

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

**Mechanistische und Kinetische
Untersuchung der
Formose-Reaktion**

Kai Kilian Kohler
aus Biberach an der Riß, Deutschland

2021

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

**Mechanistische und Kinetische
Untersuchung
der Formose-Reaktion**

Kai Kilian Kohler
aus Biberach an der Riß, Deutschland

2021

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, den 21.10.2021

Kai Kohler

Dissertation eingereicht am: 21.10.2021

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

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

Mündliche Prüfung am: 25.11.2021

Publikationen und Posterpräsentationen

Publikationen

Kai Kohler, Oliver Trapp

Selectivity in the C1-C3/C4 Network of the Base-Free Formose Reaction by Isotope Labelling Analysis
in preparation

Klaus Paschek, Kai Kohler, Ben K. P. Pearce, Kevin Lange, Thomas K. Henning, Oliver Trapp, Ralph E. Pudritz, Cornelius P. Dullemond, Dmitry A. Semenov
Meteorites and the RNA-World. III: Formation of Ribose in Carbonaceous Planetesimals
in preparation

Posterpräsentationen

Kai Kohler, Oliver Trapp

Mapping the Formose-Reaction
Molecular Origins of Life, CAS Conference, Oktober 2018, München (Deutschland)

Kai Kohler, Oliver Trapp

Mapping the Formose-Reaction
SFB 749 Symposium, März 2019, Venedig, San Servolo (Italien)

Kai Kohler, Oliver Trapp

Effect on Selectivity of Different Organocatalysts in the Formose Reaction
Science of Early Life Conference, November 2019, Seeon (Deutschland)

Severin Angerpointner, Florian Gartner, Kai Kohler, Erwin Frey, Oliver Trapp

Evolutionary optimization of experimental synthetic networks
The Molecular Origins of Life, Juli 2020, München (Deutschland)

Kai Kohler, Beatriz von der Esch, Florian Kruse, Christian Ochsenfeld, Oliver Trapp

Prebiotic Pathway to DNA Nucleosides
The Molecular Origins of Life, Juli 2020, München (Deutschland)

„Entia non sunt multiplicanda praeter sine necessitate“

–Ockhams Skalpell

(Wesenheiten dürfen nicht über das Notwendige hinaus vermehrt werden)

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die im Jahr 1861 von Alexander Butlerow entdeckte Formose-Reaktion detailliert untersucht. Sie bildet die präbiotische Synthese von Kohlenhydraten ausgehend von Formaldehyd ab. In einem dichten Netzwerk aus Aldol- und Retro-Aldol-Reaktionen sowie Umlagerungen und Abbau-Reaktionen werden eine Vielzahl an möglichen Zuckern gebildet. Zu den erhaltenen Produkten zählen unter anderem die Ribose sowie Glycerinaldehyd, die wichtige Bausteine für die präbiotische Synthese von Nucleosiden darstellen. Mittels moderner HPLC- und GC-Analytik und neu entwickelten Methodenverfahren wurde in dieser Arbeit die Selektivität, der Mechanismus und die Kinetik der Formose-Reaktion näher untersucht.

Grundlage der Analytik bildete, neben dem Stoppen der Reaktion, der Identifizierung und Qualifizierung verschiedenster Kohlenhydrate ebenso eine neu entwickelte Separierung der Enantiomere des Glycerinaldehyds. Durch den Einsatz von (S)-1-Amino-2-methoxy-methylpyrrolidin lassen sich die beiden Stereoisomere gaschromatographisch innerhalb kürzester Zeit trennen.

Zusätzlich konnte durch den Einsatz von Dihydroxyfumarsäure eine Selektivität zugunsten des Glycerinaldehyds in einer Formose-ähnlichen Reaktion erzielt werden. In der Reaktion von Dihydroxyfumarsäure und Formaldehyd konnte in einer unkatalysierten Reaktion bei 60 °C selektiv Glycerinaldehyd hergestellt werden. Damit wurde nicht nur ein wichtiger Baustein der Nucleosid-Synthese selektiv hergestellt, sondern auch die Chemie der Nucleobasen mit der Zuckerchemie verbunden.

Mittels Markierungsexperimenten und hochauflösender Massenspektrometrie konnte die Reaktion mechanistisch untersucht werden. Dieses neue Verfahren bietet die Möglichkeit einzelne Reaktionswege innerhalb des Formose-Netzwerkes zu verstehen und nachzuvollziehen. So konnte die Bildung von Glycerinaldehyd und Erythrose über entsprechende Reaktionswege nachverfolgt werden. Bei Erythrose konnte zudem die prozentuale Beteiligung des jeweiligen Reaktionspfades bestimmt werden. Abschließend wurde die salzkatalysierte Formose-Reaktion kinetisch untersucht. In einer Kooperation wurden mit Hilfe von computergestützten Berechnungen Modelle der Formose-Reaktion aufgestellt, um Geschwindigkeitskonstanten einzelner Reaktionen zu bestimmen. Aufgrund der Vielzahl an Reaktionen und voneinander abhängigen Variablen innerhalb der Differenzialgleichungen konnten die Geschwindigkeitskonstanten nur mittels einer kontinuierlichen Anpassung des Modells näher bestimmt werden.

Abstract

In the present work, the formose reaction discovered by Alexander Butlerow in 1861 was studied in detail. It represents the synthesis of carbohydrates on the early earth starting from formaldehyde. In a dense network consisting of aldol- and retro-aldol reactions, rearrangements and degradation reactions a broad mixture of sugars are formed. This involves important building blocks for the prebiotic synthesis of nucleosides like ribose and glyceraldehyde. By the use of new developed HPLC and GC analytics the selectivity, the mechanism and the kinetics of the formose reaction were investigated in detail.

The identification and quantification of different carbohydrates, as well as stopping the reaction builds the fundament of this research. In addition, a new gas chromatographic separation of the enantiomers of glyceraldehyde by the use of (S)-1-Amino-2-(methoxymethyl)pyrrolidine was developed.

A high selectivity in favour of glyceraldehyde could be realized in a formose-like reaction by the use of 2,3-dihydroxyfumaric acid. In an uncatalysed reaction of dihydroxyfumaric acid and formaldehyde at 60 °C glyceraldehyde is formed selectively. Thus, an important building block for the prebiotic synthesis of nucleosides is formed and the chemistry of nucleobases and carbohydrates is connected.

Isotopic labelling in combination with high resolution mass spectroscopy allowed a mechanistic investigation of the reaction network. This new method allows the identification and the tracking of individual reaction pathways. Thus, the formation of glyceraldehyde and erythrulose by single reaction pathways could be traced and identified. In the case of erythrulose, it was also possible to determine the relative involvement of the respective pathway.

Finally, the salt catalysed formose reaction was kinetically investigated. In a cooperation, models of the formose network were set up with the help of computer-assisted calculations in order to determine the rate constants of individual reaction. Due to the large number of reactions and interdependent variables within the differential equation, the rate constants could only be determined more closely by continuously adapting the model.

Abkürzungsverzeichnis

Äq.	Äquivalente
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
DHFS	2,3-Dihydroxyfumarsäure
DMM	Dimethoxymethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
EtOx	<i>O</i> -Ethylhydroxylamin-Hydrochlorid
FaPy	Formamidopyrimidin
FD	Filmstärke
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
gewC4	2-Hydroxymethyl-Glyceraldehyd
gewC4Alk	2-Hydroxymethyl-Glycerin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ID	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
LC	Flüssigkeitschromatographie
LoQ	Limit of Quantification
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NTMP	Nitrilotris(methylenphosphonsäure)
ppm	parts per million
SAMP/RAMP	(<i>S</i>)/(<i>R</i>)-1-Amino-2-methoxy-methylpyrrolidin
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1:	Theoretischer Hintergrund	3
1.1	The Origin of Life.....	3
1.2	Allgemeine Theorien	5
1.2.1	Das Urey-Miller-Experiment	5
1.2.2	Hydrothermale Quellen - Schwarze und Weiße Raucher	8
1.2.3	Thermalquellen.....	10
1.3	RNA-Welt-Hypothese	12
1.3.1	Emil Fischers Weg zu Purin-Nukleosiden über die Glykosidbindung	13
1.3.2	Aufbau der Nukleobasen am Grundgerüst des Kohlenhydrats	14
1.3.3	Carells kombinierter Weg zu Pyrimidin- und Purin-Nukleosiden.....	15
1.3.4	Trapp'sche DNA-Synthese: Die Selektivität des Einfachen	16
1.4	Die Formose-Reaktion.....	19
1.4.1	Allgemein.....	20
1.4.2	Reaktionsverlauf der Formose-Reaktion.....	21
1.4.3	Einflüsse auf die Formose-Reaktion	25
1.5	Die Chemie der Kohlenhydrate	27
1.5.1	Analytik von Kohlenhydraten	28
1.5.2	Derivatisierung für erhöhte Volatilität.....	29
1.5.3	Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin	30
1.6	Motivation und Zielsetzung.....	31
Kapitel 2:	Ergebnisse und Diskussion	33
2.1	Methodenentwicklung zur Analyse der Formose-Reaktion.....	35
2.1.1	Analyse des Formose-Netzwerkes	35
2.1.2	Abbruch der Formose-Reaktion.....	40
2.1.3	Zusammenfassung der Methodenentwicklung	44
2.2	Selektivität innerhalb der Formose-Reaktion	45
2.2.1	Enantioselektive Katalyse der Formose-Reaktion	45
2.2.2	Selektivität über den Einsatz verschiedener Substrate	49
2.2.3	Zusammenfassung zur Substratinduzierten Selektivität bei der Reaktion mit DHFS	56
2.3	Mechanistische Untersuchungen des Formose-Netzwerkes.....	58
2.3.1	Vorbereitungen.....	60
2.3.2	Erste Scrambling-Experimente mit Formalin und DHFS.....	64
2.3.3	Zusammenfassung	69
2.4	Kinetische Untersuchungen der Formose-Reaktion	70
2.4.1	Experimentelle Analyse des Netzwerkes	70
2.4.2	Vergleich der Reaktionen	78

2.4.3	Kinetische Modellierung der Formose-Reaktion	80
2.4.4	Zusammenfassung	98
2.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	100
Kapitel 3:	Experimenteller Teil.....	103
3.1	Allgemeine Angaben.....	105
3.1.1	Arbeitstechniken, eingesetzte Stoffe und Lösungsmittel	105
3.1.2	Analytische Methoden	105
3.1.3	Allgemeine Derivatisierung zur Analyse mittels GC.....	106
3.1.4	Allgemeine Derivatisierung zur Analyse mittels HPLC.....	107
3.1.5	Quantifizierung von Formaldehyd mittels HPLC.....	107
3.1.6	Quantifizierung von Glycolaldehyd mittels HPLC.....	108
3.2	Experimente zu 2. Methodenentwicklung zur Analytik der Formose-Reaktion	108
3.2.1	Umsetzung von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Kaliumcarbonat	108
3.2.2	Stoppen der Formose-Reaktion durch den Einsatz von Salzbildnern	108
3.2.3	Stoppen der Formose-Reaktion durch den Einsatz von Komplexbildnern	109
3.3	Experimente zu 3. Selektivität in der Formose-Reaktion.....	109
3.3.1	Trennung von D/L-Glyceraldehyd mit SAMP	109
3.3.2	Trennung der Aldotetrosen über SAMP	109
3.3.3	Allgemeine Derivatisierung mittels SAMP	110
3.3.4	Chirale Induktion durch Aminosäuren	110
3.3.5	Reaktion von 1,3,5-Trioxan mit Dihydroxyfumarsäure.....	111
3.3.6	Reaktion von Dimethoxymethan mit Dihydroxyfumarsäure.....	111
3.3.7	Reaktion von Formalin mit Dihydroxyfumarsäure.....	111
3.3.8	Reaktion von 1,3,5-Trioxan und Dihydroxyfumarsäure mit Calciumcarbonat	112
3.3.9	Reaktion von Dimethoxymethan und Dihydroxyfumarsäure mit Calciumcarbonat.....	112
3.3.10	Reaktion von Formalin und Dihydroxyfumarsäure mit Calciumcarbonat.....	112
3.4	Experimente zu 4. Mechanistische Untersuchung der Formose-Reaktion	113
3.4.1	Herstellung einer Formalin-Lösung in deuterierten Lösungsmitteln	113
3.4.2	Deuterierung von Glycolaldehyd durch Deuteriumoxid.....	113
3.4.3	Deuterierung von Glycolaldehyd über mehrfaches Lösen in Deuteriumoxid.....	113
3.4.4	Deuterierung von Glycolaldehyd in Deuteriumoxid katalysiert durch TFA.....	114
3.4.5	Deuterierung von Glycolaldehyd in Deuteriumoxid katalysiert durch DMAP.....	114
3.4.6	Beschleunigung der Deuterierung durch Temperaturerhöhung.....	114
3.4.7	Synthese von 2-((<i>tert</i> -butyldimehtylsilyl)oxy)-ethanol	115
3.4.8	Synthese des 2-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)-ethanals über eine Parikh-Doering-Oxidation	115
3.4.9	Synthese von Glycolaldehyd über eine Swern-Oxidation.....	116

3.4.10	Deuterierung der 2,3-Dihydroxyfumarsäure.....	116
3.4.11	Decarboxylierung von 2,3-Dihydroxyfumarsäure.....	116
3.4.12	Reaktion von Formaldehyd mit 2,3-Dihydroxyfumarsäure-d ₄	117
3.4.13	Reaktion von Formaldehyd und 2,3-Dihydroxyfumarsäure-d ₄ mit Kaliumcarbonat	117
3.5	Experimente zu 5. Kinetische Untersuchung der Formose-Reaktion	117
3.5.1	Reaktion von Formaldehyd mit Glycolaldehyd.....	117
3.5.2	Katalysierte Reaktion von Formaldehyd mit Glycolaldehyd	118
Kapitel 4:	Literaturverzeichnis	121
Kapitel 5:	Anhang.....	127
5.1	Quantifizierung der Kohlenhydrate	128
5.2	Reaktionszuordnung der Geschwindigkeitskonstanten zu den aufgestellten Modellen	130

Kapitel 1:

Theoretischer Hintergrund

1.1 The Origin of Life

Die Frage nach der Herkunft des Lebens auf der Erde ist wohl eine der ältesten der Menschheit. Wie ist das Universum entstanden? Und wie das Leben? An welchem Ort hat sich das Leben entwickelt? War der Ursprung des Lebens auf der Erde? Dies sind grundlegende Fragen, mit denen sich Natur- und Geisteswissenschaftler befassen. Dabei ist eine eindeutige Antwort nur schwer zu finden. Die Vielfalt an Möglichkeiten, wie das Leben auf der Erde entstanden sein könnte, erschweren eine eindeutige Aussage.^[1] Daher ist es umso wichtiger den zeitlichen Ablauf zur Entstehung der Erde (s. Abb. 1.1) und die damit verbundenen geologischen Bedingungen auf der Erde zu berücksichtigen. Anhand dieser Grundlage können anschließend Theorien und Szenarien zur Entstehung des Lebens entwickelt werden. Heutzutage geht man davon aus, dass die Erde vor ca. 4.5 Milliarden Jahren entstand und Seen aus Lava die Erdoberfläche bedeckten.^[2-4] Im Laufe der Zeit verfestigten sich die Gesteinsseen und erste Ozeane entwickelten sich durch das Ausgasen von wasserhaltigen Mineralien und durch Einschläge wasserhaltiger Asteroiden und Meteoriten.^[5-8] Erst nachdem die Erde von unzähligen Himmelskörpern getroffen wurde, dem sogenannten „*Late Heavy Bombardement*“,^[9-12] konnte sich Leben entwickeln. Diese brachten jährlich bis zu 10^5 kg an organischen Verbindungen auf die Erde. Anhand fossiler Bakterienfunde wird das älteste bekannte Lebewesen auf der Erde auf ein Alter von ca. 3 Milliarden Jahren datiert.^[13] Für Chemiker ist jedoch die Zeitspanne zwischen der Bildung erster lebenswichtiger Bausteine aus Kohlenstoff vor ca. 3.8 Milliarden Jahren und dem Fund des ältesten Mikrofossils vor 3.5 Milliarden Jahren von besonderem Interesse.^[14-15] Geochemische Daten der in dieser Zeitspanne herrschenden Bedingungen und vorhandenen Stoffe bilden das Fundament der chemischen Forschung zur Entwicklung des Lebens. Durch sie lassen sich verschiedene Theorien zur Entstehung des Lebens entwickeln und labortechnisch nachbilden. Einige dieser Theorien sollen in den nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben und untersucht werden.

Der Fokus dieser Arbeit liegt dabei auf die Untersuchung von Mechanismus und Kinetik der Formose-Reaktion. In ihr werden die für die RNA, DNA oder auch Glykolipide benötigten Kohlenhydrate gebildet.

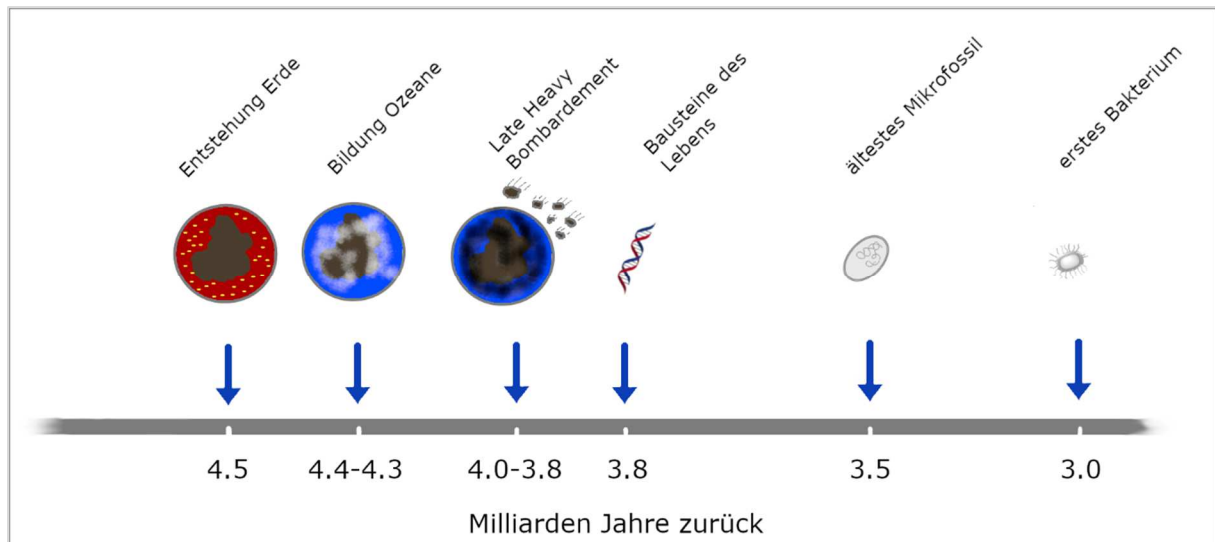


Abb. 1.1: Zeitlicher Verlauf bedeutender Ereignisse zur Entstehung des Lebens.

1.2 Allgemeine Theorien

Vor ca. 3.8 Milliarden Jahren war die Erde alles andere als ein optimaler Ort für eine Entwicklung von Leben. Stürmende Ozeane, Vulkanausbrüche und Meteoriteneinschläge sorgten für eine Umgebung, in der das heutige Leben kaum existieren könnte.^[16] Dennoch stellen diese lebensfeindlichen Bedingungen die Grundlage für viele der heutigen Theorien zur Entstehung des Lebens auf der Erde dar. In Abb. 1.2 sind einige dieser Theorien, auf die in den folgenden Abschnitten detailliert eingegangen wird, schematisch aufgezeigt. Einen großen Einfluss haben dabei die Atmosphäre, der mit zahlreichen Mineralien angereicherte Ozean, die Geologie und die zahlreichen Einschläge der Meteoriten und Asteroiden auf die Erde.^[1, 17-20] Aber auch meteorologische Konzepte, wie Tag-Nacht- und Nass-Trocken-Zyklen könnten großen Einfluss auf die Entwicklung des Lebens gehabt haben.^[21-22]

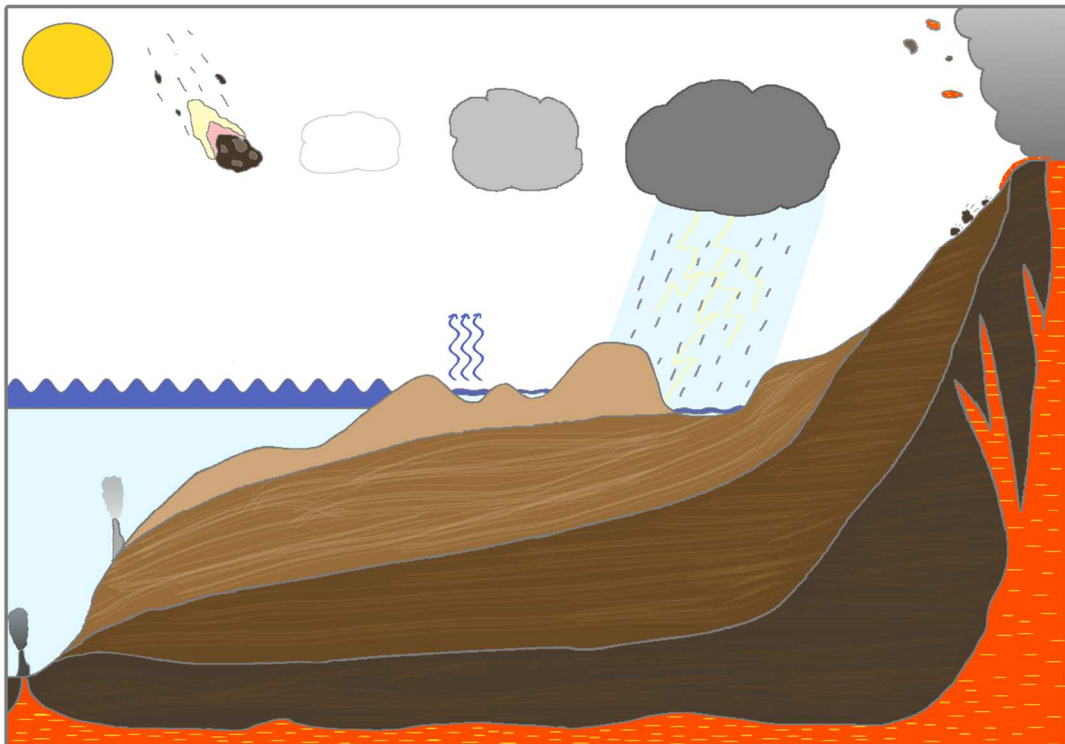


Abb. 1.2: Skizze zur Entstehung des Lebens durch verschiedene Szenarien, wie Hydrothermale Quellen, Nass-Trocken-Zyklen oder Blitzentladungen auf der Erde.

1.2.1 Das Urey-Miller-Experiment

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Erdatmosphäre zum Zeitpunkt der Entstehung wichtiger Bausteine des Lebens eine reduzierende Eigenschaft hatte. Dies wurde damit begründet, dass keine der für das Leben essentiellen Substanzklassen unter oxidativen Bedingungen stabil ist.^[23] Gestützt wurde dies durch das damals verwendete Modell zur Entstehung neuer Planeten und ihrer Atmosphäre.

Dementsprechend wurde die Erdatmosphäre von der Atmosphäre des Jupiters abgeleitet, der aufgrund seiner hohen Masse und seines großen Abstands zur Sonne jedoch im Gegensatz zur Erde leichte, reduzierende Gase in seiner Atmosphäre halten und diese komprimieren konnte. Erst mit der Zeit, so die Theorie, hätte die Erde ihre damals bestehende reduzierende Atmosphäre verloren.^[23-24] Dies veranlasste Stanley Miller und Harold Urey 1953 dazu, die postulierten Bedingungen der früheren Erde labortechnisch nachzubilden. Wasser, welches in Rundkolben erhitzt wurde, sollte dabei den „Urozean“ simulieren. Die Gase Wasserstoff, Methan und Ammoniak wurden als Erdatmosphäre in die in Abb. 1.3 skizzierte Apparatur eingesetzt. Funkenentladungen wurden als Energiequelle mittels zwei Wolframelektroden erzeugt. Blitze sollten den Vorteil haben, dass sie ihre Energie nahe der simulierten Erdoberfläche abgeben und dabei entstandene Produkte schnell in die Ozeane eindringen konnten. Somit stellen sie eine gute Alternative zu den von der Sonne emittierten UV-Strahlen dar. Diese würden nur beschränkt durch die komprimierte Erdatmosphäre dringen und daher nur in der oberen Atmosphäre Photoreaktionen induzieren.^[25-26]

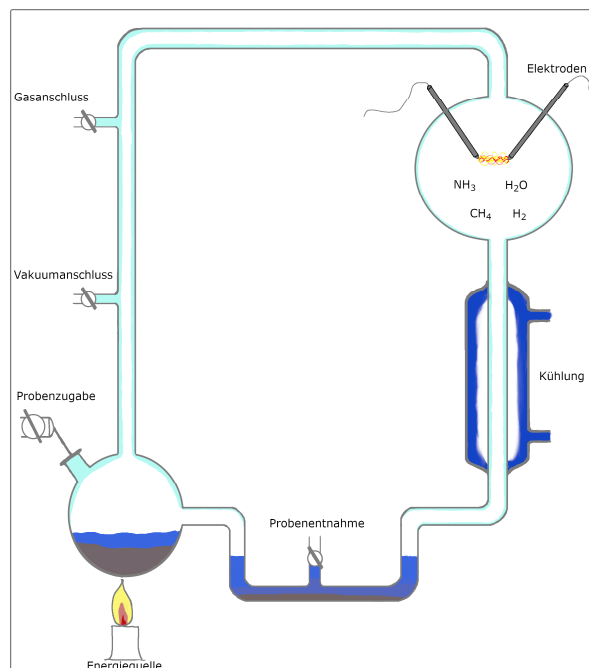


Abb. 1.3: Skizzierter Versuchsaufbau des Experiments von Urey und Miller.

Nach einer Woche Reaktionszeit konnten Urey und Miller an den Glaswänden des Entladungskolbens eine ölige Substanz feststellen. Ebenfalls hatte sich die Farbe des Wassers im Laufe der Zeit braun-gelblich verfärbt.^[27] Eine Analyse der Lösungen zeigte, dass sich während des Experimentes zahlreiche organische Verbindungen gebildet hatten, die wichtige Grundbausteine für die Entstehung des Lebens darstellen.^[28] Unter anderem konnten die Wissenschaftler die Aminosäuren Glycin, Alanin,

Asparaginsäure sowie Glutaminsäure nachweisen.^[25] Selbst nach dem Tod von Miller im Jahr 2007 konnten insgesamt über 20 Aminosäuren aus den Originalproben identifiziert werden.^[29] Zusätzlich konnten durch kleinere Variationen des Experimentes die Nukleinbasen Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil erzeugt werden.^[30]

Die Problematik des Urey-Miller-Experiments zeigte sich jedoch in seiner Grundannahme. Geologische Untersuchungen konnten einen enormen Kohlenstoffdioxidvorrat nachweisen, der in Form von Carbonaten in Mineralien gespeichert ist. Daraus wurde geschlossen, dass die Erdatmosphäre vor 3.8 Milliarden Jahren zu einem Großteil aus Kohlenstoffmonoxid bzw. Kohlenstoffdioxid bestanden haben muss und daher redoxneutrale bzw. schwach oxidierende Eigenschaften hatte.^[12, 31-32] Auch der hohe Anteil an Wasserstoff in der Atmosphäre wird kritisiert. Dieser Anteil ist in starker Abhängigkeit vom Gleichgewicht zwischen dem Ausgasen der Erde und der Ausschüttung an Wasserstoff bei Vulkanausbrüchen.^[17-18, 33] Zusätzlich wird eine hohe Konzentration an Ammoniak und Methan in der Atmosphäre bezweifelt. So argumentiert Abelson, dass Ammoniak ebenso wie Methan nicht UV-stabil sei und mit der Zeit durch die UV-Strahlung der Sonne abgebaut wurde.^[33-35]

Experimente mit einer redoxneutralen Atmosphäre aus Kohlenstoffdioxid, Stickstoff und Wasserdampf zeigten eine deutliche Verminderung der Ausbeuten an Aminosäuren.^[36] Grund dafür ist die reduzierte Bildung an Cyanwasserstoff, welches als essentieller Bestandteil bei der Synthese von Aminosäuren in der Strecker-Reaktion agiert.^[37] Durch Zugabe von Antioxidantien, wie zum Beispiel Eisen(II)-Verbindungen, konnte jedoch die Ausbeute an Aminosäuren in einer redoxneutralen Atmosphäre gesteigert werden. Antioxidantien verhindern eine Oxidation der organischen Verbindungen während einer wässrigen Aufarbeitung durch das im Experiment entstandene Nitrit und Nitrat.^[38]

Aus diesem Grund wurden Alternativen gesucht, die eine reduzierende Umgebung lokal oder zeitlich begrenzt bereitstellen können. Lokal auftretende Ereignisse wie Vulkanausbrüche oder eisenhaltige Asteroideneinschläge, die vorübergehend eine reduzierende Atmosphäre erzeugen, könnten in Verbindung mit den durch Urey und Miller durchgeführten Experimenten zu einer Bildung von Aminosäuren führen.^[39-41] Eine weitere Alternative bilden hydrothermale Quellen. Sie können ebenso eine reduzierende Atmosphäre bereitstellen und dabei auf eine elektrische Entladung als Energiequelle verzichten.

1.2.2 Hydrothermale Quellen - Schwarze und Weiße Raucher

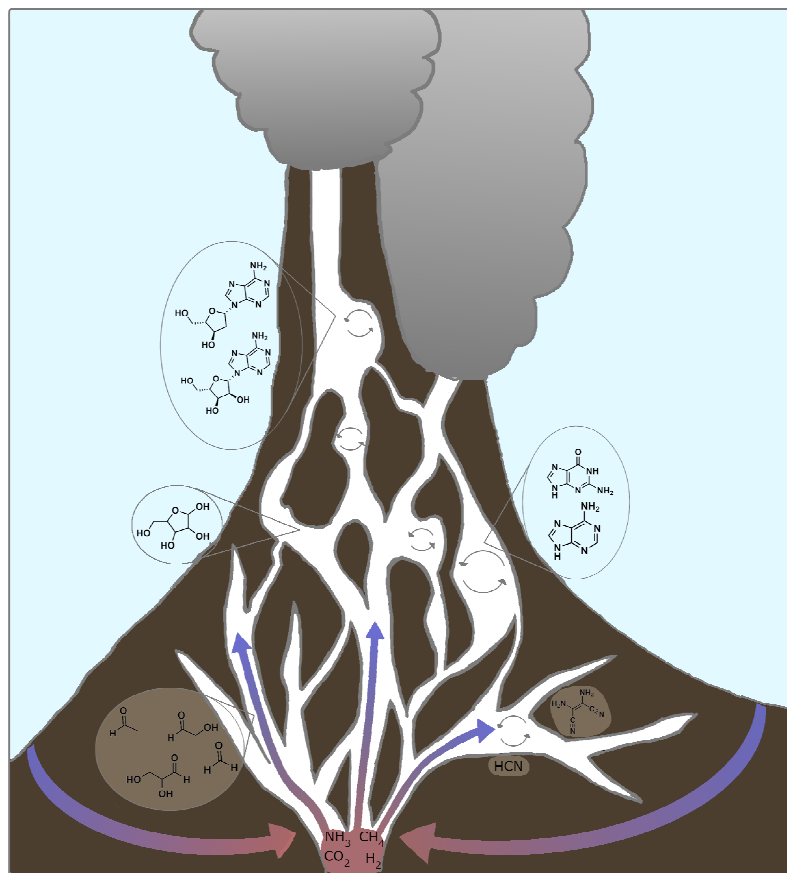


Abb. 1.4: Schematische Darstellung einer Hydrothermalen Quelle und die darin verlaufende Evolution kleinerer Moleküle hin zu komplexen, für das Leben benötigten Substanzen.

Das Urey-Miller-Experiment zeigte, dass sich in einer reduzierenden Atmosphäre Verbindungen bilden können, die für den Aufbau des Lebens benötigt werden.^[28] Eine dafür benötigte reduzierende Atmosphäre findet sich in hydrothermalen Quellen, die nahe an Ozeanbodenspreizungen in Tiefen von bis zu 3 km vorkommen und damit vor Einschlägen von Asteroiden und Meteoriden geschützt sind.^[42-43] Die dort vorherrschenden Reaktionsbedingungen, wie Temperatur und pH-Wert, können jedoch innerhalb einer einzelnen Quelle deutlich variieren. Während die Temperaturen an den äußeren Stellen einer Quelle im Bereich des umliegenden Wassers liegen, werden an Stellen an denen Magma austritt Temperaturen von bis zu 1000 °C erreicht.^[44-47] Diese Temperaturunterschiede können dazu führen, dass temperaturlabile Produkte bzw. reaktive Zwischenprodukte in kältere Areale diffundieren und sich dort anreichern.^[23] Neben austretenden reduzierenden Gasen wie Methan, Wasserstoff und Ammoniak sind auch eine Vielzahl an Mineralien und Phosphaten zu finden. Diese können nicht nur wichtige Reaktionen zur Entstehung des Lebens katalysieren, sondern sind auch bei der Bildung wichtiger

Substrate beteiligt.^[48-49] Eisen(II)-Mineralien, wie Olivin oder Pyrrhotin, können zum Beispiel mit Wasser in einer Serpentinisierung – einer Hydratation mit anschließender Reduktion – Wasserstoff bilden.^[47, 50] Ebenso konnte reduzierend wirkender Schwefelwasserstoff in Bereichen der hydrothermalen Quellen detektiert werden.^[48, 51-52]

Das interessanteste Redoxpaar bilden jedoch Kohlenstoffdioxid und Methan. Kohlenstoffdioxid lässt sich bei Kontakt mit Pyrit, Pyrrhotin oder Magnetit in Wasser in einer Gleichgewichtsreaktion zu Methan reduzieren.^[47, 53] Diffundieren dabei metastabile Intermediate in anders temperierte Bereiche der Quelle, können Verbindungen wie Carbonsäuren, Formaldehyd oder bei Anwesenheit von Stickstoffverbindungen auch Aminosäuren gebildet werden.^[47] Einen Kritikpunkt an den hydrothermalen Quellen als Ort für die Entstehung des Lebens stellen jedoch Kondensationsreaktionen dar. Diese, für Polymerisierung von Aminosäuren oder Nukleotiden essentielle Reaktion, verläuft in Wasser nur vermindert ab.^[54] Allerdings konnte gezeigt werden, dass sich durch die Kombination der mikroporösen Struktur innerhalb der Quelle und einem Temperaturgradienten Substrate mit hoher Konzentration erhalten lassen, wodurch Kondensationsreaktionen ermöglicht werden.^[55-57]

Die wichtigsten Vertreter der hydrothermalen Quellen sind die schwarzen und weißen Raucher, auf deren Unterschiede in den nächsten Abschnitten näher eingegangen werden soll. Der allgemeine Aufbau dieser Raucher ist in Abb. 1.4 skizziert.

Schwarze Raucher

Schwarze Raucher entstehen direkt an der Spreizungsachse von Ozeanbodenspreizungen. Hier befinden sich 800-1200 °C heiße Magmakammern, an denen Lava teilweise direkt zum Meeresgrund befördert wird.^[42] Kaltes, absinkendes Meerwasser kommt dabei in engen Kontakt zu diesen Magmakammern und wird dabei auf bis zu ca. 400 °C erhitzt. Anschließend wird das aufgeheizte und mineralreiche Wasser durch die Quelle zurück ins Meer geleitet.^[46, 58-60] Durch das umliegende Meerwasser kühlt das ausströmende heiße Wasser rapide ab, sodass das gelöste Eisensulfid als dunkle, schwarze Wolke ausfällt, die der Quelle ihren Namen gibt.^[59] Schwarze Raucher sind reich an Mineralien und gelösten Übergangsmetallen, wie Eisen(II) und Mangan(II) sowie an Sulfiden, Kohlenstoffdioxid, Methan und Wasserstoff und besitzen einen aziden pH-Wert.^[60-61] Großer Kritikpunkt der schwarzen Raucher für die Bildung lebenswichtiger Moleküle sind die in ihnen vorherrschenden Temperaturen.^[20] Unter diesen Bedingungen racemisieren einzelne Aminosäuren wie zum Beispiel Asparagin, Alanin und Leucin. Ebenso denaturieren Nukleinsäuren bei hohen Temperaturen. Die DNA würde dabei eine Depurinierung eingehen, bei der eine Hydrolyse der Purinbase vom Zucker-Phosphat-Grundgerüst stattfindet. Im Vergleich dazu würde die RNA, die aufgrund der 2'-Hydroxygruppe eine höhere

Instabilität als die DNA aufweist, vollständig hydrolysieren. Die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen wie Magnesium und Calcium beschleunigt diesen Prozess zusätzlich.^[62-64]

Weißer Raucher

Im Vergleich zu den schwarzen Rauchern lokalisieren sich weiße Raucher mehrere Kilometer von Ozeanbodenspreizungen entfernt in einer Tiefe von 750-900 m.^[42, 65-66] Durch die Distanz zu den Magmakammern erhalten die weißen Raucher ihre Energie allein durch die Serpentinisierung.^[18, 66-67] In der Reaktion werden dabei neben Wasserstoff und Serpentin auch kleinere Kohlenhydrate gebildet.^[60, 65, 68-69] Zusätzlich werden durch die exotherme Reaktion nur milde Temperaturen von bis zu 90 °C erreicht. Für die Herstellung von Bausteinen, die das Leben benötigt, bieten die weißen Raucher deshalb deutlich geeignetere Temperaturen als die schwarzen Raucher. Zusätzlich hat die Serpentinisierung einen besonderen Einfluss auf den pH-Wert der Quelle. Dieser liegt mit einem Wert von 9-11 im Basischen.^[46, 66, 69] Die namensgebende weiße Rauchsäule wird durch das Ausfällen von verschiedenen Carbonaten und Hydroxiden gebildet.^[18, 54]

1.2.3 Thermalquellen

Ein großer Nachteil der hydrothermalen Quellen als Ort für die Entstehung des Lebens beschreibt die niedrige Konzentration an Substraten und die damit verbundene Problematik der Kondensationsreaktionen in wässriger Lösung.^[70] Eine zu große Verdünnung führt zu einer im Wasser nur vermindert ablaufenden Polymerisation von Aminosäuren oder Nukleotiden.^[54] Mineralreiche Thermalquellen oder auch Darwins „*warm little ponds*“ stellen eine Alternative zu den hydrothermalen Quellen dar.^[71] In Verbindung mit Nass-Trocken-Zyklen bilden sie eine Lösung der Kondensations-Problematik. Durch Austrocknung kleinerer Gewässer oder auch durch Adsorption an Ton könnten hier Substrate konzentriert und Polymerisationsreaktionen begünstigt werden.^[54, 60] Zusätzlich fördert die hohe Salzkonzentration der Quellen und das damit verbundene chemische Potential das Abfließen von Kondensationsreaktionen.^[54, 72] Zeitlich könnten sich Nass-Trocken-Zyklen deutlich unterscheiden. Während in Bereichen von Geysiren das Wasser innerhalb von Sekunden an heißen Steinen verdampfen kann, kann die Dauer eines Nass-Trocken-Zyklus bei vollständiger Verdunstung und Auffüllung auch mehrere Tage betragen.^[70] Eine wichtige Rolle für den pH-Wert dieser Becken ist die Konzentration an Calciumkationen. Geringe Konzentrationen an Calcium- und Magnesium-Ionen führt zu einer deutlichen Erhöhung des pH-Werts auf bis zu 11.5.^[73-74]

Auch wird die Bildung von Nukleosiden in Thermalquellen diskutiert. Werden höhere Mengen an Ammoniak in geothermalen Feldern ausgestoßen und sind zusätzlich Carbonsäuren vorhanden, können dadurch Ammoniumsalze gebildet werden. Durch Dehydratation der Ammoniumsalze können diese wiederum in Amide überführt werden.^[75] Im Fall von Ammoniumformiat wird Formamid gebildet, das als ein wichtiger Baustein in abiotischen Synthesen von Nukleotiden und Aminosäuren fungiert.^[76-77] Ein weiterer Vorteil im Vergleich zu den hydrothermalen Quellen besteht darin, dass auch UV-Strahlung als Energiequelle zur Verfügung steht und somit photochemische Reaktionen ermöglicht werden.^[76] Ebenso kann die UV-Strahlung zu einer Selektion bei der Bildung von Nukleotiden führen, da nur UV-beständige Nukleotide gebildet und angereichert werden.^[78-80] Insgesamt bieten sie die Möglichkeit der Bildung von Aminosäuren und Nukleotiden. Zusätzlich begünstigen sie Kondensationsreaktionen und stellen damit einen optimalen Ort für die Bildung von Peptiden und Nukleotiden dar.

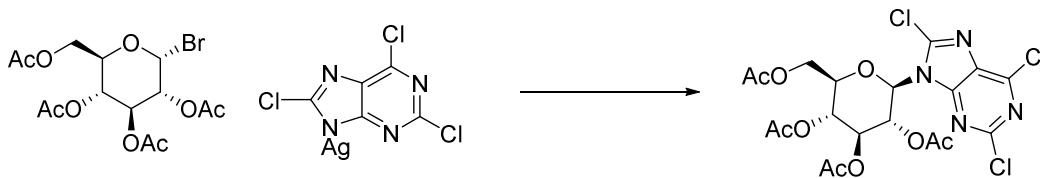
1.3 RNA-Welt-Hypothese

Welches der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Szenarien zur Entstehung des Lebens geführt hat, lässt sich vermutlich niemals mit absoluter Sicherheit klären. Jede Theorie bietet Möglichkeiten zur Herstellung von essenziellen Bausteinen des Lebens, die für die Synthese von Polymeren wie zum Beispiel Proteinen, RNA und DNA genutzt werden können.

Jedes dieser drei Biopolymere besitzt in unserem Körper lebenswichtige Aufgaben. Während die DNA die Information des gesamten Lebewesens speichert, bildet die RNA die Blaupausen und Maschinerie für die Herstellung von Proteinen. Diese wiederum dienen als Katalysator verschiedenster Reaktionen im Körper. RNA-Polymerasen zum Beispiel nehmen eine essenzielle Rolle bei der Transkription der DNA zur RNA ein.^[81-83] Mit der Entstehung des Lebens lässt es sich jedoch nur schwer vereinigen, dass strukturierte Proteine für die Herstellung der RNA benötigt werden, wenn die RNA wiederum essenziell für die Herstellung von Proteinen ist. Orgel verglich diese Problematik mit dem Henne-Ei-Problem.^[84] In die in der Literatur viel beschriebene Diskussion brachten die Forschungen von den Nobelpreisträgern Sidney Altman und Thomas R. Cech neue Erkenntnisse.^[85-86] Unabhängig voneinander entdeckten sie die katalytische Wirkung der RNA.^[59, 87-89] Darauf aufbauende Untersuchungen zeigten, dass RNA auch in Reaktionen wie Umlagerungen, Phosphat-Transfer oder Hydrolyse-Reaktionen eine katalytische Wirkung zeigen kann.^[90-94] Basierend auf den Ergebnissen von Altman und Cech postulierte 1986 Walter Gilbert die weitverbreitete RNA-Welt-Hypothese.^[95] RNA könnte anfänglich sowohl als Informationsspeicher als auch als Katalysator zur Replikation gedient haben. Erst im Laufe der Zeit hätten sich Katalysatoren mit höherer Aktivität, die Proteine, und Informationsspeicher mit höherer Stabilität, die DNA, entwickelt.^[37, 84, 96] Unterstützt wurde die Hypothese durch die bis dato erhaltenen Forschungsergebnisse zur Nukleosid-Synthese. Fundament dieser Nukleosid-Synthesen bildet, neben der Herstellung der Nukleobasen,^[97-100] die im Jahre 1861 von Alexander Butlerow entdeckte Formose-Reaktion.^[101] Sie ist die bis heute einzige präbiotische Reaktion zur Herstellung der in den Nukleosid-Synthesen benötigten Zucker.^[90] In dieser zeigt sich zusätzlich zu der geringen Ausbeute an Ribose von ca. 1 %, dem sogenannten „Ribose-Problem“, eine noch geringere Verfügbarkeit der Desoxyribose.^[78, 102-106] Dies deutete somit ebenfalls auf eine Priorisierung der RNA über die DNA im zeitlichen Verlauf der Entstehung des Lebens hin.^[107]

1.3.1 Emil Fischers Weg zu Purin-Nukleosiden über die Glykosidbindung

Das Fundament der Nukleosid-Syntheserouten legte Emil Fischer bereits im Jahr 1914.^[102, 108] Seine erfolgreiche Herstellung von Purin-Nukleosiden nahmen viele Forscher als Inspiration für ihren eigenen Syntheseweg. Die retrosynthetische Analyse der glycosidischen Bindung führt dabei zur Teilung des Nukleosids in Nukleobase und Zuckerfragment. Fischer nutzte dabei die Reaktion von Acetylgeschützten Bromzuckern mit Silbersalzen der Purin-Nukleobasen in wasserfreien Lösungsmitteln.^[102, 108] Zur Veranschaulichung ist in Schema 1.1 die Reaktion von Aceto-Bromglucose mit Trichlorpurin-silber in Xylol gezeigt. Die Herstellung der kanonischen Nukleoside sowie der Pyrimidin-Nukleoside konnte auf diesem Weg jedoch nicht realisiert werden.^[109]

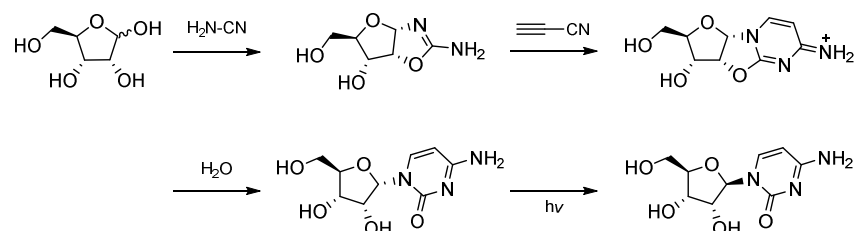


Schema 1.1: Emil Fischers erfolgreiche Synthese der glycosidischen Bindung zwischen Aceto-Bromglucose und Trichlorpurin-silber.^[102]

Als erstes kanonisches Nukleosid konnte 1963 Adenosin mittels UV-Strahlung erhalten werden. Adenin und Ribose reagierten dabei bei Zugabe von Phosphorsäure und Polyphosphatestern mit einer Ausbeute von 0.01 %.^[103] Fuller *et al.* konnten diese Ausbeute sogar durch Austrocknen der Reaktion steigern und einen wie in Abschnitt 1.2.3 beschriebenen Nass-Trocken-Zyklus nutzen. Dazu wurden verschiedene Nukleobasen mit D-Ribose bei neutralem pH-Wert gelöst und Magnesiumchlorid sowie Natriumtriphosphat als Additive zugegeben. Bei der Reaktion mit Adenin konnte nach zwei Stunden Reaktionszeit und einer Temperatur von 100 °C durch anschließende Hydrolyse der mehrfach ribosylierten Nebenprodukte Adenosin mit einer Ausbeute von 7.2 % erhalten werden. Alternative Additive wie Calciumhydroxid oder Calciumcarbonat verminderten jedoch die Ausbeute auf weniger als 0.1 %. Die große Schwierigkeit der von Fischer entwickelten Syntheseroute liegt an der Bildung der Glycosidbindung und ihrem Energiegehalt. Aufgrund der hohen Energiebarriere werden auch höhere Temperaturen benötigt, die wiederum eine Depurinierung begünstigen.^[104-105]

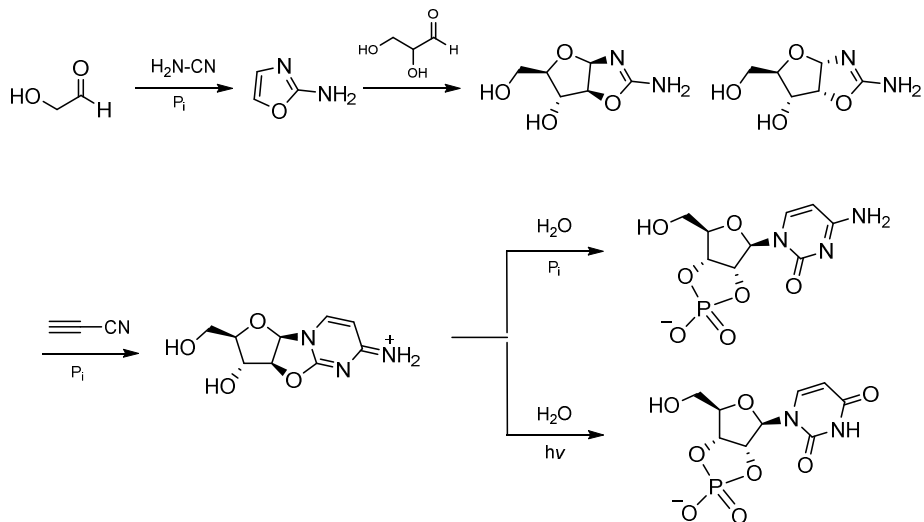
1.3.2 Aufbau der Nukleobasen am Grundgerüst des Kohlenhydrats

Um diese Problematik der Knüpfung der C-N-Bindung zu umgehen entwickelten Orgel *et al.* eine alternative Syntheseroute: Hierbei wird die Glycosidbindung bereits zu Beginn der Synthese gebildet (s. Schema 1.2). Um das Ribo-aminooxazolin zu bilden, welches die spätere Glycosidbindung bereits beinhaltet, wird D-Ribose mit Cyanamid umgesetzt. Erst danach wird die Nukleobase mit Cyanoacetylen und anschließender Hydrolysierung am Ribo-aminooxazolin aufgebaut. Cytidin konnte über diese Route mit einer Ausbeute von 10-20 % in der α -Konfiguration erhalten werden. Die benötigte β -Konfiguration des Nucleosids wurde mittels photochemischer Isomerisierung erhalten, führte jedoch zu einem weiteren Ausbeuteverlust.^[110-111]



Schema 1.2: Syntheseroute von Orgel *et al.* zu den Pyrimidinnucleosiden über die Bildung von Ribo-aminooxazolin aus Ribose.^[110]

Dieser Syntheseweg wurde 2009 durch Sutherland *et al.* weiter optimiert.^[78, 112] Das Ribose-Problem konnte durch den Einsatz mehrerer kleinerer Zucker der Formose-Reaktion umgangen werden. Dafür wird zuerst Glycolaldehyd mit Cyanamid zu Oxazol-2-Amin umgesetzt. Dieses reagiert anschließend mit Glyceraldehyd zu den Aminooxazolin-Isomeren. Begünstigt wird die Route durch Zugabe von Phosphat, welches als Säure-Base-Katalysator, als Nucleophilie-Katalysator sowie als pH-Puffersystem wirkt. Zusätzlich lässt sich damit das unter anderem erhaltene Ribo-aminooxazolin in das für die β -Konfiguration benötigte Arabino-aminooxazolin überführen. Das als Puffersystem zugesetzte Phosphat verhindert im darauffolgenden Schritt eine Hydrolyse des erhaltenen Anhydronucleosids. Mittels UV-Strahlen kann durch Erhitzen im Trockenen oder in Formamid neben dem 2',3'-cyclo-Cytidinmonophosphat das 2',3'-cyclo-Uracilmonophosphat erhalten werden.^[111-112] Zusätzlich gelang es Sutherland *et al.* auf einem leicht modifiziertem Weg über das Tetramer der Cyanwasserstoffsäure als zusätzlichen Vorläufer die 2',3'-cyclo-Purinnucleotide herzustellen.^[113]



Schema 1.3: Bildung der Pyrimidin-Nucleoside durch Sutherland *et al.* durch den Einsatz der kleineren Kohlenhydrate Glycolaldehyd und Glyceraldehyd.^[78]

1.3.3 Carells kombinierter Weg zu Pyrimidin- und Purin-Nucleosiden

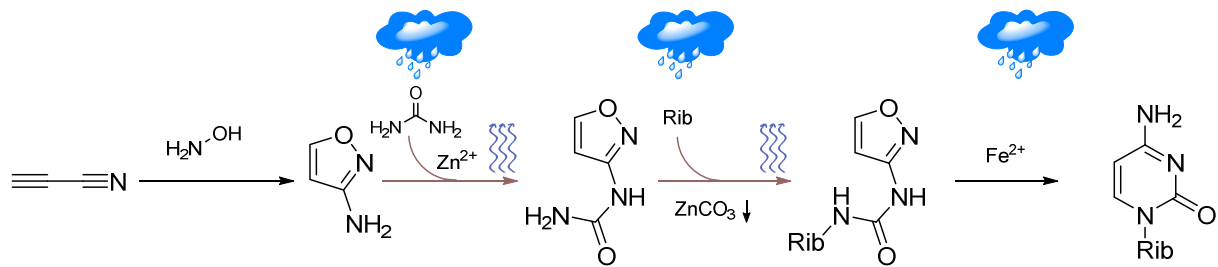
Eine weitere Theorie zur Pyrimidin- und Purin-Synthese stellten 2019 Carell *et al.* vor. Durch den Austausch von Verbindungen interagieren die Routen miteinander und ermöglichen so die Synthese der Nucleoside. Fundament dieser Route bilden mehrere der in Abschnitt 1.2.3 diskutierten Nass-Trocken-Zyklen.

Zu Beginn der Synthese der Pyrimidin-Nucleoside wird Cyanoacetylen mit Derivaten des Hydroxylamins im basischen zu 3-Aminoisooxazol umgesetzt.

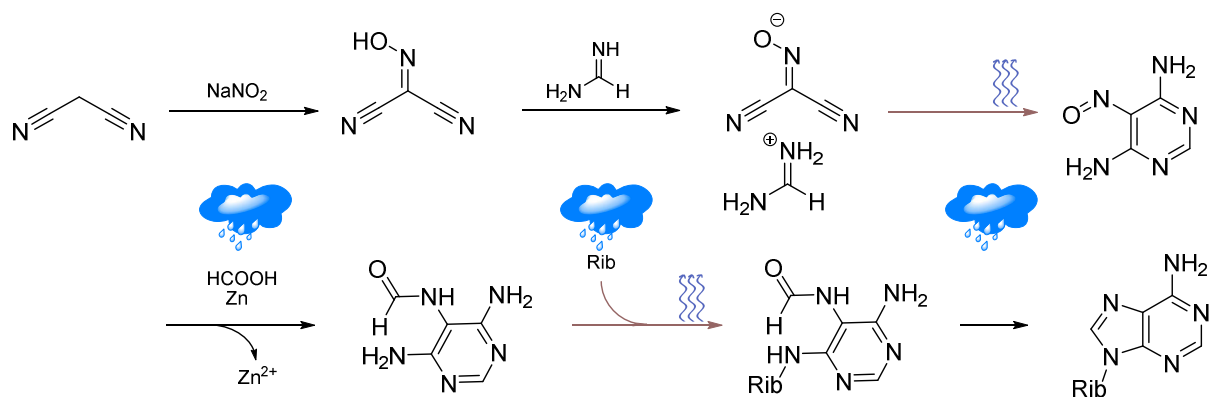
Die Ausgangsverbindung für die entsprechenden Purin-Nucleoside bildet Malonsäuredinitril, welches ebenfalls aus Cyanoacetylen erhalten werden kann. Mit Natriumnitrit versetzt, reagiert es zu (Hydroxyimino)malonodinitril, das mit Imidinen ein organisches Guanidinium-Salz ausbildet. Wird das Salz anschließend erhitzt, entstehen wasserunlösliche Nitrosopyrimidine und fallen aus. Das aus der Pyrimidin-Synthese entstandene 3-Aminoisooxazol kann dadurch weitergetragen und abgetrennt werden. Über eine Reduktion und Formylierung der Nitrosopyrimidine durch verdünnte Ameisensäure und Zink wird wasserlösliches Formamidopyrimidin (FaPy) als Vorläufer der Purin-Nucleoside erhalten.

Die dabei entstandenen Zinksalze katalysieren wiederum im Trocken-Teil des Nass-Trocken-Zyklus die Umsetzung von 3-Aminoisooxazol mit Harnstoff in der Pyrimidin-Synthese. Wird der Rückstand anschließend mit carbonathaltigem Wasser aufgenommen fällt das gelöste Zink als Carbonat aus und kann somit abgetrennt werden.

Während einer weiteren Austrocknung der Lösung in Gegenwart von Ribose bilden sich die entsprechenden Purin-Nukleoside sowie die α - β -Pyranoside der Pyrimidinvorläufer aus. Sind Borate vorhanden, können diese bei weiterer Erhitzung in die Furanform überführt werden. Über eine abschließende Ringöffnung mittels Eisen(II) und Thiolen können die α - und β -Pyrimidin-Nukleoside erhalten werden.^[111, 114-116]



Schema 1.4: Bildung der Pyrimidin-Nukleoside über 3-Aminoisooxazol durch Carell *et al.*^[114]

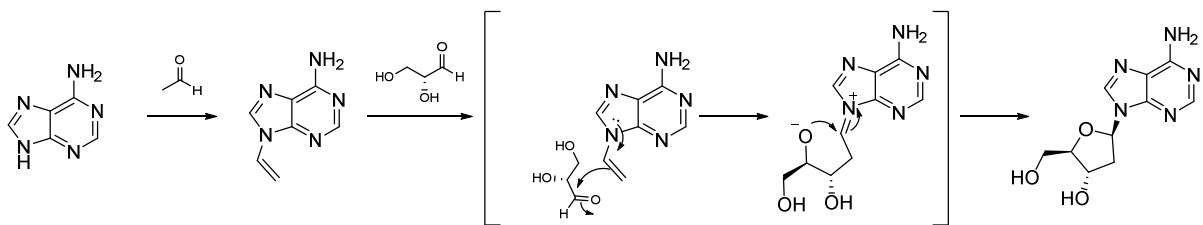


Schema 1.5: Syntheseroute der Purin-Nukleoside über FaPy-Produkte und mehrere Nass-Trocken-Zyklen durch Carell *et al.*^[114]

1.3.4 Trapp'sche DNA-Synthese: Die Selektivität des Einfachen

Lange Zeit ging man davon aus, dass sich die DNA erst im Laufe der Zeit aus der RNA entwickelt hat. Zu gering waren die Ausbeuten der untersuchten Desoxynukleoside im Vergleich zu den ribosehaltigen Nukleosiden. Auch in der Formose-Reaktion zeigte sich eine deutliche verminderte Verfügbarkeit der Desoxy-Variante.^[105-106] Erst neuere Untersuchungen mit innovativen Syntheserouten zeigten, dass möglicherweise in der Geschichte des Lebens die DNA schon viel früher verfügbar war als bisher angenommen. Somit könnte die DNA in der gleichen Zeit wie die RNA entstanden sein.

Einen direkten Weg zu den Desoxynucleosiden in einer gemeinsamen Reaktion zeigten Trapp *et al.* durch Kondensation der Nucleobasen mit Acetaldehyd und D-Glyceraldehyd.^[117] Wie auch bei den Synthesen über die Aminooxazolidine wird die Glykosidbindung bereits im ersten Reaktionsschritt gebildet. Mittels einer Kondensationsreaktion der Nucleobasen mit Acetaldehyd wird an der N9-Position der Purine bzw. N1-Position der Pyrimidine eine Vinylspezies ausgebildet. Über einen kinetisch begünstigten *5-exo-trig* Ringschluss mit D-Glyceraldehyd wird bereits abschließend stereoselektiv die β -Konfiguration der Desoxynucleoside aufgebaut.^[118] Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Syntheserouten können auf diese Weise alle vier kanonischen Desoxyribonucleoside in einer *One-Pot*-Reaktion bei einer Temperatur von 50 °C in Wasser gebildet werden. Zusätze, Nass-Trocken-Zyklen, Aufreinigungen oder Änderung des pH-Werts werden dabei nicht benötigt.



Schema 1.6: Bildung der Desoxyribonucleoside über einen stereoselektiven *5-exo-trig* Ringschluss durch Trapp *et al.*^[117]

Wird bei der Reaktion an Stelle des D-Glyceraldehyds Formaldehyd eingesetzt, bildet sich eine Vielzahl an Nucleosiden mit unterschiedlichem Zuckerfragment. Interessanterweise kristallisiert sich dabei die Antwort auf die Frage heraus, warum gerade die Ribose das Rückgrat der Nucleoside bildet, ist Ribose doch der instabilste C5-Zucker.^[107] Viele der Zuckerfragmente der entstandenen Nucleoside sind Produkte einer Cannizzaro-Reaktion und besitzen daher nicht mehr die Möglichkeit eines Ringschlusses. Dies führt unweigerlich zu einer Vielzahl an Stereoisomeren, die eine definierte Struktur und damit eine potenzielle Reproduktion verhindern. Weitere Produkte wiederum besitzen nicht die Fähigkeit zu polymerisieren. So auch die Desoxy-Variante der als möglicher RNA-Vorfahren von Eschenmoser beschriebenen Threonucleosiden.^[119] Schlussendlich bleiben nur noch zwei Zuckerfragmente übrig, die eine geringe Anzahl an Stereoisomeren bieten und somit eine definierte Struktur zur Reproduktion zulassen. Die der Desoxyribose und die Desoxy-Variante der Apiose. Die Desoxyribonucleoside weisen dabei nur zwei Stereoisomere auf, die D- und L-Form des Zuckers. Im Vergleich dazu besitzen die Nucleoside der Desoxyapiose zwei weitere, die R- und S- Form der C3'-Position. Während die Ribose dadurch zu einem wichtigen Baustein des Lebens wurde, findet sich die Apiose nur noch in Pflanzen wieder und könnte somit ein Überrest ihrer früheren Bedeutung darstellen.

Verwendung findet sie dort als Glykosylierungsstoff von verschiedenen Sekundärmetaboliten und in der pflanzlichen Zellwand.^[111, 120]

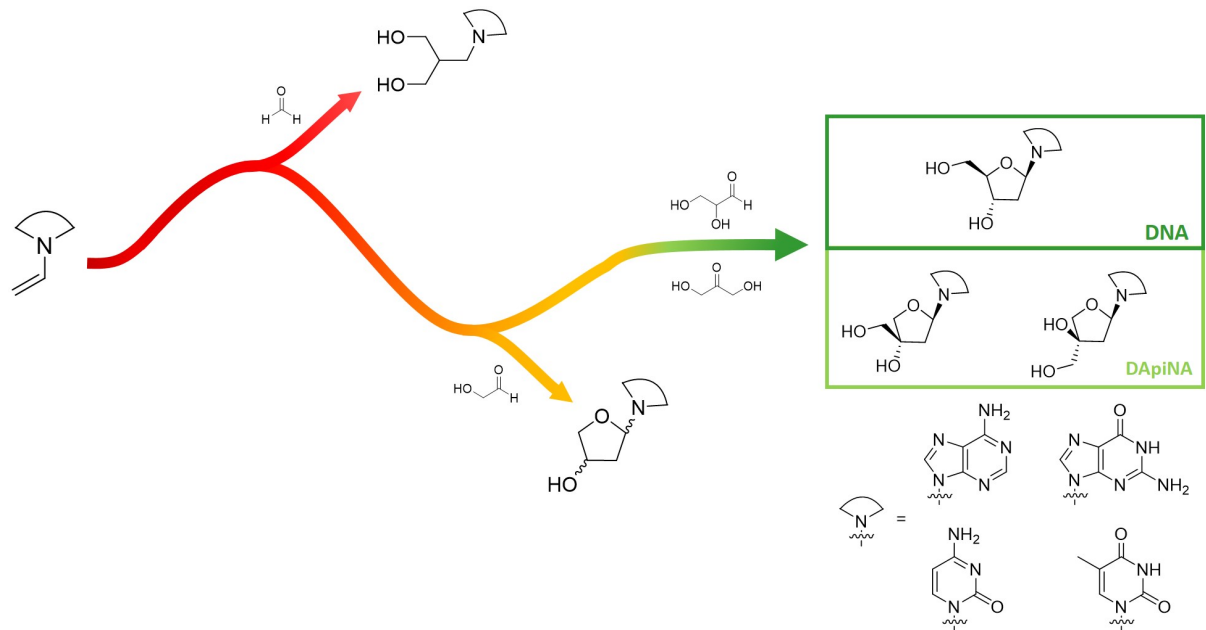


Abb. 1.5: Reaktion der Vinylspezies mit kleinen Zuckern. Dabei entstehen unter anderem Nebenprodukte, die zum einen keine stabile Struktur ausbilden können oder zum anderen keine Fähigkeit der Polymerisation besitzen. Durch die Addition von C3-Zuckern werden jedoch die entsprechenden Nucleoside der DNA bzw. DApiNa gebildet.^[117]

Jede der hier vorgestellten Synthesen zeigt eine Möglichkeit auf, über unterschiedliche Wege zu den Monomeren der RNA bzw. der DNA zu gelangen. Sei es über das Zusammenspiel von Nass-Trocken-Zyklen, zeitliche Zugabe verschiedener Komponenten oder durch eine *One-Pot*-Synthese. Ob über eine direkte Kupplung der Nucleobase mit dem Glykosid oder einen langsamen Aufbau der Nucleobase – eines haben alle Routen gemeinsam: Es wird ein Zucker benötigt. Orgel bzw. Carell verwenden Ribose in ihren Synthesen während Trapp und Sutherland Glyceraldehyd in ihre Routen implementieren. Beide Zucker werden präbiotisch in der gleichen Reaktion hergestellt: In der von Alexander Butlerow 1861 entdeckten Formose-Reaktion, auf die im nächsten Abschnitt weiter eingegangen werden soll.^[101]

1.4 Die Formose-Reaktion

Kohlenhydrate oder auch Zucker sind für den Aufbau des Lebens essenzielle Bausteine. Nicht nur im Rückgrat der bereits beschriebenen RNA bzw. DNA spielen Kohlenhydrate eine wichtige Rolle, sondern auch als Bestandteil einiger Membranlipide, den Glycolipiden.^[121-122] Die erste präbiotische Synthese von Zuckern wurde bereits 1861 beschrieben. Der russische Chemiker Alexander Butlerow versetzte wässrige Formaldehyd-Lösungen mit Calciumhydroxid bzw. Calciumcarbonat und konnte durch die Reaktion ein Gemisch aus Kohlenhydraten erhalten.^[101, 123] Diese sogenannte Formose-Reaktion oder auch Butlerow-Reaktion gilt selbst heute, 160 Jahre nach ihrer Entdeckung, als wichtigste präbiotische Synthese für Zucker.^[90] Eine vereinfachte Übersicht ist in Abb. 1.6 wiedergegeben. Dennoch stellt sie für die Wissenschaft immer noch eine große Herausforderung dar. Nicht nur die Identifizierung und Quantifizierung der über 40 Produkte, sondern auch ihre Sensibilität auf Änderungen der Reaktionsbedingungen führen dazu, dass ihr genauer Mechanismus und die ablaufenden Reaktionen nicht vollständig verstanden sind.^[123-125] Umso wichtiger ist es, dass weitere mechanistische und kinetische Untersuchungen durchgeführt werden, um Erklärungen für das sogenannte Ribose-Problem und die Homochiralität der Zucker zu finden.

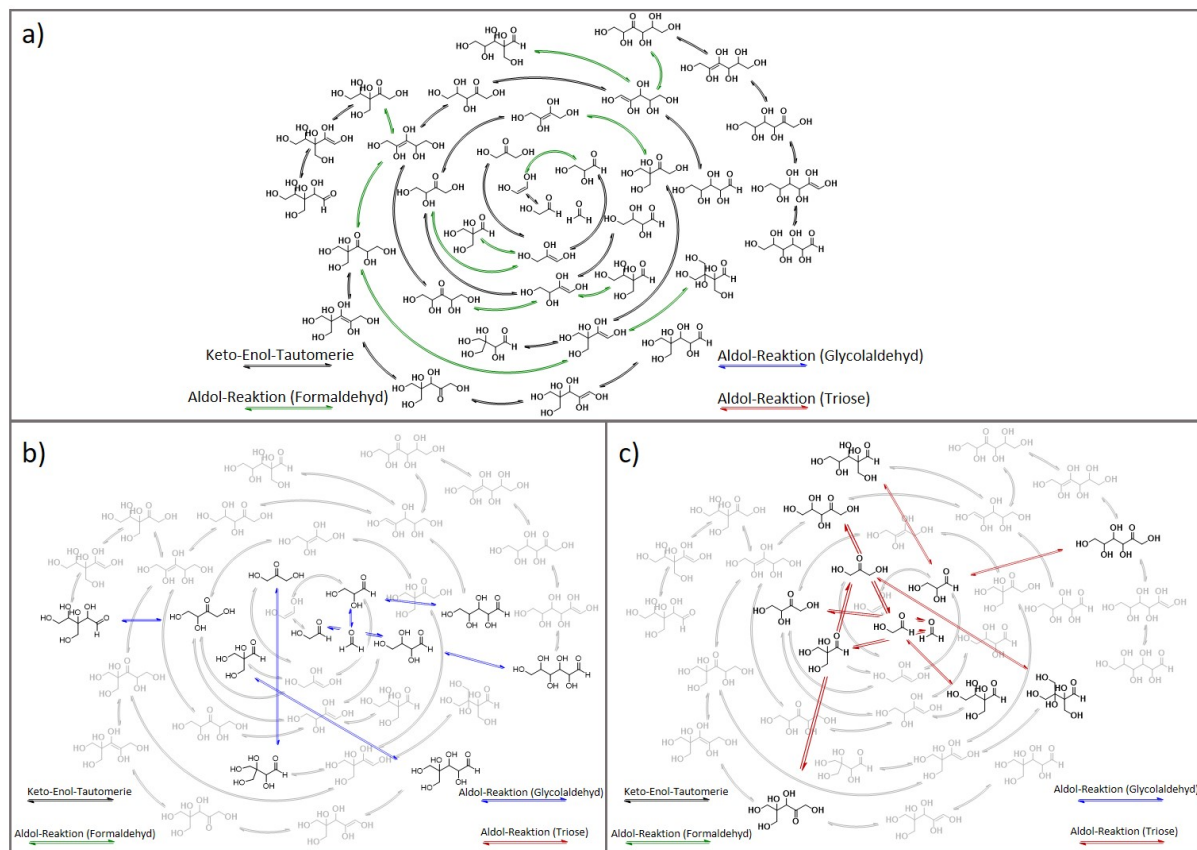


Abb. 1.6: Vereinfachte Abbildung des Formose-Netzwerkes ohne die Einbeziehung von Abbau-Reaktionen bis hin zu den Hexosen. a) Aldol-Reaktionen mit Formaldehyd, b) Aldol-Reaktionen mit Glycolaldehyd, c) Aldol-Reaktionen mit Triosen.

1.4.1 Allgemein

Generell handelt es sich bei der von Butlerow entdeckten Reaktion um eine katalysierte Selbstaddition von Formaldehyd zu Kohlenhydraten. Neben der im Vordergrund stehenden Aldol-Reaktion läuft eine Vielzahl weiterer Reaktionen ab, sodass je nach Reaktionsverlauf zusätzlich zu den linearen bzw. gewinkelten Kohlenhydraten auch Zuckeralkohole, Zuckersäuren und weitere Abbauprodukte der Kohlenhydrate erhalten werden.^[126] Katalysiert werden kann die Reaktion auf unterschiedlichste Art und Weise. Chemisch gesehen können anorganische Katalysatoren wie Hydroxide^[127-130], Carbonate^[127-128] bzw. Oxide^[127-128, 131] der Haupt- und Nebengruppenmetalle eingesetzt werden. Auch einigen Hydroxiden der seltenen Erden konnte eine katalytische Wirkung nachgewiesen werden.^[130] Als organische Katalysatoren konnten die stickstoffhaltigen Basen Imidazol,^[132-133] Collidin,^[127] Pyridin^[132] oder auch Thiazol^[134] erfolgreich verwendet werden. Ebenso konnte eine physikalische Katalyse über UV-Strahlung^[135-136] oder mechanische Einwirkung^[137] gezeigt werden.

Neben dem Katalysator ist zu Beginn der Reaktion ein Initiator von enormer Bedeutung. Kleine Spuren von Verunreinigungen oder Kohlenhydraten in der Reaktionslösung ermöglichen erst die Formose-Reaktion. Socha *et al.* konnten 1980 zeigen, dass mit einer frisch destillierten Formaldehyd-Lösung ohne Initiator keine Reaktion möglich ist. Ohne Initiator würde ausschließlich die Konkurrenzreaktion, die Cannizzaro-Reaktion, ablaufen und es würde ausschließlich zu einer Bildung von Methanol und Ameisensäure kommen. Jedoch sind 3 ppm Glycolaldehyd ausreichend, um die Butlerow-Reaktion zu starten.^[138-139]

Formell lässt sich die Formose-Reaktion in drei aufeinanderfolgende Teilreaktionen gliedern (s. Abb. 1.7). Die Induktionsphase bzw. Primärreaktion beinhaltet die für alle folgende Reaktionsschritte essenzielle Umpolungs-Reaktion des Formaldehyds. Mit Hilfe des Katalysators wird dabei aus dem elektrophilen Kohlenstoff des Formaldehyds ein Nukleophil generiert und somit eine Selbstaddition ermöglicht (Gleichung (1)). Anschließend erfolgt der Aufbau höherer Zucker mittels Additions- und Isomerisierungsschritten in der Sekundärreaktion (Gleichung (2)). Den Abschluss bilden die Zuckerabbau-Reaktionen in der Tertiärreaktion (Gleichung (3)).^[140]

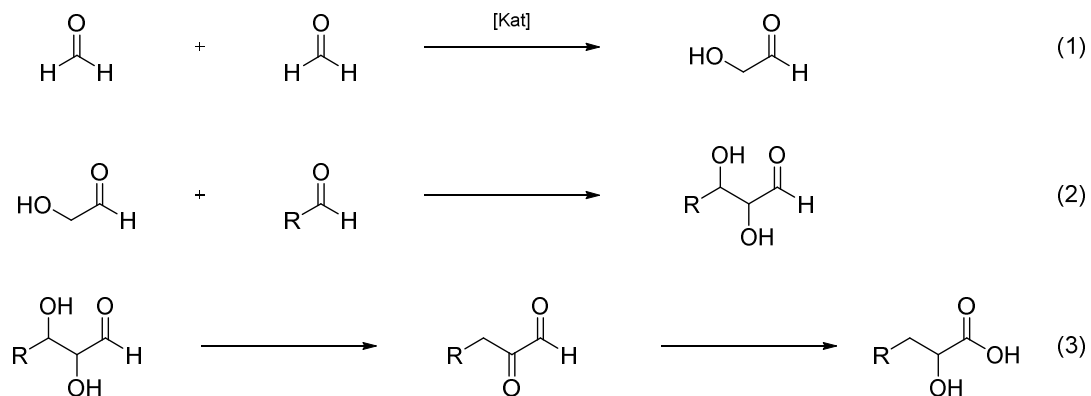


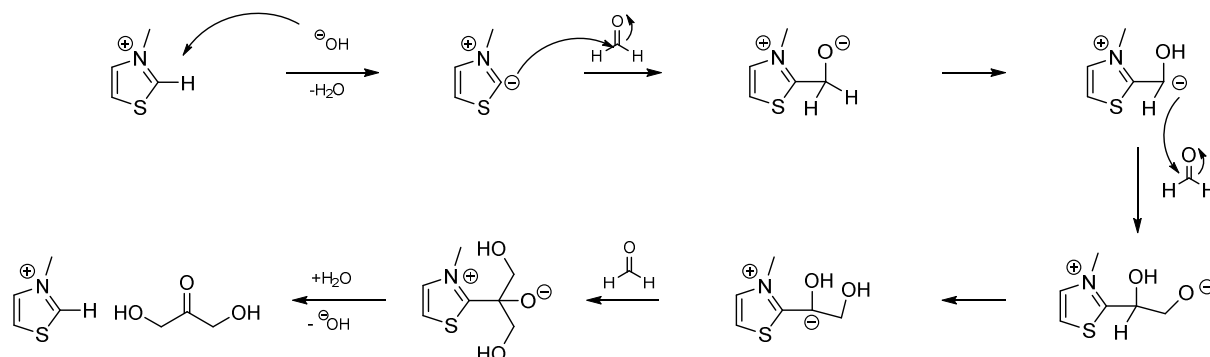
Abb. 1.7: Übersicht der drei Teilreaktionen innerhalb der Formose Reaktion.
(1) Selbstaddition, (2) Additionsreaktionen, (3) Abbaureaktionen.

1.4.2 Reaktionsverlauf der Formose-Reaktion

Der Start

Die erste Phase der Formose-Reaktion bis zur Bildung erster Zucker wird durch die Primärreaktion beschrieben. Durch Umpolung eines Moleküls Formaldehyd wird durch eine Selbstaddition Glycolaldehyd gebildet. Socha *et al.* zeigte jedoch, dass historische verwendete Katalysatoren, wie z.B. Calciumhydroxid, keine Umpolung ermöglichen und meist Verunreinigungen oder kleine Kohlenhydrate für den Start der Formose-Reaktion benötigt werden.^[138] Im Gegensatz dazu lässt sich

durch den Einsatz eines Thiazoliumsalses eine gezielte Umpolung des Formaldehyds realisieren. Der dazugehörige Mechanismus des Thiazol-katalysierten Starts zur Herstellung von Dihydroxyaceton wird in Schema 1.7 gezeigt.



Schema 1.7: Durch Thiazol katalysierte Umpolung des Formaldehyds bis hin zur Bildung des 1,3-Dihydroxyacetons.

Sutherland *et al.* konnten zeigen, dass durch eine Kiliani-Fischer ähnliche Synthese ebenso Glycolaldehyd erhalten werden kann. Dabei addierten sie HCN an Formaldehyd und reduzierten es anschließend mit Schwefelwasserstoff.^[52, 141] Eine weitere präbiotische Alternative zur Initiierung der Formose-Reaktion stellt 2,3-Dihydroxyfumarsäure (DHFS) dar. Bereits unter milden Bedingungen findet eine Decarboxylierung statt und Glycolaldehyd wird gebildet.^[142] Zusätzlich sieht Eschenmoser durch die DHFS eine Verbindung zur Nukleosid-Synthese und dem Citratzyklus. Eine schrittweise Hydrolyse des HCN-Tetramers würde in der DHFS enden und somit die Kohlenhydrat-Chemie mit der Chemie des HCNs verbinden.^[143] Kleine Kohlenhydrate könnten auf diese Arten aufgebaut werden, die Formose-Reaktion starten und in die Sekundärreaktion überführen.

Die Sekundärreaktion

Mit der Bildung der ersten kleineren Kohlenhydrate läuft primär eine Aldol-Reaktion ab, welche die Formose-Reaktion beschleunigt. Bereits 1959 stellte Ronald Breslow einen autokatalytischen Mechanismus für die Reaktion vor.^[144] Durch eine aufeinanderfolgende Addition von Formaldehyd an Glycolaldehyd wird Erythrose gebildet. Die Tautomerisierung zur Aldotetrose und anschließende Retro-Aldol-Reaktion führen zur Schließung des Zyklus, der in Abb. 1.8 zu sehen ist, sowie zur Bildung zweier Moleküle Glycolaldehyd.^[144-146] Allgemein läuft die Formose-Reaktion laut Kim *et al.* nach eindeutigen Regeln ab. Eine Enol-Spezies würde demnach, solange Formaldehyd vorhanden ist, primär Formaldehyd addieren anstatt zu tautomerisieren. Somit würden bei Anwesenheit von Formaldehyd primär höhere Zucker aufgebaut.^[145] Aufgrund fehlender Aldehydfunktion sind Kohlenhydrate, die

zyklische Halbacetale ausbilden können, stabiler und gegenüber Aldol-Reaktionen weniger reaktiv.^[124] Dementsprechend werden Kohlenhydrate, die weder zyklische Halbacetale ausbilden können noch enolisierbar sind, über eine Cannizzaro-Reaktion reduziert, wobei als Reaktionspartner Formaldehyd zur Ameisensäure oxidiert wird. Zudem finden Retro-Aldol-Reaktionen, bei denen Formaldehyd freigegeben wird, nur in vernachlässigbaren Teilen statt. Generell sind Retro-Aldol-Reaktionen primär bei höheren Kohlenhydraten mit fehlender Möglichkeit zur Zyklisierung zu beobachten. Zusätzlich wird dies durch eine höhere Substitution an der β -Position beschleunigt.^[146]

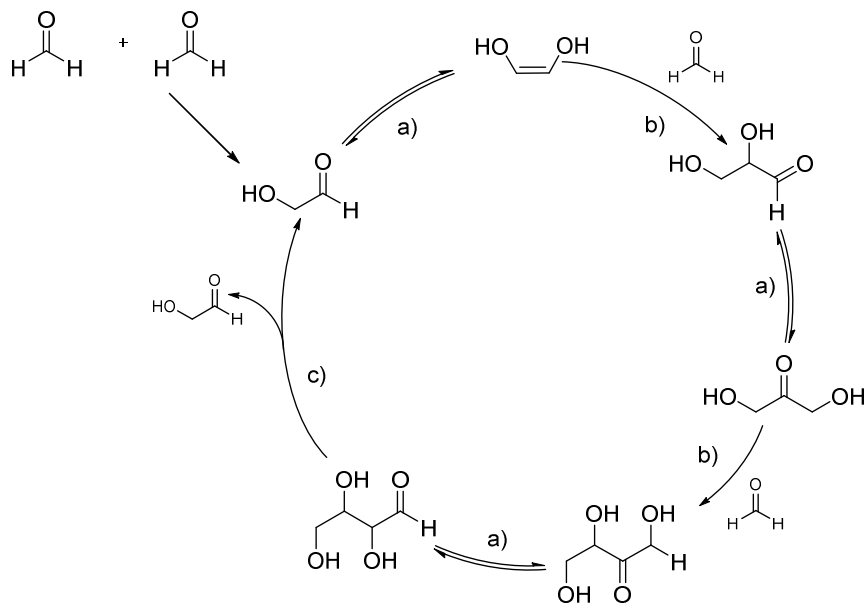
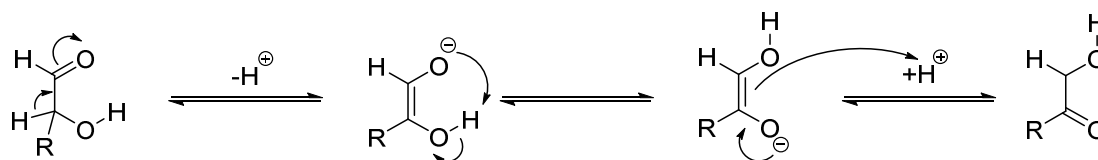


Abb. 1.8: Der autokatalytische Zyklus der Formose-Reaktion postuliert durch Breslow *et al.*^[144] a) Tautomerisierungs-Reaktion, b) Aldol-Reaktion, c) Retro-Aldol-Reaktion.

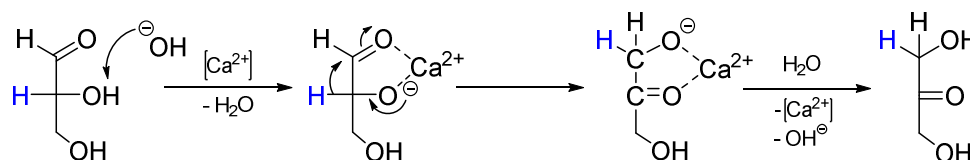
Umlagerungen

Neben den im Vordergrund stehenden Aldol- bzw. Retro-Aldol-Reaktionen führen verschiedenste Umlagerungen zu weiteren Produkten im Formose-Netzwerk. Die Lobry-de-Bruyn-Alberda-van-Ekenstein Umlagerung ist hierbei die am meisten beschriebene innerhalb der Formose-Reaktion. Dabei wird meist das Aldehyd durch Keto-Enol-Tautomerisierung in das stabilere Keton überführt.^[131, 147-148]



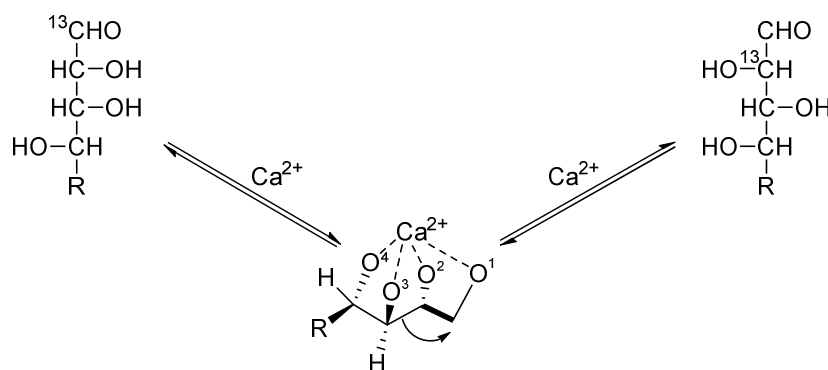
Schema 1.8: Reaktionsverlauf der Lobry-de-Bruyn-Alberda-van-Ekenstein Umlagerung.

Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass sich der Mechanismus der Umlagerung je nach Katalysator unterscheidet. Delidovich *et al.* wiesen darauf hin, dass bei Anwesenheit von Calciumionen die Lobry-de-Bruyn-Alberda-van-Ekenstein Umlagerung nur zu einem kleinen Teil von 26 % zu der Umwandlung von Glyceraldehyd zu Dihydroxyaceton beiträgt. Die restlichen 74 % des Dihydroxyacetons entstehen durch einen 1,2-Hydridshift, der durch eine Komplexierung des eingesetzten Kations ermöglicht wird. Diese Umlagerung wird in Schema 1.9 veranschaulicht.^[145, 149]



Schema 1.9: Reaktionsverlauf des durch Calciumionen ermöglichten 1,2-Hydridshifts am Beispiel von Glyceraldehyd.^[149]

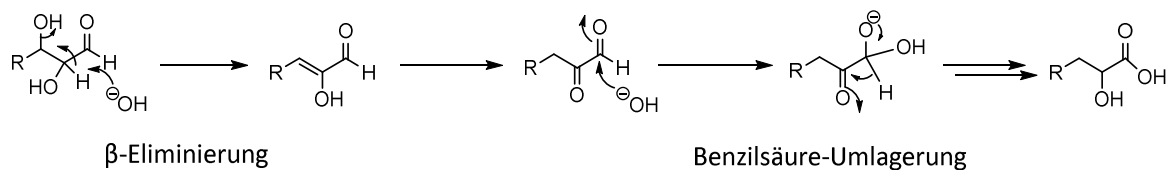
Zusätzlich können bestimmte Mineralien eine Epimerisierung der Kohlenhydrate begünstigen. Eine Komplexierung von Kationen wie Nickel(II) oder Calcium(II) ermöglicht einen stereoselektiven 1,2-Shift durch Verschiebung einer C-C-Bindung am Kohlenstoffskelett. Wie in Schema 1.10 zu sehen ist wird dabei die Bindung des C3 zum C2 gebrochen und eine neue Bindung zum C1-Kohlenstoff ausgebildet. Angyal *et al.* konnten dies ebenfalls bei weiteren Kationen ähnlicher Größe nachweisen. So auch bei Strontium- und einigen Lanthanoidionen.^[150]



Schema 1.10: 1,2-Shift des Kohlenstoffskeletts ermöglicht durch die Komplexierung von Calciumionen.^[150]

Der Abbau

Der Beginn der Tertiärreaktion zeigt sich in der Formose-Reaktion durch eine auffällige Gelbfärbung der Reaktionslösung. Dieser *Yellowing-Point* beschreibt den Punkt, an dem die entstandenen Zucker Abbau-Reaktionen eingehen. Dies tritt meist nach dem vollständigen Verbrauch des Formaldehyds ein. Die immer intensiver werdende Gelbfärbung ist dabei auf die Bildung von α -Dicarbonyl-Verbindungen zurückzuführen.^[149] Weitere Zersetzung und Transformierungen führen zu einer Braunfärbung der Reaktionslösung, die durch extrem farbige Substanzen unbekannter Struktur hervorgerufen wird.^[149, 151] Typische Abbau-Reaktionen sind die Oxidation durch Luftsauerstoff oder β -Eliminierung mit anschließender Benzilsäure-Umlagerung, die in Schema 1.11 zu sehen sind.^[126, 151-152]



Schema 1.11: Allgemeine Abbau-Reaktion der Kohlenhydrate durch eine β -Eliminierung gefolgt von einer Benzilsäure-Umlagerung.

1.4.3 Einflüsse auf die Formose-Reaktion

Wie bereits aufgeführt, sind Kohlenhydrate in vielen Bereichen des Lebens essenziell. Aus dem über 40 Produkten bestehenden Gemisch der Formose-Reaktion wird jedoch nur ein Bruchteil für die Entwicklung des Lebens benötigt. Das Gros beinhaltet Neben- bzw. Abbauprodukte. Daher ist es von enormer Bedeutung, die Kinetiken und Mechanismen der Teilreaktionen des Netzwerks zu untersuchen und nachzuvollziehen. Da kleine Änderungen der Reaktionsbedingungen zu starker Auswirkung auf die Produktverteilung und Ausbeuten haben können, sind Untersuchungen zu Einflussfaktoren auf die Formose-Reaktion von hoher Wichtigkeit.^[124-125]

Bereits die Anfangsbedingungen haben entscheidenden Einfluss auf den weiteren Verlauf der Reaktion. Durch Zugabe verschiedener Kohlenhydrate kann die Primärreaktion, bzw. Induktionsphase, deutlich beschleunigt werden. Kleinere Kohlenhydrate können diese dabei besser beschleunigen als höhere Zucker. Zusätzlich unterscheiden sich auch Aldosen von Ketosen in ihrer Wirkung auf die Induktionsphase. Dihydroxyaceton reagiert mit Formaldehyd bei gleichen Reaktionsbedingungen bis zu 6-mal schneller als Glyceraldehyd. Zurückführen lässt sich dies auf die unterschiedliche Hydratation der Carbonyle in Wasser. Dihydroxyaceton liegt in Wasser zu 80 % in der Carbonyl-Form vor während Glyceraldehyd mit über 99 % als Hydrat vorliegt.^[145, 153] Einen weiteren Effekt auf die Geschwindigkeit

nimmt die Anfangskonzentration an Formaldehyd ein. Höhere Konzentrationen an Formaldehyd können die Reaktion verlangsamen und die Cannizzaro-Reaktion begünstigen.^[127, 151]

Ein weiterer Einfluss auf die Formose-Reaktion kann durch die Wahl des Lösungsmittels genommen werden. So können stark polare Lösungsmittel die Induktionsphase verkürzen. Zugabe von Dioxan, Tetrahydrofuran, Glycerol, Methanol oder anderen leichten Alkohole führt zusätzlich zu einer Unterdrückung der Cannizzaro-Reaktion. Um Teilreaktionen innerhalb der Formose-Reaktion besser zu verstehen können auch aprotische Lösungsmittel eingesetzt werden. Dabei lassen sich jedoch nur die Mechanismen organischer Katalysatoren studieren, anorganische Katalysatoren können in ihnen nicht eingesetzt werden.^[149]

Katalysatoren im Allgemeinen nehmen innerhalb der Formose-Reaktion eine wichtige Rolle ein. Sie nehmen nicht nur Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit oder das Verhältnis zwischen Aldol- und Cannizzaro-Reaktion, sondern können im Formose-Netzwerk, wie bereits gezeigt, alternative Reaktionswege über zum Beispiel 1,2-Hydrid-Shits, ermöglichen.^[145, 149] Entscheidend bei anorganischen Katalysatoren sind vor allem ihr pK_B -Wert und das Kation der eingesetzten Base. Während der pK_B -Wert direkt proportional zum Anteil an Disproportionierung von Fomaldehyd ist,^[154] bestimmt der Ionenradius des Kations seine Fähigkeit zur Komplexierung. Calcium-, Lanthan- und Thallium-Ionen weisen eine erhöhte Aktivität auf und ermöglichen eine kurze Induktionsphase, während Kationen mit kleineren Ionenradien als Calcium zu klein für eine Komplexierung sind.^[139, 149-150] Aufgrund der hohen Zahl möglicher Reaktionsprodukte ist die Selektivität eines Katalysators ebenfalls von enormer Bedeutsamkeit. Inoue *et al.* konnten in Dioxan durch den Einsatz von 3-Ethyl-benzothiazoliumbromid und Triethylamin als Katalysatoren Dihydroxyaceton mit einer Ausbeute von 80 % erhalten.^[155] Ebenso konnte Shigemasa eine selektive Synthese von Dihydroxyaceton durch Katalyse mit 2-(Dimethylamino)ethanol und Vitamin B1 in Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid nachweisen.^[156] Von hohem Interesse ist die Forschung unter dem Einsatz von L-Aminosäuren durch Breslow. Sie könnte ein erstes Indiz zur Homochiralität der für Zellen essenziellen Zucker darstellen. Verschiedene Aminosäuren wie L-Leucin, L-Glutaminsäure oder L-Alanin zeigen eine Präferenz zur Bildung des D-Glyceraldehyds im Vergleich zu seinem Enantiomer.^[157-158]

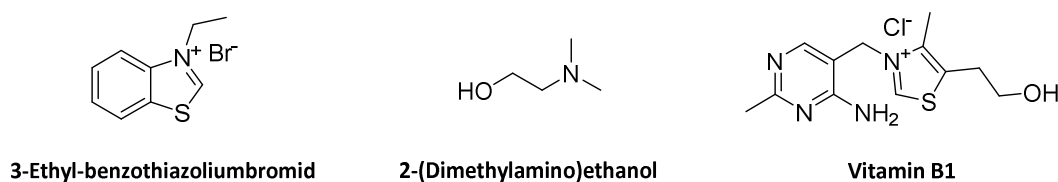


Abb. 1.9: Abbildung eingesetzter organischer Katalysatoren in der Formose-Reaktion.^[155-156]

Selektivität kann ebenfalls durch Zugabe von Additiven und damit Stabilisierung einzelner entstandenen Zucker erreicht werden. Ricardo *et al.* konnten zeigen, dass Borate vicinale Alkohole komplexieren und damit stabilisieren können. Zyklische Zucker sollten aufgrund der Maskierung ihrer Carbonylfunktion als Halbacetal dadurch weniger anfällig gegenüber Abbaureaktionen sein.^[159] Dies bietet eine Lösung des sogenannten Ribose-Problems der Formose-Reaktion.^[107] Wie in Abschnitt 1.3 gezeigt wird bei mehreren Nukleosid-Synthesen die Ribose benötigt. Diese und die Desoxyribose werden jedoch nur zu einem Anteil von ca. 1 % während der Formose-Reaktion gebildet. Darüber hinaus ist Ribose im freien Zustand nicht stabil. Bei höheren Temperaturen um die 100 °C und einem neutralen pH-Wert beträgt die Halbwertszeit der Ribose nur 73 Minuten.^[107, 123] Auch bei einem höheren pH-Wert von 9.8 und einer Temperatur von 55 °C beträgt die Halbwertszeit weniger als drei Stunden. Damit ist der Abbau der Ribose über 6-mal schneller als der der Arabinose ($7.0 \cdot 10^{-5}$ und $1.1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$).^[160] Zugabe von Bormineralien wie Ulexit, Kernit oder Colemanit zu einer Formose-Reaktion ermöglicht es, dass die Reaktion über einen Zeitraum von zwei Monaten durchgeführt wird, ohne dass die durch die bekannten Zersetzungsreaktionen hervorgerufene Gelb- bzw. Braunfärbung eintritt. Auch analytisch konnten keine Zersetzungsprodukte gefunden werden. Entfernt werden können die gebildeten Borat-Zucker-Komplexe (Abb. 1.10) über die Bildung der Trimethylboratester durch Zugabe von Methanol.^[159]

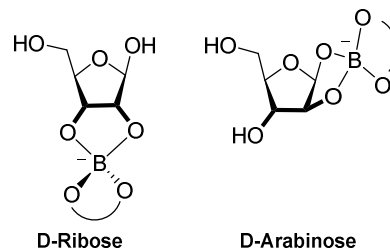


Abb. 1.10: Stabilisierung der Zucker durch Bildung von Borat-Komplexen am Beispiel von D-Ribose und D-Arabinose.^[159]

1.5 Die Chemie der Kohlenhydrate

Kohlenhydrate zählen zu den strukturell komplexesten Bausteinen des Lebens. Dabei erstreckt sich die Bandbreite von einfachen Monosacchariden bis hin zu komplexen Makromolekülen mit einem Molekulargewicht von bis zu 1 MDa.^[161-162] Schätzungen zufolge gibt es allein von reduzierenden Hexasacchariden bis zu $1.05 \cdot 10^{12}$ mögliche Isomere.^[161] Einteilen lassen sie sich anhand ihrer funktionellen Gruppen oder Konstitution. Zusätzlich können die meisten Kohlenhydrate auf unterschiedliche Art vorliegen. Kleinere Zucker, wie Glycolaldehyd und Glyceraldehyd können im

festen Zustand dimere Halbacetale ausbilden, während höhere Zucker aufgrund von intramolekularen Ringschlüssen als Fünf- (Furanosen) bzw. Sechsringe (Pyranosen) vorliegen können.

Dieser Ringschluss führt zur Bildung eines zyklischen Halbacetals und fügt ein zusätzliches Stereozentrum am vormaligen Carbonyl-Kohlenstoff ein. Infolgedessen werden bei Ringschluss zwei weitere Konstitutionen erhalten. Diese Anomere werden anhand des gebildeten Stereozentrums und des höchstbezahlten chiralen Zentrums definiert. Besitzen beide Zentren die gleiche Konfiguration handelt es sich um das β -Anomer. Unterscheiden sich die beiden Konfigurationen jedoch, erhält man somit das α -Anomer. Somit können wie in Abb. 1.11 gezeigt die Hexasaccharide in bis zu fünf isomeren Strukturen vorliegen. In Lösung können diese jeweiligen Formen ineinander überführt werden und durch Addition von Wasser zusätzlich Hydrate ausgebildet werden. Allein für das Glycolaldehyd konnte Glushonok *et al.* in Wasser neun verschiedene Strukturen nachweisen.^[163]

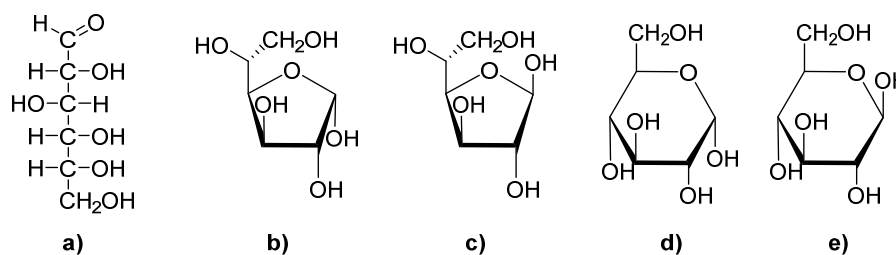


Abb. 1.11: Abbildung der fünf möglichen Strukturen der D-Glucose in wässriger Lösung. a) offenkettige Darstellung, b) α -D-Glucopyranose, c) β -D-Glucopyranose, d) β -D-Glucopyranose, e) α -D-Glucopyranose.

1.5.1 Analytik von Kohlenhydraten

Die in Abschnitt 1.5.1 diskutierte Vielfalt an Isomeren und das Fehlen von Chromo- bzw. Fluorophoreinheiten in Kohlenhydraten stellt für die analytische Chemie eine große Schwierigkeit dar.^[161] Zudem erschweren hohe Polarität und daraus resultierende fehlende Volatilität ihre Analyse. Dies hat zur Folge, dass eine direkte Detektion nur schwer möglich ist. Über Amperometrie oder Brechungsindex sind Kohlenhydrate zwar bestimmbar, jedoch in beiden Fällen nur mit geringer Sensitivität. Ebenso ist eine direkte spektroskopische Analyse bei $\lambda = 195$ nm möglich, aufgrund des geringen Absorptionskoeffizienten ϵ jedoch ebenfalls wenig sensitiv.^[162] Auch eine direkte Identifizierung des Analyten mittels massenspektrometrischer Detektion bietet keine fundierte Aussage, da Diastereomere der Zucker, wie zum Beispiel Erythrose und Threose, identische Massenspektren aufweisen. Eine Qualifizierung von Kohlenhydraten kann daher nur durch die Kombination mit einer chromatographischen Methode über die Retentionszeit realisiert werden.^[164-167] Dementsprechend ist es

unerlässlich, Zucker für eine vollständige, sensitive Analytik zu derivatisieren, um die fehlende Volatilität zu kompensieren oder eine Wechselwirkung mit Strahlung und eine UV-Detektion zu ermöglichen.

1.5.2 Derivatisierung für erhöhte Volatilität

Um eine Analytik mittels Gaschromatographie (GC) zu ermöglichen, müssen Kohlenhydrate in volatile und thermisch stabile Substanzen überführt werden. Eine direkte Derivatisierung kann mittels Pertrifluoracetylierung^[161, 168-169], Permethylierung^[161, 168-170] oder Persilylierung^[161, 168-174] der Hydroxylgruppen erfolgen. Pertrifluoracetylierung und Permethylierung bringen jedoch als direkte Derivatisierungsmethoden Schwierigkeiten mit sich, da es unter den benötigten Bedingungen zu einer Verschiebung des Isomerengleichgewicht kommen kann und somit einzelne Verhältnisse verfälscht werden.^[168] Zudem bleibt die Carbonylgruppe bestehen. Dies hat zur Folge, dass die im Isomerengleichgewicht gebildeten zyklischen Halbacetale bestehen bleiben. Dementsprechend werden nach einer direkten Derivatisierung von D-Glucose fünf Signale, die der offenkettigen, der Pyranose- sowie der Furanose-Form (siehe Abb. 1.11), mit unterschiedlicher Intensität erhalten. Eine quantitative Auswertung wird durch die Vielzahl an erhaltenen Signalen einzelner Zucker erschwert. Vereinfachen lässt sich die Analyse durch eine zusätzliche Derivatisierung der Carbonylgruppe.

Eine Variante bietet die Reduktion der Carbonylgruppe und damit die Überführung in ein Alditol. Dies geht jedoch mit einem Informationsverlust einher, da beispielsweise D-Sorbit sowohl aus D-Glucose als auch aus L-Gulose erhalten wird. Ebenfalls wird bei der Reduktion einer Ketose ein neues Stereozentrum gebildet und somit zwei unterschiedliche Alditole erhalten. Ein nachträglicher Rückschluss auf den reduzierten Zucker ist ausgeschlossen.^[175-176]

Eine weitere Möglichkeit bietet eine Überführung der Carbonylgruppe in Oxime mittels Hydroxylamin-hydrochlorid (HACl) bzw. O-Ethylhydroxylamin-hydrochlorid (EtOx). Dies bringt mehrere Vorteile mit sich: Auch Kohlenhydrate mit mehr als einer Carbonylgruppe lassen sich in Substanzen mit genügend Volatilität überführen, um sie mit gaschromatographischen Methoden zu analysieren. Des Weiteren findet eine Reduktion der erhaltenen Signale einzelner Zucker durch Aufbrechen der Ringstruktur statt.^[164] Anstelle der fünf zu erwartenden Signale bei direkter Derivatisierung von Hexasacchariden werden diese auf zwei reduziert, namentlich das Signal des (Z)- sowie das (E)-Isomers des entstandenem Oxims. Chapman und Horvat konnten zusätzlich feststellen, dass das Verhältnis der Signale für das (Z)- und (E)-Isomer bei der Derivatisierung durch Hydroxylamin mit anschließender Silylierung selbst bei unterschiedlicher Konzentration konstant

bleibt. Xylose, Galactose sowie Mannose würden somit ein konstantes Isomerenverhältnis von 4:1 ((*Z*):(*E*)) zeigen.^[164, 177]

1.5.3 Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Ein Nachteil der in Abschnitt 1.5.2 diskutierten Derivatisierung der Hydroxylgruppen ist, dass bei dieser Methode eine Abwesenheit von Wasser erforderlich ist und daher die Probe gefriergetrocknet werden muss. Kleine, leicht flüchtige Kohlenhydrate können bei diesem Schritt verloren gehen und somit eine Quantifizierung beeinträchtigen oder gar unterbinden. Eine Alternative dazu bildet der Einsatz von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) um Kohlenhydrate für eine UV-Detektion innerhalb einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zugänglich zu machen. Die Zucker werden dafür bei Raumtemperatur unter sauren Bedingungen mit einer DNPH-Lösung versetzt und in die entsprechenden Hydrazone überführt. Eine thermisch bedingte Zersetzung kann durch die milden Temperaturen ausgeschlossen werden.^[178] Analog zur Derivatisierung über die Oxime werden für jeden Zucker zwei Signale erhalten, die des (*Z*)- sowie des (*E*)-Isomers.^[179] Problematisch stellt sich jedoch die Lagerungszeit der erhaltenen Analyten dar. Längere Lagerzeiten als 16 Stunden sollten nach Iqbal *et al.* vermieden werden. Ebenso können die oxidierend wirkenden Hydrazine Hydroxygruppen in Carbonylgruppen überführen und eine anschließende Reaktion mit überschüssigem DNPH ermöglichen.^[180]

1.6 Motivation und Zielsetzung

Mehrere Theorien zur präbiotischen Synthese von Nukleosiden, den Bausteinen des Lebens, wurden in den vorangegangenen Abschnitten diskutiert. In jeder einzelnen der von Orgel, Sutherland, Carell oder Trapp beschriebenen Routen, wird für die Herstellung in mindestens einem der Reaktionsschritte ein Zucker benötigt. Dabei spielt es keine Rolle, ob es im Einzelfall um die Ribose, Glyceraldehyd oder das Glycolaldehyd handelt. Alle drei Kohlenhydrate werden in einer Reaktion gebildet, die bereits seit über 160 Jahre bekannt ist: der Formose-Reaktion. Doch selbst nach langer Zeit an Forschung ist das dichte Netz aus Aldol-Reaktionen, Retro-Aldol-Reaktionen, Umlagerungen und Abbau-Reaktionen nicht vollends verstanden. Die Vielzahl an Produkten und ihre nahezu identische Struktur erschweren ihre Analytik und damit eine Nachverfolgung einzelner Reaktionen und Synthesewege.

An diesem Punkt soll diese Arbeit ansetzen und das Dickicht an ablaufenden Reaktionen innerhalb der Formose entwirren. Um dies zu ermöglichen soll zu Beginn des Projektes eine fundierte Analytik der Kohlenhydrate aufgebaut werden. Dazu zählt die weitgehende Identifizierung und Quantifizierung einzelner Produkte, die durch das Netzwerk entstehen.

Mit der entwickelten Analytik sollen anschließend Untersuchungen zur Selektivität innerhalb des Netzwerkes durchgeführt werden. In der historischen Formose-Reaktion mit Calciumhydroxid werden bis zu 40 verschiedene Produkte generiert.^[123] Jedoch wird nur ein Bruchteil dieser für die Synthesen von Nukleosiden benötigt. Vor allem im Hinblick auf Glyceraldehyd sollen entsprechende Untersuchungen fokussiert werden.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit ist das Nachvollziehen einzelner Reaktionswege und Mechanismen. Dazu sollen Markierungsexperimente durchgeführt werden und die Mechanismen mit Hilfe von Kreuzreaktionen deuterierter und nicht-deuterierter Verbindungen in Kombination mit hochauflösender Massenspektrometrie.

Die Untersuchung der Formose-Reaktion soll mit kinetischen Untersuchungen verschiedener Calcium- und Kaliumkatalysatoren abgeschlossen werden. In einer Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Erwin Frey sollen Reaktionsmodelle entworfen und implementiert werden. Mit experimentell erhaltenen Daten sollen sich durch die Modelle Geschwindigkeitskonstanten einzelner Reaktionen innerhalb des Formose-Netzwerkes bestimmen lassen.

Die Ergebnisse der einzelnen Unterbereiche der Arbeit, sollen ein tieferes Verständnis für die präbiotische Synthese von Kohlenhydraten bilden. Darüber hinaus sollen die Ergebnisse Ansätze einer verbesserten Selektivität bezüglich einzelner Zucker der Reaktion bieten, die für die präbiotische Synthese von Nukleosiden benötigt werden.

Kapitel 2:

Ergebnisse und Diskussion

2.1 Methodenentwicklung zur Analyse der Formose-Reaktion

Eine effiziente Analytik bildet das Fundament zur tiefgründigen Untersuchung komplexer Systeme und Netzwerke. Im Hinblick auf die Formose-Reaktion, ihrer vielfältigen Kohlenhydratchemie und ihrer diversen Reaktionsmechanismen ist dies von enormer Bedeutung. Bereits in Abschnitt 1.5.1 wurde die unterliegende Problematik behandelt. Zusammengefasst erschweren fehlende Chromo- bzw. Fluorophoreinheiten innerhalb der Kohlenhydrate eine direkte Analyse über die LC, während die hohe Polarität – und damit fehlende Volatilität – größerer Zucker eine Analyse über die GC verhindern. Eine Derivatisierung der Reaktionskomponenten ist daher unerlässlich. Verschiedene Analytik- und Derivatisierungsmethoden für HPLC sowie GC wurden bereits in Abschnitt 1.5.2 und 1.5.3 vorgestellt. Weiterführend soll die zeitliche Verfolgung der Reaktion, um geplante kinetische Untersuchungen zu ermöglichen, realisiert werden. Hierfür muss die Reaktion zu beliebigen Zeiten gestoppt und nachvollzogen werden. In diesem Kapitel sollen die für die Analytik des Formose-Netzwerkes entwickelten und angewandten Methoden näher beschrieben werden.

2.1.1 Analyse des Formose-Netzwerkes

Nur durch eine Kombination aus GC und LC lässt sich eine umfangreiche Analytik, der in Wasser ablaufenden Formose-Reaktion, gewährleisten. Kohlenhydrate lassen sich zwar mittels GC deutlich besser voneinander trennen und identifizieren als über die LC, jedoch werden kleinere Komponenten bei der für die GC-Derivatisierung benötigten Gefriertrocknung im Feinvakuum ebenfalls teilweise entfernt. Deshalb wird auf die im Arbeitskreis Trapp entwickelten Methoden der Gas- und Flüssigkeitschromatographie aufgebaut und diese erweitert.^[167] Flüchtige Komponenten, wie Formaldehyde und Glycolaldehyd, werden dabei über eine DNPH-Derivatisierung direkt in Wasser bestimmt, während höhere Zucker über die GC über eine Derivatisierung mit EtOx und *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) vermessen werden.

Qualitative Analyse

Eine Analyse geradkettiger Aldosen und 2-Ketosen mit EtOx und BSTFA konnte bereits durch Trapp *et al.* beschrieben werden.^[167] Die entwickelte Auftrennung der Monosaccharide über die GC ist in Abb. 2.1 wiedergegeben. Dabei geben die abgebildeten Zucker ebenfalls den Hauptbestandteil der in der Formose dargestellten Kohlenhydrate der Sekundärreaktion wieder. Aus diesem Grund bietet diese Methodik ein optimales Fundament für eine weiterführende Analytik der Formose-Reaktion.

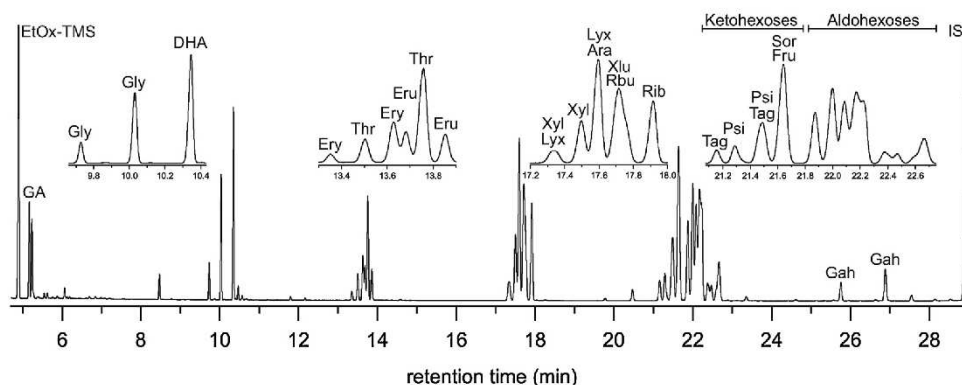


Abb. 2.1: Chromatogramm zur Quantifizierung geradkettiger Aldosen und 2-Ketosen. Abbildung übernommen aus der Veröffentlichung durch Trapp *et al.*^[167] GA: Glycolaldehyd, Gly: Glyceraldehyd, DHA: 1,3-Dihydroxyaceton, Ery: Erythrose, Thr: Threose, Eru: Erythrulose, Xyl: Xylose, Lyx: Lyxose, Ara: Arabinose, Xlu: Xylulose, Rbu: Ribulose, Rib: Ribose, Tag: Tagatose, Psi: Psicose, Sor: Sorbose, Fru: Fructose, Gah: Galactoheptose, IS: Interner Standard.

Während erster Untersuchungen der Formose-Reaktion wurden bei Umsetzung von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid weitere unbekannte Signale erhalten, die in Abb. 2.2 dargestellt sind. Diese stammen von gewinkelten Monosacchariden sowie Abbauprodukten der Kohlenhydrate über eine Cannizzaro-Reaktion oder eine β -Eliminierung. Diese Produkte zu identifizieren ist jedoch nicht trivial und wird meist durch einen schlechten Zugang zu Referenzproben erschwert. Die Ähnlichkeit zwischen den Strukturen einzelner Monosaccharide wird hierbei jedoch zum Vorteil. Da, wie in Abb. 2.3 zu sehen ist, Kohlenhydrate mit gleicher Anzahl an Kohlenstoffatomen bei ähnlicher Retentionszeit detektiert werden, wurde anhand dieser auf die Größe der unbekannt Substanz geschlossen. Ebenso konnte durch das Massenspektrum eine Aussage getroffen werden, ob es sich bei der Verbindung um eine Ketose oder eine Aldose handelt. Aldopentosen können zum Beispiel über das Fragment mit m/z 307 identifiziert werden während die Ketopentosen ein Massenfragment von m/z 378 aufweisen.^[167] Somit wurde die 3-Ketopentose mit einer Retentionszeit von 17.0 Min identifiziert. Die Bestimmung der Apiose bei einer Retentionszeit von 17.3 Min konnte zusätzlich mit einer Referenzprobe verifiziert werden.

Auch im C4-Zuckerbereich wurden zwei zusätzliche Signale neben den der Erythrose, Threose und Erythrulose erhalten und identifiziert. Über das Massenspektrum konnte die gewinkelte Tetrose 2-Hydroxymethyl-Glyceraldehyd (gewC4) mit einer Retentionszeit von 13.6 Min sowie ihre reduzierte Form 2-Hydroxymethyl-Glycerin (gewC4Alk) bei einer Retentionszeit von 13.3 Min bestimmt werden. Der erhaltene gewC4-Zucker bildet sich dabei über eine Aldol-Reaktion von Glyceraldehyd bzw. 1,3-Dihydroxyaceton und Formaldehyd. Aufgrund eines fehlendes α -Wasserstoffatoms kann dieser

jedoch keine Keto-Enol-Tautomerie eingehen. Dadurch ist dieser anfälliger gegenüber einer Cannizzaro-Reaktion in der über eine potentielle Reduktion in den entsprechenden Alkohol überführt wird, dem gewC4Alk.

Zu den beschriebenen Signalen wurden noch drei weitere Signale im C3-Zuckerbereich bestimmt. Mittels Referenzproben konnte Milchsäure bei 6.70 Min, Glycerin bei 10.1 Min sowie Glycerinsäure bei 10.9 Min identifiziert werden. Die Milchsäure wird dabei über eine β -Eliminierung mit anschließender Benzilsäure-Umlagerung gebildet, Glycerin und Glycerinsäure durch Reduktion bzw. Oxidation innerhalb einer Cannizzaro-Reaktion. Ebenfalls ist es möglich, dass Glycerinsäure über eine Oxidation mit Luftsauerstoff gebildet wird.

Von besonderem Interesse ist die Bildung des Glycerins über eine Reduktion von Glyceraldehyd bzw. Dihydroxyaceton. Da beide Substanzen ein α -Wasserstoffatom besitzen wird erwartet, dass diese Kohlenhydrate primär eine Aldol-Reaktion unterlaufen. Dennoch werden signifikante Anteile an Glycerin gebildet, welches für die Synthese von Fetten als Triacylglyceride von enormer Bedeutung ist. Ebenso bildet es das Rückgrat der Phosphoglyceride, ein Bestandteil der Zellmembran, und ist somit für die Grundlagen des Lebens essentiell.

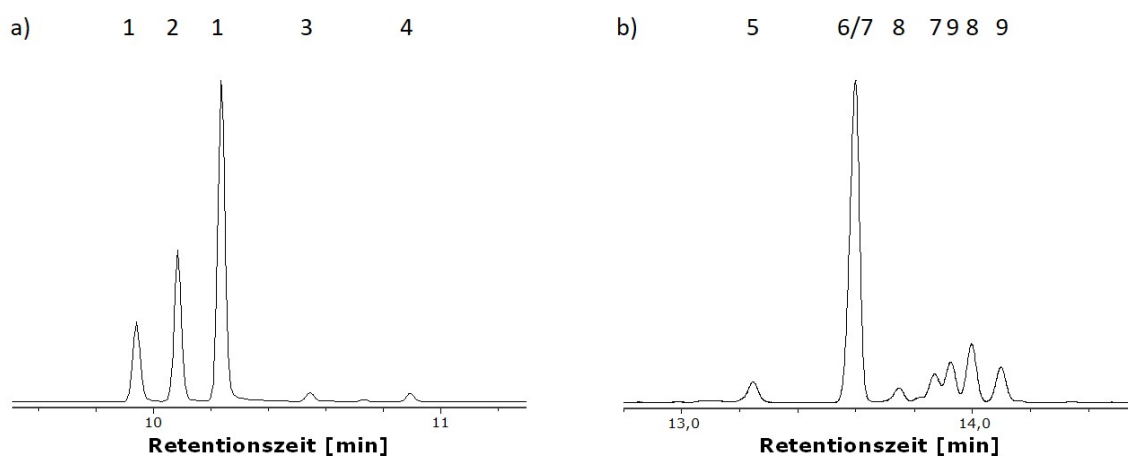


Abb. 2.2: Erhaltene Signale im C3 und C4 Bereich bei der Umsetzung von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid. a) 1: Glyceraldehyd, 2: Glycerin, 3: Dihydroxyaceton, 4: Glycerinsäure. b) 5: gewC4Alk, 6: gewC4, 7: Erythrose, 8: Threose, 9: Erythrulose.

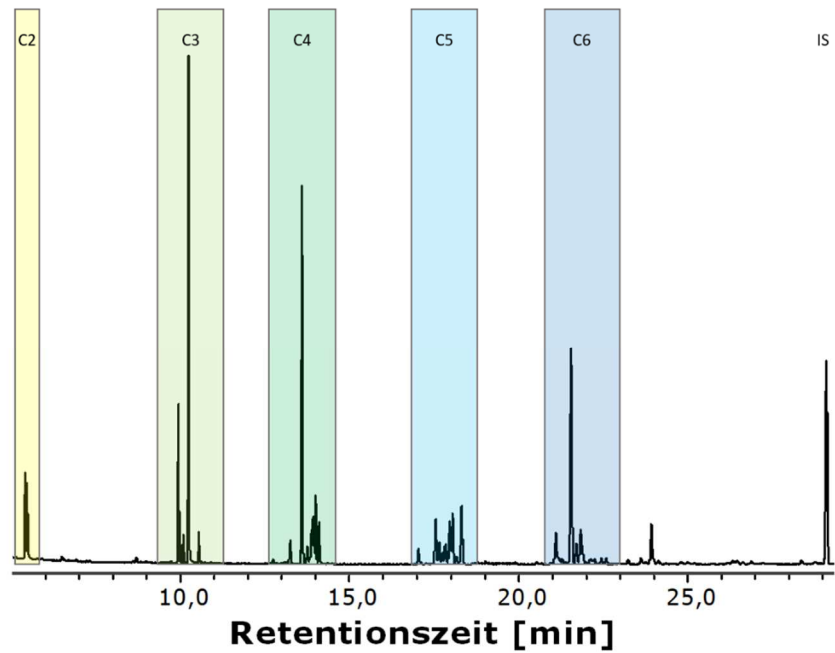


Abb. 2.3: Umsetzung von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Kaliumcarbonat nach 20 Minuten. Die Gruppierungen stellen Kohlenhydrate ähnlicher Retentionszeit anhand der Zahl ihrer Kohlenstoffatome dar. IS = interner Standard.

Quantitative Analyse

Für eine quantitative Analyse wurde Phenyl- β -D-Glucopyranosid als interner Standard (IS) bei der GC-Messung eingesetzt und die Konzentrationen der einzelnen Verbindungen über die *effective carbon number* (ECN) ermittelt.^[181-182] Hierfür wurden die ECNs der in den Substanzen beinhalten funktionellen Gruppen addiert. Zusätzlich wurde ein *Limit of Quantification* (LoQ) jeder Komponente ermittelt. Hierfür wurde in einer Blindmessung das Hintergrundsignal jedes Kohlenhydrates bestimmt. Erst bei Überschreitung des Dreifachen dieser erhaltenen Fläche wurde der entsprechende Zucker als vorhanden gewertet und seine Konzentration bestimmt. Dies soll Signalschwankungen im Hintergrund minimieren und somit eine genauere Quantifizierung gewährleisten. Eine quantitative Bestimmung über die HPLC erfolgte mit Hilfe von Eichgeraden.

Erste Untersuchungen zeigten, dass neben Formaldehyd auch Glycolaldehyd zu Teilen bei der Gefriertrocknung entfernt wird und somit nicht über GC quantifiziert werden kann. Die in Abb. 2.4 gezeigten Eichgeraden von in Pyridin (a) bzw. in Wasser (b) gelöstem Glycolaldehyd bestätigte dies. Dabei weist Linie (b) bei gleicher Konzentration eine kleinere Signalfläche auf als Linie (a), bei der Glycolaldehyd ohne Lyophilisierung direkt derivatisiert wurde. Aus diesem Grund wurde auch die Konzentration von Glycolaldehyd über die DNPH-Derivatisierung mittels HPLC bestimmt.

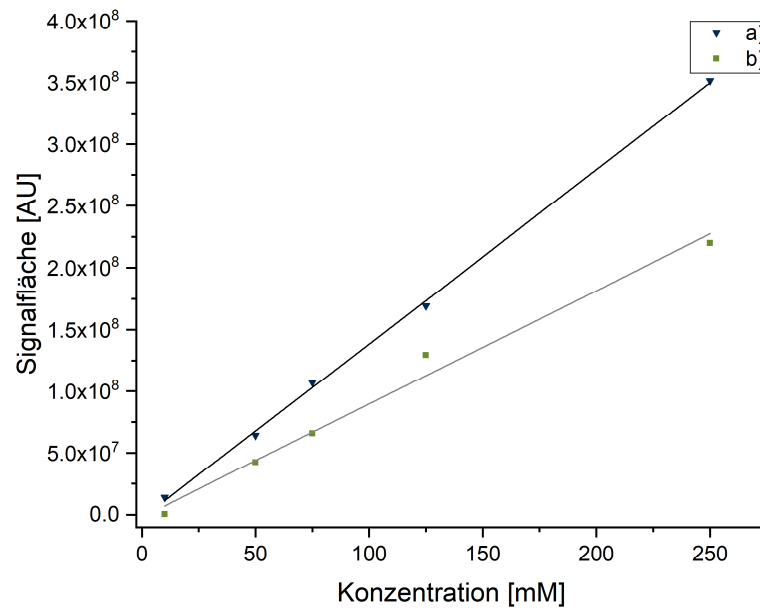


Abb. 2.4: Eichgeraden des mittels GC vermessenen Glycolaldehyds. Linie a) zeigt dabei eine direkte Derivatisierung während bei Linie b) Glycolaldehyd in Wasser gelöst und eine Gefriertrocknung vollzogen wurde.

Abb. 2.2 zeigt die Problematik bei der Analyse der Tetrosen. Eine Trennung des gewC4 und der Erythrose und somit eine direkte Quantifizierung war nicht realisierbar. Da Erythrose und Threose gleich fragmentieren, wurde der Anteil der Erythrose über das Verhältnis des gesamten Signals zum Fragment m/z 175 der beiden Stoffe bestimmt. Auf diese Weise konnte das überlagerte Signal des gewC4-Zuckers und der Erythrose in die jeweiligen Anteile aufgeteilt werden.

Eine quantitative Analyse der Pentosen sowie Hexosen war im Einzelnen nicht möglich. Der strukturelle Unterschied innerhalb dieser Kohlenhydrate wirkt sich nur minimal auf deren Retentionszeit aus. Eine eindeutige Signaltrennung ist dadurch nur in einzelnen Fällen möglich. Aus diesem Grund wurden Pentosen sowie Hexosen als geschlossene Gruppe quantifiziert. Ausnahmen bilden die Ribose, die Apiose, sowie die C3-Ketopentose, die als einzelnes Signal mittels GC quantifiziert werden konnten. Eine Übersicht der innerhalb der Formose-Reaktion identifizier- und quantifizierbaren Verbindungen ist in Abb. 2.5 wiedergegeben.

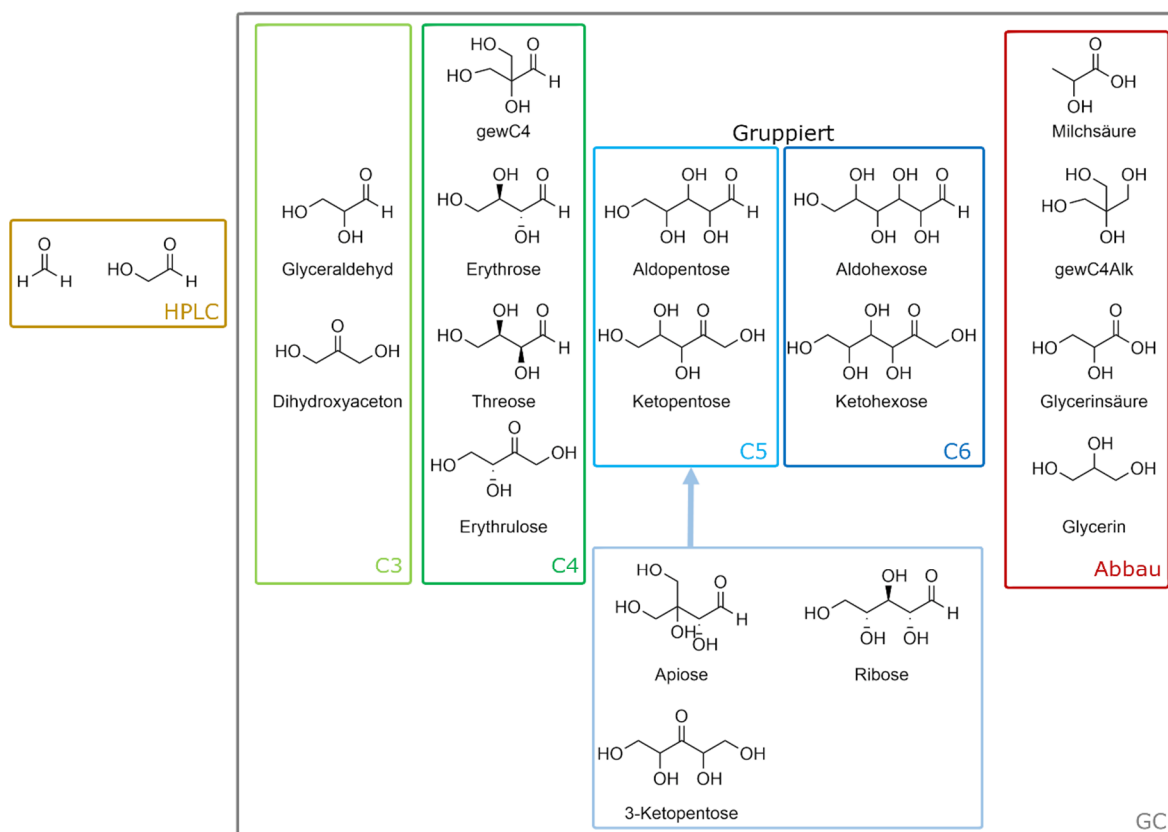


Abb. 2.5: Überblick der identifizierten und qualifizierten Verbindungen innerhalb der Formose-Reaktion. Die Pentosen sowie die Hexosen wurden dabei als eigenständige Gruppe quantifiziert.

2.1.2 Abbruch der Formose-Reaktion

Um kinetische Analysen durchzuführen ist es essenziell, die Konzentrationen einzelner Komponenten zu einem konkreten Zeitpunkt zu bestimmen. Hierfür muss die Reaktion in Echtzeit verfolgt oder die Reaktion zu entsprechenden Zeiten gestoppt werden. Untersuchungen mit Glycolaldehyd und Calciumhydroxid in Wasser zeigten jedoch, dass es nicht ausreichend ist, die Reaktion durch Einfrieren der Reaktionsmischung in flüssigem Stickstoff zu unterbinden. Bereits zu Reaktionsbeginn konnten Tetrosen gaschromatographisch nachgewiesen werden. Experimentell wurde eine Bildung während der Derivatisierung ausgeschlossen. Dies führte zur der Annahme, dass die Reaktion während oder nach einer Gefriertrocknung weiter abläuft. Um diese Theorie zu bestätigen, wurde Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid vermengt und nach einer Stunde Reaktionszeit derivatisiert. Auch hier wurden Tetrosen in der Reaktionsmischung nachgewiesen. Daraus lässt sich ableiten, dass nach der Entfernung des Lösungsmittels ebenfalls eine Feststoff-Feststoff-Reaktion im Lyophilisator stattfindet und die Reaktion somit fortgesetzt wird. Diese Feststoff-Reaktion gilt es zu unterbinden, um kinetische Analysen der Formose-Reaktion zu ermöglichen.

In der Literatur ist häufig zu finden, dass die Formose-Reaktion über das Ansäuern mit Salzsäure zum Stillstand gebracht werden kann.^[183-184] Bei der Verwendung eines Lyophilisators ist diese Variante jedoch ungeeignet, da dies auf Dauer eine Beschädigung des Gerätes verursachen würde. Daher wurden Alternativen gesucht, um eine weitere Reaktion nach einer Probenentnahme zu unterbinden. Im Fokus steht dabei eine schnelle Unterbindung weiterer Reaktionen, sowie aufgrund der hohen Probenanzahl eine simple und praktikable Anwendung. Der Einsatz eines Ionentauschers zeigte sich zu Beginn der Untersuchung als nicht praxistauglich. Eine zeitgenaue Unterbindung von schnelleren Reaktionen, wie mit Calciumhydroxid, kann hierbei nicht garantiert werden. Aus diesem Grund wurde versucht eine chemische Lösung zu finden. Hierfür wurden zwei Optionen intensiver untersucht. Zum einen die Zugabe eines Salzbildners, zum anderen der Einsatz eines Komplexbildners. Beide Varianten sollen dabei primär das katalytisch aktive Kation durch Bildung eines schwerlöslichen Salzes bzw. durch Bildung eines Komplexes aus der Reaktion entfernen.

Untersuchung von Salzbildnern

Die Zugabe eines Salzbildners soll eine schnelle und effiziente Entfernung des katalytisch aktiven Kations über Fällung als schwerlösliches Salz erfolgen. Als potentielle Substanzen wurden Natriumfluorid, Natriumphosphat sowie Natriumdihydrogenphosphat in Betracht gezogen. Durch Bildung des schwerlöslichen Calciumfluorids bzw. der Calciumphosphat-Salze soll die von Calciumhydroxid katalysierte Selbstaddition von Glycolaldehyd unterbunden werden.

Dafür wurde Glycolaldehyd jeweils mit dem entsprechenden Salz und Calciumhydroxid in Wasser umgesetzt, eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Zuvor muss jedoch ausgeschlossen werden, dass bereits die Salzbildner selbst eine katalytische Wirkung besitzen. Daher wurde deren Reaktion mit Glycolaldehyd vorab und ohne Zugabe einer Base in Wasser untersucht.

Hierbei konnte bereits bei Natriumfluorid ohne die Zugabe von Calciumhydroxid eine Umsetzung von Glycolaldehyd zu den Tetrosen beobachtet werden. Auch bei Natriumphosphat konnte eine katalytische Wirkung festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich bei Natriumphosphat eine unvollständige Derivatisierung, die in Verbindung mit der Bildung eines unlöslichen Feststoffes bei der Umsetzung mit BSTFA stehen könnte. Natriumdihydrogenphosphat im Gegenzug weist hingegen nur in geringen Maßen eine eigene katalytische Aktivität auf. Doch auch hier zeigt sich in den Experimenten die Bildung eines unlöslichen Feststoffes, sowie eine unvollständige Derivatisierung. Wie in Abb. 2.6 b) gezeigt ist, wurde weder das Signal des internen Standards noch das Signal des trimethylsilylierten Phosphats bei einer Retentionszeit von 10.0 Min erhalten. Der Unterschied zwischen Natriumphosphat und

Natriumdihydrogenphosphat in ihrer katalytischen Wirkung zeigt sich ebenso durch ihren unterschiedlichen pK_b -Wert. Aus diesem Grund sollte nicht nur der Fokus auf das Fällen des Kations liegen, sondern zusätzlich auch auf dem resultierenden pH-Wert nach Zugabe des Salzbildners.

Schlussendlich zeigt sich nochmals deutlich, dass die verwendeten Salzbildner nicht für den Abbruch der Formose-Reaktion geeignet sind. Mit Natriumfluorid und Natriumphosphat werden, wie in Abb. 2.6 zu sehen, weiterhin höherer Zucker gebildet, während bei Natriumdihydrogenphosphat keine vollständige Derivatisierung realisiert werden konnte.

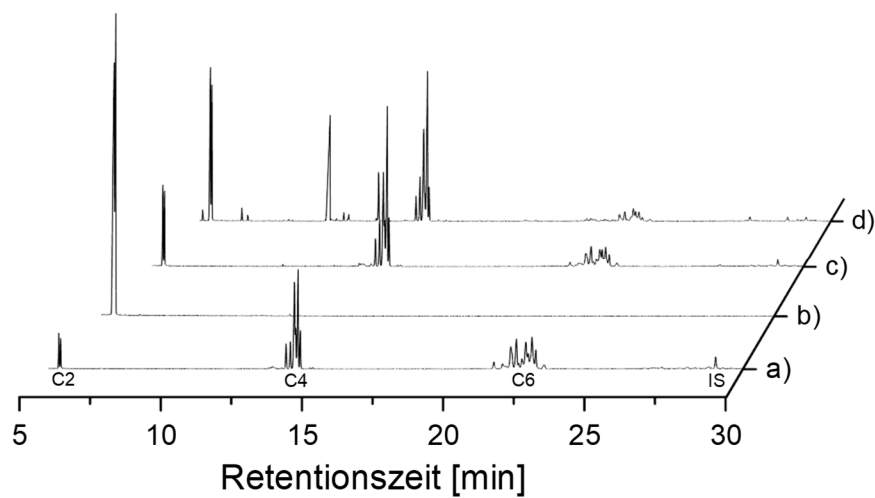


Abb. 2.6: Chromatogramme der Umsetzung von Glycolaldehyd mit den einzelnen Salzbildner zum Stoppen der Aldol-Reaktion. a) Ohne Salzbildner, b) Natriumdihydrogenphosphat, c) Natriumfluorid, d) Natriumphosphat.

Untersuchung von Komplexbildnern

Als weitere Variante die Formose-Reaktion abubrechen wurde der Einsatz von Komplexbildnern untersucht. Neben ihrer Fähigkeit Metallkationen zu komplexieren, sollte auch ihre Azidität einen positiven Effekt auf die Unterbrechung der Aldol-Reaktion haben. Die in Abb. 2.7 dargestellten Komplexbildner Citronensäure, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Nitrilotris(methylenphosphonsäure) (NTMP), das auch in Waschmitteln als Komplexbildner zum Einsatz kommt,^[185] wurden dafür mit Glycolaldehyd und Calciumhydroxid umgesetzt, eingefroren und lyophilisiert. Auch hier wurde eine katalytische Wirkung der einzelnen Verbindungen auf die Selbstaddition von Glycolaldehyd getestet.

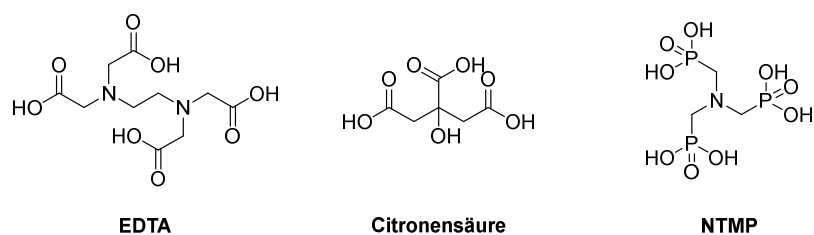


Abb. 2.7: Eingesetzte Komplexbildner zum Stoppen der katalysierten Selbstaddition von Glycolaldehyd durch Calciumhydroxid.

Erste Untersuchungen zur direkten Wirkung der eingesetzten Komplexbildner auf Glycolaldehyd zeigten, dass nur NTMP einen katalytischen Effekt auf die der Selbstaddition des C2-Zuckers hat. Bei einer Zugabe von Calciumhydroxid zeigten alle eingesetzten Stoffe eine deutliche Unterdrückung der Dimerisierung während der Gefriertrocknung über Nacht. Im Vergleich zur Umsetzung von Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid ohne Komplexbildner wurden bei der Zugabe von NTMP nur noch geringe Mengen an Tetrosen erhalten (Abb. 2.8 b)). Bei EDTA sowie Citronensäure als Additive wurden über Nacht keine höheren Zucker erhalten. Erst nach drei Tagen Reaktionszeit am Lyophilisator konnten Tetrosen nachgewiesen werden. Einen möglichen Nachteil der beiden Verbindungen stellen zusätzlich erhaltene Signale dar. Während bei EDTA ein weiteres Signal mit einer Retentionszeit von 30.9 Min erhalten wird, können bei Citronensäure zwei breite Signale bei 18.8 bzw. 19.8 Min festgestellt werden. Damit liegen die Signale der Komplexbildner außerhalb der für die Kohlenhydrate zu erwartenden Retentionszeiten und sollten deshalb keinen Einfluss auf die Qualifizierung und Quantifizierung ebendieser nehmen. Dementsprechend kann sowohl EDTA als auch Citronensäure zum Stoppen der Aldol-Reaktion verwendet werden. Praxistauglicher ist dabei, im Gegensatz zu der in Wasser schwerlöslichen EDTA, die wasserlösliche Citronensäure. Ein weiterer Vorteil ist, dass eine Stammlösung an Citronensäure verwendet werden kann, während EDTA für jede einzelne Probe eingewogen werden muss. Aus diesem Grund wurde Citronensäure für den Einsatz zur Unterbrechung der Formose-Reaktion ausgewählt.

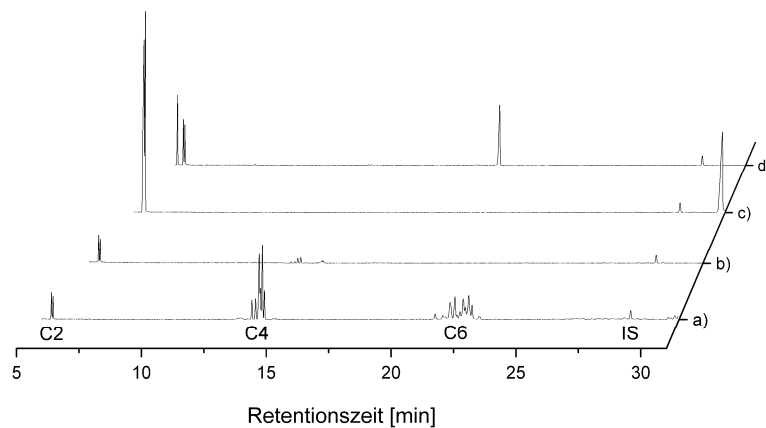


Abb. 2.8: Chromatogramme der Reaktionen mit verschiedenen Komplexbildnern zum Stoppen der Aldol-Reaktion über Nacht. a) Ohne Komplexbildner, b) NTMP, c) EDTA, d) Citronensäure.

2.1.3 Zusammenfassung der Methodenentwicklung

In diesem Kapitel der Arbeit konnte ein solides Fundament zur Analytik der Formose-Reaktion gelegt werden. Die bisherige bekannte qualitative Analyse von Kohlenhydraten über eine Derivatisierung mit EtOx und BSTFA wurde um weitere Komponenten, wie zum Beispiel die der C3-Ketopentose oder des gewC4 ergänzt. Zusätzlich konnte ein System zur quantitativen Analyse eingeführt werden, welches Ungenauigkeiten durch den Hintergrund bei kleinen Konzentrationen verhindert. Abschließend wurde durch die Verwendung von EDTA und Citronensäure zwei Varianten gefunden, um eine Feststoff-Feststoff-Reaktion während der benötigten Gefriertrocknung zu unterbinden. Dies ermöglicht es, gaschromatographisch tiefere mechanistische und kinetische Untersuchungen des Formose-Netzwerkes zu ausgewählten Zeitpunkten durchzuführen.

2.2 Selektivität innerhalb der Formose-Reaktion

Jeder, der in Abschnitt 1.3 beschrieben zu den Nucleosiden führende Synthesewege, benötigt Kohlenhydrate, die in der Formose-Reaktion gebildet werden können. Obwohl sich im gesamten Netzwerk über 40 Produkte bilden, werden in den vorgestellten Nucleosid Synthesen nur insgesamt drei verschiedene Zucker verwendet. Während Fischer, Orgel und Carell in ihren Routen die Ribose einsetzen, greifen Sutherland und Trapp auf Glyceraldehyd bzw. Glycolaldehyd zurück. Darüber hinaus ist das Leben, wie wir es kennen, homochiral. Dementsprechend werden, um zu den lebensnotwendigen Nucleosiden zu gelangen nur die der D-Zucker, also ein Enantiomer des Kohlenhydrates in den Reaktionen benötigt. Ohne eine chirale Induktion verläuft die Formose-Reaktion jedoch unspezifisch und racemisch ab. Dementsprechend werden die Zucker zu gleichen Teilen als D- und L-Enantiomer gebildet. Unter diesem Aspekt, sind viele der entstehenden Kohlenhydrate innerhalb des Formose-Netzwerkes Nebenprodukte und von geringer Bedeutung. Umso wichtiger sind stereoselektive Untersuchungen der Reaktion, um die Ausbeuten ausgewählter Produkte innerhalb des Netzwerkes zu erhöhen. Induziert werden kann Stereoselektivität zum Beispiel durch Additive, Zugabe eines entsprechenden Katalysators oder über eine Substratkontrolle.

In diesem Kapitel liegt der Fokus auf der Induktion der Stereoselektivität im Formose-Netzwerk. Es werden Untersuchungen durchgeführt, die es ermöglichen, die Formose-Reaktion und ihre Produktverteilung zu steuern.

2.2.1 Enantioselektive Katalyse der Formose-Reaktion

Methodenentwicklung zur enantioselektiven Trennung von Zuckern

In der organischen Chemie werden oftmals chirale Auxiliare verwendet um den stereochemischen Verlauf einer anschließenden Reaktion zu beeinflussen. Eines der wohl bekanntesten Auxiliare ist dabei das Evans-Auxilar, das für die stereoselektive α -Substitution von Carbonsäuren eingesetzt wird.^[186-187] Das Enders-Reagenz, ein nach Dieter Enders benanntes Auxilliar ist in Abb. 2.9 abgebildet. Die beiden Enantiomere (S) bzw. (R)-1-Amino-2-Methoxy-methylpyrrolidin, kurz SAMP bzw. RAMP, können unter anderem in stereoselektiven α -Alkylierungen von Ketonen und Aldehyden eingesetzt werden.^[188-189] Ähnlich zu einer DNPH-Derivatisierung werden die Substrate dabei in Hydrazone überführt. Anschließend kann über den Einsatz von enolatbildenden Basen, wie zum Beispiel Lithiumdiisopropylamin, die Stereoinformation der Methoxymethyl-Gruppe im Produkt induziert werden.

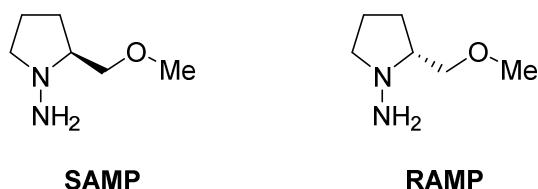


Abb. 2.9: Die Enders-Reagenzien SAMP bzw. RAMP.

Diese Reaktivität gegenüber Aldehyden kann ebenso für analytische Zwecke eingesetzt werden, wodurch eine Trennung von Enantiomeren möglich ist. Durch den Einsatz von enantiomerenreinem SAMP wurden die einzelnen Enantiomerepaare der Kohlenhydrate in Diastereomere überführt und eine verbesserte Trennung dieser ermöglicht. Um eine gaschromatographische Analyse zu realisieren, wurde die Flüchtigkeit der Analyten durch Trimethylsilylierung erhöht. Analog zur Oxim-Derivatisierung wurden dafür Glyceraldehyd und die Aldotetrosen mit SAMP umgesetzt und anschließend mit BSTFA silyliert. Da die entstehenden Hydrazone ebenfalls in (*E*)- und (*Z*)-Konfiguration vorliegen sollten, werden für jeden Zucker ebenfalls zwei Signale erwartet. Dies konnte jedoch bei der Derivatisierung mit SAMP und BSTFA nicht beobachtet werden.

Die Trennung der Enantiomere des Glyceraldehyds ist in Abb. 2.10 a) zu sehen. Mit einer Retentionszeit von 29.1 Min (D-Glyceraldehyd) sowie 30.6 Min (L-Glyceraldehyd) wurden die beiden Enantiomere auf einer 10 m β -Dex-Trennsäule getrennt. Die bisher literaturbekannte Trennung der DNPH-Derivate nach Breslow *et al.* konnte damit deutlich verkürzt werden. Für die Trennung von Glyceraldehyd benötigten sie 82 bzw. 110 Min.^[157] Die Erstellung einer Eichgerade ermöglichte zusätzlich eine Quantifizierung des Glyceraldehyds über die GC. Eine Auswertung des Enantiomerenverhältnisses ist jedoch nur ab einer Konzentration von ca. 5 mM möglich. Verhältnisse bei niedrigeren Konzentrationen werden dabei sehr vom Hintergrund beeinträchtigt und verzerren das Ergebnis.

Eine vollständige Trennung der C4-Enantiomere hingegen wurde über die SAMP-Derivatisierung nicht erreicht. Unter isothermalen Bedingungen bei 110 °C und 40 kPa Wasserstoff konnte L-Threose mit einer Retentionszeit von 42.5 Min und D-Threose mit 43.9 Min eluiert werden. Jedoch, wie in Abb. 2.10 b) zu sehen ist, findet eine Überschneidung der erhaltenen Signale statt. Zudem ist es nicht gelungen die beiden Enantiomere der Erythrose zu trennen. Beide Signale der D- bzw. L-Form werden bei einer Retentionszeit von 36.6 Minuten erhalten.

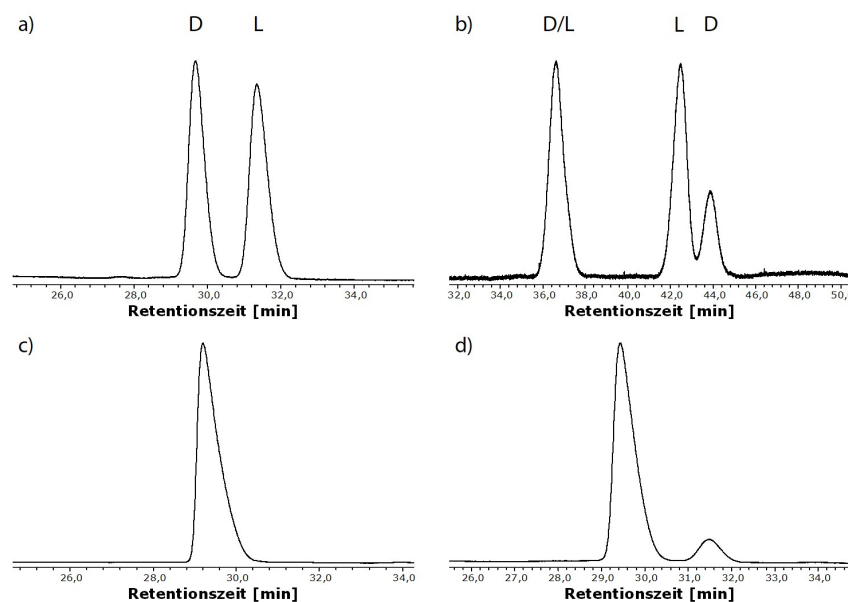


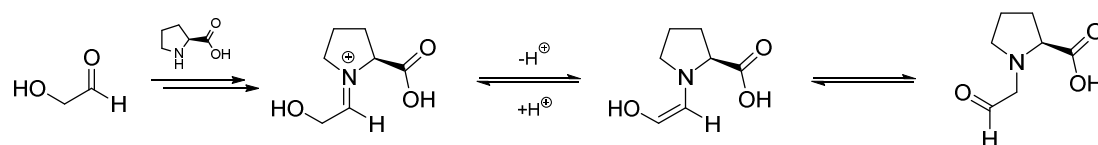
Abb. 2.10: Trennung der C3- und C4-Aldosen nach einer Derivatisierung über SAMP und BSTFA auf einer 10m β -Dex Trennsäule. a) Trennung D/L-Glyceraldehyd, isothermal 105 °C, 80 kPa Helium, b) Trennung der C4-Aldosen, isothermal 110 °C, 40 kPa Wasserstoff c) Signal des D-Glyceraldehyds d) Coinjektion des D-Glyceraldehyds zu einem racemischen Gemisch an Glyceraldehyd.

Chirale Induktion durch L-Aminosäuren

Eine genaue Herkunft der Homochiralität des Lebens ist bis heute nicht geklärt. Eine Theorie führt auf chirale Induktion durch extraterrestrische Aminosäuren zurück, welche im Murray und Murchison Meteoriten gefunden wurden. Die in den Proben identifizierten α -Methyl-Aminosäuren zeigten dabei einen kleinen Überschuss des L-Enantiomers und weisen somit die gleiche bevorzugte Konfiguration, wie die für das Leben essentiellen Aminosäuren auf. ^[190-191] Dieser kleine Überschuss könnte bereits ausreichen, um die Stereoinformation anschließend auf weitere Moleküle zu induzieren. Somit wäre es denkbar, dass diese identifizierten α -Methyl-Aminosäuren mit ihrem geringen Enantiomerenüberschuss ebenso in der Formose-Reaktion eine chirale Induktion ausübten. Bestätigen konnten dies Breslow *et al.*. Durch Zugabe von L-Aminosäuren gelang es ihnen, die Umsetzung von Formaldehyd mit Glycolaldehyd enantioselectiv zu beeinflussen. ^[157]

Auf diesen Ergebnissen aufbauend soll nun die in Abschnitt 2.2.1 entwickelte Methode zur Trennung von D- und L-Glyceraldehyd angewendet werden. Dafür wird der stereoselektive Einfluss von L-Aminosäuren auf die Umsetzung von Formaldehyd mit Glycolaldehyd analysiert. Formaldehyd und Glycolaldehyd werden dazu mit verschiedenen Aminosäuren umgesetzt und die Reaktion über zehn Tage bei Raumtemperatur durchgeführt. Als achirale Referenzprobe wird Calciumcarbonat eingesetzt. Da sich die dafür ausgesuchten Aminosäuren gut in Wasser lösen sollten, wurden in den Reaktionen

L-Serin, L-Threonin und L-Isoleucin verwendet. Zusätzlich wurde Prolin als vielverwendeter Organokatalysator in seiner D- und L-Konfiguration sowie als Racemat eingesetzt.^[192] Neben der Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Glyceraldehyd wurde die Reaktion zusätzlich über die EtOx-BSTFA Derivatisierung analysiert um eine quantitative Aussage über die erhaltenen Zucker zu treffen. Hierbei zeigte allein Calciumcarbonat eine deutliche Aktivität in der Reaktion. Während bei dem Calciumsalz auch Tetrosen und Pentosen erhalten werden konnten, wurden bei den Aminosäuren primär die Amadori-Produkte des Glycolaldehyds gebildet. Dabei reagiert das Carbonyl im ersten Schritt mit der Amino-Gruppe der Aminosäure zum Iminium-Ion. Über die Bildung des Enamins und eine anschließende Keto-Enol-Tautomerie wird abschließend das Carbonyl des 2-Amino-Acetaldehyds ausgebildet. Gezeigt ist diese Reaktion vereinfacht am Beispiel des L-Prolins in Schema 2.1.



Schema 2.1: Vereinfachte Darstellung der Amadori-Umlagerung am Beispiel der Reaktion von Glycolaldehyd mit L-Prolin.

Aufgrund der niedrigen katalytischen Wirkung der Aminosäuren und der damit verbundenen geringen Ausbeute an Glyceraldehyd sind die in Tabelle 2.1 erhaltenen Verhältnisse der Enantiomere über die durchgeführte SAMP-Derivatisierung nicht belastbar. Dies zeigt sich deutlich anhand der Ergebnisse der verwendeten Enantiomeren der Aminosäure Prolin. Während man jeweils das gespiegelte Verhältnis an D- und L-Glyceraldehyd erwartet, werden die jeweiligen Enantiomere in den Reaktionen unterschiedlich stark begünstigt. Darüber hinaus wird bei der Verwendung von racemischem Prolin nicht wie erwartet ein racemisches Gemisch an Glyceraldehyd gebildet, sondern es wird eine Präferenz bezüglich des L-Glyceraldehyds erhalten. Vergleicht man abschließend die erhaltenen Daten mit den Ergebnissen von Breslow zeigt sich allein bei L-Prolin ein analoges Enantiomerenverhältnis. Einen deutlichen Unterschied in den Ergebnissen zu Breslow zeigt hingegen L-Serin. Hierbei unterscheiden sich die erhaltenen Ergebnisse um 8.4 Prozentpunkte und begünstigen zudem das gegenteilige Enantiomer.

Die zusätzliche Analyse durch die EtOx-Variante zeigte, dass allein bei der Reaktion mit Calciumcarbonat genügend Glyceraldehyd gebildet wird, um eine deutliche Aussage über das Verhältnis der Enantiomere treffen zu können. Wie erwartet wird dabei jedoch ohne jegliche Stereoinformation ein racemisches Gemisch an Triose erhalten.

Tabelle 2.1: Erhaltene Enantiomerenverhältnisse der katalysierten Reaktion von Formaldehyd mit Glycolaldehyd.
 a) Durch Breslow *et al.* erhaltene Ergebnisse.^[157]

Aminosäure	Verhältnis, D/L	c(Glyceraldehyd) [mM]
L-Serin	41.9/58.1 (50.3/49.7) ^{a)}	0.2
L-Threonin	42.0/58.0	0.3
L-Isoleucin	50.1/49.9	0.2
D-Prolin	50.1/49.9	0.1
L-Prolin	30.2/69.8 (28.9/71.1) ^{a)}	0.1
D/L-Pro	38.9/61.1	0.1
CaCO ₃	50.0/50.0	8.7

2.2.2 Selektivität über den Einsatz verschiedener Substrate

Einen kritischen Punkt der Formose-Reaktion bildet bereits zu Beginn des Netzwerkes die Primärreaktion. In ihr reagiert Formaldehyd über eine Umpolungs-Reaktion zu Glycolaldehyd und ermöglicht somit die anschließenden Aldol-Reaktionen. Dementsprechend hat vor allem die Verfügbarkeit an Formaldehyd und seine Konzentration einen bedeutenden Einfluss auf die anschließende Reaktion. Socha *et al.* zeigten, dass ohne Verunreinigungen kleiner Kohlenhydrate oder geeigneter Katalysatoren die benötigte Umpolung nicht stattfindet und ausschließlich die Cannizzaro-Reaktion erfolgt.^[138] Aus diesem Grund werden für die Untersuchungen des Formose-Netzwerkes und ihrer Teil-Reaktionen zu Beginn Additive wie Glycolaldehyd, Glyceraldehyd oder 1,3-Dihydroxyaceton zugegeben um die Aldol-Reaktionen zu starten.^[180, 193] Ein sehr interessantes Additiv ist dabei 2,3-Dihydroxyfumarsäure. Bereits bei moderaten Temperaturen von 60 °C decarboxyliert diese zu Glycolaldehyd.^[142] Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser bietet sie somit eine langsame und kontinuierliche Quelle an C2-Bausteinen. Über eine schrittweise Hydrolyse des Cyanwasserstoff-Tetramers gebildet, würde sie darüber hinaus die Kohlenhydrat-Chemie mit der Nukleosid-Synthese und dem Citratzyklus verbinden.^[143]

Sagi *et al.* konnten bei ihren Untersuchungen durch die Verwendung von Dihydroxyfumarsäure eine hohe Selektivität gegenüber geradkettigen Ketosen bei Raumtemperatur feststellen. Dafür setzten sie die Lithium- und Cäsium-Salze der Säure unter anderem mit Formaldehyd und Glycolaldehyd um und konnten damit die C3- bzw. C4-Ketosen stereoselektiv erhalten.^[194]

Die Verbindung zur HCN-Chemie und die durch Sagi *et al.* gezeigte Selektivität bietet ein interessantes Fundament für weiteren Untersuchungen von Reaktionen mit 2,3-Dihydroxyfumarsäure. In den folgenden Abschnitten wird daher die Reaktion von 2,3-Dihydroxyfumarsäure mit unterschiedlichen Arten des Formaldehyds und ihre Auswirkung auf die Selektivität analysiert und beschrieben.

Grundlage dieser Überlegungen sind Nass-Trocken-Zyklen in Thermalquellen, wie z.B. Geysiren, in denen Formaldehyd durch die Trockenzyklen aufkonzentriert werden kann und sich somit auch die Derivate bilden lassen.

Einfluss von Derivaten des Formaldehyds auf die Selektivität in der Reaktion mit DHFS

Um den Einfluss der Substrate auf die Selektivität innerhalb der Formose-Reaktion zu untersuchen wurden Analoga des Formaldehyds mit 2,3-Dihydroxyfumarsäure als Additiv bei 60 °C umgesetzt und gaschromatographisch analysiert. Als Formaldehyd-Derivate wurden 1,3,5-Trioxan, Dimethoxymethan (DMM) sowie Formalin eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse in den einzelnen Reaktionen spiegeln dabei vor allem die Reaktivität der einzelnen Analoga wider.

In der Reaktion von Dihydroxyfumarsäure mit Trioxan, dem stabilsten der verwendeten Formaldehyd-Analoga, konnte primär die Bildung von Glycolaldehyd beobachtet werden. Zusätzlich kam es zu der Entstehung der beiden Aldotetrosen Erythrose sowie Threose. Innerhalb der Reaktion wird die Synthese der Threose während der zwei Stunden Reaktionszeit mit einer Konzentration von bis zu ca. 9.5 mM gegenüber der Erythrose mit ca. 7.7 mM begünstigt. Die nur in Spuren vorhandene Konzentration an C3-Zuckern zeigt, dass während der Reaktion nur geringe Anteile an Formaldehyd durch Trioxan freigesetzt werden. Zu gering ist dabei die Temperatur von 60 °C, um das stabile Trioxan aufzubrechen. Dies wird ebenso durch die Bildung der Aldotetrosen als primäre Folgeprodukte des Glycolaldehyds untermauert. Sie entstehen durch die Selbstaddition des gebildeten C2-Zuckers bei höheren Temperaturen. Abschließend zeigt sich, dass die beiden Substrate in der Reaktion durch die geringe Verfügbarkeit an Formaldehyd nur in minimalen Mengen miteinander reagieren. Dementsprechend findet eine vollständige Decarboxylierung der Dihydroxyfumarsäure zu Glycolaldehyd statt.

Mit Dimethoxymethan als Analogon zeigt sich eine deutliche Steigerung der Verfügbarkeit an Formaldehyd und damit auch der Reaktivität. Zwar ist immer noch Glycolaldehyd das Hauptprodukt, jedoch wurden weitere Zucker mit erhöhter Konzentration in der Lösung detektiert. Die Ausbeute der detektierten Threose wurde dabei auf bis zu 13.8 mM erhöht. Ebenfalls konnte die Konzentration an Erythrose auf 11 mM gesteigert werden. Zusätzlich wurden geringe Spuren an C5-Zucker sowie der gewinkelten Tetrose erhalten. Interessanterweise bildet abweichend von den Ergebnissen von Sagi *et al.* Glyceraldehyd als Triose mit einer Konzentration von bis zu 28 mM das meistgebildete Nebenprodukt. Wird eine Formalin-Lösung verwendet, verändert sich die Selektivität massiv im Vergleich zu den davor durchgeführten Reaktionen. Tetrosen werden hier nur noch in Spuren von bis zu 765 µM detektiert. Die Konzentration an Erythrose übersteigt dabei die der Threose. Die meist gebildete Tetrose ist mit bis zu 1.6 mM jedoch die Erythrulose, welche in den vorangegangenen Reaktionen nicht beobachtet wurde.

Die Ausbeute an C5-Zuckern wird auf eine Konzentration von bis zu 11.7 mM erhöht. Der größte Anteil fällt dabei mit bis zu 8.74 mM auf eine Substanz unbekannter Struktur mit einer Retentionszeit von 17.7 Min bzw. 18.3 Min. Die insgesamt stärkste Veränderung zeigt sich jedoch bei der Bildung von Glyceraldehyd. Dieser wird mit einer Konzentration von bis zu 123 mM erhalten und ist somit das Hauptprodukt der Reaktion.

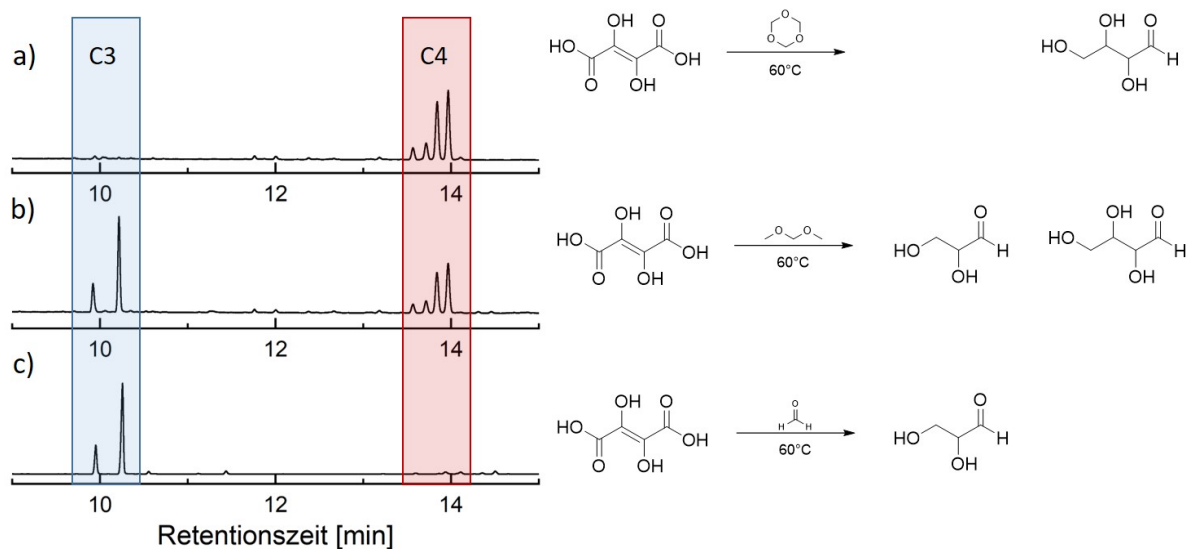
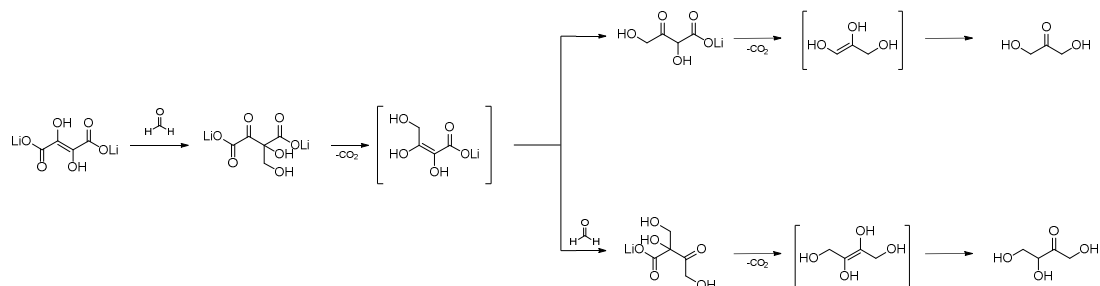


Abb. 2.11: Übersicht der gebildeten Triosen bzw. Tetrosen nach Derivatisierung über die EtOx-Variante in den durchgeführten Reaktionen mit DHFS. a) Reaktion mit Trioxan, b) Reaktion mit DMM, c) Reaktion mit Formalin.

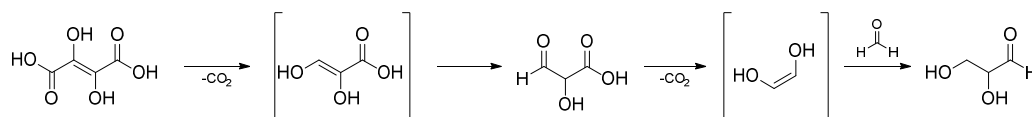
Damit unterscheiden sich die hier erhaltenen Ergebnisse deutlich von den durch Sagi *et al.* publizierten Ergebnissen. Mittels NMR-Experimenten zeigten sie eine vollständige Umsetzung von Lithiumdihydroxyfumarat mit Formalin in die entsprechenden C3- bzw. C4-Ketosen. Die Selektivität der Reaktion mit Dihydroxyfumarsäure bei Raumtemperatur konnten sie dabei durch die eingesetzten Äquivalente an Formaldehyd steuern. Wurde innerhalb der Reaktion ein Äquivalent Formalin eingesetzt, wurde 1,3-Dihydroxyaceton mit Hydrogencarbonat als alleiniges Nebenprodukt erhalten. Zwei Äquivalente des eingesetzten Formalins hingegen führten vollständig zur Bildung von Erythrulose. Dieses Verhalten der Selektivität wurde durch den in Schema 2.2 gezeigten Reaktionsweg erklärt. Dementsprechend findet im Verlauf der Reaktion primär eine Addition des Formaldehyds statt. Anschließend decarboxyliert die dabei entstandene β -Ketosäure. Je nach eingesetzten Äquivalenten von Formalin kann die Produktverteilung durch eine weitere Addition von Formaldehyd gesteuert werden. Befindet sich nur ein Äquivalent Formaldehyd in Lösung findet die zweite CO_2 -Abspaltung direkt statt. Werden zwei Äquivalente eingesetzt wird Formaldehyd erneut addiert und erst anschließend

decarboxyliert. Dadurch kann selektiv Erythrose erhalten werden.^[194] Die selektive Bildung der Ketosen erklärt sich durch die in dem Reaktionspfad entstehenden Enol-Spezies nach der jeweiligen Decarboxylierung. Diese bilden durch die Keto-Enol-Tautomerie das stabilere Carbonyl und somit die jeweiligen Ketosen aus.



Schema 2.2: Über ^{13}C -NMR Spektroskopie beobachtete Reaktion von Lithiumdihydroxyfumarat mit Formaldehyd zur Bildung von Dihydroxyaceton und Erythrose nach Sagi *et al.*^[194]

Abweichend von Sagi *et al.* wurden in den hier beschriebenen Reaktionen insgesamt fünf Äquivalente Formalin eingesetzt und sollten somit eine Addition begünstigen. Jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede in der Selektivität. Grund hierfür ist vermutlich der große Temperaturunterschied beider Reaktionen. In den hier beschriebenen Ergebnissen wird Abweichend zu Sagi *et al.* die Reaktion bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt, wodurch die Decarboxylierung der Säure stark beschleunigt wird. Dementsprechend konkurrieren selbst bei diesen Konzentrationen temperaturbedingt Decarboxylierung und die Addition an Formaldehyd. Da jedoch eine andere Produktverteilung als bei Sagi *et al.* beobachtet wird, muss zwingend ein anderer Reaktionsweg vorliegen. Daher wird vermutet, dass innerhalb der Reaktion anfänglich eine vollständige Decarboxylierung stattfindet. Dies würde, wie in Schema 2.3 gezeigt, zu der Bildung der Enol-Form des Glycolaldehyds führen. Anschließend wird durch die Addition von Formaldehyd an das reaktive Enol selektiv Glyceraldehyd gebildet und somit die hohe Ausbeute erklären. Abweichend davon würden vorangegangene Additionen von Formaldehyd, wie im von Sagi *et al.* beschrieben Reaktionsweg, in den C3- bzw. C4-Ketosen münden, die jedoch nicht beobachtet werden.



Schema 2.3: Reaktionsweg der DHFS mit Formaldehyd bei 60 °C. Eine vollständige Decarboxylierung mit anschließender Addition von Formaldehyd führt zu Glyceraldehyd.

Untermauert wird dieser Reaktionsweg durch die Bildung von Erythrose als bevorzugte Tetrose in der Reaktion mit Formalin. Aufgrund der hohen Temperatur findet eine vollständige Decarboxylierung der Säure statt und endet in der reaktiven Enol-Spezies. Eine verminderte Verfügbarkeit an freiem Formaldehyd, wie in den vorangegangenen Reaktionen mit Trioxan und Dimethoxymethan führt zur vermehrten Bildung an Glycolaldehyd, welches über eine Dimerisierung zu den Aldotetrosen führt. Mit der hohen Verfügbarkeit an Formaldehyd in Formalin wird dieses direkt addiert und Glyceraldehyd gebildet. Aufgrund der höheren Temperaturen kommt es anschließend in geringen Maßen erneut zu einer Aldol-Reaktion des gebildeten Glyceraldehyds und Formaldehyd, wodurch selektiv die Erythrose entsteht.

Im präbiotischen Kontext könnte diese Reaktion und die damit selektive Bildung von Glyceraldehyd von enormer Bedeutung sein. Vor allem in Bezug auf die in Abschnitt 1.3 beschriebenen Synthesen von Nucleosiden. In ihnen werden oftmals Glycolaldehyd und Glyceraldehyd für den Aufbau des Zuckergerüsts benötigt. Eine selektive Synthese des Glyceraldehyds, wie hier gezeigt, würde die vorgestellten Theorien weiter unterstützen und untermauern.

Einfluss von Formaldehyd-Analoga in Reaktion mit DHFS katalysiert durch CaCO₃ auf das Formose-Netz

Als weiterer Schritt wurde die zusätzliche katalytische Wirkung von Calciumcarbonat in den einzelnen Reaktionen der Formaldehyd-Analoga mit Dihydroxyfumaric acid untersucht. Damit sollte es möglich sein, die Reaktion nach der Decarboxylierung weiterzuführen, um höhere Kohlenhydrate zu erhalten. Interessanterweise scheint dabei jedoch das Calcium die Dihydroxyfumaric acid zu stabilisieren und ihre Decarboxylierung zu unterdrücken. Während in der Reaktion mit Trioxan ohne Katalysator die Säure bereits nach 30 Min Reaktionszeit vollständig reagierte, benötigt es in der Reaktion mit Calciumcarbonat über 90 Min. Zusätzlich wurden viele weitere unbekannte Signale mit Retentionszeiten im Bereich der Citronensäure, außerhalb der bekannten Zuckergruppen, erhalten. Dies könnte auf die Bildung verschiedener C5- bzw. C6-Zuckersäuren hindeuten. Die Ausbeuten der

erhaltenen Tetrosen veränderten sich im Vergleich zur nichtkatalysierten Reaktion nur leicht. So erhöhte sich die Konzentration von Threose nur geringfügig auf bis zu 13.6 mM, während sich die Konzentration an Erythrose mit bis zu 7.9 mM kaum veränderte. Jedoch konnte zusätzlich in der Reaktion auch Erythrulose detektiert werden. Innerhalb der 2 h Reaktionszeit steigt die Konzentration der Ketotetrose stetig auf bis zu ca. 11.1 mM an. Eine genaue Aussage zum Reaktionsweg der Bildung der Ketose ist nicht möglich. Da jedoch Glycolaldehyd nur in geringen Ausbeuten erhalten wird und zusätzlich keine C3-Zucker vorhanden sind, kann der Reaktionsweg über eine stetige Addition von Formaldehyd an Glycolaldehyd zur Bildung der Erythrulose ausgeschlossen werden. Naheliegender wäre eine Addition von Formaldehyd während oder vor einer Decarboxylierung der stabilisierten Säure. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Verwendung von Dimethoxymethan. Auch hier ist die Dihydroxyfumarsäure länger in der Reaktion enthalten. Erst nach 90 Min Reaktionszeit konnte kein Signal dieser mehr beobachtet werden. Analog zu der Reaktion mit Trioxan werden ebenfalls die gleichen unbekanntem Signale erhalten. Die Ausbeuten kleinerer Zucker sind bei der Verwendung von Calciumcarbonat geringer im Vergleich zu der Reaktion ohne Katalysator. So verringerte sich die Ausbeute der Aldotetrosen auf ca. 10.6 mM für die Threose und auf 6.7 mM für die Erythrose. Auch die Konzentration an Glycerinaldehyd zeigt sich rückläufig. So konnten nur noch maximal 2.7 mM erhalten werden. Dahingegen stiegen die Konzentrationen der Ketosen an. Erythrulose konnte mit einer Konzentration von bis zu 11.3 mM erhalten werden. Auch Dihydroxyaceton konnte diesmal mit einer Konzentration von bis zu 2.10 mM detektiert werden.

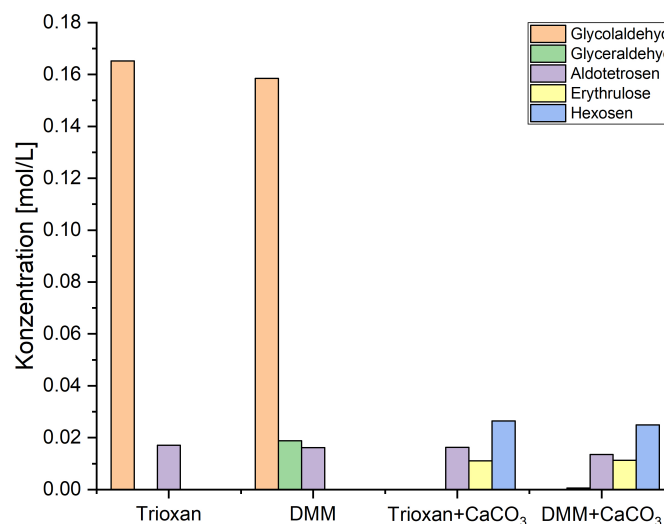
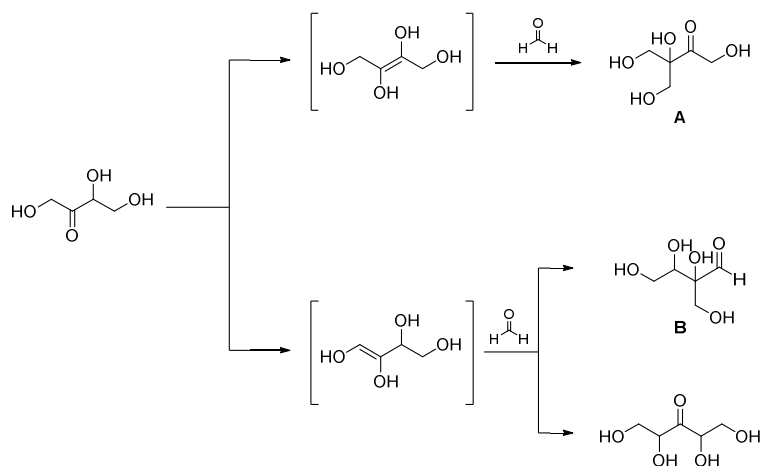


Abb. 2.12: Vergleich der erhalten Konzentrationen bei der Verwendung von Trioxan und DMM mit und ohne Calciumcarbonat. Zu sehen ist die Verschiebung hin zu höheren Zuckern durch die Zugabe des Katalysators.

Wird Calciumcarbonat zu der Reaktion mit Formalin und Dihydroxyfumarsäure gegeben ändern sich die Reaktionsverläufe deutlich. Wurde in der unkatalysierten Reaktion als Hauptprodukt noch Glyceraldehyd mit einer Konzentration von 123 mM erhalten, überwiegt Calcium-katalysiert ein C5-Zucker. Dieser konnte mit einer Ausbeute von bis zu 153 mM erhalten werden. Glyceraldehyd wird dabei nur noch mit einer Konzentration von bis zu 56.7 mM erhalten. Wie auch in den vorangegangenen Reaktionen steigern sich die Konzentrationen an Ketosen. Erythrose konnte mit einer Ausbeute von bis zu 14.9 mM und Dihydroxyaceton mit bis zu 13.8 mM erhalten werden. Aldotetrosen konnten hingegen nur noch in Spuren nachgewiesen werden.

Wie bei den unkatalysierten Reaktionen besitzt die Reaktivität des Formaldehyd-Analogons den größten Einfluss auf die Reaktion. So werden die meisten Aldol-Produkte in der Formalin-Reaktion gefunden. In allen drei durchgeführten Reaktionen mit Calciumcarbonat konnte die stabilisierende Wirkung des Calciums auf die Dihydroxyfumarsäure beobachtet werden. Die Säure konnte bis zu 60 Min länger in der Reaktion nachgewiesen werden. Diese stabilisierende Wirkung zeigt sich auch in der Produktverteilung. Unkatalysiert wird die Decarboxylierung priorisiert, sodass vor allem Aldosen über die Bildung des C2-Bausteins mit anschließender Selbstaddition entstehen. Mit Calcium werden hingegen vermehrt Ketosen gebildet. Dies weist auf den von Sagi *et al.* postulierten Reaktionsverlauf hin, in dem vor einer Decarboxylierung Formaldehyd addiert wird. Endprodukt dieser Reaktionskaskade ist wie in Schema 2.2 gezeigt die Erythrulose.

Zusätzlich können durch das anwesende Calciumcarbonat weitere Aldol-Reaktionen katalysiert werden. Dies wird vor allem in der Reaktion mit Formalin beobachtet. Dabei reagierte unter anderem die entstandene Erythrulose ein weiteres Mal mit Formaldehyd. Die dabei theoretisch entstehenden Produkte sind in Schema 2.4 gezeigt. Anhand des Massenspektrums werden die Strukturen 3-Hydroxymethyl-Erythrulose (**A**) und 2-Hydroxymethyl-Tetrose (**B**) den Retentionszeiten 17.5 und 17.6 Min bzw. 18.0 und 18.3 Min zugeordnet. Fehlende Referenzen verhindern jedoch eine eindeutige Identifizierung. Substanz **A** zeigt die intensivsten Signale im C5-Zuckerbereich und ist mit ca. 153 mM das Hauptprodukt der Reaktion. Eine quantitative Aussage über **B** konnte aufgrund überlappender Signale nicht getroffen werden. Die 3-Ketopentose wird nur in Spuren erhalten.



Schema 2.4: Mögliche Aldol-Reaktionen von Erythrose mit Formaldehyd zur Bildung von A, B und der 3-Ketopentose.

2.2.3 Zusammenfassung zur Substratinduzierten Selektivität bei der Reaktion mit DHFS

Der Fokus dieses Kapitels lag auf der Selektivität innerhalb der Formose-Reaktion. Mittels der Verwendung von SAMP wurde eine neue Trennmethode zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Glyceraldehyd entwickelt. Dadurch ist es möglich die D- und L-Form des C3-Zuckers gaschromatographisch zu trennen und analysieren. Die Enantiomere der Aldotriose werden dabei in das entsprechende Hydrazone überführt und nach anschließender Trimethylsilylierung als Diastereomere voneinander getrennt. Somit wurde die bisher von Breslow *et al.* bekannte HPLC-Trennung über die DNPH-Derivate um bis zu 80 Min verkürzt.^[157]

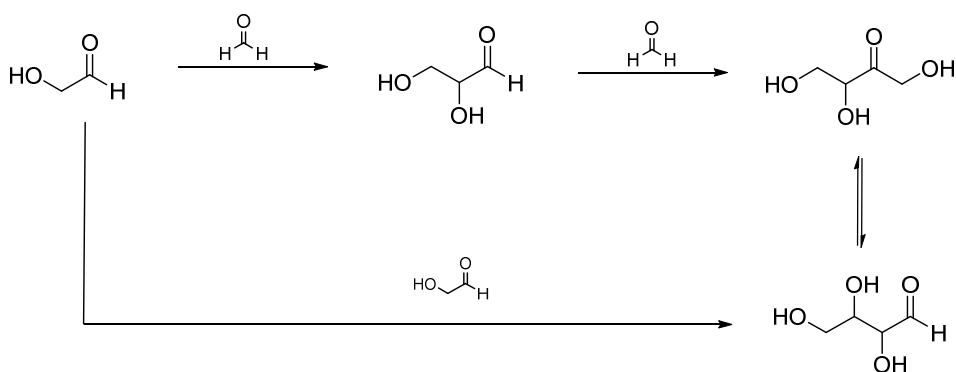
Die anschließend durchgeführten stereoselektiven Katalysen mit Aminosäuren als Katalysator zeigten jedoch den Nachteil dieser Analytik auf. Um eine fundierte Aussage über das Verhältnis der Enantiomere treffen zu können wird eine Konzentration des Analyten von über 5 mM benötigt. Allein die Reaktion mit Calciumcarbonat zeigte bei der Umsetzung von Formalin mit Glycolaldehyd die benötigte Aktivität mit einer entsprechenden Ausbeute. Nach einer Woche Reaktionszeit bei Raumtemperatur konnte Glyceraldehyd somit mit einer Konzentration von 8.7 mM erhalten werden. Das dabei gemessene Enantiomerenverhältnis entsprach mit 50:50 dem erwarteten Ergebnis eines racemischen Gemisches.

Untersuchungen mit unterschiedlichen Derivaten des Formaldehyds und 2,3-Dihydroxyfumarensäure bei 60 °C zeigten einen von Sagi *et al.* deutlich abweichenden Reaktionspfad.^[194] Während in ihrem gezeigten Weg primär Formaldehyd addiert und anschließend decarboxyliert wird, wird bei einer Temperatur von 60 °C die Decarboxylierung bevorzugt. Dabei kommt es bei der Verwendung der unreaktiveren Verbindungen 1,3,5-Trioxan und Dimethoxymethan bevorzugt zu einer Bildung von

Glycolaldehyd. Wird Formaldehyd in hoher Konzentration verwendet wird jedoch Glyceraldehyd als Hauptprodukt erhalten. Dies deutet auf eine vollständige Decarboxylierung der Dihydroxyfumarsäure mit einer anschließenden Addition von Formaldehyd hin. Da auf diese Weise Glyceraldehyd selektiv in hoher Ausbeute erhalten wird, könnte diese Reaktion für die Synthesen von Nucleosiden von enormer Bedeutung sein. Wie in Abschnitt 1.3 diskutiert, benötigen die Synthesen von Trapp und Sutherland den C3-Baustein, um entsprechende Nucleoside präbiotisch herzustellen. Möglich wäre dies in einem Szenario von Nass-Trocken-Zyklen in Thermalquellen.

Wird der Reaktion Calciumcarbonat zugegeben, ändert sich jedoch der Reaktionsweg erneut. Es konnte gezeigt werden, dass das eingesetzte Calcium stabilisierend auf die Säure wirkt und somit die Decarboxylierung vermindert abläuft. Dies hat zur Auswirkung, dass es die Addition von Formaldehyd bevorzugt wird, bevor eine Decarboxylierung stattfinden kann. Neben unbekanntem Zuckersäuren werden in diesen Reaktionen ebenfalls deutlich mehr Ketosen erhalten als in der analogen unkatalysierten Reaktion.

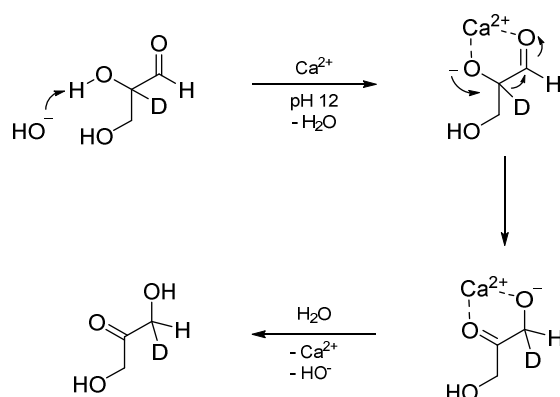
Ebenfalls zeigte sich in den Untersuchungen die Schwierigkeit, einzelne Reaktionswege gaschromatographisch nachzuvollziehen. Allein die Bildung von Erythrose kann bei einer Reaktion mit Glycolaldehyd und Formaldehyd, wie im folgenden Schema 2.5 gezeigt, auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Aus diesem Grund sind mechanistische Untersuchungen zur Formose-Reaktion notwendig, um einzelne Reaktionswege innerhalb des Netzwerkes besser nachzuvollziehen und verstehen zu können. Ansätze von mechanistischen Untersuchungen werden im nächsten Kapitel diskutiert.



Schema 2.5: Bildung der Erythrose auf unterschiedlichen Reaktionswegen innerhalb der Reaktion von Formaldehyd mit Glycolaldehyd.

2.3 Mechanistische Untersuchungen des Formose-Netzwerkes

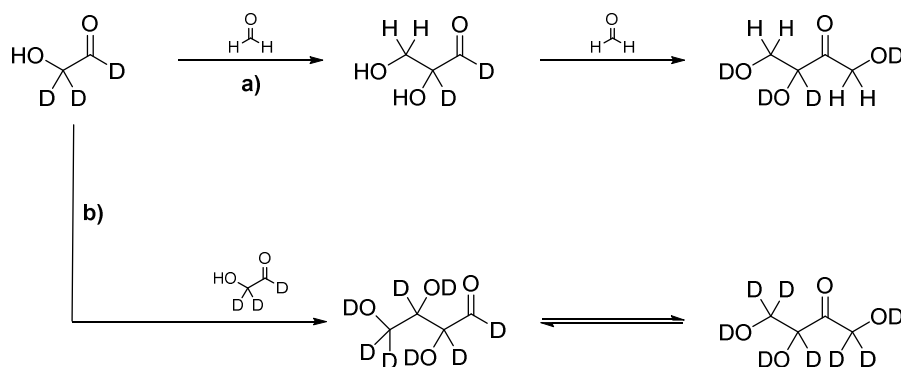
Die Problematik, das dichte Formose-Netzwerk an ablaufenden Reaktionen vollständig zu analysieren und nachzuerfolgen, ist vielseitig. Zum einen erschwert die Vielzahl an entstehenden Produkten mit struktureller Ähnlichkeit und gleichen funktionellen Gruppen die Analyse, zum anderen sind individuelle Synthesewege einzelner Produkte nur schwer nachvollziehbar. Neben den typischen Aldol- und Retro-Aldol-Reaktionen laufen zudem unterschiedlichste Umlagerungen ab, die einzelne Produkte ineinander überführen. Einige dieser stattfindenden Reaktionen wurden bereits in Abschnitt 1.4.2 vorgestellt. Mittels Isotopenmarkierung konnten bereits einzelne Reaktionswege aufgedeckt, nachvollzogen werden. Ricardo *et al.* zeigten 2006 zum Beispiel, dass in einer Formose-Reaktion mit 350 mM Formaldehyd in Deuteriumoxid keine Einlagerung an Deuterium stattfindet, solange Formaldehyd präsent ist.^[195] Dies widerspricht jedoch dem von Breslow postulierten autokatalytischem Zyklus, in dem Glyceraldehyd über eine Keto-Enol-Tautomerie in 1,3-Dihydroxyaceton überführt wird.^[144] Daraufhin konnten Appayee *et al.* 2014 ebenfalls mit Markierungsexperimenten einen 1,2-Hydrid-Shift innerhalb des von Breslow aufgestellten Katalyse-Zyklus aufdecken.^[145] Ihren Ergebnissen zufolge verläuft die Reaktion von Glyceraldehyd zu 1,3-Dihydroxyaceton nicht über eine normale Keto-Enol-Tautomerie ab, sondern über einen 1,2-Hydrid-Shift mit Hilfe der eingesetzten Calciumionen. Dieser Mechanismus des 1,2-Hydrid-Shifts ist in Schema 2.6 dargestellt. Dies erklärt auch, weshalb keine Einlagerung von Deuteronen des Lösungsmittels stattfindet.



Schema 2.6: Durch von Appayee *et al.* durchgeführte Markierungsexperimente gefundener Reaktionsweg bei der Isomerisierung von Glyceraldehyd in Dihydroxyaceton über einen 1,2-Hydrid-Shift.^[145]

Scrambling-Experimente, also die gleichzeitige Verwendung von markierten und unmarkierten Substraten, ermöglichen anhand erhaltener Massenspektren einzelner Produkte eine Identifizierung ihrer Syntheseroute.

Als Beispiel soll die unterschiedliche Bildung der Erythrose dargestellt werden, die innerhalb des Netzwerkes auf unterschiedlichen Wegen stattfinden kann. Über den in Schema 2.7 gezeigten Reaktionsweg a) führt eine kontinuierliche Addition von Formaldehyd an Glycolaldehyd und anschließend an dem dadurch gebildeten Glyceraldehyd zur Ketose. Alternativ kann die Bildung der Erythrose über eine Dimerisierung von Glycolaldehyd mit anschließender Tautomerisierung (Reaktionsweg b)) erfolgen. Welcher der beiden Wege dominiert und die bevorzugte Synthese von Erythrose abbildet, kann ohne eine Isotopenmarkierung jedoch nicht differenziert werden. Wird in der Reaktion nun ein Substrat wie zum Beispiel Glycolaldehyd in deuterierter Form eingesetzt, führen die beiden Reaktionswege zu unterschiedlichen Produkten. Diese können anschließend mittels Tandem-Massenspektrometrie anhand der Positionen der eingebauten Deuteronen identifiziert und ihr Anteil berechnet werden.



Schema 2.7: Unterscheidung der Synthesewege von Erythrose über eine kontinuierliche Addition von Formaldehyd an Glycolaldehyd (a) bzw. über eine Dimerisierung von Glycolaldehyd (b)) durch die Verwendung von deuteriertem Glycolaldehyd.

Um entsprechende Untersuchungen durchführen zu können, müssen jedoch vorab einige Aspekte beachtet werden. Im Fokus steht dabei die Wahl der deuterierten Spezies und das damit verbundene Lösungsmittel.

Als C1-Baustein besitzt deuteriertes Formalin den Vorteil der kommerziellen Verfügbarkeit. Dieses ist jedoch in der entsprechenden Formaldehyd-d₂ Lösung in Deuteriumoxid gelöst. Dementsprechend müsste die Reaktion ebenfalls in deuterierten Lösungsmitteln durchgeführt werden. Austausch von Deuteronen des Lösungsmittels mit dem undeuterten Glycolaldehyd durch eine Keto-Enol-Tautomere kann somit nicht ausgeschlossen werden und würde zu einer Verzerrung des Ergebnisses führen. Um diese Problematik zu umgehen, wurden die Scrambling-Experimente mit dem undeuterten C1- und dem deuterierten C2-Baustein durchgeführt.

2.3.1 Vorbereitungen

Synthese einer Formalin-Lösung in deuterierten Lösungsmitteln

Für die Herstellung des C1-Bausteins in deuterierten Lösungsmitteln wurde Paraformaldehyd thermisch gespalten und das dabei gebildete gasförmige Formaldehyd in eine 12 %ige CD₃OD-D₂O Lösung eingeleitet. Die Zugabe von Methanol-d₄ dient zur Stabilisierung des gelösten Formaldehyds und soll eine erneute Reaktion zu Paraformaldehyd sowie dessen Ausfällung verhindern. Mittels einer DNPH-Derivatisierung und anschließender Quantifizierung über die HPLC konnte auf diese Weise eine Formalin-Lösung mit einer Konzentration von 19.9 M erhalten werden. Über Nacht zeigte sich jedoch die Fällung eines farblosen, pulverförmigen Feststoffes, welcher sich am Boden absetzte. Demnach kam es über Nacht zu erneuter Bildung von Paraformaldehyd durch Polymerisierung des gelösten Formaldehyds. Dementsprechend wurde Formaldehyd bei dieser hohen Konzentration durch die Zugabe von Methanol nur unzureichend stabilisiert. Um jedoch nachfolgende Reaktionen präzise durchzuführen zu können wurde die Lösung vor jeder Verwendung filtriert und erneut quantifiziert.

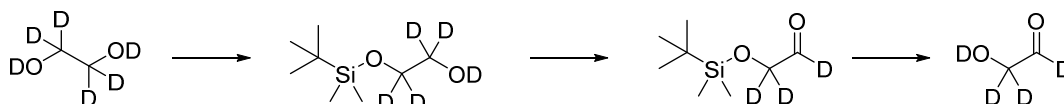
Synthese des deuterierten Glycolaldehyds-d₄

Glycolaldehyd bietet aufgrund seiner Struktur, theoretisch die Möglichkeit einer Einlagerung von Deuteronen über die Keto-Enol-Tautomerie. In D₂O gelöst sollten sich infolge eines Überschusses Deuteronen über die Zeit in das Glycolaldehyd einlagern und dieses zur vollständig deuterieren bringen. Für erste Untersuchungen wurde daher Glycolaldehyd in D₂O gelöst und über mehrere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Abschließend wurde die Reaktion mittels GC-MS direkt vermessen. Selbst nach 40 h Reaktionszeit konnte jedoch kein vollständiger Austausch erreicht werden. Auch eine katalytische Zugabe von Trifluoressigsäure oder 4-(Dimethylamino)pyridin, die eine Keto-Enol-Tautomerie begünstigen sollten, führte ebenfalls nicht zu einer vollständigen Deuterierung des gesamten Glycolaldehyds. Wiederholte Gefriertrocknung und Aufnahme in D₂O zeigten gleichermaßen keinen Erfolg. Eine Steigerung der Temperatur zur Förderung der Tautomerie zeigte sich ebenso als ungeeignet, da dies nur vermehrt zu einer Bildung von Tetrosen und Nebenprodukten führte. Dementsprechend konnte eine Deuterierung des Glycolaldehyds über den Pfad der Keto-Enol-Tautomerisierung nicht erfolgen.

Die unvollständigen Deuterierung über die Keto-Enol-Tautomerie begründet sich vermutlich in der Vielzahl an Strukturen, die Glycolaldehyd in wässriger Lösung ausbildet. Glushonok *et al.* konnten in NMR-Experimenten zeigen, dass das in Feststoff als Dimer vorliegende Glycolaldehyd nur langsam in Wasser aufgebrochen wird. Selbst nach 150 Min Reaktionszeit konnten sie noch Anteile des Dimers in

Lösung nachweisen. Zusätzlich wird nach einer Monomerisierung das entsprechende Hydrat gebildet, welches den Hauptbestandteil des gelösten Glycolaldehyds darstellt.^[163] Eine Keto-Enol-Tautomerisierung und die damit verbundene Einlagerung von Deuteronen kann anschließend nicht mehr erfolgen.

Ausgangsstoff einer Synthese bildet das kommerziell erhältliche Ethylenglycol. Über die Einführung einer Tert-Butyl-Dimethyl-Silylgruppe wird zu Beginn eine der zwei vorhandenen Hydroxygruppen geschützt, während die andere Hydroxygruppe in der Folge zum Aldehyd oxidiert wird. Abschließend kann das Glycolaldehyd-d₄ nach einer Entschützung erhalten werden. Um eine Reaktionskontrolle über NMR-Messungen zu ermöglichen und Kosten zu sparen, wurde die Syntheseroute mit undeuterten Substanzen getestet.



Schema 2.8: Syntheseroute zu Glycolaldehyd-d₄ über eine Schützung des Ethylenglycol-d₆ mit anschließender Oxidation und Entschützung.

Im ersten Reaktionsschritt wurde das Glycol mit einer TBSCl-Pyridin-Lösung selektiv geschützt und über eine Kugelrohr-Destillation aufgereinigt. Auf diese Weise konnten 1.15 g des geschützten Glycols erhalten werden. Die erste Oxidationsreaktion erfolgte über eine Parikh-Doering-Oxidation. Die anschließende Aufreinigung des Produktes erfolgte ebenfalls über eine Kugelrohr-Destillation. Das gewünschte Produkt des geschützten Glycolaldehyds konnte dabei allerdings nicht erhalten werden. Auffällig zeigte sich jedoch eine Gelbfärbung der Reaktionslösung während der Destillation bei 80 °C. Innerhalb der Formose-Reaktion weist eine gelbliche Verfärbung der Reaktionslösung, der sogenannte „Yellowing Point“, auf eine Dekomposition der Reaktionsprodukte hin. Auch in der vorliegenden Aufreinigung liegt es im Bereich des Möglichen, dass die bei der Aufreinigung verwendete Temperatur zu Aldol-Reaktionen bzw. zu Abbaureaktionen des entstandenen Aldehyds führten.

Die Aufreinigung des erhaltenen Produktes ist die zentrale Problematik der synthetischen Herstellung des deuterierten Glycolaldehyds. Da zu jeder Zeit ein potentieller Protonen-Deuteronen-Austausch verhindert werden muss, wurde bereits zu Beginn der Syntheseplanung eine säulenchromatographische Aufreinigung ausgeschlossen. Die Alternative, eine Aufreinigung über eine Destillation der Produkte, zeigte jedoch aufgrund der dabei benötigten Temperaturen ebenfalls Limitationen auf.

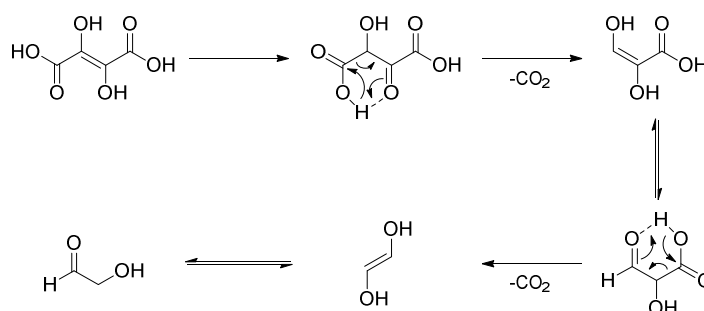
Als Alternativroute wurde versucht, Glycol über einen direkten Weg zu oxidieren. Dadurch lassen sich die Anzahl der Reaktions- und Aufreinigungsschritte reduzieren und sollten Nebenreaktionen minimieren. Hierfür wurde auf die Swern-Oxidation zurückgegriffen. Sie hat den Vorteil, dass sich die in ihr verwendeten Substanzen leichter entfernen lassen sollten, als der in der Parikh-Doering eingesetzte Pyridin-Komplex. So wird das zur Oxidation benötigte Oxalylchlorid in der Reaktion zu Kohlenstoffmonoxid und Kohlenstoffdioxid abgebaut, während das eingesetzte DMSO zu Dimethylsulfid reduziert wird.

Das dabei erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung über die EtOx-BSTFA Derivatisierung mittels GC analysiert. Hierbei zeigte sich, dass das gewünschte Glycolaldehyd nur in geringen Mengen erhalten wurde. Der Großteil des untersuchten Rohproduktes bestand weiterhin aus Glycol. Daher wurde geschlossen, dass bei der Reaktion vermehrt Glycol doppelt oxidiert und somit bevorzugt Glyoxal gebildet wird. Dadurch wird das eingesetzte Oxidationsmittel verbraucht ohne das weiter vorhandene Glycol zu oxidieren. Da das primär entstandene Glyoxal leicht flüchtig ist, wurde dieses vermutlich bei der Entfernung des Lösungsmittels am Feinvakuum ebenfalls aus der Reaktion entfernt wurde und somit nicht mehr über die GC detektiert werden konnte.

Beide durchgeführten Synthesewege zeigten Schwierigkeiten bei der Durchführbarkeit der selektiven Synthese von Glycolaldehyd. Während eine Schützung des Glycols eine selektive Oxidation ermöglicht, erschwert die Keto-Enol-Tautomerie die Aufreinigung des erhaltenen Produktes sowie die daraufhin benötigte Abspaltungsreaktion der Schutzgruppe. Eine direkte Oxidation des Glycols wird durch das Vorhandensein einer weiteren Hydroxygruppe erschwert. Dadurch ist es nahezu unmöglich Glycol selektiv auf einer Seite zu oxidieren, während die zweite Hydroxygruppe unangetastet bleibt.

Synthese des deuterierten Glycolaldehyds über 2,3-Dihydroxyfumarsäure

Eine weitere Alternative zu den in vorangegangenen Abschnitten diskutierten Syntheserouten wurde bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben: Die Verwendung von 2,3-Dihydroxyfumarsäure als Precursor für Glycolaldehyd. Der große Vorteil der Dihydroxyfumarsäure besteht darin, dass die vorhandenen Protonen des Lösungsmittels durch eine Keto-Enol-Tautomerie zu Beginn der Decarboxylierung, wie in Schema 2.9 zu sehen, in das Rückgrat der Kohlenstoffkette eingebaut werden. Wird die Decarboxylierung jedoch in Deuteriumoxid durchgeführt, werden dementsprechend selektiv Deuteronen in das Grundgerüst der Dihydroxyfumarsäure eingebaut.



Schema 2.9: Mechanismus der Decarboxylierung nach Bildung des Carbonyls über eine Keto-Enol-Tautomerie von 2,3-Dihydroxyfumarsäure bei einer Temperatur über 60 °C.

Um jedoch den Deuterierungsgrad des entstehenden Glycolaldehyds zu analysieren wurde zu Beginn getestet, ob 2,3-Dihydroxyfumarsäure direkt eingesetzt werden kann oder eine vorangestellte Deuterierung vollzogen werden muss. Durch Lösen der Säure in CD_3OD und anschließende Fällung mittels Deuteriumoxid sollten sich die enthaltenen Protonen und Kristallwasser leicht durch Deuteronen des Lösungsmittels austauschen lassen.

Um anschließend den Deuterierungsgrad zu überprüfen, wurde eine Decarboxylierung der deuterierten sowie der undeuterierten Säure bei 60 °C durchgeführt. Nach jeweils 15 Min Reaktionszeit wurde eine Probe der Reaktionen entnommen, derivatisiert und analysiert. Anschließend konnte anhand des Massenspektrums der erhaltenen Substanzen der Deuterierungsgrad abgeschätzt werden. In beiden Reaktionen zeigten sich minimale Mengen an C4-Zuckern, die durch eine Dimerisierung des entstandenen Glycolaldehyds gebildet wurden. Dabei zeigte sich wie erwartet das Signal des $[\text{M}+5]^+$ -Signal als intensivste Signal der jeweiligen Molekülpeaks. Dementsprechend wird in beiden Fällen die vollständig deuterierte Form den Hauptbestandteil des entstandenen Glycolaldehyds ausbilden. Bei der undeuterierten Variante konnte jedoch das $[\text{M}+4]^+$ Signal mit einer Häufigkeit von ca. 16 % im Vergleich zum $[\text{M}+5]^+$ Signal erhalten werden. Bei der deuterierten Form der

Dihydroxyfumarsäure reduzierte sich dieses Signal auf ca. 5 %. Dies zeigt, dass durch das Lösen in Methanol- d_4 und erneutem Ausfällen mit Deuteriumoxid der Anteil an Deuteronen im Molekül deutlich gesteigert werden kann und somit das Glycolaldehyd fast ausschließlich in seiner deuterierten Form erhalten wird. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass in den geplanten Scrambling-Experimenten Protonen allein durch die Reaktion mit Formaldehyd in das Grundgerüst der entstehenden Zucker eingelagert werden.

2.3.2 Erste Scrambling-Experimente mit Formalin und DHFS

Mit Formaldehyd als undeuteriertem C1-Baustein in einer deuterierten Lösung sowie Dihydroxyfumarsäure als Precursor für den deuterierten C2-Baustein, lassen sich nun mechanistische Untersuchungen durchführen. Dadurch lassen sich genaue Synthesewege bzw. ihre Anteile einzelner Produkte innerhalb der durchgeführten Reaktionen durch die erhaltenen Massenspektren nachvollziehen.

Für die ersten mechanistischen Untersuchungen wurde die CH_2O/D_2O -Lösung mit Dihydroxyfumarsäure ohne die Zugabe eines Katalysators bei 60 °C in Deuteriumoxid umgesetzt. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde eine Probe aus der Reaktionslösung entnommen, derivatisiert und analysiert. Dabei zeigte sich vor allem die Bildung des C3-Zuckers Glyceraldehyd. Über die, durch die GC-Orbitrap erhaltenen, hochaufgelösten Massenspektren (Abb. 2.13) konnte eine vollständige Bildung des Glyceraldehyds- d_2 nachgewiesen werden. Dementsprechend wurde nur die in Abb. 2.13 a) gezeigten Massensignale des doppelt deuterierten Glycolaldehyds beobachtet. Dabei zeigt sich deutlich ein +2 Shift der Massen im Vergleich zum undeuterierten C3-Zucker (Abb. 2.13 c)). Wie erwartet setzt sich das gebildete Glyceraldehyd aus einem undeuterierten C1-Baustein sowie einem deuterierten C2-Baustein zusammen. Die Bestimmung der genauen Positionen der Deuteronen konnte über die Fragmentierung erfolgen. In Abb. 2.13 b) ist die „Kopfgruppe“ des Glyceraldehyds nach einem Verlust einer $[CH_2Si(CH_3)_3]^-$ -Gruppe gezeigt. Auch hier ist der +2 Shift im Vergleich zum undeuterierten Fragment (Abb. 2.13 d)) deutlich zu erkennen.

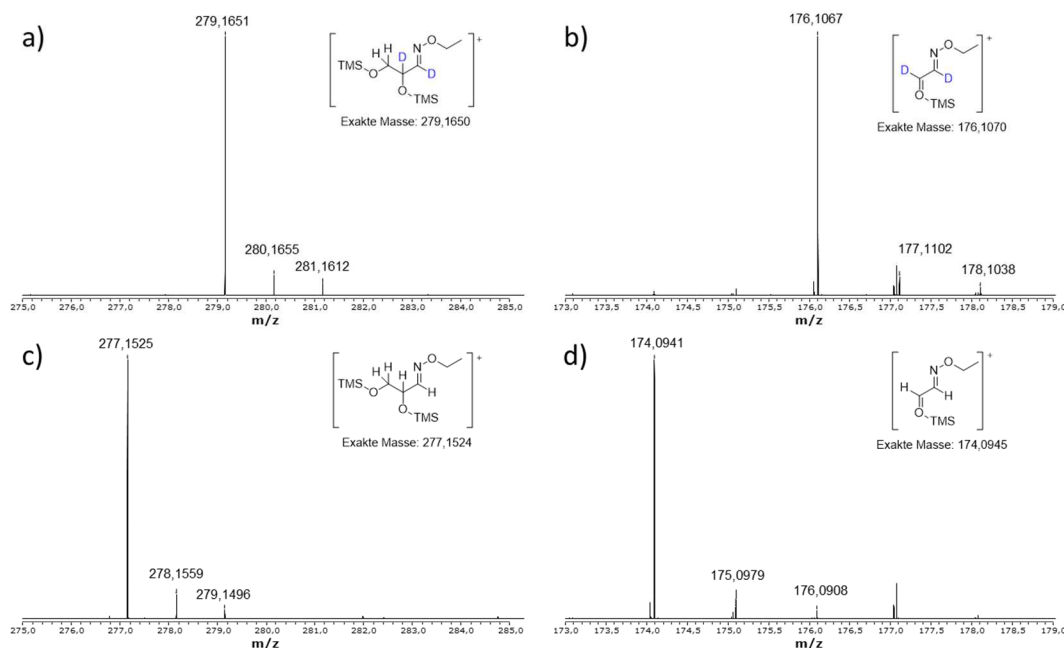


Abb. 2.13: Erhaltene Massenspektren von Glyceraldehyd-d₂ im Vergleich zu der undeuterten Spezies. a) Molekülpeak des Glyceraldehyd-d₂, b) Fragmentation nach Verlust einer [CH₂Si(CH₃)₃] Gruppe von Glyceraldehyd-d₂, c) Molekülpeak des undeuterten Glyceraldehyds, d) Fragmentation nach Verlust einer [CH₂Si(CH₃)₃] Gruppe von Glyceraldehyd.

Eine alternative Bildung über die Abspaltung von Formaldehyd aus Erythrulose mittels Retro-Aldol-Reaktion konnte durch die Abwesenheit höherer Zucker ausgeschlossen werden.

Wie bereits in Abschnitt 2.2.2 diskutiert, ist es möglich, Glyceraldehyd innerhalb der durchgeführten Reaktion mit Formaldehyd und Dihydroxyfumarsäure über zwei unterschiedliche Mechanismen zu erhalten. Zum einen über den von Sagi *et al.* beschriebenen Reaktionspfad, in dem die Addition von Formaldehyd noch vor einer zweiten Decarboxylierung stattfindet.^[194] Zum anderen über eine vollständige Decarboxylierung mit anschließender Addition an das aus der Decarboxylierung resultierende C2-Enol. Das in Abb. 2.13 gezeigte hochaufgelöste Massenspektrum bekräftigt nun den bereits vermuteten Reaktionspfad der vollständigen Decarboxylierung. Weder das stabilere Dihydroxyaceton noch die Zwischenstufe nach einer Decarboxylierung und Formaldehyd-Addition konnten innerhalb der Reaktionsanalyse gefunden werden.

Um höhere Zucker zu generieren wurde in einer weiteren Reaktion Kaliumcarbonat als Katalysator eingesetzt. Erneut wurde die Reaktion für eine Stunde bei 60 °C durchgeführt und anschließend aus der leicht gelblich gewordenen Lösung eine Probe entnommen. Nach Derivatisierung und Analyse der Reaktionsmischung konnten beide Triosen sowie Erythrulose erhalten werden. Zusätzlich wurden die gewinkelten Zucker 2-Hydroxymethyl-Glyceraldehyd (gewC4) und ebenso

3-Hydroxymethyl-Erythrose identifiziert. Die beiden Aldotetrosen, Erythrose und Threose, wurden in der Reaktionsmischung nicht beobachtet. Eine Übersicht der entstandenen Produkte ist in Abb. 2.14 abgebildet. Wie bereits in der vorangegangenen Reaktion zeigt sich, dass Glyceraldehyd selektiv aus einem C2 und einem C1-Baustein zusammen gesetzt wird. Auch das erhaltene Dihydroxyaceton setzt sich aus zwei Deuteronen sowie vier Protonen im Grundgerüst zusammen. Die beiden identifizierten Tetrosen zeigten jeweils den fast vollständigen Einbau eines einzelnen Deuterons. Allein Erythrose enthält zu 2 % ein weiteres Deuteron in seiner Struktur. Der gewinkelte C5-Zucker, 3-Hydroxymethyl-Erythrose, zeigte jedoch keine Einlagerung von Deuterium.

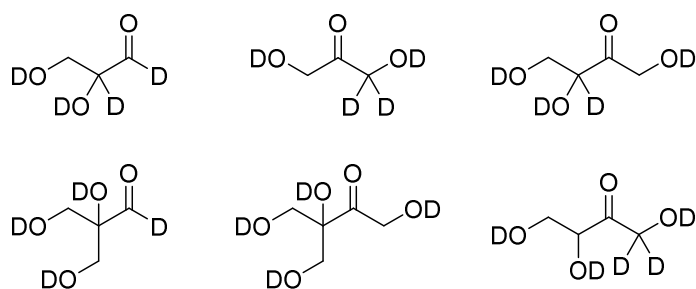


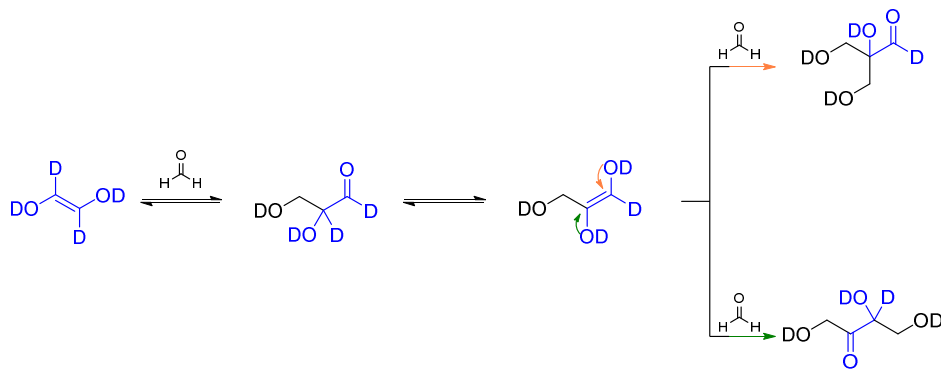
Abb. 2.14: Übersicht der gefundenen Produkte bei der Reaktion von Formaldehyd mit Dihydroxyaceton katalysiert durch Kaliumcarbonat bei 60 °C.

Somit weist mit Ausnahme von Erythrose jeder identifizierte Zucker eine einheitliche Einlagerung an Deuteronen im Grundgerüst auf. Dadurch kann geschlussfolgert werden, dass alle Komponenten bis auf die Aldoketose über einen gemeinsamen Syntheseweg gebildet werden.

Bildung der Tetrosen Erythrose und gewC4

Den Beginn der Bildung von Tetrosen bildet die Addition von Formaldehyd an das C2-Enols des Glycolaldehyds. Das daraus resultierende Glyceraldehyd kann anschließend über zwei weitere Wege Formaldehyd addieren. Wird das Formaldehyd an Position 2 addiert, wie es in Schema 2.10 am orangenen Weg zu sehen ist, wird gewC4 gebildet. Eine weitere Addition von Formaldehyd kann hier jedoch aufgrund des Fehlens eines α -Wasserstoffes nicht mehr stattfinden. Der gebildete Zucker kann daher nur noch als Elektrophil in einer Aldol-Reaktion teilnehmen oder alternativ in einer Canizzarro-Reaktion reduziert bzw. oxidiert werden.

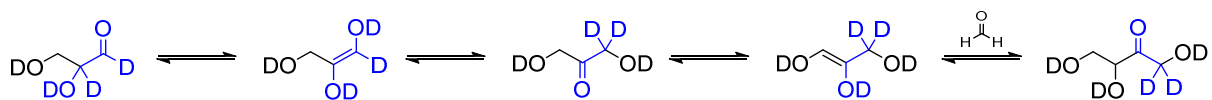
Verläuft die Addition von Formaldehyd an der C1-Position, wie der grüne Weg anzeigt, entsteht die Erythrose. Beide über diesen Reaktionspfad gebildeten Tetrosen beinhalten nur noch ein Deuteron in ihrer Grundstruktur. Untermuert wird der dargestellte Weg durch die erhaltenen hochaufgelösten Massenspektren der vorangegangenen Experimente.



Schema 2.10: Bildung der beiden Tetrosen über die Addition von Formaldehyd an das Enol des Glyceraldehyds. Addition an C2-Position zur Bildung des gewinkelten C4-Zuckers (orange). Addition von Formaldehyd an die C1-Position, die zur Bildung von Erythrose führt (grün).

Alternativ kann jedoch das gebildete Glyceraldehyd zu Dihydroxyaceton isomerisieren, welches ebenfalls in der Mischung detektiert wurde. Da bei der durchgeführten Reaktion mit Kalium kein koordinierendes Kation eingesetzt wurde, bildete sich die Ketose dabei vermutlich über die Keto-Enol-Tautomerie und nicht über den Mechanismus des in Abschnitt 1.4.2 diskutierten 1,2-Shifts.

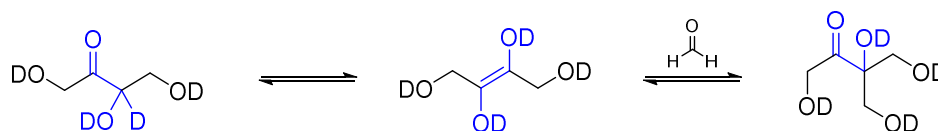
Ausgehend von Dihydroxyaceton kann sich anschließend erneut das 1,2-Enol ausbilden und nach Addition von Formaldehyd ebenso zur Erythrose führen. Erfolgt diese Enolisierung jedoch über die protonierte Seite entsteht wie in Schema 2.11 gezeigt die Erythrose mit zwei Deuteronen in ihrer Struktur, die einem Anteil von 2 % ebenfalls in der Reaktion beobachtet wurde.



Schema 2.11: Reaktionspfad in Deuteriumoxid zur zwei Deuteronen beinhaltenden Erythrose. Dieser Reaktionsweg ist für 2 % der Bildung von Erythrose beteiligt.

Bildung der Pentose

Erythrose weist zwei asymmetrische α -Wasserstoffe auf und kann dementsprechend über eine Keto-Enol-Tautomerie zwei Regioisomere ausbilden, das 1,2- und das 2,3-Enol. Aufgrund der hohen Temperatur und der schwachen Base wird dabei bevorzugt das symmetrische 2,3-Enol als das thermodynamisch stabilere und damit höhersubstituierte Enol gebildet. Dadurch wird bereits das letzte verbliebene Deuteron in der Kohlenstoffkette entfernt. Über beide Seiten des Endiols wird nun bei Addition von Formaldehyd das Stereoisomer der Apiose gebildet. Alle Deuterone des Glycolaldehyds werden während dieser Reaktionskaskade entfernt, sodass am Ende nach der Derivatisierung allein die Protonen der angelagerten Formaldehyd-Moleküle in der Struktur wiederzufinden sind. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von nur 2 % der Erythrose mit zwei Deuterone wurde die theoretisch mögliche 3-Hydroxymethyl-Erythrose mit ebenfalls zwei Deuterone nicht gefunden.



Schema 2.12: Aldol-Reaktion von Erythrose mit Formaldehyd über das thermodynamisch stabilere 2,3-Enol zur Bildung von 3-Hydroxymethyl-Erythrose.

Abschließend wurde jeder Syntheseweg der gebildeten Produkte, durch die durchgeführten Scrambling-Experimente und die dazu erhaltenen hochaufgelösten Massenspektren, nachvollzogen. Es war möglich, wie im Fall der Erythrose, den genauen Anteil des jeweiligen Reaktionsweg zu bestimmen.

Das Interessante bei der Reaktion von Formaldehyd mit 2,3-Dihydroxyfumarsäure zeigt sich jedoch darin, dass sie im Vergleich zur normalen Formose-Reaktion eine bemerkenswerte Selektivität erzeugt. Während bei einer direkten Verwendung von Glycolaldehyd eine deutlich größere Produktverteilung erhalten wird, zeigen sich hier selbst bei einer katalysierten Reaktion bevorzugt die Hauptprodukte einer einzelner Reaktionskaskade. Auslöser dafür könnte die vollständige Decarboxylierung der Säure bei höheren Temperaturen sein. Diese endet in der sehr reaktiven Enol-Spezies des Glycolaldehyds, welches anschließend direkt mit einem im Überschuss vorhandenen Formaldehyd-Molekül reagiert. Ebenso wird jedes weitere gebildete Enol anschließend schnell von Formaldehyd abgefangen, sodass Formaldehyd allein das bevorzugte Elektrophil innerhalb der Reaktionslösung darstellt.

Wird im Gegenzug Glycolaldehyd direkt in der Reaktion verwendet, kann dieses ebenfalls als Elektrophil in der Reaktion angegriffen werden. Somit sind höhere Zucker deutlich schneller zugänglich als über den Reaktionsweg einer kontinuierlichen Addition von Formaldehyd. Mit Glycolaldehyd als Substrat können bereits nach wenigen Minuten Reaktionszeit die Aldotetrosen durch Selbstaddition in der analogen Reaktion erhalten werden.

2.3.3 Zusammenfassung

Der Fokus dieses Kapitels lag auf der Untersuchung von Reaktionsmechanismen durch den Einsatz von markierten Substraten in Scrambling-Experimenten. Da die in der Formose-Reaktion gebildeten Zucker auf unterschiedlichsten Wegen innerhalb des Netzwerkes entstehen können wurde eine Möglichkeit gesucht, einzelne Reaktionswege direkt nachzuverfolgen und zu charakterisieren. Erste Untersuchungen konnten mittels Isotopenmarkierung durchgeführt werden. Die Schwierigkeit dabei zeigte sich in der Wahl der zu markierenden Substrate und ihrer Herstellung. Verschiedene Syntheserouten wurden konzipiert um Glycolaldehyd- d_4 herzustellen, endeten jedoch spätestens bei der Aufreinigung der erhaltenen Produkte. Dabei galt es, Protonen-Austauschreaktionen mit Lösungsmitteln sowie vorzeitige Selbstadditions-Reaktionen zu verhindern. Mit 2,3-Dihydroxyfumarsäure wurde ein Substrat gefunden, welches ab Temperaturen um die 50 °C selbstständig decarboxyliert und dabei Glycolaldehyd ausbildet. Bei der unkatalysierten Umsetzung von Formalin in deuterierten Lösungsmitteln mit 2,3-Dihydroxyfumarsäure konnte Glyceraldehyd- d_2 als alleiniges Produkt aus undeutertem C1- und deuteriertem C2-Baustein erhalten werden. Bestätigt wurde dies mit hochaufgelösten Massenspektren. Darüber hinaus war es möglich durch die erhaltenen Fragmente die genaue Position der Deuteronen zu bestimmen. Dabei wurde des Weiteren der bereits in Schema 2.3 beschriebene Reaktionsweg über eine vollständige Decarboxylierung mit anschließender Addition eines Formaldehyds bekräftigt.

Anschließend wurde Kaliumcarbonat als Katalysator in der Reaktion zugesetzt, um die Reaktion weiter voranzutreiben und ebenfalls höhere Zucker zu erhalten. Dabei zeigten sich vor allem die Produkte einer einzelnen Reaktionskaskade als Hauptprodukte. Angefangen bei der Enol-Spezies des Glycolaldehyds wird kontinuierlich Formaldehyd an die einzelnen Zwischenprodukte addiert. Dabei erfolgte bei jeder weiteren Enolisierung und Addition von Formaldehyd die Substitution eines Deuteriums am Grundgerüst des Kohlenhydrates. Schlussendlich wurden alle Deuteronen in der Reaktionskaskade zur Bildung von 3-Hydroxymethyl-Erythrose durch die Addition von Formaldehyd substituiert.

Abschließend wurde über Isotopenmarkierung in Verbindung mit hochaufgelöster Massenspektrometrie eine Möglichkeit gefunden, um einzelne Reaktionswege innerhalb der Formose-Reaktion zu verfolgen und Reaktionsmechanismen detaillierter nachzuvollziehen.

Nach Untersuchungen der Selektivität innerhalb der Formose-Reaktion im vorangegangenen Kapitel und der mechanistischen Analyse in diesem soll nun final im nächsten Kapitel die Formose-Reaktion kinetisch untersucht werden.

2.4 Kinetische Untersuchungen der Formose-Reaktion

Um detailliertere Einblicke in das Verhalten des Netzwerkes der Formose-Reaktion zu erhalten sind kinetische Untersuchungen enorm wichtig. Welche der in ihr ablaufenden Reaktionen sind schnell und laufen daher bevorzugt ab, welche verlaufen hingegen eher langsamer und somit im Hintergrund ab? Welchen Einfluss haben unterschiedliche Katalysatoren auf die einzelnen Reaktionen und auf die Produktverteilung innerhalb des Netzwerkes? Welche Reaktionskaskaden werden wie begünstigt? Mit den kinetischen Aspekten dieser Themen soll sich das folgende Kapitel befassen.

Die Vielzahl an parallel verlaufenden Reaktionen sowie die Vielzahl an gebildeten Produkten stellt eine enorme Herausforderung für kinetische Untersuchungen dar. Dabei bilden die Verbindungen, die mit GC und HPLC identifizierbar und quantifizierbar sind nur eine Teilmenge aller Reaktionsprodukte innerhalb der Formose-Reaktion ab. Um das Netzwerk dennoch weitreichend zu durchleuchten und die beinhaltende Reaktionswege kinetisch zu untersuchen wird neben einer leistungsfähigen Analytik eine computergestützte Modellierung benötigt.

Zusammen mit Severin Angerpointner aus dem Arbeitskreis von Prof. Erwin Frey der LMU München wird daher der Reaktionsverlauf der Formose-Reaktion in einer Kooperation verfolgt und untersucht. Hierfür wird das Netzwerk mit unterschiedlichen Katalysatoren bei 40 sowie bei 60 °C experimentell analysiert. Mit den aus den Experimenten erhaltenen Daten werden anschließend computergestützte Modellrechnungen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Erwin Frey implementiert. Das Aufstellen der Modelle sowie ihre Weiterentwicklung und Verfeinerung wird dabei in gemeinschaftlicher Arbeit durchgeführt. Primäres Ziel ist dabei die Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten einzelner Reaktionen innerhalb des Netzwerkes. Des Weiteren sollen zusätzlich Reaktionen nachverfolgt werden, die aktuell nicht über die bisher etablierte Analytik zugänglich sind.

2.4.1 Experimentelle Analyse des Netzwerkes

Die analytischen Grundlagen zur kinetischen Untersuchung des Formose-Netzwerkes wurden bereits in Kapitel 2.1 vorgestellt. Mit den entwickelten Methoden sollen nun entstandene Verbindungen zeitaufgelöst quantifiziert und dadurch kinetische Aussagen über einzelne Reaktionen getroffen werden. Die dabei verwendeten Reaktionsbedingungen wurden dabei an die Veröffentlichung „*Direct Prebiotic Pathway to DNA Nucleosides*“ von Jennifer Teichert, Dr. Florian Kruse und Prof. Oliver Trapp angelehnt.^[117] Da die Hauptreaktion des Formose-Netzwerkes, die Sekundärreaktion, untersucht werden soll wurde Glycolaldehyd mit 20 mol% als Initiator in den Reaktionen eingesetzt. Durch Zugabe von 10 mol% des Katalysators wurden die jeweiligen Reaktionen gestartet. Die eingesetzten Salze

Calciumhydroxid und Calciumcarbonat bilden dabei die klassischen Katalysatoren, die bereits von Butlerow selbst verwendet wurden.^[101] Mit Calciumchlorid wurde ein leichtlösliches, neutrales Salz eingesetzt, um eine alleinige, katalytische Wirkung des Kations zu untersuchen. Zusätzlich wurde Calciumformiat als kleinstes organisches Calciumsalz ausgewählt.

Um darüber hinaus einen Vergleich zwischen einwertigen und zweiwertigen Kationen zu ermöglichen, wurden die Reaktionen ebenfalls mit den analogen Kaliumsalzen durchgeführt. Eine komplette Übersicht der verwendeten Katalysatoren ist in Tabelle 2.2 wiedergegeben. Die jeweiligen Reaktionen wurden bei einer Temperatur von 40 sowie 60 °C in einem Zeitraum von 180 Min in Abständen von 20 Min durchgeführt. Ausnahmen bilden dabei die Hydroxide, die aufgrund ihrer hohen Basizität über eine ausgeprägte katalytische Wirkung verfügen. Dementsprechend wurden bei Calciumhydroxid die Reaktion 18 Min und bei Kaliumhydroxid 40 Min lang mit kürzeren Zeitintervallen bei 40 °C untersucht.

Tabelle 2.2: Übersicht über die eingesetzten Katalysatoren zur kinetischen Untersuchung der Formose-Reaktion.

Anion	Calcium	Kalium
Blindprobe	-	-
Hydroxid	Ca(OH) ₂	KOH
Carbonat	CaCO ₃	K ₂ CO ₃
Chlorid	CaCl ₂	KCl
Formiat	Ca(HCOO) ₂	HCOOK

Blindprobe

Die erste Reaktion, die untersucht wurde, beschreibt das Verhalten der Substrate ohne Einwirkung eines Katalysators. Da eine erhöhte Temperatur die Keto-Enol-Tautomerie beschleunigt liegt es nahe, dass bereits bei höherer Temperatur Aldol-Reaktionen auch ohne Katalysator stattfinden und eine Reaktion ermöglichen. Dementsprechend konnte bereits bei 40 °C die Bildung von kleineren Mengen an Glyceraldehyd beobachtet werden. Mit ca. 594 µM liegen diese jedoch nur knapp oberhalb des gesetzten *Limit of Quantification*. Nach 120 Min Reaktionszeit wurde mit 770 µM das Maximum der Konzentration an Glyceraldehyd erreicht. Eine Temperatursteigerung auf 60 °C begünstigte noch weiter die vermehrte Tautomerie von Glycolaldehyd. So konnte die Ausbeute an Glyceraldehyd auf eine Konzentration von bis zu 1.17 mM nach 140 Min gesteigert werden. 1,3-Dihydroxacetone als Isomer des Glyceraldehyds sowie höhere Zucker wurden jedoch nicht erhalten. Dadurch zeigte sich nur ein geringer

Einfluss der Temperatur auf die unkatalysierte Aldol-Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd. Alle weiteren untersuchten Reaktionen sollten aus diesem Grund die direkte Auswirkung des Katalysators auf das Reaktionsnetzwerk abbilden.

Calciumhydroxid

Calciumhydroxid ist der aktivste der eingesetzten Katalysatoren. Bereits nach 2 Min Reaktionszeit konnten neben den identifizierbaren Zuckern ebenso Abbauprodukte der Kohlenhydrate in der Reaktionslösung detektiert werden. Dies wurde ebenso durch die gemessene Kohlenstoffbilanz im Laufe der Reaktionszeit widerspiegelt. Nach 18 Min konnte nur noch 65 % des eingesetzten Kohlenstoffes gemessen werden. Die Konzentration des eingesetzten Formaldehyds wurde dabei kontinuierlich auf 317 mM reduziert. Wohingegen Glycolaldehyd bereits nach 4 Min primär verbraucht wurde und sich anschließend auf eine Konzentration von ca. 16 mM stabilisierte. Glyceraldehyd sowie die beiden Aldotetrosen zeigten ein Maximum der Konzentration bereits nach 2 Min. Dies begründet ebenfalls den schnellen Verbrauch an Glycolaldehyd, welches für den Aufbau der genannten Verbindungen benötigt wird. Glyceraldehyd, gebildet durch die Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd wurde nach 2 Min mit einer Konzentration von bis zu 78.6 mM detektiert. Die beiden Aldotetrosen, die zu Beginn der Reaktion durch eine Selbstaddition von Glycolaldehyd gebildet werden, wurden mit ca. 14 mM (Erythrose) und ca. 13 mM (Threose) erhalten. Die Konzentrationen dieser drei Verbindungen fielen jedoch im weiteren Verlauf der Reaktion exponentiell ab und in der Folge wurden höhere Zucker sowie Abbauprodukte gebildet. Ein ähnliches Verhalten zeigte Erythrulose mit jedoch verminderter Ausprägung. Mit einer Konzentration von 2.35 mM ist das Maximum ebenfalls bereits nach 2 Min erreicht. Das Gleichgewicht stabilisiert sich jedoch im Reaktionsverlauf um die 1.4 mM.

Die Beziehung zwischen dem gewinkelten C4-Zucker und seinem reduzierten Cannizzaro-Produkt zeigte sich in den Konzentrationsverläufen. Nach 2 Min Reaktionszeit flachte die Bildung an gewinkeltem C4-Zucker ab, zeitgleich stieg jedoch die Bildung des Alkohols. Bereits nach 6 Min erreichte der gewC4-Zucker mit 30 mM sein Maximum. Darauf folgend wird dieser kontinuierlich abgebaut, während die Konzentration an gewC4Alk stetig stieg.

Die Konzentrationen an Hexosen sowie Pentosen stiegen, wie in Abb. 2.15 zu sehen, exponentiell an und stabilisierten sich anschließend auf 76.3 mM bzw. 45.0 mM. Innerhalb der Pentosen war es zudem möglich die Ribose als eigenständige Pentose zu quantifizieren. Dabei zeigte sich erneut deutlich das bereits beschriebene Ribose-Problem. Nur ein Anteil von ca. 4 % der gebildeten C5-Zucker konnte auf die Ribose zurückgeführt werden. Darüber hinaus besteht dieser Anteil zu gleichen Teilen aus D- sowie der L-Form des Zuckers.

Die während der Reaktion entstandenen Abbauprodukte Glycerinsäure sowie Milchsäure konnten mit einer Konzentration von ca. 1.1 mM bzw. 1.5 mM detektiert werden. Glycerinsäure bildete sich dabei vermutlich durch über eine Autoxidation von Glycerinaldehyd wohingegen Milchsäure in Folge einer β -Eliminierung mit anschließender Benzilsäure-Umlagerung erhalten wurde. Als weiteres Produkt einer Cannizzaro-Reaktion konnte Glycerin mit bis zu 7 mM erhalten werden. Des Weiteren konnte ein Abfall der Kohlenstoffbilanz im Verlauf der Reaktion festgestellt werden. Somit war es nicht möglich alle entstandenen Verbindungen innerhalb der Reaktion mit den durchgeführten Analysen zu identifizieren und quantifizieren.

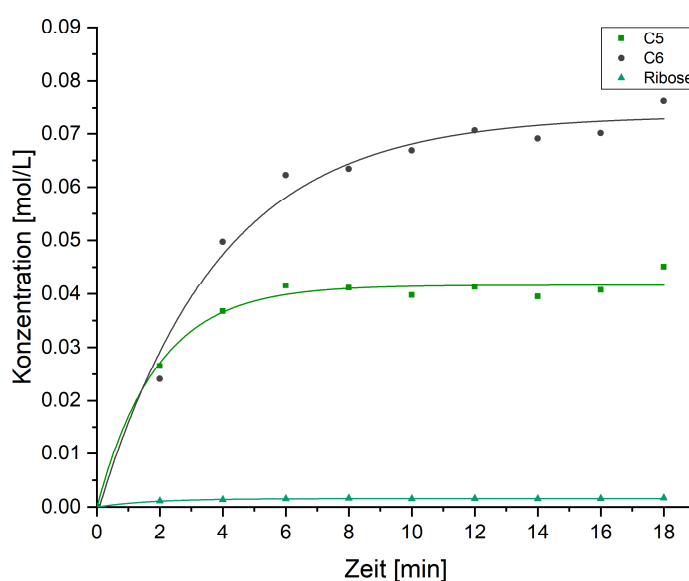


Abb. 2.15: Zeitlicher Verlauf der Bildung von Pentosen sowie Hexosen in der Reaktion mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Nur ca. 4% der gesamten Pentosen nimmt dabei die Ribose ein. Zur Veranschaulichung wurde ein exponentieller Fit als Trendlinie eingefügt.

Calciumcarbonat

Als zweiter historischer Katalysator wurde Calciumcarbonat eingesetzt. Im Vergleich zu Calciumhydroxid zeigte dieser jedoch aufgrund seiner geringeren Basizität und Löslichkeit in Wasser eine deutliche verminderte Aktivität. Dementsprechend konnten bei 40 °C mit Glycerinaldehyd und den Aldotetrosen nur die Produkte des ersten Reaktionsschrittes erhalten werden. Dabei stiegen die Konzentrationen der entstandenen Kohlenhydrate stetig an. Erst nach 160 Min erreichten sie ein Maximum. Glycerinaldehyd überstieg dabei mit einer Konzentration von bis zu 30.1 mM deutlich die der Threose (2.92 mM) sowie der Erythrose (1.35 mM).

Über die Erhöhung der Temperatur auf 60 °C konnten weitere Reaktionsprodukte erhalten werden. Primär zählten dazu die weiteren Tetrosen Erythrose und gewC4, die durch die Addition von Formaldehyd an die Triosen gebildet werden. Die Pentosen konnten darüber hinaus ebenfalls in kleinen Mengen erhalten werden. Hexosen sowie Abbauprodukte wurden jedoch nicht detektiert. Glyceraldehyd konnte dabei weiterhin mit ca. 90 mM nach 160 Min als die dominierende Spezies erhalten werden. Das Stereoisomer Dihydroxyaceton wurde hingegen erst nach einer Reaktionszeit von 180 Min registriert (1.05 mM). Wie in Abb. 2.16 zu sehen bildete die Threose weiterhin die bevorzugte Verbindung der Tetrosen. Mit einer Konzentration von bis zu 80 mM übertraf sie damit die Erythrose (ca. 36 mM) sowie die Erythulose (ca. 24 mM). Der gewinkelte C4-Zucker wurde mit einer Konzentration von bis zu 5.41 mM detektiert. Erst nach einer Reaktionszeit von 60 Min wurden in der Lösung ebenfalls die Pentosen erhalten. Im Laufe der Reaktion stiegen sie dabei bis zu einer Konzentration von 6.02 mM an. Die Ribose konnte dabei innerhalb der Pentosen nicht detektiert werden.

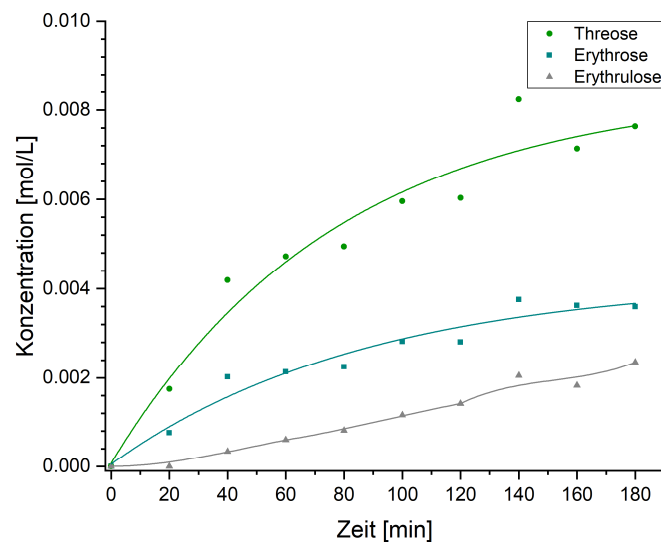


Abb. 2.16: Bildung der Tetrosen bei der durch Calciumcarbonat katalysierten Formose-Reaktion bei 60 °C. Zur besseren Übersicht wurde bei den Aldotetrosen ein exponentieller Fit und bei der Erythulose ein Spline als Trendlinie eingezeichnet.

Calciumchlorid

Bei der Verwendung des Chloridsalzes von Calcium konnte nach 180 Min Reaktionszeit bei 40 °C primär Glyceraldehyd mit einer Konzentration von bis zu 19.4 mM gefunden werden. Darüber hinaus konnte nur noch Erythrose mit ca. 440 µM detektiert werden. Damit liegt ihre Konzentration jedoch nur knapp oberhalb des *Limit of Quantification*. Eine Temperaturerhöhung brachte kaum Veränderungen. So konnten nur die Ausbeuten der bereits gefundenen Zucker erhöht werden.

Glyceraldehyd wurde dabei mit bis zu 17.2 mM erhalten während die Konzentration an Erythrose leicht auf 686 μ M anstieg. Andere Tetrosen, höhere Zucker oder sogar Abbauprodukte wurden innerhalb der Reaktionslösung nicht gefunden.

Calciumformiat

Auch bei Calciumformiat ist die Triose Glyceraldehyd die dominierende Verbindung. Bei einer Temperatur von 40 °C stieg die Konzentration innerhalb der 180 Min auf 2.31 mM an. Damit ist Glyceraldehyd das alleinige Produkt der durchgeführten Reaktion. Erythrose, Threose und Erythulose können hingegen nach einer Steigerung der Temperatur erhalten werden. Während die Aldotetrosen bereits nach 20 Min detektiert wurden, zeigte sich Erythulose erst nach 180 Min in der Reaktionsmischung. Die Ausbeuten der einzelnen Tetrosen sind dabei jedoch sehr gering. Glyceraldehyd wurde mit einer maximalen Konzentration von 30.2 mM gemessen, während die Aldotetrosen mit lediglich bis zu 2.39 mM quantifiziert werden konnten. Erythulose lag dabei nur knapp über dem *Limit of Quantification* (365 μ M).

Kaliumhydroxid

Der Einsatz von Kaliumhydroxid in der Formose-Reaktion erzeugte ebenso wie Calciumhydroxid ein sehr aktives Reaktionsverhalten. Bereits nach 5 Min Reaktionszeit wurden bis auf die Apiose und die Milchsäure alle identifizierbaren Substanzen in der Lösung detektiert. Ebenso konnte nach 5 Min bereits die maximale Konzentration kleinerer Kohlenhydrate, wie die der Triosen und Tetrosen, gemessen werden. Das in der Reaktion eingesetzte Glycolaldehyd wurde dabei bereits fast vollständig verbraucht. Den primären Anteil der Produkte nach 5 Min bildete Glyceraldehyd mit einer Konzentration von 55.2 mM, wohingegen die Tetrosen in deutlich kleineren Mengen erhalten wurden. Erythrose konnte mit einem Maximum von 5.18 mM und Threose mit 6.56 mM detektiert werden. Erythulose wurde hingegen nur mit bis zu 2.46 mM gebildet. Wie bei der Reaktion mit Calciumhydroxid zeigte sich anschließend ein exponentieller Abfall der genannten Zucker.

Der gewinkelte C4-Zucker hingegen erreichte erst nach 10 Min mit bis zu 56.6 mM sein Maximum und stellt damit die bevorzugte Tetrose in der Reaktion dar. Anschließend zeigt auch dieser einen exponentiellen Abfall der Konzentration, der im Zusammenhang mit der Bildung des Alkohols nach einer Cannizzaro-Reaktion steht. Ebenso stabilisierte sich die Konzentration der C5- und C6-Zucker nach den ersten 10 Minuten. Während die Konzentration der Hexosen nach Erreichen des Maximums (57.9 mM) wieder leicht sank, hielten die Pentosen dabei konstant eine Konzentration um die 45 mM. Dabei stellte Ribose nur ca. 2 %, der entstandenen C5-Zucker dar.

Zu den primären Abbauprodukten zählten mit bis zu 36.8 mM der gewC4Alk sowie das Glycerin mit einer Konzentration von 6.35 mM. Auch die Glycerinsäure konnte detektiert werden (870 μ M). Zusätzlich wurden während der Reaktion ebenfalls wie bei Calciumhydroxid Produkte gebildet, die nicht mit den verwendeten Analysemethoden detektiert werden konnten. Dies zeigt die in Abb. 2.17 dargestellte Abnahme der gestammten Kohlenstoffkonzentration innerhalb der Reaktion.

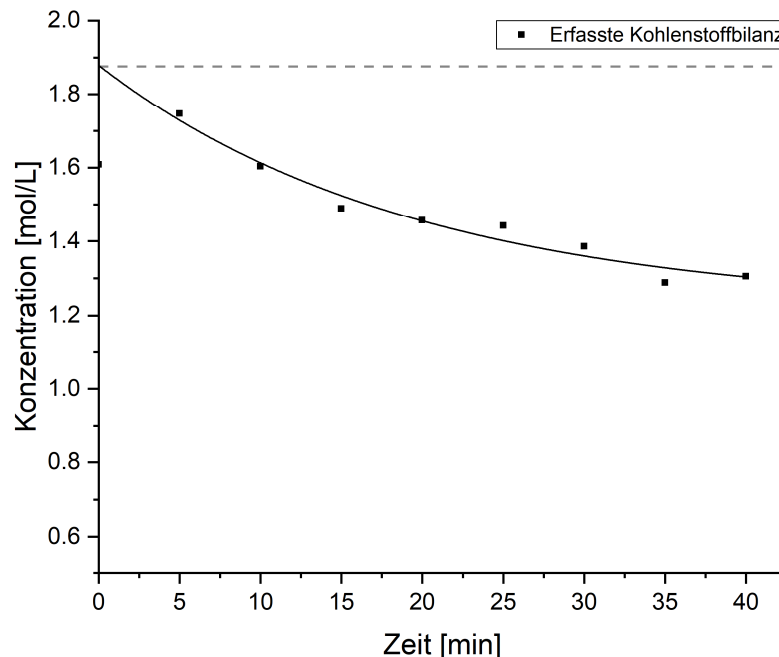


Abb. 2.17: Erfassbare Kohlenstoffbilanz innerhalb der Formose-Reaktion, katalysiert durch Kaliumhydroxid. Zur Veranschaulichung wurde ein exponentieller Fit der abnehmenden Kohlenstoffkonzentration innerhalb der Reaktion eingeführt. Zusätzlich ist die eingesetzte Kohlenstoffkonzentration von 1.87 M als gestrichelte Linie eingezeichnet.

Kaliumcarbonat

Die Reaktion mit Kaliumcarbonat zeigte im Vergleich zu Kaliumhydroxid eine deutliche Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit. Doch auch hier erreichten die kleineren Zucker bereits nach 5 Min ihr Maximum und nahmen anschließend im weiteren Verlauf der Reaktion erneut ab. Diese schnelle Bildung an Glyceraldehyd (bis zu 74.3 mM) wurde auch durch die rapide Abnahme an Glycolaldehyd wiedergegeben. Nach 20 Min Reaktionszeit konnte der C2-Zucker nur noch mit einer Konzentration von 34.2 mM detektiert werden. Nach bereits 60 Min konnten nur noch Konzentrationen um die 8 mM gemessen werden. Der gewC4 Zucker zeigte sich ebenfalls erneut als die primär gebildete Tetrose (bis zu 73.2 mM). Diese Konzentration wurde auch im weiteren Verlauf der Reaktion beibehalten, sodass es nur geringfügig zu einer Cannizzaro-Reaktion kam.

Die Aldotetrosen konnten nach 20 Min hingegen nur mit bis zu 10.8 mM (Threose) bzw. 5.71 mM (Erythrose) quantifiziert werden. Erythrose erreichte dabei ebenso ihr Maximum von 4.74 mM. Anschließend zeigten die drei Tetrosen, wie in Abb. 2.18 und in den vorangegangenen Reaktionen zu beobachten, eine Verminderung ihrer Konzentration. Höhere Zucker zeigten ebenso ein analoges Verhalten zu der Reaktion mit Kaliumhydroxid. Während die Hexosen nach 20 Min wieder abgebaut wurden, blieben die Pentosen bei einer Konzentration um die 30 mM stabil. Auch der Anteil der Ribose beschrieb mit 2 % den gleichen Anteil der Pentosen wie bei Kaliumhydroxid. Von den detektierten Abbauprodukten wurde vor allem im Laufe der Reaktion der gewC4Alk gebildet (25 mM). Glycerin als weiteres Abbauprodukt konnte hingegen nur mit einer Konzentration von 4.20 mM quantifiziert werden.

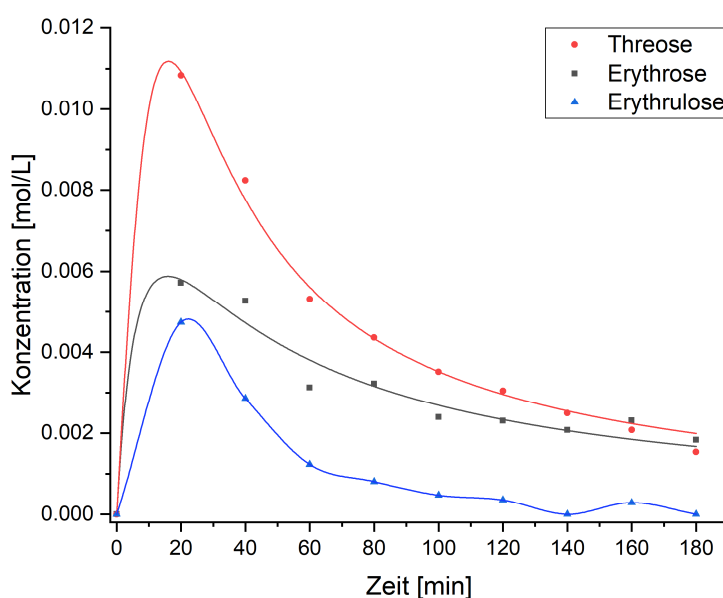


Abb. 2.18: Konzentrationsverlauf von Erythrose, Threose sowie Erythrose bei der Reaktion mit Kaliumcarbonat bei 40 °C. Alle drei Tetrosen erreichen ihr Maximum bereits nach 20 Min Reaktionszeit und werden anschließend wieder abgebaut bzw. reagieren weiter zu höheren Zuckern. Zur besseren Veranschaulichung wurden Trendlinien eingefügt.

Die Steigerung der Temperatur veränderte den allgemeinen Verlauf der Reaktion nur in geringem Maße. Die Konzentration der kleinen Zucker stieg dabei in den ersten Minuten der Reaktion stark an und zeigte anschließend wie zuvor einen exponentiellen Abfall. Die maximalen Konzentrationen an Pentosen und Hexosen lagen mit 32.0 mM bzw. 35.8 mM in ähnlichen Bereichen wie bei 40 °C. Der große Unterschied beider Temperaturen zeigte sich jedoch in den erhaltenen Konzentrationen kleinerer Zucker sowie in der Kohlenstoffbilanz. Während die Bildung von Dihydroxyaceton auf bis zu 1.91 mM um das Dreifache anstieg wurden die Tetrosen nur noch zu einem Zehntel der bei 40 °C gemessenen

Konzentration detektiert. Threose erreichte dabei nach 20 Min das Maximum (1.43 mM) und zeigte anschließend den exponentiellen Abfall. Das gleiche Verhalten zeigte der gewinkelte C4-Zucker, der nach 20 Min mit 43.8 mM die höchste Konzentration aufwies und anschließend abgebaut wurde. Erythrose hingegen stabilisierte sich nach 20 Min um die 400 μ M leicht oberhalb des *Limits of Quantification*.

Die Abbauprodukte zeigten ebenfalls gleiche Tendenzen zu der bei 40 °C durchgeführten Reaktion. Nur die Konzentration des gewC4Alk stieg mit 60 mM auf das Dreifache des zuvor gemessenen Wertes. Die Abbaureaktionen und die daraus resultierende geringere Zuckerkonzentration spiegelte sich schlussendlich auch in der Kohlenstoffbilanz wieder. Diese fiel innerhalb der Reaktion auf 57 % der eingesetzten Stoffmenge. Dementsprechend entstanden in der Reaktion viele Neben- bzw. Abbauprodukte, die mit den eingesetzten Analysemethoden nicht detektiert werden konnten.

Kaliumchlorid

Die Reaktion mit Kaliumchlorid zeigte, wie mit Calciumchlorid zuvor, nur eine geringe katalytische Aktivität. So konnte bei 40 °C alleine Glyceraldehyd mit einer maximalen Konzentration von 1.07 mM nach 120 Minuten erhalten werden. Auch eine Steigerung der Temperatur zeigte keinerlei Einfluss auf die Reaktion. Auch hier blieb die Aldotriose mit bis zu 1.47 mM der einzige detektierbare Zucker.

Kaliumformiat

Nur geringfügig aktiver zeigte sich Kaliumformiat. Hier konnte Glyceraldehyd bei einer Temperatur von 40 °C mit einer Konzentration bis zu 1.80 mM erhalten werden. Bei 60 °C steigerte sich diese nach 180 Min Reaktionszeit auf bis zu 8.45 mM. Zusätzlich konnte nach 80 Min die Threose in der Reaktionslösung gefunden werden. Das Epimer, die Erythrose, konnte erst nach 180 Min detektiert werden. Ihre Konzentrationen liegen jedoch mit 779 μ M (Threose) bzw. 338 μ M (Erythrose) nur knapp oberhalb des *Limit of Quantification*.

2.4.2 Vergleich der Reaktionen

Werden die erhaltenen Ergebnisse innerhalb der eingesetzten Kationen betrachtet zeigen sich deutliche Tendenzen der verschiedenen Anionen in der Formose-Reaktion. Wie erwartet verhält sich dabei die Aktivität der Katalysatoren analog zur ihrer Basizität der einzelnen Anionen und dem daraus resultierenden pH-Wert. Durch einen erhöhten pH-Wert werden die Tautomerien und damit auch die Aldol- und Abbau-Reaktionen, sowie die β -Eliminierung beschleunigt und gefördert. Dementsprechend wurden bei den Hydroxiden mit einem pH-Wert von 12 die größte Produktvielfalt in kürzester Zeit

erhalten. Eine leicht verminderte Aktivität zeigten die Carbonate. Mit einem pH-Wert von 10 bei Kaliumcarbonat bzw. von 8 bei Calciumcarbonat wurde zwar eine ähnliche Produktvielfalt wie bei den Hydroxiden erhalten, jedoch wurde hierfür eine längere Reaktionszeit benötigt. Zudem wurde eine geringere Ausbeute der einzelnen Kohlenhydrate erzielt. Wenig Aktivität zeigten hingegen die eingesetzten Formiate und Chloride. Beide Katalysatoren bildeten bei 40 °C Glyceraldehyd als alleiniges Produkt der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd aus. Dabei zeigten die Formiate eine leicht höhere Aktivität als die analogen Chloride. Temperaturerhöhung auf 60 °C steigerte die Reaktivität der Formiate, sodass die Selbstaddition von Glycolaldehyd ebenfalls ermöglicht und Aldotetrosen erhalten wurden. Eine Übersicht der bei 60 °C erhaltenen Produkte ist in Tabelle 2.3 wiedergegeben. Bei den eingesetzten Chloriden konnte dies nicht beobachtet werden. Dieser Unterschied zwischen den Formiaten und Chloriden spiegelt erneut die Bedeutung der entsprechenden pK_B -Werte der Anionen und der daraus resultierenden Basizität wider. Während Formiate einen pK_B -Wert von 10.3 besitzen, weisen Chloride einen Wert von 20 auf und verfügen somit über eine geringere Basizität.

Tabelle 2.3: Übersicht über die erhaltenen Konzentrationen an Kohlenhydraten in den Reaktionen mit Formaldehyd und Glycolaldehyd bei 60 °C. Die Intensität deutet die erhaltene Konzentration im Vergleich zur maximal erhaltene Konzentration an.

60 °C	Glyceraldehyd	Dihydroxyaceton	Erythrose	Threose	Erythulose	Pentosen	Hexosen
CaCO ₃	■	■	■	■	■	■	■
CaCl ₂	■	■	■	■	■	■	■
Ca(HCOO) ₂	■	■	■	■	■	■	■
K ₂ CO ₃	■	■	■	■	■	■	■
KCl	■	■	■	■	■	■	■
HCOOK	■	■	■	■	■	■	■

Um einen Vergleich der eingesetzten Kationen zu ermöglichen, wurde bei allen Reaktionen mit 10 mol% die gleiche Stoffmenge an Katalysator zugeführt. Eine Nebeneinanderstellung dieser über die erhaltene Produktverteilung erwies sich jedoch als schwierig. Die unterschiedliche Löslichkeit der Calcium- bzw. Kaliumsalze erschwerte zum Teil einen direkten Vergleich. Calciumcarbonat wie beispielsweise eine bis zu 80 000-fache geringere Löslichkeit in Wasser auf als das analoge Kaliumsalz.

Ein Vergleich der vollständig gelösten Chloride und Formiate deutet jedoch auf eine höhere Aktivität des zweiwertigen Calciums hin. Beide Calciumsalze bildeten in den Reaktionen Glyceraldehyd in höheren Konzentrationen aus als die entsprechenden Kaliumverbindungen. Auch die Tetrosen konnten mit einer höheren Konzentration durch die Zugabe von Calciumformiat erhalten werden. Bis zu der

dreifachen Menge an Threose wurde mit Calciumformiat (2.39 mM) im Vergleich zum Kaliumsalz (779 μM) erhalten werden.

Um jedoch weitere Einsichten in das Verhalten der Katalysatoren und ihren Einfluss auf einzelne Reaktionen innerhalb der Formose-Reaktion zu untersuchen, wurden im nächsten Abschnitt Reaktionsmodelle aufgestellt. Mit Hilfe von computergestützten Rechnungen sollen innerhalb des Netzwerkes Reaktionskinetiken berechnet werden und somit eine einfachere Gegenüberstellung ermöglichen.

2.4.3 Kinetische Modellierung der Formose-Reaktion

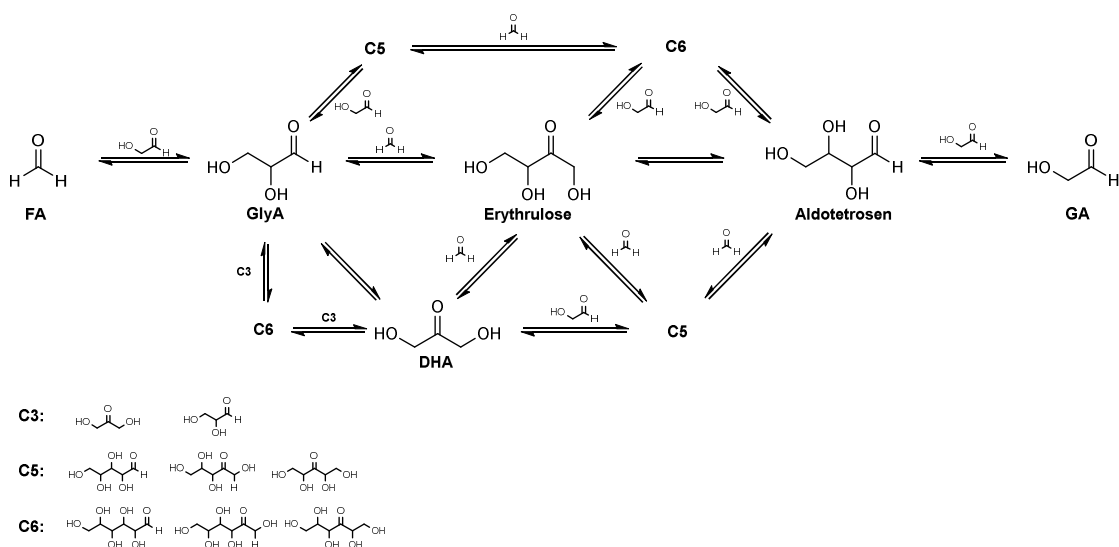
Mit Hilfe von Reaktionsmodellen lassen sich Reaktionen innerhalb eines Netzwerkes beschreiben und nachvollziehen. Zusätzlich ermöglichen sie die Aufstellung von Differenzialgleichungen der einzelnen Reaktanden und daraus die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten spezifischer Reaktionen. Um diese zu bestimmen, wurde ein vereinfachtes Reaktionsmodell des Formose-Netzwerkes erstellt und die dazu gehörigen Differentialgleichungen aufgestellt. Das Lösen dieser Gleichungen erfolgte in Kooperation mit Severin Angerpointner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Erwin Frey.

Mittels des „*Simulated Annealing*“-Verfahrens werden im ersten Schritt randomisiert Startwerte einzelner Reaktionskonstanten angenommen. Anschließend werden diese schrittweise angepasst und optimiert. Eine Bewertung der erhaltenen Resultate wurde über die Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt. Der über dieses mathematische Standardverfahren erhaltene Wert beschreibt wie genau die Lösung der Gleichungen die vorhandenen Datenpunkte approximiert. Je geringer der Wert desto näher beschreiben die erhaltenen Reaktionskonstanten und die daraus resultierende Funktion den experimentell gemessenen Verlauf der Konzentrationen innerhalb des Reaktionsnetzwerkes.

Aufgrund der Komplexität, Reaktionsvielfalt und begrenzter Möglichkeit der Quantifizierung einzelner Substanzen innerhalb der Formose-Reaktion mussten bereits zu Beginn Vereinfachungen des Modells durchgeführt werden. Dementsprechend wurde die Bildung von Hydraten sowie die Ausbildung von Ringstrukturen einzelner Kohlenhydrate in den jeweiligen Reaktionsmodellen nicht berücksichtigt. Ebenso erfolgte eine vereinfachte Visualisierung einzelner Modelle um eine bessere Übersicht zu gewährleisten. Daher wurde auf die Darstellung doppelter Reaktionen sowie die Reaktionen der Keto-Enol-Tautomerien in einzelnen Modellen verzichtet. Eine vollständige Übersicht der beinhalteten Reaktionen und ihre Zuordnung zu den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten innerhalb komplexer Modelle wurde dem Anhang hinzugefügt.

Modell I „The Beginning“

In einem ersten Modellierungsversuch des Formose-Netzwerkes wurden die detektierten Kohlenhydrate, ihre Keto-Enol-Tautomerien sowie die anschließenden Aldol-Reaktionen als Grundgerüst ausgewählt. Dieses erste Modell ist in Schema 2.13 dargestellt und zeigt die verschiedenen Aldol-Reaktionen zwischen den einzelnen Kohlenhydraten. Innerhalb der abgebildeten Reaktion können mit Ausnahme von Formaldehyd dabei beide Komponenten über eine Keto-Enol-Tautomerie als Nukleophil agieren. Zur Vereinfachung des Modells wurden neben den Hexosen und Pentosen ebenfalls die Aldotetrosen gruppiert.



Schema 2.13: Erstes Modell des Formose-Netzwerkes. Zu sehen sind die Aldol-Reaktionen bis zur Bildung der Hexosen. Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten sind im Anhang in Tabelle 5.2 angegeben. Für eine bessere Übersicht wurde in der Abbildung die Selbstadditionsreaktionen beider Triosen zusammengeführt

Über das Lösen der aus dem Modell resultierenden Differenzialgleichungen konnten die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionen sowie der zeitliche Verlauf bestimmt werden. Der beste errechnete Fit für die Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid bei 40 °C ist in Abb. 2.19 dargestellt. Dabei entspricht der durch das Modell erhaltene Verlauf einzelner Konzentrationen an Kohlenhydraten genau den experimentell erhaltenen Datenpunkten.

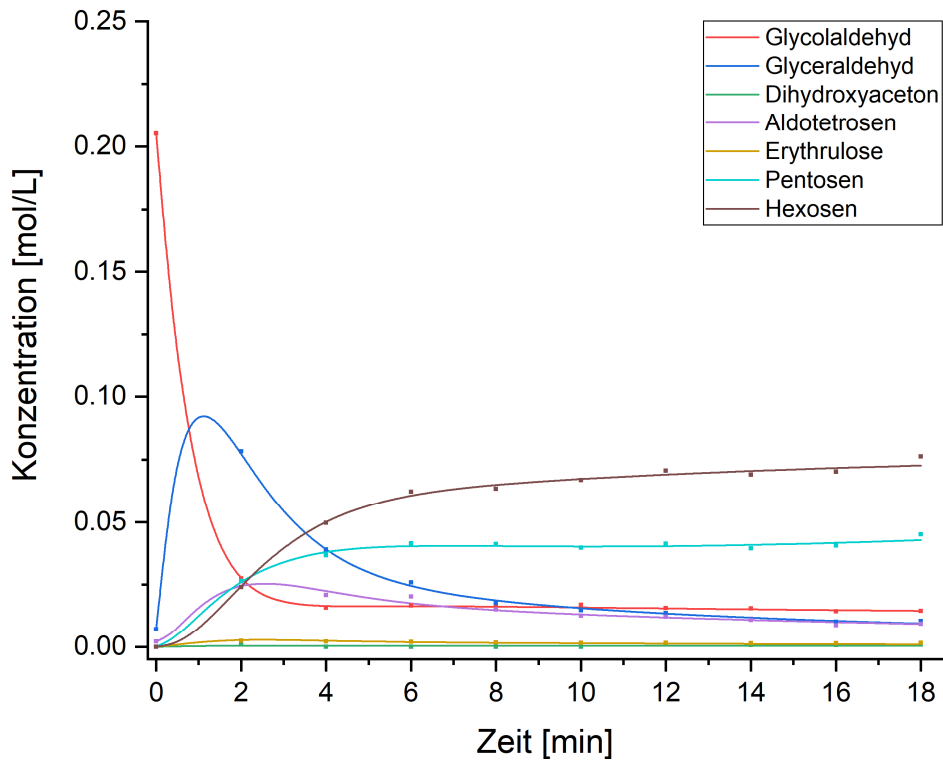


Abb. 2.19: Zeitlicher Verlauf der Bildung an Kohlenhydraten mit Modell I in der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid bei 40 °C.

Betrachtet man nun jedoch die in Abb. 2.20 dargestellten Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionen zeigt sich das Problem des aufgestellten Modells: Nahezu alle der in dem Modell vorhandenen Geschwindigkeitskonstanten sind unbestimmt. Zu stark variieren die Werte der erhaltenen Konstanten bei unterschiedlichen Wiederholungen mit zufälligen Start-Konstanten. Teilweise beträgt die Differenz der erhaltenen Werte mehrere Zehnerpotenzen. Zusätzlich ist deutlich zu sehen, wie viele der Geschwindigkeitskonstanten während der Berechnungen das definierte obere Limit mit $k = 10^3$ erreichen bzw. viele der Konstanten sich im oberen Bereich konzentrieren. Anhand der Ergebnisse der Loss-Funktion wurden die durchgeführten Fits von rechts nach links geordnet.

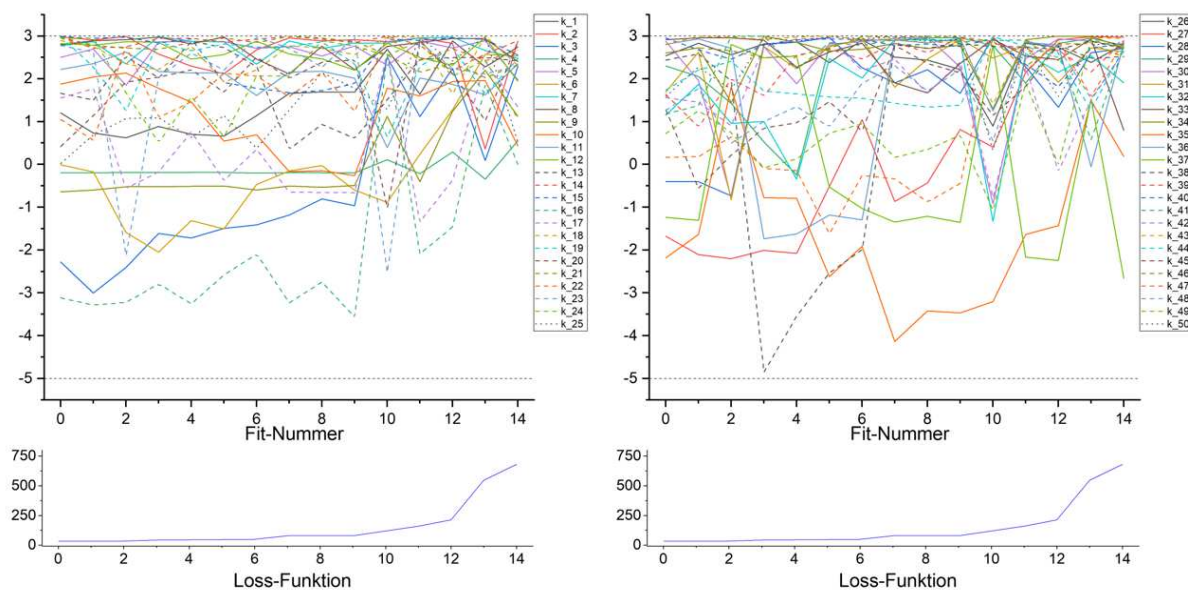


Abb. 2.20: Abbildung der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten durch die einzelnen Berechnungen bei der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid. Die Grenzen wurden dabei auf $10^{-5} < k < 10^3$ festgelegt. Eine Zuordnung der Geschwindigkeitskonstanten zu den jeweiligen Reaktionen sind in der Tabelle 5.2 im Anhang wiedergegeben.

Werden die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten näher betrachtet zeigt sich, dass vor allem die Reaktionen der Keto-Enol-Tautomerie an die in der Berechnung festgelegte Grenze stoßen. Die Keto-Enol-Tautomerien zeigten darüber hinaus eine weitere Problematik. Während der Implementierung des Modells wurden die einzelnen Enol-Spezies der Kohlenhydrate als eigenständige Spezies eingefügt und keinem entsprechenden Kohlenhydrat zugeschrieben. Experimentell werden diese jedoch durch die Derivatisierung in die Carbonyl-Form des jeweiligen Zuckers überführt und diesem zugehörig quantifiziert. Dies hat zur Folge, dass das aufgestellte Modell die experimentellen Daten perfekt angleichen kann, während es Abweichungen über die entsprechenden Enol-Spezies ausgleicht. In Abb. 2.21 ist die Summe der Konzentration an C6-Stereoisomeren sowie die der berechneten Enol-Spezies gezeigt. Dabei ist deutlich zu sehen, dass dem Modell zufolge bereits nach einer Reaktionszeit von 7 Min die Konzentration der Enole innerhalb der Reaktionslösung die der C6-Zucker überschreitet. In wässriger Lösung liegen jedoch die Hexosen überwiegend in ihrer Ringstruktur vor und nur zu einem geringfügigen Anteil in ihrer entsprechenden Enol-Form. Dieses Verhalten kann dementsprechend nicht der Realität entsprechen, sodass das Modell modifiziert und überarbeitet wurde.

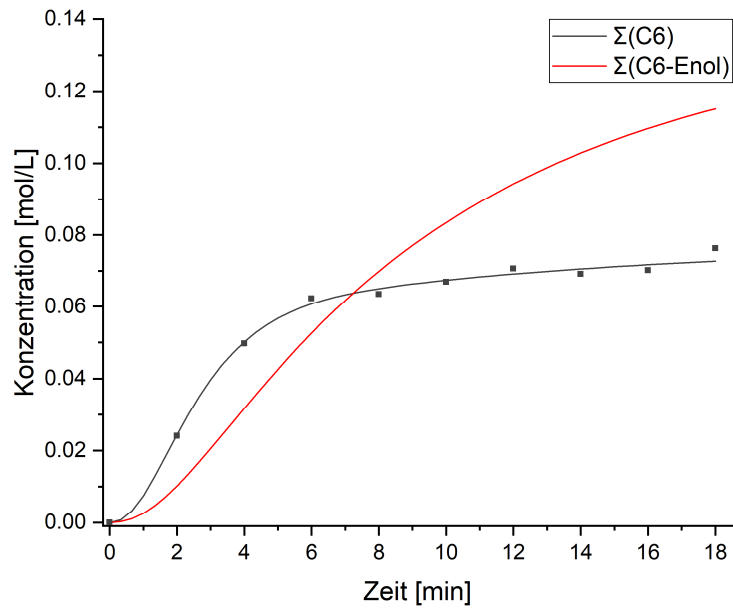


Abb. 2.21: Verlauf der durch das Modell erhaltenen Konzentrationen an C6-Zuckern sowie ihrer Enol-Form. Die Datenpunkte geben dabei die experimentell gemessenen Konzentrationen wieder.

Modell II „Enol-los“

Um das aufgestellte Modell zu vereinfachen wurden die zu berechnenden Reaktionen und damit die Anzahl der Parameter der Differenzialgleichungen reduziert. Da vor allem die erhaltenen Komplikationen in Assoziation zu den Reaktionen der Keto-Enol-Tautomerien einzelner Kohlenhydrate standen, wurden Zwischenschritte über die Tautomerie in dem in Schema 2.13 gezeigten Modell entfernt. Dadurch konnte die Anzahl der Reaktanden sowie der Reaktionen und daraus resultierend die Parameter deutlich reduziert werden. Darüber hinaus wurden die einzelnen C4-Aldosen in die beiden Stereoisomere Erythrose und Threose aufgeteilt.

Der durch die Reduzierung erhaltene Konzentrationsverlauf einzelner Kohlenhydrate ist in Abb. 2.22 wiedergegeben. Bereits nach 4 Min Reaktionszeit weichen die berechneten Konzentrationen an Hexosen und Pentosen deutlich von den experimentell erhaltenen Daten ab. Auch die weiteren Zucker werden durch die Berechnungen massiv überproduziert. Allein der Verlauf der Konzentration an Formaldehyd entspricht dem der experimentell erhaltenen Daten. Erklärt werden kann dieses Verhalten durch zwei Punkte. Zum einen könnte sich eine zu starke Gewichtung der Datenpunkte des Formaldehyds durch die Implementierung negativ auf die weitere Produktverteilung auswirken. Dies hätte zur Folge, dass das Modell bevorzugt die Konzentration des Formaldehyds an die Daten angleicht. Zum anderen könnte es zeigen, dass die Keto-Enol-Tautomerien zwingend für die Berechnung des Modells benötigt werden.

Aus diesem Grund wurden die Keto-Enol-Tautomerien erneut in das Modell mit eingebunden. Abweichend von Modell I wurden die Enol-Spezies zu den jeweiligen experimentell quantifizierten Zuckern hinzugerechnet und nicht als eigenständige Spezies betrachtet. Auffallend ist die gezeigte Überproduktion der vorhandenen Zucker. Jeder erhaltene Konzentrationsverlauf in Abb. 2.22 übertrifft die experimentell erhaltenen Daten. Aus diesem Grund wurde nach bekannten Nebenprodukten und den dazugehörigen Reaktionen gesucht um diese Überproduktion an Kohlenhydraten zu kompensieren.

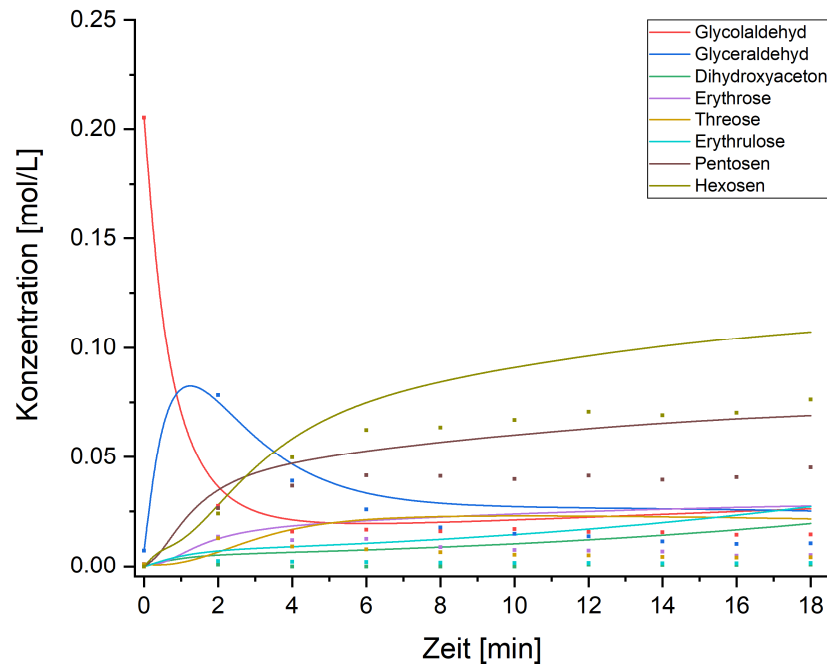
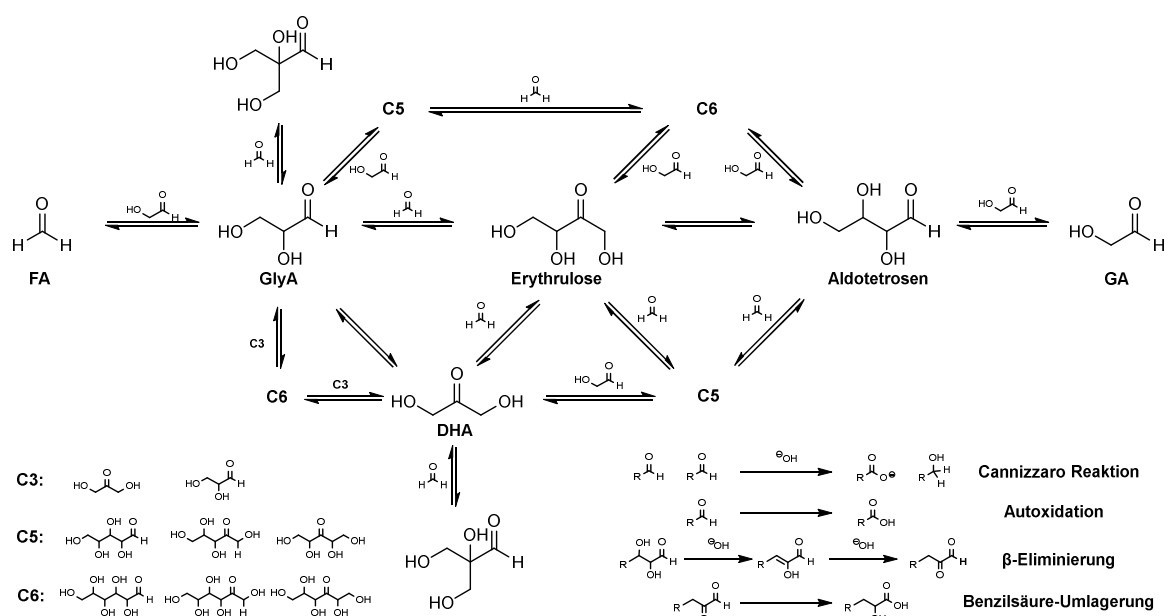


Abb. 2.22: Konzentrationsverlauf der Kohlenhydrate bei einer Umsetzung von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid. Verwendet wurde das überarbeitete Modell II ohne die entsprechenden Keto-Enol-Tautomerien.

Modell III „Side-Reactions“

Wie sich zeigte brachte eine alleinige Reduzierung des Modells über die Keto-Enol-Reaktionen nicht den gewünschten Erfolg. Aus diesem Grund wurde das vorhandene Modell im nächsten Schritt erweitert und detaillierter gestaltet. Hierfür wurden bekannte Nebenreaktionen und die entsprechenden Produkte eingeführt. Dazu gehört die Bildung gewinkelter Zucker, die Cannizzaro-Reaktion, die Autoxidation, die β -Eliminierung sowie die darauffolgende Benzilsäure-Umlagerung. Damit sollten dem Modell weitere Daten zur Verfügung gestellt werden, um über die zusätzlichen Informationen genauere Anpassungen zu generieren. Da bereits zu Beginn der Modellierungen die Grenzen der Geschwindigkeitskonstanten erreicht wurden, wurden die mögliche k -Werte auf $10^{-10} < k < 10^7$ erweitert. Dieses überarbeitete Modell mit den Keto-Enol-Tautomieren, erweiterten Grenzen sowie hinzugefügte Nebenreaktionen ist in Schema 2.14 wiedergegeben.



Schema 2.14: Modell III des Formose-Netzwerkes. Erweitert durch die Bildung der gewinkelten Zucker sowie der angegebenen Nebenreaktionen.

Durch die genannten Änderungen des Modells konnte eine Verbesserung der Konzentrationsverläufe erzielt werden. Wie in Abb. 2.23 zu sehen ist werden im späteren Verlauf der Reaktion einige Zucker deutlich realitätsnäher beschrieben als im vorangegangenen Modell. Wohingegen auch dieses Modell Konzentrationsverläufe einzelner Kohlenhydrate darstellt, die nicht der Realität entsprechen. So weichen nicht nur die Kurven von Glycolaldehyd und Glyceraldehyd deutlich von den experimentellen Daten ab. Auch die Konzentration der Hexosen zeigt bereits in der ersten Reaktionsminute einen unerwarteten Verlauf. Während der ersten Minute soll ein Konzentrationsmaximum an C6-Zuckern

gebildet werden, der nach kurzem Abbau erneut zur weiteren Bildung von Hexosen führt. Auch die Pentosen zeigen nach 2 Minuten Reaktionszeit einen stabilen Verlauf, bis es ab Minute 4 erneut zu einem Anstieg der Konzentration kommt. Dieses Verhalten der größeren Zucker zeigt bereits, dass eine weitere Überarbeitung des beschriebenen Modells von Nöten ist.

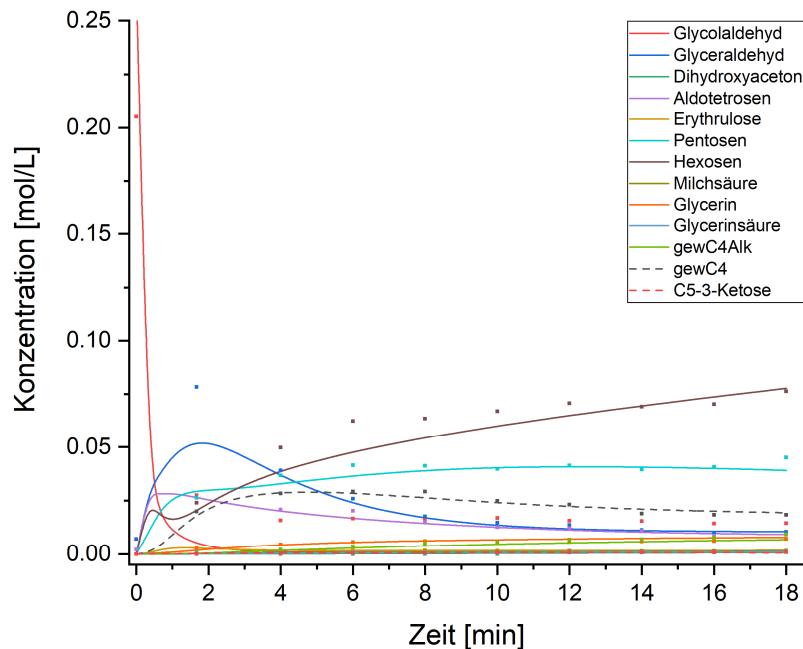


Abb. 2.23: Zeitlicher Verlauf der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid. Gezeigt ist der beste Fit mit Modell III.

Betrachtet man die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionen zeigt sich auch in diesem Modell die Unbestimmtheit der Konstanten. Dabei schwanken die erhaltenen Werte um bis zu 15 Zehnerpotenzen. Dadurch wieder erneut verdeutlicht, wie stark die einzelnen Reaktionen mit ihren unzähligen Variablen und Parametern voneinander abhängig sind und sich gegenseitig beeinflussen. Kleine Änderungen einer Reaktionskonstanten können bewirken, dass der Wert einer anderen Reaktion stark variiert wird. Diese gegenseitige Abhängigkeit der Konstanten, die große Flexibilität des Modells sowie die Unterbestimmtheit des Modells erschweren eine genaue Bestimmung der Kinetik.

Um die aus Modell II bekannte Überproduktion an Kohlenhydraten weiter zu modifizieren und zu kompensieren, sollen allgemeine Abbau-Reaktionen im Modell implementiert werden. Einzelne experimentell durchgeführte Reaktionen, wie die Katalyse mit Calciumhydroxid, zeigten eine abfallende Kohlenstoffbilanz aller detektierten Verbindungen im Laufe der Reaktion. Dementsprechend liefen unbekannte Abbau-Reaktionen innerhalb des Netzwerkes ab, die über die Analyse mit GC und HPLC nicht zu verfolgen waren. Um diese unbekanntes Abbau-Reaktionen und die daraus resultierende

verminderte Kohlenstoffbilanz in das Modell einzubauen, wurde eine allgemeine Abbau-Reaktion eingebaut. Dadurch sollte eine Überproduktion an Kohlenhydraten verhindert werden und es dem Modell es ermöglicht werden, überschüssige Verbindungen aus dem Netzwerk zu entfernen. Diese Abbau-Reaktion wurde jeder der detektierten Zucker hinzugefügt. Um jedoch das Angleichen der Konzentrationen über die Abbau-Reaktion der Zucker zu verhindern wurde eine gemeinsame Reaktionskonstante aller Kohlenhydrate implementiert.

Modell IV „Dump“

Die neuen Modifizierungen zeigten direkt positive Auswirkungen auf den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen einzelner Zucker (s. Abb. 2.24). Nicht nur die Genauigkeit des Konzentrationsverlaufs von Glyceraldehyd konnte deutlich gesteigert werden, auch der Verlauf der Pentosen näherte sich im Vergleich zum vorangegangenen Modell deutlich den experimentellen Daten an. Zwar konnte die Kurve des Glycolaldehyds durch die Einführung der Abbau-Reaktionen verbessert werden, dennoch zeigten die modellierten Daten immer noch Abweichungen von den experimentell erhaltenen Konzentrationsverläufen. Ebenso konnten die Hexosen verbessert werden. Der im vorangegangenen Modell erhaltene Hochpunkt ist nicht mehr vorhanden, jedoch zeigten sich zwischen Minute 4 und 6 sowie nach Minute 16 stärkere Abweichungen der experimentellen und modellierten Daten.

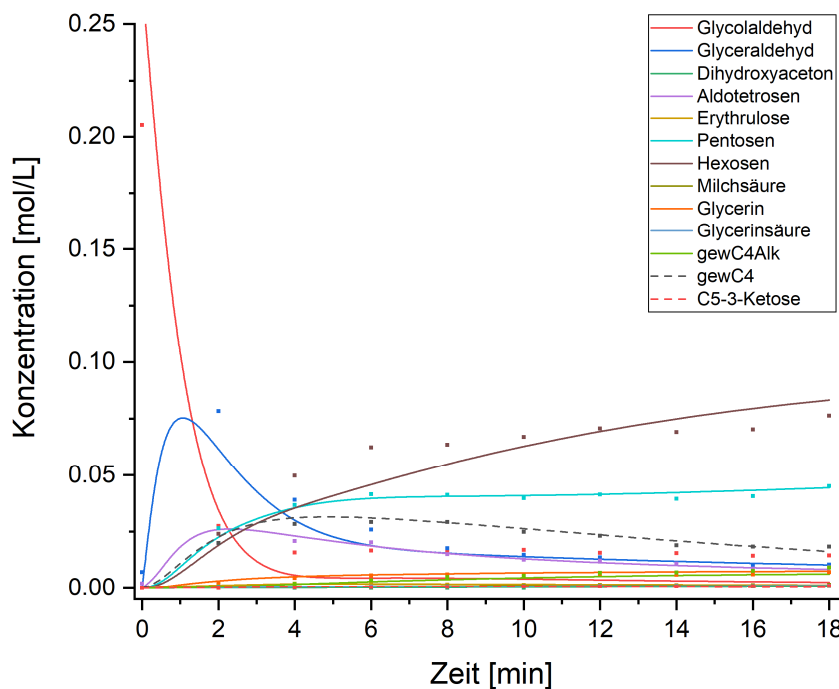


Abb. 2.24: Zeitlicher Verlauf der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid. Gezeigt ist der beste Fit mit Modell IV.

Während die Betrachtung der Konzentrationsverläufe einzelner Kohlenhydrate den Eindruck einer Verbesserung des Modells erweckten, zeigten die detaillierten Daten der Geschwindigkeitskonstanten ein anderes Bild. Weiterhin konnten einzelne Reaktionskonstanten, wie in Abb. 2.25 und Abb. 2.26 zu sehen, nicht bestimmt werden. Zwischen unterschiedlichen Berechnungen zeigten die erhaltenen Konstanten erneut eine starke Fluktuation. Eine Ausnahme bildete jedoch die Geschwindigkeitskonstante der Cannizzaro-Reaktion, die innerhalb des angelegten Modells annähernd gut bestimmt werden konnte (Abb. 2.25 schwarze Linie).

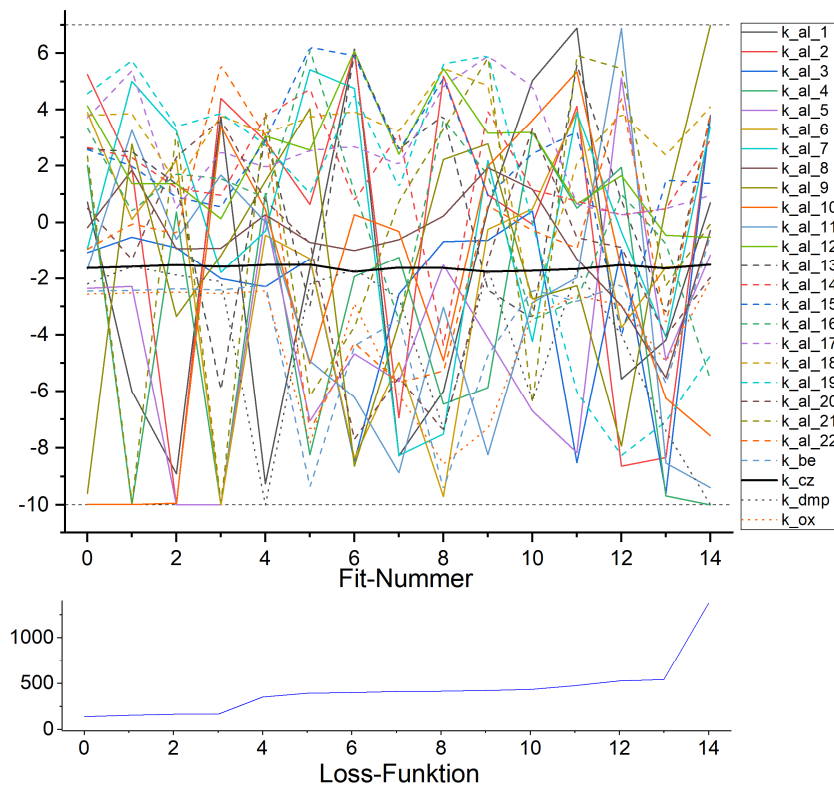


Abb. 2.25: Abbildung der berechneten Geschwindigkeitskonstanten der Aldol- und Abbau-Reaktionen bei der Umsetzung von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid über Modell IV. Die Grenzen wurden dabei auf $10^{-10} < k < 10^7$ festgelegt. Eine Zuordnung der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten zu den Reaktionen kann der Tabelle 5.3 im Anhang entnommen werden.

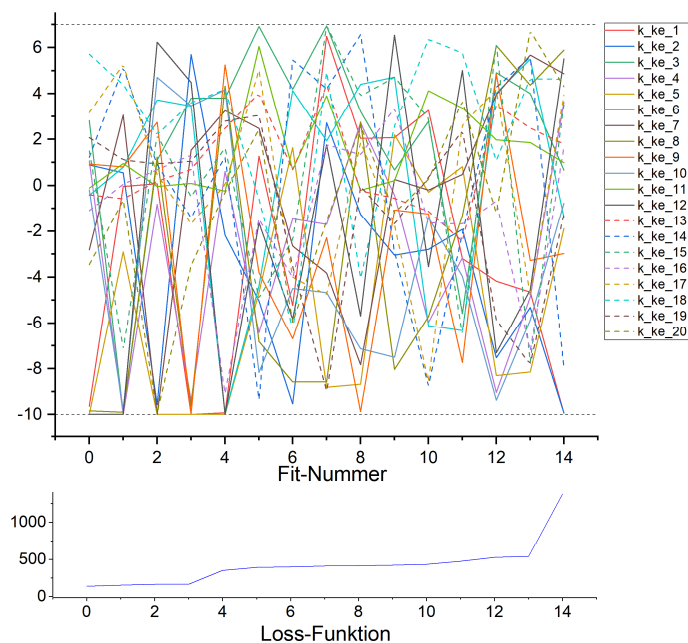


Abb. 2.26: Abbildung der berechneten Geschwindigkeitskonstanten der Keto-Enol-Tautomerien bei der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid über Modell IV. Die Grenzen wurden dabei auf $10^{-10} < k < 10^7$ festgelegt. Eine Zuordnung der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten zu den Reaktionen kann der Tabelle 5.4 im Anhang entnommen werden.

Nicht nur die unbestimmbaren Geschwindigkeitskonstanten stellen die Problematik des Systems dar. Auch die berechneten Konzentrationen einzelner Kohlenhydrate und ihre Zusammensetzung zeigen Ungenauigkeiten des Modells auf. Als Beispiel sind in Abb. 2.27 die experimentell erhaltenen Datenpunkte der Konzentration an Pentosen sowie die berechneten Anteile der sich in der Reaktionslösung befindenden Enol-Spezies (rot) und der Carbonyl-Form (grau) dargestellt. Dem Modell zufolge müssten die Pentosen fast vollständig in der reaktiveren Enol-Spezies vorliegen. Im Durchschnitt beträgt die errechnete Konzentration an Enol-Form das 90-fache der berechneten Carbonyl-Form in der Reaktionslösung. Die gleiche Problematik der Überproduktion an Enol-Spezies konnte bereits in Modell I beobachtet werden und kann durch die fehlende Quantifizierbarkeit der entsprechenden Spezies erklärt werden.

Experimentell ist es nur möglich die derivatisierte Form der einzelnen Kohlenhydrate zu quantifizieren. Darin inbegriffen sind alle weitere Formen der entsprechenden Zucker wie Hydrate, Ringstrukturen und auch Enol-Formen. Innerhalb des Modells wurde die gemessene Konzentration jedoch in Carbonyl- und Enol-Form unterteilt. Diese Unterteilung und die fehlende Information über die Konzentrationen der einzelnen Untergruppen ermöglicht den Berechnungen die Freiheit Geschwindigkeitskonstanten und Konzentrationen individuell anzupassen um das Netzwerk auszugleichen. Im Fall der Pentosen resultierte dadurch die Überproduktion der Enol-Spezies in der Reaktionslösung.

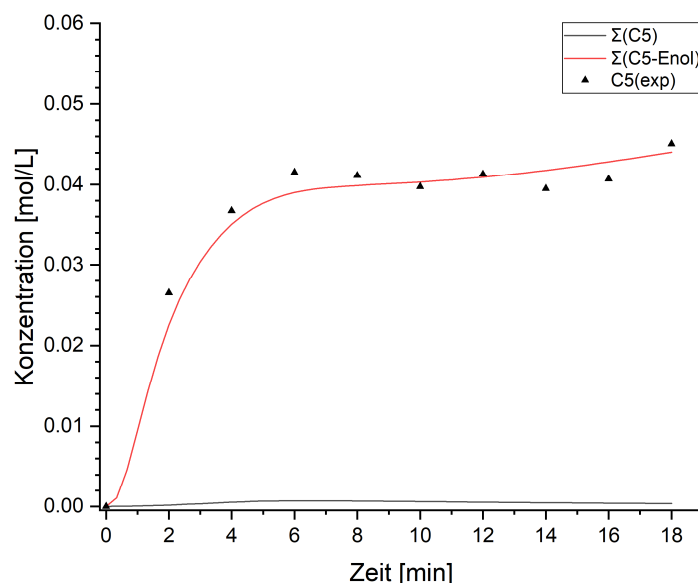


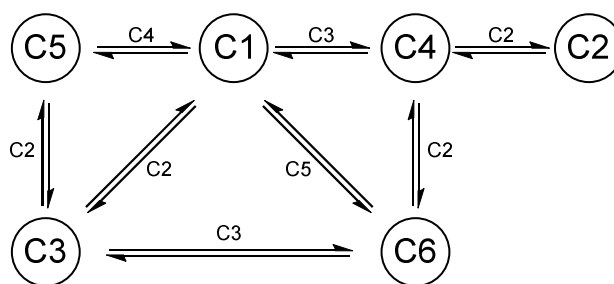
Abb. 2.27: Verlauf der durch das Modell IV erhaltene Konzentrationen an C5-Zucker sowie ihrer Enol-Form. In schwarz gezeigt sind die Datenpunkte der experimentell gemessenen Konzentration an Pentosen.

Die durchgeführten Modifizierungen und Anpassungen des in Schema 2.14 aufgestellten Formose-Modells zeigten bisher keinen Erfolg zur Bestimmung einzelner Geschwindigkeitskonstanten. Die Unterbestimmtheit des Modells verhinderte eine genaue Berechnung der Reaktionskonstanten.

Zu viele voneinander abhängige Variablen und Parameter stehen zu wenig Informationen über die Konzentrationen von einzelnen Verbindungen gegenüber. Aus diesem Grund wurde ein neuer Ansatz für die Modellierung des Formose-Reaktionsnetzwerks verfolgt. Stark vereinfacht sollte es möglich sein einzelne Reaktionskonstanten zu bestimmen und diese anschließend auf ein größeres Modell als Startwerte zu übertragen.

Modell V „Back to the Roots“

In Schema 2.15 ist das neue, stark vereinfachte Modell der Formose-Reaktion dargestellt. Die dadurch erhaltenen Konstanten sollen anschließend in das Modell IV mit kleineren Grenzen der einzelnen Reaktionskonstanten eingesetzt werden. Somit sollte die Flexibilität und Freiheit durch die Unbestimmtheit des größeren Modells eingeschränkt werden. Schritt für Schritt sollen durch dieses Verfahren Geschwindigkeitskonstanten eingegrenzt und bestimmt werden.



Schema 2.15: Stark vereinfachtes Modell V der Formose-Reaktion ohne Stereoinformation und die Verwendung von Enol-Formen.

Tabelle 2.4: Zuordnung der Geschwindigkeitskonstanten zu den jeweiligen Reaktionen innerhalb des Modells V. Zusätzlich wurde zu jedem Zucker die Abbau-Reaktionen der Cannizzaro-Reaktion, der β -Eliminierung und der Oxidation an Luftsauerstoff implementiert.

k	Reaktion	k	Reaktion
k_1	$C1 + C2 \longrightarrow C3$	k_9	$C2 + C2 \longrightarrow C4$
k_2	$C1 + C3 \longrightarrow C4$	k_10	$C2 + C3 \longrightarrow C5$
k_3	$C1 + C4 \longrightarrow C5$	k_11	$C2 + C4 \longrightarrow C6$
k_4	$C1 + C5 \longrightarrow C6$	k_12	$C3 + C3 \longrightarrow C6$
k_5	$C3 \longrightarrow C1 + C2$	k_13	$C4 \longrightarrow C2 + C2$
k_6	$C4 \longrightarrow C1 + C3$	k_14	$C5 \longrightarrow C2 + C3$
k_7	$C5 \longrightarrow C1 + C4$	k_15	$C6 \longrightarrow C2 + C4$
k_8	$C6 \longrightarrow C1 + C5$	k_16	$C6 \longrightarrow C3 + C3$

In Modell V wurden zunächst nur die einzelnen Reaktionen der analysierten Kohlenhydrate untereinander betrachtet. Die Stereochemie sowie die Keto-Enol-Tautomerie wurden dabei nicht berücksichtigt. Bereits implementierte Nebenreaktionen, wie die Cannizzaro-Reaktion (k_{cz}), die β -Eliminierung (k_{be}) sowie die Oxidation an Luftsauerstoff (k_{ox}) wurden in das Modell für die einzelnen Zucker übernommen.

Über diese Vereinfachungen und das Einschränken der Grenzen war es erstmals möglich das vollständige Modell und die dazugehörigen Reaktionskonstanten zu berechnen. Dabei spiegelt der berechnete Verlauf einzelner Konzentrationen trotz der starken Vereinfachung die experimentell erhaltenen Daten in Abb. 2.28 sehr gut wider. Allein Glycolaldehyd zeigt nur leichte Abweichungen zu den experimentellen Daten.

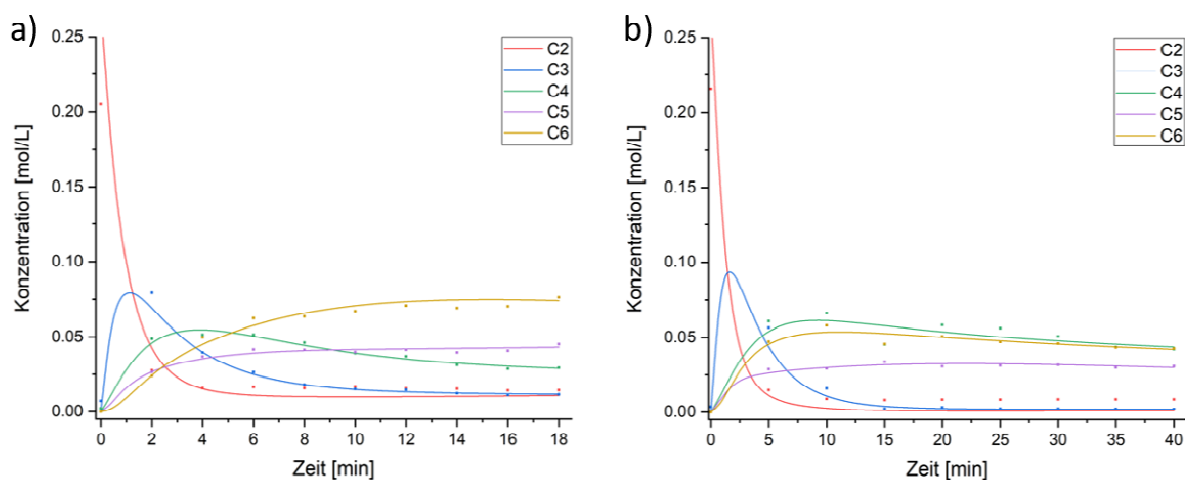


Abb. 2.28: Zeitlicher Verlauf der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit den Hydroxiden a) Calciumhydroxid, b) Kaliumhydroxid. Gezeigt ist jeweils der beste Fit mit Modell V.

Werden die einzelnen Reaktionskonstanten detailliert betrachtet, zeigte sich mit zunehmender Wiederholung der Rechnungen eine deutliche Verbesserung der Fits. So wurde bei sechs der zehn Rechnungen konkrete Werte für einzelne Reaktionskonstanten gefunden, die nicht weiter verbessert werden konnten.

Bei der Reaktion mit Calciumhydroxid (Abb. 2.29 a)) stoßen nur die beiden Retro-Aldol-Reaktionen der C4-Zucker (k_6 , k_{13}) sowie die des C6-Zuckers zu den Triosen (k_{16}) an die im Modell gesetzte untere Grenze von $k > 10^{-8}$. Alle weiteren Reaktionskonstanten konnten eindeutig bestimmt werden.

Mit Kaliumhydroxid sind es hingegen insgesamt 6 Reaktionen, die an die festgelegte untere Grenze stoßen. Dazu zählen die Dimerisierungen von C2- (k_9) sowie C3-Zuckern (k_{12}), die Aldol-Reaktion von Pentosen und Formaldehyd (k_4) sowie die Retro-Aldol-Reaktionen von Hexosen in Triosen (k_{16}) bzw. C4- und C2-Zucker (k_{15}). Auch die Retro-Aldol-Reaktion des C4-Zuckers in Formaldehyd und C3-Zucker (k_6) stößt wie bei Calciumhydroxid an die Grenzen des Modells.

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse der beiden Reaktionen mit Calcium- bzw. Kaliumhydroxid miteinander, zeigten mehrere Reaktionskonstanten ähnliche Werte (k_1 , k_2 , k_7 , k_{cz}). So liegen zum Beispiel die Werte der Aldol-Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd (k_1) in beiden Reaktionen dicht beieinander (a) $0.011 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ b) $0.10 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) oder auch die Reaktion von Formaldehyd mit den Triosen zeigen mit $6.49\cdot 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ für Calciumhydroxid und $4.77\cdot 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ für Kaliumhydroxid ähnliche Werte.

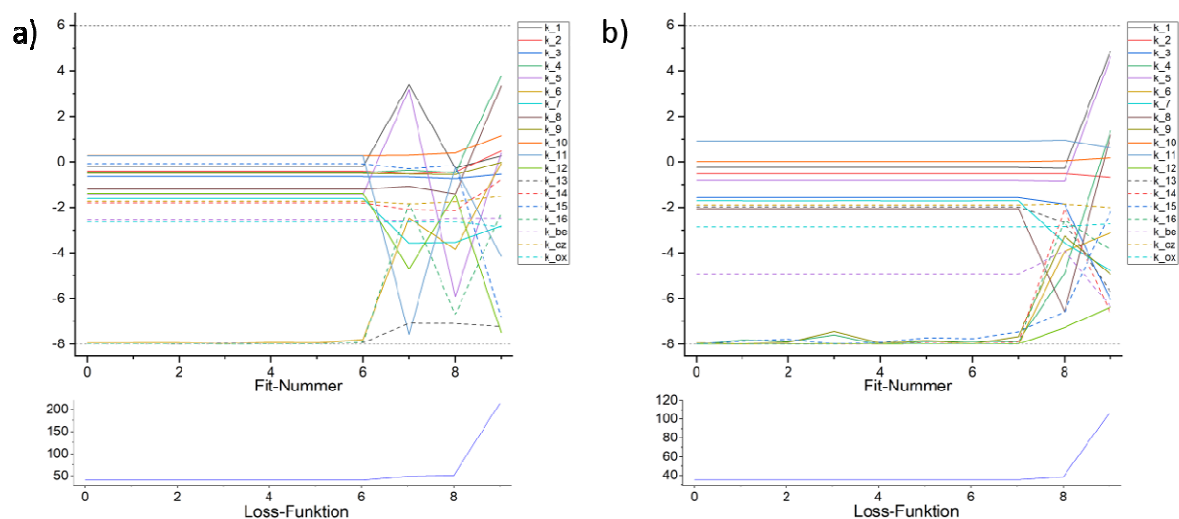
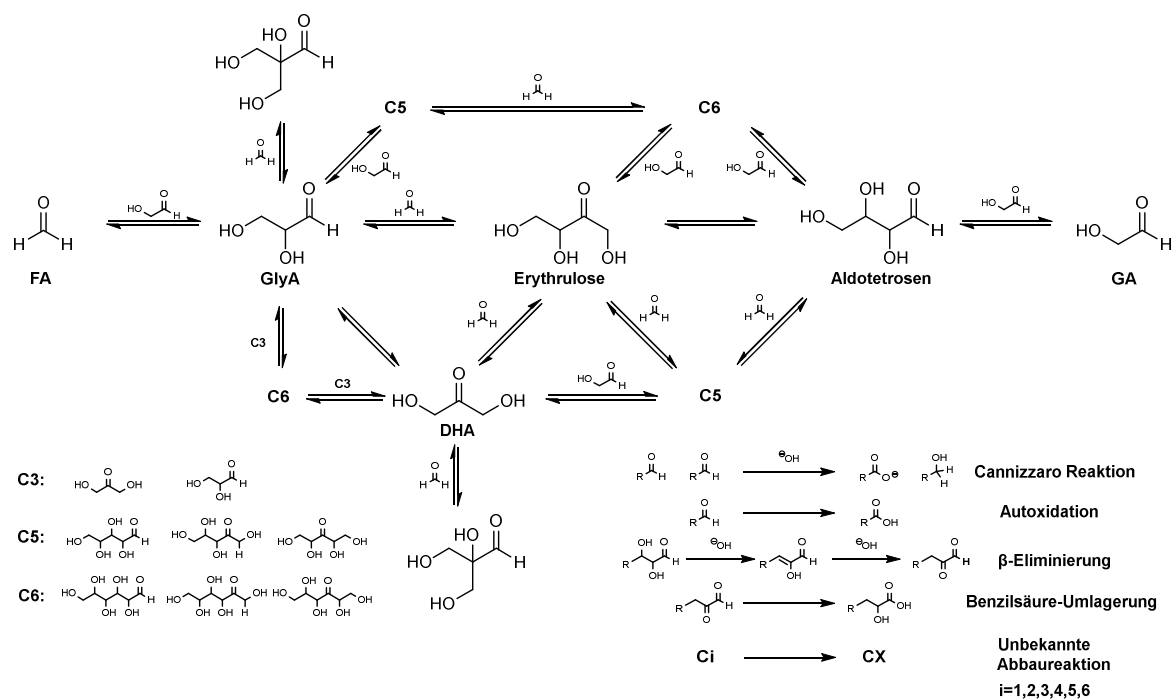


Abb. 2.29: Abbildung der berechneten Geschwindigkeitskonstanten der Keto-Enol-Tautomerien bei der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit den Hydroxiden über Modell V. Die Grenzen wurden dabei auf $10^{-8} < k < 10^6$ festgelegt. Eine Zuordnung der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten zu den Reaktionen kann der Tabelle 2.4 entnommen werden. a) Calciumhydroxid, b) Kaliumhydroxid.

Um nun die erhaltenen Werte in erweiterten Netzwerken zu nutzen, wurden nur eindeutige Reaktionen ausgewählt und diese als Startwert für die Berechnung genutzt. Zusätzlich wurde der Bereich dieser Werte stark eingegrenzt. So konnten die gesetzten Werte nur maximal um den Faktor 10 in den größeren Netzwerken abweichen. Zu den Reaktionen zählte die Aldol-Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd (k_1) sowie die beiden Retro-Aldol-Reaktionen der Triosen (k_5) und der Hexosen in Pentosen sowie Formaldehyd (k_8). Bei Calciumhydroxid konnte zusätzlich noch die entsprechende Aldol-Reaktion von Pentosen und Formaldehyd zu Hexosen (k_4) in das größere Netzwerk übernommen werden. Da diese Reaktion bei Kaliumhydroxid an die untere Grenze stößt war dies hier nicht möglich. Alle weiteren Reaktionen konnten nicht näher spezifiziert werden, da die einzelnen Kohlenhydrat-Gruppen mehrere Stereoisomere beinhalten.

Modell VI „no-Enol-Dump-fix“

Die durch Modell V erhaltenen Reaktionskonstanten wurden nun in das größere Modell IV (Schema 2.16) als Startwert übertragen und ihre Grenzen entsprechend eingeschränkt. Die Übertragung der entsprechenden Reaktionen ist in Tabelle 2.5 wiedergegeben. Zusätzlich wurden aus dem Modell IV die Enol-Formen entfernt, um eine Angleichung des Modells durch die fehlende Information der Konzentration dieser zu verhindern.



Schema 2.16: Modell VI des Formose-Netzwerkes. Mit inbegriffen sind die bekannten Nebenreaktionen sowie eine unbekannte Abbaureaktion der Zucker über eine bestimmte Reaktionskonstante. Auf die Keto-Enol-Tautomerien wurde hierbei verzichtet.

Tabelle 2.5: Übersicht der aus Modell V übertragenen Reaktionskonstanten in das Modell VI.

Modell V	Modell VI	Reaktion
k ₁	k ₁	<chem>H-C(=O)-H</chem> $\xrightarrow{}$ <chem>HO-CH2-CHO</chem>
k ₄	k ₂₉	<chem>H-C(=O)-H</chem> $\xrightarrow{C5}$ <chem>OCC(O)C(O)C(=O)O</chem>
k ₅	k ₂	<chem>OCC(O)C(O)C(=O)O</chem> $\xrightarrow{}$ <chem>H-C(=O)-H</chem> <chem>HO-CH2-CHO</chem>
k ₈	k ₃₆	<chem>OCC(O)C(O)C(O)C(=O)O</chem> $\xrightarrow{}$ <chem>H-C(=O)-H</chem> <chem>OCC(O)C(O)C(=O)O</chem>

Bereits durch die Eingrenzung dieser Reaktionskonstanten und die Entfernung der Enol-Formen konnte eine verbesserte Beschreibung der experimentell erhaltenen Datenpunkte erzielt werden. In Abb. 2.30 ist der erhaltene zeitliche Verlauf an Konzentration der einzelnen Zucker wiedergegeben. Dabei entspricht der durch das Modell erhaltene Verlauf bei Calciumhydroxid (Abb. 2.30 a)) relativ genau den durch das Experiment erhaltenen Konzentrationen. Wie in den vorangegangenen Modellen zeigt jedoch Glycerinaldehyd in den ersten Reaktionsminuten einen geringeren Konzentrationsverlauf als die gemessene Konzentration. Erklärt werden kann dies durch die schnelle Reaktion bei Calciumhydroxid sowie die niedrige Zeitauflösung in den ersten Reaktionsminuten. Alle weiteren erhaltenen Kohlenhydrate werden jedoch realitätsnah beschrieben. Bei Kaliumhydroxid (Abb. 2.30 b)) zeigen sich hingegen stärkere Abweichungen. Dies zeigt sich vor allem in dem Reaktionspaar der gewinkelten

Tetrose sowie des Cannizzaro-Produktes. Während der gewC4-Zucker (gestrichelt rot) in den ersten Minuten im Modell in einer höheren Konzentration als gemessen vorliegt kommt es bei dem entsprechenden Alkohol (gestrichelt schwarz) zu einer Unterproduktion. Dementsprechend fällt die Reaktionskonstante der Cannizzaro-Reaktion im Modell kleiner aus als der reale Wert, sodass die Reduktion des gewC4-Zuckers schneller vonstattengeht als von dem Modell beschrieben.

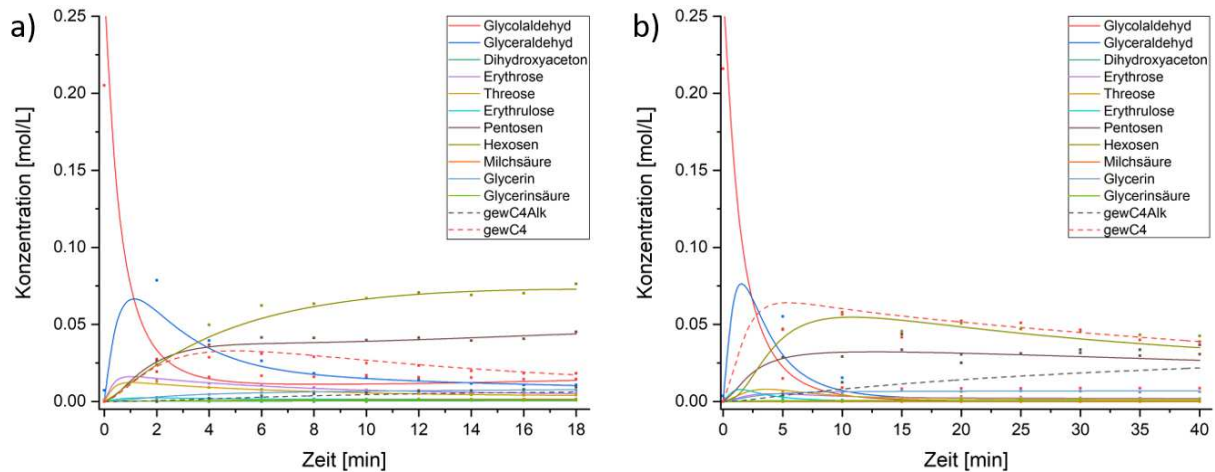


Abb. 2.30: Zeitlicher Verlauf der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit den Hydroxiden a) Calciumhydroxid, b) Kaliumhydroxid. Gezeigt sind jeweils der beste Fit mit Modell VI.

Bei erster Betrachtung der erhaltenen Reaktionskonstanten einzelner Fits der Reaktion mit Calciumhydroxid in Abb. 2.31, zeigt sich weiterhin die allgemeine Unbestimmtheit der Parameter. Trotz der Einschränkung einzelner Reaktionskonstanten schwanken noch immer einige der Werte zwischen den Fits um mehrere Zehnerpotenzen. Dennoch konnten weitere Reaktionskonstanten durch das Festhalten eingeschränkt werden. Dies zeigt sich zum Beispiel bei der Reaktion von Formaldehyd mit Erythrulose (k_{19} , links, dunkelgrüne Line), die bis auf zwei starken Abweichungen einen stabilen Verlauf aufweist. Werden die beiden Datenpunkte vernachlässigt, sodass insgesamt über 85 % der Datenpunkte berücksichtigt werden, wird im Durchschnitt ein Wert von $1.20 \cdot 10^{-1} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ erhalten. Zusätzlich konnte auf diese Weise auch die Reaktion von Formaldehyd mit Glyceraldehyd zur gewinkelten Tetrose mit einem Wert von $3.21 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt werden (k_{43} , rechts, dunkelblaue Line).

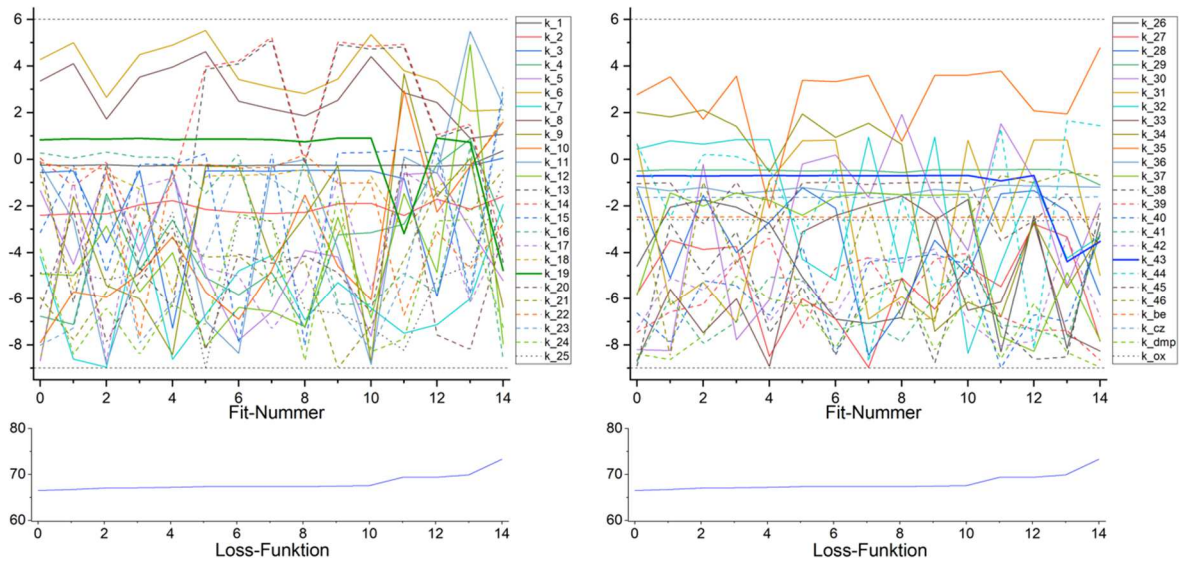


Abb. 2.31: Abbildung der berechneten Geschwindigkeitskonstanten der der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid über Modell VI. Die Grenzen wurden dabei auf $10^{-9} < k < 10^6$ festgelegt. Eine Zuordnung der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten zu den Reaktionen kann der Tabelle 5.5 entnommen werden.

Ein ähnliches Verhalten wird bei Kaliumhydroxid beobachtet. Viele der in Abb. 2.32 erhaltenen Parameter sind bei der ersten Betrachtung unbestimmbar. Aber auch hier zeigen einzelne Reaktionskonstanten ein stabiles Verhalten in den durchgeführten Berechnungen. Ein Beispiel ist die Isomerisierung von Erythrose zu Erythrulose (k_{12} , links, hellgrüne Linie). Alternativ die Reaktion von Formaldehyd und Erythrulose (k_{19} , links, schwarze Linie), die bereits bei Calciumhydroxid in diesem Modell einen sehr stabilen Verlauf aufwies. Doch auch hier zeigen sich zwei stärkere Abweichungen in den verschiedenen Berechnungen. Werden diese bei der Bestimmung der Reaktionskonstante nicht berücksichtigt, wird für k_{19} ein Wert von $1.83 \cdot 10^{-2} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ erhalten.

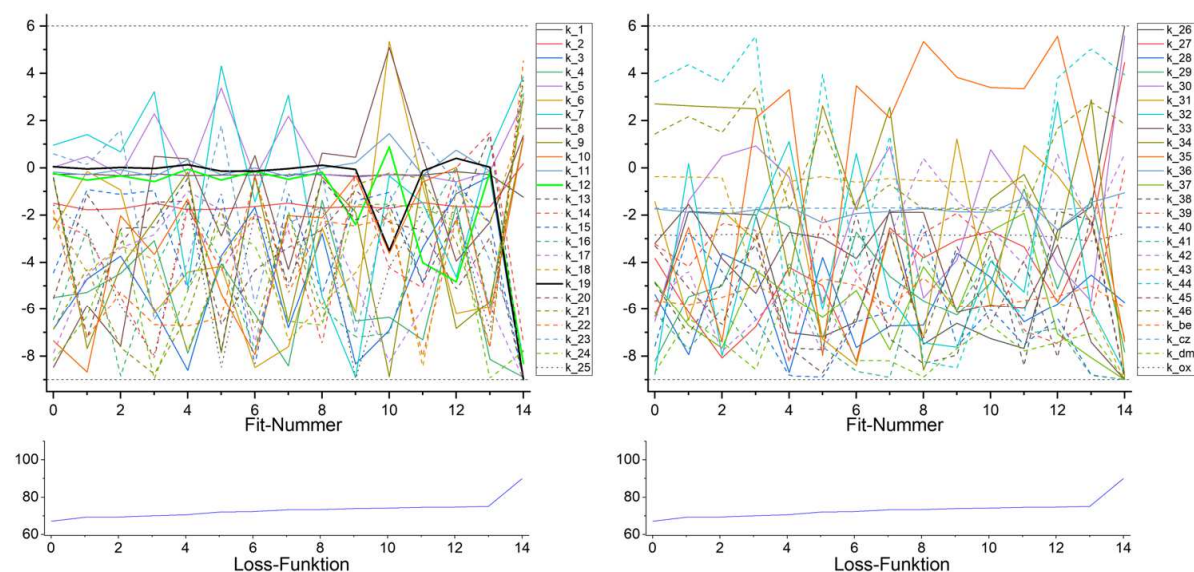


Abb. 2.32: Abbildung der berechneten Geschwindigkeitskonstanten bei der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Kaliumhydroxid über Modell VI. Die Grenzen wurden dabei auf $10^{-9} < k < 10^6$ festgelegt. Eine Zuordnung der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten zu den Reaktionen kann der Tabelle 5.5 entnommen werden.

Werden nun diese zusätzlich bestimmte Reaktionskonstanten in einer weiteren Berechnung ebenfalls eingegrenzt können somit weitere Konstanten bestimmt werden. Auf diese Weise kann iterativ das Modell und die dazugehörigen Reaktionskonstanten bestimmt werden.

2.4.4 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurden kinetische Untersuchungen der Formose-Reaktion in Kooperation mit Severin Angerpointner vorgestellt. Dafür wurde der zeitliche Verlauf an Zuckerkonzentrationen innerhalb der Reaktion mit unterschiedlichen Katalysatoren verfolgt. Mittels computergestützter Modellierungen konnten anschließend Reaktionskonstanten der einzelnen Reaktionen bestimmt werden. Bereits zu Beginn der Modellierungen zeigte sich die Problematik der Unterbestimmtheit des Modells. Mit der aktuell modernsten Analytik war es nicht möglich genügend Informationen über die Konzentration einzelner Produkte sowie Nebenprodukte zu generieren. Durch zum Beispiel die Implementierung von Enol-Formen in das Modell, deren Konzentration analytisch nicht zugänglich waren, konnte dieses jegliche Reaktionskonstanten und Konzentrationen über diese ausgleichen. Dies hatte zur Folge, dass laut Modell einzelne Verbindungen zu 90 % in ihrer Enol-Form vorliegen sollten. Weitere Anpassungen des Modells, wie durch das Einführen von Abbaureaktionen konnten die Unbestimmtheit die einzelnen Parameter verbessern.

Über einen neuen Ansatz war es dann jedoch möglich, einzelne Reaktionskonstanten zu bestimmen. Dafür wurde das Modell stark vereinfacht und auf die genaue Stereoisomerie der Kohlenhydrate verzichtet. Die daraus resultierenden Werte konnten anschließend bei genau definierten Reaktionen in ein größeres Netzwerk als Startwert übertragen werden. Durch zusätzliches Eingrenzen dieser Werte konnten mit dem größeren Modell VI weitere Reaktionskonstanten bestimmt werden.

2.5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Formose-Reaktion im Hinblick auf Selektivität, Mechanismus und Kinetik untersucht. Das Fundament dieser Forschung bildet eine tiefgehende Analytik der in dem Netzwerk entstehenden Reaktionsprodukte sowie –nebenprodukte. Durch die Kombination von HPLC und GC war es möglich, insgesamt 15 verschiedene Kohlenhydrate zu identifizieren und zu qualifizieren. Eine Auftrennung der Pentosen und Hexosen konnte aufgrund der geringen strukturellen Unterschiede nur in einzelnen Fällen erreicht werden. Durch den Einsatz von Citronensäure bzw. EDTA konnte zusätzlich eine Methode entwickelt werden, um die basenkatalysierte Formose-Reaktion zeitaufgelöst zu stoppen. Mit dem Einsatz von SAMP als Derivatisierungsmittel konnte die gaschromatographische Trennung von D- und L-Glyceraldehyd erzielt werden. Anschließend durchgeführte stereoselektive Katalysen mit verschiedenen Aminosäuren zeigten sich jedoch nicht als geeignet für diese Analysemethode. Zu gering ist dabei die Umsetzung zu Glyceraldehyd, um die benötigte Konzentration von 5 mM zu übersteigen. Wurde hingegen Calciumcarbonat als Katalysator eingesetzt, konnte Glyceraldehyd mit einer Konzentration von 8.7 mM erhalten und analysiert werden.

Weitere stereoselektive Analysen wurden mit verschiedenen Derivaten von Formaldehyd und 2,3-Dihydroxyfumarsäure als Syntheseanalogon für Glycolaldehyd bei 60 °C durchgeführt. In den Reaktionen mit den unreaktiveren Formaldehyd-Analoga, 1,3,5-Trioxan und Dimethoxymethan, konnte primär die Decarboxylierung von Dihydroxyfumarsäure zu Glycolaldehyd beobachtet werden. Eine Reaktion der jeweiligen Substrate fand nur im geringen Maßstab statt. Bei der Verwendung einer Formalin-Lösung wurde hingegen eine hohe Selektivität gegenüber Glyceraldehyd beobachtet. Die Zugabe von Calciumcarbonat als Katalysator führte zur Stabilisierung der Säure und zur vermehrten Bildung von Ketosen sowie unbekanntem Zuckersäuren.

Mechanistisch konnte die selektive Bildung von Glyceraldehyd durch Reaktion von Formaldehyd und Dihydroxyfumarsäure über Isotopenmarkierung nachvollzogen werden. Dazu wurde die Säure vollständig deuteriert und zusätzlich eine undeuterierte Formaldehyd-Lösung in deuterierten Lösungsmitteln hergestellt. In der Reaktion kommt es bei 60 °C zu einer vollständigen Decarboxylierung der Säure in die Enol-Form des Glycolaldehyds, welches anschließend Formaldehyd addiert. Das dabei entstandene Glyceraldehyd-d₂ konnte anschließend über hochaufgelöste Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

Abschließend wurde die Formose-Reaktion kinetisch untersucht. Dazu wurde der Reaktion verschiedene Calcium- und Kaliumsalze bei 40 °C bzw. 60 °C zugeführt und der Konzentrationsverlauf der Kohlenhydrate zeitaufgelöst nachverfolgt. Eine erste Gegenüberstellung der Reaktionen zeigte vor

allem, dass die Basizität der Katalysatoren entscheidend ist für die Aktivität des Katalysators. Eine höhere Basizität beschleunigte die Formose-Reaktion und bewirkte eine breitere Produktverteilung sowie einen schnelleren Abbau der entstandenen Kohlenhydrate. Der Vergleich der Kationen erwies sich aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit der eingesetzten Salze als schwierig. Jedoch konnte bei den Formiaten eine leicht höhere Reaktivität des Calciumsalzes im Vergleich zum Kalium beobachtet werden.

Über die erhaltenen Konzentrationen sollten anschließend Reaktionskonstanten einzelner Reaktionen bestimmt werden. Dazu wurden Modelle der Formose-Reaktion aufgestellt und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erwin Frey berechnet. Bereits zu Beginn zeigte sich eine Unterbestimmtheit des Modells. Die Unzahl an Reaktionen und Vernetzungen erschwerten eine genaue Bestimmung der Konstanten einzelner Reaktionen. Das Fehlen von Informationen über Konzentrationen einzelner Spezies verhinderte trotz moderner Analytik eine eindeutige Lösung der Modelle. Die dadurch entstandene Freiheit, das Modell über zum Beispiel die Konzentrationen der Enol-Spezies anzugleichen, bewirkte, dass diese vermeintlich im großen Überschuss gebildet werden sollten.

Durch eine starke Vereinfachung war es möglich, die effektiven Reaktionskonstanten zwischen den einzelnen Gruppen der Kohlenhydrate zu bestimmen. Eindeutige Konstanten, wie zum Beispiel die der Reaktion von Formaldehyd und Glyceraldehyd wurden anschließend in ein größeres Netzwerk als Startwert überführt. Durch Verkleinerung der Grenzen dieser Werte war es anschließend möglich, weitere Reaktionskonstanten innerhalb des größeren Netzwerkes zu bestimmen.

Im weiteren Verlauf werden nun Reaktionskonstanten im Netzwerk gesucht, die in den verschiedenen Berechnungen einen nahezu stabilen Wert aufweisen. Dieser Wert wird anschließend in einer neuen Berechnung des Netzwerkes als Startwert eingegeben und die Grenzen individuell mit einem Bereich von $\pm 10^3$ festgelegt. Durch die in Abb. 2.33 gezeigten Einschränkungen sollten sich anschließend weitere Reaktionskonstanten eingrenzen lassen und bestimmt werden. Über ein iteratives Verfahren sollen so in Zukunft nach und nach alle Reaktionskonstanten des Modells bestimmt werden.

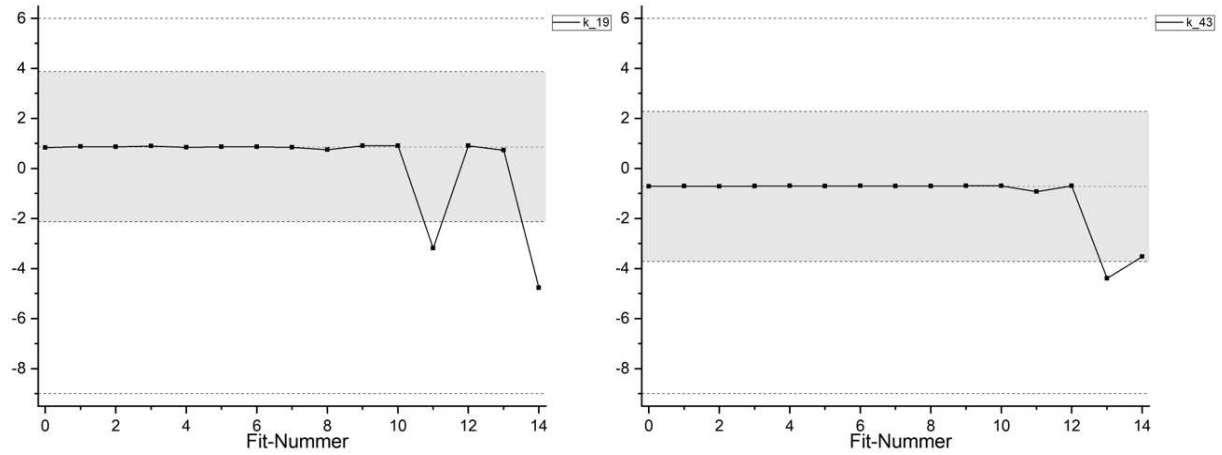


Abb. 2.33: Abbildung der berechneten Geschwindigkeitskonstanten von Formaldehyd und Erythrulose (k_{19}) und Formaldehyd mit Glyceraldehyd (k_{43}) mit Calciumhydroxid über Modell VI. Die Grenzen wurden dabei auf $10^{-9} < k < 10^6$ festgelegt. In der nächsten Berechnung wird die Grenze auf $10^{-2.14} < k_{19} < 10^{3.86}$ bzw. $10^{-3.72} < k_{43} < 10^{2.28}$ (grauer Bereich) eingegrenzt

Kapitel 3:

Experimenteller Teil

3.1 Allgemeine Angaben

3.1.1 Arbeitstechniken, eingesetzte Stoffe und Lösungsmittel

Allgemein wurden die Untersuchungen der Reaktionsnetzwerke in Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt. Das für die Reaktionen verwendete vollentsalzte Wasser wurde von einer Puranity PU Wasseraufbereitungsanlage der Firma VWR (Radnor, Pennsylvania, USA) entnommen.

Die Derivatisierung der GC-Proben erfolgte in einem AccuBlock Digital Dry Baths Heizblock von LABNET INTERNATIONAL, INC. (Edison, New Jersey, USA). Die Probendurchmischung erfolgte durch einen Standard Orbital Shaker 1000 der Firma VWR. Die anschließende Gefriertrocknung der Proben wurde an einem Alpha 1-2 LDplus Lyophilisator von MARTIN CHRIST (Oserode am Harz, Niedersachsen, Deutschland) durchgeführt.

Synthesen einzelner Substanzen wurden hingegen in einer wasserfreien und sauerstofffreien Umgebung realisiert. Hierbei wurden die verwendeten Glasgeräte vor der Verwendung mit einem Heißluftfön ausgeheizt und zusätzlich unter Stickstoffatmosphäre gearbeitet. Der dazu verwendete Stickstoff wurde dabei nicht zuvor getrocknet.

Die Zugabe verschiedener Substanzen erfolgte über die Spritzen/Septen-Technik. Allgemein wurden die Standard-Schlenk-Techniken bei den chemischen Synthesen angewendet.

Die in den Reaktionen eingesetzten Edukte sowie Lösungsmittel, die über ABCR, ACROS, ALFA AESAR, SIGMA-ALDRICH oder VWR bezogen worden sind, wurden direkt und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden von einer MB SPS-800-Trocknungsanlage der Firma MBRAUN (Garching, Bayern, Deutschland) bezogen.

3.1.2 Analytische Methoden

Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)

Gaschromatographische Messungen mit Massenkopplung wurden an einer Trace GC Ultra von THERMO FISHER SCIENTIFIC (San Jose, Kalifornien, USA) mit einem Split/Splitless-Injektor (120-300 °C) sowie einem Flammenionisationsdetektor (250 °C) durchgeführt. Die Massenspektren wurden mit einer Quadrupol-Ionenfalle (PolarisQ MS) bzw. einem Quadrupol (ISQ single quadrupole MS) aufgenommen. Die Elektronenstoßionisation erfolgte bei 200 °C und 70 eV. Bei einer Inlet-Temperatur von 250 °C und einem Splitfluss von 30 mL·min⁻¹ wurden 0.1 µL der Probe injiziert.

Hochaufgelöste Massenspektren wurden durch Mitarbeiter der zentralen Analytik-Abteilung der LMU München unter Leitung von Herrn Dr. Spahl an einer Orbitrap Q Exactive Plus von THERMO FISHER SCIENTIFIC durchgeführt. Dabei wurde ein Optima 5 MS (30 m, ID 250 µm, FD 250 nm) verwendet. Als

Temperaturprogramm wurde bei 100 °C gestartet und für 2 Min gehalten. Anschließend mit 8 °C·Min⁻¹ auf 180 °C erhitzt und direkt weiter mit 4 °C·Min⁻¹ auf 250 °C erhitzt und diese Endtemperatur für 5 Min gehalten. Gemessen wurde mit 80 kPa Helium.

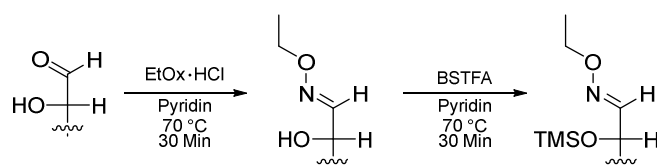
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

An einem Agilent Serie 1200 Hochleistungsflüssigkeitschromatographen der Firma AGILENT TECHNOLOGIES (Santa Clara, Kalifornien, USA) wurden HPLC Messungen durchgeführt. Für die Trennung bei der DNPH-Derivatisierung wurde eine LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm, 250 mm x 4 mm) von MERCK (Darmstadt, Hessen, Deutschland) verwendet. Die Trennsäule wurde dabei auf 25 °C temperiert und 1.0 µL Probeflüssigkeit injiziert. Ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser (50:50, v:v) mit 0.1 % Ameisensäure wurde bei einem Fluss von 1.0 mL·Min⁻¹ verwendet. Eine Zuordnung der Signale erfolgte bei einer Wellenlänge des UV-Detektors von 360 nm. Die dabei genutzten Lösungsmittel in HPLC-Gradienten-Qualität wurden von SIGMA-ALDRICH bezogen.

NMR-Kernresonanzspektroskopie

NMR-spektroskopische Untersuchungen wurde an Avance 400 Spektrometern der Firma BRUKER durchgeführt bei Raumtemperatur durchgeführt. Die dabei präsenten Kopplungskonstanten *J* sind in Hz und die chemische Verschiebung δ in ppm angegeben. Um eine qualitative Aussage über die chemische Verschiebung zu gewährleisten, wurde gegen das ¹H-Restsignal der deuterierten Lösungsmittel kalibriert.^[196] Die Multiplizitäten der Signale wurden für eine übersichtliche Beschreibung folgendermaßen abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, quin = Quintett, sext = Sextett, m = Multipllett und bs = breites Signal. Als Lösungsmittel wurden deuteriertes Chloroform (CDCl₃) und Deuteriumoxid (D₂O) verwendet

3.1.3 Allgemeine Derivatisierung zur Analyse mittels GC

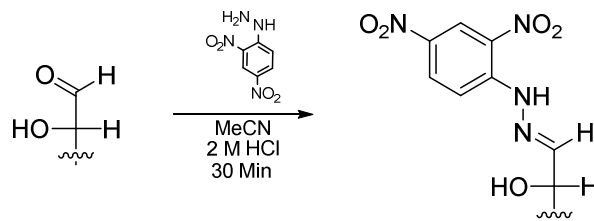


Für die Probenvorbereitung zur GC-Analyse wurde eine Derivatisierungslösung mit internem Standard hergestellt. Dafür wurden 100 mg·mL⁻¹ O-Ethylhydroxylamin-Hydrochlorid und 640 µg·mL⁻¹ Phenyl-β-D-glucopyranosid in Pyridin gelöst. Die getrocknete Reaktionsmischung wurde mit 400 µL der Derivatisierungslösung vermischt und für 30 Min bei 70 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf RT wurden

150 μL an BSTFA zugeführt und die Probe erneut für 30 Min auf 70 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Abschließend wurde die Probe filtriert und mittels GC vermessen.

Eine Trennung der Substanzen erfolgte, falls nicht abweichend angegeben, über eine SE-52 (14 m, ID 250 μm , FD 250 nm) Trennsäule. Die Trennung erfolgte über ein Temperaturprogramm: isothermal bei 50 $^{\circ}\text{C}$ für 2 Min, mit anschließender Temperatursteigerung von 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{Min}^{-1}$ auf 140 $^{\circ}\text{C}$ und abschließend mit 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{Min}^{-1}$ für 2 Min auf 240 $^{\circ}\text{C}$. Als Trägergas wurde Helium mit einem Druck von 80 kPa verwendet.

3.1.4 Allgemeine Derivatisierung zur Analyse mittels HPLC



Für die Derivatisierung über DNPH zur Analyse mittels HPLC wurde eine gesättigte MeCN-Lösung von DNPH hergestellt. Aus dieser wurden 700 μL entnommen und mit 290 μL MeCN verdünnt. Dazu wurden 5 μL der Probe sowie 5 μL einer 2 M HCl-Lösung hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 30 Min bei RT durchgeführt und abschließend mittels HPLC vermessen.

3.1.5 Quantifizierung von Formaldehyd mittels HPLC

Zur Quantifizierung von Formaldehyd mittels HPLC wurden Eichgeraden aufgenommen. Dafür wurde eine 1 mL Stammlösung mit einer Konzentration von 250 mM erstellt. Anschließend wurden diese mit Wasser zu jeweils 1 mL der folgenden Stammlösungen verdünnt: 125 mM, 75 mM, 50 mM, 10 mM, 7.5 mM, 5 mM, 2.5 mM, 1 mM und 0.5 mM. Jeweils 200 μL der einzelnen Verdünnungen wurden mit 600 μL einer gesättigten DNPH Lösung in MeCN vermengt und mit 195 μL MeCN weiter verdünnt. Abschließend wurden 5 μL einer 2 M HCl Lösung hinzugegeben, die Reaktion für 30 Min bei RT durchgeführt und anschließend mittels HPLC vermessen. Aus den erhaltenen Datenpunkten wurde die Eichgerade im Anhang erstellt. Dabei wurde auf die Konzentrationen von 250 mM und 125 mM verzichtet, da sie außerhalb des linearen Bereich des Detektors lagen.

3.1.6 Quantifizierung von Glycolaldehyd mittels HPLC

Zur Quantifizierung von Glycolaldehyd mittels HPLC wurden Eichgeraden aufgenommen. Dafür wurde eine 1 mL Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mM erstellt. Anschließend wurden diese mit Wasser zu jeweils 1 mL der folgenden Stammlösungen verdünnt: 25 mM, 15 mM, 10 mM, 2 mM, 1.5 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.2 mM und 0.1 mM. Jeweils 200 μ L der einzelnen Verdünnungen wurden mit 600 μ L einer gesättigten DNPH Lösung in MeCN vermenget und mit 195 μ L MeCN weiter verdünnt. Abschließend wurden 5 μ L einer 2 M HCl Lösung hinzugegeben, die Reaktion für 30 Min bei RT durchgeführt und anschließend mittels HPLC vermessen. Aus den erhaltenen Datenpunkten wurde die Eichgerade im Anhang erstellt. Dabei wurde auf die Konzentrationen von 50 mM und 25 mM verzichtet, da sie außerhalb des linearen Bereich des Detektors lagen.

3.2 Experimente zu 1. Methodenentwicklung zur Analytik der Formose-Reaktion

3.2.1 Umsetzung von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Kaliumcarbonat



Für die Reaktion wurden 100 μ L einer 13.4 M Formalinlösung (1.34 mmol, 1 Äq.) mit 900 μ L Wasser aufgefüllt und 16.2 mg Glycolaldehyd (269 μ mol, 0.20 Äq.) dazugegeben. Um die Reaktion zu starten wurden 18.5 mg K_2CO_3 (134 μ mol, 0.1 Äq.) dazugegeben und die Reaktion auf 40 °C erhitzt. Nach 20 Min Reaktionszeit wurde eine 50 μ L Probe entnommen und eingefroren. Über Nacht wurde das Lösungsmittel am Lyophilisator entfernt und anschließend die Probe derivatisiert und über die GC vermessen.

3.2.2 Stoppen der Formose-Reaktion durch den Einsatz von Salzbildnern

Um das Stoppen der Aldol-Reaktion über das Ausfällen des katalytisch aktiven Kations zu untersuchen wurden Stammlösungen von Glycolaldehyd als Substrat, Calciumhydroxid als Katalysator und jeweils Natriumdihydrogenphosphat, Natriumfluorid und Natriumphosphat in Wasser hergestellt. Um nun die einzelnen Salzbildner zu testen wurden 500 μ L einer 280 mM Glycolaldehyd-Lösung (140 μ mol, 1.00 Äq.) mit 300 μ L einer 56.0 mM Lösung des Salzbildners (16.8 μ mol, 0.12 Äq.) sowie 200 μ L einer 70.0 mM Calciumhydroxid-Lösung (14.0 μ mol, 0.10 Äq.) vermenget und direkt in flüssigem Stickstoff

eingefroren. Die Proben wurden über Nacht gefriergetrocknet, anschließend derivatisiert und mittels GC vermessen.

3.2.3 Stoppen der Formose-Reaktion durch den Einsatz von Komplexbildnern

Zum Stoppen der Reaktion über Ansäuerung und Komplexbildung wurden ebenfalls Stammlösungen der einzelnen Komponenten, Glycolaldehyd, Calciumhydroxid, EDTA, Citronensäure und NTMP, angefertigt. Zu 500 μL einer 280 mM Glycolaldehyd-Lösung (140 μmol , 1.00 Äq.) wurden 300 μL einer 56.0 mM Lösung der jeweiligen Komplexbildner (16.8 μmol , 0.12 Äq.) und 200 μL einer 70.0 mM Calciumhydroxid-Lösung (14.0 μmol , 0.10 Äq.) gegeben. Die Probe wurde anschließend direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht am Lyophilisator getrocknet. Abschließend wurden die Proben für die GC derivatisiert und vermessen.

3.3 Experimente zu 2. Selektivität in der Formose-Reaktion

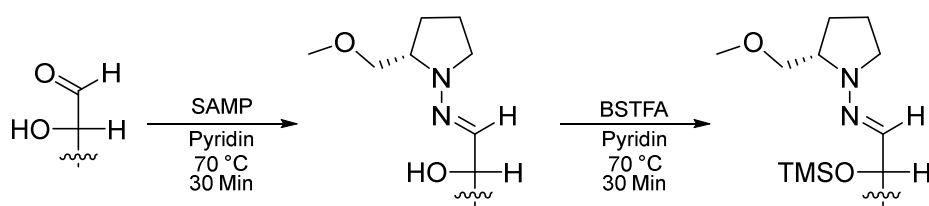
3.3.1 Trennung von D/L-Glyceraldehyd mit SAMP

Zur Methodenentwicklung der Trennung der beiden Enantiomere von Glyceraldehyd wurden 1.80 mg D/L-Glyceraldehyd (20.0 μmol , 1.00 Äq.) in 400 μL Pyridin gelöst. Dazu wurden 27.0 μL SAMP (200 μmol , 10 Äq.) dazugegeben und die Probe bei 70 °C für 30 Min gerührt. Nach Abkühlung wurden 100 μL BSTFA (37.3 μmol , 1.87 Äq.) zugegeben und erneut für 30 Min auf 70 °C erhitzt. Die abgekühlte Probe wurde abfiltriert und mittels GC vermessen. Zur Trennung wurde eine β -Dex Trennsäule (10 m, ID 250 μm , FD 250 nm) verwendet. Es wurde isothermal bei 105 °C mit 80 kPa Helium gemessen.

3.3.2 Trennung der Aldotetrosen über SAMP

Für die Optimierung der Trennung wurden kleine Mengen der einzelnen Tetrosen in 400 μL Pyridin gelöst und 30.0 μL SAMP (224 μmol) hinzugefügt. Die einzelnen Proben wurden für 30 Min auf 70 °C erhitzt und nach Abkühlung mit 100 μL BSTFA (37.3 μmol) versetzt. Erneut wurde auf 70 °C für 30 Min erhitzt und anschließend die Probe filtriert und mittels GC analysiert. Die Trennung erfolgte auf einer β -Dex Trennsäule (10 m, ID 250 μm , FD 250 nm). Es wurde isothermal bei 110 °C mit 40 kPa Wasserstoff gemessen.

3.3.3 Allgemeine Derivatisierung mittels SAMP



Für die Analyse der Verhältnisse an D/L-Glyceraldehyd wurden die getrockneten Zuckerproben mit 400 μL einer SAMP-Pyridin-Lösung versetzt. Zur Herstellung der SAMP-Pyridin-Lösung wurde jeweils 1 Teil SAMP in 10 Teile Pyridin gelöst. Anschließend wurde die Probe für 30 Min auf 70 °C erhitzt und nach Abkühlung 150 μL BSTFA hinzugegeben. Erneut wurde für 30 Min auf 70 °C erhitzt. Abschließend wurde die Probe filtriert und mittels GC vermessen.

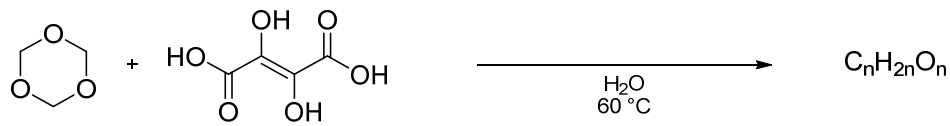
3.3.4 Chirale Induktion durch Aminosäuren

Zur Analyse mehrerer Aminosäuren wurde eine Stammlösung bestehend aus Formalin und Glycolaldehyd hergestellt. Dafür wurde 1.00 mL einer 13.4 M Formalinlösung (13.4 mmol, 1.00 Äq.) auf 10.0 mL mit Wasser aufgefüllt. Darin wurden zusätzlich 161 mg Glycolaldehyd (2.69 mmol, 0.20 Äq.) gelöst. Jeweils 1.00 mL dieser Stammlösung wurde mit 134 μmol (0.10 Äq.) der einzelnen Katalysatoren (s. Tabelle 3.1) versetzt und die Reaktion bei RT für 10 Tage durchgeführt. Abschließend wurde für die Derivatisierung über die EtOx-Variante 50.0 μL sowie 30.0 μL Probe für die Derivatisierung mittels SAMP entnommen, eingefroren und lyophilisiert.

Tabelle 3.1: Angaben der eingesetzten Masse der einzelnen Katalysatoren bei der Untersuchung der chiralen Induktion durch Aminosäuren.

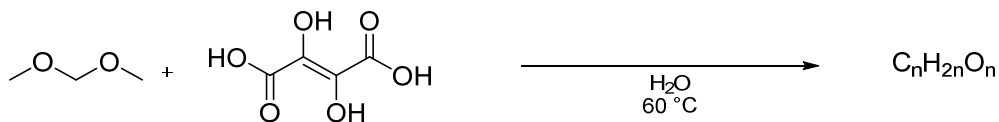
Katalysator	Masse [mg]
L-Isoleucin	17.6
L-Serin	14.1
L-Threonin	16.0
D-Prolin	15.5
L-Prolin	15.5
D/L-Prolin	15.5
Calciumcarbonat	13.4
Blank	-

3.3.5 Reaktion von 1,3,5-Trioxan mit Dihydroxyfumarsäure



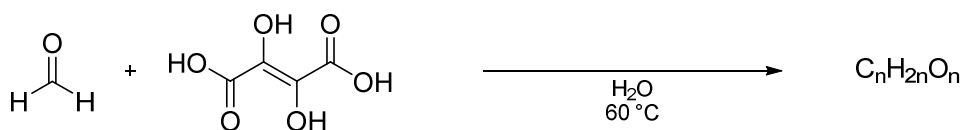
Für die Reaktion wurden 40.3 mg 1,3,5-Trioxan (447 μmol , 0.33 Äq.) in 1.00 mL Wasser gelöst und 39.7 mg Dihydroxyfumarsäure (269 μmol , 0.20 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde bei 60 °C gestartet und alle 30 Min 50 μL Proben entnommen. Diese wurden mit je 100 μL einer 80.4 mM Citronensäure-Lösung versetzt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und getrocknet.

3.3.6 Reaktion von Dimethoxymethan mit Dihydroxyfumarsäure



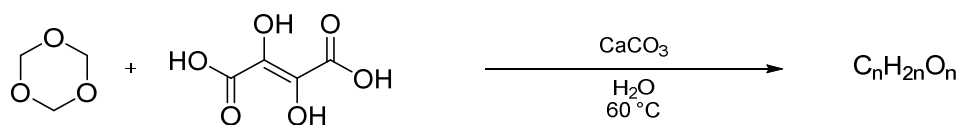
Für die Reaktion wurden 119 μL DMM (1.34 mmol, 1.00 Äq.) in 881 μL Wasser gelöst und 39.7 mg Dihydroxyfumarsäure (269 μmol , 0.20 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde auf 60 °C erhitzt und alle 30 Min Proben zu je 50 μL entnommen. Mit 100 μL einer 80.4 mM Citronensäure-Lösung gemischt wurde die Probe eingefroren und über Nacht am Lyophilisator getrocknet.

3.3.7 Reaktion von Formalin mit Dihydroxyfumarsäure



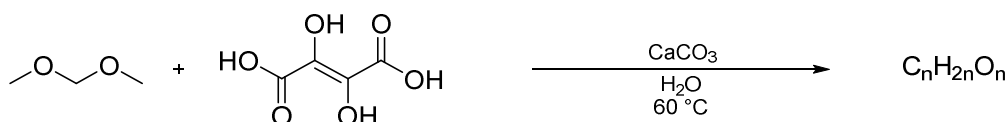
Für die Reaktion wurden 100 μL einer 13.4 M Formalin-Lösung (1.34 mmol, 1.00 Äq.) mit 900 μL Wasser versetzt und 39.7 mg Dihydroxyfumarsäure (269 μmol , 0.20 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde auf 60 °C erhitzt und alle 30 Min Proben zu je 50 μL entnommen. Die Proben wurden mit je 100 μL einer 80.4 mM Citronensäure-Lösung versetzt, eingefroren und getrocknet.

3.3.8 Reaktion von 1,3,5-Trioxan und Dihydroxyfumarsäure mit Calciumcarbonat



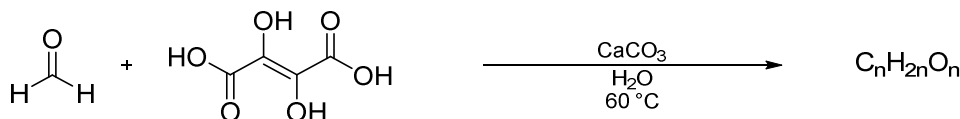
Für die Reaktion wurden 40.3 mg 1,3,5-Trioxan (447 μmol , 0.33 Äq.) in 1.00 mL Wasser gelöst und 39.7 mg Dihydroxyfumarsäure (269 μmol , 0.20 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 13.4 mg Calciumcarbonat (134 μmol , 0.10 Äq.) bei 60 °C gestartet. Alle 30 Min wurden Proben zu je 50 μL entnommen und mit 100 μL einer 80.4 mM Citronensäure-Lösung versetzt. Die Proben wurden eingefroren und über Nacht getrocknet.

3.3.9 Reaktion von Dimethoxymethan und Dihydroxyfumarsäure mit Calciumcarbonat



119 μL DMM (1.34 mmol, 1.00 Äq.) wurden mit 39.7 mg Dihydroxyfumarsäure (269 μmol , 0.20 Äq.) in 881 μL Wasser gelöst. Zusätzlich wurden 13.4 mg Calciumcarbonat (134 μmol , 0.10 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion bei 60 °C gestartet. Jede 30 Min wurden Proben zu je 50 μL entnommen und mit 100 μL einer 80.4 mM Citronensäure-Lösung versetzt, eingefroren und das Lösungsmittel über Nacht am Lyophilisator entfernt.

3.3.10 Reaktion von Formalin und Dihydroxyfumarsäure mit Calciumcarbonat



Für die Reaktion wurden 100 μL einer 13.4 M Formalin-Lösung (1.34 mmol, 1.00 Äq.) mit 900 μL Wasser aufgefüllt. Darin wurden 39.7 mg Dihydroxyfumarsäure (269 μmol , 0.20 Äq.) gelöst und zum Start der Reaktion bei 60 °C 13.4 mg Calciumcarbonat (134 μmol , 0.10 Äq.) zugegeben. Alle 30 Min wurden 50 μL Proben entnommen und mit 100 μL einer 80.4 mM Citronensäure-Lösung versetzt. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet.

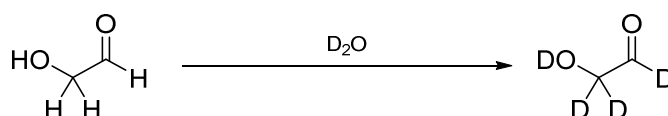
3.4 Experimente zu 3. Mechanistische Untersuchung der Formose-Reaktion

3.4.1 Herstellung einer Formalin-Lösung in deuterierten Lösungsmitteln



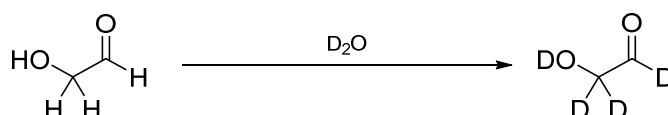
Zur Herstellung einer ca. 13.4 M Formalin-Lösung wurden 6.04 g Paraformaldehyd (201 mmol, 1.5 Äq.) vorgelegt und mit einer Heißluftfön ge-crackt. Über eine Teflonkanüle wurde das so erhaltene Formaldehyd-Gas in eine 12 %-CD₃OD-D₂O-Lösung (wt%) eingeleitet. Zur Quantifizierung wurden drei Proben mit je 5 µL entnommen, auf 1000 µL aufgefüllt und mittels DNPH-Derivatisierung analysiert. Nach erneuter Durchführung der Synthese konnte somit eine 19.9 M Formalin-Lösung erhalten werden. Über Nacht zeigte sich der Ausfall eines farblosen Feststoffes. Aus diesem Grund wurde vor jedem Gebrauch die Lösung abfiltriert und erneut quantifiziert.

3.4.2 Deuterierung von Glycolaldehyd durch Deuteriumoxid

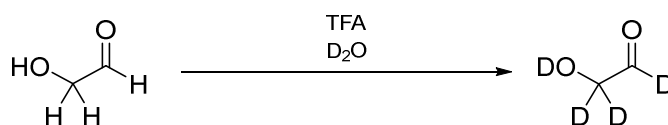


Zur Einlagerung von Deuteronen über eine Keto-Enol-Tautomerisierung wurden 25.0 mg Glycolaldehyd (416 µmol, 1.00 Äq.) in 3.00 mL D₂O (166 mmol, 399 Äq.) gelöst. Nach 40 h Reaktionszeit wurde die Probe direkt mittels GC vermessen. Zur Analyse wurde eine CP-Volamin (30 m, ID 0.32 mm, FD 0.32 µm) von AGILENT TECHNOLOGIES verwendet. Es wurde isothermal bei 40 °C mit einem Druck von 80 kPa Helium gemessen. Dabei konnte keine vollständige Deuterierung festgestellt werden.

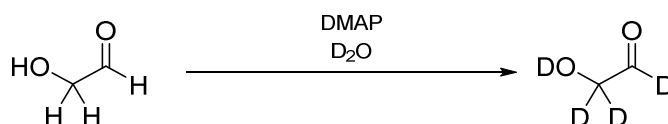
3.4.3 Deuterierung von Glycolaldehyd über mehrfaches Lösen in Deuteriumoxid



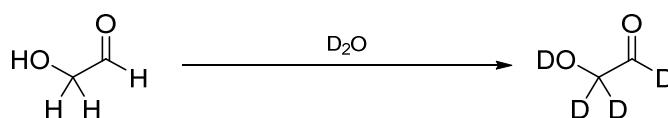
Für die Reaktion wurden 25.0 mg Glycolaldehyd (416 µmol, 1.00 Äq.) in 3.00 mL D₂O (166 mmol, 399 Äq.) gelöst. Nach 3 h Reaktionszeit wurde die Mischung eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet. Am nächsten Morgen wurde der erhaltene Rückstand erneut in 3.00 mL D₂O gelöst. Nach 8 h wurde die Probe direkt mittels GC vermessen. Eine vollständige Deuterierung konnte nicht beobachtet werden.

3.4.4 Deuterierung von Glycolaldehyd in Deuteriumoxid katalysiert durch TFA

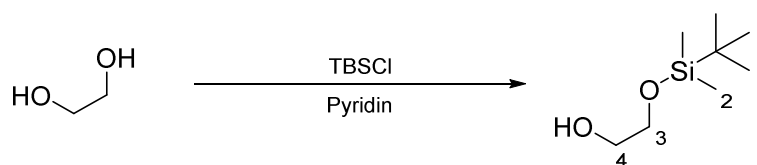
Für die Reaktion wurden 25.6 mg Glycolaldehyd (426 μmol , 1.00 Äq.) in 3.00 mL D_2O (166 mmol, 390 Äq.) gelöst und 3.00 μL TFA (45.3 μmol , 0.11 Äq.) dazugegeben. Die Reaktion wurde für 2 Tage gerührt und anschließend eine 50 μL Probe entnommen, eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels und der TFA wurde die Probe mittels der EtOx-Variante derivatisiert und über GC vermessen. Es konnte keine vollständige Deuterierung beobachtet werden.

3.4.5 Deuterierung von Glycolaldehyd in Deuteriumoxid katalysiert durch DMAP

Zur Beschleunigung der Keto-Enol-Tautomerie und Aufbrechung der Ringstruktur des Glycolaldehyds wurde DMAP als Katalysator verwendet. Dafür wurden 25.0 mg Glycolaldehyd (416 μmol , 1.00 Äq.) in 3.00 mL D_2O (166 mmol, 399 Äq.) gelöst. Nach einem Tag Reaktionszeit konnte in einer direkten Vermessung keine vollständige Deuterierung des Glycolaldehyds beobachtet werden.

3.4.6 Beschleunigung der Deuterierung durch Temperaturerhöhung

Um die Keto-Enol-Tautomerisierung zu beschleunigen wurden 25.6 mg Glycolaldehyd (426 μmol , 1.00 Äq.) in 4.00 mL D_2O (222 mmol, 521 Äq.) gelöst und für 2 Stunden unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde eine 50 μL Probe entnommen, eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet. Die getrocknete Probe wurde mittels der EtOx-Variante derivatisiert und mittels GC vermessen. Eine vollständige Deuterierung konnte nicht erhalten werden. Jedoch zeigte sich die Anwesenheit von Aldotetrosen.

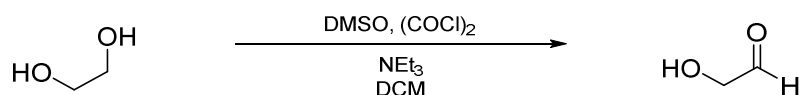
3.4.7 Synthese von 2-((*tert*-butyldimehtylsilyl)oxy)-ethanol

Für die Reaktion wurden 1.00 mL Glycol (17.9 mmol, 1.00 Äq.) unter Stickstoff in 10 mL Pyridin vorgelegt. Dazu wurde unter Rühren eine TBSCl-Pyridin Lösung langsam über 1 h zugegeben. Hierfür wurden 2.40 g TBSCl (15.9 mmol, 0.89 Äq.) in 5 mL Pyridin gelöst. Nach 2 h Rührzeit wurden 15 mL einer gesättigten NaHCO₃-Lösung hinzugegeben. Das Produkt wurde mit Et₂O extrahiert und mit einer gesättigten Kupfersulfat-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Na₂CO₃ wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Abschließend wurde das Rohprodukt über eine Kugelrohr-Destillation bei 90 °C und 20 mbar aufgereinigt und mittels NMR und GC-MS analysiert. Dadurch konnten 1.15 g (6.5 mmol, 36 %) des Produktes erhalten werden.

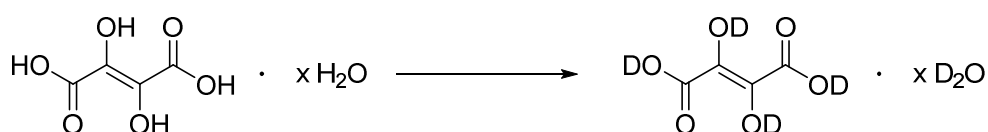
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, 300 K): δ (ppm) = 0.08 (s, 6H, H²), 0.91 (s, 9H, H¹), 3.64 (t, ³J_{H-H} = 4.0 Hz, 2H, H^{3/4}), 3.71 (t, ³J_{H-H} = 4.0 Hz, 2H, H^{3/4}).

3.4.8 Synthese des 2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-ethanals über eine Parikh-Doering-Oxidation

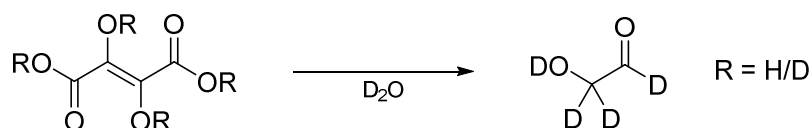
Für die Oxidation wurden 15 mL DCM unter Schutzatmosphäre bei 0 °C vorgelegt und 720 µL DMSO (792 mg, 10.1 mmol, 3.50 Äq.), 710 µL Triethylamin (518 mg, 5.12 mmol, 1.80 Äq.) und 504 mg des Alkohols (2.86 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben. Um die Reaktion zu starten wurden 1.35 g des Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplexes (8.48 mmol, 3.00 Äq.) hinzugeführt und die Reaktion bei 0 °C für 90 Min gerührt. Zur Aufreinigung der Reaktion wurde erneut eine Kugelrohrdestillation bei 80 mbar und 80 °C durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Verfärbung der Reaktionslösung ins gelbliche. Ein Produkt konnte auf diese Weise nicht erhalten werden.

3.4.9 Synthese von Glycolaldehyd über eine Swern-Oxidation


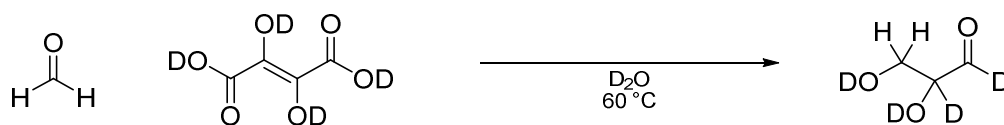
Für die Swern-Oxidation wurden 1.53 mL Oxalylchlorid (2.30 g, 17.9 mmol, 1.00 Äq.) und 3.00 mL DMSO (3.35 g, 42.9 mmol, 2.40 Äq.) mit 150 mL DCM vermengt und auf -78 °C temperiert. Nach 45 Min Reaktionszeit wurde diese langsam in 15 mL einer auf -78 °C temperierten DCM-Alkohol-Lösung überführt. Dafür wurden 1.10 g Glycol (17.9 mmol, 1.00 Äq.) in 15 mL DCM gelöst. Nach weiteren 2 h wurde 12.4 mL Triethylamin (9.05 g, 89.4 mmol, 5.00 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Abschließend wurde das Lösungsmittel und weitere flüchtige Komponenten am Feinvakuum (FV) entfernt. Eine Analyse des Rohproduktes mittels der EtOx-Derivatisierung mit GC-MS zeigte vor allem die Anwesenheit des Eduktes. Das Produkt selber konnte nur in minimalen Mengen erhalten werden.

 3.4.10 Deuterierung der 2,3-Dihydroxyfumarsäure


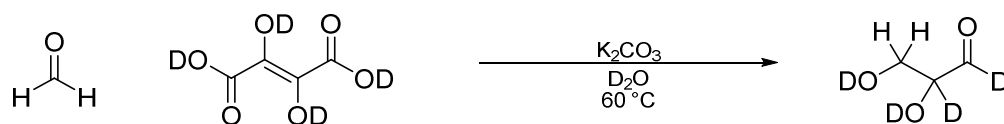
Für die Reaktion wurden 1.04 mg 2,3-Dihydroxyfumarsäure (7.00 mmol, 1.00 Äq.) in 5.00 mL CD₃OD (123 mmol, 17.6 Äq.) gelöst. Anschließend wurde die Säure mit 5.00 mL D₂O (277 mmol, 39.6 Äq.) wieder gefällt. Abschließend wurde das Lösungsmittel am FV entfernt. Somit konnten 913 mg der deuterierten 2,3-Dihydroxyfumarsäure (6.00 mmol, 85 %) erhalten werden.

 3.4.11 Decarboxylierung von 2,3-Dihydroxyfumarsäure


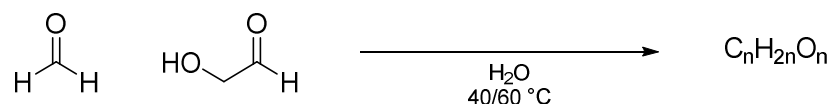
Zur Testung welche Form der DHFS den höheren Deuterierungsgrad ergibt wurden 10 mg DHFS-h₄ (67.5 µmol, 1.00 Äq.) bzw. 10 mg DHFS-d₄ (65.8 µmol, 1.00 Äq.) in 1 mL D₂O gelöst und für 15 Min auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurde jeweils eine 50 µL Probe entnommen, eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet. Am nächsten Tag wurde diese mittels GC vermessen.

3.4.12 Reaktion von Formaldehyd mit 2,3-Dihydroxyfumarsäure-d₄

Für die Reaktion wurden 79.2 μL einer 16.9 M, in D_2O gelösten, Formaldehyd-Lösung (1.34 mmol, 1.00 Äq.) mit 920.8 μL D_2O aufgefüllt und auf 60 °C erhitzt. Zusätzlich wurden dem Gemisch 40.8 mg DHFS-d₄ (268 μmol , 0.20 Äq.) hinzugeführt. Eine 50 μL Probe wurde nach 1 h Reaktionszeit entnommen und mit einer 80.4 mM Citronensäure-Lösung vermischt und eingefroren. Die Probe wurde über Nacht gefriergetrocknet und anschließend über die EtOx-Variante derivatisiert. Eine Analyse der Probe erfolgte an der GC-Orbitrap.

3.4.13 Reaktion von Formaldehyd und 2,3-Dihydroxyfumarsäure-d₄ mit Kaliumcarbonat

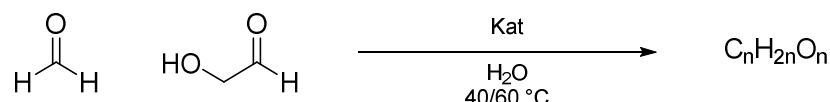
Für die Reaktion wurden 79.2 μL einer 16.9 M, in D_2O gelösten, Formaldehyd-Lösung (1.34 mmol, 1.00 Äq.) mit 921 μL D_2O aufgefüllt und auf 60 °C erhitzt. Dazu wurden 40.8 mg DHFS-d₄ (268 μmol , 0.20 Äq.) und 18.5 mg K_2CO_3 (134 μmol , 0.10 Äq.) hinzugegeben. Nach 1 h Reaktionszeit wurde eine 50 μL Probe entnommen und mit 100 μL einer 80.4 mM Citronensäure-Lösung vermischt und eingefroren. Über Nacht wurde die Probe getrocknet und anschließend mittels der EtOx-Variante derivatisiert. Analysiert wurde die Probe an der GC-Orbitrap.

3.5 Experimente zu 4. Kinetische Untersuchung der Formose-Reaktion3.5.1 Reaktion von Formaldehyd mit Glycolaldehyd

Bei der unkatalysierten Reaktion von Formaldehyd mit Glycolaldehyd wurden 100 μL einer 13.4 M Formalin-Lösung (1.34 mmol, 1.00 Äq.) mit 500 μL Wasser aufgefüllt und auf 40 bzw. 60 °C erhitzt. Hinzugeführt wurden 400 μL einer 673 mM Glycolaldehyd-Lösung (269 μmol , 0.20 Äq.). Dazu wurden 40.4 mg Glycolaldehyd (673 μmol) in 1 mL Wasser gelöst. Alle 20 Min wurden jeweils eine 50 μL und

eine 5 μL Probe entnommen. Die 50 μL Probe wurde mit 100 μL einer 80.4 mM Citronensäure-Lösung versetzt, eingefroren und am Lyophilisator getrocknet. Anschließend wurde die Probe mit der EtOx-Variante derivatisiert und mittels GC vermessen. Die 5 μL Probe wurde für eine Messung über die HPLC mit der DNPH-Derivatisierung analysiert.

3.5.2 Katalysierte Reaktion von Formaldehyd mit Glycolaldehyd



Für die katalysierte Reaktion von Formaldehyd mit Glycolaldehyd wurden 100 μL einer 13.4 M Formalin-Lösung (1.34 mmol, 1.00 Äq.) mit 500 μL Wasser aufgefüllt und auf 40 bzw. 60°C temperiert. Dazu wurden 400 μL einer 673 mM Glycolaldehyd-Lösung (269 μmol , 0.20 Äq.) zugegeben. Hierfür wurden 40.4 mg Glycolaldehyd (673 μmol) in 1 mL Wasser gelöst. Zusätzlich wurden 10 mol% des entsprechenden Katalysators (134 μmol , 0.1 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion zeitlich verfolgt. Dazu wurden alle 20 Min zwei Proben von 50 μL bzw. 5 μL entnommen und analysiert. Die 50 μL Probe wurde mit 100 μL einer 80.4 mM Citronensäure-Lösung versetzt, eingefroren und das Lösungsmittel über Nacht entfernt. Für die HPLC Analyse wurde die 5 μL Probe entsprechend der DNPH Derivatisierung bearbeitet. Abweichend dazu wurden bei $\text{Ca}(\text{OH})_2$ alle 2 Min bzw. bei KOH alle 5 Min Proben entnommen und die Reaktion nur bei 40 °C durchgeführt.

Tabelle 3.2: Angaben der eingesetzten Masse der einzelnen Katalysatoren zur Kinetischen Untersuchung der Formose-Reaktion.

Katalysator	Masse [mg]
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	9.93
CaCO_3	13.4
CaCl_2	14.9
$\text{Ca}(\text{HCOO})_2$	17.5
KOH	7.52
K_2CO_3	18.5
KCl	10.0
HCOOK	11.3

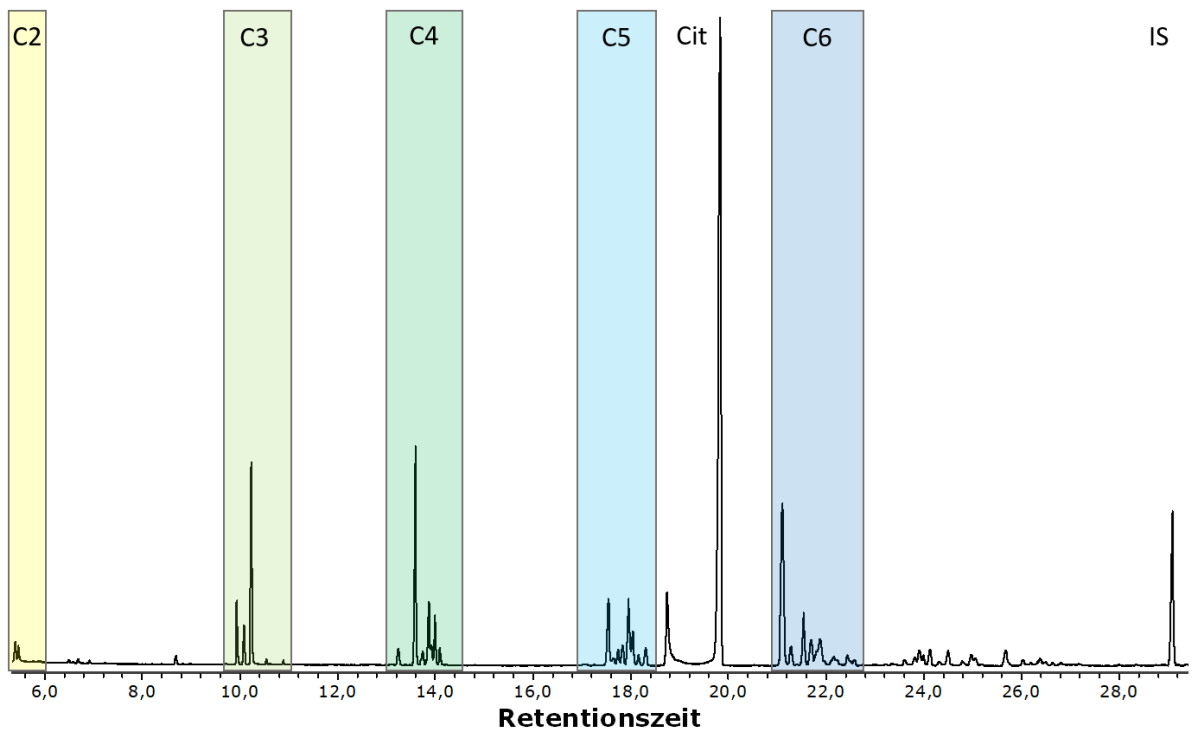


Abb. 3.1: Chromatogramm der Umsetzung von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid nach vier minütiger Reaktionszeit zur Analyse der Reaktionskinetik. IS = interner Standard, Cit = Citronensäure.

Kapitel 4:

Literaturverzeichnis

- [1] L. E. Orgel, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 491-495.
- [2] N. H. Sleep, K. Zahnle, P. S. Neuhoff, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 3666-3672.
- [3] G. Manhes, C. J. Allègre, B. Dupré, B. Hamelin, *Earth Planet. Sci. Lett.* **1980**, *47*, 370-382.
- [4] G. B. Dalrymple, *Geological Society, London, Special Publications* **2001**, *190*, 205-221.
- [5] N. Dauphas, *ICARUS* **2000**, *148*, 508-512.
- [6] S. J. Mojzsis, T. M. Harrison, R. T. Pidgeon, *Nature* **2001**, *409*, 178-181.
- [7] S. A. Wilde, J. W. Valley, W. H. Peck, C. M. Graham, *Nature* **2001**, *409*, 175-178.
- [8] M. Hirschmann, D. Kohlstedt, *Phys. Today* **2012**, *65*, 40-45.
- [9] R. Schoenberg, B. S. Kamber, K. D. Collerson, S. Moorbath, *Nature* **2002**, *418*, 403-405.
- [10] E. G. Nisbet, N. H. Sleep, *Nature* **2001**, *409*, 1083-1091.
- [11] N. H. Sleep, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a002527.
- [12] C. Chyba, C. Sagan, *Nature* **1992**, *355*, 125-132.
- [13] M. Brasier, N. McLoughlin, O. Green, D. Wacey, *Philos. Trans. R. Soc. B* **2006**, *361*, 887-902.
- [14] S. J. Mojzsis, G. Arrhenius, K. D. McKeegan, T. M. Harrison, A. P. Nutman, C. R. Friend, *Nature* **1996**, *384*, 55-59.
- [15] K. D. McKeegan, A. B. Kudryavtsev, J. W. Schopf, *Geology* **2007**, *35*, 591.
- [16] K. Zahnle, L. Schaefer, B. Fegley, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*.
- [17] C. F. Chyba, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1993**, *57*, 3351-3358.
- [18] E. E. Stueken, R. E. Anderson, J. S. Bowman, W. J. Brazelton, J. Colangelo-Lillis, A. D. Goldman, S. M. Som, J. A. Baross, *Geobiology* **2013**, *11*, 101-126.
- [19] B. K. D. Pearce, R. E. Pudritz, *Astrophys. J.* **2015**, *807*.
- [20] J. L. Bada, A. Lazcano, *Science* **2002**, *296*, 1982-1983.
- [21] J. G. Forsythe, S. S. Yu, I. Mamajanov, M. A. Grover, R. Krishnamurthy, F. M. Fernandez, N. V. Hud, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9871-9875.
- [22] B. Burcar, M. Pasek, M. Gull, B. J. Cafferty, F. Velasco, N. V. Hud, C. Menor-Salvan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13249-13253.
- [23] M. Bernstein, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2006**, *361*, 1689-1702.
- [24] A. I. Oparin, *The Origin of Life*, Macmillan, New York, **1938**.
- [25] S. L. Miller, H. C. Urey, *Science* **1959**, *130*, 245-251.
- [26] S. L. Miller, *Science* **1953**, *117*, 528-529.
- [27] A. Lazcano, J. L. Bada, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2003**, *33*, 235-242.
- [28] J. L. Bada, A. Lazcano, *Science* **2003**, *300*, 745-746.
- [29] A. P. Johnson, H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, A. Lazcano, J. L. Bada, *Science* **2008**, *322*, 404.
- [30] M. Ferus, F. Pietrucci, A. M. Saitta, A. Knizek, P. Kubelik, O. Ivanek, V. Shestivska, S. Civis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114*, 4306-4311.
- [31] C. Sagan, *Science* **1997**, *276*, 1217-1221.
- [32] J. W. Delano, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2001**, *31*, 311-341.
- [33] W. R. Kuhn, S. K. Atreya, *ICARUS* **1979**, *37*, 207-213.
- [34] P. H. Abelson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1966**, *55*, 1365-1372.
- [35] J. F. Kasting, K. J. Zahnle, J. C. G. Walker, *Precambrian Res.* **1983**, *20*, 121-148.
- [36] G. Schlesinger, S. L. Miller, *J. Mol. Evol.* **1983**, *19*, 376-382.
- [37] J. P. Ferris, P. C. Joshi, E. H. Edelson, J. G. Lawless, *J. Mol. Evol.* **1978**, *11*, 293-311.
- [38] H. J. Cleaves, J. H. Chalmers, A. Lazcano, S. L. Miller, J. L. Bada, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, *38*, 105-115.
- [39] R. D. Hill, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1992**, *22*, 277-285.
- [40] C. Mompean, M. R. Marin-Yaseli, P. Espigares, E. Gonzalez-Toril, M. P. Zorzano, M. Ruiz-Bermejo, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1916.
- [41] J. F. Kasting, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1992**, *20*, 199-231.
- [42] D. S. Kelley, J. A. Baross, J. R. Delaney, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **2002**, *30*, 385-491.

- [43] N. G. Holm, in *Marine Hydrothermal Systems and the Origin of Life: Report of SCOR Working Group 91* (Ed.: N. G. Holm), Springer Netherlands, Dordrecht, **1992**, pp. 5-14.
- [44] F. M. Moller, F. Kriegel, M. Kiess, V. Sojo, D. Braun, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2340-2344.
- [45] M. J. Russell, L. M. Barge, R. Bhartia, D. Bocanegra, P. J. Bracher, E. Branscomb, R. Kidd, S. McGlynn, D. H. Meier, W. Nitschke, T. Shibuya, S. Vance, L. White, I. Kanik, *Astrobiology* **2014**, *14*, 308-343.
- [46] W. Martin, M. J. Russell, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2007**, *362*, 1887-1925.
- [47] R. J. Hennes, N. G. Holm, M. H. Engel, *Naturwissenschaften* **1992**, *79*, 361-365.
- [48] J. B. Corliss, J. A. Baross, S. E. Hoffman, *Oceanol. Acta* **1981**, 59-69.
- [49] J. Dymond, R. W. Collier, M. E. Watwood, *Nature* **1989**, *342*, 673-675.
- [50] K. Michiels, B. Peeraer, W. Van Dun, J. Spooren, V. Meynen, *Faraday Discuss.* **2015**, *183*, 177-195.
- [51] N. G. Holm, E. Andersson, *Astrobiology* **2005**, *5*, 444-460.
- [52] D. J. Ritson, J. D. Sutherland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5845-5847.
- [53] T. M. McCollom, G. Ritter, B. R. T. Simoneit, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1999**, *29*, 153-166.
- [54] D. Deamer, B. Damer, *Astrobiology* **2017**, *17*, 834-839.
- [55] P. Baaske, F. M. Weinert, S. Duhr, K. H. Lemke, M. J. Russell, D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 9346-9351.
- [56] W. Martin, M. J. Russell, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2003**, *358*, 59-83; discussion 83-55.
- [57] M. J. Russell, A. J. Hall, *J Geol Soc London* **1997**, *154*, 377-402.
- [58] K. L. Von Damm, M. D. Lilley, W. C. Shanks, M. Brockington, A. M. Bray, K. M. O'Grady, E. Olson, A. Graham, G. Proskurowski, *Earth Planet. Sci. Lett.* **2003**, *206*, 365-378.
- [59] T. R. Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 4360-4363.
- [60] W. Martin, J. Baross, D. Kelley, M. J. Russell, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 805-814.
- [61] K. L. Von Damm, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **1990**, *18*, 173-204.
- [62] T. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 1970-1973.
- [63] T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 709-715.
- [64] H. N. Poinar, M. Hoss, J. L. Bada, S. Paabo, *Science* **1996**, *272*, 864-866.
- [65] D. S. Kelley, J. A. Karson, D. K. Blackman, G. L. Fruh-Green, D. A. Butterfield, M. D. Lilley, E. J. Olson, M. O. Schrenk, K. K. Roe, G. T. Lebon, P. Rivizzigno, A. T. S. Party, *Nature* **2001**, *412*, 145-149.
- [66] D. S. Kelley, J. A. Karson, G. L. Fruh-Green, D. R. Yoerger, T. M. Shank, D. A. Butterfield, J. M. Hayes, M. O. Schrenk, E. J. Olson, G. Proskurowski, M. Jakuba, A. Bradley, B. Larson, K. Ludwig, D. Glickson, K. Buckman, A. S. Bradley, W. J. Brazelton, K. Roe, M. J. Elend, A. Delacour, S. M. Bernasconi, M. D. Lilley, J. A. Baross, R. E. Summons, S. P. Sylva, *Science* **2005**, *307*, 1428-1434.
- [67] N. H. Sleep, A. Meibom, T. Fridriksson, R. G. Coleman, D. K. Bird, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 12818-12823.
- [68] G. Proskurowski, M. D. Lilley, J. S. Seewald, G. L. Fruh-Green, E. J. Olson, J. E. Lupton, S. P. Sylva, D. S. Kelley, *Science* **2008**, *319*, 604-607.
- [69] G. L. Fruh-Green, D. S. Kelley, S. M. Bernasconi, J. A. Karson, K. A. Ludwig, D. A. Butterfield, C. Boschi, G. Proskurowski, *Science* **2003**, *301*, 495-498.
- [70] B. Damer, D. Deamer, *Astrobiology* **2020**, *20*, 429-452.
- [71] J. Pereto, J. L. Bada, A. Lazcano, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2009**, *39*, 395-406.
- [72] N. Lahav, D. White, S. Chang, *Science* **1978**, *201*, 67-69.
- [73] D. J. Gottlieb, H. G. Prentice, A. B. Mehta, A. R. Galazka, H. E. Heslop, A. V. Hoffbrand, M. K. Brenner, *Br. J. Haematol.* **1990**, *75*, 499-505.
- [74] K. Pedersen, E. Nilsson, J. Arlinger, L. Hallbeck, A. O'Neill, *Extremophiles* **2004**, *8*, 151-164.
- [75] S. B. Bortnikova, G. M. Gavrilenko, E. P. Bessonova, A. S. Lapukhov, *J. Volcanol. Seismol.* **2010**, *3*, 388-404.

- [76] A. Y. Mulkidjanian, A. Y. Bychkov, D. V. Dibrova, M. Y. Galperin, E. V. Koonin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, E821-830.
- [77] K. Harada, *Nature* **1967**, *214*, 479-480.
- [78] M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature* **2009**, *459*, 239-242.
- [79] A. Y. Mulkidjanian, D. A. Cherepanov, M. Y. Galperin, *BMC Evol. Biol.* **2003**, *3*, 12.
- [80] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, *J. Photochem. Photobiol. C* **2009**, *10*, 21-32.
- [81] S. T. Smale, J. T. Kadonaga, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 449-479.
- [82] P. Cramer, D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David, R. D. Kornberg, *Science* **2000**, *288*, 640-649.
- [83] G. Orphanides, T. Lagrange, D. Reinberg, *Genes Dev.* **1996**, *10*, 2657-2683.
- [84] L. E. Orgel, *J. Theor. Biol.* **1986**, *123*, 127-149.
- [85] F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 367-379.
- [86] L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 381-393.
- [87] C. Guerrier-Takada, S. Altman, *Science* **1984**, *223*, 285-286.
- [88] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaugg, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147-157.
- [89] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, *35*, 849-857.
- [90] R. Shapiro, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1988**, *18*, 71-85.
- [91] T. R. Cech, B. L. Bass, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 599-629.
- [92] D. S. Waugh, N. R. Pace, *BioEssays* **1986**, *4*, 56-61.
- [93] A. J. Zaugg, T. R. Cech, *Biochemistry* **1986**, *25*, 4478-4482.
- [94] G. F. Joyce, *Nature* **2002**, *418*, 214-221.
- [95] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618-618.
- [96] A. Lazcano, R. Guerrero, L. Margulis, J. Oro, *J. Mol. Evol.* **1988**, *27*, 283-290.
- [97] W. Traube, *Chem. Ber.* **1904**, *37*, 4544-4547.
- [98] J. P. Ferris, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3829-3831.
- [99] J. P. Ferris, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1968**, *33*, 693-704.
- [100] R. A. Sanchez, J. P. Ferris, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 121-128.
- [101] A. Butlerow, *Liebigs Ann.* **1861**, *120*, 295-298.
- [102] E. Fischer, B. Helferich, *Chem. Ber.* **1914**, *47*, 210-235.
- [103] C. Ponnampereuma, R. Mariner, C. Sagan, *Nature* **1963**, *198*, 1199-1200.
- [104] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 25-33.
- [105] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1972**, *1*, 249-257.
- [106] M. Nuevo, G. Cooper, S. A. Sandford, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5276.
- [107] R. Larralde, M. P. Robertson, S. L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 8158-8160.
- [108] E. Fischer, *Chem. Ber.* **1914**, *47*, 3193-3205.
- [109] L. E. Orgel, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 99-123.
- [110] R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1970**, *47*, 531-543.
- [111] F. M. Kruse, J. S. Teichert, O. Trapp, *Chemistry* **2020**, *26*, 14776-14790.
- [112] M. W. Powner, J. D. Sutherland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4641-4643.
- [113] M. W. Powner, J. D. Sutherland, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16677-16688.
- [114] S. Becker, J. Feldmann, S. Wiedemann, H. Okamura, C. Schneider, K. Iwan, A. Crisp, M. Rossa, T. Amatov, T. Carell, *Science* **2019**, *366*, 76-82.
- [115] S. Becker, I. Thoma, A. Deutsch, T. Gehrke, P. Mayer, H. Zipse, T. Carell, *Science* **2016**, *352*, 833-836.
- [116] C. Schneider, S. Becker, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Stadlmeier, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5943-5946.
- [117] J. S. Teichert, F. M. Kruse, O. Trapp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 9944-9947.
- [118] J. E. Baldwin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**.
- [119] K. Schoning, P. Scholz, S. Guntha, X. Wu, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Science* **2000**, *290*, 1347-1351.
- [120] M. Picmanova, B. L. Moller, *Glycobiology* **2016**, *26*, 430-442.
- [121] W. Curatolo, *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1987**, *906*, 111-136.

- [122] T. Yamakawa, Y. Nagai, *Trends Biochem. Sci.* **1978**, *3*, 128-131.
- [123] H. Rauchfuß, *Chemische Evolution und der Ursprung des Lebens*, Springer Berlin Heidelberg, **2005**.
- [124] T. Niitsu, M. M. Ito, H. Inoue, *J. Chem. Eng. Jpn.* **1992**, *25*, 480-485.
- [125] A. Weiss, *J. Catal.* **1970**, *16*, 332-347.
- [126] J. M. De Bruijn, A. P. G. Kieboom, H. V. Bekkiun, *J. Carbohydr. Chem.* **1986**, *5*, 561-569.
- [127] K. Runge, R. Mayer, *Liebigs Ann. Chem.* **1967**, *707*, 161-169.
- [128] T. I. Khomenko, M. M. Sakharov, O. A. Golovina, *Russ. Chem. Rev.* **1980**, *49*, 570-584.
- [129] Y. Shigemasa, *J. Catal.* **1981**, *69*, 58-68.
- [130] H. Tambawala, *J. Catal.* **1972**, *26*, 388-400.
- [131] T. Mizuno, A. H. Weiss, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1974**, *29*, 173-227.
- [132] C. D. Gutsche, D. Redmore, R. S. Buriks, K. Nowotny, H. Grassner, C. W. Armbruster, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1235-1245.
- [133] T. Matsumoto, S. Inoue, *J. Chem. Soc., Perkin trans. 1* **1982**, 1975-1979.
- [134] J. Henrique Teles, J.-P. Melder, K. Ebel, R. Schneider, E. Gehrler, W. Harder, S. Brode, D. Enders, K. Breuer, G. Raabe, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 61-83.
- [135] S. V. Stovbun, A. M. Zanin, A. A. Skoblin, M. A. Tregubova, V. A. Tverdislov, O. P. Taran, V. N. Parmon, *Russ. J. Phys. Chem. B.* **2019**, *13*, 486-501.
- [136] O. A. Snytnikova, A. N. Simonov, O. P. Pestunova, V. N. Parmon, Y. P. Tsentalovich, *Mendeleev Commun.* **2006**, *16*, 9-11.
- [137] S. Lamour, S. Pallmann, M. Haas, O. Trapp, *Life (Basel)* **2019**, *9*.
- [138] R. F. Socha, A. H. Weiss, M. M. Sakharov, *React. Kinet. Catal. Lett.* **1980**, *14*, 119-128.
- [139] A. W. Schwartz, R. M. de Graaf, *J. Mol. Evol.* **1993**, *36*, 101-106.
- [140] G. Harsch, M. Harsch, H. Bauer, W. Voelter, *Z. Naturforsch. B* **1983**, *38*.
- [141] D. Ritson, J. D. Sutherland, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 895-899.
- [142] H. J. H. Fenton, H. Jackson, *J. Chem. Soc., Trans.* **1899**, *75*, 575-579.
- [143] A. Eschenmoser, *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 554-573.
- [144] R. Breslow, *Tetrahedron Lett.* **1959**, *1*, 22-26.
- [145] C. Appayee, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3720-3723.
- [146] H.-J. Kim, A. Ricardo, H. I. Illangkoon, M. J. Kim, M. A. Carrigan, F. Frye, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9457-9468.
- [147] J. Castells, F. López-Calahorra, F. Geijo, *Carbohydr. Res.* **1983**, *116*, 197-207.
- [148] G. De Wit, A. P. G. Kieboom, H. van Bekkum, *Carbohydr. Res.* **1979**, *74*, 157-175.
- [149] I. V. Delidovich, A. N. Simonov, O. P. Taran, V. N. Parmon, *ChemSusChem* **2014**, *7*, 1833-1846.
- [150] S. J. Angyal, *Carbohydr. Res.* **1997**, *300*, 279-281.
- [151] I. Zafar, N. Senad, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 769-788.
- [152] A. L. Weber, *J. Mol. Evol.* **1992**, *35*, 1-6.
- [153] O. Pestunova, A. Simonov, V. Snytnikov, V. Stoyanovsky, V. Parmon, *Adv. Space Res.* **2005**, *36*, 214-219.
- [154] E. Pfeil, G. Sehroth, *Chem. Ber.* **1952**, *85*, 293-307.
- [155] T. Matsumoto, S. Inoue, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 171.
- [156] Y. Shigemasa, Y. Sasaki, N. Ueda, R. Nakashima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, *57*, 2761-2767.
- [157] R. Breslow, Z.-L. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 5723-5725.
- [158] R. Breslow, V. Ramalingam, C. Appayee, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2013**, *43*, 323-329.
- [159] A. Ricardo, M. A. Carrigan, A. N. Olcott, S. A. Benner, *Science* **2004**, *303*, 196.
- [160] G. Springsteen, G. F. Joyce, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9578-9583.
- [161] D. J. Harvey, *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1196-1225.
- [162] F. N. Lamari, R. Kuhn, N. K. Karamanos, *J. Chromatogr. B* **2003**, *793*, 15-36.
- [163] G. K. Glushonok, T. G. Glushonok, O. I. Shadyro, *Kinet. Catal.* **2000**, *41*, 620-624.
- [164] M. Cocchi, C. Durante, M. Grandi, P. Lambertini, D. Manzini, A. Marchetti, *Talanta* **2006**, *69*, 1166-1175.
- [165] R. A. Laine, C. C. Sweeley, *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 199-213.
- [166] R. A. Laine, C. C. Sweeley, *Anal. Biochem.* **1971**, *43*, 533-538.

- [167] M. Haas, S. Lamour, O. Trapp, *J. Chromatogr. A* **2018**, *1568*, 160-167.
- [168] W. A. König, H. Bauer, W. Voelter, E. Bayer, *Chem. Ber.* **1973**, *106*, 1905-1919.
- [169] A. I. Ruiz-Matute, O. Hernandez-Hernandez, S. Rodriguez-Sanchez, M. L. Sanz, I. Martinez-Castro, *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1226-1240.
- [170] V. A. Likholobov, A. H. Weiss, M. M. Sakharov, *React. Kinet. Catal. Lett.* **1978**, *8*, 155-166.
- [171] T. Matsumoto, M. Yamane, S. Inoue, *Chem. Lett.* **1984**, *13*, 1819-1822.
- [172] D. J. Harvey, M. G. Horning, *J. Chromatogr. A* **1973**, *76*, 51-62.
- [173] C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, W. W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2497-2507.
- [174] J. L. Little, *J. Chromatogr. A* **1999**, *844*, 1-22.
- [175] T. Zweckmair, S. Bohmdorfer, A. Bogolitsyna, T. Rosenau, A. Potthast, S. Novalin, *J. Chromatogr. Sci.* **2013**, *52*, 169-175.
- [176] W. Funcke, C. von Sonntag, *Carbohydr. Res.* **1979**, *69*, 247-251.
- [177] G. W. Chapman, R. J. Horvat, *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 947-950.
- [178] L. J. Papa, L. P. Turner, *J. Chromatogr. Sci.* **1972**, *10*, 747-750.
- [179] S. Honda, K. Kakehi, *J. Chromatogr. A* **1978**, *152*, 405-411.
- [180] M. Z. Iqbal, S. Novalin, *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5116-5121.
- [181] M. Kállai, J. Balla, *Chromatographia* **2002**, *56*, 357-360.
- [182] J. T. Scanlon, D. E. Willis, *J. Chromatogr. Sci.* **1985**, *23*, 333-340.
- [183] R. Socha, *J. Catal.* **1981**, *67*, 207-217.
- [184] Y. Shigemasa, Y. Matsuda, C. Sakazawa, T. Matsuura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 222-226.
- [185] M. Bahadir, H. Parlar, M. Spitteller, *Springer Umwelt Lexikon*, Springer-Verlag, **2013**.
- [186] D. A. Evans, M. M. Morrissey, R. L. Dorow, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *107*, 4346-4348.
- [187] M. T. Crimmins, K. A. Emmitte, J. D. Katz, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2165-2167.
- [188] D. Enders, H. Eichenauer, U. Baus, H. Schubert, K. A. M. Kremer, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1345-1359.
- [189] A. Job, C. F. Janeck, W. Bettray, R. Peters, D. Enders, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2253-2329.
- [190] S. Pizzarello, J. R. Cronin, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2000**, *64*, 329-338.
- [191] S. Pizzarello, C. T. Yarnes, *Earth Planet. Sci. Lett.* **2016**, *443*, 176-184.
- [192] D. W. MacMillan, *Nature* **2008**, *455*, 304-308.
- [193] I. V. Delidovich, A. N. Simonov, O. P. Pestunova, V. N. Parmon, *Kinet. Catal.* **2009**, *50*, 297-303.
- [194] V. N. Sagi, V. Punna, F. Hu, G. Meher, R. Krishnamurthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3577-3589.
- [195] A. Ricardo, F. Frye, M. A. Carrigan, J. D. Tipton, D. H. Powell, S. A. Benner, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9503-9505.
- [196] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.

Kapitel 5:

Anhang

5.1 Quantifizierung der Kohlenhydrate

Quantifizierung von Formaldehyd und Glycolaldehyd über die HPLC

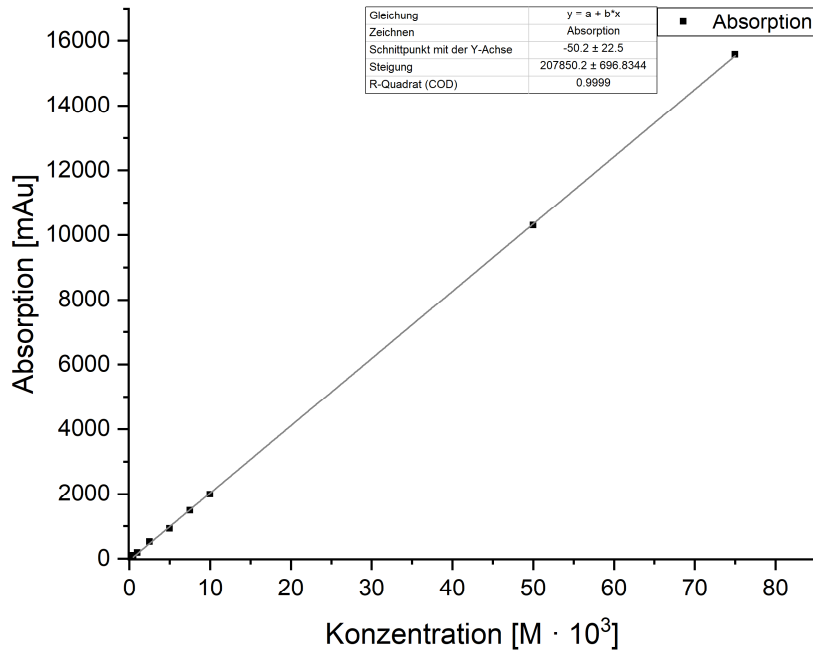


Abb. 5.1: Kalibrierungsgerade zur Quantifizierung von Formaldehyd mittels der DNPH-Derivatisierung über die HPLC.

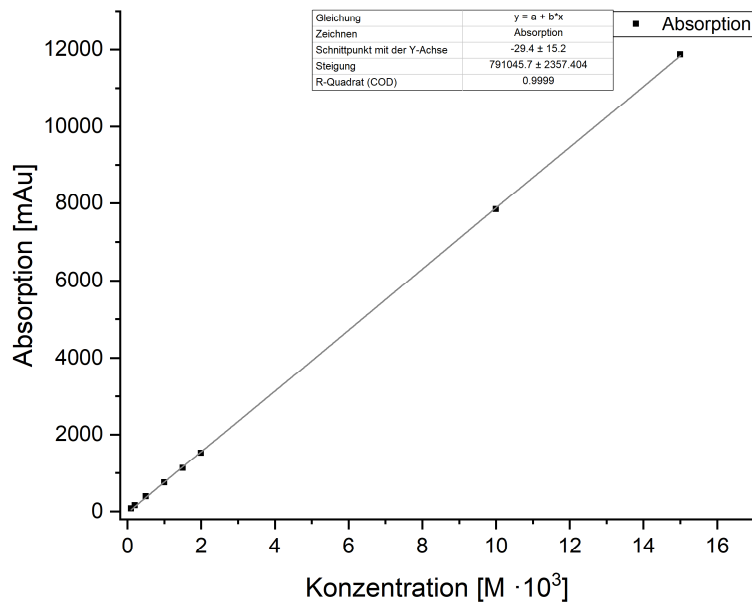


Abb. 5.2: Kalibrierungsgerade zur Quantifizierung von Glycolaldehyd mittels der DNPH-Derivatisierung über die HPLC.

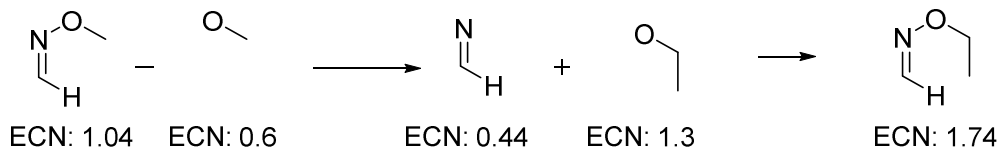
Quantifizierung der Kohlenhydrate über die GC mittels ECN^[181-182]

Abb. 5.3: Berechnung der ECN für die Kopfgruppe bei der EtOx-Derivatisierung

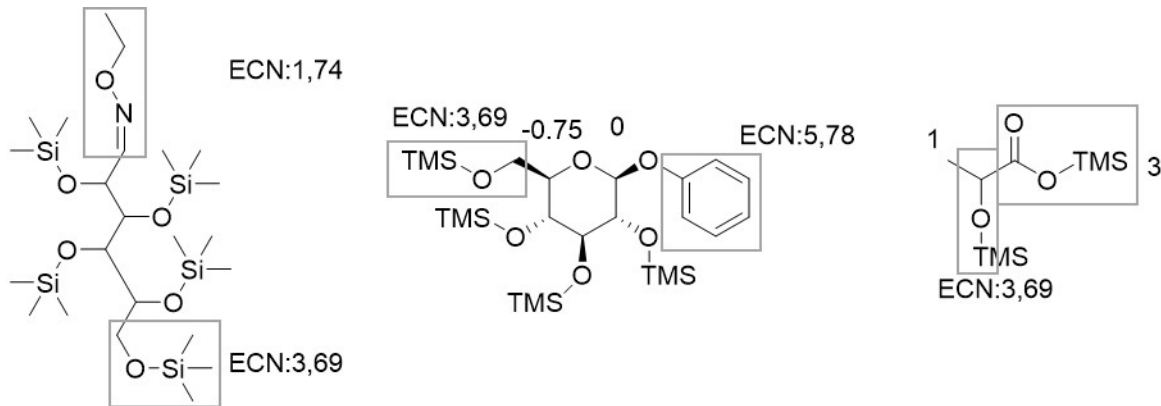


Abb. 5.4: Berechnung der ECNs verschiedener Substanzen innerhalb der Formose-Reaktion.

Tabelle 5.1: Verwendete ECNs der detektierten Verbindungen innerhalb der Formose-Reaktion zu ihrer Quantifizierung über die GC.

Verbindung	ECN
C2-Zucker	5.43
C3-Zucker	9.12
C4-Zucker	12.81
C5-Zucker	16.5
C6-Zucker	20.19
C7-Zucker	23.88
Phenyl-β-D-Glucopyranosid (IS)	19.79
Glycerin	11.07
C4-Alkohol	14.76
Milchsäure	7.69
Glycerinsäure	10.38

Berechnung der Konzentration der Zucker über die ECN:

$$A_{corr}^i = \frac{A_i}{ECN_i} \quad (1)$$

$$C_i = \frac{A_{corr}^i}{A_{IS}} \cdot \frac{c_{IS} \cdot V_{Deri}}{V_{Probe}} \quad (2)$$

mit:

- A_i = Fläche der Verbindung i
- ECN_i = ECN der Verbindung i
- A_{corr}^i = um die ECN korrigierte Fläche der Verbindung i
- c_{IS} = Konzentration des internen Standards
- V_{Probe} = Volumen der entnommenen Probe
- V_{Deri} = Volumen der derivatisierten Lösung

5.2 Reaktionszuordnung der Geschwindigkeitskonstanten zu den aufgestellten Modellen

Anhang Modell I: „The Beginning“

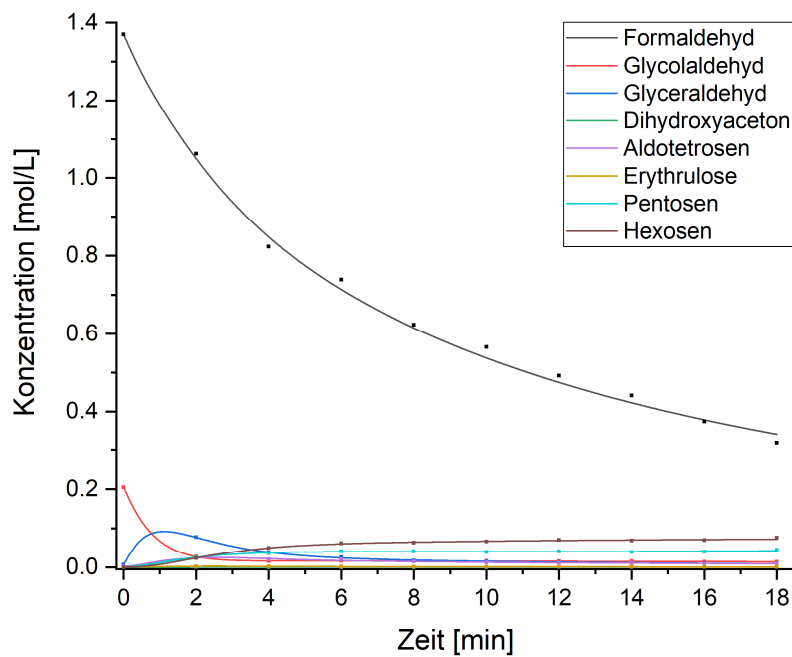

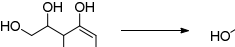
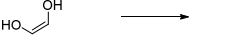
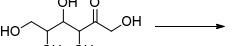

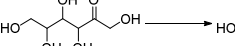

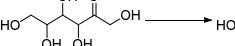
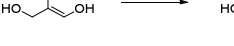
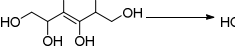
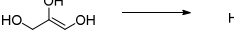
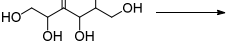

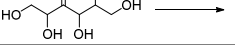
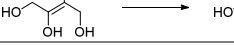
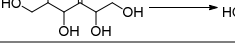
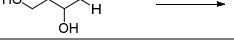
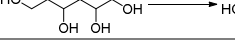
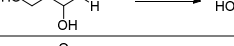
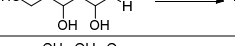

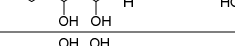

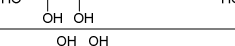

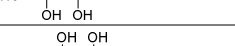
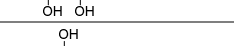
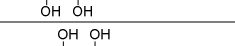
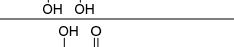


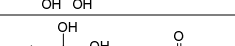


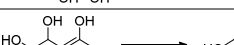

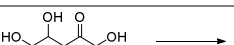
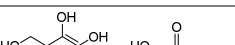
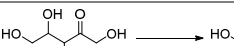

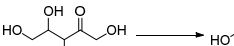

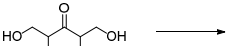
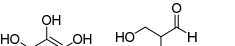
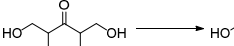



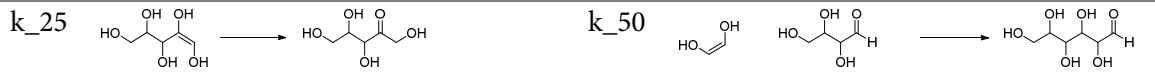


Abb. 5.5: Vollständige Übersicht des berechneten Verlaufs der Konzentrationen an Kohlenhydraten in der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid bei 40 °C mit Modell I.

Tabelle 5.2: Zuordnung der einzelnen Reaktionen zu den Geschwindigkeitskonstanten des erstellten Modell I der Formose-Reaktion.

k	Reaktion	k	Reaktion
k_1		k_26	
k_2		k_27	
k_3		k_28	
k_4		k_29	
k_5		k_30	
k_6		k_31	
k_7		k_32	
k_8		k_33	
k_9		k_34	
k_10		k_35	
k_11		k_36	
k_12		k_37	
k_13		k_38	
k_14		k_39	
k_15		k_40	
k_16		k_41	
k_17		k_42	
k_18		k_43	
k_19		k_44	
k_20		k_45	
k_21		k_46	
k_22		k_47	
k_23		k_48	
k_24		k_49	



Anhang Modell II: „Enol-los“

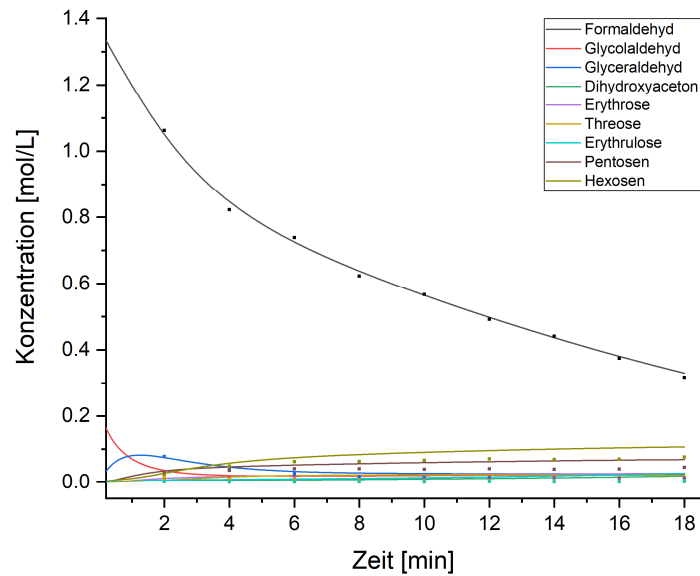


Abb. 5.6: Vollständige Übersicht des berechneten Verlaufs der Konzentrationen an Kohlenhydraten in der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid bei 40 °C mit Modell II.

Anhang Modell III: „Side-Reactions“

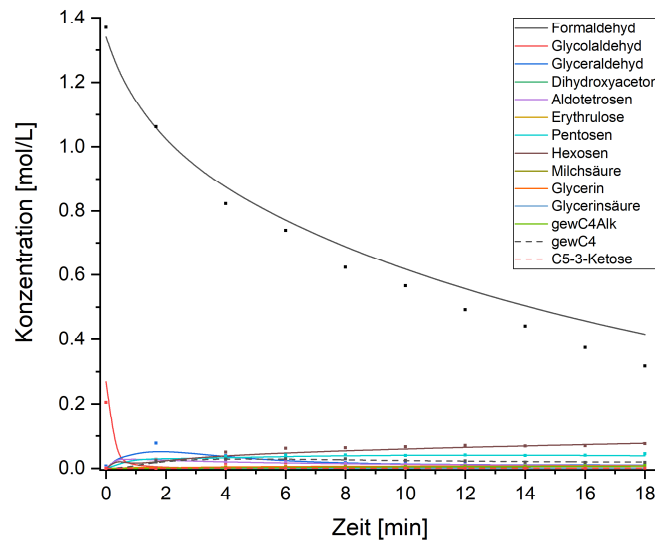


Abb. 5.7: Vollständige Übersicht des berechneten Verlaufs der Konzentrationen an Kohlenhydraten in der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid bei 40 °C mit Modell III.

Anhang Modell IV: „Dump“

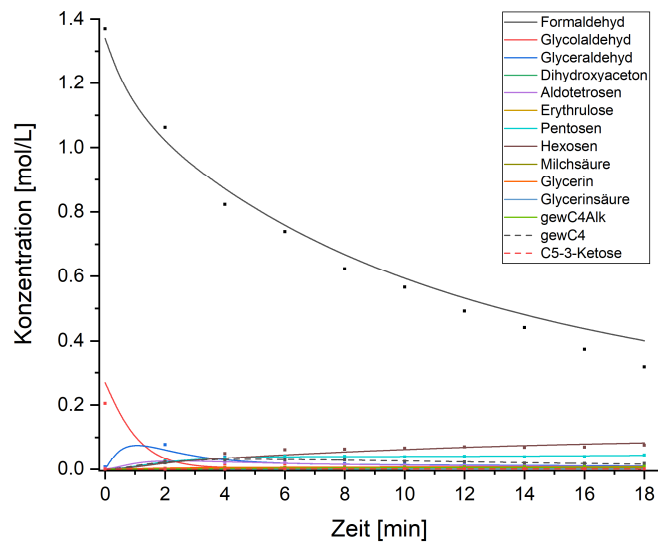


Abb. 5.8: Vollständige Übersicht des berechneten Verlaufs der Konzentrationen an Kohlenhydraten in der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit Calciumhydroxid bei 40 °C mit Modell IV.

k_cz: Cannizzaro mit Formaldehyd als Reduktions-Mittel

k_dmp: durch Cannizzaro, β -Eliminierung und Oxidation aus der Reaktion fallende Moleküle

Aldol-Reaktionen

Tabelle 5.3: Zuordnung der einzelnen Aldol-Reaktionen zu den Geschwindigkeitskonstanten des erstellten Modell IV der Formose-Reaktion.

k	Reaktion	k	Reaktion
k_al_1	<chem>HOCH2CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO</chem>	k_al_12	<chem>HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO</chem>
k_al_2	<chem>HOCH2CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO</chem>	k_al_13	<chem>HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO</chem>
k_al_3	<chem>HOCH2CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO</chem>	k_al_14	<chem>HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO</chem>
k_al_4	<chem>HOCH2CHO + HCHO -> HOCH2CH(OH)CHO</chem>	k_al_15	<chem>HOCH2CH(OH)CHO + HCHO -> HCHO + HOCH2CHO</chem>
k_al_5	<chem>HOCH2CH(OH)CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CHO</chem>	k_al_16	<chem>HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO</chem>
k_al_6	<chem>HOCH2CH(OH)CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CHO</chem>	k_al_17	<chem>HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO</chem>
k_al_7	<chem>HOCH2CH(OH)CHO + HCHO -> HOCH2CH(OH)CHO</chem>	k_al_18	<chem>HOCH2CH(OH)CHO + HCHO -> HCHO + HOCH2CHO</chem>
k_al_8	<chem>HOCH2CH(OH)CHO + HCHO -> HOCH2CH(OH)CHO</chem>	k_al_19	<chem>HOCH2CH(OH)CHO + HCHO -> HCHO + HOCH2CHO</chem>
k_al_9	<chem>HOCH2CH(OH)CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CHO</chem>	k_al_20	<chem>HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO -> HOCH2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CHO + HOCH2CHO</chem>
k_al_10	<chem>HOCH2CH(OH)CHO + HCHO -> HOCH2CH(OH)CHO</chem>	k_al_21	<chem>HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO + HCHO -> HCHO + HOCH2CHO</chem>
k_al_11	<chem>HOCH2CH(OH)CHO + HCHO -> HOCH2CH(OH)CHO</chem>	k_al_22	<chem>HOCH2CH(OH)CH(OH)CHO + HCHO -> HCHO + HOCH2CHO</chem>

Keto-Enol-Tautomerien

Tabelle 5.4: Zuordnung der einzelnen Keto-Enol-Tautomerien zu den Geschwindigkeitskonstanten des erstellten Modell IV der Formose-Reaktion.

k	Reaktion	k	Reaktion
k_ke_1		k_ke_11	
k_ke_2		k_ke_12	
k_ke_3		k_ke_13	
k_ke_4		k_ke_14	
k_ke_5		k_ke_15	
k_ke_6		k_ke_16	
k_ke_7		k_ke_17	
k_ke_8		k_ke_18	
k_ke_9		k_ke_19	
k_ke_10		k_ke_20	

Anhang Modell V: „Back to the Roots“

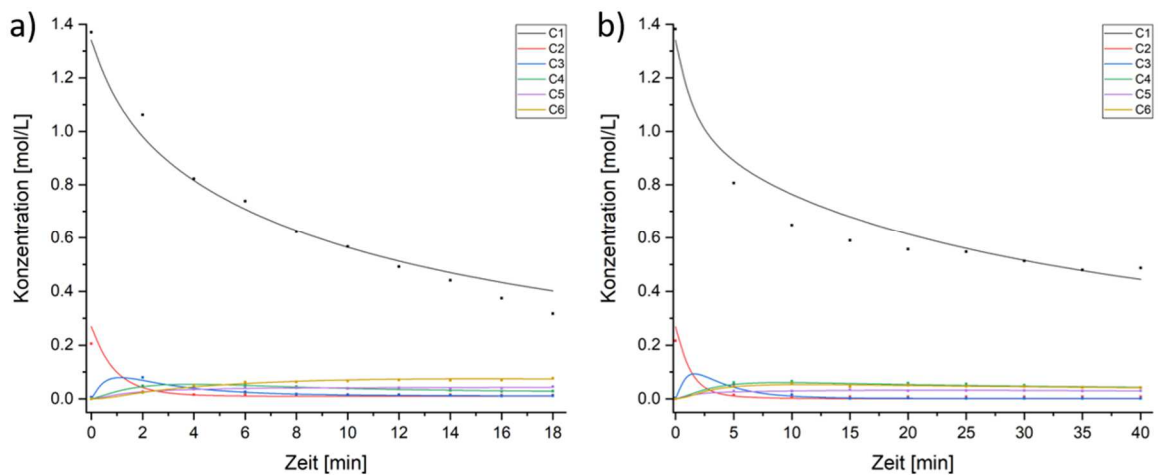


Abb. 5.9: Vollständige Übersicht des berechneten Verlaufs der Konzentrationen an Kohlenhydraten in der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit den Hydroxiden bei 40 °C mit Modell V. a) Calciumhydroxid, b) Kaliumhydroxid.

Anhang Modell VI: „no-Enol-Dump-fix“

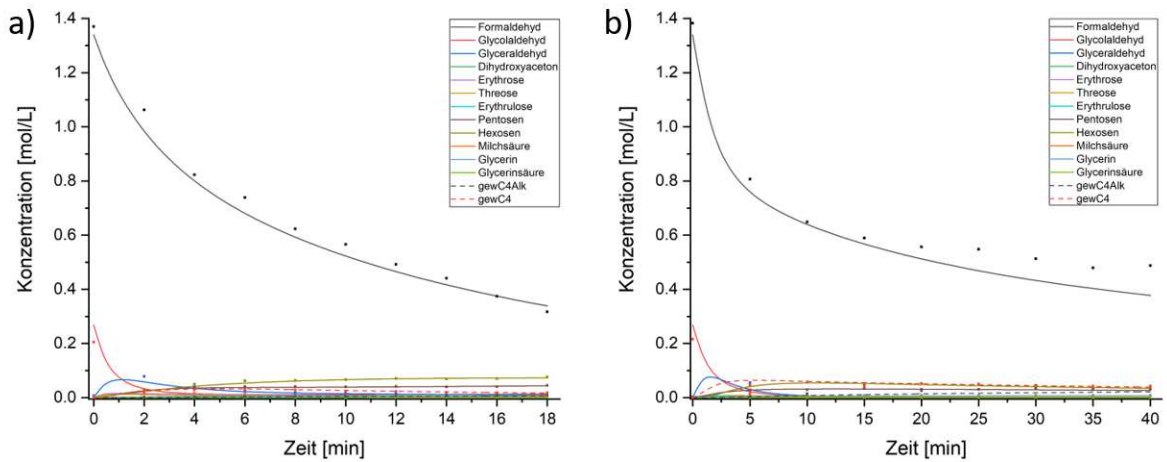


Abb. 5.10: Vollständige Übersicht des berechneten Verlaufs der Konzentrationen an Kohlenhydraten in der Reaktion von Formaldehyd und Glycolaldehyd mit den Hydroxiden bei 40 °C mit Modell VI. a) Calciumhydroxid, b) Kaliumhydroxid.

Tabelle 5.5: Zuordnung der einzelnen Reaktionen zu den Geschwindigkeitskonstanten des erstellten Modell VI der Formose-Reaktion.

k	Reaktion	k	Reaktion
k ₁		k ₂₄	C5
k ₂		k ₂₅	C5
k ₃		k ₂₆	C5
k ₄		k ₂₇	C5
k ₅		k ₂₈	C5
k ₆		k ₂₉	HCHO C5
k ₇		k ₃₀	
k ₈		k ₃₁	
k ₉		k ₃₂	
k ₁₀		k ₃₃	
k ₁₁		k ₃₄	
k ₁₂		k ₃₅	
k ₁₃		k ₃₆	C6
k ₁₄		k ₃₇	C6
k ₁₅		k ₃₈	C6
k ₁₆		k ₃₉	C6
k ₁₇		k ₄₀	C6
k ₁₈		k ₄₁	C6
k ₁₉		k ₄₂	C6
k ₂₀		k ₄₃	
k ₂₁		k ₄₄	
k ₂₂		k ₄₅	
k ₂₃		k ₄₆	

Danksagung

Abschließend möchte ich mich gerne bei einer Vielzahl an Personen für die Unterstützung in den letzten Jahren bedanken.

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Oliver Trapp danken, für die Möglichkeit diese Doktorarbeit bei ihm in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Für sein Interesse an der Chemie, seine Motivation und motivierende Betreuung, das vermittelte Wissen in der analytischen Chemie sowie für die durchgehende Unterstützung während meiner Arbeit.

Herzlichst möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder bedanken, für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation.

Einen weiteren Dank gilt meinen Kooperationspartnern Severin Angerpointner, Florian Gartner und Prof. Dr. Erwin Frey sowie dem ganzen CRC 235-Team für die spannende, interdisziplinäre Zusammenarbeit im Bereich *Origin of Life*.

Für den freundlichen Umgang und die Unterstützung bei meiner Forschung sowie den betreuten Praktika möchte ich gerne den Angestellten an der Fakultät für Chemie und Pharmazie meinen Dank aussprechen. Ebenfalls möchte ich mich bei Claudia, Hildegard, Carrie und Heike bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und bei den kleinen Hürden der Bürokratie immer helfend zur Seite standen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Brigitte, die mir als Laborpartnerin jeden Tag mit ihrer positiven und offenen Art den Alltag im Labor verschönerte.

Weiterführend möchte ich dem ganzen ehemaligen sowie aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises Trapp für eine freundliche Aufnahme, abwechslungsreiche Pausen und für die große Hilfsbereitschaft jeglicher Art danken. Elina und Laura, danke für die Musik, die Gespräche und Diskussionen, die den Alltag belebten. Jenny und Steffi, vielen Dank für die schöne Zeit im Labor und außerhalb wenn wir mal wieder zusammen den Tag ausklingen haben lassen. Auch möchte ich mich bei Alex und Max bedanken, die mir bei analytischen Fragen immer wieder zur Seite standen und tatkräftig geholfen haben. Für kreative Diskussionen, kulinarisches Essen mit verschiedensten Tastings, sportliche Aktivitäten und schöne Abende möchte ich mich herzlichst bei Florian bedanken. Durch das gemeinsame Kochen hat sich meine Speisekarte deutlich erweitert.

Ebenfalls möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Korrekturlesern Alex, Florian und Klaus bedanken, dass sie sich die Zeit genommen und mir fleißig Input und Verbesserungen für diese Arbeit mitgegeben haben.

Danksagung

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Christoph, Daniel, Dominik und Felix aussprechen. Die mich seit dem Studium als enge Freunde trotz der Entfernung begleiten. Vielen Dank für lustige Reisen, verrückte Mario-Kart-Fahrten, spannende Quiz-Abende und für die ganze gemeinsame Zeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner ganzen Familie bedanken. Für die große Unterstützung in jeder Lebenssituation, für die motivierenden und kraftspendenden Worte und dass sie immer für mich da sind.

Vielen Dank!