

193. Chemie von α -Aminonitrilen¹⁾

13. Mitteilung

Über die Bildung von 2-Oxoethyl-phosphaten ('Glycolaldehyd-phosphaten') aus *rac*-Oxirancarbonitril und anorganischem Phosphat und über (formale) konstitutionelle Zusammenhänge zwischen 2-Oxoethyl-phosphaten und Oligo(hexo- und pentopyranosyl)nucleotid-Rückgratenby Stefan Pitsch²⁾, Esteban Pombo-Villar³⁾ und Albert Eschenmoser*Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule,
Universitätstrasse 16, CH-8092 Zürich

(30.IX.94)

Chemistry of α -Aminonitriles.**Formation of 2-Oxoethyl Phosphates ('Glycolaldehyde Phosphates') from *rac*-Oxirancarbonitrile and on (Formal) Constitutional Relationships between 2-Oxoethyl Phosphates and Oligo(hexo- and pentopyranosyl)nucleotide Backbones**

Oxirancarbonitrile in basic aqueous solution at room temperature reacts regioselectively with inorganic phosphate to give the cyanohydrin of 2-oxoethyl phosphate ('glycolaldehyde phosphate'), a source of (the hydrate of) the free aldehyde, preferably in the presence of formaldehyde. In aqueous phosphate solution buffered to nearly neutral pH, oxirancarbonitrile produces the phosphodiester of glycolaldehyde as its bis-cyanohydrin in good yield. In contrast to mono- and dialkylation, trialkylation of phosphate with oxirancarbonitrile is difficult, and the triester derivative is highly sensitive to hydrolysis. Glycolaldehyde phosphate *per se* is of prebiotic interest, since it had been shown [5] to aldomerize in basic aqueous solution regioselectively to *rac*-hexose 2,4,6-triphosphates and – in the presence of formaldehyde – mainly to *rac*-pentose 2,4-diphosphates with, under appropriate conditions, *rac*-ribose 2,4-diphosphate as the major reaction product. However, the question as to whether oxirancarbonitrile itself has the potential of having been a prebiological natural constituent remains unanswered.

Backbone structures of hexopyranosyl-oligonucleotides with phosphodiester linkages specifically between the positions 6'→4', 6'→2', or 4'→2' of the sugar residues can *formally* be derived *via* the (hypothetical) aldomerization pathway, a combinatorial intermolecular aldomerization of glycolaldehyde phosphate and bis(glycolaldehyde)-phosphodiester in a 1:1 ratio. The constitutional relationships revealed by this synthetic analysis has played a decisive role as a selection criterion in the pursuit of our experimental studies toward a chemical etiology of the natural nucleic acids' structure. The *Discussion* in this paper delineates how the analysis contributed to the conception of the structure of p-RNA.

The *English Footnotes* to Schemes 1–11 provide an extension of this summary.

1. Einleitung. – In der 3. Mitteilung der Reihe zur Chemie der α -Aminonitrile [4] haben wir die Phosphorolyse von *rac*-Aziridin-2-carbonitril zum *rac*-O³-Phosphoserin-nitril sowie dessen hydrolytische Überführung in 2-Oxoethyl-phosphat ('Glycolaldehyd-phosphat') beschrieben. Diese einfachen Reaktionen beanspruchten unsere Aufmerk-

¹⁾ 1. Mitteilung: [1], 12. Mitteilung: [2].

²⁾ Vgl. Promotionsarbeit ETH-Zürich, 1993 [3].

³⁾ Postdoktorat ETH-Zürich, 1986–1988.

samkeit des konstitutionellen Zusammenhangs wegen, der durch den Struktur-Typ des Aziridin-2-carbonitrils zwischen den Strukturfamilien der α -Aminosäuren [4] und Zucker-phosphaten [5] vermittelt wird. Im Hintergrund stand die Frage nach der Bedeutung dieses Zusammenhangs für die präbiotische Chemie, gehören doch die beiden Stoffgruppen der α -Aminosäuren und Zucker zu den molekularen Grundpfeilern der Biomolekül-Welt, und wäre da doch ein gemeinsamer Zwischenprodukt-Typ mit einem gespannten Dreiring, dessen Spannung gespeicherter Lichtenergie entspräche (vgl. [6]), und bei dessen regioselektiver Öffnung durch Nucleophile α -Aminonitril-Derivate entstünden, die sich – je nach Verhalten der CN-Gruppe – entweder zu α -Aminosäure-Derivaten (CN-Gruppe als latentes Carboxyl) oder Derivaten des einfachsten Zuckers, des Glycolaldehyds (CN-Gruppe als elektronegative Abgangsgruppe), umwandeln.

In unseren Untersuchungen über diesen Zusammenhang hat uns nebst der Möglichkeit, auf solchem Wege spezifisch zu Dipeptidnitrilen zu gelangen⁴⁾, vor allem die Umsetzung des Aziridin-2-carbonitrils mit Phosphat zu Glycolaldehyd-phosphat beschäftigt. Die Vorstellung von einer präbiologischen Rolle des Glycolaldehyd-phosphats hatte nahe dem Ausgangspunkt unserer Arbeiten über präbiotische Chemie gestanden; sie führte uns zu den Untersuchungen über die Bildung von Zucker-phosphaten [5] und damit – aus der Retrospektive gesehen – letztlich auch zu den Arbeiten, die neulich in die Chemie der p-RNA einmündeten [12]. Die im *Kap. 6* erörterten Zusammenhänge werden dies noch eingehender ausleuchten.

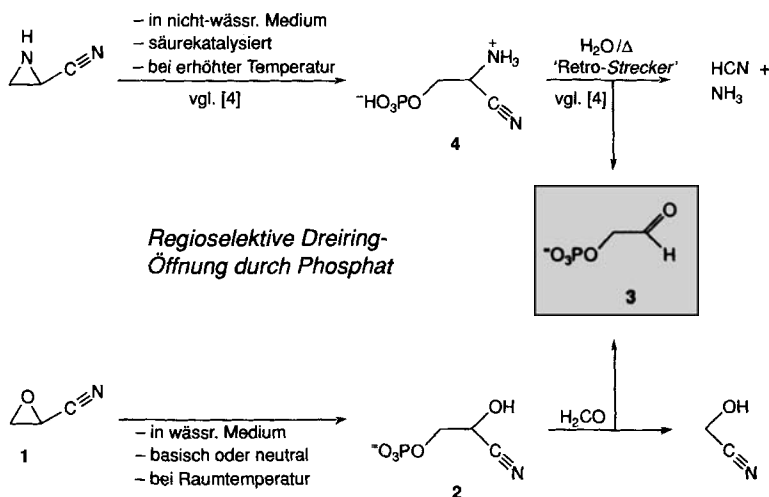
In der Folge vermochten die experimentellen Befunde die Vorstellung von einer gemeinsamen Herkunft von α -Aminosäuren und Zucker-phosphaten aus Aziridin-2-carbonitril wegen der hierfür sich als notwendig erweisenden Reaktionsbedingungen nicht zu befriedigen. Besonders problematisch an der Glycolaldehyd-phosphat-Bildung aus Aziridin-2-carbonitril musste die mit natürlichen geochemischen Bedingungen schwerlich zu vereinbarende hohe Elektrophilie des (nicht-wässrigen) Reaktionsmediums [4] erscheinen, sowie der scharfe Unterschied zwischen diesen Bedingungen und dem basisch-wässrigen Reaktionsmedium [5] der Aldomerisierung von Glycolaldehyd-phosphat zu Zucker-phosphaten. Ein solch krasser Wechsel des Reaktionsumfelds konsekutiver Synthese-Stufen widerspricht geradezu exemplarisch einem Postulat, das man bei Entwürfen potentiell präbiologischer Selbstkonstituierungswege so weit wie möglich einzuhalten versucht, bzw. versuchen sollte, das *Postulat möglichst weitgehender Kontinuität des Reaktionsumfelds entlang präbiotischer Synthese-Wege*⁵⁾. Es war denn auch letztlich diese Forderung, zusammen mit Informationen aus der Literatur (vgl. z. B. [15] [16]) über die Öffnung von Epoxid-Ringen mit Phosphat in wässrig-alkalischer Lö-

⁴⁾ Setzt man Aziridin-2-carbonitril unter protonierenden Bedingungen mit α -Aminosäuren in nicht-wässrigem Medium (z. B. MeCN) bei erhöhter Temperatur um, erhält man (nach anschliessend in basisch-wässrigem Medium erfolgreicher (O \rightarrow N)-Acylumlagerung) entsprechende *N*-(α -Aminoacyl)serinnitrile; unveröffentlichte Arbeiten von *Baumann* [7] und *Glück* [8]. Solche Dipeptidnitrile lassen sich in gepufferten Lösungen zu Poly(dipeptamidinium)-Salzen oligomerisieren, vgl. [9–11].

⁵⁾ '... Ein pragmatisches Mass für die Komplexität einer molekularen Struktur wäre die Menge an äusserer Instruktion, welche die Struktur unter gegebenen Voraussetzungen zu ihrer Bildung aus elementaren Ausgangsstoffen braucht. ... Äussere Instruktion müsste wohl zu tun haben mit der Art und Zahl von Reaktionsumfeldänderungen, die zur Produkt-Bildung aus Edukten notwendig sind. Weder die Art, noch die Zahl der Reaktionsschritte würde an sich die Komplexität einer molekularen Struktur ausmachen, sondern die Art und Zahl der für diese Reaktionsschritte verwendeten *unterschiedlichen* Umfeldbedingungen, Reagentien und vor allem Katalysatoren.' [13] (Vgl. auch [14]).

sung⁶⁾, ergänzt durch die Erwartung, dass eine α -ständige CN-Gruppe eine solche Reaktion eigentlich noch beschleunigen sollte, was uns im Hinblick auf die Aldomerisierung von Glycolaldehyd-phosphat in alkalischer Lösung zu Hexose- und Pentosephosphaten [5] bewog, die Umsetzung von rac-Oxirancarbonitril (1) mit Phosphat in alkalisch-wässriger Lösung zu untersuchen (Schema 1). Aus analogen Gründen, wie wir sie zur Interpretation des Reaktionsverlaufs beim Aziridin-2-carbonitril vorgebracht hatten (vgl. Schema 4 in [4]), sollte die Ring-Öffnung durch Phosphat auch beim Oxirancarbonitril in der β -Stellung zur CN-Gruppe erfolgen⁷⁾ und damit 2-Cyano-2-hydroxyethyl-phosphat

Schema 1. Glycolaldehyd-phosphat aus Aziridin-2-carbonitril und aus Oxirancarbonitril:
Unterschiede in den Reaktionsbedingungen*)



- *) Our previous interest in the chemistry of aziridine-2-carbonitrile [2] [4] [6] had been induced by the constitutional position of this (MeCN + HCN) isomer between the two major families of biomolecular building blocks, the α -amino acids and the sugar phosphates. However, experiments revealed that the harsh type of (acidic) reaction conditions necessary to derive e.g. glycolaldehyde phosphate from the aziridine derivative could hardly be considered to be potentially prebiological. Now, this is no longer true for the conditions which the (MeCN + CO) isomer oxirancarbonitrile requires to undergo the reaction with inorganic phosphate (aqueous solution, pH < 10.5, room temperature) to give – via its cyanohydrin – glycolaldehyde phosphate. These conditions are essentially of the same type as those under which glycolaldehyde phosphate in the presence of formaldehyde had been shown [5] to aldomerize to rac-pentose 2,4-diphosphates.

⁶⁾ So ergibt das Epoxid des Acrolein-diethylacetals durch 5stündiges Erhitzen in wässriger K₂HPO₄-Lösung das Diethylacetal von Glycerinaldehyd-3-phosphat in 27% Ausbeute [15].

⁷⁾ Durch den Einfluss der CN-Gruppe sollte das Oxid-O-Atom für eine S_N2-Reaktion am C(β)-Atom eine bessere Abgangsgruppe sein als für eine Substitution am C(α)-Atom (Stabilisierung des sich bildenden α -Cyano-alkoxids durch (n \rightarrow σ^*)-Konjugation, entsprechend dem (verallgemeinerten) anomeren Effekt der CN-Gruppe). Andererseits macht die bekannte Tatsache, dass CN-Gruppen als elektrophile π -Substituenten S_N2-Prozesse am α -C-Zentrum mit (starken) Nucleophilen sehr effizient (durch ($\sigma\rightarrow\pi^*$)-Konjugation im Übergangszustand) beschleunigen [17], eine zuverlässige Prognose zur Frage der Regioselektivität der Reaktion von 1 mit Phosphat unmöglich. Eine eingehendere Diskussion des komplexen Zusammenspiels von Reaktivitätsfaktoren bei der im vorliegenden Zusammenhang in unserem Laboratorium ebenfalls untersuchten Reaktion von Phosphat mit Methoxyoxiran findet sich in [18].

2 erzeugen, dem aus chemischer Sicht eine analoge konstitutionelle Mittelstellung zwischen α -Aminosäuren und Zucker-phosphaten zugeordnet werden kann wie dem O^3 -Phosphoserinnitril 4.

Die Untersuchungen über Oxirancarbonitril erwiesen sich als insofern erfolgreich, dass sich dieses Epoxid in der Tat als hervorragende Quelle von Glycolaldehyd-phosphat-cyanhydrin (und damit von Glycolaldehyd-phosphat) in wässrig-basischem Medium herausstellte (Kap. 3). Durch Einsatz des Oxiran-, statt Aziridin-Derivats als Zwischenprodukt wäre damit (vgl. jedoch Kap. 7) dem Postulat einer möglichst weitgehenden Kontinuität des Reaktionsumfelds für das hier in Frage stehende Modell einer potentiell präbiotischen Selbstkonstituierung von Zucker-phosphaten Genüge getan. Als (zumindest vorläufig) wichtiger erscheint uns allerdings die Rolle, welche die Bearbeitung des Oxirancarbonitrils gedanklich für die Entwicklung unserer Untersuchungen in die Richtung des Struktur-Typs der p-RNA gespielt hat (vgl. Kap. 6).

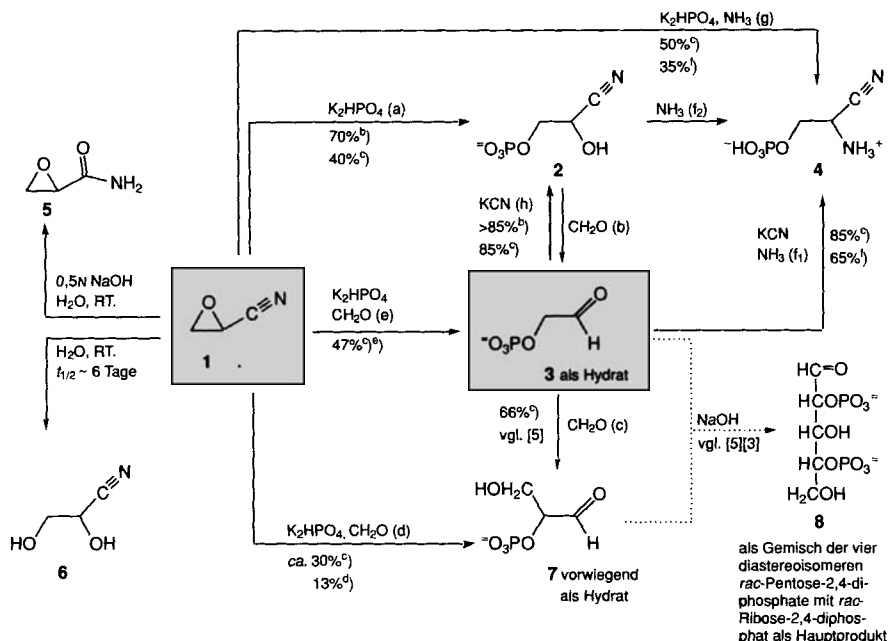
2. Reaktion von Phosphat mit *rac*-Oxirancarbonitril: 2-Oxoethyl-phosphat ('Glycolaldehyd-phosphat'). – Die Herstellung von *rac*-Oxirancarbonitril (**1**) ist beschrieben [19] [20], und ebenso einige seiner chemischen [19] [21] sowie insbesondere auch toxikologischen [22]⁸⁾ Eigenschaften. Die Verbindung ist in unserer Erfahrung nach der Methode von Kopecky und Smejkal [19] durch Umsetzung von Acrylonitril mit wässriger NaOCl-Lösung bei 15° leicht und ungefährlich im 10- bis 30-g-Massstab in guter Qualität herstellbar.

rac-Oxirancarbonitril (spektroskopische Charakterisierung⁹⁾ vgl. *Exper. Teil*) ist beschränkt wasserlöslich (ca. 0,5 mol/l bei RT.) und hydrolysiert bei Raumtemperatur in sowohl saurer [19] als auch neutraler wässriger Lösung zu *rac*-Glycolaldehyd-cyanhydrin (**6**; Halbwertszeit von **1** in ca. 0,1M D₂O-Lösung bei RT. ca. 6 Tage; Schema 2). In 0,5N NaOH-Lösung unter sonst analogen Bedingungen ist die Hydrolyse der CN-Gruppe zur Amid-Gruppe rascher als die hydrolytische Öffnung des Epoxid-Rings (vgl. die Charakterisierung des Oxiran-2-carboxamids (**5**) im *Exper. Teil*); dies entspricht dem in der Literatur [21] festgehaltenen Befund, wonach die konventionelle Epoxidierung in wässrig-basischer Lösung [23] von Acrylonitril *rac*-Oxiran-2-carboxamid (**5**) in hoher Ausbeute liefert. In [22a] findet sich auch die Angabe, wonach die Halbwertszeit von **1** bei 37° in 0,1M KHPO₄-Lösung(!) bei pH 7,4 ca. 2 h betrage; über die Natur der dabei aufgetretenen 'Hydrolyse-Produkte' schweigt sich die Publikation indessen aus.

Ein orientierender Vorversuch der Umsetzung von **1** mit 1 mol-equiv. K₂HPO₄ unter den in [15] [16] für die dort untersuchten Epoxide als notwendig befundenen Reaktionsbedingungen (z. B. 100° während 15 h in H₂O) führte zu einem komplizierten Reaktionsgemisch, dessen Untersuchung darauf hinwies, dass die Umsetzung zu Folgereaktionen der Epoxid-Ringöffnungsprodukte führt und deshalb unter milderen Reaktionsbedingungen durchzuführen ist. Systematische NMR-Sondierung von Umsetzungen bei

⁸⁾ Oxiran-2-carbonitril (**1**) ist ein primärer Metabolit des (technisch bedeutsamen) Acrylonitrils in Säugetieren und ein aktives Mutagen in menschlichen Zellkulturen [22a]; bei *in vitro*-Untersuchungen an SC40-Phagen wurden durch **1** Strangbrüche induziert [22b]; **1** bindet irreversibel an mikrosomale Proteine und DNS [22c]; mit Adenosin reagiert es zum 1,N⁶-Etheno-Derivat [22a].

⁹⁾ Mikrowellenspektroskopische Daten von **1** sind von A. Bauder und Mitarbeitern (Institut für Physikalische Chemie, ETH-Zürich) ermittelt worden (s. [3], S. 106).

Schema 2. Glycolaldehyd-phosphat aus Oxirancarbonitril: Reaktionen ausgehend von Oxirancarbonitril^{a)}*)


- a) Reaktionsbedingungen: (a) 0,67M **1** + 2,0M K₂HPO₄, H₂O, pH 10,5, Ar, RT., 24 h, IA-Chromatographie. (b) 0,15M **2** + 2 mol.-equiv. CH₂O, 0,4M Na₂CO₃-NaHCO₃-Puffer, D₂O, pD 10,4, Ar, RT., 25 min (¹H-NMR-Experiment). (c) 10 mol-equiv. CH₂O, NaOH, H₂O, pH 10,7, Ar, RT., 6 Tage (vgl. [5]). (d) 0,2M **1** + 2,0M K₂HPO₄ + 4,0M CH₂O, H₂O, pH 10,5, Ar, RT., 13 Tage, DEA-Chromatographie, Polyacrylamid-Chromatographie. (e) 0,19M **1** + 1,9M K₂HPO₄ + 0,23M CH₂O, H₂O, pH 10,5, Ar, RT., 25 h, IA-Chromatographie. (f₁) 0,2M **3** (H⁺-Form aus Ca-Salz) + 1,5 mol-equiv. KCN, H₂O, pH ~ 6, RT., 14 h, anschliessend (K⁺→H⁺)-Ionenaustausch, 2N NH₃, H₂O, RT., 3 h, IA-Chromatographie, Kristallisation aus H₂O/EtOH (Schmp. 178°, Ausbeute 65%). (f₂) Rohprodukt aus Reaktion (h) in 2N NH₃, H₂O, RT., 3 h, IA-Chromatographie. (g) 0,67M **1** + 1,0M K₂HPO₄, H₂O, pH 10,5, Ar, RT., 24 h, (K⁺→H⁺)-Ionenaustausch, 2N NH₃, H₂O, RT., 3 h, Kristallisation aus H₂O/EtOH (Schmp. 175–177°, Ausbeute 35%). (h) 0,2M **3** (H⁺-Form aus Ca-Salz) + 1,5 mol-equiv. KCN, H₂O, pH ~ 6, RT., 8 h, IA-Chromatographie (Ausbeute 85%).
- b) ¹H-NMR-spektroskopisch geschätzte Ausbeute im Rohprodukt. d) Ausbeute nach 2facher Chromatographie.
- c) Ausbeute nach Chromatographie. e) In je ca. 2% Ausbeute **5** und **7** enthaltend. f) Ausbeute nach Kristallisation.

- *) Reactions of **1**: The half-life of **1** with respect to hydrolytic ring opening to give **6** in water (pH 7) at room temperature is ca. 6 d; in 0.5N NaOH, conversion of the nitrile to the amide group is faster than ring opening. In aqueous phosphate solution (pH ~ 10), **1** reacts faster with phosphate anion than with hydroxide. Cyanhydrin **2** formed under reaction conditions (a) was isolated by chromatography on DEAE Sephadex at 4° using a HCOOH/H₂O gradient (with some concomitant formation of **3**). Preparative conversion of **2** to **3** is best achieved by capturing HCN with formaldehyde (conditions (b) and (e)). Whereas condensation of **3** with formaldehyde (condition (c)) is known to produce glyceraldehyde 2-phosphate **7** in good yield [5], one-pot formation of **7** from **1** (condition (d)) is accompanied by a complex product mixture, the formation of (unidentified) by-products probably being due to the latent presence of HCN in the reaction medium (for the presumed type of side reactions, see formulae in Footnote 12). Not surprisingly, therefore, attempts to demonstrate the formation of *rac*-pentose 2,4-diphosphates by a one-pot reaction cascade starting from **1** were unsuccessful. Possibly, the process would require continuous removal of the (neutral) HCN carrier hydroxyacetonitrile. Product yields: ^{b)} Estimated in crude reaction product by ¹H-NMR spectroscopy. ^{c)} After chromatography. ^{d)} After double chromatography. ^{e)} Contains **5** and **7**, each in 2% yield. ^{f)} After crystallization.

Raumtemperatur in D₂O bei variierenden pH-Werten offenbarten die Bildung von komplexen Reaktionsgemischen (u. a. Hydrolyse der CN-Gruppe) bei pH-Werten oberhalb 10,5 und die teilweise Weiterreaktion des Glycolaldehyd-phosphat-cyanhydrins **2** mit dem Edukt **1** bei pH-Werten unterhalb pH ~ 9. Bei einem pH-Wert von ca. 10 und Verwendung von 1 mol-equiv. K₂HPO₄ (*c* ≈ 0,3M) war bei Raumtemperatur nach 24 h kein Edukt **1** mehr nachweisbar (¹H-NMR), und das Produkt bestand hauptsächlich und relativ einheitlich aus dem gesuchten Cyanhydrin **2**. Versuche, letzteres durch Ionenaustausch unter neutralen Chromatographie-Bedingungen in reiner Form zu isolieren, scheiterten indessen; abgesehen von der Schwierigkeit, die Nebenprodukte abzutrennen, fand im Laufe solcher Chromatographie immer auch eine teilweise Umwandlung des Produkts **2** in das Hydrat **3** des Glycolaldehyd-phosphats statt. Nicht die Bildung von **2** aus **1** erwies sich in diesen Versuchen als das eigentliche Problem, sondern die Isolierung von **2** in reiner Form. Die Erarbeitung eines Isolierungsverfahrens durch Ionenaustausch-Chromatographie (IC) mit wässriger Ameisensäure¹⁰⁾ sowie von Reaktionsbedingungen, bei denen nicht abtrennbare Nebenprodukte im wesentlichen gar nicht erst gebildet werden, führte schliesslich zu dem im *Schema 2* angegebenen Vorgehen. In einem auf solche Art gewonnenen Rohprodukt wurde ¹H-NMR-spektroskopisch (mittels internen Standards) ein Gehalt an **2** bestimmt, der einer Ausbeute (bezüglich **1**) von 72% entsprach; daneben waren ca. 10% (bezüglich **2**) des Cyanhydrins **6** erkennbar, das aus **1** durch konkurrierende Hydrolyse entsteht, sowie geringe Mengen mehrerer nicht identifizierter Fremdprodukte, und zwar in ihrer Gesamtheit zu einem Ausmass, das der Integration von ca. 1 H (bezogen auf anwesendes **2**) entsprach. Dabei war die Anwesenheit des Regioisomeren von **2**, das durch phosphorolytische Ring-Öffnung in α-(statt in β-)Stellung aus **1** entstehen könnte, zwar nicht auszuschliessen, doch NMR-spektroskopisch nicht erkennbar. Die Abtrennung des Phosphat-Überschusses bei der Isolierung von **2** erfolgte durch Ausfällung als schwerlösliches Li₃PO₄ mit LiOH nach vorgängigem (K⁺ → H⁺)-Ionenaustausch und anschliessender Chromatographie an DEAE-*Sephadex*¹⁰⁾; Restmengen noch vorhandenen (anorganischen) Phosphats trennten sich dabei in Vorlauf-Fractionen ab. Dergestalt isoliertes Glycolaldehyd-phosphat-cyanhydrin **2** (Ausbeute 37%, ¹H-NMR) enthielt als einzige Beimengung Glycolaldehyd-phosphat **3** in einer ca. 3% Ausbeute entsprechenden Menge¹¹⁾ (mit Vergleichsproben, die aus Allyl-phosphat hergestellt worden waren, chromatographisch sowie ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-spektroskopisch identifiziert, vgl. *Kap. 5*).

Überliess man eine 0,15M Lösung von **2** in D₂O mit einem pD-Wert von 10,4 im NMR-Röhrchen (Carbonat-Puffer) der Einwirkung von 2 mol-equiv. Formaldehyd bei Raumtemperatur, so war ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopisch bereits nach 15 min das Cyanhydrin zugunsten (des Hydrats) von Glycolaldehyd-phosphat **3** und von Formaldehyd-cyanhydrin verschwunden. Erwartungsgemäss kann demnach Formaldehyd unter basischen Bedingungen als effizienter HCN-Fänger zur Freisetzung von Glycolaldehyd-phosphat **3** aus seinem Cyanhydrin dienen. Unsere Absicht, auch Bedingungen aufzuzei-

¹⁰⁾ Auftragung des Reaktionsgemischs in 0,1N HCOOH/H₂O auf DEAE-*Sephadex*, Chromatographie mit steigendem HCOOH-Gradienten bei 4°. Das Verfahren wurde mittels Proben von **2** ausgearbeitet, die ausgehend von Allyl-phosphat hergestellt worden waren (vgl. *Schema 4*).

¹¹⁾ Generell liess sich die Bildung einer kleinen, aus dem (Cyanhydrin ⇌ Aldehyd)-Gleichgewicht stammenden Menge an **3** bei der chromatographischen Isolierung von **2** nicht vermeiden.

gen, unter denen sich **3** in Gegenwart von Formaldehyd direkt aus Oxirancarbonitril gewinnen liesse, verlangte zwecks Verhinderung der Bildung von isolationserschwerenden Nebenprodukten wiederum eine Anpassung der Reaktionsbedingungen (Erniedrigung der Konzentration von **1** bei gleichbleibender Konzentration von K_2HPO_4). Die im Schema 2 beim Experiment **1** \rightarrow **3** aufgeführten Bedingungen lieferten eine nach oben erwähntem Vorgehen gereinigte Produktprobe, die Glycolaldehyd-phosphat in 47% Ausbeute (1H -NMR) nebst seinem C α nyhydrin **2** und dem durch Aldolisierung von **3** mit CH_2O entstandenen *rac*-Glycerinaldehyd-2-phosphat (**7**; in je ca. 2% Ausbeute (1H -NMR)) enthielt.

Die Bildung von racemischem Glycerinaldehyd-2-phosphat (**7**) aus Glycolaldehyd-phosphat (**3**) in Gegenwart von (überschüssigem) Formaldehyd in wässrig-alkalischer Lösung (pH 10,7) haben wir in einer früheren Arbeit beschrieben (vgl. [5], dort Schema 7). Unseren Versuchen, die Entstehung dieses wichtigen Triose-Derivats direkt aus Oxirancarbonitril (**1**), d. h. in einem gemeinsamen Reaktionsumfeld, zu demonstrieren, stand wiederum die Isolierung einheitlicher Produktproben als Hauptschwierigkeit entgegen. Liess man die nunmehr dreistufige Reaktionsfolge **1** \rightarrow **7** unter Bedingungen ablaufen, welche auf eine Isolierbarkeit von **7** ausgerichtet waren (Mol-Verhältnis **1**/ K_2HPO_4 / CH_2O 1:10:20, vgl. Schema 2, Experiment **1** \rightarrow **7**), so gelang nach verlustreicher (eine zusätzliche Chromatographie an Polyacrylamid-Gel benötigender) Reinigung die Isolierung von weitgehend einheitlichem *rac*-Glycerinaldehyd-2-phosphat (**7**) in ca. 13% Ausbeute. Im Rohprodukt dürfte **7** in einer ca. 30% Ausbeute entsprechenden Menge anwesend gewesen sein.

Wir haben früher gezeigt [5], dass *rac*-Glycerinaldehyd-2-phosphat (**7**) und Glycolaldehyd-phosphat (**3**) in alkalisch-wässrigem Medium miteinander zum Gemisch der diastereoisomeren *rac*-Pentose-2,4-diphosphate **8** (mit *rac*-Ribose-2,4-diphosphat als Hauptprodukt) reagieren können. Deshalb drängte sich hier die Frage auf, ob – dem Postulat der möglichst weitgehenden Kontinuität des Reaktionsumfeldes folgend – die Bildung der *rac*-Pentose-2,4-diphosphate unter einer einzigen Reaktionsbedingung auf dem mehrstufigen Reaktionsweg **1** \rightarrow **2** \rightarrow **3** \rightarrow **7** \rightarrow **8** direkt aus Oxiran-2-carbonitril beobachtet werden könnte. Zwar war seinerzeit die Aldolisierungsfolge Glycolaldehyd-phosphat \rightarrow *rac*-Pentose-2,4-diphosphate in 2N NaOH durchgeführt worden [5], doch hat sich bei späteren Versuchen gezeigt [3] (dort S. 61), dass sie auch bei pH-Werten zwischen 10,5 und 11,0 erfolgt, sofern man die Konzentration von **3** erhöht (0,5M statt 0,08M) und die Reaktionszeit verlängert (20 Wochen statt 7 Tage). In zahlreichen orientierenden Versuchen des Typs (**1** + K_2HPO_4 + CH_2O in H_2O , pH 10,5), in denen hauptsächlich die relative Formaldehyd-Menge variiert wurde, und in denen eine Bildung von 2,4-Pentose-phosphaten auf erprobte Weise (vgl. [5]) nach Derivatisierung der Reaktionsprodukte durch GC-Analyse erkannt worden wäre, misslang ein solcher Nachweis, ebenso ein solcher von gegebenenfalls gebildeter Tetrose-2,4-di- und Hexose-2,4,6-triphosphate.

Dieser (wohl kaum definitive) Misserfolg exemplifiziert die generelle Erwartung, dass bei 'Eintopf-Versionen' von Synthese-Reaktionsfolgen, wie sie für die Befolgung des Postulats der möglichst weitgehenden Kontinuität des Reaktionsumfeldes in der präbiotischen Chemie zu fordern wären, sich sehr rasch Komplikationen einstellen können. Im vorliegenden Fall dürfte die latente Präsenz der (CN^-) -Ionen im Reaktionsgemisch einen Nebenreaktionstyp ermöglichen, der die Folge der Aldomerisierungsschritte irreversibel

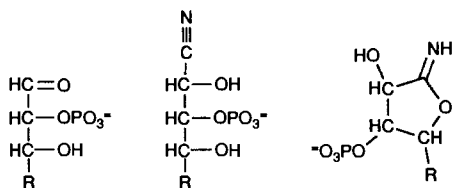
zu unterbrechen vermag¹²⁾. Diese (bislang experimentell nicht nachgeprüfte) Vorstellung würde nach einem Reaktionsumfeld rufen, in welchem die (CN⁻)-Ionen während des Reaktionsgeschehens laufend entfernt würden¹³⁾.

Das *Schema 2* enthält schliesslich noch Reaktionsbedingungen, unter welchen Glycolaldehyd-phosphat-cyanhydrin und Glycolaldehyd-phosphat in guter Ausbeute in das (in kristalliner Form isolierte) *rac*-O³-Phosphoserinnitril **4** übergehen; damit soll die konstitutionelle Nähe des Oxirancarbonitrils zu den α -Aminosäuren *via* entsprechende α -Aminonitrile an einem Beispiel angedeutet sein.

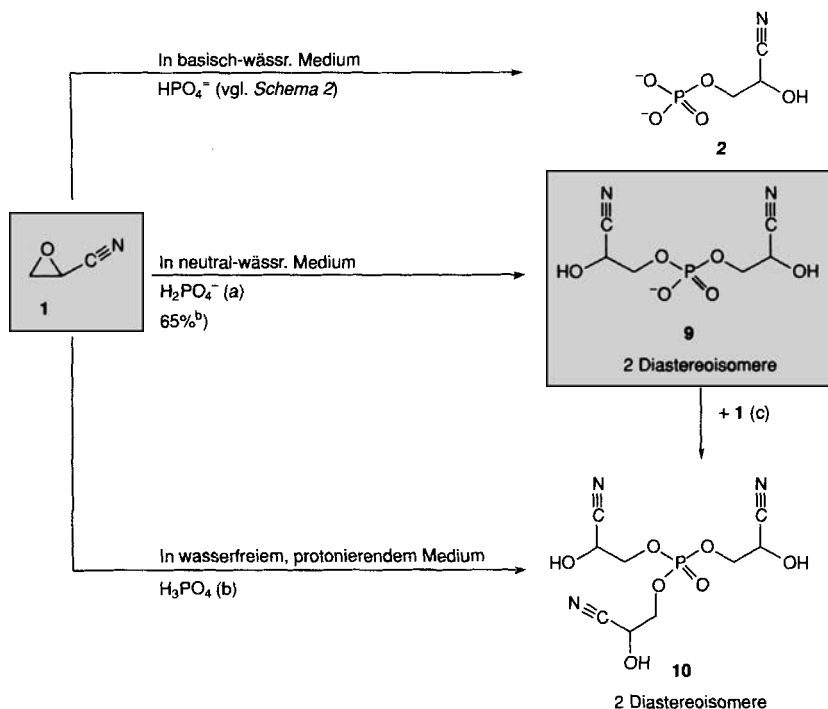
3. Reaktion von Phosphat mit *rac*-Oxirancarbonitril: Bis(2-oxoethyl)-phosphat ('Bis(glycolaldehyd)-phosphat'). – Wegen des besonderen konstitutionellen Zusammenhangs zwischen dem Bis(glycolaldehyd)-phosphat (**11**; vgl. *Schema 4*) und dem Rückgrat des Struktur-Typs der Oligonucleotide (vgl. *Kap. 6*) haben wir bereits früher bei der Bearbeitung des Aziridin-2-carbonitrils [4] nach Bedingungen gesucht, unter welchen sich der Struktur-Typ dieses Phosphodiesters bilden würde. Zwar konnte damals eine solche Bildung von **11** aus dem Aziridin-2-carbonitril experimentell nachgewiesen werden, doch war diese aus präbiotisch-chemischer Sicht noch weniger überzeugend als jene zum O³-Phosphoserinnitril, und zwar aus analogen (bereits oben ausgeführten) Gründen. Um so willkommener war dann der beim Oxirancarbonitril gemachte Befund, dass nicht nur die Bildung des Glycolaldehyd-phosphats, sondern auch jene des entsprechenden Phosphodiester-Derivats aus dem Oxiran-Analogon des Aziridin-2-carbonitrils viel leichter erfolgt und vor allem auch unter Bedingungen (wässrige neutrale Phosphat-Lösung), welche den Forderungen aus präbiotisch-chemischer Sicht durchaus entsprechen würden.

Das Bis-cyanhydrin **9** (*Schema 3*) des Bis(glycolaldehyd)-phosphats (**11**) bildet sich (nebst Glycolaldehyd-phosphat-cyanhydrin (**2**)) aus Oxiran-2-carbonitril (**1**) und Phosphat in wässriger Lösung bei Raumtemperatur immer dann, wenn der pH-Wert der Phosphat-Lösung zwischen schwach basisch und neutral liegt. Ein ¹H-NMR-spektroskopisch verfolgter (orientierender) Versuch in D₂O (3 mol-equiv. **1**, *c* = 0.45M, 1 mol-equiv. D₃PO₄, 2 mol-equiv. Lutidin, pH *ca.* 7) zeigte neben fortschreitender Hydrolyse von **1** zu Glycolaldehyd-cyanhydrin die rasche Bildung von **2** bis zu einem Anteil von *ca.* 0,3 mol-equiv. und dann rasch fortschreitende Bildung von **9**. Nach zwei Wochen war **1** im wesentlichen verbraucht, und im Reaktionsgemisch fand sich gemäss ¹H-, ¹³C- und

¹²⁾ Gemeint ist Bildung von Cyanhydrinen, die in β -Stellung zur (latenten) Aldehyd-Gruppe eine freie OH-Gruppe tragen (z. B. Glycerinaldehyd-2-phosphat), und in welchen durch Ringschluss des folgenden Typs die (Cyanhydrin \rightleftharpoons Aldehyd)-Gleichgewichte irreversibel gestört werden können.



¹³⁾ So z. B. durch Verwendung eines Reaktors, in welchem Oxirancarbonitril und HCN mobil, Phosphat sowie phosphorylierte Reaktionsprodukte jedoch immobilisiert wären. Eine attraktive Möglichkeit wäre die Perkolations einer wässrigen Lösung von (membrandurchlässigem, da neutralem) Oxirancarbonitril und Formaldehyd durch ein Beut von Lipidvesikeln, die eine wässrige Lösung von (membran-undurchlässigem, da geladenem) Phosphat enthalten; Glycolaldehyd-phosphat und Zucker-phosphate würden in den Vesikeln zurückbehalten, während HCN als (membran-durchlässiges, da neutrales) Formaldehyd-cyanhydrin fortlaufend abgeführt würde. Solche Versuche werden im Laboratorium von Prof. P. Luisi (ETH) geplant.

Schema 3. Bis(glycolaldehyd)-phosphat aus Oxirancarbonitril^{a)}*)

^{a)} Reaktionsbedingungen: (a) 1,0M **1** + 0,33M Hydrogen-lutidinium-phosphat, H_2O , pH 7,0, Ar, RT., 5 Tage + 1 mol-equiv. **1**, 5 weitere Tage, IA-Chromatographie. (b) H_3PO_4 (86%) in **1** als Reaktionsmedium, RT., 16 Tage (Reaktionsprodukt: ca. (1:1)-Gemisch von **10** und **9** (H^+ -Form) gemäss ^1H -NMR. (c) **9** (H^+ -Form) in **1** als Reaktionsmedium, RT., 16 Tage (65% Umsatz zu **10** gemäss ^1H -NMR).

^{b)} Ausbeute nach Chromatographie.

^{*)} Comparison of reaction conditions for formation of mono-, di-, and trialkyl phosphates from oxiranecarbonitrile. Dialkylation of phosphate ion to give phosphodiester **9** proceeds smoothly in buffered aqueous solution (pH 7,0) at room temperature. In contrast, formation of phosphotriester **10** could be achieved only when H_2O was largely excluded, e.g. using either H_3PO_4 (86%) or starting from **9** with oxiranecarbonitrile as the reaction medium. Constitutional assignment of reaction products **2**, **9**, and **10** is based on ^1H - and ^{13}C -NMR comparison with samples prepared by ozonolysis of mono-, di-, and triallyl phosphate followed by cyanohydrin formation (Scheme 4). ^{b)} Yield after chromatography.

^{31}P -NMR (vgl. Fig. 1) folgende Produktverteilung: 32% **9**, 6% **2**, 64% **6**, 2% Phosphat. In einem unter optimierten Bedingungen (vgl. Schema 3) durchgeführten, präparativen Ansatz mit zeitlich versetzter Zugabe des Edukts **1** wurde nach Ionenaustausch-Chromatographie (vgl. Isolierung von **2**) der Phosphodiester **9**¹⁴⁾ in ca. 65% Ausbeute (bezogen auf **1**) nebst ca. 10% des Monoesters **2** isoliert. Die solcherart erhaltene Probe von **9** wurde nach DC, Neg. FAB-MS sowie ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektrum mit einem durch

¹⁴⁾ Nach ^{31}P -NMR-Spektrum und Neg. FAB-MS noch ca. $10 \pm 5\%$ **2** enthaltend; vgl. Exper. Teil.

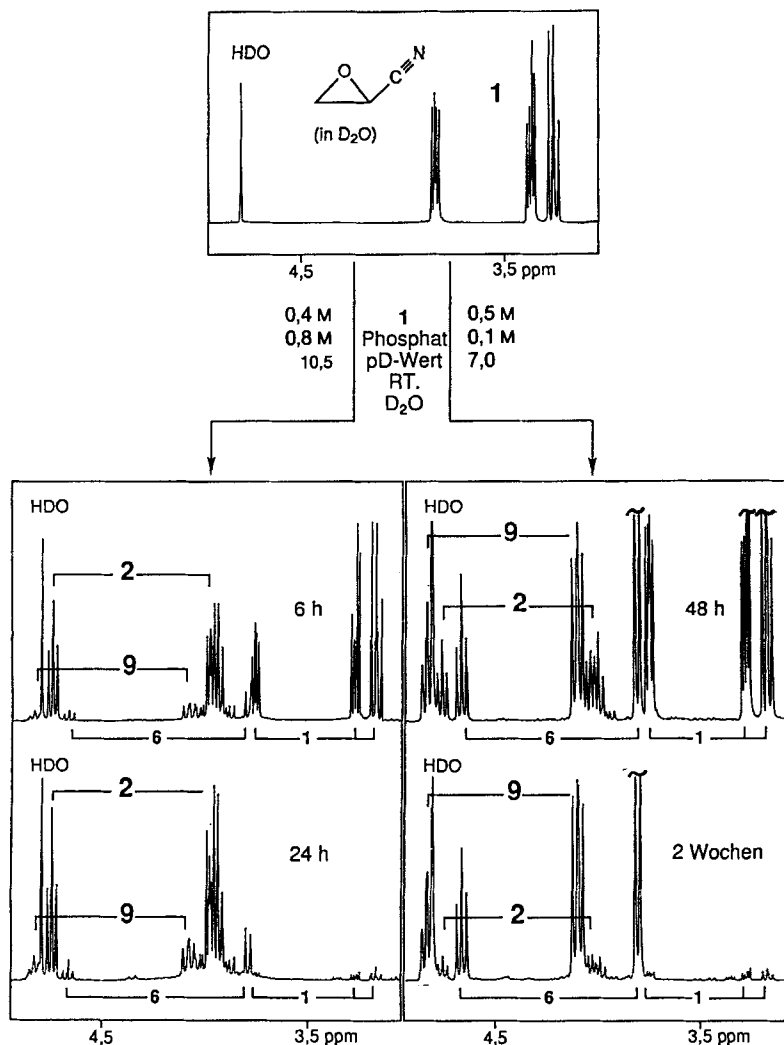


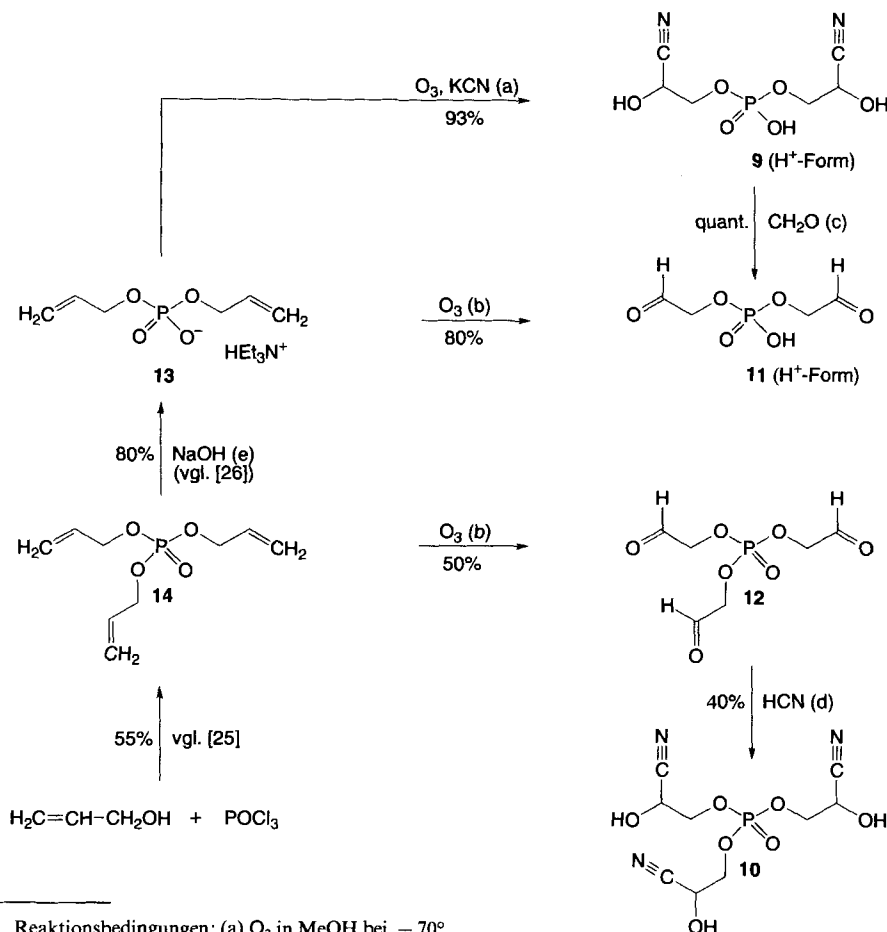
Fig. 1. ^1H -NMR-spektroskopische (200 MHz) Verfolgung der Umsetzung von **1** mit Phosphat in D_2O -Lösung*)

- *) ^1H -NMR-Spectroscopic characterization of the reaction of oxiranecarbonitrile **1** with inorganic phosphate in D_2O . Left: When the reaction is carried out at pH $\sim 10,5$ (K_2HPO_4 in D_2O) mainly monoester **2** is formed; right: the reaction at pH ~ 7 (dilutidinum phosphate) produces mainly diester **9**.

Ozonolyse von Diallyl-phosphat gewonnenen Probe von **9** (vgl. Kap. 4 und Schema 4) identifiziert. Das Vorliegen zweier diastereoisomerer Formen von **9** ist durch eine (nur bei hoher Auflösung sichtbare) Linienverdopplung für das Cyanhydrin-C-Atom im ^{13}C -NMR-Spektrum dokumentiert (vgl. die Diskussion der spektroskopischen Eigenschaften in Kap. 5).

Ebenso wie beim Cyanhydrin **2** haben wir auch beim Bis-cyanhydrin **9**¹⁵⁾ in einem ¹H-NMR-kontrollierten Experiment nachgewiesen, dass in Carbonat-gepufferter Lösung in D₂O beim Raumtemperatur (0,05M **9**, 0,35M NaDCO₃/Na₂CO₃-Puffer, pH 9,4) in Gegenwart von 4 mol-equiv. Formaldehyd die CN-Gruppen von **9** rasch und vollständig auf Formaldehyd übertragen werden, unter Bildung des Bis(glycolaldehyd)-phosphats **11** (Schema 4), der in diesem Medium zur Hauptsache als Bis-hydrat vorliegt (¹H-

Schema 4. Herstellung von Vergleichsproben^{a)}*)



^{a)} Reaktionsbedingungen: (a) O₃ in MeOH bei –70°, Me₂S bei –20°, (HEt₃N⁺→H⁺)-Austausch, KCN + HCOOH in H₂O, pH ~ 7, IA-Chromatographie ((H₂O/HCOOH)-Gradient). (b) O₃ in MeOH bei –70°, Ph₃P, Benzol bei –4°, H₂O, Chromatographie an Polyacrylamid. (c) 0,05M **9** + 4 mol-equiv. CH₂O, D₂O, 0,35M Na₂CO₃-Puffer, pH 9,4, RT., 10 min (¹H-NMR-Experiment). (d) HCN, Hexan, MeOH, H₂O, (C₁₂H₂₅)₃N, RT. (2phasig), Chromatographie an RP-18 (verlustreich). (e) 10 mol-equiv. NaOH, H₂O, 100°, 30 min.

*) Reaction conditions for the preparation of authentic comparison samples of **9**–**12**.

¹⁵⁾ Experiment mit einer Probe von **9** durchgeführt, die auf dem Wege **13**→**9** (vgl. Schema 4) gewonnen worden war.

NMR). Für präparative Zwecke wird diese Verbindung am einfachsten auf dem Wege **13** → **9** → **11** (vgl. *Schema 4*) hergestellt¹⁶⁾.

Wie aus den Formulierungen des *Kap. 6* zu extrapolieren ist, sind nicht nur ausgehend von der Konstitution des Bis(glycolaldehyd)-phosphats, sondern auch von der des Tris(glycolaldehyd)-phosphats Zusammenhänge mit Oligonucleotid-Rückgrat-Strukturen formulierbar, welche im Zusammenhang mit der Chemie des Oxirancarbonitrils Aufmerksamkeit verdienen. Wir haben deshalb auch Versuche angestellt, welche die Abklärung der Bildungschancen dieses Phosphotriester-Derivats zum Gegenstand hatten. Dabei gelang es zwar, die drei Oxid-O-Atome der Phosphat-Gruppe mit Oxirancarbonitril zum erwarteten Phosphotriester-Derivat **10** zu alkylieren, doch die hiezu als notwendig befundenen Reaktionsbedingungen sind keinesfalls von präbiotischer Relevanz. Im übrigen hat es sich ohnehin gezeigt, dass das Tris-cyanhydrin **10** des Phosphotriesters so sehr hydrolyseempfindlich ist, dass es in wässriger Lösung nicht auf übliche Weise mit Formaldehyd in die Trialdehyd-Form übergeführt werden kann.

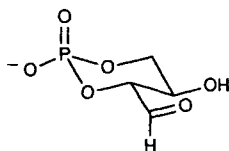
In zahlreichen orientierenden Versuchen ist weder in basisch-wässrigen, noch neutral-wässrigen Bedingungen gelungen, den Phosphodiester **9** mit einem Überschuss von **1** zum Triester **10** zu alkylieren. Eine weitgehend einheitliche, aber langsame Triester-Bildung bei Raumtemperatur konnte hingegen beim Stehenlassen der Säure-Form des Phosphodiesters **9** mit überschüssigem **1** als Lösungsmittel (*ca.* 80 mol-equiv.) beobachtet werden: ¹H-NMR-spektroskopisch¹⁷⁾ waren innert vier Tagen 16%, und in 16 Tagen *ca.* 65% Produkt-Bildung festzustellen, während bei noch längerer Reaktionszeit die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches nicht mehr änderte. Ging man unter analogen Bedingungen nicht von **9**, sondern von Phosphorsäure (87%) aus, so bestand das Reaktionsgemisch nach 16 Tagen aus einem Gemisch von Phosphotriester **10** (H⁺-Form) und dem Phosphodiester **9** (H⁺-Form) im Verhältnis von *ca.* 1:1. Zusatz von H₂O zu den Reaktionsgemischen solcher Alkylierungsansätze führte stets zu rascher Hydrolyse von **1** und weitgehender Unterbindung der Bildung von **10**, während Zusatz von Lösungsmitteln wie MeCN oder DMSO die Produkt-Bildung drastisch verzögerte.

Beim Phosphotriester-tris(cyanhydrin) **10** ist das Vorliegen der beiden möglichen Diastereoisomeren ((*R,R,R*)- und (*R,R,S*)-Form bzw. Enantiomeren) im ¹³C-NMR-Spektrum leicht erkennbar (vgl. *Kap. 5*).

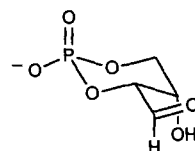
4. Herstellung von Vergleichsverbindungen. – *Schema 4* resümiert die Reaktionsstufen, durch welche wir ausgehend von Triallyl-phosphat (**14**) [25] bzw. Diallyl-phosphat (**13**) [26] die Tris- und Bis(glycolaldehyd)-phosphate **12** bzw. **11** (als Hydrate), sowie hieraus die entsprechenden Cyanhydrine **10** bzw. **9** hergestellt haben, und zwar nicht nur zu Vergleichszwecken, sondern auch zur Bereitstellung grösserer Mengen von Experi-

¹⁶⁾ Der Dialdehyd **11** (bzw. sein Bis-hydrat) ist in wässrig-alkalischem Medium erwartungsgemäss eine empfindliche Verbindung; er geht leicht die intramolekulare Aldolisierung zum Gemisch der beiden diastereoisomeren cyclischen Hydroxaldehyde ein [3] [24].

¹⁷⁾ Nach Entfernung des überschüssigen **1** durch Absaugen im Vakuum und Aufnahme des Rückstandes in D₂O.



D-Erythrose-2,4-cyclophosphat



D-Threose-2,4-cyclophosphat

mentiermaterial. Die entsprechende Herstellung von Glycolaldehyd-phosphat durch Ozonolyse des Triethylammonium-allyl-hydrogenphosphats haben wir bereits früher [5] beschrieben.

Die Herstellung von **9** (als Gemisch der beiden Diastereoisomeren) erfolgte durch Ozonolyse von Trimethylammonium-diallyl-phosphat in MeOH, Aufarbeitung mit Me₂S, Behandlung der durch (Ammonium → H⁺)-Ionentausch bereiteten, wässrigen Lösung der Säure-Form des Ozonolyse-Produkts mit 6 mol-equiv. KCN in Gegenwart von 5 mol-equiv. HCOOH¹⁸), und anschliessende Chromatographie an DEAE-*Sephadex* mit ansteigendem HCOOH-Gradienten. Das Produkt wurde in hoher Ausbeute und, gemäss DC, ¹H-, ¹³C-, ³¹P-NMR-Spektren und Neg. FAB-MS, in weitgehend einheitlicher Form erhalten. Proben solcher Bis-cyanhydrine verlieren teilweise HCN, wenn man sie gefriertrocknet. Wie oben schon erwähnt, ist an einer solcherart gewonnene Probe die Rückführung von **9** in **11** (bzw. deren Dihydrat-Form) durch Umsetzung mit Formaldehyd vollzogen werden. Da Proben der Diester-Form nur unter merklicher Zersetzung (an Ionenaustauschern) chromatographiert werden konnten, ging man zur (präparativen) Herstellung von **11** direkt von Diallyl-phosphat aus, verwendete bei der Aufarbeitung des Ozonolyse-Gemisches statt Me₂S (einen Überschuss von) Ph₃P und reinigte das Produkt nach seiner Überführung in die H⁺-Form durch Chromatographie an Polyacrylamid-Gel. Nach ¹H-NMR-Spektrum enthielten solche in ca. 70% Ausbeute gewonnene Proben von **11** (H⁺-Form) noch je ca. 5% der beiden Hydrolyse-Produkte¹⁹) von **11**, nämlich Glycolaldehyd-phosphat und Glycolaldehyd (beide als Hydrate).

Nach analogem Vorgehen liessen sich durch Ozonolyse von Triallyl-phosphat, reduktiver Aufarbeitung mit Ph₃P und Chromatographie an Polyacrylamid-Gel wässrige Lösungen des Triesters **12** in Ausbeute von ca. 50% erhalten. Solche wässrigen Lösungen, in welchen die Aldehyd-Gruppe von **12** durch Hydrat-Bildung geschützt vorliegen (¹H-NMR), lassen sich bei Raumtemperatur (unter N₂) während zumindest zwei Tagen ohne NMR-spektroskopisch feststellbare Veränderungen aufbewahren; Versuche zur Gefriertrocknung solcher Lösungen führten (vermutlich durch polymerisierende Anhydatisierung) zu einem farblosen, wasserunlöslichen Gel.

Die Cyanhydrin-Bildung auf die übliche Art führte in der Phosphotriester-Reihe vorerst zu Schwierigkeiten; diese waren auf die hohe Hydrolyse-Empfindlichkeit von **11** zurückzuführen. In wässrigen Lösungen von **12** wurde nach Zugabe von HCN (ohne KCN) bei Raumtemperatur keine Produkt-Bildung beobachtet, setzte man indessen die für Cyanhydrin-Bildung erfahrungsgemäss notwendige (üblicherweise katalytische Menge) Base hinzu, so erfolgte Hydrolyse der Phosphotriester-Funktion (¹H-NMR), und zwar in einem Ausmass, das jeweils der Menge eingesetzter Base äquivalent war (NaOH, KCN, Et₃N oder diverse basische Ionenaustauscher in variierender Konzentration). Indessen gelang Produkt-Bildung im Zweiphasensystem Wasser–HCN–MeOH/Tri-dodecylamin–Hexan. Auf solche Weise in der wässrig-methanolischen Phase sich anreicherndes Reaktionsprodukt (Umsetzung bis zu 90%) enthielt gemäss ¹H-NMR ein Gemisch von **10** und entsprechenden Phosphotriester-Hydrolyse-Produkten in

¹⁸) Mit einer Reaktionslösung, die nur KCN, aber keine zusätzliche Säure (hier HCOOH) enthielt, fand die Cyanhydrin-Bildung in nur untergeordnetem Ausmass statt.

¹⁹) Partielle Hydrolyse von **11** findet vermutlich bei der Überführung in die (H⁺)-Form am Ionenaustauscher statt.

einem Verhältnis von *ca.* 3:1. Durch verlustreiche Chromatographie an Kieselgel (Umkehrphase) liess sich in einem der Experimente eine Probe von **10** als binäres Diastereoisomerengemisch gewinnen (Ausbeute *ca.* 50%), welches *ca.* 15% des Bis-cyanhydrins **9** enthielt.

5. NMR-Spektroskopische Charakterisierungen. – Alle in den *Kap.* 2 und 3 erwähnten Glycolaldehyd-phosphate und deren HCN-Addukte (Cyanhydrine) wurden durch ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie in D_2O als Lösungsmittel charakterisiert (vgl. *Tab.*). Was die drei Phosphate **3**, **11** und **12** anbetrifft, so liegen diese auf Grund der spektroskopischen Beobachtungen alle als Aldehyd-Hydrate vor, es fehlen die aldehydischen $\text{C}(\text{sp}^2)(\text{H})$ bzw. $\text{C}(\text{sp}^2)$ -Signale bei *ca.* 9,5 und 190 ppm im ^1H -NMR- bzw. ^{13}C -NMR-Spektrum.

^{31}P -NMR-Spektren. Diese erwiesen sich für die strukturelle Zuordnung der Verbindungen als besonders wertvoll, weil die Multiplizität der jeweiligen Signale beim protonengekoppelten Aufnahmemodus Aufschluss über die Anzahl der an die zentrale Phosphat-Gruppierung gebundenen Glycolaldehyd-Reste (bzw. deren HCN-Addukte) ergab, eine Information, die als Folge der jeweiligen Identität dieser Substituenten sonst nicht direkt zugänglich ist. Mit Hilfe zusätzlich unter Protonen-Entkopplung aufgenommener Spektren wurde für alle Charakterisierungsproben sichergestellt, dass die gefundene Signal-Multiplizität tatsächlich von der Resonanz eines einzelnen P-Kerns stammt und nicht von einer zufälligen Signal-Überlagerung herrührt. Die Werte der Kopplungskonstanten zwischen P und jeweiligen CH_2 -Protonen bewegen sich zwischen 6,0 und 8,3 Hz; dabei sind sie für die Aldehyd-Hydrate tendenziell etwas grösser, als für die entsprechenden Cyanhydrine. Letztere weisen zudem noch eine Fernkopplung des P-Kerns über 4 Bindungen zu den Protonen am C(1) auf. Bei **3** und **11** deutet sich diese Kopplung wegen mangelnder Auflösung nur in einer Signal-Verbreiterung an, die jeweils angegebene Kopplungskonstante (< 1 Hz) ist aus den ^1H -NMR-Spektren gewonnen (s. u.). Bei **10** beträgt die Fernkopplung fast 2 Hz und ist auch im ^{31}P -NMR-Spektrum sichtbar.

Die ^{31}P -NMR-Signale der HCN-Addukte erscheinen generell bei höherem Feld als diejenigen der entsprechenden Aldehyd-Hydrate; in beiden Reihen ist zudem eine markante Hochfeldverschiebung bei zunehmendem Substitutionsgrad (Monoester \rightarrow Triester) festzustellen. Bei den Cyanhydrinen **11** und **12** wird das Vorliegen von jeweils zwei diastereoisomeren Formen erwartet; offenbar sind deren ^{31}P -Signale aber isochron, jedenfalls konnten sie nicht getrennt beobachtet werden.

^1H -NMR-Spektren. In den einander sehr ähnlichen ^1H -NMR-Spektren der drei Aldehyd-Hydrate **3**, **11** und **12** sind jeweils ein scharfes *Triplet*-Signal (um $\delta = 5,2$ ppm) mit einem *J*-Wert von *ca.* 5 Hz und ein scharfes (*Dublett* \times *Dublett*)-Signal ($\delta = 3,7\text{--}4,1$ ppm) mit *J*-Werten von *ca.* 5 bzw. *ca.* 7 Hz zu erkennen; das Integrationsverhältnis der beiden Signale beträgt 1:2. Die Signal-Lage des *Tripletts* ist typisch für das *CH*-Signal von Acetal-Derivaten und wird dem $\text{H}-\text{C}(1)$ der hydratisierten Glycolaldehyd-Substituenten zugeordnet. Das (*Dublett* \times *Dublett*)-Signal ist den beiden geminalen $\text{H}-\text{C}(2)$ zuzuordnen; die zweite *Dublett*-Aufspaltung reflektiert dabei die Kopplung zum ^{31}P -Kern. Die Signal-Lagen und *J*-Werte der drei Verbindungen sind nur unwesentlich vom pH-Wert der Messlösung abhängig. Der zunehmende Substitutionsgrad bei den drei Glycolaldehydphosphaten äussert sich in einer geringen Tieffeldverschiebung des ($\text{H}-\text{C}(1)$)-Signals und in einer grösseren des ($\text{H}-\text{C}(2)$)-Signals.

Tabelle. NMR-Spektroskopische Daten der Glycolaldehyd-phosphate 2, 3, 9, 10, 11 und 12

	¹ H-NMR ^{c)}			¹³ C-NMR ^{c)}				³¹ P-NMR ^{c)}	
	δ [ppm]		J [Hz]	δ [ppm]		J [Hz]	J [Hz]	δ [ppm] ^{d)}	
	H-C(1)	H-C(2)		C(1)	C(2)			P	
2 (H ⁺ -Form)	4,84	4,09	4,7	63,3	68,2	121,5	8,5	4,5	+0,05
2 (Na ⁺ -Salz; pD 5,5)	4,84	4,06	4,8	63,4	68,3	121,5	8,4	4,7	+0,8
		4,02 ^{b)}	4,8 ^{b)}						
2 (Na ⁺ -Salz; pD 10,4) ^{a)}	4,79		8,3						
		4,00 ^{b)}	4,6 ^{b)}						
9 (H ⁺ -Form)	4,85	4,10	4,6	63,1	68,9 ^{f)}	121,3	9,1	5,4	-0,35
9 (Na ⁺ -Salz; pD 9,4) ^{a)}	4,88	4,12	4,7						
10 (D ₂ O; pD neutral)	4,97	4,45	4,1	62,6	71,4 ^{g)}	120,6	8,1	ca. 5	-2,17
3 (H ⁺ -Form) ^{e)}	5,09	3,72	4,9	91,2	70,2		8,9	5,2	+1,10
3 (Na ⁺ -Salz; pD 5,5) ^{f)}	5,15	3,78	4,8	91,5	70,5		9,3	4,7	+0,91
3 (Na ⁺ -Salz; pD 10,4) ^{a)f)}	5,10	3,72	4,5	92,4	69,9		7,2	4,6	
11 (H ⁺ -Form) ^{e)}	5,16	3,79	4,9	91,1	70,6		9,0	5,7	+0,85
11 (Na ⁺ -Salz; pD 5,5) ^{f)}	5,20	3,82	4,9						
11 (Na ⁺ -Salz; pD 9,4) ^{a)f)}	5,18	3,80	4,9						
12 (D ₂ O; pD neutral) ^{e)}	5,23	4,05	4,8	90,2	72,5		8,5	6,1	-0,68

^{a)} In (NaDCO₃/Na₂CO₃)-Puffer.^{b)} AB-Teil von ABMX-System; ² $J(2,2') = 11,5$ Hz.^{c)} In D₂O.^{d)} J_s , ¹H-NMR-Daten.^{e)} Hydrat-Form.^{f)} 2 Dublette der beiden Diastereoisomeren in gleichem Verhältnis.^{g)} 4 Dublette der beiden Diastereoisomeren in gleichem Verhältnis.

Die Spektren der drei Cyanhydrine **2**, **9** und **10** sind sich wiederum sehr ähnlich und zeigen ähnliche Kopplungskonstanten wie die drei entsprechenden Aldehyd-Hydrate. Verglichen mit diesen sind jedoch die (H–C(2))-Signale um *ca.* 0,4 ppm nach tieferem und die (H–C(1))-Signale um *ca.* 0,25 ppm nach höherem Feld verschoben. Das Signal von H–C(1) erscheint als *Triplet* \times *Dublett*; die zusätzliche kleine Aufspaltung (1–2 Hz) ist auf die Fernkopplung zum P-Kern zurückzuführen. Mit Ausnahme von **2** – und auch dort nur bei einem pH-Wert von 10,4 – sind die Signale der beiden diastereotopen (H–C(2))-Protonen isochron und nur in (*Dublett* \times *Dublett*)-Signale aufgespalten. Wie bei den entsprechenden ^{31}P -NMR-Spektren fallen die Signale der beiden diastereoisomeren Formen von **9** und **10** offenbar zusammen und können nicht getrennt beobachtet werden.

^{13}C -NMR-Spektren. Die protonenentkoppelten Spektren der drei Aldehyd-Hydrate **3**, **11** und **12** sind sehr einfach und zeigen jeweils zwei in *Dublette* aufgespaltene Signale. Die Signale um δ 91 ppm stammen gemäss DEPT-Experiment von CH-C-Atomen und weisen einen *J*-Wert von *ca.* 9 Hz auf; diese Signal-Lage ist typisch für das CH-Signal von Acetal-Derivaten und es wird dem C(1) der hydratisierten Glycolaldehyd-Substituenten zugeordnet. Die Signale um δ 71 ppm stammen gemäss DEPT-Experiment von CH₂-C-Atomen, weisen eine Kopplungskonstante von *ca.* 5 Hz auf und sind den jeweiligen C(2)-Zentren zuzuordnen. Die beobachteten *J*-Werte sind typisch für (^{13}C , ^{31}P)-Kopplungen über drei bzw. zwei Bindungen. Mit zunehmendem Substitutionsgrad (Monoester \rightarrow Triester) erfahren die C(1)-Signale eine leichte Hochfeld- und die C(2)-Signale eine etwas grössere Tieffeldverschiebung.

Infolge des stark entschirmenden Effekts der CN-Substituenten, deren Signale um δ *ca.* 121 ppm erkennbar sind, erscheinen die *Dublett*-Signale der C(1)-Zentren (CH-C-Atome gemäss DEPT-Experiment) der drei Cyanhydrine **2**, **9** und **10** bei wesentlich höherem Feld als die entsprechenden Signale der entsprechenden Aldehyd-Hydrate, nämlich um δ *ca.* 63 ppm; die (^{13}C , ^{31}P)-Kopplungskonstanten weisen Werte von *ca.* 8 Hz auf und sind mit einer Kopplung über drei Bindungen vereinbar. Die chemischen Verschiebungen der C(2)-Zentren (CH₂-C-Atome gemäss DEPT-Experiment) (δ *ca.* 69 ppm) sind fast identisch mit den entsprechenden Signalen der Aldehyd-Hydrate. Mit zunehmenden Substitutionsgrad erfahren die C(1)- sowie die CN-Signale eine leichte Hochfeld- und die C(2)-Signale eine etwas grössere Tieffeldverschiebung.

Das CH₂-Signal des Monoesters **2** ist ein *Dublett* mit einem *J*-Wert von 4,5 Hz. Im Spektrum des Diesters **9** sind an dessen Stelle zwei sehr nahe beieinanderliegende CH₂-*Dublett*-Signale (*J* jeweils 5,4 Hz) gleicher Intensität zu erkennen, welche den beiden möglichen Diastereoisomeren zugeordnet werden. Für das C(2)-Signal des Triesters **10** sind hingegen vier nahe beieinanderliegende *Dublette* (*J*-Werte *ca.* 5 Hz) gleicher Intensität zu sehen: das (*R,R,R*)- (oder (*S,S,S*))-konfigurierte Diastereoisomere weist C₃-Symmetrie auf, die drei Äste sind homotop und geben deshalb zu einem *Dublett*-Signal Anlass. Die drei Äste des asymmetrischen, d.h. (*R,R,S*)- (oder (*S,S,R*))-konfigurierten Diastereoisomeren sind diastereotop und geben erwartungsgemäss Anlass zu drei verschiedenen C(2)-*Dublett*-Signalen. Aufgrund des beobachteten Intensitätsverhältnisses der vier *Dublette* beträgt das Verhältnis der beiden Diastereoisomeren *ca.* 1:3.

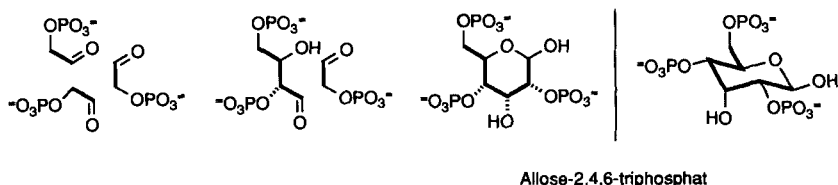
6. Über (formale) konstitutionelle Zusammenhänge zwischen Bis(glycolaldehyd)-phosphaten und Rückgraten von Hexo- und Pentopyranosyl-oligonucleotiden.

Dieses Kapitel bedarf einer Vorbemerkung: Formelschemata, die einen zwar attraktiven, jedoch experimentell noch unberührten Synthese-Plan wiedergeben, gehören normalerweise nicht in eine wissenschaftliche Publikation, sondern ins Laboratorium, oder dann in die Schreibtisch-Schublade. Wenn wir hier von dieser Norm abweichen, tun wir dies aus besonderen Gründen. Aus äusseren Umständen werden wir einerseits wohl kaum in die Lage kommen, das in diesen Schemata zum Ausdruck kommende Konzept einer Oligonucleotidrückgrat-Synthese durch aldolisierende Oligomerisation in der zu wünschenden Weise experimentell zu bearbeiten. Andererseits haben wir die Erfahrung gemacht, dass schon allein die formale Kenntnis der diesem Konzept zugrunde liegenden, konstitutionellen Zusammenhänge Fragestellungen anzuregen vermag, die zu experimentell leicht zugänglichen und unmittelbares Interesse erheischenden Zielsetzungen auf dem Gebiete des Entwurfs alternativer Oligonucleotid-Systeme führen können, Zielsetzungen, die sich (anscheinend) nicht so ohne weiteres aus anderen Quellen ergeben. So waren es u. a. diese Zusammenhänge, welche letztlich zum Entwurf des Struktur-Typs der p-RNA [27] (Sommer 1992) und damit zur experimentellen Bearbeitung [12] dieser Verbindungsklasse geführt haben. Dies soll hier – wie in der vorläufigen Mitteilung über die Synthese und Paarungseigenschaften von Oligonucleotiden des p-RNA-Typs in Aussicht gestellt (vgl. Fussnote 5 in [12]) – durch eine Erörterung der Zusammenhänge nachgezeichnet werden.

Der Aldomerisierungsweg zu Oligonucleotid-Rückgratstrukturen vermag aus chemischer Sicht aus mehrfachen Gründen zu interessieren. Vorab würde es sich in dieser Art des Zugangs zu Oligomeren um *Oligomerisierungsprozesse* im eigentlichen Sinne des Wortes handeln (Ensemble der Edukte sind isomer zu Produkten) im Gegensatz zu den komplizierten *Oligokondensationsprozessen* der konventionellen Oligonucleotid-Synthetik. Dass für den Struktur-Typ von Oligonucleotiden neben der 'ganz offensichtlich einzig adäquaten' Synthese-Strategie der Oligokondensation eine Alternative überhaupt existiert, ist zumindest vom pädagogischen (um nicht zu sagen synthese-theoretischen) Interesse, und als Exempel dafür, wie sehr 'Offensichtlichkeit' einer Synthese-Strategie unter Umständen geeignet ist, die Erkennung von alternativen Strategien zu erschweren, wäre eine experimentelle Realisierung der Alternative infolge der besonderen Prominenz des Struktur-Typs der Oligonucleotide besonders lehrreich. Selbstverständlich steht im Hintergrund dieser Erörterung keinesfalls etwa die Meinung, die Alternative könnte gegebenenfalls eine solche der praktischen Herstellung von Oligonucleotiden bedeuten – wie unten zu zeigen sein wird, würde sie sich gerade für das natürliche System der Ribufuranosyl-(5'→3')-oligonucleotide ohnehin am wenigsten eignen, sondern das chemische Interesse am Aldomerisierungsweg zu Oligonucleotiden entspringt vornehmlich der Problemstellung der chemischen Etiologie des Struktur-Typs der natürlichen Nucleinsäuren, insbesondere der RNA [27–29] [12]. Hierin geht es primär darum, die problemgerecht relevanten chemischen Eigenschaften von Oligonucleotid-Alternativstrukturen zu untersuchen und dieselben mit den entsprechenden Eigenschaften der Oligonucleotide des natürlichen Struktur-Typs zu vergleichen. Die Auswahl der Alternativstrukturen richtet sich nach dem Kriterium des Selbstkonstituierungspotentials solcher Strukturen. Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, bei der Beurteilung von Selbstkonstituierungswegen sich nicht *a priori* auf sogenannte offensichtliche Selbstkonstituierungsstrategien zu beschränken, sondern mögliche Alternativen zu erkennen und diese gegebenenfalls einer experimentellen Prüfung zu unterziehen, jedenfalls das aus chemischer Sicht ihr zukommende Potential bei der Entscheidung über die Wahl von Alternativstrukturen mitzuberücksichtigen. Solch systematisches, im optimalen Fall immer experimentell untermauertes Gegenüberstellen von Funktions- und Selbstkonstituierungspotential natürlicher und alternativer Oligonucleotid-Strukturen stellt ein Forschungskonzept dar, von dem wir annehmen, dass es auf konsequent experimentellem Wege letztlich einen Einblick in die Frage nach dem Ursprung des Struktur-Typs der natürlichen Nucleinsäuren verschaffen wird. Es geschieht in diesem Sinn und Zusammenhang, dass wir nachstehend (vgl. *Schema 5–9*) die hypothetischen Aldomerisierungswege zu Oligonucleotidrückgrat-Strukturen zusammenfassend formulieren.

Um gleich einem naheliegenden Missverständnis vorzubeugen: Die Formulierungen der *Schemata 5–9* stellen *nicht* den Vorschlag dar, wie Rückgrate von Oligonucleotid-Strukturen, speziell jenes des p-RNA-Typs, unter natürlichen präbiotischen Bedingungen entstanden sein sollen, sondern sie dienen hier ausschliesslich der Erläuterung eines Auswahlkriteriums, das wir zur Beurteilung von Oligonucleotid-Alternativstrukturen und zur Entscheidung der Frage benutzt hatten, welchen von diesen Struktur-Typen die Priorität der experimentellen Bearbeitung zu geben sei [27] [12]. Ob diese Schemata gegebenenfalls später zum Inhalt präbiotisch-chemischer Theorien avancieren könnten, ist eine zur Zeit aufs Eis gelegte Frage; es wird von Ergebnissen experimenteller Untersuchungen über sowohl die Bedingungen und Eigenschaften solcher intermolekularer Aldomerisierungen, als auch die Eigenschaften der zugehörigen (vorläufig konventionell synthetisierten) Oligonucleotid-Strukturtypen abhängen, ob diesen konstitutionellen Zusammenhängen eine über die jetzige Funktion hinausgehende Bedeutung zuzuschreiben sein wird.

Schema 5. Konstitutionelles Muster der Aldomerisierung von Glycolaldehyd-phosphat zu *rac*-Hexose-2,4,6-triphosphaten^{*)}

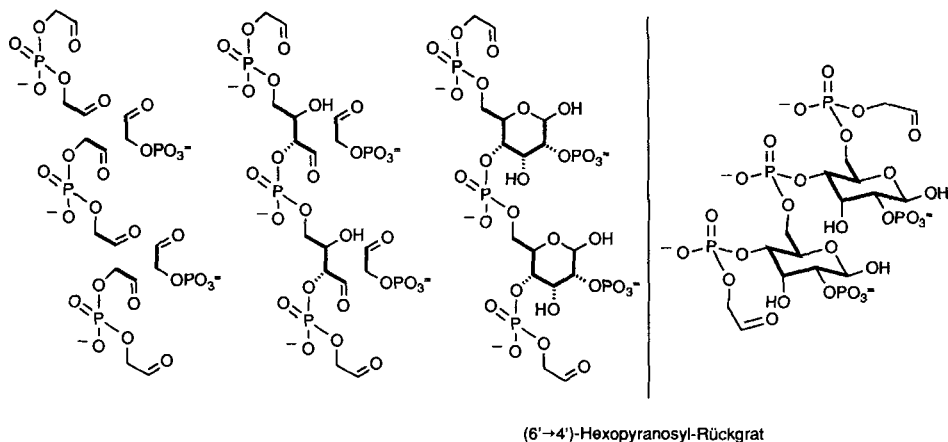


- *) Constitutional pattern of the aldomerization of glycolaldehyde phosphate to *rac*-hexose 2,4,6-triphosphates, a reaction that had been shown [5] to occur regioselectively and in high yield in aqueous solution ($c \approx 0.1\text{M}$; 2N NaOH) leading to the allopypyranosyl diastereoisomer as the main product. Formally imposing this pattern on the intermolecular combinatorial aldomerization of bis(glycolaldehyde) phosphate and glycolaldehyde phosphate in a 1:1 ratio leads to the formulae of the three different versions of hexopyranosyl-oligonucleotide backbones shown in Schemes 6, a–c (all formulated as the allopypyranosyl diastereoisomers).

Das Konzept der aldomerisierenden Oligomerisation zu Hexopyranosyl-oligonucleotid-Rückgraten²⁰⁾ ergibt sich aus einer einfachen Betrachtung des Reaktionsweges der Bildung von Hexose-2,4,6-triphosphaten durch Aldomerisierung von drei Molekülen Glycolaldehyd-phosphat (vgl. Schema 5; über eine experimentelle Version dieser Aldomerisierung vgl. [5]). Ersetzt man in diesem Prozess zwei Glycolaldehyd-phosphat-Bausteine, die zwei verschiedenen Hexose-2,4,6-triphosphat-Molekülen entsprechen, durch ein Molekül Bis(glycolaldehyd)-phosphat und *unterstellt* man Bedingungen, unter welchen dieser Dialdehyd-Baustein nicht *intramolekular*, sondern ausschließlich *intermolekular* aldomerisiert, so resultiert als formales Produkt einer dreifachen Aldomerisierung ein

Schema 6

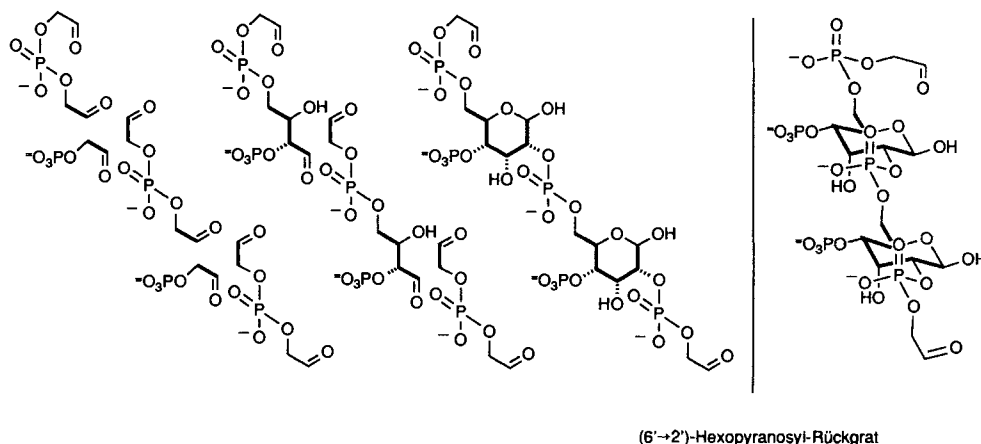
- a) Formale Herleitung der Rückgrat-Strukturen von Hexopyranosyl-oligonucleotiden via den Aldomerisierungsweg: Hexopyranosyl-(6'→4')-oligonucleotide^{*)}



- *) Formal derivation of the backbone structure of allopypyranosyl (6'→4')-oligonucleotides *via* the aldomerization pathway. The pathway differs in essence from the conventional (and 'natural') way of hexopyranosyl (6'→4')-oligonucleotide synthesis by starting (instead of ending) with phosphodiester formation. Interestingly, the constitutional distance between oxiranecarbonitrile and the hexopyranosyl (6'→4')-oligonucleotide backbone is shorter *via* the aldomerization pathway than *via* the conventional pathway. The formula to the right represents the (idealized) pairing conformation of the backbone [28].

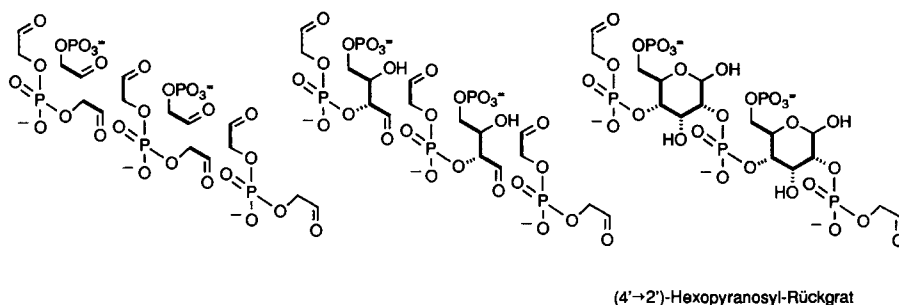
²⁰⁾ Vgl. eine erste diesbezügliche Anmerkung in der Arbeit zur Chemie von Aziridin-2-carbonitril [4].

b) *Formale Herleitung der Rückgrat-Strukturen von Hexopyranosyl-oligonucleotiden via den Aldomerisierungsweg: Hexopyranosyl-(6'→2')-oligonucleotide**



*) Formal aldomerization pathway to the hexopyranosyl (6'→2')-oligonucleotide backbone. Hexopyranosyl (6'→2')-oligonucleotide systems have a linear pairing conformation (idealized) in which orthogonal base-pair distances would amount to *ca.* 7.0 Å (*cf.* Footnote 22).

c) *Formale Herleitung der Rückgrat-Strukturen von Hexopyranosyl-oligonucleotiden via den Aldomerisierungsweg: Hexopyranosyl-(4'→2')-oligonucleotide**

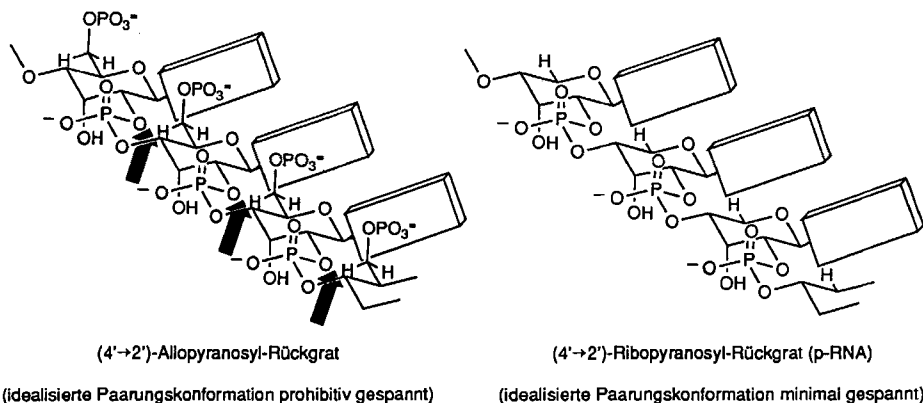


*) Formal aldomerization pathway to the hexopyranosyl (4'→2')-oligonucleotide backbone. Note that the pairing conformation of the backbone is strongly sterically hindered (see Fig. 7).

Hexopyranosyl-oligonucleotid-Rückgrat. Dabei sind die drei konstitutionellen Varianten möglich, die durch die *Schema 6, a–c*, dargestellt sind. Sie unterscheiden sich durch die Reihenfolge, mit welcher die drei in Betracht kommenden, konstitutionell unterschiedlichen Aldomerisierungsschritte zwischen Aldehyd-Gruppen des Bis(Glycolaldehyd)-phosphat- und Glycolaldehyd-phosphat-Bausteins ablaufen würden und führen zu drei konstitutionsisomeren Hexopyranosyl-oligonucleotid-Rückgraten. Diese unterscheiden sich in der Konstitution der Phosphodiester-Verknüpfung; neben der konventionellen (d. h. in Homo-DNS sowie in den bisher bearbeiteten Hexopyranosyl-oligonucleotiden vorliegenden) ($6' \rightarrow 4'$)-Verknüpfung (*Schema 6, a*), resultieren die ($6' \rightarrow 2'$)-Anordnung (*Schema 6, b*) sowie die uns hier besonders interessierende ($4' \rightarrow 2'$)-Anordnung (*Schema 6, c*). In konfigurativer Hinsicht sind in allen Schemata die Allopyranosyl-Formen herausgegriffen, dies zur Hauptsache der Übersichtlichkeit halber, zum andern aber der Erfahrungstatsache entsprechend, wonach die Aldomerisierung von Glycolaldehyd-phosphat in wässrig-alkalischer Lösung unter Bedingungen der kinetischen Kontrolle das *rac*-Allopyranose-2,4,6-triphosphat als Hauptprodukt erzeugt [5]. Es ist beachtenswert und an der konstitutionellen Natur des hier unterstellten Aldomerisierungsprozesses liegend, dass von insgesamt sechs in der Hexopyranosyl-Reihe konstitutionell möglichen Phosphodiester-Verknüpfungen ($6' \rightarrow 4'$, $6' \rightarrow 3'$, $6' \rightarrow 2'$, $4' \rightarrow 3'$, $4' \rightarrow 2'$ und $3' \rightarrow 2'$) spezifisch nur die drei aufgeführten Varianten erzeugt werden. Diese Korrelation hat uns denn auch als Auswahlkriterium gedient, als wir uns anschickten, die Untersuchungen über Hexopyranosyl-oligonucleotide des ($6' \rightarrow 4'$)-Typs auf andere Typen auszudehnen und zu diesem Zwecke auf die für die Homo-DNA entwickelte Art [28] konformationsanalytisch die Basenpaarungs-Bereitschaft solcher Typen unter Berücksichtigung jeweils aller acht diastereoisomeren Hexopyranosen zu evaluieren. Es ist hier nicht der Ort, eine Übersicht über die Ergebnisse dieser Analysen zu geben²¹⁾, hier seien lediglich die Gegebenheiten und der Gang der Überlegungen festgehalten, die schliesslich zur p-RNA führten.

Die im *Schema 6a–c* angegebenen Konformationsbilder geben jeweils die Einzelstrang-Konformation (bzw. im Falle des *Schemas 6, a*, eine der beiden möglichen Einzelstrang-Konformationen [28] [29]), die aufgrund des Kriteriums der konformationellen Repetitivität der konstitutionellen Repetiereinheiten paarungsfähig sein

Schema 7. Sterische Hinderung der Paarungskonformation von Allopyranosyl-($4' \rightarrow 2'$)-oligonucleotiden*)



*) The allopyranosyl ($4' \rightarrow 2'$)-oligonucleotide backbone has one single repetitive (and, therefore, pairing) conformation which, however, is strongly sterically hindered (for the criteria used in the analyses of such systems in idealized conformations, see [28] [29] [12]). This steric hindrance (see arrows) is expected to prohibit the population of this specific type of conformation, and, therefore, such an allopyranosyl ($4' \rightarrow 2'$)-oligonucleotide system is not expected to be an efficient pairing system. The opposite would be predicted to be true in a related structure, in which everything were identical except the exocyclic CH_2OH -substituent at C(6') were lacking (formula to the right). That system happens to be ribopyranosyl ($4' \rightarrow 2'$)-oligonucleotide system ('p-RNA') which is isomeric to RNA. It was the path of analysis delineated here and on *Scheme 8* that eventually had inspired the chemical synthesis and experimental study of the pairing properties of p-RNA oligonucleotides [27] [12] [41] [42].

²¹⁾ Vgl. [27]; eine Übersicht soll bei späterer Gelegenheit gegeben werden (Hexopyranosyl-($6' \rightarrow 4'$)-oligonucleotide [30], Hexopyranosyl-($6' \rightarrow 2'$)-oligonucleotide [31]).

sollten²²⁾. In *Schema 7* ist das Konformationsbild des (4'→2')-Oligonucleotid-Typs von *Schema 6, c*, herausgegriffen und mit dem Hinweis versehen, warum dieser (idealisierte) Konformationstyp infolge prohibitiver sterischer Hinderung keine Chance hätte, populiert zu sein. Da für die hier herausgestellte Hexopyranose-Konfiguration, nämlich jene der Allopyranose, kein weiterer repetitiver Konformationstyp eines (4'→2')-verknüpften Oligonucleotid-Rückgrats existiert (vgl. hierzu [12]), ist zu folgern, dass das Allopyranosyl-(4'→2')-oligonucleotid-System kein Paarungssystem darstellt. Das zweite Formelbild im *Schema 7* steht für die hier sich einstellende Assoziation: von einem im übrigen identischen System, das jedoch den sterisch prohibitiven CH₂OH-Substituenten²³⁾ des Allopyranosyl-Systems nicht aufwiese, würde sehr wohl Paarungsbereitschaft zu erwarten sein. Dieses System entpuppt sich – Ribose ist die Allose der Pentose-Reihe – als Struktur-Typ der Ribopyranosyl-(4'→2')-oligonucleotide (p-RNA).

Wie verhält sich der so hergeleitete Struktur-Typ des p-RNA-Rückgrats zum Systemwahl-Kriterium 'Oligomerisation durch Aldomerisierung'? Das Ergebnis der nunmehr 'retrosynthetischen Rekonstruktion' des zugehörigen Aldomerisierungsweges gibt *Schema 8*: die C₂-Aldolisierungs-Komponente des Hexopyranosyl-(4'→2')-Systems des *Schema 6, c*, Glycolaldehyd-phosphat, ist einfach durch Formaldehyd zu ersetzen. Der Aldomerisierungsweg zum Rückgrat der p-RNA ausgehend von Bis(glycolaldehyd)-phosphat und Formaldehyd präsentiert sich als das formale Analogon des diastereoselektiven Reaktionswegs, den Glycolaldehyd-phosphat und Formaldehyd in alkalisch-wässriger Lösung einschlagen und *rac*-Ribose-2,4-diphosphat als Hauptprodukt bilden [5].

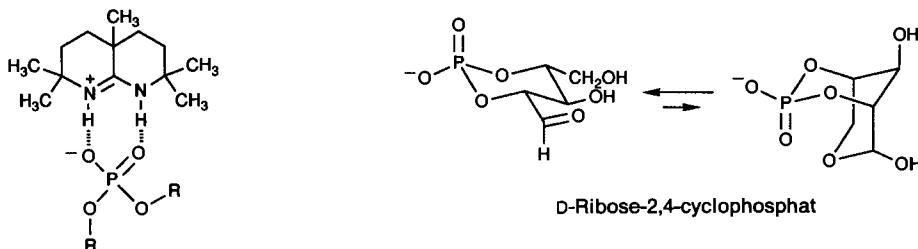
Die in obigen Analysen verwendeten Aldomerisierungspartner Glycolaldehyd-phosphat, Bis(glycolaldehyd)-phosphat und Formaldehyd sind die Reaktionsprodukte der in *Kap. 5* beschriebenen Umsetzung von Oxirancarbnitril mit anorganischem Phosphat in wässriger Lösung, bzw. das dabei zur Freisetzung der freien Aldehyd-Funktionen verwendete HCN-Abfangreagens. Es drängen sich hier vorab zwei Fragen auf. Die eine: wie (un)realistisch ist eigentlich die Vorstellung von einer aldolisierenden Oligomerisation zu Oligonucleotid-Rückgraten aus der Sicht chemischer Erfahrung, und die andere: wie (un)realistisch ist eigentlich die im Hintergrund unserer Beschäftigung mit der Chemie des Oxirancarbnitrils implizierte Vorstellung, wonach dieses Epoxid zu den potentiell präbiotischen Naturstoffen gehören könnte? Auf letztere Frage soll in *Kap. 7* näher eingegangen werden, und die erste sei wie folgt kurz kommentiert.

Es liegt auf der Hand, dass das Kernproblem einer intermolekular-aldolisierenden Oligomerisation des Bis(glycolaldehyd)-phosphats in der entropisch begünstigten Konkurrenz-Reaktion der intramolekularen aldomerisierenden Cyclisierung besteht. In orientierenden Versuchen fanden wir dies übrigens auch bestätigt: auch bei hoher Konzentration (bis zu 0,9M) führt die Aldolisierung von Bis(glycolaldehyd)-phosphat sowohl in wässrig-alkalischer Lösung¹⁶⁾ [3], als auch (in Form des in *Fussnote 24* formulierten Amidinium-Salzes) in organischen Lösungsmitteln wie MeCN oder CH₂Cl₂ [24] ausschliesslich zu Cyclisierung. Wie diese Cyclisierung²⁴⁾ zugunsten

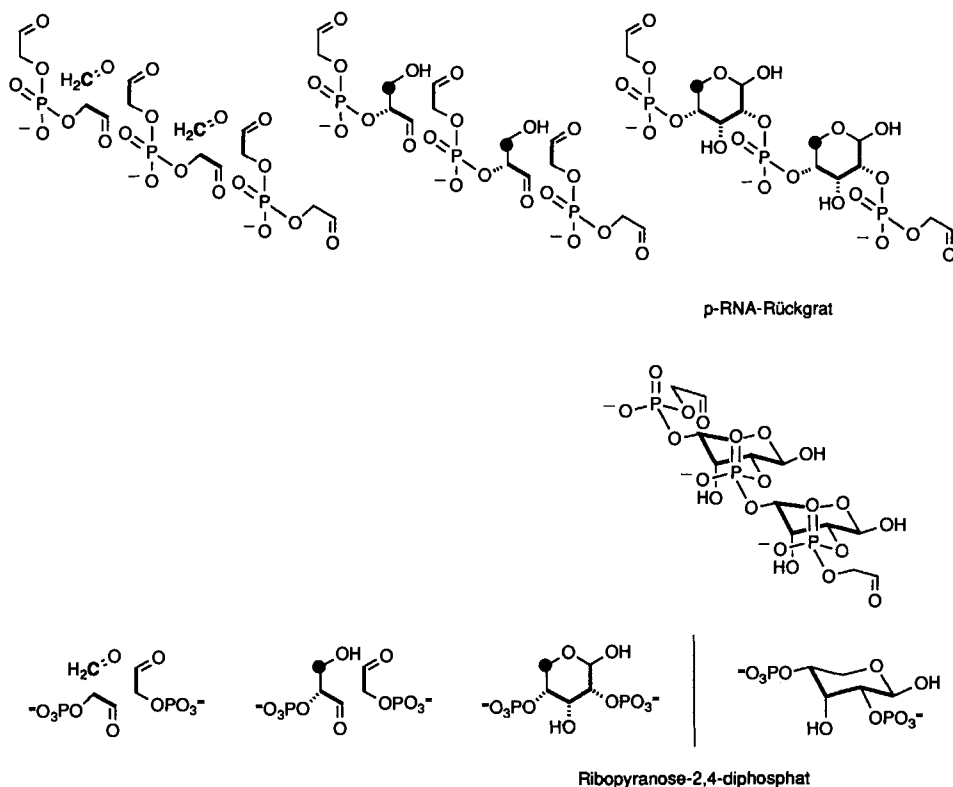
²²⁾ Die Aussage bezieht sich hier nur auf das Kriterium der konformationellen Repetitivität des Einzelstrangs. Im Falle des (6'→2')-Systems (*Schema 6b*) würde der orthogonale Basenabstand in Duplexen ca. 7 Å betragen. Orientierende experimentelle Untersuchungen [31] mit dem Allopyranosyl-(6'→2')-System haben gezeigt, dass ein (1:1)-Gemisch von Allo-(6'→2')(G₆) + Allo-(6'→2')(I₆) nur schwach, in Gegenwart eines Intercalators (Proflavin) jedoch, stark paart (G = Guanin, I = Isoguanin). Für vorläufige Angaben zur (Guanin-Isoguanin)-Paarung vgl. [40–42].

²³⁾ Die Diagnose 'sterische Behinderung' ist nicht abhängig von der Ab- oder Anwesenheit eines Phosphat-Restes an der CH₂OH-Gruppe.

²⁴⁾ Diese Base [32] (vgl. Formelbild) eignet sich generell zur Löslichmachung von Phosphatestern, vorzugsweise Phosphodiestern (inklusive DNA [33]) in organischen Lösungsmitteln, sowie zur Kristallisation von Phosphodiestern, wie auch beinahe beliebigen Carbonsäuren [32] [34] entsprechenden Amidinium-Salzen. Über die Herstellung vgl. [32]. Der Cyclisierung des Phosphodiesters **11** kommt im vorliegenden Zusammenhang eigenes Interesse zu. Eines der in Gegenwart von Formaldehyd zu erwartenden Reaktionsprodukte ist das *rac*-Ribose-2,4-cyclophosphat.



Schema 8. Formale Herleitung der Rückgrat-Struktur von p-RNA via den Aldomerisierungsweg*)



- *) The p-RNA backbone can be formally derived from bis(glycolaldehyde) phosphate and formaldehyde *via* the aldomerization pathway by closely paralleling the aldomerization pattern of the experimentally documented formation [5] of *rac*-ribose 2,4-diphosphate from glycolaldehyde phosphate and formaldehyde. Since *intra*-molecular aldolization of bis(glycolaldehyde) phosphate occurs very readily (see *Footnote 16*), the pathway to the p-RNA backbone is expected to be quite difficult to realize experimentally; a realization of the pathway, however, remains a challenge, since any commentary on the question, whether the pathway has prebiotic relevance, would have to await the outcome of an experimental exploration of its properties.

einer Oligomerisation²⁵⁾ zu umgehen wäre, ist zumindest synthese-konzeptuell ein forderndes Problem. Denkbare Lösungen lägen in einer reaktionsgerechten Substrat-Fixierung durch ein Templat, oder in einer einseitigen und unter den Reaktionsbedingungen jeweils reversiblen Reaktivitätsmodifikation von jeweils einer der beiden Aldehyd-Funktionen des Substrats, oder in einer Kombination der beiden Strategien.

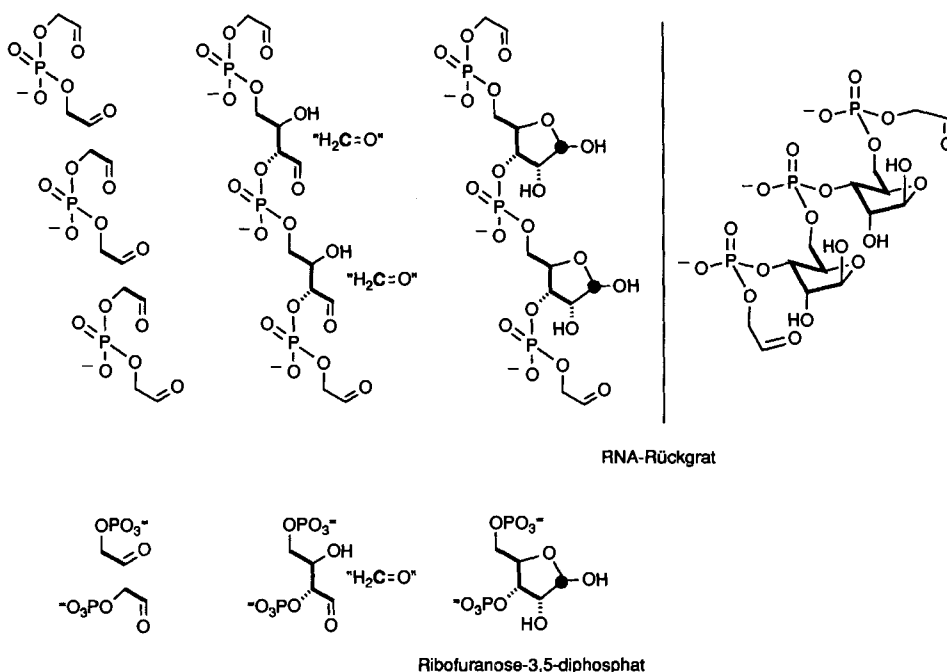
Einer der bemerkenswertesten, aus den hier dargelegten strukturellen Zusammenhängen hervortretenden Aspekte ist der im *Schema 8* enthaltene: die Konstituierung eines *Pentose*-Nucleinsäure-Rückgrats auf dem Aldomerisierungsweg mit je 1 mol-equiv. Bis(glycolaldehyd)-phosphat und Formaldehyd führt chemisch sozusagen zwangsläufig zum Pentopyranosyl-(4'→2')-Rückgrat der p-RNA. Dabei fordert die Zielstruktur, dass der Aldomerisierungsweg mit Formaldehyd zu starten hat, und dass in der zweiten Stufe die β -(Hydroxymethyl)aldehyd-Funktion als elektrophiler Partner mit dem Enolat einer α -unsubstituierten Aldehyd-Gruppe reagie-

²⁵⁾ Nicht zu übersehen ist, dass die Oligomerisation zusätzlich zum Problem des konfigurativen Verlaufs auch noch ein Regioselektivitätsproblem stellen würde.

ren muss. Beide Forderungen sind – zufällig oder nicht – chemisch plausibel: die erste, weil die Formaldehyd-Funktion die (elektrophil) reaktivste ist, und die zweite, weil von den konstitutionell unterschiedlichen Primärprodukten der insgesamt vier konstitutionellen Aldomerisierungsvarianten das Produkt der geforderten Variante das einzige ist, welches sich durch *intramolekulare* Halbacetal-Bildung stabilisieren kann, ohne gleichzeitig der sterisch benachteiligten Aldolisierung zwischen zwei α -(hydroxymethyl)-substituierten Aldehyd-Funktionen zu entspre-

chen. Die 'natürlich anmutende' Affinität der p-RNA-Rückgrat-Struktur zur Chemie des Aldomerisierungswegs (Schema 8) kontrastiert auffallend mit der formalen Unvereinbarkeit, die zwischen dem Struktur-Typ des RNA-Rückgrats unter einer entsprechenden Konstituierung aus Bis(glycolaldehyd)-phosphat und Formaldehyd auf dem Aldomerisierungsweg besteht (Schema 9). Würde man eine Vereinbarkeit herbeinötigen wollen, so setzte dies einen 'umgepolten' Aldolisierungs-Reaktionstyp voraus, durch welchem im (Tetrose \rightarrow Pentose)-Schritt das Ribofuranose-C-Atome C(1) von einem nukleophilen Formaldehyd-Äquivalent herzukommen hätte²⁶). Ob von den hier in Frage kommenden Reaktionstypen einer existiert, der zudem auch noch die Forderung erfüllen würde, ein potentiell präbiotischer zu sein, ist eine interessante, über das spezielle hier zur Diskussion stehende Problem hinaus gehende Frage. Zu ihr eine experimentell begründete Stellungnahme zu erarbeiten, ist eigentlich Aufgabe

Schema 9. Keine (einfache) Herleitbarkeit der Rückgrat-Struktur von RNA auf dem Aldomerisierungsweg*)



*) In remarkable contrast to the p-RNA backbone, it is not possible to derive the constitution of the natural RNA backbone *via* a (simple) aldomerization pathway. Enforcing such a derivation would require a (potentially natural) nucleophilic reagent that is an equivalent of formaldehyde. Such reagents are, *per se*, of interest, considering the central role ascribed to formaldehyde in the chemical etiology of carbohydrates.

²⁶) 'Konstanz des Oxidationsniveaus' ist eine gewichtige Spielregel in der formalen Analyse potentiell präbiotischer, konstitutioneller Zusammenhänge. Deshalb wird hier die am nächstliegend erscheinende Option, Cyanhydrin-Bildung gefolgt von partieller Reduktion, nicht als gültige Lösung betrachtet (obwohl sie mit Mitteln der präparativen Chemie vermutlich realisierbar wäre).

der präbiotischen Chemie, bedenkt man die unbestritten zentrale Rolle, die dem Formaldehyd in der Aetiologie des Struktur-Typs der Zucker zugewiesen wird²⁷⁾).

7. Schlussbemerkungen. – Die experimentelle präbiotische Chemie darf sich nicht auf die Bearbeitung von Verbindungs- und Reaktionstypen beschränken, deren Relevanz für die Präbiotik eine offensichtliche ist, sondern sie hat ihre Fühler auch auf Verbindungen auszustrecken, welches auf Grund nur schon rein chemischer Kriterien für die Erforschung des Selbstkonstituierungspotentials biomolekularer Struktur-Typen möglicherweise von Belang sind. Nicht eine *a-priori*-Beurteilung, sondern immer nur auf Grund einer solchen Hinterfragung experimentell ermittelte Eigenschaften von Verbindungen und Reaktionen werden über die Frage nach deren präbiotischer Relevanz entscheiden.

Eine solche Analyse kann sich gegebenenfalls in die Frage zuspitzen, ob einem bestimmten Ausgangsmaterial oder Zwischenprodukt ein potentiell natürliches Vorkommen zu attestieren sei. In Anbetracht der in dieser Arbeit vorgelegten experimentellen Befunde besteht eine solche Situation für Oxirancarbonitril. Dabei ist es keinesfalls so, dass mit einer Beantwortung dieser Frage über Oxirancarbonitril die entsprechende Frage über Glycolaldehyd-phosphat beantwortet würde, gefragt ist nur, ob den gemäss chemischem Ermessen als zahlreich zu vermutenden, potentiell präbiotischen Bildungsweisen von Glycolaldehyd-phosphat²⁸⁾ die Herleitung aus Oxirancarbonitril zuzuzählen sei. Die anscheinend sehr robuste (Oxirancarbonitril→Glycolaldehyd-phosphat)-Umwandlung erfüllt alle an einen präbiotischen Prozess zu stellenden Anforderungen; in Frage steht einzig die Synthetik des Oxirancarbonitrils selbst. Diese ist im wesentlichen unbekannt, zählt doch hier die präparativ verwendete (oxidative) Darstellung der Verbindung aus Acrylonitril [19] [20] wohl kaum. Unter den hypothetischen Bildungsweisen der Verbindung würden hier thermisch oder photochemisch induzierte Prozesse in der Gas-Phase oder an Oberflächen im Vordergrund des Interesses stehen. Die Formelbilder im *Schema 10* deuten an, in welcher Richtung eine entsprechende Suche wohl zu gehen hätte.

Oxirancarbonitril ist isomer zum Ensemble MeCN/CO, die errechnete Differenz der Bildungswärmen zwischen dem (enthalpiereicheren) Epoxid und dem Ensemble beträgt *ca.* 24 kcal/mol²⁹⁾; ob es photochemisch zu indizierende Wege der Vereinigung der Ensemble-Partner zum Oxirancarbonitril gibt, ist eine der zahlreichen anstehenden Fragen³⁰⁾. Jedenfalls wäre zu erwarten, dass Reaktionen zwischen Formaldehyd und Cyanocarbon, oder zwischen Formyl-cyanid und Methylen, u. a. zu Oxirancarbonitril führen würden. In Analogie zum Übergang von 2-Aminoprop-2-enitril in Aziridin-2-carbonitril [6] wäre auch in Betracht zu ziehen, dass die Enol-Form des 2-Oxopropanitrils durch Photoaktivierung in das isomere Oxid übergehen könnte. Auch die Photolyse von Dicyan in Gegenwart von Oxiran könnte zu **1** führen.

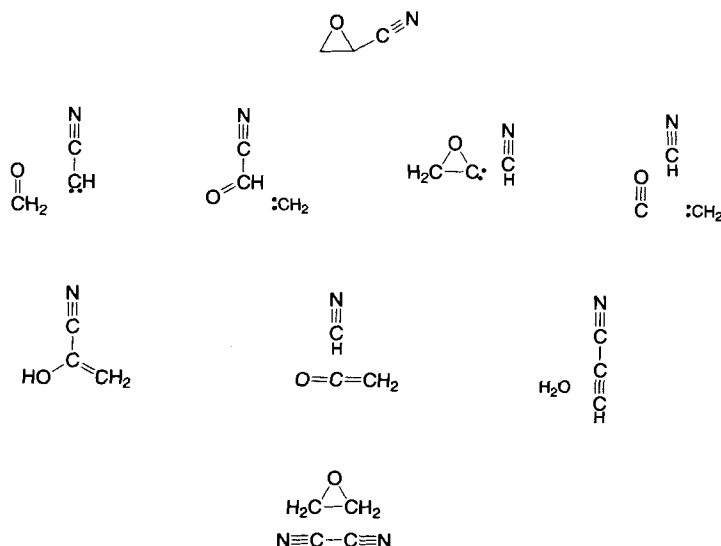
²⁷⁾ In diesen Zusammenhang gehören die Arbeiten von *Castells et al.* [35], von *Matsumoto et al.* [36] und *Shigemasa et al.* [37] über die Katalyse der Formose-Reaktion mit Katalysatoren des Thiamin-Typs, sowie die Versuche über die Realisierung einer 'Homo-Strecker-Reaktion' von Aldehyden mit α -(Hydroxycarbonyl)glycinnitril als nucleophiles Formaldehyd-Äquivalent (vgl. Fussnote 19 sowie Schema 6 in [5]).

²⁸⁾ Über eine Parallel-Untersuchung aus unserem Laboratorium zu dieser Frage vgl. [18].

²⁹⁾ Ermittelt aus den experimentellen ΔH_f° -Werten für MeCN (+20,9 kcal/mol) [34] und CO (–26,4 kcal/mol) [34] und dem berechneten Wert für **1** (+18,2 kcal/mol) [35]. Im Massenspektrum von **1** (vgl. Fig. 2 im *Exper. Teil*) tritt die Masse 29 (HCO^+) als Basis-Peak auf, neben dem Peak der Masse 41 ($\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{N}^+$).

³⁰⁾ In unserem Laboratorium sind keine Versuche in dieser Richtung im Gange.

Schema 10. Zur Frage potentiell präbiotischer Bildungsmöglichkeiten von Oxirancarbonitril*)



- *) Research in prebiotic chemistry can proceed in two differing, but complementary, directions: in the 'bottom-up approach', the chemistry of prebiotic organic matter is studied under conditions which are considered to simulate prebiotic conditions, whereas, in the 'top-down approach', it is the propensity for constitutional self-assembly of biomolecules that is studied by experiments which one derives from retrosynthetic analyses of the structure of these biomolecules directed towards potentially prebiotic starting materials. The studies on the formation of sugar phosphates by aldomerization of glycolaldehyde phosphates, and of the latter from oxirancarbonitrile, are examples of such a 'top-down approach'; these studies funnel into the question, whether oxirancarbonitrile could have been a prebiotic material. The question must be left open, since no relevant experimental search for modes of its formation has been carried out. The scheme formulates ensembles of molecules to which oxirancarbonitrile is isomeric, and from which it might conceivably be formed by photochemically and/or thermally induced gas-phase (or surface) reactions.

Von besonderem Gewicht im vorliegenden Zusammenhang wäre ein Vorkommen von Oxirancarbonitril im interstellaren Raum; eine experimentelle Annäherung an diese Frage mit Hilfe der von A. Bauder³¹⁾ bestimmten mikrowellenspektroskopischen Daten von **1** ist geplant³¹⁾.

Das besondere Interesse, das aus chemischer Sicht einem experimentellen (oder gegebenenfalls auch rechnerischen) Nachweis der Existenz potentiell präbiologischer Bildungsweisen für Oxirancarbonitril zukäme, gründet in der bemerkenswert kurzen konstitutionellen Distanz, die zwischen dieser Verbindung und dem Struktur-Typ der Zucker, der α -Aminosäuren und – kraft ihres Gehalts an latentem HCN – sogar der Nucleinsäurebasen, besteht. Ein Szenario, wonach atmosphärisch verfügbares Oxirancarbonitril an festen und/oder flüssigen Oberflächen durch Umsetzung mit (bevorzugt anionischen) Nucleophilen reaktiv absorbiert und damit als atmosphärische Quelle der genannten Bausteine in örtlicher Fixierung dienen könnte, trägt zwar etwas Verlockendes an sich,

³¹⁾ Privatmitteilung Prof. W. M. Irvine, FCRAO, University of Massachusetts, Amherst, MA, USA.

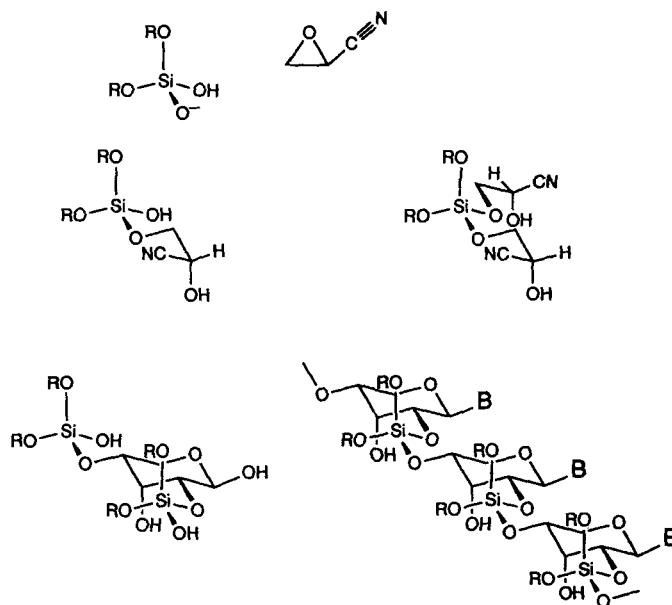
verliert sich aber bei näherem Zusehen in jener Kumulation von *ad-hoc*-Vorstellungen, die für jegliche 'geographische' Detaillierungen präbiotischer Szenarien sowohl typisch als auch unausweichlich sind; jedenfalls sind aus dieser Richtung vorderhand keine ins Gewicht fallenden Ergänzungen zur chemischen Begründung der präbiotischen Relevanz von Oxirancarbonitril zu gewärtigen. Die chemische Begründung der Relevanz des Oxirancarbonitrils weist indessen noch andere Aspekte auf, welche in diesen Zusammenhang gehören; auf einen dieser Aspekte soll hier abschliessend noch kurz hingewiesen werden.

Die in der Reihe 'Warum Pentose- und nicht Hexose-Nukleinsäuren' [28] [29] [12] dargelegten Untersuchungen zur chemischen Ätiologie des Struktur-Typs der natürlichen Nucleinsäuren folgen dem generellen Konzept [40–42] eines experimentellen Vergleichs funktionsrelevanter chemischer Eigenschaften der natürlichen Nucleinsäuren mit den Eigenschaften solcher synthetischer Nucleinsäure-Alternativen, welche auf Grund des ihnen zuzuschreibenden Selbstkonstituierungspotentials sich nach chemischem Ermessen der Evolution ebenfalls angeboten haben könnten, in der Natur jedoch nicht (oder nicht mehr) vorkommen. Entscheidend für die experimentelle Bearbeitbarkeit solcher sich auf spezielle Struktur-Teile der Nucleinsäuren beziehenden 'Warum-Fragen' ist eine Formulierung entsprechender Struktur-Alternativen. Bislang haben wir uns diesbezüglich in den experimentellen Untersuchungen auf die Frage des Zucker-Bausteins beschränkt; es ist indessen klar, dass eine umfassende Erarbeitung einer chemischen Ätiologie des Nucleinsäure-Strukturtyps auch die Struktur-Teile der Nucleinsäure-Basen und der Phosphodiester-Gruppierung wird miteinbeziehen müssen³²). Hier sei auf einen Zusammenhang hingewiesen, der zwischen den chemischen Eigenschaften des Oxirancarbonitrils und der Erkennung von Alternativen des Phosphodiester-Strukturteils sich denken lässt: Analog zur regioselektiv und mit grosser Leichtigkeit erfolgende Ring-Öffnung von Oxirancarbonitril mit Phosphat-Anionen dürfte das Reaktionspotential dieser Verbindung auch Reaktionen umfassen, bei denen der Oxiran-Ring sich mit anderen potentiell natürlichen Anionen öffnen lässt. Nebst *Aluminat*-Anionen kommen hier vor allem *Silicat*-Anionen in Frage. *Schema 11* verdeutlicht eine gedankliche Verknüpfung einer (bislang) hypothetischen Reaktion von Oxirancarbonitril mit *Silicat*-Anionen und dem Struktur-Typ einer (bislang) hypothetischen 'Sila-p-RNA'; dieser Zusammenhang ist analog jenem, der von der entsprechenden (jedoch experimentell nachgewiesenen) Reaktion des Oxirancarbonitrils mit Phosphat-Anionen zum Struktur-Typ der p-RNA geführt hat (vgl. *Kap. 6*).

Dem Struktur-Typ einer 'Sila-p-RNA' kommt vorab paarungstheoretisches Interesse zu: Sein (idealisiertes) konformationelles Paarungsmodell entspricht – von einem höheren Basenpaar-Abstand abgesehen – völlig dem (idealisierten) Paarungsmodell der p-RNA [12]. Da auch letzteres ebenfalls einen für eine theoretisch optimale Basenstapelung zu hohen Basenpaar-Abstand aufweist, p-RNA-Oligonucleotide jedoch sehr starke Paarung zeigen [12] [41], ist die Erwartung gerechtfertigt, dass es sich in der 'Sila-p-RNA' um ein funktionierendes Paarungssystem handeln dürfte. Drastisch verschieden von der p-RNA wird aber das chemische Verhalten des Rückgrats einer solchen 'Sila-p-RNA' sein.

³²) Die neuere Literatur verzeichnet hierzu gezielte, wenn auch nicht in obigem Sinne systematische, Ansätze in jeder der beiden Richtungen [43–45], vgl. insbesondere die von *Westheimer* [43] behandelte Frage 'Why Nature chose phosphates'.

Schema 11. *Stipulation der Frage Warum Phosphat- und nicht Silicat-Nucleinsäuren? durch eine (bislang hypothetische) Ringöffnungsreaktion des Oxiranecarbonitrils*)*



- *) A comprehensive chemical etiology of the natural nucleic acid's structure would require the ongoing experimental studies to proceed from the investigations on sugar-backbone alternatives to phosphodiester-backbone alternatives, as well as to alternatives for the canonical nucleic-acid bases. Independent from eventual conclusions regarding the problem of oxiranecarbonitrile's prebiotic status, the chemical properties of this compound forcibly stipulate the question 'why phosphate and not silicate nucleic acids?', since one of the oxirane's (so far hypothetical) properties is a regioselective ring opening by silicate anions to give silica-bound glycolaldehyde. A silicate backbone of p-RNA ($R = H$ or part of a silicate structure) would be expected to support base pairing comparably well as the phosphate backbone, but also to be more labile and more complex in behavior than the latter. However, backbone lability could go hand in hand with facile backbone self-assembly and replication. In principle, the half-lives of biological systems, as we know them, are not necessarily valid standards for, e.g., the self-organization of prebiological replicators. Experiments on the chemical properties of 'sila-p-RNA' (and perhaps also RNA) oligonucleotides would belong to a comprehensive programme of studies toward the chemical etiology of today's RNA structure.

Die im Vergleich zu einer Phosphodiester-Gruppierung viel höhere Labilität einer (z. B. (Dialkoxy)(hydroxy)silan-Verknüpfung würde indessen nicht nur den 'Nachteil' einer hohen Rückgrat-Labilität, sondern zugleich den 'Vorteil' einer hohen kinetischen Bereitschaft zur Selbstkonstituierung des Rückgrats bedeuten. Ob sich z. B. Gemische von gepaarten 'Sila-p-RNA'-Oligonucleotid-Duplexen aus ungeschützten (homochiralen) Ribopyranosyl-Nucleosiden unter Bedingungen einer Kieselsäure-Veresterung selbst zu konstituieren vermöchten, ist eine nicht *a priori* unrealistische, wenn auch experimentell vermutlich schwierig zu bearbeitende Frage. Aus solchen chemischen Gründen, wie auch in Anbetracht der überragenden Bedeutung der Silicate in der mineralischen Natur, gehört die Ermittlung der Eigenschaften des Struktur-Typs der 'Sila-p-RNA' in das

Programm der experimentellen Untersuchungen zur Ätiologie der Struktur der natürlichen RNA. Der hier leicht sich einstellende Einwand, wonach ein Paarungssystem mit labilem Rückgrat ohnehin keine biologische Relevanz haben könnte, trifft daneben, denn grundsätzlich müssten die Halbwertszeiten der uns bekannten biologischen Welt nicht unbedingt als Massstab für eine Selbstorganisation vorbiologischer Systeme gelten.

Die Arbeit wurde unterstützt vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sowie von der Ciba AG, Basel, und der Firmenich SA, Genf. Wir danken Herrn Dominik Huber für tatkräftige experimentelle Unterstützung und Frau Brigitte Brandenberger für die Aufnahme der zahlreichen NMR-Spektren. Dr. M. Minton danken wir für die sprachliche Korrektur der English Footnotes.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Reagenzien: Fluka, jeweils höchste erhältliche Qualität (Ausnahmen angegeben). Glycolaldehydphosphat (3; Ca^{2+} -Salz) nach [5] hergestellt. Ionenaustauscher (IA): Amberlite IR 120 (H^+ -Form) und Dowex 50W X 4 (Na^+ -Form), in 80% wässr. EtOH aufbewahrt, vor Gebrauch mit viel H_2O gewaschen. DEAE-Sephadex (Cl^- -Form, Aldrich) durch mehrmaliges Stehenlassen mit ges. wässr. NaHCO_3 -Lsg. in die HCO_3^- -Form übergeführt und anschliessend mit H_2O neutral gewaschen. Chromatographie an Polyacrylamid-Gel: s. [5]. DC: Kieselgel-60- F_{254} -Platten (Merck), Standardlaufmittel BuOH/ H_2O /AcOH 5:3:2 (Ausnahmen angegeben); Färbereagenzien (Tauch-Lsg.): Anis.: 10 ml Anisaldehyd, 10 ml konz. H_2SO_4 , 2 ml AcOH, 180 ml EtOH; Nin.: 200 mg Ninhydrin, 100 ml BuOH, 30 ml AcOH, in der Hitze entwickelt. IR: Perkin-Elmer-283 für KBr-Presslinge, Perkin Elmer FT-IR 1600 für CHCl_3 -Lsg., $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]. NMR: ^1H und ^{13}C : Bruker WM-400 (400 bzw. 100 MHz) und Varian Gemini 200 (200 bzw. 50 MHz), δ -Werte in ppm bzgl. 4,4-Dimethyl-4-silapentasilulfonat als externer Standard, Multiplizitäten (^{13}C) aus DEPT-Spektren ermittelt, J [Hz]; ^{31}P : Bruker WM-400 (162 MHz), δ -Werte in ppm bzgl. 85% H_3PO_4 als externer Standard, J [Hz]. EI-MS: Hitachi RMU-6D; FAB-MS (negativer Modus): VG ZAB2 SEQ, Matrix Glycerin; m/z (Intensität in %, ggf. Zuordnung), üblicherweise nur Signale mit Intensität > 10% angegeben. Nachweis anorg. Phosphats nach [46]. RG: Reaktionsgemisch.

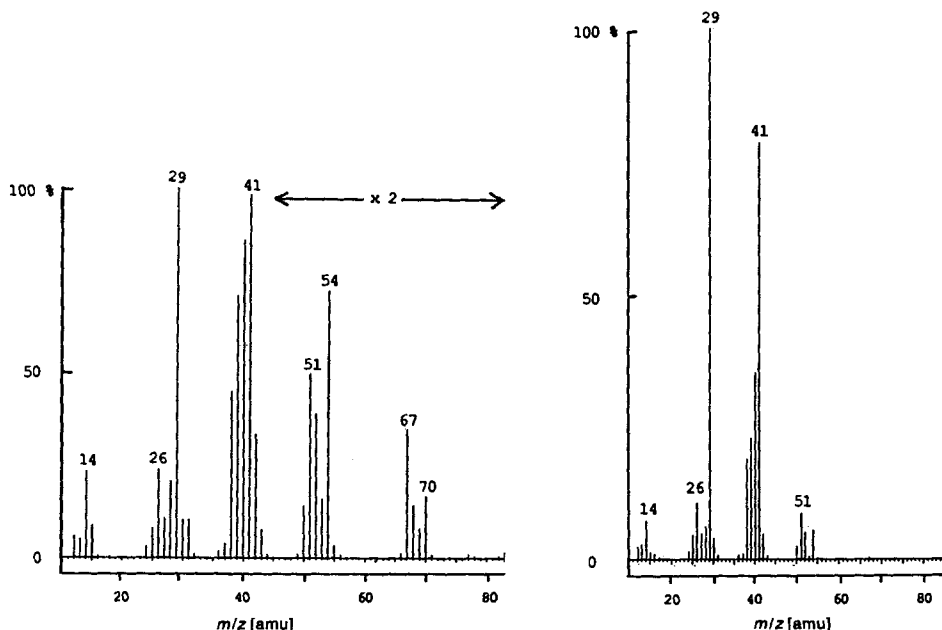
Warnung: Alle Operationen mit Oxirancarbonitril sind mit grosser Vorsicht und in gut entlüftender Kapselle durchzuführen (zur Toxikologie der Verbindung vgl. Fussnote 8).

1. Experimente zu Schema 2. – 1.1. Herstellung von rac-Oxiran-2-carbonitril (1). Gemäss [19] durch Umsetzung von Acrylonitril (Fluka; dest.) mit wässr. NaOCl -Lsg. (1,8M), nach Destillation des RG wurde einheitliches **1** in ca. 35% Ausbeute erhalten. IR (CHCl_3): 3032w, 2921w, 2253w, 1608w (br.), 1475w, 1364s, 1136s, 1076s, 1030vs, 905vs, 838vs. ^1H -NMR (400 MHz, D_2O): 3,76 (dd, $J = 2,56, 4,31$, 1 H); 3,28 (dd, $J = 2,56, 5,34$, 1 H); 3,16 (dd, $J = 4,40, 5,20$, 1 H). ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): 3,43 (dd, $J = 2,35, 3,97$, 1 H); 3,16 (dd, $J = 2,35, 5,63$, 1 H); 3,06 (dd, $J = 3,97, 5,63$, 1 H). ^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): 120,6 (C); 50,0 (CH_2); 39,4 (CH). EI-MS (vgl. Fig. 2): 70 (8), 69 (4,1, M^+), 68 (7), 67 (17), 54 (36), 52 (20), 51 (25), 42 (34), 41 (98), 40 (86), 39 (71), 38 (45), 31 (10), 30 (10), 29 (100), 28 (21), 27 (11), 26 (24), 14 (23). GC (Ofen: Carlo Erba 4160, Säule: OV 1701, 0,3 mm \times 44 m, FID, H_2 , 45° isotherm, Injektion des Gasraumes): 8,10 min. GC/MS (Ofen: HP 5890 II; Säule: Supelcowax 0,25 mm \times 30 m, He, 80°–150° (5°/min), Injektion des Gasraumes): 6,80 min; davon MS (HP 5971 A; vgl. Fig. 2): 54 (6), 52 (4), 51 (8), 42 (5), 41 (76), 40 (32), 39 (24), 38 (18), 29 (100), 26 (11).

1.2. 1 \rightarrow 6: Hydrolyse von 1 zu rac-2,3-Dihydroxypropannitril (6; NMR-Versuch). Eine 0,1M Lsg. von **1** in D_2O wurde bei RT. stehengelassen und periodisch ^1H -NMR-spektroskopisch charakterisiert: Bildung von **6** mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k \approx 0,12/\text{Tag}$ (pseudo-erste Ordnung). ^1H -NMR (200 MHz, D_2O): 4,71 (t, $J = 4,8$, 1 H); 3,83 (d, $J = 4,9$, 2 H). ^{13}C -NMR (50 MHz, D_2O): 121,9 (C); 65,3 (CH_2); 64,4 (CH).

1.3. Hydrolyse von 1 zu rac-Oxiran-2-carboxamid (5; NMR-Versuch). Eine Lsg. von 20 mg **1** (0,29 mmol) in 0,7 ml 0,5N NaOD in D_2O wurde bei RT. stehengelassen. ^1H -NMR nach 10 h (200 MHz): die Signale von **5**: 3,41 (dd, $J = 2,8, 4,9$, 1 H); 2,98 (dd, $J = 5,9, 4,9$, 1 H); 2,82 (dd, $J = 2,8, 5,9$, 1 H); daneben Signalaufen von 4,30–3,55 (0,8 H). ^{13}C -NMR nach 10 h (50 MHz): die intensiven Signale von **5** bei 180,1 (C); 52,7 (CH); 49,2 (CH_2); daneben sehr schwache Signale: 48; 55; 67; 76.

1.4. 1 \rightarrow 2: rac-1-Cyano-1-hydroxyethyl-phosphat (2; Mononatrium-Salz). Zu 186 mg (2,7 mmol) **1** wurden 4 ml wässr. 2M K_2HPO_4 -Lsg. (8 mmol) gegeben; nach 35 min bei RT. hatte sich aus der Emulsion eine klare Lsg. gebildet, welche sich zunehmend gelb verfärbte. Das RG wurde nach 24 h Stehengelassen bei RT. mit 2 ml H_2O verdünnt, mit 3 ml IA IR 120 (H^+ -Form) versetzt, 5 min geschüttelt, filtriert, nachgewaschen und i. RV. bei RT.

Fig. 2. EI-MS von **1** (rechts aus GC/MS)

auf 5,70 g Lsg. eingengt. Es wurden 3 genau bekannte Mengen dieser Lsg. entnommen, lyophilisiert und noch 2mal aus D_2O lyophilisiert; 2 dieser Proben wurden mit bekannten Mengen an AcONa und HCO_2Na versetzt, und aus den 1H -NMR-Spektren (200 MHz, D_2O) aus der Integration der Gehalt von **2** im RG bestimmt, dieser entsprach einer (anal.) Ausbeute von 72%. Die 3. Probe wurde durch NMR charakterisiert (*Charakterisierungsprobe A*, Rohprodukt, vgl. unten).

Vom obigen RG wurden 4,25 g (74,5%) mit 10 ml H_2O verdünnt, im Zentrifugenglas mit 10 ml eiskalter 2N LiOH versetzt, 5 min bei 2500 U/min zentrifugiert, der Überstand abdekantiert, mit 10 ml H_2O verdünnt, mit 8 ml IA IR 120 (H^+ -Form) versetzt und 5 min geschüttelt. Dann wurde filtriert, mit H_2O nachgewaschen, i. RV. bei RT. auf 5 ml Lsg. eingengt, mit 25 ml 0,1N HCOOH verdünnt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule ($1,5 \times 12$ cm, HCO_3^- -Form, mit 500 ml 0,1N HCOOH konditioniert) geladen. Es wurde mit einem linearen Gradienten von 0,1–0,75N HCOOH (1500 ml) und danach mit einem von 0,75–2,5N (500 ml) bei 4° chromatographiert. Anorg. Phosphat (vgl. *Allgemeines*) eluierte von 0,40–0,75N HCOOH, **2** eluierte von 0,75–2,5N HCOOH (DC, Nin.). Die produkthaltigen Fraktionen wurden i. RV. bei RT. eingedampft und durch 1H -NMR charakterisiert. Die einheitlichen Fraktionen (1,4–2,5N HCOOH) wurden vereinigt, i. RV. bei RT. eingedampft und 1 h bei 0,03 Torr getrocknet: 144 mg farblores Öl, in 10 ml H_2O gelöst. Davon wurden 9 ml durch $1,5 \times 5$ cm IA Dowex 50W X 4 (Na^+ -Form) filtriert, mit 50 ml H_2O nachgewaschen und lyophilisiert: 146 mg **2** (Na^+ -Salz) als farbloser Schaum (*Charakterisierungsprobe B*), welches 1H - sowie ^{13}C -NMR-spektroskopisch gemäss Mischspektren mit einer authentischen Materialprobe identisch war. Der Gehalt an **2** – 1H -NMR-spektroskopisch 2mal mittels je 2 int. Standardsubstanzen (NaOBz und NaOAc) bestimmt – betrug 86%, derjenige an 3,5%, was Ausbeuten von 37% bzw. 3% entspricht. Die Fraktionen von 0,1–0,2N HCOOH enthielten (nach Eindampfen und HV.-Trocknung) 41 mg gelbes Öl (gemäss 1H -NMR (200 MHz, D_2O) hauptsächlich Formiat und **6**), die Fraktion von 0,4–1,4N HCOOH 41 mg gelbes Öl (gemäss 1H -NMR (200 MHz, D_2O) verunreinigtes **2**).

Charakterisierungsprobe A (Rohprodukt): 1H -NMR (400 MHz, D_2O , H^+ -Form): die Signale von **2**: 4,82 (dt, $J = 0,73, 4,71, 1$ H); 4,04 (dd, $J = 4,75, 6,65, 2$ H); von **6** bei 4,74 (t, $J = 4,89, 0,09$ H); 3,78 (d, $J = 4,90, 0,18$ H); Signale unbekannter Herkunft: 5,15–4,85 (br. Signalhaufen, 0,11 H); 4,50–4,05 (Signalhaufen, 0,65 H); 3,54 (dd, $J = 2,66, 4,70, 0,06$ H); 3,02 (dd, $J = 4,70, 5,77, 0,06$ H); 2,91 (dd, $J = 2,61, 5,81, 0,06$ H). ^{13}C -NMR (50 MHz, H_2O/D_2O , H^+ -Form): die Signale von **2**: 122 (C); 68,9 (d, $J = 4,7, CH_2$); 63,7 (d, $J = 8,6, CH$); daneben schwache Fremdsignale bei 177,4; 69,3 (d, $J = 4,9$); 65,9; 64,9; 51,1; 49,8.

Charakterisierungsprobe B (nach IA-Chromatographie): DC: R_f 0,5 (Nin.). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , Na^+ -Salz): die Signale von **2**: 4,84 (t, $J = 4,76$, 1 H); 4,06 (dd, $J = 4,85$, 6,63, 2 H); von **3** (Hydrat-Form): 5,15 (t, $J = 4,87$, 0,07 H); 3,78 (dd, $J = 4,87$, 6,51, 0,14 H); versch. Signale unbekannter Herkunft: 4,4–3,8 (0,3 H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O , Na^+ -Salz): die Signale von **2**: 121,5 (C); 68,3 (d, $J = 4,7$, CH_2); 63,4 (d, $J = 8,4$, CH); die schwachen Signale von **3** (Hydrat-Form): 91,3 (d, $J = 9,1$, CH); 70,2 (d, $J = 5,1$, CH_2). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O , Na^+ -Salz): 0,84 (t, $J = 6,6$, 1 P von **2**); 1,17 (t, $J = 6,5$, 0,07 P von **3** (Hydrat-Form)). FAB-MS (Et_3NH^+ -Salz): 500 (10, $[\text{3M} - 1]$), 333 (63, $[\text{2M} - 1]$), 306 (10, $[\text{2M} - \text{HCN} - 1]$), 246 (15), 177 (10), 166 (100, $[\text{M} - 1]$), 159 (12), 139 (63, $[\text{M} - \text{HCN} - 1]$), 97 (16), 79 (45).

Über einen analog durchgeführten $^1\text{H-NMR}$ -Versuch vgl. Fig. 1.

1.5. **1** \rightarrow **3**: 2-Oxoethyl-phosphat (**3**; Mononatrium-Salz). Eine Mischung von 220 mg (3,2 mmol) **1**, 16 ml 2N K_2HPO_4 -Lsg. (32 mmol) und 1 ml 4N CH_2O -Lsg. (4 mmol); Gehalt durch iodometrische Titration [47] bestimmt) wurde bei RT. unter Ar stengelassen. Nach 25 h wurde das farblose RG mit 15 ml H_2O und 8 ml IA IR 120 (H^+ -Form) versetzt und 5 min geschüttelt. Es wurde vom IA abfiltriert, nachgewaschen, i. RV. bei RT. auf 50 ml eingengt, auf 4° gekühlt und im Zentrifugenglas mit 50 ml eiskalter 2N LiOH-Lsg. (100 mmol) versetzt. Die Suspension wurde 5 min bei 2500 U/min zentrifugiert und der Überstand zuerst mit 50 ml H_2O , dann mit 25 ml IA IR 120 (H^+ -Form) versetzt und 5 min geschüttelt. Es wurde vom IA abfiltriert, nachgewaschen und i. RV. bei RT. auf 19,7 g Lsg. eingengt. Eine Probe hiervon wurde durch $^1\text{H-NMR}$ charakterisiert (*Charakterisierungsprobe A*). Zusätzlich wurden 2 Proben bekannter Menge lyophilisiert, jeweils mit bekannten Mengen an AcONa und HCO_2Na versetzt und $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch aus der Integration der Gehalt im RG von **3** (53%), **2** (5%) und **7** (5%) bestimmt.

Von obigem RG wurden 11,3 g (57%) Lsg. mit 25 ml 0,1N HCOOH verdünnt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1,5 \times 16 cm, HCO_3^- -Form, mit 500 ml 0,1N HCOOH konditioniert) geladen. Es wurde mit einem linearen Gradienten von 0,1–2,5N HCOOH (1800 ml) bei 4° chromatographiert. Anorg. Phosphat (Nachweis vgl. *Allgemeines*) eluierte bei 0,80–1,05N HCOOH , **3** bei 0,85–1,50N HCOOH (DC, Anis.). Die produkthaltigen Fraktionen wurden i. RV. bei RT. eingedampft und durch $^1\text{H-NMR}$ charakterisiert. Die einheitlichen Fraktionen (1,0–2,5N HCOOH) wurden vereinigt, i. RV. bei RT. eingedampft und 1 h bei 0,03 Torr getrocknet: 140 mg farbloses Öl. Dieses löste man in 10 ml H_2O und filtrierte davon 9 ml durch 1,5 \times 5 cm IA Dowex 50W X 4 (Na^+ -Form), mit 50 ml H_2O wurde nachgewaschen und lyophilisiert: 148 mg **3** (Na^+ -Salz) als farbloser Schaum (*Charakterisierungsprobe B*). ^1H - sowie $^{13}\text{C-NMR}$ -spektroskopisch gemäss Mischspektren identisch mit authentischem **3**. Der Gehalt an **3**, $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisch 2mal mittels je 2 int. Standards – NaOBz und NaOAc – bestimmt, betrug 85%, derjenige an **2** und **7** je 4%, was einer Ausbeute von 47% bzw. 2mal je 2% entspricht.

Charakterisierungsprobe A (Rohprodukt nach Ausfällung des anorg. Phosphats): $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O , H^+ -Form): die Signale von **3** (Hydrat-Form) bei 5,15 (t, $J = 4,90$, 1 H); 3,82 (dd, $J = 4,82$, 2 H); das Signal von Formaldehyd-cyanhydrin bei 4,39 (s, 0,5 H); daneben weitere Signale unbekannter Herkunft (zusammen 4 H).

Charakterisierungsprobe B (nach IA-Chromatographie): DC: R_f 0,5 (Anis.). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , Na^+ -Salz): die Signale von **3** (Hydrat-Form): 5,15 (t, $J = 4,83$, 1 H); 3,78 (dd, $J = 4,84$, 6,78, 2 H); von **2**: bei 4,84 (td, $J = 4,8$, 0,5, 0,08 H); 4,06 (dd, $J = 4,8$, 6,6, 0,16 H); von **7** (Hydrat-Form): 5,10 (d, $J = 4,12$, 0,08 H); andere Signale von **7** verdeckt; das Signal von Glycolsäure-phosphat: 4,58 (d, $J = 8,2$, 0,05 H); Fremdsignale: 4,85–5,5 (versch. t, zusammen 0,08 H); 4,38 (m, 0,02 H); 3,85–4,00 (Signalhaufen, 0,2 H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O , Na^+ -Salz): die Signale von **3** (Hydrat-Form): 91,2 (d, $J = 8,92$, CH); 70,2 (d, $J = 5,21$, CH_2); die schwachen Signale von **2**: 121,5 (C); 68,3 (d, $J = 4,7$, CH_2); 63,3 (d, $J = 8,6$, CH); die schwachen Signale von **7** (Hydrat-Form): 91,8 (d, $J = 5,3$, CH); 80,4 (d, $J = 5,8$, CH); 63,7 (d, $J = 3,5$, CH_2). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O , Na^+ -Salz; ^1H -gekoppelt): 1,1 (t, $J = 6,7$, 1 P von **3** (Hydrat-Form)); 0,8 (t, $J = 6,5$, 0,1 P von **2**); 0,6 (s, 0,05 P von anorg. Phosphat). FAB-MS (Et_3NH^+ -Salz): 419 (6, $[\text{3M} - 1]$), 279 (67, $[\text{2M} - 1]$), 219 (16), 177 (35), 159 (28), 139 (57, $[\text{M} - 1]$), 97 (54), 79 (100).

1.6. **1** \rightarrow **7**: rac-1-(Hydroxymethyl)-2-oxoethyl-phosphat (**7**; Mononatrium-Salz). Eine Lsg. von 126 mg (1,8 mmol) **1** und 4,1 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (18 mmol) in 9 ml 4N CH_2O -Lsg. (36 mmol) wurde bei RT. unter Ar stengelassen. Nach 13 Tagen wurde das farblose RG mit 8 ml H_2O und 10 ml IA IR 120 (H^+ -Form) versetzt und 5 min geschüttelt. Es wurde vom IA abfiltriert, nachgewaschen, i. RV. bei RT. auf 20 ml Lsg. eingengt, auf 4° gekühlt und im Zentrifugenglas mit 26 ml eiskalter 2N LiOH-Lsg. (52 mmol) versetzt. Die Suspension wurde 5 min bei 2500 U/min zentrifugiert, danach wurde der Überstand mit 25 ml H_2O und 15 ml IA IR 120 (H^+ -Form) versetzt, 5 min geschüttelt, vom IA abfiltriert, nachgewaschen und i. RV. bei RT. auf 15 ml eingengt, mit 25 ml 0,1N HCOOH verdünnt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1,5 \times 16 cm, HCO_3^- -Form, mit 300 ml 0,1N HCOOH konditioniert, Chromatographie bei 4°) geladen. Es wurde mit einem linearen Gradienten von 0,1–0,7N HCOOH (1000 ml) und danach mit einem von 0,7–2,5N HCOOH (600 ml) chromatographiert. Anorg. Phosphat

(Bestimmung vgl. *Allgemeines*) eluierte bei 0,35–1,05N HCOOH, 7 bei 0,40–1,45N HCOOH (DC, Anis.). Die produktthaltigen Fraktionen wurden i. RV. bei RT. eingedampft und durch $^1\text{H-NMR}$ charakterisiert. Die einheitlichen Fraktionen (0,70–1,45N HCOOH; produktthaltige, aber stärker verunreinigte Fraktionen verworfen) wurden i. RV. bei RT. eingedampft, 1 h bei 0,03 Torr getrocknet, in 10 ml H_2O gelöst und durch $1,5 \times 5 \text{ cm IA Dowex } 50\text{W } X\ 4$ (Na^+ -Form) filtriert; es wurde mit 50 ml H_2O nachgewaschen und lyophilisiert: 68 mg farbloses Pulver, welches in 7 ml H_2O gelöst wurde. Davon wurden 2,4 ml an Polyacrylamid-Gel chromatographiert und die produktthaltigen Fraktionen (DC, Anis.) vereinigt und lyophilisiert: 15,2 mg Na^+ -Salz als farbloses Pulver (13% zu ca. 90% aus 7 bestehend). DC: R_f 0,45 (Anis.). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , Na^+ -Salz): die Signale von 7 (Hydrat-Form): 5,04 (d , $J = 3,87$, 1 H); 4,05 ($dddd$, $J = 3,89$, 5,27, 5,52, 9,33, 1 H); 3,75 (dd , $J = 5,37$, 12,10, 1 H); 3,71 (dd , $J = 5,63$, 12,05, 1 H); Fremdsignale: 9,20 (d , $J = 3,10$, 0,05 H); 3,80–3,95 (Signalhaufen, 0,5 H); schwache Signale: 6,15; 5,66; verschiedene schwache Signale um 5,10. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O , Na^+ -Salz): die Signale von 7 (Hydrat-Form): 92,0 (d , $J = 4,4$, CH); 79,8 (d , $J = 5,5$, CH); 64,1 (d , $J = 4,0$, CH_2); daneben schwache Fremdsignale: 93,0; 92,8; 70,0; 68,8; 67,3; 64,2; 63,7. $^{31}\text{P-NMR}$ (^1H -gekoppelt, 162 MHz, D_2O , Na^+ -Salz): 2,92 (d , $J = 8,4$, 1 P von 7 (Hydrat-Form)); 0,85 (s , 0,05 P von anorg. Phosphat). FAB-MS (Et_3NH^+ -Salz): 277 (12), 249 (10), 201 (18), 199 (38), 177 (33), 169 (41, $[M - 1]$), 159 (30), 151 (50), 97 (60), 79 (100).

1.7. 2 \rightarrow 3: *Phosphat 3 (NMR-Versuch)*. Eine Lsg. von 18 mg (0,11 mmol) 2 (H^+ -Form) in 1 ml H_2O wurde mit 0,05M wässr. NaOH-Lsg. auf einen pH-Wert von ca. 8,5 gebracht, lyophilisiert und in 0,8 ml $\text{NaDCO}_3/\text{NaOD}$ -Puffer (0,4M, pD-Wert 10,4) gelöst. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz): die Signale von 2: 4,79 (teilweise durch HDO-Signal verdeckt, t , $J = 4,75$, 1 H); 4,00 (AB von $ABMX$, A bei 4,02; ddd , $J = 4,8$, 8,3, 11,5; B bei 3,98; ddd , $J = 4,6$, 8,3, 11,5, 2 H); Fremdsignale: 5,11 (t , $J = 4,5$, 0,05 H); 3,73 (dd , $J = 4,5$, 6,4, 0,1 H); 4,27 (dd , $J = 3,1$, 5,0, 0,1 H). Diese Lsg. wurde mit ca. 0,15 ml 1N CH_2O -Lsg.³³) in D_2O versetzt. Bereits nach 15 min waren im $^1\text{H-NMR}$ die Signale von 2 vollständig verschwunden und hatten den Signalen von 3 (Hydrat-Form) Platz gemacht. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, 15 min nach CH_2O -Zugabe): die Signale von 3 (Hydrat-Form): 5,10 (t , $J = 4,53$, 1 H); 3,72 (dd , $J = 4,52$, 7,34, 2 H); das s von Formaldehyd-cyanhydrin bei 4,41 (2 H); sowie die oben erwähnten Fremdsignale (zusammen 0,25 H). $^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz): die Signale von 3 (Hydrat-Form): 92,4 (d , $J = 7,2$, CH); 69,9 (d , $J = 4,6$, CH_2); von Formaldehyd-cyanhydrin bei 122,6 (C); 51,0 (CH_2); das Signal von Formaldehyd-Hydrat bei 84,9 (CH_2); von NaDCO_3 bei 168,1 (C).

1.8. 3 \rightarrow 2: *Phosphat 2 (Säure-Form)*. Eine Suspension von 236 mg (ca. 1 mmol) 3 (Ca^{2+} -Salz) in 5 ml H_2O wurde mit ca. 3 ml IA $IR\ 120$ (H^+ -Form) versetzt und 5 min geschüttelt. Daraufhin wurde vom IA abfiltriert, mit H_2O nachgewaschen, i. RV. bei RT. auf 5 ml Lsg. eingengt, mit 100 mg (1,5 mmol) KCN versetzt, geschüttelt bis eine Lsg. entstanden war, und bei RT. stehengelassen. Nach 8 h wurde das farblose RG mit 25 ml 0,1N HCOOH versetzt, auf eine DEAE-Sephadex-Säule ($1 \times 7,5 \text{ cm}$, HCO_3^- -Form, mit 300 ml 0,1N HCOOH konditioniert, Chromatographie bei 4°) geladen und mit einem linearen Gradienten von 0,1–1,0N HCOOH (800 ml) chromatographiert. Die produktthaltigen Fraktionen (0,2–0,4N HCOOH; DC, Nin.) wurden vereinigt, i. RV. bei RT. zur Trockene eingengt, 1 h bei 0,05 Torr getrocknet: 180 mg 2 (H^+ -Form) als farbloses Öl (enthält gemäss ^1H - und ^{31}P -NMR 10 mol-% Glycerinsäure-3-phosphat; Ausbeute an 2 ca. 85%³⁴). DC (H^+ -Form): R_f 0,5 (Nin.). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H^+ -Form): die Signale von 2: 4,84 (td , $J = 4,65$, 0,85, 1 H); 4,09 (dd , $J = 4,67$, 6,53, 2 H); von Glycerinsäure-3-phosphat: 4,35 (dt , $J = 1,43$, 3,95, 0,1 H); 4,12 (dd , $J = 3,91$, 6,02, 0,2 H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O , H^+ -Form): die Signale von 2: 121,5 (C); 68,2 (d , $J = 4,52$, CH_2); 63,3 (d , $J = 8,53$, CH); von Glycerinsäure-3-phosphat: 179,1 (C); 73,6 (br. s , CH); 70,4 (d , $J = 5,33$, CH_2). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O , H^+ -Form): +0,05 (t , $J = 6,49$, 1 P von 2); +0,35 (t , $J = 5,72$, 0,1 P von Glycerinsäure-3-phosphat). FAB-MS (Et_3NH^+ -Form): 500 (5, $[3M - 1]$), 333 (64, $[2M - 1]$), 246 (18), 177 (15), 166 (100, $[M - 1]$), 159 (26), 148 (13), 139 (58, $[M - \text{HCN} - 1]$), 97 (22), 79 (50).

1.9. 1 \rightarrow 4: *rac-O³-Phosphoserinnitril (4)*. Ein Gemisch aus 203 mg (2,9 mmol) 1 und 4,4 ml 1M K_2HPO_4 (4,4 mmol) wurde 24 h bei RT. stehengelassen. Danach wurde das gelbe RG mit 5 ml H_2O und 4 ml IA $IR\ 120$ (H^+ -Form) versetzt, 5 min geschüttelt, vom IA abfiltriert, mit H_2O nachgewaschen, mit H_2O auf 50 g ergänzt und mit 9 ml 25% NH_3 -Lsg. (ca. 120 mmol) versetzt. Das RG wurde 4 h bei RT. stehengelassen, i. RV. bei RT. langsam auf 10 ml eingengt und daraufhin lyophilisiert. Der braune Rückstand wurde an IA *Dowex I X 8* ($1,5 \times 15 \text{ cm}$, HCO_3^- -Form) zuerst mit 50 ml H_2O und dann mit einem linearen HCOOH-Gradienten (0,1M, 1000 ml) bei

³³) Hergestellt durch Auflösen von 300 mg (10 mmol) Paraformaldehyd in 10 ml kochendem D_2O . $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O): 4,82 (s). $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, D_2O): 84,9 (CH_2).

³⁴) In späteren Ansätzen wurden die produktthaltigen Fraktionen, ohne i. RV. einzuengen, direkt lyophilisiert, was die Bildung von Glycerinsäure-3-phosphat vollständig verhinderte.

4° chromatographiert. Das Produkt eluierte bei 0,32–0,45M HCOOH (DC, Nin.). Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert: 186 mg leicht gelb gefärbtes Pulver, aus 30 ml H₂O/70 ml EtOH bei 4° kristallisiert: 96 mg **4** als beiges Pulver vom Schmp. 175–177° (Zers.). Die anal. Daten stammen aus diesem Kristallisat. Aus der Mutterlauge konnten weitere 35 mg **4** als beiges Pulver mit identischem Schmp., ¹H-NMR, IR (KBr) und DC erhalten werden. Die Mutterlauge wurde eingedampft und lyophilisiert: 31 mg braunes Pulver, enthält gemäss ¹H-NMR ca. zur Hälfte noch **4**. Ausbeute an **4** somit ca. 35%. DC (AcOEt/EtOH/H₂O 2:2:1): R_f 0,35 (Nin.). IR (KBr): 3600–2200 (br., darin 3433, 2970, 2920, 2810, 2660, 2610), 2145m, 1630s, 1525s, 1450w, 1365w, 1335w, 1270w, 1220s, 1160m, 1100m, 1080m, 1055s, 1000s, 960s, 930m, 850m, 760m, 670m, 580w, 560w, 510s, 410w, 370w. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O + 1 Tropfen DCl): 4,72 (br. dt, *M* von ABMX, *J_d* = 1,30, *J_f* ≈ 4,0, 1 H); 4,21 (*AB* von ABMX, *A* bei 4,23, *B* bei 4,18, *J_{AB}* = 11,74, *J_{AM}* = 4,21, *J_{BM}* = 3,73, *J_{AX}* = 6,15, *J_{BX}* = 5,31, 2 H). ¹³C-NMR (50 MHz, D₂O + 3 Tropfen DCl): 116,3 (C); 65,4 (*d*, *J* = 3,9, CH₂); 44,6 (*d*, *J* = 9,2, CH). ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O + 3 Tropfen DCl, ¹H-entkoppelt): –1,56 (br. s).

1.10. 4 → 3: rac-O³-Phosphoserinnitril (**4**). Eine Suspension von 237 mg 3 (Ca²⁺-Salz; ca. 1 mmol) in 20 ml H₂O wurde 5 min mit 10 ml IA IR 120 (H⁺-Form) geschüttelt. Daraufhin wurde vom IA abfiltriert, mit H₂O nachgewaschen und im RV. bei RT. auf 5 ml Lsg. eingengt. Die farblose Lsg. wurde mit 100 mg (1,5 mmol) KCN versetzt (pH ca. 6) und das RG 14 h bei RT. stehengelassen. Daraufhin wurde mit 7 ml H₂O und 4 ml IA IR 120 (H⁺-Form) versetzt, 5 min geschüttelt, vom IA abfiltriert, mit H₂O nachgewaschen i. RV. bei RT. eingedampft und 1 h i. HV. getrocknet (im wesentlichen einheitliches **2** gemäss ¹H-NMR). Das farblose Öl wurde in 16 ml H₂O aufgenommen, mit 3 ml 25% NH₃-Lsg. (ca. 40 mmol) versetzt; das RG wurde 3 h bei RT. stehengelassen, sodann i. RV. bei RT. auf 1,5 ml Lsg. eingengt und lyophilisiert: farbloses Öl, an IA Dowex 1 X 8 (1 × 10 cm, HCO₃[–]-Form) zuerst mit 50 ml H₂O und dann mit einem linearen HCOOH-Gradienten (0–1M, 600 ml) bei 4° chromatographiert. Das Produkt eluierte bei 0,23–0,27M HCOOH (DC, Nin.). Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert: 135 mg farbloses Pulver (ca. 82% Ausbeute), nach ¹H-NMR und DC einheitliches **4**. Davon wurden 54 mg aus H₂O/EtOH kristallisiert: 37 mg farblose, feine Kriställchen vom Schmp. 178° (Zers.); aus der Mutterlauge liessen sich nochmals 8 mg Kriställchen vom Schmp. 177° (Zers.) gewinnen. Schmp. 178°. DC (EtOAc/EtOH/H₂O 2:2:1): R_f 0,35 (Nin.). IR (KBr): 3600–2200 (br., darin 3430, 3240, 3000, 2960, 2920, 2800, 2760, 2650, 2610), 2145m, 1630s, 1620s, 1525s, 1450w, 1365m, 1330w, 1270m, 1220s, 1160m, 1100m, 1080s, 1055s, 1000s, 960s, 930m, 850m, 815w (br.), 760m, 670m, 580w, 560w, 530w, 510s, 410w, 370w. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, Lyophilisat): 4,81 (ddd, *M* von ABMX, *J* = 1,04, 3,90, 4,50, 1 H); 4,28 (*AB* von ABMX, *A* bei 4,30, *B* bei 4,25, *J_{AB}* = 11,72, *J_{AM}* = 4,50, *J_{BM}* = 3,87, *J_{AX}* = 6,13, *J_{BX}* = 5,61). ¹³C-NMR (50 MHz, D₂O + 3 Tropfen DCl; 1. Kristallisat): 116,5 (C); 65,5 (*d*, *J* = 3,9, CH₂); 44,7 (*d*, *J* = 9,2, CH). ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O + 3 Tropfen DCl; 1. Kristallisat, ¹H-gekoppelt): –1,05 (*t*, *J* = 4,4). Anal. ber. für C₃H₇N₂O₄P (166,07): 21,70 C, 4,25 H, 16,87 N; gef.: 21,55 C, 4,39 H, 16,41 N.

Experimente zu Schema 3. – 2.1. 1 → 9: rac-Bis(2-cyano-2-hydroxyethyl)-phosphat (**9**; 2 Diastereoisomere; Säure-Form). Eine Lsg. von 137 mg (2 mmol) **1** in 2 ml einer Lsg., welche 0,33M an H₃PO₄ und 0,66M an 2,6-Lutidin war, wurde 5 Tage bei RT. gerührt. Daraufhin wurde das gelbe RG mit weiteren 125 mg (1,8 mmol) **1** versetzt und erneut 5 Tage bei RT. gerührt. Das braune RG wurde sodann mit 20 ml 0,2N HCOOH-Lsg. verdünnt, auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 × 10 cm, HCO₃[–]-Form, mit 200 ml 0,2N HCOOH konditioniert) geladen und mit einem linearen HCOOH-Gradienten (0,2–1,5N, 600 ml) bei 4° chromatographiert. Die produkthaltigen Fraktionen (0,85–1,15N HCOOH; DC, Nin.) wurden lyophilisiert: 114 mg **9** (H⁺-Form; gemäss ³¹P-NMR ca. 10 mol-% **2** enthaltend) als farbloses Öl, was einer (korrigierten) Ausbeute von 65% entspricht. DC (H⁺-Form): R_f 0,58 (Nin.). ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, H⁺-Form): die Signale von **9**: 4,85 (*dt*, *J* ≈ 0,7, 4,60, 2 H); 4,10 (*dd*, *J* = 4,64, 6,06, 4 H); Fremdsignale: 4,84 (*m*, 0,1 H); 4,35 (*dt*, *J* = 1,5, 3,8, 0,1 H); 4,22–4,04 (Signalhaufen, 0,2 H); 3,91 (*m*, 0,05 H); 3,80 (*d*, *J* = 4,39, 0,05 H); 1,77 (*s*, 0,05 H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, H⁺-Form): die Signale von **9**: 121,3 (C); 68,9 (*d*, *J* = 5,4, CH₂); 63,1 (*d*, *J* = 9,1, CH); sehr schwache Fremdsignale: 69,9 (*d*, *J* = 5,3); 65,4; 27,8. ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O, H⁺-Form, ¹H-gekoppelt): –0,36 (*qi.*, *J* = 5,9, 1,0 P von **9**); +0,09 (br. *t*, *J* ≈ 6, 0,1 P von **2**). FAB-MS (H⁺-Form): 471 (10, [2*M* – 1]); 402 (21, [2*M* – CH₂CH(OH)CN – 1]); 351 (13); 333 (29, [2*M* – 2 (CH₂CH(OH)CN) – 1]); 253 (23); 235 (100, [*M* – 1]); 208 (16, [*M* – HCN – 1]); 184 (24); 181 (11, [*M* – 2 HCN – 1]); 166 (73, [*M* – CH₂CH(OH)CN – 1]); 139 (20, [*M* – CH₂CH(OH)CN – HCN – 1]); 97 (10); 79 (12).

Über einen analog durchgeführten ¹H-NMR-Ansatz vgl. Fig. 1.

2.2. **9** + **1** → **10**: rac-Tris(2-cyano-2-hydroxyethyl)-phosphat (**10**; 2 Diastereoisomere). Unter N₂ wurden 13 mg (0,056 mmol) **9** (H⁺-Form) in 0,3 ml (4,8 mmol) **1** gelöst. Die farblose Lsg. wurde 16 Tage bei RT. stehengelassen, i. HV. eingedampft und der Rückstand, ein farbloses Öl, wurde in 0,7 ml D₂O aufgenommen. Gemäss ¹H- und ³¹P-NMR bestand das Produktgemisch aus ca. 2/3 **10** und ca. 1/3 **9** sowie wenig **1** und **6**. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O):

die Signale von **10**: 4,96 (br. *dt*, $J = 1,7, 4,1, 3,0$ H); 4,44 (br. *dd*, $J \approx 4, 7, 6,0$ H); von **9**: 4,86 (br. *t*, $J \approx 4,5, 1,0$ H); 4,10 (br., *dd*, $J \approx 4,5, 7,5, 2,0$ H); von **6**: 4,68 (*t*, $J = 4,8, 2,5$ H); 3,80 (*d*, $J = 4,8, 5,0$ H); von **1**: 3,73 (*dd*, $J = 2,6, 4,3, 1,5$ H); 3,25 (*dd*, $J = 2,6, 5,3, 1,5$ H); 3,14 (*dd*, $J = 4,3, 5,3, 1,5$ H). ^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): die Signale von **10**: 120,6 (C); um 71,4 (3*d*, je $J \approx 5, \text{CH}_2$); 62,6 (*d*, $J = 8,1, \text{CH}$); von **9**: 121,3 (C); 68,9 (2*d*, $J = 5,1, \text{CH}_2$); 63,1 (*d*, $J = 9,0, \text{CH}$); von **6**: 122,0 (C); 65,4 (CH_2); 64,5 (CH); von **1**: 121,6 (C); 49,9 (CH_2); 39,4 (CH). ^{31}P -NMR (162 MHz, D_2O ; ^1H -entkoppelt): -2,15 (0,65 P von **10**); -0,20 (0,35 P von **9**). ^{31}P -NMR (162 MHz, D_2O ; ^1H -gekoppelt): -2,16 (*qhept.*, $J = 1,5, 7,1$); 0,20 (br. *qi.*, $J \approx 6,5$).

2.3. **1**→**10**: rac-Phosphat **10** (2 Diastereoisomere) aus **1** und H_3PO_4 . In 0,3 ml **1** (ca. 4,8 mmol) wurden 5,4 mg (0,05 mmol) H_3PO_4 (85%) gelöst. Nach 16 Tagen bei RT. wurden 0,1 ml der schwach gelben Lsg. entnommen, im RV. eingedampft und i. HV. getrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml D_2O aufgenommen und enthielt gemäss ^1H -NMR-Spektrum je 18,5 mol-% **10** und **9** sowie 50 mol-% **6** und 13 mol-% **1**. ^1H -NMR (200 MHz, D_2O): die Signale von **10**: 4,98 (*dt*, $J = 1,7, 4,1, 3,0$ H); 4,44 (*dd*, $J = 4,1, 7,1, 6,0$ H); von **9**: 4,88 (*dt*, $J = 1,0, 4,6, 2,0$ H); 4,12 (*dd*, $J = 4,6, 6,1, 4,0$ H); von **6**: 4,70 (*t*, $J = 4,9, 2,5$ H); 3,82 (*d*, $J = 4,9, 5,0$ H); von **1**: 3,75 (*dd*, $J = 2,6, 4,3, 0,8$ H); 3,27 (*dd*, $J = 2,5, 5,3, 0,8$ H); 3,16 (*dd*, $J = 4,2, 5,3, 0,8$ H).

3. Experimente zu Schema 4. – 3.1. Triallyl-phosphat (**14**) [25]. Ein Gemisch von 50 ml (0,99 mol) Allyl-alkohol (dest. BaO), 70 ml Pyridin (dest. CaH_2) und 120 ml Toluol (dest. CaH_2) wurde bei -45° langsam (während 3 h) mit 25 ml (0,26 mol) POCl_3 versetzt. Das RG wurde 14 h bei -20° aufbewahrt, auf RT. erwärmt und filtriert. Das Filtrat wurde nacheinander mit ges. NaCl-Lsg. und halbges. NaHCO_3 -Lsg. gewaschen; die org. Phase wurde getrocknet (Na_2SO_4) i. RV. eingedampft und i. HV. destilliert: 29 g (55%) **14** als farblose Flüssigkeit. Sdp. $75^\circ/0,04$ Torr. ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): 4,50 (*tdd*, $J = 1,4, 5,5, 8,3, 2$ H); 5,20 (*dq*, $J = 10,4, 1,4, 1$ H); 5,34 (*dq*, $J = 17,1, 1,4, 1$ H); 5,90 (*ddt*, $J = 17,1, 10,4, 5,5, 1$ H). ^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD ; ^1H -gekoppelt): 0,03 (*hept.*, $J = 8,4$).

3.2. Diallyl-phosphat (**13**; Triethylammonium-Salz) [26]. Eine Emulsion von 10 g (46 mmol) **14** in 50 ml 30% wässr. NaOH wurde 30 min unter Rückfluss gekocht. Das RG wurde abgekühlt, mit 35 ml konz. HCl-Lsg. versetzt und mit Et_2O extrahiert. Die org. Phase wurde mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, mit 50 ml Et_3N versetzt und 4mal mit H_2O extrahiert. Die vereinigten H_2O -Phasen wurden i. RV. eingedampft und i. HV. getrocknet: 10,2 g (80%) **13** (Et_3NH^+ -Salz) als farbloses Öl. ^1H -NMR (200 MHz, D_2O): 1,28 (*t*, $J = 7,4, 9$ H); 3,20 (*q*, $J = 7,4, 6$ H); 4,38 (*tdd*, $J = 1,3, 5,5, 8,4, 4$ H); 5,24 (*dq*, $J = 17,1, 1,4, 2$ H); 5,38 (*dq*, $J = 17,1, 1,4, 2$ H); 6,00 (*ddt*, $J = 17,1, 10,3, 5,5, 2$ H). FAB-MS (Et_3NH^+ -Salz): 355 (42, [*M* – 1]); 315 (44); 275 (14); 177 (100, [*M* – 1]); 137 (38); 79 (34).

3.3. **13**→**9**: rac-Bis(2-cyano-2-hydroxyethyl)-phosphat (**9**; 2 Diastereoisomere; Säure-Form). Durch eine auf -65° abgekühlte Lsg. von 560 mg (2 mmol) **13** (Et_3NH^+ -Salz) in 40 ml MeOH wurde 30 min ein O_3 -haltiger O_2 -Strom geschickt. Daraufhin wurde das blau gefärbte RG mit N_2 gespült, mit 2 ml (30 mmol) Me_2S versetzt und 20 h bei -20° gehalten. Das farblose RG wurde bei 4° mit 50 ml H_2O und 15 ml IA IR 120 (H^+ -Form) versetzt, 10 min gerührt, vom IA abfiltriert, mit 100 ml H_2O nachgespült und i. RV. bei RT. auf 28 g Lsg. eingengt. Die Hälfte davon wurde mit 2 ml 2,5*N* HCOOH -Lsg. (5 mmol) und dann mit einer Lsg. von 390 mg (6 mmol) KCN in 2 ml H_2O versetzt und 2 h bei RT. stehengelassen. Dann wurde mit 20 ml 0,1*N* HCOOH -Lsg. verdünnt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1,5 × 14 cm, HCO_3^- -Form, mit 500 ml 0,1*N* HCOOH -Lsg. konditioniert, Chromatographie bei 4°) aufgetragen und mit einem linearen HCOOH -Gradienten (0,1–2,0*N*) eluiert. Die produkthaltigen Fraktionen (DC, Nin.: 1,1–2,0*N* HCOOH) wurden vorsichtig lyophilisiert: 219 mg **9** (H^+ -Form) als farbloses Öl (93%). DC (H^+ -Form): R_f 0,58 (Nin.). ^1H -NMR (400 MHz, D_2O , H^+ -Form): 4,85 (br. *t*, $J \approx 4,5, 2$ H); 4,10 (br. *t*, $J \approx 5,0, 4$ H). ^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O , H^+ -Form): 121,3 (C); 68,9 (*d*, $J = 5,3, \text{CH}_2$); 63,1 (*d*, $J = 9,0, \text{CH}$). ^{31}P -NMR (162 MHz, D_2O , H^+ -Form): -0,34 (*qi.*, $J = 6,1$). FAB-MS (H^+ -Form): 333 (14), 253 (32), 235 (100, [*M* – 1]), 226 (12), 208 (33, [*M* – HCN – 1]), 184 (15), 181 (28), 166 (46, [*M* – $\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{CN}$ – 1]), 148 (13), 139 (44, [*M* – $\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{CN}$ – HCN – 1]), 97 (20), 79 (30).

3.4. **13**→**11**: Bis(2-oxoethyl)-phosphat (**11**; Säure-Form). Durch eine auf -72° abgekühlte Lsg. von 560 mg (2 mmol) **13** (Et_3NH^+ -Salz) in 40 ml MeOH wurde 30 min ein O_3 -haltiger O_2 -Strom geschickt. Daraufhin wurde das blau gefärbte RG mit N_2 gespült, mit 4,2 g (16 mmol) Ph_3P in 16 ml Benzol versetzt und 20 h bei 4° gehalten. Das farblose RG wurde bei 4° mit 50 ml H_2O und 10 ml IA IR 120 (H^+ -Form) versetzt, 10 min gerührt, vom IA abfiltriert, mit 100 ml H_2O nachgespült, i. RV. bei RT. auf 100 ml eingengt, filtriert, mit H_2O nachgewaschen, i. RV. bei RT. auf 50 ml eingengt, filtriert, mit H_2O nachgewaschen, gegen 30 ml Et_2O extrahiert; die H_2O -Phase wurde i. RV. bei RT. auf 8 g Lsg. eingengt. Davon wurde 1 g an Polyacrylamid-Gel chromatographiert. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt. Ein Aliquot davon wurde mit einer bekannten Menge an Pentaerythritol versetzt; durch Vergleich der Signal-Intensitäten wurde der Gehalt an **11** (H^+ -Form) im Aliquot und daraus eine Ausbeute von ca. 80% bestimmt. DC (H^+ -Form): R_f 0,58 (Anis.). ^1H -NMR (400 MHz, D_2O ;

H⁺-Form; H₂O-Lsg. 4mal mit 1 ml D₂O versetzt und jeweils auf 0,2 ml eingeeengt): die Signale von **11** (Hydrat-Form): 5,16 (*t*, *J* = 4,90, 2 H); 3,79 (*dd*, *J* = 4,90, 6,70, 4 H); von **3** (Hydrat-Form): 5,15 (*t*, *J* = 4,85, 0,03 H); 3,80 (*dd*, *J* = 4,85, 6,90, 0,06 H); von Glycolaldehyd (Hydrat-Form): 5,03 (*t*, *J* = 5,15, 0,03 H); 3,50 (*d*, *J* = 5,15, 0,06 H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O/H₂O; H⁺-Form): die Signale von **11** (Hydrat-Form): 91,1 (*d*, *J* = 9,0, CH); 70,6 (*d*, *J* = 5,7, CH₂); daneben schwache *s* bei 92,4; 67,1. ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O/H₂O; H⁺-Form): 0,85 (br. *qi*, *J* ≈ 6,5).

3.5. **9** → **11**: *Phosphat 11 (NMR-Versuch)*. Eine Lsg. von 10 mg (0,042 mmol) **9** (H⁺-Form) in 0,7 ml NaDCO₃/Na₂CO₃-Puffer (0,5M, pD 9,4) wurde durch ¹H-NMR charakterisiert: gegenüber **9** in der H⁺-Form unverändertes Spektrum; enthält jedoch zusätzliche schwache Signale bei 5,2 (*t*, *J* ≈ 4,5) und 3,82 (*dd*, *J* ≈ 4,5, 6,3) ppm. Diese Lsg. wurde mit 4 mol-equiv. H₂CO in D₂O³³) versetzt. Bereits nach 10 min waren die Signale von **9** verschwunden und hatten den Signalen von **11** (Hydrat-Form) Platz gemacht. ¹H-NMR (200 MHz, 15 min nach CH₂O-Zugabe): die Signale von **11** (Hydrat-Form): 5,18 (*t*, *J* = 4,9, 2 H); 3,80 (*dd*, *J* = 4,9, 6,7, 4 H); das *s* von Formaldehyd-cyanhydrin bei 4,42 (4 H); das *s* von Formaldehyd-Hydrat bei 4,82 (*ca.* 4 H).

3.6. **14** → **12**: *Tris(2-oxoethyl)-phosphat (12)*. Durch eine auf –77° abgekühlte Lsg. von 440 mg (2 mmol) **14** in 40 ml MeOH wurde 1 h ein O₂-haltiger O₂-Strom geschickt. Daraufhin wurde das blau gefärbte RG mit N₂ gespült, mit 6,3 g (24 mmol) Ph₃P in 20 ml Benzol versetzt und 24 h bei 4° gehalten. Das farblose RG wurde bei 4° mit 50 ml H₂O versetzt, i. RV. bei RT. auf 50 ml eingeeengt, filtriert, mit H₂O nachgewaschen, i. RV. bei RT. auf 50 ml eingeeengt, 2mal gegen je 30 ml Et₂O extrahiert; die H₂O-Phase wurde i. RV. bei RT. auf 5 g Lsg. eingeeengt und in 5 Portionen an Polyacrylamid-Gel chromatographiert. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt. Ein Aliquot davon wurde mit einer bekannten Menge an Pentaerythritol versetzt; durch Vergleich der Signal-Intensitäten wurde der Gehalt an **14** im Aliquot und daraus eine Ausbeute von *ca.* 50% bestimmt. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O; H₂O-Lsg. 4mal mit je 1 ml D₂O versetzt und jeweils auf 0,2 ml eingeeengt): die Signale von **12** (Hydrat-Form): 5,23 (*t*, *J* = 4,80, 3 H); 4,05 (*dd*, *J* = 4,80, 7,60, 6 H); von **11** (Hydrat-Form): 5,16 (*t*, *J* = 4,90, 0,15 H); 3,79 (*dd*, *J* = 4,90, 6,70, 0,3 H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O/H₂O): 90,23 (*d*, *J* = 8,5, CH); 72,45 (*d*, *J* = 6,1, CH₂). ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O/H₂O; ¹H-gekoppelt): –0,70 (*m*, *J* ≈ 7,5).

3.7. **12** → **10**: *rac-Tris(2-cyano-2-hydroxyethyl)-phosphat (10; 2 Diastereoisomere)*. Zu 10 ml 8,3% HCN in MeOH wurden 5 ml einer 0,08M Stammlsg. von **12** (0,4 mmol) in H₂O und 20 ml einer 0,5M (C₁₂H₂₅)₃N-Lsg. in Hexan gegeben. Das zweiphasige RG wurde 2 h bei RT. heftig gerührt und anschliessend zentrifugiert. Die H₂O-Phase wurde 3mal mit je 20 ml Hexan gewaschen, i. RV. bei RT. eingedampft und i. HV. getrocknet: 101 mg farblores Öl (¹H-NMR: 76% **10** und 24% **9**), in 2 ml H₂O gelöst und an C₁₈-Umkehrphasenkieselgel (15 g; *Baker*) mit einem linearen H₂O/MeCN Gradienten (0–50%, 400 ml) eluiert. Es wurden Fraktionen à 25 ml gesammelt; die produkthaltigen Fraktionen (5–8; ¹H-NMR) wurden vereinigt, eingedampft und i. HV. getrocknet: 71 mg (*ca.* 60%) farblores Öl, gemäss ¹H-NMR: 85% **10** und 15% **9**. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): die Signale von **10**: 4,97 (br. *dt*, *J* = 1,6, 4,1, 3 H); 4,45 (br. *dd*, *J* ≈ 4,1, 7,2, 6 H); von **9**: 4,87 (*m*, 0,5 H); 4,11 (*m*, 1 H); von **6**: 4,69 (*t*, *J* = 4,7, 0,2 H); 3,81 (*d*, *J* = 4,7, 0,4 H). ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): die Signale von **10**: 120,6 (C); 71,4 (3*d*, *J* ≈ 5, CH₂); 62,6 (*d*, *J* = 8,1); von **9**: 68,9 (*d*, *J* = 5,4, CH₂); 63,1 (*d*, *J* = 9,1, CH); schwache Signale: 121,3 (C); 90,1 (*d*, *J* = 8,1, CH); 65,4; 64,5. ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O; ¹H-entkoppelt): –2,16 (0,85 P von **10**); –1,67 (0,05 P); –0,22 (0,10 P von **9**). ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O; ¹H-gekoppelt): –2,17 (*qhept.*, *J* = 1,5, 7,2); –1,67 (br. *hept.*, *J* = 7,6); 0,25 (br. *q*, *J* ≈ 6).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. Ksander, G. Bold, R. Lattmann, C. Lehmann, T. Früh, Yi-Bin Xiang, K. Inomata, H.-P. Buser, J. Schreiber, E. Zass, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1115.
- [2] Yi-Bin Xiang, S. Drenkard, K. Baumann, D. Hickey, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 2209.
- [3] S. Pitsch, 'Zur Chemie von Glykolaldehydphosphat: Seine Bildung aus Oxirancarbonitril und seine Aldolisierung zu den (racemischen) Pentose-2,4-diphosphaten und Hexose-2,4,6-triphosphaten', Diss. Nr. 10055, ETH Zürich, 1993.
- [4] E. Wagner, Yi-Bin Xiang, K. Baumann, J. Gück, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1391.
- [5] D. Müller, S. Pitsch, A. Kittaka, E. Wagner, C. E. Wintner, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1410.
- [6] S. Drenkard, J. Ferris, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1373.
- [7] K. Baumann, Arbeitsbericht, Postdoktorat ETH Zürich, 1984–1986.
- [8] J. Gück, 'Zur Chemie des Aziridin-2-carbonitril', Diss. Nr. 9027, ETH Zürich, 1989.
- [9] H. Moser, A. Fliri, A. Steiger, G. Costello, J. Schreiber, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 1224.
- [10] H. Moser, 'Synthese und Eigenschaften von oligomeren Di- und Tri-Peptamidinium-Salzen', Diss. Nr. 7925, ETH Zürich, 1985.

- [11] A. Steiger, 'Oligomerisation von Dipeptidnitrilen', Diss. Nr. 8367, ETH Zürich, 1987.
- [12] S. Pitsch, S. Wendeborn, B. Jaun, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2161.
- [13] A. Eschenmoser, 'Kon-Tiki-Experimente zur Frage nach dem Ursprung von Biomolekülen', Ed. W. Gerok et al., 'Materie und Prozesse vom Elementaren zum Komplexen', Verh. der Ges. Dtsch. Naturforsch. Ärzte, 116. Versammlung, Berlin 1990, Wissenschaftl. Verlagsges.m.b.H., Stuttgart, 1990, S. 135.
- [14] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 5; *ibid. Int. Ed.* **1988**, *27*, 5.
- [15] T. Ukita, K. Nagasawa, *Chem. Pharm. Bull. (Japan)* **1959**, *7*, 383.
- [16] G. P. Lampson, H. A. Lardy, *J. Biol. Chem.* **1949**, *181*, 693; F. R. Atherton, H. T. Openshaw, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1945**, 382.
- [17] J. B. Conant, W. R. Kirner, R. E. Hussey, *J. Am. Chem. Soc.* **1925**, *47*, 488; P. D. Bartlett, E. N. Trachtenberg, *ibid.* **1958**, *80*, 5808; F. G. Bordwell, W. T. Brannen, Jr., *ibid.* **1964**, *86*, 4645.
- [18] S. Pitsch, A. Eschenmoser, *Pol. J. Chem.* **1994**, *68*, 2383.
- [19] J. Kopecký, J. Šmejkal, *Z. Chem.* **1984**, *24*, 211.
- [20] G. B. Payne, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4901.
- [21] J. Kopecký, J. Šmejkal, I. Linhart, V. Hanuš, F. Tureček, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4295.
- [22] a) F. P. Guengerich, L. E. Geiger, L. L. Hogg, P. L. Wright, *Cancer Res.* **1981**, *41*, 4925; b) L. Recio, T. R. Skopek, *Mutat. Res.* **1988**, *206*, 297; c) H. Peter, M. Schwarz, B. Mathiasch, K. E. Appel, H. M. Bolt, *Carcinogenesis* **1983**, *4*, 235.
- [23] G. B. Payne, P. H. Williams, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 651.
- [24] E. Pombo-Villar, Forschungsbericht, Postdoktorat ETH Zürich, 1988.
- [25] J. Kennedy, E. S. Lane, B. K. Robinson, *J. Appl. Chem.* **1958**, *8*, 459.
- [26] A. D. Fon Toy, P. Forest, J. R. Costello, US Pat. 2754315 (10.7.1956).
- [27] A. Eschenmoser, 'Hexose nucleic acids', *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1179 (Vortrag am 18th Int. IUPAC Symposium on the Chemistry of Natural Products, Strasbourg/F, August 1992).
- [28] A. Eschenmoser, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 218.
- [29] J. Hunziker, H.-J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, Ravichandran Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 259.
- [30] R. W. Fischer, A. Helg, U. Diederichsen, A. Giger, K. Groebke, R. Krishnamurthy, R. Hammer, C. Miculka, S. Pitsch, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta*, in Vorbereitung.
- [31] G. Issakides, A. Eschenmoser, unveröffentlichte Arbeiten; G. Issakides, Arbeitsbericht, Postdoktorat ETH Zürich, 1993.
- [32] F. Heinzer, M. Soukup, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1978**, *61*, 2851.
- [33] J. Takacs, A. Eschenmoser, unveröffentlichte Arbeiten; J. Takacs, Arbeitsbericht, Postdoktorat ETH Zürich, 1982.
- [34] D. Sternbach, M. Shibuya, F. Jaisli, M. Bonetti, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 670; *ibid. Int. Ed.* **1979**, *18*, 634; M. Shibuya, F. Jaisli, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 672; *ibid. Int. Ed.* **1979**, *18*, 636.
- [35] J. Castells, F. Geijo, F. López-Calahorra, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 4517; J. Castells, F. López-Calahorra, F. Geijo, *Carbohydr. Res.* **1983**, *116*, 197.
- [36] T. Matsumoto, S. Inoue, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 171; T. Matsumoto, H. Yamamoto, S. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4829.
- [37] Y. Shigemasa, Y. Sasaki, N. Ueda, R. Nakashima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, *57*, 2761.
- [38] National Bureau of Standards, Washington, in 'CRC Handbook of Chemistry and Physics', 68th edn., Ed. R. C. Weast, CRC Press, Florida, S. D 50ff, 1987–1988.
- [39] K. E. Porter, H. S. Rzepa, *J. Chem. Res.* **1983**, 262.
- [40] A. Eschenmoser, 'Chemie potentiell präbiologischer Naturstoffe', *Nova Acta Leopoldina, Neue Folge* **1992**, *67*, Nr. 281, S. 201; engl. Fassung (mit E. Loewenthal) *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21*, 1.
- [41] A. Eschenmoser, 'Toward a Chemical Etiology of the Natural Nucleic Acids' Structure', in: Proceedings of the R. A. Welch Foundation Conference on Chemical Research XXXVII: '40 Years of the DNA Double Helix', A. Welch Foundation, Houston, Texas, 1993, p. 201.
- [42] A. Eschenmoser, *Origins Life Evol. Biosphere* **1994**, *24*, 389.
- [43] F. H. Westheimer, *Science* **1987**, *235*, 1173.
- [44] J. A. Piccirilli, T. Krauch, S. E. Moroney, S. A. Benner, *Nature (London)* **1990**, *343*, 33.
- [45] V. M. Kolb, J. P. Dworkin, S. L. Miller, *J. Mol. Evol.* **1994**, *38*, 549.
- [46] B. N. Ames, *Meth. Enzymol.* **1966**, *8*, 115; P. S. Chen, T. Y. Toribara, H. Warner, *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 1756.
- [47] J. Mitchell, I. M. Kolthoff, E. S. Proskauer, A. Weissberger, 'Organic Analysis', Interscience, New York, 1953, Vol. 1, p. 267.