

# Zur Chemie von Glykolaldehydphosphat:

Seine Bildung aus Oxirancarbonitril  
und seine Aldolisierung zu den (racemischen)  
Pentose-2,4-diphosphaten und Hexose-2,4,6-triphosphaten

Abhandlung zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE, ZÜRICH

vorgelegt von Stefan Pitsch  
dipl. Natw. ETH  
geboren am 28. April 1964  
von Müstair (GR)

angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. A. Eschenmoser, Referent  
Prof. Dr. D. Arigoni, Korreferent

Zürich 1993

## Zusammenfassung

Die Aldolisierung von Glykolaldehydphosphat ( $c = 0,08 \text{ M}$ ) in Gegenwart eines halben Molequivalents Formaldehyd in 2 N NaOH und bei RT. führte innerhalb einer Woche Reaktionszeit zur Bildung der vier (racemischen) Pentose-2,4-diphosphate (Ausbeute ca. 35 %) sowie, in untergeordnetem Mass, der acht (racemischen) Hexose-2,4,6-triphosphate (Ausbeute ca. 15 %). Dieses Reaktionsgemisch wurde bezüglich seiner Zusammensetzung ausführlich charakterisiert. Durch konstitutionell eindeutige Synthese von D-Ribose-, D-Arabinose- und D-Xylose-2,4-diphosphat konnten die Hauptprodukte dieser Reaktion zweifelsfrei identifiziert werden.

Unter den *rac*-Pentose-2,4-diphosphaten wird mit einer Selektivität von 50 % *rac*-Ribose-2,4-diphosphat und unter den *rac*-Hexose-2,4,6-triphosphaten mit derselben Selektivität *rac*-Allose-2,4,6-triphosphat gebildet. Diese beiden Aldosephosphate weisen beide je eine durchwegs *erythroide* Anordnung ihrer Substituenten auf; diese Gesetzmässigkeit gab Anlass zu einer ausführlichen Diskussion des konfigurativen Verlaufs dieser Aldolreaktion [40].

Die Bildung der Reaktionsprodukte unterliegt der kinetischen Kontrolle. Dieser Befund geht eindeutig aus der Analyse eines entsprechenden Langzeitaldolisierungsversuches hervor. Während die Aldosephosphate auch nach einer Reaktionszeit von 30 Wochen konstitutionell weitgehend stabil sind, ändert sich ihre relative Zusammensetzung in einem konfigurativen Sinn dergestalt, dass Ribose-2,4-diphosphat in das (thermodynamisch) stabilere Arabinose-2,4-diphosphat übergeht (entsprechend geht auch Allose-2,4,6-triphosphat in Altrose-2,4,6-triphosphat über). Die kinetischen Kenngrössen dieser  $\alpha$ -Epimerisierungsreaktion wurden, sowohl für das zueinander  $\alpha$ -epimere Paar Ribose-/Arabinose-2,4-diphosphat (ausgehend von D-Ribose-2,4-diphosphat), als auch für das Paar Xylose-/Lyxose-2,4-diphosphat (ausgehend von D-Xylose-2,4-diphosphat) bestimmt. Diesen Werten zufolge liegt im Gleichgewicht jeweils jenes Diastereomere bevorzugt vor (Anteil je ca. 70 %), welches über mehr zueinander *synclinal*e Anordnungen elektronegativer Substituenten verfügt: nämlich Arabinose-, bzw. Lyxose-2,4-diphosphat. Die Hydrolyse von Ribose-2,4-diphosphat unter verschiedenen sauren Bedingungen wurde von Atsumi [69] untersucht. Neben fortschreitender Hydrolyse der Phosphatesterfunktionen wurde ihre extensive Wanderung entlang des Zuckerrückgrates festgestellt. Zur spektroskopischen Identifizierung der Hydrolyse-

## VIII

produkte wurde D-Ribose-2-phosphat, D-Ribose-3-phosphat, D-Ribose-4-phosphat und D-Ribose-3,4-diphosphat auf konstitutionell eindeutigen Wegen dargestellt; ihre aus den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ermittelten Konformationen werden ausführlich diskutiert.

Unter den oben vorgestellten Reaktionsbedingungen, aber in Abwesenheit von Formaldehyd aldolisiert Glykolaldehydphosphat ausschliesslich zum Ensemble der acht *rac*-Hexose-2,4,6-triphosphate, und zwar mit derselben konfigurativen Selektivität wie in Anwesenheit von Formaldehyd [38][40]. Wird die Aldolisierung von Glykolaldehydphosphat in konzentrierter Lösung (0,5 M), aber bei einem pH-Wert von 11 durchgeführt, so bildet sich nach langer Reaktionszeit (ca. 30 Wochen) ein Reaktionsgemisch, das die beiden *rac*-Tetrose-2,4-diphosphate (Ausbeute ca. 15 %) und die acht *rac*-Hexose-2,4,6-triphosphate (Ausbeute ca. 50 %) enthält, wobei unter diesen nunmehr *rac*-Allose-2,4,6-triphosphat in einem Anteil von ca. 60 % vorliegt.

Die Aldolisierung von Glykolaldehydphosphat durch Vermittlung von *Hydrotalcit* [ $\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6(\text{Cl}\cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ], einem Mineral, das zur Aufnahme von Anionen aus einer umgebenden Lösung befähigt ist, führt in einer weitgehend konzentrationsunabhängigen Reaktion ebenfalls zur Bildung der beiden *rac*-Tetrose-2,4-diphosphate und der acht *rac*-Hexose-2,4,6-triphosphate und dies unter Bedingungen, die in Abwesenheit von *Hydrotalcit* zu quantitativer Rückgewinnung des Edukts führen. Die relativen Anteile der Konfigurationsisomeren innerhalb beider Gruppen ist im wesentlichen abhängig vom stöchiometrischen Verhältnis zwischen *Hydrotalcit* und Glykolaldehydphosphat, während die Ausbeute zusätzlich vom pH-Wert des (heterogenen) Reaktionsgemisches abhängt. Bei Verwendung von 4 Molequivalenten *Hydrotalcit* gegenüber Glykolaldehydphosphat ( $c = 0,003 \text{ M}$ ) und einem pH-Wert von 10,7 dominiert nach 8 Tagen Reaktionszeit unter den *rac*-Tetrose-2,4-diphosphaten (Ausbeute ca. 30 %) *rac*-Erythrose-2,4-diphosphat mit einem Anteil von 70 % und unter den *rac*-Hexose-2,4,6-triphosphaten (Ausbeute ca. 30 %) *rac*-Altrose-2,4,6-triphosphat mit einem Anteil von 45 %, während bei Verwendung von mehr Molequivalenten *Hydrotalcit* der Anteil beider vorher stark dominierenden Isomeren abnimmt.

Die Anionenaustauscher-Chromatographie eines Gemischs der acht *rac*-Hexose-2,4,6-triphosphate an *Hydrotalcit* mittels Carbonat lieferte eine Kopffraktion, welche ausschliesslich aus *rac*-Allose-2,4,6-triphosphat bestand.

Zu Glykolaldehydphosphat, dem Ausgangsprodukt für sämtliche, in diesem Rahmen untersuchten Aldolisierungsversuche, bestand bislang ein potentiell präbiologischer Zugang aus *rac*-Aziridin-2-carbonitril, einer Verbindung aus dem Umfeld der  $\alpha$ -Aminonitrile [33].

Durch substitutive Öffnung des Epoxidringes von *rac*-Oxirancarbonitril, dem Sauerstoffanalogon von *rac*-Aziridin-2-carbonitril, mittels anorganischem Phosphat wurde in wässriger, schwach alkalischer Lösung (pH-Wert 10,5) in guter Ausbeute *rac*-Glykolaldehydphosphat-cyanhydrin erhalten. Ausgehend von diesem findet bei demselben pH-Wert vollständige Übertragung von HCN auf die Carbonylgruppe von Formaldehyd - unter Ausbildung von Formaldehyd-cyanhydrin und Glykolaldehydphosphat - statt. Die Reaktion zwischen anorganischem Phosphat und *rac*-Oxirancarbonitril führt dementsprechend unter obigen Reaktionsbedingungen, aber in Anwesenheit von Formaldehyd im Reaktionsgemisch, zur effizienten Bildung von Glykolaldehydphosphat.

Wird die Öffnung des Epoxidringes von *rac*-Oxirancarbonitril mit anorganischem Phosphat bei einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt, so bildet sich in sehr guter Ausbeute der entsprechende Phosphorsäurediester *rac*-Bis(glykolaldehyd-cyanhydrin)-phosphat (als Diastereomerengemisch), wobei die Reaktion zu diesem schneller erfolgt als die Bildung des Zwischenprodukts *rac*-Glykolaldehydphosphat-cyanhydrin. Bei einem pH-Wert von 9,4 findet auch ausgehend von dem Phosphorsäurediester vollständige Übertragung von HCN auf Formaldehyd statt.

In wässriger Lösung findet ausgehend von *rac*-Oxirancarbonitril keine Bildung des Phosphorsäuretriesters *rac*-Tris(glykolaldehyd-cyanhydrin)-phosphat statt. Erst durch lösungsmittelfreie Reaktion zwischen *rac*-Bis(glykolaldehyd-cyanhydrin)-phosphat (in der Säureform) oder Orthophosphorsäure mit einem grossen Überschuss an *rac*-Oxirancarbonitril wird dieser in guter Ausbeute (als Diastereomerengemisch) gebildet.

Sämtliche, durch die Reaktion zwischen anorganischen Phosphaten und *rac*-Oxirancarbonitril erhaltenen Aldehyd- und Cyanhydrin-phosphate wurden auf unabhängigen synthetischen Wegen dargestellt die eine eindeutige Identifizierung der jeweiligen Reaktionsprodukte gestatteten.

Die potentielle Relevanz dieser Verbindungen als Zwischenprodukte für die Bildung biologischer Moleküle wird anhand einiger orientierender Vorversuche diskutiert.

## Summary

In the presence of half an equivalent of formaldehyde the base catalyzed (2 N NaOH; during one week at ambient temperature) aldol reaction of glycolaldehyde phosphate ( $c = 0.08$  M) lead to the formation of the four (racemic) pentose 2,4-diphosphates as main products. Besides, the eight (racemic) hexose 2,4,6-triphosphates were formed to a smaller extent. The complex reaction mixture was characterized extensively with respect to its composition. The independent synthesis of D-ribose, D-xylose and D-arabinose 2,4-diphosphate confirmed the identities of the main products.

Ribose 2,4-diphosphate and allose 2,4,6-triphosphate were each formed with a selectivity of 50 % among the pentose 2,4-diphosphates and the hexose 2,4,6-triphosphates, respectively. All the substituents on either of these aldose phosphates are arranged *erythro* to each other. This observation lead to a detailed discussion of the configurative course of this aldol reaction [40].

The formation of the reaction products is subjected to kinetic control. This conclusion was reached from an aldolization experiment conducted over an extended period. The aldose phosphates which were formed were constitutionally stable even after a period of 30 weeks in 2 N NaOH. However, under these reaction conditions,  $\alpha$ -epimerization was observed: ribose and xylose 2,4-diphosphate were converted to the thermodynamically more stable diastereoisomers arabinose and lyxose 2,4-diphosphate, respectively. Both, pure ribose and xylose 2,4-diphosphate were subjected to the same conditions; the analysis of the resulting reaction mixtures afforded the kinetic parameters of the epimerization reactions. Those diastereoisomers predominated each to an extent of 70 % in which more stereoelectronically favoured interactions are realized: arabinose and lyxose 2,4-diphosphate, respectively.

Atsumi [69] investigated the acid promoted hydrolysis of ribose 2,4-diphosphate. Besides the continuous hydrolysis of the phosphate groups their extensive migration all along the sugar backbone was observed. The spectroscopical identification of the different hydrolysis products was accomplished by comparison with authentic samples. Therefore D-ribose 2-phosphate, 3-phosphate, 4-phosphate and 3,4-diphosphate were synthesized in an unambiguous way; their conformations as determined by  $^1\text{H-NMR}$ -spectroscopy are discussed.

Under the above mentioned conditions but in the absence of formaldehyde, glycolaldehyde phosphate aldolized exclusively to the eight hexose 2,4,6-triphosphates and, to a small extent, to the two tetrose 2,4-diphosphates. Among the hexose 2,4,6-triphosphates the diastereoisomeric distribution was the same as in the presence of formaldehyde [38][40]. In a much more concentrated solution ( $c = 0.5 \text{ M}$ ) but at a much lower pH value of 11, the aldol reaction of glycolaldehyde phosphate afforded within a period of about 30 weeks the two tetrose 2,4-diphosphates and the eight hexose 2,4,6-triphosphates in 15 % and 50 % yield, respectively. Among the eight diastereoisomers all the 2,4,6-triphosphate predominated up to the extent of 60 %.

By means of the layered mineral *hydrotalcite*  $[\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6](\text{Cl}\cdot 4\text{H}_2\text{O})$  glycolaldehyde phosphate aldolized to the tetrose 2,4-diphosphates and hexose 2,4,6-triphosphates under surprisingly mild reaction conditions that lead to the complete recovery of unchanged starting material in the absence of this mineral. The diastereoisomeric composition among the two groups of sugar phosphates depends exclusively on the relative stoichiometric amount of *hydrotalcite* and glycolaldehyde phosphate. Meanwhile, the yield depends considerably on the pH value of the heterogeneous reaction mixture. The course of the reaction is essentially independent of the concentration of glycolaldehyde phosphate. This reflects the fact that this class of layered minerals is capable of taking up anions, such as glycolaldehyde phosphate from a surrounding solution. In a dilute solution with a pH value of 10,7 and in the presence of 4 equivalents of *hydrotalcite*, glycolaldehyde phosphate ( $c = 0.003 \text{ M}$ ) was converted within a period of 8 days to the tetrose 2,4-diphosphates and the hexose 2,4,6-triphosphates in yields of 30 %, respectively. Erythrose 2,4-diphosphate predominated to an extent of 70 % and altrose 2,4,6-triphosphate to an extent of 45 % among the two respective groups of sugar phosphates.

The ion exchange chromatography of a mixture, containing all eight hexose 2,4,6-triphosphates on *hydrotalcite* as stationary phase (elution with carbonate) afforded a front fraction consisting of pure all the 2,4,6-triphosphate.

Up to now, one potentially prebiological pathway leading from aziridine 2-carbonitrile to glycolaldehyde phosphate, the starting material of all investigated aldol reactions within this scope, existed [33].

By substitutive ring opening of oxirane carbonitrile, the oxygen analogue of aziridine 2-carbonitrile with inorganic phosphate in weakly aqueous alkaline solution (pH value 10.5), glycolaldehyde phosphate cyanohydrin was obtained in good yield. Complete transfer of HCN to the carbonyl group of formaldehyde took place smoothly at the same pH value and lead to the quantitative formation of glycolaldehyde phosphate. Similarly, in the presence of formaldehyde the reaction between oxirane carbonitrile and inorganic phosphate lead to the straightforward formation of glycolaldehyde phosphate.

At a lower pH value of 7 the same reaction afforded the corresponding phosphoric acid diester bis(glycolaldehyde cyanohydrin) phosphate in very good yield. At somewhat higher pH value of 9,4 HCN was again transferred quickly and completely to formaldehyde (forming the corresponding cyanohydrin).

Starting from oxirane carbonitrile and inorganic phosphate no formation of the corresponding phosphoric acid triester tris(glycolaldehyde cyanohydrin) phosphate could be observed in aqueous solution. However, a fairly good yield could be achieved in the neat reaction between bis(glycolaldehyde cyanohydrin) phosphate and a large excess of oxirane carbonitrile.

All cyanohydrin and aldehyde compounds obtained by the reaction of oxirane carbonitrile and inorganic phosphate were prepared by independent syntheses, allowing therefore an unambiguous identification of the reaction products.

The potential meaning of these compounds as intermediates for the formation of biological molecules is briefly discussed.