

**Herstellung molekular geprägter Polymere (MIPs) unter Einsatz
chiraler und nicht-chiraler Template und Anwendung
dieser MIPs in Separation und Katalyse**

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin
Aleksandra Visnjevski
aus Vrsac

Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Gradzielski, Technische Universität Berlin
Berichter/Gutachter: Priv.-Doz. Dr. O. Brüggemann, Technische Universität Berlin
Berichter/Gutachter: Prof. Dr. R. Schomäcker, Technische Universität Berlin
Berichter/Gutachter: Prof. Dr. K. Haupt, Université de Technologie de Compiègne

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15. April 2005

Berlin 2005
D 83

DANKSAGUNGEN

Meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Priv. Doz. Dr. Oliver Brüggemann möchte ich insbesondere für die interessante, aktuelle und herausfordernde Themenstellung sowie die Ermöglichung meines Forschungsaufenthalts in Schweden, des Industrieprojekts bei der BASF und für die Unterstützung über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Schomäcker danke ich herzlich für die sehr guten Arbeitsbedingungen, die Bereitstellung von Geräten und Chemikalien und seine Diskussionsbereitschaft.

Für die Übernahme des Korreferats bedanke ich mich beim Herrn Prof. Dr. Karsten Haupt.

Meinem Betreuer während des Forschungsaufenthalts Herrn Dr. Ecevit Yilmaz möchte ich für die Hilfestellung beim Erlernen der neuen Technik zum molekularen Prägen von Polymeren danken.

Mein Dank gilt insbesondere meiner Diplomandin Fatma Arslan sowie Volker Tietjen, Mathias Latka und Faissal Ali El-Toufaily für die Unterstützung im Labor.

Ein großes Dankeschön an Frau Astrid Müller vom Analysenzentrum für die Durchführung von IR-, UV- und NMR-Messungen am Institut für Chemie. Bei Herrn Ulrich Gernert bedanke ich mich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen am ZELMI der Technischen Universität Berlin.

Allen Mitarbeitern der Arbeitskreise von Prof. Schomäcker an der Technischen Universität Berlin und Prof. Mosbach an der Universität Lund, Schweden danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Meinem Freund Sebastian Volkmann bin ich dankbar für das zusätzliche Korrekturlesen und "puno ljubavi i neznosti" während meiner Promotionszeit. Bei meiner Familie bedanke ich mich für die geleistete Aufbauarbeit und bei Brigitte Strunk für das bestimmt tolle Lay-out meiner Dissertation.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der DFG (Projekte BR 2112/1-1 und BR 2112/1-2).

ABSTRACT

In der modernen Reaktionstechnik werden hohe Anforderungen insbesondere an katalytisch aktive Materialien hinsichtlich Selektivität und Effizienz, aber auch Stabilität und Langlebigkeit gestellt. Derzeit werden entweder teure Edelmetallkatalysatoren eingesetzt oder es wird vielfach mit biologischen Katalysatoren gearbeitet, hauptsächlich mit immobilisierten Enzymen, deren Haltbarkeiten in der Regel nur kurz sind. Als Alternative bieten sich biomimetische Katalysatoren an, wie z.B. molekular geprägte Polymere. Unter molekularem Prägen ("molecular imprinting") versteht man die Erzeugung künstlicher Rezeptoren bzw. Antikörper ("plastibodies") durch die Polymerisation von funktionellen Monomeren und Quervernetzern in Anwesenheit von Templatmolekülen. Nach dem Eluieren des Templats entstehen spezifische molekulare Abdrücke so genannte MIPs ("molecularly imprinted polymers"), die in der Lage sind, das Templat auf molekularer Ebene zu erkennen, und somit zur Separation des Templats aus Analytgemischen verwendet werden können. Wählt man das Templat nach bestimmten Kriterien, so können die Abdrücke als katalytisch aktive Zentren agieren ("plastizymes"). Ziel dieser Arbeit war es, molekular geprägte Polymere zu generieren und deren Verwendbarkeit in der Separation und Katalyse zu untersuchen. Dazu wurden MIPs in der Chromatographie auf ihre Affinität zum verwendeten Templat getestet und in Reaktoren hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivitäten und ihres Materialverhaltens charakterisiert. Ein weiterer Schwerpunkt wurde in die Herstellung und Anwendung enantioselektiver MIPs gesetzt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	8
2	Theoretische Grundlagen.....	10
2.1	Molekulare Wiedererkennung.....	10
2.1.1	Prinzip der Enzymkatalyse.....	10
2.1.2	Michaelis-Menten-Modell.....	13
2.1.3	Kompetitive und nicht-kompetitive Hemmung.....	16
2.1.4	Katalytisch aktive Antikörper.....	18
2.2	Molekulares Prägen von Polymeren.....	23
2.2.1	Standardmethode zur MIP-Herstellung.....	23
2.2.1.1	Prinzip des molekularen Prägens.....	23
2.2.1.2	MIPs in der analytischen Chemie.....	27
2.2.1.3	Plastizyme.....	30
2.2.2	Immobilisierung von Templaten.....	34
2.2.2.1	Prägen an festen Oberflächen.....	34
2.2.2.2	Prägen mit immobilisierten Templaten.....	36
2.2.2.3	Einsatz in der Katalyse.....	38
2.2.3	Enantioselektive MIPs.....	39
2.2.3.1	Trennung von chiralen Substanzen.....	39
2.2.3.2	Regio- und stereoselektive MIPs.....	40
2.2.3.3	Katalyse mit enantioselektiven MIPs.....	41
2.2.3.4	Immobilisierte Template.....	43
3	Vorarbeiten.....	44
4	Ziele und Problemstellung.....	51
5	Experimentelle Arbeiten.....	56
5.1	MIPs für die Chromatographie und Extraktion.....	56
5.1.1	Polymerherstellung.....	56
5.1.2	Affinitätschromatographie.....	57
5.1.3	SPE-Säulen.....	58
5.1.4	Batchextraktion.....	59
5.2	Membranoberflächenmodifizierung mit MIPs.....	60
5.2.1	Grafting von MIP-Schichten.....	60
5.2.2	MIP-Filme mittels Casting.....	61
5.2.3	Evaluierung der Affinität.....	64
5.3	MIPs für die Katalyse.....	65
5.3.1	MIPs als Massepolymere.....	66
5.3.1.1	Herstellung - Standardmethode.....	66
5.3.1.2	Synthese der Reaktionskomponenten.....	67
5.3.1.3	Polymerevaluierung.....	69
5.3.2	MIPs mit immobilisierten Templaten.....	71
5.3.2.1	Modifizierte Diels-Alder-Reaktion.....	71
5.3.2.2	Offline-Analytik.....	74
5.3.2.3	Online-Analytik.....	75
5.3.3	Vergleich der Prägemethoden.....	76
5.4	Enantioselektive MIPs in der Katalyse.....	78
5.4.1	MIP-Schalen von chiralen Templaten.....	78

5.4.2	Synthese des Substrats	79
5.4.3	TSA-Testsynthese.....	81
5.4.4	Katalysatorherstellung.....	85
6	Ergebnisse und Diskussion	89
6.1	Separation mit MIPs.....	89
6.1.1	Kapazitätsfaktoren.....	89
6.1.2	Durchbruchskurven	91
6.1.3	MIPs zur Festphasenextraktion	93
6.2	High Throughput Screening von MIP-Rezepturen	96
6.2.1	DVB als Quervernetzer.....	96
6.2.2	Einfluss des EGDMA	98
6.2.3	Mit TRIM vernetzte MIPs	100
6.2.4	Modell nach Snyder.....	102
6.3	Katalyse mit MIPs	106
6.3.1	Affinität der Standard-MIPs	106
6.3.2	Kinetische Studie	108
6.3.3	Prägemethoden im Vergleich	114
6.3.4	Enantioselektivität der MIPs	117
7	Zusammenfassung	124
7.1	MIP-Anwendung in der Separation	124
7.2	MIPs für die Racemattrennung.....	126
7.3	Einsatz der MIPs in der Katalyse	128
	Anhang.....	133
	Literaturverzeichnis	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(Boc) ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
4-FNB	4-Fluoro-4-(<i>p</i> -nitrophenyl)-2-butanon
4-VPy	Vinylpyridin
AA	Acrylsäure
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AFM ("atomic force microscopy")	Rasterkraftmikroskopie
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
B	Base
BET	Brunauer, Emmett und Teller
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
Boc-D-PheONP	Boc-D-phenylalanin- <i>p</i> -nitrophenylester
Boc-L-PheONP	Boc-L-phenylalanin- <i>p</i> -nitrophenylester
Boc-S-IP	Ethyl-Boc-S-(-)-Phenylalaninyl 4-(Bocimino)benzylphosphonat
Boc-S-PheOH	Boc-S-(-)-Phenylalaninol
Boc-S-PheONP	Boc-S-phenylalanin- <i>p</i> -nitrophenylester
BOP-Reagenz	Benzotriazol-1-yl-oxo-tris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat
CA	Chlorendinesäureanhydrid
CLEN	Chlorendinesäure
CP ("control polymer")	Kontrollpolymer
Cyclop.	Cyclopentanon
d	Dublett
DAP	Diethyl-4-aminobenzylphosphonat
DA-Reaktion	Diels-Alder-Reaktion
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DSC ("differential scanning calorimetry")	Kalorimetrie mit Differentialabtastung
DVB	Divinylbenzol
E	Enzym
EDX "energy-dispersive X-ray analysis"	energiedispersive Röntgenspektroskopie
EGDMA	Ethylenglycoldimethacrylat
EIA	Enzymimmunoassay

ES-Komplex	Enzym-Substrat-Komplex
Fa.	Firma
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Funktionelles Monomer
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometer
HBX	Salz
HCCPD	Hexachlorocyclopentadien
HOBT	N-Hydroxybenzotriazolhydrat
HPLC ("high-performance liquid chromatographie")	Hochleistungsflüssigchromatographie
HTPS ("high throughput screening")	Hochdurchsatz-Screening
Immobil.	Immobilisierung
Init.	Initiator
IP	Ethyl-4-(<i>Bocimino</i>)benzylphosphonat
IR	Infrarot
LC	Flüssigchromatographie
Leu	Leucin
LM	Lösungsmittel
m	Multipllett
MAA	Methacrylsäure
MeOH	Methanol
MIP ("molecularly imprinted polymer")	Molekular geprägtes Polymer
MMA	Methylmethacrylat
MS	Maleinsäure
MSA	Maleinsäureanhydrid
NMR	kernmagnetische Resonanz
P	Produkt
P.-tetraacrylat	Pentaerythritoltetraacrylat
P.-triacrylat	Pentaerythritoltriacrylat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
PG	Propylgallat
pH	pH-Wert
Phe	Phenylalanin
PLC	Leistungsflüssigchromatographie
p-NP	p-Nitrophenol
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVA	Polyvinylalkohol
q	Quartett
quin	Quintett
QV	Quervernetzer
R	Alkylrest
RIA	Radioimmunoassay

Rkt.	Reaktion
RP ("reversed phase")	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
RX	Alkylhalogenid
S	Substrat
s	Singulett
SEM ("scanning electron microscopy")	Rasterelektronenmikroskopie (REM)
SPE ("solid-phase extraction")	Festphasenextraktion
T	Templat
t	Triplett
TCTD	Tetrachlorothiophendioxid
TFMAA	Trifluormethacrylsäure
THF	Tetrahydrofuran
TRIM	Trimethylolpropantrimethacrylat
TS ("transition state")	Übergangszustand
TSA ("transition state analogue")	Übergangszustandsanalogon
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VI	Vinylimidazol
Z	Benzyloxycarbonyl (Schutzgruppe)

Parameter

A	Stoßfaktor
E_a	Aktivierungsenergie
G	Freie Enthalpie
K	Gleichgewichtskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
k	Geschwindigkeitskonstante
$k_{\text{con-imp}}$	Geschwindigkeitskonstante der mit MIP katalysierten Reaktion, geprägt mit einem, dem Original-Templat verwandten Templat
k_{imp}	Geschwindigkeitskonstante der mit MIP katalysierten Reaktion
k_{kat}	Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion
$k_{\text{non-imp}}$	Geschwindigkeitskonstante der mit nicht geprägtem Polymer (CP) katalysierten Reaktion
k_{unkat}	Geschwindigkeitskonstante der Reaktion ohne Katalysator
R	Gaskonstante
r	Reaktionsgeschwindigkeit
$r_{(\text{Co}^{2+}\text{-MIP})}$	Reaktionsgeschwindigkeit des MIP, geprägt mit ausschliesslich dem Komplexbildner
$r_{(\text{DBM/Co}^{2+}\text{-MIP})}$	Reaktionsgeschwindigkeit des MIP, geprägt mit Templat und Komplexbildner
T	Temperatur

1 EINLEITUNG

Die Erkennung auf molekularer Ebene ist entscheidend für den Ablauf biologischer Prozesse. Auf diesem Prinzip basiert das Immunsystem, bei dem bestimmte Antikörper als Antwortreaktion auf eine kleine Menge Antigen produziert werden. Ein weiteres Beispiel für die molekulare Erkennung ist die Einlagerung eines Substrats in ein Enzym. Die hohe Spezifität des Enzyms wird dabei durch ein aktives Zentrum erreicht, dessen dreidimensionale Form geometrisch komplementär zu der des Substrats ist und als zusätzliche Erkennungselemente definiert angeordnete Bindungsstellen besitzt, die mit dem Substrat wechselwirken können.

Aus der Problematik, diese Eigenschaft der biologischen Modelle zu imitieren und stabile Erkennungselemente in eine Matrix einzubauen, hat sich in den letzten dreißig Jahren ein sehr aktives Arbeitsgebiet entwickelt. Die Technik des molekularen Prägens stellt einen Weg dar, künstliche Rezeptoren zu synthetisieren. Analog zu der früheren Vorstellung von der Bildung von Antikörper, geht diese von einem als Templat (Matrize, Schablone) fungierenden Molekül aus, dessen Bindungsstellen mit funktionellen Monomeren wechselwirken können. Die durch diese Wechselwirkung um das Templat organisierten Monomere erlauben, dass das Templat bei der anschließenden Polymerisation in das Polymernetzwerk eingebaut wird. Wenn dieses nachträglich herausgelöst wird, bleibt im Polymer ein zum Templat komplementärer "Abdruck" bzw. Hohlraum mit Bindungsstellen zurück, der als Prägung bezeichnet wird. Aufgrund der hohen Spezifität bezüglich des Templats besteht ein potentiell Anwendungsgebiet der molekular geprägten Polymere (MIPs) in der Abtrennung des Templats aus Analytgemischen. Des Weiteren können ähnlich wie bei katalytisch aktiven Antikörpern Polymere mit katalytischen Prägnungen erzeugt werden.

Aus heutiger Sicht kann das Experiment von F. Dickey im Jahre 1949 dem Forschungsgebiet des molekularen Prägens zugeordnet werden. In diesem wurde Kieselgel in Gegenwart des Templats Methylorange gefällt. Nach dem Trocknen und Auswaschen des Templats adsorbierten die erhaltenen Gele das Methylorange wesentlich besser als Ethylorange im Vergleich zu den nicht geprägten Gelen.

Das Prägen von organischen Polymeren wurde erstmals 1972 im Arbeitskreis von G. Wulff zur Darstellung von künstlichen Enzymen beschrieben. Seitdem wurde in zahlreichen Arbeiten gezeigt, dass sich mit dieser Technik effiziente Rezeptoren und Katalysatoren synthetisieren lassen.

Die künstlichen Rezeptoren wurden als spezifische Säulenfüllmaterialien verwendet, um ein Enantiomer aus dem Racemat im einfachen chromatographischen Verfahren zu trennen. MIP-basierte Immunotests wurden bereits für verschiedene Substanzen wie Medikamente, Herbizide und Corticosteroide entwickelt. In der Sensortechnologie wurden Messgeräte konstruiert, in denen MIPs als Erkennungselemente auftreten.

Auf dem Gebiet Katalyse konnten für einige Reaktionstypen unter Einsatz von MIPs katalytische Effekte beobachtet werden, die bisher keinen Schluss über eine Systematik zulassen, wenn es sich um Zusammenhänge der katalytischen Effizienz und Polymerrezeptur handelt. Es blieb unklar, ob die vorliegenden Ergebnisse lediglich als individuelle Phänomene zu beurteilen sind, oder ob diese vielleicht auf eine breite Anwendbarkeit geprägter Polymere in der Katalyse hindeuten. Der bislang größte katalytische Effekt wurde von K. Mosbach et al. für eine Diels-Alder-Reaktion zwischen Tetrachlorothiophendioxid und Maleinsäureanhydrid erreicht. Dieser liegt allerdings zwei Größenordnungen unter dem für die katalytischen Antikörper ermittelten Wert und weit unterhalb der katalytischen Aktivität der Enzyme im Allgemeinen.

Um die Eigenschaften von MIPs zu verbessern, wurde inzwischen eine effizientere Prägemethode entwickelt, die eine Fixierung des Templats vor dem Prägen involviert. Dadurch wird die Beweglichkeit des Templats während des Prägens deutlich vermindert, mit der Folge, dass ein spezifischerer Abdruck entstehen kann.

Im Rahmen eines DFG-Projekts wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, den Vorteil der Immobilisierung zu nutzen, um die Katalyse der erwähnten Diels-Alder-Reaktion mit MIPs zu optimieren. Es konnte dadurch nicht nur mehr über die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Polymerrezeptur, sondern auch über den Zusammenhang der katalytischen Effizienz und der Prägetechnik erfahren werden.

Durch die systematischen Untersuchungen wurden an diesem Beispiel die Daten der Konzentration über die Zeit erfasst und daraus die wichtigen kinetisch relevanten Parameter für die Reaktionstechnik ermittelt, welche die ersten Informationen über die Reaktionskinetik solcher Systeme darstellen. Wie sich auf Basis zahlreicher Arbeiten auf diesem Projekt erschließen ließ, können die reaktionstechnischen Kenntnisse als zusätzliches Mittel genutzt werden, um den Effekt des molekularen Prägens deutlicher herauszustellen.

Auf die Enantioselektivität als einer der wichtigsten Aspekte bei der Katalyse wurde besonderer Wert gelegt. Als Zielreaktion wurde dabei eine hydrolytische Esterspaltung in den Vordergrund gestellt, für welche enantioselektive MIPs hergestellt und charakterisiert wurden.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Molekulare Wiedererkennung

2.1.1 Prinzip der Enzymkatalyse

Chemische Reaktionen in biologischen Systemen werden durch Enzyme katalysiert, die ihrer Natur nach überwiegend Proteine mit einer charakteristischen, genau definierten Aminosäuresequenz sind. Die enzymatische Umsetzung des Substrats wird an einem so genannten aktiven Zentrum durchgeführt, welches aus mehreren katalytischen Gruppen besteht, die sich in verschiedenen Abschnitten der Aminosäuresequenz befinden können. Die dreidimensionale Form des aktiven Zentrums wird erreicht, indem um dieses von den restlichen Aminosäuren ein Hohlraum gebildet wird. Begünstigt durch den unpolaren Charakter des aktiven Zentrums werden im Enzym viele schwache Wechselwirkungen an den vorhandenen Bindungsstellen zum Substrat ausgebildet. Aufgrund der kurzen Reichweite der Wechselwirkungen wird ein enger Kontakt zwischen Enzym und Substrat benötigt, der durch eine geeignete, enzymkomplementäre Form des Substrats erreicht werden kann. Die im Jahre 1890 von E. Fischer formulierte Analogie der beiden Komponenten zum Schloss und Schlüssel wurde aufgrund neuerer Untersuchungen ergänzt, die - wie von E. Koshland Jr. im Jahre 1958 postuliert - Enzyme als flexibel charakterisieren, deren aktive Zentren durch die Substratbindung deutlich verändert werden können. Die komplementäre Form an aktiven Zentren einiger Enzyme kann erst nach der Bindung des Substrates erreicht werden; ein Prozess der dynamischen Erkennung, der als "induced fit" bezeichnet wird.

Die chemische Umwandlung des Substrats (**S**) über einen Übergangszustand ("transition state") in das Produkt (**P**) läuft spontan ab, da nach dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik $\Delta G = G_S - G_P$ negativ ist (Abbildung 1).



Der "transition state" (TS) dieser Reaktion ist kurzlebig, weil dieser die größte freie Enthalpie (G_{TS}) aufweist. Die freie Aktivierungsenthalpie (im Folgenden: Aktivierungsenergie E_a) stellt die Differenz zwischen der freien Enthalpie des Übergangszustands und der des Substrates dar (Gl. 1).

$$\Delta G_{TS} = G_{TS} - G_S \quad \text{Gl. 1}$$

Gegenüber dem nicht-katalysierten Reaktionsablauf in Abbildung 1 wird die freie Enthalpie des Übergangszustands ΔG_{TS} und damit auch die Aktivierungsenergie durch die Verwendung eines Katalysators, in diesem Fall eines Enzyms, infolge der Stabilisierung des Übergangszustands gesenkt.

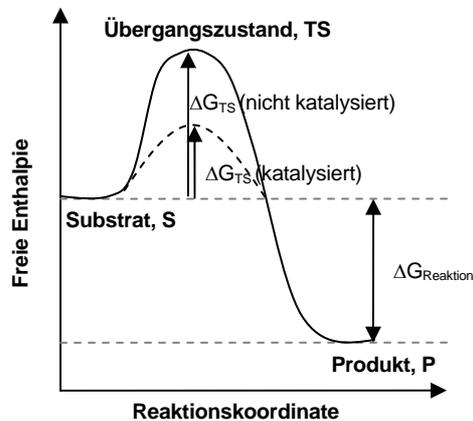


Abbildung 1: Verminderung der Aktivierungsenergie durch Katalysator

Die daraus folgende Beschleunigung der Reaktion kann über die Theorie des aktivierten Komplexes verdeutlicht werden [1]. Die Produktbildungsgeschwindigkeit ist unter Annahme eines konstanten Reaktionsvolumens definiert als zeitliche Änderung der Produktkonzentration c_p und entspricht [2]:

$$r = \frac{dc_p}{dt} = v \cdot c_{TS}, \quad \text{Gl. 2}$$

wobei v durch die Gleichung von Eyring gegeben ist (Gl. 3).

$$v = \frac{k \cdot T}{h} \quad \text{Gl. 3}$$

In dieser Gleichung ist k die Boltzmann-Konstante und h das Planck'sche Wirkungsquantum. Bei $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ beträgt der Wert von kT/h $6,2 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$.

Die Konzentration des Übergangszustands c_{TS} ist nach Gl. 4 proportional zur Substratkonzentration c_S und Gleichgewichtskonstante K_{TS} :

$$c_{TS} = c_S \cdot K_{TS} \quad \text{Gl. 4}$$

Die Gleichgewichtskonstante K_{TS} für die Bildung von TS lässt sich nach Gl. 5 berechnen.

$$K_{TS} = e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad \text{Gl. 5}$$

Durch das Einsetzen von v und c_{TS} in Gl. 2 erhält man den Ausdruck für die Reaktionsgeschwindigkeit (Gl. 6).

$$r = \frac{k \cdot T}{h} \cdot c_S \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad \text{Gl. 6}$$

Aus dieser Formel wird ersichtlich, auf welche Weise die Reaktionsgeschwindigkeit von der Aktivierungsenergie abhängt. Um den Einfluss dieser Größe auf die Reaktionsgeschwindigkeit zu demonstrieren, dient folgendes Beispiel. Wenn die Temperatur und die Substratkonzentration konstant gehalten werden, wird bei einer Verminderung der Aktivierungsenergie um 20 % eine 10fache Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit hervorgerufen.

Gleichzeitig wird deutlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von ΔG der Reaktion ist und damit analog zu Gl. 5 keinen Einfluss auf die Gleichgewichtskonstante der Reaktion hat. Durch einen Katalysator kann also die Einstellung des Gleichgewichts nicht in Richtung der Ausgangssubstanzen oder der Produkte verschoben werden.

Die Beschleunigung der chemischen Reaktion durch Enzyme führt dagegen zu einer schnelleren Gleichgewichtseinstellung, wie anhand eines Experiments gezeigt werden kann. Wenn die Konzentration des gebildeten Produkts als Funktion der Zeit für zunehmende Substratkonzentrationen ($c_{S1} < c_{S2} < c_{S3} < c_{S4}$) gemessen wird, nimmt die Produktmenge mit der Zeit solange zu, bis das Gleichgewicht erreicht wird (Abbildung 2, links). Mit kleinen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten r_0 wird dieser Zustand erst nach langer Zeit und mit großen dagegen schnell erreicht. Demnach wird durch Enzyme oder andere Katalysatoren auf Basis der höheren Reaktionsgeschwindigkeiten eine schnellere Einstellung des Gleichgewichts ermöglicht.

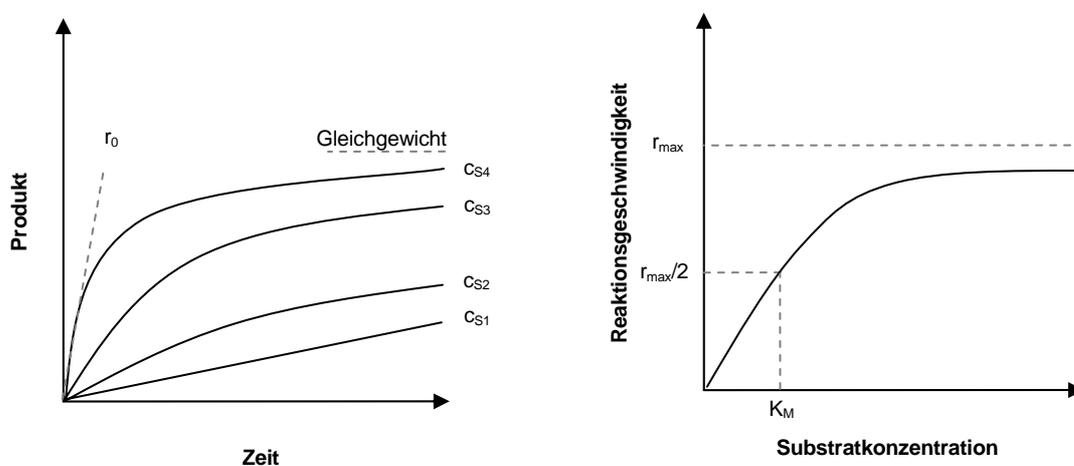
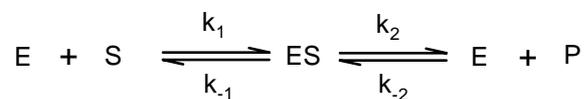


Abbildung 2: Typische Profile bei enzymatischer Umsetzung: Produktkonzentration gegen Zeit (links) und Reaktionsgeschwindigkeit gegen Substratkonzentration (rechts)

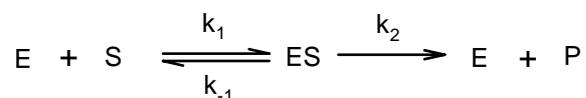
Beim Auftragen der Reaktionsgeschwindigkeit über die Substratkonzentration erhält man das typische Profil der Enzymkinetik (Abbildung 2, rechts), bei dem mit zunehmender Substratkonzentration zunächst die Katalysegeschwindigkeit r linear ansteigt und bei höheren Substratkonzentrationen die Kurve schließlich beim Erreichen eines Maximums abflacht.

2.1.2 Michaelis-Menten-Modell

Um den charakteristischen Kinetikverlauf der Enzyme nachvollziehen zu können, wird die Umwandlung des Substrats **S** zu Produkt **P** mit Hilfe des Enzyms **E** über den folgenden Reaktionsweg beschrieben [3]:



In der Anfangsphase ist die Produktkonzentration so gering, dass die Rückreaktion k_{-2} vernachlässigt werden kann. Die Reaktionsgleichung lautet dann:



Das Enzym bindet das Substrat unter Bildung eines **ES**-Komplexes mit der Geschwindigkeitskonstante k_1 . Dieser **ES**-Komplex kann entweder mit der Konstante k_2 in das Produkt (und freies Enzym) umgewandelt werden oder mit einer Geschwindigkeitskonstante k_{-1} wieder in das Enzym und Substrat zerfallen.

Nach der Theorie des aktivierten Komplexes (Gl. 2) entspricht die Katalysegeschwindigkeit dem Produkt aus k_2 und der Konzentration des **ES**-Komplexes c_{ES} (Gl. 7).

$$r = k_2 \cdot c_{ES} \tag{Gl. 7}$$

Dabei sind die einzelnen Geschwindigkeiten für die Bildung (Gl. 8) und den Zerfall (Gl. 9) von dem **ES**-Komplex gegeben als:

$$c_{ES} = k_1 \cdot c_E \cdot c_S \text{ (Bildung)} \tag{Gl. 8}$$

$$c_{ES} = (k_{-1} + k_2) \cdot c_{ES} \text{ (Zerfall)} \tag{Gl. 9}$$

Unter der Annahme, dass die Konzentration des Zwischenprodukts **ES** konstant bleibt ("steady state" Bedingung) entspricht die Bildungsgeschwindigkeit der Zerfallsgeschwindigkeit. Wenn die rechten Seiten der Gleichungen Gl. 8 und Gl. 9 gleichgesetzt werden, erhält man Gl. 10.

$$k_1 \cdot c_E \cdot c_S = (k_{-1} + k_2) \cdot c_{ES} \quad \text{Gl. 10}$$

Das Umstellen dieser Gleichung ergibt:

$$\frac{c_E \cdot c_S}{c_{ES}} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Gl. 11}$$

Gleichung Gl. 11 lässt sich vereinfachen, indem eine neue Konstante K_M , die Michaelis-Konstante, definiert wird:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Gl. 12}$$

Wie aus Gl. 12 zu sehen ist, hat K_M zwar die Einheit mol l^{-1} , ist aber unabhängig von der Konzentration der einzelnen Komponenten im System. Eingesetzt in Gl. 11 und aufgelöst nach c_{ES} erhält man Gl. 13.

$$c_{ES} = \frac{c_E \cdot c_S}{K_M} \quad \text{Gl. 13}$$

Die Konzentration am freien Enzym c_E ist gleich der Enzymgesamtkonzentration $c_{E,ges}$ minus der Konzentration des ES-Komplexes c_{ES} :

$$c_E = c_{E,ges} - c_{ES} \quad \text{Gl. 14}$$

Wenn man diesen Ausdruck in Gl. 13 einsetzt, erhält man:

$$c_{ES} = \frac{(c_{E,ges} - c_{ES}) \cdot c_S}{K_M} \quad \text{Gl. 15}$$

Diese aufgelöst nach c_{ES} ergibt:

$$c_{ES} = \frac{c_{E,ges} \cdot c_S / K_M}{1 + c_S / K_M} \quad \text{Gl. 16}$$

oder:

$$c_{ES} = c_{E,ges} \frac{c_S}{K_M + c_S} \quad \text{Gl. 17}$$

Das Einsetzen von c_{ES} in Gl. 7 ergibt den folgenden Ausdruck für die Katalysegeschwindigkeit:

$$r = k_2 \cdot c_{E,ges} \frac{c_S}{K_M + c_S} \quad \text{Gl. 18}$$

Die Maximalgeschwindigkeit r_{max} wird folglich erreicht, wenn $c_{ES} = c_{E,ges}$ ist. Demzufolge gilt:

$$r_{max} = k_2 \cdot c_{E,ges} \quad \text{Gl. 19}$$

Bei Einsetzen dieser (Gl. 19) in die Gl. 18 wird die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 20) erhalten.

$$r = r_{max} \frac{c_S}{K_M + c_S} \quad \text{Gl. 20}$$

Mit dieser Gleichung kann die in Abbildung 2 (rechts) dargestellte Kurve interpretiert werden: wenn c_S viel kleiner ist als K_M , ist die Reaktionsgeschwindigkeit $r = c_S \cdot (r_{max}/K_M)$ direkt proportional zu c_S . Liegt die Substratkonzentration dagegen viel höher als K_M , so ist $r = r_{max}$, und damit unabhängig von der Substratkonzentration. Mit Hilfe dieses einfachen nach L. Michaelis und M. Menten¹ benannten Modells kann somit die Enzymkinetik erfolgreich beschrieben werden.

Aus Gl. 20 geht die Bedeutung der Größe K_M hervor. Wenn der c_S - und K_M -Wert gleich groß sind, ist $r = r_{max}/2$, d.h. K_M gibt die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist. In Abhängigkeit vom Verhältnis der Michaelis-Menten-Konstante und der Substratkonzentration ändert sich das Kriterium für das kinetische Optimum der enzymatischen Katalyse. Wenn das Enzym vollständig mit dem Substrat gesättigt wird, spielt die Wechselzahl k_2 , noch als k_{kat} bezeichnet, die entscheidende Rolle. Bei nicht vollständiger Substratsättigung ist der k_{kat}/K_M -Wert relevant (Tabelle 1).

Tabelle 1: Grenzfälle der Michaelis-Menten-Gleichung

<i>Grenzfall</i>	<i>Michaelis-Menten-Gleichung</i>	<i>Kinetisches Optimum</i>
$c_S \gg K_M$ vollständige Substratsättigung	$r = r_{max}$	Wechselzahl k_{kat} gibt die katalytische Aktivität an (hoher Wert \Rightarrow optimale Katalyse)
$c_S \ll K_M$ keine vollständige Substratsättigung	$r = r_{max} \frac{c_S}{K_M}$	k_{kat}/K_M -Kriterium für die katalytische Effizienz (hoher Wert \Rightarrow optimale Katalyse)

¹ Benannt nach Leonor Michaelis und Maud Menten, die im Jahre 1913 dieses Modell vorgeschlagen haben.

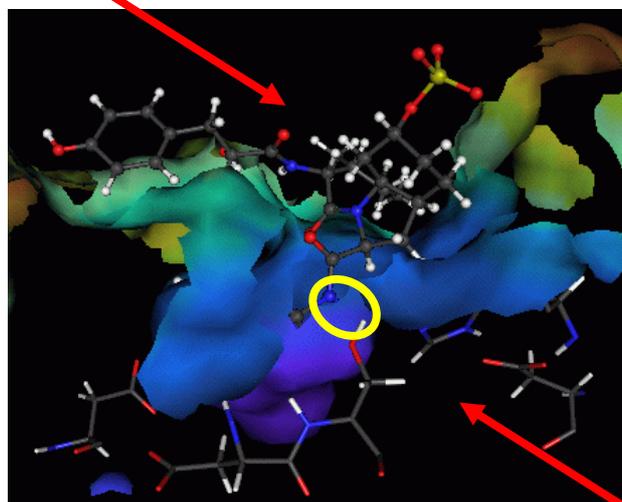
2.1.3 Kompetitive und nicht-kompetitive Hemmung

Durch die Bindung spezifischer Moleküle oder Ionen kann die Aktivität vieler Enzyme gehemmt (inhibiert) werden. Auf dieser Basis funktionieren einige Kontrollmechanismen in biologischen Systemen und die Wirkung vieler Medikamente bzw. toxischer Stoffe. Neben der röntgenkristallographischen Untersuchung des Komplexes eines Enzym mit seinem gebundenen Substrat werden Einblicke in den Mechanismus der Enzymwirkung auch über die Hemmung gewonnen, da sich durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren oft die für die Katalyse bedeutsamen Gruppen identifizieren lassen.

Auf analoge Art und Weise wurde der Katalysemechanismus des proteolytischen Enzyms Trypsin detailliert untersucht, das während der Verdauung im Magen-Darm-Trakt Peptidketten spezifisch nur nach den Aminosäuren Arginin oder Lysin spaltet. Sein aktives Zentrum enthält wie das aktive Zentrum aller Serinproteasen die so genannte katalytische Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparagin. Der Angriff auf die zu spaltende Amidgruppe erfolgt durch das Serin, nachdem die Nucleophilie der Hydroxylgruppe durch die benachbarte Histidinseitenkette stark erhöht worden ist. Das Histidin löst das Proton der Serinhydroxylgruppe ab und ermöglicht so deren Angriff auf die Peptidbindung. Das Asparagin nimmt ein Proton des Histidins auf, wodurch der Übergangszustand der proteolytischen Spaltung stabilisiert wird.

Das 3D-Modell (Abbildung 3) zeigt den Inhibitor Aeroginosin am aktiven Zentrum einer Protease. Die entsprechende Aminosäure bildet Wasserstoffbrücken zum basischen Rest des Inhibitors aus (eingekreist in Abbildung 3), wodurch das Enzym in seiner Wirkung gehemmt wird.

Inhibitor Aeroginosin



Aktives Zentrum

Abbildung 3: 3D-Modell des inaktivierten Trypsins [4]

Ein irreversibler Inhibitor wird sehr stark vom Enzym – entweder kovalent oder nicht-kovalent – gebunden. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Wirkungsweise des Antibiotikums Penicillin, welches vom aktiven Zentrum einer Transpeptidase in Bakterien *Staphylococcus aureus* gebunden wird. Anschließend geht der Wirkstoff eine kovalente Bindung am aktiven Zentrum des Enzyms ein. Dadurch kann keine Quervernetzung der Peptide stattfinden, die für die Zellwandbiosynthese dieser Bakterien verantwortlich ist.

Typisch für die reversible Hemmung ist, dass der Inhibitor locker an das aktive Zentrum gebunden ist. Von der kompetitiven Hemmung spricht man, wenn der Inhibitor dem Substrat ähnlich ist und an der aktiven Stelle gebunden wird. Jede kompetitive Hemmung kann durch Erhöhung der Substratkonzentration aufgehoben werden. Beispielsweise wird Methotrexat zur Behandlung von Krebs eingesetzt, weil dieses als Struktur analogon von Dihydrofolat, dem Substrat der Dihydrofolatreduktase, die eine Rolle bei der Biosynthese von Purinen und Pyrimidinen spielt, an dieses Enzym 1000fach fester bindet und die Nucleotidbasensynthese verhindert.

Anders als bei kompetitiven können die nicht-kompetitiven Inhibitoren gleichzeitig mit dem Substrat an unterschiedlichen Bindungsstellen desselben Enzymmoleküls gebunden werden. Daher wird die Wechselzahl und nicht wie bei der kompetitiven Inhibierung die Anzahl der mit dem Substrat besetzten aktiven Zentren erniedrigt. Die Auswirkung des Inhibitors kann durch eine Erhöhung der Substratkonzentration nicht kompensiert werden.

L. Pauling stellte im Jahre 1948 die Hypothese auf, dass die effektivsten Enzymhemmstoffe solche Moleküle sein müssten, die dem Übergangszustand der enzymatischen Reaktion ähneln. Diese werden als Übergangszustandsanaloga ("transition state analoga") bezeichnet. Seine Annahme konnte an der Isomerisierung von L-Prolin (1) zu D-Prolin (3) durch die Prolinracemase bestätigt werden (Abbildung 4).

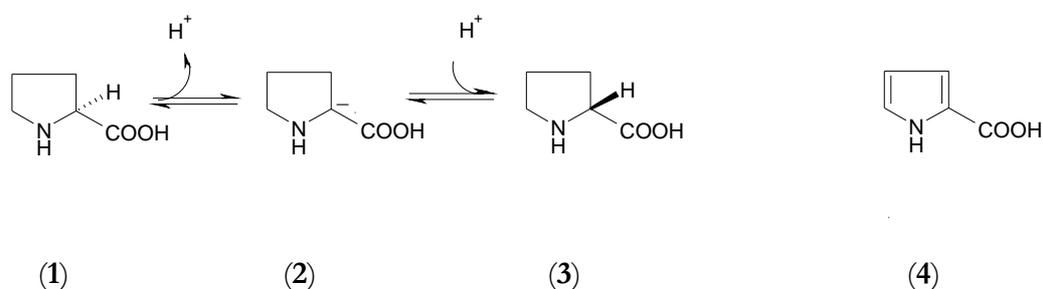


Abbildung 4: Inhibierung einer Isomerisierungsreaktion durch Übergangszustandsanaloga

Bei dieser Racemisierung wird aus einem tetraedrischen α -Kohlenstoff unter Abspaltung eines Protons ein trigonaler Übergangszustand (2) gebildet. Dieser ist planar, negativ geladen und kann von beiden Seiten angegriffen werden. Abhängig davon, von welcher Seite der Angriff erfolgt, bildet sich das L- oder D-Isomer. Die Pyrrol-2-carbonsäure (4) besitzt einen trigonal-planaren, nicht geladenen α -Kohlenstoff und bindet 160mal stärker an die Racemase als Prolin. Demzufolge kann (4) als "transition state analogon" (TSA) dieser Isomerisierung angesehen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass viele Enzyme über aktive Zentren verfügen, die sterisch und elektronisch komplementär zu dem Übergangszustand sind und von den TSA gehemmt werden, wurde von Jencks vorgeschlagen, diese zum Prägen von Antikörpern (Immunoproteinen) zu verwenden, um katalytische Eigenschaften bei diesen zu induzieren [5].

2.1.4 Katalytisch aktive Antikörper

Das erste Mal wurde diese Idee an der Acyl-Übertragungsreaktion experimentell demonstriert. Es handelt sich hierbei um eine einfache, detailliert untersuchte chemische Reaktion, bei der sich die sterische und elektronische Natur des Übergangszustands (tetraedrisch und negativ geladen) wesentlich von der des Substrats (planar und neutral) unterscheidet. Durch stabile Phosphate, Phosphonate und Phosphonamide, die als Inhibitoren für einige Acyl-Transferasen bekannt sind, werden die Eigenschaften des TS gut wiedergegeben [6,7] und können als Antigen katalytische Eigenschaften bei einem Antikörper induzieren. Antikörper, spezifisch für diese TSA, wirken wie Katalysatoren mit einer Beschleunigungsrate, die 10^3 bis 10^4 Größenordnungen höher als die der unkatalysierten Reaktion liegt [8,9]. Die Antikörper befolgen die Michaelis-Menten-Kinetik, zeigen Substratspezifität und binden TSA viel stärker als das Substrat.

Um eine einfache Kinetik sowie eine einfache mechanistische und strukturelle Charakterisierung der katalytischen Antikörper und deren reproduzierbare Herstellung zu gewährleisten, werden monoklonale Antikörper eingesetzt, die sich nach der Methode von Milstein und Köhler mit Myelomzellen einfach herstellen lassen [10]. Im Unterschied zu den polyklonalen Antikörpern sind die monoklonalen Antikörper identisch und erkennen auf dem Antigen nur eine spezielle Gruppe oder eine Gruppierung von Aminosäuren, die als antigene Determinate oder als Epitop bezeichnet wird.

Seitdem die ersten Experimente durchgeführt wurden, gibt es mehr als 20 Acyl-Übertragungsreaktionen, die mit geprägten Antikörpern erfolgreich katalysiert werden konnten. außerdem hat diese Methode den einfachen Zugang zu geeigneten Katalysatoren ermöglicht, für die es in der Natur keine Analoga gibt.

Es wurde lange spekuliert, ob sich die Natur beim Aufbau einiger Sekundärmetabolite der Diels-Alder-Reaktionen (DA-Reaktionen)* bedient. Die Tatsache, dass bei den vorkommenden Naturstoffen, die möglicherweise durch diese Reaktionen gebildet werden, eine von mehreren energetisch gleichwertigen Konfigurationen bevorzugt wird, führte relativ früh zur Postulierung einer enzymatischen Katalyse dieser Reaktionen. Gleichzeitig wurde deutlich, dass ein solches Enzym, das einen dem Produkt der Reaktion strukturell sehr ähnlichen Übergangszustand stabilisieren kann, gleichzeitig eine große Affinität zu dem Produkt aufweisen und dadurch selbst inhibiert würde. Seitdem zwei natürlich vorkommende Diels-Alderasen isoliert worden sind [11,12], zählen die DA-Reaktionen auch zu den Biosynthesereaktionen.

Die Voraussetzung für eine enzymanaloge Katalyse der DA-Reaktionen ist, dass eine potentielle, durch das Produkt hervorgerufene Katalysatorinhibierung verhindert wird. So könnte bei der DA-Katalyse mit einem makrozyklischen Porphyrin theoretisch eine 20000fache Beschleunigung der Reaktion erzielt werden. Tatsächlich aber wurden aufgrund der Katalysatorinhibierung durch das Produkt kleinere Wechselzahlen (1000fach) beobachtet [13-16].

Hilvert et al. berichteten 1989 erstmals über die Katalyse einer DA-Reaktion durch Antikörper [17]. Die monoklonalen Antikörper wurden gegen das Hapten (9) geprägt, welches dem Übergangszustand der DA-Reaktion zwischen dem Tetrachlorothiophendioxid (5) und N-Ethylmaleimid (6) entspricht (Abbildung 5). Die Katalysatorinhibierung durch das Produkt wurde dadurch verhindert, dass ein labiles Cycloaddukt (7) als Zwischenprodukt gebildet wurde. Dieses spaltet das SO₂ schnell ab und führt zu einem Produkt (8), das dem Übergangszustand nicht mehr ähnelt und aus diesem Grund am Katalysator nicht haftet.

* Professor Otto Diels, 1876-1954, Universität Kiel, Nobelpreis 1950; Professor Kurt Alder, 1902-1958, Universität Köln, Nobelpreis 1950.

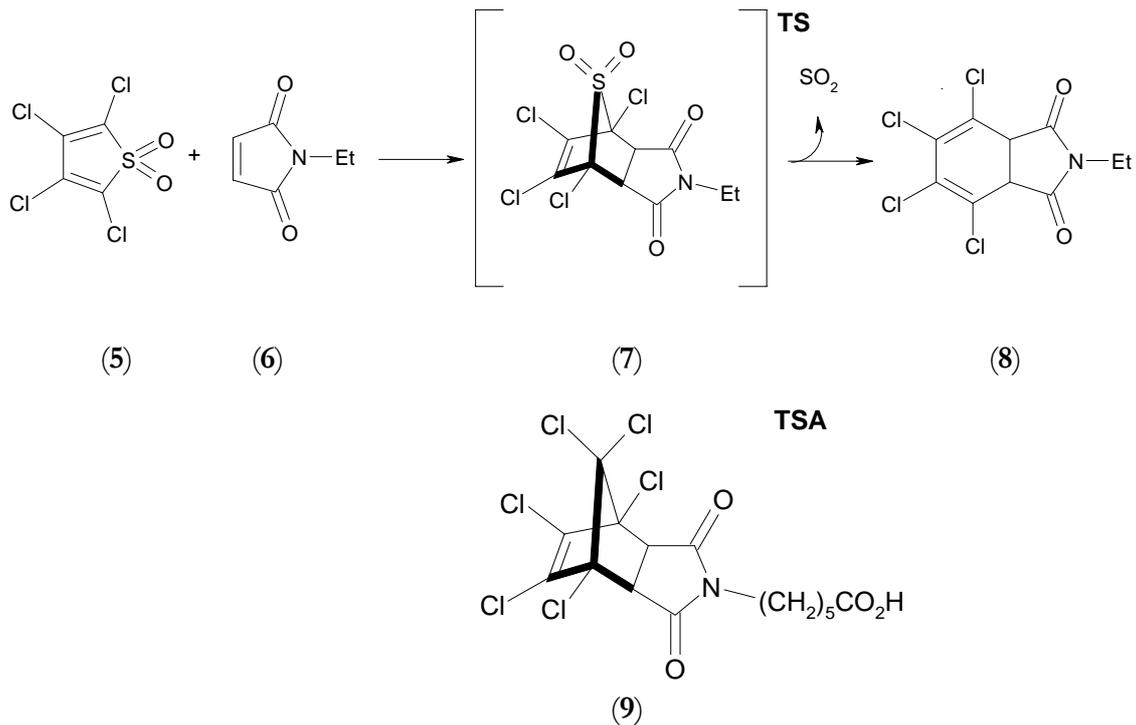


Abbildung 5: Katalyse von Diels-Alder-Reaktionen mit Antikörper nach Hilvert

Für eine ähnliche DA-Reaktion wurde mit geprägten Antikörpern eine katalytische Effizienz ($k_{\text{kat}}/k_{\text{unkat}}$) von 10^2 M erzielt. In diesem Fall liegt diese fünf Größenordnungen höher als die maximale Löslichkeit von TCTD in Wasser [18]. Mit einem wasserlöslichen TCTD-Derivat ließ sich die katalytische Aktivität der Antikörper auf 10^3 M erhöhen [19]. Im Vergleich zu anderen Antikörpern, die einen katalytischen Effekt um 10 M aufweisen [20,21,22,23], ist somit die katalytische Effizienz der Diels-Alderasen relativ hoch. Allerdings wurde die maximale katalytische Wirkung auf 10^8 M geschätzt [24]. Somit stellen die Löslichkeit der Substrate in Wasser sowie die Empfindlichkeit der Antikörper gegenüber organischen Lösungsmitteln die limitierenden Faktoren bei der Katalyse mit Antikörpern dar.

Um die Katalysatorinhibierung durch das Produkt zu vermeiden, wurde von Braisted und Schultz ein anderer Ansatz entwickelt [25]. Durch die Ethanobrücke wurde der Cyclohexenring des Haptens (14) in eine Konformation gezwungen, die den Übergangszustand der DA-Reaktion (12) zwischen dem acyclischen Dien (10) und dem Dienophil (11) gut beschreibt (Abbildung 6). Die verdrehte Sesselkonformation, die durch das Bicyclo[2.2.2]haptan induziert wird, wird von dem Produkt (13) der starren Boots-konformation vorgezogen und ermöglicht damit das Ablösen von der aktiven Stelle des Antikörpers. Bei der anschließenden Strukturaufklärung dieses katalytisch aktiven Antikörpers im Komplex mit dem verwendeten Hapten wurden 89 Van-der-Waals Wechselwirkungen und zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Antikörper und dem Hapten nachgewiesen, durch die das Dienophil anscheinend aktiviert wird [26].

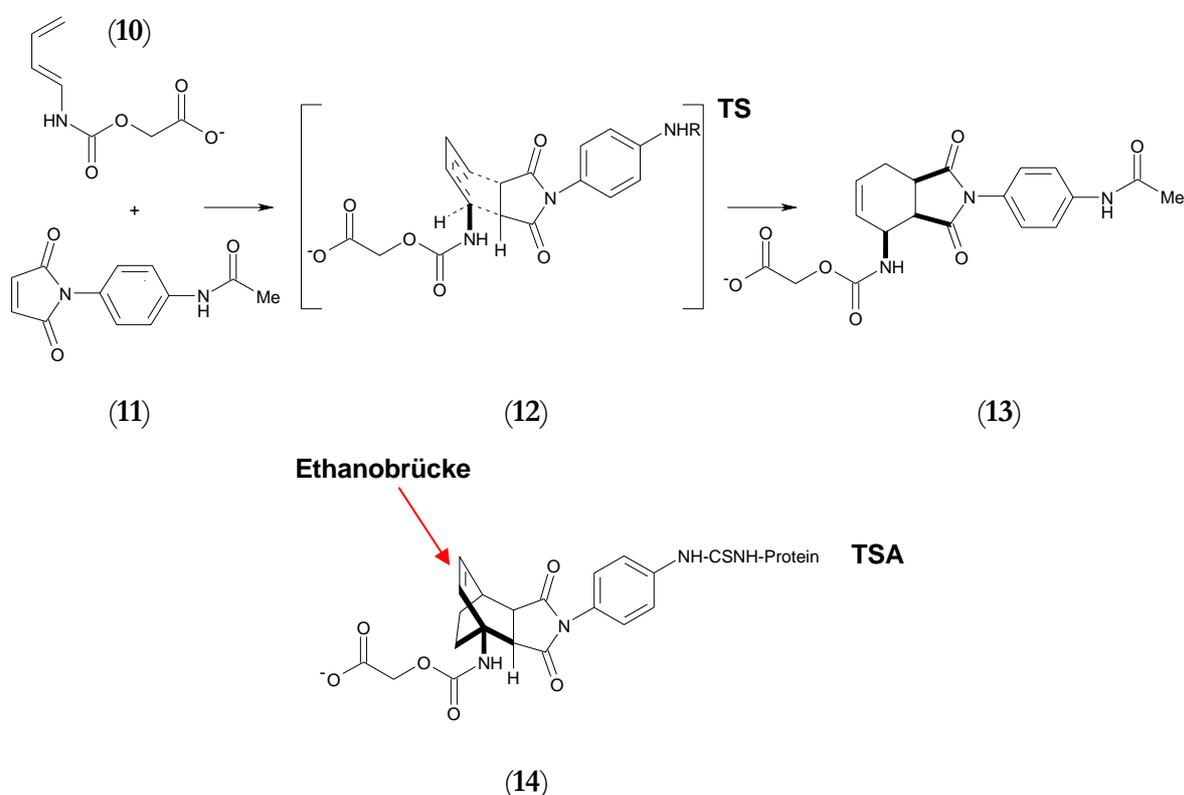
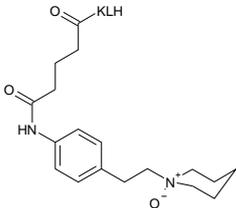
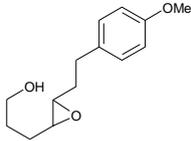
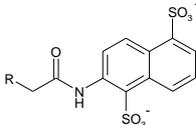
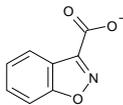
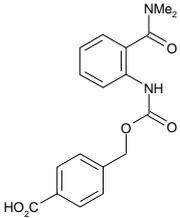
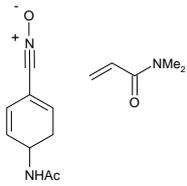
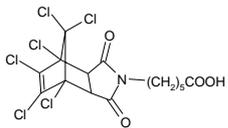
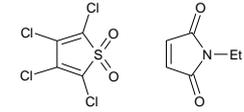
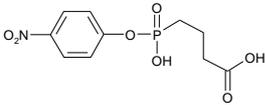
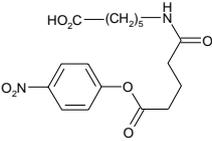


Abbildung 6: Katalyse der DA-Reaktion mit geprägten Antikörpern nach Braisted und Schulz

Obwohl bei katalytisch aktiven monoklonalen Antikörpern (Tabelle 2) die Möglichkeit besteht, diese unter den in lebenden Zellen nicht vorkommenden Bedingungen reagieren zu lassen, z.B. Oxidationen mit NaAlO_4 [27,28] und Reduktionen mit LiBH_4 [27,29], müssen bei deren Einsatz als Katalysatoren die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Proteine berücksichtigt werden (z.B.: Abhängigkeit der Aktivität und Stabilität von pH-Wert, Temperatur, organischen Lösungsmitteln, Ionenstärke, Cofaktoren, etc.), wodurch deren Verwendbarkeit drastisch eingeschränkt wird.

Tabelle 2: Katalytisch aktive Antikörper für verschiedenen Reaktionstypen

Antigen (TSA)	Substrat	k_{kat}/K_M $\text{l s}^{-1} \text{mmol}^{-1}$	Referenz
Reaktion des Epoxyalkohols			
		76	[30]
Decarboxylierung			
		1686	[31]
1,3-Dipolare Cycloaddition			
		100 bzw. 59	[32]
Diels-Alder-Reaktion			
		3,4	[33]
Esterhydrolyse			
		22	[34]

2.2 Molekulares Prägen von Polymeren

2.2.1 Standardmethode zur MIP-Herstellung

2.2.1.1 Prinzip des molekularen Prägens

Das molekulare Prägen ist ein Verfahren zur Herstellung von Polymeren mit molekularen Abdrücken so genannter Templat-Moleküle. Dazu werden an bestimmten Stellen des als Schablone verwendeten Templats, Bindungen (kovalente oder nicht-kovalente) mit funktionellen Monomeren (z.B. MAA, MMA, Styrol) ausgebildet (Abbildung 7, Selbstorganisation). Dieser Komplex wird dann in Gegenwart eines organischen Lösungsmittels durch eine Copolymerisation mit geeigneten Quervernetzern (z.B. EGDMA, TRIM, DVB) stabilisiert (Abbildung 7, Copolymerisation). Anschließend wird die Schablone aus der vernetzten Polymermatrix mit einem geeigneten Lösungsmittel herausgewaschen bzw. extrahiert (Abbildung 7, Eluierung). Die zurückbleibenden Hohlräume (Prägungen) weisen eine zum Templat komplementäre Form und entsprechende Bindungsstellen auf. Beide Effekte begründen die Affinität der Prägungen zum Templat-Molekül bei erneutem Kontakt mit diesem.

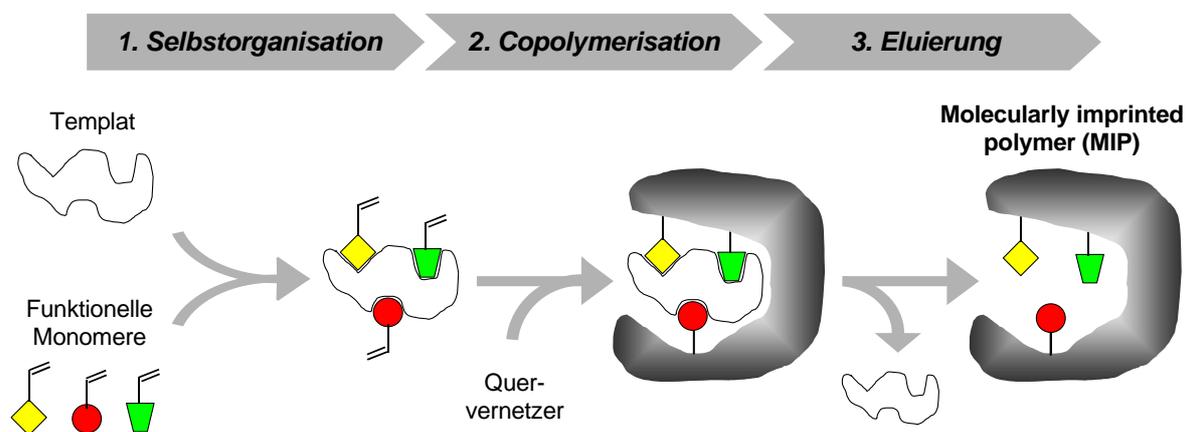


Abbildung 7: Prinzip des molekularen Prägens

Diese erhöhte Affinität wird im Bezug auf ein Kontrollpolymer (CP) betrachtet, welches nach der Rezeptur des MIP jedoch ohne Templat hergestellt wird. Damit wird sicher gestellt, dass die Affinität nicht durch die statistisch verteilten funktionellen Gruppen der Monomere beeinflusst wird, sondern tatsächlich auf das Prägen zurückzuführen ist. Vielfach werden zur Bildung des Referenzmaterials ebenfalls Template meist Strukturanaloga des eigentlichen Templats verwendet, da in Abwesenheit des Templats die Copolymerisation z.T. anders verläuft und zu Polymeren mit anderen z.B. morphologischen Eigenschaften führen kann. Die Verwendung solcher Template ist mit dem Risiko behaftet, dass dadurch störend ähnliche Prägeeffekte hervorgerufen werden können.

Zur Evaluierung der Affinität zum verwendeten Templat eignet sich die Flüssigkeitschromatographie (HPLC). Dazu werden die als Massepolymere hergestellten MIPs bzw. CPs zunächst aufgearbeitet, so dass diese als stationäre Phasen in der HPLC fungieren können. Anschließend wird das Templat bei der affinitätschromatographischen Messung als Analyt verwendet, dem ein wenig Aceton als Marker zugesetzt wird. Aus den erhaltenen Chromatogrammen wird die Retentionszeit der beiden Komponenten bestimmt.

Daraus kann der Kapazitätsfaktor nach Gl. 21 kalkuliert werden:

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0} \quad \text{Gl. 21}$$

wobei k' der Kapazitätsfaktor, t die Retentionszeit des Templats und t_0 die Retentionszeit des Acetons ist. Als Trennfaktor α wird das Verhältnis der Kapazitätsfaktoren des MIP und des CP bezeichnet (Gl. 22):

$$\alpha = \frac{k'_{\text{MIP}}}{k'_{\text{CP}}} \quad \text{Gl. 22}$$

Hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen Templat und Monomeren wurden seit den Anfängen dieser Technik zwei unterschiedliche Wege verfolgt. Von G. Wulff und K.J. Shea wurden kovalente Bindungen der Template mit den Monomeren bevorzugt, während K. Mosbach hauptsächlich auf nicht-kovalente Wechselwirkungen setzte (ionische Wechselwirkungen, H-Brücken, hydrophobe Wechselwirkungen). Eine kovalente Bindung führt oft zu einer besseren Spezifität des Hohlräume [35], ist jedoch auf wenige Systeme übertragbar, da die Bindung reversibel sein muss und die Bindungen sehr schnell geknüpft und gelöst werden müssen. Nach den Arbeiten von Wulff erwiesen sich unter den genannten Gesichtspunkten die Vinylboronsäureester als ideal für die kovalente Bindung des Templates an die Polymermatrix (Abbildung 8, links) [35-42].

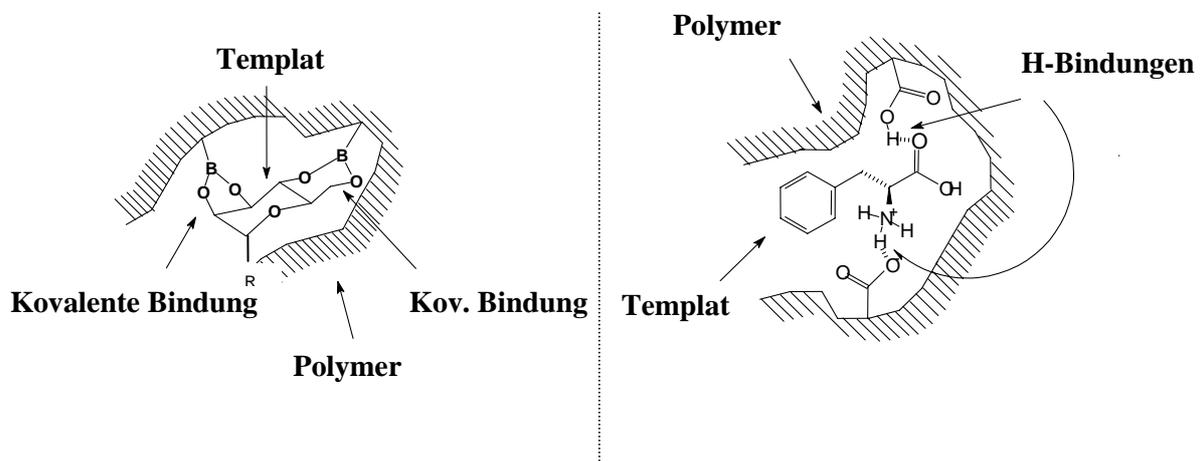


Abbildung 8: kovalente (links) und nicht-kovalente (rechts) Bindung des Templates an die Polymermatrix

Die nicht-kovalente Methode erlaubt dagegen den Einsatz einer Vielfalt an funktionellen Monomeren, die sich um das Templat über eine Selbstorganisation ("self-assembly") anordnen. Da die nicht-kovalenten Bindungen zwischen dem Templat und den funktionellen Monomeren (Abbildung 8, rechts) schwächer sind (ca. 20mal), werden die Monomere im Überschuss verwendet. Daraus resultieren in den meisten Fällen Hohlräume mangelnder Spezifität; z.T. können lediglich 15 % der Hohlräume mit dem Templat wiederbelegt werden [43,44], die allerdings hoch selektiv sind [45]. Positive Auswirkung hat dagegen der potentiell bedeutend schnellere Templateaustausch, der ausschlaggebend für die chromatographischen Anwendungen ist. Darüber hinaus scheint die nicht-kovalente Methode die Wechselwirkungen in biologischen Prozessen besser abzubilden, z.B. treten bei der Basenpaarung der DNS "Vielfach-Wechselwirkungen" auf, die bis zu drei H-Brücken mit sechs Zentren beinhalten können.

Die geringe Kapazität der Hohlräume kann als Stabilitätsverlust nach der Templatextraktion, wodurch die Hohlräume zusammen schrumpfen und eine Wiederaufnahme des Templats erschwert wird [46-48], oder als unzureichende Porosität der Matrix interpretiert werden, so dass die Hohlräume im Polymer nur schwer zugänglich bleiben. Grundsätzlich können poröse Polymernetzwerke z.B. durch eine dispersive Polymerisation, unter Verwendung eines passenden Lösungsmittels produziert werden. Das Lösungsmittel soll bezüglich der Mischbarkeit mit dem Monomer bzw. dem Polymer ein thermodynamisch gutes Lösungsmittel für das Monomer, aber ein schlechtes Lösungsmittel für das Polymer sein. Während der Polymerisation führt das Lösungsmittel zu einer Phasentrennung und damit zur Bildung kleiner Poren, weshalb dieses als Porogen bezeichnet wird. Wie sich in Abbildung 9 erkennen lässt, besitzen poröse Polymere Nuclei von 100-200 nm Durchmesser und Makroporen von 20-50 nm, die einerseits einen Stofftransport durch das Polymernetzwerk hindurch und andererseits den Zugang zu den aktiven Prägungen erlauben [38].

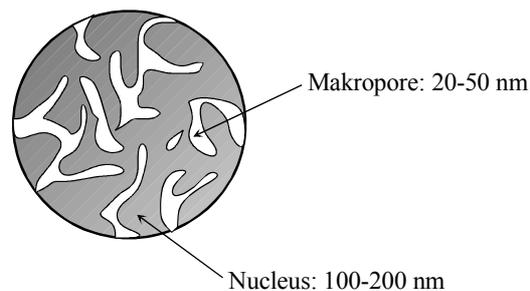


Abbildung 9: Poröse Polymere

An die Struktur der Polymermatrix werden die folgenden Anforderungen gestellt:

- Nach dem Entfernen der Matrizenmoleküle sind die Polymernetzwerke steif genug, um die Form ihrer Hohlräume beibehalten zu können, die mit einer hohen Templatepezifität zusammenhängt.
- Die Polymerstruktur ist dennoch flexibel, damit die schnelle Gleichgewichtseinstellung bei der Einlagerung des Templats in den Hohlraum erreicht werden kann.
- Möglichst viele Hohlräume sind gut zugänglich, d.h. sie liegen nicht tief im Polymerinneren, sondern an der inneren Oberfläche der Poren.
- Die vernetzten Polymerpartikel müssen mechanisch und thermisch stabil sein, da die Stabilität für viele Anwendungen von grundlegender Bedeutung ist, z.B. in HPLC-Säulen bei hohen Drücken.

2.2.1.2 MIPs in der analytischen Chemie

Unabhängig von der Art der Templatanbindung (kovalent oder nicht-kovalent) entstehen in beiden Fällen beim Prägen künstliche Rezeptoren, so genannte "plastibodies", die das Templat auf molekularer Ebene erkennen und deshalb in der Analytik zu folgenden Zwecken genutzt werden können:

- Separation:
 - Chromatographie [49-53],
 - Festphasenextraktion [54-60],
 - Kapillarelektrochromatographie [61-66],
- Nachweis- und Quantifizierungsassays [67-77]
- Sensoren [78-86]

Zusätzlich weisen diese Rezeptoren gegenüber den biologischen Antikörpern wesentliche Vorteile auf, wie beispielsweise geringe Herstellungskosten, deutlich erhöhte Haltbarkeit und zudem hohe Selektivität.

Separation

Für den Einsatz in der Lebensmittelanalytik wurden z.B. stationäre Phasen für die HPLC basierend auf MIPs entwickelt, indem mit dem β -Lactam-Antibiotikum Oxacillin (Abbildung 10) geprägte Polymere in HPLC-Säulen gepackt und für die Trennung des Oxacillins (**15**) aus einer Mischung strukturverwandter Antibiotika (Penicillin V, Penicillin G und Oxacillin) verwendet wurden [52,53].

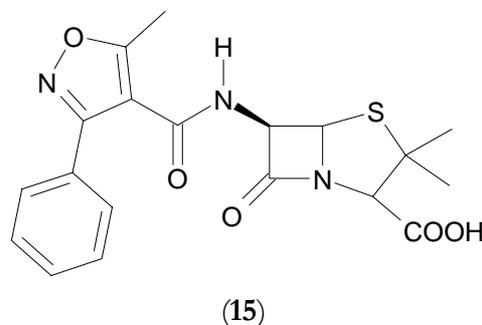


Abbildung 10: Struktur des Oxacillins (**15**)

Innerhalb der Gruppe der β -Lactam-Antibiotika konnte im Gegensatz zum CP unter Verwendung des MIP in Kombination mit bisher nur wenig eingesetzten wässrigen mobilen Phasen eine Basislinienseparation des Oxacillins von den strukturverwandten Penicillinen erreicht werden.

Die Festphasenextraktion (SPE) eignet sich zur Anreicherung des Analyten aus komplexen Matrices, da zwischen dem Zielmolekül und einer für dieses Zielmolekül spezifischen Festphase Wechselwirkungen auftreten, die zu seiner Retardierung im Vergleich zu dem Matrixrest führen.

Ein gutes Beispiel hierfür ist die quantitative Bestimmung des in einer Rinderleber angesammelten Herbizids Atrazin. Zuerst wurde das Atrazin aus der Leber mit Chloroform extrahiert und dann mit Hilfe der atrazin-spezifischen MIPs aufkonzentriert und gereinigt. Nach der Anreicherung des Analyten ($19 \mu\text{mol g}^{-1}$) wurde dieses vom Polymer mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert. Der Wiedergewinnungsanteil des Atrazins aus der Lösung wurde durch diesen zusätzlichen Schritt von 60,9 auf 88,7 % in einer RP-HPLC Quantifizierung bzw. von 79,6 auf 92,8 % in einem ELISA-Test erhöht. Gleichzeitig konnte durch die Beseitigung der störenden Komponenten eine Basislinientrennung des Atrazins erreicht werden und damit die Messgenauigkeit der HPLC Methode deutlich verbessert werden [60].

Beim Einsatz der MIPs als Materialien zur SPE stellt das "Ausbluten" des Templats ein großes Problem für die Analytik dar. Selbst nach einer intensiven Templatextraktion verbleibt noch Templat in der Polymermatrix, welches bei der Anwendung in kleinen Mengen über einen langen Zeitraum ausgewaschen wird. Dies führt zu einem nachteiligen Einfluss besonders dann, wenn die MIPs in der Spuren- und Ultra-Spuren-Analyse verwendet werden. Um das Problem des "Ausblutens" zu beheben, können statt des Analyten seine Strukturanaloga als Templat verwendet werden [56].

Nachweis- und Quantifizierungsassays

Die ersten Versuche, in denen Antikörper in Radio- (Radioimmunoassay RIA) und Enzymimmunoassays (Enzymimmunoassay EIA) durch MIPs ersetzt wurden, befassten sich mit dem bronchodilatatorischen Medikament Theophyllin und dem Beruhigungsmittel Diazepam [67]. Mittlerweile gibt es Immunoassays mit MIPs auch für andere Medikamente [68,69], Herbizide [70,71] und Corticosteroide [72]. Zum Nachweis der Bindung wurden fluoreszierende [73] und elektrochemisch aktive Proben [74] eingesetzt. Die Bindungen wurden ebenfalls über die Kolorimetrie [75,76] und Chemilumineszenz [76] detektiert.

Eine elegante Methode, Indikatorgruppen in das Polymer einzuführen, stellt der Einbau von scintillierendem Fluor in das MIP durch Copolymerisation dar. Bei einer Bestrahlung des scintillierenden Fluors mit β -Strahlen wurde die emittierte Fluoreszenz mittels eines Sekundärelektronenvervielfachers quantifiziert. Solange sich in der Nähe von scintillierendem Fluor, das dicht an der Bindungsstelle im MIP liegt, ein radioaktiver Analyt befindet, kommt es zu seiner Anregung und das fluoreszente Licht wird emittiert. Die Verdrängung des radioaktiv markierten Analyten von der Bindungsstelle am MIP durch den unradioaktiven führt dazu, dass dieses das Fluor aus der Lösung wegen der zu großen Entfernung nicht mehr in den angeregten Zustand überführen kann, so dass eine geringere Fluoreszenz proportional zu der Menge des gebundenen Analyten auftritt [77]. Der Vorteil dieser Methode ist, dass für die Testauswertung die gebundene Fraktion des markierten Analyten von der ungebundenen nicht abgetrennt werden muss, wie man es von den meisten Immunotests kennt.

Sensoren

Anstelle von Biomolekülen können MIPs als Erkennungselemente in chemischen Sensoren und Biosensoren verwendet werden. Durch das Binden des Analyten an dem Erkennungselement wird ein chemisches (durch Veränderung der IR-Spektren) oder physikalisches Signal (durch Massezunahme oder Adsorptionswärme) ausgelöst und von einem Umwandler in das Ausgangssignal umgeformt, das sich quantitativ auswerten lässt. Auch spezielle Eigenschaften des Analyten (z.B. Fluoreszenz oder elektrochemische Aktivität) können für die Detektion der Bindung ausgenutzt werden.

Als Signalumwandler wird in der Regel die Quarzmikrowaage verwendet, um den MIP-Sensor zu konstruieren. Für einen glucoseempfindlichen Sensor wurde das Polymer Poly(o-phenylenediamin) direkt an der Oberfläche einer Goldelektrode synthetisiert, so dass eine dünne Polymerschicht erhalten wurde, die Glucose selektiv wiederbinden konnte [85].

Die umgewandelten Signale sind größtenteils zweidimensional und bieten nur begrenzt Informationen über die Zusammensetzung der Probe. "Intelligente" Umwandlungssysteme, die Signale mit mehr Eigeninformationen enthalten, konnten erreicht werden, wenn die hohe molekulare Spezifität im mittleren Infrarotgebiet ausgenutzt wurde ($3500 - 500 \text{ cm}^{-1}$). Die mit dem Herbizid 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure erzeugten MIP-Filme wurden auf ein Zinkselenid (ZnSe) ATR Element aufgetragen, das anschließend in eine Durchflusszelle eingebaut wurde. Die Anreicherung des Herbizids in der MIP-Schicht wurde online durch IR-Messungen verfolgt [86].

2.2.1.3 Plastizyme

Katalytisch aktive, geprägte Polymere, auch Plastizyme ("plastizymes") genannt, werden analog zu katalytisch aktiven Antikörpern (Abschnitt 2.1.4) mit dem Übergangszustandanalogon TSA einer chemischen Reaktion quasi als Antigen synthetisiert. Die Funktionalitäten der Monomere werden nach dem Kriterium ausgewählt, dass sie den katalytischen Gruppen der für die Zielreaktion geeigneten Enzyme in aktiven Zentren entsprechen. Zu dem sollen die funktionellen Gruppen während des Prägens mit dem Templat über die Bindungsstellen wechselwirken können, so dass diese Gruppen bei der Anwendung des Polymers in Doppelfunktion als Bindungsstellen und katalytisch aktive Gruppen fungieren.

Auf dem Mechanismus der katalytischen Triaden (Abschnitt 2.1.3) basiert auch die Esterspaltung durch eine Acetylcholinesterase, so dass ihr aktives Zentrum auf Basis dieses Mechanismus in MIPs nachgeahmt werden kann.

In den ersten Versuchen wurden Histamine, die der Aminosäure Histidin in der katalytischen Triade entsprechen, auf einer festen Phase (Sephadex) immobilisiert und in der Hydrolyse von aktivierten Estern effizient eingesetzt [87]. Ebenfalls polymergebundene Imidazole, die ausschlaggebend für die katalytische Aktivität des Histidins sind (Abschnitt 2.1.3), führten zu einer Beschleunigung der Esterhydrolyse im Vergleich zu freien Imidazolen [88]. Enzymähnliche Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Hydrolyse von p-Nitrophenylcapronat zeigten auch die synthetisierten Poly(ethylenimine) [89]. Als Weiterentwicklung wurde die Immobilisierung der geeigneten funktionellen Gruppen an ein Polymernetzwerk mit der Technik des molekularen Prägens erreicht.

An zwei von Übergangsmetallionen (Co^{2+}) komplexierte Template, Derivate der N-geschützten Aminosäuren, wurden jeweils mehrere 4-(5)-Vinylimidazol nicht-kovalent gebunden, die damit Histidine in den aktiven Zentren der MIPs ersetzen. Die Copolymerisation mit Divinylbenzol führte zu einer Polymermatrix, die nach der Templatextraktion zum p-Nitrophenylester der jeweiligen Aminosäure zugegeben wurde. Vom Polymer wurde das zum Templat analoge Substrat wiedererkannt, da dieses schneller als das nicht templat-ähnliche Substrat umgesetzt wurde. Auf die katalytische Aktivität der im Polymer gebundenen Imidazolgruppen deutete die bei einem Substratüberschuss über die Reaktionszeit ermittelte Wechselzahl. Diese lag deutlich höher als bei dem nicht gebundenen Imidazol in Lösung [90]. Mit Phosphonaten als TSA wurden z.T. sogar wasserlösliche stereoselektive Katalysatoren [91] erzeugt, die die Hydrolyse um Faktoren bis über drei beschleunigen konnten [91,92].

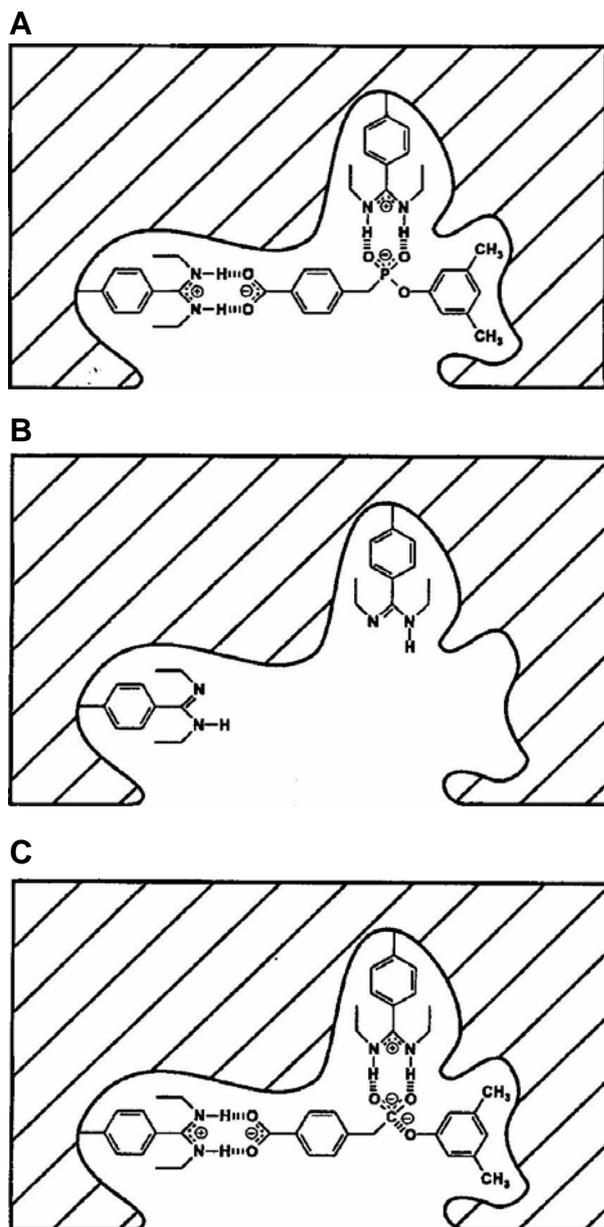


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Hohlraums:
 A) beim Prägen mit einem Phosphorsäuremonoester als Templat,
 B) nach der Abspaltung des Templats
 C) bei der Stabilisierung des Übergangszustands der Reaktion

Eine über 100fache Beschleunigung wurde von Wulff et al. für die basische Esterhydrolyse eines Homoterephthalsäureesters unter Verwendung von Amidinresten erzielt [93]. Als Templat wurde ein Phosphorsäuremonoester eingesetzt (Abbildung 11A), mit dem bereits mehrmals katalytisch aktive, monoklonale Antikörper erfolgreich isoliert wurden. In unpolaren Lösungsmitteln bildet der Phosphorsäuremonoester mit zwei Äquivalenten der polymerisierbaren Amidinverbindung (p-N,N'-Diethyl-amidinstyrol) das Bisamidiniumsalz. Dieses Salz wurde in Gegenwart eines Inertlösungsmittels (THF) mit EGDMA als Vernetzer copolymerisiert. Nach der Abspaltung des Templats blieb ein Hohlraum mit zwei Diethylamidinresten zurück (Abbildung 11B), die den Übergangszustand der basischen Esterhydrolyse mittels Wasserstoffbrücken ideal stabilisieren konnten (Abbildung 11C).

Die bislang stärkste katalytische Beschleunigung (270fach) für molekular geprägte Polymere wurde für die Diels-Alder-Reaktion (DA-Reaktion) zwischen Tetrachlorothiophendioxid (TCTD) (**5**) und Maleinsäureanhydrid (MSA) (**16**) erzielt, die eine langsame [4+2] Cycloaddition des konjugierten Diens an das Dienophil und eine rasche chelotropische SO_2 -Eliminierung aus dem als Zwischenprodukt entstandenen Cyclohexenderivat (**17**) umfasst (Abbildung 12). Bei der dargestellten DA-Reaktion, wie auch bei den vergleichbaren Reaktionen (Abschnitt 2.1.4), unterscheidet sich das Produkt (**18**) hinsichtlich seiner Struktur sehr von dem Übergangszustand des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts, so dass keine Inhibierung des Katalysators durch das Produkt auftritt.

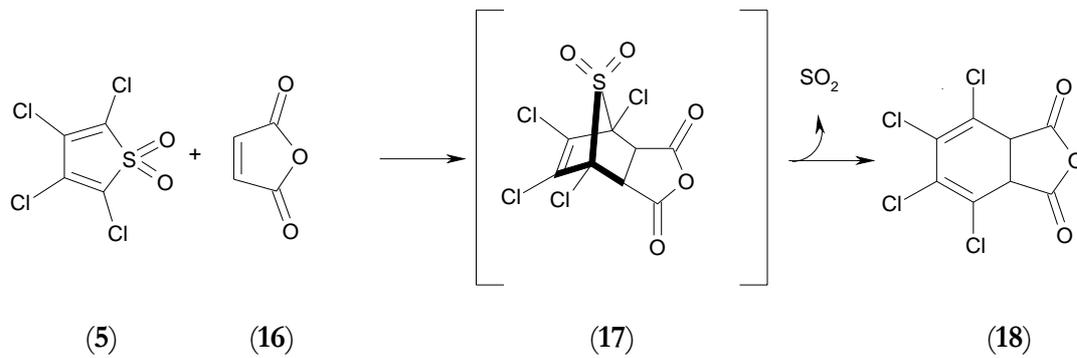


Abbildung 12: Diels-Alder Reaktion zwischen TCTD und MSA

Für die dargestellte Reaktion (Abbildung 12) wurde der MIP-Katalysator nach der Standardmethode bereits synthetisiert und im Acetonitril auf seine Affinität zum "transition state analogue" und seine katalytische Aktivität überprüft [94]. Als TSA wurde das Chlorendinesäureanhydrid (CA) eingesetzt (Abbildung 13), das geometrisch einschließlich der Bootkonformation des Cyclohexenrings dem Zwischenprodukt (17) entspricht, mit dem einzigen Unterschied an der Norbornenspitze, an der eine Dichlormethylen-Gruppe anstelle der SO_2 -Gruppe gebunden ist.

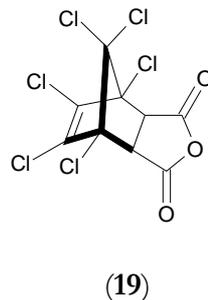


Abbildung 13: 1,4,5,6,7,7-Hexachloro-5-norbornene-2,3-dicarbonsäure anhydrid (TSA)

Für das aufgearbeitete MIP, aus Methacrylsäure und Ethylenglycoldimethacrylat copolymerisiert, wurde während der Katalyse in Acetonitril eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{imp} von $0,63 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_M = 42,5 \text{ mM}$ ermittelt [94].

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die wichtigsten von MIP katalysierten Reaktionen:

Tabelle 3: Die wichtigsten von MIPs katalysierten Reaktionen im Überblick

<i>Templat (TSA)</i>	<i>Substrat</i>	<i>Rel. kat. Effekt</i>	<i>Referenz</i>
Hydrolyse			
Derivate N-Boc-Aminosäuren	Nitrophenylester	$k_{\text{imp}}/k_{\text{non-imp}}=4-5$	[90]
p-Nitrophenylmethylphosphonat	p-Nitrophenolacetat	$k_{\text{imp}}/k_{\text{non-imp}}=1,6$	[95]
Phosphonat	Aminosäureester	$k_{\text{imp}}/k_{\text{unkat}}=3$	[91,92]
Phosphonat	Carbonsäureester	$k_{\text{imp}}/k_{\text{unkat}}\approx 100$	[93]
Phosphonat	Aminosäureester	$k_{\text{imp}}/k_{\text{non-imp}}=2,54$	[96]
Dehydrofluorierung			
N-Benzylisopropylamin	4-Fluoro-4-(p-nitrophenyl)-2-butanon	$k_{\text{imp}}/k_{\text{non-imp}}<2,4$	[97]
Benzylmalonsäure	4-Fluoro-4-(p-nitrophenyl)-2-butanon	$k_{\text{imp}}/k_{\text{con-imp}}<3,5$	[98]
N-Methyl-N-(4-nitrobenzyl)- δ -aminovaleriansäure	4-Fluoro-4-(p-nitrophenyl)-2-butanon	$k_{\text{imp}}/k_{\text{unkat}}=3,3$	[99]
N-Isopropyl-N-p-nitrobenzylamin	4-Fluoro-4-(p-nitrophenyl)-2-butanon	$k_{\text{imp}}/k_{\text{con-imp}}=3,27$	[100]
N-Benzyl-N-isopropylamin	4-Fluoro-4-(p-nitrophenyl)-2-butanon	$k_{\text{imp}}/k_{\text{con-imp}}=5,97$	[101]
Diels-Alder-Reaktion			
Chlorendinesäureanhydrid	Tetrachlorothiophendioxid und Maleinsäureanhydrid	$(k_{\text{imp}}-k_{\text{non-imp}})/k_{\text{unkat}}=270$	[94]
Aldol-Kondensation			
Dibenzoylmethan (DBM) + Co^{2+}	Acetophenon und Benzaldehyd	$r_{(\text{DBM}/\text{Co}^{2+}\text{-MIP})}/r_{(\text{Co}^{2+}\text{-MIP})} \leq 2$	[102]
Isomerisierung			
Indol	Benzisoxazol	$k_{\text{imp}}/k_{\text{non-imp}}=7,2$	[103]
Suzuki-Reaktion			
Pd-Ligand-Komplex	p-Bromanisol und Phenylboronsäure	-	[104]
Reduktion			
Rh(III)cyclopentadien-Komplex	Acetophenon	-	[105,106]

Legende:**Geschwindigkeitskonstanten** k_{imp} $k_{\text{non-imp}}$ $k_{\text{con-imp}}$ k_{unkat} **Reaktionsgeschwindigkeiten** $r_{(\text{DBM}/\text{Co}^{2+}\text{-MIP})}$ $r_{(\text{Co}^{2+}\text{-MIP})}$

ermittelt unter Verwendung des:

geprägten Polymers (MIP)

nicht-geprägten Polymers (CP)

MIP geprägt mit einem, dem Original-Templat verwandten Templat

kein Katalysator eingesetzt

MIP, geprägt mit Templat und Komplexbildner

MIP, geprägt mit ausschliesslich dem Komplexbildner

2.2.2 Immobilisierung von Templaten

Katalytisch wirksame, molekular geprägte Polymere haben im Gegensatz zu Enzymen und geprägten Antikörpern aktive Zentren, die aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl an funktionellen Gruppen eine variable Bindungsstärke, Selektivität und katalytische Aktivität aufweisen bzw. polyklonal sind. Bisher gibt es keine detaillierten Erkenntnisse darüber, wie diese Eigenschaften gezielt variiert werden können und wie sie sich gegenseitig beeinflussen. Da die gute Zugänglichkeit der aktiven Zentren eine Voraussetzung für die wirksame Katalyse ist, wurde die Variabilität der Bindung in den Hohlräumen mit den nicht-kovalenten Bindungsstellen detailliert in Batchversuchen unter Verwendung des Modells der Langmuir bzw. Freundlich Adsorptionsisotherme sowie in der Frontalanalyse chromatographisch untersucht [44,45,107,108]. Demnach können mehr als 75 % der funktionellen Gruppen binden, die etwas katalytisch aktiv aber nicht selektiv sind, weil sich viele davon nicht in den aktiven Zentren befinden, sondern in der Polymermatrix statistisch verteilt sind. Bei Verwendung heterogener Systeme, bei denen die Template an festen Oberflächen immobilisiert sind, wird die Gesamtentropie während des Prägens vermindert. Das fixierte Templat interagiert analog zu Abbildung 7 mit den funktionellen Monomeren und fügt sich über eine Selbstorganisation zu einem Komplex (Selbstorganisation in Abbildung 7), der mit Quervernetzern in das Polymernetzwerk einpolymerisiert wird (Copolymerisation in Abbildung 7). Anschließend wird durch Zugabe von Flusssäure (anstelle von Lösungsmittel) der Träger und damit auch das kovalent gebundene Templat aufgelöst (Eluierung in Abbildung 7). Mit dieser Technik wird erreicht, dass die spezifischen Abdrücke ausschließlich auf der Oberfläche der Polymerpartikel lokalisiert und somit diese Polymerschalen für das Substrat bei der Katalyse besser zugänglich sind. Zusätzlich zur guten Qualität und Zugänglichkeit der Abdrücke steht die Immobilisierung von Templaten im Zusammenhang mit einer einfachen Polymeraufarbeitung, da die Partikel mit der für die Affinitätschromatographie erforderlichen Größe direkt produziert werden und Schritte wie Mahlen und Sieben, die typisch für das Standardverfahren sind, entfallen.

2.2.2.1 Prägen an festen Oberflächen

Bei der erstentwickelten Methode zum Kopieren von Oberflächen (Lithografie) wird zunächst eine Musterform präpariert (Abbildung 14), indem Silandampf durch eine Mustermaske geleitet wird, so dass bei anschließender Silanisierung eine zum Relief der Mustermaske topografisch passende, komplementäre Form auf der darunter liegenden Siliciumplatte entsteht. In diese Musterform, die so genannte Masterform, wird dann die flüssige Polymerisationsmischung aus Polydimethylsiloxan

(PDMS) eingegossen. Nach ihrem Aushärten wird ein Negativ der Masterform entnommen, womit weitere Kopien auch aus anderen Materialien angefertigt werden können [109].

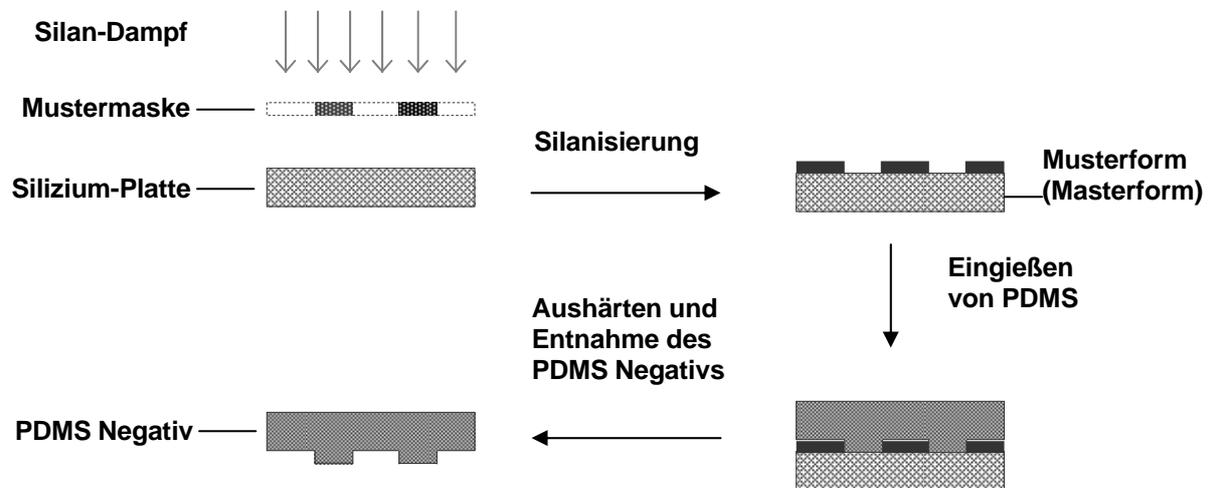


Abbildung 14: Prinzip der Lithografie [109]

In diesem Fall gehen die chemischen Informationen einer Masterform aufgrund der Verwendung von nicht funktionellen PDMS verloren. Bei den darauf folgenden Prägetechniken hatte man nach Alternativen gesucht, um nicht nur die Topologie des als Muster verwendeten Templates sondern auch seine chemischen Charakteristiken wiederzugeben. Dies geschah insbesondere über die nicht-kovalenten Wechselwirkungen des Templates mit funktionellen Monomeren oder anderen funktionellen Substanzen wie z.B. Zucker. Als Template wurden sowohl immobilisierte Zellen [110] und Kristalloberflächen [111] als auch Proteine [112] verwendet.

Das an eine Glimmerscheibe fixierte Protein (Abbildung 15) wurde durch Spin-Coating mit einer Zuckerschicht überzogen, die mit dem Protein spezifische nicht-kovalente Wechselwirkungen ausbildet. Durch eine Glimmentladung aus einem Hexafluorpropylen-Plasma wurde ein Polymerfilm erzeugt, indem die reaktiven Monomere untereinander und zugleich mit der Zuckerschicht vernetzt wurden. Über eine Harzschicht und eine darauf liegende Glasplatte wurde das abgeschiedene Polymer zusätzlich stabilisiert, so dass die Glimmerscheibe und das Protein entfernt werden konnten.

An der Oberfläche des geprägten Materials konnten mittels AFM-Aufnahmen Hohlräume festgestellt werden, welche die Größe und die Form des eingesetzten Proteins wiedergeben. Außerdem wurde durch die kompetitiven Untersuchungen (analog zu Abschnitt 2.1.3) der Adsorption eine gute Selektivität belegt, die mit den Zuckerfunktionalitäten zusammenhängt.

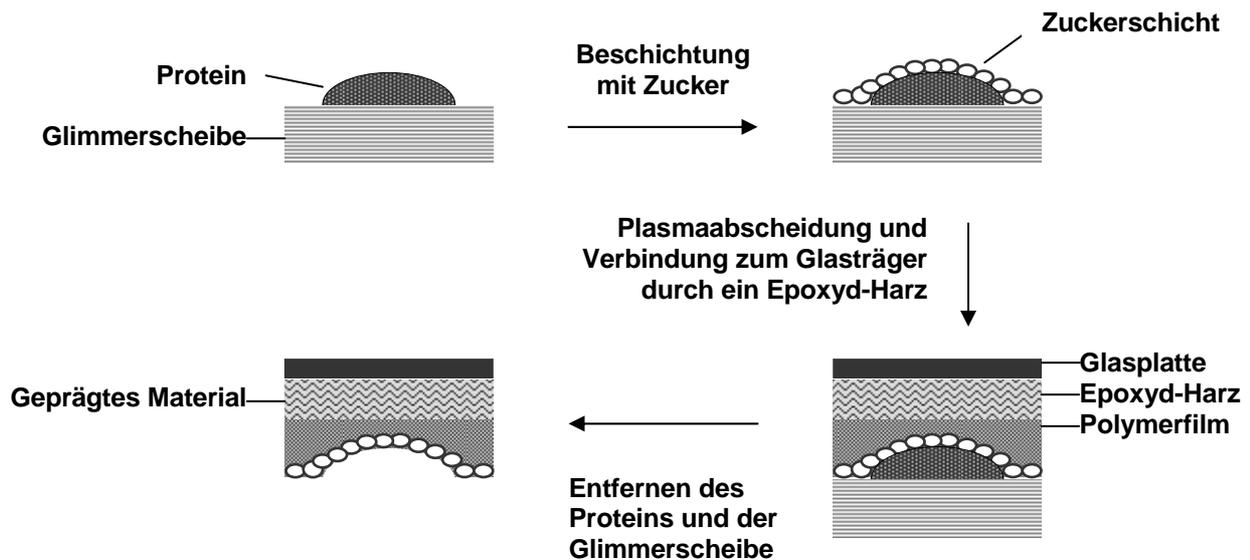


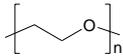
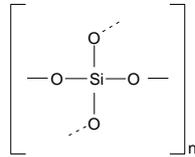
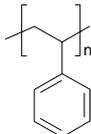
Abbildung 15: Prägen von immobilisierten Proteinen [112]

2.2.2.2 Prägen mit immobilisierten Templaten

Dünne MIP-Filme an Silikaoberflächen wurden als Komposite bereits detailliert erforscht und für chromatographische Zwecke eingesetzt [113]. Solche Komposite können hergestellt werden, wenn der Initiator direkt an der Oberfläche des Trägers immobilisiert wird. Dann läuft der Wachstumsschritt der Polymerisation nicht in der flüssigen Phase der Polymerisationsmischung, sondern ausschließlich an der Trägersoberfläche ab, wodurch dichtere Graftpolymer entstehen können, deren Dicke über die Radikale des Initiators steuerbar ist [114,115,116]. Diese Methode wurde bereits eingesetzt, um Packungsmaterial für spezielle chromatographische Zwecke zu modifizieren [117] und Kapillaren in situ zu beschichten [118]. Die erforderliche Stabilität des Trägermaterials für MIPs konnte außerdem bei Polymerpartikeln festgestellt werden [119,120].

Für die Immobilisierung von Templaten soll der Träger geeignete Funktionalitäten aufweisen, die eine schnelle Verbindung zu den Matrizenmolekülen gestatten, und nicht weiter mit den zum Prägen verwendeten Reagenzien wechselwirken. Außerdem soll dieser Träger während des Prägens stabil bleiben und sich nach der Polymerisation selektiv und leicht entfernen lassen. Die genannten Anforderungen erfüllen einige Materialien, welche in Prägeprotokollen bereits verwendet wurden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zum Fixieren von Templaten geeignete Trägermaterialien

Träger	Wiederholungseinheit	Lösungsmittel (Entfernung des Trägers)	Referenz
PEG		Wasser, mehrere organische Lösungsmittel	[121]
Silika		Flußsäure, Natrium und Kalium Hydroxid, Tetramethylammonium Hydroxid, Ammonium Hydrogen Difluorid	[122,123,124]
Latex		Benzol, Chloroform, Dioxan, Pyridin, Dimethylformamid, andere organische Lösungsmittel	[125,126]

Um den idealen Träger für das Bronchospasmolytikum Theophyllin zu finden, wurde dieses an löslichem Polyethylenglykol (PEG), an Silikapartikeln und sphärischen Latexpartikeln fixiert und je ein Abdruck des Templats in der Polymermatrix erzeugt [127]. Bei den Silikapartikeln wurde zusätzlich zwischen porösen und nicht porösen Partikeln differenziert. Nachdem der Träger entfernt worden war, wurden die Bindungskapazität und Selektivität der entstandenen Polymere untersucht.

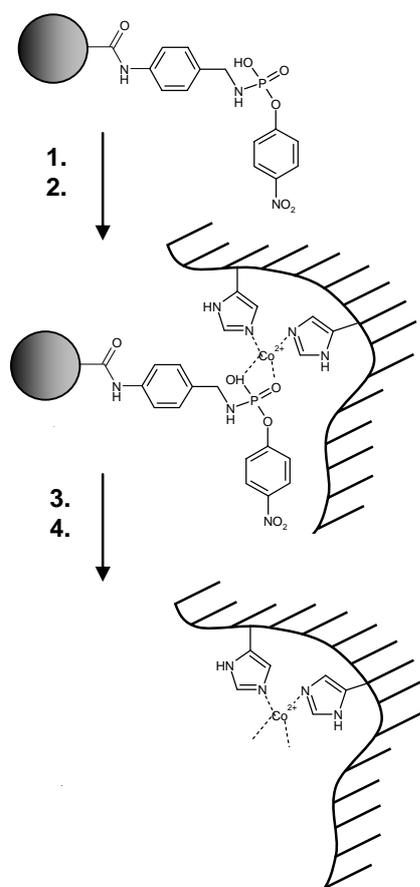
Für die Bestimmung der Kapazität wurde zu verschiedenen Volumina einer Polymersuspension eine konstante Menge an radioaktivem Ligand ^3H -Theophyllin zugegeben (Polymerkonzentration: $0,001\text{-}10 \mu\text{g ml}^{-1}$). Nach der Inkubation wurde das Polymer abgetrennt. Der Rest wurde mit dem Szintillationsreagenz versetzt und im Szintillator vermessen. Wenn bei der Untersuchung zusätzlich Kompetitoren zugegeben wurden, konkurrierten diese mit dem ^3H -Theophyllin um die Bindungsstellen, so dass Aussagen über die Selektivität gemacht werden konnten.

Unter Verwendung des porösen Silikatträgers wurde ein MIP isoliert, das bei relativ kleiner Polymermenge das gelöste Theophyllin vollständig adsorbiert. Vom CP wurde eine totale Aufnahme des Theophyllins erst bei sehr großer Polymerkonzentration erreicht. Bei der kompetitiven Untersuchung mit drei strukturverwandten Kompetitoren (Xantin-Theophyllin, -Theobromin und -Caffein) wurde gezeigt, dass das MIP diese mit einer Kreuzreaktivität von 2 % bezüglich des freien Theophyllins unterscheiden konnte, vergleichbar mit der von natürlichen Anti-Theophyllin-Antikörpern [128].

Um den Vorteil der Methode auf Basis von immobilisierten Templaten gegenüber der Standardmethode verifizieren zu können, wurden Polymere nach beiden Methoden mit Theophyllin als Templat (T) geprägt und ihre Bindungskapazitäten miteinander verglichen. Nach der Optimierung der Polymerzusammensetzung wurde ein templat-spezifisches Massepolymer aus Trifluormethacrylsäure (FM) und Divinylbenzol (QV) in einem Verhältnis T : FM : QV von 1: 12:26,7 erzielt [129]. Im Vergleich dazu zeigten die aus den gleichen Komponenten hergestellten Polymerschalen (T : FM : QV entspricht 1:4:19,5), bei den anfänglich Theophyllin auf porösem Kieselgel immobilisiert wurde, eine schlechtere Bindungskapazität [130].

2.2.2.3 Einsatz in der Katalyse

Die Verwendbarkeit der neuartigen Methode zum molekularen Prägen wurde auf dem Gebiet der biomimetischen Katalysatoren für eine Hydrolyse des Nitrophenylacetats zu Nitrophenol und Essigsäure getestet [131]. Das Phosphonat (4-Aminobenzyl)-phosphoramidinsäure-4-nitrophenylester ähnelt dem aktivierten Komplex dieser Reaktion und wurde vor der Polymersynthese zunächst auf dem porösen Silikaträger fixiert.



Neben 4(5)-Vinylimidazol und DVB wurde bei dem Polymeransatz ein Komplexbildner (CoCl_2) verwendet, um das katalytisch aktive Zentrum einer Phosphotriesterase nachzuahmen. Laut Röntgenkristallstrukturanalyse besteht dieses aus einem bivalenten Cobaltion umgeben von vier Histidinresten [132,133]. In diesem Fall wurde ein Komplex aus Cobalt, Phosphonat und zwei 4(5)-Vinylimidazol geformt (Abbildung 16, 1. Schritt), bei dem die Imidazole die notwendigen Histidingruppen substituieren. Durch die thermisch initiierte radikalische Polymerisation (Abbildung 16, 2. Schritt) wurde um die Silikamasse ein Komposit synthetisiert, welches nach einer Behandlung mit Flusssäure (Abbildung 16, 3. Schritt) in einem Polymer resultierte. Um die Imidazolgruppen zu Katalysezwecken richtig zu positionieren, wurde das Polymer nachträglich mit CoCl_2 beladen (Abbildung 16, 4. Schritt).

Abbildung 16: Immobilisierung von Templaten zur Herstellung katalytisch aktiver MIP-Schalen: 1. Zugabe der Polymerisationsmischung aus CoCl_2 , DVB und 4(5)-Vinylimidazol (VI) und Selbstorganisation von funktionellen Monomeren VI und Cobalt-Ionen um das immobilisierte TSA, 2. Quervernetzung mit DVB und Polymerisation des TSA-Monomer-Komplexes, 3. Entfernen des Silikaträgers und des gebundenen Templats durch Auflösen mit konzentrierter Flusssäure, 4. Waschen und erneutes Beladen mit Cobalt

Unter optimierten Katalysebedingungen wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten über die Nitrophenylacetatkonzentration nach dem Michaelis-Menten-Modell ausgewertet. Danach weist das MIP ähnliche Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, und um Faktor drei kleineren K_M -Wert als das CP auf, was nach dem k_{kat}/K_M -Kriterium (Tabelle 1, Abschnitt 2.1.2) im Bereich $c_s \ll K_M$ eine effizientere Katalyse bedeutet.

An diesem Beispiel wird deutlich, dass der Syntheseweg ausgehend von immobilisierten Templaten grundsätzlich für die Herstellung katalytisch aktiver MIPs geeignet ist. Ein Vergleich der beiden Prägemethoden am gleichen System, wie man es von den künstlichen Rezeptoren kennt (Abschnitt 2.2.2.2), wurde für katalytisch aktive MIPs bisher nicht durchgeführt.

2.2.3 Enantioselektive MIPs

Ein Enzym, bei dem überwiegend (oder ausschließlich) eines der beiden möglichen Enantiomere gebunden wird, bezeichnet man als enantioselektiv bzw. als stereoselektiv, wenn eines von mehreren möglichen Stereoisomeren bevorzugt wird. Diese Eigenschaft wird bei enzymatischen Synthesen zur Herstellung von enantiomerenreinen Substanzen ausgenutzt, da in vielen Fällen nur ein Enantiomer die pharmakologische Wirksamkeit besitzt, während das andere keine oder sogar eine unerwünschte Wirkung zeigt.

Von der chemischen Industrie werden verstärkt Anstrengungen unternommen, nur das aktive Enantiomer in Pharmazeutika und Wirkstoffen für die Landwirtschaft einzusetzen, so dass enantioselektive MIPs von Vorteil sind.

2.2.3.1 Trennung von chiralen Substanzen

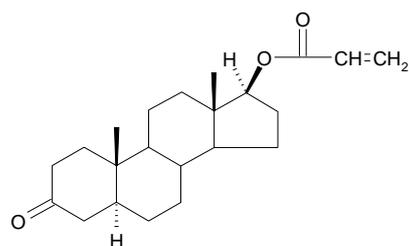
Es wurde relativ früh erkannt, dass die im Templat vorhandene Symmetrie die Stereochemie der künstlichen Rezeptoren beeinflusst [134,135]. Mit einem reinen Enantiomer als Matrize wird der Abdruck im Polymer asymmetrisch aufgebaut, so dass nur das erwünschte Enantiomer, in Bindungsstellen optimal orientiert, eingelagert werden kann. Das unerwünschte Enantiomer kann zwar die gleichen Wechselwirkungen mit den Bindungsstellen des Polymers ausbilden, aber nicht alle gleichzeitig. Die als Zweipunktbindung bezeichnete Wechselwirkung des erwünschten Enantiomers ist im Gegensatz zur Einpunktbindung des unerwünschten Enantiomers für die größere Bindungskonstante verantwortlich. Solche enantioselektiven MIPs wurden als enantioselektive stationäre Phasen in der HPLC [136,137] und Kapillarelektrochromatographie eingesetzt [118,138].

Für die kovalente Templatbindung (Abschnitt 2.2.1.1) wurde Phenyl- α -D-mannopyranosid mit 4-Vinylboronsäure verestert (R = Phenyl; Abbildung 8, links). In Gegenwart des bifunktionellen Vernetzers (EGDMA) wurde die Lösung radikalisch copolymerisiert, wobei makroporöse Polymere mit einer hohen inneren Oberfläche und einer permanenten Porenstruktur erzielt wurden. Nach einem 95 %-igen Extrahieren des Templats mittels Wasser oder Methanol wurde die Qualität des hinterlassenen Hohlrums bei der Trennung des entsprechenden Racemats ermittelt. Bei einer Äquilibrierung des Polymers mit dem Racemat wurde bevorzugt das als Templat verwendete Enantiomer aufgenommen. In Abhängigkeit von der Polymerstruktur und den Äquilibrierungsbedingungen wurden α -Werte zwischen 1,2 und 6,0 erhalten, womit Basislinientrennungen des Racemats in der HPLC erreicht wurden [139].

Ähnlich hohe Selektivitäten bei der Racemattrennung (Trennfaktoren $\alpha = 4 - 8$) wurden in den Prägungen erzielt, bei deren Herstellung das Monomer Acrylsäure mit dem Templat L-Phenylalaninanilid ausschließlich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen (elektrostatische und Wasserstoffbrückenbindungen) interagierte [140-145].

2.2.3.2 Regio- und stereoselektive MIPs

Bei der Annäherung zu enantioselektiven Enzymen wurden regio- bzw. stereoselektive MIPs entwickelt [146], indem z.B. der in Abbildung 17 dargestellte Templat-Monomer-Komplex (**20**) aus einem Steroidalkohol derivatisiert und mit Divinylbenzol (DVB) copolymerisiert wurde. Der verwendete Steroidalkohol wurde über eine reduktive Spaltung selektiv abgetrennt, wodurch eine Kavität mit der CH_2OH -Gruppe an der definierten Position entstand. Nach der Umwandlung in die aktive Hydridspezies mit LiAlH_4 wurde von einem solchen Polymer die Carbonylgruppe in der Position C-17 von Androstan-3,17-Dion bevorzugt zum Alkohol reduziert, obwohl in der Lösung (ohne Polymer) oder mit statistisch verteilten Hydridgruppen an der Polymeroberfläche nur die Position 3 reagierte. Neben dieser Regioselektivität wurde eine recht gute Enantioselektivität (β - α -Verhältnis der entstehenden OH-Gruppen) von 16 erreicht.



(20)

Abbildung 17: Templat-Monomer-Komplex

Lange blieb die im Folgenden beschriebene asymmetrische Synthese von chiralen Aminosäuren mit Hilfe von geprägten Polymeren bezüglich der Enantioselectivität die Erfolgreichste [147]. Das als Templat-Monomer-Komplex (21) verwendete Derivat des L-Dihydroxyphenylalanins (L-DOPA) wurde nach der Polymerisation entfernt. An die im Abdruck entstandene Carbonylgruppe (Abbildung 18) wurde Glycin (25) kovalent gebunden. In den nächsten zwei Schritten wurde das Glycin mit einer Base (26) deprotoniert und mit einem Alkylhalogenid (24) alkyliert. Das gebildete Salz (22) und die synthetisierte chirale Aminosäure (23) werden von dem Polymer abgetrennt. Auf diese Weise konnten Aminosäuren in einem Enantiomerenüberschuss von 36 % erzeugt werden.

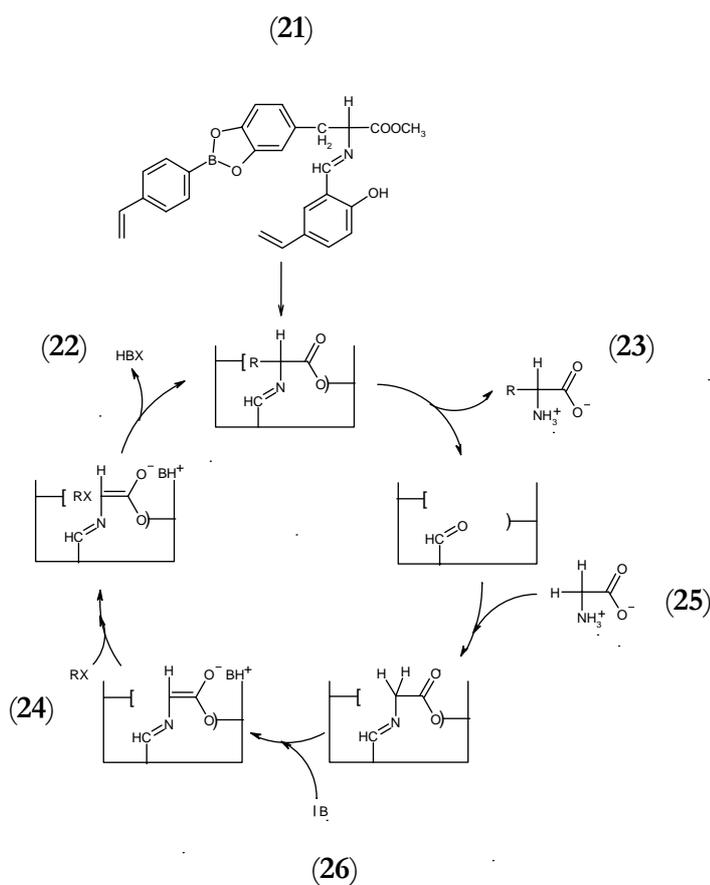


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Synthese von chiralen Aminosäuren in MIPs [147]

2.2.3.3 Katalyse mit enantioselectiven MIPs

Die Untersuchung der Enantioselectivität wurde mit einem racemischen TSA in der Katalyse fortgesetzt. Unter Verwendung des L-Histidins als funktionellem Monomer wurden enantioselective Polymere hergestellt, deren Form- und Stereoselectivität durch die verschiedene Länge des Quervernetzlers und hydrophobe Styrol Comonomere verbessert wurden, so dass bei der Hydrolyse das L-Isomer des Substrats schneller als das D-Isomer umgesetzt wurde [148,149].

Auf diesem Gebiet wurde weiter mit dem imidazolhaltigen D-konfigurierten Templat (Abbildung 19) gearbeitet, komplementär zum tetraedrischen Übergangszustand der Hydrolyse von Boc-D-phenylalanin-p-nitrophenylester (Boc-D-PheONP). Der Templat-Monomer-Komplex (27) wurde mit Methacrylsäure (MAA) und Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA) polymerisiert (Abbildung 19, 1. Schritt). Eine geeignete nucleophile Behandlung (Abbildung 19, 2. Schritt) von Polymer (28) führte zum MIP (29), welches bezogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit des Kontrollpolymers, das mit einem nicht chiralen Molekül mit fehlender tetraedrischer Komplementarität synthetisiert wurde, die Reaktion (Abbildung 19, 3. Schritt) 2,5fach beschleunigte. Hinsichtlich der Enantioselektivität wurde mit diesem MIP das D-konfigurierte Substrat 1,8mal schneller als das L-konfigurierte abgebaut [96].

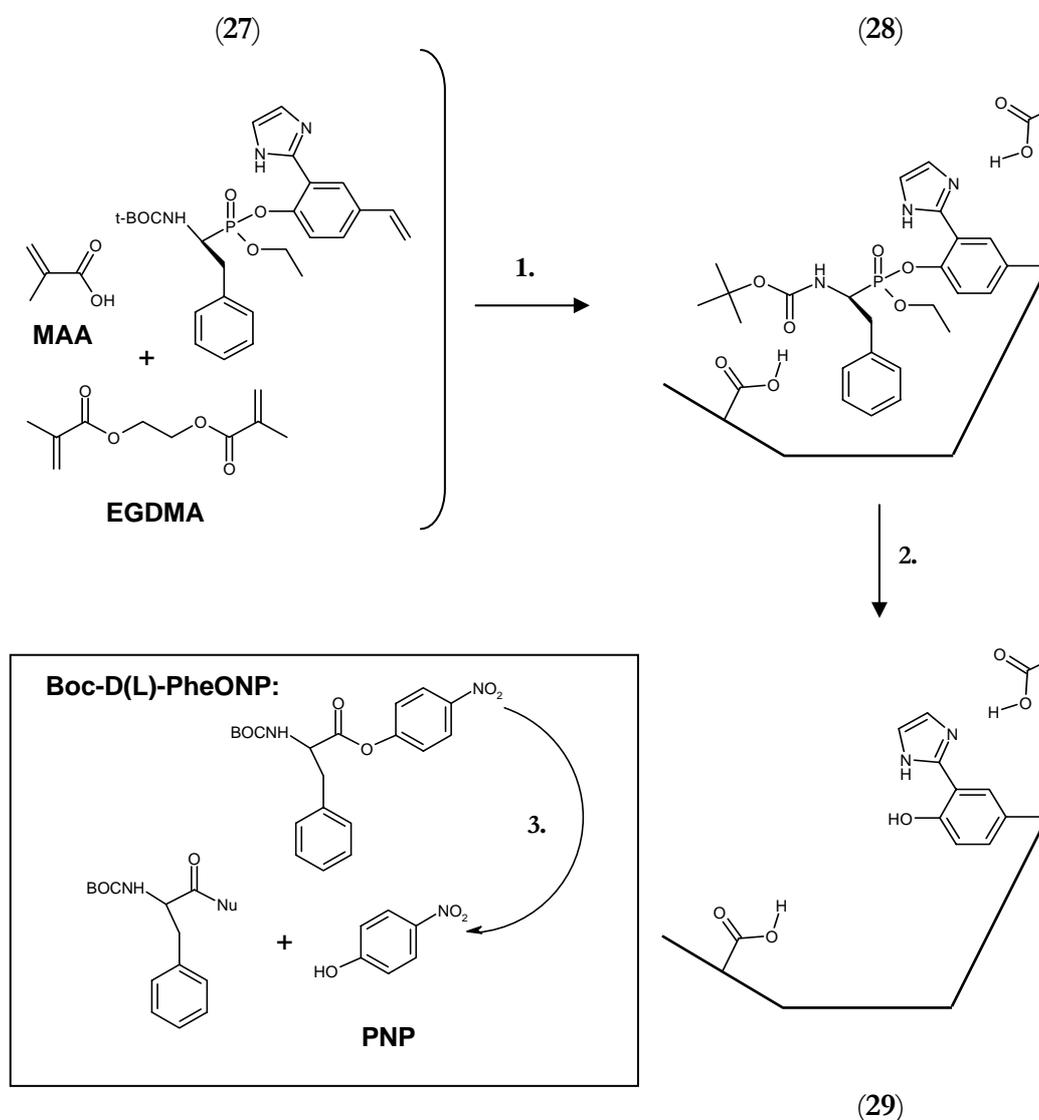


Abbildung 19: Der Weg zur enantioselektiven Esterhydrolyse mit MIPs: 1. Polymerisation 2. 5 h Waschen mit Methanol/Chloroform 1:1 (v/v); Soxhletextraktion in Methanol über Nacht; Behandlung jeweils über Nacht mit: CsF (wasserfrei) in Methanol bei 60 °C; Natriumcarbonat (0,5 M)/Methanol 1:1 (v/v) bei RT; Natriumhydroxid (1M)/Methanol 1:1 (v/v) 3. Hydrolyse

2.2.3.4 Immobilisierte Template

Hinsichtlich der Enantioselektivität wurde ein Vergleich der künstlichen Rezeptoren angestellt, die nach beiden Prägemethoden mit dem gleichen chiralen Templat R-(-)-Isoproterenol isoliert wurden [150]. Die "klassisch" geprägten Polymere bzw. Polymerschalen wurden in der chromatographischen Trennung der zwei Enantiomere (R- und S- Isoproterenol) eingesetzt. Während mit "klassisch" geprägten Polymeren bei der Racemattrennung ein Trennfaktor von 1,6 erzielt werden konnte, zeichneten sich die Polymerschalen mit einem α -Wert von 1,3 aus.

Die Enantioselektivität der Polymerschalen wurde erneut demonstriert, als die mit dem chiralen Dipeptid L-Leucin-L-Phenylalanin-Z gebildeten Prägungen zunächst mit einem fluoreszierenden Marker (Dansyl-L-Phe) belegt wurden [151]. In der kompetitiven Reaktion mit je einem Enantiomeren des Z-Phe (entweder D- oder L-Isomer) wurde gezeigt, dass das L-Isomer besser die Markersubstanz aus den Bindungsstellen verdrängt, weshalb in diesem Fall die Fluoreszenz innerhalb des Polymers schneller abnahm als im Falle des D-Isomers.

3 VORARBEITEN

Das Ziel des DFG-Projekts, in dessen Rahmen diese Dissertation angefertigt wurde, war es, katalytisch aktive, molekular geprägte Polymere für die angegebenen Reaktionen (Tabelle 5) in unterschiedlichen Konfigurationen zu generieren und deren Verwendbarkeit unter Aspekten der Reaktionstechnik zu bewerten.

Bisher wurden MIPs in Formaten wie Massepolymere oder Mikrogele hauptsächlich für die Katalyse der Dehydrofluorierung [152,153,154] und Knoevenagel-Reaktion [155,156] hergestellt und in der Analytik auf ihre Affinität zu dem jeweiligen TSA evaluiert. Anschließend wurden Massepolymere in diskontinuierlich betriebenen Batchreaktoren, sowie in kontinuierlich betriebenen Festbett- und Membranreaktoren in der heterogenen Katalyse getestet [101,157]. Dabei wurde der Einfluss bestimmter Parameter wie Polymermenge, Flussrate der Substratlösung, Substratkonzentration und Temperatur auf die Reaktionskinetik berücksichtigt. Mittels kinetischer Messungen wurde versucht, den Reaktor für die Anwendung dieser Katalysatoren optimal auszulegen. Zusätzlich wurden MIP-Mikrogele isoliert [158], die den natürlichen Enzymen hinsichtlich der Flexibilität im Sinne der Eigenschaft "induced fit" (Abschnitt 2.1.1) besser entsprechen, und in einem Batchreaktor für den Einsatz in der homogenen Katalyse geprüft. Aus dem Vergleich mit den Ergebnissen der heterogenen Katalyse konnten Schlüsse über das besser geeignete Reaktionssystem gezogen werden.

Tabelle 5: Durch MIPs katalysierte Zielreaktionen

<i>Rkt.</i>	<i>Typ</i>	<i>Substrat</i>	<i>Templat (TSA)</i>
A:	Dehydrofluorierung	4-Fluoro-4-(p-nitrophenyl)-2-butanon	N-Benzylisopropylamin
B:	Knoevenagel-Reaktion	Benzaldehyd und Diethylmalonat	Diethylbenzylmalonat
C:	Diels-Alder-Reaktion	Hexachlorocyclopentadien und Maleinsäure	Immob. Chlorendinesäureanhydrid
D:	Esterhydrolyse mit enantioselektiven MIPs	Boc-S(-)-Phenylalanin-p-nitrophenylester	Immob. Ethyl-Boc-S(-)-Phenylalaninyl 4-aminobenzylphosphonat

Massepolymere

Für die Katalyse der Dehydrofluorierung des 4-Fluoro-4-(p-nitrophenyl)-2-butanons (4-FNB) wurde das Massepolymer beispielsweise folgendermaßen hergestellt: Zu 466,4 mg N-Benzylisopropylamin wurde eine Mischung aus 1,08 g MAA, 9,9 g EGDMA und 80 mg AIBN in 5 ml CH_2Cl_2 zugegeben. Die resultierende Lösung wurde anschließend im UV-Reaktor Fa. Southern N.E. Ultraviolet Co. (Modell RPR-200) bei Raumtemperatur polymerisiert.

Um eine Partikelgröße der Polymerpartikel von unterhalb 25 μm zu gewährleisten, wurde das in einer Kugelmühle der Fa. Retsch (Modell S100) gemahlene Polymer in Aceton suspendiert und mit einem 25 μm Sieb aufgearbeitet. Nachdem die feinen Partikel durch mehrmalige Sedimentation in Aceton abgetrennt worden waren, wurde der sich am Boden abgesetzte Rest mit Methanol gewaschen und getrocknet (65 °C). Aus einem Teil des Pulvers wurde das Templat mit einem Gemisch aus Methanol/Essigsäure 7:1 (v/v) extrahiert. Diese Partikel wurden anschließend mit Methanol gewaschen, um die Essigsäure zu entfernen, und im trockenen Zustand als Katalysator in einem Batch- bzw. Membranreaktor verwendet. Das restliche Pulver wurde in eine HPLC-Säule (4,6 mm x 250 mm) gepackt, die zunächst mit dem gleichen Extraktionsmittel und danach mit Methanol gespült wurde. Die mit MIP bzw. CP gefüllten HPLC-Säulen wurden als kontinuierlich betriebene Festbettreaktoren eingesetzt.

Batchreaktor

Entweder 100 mg, 200 mg oder 500 mg des MIP-Pulvers wurden für Batchexperimente in einer Lösung von 0,05; 0,5 oder 5 mg 4-FNB in 10 ml oder 20 ml CH_2Cl_2 suspendiert. Die Versuche wurden in einem Temperaturbereich von 10 °C bis 40 °C (Rückfluss) sowohl in wässrigen Systemen wie reinem Wasser (10 ml, 30 °C und 40 °C) als auch in Gemischen Wasser/Acetonitril 1:1 (v/v) (10 ml, 30 °C – 50 °C) durchgeführt. Die Abnahme der Substratkonzentration wurde gaschromatographisch oder spektroskopisch im UV-Licht detektiert (Abbildung 20).

Die beste katalytische Leistung konnte erhalten werden, wenn 500 mg MIP zur Katalyse der Umsetzung von 5 mg 4-FNB in 10 ml Wasser/Acetonitril Mischung bei 50 °C eingesetzt wurden. Unter Annahme eines Reaktionsgeschwindigkeitsgesetzes pseudo erster-Ordnung wurden bei dieser Temperatur Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (k) für MIP und CP und mit diesen ein relativer katalytischer Effekt, als $k_{\text{MIP}}/k_{\text{CP}}$ definiert, von ca. sechs errechnet.

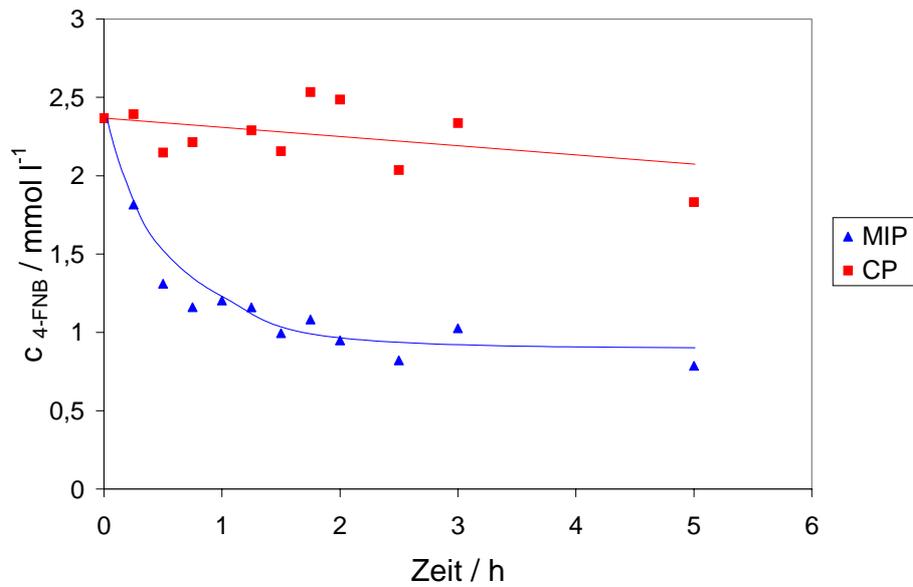


Abbildung 20: Verwendung eines mit N-Benzylisopropylamin geprägten Polymers als Katalysator (MIP) bzw. eines Kontrollpolymers (CP) für die Dehydrofluorierung von 4-FNB im Batchreaktor. Die Reaktion wurde durchgeführt bei 50 °C mit 5 mg des Substrats 4-FNB und 500 mg MIP bzw. CP in 10 ml Wasser/Acetonitril 1:1 (v/v); MIP (▲), CP (■)

Festbettreaktor

Die kontinuierlich betriebenen Festbettreaktoren (Abbildung 21) wurden zunächst mit reinem CH_2Cl_2 und anschließend mit einer 4-FNB Lösung (Substrat) in CH_2Cl_2 ($0,05 \text{ mg ml}^{-1}$) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml min^{-1} beschickt. Die Reaktionstemperatur wurde zwischen 20 °C und 60 °C variiert und deren Einfluss auf den Substratabbau mit Hilfe der UV-Spektroskopie analysiert.

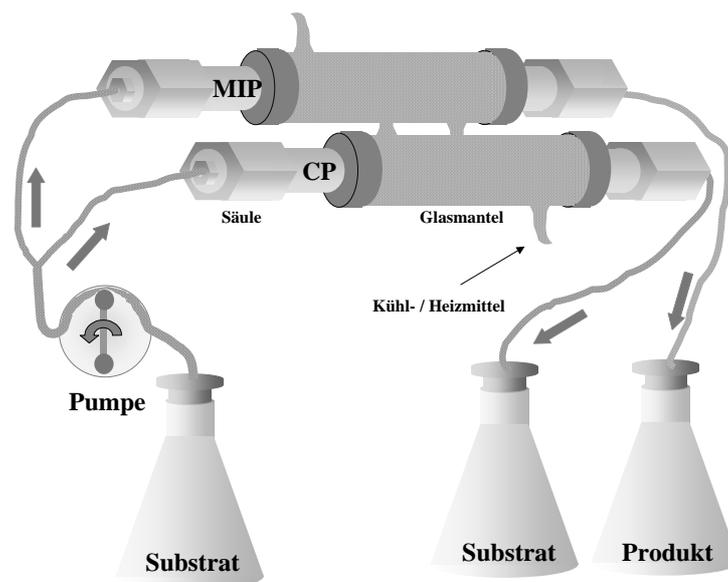
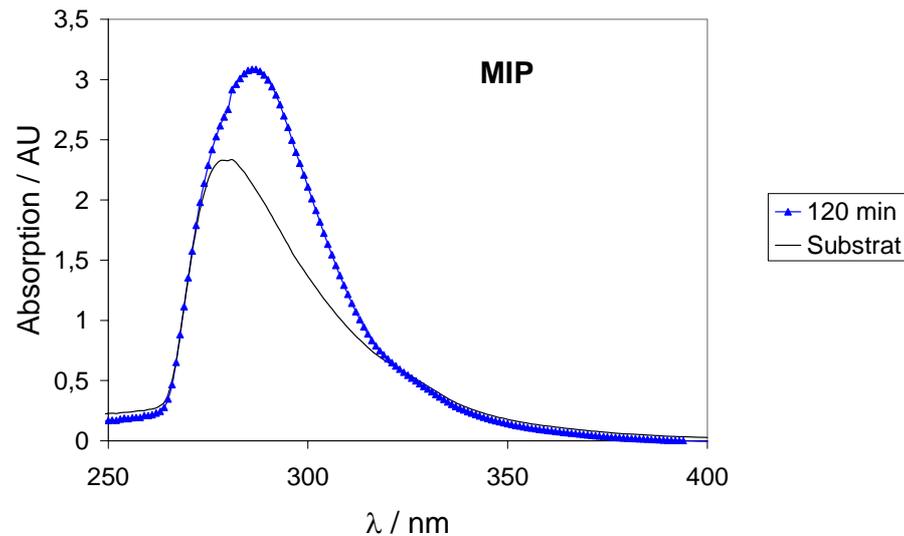


Abbildung 21: Gepackte, thermostatisierte HPLC-Säulen als Festbettreaktoren [157]

Aufgrund der schnelleren Umsetzung des Edukts zum Produkt im MIP-Festbettreaktor wurde während der Reaktion (120 min) bei 35 °C das Spektrum von 268 nm (Absorptionsmaximum des Edukts) zu 304 nm (Absorptionsmaximum des Produkts) verschoben; im Fall des MIP (Abbildung 22A) stärker als beim CP (Abbildung 22B), d.h. dass unter Verwendung des MIP mehr Produkt gebildet wird, und zwar mit einem Umsatz von ca. 25 % [157].

A:



B:

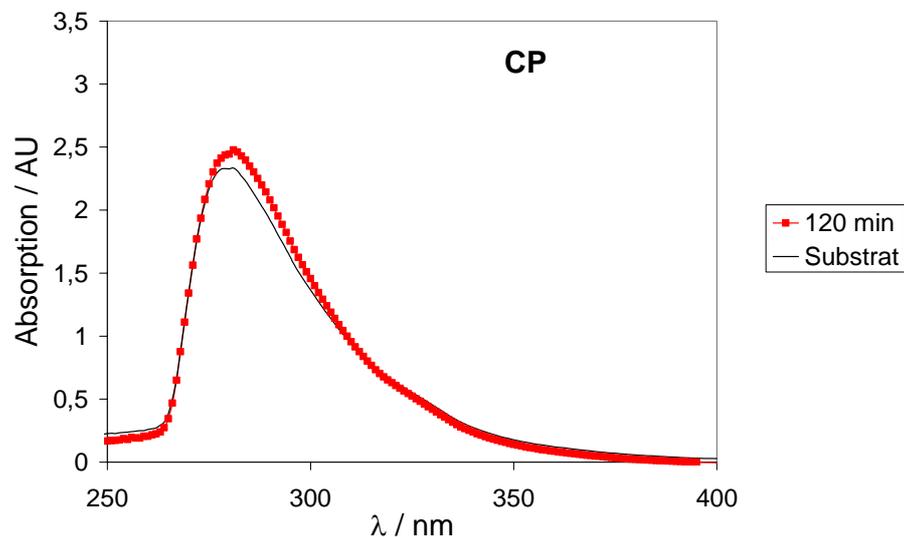


Abbildung 22: Verwendung eines mit N-Benzylisopropylamin geprägten Polymers als Katalysator (A) bzw. eines Kontrollpolymers (B) für die Dehydrofluorierung von 4-FNB im Festbettreaktor. UV-Spektren der Substratlösung im Vorratsgefäß und am Reaktorausgang 120 min nach Beginn der Substratzufuhr. Die Reaktion wurde durchgeführt bei 35 °C mit 0,05 mg ml⁻¹ Substrat 4-FNB in CH₂Cl₂, Flussrate: 1 ml min⁻¹

Membranreaktor

Zur Untersuchung der Kinetik der Dehydrofluorierung in einem Membranreaktor wurden aufgearbeitete Massepolymere zunächst in eine Membran aus Polyvinylalkohol (PVA) inkorporiert. Dazu wurden 2,6 g einer PVA/H₂O 5:95 (w/w) Lösung bei 90 °C unter Rückfluss 48 h erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde diese mit 25 mg MIP bzw. CP und 0,295 g Glutaraldehyd/H₂O 1:99 (w/w) vermischt. Die Suspension wurde kurz im Ultraschallbad homogenisiert und auf eine vorher mit verdünnter Salzsäure getränkte Zellulosemembran zu einem ca. 1 mm dicken Film gegossen, der anschließend während einer Polymerisation vernetzt wurde. Die beschichteten Membranen wurden abwechselnd jeweils für 30 min bei -20 °C eingefroren und bei 0 °C aufgetaut.

Die vorbereiteten Membranen wurden in einen Membranreaktor eingebaut, durch den eine 0,05 mg ml⁻¹ 4-FNB Lösung in Acetonitril/Wasser 1:1 (v/v) aus dem Vorratsgefäß mit einem Volumenstrom von 0,05 oder 0,1 ml min⁻¹ gepumpt wurde. Um der Substratlösung einen mehrfachen Kontakt mit der Membran zu erlauben, wurde diese zirkuliert, d.h. die aus dem Membranreaktor fließende Lösung wurde in das Vorratsgefäß zurückgeführt. Die Proben wurden aus diesem Gefäß regelmäßig bei zwei verschiedenen Reaktortemperaturen (30 und 55 °C) entnommen und mittels HPLC analysiert (Aceton wurde als interner Standard zugegeben (1 % (v/v))).

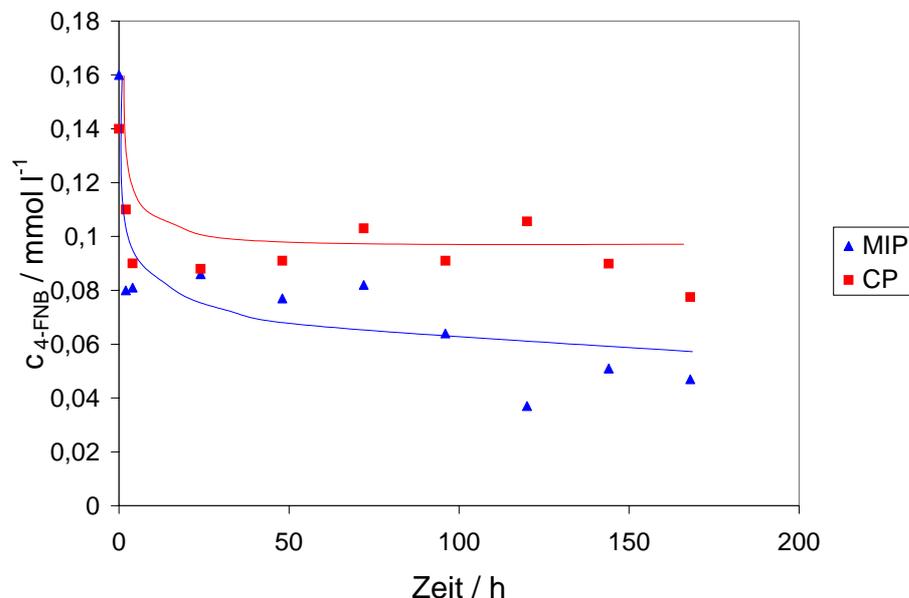


Abbildung 23: Verwendung einer Membran mit inkorporierten Polymerpartikeln, geprägt mit N-Benzylisopropylamin, als Katalysator (MIP) bzw. einer Kontrollmembran (CP) für die Dehydrofluorierung von 4-FNB im Membranreaktor. Die Reaktion wurde durchgeführt bei 55 °C mit 0,05 mg ml⁻¹ Substrat 4-FNB in Wasser/Acetonitril 1:1 (v/v), Flussrate: 0,1 ml min⁻¹; MIP (▲), CP (■)

Bei einer Substratdurchflussgeschwindigkeit von $0,1 \text{ ml min}^{-1}$ und einer Temperatur von $55 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde mit der MIP-Membran ein um den Faktor 3,8 schnellerer Ablauf der Reaktion, d.h. ein schnellerer Substratabbau als mit der CP-Membran festgestellt (Abbildung 23).

Mikrogele

Lösliche molekular geprägte Mikrogele lassen sich durch eine hohe Verdünnung der Polymerisationsmischung herstellen. Dazu wurden $22 \text{ } \mu\text{l}$ MAA und $442 \text{ } \mu\text{l}$ EGDMA in 47 ml Cyclopentanon vorgelegt. Die farblose Lösung wurde nach kurzem Rühren mit $10 \text{ } \mu\text{l}$ N-Benzylisopropylamin und 15 mg AIBN versetzt. Anschließend wurde nach einer Begasung mit Stickstoff die Reaktionsmischung bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ vier Tage lang polymerisiert. Das Polymer wurde mit 450 ml hochsiedendem Petroläther aus der Lösung ausgefällt. Hierfür erfolgte die Zugabe zunächst zügig und nach sichtbarer Bildung des Niederschlags tröpfchenweise. Die MIP-Mikrogele wurden abfiltriert und 3 Stunden im Vakuumtrockenschrank bei RT getrocknet. Die erhaltenen MIP- (gelb) und CP-Mikrogele (weiß) wurden im Mörser zermahlen und in einem Keramikfilter mit 75 ml Methanol/AcOH 9:1 (v/v), 25 ml Methanol und schließlich mit 75 ml Petroläther gewaschen, bis das MIP ebenfalls weiß erschien. Zum Schluss wurden die Polymere nochmals getrocknet.

Im Unterschied zu den Massepolymeren wurde mit den molekular geprägten Mikrogele die homogene Katalyse betrieben, d.h. 6 mg (4-FNB) und 6 mg Polymer (entweder MIP oder CP) wurden in 20 ml Cyclopentanon gelöst und bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 14 Tage gerührt. Während des Versuchs wurden regelmäßig Proben entnommen, aus denen das Polymer vor der chromatographischen Analyse entfernt wurde. Aus $167 \text{ } \mu\text{l}$ der Probe wurde das Polymer dazu mit 4 ml Petroläther ausgefällt und abfiltriert. Der Rest der Probe wurde lyophilisiert und in 1 ml ACN/ H_2O 1:1 (v/v) gelöst. $1 \text{ } \%$ (v/v) Aceton wurde den Proben als interner Standard für die HPLC zugesetzt.

In der homogenen Katalyse konnte kein nennenswerter katalytischer Effekt mit MIP-Mikrogele erreicht werden. Bei längeren Reaktionszeiten sind bei der Verwendung von MIP nur geringfügig höhere Produktkonzentrationen als beim Einsatz des CP erkennbar (Abbildung 24).

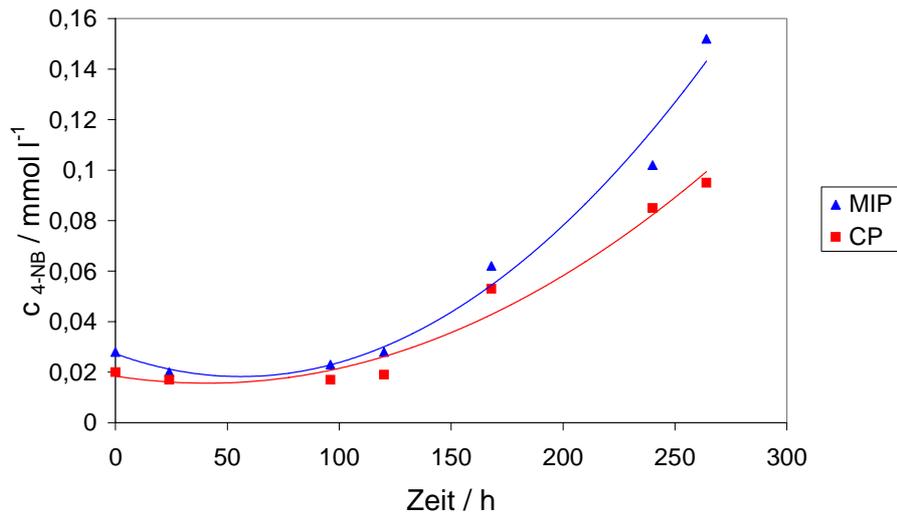


Abbildung 24: Verwendung eines mit N-Benzylisopropylamin geprägten Mikrogels als Katalysator (MIP) bzw. eines Kontrollmikrogels (CP) für die Dehydrofluorierung von 4-FNB im Batchreaktor. Die Reaktion wurde durchgeführt bei 55 °C mit 6 mg des Substrats 4-FNB und 6 mg MIP- bzw. CP-Mikrogels in 20 ml Cyclopentanon; MIP (▲), CP (■)

Durch reaktionstechnische Untersuchungen der "klassisch" geprägten Polymere wurde der Zusammenhang zwischen dem Reaktortyp und relativen katalytischen Effekt prinzipiell demonstriert, wonach der relative katalytische Effekt im diskontinuierlichen Batchreaktor am größten ist. Gleichzeitig wurde am Beispiel der löslichen Mikrogele gezeigt, welchen Einfluss die Wahl des Reaktionssystems auf den Unterschied der katalytischen Aktivitäten von MIP und CP hat, so dass in diesem Fall die heterogene Katalyse als günstiger erscheint.

Die Auslegung des Reaktors sowie die Art der Reaktionsführung und des Reaktionssystems müssen also berücksichtigt werden, damit von den molekular geprägten Polymeren in der Katalyse maximal profitiert werden kann. Um die optimalen apparativen Bedingungen für die Durchführung chemischer Reaktionen zu ermitteln, ist deren quantitative Beschreibung erforderlich, bei der neben Kenntnissen zur Stöchiometrie Informationen über die Kinetik die wichtigste Rolle spielen.

4 ZIELE UND PROBLEMSTELLUNG

In dieser Arbeit wurden zur Vervollständigung des DFG-Projekts molekular geprägte Polymere zur Katalyse der Diels-Alder-Reaktion und enantioselektiven Esterhydrolyse (Tabelle 5) generiert und untersucht. Als zusätzliche Verwendung wurde der Einsatz molekular geprägter Polymere in Separation fokussiert.

Es wurde bereits erwähnt, dass ein Enzym durch Stoffe inhibiert werden kann, die dem Übergangszustand der enzymatischen Reaktion ähneln (TSA). Je besser das TSA zum Übergangszustand passt, desto stärker sind die Wechselwirkungen zwischen dem TSA und dem Enzym, bzw. desto größer ist die Affinität des Enzyms zu dieser Spezies. Umgekehrt kann man bei dem Katalysatordesign davon ausgehen, dass eine große Affinität des potentiellen Katalysators zum TSA einer chemischen Reaktion ein Hinweis auf seine katalytische Aktivität ist. Deshalb wurde zunächst die Affinität der molekular geprägten Polymere zu dem verwendeten TSA in der Affinitätschromatographie getestet, bevor die aufwendigen kinetischen Untersuchungen durchgeführt wurden.

Um sich mit der Technik des Prägens vertraut zu machen, wurde in der Anfangsphase dieser Arbeit die Templataffinität der MIPs an einem System ohne katalytische Aktivität untersucht. Dazu sollte ein Konzept unter Verwendung molekular geprägter Polymere als künstliche Rezeptoren für die Lösung eines praxisrelevanten Problems aus dem Bereich der Lebensmittelchemie entwickelt werden.

Antioxidantien wie beispielsweise einige Vitamine sind Substanzen, die in der Lage sind Elektronen zu dotieren und damit Radikale zu neutralisieren. Deren Menge, die Lebensmitteln zur Erhaltung oder Verbesserung des Nährwertes zugesetzt wird, muss ständig kontrolliert werden, da speziell die synthetischen Antioxidantien gesundheitlich nicht unbedenklich sind. Der limitierende Faktor für eine präzise und individuelle Analyse der Zusätze ist die komplexe Zusammensetzung der Lebensmittelproben, so dass diese Stoffe aus den Proben selektiv abgetrennt werden müssen, z.B. über eine Festphasenextraktion (SPE). Die hierzu notwendigen festen Phasen lassen sich über die Technik des molekularen Prägens erzielen (Abschnitt 2.2.1.2).

Drei verschiedene synthetische Antioxidantien wurden als Template aus gesucht: Butylhydroxyanisol BHA (**30**), Butylhydroxytoluol BHT (**31**) und Propylgallat PG (**32**).

Für jede dieser Komponenten wurde ein MIP generiert und auf seine Affinität zum jeweiligen Templat untersucht. Anschließend wurde jedes dieser MIPs als feste Phase zur Extraktion des entsprechenden Antioxidationsmittels aus dessen Lösungen im Batchmodus und in den SPE-Säulen eingesetzt (Abschnitt 5.1).

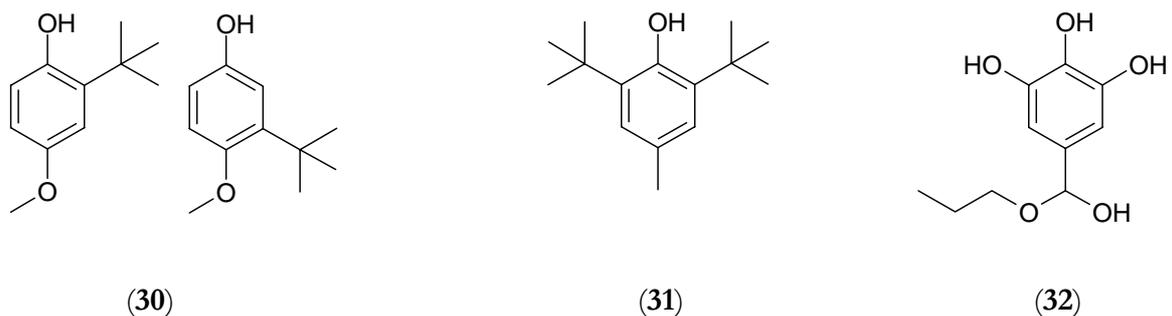
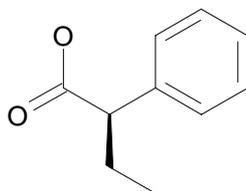


Abbildung 25: Chemische Strukturen der untersuchten Antioxidantien: Isomere von Butylhydroxyanisol BHA (**30**), Butylhydroxytoluol BHT (**31**), Propylgallat PG (**32**)

Anschließend wurde nach Methoden geforscht, die die Affinitätsbestimmungen von den kinetischen Messungen entkoppeln, so dass besonders templat-spezifische MIPs aus einer Vielfalt unterschiedlicher kleiner Polymerproben von potentiellen MIP-Kandidaten, die als kombinatorische Bibliothek bezeichnet werden, ermittelt werden können, ohne dass die Polymersynthese im größeren Maßstab durchgeführt werden muss. Selbst wenn die Studien zunächst auf die affinitätschromatographischen Untersuchungen beschränkt werden, handelt es sich im Falle der klassischen Massepolymerisationen um einige Tage, bis man Werte für die Affinität erhalten kann. Dazu müssen die Kosten der zur Herstellung von Polymeren notwendigen Chemikalien berücksichtigt werden. Aus diesen Gründen wurden bereits Zeit und Kosten sparende Methoden ausgearbeitet, die das "screening" kombinatorischer Bibliotheken von MIPs erlauben [159,160]. Zu diesem Zweck wurden bislang noch keine Membranen verwendet.

Zur Realisierung dieser Idee wurden in situ MIP-Filme verschiedener Zusammensetzung an Membranoberflächen aufgetragen und deren Affinitäten hinsichtlich des optisch aktiven Templatmoleküls R-(–)-2-Phenylbuttersäure (**33**) in einer Art "high throughput screening" bestimmt (Abbildung 26).



(**33**)

Abbildung 26: Chemische Struktur der R-(–)-2-Phenylbuttersäure (**33**)

Zum Prägen wurde als chirales Templat die R-(–)-2-Phenylbuttersäure (**33**) mit der Absicht gewählt, das Verfahren zur Herstellung enantioselektiver Membranen auf Basis der darauf folgenden systematischen Untersuchungen sowohl experimentell als auch theoretisch zu verbessern. Die enantioselektiven Membranen könnten unter Umständen bei den Affinitätsbestimmungen eine Alternative zu den herkömmlichen chromatographischen Trennverfahren unter Verwendung chiraler Säulen darstellen. Diese chiralen Säulen wurden insbesondere in den letzten Jahren entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Ein Nachteil dieser Säulen-Verfahren ist ihr aufgrund der langen Trennzeiten häufig diskontinuierlicher Charakter, der sich durch Einsatz solcher Membranen umgehen lässt. Der effizienten Auftrennung von racemischen Mischungen in die einzelnen Enantiomere wird von der pharmazeutischen Industrie und der Biotechnologie eine wachsende Bedeutung beigemessen.

Bei der Anwendung molekular geprägter Polymere in der Katalyse sollte die Fokussierung auf die abgebildete Diels-Alder-Reaktion (Abbildung 27) im Kontext mit den erhaltenen Daten der Katalyse der Dehydrofluorierung und Knoevenagel-Reaktion eine Grundlage dafür schaffen, dass erste Aussagen über die Verwendbarkeit molekular geprägter, katalytisch aktiver Polymere unter Aspekten der Reaktionstechnik gemacht werden können.

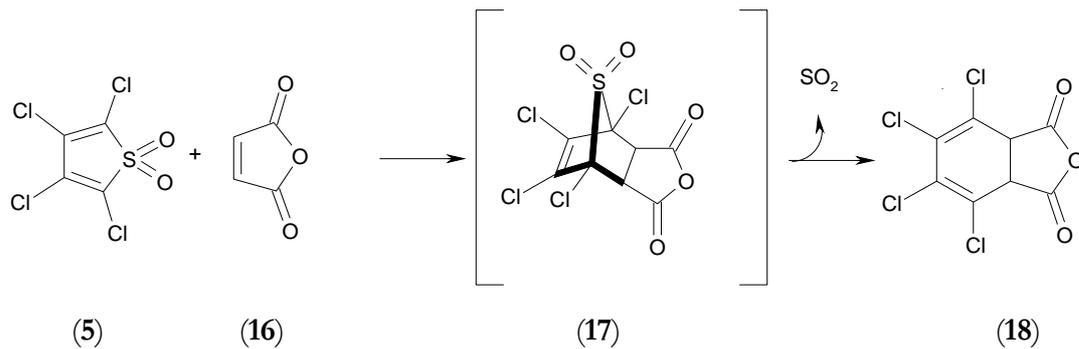


Abbildung 27: Diels-Alder Reaktion zwischen TCTD und MSA

Speziell für diese Reaktion wurden in der Vergangenheit effiziente Katalysatoren auf MIP-Basis nach der Standardmethode hergestellt, weshalb Untersuchungen unter Aspekten der Reaktionstechnik an dieser Stelle sinnvoll sind. Außerdem handelt sich um eine der wenigen bimolekular verlaufenden Reaktionen unter den von MIP katalysierten Systemen

(Tabelle 3, 2.2.1.3), die wegen der komplexen Kinetik eine anspruchsvolle Untersuchung verlangt. Für die Bedeutung einer künstlichen Diels-Alderase spricht auch die Tatsache, dass die Existenz solcher Enzyme lange umstritten war und erst zwei dieser Art vor kurzem isoliert wurden [11,12].

Trotz des bisher stärksten katalytischen Effekts bei dieser Reaktion (270fach) liegt dieser zwei Größenordnungen unter dem Wert für die analogen katalytischen Antikörper, woraus sich ableiten lässt, dass das verwendete Templat grundsätzlich gut geeignet ist, ein aktives Zentrum mit der erforderlichen räumlichen Struktur und katalytisch aktiven Gruppen in definierter Position zu induzieren. Eine schlechtere katalytische Aktivität im Vergleich zu den katalytisch aktiven Antikörpern lässt sich durch die für das Substrat bei der Katalyse nicht zugänglichen aktiven Zentren erklären.

Auf Basis der trägerfixierten Template sollten MIP-Schalen hergestellt werden, deren spezifische Abdrücke ausschließlich auf der Partikelinnenoberfläche lokalisiert sind und die zur Verbesserung der katalytischen Aktivität eingesetzt werden können. Dadurch sollte mehr über die Abhängigkeit der katalytischen Effizienz von der Polymerrezeptur in Erfahrung gebracht werden, um das molekulare Prägen auf eine größere Anzahl der Reaktionen übertragen zu können. An dem optimierten Katalysator sollten die ersten kinetischen Parameter zur quantitativen Beschreibung solcher Systeme ermittelt werden.

Über einen Vergleich der beiden Prägemethoden bezüglich katalytischer MIPs liegen noch keine Erkenntnisse vor. Ein derartiger Test war deshalb von Interesse, um Aussagen zur Auswirkung der TSA-Immobilisierung auf die katalytische Aktivität der Polymere treffen zu können. Dazu sollten die Katalysatoren nach beiden Prägemethoden unter möglichst gleichen Bedingungen synthetisiert und dem gleichen kinetischen Test unterzogen werden.

Molekular geprägte Polymere können als Alternative zu Enzymen eingesetzt werden, vor allem da sie eine höhere Stabilität und Haltbarkeit aufweisen. Da Enantioselektivität, Substratspezifität und "induced fit" weitere Eigenschaften darstellen, die bei der Entwicklung der enzymähnlich wirkenden Stoffe zu berücksichtigen sind, sollten in der Abschlussphase dieser Arbeit enantioselektive MIPs für die folgende hydrolytische Esterspaltung hergestellt werden (Abbildung 28).

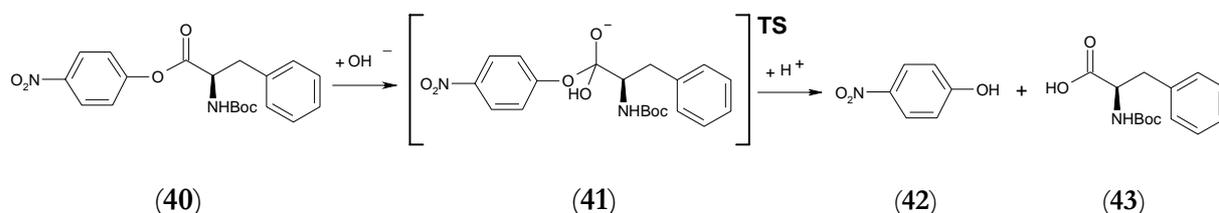


Abbildung 28: Modellreaktion zur Untersuchung der Enantioselektivität

Eine ähnliche Reaktion wurde im Kontext der enantioselektiven Katalyse bereits in der Literatur erwähnt, so dass die Art der Analyse des gebildeten p-Nitrophenols bei der Untersuchung der Kinetik übernommen werden konnte. Um die MIPs für ein Phosphonat-Templat, dem TSA dieser Reaktion, maßgeschneidert zu produzieren, wurde die Methode auf Basis von immobilisierten Templaten gewählt, die in Bezug auf die Enantioselektivität der katalytisch aktiven Zentren bisher nicht untersucht wurde. Die Polymere wurden in diesem Fall nach den Gesichtspunkten Partikelmorphologie und -größenverteilung charakterisiert.

In der folgenden Arbeit wurde das CP in gleicher Komposition wie das MIP mit Ausnahme des Templats erzeugt. Die Affinität sowie die katalytische Aktivität des MIP wurde immer im Bezug auf das CP betrachtet. Die relative Affinität wurde als das Verhältnis der Affinitäten des MIP und des CP dargestellt. Als katalytischer Effekt wurde der Quotient der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{\text{MIP}}/k_{\text{CP}}$ definiert, die für die hier vorliegende Reaktion pseudo-erster Ordnung bei Verwendung des MIP bzw. CP ermittelt wurden.

5 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

5.1 MIPs für die Chromatographie und Extraktion

Für jede der drei Antioxidantien BHA, BHT, PG (Abbildung 25, Abschnitt 4) wurde ein MIP generiert, das nach der Aufarbeitung in eine HPLC-Säule gepackt wurde (Abschnitt 5.1.1). Mit einem für alle drei Antioxidantien gleichsam gültigen CP wurde analog verfahren. Die Affinität der beiden Polymere zu dem jeweiligen Templat wurde chromatographisch evaluiert (Abschnitt 5.1.2). An den gleichen Festphasen in der HPLC wurden zur weiteren Überprüfung der Affinität die Durchbruchkurven aufgenommen (Abschnitt 5.1.3). Um das entsprechende Antioxidans aus einer Probe mit Hilfe dieser MIPs zu extrahieren, wurde die Festphasenextraktion sowohl an den SPE-Säulen (Abschnitt 5.1.4) als auch in Batchversuchen (Abschnitt 5.1.4) absolviert [161].

5.1.1 Polymerherstellung

Die Komponenten zur Polymerherstellung wurden nach den Angaben gemäß Tabelle 6 vermischt und homogenisiert. Um Sauerstoff zu entfernen, wurde die daraus resultierende Lösung mit Stickstoff 3 min bei RT begast und in Kulturröhrchen über Nacht bei 70 °C polymerisiert.

Tabelle 6: Synthese der MIPs zur Separation

<i>Funktion</i>	<i>Substanz</i>	<i>Mol- verhältnis</i>	<i>BHA-MIP /g bzw. ml</i>	<i>BHT-MIP /g bzw. ml</i>	<i>PG-MIP /g bzw. ml</i>	<i>CP /g bzw. ml</i>
Templat	BHA, BHT, PG	1	0,60 g BHA ($\hat{=}$ 3,33 mmol)	0,73 g BHT ($\hat{=}$ 3,33 mmol)	0,71 g PG ($\hat{=}$ 3,33 mmol)	-
Funktionelles Monomer	MAA	4	1,15 g ($\hat{=}$ 13,4 mmol)	1,15 g ($\hat{=}$ 13,4 mmol)	1,15 g ($\hat{=}$ 13,4 mmol)	1,15 g ($\hat{=}$ 13,4 mmol)
Quervernetzer	EGDMA	12	7,93 g ($\hat{=}$ 40 mmol)	7,93 g ($\hat{=}$ 40 mmol)	7,93 g ($\hat{=}$ 40 mmol)	7,93 g ($\hat{=}$ 40 mmol)
Initiator	AIBN	0,15	0,08 g ($\hat{=}$ 0,49 mmol)	0,08 g ($\hat{=}$ 0,49 mmol)	0,08 g ($\hat{=}$ 0,49 mmol)	0,08 g ($\hat{=}$ 0,49 mmol)
Porogen	ACN	-	5 ml ($\hat{=}$ 96 mmol)	5 ml ($\hat{=}$ 96 mmol)	5 ml ($\hat{=}$ 96 mmol)	5 ml ($\hat{=}$ 96 mmol)

Die erhaltenen Massepolymere, zuvor in einem Mörser zerkleinert, wurden danach in einer Kugelmühle der Fa. Retsch (Modell S100) 45 min bei 300 UpM gemahlen. Das Mahlen des Polymers sowie das Sieben der Polymersuspension in Aceton wurden mit einem Sieb der Maschenweite 25 μm mit anschließendem Trocknen sukzessiv durchgeführt, wobei die Gesamtmenge in drei Durchläufen verarbeitet wurde. Aus dem resultierenden Pulver wurden die feinen Partikel abgetrennt, indem dieses erneut in Aceton aufgeschlämmt und die überstehende Flüssigkeit nach 20 min Sedimentation abdekantiert wurde. Um die vollständige Abtrennung sicher zu stellen, wurde dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Das verwendete Aceton wurde von den feinen Partikeln am Rotationsverdampfer abdestilliert. Die feinen Polymerpartikel wurden je zweimal mit Methanol/Essigsäure 7:1 (v/v) und Methanol im Batchmodus gewaschen und danach getrocknet.

Die Polymerpartikel der Größe unter 25 μm wurden für den Einsatz in der Chromatographie mit MeOH gewaschen und bei 50 °C über Nacht getrocknet. Von dieser Menge wurden 3 g in Aceton suspendiert und mit Hilfe eines Alltech "slurry packer" (Modell 1666) in eine HPLC-Säule (250 mm x 4,6 mm) gepackt, die anschließend an eine Standard-HPLC Fa. Dionex montiert wurde. Durch diese wurden 400 ml eines Gemisches aus Methanol/Essigsäure 7:1 (v/v) und 100 ml MeOH gepumpt, und die Templatextraktion bis zur stabilen Basislinie bei 220, 260, 300 und 330 nm wurde online durch UV-Detektion verfolgt.

5.1.2 Affinitätschromatographie

In der Flüssigkeitschromatographie wurde die Affinität der einzelnen MIP-Säulen zum jeweiligen Antioxidans getestet. Dazu wurden die mobilen Phasen hinsichtlich der Zusammensetzung auf die Analyten abgestimmt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Optimierung der mobilen Phasen

	<i>BHA-MIP</i>	<i>BHT-MIP</i>	<i>PG-MIP</i>
Mobile Phase	<i>i</i> -Propanol/Wasser	<i>i</i> -Propanol/Wasser	Methanol/Wasser
Zusammensetzung	1:1 (v/v)	1:1 (v/v)	1:1 (v/v)
Durchflussgeschwindigkeit	1 ml min ⁻¹	1 ml min ⁻¹	1 ml min ⁻¹

20 µl BHA- oder BHT-Lösung in *i*-Propanol mit der Konzentration 1 mg ml⁻¹ bzw. 20 µl PG-Lösung in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) der Konzentration 1,2 mg ml⁻¹, die 5 % (v/v) Aceton enthielten, wurden in die HPLC injiziert und bei 260 und 280 nm detektiert. Das CP wurde passend zu dem jeweiligen MIP untersucht, d.h. unter Einsatz der gleichen mobilen Phase und der gleichen Probelösung. Aus den drei durchgeführten Analysen pro Polymer wurden die mittleren Retentionszeiten der Antioxidantien bzw. des Acetons bestimmt.

5.1.3 SPE-Säulen

Nach den affinitätschromatographischen Untersuchungen wurde bei 280 nm die PG-MIP-Säule mit Methanol/Essigsäure 7:1 (v/v) bis zur stabilen Basislinie gereinigt. Die Essigsäure wurde vor der weiteren Affinitätsmessung mit reinem Methanol verdrängt. Dazu wurde die MIP-Säule aus der HPLC ausgebaut und die Zu- und Abflussleitungen kurzgeschlossen, damit die Anlage mit einer Lösung 0,10 mg ml⁻¹ PG in Methanol gespült werden konnte. Als die Säule wieder mit dem Leitungssystem verbunden war, wurde die gleiche Lösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml min⁻¹ durchgepumpt. Bei 280 nm wurde die Veränderung der Absorption detektiert. Eine analoge Durchbruchskurve wurde für das CP-Adsorbens aufgenommen.

Um die Isolierung eines Antioxidationsmittels aus den Lebensmittelproben zu demonstrieren, wurde Apfelsaft mit einer 0,105 mg ml⁻¹ PG-Lösung in Methanol im Verhältnis 1:1 (v/v) vermischt und durch die mit PG-MIP-Säule 1 h gefördert, damit PG in der Festphase angereichert werden konnte.

Zur Analyse der aus der Festphasenextraktion stammenden Probe wurde an der HPLC die MIP- gegen eine Trennsäule (PLC 18, Supelcosil, 12 µm) ausgetauscht, die dann mit der mobilen Phase Methanol/Wasser 1:1 (v/v) äquilibriert wurde. Anschließend wurde die PG-MIP- vor die PLC-18-Säule montiert, so dass unter Verwendung der gleichen mobilen Phase und mit Hilfe des UV-Detektors die von der MIP-Festphase adsorbierte Menge an PG quantitativ bestimmt werden konnte. In einem Kontrollversuch wurde der Apfelsaft ohne PG mit reinem Methanol 1:1 (v/v) vermischt und auf gleiche Weise untersucht.

5.1.4 Batchextraktion

Um die Diffusion als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ausschließen zu können, wurden die feinen Partikel als feste Phase für die Extraktion im Batchbetrieb gewählt. Zuvor wurde aus den Vorratslösungen der Konzentration 10 mg ml^{-1} des jeweiligen Antioxidationsmittels in Methanol eine Verdünnungsreihe mit 1; 0,5; 0,1; 0,05; $0,01 \text{ mg ml}^{-1}$ angesetzt und mit dem Mittelwert aus drei gemessenen Messpunkten die HPLC kalibriert. Je 20 ml der $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ Lösung wurden zu 500 mg Polymer zugegeben und auf einem Schütteltisch in Bewegung gehalten. Zu definierten Zeiten wurden 1 ml Probe abgenommen, zentrifugiert und mittels HPLC analysiert. Analoge Versuche wurden in Acetonitril durchgeführt, wobei lediglich 10 ml einer $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ Vorratslösung zu 250 mg Polymer zugegeben wurden.

$20 \mu\text{l}$ der gesammelten Proben wurden im Fall von BHA jeweils dreimal und beim BHT und PG zweimal vermessen. Für die Analyse wurde als stationäre Phase die PLC 18 Supelcosil $12 \mu\text{m}$ Säule mit der passenden mobilen Phase (Tabelle 8) eingesetzt.

Tabelle 8: Mobile Phasen für die HPLC-Analysen

	<i>BHA-MIP</i>	<i>BHT-MIP</i>	<i>PG-MIP</i>
Mobile Phase	Methanol/Wasser	Methanol/Wasser	Methanol/Wasser
Zusammensetzung	8:2 (v/v)	8:2 (v/v)	1:1 (v/v)
Durchflussgeschwindigkeit	1 ml min^{-1}	1 ml min^{-1}	1 ml min^{-1}
UV-Detektion	290 nm	280 nm	280 nm

5.2 Membranoberflächenmodifizierung mit MIPs

5.2.1 Grafting von MIP-Schichten

Für ein "high throughput screening" (HTPS) der Polymerrezepte wurde eine neue Methode auf Basis von Membranen entwickelt. In der Vergangenheit wurden bereits MIP-beschichtete Membranen für die Anwendung in Separationsprozessen verwendet. Durch ein photoinitiertes Grafting (Pfpfen) von Polymeren in Anwesenheit eines Herbizids wurde die Membranoberfläche derart modifiziert, dass durch diese das Herbizid aus wässrigen Lösungen selektiv retardiert werden konnte [162].

Die Membranen wurden mit einem photochemischen Initiator beschichtet (Abbildung 29). Aus der Polymerisationslösung (Templat, funktionelles Monomer, Quervernetzer und Lösungsmittel) wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht eine MIP-Schicht an der Membranoberfläche gepfropft und deren Affinität zu dem jeweiligen Templat in einfachen Filtrationsversuchen getestet.

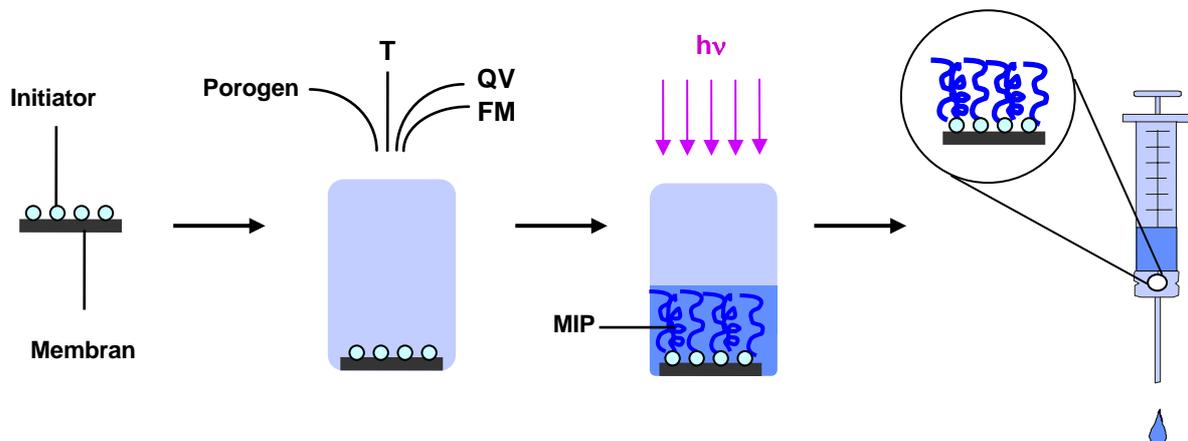


Abbildung 29: Prinzip der Membranoberflächenmodifizierung durch Grafting; Templat (T), funktionelles Monomer (FM), Quervernetzer (QV)

Dünne Polyamidmembranen (Fläche 9 cm^2) wurden gewogen und 15 min in 60 ml einer 80 mM Lösung von Benzophenon (Initiator) in Aceton in einer Petrischale eingetaucht. Nach dem Trocknen im Ofen bei ca. $50 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die so mit dem Initiator beschichteten Polyamidmembranen in Petrischalen transferiert, die mit einer 1,4-Dioxanlösung des Chlorendinesäureanhydrids CA (10 mM), MAA (50 mM) und EGDMA (300 mM) gefüllt waren (Tabelle 9). Anschließend wurden diese 10 min lang, entsprechend 10 Zyklen, mit UV-Licht einer Quecksilberlampe (2000 W) Fa. Beltron bestrahlt. Nach der Polymerisation wurden die Membranen einige Minuten jeweils in 60 ml 1,4-Dioxan, dann in Methanol und anschließend in

Wasser gewaschen und über Nacht zur Extraktion des Templats in 100 ml Methanol/Essigsäure 9:1 (v/v) bei RT aufbewahrt. Danach wurden sie mit MeOH bis zum neutralen pH-Wert gewaschen und im Ofen bei 50 °C getrocknet.

Tabelle 9: Synthese der MIP-Beschichtungen (Grafting)

<i>Funktion</i>	<i>Substanz</i>	<i>Mol- verhältnis</i>	<i>MIP / mg bzw. ml</i>	<i>CP / mg bzw. ml</i>
Templat	CA	1	74 mg ($\hat{=}$ 0,20 mmol)	-
Funktionelles Monomer	MAA	5	0,085 ml ($\hat{=}$ 1 mmol)	0,085 ml ($\hat{=}$ 1 mmol)
Quervernetzer	EGDMA	30	1,13 ml ($\hat{=}$ 6 mmol)	1,13 ml ($\hat{=}$ 6 mmol)
Porogen	1,4-Dioxan	-	20 ml ($\hat{=}$ 168 mmol)	20 ml ($\hat{=}$ 168 mmol)

Der Modifikationsgrad der Membranen, d.h. die Dicke der erzeugten Polymerschicht, wurde gravimetrisch bestimmt. Zur Charakterisierung solcher dünn beschichteten Kompositmembranen wurden Fourier-Transformations-IR-Spektren unter Verwendung des Spektrometers FTIR-8201 PC (Fa. Shimadzu) aufgenommen, indem die Membranen als Proben eingesetzt wurden. Die Affinität zum Templat wurde über die Adsorption des CA aus einer Lösung definierter Konzentration während einer schnellen Filtration bestimmt. Dazu wurden 10 ml einer 10^{-5} M CA-Lösung in ACN durch eine Spritze mit einem Filteraufsatz (Durchmesser 25 mm), in dem sich die Membran befand, innerhalb 1 min filtriert. Die Templatkonzentration wurde sowohl im Filtrat als auch im Filter (nach der Extraktion der Membran) mit einem GC-MS gemessen.

5.2.2 MIP-Filme mittels Casting

Im Gegensatz zum Grafting, bei welchem die Oberfläche eines Trägers, in diesem Fall eine Membran, chemisch modifiziert wird, handelt es sich beim Casting (Gießen) um ein Verfahren, das auf der physikalischen Veränderung der Trägeroberfläche basiert, d.h. eine Polymerisationslösung wird auf die Oberfläche der Membran gegossen und durch die anschließende Polymerisation sowie Verdampfung des Lösungsmittels ausgehärtet.

Für das Templat R-(-)-2-Phenylbuttersäure wurde eine kombinatorische Bibliothek aus verschiedenen Membranen aufgestellt, deren Oberflächen mit den verschiedenen MIP-Filmen durch Casting physikalisch modifiziert wurden, wobei die dazu verwendeten Rezepturen bezüglich ihrer Bestandteile variiert wurden. Anschließend wurden die MIP-Membranen hinsichtlich ihrer Affinität getestet, um die optimale Zusammensetzung der Rezeptur zur Herstellung einer für das chirale Templat spezifischen Membran ermitteln zu können [163].

In diesem Fall wurden aufgrund der einfacheren Handhabung Membranmodule verwendet, die ursprünglich zur Filtration vorgesehen waren (Abbildung 30, rechts). Das Membranmodul bzw. der Einwegfilter bestand aus einem PP-Gehäuse, in dem sich eine PTFE-Ultrafiltrationsmembran befand, mit einem Zu- und Ablauf für die Flüssigkeit (Abbildung 30, links). Die beschrifteten Einwegfilter, für die Beschichtung mit 45 MIP- und entsprechenden CP-Filmen vorgesehen, wurden zunächst im trockenen Zustand gewogen und dann miteinander verbunden. Die auf diese Weise aufgebaute Kette wurde an eine HPLC-Pumpe angeschlossen und mit 3 l MeOH zur Reinigung und gleichzeitiger Hydrophilisierung der Membranen gespült.

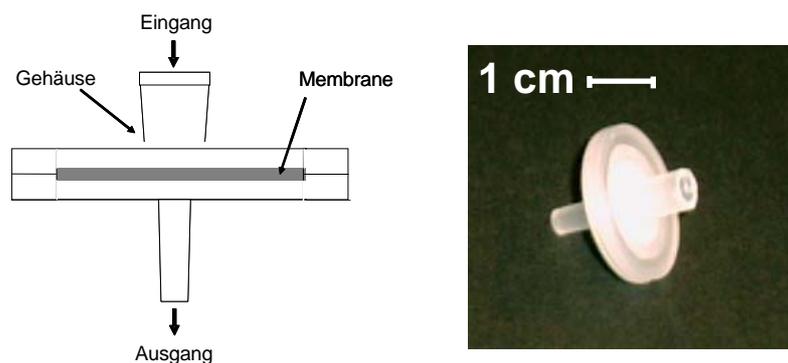


Abbildung 30: Zur Modifizierung verwendete Membranmodule: Skizze (links), Photo (rechts)

Bei der Synthese der MIP-Filme wurde die Menge an R-(-)-2-Phenylbuttersäure, 4-Vinylpyridin (4-VPy) und AIBN in allen Experimenten konstant gehalten (Tabelle 10). Die Polymerrezeptur wurde bezüglich des Quervernetzertyps DVB, EGDMA und TRIM und Quervernetzergehalts im Bereich von 4 bis 20×10^{-5} mol variiert. Zusätzlich wurde in der kombinatorischen Bibliothek zwischen den drei Porogenen ACN, MeOH und DMSO (Dimethylsulfoxid) unterschieden.

Tabelle 10: Synthese der MIP-Filme (Casting)

<i>Funktion</i>	<i>Substanz</i>	<i>Molverhältnis</i>	<i>MIP / mol</i>	<i>CP / mol</i>
Templat	R-(–)-2-Phenylbuttersäure	1	10^{-5}	-
Funktionelles Monomer	4-VPy	4	4×10^{-5}	4×10^{-5}
Quervernetzer	EGDMA, TRIM oder DVB	4, 8, 12, 16, 20	$(4, 8, 12, 16, 20) \times 10^{-5}$	$(4, 8, 12, 16, 20) \times 10^{-5}$
Initiator	AIBN	0,15	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
Porogen	ACN, MeOH oder DMSO	-	3×10^{-4}	3×10^{-4}

Die 15 min abgestandene Polymerisationsmischung wurde aus einer 1 ml-Spritze durch die vorbereiteten Membranmodule durchgepumpt und anschließend an der Membranoberfläche fein verteilt, indem die Module unter Verwendung einer 20 ml-Spritze 10mal mit Luft gespült wurden. Dabei konnte gleichzeitig die überschüssige Polymerisationsmischung entfernt werden. Der Sauerstoff wurde aus den Modulen beim Durchströmen eines Stickstoffstroms innerhalb 3 min verdrängt. Die Proben wurden auf der einen Seite mit einer 1 ml Spritze und auf der anderen mit einer Kanüle verschlossen und in den Trockenschrank gestellt.

Nach der thermisch initiierten Polymerisation bei 70 °C über Nacht wurden die Module mit einer Lösung aus Methanol/Essigsäure 7:1 (v/v) und schließlich mit reinem Methanol solange gewaschen, bis im ersten Waschgang das Templat und im zweiten die für die weiteren Messungen störende Essigsäure entfernt wurde. Die bei 50 °C getrockneten Filter wurden gewogen, und aus der Differenz zur ursprünglichen Masse der Membranen wurde die Masse der erzeugten Filme bestimmt. Bis zu einer Zunahme von 0,5 g Polymer pro Membran konnte keine Einschränkung in deren Permeabilität festgestellt werden. Die modifizierten Membranen wurden im Durchschnitt mit 20 bis 200 mg Polymer beladen und blieben nach drei aufeinander folgenden Affinitätsmessungen hinsichtlich der Masse unverändert.

5.2.3 Evaluierung der Affinität

Für die Affinitätsanalyse wurden mit Hilfe einer HPLC-Pumpe 15 ml einer $1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ Lösung von R-(-)-2-Phenylbuttersäure in geeignetem Lösungsmittel aus dem Vorratsbehälter innerhalb 1,5 min durch die Module gepumpt. Im Permeat wurde die Konzentration der Testsubstanz gemessen und mit der Permeatkonzentration aus einem Experiment verglichen, bei dem ein nicht modifiziertes Modul eingesetzt wurde. Damit wurde die unspezifische Adsorption des Trägermaterials (PTFE) und des Modulgehäuses eliminiert.

Für die Kalibrierung wurde eine Messreihe mit den Messpunkten 1×10^{-2} ; 5×10^{-3} ; 1×10^{-3} ; 5×10^{-4} ; $1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ R-(-)-2-Phenylbuttersäure aufgenommen. Die GC-MS-Analytik wurde standardmäßig betrieben, es sei denn es wurde MeOH als Porogen bei der Herstellung der Polymere verwendet. Die in diesen Fällen verwendeten MeOH-Lösungen der R-(-)-2-Phenylbuttersäure wurden nicht mit einem Massenspektrometer, sondern mit einem FID detektiert.

5.3 MIPs für die Katalyse

Diels-Alder-Reaktionen ermöglichen durch eine konzertierte Verknüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen von terminalen Kohlenstoffatomen eines konjugierten Diens (z.B. 1,3-Butadiens) zu einem Alken (z.B. Ethen) - oder Alkin (z.B. Acetylen) - einen einfachen Zugang zu sechsgliedrigen Ringen. Damit stellen diese einen Spezialfall der allgemeinen Klasse der Cycloadditionsreaktionen von π -Systemen dar. Angesichts der Reaktion einer Einheit aus vier konjugierten Atomen mit vier π -Elektronen (Dien) mit einer Doppelbindung mit zwei Elektronen (Dienophil) werden diese auch als [4 + 2]-Cycloadditionen bezeichnet. Generell sind die thermisch induzierten [4 + 2]-Cycloadditionen "erlaubt", da sich dabei ein aromatischer Übergangszustand vom Hückeltyp ausbildet [164], welcher im Unterschied zu anderen Reaktionen sehr dem Produkt ähnelt. Dieser kann zusätzlich stabilisiert werden, indem das Dien mit einem Elektronendonator und das Dienophil mit einem Elektronenakzeptor substituiert wird. Wegen einer erhöhten Cycloadditionsgeschwindigkeit werden solche DA-Reaktionen überwiegend eingesetzt und als diejenigen mit normalem Elektronenbedarf bezeichnet.

Die Reaktivität des durch den Akzeptorsubstituenten elektronenarmen Dienophils kann zusätzlich durch den Zusatz von katalytischen Mengen Lewissäure erhöht werden. Dabei wird aus beiden rasch ein Komplex gebildet, der die überschüssige negative Ladung auf dem Dienophil besser stabilisieren und aus diesem Grund mit dem Dien schneller reagieren kann [165].

Die folgende DA-Reaktion (Abbildung 31) zwischen Tetrachlorothiophendioxid (**5**) und Maleinsäureanhydrid (**16**) lässt sich auch durch MIPs katalysieren (Abschnitt 2.2.1.3). Diese wurden zunächst nach der Standardmethode hergestellt (Abschnitt 5.3.1). Die katalytische Aktivität der MIPs wurde durch die Anwendung der Methode auf Basis von immobilisierten Templaten optimiert (Abschnitt 5.3.2). Anschließend wurde ein Vergleich der beiden Prägemethoden bezüglich der relativen katalytischen Aktivität angestellt (Abschnitt 5.3.3).

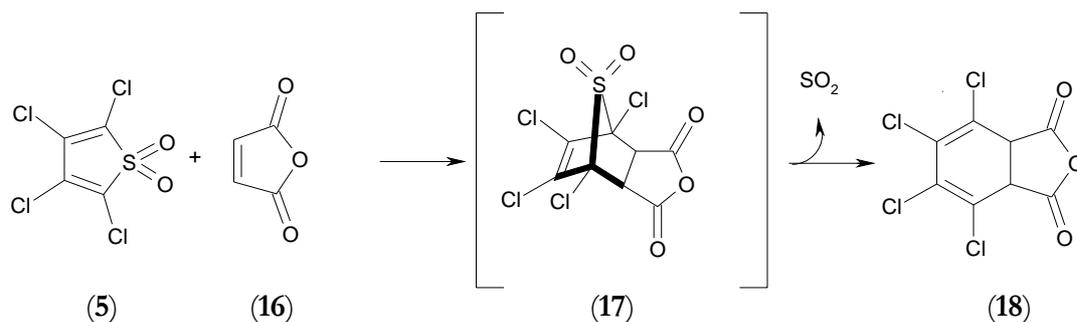


Abbildung 31: Diels-Alder Reaktion zwischen TCTD und MSA

5.3.1 MIPs als Massepolymere

5.3.1.1 Herstellung - Standardmethode

Die Rezeptur der MIPs nach der Standardmethode wurde der Referenz [94] entnommen: Zu 0,72 g CA wurde eine Mischung von 0,88 ml MAA und 11 ml EGDMA in 15 ml trockenem CHCl_3 zugegeben (Tabelle 11). Nach einer zweistündigen Selbstorganisation bei RT wurde die resultierende Lösung mit 81 mg AIBN versetzt und mit Stickstoff gespült. Anschließend wurde diese in einem UV-Reaktor Fa. Southern N.E. Ultraviolet Co. (Modell RPR-200) bei einer Wellenlänge von 366 nm und einer Temperatur von 4 °C 20 Stunden polymerisiert.

Tabelle 11: Synthese der katalytisch aktiven MIPs nach der Standardmethode

<i>Funktion</i>	<i>Substanz</i>	<i>Mol- verhältnis</i>	<i>MIP / mg bzw. ml</i>	<i>CP / mg bzw. ml</i>
Templat (TSA)	CA	1	720 mg ($\hat{=}$ 1,94 mmol)	-
Funktionelles Monomer	MAA	5	0,88 ml ($\hat{=}$ 10,37 mmol)	0,88 ml ($\hat{=}$ 10,37 mmol)
Quervernetzer	EGDMA	30	11 ml ($\hat{=}$ 58,27 mmol)	11 ml ($\hat{=}$ 58,27 mmol)
Initiator	AIBN	0,25	81 mg ($\hat{=}$ 0,5 mmol)	81 mg ($\hat{=}$ 0,5 mmol)
Porogen	CHCl_3	-	15 ml ($\hat{=}$ 187 mmol)	15 ml ($\hat{=}$ 187 mmol)

Das Massepolymer wurde in einem Mörser zerkleinert und sukzessiv so lange in einer Kugelmühle der Fa. Retsch (Modell S100) gemahlen, bis alle in Aceton suspendierten Partikel ein 25- μm -Sieb passieren konnten. Das isolierte Pulver wurde in 500 ml Aceton suspendiert und 20 min sedimentiert. Die in der Flüssigkeit vorhandenen feinen Partikel wurden abdekantiert. Um diese vollständig zu trennen, wurde das ganze Verfahren (Aufschlämmen, Sedimentieren und Abdekantieren) zweimal wiederholt.

Nach dem Trocknen wurden ca. 3 g Polymer in 30 ml Aceton suspendiert und mittels eines Alltech "slurry packer" (Modell 1666) bei einem Druck von 3500 psi (entspricht 241 bar) in eine HPLC-Säule gepackt. Die gefüllte Säule wurde in einer HPLC Fa. Dionex so lange mit einem Gemisch Methanol/Essigsäure 9:1 (v/v) gespült, bis das Absorptionssignal des CA im UV-Bereich (bei 257 nm) verschwunden war.

Neben dem beschriebenen MIP (grau hinterlegt in Tabelle 12) wurden weitere Polymere bestehend aus anderen Monomeren und Quervernetzern synthetisiert, die gemäß Tabelle 12 bei sonst gleichem Verfahren variiert wurden.

Tabelle 12: Variation der Monomer- bzw. Quervernetzerkomponenten

<i>Polymere</i>	<i>Monomer / ml</i>	<i>Quervernetzer / ml bzw. g</i>
EGDMA / AA	0,71 ml ($\hat{=}$ 10,3 mmol)	11 ml ($\hat{=}$ 58,3 mmol)
EGDMA / MMA	1,10 ml ($\hat{=}$ 10,3 mmol)	11 ml ($\hat{=}$ 58,3 mmol)
EGDMA / MAA	0,88 ml ($\hat{=}$ 10,3 mmol)	11 ml ($\hat{=}$ 58,3 mmol)
P.-tetraacrylat / AA	0,71 ml ($\hat{=}$ 10,3 mmol)	19,75 g ($\hat{=}$ 56,1 mmol)
P.-tetraacrylat / MMA	1,10 ml ($\hat{=}$ 10,3 mmol)	19,75 g ($\hat{=}$ 56,1 mmol)

5.3.1.2 Synthese der Reaktionskomponenten

Die Eigenschaften von MIPs als Katalysatoren lassen sich am einfachsten untersuchen, wenn MIP-Partikel als Katalysator in einer Lösung der Substrate suspendiert werden und die Reaktion unter gegebenen Reaktionsbedingungen mit analytischen Methoden verfolgt wird.

Das eine für die kinetischen Untersuchungen der DA-Reaktion (S. 65) notwendige Substrat MSA (**16**) wurde wie andere Reagenzien sowie Lösungsmittel käuflich erworben. Das andere erforderliche Substrat TCTD (**5**) wurde ausgehend von Tetrachlorothiophen synthetisiert [166]. Das Produkt dieser Reaktion (**18**) wurde zusätzlich auf einem anderen Wege isoliert [167], um dieses als Referenzmaterial in der Analytik verwenden zu können. Mit den Reaktionsteilnehmern sowie dem Produkt wurden analytische Messgeräte (HPLC) kalibriert, so dass der Verlauf der DA-Reaktion und die damit verbundene Abnahme der Substratkonzentration bzw. die Zunahme der Produktkonzentration quantifiziert werden konnten.

Das TCTD (**5**) wurde durch Oxidation des Tetrachlorothiophens (**34**) mit 3-Chlorperbenzoesäure in 1,2-Dichlorethan produziert (Abbildung 32).

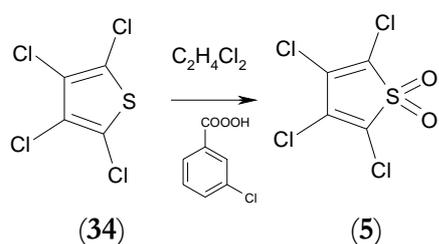


Abbildung 32: Synthese des TCTD (**5**) aus Tetrachlorothiophen (**34**)

Dazu wurden 12,53 g 3-Chlorperbenzoesäure zusammen mit 5 g Tetrachlorothiophen in 86,5 ml 1,2-Dichlorethan gelöst und in einem Ölbad unter Rückfluss 48 h erhitzt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde filtriert, und der Filterkuchen wurde mit kaltem 1,2-Dichlorethan gewaschen. Das Filtrat wurde mit einer 10 % Natriumcarbonatlösung (Na_2CO_3 (aq)) neutralisiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und durch Zugabe von Magnesiumsulfat (MgSO_4) getrocknet. Nach Abfiltrieren wurde das verwendete Lösungsmittel anschließend im Vakuum abdestilliert. Danach wurde das Rohprodukt mit etwas Hexan umkristallisiert, um das reine Produkt zu isolieren. Die ausgefallenden TCTD-Kristalle (**5**) wurden abfiltriert und mit Hilfe der IR-Spektroskopie analysiert.

Das Produkt der DA-Reaktion (**18**) wurde durch Zugabe von Pyridin zum tricyclischen Vorprodukt (**19**) unter Abspaltung der endo-Dichloromethylenbrücke erzeugt (Abbildung 33).

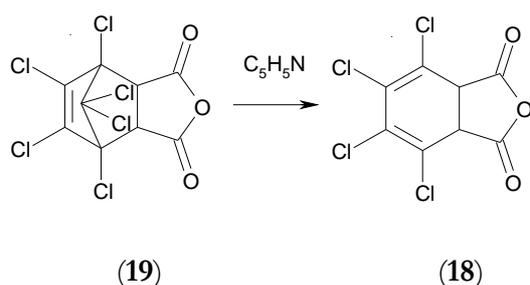


Abbildung 33: Synthese des 1,2,3,4-Tetrachloro-1,3-cyclo-hexadien-5,6-dicarboxysäureanhydrids (**18**)

Dabei wurden 3 ml Pyridin tropfenweise zu einer Lösung von 3,71 g CA in 20 ml Dimethylformamid (DMF) gegeben. In einem auf 30 °C temperierten Wasserbad wurde dieses Gemisch über Nacht gerührt. Danach wurde die entstandene rote Lösung in Eiswasser gegeben. Die gebildeten Kristalle wurden abfiltriert und mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen.

5.3.1.3 Polymerevaluierung

Nachdem das Templat aus den MIP-Säulen extrahiert worden war, wurden diese für die Affinitätsmessung mit Acetonitril als mobile Phase äquilibriert. Nach Erreichen einer stabilen Basislinie wurde ein Probenvolumen von 20 μl Lösung des CA und Aceton (10 mg ml^{-1} CA in Acetonitril/Aceton 97:3 (v/v)) in die HPLC injiziert und bei einer Durchflussrate von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ analysiert. Das CA und als Marker verwendetes Aceton wurden bei 260 nm detektiert, um deren Retentionszeiten zu bestimmen.

Die Kinetik der DA-Reaktion wurde parallel in drei Glasreaktoren (mit MIP, CP und ohne Polymer) bei $82 \text{ }^\circ\text{C}$ untersucht. Dabei wurden das Einsatzverhältnis der beiden Reaktionspartner (TCTD, MSA) und die Reaktortemperatur nach den in Tabelle 13 genannten Angaben variiert.

Tabelle 13: Untersuchung der Kinetik (Standardmethode)

Versuchsnr.	Molverhältnis TCTD : MSA	Temperatur
1	0,75 : 1	82°C
2	1,25 : 1	82°C
3	1:1,2	82°C
4	1:1	60°C
5	1:1	40°C

Beispielsweise wurde im Versuch Nr. 3 (grau hinterlegt in Tabelle 13) folgendermaßen vorgegangen: Zu je einer Mischung aus 43,3 mg ($443 \mu\text{mol}$) MSA und 95,2 mg ($377 \mu\text{mol}$) TCTD in 15 ml ACN wurden 300 mg MIP im ersten Reaktor bzw. 300 mg CP im zweiten Reaktor zugegeben. Im dritten Reaktor wurde die DA-Reaktion ohne Polymerzusatz durchgeführt. Die drei Reaktoren wurden mittels eines Thermostaten auf $82 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Zu definierten Zeiten wurden aus allen drei Batchreaktoren Proben für eine HPLC-Analyse entnommen. Die Proben wurden gleich nach der Entnahme zentrifugiert und durch einen $0,45 \mu\text{m}$ Einwegfilter filtriert, um den Feststoff zu entfernen. Bis zur Konzentrationsbestimmung der einzelnen Komponenten wurden diese bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Für die Analyse dieser Proben wurde als stationäre Phase in der HPLC eine Nucleosil Säule C-18 (250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 12 μm) und als mobile Phase Acetonitril/Wasser 6:4 (v:v) gewählt, welche isokratisch mit einem Volumenstrom von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ eingesetzt wurde. Im Anschluss wurden eine Supelcosil LC-18- (250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm) und eine Supelcosil PLC-18-Säule (250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 12 μm) verwendet. Als mobile Phasen wurden neben unterschiedlich zusammengesetzten Acetonitril/Wasser-Gemischen auch andere Lösungsmittel benutzt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Variation der mobilen Phasen

<i>Nr.</i>	<i>Mobile Phase</i>
1	ACN
2	ACN/H ₂ O 8:2 (v:v)
3	ACN/H ₂ O 6:4 (v:v)
4	ACN/MeOH 6:4 (v:v)

5.3.2 MIPs mit immobilisierten Templaten

5.3.2.1 Modifizierte Diels-Alder-Reaktion

Die anfängliche Diels-Alder-Reaktion (Abbildung 31, Abschnitt 5.3) wurde auf einen Reaktionsschritt eingeschränkt, indem TCTD durch das Hexachlorocyclopentadien HCCPD (**35**) ersetzt wurde. Gleichzeitig wurde wasserempfindliches MSA durch Maleinsäure MS (**36**) ersetzt (Abbildung 34). Sowohl die beiden Reaktionspartner (**35**) und (**36**) als auch das neu definierte Produkt, die Chlorendinesäure CLEN (**37**), waren käuflich erhältlich, so dass diese nicht synthetisiert und aufgereinigt werden mussten, bevor sie zur Kalibrierung von Messgeräten in der Analytik verwendet werden konnten.

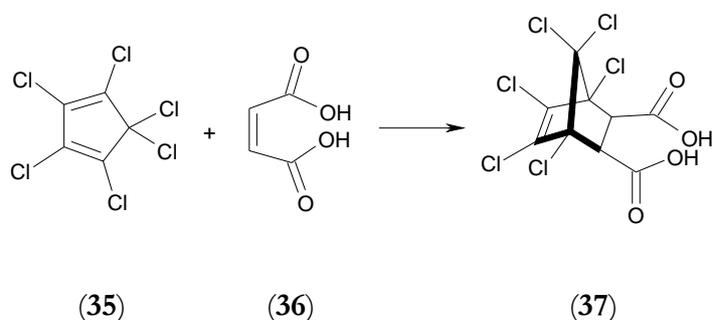


Abbildung 34: Modifizierte DA-Reaktion

Für den Einsatz als Katalysator in der modifizierten DA-Reaktion wurden MIPs gemäß der Methode auf Basis von immobilisierten Templaten (Abschnitt 2.2.2.2) polymerisiert. Dazu wurde das cyclische Anhydrid CA (**19**) an einen Silikaträger (**38**) fixiert (Abbildung 35), um anschließend als TSA der modifizierten DA-Reaktion fungieren zu können. In einer Reaktion des CA mit den am Träger vorhandenen Aminogruppen wurde unter einer Ringöffnung ein Übergangszustand- bzw. Produktanalogon (**39**) der vereinfachten Modellreaktion gebildet (Abbildung 34) [168].

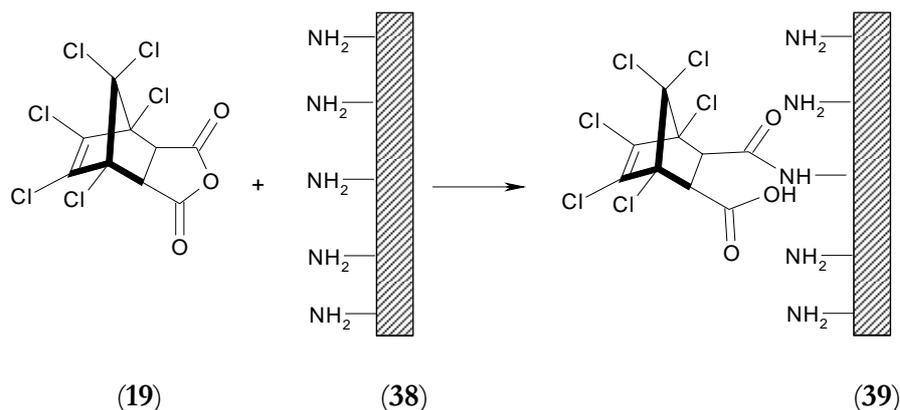


Abbildung 35: Immobilisierung des CA unter Ringöffnung

Die Kopplung der Carbonylgruppe des TSA-Vorläufers an die Aminogruppe des Trägers wurde nach dem Festphasenverfahren realisiert [169]. Dabei wurde ein Silikaträger verwendet, der mit 0,9 mmol Aminogruppen pro 1 g Silika beladen war. In einer Lösung von 75 mg (0,2 mmol) CA in 7,5 ml Dimethylformamid wurden 2 g Silikapartikel suspendiert. Die am CA vorhandenen Carbonylgruppen wurden zusätzlich mit 62 μ l (0,4 mmol) Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 60 mg (0,4 mmol) N-Hydroxybenzotriazolhydrat (HOBT) aktiviert. Nach 15 h Reaktionszeit wurden die Silikapartikel von den nicht abreagierten Substanzen über eine Filtration abgetrennt und mit 50 ml DMF gewaschen. Der Feststoff wurde mit einer Lösung von 2 ml (20 mmol) Essigsäureanhydrid (im Überschuss) in 7,5 ml DMF 5 h inkubiert, um freie Aminogruppen mit einer Schutzgruppe zu versehen. Die MIP-Silikapartikel wurden mit je 100 ml DMF, CH₂Cl₂ und MeOH in einer Filternutsche (Porengröße Nr. 3) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Da bei der Synthese von CP-Silikapartikeln kein CA an die Silikapartikel gekoppelt wurde, wurden alle Aminogruppen mit 2 ml Essigsäureanhydrid in 7,5 ml DMF deaktiviert.

Zu 2 g des modifizierten Silikaträgers (MIP oder CP) wurden 1,2 ml einer Polymerisationsmischung gegeben, die aus 170 μ l (2 mmol) MAA, 4 ml (28 mmol) Divinylbenzol (DVB) und 120 mg (0,73 mmol) AIBN vorbereitet wurde. Die Mischung wurde unter Verwendung eines Mini-Wirbelmischers homogenisiert, nachdem Aggregate der Silikapartikel vorsichtig mit einem Spatel getrennt worden waren. Durch 3 min Begasung mit Stickstoff wurde der Sauerstoff verdrängt, so dass anschließend im Ofen bei 60 °C innerhalb 15 h polymerisiert werden konnte.

Tabelle 15: Synthese der katalytisch aktiven MIP-Schalen mit immobilisierten Templaten

<i>Funktion</i>	<i>Substanz</i>	<i>Mol- verhältnis</i>	<i>MIP / mg bzw. μl</i>	<i>CP / mg bzw. μl</i>
Templat (TSA)	Immobil. CA	1	75 mg ($\hat{=}$ 0,2 mmol)	-
Funktionelles Monomer	MAA	2,9	49 μ l ($\hat{=}$ 0,58 mmol)	49 μ l ($\hat{=}$ 0,58 mmol)
Quervernetzer	DVB	40	1150 μ l ($\hat{=}$ 8,07 mmol)	1150 μ l ($\hat{=}$ 8,07 mmol)
Initiator	AIBN	1,1	35 mg ($\hat{=}$ 0,21 mmol)	35 mg ($\hat{=}$ 0,21 mmol)

Die entstandenen Silikakomposite wurden in Plastikbehälter transferiert und in 4 ml Aceton suspendiert. Da zum Auflösen des Silikatträgers Flusssäure benötigt wurde, wurden keine Behälter aus Glas sondern ausschließlich Plastikbehälter verwendet. 8 ml 40%-iger Flusssäure (aq) wurden unter Eiskühlung bei 0 °C langsam innerhalb von 20 min zugetropft. Um die Silikapartikel und das Templat vollständig aufzulösen, wurden die Proben auf einem Schütteltisch mehrere Stunden geschüttelt. Das gewonnene Polymer wurde abfiltriert, zuerst mit 2 l H₂O/MeOH 8:2 (v/v) und dann mit 200 ml MeOH gewaschen und schließlich im Vakuum getrocknet.

5.3.2.2 Offline-Analytik

Die entwickelte HPLC-Methode für die DA-Reaktion (Abschnitt 5.3.1.3) wurde zur Untersuchung der Kinetik der neu definierten DA-Reaktion (Abschnitt 5.3.2.1) aufgrund der Variation der Reaktionspartner sowie des Produkts angepasst. Für dieses Trennproblem wurde DMF/AcOH 98:2 (v/v) bei einer Flussrate von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ als optimale mobile Phase bestimmt. Die einzelnen Komponenten in den Proben wurden mit einer "reversed phase" Vydac 201SP104 C18-Säule (250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 10 μm) mit den folgenden Retentionszeiten getrennt (Tabelle 16). Die Fläche des bei 325 nm detektierten HCCPD-Signals wurde unter Verwendung der aufgenommenen Kalibrierkurve als Maß für die chemische Umsetzung verwendet.

Tabelle 16: Retentionszeiten der einzelnen Komponenten

<i>Komponente</i>	<i>HCCPD</i>	<i>MS</i>	<i>CLEN</i>
Retentionszeit / min	7,32	4,28	5,86

Eine Lösung aus 52 mg (0,44 mmol) MS und 54 μl (0,34 mmol) HCCPD in 30 ml DMF wurde in einem Batchreaktor vorgelegt, der mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt wurde. Nach Zugabe von 300 mg Polymer (MIP bzw. CP) wurde die Reaktionsmischung auf 60, 80 oder 100 °C erhitzt. Zu verschiedenen Intervallen wurden 0,5 ml Proben entnommen und zentrifugiert. Zur Analyse wurden 20 μl der Probe in die HPLC bei den angegebenen Bedingungen (siehe oben) injiziert. Die polymerfreie Lösung der beiden Substrate wurde analog untersucht.

Bei 80 °C wurde die Anfangskonzentration des HCCPD nach Tabelle 17 variiert, wobei die MS-Menge konstant im Überschuss gehalten wurde. Im gerührten Batchreaktor wurden 300 mg MIP mit 375 μmol (44 mg) MS und der in Tabelle 17 angeführten HCCPD-Menge in 15 ml DMF vermischt. Nachdem die gewünschte Temperatur erreicht worden war, wurden in halbstündigen Abständen 10 μl -Proben online (Abschnitt 5.3.2.3) untersucht.

Tabelle 17: Veränderung der HCCPD-Menge

<i>Versuchsnr.</i>	<i>HCCPD</i> <i>/ μl</i>	<i>MS</i> <i>/ mg</i>	<i>Molverhältnis</i> <i>HCCPD : MS</i>
1	12 ($\hat{=}$ 75 μmol)	44 ($\hat{=}$ 375 μmol)	1 : 5
2	6 ($\hat{=}$ 37,5 μmol)	44 ($\hat{=}$ 375 μmol)	1 : 10
3	2,4 ($\hat{=}$ 15 μmol)	44 ($\hat{=}$ 375 μmol)	1 : 25

5.3.2.3 Online-Analytik

Für die Online-Messung wurde in die Standard-HPLC (Angabe zu einzelnen Geräten sind grau hinterlegt in Tabelle 34, Anhang) ein programmierbarer Autosampler eingebaut und in der Weise umfunktioniert, dass die Proben direkt aus dem Batchreaktor über eine Pumpe eingesaugt und in die HPLC durch ein Ventil injiziert wurden (Abbildung 36). Beim Auslösen des Injektionsventils wurde ein Signal an den Rechner gesendet, um mit der Datenerfassung zu beginnen. Bei gleichen Analysebedingungen, wie unter 5.3.2.2 angegeben, wurde nach 30 min automatisch die nächste Probe analysiert.

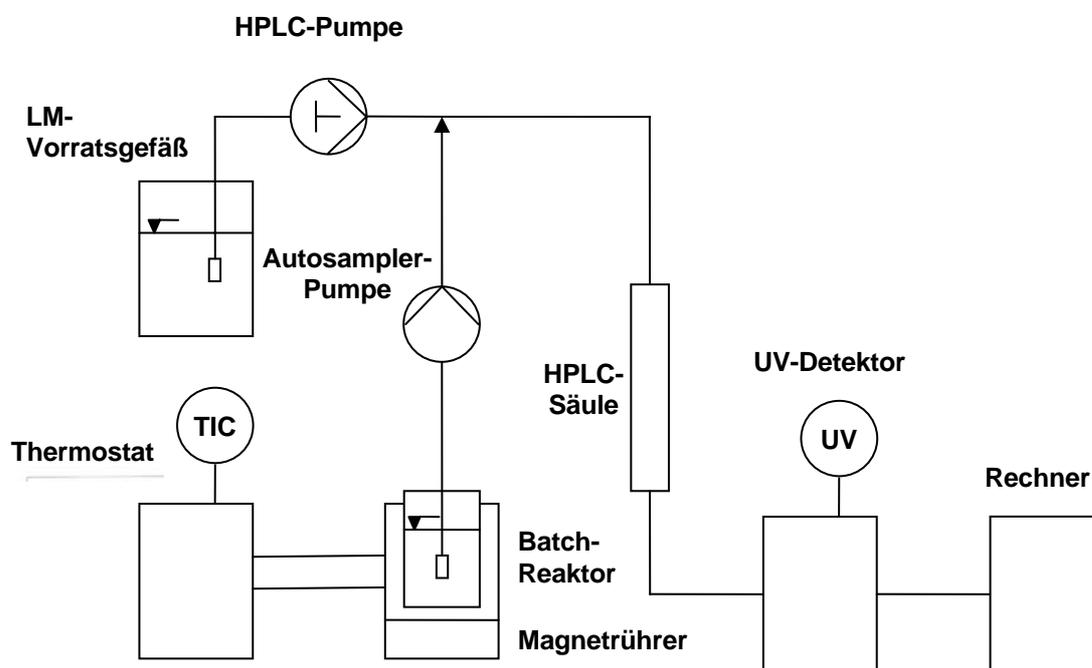


Abbildung 36: Online-HPLC-Messung

5.3.3 Vergleich der Prägemethoden

Für den Vergleich der beiden Prägemethoden wurden Katalysatoren aus äquivalenten Komponenten bei gleichem Moleinsatzverhältnis nach der Standardmethode und der Methode auf Basis von immobilisierten Templaten synthetisiert und in der modifizierten DA-Reaktion eingesetzt [170].

Die Polymerschalen wurden analog zu 5.3.2.1 angefertigt, wobei zu 2 g Silikapartikel 1 ml Polymerisationsmischung zugegeben wurde, so dass die folgenden Größen für das MIP 1 berechnet werden konnten (Tabelle 18).

Tabelle 18: Synthese der katalytischen MIPs nach der Methode auf Basis von immobilisierten Templaten

<i>Funktion</i>	<i>Substanz</i>	<i>Mol- verhältnis</i>	<i>MIP 1 / mg bzw. µl</i>	<i>CP 1 / mg bzw. µl</i>
Templat (TSA)	Immobil. CA	1	75 mg ($\hat{=}$ 0,2 mmol)	-
Funktionelles Monomer	MAA	2,4	40 µl ($\hat{=}$ 0,47 mmol)	40 µl ($\hat{=}$ 0,47 mmol)
Quervernetzer	DVB	34	960 µl ($\hat{=}$ 6,74 mmol)	960 µl ($\hat{=}$ 6,74 mmol)
Initiator	AIBN	0,9	29 mg ($\hat{=}$ 0,18 mmol)	29 mg ($\hat{=}$ 0,18 mmol)

Bei der Standardmethode wurde die freie Chlorendinesäure (CLEN) als TSA eingesetzt (Tabelle 19). Die entsprechenden MAA- und DVB-Mengen wurden dem Ansatz zur Polymersynthese auf Basis von immobilisierten Templaten (Tabelle 18) angepasst, um das gleiche Molverhältnis der Komponenten zu erreichen. Für diese Polymerisationsmischung wurde ACN als geeignetes Porogen bestimmt. Der Katalysator wurde mit einer für die Standardrezeptur bezogen auf das Templat typischen Menge (4 ml) beim MIP 2 oder mit einer geringen Menge an Lösungsmittel (0,5 ml) beim MIP 3 produziert.

Tabelle 19: Synthese der katalytischen MIPs nach der Standardmethode

<i>Funktion</i>	<i>Substanz</i>	<i>Mol- verhältnis</i>	<i>MIP 2 /mg bzw. ml</i>	<i>CP /mg bzw. ml</i>	<i>MIP 3 /mg bzw. ml</i>	<i>CP 3 /mg bzw. ml</i>
Templat (TSA)	CLEN	1	240 mg ($\hat{=}$ 0,62 mmol)	-	240 mg ($\hat{=}$ 0,62 mmol)	-
Funktionelles Monomer	MAA	2,4	0,128 ml ($\hat{=}$ 1,51 mmol)			
Quervernetzer	DVB	34	3 ml ($\hat{=}$ 21,1 mmol)			
Initiator	AIBN	0,9	90 mg ($\hat{=}$ 0,55 mmol)			
Porogen	ACN	-	4 ml ($\hat{=}$ 76,6 mmol)	4 ml ($\hat{=}$ 76,6 mmol)	0,5 ml ($\hat{=}$ 9,57 mmol)	0,5 ml ($\hat{=}$ 9,57 mmol)

Zu einer Lösung von 128 μ l (1,5 mmol) MAA, 3 ml (21 mmol) DVB und 90 mg (0,55 mmol) AIBN wurden 0,24 g (0,62 mmol) CLEN zugegeben. Zusätzlich wurden zum Auflösen des CLEN bzw. als Porogen entweder 4 ml oder 0,5 ml ACN zugegeben. Die Mischung wurde mit Stickstoff gespült und über Nacht bei 60 °C im Ofen polymerisiert. Die entstandenen Polymere (MIP 2 und MIP 3) wurden analog zu 5.3.1.1 aufgearbeitet (gemahlen, nass gesiebt, sedimentiert, getrocknet). Das TSA wurde in einer Soxhletapparatur zunächst mit Methanol/Essigsäure 9:1 (v/v) und anschließend mit Methanol extrahiert, wobei in beiden Fällen pro 1 g Polymer ca. 100 ml Extraktionsmittel eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Polymerpartikel im Vakuum getrocknet.

Die drei Polymerpaare (MIP1/CP1, MIP2/CP2 und MIP3/CP3) wurden auf gleiche Weise getestet, indem 300 mg Polymerpulver (MIP bzw. CP) in einer Lösung von 8,7 mg (75 μ mol) MS und 12 μ l (75 μ mol) HCCPD in 15 ml DMF suspendiert und bei 80 °C gerührt wurden. Alle 30 min wurde eine 10 μ l Probe automatisch in die laufende HPLC injiziert (Abschnitt 5.3.2.3).

5.4 Enantioselektive MIPs in der Katalyse

Zur Übertragung der Enantioselektivität als wichtige Eigenschaft der Enzyme auf die MIPs wurden zuerst die enantioselektiven MIP-Schalen in einer nicht-kompetitiven Affinitätsmessung untersucht (Abschnitt 5.4.1) und anschließend zu Katalysezwecken eingesetzt. Als Modellreaktion für die Untersuchung der Katalyse wurde eine Esterhydrolyse gewählt (Abschnitt 5.4.2), wobei die MIPs mit einem chiralen, an der Oberfläche eines Silikaträgers immobilisierten Phosphonat als TSA erzeugt wurden. Dieses wurde ausgehend von einem nicht chiralen Vorläufer gebildet, der mit einem enantiomerenreinen Alkohol modifiziert wurde. Wegen mangelnder Analysemethoden zum Nachweis chemischer Reaktionen an der Silikaoberfläche, mit deren Hilfe die Synthese des chiralen TSA in Anwesenheit von Silikapartikeln verfolgt werden sollte, wurde dieses TSA in einer Testsynthese zunächst in Abwesenheit der Silikapartikel hergestellt (Abschnitt 5.4.3). Anschließend wurde bei der Katalysatorherstellung die Synthese des TSA unter gleichen Vorschriften in Anwesenheit des Silikaträgers wiederholt, wobei aufgrund der Ergebnisse der Testsynthese davon ausgegangen werden konnte, dass die Synthese des chiralen TSA an der Trägeroberfläche erfolgreich durchgeführt wurde (Abschnitt 5.4.4). Das in Anwesenheit der Silikapartikel synthetisierte TSA wurde zuletzt als Templat zum molekularen Prägen nach der Technik auf Basis von immobilisierten Templaten verwendet. Die damit geformten enantioselektiven Polymerschalen wurden zusätzlich nach den Gesichtspunkten Partikelmorphologie und -größenverteilung charakterisiert.

5.4.1 MIP-Schalen von chiralen Templaten

Zur Ermittlung der grundsätzlichen Synthetisierbarkeit von enantioselektiven MIP-Schalen wurde ein chirales, mit einer Benzyloxycarbonylgruppe **Z** geschütztes Dipeptid L-Leu-L-Phe-Z aus Leucin Leu und Phenylalanin Phe über die Peptidbindung analog zu [171] an die bereits genannten Aminopropylsilikapartikel gekoppelt. Die Silikapartikel mit dem immobilisierten Templat wurden dann mit einer Lösung Trifluormethacrylsäure TFMAA als funktionellem Monomer inkubiert, und der Überschuss an TFMAA wurde ausgewaschen. Nach Zugabe von DVB und AIBN wurde die Polymerisation thermisch initiiert. Anschließend wurden die Silikapartikel und das Templat mit 40%-iger Flusssäure aufgelöst, abgetrennt und das fertige Polymer auf seine Affinität zum dipeptid-ähnlichen Dansyl-L-Phe getestet.

Dazu wurden von einer gerührten Suspension dieses Polymers der Konzentration 10 mg ml^{-1} in ACN $100 \text{ }\mu\text{l}$ -Proben in Eppendorfröhrchen transferiert. Eine variable Menge (zwischen 10 und $800 \text{ }\mu\text{l}$) einer Dansyl-L-Phe-Lösung der Konzentration $10 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ in ACN wurde diesen Proben zugefügt, die jeweils mit ACN auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt wurden. Zur Bestimmung der maximalen Konzentration (entspricht 100%) wurde eine der Proben ausschließlich mit Dansyl-L-Phe-Lösung aufgefüllt. Die Proben wurden eine Zeit lang geschüttelt und danach zentrifugiert. Die Konzentration des Dansyl-L-Phe wurde daraufhin in den Überständen fluorimetrisch bestimmt und auf die maximale Konzentration bezogen. Die Dansylgruppe wurde für die Analyse bei 350 nm angeregt und ihre Emission bei 485 nm detektiert. Zu Vergleichszwecken wurde wie für Dansyl-L-Phe beschrieben mit Dansyl-D-Phe verfahren.

5.4.2 Synthese des Substrats

Bei der Katalyse mit enantioselektiven MIPs wurde die Esterspaltung (Abbildung 37) des chiralen Boc-S-PheONP (**40**) zum p-NP (**42**) und Boc-S-Phe (**43**) fokussiert (Abschnitt 2.2.3.3). Als TSA wurde das chirale Phosphonat (**50**) gewählt. In dessen Struktur ist ein chirales Zentrum mit ähnlicher sterischer Konfiguration wie im Falle des Übergangszustands der Esterhydrolyse (**41**) vorhanden. Außerdem wurden Phosphonate häufig als TSA für Esterhydrolyse ausgewählt, da sie die sterische und elektronische Natur des Übergangszustands solcher Reaktionen gut nachempfinden [172,173,174,175].

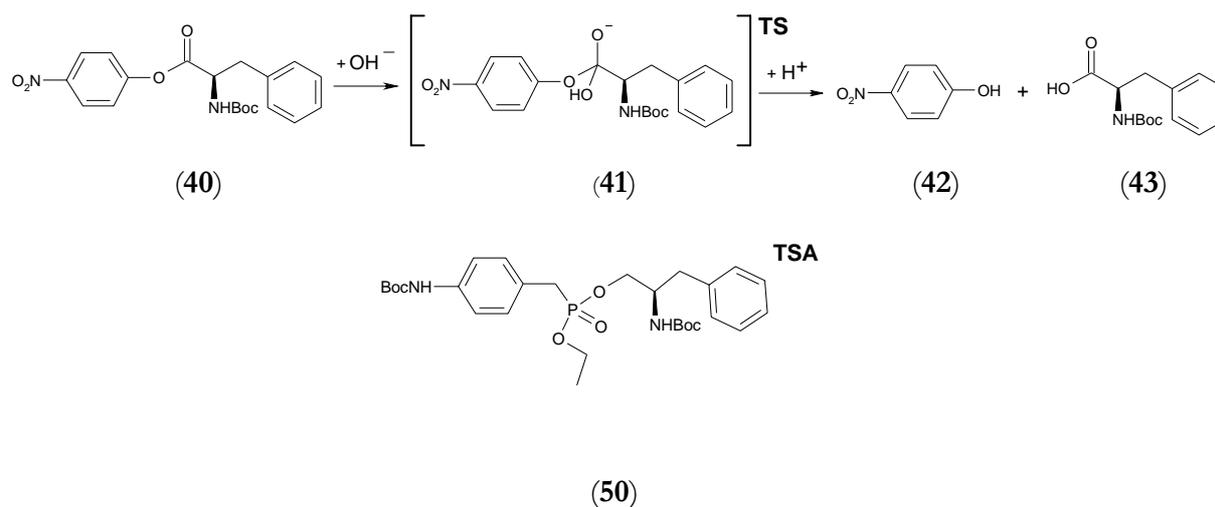


Abbildung 37: Modellreaktion zur Untersuchung der Enantioselektivität von katalytisch aktiven MIPs

Folgende Substanzen waren erforderlich, um die Kinetik der gewählten Esterhydrolyse untersuchen zu können:

- Boc-S-(-)-Phenylalanin (Boc-S-Phe) (Ausgangsstoff für die Substratsynthese)
- Boc-S-(-)-Phenylalanine- p-nitrophenylester (Boc-S-PheONP) (Substrat)

Vor der Untersuchung der Kinetik wurde das Substrat (**40**) ausgehend von der entsprechenden Aminosäure in zwei Reaktionsstufen synthetisiert. Zunächst wurde die Aminogruppe des S-(-)-Phenylalanins (S-Phe) unter Ausbildung von (**43**) geschützt (Abbildung 38) und im nächsten Schritt deren Carboxygruppe mit p-Nitrophenol p-NP verestert (Abbildung 39).

Synthese des Boc-S-(-)-Phenylalanins (Boc-S-Phe)

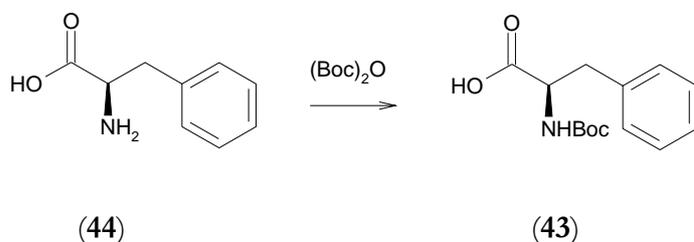


Abbildung 38: Schützen der Aminogruppe des S-Phe

Dazu wurden in einem mit Eis von außen gekühlten Kolben 10 mmol S-Phe (**44**) in 20 ml Dioxan gelöst. Dazu wurden 10 ml Wasser und 10 ml 1 N NaOH zugegeben. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf RT gebracht und mit 11 mmol Boc-Anhydrid (Di-*tert*-butyldicarbonat) (Boc)₂O versetzt. Die Lösung wurde 30 Minuten weiterhin bei RT gerührt.

Anschließend wurde die Mischung unter Vakuum auf die Hälfte des anfänglichen Volumens eingengt. Dem Rest wurden 30 ml Ethylacetat und, bis zum pH-Wert von 2-3, eine 1 M KHSO₄-Lösung (aq) hinzugefügt. Nach der Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase zweimal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zusätzlich dreimal mit je 30 ml Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert worden war, konnte das Produkt isoliert werden.

Das isolierte Produkt Boc-S-Phe (**43**) wurde mittels ¹H-NMR charakterisiert:

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,4 (9H, s); 2,7-3,35 (2H, m); 3,7 (1H, s); 6,97-7,47 (5H, m); 8,51 (1H, s)

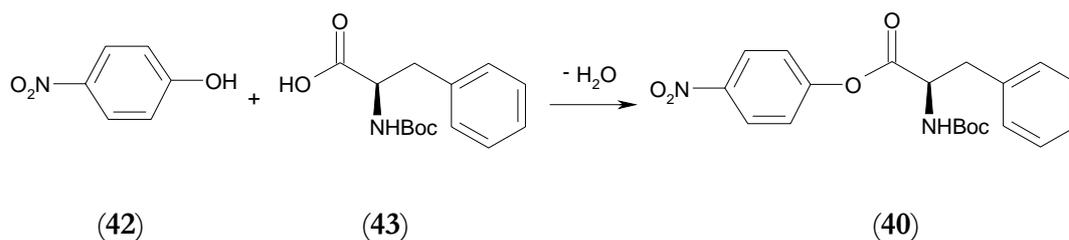
Synthese des Boc-S-(-)-Phenylalanine- p-nitrophenylesters (Boc-S-PheONP)

Abbildung 39: Veresterung der Boc-geschützten Aminosäure

In 35 ml Ethylacetat wurden 9 mmol Boc-S-Phe (43) gelöst. Anschließend wurden 9 mmol p-NP (42) und 9,45 mmol Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Die resultierende Lösung wurde 1,5 h bei RT gerührt und danach filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit je 30 ml Wasser und auf gleiche Weise mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (aq) ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen wurden zweimal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die jeweiligen organischen Phasen vereint wurden dreimal mit je 30 ml einer gesättigten NaCl-Lösung (aq) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Trockenmittel abfiltriert worden war, wurde das Ethylacetat unter Vakuum abdestilliert und das resultierende Rohprodukt aus Ethanol umkristallisiert. Die gebildeten Kristalle wurden mit kaltem Ethanol gereinigt.

Zur Charakterisierung des Produkts Boc-S-PheONP (40) wurde ¹H-NMR verwendet:

¹H-NMR: (CDCl₃) δ = 1,48 (9H, s); 3,22 (2H, d); 4,63-4,94 (1H, m); 7,02-7,62 (9H, m); 8,24 (1H, d)

5.4.3 TSA-Testsynthese

Das TSA wurde in Anwesenheit der Silikapartikel hergestellt und als Templat zum molekularen Prägen nach der Technik auf Basis von immobilisierten Templaten verwendet. Um die Synthese des chiralen TSA zu verifizieren, wurde dieses zunächst ohne Silikaträger synthetisiert. Als Vorläufer wurde Diethyl-4-aminobenzylphosphonat (DAP) eingesetzt, welches mit einem chiralen Aminoalkohol modifiziert wurde. Zunächst wurde die Aminogruppe des Alkohols geschützt (Abbildung 40) und DAP in zwei Reaktionsstufen in Ethyl-4-(Bocimino)benzylphosphonat (IP) überführt (Abbildung 41). Dabei wurden die einzelnen Reaktionsschritte mit ¹H-NMR-Spektren belegt.

Im Rahmen der TSA-Testsynthese wurden folgende Substanzen hergestellt:

- Boc-S-(-)-Phenylalaninol (Boc-S-PheOH) (Ausgangsstoff für die Synthese des chiralen TSA)
- Ethyl-4-(Bocimino)benzylphosphonat (IP) (Ausgangsstoff für die Synthese des chiralen TSA)
- Ethyl-Boc-S-(-)-Phenylalaninyl 4-(Bocimino)benzylphosphonat (Boc-S-IP) (chirales TSA)

Synthese des Boc-S-(-)-Phenylalaninols (Boc-S-PheOH)

Zunächst wurde der chirale Aminoalkohol (**45**) mit einer Boc-Gruppe geschützt (Abbildung 40), wobei Boc-S-PheOH (**46**) analog zu Boc-S-Phe isoliert wurde (S. 80).

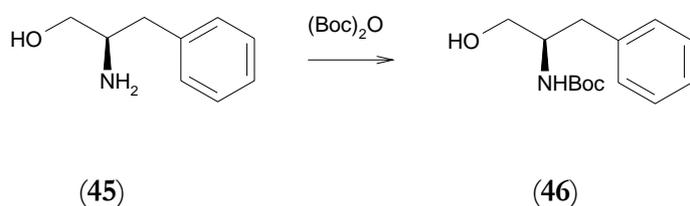


Abbildung 40: Schützen der Aminogruppe des S-PheOH

Sowohl die Ausgangsstoffe $(\text{Boc})_2\text{O}$ und S-PheOH (**45**) als auch das Produkt Boc-S-PheOH (**46**) wurden mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie analysiert:

$(\text{Boc})_2\text{O}$

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3) $\delta = 1,52$ (9H, s)

S-PheOH (**45**)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3) $\delta = 1,74$ (3H, s); 2,52 (1H, q); 2,80 (1H, q); 2,98-3,26 (1H, m); 3,38 (1H, q); 3,64 (1H, q); 7,00-7,46 (5H, m)

Boc-S-PheOH (**46**)

$^1\text{H-NMR}$: (n-Hexan) $\delta = 1,41$ (9H, s); 2,83 (2H, d); 3,40-3,76 (2H, m); 3,76-4,02 (1H, m); 7,05-7,44 (5H, m)

Synthese des Ethyl-L-(Bocimino)benzylphosphonats (IP)

Das modifizierte Phosphat IP (**49**) wurde mit dem bereits geschützten Aminoalkohol (**46**) umgesetzt (Abbildung 42), nachdem die Aminogruppe des DAP (**47**) blockiert und eine seiner Ethylgruppen abgespalten worden war (Abbildung 41).

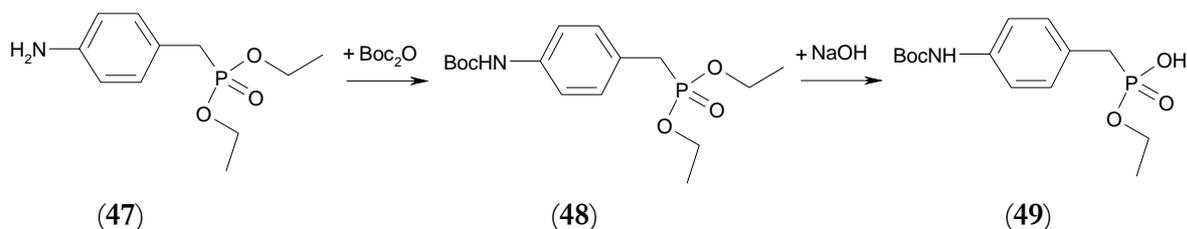


Abbildung 41: Chemische Veränderung des DAP

Die Inaktivierung der Aminogruppe wurde entsprechend der Prozedur für die Synthese des Boc-S-Phe durchgeführt (siehe S. 80). Für die Verseifung des Zwischenprodukts (**48**) wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zu 4 mmol (**48**), in etwas Wasser gelöst, wurden 12 ml einer 1 M NaOH-Lösung hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 60 °C über Nacht gerührt. Danach wurde dieses mit 1M HCl, bis zu einem pH-Wert von 1-2 angesäuert. Nach der Phasentrennung durch Zugabe von Dichlorethan wurde das Rohprodukt aus der wässrigen Phase isoliert und im Vakuum getrocknet. Das reine Produkt konnte nach einer Umkristallisation in Methanol isoliert werden.

Um die Umsetzung von DAP zu IP nachweisen zu können, wurden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren gemessen und ausgewertet:

DAP (**47**)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3) δ = 1,23 (6H, t); 3,06 (2H, d); 4,00 (4H, quin); 6,64 (3H, d); 7,07 (2H, q);

IP (**49**)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3) δ = 1,24 (3H, t); 2,68 (1H, s); 2,78 (1H, s); 3,66 (2H, quin); 6,62 (3H, d); 6,93 (2H, q)

Synthese des Ethyl-Boc-S-(-)-Phenylalaninyl 4-(Bocimino)benzylphosphonats (Boc-S-IP)

In der Reaktion des IP (**49**) mit dem Boc-S-PheOH (**46**) konnte das chirale TSA (**50**) gebildet (Abbildung 42) und anschließend als Templat zur Herstellung molekular geprägter, katalytisch aktiver Polymere für die in Abbildung 37, Abschnitt 5.4.2 dargestellte Reaktion eingesetzt werden.

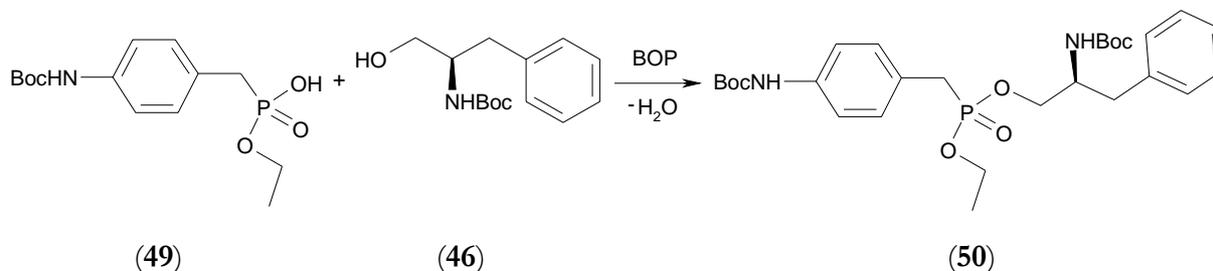


Abbildung 42: Herstellung des chiralen TSA

Zu 0,2 mmol (65,6 mg) IP (**49**) wurden 0,2 mmol (37,3 mg) Boc-S-PheOH (**46**), 0,56 mmol (79 μ l) Triethylamin und 0,36 mmol (162 mg) Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (Castros BOP Reagenz) in 3,5 ml CH₂Cl₂ zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT unter Stickstoffatmosphäre 24 h gerührt.

Danach wurden 5 ml einer gesättigten NaCl-Lösung (aq) zugegeben. Nach der Phasentrennung wurde das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden zunächst mit einer 1 M HCl-Lösung (aq), danach mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (aq) und schließlich mit einer NaCl-Lösung (aq) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Trocknungsmittel abfiltriert worden war, wurde das Lösungsmittel im Vakuum abrotiert, wobei das Produkt in Form von weißen Kristallen isoliert werden konnte.

Das erhaltene Produkt Boc-S-IP (**50**) wurde mittels ¹H-NMR analysiert:

¹H NMR: (CDCl₃) δ = 1,00-1,92 (21 H, m); 2,62-3,06 (4H, m); 3,40-4,00 (5H, m); 6,97-7,50 (9H, m)

5.4.4 Katalysatorherstellung

Das zur TSA-Synthese entwickelte Konzept (Abschnitt 5.4.3) wurde in Gegenwart der Silikapartikel wiederholt, mit dem Ziel, das chirale TSA an der Silikaoberfläche zu bilden, um es als Templat zum molekularen Prägen nach der Technik auf Basis von immobilisierten Templaten zu verwenden. Bei der Durchführung einzelner Reaktionsschritte wurde im Sinne einer Festphasensynthese auf eine Aufarbeitung der Produkte nach den einzelnen Reaktionsschritten verzichtet. Zur Kontrolle wurden im Laufe der Modifizierung Silikaprobe zur Elementaranalyse abgegeben.

Ein Teil der an der Silikaoberfläche vorhandenen Aminogruppen ($0,9 \text{ mmol g}^{-1}$ Silikamaterial) wurde in der Reaktion mit Bernsteinsäureanhydrid für die Immobilisierung des DAP vorbereitet. Dazu wurden diese nach einer Ringöffnung des Anhydrids in $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ -Gruppen überführt (Abbildung 43), an welche sich die Aminogruppe des DAP koppeln ließ. Die restlichen Aminogruppen an der Silikaoberfläche wurden anschließend mit Essigsäureanhydrid inaktiviert.

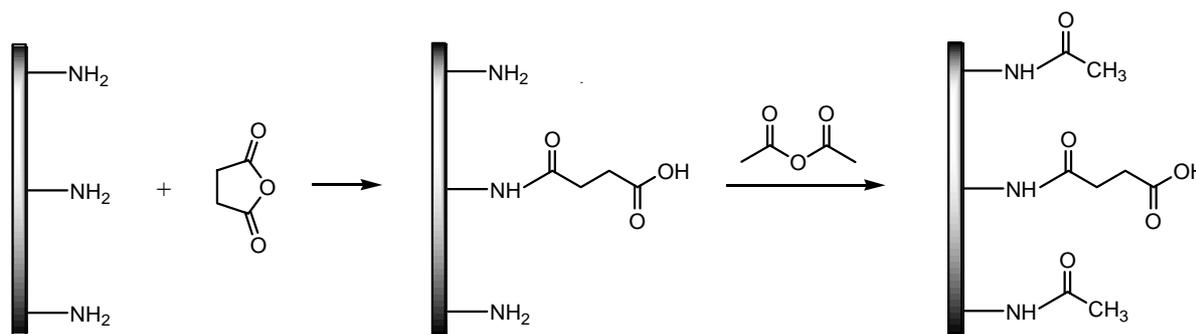


Abbildung 43: Vorbereitung des Trägers zur Immobilisierung

Ausgehend vom vollständigen Umsatz des Bernsteinsäureanhydrids bei der Vorbereitung des Trägers zur Immobilisierung wurde die Modifizierung des DAP nach optimierten Vorschriften durchgeführt (Abbildung 44), wobei die angesetzte Menge der erforderlichen Reagenzien entsprechend der DAP-Konzentration an der Silikaoberfläche verringert wurde (Abschnitt 5.4.3).

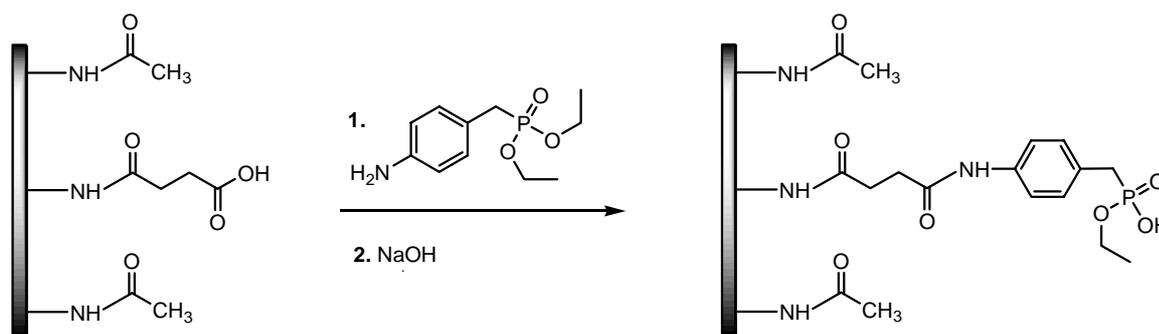


Abbildung 44: Kopplung und Modifizierung des DAP an der Silikaoberfläche

Anschließend wurde eine Veresterung des Phosphonats durch Zugabe des chiralen Aminoalkohols durchgeführt (Abschnitt 5.4.3), womit ein chirales TSA an der Silikaoberfläche erzeugt wurde (Abbildung 45).

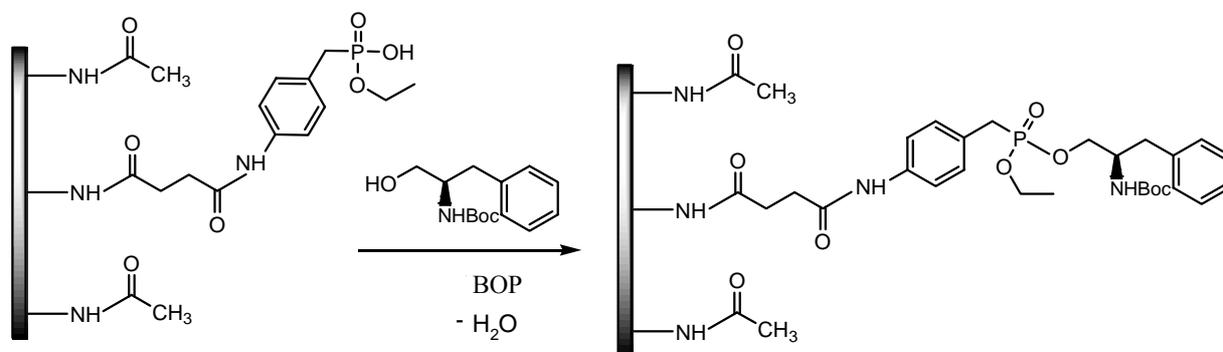


Abbildung 45: Einführung des chiralen Zentrums am DAP-Silika

Synthese des chiralen TSA am Silikaträger

In einem Plastikbehälter wurden 0,1 g ($\hat{=}$ 0,1 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 5 ml DMF aufgelöst und zu 1 g Aminopropylsilika zugegeben. Die Suspension wurde 2 h auf dem Schütteltisch inkubiert und danach über eine Glasfritte filtriert. Nach dem Waschen mit 100 ml DMF wurde das Silikamaterial mit 5 mmol Essigsäureanhydrid, die in 5 ml DMF gelöst wurden, weitere 2 h auf dem Schütteltisch in Bewegung gehalten. Die Silikapartikel wurden unter Verwendung einer Glasfritte abgetrennt und noch einmal mit 100 ml DMF gewaschen.

Die Silikapartikel wurden in einer Lösung von 0,2 mmol (48 mg) DAP und 0,5 mmol DIC als Kupplungsagens in 5 ml DMF suspendiert. Nach 6 h Inkubationszeit auf dem Schütteltisch wurde die Suspension mit einer Glasfritte filtriert, die erhaltenen Partikel mit je 100 ml DMF, CH_2Cl_2 und MeOH gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Für die Verseifung des DAP wird auf die Synthese des Ethyl-4-Aminobenzylphosphonats (S. 83) verwiesen und für die anschließende Veresterung auf die Synthese des Boc-S-IP (S. 84).

Zur Herstellung der CP-Silikapartikel wurden zu 1 g Silikapartikeln, die in 5 ml DMF suspendiert wurden, 5 mmol Essigsäureanhydrid zugegeben und 2 h auf dem Schütteltisch inkubiert. Anschließend wurden die Silikapartikel analog zu MIP-Silika gewaschen.

Synthese der enantioselektiven Polymerschalen

Um die enantioselektiven Polymerschalen zu formen, wurde eine Mischung von 2 mmol (170 μ l) MAA, 28 mmol (4 ml) DVB und 1,46 mmol (240 mg) AIBN mit Stickstoff gespült. Aus dieser Lösung wurden 1,2 ml entnommen und zu 2 g MIP- bzw. CP-Silika hinzugefügt (Tabelle 20). Nach der Homogenisierung (Abschnitt 5.3.2.1) wurde die Polymerisation bei 60 °C im Ofen über Nacht absolviert.

Tabelle 20: Synthese der enantioselektiven MIPs (bezogen auf 1 g Silika)

<i>Funktion</i>	<i>Substanz</i>	<i>Mol- verhältnis</i>	<i>MIP / mg bzw. μl</i>	<i>CP / mg bzw. μl</i>
Templat (TSA)	Immobil. DAP	1	24 mg ($\hat{=}$ 0,1 mmol)	-
Funktionelles Monomer	MAA	2,8	24 μ l ($\hat{=}$ 0,28 mmol)	24 μ l ($\hat{=}$ 0,28 mmol)
Quervernetzer	DVB	42	595 μ l ($\hat{=}$ 4,18 mmol)	595 μ l ($\hat{=}$ 4,18 mmol)
Initiator	AIBN	2,1	35 mg ($\hat{=}$ 0,21 mmol)	35 mg ($\hat{=}$ 0,21 mmol)

Anschließend wurden die Silika-Polymer-Komposite in 4 ml Aceton suspendiert und 8 ml einer 40%-iger Flusssäure wurden vorsichtig unter Kühlung im Eisbad zugetropft. Nach 5 Stunden Inkubationszeit wurden die Polymerschalen abfiltriert, analog zu 5.3.2.1 aufgearbeitet und hinsichtlich der katalytischen Wirksamkeit auf das chirale Substrat evaluiert.

Esterhydrolyse

Boc-S-PheONP (**40**) wurde mit einem $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ Kalium-Phosphat-Puffer (pH 4,5) zu einer Lösung der Konzentration von $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$ angesetzt und bei $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Drei Batchversuche mit je 10 ml dieser Lösung wurden gestartet: Im ersten wurden 100 mg MIP, im zweiten 100 mg CP zugegeben. Der dritte Versuch wurde ohne Polymerzusatz durchgeführt. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden 1-1,5 ml Proben unter weiterem Rühren homogen entnommen, wobei versucht wurde, in den Proben das gleiche Verhältnis zwischen Polymerpartikeln und der Flüssigkeit wie im Reaktor einzuhalten. Der Feststoff wurde mit einer Minizentrifuge grob und durch anschließende Filtration über einen Einwegfilter mit einer Porengröße von $2 \text{ }\mu\text{m}$ abgetrennt, wodurch die weitere Hydrolyse zu p-NP und Boc-S-Phe gestoppt wurde. Bis zur Analyse der UV-Absorption in einem Spektrometer wurden die Proben kühl gelagert ($0 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Das Problem bei der UV-Analyse, dass bei einem pH-Wert > 8 die UV-Absorption dieser Proben aufgrund des gebildeten Phenolats pH-abhängig ist, wurde dadurch umgangen, dass die Messungen einschließlich Kalibrierung bei einer bestimmten Wellenlänge an dem so genannten isosbestischen Punkt durchgeführt wurden, bei dem die Summe der Absorptionen bzw. der Konzentrationen von zwei hauptsächlich absorbierenden Spezies konstant bleibt. Dieser konnte in einem Test, in dem für eine bestimmte p-NP Konzentration die Absorption bei verschiedenen pH-Werten gemessen wurde, bei 348 nm festgestellt werden.

6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

6.1 Separation mit MIPs

In der Anfangsphase dieser Arbeit wurden MIPs für die Chromatographie und Extraktion von Antioxidantien zur Lösung eines praxisrelevanten Problems aus dem Bereich der Lebensmittelchemie entwickelt.

Nach der Standardmethode des molekularen Prägens wurden mit BHA, BHT und PG geprägte Polymere isoliert und deren Kapazitätsfaktoren chromatographisch evaluiert. Mit dem MIP-PG als Festphase wurde für die zusätzliche Bestimmung der Affinität die Durchbruchskurve aufgenommen und das PG aus einer Probe komplexer Zusammensetzung extrahiert. Zum Vergleich wurden für diese Antioxidantien in Batchextraktionen die Einpunktadsorptionsisothermen bestimmt, bei welchen unter isothermen Bedingungen die von den MIPs adsorbierte Menge für eine bestimmte Ausgangsmenge der Antioxidantien gemessen wurde.

6.1.1 Kapazitätsfaktoren

Nach abgeschlossenen Affinitätsmessungen (Abschnitt 5.1.2) wurden die Kapazitätsfaktoren k'_{MIP} und k'_{CP} (Tabelle 21) nach Gl. 21 und daraus die Trennfaktoren (α) nach Gl. 22 kalkuliert (Gl. 21 und Gl. 22, Abschnitt 2.2.1.1).

Tabelle 21: Ermittelte Kapazitäts- und Trennfaktoren

<i>Templat / Analyt</i>	k'_{MIP}	k'_{CP}	α -Wert
BHA	1,58	1,42	1,12
BHT	3,62	2,46	1,47
PG	3,49	2,81	1,24

Der höchste Trennfaktor konnte ermittelt werden, wenn BHT (**31**) als Templat beim Prägen und anschließend als Analyt bei der chromatographischen Affinitätsmessung verwendet wurde (Abbildung 46). Offensichtlich wird die Affinität nicht nur durch die im BHT-Molekül vorhandene Hydroxygruppe beeinflusst, da im Fall des PG (**32**) aufgrund der vier OH-Gruppen der größte α -Wert verzeichnet werden müsste. Beim BHA (**30**) kann der schwächere Prägeefferkt durch den Gebrauch eines Isomerengemischs als Templat erklärt werden.

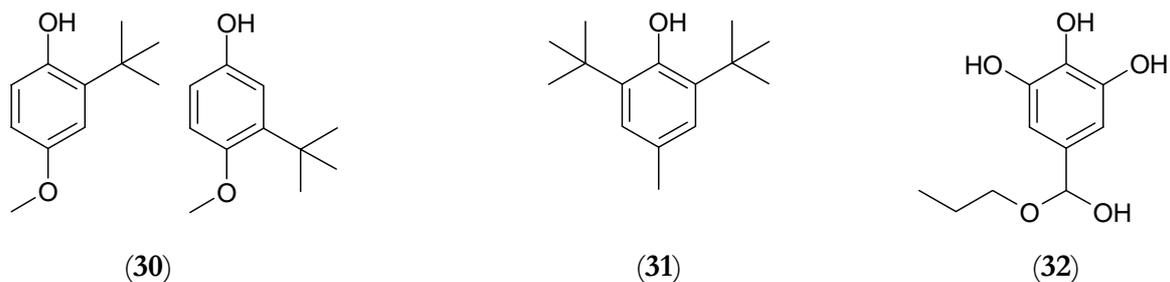


Abbildung 46: Chemische Strukturen der untersuchten Antioxidantien: Isomere von Butylhydroxyanisol BHA (**30**), Butylhydroxytoluol BHT (**31**), Propylgallat PG (**32**)

Eine beispielhafte Affinitätsmessung zeigte, dass PG ($t = 18,70$ min) unter Einsatz der PG-MIP-Säule angesichts der vorhandenen Prägungen deutlich länger als Aceton ($t_0 = 4,04$ min) zurückgehalten wurde (Abbildung 47A). Im Gegensatz dazu wurde durch die CP-Säule bei vergleichbarer Retentionszeit für das Aceton ($t_0 = 4,20$ min) das PG ($t = 15,79$ min) schlechter retardiert, weshalb sein Signal im Chromatogramm früher als beim MIP erscheint (Abbildung 47B).

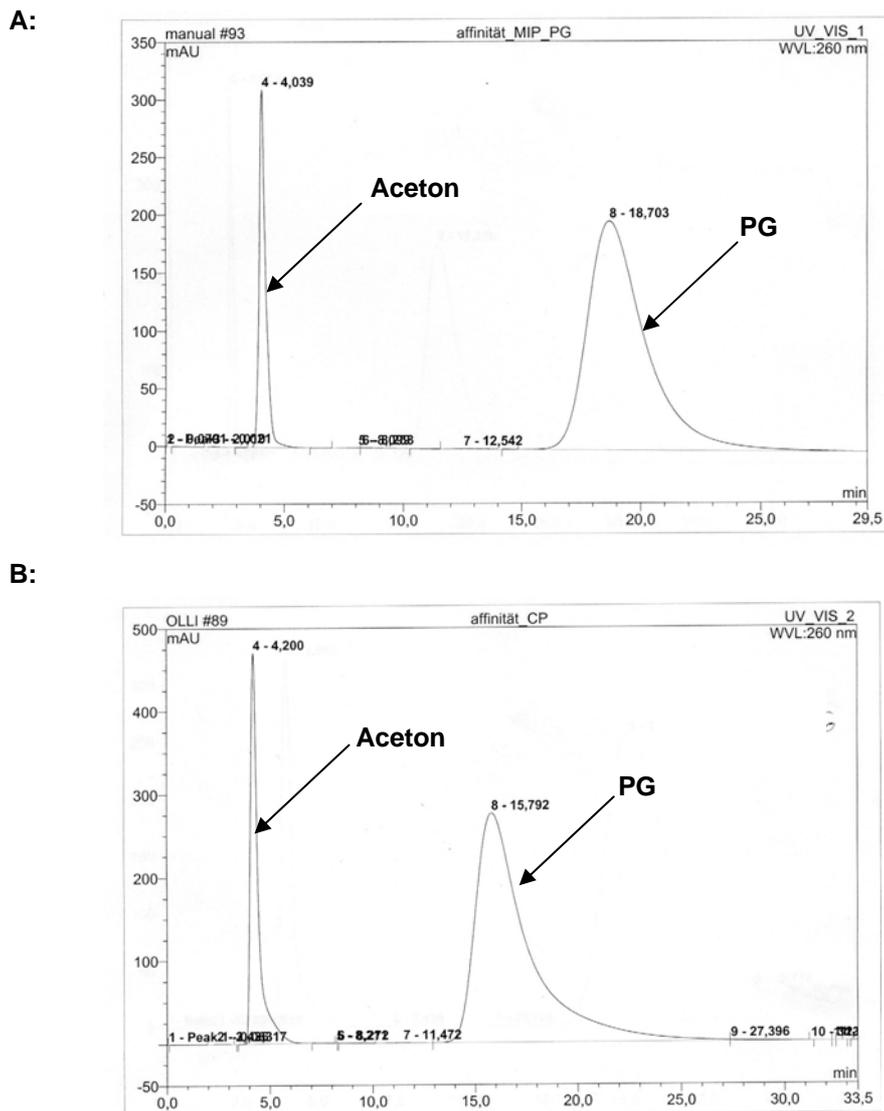
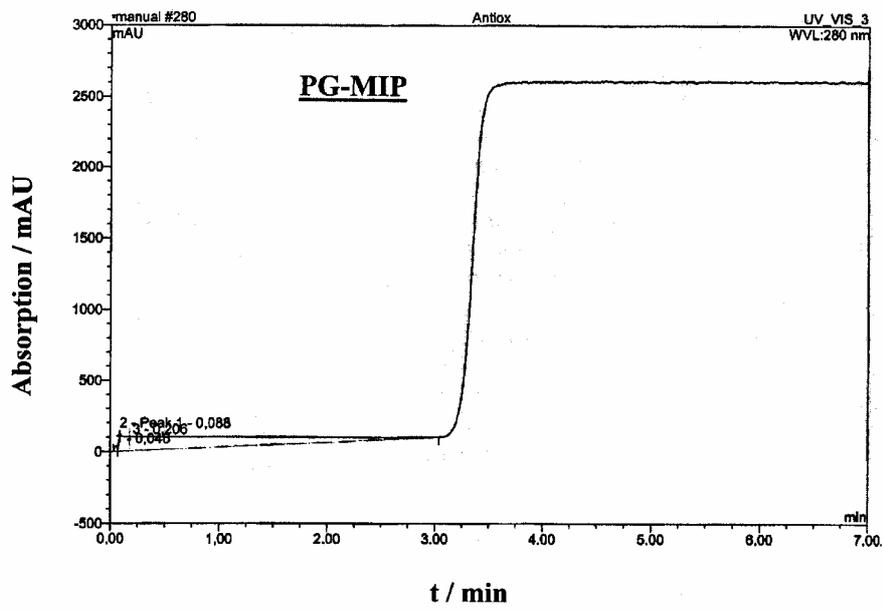


Abbildung 47: Chromatographische Analyse von Propylgallat (PG) mit einer Konzentration von $1,2 \text{ mg ml}^{-1}$ in mobiler Phase/Aceton 95:5 (v/v). Mobile Phase: MeOH/H₂O 1:1 (v/v) mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} . Stationäre Phase: mit PG geprägtes MIP (A), entsprechendes CP (B). Detektion bei 260 nm. Auftragung der Absorption gegen die Zeit

6.1.2 Durchbruchskurven

Nach der Auswertung der bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml min^{-1} und für eine Lösung von $0,105 \text{ mg ml}^{-1}$ PG in Methanol erhaltenen Durchbruchskurven (Abschnitt 5.1.3) für das PG-MIP wurde eine Durchbruchzeit von $t = 3,35 \text{ min}$ (Abbildung 48A) und für das CP von $t = 3,2 \text{ min}$ (Abbildung 48B) bestimmt. Unter Berücksichtigung des Totvolumens zwischen der Säule und dem Detektor, welches mit $0,15 \text{ ml}$ bestimmt wurde, wurde für das PG-MIP ein Durchbruchsvolumen von $3,2 \text{ ml}$ und für das CP $3,05 \text{ ml}$ erzielt, d.h. der relative Faktor liegt bei 1,5.

A:



B:

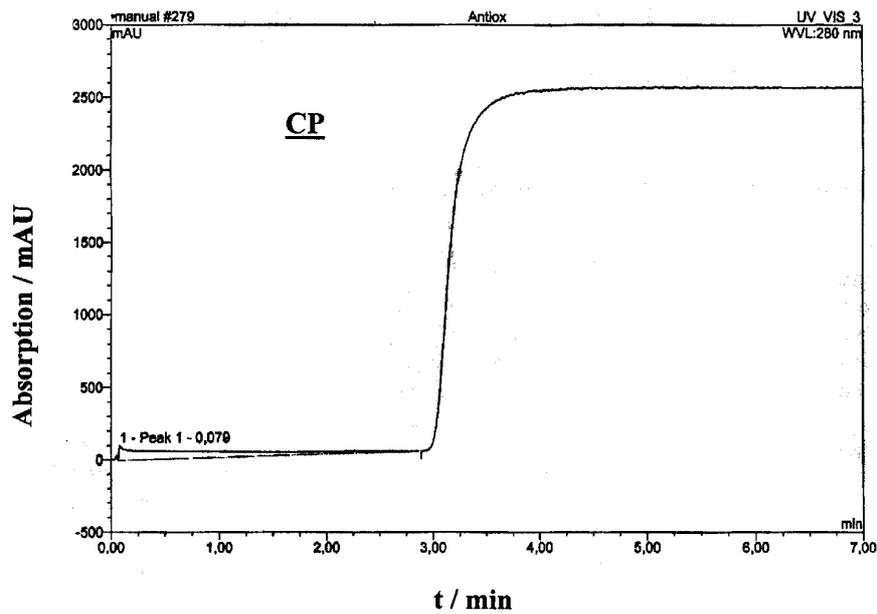


Abbildung 48: Durchbruchskurven von $0,105 \text{ mg ml}^{-1}$ Propylgallat (PG) mit Polymerfestphasensäulen bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} . Detektion bei 280 nm. Auftragung der Absorption gegen die Zeit. Mit PG geprägtes MIP (A), entsprechendes CP (B) als Festphase

6.1.3 MIPs zur Festphasenextraktion

In der Festphasenextraktion auf Basis einer PG-MIP-Säule wurde das PG aus einem PG-haltigen Apfelsaft angereichert und die PG-Menge in der HPLC analysiert (Abschnitt 5.1.3). Dabei konnte das PG-Signal in Chromatogrammen nicht eindeutig von dem starken Basisrauschen identifiziert werden. Allerdings wurde nach der Analyse für das PG-MIP im Vergleich zum CP ein Vielfaches an Lösungsmittel benötigt, um die Apfelsaft-PG-Mischung von der Säule vollständig zu entfernen. Der größere Lösungsmittelverbrauch deutet darauf hin, dass vom MIP als Festphase mehr PG als vom CP adsorbiert wurde und somit die Festphasenextraktion in dem Fall effizienter war.

Die Experimente zur Festphasenextraktion im Batchmodus (Abschnitt 5.1.4) wurden in zwei verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Wenn mit MeOH extrahiert wurde, wurde für das BHT-MIP und PG-MIP kein spezifisches Verhalten bezogen auf das CP beobachtet. Im Fall des PG wurde das jeweilige Antioxidans vom CP sogar besser adsorbiert (Tabelle 22). Die im Überstand vom CP gemessene höhere Konzentration des PG im Vergleich zur Vorratslösung (eingekreist in Tabelle 22) lässt sich auf die während der Extraktion aufgelösten Polymerbestandteile zurückführen, die sich störend auf die UV-Detektion bei der HPLC auswirken. Da im Polymer zuvor kein Templat vorhanden war, konnte ein eventuelles "Ausbluten" des Polymers (Abschnitt 2.2.1.2) ausgeschlossen werden.

Eine extreme Differenz der BHA-Konzentrationen im Überstand wurde in der Adsorption des BHA-MIP und CP nach 233,5 h in MeOH festgestellt (Tabelle 22). Wenn die Werte in Klammern berücksichtigt werden, die prozentual die von den Polymeren adsorbierte Menge an Antioxidantien bezogen auf die Menge in den Vorratslösungen darstellen, ergibt sich zwischen dem BHA-MIP und CP als Festphasen ein Faktor von sechs. Dieser konnte bei der Extraktion in ACN nicht bestätigt werden (Tabelle 23). Beim BHT-MIP führte der Wechsel des Lösungsmittels zu einer Verbesserung der Resultate. In ACN konnte mit dem PG-spezifischen MIP, relativ zur Anreicherung in MeOH, mehr PG extrahiert werden.

Mit Blick auf diese Ergebnisse scheint der Einfluss des Porogens auf die Extraktion des jeweiligen Antioxidations mit dem geeigneten MIP nicht allgemein gültig sondern von Systemkomponenten abhängig zu sein, wobei für eine fundierte Aussage zu wenig Daten vorliegen. Die durchgeführten Messungen sollen als Ansatzpunkt zur Auswahl der entsprechenden Parameter zugrunde gelegt werden, um Adsorptionsisothermen für diese Polymere über eine lange Extraktionszeit mit mehreren Messpunkten in verschiedenen Lösungsmitteln aufzunehmen.

Tabelle 22: Ergebnisse der Batchextraktion in Methanol unter Verwendung der jeweiligen MIP- bzw. CP-Partikel

Extraktionszeit <i>h</i>	BHA-Vorratslösung $\mu\text{g ml}^{-1}$	CP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$	BHA-MIP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$
42,5	98,6	98 ($\hat{=}$ 0,6 % adsorbiert)	96,5 ($\hat{=}$ 2 % adsorbiert)
233,5	96,6	81,6 ($\hat{=}$ 15 % adsorbiert)	7,6 ($\hat{=}$ 92 % adsorbiert)

Extraktionszeit <i>h</i>	BHT-Vorratslösung $\mu\text{g ml}^{-1}$	CP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$	BHT-MIP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$
186,5	99,5	97,9 ($\hat{=}$ 1,6 % adsorbiert)	99,5 ($\hat{=}$ 0 % adsorbiert)

Extraktionszeit <i>h</i>	PG-Vorratslösung $\mu\text{g ml}^{-1}$	CP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$	PG-MIP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$
21	78,1	86,1	77,9 ($\hat{=}$ 0,3 % adsorbiert)

Tabelle 23: Ergebnisse der Batchextraktion in Acetonitril unter Verwendung der jeweiligen MIP- bzw. CP-Partikel

Extraktionszeit <i>h</i>	BHA-Vorratslösung $\mu\text{g ml}^{-1}$	CP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$	BHA-MIP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$
42,5	82,4	77,2 ($\hat{=}$ 6,3 % adsorbiert)	76,8 ($\hat{=}$ 6,8 % adsorbiert)
233,5	80,3	73,4 ($\hat{=}$ 8,6 % adsorbiert)	72,6 ($\hat{=}$ 9,6 % adsorbiert)

Extraktionszeit <i>h</i>	BHT-Vorratslösung $\mu\text{g ml}^{-1}$	CP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$	BHT-MIP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$
186,5	83,4	73,6 ($\hat{=}$ 12 % adsorbiert)	75,5 ($\hat{=}$ 9,5 % adsorbiert)

Extraktionszeit <i>h</i>	PG-Vorratslösung $\mu\text{g ml}^{-1}$	CP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$	PG-MIP-Überstand $\mu\text{g ml}^{-1}$
21	84,4	72,8 ($\hat{=}$ 14 % adsorbiert)	67,6 ($\hat{=}$ 20 % adsorbiert)
21	84,4	74,3 ($\hat{=}$ 12 % adsorbiert)	68,3 ($\hat{=}$ 19 % adsorbiert)
21	84,4	69,9 ($\hat{=}$ 17 % adsorbiert)	64,7 ($\hat{=}$ 23 % adsorbiert)
Mittelwert und Standardabw.	84,4	72,3 \pm 2,3 ($\hat{=}$ 14 \pm 3 % adsorbiert)	66,9 \pm 1,9 ($\hat{=}$ 21 \pm 2 % adsorbiert)

Obwohl die Retentionszeiten der Affinitätsmessungen eine Funktion der Beladung sind, korrelieren deren Ergebnisse mit denen der Batchextraktion in diesem Fall nicht, da die Messungen nicht von gleichen Bedingungen ausgehen. Der Unterschied besteht hauptsächlich in der Wahl des Lösungsmittels, wodurch das Quellvermögen der Polymere beeinflusst wird, und in der Größe der Polymerpartikel, die für die Diffusion in diese Partikel entscheidend ist.

Außerdem kann der besonders hohe Wert für die Adsorption des BHT-MIP in der Flüssigkeitschromatographie auf andere Effekte zurückgeführt werden. Eine Art des selektiven Transports wurde z.B. von Mathew-Krotz et al. bei geprägten Membranen bereits erkannt [176]. Nach dem Prägen mit 9-Ethyladenin konnte das Adenin durch diese Membran in einem kontinuierlichen (Flüssigkeitschromatographie-ähnlichen) Prozess deutlich schneller transportiert werden als zur Kontrolle verwendetes Cytosin oder Thymin. Dieser Effekt wurde mit einer reversiblen Komplexierung und einem Austausch zwischen 9-Ethyladenin und seinen Prägnungen erklärt. Allerdings können solche Phänomene im Batchmodus nicht auftreten, weil in diesem Fall der Analyt nicht kontinuierlich gefördert wird.

6.2 High Throughput Screening von MIP-Rezepturen

Aufbauend auf den Arbeiten mit einzelnen, unverpackten Membranen (Abschnitt 5.2.1) wurden die Membranen in kommerziell erhältlichen Einwegfiltern mittels Grafting mit dünnen Polymerfilmen versehen (Abschnitt 5.2.2). Für optisch aktive R-(–)-2-Phenylbuttersäure wurde unter Verwendung drei verschiedener Quervernetzer und drei Porogene eine kombinatorische Bibliothek von insgesamt 45 Polymerpaaren synthetisiert, die in zwei Tagen auf ihre Affinität zum verwendeten Templat getestet wurde (Abschnitt 5.2.3). Somit verlief das Screening verschiedener Polymerrezepturen wesentlich schneller als über die Massepolymere (vergleiche Abschnitt 4).

Die Affinität der einzelnen Filme wurde als Differenz der Templatkonzentrationen in Vorratslösung und Permeat, bezogen auf ein Gramm Polymer, bezeichnet. Aus dem Verhältnis des MIP-Werts zum CP-Wert wurden relative Werte für die korrespondierenden Paare, d.h. eine relative Affinität, erzielt.

Ein eindeutiges Indiz für eine vorhandene Polymerschicht auf den Membranen war neben der Massezunahme eine rosa-braune Verfärbung ihrer Oberfläche, die im Falle der MIP-Filme beim Waschen verloren ging. Diese Farbänderung wurde nicht bei CP-Filmen beobachtet und deshalb auf die Anwesenheit des Templats zurückgeführt. Basierend auf dieser Beobachtung konnte von der Entstehung eines Charge-Transfer-Komplexes zwischen dem Templat und dem Monomer ausgegangen werden, der prinzipiell als Merkmal solcher Systeme ausgenutzt werden kann.

6.2.1 DVB als Quervernetzer

Die Polymere, die mit DVB in ACN vernetzt wurden, zeigen eine maximale relative Affinität von 4,7 bei einem molaren Templat-Divinylbenzol-Verhältnis ($T : DVB$) von 1 : 8 (Abbildung 49). Bei größeren DVB-Mengen bezogen auf das Templat nimmt die relative Affinität stark ab. Die Eignung des aromatischen Vernetzungsmittels bei kleineren T-DVB-Molverhältnissen kann durch die Ausbildung der π - π -Wechselwirkungen zwischen den beiden Komponenten erklärt werden, die zu selektiven Abdrücken führen. Erhöht man die DVB-Menge, werden die Prägungen anhand des starren Benzolrings unflexibel, wodurch sie sich bei der Wiedererkennung an das Templat nicht anpassen können und schlechtere Ergebnisse liefern.

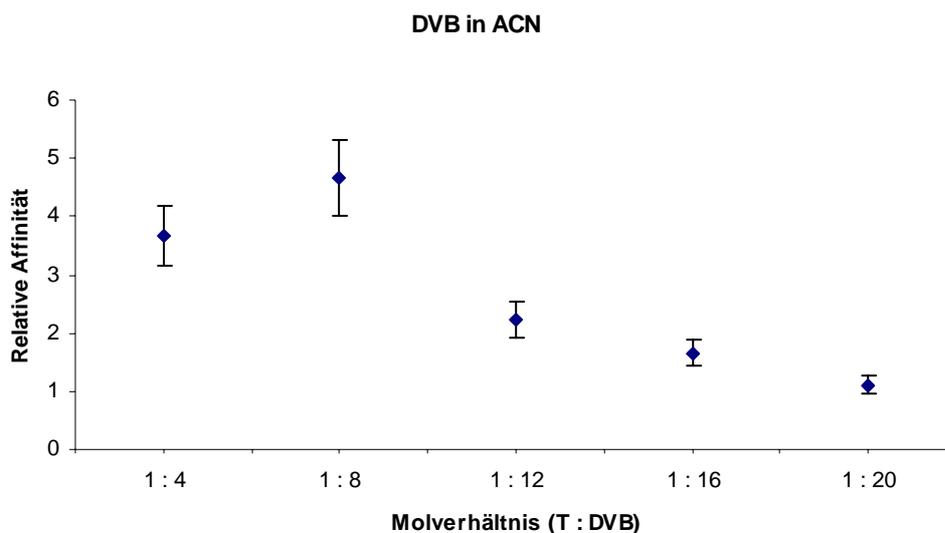


Abbildung 49: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R-(–)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-DVB-Molverhältnissen (Porogen: ACN)

Eine Änderung des Porogens von ACN zu MeOH bewirkte einen kleineren Prägeeﬀekt im gesamten T-DVB-Bereich (Abbildung 50). Das Maximum von 1,7 erscheint bei T : DVB 1 : 4. Durch die verringerte Polarität (Tabelle 32, Anhang) des Methanols (5,1) im Vergleich zu ACN (5,8) werden die Templat-Monomer-Wechselwirkungen weniger beeinträchtigt, wodurch die erste Voraussetzung für die Entstehung hochspezifischer Bindungsstellen erfüllt ist. Jedoch können die Carboxylgruppen der R-(–)-2-Phenylbuttersäure während der Selbstorganisation die Protonen an das protische MeOH abgeben, wodurch diese Gruppen stark solvatisiert werden und mit dem Monomer bei der Bildung des Templat-Monomer-Komplexes nicht stark genug interagieren können.

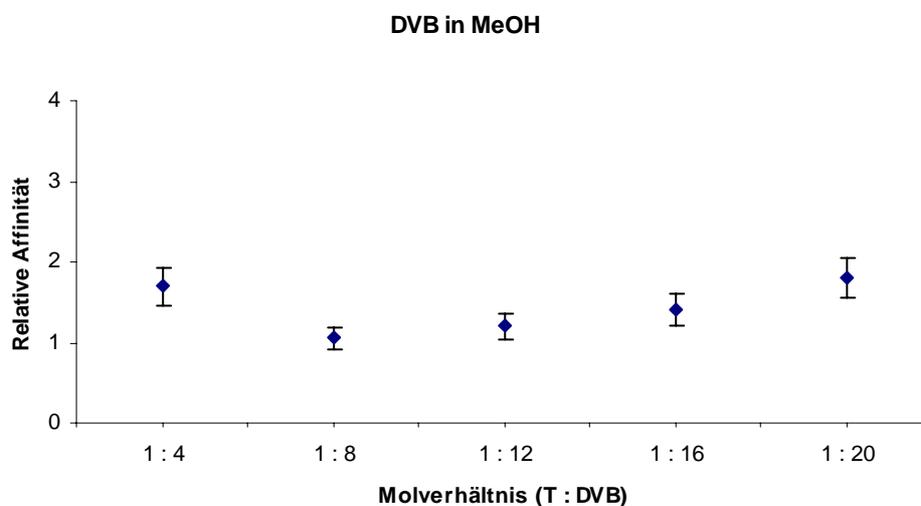


Abbildung 50: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R-(–)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-DVB-Molverhältnissen (Porogen: MeOH)

Anders als bei MeOH wurde der Unterschied zwischen dem MIP und dem CP im weniger protischen DMSO deutlicher. Die relative Affinität steigt bis auf 2,5 bei T : DVB von 1 : 4 (Abbildung 51). Insgesamt liegen die Werte tiefer als bei ACN, weil das sehr polare DMSO (7,2) (Tabelle 32, Anhang) mit dem Monomer bei der Ausbildung des Templat-Monomer-Komplexes konkurrierte. Dieser Effekt wird als groß eingeschätzt, da das Porogen im Überschuss vorlag. Ein Zusammenhang zwischen großer DVB-Menge und kleinen Affinitäten wie beim DVB in ACN wurde an dieser Stelle ebenfalls beobachtet (Abbildung 49).

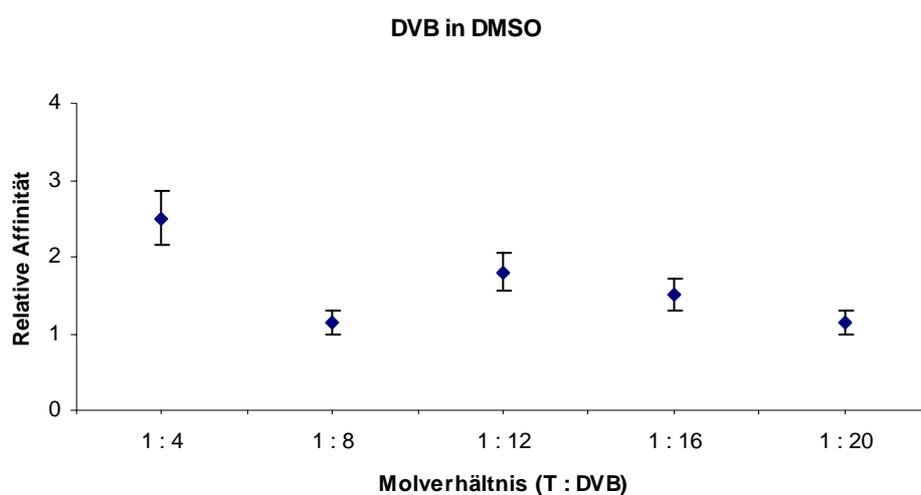


Abbildung 51: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R(-)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-DVB-Molverhältnissen (Porogen: DMSO)

6.2.2 Einfluss des EGDMA

Wenn EGDMA und ACN bei der MIP-Herstellung benutzt wurden, sind die Messpunkte bei kleineren Überschüssen an Quervernetzer bezüglich der relativen Affinität vergleichbar mit denen für das DVB und ACN (Abbildung 49). Die relative Affinitätskurve durchläuft den Höchstwert bei größeren Überschüssen (1 : 16) (Abbildung 52). Zwar besitzt EGDMA keine aromatischen Gruppen, die für das System von Vorteil sind, es ist aber deutlich flexibler als DVB, so dass der Effekt molekularer Prägungen beim EGDMA erst bei großem Überschuss zu erkennen ist.

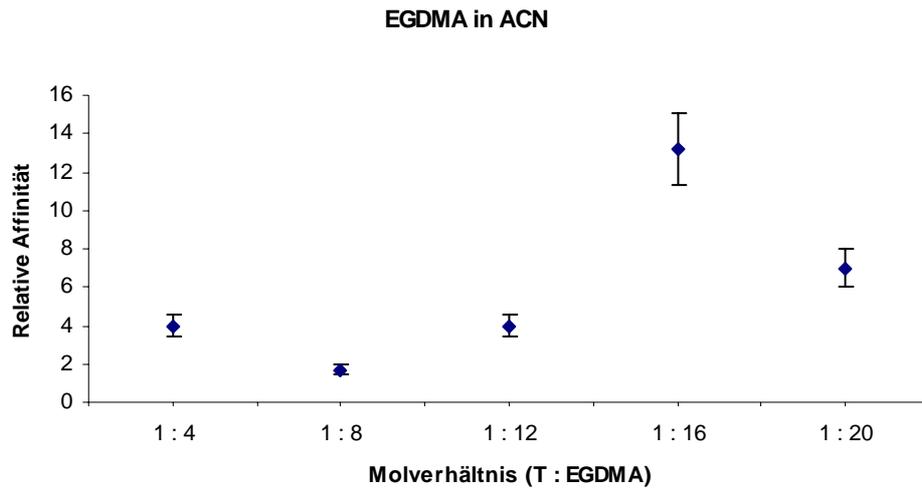


Abbildung 52: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R-(–)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-EGDMA-Molverhältnissen (Porogen: ACN)

In MeOH hatte der neu gewählte Quervernetzer keine Auswirkung auf die relative Affinität. Die Werte bleiben in Hinsicht auf die relative Affinität aufgrund des protischen Methanolcharakters weiterhin klein (Abbildung 53).

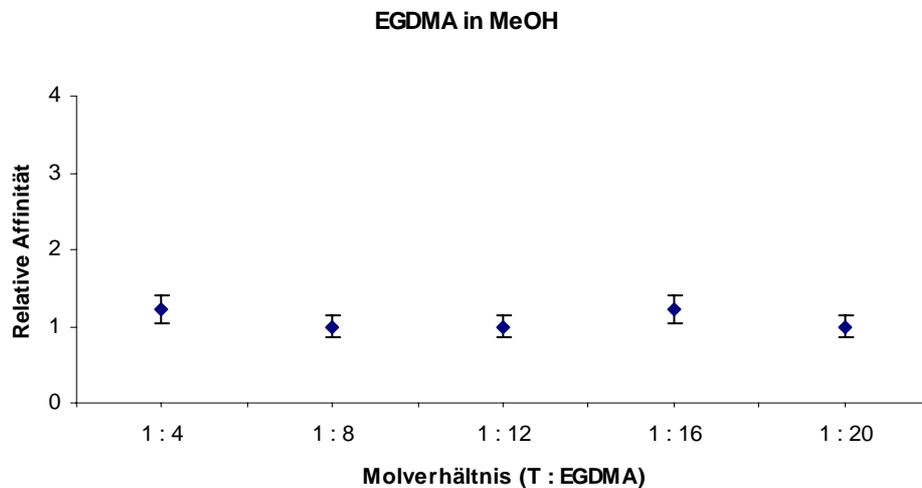


Abbildung 53: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R-(–)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-EGDMA-Molverhältnissen (Porogen: MeOH)

DMSO führte auch beim EGDMA zu einer generellen Zunahme der Zielgröße verglichen mit dem MeOH. Ähnlich wie bei den DVB-DMSO-Membranen (Abbildung 51) erreicht die Kurve (Abbildung 54) beim gleichen molarem Verhältnis von 1:4 ein Maximum, und zwar einen Wert von 2,89.

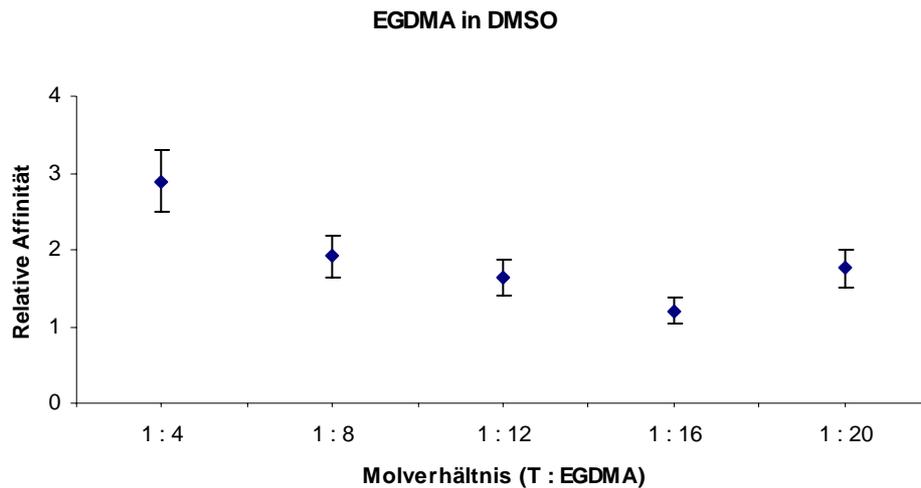


Abbildung 54: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R-(–)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-EGDMA-Molverhältnissen (Porogen: DMSO)

6.2.3 Mit TRIM vernetzte MIPs

TRIM und ACN in Kombination ergeben eine maximale relative Affinität von sieben beim Molverhältnis T : TRIM 1 : 20 (Abbildung 55). Hier lässt sich die gleiche Tendenz wie beim EGDMA erkennen, d.h. erst Überschüsse an Quervernetzer wirken sich positiv auf die Wiedererkennungseigenschaften der Bindungsstellen aus (Abbildung 55).

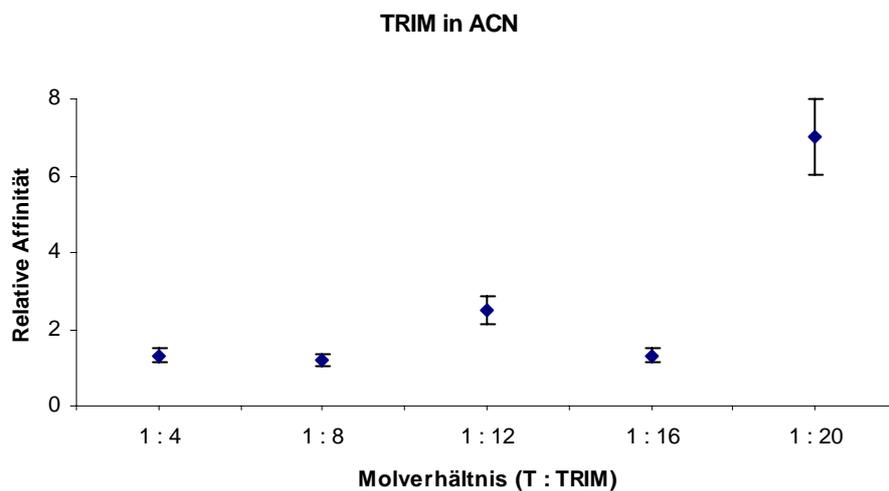


Abbildung 55: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R-(–)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-TRIM-Molverhältnissen (Porogen: ACN)

Im Gegensatz zu den DVB- und EGDMA-MIPs, die ebenfalls mit MeOH hergestellt wurden, zeichnen sich die in MeOH synthetisierten TRIM-MIPs durch eine erhöhte Affinität zum Templat aus, besonders bei T : TRIM-Verhältnissen von 1 : 4 und 1 : 8 (Abbildung 56).

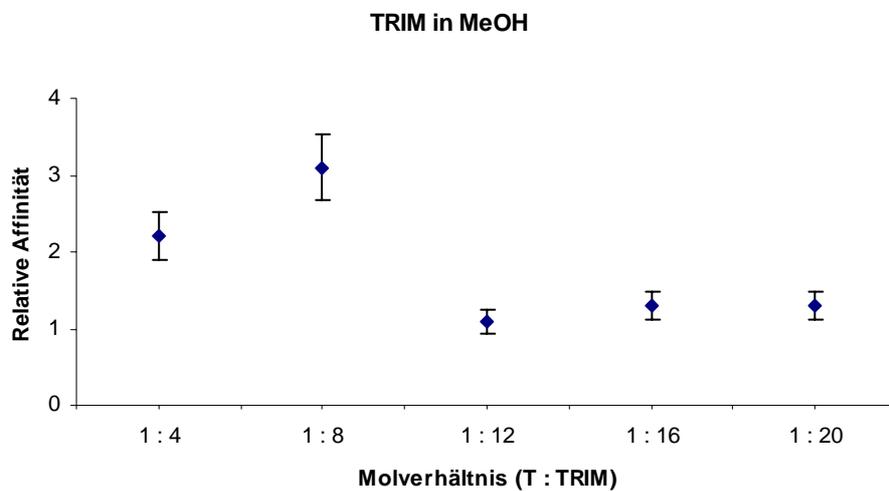


Abbildung 56: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R-(–)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-TRIM-Molverhältnissen (Porogen: MeOH)

Die in Abbildung 57 dargestellten Ergebnisse der relativen Affinität der TRIM-MIPs zum Templat in DMSO konnten mit den erzielten Werten in MeOH (Abbildung 56) über den gesamten Messbereich nicht direkt verglichen werden. Es lässt sich jedoch bei einem Verhältnis T : TRIM von 1 : 12 eine Zunahme der relativen Affinität erkennen.

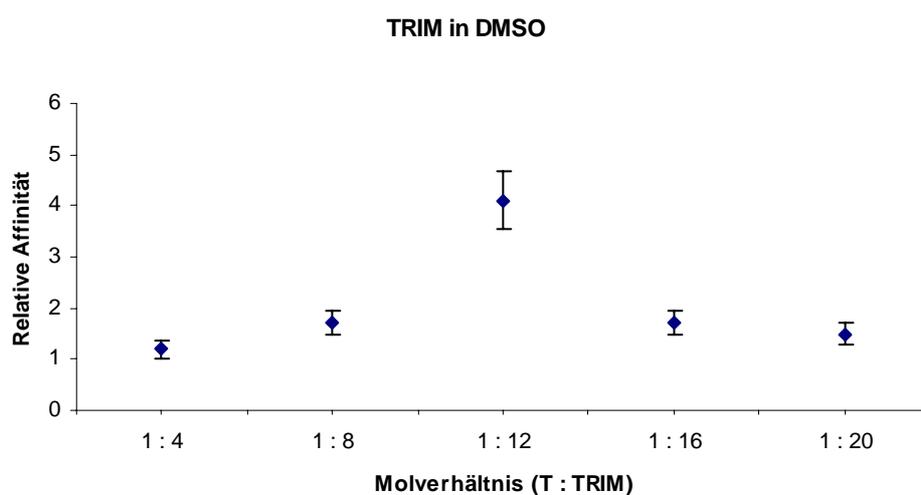


Abbildung 57: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R-(–)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-TRIM-Molverhältnissen (Porogen: DMSO)

Durch die Affinitätsuntersuchung fünf verschiedener, nach gleicher Vorschrift hergestellter MIPs unter Verwendung einer $1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ Lösung der R-(–)-2-Phenylbuttersäure in ACN konnte eine 14 %-ige Standardabweichung der relativen Affinität bestimmt werden, die bei den Messpunkten in den Abbildungen berücksichtigt wurde. Die verhältnismäßig großen Fehlergrenzen im Rahmen dieser Experimente wurden toleriert, da diese Messungen exakt genug sind, um zumindest die Tendenzen über die Auswirkung einzelner Parameter auf die relative Affinität zu ermitteln.

6.2.4 Modell nach Snyder

Bei der Auswertung der relativen Affinität in verschiedenen Lösungsmitteln konnten für jeden Quervernetzer folgende Regelmäßigkeiten festgestellt werden (vergleiche 6.2.1, 6.2.2, 6.2.3), die mit den zugehörigen Polaritäten (vergleiche Tabelle 32, Anhang) nicht korrelieren:

Rel. Affinität: ACN > DMSO > MeOH

Polaritäten: 5,8 < 7,2 > 5,1

Unter der Polarität eines Lösungsmittels werden die gesamten intermolekularen Wechselwirkungen zusammengefasst, die aus verschiedenen intermolekularen Kräften wie z.B. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder durch induzierte Dipole ausgelöste Dispersionskräfte bestehen. Die aus unterschiedlichen Beiträgen zusammengesetzte Polarität kann bei zwei Lösungsmitteln gleich groß sein. Trotzdem können diese Unterschiede aufweisen, die als spezifische Effekte bezeichnet werden. Es wird ein Modell benötigt, das die individuelle Verteilung der einzelnen Wechselwirkungen beschreibt. Nach Snyder werden jedem Lösungsmittel drei Einteilungsparameter (x_c Protonenakzeptoreigenschaften, x_d Protonendonatoreigenschaften und x_n Dipoleigenschaften) zugeordnet. Basierend auf ähnlichen x-Parametern werden alle Lösemittel in acht Gruppen eingeteilt (Tabelle 33, Anhang) und nur dann als ähnlich angesehen, wenn sie derselben Gruppe angehören, unabhängig von den gemessenen Polaritäten.

Die Ergebnisse der Untersuchung von 81 Lösungsmitteln wurden in einem Selektivitätsdreieck eingetragen. Am Beispiel von ACN (Gruppe VI) wird gezeigt, wie man ein Lösungsmittel in diesem Dreieck positioniert. Auf den jeweiligen Koordinaten (x_e ; x_d ; x_n) werden aus den zugehörigen Punkten (0,31; 0,27; 0,42) die Parallelen (gestrichelte Linien) zu den Dreiecksseiten gezogen, so dass sich diese in einem Punkt schneiden (Abbildung 58).

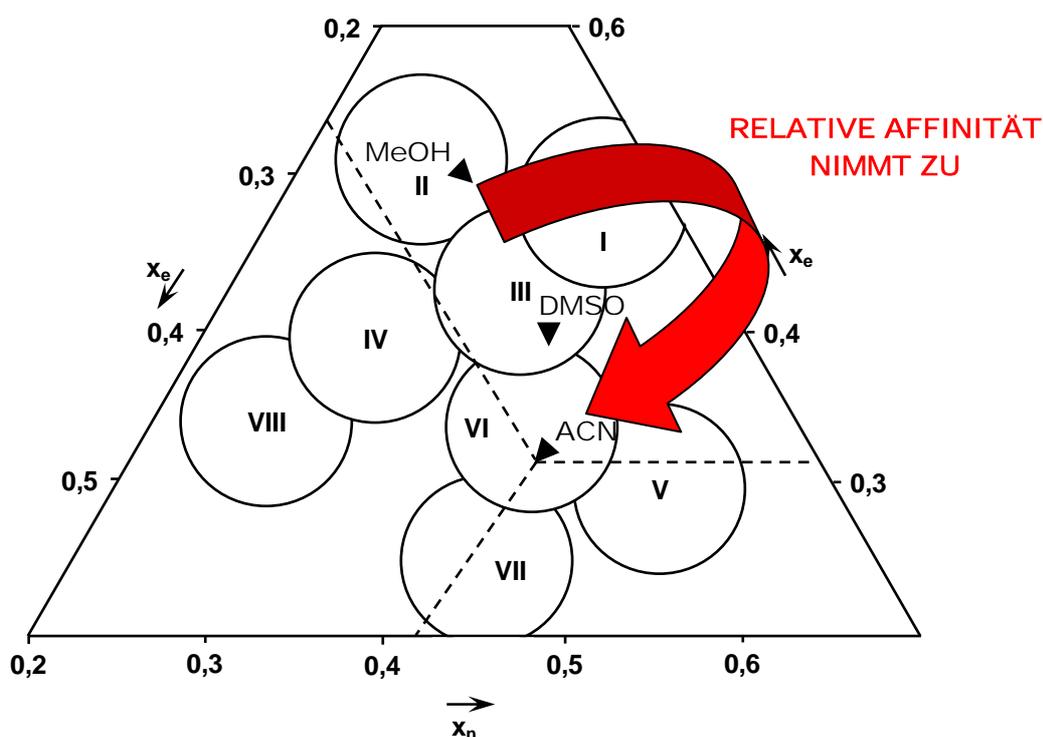


Abbildung 58: Selektivitätsdreieck der Lösungsmittel nach Snyder

Nach diesem Modell gehört MeOH ($x_e = 0,48$; $x_d = 0,22$; $x_n = 0,31$) der Gruppe II und DMSO ($x_e = 0,39$; $x_d = 0,23$; $x_n = 0,39$) der Gruppe III an, wie in Abbildung 58 bereits eingetragen wurde.

Der Zusammenhang zwischen der relativen Affinität und den Lösungsmiteleigenschaften lässt sich jetzt besser erkennen. Für das unter Abschnitt 6.2.1 - 6.2.3 beschriebene System ermöglicht ein Lösemittel der Gruppe VI (ACN) die besten MIP-Effekte, da dieses keine Protonen vom Templat aufnimmt und damit die verbundene Solvatisierung des Protons bei der Selbstorganisation nicht unterstützt (Tabelle 24). Beim Lösungsmittelwechsel auf DMSO bzw. MeOH steigen die Protonenakzeptoreigenschaften bei gleichzeitigem Sinken der Protonendonatoreigenschaften und Dipoleigenschaften, weshalb die Ergebnisse der relativen Affinität in DMSO mäßig ausfallen und in MeOH schlecht sind. Dieser Argumentation folgend sollte das Templat, gelöst in einem Lösungsmittel der Gruppe VII, noch spezifischere MIP-Membranen liefern.

Tabelle 24: Die Abhängigkeit der relativen Affinität vom Lösungsmittel

	<i>MeOH</i>	<	<i>DMSO</i>	<	<i>ACN</i>	<i>Die relative Affinität nimmt zu</i>
x_e :	0,48	>	0,39	>	0,31	<i>Die Protonenakzeptoreigenschaften nehmen ab</i>
x_d :	0,22	<	0,23	<	0,27	<i>Die Protonendonatoreigenschaften nehmen zu</i>
x_n :	0,31	<	0,39	<	0,42	<i>Die Dipoleigenschaften nehmen zu</i>

Die Ergebnisse der drei verschiedenen Quervernetzer lassen sich nach den Lösungsmitteln in einer Reihenfolge anordnen, die sich im Sinne des Selektivitätsdreiecks nachvollziehen lässt. Schließlich wurden die getesteten Quervernetzer miteinander verglichen, wobei die relativen Affinitäten im optimalen Porogen (ACN) herangezogen wurden.

Aus den Abbildungen 59 – 61 folgt, dass in Kombination mit ACN, das DVB aufgrund der erhaltenen Werte für die Herstellung der MIP-Membranen ungeeignet ist, das EGDMA die beste Wahl darstellt und TRIM mittelmäßig geeignet ist. Diese Feststellung hängt allerdings mit den Eigenschaften der Systemkomponenten zusammen, so dass keine allgemein gültige Interpretation möglich ist. Das erarbeitete Modellsystem kann jedoch als Grundlage für einen "scale up" zur Herstellung enantioselektiver Membranen für die Trennung der R-(–)-2-Phenylbuttersäure aus ihrem Racemat verwendet werden, nachdem die relative Affinität der Membranen zur S-(+)-2-Phenylbuttersäure untersucht worden ist.

In den Graphiken ist noch ein Trend zu beobachten. Wie schon in Abschnitt 6.2.1 erwähnt, wirkt sich bei kleineren DVB-Mengen (1 : 8) der aromatische Charakter des DVB positiv auf die Qualität der Prägungen aus. Diese wird bei größeren DVB-Mengen vermutlich aufgrund der mangelnden Flexibilität der Bindungsstellen verschlechtert (Abbildung 59). Für die nicht steifen Quervernetzer EGDMA und TRIM tritt die hohe relative Affinität bei größeren T-EGDMA- bzw. T-TRIM-Molverhältnissen auf, da der kritische Flexibilitätspunkt erst dann erreicht wird. Wie erwartet ist bei dem EGDMA der rapide Abfall der Affinitätskurve erst nach T : EGDMA 1 : 16 zu sehen (Abbildung 60). Eine Verschiebung des Affinitätsmaximums zu höheren Konzentrationen (1 : 20) ist auch beim TRIM erkennbar (Abbildung 61).

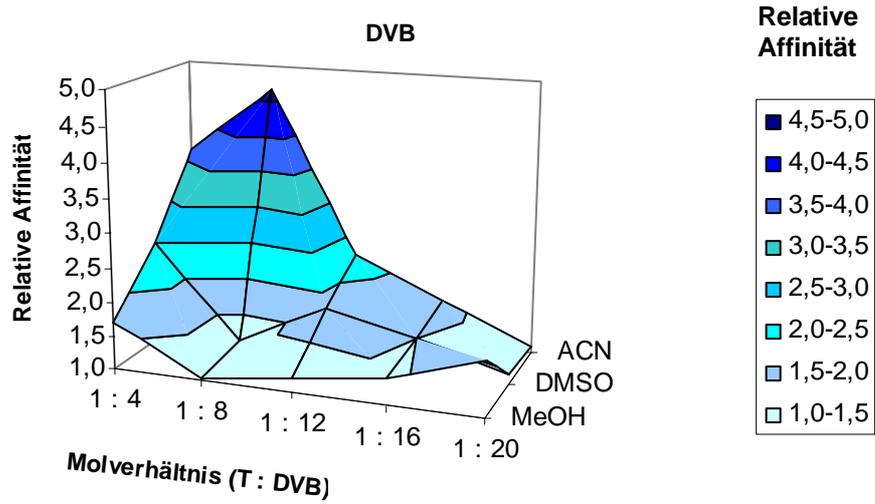


Abbildung 59: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R(-)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-DVB-Molverhältnissen (Porogen: MeOH, DMSO, ACN)

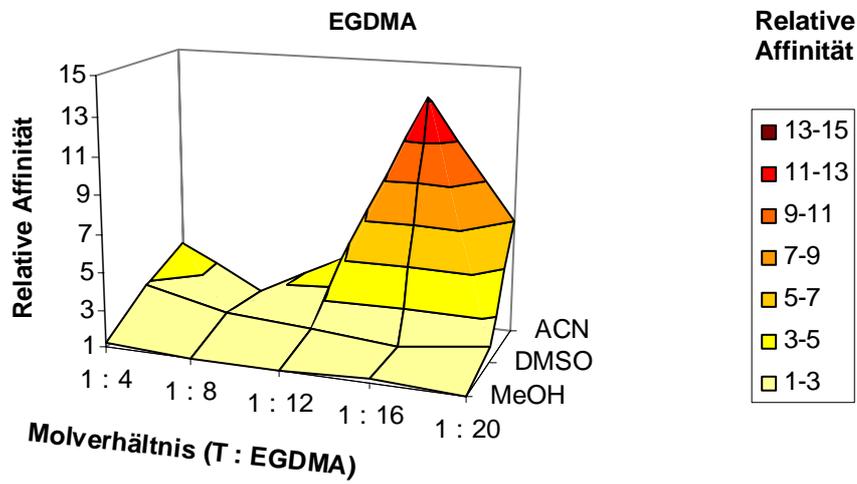


Abbildung 60: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R(-)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-EGDMA-Molverhältnissen (Porogen: MeOH, DMSO, ACN)

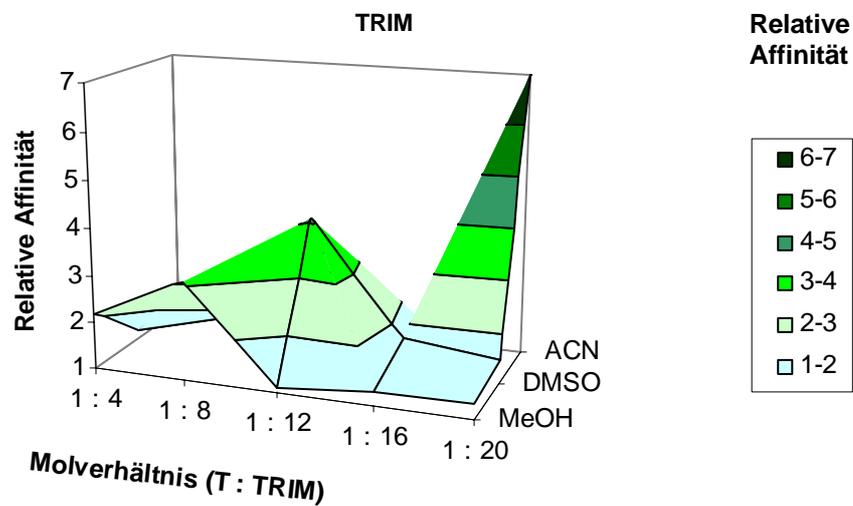


Abbildung 61: Relative Affinität der MIP-Membranen geprägt mit R(-)-2-Phenylbuttersäure bei verschiedenen T-TRIM-Molverhältnissen (Porogen: MeOH, DMSO, ACN)

6.3 Katalyse mit MIPs

In den weiteren Arbeiten wurde überwiegend der Einsatz der MIPs als Katalysatoren in Betracht gezogen, um deren Verwendbarkeit auf diesem Gebiet unter Aspekten der Reaktionstechnik bewerten zu können.

Aus der Verbundenheit der Rezeptoreigenschaften und enzymatischer Aktivität wurde ein umfangreicher Affinitätstest der Standard-MIPs als Anhaltspunkt bei der Feststellung der katalytischen Aktivität verwendet (Abschnitt 6.3.1). Anschließend wurde der Vorteil der Immobilisierung genutzt, um die Katalyse der modifizierten DA-Reaktion mit MIPs zu optimieren. Ein durch MIP-Schalen hervorgerufener, katalytischer Effekt wurde zunächst sichergestellt und systematisch untersucht (Abschnitt 6.3.2). Um mehr über den Zusammenhang der katalytischen Effizienz und der jeweiligen Prägetechnik erfahren zu können, wurden die verschiedenartig synthetisierten MIPs bezüglich der relativen katalytischen Aktivität in Abschnitt 6.3.3 verglichen. Abschließend wurde die Enantioselektivität als wichtiger Gesichtspunkt bei der Katalyse untersucht (Abschnitt 6.3.4).

6.3.1 Affinität der Standard-MIPs

Zur Synthese der geprägten Polymere nach der Standardmethode wurde die bereits veröffentlichte Vorschrift als Vorlage verwendet [94], wobei MAA als Monomer und EGDMA als Quervernetzer eingesetzt wurden (grau hinterlegt in Tabelle 25). Die restlichen Polymere wurden synthetisiert, um den Einfluss auf die Affinität zum jeweiligen Templat bei der Verwendung von Quervernetzern mit mehreren Vernetzungsstellen und verschiedenen Monomeren zu bewerten.

Tabelle 25: Auswertung der Affinitätsmessungen

<i>Polymer</i>	k'_{MIP}	k'_{CP}	α -Wert
EGDMA / AA	0,48	0,41	1,17
EGDMA / MMA	0,50	0,46	1,09
EGDMA / MAA	0,43	0,38	1,13
P.-tetraacrylat / AA	0,32	0,15	2,13
P.-tetraacrylat / MMA	0,30	0,11	2,73

Die Auswertung der Affinität des nach [94] durchgeführten Versuches zeigt nach Gl. 21 einen Kapazitätsfaktor k' von 0,43 für das MIP bzw. 0,38 für das CP. Damit konnten die in [94] erzielten Ergebnisse von 0,72 (MIP) und 0,082 (CP) nicht bestätigt werden. In diesem Fall ist der α -Wert, bestimmt nach Gl. 22, von 1,13 viel kleiner als der Literaturwert (8,78). Einige Polymere wie z.B. P.-tetraacrylat /MMA weisen größere Kapazitätsfaktoren unter Verwendung des MIP im Vergleich zum CP auf, liegen aber deutlich unter dem Literaturwert.

Aus der Auftragung der Ergebnisse in Abbildung 62 lässt sich unter den mit EGDMA synthetisierten Polymeren kein Zusammenhang zwischen dem α -Wert und der Art des verwendeten Monomers erkennen, da sich dieser Wert für verschiedene Monomere (AA, MMA oder MAA) nicht wesentlich ändert. Im Fall von AA und MMA führte der Wechsel beim Quervernetzungsmittel von EGDMA auf P.-tetraacrylat zu einer verbesserten Affinität.

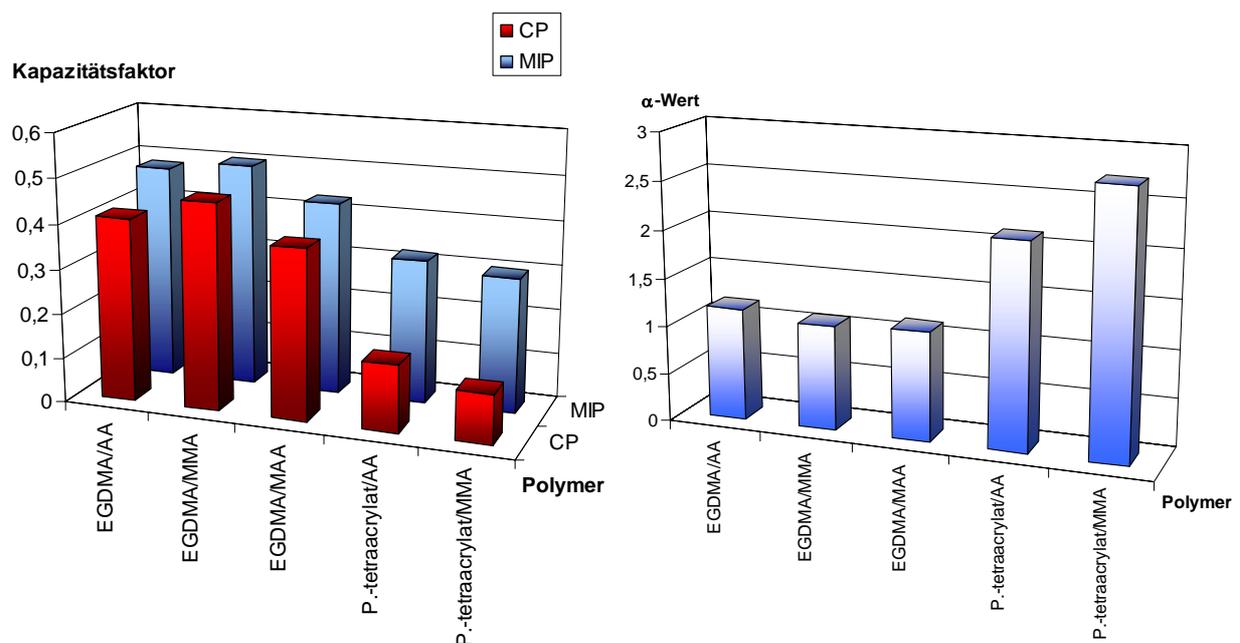


Abbildung 62: Nach der Standardmethode hergestellte Polymere: Kapazitätsfaktoren (links), α -Werte (rechts)

Die katalytische Aktivität des Polymerpaars EGDMA / MAA nach Mosbach et al. konnte im Einklang mit der geringen Affinität ebenfalls nicht reproduziert werden. Die Ergebnisse sind im Anhang unter Abbildung 88 (Literatur) bzw. Abbildung 89 (Experiment) dargestellt.

Der Unterschied in der Kinetik der untersuchten DA-Reaktion zwischen den Literaturdaten und experimentell bestimmten Werten konnte durch die mangelnde Qualität der synthetisierten Substanzen nicht erklärt werden, da die Synthese der für die kinetischen Untersuchungen erforderlichen Komponenten erfolgreich abgeschlossen und im Fall des TCTD durch IR-Spektroskopie bestätigt wurde (Abbildung 90, Anhang). Das Signal bei 1166 cm^{-1} deutet auf die gebildete SO_2 -Gruppe nach der Oxidation des Tetrachlorothiophens (Abschnitt 5.3.1.2) hin.

Unter den angegebenen Bedingungen [94] konnte mittels HPLC keine Trennung der einzelnen Reaktionskomponenten erzielt werden. Die besten Trenneffekte wurden mit der Supelcosil PLC-18-Säule sowie der mobilen Phase Nr. 4 (Tabelle 14, Abschnitt 5.3.1.3) erreicht, so dass diese Bedingungen bei der Analyse der kinetischen Messungen eingesetzt wurden.

6.3.2 Kinetische Studie

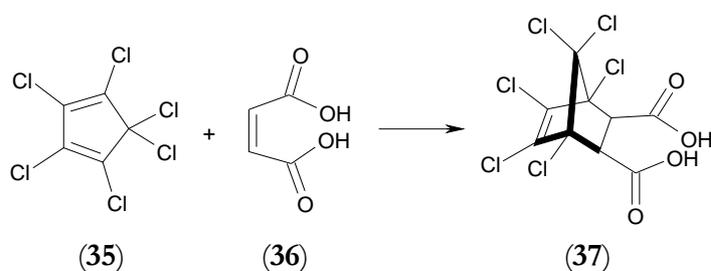


Abbildung 63: Modifizierte DA-Reaktion

Nach der Modifizierung konnte die DA-Reaktion (Abbildung 63) analytisch wesentlich einfacher verfolgt werden, da sowohl die Reaktionspartner als auch das Produkt käuflich erhältlich waren. Bei der Untersuchung der Kinetik bei $50\text{ }^\circ\text{C}$ konnte unter Zusatz von MIP- oder CP-Schalen kein nennenswerter Umsatz festgestellt werden (keine Abbildung). Der Verlauf der Katalyse bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ zeigt nach der gemessenen Zeit für das MIP eine höhere Produktkonzentration als beim CP. Der geringe Unterschied zwischen dem CP und der Reaktion in Lösung weist auf eine geringe Beteiligung des CP bei der Katalyse hin (Abbildung 64, links).

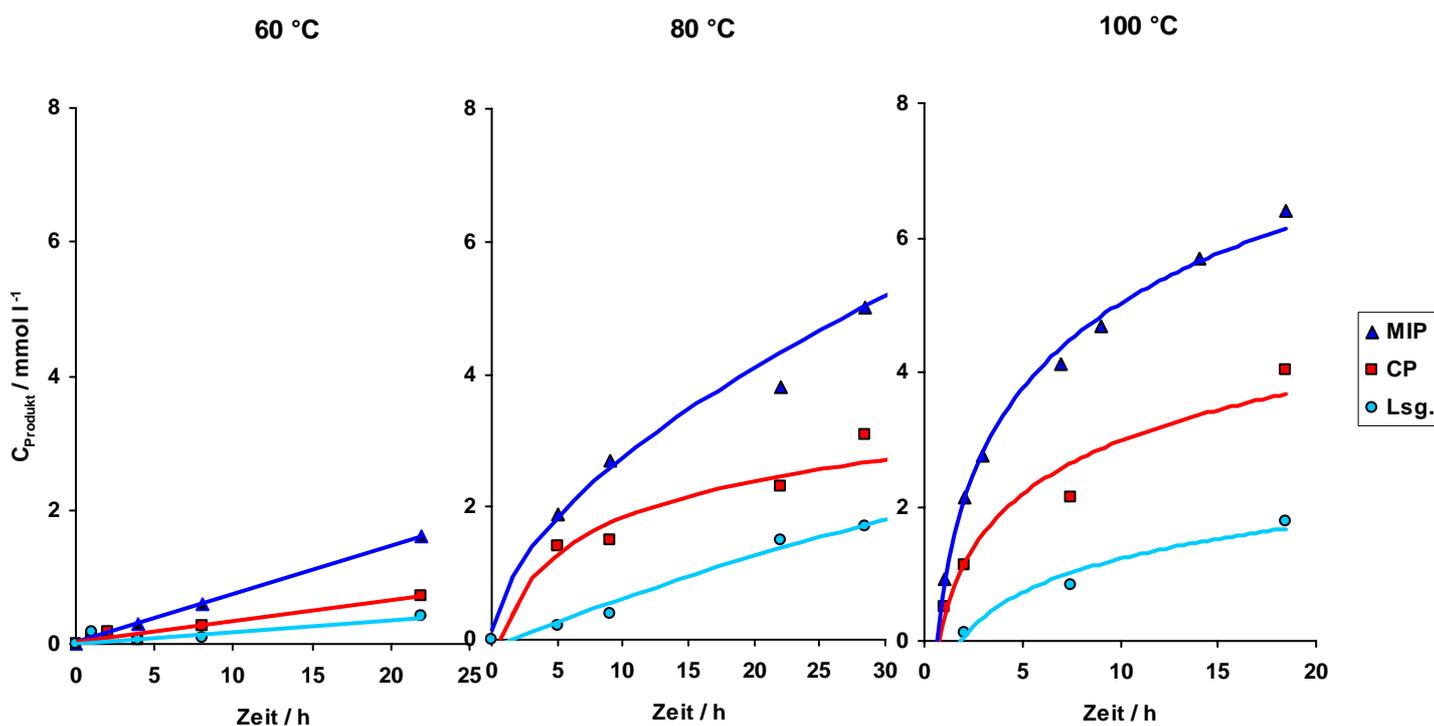


Abbildung 64: Einsatz der mit dem immobilisierten Chlorendinesäureanhydrid geprägten bzw. der nicht geprägten DVB-MAA-Copolymer-Schalen als Katalysator für die Diels-Alder-Reaktion von Hexachlorocyclopentadien (HCCPD) und Maleinsäure (MS) im Batchreaktor. Die Reaktion wurde bei 60 °C (links), 80 °C (Mitte), 100 °C (rechts) in 30 ml DMF mit 0,44 mmol MS und 0,34 mmol HCCPD, sowie mit entweder 300 mg MIP (▲), CP (■) oder ohne Polymer (●) durchgeführt. Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit.

Die DA-Reaktion wurde wesentlich schneller, wenn das gleiche Experiment bei 80 °C wiederholt wurde (Abbildung 64, Mitte). Bei dieser Temperatur wurde im Fall eingesetzter MIP-Schalen das Produkt nach 22 h in mehr als der doppelten Menge gebildet, bezogen auf die Produktkonzentration nach gleicher Zeit bei 60 °C. Trotzdem nimmt durch die Temperaturerhöhung der katalytische Effekt ab. Offensichtlich geschieht das deshalb, weil die nicht-spezifische katalytische Aktivität des CP bei steigender Temperatur im größeren Ausmaß zunimmt. Damit steigt die Produktbildungsgeschwindigkeit auch schneller als die in polymerfreier Lösung.

Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 100 °C nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der DA-Reaktion im Falle des MIP weiter zu (Abbildung 64, rechts), so wie dies nach dem Gesetz von Arrhenius (Gl. 23), aufgrund der Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der Temperatur, zu erwarten ist:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

Gl. 23

In dieser Gleichung ist k die Geschwindigkeitskonstante, A der Stoßfaktor, E_a die Aktivierungsenergie, R die Gaskonstante ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) und T die Temperatur.

Die schnelle Produktbildung bei der Verwendung des CP kann ebenso dem Temperatureffekt zugeschrieben werden. Die MIP-Schalen sind bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ hinsichtlich der Umsetzung aktiver als bei tiefen Temperaturen. Allerdings liegt bei dieser Temperatur ($100 \text{ }^\circ\text{C}$) nach einer analogen Reaktionszeit (ca. 18 h) ein kleinerer katalytischer Effekt vor.

Folglich nimmt die katalytische Aktivität der beiden Polymere mit steigender Temperatur zu und der relative katalytische Effekt ab. Dieser Sachverhalt hängt mit der Zunahme der nicht-spezifischen Katalyse im Fall des CP bei gleichzeitigem Abbau der MIP-Struktur zusammen, der in einer DSC-Analyse aufgezeichnet wurde. Bei Temperaturen über $86 \text{ }^\circ\text{C}$ konnte eine Zersetzung der MIPs beobachtet werden (Abbildung 65, links), weshalb die strukturelle Integrität der aktiven Zentren sinkt und die katalytische Wirkung über $86 \text{ }^\circ\text{C}$ immer mehr über nicht-spezifische Wechselwirkungen zustande kommt. Bei der elektronenmikroskopischen Charakterisierung der MIP-Schalen (Abbildung 65, rechts) wurde die poröse Struktur des Materials sichtbar.

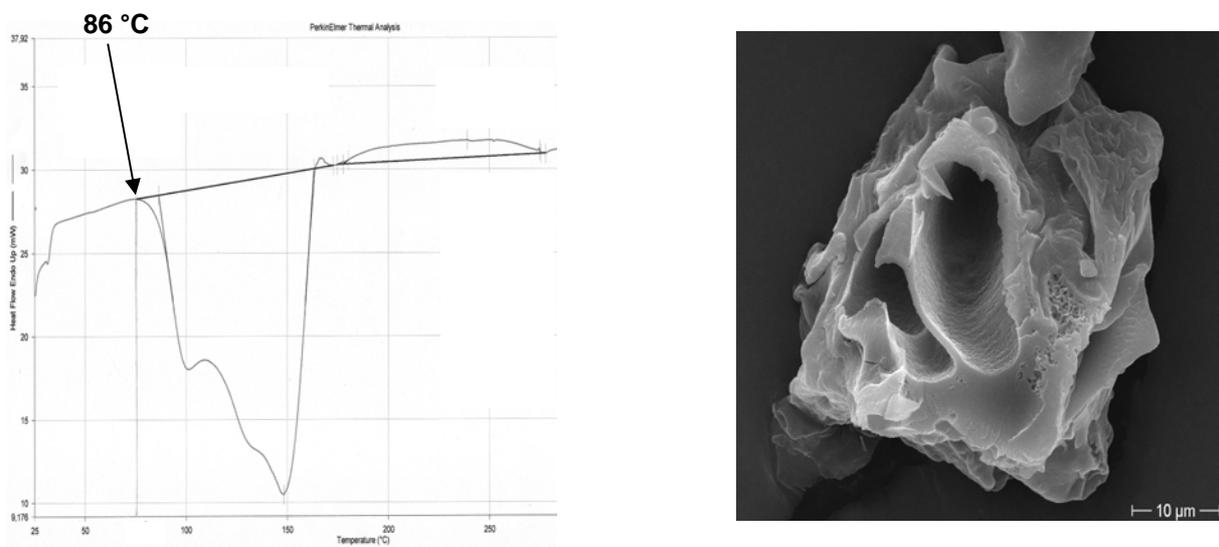


Abbildung 65: Charakterisierung der MIP-Schalen: DSC-Analyse (links), REM-Aufnahme (rechts)

Für die MIP- bzw. CP-katalysierte Reaktion wurden die effektiven Aktivierungsenergien $E_{a,\text{eff}}$ berechnet und mit der Aktivierungsenergie der Reaktion in Lösung verglichen. Dazu wurden zuerst die Geschwindigkeitskonstanten für verschiedene Temperaturen bestimmt, die durch das Modell einer Reaktion pseudo-erster Ordnung beschrieben werden:

$$r_0 = \frac{dc_{\text{produkt}}}{dt} = k_{\text{eff}} \cdot c_{0,\text{HCCPD}} = A \cdot e^{-\frac{E_{a,\text{eff}}}{RT}} \cdot c_{0,\text{HCCPD}} \quad \text{Gl. 24}$$

$$\Leftrightarrow \ln r_0 = \ln A + \ln c_{0,\text{HCCPD}} - \frac{E_{a,\text{eff}}}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad \text{Gl. 25}$$

Die Auftragung $\ln r_0$ über T^{-1} nach Gl. 25, das so genannte Arrhenius-Diagramm (Abbildung 66), ergibt nach einer linearen Regression für das MIP einen $E_{a,\text{eff}}$ -Wert von $55 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 3 \%$. Für das Kontrollpolymer kann auf diese Weise eine effektive Aktivierungsenergie von $60 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 3 \%$ bestimmt werden. Im Vergleich dazu benötigt die Reaktion in Lösung zur Aktivierung $63 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 3 \%$. Dadurch wird deutlich, dass die Aktivierungsenergie der DA-Reaktion beim Einsatz des MIP abgesenkt wird. Zum gleichen Effekt in einem kleineren Ausmaß kommt es unter Verwendung des CP. Da das MIP bei den gemessenen Temperaturen eine höhere Aktivität aufweist, d. h. eine größere Reaktionsgeschwindigkeit ermöglicht, stellt es den besseren Katalysator für diese Reaktion dar (vergleiche Abschnitt 2.1.1).

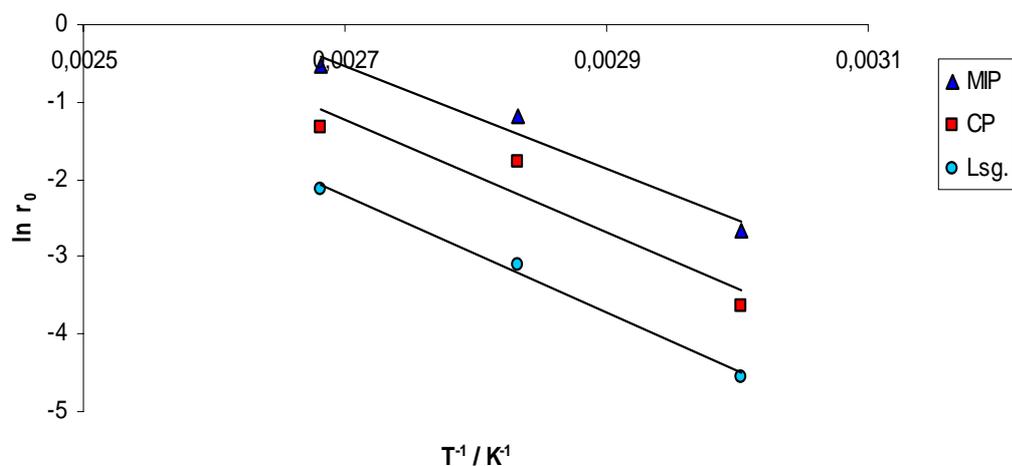


Abbildung 66: Arrhenius-Diagramm zur Bestimmung der Aktivierungsenergien $E_{a,\text{eff}}$ der modifizierten DA-Reaktion. Vergleich der in Anwesenheit des MIP (\blacktriangle), des CP (\blacksquare) oder in Abwesenheit eines Polymers (\bullet) durchgeführten Reaktionen

Um biologische Enzyme und polymere Katalysatoren vergleichen zu können, wurde die Kinetik mit Hilfe des Michaelis-Menten-Modells ausgewertet (Abschnitt 2.1.2). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die katalytisch aktiven Zentren bei einer bimolekularen Reaktion, so wie in diesem Fall, zwei Reaktionspartner zu binden haben, wird die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 20) zu Gl. 26 erweitert.

$$r = r_{\max} \cdot \frac{c_{\text{HCCPD}}}{K_{M,\text{HCCPD}} + c_{\text{HCCPD}}} \cdot \frac{c_{\text{MS}}}{K_{M,\text{MS}} + c_{\text{MS}}} \quad \text{Gl. 26}$$

$$r_{\max} = k_{\text{kat}} \cdot c_{\text{kat,ges}} \quad \text{Gl. 27}$$

Gleichung Gl. 26 bringt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration der beiden Substrate und deren Michaelis Konstanten zum Ausdruck, wobei r_{\max} durch die Geschwindigkeitskonstante k_2 bzw. k_{kat} (Abschnitt 2.1.2) und die Gesamtzahl der katalytisch aktiven Zentren $c_{\text{kat,ges}}$ definiert ist (Gl. 27). Da die Größe $c_{\text{kat,ges}}$ experimentell nicht bestimmt wurde, wurde der Wert für $c_{\text{kat,ges}}$ auf 5 % der beim Prägen eingesetzten Templatmenge abgeschätzt. Zur Herstellung von 600 mg Polymer wurden 0,2 mmol CA (Templat) benötigt. Für die in Batchexperimenten eingesetzten 300 mg Polymer wurden also 0,1 mmol CA verbraucht, um die Prägungen zu erzeugen. Ausgehend davon, dass jedes Templatmolekül zu einem Abdruck führt, beträgt somit die Konzentration der Prägungen, die zur Gesamtzahl der katalytisch aktiven Zentren äquivalent ist, im verwendeten Reaktionsvolumen von 15 ml $c_{\text{kat,ges}} = 6,7 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (100 %). Demnach entsprechen 5 % der katalytisch aktiven Zentren einem Wert von $c_{\text{kat,ges}} = 0,33 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (5 %).

Experimentell wurden zunächst durch Variation der Anfangskonzentrationen von HCCPD die Verläufe der HCCPD-Konzentration unter sonst gleichen Bedingungen bei 80 °C gemessen (Abbildung 67). Daraus wurden anschließend verschiedene Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bestimmt.

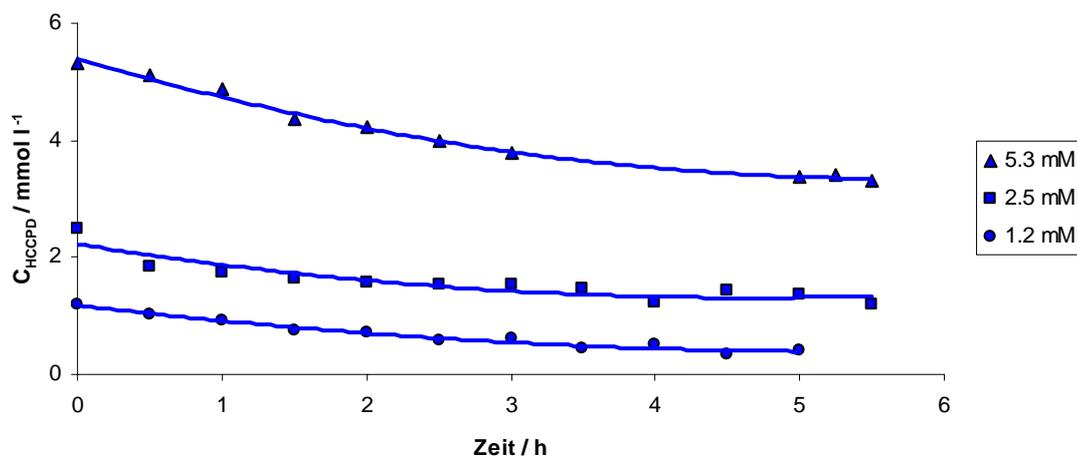


Abbildung 67: Einsatz der mit dem immobilisierten Chlorendinesäureanhydrid geprägten DVB-MAA-Copolymer-Schalen als Katalysator für die Diels-Alder-Reaktion von Hexachlorocyclopentadien (HCCPD) und Maleinsäure (MS) im Batchreaktor. Die Reaktion wurde bei 80 °C in 15 ml DMF mit 375 μmol MS und 75 (\blacktriangle), 37,5 (\blacksquare) oder 15 (\bullet) μmol HCCPD, sowie mit 300 mg MIP durchgeführt. Auftragung der Substratkonzentration gegen die Zeit.

Eine große Anfangsreaktionsgeschwindigkeit und damit verbundene schnelle Abnahme der HCCPD-Konzentration ist charakteristisch für die größte gewählte Anfangskonzentration ($c_{\text{HCCPD}} = 5,3 \text{ mmol l}^{-1}$). Aufgrund der Tatsache, dass Maleinsäure im Überschuss verwendet wurde, kann deren Konzentration während der Reaktion als konstant betrachtet und in die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{eff} einbezogen werden (Gl. 29), so dass sich Gl. 26 vereinfachen lässt:

$$r = r_{\text{max,eff}} \cdot \frac{c_{\text{HCCPD}}}{K_{\text{M,HCCPD}} + c_{\text{HCCPD}}} \quad \text{Gl. 28}$$

$$r_{\text{max,eff}} = k_{\text{eff}} \cdot c_{\text{kat,ges}} \quad \text{Gl. 29}$$

Diese Gleichung (Gl. 28) kann nach Lineweaver-Burk in Gl. 30 transformiert werden, die eine einfache Bestimmung von $K_{\text{M,HCCPD}}$ und k_{eff} ermöglicht, wenn man die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit r_0^{-1} gegen die reziproke Anfangskonzentration des HCCPD $c_{0,\text{HCCPD}}^{-1}$ aufträgt.

$$\frac{1}{r_0} = \frac{1}{r_{\text{max,eff}}} + \frac{1}{r_{\text{max,eff}}} \cdot \frac{K_{\text{M,HCCPD}}}{c_{0,\text{HCCPD}}} \quad \text{Gl. 30}$$

Aus dem Achsenabschnitt (Abbildung 68) wurde für $r_{\text{max,eff}}$ ein Wert von $0,4 \mu\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und aus der Steigung der eingezeichneten Gerade $K_{\text{M,HCCPD}} = 5,8 \text{ mmol l}^{-1}$ bestimmt. Bei diesem Wert für $r_{\text{max,eff}}$ ergibt sich außerdem mit der abgeschätzten Anzahl der aktiven Zentren bei $c_{\text{kat,ges}} = 0,33 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (5 %) nach Gl. 29 eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $k_{\text{eff}} = 1,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

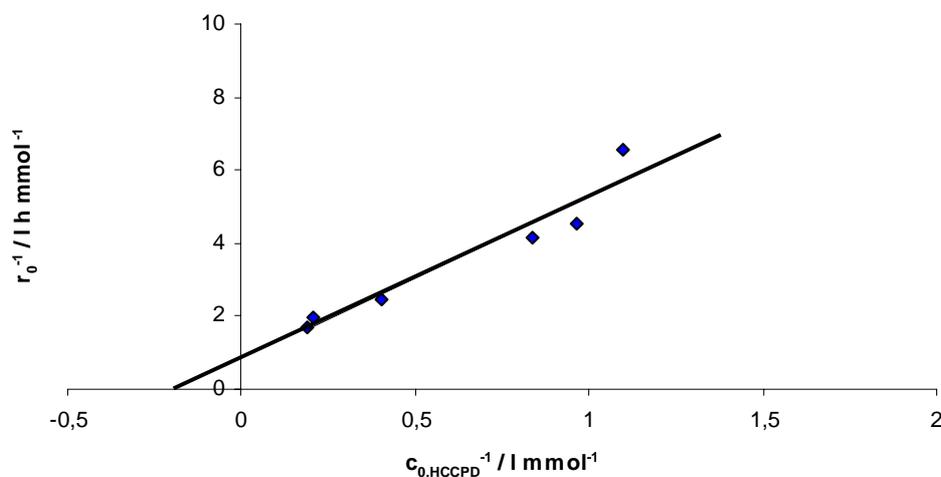


Abbildung 68: Lineweaver-Burk-Diagramm der reziproken Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Ausgangskonzentration von HCCPD für die Bestimmung von $K_{\text{M,HCCPD}}$ und k_{eff}

Für eine ähnliche DA-Reaktion (Abbildung 12, 2.2.1.3) zwischen TCTD und MSA wurden mit klassischen MIPs die Konstanten $k_{\text{imp}} = k_{\text{eff}} = 0,63 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $K_M = 42,5 \text{ mM}$ erzielt (Tabelle 26). Die Anzahl der aktiven Zentren ($2,83 \mu\text{mol}$) wurde für 300 mg dieser Polymere über eine Frontalanalyse ermittelt. Daher sind auch hier - bezogen auf die Gesamtpolymermenge ($12,8 \text{ g}$) - ca. 5 % der maximal möglichen Prägungen aktiv, wenn angenommen wird, dass jedes verwendete Templatmolekül zu einer Prägung führt [94].

Tabelle 26: Die Ergebnisse der Katalyse der DA-Reaktionen mit verschiedenen Katalysatoren

<i>DA-Reaktion</i>	<i>Katalysator</i>	$k_{\text{kat}} / \text{s}^{-1}$	$K_M / \text{mol l}^{-1}$	$k_{\text{kat}}/K_M / \text{s}^{-1} \text{mol}^{-1}$
TCTD + MSA	Standard-MIPs [94]	$0,63 \times 10^{-3}$	$42,5 \times 10^{-3}$	0,015
HCCPD + MS	MIP-Schalen [168]	$1,1 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-3}$	0,19
TCTD + MSA	Katalytische Antikörper [33]	7×10^{-2}	21×10^{-3}	3,4

Im Vergleich dazu ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Polymerschalen bei einer wesentlich kleineren Michaelis-Konstante fast doppelt so groß. Nach dem k_{kat}/K_M -Kriterium für das kinetische Optimum der enzymatischen Katalyse (Abschnitt 2.1.2) verfügen diese über eine größere katalytische Effizienz als die Standard-MIPs und nähern sich hinsichtlich dieser den katalytischen Antikörpern an.

Bei der Bestimmung der Konstanten der beiden MIPs nach dem Michaelis-Menten-Modell besteht ein gewisser Unterschied in den verwendeten Überschusskonzentrationen einer Komponente, um die Gültigkeit des erweiterten Modells zu erhalten (Gl. 26 und Gl. 28). Während im Fall der Polymerschalen von einem 5fachen Überschuss an MS (Tabelle 17, Abschnitt 5.3.2.2) ausgegangen wurde, wurde in [94] lediglich ein 1,2facher Überschuss des MSA verwendet, weshalb die Gültigkeit der Annahme einer konstanten MSA-Konzentration überprüft werden müsste.

6.3.3 Prägemethoden im Vergleich

Um Aussagen treffen zu können, welche der beiden Prägetechniken zu effizienteren Katalysatoren führt, wurden MIP-Schalen und klassische MIPs isoliert und in der Katalyse der modifizierten DA-Reaktion vermessen, so wie unter 5.3.2.1 beschrieben. Um die tatsächlichen Vorteile einer der beiden Prägemethoden besser abwägen zu können, wurde bei der Herstellung der Standard-MIPs zwischen großen und kleinen Mengen Lösungsmittel unterschieden. In der ersten Variante wurde

durch ausreichend viel Porogen sichergestellt, dass dieses kein limitierender Faktor bei der Ausbildung der aktiven Stellen ist. Die zweite Möglichkeit stellt einen besseren Übergang zur Immobilisierungstechnik dar, bei der kein Lösungsmittel zum Prägen erforderlich ist.

Bei der Katalyse mit den MIP-Schalen wurde im Laufe der Reaktion eine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet, die offensichtlich auf die spezifischen Wechselwirkungen der Substrate mit den aktiven Zentren zurückzuführen ist (Abbildung 69). Im Gegensatz dazu führen die CP-Schalen zu keiner signifikanten katalytischen Aktivität, vergleichbar mit der polymerfreien Lösung.

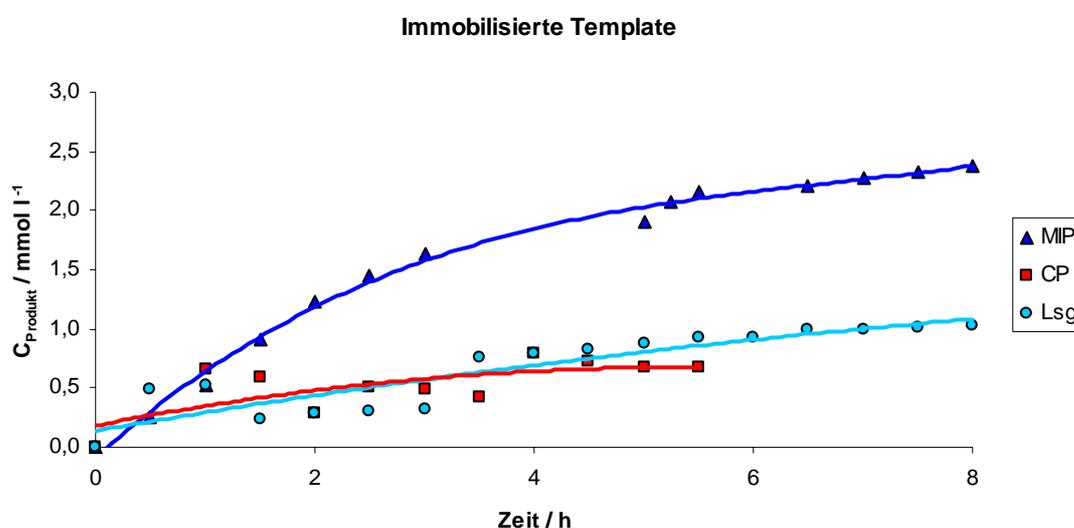


Abbildung 69: Katalyse der Diels-Alder-Reaktion von Hexachlorocyclopentadien (HCCPD) und Maleinsäure (MS) im Batchreaktor unter Verwendung der mit dem immobilisierten Chlorendinesäureanhydrid geprägten (bzw. der nicht geprägten) DVB-MAA-Copolymer-Schalen. Die Reaktion wurde bei 80 °C in 15 ml DMF mit 75 μmol MS und 75 μmol HCCPD, sowie mit entweder 300 mg MIP (\blacktriangle), CP (\blacksquare) oder ohne Polymer (\bullet) durchgeführt. Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit.

Durch die Standard-MIPs, die mit relativ wenig, d.h. 0,5 ml ACN hergestellt wurden, konnten im Vergleich zu den MIP-Schalen nur kleinere Produktkonzentrationen erzielt werden. Zum Beispiel wird mit den MIP-Schalen nach einer Reaktionszeit von 5,5 h 2,2 mmol l^{-1} Produkt gebildet. Im gleichen Zeitraum wird mit den Standard-MIPs eine Produktkonzentration von 0,9 mmol l^{-1} erreicht, die sich innerhalb der nächsten 2,5 h nicht bedeutend verändert (Abbildung 70). Diese unterscheidet sich kaum von den Produktkonzentrationen, die mit dem Standard-CP (1,2 mmol l^{-1}) und in Lösung (0,9 mmol l^{-1}) zu diesem Zeitpunkt erreicht wird. Die entsprechenden Werte für die Technik auf Basis von immobilisierten Template (Abbildung 69) liegen bei 0,7 mmol l^{-1} (CP) bzw. 0,9 mmol l^{-1} (polymerfreie Lösung).

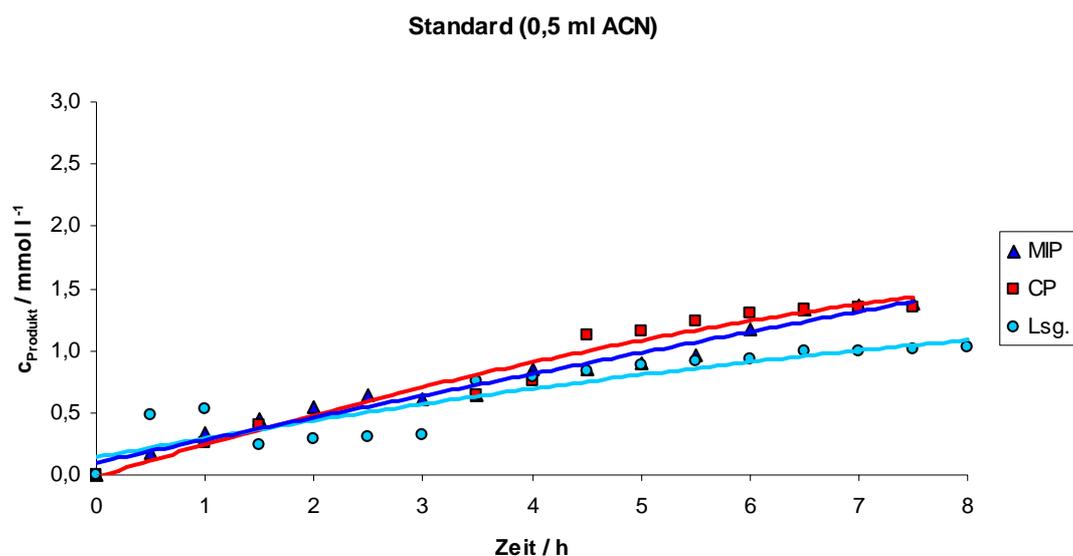


Abbildung 70: Katalyse der Diels-Alder-Reaktion von Hexachlorocyclopentadien (HCCPD) und Maleinsäure (MS) im Batchreaktor unter Verwendung der nach der Standardmethode mit 0,5 ml ACN geprägten (bzw. der nicht geprägten) DVB-MAA-Copolymerpartikel. Die Reaktion wurde bei 80 °C in 15 ml DMF mit 75 μmol MS und 75 μmol HCCPD, sowie mit entweder 300 mg MIP (\blacktriangle), CP (\blacksquare) oder ohne Polymer (\bullet) durchgeführt. Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit.

Die Katalysatorwirksamkeit der Standard-MIPs, die mit 4 ml ACN hergestellt wurden, ist anders als erwartet. Mit einer Produktkonzentration von 1,4 mmol l⁻¹, die nach 6 h bestimmt wurde, liegt das MIP sogar unterhalb von seinem CP (1,6 mmol l⁻¹). Die Konzentration in der Lösung beträgt auch hier 0,9 mmol l⁻¹ (Abbildung 71).

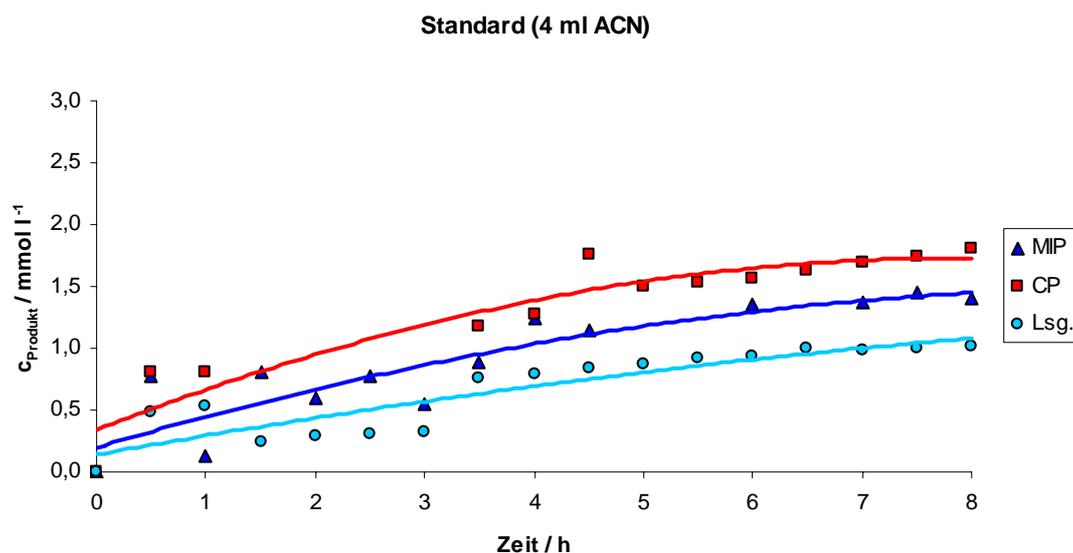


Abbildung 71: Katalyse der Diels-Alder-Reaktion von Hexachlorocyclopentadien (HCCPD) und Maleinsäure (MS) im Batchreaktor unter Verwendung der nach der Standardmethode mit 4 ml ACN geprägten (bzw. der nicht geprägten) DVB-MAA-Copolymerpartikel. Die Reaktion wurde bei 80 °C in 15 ml DMF mit 75 μmol MS und 75 μmol HCCPD, sowie mit entweder 300 mg MIP (\blacktriangle), CP (\blacksquare) oder ohne Polymer (\bullet) durchgeführt. Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit.

Die katalytische Aktivität des auf Basis von immobilisierten Templaten hergestellten MIP liegt höher als die von dem entsprechenden CP. Somit stellt dieses für das zugrunde liegende System den wirksamsten Katalysator dar, deren Effizienz auf die grundsätzlichen Vorteile der Immobilisierung zurückgeführt werden kann. Bei der anderen Methode ändert sich die katalytische Aktivität innerhalb der Reaktionszeit praktisch nicht, wobei die Porogenmenge keine bedeutsame Rolle spielt. Im Gegensatz zu unter Verwendung von 0,5 ml Porogen erzeugten Standardpolymeren kann aufgrund der ausreichenden Porogenmenge (4 ml) davon ausgegangen werden, dass die zugänglichen aktiven Stellen geformt werden können. Die schwache katalytische Aktivität ergibt sich in diesem Fall offensichtlich aus den nicht-spezifischen Wechselwirkungen der Polymermatrix mit den beiden Substraten. Der Vorteil der auf Basis von immobilisierten Templaten hergestellten MIPs gegenüber Standard-MIPs in der Katalyse der DA-Reaktion bestätigt die unter Abschnitt 6.3.1 erhaltenen Ergebnisse.

6.3.4 Enantioselektivität der MIPs

Die Polymermatrix mit einem chiralen Abdruck kann nach 2.2.3.1 templat-verwandte Moleküle bezüglich der Stereochemie unterscheiden und stärker binden. Wie in Abbildung 72 zu sehen ist, können die MIP-Schalen, die mit dem L-Leu-L-Phe-Z geprägt wurden, bei der Affinitätsmessung das Dansyl-Phe-Molekül nicht nur erkennen, sondern auch zwischen seinen beiden Konfigurationen L und D unterscheiden, weshalb mit zunehmender Menge an Dansyl-Phe in der Lösung die L-Form stärker als die D-Form vom Polymer gebunden wird.

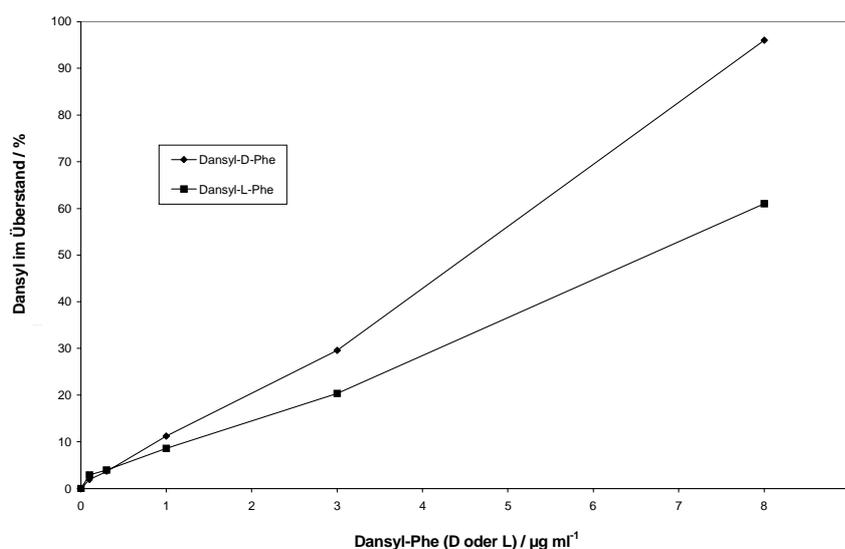


Abbildung 72: Affinität der mit dem Dipeptid L-Leu-L-Phe-Z geprägten MIP-Schalen. Die Messung wurde bei RT in 1 ml ACN mit 1 g MIP-Schalen, sowie der variablen Menge Dansyl-L-Phe- (◆) bzw. Dansyl-L-Phe-Lösung (■) durchgeführt. Auftragung der relativen Dansylkonzentration in Überstand gegen die Aufgabekonzentration der Dansyl-Lösungen.

Die MIP-Schalen, die ähnliche katalytische Elemente wie das Trypsin (Abschnitt 2.1.3) enthalten, wurden in der Hydrolyse des chiralen Boc-PheONP zum p-NP und Boc-Phe untersucht, da diese Reaktion mit klassischen MIPs hinsichtlich der Enantioselektivität bereits untersucht wurde (Abschnitt 2.2.3.3).

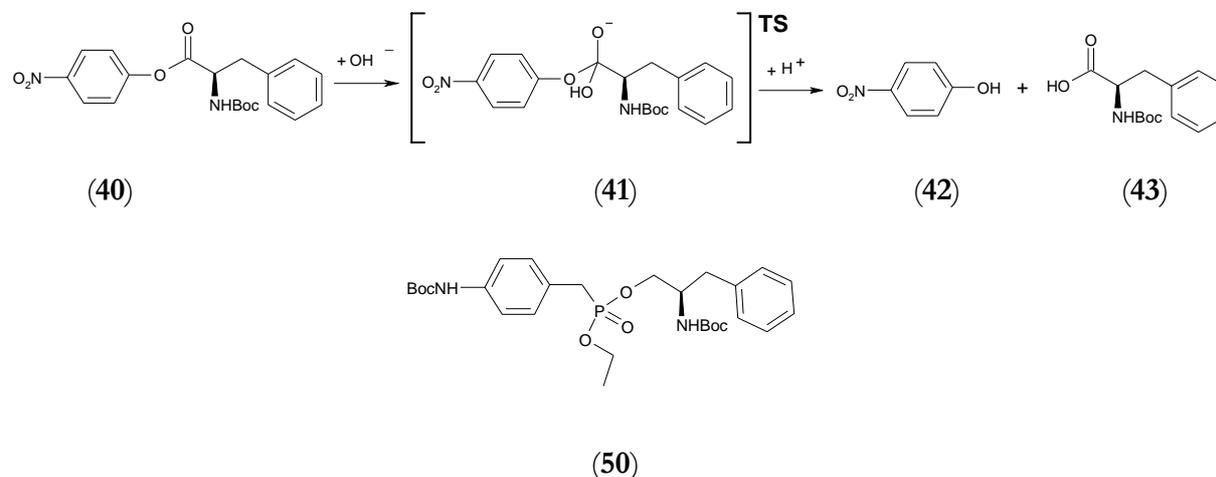


Abbildung 73: Modellreaktion zur Untersuchung der Enantioselektivität von katalytisch aktiven MIPs

Das chirale Phosphonat (TSA) weist eine ähnliche Struktur wie der Übergangszustand (TS) der Hydrolysereaktion auf (Abbildung 73), da dieses die tetraedrische Geometrie des attackierten C-Atoms wiedergibt und ein analoges chirales Zentrum besitzt. Das TSA wurde in folgenden Reaktionsschritten synthetisiert (Abschnitt 5.4.3):

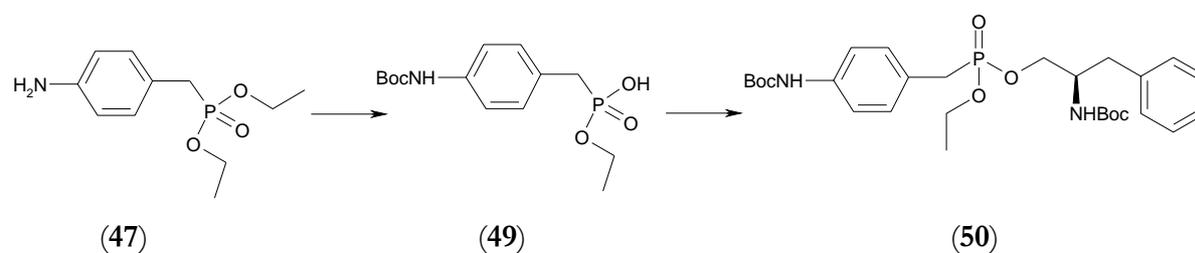


Abbildung 74: Synthese des chiralen TSA

Diese Reaktionen (Abbildung 74) wurden in Anwesenheit der Silikapartikel mit dem Ziel durchgeführt, das chirale Templat ausgehend von dem DAP an der Silikaoberfläche zu erzeugen. Die chemische Modifizierung der Silikapartikel (Abbildung 75) durch die einzelnen Schritte wurde mit Hilfe der Elementaranalyse verfolgt.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse (Abbildung 76) zeigen, dass bezogen auf die Silikamasse der relative Anteil an Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H) und Stickstoff (N) nach Zugabe des Bernsteinsäureanhydrids und Essigsäureanhydrids (Abbildung 75, 1. Schritt) bei anschließender Immobilisierung des DAP (Abbildung 75, 2. Schritt) angestiegen ist. Die Reaktion des fixierten

DAP mit dem Boc-S-PheOH (Abbildung 75, 3. Schritt) führt zu einer erneuten Steigerung des relativen Gehalts dieser Elemente, die hinsichtlich des Stickstoffs mit den zur Modifizierung der Silikapartikel verwendeten Mengen übereinstimmen. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass das chirale Phosponat an dem Silikaträger wie geplant immobilisiert wurde.

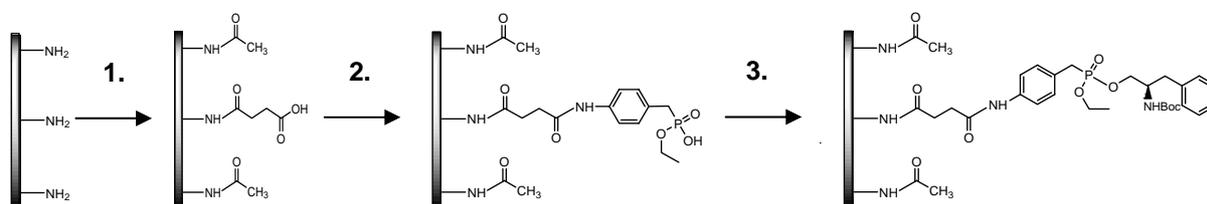


Abbildung 75: Erzeugung des chiralen TSA an der Silikaoberfläche: 1. Zugabe des Bernsteinsäure-Anhydrids und Essigsäureanhydrids, 2. Immobilisierung des DAP, 3. Modifizierung mit Boc-S-PheOH

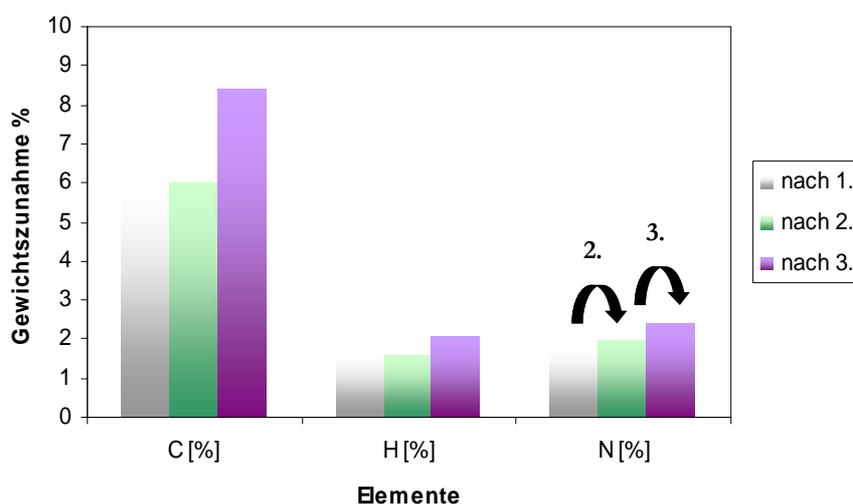


Abbildung 76: Elementaranalyse zur Kontrolle der Modifizierung der Silikapartikel

Nach Polymerisation um die mit immobilisierten Templaten versehenen Silikapartikel und anschließende Auflösung der Silikamatrix mit Flusssäure wurde der Siliciumgehalt im Polymer über eine REM/EDX-Analyse bestimmt. Bei dieser Methode wird die Oberfläche einer Probe mit einem gebündelten Elektronenstrahl zeilenweise abgerastert und die entstehenden Sekundärsignale ausgewertet (REM). Dabei liefert das REM hoch aufgelöste Abbildungen der Probe bis in den Nanometerbereich. Die Wechselwirkung zwischen Elektronen des Strahls und Elektronenhüllen der Probenatome führt zur Tiefenionisation der Atome und somit zur Emission von Röntgenstrahlung. Da die Energie der Röntgenstrahlung von der Ordnungszahl der Atome abhängt, kann anhand der Spektren der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX) auf die chemische Zusammensetzung der Probe geschlossen werden. Im Vergleich zum Kohlenstoff, aus welchem die Polymermatrix hauptsächlich besteht, konnte in beiden Fällen (MIP und CP) nur wenig Silicium nachgewiesen werden (Abbildung 91 und Abbildung 92, Anhang).

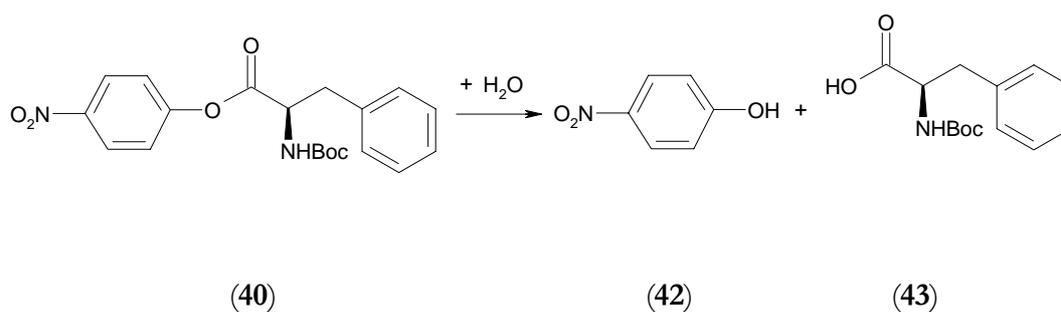


Abbildung 77: Modellreaktion zur Untersuchung der Enantioselektivität der MIPs

Bei der Reaktion des MIP mit einem Enantiomer des Boc-PheONP (Abbildung 77) wurde in einem diskontinuierlich betriebenen Batchreaktor die Entstehung des p-NP spektrophotometrisch am isosbestischen Punkt bei 348 nm verfolgt. Die Ergebnisse wurden mit denen des CP bzw. einer polymerfreien Lösung verglichen.

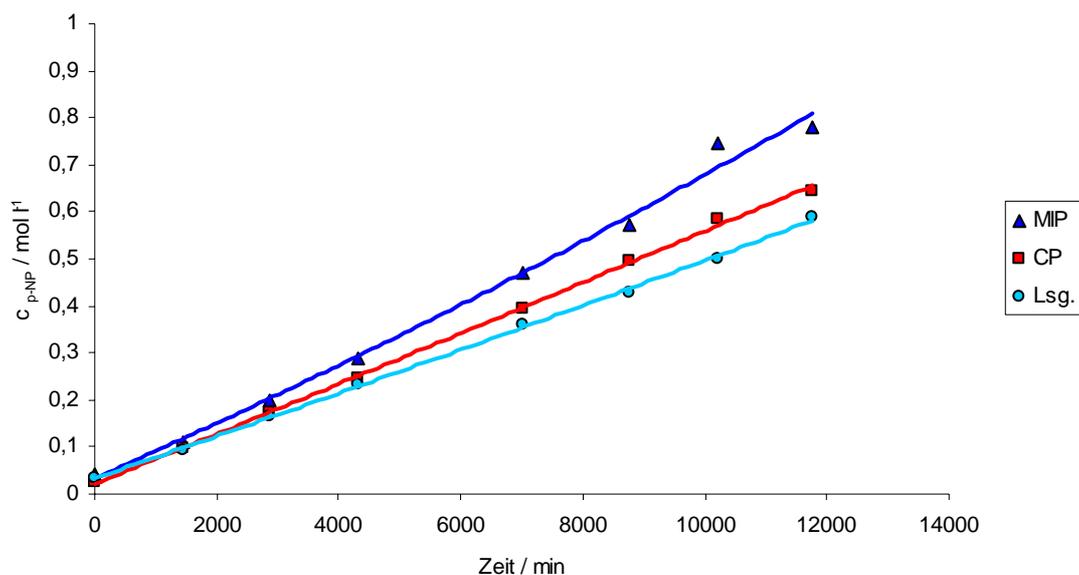


Abbildung 78: Verwendung der geprägten (bzw. der nicht geprägten) DVB-MAA-Copolymer-Schalen als Katalysatoren für die Esterhydrolyse von Boc-S-PheONP als Substrat im Batchreaktor. Die Reaktion wurde bei RT in 10 ml einer Lösung von 2,5 mmol l⁻¹ Substrat in 0,05 mol l⁻¹ Kalium-Phosphat-Puffer (pH 4,5), sowie mit entweder 100 mg MIP (▲), CP (■) oder ohne Polymer (●) durchgeführt. Auftragung der Konzentration eines der Produkte gegen die Zeit.

Eine schnellere Umsetzung des reinen Enantiomers als Substrat mit dem MIP (Abbildung 78) gegenüber dem CP und der polymerfreien Lösung weist darauf hin, dass die Informationen über die Stereochemie des Templats nach dem Prägen erhalten geblieben sind und bei der Hydrolyse in Erscheinung treten. Die erhöhte katalytische Wirksamkeit des MIP steht im Einklang mit den Ergebnissen der Polymercharakterisierung. Wie aus der Auswertung der auf REM-Untersuchungen basierenden Histogramme zu sehen ist, zeigt das MIP eine breitere Partikelgrößenverteilung als das CP (Abbildung 79). Zum Umrechnen der einzelnen Partikelklassen (Abbildung 79) in die entsprechenden Flächen (Tabelle 27) wurde Tabelle 35, Anhang zu Grunde gelegt.

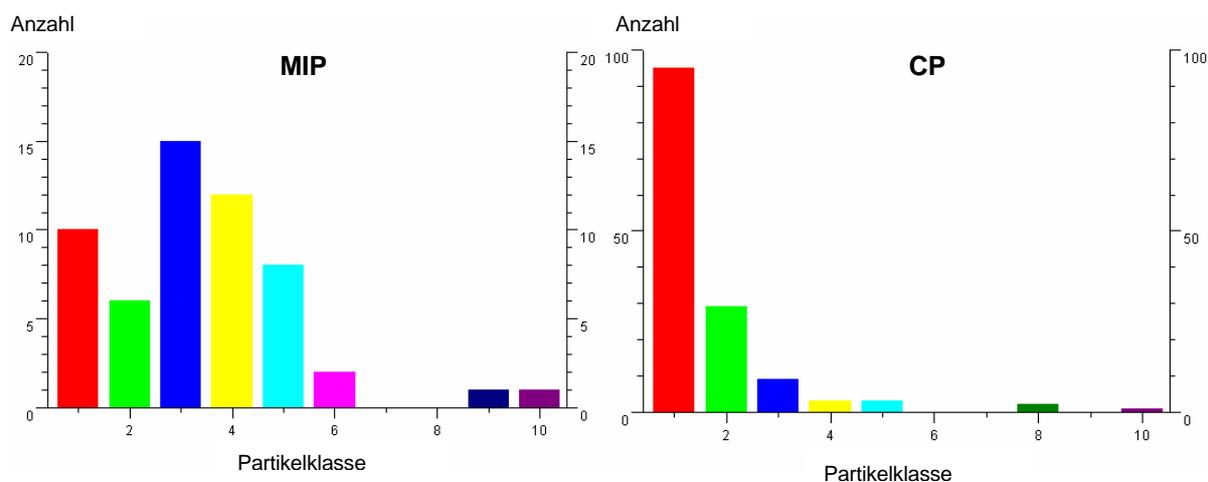


Abbildung 79: Ergebnisse der Partikelgrößenverteilung nach REM-Charakterisierung (Klassifizierung Tabelle 35, Anhang)

Tabelle 27: Auswertung der auf REM-Aufnahmen basierenden Histogramme

<i>Probe Funktion / Einheit</i>	<i>MIP Fläche / μm^2</i>	<i>CP Fläche / μm^2</i>
Minimum	448	53
Maximum	83290	832601
Standard Abweichung	16139	11222
Durchschnitt	23674	9484

Es unterscheiden sich also das MIP und sein CP bezüglich der Partikelgrößenverteilung, obwohl bei der Polymerherstellung gleiche Komponenten verwendet wurden (vergleiche 5.4.4). Dieser Effekt ist auf die Anwesenheit des Templats bei der Polymerisation des MIP zurückzuführen und zeigt, dass die beiden Polymere keine identische Morphologie besitzen, wodurch ihre Eigenschaften (u.a. ihre katalytische Aktivität) beeinflusst werden können.

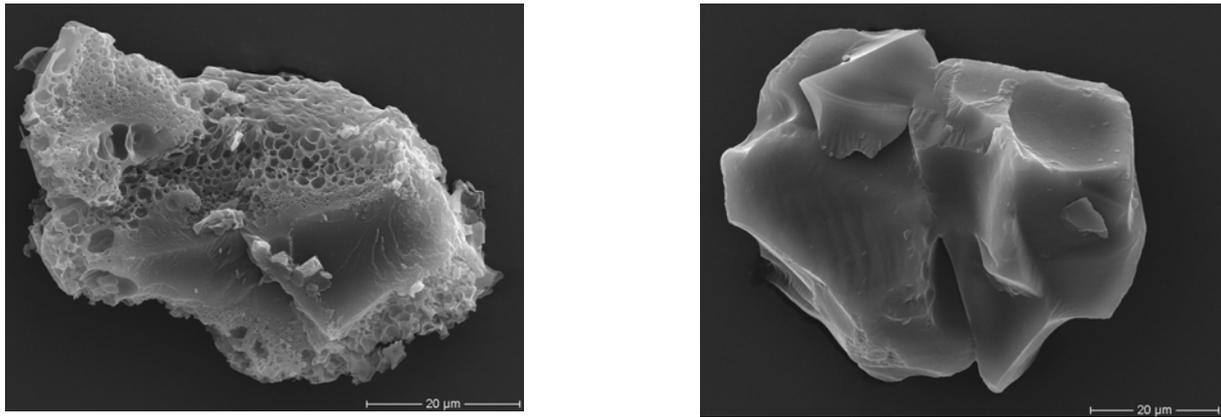


Abbildung 80: REM-Aufnahmen von MIP- (links) und CP-Partikeln (rechts)

Auf den REM-Aufnahmen erscheint das MIP poröser als sein Kontrollpolymer (Abbildung 80). Der beschriebene unterschiedliche Charakter der MIP- und CP-Oberflächen wurde auch in weiteren REM-Aufnahmen beobachtet (Abbildung 94, Anhang). Die größere Porosität, die normalerweise mit einer größeren spezifischen Oberfläche verbunden ist, konnte im Rahmen einer BET-Messung nicht bestätigt werden. Danach weist das CP sogar eine größere spezifische Oberfläche als das MIP auf. Die Partikelagglomeration, die in den MIP-Proben auftrat, wurde durch die REM-Bilder dokumentiert (Abbildung 81). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass bei den MIPs die Ergebnisse der BET-Messungen verfälscht wurden, da die Proben massebezogen waren und deshalb die Agglomeration der Partikel bei der Bestimmung der Oberfläche nicht mit erfasst wurde.

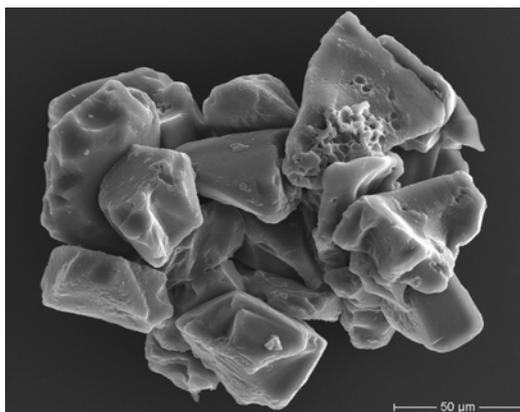


Abbildung 81: Agglomerierende MIP-Partikel

Ein schnellerer Abbau des zum MIP passenden Substrats ist ein Indiz für die Enantioselektivität eines katalytisch wirkenden Stoffes. Eine Aussage über die Enantioselektivität der MIP-Schalen zu treffen, ist nur dann möglich, wenn der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit für das MIP mit dem anderen Stereoisomer des Substrats bekannt ist.

Trotz fehlender Daten für die enantiomere Form des Substrats können die Ergebnisse der kinetischen Untersuchung zum qualitativen Vergleich mit denen der Massepolymere herangezogen werden. Wie bereits erwähnt wurde, verläuft die gleiche Reaktion in Anwesenheit der klassisch geprägten MIPs wesentlich schneller (2,5fach) als mit den CPs (Abbildung 93, Anhang). Ein vergleichbarer katalytischer Effekt $k_{\text{MIP}}/k_{\text{CP}}$ ist erforderlich, bevor mit den weiteren Untersuchungen der Enantioselektivität begonnen wird.

Die Wichtigkeit der Histidingruppe in der Nähe der Serinseitenkette für die Erhöhung der Nucleophilie am aktiven Zentrum einer Hydrolase wird vermehrt in der Literatur betont. Auf die Verwendung des Imidazols als Ersatz für den Histidinrest in den aktiven Stellen wurde in dieser Studie aus praktischen Gründen verzichtet, weil die Polymerisation dadurch teilweise gestört wird, sollte aber in weiteren Arbeiten berücksichtigt werden, damit die Vorteile der Immobilisierungstechnik maximal ausgenutzt werden können.

7 ZUSAMMENFASSUNG

7.1 MIP-Anwendung in der Separation

Die im Abschnitt 6.1.1 präsentierten Ergebnisse zeigen, dass MIPs auf Basis von Antioxidantien (Abbildung 82) grundsätzlich hergestellt und als spezifische stationäre Phasen in der Flüssigkeitschromatographie verwendet werden können, da das jeweilige Antioxidans (BHA, BHT oder PG) durch die MIP-Säule stärker retardiert wurde.

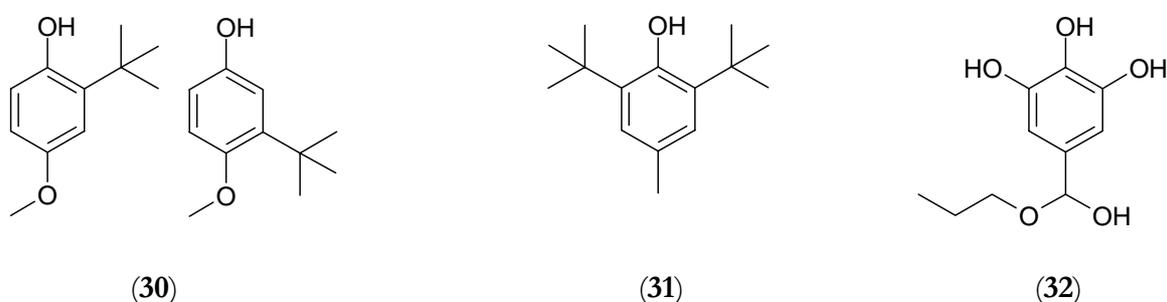


Abbildung 82: Chemische Strukturen der untersuchten Antioxidantien: Isomere von Butylhydroxyanisol BHA (30), Butylhydroxytoluol BHT (31), Propylgallat PG (32).

Eine etwas höhere Affinität des MIP im Vergleich zum CP wurde beim Aufnehmen der Durchbruchkurven bestätigt (Abschnitt 6.1.2). Der geringe Unterschied der jeweiligen Polymere bei der Affinitätsmessung in MeOH kann auf das veränderte Quellverhalten der Polymere in MeOH zurückgeführt werden, da dieses nicht beim Prägen als Porogen eingesetzt wurde. Auf die Gültigkeit dieser Annahme deuten die Versuche der Batchextraktion hin (Abschnitt 6.1.3). Eine Änderung des Lösungsmittels von MeOH zu ACN (Porogen), führt insgesamt zu einer Erhöhung der extrahierten Menge außer im Fall von BHA, dessen höhere Adsorptionsfähigkeit in MeOH offensichtlich nicht nur auf das Prägen zurückzuführen ist. Anscheinend unterstützt das MeOH nach langer Extraktionszeit (233,5h) die Gleichgewichtseinstellung zwischen dem Isomerengemisch und den Bindungsstellen besser als ACN. Der Zusammenhang zwischen der extrahierten Antioxidans-Menge und der verwendeten Festphase in ACN sind in Abbildung 83 dargestellt.

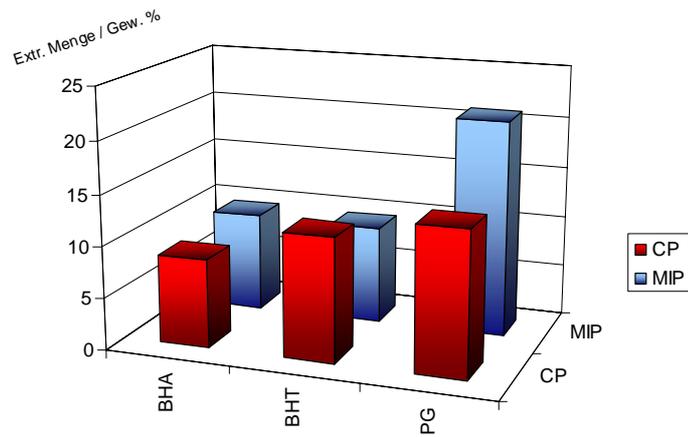


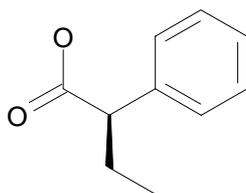
Abbildung 83: Extrahierte Menge mit MIPs im Batchmodus (ACN)

Die bei der Batchextraktion erzielten Ergebnisse korrelieren nicht mit denen der Affinitätsmessungen. Der besonders hohe Wert für die Adsorption des BHT-MIP in der Flüssigkeitschromatographie und die mäßige Effizienz als Festphase im Batchmodus kann auf andere Effekte zurückgeführt werden. Eine für dieses Verhalten mögliche Erklärung wurde in 6.1.3 vorgestellt und diskutiert.

Bei der Trennung des PG aus den Proben komplexer Zusammensetzung (Abschnitt 6.1.3) wurde keine selektive Extraktion erzielt, so dass das entwickelte Konzept auf Basis von MIPs zur Lösung dieses praxisrelevanten Problems aus dem Bereich der Lebensmittelchemie eine Weiterentwicklung benötigt.

7.2 MIPs für die Racemattrennung

In Abschnitt 6.2 wurde beschrieben, wie Mikrofiltrationsmembranen mit einer MIP-Schicht versehen werden können und wie sich damit eine kombinatorische Bibliothek aus 45 MIP-Rezepturen für R-(–)-2-Phenylbuttersäure (Abbildung 84) aufstellen lässt. Bei der Polymerrezeptur wurden sowohl das Porogen als auch das Quervernetzungsmittel variiert. Bei der Optimierung des Lösungsmittels wurden für die drei untersuchten Quervernetzer die größten relativen Affinitäten mit ACN erzielt. Das DMSO ist für die Herstellung der MIP-Membranen mittelmäßig geeignet, und MeOH stellt kein gutes Porogen dar. Dies lässt sich plausibel durch das Modell nach Snyder (Abschnitt 6.2.4) begründen, wobei speziell für dieses System der Prozess des Prägens durch die Lösungsmittel mit Protonenakzeptoreigenschaften im Gegensatz zu den Lösungsmitteln mit Protonendonoreigenschaften negativ beeinflusst wurde. Außerdem sind die Lösungsmittel mit ausgeprägten Dipoleigenschaften in diesem Fall gut geeignet, um spezifische MIP-Membranen zu erhalten.



(33)

Abbildung 84: Chemische Struktur der R-(–)-2-Phenylbuttersäure (33)

In ACN wurde eine Verschiebung der maximalen relativen Affinität zu großen Templat-Quervernetzer-Molverhältnissen vom DVB zum EGDMA und TRIM beobachtet, die vermutlich mit der Flexibilität der Polymermatrizes zusammenhängt. Die kleinen Molverhältnisse wirken sich beim DVB positiv auf die Qualität der Prägungen aus, während eine große DVB-Menge aufgrund der mangelnden Flexibilität der Bindungsstellen zu einer Verschlechterung der Spezifität der Prägungen führt (Abbildung 85). Für die nicht steifen Quervernetzer EGDMA und TRIM tritt das analoge Verhalten bei großen T-EGDMA- bzw. T-TRIM-Molverhältnissen auf, da der kritische Flexibilitätspunkt erst dann erreicht wurde.

Außerdem wurde das Maximum der relativen Affinität (13) für das EGDMA erreicht, so dass das EGDMA in diesem Kontext den am besten geeigneten Quervernetzer darstellt. Auf Basis dieser Untersuchungen könnten dann bei der Zusammensetzung T:EGDMA 1:16 in ACN nach einer Untersuchung der relativen Affinität der S-(+)-2-Phenylbuttersäure und einem "scale up" dieses Verfahrens effiziente Membranen für den Einsatz in der Racemattrennung erzeugt werden.

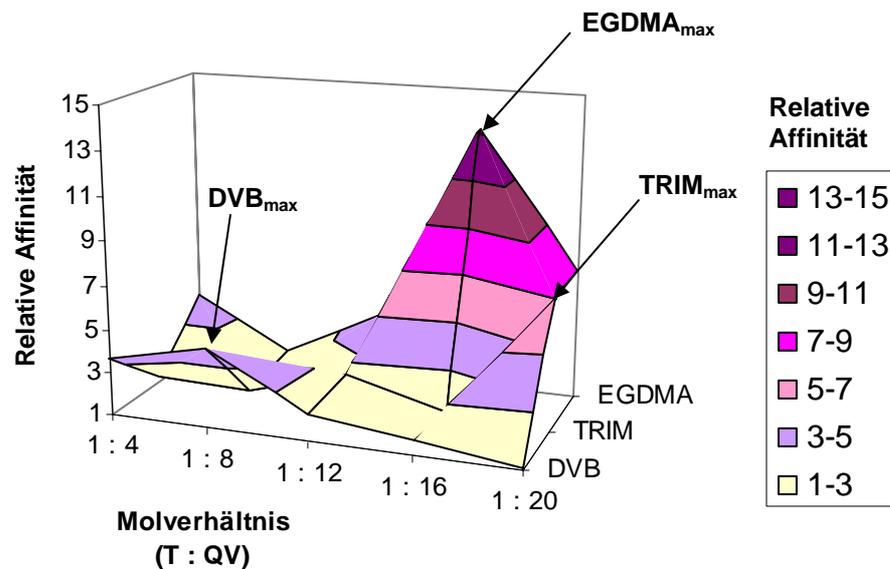


Abbildung 85: Relative Affinität der MIP-Membranen bei verschiedenen Templat-Quervernetzer-Molverhältnissen, wobei Quervernetzer (QV) entweder DVB, TRIM oder EGDMA ist (Porogen: ACN)

7.3 Einsatz der MIPs in der Katalyse

Für die Katalyse der DA-Reaktion zwischen Hexachlorocyclopentadien und Maleinsäure (Abbildung 86) wurden MIPs nach der Methode auf Basis von immobilisierten Templaten hergestellt, um den katalytischen Effekt bezüglich der Standard-MIPs zu verbessern und sich in dieser Hinsicht katalytischen Antikörpern anzunähern.

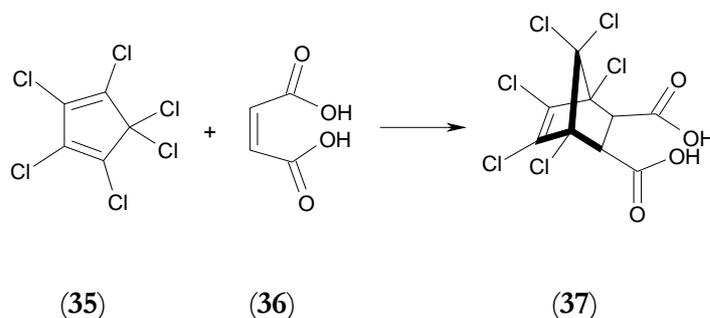


Abbildung 86: Modifizierte DA-Reaktion

Für diese biomimetischen Katalysatoren wurden die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante und die Michaelis-Konstante nach dem Michaelis-Menten-Modell berechnet, nachdem in einem Experiment die Konzentration eines Reaktionspartners im Überschuss eingesetzt und die Konzentration der Unterschusskomponente in Abhängigkeit der Zeit gemessen worden war (Abschnitt 6.3.2). Die Auftragung nach Lineweaver-Burk ergibt unter Annahme, dass 5 % der Zentren katalytisch aktiv sind, die folgende effektive Reaktionsgeschwindigkeitskonstante und die entsprechende Michaelis-Menten-Konstante:

$$k_{\text{eff}} = 1,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = 5,8 \text{ mM}$$

Nach dem k_{kat}/K_M -Kriterium (Abschnitt 2.1.4) konnte durch die Anwendung der neuen Prägemethode der katalytische Effekt der MIPs um eine Zehnerpotenz verbessert werden. Zusätzlich konnte in einem direkten Vergleich der beiden Methoden (Abschnitt 6.3.3) belegt werden, dass die MIP-Schalen, die von immobilisierten Templaten ausgehen, effizienter als die MIP-Massepolymere sind, die bei 80 °C keine erhöhte katalytische Aktivität aufweisen. Die hohe relative katalytische Aktivität der MIP-Schalen, um den Faktor zwei ($k_{\text{MIP}}/k_{\text{CP}}$), hängt offensichtlich mit den generellen Vorteilen dieser Methode zusammen.

Für die MIP-Schalen wurde eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollpolymeren und der Reaktion in polymerfreier Lösung in einem großen Temperaturbereich von 60 bis 100 °C festgestellt (Abschnitt 6.3.2). Aus dieser Temperaturabhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten konnte die Aktivierungsenergie, einer der wichtigsten kinetischen Parameter, bestimmt werden. Unter Annahme eines Geschwindigkeitsgesetzes pseudo-erster Ordnung wird für die Reaktion in polymerfreier Lösung eine effektive Aktivierungsenergie von 63 kJ mol⁻¹ bestimmt. Im Vergleich dazu benötigt die Reaktion mit dem Kontrollpolymer eine Energie von 60 kJ mol⁻¹ und mit dem MIP 55 kJ mol⁻¹ zur Aktivierung.

polymerfreie Lösung: 63 kJ mol⁻¹ ± 3 %

CP: 60 kJ mol⁻¹ ± 3 %

MIP: 55 kJ mol⁻¹ ± 3 %

Damit konnte gezeigt werden, dass sich MIPs als typische Katalysatoren verhalten, weil sie in der Lage sind, die Aktivierungsenergie der Reaktion abzusenken. Durch eine umfangreiche Studie unter den Gesichtspunkten der Reaktionstechnik kann sowohl der Reaktortyp als auch die Art der Reaktionsführung für die Katalyse dieser Reaktion mit MIPs optimal ausgelegt werden, wodurch eine weitere Verbesserung der katalytischen Effekte erzielt werden könnte.

Die Methode zum Design effizienterer Katalysatoren wurde verwendet, um enantioselektive MIPs für die Katalyse der Esterspaltung von Boc-S-PheONP zu Boc-S-Phe und p-NP herzustellen (Abbildung 87). Dazu wurde ein chirales Phosphonat, das durch die Modifizierung eines nicht-chiralen Vorläufers (DAP) erzeugt wurde, immobilisiert an Silikapartikeln als Templat verwendet.

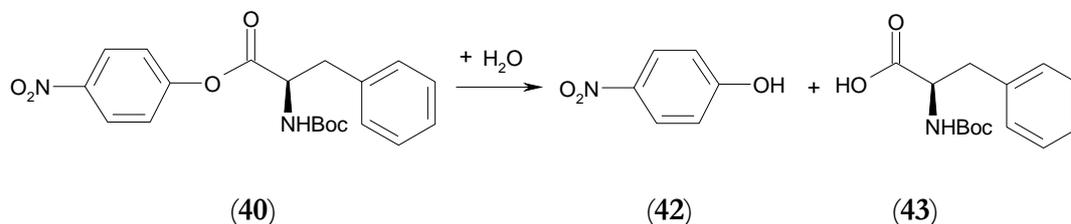


Abbildung 87: Modellreaktion zur Untersuchung der Enantioselektivität der MIPs

Die kinetischen Untersuchungen, bei denen die Entstehung des p-NP am isobestischen Punkt mittels UV-Spektroskopie gemessen wurde, zeigen eine höhere katalytische Aktivität der geformten MIP-Schalen verglichen mit entsprechenden CP-Schalen.

Der moderate Effekt für die Katalyse des Boc-S-PheONP kann als erster Hinweis für eine enantioselektive Wiedererkennung auf molekularer Ebene verstanden werden. Für eine vollständige Evaluierung der Enantioselektivität des polymeren Katalysators und einen Vergleich mit den enantioselektiven Standard-MIPs müssten die MIP-Schalen in der Hydrolyse des anderen Enantiomers Boc-R-PheONP untersucht werden.

Insgesamt wurde im Rahmen dieses DFG-Projekts die Katalyse folgender chemischer Reaktionen (Tabelle 28) mit MIPs erforscht:

Tabelle 28: Durch MIPs katalysierte Zielreaktionen

<i>Rkt.</i>	<i>Typ</i>	<i>Substrat</i>	<i>Templat (TSA)</i>
A:	Dehydrofluorierung	4-Fluoro-4-(p-nitrophenyl)-2-butanon	N-Benzylisopropylamin
B:	Knoevenagel-Reaktion	Benzaldehyd und Diethylmalonat	Diethylbenzylmalonat
C:	Diels-Alder-Reaktion	Hexachlorocyclopentadien und Maleinsäure	Immobil. Chlorendinesäureanhydrid
D:	Esterhydrolyse mit enantioselektiven MIPs	Boc-S-(-)-Phenylalanin-p-nitrophenylester	Immobil. Ethyl-Boc-S-(-)-Phenylalaninyl- 4-aminobenzylphosphonat

Die Katalysatoren wurden dazu entweder als Standard-MIPs oder MIP-Schalen hergestellt (Tabelle 29), wobei ein für die MIPs unkonventionelles Format, die Mikrogele, ebenfalls in der Katalyse eingesetzt wurde.

Tabelle 29: Katalysatorherstellung (Übersicht)

<i>Rkt.</i>	<i>Polymer</i>	<i>Komponenten</i>				<i>Polymerisation</i>		
		<i>FM</i>	<i>QV</i>	<i>Init.</i>	<i>Porogen</i>	<i>Initiierung</i>	<i>T</i>	<i>Dauer</i>
A:	Standard-MIP	MAA	EGDMA	AIBN	CH ₂ Cl ₂	UV	RT	-
	Mikrogel	MAA	EGDMA	AIBN	Cyclop.	Thermisch	80 °C	4 Tage
B:	Standard-MIP	MAA	TRIM	AIBN	DFM	Thermisch	71 °C	24 h
C:	Standard-MIP	MAA	EGDMA	AIBN	CHCl ₃	UV	4 °C	20 h
	MIP-Schale	MAA	DVB	AIBN	-	Thermisch	60 °C	15 h
D:	MIP-Schale	MAA	DVB	AIBN	-	Thermisch	60 °C	15 h

Unter den in Tabelle 30 angegebenen Reaktionsbedingungen der kinetischen Untersuchungen und den in Tabelle 31 angeführten analytischen Bedingungen konnte der größte katalytische Effekt für die Dehydrofluorierung in einem Batchreaktor bei 50 °C erzielt werden, wobei für diese Reaktion im Vergleich zu anderen Zielreaktionen die ausführlichsten Untersuchungen bezüglich der Reaktionstechnik unternommen wurden. Die durchschnittlichen katalytischen Effekte, die bei den anderen Reaktionen erzielt wurden, stellen eine gute Basis für weitere reaktionstechnische Untersuchungen von MIP-Katalysatoren dar.

Tabelle 30: Reaktorauslegung (Übersicht)

<i>Rkt</i>	<i>Polymer</i>	<i>Reaktortyp</i>	<i>Bedingungen</i>			<i>Kat. Effekt</i>
			<i>LM</i>	<i>T</i>	<i>Flußrate</i>	
A:	Standard-MIP	Batchreaktor	H ₂ O/ACN 1:1 (v/v)	50 °C	-	$k_{\text{MIP}} / k_{\text{CP}} = 6$
		Festbettreaktor	CH ₂ Cl ₂	35 °C	1 ml min ⁻¹	-
		Membranreaktor	ACN/H ₂ O 1:1 (v/v)	55 °C	0,1 ml min ⁻¹	$k_{\text{MIP}} / k_{\text{CP}} = 3,8$
	Mikrogel	Batchreaktor	Cyclop.	55 °C	-	Kein Effekt
B:	Standard-MIP	Festbettreaktor	ACN	50 °C	0,5 ml min ⁻¹	Kein Effekt
C:	Standard-MIP	Batchreaktor	DMF	80 °C	-	Kein Effekt
	MIP-Schale	Batchreaktor	DMF	60 – 100 °C	-	$k_{\text{MIP}} / k_{\text{CP}} = 2$
D:	MIP-Schale	Batchreaktor	Puffer	RT	-	$k_{\text{MIP}} / k_{\text{CP}} = 1,3$

Tabelle 31: Analysemethoden (Übersicht)

Rkt	Polymer	Reaktortyp	Bedingungen				
			Art	Stationäre Phase	Mobile Phase	Detektor	T
A:	Standard-MIP	Batch-reaktor	UV-Spektroskopie	-	-	UV (268 nm)	RT
		Festbett-reaktor	UV-Spektroskopie	-	-	UV (250-400 nm)	RT
		Membran-reaktor	HPLC	LC-12 (12 µm)	ACN/H ₂ O 1:1 (v/v)	UV (268nm)	RT
	Mikrogel	Batch-reaktor	HPLC	LC-12 (12 µm)	ACN/H ₂ O 1:1 (v/v)	UV (268nm)	RT
B:	Standard-MIP	Festbett-reaktor	GC	Rtx-5 MS	H ₂	FID	Gradient
C:	Standard-MIP	Batch-reaktor	HPLC	PLC-18 (12 µm)	ACN/MeOH 6:4 (v:v)	UV (234 nm)	RT
	MIP-Schale	Batch-reaktor	HPLC	Vydac C-18 (10 µm)	DMF/AcOH 98:2 (v/v)	UV (325 nm)	RT
D:	MIP-Schale	Batch-reaktor	UV-Spektroskopie	-	-	UV (348 nm)	RT

Angesichts der hier präsentierten Ergebnisse wird erwartet, dass MIPs in absehbarer Zeit ein großes Interesse der chemischen Industrie wecken werden und die Produktion nicht mehr nur im Labor-, sondern auch im Kilogramm- oder Tonnenmaßstab stattfinden wird. Besonders attraktiv erscheint eine breite Anwendung in Separation und Katalyse unter Berücksichtigung von chiralen Templaten bei der Herstellung von MIPs.

Anhang

Tabelle 32: Polarität für eine Reihe der Lösungsmittel

<i>Lösungsmittel</i>	<i>Polarität</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Polarität</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Polarität</i>
n-Hexan	0,1	Ethoxybenzol	3,3	2-Picolin	4,9
i-Octan	0,1	Phenylether	3,4	Aceton	5,1
Cyclohexan	0,2	Ethylenchlorid	3,5	Methanol	5,1
Schwefelkohlenstoff	0,3	n-Butanol	3,9	Nitroethan	5,2
n-Decan	0,4	i-Propanol	3,9	Pyridin	5,3
Tetrachlormethan	1,6	Tetrahydrofuran	4,0	Methoxyethanol	5,5
Triethylamin	1,9	n-Propanol	4,0	Benzylalkohol	5,7
Butylether	2,1	Chloroform	4,1	Acetonitril	5,8
i-Propylether	2,4	t-Butanol	4,1	Essigsäure	6,0
Toluen	2,4	Benzylether	4,1	Nitromethan	6,0
p-Xylen	2,5	Ethanol	4,3	Methylformamid	6,0
Benzol	2,7	Essigsäureethylester	4,4	Anilin	6,3
Chlorbenzol	2,7	Nitrobenzol	4,4	Dimethylformamid	6,4
Brombenzol	2,7	Cyclohexanon	4,7	Ethylenglycol	6,9
Ethylether	2,8	Methylethylketon	4,7	Dimethylsulfoxid	7,2
Iodbenzol	2,8	Dioxan	4,8	Tetrafluorpropanol	8,6
Dichlormethan	3,1	Benzonitril	4,8	Formamid	9,6
Fluorbenzol	3,2	Acetophenon	4,8	Wasser	10,2

Tabelle 33: Selektivitätsparameter für eine Reihe von Lösungsmittel

<i>Lösungsmittel</i>	<i>Gruppe</i>	<i>Polarität</i>	x_e	x_d	x_n	<i>Substanzklasse</i>
Hexan	I	0,1	-	-	-	Aliphatische Kohlenwasserstoffe
Diethylether	I	2,8	0,53	0,13	0,34	Ether
Methanol	II	5,1	0,48	0,22	0,31	Aliphatische Alkohole
Ethanol	II	4,3	0,52	0,19	0,29	
THF	III	4,0	0,38	0,20	0,42	Pyridine, THF, Sulfoxide
DMSO	III	7,2				
Essigsäure	IV	6,0	0,39	0,31	0,30	Carbonsäuren
Benzylalkohol	IV	5,7	0,40	0,30	0,30	Aromatische Alkohole
Dichlormethan	V	3,1	0,29	0,18	0,53	Aliphatische halogenierte Kohlenwasserstoffe
1,2-Dichlorethan	V	3,5	0,30	0,21	0,49	
1,4-Dioxan	VI	4,8	0,36	0,24	0,40	Aliphatische Ketone und Ester
Acetonitril	VI	5,8	0,31	0,27	0,42	Dioxane, Nitrile, Sulfone
Ethylacetat	VI	4,4	0,34	0,23	0,43	
Aceton	VI	5,1	0,35	0,23	0,42	
Toluol	VII	2,4	0,25	0,28	0,47	Aromatische Kohlenwasserstoffe,
Chlorbenzol	VII	2,7	0,23	0,33	0,44	Nitroverbindungen, aromatische
Nitroethan	VII	5,2	0,28	0,29	0,43	Ether, halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe
Wasser	VIII	10,2	0,37	0,37	0,25	Wasser, fluorierte Alkohole

Tabelle 34: Verwendete Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Modell</i>	<i>Firma / Land</i>
"slurry packer"	1666	Alltech / USA
UV-Reaktor	RPR-200	Southern N.E. Ultraviolet Co. / USA
Kugelmühle	S 100	Retsch / Deutschland
Pumpe	P 580	Dionex / Deutschland
Autosampler	Marathon	Latek / Deutschland
UV Detektor	UVD 170	Dionex / Deutschland
Rechner	OptiPlex GX 110	Dell / USA
Thermostat	Ecoline RE 207 E 200	Lauda / Deutschland
Quecksilberlampe	2000 W	Beltron / Deutschland
FTIR-Spektrometer	8201 PC	Shimadzu / Japan

Tabelle 35: Die Fläche der einzelnen Partikelklassen

<i>Partikelklasse</i>	<i>Von</i>	<i>Bis</i>	<i>MIP</i>	<i>CP</i>
<i>Funktion / Einheit</i>	<i>Fläche / μm^2</i>	<i>Fläche / μm^2</i>	<i>Anzahl / -</i>	<i>Anzahl / -</i>
1	0	8400	10	95
2	8400	16800	6	29
3	16800	25200	15	9
4	25200	33600	12	3
5	33600	42000	8	3
6	42000	50400	2	0
7	50400	58800	0	0
8	58800	67200	0	2
9	67200	75600	1	0
10	75600	84000	1	1

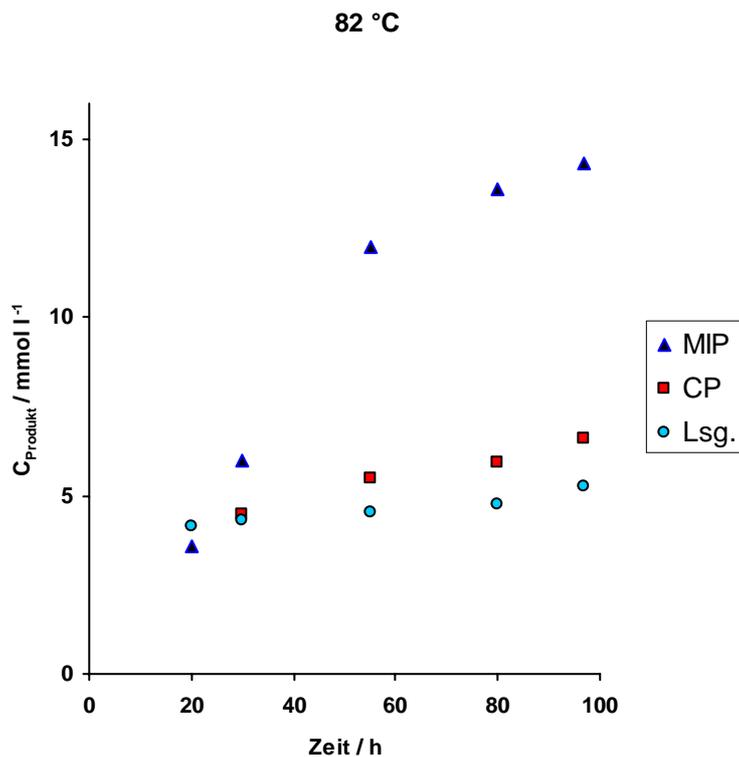


Abbildung 88: Einsatz der mit dem Chlorendinesäureanhydrid geprägten (bzw. der nicht geprägten) EGDMA-MAA-Massepolymere als Katalysator für die Diels-Alder-Reaktion von Tetrachlorothiophendioxid (TCTD) und Maleinsäureanhydrid (MSA) im Batchreaktor [94]. Die Reaktion wurde bei 82 °C in 15 ml ACN mit 443 μmol MSA und 377 μmol TCTD, sowie mit entweder 300 mg MIP (\blacktriangle), CP (\blacksquare) oder ohne Polymer (\bullet) durchgeführt. Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit.

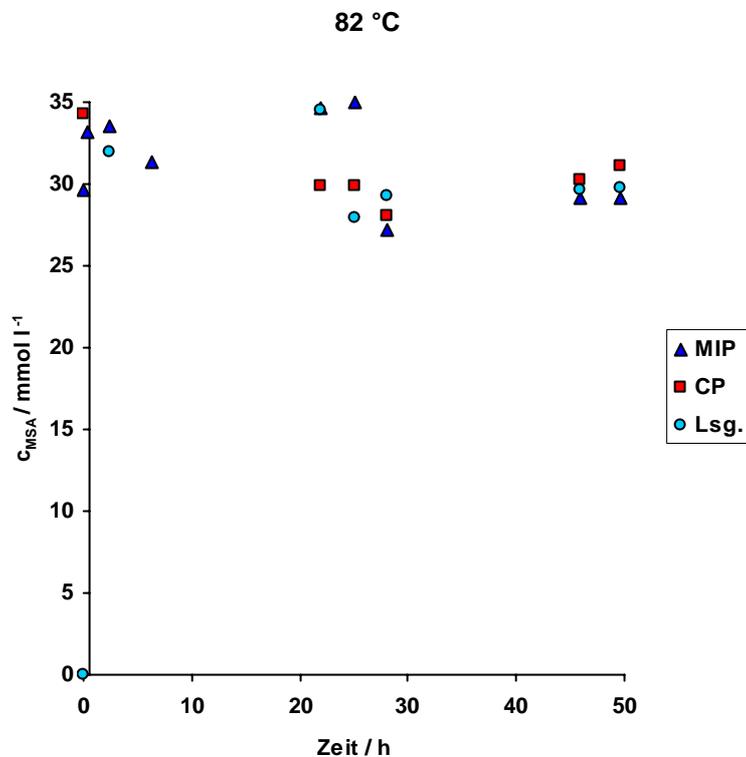


Abbildung 89: Einsatz der mit dem Chlorendinesäureanhydrid geprägten (bzw. der nicht geprägten) EGDMA-MAA-Massepolymere als Katalysator für die Diels-Alder-Reaktion von Tetrachlorothiophendioxid (TCTD) und Maleinsäureanhydrid (MSA) im Batchreaktor (Experiment). Die Reaktion wurde bei 82 °C in 15 ml ACN mit 443 μmol MSA und 377 μmol TCTD, sowie mit entweder 300 mg MIP (\blacktriangle), CP (\blacksquare) oder ohne Polymer (\bullet) durchgeführt. Auftragung der MSA-Konzentration gegen die Zeit.

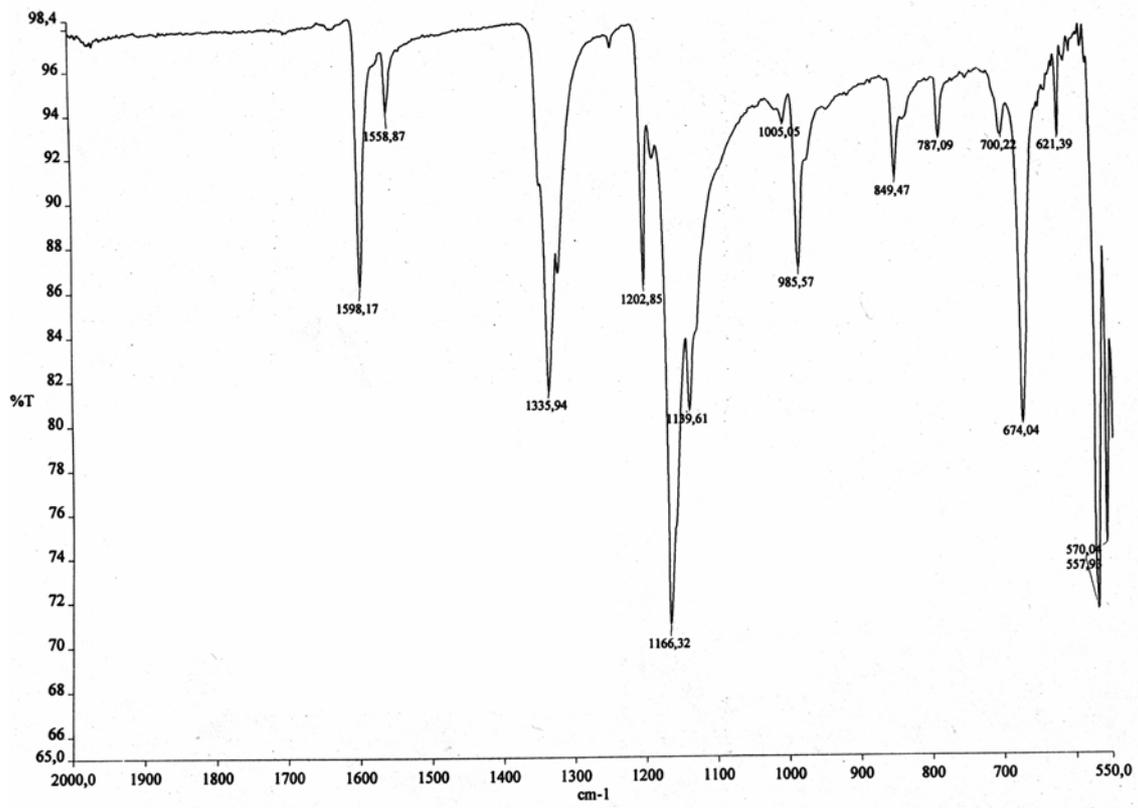


Abbildung 90: IR-Spektrum von Tetrachlorothiophendioxid (TCTD)

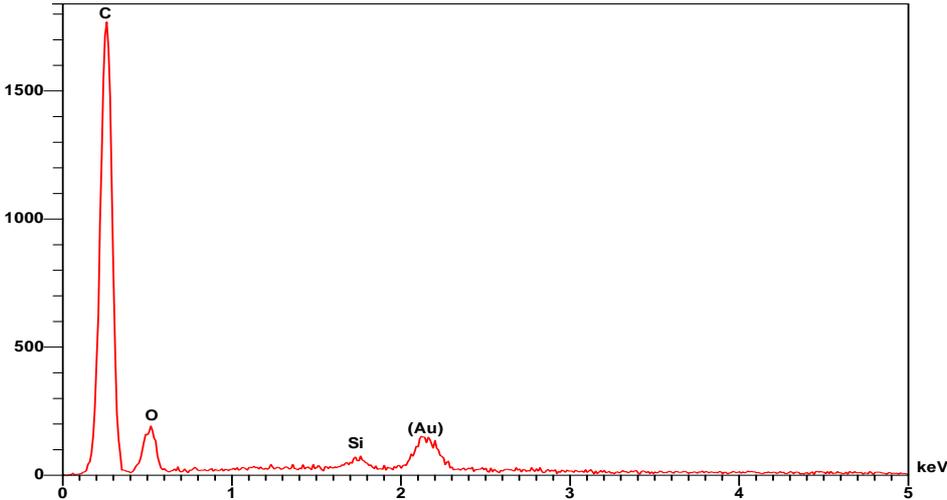


Abbildung 91: REM/EDX Spektrum der polymeren Oberfläche (MIP)

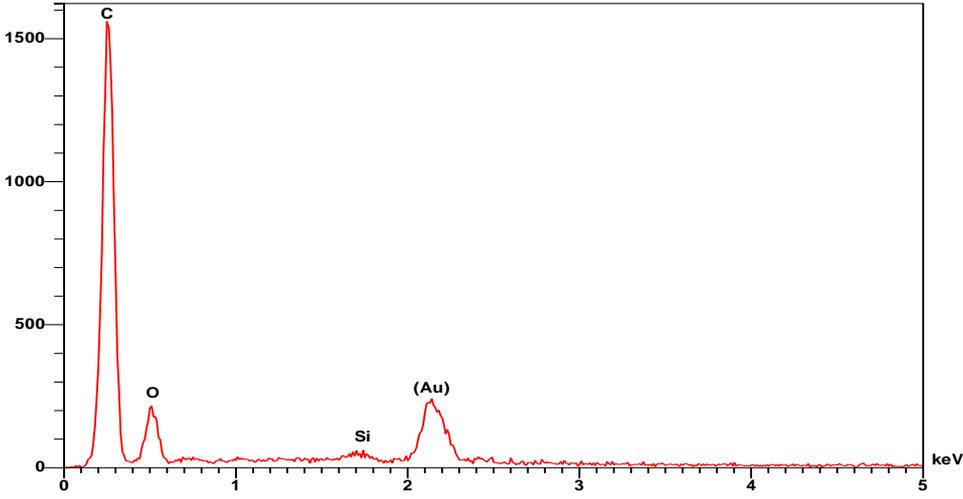


Abbildung 92: REM/EDX Spektrum der polymeren Oberfläche (CP)

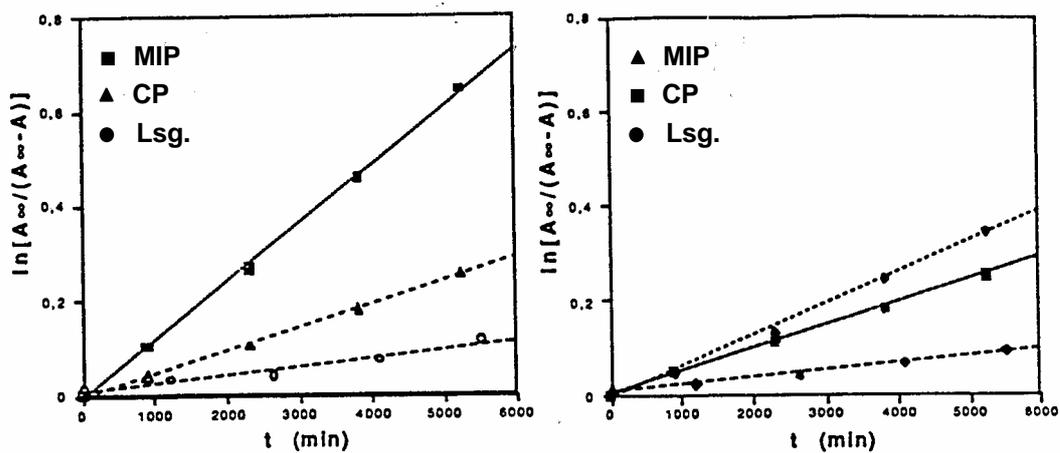


Abbildung 93: Die Ergebnisse der enantioselektiven Katalyse der klassisch geprägten MIPs. Ergebnisse der Umsetzung von Boc-D-PheONP (links) bzw. von Boc-L-PheONP (rechts)

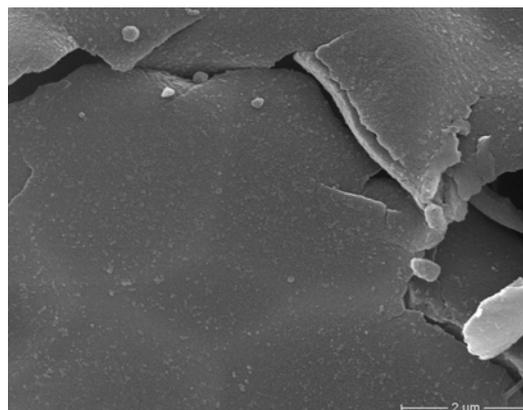
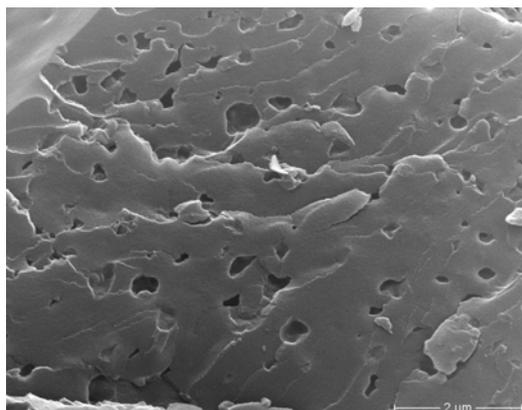


Abbildung 94: REM-Aufnahmen der enantioselektiven Polymerschalen für den Einsatz als Katalysatoren in der Esterhydrolyse. MIP-Oberfläche (links) im Vergleich zur CP-Oberfläche (rechts)

Literaturverzeichnis

- [1] Atkins, P.W. (Ed.); Physikalische Chemie, 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim **1990**, 765
- [2] Baerns, M.; Hofmann, H.; Renken, A.; in Baerens, M.; Falbe, J.; Fetting, F.; Hofmann, H.; Keim, W.; Onken, U. (Ed.); Chemische Reaktionstechnik, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York **1999**, 16
- [3] Berg, J.M. (Ed.); Tymoczko, J.L. (Ed.); Stryer, L.; Biochemie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin **2003**, 222
- [4] http://www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~classhou/ENZYM_VIS_KURS/VRML/TRYPsin/trypsin.html; 05.12.2004
- [5] Jencks, W. (Ed.); Catalysis in Chemistry and Enzymology, McGraw-Hill, New York, **1969**
- [6] Wolfenden, R.; Annu. Rev. Biophys. Bioeng. **1976**, 5, 271
- [7] Barlett, P.; Marlowe, C.; Biochemistry **1983**, 22, 4168
- [8] Pollack, S.J.; Jacobs, J.W.; Schultz, P.G.; Science **1986**, 234, 1570
- [9] Tramontano, A.; Janda, K.D.; Lerner, R.A.; Science **1986**, 234, 1566
- [10] Berg, J.M. (Ed.); Tymoczko, J.L. (Ed.); Stryer, L.; Biochemie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin **2003**, 110
- [11] Auclair, K.; Sutherland, A.; Kennedy, J.; Witter, D.J.; Van den Heever, J.P.; Hutchinson, C.R.; Vederas, J.C.; J. Am. Chem. Soc. **2000**, 122, 11519
- [12] Watanabe, K.; Mie, T.; Ichihara, A.; Oikawa, H.; Honma, M.; J. Biol. Chem. **2000**, 275, 38393
- [13] Anderson, H.L.; Sanders, J.K.M.; J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1989**, 1714
- [14] Walter, C.J.; Sanders, J.K.M.; Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **1995**, 34, 217
- [15] Walter, C.J.; Anderson, H.L.; Sanders, J.K.M.; J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1993**, 458
- [16] Bonar-Low, R.P.; Mackay, L.G.; Walter, C.J.; Marvaud, V.; Sanders, J.K.M.; Pure Appl. Chem. **1994**, 66, 803
- [17] Hilvert, D.; Hill, K.W.; Nared, K.D.; Auditor, M.-T.M.; J. Am. Chem. Soc. **1989**, 111, 9261
- [18] Hilvert, D.; Acc. Chem. Res. **1993**, 26, 552
- [19] Xu, J.; Deng, Q.; Chen, J.; Houk, K.N.; Bartek, J.; Hilvert, D.; Wilson, I.A.; Science **1999**, 286, 2345
- [20] Gouverneur, V.E. et al.; Science **1997**, 275, 1140
- [21] Meekel, A.A.P.; Resmini, M.; Pandit, U.K.; J. Chem. Soc. Chem. Commun. **1995**, 571
- [22] Yli-Kauhalouma, J.T. et al.; J. Am. Chem. Soc. **1995**, 117, 7041
- [23] Pitt, A.R.; Stimson, W.H.; Suckling, C.J.; Merrero-Tellado, J.J.; Vazzana, C.; Israel J. Chem. **1996**, 136, 171
- [24] Page, M.I.; Jencks, W.P.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1971**, 68, 1678

- [25] Braisted, A.C.; Schultz, P.G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7430
- [26] Romesberg, F.E.; Spiller, B.; Schultz, P.G.; Stevens, R.C.; *Science* **1998**, 279, 1929
- [27] Schultz, P.G.; Lerner, R.A.; *Science* **1995**, 269, 1835
- [28] Hsieh, L.C.; Stephans, J.C.; Schultz, P.G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2167
- [29] Hsieh, L.C.; Yonkovich, S.; Kochersperger, L.; Schultz, P.G.; *Science* **1993**, 260, 337
- [30] Janda, K.D.; Shevlin C.G.; Lerner, R.A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9, 2659
- [31] Lewis, C.; Krämer, T.; Robinson, S.; Hilvert, D.; *Science* **1991**, 253, 1019
- [32] Tocker, J.D.; Wentworth, P.Jr.; Hu, Y.; Houk, K.N.; Janda, K.D.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3244
- [33] Hilvert, D.; Hill, K.W.; Nared K.D; Auditor M.-T.M.; *J. Am. Chem.Soc.* **1989**, 111, 9261
- [34] Tawfik, D.S.; Zemel, R.R.; Arad-Yellin, R.; Green, B.S.; Eshar, Z.; *Biochemistry* **1990**, 29, 9916
- [35] Wulff, G.; Grobe-Einsler, R.; Vesper, W.; R.; Sarhan, A.; *Makromol. Chem.* **1977**, 178, 2817
- [36] Wulff, G.; Vesper, W.; Grobe-Einsler, R.; Sarhan, A.; *Makromol. Chem.* **1977**, 178, 2799
- [37] Wulff, G.; Minarik, M.; *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, 13, 2987
- [38] Wulff, G.; Vesper, W.; *J. Chromatogr.* **1978**, 167, 171
- [39] Wulff, G.; Poll, H.-G.; Minarik, M.; *J. Liq. Chromatogr.* **1986**, 9, 385
- [40] Wulff, G.; Vietmeier, J.; Poll, H.-G; *Makromol. Chem.* **1987**, 188, 731
- [41] Wulff, G.; Poll, H.-G.; *Makromol. Chem.* **1987**, 188, 741
- [42] Wulff, G.; Kirstein, G.; *Angew. Chem.* **1990**, 102, 706
- [43] Sellergren, B.; Shea, K.J.; *J. Chromatogr.* **1993**, 635, 31
- [44] Sellergren, B. (Ed.); *Molecularly Imprinted Polymers-Man-Made: Mimics of Antibodies and Their Application in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam **2001**, 185-201
- [45] Shea, K.J.; Spivak, D.A.; Sellergren, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3368
- [46] Wulff, G.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1812
- [47] Wulff, G.; Biffis, A.; in Sellergren, B. (Ed.); *Molecularly Imprinted Polymers-Man-Made: Mimics of Antibodies and Their Application in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, **2001**, 71-111
- [48] Wulff, G.; Gross, T.; Schönfeld, R.; Schrader, T.; Kirsten, C.; in Bartsch, R.A.; Maeda, M.; (Ed.); *Molecular and Ionic Recognition with Imprinted Polymers*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington DC **1998**, 703, 10-28
- [49] Matsui, J.; Nicholls, I.A.; Takeuchi, T; *Tetrahedron: Asymmetrie* **1996**, 2, 1357
- [50] Ramstöm, O.; Nicholls, I.A.; Mosbach, K.; *Tetrahedron: Asymmetrie* **1994**, 5, 649
- [51] Mayes, A.G.; Andersson, L.I.; Mosbach, K.; *Anal. Biochem.* **1994**, 222, 483
- [52] Skudar, K.; Brüggemann, O.; Wittelsberger, A.; Ramström, O.; *Anal. Commun.* **1999**, 36, 327
- [53] Brüggemann, O.; Haupt, K.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Mosbach, K.; *J. Chromatogr.* **2000**, 889, 15
- [54] Sellergren, B.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1578
- [55] Zander, A.; Findlay, P.; Renner, T.; Sellergren, B.; Swietlow, A.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3304

-
- [56] Andersson, L.I.; Paprica, A.; Arvidsson, T.; *Chromatographia* **1997**, 46, 57
- [57] Martin, P.; Wilson, I.D.; Morgan, D.E.; Jones, G.R.; Jones, K.; *Anal. Commun.* **1997**, 34, 45
- [58] Matsui, J.; Okada, M.; Tsuruoka, M.; Takeuchi, T.; *Anal. Commun.* **1997**, 34, 85
- [59] Mullett, W.M.; Lai, E.P.C.; Sellergren, B.; *Anal. Commun.* **1999**, 36, 217
- [60] Muldoon, M.T.; Stanker, L.H.; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 803
- [61] Nilsson, K.G.I.; Lindell, J.; Norrlöw, O.; Sellergren, B.; *J. Chromatogr. A* **1994**, 680, 57
- [62] Vallano, P.T.; Remcho, V.T.; *J. Chromatogr. A* **2000**, 887, 125
- [63] Schweitz; L.; Andersson, L.I.; Nilsson, K.G.I.; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1179
- [64] Lin, J.M.; Nakagama, T.; Uchiyama, K.; Hobo, T.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, 15, 1351
- [65] Lin, J.M.; Nakagama, T.; Uchiyama, K.; Hobo, T.; *Chromatographia* **1996**, 43, 585
- [66] Schweitz; L.; Spégel, P.; Nilsson, S.; *Analyst* **2000**, 125, 1899
- [67] Vlatakis, G.; Andersson, L.I.; Müller, R.; Mosbach, K.; *Nature* **1967**, 25, 825
- [68] Andersson, L.; Müller, R.; Vlatakis, G.; Mosbach, K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 4788
- [69] Andersson, L.I.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 111
- [70] Muldoon, M.T.; Stanker, L.H.; *J. Agric. Food. Chem.* **1995**, 43, 1424
- [71] Haupt, K.; Dzgoev, A.; Mosbach, K.; *Chem. Biol.* **1996**, 3, 471
- [72] Ramström, O.; Ye, L.; Mosbach, K.; *Chem. Biol.* **1996**, 3, 471
- [73] Haupt, K.; Mayes, A.G.; Mosbach, K.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3936
- [74] Kröger, S.; Turner, A.P.F.; Mosbach, K.; Haupt, K.; *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3698
- [75] Piletsky, S.A.; Piletska, E.V.; Chen, B.; Karim, K.; Weston, D.; Barrett, G.; Lowe, P.; Turner, A.P.F.; *Anal. Chem.* **1999**, 71, 1366
- [76] Surugui, I.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Dzgoev, A.; Danielsson, B.; Mosbach, K.; Haupt, K.; *Analyst* **2000**, 125, 13
- [77] Ye, L.; Mosbach, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2901
- [78] Dickert, F.L.; Tortschanoff, M.; Bulst, W.E.; Fischerauer, G.; *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4559
- [79] Dickert, F.L.; Forth, P.; Lieberzeit, P.; Tortschanoff, M.; Fresenius J. *Anal. Chem.* **1998**, 360, 759
- [80] Dickert, F.L.; Thierer, S.; *Adv. Mater.* **1996**, 8, 987
- [81] Haupt, K.; Noworyta, K.; Kutner, W.; *Anal. Commun.* **1999**, 36, 391
- [82] Ji, H.-S.; McNiven, S.; Ikebukuro, K.; Karube, I.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, 390, 93
- [83] Ji, H.-S.; McNiven, S.; Lee, K.-H.; Saito, T.; Ikebukuro, K.; Karube, I.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 15, 403
- [84] Liang, C.; Peng, H.; Bao, X.; Nie, L.; Yao, S.; *Analyst* **1999**, 124, 1781
- [85] Malitesta, C.; Losito, I.; Zambonin, P.G.; *Anal. Chem.* **1999**, 71, 1366
- [86] Jakusch, M.; Janotta, M.; Mizaikoff, B.; Mosbach, K.; Haupt, K.; *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4786
- [87] Nilsson, K.; Mosbach, K.; *J. Solid-Phase Biochem.* **1979**, 4, 271

-
- [88] Overberger, C.G.; Pierre, T.S.; Vorchheimer, N.; Lee, J.; Yaroslowsky, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 296
- [89] Klotz, I.M.; Royer, G.P.; Scarpa, I.S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 263
- [90] Leonhardt, A.; Mosbach, K.; *Reactive Polymers* **1987**, *6*, 285
- [91] Ohkubo, K.; Urata, Y.; Hirota, S.; Funakoshi, Y.; Sagawa, T.; Usui, S.; Yoshinaga, K.; *J. Mol. Catal.* **1995**, *101*, L111
- [92] Ohkubo, K.; Funakoshi, Y.; Sagawa, T.; *Polymer* **1996**, *37*, 17, 3993
- [93] Wulff, G.; Gross, T.; Schönfeld, R.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 18, 1962
- [94] Liu, X.-C.; Mosbach, K.; *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18*, 609
- [95] Robinson, D.K.; Mosbach, K.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 969
- [96] Sellergren, B.; Shea, K.J.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 8, 1403
- [97] Müller, R.; Andersson, L.I.; Mosbach, K.; *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1993**, *14*, 637
- [98] Beach, J.V.; Shea, K.J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 379
- [99] Ohya, Y.; Miyaoka, J.; Ouchi, T.; *Macromol. Rapid Commun.* **1996**, *17*, 871
- [100] Slade, C.; Vulfson, N.; *Biotech. Bioeng.* **1998**, *57*, 2, 211
- [101] Brüggemann, O.; *Biomol. Engin.* **2001**, *18*, 1, 1
- [102] Matsui, J.; Nicholls, I.A.; Karube, I.; Mosbach, K.; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5414
- [103] Liu, X.-C.; Mosbach, K.; *Macromol. Rapid Commun.* **1998**, *19*, 671
- [104] Cammidge, A.N.; Baines, N.J.; Bellingham, R.K.; *Chem. Commun.* **2001**, 2588
- [105] Gamez, P.; Durijic, B.; Pinel, C.; Lemaire, M.; *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8779
- [106] Locatelli, F.; Gamez, P.; Lemaire, M.; *J. Mol. Cat. A* **1998**, *135*, 89
- [107] Vlatakis, G.; Andersson, L.I.; Müller, R.; Mosbach, K.; *Nature* **1993**, *361*, 645
- [108] Whitcombe, M.J.; Rodrigez, M.E.; Villar, P.; Vulfson, E.N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7105
- [109] Xia, Y.; Whitesides, G.M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 550
- [110] Dickert, F.L.; Hayden, O.; Halikias, K.P.; *Analyst* **2001**, *126*, 766
- [111] D'Souza, S.M.; Alexander, C.; Carr, S.W.; Waller, A.M.; Whitcombe, M.J.; Vulfson, E.N.; *Nature* **1999**, *398*, 312
- [112] Shi, H.; Tsai, W.-B.; Garrison, M.D.; Ferrari, S.; Rather, B.D.; *Nature* **1999**, *398*, 593
- [113] Norrlöw, O.; Glad, M.; Mosbach, K.; *J. Chromatogr.* **1984**, *299*, 29
- [114] Rühle, J.; *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* **1994**, *42*, 1237
- [115] Prucker, O.; Rühle, J.; *Macromolecules* **1998**, *31*, 592
- [116] Prucker, O.; Rühle, J.; *Macromolecules* **1998**, *31*, 602
- [117] Sulitzky, C.; Rückert, B.; Hall, A.G.; Lanza, F.; Unger, K.; Sellergren, B.; *Macromolecules* **2002**, *35*, 79
- [118] Schweitz, L.; *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 1192
- [119] Glad, M.; Reinholdsson, P.; Mosbach, K.; *Reactive Polymers* **1995**, *25*, 47

-
- [120] Dhal, P.K.; Vidyasankar, S.; Arnold, F.H.; *Chemistry of Materials* **1995**, 7, 154
- [121] Budavari, S.; in Budavari, S.; O'Neil, M.J.; Smith, A.; Heckelmann, P.E. (Ed.); *The Merck index - an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, Merck and Co., Rahway **1989**
- [122] Titrici, M.M.; Hall, A.J.; Sellergren, B.; *Chemistry of Materials* **2002**, 14, 21
- [123] Feibush, B.; Li, N.-H.; USA Patent **1990**, 4, 933, 372
- [124] Iler, R.K. (Ed.); *The chemistry of silica*, John Wiley and Sons, New York, **1979**
- [125] Bangs, L.B. (Ed.); *Uniform latex particles*, Particle Technology Division, Seradyn Inc., Indianapolis **1986**
- [126] Takeuchi, T.; Matsui, J.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **2000**, 23, 44
- [127] Yilmaz, E. (Ed.); *Composite Materials in Molecular Imprinting Technology*, Lunds Universitet Media-Tryck, Lund, **2002**, Publikation Nr. 3
- [128] Poncelet, S.M.; Limet, J.N.; Noel, J.P.; Kayaert, M.C.; Galanti, L.; Collet-Cassart, D.; *Journal of Immunoassay* **1990**, 11, 77
- [129] Yilmaz, E.; Mosbach, K.; Haupt, K.; *Anal. Commun.* **1999**, 36, 167
- [130] Yilmaz, E.; Haupt, K.; Mosbach, K.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 12, 2115
- [131] Yilmaz, E. (Ed.); *Composite Materials in Molecular Imprinting Technology*, Lunds Universitet Media-Tryck, Lund, **2002**, Publikation Nr. 4
- [132] Vanhooke, J.; Benning, M.; Raushell, F.; Holden, H.; *Biochemistry* **1996**, 35, 6020
- [133] Benning, M.; Kuo, J.; Raushel, F.; Holden, H.; *Biochemistry* **1994**, 33, 15001
- [134] Fischer, L.; Müller, R.; Ekberg, B.; Mosbach, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9358
- [135] Kempe, M.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1948
- [136] Kempe, M.; Mosbach, K.; *J. Chromatogr. A* **1995**, 691, 317
- [137] Wulff, G.; Oberkobusch, D.; Minárik, M.; *Reactive Polymers* **1985**, 3, 261
- [138] Brüggemann, O.; Freitag, R.; Whitcombe, M.J.; Vulfson, E.N.; *J. Chromatogr. A* **1997**, 781, 43
- [139] Wulff, G.; *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1958
- [140] Moradian, A.; Mosbach, K.; *J. Mol. Recogn.* **1989**, 2, 167
- [141] O'Shannessy, D.J.; Andersson, L.I.; Mosbach, K.; *J. Mol. Recogn.* **1989**, 2, 1
- [142] Lepistö, M.; Sellergren, B.; *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 6010
- [143] Sellergren, B.; *Makromol. Chem.* **1989**, 190, 2703
- [144] Kempe, M.; Mosbach, K.; *Anal. Lett.* **1991**, 24, 1137
- [145] Sellergren, B.; Shea, K.J.; *J. Chromatogr.* **1993**, 635, 31
- [146] Byström, S.E.; Boerje, A.; Akermark, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2081
- [147] Wulff, G.; Vietmeier, J.; *J. Makromolek. Chem.* **1989**, 190, 1727
- [148] Ohkubo, K.; Sawakuma, K.; Sagawa, T.; *Polymer* **2001**, 42, 2263
- [149] Ohkubo, K.; Sawakuma, K.; Sagawa, T.; *J. Mol. Catal. A, Chem.* **1999**, 165, 1
- [150] Yilmaz, E.; Ramström, O.; Möller, P.; Sanchez, D.; Mosbach, K.; *J. Mater. Chem.* **2002**, 12, 5, 1577

-
- [151] Yilmaz, E. (Ed.); *Composite Materials in Molecular Imprinting Technology*, Lunds Universitet Media-Tryck, Lund, **2002**, Publikation Nr. 5
- [152] Brüggemann, O.; *Chemie Ingenieur Technik* **2001**, 73, 4, 373
- [153] Kalim, R.; Brüggemann, O.; *Journal of Membrane Science*, eingereicht
- [154] Kalim, R.; *Reaktionstechnische Untersuchungen von katalytisch aktiven, molekular geprägten Membranen am Beispiel einer Dehydrofluorierung und einer Aldolkondensation*, Technische Universität Berlin, Berlin, **2001**
- [155] Rylander, J.; *Generation of molecularly imprinted catalysts for the Knoevenagel condensation and their evaluation in chemical reactors*, Lund Universität, Lund, **2002**
- [156] Abdic, C.; *Entwicklung spektroskopischer Methoden zur Untersuchung der Katalyse mit geprägten Polymeren*, Technische Universität Berlin, Berlin, **2002**
- [157] Brüggemann, O.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, 435, 197
- [158] Pawelski, A.; *Entwicklung löslicher, molekular geprägter Polymere mit den Induced-Fit-Eigenschaften eines Enzyms*, Technische Universität Berlin, Berlin, **2002**
- [159] Takeuchi, T.; Fukuma, D.; Matsui, J.; *Anal. Chem.* **1999**, 71, 285
- [160] Lanza, F.; Sellergren, B.; *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2092
- [161] Brüggemann, O.; Visnjeviski, A.; Burch, R.; Patel, P.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, 504, 81
- [162] Sergejeva, T.A.; Matuschewski, H.; Piletsky, S.A.; Bendig, J.; Schedler, U.; Ulbricht, M.; *J. of Chromatogr. A* **2001**, 907, 89
- [163] El-Toufaily, F.-A.; Visnjeviski, A.; Brüggemann, O.; *J. Chromatogr. B* **2004**, 804, 135
- [164] Carey, F.A.; Sundberg, R.J.; in Schäfer, H.J.; Hoppe, D.; Erker, G. (Ed.); *Organische Chemie*, VCH, Weinheim **1995**, 575
- [165] Brückner, R. (Ed.); *Reaktionsmechanismen Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, Spektrum, **1996**, 441
- [166] Raasch, M. S.; *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 5, 862
- [167] Mamedov, S. A.; *Zhurnal Organicheskoi Khimii (englische Übersetzung)* **1992**, 27, 10, 1972
- [168] Visnjeviski, A.; Yilmaz, E.; Brüggemann, O., *Appl. Catal. A: Gen* **2004**, 260, 169
- [169] Albericio, F.; Carpino, L.A.; *Solid phase peptide synthesis in: Methods in enzymology*, Academic Press, New York **1997**, 289
- [170] Brüggemann, O.; Visnjeviski, A.; Yilmaz, E.; Schomäcker, R.; *Appl. Catal. A: Gen*, eingereicht
- [171] Yilmaz, E.; Haupt, K.; Mosbach, K.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 12, 2115
- [172] Janda, K.D.; Benkovic, S.J.; Lerner, R.A.; *Science* **1989**, 244, 437
- [173] Janda, et al.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 8886
- [174] Tramontano, A.; Janda, K.D.; Lerner, R.A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 6736
- [175] Tramontano, A.; Ammann, A.A.; Lerner, R.A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2282
- [176] Mathew-Krotz, J.; Shea, K.J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8154