

**Katalytische molekular geprägte Polymere: Herstellung und  
Anwendung in einem Thermistor**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin Analytische Biochemie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von

**Kristian Lettau**

Potsdam, März 2007

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 Germany License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/> or send a letter to Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.

Elektronisch veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2007/1480/>  
urn:nbn:de:kobv:517-opus-14804  
[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-14804>]

Für meine Eltern  
und ganz besonders für Katrin

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Symbole und Abkürzungen .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Allgemeiner Überblick: Molekulare Erkennung und Katalyse.....	1
1.2. Literaturübersicht.....	2
1.2.1. Molekulares Prägen.....	2
1.2.1.1. Historische Entwicklung .....	3
1.2.1.2. Das molekulare Prägen von Polymeren .....	5
1.2.1.3. MIPs in der Anwendung .....	11
1.2.2. Biologische und biomimetische Katalyse .....	14
1.2.3. Sensorik.....	16
1.2.3.1. Biosensoren und Biomimetische Sensoren .....	16
1.2.3.2. Thermistoren .....	19
<b>2. Zielstellung .....</b>	<b>21</b>
<b>3. Resultate und Diskussion .....</b>	<b>23</b>
3.1. Herstellung und Charakterisierung der Template .....	23
3.1.1. Templatsynthese für die Herstellung von Massepolymeren .....	23
3.1.2. Templatsynthese für eine spätere optimierte Polymerherstellung .....	25
3.2. Synthese und Aufarbeitung der geprägten Polymere.....	29
3.2.1. Immobilisierung der Template an poröses Kieselgel.....	29
3.2.2. Darstellung und Reinigung von 4-Vinylimidazol .....	33
3.2.3. Polymerisation und Aufarbeitung der oberflächengeprägten Polymere .....	33
3.3. Charakterisierung der Polymere in Einzelmessungen .....	40
3.3.1. Untersuchungen zur Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Polymermenge.....	42
3.3.2. Untersuchungen zur Substratkonzentrations-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit.....	45
3.3.3. Untersuchungen zur Substratspezifität der geprägten Polymere.....	46

---

3.3.4.	Untersuchungen zur Umesterung von <i>p</i> -Nitrophenylacetat .....	49
<b>3.4.</b>	<b>Charakterisierung der Polymere im Thermistor .....</b>	<b>53</b>
3.4.1.	Kontrolle und Vergleich durch Esterase-Immobilisierung .....	54
3.4.2.	Temperaturmessungen mit Polymer im Reaktor .....	55
3.4.2.1.	Messungen mit 50 mg Polymer je Reaktor .....	56
3.4.2.2.	Messungen mit 150 mg Polymer je Reaktor .....	67
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>5.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>79</b>
<b>5.1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>79</b>
5.1.1.	Chemikalien .....	79
5.1.2.	Geräte und Sensoren .....	80
<b>5.2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>80</b>
5.2.1.	Herstellung, Charakterisierung und Immobilisierung der Template .....	80
5.2.1.1.	Synthese der Template .....	80
5.2.1.2.	Immobilisierung der Template .....	87
5.2.2.	Herstellung und Aufarbeitung der Monomere .....	89
5.2.3.	Herstellung, Aufarbeitung und Charakterisierung der Polymere .....	90
5.2.3.1.	Zusammensetzung der Monomermischungen .....	90
5.2.3.2.	Polymerisationsbedingungen .....	91
5.2.3.3.	Aufarbeitung der Polymere .....	91
5.2.3.4.	Physikalische Charakterisierung der Polymere .....	92
5.2.3.5.	Chemische Charakterisierung der Polymere .....	92
5.2.4.	Untersuchungen am Photometer .....	93
5.2.4.1.	Solvolyse von <i>p</i> -Nitrophenylacetat .....	93
5.2.4.2.	Solvolyse weiterer <i>p</i> -Nitrophenylester .....	93
5.2.4.3.	Umesterung von <i>p</i> -Nitrophenylacetat .....	94
5.2.5.	Untersuchungen im Thermistor .....	94
5.2.5.1.	Methoden zur Enzymimmobilisierung .....	94
5.2.5.2.	Aktivitätsmessungen im Thermistor .....	95
5.2.5.3.	Bestimmung des Umsatzgrades mit Hilfe einer Tyrosinaseelektrode .....	96
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>

## Symbole und Abkürzungen

<b>AIBN</b>	Azobisisobutyronitril
<b>APS</b>	Aminopropylkieselgel (amino propyl silica)
<b>CPG</b>	poröses Glas (controlled pore glas)
<b>DCM</b>	Dichlormethan
<b>DIC</b>	<i>N,N'</i> -Diisopropyl-carbodiimid
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DVB</b>	Divinylbenzen
<b>gef.</b>	gefunden
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>IM</b>	Immobilisationsmethode
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MIP</b>	molekular geprägtes Polymer (molecular imprinted polymer)
<b>MM</b>	Monomermischung
<b>MP</b>	Massepolymere (bulk polymer)
<b>NIP</b>	nicht geprägtes Polymer (non imprinted polymer)
<b>NMR</b>	kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance)
<b>PA</b>	Phenylacetat
<b>Ph</b>	Phenol
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SuP</b>	Suspensionspolymerisation
<b>TEA</b>	Triethylamin
<b>theor.</b>	theoretisch
<b>TSA</b>	Übergangszustandsanalogon (transition state analogon)
<b>Tyr</b>	Tyrosinase
<b>1-VI</b>	1-Vinylimidazol
<b>2-VP</b>	2-Vinylpyridin
<b>4-VI</b>	4-Vinylimidazol
<b>4-VP</b>	4-Vinylpyridin
<b>WW</b>	Wechselwirkungen

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Generelles Schema zum molekularen Prägen von Polymeren.....	3
Abbildung 2:	Verschiedene Arten der Interaktionen von Templat und funktionellen Monomeren .....	7
Abbildung 3:	Funktionelle Monomere für das nicht-kovalente Prägen .....	8
Abbildung 4:	Styrylamidin zur Verwendung als funktionelles Monomer .....	9
Abbildung 5:	Häufig verwendete Vernetzer in geprägten Polymeren .....	10
Abbildung 6:	Schema eines Biosensors .....	16
Abbildung 7:	Schematischer Aufbau des Enzymthermistors.....	19
Abbildung 8:	Schematischer Aufbau des Reaktors eines Enzymthermistors mit nachfolgendem Signalwandler .....	20
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der gerichtet immobilisierten Template an porösem Kieselgel.....	21
Abbildung 10:	Übergangszustandsanalogon (TSA) 1 für das Oberflächenprägen .....	23
Abbildung 11:	TSA 2 für das Prägen von Massepolymeren.....	24
Abbildung 12:	Hauptreaktion der Synthese von TSA 2.....	25
Abbildung 13:	Selbstsynthetisierte optimierte Übergangszustandsanaloge für weiterführende Arbeiten.....	25
Abbildung 14:	Edukte der TSA-Synthese .....	26
Abbildung 15:	Schema der TSA-Oligomere am Beispiel des TSA 4 .....	28
Abbildung 16:	TSA-Immobilisierung nach Methode I .....	29
Abbildung 17:	Oberfläche des Trägers nach Immobilisierung mit Methode I .....	30
Abbildung 18:	TSA-Immobilisierung nach Methode IV .....	31
Abbildung 19:	Oberfläche des Trägers nach Immobilisierung mit Methode IV.....	31
Abbildung 20:	IR-Spektrum des nach Methode IV modifizierten Kontrollkieselgels.....	32
Abbildung 21:	Darstellung von 4-Vinylimidazol.....	33
Abbildung 22:	Nomenklatur der hergestellten Polymere.....	33
Abbildung 23:	Vorgeschlagener Komplex aus Vinylimidazol, $\text{Co}^{2+}$ und TSA 1 .....	35
Abbildung 24:	Vorgeschlagener Komplex aus Vinylimidazol und TSA 1 .....	36
Abbildung 25:	Schemata und Phasenkontrastaufnahmen der verschiedenen Stufen des Oberflächenprägens.....	38
Abbildung 26:	Optischer Aktivitätstest für die katalytischen Polymere .....	40
Abbildung 27:	Absorptions-Zeit-Diagramm für die Solvolyse von <i>p</i> -Nitrophenylacetat....	40

---

Abbildung 28:	pH-Abhängigkeit der Solvolyse von <i>p</i> -Nitrophenylacetat.....	41
Abbildung 29:	Bestimmung der spezifischen Geschwindigkeit der <i>p</i> -Nitrophenylacetat-Solvolyse.....	42
Abbildung 30:	Konzentrations-Abhängigkeit der <i>p</i> -Nitrophenylacetat-Solvolyse.....	45
Abbildung 31:	Estersubstrate für die Untersuchungen zur Substratspezifität.....	47
Abbildung 32:	Carbamate und Harnstoffderivate als Substrat.....	48
Abbildung 33:	Mechanismen der Carbamatspaltung.....	49
Abbildung 34:	Reaktion der Umesterung von <i>p</i> -Nitrophenylacetat und Hexanol.....	50
Abbildung 35:	Umesterung von <i>p</i> -Nitrophenylacetat mit Hexanol.....	50
Abbildung 36:	Inhibition der Umesterung mit <i>p</i> -Nitrophenol.....	51
Abbildung 37:	Protonierung von Imidazolresten durch <i>p</i> -Nitrophenol.....	51
Abbildung 38:	Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit immobilisierter Esterase im Reaktor.....	54
Abbildung 39:	Konzentrations-Abhängigkeit der Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit immobilisierter Esterase.....	55
Abbildung 40:	Schematischer Aufbau für differenzielle Messungen im Thermistor.....	56
Abbildung 41:	Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit 50 mg Polymer (differenziell).....	57
Abbildung 42:	Schematischer Aufbau für sequenzielle Messungen im Thermistor.....	59
Abbildung 43:	Temperaturänderungen durch Phenylacetat-Solvolyse mit 50 mg Polymer.....	60
Abbildung 44:	Temperaturänderungen durch Bindung und Desorption von Phenol an 50 mg Polymer.....	60
Abbildung 45:	Temperaturänderungen durch Bindung und Desorption von Essigsäure an 50 mg Polymer.....	61
Abbildung 46:	Reaktionsschema zur Verstärkung des Signals mittels Tyrosinase.....	62
Abbildung 47:	Temperaturerhöhung durch Phenoloxidation mit immobilisierter Tyrosinase im Reaktor.....	62
Abbildung 48:	Konzentrations-Abhängigkeit der Temperaturänderung durch Phenoloxidation mit immobilisierter Tyrosinase.....	63
Abbildung 49:	Registerladung mit Polymer und immobilisierter Tyrosinase.....	64
Abbildung 50:	Temperaturänderung durch Phenoloxidation mit Tyrosinase und Polymer im Reaktor.....	65
Abbildung 51:	Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit Tyrosinase und Polymer im Reaktor.....	66



---

Abbildung 52:	Konzentrations-Abhängigkeit der Temperaturerhöhung durch Solvolyse von Phenylacetat mit Polymer und immobilisierter Tyrosinase .....	67
Abbildung 53:	Schema des verbesserten Aufbaus für sequenzielle Messungen im Thermistor mit nur einem Reaktor .....	68
Abbildung 54:	Optimierung der Fließgeschwindigkeit mit 150 mg Polymer .....	68
Abbildung 55:	Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit 150 mg Polymer..	70
Abbildung 56:	Temperaturänderungen durch Bindung und Desorption von Phenol an 150 mg Polymer .....	71
Abbildung 57:	Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit 5 mM Phenol im Laufpuffer.....	71
Abbildung 58:	Schematische Abbildung der katalytischen und bindenden Kavitäten .....	72
Abbildung 59:	Konzentrations-Abhängigkeit der Temperaturänderung bei Wechselwirkung von Phenylacetat mit MIP und NIP.....	73

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Anwendungsmöglichkeiten von molekular geprägten Polymeren.....	12
Tabelle 2:	Vergleich der Affinitätskonstanten von MIPs und Antikörpern .....	13
Tabelle 3:	Literaturübersicht über hydrolytische Polymere .....	14
Tabelle 4:	In Biosensoren häufig verwendete Erkennungselemente, die Art der Interaktion und mögliche Nachweise .....	17
Tabelle 5:	Beispiele für Sensoren basierend auf molekular geprägten Polymeren.....	18
Tabelle 6:	Löslichkeiten der zwei verwendeten TSAs .....	24
Tabelle 7:	Löslichkeiten der optimierten TSAs .....	27
Tabelle 8:	Übersicht über die getesteten Kombinationen von Monomermischung und Immobilisierungsmethode zur Herstellung von katalytischen MIPs .....	34
Tabelle 9:	Übersicht Synthese sonstige Kontrollen .....	36
Tabelle 10:	Spezifische Geschwindigkeiten der katalytischen Polymere und ihrer Kontrollen.....	43
Tabelle 11:	Apparente kinetische Parameter der <i>p</i> -Nitrophenylacetat-Solvolyse.....	46
Tabelle 12:	Geschwindigkeiten der Solvolyse mit verschiedenen Substraten .....	47
Tabelle 13:	Zeitschema für Substratzugabe mit 50 mg Polymer .....	57
Tabelle 14:	Zeitschema für Substratzugabe mit 150 mg Polymer .....	69
Tabelle 15:	Zusammenfassung der Werte für $\Delta T_{max}$ , $K_M$ und $K_D$ aus den Thermistorexperimenten .....	74
Tabelle 16:	Zusammensetzung der Präpolymerisationsmixturen .....	90

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeiner Überblick: Molekulare Erkennung und Katalyse

Biomakromoleküle sind in der Natur für viele Abläufe in lebenden Organismen verantwortlich. Dies reicht vom Aufbau der extrazellulären Matrix und dem Cytoskelett über die Erkennung von Botenstoffen durch Rezeptoren bis hin zur Katalyse der verschiedensten Reaktionen in den Zellen selbst. Diese Aufgaben werden zum größten Teil von Proteinen übernommen. Die spezifische Erkennung der Interaktionspartner ist für alle diese Moleküle äußerst wichtig, um eine fehlerfreie Funktion zu gewährleisten. Dies beruht zumeist auf der spezifischen räumlichen Anordnung bestimmter funktioneller Gruppen beider Partner, die sich durch die vielfältigen Wechselwirkungen dieser Gruppen gerichtet aneinanderlagern können.

Rezeptoren sind auf die Bindung von bestimmten niedermolekularen Substanzen spezialisiert, die dann bei Interaktion mit eben jenen Botenstoffen Signalkaskaden auslösen. Im Immunsystem müssen die Immunglobuline körperfremde, möglicherweise schädliche Substanzen schnell identifizieren und unschädlich machen. Aber auch für Enzyme ist die spezifische molekulare Erkennung außerordentlich wichtig. Die Substrate des Enzyms müssen sicher vom aktiven Zentrum gebunden und in diesem orientiert werden. Oftmals sind bestimmte Regionen auf der Oberfläche vieler Enzyme für die Regulation der Aktivität durch die Interaktion mit Botenstoffen, vorgesehen.

Enzyme katalysieren die meisten der chemischen Reaktionen in der belebten Welt, aber es gibt auch andere biologische Katalysatoren. Hierzu zählen z.B. Ribozyme, katalytisch aktive Nukleinsäuren, die entweder als Komplex mit Proteinen oder auch ohne Proteinkomponente vorkommen. Die meisten dieser biologischen Katalysatoren zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Aktivität aus. Um dies zu erreichen, müssen eine schnelle Erkennung des Substrats in der aktiven Tasche des Enzyms sowie eine starke Erniedrigung der Aktivierungsenergie für die zu katalysierende Reaktion gegeben sein.

Die große Vielfalt, außerordentliche Wirksamkeit und hohe chemische Selektivität dieser biologischen Katalysatoren weckte vor langem das Interesse der chemischen Forschung und Industrie. Schon früh wurde erkannt, dass diese biologischen Katalysatoren vielen chemischen hinsichtlich ihrer Effizienz, Spezifität und Stereoselektivität, vor allem bei Reaktionen unter moderaten Bedingungen, überlegen sind. Heute werden Enzyme aus den

verschiedensten Organismen in industriellen Prozessen eingesetzt. Sie finden sich auch in industriell hergestellten Produkten für das tägliche Leben, wie z.B. Waschmittel.

Die natürlichen Katalysatoren haben allerdings den Nachteil, mit der Zeit einem natürlichen Abbau zu unterliegen. Daher müssen bei biotechnologischen Anwendungen, wie etwa Langzeiteinsätzen in Fermentern und Reaktoren die Enzyme sehr häufig erneuert werden. Auch ist das Abtrennen von Katalysator und Produkt durch die Löslichkeit der biologischen Moleküle oft aufwendig.

Daher wird in der Forschung in den letzten Jahren verstärkt an künstlichen Katalysatoren gearbeitet, welche die Vorteile der Enzyme mit einer deutlich verbesserten Langzeitstabilität vereinen. Hier spielen besonders molekular geprägte Polymere eine wichtige Rolle. Ein großer Vorteil dieser Polymere ist die Einfachheit ihrer Synthese und die kostengünstige Herstellung durch Verwendung von preiswerten Ausgangssubstanzen.

## **1.2. Literaturübersicht**

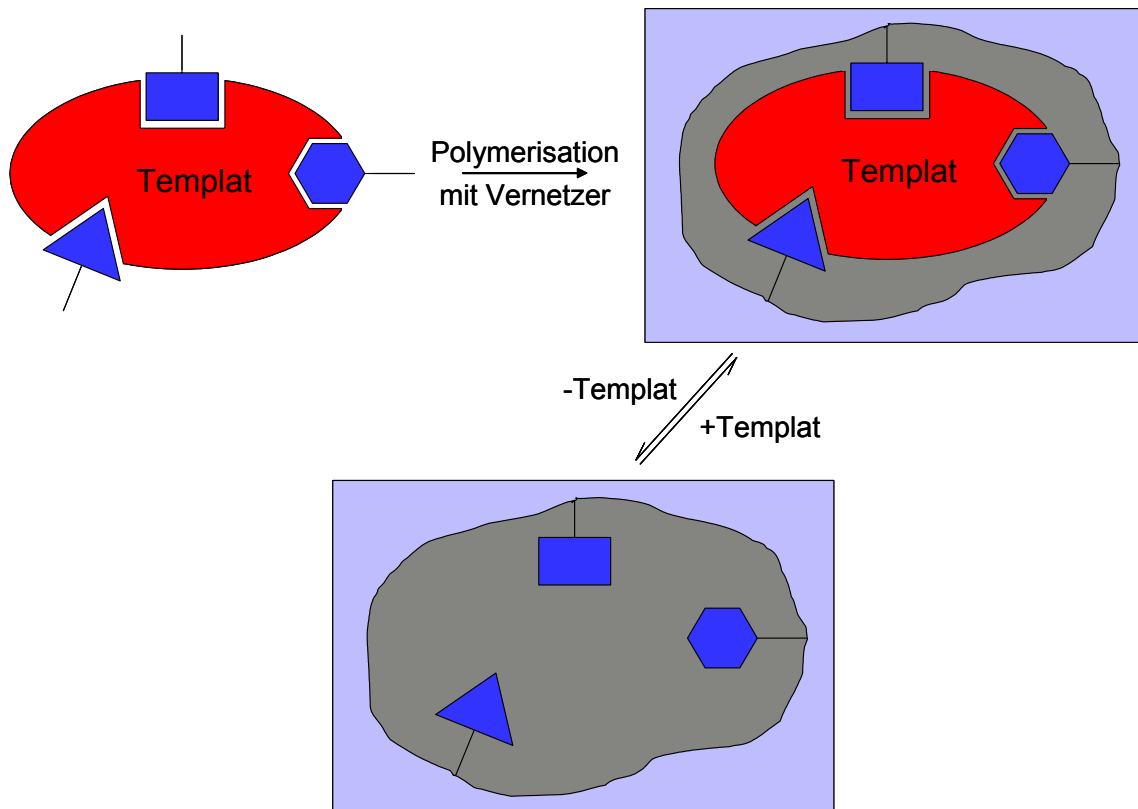
### **1.2.1. Molekulares Prägen**

Das starke Interesse an molekular geprägten Polymeren (molecular imprinted polymers, MIPs) in den letzten Jahren wird reflektiert durch die deutlich gestiegene Anzahl wissenschaftlicher Publikationen, die sich mit der Beschreibung von Design, Entwicklung und Anwendung dieser Polymere beschäftigen.

Eine Definition über das molekulare Prägen von Wulff lautet:

„Es wird um ein als Schablone (Templat) wirkendes Molekül herum in Gegenwart von wechselwirkenden Monomeren vernetzend polymerisiert. Nach dem Abtrennen des Templats bleibt im Polymer ein Abdruck (Imprint) mit zur Wechselwirkung befähigten Gruppen zurück, wobei dessen Form und die Anordnung der Haftgruppen in ihm komplementär zur Struktur des Templatmoleküls sind.“<sup>[1]</sup>

Schematisch ist dieses Verfahren in Abbildung 1 dargestellt. Ein Schablonenmolekül (Templat) interagiert durch kovalente, nicht-kovalente oder komplexierende Wechselwirkungen mit verschiedenen funktionellen polymerisierbaren Molekülen (funktionelle Monomere).



**Abbildung 1:** Generelles Schema zum molekularen Prägen von Polymeren

Durch diese Interaktionen ordnen sich die Monomere in einem Selbstordnungsprozess in einer definierten räumlichen Geometrie um das Templat herum an. Werden die Monomere nun unter Zuhilfenahme eines Vernetzers zu einem Polymer gehärtet, behalten sie während dieses Vorgangs ihre Anordnung. Durch eine anschließende Extraktion des Templates entsteht eine molekulare Kavität (Tasche) im Polymer, die durch ihre Form und die Anordnung der funktionellen Gruppen komplementär zur verwendeten Schablone ist. In Folge dieser Komplementarität können die als Templat benutzten oder ihm strukturverwandte Moleküle selektiv in die geprägten Kavitäten des Polymers binden.

#### 1.2.1.1. Historische Entwicklung

Schon zu Beginn der dreißiger Jahre des 20. Jahrhunderts machte die Gruppe um Polyakov in Kiev Adsorptionsexperimente mit verschiedenen Kieselgelen, die nach einer neuartigen Vorschrift hergestellt waren.<sup>[2]</sup> Natriumsilikat wurde in Wasser unter Zuhilfenahme von Ammoniumcarbonat polymerisiert, und nach zwei Wochen wurden in verschiedenen Experimenten Benzen, Toluol oder Xylen als Additive zugesetzt. Nach dem Trocknen

wurden die zugesetzten Additive durch Waschen mit heißem Wasser entfernt, und bei anschließenden Adsorptionsstudien der Additive an das Kieselgel konnte für die Fälle mit Benzen und Toluol eine erhöhte Kapazität der Aufnahme dieser beiden Additive gegenüber strukturell verwandten Verbindungen festgestellt werden.<sup>[3]</sup> Dieses Verhalten wurde mit einer Veränderung der Struktur des Kieselgels durch die Natur des Additivs erklärt.

Zur gleichen Zeit wurde eine Debatte über den Ursprung der Selektivität von Antikörpern geführt. Als erstes formulierte Ehrlich um 1900 die so genannte „selective theory“.<sup>[4]</sup> Nach dieser Theorie würde ein weißes Blutkörperchen viele verschiedene Antikörper auf der Oberfläche tragen, an die das Antigen chemisch bindet. Aufgrund dieser Bindung würde dann die Zelle veranlasst große Mengen dieses Antikörpers zu produzieren und freizusetzen. Breinl und Haurowitz präsentierten dann 1930 die „instructional theory“ der Antikörpergenerierung, der sich dann auch Mudd sowie Pauling anschlossen.<sup>[5-7]</sup> Hierbei sollte die Antikörpergenerierung in der Zelle stattfinden, wobei das Antigen zugegen sein und als Templat fungieren sollte. Pauling schlug weiter vor, dass alle Antikörper dieselbe Primärstruktur hätten, und dass alleine die Templat-Interaktion mit dem Polypeptid Grund für die Selektivität sei. Weiter könne man dies untersuchen, indem man Globuline in Anwesenheit eines Antigens unter denaturierenden Bedingungen präzipitieren und dann diese Globuline langsam wieder in Lösung bringen würde. Diese würden dann eine erhöhte Selektivität für das genutzte Antigen aufweisen. Diese Theorie ist zwar in Bezug auf die Antikörperselektion des Immunsystems inkorrekt, bildet aber die Grundlage der heutigen Technik des „Bioimprinting“.<sup>[8-11]</sup>

In den folgenden Jahren wurde dann die „instructional theory“ auf die Forschung an verschiedenen Kieselgelen angewendet.<sup>[12]</sup> Aus identischen Bausteinen sollten Binder mit den verschiedensten Selektivitäten entstehen. Aber nicht nur Grundlagen der molekularen Interaktion wurden erforscht, es wurde sich auch schon früh mit möglichen Anwendungen dieser geprägten Kieselgele beschäftigt.<sup>[13-16]</sup>

Die intensive Forschung an Kieselgelen nahm nach rund zwei Jahrzehnten vermutlich durch die Einführung des Prägens in organischen Polymeren leicht ab. Diese neue Methode wurde 1972 unabhängig voneinander von Wulff und Klotz publiziert.<sup>[17,18]</sup>

Mit den Variationen dieser Methode ist es inzwischen möglich, geprägte Polymere für so unterschiedliche Substanzen wie Kohlenhydrate, Aminosäuren und ihre Derivate, verschiedenste biochemisch relevante Moleküle, aber auch für größere Proteine und Zellen zu erhalten.<sup>[19-30]</sup>

### 1.2.1.2. *Das molekulare Prägen von Polymeren*

Durch das Prägen von organischen Polymeren können nun in einem einfachen Verfahren bindende Strukturen hergestellt werden.

#### Massepolymere (bulk polymers):

Die einfachste und heute am meisten angewandte Form der Polymerherstellung besteht in der Fertigung so genannter Massepolymere (bulk polymers).<sup>[31-33]</sup> Hierbei wird das Templat mit den funktionellen Monomeren, dem Vernetzer, einem inerten Lösungsmittel zur Kontrolle der Porengröße (Porogen) und einem Initiator gemischt und in einer freien radikalischen Polymerisation zu einem monolithischen Block polymerisiert. Als Auslöser für die Polymerisation fungieren entweder Temperatur oder ultraviolettes Licht.<sup>[34,35]</sup> Dieses Verfahren erfordert ein anschließendes Zerkleinern des Polymers mit einer Größenfraktionierung in die gewünschte Anwendungsgröße. Aus diesem Grund geht viel Material verloren. Zusätzlich entstehen irreguläre Partikel, die für viele Anwendungen suboptimal sind.<sup>[36]</sup> Ein weiteres Problem der Herstellung von Massepolymeren besteht darin, dass häufig Templatmoleküle und Monomere unterschiedliche Löslichkeiten besitzen. Aufgrund dessen kann es zu einer ungenügenden Ausbildung des Templat-Monomer-Komplexes kommen, wodurch die Kapazität des Polymers stark herabgesetzt ist. Weiter können durch die unkontrollierte Verteilung der Monomere und Templatmoleküle im Polymer Kavitäten ausgebildet werden, die keinen oder nur einen erschwerten Zugang zum Templat durch die poröse Struktur des Polymers ermöglichen.<sup>[37]</sup>

Diese verschiedenen Nachteile führten dazu, dass neuartige Polymerisationsansätze, die eine definiertere Ausbildung der Polymormorphologie erlauben, untersucht wurden.

#### *In situ* Polymere:

Als erstes ist hier der *In Situ*-Ansatz zu nennen. Dabei kommt es zur Polymerbildung direkt in der für die Anwendung gewünschten Form. Um bei der Anwendung von geprägten Polymeren als feste Phase in der Flüssigkeitschromatographie das Zerkleinern der Massepolymere und anschließende Packen der Partikel in HPLC-Säulen zu vermeiden, können die MIPs direkt in einer HPLC-Kartusche als poröser Monolith polymerisiert werden.<sup>[38-40]</sup> Eine ähnliche Methode wird bei der direkten Polymerisation in Kapillaren für elektrochromatographische Anwendungen verwendet.<sup>[41-43]</sup> Geringe Mengen an Polymer

wurden auch schon in kleinen Probengläschen für ein Hoch-Durchsatz-Screening hergestellt.<sup>[44]</sup>

#### Polymere auf Oberflächen:

Eine weitere Möglichkeit, Polymere mit definierter Morphologie zu erhalten, ist das Beschichten einer definierten Oberfläche (Glassubstrat, Kieselgelpartikel) mit einer dünnen Schicht Polymer. Besonders eignen sich hierfür Kieselgelpartikel, die an der Oberfläche entweder mit einer polymerisierbaren Gruppe<sup>[45,46]</sup> oder dem Initiator der Polymerisation modifiziert sind.<sup>[47]</sup> Weiter können Template an porösem Kieselgel immobilisiert und das Kieselgel anschließend aufgelöst werden. Dies resultiert in einem Abdruck der Porenstruktur des modifizierten Kieselgelpartikels und geprägten Kavitäten auf der Oberfläche des Polymers.<sup>[48-50]</sup>

#### Polymerfilme:

Planare MIP-Strukturen wie Filme und Membranen können entweder über eine Polymerisation innerhalb einer Form oder auf der planaren Oberfläche eines Trägers hergestellt werden.<sup>[51,52]</sup> So gibt es Berichte über acrylamid-basierte Polymere, die durch Polymerisation direkt auf der Oberfläche von ISFETs (Ionen-sensitive Feld-Effekt-Transistoren) hergestellt wurden.<sup>[53,54]</sup>

#### Kugelförmige Polymere:

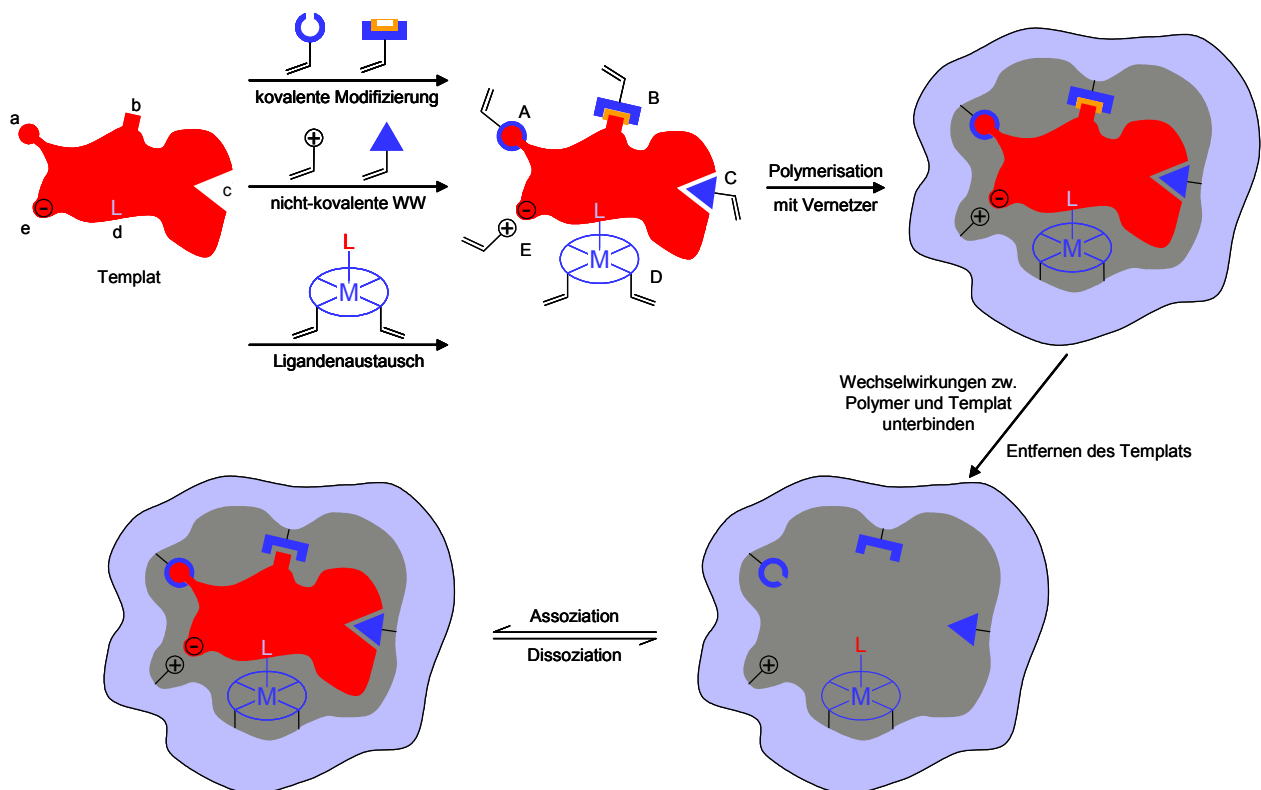
Sphärische Partikel erhält man über die verschiedenen Arten der Suspensions- und Präzipitations-Polymerisation. Bei der wässrigen Suspensions-Polymerisation findet die Bildung des MIPs in kleinen Tröpfchen statt, die in einer Pufferlösung suspendiert sind.<sup>[33,55]</sup> Durch diese Technik können regelmäßige Partikel in der Größe von 5 µm bis 350 µm Durchmesser hergestellt werden. Da es durch die Anwesenheit eines großen Überschusses an Wasser allerdings oftmals zu Störungen in der Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen kommen kann, wurden auch schon flüssige perfluorierte Kohlenwasserstoffe als Suspensionsmedium eingesetzt.<sup>[56,57]</sup> Eine Möglichkeit, Partikel im sub-Mikrometer-Maßstab (0,2 µm bis 0,3 µm) zu erhalten, ist die Präzipitations-Polymerisation, die erstmals von Ye *et al.* beschrieben wurde.<sup>[58,59]</sup> Hierbei werden das Templat, die Monomere und der Initiator in einem großen Überschuss an Lösungsmittel gelöst. Durch die hohe Verdünnung kommt es nur zur Bildung von kleinen Polymerpartikeln, die sich ab einer bestimmten Größe am Boden des Polymerisationsgefäßes absetzen.<sup>[60]</sup>



Die Art der Interaktion von Templat und funktionellen Monomeren ist der für die spätere Anwendung entscheidende Teil der Polymerkonzeption. Die verschiedenen Möglichkeiten der Interaktion können mit unterschiedlichen Monomeren realisiert werden (Abbildung 2).

### Kovalentes Prägen:

Dieser Ansatz zeichnet sich durch die Benutzung von Templaten aus, die kovalent an eine oder mehrere polymerisierbare Gruppen gebunden sind (Abbildung 2 A).<sup>[61,62]</sup> Nach der Polymerisation wird das Templat abgespalten, und die bindenden Gruppen verbleiben im Polymer. Diese Bindungsstelle kann nun selektiv unter Ausbildung einer kovalenten Bindung das Templat erneut binden.<sup>[37,63-65]</sup> Beispiele für diese Art der Interaktion sind Boronsäureester, Bildung einer Schiffschen Base oder die Bildung von Ketalen.<sup>[66-68]</sup>



**Abbildung 2: Verschiedene Arten der Interaktionen von Templat und funktionellen Monomeren**

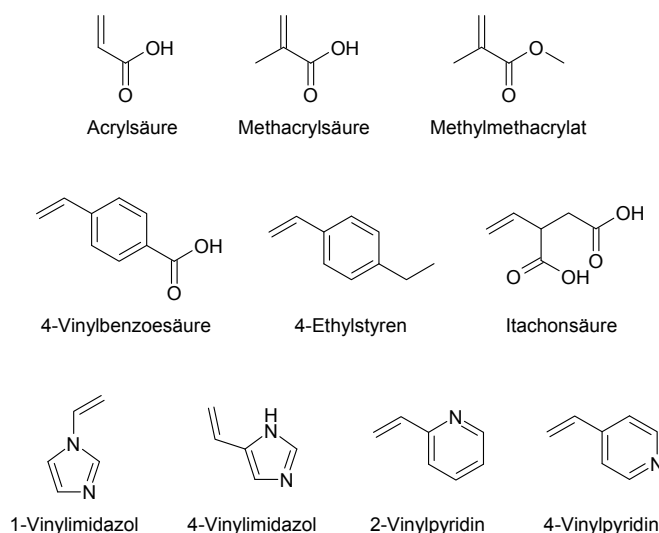
Die Bildung reversibler Interaktionen zwischen Templatmolekül und funktionellen Monomeren kann verschiedene Wechselwirkungen beinhalten: (A-E) Alle Wechselwirkungen benötigen zum funktionellen Monomer komplementäre Gruppen auf der Oberfläche des Templats (a-e). (Schema adaptiert von Alexander *et al.*<sup>[69]</sup>)

Der Vorteil dieser Methode besteht in der genauen und einzigen Lokalisation der funktionellen Gruppen um das Templatmolekül in der Bindungstasche. Dies vermindert unspezifische Bindungen, hat aber den Nachteil einer langsamen Bindungs-Kinetik.<sup>[70]</sup> Ein

anderer Nachteil ist, dass nur wenige Substanzklassen (Alkohole, Aldehyde, Ketone und Carbonsäure) mit diesem Ansatz verwendbar sind.<sup>[69]</sup>

### Nicht-kovalentes Prägen:

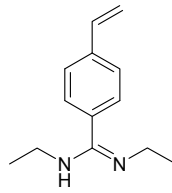
Bei dieser Methode finden während des Prägens, sowie während der späteren Bindung des Templats nur nicht-kovalente Interaktionen, etwa hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals-Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen statt (Abbildung 2 C, E).<sup>[71,72]</sup> Wegen der leichten Herstellung durch einfaches Mischen der Komponenten ohne weitergehende chemische Modifikation, ist dies der am häufigsten genutzte Weg, um zu molekular geprägten Polymeren zu gelangen. Beispiele für häufig verwendete funktionelle Monomere sind in Abbildung 3 zu finden.



**Abbildung 3: Funktionelle Monomere für das nicht-kovalente Prägen**

Da allerdings meist nur niedrige Assoziationskonstanten von Templat zu funktionellem Monomer vorliegen, müssen hohe Überschüsse an Monomer zur Reaktionsmischung hinzugefügt werden, um das Bindungsgleichgewicht so weit wie möglich auf die Seite des Komplexes zu verlagern. Durch diesen hohen Anteil an funktionellem Monomer in der Polymermischung ist bei Polymeren aus dieser Herstellung meist mit verstärkten unspezifischen Wechselwirkungen zu rechnen.<sup>[70]</sup>

In diesem Zusammenhang ist vor allem das von Wulff *et al.* verwendete Styrylamidin hervorzuheben (Abbildung 4).<sup>[73]</sup> Aufgrund seiner zwei Stickstoffatome besitzt es hohe Affinitäten zu Carboxylgruppen von bis zu  $10^6 \text{ l mol}^{-1}$  in Chloroform. Dadurch kann ein geringeres Verhältnis von Monomer zu Templat für den Polymerisierungsprozess eingesetzt werden, was die spätere Affinität des Polymers zum Templat erhöht.



**Abbildung 4: Styrylamidin zur Verwendung als funktionelles Monomer**

Mit diesem Ansatz wurden schon Polymere mit Bindungseigenschaften zu niedermolekularen Substanzen wie 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), Steroiden und Nukleotiden aber auch zu Proteinen und Zellen hergestellt.<sup>[22,30,74-81]</sup>

#### Semi-kovalentes Prägen:

Analog zum kovalenten Prägen wird in diesem Ansatz mit einem Templatmolekül geprägt, das kovalent mit polymerisierbaren Gruppen modifiziert ist (Abbildung 2 B). Damit ist sichergestellt, dass sich zur selektiven Bindung befähigte Funktionalitäten nur in den Bindungstaschen befinden. Nach dem Polymerisieren und der Spaltung des Templates wird das erneute Binden allerdings durch nicht-kovalente Wechselwirkungen vermittelt.<sup>[66,82]</sup> Dieser Weg verbindet die Vorteile des kovalenten Prägens (Stabilität und exakte Stöchiometrie zwischen Templat und funktionellem Monomer) mit der schnellen Gleichgewichtseinstellung der Bindung beim nicht-kovalenten Prägen. Weiter wird noch zwischen zwei verschiedenen Ausprägungen der funktionellen Monomere unterschieden: (I) Templat und Monomer sind direkt aneinander gebunden oder (II) Templat und Monomer sind über einen Linker miteinander verbunden, der nach der Abspaltung des Templates wegfällt.<sup>[66,83,84]</sup> Insgesamt wurden unter anderem mit dieser Methode schon Polymere gegen Testosteron, Phenol, Bisphenol A und Nitrophenol hergestellt.<sup>[21,85]</sup>

#### Metallionen-vermitteltes Prägen:

Metallionen können von einer Vielzahl an (hetero-)organischen Verbindungen komplexiert werden. Dies geschieht z.B. aufgrund der Interaktion von freien Elektronenpaaren der Heteroatome mit den freien d-Orbitalen der Metalle. Aus diesem Grund werden sie als Alternative zur direkten Interaktion von Templat und Monomer eingesetzt, um eine Bindung zwischen den Partnern herzustellen. Hierbei kommen in den Polymeren als Metallionen vor allen Dingen Kupfer und Kobalt vor.<sup>[86-90]</sup> Diese Ionen werden auf der einen Seite durch einen polymerisierbaren Liganden und auf der anderen Seite durch das Templat koordiniert (Abbildung 2 D). Neben Polymeren für die Bindung von Kohlenhydraten wurden auch

Polymere für Histamin, Aminosäuren, und Proteine hergestellt. [20,27,87,91-93] Als funktionelle Monomere werden für das metallionen-vermittelte Prägen vielfach Porphyrine verwendet. [94-96]

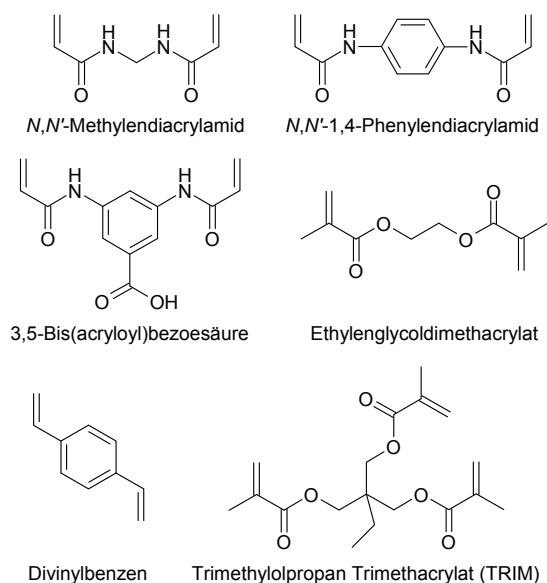
Außer den funktionellen Monomeren für die spezifische Interaktion sind noch weitere Faktoren für die Polymerherstellung von Bedeutung:

#### Initiatoren:

Die thermische Zersetzung von Azo-Initiatoren ist die gebräuchlichste Quelle von freien Radikalen zur Herstellung von MIPs. Hierbei hat sich Azobisisobutyronitril (AIBN) als Standard etabliert. [51,97-99] Die Möglichkeit der photochemischen Zersetzung dieser Substanz erlaubt zusätzlich die Herstellung von Polymeren bei niedrigen Temperaturen, und dadurch mit einer gesteigerten Spezifität aufgrund einer thermischen Stabilisierung des Templat-Monomer-Komplexes. [35] Beispiele für andere thermische Initiatoren sind Benzoylperoxid und Lauroylproxid. [100,101] Aber auch andere Photoinitiatoren wie Benzophenon und 2,2'-Dimethoxy-2-phenylacetophenon werden zur Herstellung molekular geprägter Polymere verwendet. [20,102]

#### Vernetzer:

Um die funktionellen Monomere an ihrer Position zu fixieren und dem gesamten Polymer mechanische Stabilität zu geben, werden die funktionellen Monomere mit einem Vernetzer copolymerisiert (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Häufig verwendete Vernetzer in geprägten Polymeren**

Die gebräuchlichsten difunktionellen Monomere sind hierbei Divinylbenzen (DVB) und Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA). Monomere mit mehr als zwei polymerisierbaren Gruppen wie Trimethylolpropan Trimethacrylat (TRIM) zeigten sich in einigen Polymeren EGDMA überlegen.<sup>[22,59,103]</sup>

#### Lösungsmittel:

Auch die Wahl und Menge des porogenen Lösungsmittels (Porogen) hat einen großen Effekt auf die Polymerisation selbst sowie die physikalische Struktur (Porenstruktur, Verteilung der Porengröße, Quellfähigkeit, Härte und Morphologie) des MIP.<sup>[104]</sup> Das Porenvolumen unterschied sich in dieser Studie nur durch die Verwendung eines anderen Lösungsmittels (Acetonitril und Chloroform) um bis zu zwei Größenordnungen.

#### *1.2.1.3. MIPs in der Anwendung*

Molekular geprägte Polymere wurden schon in einem sehr frühen Stadium der Forschung als feste Phasen in der chromatographischen Anwendungen eingesetzt (Tabelle 1).

Vor allem diente dies der Evaluierung der Bindungscharakteristiken der geprägten Polymere und ihrer Kontrollen. Zunehmend werden aber auch geprägte Polymere direkt für analytische und präparative Anwendungen entwickelt.<sup>[22,24,62]</sup> Einen Spezialfall stellt die Hybridtechnik aus Flüssigkeitschromatographie und Kapillarelektrophorese, die Kapillar-Elektro-Chromatographie (CEC, capillary electrochromatography) mit einer polymerbeschichteten Kapillare als feste Phase dar.<sup>[43,105]</sup>

Ein weiteres großes Anwendungsfeld ist die Festphasen-Extraktion (SPE, solid phase extraction). Hierbei wird mittels eines geprägten Polymers als feste Phase eine bestimmte Substanz aus einem Gemisch extrahiert, mit wenig Lösungsmittel von der Phase eluiert und somit eine Aufkonzentration der Substanz für weitere Analysen ermöglicht.<sup>[106-108]</sup>

Eine viel versprechende Anwendung der molekular geprägten Polymere ist ihre Verwendung anstelle von Immunglobulinen in „Pseudo-Immunoassays“. MIPs haben gegenüber Antikörpern bedeutende Vorteile hinsichtlich Stabilität und der Anwendbarkeit in nicht-wässrigen Assayformaten. Außerdem wird der Einsatz von Tierversuchen zur Antikörperproduktion vermieden und die Herstellungskosten sind vielfach geringer.

**Tabelle 1: Anwendungsmöglichkeiten von molekular geprägten Polymeren**

Analyt	Referenz
<b>Flüssigkeitschromatographie</b>	
Aminosäuren	[109]
Atrazin	[110]
Ephedrin	[111]
Fruktose, Galaktose	[61]
Naproxen	[112]
Nikotin	[113]
Steroide	[114]
Testosteron	[115]
Timolol	[116]
<b>Dünnschichtchromatographie</b>	
Ephedrin	[117]
<b>Kapillarelektrophorese</b>	
Propanolol	[118]
<b>Kapillare Elektrochromatographie</b>	
Dansylphenylalanin	[119]
Propanolol	[42]
<b>Festphasenextraktion (SPE)</b>	
Atrazin	[120]
Bentazon	[121]
Hydroxycoumarin	[122]
Indolessigsäure	[123]
Nikotin	[124]
<i>p</i> -Nitrophenol	[125]
Propanolol	[106]
Pentamidin	[126]
Simazin	[127]
Sameridin	[128]
Tamoxifen	[129]
Theophyllin	[130]
Pentamidin	[131]

(Tabelle adaptiert nach Andersson<sup>[132]</sup>)

Nachteile gegenüber natürlichen Erkennungselementen bestehen vor allem in der meist deutlich geringeren Affinität zum Analyten, der Heterogenität der Bindungsstellen, als auch in der Notwendigkeit für jede Polymerpräparation genügend Templat zur Verfügung zu haben.<sup>[75,80,133]</sup> Durch die Verwendung von Computerprogrammen zur Optimierung der

Monomierzusammensetzung können allerdings schon Affinitätskonstanten im Bereich polyklonaler Antikörper erreicht werden (Tabelle 2).<sup>[134]</sup>

**Tabelle 2: Vergleich der Affinitätskonstanten von MIPs und Antikörpern**

Erkennungselement	$K_d$ /nM	Messbereich / $\mu\text{g l}^{-1}$
„normales“ MIP	$0,9 \pm 0,1$	0,8 – 100
computer-optimiertes MIP	$0,3 \pm 0,08$	0,1 – 100
polyklonaler Antikörper	$0,5 \pm 0,07$	0,05 – 10
monoklonaler Antikörper	$0,03 \pm 0,004$	0,025 – 5

MIPs und Antikörper gegen Microcystin LR. Evaluierung der Konstanten und des Messbereichs durch einen kompetitiven Assay.  
Tabelle adaptiert nach Chianella *et al.*<sup>[134]</sup>

Dabei kommen molekular geprägte Polymere als künstliches Erkennungselement auch in anderen Sensorkonfigurationen zum Einsatz. Hierbei ist vor allem die Kombination der Polymere mit piezoelektrischen Sensoren und der Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie zur Messung von spezifischen Masseänderungen hervorzuheben.<sup>[135-139]</sup> Eine weitere Möglichkeit zur direkten Anzeige eines Bindungsereignisses in einem Sensor ist die Änderung der Eigenfluoreszenz von funktionellen Gruppen des Polymers. In diesem Fall wird durch die Bindung des Analyten entweder die Fluoreszenz von Reportergruppen im Polymer verstärkt oder erniedrigt.<sup>[79,140]</sup> Auch für die elektrochemische Sensorik werden molekular geprägte Polymere eingesetzt.<sup>[141]</sup> Dies geschieht hauptsächlich durch die Beschichtung von Elektroden mit dem Polymer und anschließender Messung der Änderung von Impedanz oder Leitfähigkeit aufgrund der Bindung von Analyt an das Polymer.<sup>[51,142]</sup> Feld-Effekt-Transistoren (FET) können ebenfalls mit geprägten Polymeren beschichtet werden.<sup>[53,54]</sup> Der Einsatz von molekular geprägten Polymeren als Katalysatoren für chemische Synthesen oder Umsetzungen ist momentan ein ausgeprägtes Feld der Forschung.<sup>[143-145]</sup> Geprägte Materialien erlauben es, selektive chemische Reaktionen in definierten stereochemischen Umgebungen ablaufen zu lassen. Weiterhin macht ihre außergewöhnliche Stabilität gegenüber hohen Temperaturen und organischen Lösungsmitteln sie für einen Einsatz in industriellen Anwendungen interessant. Eine genauere Betrachtung der katalytischen Polymere folgt im nächsten Kapitel.

### 1.2.2. Biologische und biomimetische Katalyse

Katalysatoren finden vor allem in der technischen Chemie eine große Anwendung.<sup>[146]</sup> Das Marktvolumen für heterogene und homogene Katalysatoren beträgt ca. zwölf Milliarden Dollar (Stand: 2006) und die Menge an weltweit produzierten Katalysatoren beläuft sich auf ca. eine Million Tonnen jährlich.<sup>[147]</sup> Hier sind mit Hilfe von neuartigen chemischen Katalysatoren Reaktionen und hohe Ausbeuten bei relativ milden Bedingungen möglich, die ohne den Einsatz von vielfach giftigen Substanzen und der damit verbundenen Abfallentsorgung nicht möglich wären.

Ein Beispiel hierzu ist die neuartige Herstellung von Manadion (Vitamin K<sub>3</sub>) ohne den Zusatz von Chromsäure.<sup>[148]</sup> Vielfach werden hierfür heutzutage schon Enzyme oder gar ganze Zellen eingesetzt. Diese zeichnen sich durch besonders hohe Spezifitäten und Umsatzraten aus. Die so in der chemischen Industrie genutzten Enzyme reichen dabei von Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, und Lyasen, bis zu Isomerasen.<sup>[149-154]</sup> Allerdings haben diese natürlichen Katalysatoren den Nachteil, dass sie gegenüber vielen Bedingungen der chemischen Synthese anfällig sind und dadurch schnell ihre Funktion verlieren und ersetzt werden müssen.

**Tabelle 3: Literaturübersicht über hydrolytische Polymere**

Substrat	Format <sup>[a]</sup>	$k_{\text{mip}} / \text{min}^{-1}$	$k_{\text{mip}}/k_{\text{uncat}}$	$k_{\text{mip}}/k_{\text{nip}}$	$K_{\text{M}} / \text{mM}$	Referenz
Cholesteryl-p-Nitrophenylcarbonat	MP	$2,2 \cdot 10^{-4}$	27	n.a. <sup>[b]</sup>	3,7	[155]
Di-(2-pyridyl)-Carbonat	MP	13,0	76570	80,1	0,58	[86]
<i>N</i> -(4-Carboxybenzoyl)- $\alpha$ -isobutyl-(3,5-Dimethylphenyl) Ester	MP	$4,7 \cdot 10^{-4}$	n.a. <sup>[b]</sup>	n.a. <sup>[b]</sup>	0,51	[156]
Diphenylcarbonate	SuP	$4,7 \cdot 10^{-4}$	168	23,3	13,4	[33]
	MP	$2,8 \cdot 10^{-4}$	455	10,7	5,01	
	MP	$2,4 \cdot 10^{-3}$	3264	61,5	2,01	[157]
4-(3,5-Dimethyl-phenoxy-carbonylmethyl)-Benzoessäure	MP	$0,8 \cdot 10^{-4}$	17,6	1,5	0,6	[158]
<i>p</i> -Nitrophenylacetat	MP	$9,0 \cdot 10^3$	1,9	n.a. <sup>[b]</sup>	n.a. <sup>[b]</sup>	[159]
<i>p</i> -Nitrophenyl- <i>N</i> -(benzyloxy-carbonyl)- <i>L</i> -Leucinat	MP	$3,5 \cdot 10^6$	28,8	n.a. <sup>[b]</sup>	1,06	[160]

<sup>[a]</sup> MP: Massepolymer, SuP: Suspensionspolymer; <sup>[b]</sup> nicht angegeben



Hierbei können künstliche Katalysatoren helfen, die wie Enzyme eine mit verschiedenen Funktionalitäten ausgebildete Tasche haben, aber aus einem künstlichen Polymer hergestellt sind. Eine kurze Übersicht verschiedener hydrolytischer Polymere und deren kinetischer Parameter ist in Tabelle 3 zu finden.

Es gibt verschiedene Strategien, um diese Polymere herzustellen.

Als erstes ist das Prägen mit substrat-analogen Verbindungen als Templat zu nennen. Durch die Verwendung einer substrat-analogen Substanz als Templat werden die funktionellen Monomere so im Polymer immobilisiert, dass sie das Substrat in die Kavität „locken“ und dadurch eine Reaktion durch Veränderung der Einflüsse (Hydrathülle, etc.) katalysieren können. Erste Studien mit dieser Art der Herstellung von katalytischen Polymeren wurden an Polymeren mit esterolytischen Eigenschaften durchgeführt.<sup>[161]</sup> In diesem Fall wurde das Templat während des Prägevorgangs über Kobalt(II) und Vinylimidazolreste komplexiert.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit übergangszustandsanaloge Verbindungen (TSAs) als Templat zu verwenden. Hierbei wird die Bindungsstelle im Polymer mit Hilfe des Templats so ausgebildet, dass sie den Übergangszustand der zu katalysierenden Reaktion bevorzugt bindet und dadurch stabilisiert.<sup>[145,158,162-165]</sup> Dadurch wird die Energie zur Erreichung des Übergangszustandes abgesenkt und die Umsatzrate gesteigert.

Die dritte Möglichkeit, katalytisch aktive Polymere herzustellen, besteht darin, ein Produkt der Reaktion als Templat zu verwenden. Bei diesem Ansatz ist allerdings eine sehr schnell erfolgende Produktinhibition zu beobachten. Diese Inhibition kann man dadurch vermeiden, dass ein Analogon eines instabilen Produktintermediats als Templat verwendet wird. In der dann katalysierten Reaktion bildet sich mit Hilfe des Polymers zunächst das Intermediat, welches anschließend spontan weiterreagiert. Ein Beispiel für die Polymerherstellung nach dieser Methode gibt die von Liu *et al.* beschriebene Diels-Alder Synthese, bei der durch das Polymer eine Erhöhung der katalytischen Rate um den Faktor 270 erreicht werden konnte.<sup>[166]</sup>

### 1.2.3. Sensorik

#### 1.2.3.1. Biosensoren und Biomimetische Sensoren

Biosensoren sind laut Definition der IUPAC integrierte Geräte, bei denen sich ein biologisches Erkennungselement in direktem räumlichem Kontakt zu einem Signalwandler (Transducer) befindet. Dadurch sind sie in der Lage, spezifische, quantitative oder semi-quantitative Informationen zu liefern. Dabei soll von so genannten bioanalytischen Systemen unterschieden werden, die zusätzliche Prozessschritte enthalten. Auch soll ein Biosensor von „bioprobes“ (Teststreifen) zur einmaligen Verwendung unterschieden werden.<sup>[167]</sup>

Da diese Definition einige der kommerziell erfolgreichsten Analysesysteme mit Verwendung von Biomolekülen (z.B. Blutglukose-Teststreifen) ausschließt, wird in der Fachwelt ein Biosensor nur durch die enge räumliche Nähe des Erkennungselements zum Signalwandler und die damit verbundene Generierung eines elektrischen Signals definiert.<sup>[168]</sup> Inzwischen werden nicht nur natürliche Erkennungselemente in Biosensoren eingesetzt, sondern auch (halb)synthetische Moleküle wie Aptamere, Peptidnukleinsäuren (PNA) und molekular geprägte Polymere.<sup>[169-172]</sup> Diese werden dann in der Literatur oftmals als biomimetische Sensoren bezeichnet.

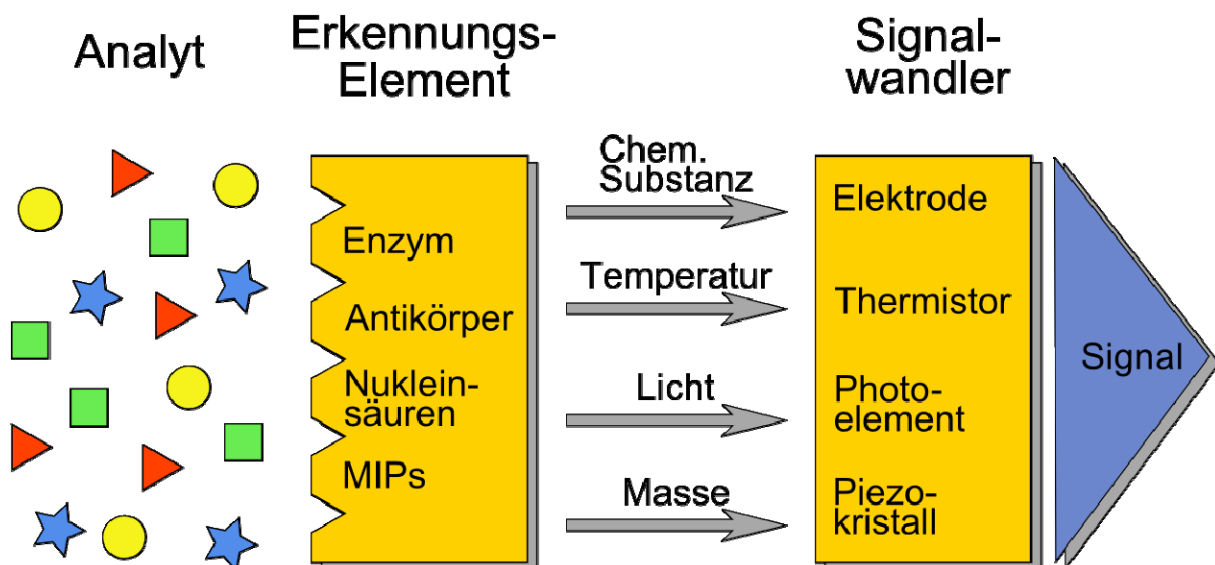


Abbildung 6: Schema eines Biosensors

Klassifiziert werden Biosensoren entweder nach verwendetem Signalwandler oder nach Art des Erkennungselements (Abbildung 6). Mögliche Arten der Signalgenerierung und -umwandlung sind optisch (Absorption, Fluoreszenz, Brechungsindex, etc.), elektrochemisch (amperometrisch, potentiometrisch, konduktometrisch, etc.), kalorimetrisch (Thermistoren, Titrationskalorimetrie) oder durch Messung einer Masseänderung (Quarz-Kristall Mikrowaagen, Oberflächenplasmonresonanz).

Verschiedene Arten an Erkennungselementen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: In Biosensoren häufig verwendete Erkennungselemente, die Art der Interaktion und mögliche Nachweise**

<b>Erkennungselement</b>	<b>Art der Interaktion</b>	<b>Nachweismöglichkeit</b>
Nukleinsäuren	Hybridisierung, Bindung von Proteinen	elektrochemisch, gravimetrisch, optisch; indirekt durch Marker
Rezeptoren	Bindung	optisch, konduktometrisch
Enzyme	katalytische Umsetzung	elektrochemisch, optisch, kalorimetrisch
Antikörper	Bindung	direkt: gravimetrisch, optisch, kalorimetrisch indirekt: optischer oder elektrochemischer Marker
Aptamere	Bindung, katalytische Umsetzung	siehe Antikörper

(Tabelle adaptiert nach Scheller *et al.* <sup>[168]</sup>)

Auch bei Sensoren basierend auf molekular geprägten Polymeren gibt es in der Literatur verschiedene Möglichkeiten der Signalwandlung. Beispiele für verschiedene Sensorarten sind in Tabelle 5 gegeben.

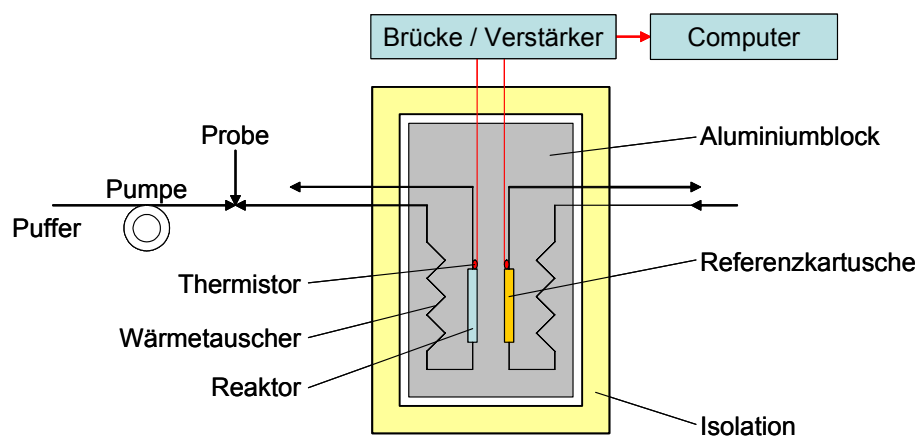
Tabelle 5: Beispiele für Sensoren basierend auf molekular geprägten Polymeren

Signalwandler	Analyt (Beispiel)	Messbereich / $\mu\text{M}$	Referenz
Generelle Sensorformate			
Ellipsometrie	Vitamin K <sub>1</sub>	qualitativ	[173]
Oberflächen Plasmon Resonanz	Theophyllin	5000 - 33000	[138]
Kapazität	Phenylalaninanilid	qualitativ	[174]
	Phenylalanin	6000	[175]
Leitfähigkeit	Atrazin	0,005 - 0,05	[51]
Oberflächen Akustische Welle	Lösungsmitteldämpfe	(0,1 $\mu\text{l l}^{-1}$ )	[176]
Quarzkristall-Mikrowaage	Lösungsmitteldämpfe	(4 $\mu\text{l l}^{-1}$ )	[176]
	Glukose	1000-20000	[177]
	S-Propanol	50 - 1300	[136]
Kompetitive Formate			
Kolorimetrie	Chloramphenicol	10 - 3000	[178]
Voltametrie	2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure	0,1 - 100	[179]
Analyt generiert Signal			
Fluoreszenz	Dansylphenylalanin	25 - 250	[180]
Amperometrie	Morphin	3,5 - 35	[181]
Polymer generiert Signal			
pH	Glukose	1000 - 25000	[91]
Fluoreszenz	cAMP	0,1 - 100	[182]

(Tabelle adaptiert nach Haupt *et al.* [183])

### 1.2.3.2. Thermistoren

In der Elektrotechnik sind Thermistoren Widerstände, die ihren spezifischen Widerstand unter dem Einfluss der Temperatur ändern. Hierbei wird zwischen Heißleiter (Widerstand sinkt bei Temperaturerhöhung) und Kaltleiter (Widerstand sinkt bei Temperaturniedrigung) unterschieden. Thermistoren gehören damit zur Klasse der kalorimetrischen Signalwandler. In der Biosensorik finden diese Bausteine ihre Anwendung in Strömungskalorimetern, die lokale Temperaturdifferenzen zwischen einer Messkartusche (Reaktor) und einer Referenzkartusche aufzeichnen (Abbildung 7). In der biosensorischen Literatur werden diese Strömungskalorimeter allerdings oft aufgrund der Verwendung von Thermistoren als Signalwandler selber als Thermistoren bezeichnet. Erstmals wurde ein Enzymthermistor von Mosbach *et al.* zur Untersuchung der Aktivität von Enzymimmobilisaten eingesetzt.<sup>[184-188]</sup>



**Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Enzymthermistors**  
(Schema adaptiert nach Danielsson *et al.*<sup>[189]</sup>)

In diesem System wird das Immobilisat in einem Reaktor zwischen zwei Filterplatten fixiert. Am Ausgang der beiden Reaktoren sind Thermistoren angebracht, und deren temperaturabhängige Widerstandsdifferenz wird mit Hilfe einer Wheatstonebrücke gemessen (Abbildung 8). Mittels eines Verstärkers können unterschiedliche Messbereiche eingestellt werden.

Hydrolytische Reaktionen sind exotherm, d.h. in einem thermisch isolierten Reaktionsvolumen steigt die Temperatur als Folge der Reaktion. Enzymatische Reaktionen besitzen normalerweise eine Enthalpie in der Größenordnung von  $5 - 100 \text{ kJ mol}^{-1}$ .<sup>[184,189,190]</sup> Werden während der Reaktion Protonen verbraucht oder gebildet, führt das zu einer pH-Änderung in der Lösung und damit zu einer Beeinflussung des Dissoziationsgleichgewichts

von vorhandenen schwach dissoziierten Elektrolyten (Proteinen, Puffersubstanzen). Unterschiedliche Ladungszustände sind durch unterschiedliche Hydratation charakterisiert, die Änderung der Hydratation somit ebenfalls zu Temperaturänderungen führen kann (Hydratationswärme).

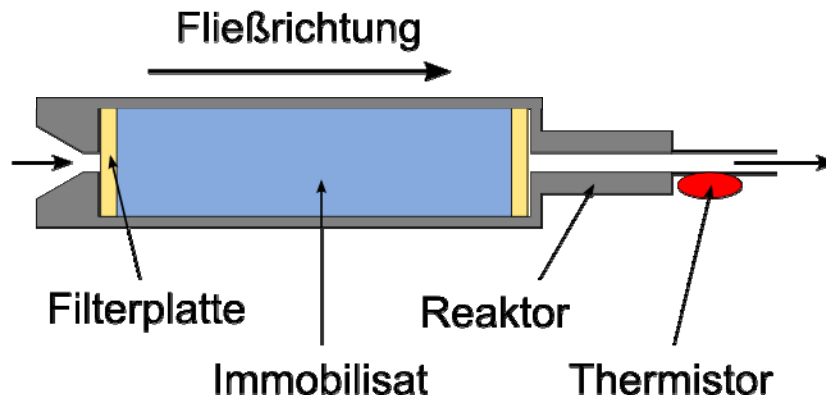


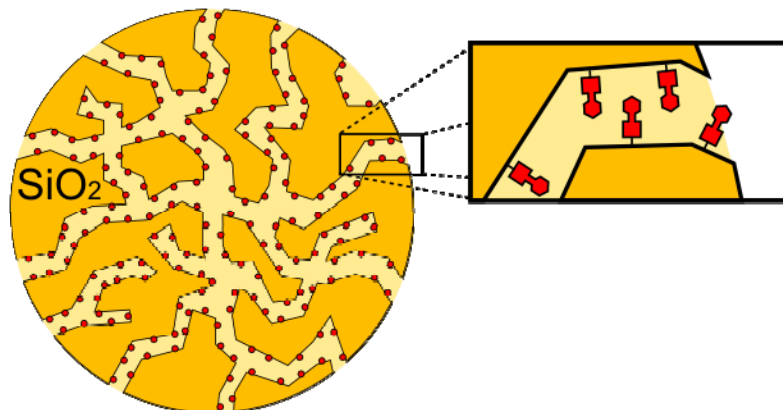
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Reaktors eines Enzymthermistors mit nachfolgendem Signalwandler

Die Hydratationswärme ist substanzabhängig, es sind sowohl exotherme, als auch endotherme Hydratationsprozesse bekannt. Exotherme Prozesse führen zu einer Verstärkung des Signals bei enzymatischen Hydrolysen, bei endothermen Prozessen wird das Signal verringert, unter Umständen kann eine Temperaturniedrigung gemessen werden, wenn die endotherme Hydratationswärme absolut größer als die exotherme Reaktionswärme ist. Wenn die Hydrolyse enzymatisch katalysiert wird, lässt sich die Temperaturänderung in beiden Fällen als Maß der Enzymaktivität nutzen. Das Mischsignal erweist sich dabei als relative Größe, die keine Aussagen über die Höhe der beiden Anteile - Reaktionswärme oder Hydratationswärme - gestattet.

## 2. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, katalytisch aktive geprägte Polymere nach einer modernen Methode, dem Prägen mit immobilisierten Schablonen (Templaten), herzustellen, diese hinsichtlich ihrer katalytischen Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit und ihrer Spezifität zu charakterisieren und anschließend in einem Thermistor als Erkennungselement sensorisch einzusetzen. Diese Polymere sollen die Solvolyse von substituierten phenolischen Estern katalysieren und die daraus erhaltenen Ergebnisse mit anderen katalytischen Systemen (Esterase, katalytischen Antikörpern) verglichen werden.

Es sollte ein neuartiger, der biotechnologischen Antikörperherstellung analoger Ansatz verfolgt werden. Zur Herstellung katalytischer Antikörper wurden am Institut für Biochemie und Biologie der *Universität Potsdam*, unter der Leitung von Prof. Mischeel, Übergangszustandsanaloge Verbindungen (TSA) benutzt, die den aktivierten Zustand des Substrats einer Carbamathydrolyse nach dem  $B_{AC}2$ -Mechanismus nachbilden. Dieser biotechnologische Ansatz sollte auf die supramolekulare Chemie übertragen werden. Hierzu sollte ein Übergangszustandsanalogon aus dem Antikörper-Projekt in einer definierten Orientierung durch eine Immobilisierung auf der Oberfläche von porösem Kieselgel fixiert werden (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der gerichtet immobilisierten Template an porösem Kieselgel

Die Template (rot) sollen gerichtet an poröses Kieselgel (orange) immobilisiert werden.

Da der  $B_{AC}2$ -Mechanismus der Carbamathydrolyse der basischen Esterhydrolyse ähnelt, konnte das Übergangszustandsanalogon für die Herstellung eines Ester-hydrolysierenden Polymers verwendet werden. Dieser Ansatz bietet durch die Immobilisierung eine homogenere Ausbildung der aktiven Taschen, als es das konventionelle Prägen im Block

ermöglicht. Ferner erhält man durch die Benutzung von Kieselgelpartikeln nach der Aufarbeitung diskrete Polymerpartikel.

Das für das Prägen als Templat zu verwendende TSA wurde vom *Institut für Organische Chemie* der Universität Potsdam zur Verfügung gestellt. Zum Vergleich von oberflächengeprägtem Polymer und konventionellem Massepolymer sollte ein weiteres, nicht immobilisierbares Templat synthetisiert und charakterisiert werden. Weiter waren für das Oberflächenprägen verschiedene Immobilisierungsverfahren zu testen und auf eine hohe Ausbeute hin zu optimieren.

Für die Polymerherstellung sollte 4-Vinylimidazol als funktionelles Monomer eingesetzt werden. Zum einen ist der in diesem Monomer enthaltene Imidazolring ein Ligand für Metallionen. Weiterhin sind Imidazolreste als Teil der Aminosäure Histidin in der Natur wichtiger Bestandteil der katalytischen Triaden von ester- und amidspaltenden Serin- und Cysteinproteasen. Hier hat der Imidazolrest die Funktion das Proton des Serins, bzw. Cysteins aufzunehmen und dadurch diese Reste zu aktivieren. Weiter ist es in der Literatur bekannt, das Imidazol allein die hydrolytische Spaltung von Phenylacetat katalysieren kann.

Die so erhaltenen Polymere waren hinsichtlich der katalytischen Beschleunigung der Umsatzgeschwindigkeit zu charakterisieren und auf ihre Verwendbarkeit in einer Sensorkonfiguration zu überprüfen, bei der zum ersten Mal ein Thermistor als Signalwandler eingesetzt werden soll. Dafür müssen einerseits eine ausreichende Umsatzgeschwindigkeit sowie andererseits eine genügend hohe Spezifität zum Substrat vorhanden sein. Diese Eigenschaften waren in einem optischen Verfahren zur schnellen Evaluation der Polymere zu testen.

Nach der so erfolgten Charakterisierung der Polymere sollten der katalytische Umsatz des Substrates sowie die eventuelle Bindung von Substrat und Produkten an das Polymer evaluiert werden. Weiter sollte die Kopplung der Reaktionen von molekular geprägtem Polymer und Tyrosinase als Beispiel für eine Substratweiterleitung und damit verbundene Singnalerhöhung getestet werden. Hierzu war das System der Temperaturmessung hinsichtlich Sensitivität und Messzeit zu optimieren.



### 3. Resultate und Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden Herstellung und Charakterisierung der Template für das Oberflächenprägen diskutiert (3.1). Danach wird auf die Polymersynthese (3.2), sowie deren Charakterisierung mittels Einzelmessungen (3.3) und mittels eines Thermistors (3.4) eingegangen.

#### 3.1. Herstellung und Charakterisierung der Template

Als Templat für das Oberflächenprägen wurde (4-Amino-benzyl)-phosphorsäureamid mono-(4-nitro-phenyl) ester, ein Phosphorsäureamid (Abbildung 10), genutzt. Dies wurde am *Institut für Organische Chemie* der Universität Potsdam unter der Leitung von Prof. Kempster im Rahmen einer Kooperation synthetisiert (TSA 1).<sup>[191]</sup>

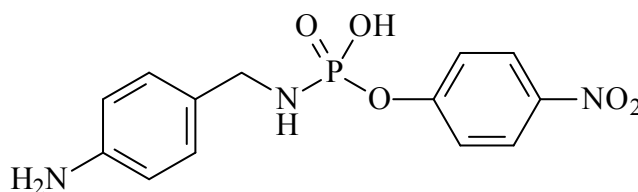


Abbildung 10: Übergangszustandsanalogon (TSA) 1 für das Oberflächenprägen

Das Templat weist durch die tetraedrische Anordnung der Atome am Phosphatatom eine hohe Ähnlichkeit mit dem tetraedrischen Übergangszustand einer basekatalysierten Esterhydrolyse auf.<sup>[162]</sup>

##### 3.1.1. Templatsynthese für die Herstellung von Massepolymeren

Zum Vergleich der Eigenschaften mit den durch das Oberflächenprägen hergestellten Polymeren sollte ein Massepolymer nach konventioneller Vorschrift hergestellt werden. Dafür wurde ein Übergangszustandsanalogon benötigt, das die gleichen Interaktionen zwischen Polymer und Templat erlaubt, aber keine zusätzlichen Wechselwirkungen aufweist. Diese würden beim TSA 1 durch Interaktion der freien Aminogruppe und den funktionellen Monomeren im Polymerisationsansatz auftreten. Beim TSA 2 ist diese Aminogruppe nicht vorhanden (Abbildung 11).

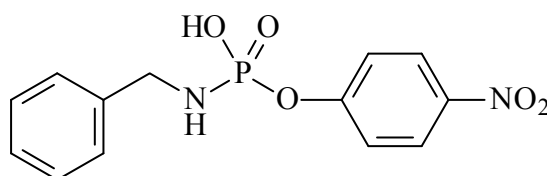


Abbildung 11: TSA 2 für das Prägen von Massepolymeren

Die Synthese des TSA 2 wurde nach veränderten Vorschriften von Koizumi *et al.* und Takaku *et al.* durchgeführt.<sup>[192,193]</sup> Dafür wurde an *p*-Nitrophenylphosphodichlorid durch eine basenkatalysierte nukleophile Substitution mit Benzylamin das Chlorid gegen das Amin substituiert, und anschließend das verbleibende Phosphochlorid mit Wasser hydrolysiert. Die Schwierigkeit dieser Synthese bestand darin, dass das Phosphodichlorid mit jeweils zwei Molekülen des Benzylamins reagieren konnte. Um diese ungewünschte Reaktion zu unterbinden, wurde Triethylamin als Hilfsbase zugesetzt. Nach Aufarbeitung wurde eine Ausbeute von 27% der Theorie erhalten.

Um die beiden zur Polymerherstellung zu verwendenden Template genauer charakterisieren zu können, wurde als erstes die Löslichkeit der Verbindungen in verschiedenen Lösungsmitteln (Methanol, Dimethylsulfoxid (DMSO), Chloroform und Wasser (Tabelle 7)) getestet.

Die richtige Auswahl des Lösungsmittels war insbesondere für die nachfolgenden Analyseverfahren und die Verwendung als Porogen für die Herstellung des Massepolymers wichtig. In Methanol konnten beide Template gut gelöst werden. Daher wurde Methanol als Porogen bei der Herstellung der Polymere verwendet. Die Löslichkeit in DMSO war hervorragend, und somit eignete sich dieses Lösungsmittel in seiner deuterierten Form besonders für die Kernresonanzspektroskopie (NMR). Ebenfalls sehr gut war die Löslichkeit in Dimethylformamid. Daher wurde dieses Lösungsmittel für die Immobilisierung der TSA an das modifizierte Kieselgel benutzt. Diethylether, Chloroform und Wasser konnten die beiden Übergangszustandsanaloga nur mäßig bis gar nicht lösen.

Tabelle 6: Löslichkeiten der zwei verwendeten TSAs

	Methanol	DMSO	DMF	Diethylether	Chloroform	H <sub>2</sub> O
TSA 1	+	+	+	-	-	-
TSA 2	+	+	+	-	+	-

+: gut löslich, -: unlöslich

Die  $^1\text{H-NMR}$  Untersuchungen an dem synthetisierten Übergangszustandsanalogon ergaben, dass das *p*-Nitrophenylphosphordichlorid bei der Synthese von TSA 2 mit zwei Molekülen Benzylamin reagiert hatte (Abbildung 12).

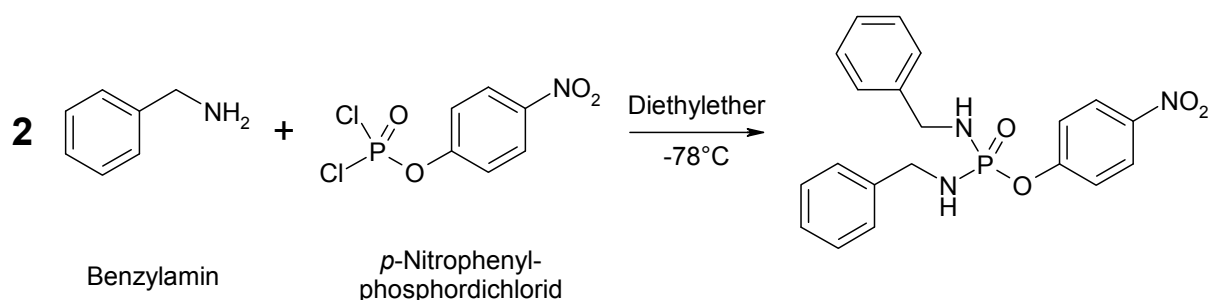


Abbildung 12: Hauptreaktion der Synthese von TSA 2

Dies konnte auch durch Bestimmung der Molmasse bestätigt werden, bei der eine Verbindung mit dem Molekulargewicht von 398,15 statt der erwarteten 308,23 auftrat. Diese gefundene Masse stimmt mit der berechneten Masse von 397,37 der neuen Verbindung überein und erklärt damit die geringe Ausbeute der Reaktion. Aufgrund der tetraedrischen Konfiguration des Phosphoratoms sollte das so erhaltene TSA 2 trotzdem für die Herstellung des Massepolymers verwendet werden.

### 3.1.2. Templatsynthese für eine spätere optimierte Polymerherstellung

Für die Weiterführung der Arbeiten sollten zusätzlich weitere Übergangszustandsanaloge Verbindungen für eine optimierte Polymerherstellung synthetisiert werden (Abbildung 13).

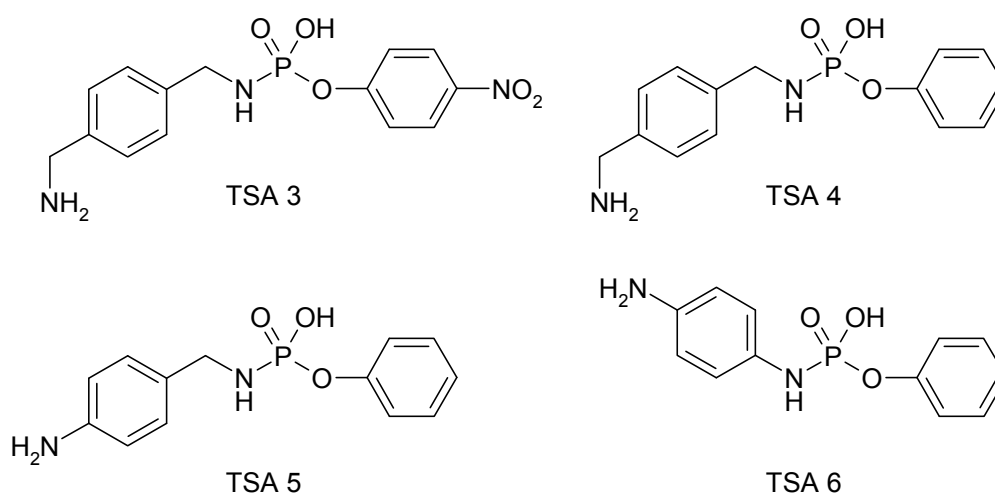
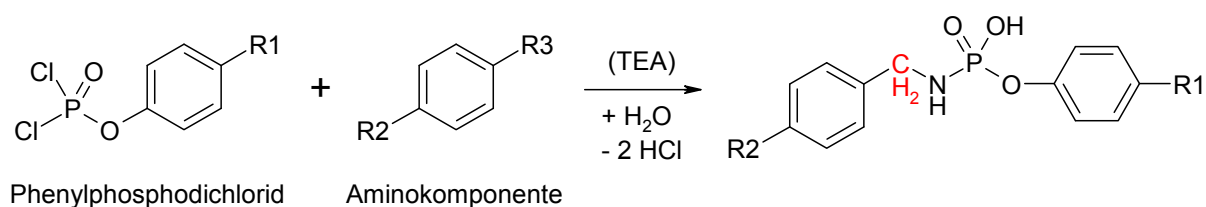


Abbildung 13: Selbstsynthetisierte optimierte Übergangszustandsanaloge für weiterführende Arbeiten

Die Synthese wurde analog der Synthese des TSA 2 nach Vorschriften von Koizumi *et al.* und Takaku *et al.* durchgeführt (Abbildung 14).<sup>[192,193]</sup> Allerdings wurde für die spätere Immobilisierung des Templats an der Oberfläche des Trägers ein Diamin statt des Benzylamins verwendet. Zur Optimierung wurde bei den TSA 4 – 6 das unsubstituierte Phenylphosphodichlorid verwendet. Dies soll eine bessere Polymerisation bewirken, da Nitroverbindungen als Polymerisationsinhibitor fungieren. Die Schwierigkeit dieser Synthese bestand allerdings darin, dass im Gegensatz zur Synthese von TSA 2 nun beide Reaktanden mit jeweils zwei Molekülen des Reaktionspartners reagieren konnten. Auch in diesen Fällen wurde, um diese ungewünschte Reaktion zu unterbinden, entweder die Aminokomponente im Überschuss eingesetzt oder Triethylamin als Hilfsbase zugesetzt. Eine weitere Schwierigkeit bestand in der gerichteten Synthese des TSA 5, da hier die Diaminokomponente mit einer benzylischen und einer phenylischen Aminogruppe vorlag.



	Phenylphosphodichlorid		Aminokomponente	
	R1	R2	R3	
TSA 3	—NO <sub>2</sub>			
TSA 4	—H			
TSA 5	—H	—NH <sub>2</sub>		
TSA 6	—H	—NH <sub>2</sub>	—NH <sub>2</sub>	

**Abbildung 14: Edukte der TSA-Synthese**

Die rot eingefärbte CH<sub>2</sub>-Gruppe fehlt beim TSA 6

Der Unterschied von TSA 3 zu TSA 1 besteht in einer durch eine eingeschobene CH<sub>2</sub>-Gruppe verlängerten Kopplungsgruppe, durch die das Molekül bei der Immobilisierung und anschließenden Ausrichtung zu den funktionellen Monomeren flexibler wird. TSA 4 hat diese flexible Gruppe ebenfalls, allerdings fehlt dieser Verbindung die Nitrogruppe. Dies kann außer zu einer verbesserten Polymerisierbarkeit der Monomermischung auch zu einer

unterschiedlichen Substratspezifität führen. TSA 5 gleicht bis auf die fehlende Nitrogruppe TSA 1. TSA 6 wurde synthetisiert, um den Einfluss einer kompakteren Molekülstruktur auf die Ausformung der resultierenden Kavitäten sowie die Erkennung zu untersuchen.

Auch bei diesen Verbindungen wurde als erstes die Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln (Methanol, Dimethylsulfoxid (DMSO), Chloroform und Wasser) getestet (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Löslichkeiten der optimierten TSAs**

	Methanol	DMSO	DMF	Diethylether	Chloroform	H <sub>2</sub> O
<b>TSA 3</b>	+	+	+	-	o	-
<b>TSA 4</b>	+	+	+	-	o	o
<b>TSA 5</b>	+	+	+	-	o	-
<b>TSA 6</b>	o	+	+	-	o	o

+: gut löslich, o: mäßig löslich, -: unlöslich

In Methanol, DMSO und DMF konnten alle Übergangszustandsanaloga gut gelöst werden. Einzige Ausnahme war die nur mäßige Löslichkeit von TSA 6 in Methanol. Diethylether, Chloroform und Wasser konnten die Übergangszustandsanaloga nur mäßig bis gar nicht lösen.

Die nach der Synthese durchgeführten <sup>1</sup>H-NMR Untersuchungen an den synthetisierten Übergangszustandsanaloga ergaben bei allen Verbindungen ein passendes Absorptionsspektrum der Wasserstoffatome. Das <sup>31</sup>P-NMR Spektrum zeigte in allen Fällen eine Änderung der chemischen Verschiebung durch die Reaktion. Die Das Signal der chemischen Verschiebung des Phenylphosphordichlorid bei -5,8 ppm verschwand und ein neues Signal bei 14,5 ppm erschien bei allen Produkten. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Reaktion am Phosphorchlorid stattgefunden hat.

Die massenspektroskopische Untersuchung zeigte bei den übergangszustandsanalogen Verbindungen 3 und 6 eine Übereinstimmung der gefundenen mit der zuvor berechneten Masse. Allerdings wurden hierzusätzlich Moleküle höherer Masse gefunden, die auf eine oligomere Struktur hinweisen. Bei den Verbindungen TSA 4 und TSA 5 konnten nur die oligomeren Formen im Massenspektrum nachgewiesen werden. Die Unterschiede betragen genau die Summen aus Amino- und Phosphorkomponente nach der Abspaltung von Wasser. Ein Beispiel dieser Oligomere ist in Abbildung 15 dargestellt. Nachgewiesen wurden Oligomere mit n von 0 bis 6.

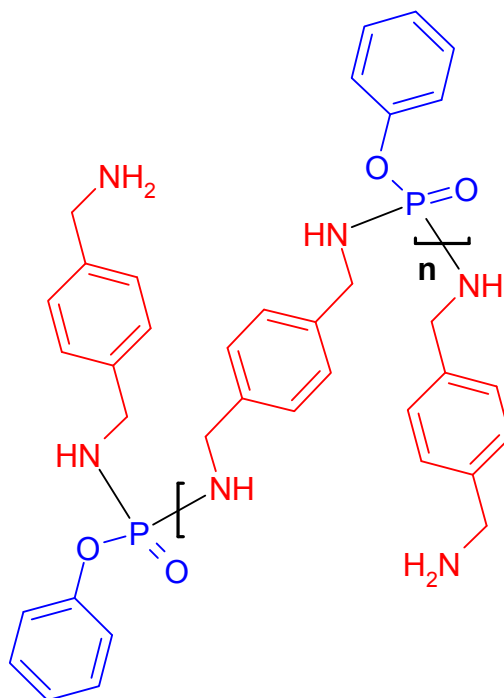


Abbildung 15: Schema der TSA-Oligomere am Beispiel des TSA 4

Als Templat für das Oberflächenprägen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine übergangszustandsanaloge Verbindung genutzt, die vom *Institut für Organische Chemie* der Universität Potsdam zur Verfügung gestellt wurde (TSA 1). Um einen Vergleich der durch das Oberflächenprägen erhaltenen Polymere mit Polymeren aus dem konventionellen Massepolymer-Ansatz ziehen zu können, wurde ein Übergangszustandsanlogon (TSA 2) ohne Immobilisierungsgruppe selber synthetisiert. Dafür war es nötig, einen bekannten Syntheseweg auf die neue Verbindung anzupassen.

Zusätzlich wurden für eine spätere Verwendung in einem weiteren Projekt verschiedene optimierte übergangszustandsanaloge Substanzen synthetisiert (TSA 3 – 6). Dabei stellte sich heraus, dass die synthetisierten Template neben dem Hauptprodukt immer auch als Oligomere vorlagen.

## 3.2. Synthese und Aufarbeitung der geprägten Polymere

### 3.2.1. Immobilisierung der Template an poröses Kieselgel

Die Immobilisierung der Template an aminopropyl-modifiziertes Kieselgel erfolgte nach unterschiedlichen Protokollen. Bei Methode I wurde zuerst ein Linker mittels Bernsteinsäureanhydrid in einer spontanen Reaktion an die Aminogruppe des Trägers gekoppelt (Abbildung 16).

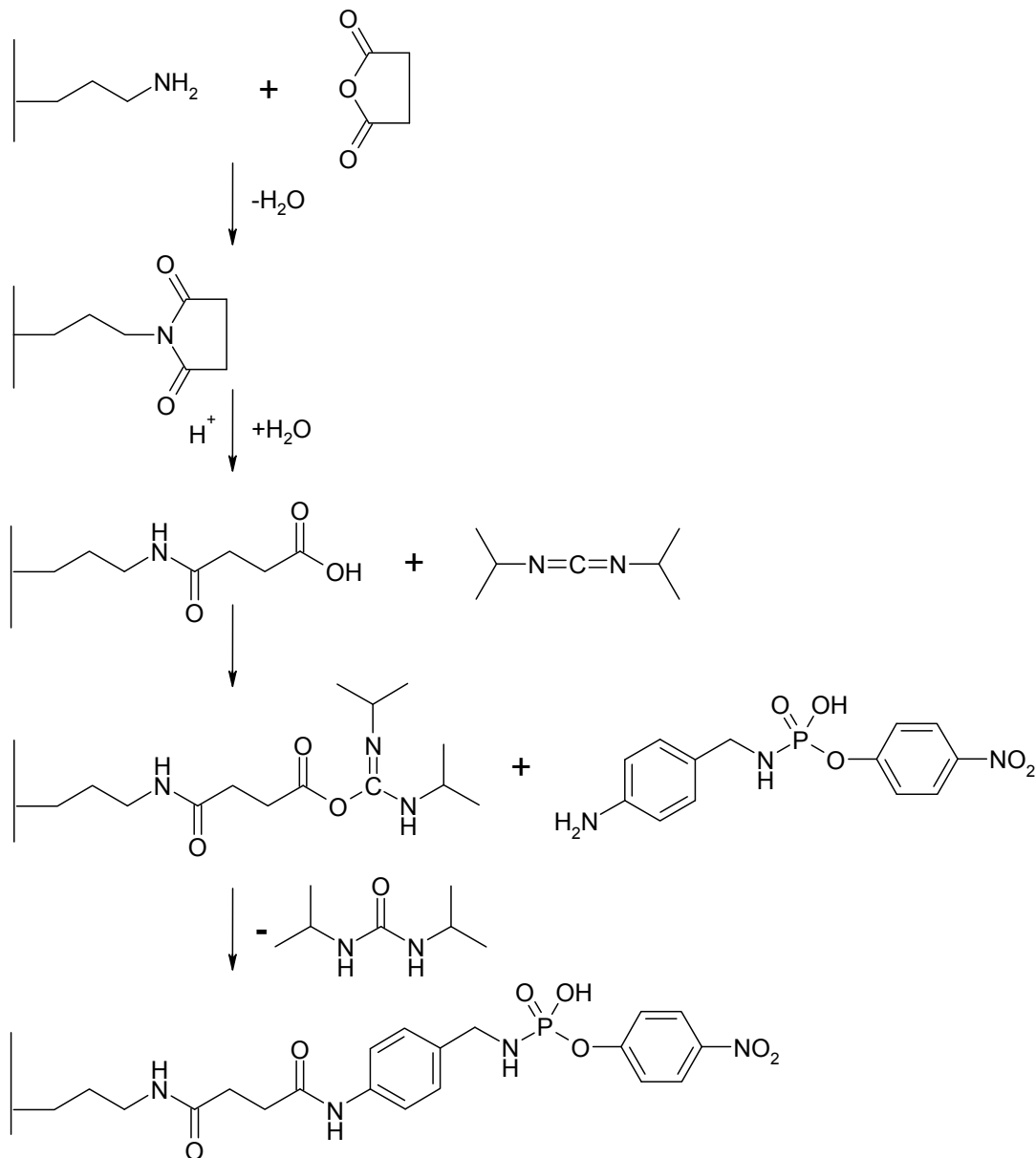
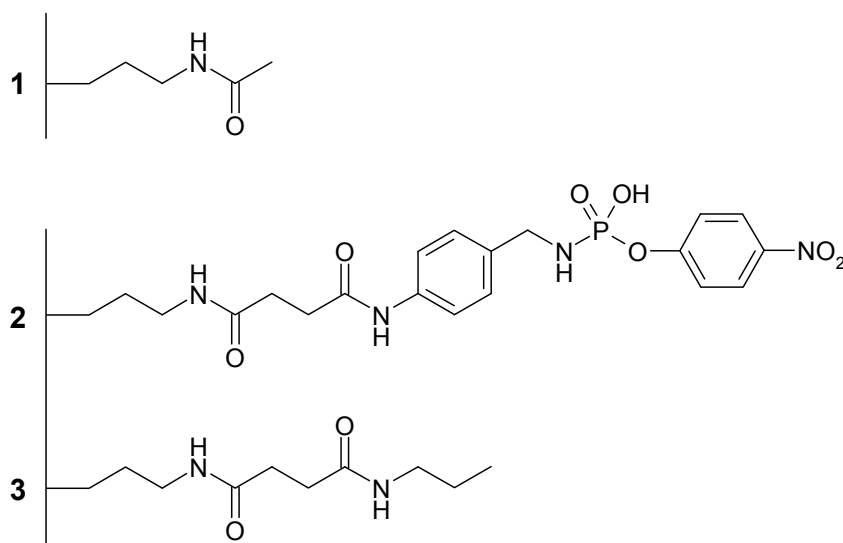


Abbildung 16: TSA-Immobilisierung nach Methode I

Der Erfolg dieser Kopplung wurde mit Hilfe des Kaiser-Tests auf freie Aminogruppen qualitativ überprüft.<sup>[194]</sup> Hierbei wurden durch eine visuelle Überprüfung keine freien Aminogruppen mehr festgestellt. Eine Quantifizierung der Kopplungseffizienz inklusive des Nachweises der quantitativen Ringöffnung des Bernsteinsäureanhydrids war allerdings nicht möglich. Anschließend wurde die zweite Säuregruppe der Bernsteinsäure über eine Carbodiimid-Reaktion aktiviert und an die Aminogruppe des Übergangszustandes gekoppelt. Da diese Reaktion nicht quantitativ verlief, wurden die restlichen aktivierten Säuregruppen mit Propylamin inaktiviert. Für den Kontrollträger wurden die Aminogruppen des Trägers direkt im Überschuss mit Essigsäureanhydrid inaktiviert (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Oberfläche des Trägers nach Immobilisierung mit Methode I**

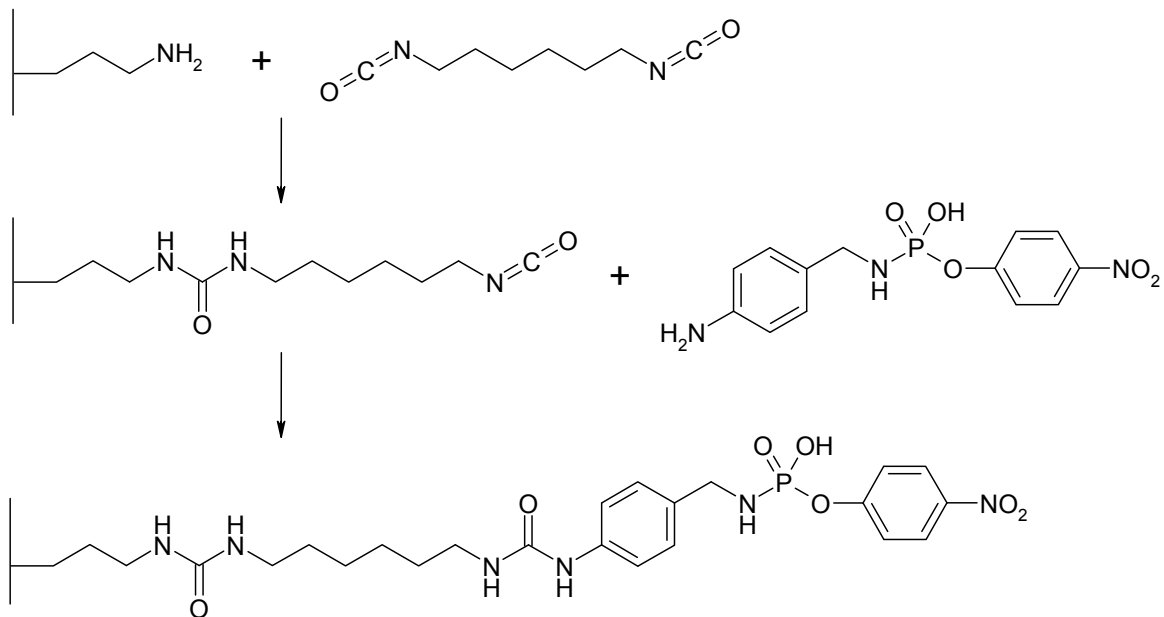
Modifizierung des Aminopropylkieselgels nach Methode I. Der Kontrollträger (**1**) wurde mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Beim Templatträger wurde zuerst mit Bernsteinsäureanhydrid ein Linker eingefügt und dann das TSA gekoppelt (**2**). Nicht reagierte Säuregruppen wurden mit Propylamin inaktiviert (**3**).

Die Methode II entsprach beim Templatträger bis auf das Inaktivieren der unreaktierten Bindungsstellen der ersten Methode. Um die Reaktion quantitativ verlaufen zu lassen wurde deutlich mehr Propylamin eingesetzt. Allerdings wurde durch die große Menge an Base der pH-Wert soweit erhöht, dass eine Solvolyse des schon immobilisierten Phosphorsäureesters auftrat, und *p*-Nitrophenol freigesetzt wurde. Durch diese Solvolyse wurde die Menge an immobilisiertem Templat für das Prägen deutlich verringert. Der Kontrollträger wurde bei dieser Methode ebenfalls zuerst mit Bernsteinsäureanhydrid modifiziert und danach mit Propylamin inaktiviert.

Um die Solvolyse des TSA am Templatträger zu unterbinden, wurde bei Methode III mit Methanol statt mit Propylamin inaktiviert. Auch der Kontrollträger wurde zur Vergleichbarkeit mit Methanol statt mit Propylamin inaktiviert.

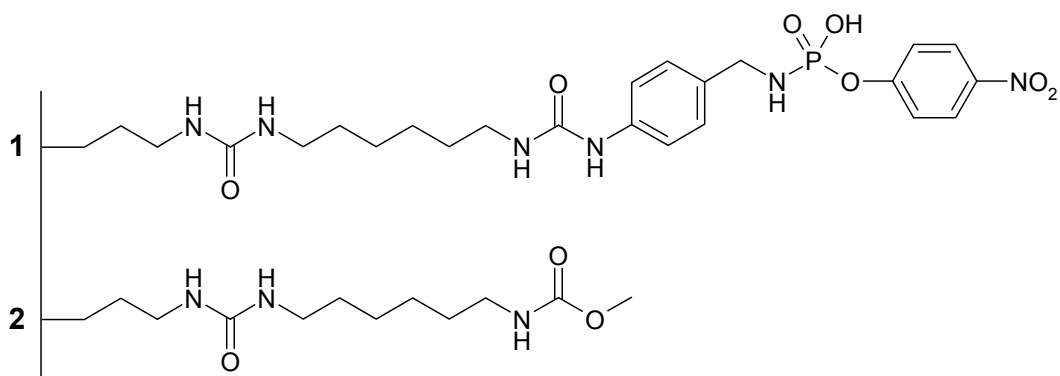


Um die Schwachstellen der Immobilisierung mittels Bernsteinsäureanhydrid zu umgehen wurde bei Methode IV das hochreaktive Hexamethyldiisocyanat als Kopplungsreagenz eingesetzt (Abbildung 18).



**Abbildung 18: TSA-Immobilisierung nach Methode IV**

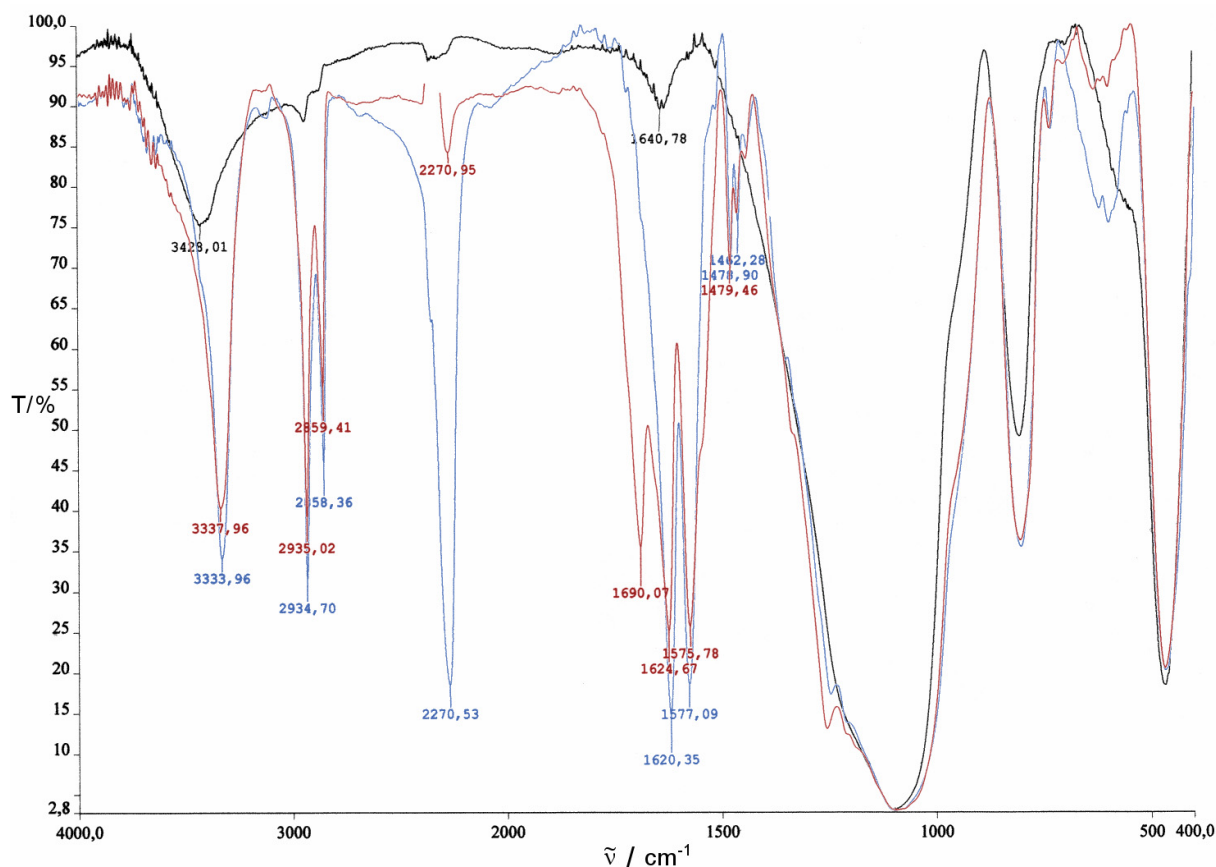
Das Diisocyanat reagierte zunächst im Überschuss mit den Aminogruppen des modifizierten Kieselgels unter Ausbildung einer Harnstoffbindung. Nach dem Entfernen des überschüssigen Kopplungsreagenz reagierte die zweite Isocyanatgruppe dann mit der freien Aminogruppe des TSA, ebenfalls unter Entstehung einer Harnstoffbindung. Nicht umgesetztes Isocyanat wurde mit Methanol abreagiert (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Oberfläche des Trägers nach Immobilisierung mit Methode IV**

Modifizierung des Aminopropylkieselgels nach Methode V. Beim Templatsträger wurde zuerst mit Hexamethyldiisocyanat ein Linker eingefügt und dann das TSA gekoppelt (**1**). Nicht reagiertes Diisocyanat wurde beim Templatsträger sowie beim Kontrollträger mit Methanol abreagiert (**2**).

Mit IR-Spektroskopie (Abbildung 20) konnte zunächst gezeigt werden, dass die Kopplung von Hexamethylendiisocyanat an aminopropyl-funktionalisiertes Kieselgel in einer für Harnstoffe typischen Bande um  $1620\text{ cm}^{-1}$  und einer Bande bei  $2270\text{ cm}^{-1}$  für freie Isocyanatgruppen resultiert, die in unmodifiziertem Aminopropylkieselgel nicht vorhanden war.



**Abbildung 20: IR-Spektrum des nach Methode IV modifizierten Kontrollkieselgels**

Schwarzes Spektrum: Aminopropylkieselgel; blaues Spektrum: Aminopropylkieselgel mit Hexamethylendiisocyanat modifiziert; rotes Spektrum: Aminopropylkieselgel mit Hexamethylendiisocyanat modifiziert und die zweite Isocyanatgruppe mit Methanol inaktiviert.

Bei der weiteren Reaktion mit den übergangszustandsanalogen Verbindungen und der anschließenden Inaktivierung mit Methanol verschwand die Bande bei  $2270\text{ cm}^{-1}$ , und es erschien eine Bande bei  $1690\text{ cm}^{-1}$  durch das Inaktivieren mit Methanol, wie für Carbamate typisch. Zusätzlich zu den besseren Kontrollmöglichkeiten der Immobilisierung und der etwas verlängerten Kopplungsgruppe sind die bei dieser Reaktion gebildeten Harnstoffderivate sehr stabil und damit für das spätere Prägen besonders geeignet.

### 3.2.2. Darstellung und Reinigung von 4-Vinylimidazol

Da 4-Vinylimidazol nicht kommerziell erhältlich ist, wurde es nach einer abgewandelten Methode von Overberger *et al.* dargestellt.<sup>[195]</sup> Es handelt sich hierbei um eine thermische Decarboxylierung der Urocansäure (Abbildung 21). Die Urocansäure wurde in einem Kugelrohrfen soweit erhitzt, bis ein langsamer und gleichmäßiger Zerfall in 4-Vinylimidazol und Kohlenstoffdioxid einsetzte.

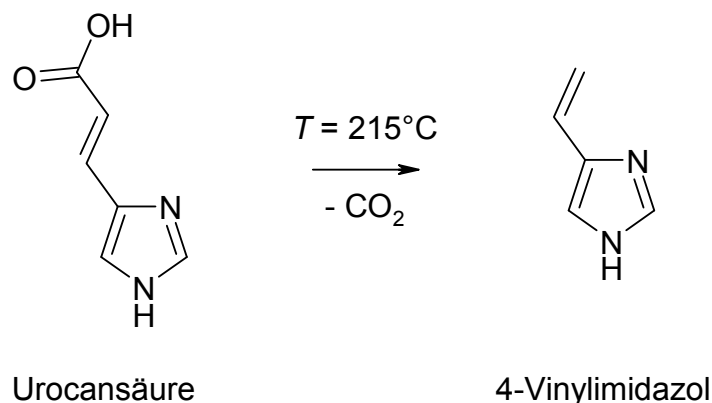


Abbildung 21: Darstellung von 4-Vinylimidazol

Das erhaltene Produkt wurde während der Decarboxylierung gleichzeitig abdestilliert und nach dem Abkühlen aus Methanol umkristallisiert. Durch diese modifizierte Methode konnte die Ausbeute von 69% auf 84% gesteigert werden. Die Lagerung fand bei  $4^{\circ}\text{C}$  statt.

### 3.2.3. Polymerisation und Aufarbeitung der oberflächengeprägten Polymere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden oberflächengeprägte Polymere nach verschiedenen Protokollen der Immobilisierung sowie mit unterschiedlichen Monomermischungen hergestellt. Um eine eindeutige Zuordnung der Polymere zu den verschiedenen Herstellungsarten zu gewährleisten, wurde folgende Nomenklatur verwendet, die in Abbildung 22 dargestellt wird.

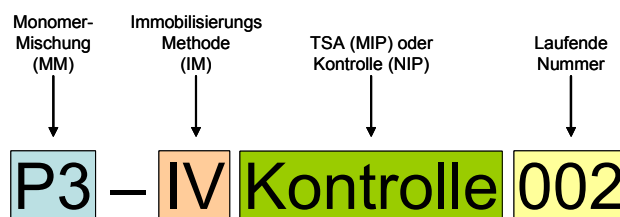


Abbildung 22: Nomenklatur der hergestellten Polymere

Als erstes ist die Monomermischung (MM) nach Tabelle 16 (Kapitel 5.2.3.1) angegeben. Darauf folgt die jeweilige Modifizierungsmethode (IM) für das aminopropylfunktionalisierte Kieselgel (Abbildung 17; Abbildung 19) mit der Angabe, ob es sich um ein geprägtes oder um ein Kontrollpolymer handelt. Abgeschlossen wird der Name durch eine laufende Nummer, die den jeweiligen Versuch angibt. Diese Versuche fanden jeweils unter gleichen Polymerisationsbedingungen (Temperatur, Zeit, Aufarbeitungsmethode), aber mit unterschiedlichen Chargen modifizierten Kieselgels der gleichen Immobilisierungsmethode statt. Nur die Polymere der Reihe P3-I 005 – 007 wurden mit einem modifizierten Kieselgel der gleichen Charge hergestellt. Zusätzlich zu den direkten Kontrollen für die geprägten Polymere wurden noch Versuche zur generellen Polymerisierbarkeit der Mischungen sowie zum Einfluss der Porengröße des Trägers durchgeführt. Diese Porengröße bestimmt die spätere Stabilität und Morphologie der Polymerpartikel und beeinflusst damit die Diffusion des Substrates zu den Kavitäten und den Gegendruck in einem Fließsystem. Die Nomenklatur dieser Polymere lehnt sich an der oben eingeführten an, wird aber jeweils im Detail erläutert.

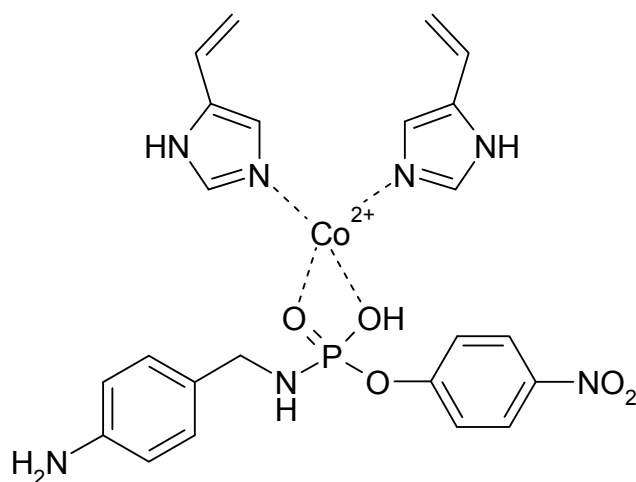
**Tabelle 8:** Übersicht über die getesteten Kombinationen von Monomermischung und Immobilisierungsmethode zur Herstellung von katalytischen MIPs

MM	IM
P1	I
P2	I
	ohne
	I
P3	II
	III
	IV

In Tabelle 8 sind die verschiedenen Kombinationen aus Monomermischung und Immobilisierungsmethode aufgeführt, die zur Herstellung von katalytisch aktiven Polymeren und ihren Kontrollen führen sollten.

Die Monomermischung für die P1-Polymere wurde nach einer veränderten Methode von Yamazaki *et al.* hergestellt.<sup>[89]</sup> Hierbei sollte das  $\text{Co}^{2+}$  von zwei Molekülen 4-Vinylimidazol

sowie dem Übergangszustandsanalogon komplexiert, und somit im späteren Polymer eine Erniedrigung der benötigten Energie zur Erreichung des Übergangszustands erreicht werden. Diese Mischung wurde mit dem Träger für das Oberflächenprägen vermischt. In diesem Fall handelte es sich um nach Methode I modifiziertes Aminopropylkieselgel. Das eingesetzte Verhältnis von metallbindendem, funktionellem Monomer (4-VI) zu Metallion ( $\text{Co}^{2+}$ ) betrug zwei zu eins. Das tatsächliche Verhältnis im Komplex wurde allerdings nicht ermittelt, da mit dieser Mischung nur ein Polymer hergestellt wurde und das weitere Hauptaugenmerk auf die Polymerherstellung ohne Cobalt gelegt wurde. Abbildung 23 zeigt die vermutete Komplexierung des Cobalts durch 4-Vinylimidazol und TSA 1.



**Abbildung 23: Vorgeschlagener Komplex aus Vinylimidazol,  $\text{Co}^{2+}$  und TSA 1**

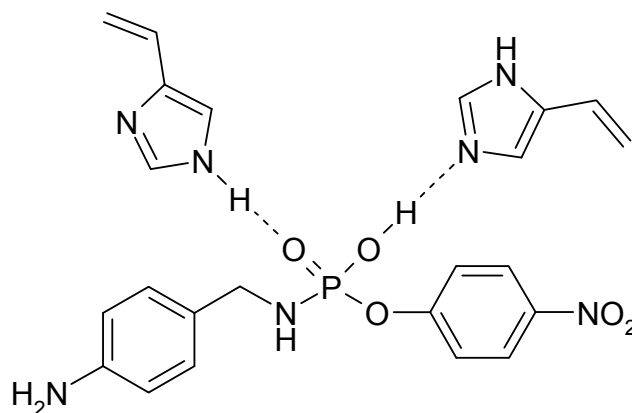
Zwei Vinylimidazole komplexieren ein  $\text{Co}^{2+}$ , welches wiederum mit seinen beiden anderen Ligandenbindungsstellen das Phosphorsäureesteramid komplexiert.

Es wurde bei der Zugabe der Monomermischung zum modifizierten Kieselgel eine Farbänderung von Farblos nach Violett beim Kontrollkieselgel, sowie nach Rosa beim TSA-modifiziertem Kieselgel festgestellt.

Nach der Polymerisation und dem Auflösen des Trägers mit Hilfe von 40%iger Flusssäure wurde nur das geprägte Polymer erhalten. Die Mischung für das Kontrollpolymer blieb unpolymerisiert. Ein Grund für dieses Verhalten könnte ungenügendes Spülen der Monomermischung mit Argon sein, da molekularer Sauerstoff als Polymerisationsinhibitor wirkt. Ein weiterer Inhibitor der Polymerisation der geprägten Polymere ist die Nitrogruppe des Übergangszustandsanalogon.

Für die P2-Polymere wurde der gleiche Träger verwendet, aber zu der Monomermischung kein  $\text{CoCl}_2$  hinzugefügt, da aus der Literatur bekannt ist, dass auch Imidazol Phenylacetate hydrolysieren kann.<sup>[196]</sup> Ein möglicher Komplex zwischen Übergangszustandsanalogon und 4-Vinylimidazol als funktionellem Monomer ist in Abbildung 24 gezeigt. Dabei werden zwei

Imidazolreste durch die tetraedrische Anordnung der Atome am Phosphatatom so ausgerichtet, dass sie diesen auf zwei Seiten umschließen. Nach der Aufarbeitung wurde sowohl Kontroll- als auch geprägtes Polymer erhalten.



**Abbildung 24: Vorgeschlagener Komplex aus Vinylimidazol und TSA 1**

Zwei Vinylimidazole komplexieren zwei Sauerstoffatome des Phosphorsäureesters.

Die P3-Polymere wurden mit einer verringerten Menge an porogenem Lösungsmittel und ebenfalls ohne  $\text{CoCl}_2$  hergestellt. Dies sollte ein kompakteres Polymer ermöglichen, bei dem nur die in den Kavitäten der geprägten Oberfläche liegenden, geordneten Imidazolreste mit dem umgebenden Lösungsmittel und damit dem Substrat in Kontakt treten könnten.

Mit dieser Mischung wurden sowohl die Massepolymere mit dem TSA 2 (P3-ohne), als auch oberflächengeprägte Polymere mit verschiedenen modifizierten Trägern (I, II, III, IV) hergestellt. Einige Polymerisationsansätze waren allerdings nicht erfolgreich.

Zeitgleich wurden Experimente zur Polymerisierbarkeit der Monomermischungen P3 und P4 mit verschiedenen unmodifizierten Trägern gemacht (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Übersicht Synthese sonstige Kontrollen**

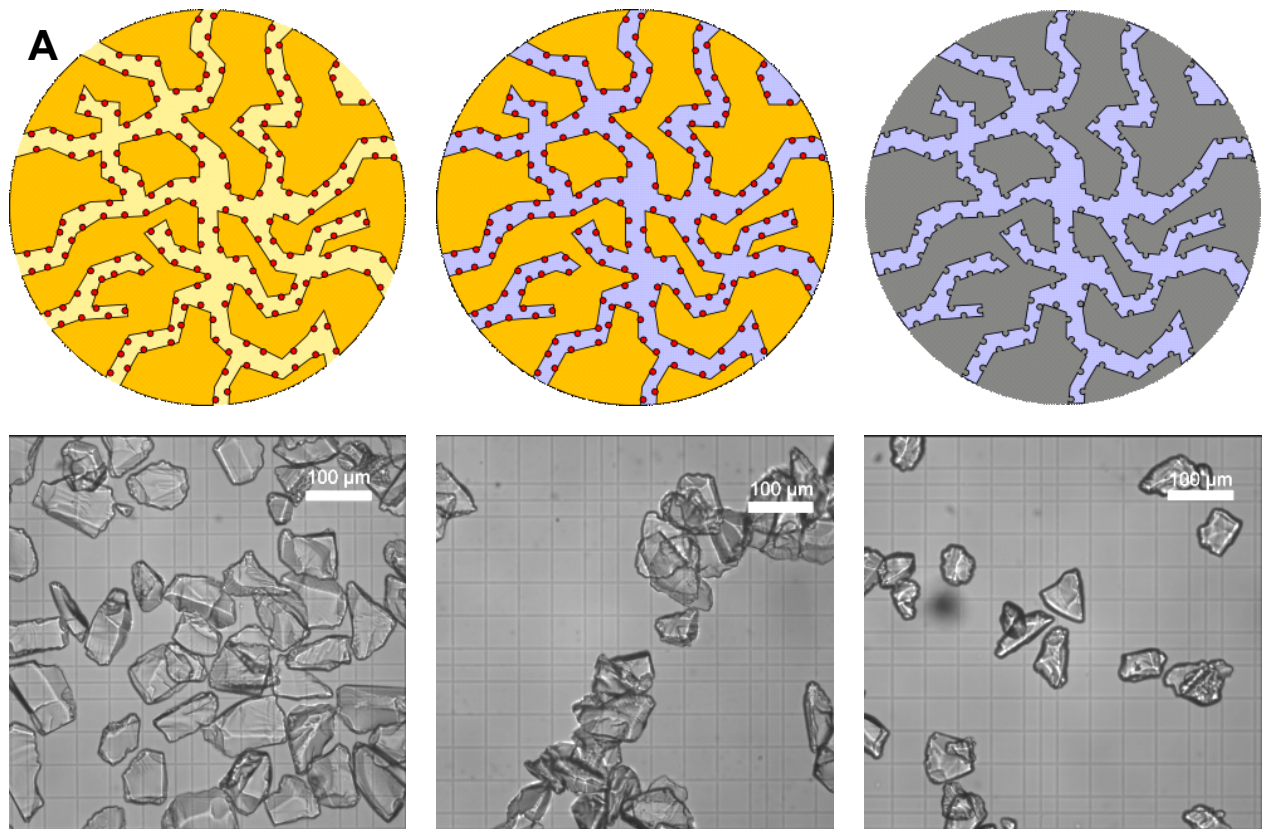
MM	Träger
P3	APS
	S60
	S100
P4	APS
	S100

Dies beinhaltet die Polymerisation an einfachem Aminopropylkieselgel (APS: Porengröße ~9 nm), sowie an unmodifizierten Kieselgelen verschiedener Porengrößen (S60: ~6 nm, S100: ~10 nm). Durch die Verwendung verschiedener Porengrößen sollte ermittelt werden, wie gut die Polymermischung in die Poren eindringt und dort polymerisiert. Die als Monomer nur Vernetzer enthaltenden P4-Polymere sollten dabei Aufschluss über die Reproduzierbarkeit der Polymerisation und anschließenden Stabilität bei der Polymeraufarbeitung mit Flusssäure geben.

Es stellte sich heraus, dass beide Monomermischungen in allen drei Kieselgelen reproduzierbar polymerisierten. Ein Unterschied in der makroskopischen Morphologie aufgrund der unterschiedlichen Porengrößen konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Die Polymere der P4-S100 Reihe dienten weiterhin zur Ermittlung, wie viel Monomermischung von dem porösen Kieselgel aufgenommen werden kann, bis es makroskopisch aggregiert. Laut den Angaben des Herstellers (Fluka) beträgt das Porenvolumen für 1 g Kieselgel S100 und das Aminopropylkieselgel, ungefähr 900  $\mu\text{l}$ . Durch das gleiche Porenvolumen und durch die annähernd gleiche Porengröße können die Werte der beiden Materialien direkt miteinander verglichen werden. Bei dem Experiment stellte sich heraus, dass eine Beladung von 1 g Kieselgel mit maximal 900  $\mu\text{l}$  Monomermischung noch zu einem feinen Pulver führt. Somit dürften die Poren des Kieselgels komplett gefüllt sein, und an der äußeren Oberfläche der Partikel würde sich kaum Polymermischung befinden, welche ein Aggregieren der Partikel ermöglichen würde. Für die Herstellung der katalytischen Polymere wurden nur 500  $\mu\text{l}$  Monomermischung eingesetzt, um die Partikel nicht komplett zu füllen.

Um die Morphologie der Polymere während des Herstellungsprozesses zu überwachen, wurden phasenkontrast-mikroskopische Aufnahmen der modifizierten Kieselgelpartikel, der Polymer/Kieselgel-Hybride und der daraus entstandenen Polymerpartikel gemacht (Abbildung 25). Aus den mikroskopischen Aufnahmen kann man keinen Unterschied zwischen den einzelnen Stationen des Oberflächenprägens erkennen. Dies bestätigt den genauen Negativabdruck der resultierenden Polymere von den modifizierten Kieselgelpartikeln. Die hochporöse Struktur des Kieselgels wurde mit Polymermischung gefüllt, und nach der Aufarbeitung wurden Partikel von gleicher Morphologie und Größe der Ausgangspartikel erhalten. Nur eine leichte Verklumpung der Partikel aufgrund der Polymerisation ist zu erkennen.



**Abbildung 25: Schemata und Phasenkontrastaufnahmen der verschiedenen Stufen des Oberflächenprägens**

Schemata der verschiedenen Stufen des Oberflächenprägens (oben) und dazugehörige Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen (unten). **A** zeigt das mit Templatmolekülen (rot) modifizierte Kieselgel (orange). **B** zeigt die mit Polymer (blau) gefüllten Poren des Kieselgels (orange) nach der Polymerisation und **C** das fertige Polymer (blau) ohne Kieselgelgerüst.

Mithilfe einer Elementaranalyse hinsichtlich Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorgehalt konnte der Modifizierungsgrad der Polymere P3-I TSA 001 und P3-I Kontrolle 001 festgestellt werden. Dabei konnten 69 µmol TSA pro Gramm Kieselgel nachgewiesen werden, was einer Ausbeute von 69% entsprach. Die Modifizierung des Kontrollträgers mit Essigsäureanhydrid resultierte in einer 96% Ausbeute.

Zur Bestimmung des Restgehalts an anorganischem Kieselgel in den Polymeren nach der Aufarbeitung, wurde eine thermogravimetrische Analyse der Polymere P3-IV TSA 002 und P3-IV Kontrolle 001 durchgeführt. Dabei wurde das Polymer thermisch zersetzt und die übrig bleibenden Feststoffe bestimmt. Bei beiden Polymeren kam ein Restgehalt an anorganischem Material von ca. 20% vor. Da das restliche Kieselgel den Zugang zu weiteren Bindungsstellen im Polymer beeinträchtigt, könnte es zu einer leichten Erniedrigung der spezifischen Umsatzgeschwindigkeit kommen.

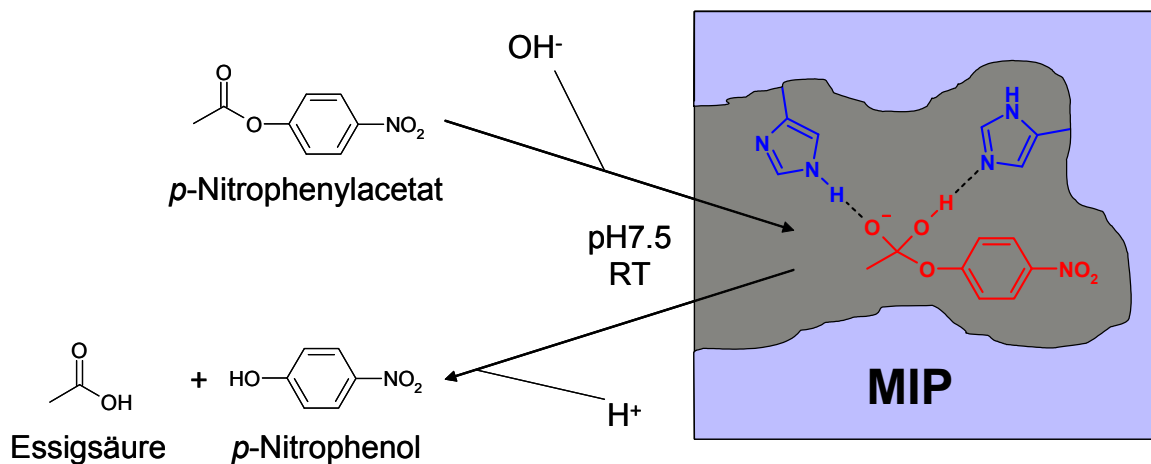


Trotz dieses Restgehaltes sind die so erstellten Polymere für einen Einsatz als katalytisch aktive Polymere verwendbar, da der Grossteil des Trägermaterials entfernt werden konnte und somit ausreichend aktive Taschen für eine Katalyse zur Verfügung stehen sollten.

Die Herstellungsmethode der oberflächengeprägten Polymere wurde hinsichtlich eines reproduzierbareren Polymerisationsverhaltens optimiert. Dies wurde durch die im Zusammenhang mit oberflächengeprägten Polymeren erstmalige Verwendung von Hexamethylendiisocyanat als Kopplungsreagenz erreicht. Mit dieser Methode wurde eine bessere Verfolgung der Reaktion durch IR-Spektroskopie möglich. Außerdem konnte durch die Verwendung des Diisocyanats in wasserfreien Lösungsmitteln eine Vermeidung von Zwischenreaktionen, die in energetisch stabilen Produkten enden, erreicht werden. Die Charakterisierung zeigte eine einheitliche Polymermorphologie mit leichten Resten an anorganischem Trägermaterial.

### 3.3. Charakterisierung der Polymere in Einzelmessungen

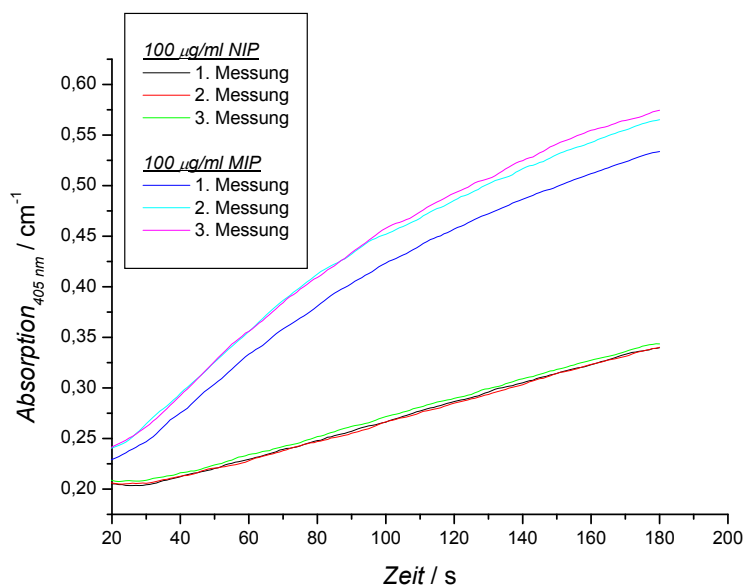
Zur Evaluierung der katalytischen Polymere wurde ein einfacher optischer Nachweis benutzt (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Optischer Aktivitätstest für die katalytischen Polymere**

20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol.

Eine bestimmte Konzentration einer Polymersuspension in Puffer wurde mit verschiedenen Konzentrationen an *p*-Nitrophenylacetat in einer Küvette gemischt. Die Umsetzung des Substrates zu *p*-Nitrophenol und Essigsäure wurde über die Zunahme der Absorption von *p*-Nitrophenol photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen (Abbildung 27).



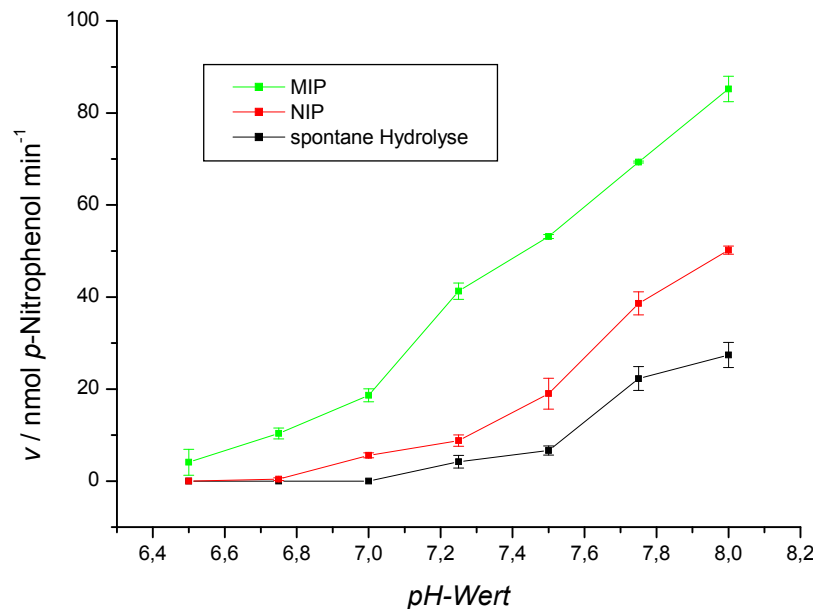
**Abbildung 27: Absorptions-Zeit-Diagramm für die Solvolyse von *p*-Nitrophenylacetat**

100 µg ml<sup>-1</sup> P3-I Kontrolle 001 / TSA 001, 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 5 mM *p*-Nitrophenylacetat.

Die daraus erhaltenen Geschwindigkeiten  $v$  in  $\Delta\text{Abs min}^{-1}$  wurden mittels einer *p*-Nitrophenol-Kalibrationsgraden in  $\text{nmol min}^{-1}$  umgerechnet.

In dieser Kinetik ist zu erkennen, dass die Kurve ab ca. 70 s abflacht. Aus der Kalibrationsgraden konnte berechnet werden, dass zu diesem Zeitpunkt ca.  $40 \mu\text{M}$  *p*-Nitrophenol in der Lösung vorlagen, was einem Umsatzgrad von 0,8% entspricht. Daher ist es anzunehmen, dass der Abfall der Umsatzrate eher durch einen Inhibitionseffekt durch die Produkte *p*-Nitrophenol und Essigsäure begründet ist, als durch die im Reaktionsverlauf verringerte Substratkonzentration.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Abhängigkeit des Umsatzes vom pH-Wert gemessen.



**Abbildung 28:** pH-Abhängigkeit der Solvolyse von *p*-Nitrophenylacetat

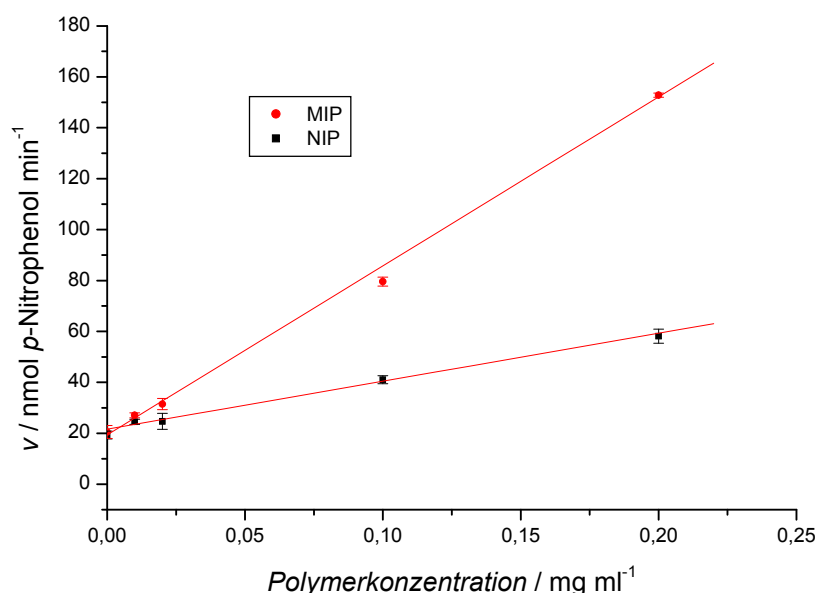
200  $\mu\text{g/ml}$  P3-I Kontrolle 001 / TSA 001, 20 mM Phosphatpuffer / 10% Methanol, 5 mM Phenylacetat.

In Abbildung 28 ist die Solvolyseaktivität von  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  Polymer mit 5 mM *p*-Nitrophenylacetat in 20 mM Natriumphosphatpuffer / 10% Methanol bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Weiter wurde auch die Spontansolvolyse ohne Polymer in diesen verschiedenen Puffern gemessen. Es wurde beobachtet, dass die Umsatzgeschwindigkeit mit steigendem pH-Wert immer weiter zunahm. Begründet ist dies in der basekatalysierten Solvolyse von Estern. Um eine ausreichend große Differenz zwischen der spontanen Solvolyse, der Aktivität des NIP sowie der Aktivität des MIP für die folgenden Versuche zu gewährleisten, wurde ein pH-Wert von 7,5 für alle folgenden Messungen verwendet.

### 3.3.1. Untersuchungen zur Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Polymermenge

Ein weiterer Einfluss neben dem pH-Wert auf die Umsatzgeschwindigkeit besteht in der Menge an aktiven Zentren und damit der Menge an aktivem Polymer. Je mehr aktive Zentren vorhanden sind, desto mehr Substratmoleküle können an diese Zentren binden und umgesetzt werden. Daraus folgt, dass die Geschwindigkeit bei gleicher Substratkonzentration, pH-Wert und Temperatur der Menge an Polymer proportional sein muss.

Um eine für die weiteren Messungen optimale Polymermenge zu finden, wurden variierende Mengen an Polymer mit konstanten *p*-Nitrophenylacetat-Konzentrationen inkubiert und die Zunahme der Absorption durch freigesetztes *p*-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 405 nm beobachtet. Durch die geringe Löslichkeit des Substrats in dem verwendeten Puffersystem konnte nicht unter Sättigungsbedingungen gearbeitet werden. Stattdessen wurden alle Experimente an der Löslichkeitsgrenze von *p*-Nitrophenylacetat bei einer Konzentration von 5 mM in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) / 10% Methanol durchgeführt. Der lineare Anstieg der Absorption im Bereich zwischen 20 und 60 s wurde dann mit Hilfe einer *p*-Nitrophenol-Kalibrationsgraden in eine Geschwindigkeit  $v$  ( $\text{nmol min}^{-1}$ ) umgerechnet. Bei der Auftragung dieser Geschwindigkeit gegen die Polymermenge im Ansatz erhielt man eine lineare Abhängigkeit (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Bestimmung der spezifischen Geschwindigkeit der *p*-Nitrophenylacetat-Solvolyse  
P3-I Kontrolle 006 / TSA 006, 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 5 mM Phenylacetat.

Aus dieser Abhängigkeit wurde die spezifische Geschwindigkeit  $v_{spz.}$  berechnet. Um eine quantitative Aussage über die Qualität des Prägeprozesses und damit den Unterschied in den Umsatzgeschwindigkeiten von MIP und NIP zu machen wurde der Prägefaktor  $\alpha$  eingeführt. Er definiert sich wie folgt:

$$\alpha = \frac{\text{spezifische Geschwindigkeit}_{MIP}}{\text{spezifische Geschwindigkeit}_{NIP}}$$

Höhere Werte für  $\alpha$  sind somit ein Zeichen für einen großen Unterschied in den Umsetzungsgeschwindigkeiten von MIP zu NIP und damit für einen guten Prägeeffekt. Dieser resultiert hauptsächlich aus dem Vorhandensein des Templats auf der Oberfläche des Kieselgels während des Prägevorgangs. Unterschiede in den Geschwindigkeiten durch eine starke Veränderung der Porenstruktur des Polymers Aufgrund des Fehlens des Übergangszustandsanalogon war hingegen nicht zu erwarten, da die Porosität des Polymers hauptsächlich durch das Porogen bestimmt wird.<sup>[197]</sup>

In Tabelle 10 sind die spezifischen Geschwindigkeiten  $v$  der im Rahmen dieser Arbeit mit verschiedenen Immobilisationsmethoden hergestellten Polymere aufgelistet.

**Tabelle 10: Spezifische Geschwindigkeiten der katalytischen Polymere und ihrer Kontrollen**

MM	IM	$v_{spz.} / \text{nmol } p\text{-Nitrophenol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$		$\alpha$
		NIP	MIP	
	ohne	1,82 ± 2,29	14,96 ± 2,11	8,2
	I <sup>[a]</sup>	48,04 ± 80,78	108,49 ± 98,54	2,7
P3	II <sup>[b]</sup>	185,01 ± 2,94	66,00 ± 5,74	0,6
	III	113,86 ± 5,06	41,94 ± 1,55	0,4
	IV	2,14 ± 1,59	90,52 ± 1,72	42,3

<sup>[a]</sup> Durchschnitt von 11 getesteten Polymeren; <sup>[b]</sup> Durchschnitt von 2 getesteten Polymeren

Das konventionell geprägte Polymer (bulk polymer) P3-ohne zeigte nur eine geringe absolute Erhöhung der spezifischen Geschwindigkeit. Da das Kontrollpolymer allerdings so gut wie keinen katalytischen Effekt zeigte, kam es zu einem recht hohen Prägefaktor  $\alpha$  von 8,2.

Obwohl der Prägefaktor  $\alpha$  der P3-I Polymere im Durchschnitt bei 2,7 liegt, kann man aus den Standardabweichungen erkennen, dass die Polymerherstellung nicht reproduzierbar ist. Die spezifische Geschwindigkeit des Kontrollpolymers P3-I 002 ( $274,83 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) war ca. 150-mal so groß wie die des Polymers P3-I 010 ( $1,78 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). Bei den geprägten Polymeren war eine Abweichung um den Faktor 50 zu finden (P3-I TSA 006:  $218,94 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ; P3-I TSA 012:  $4,38 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). Diese Schwankungen können nur durch ungenügende Kontrolle der einzelnen Herstellungsschritte des Polymers erklärt werden. Hierbei ist vor allem die Immobilisierung des Templats an der Aminopropyloberfläche des Kieselgels zu nennen. Die Reaktion über Bersteinsäureanhydrid resultierte in Schwankungen in der Ausbeute und somit war die Konzentration an Templatmolekülen auf der Oberfläche nicht bei jeder Polymerisation gleich. Allerdings konnte gezeigt werden, dass bei einer Herstellung von drei Polymeren (P3-I 005 – 007) aus demselben Immobilisationsansatz des Kieselgels nur noch Schwankungen im Bereich von 35% bei den Kontrollen bzw. 9% bei den geprägten Polymeren auftraten. Dies verdeutlicht den großen Einfluss, den die Modifizierung des Kieselgels mit Templat auf die daraus resultierenden Polymere hat.

Die Umsatzgeschwindigkeiten der geprägten P3-II und P3-III Polymere lag sogar unter den Geschwindigkeiten der Kontrollen.

Aus diesem Grund wurde das Immobilisierungsverfahren in der P3-IV-Reihe hinsichtlich der Ausbeute optimiert. Die Fixierung der Template erfolgte in diesem Fall über Hexamethylenisocyanat. Dieses Verfahren erlaubt eine bessere Ausbeute der Reaktion des Templats mit dem Träger durch den Wegfall von Nebenprodukten und die genauere Kontrolle des Verlaufs mittels IR-Spektroskopie. Der resultierende Prägefaktor  $\alpha$  beträgt hier ca. 42. Im Vergleich zu den Prägefaktoren von 0,4-2,7 der P3-I bis P3-III Polymere spiegelt dieser einen deutlichen Anstieg der spezifischen Katalyse wieder.

Vergleicht man nun das konventionell hergestellte Polymer P3-ohne mit den Polymeren P3-IV, kann man ebenfalls eine Erhöhung der spezifischen Katalyse erkennen. Da auf eine gleiche Menge Templat pro Volumen Monomermischung geachtet wurde, sollten sich die beiden Polymerarten (konventionell, oberflächengeprägt) hinsichtlich der Anzahl an möglichen Bindungsstellen nicht groß unterscheiden. Dementsprechend deutet der Unterschied in den Geschwindigkeiten auf einen besseren Zugang des Substrates zu den aktiven Kavitäten im Polymer aufgrund der gerichteten Öffnungen hin.

Da katalytische Polymere in der Literatur oftmals aus unterschiedlichen Monomeren bestehen, sehr verschiedene Lösungsmittelzusammensetzungen für die Katalyse verwendet

werden und häufig nur die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  angegeben wird, ist ein umfassender Vergleich mit Daten aus früheren Arbeiten kaum möglich. Der Vergleich mit dem von der Monomerkomposition verwandten Polymer von Yamazaki *et al.* zeigt eine katalytische Rate ( $40 \text{ nmol Paraoxon min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Polymer}$ ), die in der Größenordnung der in dieser Arbeit gefundenen Werte liegt.<sup>[89]</sup>

### 3.3.2. Untersuchungen zur Substratkonzentrations-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

Zur weiteren Charakterisierung der Polymere wurde der Einfluss der Substratkonzentration auf die Umsatzgeschwindigkeit gemessen. Benutzt wurden für diesen Test die Polymere P3-I TSA 005 (MIP) sowie P3-I Kontrolle 005 (NIP).  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Polymer wurden mit verschiedenen Konzentrationen an *p*-Nitrophenylacetat zur Reaktion gebracht und die Reaktionsgeschwindigkeit mittels einer *p*-Nitrophenol-Kalibration berechnet.

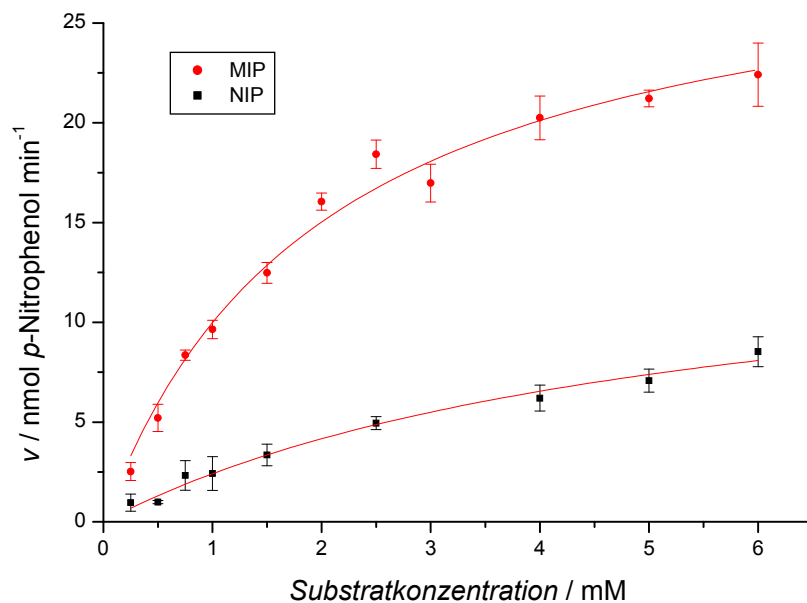


Abbildung 30: Konzentrations-Abhängigkeit der *p*-Nitrophenylacetat-Solvolyse

$50 \mu\text{g ml}^{-1}$  P3-I Kontrolle 005 / TSA 005, 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol.

Die Auftragung der Geschwindigkeit gegenüber der Substratkonzentration zeigte einen hyperbolischen Verlauf, wie ihn eine typische Enzymkinetik nach Michaelis-Menten beschreibt (Abbildung 30). Messungen mit Konzentrationen über 6 mM *p*-Nitrophenylacetat

waren nicht möglich, da in diesem Bereich die Löslichkeitsgrenze in dem gewählten Puffer erreicht war. Eine Regressionsanalyse der Daten nach dem Michaelis-Menten-Modell der Enzymkinetik ergab folgende Parameter:

**Tabelle 11: Apparente kinetische Parameter der *p*-Nitrophenylacetat-Solvolyse**

	$K_M$ (app.) / mM	$v_{max}$ (app.) / nmol min <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>
MIP	2,04 ± 0,25	30,37 ± 1,58	0,98496
NIP	5,33 ± 1,11	15,27 ± 1,83	0,98667

50 µg ml<sup>-1</sup> P3-I Kontrolle 005 / TSA 005, 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol (Abbildung 30).

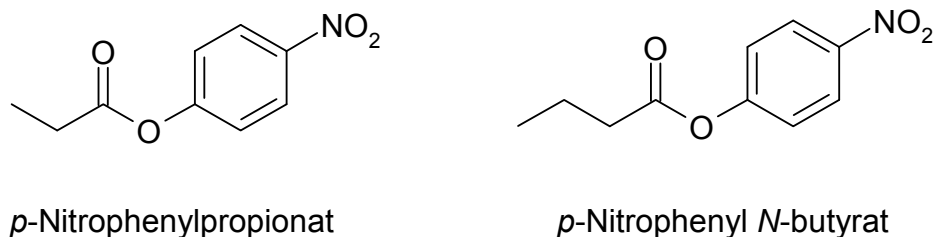
Aufgrund der geringen Löslichkeit des Substrates sowie der Heterogenität der katalytischen Kavitäten können die gewonnenen Daten nur als scheinbare (apparente) Daten behandelt werden. Aus diesen in Tabelle 11 zusammengefassten Daten ist zu erkennen, dass beim geprägten Polymer bei einer Substratkonzentration von 2,04 mM schon die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist. Das Kontrollpolymer hingegen ist erst bei einer Substratkonzentration von 5,33 mM zur Hälfte gesättigt. Dies kann durch die durch das Prägen bedingte Ausrichtung der Substratmoleküle in den Kavitäten des MIP begründet werden. Die Werte im unteren millimolaren Bereich korrelieren ferner sehr gut mit Daten aus anderen Arbeiten, die sich mit der MIP-katalysierten Solvolyse von *p*-Nitrophenolestern beschäftigt haben. Kim *et al.* erreichten mit dem Substrat Cholesteryl-*p*-Nitrophenylcarbonat einen  $K_M$  von 3,7 mM, und Toorisaka *et al.* bei der Hydrolyse von *N*-*t*-*boc*-*L*-Alanin-*p*-Nitrophenylester einen  $K_M$  von 1,63 mM für das geprägte und einem  $K_M$  von 2,05 mM für das ungeprägte Polymer.<sup>[155,198]</sup> Ferner ist auch die Maximalgeschwindigkeit  $v_{max}$  des MIP ungefähr doppelt so groß wie die des NIP. Dass auch das Kontrollpolymer eine Sättigungskinetik zeigt, liegt an vereinzelt, zufällig auf der Oberfläche des Kontrollpolymers entstandenen Bindungsstellen. Der Unterschied in den ermittelten Werten lässt allerdings auf einen guten Prägeefferkt schließen.

### 3.3.3. Untersuchungen zur Substratspezifität der geprägten Polymere

Ferner wurde neben der Solvolyse von *p*-Nitrophenylacetat auch die Umsetzung weiterer Substrate getestet. Dies diente zum einen einer Abschätzung der Spezifität der geprägten Kavität und der daraus resultierenden Morphologie, zum anderen dem Test, ob neben der Esterbindung auch andere Verbindungen mit einem Carbonyl-Kohlenstoffatom gespalten



werden können. Für diese Experimente wurden die Polymere P3-I TSA 007 (MIP) sowie P3-I Kontrolle 007 (NIP) verwendet. Als erstes wurde der Einfluss der Länge des aliphatischen Rests der Säurekomponente im Nitrophenylester an Hand von *p*-Nitrophenylpropionat und *p*-Nitrophenyl *N*-butyrat untersucht (Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Estersubstrate für die Untersuchungen zur Substratspezifität

Hierzu wurden  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Polymer mit 1 mM Konzentrationen der verschiedenen Substrate inkubiert und die Umsatzgeschwindigkeiten mittels einer *p*-Nitrophenolkalibration berechnet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12:** Geschwindigkeiten der Solvolyse mit verschiedenen Substraten

Substrat	$v / \text{nmol min}^{-1}$			Verhältnis	
	Spontan- solvolyse	MIP	NIP	MIP/Spontan- solvolyse	MIP/NIP
<i>p</i> -Nitrophenylacetat	$3,1 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,9$	2,3	1,9
<i>p</i> -Nitrophenylpropionat	$4,0 \pm 0,8$	$6,8 \pm 0,8$	$4,4 \pm 0,3$	1,7	1,5
<i>p</i> -Nitrophenyl <i>N</i> -butyrat	$2,5 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,3$	2,5	1,8

50  $\mu\text{g/ml}$  P3-I Kontrolle 007 / TSA 007, 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 1 mM Substrat.

Zusätzlich zu den Geschwindigkeiten der Solvolyse durch die Polymere ist auch die Spontansolvolyse angegeben, die in Abwesenheit der Polymere in den Lösungen beobachtet werden konnte. Das Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten von MIP zu NIP betrug 1,5 hinsichtlich des Propionatesters und 1,7 bei der Spontansolvolyse. Die Verhältnisse für den Buttersäureester betragen 1,8 bei MIP zu NIP und 2,5 bei MIP zu Spontansolvolyse. Diese Verhältnisse entsprechen ungefähr den Verhältnissen der Solvolyse des Essigsäureesters (MIP/NIP: 1,9; MIP/Spontansolvolyse: 2,3). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Länge des aliphatischen Rests der Säurekomponente keinen großen Einfluss auf die Erkennung des Substrates durch das Polymer und damit auch auf die Geschwindigkeit des Umsatzes hat. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Prägeprozedur, da das

strukturverwandte Templat über die Aminokomponente immobilisiert wurde, deren Lage der der Säurekomponente des Substrates entspricht. Interaktionen zwischen Monomeren und Templat fanden hauptsächlich am Nitrophenolring über  $\pi$ - $\pi$ - und elektrostatische Wechselwirkungen sowie an der Phosphonatgruppe ebenfalls über elektrostatische Wechselwirkungen statt.

Als weitere Substrate wurden zwei Carbamate (Methyl-*N*-(4-Nitrophenyl)-Carbamate, Ethyl-*N*-(4-Nitrophenyl)-Carbamate) sowie zwei Harnstoffderivate (1-Ethyl-3-(4-Nitrophenyl)-Harnstoff, 1,1-Diethyl-3-(4-Nitrophenyl)-Harnstoff) getestet (Abbildung 32). Sie wurden ausgewählt, um zu sehen, ob auch solvolysereibere Verbindungen von dem geprägten Polymer umgesetzt würden.

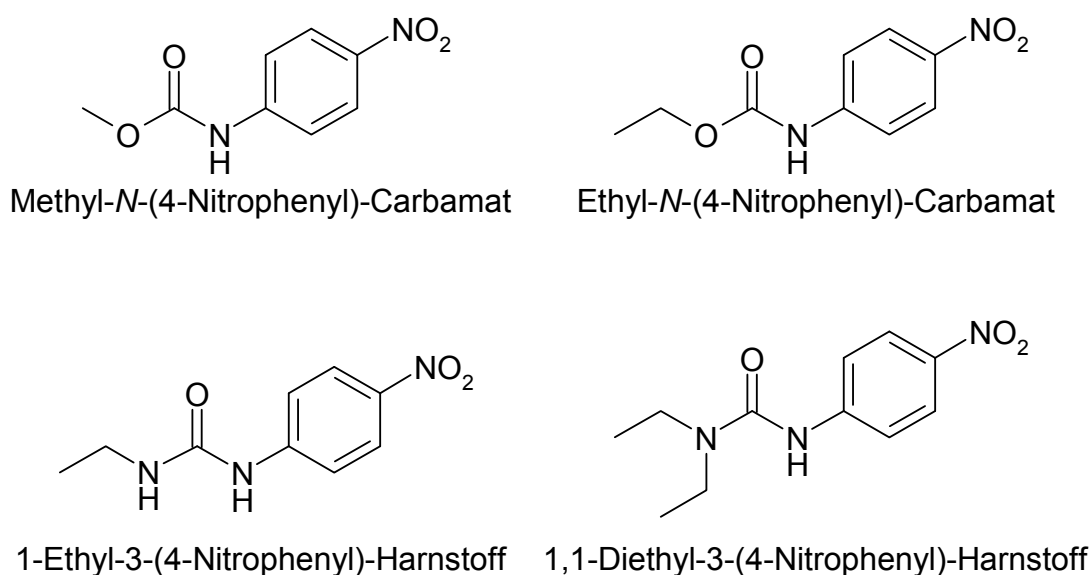
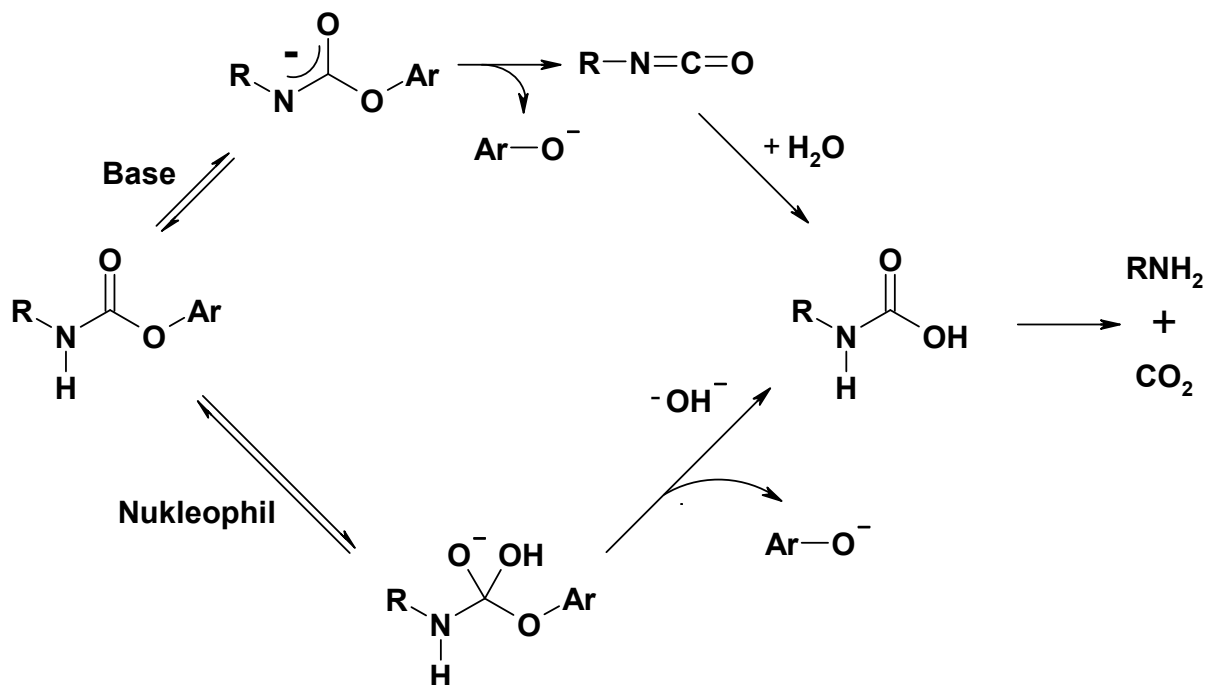


Abbildung 32: Carbamate und Harnstoffderivate als Substrat

Die Inkubationszeit der Substrate mit den Polymeren wurde auf 24 h (RT) ausgedehnt, da erst nach dieser Zeit das durch die Spontansolvolyse freigesetzte *p*-Nitrophenol optisch nachgewiesen werden konnte. Trotzdem wurde mit den Polymeren keine Erhöhung der Solvolyserate festgestellt. Ein Grund dafür ist die delokalisierte Doppelbindung zwischen Carbonyl-Sauerstoff und -Kohlenstoff sowie dem freien Elektronenpaar des Amid-Stickstoffs und die damit verbundene sehr hohe Stabilität der Verbindung. Außerdem wird nur bei Arylcarbamatoren ohne ionisierbares Stickstoffatom der B<sub>AC</sub>2-Mechanismus (Additions-Eliminations-Mechanismus) der basischen Spaltung bevorzugt.<sup>[199,200]</sup> Wegen des verwendeten Übergangszustandsanalogons ist der B<sub>AC</sub>2 Mechanismus der von dem Polymer bevorzugten Katalysemechanismus. Bei Carbamaten mit ionisierbarem Stickstoff findet die

Spaltung über den E1cb-Mechanismus (Eliminations-Additions-Mechanismus) statt (Abbildung 33).

### E1cb Mechanismus (Elimination-Addition)



### BAC2 Mechanismus (Addition-Elimination)

Abbildung 33: Mechanismen der Carbamatspaltung

Schema nach Wentworth *et al.*<sup>[200]</sup>

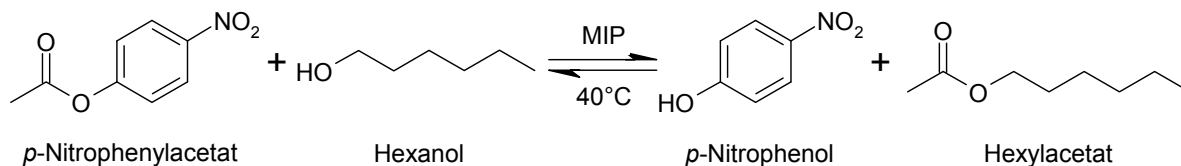
Aus diesen Gründen ist mit den so gefertigten Polymeren kaum eine katalytische Spaltung dieser Substrate zu erwarten.

#### 3.3.4. Untersuchungen zur Umesterung von *p*-Nitrophenylacetat

Das verwendete Übergangszustandsanalogon ähnelt auch der aktivierten Form einer basekatalysierten Umesterungsreaktion. Da dieser Reaktionsmechanismus dem der basischen Estersolvolyse sehr ähnlich ist, wurden Studien zur Umesterung von *p*-Nitrophenylacetat und Hexanol zu *p*-Nitrophenol und Hexylacetat gemacht (Abbildung 34). Schon Meng *et al.* zeigten diese Reaktion mit geprägten, aber ohne immobilisierte Template hergestellten Mikrosphären.<sup>[201]</sup>

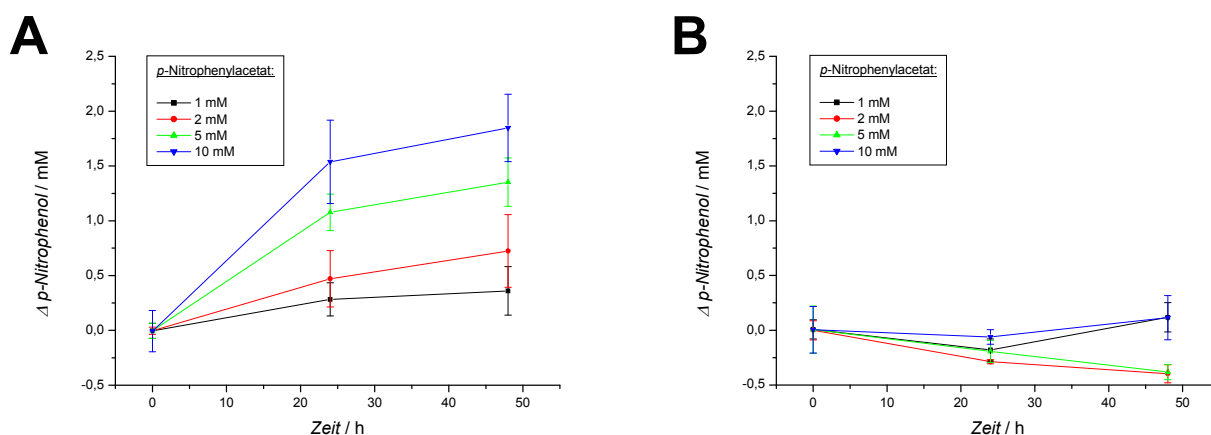
Für die Messungen der Umesterung wurden aus den vorhergehenden Experimenten die Polymere P3-IV TSA 002 sowie P3-IV Kontrolle 001, im Folgenden nur noch als geprägtes

Polymer (MIP), sowie als Kontrollpolymer (NIP) bezeichnet, aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften ausgewählt.



**Abbildung 34:** Reaktion der Umesterung von *p*-Nitrophenylacetat und Hexanol

Hierzu wurden verschiedene *p*-Nitrophenolacetat-Konzentrationen mit 2 mg/ml Polymer in reinem Hexanol bei 40°C inkubiert, alle 24 h eine Probe genommen, mit wässrigem Puffer verdünnt und auf die freigesetzte Menge an *p*-Nitrophenol untersucht (Abbildung 35). Dazu wurde nach verschiedenen Verdünnungsschritten die Absorption von *p*-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.



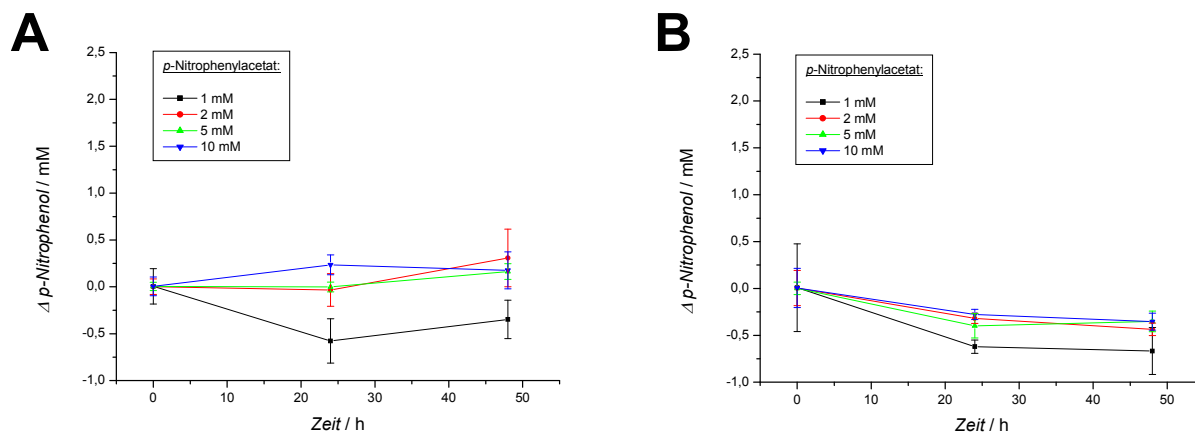
**Abbildung 35:** Umesterung von *p*-Nitrophenylacetat mit Hexanol

Zeitabhängige Messung der Umesterung. 2 mg ml<sup>-1</sup> MIP (**A**), 2 mg ml<sup>-1</sup> NIP (**B**). 40°C, Hexanol (abs.). Werte korrigiert um die *p*-Nitrophenolfreisetzung ohne Polymer.

Wie man aus Abbildung 35 **A** erkennen kann, stieg die Konzentration an freigesetztem *p*-Nitrophenol mit der Zeit zunächst deutlich an, verlangsamte sich dann aber mit fortschreitender Reaktionsdauer. Die Anfangsgeschwindigkeit erhöhte sich dabei mit Zunahme der *p*-Nitrophenylacetatkonzentration.

Der Reaktionsansatz mit dem Kontrollpolymer (Abbildung 35 **B**) zeigte keine Substratumsetzung. Es konnte nur in vernachlässigbaren Mengen *p*-Nitrophenol nachgewiesen werden. Für das geprägte Polymer konnte aus den Anfangsgeschwindigkeiten

ein  $v_{\max}$  von  $1,08 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und ein  $K_M$  von  $10 \text{ mM}$  *p*-Nitrophenylacetat berechnet werden.

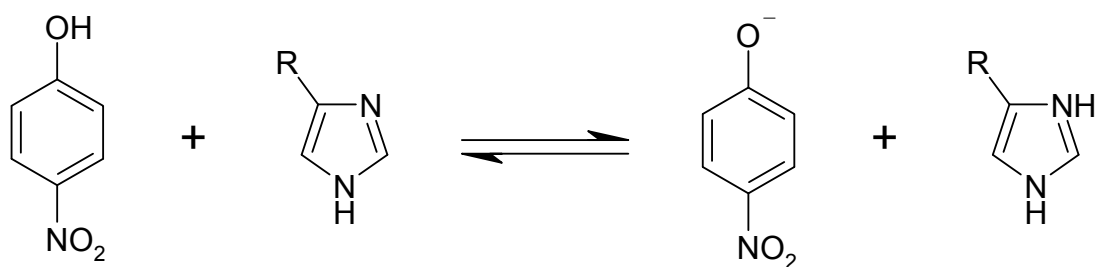


**Abbildung 36: Inhibition der Umesterung mit *p*-Nitrophenol**

Einfluss von  $5 \text{ mM}$  *p*-Nitrophenol auf die Umesterung.  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  MIP (**A**),  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  NIP (**B**).  $40^\circ\text{C}$ , Hexanol (abs.). Werte korrigiert um die *p*-Nitrophenolfreisetzung ohne Polymer und das schon in der Lösung vorhandene freie *p*-Nitrophenol.

Durch den Zusatz von *p*-Nitrophenol zum Reaktionsansatz wurde die Umesterung fast komplett inhibiert. In Abbildung 36 **A** kann beobachtet werden, dass mit Hilfe des MIP über den Zeitraum von 48 h kaum *p*-Nitrophenol freigesetzt wurde. Auch im Reaktionsgemisch mit dem Kontrollpolymer (Abbildung 36 **B**) wurde keine Erhöhung der *p*-Nitrophenol-Konzentration festgestellt.

Ursachen für dieses Verhalten können darin liegen, dass mit dem vorhandenen *p*-Nitrophenol das Gleichgewicht schon auf der Seite der Produkte liegt, und kein weiteres *p*-Nitrophenol mehr freigesetzt werden kann. Weiter ist es vorstellbar, dass das zugesetzte *p*-Nitrophenol als starke Base die im Polymer vorhandenen Imidazolreste protoniert und damit eine Bindung des Substrates in der aktiven Tasche inhibiert (Abbildung 37)



**Abbildung 37: Protonierung von Imidazolresten durch *p*-Nitrophenol**

Ein Vergleich mit den von Meng *et al.* veröffentlichten Werte ( $v_{\max}$ :  $14,3 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  und  $K_M$ :  $86,1 \text{ nM}$ ) war aufgrund des nicht angegebenen Volumens des Reaktionsansatzes nicht möglich.

Durch die optischen Messungen der *p*-Nitrophenol-Freisetzung konnte erstmalig gezeigt werden, dass katalytisch aktive Polymere nach der Methode des Oberflächenprägens erhalten werden können. Der Zusatz von Polymer zu einer Substratlösung resultierte in einer deutlich erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit nicht nur gegenüber der spontanen Solvolyse, sondern auch gegenüber der Umsetzung durch das Kontrollpolymer.

Als Lösungsmittel für die zu katalysierende Reaktion war ein Phosphatpuffer pH 7,5 mit 10% Methanol am besten geeignet, da sich hierbei ein optimales Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten von niedriger Spontansolvolyse zu katalysierter Reaktion einstellte. Bei den P3-I TSA Polymeren wurden im Durchschnitt Umsatzraten von  $108 \text{ nmol } p\text{-Nitrophenol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  gemessen und ein durchschnittlicher Prägefaktor von  $\alpha=2,7$  erhalten. Durch eine weitere Optimierung der Polymerherstellung (P3-V Polymere) hinsichtlich der Templatimmobilisierung konnte der Faktor zwischen durch MIP und NIP katalysierter Reaktion auf  $\alpha=42,3$  gesteigert werden. Eine Messung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der *p*-Nitrophenylacetatkonzentration ergab einen hyperbolischen Verlauf, wie er für enzym-katalysierte Reaktionen typisch ist. Dieses Verhalten gibt einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein von spezifischen katalytischen Zentren im geprägten Polymer. Die durch diese Methode gefundenen Reaktionsgeschwindigkeiten und Parameter für hydrolytische Polymere (siehe auch Tabelle 3) entsprechen den aus der Literatur bekannten Daten von Yamazaki *et al.* ( $40 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  und Kim *et al.* ( $K_M = 3,7 \text{ mM}$ )).<sup>[89,155]</sup> Um noch bessere katalytisch aktive Polymere zu erhalten, müssten die Anzahl der spezifisch aktiven Taschen erhöht und die Geometrie sowie die räumliche Anordnung der funktionellen Monomere in den Taschen noch besser auf das Substrat angepasst werden.

Ferner konnte aus Studien zur Substratspezifität geschlossen werden, dass durch die Methode des Oberflächenprägens die Herstellung einer definierten Öffnung der Kavität zum Lösungsmittel möglich ist. Mit diesen Ergebnissen war es nun möglich, die erhaltenen Polymere in einer Sensoranordnung einzusetzen.

### 3.4. Charakterisierung der Polymere im Thermistor

Es sollte überprüft werden, ob es möglich ist, die katalytische Aktivität von geprägten Polymeren direkt aufgrund der mit der Reaktion verbundenen Temperaturänderung mit einem Thermistor zu verfolgen. Ferner sollte überprüft werden, ob auch Bindungsereignisse durch Temperaturänderungen aufgrund Adsorptions- und Desorptionsereignissen verfolgt werden können.

Als Substrat für die Messungen im Thermistor wurde Phenylacetat genutzt. Dieses Substrat hat eine geringere Eigensolvololyse als der korrespondierende, durch eine *p*-Nitrogruppe aktivierte Phenylester und ist in Puffer mit 10% Methanol in millimolaren Konzentrationen löslich. Als Produkt wird Phenol freigesetzt, welches zusätzlich mittels einer Tyrosinase-Elektrode detektiert werden kann und in der erwarteten Produktkonzentration keine Produktinhibition zeigt, wie es für andere Substrate berichtet wurde.<sup>[158]</sup> Generell sind die katalytischen Raten für Phenylacetat niedriger als die für NPA veröffentlichten Werte.<sup>[202]</sup> Der Grund liegt in der elektronenziehenden Natur der *p*-Nitrogruppe am Phenolring und der dadurch erleichterten Hydrolisierbarkeit von *p*-Nitrophenylacetat (NPA) im Gegensatz zu Phenylacetat (PA).<sup>[164]</sup>

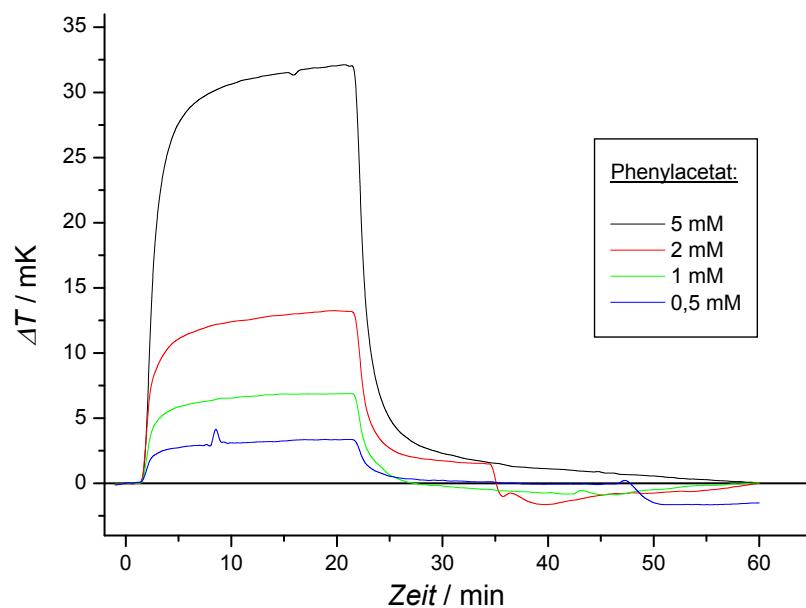
Der Temperaturunterschied zwischen den beiden Thermistoren wird von dem Messgerät als Spannung im Bereich von -1 bis +1 V ausgegeben und in eine Temperaturdifferenz umgerechnet.

Der Enzymthermistor wurde so kalibriert, dass eine Erwärmung des Reaktors mit dem aktiven Material gegenüber dem Referenz-Reaktor eine positive Temperaturdifferenz ergibt. Ein positiver Signalausschlag bedeutet eine Erwärmung des mit aktivem Material gefüllten Reaktors oder eine Abkühlung des Referenz-Reaktors, da nur die Differenzen der beiden Thermistoren gemessen werden. Ein negativer Ausschlag würde die entgegen gesetzten Ursachen haben.

Zur Untersuchung der geprägten Polymere wurde Substratlösung in konstantem Strom über das aktive Material geleitet, bis sich ein stationärer Zustand des Signals einstellte.

### 3.4.1. Kontrolle und Vergleich durch Esterase-Immobilisierung

Um das System des Thermistors auf die folgenden Messungen mit den katalytisch aktiven Polymeren einzustellen und zusätzlich Informationen über die zu erwartenden Temperaturänderungen durch die Spaltung von Phenylacetat zu erhalten, wurde der katalytische Umsatz von Phenylacetat durch eine Esterase, die an aminofunktionalisiertem porösem Glas immobilisiert wurde, biosensorisch untersucht. Die Messungen im Thermistor wurden in einem Durchflussreaktor, welcher den Träger mit dem Enzym enthielt, durchgeführt. Die Signal / Zeit-Antwort zeigt den typischen Kurvenverlauf, der schon früher für Enzymreaktionen berichtet wurde (Abbildung 38).<sup>[184]</sup> Es wurden weder nach Substrat- noch nach Puffer-Injektion Peaks beobachtet, was auf keine messbaren Temperaturunterschiede durch Adsorptions- und Desorptionsprozesse hindeutet.



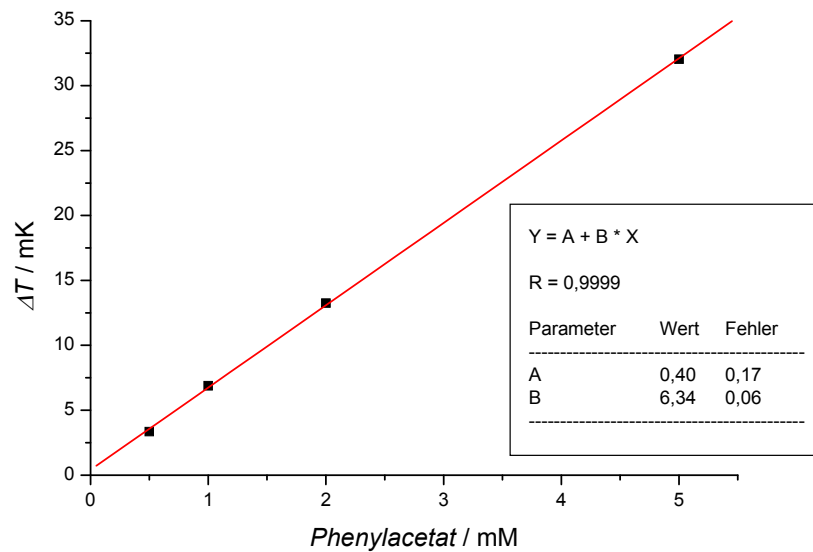
**Abbildung 38: Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit immobilisierter Esterase im Reaktor**

Änderung der Temperatur durch den Umsatz von Phenylacetat in verschiedenen Konzentrationen. 250 mg Träger mit immobilisierter Esterase im Reaktor. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1 ml min<sup>-1</sup>.

Dies ist durch die hydrophile Oberfläche der funktionalisierten Partikel erklärbar. Es wurde eine lineare Abhängigkeit des stationären Signals im Bereich von 0,5 bis 5 mM Phenylacetat beobachtet (Abbildung 39). Die Signale wurden nach 20 min gemessen und gegen die Konzentration an Phenylacetat aufgetragen. Durch Bestimmung der Phenolkonzentration



hinter dem Thermistor mit Hilfe einer Tyrosinaselektrode wurde ein Umsatzgrad von nahezu 100% errechnet.



**Abbildung 39: Konzentrations-Abhängigkeit der Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit immobilisierter Esterase**

Durch diese Untersuchung konnte bestätigt werden, dass die Spaltung von Phenylacetat exotherm verläuft. Der Signalverlauf entsprach der aus der Literatur bekannten Kurvenform für enzymatisch katalysierte Reaktionen in einem Fließsystem mit ständiger Substratzuführung. Im untersuchten Konzentrationsbereich lag eine lineare Abhängigkeit der Temperaturänderung vor.

### 3.4.2. Temperaturmessungen mit Polymer im Reaktor

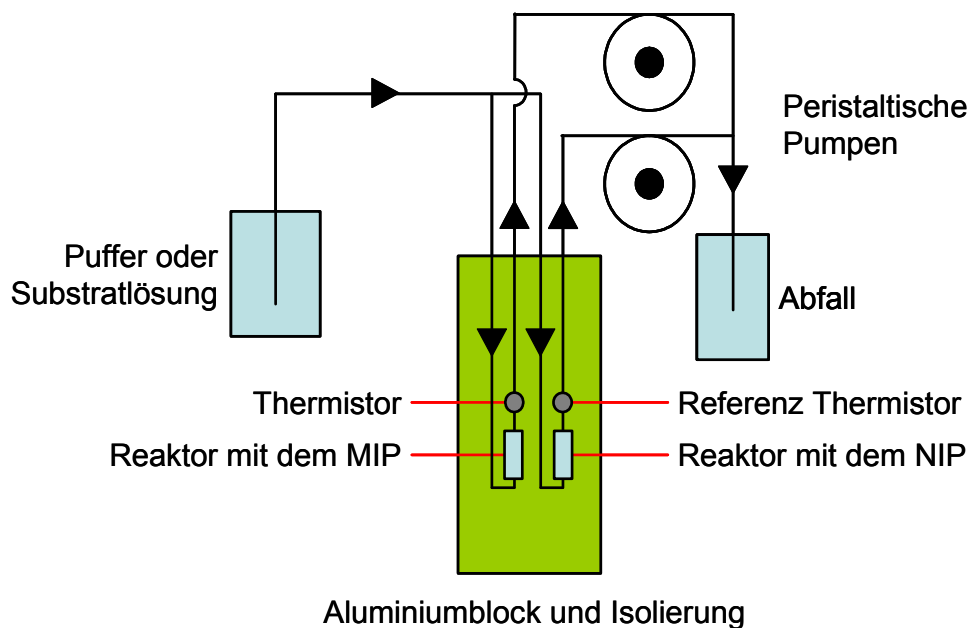
Für die Messungen im Thermistor wurden aus den vorhergehenden Experimenten die Polymere P3-IV TSA 002 (MIP) sowie P3-IV Kontrolle 001 (NIP) wegen des hohen Prägefaktors  $\alpha$  bei der Katalyse ausgewählt.

### 3.4.2.1. Messungen mit 50 mg Polymer je Reaktor

#### Differentielle Messungen:

Um die Aktivität der Polymere mittels eines Enzymthermistors messen und direkt MIP und NIP vergleichen zu können, wurde eine Messanordnung mit zwei Reaktoren gewählt, bei denen beide parallel zueinander von Laufpuffer sowie Substratlösung durchflossen werden konnte (Abbildung 40). Durch diese Anordnung werden nur die Unterschiede der Temperaturen zwischen dem geprägten und dem Kontrollpolymer aufgezeichnet. Unspezifische Wechselwirkungen, die in beiden Sensoren gleich große Effekte hervorrufen sollten, fließen so nicht in das Differenzsignal ein.

In diesem Fall wurde der Puffer- / Substratstrom durch einen Flussteiler vor den Reaktoren getrennt und dann durch die Reaktoren und an den Sensoren mittels zweier peristaltischer Pumpen mit einer Fließgeschwindigkeit von  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$  vorbei geleitet. Dies war notwendig, damit in beiden Reaktoren ein gleicher Fluss herrschte. Bei nur einer Pumpe könnten sich Differenzen in der Fließgeschwindigkeit aufgrund leicht verschiedener Packungsdichten ergeben.



**Abbildung 40:** Schematischer Aufbau für differenzielle Messungen im Thermistor

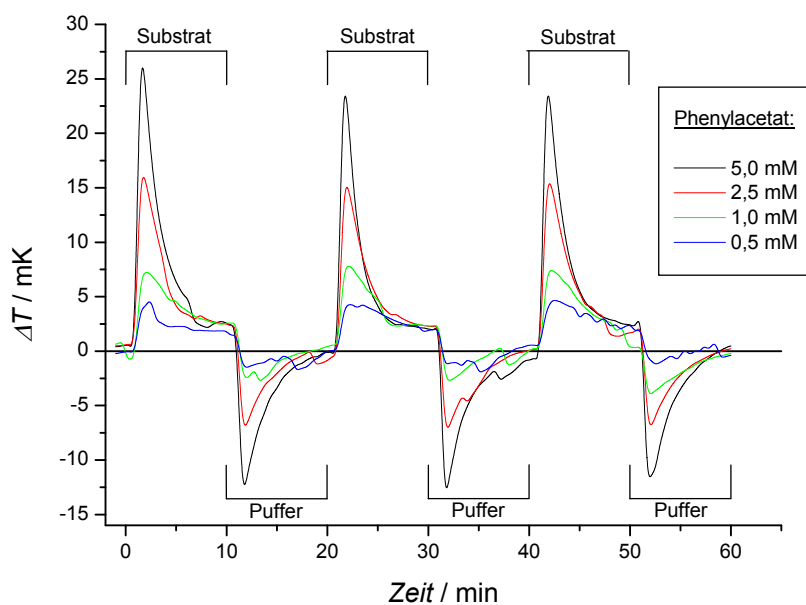
Das für die folgenden Messungen verwendete Injektionsschema ist in Tabelle 13 angegeben. Durch die kurze Dauer einer Messung (Injektion und Spülung: 20 min) konnten mit einem Substratansatz gleich Dreifachbestimmungen erhalten werden, ohne dass sich die durch spontane Solvolyse leicht verminderte Substratkonzentration im Probengefäß auf die

Messungen auswirkt. Es wurden jeweils 50 mg MIP, beziehungsweise 50 mg NIP in einen 500  $\mu$ l-Reaktor gegeben und an den Enden mit zwei Fritten verschlossen.

**Tabelle 13: Zeitschema für Substratzugabe mit 50 mg Polymer**

t / min	
-1	Start der Datenaufnahme mit Puffer
0	Substrat
10	Puffer
20	Substrat
30	Puffer
40	Substrat
50	Puffer
60	Stopp der Datenaufnahme

Bei Injektion des Substrates trat eine von der Konzentration abhängige positive Temperaturdifferenz in Form eines Peaks in den ersten 5 min auf, der dann auf ein Plateau hin abfiel (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit 50 mg Polymer (differenziell)**

Änderung der Temperatur durch den Umsatz von Phenylacetat in verschiedenen Konzentrationen. 50 mg MIP sowie 50 mg NIP in den Reaktoren. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1,5 ml min<sup>-1</sup>.

Nach dem Wechsel von Substratlösung auf Substrat-freien Puffer kam es erneut zu einer Temperaturänderung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, allerdings in negativer Richtung. Diese Peaks traten bei den vorhergehenden Esterase-Experimenten nicht auf und haben damit ihren Ursprung in den Eigenschaften des Polymers.

Die schon mit der Esterase beobachtete katalysierte Reaktion konnte auch mit dem geprägten Polymer in Form eines Plateaus mit positiver Temperaturdifferenz beobachtet werden. Die Höhe des Plateaus sollte hier wie auch bei der durch die Esterase katalysierten Reaktion die Substratkonzentration widerspiegeln.<sup>[184]</sup> Allerdings konnte keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Gründe dafür könnten zu kleine Unterschiede aufgrund einer zu geringen Menge aktiven Materials im Thermistor, eine zu hohe Fließgeschwindigkeit oder auch eine Sättigung mit Substrat im untersuchten Konzentrationsbereich sein.

Die positiven, peakförmigen Kurvenauschläge am Anfang jeder Substratinjektion, sowie die negativen nach dem Wechsel zu Substrat-freiem Puffer scheinen darauf hinzudeuten, dass es sich hierbei um Adsorptions- und Desorptionsprozesse des Substrates in den Kavitäten auf der Oberfläche des Polymers handelt.

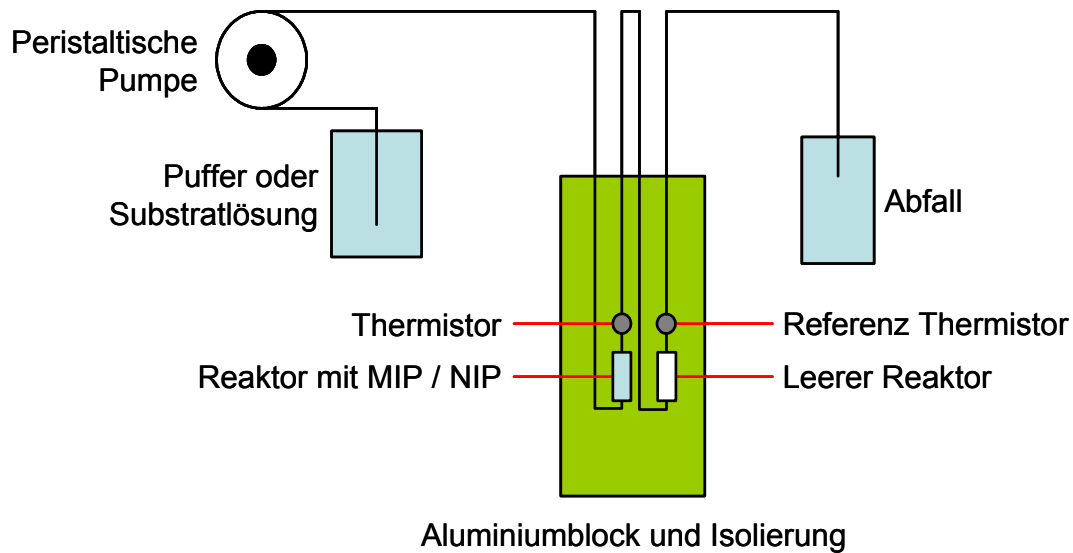
Durch die Bindung des Substrates an das Polymer wird dem System Energie zugeführt, die sich in einer Temperaturerhöhung bemerkbar macht, während seine Freisetzung dem System Energie entzieht (Temperaturerniedrigung). Die Adsorption / Desorption von Substrat an die Oberfläche muss beim geprägten Polymer größer als bei der Kontrolle sein, da die beiden Thermistoren an den Reaktoren ansonsten eine gleiche Temperaturerhöhung messen würden und das Signal sich auslöschten würde. Daher müssen diese reversiblen Bindungsprozesse auf spezifische Kavitäten, die durch das molekulare Prägen entstanden sind, zurückzuführen sein.

#### Sequentielle Messungen:

Um nicht mehr nur das direkte Differenzsignal von beiden Polymeren zu erhalten, sondern die Signale der einzelnen Polymere, wurde der Reaktor mit dem Kontrollpolymer gegen einen polymerfreien Reaktor ausgetauscht (Abbildung 42). Durch diese aufeinander folgenden Messungen mit MIP und NIP können durch Katalyse und Bindung verursachte Temperaturänderungen an beiden Polymeren besser verfolgt und so Gründe für das Gesamtsignal den einzelnen Komponenten zugeordnet werden.

Durch das Entfernen des Kontrollpolymers aus dem zweiten Reaktor konnte auch das Fließsystem vereinfacht werden. Es wurde nur noch eine peristaltische Pumpe eingesetzt, die den Pufferstrom nun als erstes durch den polymergefüllten Reaktor und anschließend durch den leeren Reaktor befördert. Das Pumpen hat gegenüber dem Saugen außerdem den großen

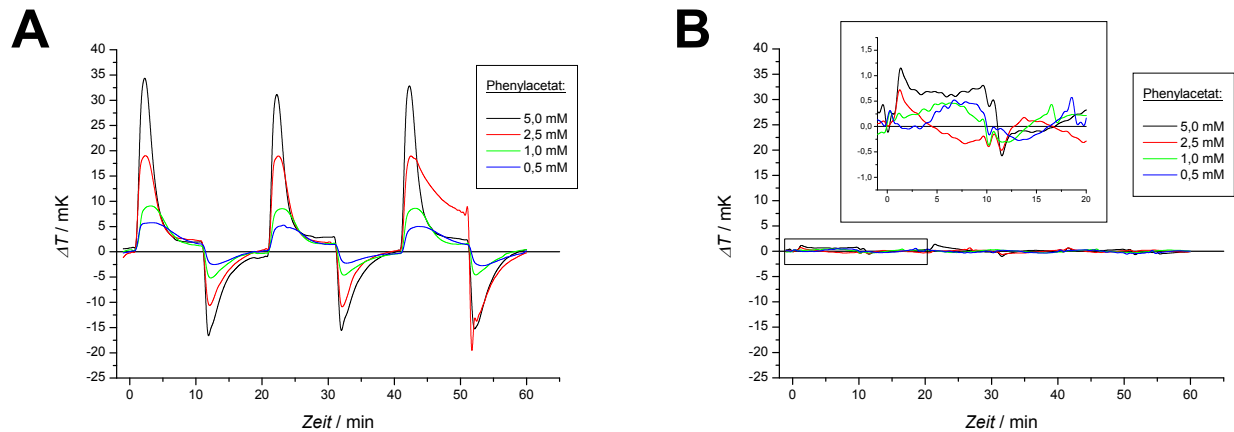
Vorteil, dass sich weniger Luftblasen in den Schläuchen aufgrund winziger Undichtigkeiten bilden können. Dies resultiert in einem verringerten Rauschen und damit einer besseren Signalauflösung. Die Injektionszeiten (Tabelle 13), Polymermengen im Reaktor, sowie die Fließgeschwindigkeit ( $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ ) wurden nicht verändert.



**Abbildung 42:** Schematischer Aufbau für sequenzielle Messungen im Thermistor

Als erstes wurde die Abhängigkeit des Signals mit geprägtem Polymer von der Substratkonzentration untersucht (Abbildung 43 **A**). Wie schon bei den differentiellen Messungen wurde eine konzentrationsabhängige Temperaturerhöhung in Form eines Peak innerhalb der ersten 5 min nach Substratzugabe festgestellt, wobei das Signal dann anschließend auf ein Plateau abfällt. Nach Wechsel zum Substrat-freien Puffer wurde eine negative Temperaturdifferenz aufgezeichnet, die durch Desorptionsvorgänge von Substrat aus den Kavitäten des geprägten Polymers erklärt werden kann. Die Höhe des Peaks war auch bei diesen Messungen von der vorhergehenden Substratkonzentration abhängig. Allerdings konnte bei der Bestimmung der Solvolyseaktivität des geprägten Polymers keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit des Signals festgestellt werden.

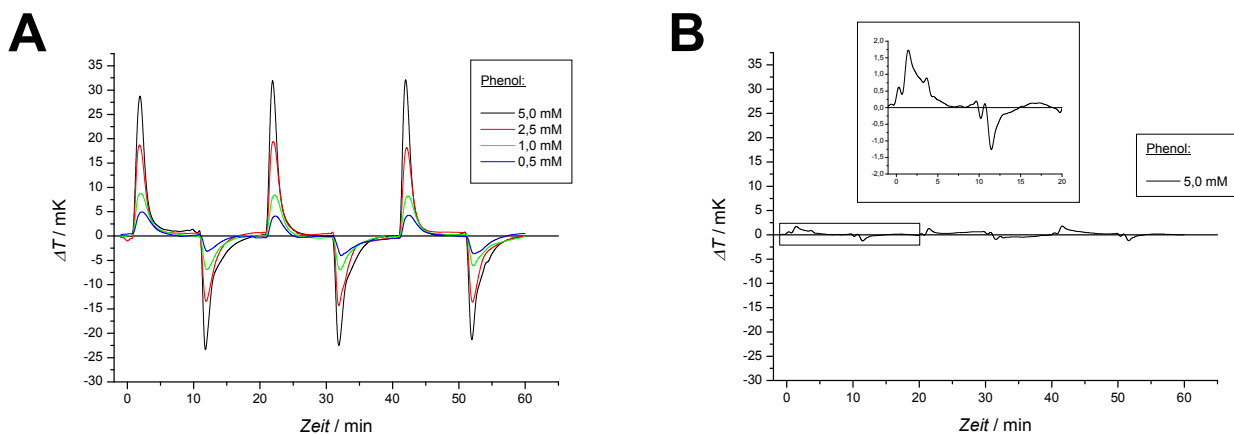
Das nicht geprägte Polymer (Abbildung 43 **B**) zeigte bei Substratzugabe nur eine sehr geringe Signaldifferenz. Weder Temperaturänderungen durch Adsorptions- und Desorptionsvorgänge, noch katalytische Aktivitäten konnten quantifiziert werden.



**Abbildung 43: Temperaturänderungen durch Phenylacetat-Solvolyse mit 50 mg Polymer**

Änderung der Temperatur durch den Umsatz von Phenylacetat in verschiedenen Konzentrationen. 50 mg MIP (**A**), 50 mg NIP (**B**) im Reaktor. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1,5 ml min<sup>-1</sup>.

Um Temperaturänderungen bei der Wechselwirkung des Produktes Phenol mit dem Polymer zu untersuchen, wurde analog zu den Messungen mit Phenylacetat der Reaktionsverlauf mit verschiedenen Phenolkonzentrationen verfolgt und die Signale aufgezeichnet (Abbildung 44).



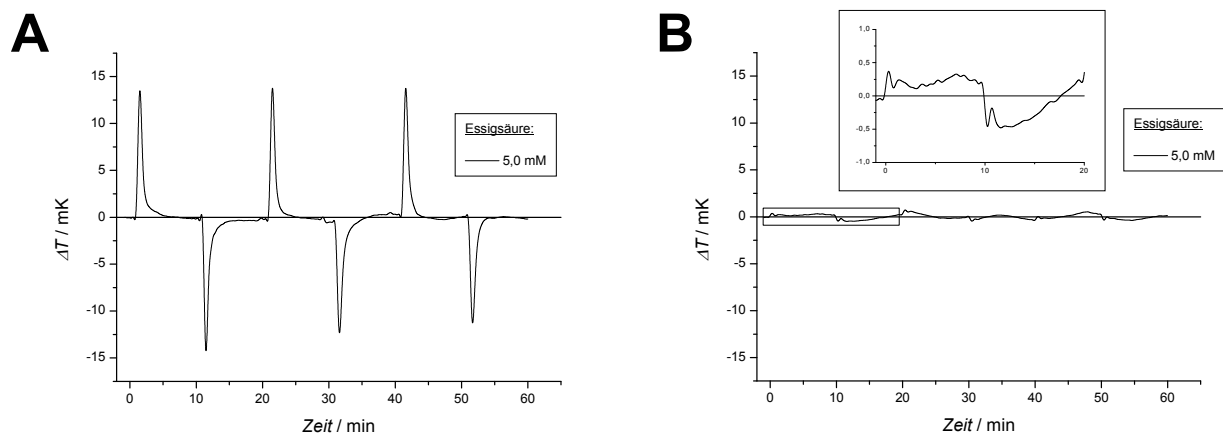
**Abbildung 44: Temperaturänderungen durch Bindung und Desorption von Phenol an 50 mg Polymer**

Änderung der Temperatur durch die Wechselwirkung von Phenol in verschiedenen Konzentrationen mit 50 mg MIP (**A**), 50 mg NIP (**B**) im Reaktor. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1,5 ml min<sup>-1</sup> statt.

Auch dabei konnte beobachtet werden, dass in den ersten 5 min ein Peak auftrat, der vergleichbar mit den Signalen aus den Messungen mit Phenylacetat war. Im Unterschied dazu fiel dieser Peak schnell wieder auf das Niveau der Basislinie zurück. Bei anschließender Pufferinjektion zeigte sich auch hier eine negative Temperaturdifferenz. Das Kontrollpolymer

hingegen zeigte selbst bei der höchsten Konzentration nur ein kaum auswertbares Signal (Abbildung 44 **B**).

Auch das zweite Produkt der Reaktion – Essigsäure – wurde hinsichtlich seiner Interaktionen mit dem Polymer untersucht. Nach Injektion von 5 mM Essigsäure zeigte das Signal einen sehr scharfen Peak, der sofort wieder auf das Niveau der Basislinie hin abfiel (Abbildung 45 **A**). Auch bei dieser Messung sah man ein negatives Signal, beim Umschalten auf den Laufpuffer. Das Kontrollpolymer zeigte keinerlei Interaktion mit der zugeführten Substanz (Abbildung 45 **B**).



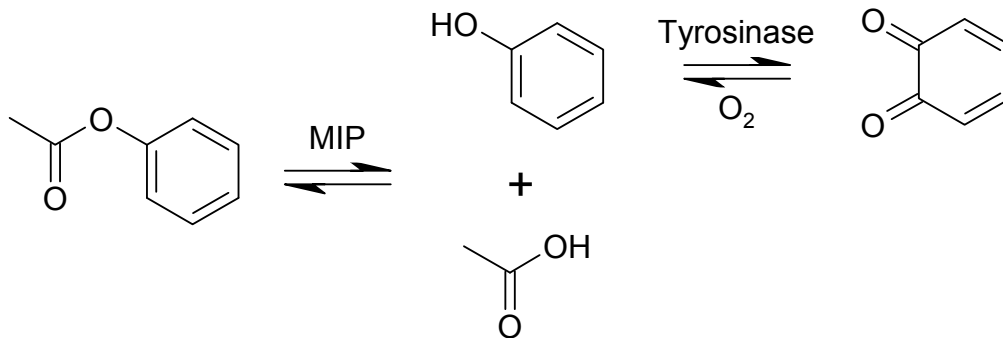
**Abbildung 45: Temperaturänderungen durch Bindung und Desorption von Essigsäure an 50 mg Polymer**

Änderung der Temperatur durch die Wechselwirkung von 5 mM Essigsäure mit 50 mg MIP (**A**), 50 mg NIP (**B**) im Reaktor. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1,5 ml min<sup>-1</sup>.

Somit scheint eine Anlagerung des phenolischen Rests des Phenylacetats an das Polymer vorzuliegen. Aus diesen Messungen kann also geschlussfolgert werden, dass nur das geprägte Polymer im untersuchten Konzentrationsbereich Interaktionen mit sowohl dem Substrat als auch mit den aus der Reaktion entstehenden Produkten aufweist. Dies deutet auf einen starken Prägeeffekt durch die Verwendung des TSA während der Polymerisation hin. Weiter zeigt nur das Substrat, analog zur Reaktion mit Esterase, eine über die Zeit stabile Temperaturerhöhung. Die Ergebnisse legen nahe, dass Katalyse und Bindung von verschiedenen Substanzen mittels eines Thermistors beobachtet werden können. Allerdings können die Temperaturdifferenzen mit diesem System noch nicht quantitativ ausgewertet werden.

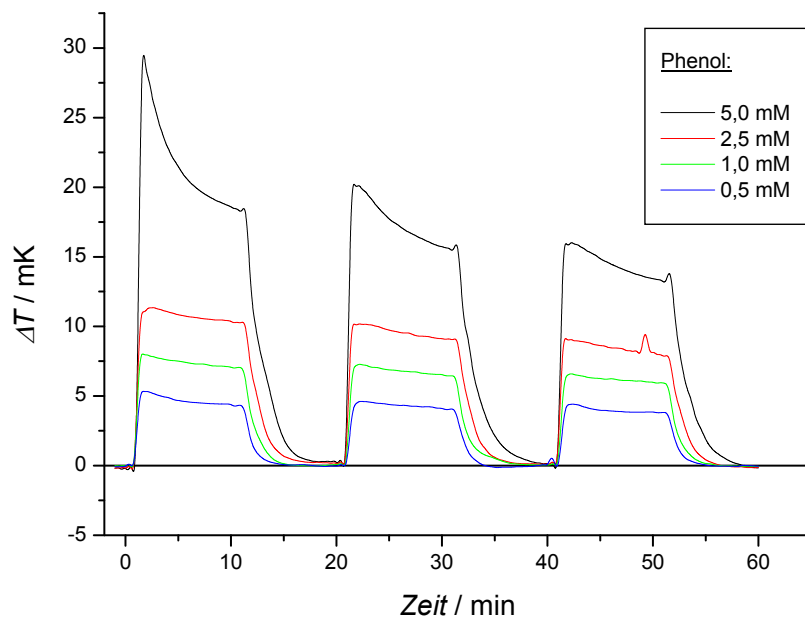
### Verstärkung des Signals der Katalyse mittels immobilisierter Tyrosinase:

Um eine Verstärkung des Signals der Katalyse zu erreichen, wurde eine Reaktionsfolge nach folgendem Schema durchgeführt (Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Reaktionsschema zur Verstärkung des Signals mittels Tyrosinase

Phenylacetat wird als erstes durch das katalytisch aktive Polymer in Essigsäure und Phenol gespalten. Dieses freigesetzte Phenol wird nun von einer immobilisierten Tyrosinase unter  $O_2$ -Verbrauch zum *ortho*-Benzochinon oxidiert. Die daraus resultierende Temperaturerhöhung ist proportional zur vorhandenen Phenolkonzentration, die durch die katalytische Aktivität des Polymers erzeugt wird.



**Abbildung 47:** Temperaturerhöhung durch Phenoloxidation mit immobilisierter Tyrosinase im Reaktor

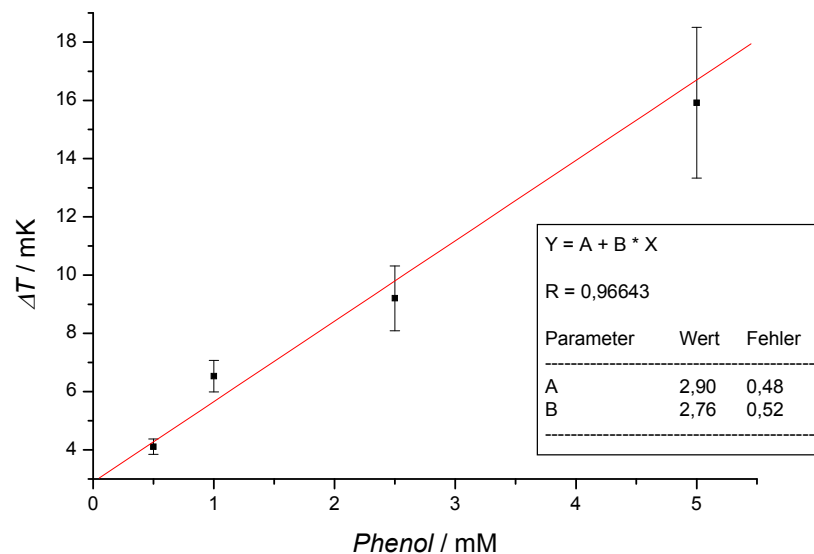
Änderung der Temperatur durch die Oxidation von Phenol in verschiedenen Konzentrationen. 50 mg Träger mit immobilisierter Tyrosinase im Reaktor. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1,5 ml min<sup>-1</sup>.



Um diese Reaktion zu testen wurde Tyrosinase auf einem porösen Glaträger mittels einer Glutardialdehyd-Kopplung immobilisiert.<sup>[203]</sup> Anschließend wurden 50 mg des Immobilisats in den Reaktor gefüllt und bei einer Fließgeschwindigkeit von  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$  mit dem Injektionsschema aus Tabelle 13 verschiedenen Phenolkonzentrationen ausgesetzt (Abbildung 47). Der pH-Wert des eingesetzten Puffers, sowie das zugesetzte Methanol entsprachen nicht den optimalen Bedingungen der Tyrosinase, mussten aber benutzt werden, damit das MIP aktiv war.

Die Phenolinjektion resultierte in einem Plateau des Signals, die einem konzentrationsabhängigen Plateau der Temperaturänderung entsprach. Bei drei aufeinander folgenden Substratinjektionen war zu beobachten, dass das Signal bei gleicher Konzentration leicht abnahm. Ein Grund dafür kann die generell geringe Stabilität von Tyrosinasen sein, bei denen bei  $30^\circ\text{C}$  die Aktivität innerhalb von 4 Stunden um 50% abnehmen kann.<sup>[204]</sup>

Trägt man die Temperaturänderung gegen die Substratkonzentration auf, erhält man im gewählten Konzentrationsbereich eine lineare Abhängigkeit (Abbildung 48).



**Abbildung 48: Konzentrations-Abhängigkeit der Temperaturänderung durch Phenoloxidation mit immobilisierter Tyrosinase**

Um beide Reaktionen miteinander zu koppeln, müssen beide katalytisch aktiven Substanzen in den Reaktor eingebracht werden. Dies wird durch eine so genannte Registerladung mit räumlicher Trennung von Polymer und Enzymimmobilisat erreicht, die schematisch in Abbildung 49 dargestellt ist. Die Substratlösung fließt zuerst durch ein Kompartiment im Reaktor mit dem Polymer und anschließend, durch einen Filter getrennt, durch das Kompartiment mit der immobilisierten Tyrosinase.

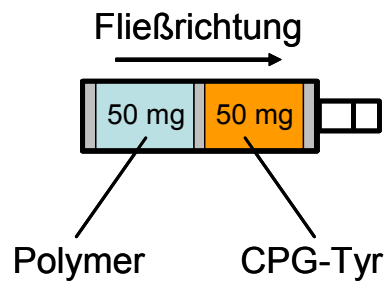


Abbildung 49: Registerladung mit Polymer und immobilisierter Tyrosinase

Dies hat den Vorteil, dass im Gegensatz zu einer Vermischung von Polymer und Enzymträger das Polymer leicht vom inaktivierten Enzym abgetrennt und wiederverwertet werden kann. Als nachteilig ist hierbei anzusehen, dass durch eine stärkere räumliche Nähe eine größere Empfindlichkeit erreicht werden könnte, da sich ein Temperaturgradient entlang der Flussrichtung im Reaktor aufgrund von geringen Wärmeverlusten über die Reaktorhülle nicht vermeiden lässt. So wird schon ein Teil der Solvolysewärme, die durch das Polymer gebildet wird, an die Umgebung abgegeben. Trotzdem wurde die räumliche Trennung der Mischung vorgezogen, da eine Wiederverwertbarkeit des Polymers im Vordergrund stand.

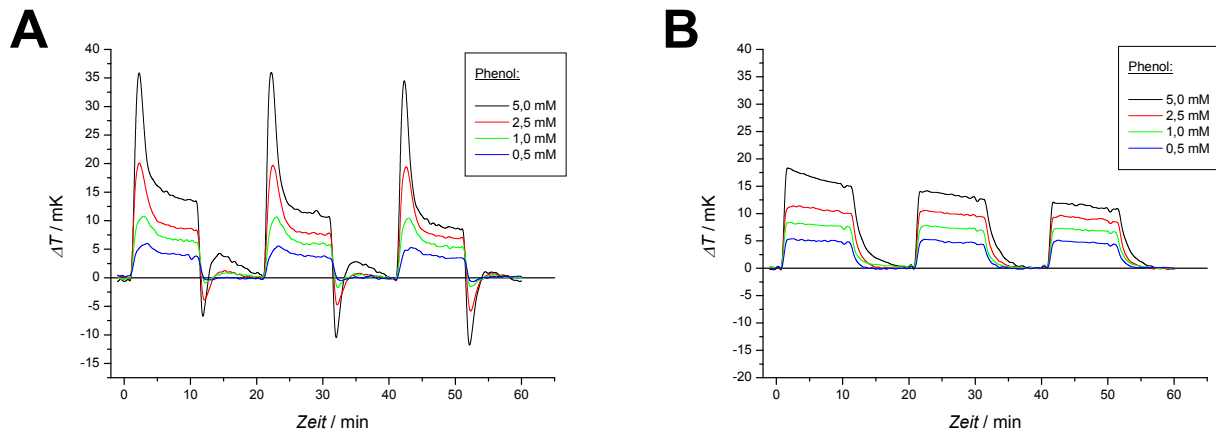
Die Reaktionsschritte in diesem Thermistoraufbau lassen sich in folgender Gleichung zusammenfassen:



Da beides katalytische Reaktionen sind, müsste für jede dieser Teilreaktionen die Michaelis-Menten-Gleichung gelten. Weil das Temperatursignal der Oxidation von Phenol durch die Tyrosinase im gewählten Konzentrationsbereich linear von der Phenolkonzentration abhängig ist, kann man aber eine Reaktion erster Ordnung annehmen.

Diese lineare Abhängigkeit ist wichtig, da eine proportionale Verstärkung des Signals der katalytischen Aktivität erreicht werden soll. In der Sättigung gäbe es nur ein konstantes Signal, unabhängig wie viel Phenol durch das Polymer freigesetzt wird.

Als erstes wurde der Hybridreaktor mit geprägtem Polymer und immobilisierter Tyrosinase befüllt und die Temperaturänderungen bei verschiedenen Phenolkonzentrationen gemessen, um den Einfluss der Phenoladsorption des Polymers auf die Umsetzung von Phenol zu *o*-Chinon durch das Enzym zu testen.



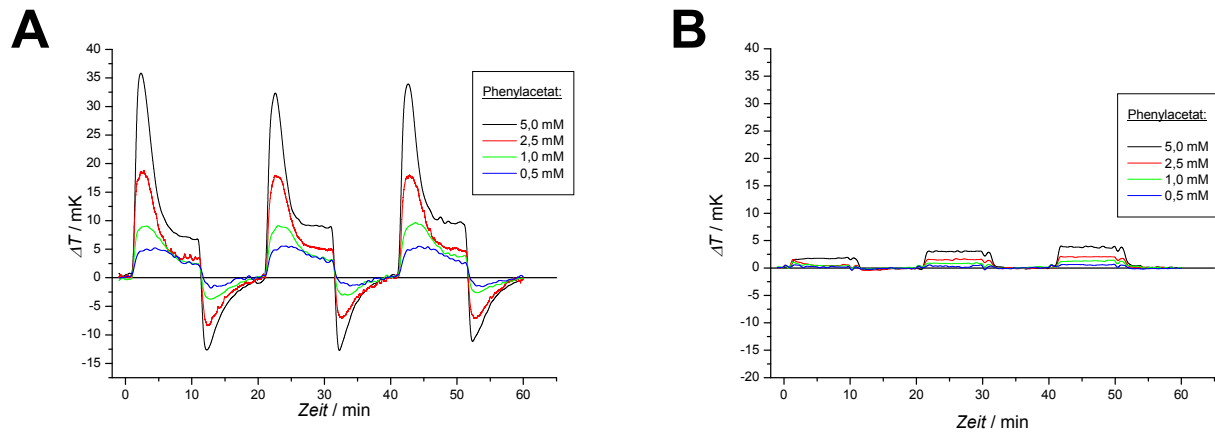
**Abbildung 50: Temperaturänderung durch Phenoloxidation mit Tyrosinase und Polymer im Reaktor**

Änderung der Temperatur durch die Oxidation von Phenol in verschiedenen Konzentrationen. 50 mg Träger mit immobilisierter Tyrosinase und 50 mg MIP (**A**), 50 mg NIP (**B**) im Reaktor. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1,5 ml min<sup>-1</sup>.

Wie schon bei den Versuchen mit den Polymeren ohne gekoppelte Reaktion zeigte sich beim MIP ein scharfer Anstieg des Signals mit einem darauf folgenden Abfall. Dieses Signal ist hauptsächlich der weiter oben beschriebenen Adsorption von Phenol an das geprägte Polymer im Reaktor zuzuschreiben. Allerdings ist nun ein Plateau zu erkennen, das durch die katalytische Aktivität der Tyrosinase hervorgerufen wird (Abbildung 50 **A**). Die Höhe dieses Plateaus ist von der eingebrachten Phenolkonzentration abhängig. Weiter zeigte sich auch hier ein negatives Signal, wenn der Substratfluss durch Puffer ersetzt wurde.

Der Hybridreaktor aus Kontrollpolymer und immobilisierter Tyrosinase zeigte nur das Bild der Phenoloxidierung durch die Tyrosinase, aber nicht die Adsorption und Desorption von Phenol an das Polymer (Abbildung 50 **B**). Die durch die Tyrosinasereaktion bedingte Temperaturdifferenz in der Plateauphase war allerdings genauso hoch wie beim mit MIP und Tyrosinase beladenen Reaktor sowie dem Tyrosinase-Reaktor alleine. Somit hat die Phenoladsorption des Polymers im Reaktor kaum einen Einfluss auf den katalytischen Umsatz von Phenol durch die Tyrosinase. Was allerdings auch bei diesem Experiment, wie bei dem Reaktor mit immobilisiertem Enzym allein auffiel, ist, dass sich die Höhe des Signals im Plateau im Laufe der drei Messungen erniedrigte. Dies ist entweder auf eine zeitlich verringerte Aktivität der Tyrosinase oder eine Produktinhibition zurückzuführen.

Wenn statt Phenol Phenylacetat als Substrat gewählt wurde, zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei Phenol (Abbildung 51 **A**).



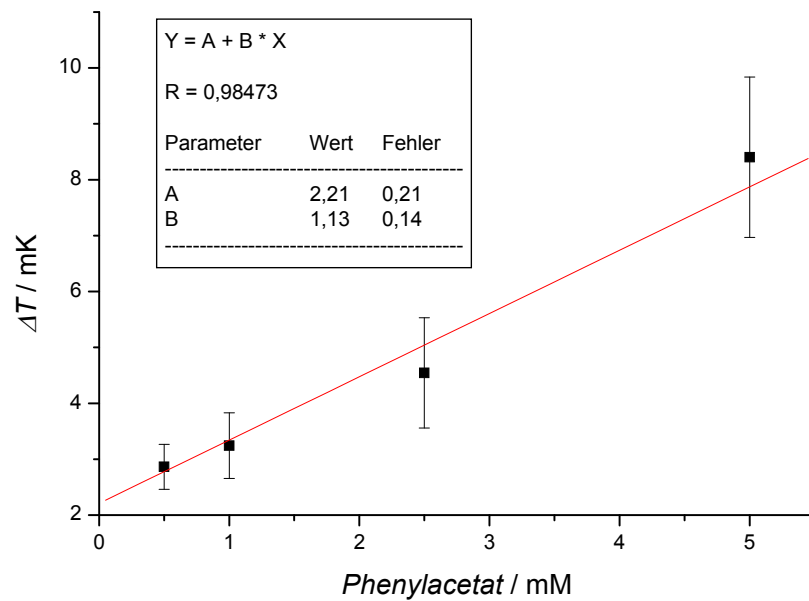
**Abbildung 51: Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit Tyrosinase und Polymer im Reaktor**

Änderung der Temperatur durch den Umsatz von Phenylacetat verschiedener Konzentrationen. 50 mg Träger mit immobilisierter Tyrosinase und 50 mg MIP (**A**), 50 mg NIP (**B**) im Reaktor. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1,5 ml min<sup>-1</sup>.

Erneut war beim MIP-Reaktor in den ersten 5 min ein konzentrationsabhängiges peakförmiges Signal zu erkennen, das dann auf ein Plateau abfiel. Auch war nach dem Wechsel zu Puffer ohne Substrat der negative Kurvenverlauf zu beobachten. Bei dem geprägtem Polymer war im Gegensatz zu den vorhergehenden Messungen mit Phenol allerdings ein eine Erhöhung des Steady-state bei der zweiten und dritten Messung gegenüber der ersten zu beobachten. Dies lässt sich aus der Tatsache herleiten, dass das eingesetzte Phenylacetat im Vorratsgefäß schon einer leichten Selbstsolvolyse unterliegt, wobei im Laufe von 60 min der prozentuale Gehalt an Phenol in der Mischung zunimmt. Der Hybridreaktor mit Kontrollpolymer hingegen zeigte keinerlei Adsorptions / Desorptionssignal, sondern nur die deutlich geringere Temperaturerhöhung in der Plateauphase durch den Umsatz des durch spontane Solvolyse entstandenen Phenols (Abbildung 51 **B**).

Trotzdem scheint in diesem Fall eine Abhängigkeit der Höhe des Plateaus beim geprägtem Polymer von der Phenylacetatkonzentration vorzuliegen (Abbildung 52). Diese Abhängigkeit war allerdings mit einem relativ großen Fehler behaftet und brachte nur partiell die erhoffte Verstärkung der Signale.

Mit diesen Versuchen konnte bestätigt werden, dass durch das NIP kein Phenol aus der Solvolyse von Phenylacetat entsteht. Die Ergebnisse hinsichtlich der Katalyse durch das MIP waren allerdings immer noch unbefriedigend. Durch die Kombination von solvolytischer Reaktion des Polymers und anschließender Oxidation des Produkts der ersten Reaktion konnte kaum eine Steigerung des Temperatursignals erreicht werden.



**Abbildung 52:** Konzentrations-Abhängigkeit der Temperaturerhöhung durch Solvolyse von Phenylacetat mit Polymer und immobilisierter Tyrosinase

Daher waren weitere Verbesserungen hinsichtlich der Fließgeschwindigkeit und Polymermenge nötig.

#### 3.4.2.2. Messungen mit 150 mg Polymer je Reaktor

Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurde der Referenz-Thermistor durch eine Temperatursonde ausgetauscht, welche direkt die vorgewählte Temperatur im Aluminiumblock misst und als Referenztemperatur einsetzt (Abbildung 53). Damit werden Schwankungen durch Luftblasen in den Kapillaren sowie eine mögliche Temperaturdrift vermindert. Außerdem wurde die Menge an Polymer im Reaktor erhöht. Es wurden je 150 mg MIP beziehungsweise NIP in einen 500  $\mu\text{l}$ -Reaktor gefüllt.

Für eine weitere Optimierung des Systems wurde eine Variation der Fließgeschwindigkeit im Bereich von 0,5  $\text{ml min}^{-1}$  bis 2,0  $\text{ml min}^{-1}$  bei konstanter Substratkonzentration (5 mM Phenylacetat) durchgeführt (Abbildung 54).

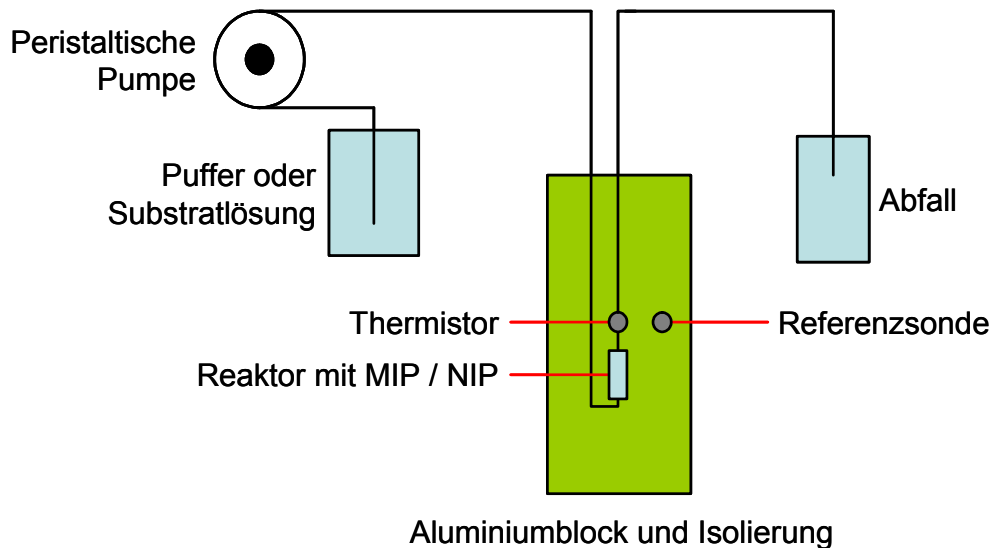


Abbildung 53: Schema des verbesserten Aufbaus für sequenzielle Messungen im Thermistor mit nur einem Reaktor

Wie aus Abbildung 54 ersichtlich, vergrößert und verschiebt sich der durch die Adsorption hervorgerufene Temperatursprung am Anfang der Substratzugabe mit steigender Fließgeschwindigkeit, während sich gleichzeitig das durch die Katalyse gebildete Plateau am Ende der Substratzugabe erniedrigt.

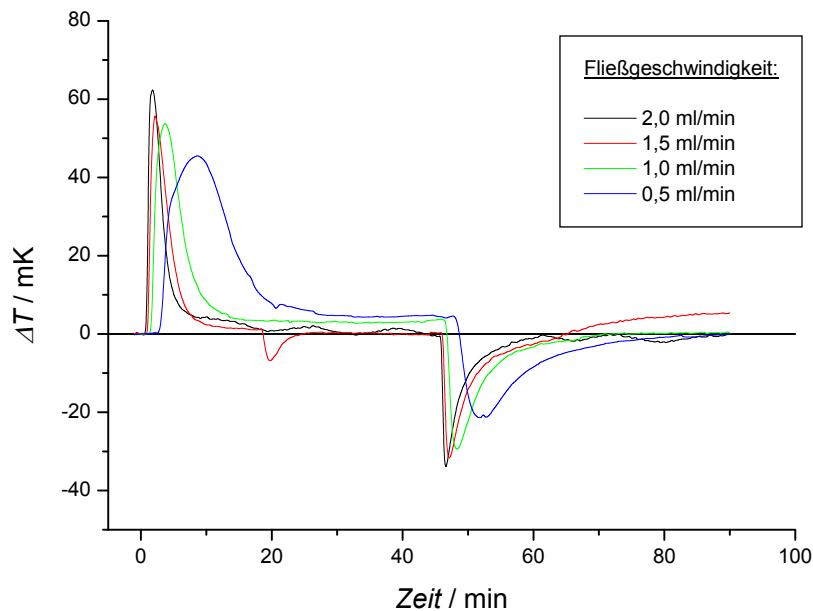


Abbildung 54: Optimierung der Fließgeschwindigkeit mit 150 mg Polymer

150 mg MIP im Reaktor, 5 mM Phenylacetat, 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C.

Aufgrund der durch die höhere Fließgeschwindigkeit verringerten Zeit zwischen Start der Substratinjektion und dem Zeitpunkt, an dem die Substrat-Puffer-Grenze den Reaktor

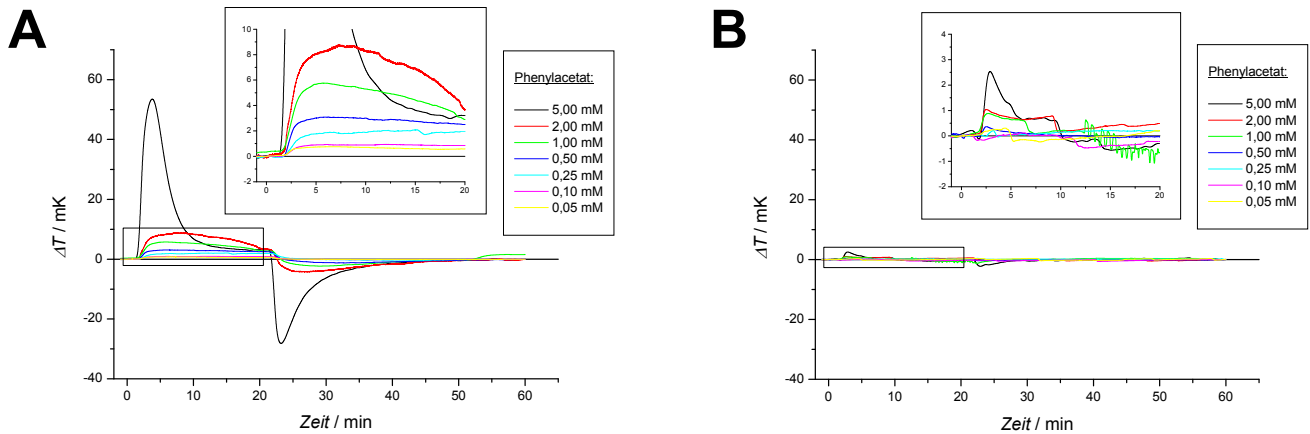
erreicht, kommt es zu einer geringeren Vermischung an der Phasengrenze und damit zu einer effektiv höheren Konzentration an Substrat. Dies resultiert in einer stärkeren Temperaturerhöhung, da die Adsorption von der Konzentration abhängig ist. Der nach der Adsorption starke Abfall bei hohen Fließgeschwindigkeiten spricht dementsprechend auch für eine schnelle Sättigung der Bindungsstellen.

Gleichzeitig ist die Erniedrigung der durch die Katalyse entstehenden Wärme durch Verwirbelungen mit Puffer im Reaktor bei langsamen Flussraten niedriger, und am Thermistor wird ein höheres Signal registriert. Um eine optimale Sensitivität zu erhalten, wäre es demnach am günstigsten, bei einer sehr langsamen Fließgeschwindigkeit zu arbeiten, um ein maximales Signal für die Katalyse im Steady-State zu erhalten. Allerdings stellt sich bei einem Fluss von  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  erst nach mehr als 30 min ein stabiles Gleichgewicht der Reaktion ein. Bei einem Fluss von  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$  wird dies bereits nach nur 17-20 min erreicht. Bei höheren Fließgeschwindigkeiten erfolgt die Einstellung zwar noch schneller, aber dann kann kaum noch ein Unterschied zwischen Basislinie und Plateau festgestellt werden. Als Kompromiss wurde daher bei allen weiteren Messungen mit einer Fließgeschwindigkeit von  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$  gearbeitet und zur statistischen Auswertung Dreifachbestimmungen durchgeführt. Weiterhin wurde das Zeitschema zur Substratzugabe verändert:

**Tabelle 14: Zeitschema für Substratzugabe mit 150 mg Polymer**

t / min	
-1	Start der Datenaufnahme mit Puffer
0	Substrat
20	Puffer
60	Stopp der Datenaufnahme

Das geprägte Polymer zeigt für niedrige Phenylacetatkonzentrationen konzentrationsabhängige Plateaus, die sich ab einer Konzentration von  $500 \mu\text{M}$  kaum noch erhöhen (Abbildung 55 **A**). Um die Katalyse durch das geprägte Polymer nachzuweisen und gleichzeitig den Umsatzgrad der Reaktion zu bestimmen, wurde bei  $500 \mu\text{M}$  Phenylacetat die Phenolkonzentration hinter dem Thermistor mit Hilfe einer Tyrosinaseelektrode bestimmt. Die Phenolkonzentration beim geprägten Polymer lag bei ungefähr 20% der eingesetzten Phenylacetatkonzentration (NIP: <2%).



**Abbildung 55: Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit 150 mg Polymer**

Änderung der Temperatur durch die Solvolyse von Phenylacetat bei verschiedenen Konzentrationen. 150 mg MIP (**A**), 150 mg NIP (**B**) im Reaktor. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1,0 ml min<sup>-1</sup>.

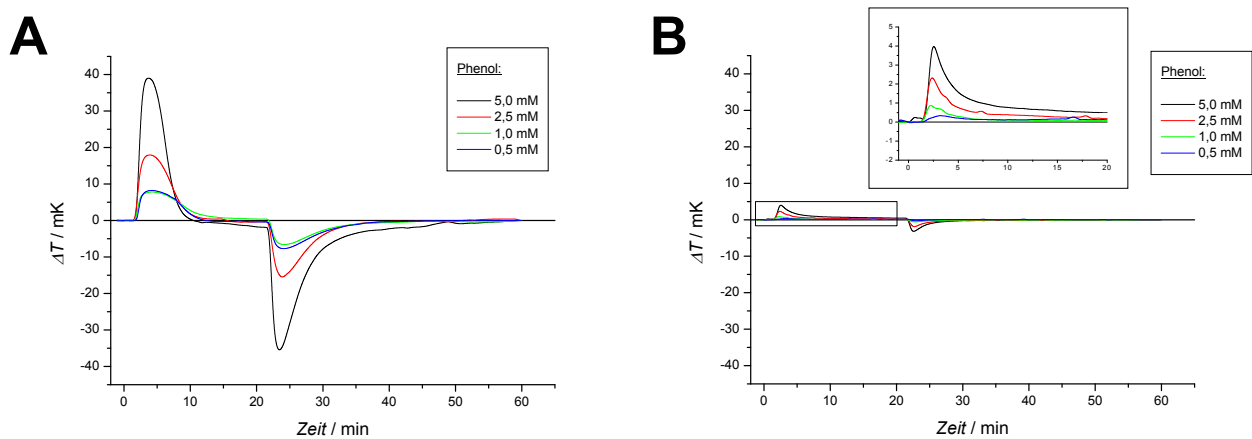
Nach dem Wechsel auf Puffer ohne Substrat kam es zunächst zu einer leichten negativen Temperaturdifferenz, die sich schnell der Basislinie annäherte. Der Vergleich mit den Esterase-Messungen aus Kapitel 3.4.1 zeigt eine ähnliche Differenz von ca. 2 mK bei einer Phenylacetatkonzentration von 0,5 mM. Mit Konzentrationen zwischen 0,5 mM und 5 mM Phenylacetat beobachtete man einen Peak in den ersten 10 min mit einem anschließenden Abfall der Temperatur auf einen stationären Wert.

Der folgende Pufferstrom ohne Substrat resultierte in einem negativen Temperatursignal, das sich dann langsam wieder der Basislinie annäherte. Das NIP zeigte nur bei der höchsten Konzentration von 5 mM einen leichten Peak (Abbildung 55 **B**).

Um den Ursprung des aus den vorhergehenden Messungen bekannten initialen Peaks durch Adsorption und Desorption von Phenylacetat bei höheren Konzentrationen zu ergründen, wurden weitere Messungen mit dieser verbesserten Messanordnung und einem Produkt der Reaktion – Phenol – durchgeführt.

Für 5 mM Phenol wurde ein schärferer initialer Peak im Vergleich mit 5 mM Phenylacetat beobachtet, der sehr schnell auf die Basislinie hin abfiel (Abbildung 56 **A**). Bei Messungen mit dem nicht geprägten Polymer wurde nur ein geringer Einfluss der Phenolkonzentration auf die Temperatur festgestellt (Abbildung 56 **B**).

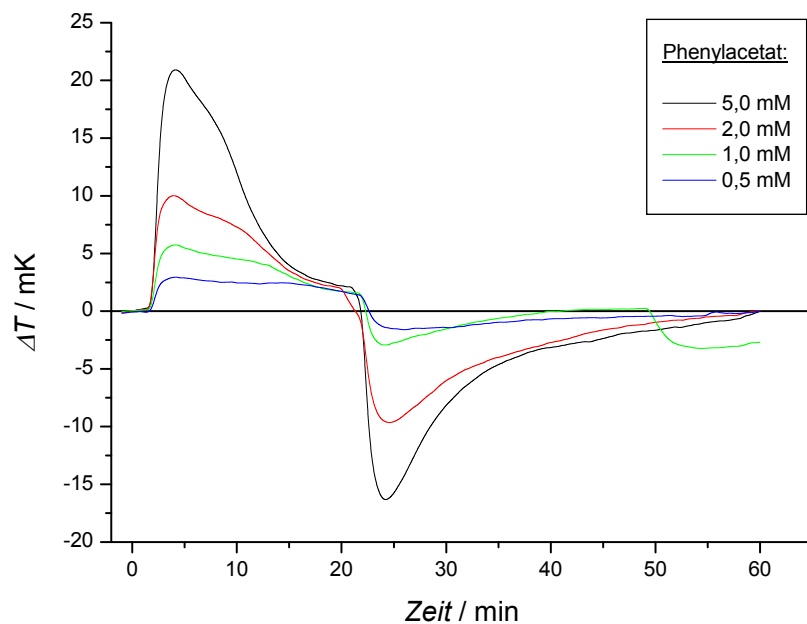




**Abbildung 56: Temperaturänderungen durch Bindung und Desorption von Phenol an 150 mg Polymer**

Änderung der Temperatur durch die Wechselwirkung von Phenol in verschiedenen Konzentrationen mit 150 mg MIP (**A**), 150 mg NIP (**B**) im Reaktor. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1,0 ml min<sup>-1</sup>.

Laut Literatur senken Solvolysprodukte oftmals die Substrataffinität.<sup>[158]</sup> Daher wurde der Einfluss von Phenol auf die Phenylacetat-Solvolyse untersucht (Abbildung 57).



**Abbildung 57: Temperaturänderung durch Phenylacetat-Solvolyse mit 5 mM Phenol im Laufpuffer**

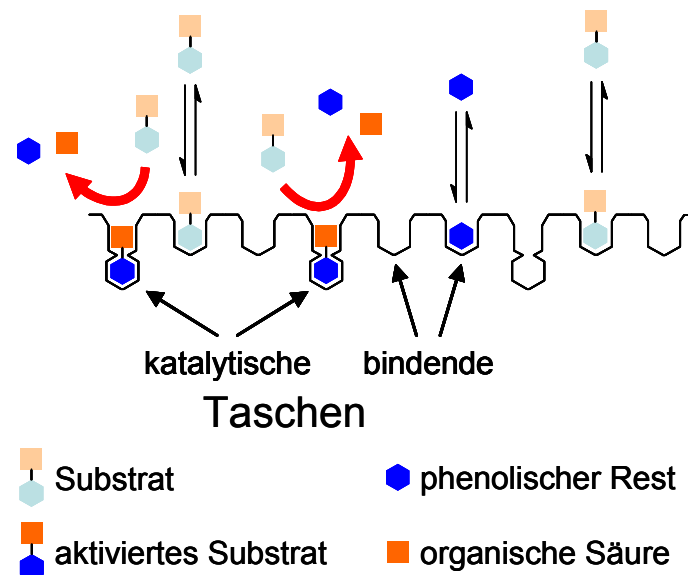
Änderung der Temperatur durch die Solvolyse von Phenylacetat bei verschiedenen Konzentrationen. 150 mg MIP im Reaktor, 5 mM Phenol, 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1 ml min<sup>-1</sup>.

Experimente mit einem Laufpuffer, der 5 mM Phenol enthielt, und Injektionen von verschiedenen Phenylacetatkonzentrationen resultierten gegenüber der nicht beeinflussten Reaktion in einem um 50% verminderten Signal des stationären Werts (Vergleiche Abbildung 55 **A** und Abbildung 57).

Auch der initiale Peak war noch sichtbar, wenn auch niedriger und verbreitert. Diese Erniedrigung kann mit einer Vorbesetzung der Bindungsstellen bei einem großen Überschuss an Produkt erklärt werden. Da aber nur sehr wenig Produkt (20% Umsatzgrad) gebildet und außerdem durch das benutzte Fließsystem Phenol ständig ausgewaschen wurde, kann der Inhibitionseffekt durch Phenol bei der Phenylacetat-Solvolyse vernachlässigt werden.

Das NIP zeigte bei diesen Messungen für Phenylacetat und auch für Phenol weniger als 5% des konzentrationsabhängigen Wärmesignals des MIP, sowohl im stationären Bereich als auch bei den Peaks.

Da beide Polymere – MIP und NIP – aus derselben Monomermischung hergestellt wurden, kann man aus diesem Verhalten schließen, dass es sich bei den Signalen des MIP um einen Prägeeﬀekt handelt. Aus der Art der Konzentrationsabhängigkeit, die mit dieser Methode beobachtet wurde, scheint es, dass es zwei Gruppen von Bindungsstellen gibt (Abbildung 58). Als erstes solche, die katalytisch aktiv sind und als zweites eine Gruppe ohne Substratumsetzung.

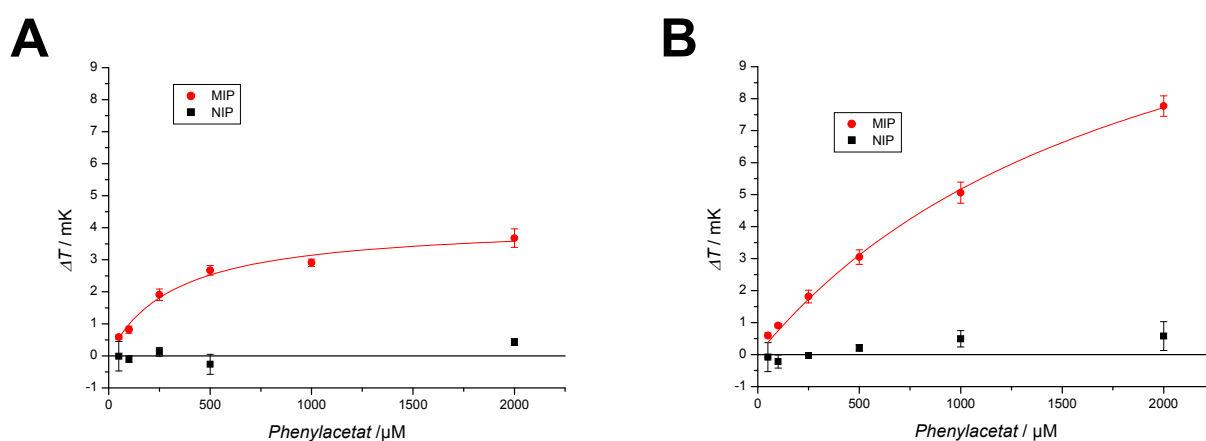


**Abbildung 58:** Schematische Abbildung der katalytischen und bindenden Kavitäten

Kirchner *et al.* bemerkten schon einen ähnlichen Effekt, bei dem die am besten geformten Kavitäten bevorzugt bei niedrigen Analytkonzentrationen besetzt wurden, die weniger gut

ausgebildeten Kavitäten erst bei höheren Konzentrationen, was in zwei verschiedenen Bindungsenthalpien resultierte.<sup>[205]</sup> Das Steady-State-Verhalten bei niedrigen Substratkonzentrationen reflektiert eine Gruppe von Bindungsstellen mit hoher Affinität, die Phenylacetat zu Phenol und Essigsäure solvolysieren. Diese Katalyse kann in einer konzentrationsabhängigen, stationären Temperaturänderung beobachtet werden. Der bei hohen Konzentrationen gebildete Peak wird verursacht durch eine zweite Gruppe von Bindungsstellen mit schwächerer Affinität, die in der Lage ist, reversibel Phenylacetat und auch Phenol zu binden. Die Signale dieser Bindungsereignisse sind ein Resultat der Adsorption und Desorption der aromatischen Substituenten. Nach einer bestimmten Zeit der Substratzufuhr ist ein Gleichgewicht der Bindung erreicht, und das Signal fällt auf den Wert der durch die Katalyse bestimmten Temperaturdifferenz, bis die Waschphase beginnt. Dann wird ein negatives Signal beobachtet, das der Desorption zugeschrieben werden kann.

Aus diesen Beobachtungen folgt, dass Phenylacetat von der katalytisch aktiven Tasche in Phenol und Essigsäure hydrolysiert wird. Dabei zeigt die lang anhaltende Temperaturänderung eine Sättigung bei Konzentrationen über 500  $\mu\text{M}$  Phenylacetat. Bei höheren Konzentrationen wird dieses Signal durch die schnelle Adsorption des Substrates an nicht katalytische Bindungsstellen in den ersten Minuten der Substratzugabe überlagert. Nach dem Wechsel zu substratfreiem Puffer desorbiert das nicht-hydrolysierte Substrat von den nicht katalytischen Bindungsstellen.



**Abbildung 59: Konzentrations-Abhängigkeit der Temperaturänderung bei Wechselwirkung von Phenylacetat mit MIP und NIP**

Auftragung der Temperaturänderung gegen die Substratkonzentration gemessen bei verschiedenen Zeiten (**A** bei 20 min, **B** bei 4 min). 150 mg MIP im Reaktor, 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 / 10% Methanol, 30°C, 1,0 ml min<sup>-1</sup>.

Aufgrund des schnellen Temperatursignals für die Adsorption und des konstanten Temperatursignals der Katalyse können nun die Daten für beide Bindungsstellen bestimmt werden. Für die katalytische Tasche wurde das Signal bei 20 min, für die bindende Kavität das Signal bei 4 min gegen die jeweils benutzte Substratkonzentration aufgetragen (Abbildung 59).

Die aus den Thermistormessungen gewonnenen  $\Delta T_{max}$ -,  $K_M$ - und  $K_D$ -Werte sind in Tabelle 15 aufgelistet.

**Tabelle 15:** Zusammenfassung der Werte für  $\Delta T_{max}$ ,  $K_M$  und  $K_D$  aus den Thermistorexperimenten

		$\Delta T_{max} / \text{mK}$	$K_M$ oder $K_D / \mu\text{M}^{[a]}$
Signal (stat. Zustand)	MIP	$4,16 \pm 0,25$	$322,17 \pm 57,88$
	NIP	n.b. <sup>[b]</sup>	n.b. <sup>[b]</sup>
Signal (Peak)	MIP	$15,72 \pm 0,94$	$1836,28 \pm 187,76$
	NIP	n.b. <sup>[b]</sup>	n.b. <sup>[b]</sup>

<sup>[a]</sup>  $K_M$  für Signal (stat. Zustand),  $K_D$  für Signal (Peak); <sup>[b]</sup> Nicht bestimmbar

Durch die Kombination der katalytischen Polymere mit dem Prinzip der Temperaturmessung über einen Thermistor konnte erstmalig eine Solvolyse von Phenylacetat nachgewiesen und gleichzeitig eine Bindung von phenolischer Komponente des Substrats und des Produkts an das Polymer verfolgt werden.

Zum ersten Mal wurde mit Hilfe eines Thermistors die katalytische Aktivität von geprägten Polymeren nachgewiesen. Der tatsächliche Produktnachweis erfolgte dabei über eine Tyrosinase-Elektrode. Hierbei stellte sich heraus, dass das Gesamtsignal aus einer katalytischen und einer zusätzlichen, adsorptiven Komponente bestand. Letzteres Signal rührte von der Bindung des Substrats an eine zweite, nicht-katalytische Bindungsstellenart im Polymernetzwerk her. Bindung sowie Katalyse spiegelten sich in Abhängigkeiten der Temperaturdifferenz von der Substratkonzentration wieder. Aus weiteren Versuchen mit verschiedenen Phenolkonzentrationen und im Zusammenhang mit den Einzelmessungen zur Substratspezifität (Kapitel 3.3.3) wurde geschlussfolgert, dass die bindenden Kavitäten ein Nebenprodukt des Prägevorgangs sind, so dass der phenolische Teil des Substrates erkannt wird, aber keine Katalyse stattfindet.

Somit wurden mit dieser Sensorconfiguration das erste Mal gleichzeitig die Bindung und der Substratumsatz an einem Polymer quantifiziert. Durch diese Quantifizierung ist es möglich das Verhältnis zwischen bindenden und katalytischen Taschen zu bestimmen und die

Polymerkomposition auf eine Art von Kavitäten zu optimieren. Damit ist diese Methode ein wertvolles Hilfsmittel zu weiteren Optimierung von bindenden, vor allem aber katalytischen Polymeren.

Der begrenzte Messbereich hinsichtlich des Substratumsatzes ist vor allem der Empfindlichkeit des benutzten Thermistors zuzuschreiben und könnte mit einem sensitiveren Instrument sicherlich nach unten erweitert werden. Trotzdem reicht die vorhandene Sensitivität, um das Messprinzip zu demonstrieren und zu dokumentieren.

Die hier vorgestellten Polymere sind also als künstliches Erkennungselement in Sensoren einsetzbar. Eine näher liegende Anwendungsmöglichkeit derartiger Polymere liegt allerdings in der Verwendung als Katalysatoren für große Synthesen in der technischen Chemie. Nichts desto trotz wird es für einige Anwendungen in der Biosensorik unerlässlich sein, langzeitstabile, in großen Mengen günstig herstellbare katalytische Erkennungselemente zu besitzen. Molekular geprägte Polymere bieten eine gute Möglichkeit, diesen Bedarf zu stillen.

## 4. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, katalytisch aktive Polymere herzustellen, welche die Umsetzung von substituierten Phenylestern in organische Säure und Phenolrest katalysieren, und Einsatzmöglichkeiten ebendieser in einem Strömungskalorimeter (Thermistor) als künstliches Erkennungselement zu untersuchen. Für die Synthese katalytischer Polymere wurde eine Strategie mit Übergangszustandsanaloga (TSA, *transition state analogues*) als „Schablone“ verfolgt, wie sie auch in der Biotechnologie bei der Herstellung von katalytisch aktiven Antikörpern verwendet wird. Dazu wird ein stabiles Molekül, das den aktivierten Zustand des Substrates während der Reaktion nachahmt, zur Generierung einer aktiven Tasche innerhalb eines größeren Polymers herangezogen.

Es wurde das vom Institut für organische Chemie der *Universität Potsdam* zur Verfügung gestellte TSA 1 ((4-Amino-benzyl)-phosphorsäureamid mono-(4-nitro-phenyl) ester) zur Herstellung der oberflächengeprägten Polymere verwendet. Um die so erhaltenen Polymere mit dem konventionellen Prägeansatz vergleichen zu können wurde im Rahmen dieser Arbeit das TSA 2 (Benzyl-phosphorsäureamid mono-(4-nitro-phenyl) ester), ohne zusätzliche Kopplungsgruppe, erstmalig synthetisiert und als Templat für die Massepolymere verwendet.

Für die Herstellung der Polymere wurde zunächst das Templat über eine einfache Kopplung mittels Bernsteinsäureanhydrid kovalent an eine poröse Kieselgelmatrix immobilisiert. Durch große Schwankungen in der Zuverlässigkeit bei der Polymerisation stellte sich heraus, dass diese Immobilisierungsart für den Zweck des molekularen Prägens suboptimal war. Es folgten eine Optimierung der Reaktionsbedingungen sowie ein anderer Kopplungsansatz mittels eines reaktiven Diisocyanats. Beste Ergebnisse zeigten sich dann bei der Immobilisierung über Hexamethylendiisocyanat.

Die Evaluation der Polymere erfolgte zunächst über eine optische Aktivitätsbestimmung der Solvolyse von *p*-Nitrophenylacetat zu Essigsäure und *p*-Nitrophenol. Hiermit konnte direkt die katalytische Aktivität der geprägten Polymere quantifiziert werden. Die spezifische Geschwindigkeit erreichte bei den geprägten Polymeren das bis zu 40-fache der jeweiligen Kontrollen (P3-IV:  $90,52 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  MIP/  $2,14 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  Kontrolle). In der Literatur wird schon ein Erreichen des 3 bis 5-fachen als Nachweis einer erfolgreichen Prägung angesehen, so dass die neuen Polymere über herausragende katalytische

Eigenschaften verfügen.<sup>[165,206]</sup> Die Affinität des Substrates zu dem geprägten Polymer liegt, wie schon für andere in der Literatur beschriebene, hydrolytische Polymere, im unteren millimolaren Bereich (siehe Tabelle 3). Die Michaeliskonstante  $K_M$  beträgt 2,04 mM für das Substrat *p*-Nitrophenylacetat.

Um Aussagen über die Morphologie der aktiven Tasche des Polymers und der sich daraus ergebenden Substratspezifität machen zu können, wurden nicht nur der Essigsäureester, sondern auch die *p*-Nitrophenolester der Propion- und *N*-Buttersäure als Substrate eingesetzt. Das Ergebnis zeigte einen sehr geringen Einfluss der Länge der aliphatischen Säurekomponente auf die Aktivität. Dies ist insofern nahe liegend, als die gewählten funktionellen Monomere nur mit den OH-Gruppen am Kohlenstoff des Übergangszustands interagieren und die Tasche nur auf der Seite des substituierten Phenolrestes räumlich begrenzt ist. Die Säurekomponente hingegen liegt während der Polymerisation stets auf der offenen Seite der entstehenden Kavität.

Die strukturverwandten Verbindungen der Nitrophenylcarbamate und Nitrophenylharnstoffe hingegen wurden von den Polymeren nicht messbar umgesetzt, was auf eine hohe Stabilität der in diesem Fall zu spaltenden Säureamidbindung hinweist. Weiterhin läuft die Spaltung der verwendeten Carbamate hauptsächlich über den E1cb Mechanismus und nicht über den B<sub>AC</sub>2 Mechanismus, der aufgrund des verwendeten Übergangszustandsanalogon eher von der Polymerkatalyse favorisiert wird.

Weiterhin sollte die Verwendbarkeit der neuartigen katalytischen Polymere für sensorische Detektionsverfahren demonstriert werden. Als Signalwandler wurde zum ersten Mal ein Thermistor eingesetzt, der Temperaturänderungen in einem Durchflussreaktor direkt in ein messbares Signal umwandelt.

Zur Evaluation des Systems und dem späteren Vergleich mit den katalytisch aktiven Polymeren wurde zuerst die katalytische Aktivität von immobilisierter Esterase hinsichtlich der Spaltung von Phenylacetat ermittelt. Die Messungen zeigten hierbei den typischen Verlauf einer enzymatischen Reaktion in einem Fließsystem bei kontinuierlicher Substratzugabe. Die gemessene Temperaturdifferenz unterlag dabei im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,5 mM bis 5 mM einer linearen Abhängigkeit von 6,34 mK mM<sup>-1</sup> Phenylacetat.

Versuche mit 50 mg Polymer im Reaktor konnten die katalytische Aktivität auch im Fließsystem erkennen lassen. Zusätzlich wurden Substrat-konzentrationsabhängige Temperaturänderungen in positiver Richtung bei Substratzugabe und in negativer Richtung bei nachfolgender Pufferzugabe ohne Substrat aufgenommen, welche die Estererträger nicht zeigten.

Eine genauere Untersuchung der Signalentstehung zeigte, dass gleichzeitig zur katalytischen Temperaturerhöhung eine zweite Signalkomponente vorlag. Studien der Produktabhängigkeiten konnten nachweisen, dass dieses zusätzliche Teilsignal auf der Bindung des phenolischen Teils von Substrat und Produkt in bindenden, aber nicht katalytisch aktiven Taschen beruht. Beide Taschenarten tragen zum Gesamtsignal des Sensors bei. Die gleichzeitige Beobachtung von Katalyse und Bindung wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben.

Nach Optimierung der Parameter konnte der mit den katalytischen Polymeren beladene Thermistor als Sensor für substituierte Phenylester eingesetzt werden, der die Konzentration des Substrats durch die Temperaturänderung bei der Solvolyse misst. Zusätzlich wurden über die quantitative Auswertung der Adsorptions-Peaks Informationen über die bindenden Eigenschaften des Polymers erhalten.

Eine Weiterleitung des Phenols aus der solvolytischen Reaktion an eine immobilisierte Tyrosinase zeigte keine Sensitivitätssteigerung. Trotzdem konnte mit diesen Experimenten der spezifische Umsatz von Phenylacetat sowie die Bindung von Phenol und Phenylacetat durch das geprägte Polymer bestätigt werden.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit somit zum ersten Mal ein katalytisch aktives Polymer mit der Methode von immobilisierten Templaten hergestellt, charakterisiert und dieses dann als biomimetisches Erkennungselement in einem Sensor für substituierte Phenylester eingesetzt. Weiter wurde zum ersten Mal die Bifunktionalität eines Polymers durch gleichzeitige Messung der katalytischen Aktivität und die reversible Bindung von Substrat und Produkten nachgewiesen.



## 5. Material und Methoden

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Chemikalien

- *p*-Aminobenzylamin, Aldrich (368466)
- Aminopropylkieselgel, Fluka (09298)
- Ammoniumhydrogen Difluorid, Fluka (09835)
- Azobisisobutyronitril, Fluka (11630)
- Benzylamin, Fluka (13190)
- Bernsteinsäureanhydrid, Merck-Suchard (8.00683)
- Diaminoxilylen, Fluka (33423)
- 1,1-Diethyl-3-(4-Nitrophenyl)-Harnstoff Sigma (S66983-0)
- Diisopropylcarbodiimid, Merck (8.03649)
- 4-(Dimethylamino)pyridin, Aldrich (522805)
- Divinylbenzen, Fluka (43908)
- Essigsäureanhydrid, Fluka (45830)
- Esterase aus Schweineleber, Sigma (E2884)
- Ethyl-*N*-(4-Nitrophenyl)-Carbamat Sigma (S34946-1)
- 1-Ethyl-3-(4-Nitrophenyl)-Harnstoff Sigma (S66905-9)
- Flusssäure 40%, Riedel-de Haën (01067)
- Glutaraldehyd 25%, Fluka (49630)
- Hexamethylendiisocyanat, Fluka (52650)
- Kieselgel 60, Merck (1.09385)
- Kieselgel 100, Fluka (60753)
- Methyl-*N*-(4-Nitrophenyl)-Carbamat Sigma (S59408-3)
- *p*-Nitrophenol, VEB Jenapharm (011172)
- *p*-Nitrophenyl *N*-butyrat Sigma (N 9876)
- *p*-Nitrophenylacetat, Fluka (46021)
- *p*-Nitrophenylphosphordichlorid, Aldrich (155403)
- *p*-Nitrophenylpropionat Sigma (N3377)
- Phenol Merck (1.00206)

- Phenylacetat, Merck-Suchard (8.22053)
- 1,4-Phenylendiamin, Fluka (78429)
- Phenylphosphordichlorid, Fluka (78375)
- Propylamin, Fluka (82098)
- TSA 1 ((4-Amino-benzyl)-phosphorsäureamid mono-(4-nitro-phenyl) ester)  
Universität Potsdam
- Tyrosinase aus Champignons, Sigma (T3824)
- Urocansäure, Aldrich (859796)
- 1-Vinylimidazol, Aldrich (235466)
- 2-Vinylpyridin, Fluka (95040)
- 4-Vinylpyridin, Aldrich (V3204)

Sämtliche für die Synthese verwendeten Lösungsmittel waren wasserfrei nach Standardvorschrift aufbereitet.

### 5.1.2. Geräte und Sensoren

- Datenaufzeichnung DUO 18, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
- Elektrochemischer Detektor PED 300, Biometra, Göttingen
- Enzymthermistor Modell 9000, Universität Lund, Schweden
- Kugelmühle Retsch S100, Haan, Deutschland
- UV-Vis Spektrophotometer UV-1602, Shimadzu, Duisburg
- Dickschicht Tyrosinase Elektroden, BST, Berlin

## 5.2. Methoden

### 5.2.1. Herstellung, Charakterisierung und Immobilisierung der Template

#### 5.2.1.1. *Synthese der Template*

Es wurden verschiedene Übergangszustandsanaloge als mögliche Template nach veränderten Vorschriften von Koizumi und Takaku synthetisiert.<sup>[192,193]</sup> Die synthetisierten Template

wurden mithilfe von Massenspektrometrie (MALDI-ToF) und  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) charakterisiert.

#### Löslichkeiten:

Um weitergehende Untersuchungen durchführen zu können, wurde getestet, in welchen Lösungsmitteln die synthetisierten Übergangszustandsanaloga löslich sind. Als Lösungsmittel wurden Methanol, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Diethylether, Chloroform und destilliertes Wasser verwendet. Dazu wurden jeweils 5 mg Substanz mit je 1 ml Lösungsmittel versetzt und 5 min im Ultraschallbad gelöst und die Löslichkeit visuell überprüft.

#### Massenspektren (MALDI-ToF):

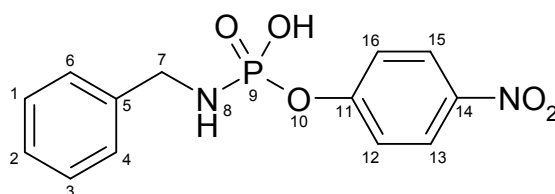
Die Proben wurden für die massenspektrometrische Vermessung in Methanol gelöst und für die Laser-Desorption auf eine Matrix aus  $\alpha$ -Cyanozimtsäure aufgebracht. Die Detektion erfolgte mittels Time-of-flight (ToF)-Analysator im Reflektionsmodus. Die Messungen wurden von Frau Dr. S. Haebel vom Interdisziplinären Zentrum für Massenspektrometrie von Biopolymeren der *Universität Potsdam* durchgeführt.

#### NMR-Spektren:

Die Messungen erfolgten im Fourier-Transform-Verfahren mit einem Avance 300 Spektrometer (Messfrequenz 300,132 MHz für  $^1\text{H}$ -, und 121,489 MHz für  $^{31}\text{P}$ -NMR) der Firma Bruker. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Lösungsmittel [ $\text{D}_6$ ] DMSO und sind in ppm-Werten der  $\delta$ -Skala angegeben. Die Signalmultiplizitäten werden durch die Abkürzungen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet) und m (Multiplet) bezeichnet. Die Zuordnung der Wasserstoff- und Phosphoratome erfolgte mit Hilfe von Vergleichsverbindungen und Inkrementregeln.<sup>[207]</sup> Die Nummerierungen der Atome in den Verbindungen sind jeweils in den Strukturformeln eingezeichnet, können allerdings aus Gründen der Vereinfachung von den Bezifferungen der IUPAC-Namen abweichen. Die Proben wurden in [ $\text{D}_6$ ] DMSO gelöst und mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Kernresonanz-Spektroskopie untersucht. Als Referenzsubstanz für die  $^{31}\text{P}$ -Spektren wurde Phosphorsäure benutzt und die dadurch erhaltene chemische Verschiebung von 250,357 ppm auf 0 ppm gesetzt. Alle Angaben beziehen sich dadurch relativ zur chemischen Verschiebung von Phosphorsäure.

TSA 2: Benzyl-phosphorsäureamid mono-(4-nitro-phenyl) ester

2,7 ml (25 mmol) Benzylamin wurden in einem 250 ml Dreihalsrundkolben in 100 ml Diethylether unter einer Stickstoffatmosphäre gelöst. 3,5 ml (25 mmol) TEA wurden bei -78°C direkt hinzugefügt und mittels eines Magnetrührers vermischt. Eine Lösung von 6,4 g (25 mmol) *p*-Nitrophenylphosphordichlorid in 40 ml Toluol wurde mit einem Tropftrichter langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 15 min bei -78°C gerührt und anschließend langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und für 30 min im Vakuum getrocknet, anschließend in 200 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) suspendiert und unter vermindertem Druck 15 min gerührt. Das Produkt wurde erneut filtriert und im Vakuum und Hochvakuum ( $2 \cdot 10^{-2}$  mbar) getrocknet.



Masse: theor.: 308,23 g mol<sup>-1</sup> gef.: 398,15 g mol<sup>-1</sup>

Ausbeute: theor.: 7,71 g (100%) gef.: 2,05 g (27%)

<sup>1</sup>H-NMR: (300,132 MHz; [D<sub>6</sub>] DMSO)

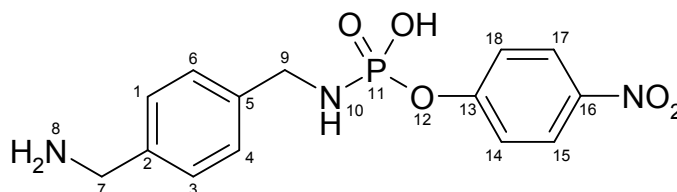
8,18 (d, 2H, HC-13, HC-15), 7,35-7,20 (m, 12H, HC-1, HC-2, HC-3, HC-4, HC-6, HC-1', HC-2', HC-3', HC-4', HC-6', HC-12, HC-16), 5,70 (d, 2H, HN-8, HN-8'), 4,05 (q, 4H, H<sub>2</sub>C-7, H<sub>2</sub>C-7')

<sup>31</sup>P-NMR: (121,489 MHz; [D<sub>6</sub>] DMSO)

14,51 (P-9)

TSA 3: 4-Aminomethyl-benzyl)- phosphorsäureamid mono-(4-nitro-phenyl) ester

3,4 g (25 mmol) 1,4-Diaminoxylylen wurden in einem 250 ml Dreihalsrundkolben in 100 ml Diethylether unter Stickstoffatmosphäre gelöst. 3,5 ml (25 mmol) TEA wurden bei  $-78^{\circ}\text{C}$  direkt hinzugefügt und mittels eines Magnetrührers vermischt. Eine Lösung von 6,4 g (25 mmol) *p*-Nitrophenylphosphordichlorid in 40 ml Diethylether wurde mit einem Tropftrichter langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 15 min bei  $-78^{\circ}\text{C}$  gerührt und anschließend langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Der leicht gelbliche Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum für 30 min getrocknet, anschließend in 200 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) suspendiert und unter vermindertem Druck 15 min gerührt. Das Produkt wurde erneut filtriert und im Vakuum und Hochvakuum ( $2 \cdot 10^{-2}$  mbar) getrocknet.



Masse: theor.:  $337,27 \text{ g mol}^{-1}$  gef.:  **$338,14 \text{ g mol}^{-1}$** ;  $456,24 \text{ g mol}^{-1}$ ;  
 $775,44 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $1094,75 \text{ g mol}^{-1}$ ;  
 $1413,99 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $1733,24 \text{ g mol}^{-1}$

Ausbeute: theor.: 8,43 g (100%) gef.: 6,07 g (72%)

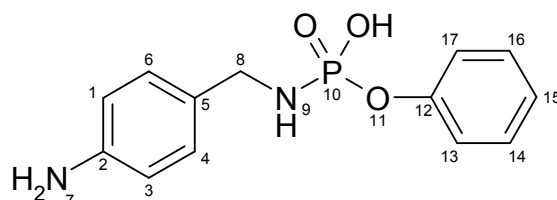
$^1\text{H-NMR}$ : (300,132 MHz;  $[\text{D}_6]$  DMSO)  
 8,16 (d, 2H,  $\underline{\text{H}}\text{C-15}$ ,  $\underline{\text{H}}\text{C-17}$ ), 7,32 (t, 2H,  $\underline{\text{H}}\text{C-1}$ ,  $\underline{\text{H}}\text{C-3}$ ), 7,22-7,16 (m, 4H,  $\underline{\text{H}}\text{C-4}$ ,  $\underline{\text{H}}\text{C-6}$ ,  $\underline{\text{H}}\text{C-14}$ ,  $\underline{\text{H}}\text{C-18}$ ), 5,70 (s, 1H,  $\underline{\text{H}}\text{N-10}$ ), 3,96 (d, 4H,  $\underline{\text{H}}_2\text{C-7}$ ,  $\underline{\text{H}}_2\text{C-9}$ )

$^{31}\text{P-NMR}$ : (121,489 MHz;  $[\text{D}_6]$  DMSO)  
 14,54 (P-11)



TSA 5: (4-Amino-benzyl)-phosphorsäureamid monophenyl ester

2,83 ml (25 mmol) 4-Aminobenzylamin wurden in einem 250 ml Dreihalsrundkolben in 100 ml Diethylether unter Stickstoffatmosphäre gelöst. 3,5 ml (25 mmol) Triethylamin wurden bei  $-78^{\circ}\text{C}$  direkt hinzugefügt und mittels eines Magnetrührers vermischt. Eine Lösung von 3,72 ml (25 mmol) Phenylphosphordichlorid in 40 ml Diethylether wurde mit einem Tropftrichter langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 15 min bei  $-78^{\circ}\text{C}$  gerührt und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Der stark gelbliche Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat für 30 min im Vakuum getrocknet und anschließend in 200 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) suspendiert. Unter vermindertem Druck wurde über Nacht gerührt und erneut filtriert. Das Produkt wurde erneut filtriert und im Vakuum und Hochvakuum ( $2 \cdot 10^{-2}$  mbar) getrocknet.

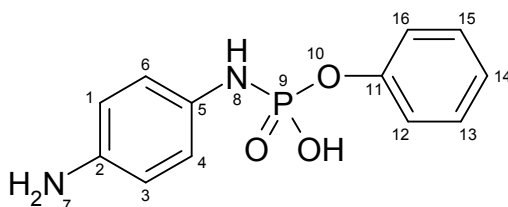


Masse:	theor.: 278,25 g mol <sup>-1</sup>	gef.: 643,34 g mol <sup>-1</sup> ; 903,60 g mol <sup>-1</sup> ; 1163,86 g mol <sup>-1</sup> ; 1424,05 g mol <sup>-1</sup> ;
Ausbeute:	theor.: 6,956 g (100%)	gef.: 5,286 g (76%)

<sup>1</sup>H-NMR: (300,132 MHz; [D<sub>6</sub>] DMSO)  
7,29 (t, 2H, HC-1, HC-3), 7,17-7,06 (m, 5H, HC-13, HC-14, HC-15, HC-16, HC-17), 6,90 (d, 2H, HC-4, HC-6), 5,55-5,44 (m, 1H, HN-9), 4,64 (s, 2H, H<sub>2</sub>N-7), 3,90 (d, 2H, H<sub>2</sub>C-8)

TSA 6: (4-Amino-phenyl)- phosphorsäureamid monophenyl ester

5,4 g (50 mmol) 1,4-Phenylendiamin wurden in einem 250 ml Dreihalsrundkolben in 100 ml Diethylether unter einer Stickstoffatmosphäre gelöst und auf  $-78^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Eine Lösung von 3,7 ml (25 mmol) Phenylphosphordichlorid in 40 ml Diethylether wurde über einen Tropftrichter langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 15 min bei  $-78^{\circ}\text{C}$  gerührt und danach langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Der dunkel violette Niederschlag wurde abfiltriert, der Rückstand im Vakuum getrocknet und anschließend in Eiswasser suspendiert. Bei vermindertem Druck wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt erneut filtriert und noch einmal in Eiswasser suspendiert und für 30 min gerührt. Das Produkt wurde erneut filtriert und im Vakuum und Hochvakuum ( $2 \cdot 10^{-2}$  mbar) getrocknet.



Masse:	theor.: $264,22 \text{ g mol}^{-1}$	gef.: <b><u><math>264,08 \text{ g mol}^{-1}</math></u></b> ; $355,18 \text{ g mol}^{-1}$ ; $601,27 \text{ g mol}^{-1}$ ; $847,45 \text{ g mol}^{-1}$ ; $1093,67 \text{ g mol}^{-1}$ ; $1339,87 \text{ g mol}^{-1}$ $1586,05 \text{ g mol}^{-1}$
Ausbeute:	theor.: 6,61 g (100%)	gef.: 4,43 g (67%)

$^1\text{H-NMR}$ : (300,132 MHz;  $[\text{D}_6]$  DMSO)  
7,21 (t, 2H, HC-1, HC-3), 7,06 (d, 2H, HC-12, HC-16), 6,09 (t, 3H, HC-13,  
HC-14, HC-15), 6,89 (t, 2H, HC-4, HC-6)



### 5.2.1.2. *Immobilisierung der Template*

Es wurden insgesamt vier verschiedene Verfahren zur Vorbereitung des porösen Kieselgels als Kontrollträger und zur Immobilisierung des Übergangszustandsanalogon als Templatträger verwendet:

#### Methode I:

##### *Templatträger:*

Zur Immobilisierung des Templats wurde 1 g Aminopropylkieselgel in 10 ml DMF suspendiert, 0,1 g (1 mmol) Bernsteinsäureanhydrid hinzugefügt und die Mischung für 20 h in einem Überkopfschüttler bei RT geschüttelt. Anschließend wurde mit je 100 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen und für 2 h bei 60°C das Kieselgel getrocknet. Zur Immobilisierung des Templats wurde das modifizierte Kieselgel in 10 ml DMF resuspendiert und 0,1 mmol Templat sowie 46,5 µl (0,3 mmol) DIC hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 20 h bei RT fortgesetzt, anschließend mit je 100 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen und das Kieselgel für 2 h bei 60°C getrocknet. Abschließend wurde das Kieselgel in 10 ml DMF resuspendiert und 10,3 µl (0,125 mmol) Propylamin sowie 46,5 µl (0,3 mmol) DIC hinzugefügt, für 20 h im Überkopfschüttler geschüttelt und mit je 100 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen und für 2 h bei 60°C getrocknet.

##### *Kontrollträger:*

Zur Erstellung des Kontrollträgers wurde 1 g Aminopropylkieselgel in 10 ml DMF suspendiert, 94,4 µl (1 mmol) Essigsäureanhydrid hinzugefügt und die Mischung für 20 h in einem Überkopfschüttler geschüttelt. Anschließend wurde mit je 100 ml DMF, DCM und Methanol auf einer Nutsche gewaschen und für 2 h bei 60°C das Kieselgel getrocknet. Abschließend wurde das modifizierte Kieselgel in 10 ml DMF resuspendiert und 10,3 µl (0,125 mmol) Propylamin sowie 46,5 µl (0,3 mmol) DIC hinzugefügt, für 20 h im Überkopfschüttler geschüttelt und mit je 100 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen und für 2 h bei 60°C getrocknet.

### Methode II:

#### *Templatträger und Kontrollträger:*

Für Templat- und Kontrollträger wurde je 1 g Aminopropylkieselgel in 10 ml DMF suspendiert und 0,15 g (1,5 mmol) Bernsteinsäureanhydrid hinzugefügt. Die Mischungen reagierten für 20 h im Überkopfschüttler und wurden anschließend mit je 100 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen sowie für 2 h bei 60°C getrocknet. Der Templatträger wurde dann in 10 ml DMF resuspendiert und 0,1 mmol Templat sowie 19,4 µl (0,125 mmol) DIC hinzugefügt. Erneut wurde für 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt und noch einmal mit je 100 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen und für 2 h bei 60°C getrocknet. Beide Träger wurden in jeweils 10 ml DMF resuspendiert und 92,5 µl (1,125 mmol) Propylamin sowie 194 µl (1,25 mmol) DIC hinzugefügt. Nach einer weiteren Reaktion über 20 h im Überkopfschüttler wurden die Proben mit je 100 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen und für 2 h bei 60°C getrocknet.

### Methode III:

#### *Templatträger:*

Für den Templatträger wurde 1 g Aminopropylkieselgel in 10 ml DMF suspendiert. Dann wurden 500 mg (5 mmol) Bernsteinsäureanhydrid hinzugefügt und die Mischung für 18 h bei 60°C sowie 2 h bei 160°C reagieren gelassen. Es wurde mit je 250 ml DCM, 100 ml 1 M HCl und 250 ml Methanol gewaschen und im Vakuum für 30 min getrocknet. Für den Templatträger wurde das Kieselgel in 10 ml DMF resuspendiert und im Eisbad gekühlt. Dann wurden 0,4 mmol Templat, 233 µl (1,5 mmol) DIC sowie 20 mg 4-(Dimethylamino)pyridin hinzugefügt und 20 h bei RT geschüttelt. Nach der Reaktion wurden der Mischung 203 µl (5 mmol) Methanol hinzugefügt und noch einmal für 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Abschließend wurde mit je 50 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen und für 2 h bei 60°C getrocknet.

#### *Kontrollträger:*

Für den Kontrollträger wurde 1 g Aminopropylkieselgel in 10 ml DMF suspendiert. Dann wurden 500 mg (5 mmol) Bernsteinsäureanhydrid hinzugefügt und die Mischung für 18 h bei 60°C sowie 2 h bei 160°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde mit je 250 ml DCM, 100 ml

1 M HCl und 250 ml Methanol gewaschen und im Vakuum für 30 min getrocknet. Anschließend wurde das Kieselgel in 10 ml DMF resuspendiert und im Eisbad gekühlt. Es wurden 203  $\mu$ l (5 mmol) Methanol, 233  $\mu$ l (1,5 mmol) DIC sowie 20 mg 4-(Dimethylamino)-pyridin hinzugefügt und 20 h bei RT geschüttelt. Abschließend wurde mit je 50 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen und für 2 h bei 60°C getrocknet.

#### Methode IV:

##### *Templatträger:*

Die komplette Kopplung fand unter Schutzgas (Stickstoff) in einer Umkehrfritte statt. 1 g Aminopropylkieselgel wurde in 10 ml Toluol suspendiert und anschließend 6 ml (50 mmol) Hexamethylendiisocyanat hinzugefügt und für 6 h bei RT gerührt. Das modifizierte Kieselgel wurde mit 250 ml DCM gewaschen, anschließend in 10 ml DMF resuspendiert, mit 0,25 mmol Templat versehen und für 6 h bei RT gerührt. Es wurden 2 ml (50 mmol) Methanol hinzugefügt, über Nacht bei RT gerührt und abschließend mit je 50 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen und für 2 h bei 60°C getrocknet.

##### *Kontrollträger:*

Die komplette Kopplung fand unter Schutzgas (Stickstoff) in einer Umkehrfritte statt. 1 g Aminopropylkieselgel wurde in 10 ml Toluol suspendiert. Dann wurden 6 ml (50 mmol) Hexamethylendiisocyanat hinzugefügt und für 6 h bei RT gerührt. Der Reaktionsmischung wurden 2 ml (50 mmol) Methanol hinzugefügt, über Nacht bei RT gerührt und abschließend mit je 50 ml DMF, DCM und Methanol gewaschen und für 2 h bei 60°C getrocknet.

IR-spektroskopische Untersuchungen wurden am Institut für Chemie der *Universität Potsdam* von Fr. A. Nachtigall durchgeführt. Die Kieselgele wurden mittels einer Mühle zerkleinert und mit Kaliumbromid verpresst.

#### **5.2.2. Herstellung und Aufarbeitung der Monomere**

4-Vinylimidazol wurde durch thermische Decarboxylierung aus Urocansäure dargestellt. Hierzu wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Overberger *et al.*<sup>[195]</sup> verwendet.

1 g (7,25 mmol) Urocansäure wurde in einem Kugelrohrglasofen 30 min auf 180°C erhitzt. Anschließend folgte eine Erwärmung in 5°C-Schritten alle 7,5 min bis zu einer Endtemperatur von 215°C bei der die thermische Zersetzung deutlich zu erkennen war. Diese Temperatur wurde 60 min gehalten und das entstandene Produkt gleichzeitig in einer zweiten gekühlten Kugel aufgefangen. Nach dem Abkühlen wurde das Produkt in Methanol resuspendiert und filtriert. Anschließend wurde unter vermindertem Druck das Methanol evaporiert und die erhaltenen Kristalle bei 4°C gelagert. Das so erhaltene 4-Vinylimidazol wurde dann ohne weitere Aufarbeitung für die Polymersynthese verwendet.

Ausbeute:    theor.: 682 mg (100%)                      gef.: 573 mg (84%)

Das verwendete Divinylbenzen (3ml) wurde direkt vor der Benutzung an basischem Aluminiumoxid 90 chromatographisch gereinigt (Säulenlänge 5 cm, Ø 5 mm).

### 5.2.3. Herstellung, Aufarbeitung und Charakterisierung der Polymere

#### 5.2.3.1. Zusammensetzung der Monomermischungen

Die Monomermischungen für das Oberflächenprägen wurden als Präpolymerisationsmixture laut Tabelle 16 angesetzt. Diese Mixturen wurden für 5 min im Ultraschall behandelt und danach für 10 min mit Stickstoff begast. Danach wurden sie bis zum Mischen mit dem Träger bei 4°C gelagert.

**Tabelle 16: Zusammensetzung der Präpolymerisationsmixturen**

MM	4-VI	DVB	AIBN	CoCl <sub>2</sub>	MeOH
P1	94 mg (1 mmol)	2 ml (14 mmol)	100 mg (0,6 mmol)	65 mg (0,5 mmol)	1,5 ml
P2	94 mg (1 mmol)	2 ml (14 mmol)	100 mg (0,6 mmol)	- / -	1,5 ml
P3	94 mg (1 mmol)	2 ml (14 mmol)	30 mg (0,18 mmol)	- / -	0,2 ml
P4	- / -	2 ml (14 mmol)	30 mg (0,18 mmol)	- / -	0,2 ml

### Polymere in homogener Phase:

Es wurden 94 mg (1 mmol) 4-Vinylimidazol mit 2 ml (14 mmol) DVB, 10 mg (0,06 mmol) AIBN, 200 µl Methanol vermischt. Für das geprägte Polymer wurden zusätzlich 154,1 mg (0,5 mmol) TSA 2 hinzugefügt. Diese Mischung wurde für 5 min im Ultraschall behandelt und danach für 10 min mit Stickstoff begast. Danach wurde sie bis zur Polymerisation bei 4°C gelagert.

#### 5.2.3.2. *Polymerisationsbedingungen*

Für das Oberflächenprägen wurde je 1 g getrockneter Träger auf Eis gelagert und in der Kälte mit 500 µl Präpolymerisationsmischung in 50 µl Aliquots versetzt. Zwischen den Zugaben wurden die sich bildenden Klümpchen mittels eines Spatels und eines Schüttlers zerstört. Um den Restsauerstoff aus den Poren des Kieselgels zu entfernen wurde die Mischung für 10 min abwechselnd mit Stickstoff begast und im Vakuum entgast. Anschließend wurde die Mischung, soweit nicht anders angegeben, über Nacht im verschlossenen Gefäß bei 4°C gelagert und dann zunächst für 48 h bei 40°C und danach noch einmal bei 80°C für 12 h auspolymerisiert.

Die Polymere in homogener Phase wurden ebenfalls zuerst für 48 h bei 40°C und danach noch einmal bei 80°C für 12 h auspolymerisiert.

#### 5.2.3.3. *Aufarbeitung der Polymere*

### Oberflächengeprägte Polymere:

#### *Methode 1 zur Entfernung des Kieselgels:*

Zum Lösen des Kieselgels aus dem Polymer/Kieselgel Hybrid wurden die Polymere nach dem Polymerisieren in 2 ml Aceton suspendiert und im Eisbad gekühlt. Dann wurden langsam 4 ml 40% Fußsäure hinzugegossen und über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde mit 2 l Ethanol (20% v:v in Wasser) auf einer Fritte gründlich gewaschen, bis der pH-Wert im Waschwasser zwischen 6 und 7 lag. Abschließend wurden die Polymere über Nacht bei 60°C getrocknet.

*Methode 2 zur Entfernung des Kieselgels:*

Nach einer schonenderen Methode von Trittrici *et al.* wurden die Polymere direkt in 25 ml 3 M Ammoniumhydrogen Difluorid suspendiert und dann über Nacht geschüttelt.<sup>[50]</sup> Anschließend wurde mit 2 l Ethanol (20% v:v in Wasser) auf einer Fritte gründlich gewaschen bis der pH-Wert im Waschwasser zwischen 6 und 7 lag. Abschließend wurden die Polymere über Nacht bei 60°C getrocknet.

Polymere in homogener Phase:

Die Polymere wurden nach der Polymerisation zuerst grob gemörsert und dann anschließend in einem 50 ml Mahlbecher mit 20 Kugeln (Ø 10 mm) für 8 min bei 400 rpm in einer Kugelmühle zerkleinert. Danach wurden sie mit Hilfe zweier Siebe in eine Größenfraktion von 25-50 µm gebracht. Diese Arbeiten wurden an der *TU Berlin* im Arbeitskreis Technische Chemie von Prof. R. Schomäcker mit freundlicher Unterstützung von Frau G. Vetter durchgeführt.

5.2.3.4. *Physikalische Charakterisierung der Polymere*

Zum Vergleich der Polymormorphologie wurden phasenkontrast-mikroskopische Aufnahmen der modifizierten Kieselgelpartikel, Polymer/Kieselgel-Hybride und der Polymerpartikel gemacht. Diese Aufnahmen wurden mit Hilfe von Prof. D. Fürst im Arbeitsbereich Zellbiologie der *Universität Potsdam* erstellt.

5.2.3.5. *Chemische Charakterisierung der Polymere*

Zur Untersuchung der Zusammensetzung wurden bei den Polymer/Kieselgel-Hybriden P3-I TSA 001 und P3-I Kontrolle 001 sowie unmodifiziertem Kieselgel eine Elementaranalyse hinsichtlich Kohlenstoff-, Stickstoff- sowie Phosphorgehalts durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Fr. A. Müller am Institut für Geoökologie der *Universität Potsdam* durchgeführt.

Zusätzlich wurde von den Polymeren P3-IV Kontrolle 001 und P3-IV TSA 002 noch eine thermo-gravimetrische Analyse (TGA) von Fr. I. Shekova am *Max-Planck-Institut für Kolloid und Grenzflächenforschung, Golm* durchgeführt.

#### 5.2.4. Untersuchungen am Photometer

##### 5.2.4.1. *Solvolyse von p-Nitrophenylacetat*

Zum Testen der Solvolysegeschwindigkeit wurden 10 mg der Polymere in 500  $\mu\text{l}$  Methanol suspendiert und anschließend mit 20 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,5 auf 5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Von dieser Stammlösung ( $2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) wurden Mengen von 15  $\mu\text{l}$  bis 300  $\mu\text{l}$  in PMMA-Einmalküvetten gefüllt und dann mit Methanol und Phosphatpuffer auf 2940  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen und Polymerkonzentrationen von  $10 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  bis  $200 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  aufgefüllt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugaben von 60  $\mu\text{l}$  einer 250 mM *p*-Nitrophenylacetat-lösung in Methanol, was eine Endkonzentration von 5 mM Substrat und 10% Methanol in der Küvette ergab. Die Absorptionsänderung wurde bei 405 nm in der Zeit von 20 s bis 60 s nach dem Starten der Reaktion gemessen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Für die Bestimmung der Substratabhängigkeit der Aktivität wurden in einer PMMA-Einmalküvette Polymer und Methanol und 20 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,5 in einem Gesamtvolumen von 2,9 ml vorgelegt, so dass mit der Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  *p*-Nitrophenylacetat in Methanol eine Polymerkonzentration von  $50 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ , ein Methanolgehalt von 10% sowie Substratkonzentrationen von 250  $\mu\text{M}$  bis 6 mM erreicht wurden. Auch hier wurde die Änderung der *p*-Nitrophenolabsorption bei 405 nm in der Zeit von 20 s bis 60 s nach dem Start der Reaktion gemessen (Dreifachbestimmungen).

##### 5.2.4.2. *Solvolyse weiterer p-Nitrophenylester*

Zur Evaluierung der Substratspezifität wurden die Solvolysegeschwindigkeiten mit den Substraten *p*-Nitrophenylpropionat und *p*-Nitrophenyl *N*-butyrat bestimmt. Dazu wurden 10 mg der Polymere in 500  $\mu\text{l}$  Methanol suspendiert und anschließend mit 20 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,5 auf 5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Von dieser Stammlösung

(2 mg ml<sup>-1</sup>) wurden 75 µl in PMMA-Einmalküvetten gefüllt und dann mit Methanol und Phosphatpuffer auf 2940 µl Gesamtvolumen und eine Polymerkonzentrationen von 50 µg ml<sup>-1</sup> aufgefüllt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugaben von 60 µl einer 50 mM Substratstammlösung in Methanol, was eine Endkonzentration von 1 mM Substrat und 10% Methanol in der Küvette ergab. Die Absorptionsänderung wurde bei 405 nm in der Zeit von 20 s bis 60 s nach dem Starten der Reaktion gemessen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

#### 5.2.4.3. Umesterung von *p*-Nitrophenylacetat

Für die Umesterung wurden verschiedene Konzentrationen von 1 mM bis 10 mM einer Lösung von *p*-Nitrophenylacetat in Hexanol so zu den Polymeren gegeben, dass eine Polymerkonzentration von 2 mg ml<sup>-1</sup> erhalten wurde. Diese Lösung wurde bei 40°C geschüttelt und in Abständen von 24 h wurden Proben zur Auswertung entnommen. Dafür wurden zu jeweils 10 µl Probe 90 µl Hexanol sowie 900 µl Acetonitril gegeben. Um mögliche Polymerpartikel zu entfernen, wurde die Mischung für 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 250 µl vom Überstand mit 250 µl 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,5) vermischt. Die Absorption wurde bei 405 nm gemessen. Konzentrationen an freiem *p*-Nitrophenol wurden über eine Kalibrationsgerade im Bereich von 0,5 mM bis 5 mM bestimmt. Für die Inhibitionsstudien wurde in den Reaktionsansatz zusätzlich 5 mM *p*-Nitrophenol eingebracht.

### 5.2.5. Untersuchungen im Thermistor

#### 5.2.5.1. Methoden zur Enzymimmobilisierung

Die vom Enzymthermistor ausgegebenen Spannungswerte wurden nach folgender Formel in Temperaturdifferenzen umgerechnet:

$$\frac{\Delta T}{mK} = \frac{\frac{\text{Spannung}}{mV} * \text{Verstärkungsfaktor (Span)}}{66}}{mV/mK}$$



Für die Untersuchungen im Thermistor wurden verschiedene Enzyme an porösem Glas als Träger immobilisiert. Die Immobilisierungen wurden nach einem Protokoll von Hermanson durchgeführt.<sup>[203]</sup>

#### Tyrosinase-Immobilisierung:

250 mg aminopropyl-modifiziertes poröses Glas (CPG) wurden durch eine zweistündige Inkubation mit 5 ml Glutaraldehyd (5% v:v in 0,1 mM Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8)) bei RT aktiviert. Um überschüssiges Glutaraldehyd zu entfernen, wurde der Träger sechsmal mit 5 ml 0,1 mM Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8) auf einer Fritte gewaschen und zwischendurch immer wieder für 10 min geschüttelt. Gleichzeitig wurde eine Lösung von 4,6 mg Tyrosinase (E.C. 1.14.18.1) in 1,5 ml 0,1 mM Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8) für 30 min im Kühlraum geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren der Enzymlösung wurde der Überstand zu dem feuchten Träger gegeben und für 3 h bei RT gekoppelt. Abschließend wurde durch Waschen mit 25 ml 0,1 mM Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8) auf der Fritte das restliche ungebundene Enzym entfernt und der Träger mit immobilisiertem Enzym bei 4°C in 0,1 mM Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8) aufbewahrt.

#### Esterase-Immobilisierung:

250 mg aminopropyl-modifiziertes poröses Glas (CPG) wurden durch 5 ml Glutaraldehyd (5% v:v in 0,1 mM Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8)) für 2 h bei RT aktiviert. Das überschüssige Glutaraldehyd wurde durch sechsmaliges Waschen des Trägers mit 5 ml 0,1 mM Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8) auf der Fritte entfernt. Gleichzeitig wurden 300 µl der Ammoniumsulfat gefällten Esterase-Suspension abzentrifugiert und der Rückstand in 2 ml 0,1 mM Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8) aufgenommen. Diese Enzymlösung wurde zu dem feuchten Träger gegeben und für 3 h bei RT gekoppelt. Abschließend wurde durch Waschen auf der Fritte mit 25 ml 0,1 mM Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8) das restliche ungebundene Enzym entfernt und der Träger mit immobilisiertem Enzym bei 4°C in 0,1 mM Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8) aufbewahrt.

#### 5.2.5.2. *Aktivitätsmessungen im Thermistor*

Für die Temperaturmessungen wurde ein an der Universität Lund entwickelter Enzymthermistor eingesetzt. Es wurden 50 mg oder 150 mg reaktive Substanz im Reaktor

eingesetzt. Weiterhin wurde bei einer konstanten Temperatur von 30°C und Fließgeschwindigkeiten zwischen 0,5 ml min<sup>-1</sup> und 2 ml min<sup>-1</sup> gemessen. Als Lauf- und Probenpuffer wurde 20 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,5) / 10% Methanol verwendet und die Proben unmittelbar vor der Messung in diesem gelöst. Als Referenz zur entstehenden Wärme im Reaktor wurde entweder ein zweiter Reaktor oder eine Temperatursonde benutzt, welche die Blocktemperatur direkt maß.

#### 5.2.5.3. *Bestimmung des Umsatzgrades mit Hilfe einer Tyrosinaseelektrode*

Während sich das Temperatursignal im stationären Bereich befand, wurde Puffer mit dem enthaltenen Produkt aufgefangen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dies diente der Verhinderung einer weiteren Spontansolvolyse des restlichen Substrates bis zur weiteren Probenverarbeitung.

Nach dem Auftauen wurde der Phenolgehalt der Proben in einer Rührzelle mit einer Dickschicht-Tyrosinaseelektrode der Firma BST amperometrisch gemessen.<sup>[191]</sup> Dazu wurden 10 µl Probe in 490 µl 100 mM Kalium/Natrium Phosphatpuffer (pH 6,9) / 100 mM NaCl verdünnt. Das angelegte Potential betrug -50 mV gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode. Die Kalibration der Elektrode erfolgte analog über eine Konzentrationsreihe mit Phenol (1 µM; 2,5 µM; 10 µM; 25 µM; 100 µM)

## 6. Literaturverzeichnis

1. G. Wulff, *Molekulares Prägen (Imprinting) in vernetzten Materialien mit Hilfe von Matrizenmolekülen - auf dem Weg zu künstlichen Antikörpern*. *Angewandte Chemie*, **1995** (107): S. 1958-1979.
2. M.V. Polyakov, *Adsorption properties and structure of silica gel*. *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*, **1931** (2): S. 799-804.
3. M.V. Polyakov, L.P. Kuleshina, und I.E. Neimark, *On the dependence of silica gel adsorption properties on the character of its porosity*. *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*, **1937** (10): S. 100-112.
4. P. Ehrlich, *On Immunity with Special Reference to Cell Life*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **1900** (66): S. 424-448.
5. F. Breinl und F. Haurowitz, *Chemical examinations on the precipitate from haemoglobin and anti-haemoglobin serum and comments on the nature of antibodies*. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **1930** (192): S. 45-57.
6. S. Mudd, *A Hypothetical Mechanism of Antibody Formation*. *Journal of Immunology*, **1932** (23): S. 423-427.
7. L. Pauling, *A Theory of the Formation of Antibodies*. *Journal of the American Chemical Society*, **1940** (62): S. 2643-2657.
8. K. Dabulis und A.M. Klibanov, *Molecular Imprinting of Proteins and Other Macromolecules Resulting in New Adsorbents*. *Biotechnology and Bioengineering*, **1992** (39): S. 176-185.
9. M. Ståhl, M.-O. Månsson, und K. Mosbach, *The Synthesis of a D-Amino Acid Ester in an Organic Media with  $\alpha$ -Chymotrypsin Modified by a Bio-Imprinting Procedure*. *Biotechnology Letters*, **1990** (12): S. 161-166.
10. H.P. Yennawar, H.P. Yennawar, und G.K. Farber, *A Structural Explanation for Enzyme Memory in Nonaqueous Solvents*. *Journal of the American Chemical Society*, **1995** (117): S. 577-585.
11. A. Johansson, K. Mosbach, und M.-O. Månsson, *Horse Liver Alcohol-Dehydrogenase Can Accept NADP(+) as Coenzyme in High-Concentrations of Acetonitrile*. *European Journal of Biochemistry*, **1995** (227): S. 551-555.
12. F.H. Dickey, *The Preparation of Specific Adsorbents*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1949** (35): S. 227-229.
13. R.G. Haldeman und P.H. Emmett, *Specific Adsorption of Alkyl Orange Dyes on Silica Gel*. *Journal of Physical Chemistry*, **1955** (59): S. 1039-1043.

14. K. Morihara, S. Kurihara, und J. Suzuki, *Footprint Catalysis .1. A New Method for Designing Tailor-Made Catalysts with Substrate-Specificity - Silica (Alumina) Catalysts for Butanolysis of Benzoic Anhydride*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, **1988** (61): S. 3991-3998.
15. K. Morihara, *et al.*, *Enzyme-Like Enantioselective Catalysis over Chiral Molecular Footprint Cavities on a Silica (Alumina) Gel Surface*. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, **1992**: S. 358-360.
16. W.R. Ahmad und M.E. Davis, *Transesterification on "imprinted" silica*. Catalysis Letters, **1996** (40): S. 109-114.
17. G. Wulff und A. Sarhan, *Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for Resolution of Racemates*. Angewandte Chemie-International Edition, **1972** (11): S. 341.
18. T. Takagishi und I.M. Klotz, *Macromolecule-Small Molecule Interactions; Introduction of Additional Binding Sites in Polyethyleneimine by Disulfide Cross-linkages*. Biopolymers, **1972** (11): S. 483-491.
19. G. Wulff, J. Vietmeier, und H.G. Poll, *Enzyme-Analog Built Polymers .22. Influence of the Nature of the Cross-Linking Agent on the Performance of Imprinted Polymers in Racemic-Resolution*. Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics, **1987** (188): S. 731-740.
20. S. Striegler, *Investigation of disaccharide recognition by molecularly imprinted polymers*. Bioseparation, **2001** (10): S. 307-314.
21. N. Sneshkoff, K. Crabb, und J.J. BelBruno, *An improved molecularly imprinted polymer film for recognition of amino acids*. Journal of Applied Polymer Science, **2002** (86): S. 3611-3615.
22. M. Kempe und K. Mosbach, *Separation of Amino-Acids, Peptides and Proteins on Molecularly Imprinted Stationary Phases*. Journal of Chromatography A, **1995** (691): S. 317-323.
23. M. Yoshikawa, *et al.*, *Molecularly imprinted polymeric membranes containing DIDE derivatives for optical resolution of amino acids*. Macromolecules, **1996** (29): S. 8197-8203.
24. H.Q. Zhang, L. Ye, und K. Mosbach, *Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development*. Journal of Molecular Recognition, **2006** (19): S. 248-259.
25. I. Surugiu, *et al.*, *Chemiluminescence Imaging ELISA Using an Imprinted Polymer as the Recognition Element Instead of an Antibody*. Analytical Chemistry, **2001** (73): S. 487-491.
26. L.I. Andersson, *Molecular Imprinting for Drug Bioanalysis; A Review on the Application of Imprinted Polymers to Solid-Phase Extraction and Binding Assay*. Journal of Chromatography, **2000** (739): S. 163-173.

27. M. Kempe, M. Glad, und K. Mosbach, *An Approach Towards Surface Imprinting using the Ezyme Ribonuclease A*. Journal of Molecular Recognition, **1995** (8): S. 35-39.
28. H. Nishino, C.S. Huang, und K.J. Shea, *Selective protein capture by epitope imprinting*. Angewandte Chemie-International Edition, **2006** (45): S. 2392-2396.
29. F.L. Dickert, *et al.*, *Nano- and micro-structuring of sensor materials - from molecule to cell detection*. Synthetic Metals, **2003** (138): S. 65-69.
30. F.L. Dickert, O. Hayden, und K.P. Halikias, *Synthetic receptors as sensor coatings for molecules and living cells*. Analyst, **2001** (126): S. 766-771.
31. L. Ye, O. Ramström, und K. Mosbach, *Molecularly imprinted polymeric adsorbents for byproduct removal*. Analytical Chemistry, **1998** (70): S. 2789-2795.
32. G. Wulff, L. Zhu, und H. Schmidt, *Investigations on surface-modified bulk polymers .I. Copolymers of styrene with a styrene moiety containing a sugar monomer*. Macromolecules, **1997** (30): S. 4533-4539.
33. A.G. Strikovskiy, *et al.*, *Catalytic molecularly imprinted polymers using conventional bulk polymerization or suspension polymerization: Selective hydrolysis of diphenyl carbonate and diphenyl carbamate*. Journal of the American Chemical Society, **2000** (122): S. 6295-6296.
34. H.S. Andersson, *et al.*, *Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers, II [1] - Influence of monomer-template ratio and sample load on retention and selectivity*. Journal of Chromatography A, **1999** (848): S. 39-49.
35. D.J. O'Shannessy, B. Ekberg, und K. Mosbach, *Molecular Imprinting of Amino Acid Derivatives at Low Temperature (0°C) Using Photolytic Homolysis of Azobisnitriles*. Analytical Biochemistry, **1989** (177): S. 144-149.
36. E. Yilmaz, *et al.*, *A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates*. Journal of Materials Chemistry, **2002** (12): S. 1577-1581.
37. K.J. Shea und E.A. Thompson, *Template Synthesis of Macromolecules - Selective Functionalization of an Organic Polymer*. Journal of Organic Chemistry, **1978** (43): S. 4253-4255.
38. J. Matsui, *et al.*, *Molecular Recognition in Continuous Polymer Rods Prepared by a Molecular Imprinting Technique*. Analytical Chemistry, **1993** (65): S. 2223-2224.
39. J. Matsui, I.A. Nicholls, und T. Takeuchi, *Molecular recognition in cinchona alkaloid molecular imprinted polymer rods*. Analytica Chimica Acta, **1998** (365): S. 89-93.
40. T. Takeuchi und J. Matsui, *Miniaturized molecularly imprinted continuous polymer rods*. Hrc-Journal of High Resolution Chromatography, **2000** (23): S. 44-46.

41. O. Brüggemann, *et al.*, *Comparison of polymer coatings of capillaries for capillary electrophoresis with respect to their applicability to molecular imprinting and electrochromatography*. *Journal of Chromatography A*, **1997** (781): S. 43-53.
42. L. Schweitz, L.I. Andersson, und S. Nilsson, *Capillary electrochromatography with predetermined selectivity obtained through molecular imprinting*. *Analytical Chemistry*, **1997** (69): S. 1179-1183.
43. L. Schweitz, L.I. Andersson, und S. Nilsson, *Molecular imprint-based stationary phases for capillary electrochromatography*. *Journal of Chromatography A*, **1998** (817): S. 5-13.
44. T. Takeuchi, D. Fukuma, und J. Matsui, *Combinatorial molecular imprinting: An approach to synthetic polymer receptors*. *Analytical Chemistry*, **1999** (71): S. 285-290.
45. O. Norrlöw, M. Glad, und K. Mosbach, *Acrylic Polymer Preparations Containing Recognition Sites Obtained by Imprinting with Substrates*. *Journal of Chromatography*, **1984** (299): S. 29-41.
46. K. Hirayama, *et al.*, *Synthesis of polymer-coated silica particles with specific recognition sites for glucose oxidase by the molecular imprinting technique*. *Chemistry Letters*, **1998**: S. 731-732.
47. C. Sulitzky, *et al.*, *Grafting of molecularly imprinted polymer films on silica supports containing surface-bound free radical initiators*. *Macromolecules*, **2002** (35): S. 79-91.
48. E. Yilmaz, K. Haupt, und K. Mosbach, *The use of immobilized templates - A new approach in molecular imprinting*. *Angewandte Chemie. International Ed. In English*, **2000** (39): S. 2115-2118.
49. M.M. Titirici, A.J. Hall, und B. Sellergren, *Hierarchically imprinted stationary phases: Mesoporous polymer beads containing surface-confined binding sites for adenine*. *Chemistry of Materials*, **2002** (14): S. 21-23.
50. M.M. Titirici, A.J. Hall, und B. Sellergren, *Hierarchical imprinting using crude solid phase peptide synthesis products as templates*. *Chemistry of Materials*, **2003** (15): S. 822-824.
51. T.A. Sergeyeva, *et al.*, *Selective recognition of atrazine by molecularly imprinted polymer membranes. Development of conductometric sensor for herbicides detection*. *Analytica Chimica Acta*, **1999** (392): S. 105-111.
52. J. Mathew-Krotz und K.J. Shea, *Imprinted polymer membranes for the selective transport of targeted neutral molecules*. *Journal of the American Chemical Society*, **1996** (118): S. 8154-8155.
53. M. Lahav, *et al.*, *Tailored chemosensors for chloroaromatic acids using molecular imprinted TiO<sub>2</sub> thin films on ion-sensitive field-effect transistors*. *Analytical Chemistry*, **2001** (73): S. 720-723.

54. S.P. Pogorelova, *et al.*, *Selective sensing of triazine herbicides in imprinted membranes using ion-sensitive field-effect transistors and microgravimetric quartz crystal microbalance measurements*. *Analyst*, **2002** (127): S. 1484-1491.
55. A. Flores, *et al.*, *Imprinted polymers prepared by aqueous suspension polymerization*. *Journal of Applied Polymer Science*, **2000** (77): S. 1841-1850.
56. R.J. Ansell und K. Mosbach, *Molecularly imprinted polymers by suspension polymerisation in perfluorocarbon liquids, with emphasis on the influence of the porogenic solvent*. *Journal of Chromatography A*, **1997** (787): S. 55-66.
57. A.G. Mayes und K. Mosbach, *Molecularly imprinted polymer beads: Suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase*. *Analytical Chemistry*, **1996** (68): S. 3769-3774.
58. L. Ye, P.A.G. Cormack, und K. Mosbach, *Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay*. *Analytical Communications*, **1999** (36): S. 35-38.
59. L. Ye, R. Weiss, und K. Mosbach, *Synthesis and characterization of molecularly imprinted microspheres*. *Macromolecules*, **2000** (33): S. 8239-8245.
60. Z.H. Zhang, *et al.*, *Microspheres sensor based on molecularly imprinted polymer synthesized by precipitation polymerization*. *Chinese Journal of Chemistry*, **2003** (21): S. 550-555.
61. G. Wulff und S. Schauhoff, *Enzyme-Analog-Built Polymers .27. Racemic-Resolution of Free Sugars with Macroporous Polymers Prepared by Molecular Imprinting - Selectivity Dependence on the Arrangement of Functional-Groups Versus Spatial Requirements*. *Journal of Organic Chemistry*, **1991** (56): S. 395-400.
62. G. Wulff, *Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates - a Way Towards Artificial Antibodies*. *Angewandte Chemie. International Ed. In English*, **1995** (34): S. 1812-1832.
63. J. Damen und D.C. Neckers, *On the Memory of Synthesized Vinyl-Polymers for Their Origins*. *Tetrahedron Letters*, **1980** (21): S. 1913-1916.
64. J. Damen und D.C. Neckers, *Stereoselective Syntheses Via a Photochemical Template Effect*. *Journal of the American Chemical Society*, **1980** (102): S. 3265-3267.
65. J. Damen und D.C. Neckers, *Memory of Synthesized Vinyl-Polymers for Their Origins*. *Journal of Organic Chemistry*, **1980** (45): S. 1382-1387.
66. G. Wulff, A. Sarhan, und K. Zabrocki, *Enzyme-Analog Built Polymers and Their Use for Resolution of Racemates*. *Tetrahedron Letters*, **1973**: S. 4329-4332.
67. G. Wulff, B. Heide, und G. Helfmeier, *Molecular Recognition through the Exact Placement of Functional-Groups on Rigid Matrices Via a Template Approach*. *Journal of the American Chemical Society*, **1986** (108): S. 1089-1091.

68. K.J. Shea und T.K. Dougherty, *Molecular Recognition on Synthetic Amorphous Surfaces - the Influence of Functional-Group Positioning on the Effectiveness of Molecular Recognition*. Journal of the American Chemical Society, **1986** (108): S. 1091-1093.
69. C. Alexander, *et al.*, *Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003*. Journal of Molecular Recognition, **2006** (19): S. 106-180.
70. G. Wulff und K. Knorr, *Stoichiometric noncovalent interaction in molecular imprinting*. Bioseparation, **2002** (10): S. 257-276.
71. R. Arshady und K. Mosbach, *Synthesis of Substrate-Selective Polymers by Host-Guest Polymerization*. Macromolecular Chemistry and Physics, **1981** (182): S. 687-692.
72. B. Sellergren, M. Lepisto, und K. Mosbach, *Highly Enantioselective and Substrate-Selective Polymers Obtained by Molecular Imprinting Utilizing Noncovalent Interactions - Nmr and Chromatographic Studies on the Nature of Recognition*. Journal of the American Chemical Society, **1988** (110): S. 5853-5860.
73. G. Wulff und R. Schönfeld, *Polymerizable amidines - Adhesion mediators and binding sites for molecular imprinting*. Advanced Materials, **1998** (10): S. 957-+.
74. K. Haupt, A.G. Mayes, und K. Mosbach, *Herbicide Assay Using an Imprinted Polymer-Based System Analogous to Competitive Fluoroimmunoassays*. Analytical Chemistry, **1998** (70): S. 3936-3939.
75. I. Surugiu, *et al.*, *An Enzyme-Linked Molecularly Imprinted Sorbent Assay*. Analyst, **2000** (125): S. 13-16.
76. O. Ramström, L. Ye, und K. Mosbach, *Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting*. Chemistry & Biology, **1996** (3): S. 471-477.
77. P. Appelblad und K. Irgum, *Separation and detection of neuroactive steroids from biological matrices*. Journal of Chromatography A, **2002** (955): S. 151-182.
78. H. Tsunemori, *et al.*, *Surface imprinting polymers for the recognition of nucleotides*. Bioseparation, **2001** (10): S. 315-321.
79. B. Wandelt, *et al.*, *Steady-state and time-resolved fluorescence studies of fluorescent imprinted polymers*. Journal of Luminescence, **2003** (102): S. 774-781.
80. K. Haupt, *Imprinted polymers - Tailor-made mimics of antibodies and receptors*. Chemical Communications, **2003**: S. 171-178.
81. C. Alexander und E.N. Vulfson, *Spatially functionalized polymer surfaces produced via cell-mediated lithography*. Advanced Materials, **1997** (9): S. 751-755.
82. M.J. Whitcombe und E.N. Vulfson, *Imprinted polymers*. Advanced Materials, **2001** (13): S. 467-478.



83. G. Wulff, *et al.*, *Über enzymanalog gebaute Polymere, III. Zur Synthese von polymerisierbaren D-Glycerinsäurederivaten*. *Chemische Berichte-Recueil*, **1974** (107): S. 3364-3376.
84. B. Sellergren und L. Andersson, *Molecular Recognition in Macroporous Polymers Prepared by a Substrate-Analog Imprinting Strategy*. *Journal of Organic Chemistry*, **1990** (55): S. 3381-3383.
85. V.P. Joshi, *et al.*, *Effect of solvents on selectivity in separation using molecularly imprinted adsorbents: Separation of phenol and bisphenol A*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **1999** (38): S. 4417-4423.
86. J.Q. Liu und G. Wulff, *Functional mimicry of the active site of carboxypeptidase A by a molecular imprinting strategy: Cooperativity of an amidinium and a copper ion in a transition-state imprinted cavity giving rise to high catalytic activity*. *Journal of the American Chemical Society*, **2004** (126): S. 7452-7453.
87. Y. Fujii, *et al.*, *Template Synthesis of Polymer Schiff-Base Cobalt(III) Complex and Formation of Specific Cavity for Chiral Amino-Acid*. *Chemistry Letters*, **1984**: S. 1487-1490.
88. Y.N. Zeng, *et al.*, *Cyclic voltammetry characterization of metal complex imprinted polymer*. *Journal of Molecular Recognition*, **2002** (15): S. 204-208.
89. T. Yamazaki, *et al.*, *Towards the use of molecularly imprinted polymers containing imidazoles and bivalent metal complexes for the detection and degradation of organophosphotriester pesticides*. *Analytica Chimica Acta*, **2001** (435): S. 209-214.
90. K. Sreenivasan, *The use of metal-containing monomer in the preparation of molecularly imprinted polymer to increase the adsorption capacity*. *Journal of Applied Polymer Science*, **2001** (80): S. 2795-2799.
91. G.H. Chen, *et al.*, *A glucose-sensing polymer*. *Nature Biotechnology*, **1997** (15): S. 354-357.
92. A.J. Tong, H. Dong, und L.D. Li, *Molecular imprinting-based fluorescent chemosensor for histamine using zinc (II)-protoporphyrin as a functional monomer*. *Analytica Chimica Acta*, **2002** (466): S. 31-37.
93. S. Vidyasankar, M. Ru, und F.H. Arnold, *Molecularly imprinted ligand-exchange adsorbents for the chiral separation of underivatized amino acids*. *Journal of Chromatography A*, **1997** (775): S. 51-63.
94. T. Takeuchi, *et al.*, *Molecularly imprinted polymers with metalloporphyrin-based molecular recognition sites coassembled with methacrylic acid*. *Analytical Chemistry*, **2001** (73): S. 3869-3874.
95. J. Matsui, M. Higashi, und T. Takeuchi, *Molecularly imprinted polymer as 9-ethyladenine receptor having a porphyrin-based recognition center*. *Journal of the American Chemical Society*, **2000** (122): S. 5218-5219.

96. J. Matsui, Y. Tachibana, und T. Takeuchi, *Molecularly imprinted receptor having metalloporphyrin-based signaling binding site*. Analytical Communications, **1998** (35): S. 225-227.
97. G. Wulff und B. Kuhneweg, *Radically initiated asymmetric cyclizations as model reactions for asymmetric cyclopolymers*. Journal of Organic Chemistry, **1997** (62): S. 5785-5792.
98. L.I. Andersson, D.J. O'Shannessy, und K. Mosbach, *Molecular Recognition in Synthetic-Polymers - Preparation of Chiral Stationary Phases by Molecular Imprinting of Amino-Acid Amides*. Journal of Chromatography, **1990** (513): S. 167-179.
99. D. Nopper, *et al.*, *Amidine-based molecularly imprinted polymers - new sensitive elements for chiral chemosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2003** (377): S. 608-613.
100. J. Haginaka, *et al.*, *Molecularly imprinted uniform-sized polymer-based stationary phase for naproxen - Comparison of molecular recognition ability of the molecularly imprinted polymers prepared by thermal and redox polymerization techniques*. Journal of Chromatography A, **1998** (816): S. 113-121.
101. K. Hirayama, *et al.*, *Preparation of a sensor device with specific recognition sites for acetaldehyde by molecular imprinting technique*. Sensors and Actuators B-Chemical, **2002** (86): S. 20-25.
102. S.A. Piletsky, *et al.*, *Surface functionalization of porous polypropylene membranes with molecularly imprinted polymers by photograft copolymerization in water*. Macromolecules, **2000** (33): S. 3092-3098.
103. M. Glad, P. Reinholdsson, und K. Mosbach, *Molecularly Imprinted Composite Polymers Based on Trimethylolpropane Trimethacrylate (Trim) Particles for Efficient Enantiomeric Separations*. Reactive Polymers, **1995** (25): S. 47-54.
104. B. Sellergren und K.J. Shea, *Influence of Polymer Morphology on the Ability of Imprinted Network Polymers to Resolve Enantiomers*. Journal of Chromatography, **1993** (635): S. 31-49.
105. L. Schweitz, *Molecularly imprinted polymer coatings for open-tubular capillary electrochromatography prepared by surface initiation*. Analytical Chemistry, **2002** (74): S. 1192-1196.
106. P. Martin, *et al.*, *Evaluation of a Molecular-Imprinted Polymer for Use in the Solid Phase Extraction of Propranolol from Biological Fluids*. Analytical Communication, **1997** (34): S. 45-47.
107. M.-C. Hennion, *Solid-Phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling with Liquid Chromatography*. Journal of Chromatography, **1999** (856): S. 3-54.

108. I. Chianella, *et al.*, *MIP-based solid phase extraction cartridges combined with MIP-based sensors for the detection of microcystin-LR*. *Biosensors & Bioelectronics*, **2003** (18): S. 119-127.
109. M. Kempe, *Antibody-Mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC*. *Analytical Chemistry*, **1996** (68): S. 1948-1953.
110. J. Matsui, *et al.*, *A Molecularly Imprinted Synthetic-Polymer Receptor-Selective for Atrazine*. *Analytical Chemistry*, **1995** (67): S. 4404-4408.
111. O. Ramström, C. Yu, und K. Mosbach, *Chiral recognition in adrenergic receptor binding mimics prepared by molecular imprinting*. *Journal of Molecular Recognition*, **1996** (9): S. 691-696.
112. M. Kempe und K. Mosbach, *Direct Resolution of Naproxen on a Noncovalently Molecularly Imprinted Chiral Stationary-Phase*. *Journal of Chromatography A*, **1994** (664): S. 276-279.
113. J. Matsui und T. Takeuchi, *A molecularly imprinted polymer rod as nicotine selective affinity media prepared with 2-(trifluoromethyl)acrylic acid*. *Analytical Communications*, **1997** (34): S. 199-200.
114. O. Ramström, *et al.*, *Screening of a combinatorial steroid library using molecularly imprinted polymers*. *Analytical Communications*, **1998** (35): S. 9-11.
115. S.H. Cheong, *et al.*, *Testosterone receptor binding mimic constructed using molecular imprinting*. *Macromolecules*, **1997** (30): S. 1317-1322.
116. L. Fischer, *et al.*, *Direct Enantioseparation of Beta-Adrenergic Blockers Using a Chiral Stationary Phase Prepared by Molecular Imprinting*. *Journal of the American Chemical Society*, **1991** (113): S. 9358-9360.
117. R. Suedee, *et al.*, *Chiral determination of various adrenergic drugs by thin-layer chromatography using molecularly imprinted chiral stationary phases prepared with alpha-agonists*. *Analyst*, **1999** (124): S. 1003-1009.
118. M. Walshe, *et al.*, *Separation of the enantiomers of propranolol by incorporation of molecularly imprinted polymer particles as chiral selectors in capillary electrophoresis*. *Analytical Communications*, **1997** (34): S. 119-121.
119. Z.X.J. Tan und V.T. Remcho, *Molecular imprint polymers as highly selective stationary phases for open tubular liquid chromatography and capillary electrochromatography*. *Electrophoresis*, **1998** (19): S. 2055-2060.
120. M.T. Muldoon und L.H. Stanker, *Molecularly imprinted solid phase extraction of atrazine from beef liver extracts*. *Analytical Chemistry*, **1997** (69): S. 803-808.
121. C. Baggiani, *et al.*, *A molecularly imprinted polymer for the pesticide bentazone*. *Analytical Communications*, **1999** (36): S. 263-266.

122. M. Walshe, *et al.*, *The preparation of a molecular imprinted polymer to 7-hydroxycoumarin and its use as a solid-phase extraction material*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1997** (16): S. 319-325.
123. A. Kugimiya und T. Takeuchi, *Application of indoleacetic acid-imprinted polymer to solid phase extraction*. *Analytica Chimica Acta*, **1999** (395): S. 251-255.
124. W.M. Mullet, E.P.C. Lai, und B. Sellergren, *Determination of Nicotine in Tobacco by Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction with Differential Pulsed Elution*. *Analytical Communication*, **1999** (36): S. 217-220.
125. N. Masqué, *et al.*, *Synthesis and Evaluation of a Molecularly Imprinted Polymer for Selective On-Line Solid-Phase Extraction of 4-Nitrophenol from Environmental Water*. *Analytical Chemistry*, **2000** (72): S. 4122-4126.
126. B. Sellergren, *Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer*. *Analytical Chemistry*, **1994** (66): S. 1578-1582.
127. J. Matsui, *et al.*, *Solid-Phase Extraction of a Triazine Herbicide Using a Molecularly Imprinted Synthetic Receptor*. *Analytical Communications*, **1997** (34): S. 85-87.
128. L.I. Andersson, A. Paprica, und T. Arvidsson, *A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting*. *Chromatographia*, **1997** (46): S. 57-62.
129. B.A. Rashid, *et al.*, *Preliminary Evaluation of a Molecular Imprinted Polymer for Solid-Phase Extraction of Tamoxifen*. *Analytical Communication*, **1997** (34): S. 303-305.
130. W.M. Mullet und E.P.C. Lai, *Determination of Theophylline in Serum by Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction with Pulsed Elution*. *Analytical Chemistry*, **1998** (70): S. 3636-3641.
131. K. Nilsson, *et al.*, *Imprinted Polymers as Antibody Mimetics and New Affinity Gels for Selective Separations in Capillary Electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, **1994** (680): S. 57-61.
132. L.I. Andersson, *Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field*. *Journal of Chromatography B*, **2000** (745): S. 3-13.
133. M.D. Yan, *Molecularly imprinted polymers as antibody mimics: Applications in immunoassays and recent developments*. *Journal of Clinical Ligand Assay*, **2002** (25): S. 234-236.
134. I. Chianella, *et al.*, *Rational design of a polymer specific for microcystin-LR using a computational approach*. *Analytical Chemistry*, **2002** (74): S. 1288-1293.
135. F.L. Dickert und O. Hayden, *Imprinting with sensor development - On the way to synthetic antibodies*. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **1999** (364): S. 506-511.

136. K. Haupt, K. Noworyta, und W. Kutner, *Imprinted polymer-based enantioselective acoustic sensor using a quartz crystal microbalance*. Analytical Communications, **1999** (36): S. 391-393.
137. T. Kobayashi, *et al.*, *Molecular imprinting of caffeine and its recognition assay by quartz-crystal microbalance*. Analytica Chimica Acta, **2001** (435): S. 141-149.
138. E.P.C. Lai, *et al.*, *Surface plasmon resonance sensors using molecularly imprinted polymers for sorbent assay of theophylline, caffeine, and xanthine*. Canadian Journal of Chemistry-Revues Canadienne De Chimie, **1998** (76): S. 265-273.
139. P. Li, *et al.*, *Surface plasmon resonance studies on molecular imprinting*. Sensors, **2002** (2): S. 35-40.
140. N.T.K. Thanh, *et al.*, *Selective recognition of cyclic GMP using a fluorescence-based molecularly imprinted polymer*. Analytical Letters, **2002** (35): S. 2499-2509.
141. M.C. Blanco-Lopez, *et al.*, *Voltammetric sensor for vanillylmandelic acid based on molecularly imprinted polymer-modified electrodes*. Biosensors & Bioelectronics, **2003** (18): S. 353-362.
142. T. Panasyuk-Delaney, *et al.*, *Impedometric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers*. Analytica Chimica Acta, **2001** (435): S. 157-162.
143. O. Ramström und K. Mosbach, *Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials*. Current Opinion in Chemical Biology, **1999** (3): S. 759-764.
144. M.J. Whitcombe, C. Alexander, und E.N. Vulfson, *Imprinted polymers: Versatile new tools in synthesis*. Synlett, **2000**: S. 911-923.
145. G. Wulff, *Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers*. Chemical Reviews, **2002** (102): S. 1-27.
146. C. Wandrey, A. Liese, und D. Kihumbu, *Industrial biocatalysis: Past, present, and future*. Organic Process Research & Development, **2000** (4): S. 286-290.
147. H.J. Wernicke und R.W. Fischer, *Perspektiven industrieller Katalyse - Die Zukunft gestalten*. Chemie Ingenieur Technik, **2006** (78): S. 825-834.
148. W. Adam, *et al.*, *Homogeneous Catalytic-Oxidation of Arenes and a New Synthesis of Vitamin-K-3*. Angewandte Chemie-International Edition, **1994** (33): S. 2475-2477.
149. B.A. Anderson, *et al.*, *Application of a Practical Biocatalytic Reduction to an Enantioselective Synthesis of the 5h-2,3-Benzodiazepine Ly300164*. Journal of the American Chemical Society, **1995** (117): S. 12358-12359.
150. U. Kragl, D. VasicRacki, und C. Wandrey, *Continuous production of L-tert-leucine in series of two enzyme membrane reactors - Modelling and computer simulation*. Bioprocess Engineering, **1996** (14): S. 291-297.

151. H. Nakajima, *et al.*, *Industrial Application of Adenosine 5'-Triphosphate Regeneration to Synthesis of Sugar Phosphates*. *ACS Symposium Series*, **1991** (466): S. 111-120.
152. A.S. Bommarius, *et al.*, *Operational Stability of Enzymes - Acylase-Catalyzed Resolution of N-Acetyl Amino-Acids to Enantiomerically Pure L-Amino-Acids*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1992** (672): S. 126-136.
153. M. Mahmoudian, *et al.*, *An efficient process for production of N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminic acid aldolase*. *Enzyme and Microbial Technology*, **1997** (20): S. 393-400.
154. U. Kragl, *et al.*, *Enzymatic 2-Step Synthesis of N-Acetylneuraminic Acid in the Enzyme Membrane Reactor*. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, **1991** (30): S. 827-828.
155. J.M. Kim, K.D. Ahn, and G. Wulff, *Cholesterol esterase activity of a molecularly imprinted polymer*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2001** (202): S. 1105-1108.
156. M. Emgenbroich und G. Wulff, *A new enzyme model for enantioselective esterases based on molecularly imprinted polymers*. *Chemistry-a European Journal*, **2003** (9): S. 4106-4117.
157. J.Q. Liu und G. Wulff, *Molecularly imprinted polymers with strong carboxypeptidase A-like activity: Combination of an amidinium function with a zinc-ion binding site in transition-state imprinted cavities*. *Angewandte Chemie. International Ed. In English*, **2004** (43): S. 1287-1290.
158. G. Wulff, T. Gross, und R. Schönfeld, *Enzyme models based on molecularly imprinted polymers with strong esterase activity*. *Angewandte Chemie. International Ed. In English*, **1997** (36): S. 1962-1964.
159. K. Ohkubo, *et al.*, *Homogeneous and Heterogeneous Esterolytic Catalyses of Imidazole-Containing Polymers Prepared by Molecular Imprinting of a Transition-State Analog*. *Journal of Molecular Catalysis*, **1994** (87): S. L21-L24.
160. K. Ohkubo, K. Sawakuma, und T. Sagawa, *Shape- and stereo-selective esterase activities of cross-linked polymers imprinted with a transition-state analogue for the hydrolysis of amino acid esters*. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical*, **2001** (165): S. 1-7.
161. A. Leonhardt und K. Mosbach, *Enzyme-Mimicking Polymers Exhibiting Specific Substrate Binding and Catalytic Functions*. *Reactive Polymers*, **1987** (6): S. 285-290.
162. G.E. Lienhard, *Enzymatic Catalysis and Transition-State Theory*. *Science*, **1973** (180): S. 149-154.
163. D.K. Robinson und K. Mosbach, *Molecular Imprinting of a Transition State Analogue Leads to a Polymer Exhibiting Esterolytic Activity*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1989** (14): S. 969-970.

164. K. Ohkubo, *et al.*, *Homogeneous Esterolytic Catalysis of a Polymer Prepared by Molecular Imprinting of a Transition-State Analog*. *Journal of Molecular Catalysis*, **1994** (93): S. 189-193.
165. O. Brüggemann, *Chemical reaction engineering using molecularly imprinted polymeric catalysts*. *Analytica Chimica Acta*, **2001** (435): S. 197-207.
166. S.C. Liu und K. Mosbach, *Studies towards a tailor-made catalyst for the Diels-Alder reaction using the technique of molecular imprinting*. *Macromolecular Rapid Communications*, **1997** (18): S. 609-615.
167. D.R. Thevenot, *et al.*, *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. *Biosensors & Bioelectronics*, **2001** (16): S. 121-131.
168. F.W. Scheller, *et al.*, *Research and development in biosensors*. *Current Opinion in Biotechnology*, **2001** (12): S. 35-40.
169. M.N. Stojanovic, P. de Prada, und D.W. Landry, *Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine*. *Journal of the American Chemical Society*, **2001** (123): S. 4928-4931.
170. F. Kleinjung, *et al.*, *High-affinity RNA as a recognition element in a biosensor*. *Analytical Chemistry*, **1998** (70): S. 328-331.
171. J. Wang, *DNA biosensors based on peptide nucleic acid (PNA) recognition layers. A review*. *Biosensors & Bioelectronics*, **1998** (13): S. 757-762.
172. K. Haupt und K. Mosbach, *Plastic Antibodies: Developments and Applications*. *Trends in Biotechnology*, **1998** (16): S. 468-475.
173. L.I. Andersson, C.F. Mandenius, und K. Mosbach, *Studies on Guest Selective Molecular Recognition on an Octadecyl Silylated Silicon Surface Using Ellipsometry*. *Tetrahedron Letters*, **1988** (29): S. 5437-5440.
174. E. Hedborg, *et al.*, *Some Studies of Molecularly-Imprinted Polymer Membranes in Combination with Field-Effect Devices*. *Sensors and Actuators a-Physical*, **1993** (37-8): S. 796-799.
175. T.L. Panasyuk, *et al.*, *Electropolymerized molecularly imprinted polymers as receptor layers in a capacitive chemical sensors*. *Analytical Chemistry*, **1999** (71): S. 4609-4613.
176. F.L. Dickert, *et al.*, *Molecular imprinting in chemical sensing - Detection of aromatic and halogenated hydrocarbons as well as polar solvent vapors*. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **1998** (360): S. 759-762.
177. C. Malitesta, I. Losito, und P.G. Zambonin, *Molecularly imprinted electrosynthesized polymers: New materials for biomimetic sensors*. *Analytical Chemistry*, **1999** (71): S. 1366-1370.

178. R. Levi, *et al.*, *Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers*. *Analytical Chemistry*, **1997** (69): S. 2017-2021.
179. S. Kröger, *et al.*, *Imprinted polymer based sensor system for herbicides using differential-pulse voltammetry on screen printed electrodes*. *Analytical Chemistry*, **1999** (71): S. 3698-3702.
180. D. Kriz, *et al.*, *Introducing Biomimetic Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers as Recognition Elements*. *Analytical Chemistry*, **1995** (67): S. 2142-2144.
181. D. Kriz und K. Mosbach, *Competitive Amperometric Morphine Sensor-Based on an Agarose Immobilized Molecularly Imprinted Polymer*. *Analytica Chimica Acta*, **1995** (300): S. 71-75.
182. P. Turkewitsch, *et al.*, *Fluorescent functional recognition sites through molecular imprinting. A polymer-based fluorescent chemosensor for aqueous cAMP*. *Analytical Chemistry*, **1998** (70): S. 2025-2030.
183. K. Haupt und K. Mosbach, *Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors*. *Chemical Reviews*, **2000** (100): S. 2495-2504.
184. K. Mosbach und B. Danielsson, *Thermal Bioanalyzers in Flow Streams - Enzyme Thermistor Devices*. *Analytical Chemistry*, **1981** (53): S. A83.
185. V. Stefuca, I. Cipakova, und P. Gemeiner, *Investigation of immobilized glucoamylase kinetics by flow calorimetry*. *Thermochimica Acta*, **2001** (378): S. 79-85.
186. Y.H. Zheng, *et al.*, *Detection of dichlorvos residue by flow injection calorimetric biosensor based on immobilized chicken liver esterase*. *Journal of Food Engineering*, **2006** (74): S. 24-29.
187. K. Ramanathan und B. Danielsson, *Principles and applications of thermal biosensors*. *Biosensors & Bioelectronics*, **2001** (16): S. 417-423.
188. H. Graebner, *et al.*, *Immobilized enzymes - A simple calorimetric method for the determination of the catalytic activity*. *Thermochimica Acta*, **1998** (310): S. 101-105.
189. B. Danielsson, *et al.*, *Evaluation of the Enzyme Thermistor as a Specific Detector for Chromatographic Procedures*. *Analytical Biochemistry*, **1981** (117): S. 84-93.
190. I. Satoh, *Biosensing Using Calorimetric Devices*, in *Chemical Sensor Technology*, T. Seiyama, Editor. **1989**, Elsevier: Amsterdam.
191. D. Werner, Doktorarbeit, *Versuche zur Gewinnung von katalytischen Antikörpern zur Hydrolyse von Arylcarbamaten und Arylharnstoffen*, **2002**, Institut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam, Potsdam
192. T. Koizumi, Y. Arai, und E. Yoshii, *The Reaction of o-phenylenediamine with Phenyl Phosphorodichloridate. Synthesis and Reactions of 2-Phenoxy-1,3-dihydro-2H-1,3,2-benzodiazaphosphole-2-oxide and Related Compounds*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1973** (21): S. 202-206.



193. H. Takaku, K. Tsubuhari, und Y. Nakajima, *A convenient Method for the Preparation of Mixed Diesters of Phosphoric Acid and Pyrophosphates*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **1980** (28): S. 1626-1629.
194. E. Kaiser, *et al.*, *Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in Solid-Phase Synthesis of Peptides*. Analytical Biochemistry, **1970** (34): S. 595-598.
195. C.G. Overberger, *et al.*, *Poly[4(5)-vinylimidazole]*. Macromolecular Synthesis, **1974** (5): S. 43-49.
196. T.C. Bruice und G.L. Schmir, *Imidazole Catalysis .I. The Catalysis of the Hydrolysis of Phenyl Acetates by Imidazole*. Journal of the American Chemical Society, **1957** (79): S. 1663-1667.
197. B. Mizaikoff, Georgia Institute of Technology, School of Chemistry and Biochemistry, Atlanta, GA 30332-0400, U.S.A., *Persönliche Mitteilung: 46. Tutzing-Symposium*, **2007**
198. E. Toorisaka, *et al.*, *A molecularly imprinted polymer that shows enzymatic activity*. Biochemical Engineering Journal, **2003** (14): S. 85-91.
199. M.L. Bender und R.B. Homer, *Mechanism of Alkaline Hydrolysis of P-Nitrophenyl N-Methylcarbamate*. Journal of Organic Chemistry, **1965** (30): S. 3975-3978.
200. P. Wentworth, *et al.*, *Antibody catalysis of B(Ac)<sub>2</sub> aryl carbamate ester hydrolysis: A highly disfavored chemical process*. Journal of the American Chemical Society, **1997** (119): S. 2315-2316.
201. Z.H. Meng, T. Yamazaki, und K. Sode, *A molecularly imprinted catalyst designed by a computational approach in catalysing a transesterification process*. Biosensors & Bioelectronics, **2004** (20): S. 1068-1075.
202. K. Young-Keun, Diplomarbeit, *Development of sensitive biosensors for the detection of esterolytic activities and phenylesters based on a tyrosinase carbon paste electrode*, **2004**, Institut für Biotechnologie, Technische Universität Berlin, Berlin
203. G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. **1996**, San Diego: Academic Press.
204. A. Janovitz-Klapp, F. Richard, und J. Nicolas, *Polyphenoloxidase from Apple, Partial-Purification and Some Properties*. Phytochemistry, **1989** (28): S. 2903-2907.
205. R. Kirchner, *et al.*, *Calorimetric investigation of chiral recognition processes in a molecularly imprinted polymer*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, **2002** (43): S. 279-283.
206. Y. Kawanami, *et al.*, *Imprinted polymer catalysts for the hydrolysis of p-nitrophenyl acetate*. Journal of Molecular Catalysis a-Chemical, **1999** (145): S. 107-110.
207. M. Hesse, H. Meier, und B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7. ed. **2005**, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.