

**Neue molekular geprägte Polymere für die
enantioselektive Katalyse und
zur Verwendung in Chemosensoren**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marco Emgenbroich

aus Hilden

2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Wulff
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1998 bis Juli 2002 am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Günter Wulff durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Wulff danke ich für die vertrauensvolle Aufnahme in seinem Arbeitskreis und die damit verbundene Möglichkeit auf dem interessanten Arbeitsgebiet des „Molecular Imprinting“ zu arbeiten, sowie die Chance mich bei der Organisation und der Leitung der InCom/LifeCom einzubringen.

Meinen langjährigen Kollegen Karsten Knorr, Jochen Bitta, Dr. Lars Peters, Dr. Axel Lache, Dr. Michael Herm, Steffi Manz und Byong Oh Chong danke ich für die freundliche Atmosphäre, sowie für Ihr stetes Interesse am Fortschreiten und Gelingen dieser Arbeit. Nicht zu vergessen ist die Unterstützung meines langjährigen besten Freundes Dr. Thomas Grawe. Mein ganz herzlicher Dank gebührt Sonja Coors für ihre tatkräftige und interessierte Mitarbeit. Auch den Studenten Alenka Dimec, Hakan Cinar und Alexander Mixa danke ich für die Arbeit bei mir im Rahmen ihrer Vertiefungsphasen.

Allen weiteren Kollegen im Arbeitskreis danke ich für die freundschaftliche familiäre Arbeitsatmosphäre und die großzügige Hilfsbereitschaft.

Auch erwähnt seien alle Kollegiaten und Professoren des Graduiertenkollegs „Molekulare Physiologie“, die mir in den letzten Jahren die Möglichkeit gaben, über den Tellerrand hinaus zu schauen und eine neue offene Sichtweise zu erhalten.

Einen ganz herzlichen Dank an Dr. Stefan Kostrewa für die fruchtbare aber leider zu kurze Zusammenarbeit bei MIP meets SERS.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziell unterstützt. Für die Korrektur des Manuskripts danke ich Karsten Knorr und Thomas Grawe. Schließlich danke ich Anika Wolf für ihre liebevolle Geduld sowie ihren Glauben an mich und natürlich auch meiner Familie, besonders meinen Großeltern, für ihre Unterstützung.



für meine Großmutter

Klara Emgenbroich

geb. Kramer

*7.6.1921 †22.12.2002

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Theoretischer Teil	13
2.1 Problemstellung und Ziele	13
2.2 Neue molekular geprägte Polymere für die Katalyse	16
2.2.1 Synthese der Substrate und der übergangszustandsanalogen Template	19
2.2.2 Synthese der geprägten Polymere	25
2.2.3 Untersuchung der polymeren Katalysatoren	28
2.2.4 Ablauf des Katalysemechanismus	38
2.2.5 Inhibitionsuntersuchungen	46
2.3 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung an geprägten Polymerschichten	51
2.3.1 Einführung in die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)	51
2.3.2 Herstellung der SERS-aktiven Polymerschichten	57
2.3.3 SERS-Messungen der geprägten Polymerschichten	61
3 Zusammenfassung und Ausblick	68
4 Experimenteller Teil	72
4.1 Katalytisch aktive geprägte Polymere	72
4.1.1 Apparatives	72
4.1.2 Ausgangskemikalien und Lösungsmittel	73
4.1.3 Reinigung der Comonomere	75
4.1.4 Synthesen der organischen Verbindungen	76
4.1.5 Darstellung der molekular geprägten Polymere	104
4.1.6 Durchführung der Kinetikmessungen	106
4.2 SERS-aktive Polymerschichten	111
4.2.1 Ausgangskemikalien, Metalloberflächen	111
4.2.2 Herstellung der Polymerschichten	111
4.2.3 Raman und SERS Spektroskopie	112
5 Abkürzungsverzeichnis	114
6 Literatur	115

„Wissenschaft ist Irrtum auf den letzten Stand gebracht.“

Linus Carl Pauling (1901-1994),
Nobelpreis für Chemie 1954, Friedensnobelpreis 1963

1 Einleitung

In biochemischen Vorgängen kommt Enzymen und Rezeptoren eine essentielle Bedeutung zu. Ein zentraler Prozeß dabei ist der Schritt der molekularen Erkennung.

So übernehmen Rezeptoren die Aufgabe des Signalempfängers und des Informationswandlers, wobei alle Rezeptoren für chemische Transmitter zwei biochemische Eigenschaften gemeinsam haben: Sie besitzen eine Bindungsstelle für den Liganden und üben in der Zelle eine Effektorfunktion aus. Beispielsweise ist der Immunantwort eines Organismus die molekulare Erkennung kleinster Mengen eines körperfremden Stoffes vorausgeschaltet, worauf sofort die Bildung spezifischer Antikörper folgt.

In Enzymen wiederum verursacht die Erkennung eines Substratmoleküls und die darauf folgende Stabilisierung des Reaktionsübergangszustandes eine Herabsenkung der Aktivierungsenergie. Somit wird die Geschwindigkeit der Reaktion beschleunigt, das Reaktionsgleichgewicht jedoch nicht beeinflußt.

Alle natürlichen Systeme besitzen eine enorm hohe Selektivität und Spezifität, deren Erkennungsmerkmale auf eine dem einzulagernden Substratmolekül komplementären Konformation und der definierten räumlichen Anordnung geeigneter Haftgruppen basieren.

Naturwissenschaftler verschiedenster Disziplinen haben es sich zu Ihrer Aufgabe gemacht, die Prozesse in Enzymen und Rezeptoren zu verstehen und zu beschreiben.

Seit mehr als einem viertel Jahrhundert versuchen Chemiker niedermolekulare, supramolekulare oder makromolekulare Ansätze zu entwickeln, um Enzym- und Rezeptoreigenschaften zu studieren und nachzuahmen.

Durch niedermolekulare Systeme ist es möglich, einzelne Erkennungsmerkmale nachzuahmen. Dadurch ist zwar keine spezifische Erkennung möglich, aber es konnten somit erfolgreiche Mimetika für enzymähnliche Katalysen vorgestellt werden. Zu den interessanten niedermolekularen Enzymmimetika gehören die Systeme von Göbel et al..^[1, 2]

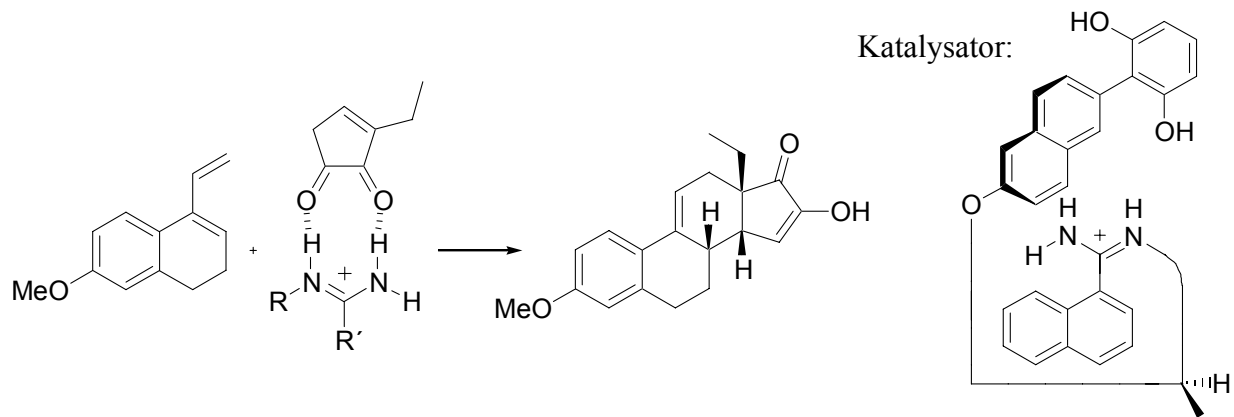


Abbildung 1. Enantioselektive Katalyse einer Diels-Alder Reaktion durch Göbel et al..^[1, 2]

Die Katalyse einer Diels-Alder Reaktion wird im allgemeinen durch Bindung des Dienophils mit relativ starken chiralen Lewis Säuren erreicht (siehe Abbildung 1). Göbels Ansatz verwendet eine Wasserstoffbrücken-vermittelte Bindung des Dienophils an den chiralen Katalysator. In einer enantioselektive Reaktion, die das Steroidgerüst Norgestrel bildet, wurde durch chirale Amidiniumionen ein Verhältnis der beiden Enantiomeren von 2,5:1 erreicht.

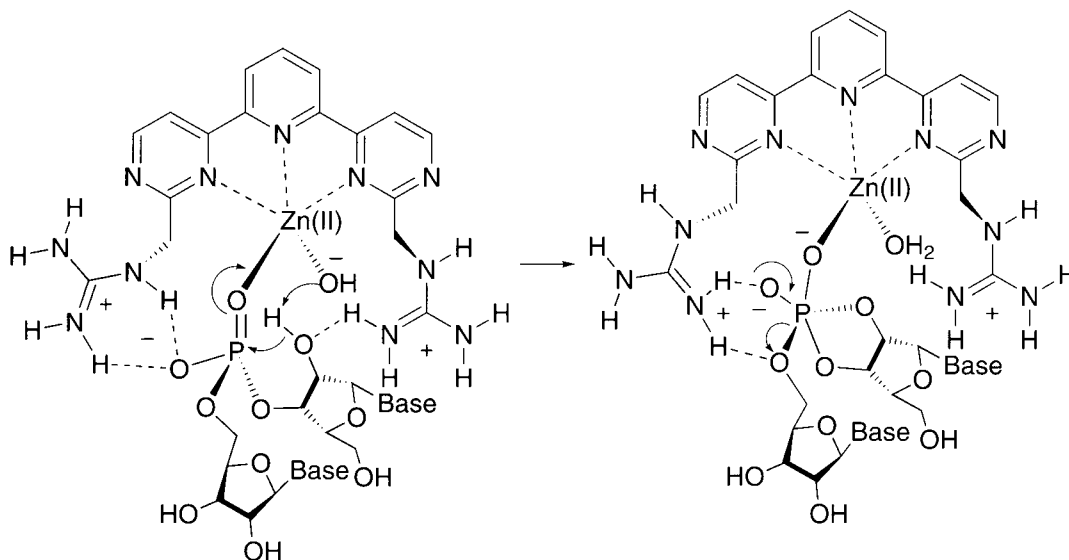


Abbildung 2. Mimetikum einer RNAase basierend auf der Kooperativität zwischen dem Metallzentrum und den Guanidingruppen – Vorgeschlagener Mechanismus für den nukleophilen Angriff und die Abspaltung der Abgangsgruppe gefördert durch das Zn^{II} .^[3]

Unter den jüngsten Veröffentlichungen befindet sich ein interessanter Ansatz von Anslyn et al., bei dem mit einem synthetischen niedermolekularen Katalysator (ersichtlich in Abbildung 2), der ein Zink-Ion und zwei Guanidingruppen aufweist, die Phosphatgruppen zwischen zwei Nucleotiden in der RNA hydrolysiert werden konnten.^[3] Durch diese Nachahmung der Kooperativität zwischen Zn^{II} und den Guanidingruppen einer RNAase wurde durch Extrapolation der Hintergrundreaktion ohne Katalysator eine Beschleunigung zur Lösung von nahezu 10^6 bei $37^\circ C$ berechnet.

Um die Selektivität im Vergleich zu niedermolekularen Ansätzen zu verbessern, basieren einige Mimetika auf der supramolekularen Chemie, ein in den letzten Jahren stark expandierendes Gebiet. Dabei standen bisher meist die Rezeptoreigenschaften im Vordergrund, es wurden aber auch zunehmend Systeme mit katalytischen Wirksamkeiten vorgestellt. In modernen synthetischen Rezeptoren wird eine dreidimensionale Erkennung der Gastmoleküle durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen erzielt. Schrader et al. haben einen Rezeptor für Adrenalin-derivate vorgestellt, in dem die natürlichen Wechselwirkungen in einem Makrozyklus, u.a. durch die Einführung von Phosphonatgruppen, gezielt nachgeahmt werden. Mit diesem Makrozyklus konnte eine Selektivität für die Bindung von Noradrenalin gefunden werden (Assoziationskonstante von $215 M^{-1}$ in $D_2O/MeOD$ 1:1 für den gebildeten 1:1-Komplex).^[4]

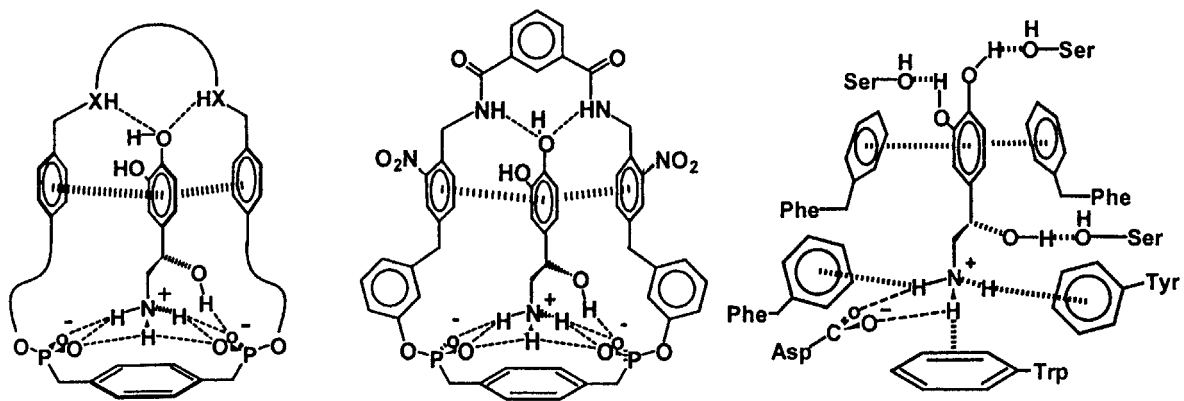


Abbildung 3. Mehrpunktbindung von Adrenalin-derivaten durch einen biomimetischen Adrenalinwirt mit integrierten Phosphonaten. Links: Schema der geplanten Wechselwirkungen; Mitte: vorgeschlagener Bindungsmodus; Rechts: natürliches Bindungsmuster von Noradrenalin im Adrenalinrezeptor.^[4]

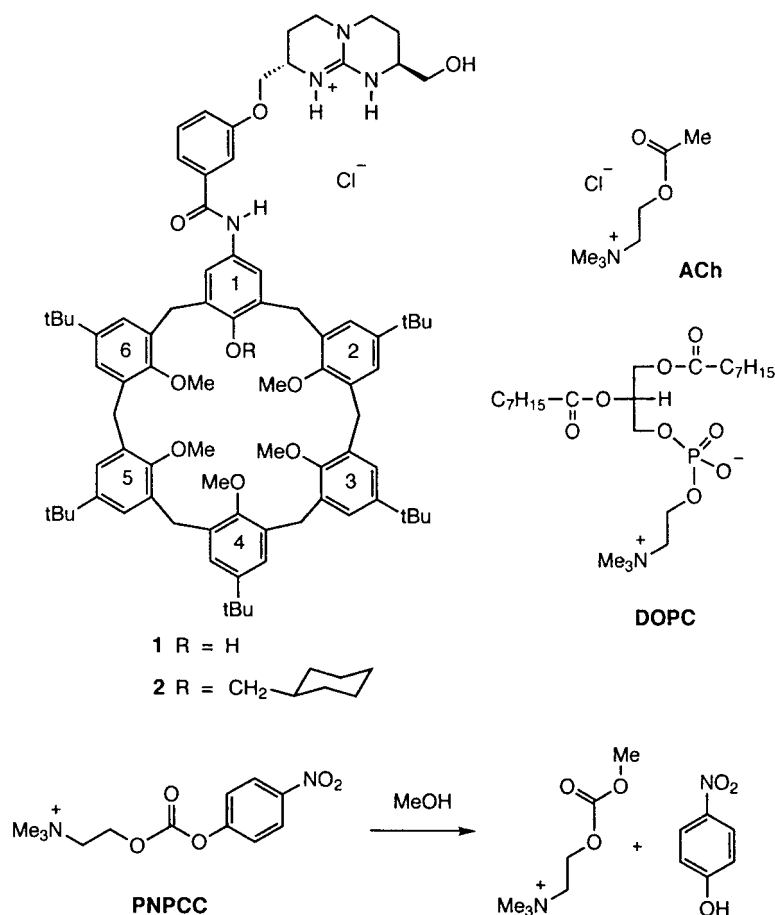


Abbildung 4. Methanolyse mit supramolekularem Katalysator nach de Mendoza.^[16]

niumgruppe sowie der Hohlraum des Calixarens blockiert, wodurch die Reaktion kompetitiv inhibiert wird.

Neben nieder- und supramolekularen Ansätzen wurden auch die Vorteile einer dreidimensionalen, polymeren Struktur für Mimetika von Rezeptoren und Enzymen verwendet. Einen makromolekularen Ansatz bietet das „Molecular Imprinting“. In der Arbeitsgruppe von Wulff wurde in den Siebziger Jahren diese neue Methode eingeführt, um solche Strukturen in synthetischen Polymeren (enzymanalogue gebaute Polymere) zu erhalten.^[17-19] Es konnten ähnlich wie bei Antikörpern, künstliche Hohlräume (Kavitäten) erzeugt werden, die komplementär zu einem bestimmten Matrizenmolekül sind. Dazu wird ein hochvernetztes Copolymer um ein Templatmolekül herum (siehe Abbildung 5), in Anwesenheit eines als Porogen wirkendes Lösungsmittel durch radikalische Initiation geformt. Zusätzlich befinden sich bestimmte Haftgruppen in spezifischer räumlicher Anordnung innerhalb des Hohlräumcs. Um diese Gruppen einführen zu können, beinhaltet die Monommischung funktionelle Monomere, die

Durch die Verwendung der supramolekularen Chemie^[5-11] konnten neben der reinen Erkennung auch katalytische Effekte erzielt werden (Übersichtsartikel Enzymmodelle siehe^[12-14], Buch siehe^[15]). So haben de Mendoza et al. einen künstlichen Katalysator synthetisiert, der die Methanolyse eines Carbonats um den Faktor 149 beschleunigt.^[16] Der Makrozyklus (Abbildung 4) besteht aus einem Calix[6]aren-Grundgerüst, welches als katalytisch aktive Gruppen ein Guanidiniumteil enthält. Durch einen Gast, der stärker gebunden werden kann als das Substrat, wird die Guanidi-

über kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen mit den Templaten interagieren können. Nach dem Entfernen des Templats aus dem entstandenen Polymer, verbleibt ein Hohlraum, der die eingeführten funktionelle Gruppen in einer bestimmten Orientierung enthält. Die Form des erzeugten Abdruckes und die Anordnung der funktionellen Gruppen sind komplementär zur Struktur des Templats (Übersichtsartikel und Bücher siehe^[19-25]). Somit können Polymere und Polymerschichten, mit einer hohen Selektivität für die Adsorption des Templatmoleküls, hergestellt werden.

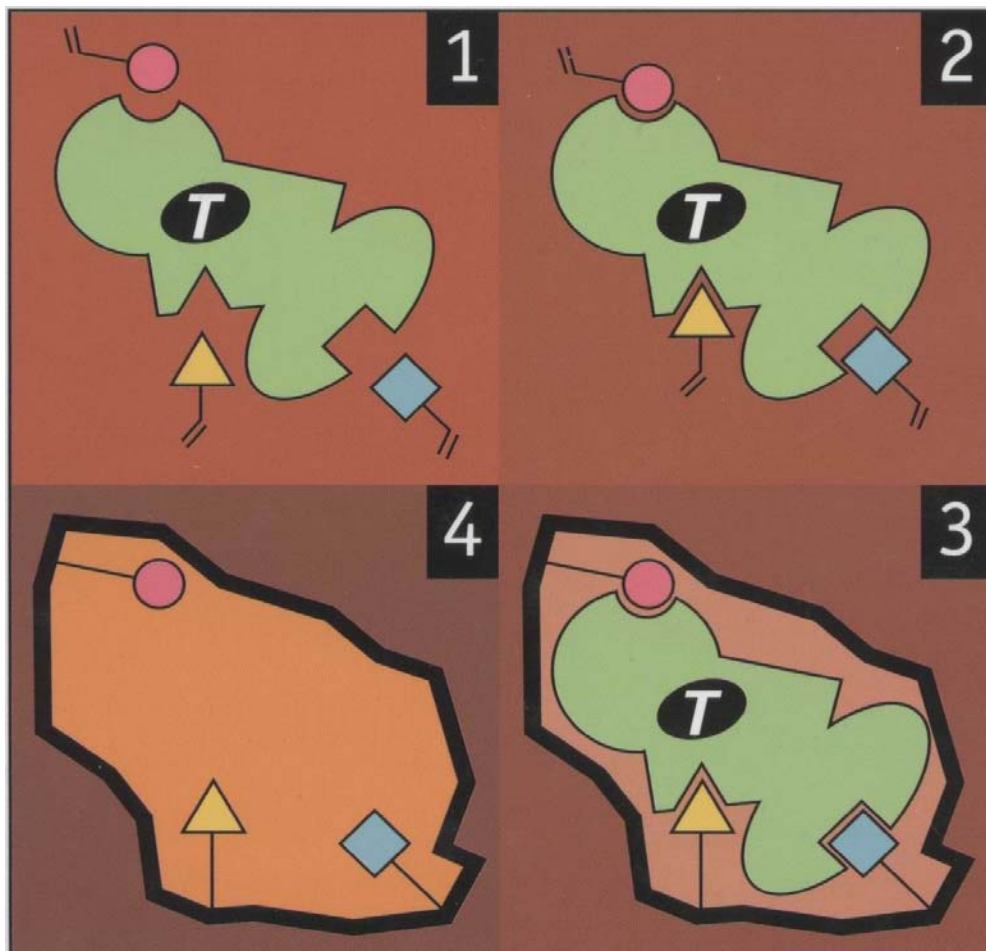


Abbildung 5. Prinzip des Molecular Imprinting^[26]

Seitdem wurde dieses Konzept von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen weltweit aufgegriffen. In den 80er Jahren führte die Arbeitsgruppe von Mosbach, zusätzlich zu den kovalenten Wechselwirkungen, auch nicht-kovalenten Wechselwirkungen ein. Anfangs wurden ausschließlich die Acryl- oder Methacrylsäure als funktionelle Monomere eingesetzt. Im Laufe der Jahre sind weitere Haftmonomere wie 4-Vinylpyridin hinzugekommen.^[27, 28] Zahlreiche Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit der Beschreibung und Optimierung der Polymereigenschaften, wobei vor allem die sogenannte „Polyklonalität“ der aktiven Zentren von

Interesse ist.^[29-32] Dies beschreibt die Tatsache das geprägte Polymere, im Gegensatz zu Enzymen und monoklonalen Antikörpern, aktive Zentren mit unterschiedlichen Eigenschaften hinsichtlich der Bindungsstärke, Selektivität oder auch der katalytischen Aktivität besitzen. Erste erfolgreiche Anwendungen von geprägten Polymeren konnten als stationäre Phase in Chromatographiesäulen erzielt werden, wobei hohe Selektivitäten bei der Racemattrennung erreicht wurden. Auf diese Weise können beispielsweise auch pharmakologisch relevante Substanzen gereinigt werden, wie zum Beispiel Betablocker, entzündungshemmende Mittel und Pentamidine.^[33]

Um mit dem Molecular Imprinting einen Katalysator herzustellen, dessen Funktionsweise einem Enzym ähnelt, muß die Kavität als aktives Zentrum generiert werden, deren Gestalt, analog der katalytisch aktiven Antikörpern (Catalytic Antibodies), der Form des Substrates oder besser der Form des Übergangszustandes der Reaktion entspricht.^[34-36] Dadurch erfolgt eine Stabilisierung des Übergangszustandes der zu

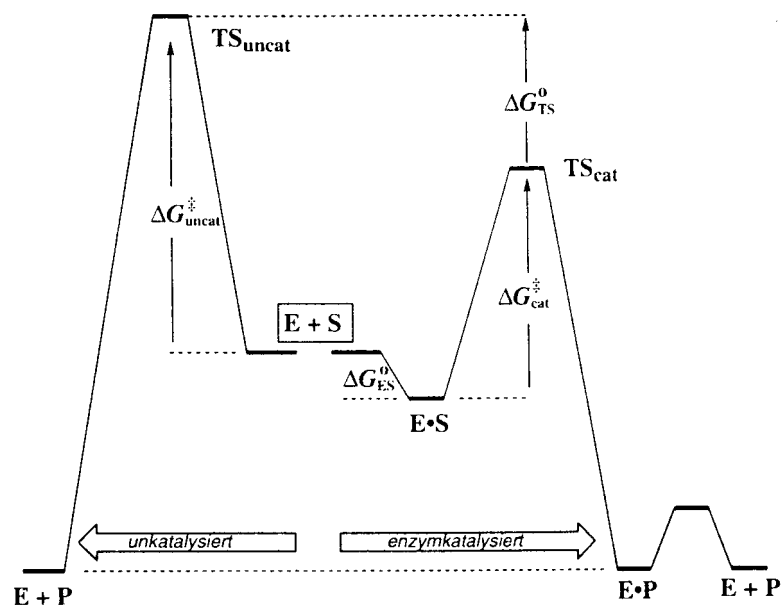


Abbildung 6. Energieverlauf einer unkatalysierten und einer enzymkatalysierten Reaktion (Ordinate: Gibbs-Energie; Abzisse: Reaktionsverlauf)^[14]

katalysierenden Reaktion, wodurch die Aktivierungsenergie (um den Betrag ΔG_{TS}^0) erniedrigt wird, wie aus Abbildung 6 ersichtlich ist. Ferner müssen funktionelle Gruppen in einer passenden dreidimensionalen Anordnung in die Kavität eingeführt werden, die als Haftgruppen, Cozymanaloga oder katalytisch aktiver Gruppen wirken können.

Die funktionellen Gruppen, die bei der Herstellung geprägter Polymere als Katalysatoren eingeführt werden sollen, müssen einerseits als Haftgruppen sowie andererseits als katalytisch aktive Gruppen fungieren. Das bedeutet, daß die Haftmonomere für eine feste Bindung während des Prägeprozesses sorgen müssen, dennoch soll nachher eine nahezu vollständige Abspaltung des Templates garantiert werden können, und des weiteren sollen diese Gruppen

ein schnelles Gleichgewicht in der Substratbindung und während der Katalyse selbst sicherstellen.^[39] Die Haftgruppen sind einer der Schlüssel, zum Erlangen katalytischer Aktivität. Weiterhin ist es notwendig eine Form des Hohlraumes zu kreieren, die die Katalyse, beispielsweise durch die Stabilisierung des Übergangszustands der Reaktion, unterstützt. Dieser Ansatz wurde inspiriert durch die Arbeiten von Schulz, Lerner und Benkovic, die Antikörper gegen stabile Übergangszustandsanaloga einer Reaktion generiert und katalytisch aktive Antikörper erhalten haben.^[40, 41] An katalytischen Antikörpern konnte gezeigt werden, daß, ähnlich wie in Enzymen, zusätzlich zur Form des aktiven Zentrums im Antikörper, spezielle katalytisch aktive Gruppen wie Guanidine oder Imidazole die Reaktion beträchtlich beschleunigen.^[37, 38] So wird angenommen, daß bei der Bildung des Antiköpers gegen das Hapten in Abbildung 7 das Phosphonat-Anion durch die Guanidingruppe des Arginins L96 komplexiert wird. Das Histidin L91 hat die Aufgabe den Ester (bzw. Amid) durch einen nukleophilen Angriff zu aktivieren.

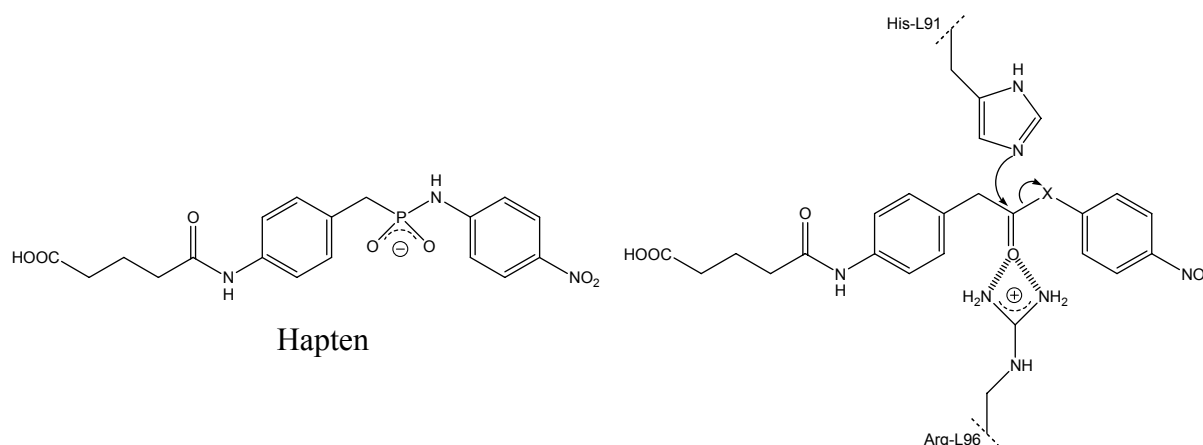


Abbildung 7. Substrataktivierung im Antikörper durch eine Guanidingruppe nach Benkovic^[37, 38]

Zu den am besten untersuchten Reaktionen in der Antikörperchemie gehören die Esterhydrolysen und folglich wurden solche Reaktionen im Molecular Imprinting zuerst untersucht^[42-46] (Übersichtsartikel siehe ^[39]). Für die Katalyse ist es von daher von besonderem Interesse, in geprägten Polymeren aktive Zentren mit der Gestalt des Übergangszustands herzustellen und katalytisch aktive Gruppen in die korrekten Positionen innerhalb der Zentren zu positionieren. Das Hauptproblem besteht darin, geeignete Templatsysteme zu finden, die sowohl die Analogie zum Übergangszustand (Abbildung 8) als auch die Haftgruppen und katalytische aktive Gruppen in den gewünschten Positionen enthalten.

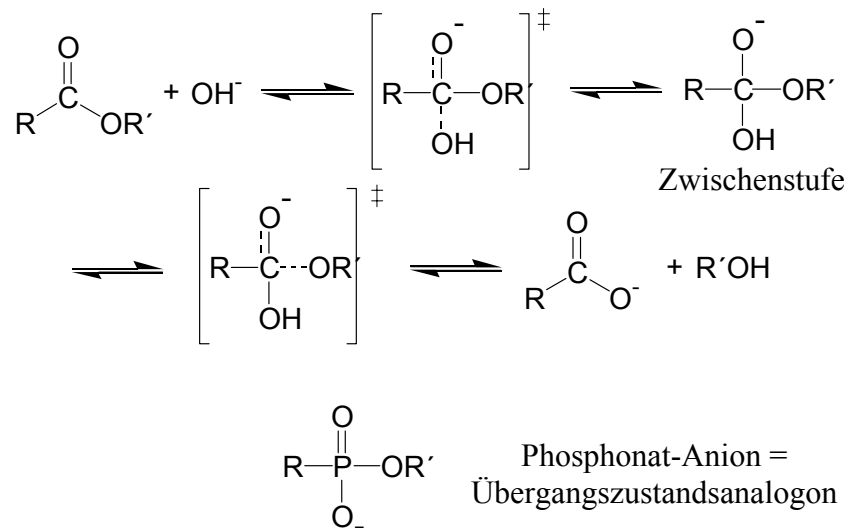


Abbildung 8. *Basische Esterhydrolyse (B_{ac2}) – Analogie zum Übergangszustand*

Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems ist die Verwendung nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen Templatmolekülen und Haftmonomeren mit starken Bindungen (Bindungskonstanten $>10^3 \text{ l mol}^{-1}$), sogenannter stöchiometrisch nicht-kovalenter Wechselwirkungen, wie die Bindung zwischen Haftmonomeren mit Amidgruppen und Carbon-, Phosphon- oder Phosphorsäuren.^[47, 48] In dieser Hinsicht ist es interessant darauf hinzuweisen, daß die aktivsten Esterasevertreter der katalytischen Antikörper Guanidingruppen (aus der Aminosäure L-Arginin) enthalten, die eine wichtige Rolle bei der Katalyse der basischen Esterhydrolyse spielen (siehe Abbildung 8).^[37] Dementsprechend haben Wulff et al. Amidgruppen in polymeren Katalysatoren für die Bindung und Katalyse zur Beschleunigung der basischen Hydrolyse von Estern, Carbonaten und Carbamaten eingesetzt.^[39, 43, 49-52] Durch diesen Ansatz waren sie in der Lage Katalysatoren zu erhalten, welche 102-235-fache Beschleunigungen bei Esterhydrolysen, im Vergleich zur Reaktion in Lösung zeigten. Im Fall der Carbonate und Carbamate war die Hydrolyse, katalysiert durch ein geprägtes Polymer, 588 mal bzw. 1400-3860 mal schneller. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Kinetiken dieser Katalysatoren enzymähnlich sind und nach dem Ansatz von Michaelis und Menten ausgewertet werden konnten.

Sellergren und Shea^[44, 45] haben bereits katalytisch aktive geprägte Polymere für die enantioselective Hydrolyse von Aminosäureestern präsentiert. Durch Kombination von kovalenten und nicht-kovalenten Wechselwirkungen wurde der Hohlraum erzeugt. Als Templat wurde eine chirale α -Aminophosphonsäure verwendet. Durch eine Imidazol-, eine phenolische

Hydroxy- und eine Carbonsäuregruppe wurde die katalytische Triade im aktiven Zentrum von Chymotrypsin nachgeahmt (siehe Abbildung 9). Während die Beschleunigung nicht sehr stark ausfiel (2,5-fache gegenüber dem Kontrollpolymer und 10-fache gegenüber der Lösung), war die Enantioselektivität der Hydrolyse mit $k_D/k_L = 1,85$ relativ hoch.

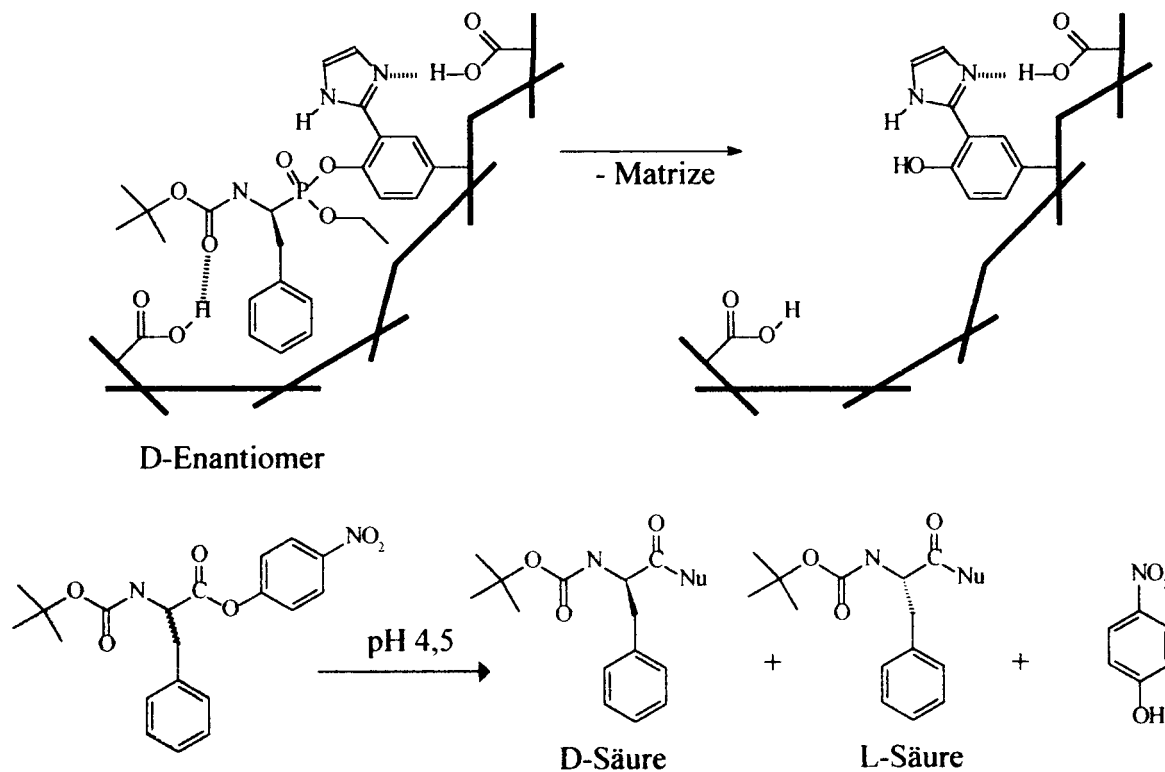


Abbildung 9. Enantioselektives Esterasemodell nach Shea und Selligren^[44, 45]

Allgemein kann gesagt werden, daß molekular geprägte Polymer aufgrund ihrer Eigenschaften bezüglich Erkennung, Katalyse, Vielseitigkeit der Polymerstruktur und Stabilität in vielen Gebieten zum Einsatz kommen. So beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen weltweit neben der Grundlagenforschung hinsichtlich der Anwendung beispielsweise als Katalysatoren auch mit eher praxisorientierten Bereichen in der Analytik.

In den letzten Jahren stieg bei Analytikern das Interesse am Molecular Imprinting. (Übersichtsartikel siehe ^[19-22, 39, 53, 54]). Geprägte Polymere finden Verwendung als chromatographische Materialien oder in der Festphasenextraktion.^[19, 22, 39, 53] Unlängst wurden Applikationen in Bereichen der biologischen^[55], der Lebensmittelanalytik^[56] und pharmazeutischen Analytik^[57] sowie der Umweltanalytik^[58] vorgestellt.

Molekular geprägte Polymere können ebenso als sensitive Schicht in sogenannten Chemosensoren (Übersichtsartikel siehe ^[53, 59-61]) verwendet werden. In Chemosensoren wird ein bestimmter Analyt mit Hilfe der sensitiven Einheit erkannt und daraus wird über ein

Transducersystem ein elektrisches Signal erzeugt, welches proportional zur Konzentration des Analyten ist.

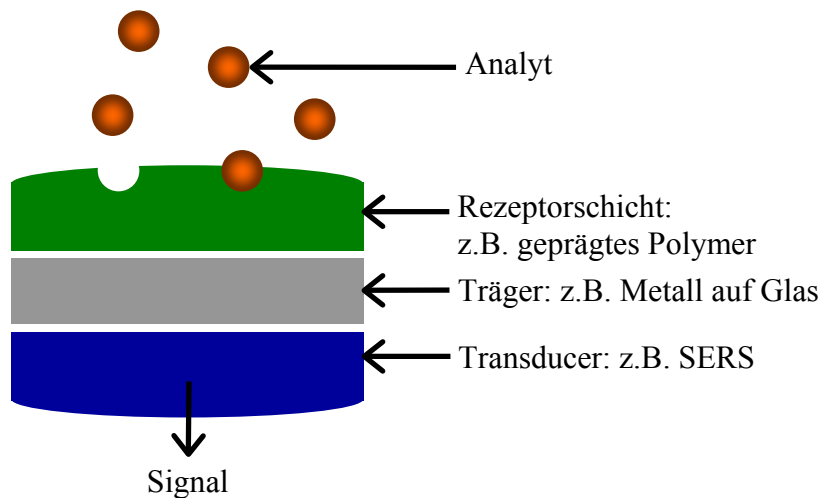


Abbildung 10. Aufbau eines Chemosensors

Die sensitive Einheit besteht aus einer Rezeptorschicht, welche selektiv mit dem Analyten in Wechselwirkung tritt. Hierdurch kommt es entweder zur Änderung von physikalischen oder chemischen Eigenschaften der Rezeptorschicht oder aber es ist ein direkter Nach-

weis des adsorbierten Analyten möglich. Zu den messbaren Parametern gehören z. B. Temperatur, Masse, elektrische Kenngrößen wie Spannung, Strom, Leitfähigkeit und Kapazität oder optische Eigenschaften wie Brechungsindex, Absorption, Streuung, optische Schichtdicke oder Fluoreszenz.

An Chemosensoren wird eine Reihe von Anforderungen gestellt. Hierzu gehören:

- eine hohe Selektivität für einen bestimmten Analyten oder eine Analytgruppe;
- eine hohe Sensitivität zur Erfassung geringer Konzentrationen;
- die Umwandlung chemischer Information in ein elektrisches Signal (Transducerprinzip);
- ein eindeutiger (meist linearer) Zusammenhang zwischen dem elektrischen Signal und der Analytkonzentration;
- die Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Meßeffekte;
- ein schnelles Ansprechverhalten;
- Langzeitstabilität der sensitiven Schicht;
- niedrige Kosten in Produktion, Betrieb und Wartung;
- eine mögliche Miniaturisierbarkeit.

Eher realistisch ist allerdings, daß kein Chemosensor allen Anforderungen in gleicher Weise gerecht werden kann, sondern daß jedem Analyseproblem eine unterschiedliche Gewichtung der verschiedenen Aspekte zukommt.

Viele Sensormessgrößen sind unspezifisch für den Analyten, so daß die Selektivität alleine über die Wechselwirkung mit der Sensoroberfläche gegeben ist und die Adsorption von Ver-

unreinigungen zu Querempfindlichkeiten führt. Bei der direkten Detektion über molekülspezifische Meßgrößen wie z.B. IR-Absorption oder Raman-Streuung wird durch die Kombination von selektiver Adsorption und spezifischer Detektion eine hohe Selektivität erreicht. Dies kann auch einen Multikomponentennachweis mit einem einzelnen Sensor ermöglichen. Aufgrund der hohen Vernetzung molekular geprägter Polymere sind direkte Untersuchungen von Aufnahme und Freisetzung der Template schwierig. Deshalb wurden bisher in den meisten Veröffentlichungen die verschiedensten, meistens indirekte Methoden, für die Untersuchung eingesetzt.^[62-66] Folgerichtig besteht ein großes Interesse daran, Methoden für direkte Messungen zu entwickeln.

Ein direktes Signal sollte durch die hochsensitive und selektive Methode der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (surface enhanced Raman-scattering = SERS)^[67-69] möglich sein. SERS erzeugt Schwingungsspektren, welche für die adsorbierte Substanz charakteristisch sind und durch den Vergleich mit einem Referenzspektrum für die Identifikation einer Komponente verwendet werden können.

Verglichen mit anderen spektroskopischen Methoden, die in diesem Bereich eingesetzt wurden, wie RiFS^[70] (refractometric interference spectroscopy) oder SPR^[71-73] (surface plasmon resonance) wird SERS kaum durch Kreuzselektivitäten, verursacht durch unspezifische Adsorption, Quellung oder Schrumpfung des Polymers, pH-Abhängigkeit oder den Einfluß der Analytkonzentration, beeinträchtigt, wodurch die Auswertung vereinfacht wird.

Ein Hauptproblem in der Anwendung von SERS bei der Detektion selektiv gebundener Substanzen ergibt sich aus der Notwendigkeit der Kombination der selektiven Schicht, in diesem Fall des geprägten Polymers, mit einer SERS-aktiven Metalloberfläche. In früheren Arbeiten wurden solche SERS-aktiven Metalloberflächen bereits mit niedermolekularen organischen Substanzen modifiziert.^[74] Auf diese Weise konnten durch chemische Modifikation selektive Adsorptionszentren erzeugt und durch diese Rezeptorschichten eine Reihe von Molekülen erkannt werden. Dieses Konzept wurde erfolgreich demonstriert für die Adsorption aromatischen Komponenten aus Wasser und der Gasphase auf SERS-aktive Oberflächen, die mit Käfigmolekülen wie Calixarenen^[75] oder Cyclodextrinen^[76] beschichtet waren.

Das breite Spektrum des Forschungsbereiches Molecular Imprinting, neben der Katalyse und den analytischen Anwendungen, zeigen unter anderem die Arbeiten von Alexander et al., die durch geprägte Polymere das Kristallwachstum in die nicht bevorzugte Modifikation steuern.^[77, 78] Sie stellten einen gegen Calcitkristalle geprägte Polymerschicht vor, mit der bemerkenswerten Eigenschaft, daß in den erzeugten Abdruck Calciumcarbonat bei 95°C wieder als

Calcit kristallisiert werden konnte, obwohl bei diesen Bedingungen die Aragonitform bevorzugt kristallisiert.

Das Molecular Imprinting ist in den letzten Jahren mehr zu einer Methode gereift, was sich in der Vielfalt der publizierten Möglichkeiten und Untersuchungen widerspiegelt. Neben der grundlegenden Optimierung der Eigenschaften, wie zum Beispiel der Verringerung der „Polyklonalität“ oder der Verbesserung des Massentransfers durch das Polymer, stehen besonders die praxisorientierten Applikationen im Interesse der aktuellen Forschung.

2 Theoretischer Teil

2.1 Problemstellung und Ziele

Das Interesse am Molecular Imprinting entwickelt sich besonders in zwei Richtungen. Während viele Arbeiten weiterhin versuchen durch neue Grundlagenerkenntnisse das Gebiet weiterzubringen und gründlicher zu erforschen, sind andere Arbeiten schon an Anwendungen dieser Technologie interessiert.

Durch die Einführung neuer Polymerisationsverfahren, z.B. durch Miniemulsionspolymerisation, oder durch die Einführung neuer Haftmonomere und Templatsysteme kommt man dem Ziel, Polymere herzustellen, deren Größe und Eigenschaften enzymanalog sind, langsam näher.

Mit der Einführung neuer polymerisierbarer Haftgruppen wird über stöchiometrisch nicht-kovalente Wechselwirkungen^[48] ein stabiler Komplex gebildet, der während der Polymerisation zu mindestens 90% vorliegt. Dazu gehören vor allem als Haftgruppen die *N,N'*-

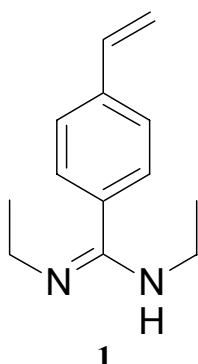


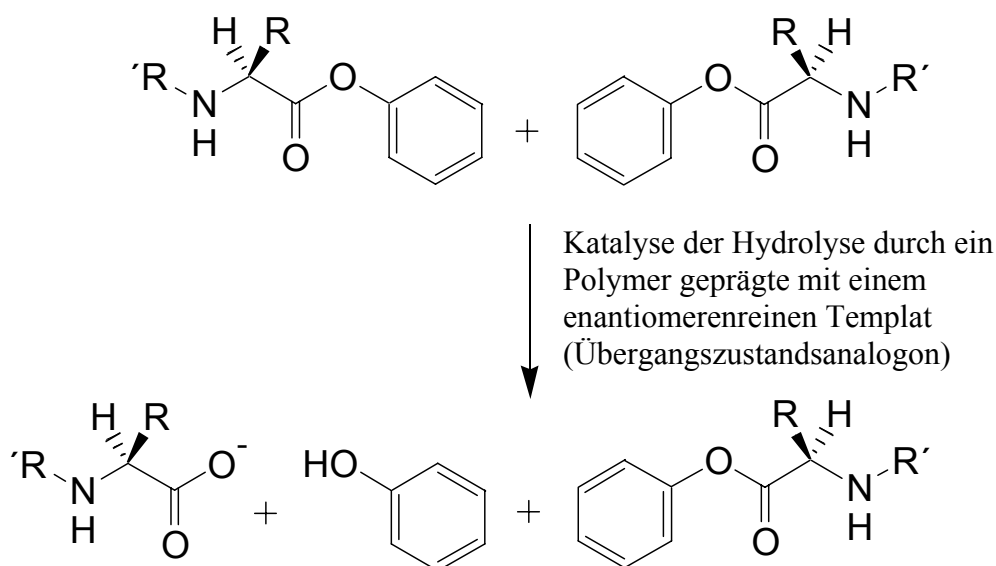
Abbildung 11.
N,N'-Diethyl-4-vinylbenzamidin (**1**)

Dialkyl-4-vinylbenzamidine, die von Schönfeld Ende der Neunziger erstmals synthetisiert wurden. So konnten geprägte Polymere mit *N,N'*-Diethyl-4-vinylbenzamidin (**1**) erfolgreich zur Erkennung von Aminosäurederivaten verwendet werden. Mit diesen neuen Haftmonomeren konnten erstmals Wiederbelegungsraten bis zu 100% erreicht werden. Die Enantioselektivitäten in der Templaterkennung der Polymere konnten in Abhängigkeit von der Wiederbelegungsrate auf 1,50 bei 100% und auf 2,80 bei 5% gesteigert werden. Des Weiteren wurden diese Haftmonomere in der Herstellung neuer Polymere für die Esterhydrolyse, sowie Carbonat- und Carbamathydrolyse eingesetzt.^[43, 49]

Polymere mit stöchiometrisch nicht-kovalenten Wechselwirkungen auf Amidinbasis wurden neben den klassischen Polymeren mit kovalenten Wechselwirkungen auch schon auf ihre Verwendung in Chemosensoren in Verbindung mit der reflektrometrischen Interferenzspektroskopie (RifS) untersucht.^[70] Voraussetzung dafür war die Herstellung einer Polymerschicht auf einem Glasträger. Die hergestellten Polymere zeigten reversible Signale und konnten im Konzentrationsbereich von 3,0 bis 5,5 mM kalibriert werden. Sie zeigten eine

Enantioselektivität mit einem α -Wert von 1,2. Die Versuchsreihe zur Kalibrierung umfaßte ebenfalls die Bestimmung der Zeitperioden, die von dem Beginn der Aufnahme des Analyten (Templats) bzw. des Auswaschens bis zum Erreichen eines konstanten Wertes des vermessenen Signals, benötigt wurden. Die Adsorption des Templats erreichte nach etwa 30 Minuten ein Maximum, wohingegen die Freisetzung erst nach 45 Minuten auf einem Minimum konstant blieb.

Im Rahmen dieser Arbeit werden neue Ansätze aus zwei Teilbereichen des Molecular Imprinting vorgestellt. Im ersten Teil wird ein neues biomimetisches Modell für die enzymähnliche enantioselektive Katalyse eingeführt, in dem die Fähigkeiten der molekular geprägten Polymere in der Katalyse und der Enantiomerenerkennung kombiniert werden. Der zweiten Teil beschäftigt sich mit der Untersuchung molekular geprägter Polymer-schichten mit Hilfe der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS).



Schema 1. Schema der Zielsetzung: enantioselektive Esterhydrolyse katalysiert durch einen neuen geprägten Katalysator.

Für die Entwicklung der neuen biomimetischen Katalysatoren sollten die Erkenntnisse der vergangenen Jahre in Bezug auf die Erkennung und insbesondere der Katalyse mittels stöchiometrisch nicht-kovalenter Wechselwirkungen in molekular geprägten Polymeren im Rahmen dieser Doktorarbeit weiter verwendet werden. Die Wahl der Moleküle basiert auf den Erfahrungen, die in den letzten Jahren mit den neuen Haftmonomeren auf Amidinbasis (**1**) erzielt wurden. Es kommen also als Bindungsmotive organische Säuregruppen in Frage, die an die Amidin-Gruppen über Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen

binden können, wodurch sich die Anzahl der in Frage kommenden Reaktionen hauptsächlich auf solche beschränkt, die im Übergangszustand eine negative Ladung tragen. Dazu gehören vor allem die basischen Hydrolysen von Estern und Carbonaten, aber auch Reaktionen mit C-H-aciden-Verbindungen, wie zum Beispiel Aldol- oder Claisenreaktionen. Aufgrund der Erfahrung mit geprägten Polymeren als Esterasemodelle im Arbeitskreis Wulff, wird auch in dieser Arbeit ein System für die Esterhydrolyse untersucht. Dazu wird die Synthese der enantiomerenreinen Templatmoleküle, der entsprechenden optisch reinen Substrate und die Darstellung, sowie die Eigenschaften der katalytisch aktiven geprägten Polymere beschrieben.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung geprägter Polymere auf SERS-aktiven Metalloberflächen und die Sorptionseigenschaften dieser Rezeptorschichten mittels SERS als spektroskopische Detektionsmethode vorgestellt. In diesen Polymeren sollen ebenfalls stöchiometrisch nicht-kovalente Wechselwirkungen zum Einsatz kommen, wobei die Template auf kommerziell erhältliche Substanzen beschränkt sein sollen.

Diese Kombination von Molecular Imprinting und SERS bietet zusätzlich die Möglichkeit solche Schichten für die Anwendung in Sensoren zu testen. Molekular geprägte Polymer-schichten stellen ein stabiles und leicht herzustellendes Erkennungssystem mit starken und selektiven Adsorptionseigenschaften dar. Sie sind von daher für die Entwicklung neuer analytischer Methoden im Mikromaßstab geeignet.^[79-81] Es bestand die Hauptaufgabe dünne Schichten molekular geprägter Polymere auf den notwendigen rauhen Metalloberflächen herzustellen, um diese für die Vermessung mit SERS zugänglich zu machen.

2.2 Neue molekular geprägte Polymere für die Katalyse

Bei den ersten Ansätzen unseres Arbeitskreises auf dem Gebiet der katalytisch aktiven geprägten Polymere wurde die Hydrolyse an achiralen aromatischen Dicarbonsäuremonoestern [4-Carboxyphenyllessigsäure (3,5-dimethyl-phenyl)ester] untersucht. Dabei wurde der entsprechende Phosphonsäureester [4-Carboxybenzylphosphon-säuremono-(3,5-dimethylphenyl)ester] als stabiles Übergangszustandsanaloges Templat eingesetzt. Dieses Templat wurde in ein Diamidiniumsalz mit zwei Äquivalenten *N,N'*-Diethyl-4-vinylbenzamidin, welches als Haftmonomer fungiert, umgesetzt.^[43] Die Amidiniumgruppen waren über chelatisierende Wasserstoffbrücken und elektro-statische Wechselwirkungen sowohl an die Carbonsäure als auch an den Phosphonsäuremonoester gebunden. Somit war es möglich das Übergangszustandsanaloge Templat während des Imprinting-Vorgangs zu fixieren und gleichzeitig die Amidin Gruppen in die richtige Anordnung für die Katalyse zu bringen.

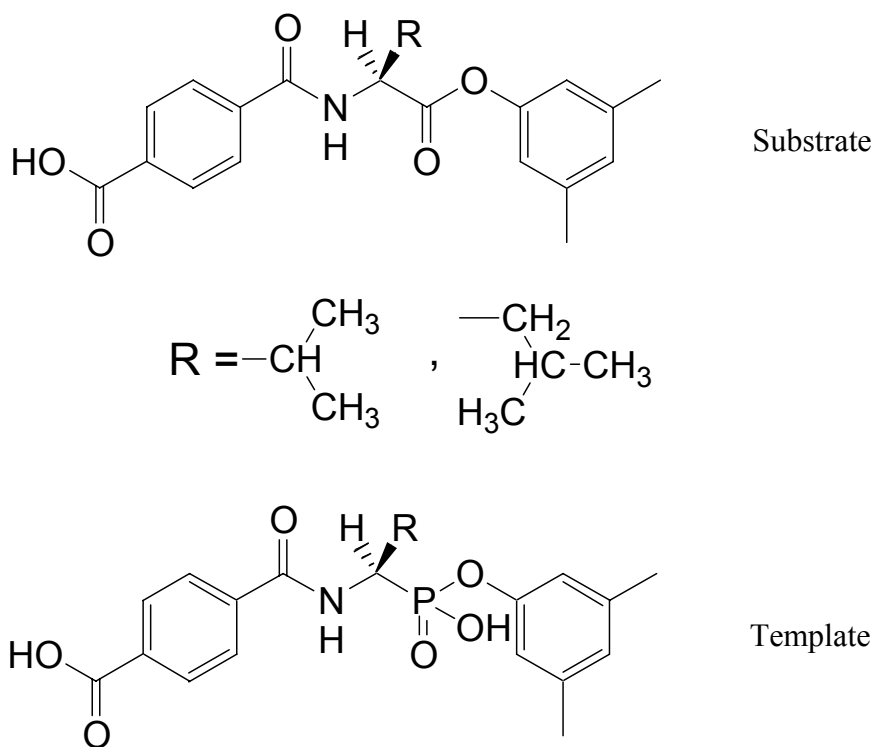


Abbildung 11. Substrate 2 (Leucin) und 3 (Valin) jeweils in der D- und L-enantiomeren Form; Template 4 (Leucin-analog) und 5 (Valin-analog) als L-Enantiomere.

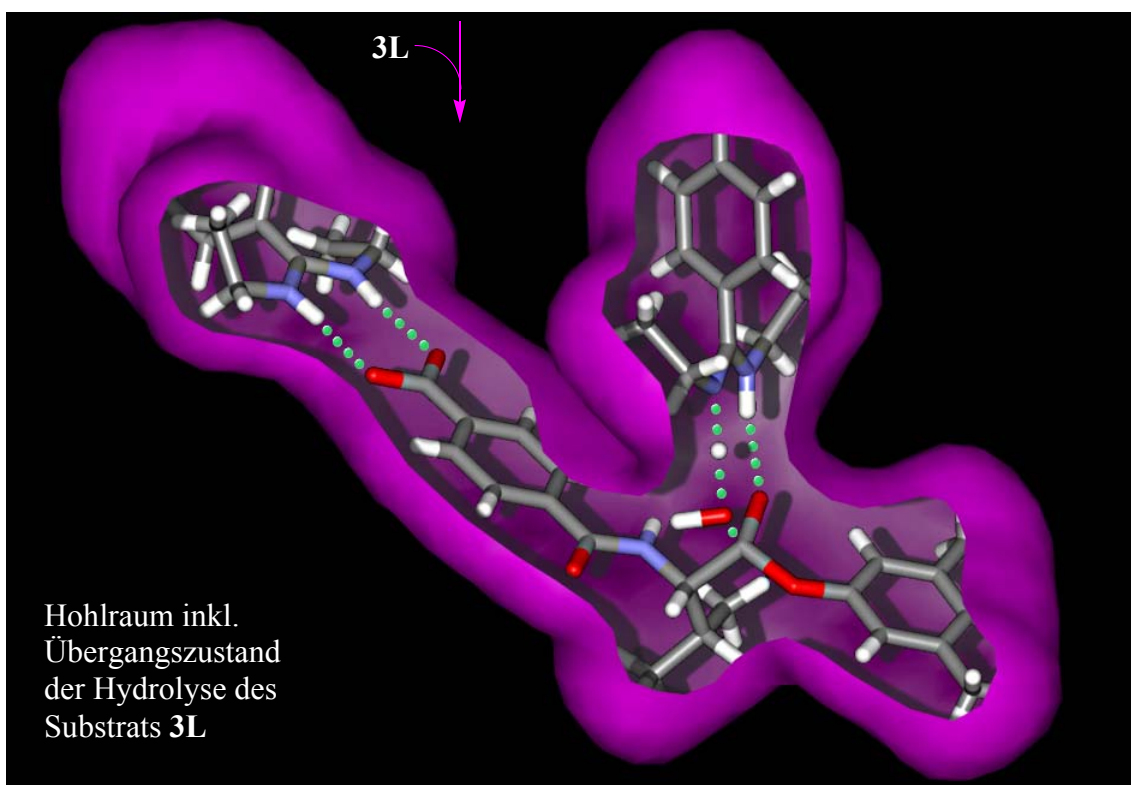
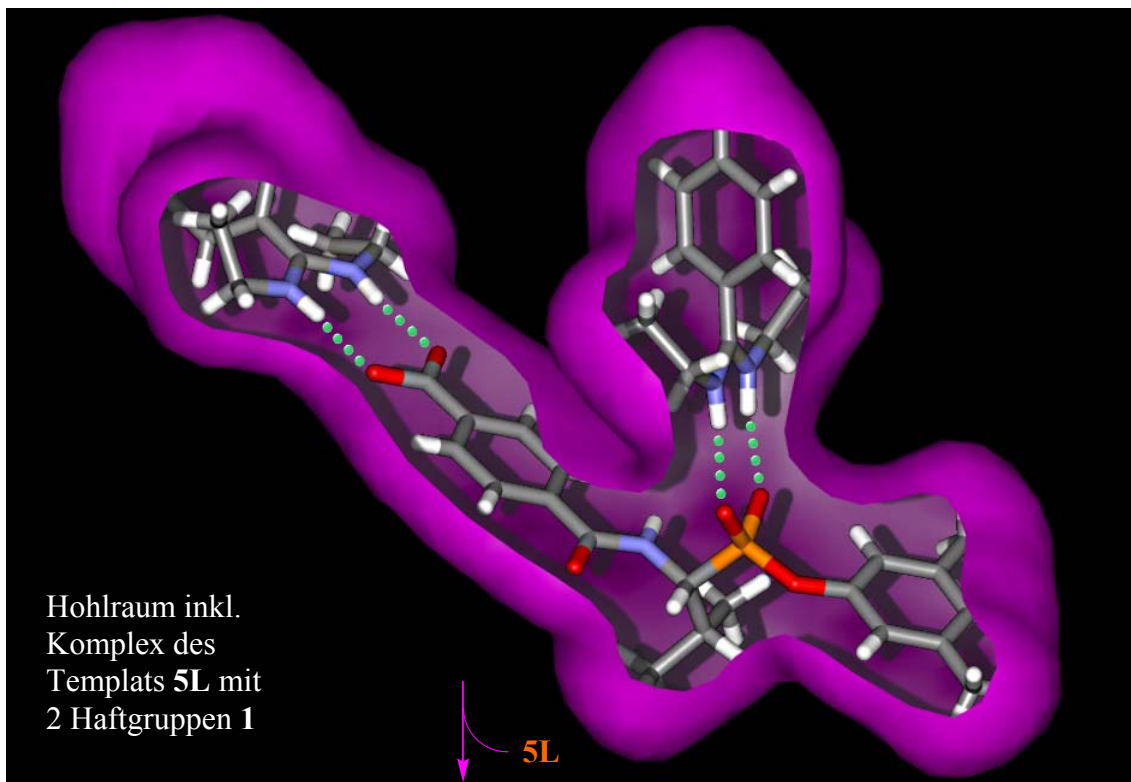


Abbildung 12. Modell des geplanten geprägten Katalysators und des ersten Übergangszustandes der enantioselektiven Esterhydrolyse im Hohlraum.

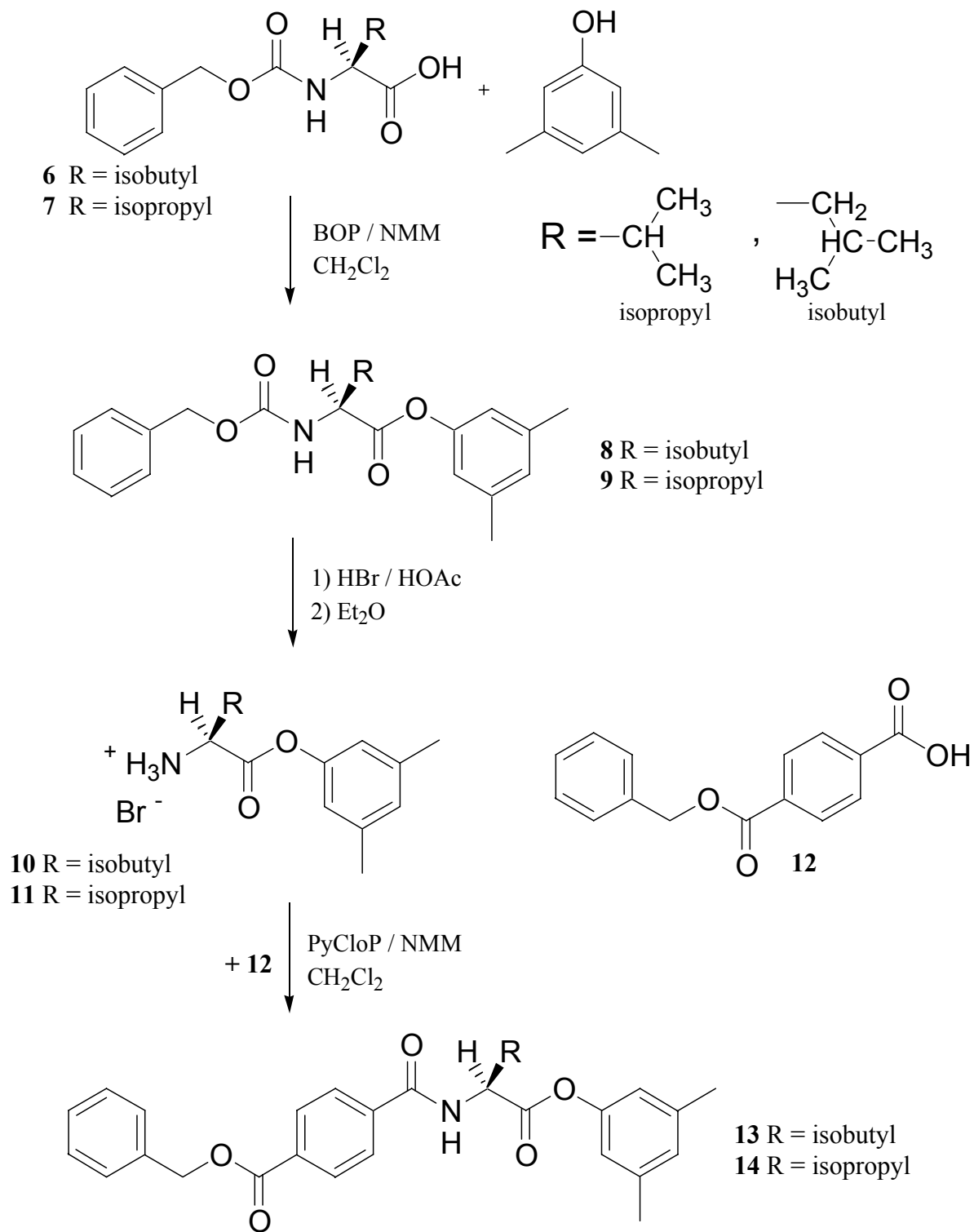
Um ein ähnliches aber nicht-racemisches chirales System zu erhalten, sollte das Substrat auf α -Aminosäuren basieren, welche einfach in beiden enantiomeren Formen erhältlich sind. Neben der Erhältlichkeit der enantiomeren Ausgangssubstanzen für die Substratsynthese bestand noch ein weiterer wichtiger Grund für diese Wahl. So mussten die Synthese des Übergangszustandsanalogen Templats, also der α -Aminophosphonsäuren, durchführbar sein, das heißt die entsprechende Chemie zur Synthese der enantiomerenreinen Vorstufe sollte möglichst literaturbekannt sein.

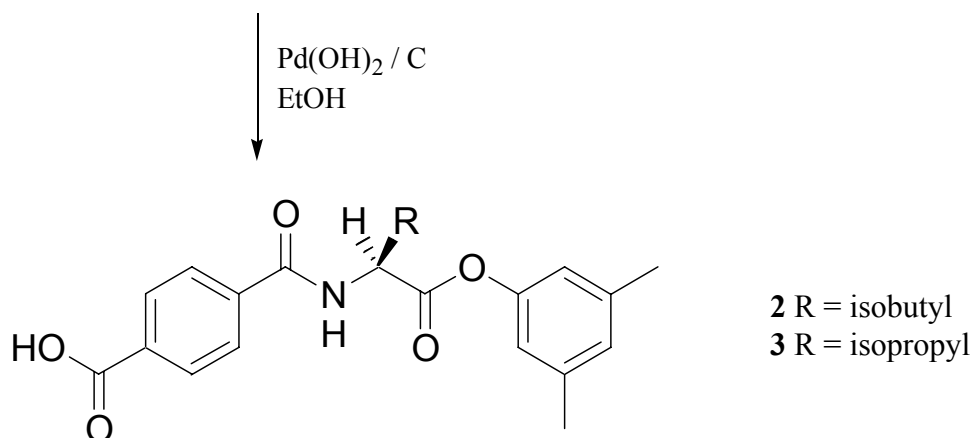
Der Esterrest der Template, als auch der Substrate, sollte ebenfalls den nicht-aktivierten 3,5-Dimethylphenylester enthalten, um durch die Methylsubstituenten während des Prägevorgangs einen signifikanten Hohlraum zu erzeugen. Am *N*-Terminus sollte eine 4-Carboxybenzoylgruppe eingeführt werden, wodurch durch die freie Carbonsäure ein Bindungsmotiv für die Erkennung während der Katalyse resultiert. Zusätzlich werden die Moleküle dadurch steifer, was wichtig für das Prägen ist. Die Hydrolyseprodukte, Phenol und Carbonsäure, können mittels UV-Adsorption während einer HPLC-Analyse detektiert werden. Folglich wurden als Substrate die *N*-(4-Carboxybenzoyl)- α -aminosäure-(3,5-dimethylphenyl)ester-Derivate von L- und D-Valin **2** sowie L- und D-Leucin **3** (jeweils durch die Zusätze L und D als Enantiomer gekennzeichnet) dargestellt. Die Wahl fiel dabei auf Valin und Leucin, da für die zugehörigen Templatsynthesen der α -Aminophosphonsäure-Grundgerüste in der Literatur für die Valin- und Leucin-Analoga die besten Ausbeuten und die höchsten Diastereomerenüberschüsse beschrieben werden.

2.2.1 Synthese der Substrate und der Übergangszustandsanalogen Template

Die Synthese der Substratmoleküle *N*-(4-Carboxybenzoyl)- α -leucin-(3,5-dimethylphenyl)ester (**2**) und *N*-(4-Carboxybenzoyl)- α -valin-(3,5-dimethylphenyl)ester (**3**) wurde am L-Valin als Edukt optimiert. So wurden daran verschiedene Synthesereihenfolgen, Schutzgruppen und Kupplungsreagenzien erprobt. Der Syntheseablauf kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, das heißt entweder die Ester- oder die Amidgruppe wird zuerst gebildet. Der erfolgreichste Weg der Substratsynthese startete bei den *Z*-geschützten α -Aminosäuren Valin und Leucin, die jeweils in beiden enantiomeren Formen separat durchgeführt wurden (Schema 2). Diese werden durch die Kupplung mit Hilfe des Reagenzes (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphat (BOP),^[82, 83] einem Kupplungsreagenz für Peptide und sterisch anspruchsvolle Ester, in die 3,5-Dimethylphenylester **8L/8D** und **9L/9D** überführt. Entgegen der angegebenen Literaturvorschrift wurde anstelle Triethylamin das *N*-Methylmorpholin (NMM) eingesetzt, woraufhin erst gute Ausbeuten erzielt werden konnten. Nach der Entschützung des *N*-Terminus mit 33% Bromwasserstoff in Essigsäure konnten die Hydrobromide **10** und **11** (als L und als D-Form) erhalten werden. Die Salze wurden ohne weitere Reinigung in Gegenwart von Chlortripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat (PyCloP),^[84] einem modernen Kupplungsreagenz in der Peptidchemie, bei dem nahezu keine Racemisierung der Aminosäuren beobachtet werden kann, und NMM mit Monobenzylterephthalsäure (**12**) gekuppelt, um die Amide **13L/13D** und **14L/14D** zu synthetisieren. Die Endprodukte, die Substrate **2L/2D**, sowie **3L/3D** (in beiden enantiomeren Formen), wurden durch Hydrogenolyse der Benzylester, mit Palladiumhydroxid auf Kohle als Katalysator, dargestellt. Die Reinigung der Substrate erfolgte über eine Säulenchromatographie, wobei dem Laufmittel 1% Essigsäure zugesetzt wurde. Nachdem Einengen wurde die Essigsäure über Kaliumhydroxid entfernt werden und die Substratmoleküle umkristallisiert, um die Reinheit zu garantieren. Die Reinheit wurde neben den üblichen Methoden auch mittels HPLC überprüft.

Der alternative Syntheseweg, der eine andere Reihenfolge der Kupplungsschritte vorsah, wurde ebenfalls durchgeführt. Dabei wurde zuerst die freie Aminosäure am Esterrest mit einer Allylschutzgruppe geschützt, um anschließend die Aminogruppe kuppeln zu können. Nach einer Entschützung könnte dann der Phenylester hergestellt werden. Im Laufe der Synthese zeigte sich aber, daß dieser alternative Weg zu schlechteren Ausbeuten führte, so daß dieser Weg nicht weiter verfolgt wurde.



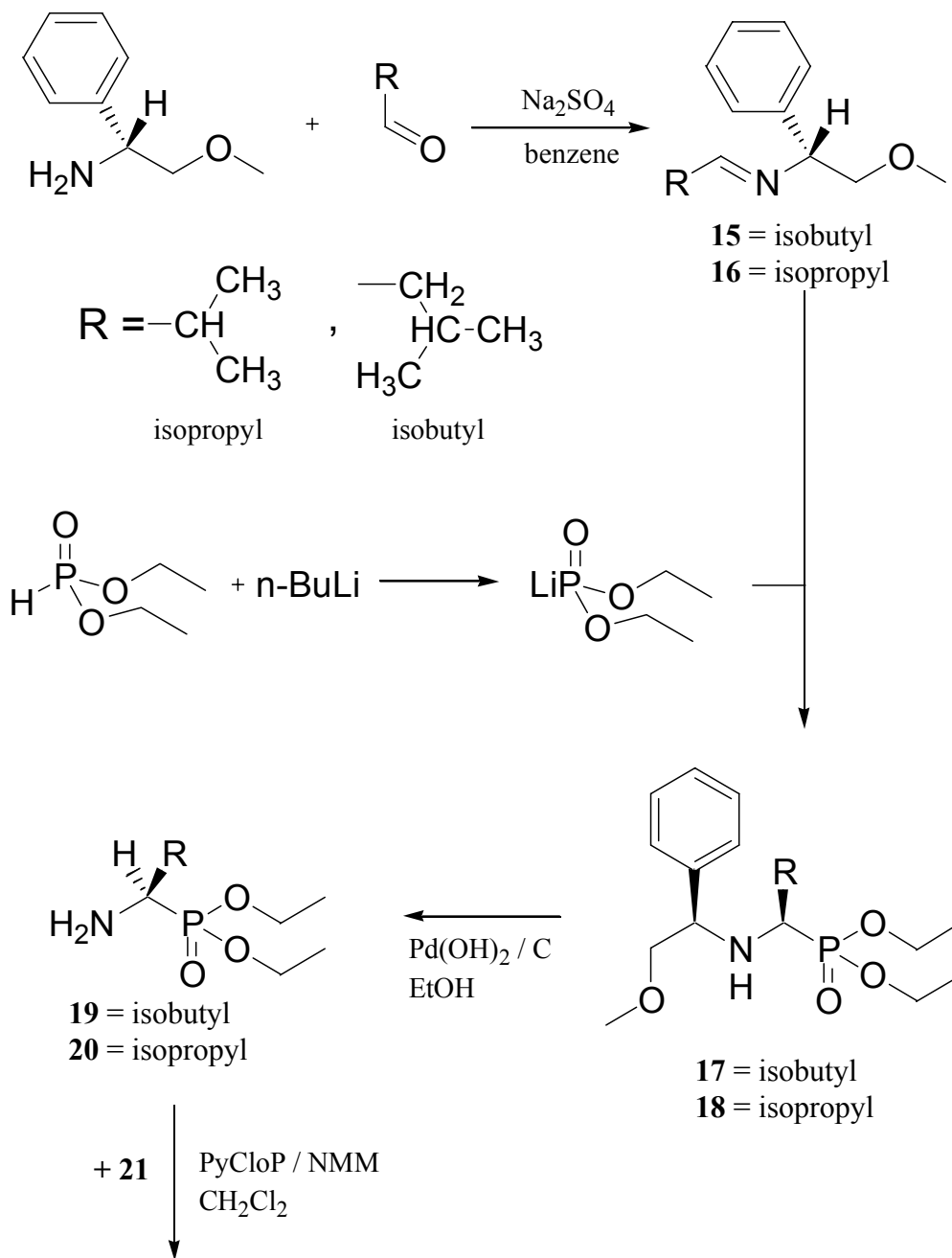


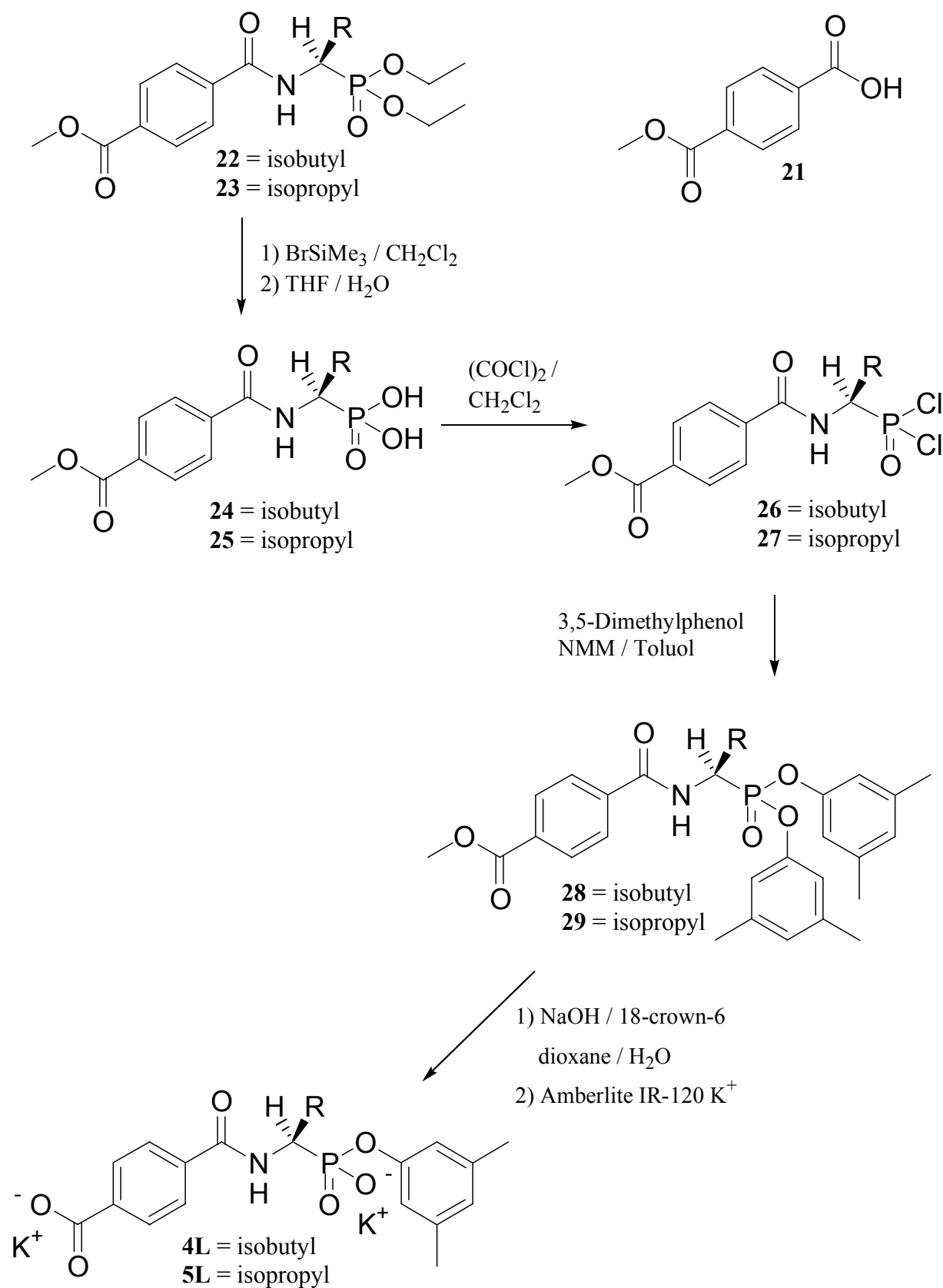
Schema 2. *Synthese der Substratmoleküle beginnend mit N-Z-Valin und N-Z-Leucin. Alle Moleküle wurden in beiden enantiomeren Formen – beschrieben mit D und L für die entsprechende D- und L-Form – hergestellt.*

Um einiges schwieriger und komplexer gestaltete sich die Synthese der entsprechenden optisch aktiven Template **4L** und **5L**. Die gängigsten literaturbekannten Wege chirale α -Aminophosphonsäuren aufzubauen sind die fraktionierte Kristallisation eines diastereomeren Salzes^[85] und die Synthese über eine diastereoselektive Reaktion.^[86] Beide Möglichkeiten wurden erfolgreich im Labor durchgeführt. Die Wahl für die eigentliche Darstellung fiel auf die effizientere sowie elegantere Synthese der chiralen α -L-Aminophosphonsäurediethylester über eine diastereoselektive Addition, beginnend mit *O*-Methyl-D-phenylglycinol, wie von Smith et al. beschrieben (Schema 3).^[86] Aus der chiralen Vorstufe wurden durch Addition an Isovaler- beziehungsweise Isobutyraldehyd die Imine **15** und **16** dargestellt. Mittels *n*-Butyllithium wurde Diethylphosphit deprotoniert, welches dann an die Imingruppen addiert wurde, wobei zum Großteil nur die *R,R*-Diastereomere von **17** und **18** entstanden. Durch Modifizierung der Reaktionsbedingungen konnten sowohl der Diastereomerenüberschuß im Rohprodukt, als auch die Ausbeute nach der säulenchromatographischen Reinigung gesteigert werden.

Da auch Phenylglycin als Substratbasis in Frage kam, wobei durch den Aromaten ein signifikanter Hohlraum gebildet werden könnte, wurde ebenfalls die Synthese der entsprechenden enantiomerenreinen Templatvorstufe α -Amino-phenylethylphosphonsäurediethylester durchgeführt. Das Problem dabei war, daß bei der Darstellung des Phenylglycin-Analogons nicht der erwünschten diastereomeren Überschuß (maximal erzielt wurde nur ein d.e. von 85%) erzielt wurde, was somit eine säulenchromatographische Aufreinigung unmöglich machte.

Der Rest des verwendeten chiralen Vorläufers der sauberen diastereomerenreinen Produkte (d.e. > 99%) wurde durch Hydrogenolyse abgetrennt, wodurch die freien Aminogruppen der enantiomerenreinen α -Aminophosphonate **19** und **20** entstanden.





Schema 3. Synthese der Templatmoleküle beginnend mit Valin- und Leucin-analogen α -L-Aminophosphonsäurediethylestern über eine diastereoselektive Synthese.

Die Template wurden als Dikaliumsalze isoliert.

Zum Aufbau des *N*-terminalen Bausteins wurden **19** und **20** unter Verwendung von PyCloP als Kupplungsreagenz mit Monomethylterephthalsäure (**21**) zu **22** und **23** gekuppelt. Weitere Kupplungsreagenzien, wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), zeigten ebenfalls gute Ausbeuten, allerdings konnten anhand der resultierenden Drehwerte und HPLC-Messungen gezeigt werden, daß eine teilweise Racemisierung während der Reaktion stattfand. Um den *P*-terminalen Teil des Phosphonsäurediethylesters zu modifizieren, wurden diese in drei Stufen in die jeweiligen Phosphonsäurediphenylester umgewandelt. Der Diethylester wurde mit Bromtrimethylsilan^[87] hydrolysiert, um die freien Phosphonsäuren (**24**, **25**) herzustellen. Dieser Weg war im Vergleich zur Hydrolyse mit Säure, zum Beispiel Salzsäure, schonender und das überschüssige Reagenz konnte viel einfacher vollständig entfernt werden. Nach dem Trocknen von **24** bzw. **25** wurde dann direkt mit Oxalylchlorid chloriert (zu **26** und **27**). Die Ausbeute war dabei höher als mit alternativen Chlorierungsmitteln. Anschließend wurde mit zwei Äquivalenten 3,5-Dimethylphenol, welches zuvor durch Sublimation aufgereinigt wurde, zu den Diestern **28** und **29** verestert. Als Hilfsbase wurde auch hier wieder das *N*-Methylmorpholin eingesetzt. Der folgende letzte Schritt bestand aus einer kombinierten Hydrolyse des Carbonsäuremethylesters und des Diphenylesters, um die entsprechenden Monophenylester zu synthetisieren. Die Hydrolyse von Phosphonsäurediphenylestern zu den Monoestern wurde beschrieben von Szewczyk et al.^[88] Darauf basierend wurde Natriumhydroxid, aktiviert durch 18-Krone-6, in Dioxan/Wasser 1:1 für die kombinierte Hydrolyse eingesetzt. Die Produkte **4L** und **5L** wurden säulenchromatographisch mit einem ammoniakalischen Laufmittel gereinigt und über eine Ionenaustauscherchromatographie in die Dikaliumsalze überführt. Die aufwendige Aufarbeitungsprozedur war schließlich notwendig, da der Monoester unter sauren wässrigen Bedingungen nicht stabil und somit die Herstellung der protonierten Form des Monoesters nicht möglich war. Eine Reinigung durch einfache Fällung aus einer sauren wässrigen Lösung und eine anschließende Umkristallisation, wie es zahlreich in der Literatur für Phosphonsäuremonoester beschrieben wurde, kam folglich nicht in Frage.

2.2.2 Synthese der geprägten Polymere

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß das Amidinmonomer **1** mit Carbonsäuren und Phosphonsäuremonoestern in Acetonitril stabile Komplexe mit hohen Assoziationskonstanten bildet. In unpolaren Lösungsmitteln, wie Toluol, ist die Assoziationskonstante sogar noch deutlich höher.^[47, 48, 89, 90] Am

Beispiel von Modellsubstanzen wurde in Acetonitril für Carboxylate eine Assoziationskonstante mit dem Hydrochlorid des Haftmonomers **1** ($1 \times \text{HCl}$) von etwa 10^4 l mol^{-1} und für Phosphonsäure von etwa 10^3 l mol^{-1} ermittelt. In Toluol lagen Assoziationskonstanten $> 10^6 \text{ l mol}^{-1}$ vor.

Basierend auf diesen Daten ließ sich folgern, daß unter den

gegebenen Polymerisationsbedingungen, bei denen ein geprägtes Polymer erzeugt wird, mehr als 97% der Säuregruppen in **4L** und **5L** komplexiert vorliegen, wenn ein 1:2 Molverhältnis von Templat zu **1** vorliegt (Abbildung 13). Mittels dieser stöchiometrisch nicht-kovalenten Wechselwirkungen kann demzufolge sichergestellt werden, daß nahezu keine ungebundenen Amidine während der Polymerisation vorhanden sind. Auf diese Weise wurden Komplexe (siehe Abbildung 13) von **4L** und **5L** (Dikaliumsalze) als Template durch Zugabe von zwei Äquivalenten $1 \times \text{HCl}$ gebildet. Als Comonomere für die Herstellung des geprägten Polymere wurden Methylmethacrylat (MMA) und Ethylendimethacrylat (EDMA) als Vernetzer zugegeben (siehe Tabelle 1). Die Wahl fiel auf EDMA und MMA, da diese Comonomere bei katalytisch aktiven Polymeren bisher die besten Eigenschaften zeigten. Als Porogen sollte zuerst Tetrahydrofuran verwendet werden, allerdings war der Komplex aus Templat und den beiden Haftmonomeren $1 \times \text{HCl}$ in diesem Lösungsmittel unlöslich. Auch der Einsatz von Haftmonomeren mit längeren löslichkeitsfördernden Alkylresten, z.B. im *N,N'*-Dibutyl- oder *N,N'*-Di-n-pentyl-4-vinylbenzamidin^[91] sowie das im Rahmen dieser Arbeit erstmalig synthetisierte *N,N'*-Diisopentyl-4-vinylbenzamidin (siehe experimenteller Teil, Kapitel 4.1.3.3) führte zu keiner Verbesserung der Löslichkeit der Templat-Komplexe. Erst durch

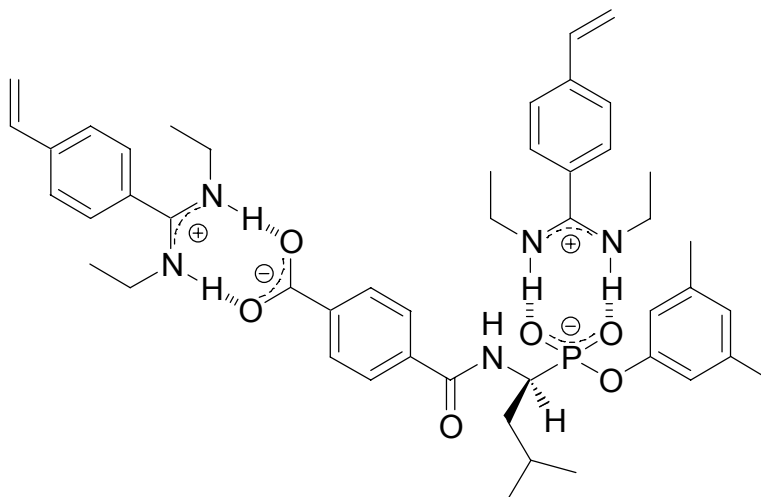
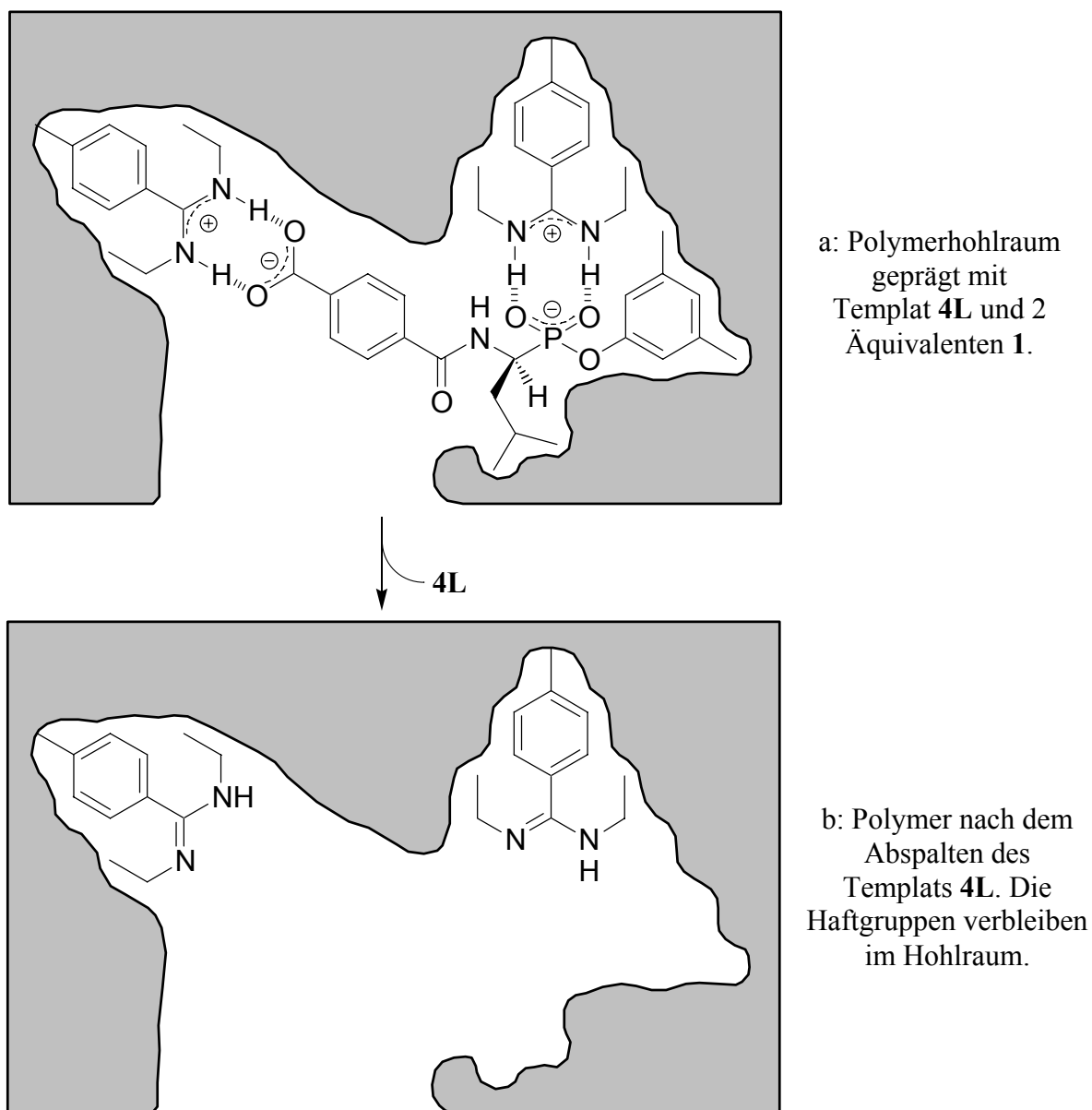


Abbildung 13. Komplex von Templat **4L** als Dikaliumsalz und 2 Äquivalenten $1 \times \text{HCl}$.

eine 1:1-Mischung aus Toluol und Acetonitril, welche schon in früheren Arbeiten als Porogen zum Einsatz kam und sehr gute Ergebnisse, vor allem in Bezug auf eine Enantioselektivität, zeigte, konnte der in Abbildung 13 gezeigte Komplex gelöst werden.

Bei der Polymerherstellung kamen in allen Fällen die gleiche Monomierzusammensetzung, mit 82 Gewichtsprozent des Vernetzers und 15 Gewichtsprozent des Comonomers, zum Einsatz. Das Volumen des Porogengemisches Acetonitril und Toluol (1:1) richtete sich an der Menge der Monomere. Die Art und Menge der variierten Template sind in Tabelle 1 angegeben. Die Komplexe wurden aus den Templaten und **1** bzw. **1-HCl** gebildet.



Schema 4. Modell des geprägten Hohlräume mit Templat **4L** und 2 Äquivalenten des Haftmonomers **1**.

Die entsprechenden Kontrollpolymere wurden unter identischen Bedingungen mit derselben Menge an **1** jedoch ohne die Zugabe der Template **4L** und **5L** hergestellt. Da die Polarität und das Polymerisationsverhalten der freien Amidgruppe in **1** sich vom komplexierten Monomer **1** Hydrochlorid ($1 \times \text{HCl}$), welches bei den mit **4L** und **5L** geprägten Polymeren verwendet wurde, unterscheiden, wurden einfache Carbonsäuren, wie Ameisensäure und Benzoesäure, eingesetzt, um diese Schwierigkeiten zu umgehen. Ohne diese bestünde sonst die Gefahr, daß die Amidgruppen während der Polymerisation teilweise zerstört werden.^[92] Diese einfachen Carbonsäuren, besonders die Benzoesäure, verhalten sich teilweise ebenfalls wie Template, aber diese Moleküle besitzen nur eine Carbonsäuregruppe und ähneln nicht der Form des Übergangszustandes. Entsprechend ist der Unterschied der katalytischen Aktivität dieser Kontrollpolymere verglichen mit den geprägten Polymeren ein guter Hinweis auf den Imprinting-Effekt (Prägeefferkt).

Polymer	Menge (g)		Abspaltraten der Template (%)		spezifische innere Oberfläche (m ²)
	Komplex	Templat	mittels HPLC	mittels Titration	
IP4	0,300	4L 0,155	76	75	217
IP4 regen					195
IP5	0,300	5L 0,155	92	82	196
CPB	0,160	Benzoessäure 0,037	95	92	287
CPF4	0,137	Ameisensäure 0,014	-	82	231
CPF5	0,138	Ameisensäure 0,014	-	82	276

Monomeranteile in allen Mischungen: 8,2g (7,81 ml) EDMA, 1,5g (1,59ml) MMA, 0,123g **1** oder 0,144 $1 \times \text{HCl}$ (**IP4** und **IP5**), 0,10g AIBN und als Porogen einer Mischung aus 5 ml Toluol und 5 ml Acetonitril. Typ und Menge des Templats variieren wie in der Tabelle beschrieben. Die Abspaltraten wurden mittels HPLC und Säure-Base-Titration der Amidine ermittelt. Die spezifische innere Oberfläche nach BET (N₂) wurde über eine Einzelmessung bestimmt (Partikelgröße 45-125 µm).

Tabelle 1. Polymerzusammensetzung und -eigenschaften

Die Polymere wurden in einer Ampulle durch radikalische Initiation hergestellt. Es entstanden feste makroporöse Blöcke, die zuerst in einem Mörser zerkleinert, dann fein gemahlen und schließlich gesiebt wurden, wobei die Partikelgröße im Bereich von 45 bis 125 µm gesammelt wurde, um dies in den folgenden Untersuchungen ausschließlich einzusetzen. Die Template wurden anschließend durch wiederholtes Waschen mit einer 1:1-Mischung aus Methanol und 0,1 N Natronlauge entfernt. Die sich daraus ergebenden Abspaltraten von 75 bis 95% der

Templatmoleküle konnten mittels HPLC und durch Säure-Base-Titration der Haftgruppen detektiert werden (siehe Tabelle 1). Die hergestellten Polymere waren mit einer hohen spezifischen inneren Oberfläche von 195 bis 287 m²/g alle makroporös, die mittels einer Einzelmessung einer BET(N₂)-Adsorptionsisotherme bestimmt wurde, wie es für solche makroretikulären Polymertypen üblich ist.

2.2.3 Untersuchung der polymeren Katalysatoren

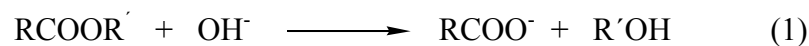
Die Bedingungen für die Anwendung der polymeren Katalysatoren mit Amidin-Haftgruppen in Esterasemodellen wurden bereits in früheren Arbeiten an einfachen Systemen, unter anderem auch durch Verwendung eines kombinatorischen Ansatzes, optimiert.^[49, 91] Bei der Wahl der optimalen Bedingungen wurde Wert gelegt auf die Höhe der Beschleunigung und der Imprinting-Selektivität. Die Hydrolyse der Ester wurde daraufhin in einer 1:1-Mischung eines 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure-(HEPES)-Puffers mit einem pH-Wert von 7,3 und Acetonitril bei einer Temperatur von 20°C, durchgeführt. Auf eine Variation der Temperatur, um somit möglicherweise die Selektivität zu verbessern, wurde verzichtet. Zu diesem Zweck wird zu einer Suspension des Katalysators mit 2 mM aktiver Zentren eine frisch erzeugte Substratlösung zugegeben, um eine Konzentration von 1 mM zu erreichen. Die Hydrolyse beider Enantiomere wurde immer separat ermittelt, um eine Enantioselektivität messen zu können. Eine Bestimmung der Enantioselektivität wäre auch direkt über eine chirale HPLC bei Anwebdung des Racemats möglich. Aber zum Nachweis der fortschreitenden Reaktion wurde das freiwerdende Produkt Phenol herangezogen, was die getrennte Vermessung der beiden Enantiomere nötig machte. Das Phenol zeigte hier keine Produktinhibition und sollte vollständig aus dem Polymer freigesetzt werden. Die entstehende Disäure kann mit beiden Säuregruppen an die Haftgruppen im Hohlraum binden, was zu einer verlangsamen Freisetzung dieses Produktes führte.

Im Falle der Kontrollexperimente wurden die Mengen der Polymere **CPF4**, **CPF5** und **CPB4** verwendet, mit denen dieselbe Konzentration von Amidin-Gruppen in der Suspension erreicht wurde. Die Hydrolyse in Lösung wird ohne jegliches Polymer, jedoch im identischen Puffergemisch, mit derselben Substratkonzentration durchgeführt. Kontrollexperimente mit dem Haftmonomer *N,N'*-Diethyl-4-vinylbenzamidin (**1**) in gepufferter Lösung wurden nicht durchgeführt, denn frühere Experimente hatten gezeigt, daß durch Amidin-Gruppen in gepufferter Lösung nahezu keinen katalytischen Effekt ausgeübt worden war, weil die meisten dieser

Gruppen bei diesem pH-Wert protoniert vorgelegen hatten.^[43] Im Gegensatz dazu verschob sich der pKs-Wert der Amidingruppen in der hydrophoben Polymerumgebung um zwei Größenordnungen, so daß die Amidine dort bei einem pH-Wert von 7,3 wahrscheinlich nur zu einem Teil protoniert vorlagen.

Um die Reaktionskinetik verfolgen zu können, wurden in regelmäßigen Intervallen aliquote Teile entnommen und mittels HPLC vermessen. Die Hydrolyseaktivitäten (Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten) wurden während der ersten 5 bis 10% Substratumsatz vermessen, wobei sich die Reaktionskinetik im linearen Bereich befand. Die katalytische Aktivität von **IP4** wurde in drei unterschiedlichen Pufferkonzentrationen von 0,05 M, 0,1 M und 0,15 M gemessen. Aufgrund der konstanten Hydroxidionenkonzentration während der Reaktion konnte zur Auswertung die Kinetik pseudo-erster Ordnung angewendet werden.

Die Reaktion wird durch die Gleichung (1) für einen B_{ac}2-Mechanismus beschrieben:



Aus dieser Esterhydrolyse kann die Reaktionsgeschwindigkeit mit einer Kinetik pseudo-erster Ordnung bestimmt werden:

$$v = -\frac{d[\text{RCOOR}']}{dt} = k[\text{RCOOR}'] \quad (2)$$

mit $k = k' [\text{OH}^-]$; k' = „wahre“ Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

Nach dem Auflösen und Integrieren von (2) folgt:

$$\ln \frac{[\text{RCOOR}']_t}{[\text{RCOOR}']_{t=0}} = -kt \quad (3)$$

Die Gesamtkonzentration von $[\text{RCOOR}']$ kann wie folgt beschrieben werden:

$$[\text{RCOOR}']_{t=0} = [\text{RCOOR}']_t + [\text{RCOO}^-]_t \quad (4)$$

$$\text{mit } [\text{RCOO}^-]_t = [\text{R}'\text{OH}]_t \quad (5)$$

Daraus folgt für die Kinetik pseudo-erster Ordnung (6):

$$\ln \left[\frac{[\text{RCOOR}']_{t=0} - [\text{R}'\text{OH}]_t}{[\text{RCOOR}']_{t=0}} \right] = -kt \quad (6)$$

Alle Hydrolysemessungen wurden 2-3 mal reproduziert. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen. Die Daten für k

wurden durch lineare Regression von 6-9 Datenpunkten in verschiedenen Zeitintervallen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,980 bis 0,999 berechnet.

Die Abbildungen 14 und 14b zeigen die beobachteten Kinetiken pseudo-erster Ordnung (Gleichung (6)), die für die Hydrolyse von **2L** und **2D** unter Katalyse des geprägten Polymers **IP4** im Vergleich mit den Kontrollexperimenten ermittelt wurden. Dabei wurde eine starke katalytische Aktivität von **IP4** für die Hydrolyse des Substrates **2L** beobachtet. Die Katalyse mit dem Kontrollpolymer **CPF5** und die Reaktion in Lösung ist erheblich langsamer. Ähnliche Ergebnisse konnten für das zweite Polymer **IP5**, geprägt mit dem Valin-analogen Templat, erzielt werden. (siehe Abbildung 15a und 15b). Die aus den Steigungen der Abbildungen 14a sowie 15a mit der Gleichung (6) berechneten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten sind im experimentellen Teil (Kapitel 4.1.5.1) aufgeführt. Die Verhältnisse dieser Geschwindigkeitskonstanten ergeben die relativen Beschleunigungen (relative Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten), die in Tabelle 2 und 3 angegebenen sind. Basierend auf diesen Ergebnisse kann gezeigt werden, daß das mit der L-Leucin-analogen Aminophosphonsäure **4L** geprägte Polymer **IP4** die Hydrolyse des L-Substrats in Relation zur Reaktion in Lösung um einen Faktor zwischen 200 und 350, in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration, beschleunigt.

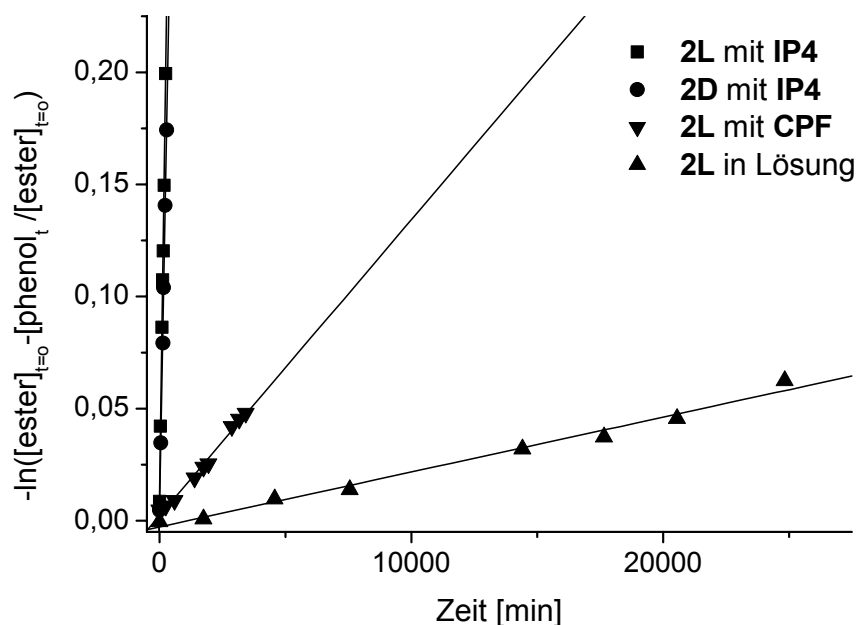


Abbildung 14a. Kinetik pseudo-erster Ordnung der Leucin-Substrate **2L** und **2D** mit **IP4**, **CPF4** und in Lösung.

Die Abbildungen 14a und 15a vergleichen jeweils die Kinetiken pseudo-erster Ordnung der geprägten Polymere mit den Kontrollen (Reaktion mit den Kontrollpolymeren **CPF4** und **CPF5** und in Lösung). Um die Enantioselektivität zu veranschaulichen werden in den Abbildungen 14b und 15b nur die Hydrolysen der beiden Substratenantiomere mit den Polymeren **IP4** beziehungsweise **IP5** aufgetragen. Aus diesen signifikanten Unterschieden der Steigungen (Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten) ließen sich Enantioselektivitäten für die Templat-analogen Substrate berechnen. Es wurde also grundsätzlich eine Bevorzugung der L-Substrate durch die L-geprägten Hohlräume erzielt.

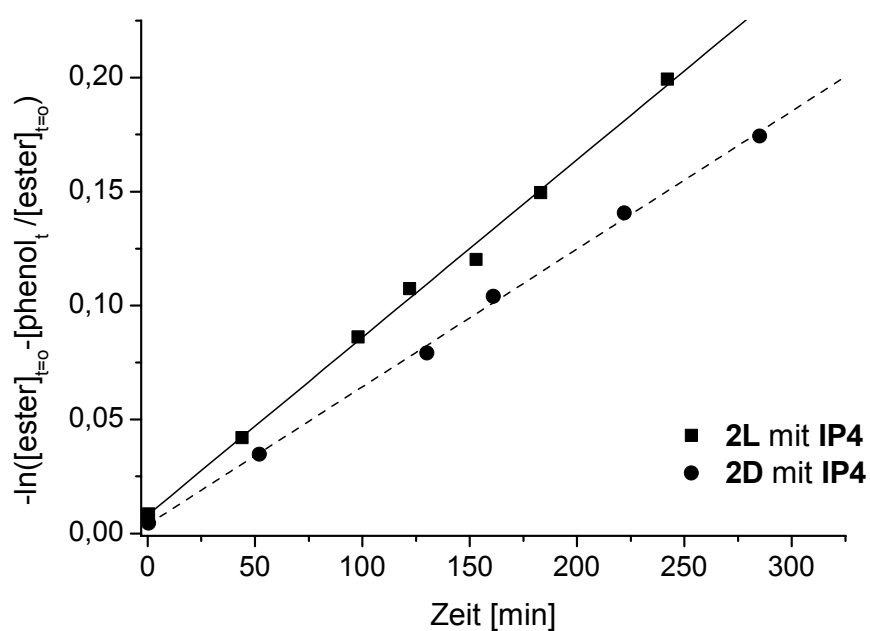


Abbildung 14b. Kinetik pseudo-erster Ordnung der Leucin-Substrate **2L** und **2D** mit **IP4**.

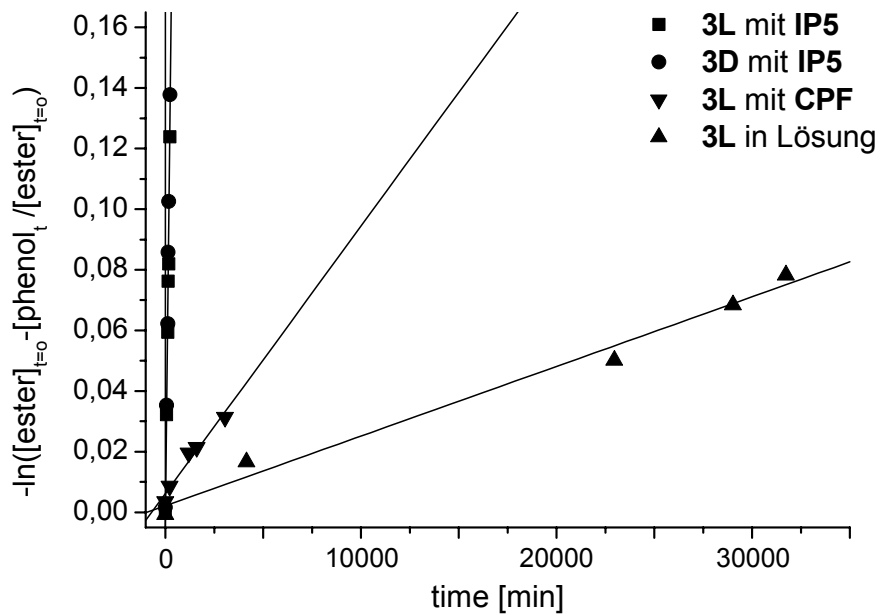


Abbildung 15a. Kinetik pseudo-erster Ordnung der Valin-Substrate 3L und 3D mit IP5, CPF5 und in Lösung.

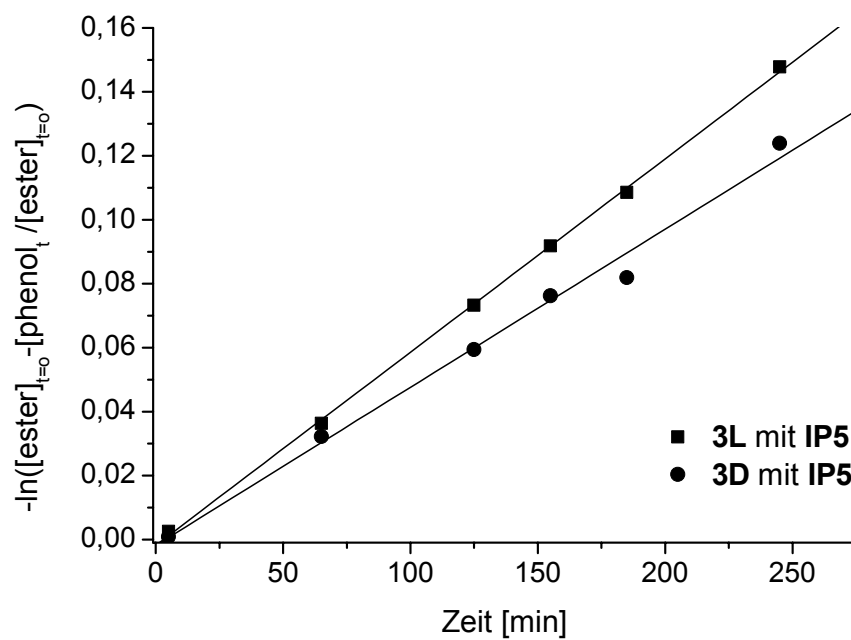


Abbildung 15b. Kinetik pseudo-erster Ordnung der Valin-Substrate 3L und 3D mit IP5.

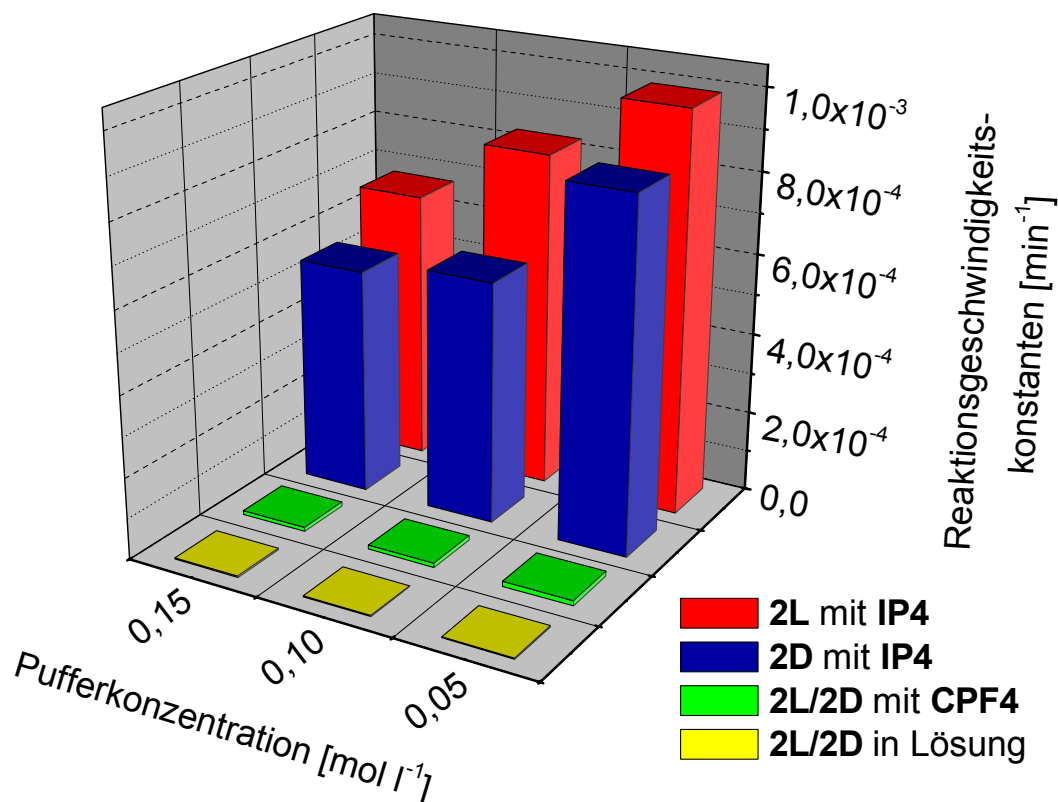


Abbildung 16. Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Hydrolysen von **2L** und **2D** mit **IP4** und den Kontrollen mit **CPF4** und in Lösung.

Um einem anschaulicheren Vergleich der aus den Steigungen entnommenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (siehe Experimentellen Teil, Kapitel 4.1.5) zu erhalten, werden alle Ergebnisse für **IP4** in Abbildung 16 gegeneinander aufgetragen. In diesem Balkendiagramm sind einerseits die starken Beschleunigungen des geprägten Polymers **IP4** gegenüber der Reaktionen mit **CPF4** und der Reaktionen in Lösung zu entnehmen. Andererseits wird die Höhe der Enantioselektivität für das Templat-analoge Substrat verdeutlicht.

Der starke Einfluß der Pufferkonzentration ist in dieser Darstellung besonders zu erkennen. Alle vermessenen Kinetiken verhielten sich ähnlich, was bedeutet, daß mit sinkender Pufferkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten anstiegen. In Tabelle 2 sind die ermittelte relativen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für das Polymer **IP4** aufgeführt, wodurch die katalytische Aktivität ausgedrückt werden kann.

	Substrat	0,05 M HEPES- Puffer		0,10 M HEPES- Puffer		0,15 M HEPES- Puffer	
		$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$	k_L/k_D	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$	k_L/k_D	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$	k_L/k_D
IP4 gegen Lsg.	2L	349	1,14	325	1,39	200	1,20
IP4 gegen Lsg.	2D	305		234		166	
IP4 gegen CPF4	2L	78		79		67	
IP4 gegen CPF4	2D	68		57		56	
IP4 gegen CPB4	2L	-		14		-	
IP4 gegen CPB4	2D	-		9.9		-	
CPB gegen Lsg.	2	-		24		-	
CPB gegen Lsg.	2	4,5		4,1		3,0	

$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ = Relative Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (relative Beschleunigungen) zwischen **IP4**, **CBF**, **CPB** und Lösung (Lsg.); k_L/k_D = Enantioselektivität.

Tabelle 2. Relative Beschleunigungen und Enantioselektivitäten für die Hydrolyse der Substrate **2L** und **2D** in Acetonitril / HEPES-Puffer (1:1) bei 20°C mit **IP4** und den Kontrollen **CPF4**, **CPB** und der Lösungen in drei verschiedenen Pufferkonzentrationen.

Die Beschleunigungen im Vergleich zu den Lösungen zeigen starke katalytische Effekte für die geprägten Polymere. Diese Beschleunigungen mögen nicht vollständig durch einen Imprinting-Effekt verursacht werden. Mögliche Nebeneffekte des Polymerrückgrates und der Haftgruppen ohne spezifischer Prägung, die ebenfalls zu der starken Beschleunigung beitragen könnten, wurden durch die Untersuchungen der Kontrollpolymere ermittelt. Die Unterschiede der geprägten Polymere zu den Kontrollpolymeren konnten, wie schon zuvor erwähnt, als Imprinting-Effekt beschrieben werden. Polymer **IP4** zeigte eine starke 67 bis 79-fache Beschleunigung in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration während des Experimentes. Die Beschleunigung im Vergleich zu dem zweiten Kontrollpolymer **CPB** lag bei 14. Entsprechend ist die Aktivität des Kontrollpolymers abhängig von der Größe der während des Prägenvorgangs komplexierten Säure. Ebenso zeigte sich durch die Vergrößerung der Säure von der Ameisensäure zur Benzoesäure im Kontrollpolymer ebenfalls im gewissen Maße ein Prägeeffekt.^[43]

Während die Hydrolysereaktion in einem 0,1 M HEPES-Puffer durch **IP4** 325-fach beschleunigt wurde, mit einem Imprinting-Effekt von 79, zeigte sich eine Enantioselektivität zwischen dem L- und dem D-Substrat, definiert als der Quotient der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Hydrolyse des L- und des D-Enantiomers von 1,39. Somit konnte eine charakteristische Enantioselektivität beobachtet und zweifelsfrei eine Substratselektivität in diesem geprägten Polymer gezeigt werden.

Die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zeigten einen starken Einfluß der Pufferkonzentration. Dieser Effekt trat sowohl bei den Hydrolysen mit dem Katalysator **IP4** als auch bei den Kontrollen auf. Je geringer die verwendete Pufferkonzentration war, desto größer war die relative Beschleunigung. So zeigte sich bei der niedrigeren Pufferkonzentration eine höhere Beschleunigung um den Faktor von 349 und ein Imprinting-Effekt der nahezu 80 betrug. Allerdings hatte dies eine Verringerung der Enantioselektivität auf 1,14 zur Folge.

In Tabelle 3 wird gezeigt, daß für den geprägten polymeren Katalysator **IP5** ähnliche, wenn auch etwas geringere, Werte vermessen werden konnten. Die Messungen mit **IP5** wurden nur in einem Medium, einer 1:1-Mischung aus 0.1 N HEPES-Puffer (pH=7,3) und Acetonitril durchgeführt. Die ermittelte Beschleunigung im Vergleich zur Lösung liegt bei 250 mit einem Imprinting-Effekt von 56 und einer Enantioselektivität von 1,22.

	Substrat	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$	$k_{\text{L}}/k_{\text{D}}$
IP5 gegen Lösung	3L	249	1.21
IP5 gegen Lösung	3D	206	
IP5 gegen CPF5	3L	59	
IP5 gegen CPF5	3D	49	
CPF5 gegen Lösung	3	4,2	

$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ = Relative Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (relative Beschleunigungen) zwischen **IP5**, **CBF5** und Lösung; $k_{\text{L}}/k_{\text{D}}$ = Enantioselektivität.

Tabelle 3. Relative Beschleunigungen und Enantioselektivitäten für die Hydrolyse der Substrate **3L** und **3D** in Acetonitril / 0,1 M HEPES-Puffer (1:1) bei 20°C mit **IP5** und den Kontrollen **CPF5** und der Lösungen.

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Substratselektivität ist die Bestimmung der Kreuzselektivität, und um diese zu erhalten, wurden die beiden L-geprägten Polymere **IP4**

und **IP5** mit den beiden entsprechenden L-Substraten vermessen. Zu diesem Zweck wurden die Kinetiken pseudo-erster Ordnung der Hydrolyse des L-Valin-Substrats **3L** mit **IP4** (geprägt mit dem L-Leucin-analogen Templat **5L**) und umgekehrt **2L** mit **IP5** untersucht. Wie den Tabellen 4 und 12 (siehe Experimenteller Teil, 4.1.5.1) zu entnehmen ist, wurde in beiden Fällen das „falsche“ Substrat deutlich langsamer hydrolysiert. Die Kreuzselektivität kann auf zwei verschiedene Weisen aus den erhaltenen Werten berechnet werden. Die Kreuzselektivität, definiert als der Quotient der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse der verschiedenen Substrate im gleichen Polymer (zwei Substrate mit dem gleichen Katalysator), ist etwa 3 für beide Polymere unter den gleichen Bedingungen. Zum anderen ergab die Kreuzselektivität, definiert als der Quotient der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse eines Substrates in verschiedenen Polymeren (gleiches Substrat mit zwei Katalysatoren), Werte von 4,2 (Leucin-Substrat **2L**) und 2,5 (Valin-Substrat **3L**).

Polymer	Substrat	$k_{IP}/k_{Lsg.}$	Kreuzselektivität	
IP4	2L	325	3,0	gleicher Katalysator
IP4	3L	103		
IP5	3L	249	3,2	
IP5	2L	79		
IP4 gegen IP5	2L		4,2	gleiches Substrat
IP5 gegen IP4	3L		2,5	

Tabelle 4. Kreuzselektivität von **IP4** und **IP5** mit den Substraten **2L** und **3L**
in Acetonitril/0,1 M HEPES-Puffer pH=7,3 (1:1) bei 20°C.

Die Enantioselektivität und die Kreuzselektivität zeigen, daß die Template einen spezifischen, katalytisch aktiven Hohlraum formen, der fähig ist, zwischen sehr ähnlichen Substraten zu unterscheiden. Es war ein überraschendes Ergebnis, daß durch den Unterschied zwischen einer Isopropyl- und einer Isobutylgruppe ein Faktor von 3 zwischen den katalytischen Aktivitäten resultiert. In jedem Fall hydrolysiert das mit einem Leucin-analogen Templat geprägte Polymer den Leucinester und das mit einem Valin-analogen Templat geprägte Polymer den Valinester beträchtlich schneller, was die Kreuzselektivitäten belegen.

Neben dem Interesse an der katalytischen Aktivität der Polymere, ist auch wichtig, ob diese Aktivität über längere Zeit erhalten bleibt. In der Literatur wird häufig postuliert, daß mole-

kular geprägte Polymere eine hohe Stabilität aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurde das Polymer **IP4** für einen Zeitraum von 10 Tagen im Hydrolysemedium 0.1 M HEPES-Puffer/Acetonitril 1:1 bei 20°C gerührt. Zur anschließenden Regenerierung des Polymers wurde dieses mit der Abspalllösung Methanol/0,1 M Natriumhydroxid behandelt, um alle Substrat-, Produkt- und Pufferreste zu entfernen. Nach dem Neutralwaschen wurde das Polymer wieder getrocknet. Die Hydrolyseexperimente wurden, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den Daten der frischen Polymere verglichen und sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für das L-Enantiomer **2L** sank auf 45% des Ursprungswertes und die des D-Enantiomers auf 46%. Die Enantioselektivität zwischen L und D sank auf 1,28, was 72% des Wertes der neuen Polymere entspricht. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Polymere ihre Reaktivität und Selektivität teilweise verlieren. Dies war zu erwarten, denn es bestand die Möglichkeit, daß durch die Exposition im wässrigen Hydrolysemedium Teile des Polymerrückgrates oder der Amidin-Haftgruppen zerstört, das heißt hydrolysiert wurden. Dies ist insbesondere bei der Behandlung mit Natronlauge und dem Trocknen möglich. Zukünftige Untersuchungen nach der exakten Ursache des Aktivitäts- und Selektivitätsverlustes sollten ein genaueres Bild über die Polymerstabilität liefern.

Polymer	Substrat	Aktivität $k_{IP}/k_{Lsg.}$	Enantioselektivität k_L/k_D
IP4	2L	325 (100%)	1,39 (100%)
IP4	2D	234 (100%)	
IP4-R	2L	152 (45%)	1,28 (72%)
IP4-R	2D	114 (49%)	

2L = L-Substrat; **2D** = D-Substrat; **IP4** = Polymer geprägt mit **4L**; **IP4-R** = regeneriertes **IP4**; Lösung = Acetonitril/Puffer (1:1).

Tabelle 5. Polymerstabilität **IP4** – Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Enantioselektivitäten der Hydrolyse von **3L** und **3D** in Acetonitril/0.1 M HEPES-Puffer pH=7,3 (1:1) bei 20°C katalysiert durch **IP1** und **IP1-R**.

2.2.4 Ablauf des Katalysemechanismus

Um den Katalysemechanismus der Hydrolyse näher beschreiben zu können, wurden weitere detailliertere Kinetikuntersuchungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Startgeschwindigkeiten der Reaktionen in Anhängigkeit von der Substratkonzentration für die Hydrolyse von **2L** und **2D** bestimmt, sowohl in der Gegenwart des geprägten Katalysators **IP4** als auch des Kontrollpolymers **CPF4** (siehe Abbildung 17). Es sollte die Möglichkeit bestehen, daraus Informationen über den Einfluß der selektiven Bindung und der selektiven Katalyse auf die Enantioselektivität der Katalyse zu ermitteln.

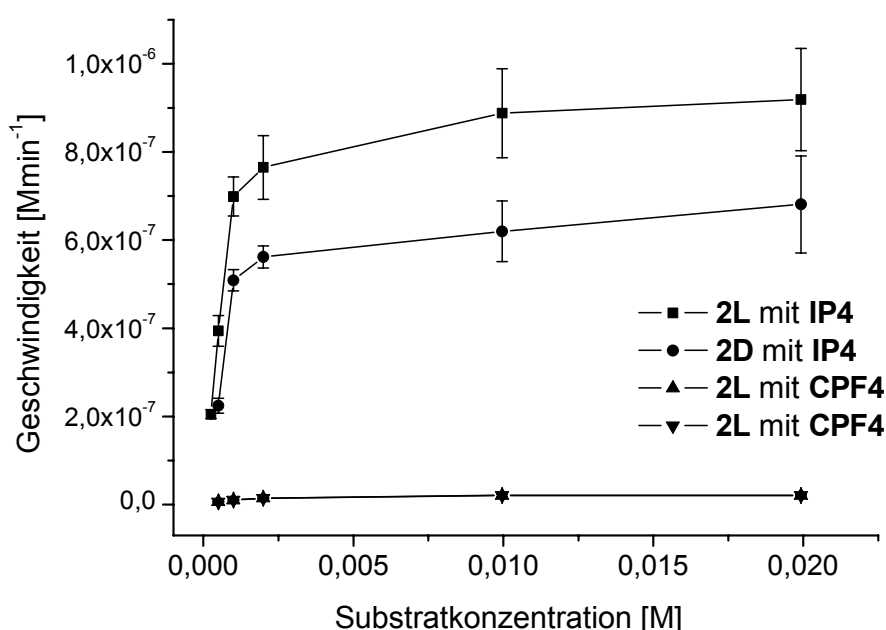
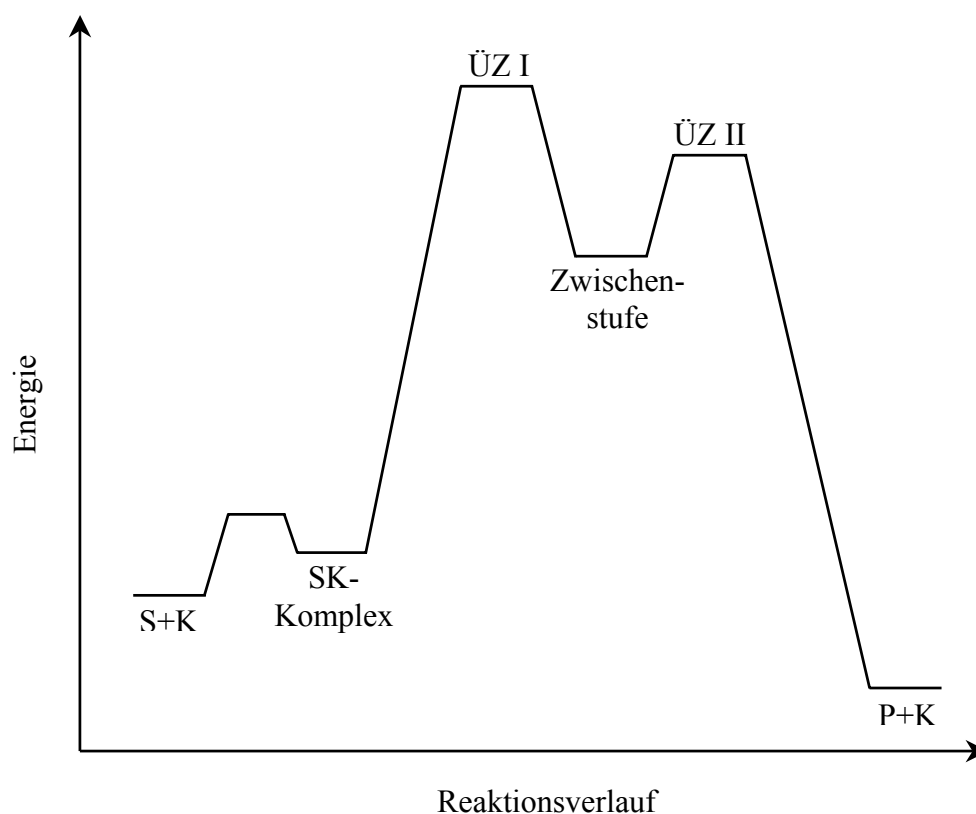


Abbildung 17. Michaelis-Menten Kinetik der Hydrolysen von **2L** und **2D** in Acetonitril / 0,1 M HEPES pH=7,3 (1:1) in Gegenwart von **IP4** und **CPF4**.

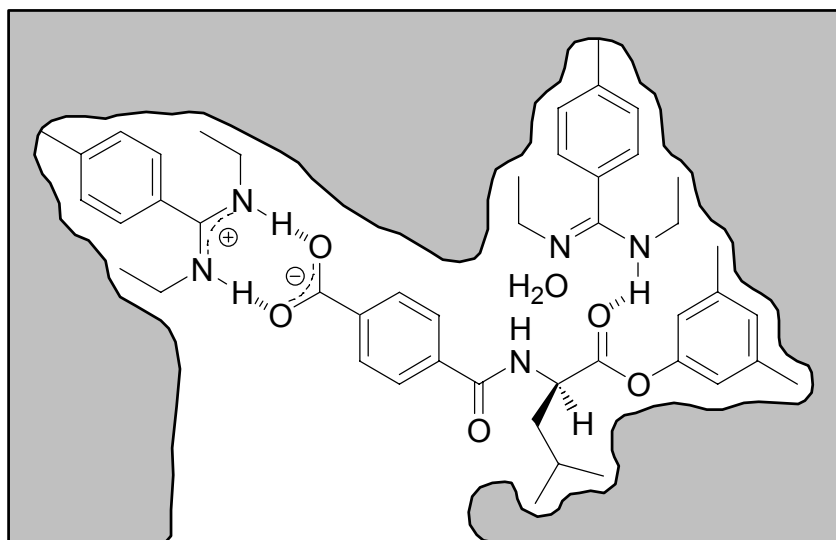
Die resultierenden Graphen in Abbildung 17 für die Katalyse durch **IP4**, insbesondere für die Hydrolyse von **2L**, zeigen den typischen Verlauf einer hyperbolischen Substratsättigungskurve einer Michaelis-Menten Kinetik, der aus der Enzymkatalyse bekannt ist. Daraus kann geschlossen werden, daß ähnlich zur Enzymkatalyse die Substrate (die Ester) vom Katalysator in einem vorgeschalteten Gleichgewicht gebunden werden. (siehe Schema 5a). Abbildung 17 verdeutlicht den entsprechenden Energieverlauf des Katalysemechanismus.



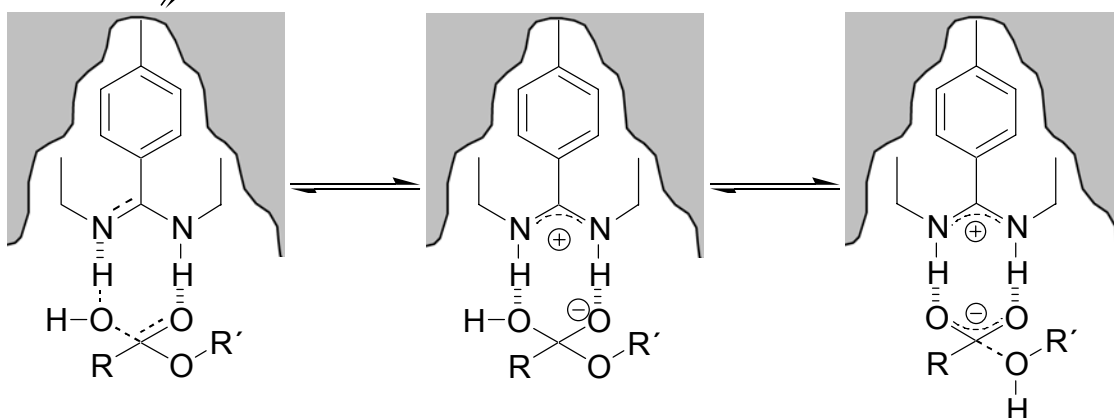
S = Substrat; K = Katalysator; ÜZ = Übergangszustand; P = Produkt.

Abbildung 18. Postulierter Energieverlauf während des katalytischen Prozesses basierend auf der enzymkatalysierten Reaktion einer basischen Hydrolyse.

Der gebundene Ester wird dann, ausgehend von der Aktivierung der Carbonylgruppe und dem Angriff eines Wassermoleküls, über die Stabilisierung des Übergangszustands durch eine der Amidgruppen (Schema 5b) in die Zwischenstufe, ähnlich der in Schema 5c, überführt. Aus Abbildung 18 ist ersichtlich, daß dies der geschwindigkeitsbestimmende Schritt mit der höchsten Aktivierungsenergie ist. Die Energiedifferenz zwischen dem Übergangszustand und der Zwischenstufe ist recht klein, so daß sich nach dem Hammond-Postulat die zugehörigen Strukturen der Beiden ähneln. Dies ist auch der Grund dafür, warum als Übergangszustandsanalogon ein Zwischenstufenanalogon die Funktion des Templats während des Prägens übernehmen kann (Vergleich Schema 4a und Schema 5a/5b). Der letzte Schritt ist der Bindungsbruch im tetrahedralen Zwischenzustand über den Übergangszustand II zum Carboxylat und Alkohol entsprechend Gleichung (1) (siehe auch Schema 5c und 5d).



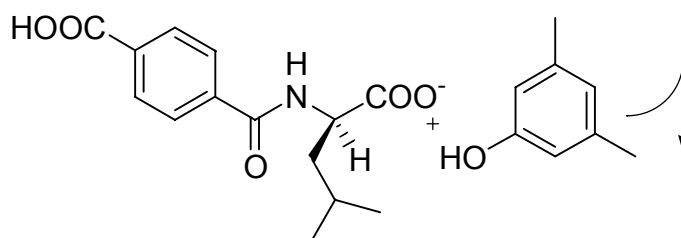
a. Substrat-Katalysator-Komplex



b. Übergangszustand I

c. Zwischenstufe

d. Übergangszustand II



e. Produkte: Carboxylat and Phenol

Schema 5. Schematischer Verlauf des Mechanismus während der katalysierten Hydrolyse des Substrats **2L**, beginnend mit dem Substrat-Katalysator-Komplex (a) und dem Detailausschnitt der Folgeschritte (b-e).

Die Ergebnisse der Hydrolyse mit einer ansteigenden Substratkonzentration (Abbildung 18) zeigen zunächst einen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zunahme der

Substratkonzentration und während sich dann bei höheren Substratkonzentrationen kaum noch ein Anstieg ergibt. Sobald alle aktiven Zentren besetzt sind, bleibt die Geschwindigkeit konstant, das heißt, sie ist erster Ordnung in Bezug auf die Esterkonzentration (Sättigungskinetik). Im Gegensatz dazu steigen die Startgeschwindigkeiten beim Einsatz des ungeprägten Kontrollpolymers **CPF4** nur kurz hyperbelförmig an und gehen dann in eine Gerade mit einer niedrigen katalytischen Aktivität über. Anhand der Abbildung in 17/20a gezeigten Kurven, deren Verläufe ähnlich wie bei Enzymen sind, kann der Einfluß der Bindung und der Katalyse durch die bekannte Michaelis-Menten Gleichung (13) ermittelt werden.

Diese Gleichung basiert auf folgendem Reaktionsverlauf:



K = Katalysator; S = Substrat; KS = Katalysator-Substrat-Komplex; P = Produkt.

Um eine kinetische Gleichung aufstellen zu können, werden zwei Vereinfachungen gemacht.

Zum einen gilt $k_{-1} \gg k_2$ und daraus folgt für die Komplexdissoziationskonstante K_s :

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[K][S]}{[KS]} \quad (8)$$

Des weiteren soll gelten, daß die Konzentration des Katalysator-Substrat-Komplexes KS konstant ist, das heißt der Verbrauch ist genauso schnell wie die Bildung.

$$\frac{d[KS]}{dt} = 0 \quad (9)$$

Daraus kann die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymreaktion bestimmt werden:

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[KS] = \frac{k_2[K]_{\text{total}}[S]}{K_M + [S]} \quad (10)$$

K_M wird dabei als Michaelis-Menten Konstante bezeichnet. Sie beinhaltet die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Gesamtreaktion:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (11)$$

Bei einem Überschuß an Substrat sind alle aktiven Zentren mit einem Substrat belegt. Somit ist $[KS] = [K]_{\text{total}}$. Daraus folgt:

$$v_{\text{max}} = k_2[K]_{\text{total}} \quad (12)$$

und

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (13)$$

v_0 = Startgeschwindigkeit; $k_2 = k_{\text{cat}}$ = Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion (Wechselzahl); K_M = Michaelis-Menten Konstante; $[S]$ = molare Substratkonzentration; $[K]$ = gesamte molare Konzentration der aktiven Zentren im Katalysator.

Der Berechnung aussagekräftiger Werte für K_M und k_{cat} stehen einige Probleme gegenüber. Ein Problem ist die Durchführung der Kinetikmessungen in einem heterogenen System, was die Genauigkeit der Werte limitiert. Dies gilt besonders für die Messungen der Sättigungskurven. Aus diesem Grund wurden die Werte nicht über eine Linearisierung durch die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk ermittelt, sondern anhand eines Computerprogramms (Origin 7.0) durch das Fitting (nicht-lineare Regression) der experimentellen Daten an den hyperbolischen Verlauf von Gleichung (13). Diese Werte besitzen üblicherweise eine höhere Genauigkeit als die durch Linearisierung erhaltenen.^[93, 94]

Um Gleichung (13) lösen zu können, muß die Anzahl der aktiven Zentren der Polymere **IP4** und **IP5** bestimmt werden. Werte dafür konnten durch die Bestimmung der Abspaltrate des Templatmoleküls erhalten werden. Da aber die Möglichkeit besteht, daß die Hohlräume im Polymer schrumpfen und somit nicht mehr zugänglich sein können, werden die Werte mittels Titration der Amidgruppen mit Säure kontrolliert. Beide Methoden ergaben ähnliche Werte (Tabelle 1), was belegt, daß durch das stöchiometrisch nicht-kovalente Imprinting die meisten Kavitäten zugänglich sind. In früheren Arbeiten^[48, 95, 96] konnte bereits gezeigt werden, daß im Fall von durch Diamidiniumgruppen gebundenen Templaten nahezu dieselbe Menge an Templat wieder aufgenommen werden konnte, die zuvor abgespalten wurde.

Ein weiteres Problem bei der Berechnung der Daten mit Gleichung (13) besteht darin, daß im Gegensatz zu Enzymen und monoklonalen Antikörpern, sich in geprägten katalytisch aktiven Polymeren verschiedene aktive Zentren mit sowohl unterschiedlichen Bindungsfähigkeiten und Selektivitäten als auch unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten befinden. Diese Inhomogenität („Polyklonalität“) tritt besonders zum Vorschein, wenn ein großer Substratüberschuß vorliegt, bei dem alle aktiven Zentren belegt sind. Aus diesem Grund erhält man durch die Kinetiken Mittelwerte. Das Erscheinungsbild der Kurven in Abbildung 17/20a läßt auf einen großen Anteil der aktiveren Zentren schließen. Bei den angegebenen Werten für K_M und

k_{cat} mit $k_{\text{cat}} = \frac{v_{\max}}{[K]_{\text{total}}}$ im nächsten Abschnitt handelt es sich somit nicht um absolute sondern

um sichtbare, gemessene Werte.

Katalysator Substrat	IP4		CPF4		IP5	
	2L	2D	2L	2D	3L	3D
K_M [mM]	0,51	0,62	1,23	1,19	0,34	0,43
v_{\max} [10^{-7} Mmin $^{-1}$]	9,48	6,98	0,22	0,23	6,51	4,30
k_{cat} [10^{-4} min $^{-1}$]	4,74	3,49	0,11	0,11	3,26	2,68
k_{cat}/K_M [min $^{-1}$ M $^{-1}$]	0,94	0,57	0,0090	0,0095	0,95	0,62
L/D Verhältnis von k_{cat}/K_M	1,66		0,95		1,53	
IP4/CPF4 Verhältnis von k_{cat}/K_M			101			

Tabelle 6. Ergebnisse der Michaelis-Menten Kinetik bei der Verwendung der geprägten Katalysatoren **IP4** und **IP5** (siehe Abbildung 17).

In Tabelle 6 sind die berechneten Werte angegeben. Die Michaelis-Menten Konstante K_M ist eine Dissoziationskonstante und somit ein Maß für die Stabilität des Substrat-Katalysator-Komplexes. Für die Templat-analogen Substrate wurden Werte von 0,51 bzw. 0,34 mM gefunden. Dies beschreibt die relativ hohe Stabilität des Substrat-Katalysator-Komplexes. Besonders unter dem Gesichtspunkt, daß es sich dabei um nicht-kovalente Wechselwirkungen in einem Medium aus wässrigem Puffer und Acetonitril in einem 1:1-Verhältnis handelt, sind dies bemerkenswerte Ergebnisse. Der Parameter k_{cat} , eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung, ist ein Maß für die katalytische Aktivität des Katalysators, die beschreibt wieviele Reaktionen pro Minute von einem aktiven Zentrum katalysiert werden können (Wechselzahl – turnover number). Die Werte für $k_{\text{cat}} = 4,74 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ und $3,26 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ sind nicht sehr hoch. Aber es sollte darauf hingewiesen werden, daß die Hydrolyse von relativ stabilen Phenylestern untersucht wurde, im Gegensatz zu vielen anderen Modelluntersuchungen, in denen die Kinetiken von 4-Nitrophenylestern vermessen wurden. In beiden Polymeren **IP4** und **IP5** wurde das Templat-analoge Substrat im Vergleich zum Enantiomer besser gebunden, ersichtlich an den Faktor 1,22 beziehungsweise 1,27 ($K_M(\text{L})/K_M(\text{D}) = 0,82$ und $0,79$). Die katalytische Konstante zeigt identische Tendenzen mit $k_{\text{cat}}(\text{L})/k_{\text{cat}}(\text{D}) = 1,36$ und $1,22$.

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, zeigt die Hydrolyse mit der Kontrolle **CPF4** nicht den typischen Verlauf einer Michaelis-Menten Kinetik. So steigt die Startgeschwindigkeit bis zu der

Substratkonzentration hyperbolisch an, bei der alle Amidgruppen im Polymer durch Substrate blockiert sind, worauf die Geschwindigkeit linear bzw. nahezu konstant bleibt. Dies weist auf eine Art Substratinhibierung hin. Diese Werte können mathematisch einer Hyperbel angeglichen werden. Die erhaltenen Werte für $K_M = 1,23$ (1,19) mM sind nur etwa um den Faktor 2,4 größer gegenüber der Konstante K_M für **IP4**. Daraus kann man unter Vorbehalt entnehmen, daß der Katalysator-Substrat-Komplex im Kontrollpolymer sich nicht erheblich schwächer ausbildet. Hieraus wird ersichtlich, daß die Substratbindung im aktiven Zentrum zum Substrat-Katalysator-Komplex (Schema 5a) hauptsächlich nur über die Wechselwirkung zwischen der Carbonsäure des Terephthaloylrests und einer Amidgruppe erfolgt. Die erhaltenen Werte für die Wechselzahl $k_{cat} = 0,11 \text{ min}^{-1}$ zeigen, daß allerdings die selektive Stabilisierung des Übergangszustandes im **IP4** über 40 mal so hoch ist.

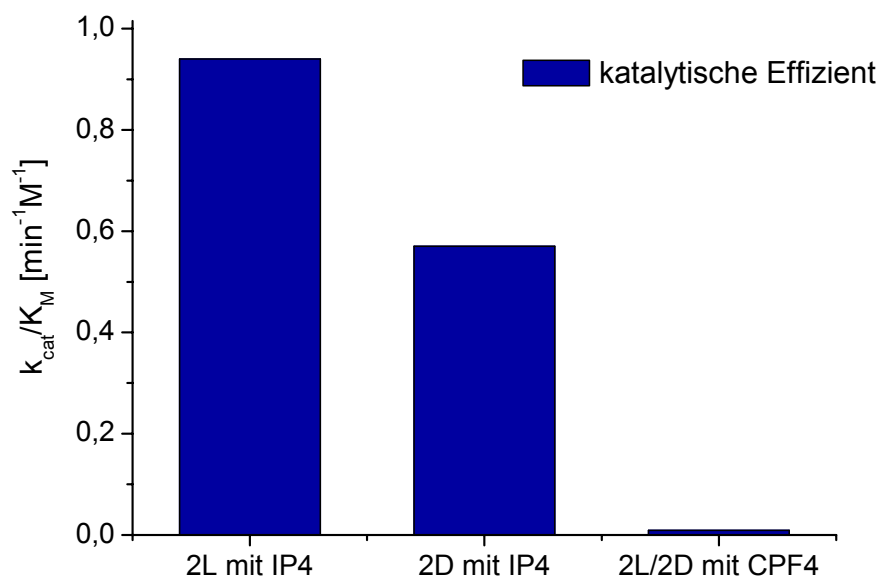


Abbildung 19. Vergleich der katalytischen Effizienzen k_{cat}/K_M von Polymer **IP4** mit **CPF4**.

Oft werden k_{cat}/K_M Werte als ein Maß für die katalytische Effizienz für Enzyme oder Enzymmodelle angegeben. Beim Vergleich der katalytischen Effizienzen der beiden Substrantenantimere können Enantioselektivitäten für **IP4** von 1,66 (Abbildung 19: Faktor zwischen k_{cat}/K_M Werten für **2L** mit **IP4** und **2D** mit **IP4**) und für **IP5** von 1,53 erzielt werden. Damit konnten bemerkenswerte Resultate für die Enantioselektivität dieses katalytischen Prozesses erzielt werden. Des weiteren konnte dargelegt werden, daß die Reaktionsbeschleunigung sowohl durch die bessere Bindung des Templat-analogen Substrats als auch durch die bessere Stabilisierung des Templat-analogen Übergangszustands der Reaktion bedingt ist. Demgemäß wird ein thermodynamischer und ein kinetischer Einfluß zu ähnlichen Anteilen beobachtet.

Neben der Selektivität zwischen den Enantiomeren ist auch besonders der Unterschied der katalytischen Effizienzen k_{cat}/K_M zwischen dem Katalysator **IP4** und dem Kontrollpolymer **CPF4** von über zwei Größenordnungen (Faktor: 101) hervorzuheben (Abbildung 19: Faktor zwischen k_{cat}/K_M Werten für **2L** mit **IP4** und **2L/2D** mit **CPF4**). Besonders der Anteil der Wechselzahl k_{cat} spielt dabei eine große Rolle (vergleiche Tabelle 6). Dieser Wert kann ebenfalls als Imprinting-Selektivität bezeichnet werden, bei der neben der rein kinetischen auch thermodynamische Unterschiede beteiligt sind. Dies ist bisher der höchste gemessene Imprinting-Effekt in molekular geprägten Polymeren während eines katalysierten Vorgangs.

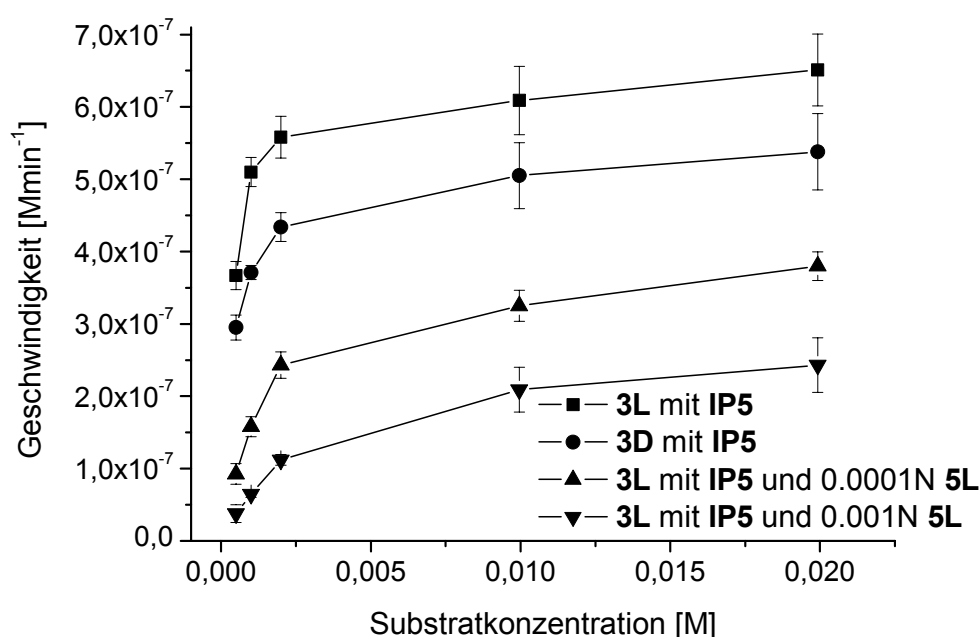
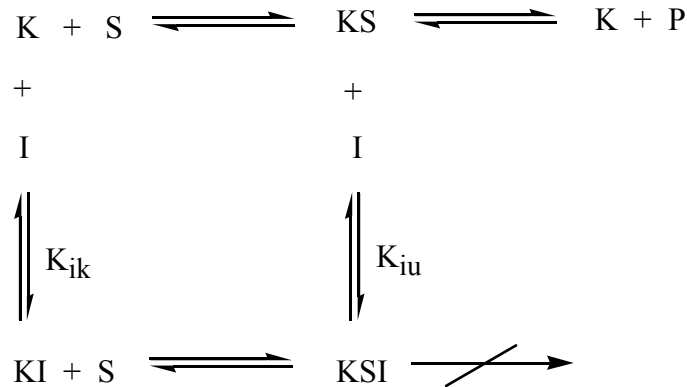


Abbildung 20a. Michaelis-Menten Kinetik der Hydrolysen von **3L** und **3D** in Acetonitril / 0,1 M HEPES pH=7,3 (1:1) in Gegenwart von **IP5** mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors **5L**.

2.2.5 Inhibitionsuntersuchungen

Eine typische Eigenschaft von Enzymen ist die Inhibition durch bestimmte Moleküle. Ein Übergangszustandsanalog-geprägtes Polymer sollte durch sein Templat, das zum Prägen eingesetzt wurde, kompetitiv gehemmt werden. Damit kann ein weiterer Nachweis für die Existenz einer Katalyse innerhalb der geprägten Hohlräume erfolgen.



Schema 6. Mechanismen der kompetitiven (links) und unkompetitiven (rechts) Inhibition.

K_{ik} und K_{iu} beschreiben die Dissoziationskonstante für die entstandenen Komplexe der entsprechenden Hemmung durch den Inhibitor I.

Bei der Inhibition sind zwei Mechanismen möglich. Im ersten Mechanismus, der kompetitiven Hemmung, besitzt der Inhibitor eine hohe Affinität zum aktiven Zentrum, so daß in diesem Fall Substrat und Inhibitor in Konkurrenz zueinander stehen. Infolgedessen wird die Maximalgeschwindigkeit v_{\max} verringert, aber durch eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration kann dieser Effekt kompensiert werden. Der zweite Mechanismus, die unkompetitive Hemmung, beschreibt die Bildung eines ternären Komplexes zwischen Katalysator, Substrat und Inhibitor. Die folgende Verringerung der maximalen Geschwindigkeit ist in diesem Fall unabhängig von der Substratkonzentration. Schema 6 beschreibt diese Vorgänge. Weitere Inhibitionsmöglichkeiten, wie die Substrathemmung oder gar die Produkthemmung werden in diesem Schema nicht berücksichtigt. Die Substrathemmung kann ausgeschlossen werden, da in diesem Fall die Geschwindigkeit bei sehr hohen Substratkonzentrationen wieder sinkt. Die Produkthemmung wurde nicht weiter untersucht, aber die Existenz dieses Hemmtyps in ähnlichen Systemen ist bekannt. Diese kann hier ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, aber eine Quantifizierung ist sehr schwer.^[91, 97]

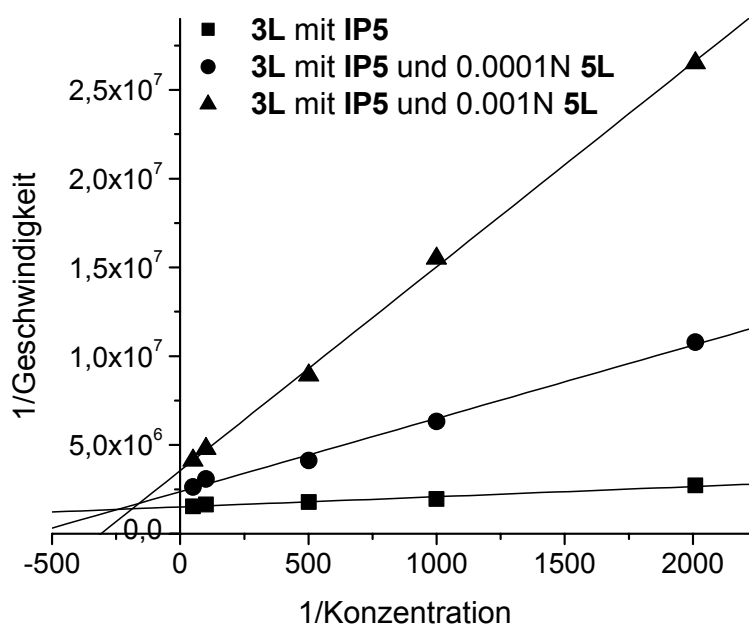


Abbildung 20b. Lineweaver-Burk-Diagramm der Hydrolysekinetik von **3L** in Gegenwart von Polymer **IP5** mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen **5L**.

Die Reaktionen wurden in Gegenwart des Katalysators **IP5** unter Standardbedingungen durchgeführt, zunächst ohne Zugabe eines Inhibitors und anschließend mit zwei verschiedenen Konzentrationen ($1 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-1}$ und $1 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1}$) des Inhibitors **5L**. Das Templat **5L** sollte eine stärkere Bindung zum aktiven Zentrum des Polymers **IP5** ausbilden als die Substrate, da das Polymer **IP5** mit diesem Molekül **5L** geprägt wurde. Somit ist **5L** als ein möglicher Inhibitor besonders geeignet.

Gleichung (14) (doppelt reziproke Linearisierung von Gleichung (13) nach Lineweaver und Burk) gilt für den Fall ohne Inhibitor.

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_M}{v_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (14)$$

Um diese Inhibition näher zu bestimmen, wird unter Berücksichtigung der Inhibitionskonstanten K_{ik} und K_{iu} aus Schema 6 für die kompetitive und unkompetitive Hemmung die Michaelis-Menten Gleichung (13) modifiziert.^[98]

$$v_0 = \frac{v_{\max} \times [S]}{K_M \alpha + [S] \alpha'} \quad (15)$$

$$\text{mit } \alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_{ik}}\right) \text{ und } \alpha' = \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)$$

[I] = Inhibitorkonzentration

K_{ik} = Inhibitionskonstante für die kompetitive Hemmung

K_{iu} = Inhibitionskonstante für die unkompetitive Hemmung

Daraus ist zu erkennen, daß α auf K_M wirkt und α' auf v_{\max} (siehe auch Gleichung (16)).

Aus der doppelt-reziproken Form von Gleichung (15) können die Inhibitionskonstanten aus den Steigungen und den Achsenabschnitte der doppelt-reziproken Auftragung in Abbildung 20b berechnet werden, die in Tabelle 7 aufgeführt sind.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\alpha'}{v_{\max}} + \frac{K_M \alpha}{v_{\max} [S]} \quad (16)$$

I = 5L [mol ⁻¹]	[E] _{total} /[I]	K_m [mM]	K_{iu} [mM]	K_{ik} [mM]
0	-	0,38	-	-
1×10 ⁻⁴	20	0,38	0,18	0,016
1×10 ⁻³	2	0,38	0,77	0,053

K_M = Dissoziationskonstante des Substrat-Katalysator-Komplexes;

K_{iu} = Inhibitionskonstante – unkompetitiver Weg;

K_{ik} = Inhibitionskonstante – kompetitiver Weg;

$v_{\max} = 6,62 \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$; $K_m = 0,38 \text{ mM}$ (aus Lineweaver-Burk-Plot ohne Inhibitor)

Tabelle 7. Kompetitive und unkompetitive Hemmung während der Substratsättigungskinetik des Substrates 3L mit Inhibitor 5L und Polymer IP2. Ergebnisse für die Dissoziationskonstanten K_{iu} , K_{ik} and K_M aus den Lineweaver-Burk-Auftragungen.

Aus den zunehmenden Steigungen der Geraden ist zu entnehmen, daß 5L ein effektiver Inhibitor ist, der viel stärker gebunden wurde als das Substrat 3L. Abbildung 20b zeigt die Lineweaver-Burk-Diagramme durch die Auftragung der Startgeschwindigkeiten v_0^{-1} gegen die Substartkonzentration c^{-1} . Ein genauerer Blick auf diese Abbildung läßt vermuten, daß keine reine kompetitive Hemmung vorliegt, bei der sich die Geraden auf der Ordinate schneiden müssten, was hieße, daß die Maximalgeschwindigkeiten v_{\max} der Sättigungskinetiken

gleich sind. Die Geraden der gemessenen Kinetiken schneiden sich aber im negativen Abzissenbereich und positiven Ordinatenbereich der Auftragung (Quadrant 4), was bedeutet, daß die Maximalgeschwindigkeiten v_{\max} der Sättigungskinetiken nicht gleich sind. Somit scheint eine Kombination beider Inhibitionsmechanismen vorzuliegen, was als gemischte (nicht-kompetitive) Hemmung bezeichnet wird. Weiter bedeutet dies, daß nicht nur der Katalysator den Inhibitor binden kann, sondern auch der Katalysator-Substrat-Komplex. Umgekehrt ist auch der Katalysator-Inhibitor-Komplex in der Lage das Substrat zu binden und den ternären Komplex KSI zu formen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Inhibitionskonstanten für den kompetitiven Fall erheblich niedriger als für den unkompetitiven Fall sind. Je größer eine der Inhibitionskonstanten, desto geringer der Einfluß auf die Kinetik bzw. Thermodynamik. Also beinhaltet die gemischte Hemmung von Polymer **IP5** mit dem Inhibitor **5L** einen weit größeren kompetitiven Anteil. Das Verhältnis zum unkompetitiven Weg läßt sich anhand der geringen Datenmenge nicht quantifizieren.

Aus den Inhibitionskonstanten für den kompetitiven Fall kann auf jeden Fall festgestellt werden, daß der zum Prägen verwendete Inhibitor **5L** fast 24 mal stärker im Hohlraum gebunden wird als das verwendete Substrat **3L**, was nach dem Modell des Molecular Imprinting zutreffen muß.

Unkompetitive und gemischte Hemmung werden gewöhnlich bei Enzymen mit 2 oder mehr Substraten beobachtet und besitzen für die experimentelle Analyse solcher Enzyme eine große Bedeutung. So kann die Reaktion des einen Substrats durch das andere unkompetitiv oder gemischt gehemmt sein. Auch die vorgestellten katalytischen Polymere besitzen eine Aktivität für mehrere Substrate, was durch die Kreuzselektivität gezeigt wurde.

Die Inhibitionsuntersuchungen deuteten an, daß das aktive Zentrum zu einem Teil nicht nur das Substrat oder das Templat (als Inhibitor) binden kann, sondern auch ein ternärer Komplex gebildet wurde. Dieser Komplex kann wie folgt postuliert werden: Ein Substrat mit dem Carbonsäure-Bindungsmotiv und das Templatmolekül mit einer der Säuregruppen binden an die beiden Amidin-Haftgruppen in einem Hohlraum, der nicht die perfekt komplementäre Struktur besitzt. Dadurch wird dieser geblockt und eine Reaktion kann nicht mehr stattfinden, da die Estergruppen des Substrats nicht korrekt orientiert werden.

Eine Wechselwirkung zwischen Substrat und Templat (Inhibitor) als vorgelagertes Konkurrenzgleichgewicht, das ebenfalls zu einer Inhibierung beiträgt, konnte ausgeschlossen werden, da beide Moleküle aufgrund des pH-Wertes in deprotonierter Form vorgelegen haben. Die Resultate der Inhibition ergaben einen weiteren Hinweis auf die Polyklonalität dieser katalytisch aktiven Polymere. Die Qualität der Kavitäten war nach wie vor nicht sehr hoch, so daß entgegen dem Modell sowohl ein Templat als auch ein Substrat gleichzeitig gebunden werden konnten. Zukünftige Untersuchungen könnten das Verständnis der Inhibitionsmechanismen vertiefen. Vor allem die Verwendung eines zweiten Substrats als potentielltem Inhibitor sollte weitere Erkenntnisse liefern.

2.3 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung an geprägten Polymerschichten

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Spektrochemie und Angewandter Spektroskopie in Dortmund molekular geprägte Polymere auf eine mögliche Verwendung als sensitive Schicht in Chemosensoren hin untersucht werden.^[99] Aufgrund der Stabilität und der Vielseitigkeit sind solche Polymere prädestiniert für solche Anwendungen. Durch die Tatsache, daß molekular geprägte Polymere hochvernetzt sind, ergeben sich Schwierigkeiten aufgrund des Einflusses des umgebenen Polymers bei der direkten Untersuchung der De- und Adsorption der Templatmoleküle. Somit wurden in nahezu allen Fällen bisher nur indirekte Methoden für diese Untersuchungen angewendet. Es ist daher von großem Interesse, Methoden zur direkten Bestimmung zu entwickeln. Die Möglichkeit ein direktes Signal zu erhalten, ergibt sich durch die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (surface enhanced Raman-scattering – SERS), da es sich dabei um eine sehr sensitive und selektive Methode handelt.

2.3.1 Einführung in die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)

Im Bereich der Molekülspektroskopie war die Raman-Spektroskopie lange Zeit nicht sehr verbreitet, aber dies änderte sich mit der Einführung von Lasern Anfang der 60'er Jahre und mit dem Einsatz von Vielkanaldetektoren. Beim Raman-Effekt handelt es sich um einen inelastischen Streuvorgang von Photonen an Molekülen oder Kristallen.^[100, 101]

Bestrahlt man eine Probe mit monochromatischer Strahlung, so kommt es neben Absorption, Reflexion und der überwiegenden elastischen Streuung in einem geringeren Anteil auch zu inelastischer Streuung. Bei der elastischen Streuung besitzen die gestreuten Photonen die gleiche Energie wie die einfallenden Photonen und somit auch die gleiche Wellenlänge, man spricht in diesem Fall (Abbildung 21a) von Rayleigh-Streuung. Bei der inelastischen Streuung unterscheiden sich die Energien der einfallenden und der gestreuten Photonen und somit auch deren Wellenlängen. Der Grund hierfür liegt in der Anregung von Molekül- oder Kristallschwingungen. Da Moleküle und Kristalle nur eine gewisse, ihrer Geometrie entsprechende Anzahl diskreter Schwingungszustände einnehmen können, weisen die Raman-Spektren auch nur diskrete Banden, die bestimmten Molekülschwingungen zugeordnet werden können, auf.

So können die charakteristischen Energiedifferenzen, bzw. die damit verbundenen Frequenzverschiebungen die Identifizierung funktioneller Gruppen bzw. der gesamten Verbindung anhand von Referenzspektren ermöglichen. Die Raman-Spektren sind stark symmetrieabhängig und erlauben daher insbesondere die Unterscheidung von Isomeren. Eine Schwingung ist also nur dann Raman-aktiv, wenn sich in ihrem Verlauf die Polarisierbarkeit ändert. Im Gegensatz dazu ist eine Schwingung nur dann Infrarot-aktiv, wenn sie das Dipolmoment eines Moleküls ändert. Hierdurch erklärt sich auch die Komplementarität von IR- und Raman-Spektroskopie.

Die bei der elastischen und inelastischen Streuung an Molekülen oder Kristallen beteiligten Prozesse seien kurz anhand von Abbildung 21 erläutert.

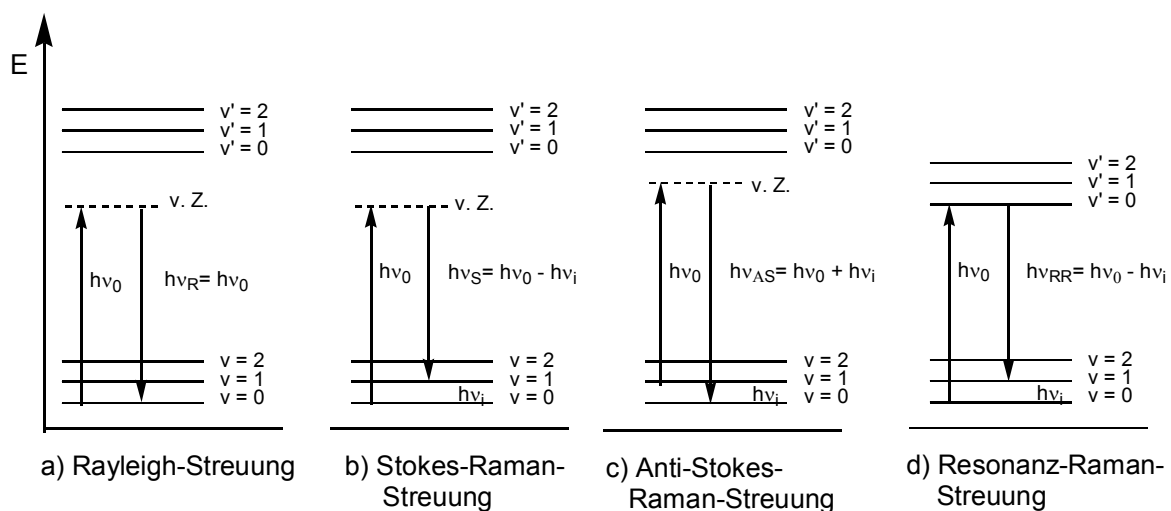


Abbildung 21. Energieniveaus bei der elastischen (a) und inelastischen Streuung (b-d) von Photonen an Molekülen und Kristallen.

Die Raman-Streuung ist ein einstufiger Prozeß, zu dessen besserem Verständnis ein virtueller Zwischenzustand (v.Z.), der unterhalb des ersten angeregten elektronischen Niveaus (v') liegt, angenommen wird. Vor der Wechselwirkung mit dem Photon befindet sich das Molekül in der Regel im nicht schwingungsangeregten elektronischen Grundzustand ($v = 0$).

Rayleigh-Streuung: (a) Das Molekül wechselwirkt mit dem einfallenden Photon, nimmt im virtuellen Zwischenzustand keine Energie vom Photon auf und befindet sich abschließend wieder im nicht schwingungsangeregten elektronischen Grundzustand. Die Wellenlängen von einfallender und gestreuter Strahlung sind identisch.

Stokes-Raman-Streuung: (b) Beim Streuprozeß werden Schwingungen im Molekül angeregt und die gestreute Strahlung ist um den Betrag der zur Schwingungsanregung benötigten Energie ärmer und weist somit eine größere Wellenlänge als die einfallende Strahlung auf.

Anti-Stokes-Raman-Streuung: (c) Das Molekül befindet sich vor dem Streuprozess in einem schwingungsangeregten Zustand (z.B. $v = 1$) und relaxiert nach der Wechselwirkung mit dem Photon in den nicht schwingungsangeregten Zustand ($v = 0$). Die Energie der Schwingung wird auf das gestreute Photon übertragen, welches dadurch eine höhere Energie und damit eine kürzere Wellenlänge als das einfallende Photon aufweist. Dieser Streuvorgang tritt üblicherweise mit geringerer Wahrscheinlichkeit als die Stokes-Streuung auf, da er von der Besetzungsdichte des schwingungsangeregten Zustandes abhängt. Diese Besetzung folgt der Boltzmann-Statistik und ist stark temperaturabhängig. So befindet sich bei Raumtemperatur nur ein geringer Bruchteil der Moleküle in einem angeregten Schwingungszustand, weshalb bei der Raman-Spektroskopie bei Raumtemperatur hauptsächlich die Stokes-Raman-Banden beobachtet werden.

Ein Spezialfall der Raman-Streuung ist die Resonanz-Raman-Streuung (Abbildung 21d). Hier führt das einfallende Photon zu einem elektronisch angeregten Zustand des Moleküls. Ein solcher Vorgang ist zu beobachten, wenn die eingesetzte Anregungswellenlänge einer Absorptionsbande des Moleküls entspricht, wie es z.B. durch ein Chromophor gegeben sein kann. Durch die Anregung kann dann selektiv das chromophore System im Molekül zur Streuung angeregt werden, während die restlichen Teile des Moleküls keinen wesentlichen Beitrag zum Raman-Spektrum liefern.

In der Praxis arbeitet man heute mit intensiven, monochromatischen Strahlungsquellen in Form von Lasern. Vorteile des Lasers sind die hohe Strahlungsqualität und scharfe spektrale Linien mit hoher Intensität, wodurch eine gute Fokussierung ermöglicht wird. Wird die Anregungswellenlänge des Lasers im roten (He/Ne- oder Dioden-Laser) oder nahen infraroten Spektralbereich (Nd:YAG-Laser) gewählt, so kann eine störende Fluoreszenz wirkungsvoll unterdrückt werden. Die Energie der Strahlung reicht dann im allgemeinen nicht dazu aus, die Probenmoleküle sowie eventuelle Verunreinigungen in einen elektronisch angeregten Zustand zu überführen. Weiterhin zeigt Wasser in diesem Bereich nur eine sehr geringe Absorption, so daß auch wäßrige Medien gut mit der Raman-Spektroskopie untersucht werden können (s. auch weiter unten).

Um die im Experiment erhaltenen Raman-Spektren unabhängig von der Anregungswellenlänge darzustellen, werden die Intensitäten gegen die Wellenzahldifferenz zwischen einfallendem Licht und Streulicht aufgetragen. Diese Wellenzahldifferenzen entsprechen den aus Schwingungsanregungen resultierenden Energiedifferenzen zwischen anregender und

gestreuter Strahlung. Dies liefert zudem eine Vergleichsmöglichkeit mit IR-Spektren. Während bei der IR-Spektroskopie die Wellenzahl die reziproke Zahl der Wellenzüge der absorbierten Strahlung pro Zentimeter angibt, beschreibt sie bei der Raman-Spektroskopie die relative Verschiebung der Streustrahlung zur Anregungswellenlänge.

So entspricht z.B. eine Raman-Bande von 1000 cm^{-1} bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm ($12738,85\text{ cm}^{-1}$) einer Wellenlänge von $851,8\text{ nm}$ ($11738,85\text{ cm}^{-1}$).

Vergleicht man die Raman- und die IR-Spektroskopie, so lassen sich einige entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Methoden feststellen. So treten im Raman-Spektrum unpolare Bindungen, wie sie z. B. in Molekülgerüsten gegeben sind, stärker hervor. Raman-Banden sind im allgemeinen schärfer als IR-Banden, da weniger Kombinations- und Oberschwingungen angeregt werden. Symmetrische, d. h. nicht deformierende Schwingungen liefern im Raman-Spektrum intensivere Banden als im IR-Spektrum. Weiterhin zeichnen sich im Raman-Spektrum Streckschwingungen durch stärkere Banden aus als Deformationsschwingungen und Mehrfachbindungen durch stärkere Banden als Einfachbindungen.

Eine Besonderheit im Zusammenhang mit Raman- und IR-Spektroskopie ist das sog. Alternativverbot. Dieses besagt, daß beim Vorhandensein eines Inversionszentrums im Molekül eine Schwingung nicht gleichzeitig IR- und Raman-aktiv sein kann.

Die Nachteile der Raman-Spektroskopie gegenüber der IR-Spektroskopie liegen in den geringen Wirkquerschnitten und in der Anfälligkeit gegen Fluoreszenzanregung. Bis in die letzten Jahre hinein stand auch der beachtliche apparative Aufwand einer weiten Verbreitung der Methode entgegen.

Im Jahr 1974 wurde dann von Fleischmann et al. eine außerordentliche Verstärkung von Raman-Banden an einer elektrochemisch aufgerauhten Silberelektrode beschrieben.^[67-69] Bei diesem surface enhanced Raman-scattering (SERS)-Effekt kann eine Verstärkung des Streuquerschnitts gegenüber den freien Molekülen um bis zu sechs Größenordnungen auftreten, sofern das Molekül hierbei an der SERS-aktiven Metalloberfläche adsorbiert ist. SERS-Aktivität tritt dann auf, wenn die Metalloberflächen Nanostrukturen im Bereich von 10 bis 300 nm aufweisen. Als Metalle kommen einige Übergangsmetalle in Betracht, von denen Silber, Gold und Kupfer am gebräuchlichsten sind.

Bei der theoretischen Betrachtung der SERS-Effekte werden zwei Teileffekte für die enormen Verstärkungen verantwortlich gemacht:^[99]

- die Verstärkung des lokalen elektrischen Feldes, welches durch den elektrischen Feldvektor des einfallenden und des abgestrahlten Lichtes an der Oberfläche erzeugt wird, dem sogenannten elektromagnetische Anteil;
- die Erhöhung der Molekülpolarisierbarkeit α , dem sogenannten chemische Anteil.

Bei dem elektromagnetischen Anteil handelt es sich um elektromagnetische Wellen, die kollektive Schwingungen gequantelter Energie von freien Elektronen (Plasmonen) anregen können. In glatten Metallfilmen breiten sich die Plasmonen als Oberflächenwellen aus. Zur Kopplung des Lichtes an diese Wellen ist eine Phasenanpassung erforderlich, die nur unter einem bestimmten Winkel in Totalreflexion erreicht werden kann. Kaum winkelabhängig ist hingegen die Anregung lokalisierter Plasmonen in kleinen Metallpartikeln oder Oberflächenstrukturen bzw. – rauhigkeiten. Da hier auch die höchsten Feldstärken auftreten, werden derartige Partikel oder aufgerauhte Metalloberflächen häufig für SERS verwendet. In Resonanz und bei geringer Dämpfung können die Plasmonen erhebliche Feldüberhöhungen auf der Metalloberfläche erzeugen. Dies hängt von den dielektrischen Eigenschaften der Metalle ab, wobei sich Silber und Gold als am geeignetsten erwiesen. Der elektromagnetische Anteil der Verstärkung ist der mit der größeren Reichweite. Sie beträgt etwa 10 nm, und es können Verstärkungen von vier bis fünf Größenordnungen erreicht werden. Im Gegensatz zum chemischen Anteil ist er nicht von der adsorbierten Spezies, dafür jedoch stark von der Beschaffenheit der Oberfläche abhängig.

Die Anwesenheit eines schwingenden Dipols auf einer Oberfläche kann die Elektronen im Metall polarisieren und Plasmonen anregen, was zu einer Energieabstrahlung von der Oberfläche mit der Frequenz der Dipolschwingung führt.

Der chemischer Anteil zur Gesamtverstärkung wird auch als charge-transfer (CT) Anteil beschrieben. Er basiert im wesentlichen auf der Möglichkeit eines Ladungstransfers zwischen den Molekülen und dem Metall, z. B. bei Lichteinstahlung. Der CT-Effekt hat nur eine sehr kurze Reichweite und beschränkt sich auf die erste adsorbierte Moleküllage. Die Verstärkungsfaktoren liegen für diesen Anteil zum SERS bei etwa 100 und sind hierbei sehr von der adsorbierten Spezies und deren chemischen Eigenschaften abhängig. Für bestimmte Moleküle und Anregungswellenlängen kann ein resonanter SERS (SERRS: surface enhanced resonance Raman-scattering) auftreten.

Molekülspektroskopische Verfahren, wie die oberflächenverstärkte Raman-Streuung, liefern im Vergleich zu anderen Methoden, wie die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) bei der Untersuchung von Sorptionen an metallischen Oberflächen einige Vorteile, da sie mit den Spektren direkt substanzspezifische Informationen liefern. Intensive und gut aufgelöste Signale in Form von Molekülschwingungsbanden können mit Hilfe der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS) erhalten werden. Wenn die Sensorschicht fest an die SERS-aktive Metalloberfläche gebunden ist und die Adsorptionszentren innerhalb der Reichweite der verstärkenden Felder liegen, können die Raman-Banden der angelagerten Analyte registriert werden. Da diese Schwingungsbanden für jede chemische Verbindung charakteristisch sind, kann der entsprechende Analyt anhand des Raman-Spektrums der Reinsubstanz oder von SERS-Referenzspektren zweifelsfrei identifiziert werden.

Für den Einsatz als Detektionsmethode für Chemosensoren bringt die SERS-Spektroskopie mehrere Vorteile. Durch den Einsatz von Lichtleitern kann die freilaufende Laserstrahlung minimiert und auch weiter vom Spektrometer entfernt in möglicherweise aggressiver chemischer Umgebung gemessen werden. Der Einsatz von Kompaktspektrometern und Diodenlasern liefert einen wartungsarmen und bei Bedarf tragbaren apparativen Aufbau, der für vor-Ort-Messungen geeignet ist.

Ein wichtiger Aspekt, neben der Verstärkung durch den SERS-Effekt, ergibt sich dadurch, daß mit SERS Schwingungsspektren erzeugt werden, die charakteristisch sind und die sich durch den Vergleich mit Referenzspektren zur Substanzidentifikation eignen. Somit ist SERS, verglichen mit anderen spektroskopischen Methoden, wie RifS (reflektrometrische Interferenzspektroskopie) oder SPR (surface plasmon resonance), die schon in diesem Bereich zum Einsatz gekommen sind, nicht so stark beeinflusst von Kreuzselektivitäten durch nicht spezifische Adsorption, Quellung und Schrumpfung des Polymers, pH-Abhängigkeit oder durch Einfluß der Analytkonzentration, wodurch die Auswertung der Spektren vereinfacht wird.

Ein großes Problem in der Anwendung von SERS für die Detektion selektiv gebundener Substanzen entsteht durch die Notwendigkeit die sensitive Schicht, in diesem Fall eine Schicht eines geprägten Polymers, mit einer SERS-aktiven Metalloberfläche zu kombinieren. In früheren Arbeiten wurden SERS-aktive Oberflächen schon mit verschiedenen niedermolekularen Verbindungen modifiziert. Durch chemische Modifikation werden selektive Erkennungszentren erzeugt, wodurch eine Reihe von Molekülen an diesen Rezeptorschichten adsorbieren.

Dieses Konzept wurde erfolgreich auf die Adsorption von aromatischen Komponenten aus Wasser und die Erkennung aus der Gasphase durch SERS-aktive Oberflächen, die mit Käfigmolekülen, wie Calixarenen oder Cyclodextrinen beschichten waren. Die notwendige Herstellung dünner Polymerschichten auf einer planen Oberfläche wurde in unserem Arbeitskreis schon bei den Untersuchungen molekular geprägter Polymere mit RfS eingesetzt.^[91] Das Verfahren mittels Spin-coating mußte nun auf die rauhen SERS-aktiven Schichten übertragen und dementsprechend verändert werden.

2.3.2 Herstellung der SERS-aktiven Polymerschichten

Von zentraler Wichtigkeit ist die Metallschicht zur Erzeugung der SERS-Verstärkung. Zu den gebräuchlichsten SERS-aktiven Oberflächen zählen elektrochemisch aufgerauhte Elektroden, Metallkolloide, Metallinselfilme und nanostrukturierte Metallfilme der entsprechenden Übergangsmetalle. Ziel ist es, Substrate zu erzeugen, die:

- hohe SERS-Intensität aufweisen,
- in standardisierter Form herstellbar sind,
- sich lange ohne Verlust der Verstärkung und Adsorptionseigenschaften lagern lassen,
- räumlich homogen sind,
- beständig gegenüber Lösungsmitteln sind,
- leicht regenerier- oder austauschbar sind,
- problemlos entsorgt werden können,
- kostengünstig und umweltschonend sind.

In dieser Arbeit kamen nanostrukturierte Metalloberflächen zum Einsatz. Derartige Träger können entweder durch direkte Strukturierung einer Metalloberfläche oder durch Aufdampfen von Metallfilmen auf strukturierte Träger erzeugt werden.

Für Metallfilme auf strukturierten Trägern gibt es eine Vielzahl von Präparationsmethoden. Besonders für solche Filme, die auf Nanopartikel-bedeckte Oberflächen aufgebracht werden, existiert eine große Auswahl an Substraten. Als Nanopartikel können z.B. Teflonpartikel^[102], Metalloxidpulver^[103], Polystyrolkugeln^[104] oder Diamantkristallite^[105] verwendet werden.

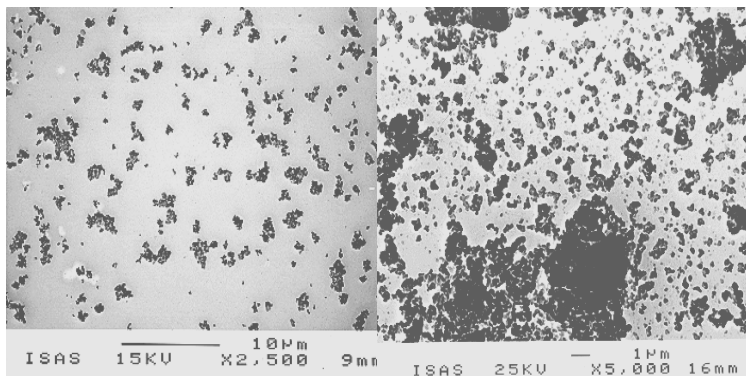


Abbildung 22. SEM Bilder von Silberfilmen über Diamantpartikeln (links) und Aluminiumoxid (rechts)^[99]

Die Herstellung solcher Substrate ist aufgrund der Zahl der benötigten Prozessschritte recht arbeitsintensiv. Sie liefern aber hohe Verstärkungen, die über Wochen stabil bleiben. Aufgrund der Präparationen und der Beschaffenheit der Partikel sind die Oberflächen im allgemeinen nicht sehr homogen, wie in Abbildung 22 am Beispiel von Silberfilmen über Aluminiumoxid- bzw. Diamantpartikeln dargestellt ist.

Für die Herstellung der Polymerschichten werden die SERS-aktiven Oberflächen in der üblichen Weise präpariert^[105]. Dabei wird auf Objektträgern für die Mikroskopie zuerst eine 2 nm dicke Chromschicht und zweitens eine 75 nm dicke Silber- oder 80 nm dicke Goldschicht mit einer Vakuumbdampfungsanlage aufgetragen.

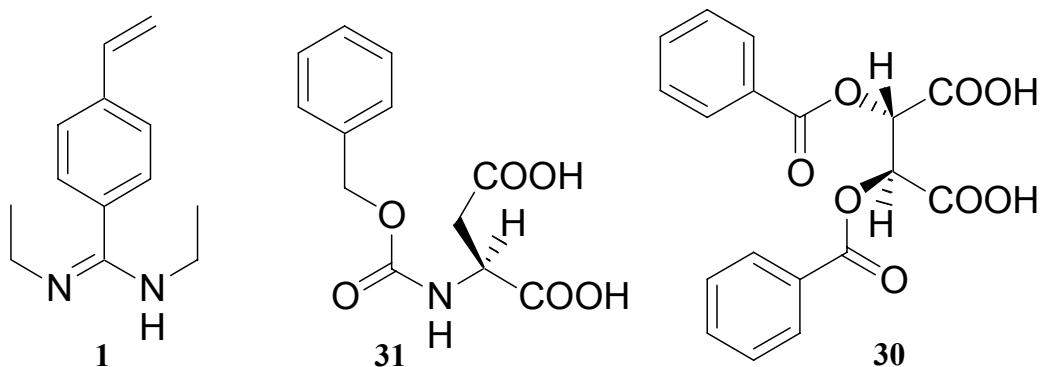
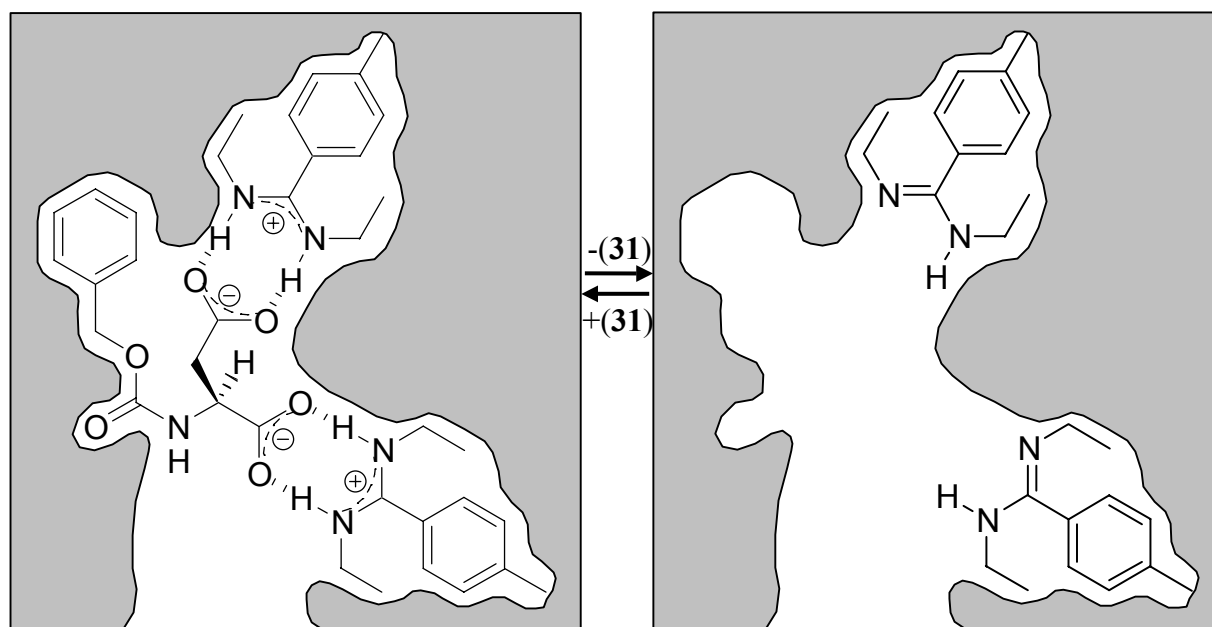


Abbildung 23. Templat und Haftmonomer: *N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-asparaginsäure (31), (2*S*,3*S*)-(+)-*Di-O-Benzoylweinsäure* (30) und *N,N'*-Diethyl-4-vinylbenzamidin (1).

Als Template im Molecular Imprinting System wurden zwei chirale Dicarbonsäuren verwendet. Dabei handelt es sich um die leicht erhältlichen (2S,3S)-(+)-Di-*O*-benzoylweinsäure (**30**) and *N*-Benzyloxycarbonyl-(L)-asparaginsäure (**31**). In beiden Fällen erfolgt die Bindung zum *N,N'*-Diethyl-4-vinylbenzamidin (**1**) durch stöchiometrisch nicht-kovalente Wechselwirkungen.^[48, 95] Ein ähnliches System mit zwei Carbonsäuregruppen war schon zuvor mit dem Komplex aus *N*-(4-Carboxybenzoyl)-(L)-phenylglycin und zwei Äquivalenten von **1** angewendet worden^[47]. Bei der Zugabe zweier Äquivalente von **1** zu **30** oder **31** in THF bildet sich nahezu quantitativ der 2:1-Komplex.

Der Templat-Monomer-Komplex wurde in THF mit einem großen Überschuß an Ethylen-dimethacrylat durch den Radikalstarter AIBN copolymerisiert. Nach der Polymerisation können die Template, **30** und **31** aus dem makroporösen Polymer in hohen Ausbeuten entfernt werden. Schema 7 zeigt ein Bild der Mikrokavität, die durch den Imprinting Prozeß mit **31** als Templat erzeugt wurde. Dabei wurden Hohlräume im Polymer hergestellt, deren Größe, Gestalt und dreidimensionale Anordnung der Amidin-Haftgruppen komplementär zur Struktur des Templatmolekül sind. Dementsprechend kann das Polymer anschließend das Templat selektiv wiederaufnehmen. Die molekulare Erkennung durch solche Polymere wurde bereits detailliert am *N*-(4-Carboxybenzoyl)-L-phenylglycin als Templatmolekül untersucht.^[47, 48, 95]



Schema 7. Schematische Darstellung einer Mikrokavität durch das Prägen mit einem Komplex aus Templat **31** und zwei Äquivalenten des Haftmonomers **1**.

Zwei *N,N'*-Diethylamidin-Gruppen verbleiben nach dem Abspalten von **31** im Hohlraum.

Die Erzeugung des dünnen Polymerfilms erfolgt mit einem Spin-Coater, der sich in einer Glove-Box befand, auf dem die zuvor beschriebenen SERS-aktiven Träger erzeugt. Nach dem die Träger mit der Monomermischung beschichtet wurden, hatte der Spin-Coater die Aufgabe durch Rotation bei 2000 Umdrehungen pro Minuten aus den Monomertropfen einen dünnen gleichmäßig verteilten Film zu erzeugen. Anschließend wurden die Träger in das abgebildete Polymerisationsgefäß überführt und unter Argon durch UV-Initiation polymerisiert.

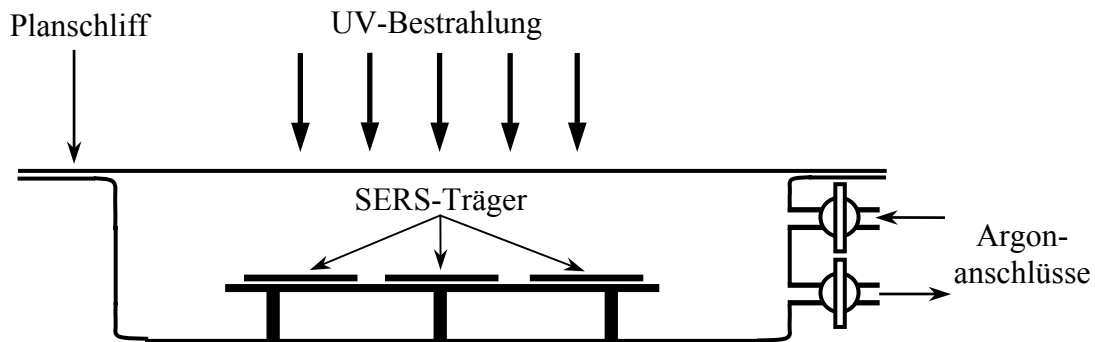


Abbildung 24. Polymerisationsgefäß zur Herstellung der Beschichtungen unter Schutzgasatmosphäre.

Durch die Beschichtung wurde ein dünner Film mit einer Dicke von etwa 500 bis 750 nm erzeugt (siehe Abbildung 25). Die Schichtdicke und das Oberflächenprofil der Polymerfilme wurden durch ein AlphaStep Schichtdickemeßsystem (Tencor Instruments, USA) bestimmt. Die im Rahmen dieser Arbeit eingeführte Handhabung in der Glove-Box brachte einige Vorteile durch den Ausschluß von Sauerstoff, der als Radikalfänger wirken kann. Zum einen konnte der Anteil an Initiator auf ein Gewichtsprozent, wie bei den Ampullenpolymeren, reduziert werden und zum anderen konnte vermieden werden, daß es zu einer Schwärzung der Polymerschicht kommt, wie es in vorangegangenen Arbeiten vorgekommen war.^[91]

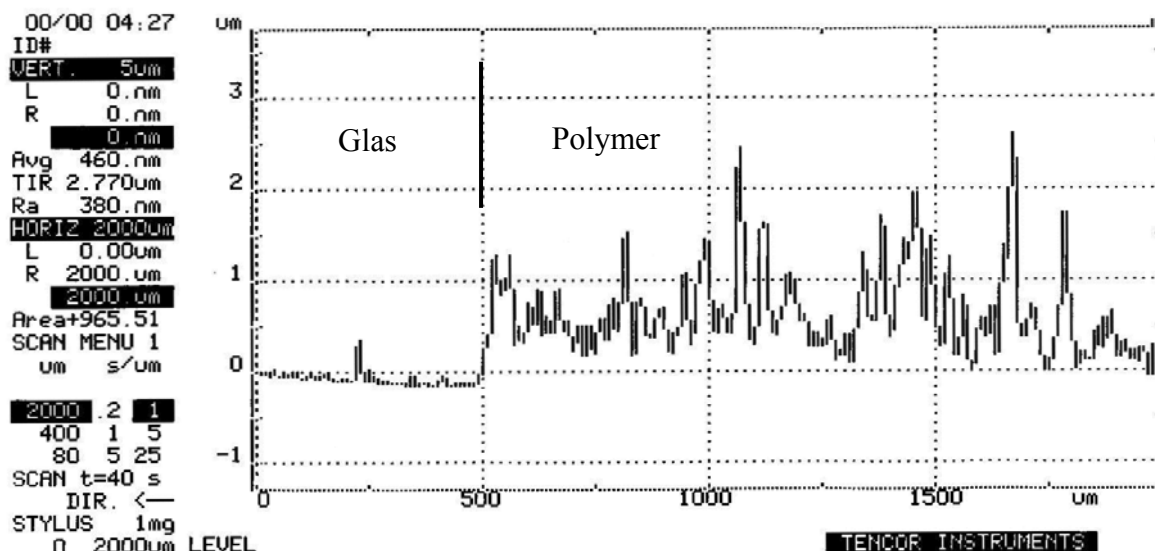


Abbildung 25. Messprotokoll zur Bestimmung der Schichtdicke.

Die Polymerisation wurde durch UV-Bestrahlung initiiert. In einigen Experimenten wurden die SERS-aktiven Goldoberflächen vor der Beschichtung mit Cysteamin modifiziert, um die Adhäsion der Polymerschicht zum Metall zu verbessern. Auch Träger mit Kontrollpolymeren wurden hergestellt. Hierbei hatte die Polymerschicht die gleiche Zusammensetzung wie oben beschrieben, allerdings ohne Zugabe eines Templats **30**, **31** oder einer anderen organischen Säure, wie Benzoesäure.

2.3.3 SERS-Messungen der geprägten Polymerschichten

Die ersten Untersuchungen wurden an geprägten Polymeren durchgeführt, die noch die Template enthielten. Die Banden der Template konnten durch den Vergleich mit den Raman-Spektren der reinen Templatmoleküle identifiziert werden. In Abbildung 26 sind die SERS-Spektren zweier unterschiedlich geprägter Polymere mit Templat **30** abgebildet. Zum Vergleich wird ebenfalls das Raman-Spektrum des freien Templats gezeigt. Das Spektrum der Polymerschicht inklusive Templat mit der mit Cysteamin modifizierten Oberfläche zeigte generell nur schwache Banden, wobei die stärkste Bande bei 1008 cm^{-1} dem aromatischen Ring zugeordnet werden konnte. Die Polymerschicht direkt auf der reinen Metallunterschicht ergab Banden mit einer guten Intensität. Die zusätzlichen Banden im oberen SERS-Spektrum (ohne Cysteamin), verglichen mit dem des reinen Templats **30**, hatten ihren Ursprung im

Polymerrückgrat. Die aromatische Templat-Bande bei 1008 cm^{-1} zeigt dieselbe Verschiebung wie im Raman-Spektrum der reinen Verbindung und im SERS-Spektrum des Polymers mit der Cysteamin-Schicht.

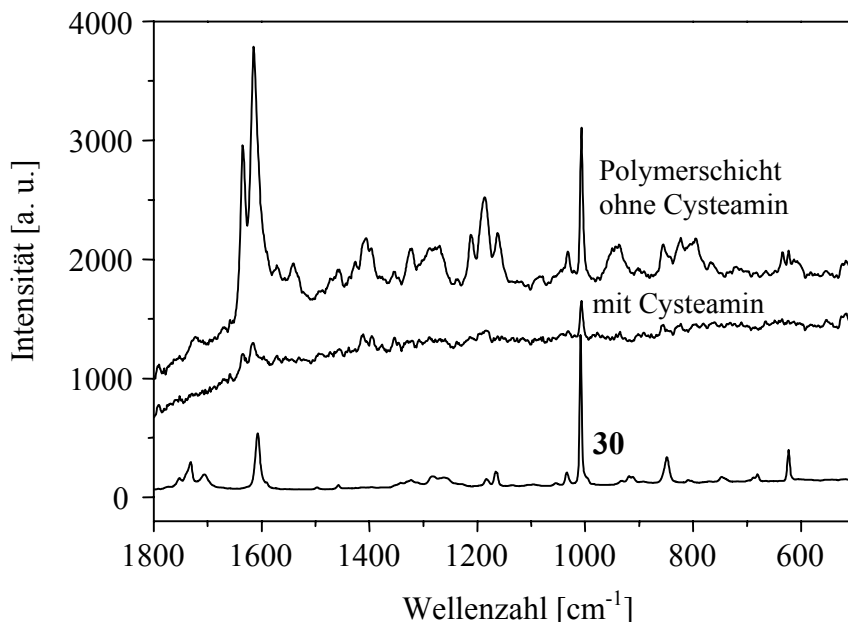


Abbildung 26. Vergleich des Raman-Spektrums des freien Templats (2S,3S)-(+)-Di-O-benzoylweinsäure (**30**) (unten) mit dem SERS-Spektrum der direkt auf einer Goldoberfläche geprägten Polymerschicht und dem SERS-Spektrum des auf der Cysteamin-modifizierten Oberfläche erzeugten Polymers (beide Polymere beinhalten das Templat **30**). In allen drei Fällen wurde die Messung im trockenen Zustand durchgeführt.

Aufgrund der nur schwachen Schwingungsbanden der Polymerschicht auf der Cysteamin-Unterschicht, waren diese nicht für die SERS Untersuchungen anwendbar. Ohne die zusätzliche Schicht zeigte das Polymer starke Raman-Banden. Diese starken Polymerbanden konnten zur Normalisierung der Templat-Banden während der Untersuchungen der Zeitabhängigkeit von Desorption und Adsorption verwendet werden.

Die Unterschiede in den SERS Intensitäten zwischen den beiden unterschiedlichen Polymerschichten demonstriert die bekannt kurze Reichweite des SERS-Phänomens. Die zusätzliche Distanz, verursacht durch das Cysteamin, war anscheinend ausreichend, um das Polymer außerhalb des verstärkenden elektromagnetischen Feldes zu halten.

In nächsten Schritt wurde untersucht, welche der zwei verschiedenen Metalloberflächen das stärkste SERS-Spektrum zeigte. Dazu wurden geprägte Polymere mit *N*-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure (**31**) analog der Vorschrift im Experimentellen Teil auf reinen Gold- und

Silberschichten hergestellt. Die beiden SERS-Spektren der Schichten werden in Abbildung 27 miteinander verglichen. Sie zeigten eine starke Bande bei 1007 cm^{-1} für den aromatischen Ring des Templatmoleküls, welche ebenfalls im Raman-Spektrum der reinen Verbindung **31** auftritt. Das Spektrum des Polymers auf der Goldoberfläche zeigte eine schärfere und stärkere Bande, insbesondere für den Polymerteil, beispielweise bei 1200 cm^{-1} , mit einem besseren Signal-zu-Rausch Verhältnis. Dies war von Vorteil für die Normalisierung der Templatbande zu diesen Polymerbanden während der Sorptionsuntersuchungen. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Messungen die Goldschichten bevorzugt.

Ebenfalls in Abbildung 27 ist das Raman-Spektrum eines $0,1\text{ M}$ HEPES-Puffers mit einem pH-Wert von $7,3$, der während der Sorptionsmessungen verwendet werden sollte, abgebildet. Die stärkste Bande des Puffers liegt bei 1048 cm^{-1} , aber überlappt nicht die Bande des Templats bei 1007 cm^{-1} , so daß dieser Puffer eingesetzt werden konnte.

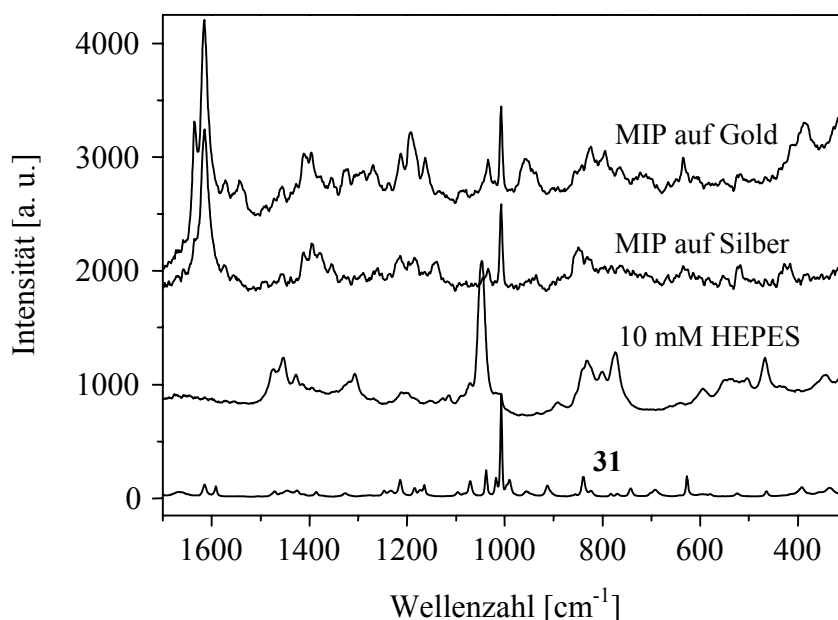


Abbildung 27. Vergleich der SERS-Spektren der Polymerschichten auf Gold und auf Silber, die das Templat *N*-Benzyloxycarbonyl-(*L*)-asparaginsäure (**31**) enthielten mit den Raman-Spektren des reinen Templats **31** und einer HEPES-Pufferlösung ($0,1\text{ M}$, $\text{pH } 7,3$), die für die Adsorptionsmessungen verwendet werden sollte.

Nachdem die besten Bedingungen für die Erzeugung der SERS-Polymerschichten feststanden, wurde das Templat-Signal bei 1007 cm^{-1} während der Freisetzung und der Wiederaufnahme des Templatmoleküls detektiert. Diese Experimente wurden in rein wässrigen Pufferlösungen ohne Zugabe von organischen Lösungsmitteln durchgeführt.

Die Desorption konnte im basischen oder sauren Medium durchgeführt werden, wobei die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Templat und den beiden Haftgruppen zerstört und das Templat abgespalten wurde. Abbildung 28 zeigt als Rohdaten das Spektrum von **31** vor und nach der Desorption aus der geprägten Polymerschicht. Sowohl Desorption als auch Adsorption wurden jeweils über 45 Minuten verfolgt, was in Abbildung 29 zu sehen ist. Die Freisetzung wurde in einer Küvette mit einem HEPES-Puffer bei einem pH-Wert von 5,4 durchgeführt. Für eine zuverlässige Auswertung der Daten mußte die zusätzliche Bande des Puffers, im besonderen die starke Bande bei 1048 cm^{-1} , aus dem Spektrum durch Subtraktion entfernt werden, um den Einfluß der Matrix zu minimieren. Um die Zeitabhängigkeit verfolgen zu können, wurde die Bande bei 1007 cm^{-1} mit der Polymerbande bei 1615 cm^{-1} normalisiert, mit dem Ziel die relativen Intensitäten der SERS-Verstärkung von Verdünnungseinflüssen beispielsweise zu befreien.

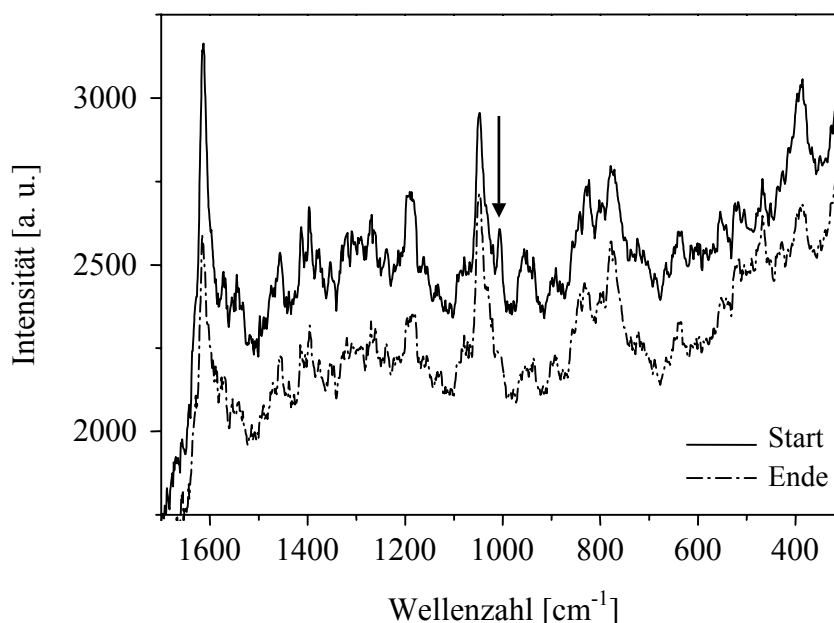


Abbildung 28. Rohdaten zu den SERS-Spektren zu Beginn und am Ende (nach 30 Minuten) der Desorption (0,1 M HEPES, pH 5,4) von *N*-Benzyloxycarbonyl-(*L*)-asparaginsäure (**31**) aus dem geprägten Polymer.

Die Templatbande bei 1007 cm^{-1} verschwindet bei diesem Prozeß.

Die anschließende Wiederaufnahme des Templats wurde in einer 10 mM Lösung von **31** in einer mit 0,1 M HEPES gepufferter Lösung bei einem pH-Wert von 7,3 vermessen. Unter diesen Bedingungen sank die Intensität der Templatbande im SERS-Spektrum und wurde bei der Aufnahme nach kurzer Zeit wieder stärker. Dadurch konnte gezeigt werden, daß Template wieder in die Hohlräume eingeschlossen wurden. Die relative Intensität während der

Adsorption des Templats erreichte nach etwas 15 Minuten einen konstant Wert. Während der Abspaltung erreichte der Werte schon nach 3 Minuten ein Minimum und war somit wesentlich schneller. Die maximale Wiederaufnahme lag bei etwa 80 Prozent des Startwertes, was mit dem Verhalten anderer Polymere mit stöchiometrisch nicht-kovalenten und kovalenten Wechselwirkungen vergleichbar ist.^[48]

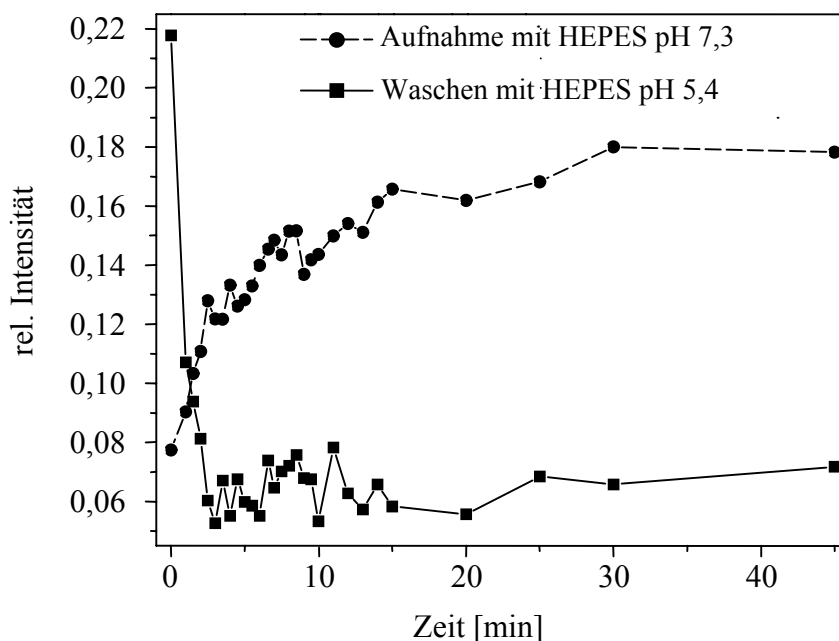


Abbildung 29. Zeitabhängigkeit der Bande bei 1007 cm^{-1} (*N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-asparaginsäure (**31**)) während des Waschvorgangs (pH 5,4) und der Aufnahme (pH 7,3) aus einer 0,1 M HEPES-Pufferlösung. Die Freisetzung des Templats ist nach 3 Minuten und die Wiederaufnahme innerhalb von 15 Minuten beendet. Nach dieser Zeit sind etwa 80% der freien Polymerkavitäten wiederbesetzt.

Ein Kontrollexperiment mit dem zuvor beschriebenen ungeprägten Polymer als Rezeptorschicht zeigte keine Templatbande beim Äquilibrieren mit **31** wie in Abbildung 30 zu sehen ist. Es kann also herausgestellt werden, daß die Aufnahme des Templats **31** in das geprägte Polymer somit einem Imprinting-Effekt zugeschrieben werden kann.

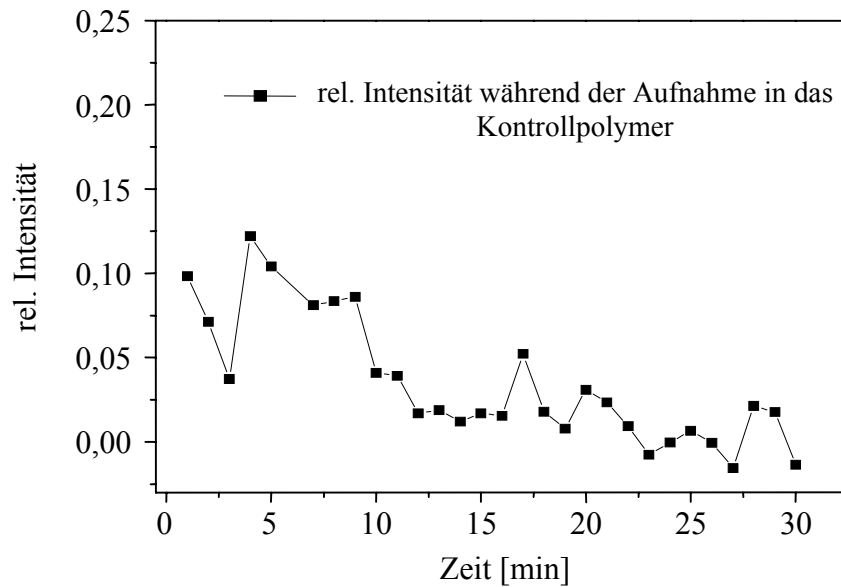


Abbildung 30. Relative Intensität der Templatbande während der Aufnahme in ein ohne Templat geprägtes Kontrollpolymer.

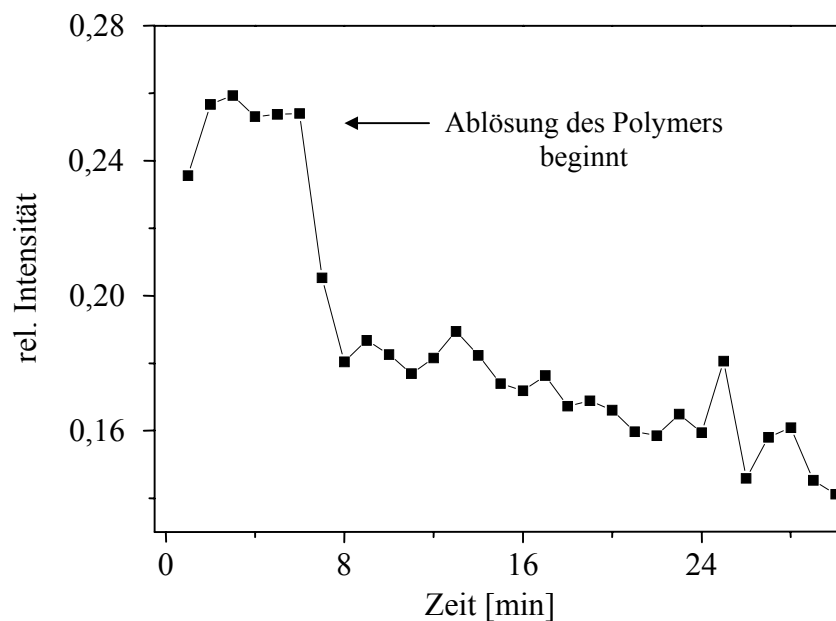


Abbildung 31. Relative Intensität der Analyt-Bande während der Ablösung der Polymerschicht. In diesem Beispiel ist eine Normalisierung der Templatbande mit der starken Polymerbande nur für eine kurze Periode möglich.

Die Lebensdauer der molekular geprägten Polymerschichten auf SERS-aktiven Oberflächen war allerdings limitiert. In einigen Fällen wurden die Schichten nach kurzer Zeit zerstört, da

sich das Polymer von der Metalloberfläche abgelöst hat. Das Ablösen führte zum vollständigen Verlust der Adsorptionseigenschaften, was in Abbildung 31 am Beispiel der Aufnahme von **31** in ein geprägtes Polymer auf einer Silberschicht gezeigt wird. In diesem besonderen Fall blieb die maximale Intensität der Bande bei 1007 cm^{-1} für nur etwa sechs Minuten bestehen. Mit Beginn des Ablösens sank die Signalintensität signifikant. Obwohl die Lebensdauer der Goldschichten beachtlich länger war (siehe Abbildung 29) war es nicht möglich eine gesamte Konzentrationsabhängigkeit der Schichten zu bestimmen. Um die Stabilität der Schichten zu verbessern, sind weitere Modifikationen bei der Herstellung der Polymerschichten auf den Metalloberflächen notwendig. Erste Modifikationen bei der Polymerherstellung durch die Verwendung von Acetonitril / Toluol 1:1 als Porogen und modernen UV-Azoinitiatoren (Wako chemicals V-70), wurden schon eingesetzt, aber die erzeugten SERS-aktiven Polymerschichten konnten im Rahmen der Kooperation nicht mehr untersucht werden.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Ein effizientes Modell mit einer enantioselektiven Esteraseaktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Verwendung der Molecular Imprinting Technik hergestellt. Als stabile Übergangszustandsanaloga wurden die enantiomerenreinen Phosphonsäuremonoester **4L** und **5L** synthetisiert. Bei ihrer Verwendung

als Templatmoleküle kamen bei Herstellung des polymerisierbaren Templatkomplexes stöchiometrisch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit zwei Äquivalenten des Amidin-Haftmonomers **1** zum Einsatz. Durch die übliche Polymerisation des Templatkomplexes mit EDMA als Vernetzer in Gegenwart eines Porogens konnten makroporöse, molekular geprägte Polymere dargestellt werden. Nach dem Entfernen der Template waren diese Polymere, abhängig vom verwendeten Templat, effiziente Katalysatoren in der Hydrolyse von bestimmten nicht-aktivierten Aminosäurephenylestern (**2L**, **2D**, **3L**, **3D**). Der geprägte Katalysator **IP4** (geprägt mit dem Leucin-analogen **4L**) beschleunigte die Hydrolyse des entsprechenden Substrats **2L** (*N*-Terephthaloyl-L-leucin-3,5-dimethylphenylester) im Vergleich zur gepufferten Lösung um den Faktor 325. Verglichen mit einem Kontrollpolymer, welches dieselben Funktionalitäten enthielt, aber ohne das Templat **4L** hergestellt wurde, war die Beschleunigung noch immer 80-fach, was dem bis jetzt höchsten Imprinting-Effekt entspricht. Die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zeigten eine starke Abhängigkeit von der verwendeten Pufferkonzentration. In Kreuzselektivitätsexperimenten wurde eine starke Substratspezifität größer als 3 gefunden, trotz des nur kleinen Unterschieds in der Struktur der Substrate und Template.

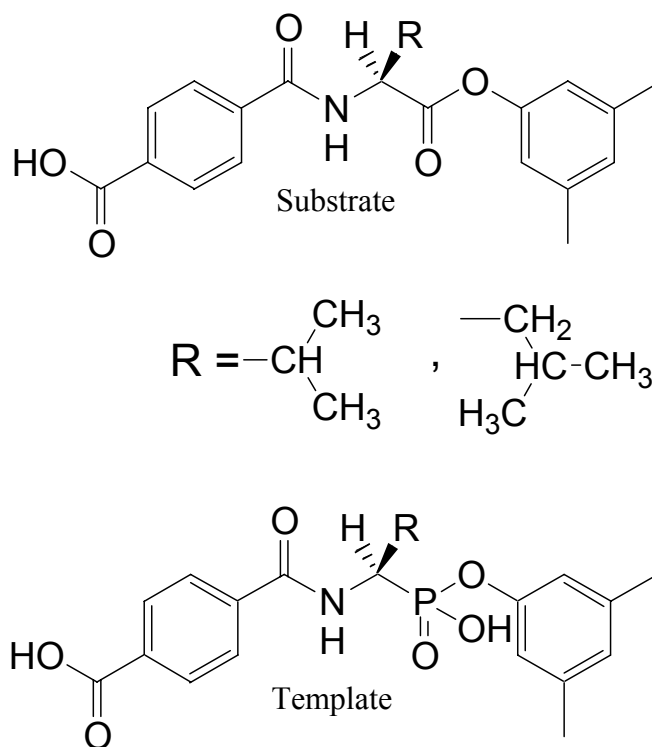


Abbildung 32. Strukturen der Substrate **2L** (*Leucin*) und **3L** (*Valin*) (*D*-Enantiomere analog) und der Template **4L** (*Leucin-analog*) und **5L** (*Valin-analog*).

Die Auftragung der Startgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen zeigte den typischen Verlauf einer Michaelis-Menten Kinetik mit einem Sättigungsverhalten. Aus diesen Kurven konnten Michaelis-Menten Konstanten K_M und Wechselzahlen k_{cat} (turnover number) berechnet werden. Am interessantesten ist die Enantioselektivität, die diese Werte zeigten. Während das Verhältnis der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M zwischen dem geprägten Polymer **IP4** und dem Kontrollpolymer **CPF4** bei etwa 100 liegt, was der Imprinting-Selektivität entspricht, ergibt sich ein Verhältnis für die Hydrolyse der **2L**- und **2D**- Substrate mit **IP4**, das heißt für die Enantioselektivität, von 1,65. Diese Enantioselektivität hat ihren Ursprung in der selektiven Substratbindung ($K_M(L)/K_M(D) = 0,82$) und der selektiven Stabilisierung des Übergangszustands ($k_{cat}(L)/k_{cat}(D) = 1.36$). Auf diese Weise konnten bei diesen molekular geprägten polymeren Katalysatoren erstmals eine hohe Imprinting-, Substrat- und Enantioselektivität gezeigt werden.

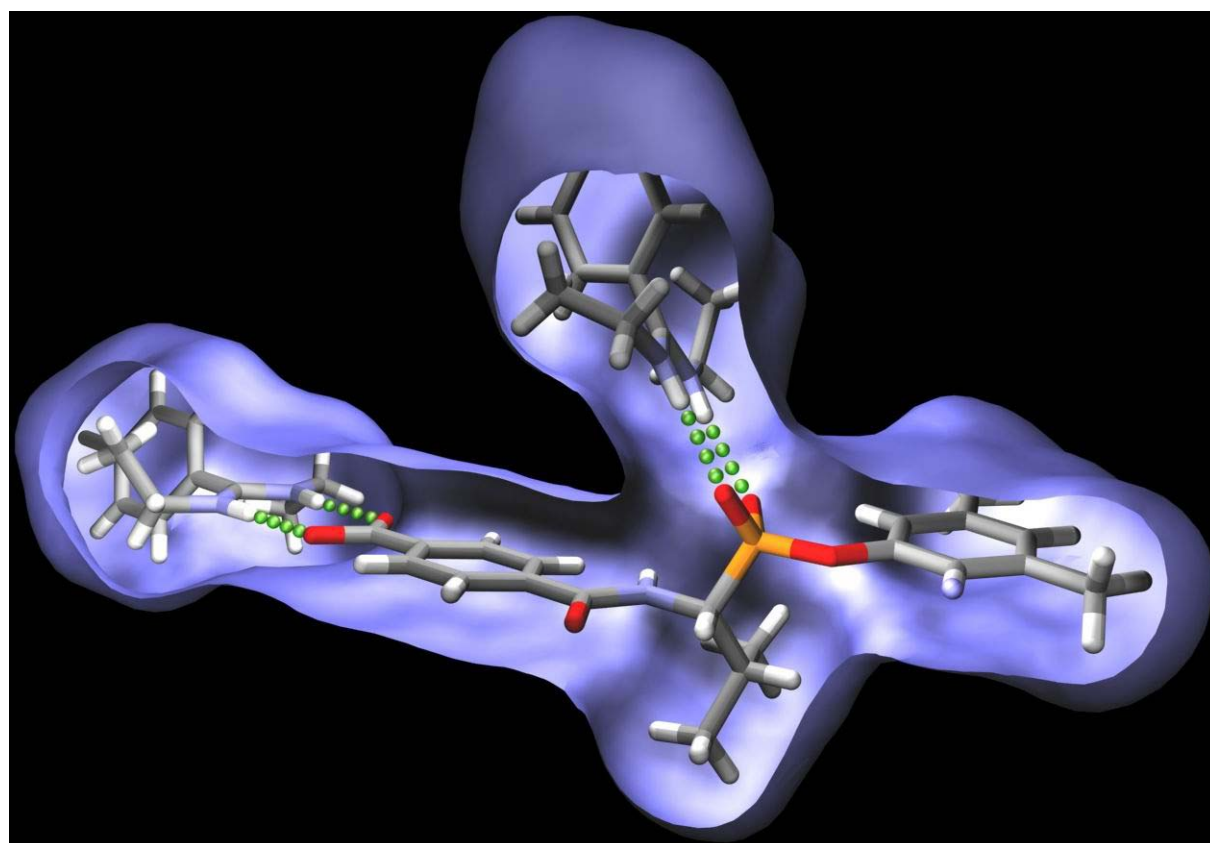


Abbildung 33. Modell des mit dem Übergangszustandsanalogon **5L** geprägten Hohlraums des Katalysators **IP5**.

Die Katalysatoren zeigten eine starke Inhibition durch das beim Prägevorgang verwendete Templat. Dabei handelt es sich um eine gemischte Hemmung, das heißt der Inhibitions-

mechanismus läuft zu einem Teil kompetitiv und zum anderen unkompetitiv ab. Auch dieses Verhalten ähnelt dem natürlicher Enzyme, für die diese polymeren Katalysatoren ein gutes Modell sind. Weitere Untersuchungen, vor allem im Bereich der Inhibition sollten ein genaueres Bild über den katalytischen Prozess in den aktiven Zentren der Polymere ermöglichen. Besonders interessant ist dabei die Verwendung zweier Substrate gleichzeitig.

In künftigen Arbeiten sollten vor allem Mimetika für die Bindungsbildung, so zum Beispiel eine Aldolkondensation oder eine Veresterung, erzeugt werden. Auf in Enzymmimetika für die Aldolkondensation oder auch einer Aldolspaltung können die Amidin-Haftmonomere **1** für die Stabilisierung des Übergangszustandes zum Einsatz kommen. Auch die Katalyse einer Diels-Alder-Reaktion kann durch Amidin-Gruppen wie dem Haftmonomer **1** erfolgen, was durch ähnliche Arbeiten von Göbel et al. gezeigt werden konnte.^[1, 2]

Es gibt vielversprechende Ansätze auch in anderen Bereichen. Ein Mimetikum für eine Peptidase, z.B. durch den Einsatz metallorganischer Komplexe, mit denen das aktive Zentrum nachgeahmt werden kann, stehen in Mittelpunkt des Interesses anderer Forschungsgruppen.

Im zweiten Teil der Arbeit ist es gelungen molekular geprägte Polymerschichten auf SERS-aktiven Trägern herzustellen und die Untersuchung der Freisetzung sowie Aufnahme einer Analytsubstanz in einem wässrigen Medium unter physiologischen Bedingungen (wässriger Puffer, Umgebungstemperatur) mittels SERS-Messungen zu verfolgen. Informationen über den adsorbierten Analyten und die Zeitabhängigkeit der Adsorption wie auch der Abspaltung konnten direkt aus den SERS-Spektren entnommen werden. Die gemessenen SERS-Banden können eindeutig den Analyten zugeordnet werden. Andere spektroskopische Methoden, die in diesem Gebiet zum Einsatz kamen, wie RfS oder SPR, liefern ausschließlich Informationen über Änderungen der Polymereigenschaften, wie Brechungsindex oder optische Schichtdicke. Somit ist es möglich, eine Substanz innerhalb des geprägten Polymers direkt zu detektieren.

Das Templat konnte in 3 Minuten nahezu vollständig aus der Polymerschicht entfernt werden. Die Aufnahme dauerte einiges länger und war nach etwa 15 Minuten auf einem konstanten Wert. Selbst in der wässrigen Pufferlösung wurden 80% des zuvor entfernten Templats wieder in die Kavitäten eingelagert.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Methode bietet die Möglichkeit zur Verwendung dieser Schichten in Chemosensoren. Zu diesem Zweck ist allerdings die Stabilität der Polymerschichten noch nicht ausreichend. Eine zusätzliche Schicht aus Cysteamin auf dem Gold

verstärkt zwar die Stabilität schwächt aber die Raman-Banden. Der Verlust der Raman-Intensität zeigt die bekannte Verringerung der SERS-Verstärkung mit der Zunahme der Distanz zur Oberfläche.

Zukünftige Untersuchungen sollten die Stabilität der Schichten beinhalten, ohne dabei zusätzliche Stoffe wie Cysteamin einzusetzen. Dies könnte durch Chemisorption des Polymers zum Metall durch die Kombination einer polymerisierbaren Gruppe mit einem Thiol oder Disulfid erzielt werden. Des Weiteren wurden auch schon Änderungen im Polymersystem (Porogen, Initiator) angedacht.

Auf der Grundlage dieser ersten Kombination von SERS und Molecular Imprinting eröffnet sich eine neue Möglichkeit für die Anwendung solcher Polymere in Chemosensoren. In der Kombination dieser Methoden liegt noch viel Potential und weitere Untersuchungen können schnell zu möglichen Anwendungen führen.

In Zukunft könnten noch weitere moderne spektroskopische Methoden, wie die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS), für die Untersuchung molekular geprägter Polymerschichten auf Metalloberflächen, im Hinblick auf die Anwendung in Chemosensoren, eingesetzt werden.

4 Experimenteller Teil

4.1 Katalytisch aktive geprägte Polymere

4.1.1 Apparatives

^1H -NMR-Spektroskopie:	Varian VXR 200 (200 MHz) Bruker AC 200 (200 MHz) Varian VXR 300 (300 MHz) Bruker DRX 500 (500 MHz) (TMS als interner Standard)
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektroskopie:	Bruker DRX 500 (125 MHz) Bruker AC 200 (50 MHz)
^{31}P -NMR-Spektroskopie:	Bruker DRX 500 (202 MHz) Varian VXR 200 (81 MHz)
Schmelzpunktbestimmung:	Büchi Melting Point B-545
Infrarotspektroskopie:	Bruker Vector 22 FT-IR-Spectrophotometer
Massenspektroskopie:	EI-MS: Varian MAT 311 A (70 eV) Finnigan Mat 8200 FAB-MS: Finnigan Mat 8200 (3-Nitrobenzylalkohol und/oder Natriumchlorid als Matrix) CI-MS: Finnigan INCOS 50
Elementaranalyse:	Pharmazeutisches Institut der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Drehwertbestimmung:	Perkin-Elmer Polarimeter 241 MC

spezifische Oberflächen:	JUWE Laborgeräte GmbH, Viersen Gerät: JUWE BET-A-MAT
Labormühle:	Janke & Kunkel, IKA A10
Membranfilter:	Whatmann, regenerierte Cellulose, 0,25µm
Säulenchromatographie:	Kieselgel 60 (230-400 Mesh ASTM), Merck
Siebe:	Siebtechnik GmbH, Mühlheim, Retsch
HPLC:	isocratische Pumpe: Waters 410 Injektor: Rheodyne Säulen: RP-18 ACE-EPS (Bischoff) RP-18 (Merck) UV-Detektor: Waters 486 Software: CSW Chromatography Station for Windows, Version 1.7, 2000, Apex Data Ltd.

4.1.2 Ausgangschemikalien und Lösungsmittel

Die Lösungsmittel für die HPLC und alle Lösungsmittel für die Reaktionen und Polymerisationen und wurden bei der Firma Biosolve gekauft.

Biosolve:	Acetonitril (HPLC - isocratic grade) Acetonitril (dry) Chloroform (dry) Ethanol (dry) Methylenchlorid (peptide grade) Toluol (dry)
-----------	---

Alle Ausgangschemikalien wurden bei den gängigen Chemikalienlieferanten in den höchsten erhältlichen Reinheitsgraden erhalten.

Fluka:	alle Aminosäureedukte (puriss.) BOP Diisopropylethylamin Isobutyraldehyd Isovaleraldehyd Benzaldehyd <i>N</i> -Methylmorpholin Oxalylchlorid Triethyloxoniumtetrafluoroborat
Aldrich:	Triethylphosphit iso-Pentylamin Terephthalsäuremonomethylester Bromtrimethylsilan 3,5-Dimethylphenol
Acros:	n-Butyllithium (2,5% in Hexan)
Merck:	1,4-Dioxane 18-Krone-6 Phenothiazin Diisopropylethylamin 30% HBr in Eisessig

Das 3,5-Dimethylphenol wurde durch Sublimation weiter aufgereinigt. Alle anderen verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destillativ gereinigt und falls nötig mit üblichen Methoden getrocknet.

4.1.3 Reinigung der Comonomere

a) Ethylendimethacrylat

EDMA wurde von der Verwendung 24h mit Calciumhydrid gerührt und danach über eine 10cm-Vigreuxkolonne im Ölpumpenvakuum (0,05 mbar) destilliert, um den Inhibitor abzutrennen. EDMA wurde im Tiefkühlschrank bei -26°C gelagert.

b) Methylmethacrylat

Kommerziell erhältliches MMA wurde über eine 10cm-Vigreuxkolonne im Membranpumpenvakuum (10 mbar) destilliert, um den Inhibitor abzutrennen. MMA wurde im Tiefkühlschrank bei -26°C gelagert.

c) *N,N'*-Diethyl-4-vinylbenzamidin

Das Haftmonomer DEVBA wurde in sieben Stufen nach der Vorschrift von Schönfeld^[95, 96, 106] dargestellt. Das eingesetzte Monomer wurde vor der Verwendung sublimiert.

Das Hydrochlorid wurde durch Einleitung von Chlorwasserstoffgas in eine Lösung auf DEVBA in trockenem Diethylether hergestellt. Das ausfallende Hydrochlorid wurde abfiltriert, mit trockenem Diethylether gewaschen und getrocknet.

d) Azo(bis)isobutyronitril

AIBN wurde aus trockenem Methanol umkristallisiert.

4.1.4 Synthesen der organischen Verbindungen

4.1.4.1 Templatsynthesen

D-Phenylglycinol (2-Amino-2-phenyl-ethanol)

D-Phenylglycinol wurde nach einer Vorschrift von McKennon et al. hergestellt.^[107] Das erhaltene ¹H-NMR Spektrum und der Schmelzpunkt entsprechen den literaturbekannten.

O-Methyl-D-phenylglycinol (2-Methoxy-1-phenyl-ethylamine)

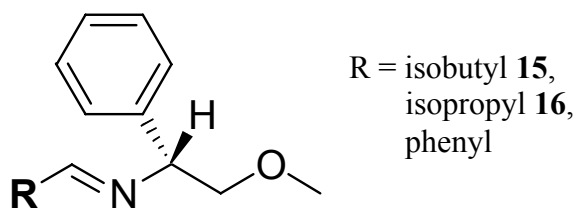
Die Methylierung wurde nach Smith et al. durchgeführt.^[86] Bei der anschließenden Destillation wurde eine 10cm Vigreux-Kolonnen verwendet. Das erhaltene ¹H-NMR Spektrum und der Siedepunkt entsprechen den literaturbekannten.

Isopentyliden-(2-methoxy-1-phenyl-ethyl)-amin (15)

Isobutyliden-(2-methoxy-1-phenyl-ethyl)-amin (16)

Phenyliden-(2-methoxy-1-phenyl-ethyl)-amin

Die Kondensationen der Aldehyde Isovaleraldehyd, Isobutyraldehyd und Benzaldehyd mit dem Imin wurden ebenfalls nach Smith et al. durchgeführt.^[86] Die Reaktionen wurden dabei abweichend unter Argon durchgeführt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne lange Lagerzeiten direkt weiter umgesetzt.



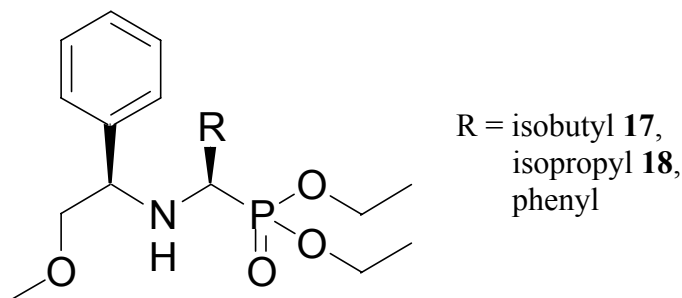
[1-(2-Methoxy-1-phenyl-ethylamino)-3-methyl-butyl]-phosphonsäurediethylester (17)

[1-(2-Methoxy-1-phenyl-ethylamino)-2-methyl-propyl]-phosphonsäurediethylester (18)

[1-(2-Methoxy-1-phenyl-ethylamino)-3-phenyl]-phosphonsäurediethylester

Die stereoselektive Addition wurde nach der Vorschrift von Smith et al. durchgeführt.^[86] Abweichend zur Originalvorschrift wurden das n-Butyllithium bei ca. -10°C zu der Lösung von Diethylphosphit in trockenem THF getropft. Die anschließende Zugabe des Imins in trockenem THF erfolgte bei einer Temperatur um die 5°C über einen Zeitraum von 1h. Die Lösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nachdem Rühren über Nacht bei RT wurde wie bei Smith et al. beschrieben aufgearbeitet.

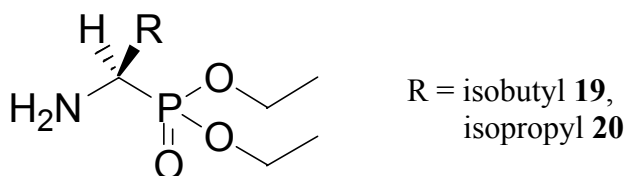
Die erhaltenen d.e. im Rohprodukt konnten auf 98.98% (**17**), bzw. 98.50% (**18**) (bestimmt durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie) gesteigert werden. Der d.e. von [1-(2-Methoxy-1-phenylethylamino)-3-phenyl]-phosphonsäurediethylester lag bei 85%, so daß eine säulenchromatographische Aufreinigung nur zu minimalen Ausbeuten mit einem d.e. >95% führte. Zur säulenchromatographischen Aufreinigung wurde Hexan/Essigsäureethylester 1:1 verwendet. Die Fraktionen mit einem d.e. >99% (bei **17** und **18**) wurden zusammengeführt und nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurden die erhaltenen Öle weiter eingesetzt.



1-Amino-3-methyl-butyl-phosphonsäurediethylester (**19**)

1-Amino-2-methyl-propyl-phosphonsäurediethylester (**20**)

Die Hydrierung des chiralen Precursors wurde nach Smith et al. durchgeführt.^[86] Die Produkte wurde nur kurze Zeit im Kühlschrank gelagert, um eine Oxidation zu vermeiden.

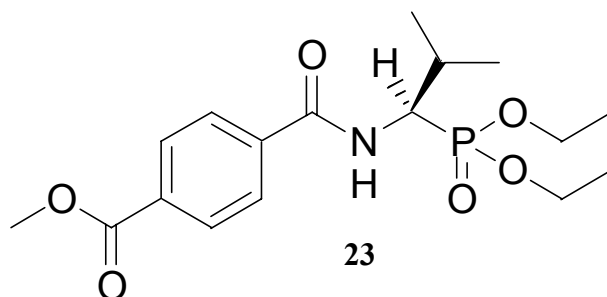


N-[1-(Diethoxy-phosphoryl)-3-methyl-butyl]-terephthalsäuremethylester (**22**)

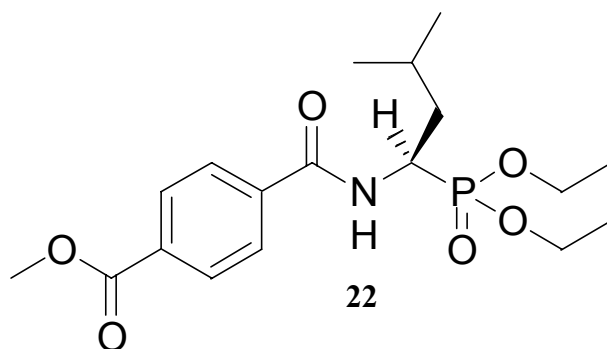
N-[1-(Diethoxy-phosphoryl)-2-methyl-propyl]-terephthalsäuremethylester (**23**)

Am Beispiel 23: Es wurden 5,19g (0,0247 mol) **20** in 180 ml trockenem Methylenchlorid unter einer Argon-Atmosphäre gelöst. Dazu wurden 10,41g (0,0247 mol) PyCloP, 5,00g (0,0494 mol) *N*-Methylmorpholin und 4,45g (0,0247 mol) Monomethylterephthalat gegeben und für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend am Rotationsverdampfer eingeeengt und das Produkt durch eine säulenchromatographische Aufreinigung in Chloroform/Hexan/Aceton 4:1:1 von den Nebenprodukten abgetrennt.

Ausbeute: 8,03g (0,0216 mol, 87,5%)



23: Ausbeute: 87,5%; Smp. 81°C; $[\alpha]_D^{25} = -2,5^\circ$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,11$ (dd, $^3J(\text{H,H}) = 6,8\text{Hz}$, $^4J(\text{P,H}) = 1,3\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,12 (d, $^3J(\text{H,H}) = 6,8\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,27 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7,5\text{Hz}$, 3H; CH_2CH_3), 1,37 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7,0\text{Hz}$, 3H; CH_2CH_3), 2,35 (m, 4H; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,98 (s, 3H; OCH_3), 4,14 (m, 3H; CH_2CH_3), 4,62 (ddd, $^3J(\text{H,H}) = 4,8\text{Hz}$, $^3J(\text{H,H}) = 10,4\text{Hz}$, $^2J(\text{P,H}) = 18,1\text{Hz}$, 1H; NHCHP), 6,72 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 10,4\text{Hz}$, $^3J(\text{P,H}) = 2,6\text{Hz}$, 1H; NH), 7,90 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,8\text{Hz}$, 2H; ArH), 8,14 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,8\text{Hz}$, 2H; ArH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 16,7$, 16,8, 18,2 (d), 20,6 (d) (CH_3), 29,3 (d), 50,8 (d) (CH), 52,8 (OCH_3), 62,5 (d), 62,6 (d) (CH_2), 127,1 (d), 129,9 (d) (CH arom), 133,0, 138,0 (C arom), 166,2, 166,6 (d) (CO); $^{31}\text{P-NMR}$ (81MHz, CDCl_3): $\delta = 25,2$ (s); FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3261$ (NH), 2981 (CH_3), 1725 (C=O Ester) 1659 (C=O Amid), 1544 (C=O Amid), 1278 (P=O), 1031 (P-O-C); MS (CI): m/z : 370 ($[\text{M-H}]^+$), 371 (M^+); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{P}$ (371,4): C 54,98, H 7,06, N 3,77; gefunden: C 54,82, H 7,19, N 3,81.



22: Ausbeute: 90,5%; farbloses Öl; $[\alpha]_D^{25} = -10,8^\circ$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 0,96$ (s, 3H; CHCH_3), 0,99 (s, 3H; CHCH_3), 1,22 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7,0\text{Hz}$, 3H; CH_2CH_3), 1,36 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7,2\text{Hz}$, 3H; CH_2CH_3), 1,77 (m, 3H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,94 (s, 3H; OCH_3), 4,11 (m, 4H; CH_2CH_3), 4,79 (m, 1H; NHCHP), 7,33 (d, $^3J(\text{H,H}) = 11,0\text{Hz}$, 1H; NH), 7,92 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,5\text{Hz}$, 2H; ArH), 8,10 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,5\text{Hz}$, 2H; ArH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 16,8$ (d), 17,0 (d) (Et- CH_3), 21,7, 22,1 (CH_3), 24,5 (d) (CH), 38,6 (CH_2), 44,5 (d) (CH_2), 52,8 (OCH_3), 62,8 (d), 63,2 (d) (OCH_2), 127,8, 130,0 (CH arom),

133,1, 138,4 (C arom), 166,6, 166,6 (C=O); ^{31}P -NMR (81MHz, CDCl_3): $\delta = 26,3$ (s); FT-IR (cm^{-1}): $\nu = 3267$ (NH), 2957 (CH_3), 2871 (CH_2), 1728 (C=O Ester) 1661 (C=O Amid), 1542 (C=O Amid), 1280 (P=O), 1031 (P–O–C); MS (EI): m/z: 385 (M^+); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{P} \times 0,25\text{H}_2\text{O}$ (385,4+4,5): C 55,45, H 7,37, N 3,59; gefunden: C 55,56, H 7,50, N 3,69.

***N*-{1-[Bis-(3,5-dimethyl-phenoxy)-phosphoryl]-3-methyl-butyl}-terephthalsäuremethylester (28)**

***N*-{1-[Bis-(3,5-dimethyl-phenoxy)-phosphoryl]-3-methyl-propyl}-terephthalsäuremethylester (29)**

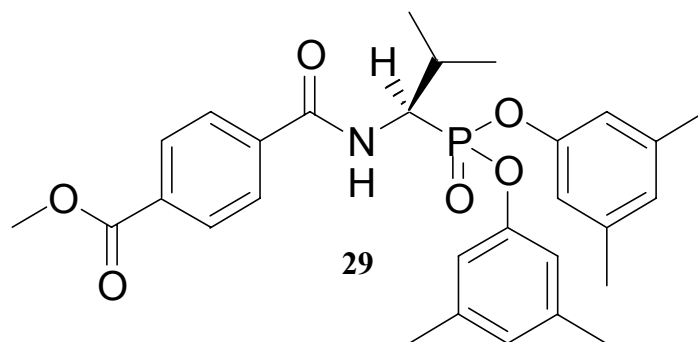
Am Beispiel 25/27/29: 0,50g (6,73 mmol) **23** wurden unter Argon in 60 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und schubweise mit 4,27 g (0,0337 mol) Bromtrimethylsilan versetzt. Nachdem für 8h bei Raumtemperatur gerührt wurden, wurde die Lösung eingeeengt und mit 20 ml THF und 2 ml Wasser versetzt. Nach weiteren 5h wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Zu einer Lösung von 6,73 mmol **25** in 60 mL trockenem Methylenchlorid wurden unter Argon 5,13 g (0,0404 mol) Oxalylchlorid und ein paar Tropfen DMF gegeben. Nachdem 11h gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel und das überschüssige Oxalylchlorid abkondensiert und anschließend wurde das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

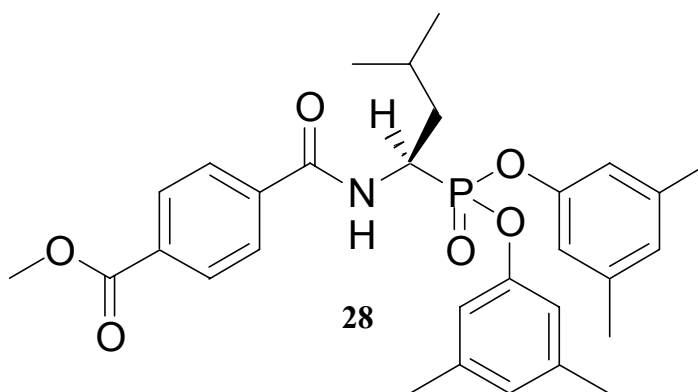
Das erhaltene Rohprodukt wurde in der Regel ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Es wurden 6,73 mmol **27** in 60 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Dazu gab man unter einer Argon-Atmosphäre 1,73 g (0,0141 mol) 3,5-Dimethylphenol und 1,43 g (0,0141 mol) *N*-Methylmorpholin. Dann wurde die Lösung 13h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eingeeengt. Zur säulenchromatographische Aufreinigung wurde Hexan/Chloroform/Aceton 10:4:1 als Laufmittel verwendet. Das Produkt wird aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit direkt weiter eingesetzt.

Ausbeute: 1,67 g (3,19 mmol, 47,4% über 3 Stufen)



29: Ausbeute: 47,4% über 3 Stufen; farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,21$ (dd, $^3J(\text{H,H})$ 6,8Hz, $^4J(\text{P,H})$ 1,4Hz, 3H), 1,23 (d, $^3J(\text{H,H})$ 6,9Hz, 3H), 2,11 (s, 6H), 2,34 (s, 6H), 2,55 (m, 1H), 4,00 (s, 3H), 5,10 (ddd, $^3J(\text{H,H})$ 4,8Hz, $^3J(\text{H,H})$ 10,4Hz, $^2J(\text{P,H})$ 19,4Hz, 1H), 6,72 (m, 4H), 6,91 (m, 2H), 7,77 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,8Hz, 2H), 8,07 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,8Hz, 2H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR: $\delta = 18,5$, 18,6, 20,9 (d), 21,4 (CH_3), 30,1 (d) (CH), 51,7 (OCH_3), 52,9 (CH), 113,5, 118,3, 122,7, 127,4, 127,7 (d), 130,2 (CH arom), 133,4, 137,8, 139,9 (d), 140,2, 150,4 (C arom), 166,7, 167,2 (d) ($\text{C}=\text{O}$); $^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CHCl_3): $\delta = 17,7$ (s); FT-IR (cm^{-1}): $\nu = 3289$ (NH), 3018 (Ar-H), 2965 (CH_3), 2922 (CH_3), 2875 (CH), 1729 ($\text{C}=\text{O}$ Ester), 1668 ($\text{C}=\text{O}$ Amid), 1593 ($\text{C}=\text{O}$ Amid), 1279 ($\text{P}=\text{O}$), 1031 ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$); MS (CI, NH_3 , 200°C): m/z : 524 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 541 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{NO}_5\text{P}$ (523,6): C 66,53, H 6,55, N 2,68; gefunden: C 66,23, H 6,58, N 2,58.



28: Ausbeute: 57,3% über 3 Stufen; farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,03$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 5,8\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,06 (d, $^3J(\text{H,H}) = 6,0\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,88 (m, 3H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,15 (s, 6H; CCH_3), 3,99 (s, 3H; OCH_3), 5,17 (m, 1H; NHCHP), 6,62 (brdd, 1H; NH), 6,79 (3s, 6H; ArH), 7,75 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,3\text{Hz}$, 2H; ArH), 8,05 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,5\text{Hz}$, 2H; ArH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR: $\delta = 18,5$, 18,6, 20,9 (d), 21,4 (CH_3), 26,5 (d) (CH_2), 41,1 (CH), 51,7 (OCH_3), 52,9 (CH), 113,5, 118,3, 122,7, 127,4, 127,7 (d), 130,2 (CH arom), 133,4, 137,8, 139,9 (d), 140,2, 150,4 (C arom), 166,7, 167,2 (d) ($\text{C}=\text{O}$); $^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CDCl_3): $\delta = 18,4$ (s); FT-IR (cm^{-1}): $\nu = 3279$ (NH), 3018 (Ar-H), 2962 (CH_3), 2921 (CH_3), 2875 (CH),

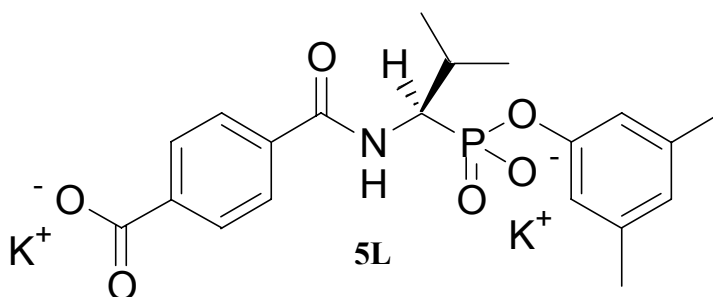
1737 (C=O Ester), 1669 (C=O Amid), 1591 (C=O Amid), 1280 (P=O), 1030 (P–O–C); MS (EI): m/z: 402 ([M-135]⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₃₀H₃₆NO₆P (537,6): C 67,03, H 6,75, N 2,61; gefunden: C 67,22, H 6,72, N 2,57.

***N*-(4-Carboxybenzoyl)-1-*L*-amino-3-methyl-butylphosphonsäure-3,5-dimethylphenylester Dikaliumsalz (4L)**

***N*-(4-Carboxybenzoyl)-1-*L*-amino-2-methyl-propylphosphonsäure-3,5-dimethylphenylester Dikaliumsalz (5L)**

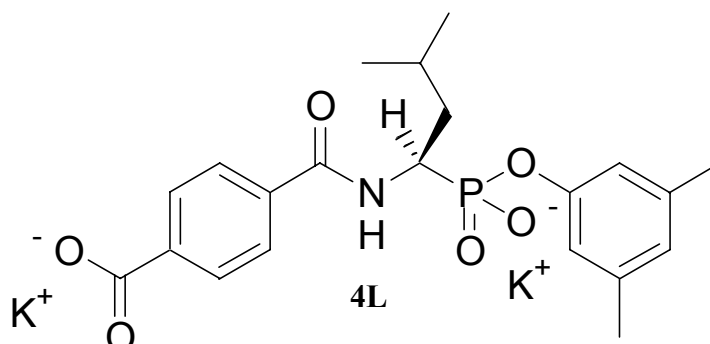
Hydrolyse der Ester am Beispiel 5L: 1,00g (1,91 mol) **29** wurde in 10 ml 1,4-Dioxan und 10 ml Wasser aufgenommen und mit 30 mg 18-Krone-6 versetzt. Dazu kamen 3,82 ml (3,82 mol) einer 1N Natriumhydroxid-Lösung. Nachdem 12h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Durch eine Säulenchromatographie in einem Gemisch aus Chloroform und ammoniakalischen Methanol 3:1 wurde das Produkt gereinigt und anschließend über eine mit Kalium-Ionen beladenen Säule zur Ionenaustauschchromatographie (Amberlite IR-120) in das Dikaliumsalz überführt.

Ausbeute: 0,59g (1,46 mmol, 76,2%)



5L: Ausbeute: 76,2%; Smp. Zersetzung >200°C; $[\alpha]_D^{25} = +19,7^\circ$ [c = 2,0 in MeOH]; ¹H-NMR (200 MHz, [D₆]DMSO), 25°C): δ = 0,93 (d, ³J(H,H) = 6,8Hz, 3H; CHCH₃), 0,98 (d, ³J(H,H) = 6,8 Hz, 3H; CHCH₃), 1,25 (m, 1H; CH(CH₃)₂), 2,09 (s, 6H; CCH₃), 3,99 (ddd, ³J(H,H) = 4,2Hz, ³J(H,H) = 9,5Hz, ²J(P,H) = 17,2Hz, 1H; NHCHP), 6,49 (s, 1H; ArH), 6,62 (s, 2H; ArH), 7,62 (d, ³J(H,H) = 8,3Hz, 2H; ArH), 7,85 (d, ³J(P,H) = 8,3Hz, 2H; ArH); ¹³C{¹H}-NMR (125,8 MHz, [D₆]DMSO): δ = 19,1, 21,2, 21,6 (d) (CH₃), 29,9 (CH), 63,2 (d) (CH), 118,8 (d), 123,6, 126,6, 129,2 (CH arom), 136,4, 137,8, 138,0, 154,1 (C arom), 166,3, 172,0 (C=O); ³¹P-NMR (202,5 MHz, [D₆]DMSO): δ = 14,1 (s); FT-IR (KBr, cm⁻¹): ν = 3428 (NH), 2960 (CH₃), 1634 (C=O Amid), 1594 (COO⁻), 1554 (C=O Amid), 1385 (COO⁻), 1222 (P=O), 1034 (P–O–C); MS (FAB, NBA): m/z: 404 ([M-2K+H]⁺); Elementaranalyse berechnet

(%) für $C_{20}H_{22}NO_6PK_2 \times 4 H_2O$ (449,57×72,1): C 43,39, H 5,46, N 2,53; gefunden: C 43,43, H 5,21, N 2,70.



4L: Ausbeute: 72,5%; Smp, Zersetzung >280°C; $[\alpha]_D^{25} = +7,2^\circ$ [$c = 2,0$ in $CHCl_3$]; 1H -NMR (200 MHz, $[D_6]DMSO$, 25°C): $\delta = 0,88$ (d, $^3J(H,H) = 4,0$ Hz, 6H; $CHCH_3$), 1,60 (m, 3H; $CH_2CH(CH_3)_2$), 2,12 (s, 6H; CCH_3), 4,22 (m, 1H; $NHCHP$), 6,51 (s, 2H; ArH), 6,67 (s, 1H; ArH), 7,59 (dd, $^3J(H,H) = 9,5$ Hz, $^4J(P,H) = 2,8$, 1H; NH), 7,77 (d, $^3J(H,H) = 8,3$ Hz, ArH), 7,84 (d, $^3J(H,H) = 8,0$ Hz, 2H; ArH); $^{13}C\{^1H\}$ -NMR: $\delta = 21,7$ (d), 22,3 (CH_3), 24,5 (CH), 26,5 (d) (CH_2), 41,1 (CH), 120,0 (d), 126,2, 128,2, 130,6 (CH arom), 137,6, 140,2, 142,5, 149,3, 155,1 (C arom), 169,5, 174,6 (C=O); ^{31}P -NMR (81 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 15,6$ (s); FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3384$ (NH), 2957 (CH_3), 1626 (C=O Amid), 1595 (COO^-), 1559 (C=O Amid), 1420 (COO^-), 1208 (P=O); MS (FAB, NBA): m/z : 464 ($[M+H]^+$), 486 ($[M+Na]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{21}H_{24}NO_6PK_2 \times 1 H_2O$ (463,59×18,0): C 49,11, H 5,10, N 2,73; gefunden: C 49,27, H 4,82, N 2,76.

4.1.4.2 Substratsynthesen

N-Benzyloxycarbonyl-(L)-valin (7L)

N-Benzyloxycarbonyl-(D)-valin (7D)

Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Balajthy et al. durchgeführt.^[108]

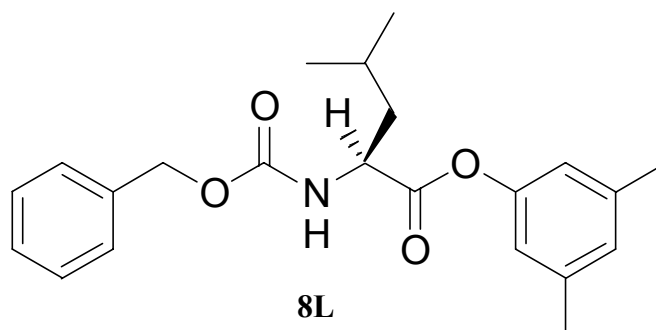
Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht dem literaturbekanntem.

N-Benzyloxycarbonyl-L-leucin-3,5-dimethylphenylester (8L)

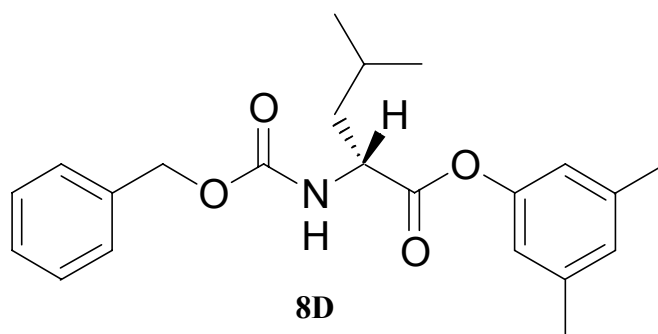
N-Benzyloxycarbonyl-D-leucin-3,5-dimethylphenylester (8D)

Vorschrift am Beispiel 8D: 5,00 g (0,0188 mol) *N*-Z-D-Leucin (M=265,31) wurden mit 2,30g (0,0188 mol) 3,5-Dimethylphenol (M=122,17) und 8,34g (0,0188 mol) BOP (M=442,29) in 150 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und anschließend mit 2,29g (1,60 ml, 0,0226 mol) *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24h unter Argon-Atmosphäre bei Raumtemperatur gerührt und anschließend säulenchromatographisch (Chloroform/Hexan/Aceton 4:10:1) gereinigt.

Ausbeute: 4,22 g (0,0114 mol, 60,8%)



8L: Ausbeute: 39,5%; farbloses Öl; $[\alpha]_D^{25} = -15,9^\circ$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,01$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 5,4\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), $1,02$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,8\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), $1,67$ (m, 1H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $1,82$ (m, 2H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $2,31$ (s, 6H; CCH_3), $4,61$ (dt, $^3J(\text{H,H}) = 4,4\text{Hz}$, $^3J(\text{H,H}) = 8,7\text{Hz}$, 1H; NHCHCH_2), $5,14$ (s, 2H; OCH_2), $5,21$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,5\text{Hz}$, 1H; NH), $6,69$ (s, 2H; ArH), $6,87$ (s, 1H; ArH), $7,33$ (m, 5H; PhH); ¹³C{¹H}-NMR (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 19,8$, $20,5$, $21,5$, $23,5$, $40,3$, $51,3$, $65,7$, $117,4$, $126,4$, $126,7$, $126,8$, $127,1$, $134,8$, $137,9$, $148,9$, $154,6$, $170,6$; FT-IR (cm^{-1}): $\nu = 3339$ (NH), 3034 (Ar-H), 2969 (CH_3), 2871 (CH_2), 1764 (C=O Carbamat), 1723 (C=O Ester); MS (EI): m/z : 369 (M^+); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ (369,5): C 71,52, H 7,37, N 3,79; gefunden: C 70,95, H 7,34, N 3,91.



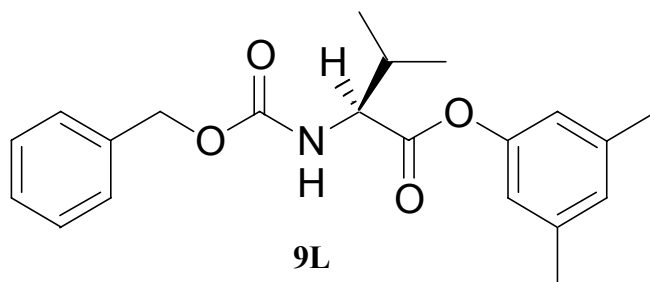
8D: Ausbeute: 60,8%; farbloses Öl; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +16,0^{\circ}$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,01$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 5,4\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), $1,02$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,8\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), $1,67$ (m, 1H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $1,82$ (m, 2H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $2,30$ (s, 6H; CCH_3), $4,61$ (dt, $^3J(\text{H,H}) = 4,4\text{Hz}$, $^3J(\text{H,H}) = 8,7\text{Hz}$, 1H; NHCHCH_2), $5,14$ (s, 2H; OCH_2), $5,23$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,5\text{Hz}$, 1H; NH), $6,69$ (s, 2H; ArH), $6,86$ (s, 1H; ArH), $7,29$ (m, 5H; PhH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 19,8, 20,5, 21,5, 23,5, 40,3, 51,3, 65,7, 117,4, 126,4, 126,7, 126,8, 127,1, 134,8, 137,9, 148,9, 154,6, 170,6$; FT-IR (cm^{-1}): $\nu = 3339$ (NH), 3034 (Ar-H), 2969 (CH_3), 2871 (CH_2), 1764 (C=O Carbamat), 1723 (C=O Ester); MS (EI): m/z : 369 (M^+); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ (369,5): C 71,52, H 7,37, N 3,79; gefunden: C 70,87, H 7,13, N 3,91.

***N*-Benzyloxycarbonyl-L-valin-3,5-dimethylphenylester (9L)**

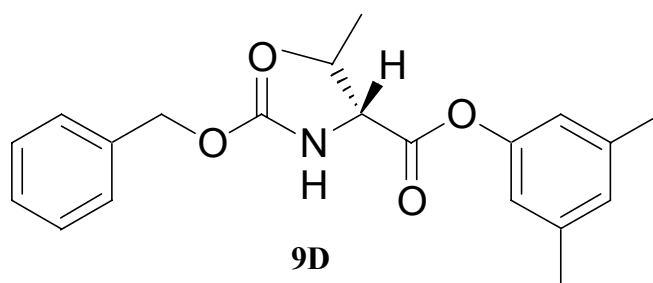
***N*-Benzyloxycarbonyl-D-valin-3,5-dimethylphenylester (9D)**

Vorschrift am Beispiel 9D: 6,68 g (0,0266 mol) der geschützten Aminosäure *N*-Z-D-Valin wurden bei Raumtemperatur in 160 ml Methylenchlorid gelöst und nacheinander 3,25 g (0,0266 mol) 3,5-Dimethylphenol, 11,76 g (0,0266 mol) BOP and 1,88 ml (0,0266 mol) *N*-Methylmorpholin zugegeben. Nachdem die Lösung über Nacht gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/Hexan/Aceton 4:7:1 oder 4:10:1).

Ausbeute: 5,43g (0,0153 mol, 57,5%)



9L: Ausbeute: 98,0 %; Smp. 52°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -11,6^{\circ}$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,04$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 6,7\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,08 (d, $^3J(\text{H,H}) = 6,6\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 2,30 (s, 6H; CCH_3), 2,34 (m, 1H; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4,53 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 4,7\text{Hz}$, $^3J(\text{H,H}) = 9,2\text{Hz}$, 1H; NHCHCH), 5,14 (s, 2H, OCH_2), 5,35 (d, $^3J(\text{H,H}) = 9,2\text{Hz}$, 1H; NH), 6,68 (s, 2H; ArH), 6,87 (s, 1H; ArH), 7,36 (m, 5H; PhH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 18,0$, 19,5, 21,4, 31,8, 59,6, 67,5, 119,3, 128,3, 128,6, 129,0, 136,7, 139,8, 150,7, 150,7, 156,7, 171,3, 171,5; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3352$ (NH), 3035 (Ar-H), 2986 (CH_3), 2963 (CH_3), 1772 (C=O Ester), 1693 (C=O Carbamat), 1618 (C=O Carbamat), 1528 (NH); MS (EI): m/z : 355 (M^+); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4(355,4)$: C 70,96, H 7,09, N 3,94; gefunden: C 70,98, H 7,28, N 3,89.



9D: Ausbeute: 57,5%; Smp. 54°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +11,6^{\circ}$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 0,95$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 7,0\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,01 (d, $^3J(\text{H,H}) = 6,6\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 2,23 (s, 6H; CCH_3), 2,27 (m, 1H; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4,53 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 4,7\text{Hz}$, $^3J(\text{H,H}) = 8,9\text{Hz}$, 1H; NHCHCH), 5,07 (s, 2H, OCH_2), 5,27 (d, $^3J(\text{H,H}) = 9,2\text{Hz}$, 1H; NH), 6,61 (s, 2H; ArH), 6,79 (s, 1H; ArH), 7,26 (m, 5H; PhH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 18,0$, 19,5, 21,6, 31,8, 59,5, 67,5, 119,3, 128,3, 128,5, 129,0, 136,7, 139,8, 150,7, 150,7, 156,7, 171,3, 171,5; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3352$ (NH), 2963 (CH_3), 1771 (C=O Ester), 1694 (C=O Carbamat), 1618 (C=O Carbamat), 1530 (NH); MS (CI, NH_3): m/z : 373 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4(355,4)$: C 70,96, H 7,09, N 3,94; gefunden: C 70,75, H 7,10, N 3,96.

L-Leucin-3,5-dimethylphenylester Hydrobromid (10L)

D-Leucin-3,5-dimethylphenylester Hydrobromid (10D)

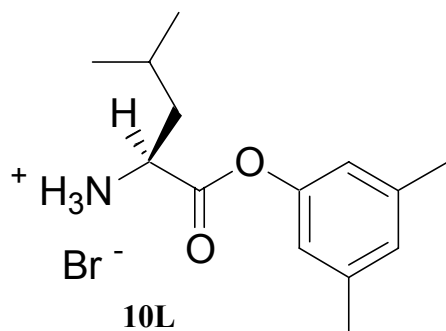
L-Valin-3,5-dimethylphenylester Hydrobromid (11L)

D-Valin-3,5-dimethylphenylester Hydrobromid (11D)

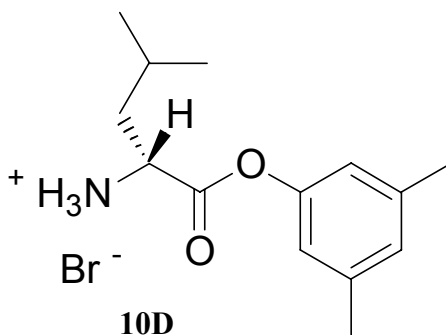
Allgemeine Vorschrift am Beispiel 11L: Zur Entschützung wurden 1,50 g (4,22 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-valin-3,5-dimethylphenylester mit 20 ml 30%iger Bromwasserstoff in

Essigsäure versetzt und für 3h bei Raumtemperatur gerührt. Die überschüssige HBr/Essigsäure wurde durch Abkondensation vollständig entfernt und der verbleibende Feststoff getrocknet. Das Produkt wurde mit trockenem Diethylether aufgenommen, abfiltriert und mit wenig trockenem Diethylether gewaschen. Das Rohprodukt konnte direkt weiter eingesetzt werden.

Ausbeute: 1,15g (3,806 mmol, 90,2%)

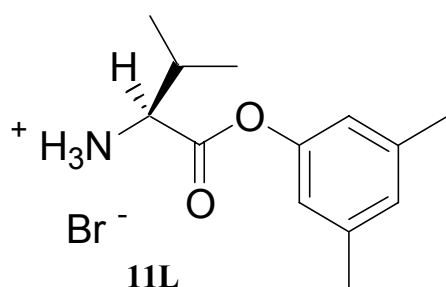


10L: Ausbeute: 75,2%; Smp. 213°C; $[\alpha]_D^{25} = +26,3^\circ$ [$c = 2,0$ in MeOH]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 25°C): $\delta = 0,97$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,8\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 0,98 (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,7\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,76 (m, 1H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,85 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,30 (s, 6H; CCH_3), 4,26 (t, $^3J(\text{H,H}) = 6,9\text{Hz}$, 1H; NHCHCH_2), 6,80 (s, 2H; ArH), 6,97 (s, 1H; ArH), 8,49 (brs, 3H; NH_3); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (125,8 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 21,1, 22,4, 22,5, 24,3, 39,5, 51,1, 119,0, 128,3, 139,6, 150,0, 169,2$; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 2952$ (CH_3), 1771 (C=O Ester), 1591 (NH_3^+), 1495 (NH_3^+); MS (FAB, NBA): m/z : 236 ($[\text{M}-\text{Br}]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{BrNO}_2$ (316,2): C 53,17, H 7,01, N 4,43; gefunden: C 53,03, H 6,75, N 4,49.

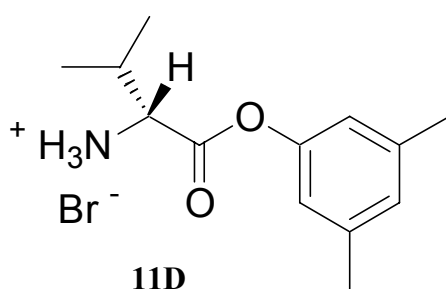


10D: Ausbeute: 71,9%; Smp. 217°C; $[\alpha]_D^{25} = -26,2^\circ$ [$c = 2,0$ in MeOH]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 25°C): $\delta = 0,97$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,8\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 0,98 (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,7\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,77 (m, 1H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,85 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,30 (s, 6H; CCH_3), 4,26 (t, $^3J(\text{H,H}) = 6,9\text{Hz}$, 1H; NHCHCH_2), 6,80 (s, 2H; ArH), 6,97 (s, 1H; ArH), 8,52 (brs,

3H; NH_3); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 21,1, 22,4, 22,5, 24,3, 39,5, 51,1, 119,1, 128,3, 139,6, 150,0, 169,2$; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 2953$ (CH_3), 1771 ($\text{C}=\text{O}$ Ester), 1591 (NH_3^+), 1496 (NH_3^+); MS (FAB, NBA): $m/z: 236$ ($[\text{M}-\text{Br}]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{BrNO}_2(316,2)$: C 53,17, H 7,01, N 4,43; gefunden: C 53,04, H 6,94, N 4,37.



11L: Ausbeute: 90,2%; Smp. 204°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +19,5^\circ$ [$c = 2,0$ in MeOH]; ^1H -NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 25°C): $\delta = 1,08$ (d, $^3J(\text{H},\text{H}) = 7,0\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,11 (d, $^3J(\text{H},\text{H}) = 7,0\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 2,30 (s, 6H; CCH_3), 2,35 (m, 1H; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4,20 (d, $^3J(\text{H},\text{H}) = 4,8\text{Hz}$, 1H; NHCHCH), 6,79 (s, 2H; ArH), 6,97 (s, 1H; ArH), 8,51 (brs, 3H; NH_3); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 18,1, 18,7, 21,1, 29,9, 57,7, 119,1, 128,4, 139,7, 149,9, 168,1$; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 2970$ (CH_3), 1753 ($\text{C}=\text{O}$ Ester), 1583 (NH_3^+), 1501 (NH_3^+); MS (FAB, NBA): $m/z: 222$ ($[\text{M}-\text{Br}]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{BrNO}_2(302,2)$: C 51,67, H 6,67, N 4,63; gefunden: C 51,48, H 6,63, N 4,53.



11D: Ausbeute: 61,3%; Smp. 202°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -19,9^\circ$ [$c = 2,0$ in MeOH]; ^1H -NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 25°C): $\delta = 1,08$ (d, $^3J(\text{H},\text{H}) = 7,0\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,11 (d, $^3J(\text{H},\text{H}) = 7,0\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 2,30 (s, 6H; CCH_3), 2,35 (m, 1H; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4,20 (d, $^3J(\text{H},\text{H}) = 4,8\text{Hz}$, 1H; NHCHCH), 6,79 (s, 2H; ArH), 6,97 (s, 1H; ArH), 8,48 (brs, 3H; NH_3); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 18,1, 18,7, 21,1, 29,9, 57,7, 119,1, 128,4, 139,7, 149,9, 168,1$; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 2970$ (CH_3), 1753 ($\text{C}=\text{O}$ Ester), 1583 (NH_3^+), 1501 (NH_3^+); MS (FAB,

NBA): m/z : 222 ($[M-Br]^{+}$); Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{13}H_{20}BrNO_2(302,2)$: C 51,67, H 6,67, N 4,63; gefunden: C 51,34, H 6,46, N 4,67.

4-Benzoylcarboxybenzaldehyd

Die Substanz wurde basierend auf einer Vorschrift von Hu et al. hergestellt.^[109] Um das Produkt aufzureinigen wurde entgegen der Vorschrift säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/Essigester 85:15). Das 1H -NMR entspricht dem literaturbekanntem.

Ausbeute: 8,43 g (85,8 %)

Terephthalsäuremonobenzylester (12)

Basierend auf einer Vorschrift von Hu et al.^[109] wurden 8,43 g (0,0351 mol) 4-Benzoylcarboxybenzaldehyd mit 35,15 g (0,0933 mol) Pyridiniumdichromat in 80 ml Dimethylformamid über 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde dann auf 400 ml Wasser gegossen, mit Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen zweimal mit 1N Salzsäure und mit einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Durch säulenchromatographische Reinigung mit Essigester/Essigsäure 100:1 wurde das Produkt gereinigt.

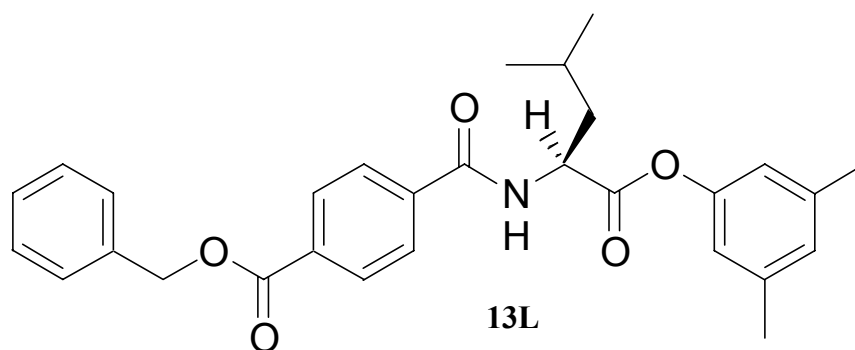
Ausbeute: 7,92 g (88,1 %)

N-(*O*-Benzylterephthaloyl)-L-leucin-3,5-dimethylphenylester (13L)

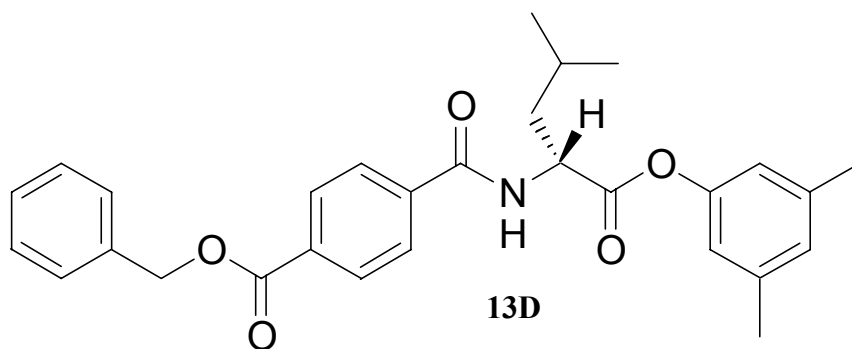
N-(*O*-Benzylterephthaloyl)-D-leucin-3,5-dimethylphenylester (13D)

Vorschrift am Beispiel 13L: 0,8g (2,53 mmol) **10L** wurden mit 0,49g (2,53 mmol) Terephthalsäuremonomethylester und 1,17g (2,783 mmol) PyCloP ($M=421,75$) in einen Einhalskolben gegeben und anschließend mit 0,77g (0,53ml, 7,583 mmol) *N*-Methylmorpholin und 60 ml trockenem CH_2Cl_2 versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24h unter Argon-Atmosphäre bei Raumtemperatur gerührt und anschließend säulenchromatographisch (Chloroform/Hexan/Aceton 4:2:1) gereinigt.

Ausbeute: 1,13 g (2,39 mmol, 94,5 %)



13L: Ausbeute: 94,5 %; Smp. 108°C; $[\alpha]_D^{25} = +2,5^\circ$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,06$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,1\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,07 (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,1\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,85 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,96 (m, 1H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,31 (s, 6H; CCH_3), 5,06 (m, 1H; NHCHCH_2), 5,38 (s, 2H; OCH_2), 6,62 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,2\text{Hz}$, 1H, NH), 6,72 (s, 2H; ArH), 6,88 (s, 1H; ArH), 7,40 (m, 5H; PhH), 7,87 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,5\text{Hz}$, 2H; ArH), 8,14 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,4\text{Hz}$, 2H; ArH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 21,2$, 22,1, 22,9, 25,2, 41,8, 51,5, 67,1, 118,8, 127,2, 128,0, 128,3, 128,4, 128,7, 130,0, 133,0, 135,7, 137,9, 139,5, 150,3, 165,6, 166,4, 171,9; FT-IR (KBr): $\nu = 3260$ (NH), 2957 (CH_3), 1762 (C=O Ester), 1722 (C=O Ester), 1638 (C=O Amid), 1538 (C=O Amid); MS (EI): m/z : 473 (M^+); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{NO}_5$ (473,6): C 73,55, H 6,60, N 2,96; gefunden: C 73,28, H 6,56, N 3,06.



13D: Ausbeute: 92,3%; Smp. 108°C; $[\alpha]_D^{25} = -2,5^\circ$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,06$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,1\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,07 (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,1\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,85 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,96 (m, 1H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,32 (s, 6H; CCH_3), 5,06 (m, 1H; NHCHCH_2), 5,38 (s, 2H; OCH_2), 6,60 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,2\text{Hz}$, 1H, NH), 6,72 (s, 2H; ArH), 6,88 (s, 1H; ArH), 7,40 (m, 5H; PhH), 7,87 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,5\text{Hz}$, 2H; ArH), 8,14 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,4\text{Hz}$, 2H; ArH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 21,2$, 22,1, 22,9, 25,2, 41,8, 51,5, 67,1, 118,8, 127,2, 128,0, 128,3, 128,4, 128,7, 130,0, 133,0, 135,7, 137,9, 139,5, 150,3, 165,6, 166,4, 171,9; FT-IR (KBr): $\nu = 3259$ (NH), 3062 (Ar-H), 2956 (CH_3),

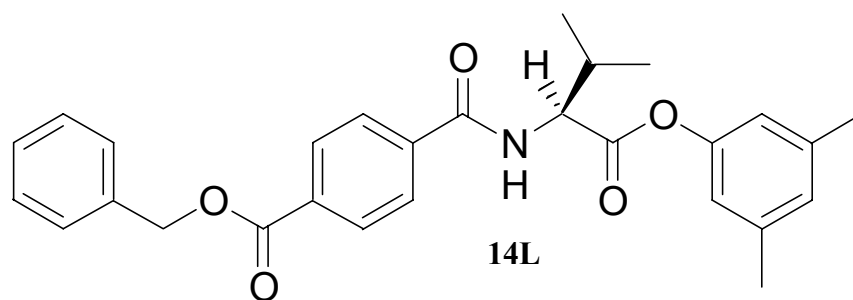
1763 (C=O Ester), 1722 (C=O Ester), 1638 (C=O Amid), 1538 (C=O Amid); MS (FAB, NBA): m/z : 474 ($[M+H]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{29}H_{31}NO_5(473,6)$: C 73,55, H 6,60, N 2,96; gefunden: C 73,65, H 6,88, N 3,10.

***N*-(*O*-Benzylterephthaloyl)-L-valin-3,5-dimethylphenylester (14L)**

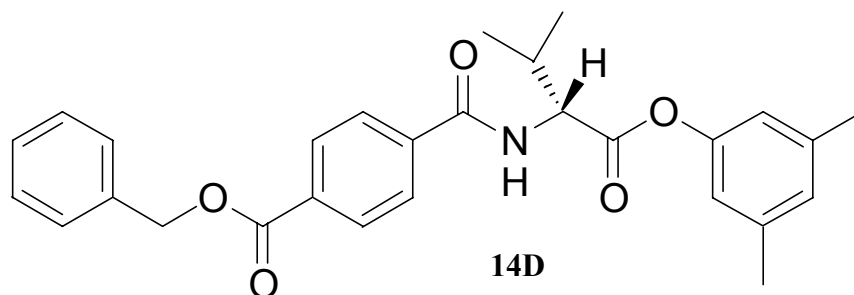
***N*-(*O*-Benzylterephthaloyl)-D-valin-3,5-dimethylphenylester (14D)**

Vorschrift am Beispiel 14L: 1,60g (5,59 mmol) des D-Valin-3,5-dimethylphenylester Hydrobromids wurden unter Argon in 100 ml trockenem Methylenchlorid suspendiert. Dann wurden nacheinander 2,36g (5,59 mmol) PyCloP, 1,43g (5,59 mmol) Terephthalsäuremonomethylester und 1,70g (5,59 mmol) N-Methylmorpholin zugegeben und die Lösung für 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/Chloroform/Aceton 10:4:1).

Ausbeute: 1,35 g (2,94 mmol, 52,5%)



14L: Ausbeute: 52,5%; Smp. 106°C; $[\alpha]_D^{25} = +10,8^\circ$ [$c = 2,0$ in $CHCl_3$]; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 25°C): $\delta = 1,29$ (d, $^3J(H,H) = 7,0$ Hz, 3H; $CHCH_3$), 1,14 (d, $^3J(H,H) = 7,3$ Hz, 3H; $CHCH_3$), 2,32 (s, 6H; CCH_3), 2,48 (m, 1H; $CH(CH_3)_2$), 5,01 (dd, $^3J(H,H) = 4,8$ Hz, $^3J(H,H) = 8,5$ Hz, 1H; $NHCHCH$), 5,39 (s, 2H; OCH_2), 6,70 (d, $^3J(H,H) = 8,8$ Hz, 1H; NH), 6,71 (s, 2H; ArH), 6,89 (s, 1H; ArH), 7,36 (m, 5H; PhH), 7,88 (d, $^3J(H,H) = 8,9$ Hz, 2H; ArH), 7,88 (d, $^3J(H,H) = 8,4$ Hz, 2H; ArH); $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (125,8 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 18,1, 19,1, 21,2, 21,8, 31,8, 57,7, 67,1, 118,8, 127,2, 128,0, 128,3, 128,4, 128,7, 130,1, 133,0, 135,7, 138,1, 139,5, 150,2, 165,6, 166,6, 170,9$; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3299$ (NH), 2973 (CH_3), 1756 (C=O Ester), 1724 (C=O Ester), 1642 (C=O Amid), 1542 (C=O Amid); MS (FAB, NBA): m/z : 460 ($[M+H]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{28}H_{29}NO_5(459,5)$: C 73,18, H 6,36, N 3,05; gefunden: C 72,84, H 6,38, N 3,22.



14D: Ausbeute: 78,0%; Smp. 106°C; $[\alpha]_D^{25} = -10,9^\circ$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,13$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 7,3\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,14 (d, $^3J(\text{H,H}) = 7,3\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 2,32 (s, 6H; CCH_3), 2,34 (m, 1H; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 5,01 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 4,8\text{Hz}$, $^3J(\text{H,H}) = 8,5\text{Hz}$, 1H; NHCHCH), 5,39 (s, 2H; OCH_2), 6,70 (d, $^3J(\text{H,H}) = 9,8\text{Hz}$, 1H; NH), 6,71 (s, 2H; ArH), 6,89 (s, 1H; ArH), 7,36 (m, 5H; PhH), 7,88 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,9\text{Hz}$, 2H; ArH), 7,88 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,4\text{Hz}$, 2H; ArH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 18,1, 19,1, 21,2, 21,8, 57,7, 67,1, 118,8, 127,2, 128,0, 128,3, 128,4, 128,7, 130,7, 133,0, 135,7, 138,1, 139,5, 150,2, 165,6, 166,6, 170,9$; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3299$ (NH), 2974 (CH_3), 1756 (C=O Ester), 1724 (C=O Ester), 1642 (C=O Amid), 1542 (C=O Amid); MS (EI): m/z : 459 (M^+); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{NO}_5$ (459,5): C 73,18, H 6,36, N 3,05; gefunden: C 72,96, H 6,34, N 3,09.

***N*-Terephthaloyl-L-leucin-3,5-dimethylphenylester (2L)**

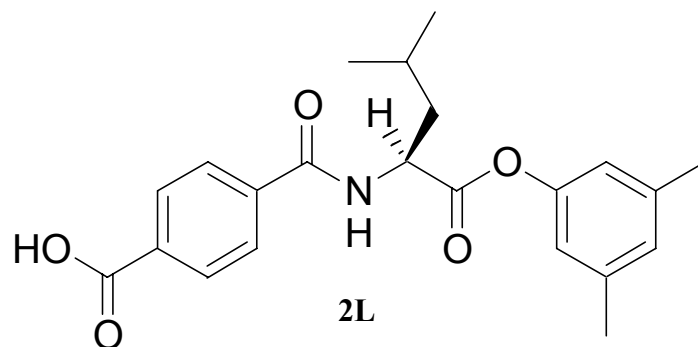
***N*-Terephthaloyl-D-leucin-3,5-dimethylphenylester (2D)**

***N*-Terephthaloyl-L-valin-3,5-dimethylphenylester (3L)**

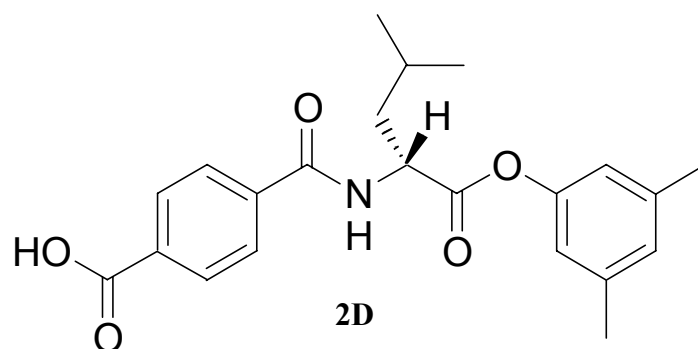
***N*-Terephthaloyl-D-valin-3,5-dimethylphenylester (3D)**

Am Beispiel 2L: In 60ml Ethanol wurden 1,20 g (2,53 mmol) of **13L** gelöst und 0,5 g Palladiumhydroxid auf Kohle als Katalysator hinzugegeben. Die Hydrierung wurde bei 1bar Wasserstoffdruck durchgeführt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt und nach 2-3 Tagen wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt konnte durch Säulenchromatographie (Essigester mit 1% Essigsäure/ Methanol 3:1) gereinigt werden. Zum vollständigen Entfernen der Essigsäure wurde das Produkt über Kaliumhydroxid getrocknet. Das Produkt konnte aus Cyclohexan/Ethanol umkristallisiert werden.

Ausbeute: 0,88 g (2,30 mmol, 91,1%)

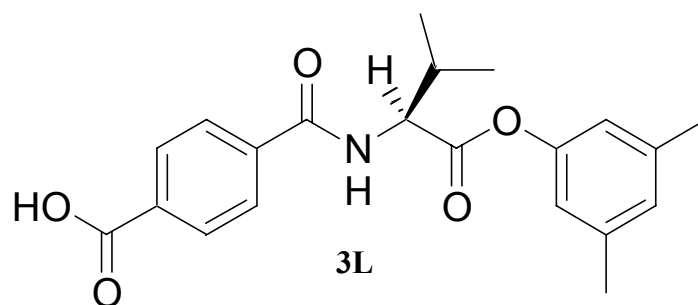


2L: Ausbeute: 91,1%; Smp. 162°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -6,6^{\circ}$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,07$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 1,6\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,08 (d, $^3J(\text{H,H}) = 1,9\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,87 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,73 (m, 1H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,32 (s, 6H; CCH_3), 5,08 (m, 1H; NHCHCH_2), 6,74 (s, 2H; ArH), 6,74 (d, $^3J(\text{H,H}) = 7,3\text{Hz}$, 1H; NH), 6,89 (s, 1H; ArH), 7,88 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,5\text{Hz}$, 2H; ArH), 8,12 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,2\text{Hz}$, 2H; ArH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 21,2, 22,1, 22,9, 25,2, 25,2, 41,7, 51,6, 118,8, 127,3, 128,0, 130,5, 132,1, 138,5, 139,5, 150,3, 166,6, 169,9, 172,3$; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3356$ (NH), 2960 (CH_3), 1752 (C=O Ester), 1701 (COOH), 1641 (C=O Amid), 1528 (C=O Amid); MS (FAB, NBA): m/z : 406 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 384 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_5 \times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (383,4×9,0): C 67,33, H 6,68, N 3,57; gefunden: C 67,04, H 6,66, N 3,48.

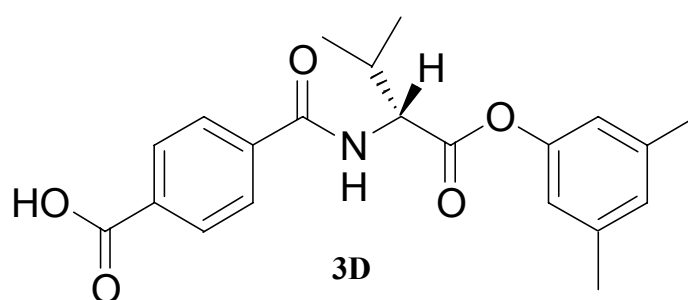


2D: Ausbeute: 94,8%; Smp. 162°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +6,6^{\circ}$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,07$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 1,3\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,08 (d, $^3J(\text{H,H}) = 1,3\text{Hz}$, 3H; CHCH_3), 1,86 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,73 (m, 1H; $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,32 (s, 6H; CCH_3), 5,08 (m, 1H; NHCHCH_2), 6,74 (s, 2H; ArH), 6,85 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,2\text{Hz}$, 1H; NH), 6,89 (s, 1H; ArH), 7,87 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,2\text{Hz}$, 2H; ArH), 8,10 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,5\text{Hz}$, 2H; ArH); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 21,2, 22,1, 22,9, 25,2, 25,2, 41,6, 51,6, 118,8, 127,3, 128,0, 130,5, 132,1, 138,4, 139,5, 150,3, 166,7, 170,2, 172,4$; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3276$ (NH), 2960 (CH_3), 1752 (C=O Ester), 1701 (COOH), 1640 (C=O Amid), 1542 (C=O Amid); MS

(FAB, NBA): m/z : 406 ($[M+Na]^+$), 384 ($[M+H]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{22}H_{25}NO_5(383,4)$: C 68,91, H 6,57, N 3,65; gefunden: C 68,75, H 6,71, N 3,76.



3L: Ausbeute: 87,8%; Smp. 153°C; $[\alpha]_D^{25} = +6,7^\circ$ [$c = 2,0$ in $CHCl_3$]; 1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$, 25°C): $\delta = 1,18$ (d, $^3J(H,H) = 2,5$ Hz, 3H; $CHCH_3$), 1,22 ($^3J(H,H) = 2,5$ Hz, 3H; $CHCH_3$), 2,37 (s, 6H; CCH_3), 2,55 (m, 1H; $CH(CH_3)_2$), 5,07 (dd, $^3J(H,H) = 4,8$ Hz, $^3J(H,H) = 8,8$ Hz, 1H; $NHCHCH$), 6,77 (s, 2H, ArH), 6,88 (d, $^3J(H,H) = 8,8$ Hz, 1H; NH), 6,94 (s, 1H; ArH), 7,93 (d, $^3J(H,H) = 8,5$ Hz, 2H; ArH), 8,19 (d, $^3J(H,H) = 8,5$ Hz, 2H; ArH); $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (125,8 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 18,1, 19,2, 21,2$ (CH_3), 31,7, 57,7 (CH), 118,8, 127,3, 128,1, 130,5 (CH arom.), 132,1, 138,7, 139,5, 150,2 (C arom), 166,8, 170,0, 171,2 ($C=O$); FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3345$ (NH), 2968 (CH_3), 1756 ($C=O$ Ester), 1681 ($COOH$), 1644 ($C=O$ Amid), 1531 ($C=O$ Amid); MS (FAB, NBA): m/z : 392 ($[M+Na]^+$), 370 ($[M+H]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{21}H_{23}NO_5 \times 0,25H_2O(369,4 \times 4,5)$: C 67,46, H 6,33, N 3,75; gefunden: C 67,38, H 6,51, N 3,61.



3D: Ausbeute: 93,3%; Smp. 153°C; $[\alpha]_D^{25} = -6,6^\circ$ [$c = 2,0$ in $CHCl_3$]; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 25°C): $\delta = 1,15$ (d, $^3J(H,H) = 6,3$ Hz, 3H; $CHCH_3$), 1,17 ($^3J(H,H) = 6,3$ Hz, 3H; $CHCH_3$), 2,32 (s, 6H; CCH_3), 2,51 (m, 1H; $CH(CH_3)_2$), 5,03 (dd, $^3J(H,H) = 4,7$ Hz, $^3J(H,H) = 8,2$ Hz, 1H; $NHCHCH$), 6,73 (s, 2H, ArH), 6,89 (d, $^3J(H,H) = 8,5$ Hz, 1H; NH), 6,94 (s, 1H; ArH), 7,89 (d, $^3J(H,H) = 7,9$ Hz, 2H; ArH), 8,13 (d, $^3J(H,H) = 7,6$ Hz, 2H; ArH); $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (125,8 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 18,5, 19,6, 21,6$ (CH_3), 32,1, 58,2 (CH), 119,2, 127,7, 128,5, 130,9 (CH arom), 132,6, 139,0, 139,9, 150,5 (C arom), 167,3, 170,6, 171,7 ($C=O$); FT-IR

(KBr, cm^{-1}): $\nu = 3345$ (NH), 2968 (CH_3), 1756 (C=O Ester), 1681 (COOH), 1644 (C=O Amid), 1531 (C=O Amid); MS (FAB, NBA): m/z: 392 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 370 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_5 \times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (369,4 \times 9,0): C 66,65, H 6,39, N 3,70; gefunden: C 66,51, H 6,47, N 3,75.

4.1.4.3 Sonstige Synthesen

a) Chlortripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat (PyCloP)

Tripyrrolidinophosphan

Die Reaktion wurde nach einer Vorschrift von Yvernault et al. durchgeführt.^[110]

Das ¹H-NMR- und das ³¹P-NMR- Spektrum entspricht dem literaturbekannten.

PyCloP

PyCloP wurde basierend auf der Vorschrift von Coste et al. dargestellt.^[84]

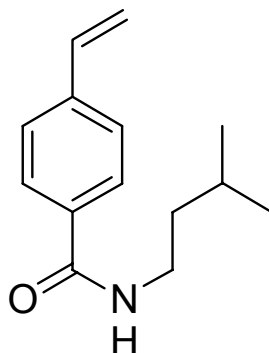
Das ¹H-NMR- und das ³¹P-NMR- Spektrum entspricht dem literaturbekannten.

b) *N,N'*-Di-iso-pentylbenzamidin

***N*-iso-Pentyl-4-vinylbenzamid**

Unter einer Argonatmosphäre wurden 10,00 g (0,06 mol) 4-Vinylbenzoesäurechlorid in 50 ml trockenen Methylenchlorid gelöst und bei -20°C wurden 13,93 ml (0,120 mol) iso-Pentylamin in 100 ml trockenem Methylenchlorid zugetropft. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemperatur gebracht und dann wurde eine Spatelspitze Phenothiazin hinzugefügt und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde zur Hälfte am Rotationsverdampfer entfernt, der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit trockenem Methylenchlorid gewaschen und anschließend wurde das Filtrat vollständig eingeeengt. Durch Umkristallisation aus Essigester/Hexan konnte die Substanz aufgereinigt werden

Ausbeute: 12,18 g (93,4 %)



Smp. 63°C; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 0,96 (d, ³J(H,H) 6,6Hz, 6H), 1,51 (m, 2H), 1,69 (m, 1H), 3,47 (dt, ³J(H,H) 8,9Hz, ³J(H,H) 6,0Hz, 2H); 5,34 (d, ³J(H,H) 11,1Hz,

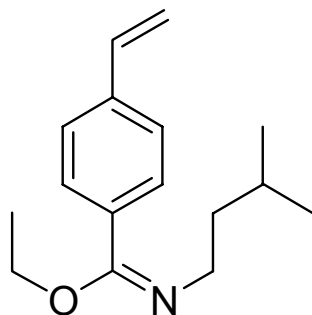
1H), 5,82 (d, $^3J(\text{H,H})$ 17,7Hz, 1H), 6,12 (brs, 1H), 6,73 (dd, $^3J(\text{H,H})$ 11,0Hz, $^2J(\text{H,H})$ 17,7Hz, 1H), 7,44 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,5Hz, 2H), 7,72 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,5Hz, 2H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 22,9 (CH_3), 26,4 (CH), 38,8, 39,0 (CH_2), 116,2 ($=\text{CH}_2$), 126,7, 127,5 (CH arom.), 134,3 (CH=), 126,4, 140,9 (C arom), 167,5 (C=O); FT-IR (KBr, cm^{-1}): ν = 3320 (NH), 2957 (CH_3), 2873 (CH_2), 1634 (C=O Amid), 1539 (C=O Amid); MS (EI): m/z : 217 (M^+), 131 ($[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}$ (217,3): C 77,38, H 8,81, N 6,45; gefunden: C 77,49, H 8,94, N 6,69.

***N*-iso-pentyl-4-vinylbenzocarbamidäthylester**

12,00g (0,055 mol) *N*-iso-Pentyl-4-vinylbenzamid wurden unter Argon in 180 ml trockenem Methylenchlorid mit 31,46 g (0,166 mol) Triäthylxoniumtetrafluorborat umgesetzt und nachdem 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurden 0,1 g Phenothiazin zugegeben. Nach 18 h Rühren wurde die Lösung eingeeengt, bis ein Sirup zurückblieb. Dieser wurde mit 110 ml einer eiskalten Natronlauge versetzt und sofort mit eiskaltem Diethylether mehrfach zügig extrahiert. Die gesammelten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt durch fraktionierte Destilliert gereinigt werden. Das Produkt wurde direkt weiter eingesetzt.

Sdp.: 94-97°C bei 4×10^{-2} mbar

Ausbeute: 6,77 g (53,0%)

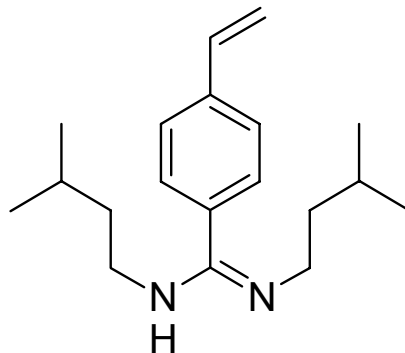


***N,N'*-Di-iso-pentylbenzamidin**

Unter einer Argonatmosphäre wurden 6,50 g (0,028 mol) Imidoester in 100 ml trockenem Methylenchlorid und 50 ml trockenem Ethanol bei einer Badtemperatur um 10°C mit 5,21 g (0,042 mol) iso-Pentylamin Hydrochlorid umgesetzt und für 5 Stunden bei 10°C und 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels verblieb ein Sirup, der mit 100 ml einer eiskalten Natronlauge versetzt und sofort mit eiskaltem Essigester/Diethylether 1:1 mehrfach zügig extrahiert wurde. Die gesammelten organischen

Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Durch eine Kugelrohrdestillation (150°C bei 3x10⁻³ mbar) konnte das Produkt aufgereinigt werden.

Ausbeute: roh: 7,51 g (93,6 %); nach Destillation: 2,27 g (28,3 %)



Smp. 34°C; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 0,90 (br, 6H), 1,41 (br, 2H), 1,60 (br, 1H), 3,16 (br, 2H), 5,93 (d, ³J(H,H) 11,1Hz, 1H), 5,79 (d, ³J(H,H) 17,7Hz, 1H), 6,72 (dd, ³J(H,H) 11,1Hz, ²J(H,H) 17,7Hz, 1H), 7,26 (d, ³J(H,H) 7,9Hz, 2H), 7,43 (d, ³J(H,H) 7,9Hz, 2H); ¹³C{¹H}-NMR (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 23,0 (CH₃), 26,4 (CH), 41,8, 48,6 (CH₂), 115,2 (=CH₂), 126,4, 126,5 (CH arom), 126,6, 127,5 (C arom), 128,3, 128,5 (CH arom), 136,6 (CH=), 138,8 (C=N); FT-IR (KBr, cm⁻¹): ν = 3238 (NH), 2954 (CH₃), 2875 (CH₂), 1634 (C=N Amidin), 1539 (C=N Amidin); MS (EI): m/z: 286 (M⁺), 130 ([M-C₁₀H₂₂N]⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₁₉H₃₀N₂(286,5): C 79,66, H 10,56, N 9,78; gefunden: C 79,71, H 10,50, N 9,56.

c) Synthese von Dipeptid-Substraten

***N*-(4-Methylbenzoyl)-glycin**

***N*-(4-Methylbenzoyl)-L-valin**

***N*-(4-Methylbenzoyl)-L-phenylglycin**

Am Beispiel *N*-(4-Methylbenzoyl)-L-valin: Basierend auf einer Vorschrift von Kirsten^[111] wurden zu einer Lösung aus 23,43g (0,2 mol) L-Valin in 200 ml einer 2N Natronlauge über einer Perfusor langsam bei Raumtemperatur 26,43 ml (0,2 mol) p- Toluylchlorid zugetropft. Nachdem über Nacht gerührt wurde, wurde mittels konz. Salzsäure die Lösung auf einen pH-Wert von 2 gebracht. Der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert, und mit einer 0,1N Salzsäure, sowie mit Wasser gewaschen. Der klebrige Feststoff wurde in Essigester

aufgenommen, die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: 44,52g (94,6%); *N*-(4-Methylbenzoyl)-glycin (93,6%); *N*-(4-Methylbenzoyl)-L-phenylglycin (97,3%)

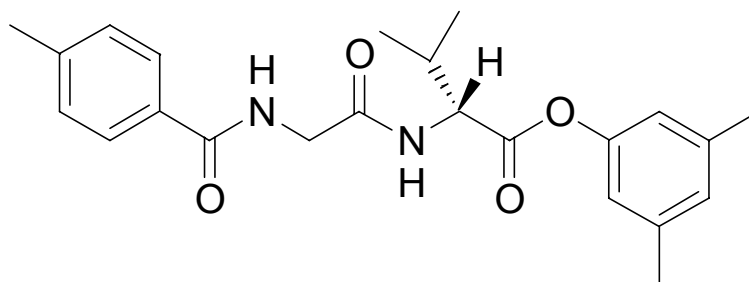
***N*-Toluyl-glycin-D-valin-3,5-dimethylphenylester**

***N*-Toluyl-glycin-L-valin-3,5-dimethylphenylester**

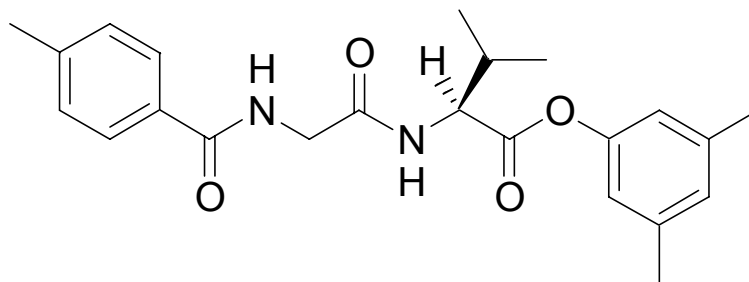
***N*-Toluyl-glycin-L-leucin-3,5-dimethylphenylester**

Am Beispiel *N*-Toluyl-glycin-D-valin-3,5-dimethylphenylester: Unter Argon wurden 0,5 g (1,654 mol) D-Valin-3,5-dimethylphenylester Hydrobromid, 0,32 g (1,654 mol) *N*-Toluyl-glycin und 0,70 g (1,654 mol) PyCloP in 50 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und mit 0,35 ml (4,962 mol) *N*-Methylmorpholin versetzt. Nachdem über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel vollständig entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (Chloroform/Hexan/Aceton 4:2:1) gereinigt.

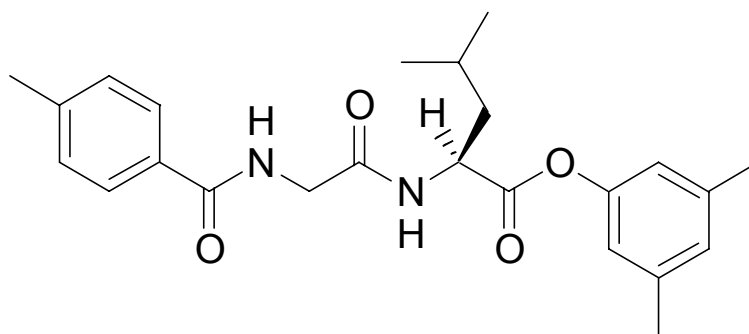
Ausbeute: 0,56 g (84,8 %)



***N*-Toluyl-glycin-D-valin-3,5-dimethylphenylester:** Smp. 160°C; $[\alpha]_D^{25} = +21,5^\circ$ [c = 2,0 in CHCl₃]; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 1,06 (m, 6H), 2,29 (s, 6H), 2,36 (m, 1H), 2,39 (s, 3H), 4,23 (t, ³J(H,H) 5,4Hz, ³J(H,H) 5,0Hz, 2H), 4,76 (dd, ³J(H,H) 4,7Hz, ³J(H,H) 8,5Hz, 1H), 6,67 (s, 2H), 6,86 (s, 1H), 6,89 (d, ³J(H,H) 8,5Hz, 1H), 7,01 (t, ³J(H,H) 4,7Hz, 1H), 7,15 (dd, ³J(H,H) 7,9Hz, ³J(H,H) 8,2Hz, 4H); ¹³C{¹H}-NMR (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 17,9, 19,1, 21,2, 21,5 (CH₃), 31,2 (CH), 43,9 (CH₂), 57,6 (CH), 118,8, 127,2, 127,9 (CH arom), 126,6, 128,3 (C arom), 129,3 (CH arom), 130,7, 139,4, 142,3, 150,2 (C arom), 167,9, 169,5, 170,5 (C=O); FT-IR (KBr, cm⁻¹): ν = 3355, 3293 (NH), 2963 (CH₃), 2879 (CH₂), 1753 (C=O Ester), 1667, 1641, 1556 (C=O Amid); MS (FAB): m/z: 397 ([M+H]⁺), 419 ([M+Na]⁺), 119 ([Tol-C=O]⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₂₃H₂₈N₂O₄(396,5): C 69,67, H 7,12, N 7,07; gefunden: C 68,82, H 7,03, N 7,05.



N-Toluyglycin-L-valin-3,5-dimethylphenylester: Ausbeute: 83,3%; Smp. 160°C; $[\alpha]_D^{25} = -23,9^\circ$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,06$ (m, 6H), 2,29 (s, 6H), 2,36 (m, 1H), 2,39 (s, 3H), 4,23 (t, $^3J(\text{H,H})$ 5,4Hz, $^3J(\text{H,H})$ 5,0Hz, 2H), 4,76 (dd, $^3J(\text{H,H})$ 4,7Hz, $^3J(\text{H,H})$ 8,5Hz, 1H), 6,67 (s, 2H), 6,86 (s, 1H), 6,89 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,5, 1H), 7,01 (t, $^3J(\text{H,H})$ 4,7, 1H), 7,15 (dd, $^3J(\text{H,H})$ 7,9Hz, $^3J(\text{H,H})$ 8,2Hz, 4H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 17,9$, 19,1, 21,2, 21,5 (CH_3), 31,2 (CH), 43,8 (CH_2), 57,6 (CH), 118,8, 127,2, 127,9 (CH arom), 126,6, 128,2 (C arom), 129,3 (CH arom), 130,6, 139,4, 142,3, 150,2 (C arom), 167,9, 169,5, 170,5 (C=O); FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3354$, 3293 (NH), 2963 (CH_3), 2878 (CH_2), 1753 (C=O Ester), 1667, 1641, 1556 (C=O Amid); MS (FAB): m/z : 397 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 419 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 119 ($[\text{Tol-C=O}]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ (396,5): C 69,13, H 7,03, N 6,92; gefunden: C 68,82, H 7,03, N 7,05.



N-Toluyglycin-L-leucin-3,5-dimethylphenylester: Ausbeute: 84,9%; Smp, 155°C; $[\alpha]_D^{25} = -21,5^\circ$ [$c = 2,0$ in CHCl_3]; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 1,00$ (dd, $^3J(\text{H,H})$ 2,2Hz, $^3J(\text{H,H})$ 6,3Hz, 6H), 1,43 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 2,28 (s, 6H), 2,39 (s, 3H), 4,23 (dd diastereotop $^3J(\text{H,H})$ 10,1Hz, $^3J(\text{H,H})$ 5,1Hz, $^3J(\text{H,H})$ 5,4Hz, 2H), 4,81 (m, 1H), 6,67 (s, 2H), 6,85 (s, 1H), 6,91 (d, $^3J(\text{H,H})$ 7,9Hz, 1H), 7,06 (t, $^3J(\text{H,H})$ 4,7Hz, 1H), 7,22 (d, $^3J(\text{H,H})$ 7,9Hz, 2H), 7,71 (d, $^3J(\text{H,H})$ 7,9Hz, 2H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 21,2$, 21,5, 21,9, 22,8, 23,0 (CH_3), 25,0 (CH), 41,2, 43,7 (CH_2), 51,2 (CH), 118,8, 127,1, 127,8 (CH arom), 128,8 (C arom.), 129,3 (CH arom), 130,6, 130,9, 139,4, 142,4, 150,3 (C arom), 167,7, 169,2, 171,5 (C=O); FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3410$, 3305 (NH), 2962 (CH_3), 2876 (CH_2), 1767

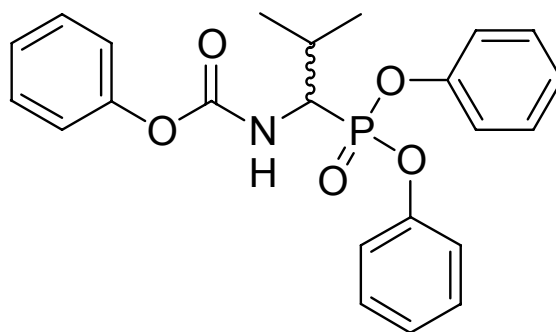
(C=O Ester), 1688, 1635, 1528 (C=O Amid); MS (FAB): m/z: 411 ($[M+H]^+$), 433 ($[M+Na]^+$), 149 ($[COO-3,5-C_8H_9]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{24}H_{30}N_2O_4$ (410,5): C 70,22, H 7,37, N 6,82; gefunden: C 70,08, H 7,44, N 6,85.

d) Alternativer Templatsyntheseweg

***N*-Benzyloxycarbonyl-2-amino-3-methyl-propanphosphonsäurediphenylester**

Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Oleksyszyn et al.^[112] durchgeführt. Das 1H -NMR- und das ^{31}P -NMR-Spektrum entsprechen den literaturbekannten.

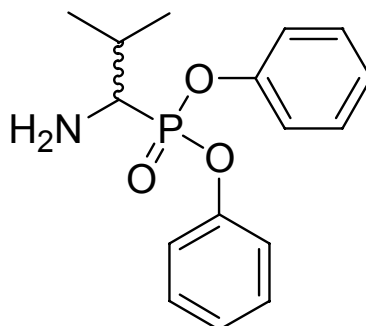
Ausbeute: 54,60 g (88,8%) (LIT: 52%)



2-Amino-3-methyl-propanphosphonsäurediphenylester

Die Darstellung wurden basierend auf einer Vorschrift von Oleksyszyn et al.^[112] durchgeführt. Das 1H -NMR- und ^{31}P -NMR-Spektrum entsprechen den literaturbekannten.

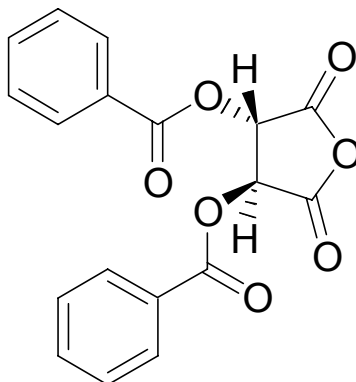
Ausbeute: 22,50g (68,9%) (LIT: 96%)



(-)-*O,O'*-Dibenzoyl-L-weinsäureanhydrid

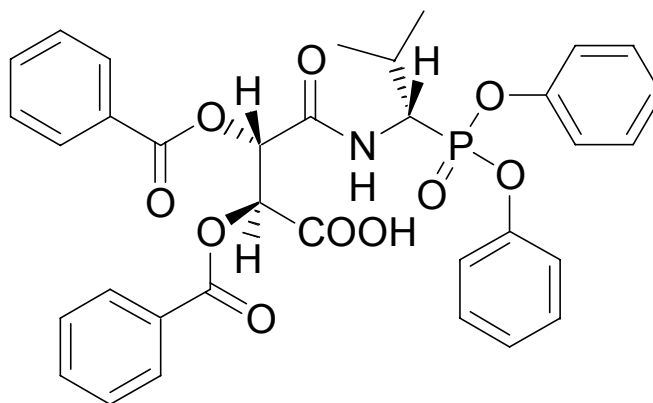
Nach einer Vorschrift von Ray und Koser^[113] wurde die Synthese des Anhydrids durchgeführt. Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht dem literaturbekannten.

Ausbeute: 3,61g (75,8%)

**Diastereomer aus (-)-*O,O'*-Dibenzoyl-L-weinsäureanhydrid und 2-Amino-3-methylpropanphosphonsäurediphenylester**

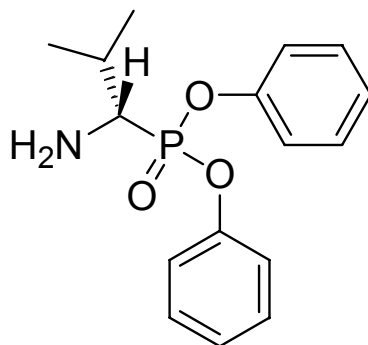
Nach einer Arbeitsvorschrift von Kafarski et al.^[85] wurde das diastereomere Salz hergestellt und fraktioniert auskristallisiert.

Ausbeute: S-Diastereomer 5,15 g (36,2% des S) (Lit: 83%; R-Diastereomer 1,02 g (7,17% des R) (LIT: 76%)

**(S)-2-Amino-3-methylpropanphosphonsäurediphenylester**

Die Spaltung der diastereomerenreinen Salze wurde nach einer Arbeitsvorschrift von Kafarski et al. ^[85] durchgeführt. Das ¹H-NMR- und ³¹P-NMR-Spektrum entsprechen den literaturbekannten.

Ausbeute: 0,52g (10,1%) (LIT: 78%)



e) Alternativer Substratsyntheseweg

D-Valin-allylester Tosylat

L-Valin-allylester Tosylat

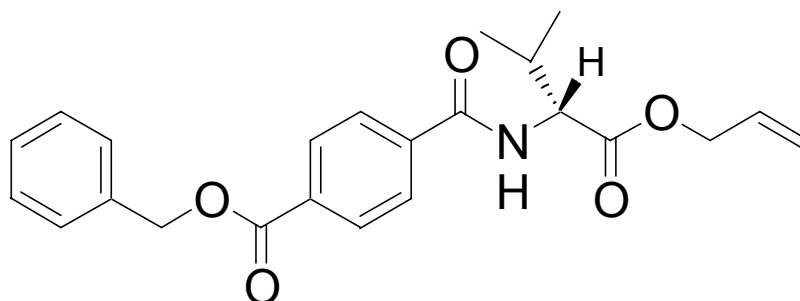
Die Reaktion wurde nach einer Vorschrift von Waldmann et al. durchgeführt.^[114] Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht dem literaturbekannten.

N-(*O*-Benzylterephthaloil)-D-valin-allylester

N-(*O*-Benzylterephthaloil)-L-valin-allylester

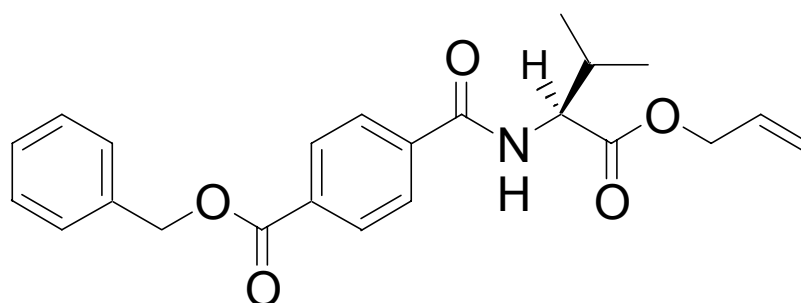
Vorschrift am Beispiel *N*-(*O*-Benzylterephthaloil)-D-valin-allylester: Zusammen mit 0,62 g (1,95 mmol) D-Valin-allylester Tosylat wurden 0,82g = 1,95 mmol PyCloP und 0,50 g (1,95 mmol) ME 130 in 60 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und mit 1,33 ml (7,80 mmol) Diisopropylethylamin versetzt. Nachdem Rühren der Reaktionslösung unter Feuchtigkeitsausschluß über 3 Tage bei Raumtemperatur, wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/Essigester 4:1)

Ausbeute: 0,67g (86,9%)



Smp. 98°C; $[\alpha]_D^{25} = -2,5^\circ$ [c = 2,0 in MeOH]; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 1,01 (dd, ³J(H,H) 13,3Hz, ³J(H,H) 7,0Hz, 6H), 2,32 (m, 1H), 4,68 (t, ³J(H,H) 2,2Hz, 2H), 4,81 (dd, ³J(H,H) 4,7Hz, ²J(H,H) 8,5Hz, 1H), 5,28 (d, ³J(H,H) 1,0Hz, ²J(H,H) 10,7Hz, 1H), 5,39 (s,

2H), 5,93 (m, 1H), 6,71 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,2Hz, 1H), 7,40 (m, 5H), 7,85 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,8Hz, 2H), 8,13 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,7Hz, 2H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 18,3, 19,4 (CH_3), 32,1, 58,0 (CH), 66,5, 67,5 (CH_2), 119,6 ($=\text{CH}_2$) 127,5, 126,7, 128,8, 129,1, 130,4 (CH arom.), 131,8 (HC=), 133,3, 136,1, 138,5 (C arom), 166,0, 166,8, 172,1 (C=O); FT-IR (KBr, cm^{-1}): ν = 3325 (NH), 3066, 3035 (C=C-H), 2966 (CH_3), 2877 (CH_2), 1724 (C=O Ester), 1650, 1532 (C=O Amid); MS (EI): m/z: 395 (M^+), 239 ($[\text{Bn-Ter-C=O}]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_5(395,5)$: C 69,86, H 6,37, N 3,54; gefunden: C 69,56, H 6,25, N 3,68.



***N*-(*O*-Benzylterephthaloyl)-*L*-valin-allylester:** Ausbeute: 82,3%; Smp. 99°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +2,5^\circ$ [$c = 2,0$ in MeOH]; ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 1,01 (dd, $^3J(\text{H,H})$ 13,3Hz, $^3J(\text{H,H})$ 7,0Hz, 6H), 2,33 (m, 1H), 4,68 (t, $^3J(\text{H,H})$ 2,2Hz, 2H), 4,83 (dd, $^3J(\text{H,H})$ 4,7Hz, $^2J(\text{H,H})$ 8,5Hz, 1H), 5,29 (d, $^3J(\text{H,H})$ 1,0Hz, $^2J(\text{H,H})$ 10,2Hz, 1H), 5,39 (s, 2H), 5,98 (m, 1H), 6,71 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,2Hz, 1H), 7,40 (m, 5H), 7,85 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,6Hz, 2H), 8,13 (d, $^3J(\text{H,H})$ 8,6Hz, 2H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 18,3, 19,4 (CH_3), 32,1, 58,0 (CH), 66,5, 67,5 (CH_2), 119,6 ($=\text{CH}_2$) 127,5, 126,7, 128,8, 129,1, 130,4 (CH arom), 131,8 (HC=), 133,3, 136,1, 138,5 (C arom), 166,0, 166,8, 172,1 (C=O); FT-IR (KBr, cm^{-1}): ν = 3325 (NH), 3065, 3035 (C=C-H), 2966 (CH_3), 2877 (CH_2), 1724 (C=O Ester), 1651, 1532 (C=O Amid); MS (EI): m/z: 395 (M^+), 239 ($[\text{Bn-Ter-C=O}]^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_5(395,5)$: C 69,86, H 6,37, N 3,54; gefunden: C 69,45, H 6,19, N 3,66.

4.1.5 Darstellung der molekular geprägten Polymere

Für die Herstellung der geprägten Polymere wurde das Haftmonomer *N,N'*-Diethyl-4-vinylbenzamidin in der Form des Amidiniumchlorid Salzes $1 \times \text{HCl}$ eingesetzt. Jeweils ein Äquivalent der Template **4L** beziehungsweise **5L** wurde zusammen mit zwei Äquivalenten $1 \times \text{HCl}$ in trockenem Methanol gelöst, um einen polymerisierbaren 1:2-Komplex auszubilden. Das gebildete Kaliumchlorid fiel aus und konnte über einen Membranfilter entfernt werden. Die Lösung wurde eingeeengt und der Komplex getrocknet. Die Komplexe wurden in 82 Gewichts-% EDMA, 15 Gewichts-% MMA und 10ml einer 1:1 Mischung Acetonitril/Toluol als Porogen gelöst. Die Mischungen wurden in einem Ultraschallbad und durch leichtes Erwärmen (maximal 40°C) homogenisiert. Schließlich wurde der Initiator AIBN zugegeben und nach der Entgasung der Monomermischung durch eine „freeze-and-thaw“ Prozedur, wurden die Polymerisationen im Block bei 60°C für 72h in der evakuierten Ampulle durchgeführt.

Anschließend wurden die Polymere im Mörser zerkleinert und gemahlen, wobei nur die Fraktion zwischen 45 und 125 μm für die Untersuchungen eingesetzt wurden.

Um das Templat aus den Polymeren zu entfernen, wurden diese zuerst in Acetonitril für 30 Minuten gequollen und anschließend 3-5 mal unter Rühren in einem Eisbad mit der Abspaltlösung, einer 1:1-Mischung einer 0,1M Natronlauge und Methanol gewaschen bis kein Templat mehr entfernt werden konnte. Die Abspaltrate wurde mittels HPLC (Säule: RP-18 ACE-EPS (Bischoff), mobile Phase: 0.2% Trifluoressigsäure in Wasser / Acetonitril 65:35, interner Standard 5mM Acetophenon, Flußrate: 1 mL/min). Dazu wurde eine Kalibrierkurve des Templats vermessen in Gegenwart eines internen Standards. Nach dem Abspalten wurde das Polymer mit Wasser und Methanol neutralgewaschen. In einem Vakuumtrockenschrank wurde das Polymer vor der weiteren Verwendung bei 40°C über Phosphorpentoxid getrocknet.

Die Makroporosität der Polymere wurde durch die Vermessung der spezifischen inneren Oberfläche (BET-Isotherme) belegt. Zur weiteren Charakterisierung wurde der Gehalt an Amidgruppen in den abgespaltenen Polymeren über eine Säure-Base-Titration bestimmt. Dazu wurden in 11 Gefäße die jeweils gleiche Menge Polymer in einer 1:1 Mischung 1M Kochsalzlösung / Dioxan suspendiert (Kochsalz zur Verbesserung der Diffusion) jeweils mit einer steigenden Konzentration Salzsäure versetzt, um somit alle theoretisch vorhandenen

Amidgruppen stufenweise zu protonieren. Aus dem gemessenen pH-Wert (Mikroelektrode Schott) kann aus der Titrationskurve der reale Gehalt an zugänglichen Amidgruppen bestimmt werden.

	IP4		CPB4		CPF4	
	Menge	Gewichts-%	Menge	Gewichts-%	Menge	Gewichts-%
EDMA	8,200 g 7,810 ml	82	8,200 g 7,810 ml	83.2	8,200 g 7,810 ml	83.4
MMA	1,500 g 1,590 ml	15	1,500 g 1,590 ml	15.2	1,500 g 1,590 ml	15.2
Komplex	0,3000 g	3	0,1596 g	1.6	0,1365 g	1.4
Amidin 1	0,1447 g		0,1226 g		0,1226 g	
Templat	1 0,1553 g 4L		1 0,0370 g Benzoessäure		1 0,0139 g Ameisensäure	
Initiator AIBN	0,1000 g		0.1000 g		0.1000 g	
Porogen Toluol	5 ml		5 ml		5 ml	
Acetonitril	5 ml		5 ml		5 ml	

Tabelle 8. Genaue Polymerzusammensetzungen **IP5**, **CPB5** und **CPF5**.

	IP5		CPF5	
	Menge	Gewichts-%	Menge	Gewichts-%
EDMA	8,200 g 7,810 ml	82	8,200 g 7,810 ml	83.4
MMA	1,500 g 1,590 ml	15	1,500 g 1,590 ml	15.2
Komplex	0,3000 g	3	0,1383 g	1.4
Amidin 1	0,1466 g		0,1242 g	
Templat	1 0,1534 g 5L		1 0,0141 g Ameisensäure	
Initiator AIBN	0,1000 g		0,1000 g	
Porogen Toluol	5 ml		5 ml	
Acetonitril	5 ml		5 ml	

Tabelle 9. Genaue Polymerzusammensetzungen **IP5** und **CPF5**.

4.1.6 Durchführung der Kinetikmessungen

4.1.6.1 Kinetiken pseudo-erster Ordnung

Die Hydrolyse der Ester wurde unter den optimalen Bedingungen^[49] für Amidin-basierende Polymere, einer 1:1 Mischung eines 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES) Puffers mit einem pH-Wert von 7,3 und Acetonitril bei einer Temperatur von 20°C, durchgeführt. Um diese Messungen durchführen zu können, wurde trockenes Polymer (**IP4** oder **IP5**) mit 6×10^{-6} mol freie Hohlräume (1.2×10^{-5} mol Amidin-Gruppen) in 2,7 ml des Puffergemischs, inklusive 30 µl einer 0,05 M Lösung des internen Standards Acetophenon, suspendiert. Das Polymer wurde dann zum Quellen und Äquilibrieren über Nacht gerührt. Zum Start der Hydrolyse-Reaktion wurden 30 µl einer 0,1 M ($=3 \times 10^{-6}$ mol) frisch hergestellten Substratlösung in Acetonitril zugegeben, wodurch man eine Substratkonzentration von 1 mM und eine Konzentration an aktiven Zentren von 2 mM erhielt. Die Hydrolysen der Substrat-Enantiomere wurden getrennt untersucht, um auf eine Enantioselektivität hin prüfen zu können.

Im Falle der Kontrollexperimente wurde die Menge des Polymers (**CPF4** oder **CPF5**) mit der gleichen Anzahl zugänglicher Amidin-Gruppen (1.2×10^{-5} mol) zugegeben. Für die Hydrolyse in Lösung wurden die selben Mengen verwendet, aber ohne Polymer.

Alle Hydrolysen wurden jeweils 2-3 mal wiederholt, um den Meßfehler zu reduzieren. Während der Reaktionen wurden jeweils 6-9 Aliquote von 150 µl entnommen, das Polymer über einen Spritzenfilter entfernt und die verbleibenden Lösungen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um die Reaktion zu stoppen. Die Proben der Hydrolysen mit den geprägten Katalysatoren **IP4** und **IP5** wurden in einem Zeitraum von 4 Stunden entnommen, im Falle der Kontrollpolymere innerhalb von 3 Tagen und bei den reinen Lösungen innerhalb von 2 Wochen. Anschließend wurden die Proben einzeln nacheinander aufgetaut und durch Injektion von 20 µl in die HPLC (Säule: RP-18 (Merck); mobile Phase: Acetonitril / 0.2% Trifluoressigsäure in Wasser 30:70; Flußrate 1 mL/min) vermessen. Die Wellenlänge wird auf das λ_{\max} des 3,5-Dimethylphenol bei 218 nm eingestellt. Das System wurde optimiert, um das Produktsignal des Phenols und den internen Standard zu detektieren. Über eine Computersoftware wurden die Chromatogramme registriert und integriert. Zur Bestimmung der Phenolkonzentration wurde zuvor eine Konzentrations-

reihe des 3,5-Dimethylphenols mit dem internen Standard Acetophenon vermessen. Die Erstellung der Kalibrierkurve erfolgte für die Umsetzung von 1-20% des Substrats.

In den Tabellen 10, 11, 12, 13 sind alle erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten aufgelistet. Aufgrund eines systematischen Fehlers, wurde die Produktkonzentration und die gesamte Substratkonzentration bei allen Werten um den Faktor 0,994 korrigiert. Dies bedeutet, daß im Durchschnitt 0,6% des Substrats schon bei Beginn der Messung hydrolysiert vorlag, obwohl die Substratlösungen mittels HPLC kontrolliert wurden.

Katalysator	Substrat	0,05 M HEPES Puffer k [min ⁻¹]	0,10 M HEPES Puffer k [min ⁻¹]	0,15 M HEPES Puffer k [min ⁻¹]
IP4	2L	9,86E-4 ± 0,1%	8,27E-04 ± 8,5%	6,69E-04
IP4	2D	8,62E-4 ± 0,6%	5,95E-04 ± 2,4%	5,57E-04
CPF4	2L	1,21E-5	1,00E-05 ± 1,5%	1,01E-05
CPF4	2D	1,31E-5	1,06E-05 ± 3,4%	9,85E-06
Mittelwert CPF4	2	1,26E-5 ± 3,8%	1,05E-05 ± 3,5%	9,97E-06 ± 1,2%
CPB4	2L		6,11E-05	-
CPB4	2D		5,97E-05	-
Mittelwert CPB4	2		6,04E-05 ± 1,2%	-
Lösung	2L	2,79E-6 ± 4,6%	2,53E-06 ± 3,8%	3,28E-06 ± 1,7%
Lösung	2D	2,93E-6 ± 2,7%	2,56E-06 ± 7,3%	3,42E-06 ± 9,8%
Mittelwert Lösung	2	2,83E-6 ± 5,1%	2,54E-06 ± 5,9%	3,35E-06 ± 7,5%

Tabelle 10. Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse der Substrate **2L** und **2D** in Acetonitril / HEPES-Puffer pH=7,3 (1:1) bei 20°C bei der Verwendung von **IP4** und der Kontrollen **CPF4**, **CPB4** und der Lösung in jeweils 3 verschiedenen Pufferkonzentrationen.

Katalysator	Substrat	k [min ⁻¹]
IP5	3L	5,54E-04 ± 2,7%
IP5	3D	4,53E-04 ± 6,2%
CPF5	3L	9,02E-06 ± 2,2%
CPF5	3D	9,43E-06 ± 0,8%
Mittelwert CPF5	3	9,23E-06 ± 2,7%
Lösung	3L	2,16E-06 ± 1,1%
Lösung	3D	2,23E-06 ± 3,0%
Mittelwert Lösung	3	2,20E-06 ± 2,8%

Tabelle 11. Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse der Substrate **3L** und **3D** in Acetonitril / HEPES-Puffer pH=7,3 (1:1) bei 20°C bei der Verwendung von **IP5** und der Kontrollen **CPF5** und der Lösung.

Katalysator	Substrat	k [min ⁻¹]
IP4	3L	2,26E-04 ± 4,1%
IP5	2L	2,00E-04 ± 3,1%

Tabelle 12. Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Kreuzselektivität des Valin-Substrats **3L** mit Polymer **IP4** (Leucin-analoges Polymer) und dem Leucin-Substrate **2L** mit **IP5** (Valin-analoges Polymer) in Acetonitril / HEPES-Puffer pH=7,3 (1:1) bei 20°C.

Katalysator	Substrat	k [min ⁻¹]
IP4-R	2L	3,74E-04 ± 4,7%
IP4-R	2D	2,91E-04 ± 1,7%

Tabelle 13. Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Hydrolyse der Leucin-Substrate **3L** und **3D** mit dem regenerierten Polymer **IP4-R** (regeneriertes **IP4**) in Acetonitril / 0.1 N HEPES Puffer pH=7,3 (1:1) at 20°C.

4.1.6.2 Messung der Startgeschwindigkeiten mit steigenden Substratkonzentrationen

Für die geprägten Polymere **IP4**, **IP5** sowie das Kontrollpolymer **CPF4** wurden Substrat-sättigungskurven bestimmt. Dazu wurden die Startgeschwindigkeiten der Hydrolysen bei einer konstanten Konzentration der aktiven Zentren und ansteigenden Substratkonzentrationen bestimmt. Wie in den Tabellen zu sehen ist, wurden 5(6) verschiedene Konzentrationen ausgewählt. Die Messung der Startgeschwindigkeiten wurde analog der zuvor beschriebenen Kinetik pseudo-erster Ordnung durchgeführt.

Des Weiteren wurde der Einfluß eines Inhibitors, dem Templat **5L**, im Polymer **IP5** überprüft. Dabei wurden zu den Hydrolysemedien zwei verschiedene Konzentrationen 0,1 mM und 1 mM des Inhibitors **5L** zugegeben. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 14 und 15 enthalten.

Substrat Konzentration [mmol l ⁻¹]	2L mit IP4 v_0 [10 ⁻⁷ Mmin ⁻¹]	2D mit IP4 v_0 [10 ⁻⁷ Mmin ⁻¹]	2L mit CPF4 v_0 [10 ⁻⁸ Mmin ⁻¹]	2D mit CPF4 v_0 [10 ⁻⁸ Mmin ⁻¹]
0.124	2.05	-	-	-
0.497	3.94	2.24	0.61	0.62
0.994	6.99	5.09	0.94	0.10
1.988	7.65	5.62	1.45	1.47
9.940	8.88	6.20	2.04	2.08
19.88	9.19	6.81	2.02	2.06

Startgeschwindigkeiten der Katalyse in Abhängigkeit der Konzentration vom Substrat **2L** und **2D** in Acetonitril/0.1 N HEPES Puffer pH=7,3 (1:1) bei 20°C.

Tabelle 14. Startgeschwindigkeiten der Michaelis-Menten-Kinetik mit **IP4** und **CPF4**.

Substrat Konzentration [mmol l ⁻¹]	3L mit IP5 v_0 [10 ⁻⁷ Mmin ⁻¹]	3D mit IP5 v_0 [10 ⁻⁷ Mmin ⁻¹]	3L mit IP5 [I] = 0.0001M v_0 [10 ⁻⁸ Mmin ⁻¹]	3L mit IP5 [I] = 0.001M v_0 [10 ⁻⁸ Mmin ⁻¹]
0.497	3,67	2,95	0,93	0,38
0.994	5,10	3,71	1,58	0,65
1.988	5,58	4,34	2,43	1,12
9.940	6,09	5,05	3,25	2,09
19.88	6,51	5,38	3,80	2,43

Startgeschwindigkeiten der Katalyse mit **IP5** in Abhängigkeit der Konzentration von Substrat **3L** und **3D** und der Inhibitorkonzentration in Acetonitril/0.1 N HEPES Puffer pH=7,3 (1:1) at 20°C. [I] = Konzentration von Inhibitor **5L**.

Tabelle 15. Startgeschwindigkeiten der Michaelis-Menten-Kinetik mit **IP5** ohne und mit zwei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen **5L**.

4.1.6.3 HPLC-Bedingungen

Alle HPLC-Untersuchungen wurden mit dem gleichen System bestimmt (siehe 4.1.1).

Analyt	Interner Standard	k' (Templat)	k' (Phenol)	k (Standard)
4L ^a	Acetophenon	1,8	-	3,1
5L ^a	Acetophenon	2,3	-	3,1
Benzoessäure ^b	Acetophenon	2,6	-	5,9
2L/2D/3L/3D ^b	Acetophenon	-	9,0	5,9

a) Säule: RP-18 ACE-EPS (Bischoff), mobile Phase: 0.2% Trifluoressigsäure in Wasser / Acetonitril 65:35, interner Standard: 5mM Acetophenon in Acetonitril, Flußrate: 1 mL/min;

b) Säule: RP-18 (Merck), mobile Phase: 0.2% Trifluoressigsäure in Wasser / Acetonitril 70:30, interner Standard: 5mM Acetophenon in Acetonitril, Flußrate 1 mL/min.

Tabelle 16. HPLC-Bedingungen inklusive der Kapazitätsfaktoren k' für die Bestimmung der Abspaltraten und für die Hydrolyseuntersuchungen

4.2 SERS-aktive Polymerschichten

4.2.1 Ausgangschemikalien, Metalloberflächen

Die verwendeten Chemikalien Hydroxyethyl-piperazin-ethansulfonsäure (HEPES^[115], >99%, Roth), *N*-Benzyloxycarbonyl-(L)-asparaginsäure (puriss., Fluka), (2S,3S)-(+)-Di-*O*-benzoylweinsäure (puriss., Merck), Cysteamin (98%, Aldrich) wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad eingesetzt. Hochreines Wasser mit einer elektrischen Leitfähigkeit unter 0,07 $\mu\text{S}/\text{cm}$ wurde durch ein kommerzielles Wasseraufarbeitungssystem (Milli-Q, Millipore) hergestellt, daß mit einem zusätzlichen Filter für organische Substanzen ausgestattet ist.

Die Reinigung der Comonomere EDMA und DEVBA und des Initiators AIBN sind in Kapitel 4.1.3 beschrieben.

Die SERS-aktiven Träger wurden auf Objektträgern für die Mikroskopie (pure white glass, Fisher Scientific, Germany) hergestellt. Die Gläser wurden mit „Hammersäure“ (konz. H_2O_2 /konz. H_2SO_4) gereinigt, gewaschen mit hochreinem Wasser und mittels Spin-coating wurde eine Suspension aus Aluminiumpartikeln (SEPP03, Piepelow & Brand) aufgetragen^[105]. Metallschichten von 75 nm Silber (99,99 %, Balzers) oder 80 nm Gold (99,9 % Balzers) wurden mit einer Vakuumbedampfungsanlage vom Typ Balzers BA 710 (Balzers, Bingen) bei Raten um 0,2 nm/s aufgetragen. Die zuerst auf das Glas aufgebrachte 2 nm dünne Chromschicht, bei einer Rate von ca. 0,03 nm/s, führte zur Verbesserung der Adhäsion des Metallfilms auf den Trägern.

4.2.2 Herstellung der Polymerschichten

Die Schichten der geprägten Polymere wurden durch eine Standardmethode hergestellt. Im folgenden wird dies am Beispiel für das Templat *N*-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure (**31**) beschrieben. Zur Herstellung des Polymers wurde aus 28,8 mg der **31** und 42,2 mg des Haftmonomers *N,N'*-Diethyl-4-vinylbenzamidin (**1**) über nicht-kovalenter Wechselwirkungen ein Komplex mit einer 1:2-Stöchiometrie gebildet.^[48] Zur Erzeugung der Polymerstruktur wurden mit einer Pipette 324 μl des Vernetzers EDMA und 532 μl THF als Porogen zugegeben, gefolgt von 5,1 mg AIBN als Radikalinitiator. Diese Monomermischung wurde in einem Ultra-

schallbad homogenisiert, dreimal durch ein 'freeze-and-thaw' Verfahren entgast und in eine mit Argon gefüllte Glove-Box überführt.

Um eine bessere Verbindung mit der Metalloberfläche zu erlangen, wurden in einigen Fällen die SERS-Träger modifiziert, um eine polarere Oberfläche zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden die SERS-Schichten zuerst für 25 Stunden in einer 10 mM ethanolischen Cysteaminlösung getaucht. Die modifizierten Träger wurden sorgfältig mit trockenem Ethanol gewaschen und in einem Argonstrom getrocknet. Sowohl die modifizierten als auch die nicht modifizierten Metallträger wurden in die Glove-box überführt.

Innerhalb der Glove-box wurden die Glasträger auf der Spitze eines Spin-Coaters befestigt. 2-4 Tropfen der entgasten Monomermischung wurden mit einer Spritze auf die Oberfläche gegeben bis die gesamte Metallschicht bedeckt was. Mittels Spin-coating (5 Sek., 2000 1/Min) wurde ein dünner Film erzeugt. Die Polymerisation wurde außerhalb der Glove-box in einem mit Argon gefüllten Gefäß durch 6 stündige UV-Bestrahlung bei einer Oberflächentemperatur von 25°C (Philips Argaphoto-BM 500 Watt) durchgeführt. Bei Abwesenheit von Sauerstoff während dieser Arbeitsschritte war nur ein Gewichtsprozent des Initiators AIBN notwendig, ähnlich wie im Falle der üblichen Bulkpolymerisation.

Für ein Kontrollexperiment wurde unter Verwendung der gleichen Monomermischung ein Polymer ohne Templatmolekül hergestellt.

Die Schichtdicke und das Oberflächenprofil der Polymerfilme wurden durch ein Tencor AlphaStep Schichtdickemeßsystem (Tencor Instruments, USA) bestimmt.

4.2.3 Raman und SERS Spektroskopie

Die Spektren wurden in einer Rückstreugeometrie mit einem Kaiser Holoprobe f/1.8 Raman Spektrometer (Kaiser Optical Systemy Inc., Ann Arbor, MI, USA) aufgenommen. Die SERS-Träger wurden in einer Küvette für die Spektroskopie platziert und ein extern stabilisierter SDL-85390 Diodenlaser (SDL, San Jose, CA, USA) mit einer maximalen Leistung von 300 mW und einer Wellenlänge von 785 nm wurde über einen optischen Faser direkt auf die Oberfläche fokussiert (90° zum Träger). Die Lösungen für das Auswaschen oder die Aufnahme wurden über eine Pipette zugegeben.

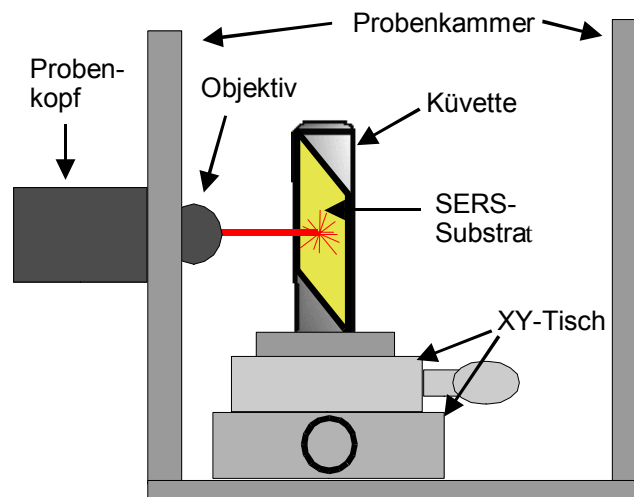


Abbildung 34. Experimenteller Aufbau zur SERS-Messung von beschichteten Substraten und zur Adsorption von Analyten aus Lösungen.

Die Laserenergie wurde für die SERS Messungen auf 10 mW festgesetzt, um ein Aufheizen der Polymer- und Metallschichten und eine Desorption der Analyten durch den Wärmeeinfluß zu vermeiden. Das zurückgestrahlte Licht wurde gesammelt und über einen zweiten optischen Faser zum Spektrometer übertragen. Die Laserbande (Rayleighstreuung) wird über einen Notch-Filter eliminiert und die Raman-Streuung wurde auf einem mit flüssigem Stickstoff gekühltem CCD-Detektor (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA) abgebildet.

Das Templat wurde mit einer 0,1 M HEPES-Pufferlösung bei einem pH-Wert von 5,4 ausgewaschen. Die Wiederaufnahme des Templats erfolgte ebenfalls in der Küvette aus einer 10 mM gepufferten Lösung (0,1 M HEPES mit einem pH-Wert von 7,3). Im Falle des Kontrollpolymers wurde nur die Aufnahme verfolgt.

Bei den Meßreihen während der Sorptionsuntersuchungen wurde jede Minute ein Spektrum mit einer Akkumulation von 2 pro Minute aufgenommen, d.h. der SERS-Frequenzbereich wurde innerhalb von 30 Sekunden gescanned.

5 Abkürzungsverzeichnis

AIBN	Azobisisobutyronitril
br	breit
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphat
BuLi	Butyllithium
CI	Chemische Ionisation
d	Dublett
d.e.	Diastereomerenüberschuß
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEVBA	<i>N,N'</i> -Diethyl-4-vinylbenzamidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differentialkalorimetrie
e.e.	Enantiomerenüberschuß
EDMA	Ethylendimethacrylat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
eq.	Äquivalent
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
IR	Infrarot
konz.	konzentriert
MMA	Methylmethacrylat
MS	Massenspektrum
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PyCloP	Chlortripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
q	Quartett
quin	Quintett
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
sept	Septulett
Smp	Schmelzpunkt
t	Triplett
THF	Tetrahydrofuran

6 Literatur

- [1] T. Schuster, M. Kurz, M. W. Göbel, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1697-1701.
- [2] T. Schuster, M. Bauch, G. Dürner, M. W. Göbel, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 179-181.
- [3] H. Ait-Haddou, J. Sumaoka, S. L. Wiskur, J. F. Folmer-Andersen, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4185-4188.
- [4] M. Herm, O. Molt, T. Schrader, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1485-1499.
- [5] D. J. Cram, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1041-1052.
- [6] J. M. Lehn, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 91-106.
- [7] V. T. D'Souza, K. Hanabusa, T. O'Leary, R. C. Gadwood, M. I. Bender, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *129*, 727-732.
- [8] G. Wenz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 851-870.
- [9] R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *28*, 146-153.
- [10] J. K. M. Sanders, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1378.
- [11] F. Vögtle, *Supramolecular Chemistry*, Wiley, New York, **1991**.
- [12] M. L. Bender, R. J. Bergeron, M. Komiyama, *The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis*, Wiley, New York, **1984**.
- [13] H. Dugas, *Bioorganic Chemistry. A Chemical Approach to Enzyme Action*, 2 ed., Springer Verlag, New York, **1989**.
- [14] A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 770-790.
- [15] J. M. Lehn, *Supramolecular Chemistry - Concepts and Perspectives*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- [16] F. Cuevas, S. DiStefano, J. O. Magrans, P. Prados, L. Mandolini, J. deMendoza, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3228-3234.
- [17] G. Wulff, A. Sarhan, K. Zabrocki, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *44*, 4329-4332.
- [18] G. Wulff, A. Sarhan, German patent Offenlegungsschrift DE-A 2242796, 1974, *Chem. Abstr.*, **1975**, *83*, P 60300w; US Patent, continuation in part US-A 4127730, 1978.
- [19] G. Wulff, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1958-1979.
- [20] *Molecular and Ionic Recognition with Imprinted Polymers, Vol. 703* (Eds.: R. A. Bartsch, M. Maeda), Washington, **1998**.
- [21] *Molecularly Imprinted Polymers - Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry* (Ed.: B. Sellergren), Elsevier, Amsterdam, **2001**.
- [22] K. Mosbach, O. Ramström, *Biotechnology* **1996**, *14*, 163-170.

- [23] M. T. Muldoon, L. H. Stanker, *Chem. Ind.* **1996**, 204-207.
- [24] T. Takeuchi, J. Matsui, *Acta Polym.* **1996**, *47*, 471-480.
- [25] G. Wulff, *CHEMTECH* **1998**, *28*, 19-26.
- [26] *Templated Organic Synthesis* (Eds.: F. Diederich, P. J. Stang), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [27] B. Sellergren, M. Lepistö, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5853-5860.
- [28] B. Sellergren, K. J. Shea, *J. Chromatogr.* **1993**, *635*, 31-49.
- [29] G. Wulff, R. Grobe-Einsler, W. Vesper, A. Sarhan, *Makromol. Chem.* **1977**, *178*, 2817-2825.
- [30] G. Vlatakis, L. I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, *Nature* **1993**, *361*, 645-647.
- [31] M. J. Whitcombe, M. E. Rodriguez, P. Villar, E. N. Vulfsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7105-7111.
- [32] K. J. Shea, D. A. Spivak, B. Sellergren, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3368-3369.
- [33] G. Wulff, *TIBTECH* **1993**, *11*, 85-87.
- [34] L. Pauling, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 2643-2657.
- [35] L. Pauling, *Chem. Eng. News* **1946**, *24*, 1375.
- [36] W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Dover, New York, **1969**.
- [37] J. D. Stewart, L. J. Liotta, S. J. Benkovic, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 396-404.
- [38] J. D. Stewart, S. J. Benkovic, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 213.
- [39] G. Wulff, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1-28.
- [40] P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1336-1348.
- [41] R. A. Lerner, S. J. Benkovic, P. G. Schultz, *Science* **1991**, *252*, 659-667.
- [42] X.-C. Liu, K. Mosbach, *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18*, 609-615.
- [43] G. Wulff, T. Groß, R. Schönfeld, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2049-2052.
- [44] B. Sellergren, K. J. Shea, *Tetrahedron Asymmetry* **1994**, *5*, 1403-1406.
- [45] B. Sellergren, R. N. Karmalkar, K. J. Shea, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4009-4027.
- [46] K. Ohkubo, Y. Funakoshi, Y. Urata, S. Hirota, S. Usui, T. Sagawa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2143-2144.
- [47] G. Wulff, R. Schönfeld, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 957-959.
- [48] G. Wulff, K. Knorr, *Bioseparation* **2003**, *in press*.
- [49] A. G. Strikovskiy, D. Kasper, M. Grün, B. S. Green, J. Hradil, G. Wulff, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6295-6296.
- [50] W. Chen, D. K. Han, K. D. Ahn, J. M. Kim, *Macromol. Res.* **2002**, *10*, 122-126.
- [51] J. M. Kim, K. D. Ahn, G. Wulff, *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, 1105-1108.

- [52] J. M. Kim, K. D. Ahn, A. G. Strikowski, G. Wulff, *Bul. Korean Chem. Soc.* **2001**, *22*, 689-692.
- [53] K. Haupt, K. Mosbach, *Chem. Rev.* **2000**, 2495-2504.
- [54] K. J. Shea, *Trends Polym. Sci.* **1994**, *2*, 166-173.
- [55] C. Berggren, S. Baydough, D. C. Sherrington, K. Ensing, *J. Chromatogr. A* **2000**, *889*, 105.
- [56] O. Ramström, K. Skudar, J. Haines, P. Pate, O. Brüggemann, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2105-2114.
- [57] P. Martin, I. D. Wilson, G. R. Jones, *J. Chromatogr. A* **2000**, 143.
- [58] O. Brüggeman, K. Haupt, Y. Lei, E. Yilmaz, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* **2000**, *889*, 15.
- [59] D. Kriz, O. Ramström, K. Mosbach, *Analyt. Chem.* **1997**, *69*, A 345-349.
- [60] G. Wulff, in *Frontiers in Biosensorics I - Fundamental aspects* (Eds.: F. W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz), Birkhäuser, Basel, **1997**, pp. 13-26.
- [61] K. Ensing, T. d. Boer, *Trens in analytical chemistry* **1999**, *18*, 138-145.
- [62] S. Kröger, A. P. F. Turner, K. Mosbach, K. Haupt, *Anal. Chem.* **1999**, *71*.
- [63] A. L. Jenkins, O. M. Uy, G. M. Murray, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 373-378.
- [64] O. S. Wolfbeiss, *Anal. Chem.* **2002**, *74*.
- [65] P. Turkewitsch, B. Wandelt, G. D. Darling, W. S. Powell, *Anal. Chem.* **1998**, *70*.
- [66] F. L. Dickert, M. Tortschanoff, W. E. Bulst, G. Fischerauer, *Anal. Chem.* **1999**, *71*.
- [67] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. M. Quillan, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163-166.
- [68] M. G. Albrecht, L. A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5215-5217.
- [69] D. J. Jeanmaire, R. P. VanDuyne, *J. Electroanal. Chem.* **1977**, *84*, 1-20.
- [70] D. Nopper, O. Lammerschop, G. Wulff, G. Gauglitz, *submitted*.
- [71] E. P. C. Lai, A. Fafara, V. A. V. d. Noot, M. Kono, B. Polsky, *Can. J. Chem* **1988**, *76*, 265.
- [72] A. Kugimiya, Y. Takeuchi, *Biosensors Bioelectronics* **2001**, *16*, 1056-1062.
- [73] P. Li, Y. Hiang, J. Hu, C. Yuan, B. Lin, *Sensors* **2002**, *2*, 35-40.
- [74] M. L. Mc Glashen, K. L. Davies, M. D. Morris, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 846-849.
- [75] W. Hill, B. Wehling, C. G. Gibbs, C. D. Gutsche, D. Klockow, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3187-3192.
- [76] W. Hill, V. Fallourd, D. Klockow, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4707-4713.
- [77] S. M. D'Souza, C. Alexander, S. W. Carr, A. M. Waller, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *Nature* **1999**, *398*, 312-316.

- [78] S. M. D'Souza, C. Alexander, M. J. Whitcombe, A. M. Waller, E. N. Vulfsen, *Polym. Int.* **2001**, *50*, 429-432.
- [79] J. A. Nelson, A. E. Karu, R. B. Wong, in *Immunoanalysis of Agrochemicals*, Vol. 586, American Chemical Society, Washington DC, **1995**.
- [80] T. E. Mallouk, D. J. Harrison, in *Interfacial design and chemical sensing*, Vol. 561, American Chemical Society, Washington DC, **1994**.
- [81] P. G. Edelman, J. Wang, in *Biosensors and chemical sensors*, Vol. 487, American Chemical Society, Washington DC, **1992**.
- [82] B. Castro, G. Evin, C. Selve, R. Seyer, *Synthesis* **1977**, 413.
- [83] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedr. Lett.* **1975**, 1219-1222.
- [84] J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437-2446.
- [85] P. Kafarski, B. Lejczak, J. Szewczyk, *Can. J. Chem* **1983**, *61*, 2425-2430.
- [86] A. B. Smith, K. M. Yager, C. M. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10879-10888.
- [87] V. A. Solodenko, T. N. Kasheva, V. P. Kukhar, E. V. Kozlova, D. A. Mironenko, V. K. Svedas, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3989-3998.
- [88] J. Szewczyk, B. Lejczak, P. Kafarski, *Synthesis* **1982**, *5*, 409-412.
- [89] L. Peters, R. Fröhlich, A. S. F. Boyd, A. Kraft, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3291-3298.
- [90] A. Kraft, L. Peters, H. R. Powell, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3499-3505.
- [91] O. Lammerschop, Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf **1999**.
- [92] K. Shiraishi, G. Wulff, *nichtveröffentlichte Ergebnisse*.
- [93] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of enzyme kinetics*, Protland Press, London, **1996**.
- [94] P. J. F. Herderson, in *Enzyme assays* (Eds.: R. Eisinger, M. J. Danson), IRL Press, Oxford, **1992**.
- [95] G. Wulff, A. Biffis, in *Molecularly Imprinted Polymers - Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry* (Ed.: B. Sellergren), Elsevier, Amsterdam, **2001**, pp. 71-111.
- [96] R. Schönfeld, Dissertation, Heinrich-Heine-University Düsseldorf **1998**.
- [97] T. Groß, PdD, Heinrich-Heine-University of Düsseldorf **1996**.
- [98] H. Bisswanger, *Enzyme Kinetik - Principles and Methods*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [99] S. Kostrewa, Dissertation, Universität Dortmund **2001**.
- [100] G. A. Smekal, *Naturwissenschaften* **1923**, *11*, 873-875.
- [101] C. V. Raman, K. S. Krishnan, *Nature* **1928**, *121*, 501-502.
- [102] J. P. Goudonnet, G. M. Begun, E. T. Arakawa, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *92*, 197-201.

- [103] J. M. Bello, D. L. Stokes, T. Vo-Dinh, *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 1325-1330.
- [104] P. Freunscht, G. Brehm, S. Schneider, in *Proceedings of the XVIth International Conference on Raman Spectroscopy* (Ed.: A. M. Heyns), John Wiley & Sons, Cape Town, **1998**, pp. 414-415.
- [105] S. Kostrewa, W. Hill, D. Klockow, *Sens. Actuators B* **1998**, *51*, 292-297.
- [106] G. Wulff, R. Schönfeld, M. Grün, R. Baumstark, G. Wildburg, L. Häußling, (BASF AG), German patent Offenlegungsschrift DE-A 19720345 A 1, 1998; *Chem. Abstr.* **1998**, *128*, *49*, 155.
- [107] M. J. McKennon, A. I. Meyers, K. I. Drauz, M. Schwarm, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3568-3571.
- [108] Z. Balajthy, J. Aradi, I. T. Kiss, P. Elodi, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3344-3349.
- [109] H. Hu, J. S. Mendoza, C. T. Lowden, L. M. Labbas, W. P. Janzen, *Bioorg. & Med. Chem.* **1997**, *5*, 1873-1882.
- [110] T. Yvernault, G. Yvernault, J. Bollinger, *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. C* **1978**, *287*, 519-521.
- [111] C. Kirsten, Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf **1997**.
- [112] J. Oleksyszyn, L. Subothowska, P. Mastalerz, *Synthesis* **1979**, 985-986.
- [113] D. G. Ray, G. F. Koser, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1607-1610.
- [114] H. Waldmann, H. Kunz, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1712-1725.
- [115] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, S. Connolly, S. Izawa, R. M. M. Singh, *Biochemistry* **1966**, *5*, 467.

„Alles in der Welt endet durch Zufall und Ermüdung.“

Heinrich Heine (1797-1856)