

- [19] a) A. Dalke, W. Humphrey, S. Izrail, J. Stone, J. Ulrich, VMD für IRIX5, Version 1.2, **1998**; b) W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 33–38.
- [20]  $RMSD = [\sum_{i=1}^N d_i^2/N]^{1/2}$  ( $N$  = Zahl der Atome,  $d$  = Abweichung): A. R. Leach, *Molecular Modelling*, Addison Wesley Longman Ltd., Essex, **1996**, S. 445.
- [21] Diese Bilder wurden mit dem Programm gOpenMol erstellt: L. Laakson, gOpenMol for Linux, Version 1.3, Centre of Scientific Computing, Espoo, Finnland, **1999**.
- [22] a) V. Barone in *Recent Advances in Density Functional Methods*, Part I (Hrsg.: D. P. Chong), World Scientific Publ. Co., Singapore, **1996**; b) N. Rega, M. Cossi, V. Barone, *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 11060–11067; c) V. Barone, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *262*, 201.
- [23] B. Horvath, R. Mössler, E. G. Horvath, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1979**, *450*, 165.
- [24] SHELXTL 5.03 for Siemens Crystallographic Research Systems, Siemens Analytical X-Ray Instruments Inc., Madison, WI, USA, **1995**.
- [25] Aus der Natural-bond-orbital(NBO)- und der Natural-localized-molecular-orbital(NLMO)-Analyse<sup>[26]</sup> ergab sich keine signifikante Wechselwirkung zwischen den freien Elektronenpaaren der Phosphoratom und den d-Orbitalen des Manganzentrums.
- [26] a) J. P. Foster, F. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7211–7218; b) A. E. Reed, F. Weinhold, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 1736–1740.

## Die Verwendung immobilisierter Template: eine neue Methode zum molekularen Prägen

Ecevit Yilmaz, Karsten Haupt\* und Klaus Mosbach\*

Das molekulare Prägen (molecular imprinting) ist ein Verfahren, mit dem spezifische Bindungsstellen in synthetischen Polymeren durch die Verwendung von Templaten erzeugt werden können. Herkömmliche Rezepturen für die Herstellung von molekulär geprägten Polymeren (molecularly imprinted polymers, MIPs) basieren auf einer von zwei unterschiedlichen Methoden, der „kovalenten“ und der „nichtkovalenten“ Methode. Die kovalente Methode wurde von der Arbeitsgruppe von Wulff<sup>[1]</sup> entwickelt und verwendet kovalente Bindungen zwischen dem Templat und den funktionellen Monomeren. Eine weitere Methode, welche auf nichtkovalenten Wechselwirkungen basiert, wurde von Mosbach und Mitarbeitern eingeführt.<sup>[2]</sup> Es wurde auch ein kombiniertes Modell vorgeschlagen, das einen kovalenten Prägeschritt beinhaltet, die darauf folgende Wiedererkennung findet jedoch ausschließlich über nichtkovalente Wechselwirkungen statt.<sup>[3]</sup>

[\*] Prof. K. Mosbach, E. Yilmaz  
Dr. K. Haupt,<sup>[+]</sup>  
Lund University  
Department of Pure and Applied Biochemistry  
Center for Chemistry and Chemical Engineering  
PO Box 124, 22100 Lund (Schweden)  
Fax: (+46) 46-2224611  
E-mail: klaus.mosbach@tbiokem.lth.se

[+] Derzeitige Adresse:  
Université Paris 12 Val de Marne  
Faculté des Sciences, CRRET Laboratory  
Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil Cedex (Frankreich)  
E-mail: karsten.haupt@tbiokem.lth.se

Bisher wurde das molekulare Prägen kleiner Moleküle ausschließlich mit Templaten in frei löslicher Form durchgeführt. Diese Polymere werden im Folgenden als klassisch molekulär geprägte Polymere bezeichnet. Hier stellen wir eine neuartige Prägingstechnik vor, die auf der orientierten Immobilisierung des Templates auf einem Feststoff beruht. Nach der Polymerisation wird der Feststoff aufgelöst und entfernt („geopfert“; Abbildung 1). Unser Ziel ist es zu

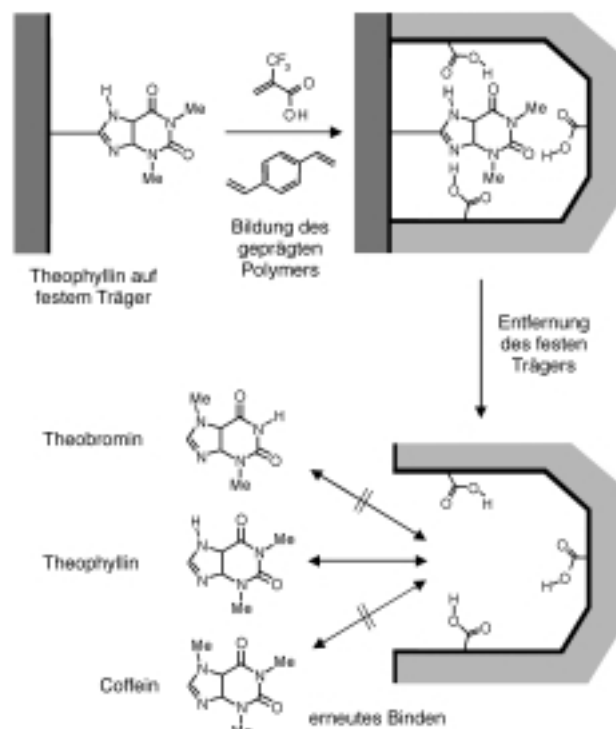


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Verwendung immobilisierter Template auf auflösbaren Trägermaterialien für das molekulare Prägen.

zeigen, dass molekulares Prägen auf diese Weise durchführbar ist und die Imprinting-Technik damit um eine weitere Methode bereichert wird. Als Modellverbindung haben wir Theophyllin (ein bronchodilatatorisches Pharmakon) gewählt, das in Form von 8-Carboxypropyltheophyllin auf Aminopropyl-derivatisiertem Kieselgel als Trägermaterial immobilisiert wurde. Die Kupplung wurde mit einem Carbo-diimid unter Bildung einer Amidbindung durchgeführt, eine Reaktion, die bei der Festphasensynthese von Peptiden eingesetzt wird.<sup>[4]</sup> Nach vollständiger Reaktion wurde die Menge gekuppelten Theophyllins durch Elementaranalyse bestimmt (Tabelle 1). Ungefähr 75 % der Aminopropylgruppen auf der Kieselgeloberfläche wurden mit dem Templat gekuppelt. Nach Beendigung der Reaktion wurden noch vorhandene freie Aminopropylgruppen (die allerdings mit konventionellen Detektionsmethoden wie dem Kaiser-<sup>[5]</sup> oder dem Trinitrobenzolsulfonsäure(TNBS)-Test<sup>[6]</sup> nicht nachgewiesen werden konnten) durch Umsetzung mit Acetanhydrid blockiert. Für die Herstellung von Kontrollpolymeren wurde das gleiche Aminopropyl-Kieselgel verwendet, alle freien Aminopropylgruppen wurden jedoch mit Acetanhydrid acetyliert.

Tabelle 1. Elementaranalyse der derivatisierten Kieselsäure-Partikel und der entsprechenden molekular geprägten Polymere.

	Aminopropyl-Kieselgel <sup>[a]</sup>	Kontroll-kieselgel <sup>[b]</sup>	Theophyllin-Kieselgel <sup>[c]</sup>	Kontroll-polymer <sup>[d]</sup>	geprägtes Polymer <sup>[e]</sup>
C [%]	1.13	1.8	3.3	80.6	80.1
H [%]	0.34	0.42	0.5	7.3	6.9
N [%]	0.33	0.34	1.21	u.N.	u.N.
Si [%]	n.b.	n.b.	n.b.	u.N.	u.N.

[a] Aminopropyl-derivatisiertes Kieselgel wurde wie vom Hersteller erhalten verwendet. [b] Durch Acetylierung des Aminopropyl-derivatisierten Kieselgels mit Essigsäureanhydrid erhalten. [c] Durch Kupplung von 8-Carboxypropyltheophyllin an Aminopropyl-derivatisiertes Kieselgel erhalten. [d] Durch Prägen mit dem Kontrollkieselgel erhalten. [e] Durch Prägen mit Theophyllin-Kieselgel erhalten. – u.N. = unterhalb der Nachweisgrenze; n.b. = nicht bestimmt.

In einer früheren Arbeit haben wir eine optimierte Polymerrezeptur für die Herstellung von Theophyllin-geprägten Polymeren beschrieben.<sup>[7]</sup> Diese enthält Trifluormethylacrylsäure (TFMAA), ein negativ geladenes funktionelles Monomer und Divinylbenzol (DVB), einen unpolaren Vernetzer. Mit dieser Rezeptur wurden über einen weiten Bereich von Monomer:Templat-Verhältnissen hocheffiziente Polymere erhalten. Dieselbe Rezeptur wurde in dieser Arbeit für die Prägung von immobilisiertem Theophyllin angewandt, wobei ein Molverhältnis von ca. 1:4 zwischen dem immobilisierten Theophyllin und dem funktionellen Monomer TFMAA verwendet wurde. Dieses Molverhältnis wurde auch beim molekularen Prägen eines Polymers gegen freies Theophyllin eingesetzt, wobei ein Polymer erhalten wurde, das Theophyllin gut adsorbierte.<sup>[7]</sup>

Im Unterschied zur Herstellung von klassischen MIPs, bei der ein porogenes Lösungsmittel für die Makroporosität des Polymers wichtig ist, wurde hier kein Lösungsmittel verwendet. Mit unserer neuen Methode werden im Polymer einheitliche Makroporen durch das Auflösen des Kieselgels gebildet. Dadurch sind auch die durch das Prägen erzeugten spezifischen Bindungsstellen auf der Oberfläche des Polymers lokalisiert. Es wurde jedoch überprüft, dass ein Zusatz des Lösungsmittels Toluol zum Polymerisationsgemisch keine Auswirkungen auf die Wiedererkennungseigenschaften des Polymers hatte. Das Kieselgel konnte mit wässriger Flusssäure vollständig aufgelöst und entfernt werden und war mit Elementaranalyse nicht mehr nachweisbar (Tabelle 1). Nach der Entfernung des Kieselgels wurde auch Stickstoff (der im Templat vorhanden ist) elementaranalytisch bestimmt, um eventuell im Polymer verbliebenes Theophyllin quantitativ nachzuweisen. Der Stickstoffgehalt lag jedoch ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze. Sowohl das geprägte als auch das Kontrollpolymer hatten sehr ähnliche Zusammensetzungen (Tabelle 1). Nach dem Entfernen von unvollständig polymerisierten Monomeren und kleineren Polymerfragmenten durch Filtrieren betrug die Ausbeute an intakten Polymerpartikeln ungefähr 80 % der anfangs eingesetzten Monomermenge.

Da die Behandlung mit wässriger Flusssäure sehr aggressiv ist, wurde ein möglicher negativer Einfluss der Flusssäurebehandlung auf die Wiedererkennungseigenschaften des Polymers untersucht. Dafür wurde ein mit freiem Theophyllin klassisch geprägtes Polymer,<sup>[7]</sup> wie beschrieben, mit wässriger

Flusssäure behandelt, gewaschen und getrocknet. Mit diesem Polymer wurden dann Bindungs- und kompetitive Bindungsstudien durchgeführt. Weder die Kapazität noch die Spezifität des Polymers wurden durch die Behandlung mit Flusssäure beeinflusst. Dies zeigt, dass molekular geprägte DVB-TFMAA-Copolymere gegen Behandlung mit wässriger Flusssäure stabil sind.

Die Porositäten der Polymere wurden mit Stickstoffadsorptions/-desorptions-Analysen untersucht, wobei sehr enge Porengrößenverteilungen bestimmt wurden. Der durchschnittliche Porendurchmesser und die mit der BET-Methode bestimmte Porenoberfläche betrugen beim molekular geprägten Polymer 254 Å bzw. 35 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> und beim Kontrollpolymer 257 Å bzw. 31 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. Weder größere Poren noch Mikroporen wurden detektiert. Im Unterschied dazu hatten mit der klassischen Methode hergestellte MIPs sowohl eine viel breitere Porengrößenverteilung (30–1000 Å) als auch eine größere Porenoberfläche (ca. 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>).

Bindungsstudien zur Bestimmung der Kapazität des mit immobilisiertem Theophyllin geprägten Polymers und des Kontrollpolymers wurden mit [<sup>3</sup>H]Theophyllin als radioaktiv markiertem Liganden in Toluol durchgeführt (Abbildung 2).

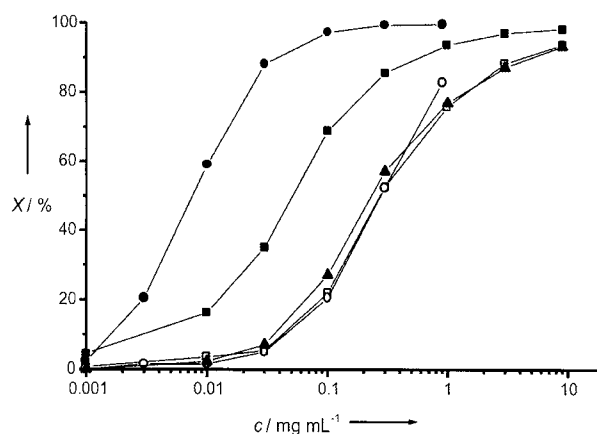


Abbildung 2. Adsorption von [<sup>3</sup>H]Theophyllin in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration. Die dargestellten Kurven repräsentieren Messungen an Polymeren, die mit folgenden Templaten geprägt wurden: Theophyllin-Kieselgel (■), acetyliertes Kieselgel (Kontrollpolymer; □), Naphthalin-Kieselgel (▲), freies Theophyllin (●), Aminopropyl-derivatisiertes Kieselgel (○). Die Messpunkte entsprechen den Mittelwerten von Dreifachmessungen.

Das geprägte Polymer hatte eine höhere Bindungskapazität als das Kontrollpolymer. Bei einer Polymerkonzentration, bei der das geprägte Polymer 50 % des radioaktiv markierten Liganden band, band das Kontrollpolymer nur 10 %. Um auch den Einfluss von Form und Funktionalität des Templats abzuschätzen, wurde ein weiteres Polymer unter Verwendung eines Aminopropyl-derivatisierten Kieselgels, an das 2-Naphthylessigsäure gekuppelt wurde, synthetisiert. Naphthalin entspricht der Größe nach in etwa Theophyllin, enthält jedoch keine funktionellen Gruppen oder Heteroatome. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, hat dieses Polymer eine ähnlich geringe Bindungskapazität wie das Kontrollpolymer, das auf acetyliertem Kieselgel hergestellt wurde. Dies zeigt,

dass die funktionellen Gruppen von Theophyllin für den Prägungseffekt wichtig sind.

Zum Vergleich ist in Abbildung 2 auch die Bindungskurve eines klassischen MIP dargestellt, das mit freiem Theophyllin hergestellt wurde. Das klassische MIP hatte eine höhere Bindungskapazität als das Polymer, das mit einem immobilisierten Templat hergestellt worden war. Ein direkter Vergleich zwischen diesen Polymeren ist jedoch nicht möglich, da unter anderem die Porositäten sehr unterschiedlich sind. Interessanterweise haben beide Kontrollpolymere sehr ähnliche (niedrige) Bindungskapazitäten. Offensichtlich führt das Kieselgel während des Prägens nicht zu einer erhöhten unspezifischen Bindung. Es ist deshalb anzunehmen, dass der Kapazitätsunterschied zwischen dem MIP und den Kontrollpolymeren durch das auf Kieselgel immobilisierte Templat verursacht wurde.

Das mit immobilisiertem Theophyllin geprägte Polymer weist eine hohe Spezifität für freies Theophyllin im Vergleich zu den verwandten Verbindungen Coffein und Theobromin auf (Abbildung 3), wobei die Kreuzreaktivitäten unter 2 % lagen. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Werten, die mit klassisch hergestellten MIPs erhalten wurden.

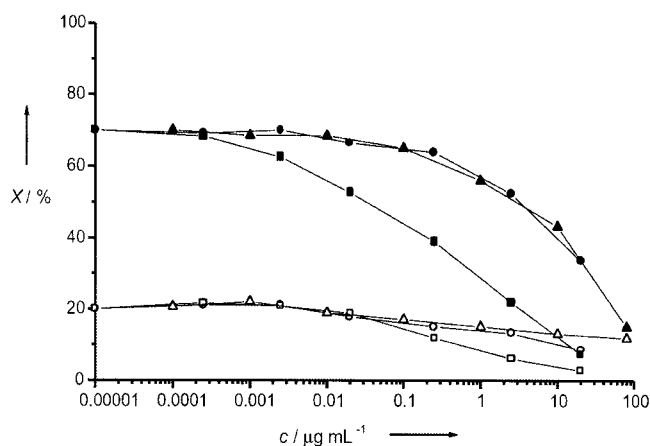


Abbildung 3. Analysen der kompetitiven Bindung von  $[^3\text{H}]$ Theophyllin an das geprägte Polymer (gefüllte Symbole) und an das Kontrollpolymer (leere Symbole) in Abhängigkeit von der Konzentration an nichtmarkiertem Theophyllin (Quadrate), Theobromin (Kreise) und Coffein (Dreiecke). Polymerkonzentration:  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Ähnliche Studien wurden in unserer Arbeitsgruppe mit Latex- und nichtporösen Kieselgelnanopartikeln als Trägermaterialien durchgeführt, jedoch nur mit geringem Erfolg. Die Gründe hierfür sind wahrscheinlich in der geringen Oberfläche der Kieselgelnanopartikel und der Unverträglichkeit der Polymermischungen zu suchen. Andererseits erschien Kieselgel geeignet für diese neue Prägmethode, da es in organischen Lösungsmitteln stabil ist, eine hohe Dichte hat und deshalb einfacher handhabbar ist. Darüber hinaus kann es mit Flusssäure leicht vom geprägten Polymer entfernt werden. Wir verwendeten poröses Kieselgel, da dieses eine höhere spezifische Oberfläche hat und somit die Beladung mit Templatmolekülen stark erhöht werden kann. Kürzlich wurde von einer anderen Arbeitsgruppe<sup>[8]</sup> gezeigt, dass mit

Kieselgel als Opfermaterial poröse poly(DVB)-Polymere hergestellt werden können. Diese Arbeit stand nicht im Zusammenhang mit dem molekularen Prägen, es wurde jedoch gezeigt, dass bei derartigen Polymer-Kieselgel-Kompositen durch Auswahl des geeigneten Kieselgels die Porengröße genau eingestellt werden kann.

Das Prägen von Polymeren mit immobilisierten Templaten bringt eine Reihe von möglichen Vorteilen mit sich. Templatmoleküle, die nicht in der Monomermischung löslich sind, können immobilisiert und dann in Kontakt mit den Monomeren gebracht werden. Das Prägen unlöslicher Template wäre somit möglich, wenn diese immobilisiert werden können.

Es wurde postuliert, dass Template sich in der Polymermischung zu größeren Molekülaggregaten zusammenlagern können und als solche auch geprägt werden.<sup>[9, 10]</sup> Diese Bildung von Molekülaggregaten vor oder während der Polymerisation kann durch die Immobilisierung des Templats unterbunden werden. Gleichzeitig bietet die Immobilisierung die Möglichkeit, das Phänomen der Molekülaggregation eingehender zu untersuchen. Es wird angenommen, dass die Immobilisierung des Templats zur Bildung gleichartig ausgerichteter, homogener Bindungsstellen im Polymer führt. Darüber hinaus wird auch die Beweglichkeit des Templats durch die Fixierung eingeschränkt, was in einem stabileren Monomer-Templat-Komplex und folglich in homogeneren Bindungsstellen resultieren sollte.

Da die Polymermischung kein Lösungsmittel (Porogen) enthält, hat das hergestellte Polymer nur Poren einheitlicher Größe, die durch das Herauslösen des Kieselgelgerüsts gebildet werden. Alle Bindungsstellen sollten auf oder nahe an der Porenoberfläche lokalisiert sein, was eine erleichterte Diffusion des Analyten an die Bindungsstellen bewirkt.

Die vorliegende Arbeit eröffnet auch neue Möglichkeiten für den Einsatz von molekular geprägten Polymeren. Als Beispiel kann angeführt werden, dass das Templat mit verschiedenen Markermolekülen gekuppelt werden kann, ohne dass bei der Bindung dieses Konjugats an das Polymer eine sterische Hinderung zu erwarten ist. Dies steht im Gegensatz zu klassisch geprägten Polymeren, wo sich die Bindungsstellen tief in den Poren des Polymers befinden und damit schlecht zugänglich sind. Dies erweitert erheblich die Verwendbarkeit molekular geprägter Polymere in Bindungsassays und kompetitiven Immunoassays.

Neben dem beschriebenen Kompositpaar Kieselgel/Acrylat, bei dem das Kieselgel als auflösbarer Templatträger fungiert, gibt es noch weitere mögliche Kompositpaare, z. B. Latex/Acrylat, Polysaccharid/Acrylat und Chitosan/Acrylat.

Wir haben hier zum ersten Mal gezeigt, dass das Prägen von Polymeren mit immobilisierten Templaten möglich ist und eine alternative Methode zur Herstellung molekular geprägter Polymere ist. Eine genauere Untersuchung der Phänomene des molekularen Prägens an der Grenzfläche zwischen fester und flüssiger Phase steht noch aus.

#### Experimentelles

Reagentien: Toluol, Dimethylformamid (DMF) und Dichlormethan (DCM; alle wasserfrei) wurden von Labscan Ltd. (Dublin, Irland) bezogen. Alle weiteren Lösungsmittel (analytische oder HPLC-Qualität) und HF (40-proz. wässrige Lösung) waren von Merck (Darmstadt, Deutschland).

8-Carboxypropyltheophyllin, Theophyllin, Coffein, Theobromin, [ $^3\text{H}$ ]Theophyllin (spezifische Aktivität:  $0.8 \text{ mCi mol}^{-1}$ ) und Diisopropylcarbodiimid (DIC) wurden von Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen. Aminopropyl-derivatisiertes Kieselgel ( $7 \mu\text{m}$ ,  $300 \text{ \AA}$ ,  $0.7 \text{ mL g}^{-1}$ ) stammte von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) und hatte einen Gehalt an Aminopropylgruppen von ca.  $0.25 \text{ mmol pro g Kieselgel}$ . Der Initiator für die radikalische Polymerisation, 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril) war von Wako Pure Chemicals Industries (Osaka, Japan). TFMAA und DVB (technisch) mit 20% Ethylvinylbenzol waren von Aldrich (Steinheim, Deutschland). DVB wurde kurz vor der Verwendung mit basischem Aluminiumoxid (Merck) behandelt, um den Polymerisationsinhibitor zu entfernen. TNBS (1-proz. Lösung in DMF) und 2-Naphthyllessigsäure wurden bei Fluka (Buchs, Schweiz) gekauft.

Vorbereitung der Aminopropyl-derivatisierten Kieselgeloberflächen für das Prägen: A) Theophyllin-Kieselgel:  $266 \text{ mg}$  ( $1 \text{ mmol}$ ) 8-Carboxypropyltheophyllin und  $450 \mu\text{L}$  ( $3 \text{ mmol}$ ) DIC wurden in  $10 \text{ mL}$  wasserfreiem DMF/DCM (1:1, v/v) gelöst. Dann wurde  $1 \text{ g}$  getrocknetes Aminopropyl-derivatisiertes Kieselgel zugegeben, und die so erhaltene Suspension wurde auf einem Schütteltisch bei Raumtemperatur  $18 \text{ h}$  lang geschüttelt. Die Kupplungsreaktion wurde so lange fortgesetzt, bis sowohl der Kaiser-<sup>[5]</sup> als auch der TNBS-Test<sup>[6]</sup> negativ verliefen, was ein Indiz dafür ist, dass die meisten Aminopropylgruppen auf der Kieselgeloberfläche mit dem Templat reagiert hatten. Dann wurden  $100 \mu\text{L}$  ( $1 \text{ mmol}$ ) Essigsäureanhydrid zugegeben und die Mischung weitere  $2 \text{ h}$  inkubiert, um eventuell noch vorhandene freie Aminopropylgruppen zu acetylieren. Das derivatisierte Kieselgel wurde dann auf einer G4-Glasfritte mit je  $50 \text{ mL}$  DMF, DCM und Methanol gewaschen und  $6 \text{ h}$  lang bei  $45^\circ\text{C}$  und weitere  $6 \text{ h}$  im Vakuum getrocknet. B) Acetyliertes Kontrollkieselgel:  $1 \text{ g}$  Aminopropyl-derivatisiertes Kieselgel wurde mit Essigsäureanhydrid ( $1 \text{ mL}$ ,  $10 \text{ mmol}$ ) im Überschuss acetyliert. Nach vollständiger Acetylierung aller freien Aminopropylgruppen wurde das Kontrollkieselgel wie unter A) beschrieben weiterbehandelt. C) Naphthalin-Kieselgel: Dieses weitere Kontrollkieselgel wurde auf dieselbe Weise hergestellt wie das Theophyllin-Kieselgel (A), statt 8-Carboxypropyltheophyllin wurde jedoch 2-Naphthyl-essigsäure ( $186 \text{ mg}$ ,  $1 \text{ mmol}$ ) verwendet.

Herstellung der Polymere: Eine Polymerisationsmischung aus  $2.14 \text{ mL}$  ( $12 \text{ mmol}$ ) DVB,  $336 \text{ mg}$  ( $2.4 \text{ mmol}$ ) TFMAA und  $20 \text{ mg}$  2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril) wurde hergestellt. Eine dem Porenvolumen des Kieselgels (ca.  $0.65 \text{ mL g}^{-1}$ ) entsprechende Menge der Polymerisationsmischung wurde zu einer bestimmten Menge Kieselgel (Theophyllin-Kieselgel, Kontrollkieselgel oder Naphthalin-Kieselgel) gegeben und vorsichtig verrührt.<sup>[11]</sup> Der Behälter wurde dann mit  $\text{N}_2$   $2 \text{ min}$  lang befüllt und die Mischung über Nacht bei  $45^\circ\text{C}$  polymerisiert. Nach vollständiger Polymerisation (dies wurde durch die Polymerisation eines Aliquots der Polymerisationsmischung ohne Kieselgel überprüft), wurde das Kieselgel-Polymer-Komposit vorsichtig mit etwas Aceton in einem Mörser zerrieben, um eventuell vorhandene Partikelaggregate zu zerkleinern. Das Komposit wurde dann in ein Plastikröhrchen mit Schraubverschluss gegeben, in  $2 \text{ mL}$  Aceton suspendiert und im Eiswasserbad gekühlt. Um das Kieselgelgerüst des Komposits aufzulösen, wurden  $4 \text{ mL}$  wässriger HF (40-proz.) portionsweise unter Schütteln zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht auf einem Schütteltisch bei Raumtemperatur inkubiert. Das erhaltene Polymer wurde ausgiebig auf einer G4-Glasfritte mit ca.  $2 \text{ L}$  20-proz. Aceton (in entionisiertem Wasser) gewaschen, bis das Waschwasser einen neutralen pH-Wert hatte, dann folgte ein weiterer Waschschritt mit  $0.25 \text{ L}$  Methanol. Die Polymerpartikel wurden  $6 \text{ h}$  in einem Trockenschrank bei  $45^\circ\text{C}$  und dann im Vakuum weitere  $6 \text{ h}$  getrocknet.

Elementaranalyse: Die Elementaranalyse durch Verbrennen und Gaschromatographie wurde von der Firma MikroKemi AB (Uppsala, Schweden) durchgeführt.

Bindungsanalysen mit radioaktiv markierten Liganden: Die Polymerpartikel wurden in Toluol suspendiert. Eine bestimmte Menge dieser Suspension und des radioaktiv markierten Liganden [ $^3\text{H}$ ]Theophyllin wurden in  $1.5 \text{ mL}$ -Teströhrchen aus Polypropylen gegeben. Bei kompetitiven Bindungsanalysen wurden noch entsprechende Mengen einer Lösung des kompetitiven Liganden hinzugegeben. Die Proben wurden mit Toluol auf  $1 \text{ mL}$  aufgefüllt und bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch  $12 \text{ h}$  inkubiert. Die Polymerpartikel wurden durch Zentrifugieren abgetrennt, und  $500 \mu\text{L}$  des Überstandes wurden zu  $10 \text{ mL}$  Szintillationsflüssigkeit (Ecoscint O, National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) gegeben. Die

Radioaktivität wurde durch Flüssigszintillationsmessung mit einem Rack-beta-1219-Zähler (LKB Wallac, Turku, Finnland) bestimmt. Dieser Assay wurde in einer früheren Arbeit beschrieben.<sup>[12]</sup>

Eingegangen am 8. September 1999 [Z13982]  
Auf Wunsch der Autoren erst jetzt veröffentlicht

- [1] G. Wulff, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1958–1979; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1812–1832.
- [2] K. Mosbach, O. Ramström, *Bio/Technology* **1996**, *14*, 163–170.
- [3] M. J. Whitcombe, M. E. Rodríguez, P. Villar, E. N. Vulfson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7105–7111.
- [4] F. Albericio, L. A. Carpino, *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 104–126.
- [5] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- [6] W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260–264.
- [7] E. Yilmaz, K. Mosbach, K. Haupt, *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 167–170.
- [8] S. A. Johnson, P. J. Ollivier, T. E. Mallouk, *Science* **1999**, *283*, 963–965.
- [9] H. S. Andersson, J. G. Karlsson, S. A. Piletsky, A.-C. Koch-Schmidt, K. Mosbach, I. A. Nicholls, *J. Chromatogr. A* **1999**, *848*, 39–49.
- [10] A. Katz, M. E. Davis, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4113–4121.
- [11] M. Glad, P. Reinholdsson, K. Mosbach, *React. Polym.* **1995**, *25*, 47–54.
- [12] G. Vlatakis, L. I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, *Nature* **1993**, *361*, 645–647.

## Hybridnaturstoffe: Design, Synthese und biologische Untersuchung von Chinon-Annonin-Acetogeninen\*\*

Sabine Hoppen, Ulrich Emde, Thorsten Friedrich, Lutz Grubert und Ulrich Koert\*

Die Acetogenine aus *Annonaceae* sind eine Naturstoffklasse mit interessanten Antitumor-, immunsuppressiven, pestiziden und antimikrobiellen Eigenschaften.<sup>[1]</sup> Ihr Wirkmechanismus beruht auf der Inhibierung von Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) der inneren Mitochondrienmembran.<sup>[2]</sup> Mucocin<sup>[3]</sup> und Squamocin D<sup>[4]</sup> sind zwei repräsentative Annonin-Acetogenine, die deren charakteristischen Struktureigenschaften aufzeigen: eine zentrale Ether-einheit mit Tetrahydrofuran(THF)- und Tetrahydropy-

[\*] Prof. Dr. U. Koert, Dipl.-Chem. S. Hoppen, Dipl.-Chem. U. Emde, Dr. L. Grubert  
Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin  
Hessische Straße 1-2, 10115 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 30-2093-7266  
E-mail: koert@chemie.hu-berlin.de

Dr. T. Friedrich  
Institut für Biochemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, vom Fonds der Chemischen Industrie und von der ASTA-Medica AG gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.