

Sensorische Mikropartikel aus einem Silicatkern und einem molekular geprägten Polymer als Schale mit aufleuchtender Fluoreszenz**

Wei Wan, Mustafa Biyikal, Ricarda Wagner, Börje Sellergren* und Knut Rurack*

Molekular geprägte (engl.: imprinted) Polymere (MIPs) sind ein etabliertes und leistungsstarkes Medium für die selektive Anreicherung und Abtrennung von chemischen Spezies, insbesondere von organischen Molekülen, die funktionelle Gruppen tragen. Im Allgemeinen werden MIPs durch die Polymerisation einer Mischung aus funktionellen Monomeren und Vernetzern in Gegenwart einer molekularen Matrix, des Templat, hergestellt. Nach der Extraktion des Templat verbleiben in der vernetzten Polymermatrix Hohlräume, die zum Templat in Form, Größe und elektronischem oder Wasserstoffbrückenbindungsbedarf komplementär sind und die das Zielmolekül selektiv erkennen und binden können.^[1] Weil ihre Herstellung, ihr Habitus und ihre Funktion Parallelen zu einem bestimmten Erkennungssystem aus der Natur zeigen, werden MIPs öfter auch als „artifizielle Antikörper“ bezeichnet.^[2] Obwohl MIPs heute schon relativ komplexe Aufgaben wie die chirale Erkennung übernehmen können,^[3,4] liegt der Schlüssel zu einer künftig weiteren Verbreitung in der Implementierung von zusätzlichen Funktionen.

Ein wichtiges Ziel ist die Integration eines signalgebenden Elements, sodass das Bindungsereignis direkt mit einem empfindlichen Nachweisverfahren wie der Fluoreszenzspektroskopie erfasst werden kann.^[5] Solche signalgebenden MIPs wären Sensoren und würden den Einsatzbereich von MIPs in der fluorometrischen Analyse über den Nachweis von fluoreszierenden Analyten,^[6] die Fluoreszenzmarkierung von

Analyten vor dem Nachweis im MIP^[7] und Verdrängungssays^[8] hinaus erweitern. In den letzten beiden Ansätzen wird das MIP nur für die Abtrennung oder Anreicherung verwendet. Die Detektion muss dann in einem zweiten, diskontinuierlichen und nachgeschalteten Schritt erfolgen, was für Sensoranwendungen nicht ideal ist.

MIPs, die fluoreszierende Einheiten direkt im Polymergerüst tragen, sind immer noch relativ selten. Zudem eignet sich die Lösung eines kovalent eingebundenen Farbstoffs ohne spezifische Bindungsstellen nur zum Nachweis von Analyten, die potente Fluoreszenzlöscher sind.^[9] Der vielleicht offensichtlichste Ansatz, der kovalente Einbau eines fluoreszierenden Sondenmonomers in ein MIP, wurde bislang nur selten realisiert,^[10–14] wobei insbesondere Beispiele von gerichteter Erkennung an einer gezielt entworfenen Bindungsstelle^[12–14] oder eine Fluoreszenzverstärkung nach Bindung des Analyten rar sind.^[13] Der attraktivste Weg – fluoreszogene MIPs, die beim Binden des Analyten einfach in einem analytisch vorteilhaften Wellenlängenbereich aufleuchten – wurde unseres Wissens bislang noch nicht beschritten.^[15,16]

Für die Entwicklung von MIPs, die eine Verstärkung der Fluoreszenz nach Analytbindung und vorteilhafte molekulare Erkennungseigenschaften zeigen sollen, haben wir *N*-Carbobenzyloxy-L-phenylalanin (Cbz-L-Phe oder Z-L-Phe, Schema 1) als Templat gewählt, da diese Verbindung ein bekannter Baustein in der Peptidsynthese ist und des Öfteren als Modellsubstanz für die Entwicklung von MIPs zur Prüfung der Enantiomerenreinheit von synthetischen Peptiden eingesetzt wird.^[4] Das fluoreszierende Monomer **1** bauten wir aus einem Nitrobenzoxadiazol(NBD)-Fluorophor, der eine direkt gebundene Harnstoff-Einheit als Erkennungseinheit für die Carboxylatgruppe trägt, einem kurzen Ethylen-Abstandshalter und einer polymerisierbaren Methacrylat-Einheit auf (Schema 1). NBD-Farbstoffe mit einer elektronenschiebenden Gruppe in der 4-Position zeigen intensive Absorptions- und Fluoreszenzbanden bei ca. 450 bzw. 550 nm, die auf einem intramolekularen Ladungstransfer (ICT) basieren.^[17] NBD-Farbstoffe werden bereits seit vielen Jahren als molekulare Sonden eingesetzt.^[18] Wir folgerten daher, dass durch den Einbau einer moderat elektronenschiebenden Harnstoff-Einheit in 4-Position bei Bindung eines elektronenreichen Gastes wie einer Carboxylatgruppe an diese Y-förmige Bindungsstelle der ICT-Prozess verstärkt werden und bathochrome Verschiebungen sowie ein Anstieg der NBD-Fluoreszenz zu erwarten sein sollten.

Verbindung **1** wurde aus 4-Amino-NBD^[19] und Methacrylsäure-2-isocyanatoethylester in Gegenwart von 4-(Dimethylamino)pyridin als Katalysator und Butylhydroxytoluol als Stabilisator hergestellt. Für eine erfolgreiche molekulare Prägung wird ein Lösungsmittel benötigt, in dem sowohl die

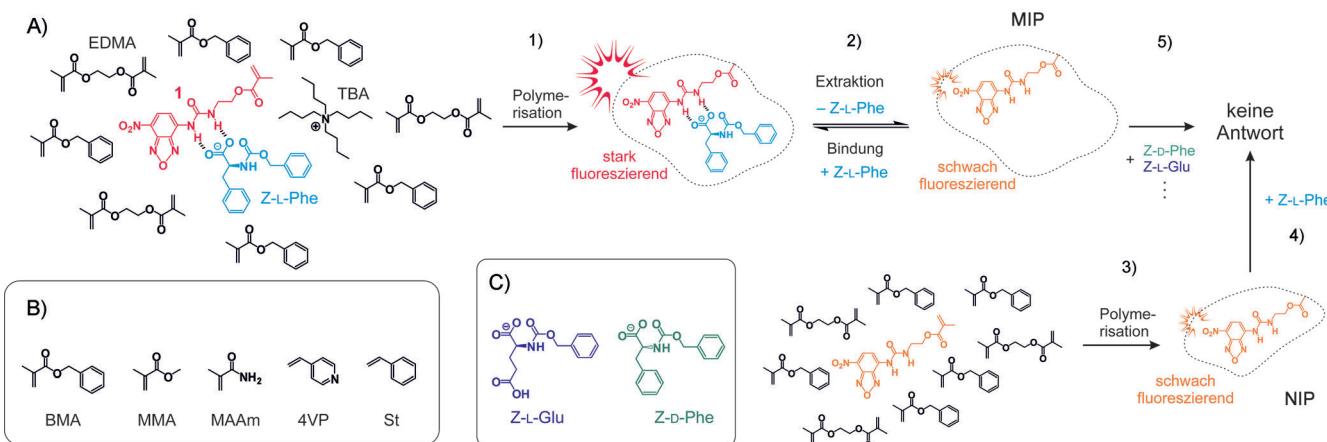
[*] W. Wan, Dr. M. Biyikal, Dr. K. Rurack
Fachbereich 1.9 Sensormaterialien
BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
Richard-Willstätter-Straße 11, 12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: knut.rurack@bam.de

Dr. R. Wagner, Prof. Dr. B. Sellergren
INFU Institut für Umweltforschung, Fakultät für Chemie
Technische Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44221 Dortmund (Deutschland)
E-Mail: B.Sellergren@infu.uni-dortmund.de

Prof. Dr. B. Sellergren
Department of Biomedical Sciences, Malmö University
SE-205 06 Malmö (Schweden)
E-Mail: borje.sellergren@mah.se

[**] Diese Arbeit wurde durch die DFG (RU 1622/1-1, SE 777/15-1) und den Innovationsfonds von BAM/BMWi unterstützt. Wir danken S. Selve (Technische Universität Berlin) für TEM-Aufnahmen, A. Zehl und U. Kätel (Humboldt-Universität Berlin) für Elementaranalysen sowie C. Mügge (HUB), D. Pfeifer und W. Altenburg (BAM Div. 1.3) für NMR-Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zur Synthese und Charakterisierung der Verbindungen und Materialien, instrumentelle Details, zusätzliche Daten aus NMR-, TEM-, TGA-, FTIR- und optischer Spektroskopie) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201300322> zu finden.



Schema 1. A) Herstellung eines stark fluoreszierenden MIP (1). Extraktion und Bindung des Templat schaltet zwischen starker und schwacher Fluoreszenz (2). Herstellung des nichtgeprägten (nonimprinted) Polymers (NIP, 3) und analytisch relevante, unspezifische Bindungs- (4) und Kreuzempfindlichkeitsreaktionen (5) komplettieren die Leistungsparameter. B) Comonomere und C) andere Analyte, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Komplexbildung zwischen Sondenmonomer und Templat effizient als auch die Polymerisation – in unserem Fall die RAFT-Polymerisation (RAFT: reversible addition–fragmentation chain-transfer) – gut möglich ist. Die RAFT-Technik ist am besten geeignet, um eine MIP-Matrix als dünnen Polymerfilm auf Silicatmikropartikel (MPs) aufzuwachsen, denn diese Polymerisation ist nicht nur quasi-lebend, sondern führt auch zu homogeneren Netzwerken und besser zugänglichen Bindungsstellen, und daher zu einer höheren Bindungskapazität.^[20] MPs waren unser Zielformat, weil sie sowohl als individuelle Sensoreinheiten eingesetzt als auch in Sensormembranen integriert werden können. Die Untersuchung des Komplexierungsverhaltens von **1** mit dem Tetrabutylammonium(TBA)-Salz von Z-L-Phe in verschiedenen Lösungsmitteln, die für die RAFT-Polymerisation geeignet sind (Acetonitril, Chloroform, Tetrahydrofuran), ergab, dass Chloroform die beste Wahl ist, weil sowohl die spektralen Verschiebungen als auch die Fluoreszenzverstärkung bei Komplexierung in diesem Lösungsmittel am ausgeprägtesten sind (vgl. Abbildung 1 mit den Abbildungen S1 und S2 in den Hintergrundinformationen).

Ein entscheidender Punkt bei der Verwendung von Harnstoff-Einheiten zur Erkennung von Carboxylatgruppen

über zwei gerichtete Wasserstoffbrückenbindungen ist die Feinjustierung der Acidität der beiden Harnstoffprotonen. Obwohl diese für eine optimale Komplexierung möglichst sauer sein sollten, darf die Acidität nicht so hoch sein, dass eine unerwünschte Deprotonierung eintritt.^[21] Letztere würde ungerichteten elektrostatischen Wechselwirkungen den Vorzug vor gerichteten H-Brücken geben, was die Bildung von Kavitäten mit gezielt entworfenen Bindungsstellen erschweren würde. Deprotonierung lässt sich in den Titrationsspektren von Harnstoffen und Carboxylaten meist anhand einer stark rotverschobenen (oft um ca. 100 nm) Absorptionsbande identifizieren.^[22] Anionische ICT-Farbstoffe fluoreszieren in der Regel nicht, was eine fluorometrische Sensorik unmöglich macht,^[23] und zeigen zudem eine viel geringere Selektivität bei der Erkennung von Gästen, die über H-Brücken binden. Aus Abbildung 1A wird deutlich, dass in CHCl_3 erst nach der Zugabe eines siebenfachen Überschusses an Z-L-Phe eine Absorptionsbande bei ca. 520 nm auftritt, die wir der Deprotonierung zuschreiben (weitere NMR-Daten hierzu finden sich in Abschnitt 7 der Hintergrundinformationen).

Aus Abbildung 1 sind auch die vorteilhaften sensorischen Eigenschaften, die für das MIP erwartet werden können,

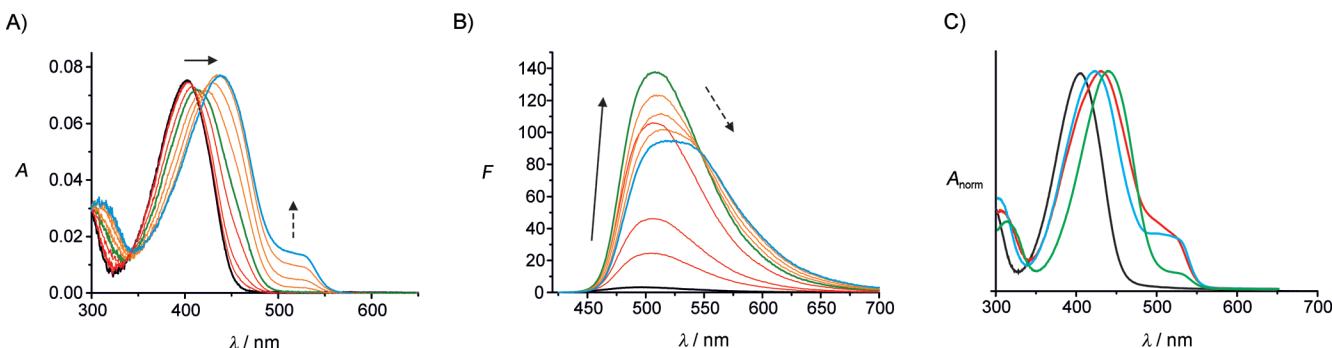


Abbildung 1. Absorptions- (A) und Fluoreszenzspektren (B) von **1** ($c=5 \mu\text{M}$) in CHCl_3 ohne (schwarz) und mit Z-L-Phe/TBA (rot: 0.4, 1, 3 Äquiv. Z-L-Phe, grün: 5 Äquiv., orange: 7, 10, 15 Äquiv., blau: 20 Äquiv.). Absorptionsspektren (C) der Prä-Polymerisationslösung von **1** ($c=1 \text{ mM}$) für das NIP in CHCl_3 (schwarz) und für das MIP bei stöchiometrischer Prägung mit Z-L-Phe/TBA in CHCl_3 (grün), THF (blau) und MeCN (rot).

ablesbar. Neben bathochromen Verschiebungen von ca. 30 und 10 nm in Absorption bzw. Fluoreszenz hat die Komplexbildung zwischen **1** und dem Templat auch eine deutliche Fluoreszenzverstärkung zur Folge (Abbildung 1B). Im Gegensatz dazu sind die H-Brücken-bedingten bathochromen Verschiebungen und die Fluoreszenzverstärkungen in den beiden polaren Lösungsmitteln MeCN und THF, die jeweils auch freie Elektronenpaare an ihren Heteroatomen tragen, welche eine Deprotonierung fördern können, deutlich geringer, und Deprotonierung wird schon bei äquimolaren Konzentrationen sichtbar (Abbildungen S1 und S2 in den Hintergrundinformationen). Eine Analyse der Titrationsdaten von **1** und Z-L-Phe in CHCl_3 unter Annahme einer 1:1-Komplexbildung ergibt eine Komplexbildungskonstante $\lg K$ von 5.11 (Abbildung S3), was ausreichend für die Prägung ist.^[24]

Da wir durch Untersuchungen anderer Forschungsgruppen^[25] zum Einfluss der Spezieskonzentration auf die Wasserstoffbrückenbindungs- und Deprotonierungsgleichgewichte sensibilisiert waren, stellte sich vor allem die Evaluierung der spektroskopischen Eigenschaften der Prä-Polymerisationslösung als wichtiger Schlüssel zum Erfolg heraus. Abbildung 1C zeigt, dass zwar der Anteil an in CHCl_3 gebildetem **1**⁻ bei äquimolaren Konzentrationen (1 mM) höher ist als bei 5 μM (Abbildung 1A), dass aber auch hier, wie im niedrigen Konzentrationsbereich, die stöchiometrische Prägung in CHCl_3 weniger als in MeCN und THF von der ungewollten Nebenreaktion beeinträchtigt werden wird (Abbildung 1C). Des Weiteren ist wichtig festzustellen, dass nach Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit der Dissoziation der Komplex auch bei höheren Temperaturen (bis 80°C), wie sie beim Ausheilen nach der Polymerisation (hier 70°C) eingesetzt werden, hinreichend stabil ist (Abbildung S4).

Nachdem wir die Signalerzeugung etabliert hatten, schritten wir zur Herstellung des eigentlichen Sensormaterials. Hierfür wählten wir Kern-Schale-MPs als Format aus, weil MPs eine sehr vielseitige Plattform sind und in sehr unterschiedlichen technischen Formaten eingesetzt werden können. Zudem können dünne Polymerschalen auf robusten Trägerpartikeln reproduzierbar über Oberflächen-initiierte Polymerisation hergestellt werden,^[26] und versprechen einige

Nanometer dicke MIP-Matrizes schnelle Ansprechzeiten und eine quantitative Extraktion des Templat in vergleichsweise kurzer Zeit.^[27]

Wir entschieden uns für ca. 300 nm große Silicatpartikel als Träger. Diese Strategie bietet den Vorteil einer relativ hohen Dichte des Silicatkerns, was die Handhabung der Partikel in verschiedenen Anwendungen erleichtert. Zudem sind Silicat-MPs hervorragend für optische Detektionstechniken geeignet. Neben **1** und Z-L-Phe/TBA wurde EDMA (Ethylenglycoldimethacrylat) als mittelpolarer Quervernetzer und verschiedene (aromatische und aliphatische) Monomere unterschiedlicher Polarität als zusätzliche Comonomere eingesetzt (Schema 1, Tabelle S1). Um eine homogene Polymerschicht um den SiO_2 -Kern zu erhalten, wurde vor dem Aufwachsen des MIP ein RAFT-Reagens (2-(2-Cyanopropyl)dithiobenzoat, CPDB) auf der Aminosilan-aktivierten SiO_2 -Oberfläche aufgebracht. Repräsentative, in den Hintergrundinformationen abgebildete TEM-Aufnahmen der Kern-Schale-MIP-Partikel lassen eine Schalendicke von ca. 10 nm erkennen.

Die Leistungsfähigkeit der Sensorpartikel wurde zuerst in Chloroform durch Titration mit dem designierten Analyten Z-L-Phe, dem potenziellen Konkurrenten Z-D-Phe als enantiomerem Zwilling und Z-L-Glu als konformativ eng verwandter Aminosäure, die zwei mögliche H-Brücken-aktive Bindungsstellen aufweist, eruiert. Wie in Tabelle S1 gezeigt lieferten die mit Benzylmethacrylat (BMA) als Comonomer hergestellten Partikel CS8 die größte Fluoreszenzverstärkung bei Zugabe von Z-L-Phe und die beste Diskriminierung zwischen MIP und NIP sowie auch gegenüber Z-D-Phe und Z-L-Glu. Der Vergleich mit den Daten der MIPs, die mit den anderen Comonomeren hergestellt wurden, legt als Ursache die Anwesenheit der Benzylgruppen nahe, die zusätzliche aromatische Reste für weitere π - π -Wechselwirkungen mit den Phenylgruppen von Phe und Cbz anbieten (siehe Tabelle S1 und Beschreibung in den Hintergrundinformationen).

Eine typische Fluoreszenzantwort von CS8 auf Z-L-Phe ist in Abbildung 2A,B zu sehen. Der Vorteil der dünnen MIP-Schale wird auch daran deutlich, dass ein vollständiges Gleichgewicht schon nach 15 s erhalten wird (Abbildung S5). Des Weiteren zeigt Abbildung 2 das unterschiedliche An-

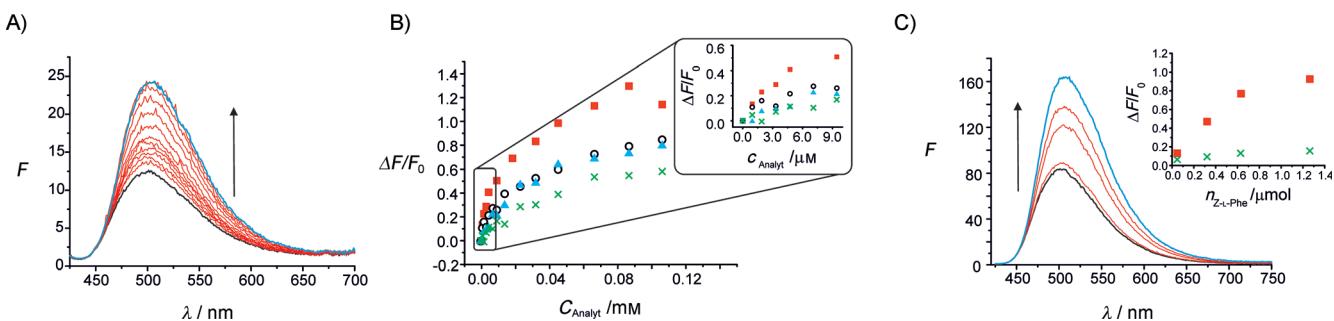


Abbildung 2. A) Fluoreszenzspektren von CS8 in CHCl_3 ohne (schwarz) und mit Z-L-Phe/TBA (rot: 0.001–0.085 mM, blau: 0.09 mM). B) Normierte Fluoreszenzänderungen $\Delta F/F_0$ (mit $\Delta F = F - F_0$) gegen die Analytkonzentration für CS8 und Z-L-Phe (rote Quadrate), CS8 und Z-D-Phe (blaue Dreiecke), CS8 und Z-L-Glu (Kreise) sowie CSN8 und Z-L-Phe (Kreuze; CSN8 ist das NIP-Analogon zu CS8). Die leichte Abnahme bei > 0.1 mM ist durch den Beginn der Deprotonierung bedingt. C) Fluoreszenzspektren von CS8 in der CHCl_3 -Phase ohne (schwarz) und mit unterschiedlichen Mengen an Z-L-Phe/TBA in der wässrigen Phase (rot: 0.1–0.7 μmol , blau: 1.4 μmol) (nach Rühren und Phasentrennung). Einschub: Entsprechende Fluoreszenztitrationskurven von CS8 (Quadrate) und CSN8 (Kreuze) mit Z-L-Phe (Symbole wie in B).

sprechverhalten von CS8-MIP und -NIP und die Diskriminierung gegenüber den beiden anderen hier untersuchten geschützten Aminosäuren.^[28] Auch CS8 reagiert auf Z-L-Phe mit einer Fluoreszenzverstärkung, allerdings nicht so deutlich wie molekulares **1** in CHCl₃ (Abbildung 1). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Umgebung um das in die Partikel-Schale eingebaute **1** polarer ist, was auch in Einklang damit ist, dass das Absorptionsmaximum von **1** in einer Suspension von CS8 in CHCl₃ mit 412 nm rotverschoben ist. Damit ähnelt es dem von reinem **1** in MeCN oder MeOH (beide 411 nm), während die Werte für **1** in CHCl₃ 403 und in Toluol 404 nm sind. Wenn weiter berücksichtigt wird, dass die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f von NBD-Farbstoffen mit zunehmender Lösungsmittelpolarität ansteigt^[17] und $\Phi_f(\mathbf{1})$ in CHCl₃ zu 0.002, in THF zu 0.01 und in MeCN zu 0.024 bestimmt wurde, unterstreicht der Φ_f -Wert von CS8 (0.015) die aus den Absorptionsmessungen abgeleitete Erklärung.^[29] Für Einzelpartikel-Assays wäre solch eine intrinsisch höhere Fluoreszenz der **1** enthaltenden Partikel sogar vorteilhaft, da ein ausreichendes Signal über den gesamten Konzentrationsbereich zu erwarten wäre. Analytische Untersuchungen mit CS8 in Küvettenexperimenten ergaben schließlich eine Bestimmungsgrenze von ca. 3 µm und eine Nachweisgrenze (3σ) von 60 nm für Z-L-Phe/TBA in CHCl₃.

Während sich die Partikel direkt für eine Beurteilung der Enantiomerenreinheit während der Synthese von stereochemisch reinen Wirkstoffen in organischen Lösungsmitteln in der pharmazeutischen Industrie eignen würden, ergaben Bindungsuntersuchungen in reinem Wasser kein messbares Ansprechen. Augenscheinlich ist die dünne Polymerschale nicht hydrophob genug, um einen über H-Brücken gebundenen Komplex vor konkurrierenden Wassermolekülen zu schützen, obwohl nur relativ unpolare Bausteine für sie verwendet wurden. Um das System für einen Einsatz in wässriger Lösung zu qualifizieren, haben wir daher ein Phasentransferprotokoll entwickelt. CS8 (10 mg) wurde dazu in einer 10-mm-Quarzküvette in CHCl₃ (2 mL) suspendiert und mit Wasser (1 mL) versetzt. Dann wurden 0.1–1.4 µmol des Zielmoleküls Z-L-Phe (als TBA-Salz) unter Rühren zugegeben und 5 min zur Phasentrennung gewartet. Nach der Messung der Fluoresenzspektren wurde der in der wässrigen Phase verbliebene Rest an Z-L-Phe mittels HPLC bestimmt (identische Kontrollexperimente ohne die Sensorpartikel wurden durchgeführt, um das Verteilungsgleichgewicht von Z-L-Phe im biphasischen System zu berücksichtigen). Abbildung 2C zeigt repräsentative Titrationsspektren und -kurven, die mit der indirekten HPLC-Methode verifiziert wurden. Es ist offensichtlich, dass zum einen das Aufleuchten der Fluoreszenz von CS8 in Gegenwart von Z-L-Phe im Extraktionsansatz erhalten bleibt, zum anderen die unspezifische Bindung sogar geringer ist (vgl. Daten von CSN8 in Abbildung 2C, Einschub); die Selektivität und die Ansprechzeit sind ebenfalls unverändert.

Uns ist es somit erstmals gelungen, ein fluoreszierendes Monomer in eine MIP-Matrix zu integrieren, die in einem analytisch wichtigen Wellenlängenbereich absorbiert und fluoresziert und die Bindung des Analyten durch ein Aufleuchten anzeigt. Die unspezifische Bindung und die Enantioselektivität sind erfreulich niedrig bzw. hoch, vor allem

wenn man letztere mit den Werten vergleicht, die bislang für MIP-Sensorsysteme mit Fluoreszenz^[11,30] oder anderen Detektionstechniken wie etwa der Quarzkristallmikrowaage^[31] publiziert wurden (<2). Der Einsatz des MIP als dünne Schale auf Silicatmikropartikeln macht das Handling der Sensorpartikel sehr einfach und ermöglicht schnelle Ansprechzeiten. Wir konnten zeigen, dass solch ein System nicht nur direkt in der pharmazeutischen Prozesskontrolle in organischen Lösungsmitteln, sondern auch mit einem einfachen Phasentransfer-Assay zum Nachweis von Analyten in wässriger Lösung eingesetzt werden kann. Aktuelle Arbeiten von anderen^[16] und unsere hier beschriebenen Befunde lassen auf eine leuchtende Zukunft von fluoreszierenden MIP-Sensorpartikeln hoffen.

Eingegangen am 14. Januar 2013,
veränderte Fassung am 18. April 2013
Online veröffentlicht am 28. Mai 2013

Stichwörter: Enantioselektivität · Fluoreszenz · Kern-Schale-Partikel · Molekular geprägte Polymere · Sensoren

- [1] a) M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 467–478; b) B. T. S. Bui, K. Haupt, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 2481–2492.
- [2] *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and Their Application in Analytical Chemistry* (Hrsg.: B. Sellergren), Elsevier, Oxford, **2000**.
- [3] N. M. Maier, W. Lindner, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 377–397.
- [4] J. Z. Hilt, M. E. Byrne, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1599–1620.
- [5] a) O. Y. F. Henry, D. C. Cullen, S. A. Piletsky, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 947–956; b) M. C. Moreno-Bondi, F. Navarro-Villalobos, E. Benito-Pena, J. L. Urraca, *Curr. Anal. Chem.* **2008**, *4*, 316–340.
- [6] a) A. M. Rosengren, B. C. G. Karlsson, I. Naslund, P. O. Andersson, I. A. Nicholls, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *407*, 60–62; b) F. J. Sainz-Gonzalo, A. L. Medina-Castillo, J. F. Fernandez-Sanchez, A. Fernandez-Gutierrez, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 3331–3338.
- [7] a) D. Kriz, O. Ramstrom, A. Svensson, K. Mosbach, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2142–2144; b) C. F. Chow, M. H. W. Lam, M. K. P. Leung, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *466*, 17–30.
- [8] a) K. Haupt, A. G. Mayes, K. Mosbach, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3936–3939; b) J. L. Urraca, M. C. Moreno-Bondi, G. Orellana, B. Sellergren, A. J. Hall, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4915–4923.
- [9] a) Y. Liao, W. Wang, B. H. Wang, *Bioorg. Chem.* **1999**, *27*, 463–476; b) R. Y. Liu, G. J. Guan, S. H. Wang, Z. P. Zhang, *Analyst* **2011**, *136*, 184–190.
- [10] a) J. Li, C. E. Kendig, E. E. Nesterov, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15911–15918; b) G. Gupta, A. S. B. Bhaskar, B. K. Tripathi, P. Pandey, M. Boopathi, P. V. L. Rao, B. Singh, R. Vijayaraghavan, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2534–2540.
- [11] P. Turkewitsch, B. Wandelt, G. D. Darling, W. S. Powell, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2025–2030.
- [12] T. H. Nguyen, R. J. Ansell, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1211–1220.
- [13] H. Kubo, N. Yoshioka, T. Takeuchi, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 359–362. Dies ist der einzige Bericht über eine integrierte Sonde, die mit einer Fluoreszenzverstärkung reagiert, wobei die Emission allerdings im UV-Bereich liegt.

- [14] R. Wagner, W. Wan, M. Biyikal, E. Benito-Peña, M. C. Moreno-Bondi, I. Lazraq, K. Rurack, B. Sellergren, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1377–1389.
- [15] Nanopartikel(NP)-Luminophore wie Quantenpunkte (H. B. Li, Y. L. Li, J. Cheng, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 2451–2457) oder „carbon dots“ (Y. Mao, Y. Bao, D. Han, F. Li, L. Niu, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *38*, 55–60) wurden aktuell in MIPs eingesetzt, wobei die Signalgebung meist über Fluoreszenzlösung passiert. Des Weiteren sind die Wechselwirkungen zwischen Analyt und Luminophor auf die Grenzschicht zwischen NP und umgebender MIP-Schicht oder -Matrix begrenzt und extrem abstandsabhängig. Die NPs sind häufig zu groß, um selbst signifikant zur Kavitätsbildung beitragen zu können. Fluoreszenzverstärkung wurde in einem sehr speziellen Fall, der Prägung von CdTe-Quantenpunkten mit Cd²⁺-Ionen, verwirklicht: P. Wu, X.-P. Yan, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7046–7048.
- [16] Ein weiterer interessanter Ansatz beruht auf der Lokalisierung von Fluorophoren an der Grenzschicht zwischen der MIP-Schale und dem Dendrimerkern eines Mikropartikels. Änderungen in der Solvatation der Fluorophore nach Templatbindung in der äußeren MIP-Schale bewirken hier eine Fluoreszenzverstärkung: P. K. Ivanova-Mitseva, A. Guerreiro, E. V. Piletska, M. J. Whitcombe, Z. Zhou, P. A. Mitsev, F. Davis, S. A. Piletsky, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5286–5289; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5196–5199.
- [17] S. Fery-Forgues, J.-P. Fayet, A. Lopez, *J. Photochem. Photobiol. A* **1993**, *70*, 229–243.
- [18] a) R. A. Kenner, A. A. Aboderin, *Biochemistry* **1971**, *10*, 4433–4440; b) Y.-K. Tsui, S. Devaraj, Y.-P. Yen, *Sens. Actuators B* **2012**, *161*, 510–519.
- [19] S. Uchiyama, T. Santa, T. Fukushima, H. Homma, K. Imai, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 2165–2173.
- [20] V. D. Salian, A. D. Vaughan, M. E. Byrne, *J. Mol. Recognit.* **2012**, *25*, 361–369.
- [21] V. Amendola, D. Esteban-Gómez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 343–353.
- [22] A. B. Descalzo, K. Rurack, H. Weisshoff, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, P. Amorós, K. Hoffmann, J. Soto, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 184–200.
- [23] M. Boiocchi, L. Del Boca, D. Esteban-Gómez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, E. Monzani, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3097–3104.
- [24] Zusammen mit $c = 1 \text{ mm}$ für **1** und Z-L-Phe/TBA bedeutet $\lg K = 5.11$, dass in der Prä-Polymerisationslösung mehr als 99.7 % von **1** komplexiert sind, d.h., dass stöchiometrische Prägebedingungen herrschen.
- [25] M. Boiocchi, L. Del Boca, D. E. Gómez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, E. Monzani, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16507–16514.
- [26] R. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu, H.-A. Klok, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5437–5527; M. R. Halhalli, C. S. A. Aureliano, E. Schillinger, C. Sulitzky, M. M. Titirici, B. Sellergren, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1033–1042; M. R. Halhalli, E. Schillinger, C. S. A. Aureliano, B. Sellergren, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 2909–2919.
- [27] S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *641*, 7–13.
- [28] Kontrollexperimente, bei denen Z-D-Phe als Templat verwendet wurde, ergaben ähnliche Prägefaktoren für das MIP und das NIP sowie Enantioselektivitäten wie bei Z-L-Phe als Templat. Zudem fluoreszieren die eingesetzten Aminosäuren unter unseren spektroskopischen Bedingungen nicht (siehe Abbildung S6).
- [29] UV/Vis-Messungen bei 265 nm (Absorptionsbande von Z-L-Phe) ergaben, dass das Templat aus der dünnen Schale quantitativ extrahiert wird.
- [30] N. Yoshioka, T. Takeuchi, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 359–362.
- [31] Y. Liu, H. Peng, L. Nie, S. Yao, *Instrum. Sci. Technol.* **2002**, *30*, 455–464.