

POLIMERY Z ODCISKIEM MOLEKULARNYM JAKO BIOMIMETYKI METALOENZYMÓW

MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS AS BIOMIMETICS OF METALLOENZYMES

**Joanna Czulak*, Andrzej Trochimczuk,
Anna Jakubiak-Marcinkowska**

*Zakład Materiałów Polimerowych i Węglowych, Wydział Chemiczny,
Politechnika Wrocławska
ul. C.K. Norwida 4/6, 50-373 Wrocław
e-mail: joanna.czulak@pwr.edu.pl

Abstract

Wstęp

1. Biomimetyki metaloenzymów

- 1.1. Układy zawierające w swoim centrum aktywnym jony Cu(II)
- 1.2. Układy zawierające w swoim centrum aktywnym jony Co(II)
- 1.3. Układy zawierające w swoim centrum aktywnym jony Zn(II)
- 1.4. Układy zawierające w swoim centrum aktywnym jony Ni(II)
- 1.5. Układy zawierające w swoim centrum aktywnym jony Fe(III)

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Joanna Czulak ukończyła studia na kierunku Technologia Chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej w 2010 roku. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie na kierunku Chemia. W ramach badań zajmuje się syntezą oraz badaniem polimerów z odciskiem molekularnym do zastosowań w katalizie oraz analityki. Jej badania skupiają się głównie na biomimetykach metaloenzymów oraz sorbentach beta-blokerów.



Prof. dr hab. inż. Andrzej Trochimczuk (r. 1959), absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej z roku 1983 roku. Doktorat (1990) i habilitację (2001) uzyskał na macierzystym Wydziale, a w roku 2008 otrzymał tytuł profesora nauk chemicznych. Specjalista w zakresie chemii polimerów, syntezy polimerów specjalnych, takich jak jonity, żywice chelatujące i adsorbenty, a także w zakresie technik separacyjnych wykorzystujących te materiały. Opublikował ponad 150 prac, które były cytowane w literaturze ponad 1100 razy.



Dr inż. Anna Jakubiak-Marcinkowska ukończyła studia na kierunku Biotechnologia na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej w 2003 roku. W 2008 roku uzyskała tytuł doktora nauk chemicznych w dyscyplinie biotechnologia, specjalności biotechnologia molekularna, po czym w tym samym roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Materiałów Polimerowych i Węglowych Politechniki Wrocławskiej. Jej zainteresowania naukowe dotyczą głównie polimerów specjalnych – metod ich syntezy oraz możliwości wykorzystania jako m.in. katalizatory, sorbenty, sensory, nośniki enzymów i substancji biologicznie aktywnych. Od czasów studiów doktoranckich głównym tematem prowadzonych przez nią badań są układy polimerowe naśladujące cząsteczki naturalne dla zastosowań w ochronie środowiska, chemii organicznej, medycynie i farmacji.

ABSTRACT

This paper presents methods of the synthesis and applications of biomimetic catalytic systems produced from molecularly imprinted polymers (MIP). MIPs contain cavities, which are complementary to the imprinted template, thus possess high selectivity and affinity for the molecules resembling template. MIPs have various applications such as: sorption, chromatography, solid phase extraction, drugs transport and catalysis. However, this article is a review of catalytic systems containing in their active sides one of the selected metal ions: copper(II), cobalt(II), zinc(II), iron(III) or nickel(II). Presented catalytic systems are used in hydrolysis, oxidations, hydrogenations and aldol condensation reactions. This review deals with papers published till 2013.

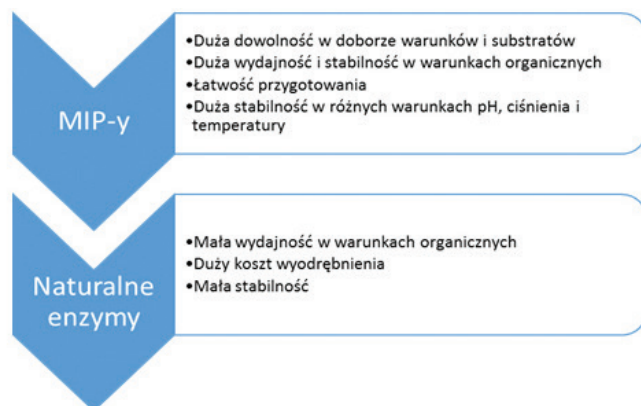
Keywords: molecularly imprinted polymers, biomimetic catalytic systems, hydrolysis, oxidations, hydrogenations, aldol condensations

Słowa kluczowe: polimery z odciskiem molekularnym, biomimetyki metaloenzymów, kataliza, reakcjach hydrolizy, reakcje utleniania, reakcje uwodornienia, kondensacja aldolowa

WSTĘP

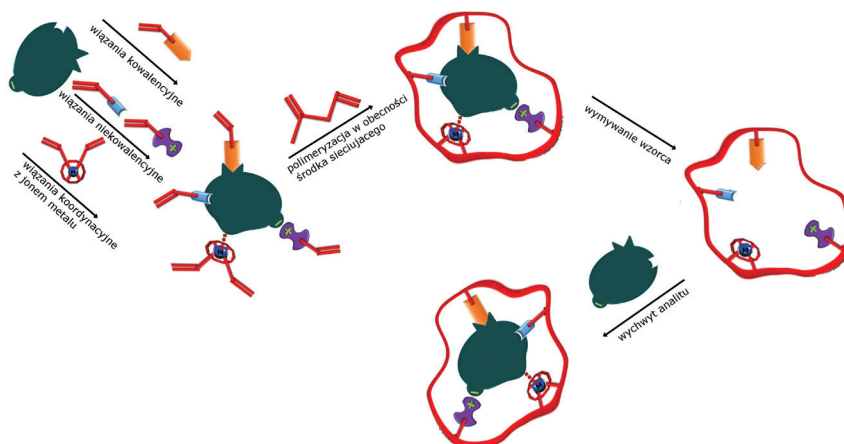
Znakomita większość reakcji chemicznych wykorzystywanych przemysłowo to reakcje katalizowane. Stąd też w wielu ośrodkach naukowych prowadzone są badania dotyczące syntezy nowych katalizatorów oraz ulepszania już znanych układów katalitycznych. Jednocześnie obserwuje się stałą tendencję dostosowywania się do zasad 'zielonej chemii'. W syntezie chemicznej i katalizie polega to na takim dopasowaniu układu katalitycznego by reakcja mogła zachodzić z bardzo dobrą wydajnością oraz selektywnością w możliwie najniższej temperaturze oraz, jeśli to możliwe, w układzie bez rozpuszczalnika lub w rozpuszczalniku przyjaznym środowisku. W tym obszarze badań enzymy cieszą się powszechnym zainteresowaniem ze względu na zdolność katalizowania różnych reakcji oraz ich selektywność. Dodatkowo reakcje takie mogą przebiegać w temperaturach tylko nieznacznie wyższych od temperatury pokojowej. Dzięki temu enzymy mają szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym i poza nim [1, 2]. Jedną z ciekawych grup enzymów są oksydoreduktazy, które wykorzystuje się m.in. w przemyśle piekarniczym, mleczarskim i piwowarskim. Największym zainteresowaniem cieszą się hydrolazy, które oprócz wyżej wymienionych zastosowań mają duży udział przy produkcji soków, karmy dla zwierząt [3], jedzenia dla niemowląt, w przemyśle tekstylnym [4], przemyśle papierniczym oraz przy wytwarzaniu kosmetyków, środków do prania, pozostałych detergentów czyszczących, w procesach oczyszczania wody oraz w przemysłowych reakcjach polimeryzacji. Jednak z wykorzystaniem enzymów wiążą się liczne problemy, jak na przykład trudność ich izolacji, a co za tym idzie duże koszty, dezaktywacja enzymów w pH odbiegającym znacząco od pH natywnego, temperatury lub pod wpływem organicznych rozpuszczalników (Rys. 1). Wady te można wprawdzie ograniczyć np. poprzez immobilizację enzymów na nierozpuszczalnych nośnikach, ale zwykle wiąże się to ze zmniejszeniem aktywności enzymu i problemem stabilności układu nośnik-enzym w czasie. Interesującym rozwiązaniem problemu jest zsyntetyzowanie sztucznych analogów enzymów, które nie posiadając wad enzymów natywnych związanych z podatnością na denaturację, będą działać ze zbliżoną do nich efektywnością i selektywnością. W taki sposób rozpoczęto badania nad polimerowymi matrycami z odciskiem molekularnym MIP (ang. *Molecularly Imprinted Polymers*). W MIP-ach starano się odtworzyć centrum aktywne enzymów poprzez przestrzenne uporządkowanie grup funkcyjnych polimeru wokół cząsteczki wzorca.

W literaturze jest dostępnych kilka artykułów przeglądowych, poruszających tematykę syntezy i zastosowania układów MIP [5–12]. Technika wdrukowywania molekularnego znalazła szerokie zastosowanie, między innymi przy syntezie materiałów do chromatograficznego rozdzielania enancjomerów z mieszanin racemicznych, w sensoryce [10], w analizie sorpcyjnej, ekstrakcji i zateżaniu substancji. MIP-y wykorzystuje się również przy wykrywaniu antybiotyków i innych związków opartych na konkurencyjnej wymianie grup, które są zdolne do fluorescencji [13] z miejsc wiążących w matrycy polimerowej, a także jako selektywne nośniki leków, uwalniające substancję czynną w pożądanym miejscu [11, 14, 15].



Rysunek 1. Porównanie właściwości naturalnych biocząsteczek oraz układów MIP [16]
 Figure 1. Comparison of the properties of native biomolecules and MIPs [16]

Technika wdrukowywania molekularnego polega na polimeryzacji monomeru funkcyjnego (lub monomerów) z monomerem sieciującym w obecności wzorca oraz porotwórczego rozpuszczalnika [17]. Dzięki obecności porów w matrycy polimerowej jest możliwe usunięcie wzorca poprzez ekstrakcję odpowiednim rozpuszczalnikiem lub zmianę pH. W końcowym etapie powstają wnęki katalityczne komplementarne kształtem i funkcjonalnością do odciskanego wzorca (Rys. 2).



Rysunek 2. Mechanizm wdrukowywania molekularnego [17]
 Figure 2. Schematic illustration of molecular imprinting technique [17]

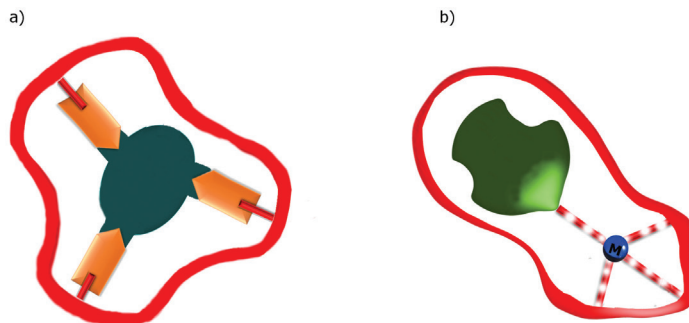
Jedną z obiecujących technik wdrukowywania jest odcisk powierzchniowy, polegający na polimeryzacji emulsji W/O. Emulsja ta jest stabilizowana przez alifatyczny surfaktant, który tworzy na granicy faz kompleks z wzorcem i monomerami funkcyjnymi, co pozwala na odpowiednią ich orientację w przestrzeni. Wprowadzając dodatkową fazę wodną (emulsja W/O/W) możliwe jest otrzymanie sferycznych

kulek polimerowych, bez konieczności kruszenia i przesiewania powstałego polimeru. Dodatkowo pozwala to na umieszczenie wnęk wiążących na powierzchni matrycy polimerowej, ułatwiając tym samym dotarcie do nich substratu i wyeliminowanie problemów z dyfuzją do wnętrza matrycy.

Podstawowy podział monomerów funkcyjnych obejmuje ich charakter chemiczny. Możemy wyróżnić monomery kwasowe, zasadowe i obojętne. Dobór odpowiedniego rodzaju monomeru dyktowany jest, między innymi przez rodzaj użytego wzorca i analizowanej substancji. Monomer sieciujący odgrywa kluczową rolę, ponieważ w zależności od jego ilości można uzyskać różne właściwości fizykochemiczne i morfologię polimeru (m.in.: całkowitą powierzchnię aktywną, objętość i średnicę porów, stopień pęcznienia polimeru oraz sztywność matrycy polimerowej) [18, 19]. Jedną z wielu zalet techniki wdrukowywania molekularnego jest fakt, że wdrukowywaniu może ulegać bardzo wiele związków (wzorców). Natomiast rozpuszczalniki, nie biorące udziału w procesie polimeryzacji (porogeny), wpływają zarówno na dynamikę procesu wdrukowywania jak i na budowę fizyczną polimeru i związane z tym cechy układów MIP (struktura porów, rozkład wielkości porów, pęcznienie, morfologia, odporność na obciążenia dynamiczne [17]).

W zależności od zastosowanych reagentów i warunków wdrukowywania molekularnego, możemy uzyskać różne rodzaje wiązań we wnękach polimeru: kowalencyjne, niekowalencyjne, wiązania koordynacyjne z jonami metali w centrum aktywnym. W przypadku enzymów reaktywne centra z jonem metalu są umieszczone w cząsteczce białka w ściśle zdefiniowanym miejscu, kompensując brak selektywności jonów metalu. MIP-y o dużym stopniu usieciowania z jonem metalu w centrum aktywnym są idealnymi matrycami do prowadzenia katalizowanych reakcji, z jonem metalu przejściowego, jako że dostęp do substratu jest ograniczony przez szkielet polimeru i geometrię miejsc aktywnych. Kombinacja immobilizowanego metalu przejściowego z układami MIP tworzy system katalityczny bardzo zbliżony do tych istniejących w metaloenzymach, jako że proces katalityczny jest kontrolowany przez warunki koordynacyjne panujące w dobrze zdefiniowanej wnęce. Powstała wnęka z odpowiednim jonem metalu powinna stabilizować stan przejściowy znacznie silniej niż stan podstawowy substratów oraz produktów, zapobiegając inhibicji wnęki [6]. Można spotkać się z dwoma głównymi strategiami tworzenia układów MIP o właściwościach katalitycznych: pierwsza to wprowadzanie do wnęki odpowiednich grup funkcyjnych aktywnych katalitycznie i zdolnych do wychwytu substratu, natomiast druga metoda opiera się na immobilizacji jonu metalu lub kompleksu metalu o małej masie, który już sam w sobie wykazuje właściwości katalityczne [20, 21]. W przypadku drugiej metody następuje znaczny wzrost selektywności i aktywności powstałych w ten sposób biomimetyków enzymów, co znacznie zwiększa jej atrakcyjność. Dodatkowo w bliskim sąsiedztwie jonów metalu (kompleksu zawierającego jon metalu), tworzy się wnęka zdolna do wychwytu substratu (Rys. 3), poprzez wdrukowywanie kompleksu metal-wzorzec. Tak wytworzone polimerowe analogi enzymów znalazły zastosowanie w wielu reakcjach takich jak: dehydrofluorowanie,

hydroliza, reakcje Dielsa–Aldera, kondensacja aldolowa, izomeryzacja, reakcje stereoselektywne i regioselektywne [5, 16, 19, 22–24].



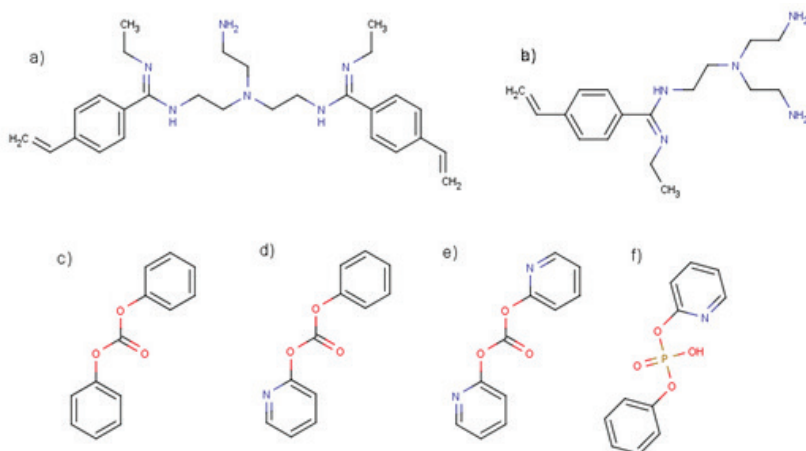
Rysunek 3. Strategie tworzenia układów MIP o właściwościach katalitycznych: a) tworzenie wnęki z grupami funkcyjnymi aktywnymi katalitycznie przy użyciu stabilnego analogu stanu przejściowego, b) wdrukowywanie kompleksu metal–wzorzec

Figure 3. Strategies for creating of MIP with catalytic properties: a) formation of the cavity with catalytically active functional groups using the stable transition state analogue, b) imprinting of metal-temple complex

1. BIOMIMETYKI METALOENZYMÓW

1.1. UKŁADY ZAWIERAJĄCE W SWOIM CENTRUM AKTYWNYM JONY Cu(II)

Układy z jonami miedzi wykazują dużą stabilność i często dużo lepszą aktywność katalityczną w porównaniu do układów zawierających inne metale. Zespół Wulffa, próbując wytworzyć system katalityczny zbliżony swoją budową do karboksypeptydazy A, zastąpił jony cynku(II), występujące naturalnie w tym enzymie, jonami miedzi(II) w celu utworzenia bardziej stabilnego kompleksu między monomerami, wzorcem oraz jonem metalu [25]. Przeprowadzono reakcję hydrolizy trzech różnych substratów węglanowych: węglanu difenyłu (Rys. 4c), węglanu fenylo-2-pirydylowego (Rys. 4d) oraz węglanu di-2,2-pirydylowego (Rys. 4e) na katalizatorze zsyntetyzowanym w obecności stabilnego analogu stanu przejściowego (fosforan fenylo-2-pirydylowy, Rys. 4f). Jako monomer funkcyjny zastosowano pochodną winylobenzamidyny (Rys. 4a), zawierającą trzy atomy azotu zdolne do tworzenia wiązań koordynacyjnych z jonem miedzi(II), dzięki czemu uzyskano dwufunkcyjny katalizator (PCu4a,4f – liczby oznaczają kolejno monomer a oraz wzorzec f).

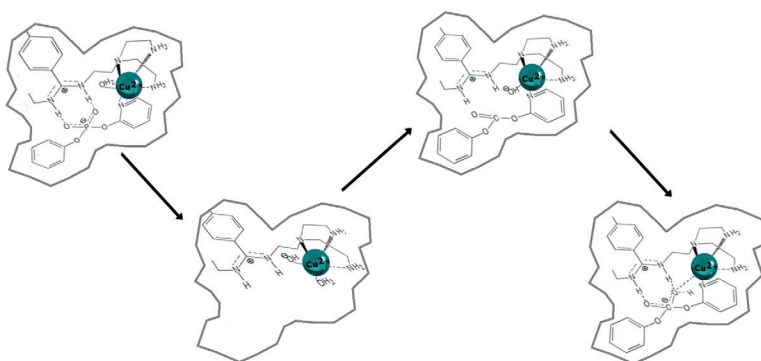


Rysunek 4. Wzory związków użytych do syntezy MIP-ów oraz substratów wykorzystanych w reakcjach katalizy [25, 26]

Figure 4. Compounds used in the synthesis of described MIPs and substrates used in catalytic reactions [25, 26]

Reakcję prowadzono w mieszaninie buforu HEPES i acetonitrylu (1:1, pH = 7,3) w temperaturze 20°C. Dla porównania przeprowadzono reakcje bez katalizatorów (w środowisku buforu) lub w obecności polimerów kontrolnych zsyntetyzowanych bez udziału wzorca (CPCu4a).

Zastosowanie nowych substratów, zawierających jedną lub dwie grupy pirydylowe (Rys. 4d i 4e) pozwoliło na lepsze ich związanie w centrum aktywnym. W trakcie katalizowanej reakcji najpierw następuje atak grupy hydroksylowej na węgiel grupy karbonylowej substratu. Następnie protonowa forma grupy amidynowej aktywuje całą grupę karbonylową (Rys. 5).



Rysunek 5. Mechanizm tworzenia odcisku molekularnego oraz reakcji katalizowanej w biomimetykach karboksypeptydazy A [25]

Figure 5. The mechanism of formation of molecularly imprinted polymers and reaction catalyzed with biomimetics of carboxypeptidase A [25]

Tabela 1. Porównanie wyników reakcji hydrolizy dla polimerów kontrolnych i biomimetyków karboksypeptydazy A z jonami Cu(II) w zależności od użytego substratu [25, 26]

Table 1. Comparison of the hydrolysis reaction's results for control polymers and biomimetics of carboxypeptidase A with Cu (II) ions, according as the chosen substrate [25, 26]

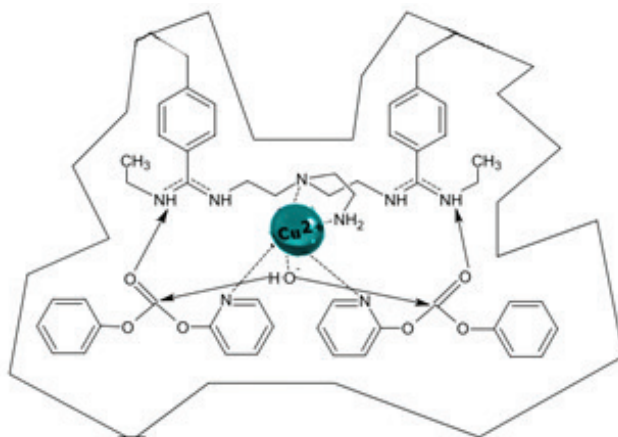
Polimer (zastosowany monomer/wzorzec)	Substrat (rys.)	$k_{\text{impr}}/k_{\text{soln}}$	$k_{\text{impr}}/k_{\text{kont}}$	$k_{\text{kat}}/k_{\text{soln}}$	$k_{\text{kat}}^{[\text{min}^{-1}]}$	K_m [mM]
PCu(4a/4f)	4c	8 015	49,0	–	–	–
PCu(4a/4f)	4d	15 700	76,9	75 700	2,87	0,65
CPCu(4a)	4d	–	–	946	0,035	4,25
PCu(4a/4f)	4e	76 570	80,1	110 000	28	0,58
CPCu(4a)	4e	–	–	1 450	0,37	6,10
Karboksypeptydaza A	4c	–	–	810	–	–
PZn(4a/4f)Cu	4d	9 250	63,2	40100	10,2	0,73
PCu(4b/4f)	4d	98 200	50,2	–	–	–
PCu(4b/4f)	4e	217 000	53,8	413 000	105	0,36

$k_{\text{impr, kont}}$ – stała szybkości reakcji pierwszego rzędu katalizowanej polimerami z odciskiem molekularnym, bez odcisku (polimer kontrolny)
 k_{soln} – stała szybkości reakcji biegnącej w roztworze buforu HEPES/MeCN (1:1)
 k_{kat} – aktywność molekularna (liczba cząsteczek substratu, które w danej jednostce czasu mogą zostać przekształcone w produkt przez enzym w pełni wysycony substratem)

Jak przedstawiono w tabeli powyżej, dla katalizowanej reakcji substratu z dwiema grupami pirydylowymi stosunek $k_{\text{impr}}/k_{\text{soln}}$ jest prawie 5 razy większy niż dla pochodnej z jedną grupą pirydylową, a stała Michaelisa (K_m) dla takich układów jest mniejsza, co wskazuje na większe powinowactwo centrum aktywnego katalizatora do substratu. W przypadku substratów z grupami pirydylowymi (Rys. 4d i 4e) reakcja w obecności układów z odciskiem molekularnym jak i bez odcisku molekularnego zachodzi lepiej niż dla naturalnego enzymu ($k_{\text{kat}}/k_{\text{soln}}$, Tab. 1). Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, iż już sama obecność jonów miedzi(II) zwiększa aktywność katalityczną w porównaniu do karboksypeptydazy A zawierającej jony cynku(II).

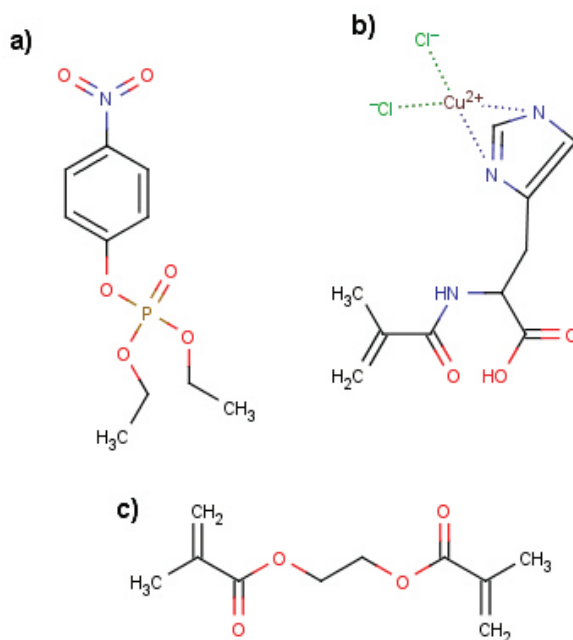
W dalszych badaniach tego samego zespołu, wytworzono układy, w których dwie grupy amidynowe znajdują się w jednym centrum aktywnym (Rys. 6) [26]. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu nowego monomeru funkcyjnego (zsyntezowanego również przez tych samych badaczy), którego dwie grupy są koordynowane przez jon miedzi(II) (Rys. 4b). Tak wytworzone katalizatory wykazują znacznie większą aktywność katalityczną w porównaniu do układów zawierających w centrum aktywnym po jednej grupie amidynowej (monomer Rys. 4a). Warto podkreślić, iż jest to najwyższa aktywność katalityczna jaką udało się do tej pory uzyskać dla polimerów z odciskiem molekularnym. Dodatkowo wyniki badań wykazują, iż jony miedzi(II) – zastosowane już na etapie polimeryzacji (PCu4b,4f) – znacznie zwiększają zdolność MIP-ów do hydrolizy substratu d i e (Rys. 4). W przypadku gdy do syntezy biomimetyków wykorzystano jony Zn(II), a następnie zastąpiono je jonami miedzi(II) (PZn4a,4fCu), nie uzyskano tak dużych stopni przereagowania jak w przypadku

polimeru PCu4b,4f. Jednakże ten sam katalizator wykazuje większą aktywność w porównaniu do reakcji prowadzonych w obecności MIP-ów zawierających jony Zn(II) w centrum katalitycznym (Tab. 1).



Rysunek 6. Schemat centrum aktywnego zawierającego dwie grupy amidynowe [26]

Figure 6. Schemat of active side with two amidinium groups [26]



Rysunek 7. Wzory monomerów oraz wzorca zastosowanego przez R. Say do wytworzenia biomimetyków hydrolaz triestrów fosforowych [27]

Figure 7. Monomers and template used by Say to produce biomimetics of triphosphate hydrolase [27]

W celu wytworzenia efektywnych biomimetyków hydrolaz triestrów kwasów fosforowych, zdolnych do hydrolizy pestycydów, Say z zespołem zsyntetyzowali polimer z odciskiem molekularnym fosforanu dietylo-4-nitrofenylowego (pełniącego jednocześnie funkcję substratu, Rys. 7a). Polimeryzację monomeru funkcyjnego (kompleksu metakrylanu histydyny-Cu(II), MAH-Cu(II), Rys. 7b) oraz monomeru sieciującego (dimetakrylanu glikolu etylenowego, EDMA, Rys. 7c) przeprowadzono metodą odcisku powierzchniowego (w obecności acetonitrylu jako porogenu) [27]. Zastosowanie MAH-Cu(II) pozwala na uzyskanie we wnęce katalitycznej pKa zbliżonego do tego występującego w naturalnych enzymach (pKa = 6,2, dzięki obecności grupy histydylowej). Dodatkowo grupa histydylowa umożliwia polaryzację wiązania fosfor – tlen obecnego w cząsteczce substratu. Zbadano również wpływ pH na aktywność katalityczną, a optymalne warunki reakcji ustalono dla pH = 9.

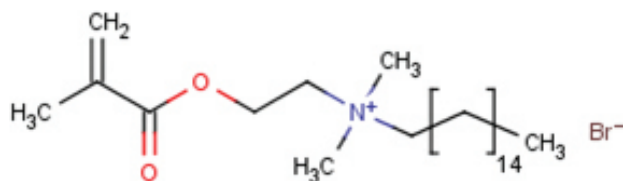
Autorzy, porównując kinetykę Michealisa-Menten naturalnych enzymów z wytworzonymi katalizatorami (w odniesieniu do analogów fosforanu dietylo-4-nitrofenylowego), stwierdzili, że przy zbliżonej wartości K_m , zsyntetyzowany enzym wykazuje mniejszą aktywność molekularną (Tab. 2). Jednakże biomimetyki te mogą być wykorzystywane kilkakrotnie bez znacznego zmniejszenia ich aktywności katalitycznej. Po 5 cyklach istnieje możliwość ponownego użycia katalizatora, a maksymalne zmniejszenie jego aktywności było równe 17%.

Tabela 2. Porównanie parametrów Michaelisa-Menten dla polimerów z odciskiem molekularnym (PIB-Cu, NIPO-Cu), polimerów kontrolnych (NIB-Cu, NIPO-Cu) i naturalnego enzymu [27, 28]

Table 2. Comparison of Michaelis-Menten parameters for imprinted (PIB-Cu, NIPO-Cu), non-imprinted polymers (NIB-Cu, NIPO-Cu) and native enzymes [27, 28]

Polimer	K_m [mM]	k_{kat} [min^{-1}]
PIB-Cu	1,28	$1,58 \cdot 10^{-3}$
NIB-Cu	4,17	–
PIPO-Cu	0,18	$3,10 \cdot 10^{-2}$
NIPO-Cu	2,66	$0,08 \cdot 10^{-2}$
fosfotriesteraza wyodrębniona z <i>Pseudomonas diminuta</i>	$0,09 \cdot 10^{-3}$	$1,32 \cdot 10^5$

Ten sam zespół opublikował w 2010 roku wyniki badań nad zmodyfikowanym nanokompozytem z odciskiem molekularnym [28]. Zastosowano ten sam wzorzec (Rys. 7a), monomer funkcyjny (MAH-Cu(II), Rys. 7b) oraz monomer sieciujący (EDMA, Rys. 7c), jako porogenu ponownie użyto acetonitrylu. Jednak tym razem całość zsyntetyzowano w obecności zmodyfikowanego smektytu, gdzie funkcję modyfikatora pełnił bromek (2-metakryloiloksyetylo)-dimetyloheksadecyloamoniowy (MOEDMAC₁₆, Rys. 8) przedstawiony na rysunku poniżej:

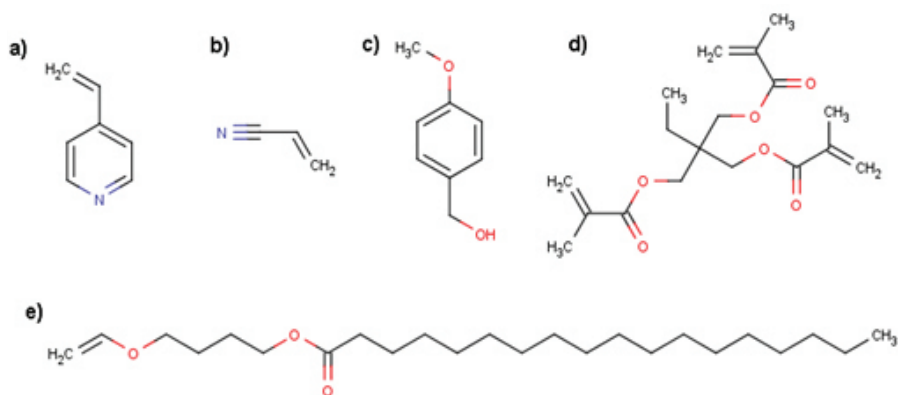


Rysunek 8. Wzór środka modyfikującego MOEDMAC₁₆ wykorzystanego przy tworzeniu nanokompozytów z odciskiem molekularnym [28]

Figure 8. Modifying agent MOEDMAC₁₆ used in formation of nanocomposites with molecular imprinting [28]

Właściwości fizykochemiczne i budowę zsyntetyzowanego katalizatora z odciskiem molekularnym (określanego jako PIPO-Cu) porównano z katalizatorem bez odcisku molekularnego (NIPO-Cu) oraz ze zmodyfikowanym (OM) i niemodyfikowanym montmorylonitem (M). Skład ilościowy uzyskanych katalizatorów potwierdzono poprzez badania w podczerwieni (FTIR). Chłonność wody była większa dla katalizatora z odciskiem, co wiąże się z obecnością wnęk po wzorcu (52% vs 48% dla katalizatora bez odcisku). Ta sama tendencja przekłada się na całkowitą powierzchnię porów, która rośnie w kolejności M < OM < NIPO-Cu < PIPO-Cu (kolejno 35,6 < 37,1 < 48,1 < 77,1 m²/g). Zarówno PIPO-Cu i OM wykazują większą odporność na degradację termiczną do 200°C niż M. Jak oczekiwano katalizator z odciskiem molekularnym wykazuje większą aktywność katalityczną (k_{kat}/K_m) niż polimer zsyntetyzowany bez obecności wzorca (387 razy). Jednocześnie aktywność molekularna (k_{kat}) dla PIPO-Cu jest 20-krotnie większa niż dla wcześniej opisanego katalizatora NIP-Cu [27]. Jednak uzyskane układy wciąż wykazują mniejszą aktywność katalityczną niż naturalne hydrolazy triestrów kwasu fosforowego (Tab. 2). PIPO-Cu charakteryzuje się dużą selektywnością w stosunku do fosforanu dietylo-4-nitrofenylowego, a jego aktywność katalityczna (k_{kat}/K_m) w tej reakcji jest 391 razy większa niż w przypadku hydrolizy analogu substratu (fosforotnianu O-(4-nitrofenylo)-O,O-dietylowego).

Kolejnym przykładem układów zsyntetyzowanych metodą odcisku powierzchniowego są katalizatory wytworzone na bazie 4-winylopirydyny (Rys. 9a, seria A), akrylonitrylu (AN, Rys. 9b, seria B) oraz trimetakrylanu 2-etylo-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiolu (TMPMA – monomer sieciujący, Rys. 9d). Polimeryzację przeprowadzono w obecności wzorca (alkoholu *p*-metoksybenzylowego – MBA, Rys. 9c) oraz porotwórczego rozpuszczalnika (cykloheksanolu) [29].



Rysunek 9. Wzory związków użytych do syntezy układów MIP wykorzystywanych w reakcji utleniania pochodnych fenoli [29]

Figure 9. Compounds used in the synthesis of MIPs applied in the oxidation of phenol derivatives [29]

W pierwszym etapie badań polimery otrzymano metodą odcisku objętościowego. W serii B – po wprowadzeniu AN do mieszaniny polimerizacyjnej – wykorzystano metodę odcisku powierzchniowego przy zastosowaniu monomeru powierzchniowo czynnego (stearynianu 4- winylooksybutylowego, Rys. 9e). Aktywność katalityczną sprawdzano w reakcji utleniania hydrochinonu (H₂Q) oraz 2,5-di-*tert*-butylohydrochinonu w obecności nadtlenu wodoru. Skład ilościowy zsyntetyzowanych katalizatorów został potwierdzony w badaniach w podczerwieni metodą FTIR. Wykazano, iż aktywność katalityczna wytworzonych układów zależy między innymi od obecności jonów miedzi(II) na etapie polimeryzacji oraz od stopnia obsadzenia jonami metalu podczas reakcji (określanego, jako ilość milimoli jonów metali przypadająca na jeden gram suchego polimeru [mmolCu²⁺/g]). Analiza EPR katalizatorów obsadzonych jonami metalu wskazała na istnienie centrów aktywnych głównie typu N2O2, gdzie jon miedzi(II) koordynuje dwie grupy pirydynowe oraz dwie grupy karboksylowe powstałe w wyniku hydrolizy TMPMA lub cząsteczki wody. Tego typu kompleksy są, obok N3O, najczęściej spotykane w naturalnych enzymach miedzowych i są odpowiedzialne za ich dużą aktywność katalityczną.

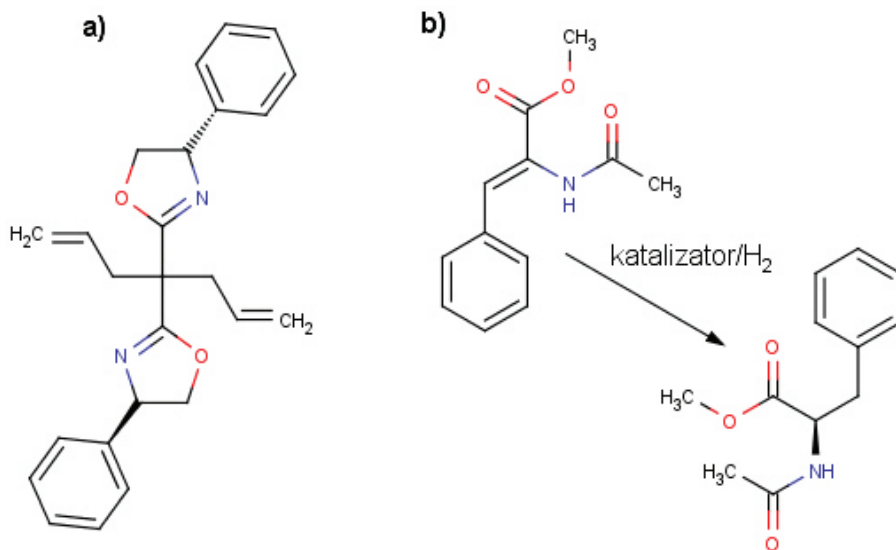
Porównując katalizatory z serii A (bez AN), ten o mniejszym obsadzeniu (0,02 mmol Cu²⁺/g) wykazuje większą aktywność katalityczną (40% przereagowania H₂Q) niż polimer o większym obsadzeniu (0,04 mmolCu²⁺/g, 15%). Tą samą tendencję można zaobserwować dla katalizatorów z serii B, zawierających w swojej budowie AN – zmniejszenie ilości Cu(II) związanej na nośniku polimerowym pozwoliło na lepszą izolację centrów aktywnych. Dodatkowo katalizatory z serii B mające zbliżone obsadzenie do katalizatorów z serii A wykazują znacznie lepszą aktywność katalityczną bez względu czy zostały otrzymane metodą odcisku objętościowego (0,03 mmol Cu²⁺/g, 75% ubytku substratu) czy powierzchniowego (0,02 mmol Cu²⁺/g, 100%). Wprowadzenie akrylonitrylu jako drugiego monomeru

spowodowało zwiększenie porowatości oraz sztywności układu, ułatwiając wnikanie substratu do centrum aktywnego. Dodatkowo polarne grupy -CN zwiększają oddziaływania substrat – matryca polimerowa, co jest widoczne jako wzrost aktywności oraz selektywności układów w stosunku do polimerów bez AN. Jednocześnie zastosowanie metody odcisku powierzchniowego pozwoliło na zwiększenie stopnia przereagowania względem hydrochinonu z 75% do 100%.

W przeprowadzonych badaniach te same układy polimerowe wykazują większą aktywność katalityczną względem drugiego substratu: 2,5-di-*tert*-butylohydrochinonu. Jednocześnie wzrost obsadzenia jonami metalu powoduje znacznie mniejszy spadek stopnia przereagowania w porównaniu do reakcji utleniania hydrochinonu.

W kolejnych badaniach tego samego zespołu 4-winylopirydynę zastąpiono 1-winyloimidazolem, jako analogiem grup histydylowych enzymów, co jednocześnie pozwoliło na dalszą modyfikację w celu uzyskania ugrupowań będących analogami cieczy jonowych, które mogą korzystnie wpływać na środowisko reakcji [30]. Modyfikację wyjściowych polimerów MIP przeprowadzono w dwóch etapach: poprzez alkilowanie a następnie wymianę jonów bromkowych na aniony tetrafluoroboranowe lub trifluorooctanowe. Wszystkie polimeryzacje zostały przeprowadzone metodą odcisku powierzchniowego. Powstałe układy, których nie poddano modyfikacji, wykazywały mniejszą aktywność katalityczną w porównaniu do polimerów z 4VP (12% konwersji H₂Q po 60 minutach; 0,05 mmol Cu²⁺/g). Aktywność katalityczna wzrosła jednak po wprowadzeniu wolnych, naładowanych grup usytuowanych w centrum aktywnym wokół kompleksów z jonami miedzi(II), jednocześnie zauważono, że aniony trifluorooctanowe wpływają na wzrost selektywności oraz stopnia przereagowania H₂Q bardziej niż aniony tetrafluoroboranowe. Takie zachowanie układów jest tłumaczone przez silny efekt indukcyjny atomów fluoru na grupy karboksylowe i wzrost siły kwasowej w centrum aktywnym, co wpływa na lepszą stabilizację reagentów w trakcie modelowej reakcji. Jednocześnie długość łańcucha alkilowego przy azocie grupy imidazoliowej nie wpływa na stopień konwersji H₂Q (grupa etylowa, butylowa, pentyłowa i heksylowa). W przypadku tak zsyntetyzowanych katalizatorów (analogi cieczy jonowej) nie zauważono wpływu obsadzenia jonami miedzi(II) w centrum aktywnym na aktywność katalityczną (jak to miało miejsce w układach z 4VP). Dla przykładu polimer z łańcuchem pentyłowym i anionami tetrafluoroboranowymi wykazywał nieznaczny wzrost stopnia przereagowania z 80% do 86% przy zmianie obsadzenia z 0,06 na 0,03 mmol Cu²⁺/g.

Kolejnym przykładem na zastosowanie jonów miedzi(II) w centrum aktywnym sztucznych katalizatorów są wytworzone przez Lee, Bernarda i Liu układy z chiralnymi ligandami *bis*-oksazoliny (Rys. 10a) jako monomerem funkcyjnym (4,4-bis-(4-fenyl-2-oksazolino)hepta-1,6-dien), wykorzystywane do asymetrycznego uwodornienia amin czwartorzędowych (w tym przypadku α -N-acetamidocynamonianu metylu, MAC) [31].



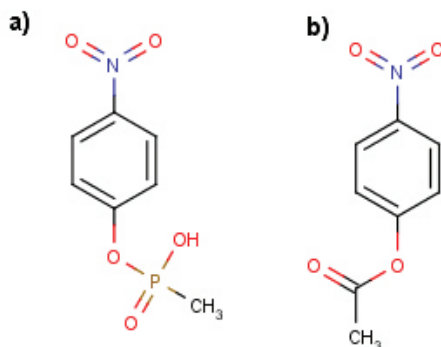
Rysunek 10. a) Wzór substratu wykorzystanego do tworzenia układów MIP dla zastosowań w reakcjach chiralnego uwodornienia, b) reakcja chiralnego uwodornienia MAC-u

Figure 10 a) Substrate used to create MIPs applied in a chiral hydrogenation reactions, b) the reaction of a chiral MAC hydrogenation

Jest to pierwszy przykład zastosowania jonów miedzi(II) w katalizie chiralnej – wcześniej wykorzystywano metale takie jak ruten lub rod, które dawały dobrą enancjoselektywność otrzymanego produktu (L enancjomeru). Wytworzony katalizator z odciskiem molekularnym Cu-MAC, w przeciwieństwie do układów z jonami Rh(I), charakteryzuje się dużą enancjoselektywnością w kierunku D enancjomeru (nadmiar enancjomeryczny – $ee = 82\%$). Wartość nadmiaru enancjomerycznego dla tego układu jest prawie dwukrotnie większa niż dla polimeru kontrolnego ($ee = 46\%$) oraz 27-krotnie niż dla reakcji prowadzonej w środowisku soli miedzowej kwasu trifluorometanosulfonowego ($ee=3\%$) (rys. 10b).

1.2. UKŁADY ZAWIERAJĄCE W SWOIM CENTRUM AKTYWNYM JONY Co(II)

Układy zawierające w centrach aktywnych jony kobaltu(II) wykazują dużą zdolność katalityczną. Jako jedni z pierwszych badania nad nimi rozpoczęli Robinson oraz Mosbach, którzy w matrycy poli[4(5)-winyloimidazolowej], z monomerem sieciującym (1,4-dibromobutan) odwzorowali analog stanu przejściowego (fosfonian *p*-nitrofenylowy, Rys. 11a) [32].

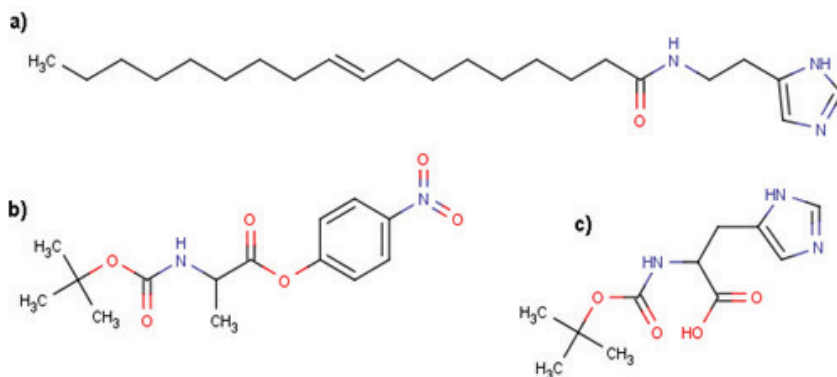


Rysunek 11. Wzory substratu i wzorca użytego przez Robinsona i Mosbacha w syntezie układów MIP z jonami kobaltu(II) [32]

Figure 11. Substrate and template used by Robinson and Mosbach in the synthesis of MIPs with cobalt(II) [32]

Tak wytworzone katalizatory zostały wykorzystane w reakcji hydrolizy octanu *p*-nitrofenylowego (Rys. 11b). Układy z odciskiem molekularnym wykazały ok. 60% zwiększenie aktywności katalitycznej w stosunku do polimeru kontrolnego (syntetyzowanego bez udziału wzorca). Dodatkowo, w reakcji inhibitowanej wzorcem, wraz ze wzrostem jego stężenia aktywność katalityczna znacznie zmalała, podczas gdy w przypadku polimeru kontrolnego nie zauważono takiej zależności. Takie wyniki są potwierdzeniem obecności wnęki katalitycznej komplementarnej kształtem i funkcjonalnością do wzorca.

Pracę nad podobnymi układami przeprowadził Toorisaka [33]. Zastosował on technikę odcisku powierzchniowego z wykorzystaniem specjalnie zsyntetyzowanego monomeru (N[2-(1H-imidazolo-4-ylo)etylenoamid kwasu oktadeka-9-eno-owego, 1C18IM, Rys. 12a) o dużej aktywności na granicy faz woda/olej. Jako wzorca użyto $N\alpha$ -*tert*-butoksykarbonylo-L-histydynę ($N\alpha$ -*t*-Boc-L-histydynę, Rys. 12c) będącą analogiem substratu (estru *p*-nitrofenylowego *t*-Boc-L-alaniny, Rys. 12b). Aktywność katalityczną wytworzonych układów sprawdzano w reakcji hydrolizy w zależności od rodzaju monomeru (1C18IM, 4VP), jego aktywności międzyfazowej, rodzaju rozpuszczalnika wykorzystanego w procesie hydrolizy oraz rodzaju substratu.



Rysunek 12. Wzory związków użytych do syntezy układów MIP metodą odcisku powierzchniowego [33]
 Figure 12. Compounds used in the synthesis of MIP by surface imprinting method [33]

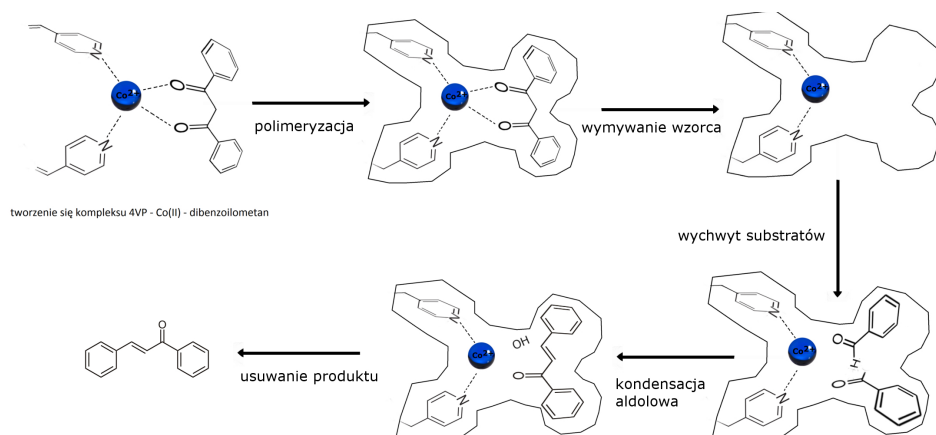
Wyniki wskazują, iż zastosowanie nowego monomeru znacznie wpływa na aktywność katalityczną w porównaniu z 4-winylopirydyną, która nie wykazuje aktywności międzyfazowej. W przypadku polimerów z 4VP centra aktywne występują również w objętości matrycy, przez co dostęp do nich jest utrudniony i pewnym stopniu zablokowany. Stopień hydrolizy po godzinie dla polimeru z 1C18IM dochodzi do około 100%, gdy dla katalizatora z 4VP nie osiąga nawet 20%.

Zastosowanie rozpuszczalników organicznych o budowie liniowej lub rozgałęzionej (*n*-tetradekan, izooktan) znacznie zwiększa aktywność katalityczną w porównaniu z rozpuszczalnikami o budowie cyklicznej (cykloheksan) i aromatycznej (toluen, *p*-ksylen). W celu sprawdzenia komplementarności wnęk zastosowano substraty o różnym stopniu podobieństwa do wzorca. Zgodnie z przypuszczeniami reakcja hydrolizy przebiegła najefektywniej dla substratu najbardziej zbliżonego swoją budową do wzorca. Podobnie jak w przypadku badań Mosbacha i Robinsona [32], przeprowadzono reakcje w obecności wzorca w różnym stosunku względem substratu. Wyniki ponownie potwierdziły, iż reakcje katalityczne zachodzą w wytworzonych na etapie polimeryzacji wnękach.

W pracy [34] wytworzono MIP-y z układem katalitycznym zbliżonym do tego występującego w hydrolazach triestrów kwasu fosforowego. Podobnie jak w opisywanej już pracy [27] zsyntetyzowano monomer z L-histydyny oraz chlorku kwasu metakrylowego, jednak jony miedzi(II) zastąpiono jonami kobaltu(II) (Rys. 7b). Całość poddano polimeryzacji suspensyjnej w obecności EDMA, jako monomeru sieciującego oraz fosforanu dietylo-4-nitrofenylowego (Rys. 7a) jako wzorca (i jednocześnie substratu). Polimeryzację przeprowadzono metodą odcisku powierzchniowego. Uzyskane katalizatory z odciskiem molekularnym PIB-Co wykazują większą aktywność katalityczną w stosunku do polimerów bez odcisku molekularnego NIP-Co ($K_m^{\text{PIB-Co}} = 0,25 \text{ mM}$, $K_m^{\text{NIP-Co}} = 0,83 \text{ mM}$). Porównano również wpływ obecności wzorca w trakcie polimeryzacji na morfologię i porowatość uzyskanych

polimerów. Zarówno powierzchnia całkowita porów, powierzchnia mikroporów oraz udział mikroporów w całkowitej powierzchni porów są większe dla układów z odciskiem molekularnym w porównaniu do polimerów kontrolnych. Natomiast średni wymiar porów oraz średni rozmiar perełek dla obu układów jest zbliżony. Układy bez odcisku molekularnego również wykazują zwiększenie szybkości reakcji w porównaniu do reakcji niekatalizowanej, co wskazuje, że już sama obecność grup histydylowych wystarczy, aby reakcja zaszła. Dodatkowe badania wykazały, że stała szybkości reakcji rośnie wraz ze wzrostem temperatury w zakresie 25–50°C. Jednocześnie wraz ze wzrostem energii aktywacji reakcji hydrolizy fosforanu dietylo-4-nitrofenolowego maleje jej wydajność. Tak wytworzone układy wykazywały większą aktywność katalityczną od wcześniej zsyntetyzowanych polimerów z jonami Cu(II) w centrum aktywnym ($K_m^{\text{PIB-Cu}} = 1,28 \text{ mM}$) [27].

Po wielu badaniach nad reakcjami hydrolizy w obecności katalizatorów polimerowych z odciskiem molekularnym Matsui, Nicholls i Mosbach zastosowali takie układy w kondensacji aldolowej do wytworzenia wiązań C–C [35]. Jako wzorzec wykorzystano analog produktu pośredniego (dibenzoilometanu, DBM), który odwzorowano w matrycy składającej się z 4-winylopirydyny/styrenu/diwinylobenzenu (Rys. 13). Otrzymany katalizator porównano z trzema polimerami kontrolnymi: bez odcisku molekularnego, zsyntetyzowanymi w obecności jonów Co(II) oraz wzorca. Badania powinowactwa dibenzoilometanu do otrzymanego polimeru przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej HPLC, a jako fazę stałą zastosowano wytworzone wcześniej polimery. Największą wartość współczynnika retencji (r) wobec DBM wykazał polimer zsyntetyzowany w obecności kompleksu DBM – Co(II) ($r = 9,3$), nieco mniejszą układ wytworzony tylko z jonami kobaltu(II) ($r = 7,0$), najmniejsze powinowactwo do DBM wykazały polimery zsyntetyzowane w obecności jedynie DBM ($r = 2,5$) oraz bez odcisku molekularnego ($r = 3,6$). Wyniki te wskazują jednoznacznie, że obecność jonów kobaltu(II) jest niezbędna do wytworzenia układów katalitycznych o dużej selektywności względem wzorca. Aktywność zsyntetyzowanych polimerów zbadano w reakcji kondensacji acetofenonu i alkoholu benzyłowego. Zgodnie z przypuszczeniami największą efektywność wykazał układ z odciskiem molekularnym kompleksu Co(II)-DBM. Wydajność reakcji była 8 razy większa w porównaniu z reakcją prowadzoną w środowisku octanu kobaltu i 2 razy większa dla katalizatora zsyntetyzowanego jedynie z jonami kobaltu(II).



Rysunek 13. Schemat wytworzenia wnęki komplementarnej do wzorca oraz katalizowanej reakcji kondensacji aldolowej [35]

Figure 13. Scheme of formation of cavity complementary to the template and catalyzed aldol condensation reaction [35]

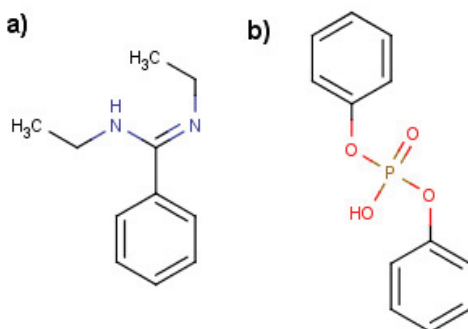
Układami z jonami Co(II) zajęto się również jako kontynuacją badań przedstawionych w [29] zamieniając jony Cu(II) na Co(II) już na etapie polimeryzacji [36]. Syntezę prowadzono metodą odcisku objętościowego (KO-Co) oraz powierzchniowego (KP-Co), a aktywność katalityczną sprawdzano w modelowej reakcji utleniania hydrochinonu. Powierzchnia właściwa (p) oraz średnia szerokość porów (s) dla KP-Co była mniejsza niż dla KO-Co ($p = 70,11\text{m}^2/\text{g}$, $s = 1119,41\text{Å}$ dla KP-Co, $p = 136,53\text{m}^2/\text{g}$, $s = 1336,35\text{Å}$ dla KO-Co). Taką samą tendencję zauważono dla układów zawierających w swoich centrach aktywnych jony Cu(II). Ponownie zastosowanie metody odcisku powierzchniowego poprawiło właściwości katalityczne KP-Co względem KO-Co. Jednak stopień przereagowania hydrochinonu był niższy w obu przypadkach w porównaniu do polimerów z jonami Cu(II). Dodatkowo układy KO-Co i KP-Co charakteryzowały się słabą stabilnością. Po okresie 10 miesięcy ponowne obsadzenie wnęk katalitycznych jonami Co(II) było niemożliwe, a co za tym idzie układów tych nie można było wykorzystać w ponownej reakcji utleniania H_2Q .

1.3. UKŁADY ZAWIERAJĄCE W SWOIM CENTRUM AKTYWNYM JONY Zn(II)

Prac nad układami zawierającymi w swych centrach aktywnych jony cynku(II) jest tylko kilka. Takie układy często pojawiają się przy porównywaniu aktywności układów MIP z innymi jonami (głównie miedzi(II)). Cynk(II) jest także zastępowany innym metalem dla zwiększenia stabilności i aktywności katalitycznej układów.

Jedne z pierwszych badań nad układami katalitycznymi zawierającymi jony cynku(II) zostały opisane w artykule Meng, Yamazaki i Sode [37]. Wykorzystu-

jąc jako monomery 4(5)-winyloimidazol, kwas metakrylowy (MAA) oraz DVB, wytworzono centra aktywne naśladujące działanie fosfotriesteraz (PTE). Jako wzorzec zastosowano fosfonian dietylo(4-nitrobenzylowy), będący analogiem substratu (fosforanu dietylo-*p*-nitrofenylowego). Szybkość reakcji hydrolizy wzrosła 105 razy, przy zastosowaniu MIP-ów z jonami Zn^{2+} , w porównaniu do reakcji zachodzącej w buforze. Wprowadzenie odcisku powierzchniowego zwiększyło aktywność katalityczną biomimetyków PTE o 30%. Autorzy udowodnili również, iż zastosowanie kwasu metakrylowego poprawia aktywność katalityczną o 100% w stosunku do MIP-ów niezawierających MAA. Grupy karboksylowe umożliwiają odpowiednią pozycję jonu metalu w centrum aktywnym, a dodatkowo wprowadzają hydrofilowe środowisko (podobnie jak we wnękach katalitycznych PTE). Badania wskazują również, iż aktywność molekularna k_{kat} wzrasta ponad dwukrotnie dla polimerów wytworzonych w niższej temperaturze (4°C, polimeryzacja metodą radiacyjną, $k_{kat} = 4,44 \text{ min}^{-1}$). Dla porównania k_{kat} dla układów zsyntezowanych w 45°C wyniosło około 2,10 min^{-1} . Takie wyniki można wytłumaczyć wpływem temperatury na oddziaływania elektrostatyczne (monomery-wzorzec) – im niższa temperatura tym oddziaływania silniejsze. Pomimo odpowiedniego dobrania warunków syntezy aktywność katalityczna takich układów jest mniejsza niż dla naturalnych fosfotriesteraz.



Rysunek 14. Związki wykorzystane podczas syntezy biomimetyków karboksypeptydazy A z jonami cynku(II) oraz substrat reakcji katalizowanej [38]

Figure 14. Compounds used in the synthesis of biomimetics of carboxypeptidase A with Zn(II) ions and substrate for the catalyzed reaction [38]

Dość obszerne badania nad wytworzeniem układu z jonami Zn(II), naśladującego karboksypeptydazę A opisano w [38]. W celu opracowania efektywniejszych MIP-ów sprawdzano aktywność katalityczną w zależności od użytego monomeru (monomer 1 – pochodna winylobenzamidyny – Rys. 14a, monomer 2 – pochodna monomeru 1 zawierająca trzy atomy azotu zdolne do tworzenia wiązań koordynacyjnych – Rys. 4a), wzorca (wzorzec 1 – fosforan difenylu – Rys. 14b, wzorzec 2 – fosforan fenylu-2-pirydylowy – Rys. 4f) oraz obecności jonów cynku w reakcji hydrolizy węglanu difenylu (Rys. 4c). Polimery zsyntetyzowano z zastosowaniem

metakrylanu metylu jako komonomeru oraz EDMA jako monomeru sieciującego. Wytworzone układy wykazały dużo większą aktywność w porównaniu do reakcji prowadzonej w buforze HEPES (w stosunku 1:1 z acetonitrylem). Dla polimeru P(14a/14b) wytworzonego z monomeru 1 oraz wzorca 1 bez udziału jonów cynku(II), stała szybkości reakcji była ponad 450 razy większa od stałej szybkości reakcji w buforze. Zamiana monomeru na związek z dodatkową aminą trzeciorzędową (Rys. 4a) oraz wprowadzenie jonów cynku (PZn(4a/14b)) spowodowało wzrost stosunku stałych szybkości do ok. 1800. Wprowadzenie pierścienia pirydynowego do wzorca (PZn(4a/4f)) dodatkowo zwiększyło aktywność katalityczną polimerów (tab. 2), również w porównaniu do naturalnych enzymów. W celu sprawdzenia wpływu rodzaju wzorca oraz efektu odwzorowania na szybkość prowadzonej reakcji porównano je z polimerem kontrolnym, który został zsyntetyzowany bez obecności wzorca oraz jonów cynku(II). Wyniki przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Porównanie właściwości fizykochemicznych biomimetyków karboksypeptydazy A z jonami cynku(II) w zależności od użytego monomeru funkcyjnego [38]

Table 3. Comparison of the physicochemical properties of carboxypeptidase A biomimetics with Zn(II) ions according as the functional monomer [38]

Polimer (zastosowany monomer/ wzorzec)	$k_{\text{impr}}/k_{\text{soln}}$	$k_{\text{impr}}/k_{\text{kont}}$	$k_{\text{kat}}/k_{\text{soln}}$	K_m [mM]	k_{kat} [min^{-1}]
P(14a/14b)	455	10,7	–	–	–
PZn(4a/14b)	1806	34,0	–	–	–
PZn(4a/4f)	3264	61,5	6900	2,01	0,035

k_{impr} – stała szybkości reakcji katalizowanej polimerami z odciskiem molekularnym
 k_{soln} – stała szybkości reakcji biegnącej w roztworze buforu HEPES
 k_{kat} – aktywność molekularna

Erdem w swoich badaniach skupił się na badaniu morfologii wytworzonych układów oraz jej wpływu na ich aktywność katalityczną [34]. Katalizatory zostały wytworzone poprzez polimeryzację kompleksu metakrylohistydyny (MAH) z jonami Zn(II) w obecności EDMA jako monomeru sieciującego oraz wzorca (fosforanu dietylo-4-nitrofenyloвого – Rys. 7a), będącego również substratem reakcji kontrolnej. Zarówno polimer kontrolny NIB-Zn (bez odcisku molekularnego wzorca) jak i katalizator PIB-Zn wykazały zwiększenie początkowej szybkości reakcji w stosunku do reakcji prowadzonej w roztworze buforu o pH = 9. Jednak polimer z odciskiem molekularnym wykazał znacznie większą aktywność w porównaniu z polimerem bez odcisku molekularnego (NIB-Zn) (Tab. 4). Zastosowanie wzorca na etapie polimeryzacji spowodowało również zwiększenie całkowitej powierzchni porów w PIB-Zn w porównaniu do NIB-Zn, przez co substrat ma znacznie łatwiejszy dostęp do centrów aktywnych zawierających jony cynku.

Tabela 4. Porównanie właściwości katalitycznych układów MIP z jonami cynku(II) w centrum aktywnym z polimerami kontrolnymi [34]

Table 4. Comparison of the catalytic properties of Zn(II) – MIPs with the control polymers [34]

Polimer	K_m [mM]	k_{kat} [min^{-1}]
PIB-Zn	1,18	$1,19 \cdot 10^{-4}$
NIB-Zn	1,36	$2,48 \cdot 10^{-5}$

1.4. UKŁADY ZAWIERAJĄCE W SWOIM CENTRUM AKTYWNYM JONY Ni(II)

Układy zawierające jony niklu w swoim centrum katalitycznym są nieliczne. W naturze nikiel występuje na drugim stopniu utlenienia w centrum aktywnym ureazy, która jest odpowiedzialna za hydrolizę mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla. Wzmiankę na temat takich układów można odnaleźć w opisanym już wcześniej artykule Erdem'a, w którym aktywność katalityczna i morfologia zostały porównane z układami zawierającymi jony miedzi(II) lub cynku(II) [34]. Tak samo jak w przypadku katalizatorów zawierających pozostałe jony tak i w tym przypadku polimer kontrolny NIB jak i katalizator PIB wykazały zwiększenie początkowej szybkości reakcji w stosunku do reakcji prowadzonej w roztworze buforu o pH = 9. Jednak w przypadku niklu wzrost ten jest znacznie większy niż dla układów z jonami cynku (ok. 2,5 razy większa aktywność dla polimeru z odciskiem substratu). Również w tym przypadku potwierdza się zależność aktywności katalitycznej od porowatości, PIB wykazując ok. 4,9 razy większą całkowitą powierzchnię porów niż NIB (Tab. 5).

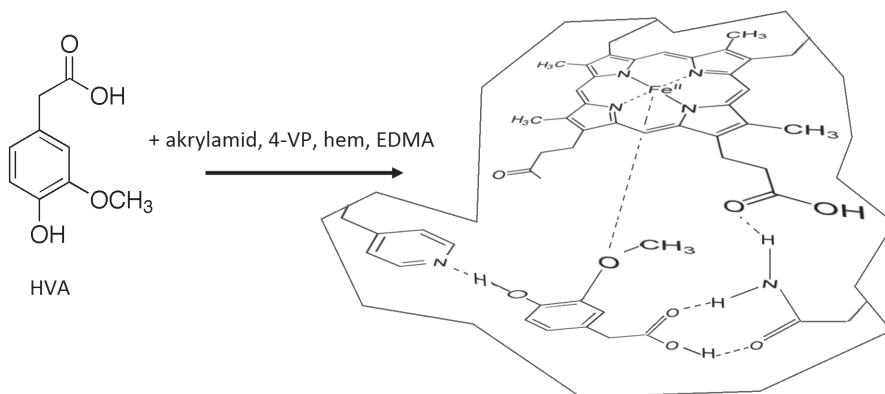
Tabela 5. Porównanie właściwości katalitycznych układów MIP z jonami niklu(II) w centrum aktywnym z polimerami kontrolnymi [34]

Table 5. Comparison of the catalytic properties of Ni(II) – MIPs with the control polymer [34]

Polimer	K_m [mM]	k_{kat} [min^{-1}]
PIB-Ni	0,92	$2,72 \cdot 10^{-4}$
NIB-Ni	0,96	$4,44 \cdot 10^{-5}$

1.5. UKŁADY ZAWIERAJĄCE W SWOIM CENTRUM AKTYWNYM JONY Fe(III)

Jony żelaza są często wprowadzane do układów MIP wraz z hemem, a nie jako oddzielna jednostka. Biomimetyki peroksydaz z sukcesem wytworzono wykorzystując 4-winylopirydynę, akryloamid (ACM) oraz EDMA (monomer sieciujący) (Rys. 15). Aktywność katalityczną wytworzonych układów sprawdzano w reakcji utleniania kwasu homowanilinowego HVA w obecności nadtlenu wodoru [19].



Rysunek 15. Schemat odcisku molekularnego oraz wychwytu substratu przez polymer z odciskiem molekularnym HVA [19]

Figure 15. Scheme of active side and uptake of substrate by polymer molecularly imprinted with HVA [19]

Dodatkowo zostały przeprowadzone badania wpływu ilości monomeru sieciującego, hemu, komonomerów, a także obecności odcisku molekularnego wzorca (w tym przypadku substratu) na wydajność reakcji utleniania oraz wychwyty substratu. Te same badania porównawcze zostały przeprowadzone z wykorzystaniem różnej zawartości procentowej porogenu w mieszaninie. Zarówno ilość środka sieciującego jak i porogenu (aceton) mają znaczący wpływ na wychwyty substratu i aktywność katalityczną uzyskanego układu. Najpierw wraz ze wzrostem ich zawartości K_m (wychwyty substratu) maleje a k_{kat}/K_m (wydajność reakcji katalizowanej) wzrasta, po czym osiąga optimum i następuje zmniejszenie (dla porogenu jest to ilość ok. 40% w mieszaninie, dla EDMA przy stosunku HVA:hem:ACM:4VP:EDMA = 1:1:2:2:20). Zarówno dodatek 4VP jak i ACM powoduje wzrost aktywności katalitycznej układu, brak odcisku molekularnego oraz obecności hemu – znaczne jej zmniejszenie (Tab. 6).

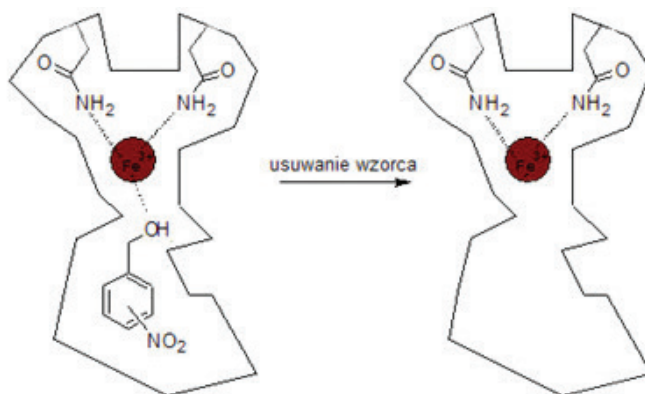
Tabela 6. Wpływ zawartości poszczególnych składników mieszaniny polimerizacyjnej na końcowe właściwości katalityczne i wychwyty substratu przez wytworzone układy [19]

Table 6. The influence of components content in the polymerization mixture on the final catalytic properties and substrate uptake by produced systems [19]

Polimer	HVA:hem:ACM:4VP:EGDMA	K_m [mM]	k_{kat}/K_m [$M^{-1}min^{-1}$]
P 1	1:1:2:2:10	4,63	$1,68 \cdot 10^8$
P 2	1:1:2:2:20	3,18	$3,85 \cdot 10^8$
P 3	1:1:2:2:40	4,07	$2,54 \cdot 10^8$
P 4	1:1:2:0:20	9,25	$9,84 \cdot 10^7$
P 5	1:1:2:4:20	2,32	$1,36 \cdot 10^8$
P 6	1:2:2:2:20	2,51	$5,39 \cdot 10^8$

Polimer	HVA:hem:ACM:4VP:EGDMA	K_m [mM]	k_{kat}/K_m [$M^{-1}min^{-1}$]
P 7	1:0:2:2:20		
P 8	0:1:2:2:20	9,89	$5,05 \cdot 10^7$

Podobne układy zostały zsyntetyzowane przez Diaz-Diaz w celu wytworzenia biomimetyków chloroperoksydaz zdolnych do oksydacyjnej degradacji 2,4,6-trichlorofenolu (TCP) [39]. Jako monomery zastosowano chloroporfirynę z jonami Fe(III), metakryloamid (MA), 4-winylopirydynę oraz EDMA. Polimeryzację przeprowadzono w obecności wzorca (TCP) oraz porotwórczego DMSO. Dodatkowo dobierano różny stosunek MA:4VP (3:1, 9:1, 1:1), chcąc wytworzyć centra aktywne o zbliżonym składzie aminokwasowym do chloroperoksydazy (3:1; zasada:kwas). Aktywność katalityczną MIP-ów porównano z polimerami bez odcisku molekularnego. Największą wydajność reakcji katalizowanej, określanej jako k_{kat}/K_m , osiągnięto dla układu 9:1 zarówno dla polimerów z odciskiem jak i bez odcisku molekularnego. Wprowadzenie wzorca na etapie polimeryzacji spowodowało zwiększenie wielkości porów w matrycy polimerowej oraz wartości k_{kat}/K_m z $3,8 \cdot 10^3$ do $4,5 \cdot 10^3$ [$M^{-1}min^{-1}$]. Jednak są to wartości wciąż znacznie mniejsze niż dla naturalnych enzymów (które wahają się w granicach 10^9 – 10^{10}).



Rysunek 16. Schemat centrum katalitycznego polimerów z odciskiem molekularnym alkoholu nitrobenzylowego [40]

Figure 16. Scheme of active site of polymer molecularly imprinted with nitrobenzyl alcohol [40]

Jednym z nielicznych przykładów zastosowania jonów żelaza(III) – wprowadzonego bez układu porfiryńowego, jest praca Suna, który wykorzystał akryloamid (AM) oraz EDMA jako monomery funkcyjne [40]. Wytworzone układy zostały przebadane w reakcji utleniania alkoholi nitrobenzylowych (*orto*-, *para*-, oraz *meta*-, Rys. 16), a ich zdolność katalityczną porównano z polimerami bez odcisku molekularnego i bez jonów Fe(III) (NIP) lub z jonami Fe(III) (Fe-NIP). Badania porównawcze zsyntezowanych polimerów jednoznacznie wskazują na potrzebę zastosowania jonów żelaza oraz wzorca w celu uzyskania odpowiedniej powierzchni oraz objętości

porów. Zarówno usunięcie wzorca jak i jonów żelaza(III) z mieszaniny polimeryzacyjnej powoduje zmniejszenie objętości porów z 0,25 [cm³/g] dla *p*-Fe-MIP do 0,09 [cm³/g] dla NIP, co przekłada się na aktywność katalityczną. Autorzy zsyntezowali katalizatory wykorzystując jako wzorca odpowiednio *para*-, *orto*- oraz *meta*-nitro-podstawione alkohole benzylowe. (*p*-Fe-MIP, *o*-Fe-MIP, *m*-Fe-MIP). *Para*-Fe-MIP wykazywał największą aktywność katalityczną oraz selektywność w stosunku do alkoholu *para*-nitrobenzylowego (80% i 85% odpowiednio dla roztworu *p*-nitrofenolu i mieszaniny trzech pochodnych). Największy stopień konwersji alkoholu do aldehydu występował dla układów dla których wzorzec był jednocześnie substratem reakcji katalizowanej. Dla pozostałych pochodnych stopień przereagowania był znacznie niższy (Tab. 7)

Tabela 7. Porównanie właściwości katalitycznych układów z odciskiem molekularnym alkoholu nitrobenzylowego

Table 7. Comparison of the catalytic properties of molecular imprinted polymers with nitrobenzyl alcohol

Polimer	Stopień konwersji alkoholu w aldehyd [%]					
	z roztworu danej pochodnej			z mieszaniny pochodnych		
	<i>o</i> -NBA	<i>m</i> -NBA	<i>p</i> -NBA	<i>o</i> -NBA	<i>m</i> -NBA	<i>p</i> -NBA
NIP	< 5,0	< 5,0	< 5,0	–	–	–
<i>o</i> -Fe-MIP	65	37	51	70	28	31
<i>m</i> -Fe-MIP	39	69	58	27	72	32
<i>p</i> -Fe-MIP	36	42	80	29	40	85
Fe-NIP	34	33	49	–	–	–
Warunki katalizy	0,1 g katalizatora; 1,8 mmol substratu; 0,75 ml 30% H ₂ O ₂ ; 15 ml H ₂ O; 80°C; 4 h			0,1 g katalizatora; (0,6 mmol <i>o</i> -NBA; 0,6 mmol <i>m</i> -NBA; and 0,6 mmol <i>p</i> -NBA); 0,75 ml 30% H ₂ O ₂ ; 15 ml H ₂ O; 80°C; 4 h		

PODSUMOWANIE

Procesy katalityczne wciąż pełnią jedną z kluczowych ról w wielu gałęziach przemysłu i nauki, a co za tym idzie, zapotrzebowanie na nie ciągle wzrasta. Bardzo istotne jest zatem opracowanie bardziej efektywnych i selektywnych katalizatorów, zdolnych do pracy w środowisku wodnym oraz w temperaturach nieznacznie przekraczających temperaturę pokojową. Wykorzystanie techniki wdrutowywania molekularnego wraz z zastosowaniem jonów metali pozwala na otrzymanie układów katalitycznych naśladujących naturalne enzymy, charakteryzujących się dużo większą stabilnością w czasie użytkowania. Po wielu badaniach dotyczących optymalizacji parametrów syntezy opracowano polimery z centrami aktywnymi zdolnymi między innymi do hydrolizy pestycydów, reakcji Dielsa–Aldera czy reakcji stereoselektywnych. Wyszczególniono również część parametrów odpowiedzialnych za polepszenie właściwości MIP-ów zawierających w centrum aktywnym jony

metali. Stwierdzono, że odpowiednio dobrana metoda polimeryzacji oraz środki porotwórcze znacznie polepszają dostępność do miejsc aktywnych (co pozwala zatem również na polepszenie kinetyki prowadzonych reakcji). Dodatkowo zastosowanie monomerów, o grupach funkcyjnych zbliżonych budową do tych występujących w metaloenzymach, pozwoliło na otrzymanie efektywnie pracujących katalizatorów polimerowych o zbliżonej aktywności katalitycznej w stosunku do naturalnych enzymów.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Wolfgang, *Enzymes in Industry, Production and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2004.
- [2] O. Kirk, T.V. Borchet, C.C. Fuglsang, *Curr. Opin. Biotech.*, 2002, **13**, 345.
- [3] M. Bedford, G. Partridge, *Enzymes in farm animal nutrition*, CAB International, Bodmin, 2010.
- [4] J. Shen, *Enzymatic treatment of wool and silk fibres*, [w:] *Advanced in textile biotechnology*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2010.
- [5] A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2005, **57**, 1742.
- [6] C. Alexander, L. Davidson, W. Hayes, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 2025.
- [7] H. Yan, K. Row, *Int. J. Mol. Sci.*, 2006, **7**, 155.
- [8] D.R. Kryscio, N.A. Peppas, *Acta. Biomater.*, 2012, **8**, 461.
- [9] M. Tada, Y. Iwasawa, *J. Mol. A - Chem.*, 2003, **199**, 115.
- [10] O. Ramstrom, R.J. Ansell, *Chirality*, 1998, **10**, 195.
- [11] R.J. Ansell, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2005, **57**, 1809.
- [12] V.B. Kandimalla, H. Ju, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **380**, 587.
- [13] D.A. Spivak, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2005, **57**, 1779.
- [14] M. Sibrian-Vazquez, D.A. Spivak, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 7827.
- [15] W.J.R. Santos, P.R. Lima, C.R.T. Tarley, N.F. Höehr, L.T. Kubota, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **631**, 170.
- [16] S.A. Piletsky, N.W. Turner, P. Laitenberger, *Med. Eng. Phys.*, 2006, **28**, 971.
- [17] C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O'Mahony, M.J. Whitcombe, *J. Mol. Recognit.*, 2006, **19**, 106.
- [18] N. Holland, J. Frisby, E. Owens, H. Hughes, P. McLoughlin, *Polymer*, 2010, **51**, 1578.
- [19] Z. Cheng, Y. Li, *J. Mol. A - Chem.*, 2006, **256**, 9.
- [20] J.D. Marty, M. Mauzac, *Adv. Polym. Sci.*, 2005, **172**, 1.
- [21] A.J. Hall, M. Emgenbroich, B. Sellergren, *Imprinted Polymers*, [w:] *Templates in Chemistry II*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin 2005.
- [22] G. Wulff, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1.
- [23] N. Holland, *An investigation into the role of morphology on the performance of molecularly imprinted polymers*, Waterford: Waterford Institute of Technology, 2008.
- [24] Z. Chen, L. Xu, Y. Liang, M. Zhao, *Adv. Mater.*, 2010, **22**, 1488.
- [25] J. Liu, G. Wulff, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 7452.
- [26] J. Liu, G. Wulff, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8044.
- [27] R. Say, M. Erdem, A. Ersöz, H. Türk, A. Denizli, *Appl. Catal. A - Gen.*, 2005, **286**, 221.
- [28] M. Erdem, R. Say, A. Ersoz, A. Denizli, H. Turk, *Appl. Clay. Sci.*, 2010, **47**, 223.
- [29] A. Jakubiak, B.N. Kolarz, J. Jezierska, *J. Macromol. Symp.*, 2006, **235**, 127.
- [30] A. Jakubiak-Marcinkowska, M. Legan, J. Jezierska, *J. Polym. Res.*, 2013, **20**, 317.
- [31] J. Lee, S. Bernard, H.C. Liu, *React. Funct. Polym.*, 2009, **69**, 650.

- [32] D. K. Robinson, K. Mosbach, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1989, 969.
- [33] E. Toorisaka, K. Uezu, M. Goto, S. Furusaki, *Biochem. Eng. J.*, 2003, **14**, 85.
- [34] M. Erdem, R. Say, A. Ersoz, A. Denizli, H. Turk, *React. Funct. Polym.*, 2010, **70**, 238.
- [35] J. Matsui, I.A. Nicholls, I. Karube, K. Mosbach, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 5414.
- [36] J. Czulak, A. Jakubiak-Marcinkowska, A. Trochimczuk, *Adv. Mat. Sci. Eng.*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/464265>.
- [37] Z. Meng, T. Yamazaki, K. Sode, *Biotech. Lett.*, 2003, **25**, 1075.
- [38] J. Liu, G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 1287.
- [39] G. Díaz-Díaz, M. C. Blanco-López, M.J. Lobo-Castanón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tunón-Blanco, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2012, **353–354**, 117.
- [40] W. Sun, R. Tan, W. Zheng, D. Yin, *Chin. J. Catal.*, 2013, **34**, 1589.

Praca wpłynęła do Redakcji 21 sierpnia 2014

