

Synthese, Strukturnachweis und Abbildung wasserlöslicher, fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie
der Universität Karlsruhe (TH)
angenommene

Dissertation

von
Diplom-Chemikerin
Iris Kräuter
aus Siegen

Dekan: Prof. Dr. W. Freyland

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Wenz

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Ballauff

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1996 bis März 1999 am Polymer-Institut der Universität Karlsruhe (TH) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Wenz angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

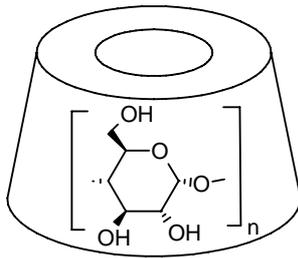
1 Einleitung	1
1.1 Cyclodextrine	1
1.2 Modifizierung von Cyclodextrinen.....	4
1.3 Der Einschluß monomerer Gastmoleküle in Cyclodextrine.....	6
1.4 Der Einschluß polymerer Gastmoleküle in Cyclodextrine.....	8
1.5 Rotaxane und Polyrotaxane aus Cyclodextrinen	13
2 Zielsetzung	16
3 Die Synthese monofunktioneller Cyclodextrine.....	18
3.1 Die Synthese fluoreszenzmarkierter Cyclodextrine	22
3.2 Die Synthese Biotin-markierter Cyclodextrine	28
4 Synthese und Charakterisierung von Ionen.....	31
4.1 Die Synthese von Ionen _{10,6} Chlorid.....	32
4.2 Die Bestimmung der Molmasse von Ionen _{10,6} Chlorid.....	33
4.3 Die Bestimmung der Viskosität von Ionen _{10,6} Chlorid.....	38
4.4 Zusammenfassung	43
5 Der Nachweis fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane durch Elektrophorese	44
5.1 Der Nachweis der Struktur Fluorescein-markierter Polyrotaxane	48
5.1.1 Die Trennung Fluorescein-markierter Ionene nach der Molmasse	51
5.1.2 Die Trennung Fluorescein-markierter Polyrotaxane nach dem Belegungsgrad.....	56
5.1.3 Der Nachweis Fluorescein-markierter polymerer Ionenpaare.....	59
5.2 Der Nachweis der Struktur Eosin-markierter Polyrotaxane	61
5.3 Der Versuch des Nachweises Rhodamin-markierter Polyrotaxane.....	63

5.4 Zusammenfassung	64
6 Die Untersuchung fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung	66
6.1 Die Untersuchung der Struktur Fluorescein-markierter Polyrotaxane	70
6.2 Der Nachweis von Homoenergietransfer im Fluorescein-markierten Polyrotaxan	77
7 Die Abbildung fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane	86
7.1 Die Abbildung Fluorescein-markierter Polyrotaxane mittels Rasterkraftmikroskopie ..	89
7.2 Die Abbildung Fluorescein-markierter Polyrotaxane mittels Fluoreszenzmikroskopie ..	98
7.2.1 Der Einfluß des Belegungsgrades auf die Struktur Fluorescein-markierter Polyrotaxane in Lösung	102
7.2.2 Der Einfluß polymerer Gegenionen auf die Struktur Fluorescein-markierter Polyrotaxane in Lösung	104
7.2.3 Die Untersuchung der Wechselwirkung von Biotin-Fluorescein-markierten Polyrotaxanen mit Streptavidin	106
7.3 Zusammenfassung	110
8 Zusammenfassung	112
9 Experimenteller Teil	114
9.1 Substanzen	114
9.2 Methoden	114
9.3 Synthesen	121
9.4 Gelelektrophorese	137
9.5 Fluoreszenzmikroskopie	143
9.6 Spektren	145
10 Strukturverzeichnis	157
11 Literaturverzeichnis	160

1 Einleitung

1.1 Cyclodextrine

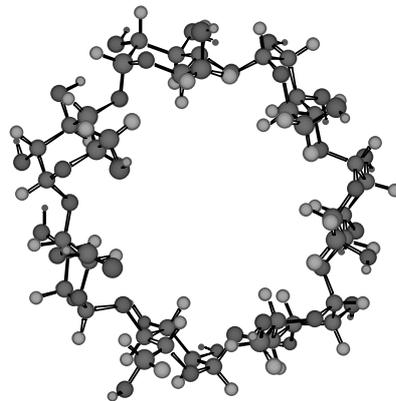
Cyclodextrine sind cyclische Oligomere der Amylose (Abb. 1-1). Sie bestehen aus α -(1 \rightarrow 4)-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, die in 4C_1 -Sesselkonformation vorliegen. Je nach Anzahl der Glucoseeinheiten ($n = 6, 7, 8, \dots$) unterscheidet man zwischen α -, β -, γ -,... Cyclodextrin [1].



1a ($n = 6$)

1b ($n = 7$)

1c ($n = 8$)



1b ($n = 7$)

Abb. 1-1: Die Struktur der Cyclodextrine.

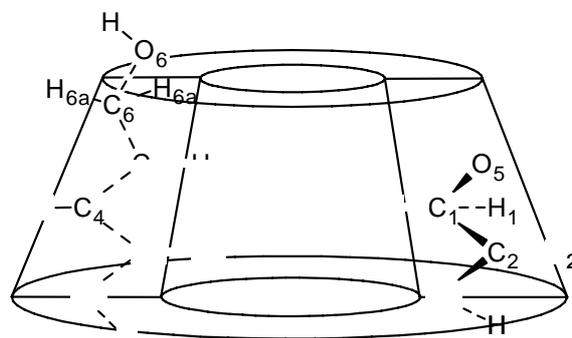
Die Cyclodextrine 1a und 1b wurden bereits 1891 von Villiers beim enzymatischen Abbau von Stärke entdeckt [2]. 44 Jahre später fand man das homologe γ -Cyclodextrin [3]. Die cyclische Struktur der Cyclodextrine konnte erstmals von Freudenberg nachgewiesen werden [4]. Die Bestimmung der Molekulargewichte geht auf French zurück [5].

Cyclodextrine werden heute in großem Maßstab durch enzymatischen Abbau der Stärke hergestellt [6, 7]. Dabei entsteht ein Gemisch von homologen Cyclodextrinen mit überwiegend 6 bis 8 Anhydroglucoseeinheiten. Durch Zugabe selektiver Fällungsmittel lassen sich die Cyclodextrine **1a-c** in beachtlichen Ausbeuten mit einer Reinheit von bis zu 99 % isolieren. Bedingt durch den Naturstoff Amylose werden hier die rechtsdrehenden Enantiomere erhalten. Zur Darstellung der linksdrehenden Cyclodextrine wäre eine Totalsynthese erforderlich [8]. Neben den leicht zugänglichen α -, β - und γ -Cyclodextrinen sind auch kleinere und größere Ringe bekannt [9]. Höhere Homologe mit bis zu 17 Anhydroglucoseeinheiten konnten in

kleinen Mengen durch chromatographische Aufarbeitung der enzymatisch gespaltenen Stärke gewonnen werden [10-13]. Die Struktur des größten bekannten Cyclodextrins mit 26 Anhydroglucoseeinheiten wurde von Saenger et al. aufgeklärt [14]. Cyclomaltopentaose ist nach Nakagawa synthetisch durch stereoselektive Glycosidierung zugänglich [15, 16].

Die Struktur der Cyclodextrine **1a-c** konnte mittels Röntgenstrukturanalyse und Neutronenbeugung aufgeklärt werden [6, 17]. Danach liegen diese Cyclodextrine im festen Zustand in einer relativ starren, konischen Konformation mit näherungsweise C_n -Symmetrie vor (s. Abb. 1-1). Moleküldynamiksimulationen weisen auf eine gewisse Flexibilität der Cyclodextrinmoleküle in Lösung hin. Eine Abweichung von der regulären Torusgestalt ist daher durchaus möglich [18-20]. Im zeitlichen Mittel jedoch bleibt die C_n -Symmetrie erhalten. Deshalb erscheinen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die Signale aller Glucosebausteine gleich [21, 22]. Je höher die Flexibilität der Cyclodextrinringe ist, desto mehr weicht die Struktur von einem kreisförmigen Konus ab. So wurde für das von Fujiwara isolierte δ -Cyclodextrin mit neun Anhydroglucoseeinheiten eine elliptische [12] und für das 26-gliedrige Cyclodextrin eine helixartige Struktur nachgewiesen [14].

Die Polarität und die Löslichkeit der Cyclodextrine in Wasser hängt von der Lage der hydrophilen und hydrophoben Gruppen im Cyclodextrinring sowie von der Wechselwirkung mit den Molekülen des Lösungsmittels ab [1]. Bei den Cyclodextrinen **1a-c** weisen die glycosidischen Etherbindungen sowie die Protonen H-3 und H-5 in den Innenraum des Torus, während die Hydroxylgruppen und die Protonen H-1, H-2 und H-4 nach außen gerichtet sind (Schema 1-1). Die Außenseite des Cyclodextrinmoleküls hat dadurch hydrophile und die Kavität hydrophobe Eigenschaft.



Schema 1-1: Die Raumerfüllung eines Cyclodextrinrings sowie die räumliche Ausrichtung der Protonen, Hydroxylgruppen und glycosidischen Etherbindungen innerhalb des Torus.

Die sekundären Hydroxylgruppen OH-2 und OH-3 liegen äquatorial und befinden sich an der weiten Seite des Torus. Dabei sind die OH-2 Gruppen nach innen und die OH-3 Gruppen nach außen gerichtet. Die primären Hydroxylgruppen OH-6 liegen an der engeren Seite des Torus und weisen nach außen. Da sich doppelt so viele Hydroxylgruppen an der weiteren Seite des Torus befinden, resultiert ein relativ starkes Dipolmoment entlang der Symmetrieachse. Der berechnete Wert für das Dipolmoment liegt bei 10-15 D [23], experimentell wurde ein kleinerer Wert von etwa 5 D bestimmt [1].

Die Konusform wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxylgruppen OH-3 und den Sauerstoffatomen O-2 benachbarter Anhydroglucosebausteine stabilisiert [20, 24, 25]. Im Fall des β -Cyclodextrins **1b** ist ein vollständiges Band aus intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet [26]. Dadurch wird der Torus besonders rigide und die Löslichkeit in Wasser geringer. Bei dem kleineren α -Cyclodextrin **1a** sind nur vier der sechs möglichen Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet [27]. Infolgedessen ist die Löslichkeit in Wasser relativ zu β -Cyclodextrin höher. Die physikalischen Eigenschaften der Cyclodextrine **1a-c** sind in Tabelle 1-1 zusammengefaßt.

Tabelle 1-1: Die molekularen Dimensionen und physikalischen Eigenschaften von α -, β - und γ -Cyclodextrin **1a-c** [9].

	α -CD	β -CD	γ -CD
	1a	1b	1c
Molekulargewicht [g/mol]	973	1135	1297
Spezifischer Drehwert $[\alpha]_D^{25}$	150.5 \pm 0.5	162.5 \pm 0.5	177.4 \pm 0.5
Außendurchmesser [Å]	13.7-14.6	15.3-15.4	16.9-17.5
Innendurchmesser der prim. Seite [Å]	4.7	6.0	7.5
Innendurchmesser der sek. Seite [Å]	5.2	6.5	8.5
Kristallwasseranteil [Gew.-%]	6-7.6	12.0	13.3
Wasserlöslichkeit bei 25°C [g/100 mL]	14.5	1.85	23.2

Cyclodextrine sind leicht und in großem Maßstab zugänglich, toxikologisch unbedenklich und biologisch abbaubar. Dies und die Fähigkeit mit einer Vielzahl an hydrophoben Substanzen wasserlöslich Addukte zu bilden macht sie zu interes-

santen Hilfsstoffen in der chemischen, pharmazeutischen sowie in der Lebensmittelindustrie [9, 28]. Cyclodextrine werden bereits vielfach zur Verkapselung von Arzneimitteln, Duft- und Aromastoffen eingesetzt. Zielsetzung ist zum Beispiel, die Solubilisierung und der Transport von Substanzen, der Schutz empfindlicher Verbindungen vor Oxidation oder die Maskierung von Aromen und Düften. Darüber hinaus finden Cyclodextrine Anwendung bei der chromatographischen Trennung von Racematen und der Katalyse chemischer Reaktionen. Neuere wissenschaftliche Untersuchungen befassen sich mit dem Einsatz von Cyclodextrinen als Hilfsstoffe für enzymatische Reaktionen.

1.2 Modifizierung von Cyclodextrinen

Aufgrund der Polyfunktionalität der Cyclodextrine ist eine Vielzahl von Cyclodextrinderivaten zugänglich [29-31]. Umsetzungen an Cyclodextrinen können allgemein unter Spaltung einer O-H, C-O, C-H oder C-C Bindung ablaufen. Am wichtigsten ist die elektrophile Substitution der Hydroxylgruppen (s. Abb. 1-1). Durch Umsetzung mit Alkylhalogeniden [32, 33], Epoxyden [34], Acylderivaten [32, 35], Isocyanaten [36] oder anorganischen Säurederivaten [37-41] sind die entsprechenden Cyclodextrinether oder -ester zugänglich. Diese lassen sich mit Nucleophilen wie Azid-Ionen [42], Halogenid-Ionen [43], Thiolen [44] und Aminen [45] leicht in die Desoxyderivate überführen.

Die Positionierung eines oder mehrerer Substituenten im Cyclodextringerüst ist durch Ausnutzung der unterschiedlichen Reaktivität der Hydroxylgruppen OH-6, OH-3 und OH-2 steuerbar [1, 46]. Die primären Hydroxylgruppen OH-6 der Cyclodextrine sind am leichtesten zugänglich. Sie werden selektiv von sterisch anspruchsvollen Gruppen angegriffen. Die aciden sekundären Hydroxylgruppen OH-2 ($pK_s = 12.2$) können unter wasserfreien Bedingungen selektiv deprotoniert [21, 47] und mit elektrophilen Reagenzien umgesetzt werden [48]. Die geringste Reaktivität weisen die sekundären Hydroxylgruppen OH-3 auf. Eine selektive Modifizierung dieser Position ist erst nach Blockierung der OH-6 und OH-2 Gruppen durch Einführung von Schutzgruppen wie Trityl-, *tert.*-Butyldimethylsilyl- [41, 49] oder Benzyl-Gruppen [50] möglich. Die Silylierung der primären Hydroxylgruppen mit *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid führt zu Silylethern, die eine selektive Modifizierung der beiden sekundären Hydroxylgruppen zulassen. Unter drastischeren Reaktionsbedingungen können zusätzlich die OH-2-Gruppen silyliert und so die OH-3-Gruppen selektiv funktionalisiert werden. Durch Abspaltung der Silylgruppen werden die regioselektiv modifizierten Cyclodextrine freigesetzt.

Die Umsetzung von Cyclodextrinen führt auch mit regioselektiven Reagenzien meist zu uneinheitlichen Produkten [1, 30]. Eine einfache Überlegung verdeutlicht dies: Die Zahl der möglichen Stellungen eines Substituenten ergibt sich aus der Zahl der möglichen Positionen an einem Glucopyranosebaustein (OH-2, -3 und -6) multipliziert mit der Zahl n der verschiedenen Glucosebausteine im Cyclodextrin (s. Abb. 1-1). Mit jedem weiteren Substituenten steigt die Zahl der möglichen Stellungsisomeren um ein Vielfaches an. Das heißt, neben dem gewünschten Produkt werden mit zunehmender Wahrscheinlichkeit homologe Derivate mit abweichendem Substitutionsgrad erhalten. Die Synthese regioselektiv substituierter Cyclodextrinderivate schließt somit die Entwicklung effizienter Methoden zur Abtrennung der homologen Nebenprodukte ein. Der dazu erforderliche Trennaufwand ist umso größer, je höher der gewünschte Substitutionsgrad ist. Infolgedessen stellt die Synthese einheitlicher Cyclodextrinderivate eine anspruchsvolle Aufgabe dar .

Die Breite der Produktverteilung ist durch die Wahl der Reaktionsführung beeinflussbar [1, 30, 31, 46]. So sollte zur Einführung nur eines Substituenten das Reagens langsam und im Unterschuß eingesetzt werden (s. Kap. 3). Disubstituierte Cyclodextrine erhält man am einfachsten durch Überbrückung des Cyclodextrinmoleküls mit bifunktionellen Reagenzien [51, 52]. Dabei kann die Regiospezifität der Disubstitution durch die Geometrie des verwendeten Reagens kontrolliert werden (Abb. 1-2).

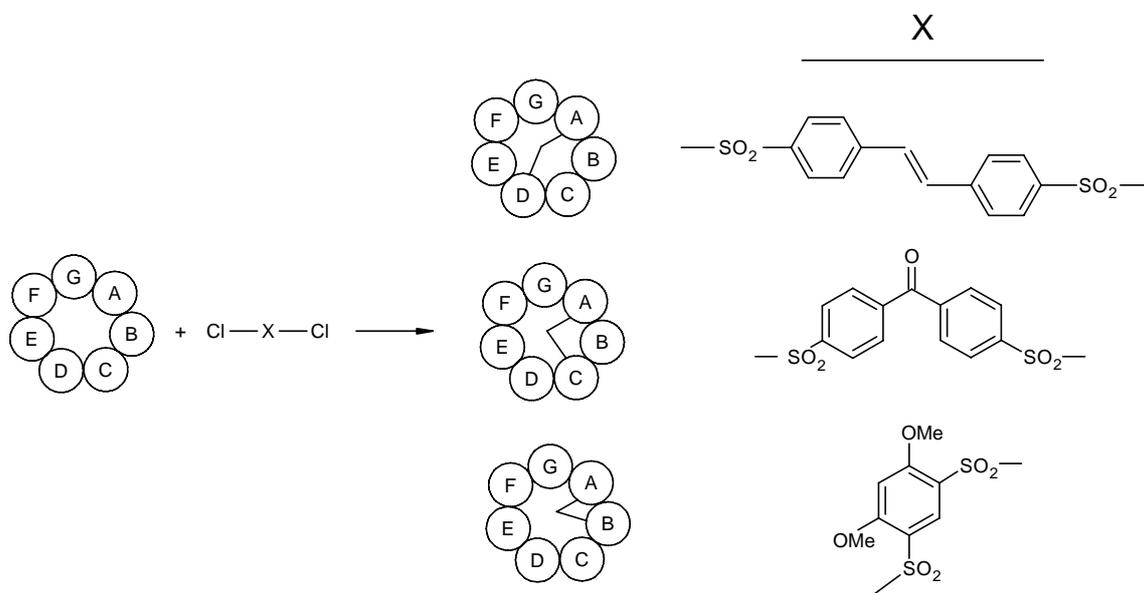
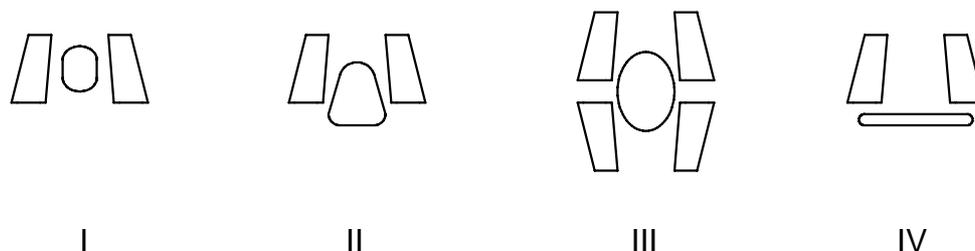


Abb. 1-2: Der Einfluß der Geometrie bifunktioneller Reagenzien (x) auf die Regiospezifität der Disubstitution von β -Cyclodextrin **1b** mit 7 Anhydroglucoseeinheiten (A-G) nach Tabushi [51, 52].

Wenn alle Glucoseeinheiten eines Cyclodextrins gleichmäßig mono- oder disubstituiert werden sollen, ist ein mäßiger Reagensüberschuß, eine optimale Reaktionszeit und eine sorgfältige Reaktionskontrolle notwendig. Die präparativ wichtigen Per(6-desoxy-6-halogen)cyclodextrine sind zum Beispiel aus der Reaktion von nativem Cyclodextrin mit Triphenylphosphan/Brom oder Iod zugänglich [53]. Die selektive Deprotonierung aller OH-2-Gruppen von β -Cyclodextrin mit Natriumhydrid und Veretherung mit Tosylchlorid führt zu Heptakis(2-O-tosyl)- β -Cyclodextrin [48]. Per(2,6-di-O-methyl)cyclodextrine und Per(2,6-di-O-ethyl)cyclodextrine werden durch Umsetzung von Cyclodextrin mit Dialkylsulfat, Bariumhydroxid und Bariumoxid dargestellt [32, 54]. Für eine vollständige Substitution aller Hydroxylgruppen sind wasserfreie Bedingungen, hoher Reagensüberschuß, eine erhöhte Reaktionstemperatur sowie lange Reaktionszeiten erforderlich [55]. Analog zu den homologen Per(2,6-di-O-alkyl)cyclodextrinen können so die Per(2,3,6-di-O-alkyl)cyclodextrine synthetisiert werden [33, 55]. Weitere Methoden zur regioselektiven Mono- und Mehrfachfunktionalisierung von Cyclodextrinen sind in der Literatur umfassend beschrieben [1, 31].

1.3 Der Einschluß monomerer Gastmoleküle in Cyclodextrine

Cyclodextrine bilden in wäßriger Lösung mit zahlreichen monomeren Gastmolekülen stabile Addukte [56] (Schema 1-2). Befindet sich der Gast im Innern der Kavität, wird das Addukt nach Cramer als *Einschlußverbindung* bezeichnet [57, 58]. Wenn der Gast außerhalb der Cyclodextrinkavität gebunden ist, spricht man von einer *Anlagerungsverbindung*. Ist das Gastmolekül kovalent mit dem Cyclodextrin verknüpft, so liegt ein *Cyclodextrin-Gast-Konjugat* vor [45] (s. Schema 3-2). In allen drei Fällen handelt es sich um eine nicht kovalente Bindung zwischen Wirt und Gastmolekül. Die treibenden Kräfte bei der Komplexbildung sind Coulomb-, Dipol-Dipol-, van der Waals-, Wasserstoffbrücken- oder solvatophobe Wechselwirkungen [59].



Schema 1-2: Die Topologie einiger Cyclodextrinaddukte: I) vollständiger, II) partieller, III) sandwichartiger Einschluß und IV) deckelartige Anlagerung.

Je besser die Kavität des Cyclodextrinmoleküls durch den Gast ausgefüllt wird, desto stabiler ist die Einschlußverbindung. In α -Cyclodextrin **1a** werden am besten unverzweigte Alkylketten wie Alkohole [60], α,ω -Alkandiole [61], α,ω -Alkandiamine [62] und α,ω -Dicarbonsäuren [63] eingeschlossen. Durch mikrokalorimetrische Messung der Stabilitätskonstanten konnte gezeigt werden, daß die Stabilität der Einschlußverbindungen mit zunehmender Länge der aliphatischen Kette stark ansteigt [61]. So wurde für α,ω -Alkandiol mit vier Methylenheiten eine Stabilitätskonstante von $K_s = 1000 \text{ M}^{-1}$ und bei zehn Methylenheiten eine von $K_s = 10\,000 \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Die Kopfgruppe des Gastmoleküls hat keinen wesentlichen Einfluß auf den Wert von K_s [62]. Folglich ist die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Wirt und Gast die maßgeblich treibende Kraft für den Einschluß von Monomeren in **1a** [59, 64]. Beim Eintritt des Gastmoleküls in die Kavität des Cyclodextrins werden Lösungsmittelmoleküle verdrängt, was zu einem Entropiegewinn führt. Darüber hinaus verringert sich die effektive hydrophobe Oberfläche des Gastes durch den Einschluß, so daß Bildungsenthalpie frei wird.

β -Cyclodextrin **1b** geht aufgrund seiner größeren Kavität stabile Einschlußverbindungen mit Benzol- [65], Naphthalin- [66] und Adamantanderivaten [67] ein. Für 1-Adamantancarbonsäure zum Beispiel wurde eine Stabilitätskonstante von $K_s = 32\,600 \text{ M}^{-1}$ gemessen [68]. γ -Cyclodextrin **1c** hat einen so großen Innenraum, daß sogar polyannelierte Ringsysteme wie Pyren [69] oder Steroide [39] darin Platz finden.

Die thermodynamische Stabilität einer Cyclodextrin-Einschlußverbindung kann durch terminale Substituenten am Gastmolekül beeinflusst werden. So führt die Einführung geladener Gruppen zu einer Erniedrigung der Stabilitätskonstante. Im Vergleich dazu haben neutrale und hydrophobe Gruppen einen geringen Einfluß auf die hydrophobe Wechselwirkung.

Die Existenz geladener Kopfgruppen wirkt sich auf die Kinetik der Einschlußbildung besonders stark aus. Der Einschluß von 1,1'-Decamethyldipyridinium [63], Decamethyldiammonium oder deprotonierter 1,10-Decandicarbonsäure [62] in α -Cyclodextrin **1a** ist zum Beispiel so langsam, daß im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eine Unterscheidung zwischen freiem und aufgefädeltm Gast möglich ist. Infolge des Einschlusses wird die Spiegelsymmetrie des asymmetrischen Wirtes aufgehoben. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist dies anhand einer charakteristische Signalverdoppelung sichtbar [70]. Bei 1,10-Decandiol [60] und Decamethyldiamin [61] hingegen folgen Einschluß und Dissoziation so schnell aufeinander, daß eine Signalmittelung auftritt. Ähnliche Effekte sind bei sterisch anspruchsvollen Endgruppen zu beobachten (vgl. Kap. 1.5).

Auch von funktionalisierten Cyclodextrinen sind bereits zahlreiche Einschlußverbindungen bekannt [1]. Diese werden nach ihrer Lösungsmittelkompatibilität in exohydrophile, exolipophile und amphiphile Wirte gegliedert. Untersuchungen von Höfler zum Einschluß von parasubstituierten Benzoaten in methylierte und sulfonierte β -Cyclodextrine zeigen, daß die Stabilität des Einschlusses signifikant von der Raumerfüllung, der Anzahl und der Stellung der Substituenten im Cyclodextringerüst abhängt [71] (Abb. 1-3).

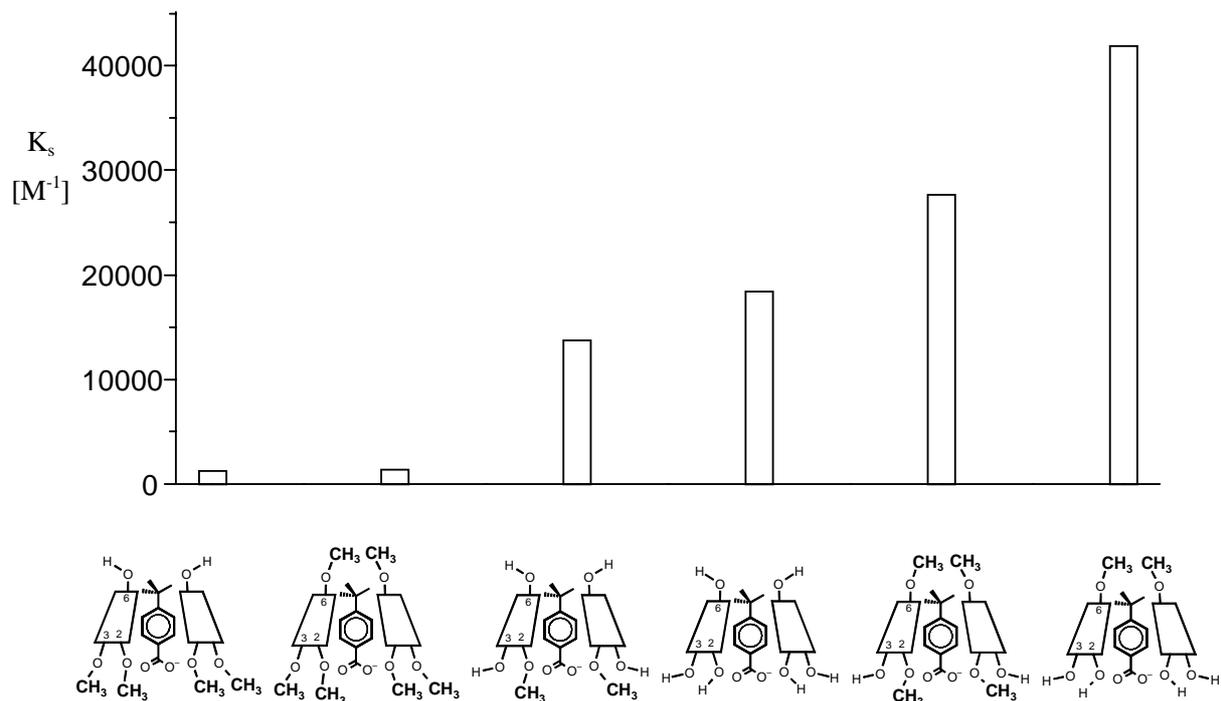
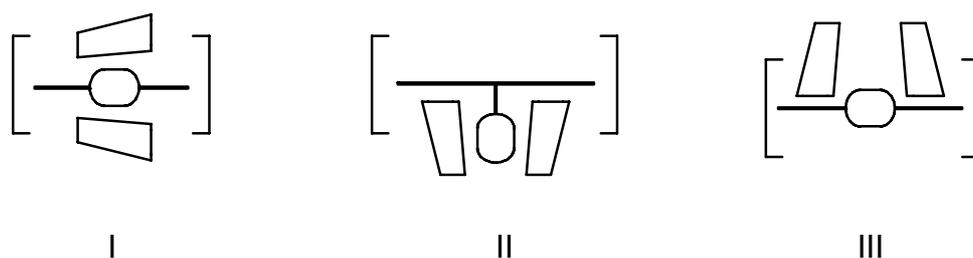


Abb. 1-3: Die Stabilitätskonstanten der Einschlußbildung von 4-*tert.*-Butylbenzoat mit β -Cyclodextrin **1b** und methylierten β -Cyclodextrinderivaten (25°C, pH = 7.2).

1.4 Der Einschluß polymerer Gastmoleküle in Cyclodextrine

Cyclodextrine bilden Einschlußverbindungen mit Polymeren, wenn diese über ausreichend viele hydrophobe Bindungsstellen verfügen und zumindest teilweise in Wasser löslich sind [1]. Je nach der Lage der Bindungsstellen im Polymer unterscheidet man zwischen einer *axialen Hauptketteneinschlußverbindung* und einer *Seitenketteneinschlußverbindung*. Darüber hinaus kann das Polymer auch außerhalb der Cyclodextrinkavität gebunden sein. In diesem Fall liegt eine *Anlagerungsverbindung* vor (Schema 1-3).



Schema 1-3: Die Topologie von Einschlußverbindungen aus polymeren Gastmolekülen und Cyclodextrinen: I) axialer Einschluß der Hauptkette, II) Einschluß der Seitenkette und III) Anlagerung an die Hauptkette.

Polymere Einschlußverbindungen sind sowohl synthetisch als auch durch Selbstorganisation von Polymeren und Cyclodextrinen in Lösung zugänglich. Bei der Synthese werden Monomere mit reaktiven Endgruppen in Cyclodextrine eingeschlossen, und die monomeren Einschlußverbindungen anschließend durch Festkörperpolykondensation in die Hauptketteneinschlußverbindung überführt. Die Anwendung dieses Verfahrens ist besonders dann von Vorteil, wenn das Polymer in Wasser unlöslich ist. Steinbrunn setzte α,ω -Aminosäuren in Gegenwart von α -Cyclodextrin **1a** bei hohen Temperaturen zu einer Einschlußverbindung aus Polyamid um. Im Gegensatz zum freien Polyamid ist die Einschlußverbindung aus α -Cyclodextrin **1a** sehr gut in Wasser löslich [72, 73].

Die Selbstorganisation von Polymeren und Cyclodextrinen in Lösung zu polymeren Einschlußverbindungen wurde erstmals von Harada et al. beschrieben. So bildet α -Cyclodextrin **1a** selektiv mit Poly(ethylenoxid) [74] und Oligoethylen [75], β -Cyclodextrin **1b** mit Poly(i-propylenoxid) [76] und γ -Cyclodextrin **1c** mit Poly(methylvinylether) [77] Hauptketteneinschlußverbindungen. Da diese Addukte in Wasser unlöslich sind und in organischen Lösungsmitteln dissoziieren, ist der Nachweis der Bildung einer Einschlußverbindung nur mittels Festkörpermethoden möglich.

Die Synthese wasserlöslicher, polymerer Hauptketteneinschlußverbindungen ist durch die Arbeiten von Wenz und Keller bekannt [1, 78]. Durch den Einsatz von amphiphilen Polymeren mit alternierenden hydrophoben und hydrophilen Segmenten konnte sowohl der Einschluß in Cyclodextrine als auch die Löslichkeit der polymeren Einschlußverbindung in Wasser gewährleistet werden [79]. Geeignete Polymere zum Aufbau wasserlöslicher Hauptketteneinschlußverbindungen stellen protonierte Poly(iminooligomethylen)e, Ionene, polymere quartäre Ammoniumverbindungen sowie Poly(viologen)e dar (Abb. 1-4). Die thermodynamische Stabilität dieser Einschlußverbindungen ist umso größer, je länger die hydrophoben Bindungsstellen sind (vgl. Kap. 1.2). Nach Wenz und Keller ist für die Bildung einer Einschlußverbindung aus Ionen und α -Cyclodextrin **1a** eine Mindestlänge von zehn Methylen-

einheiten erforderlich. Der durch den Einschluß bedingte Enthalpiegewinn beträgt bis zu 20 kJ/mol.

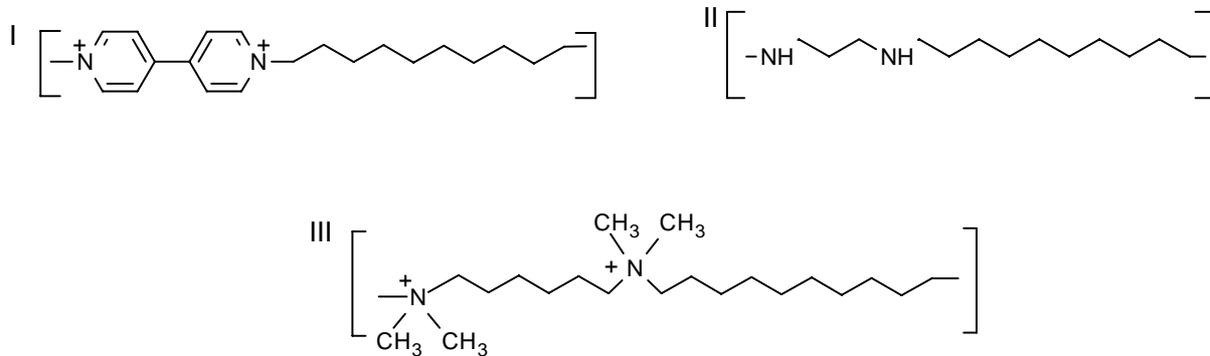


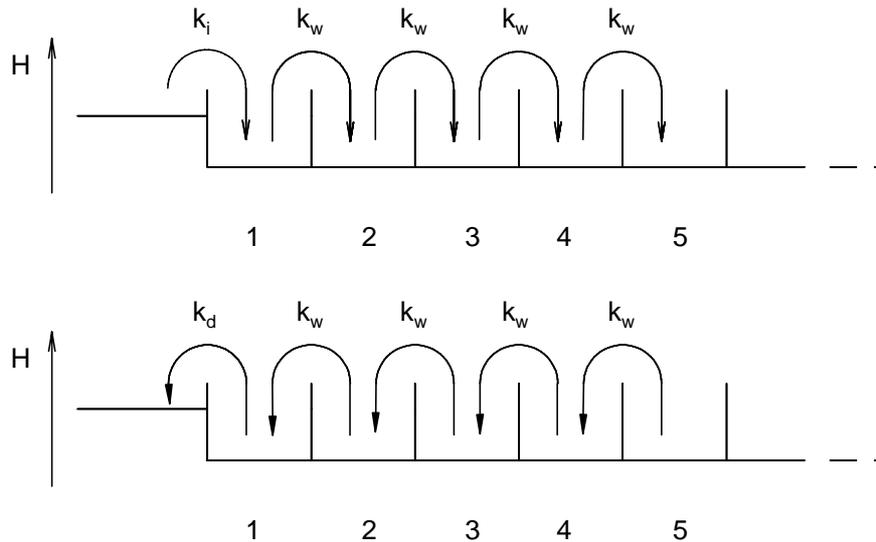
Abb. 1-4: Eine Auswahl wasserlöslicher Polymere: I) Poly(viologen), II) Poly(iminooligomethylen) und III) Ionen.

Zur Charakterisierung wasserlöslicher polymerer Einschlußverbindungen wurden hochauflösende spektroskopische Methoden wie die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, NOE-Messungen (Nuclear-Overhauser-Enhancement), sowie die Lichtstreuung und die Mikrokolorimetrie eingesetzt. Analog zum Nachweis monomerer Einschlußverbindungen zeigen die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren polymerer Hauptketteneinschlußverbindungen im Bereich der aliphatischen Kerne eine charakteristische Signalverdoppelung [70] (vgl. Kap. 1.2).

Die Kinetik der Selbstorganisation von amphiphilen Polymeren und α -Cyclodextrin **1a** wurde von Wenz, Keller und Herrmann umfassend untersucht [80, 81]. Es zeigte sich, daß die Umsatzrate mit zunehmendem Molekulargewicht des verwendeten Polymers abnimmt. Im Falle einer Anlagerung der Cyclodextrine an die Polymerkette sollte keine Abhängigkeit vom Molekulargewicht zu beobachten sein. Außerdem fand Keller, daß die Dissoziation einer polymeren Einschlußverbindung aus Poly(iminooligomethylen) und α -Cyclodextrin **1a** durch Abtrennung der freien Ringe **1a** mittels Dialyse erzwungen werden kann [78]. Die Dissoziation war jedoch nicht mehr möglich, nachdem die Enden der Polymerketten durch Einführung sterisch anspruchsvoller Gruppen blockiert wurden. Das Auffädeln von α -Cyclodextrin **1a** auf Poly(iminooligomethylen) konnte somit indirekt nachgewiesen werden.

Der Verlauf der Selbstorganisation von amphiphilen Polymeren mit Cyclodextrinen läßt sich anhand eines einfachen Modells veranschaulichen [81, 82] (Schema 1-4). Dabei wird die Polymerkette mit einer alternierenden Sequenz von hydrophilen und hydrophoben Gruppen als eine Folge energetischer Minima und Maxima dargestellt. Die Enthalpie eines aufgefädelten Cyclodextrinrings sei bezogen auf eine hydro-

phobe Bindungsstelle konstant und um den Betrag ΔH_s^0 geringer als für den freien Ring. Unter dieser Annahme ist das Auffädeln der Cyclodextrine mit einem Gewinn an freier Enthalpie verbunden. Für das Weiterfädeln der Cyclodextrine wird ein isoenthalpischer Verlauf postuliert. Somit wird durch das Auffädeln jedes weiteren Cyclodextrinmoleküls der Betrag ΔH_s^0 freigesetzt.



Schema. 1-4: Der Mechanismus der Selbstorganisation von amphiphilen Polymeren mit Cyclodextrinen.

Das Auffädeln eines Cyclodextrinrings auf die erste Bindungsstelle wird durch die Geschwindigkeitskonstante k_i beschrieben, das Weiterfädeln von Bindungsstelle zu Bindungsstelle durch k_w und die Dissoziation der Ringe von der ersten Bindungsstelle in die Lösung durch k_d ($k_w = k_d$). Für die Gleichgewichtskonstante der Selbstorganisation von Polymeren und Cyclodextrinen gilt dann $K_s = k_i/k_d$. Wenn der Polymerisationsgrad des Polymeren und die Gleichgewichtskonstante bekannt sind, kann die Selbstorganisation mit Hilfe des Computerprogramms ABAKUS simuliert werden. Als Ergebnis erhält man die Zeit, die ein Cyclodextrinring im zeitlichen Mittel auf einer Bindungsstelle verweilt.

Die axiale Hauptketteneinschlußverbindung zeichnet sich durch eine besondere Topographie aus. Während die aufgefädelten Cyclodextrinringe an den Kettenenden im dynamischen Austausch mit den freien Ringen stehen, sind die inneren Ringe auf der Polymerkette fixiert. Ihre Beweglichkeit ist durch die benachbarten Cyclodextrinringe und die Struktur der Polymerkette eingeschränkt. Aufgefädelte Ringe können entlang der Polymerachse wandern oder um diese rotieren. Die Beweglichkeit homologer Cyclodextrine entlang einer Polymerkette steigt mit zunehmendem Innen-

durchmesser [79]. So wandern auf Ionen_{10,6} Bromid (Abb. 1-4, III) aufgefädelt β -Cyclodextrinringe **1b** sehr viel schneller als die kleineren α -Cyclodextrine **1a**.

Keller und Herrmann untersuchten erstmals den sequenziellen Einschluß der Cyclodextrine **1a** und **1b** in Abhängigkeit von der Reihenfolge der Zugabe des Cyclodextrins zum Polymer. Sie konnten mittels Drehwertmessungen nachweisen, daß die Dissoziation einer polymeren Einschlußverbindung aus Ionen_{10,6} Bromid und β -Cyclodextrin **1b** durch das nachträgliche Auffädeln von α -Cyclodextrin **1a** verhindert werden kann [80, 81]. Bei Raumtemperatur ist die Wanderung der Ringe **1a** entlang der Polymerkette so stark herabgesetzt, daß die resultierende Einschlußverbindung unabhängig vom thermodynamischen Gleichgewicht über mehrere Wochen stabil bleibt. Die supramolekulare Struktur ist in Abbildung 1-5 dargestellt [83] (vgl. Kap. 1.5).

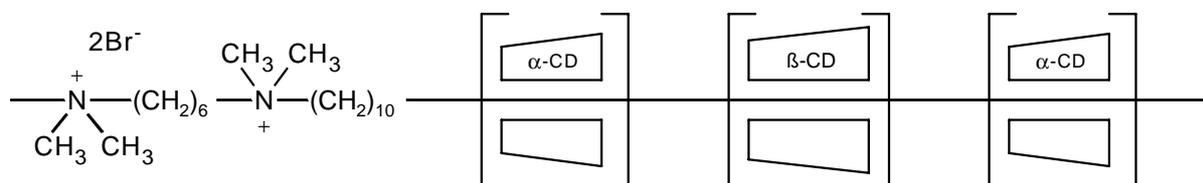


Abb. 1-5: Die Struktur des kinetisch stabilen Polyrotaxans aus Ionen_{10,6} Bromid, β -Cyclodextrin (β -CD) und α -Cyclodextrin (α -CD) nach Keller und Herrmann unter Angabe der relativen Verteilung der Cyclodextrinringe auf der Polymerkette.

Der Strukturnachweis eines Polyrotaxans aus α - und β -Cyclodextrin ist nicht trivial. Im Gegensatz zum Einschluß von α -Cyclodextrin **1a** kann das Auffädeln von β -Cyclodextrin **1b** auf Ionen_{10,6} Bromid weder mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, noch mikrokalorimetrisch nachgewiesen werden. Eine quantitative Bestimmung des Belegungsgrades durch **1b** ist deshalb nur indirekt möglich, zum Beispiel indem man die freien Ringe **1b** mittels Dialyse abtrennt und den tatsächlich aufgefädelt Anteil an β -Cyclodextrin aus der Differenz zur Einwaagekonzentration von **1b** berechnet [80, 81].

Die höhere Stabilität der Polyrotaxane zeigt sich besonders deutlich, beim Versuch, das Gleichgewicht der Einschlußbildung mittels Dialyse auf die Seite der dissoziierten Komponenten zu verschieben (Abb. 1-6). α -Cyclodextrine **1a** stellen somit geeignete Sperrgruppen für den Einschluß der homologen β -Cyclodextrine **1b** dar.

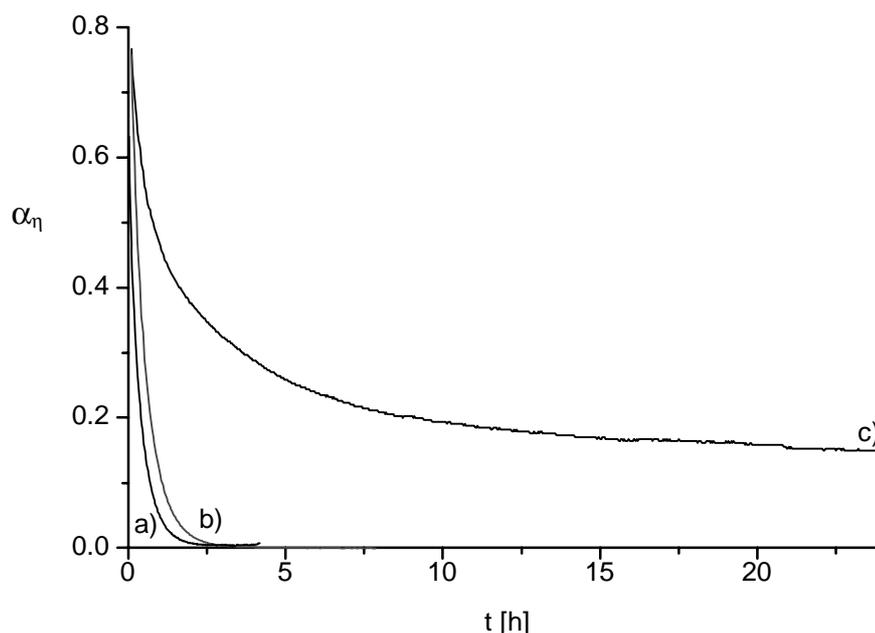
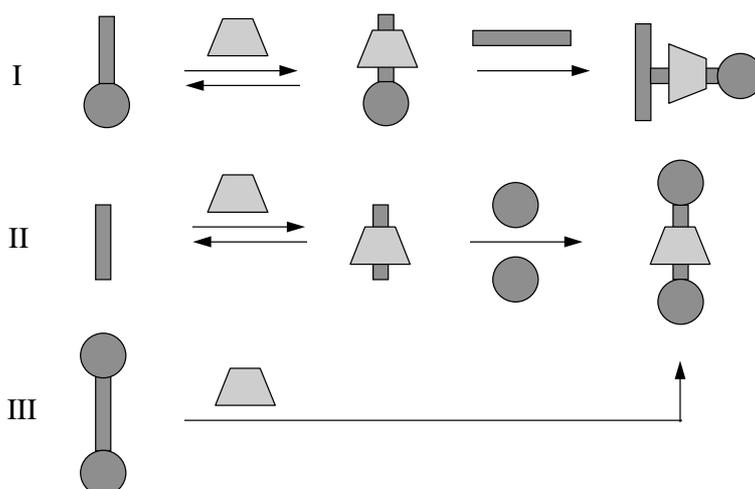


Abb. 1-6: Die Abnahme der optischen Drehung α_n [dL/g dm] mit der Dialysezeit t für die Dialyse von a) β -Cyclodextrin **1b**, b) der polymere Einschlußverbindung aus Ionen_{10,6} Bromid und β -Cyclodextrin **1b** sowie c) des Polyrotaxans aus Ionen_{10,6} Bromid, β -Cyclodextrin **1b** und α -Cyclodextrin **1a** [80].

1.5 Rotaxane und Polyrotaxane aus Cyclodextrinen

Wirt-Gast-Komplexe von Cyclodextrinen und monomeren Gästen werden heute nach ihrer kinetischen Stabilität in *Einschlußverbindungen* und *Rotaxane* gegliedert [83] (vgl. Kap. 1.3). Eine Einschlußverbindung steht mit den getrennten Komponenten im dynamischen Austausch. Ein Rotaxan ist bei Raumtemperatur isolierbar und über einen längeren Zeitraum stabil. Wirt-Gast-Komplexe von Cyclodextrinen mit polymeren Gästen bezeichnet man entsprechend als *polymere Einschlußverbindungen* und *Polyrotaxane* (vgl. Kap. 1.4).

Die Synthese von Rotaxanen und Polyrotaxanen ist präparativ sehr aufwendig [84, 85]. Zur Fixierung der Cyclodextrinringe müssen sterisch anspruchsvolle Gruppen ins Gastmolekül eingeführt werden. In Schema 1-5 sind drei verschiedene Möglichkeiten dazu dargestellt. Die Sperrgruppen können koordinativ, ionisch oder kovalent an das Gastmolekül gebunden werden. Je nach Anzahl $n = 1, 2, \dots$ der fixierten Cyclodextrinringe unterscheidet man zwischen [2]-, [3]-, ... Rotaxanen.



Schema 1-5: Strategien zur Synthese von Rotaxanen und Polyrotaxanen.

Die Synthese eines [2]-Rotaxans erfolgte erstmals 1981 durch Ogino [86] (s. Abb. 1.7). Dazu setzte er α,ω -Diaminoalkane mit α -Cyclodextrin **1a** zur Einschlußverbindung um. Durch koordinative Anknüpfung von Co^{3+} -Komplexen wurde die supramolekulare Struktur fixiert. Lawrence et al. stellte analog ein [2]-Rotaxan aus Bis(ammonium)biphenyl, Dimethyl- β -Cyclodextrin und Tetraphenylborat als anionische Sperrgruppe her [87, 88]. Asymmetrische [2]-Rotaxane aus α -Cyclodextrin mit ionisch verknüpften Ferrocen- und kovalent gebundenen Naphthalensulfonatgruppen wurden erstmals von Kaifer et al. beschrieben [89]. Die Synthese eines [2]-Rotaxans mit β -Cyclodextrin und 4,4'-Diaminostilbenen als Sperrgruppen wurde 1993 von Nakashima veröffentlicht [90].

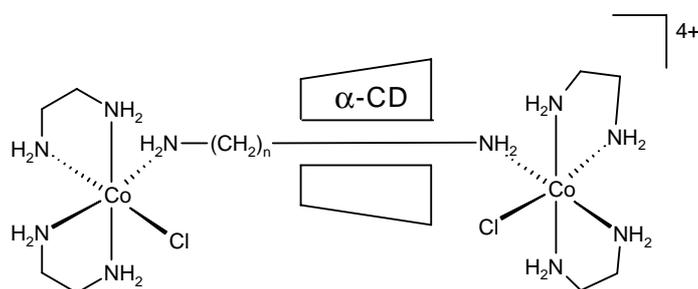


Abb. 1-7: [2]-Rotaxan nach Ogino [86].

Die Synthese von Polyrotaxanen ist durch die Arbeiten von Wenz [1, 78, 81, 91], Harada [85] und Ritter [92-95] bekannt. Keller und Wenz veröffentlichten erstmals die Synthese wasserlöslicher Polyrotaxane. So lassen sich Einschlußverbindungen

aus Poly(iminooligomethylen)en und α -Cyclodextrin **1a** in einer polymeranalogen Umsetzung mit Nicotinoyl- und 2,4-Dinitro-5-aminophenyl-Sperrgruppen stabilisieren [78]. Harada setzte α -Cyclodextrin **1a** mit Poly(ethylenoxid)bisamin um und blockierte die Kettenenden selektiv mit 2,4-Dinitrofluorobenzen [96]. Das erste Seitenkettenpolyrotaxan wurde von Ritter et al. durch Anknüpfung eines einseitig blockierten Semirotaxans mit einem 2,6-Dimethyl- β -Cyclodextrinring an Poly(methacrylat) hergestellt [97]. Darüber hinaus wurden Polysulfon- und Polyetherketon-Hauptketten zur Synthese eingesetzt [94]. Yamamoto et al. gelang die Synthese von Seitenkettenpolyrotaxanen durch N-Alkylierung von Poly(benzimidazol) in Gegenwart von Trimethyl- β -Cyclodextrin [98].

Funktionelle Rotaxane und Polyrotaxane mit optischen, katalytischen oder ererkennenden Funktionen sind bislang wenig erforscht. Tamura konnte mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung erstmals Heteroenergie transfer in einem Rotaxan aus Naphthyl-funktionalisiertem β -Cyclodextrin und Dansyl-modifiziertem Polyethylenglykol nachweisen [99] (s. Abb. 6-3). Herrmann stellte Einschlußverbindungen aus Cyclodextrinen und Polymeren mit Stilbeneinheiten in der Hauptkette her. In Gegenwart monomerer Stilbene findet bei Bestrahlung mit Licht elektrocyclischer Ringschluß zwischen polymeren und monomeren Stilbeneinheiten statt. Dabei wird ein Dihydrophenanthren-funktionalisiertes Polymer gebildet. Die aufgefädelten Cyclodextrinringe können die sterisch anspruchsvollen Dihydrophenanthreneinheiten nicht passieren. Somit konnte eine kinetisch instabile Einschlußverbindung photochemisch in ein stabiles Polyrotaxan überführt werden [100].

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten wasserlösliche, fluoreszenzmarkierte Polyrotaxane synthetisiert und hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt werden. Zielsetzung war, die Polyrotaxane als Einzelteilchen in Lösung abzubilden.

Als Cyclodextrinbausteine zum Aufbau fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane sollten einheitlich monosubstituierte Fluorescein-, Eosin- und Rhodamin-markierte β -Cyclodextrine synthetisiert werden. Auf die Entwicklung effizienter Methoden zur Synthese und Reinigung der Produkte wurde besonderen Wert gelegt. Durch die Einführung nur eines Substituenten sollte sowohl die Löslichkeit in Wasser als auch die Fähigkeit zur Bildung von Wirt-Gast-Komplexen gewährleistet bleiben. Letzteres stellt die Voraussetzung für den Aufbau und den Nachweis der Struktur fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane dar.

Für die Herstellung eines bifunktionellen Polyrotaxans, das sowohl optische als auch erkennende Funktionen erfüllt, sollte zusätzlich Biotin-markiertes β -Cyclodextrin synthetisiert werden. Da Biotin mit dem Protein Streptavidin eine sehr spezifische und stabile Bindung eingeht, sollte die Bildung eines biotinylierten, fluoreszenzmarkierten Polyrotaxans optisch nachweisbar sein.

Als Polymerbaustein zum Aufbau wasserlöslicher, funktioneller Polyrotaxane sollte Ionen_{10,6} Chlorid verwendet werden. Die Löslichkeit von Ionen_{10,6} Chlorid in Wasser ist auf eine alternierende Abfolge hydrophober Oligomethyleinheiten und hydrophiler Ammoniumgruppen zurückzuführen. Da die chemische Struktur der Polymerkette durch den Einschluß in funktionelle Cyclodextrine nicht beeinflusst wird, sollte die Einschlußverbindung ebenfalls in Wasser löslich sein. Für eine gute Abbildung einzelner Polyrotaxanmoleküle sollte das Polymer mit einem möglichst hohen Polymerisationsgrad und einer engen Molmassenverteilung synthetisiert werden. Voraussetzung hierfür sind optimale Reaktions- und Fraktionierungsbedingungen.

Der Nachweis des Auffädels fluoreszenzmarkierter β -Cyclodextrinringe auf Ionen_{10,6} Chlorid sollte mittels Gelelektrophorese durchgeführt werden. Ziel war, optimale Bedingungen zu finden, die eine Trennung freier und aufgeädelter β -Cyclodextrine im elektrischen Feld ermöglichen. Darüber hinaus sollte versucht werden, fraktionierte Ionen_{10,6} Chlorid-Proben elektrophoretisch nach der Molmasse zu trennen.

Um Informationen über den Aggregationszustand und die Mikrostruktur der Polyrotaxane in Lösung zu erhalten, sollten zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden. Es stellte sich die Frage, ob und unter welchen Bedingungen Energietransfer zwischen den aufgeädelten fluoreszenzmarkierten β -Cyclodextrinen stattfindet.

Mittels Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie sollte versucht werden, die fluoreszenzmarkierten Polyrotaxane als Einzelteilchen abzubilden. Darüber hinaus sollte die spezifische Bindung von Streptavidin an ein fluoreszenzmarkiertes, biotinyliertes Polyrotaxan mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

3 Die Synthese monofunktionaler Cyclodextrine

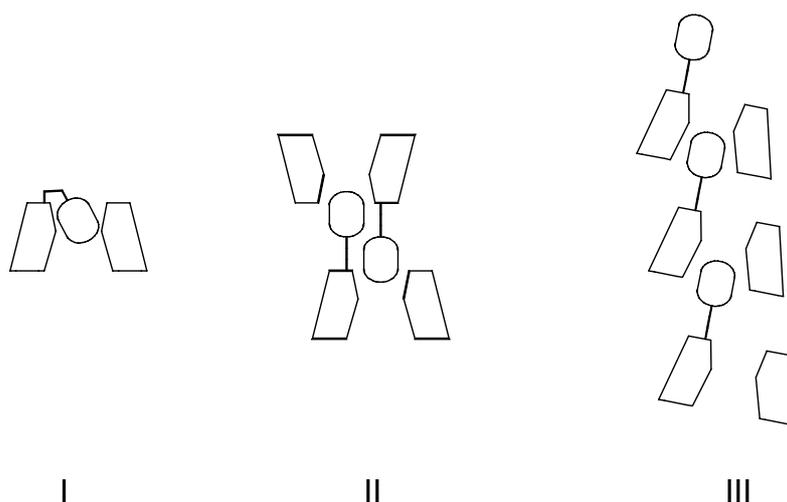
Die Synthese einheitlich monofunktionalisierter Cyclodextrine ist in der Literatur umfassend beschrieben [1-3]. Sie erfordert regioselektive Reagenzien, eine optimale Reaktionsführung und eine gute Trennbarkeit der Produkte.

Aufgrund der großen Zahl von möglichen Stellungsisomeren am Cyclodextringerüst führt die Umsetzung von Cyclodextrinen meist zu uneinheitlichen Produkten (s. Abb. 1-1) [3]. Das heißt, neben dem Produkt mit dem gewünschten Substitutionsgrad fallen homologe Derivate mit größerem und kleinerem Substitutionsgrad an. Die Produktverteilung hängt von der Wahl der Reaktionsbedingungen und der Regioselektivität des verwendeten Reagens ab. Zur effizienten Einführung nur eines Substituenten sollte das Reagens langsam und im Unterschuß eingesetzt werden. Die Isolierung des monofunktionalisierten Cyclodextrins kann chromatographisch oder mit Hilfe selektiver Fällungsreagenzien erfolgen. Als Voraussetzung für eine chromatographische Trennung muß der Substituent eine deutlich andere Polarität aufweisen als das native Cyclodextrin. Butyl- [4], Benzoyl- [5] oder Tosyl- [6] funktionalisierte Cyclodextrine lassen sich zum Beispiel gut chromatographisch reinigen, Cyclodextrine mit weniger hydrophoben Hydroxypropyl- [7] oder Methyl- [8, 9] Substituenten hingegen schlechter. Die Entwicklung effizienter Fällungsmethoden ist präparativ sehr aufwendig, erlaubt aber eine Trennung der Produkte im Grammaßstab. Dies ist mittels Chromatographie nicht möglich.

Als Ausgangsverbindung für die Synthese monosubstituierter Cyclodextrine **1a** und **1b** eignen sich besonders die Cyclodextrintosylate. Das 6-O-Tosylat ist durch Umsetzung mit p-Toluolsulfonsäurechlorid in Pyridin zugänglich [6, 10]. Diese Reaktion ist durch eine besonders hohe Regioselektivität gekennzeichnet, die auf den Einschluß des Reagens in das Cyclodextrin zurückzuführen ist. Dies ermöglicht eine regioselektive, elektrophile Substitution der Hydroxylgruppe OH-6 im Komplex [11]. Durch Veresterung der Cyclodextrine mit 3-Nitrophenyltosylat in DMF/Wasser bei pH = 10 werden die isomeren 2-O-Tosylate erhalten [12-14]. Die Hydroxylgruppe in Position drei läßt sich selektiv mit 2-Naphthalinsulfonsäurechlorid in Acetonitril/Wasser bei pH = 12 sulfonieren [15-17]. Während Cyclodextrintosylate in wäßriger Lösung gegenüber Säuren relativ stabil sind, führt der Angriff von Basen zur Bildung der Anhydroderivate [18, 19].

Auf den Cyclodextrintosylaten baut eine breite Synthesechemie auf. So können Cyclodextrin-6-O-sulfonate mit Nucleophilen wie Azid-Ionen [20], Halogenid-Ionen [21], Thiolen [22] und Aminen [23] leicht in die 6-Desoxyderivate überführt werden. Die 6-Azido-6-desoxycyclodextrine lassen sich einfach zu den präparativ wichtigen 6-Amino-6-desoxycyclodextrinen reduzieren [10, 23, 24]. Diese reagieren mit zahlreichen Elektrophilen wie Isothiocyanaten [25], Aminosäuren [20] oder Oligopeptiden [26] zu den entsprechenden Thioharnstoffen oder Amiden. Durch Umsetzung mit Phosphoniumsalzen können die katalytisch wichtigen Diphosphane erhalten werden [27].

Monofunktionalisierte Cyclodextrine, die einen hydrophoben Substituenten tragen, können in wäßriger Lösung Cyclodextrin-Gast-Konjugate bilden (Schema 3-1) [22, 23, 28]. Die Stabilität solcher Einschlußverbindungen ist umso größer, je besser der Substituent die Kavität des Cyclodextrins ausfüllt.



Schema 3-1: Die Topologie I) monomerer, II) dimerer und III) polymerer Cyclodextrin-Gast-Konjugate.

Ein kovalent gebundenes Gastmolekül kann durch einen freien Gast aus der Cyclodextrinkavität verdrängt werden. Dieser Vorgang ist mit Hilfe der optischen Absorption [29], Fluoreszenz [30] oder des Circular dichroismus [31, 32] spektroskopisch nachweisbar. Wang untersuchte zum Beispiel den Einschluß polarer, ungeladener Gastmoleküle wie 1-Adamantanol, L-Borneol und L-Menthol in Mono-(6-fluoresceinyl-6-desoxy)- β -Cyclodextrin [25]. Für den Nachweis der Bildung von Wirt-Gast-Komplexen verwendete er die UV/VIS- und die Fluoreszenzspektroskopie. Dabei führte der Einschluß von Gastmolekülen im UV/VIS-Spektrum zu einer deutlichen Blauverschiebung der Absorptionsmaxima. Bei der Fluoreszenzspektroskopie wurde die charakteristische Änderung der Fluoreszenzintensität zur Detektion genutzt. Der Einschluß von reinem Fluorescein in β -Cyclodextrin **1b** wurde von

Flamigni untersucht [33]. Mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung konnte sie zeigen, daß bevorzugt ein partieller Einschluß des Xanthenrests in die Kavität des β -Cyclodextrins **1b** erfolgt (s. Kap. 6, Abb. 6-1).

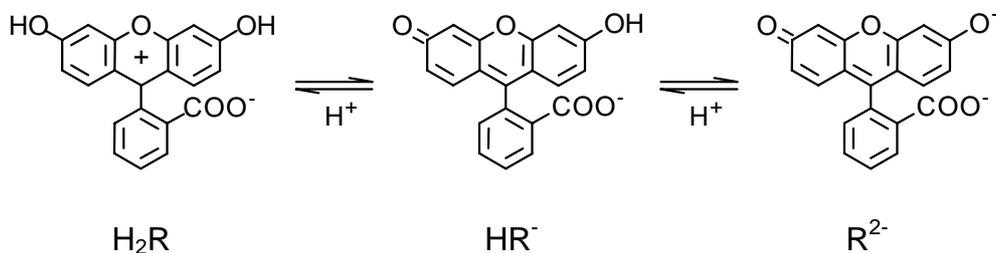


Abb. 3-1: Das Protolysegleichgewicht von Fluorescein.

Die Ladung des freien und gebundenen Fluoresceins ist vom pH-Wert abhängig (Abb. 3-1) [34]. Wang konnte durch Messung der Komplexbildungskonstanten nachweisen, daß die neutrale Form H_2R des Mono-(6-fluoresceinyl-6-desoxy)- β -Cyclodextrins polare, ungeladene Gäste stärker bindet als die negativ geladenen Formen HR^- und R^{2-} . Somit kann die Spezifität der Komplexbildung über die Ladung des Substituenten variiert werden. Eine hohe Selektivität ist die Grundvoraussetzung für den Einsatz von Cyclodextrinderivaten zur molekularen Erkennung. Dansyl-modifizierte β -Cyclodextrine zeigen zum Beispiel gegenüber Steroidverbindungen wie Chenodesoxy- und Ursodesoxycholsäure eine sehr hohe Selektivität [30, 31]. β -Cyclodextrin-modifizierte Diphosphane führen als supramolekulare Katalysatoren bei der Hydrierung und Hydroformylierung von Olefinen zu ungewöhnlich hohen Substratselektivitäten [27]. Die Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat kann nach Ikeda durch den Zusatz von Histamin-funktionalisiertem β -Cyclodextrin beschleunigt werden [35]. Fernández und Defaye untersuchten die Löslichkeit und das Einschlußverhalten von N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-thioharnstoffverbindungen in Wasser (Abb. 3-2). Ihren Messungen zufolge führt die Einführung der Thioharnstoffgruppe unabhängig von der Polarität des N'-Substituenten zu einer 25 bis 43-fachen Erhöhung der Löslichkeit gegenüber nativem β -Cyclodextrin. Dies ist für medizinische Anwendungen von großer Bedeutung. So kann die Wasserlöslichkeit des Krebs-Therapeutikums Taxotère[®] durch den Einschluß in diese Thioharnstoffderivate von 0.004 g/L auf bis zu 4.7 g/L erhöht werden [36].

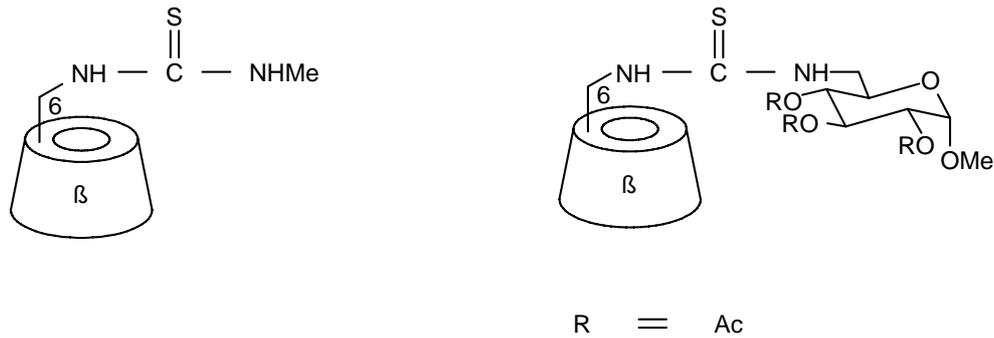
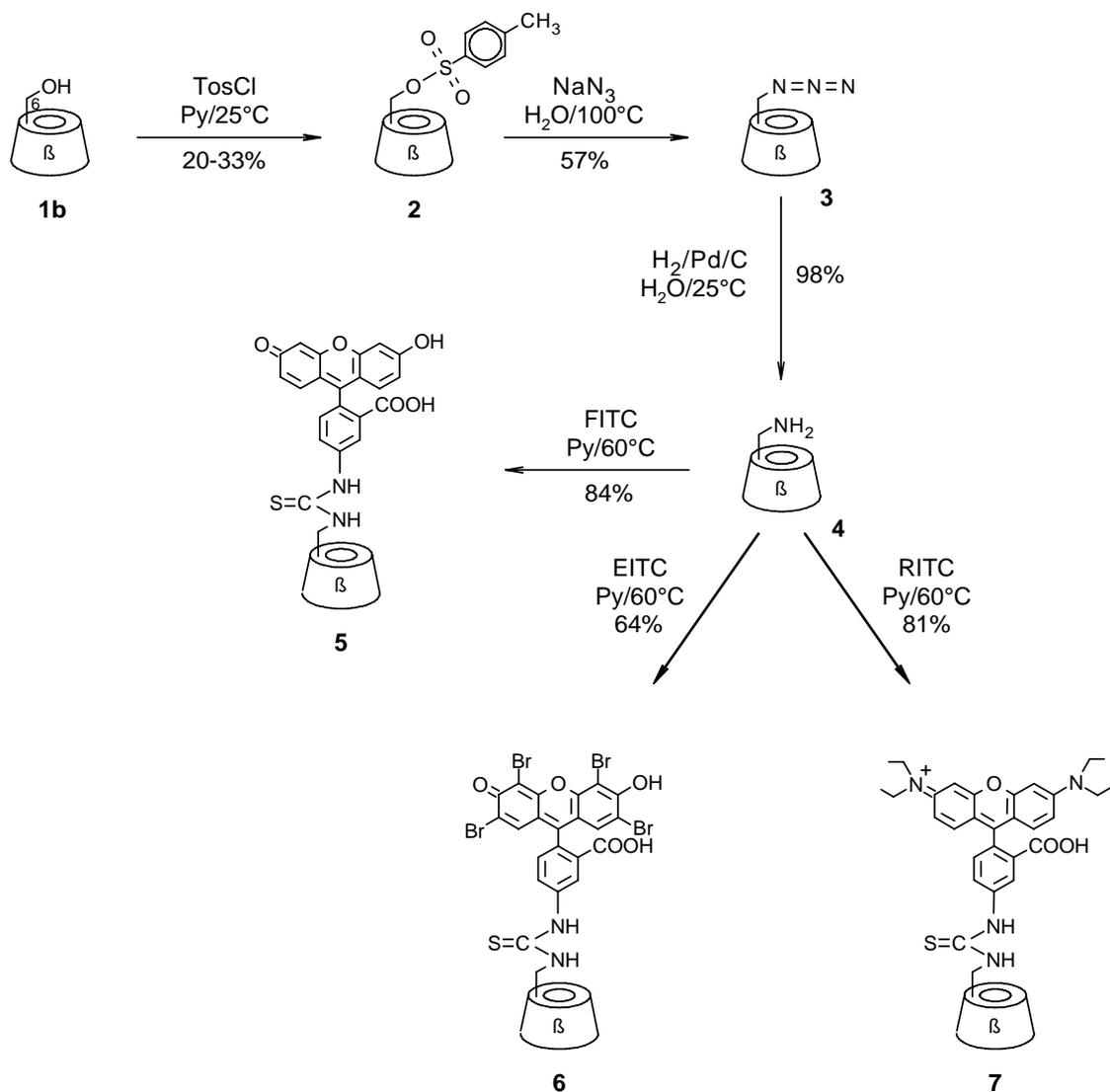


Abb. 3-2: Wasserlösliche Thioharnstoffderivate des β -Cyclodextrins nach Fernández [36].

Tamura und Ueno veröffentlichten die Synthese eines Donor-Akzeptor-modifizierten Rotaxans aus Naphthyl-funktionalisierten β -Cyclodextrinen und Dansyl-modifiziertem Polyethylenglycol [37, 38]. Mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung ist es ihnen 1998 erstmals gelungen, Heteroenergietransfer innerhalb eines Rotaxans nachzuweisen (s. Kap. 6.2, Abb. 6-3). Letzteres eröffnet neue Wege zur Untersuchung supramolekularer Strukturen in Lösung.

3.1 Die Synthese fluoreszenzmarkierter Cyclodextrine

Die Synthese einheitlich monosubstituierter, fluoreszenzmarkierter β -Cyclodextrine erfolgte über die Tosylatroute. So wurde ausgehend vom β -Cyclodextrin **1b** nacheinander das Mono-6-O-Tosylat **2**, das Mono-6-desoxy-Azid **3** und das Mono-6-desoxy-Amin **4** hergestellt. Die Fluorescein-, Eosin- und Rhodamin-markierten β -Cyclodextrine **5**, **6** und **7** sind schließlich durch Umsetzung des Mono-6-desoxy-Amins **4** mit Fluoresceinisothiocyanat (FIT), Eosinisothiocyanat (EITC) und Rhodaminisothiocyanat (RITC) im Sinne einer Edman-Kupplung zugänglich (Schema 3-2). Die einzelnen Stufen der Synthese werden im folgenden kurz diskutiert.



Schema 3-2: Die Synthese der Fluorescein-, Eosin- und Rhodamin-markierten β -Cyclodextrine **5**, **6** und **7**.

Das **Mono-(6-O-(p-tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin 2** wurde unter wasserfreien Bedingungen durch Umsetzung von β -Cyclodextrin **1b** mit Tosylchlorid in Pyridin erhalten [12, 39, 40]. Die Reinigung des Rohprodukts wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit optimiert. Die Abtrennung der hydrophilen Verunreinigungen (β -Cyclodextrin, Pyridiniumsalze) erfolgte durch Umkristallisation aus Wasser/i-Propanol. Zur Entfernung der hydrophoben Verunreinigungen (homologe Derivate, Tosylchlorid) wurde das vorgereinigte Rohprodukt in N,N-Dimethylacetamid gelöst und in Aceton gefällt. Eine Kontrolle der Reinigungsschritte ist mittels DC möglich. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 33 % erhalten. In der Literatur werden Ausbeuten von 16 % genannt [23]. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, das Mono-6-O-Tosylat **2** im Grammaßstab herzustellen. Der damit verbundene Trennaufwand ist im Vergleich zur chromatographischen Reinigung deutlich geringer.

Im RP-HPL-Chromatogramm des Monotosylats **2** ist ein 10-20 %-iger Anteil an nativem β -Cyclodextrin **1b** nachweisbar (s. Abb. 3-3). Dies ist auf die Bildung stabiler Einschlußverbindungen aus **2** und **1b** zurückzuführen [26]. Die nachfolgenden Umsetzungen werden dadurch nicht beeinträchtigt. Eine quantitative Abtrennung des β -Cyclodextrins **1b** konnte mittels Ionenaustauschchromatographie auf der Stufe des Monoamins **4** erzielt werden.

Das **Mono-(6-azido-6-desoxy)- β -cyclodextrin 3** wurde nach einer Vorschrift von Djedaini-Pilard durch Umsetzung von Monotosylat **2** und Natriumazid synthetisiert [26, 39]. Das kristalline Produkt war durch Umkristallisation aus Wasser mit einer Ausbeute von 57 % erhältlich. Analog zum Monotosylat **2** konnte mittels RP-HPLC ein 10-20 %-iger Anteil an β -Cyclodextrin **1b** im Monoazid **3** nachgewiesen werden.

Das **Mono-(6-amino-6-desoxy)- β -cyclodextrin 4** ist durch Reduktion des Monoazids **3** zugänglich. Als Methode wurde die katalytische Hydrierung am Pd/C-Katalysator in Wasser gewählt [23, 39]. Nach Abtrennung des Katalysators konnte das Produkt mit einer Ausbeute von 98 % isoliert werden. Das darin enthaltene und ursprünglich aus der Synthese des Monotosylats **2** stammende, β -Cyclodextrin **1b** (10-20 Gew.-%) ist durch Umkristallisation nur teilweise vom Monoamin **4** abtrennbar. Eine sehr effiziente Methode stellt die Ionenaustauschchromatographie (IEC) dar. Dazu wurde das Produkt **4** in verdünnter Essigsäure gelöst und auf die Säule eines schwach sauren Kationenaustauschers gegeben. Dieser bindet sowohl das protonierte Monoamin **4** als auch das β -Cyclodextrin **1b**. Durch Elution mit Wasser und Ammoniaklösung wird der pH-Wert im System sukzessive erhöht. Dadurch wurde nacheinander zuerst das native β -Cyclodextrin **1b** (pH = 5-7) und dann das Monoamin **4** selektiv eluiert (pH = 8-14). Nach der Abtrennung des Lösungsmittels konnte das reine Produkt **4** in Form eines weißen Pulvers erhalten werden

(Ausbeute 86 %). Die Kontrolle der Trennung erfolgte mittels DC und RP-HPLC (Abb. 3-3).

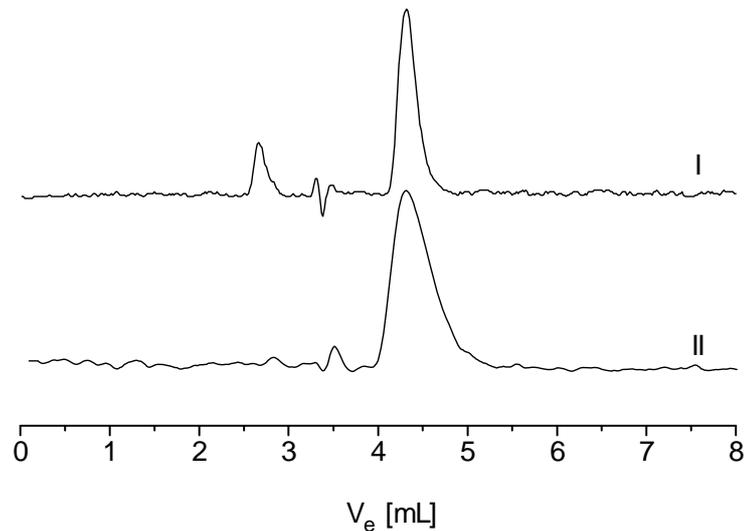


Abb. 3-3: Das HPL-Chromatogramm des Monoamins **4** I) vor und II) nach der IEC.

Monoamin **4**: 4.3 mL, β -Cyclodextrin **1b**: 2.6 mL, Laufmittel: 3.4 mL.

Eine anschließende Umkristallisation aus Wasser lieferte das kristalline Produkt, führte aber aufgrund der guten Löslichkeit des Monoamins **4** in Wasser (~ 71 g/L) zu einem erheblichen Substanzverlust von 50-60 %.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Reinigungsvorschrift stellt eine schonende und effiziente Methode zur Abtrennung von β -Cyclodextrin **1b** dar. Sie hat im Vergleich zur Chromatographie den Vorteil, daß die Reinigung auch bei Substanzmengen im Grammaßstab mit einem vertretbaren Aufwand durchführbar ist. Aufgrund der hohen Kapazität des Ionenaustauschers (10 Val/L) werden für eine Trennung relativ geringe Mengen an Trennmaterial benötigt. Darüber hinaus kann der Ionenaustauscher regeneriert und so mehrfach zur Reinigung verwendet werden.

N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*m*-carboxyfluoresceinyl)-thioharnstoff **5** wurde durch Umsetzung von Monoamin **4** und Fluoresceinisothiocyanat im Sinne einer Edman-Kupplung hergestellt [41]. Als Lösungsmittel diente Pyridin. Der Umsatz des Monoamins **4** wurde mittels RP-HPLC kontrolliert. Die Bildung des Fluoresceinmarkierten β -Cyclodextrins **5** kann anhand des IR-Spektrums einfach nachgewiesen werden. Die für Isothiocyanate charakteristische NCS-Schwingung verschwindet bei vollständigem Reaktionsumsatz.

Nach einer Reaktionszeit von 3 h wurde die Reaktion abgebrochen und das Lösungsmittel entfernt. Die Aufarbeitung des orangefarbenen Rohprodukts erfolgte

in zwei Schritten. Zur Abtrennung von überschüssigem Fluoresceinisothiocyanat wurde das Rohprodukt in N,N-Dimethylacetamid gelöst und das Produkt selektiv in Aceton gefällt. Durch Aufnahme des getrockneten Rückstandes in Wasser, Gefrier-trocknung und Nachtrocknung im Hochvakuum bei 60°C wurden komplex gebundene Lösungsmittelreste entfernt. Alle Reinigungsschritte können mittels DC, RP-HPLC und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie einfach überprüft werden. Das feinpulvrige, orangefarbene Produkt war mit einer Ausbeute von 84 % erhältlich.

Durch die Arbeiten von Mchedlov-Petrossyan und Anthoni [34, 42, 43] ist bekannt, daß Xanthenfarbstoffe je nach Lösungsmittel in unterschiedlichen tautomeren Formen vorliegen (Abb. 3-4). So ist das Tautomeriegleichgewicht von Fluorescein in DMSO fast vollständig auf die Seite des Lactons III verschoben. Eosin hingegen nimmt bevorzugt die Form I der Säure ein.

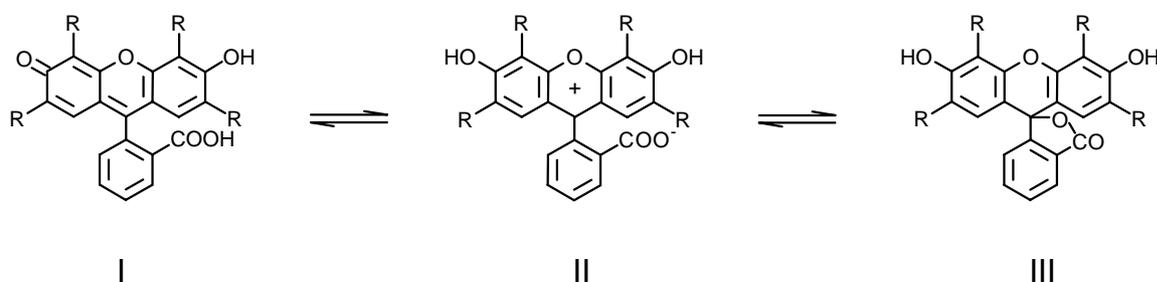


Abb. 3-4: Die tautomeren Formen von Fluorescein (R = H) und Eosin (R = Br):

I) freie Säure, II) Zwitterion und III) Lacton.

Die Struktur der Xanthenfarbstoffe in Lösung läßt sich am besten mittels $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie nachweisen. Denn die Anzahl und die Intensität der Signale sind von der Lage des Tautomeriegleichgewichts abhängig [43]. Anhand der $^{13}\text{C-NMR}$ - und DEPT-Spektren des Fluoresceinyl- β -Cyclodextrins **5** in DMSO zeigte sich, daß die chemischen Verschiebungen des Fluoresceinylrestes gut mit den bekannten Werten für Fluorescein übereinstimmen. Somit liegt das Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** in DMSO ebenfalls bevorzugt als Lacton vor. Das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **5** ist in Abbildung 3-5 dargestellt.

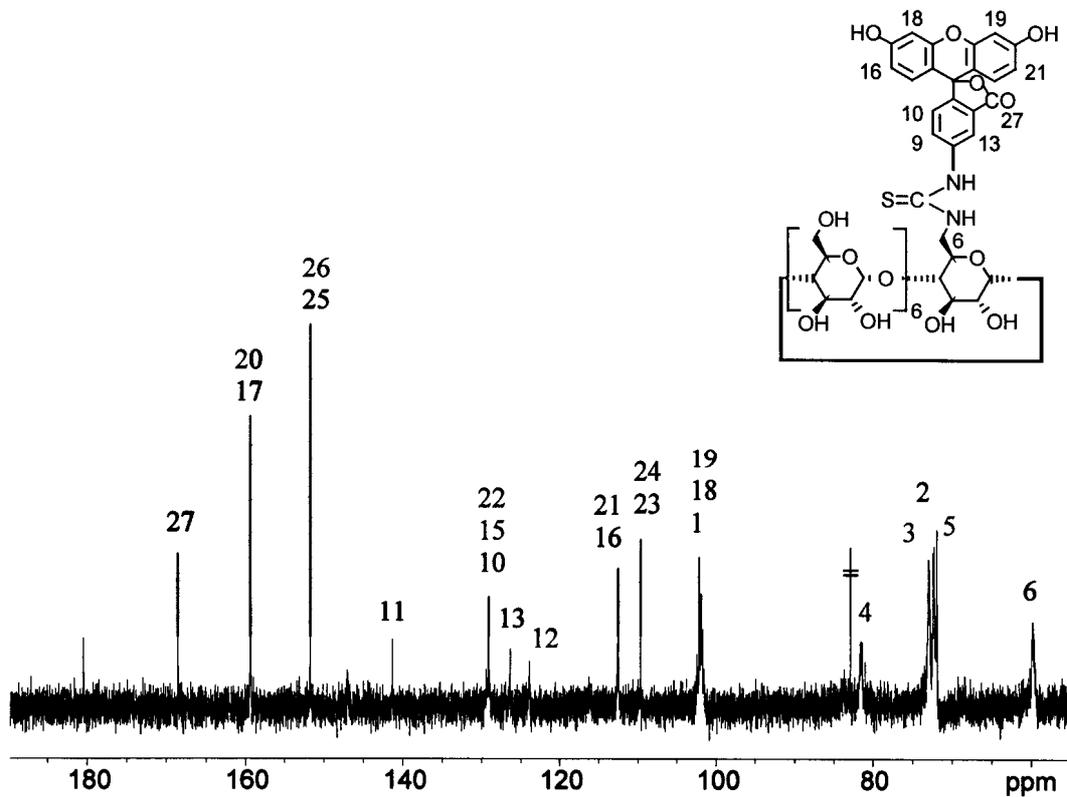


Abb. 3-5: Das ^{13}C -Spektrum des Fluorescein-markierten β -Cyclodextrins **5** in DMSO-d_6 .

N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*m*-carboxyeosinyl)-thioharnstoff **6** wurde analog zur Synthese des Fluorescein-markierten β -Cyclodextrins **5** durch Umsetzung von Monoamin **4** und Eosinisothiocyanat hergestellt. Nach einer Reaktionszeit von 10 h war die Reaktion vollständig. Die Aufarbeitung des Rohprodukts erfolgte analog zu **5** in zwei Stufen. Das feinpulvrige, rote Produkt konnte mit einer Ausbeute von 81 % isoliert werden. Der Strukturnachweis des Eosinyl- β -Cyclodextrins **6** erfolgte mittels ^{13}C -NMR- und DEPT-Spektroskopie. Im Vergleich zum Fluorescein-markierten β -Cyclodextrin **5** sind die charakteristischen Signale C-16, C-21 und C-17 um jeweils etwa 20 ppm und die Signale C-23 und C-24 um etwa 10 ppm zu tieferem Feld verschoben. Letzteres steht in guter Übereinstimmung mit den für Eosin in DMSO bekannten chemischen Verschiebungen [42, 43]. Im Gegensatz zum Fluorescein-markierten β -Cyclodextrin **5** liegt das Eosinderivat **6** somit überwiegend als freie Säure I vor (s. Abb. 3-4). Abbildung 3-6 zeigt das ^{13}C -NMR-Spektrum des Eosinyl-markierten β -Cyclodextrins **6** (vgl. Abb. 3-5).

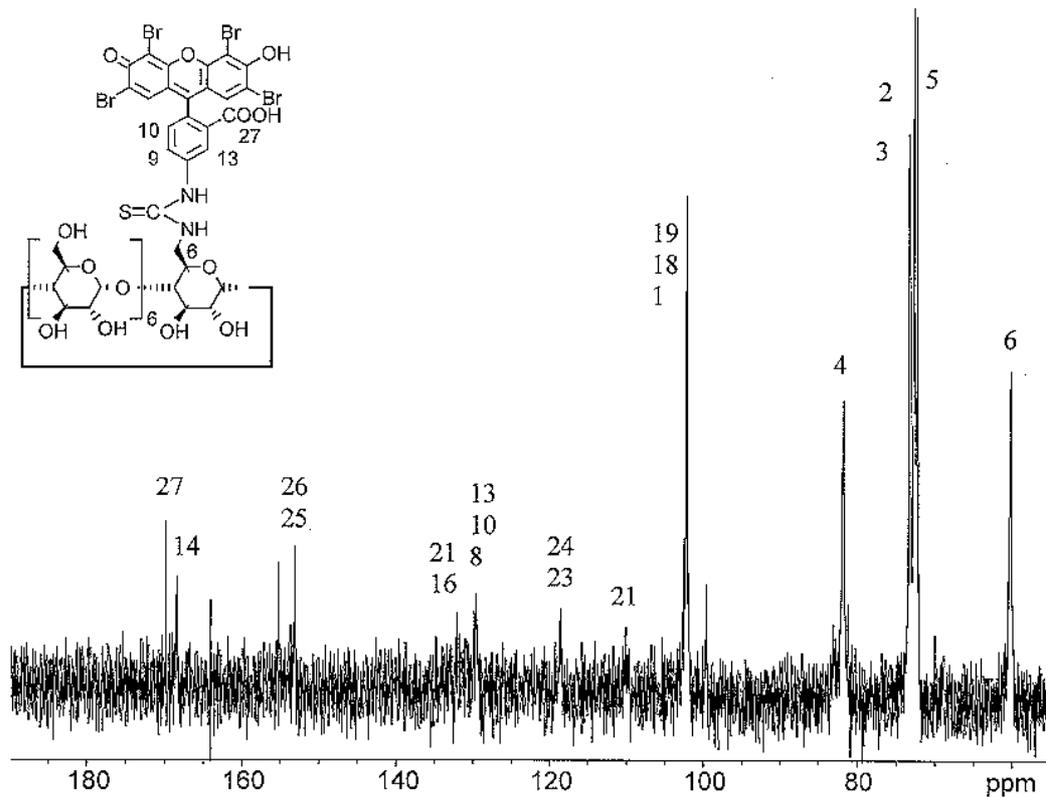


Abb. 3-6: Das ^{13}C -Spektrum des Eosin-markierten β -Cyclodextrins **6** in DMSO-d_6 .

N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*p/m*-carboxrhodaminyl)-thioharnstoff **7**

wurde analog zur Synthese des Fluorescein-markierten β -Cyclodextrins **5** durch Umsetzung von Monoamin **4** und Rhodaminisothiocyanat (Isomerengemisch) hergestellt. Nach 24 h wurde die Reaktion abgebrochen. Reaktionszeiten länger als 24 h führten zu keiner weiteren Umsatzsteigerung. Die Aufarbeitung des violetten Rohprodukts wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zur Abtrennung von überschüssigem Monoamin **4** und Rhodaminisothiocyanat wurde das Rohprodukt in *N,N*-Dimethylacetamid gelöst und in Aceton/Wasser gefällt. Komplex gebundenes Lösungsmittel wurde durch Aufnahme des Rückstands in Wasser, Gefriertrocknung und Nachrocknung im Hochvakuum bei 60°C abgetrennt. Für die Kontrolle der Reinigungsschritte wurde die DC, RP-HPLC und die ^1H -NMR-Spektroskopie eingesetzt. Das feinpulvrige, violette Produkt konnte mit einer Ausbeute von 64 % isoliert werden.

Das Tautomeriegleichgewicht von Rhodamin B ist von Mchedlov-Petrosyan et al. für verschiedene Lösungsmittel untersucht worden [34, 44]. Demnach liegt Rhodamin B in DMSO bevorzugt als freie Säure vor. Da es sich bei dem Rhodamin-markierten β -Cyclodextrin **7** um ein Isomerengemisch handelt, ist das ^{13}C -NMR-Spektrum sehr komplex. Es zeigte sich jedoch, daß die meisten für Rhodamin B

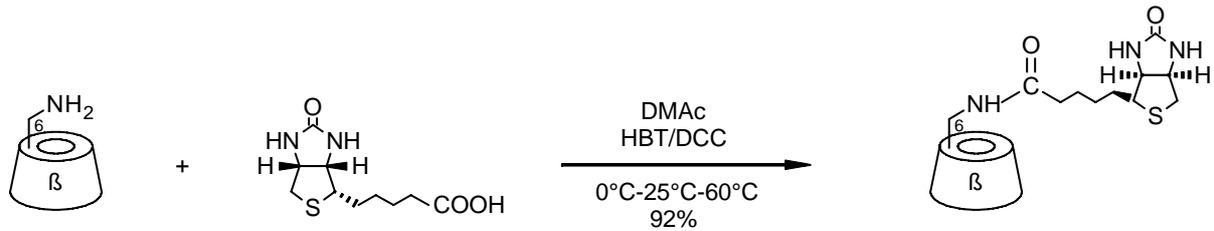
bekanntem chemischen Verschiebungen auch im ^{13}C -NMR-Spektrum des Rhodaminyl- β -Cyclodextrins **7** auftreten. Das deutet darauf hin, daß das Tautomeriegleichgewicht von **7** ebenfalls auf der Seite der freien Säure liegt.

Die Fluorescein-, Eosin- und Rhodamin-markierten β -Cyclodextrine **5**, **6** und **7** sind zwar strukturell ähnlich, unterscheiden sich aber beträchtlich hinsichtlich ihrer Löslichkeit in Wasser. Der hydrophobe Charakter der Xanthenfarbstoffe nimmt in der Reihenfolge Fluorescein \rightarrow Eosin \rightarrow Rhodamin zu. Folglich ist das Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** in Wasser besser löslich als das homologe Eosin- und Rhodaminderivat. Unter alkalischen Bedingungen wurde eine deutliche Erhöhung der Wasserlöslichkeit von **5** und **6** beobachtet. Dies ist auf die negative Ladung des Fluorescein- bzw. Eosinrestes infolge Deprotonierung zurückzuführen (s. Abb. 3-1). Das Rhodamin-markierte β -Cyclodextrin **7** zeigt in wäßriger, alkalischer Lösung eine deutlich schlechtere Löslichkeit. Durch Deprotonierung der Carboxylgruppe geht der unter neutralen Bedingungen positiv geladene Rhodaminrest in eine hydrophobere, zwitterionische Struktur über [44]. Voraussetzung für den Aufbau funktioneller Polyrotaxane aus funktionalisierten Cyclodextrinen ist eine hinreichende Wasserlöslichkeit der Cyclodextrinbausteine. Das Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und das Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** sollten deshalb bevorzugt in wäßrigen, alkalischen Lösungen zum Polyrotaxan umgesetzt werden. Die Tendenz zur Bildung stabiler Cyclodextrin-Gast-Konjugate sollte aufgrund der höheren Hydrophilie des deprotonierten Substituenten ebenfalls herabgesetzt sein.

3.2 Die Synthese Biotin-markierter Cyclodextrine

Ausgangsverbindung für die Synthese des einheitlich monosubstituierten, Biotin-markierten β -Cyclodextrins **8** war das Mono-(6-amino-6-desoxy)- β -cyclodextrin **4**. Es wurde nach der in Kapitel 3.1 beschriebenen Syntheseroute hergestellt.

Zur Synthese von **Mono-(6-D(+)-biotinyl-imino-6-desoxy)- β -cyclodextrin 8** wurde D(+)-Biotin über die Carboxylgruppe mit dem N-Terminus des Monoamins **4** verknüpft. Die Kupplungsreaktion erfolgte nach einer Methode von König und Geiger [45]. Zur Aktivierung der Carboxylgruppe wurde D(+)-Biotin mit 1-Hydroxybenzotriazol (HBT) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in N,N-Dimethylacetamid umgesetzt. Dabei entsteht ein äußerst reaktiver 1-Hydroxybenzotriazolester, der das Monoamin **4** zum Amid **8** acyliert. Der Reaktionsumsatz wurde mittels DC und RP-HPLC kontrolliert. Das Reaktionsschema ist in Schema 3-3 abgebildet.



Schema 3-3: Die Synthese des Biotin-markierten β -Cyclodextrins **8**.

Bei der Acylierung wird Wasser freigesetzt. Dieses reagiert mit DCC zum N,N'-Dicyclohexylharnstoff, der als weißer Feststoff ausfällt. Nach einer Reaktionszeit von 24 h wurde der N,N'-Dicyclohexylharnstoff durch Filtration abgetrennt und das Produkt selektiv in Aceton gefällt. Zur Entfernung von Lösungsmittelresten wurde der getrocknete Niederschlag in Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und im Hochvakuum bei 60°C nachgetrocknet. Das Biotin-markierte β -Cyclodextrin **8** konnte als weißer Feststoff mit einer hohen Ausbeute von 92 % isoliert werden.

Die Bildung des Biotin-markierten β -Cyclodextrins **8** zeigt sich besonders deutlich im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Die für D(+)-Biotin bekannte geminale ^2J - und vicinale ^3J -Kopplung der zum Schwefel-Atom benachbarten Methylengruppe ist auch im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Biotin-markierten β -Cyclodextrins **8** zu beobachten (Abb. 3-7).

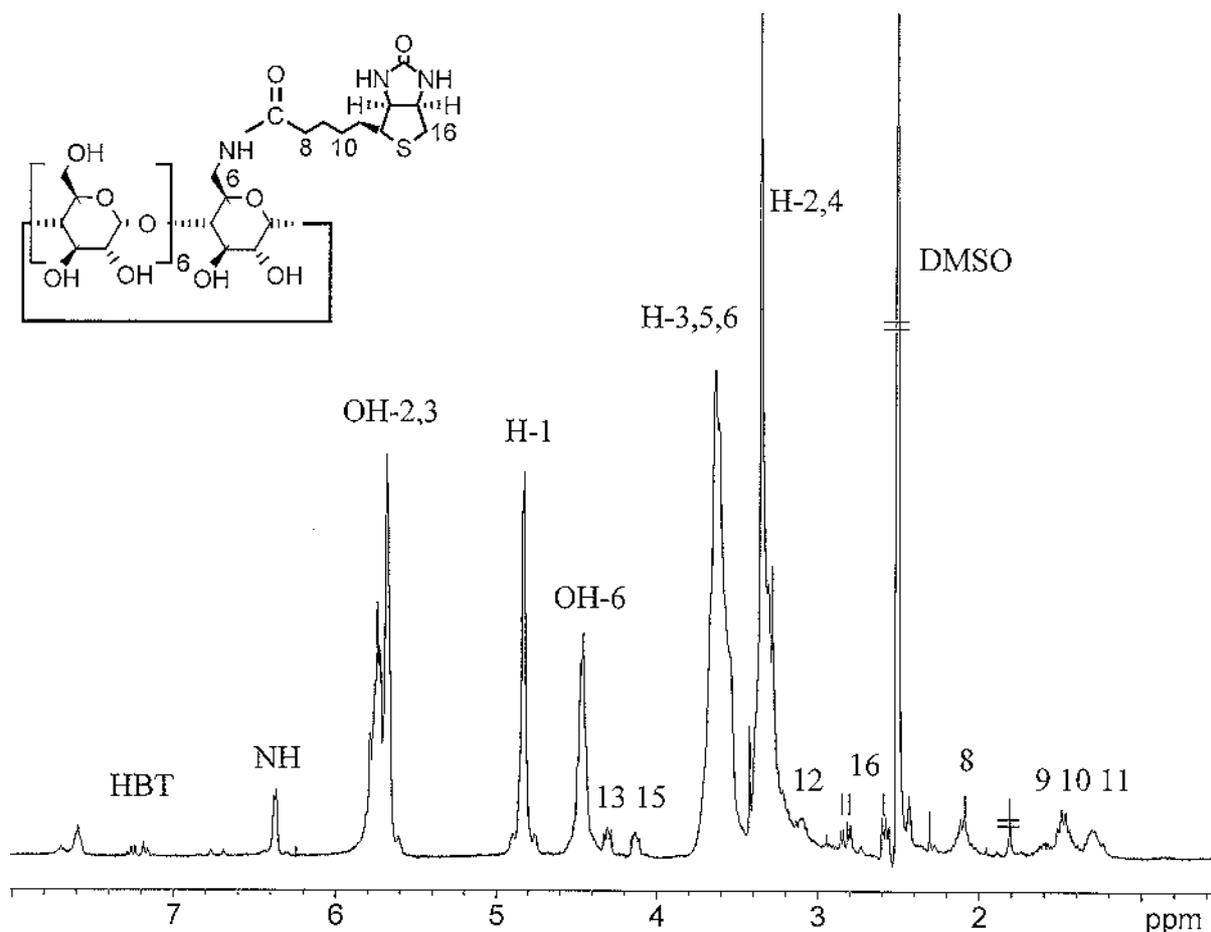


Abb. 3-7: Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Biotin-markierten β -Cyclodextrins **8** in DMSO-d_6 mit geminaler Kopplung $^2J_{16a-16b} = 12.4 \text{ Hz}$ und vicinaler Kopplung $^3J_{16b-15} = 5.6 \text{ Hz}$ und $^3J_{16a-15} = 4.8 \text{ Hz}$.

Die Signale im Bereich zwischen 6.5-7.8 ppm sind auf eine Verunreinigung durch 1-Hydroxybenzotriazol (HBT) zurückzuführen. Dies deutet auf die Bildung einer stabilen Einschlußverbindung aus HBT und Biotin-markiertem β -Cyclodextrin **8** hin [46]. Durch den Einsatz des Reagens im Unterschuß könnte eine weitere Optimierung der Synthese erzielt werden. Letzteres wurde aus Zeitgründen nicht mehr überprüft.

4 Synthese und Charakterisierung von Iononen

Ionene sind wasserlösliche, amphiphile Polymere mit einer alternierenden Abfolge hydrophober Oligomethyleinheiten und hydrophiler Ammoniumgruppen. Ionene sind nach Kern und Brenneisen durch eine Polykondensation im Sinne einer Menshutkin-Reaktion zugänglich [1]. Dabei werden Bis-(dimethylamino)-alkane mit α,ω -Dibromalkanen direkt zu Iononen umgesetzt. Der Mechanismus entspricht einer nucleophilen Substitutionsreaktion vom Typ S_N2 . Das Reaktionsschema ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

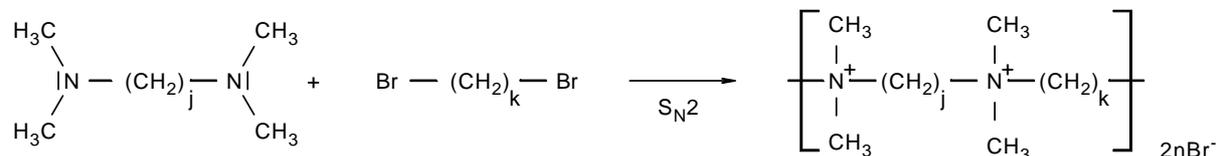


Abb. 4-1: Die Polykondensation von Bis-(dimethylamino)-alkan und α,ω -Dibromalkan zu Ionon_{j,k}-Bromid.

Der Abstand der Ammoniumgruppen innerhalb eines Ionens kann durch die Wahl der Monomere eingestellt werden. Ionene mit aliphatischen Segmenten C_2 - C_{20} wurden bereits synthetisiert [2].

Der Polymerisationsgrad der Ionene hängt von den Reaktionsbedingungen ab. So findet bei Temperaturen über 40°C oder Reaktionszeiten länger als 3 Wochen merklicher Kettenabbau durch Hoffmann-Eliminierung statt (Abb. 4-2) [2]. Effiziente Synthesewege zur Bildung hochmolekularer Ionene sind in den Arbeiten von Rembaum [3, 4] und Bockstaller [5] beschrieben.

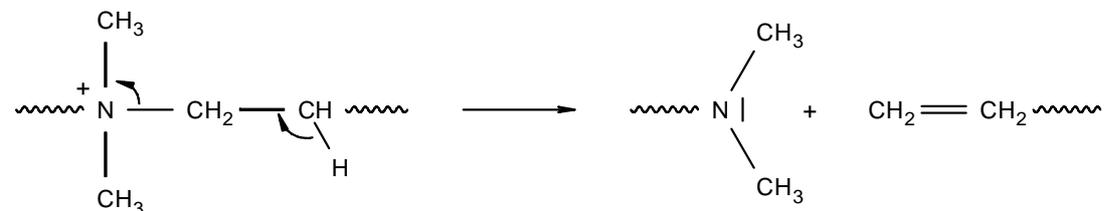


Abb. 4-2: Kettenabbau der Ionene durch Hoffmann-Eliminierung.

Durch die Arbeiten von Wenz und Keller ist bekannt, daß Ionene mit aliphatischen Segmenten größer C_{10} wasserlösliche Einschlußverbindungen mit Cyclodextrinen bilden [6, 7]. Die aliphatischen Segmente wirken dabei als Bindungsstellen für die Cyclodextrine, während die hydrophilen Ammoniumgruppen die Löslichkeit in Wasser gewährleisten. Da Ionene keine aciden funktionellen Gruppen besitzen, ist die Bildung der Einschlußverbindung vom pH-Wert unabhängig. Die Kinetik der Selbstorganisation von Ionen $_{10,6}$ Bromid und α - bzw. β -Cyclodextrin ist bereits von Herrmann umfassend untersucht worden [8, 9].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten wasserlösliche, fluoreszenzmarkierte Polyrotaxane hergestellt und mikroskopisch untersucht werden. Als Polymerbaustein dazu wurde Ionen $_{10,6}$ Chlorid gewählt. Um eine gute Abbildung der Polyrotaxane gewährleisten zu können, sollte das Ionen $_{10,6}$ Chlorid einen möglichst hohen Polymerisationsgrad und eine enge Molmassenverteilung aufweisen.

4.1 Die Synthese von Ionen $_{10,6}$ Chlorid

Bei der Darstellung von Ionen $_{10,6}$ Chlorid **10** erfolgte zuerst die Umsetzung von 1,6-Bis-(dimethylamino)-hexan und 1,10-Dibromdecan durch eine Menschutkin-analoge Polykondensation zum Ionen $_{10,6}$ Bromid **9** (Abb. 4-3). Um einen möglichst hohen Polymerisationsgrad zu erzielen, wurde nach einer von Bockstaller [5] optimierten Vorschrift gearbeitet (s. Kap.9.3). Man erhielt das Ionen $_{10,6}$ Bromid **9** in Form eines weißen, kristallinen Feststoffs mit einer Ausbeute von 82 %.

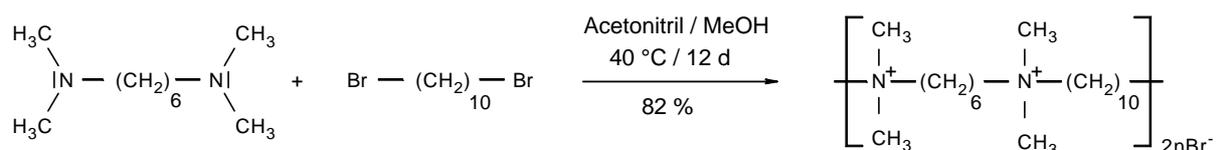


Abb. 4-3: Die Synthese von Ionen $_{10,6}$ Bromid **9** durch eine Menschutkin-analoge Polykondensation von Bis-(dimethylamino)-hexan und 1,10-Dibromdecan.

Anschließend wurden die niedermolekularen Bestandteile des Ionen $_{10,6}$ Bromids **9** mittels Dialyse abgetrennt. Die Überführung in das homologe Ionen $_{10,6}$ Chlorid **10** erfolgte durch Ionenaustausch. Das Produkt **10** konnte als weißer, kristalliner Feststoff im Grammaßstab isoliert werden.

Die Ionen $_{10,6}$ Chloride **11** und **12** wurden von Bockstaller [5] im Rahmen seiner Diplomarbeit synthetisiert und als Referenzsubstanzen für die Charakterisierung von Ionen $_{10,6}$ Chlorid **10** bereitgestellt.

4.2 Die Bestimmung der Molmasse von Ionen_{10,6} Chlorid

In den letzten Jahren hat die GPC mit gekoppelter Lichtstreuendetektion als Methode zur Bestimmung der Molmasse und Molmassenverteilung von Polymeren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Insbesondere bei Polymeren, von denen keine Standards zur Verfügung stehen, hat sich diese Methode bewährt [10-12]. Das Prinzip der Messung wird im folgenden kurz erklärt.

Bei der GPC-Messung mit gekoppelter Lichtstreuendetektion wird die gelöste, polydisperse Probe auf einer GPC-Säule nach der Molmasse in i Fraktionen aufgetrennt. Diese durchlaufen nacheinander eine Küvette, die von einem Laser durchstrahlt wird. Das Licht wird an den gelösten Teilchen gestreut. Die Detektion des Streulichts erfolgt mittels Photodioden unter einem jeweils definierten Streuwinkel θ . Für jede Fraktion erhält man dadurch die winkelabhängige Streuintensität, das Exzeß-Rayleigh-Verhältnis $R_i(\theta)$ (Gleichung 4-1). I_0 ist die Intensität des Primärstrahls, $I(\theta)$ die Intensität der Streustrahlung und r der Abstand zwischen Streuzentrum und Detektor.

$$R(\theta) = \frac{I(\theta) \cdot r^2}{I_0 \cdot (1 + \cos^2 \theta)} \quad (4-1)$$

Die zu den Meßwerten $R_i(\theta)$ gehörenden Konzentrationen werden mit Hilfe eines Differentialrefraktometers bestimmt, das dem Lichtstreuendetektor nachgeschaltet ist. Das Signal des Differentialrefraktometers RI_i ist nach Gleichung 4-2 der Massenkonzentration c_i der gelösten Substanz direkt proportional. k_{RI} ist eine lösungsmittelabhängige Gerätekonstante und dn/dc das Brechungsinkrement der gelösten Substanz.

$$RI_i = k_{RI} \cdot \left(\frac{dn}{dc} \right) \cdot c_i \quad (4-2)$$

Die mathematische Grundlage für die Auswertung der Lichtstreuung stellt die Debye-Zimm-Gleichung 4-3 dar [13, 14]. Dabei ist A_2 der Virialkoeffizient und M die Molmasse der gelösten Substanz. Die Teilchengometrie wird durch den mittleren quadratischen Trägheitsradius $\langle R_g^2 \rangle$ berücksichtigt. Die optischen Parameter des zu untersuchenden Systems sind in der Konstanten K zusammengefaßt (Gleichung 4-

4). λ_0 bezeichnet die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes, N_L die Avogadro-Konstante, n_0 den Brechungsindex des Lösungsmittels und dn/dc das Brechungsinkrement der gelösten Substanz im Lösungsmittel bei λ_0 . Die Winkelabhängigkeit von $Kc/R(\theta)$ ist durch den Betrag des Streuvektors $|\vec{q}| = q$ gegeben. Der Streuvektor wird als Differenz des einfallenden und des unter dem Winkel θ gestreuten Lichtvektors definiert (Gleichung 4-5).

$$\frac{K \cdot c}{R(q)} = \frac{1}{M} + \frac{\langle R_g^2 \rangle}{3M} \cdot q^2 + 2A_2 \cdot c \quad (4-3)$$

mit
$$K = \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2}{\lambda_0^4 \cdot N_L} \cdot \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (4-4)$$

und
$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (4-5)$$

Die Funktion $Kc/R(\theta)$ setzt sich jeweils aus einem winkelabhängigen, aber konzentrationsunabhängigen Anteil und einem konzentrationsabhängigen, aber winkelunabhängigen Anteil zusammen (s. Gleichung 4-3). Da die effektive Konzentration im Lichtstredetektor ≤ 0.3 g/L beträgt, kann der Term $2A_2 \cdot c$ vernachlässigt werden [12]. Die Molmasse M_i einer Polymerfraktion ergibt sich dann aus der linearen Winkelabhängigkeit von $Kc/R_i(\theta)$ durch Extrapolation auf den Winkel $\theta = 0$. Der dazugehörige Trägheitsradius $\langle R_g^2 \rangle_i^{1/2}$ ist über die Steigung der Geraden zugänglich. Die mittleren Molmassen M_w und M_n sowie die mittleren quadratischen Trägheitsradien $\langle R_g^2 \rangle_w$ und $\langle R_g^2 \rangle_n$ der Polymerprobe werden online aus den Einzelwerten M_i , c_i und $\langle R_g^2 \rangle_i$ der i Polymerfraktionen berechnet. Die Polymerisationsgrade P_w und P_n sowie die Polydispersität Q der Probe werden anhand der Definitionsgleichungen 4-6 und 4-7 ermittelt.

$$P_w = \frac{M_w}{M_0} \quad , \quad P_n = \frac{M_n}{M_0} \quad (4-6)$$

$$Q = \frac{M_w}{M_n} \quad (4-7)$$

Für die Bestimmung der Molmassen der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** wurde eine GPC-Anlage der Firma PSS eingesetzt. Diese bestand aus einem Lichtstreuendetektor ($\lambda_0 = 488 \text{ nm}$) und einem nachgeschalteten Differentialrefraktometer. Die Detektion der Lichtstreusignale erfolgte bei Raumtemperatur in einem Winkelbereich von 10-160°. Die Konzentration der injizierten Probelösungen betrug 5 mg/mL. Als Lösungsmittel diente eine 0.1 M wäßrige NaCl-Lösung. Durch den Zusatz von NaCl sollte der für geladene Polymere bekannte Polyelektrolyteffekt kompensiert werden.

Zur internen Kontrolle der GPC-Messung sollte zusätzlich ein Polyrotaxan **13** aus Ionen_{10,6} Chlorid **10** und α -Cyclodextrin **1a** hergestellt und vermessen werden. Die Molmassen M_w und M_n von **13** und **10** sollten sich dann um den Massenanteil an aufgefädelttem α -Cyclodextrin **1a** ($M(\mathbf{1a}) = 972.9 \text{ g/mol}$) unterscheiden. Bei bekanntem Polymerisationsgrad P_w und P_n des Ionen_{10,6} Chlorids **10** und bekanntem Belegungsgrad x durch α -Cyclodextrin **1a** ist ΔM_w und ΔM_n über Gleichung 4-8 abschätzbar.

$$\Delta M_w = P_n \cdot x \cdot M(\mathbf{1a}) \quad , \quad \Delta M_n = P_n \cdot x \cdot M(\mathbf{1a}) \quad (4-8)$$

Zur Herstellung des Polyrotaxans **13** wurde das Ionen_{10,6} Chlorid **10** nach einer Vorschrift von W. Herrmann [8] mit α -Cyclodextrin **1a** umgesetzt. Der Belegungsgrad von **10** durch **1a** wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie bestimmt (s. Kap. 9.3). Danach sind 45 % ($x = 0.45$) der Wiederholeinheiten von Ionen_{10,6} Chlorid **10** mit α -Cyclodextrinringen **1a** belegt. Die Struktur des Polyrotaxans **13** ist in Abbildung 4-4 dargestellt.

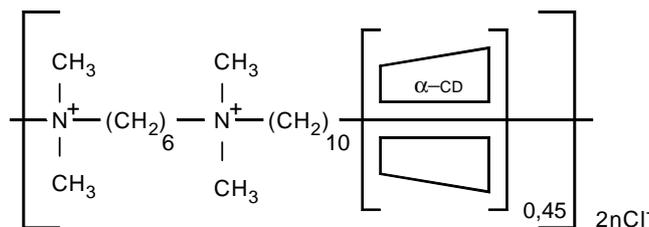


Abb. 4-4: Die Struktur des Polyrotaxans **13**.

Bei der Berechnung des mittleren Polymerisationsgrades von **13** muß der Belegungsgrad durch α -Cyclodextrin **1a** gemäß Gleichung 4-9 mitberücksichtigt werden. Im Vergleich zum Ionen_{10,6} Chlorid **10** ist somit ein geringerer Polymerisationsgrad zu erwarten (s. Gleichung 4-6). Die mittleren Molmassen, Polymerisationsgrade, Trägheitsradien sowie die Polydispersitäten der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11**, **12** und des Polyrotaxans **13** sind in Tabelle 4-1 zusammengestellt.

$$P_w = \frac{M_w}{M_0 + x \cdot M(1a)} \quad , \quad P_n = \frac{M_n}{M_0 + x \cdot M(1a)} \quad (4-9)$$

Tab. 4-1: Die mittleren Molmassen, Polymerisationsgrade, Trägheitsradien sowie die Polydispersitäten der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11**, **12** und des Polyrotaxans **13**.

	Ionen 12	Ionen 11	Ionen 10	Polyrotaxan 13
M_w [g/mol]	29 900	44 900	57 800	103 400
M_n [g/mol]	25 800	37 100	47 300	86 600
M_w/M_n []	1.16	1.21	1.22	1.19
P_w []	78	117	151	126
P_n []	68	97	123	105
$\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_w}$ [nm]	21	24	35	22
$\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_n}$ [nm]	22	25	33	22

Tabelle 4-1 zeigt, daß die Molmasse und damit der Polymerisationsgrad der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** in der Reihenfolge **12** \rightarrow **11** \rightarrow **10** zunimmt. Der relative Meßfehler liegt bei 5-10 %. Die Polydispersität der Proben M_w/M_n wurde zu jeweils 1.2 bestimmt. Für ein Polykondensat mit einer Schulz-Flory-Normalverteilung wäre ein Wert von $M_w/M_n = 2$ zu erwarten [15]. Die kleinere Uneinheitlichkeit ist auf die Abtrennung niedermolekularer Bestandteile mittels Dialyse zurückzuführen (s. Kap. 4.1).

Zur internen Kontrolle der Messung wurde zusätzlich das Polyrotaxan **13** vermessen. Nach Gleichung 4-8 sollte sich die Molmasse des Polyrotaxans **13** von der des Ionen_{10,6} Chlorids **10** um $\Delta M_w \approx 66\,000$ g/mol bzw. $\Delta M_n \approx 54\,000$ g/mol unterscheiden. Tabelle 4-1 zeigt, daß die Differenzen der Meßwerte im Rahmen der Meß-

genauigkeit gut mit den berechneten ΔM -Werten übereinstimmen. Somit konnte die Zuverlässigkeit der Meßergebnisse mit Hilfe des Kontrollexperiments überprüft werden. Eine weitere Möglichkeit dazu bietet der Vergleich der gravimetrisch und online, mittels RI-Detektion bestimmten Polymerkonzentration. Für die analysierten Proben wurde jeweils eine geringe Abweichung von $\Delta c \approx 5\%$ beobachtet. Eine wesentliche Wechselwirkung der Polymere **10**, **11**, **12** und **13** mit dem Trennmateriale der GPC-Säule findet folglich nicht statt. Die Molmassenverteilung der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11**, **12** und des Polyrotaxans **13** ist in Abbildung 4-5 dargestellt.

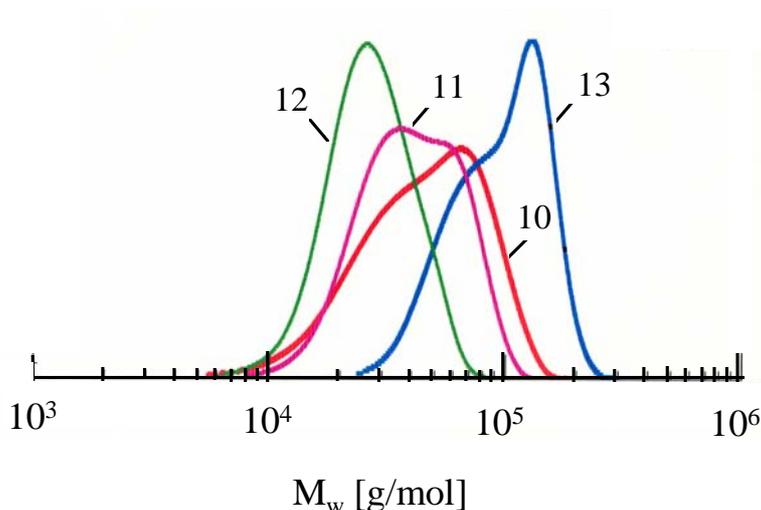


Abb. 4-5: Die Molmassenverteilung des Ionen_{10,6} Chlorids **10**, **11**, **12** und des Polyrotaxans **13**.

Die Polymerisationsgrade P_w und P_n der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11**, **12** und **13** wurden nach Gleichung 4-6 berechnet. Die mittlere Kettenlänge L_w und L_n eines Ionen_{10,6} Chloridmoleküls in gestreckter, all-trans-Konformation läßt sich dann nach Gleichung 4-10 abschätzen. Dabei ist $N = 18$ die Anzahl der Bindungen längs der Polymerachse bezogen auf eine Polymergrundeinheit und b die effektive Bindungslänge, die den Bindungswinkel zwischen den Atomen berücksichtigt. Unter Annahme des für Polyethylen bekannten Wertes von $b = 1.25 \text{ \AA}$, erhält man für die Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** die in Tabelle 4-2 aufgelisteten Mittelwerte. Die Kettenlänge L_w und L_n des Polyrotaxans **13** ist von der Anzahl der aufgefädelten α -Cyclodextrinringe **1a** unabhängig und daher identisch mit der Kettenlänge des Ionen_{10,6} Chlorids **10**.

$$L_w = P_w \cdot N \cdot b \quad , \quad L_n = P_n \cdot N \cdot b \quad (4-10)$$

Tab. 4-2: Die mittleren Kettenlängen L_w und L_n der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12**.

	Ionen 12	Ionen 11	Ionen 10
L_w [nm]	175	263	340
L_n [nm]	153	218	277

Im Vergleich zu den Molmassen sind die mittleren Trägheitsradien $\langle R_g^2 \rangle_w^{1/2}$ und $\langle R_g^2 \rangle_n^{1/2}$ der Polymerproben mit einem größeren Fehler von 20-30 % behaftet. Die mittels GPC-Analyse erhaltenen Meßwerte stellen im allgemeinen einen oberen Grenzwert dar (vgl. Kap. 4.3).

4.3 Die Bestimmung der Viskosität von Ionen_{10,6} Chlorid

In Kapitel 4.2 wurde gezeigt, daß die GPC-Messung mit gekoppelter Lichtstreuung detektion eine geeignete Methode zur Molmassenbestimmung von Ionen darstellt. Analog sollte die Viskosität der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** sowie des Polyrotaxans **13** untersucht werden. Dazu wurde eine GPC-Anlage der Firma PSS eingesetzt. Diese war mit einem Viskositätsdetektor und einem nachgeschalteten Differentialrefraktometer ausgestattet. Damit die Ergebnisse der Molmassenbestimmung mit denen der Viskositätsmessung vergleichbar sind, wurden die Analysen unter jeweils gleichen Bedingungen durchgeführt (s. Kap. 4.2).

Bei der GPC-Messung mit gekoppelter Viskositätsdetektion wird die gelöste, polydisperse Probe auf einer GPC-Säule nach der Molmasse in i Fraktionen aufgetrennt. Diese erreichen nacheinander den Viskositätsdetektor. Der Viskositätsdetektor besteht aus 4 Kapillaren, die in Form einer Wheatstoneschen Brücke angeordnet sind. Die spezifische Viskosität $\eta_{sp,i}$ einer Fraktion ist anhand der Druckdifferenzen innerhalb dieser Brücke bestimmbar [12]. Die zu $\eta_{sp,i}$ gehörende Konzentration c_i wird mit Hilfe eines Differentialrefraktometers gemessen (s. Kap. 4.2). Die mathematische Grundlage für die Auswertung der Viskositätsdaten stellt die Huggins-Gleichung 4-11 dar. Dabei ist $[\eta]$ der Staudinger-Index der gelösten Substanz in einem bestimmten Lösungsmittel bei einer Temperatur T und k_H die Huggins-Konstante.

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta](1 + k_H \cdot [\eta] \cdot c + \dots) \quad (4-11)$$

Aufgrund der niedrigen Polymerkonzentration ($\leq 0.1\text{-}0.3\text{ g/L}$) im Viskositätsdetektor kann die Potenzreihe nach dem ersten Term abgebrochen werden (vgl. Kap. 4.2) [12]. Der Staudinger-Index $[\eta]_i$ einer Fraktion ist dann direkt aus dem Quotienten $\eta_{sp,i}/c_i$ berechenbar. Der Staudinger-Index $[\eta]$ der polydispersen Polymerprobe wird online aus der Summe der i Einzelmeßwerte ermittelt.

Zur Kontrolle der GPC-Analyse wurde die Viskosität der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11**, **12** und des Polyrotaxans **13** zusätzlich mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters gemessen. Die Bestimmung des Staudinger-Index erfolgte jeweils graphisch durch Auftragung der Meßgröße η_{sp}/c gegen die Konzentration c des gelösten Polymers (s. Gleichung 4-11). Aus der Geradensteigung wurde die Huggins-Konstante k_H der Probe ermittelt. Abbildung 4-6 zeigt die Huggins-Plots der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12**. In Tabelle 4-3 sind die mittels GPC und Kapillarviskosimetrie (KV) bestimmten Molmassen, Staudinger-Indizes und Huggins-Konstanten der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11**, **12** und des Polyrotaxans **13** gegenübergestellt.

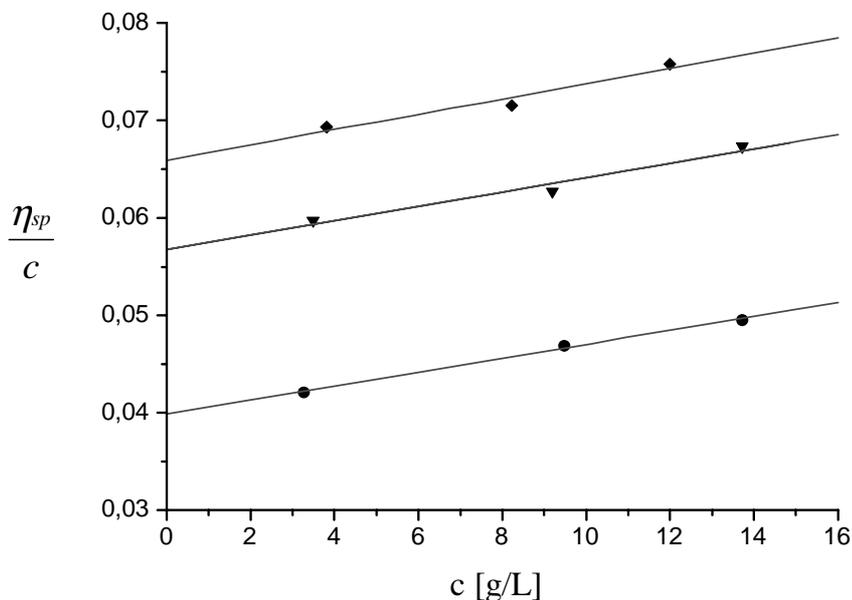


Abb. 4-6: Die Bestimmung der Staudinger-Indizes der Ionen_{10,6} Chloride **12** (●), **11** (▾) und **10** (♦) in einer 0.1 M NaCl-Lösung bei 25°C nach Huggins.

Tab. 4-3: Die mittels GPC und Kapillarviskosimetrie (KV) bestimmten Molmassen, Staudinger-Indizes und Huggins-Konstanten der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11**, **12** sowie des Polyrotaxans **13**.

	Ionen 12	Ionen 11	Ionen 10	Polyrotaxan 13
$M_{w,GPC}$ [g/mol]	29 900	44 900	57 800	103 400
$[\eta]_{GPC}$ [mL/g]	38.3	55.4	63.9	32.2
$[\eta]_{KV}$ [mL/g]	39.9	56.8	65.9	29.9
$k_{H,KV}$ []	0.51	0.26	0.18	0.55

Ein Vergleich der mittels GPC und Kapillarviskosimetrie bestimmten Staudinger-Indizes zeigt, daß die $[\eta]$ -Werte im Rahmen der Meßgenauigkeit sehr gut übereinstimmen. Eine Wechselwirkung der Polymere **10**, **11**, **12** und **13** mit dem Trennmaterial der GPC-Säule tritt folglich nicht auf (vgl. Kap. 4.2). Zu dem gleichen Ergebnis führte bereits die Untersuchung der Molmasse der Polymere **10**, **11**, **12** und **13**.

Die Huggins-Konstante ist ein Maß für die Wechselwirkung eines gelösten Teilchens mit dem Lösungsmittel. Ihr Wert ist umso kleiner, je besser das Lösungsmittel bzw. je stärker ein Knäuelmolekül aufgeweitet ist [14, 16]. Für flexible Kettenmoleküle nimmt k_H Zahlenwerte zwischen 0.2 und 0.5 an. Tabelle 4-3 zeigt, daß die Huggins-Konstante der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** mit steigender Molmasse von 0.51 → 0.26 → 0.18 abnimmt. Die Huggins-Konstante des Polyrotaxans **13** ist im Vergleich zum Ionen_{10,6} Chlorid **10** etwa um den Faktor 3 größer.

Die Staudinger-Indizes der untersuchten Ionen_{10,6} Chloride nehmen mit steigender Molmasse in der Reihenfolge **12** → **11** → **10** linear zu. Die Beziehung zwischen dem Staudinger-Index $[\eta]$ und der Molmasse M_η ist für eine Reihe von homologen Polymeren durch die Mark-Houwink-Sakurada-Gleichung gegeben:

$$[\eta] = K_\eta \cdot M_\eta^{\alpha_\eta} \quad (4-12)$$

Die Mark-Houwink-Parameter K_η und α_η können bei bekannter Molmasse M_η durch doppellogarithmische Auftragung des Staudinger-Index gegen die Molmasse graphisch ermittelt werden. Die Zahlenwerte der Parameter sind für ein gegebenes Polymer an ein definiertes Lösungsmittel/Temperatur-System gebunden. K_η liegt in

einer Größenordnung von üblicherweise 10^{-1} - 10^{-4} mL/g. Der Mark-Houwink-Exponent α_η ist von der Struktur des gelösten Polymers abhängig. Für geknäuelte Makromoleküle nimmt α_η Werte zwischen 0.5 im Thetalösungsmittel und 0.8 im guten Lösungsmittel an. So ist für Poly(vinylpyrrolidon) ein Wert von $\alpha_\eta = 0.55$ und für Poly(vinylalkohol) einer von $\alpha_\eta = 0.50$ in Wasser bei 25°C bekannt [14]. Größere Exponenten von 0.8-1.6 werden bei semiflexiblen Makromolekülen gefunden. Im Grenzfall eines starren Stäbchenmoleküls ist $\alpha_\eta = 1.8$ [16].

Die Bestimmung der Mark-Houwink-Parameter für Ionen_{10,6} Chlorid erfolgte unter der Annahme, daß $M_w \approx M_n$ ist. Dies ist aufgrund der geringen und einheitlichen Polydispersität der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** von $M_w/M_n = 1.2$ eine zulässige Näherung (s. Tab. 4-1). Es wurde eine Konstante von $K_\eta = 0.72 \cdot 10^{-3}$ mL/g und ein Mark-Houwink-Exponent von $\alpha_\eta = 0.83$ erhalten. Demnach liegen die Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** als flexible Knäuel in einer wäßrigen 0.1 M NaCl-Lösung bei 25°C vor (vgl. Kap. 7). Zhoumei et al. bestimmten für Ionen_{10,6} Bromid in einer 0.4 M KBr-Lösung einen kleineren Mark-Houwink-Exponenten von $\alpha_\eta = 0.58$ [17]. Kulicke und Jacobs ermittelten für das dem Ionen_{10,6} Chlorid strukturell ähnliche Polyacrylatchlorid (s. Abb. 4-7) in einer wäßrigen 1.0 M NaCl-Lösung bei 25°C Mark-Houwink-Parameter von $\alpha_\eta = 0.97$ und $K_\eta = 1.55 \cdot 10^{-4}$ mL/g [18].

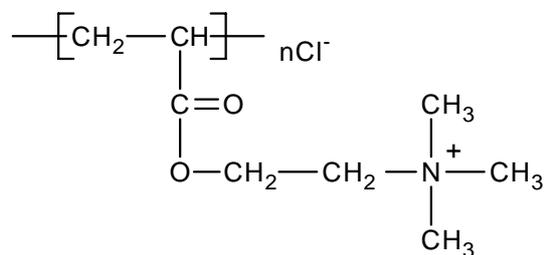


Abb. 4-7: Die Struktur von Poly(N,N,N-trimethylammoniummethylacrylatchlorid).

Der Staudinger-Index des Ionen_{10,6} Chlorids **10** ist im Vergleich zum Polyrotaxan **13** etwa doppelt so groß. Die Molmassen beider Proben weisen jedoch ein umgekehrtes Verhältnis auf. Da der Staudinger-Index reziprok von der Knäuelichte abhängt ($[\eta] \sim 1/\delta$), läßt dies auf eine größere Knäuelichte der gelösten Polyrotaxanmoleküle **13** schließen. Infolgedessen ist für **13** ein kleinerer Mark-Houwink-Exponent α_η zu erwarten als für **10**. Eine graphische Bestimmung der Mark-Houwink-Parameter wie im Falle des Ionen_{10,6} Chlorids ist nicht möglich. Statt dessen erfolgte eine Abschätzung anhand der Einzelmessung. Man erhielt $K_\eta = 5.94 \cdot 10^{-2}$ mL/g und $\alpha_\eta = 0.54$ für das Polyrotaxan **13**. Somit scheint die intramolekulare Coulomb-Abstoßung der Polyrotaxanmoleküle **13** im Vergleich zur reinen Polymerkette **10** geringer zu

sein. Das Verhältnis der Huggins-Konstanten von **10** und **13** deutet ebenfalls darauf hin. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür ist die Abschirmung der positiven Ladungen im Ionen_{10,6} Chlorid **10** durch die aufgefädelten α -Cyclodextrinringe **1a**.

Der Zusammenhang zwischen dem Staudinger-Index $[\eta]$ und dem hydrodynamischen Radius R_h eines geknäuelten Makromoleküls in einer unendlich verdünnten Lösung ($c \approx 0$ g/L) ist durch die Näherungsgleichung 4-13 gegeben.

$$[\eta] = \left(\frac{10\pi}{3} \right) \cdot \left(\frac{N_L \cdot R_h^3}{M_\eta} \right) \quad (4-13)$$

Aufgrund der niedrigen Polymerkonzentrationen im Viskositäts- und Lichtstreuendetektor lassen sich die hydrodynamischen Radien R_h der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11**, **12** sowie des Polyrotaxans **13** über Gleichung 4-13 berechnen. Wegen der geringen Polydispersität der Proben gilt näherungsweise $M_w \approx M_\eta$ (s. Tab. 4-1). Die berechneten hydrodynamischen Radien $R_{h,Visk}$ sowie die aus der GPC-Messung erhaltenen Molmassen M_w sind in Tabelle 4-4 aufgeführt.

Tab. 4-4: Die hydrodynamischen Radien $R_{h,Visk}$ und die Molmassen M_w der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11**, **12** sowie des Polyrotaxans **13**.

	Ionen 12	Ionen 11	Ionen 10	Polyrotaxan 13
M_w [g/mol]	29 900	44 900	57 800	103 400
$R_{h,Visk}$ [nm]	5.7	7.3	8.4	8.1

Nach Kirkwood und Risemann läßt sich $R_{h,Visk}$ für ein Knäuelmolekül im Theta-zustand ($\alpha_\eta = 0.5$) nach der Näherungsformel 4-14 in den hydrodynamischen Radius $R_{h,DLS}$, der aus der dynamischen Lichtstreuung erhalten wird, umrechnen [14].

$\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}$ bezeichnet dabei den z-Mittelwert des Trägheitsradius, der mittels statischer Lichtstreuung zugänglich ist.

$$R_{h,Visk} = 0.875 \cdot \sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z} = 1.316 \cdot R_{h,DLS} \quad (4-14)$$

Für das Polyrotaxan **13** ($\alpha_\eta = 0.55$) wurde ein Wert von $\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z} = 9.3$ nm und $R_{h,DLS} = 6.2$ nm nach Gleichung 4-14 berechnet (vgl. Kap. 4.2). Die dynamische Lichtstreuung lieferte für das Polyrotaxan **13** einen hydrodynamischen Radius von $R_{h,DLS} = 8.6$ nm (0.1 M NaCl, 25°C). Letzterer stimmt im Rahmen der Meßgenauigkeit mit dem berechneten Wert überein. Der mittlere Diffusionskoeffizient betrug $28.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

4.4 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die GPC-Messung mit gekoppelter Lichtstreu- und Viskositätsdetektion eine hervorragende Methode für den Strukturnachweis von Ionen darstellt. So konnte mittels Lichtstreuung die Molmasse und der Polymerisationsgrad der drei homologen Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** absolut bestimmt werden. Die Viskositätsmessung ermöglichte darüber hinaus eine genaue Bestimmung der Staudinger-Indizes sowie eine Abschätzung der hydrodynamischen Radien $R_h \approx 8$ nm. Mit Hilfe der Mark-Houwink-Sakurada-Gleichung wurden Mark-Houwink-Parameter von Ionen_{10,6} Chlorid (0.1 M NaCl, 25°C) ermittelt. Danach liegen die Ionen_{10,6} Chloridmoleküle als flexible Knäuel in Lösung vor. Eine Aggregation der Makromoleküle wurde nicht beobachtet.

Zur Herstellung fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane sollte ein Ionen_{10,6} Chlorid mit möglichst hohem Polymerisationsgrad erzeugt werden. Die Synthese erfolgte unter optimierten Bedingungen durch eine Menschutkin-analoge Polykondensation. So konnte ein maximaler Polymerisationsgrad von $P_w = 151$ erzielt werden.

5 Der Nachweis fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane durch Elektrophorese

Die Elektrophorese ist eine chromatographische Methode zur Trennung von Polyionen in einem elektrischen Feld. Sie findet heute vielseitige Anwendung in der Biomedizin, insbesondere bei der Forschung und Diagnostik von Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren [1]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Elektrophorese erstmals für den Nachweis fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane genutzt werden.

Die elektrophoretische Geschwindigkeit eines Polyions i wird nach Gleichung 5-1 berechnet. Dabei stellt v_i die Geschwindigkeit und μ_i die Mobilität des Polyions dar. Bei Gleichspannung ist die Stärke des elektrischen Feldes E zwischen zwei Elektroden proportional der angelegten Spannung und umgekehrt proportional zum Abstand der Elektroden.

$$v_i = \mu_i \cdot E = \mu_i \cdot \frac{U}{d} \quad (5-1)$$

Die Mobilität μ_i hängt von der effektiven Ladung des Polyions ab. In wässriger Lösung geht das geladene und hydratisierte Polyion elektrostatische Wechselwirkungen mit den hydratisierten Gegenionen ein. Die Nettoladung eines Polyions ist deshalb umso kleiner, je höher die Ionenstärke der Lösung ist. Für die Elektrophorese von Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren werden bevorzugt Pufferlösungen aus Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) eingesetzt.

Das Trägermaterial beeinflusst die Elektrophorese aufgrund seiner Porenstruktur. Während kleine Teilchen auf dem kürzesten Weg durch das Gel zur Gegenelektrode wandern, ist der Weg großer Teilchen durch die Größe der Poren eingeschränkt. Dadurch ist es möglich, Polyionen mit unterschiedlicher Molmasse elektrophoretisch zu trennen (s. Kap. 5.1.1).

Das Reptationsmodell nach de Gennes betrachtet die Polyionen als semiflexible Strukturen [2]. Bei ihrer Wanderung durch das Gel tritt zuerst ein Ende in die Gelpore ein und der Rest "kriecht" hinterher. Daraus resultiert eine lineare Abhängigkeit der Mobilität μ_i eines Polyions von der reziproken Kettenlänge $1/L$ (Gleichung 5-2) [3-5]. Für höhermolekulare Nukleat-Polyionen konnte dieser Zusammenhang bereits experimentell bestätigt werden [6, 7]. Der Parameter K erfaßt die Ladung und

die Reibungsstärke im System. Die Porenstruktur des Gels wird durch b ausgedrückt.

$$\mu_i = K \cdot \left(\frac{1}{L} + b \cdot E^2 \right) \quad (5-2)$$

Das Modell von Ogston beschreibt die Polyionen als statistische Knäuel. Die Mobilität μ_i eines Polyions wird dann durch die Größe seines Gyrationradius relativ zur Porengröße im Gel bestimmt. Für niedermolekulare Nukleat-Polyionen konnte ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der Mobilität μ und der Konzentration c des Gels (Gleichung 5-3) experimentell bewiesen werden [8, 9].

$$\log \mu_i = \log \mu_0 - K_R \cdot c \quad (5-3)$$

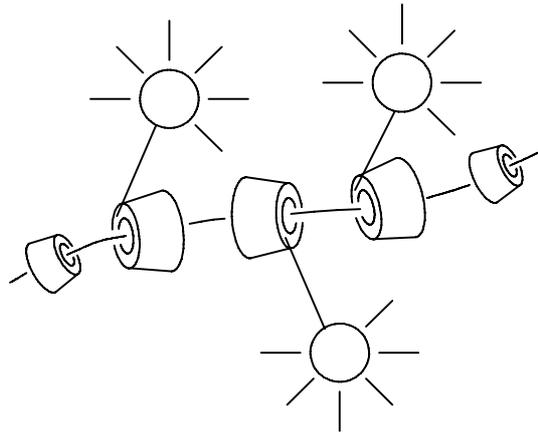
Die Mobilität des Polyions in der reinen Pufferlösung ist als μ_0 definiert. Der Retardationskoeffizient K_R hängt vom Gyrationradius des Polyions ab. Bei der Trennung von Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren kommen heute hauptsächlich Gele aus Agarose und Polyacrylamid zum Einsatz [1]. In Tabelle 5-1 ist der mittlere Porendurchmesser eines Agarosegels für verschiedene Gelkonzentrationen aufgeführt.

Tab. 5-1: Der mittlere Porendurchmesser \varnothing_p in einem Agarosegel in Abhängigkeit von der Gelkonzentration c .

Gelkonzentration c [g/dl]	Porendurchmesser \varnothing_p [nm]
0.16	800
0.75	500
1.00	150

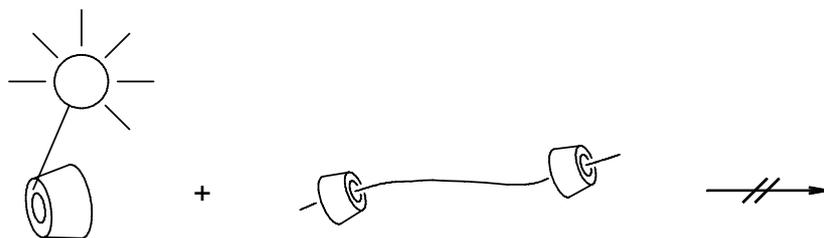
Die Auflösung der Elektrophorese wird durch die Eigenschaften der Polyionen, das Trennmedium und die Temperatur bestimmt [1]. So können beim Einsatz von Agarosegelen endosmotische Effekte auftreten, die die Auflösung beeinträchtigen: Das Agarosegel besitzt funktionelle Gruppen wie Sulfat- und Carboxyl-Gruppen, die in neutralen und alkalischen Puffern negativ geladen sind [10]. Als stationäre Phase ist das Gel unbeweglich und wandert nicht zur Anode, die positiv geladenen hydratisierten Gegenionen aber wandern in Richtung Kathode. Infolgedessen findet man am kathodischen Gelpol eine Anreicherung von Wasser, während der anodische Pol dehydratisiert. Bei der Elektrophorese von Polykationen kann es zudem zu störenden elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Agarosegel kommen. Die elektrophoretische Trennschärfe ist umso größer, je geringer die Breite einer Bande ist, die durch die Wanderung einer Komponente im Träger erzeugt wurde. Die Abbildung der Polyionen-Banden bezeichnet man als Pherogramme.

Für den Nachweis der Bildung fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane mittels Elektrophorese wurden jeweils fünf Ensembles mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** und Rhodaminylnyl- β -Cyclodextrin **7** untersucht. Ensemble ① enthält den reinen Fluoreszenzfarbstoff. Die Ensembles ② und ③ setzen sich aus dem Fluoreszenzfarbstoff, Ionen_{10,6} Chlorid **10** und α -Cyclodextrin **1a** zusammen. Durch die Reihenfolge der Substanzzugabe sollte gewährleistet werden, daß zuerst das fluoreszenzmarkierte Cyclodextrin und zuletzt α -Cyclodextrin **1a** auf die Polymerkette auffädelt. Kinetische Untersuchungen zur Selbstorganisation von Ionen_{10,6} Chlorid und α - bzw. β -Cyclodextrin von W. Herrmann [11] belegen, daß β -Cyclodextrin **1b** bei 60°C wesentlich schneller auf Ionen_{10,6} Chlorid auffädelt als α -Cyclodextrin **1a**. Bei Raumtemperatur ist die Wanderungsgeschwindigkeit von α -Cyclodextrin entlang der Polymerkette so stark herabgesetzt, daß ein Polyrotaxan aus **10** und **1a** unabhängig vom thermodynamischen Gleichgewicht über mehrere Wochen stabil bleibt. α -Cyclodextrinmoleküle **1a** können daher als Sperrgruppen eingesetzt werden, die das Abgleiten zuvor aufgefüdelter β -Cyclodextrinringe **1b** von der Polymerkette **10** verhindern [12, 13]. Je mehr α -Cyclodextrine **1a** an den Kettenenden aufgefüdelte sind, desto stabiler sollte das Polyrotaxan sein. Um dies zu untersuchen, wurde der Gehalt an α -Cyclodextrin **1a** bei Ensemble ② und ③ variiert. In Schema 5-1 ist der Aufbau eines Polyrotaxans aus Ionen_{10,6} Chlorid **10**, fluoreszenzmarkiertem β -Cyclodextrin und α -Cyclodextrin **1a** abgebildet.



Schema 5-1: Die schematische Darstellung eines Polyrotaxans aus Ionen_{10,6} Chlorid **10**, fluoreszenzmarkiertem β -Cyclodextrin und α -Cyclodextrin **1a**.

Ensemble ④ stellt einen Grenzfall dar. Es enthält den Fluoreszenzfarbstoff und Ionen_{10,6} Chlorid **10** in derselben Konzentration wie Ensemble ② und ③, jedoch kein α -Cyclodextrin **1a**. Die an den Kettenenden von Ionen_{10,6} Chlorid **10** aufgefädelten fluoreszenzmarkierten Cyclodextrinringe sollten deshalb im dynamischen Gleichgewicht mit den freien Ringen in der Lösung stehen. Ensemble ⑤ hat die gleiche Zusammensetzung wie Ensemble ②. Damit zuerst die α -Cyclodextrinringe **1a** auf die Polymerkette auffädeln, wurde die Reihenfolge der Zugabe von Fluoreszenzfarbstoff und **1a** zur Polymerlösung vertauscht. An den Kettenenden von Ionen_{10,6} Chlorid **10** aufgefädelte α -Cyclodextrinringe **1a** sollten dann als Sperrgruppen wirken und das nachträgliche Auffädeln fluoreszenzmarkierter Cyclodextrinringe verhindern (Schema 5-2).



Schema 5-2: Die Blockierung des Auffädelns durch α -Cyclodextrin **1a**.

Als Methode für den Nachweis der Bildung fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane wurde die Elektrophorese in einem 1.4 %-igen Agarosegel gewählt. Diese wurde bei einer Spannung von 70 V in einem alkalischen Puffer durchgeführt. Bei der Aufnahme der Gele wurde durch den Einsatz von Fluoreszenzfiltern vor der Anregungs-

lichtquelle und dem Objektiv sichergestellt, daß das Bild nur durch die Fluoreszenz des jeweiligen Fluorophors erzeugt wird. Die gelbe Fluoreszenz des Fluoresceinyl- β -Cyclodextrins **5**, die rote des Eosinyl- β -Cyclodextrins **6** und die violette des Rhodaminyl- β -Cyclodextrins **7** kann bereits bei Anregung mit sichtbarem Licht über einen breiten Konzentrationsbereich gut wahrgenommen werden. Ionen_{10,6} Chlorid **10** und natives α -Cyclodextrin **1a** sind hingegen farblos. Im Elektrophoreseexperiment wird also nur die Wanderung der Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar. Die Fluorophore dienen somit als optische Sonde für die Polyrotaxane. Die Elektrophorese der Ensembles ①-⑤ wird in den folgenden Kapiteln für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe diskutiert.

5.1 Der Nachweis der Struktur Fluorescein-markierter Polyrotaxane

Für den Nachweis Fluorescein-markierter Polyrotaxane durch Elektrophorese müssen freie und aufgefüdelte Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** anhand ihrer Wanderungsrichtung im elektrischen Feld unterscheidbar sein. Deshalb wurde für das Experiment ein System aus einer wäßrigen 0.01 M NH₄OH-Lösung (pH = 8.0) ausgewählt. Während das wasserlösliche Ionen_{10,6} Chlorid **10** im alkalischen Medium positiv geladen ist, liegt Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** deprotoniert vor. Der Einschluß von **10** in **5** sollte infolge intermolekularer elektrostatischer Anziehung eine höhere Bindungsenthalpie aufweisen als der Einschluß in den unsubstituierten Wirt **1b**. Zusätzlich zur hydrophoben Wechselwirkung sollte also die elektrostatische Anziehung zwischen Wirt- und Gastmolekül als treibende Kraft der Komplexbildung wirken. Für die Erzeugung der Polyrotaxane wurde ein Molverhältnis von 10:1 bezogen auf die Wiederholeinheit von Ionen_{10,6} Chlorid **10** ($M_w = 57\,800$ g/mol) und Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** eingesetzt. Selbst wenn die Ringe **5** quantitativ auf Ionen_{10,6} Chlorid **10** auffädeln, besitzt das Polyrotaxan eine positive Überschussladung. Entsprechend sollte der freie Farbstoff **5** zur Anode und der aufgefüdelte zur Kathode wandern. Bei einer höheren Belegung der Polymerkette **10** durch Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** fällt das Polyrotaxan aufgrund des intramolekularen Ladungsausgleichs teilweise aus der wäßrigen Lösung aus. Zusätzlich aufgefüdeltes α -Cyclodextrin **1a** hat hingegen keinen Einfluß auf die Löslichkeit und die Ladung der supramolekularen Struktur. Abbildung 5-1 zeigt die Pherogramme der Proben ①-⑤ mit Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** als Fluoreszenzfarbstoff nach einer Elektrophoresedauer von 60 Minuten.

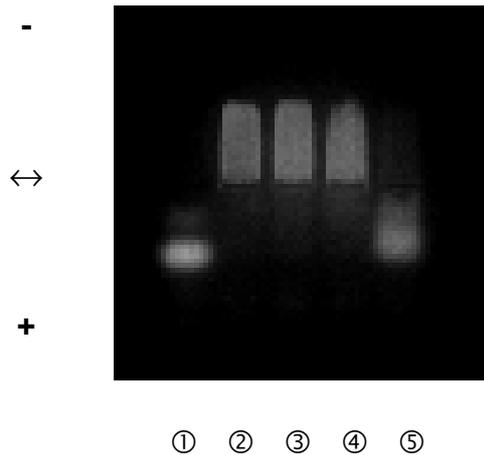


Abb. 5-1: Die Pherogramme der Proben ①-⑤ mit Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** als Fluoreszenzfarbstoff nach einer Elektrophoresedauer von 60 min. (Start: ↔, Kathode: -, Anode: +).

Probe ① enthält den reinen Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**. Dieser wandert entsprechend seiner negativen Ladung im Elektrophoreseexperiment in Richtung Kathode.

Bei Probe ② wurde Ionen_{10,6} Chlorid **10** nacheinander mit Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a** umgesetzt. Dadurch sollten zuerst die Ringe **5** und zuletzt die Ringe **1a** auf die Polymerkette auffädeln. Das Pherogramm der Probe ② zeigt eine scharf abgegrenzte fluoreszierende Bande in Richtung Kathode. In anodischer Feldrichtung ist im Vergleich zu Probe ① des reinen Farbstoffs keine Fluoreszenz erkennbar. Das läßt den Schluß zu, daß der Fluoreszenzfarbstoff **5** quantitativ an das Ionen_{10,6} Chlorid **10** gebunden ist. Eine Unterscheidung, ob die fluoreszenzmarkierten Cyclodextrine auf Ionen_{10,6} Chlorid **10** aufgefädelt sind oder an **10** anlagern, ist nur in Zusammenhang mit dem Kontrollexperiment ⑤ möglich.

Probe ⑤ unterscheidet sich von Probe ② durch die Reihenfolge der Substanzzugabe. So wurde Ionen_{10,6} Chlorid **10** zuerst mit α -Cyclodextrin **1a** und nachträglich mit Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** umgesetzt. Im Pherogramm von ⑤ ist eine starke Fluoreszenz in Richtung Anode und eine schwache Fluoreszenz in Richtung Kathode zu beobachten. Der Vergleich mit Probe ① des reinen Fluoreszenzfarbstoffs **5** macht deutlich, daß die Lauffronten beider Proben auf gleicher Höhe wandern. Somit ist die Fluoreszenz in anodischer Feldrichtung bei ⑤ auf die Existenz ungebundener Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** zurückzuführen. Die an den Kettenenden von Ionen_{10,6} Chlorid **10** aufgefädelten α -Cyclodextrinringe **1a** wirken als Sperrgruppen und verhindern das nachträgliche Auffädeln der fluoreszenzmarkierten Cyclodextrine **5**. Diese gehen keine Anlagerungsverbindung mit Ionen_{10,6} Chlorid **10** ein, sondern wandern entsprechend ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Die Fluoreszenz in Richtung Kathode bei Probe ② ist deshalb durch die

Bildung einer Einschlußverbindung aus Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und Ionen_{10,6} Chlorid **10** zu erklären. Da bei Probe ② im Gegensatz zu ⑤ keine Fluoreszenz im anodischen Bereich zu beobachten ist, muß der Fluoreszenzfarbstoff **5** quantitativ auf die Polymerkette aufgefädelt sein. Der Belegungsgrad des Ionen_{10,6} Chlorid durch **10** in Probe ② beträgt folglich 10 %. Die schwache Fluoreszenz in Richtung Kathode deutet darauf hin, daß der Verschuß der Kettenenden von Ionen_{10,6} Chlorid **10** durch α -Cyclodextrin **1a** unvollständig ist, so daß einige Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** als Einschlußverbindung zur Kathode wandern. Aufgrund der niedrigen Belegung von Ionen_{10,6} Chlorid **10** durch **5** kann der Belegungsgrad durch α -Cyclodextrin **1a** näherungsweise aus der Zeit-Umsatzkurve für die Selbstorganisation von Ionen_{10,6} Chlorid **10** und **1a** bei 60°C abgelesen werden [12]. Die Wiederholeinheiten von Ionen_{10,6} Chlorid **10** sind demnach zu 10 % mit α -Cyclodextrin **1a** belegt. Abbildung 5-2 zeigt die Struktur des Polyrotaxans ②. Dabei ist die relative Verteilung der Cyclodextrine **1a** und **5** auf der Polymerkette **10** am Beispiel einer Polymergrundeinheit dargestellt.

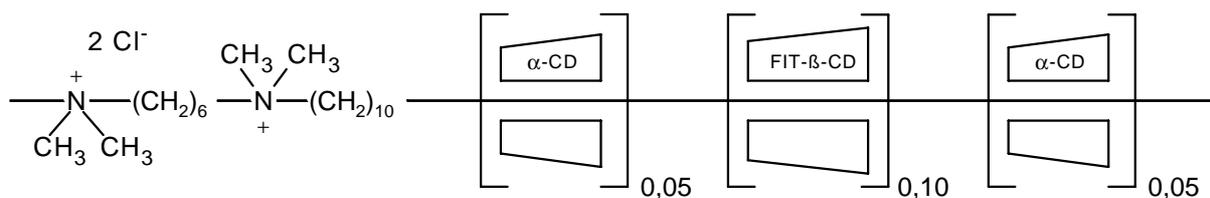


Abb. 5-2: Die Struktur des Fluorescein-markierten Polyrotaxans ②.

Probe ③ unterscheidet sich von Probe ② durch einen etwa vier mal geringeren Gehalt an α -Cyclodextrin **1a**. Deshalb sollte die Belegung der Kettenenden von Ionen_{10,6} Chlorid **10** durch α -Cyclodextrinmoleküle **1a** hier kleiner als 10 % sein und das Polyrotaxan dadurch eine geringere Stabilität besitzen. Im Elektrophoresexperiment äußert sich dies durch eine im Vergleich zu ② weniger scharf abgegrenzte fluoreszierende Bande in kathodischer Feldrichtung. Gleichzeitig tritt eine schwache Fluoreszenz in Richtung Anode auf. Das zeigt, daß der Verschuß der Polymerketten durch die α -Cyclodextrine **1a** nicht quantitativ ist. In der Probe befindet sich daher ein gewisser Anteil an abgefädeltm Fluoreszenzfarbstoff **5**, der analog zur reinen Probe ① in Richtung Kathode wandert.

Probe ④ enthält Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und Ionen_{10,6} Chlorid **10** in derselben Konzentration wie die Proben ② und ③. Die Kettenenden von Ionen_{10,6} Chlorid **10** sind jedoch nicht durch α -Cyclodextrinringe **1a** abgeschlossen. Deshalb ist zu erwarten, daß aufgefädeltm Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** unter dem Einfluß des elektrischen Feldes allmählich abfädelt. Im Elektrophoresexperiment zeigt sich der

Abfädelprozeß durch einen im Vergleich zur Probe ② deutlichen Rückgang der fluoreszierenden Bande in kathodischer Feldrichtung, während gleichzeitig die Fluoreszenz in Richtung Anode zunimmt. Dieser Prozeß verstärkt sich mit zunehmender Dauer der Elektrophorese. Folglich wird das Gleichgewicht der Selbstorganisation von Ionen_{10,6} Chlorid **10** und Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** durch das elektrische Feld zu den freien Komponenten hin verschoben. Der abgefädelte Fluoreszenzfarbstoff **5** wandert entsprechend seiner negativen Ladung zurück zur Anode.

Die Fluoreszenzintensität der elektrophoretischen Banden nimmt mit zunehmendem Abstand der Lauffront vom Aufgabepunkt zu. Das deutet auf eine Konzentration der Probe im Bereich der Lauffront hin. Die Fluoreszenz im unteren Bereich der Banden ist auf elektrostatische Wechselwirkungen der positiv geladenen Polyrotaxane mit den negativ geladenen funktionellen Gruppen des Agarosegels zurückzuführen. Weitere Gründe für die Bildung breiter Banden sind die Polydispersität der Ionen_{10,6} Chloride sowie endoelektroosmotische Effekte, die durch die Ladung des Trägermaterials bedingt sind [1].

5.1.1 Die Trennung Fluorescein-markierter Ionene nach der Molmasse

Eine der häufigsten Anwendungen der Gelelektrophorese ist die Trennung von Nukleat-Polyionen nach der Masse [1]. Da die elektrophoretische Mobilität dieser Polyionen sowohl von der Ladung als auch von der Masse abhängt (s. Kap. 5-1), muß der Einfluß der Ladung auf die Trennung eliminiert werden. Dazu wählt man Bedingungen, bei denen das Verhältnis Ladung/Masse konstant ist. Für die Reptation höhermolekularer, semiflexibler Nukleat-Polyionen konnte dann ein linearer Zusammenhang zwischen der elektrophoretischen Mobilität μ und der Kettenlänge L experimentell nachgewiesen werden (s. Gleichung 5-2). Analog dazu sollte die Reptation Fluorescein-markierter Ionene untersucht werden. Es stellte sich die Frage, ob und unter welchen Bedingungen eine elektrophoretische Trennung möglich ist.

Voraussetzung für die elektrophoretische Trennung von Ionenen nach der Molmasse ist eine möglichst enge Molmassenverteilung. Dabei müssen die Mittelwerte der Molmassen so weit auseinander liegen, daß sich die Ionene durch ihre Mobilität im Elektrophoreseexperiment unterscheiden. Damit die Wanderung der Ionene im elektrischen Feld beobachtet werden kann, sollten diese in Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** eingeschlossen werden. Nachträglich aufgefädelte α -Cyclodextrinringe **1a** sollten das Abfädeln des Fluoreszenzfarbstoffs **5** von der Polymerkette verhindern. Die Selbstorganisation von Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und

α -Cyclodextrin **1a** zu stabilen Polyrotaxanen $\textcircled{2}$ in Lösung wurde bereits in Kapitel 5.1 nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, daß die Wiederholeinheiten von Ionen_{10,6} Chlorid **10** unter den gewählten Bedingungen zu jeweils 10 % mit **5** und **1a** belegt sind (s. Abb. 5-2). Der Belegungsgrad eines Polyrotaxans $\textcircled{2}$ wird durch das Konzentrationsverhältnis der einzelnen Komponenten, die Temperatur und die Kettenlänge des Ionen_{10,6} Chlorids bestimmt. Wenn sich die Kettenlängen mehrerer, Ionene nur wenig unterscheiden, kann die Belegung durch Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a** bei gleichen Umsetzungsbedingungen näherungsweise als konstant angesehen werden. Die elektrophoretische Trennung dieser Ionene ist dann von dem Belegungsgrad unabhängig. Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** kann somit als optische Sonde für die Wanderung der Ionene im elektrischen Feld eingesetzt werden.

Für das Experiment wurden die Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** nach einer Menschutkin-analogen Polykondensation hergestellt (s. Kap. 4.1). Um eine enge Molmassenverteilung zu erzeugen, wurden die niedermolekularen und oligomeren Bestandteile der Produkte mittels Dialyse abgetrennt. Mit Hilfe der GPC konnten die Molmassen M_w und die Polymerisationsgrade P_w der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** bestimmt werden (s. Kap. 4.2). So wurde für **10** eine Molmasse von 57 800 g/mol, für **11** eine von 44 900 g/mol und für **12** eine von 29 900 g/mol erhalten. Das entspricht nach Gleichung 4-10 einer mittleren Kettenlänge L_w von etwa 340 nm für **10**, 263 nm für **11** und 176 nm für **12**. Zur Sichtbarmachung wurden die Ionene anschließend durch Umsetzung mit Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a** in die Polyrotaxane $\textcircled{2}_{a-c}$ überführt. Dazu wurden die in Kapitel 5.1 beschriebenen Umsetzungsbedingungen gewählt. Die Kettenlängen der Ionen_{10,6} Chloride **10**, **11** und **12** unterscheiden sich nur wenig voneinander. Deshalb kann der Belegungsgrad durch die Ringe **5** und **1a** näherungsweise als konstant angenommen werden. Die Struktur der Fluorescein-markierten Polyrotaxane $\textcircled{2}_{a-c}$ wird durch Abbildung 5-2 wiedergegeben. Damit das Verhältnis Ladung/Masse der Polyrotaxane $\textcircled{2}_{a-c}$ während der Elektrophorese konstant bleibt, wurde das Experiment in einem alkalischen Puffer durchgeführt. Die Trennung der Ionene ist dann ausschließlich auf ihre unterschiedliche Masse zurückzuführen.

Die experimentelle Durchführung erfolgte analog zum Nachweis Fluorescein-markierter Polyrotaxane in Kapitel 5.1. Als Träger diente ein 1 %-iges Gel aus Agarose mit einem mittleren Porendurchmesser von 150 nm (s. Tab. 5-1). Die Betriebsspannung während der Elektrophorese betrug 60 V. Die Gelplatten wurden zur Dokumentation nach einer Zeit von 30, 60, 90 und 120 Minuten fotografiert. Abbildung 5-3 zeigt die Pherogramme der Polyrotaxanproben $\textcircled{2}_{a-c}$ nach einer Elektrophoresedauer von 120 Minuten.

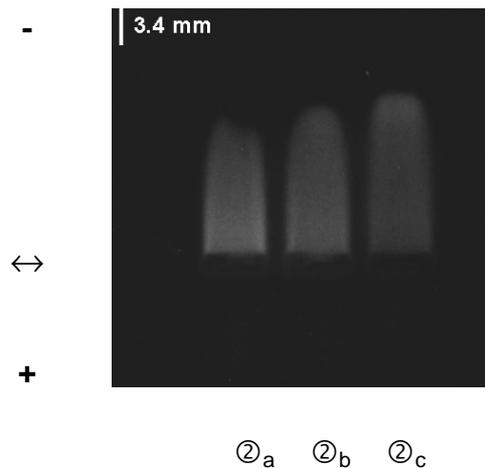


Abb. 5-3: Die Pherogramme der Polyrotaxane ②_{a-c} nach einer Elektrophoresedauer von 120 min. (Start: ↔, Kathode: -, Anode: +).

Die Proben ②_{a-c} enthalten positiv geladene Polyrotaxane aus Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, α -Cyclodextrin **1a** und Ionen_{10,6} Chlorid a) **10**, b) **11** und c) **12**, die in Richtung Kathode wandern. Dabei wird die Kettenlänge des Polyrotaxans durch die Kettenlänge des jeweiligen Ionen_{10,6} Chlorids bestimmt (s. Kap. 4.2). Nach dem Reptationsmodell [3, 4] sollte die elektrophoretische Mobilität μ der Polyrotaxane ②_{a-c} deshalb umgekehrt proportional zur Kettenlänge L_w der Ionen_{10,6} Chloride in ②_{a-c} sein (s. Gleichung 5-2). Folglich ist eine Zunahme der elektrophoretischen Mobilität μ von ②_a \rightarrow ②_c zu erwarten. Ein Maß dafür ist die Laufstrecke l . Das ist der Abstand der fluoreszierenden Lauffront einer Probe vom Startpunkt nach einer Zeit t . In Abbildung 5-4 ist die Laufstrecke l der Polyrotaxane ②_{a-c} als Funktion der Zeit graphisch aufgetragen. Es zeigt sich, daß die Laufstrecke l und damit die Mobilität μ der Polyrotaxane ②_{a-c} zu einem beliebigen Zeitpunkt t von ②_a \rightarrow ②_c zunimmt. Dabei steigt die Differenz zwischen den Laufstrecken mit der Dauer der Elektrophorese an. Die Zunahme der Laufstrecke l in einem Intervall von 120 Minuten ist für die Polyrotaxane ②_{a-c} linear.

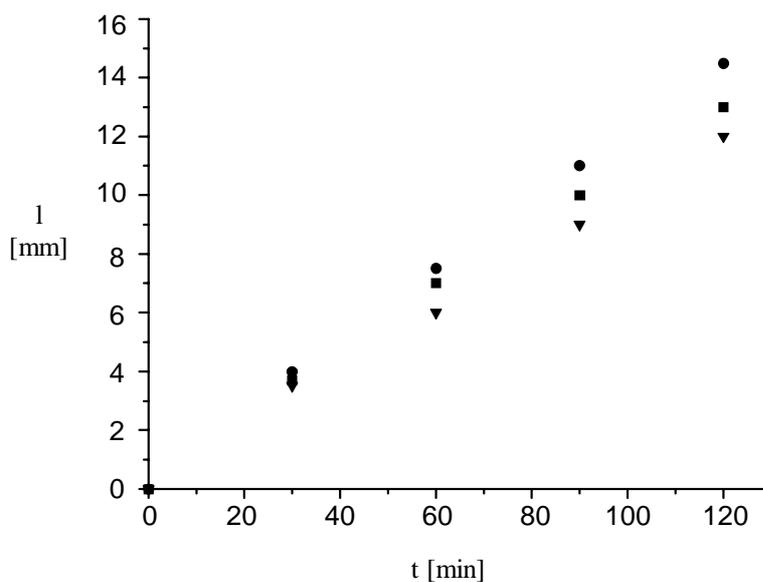


Abb. 5-4: Die Laufstrecke l der Polyrotaxane ②_a (○), ②_b (■) und ②_c (●) als Funktion der Zeit.

Die Molmasse der Ionen_{10,6} Chloride in den Proben ②_{a-c} nimmt von **10** → **11** → **12** ab. Da die Kettenlänge L_w proportional zur Molmasse M_w ist, gilt auch $\mu \sim 1/M_w$. Der Unterschied der Laufstrecken von ②_a und ②_b ist daher entsprechend einer geringeren Molmassendifferenz der Ionen_{10,6} Chloride kleiner als der zwischen den Proben ②_b und ②_c bzw. ②_a und ②_c. In Tabelle 5-2 sind die Laufstrecken l der Polyrotaxane ②_{a-c} nach einer Elektrophoresedauer von 120 Minuten und die mittleren Kettenlängen L_w sowie die Molmassen M_w der Ionen_{10,6} Chloride in ②_{a-c} angegeben. In Abbildung 5-5 sind die Laufstrecken gegen die reziproke Molmasse $1/M_w$ der Ionen_{10,6} Chloride graphisch aufgetragen.

Tab. 5-2: Die Laufstrecken l der Polyrotaxane ②_{a-c} nach einer Elektrophoresedauer von 120 min. und die mittleren Kettenlängen L_w sowie die Molmassen M_w der Ionen_{10,6} Chloride in ②_{a-c}.

Polyrotaxan	l [mm]	Ionen _{10,6} Chlorid	L_w [nm]	M_w [g/mol]
② _a	12.0	10	340	57 800
② _b	13.0	11	263	44 900
② _c	14.5	12	176	29 900

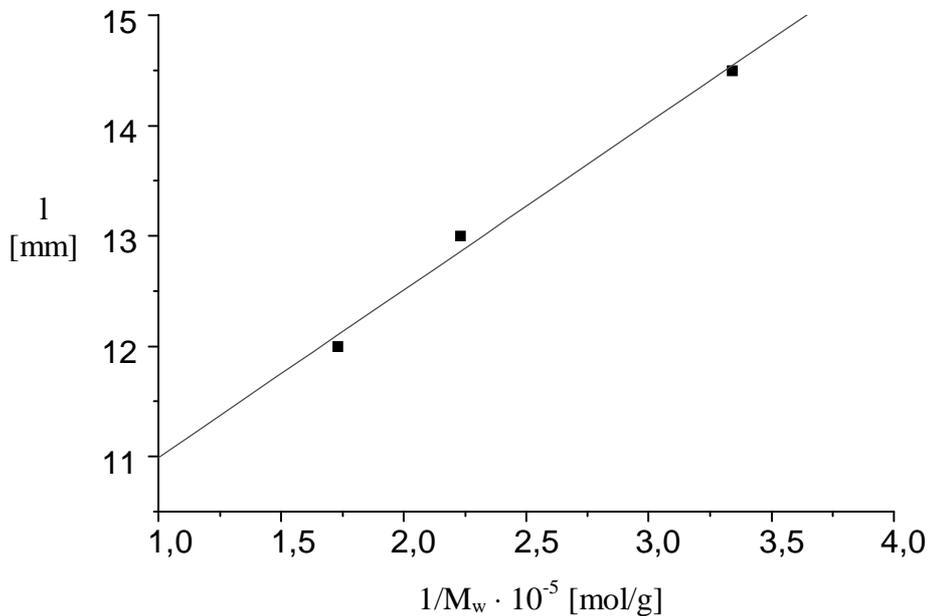


Abb. 5-5: Die Abhängigkeit der Laufstrecke l der Polyrotaxane $\textcircled{2}_{a-c}$ von der reziproken Molmasse $1/M_w$ der Ionen $_{10,6}$ Chloride in $\textcircled{2}_{a-c}$ nach einer Elektrophoresedauer von 120 min.

Aus Abbildung 5-5 geht hervor, daß die Laufstrecke l der Polyrotaxane $\textcircled{2}_{a-c}$ linear mit der reziproken Molmasse $1/M_w$ der Ionen $_{10,6}$ Chloride in $\textcircled{2}_{a-c}$ zusammenhängt. Danach entspricht eine Laufstrecke von 1 mm etwa einer Molmasse von $M_w \approx 17\,000$ g/mol. Die Genauigkeit, mit der die Laufstrecke l im Pherogramm bestimmt werden kann, beträgt ± 0.5 mm. Für die elektrophoretische Trennung von Ionen $_{10,6}$ Chloriden ist daher eine Molmassendifferenz von mindestens 8 800 g/mol erforderlich.

Für die Reptation höhermolekularer Nukleat-Polyionen konnte der in Gleichung 5-2 beschriebene lineare Zusammenhang zwischen der elektrophoretischen Mobilität μ und der Kettenlänge L bereits experimentell bestätigt werden. Wenn man die Kettenlänge der Nukleat-Polyionen durch die Anzahl der Basenpaare angibt, dann lassen sich mit Hilfe der Geraden $\mu = f(1/L)$ die Systemparameter K in $[\text{m}^2/\text{Vs}]$ und b in $[\text{m}^2/\text{V}^2]$ bestimmen [6]. Analog dazu kann die Kettenlänge L der Ionen $_{10,6}$ Chloride durch das Zahlenmittel des Polymerisationsgrades P_n [] ausgedrückt werden. Für Ionen $_{10,6}$ Chlorid **10** ist $P_n = 123$, für **11** ist $P_n = 97$ und für **12** ist $P_n = 68$ (s. Kap. 4.2). Die Mobilität μ der Polyrotaxane $\textcircled{2}_{a-c}$ wurde nach Gleichung 5-2 zu $3.75 \cdot 10^{-9}$ m^2/Vs für $\textcircled{2}_a$, $4.06 \cdot 10^{-9}$ m^2/Vs für $\textcircled{2}_b$ und $4.53 \cdot 10^{-9}$ m^2/Vs für $\textcircled{2}_c$ berechnet.

Aus der Auftragung $\mu = f(1/P_n)$ erhält man die Systemparameter $K = 1.17 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2/\text{Vs}$ und $b = 1.23 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2/\text{V}^2$. Somit konnte das Reptationsmodell auch für die Wanderung der Polyrotaxane $\textcircled{2}_{a-c}$ im Gel experimentell bestätigt werden. Demnach liegen die Polyrotaxane als semiflexible Ketten in der Elektrolytlösung vor (vgl. Kap. 4).

5.1.2 Die Trennung Fluorescein-markierter Polyrotaxane nach dem Belegungsgrad

In Kapitel 5.1.1 wurde beschrieben, wie sich Ionen nach ihrer Molmasse im Elektrophoreseexperiment trennen lassen. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte in einem weiteren Versuch der Einfluß des Belegungsgrades auf die Mobilität der Ionen untersucht werden. Dazu wurde Ionen_{10,6} Chlorid **11** nacheinander mit Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, β -Cyclodextrin **1b** und α -Cyclodextrin **1a** umgesetzt. Die zuletzt aufgefädelten α -Cyclodextrine **1a** sollten als Sperrgruppen das Abfädeln der Ringe **5** und **1b** von der Polymerkette verhindern. Das Molverhältnis der Komponenten **11**, **5** und **1a** in den Proben wurde konstant gehalten. Im Gegensatz dazu wurde der Anteil des β -Cyclodextrins **1b** bezogen auf **11** von 0 % \rightarrow 20 % \rightarrow 50 % \rightarrow 80 % erhöht. Dadurch sollten stabile Fluorescein-markierte Polyrotaxane erzeugt werden, die sich in ihrem Gehalt an aufgefädelttem β -Cyclodextrin **1b** unterscheiden (s. Abb. 5-6). Das Polyrotaxan $\textcircled{2}_b$ enthält kein β -Cyclodextrin, seine Struktur ist in Abbildung 5-2 dargestellt. Die Bildung des Polyrotaxans $\textcircled{2}_b$ wurde in Kapitel 5.1.2 nachgewiesen. Die Ladung und die Kettenlänge der Polyrotaxane $\textcircled{2}_b$, $\textcircled{6}$, $\textcircled{7}$ und $\textcircled{8}$ ist von der Anzahl aufgefädelter β -Cyclodextrine **1b** unabhängig. Deshalb sollten sie eine positive Überschußladung besitzen und im Elektrophoreseexperiment in Richtung Kathode wandern. Die freien β -Cyclodextrinmoleküle **1b** sind farblos und ungeladen. Sie werden im Experiment nicht detektiert. Wenn das Gleichgewicht für das Auffädeln von Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a** durch die Konzentration an β -Cyclodextrin **1b** nicht beeinflusst wird, dann sollte das Ionen_{10,6} Chlorid **11** in den Proben $\textcircled{6}$ - $\textcircled{8}$ wie bei $\textcircled{2}_b$ zu jeweils 10 % durch **5** und **1a** belegt sein. Die Trennung der Proben ist dann ausschließlich von dem Anteil der aufgefädelten β -Cyclodextrinringe **1b** abhängig. Abbildung 5-6 zeigt die Struktur der Polyrotaxane $\textcircled{6}$ - $\textcircled{8}$. Es ist die relative Verteilung der Cyclodextrine **1a**, **1b** und **5** auf der Polymerkette **11** bezogen auf eine Polymergrundeinheit dargestellt.

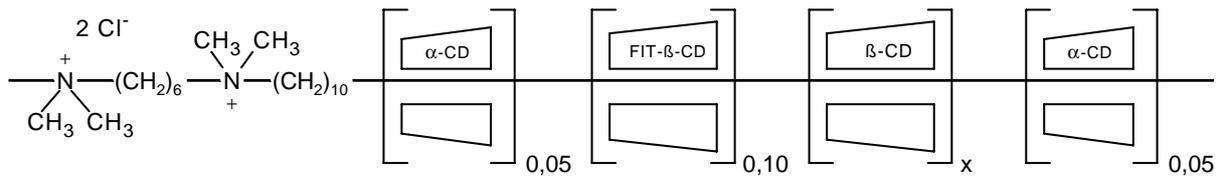


Abb. 5-6: Die Struktur der Polyrotaxane ⑥-⑧.

Die Durchführung des Experiments sowie die Aufnahme der Agarosegele erfolgte analog zur Trennung von Ionen in Kap. 5.1.1. Abbildung 5-7 zeigt die Pherogramme der Proben ②_b, ⑥, ⑦ und ⑧ nach einer Elektrophoresedauer von 120 Minuten.

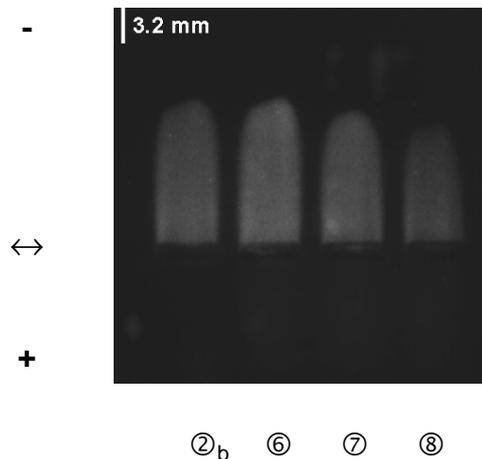


Abb. 5-7: Die Pherogramme der Polyrotaxane ②_b, ⑥, ⑦ und ⑧ nach einer Elektrophoresedauer von 120 min. (Start: ↔, Kathode: -, Anode: +)

Die Pherogramme der Proben ②_b, ⑥, ⑦ und ⑧ zeigen jeweils eine fluoreszierende Bande in Richtung Kathode. In anodischer Feldrichtung ist keine Fluoreszenz erkennbar. Folglich ist das Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** in allen Proben quantitativ auf das Ionen_{10,6} Chlorid **11** aufgefädelt. Die Wiederholeinheiten von Ionen_{10,6} Chlorid **11** in ⑥-⑧ sind also wie bei Polyrotaxan ②_b zu je 10 % durch **5** belegt.

In Kapitel 5.1 zum Nachweis der Struktur Fluorescein-markierter Polyrotaxane wurde deutlich, daß die Polyrotaxane umso stabiler sind, je mehr α -Cyclodextrinringe **1a** an den Kettenenden von Ionen_{10,6} Chlorid aufgefädelt sind. Wenn keine Blockierung durch α -Cyclodextrin **1a** vorliegt, fädeln die Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** im elektrischen Feld allmählich wieder ab und wandern entsprechend ihrer negativen Ladung zurück in Richtung Anode. Im Elektrophoreseexperiment wird dieser Abfädelprozeß durch einen Abbau der fluoreszierenden Bande in kathodischer Feldrichtung sichtbar. Die Banden der Proben ⑥-⑧ sind analog zu ②_b auch nach

einer Elektrophoresedauer von 120 Minuten noch scharf abgegrenzt, was auf die Bildung stabiler Polyrotaxane schließen läßt. Aufgrund der Analogie zu Polyrotaxan ②_b wird für die Proben ⑥-⑧ ebenfalls eine 10 %-ige Belegung von Ionen_{10,6} Chlorid **11** durch α -Cyclodextrin **1a** angenommen.

In Abbildung 5-7 ist eine kontinuierliche Abnahme der Laufstrecken von ⑥ \rightarrow ⑧ zu beobachten. Dies deutet auf eine unterschiedliche Belegung von Ionen_{10,6} Chlorid **11** durch β -Cyclodextrin **1b** hin. Die Proben ②_b und ⑥ lassen sich im Elektrophoreseexperiment jedoch nicht voneinander unterscheiden. Die Menge an β -Cyclodextrin **1b** in Stammlösung ⑥ ist mit 20 Mol-% bezogen auf das Ionen_{10,6} Chlorid **11** deutlich niedriger als bei den Proben ⑦ und ⑧. Wahrscheinlich ist der Anteil an aufgefädeltm β -Cyclodextrin **1b** in Probe ⑥ so gering, daß die Molmassendifferenz der Polyrotaxane ⑥ und ②_b unterhalb der elektrophoretischen Auflösung liegt. In diesem Fall laufen beide Proben im Elektrophoreseexperiment auf gleicher Höhe. Die Laufstrecken der Polyrotaxane ②_b und ⑥ betragen 13.0 mm. Die Proben ⑦ und ⑧ enthielten einen Anteil von 50 bzw. 80 Mol-% β -Cyclodextrin **1b** bezogen auf **11**. Aus den Pherogrammen läßt sich eine Laufstrecke von 12.0 mm für Probe ⑦ und von 10.5 mm für Probe ⑧ ermitteln. Da sich die Proben ②_b, ⑦ und ⑧ lediglich durch ihren Gehalt an β -Cyclodextrin **1b** unterscheiden und nur die aufgefädelten β -Cyclodextrinringe **1b** einen Einfluß auf die Wanderung der Polyrotaxane im Elektrophoreseexperiment haben, muß die unterschiedliche Mobilität der Polyrotaxane ②_b, ⑦ und ⑧ eine Folge des unterschiedlichen Gesamtbelegungsgrades von Ionen_{10,6} Chlorid **11** im System sein. Unter der Annahme, daß der Anteil an aufgefädeltm α -Cyclodextrin in den Stammlösungen ②_b, ⑥, ⑦ und ⑧ unabhängig von der Konzentration an β -Cyclodextrin **1b** im System ist, stellt die Differenz zwischen den Laufstrecken ②_b und ⑦ sowie ②_b und ⑧ ein Maß für den Belegungsgrad von Ionen_{10,6} Chlorid **11** durch β -Cyclodextrin **1b** dar. Somit konnte gezeigt werden, daß eine Trennung der Polyrotaxane nach dem Belegungsgrad mittels Elektrophorese prinzipiell möglich ist.

Nimmt man an, daß der in Kapitel 5.1.1 für die Polyrotaxane ②_{a-c} gefundene lineare Zusammenhang zwischen der Laufstrecke l und der reziproken Molmasse $1/M_w$ der Ionen_{10,6} Chloride in ②_{a-c} auch für die Polyrotaxane ⑦ und ⑧ gültig ist, dann entspricht die Differenz der Laufstrecken ②_b und ⑦ einer Masse von 17 000 g/mol und die von ②_b und ⑧ einer Masse von 43 000 g/mol. Da sich beide Polyrotaxane in erster Näherung nur durch den Gehalt an aufgefädeltm β -Cyclodextrin **1b** unterscheiden, kann dieser Massenanteil einer Anzahl von 38 Molekülen **1b** pro Mol Polyrotaxan ⑦ und 15 Molekülen **1b** pro Mol Polyrotaxan ⑧ gleichgesetzt werden. Der Polymerisationsgrad des Ionen_{10,6} Chlorids **11** beträgt $P_n = 97$ (s. Kap. 4.2). Für den Belegungsgrad von **11** durch **1b** ergibt sich somit ein Wert von $x = 0.15$ für Polyrotaxan ⑦ und einer von $x = 0.40$ für Polyrotaxan ⑧ (s. Abb. 5-6). Beide Werte liegen zwar in einer realistischen Größenordnung, sie können jedoch wegen der

zugrundegelegten Annahmen nur als Näherung gewertet werden. Da nebeneinander aufgefädelt α - und β -Cyclodextrine weder im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum noch durch HPLC-Analyse unterschieden werden können, ist eine genauere Aussage hinsichtlich des Belegungsgrades von Ionen $_{10,6}$ Chlorid **11** in den Polyrotaxanen ⑥-⑧ nicht möglich.

5.1.3 Der Nachweis Fluorescein-markierter polymerer Ionenpaare

Mit Hilfe der Gelelektrophorese war es bereits gelungen, die Bildung fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane aus Ionen $_{10,6}$ Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a** nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, daß die Wiederholeinheiten von Ionen $_{10,6}$ Chlorid **10** zu jeweils 10 % mit **5** und **1a** belegt sind und die Polyrotaxane ② eine positive Überschußladung haben. Im elektrischen Feld wandern die Polyrotaxane ② deshalb in Richtung Kathode (s. Kap. 5.1).

Ziel war es nun, lösliche polymere Ionenpaare aus den Fluorescein-markierten Polyrotaxanen ② aufzubauen. Dazu sollten negativ geladene Polyionen an die positiv geladenen Polyrotaxane ② in Lösung assoziiert werden. Um die Bildung polymerer Ionenpaare mittels Elektrophorese nachweisen zu können, müssen diese anhand ihrer Wanderungsrichtung im elektrischen Feld von den freien Polyrotaxanmolekülen ② unterscheidbar sein. Letzteres erfordert eine Umpolung der Polyrotaxane ② im assoziierten Zustand. Als Gegenion dazu wurde Natriumpolystyrolsulfonat mit einer Molmasse von $M_w = 149\,000$ D gewählt. Das Verhältnis der Wiederholeinheiten von Natriumpolystyrolsulfonat und Ionen $_{10,6}$ Chlorid **10** wurde auf 5:1 festgelegt. Als Referenz diente die Lösung des reinen Polyrotaxans ②. Wenn die positive Ladung der Polyrotaxane ② durch die Assoziation an Polystyrolsulfonat überkompensiert wird, dann sollten die polymeren Ionenpaare im Elektrophoresexperiment zur Anode wandern. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs **5** kann dann sowohl die Wanderung der Polyrotaxane ② als auch die der Ionenpaare ③ optisch verfolgt werden.

Als Methode zum Nachweis der Bildung polymerer Ionenpaare wurde die horizontale Gelelektrophorese eingesetzt. Die experimentelle Durchführung sowie die Aufnahme der Gelplatten erfolgte analog zum Nachweis fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane in Kapitel 5.1.1. Abbildung 5-8 zeigt die Pherogramme der Polyrotaxanproben ② und ③ nach einer Elektrophoresedauer von I) 60, II) 90 und III) 120 Minuten.

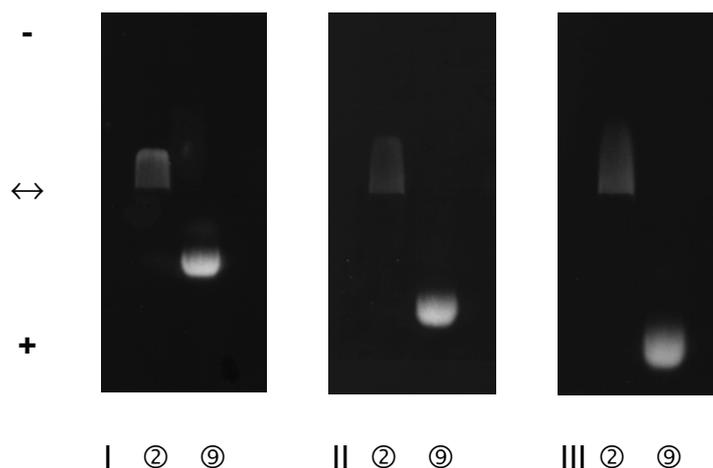


Abb. 5-8: Das Pherogramm der Proben ② und ⑨ nach einer Elektrophoresedauer von I) 60, II) 90 und III) 120 min. (Start: ↔, Kathode: -, Anode: +).

Probe ② enthält positiv geladene fluoreszenzmarkierte Polyrotaxane aus Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a**, die im Elektrophoreseexperiment in Richtung Kathode wandern (s. Kap. 5.1). In den Pherogrammen I-III sind daher bei Probe ② ausschließlich fluoreszierende Banden in kathodischer Feldrichtung zu sehen. Der Abstand der Lauffronten vom Startpunkt nimmt mit steigender Elektrophoresedauer zu. Die Breite der Banden ist durch die Polydispersität der fluoreszenzmarkierten Polyrotaxane und ihrer elektrostatischen Wechselwirkung mit dem Agarosegel bedingt. Letzteres führt zu einer Verdünnung der Proben im Gel, so daß die Fluoreszenzintensität der Banden mit der Dauer der Elektrophorese abnimmt.

Probe ⑨ setzt sich aus dem fluoreszenzmarkierten Polyrotaxan ② und Natriumpolystyrolsulfonat zusammen. Dabei beträgt das Konzentrationsverhältnis zwischen dem negativ geladenen Natriumpolystyrolsulfonat und dem positiv geladenen Ionen_{10,6} Chlorid **10** im Polyrotaxan ② 5:1. Die Pherogramme I-III von Probe ⑨ zeigen je eine fluoreszierende Bande im anodischen Bereich. In Richtung Kathode ist im Gegensatz zum reinen Polyrotaxan ② keine Fluoreszenz zu beobachten. Demzufolge ist eine vollständige Umpolung der positiv geladenen Polyrotaxane ② in Gegenwart von Natriumpolystyrolsulfonat erfolgt. Letzteres beweist die Bildung löslicher polymerer Ionenpaare aus ② und Natriumpolystyrolsulfonat.

Die Banden der Ionenpaare ⑨ sind schmaler als die der reinen Polyrotaxane ②. Es ist anzunehmen, daß die positive Ladung der Polyrotaxanmoleküle durch die Assoziation von Polystyrolsulfonationen abgeschirmt und so die elektrostatische Wechselwirkung mit dem Agarosegel unterdrückt wird. Folglich können die Ionenpaare ⑨ ungehinderter durch das Gel wandern als die freien Polyrotaxane ②. Im Elektrophoreseexperiment wird dies durch eine stärkere Intensität der fluoreszierenden Banden von Probe ⑨ im Vergleich zu Probe ② bestätigt.

Das Experiment wurde bei einem umgekehrten Verhältnis der Wiederholeinheiten von Natriumpolystyrolsulfonat und Ionen_{10,6} Chlorid **10** (1:5) wiederholt. Es zeigte sich, daß das Polyrotaxan **2** bei einem fünffachen Überschuß von **10** analog zur reinen Probe **2** quantitativ in Richtung Kathode wandert. Ein Nachweis der Bildung polymerer Ionenpaare durch Gelelektrophorese war unter diesen Bedingungen nicht möglich. Der Einfluß von Natriumpolystyrolsulfonat auf die Struktur der Polyrotaxane **2** in Lösung wurde zusätzlich mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung (s. Kapitel 6.2) und Fluoreszenzmikroskopie (s. Kapitel 7.2) untersucht.

5.2 Der Nachweis der Struktur Eosin-markierter Polyrotaxane

Die Bildung fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane aus Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und Ionen_{10,6} Chlorid **10** konnte bereits erfolgreich mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Es wurde ein wäßriges, ammoniakalisches System verwendet, in dem Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** deprotoniert und Ionen_{10,6} Chlorid **10** als Polykation vorliegt. Freie und aufgefädelt Ringe **5** konnten so anhand ihrer Wanderungsrichtung im elektrischen Feld unterschieden werden. Analog dazu wurde der Einschluß von Ionen_{10,6} Chlorid **10** in Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** untersucht (s. Kap. 5.1). Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** unterscheidet sich von Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** lediglich durch vier zusätzliche Bromid-Gruppen. Das Experiment sollte deshalb auch Aussagen über den Einfluß dieser Substituenten auf den Einschluß von Ionen_{10,6} Chlorid **10** zulassen. Abbildung 5-9 zeigt die Strukturen der Fluoreszenzfarbstoffe **5** und **6**.

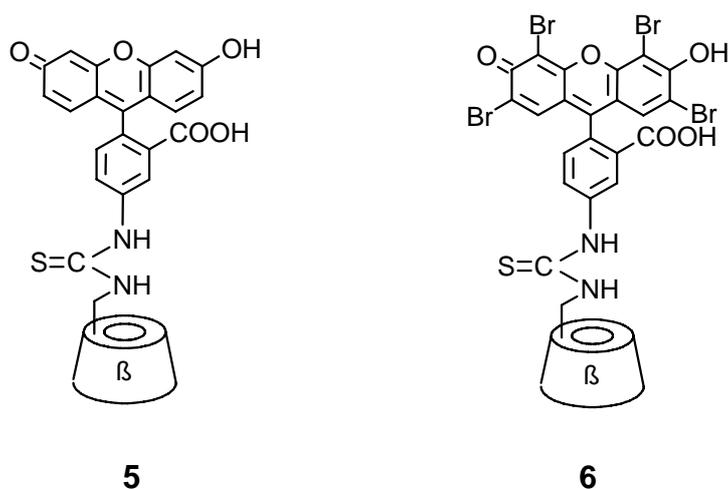


Abb. 5-9: Die Struktur von Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und Eosinyl- β -Cyclodextrin **6**.

Für den Nachweis der Bildung Eosin-markierter Polyrotaxane wurden die Ensembles ①-⑤ analog zum Nachweis Fluorescein-markierter Polyrotaxane in Kap. 5.1 elektrophoretisch untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. In Abbildung 5-10 sind die Pherogramme der Proben ①-⑤ nach einer Elektrophoresedauer von 60 Minuten dargestellt.

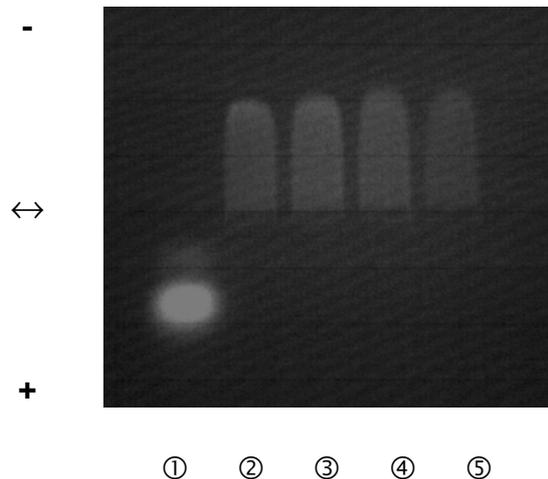


Abb. 5-10: Die Pherogramme der Proben ①-⑤ mit Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** als Fluoreszenzfarbstoff nach einer Elektrophoresedauer von 60 min. (Start: ↔, Kathode: -, Anode: +).

Probe ① enthält den reinen Fluoreszenzfarbstoff, Eosinyl- β -Cyclodextrin **6**. Dieser wandert entsprechend seiner negativen Ladung im Elektrophoreseexperiment in Richtung Kathode.

Bei Probe ② wurde Ionen_{10,6} Chlorid **10** nacheinander mit Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** und α -Cyclodextrin **1a** umgesetzt. Dadurch sollten zuerst die Ringe **6** und zuletzt die Ringe **1a** auf die Polymerkette auffädeln. Das Pherogramm der Probe ② zeigt eine scharf abgegrenzte fluoreszierende Bande in Richtung Kathode. In anodischer Feldrichtung ist im Vergleich zu Probe ① des reinen Farbstoffs keine Fluoreszenz erkennbar. Das läßt den Schluß zu, daß der Fluoreszenzfarbstoff **6** quantitativ an das Ionen_{10,6} Chlorid **10** gebunden ist. Eine Unterscheidung, ob die fluoreszenzmarkierten Cyclodextrine auf Ionen_{10,6} Chlorid **10** aufgefädelt sind oder an **10** anlagern, ist nur in Zusammenhang mit dem Kontrollexperiment ⑤ möglich.

Probe ⑤ unterscheidet sich von Probe ② durch die Reihenfolge der Substanzzugabe. So wurde Ionen_{10,6} Chlorid **10** zuerst mit α -Cyclodextrin **1a** und nachträglich mit Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** umgesetzt. Im Elektrophoreseexperiment läßt sich Probe ⑤ nicht von Probe ② unterscheiden. Im Gegensatz zu dem Experiment mit Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** (s. Kap. 5.1) tritt hier keine Fluoreszenz in anodischer Feldrichtung auf. Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** wandert zusammen mit der positiv

geladenen Polymerkette **10** quantitativ in Richtung Kathode. Wahrscheinlich gehen die Eosinyl- β -Cyclodextrine **6** stabile Anlagerungsverbindungen mit Ionen_{10,6} Chlorid **10** ein. Eine mögliche Erklärung dafür ist die höhere Hydrophilie des Eosinylrestes aufgrund der vier Bromid-Substituenten (s. Abb. 5-9). Die Anlagerung von Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** an Ionen_{10,6} Chlorid **10** könnte durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert sein, so daß Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** bevorzugt an Ionen_{10,6} Chlorid **10** anlagert, während Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** polymere Einschlußverbindungen bildet. Mit Hilfe der Proben ③ und ④ ist dies nachweisbar.

Probe ③ enthält im Vergleich zu Probe ② einen etwa 4 mal geringeren Anteil an α -Cyclodextrin **1a**. Wenn eine stabile Anlagerungsverbindung aus Ionen_{10,6} Chlorid **10** und Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** vorliegt, dann sollte die Wanderung der Moleküle **6** von der Konzentration an α -Cyclodextrin **1a** im System unabhängig sein. Das heißt, Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** müßte analog zu Probe ② in Richtung Kathode wandern. Im Elektrophoreseexperiment zeigt sich, daß eine Unterscheidung der Proben ② und ③ tatsächlich nicht möglich ist. Außerdem ist in allen drei Fällen keine Fluoreszenz in anodischer Feldrichtung zu erkennen. Dies bestätigt, daß der Fluoreszenzfarbstoff **6** auch in Probe ③ quantitativ an das Ionen_{10,6} Chlorid **10** gebunden ist.

Bei Probe ④ wurde Ionen_{10,6} Chlorid **10** ausschließlich mit Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** im Verhältnis 10:1 umgesetzt. Die Kettenenden von Ionen_{10,6} Chlorid • sind deshalb nicht durch α -Cyclodextrinringe **1a** abgeschlossen. Somit ist zu erwarten, daß aufgefädelt Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** unter dem Einfluß des elektrischen Feldes allmählich abfädelt. Das Elektrophoreseexperiment zeigt, daß Farbstoff **6** mit den Proben ② und ③ auf gleicher Höhe in Richtung Kathode wandert. Im Gegensatz zum Versuch mit Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** (s. Kap. 5.1) ist hier weder ein Rückgang der fluoreszierenden Bande auf der Seite der Kathode noch eine Fluoreszenz in anodischer Feldrichtung zu beobachten. Die Übereinstimmung der Proben ②-④ bestätigt die Annahme, daß Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** in ammoniakalischer Lösung bevorzugt an Ionen_{10,6} Chlorid **10** anlagert.

5.3 Der Versuch des Nachweises Rhodamin-markierter Polyrotaxane

Zur Erzeugung fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane wurde neben Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** auch das Rhodamin-funktionalisierte Cyclodextrinderivat **7** synthetisiert (s. Schema 3-3). Für den Nachweis Rhodamin-markierter Polyrotaxane wurden die Ensembles ①-⑤ mit Rhodaminyl- β -Cyclodextrin **7** hergestellt und analog zum Nachweis Fluorescein- und Eosin-markierter Polyrotaxane in den Kapiteln 5.1 und 5.2 elektrophoretisch untersucht. Dabei erwies sich

die vergleichsweise hohe Hydrophilie des Rhodamin-Substituenten als Nachteil. Denn im Gegensatz zu den Fluoreszenzfarbstoffen **5** und **6** fiel Rhodaminyl- β -Cyclodextrin **7** teilweise aus der ammoniakalischen Lösung aus. Der gelöste Anteil liegt als Zwitterion vor und ist elektrisch neutral [14, 15]. Im freien Zustand sollte Rhodaminyl- β -Cyclodextrin **7** deshalb keine elektrophoretische Mobilität zeigen. Bei einer Bindung an Ionen_{10,6} Chlorid **10** sollte der Farbstoff **7** zusammen mit der Polymerkette in Richtung Anode wandern. Eine Unterscheidung der freien und gebundenen Ringe **7** ist dann prinzipiell möglich. Das Gelelektrophoreseexperiment zeigte jedoch, daß sich die Proben ①-⑤ unabhängig von ihrer Zusammensetzung nicht voneinander unterscheiden lassen. Rhodaminyl- β -Cyclodextrin **7** konzentrierte sich stets um den Aufgabepunkt. Daher ist die Elektrophorese als Methode für den Nachweis Rhodamin-markierter Polyrotaxane ungeeignet.

5.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einschluß von Ionen_{10,6} Chlorid in Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** und Rhodaminyl- β -Cyclodextrin **7** mittels Gelelektrophorese untersucht. Von den drei Fluoreszenzfarbstoffen erwies sich insbesondere das Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** als geeigneter Baustein für den Aufbau wasserlöslicher fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane. So ist es erstmals gelungen, die Bildung und die Struktur Fluorescein-markierter Polyrotaxane in Lösung nachzuweisen. Dabei konnte der von Wenz und Keller beschriebene Mechanismus zur Bildung von Polyrotaxanen [13, 16] sichtbar gemacht werden. Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** geht aufgrund seiner höheren Hydrophilie keine Einschlußverbindung mit Ionen_{10,6} Chlorid ein. Statt dessen konnte die Anlagerung von **6** an Ionen_{10,6} Chlorid in Lösung experimentell nachgewiesen werden. Die resultierende Struktur ist löslich und im elektrischen Feld stabil. Die Untersuchungen mit Rhodaminyl- β -Cyclodextrin **7** gaben keinen Hinweis auf eine Wechselwirkung von **7** mit Ionen_{10,6} Chlorid **10**. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese mit den Fluoreszenzfarbstoffen **5**, **6** und **7** verdeutlichen den großen Einfluß des Substituenten auf den Einschluß von Ionen_{10,6} Chlorid **10** in substituierte β -Cyclodextrine.

Am Beispiel Fluorescein-markierter Ionen_{10,6} Chloride konnten erstmals synthetisch hergestellte Polyionen mittels Elektrophorese nach der Molmasse getrennt werden. Es wurde gezeigt, daß die elektrophoretische Mobilität dieser Polyrotaxane reziprok von der Molmasse und dem Polymerisationsgrad der Ionen_{10,6} Chloride abhängt, aus denen die Polyrotaxane aufgebaut sind. Die Reptation der Polyrotaxane kann analog zur Wanderung von Nukleat-Polyionen durch Gleichung 5-2 beschrieben werden. Dies bietet die Möglichkeit, die Molmasse fraktionierter Ionene im Laborbetrieb

zukünftig einfach und schnell anhand ihrer Laufstrecke im Elektrophoreseexperiment zu bestimmen. Darüber hinaus konnte der Einfluß des Belegungsgrades auf die Mobilität Fluorescein-markierter Polyrotaxane experimentell verdeutlicht werden.

In einem weiteren Experiment ist es gelungen, die Bildung stabiler, löslicher Ionenpaare aus Fluorescein-markierten Polyrotaxanen und Natriumpolystyrolsulfonat in wäßriger Lösung nachzuweisen. Bei einem Überschuß an Natriumpolystyrolsulfonat wird die Ladung des Polyrotaxans vollständig umgepolt. Dadurch erhalten die polymeren Ionenpaare eine negative Überschußladung. Letzteres konnte im Elektrophoreseexperiment anhand der unterschiedlichen Wanderungsrichtung von freien und assoziierten Polyrotaxanen visualisiert werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen von Dautzenberg et al. zur Komplexbildung von anionischen und kationischen Polyelektrolyten [17].

6 Die Untersuchung fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung ist eine Methode zur Detektion einzelner fluoreszierender Spezies anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer. Durch Fluoreszenzstrahlung geht ein Molekül vom elektronisch angeregten Zustand in den elektronischen Grundzustand über. In Konkurrenz dazu können der strahlungslose Energieübertrag innerhalb des Moleküls (Intersystem Crossing, Internal Conversion) sowie auf andere Moleküle (Quenching), photochemische Reaktionen oder die Emission von Phosphoreszenzstrahlung zur Relaxation führen [1]. Die Zahl der Moleküle n im ersten angeregten Zustand nimmt nach einer Kinetik erster Ordnung mit der Zeit t ab (Gleichung 6-1). Dabei setzt sich die Zerfallskonstante k summarisch aus den Zerfallskonstanten k_i der einzelnen Relaxationsmechanismen zusammen.

$$n = n_0 \cdot e^{-kt} \quad (6-1)$$

Die Lebensdauer τ eines angeregten Zustandes ist die Zeit, für die $k = 1/\tau$ ist und sich noch etwa $1/e \approx 37\%$ der Moleküle im angeregten Zustand befinden. Aufgrund der konkurrierenden Zerfallsmechanismen ist die apparente (meßbare) Lebensdauer τ des ersten angeregten Zustandes stets kleiner als die intrinsische (natürliche) Lebensdauer τ_0 . Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ist definiert als die Zeit, nach welcher die Hälfte aller Moleküle in den Grundzustand übergegangen sind. Der Zusammenhang zwischen der Lebensdauer τ und der Halbwertszeit $t_{1/2}$ wird durch Gleichung 6-2 beschrieben.

$$t_{1/2} = \ln 2 \cdot \tau = 0.693 \cdot \tau \quad (6-2)$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, daß ein angeregtes Molekül unter Emmission von Fluoreszenzstrahlung in den elektronischen Grundzustand zurückfällt. Letzteres wird deutlich, wenn man Φ_F durch die Zerfallskonstanten k_i der einzelnen Zerfallsmechanismen ausdrückt, wobei k_F die Zerfallskonstante der Fluoreszenz bezeichnet (Gleichung 6-3). Bei einer Fluoreszenzquantenausbeute von 100 % ist $\sum k_i = k_F$. Die Relaxation des angeregten Moleküls erfolgt dann ausschließlich durch Fluoreszenz.

$$\Phi_F = \frac{k_F}{\sum k_i} = k_F \cdot \tau \quad (6-3)$$

Die Lebensdauer eines Fluorophors hängt von seiner chemischen Umgebung ab. Dadurch ermöglicht die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung auch Rückschlüsse auf die Mikrostruktur des untersuchten Systems.

Keller hat bereits 1989 vorgeschlagen, die Fluoreszenzmessung als Methode zur Sequenzierung von DNA einzusetzen [2, 3]. Ambrose und Goodwin 1993 stellten 1993 eine Laser induzierte Technik vor, mit der DNA-Segmente von ≥ 40 kb mit einer Rate von 100-1000 b/s sequenziert werden können [4, 5]. Im Zeitraum zwischen 1991-1996 veröffentlichte die Arbeitsgruppe von Dovichi Anwendungen der Kapillarelektrophorese in Kopplung mit der Einzelphotonendetektion als "ultimative" Methode zur Trennung biologischer Substanzgemische. So wurden Aminosäuren [6, 7], Proteine [8, 9], Enzyme [10, 11], Zucker [12, 13] und DNA [14, 15] analysiert. Als Fluoreszenzmarker kamen insbesondere Fluorescein- und Rhodaminderivate zur Anwendung. Im Vergleich zur Gelelektrophorese besteht der große Vorteil der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung in einer signifikanten Reduktion der Analysedauer und der extrem niedrigen erforderlichen Substanzmenge (vgl. Kap. 5). So können Konzentrationen von 10^{-12} mol/L noch quantitativ bestimmt werden.

Bossmann verwendete die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung erstmals zur Analyse synthetisch hergestellter Ruthenium(II)-polypyridylkomplexe sowie von Huminstoffen [16].

In der supramolekularen Chemie nutzt man die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung zur Untersuchung der Bildung und Stöchiometrie von Einschlußverbindungen. So konnten Xu et al. die Bildung von 1:2 Chelat-Komplexen aus Pyren und Epichlorhydrin-verbrückten β -Cyclodextrinen in wäßriger Lösung nachweisen [17]. Werner und Warner erhielten ähnliche Ergebnisse. Sie verwendeten neben Pyren auch Naphthalenderivate als Gastmoleküle [18, 19]. Flamigni untersuchte den Einschluß von Fluorescein, Erythrosin und Rose-Bengal in α -, β - und γ -Cyclodextrin mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung [20]. Sie postulierte zwei Typen von Einschlußkomplexen (Abb. 6-1). Ihren Ergebnissen zufolge ist je nach Farbstoff und Cyclodextrin die Bildung einer der beiden Komplex-Typen bevorzugt. So organisiert sich Fluorescein mit β - und γ -Cyclodextrin nach dem Typ-1 Komplex, während der Farbstoff mit α -Cyclodextrin bevorzugt den Typ-2 Komplex bildet. Die Fluoreszenzen des freien und komplexierten Fluoresceins fallen jeweils monoexponentiell ab. In wäßriger Lösung wurde für den reinen Farbstoff eine Fluoreszenzlebensdauer von 4.3 ns und für den β -Cyclodextrin-Komplex eine von 4.6 ns ermittelt.

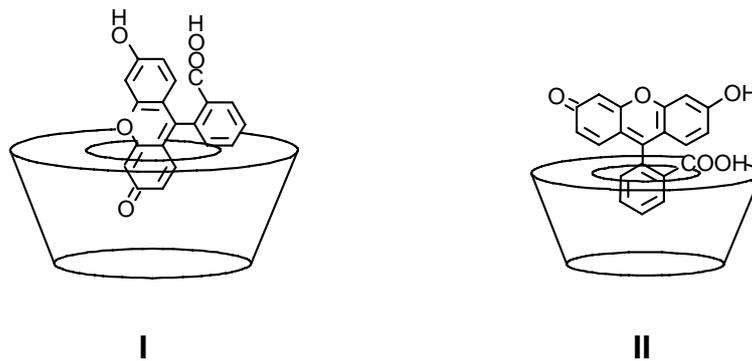


Abb. 6-1: Der Einschluß von Fluorescein in β - und γ -Cyclodextrin unter Bildung eines Typ-1-Komplexes I und in α -Cyclodextrin unter Bildung eines Typ-2-Komplexes II.

Die Arbeitsgruppe um Milewski untersuchte in ähnlicher Weise den Einschluß von 4*H*-1-benzopyran-4-thion (BPT) in α -, β - und γ -Cyclodextrin in Abhängigkeit vom Lösungsmittel [21]. Die Fluoreszenzquantenausbeute von BPT ist in wäßriger Lösung vom Cyclodextrin-Wirt nahezu unabhängig. Corradini et al. [22] und die Arbeitsgruppe von Ikeda [23] veröffentlichten 1996 Studien zum Nachweis der Selbstinclusion Dansyl-modifizierter β -Cyclodextrine in Lösung. Ikeda konnte für seine Derivate jeweils zwei voneinander abhängige Fluoreszenzlebensdauern nachweisen. Davon ist die kürzere Komponente dem freien Dansylrest zuzuordnen. Die längere Komponente resultiert aus der Emission des Fluorophors, der in die Kavität des β -Cyclodextrinrestes eingeschlossen ist. Den Nachweis dieser Selbstinclusion führte Ikeda mit Hilfe von Adamantanol in einem Verdrängungsexperiment durch. Denn Adamantanol ist ein sehr guter Gast für den Einschluß in β -Cyclodextrin und deshalb dazu in der Lage den inkludierten Dansylrest aus der Kavität des β -Cyclodextrins zu verdrängen. Corradini verwendete analog dazu Adamantancarbonsäure für den Nachweis der Selbstinclusion Dansyl-modifizierter β -Cyclodextrine. $^1\text{H-NMR}$ -Studien zur intermolekularen Selbstinclusion monofunktionalisierter β -Cyclodextrinamide wurden 1998 von Takahashi veröffentlicht [24]. Park synthetisierte Viologen-funktionalisierte β -Cyclodextrine und erforschte den Einfluß der Viologengruppe auf die Fluoreszenz eingeschlossener Naphthoxylaminopropanmoleküle. Anhand der Fluoreszenzlebensdauer des isolierten und des eingeschlossenen Gastmoleküls konnte Park das Quenchen der Gastfluoreszenz im Cyclodextrin-Komplex nachweisen [25]. Die Absorption wird hingegen durch den Einschluß nicht beeinflusst. Shen veröffentlichte 1997 erstmals photophysikalische Studien zum Einschluß einer 3*H*-Indolammoniumverbindung in natives β -Cyclodextrin. Durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung konnte die Bildung einer Rotaxan-ähnlichen Struktur mit einem Wirt/Gast-Verhältnis von 3:1 nachgewiesen werden [26].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Polyrotaxane aus Ionen_{10,6} Chlorid **10** und Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung untersucht werden. Ziel war es, anhand der gemessenen Fluoreszenzlebensdauern Informationen über die Verteilung und Konformation der aufgefädelten Cyclodextrinringe im Polyrotaxan zu erhalten.

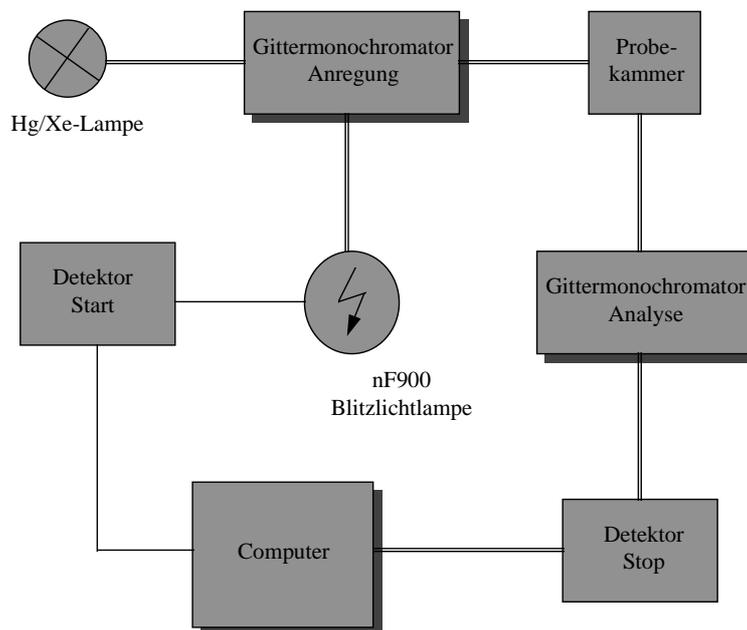
Die Fluoreszenzlebensdauer kann mit Hilfe der Einzelphotonenmessung experimentell direkt nach der Einzelpuls- oder der multipilen Pulsanregung bestimmt werden [1]. Bei der Einzelpulsmethode wird der Fluorophor mit einem einzigen intensiven Lichtblitz angeregt und der exponentielle Zerfall gemäß Gleichung 6-1 beobachtet. Die Lebensdauer τ ist aus der Steigung $d \log n / dt$ direkt zugänglich. Bei der multipilen Pulsanregung wird die Probe mit einer schnellen Folge von schwachen Blitzen bestrahlt. Jeder Blitz erfaßt einen einzigen Punkt der Zerfallskinetik. Die Photonen, die zu einer bestimmten Zeit nach der Blitzanregung den Detektor erreichen, werden dann mittels Einzelphotonenmessung registriert. Für die Zerfallskinetik müssen etwa 10^5 Einzelereignisse vermessen werden. Die Messungen erfolgen senkrecht zur Lichtanregung. Da die Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors im freiem und gebundenen Zustand charakteristisch ist, kann sie für den Nachweis fluoreszenzmarkierter Substanzen genutzt werden [27].

Für das Experiment wurde eine Lösung des Polyrotaxans **14** aus Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a** eingesetzt. Als Meßtechnik wurde die multipile Pulsanregung gewählt. Die Bildung und die Zusammensetzung des Polyrotaxans **14** konnte bereits mittels Gelelektrophorese erfolgreich nachgewiesen werden (s. Kap. 5.1, Probe ②). Für die Untersuchung der Polyrotaxane **14** durch Fluoreszenzmessung müssen freie und aufgefädelt Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer unterscheidbar sein. Zur Kontrolle wurden deshalb Referenzmessungen an Lösungen aus reinem Fluorescein und Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** durchgeführt. Da die Lebensdauer eines aufgefädelten, fluoreszenzmarkierten Cyclodextrins von seiner chemischen Umgebung im Polyrotaxan abhängt, sollte es möglich sein, inter- und intramolekulare Wechselwirkungen des Fluoresceinylrestes in Lösung nachzuweisen. Die Ergebnisse der zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung sind in den Kapiteln 6.1 und 6.2 beschrieben.

6.1 Die Untersuchung der Struktur Fluorescein-markierter Polyrotaxane

Die Mikrostruktur des Polyrotaxans **14** wurde mit einer Single-Photon-Counting-Apparatur untersucht. Die Anregung erfolgte mit einer Nanosekunden-Blitzlicht-

lampe, die mit einer Wechselspannung von 5.000-40.000 Hz gepulst wurde. Unter optimierten Bedingungen können so 10^{10} Photonen je Wechselspannungsperiode ausgesendet werden. Die Gittermonochromatoren der Single-Photon-Counting-Anlage wurden auf eine Extinktion von 333 nm und eine Emissionswellenlänge von 550 nm eingestellt. Dadurch konnte der Einfluß von Streulicht auf die Fluoreszenzmessung eliminiert werden. Die Fluoreszenz der Proben wurde senkrecht zur Lichtanregung gemessen und mit Hilfe eines Si-Detektors in einem Zeitfenster von 0-100 ns analysiert. Das Minimum der zeitlichen Auflösung liegt bei 110 ps. Der Aufbau des Single-Photon-Counters ist in Schema 6-1 abgebildet.



Schema 6-1: Der Aufbau des verwendeten Single-Photon-Counters.

Die Fluoreszenzabklingkurve $F(t)$ wurde nach Subtraktion des Referenzsignals (Lampenimpuls) iterativ unter Zugrundelegen von Gleichung 6-4 ausgewertet. Der Hintergrundterm A berücksichtigt das thermische Rauschen. $B_{1,2}$ sind vorexponentielle Faktoren, die die relative Häufigkeit der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 und τ_2 der fluoreszierenden Spezies in einem Zeitintervall $t + \delta t$ nach Aussendung des Lichtblitzes angeben. Die Abweichung der berechneten Funktion von den Meßwerten wird durch die Standardabweichung χ beschrieben [23].

$$F(t) = A + B_1 \cdot \exp\left[-(t + \delta t)/\tau_1\right] + B_2 \cdot \exp\left[-(t + \delta t)/\tau_2\right] \quad (6-4)$$

Wenn die Auswertung der Fluoreszenzabklingkurve $F(t)$ unter der Annahme erfolgte, daß voneinander unterscheidbare Fluoreszenzlebensdauern τ_i vorliegen, dann wurde die relative Fluoreszenzintensität θ_i einer Lebensdauerkomponente τ_i im Vergleich zur Gesamtintensität nach Gleichung 6-5 berechnet.

$$\theta_i = \left[\frac{B_i \cdot \tau_i}{\sum B_i \cdot \tau_i} \right] \cdot 100\% \quad (6-5)$$

Für das Experiment wurde die Polyrotaxanlösung **14** so verdünnt, daß die Konzentration des darin enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffs **5** a) 10^{-3} mol/L, b) 10^{-4} mol/L und c) 10^{-5} mol/L betrug. Zum Vergleich wurden gleiche Konzentrationen des reinen Fluoresceins und Fluoresceinyl- β -Cyclodextrins **5** hergestellt. Als Lösungsmittel diente jeweils eine wäßrige, 0.01 M NH_4OH -Lösung (pH = 8.0). Die Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung sind in Tabelle 6-1 aufgeführt.

Tab. 6-1: Die Fluoreszenzlebensdauern von Fluorescein, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** (FIT- β -CD) und Polyrotaxan **14**. Der Fitparameter χ^2 betrug 1.4-1.8.¹

	τ_1 [ns]	B ₁ [%]	τ_2 [ns]	B ₂ [%]
Fluorescein				
10 ⁻³ mol/L	6.4	100	-	-
10 ⁻⁴ mol/L	4.8	100	-	-
10 ⁻⁵ mol/L	3.6	100	-	-
FIT-β-CD 5				
10 ⁻³ mol/L	6.2	60	3.8	40
10 ⁻⁴ mol/L	4.4	51	1.9	49
10 ⁻⁵ mol/L	3.7*	100*	0.7	100
Polyrotaxan 14				
10 ⁻³ mol/L	4.7	33	1.6	67
10 ⁻⁴ mol/L	4.8	29	1.8	71
10 ⁻⁵ mol/L	3.9	100	1.7**	41**

** nach Zugabe von α -Cyclodextrin **1a**

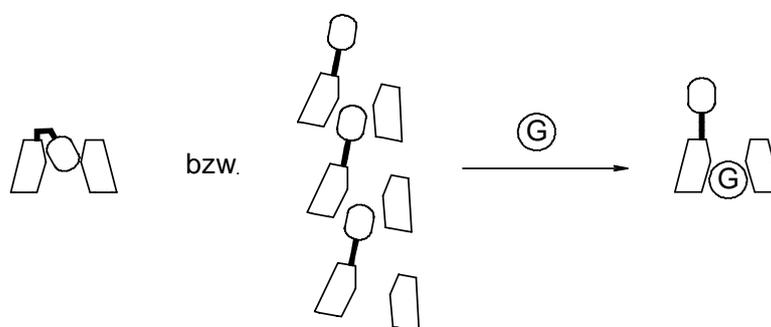
* nach Zugabe von Adamantylamin

Für die Lösungen des Fluoresceins wurde jeweils eine Lebensdauer τ_1 ermittelt, wobei der Wert von τ_1 mit zunehmender Verdünnung abnimmt. Allgemein führt der Einfluß desaktivierender Prozesse mit Lösungsmittelmolekülen in einer verdünnten Lösung zu einer Verringerung der Lebensdauer. Mit zunehmender Verdünnung werden jedoch andererseits die intermolekularen Wechselwirkungen unterdrückt, die ebenfalls desaktivierend wirken. Je nachdem welcher Prozeß dominiert, sinkt bzw. steigt die Lebensdauer der fluoreszierenden Spezies im System. Beim reinen Fluorescein beruht die Konzentrationsabhängigkeit von τ_1 auf dem Einfluß der Lösungsmittelmoleküle.

Für Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** wurden zwei Lebensdauern gemessen. Die längere Komponente τ_1 stimmt mit den für Fluorescein bestimmten Werten gut

¹ Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. A. Braun und PD Dr. Bossmann am Engler-Bunte Institut der Universität Karlsruhe.

überein und kann somit der Emission des ungebundenen Fluorophors zugeordnet werden. Die kürzere Komponente τ_2 deutet auf eine desaktivierende inter- oder intramolekulare Wechselwirkung des Fluorophors hin. Bei der Konzentration von 10^{-5} mol/L Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** tritt nur noch die kurze Lebensdauer $\tau_2 = 0.7$ ns auf. Um zu überprüfen, ob ein partieller Einschluß des Fluorophors in die Kavität des β -Cyclodextrinrestes von **5** vorliegt, wurden die Probelösungen a)-c) mit Adamantylamin gesättigt und erneut vermessen. Adamantylamin ist ein sehr guter Gast für den Einschluß in β -Cyclodextrin. Aufgrund der hohen Bindungskonstante ($K_s = 8390 \pm 300 \text{ M}^{-1}$) ist Adamantylamin in der Lage, Gäste mit niedrigerer Bindungskonstante aus der Kavität des β -Cyclodextrins zu verdrängen. Das Experiment zeigt, daß die kurze Komponente $\tau_2 = 0.7$ ns in Gegenwart von Adamantylamin nicht mehr auftritt. Statt dessen ist die mit * gekennzeichnete Lebensdauer $\tau_1 = 3.7$ ns zu beobachten. Diese stimmt mit der entsprechenden Lebensdauer des Fluoresceins überein und tritt nur in Gegenwart von Adamantylamin auf. Die kurze Lebensdauer τ_2 von **5** in Abwesenheit von Adamantylamin beruht also auf dem inter- oder intramolekularen partiellen Einschluß des Fluorophors in die Kavität des β -Cyclodextrinrestes (Schema 6-2). Bei einer Konzentration kleiner als 10^{-4} mol/L **5** liegt das Gleichgewicht der Selbstinclusion auf der Seite der Einschlußverbindung ($B_2 > B_1$).



Schema 6-2: Der Einfluß von Adamantylamin (G) auf den intra- bzw. intermolekularen Einschluß von Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**.

Bei der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung des Polyrotaxans **14** wurden ebenfalls zwei Lebensdauern beobachtet (s. Tab. 6-1). Abbildung 6-2 zeigt die Fluoreszenz-Abklingkurve der Polyrotaxanlösung **14** bei einer Konzentration von 10^{-4} mol/L bezogen auf den Fluoreszenzfarbstoff **5**.

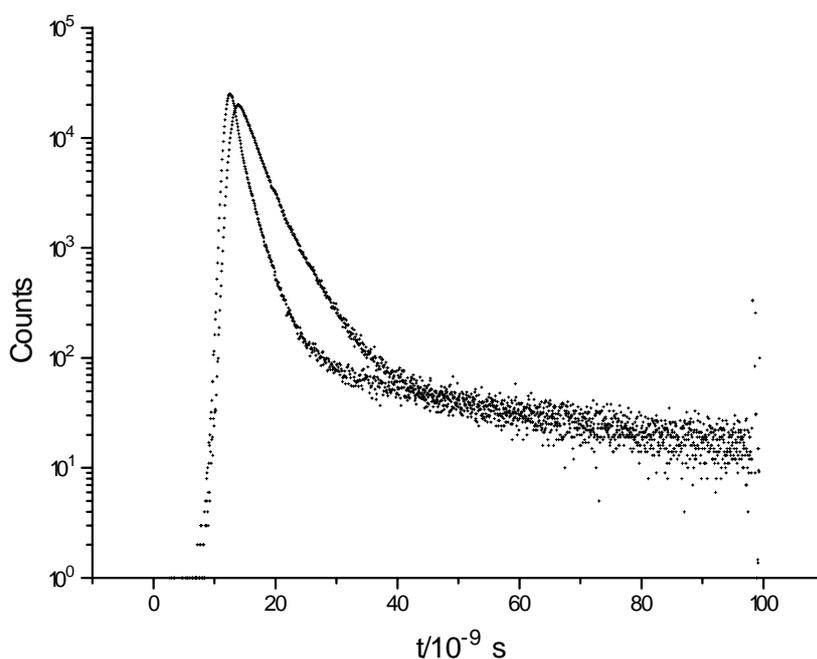
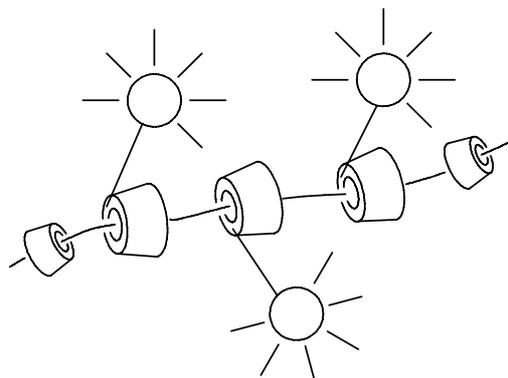


Abb. 6-2: Die Fluoreszenz-Abklingkurve des Polyrotaxans **14** bei einer Konzentration von 10^{-4} mol/L **5** und der Lampenimpuls (untere Kurve).

Die lange Fluoreszenzlebensdauer τ_1 von **14** liegt mit 4.7 ns in derselben Größenordnung wie die des ungebundenen Farbstoffs **5** und ist daher eindeutig dem Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** im Polyrotaxan-System zuzuordnen. Im Gegensatz zum isolierten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** kann hier keine Abhängigkeit von der Konzentration festgestellt werden. Letzteres ist durch die eindimensionale Fixierung der Ringe **5** auf der Polymerkette zu erklären, denn in diesem Fall ändert sich die lokale Konzentration des Fluorophors und damit die Lebensdauer bei Verdünnung der Probelösung nicht wesentlich. Eine kurze Lebensdauer, die auf Selbstinclusion der Moleküle **5** schließen läßt (Schema 6-2), war nicht nachweisbar. Dadurch konnte bewiesen werden, daß die Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** in der Polyrotaxanlösung **14** quantitativ auf Ionen_{10,6} Chlorid **10** aufgefädelt sind. Die Wiederholeinheiten von Ionen_{10,6} Chlorid **10** in **14** sind somit zu 10 % mit Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** belegt. Zu dem gleichen Ergebnis führte die elektrophoretische Untersuchung des Polyrotaxans **14** in Kapitel 5.1 (Probe ②). Die Struktur des Polyrotaxans **14** ist in Abbildung 5-2 dargestellt. Die kürzere Fluoreszenzlebensdauer τ_2 von **14** ist konzentrationsabhängig. Ihr Anteil sinkt mit zunehmender Verdünnung und er verschwindet ganz, wenn die Konzentration von 10^{-5} mol/L unterschritten wird. Der für 10^{-6} mol/L angegebene und mit ** gekennzeichnete Wert von $\tau_2 = 0.7$ ns konnte erst nach Sättigung der Probelösung mit α -Cyclodextrin **1a** beobachtet werden. Folglich muß eine Wechselwirkung zwischen aufgefädelttem Fluoresceinyl- β -Cyclo-

dextrin **5** und nicht aufgefüdeltem α -Cyclodextrin **1a** vorliegen. Aufgrund der Kinetik der Selbstorganisation von **1a** und Ionen_{10,6} Chlorid **10** fädelt maximal 10 % der α -Cyclodextrine **1a** in der Polyrotaxanlösung **14** auf die Polymerkette auf [28, 29]. Die restlichen Moleküle **1a** liegen frei in Lösung vor und können mit dem Fluorophor in Wechselwirkung treten. Eine meßbare Wechselwirkung setzt jedoch die Bindung von α -Cyclodextrin **1a** an das Polyrotaxan-System voraus. Der partielle Einschluß des Fluoresceinylrestes in **1a** unter Bildung eines Typ-1-Komplexes (s. Abb. 6-1) ist aufgrund der kleinen Kavität des α -Cyclodextrins unwahrscheinlich [20]. Wahrscheinlicher ist eine Anlagerung der α -Cyclodextrinmoleküle an die freien hydrophoben Bindungsstellen im Ionen_{10,6} Chlorid **10**, wobei in Nachbarschaft aufgefüdeltes Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** über den Fluorophor mit α -Cyclodextrin **1a** in Wechselwirkung tritt. Da hydrophobe Bindungen konzentrationsabhängig sind, sollte der Gehalt an nicht aufgefüdeltem α -Cyclodextrin **1a** in der Polyrotaxanprobe mit zunehmender Verdünnung sinken. Das Ausbleiben der kurzen Lebensdauer im System bei Konzentrationen kleiner 10^{-5} mol/L kann erklärt werden.

Die Ausrichtung der Cyclodextrine im Polyrotaxan ist entweder statistisch oder einheitlich. Im Fall statistisch aufgefüdelter Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine wäre ein Teil der Fluorophore zueinander bzw. entgegengesetzt orientiert. Entsprechend sollten im Fluoreszenzexperiment unterscheidbare Lebensdauern auftreten. Dies ist bei Polyrotaxan **14** nicht nachweisbar, was darauf hindeutet, daß ein geordnetes System vorliegt. Die Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe sind somit im wesentlichen einheitlich auf Ionen_{10,6} Chlorid aufgefüdelte. Ein Modell der Mikrostruktur des Polyrotaxans **14** ist in Schema 6-2 dargestellt.



Schema 6-2: Der Aufbau des Polyrotaxans **14**.

Für dieses Ergebnis gibt es zwei Erklärungsansätze: Im alkalischen Medium liegt der Fluorophor deprotoniert vor. Die aufgefüdelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** sollten also infolge der elektrostatischen Abstoßung antiparallel orientiert sein.

Fädeln die Ringe **5** zudem gerichtet auf die Polymerkette auf, dann nehmen benachbarte, negativ geladene Fluorophore einen maximalen Abstand zueinander ein. Die Auswirkung abstoßender Wechselwirkungen auf die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung wurde bereits am Beispiel von Cyclodextrin-Naphthylsulfonaten durch Gravett und Guillet diskutiert [30]. Außerdem ist davon auszugehen, daß der Mechanismus des Auffädels negativ geladener Cyclodextrinderivate auch durch die positiv geladene Polymerkette bestimmt wird. So könnten die Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** aufgrund der elektrostatischen Anziehung durch die Polymerkette beim Auffädelvorgang eine Vorzugsrichtung erfahren.

Eine Aggregation der Polyrotaxanmoleküle **14** in Lösung ist aufgrund der eindeutigen und reproduzierbaren Meßergebnisse auszuschließen. Die Polyrotaxane **14** liegen demnach als Einzelteilchen in der ammoniakalischen Lösung vor (vgl. Kap. 4.3).

Die Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung zeigen, daß freie und aufgefädelt Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** mittels Referenzmessungen unterscheidbar sind. So ist die längere Lebensdauer τ_1 des Polyrotaxans **14** eindeutig der Emission aufgefädelter, frei rotierbarer Fluorophore zuzuordnen. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß der Fluoreszenzfarbstoff **5** in der Polyrotaxanlösung **14** quantitativ auf Ionen_{10,6} Chlorid **10** aufgefädelt ist. Der Belegungsgrad von **10** durch **5** entspricht also 10 %. Zu demselben Ergebnis führte die Untersuchung des Polyrotaxans **14** mittels Gelelektrophorese (s. Kapitel 5.1, Probe ②). Aufgrund der Eindeutigkeit der Meßergebnisse kann eine unspezifische Aggregation der Polyrotaxanmoleküle **14** in Lösung ausgeschlossen werden (vgl. Kap. 4.3). Somit ist es zum ersten Mal gelungen, einzelne fluoreszenzmarkierte Polyrotaxane **14** mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung nachzuweisen. Darüber hinaus wurden Informationen über die Mikrostruktur der Polyrotaxane in Lösung gewonnen. So konnte die spezifische Wechselwirkung zwischen aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinmolekülen **5** und freien α -Cyclodextrinen in der Polyrotaxanlösung **14** nachgewiesen werden. Während in der Literatur das Auffädeln von nativen Cyclodextrinringen als statistischer Prozeß beschrieben ist [29, 31, 32], weisen die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung hier darauf hin, daß die Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** - zumindest domänenweise - gerichtet auf das Ionen_{10,6} Chlorid **10** im Polyrotaxan **14** aufgefädelt sind. Es ist davon auszugehen, daß der Mechanismus des Auffädels entscheidend von der Ladung der Polymerkette und des Cyclodextrinderivats abhängt.

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung des reinen Fluoresceinyl- β -Cyclodextrins **5** lieferte noch ein weiteres Ergebnis: So konnte die intra- bzw. intermolekulare Selbstinclusion von **5** zu stabilen Cyclodextrin-Gast-Konjugaten anhand der Fluoreszenzlebensdauer τ_2 qualitativ nachgewiesen werden. Ikeda und Corradini wiesen in gleicher Weise die Selbstinclusion Dansyl-modifizierter β -Cyclodextrine nach [22, 23].

6.2 Der Nachweis von Homoenergietransfer im Fluoresceinmarkierten Polyrotaxan

Nachdem die Struktur des Polyrotaxans **14** mittels Elektrophorese nachgewiesen werden konnte (s. Kap. 5.1), wurden zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen in Lösung durchgeführt (s. Kap. 6.1). Es konnte gezeigt werden, daß sich aufgefädelt und freie Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** anhand der Fluoreszenzlebensdauer experimentell unterscheiden lassen. Den Ergebnissen zufolge liegen die Polyrotaxanmoleküle **14** als Einzelteilchen in der verdünnten Lösung vor. Somit sollte ein eindimensionaler Homoenergietransfer im Polyrotaxan **14** prinzipiell nachweisbar sein. Ziel war es deshalb, Bedingungen zu finden, unter denen ein solcher Energietransfer auftritt.

Beim Förster-Energietransfer wird die Fluoreszenz eines elektronisch angeregten Moleküls (Donor) auf ein Molekül im elektronischen Grundzustand (Akzeptor) strahlungslos übertragen [33, 34]. Der Zusammenhang zwischen der Energieübertragungsrate k_T und dem Abstand R von Donor und Akzeptor wird durch die Förster-Gleichung 6-6 beschrieben. τ_D ist die Fluoreszenzlebensdauer des isolierten Donors im angeregten Zustand. R_0 ist der kritische Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem die Energieübertragungsrate k_T gleich der Zerfallsrate $1/\tau_D$ des isolierten Donors ist. Für einen effizienten Energietransfer ist somit ein Mindestabstand von $R \leq R_0$ erforderlich.

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (6-6)$$

Der kritische Abstand R_0 hängt vom Brechungsindex n des Lösungsmittels und von den spektralen Eigenschaften der Fluorophore ab (Gleichung 6-7) [35]. So ist R_0 der 6. Wurzel des Überlappungsintegrals $J(\lambda)$ zwischen dem Fluoreszenzspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors sowie der Fluoreszenz-

quantenausbeute Φ_{FD} des Donors proportional. Der Parameter κ^2 berücksichtigt die Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor. Voraussetzung für Energietransfer ist die parallele Ausrichtung der Fluorophore.

$$R_0 = \left[8.8 \cdot 10^{23} \cdot \kappa^2 \cdot n^{-4} \cdot \Phi_{\text{FD}} \cdot J(\lambda) \right]^{1/6} \quad (6-7)$$

Da der kritische Abstand R_0 in Abhängigkeit von der chemischen Umgebung eines Donor-Akzeptor-Paares etwas variiert, muß er für jedes System neu bestimmt werden. In Tabelle 6-2 sind typische Werte von R_0 für verschiedene Donor-Akzeptor-Paare aufgelistet [35].

Tab. 6-2: Typische Werte des Förster-Abstandes R_0 für verschiedene Donor-Akzeptor-Paare.

Donor	Akzeptor	R_0 [Å]
Fluorescein	Tetramethylrhodamin	55
Fluorescein	Fluorescein	44
Fluorescein	Eosin	53

Unter Heteroenergietransfer versteht man den irreversiblen Energietransfer zwischen unterschiedlichen Donor- und Akzeptormolekülen. Er kann entweder über den Anstieg der Fluoreszenzintensität des Akzeptors oder über das Quenchen der Donor-Fluoreszenz detektiert werden [35]. Eine modernere Methode stellt die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von Donor und Akzeptor dar [1]. Im Vergleich zu den isolierten Fluorophoren nimmt die Lebensdauer der Donor-Fluoreszenz in dem Maße ab, wie die der Akzeptor-Fluoreszenz zunimmt. Der Heteroenergietransfer wird heute hauptsächlich in der Biochemie zur Untersuchung der Struktur und Konformation von DNA [36, 37] und Proteinen [38] sowie zur Sequenzierung von DNA [39] eingesetzt. Wei publizierte 1992 die Anwendung in optischen Immunosensoren zur medizinischen Analyse von Blut und Urin mit Fluorescein-Tetramethylrhodamin und Eosin-Texasrot als Donor-Akzeptor-Paare [40]. Erste Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Polymeren wurden bereits 1986 von Fredrickson und Helfand durchgeführt [41]. Sie stellten fest, daß Fluorophore, die an ein Polymer gebunden sind, eine andere Fluoreszenzintensität aufweisen als im

isolierten Zustand. Dadurch konnten Fredrickson und Helfand den Energietransfer in fluoreszenzmarkierten Polymeren nachweisen. Darüber hinaus ließen ihre Ergebnisse Rückschlüsse auf die Struktur und Konformation dieser Polymere zu. Tamura, Gao und Ueno veröffentlichten 1998 erstmals zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen zum Energietransfer in Rotaxanen und Polyrotaxanen [42, 43]. Als Bausteine für diese Strukturen verwendeten sie Naphthyl-funktionalisierte Cyclodextrine und Dansyl-modifiziertes Polyethylenglykol. Bei Anregung der Naphthylgruppen erhielt man für die Naphthyl-funktionalisierten Cyclodextrine im Rotaxan eine niedrigere Fluoreszenzlebensdauer als im freien Zustand. Die Lebensdauer der Dansylgruppen im Rotaxan stieg gleichzeitig an. So konnten die Naphthylgruppen als Donor und die Dansylgruppen als Akzeptor identifiziert werden (Abb. 6-3).

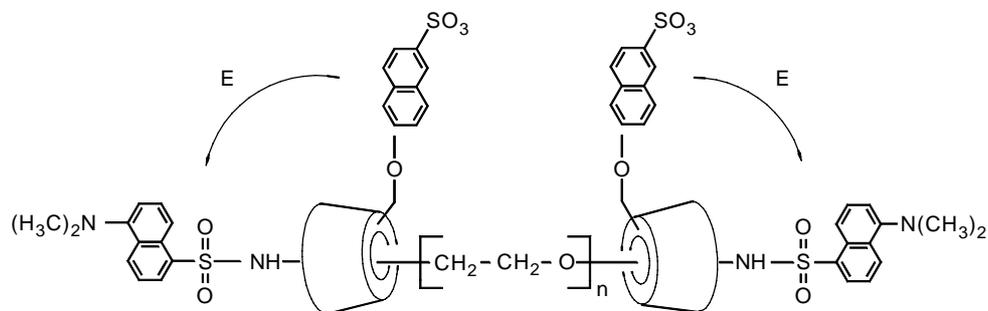


Abb. 6-3: Der Heteroenergietransfer in einem Rotaxan aus Naphthyl-funktionalisiertem Cyclodextrin und Dansyl-modifiziertem Polyethylenglykol.

Beim Homoenergietransfer sind Donor und Akzeptor identisch. Ein Nachweis des Energietransfers durch Messung der Fluoreszenzintensität ist deshalb nicht möglich. Statt dessen nutzt man die Depolarisation der Akzeptor-Emission infolge des Energietransfers [44]. Besteht ein Gleichgewicht zwischen Donor und Akzeptor, so wird die Energie mehrfach ausgetauscht. Diese Resonanz führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauer von Donor und Akzeptor im Vergleich zum isolierten Zustand. Aufgrund dessen kann der Homoenergietransfer auch durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden. In der Literatur sind vergleichsweise wenig Beispiele für die Anwendung von Homoenergietransfer aufgeführt. Weber und Daniels verwendeten den Homoenergietransfer, um die Bindungsstellen in Bovine Serum Albumin (BSA) zu bestimmen [45]. Erijman und Weber untersuchten auf diese Weise die Dissoziation oligomerer Proteine [46]. Runnels und Scarlata schlugen vor, den Homoenergietransfer zum Studium der Membran-Protein Oligomerisierung zu nutzen. Sie entwickelten eine Theorie, die den resonanten Homoenergietransfer zwischen Fluorescein-markierten Proteinuntereinheiten beschreibt [47]. Gravett und Guillet veröffentlichten 1993 eine interessante Studie zum Nach-

weis von Energietransfer zwischen β -Cyclodextrin-Naphthylsulfonaten [30]. Mit Hilfe der zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung ist es ihnen gelungen, die Bildung von Excimeren in Lösung nachzuweisen. Diese besitzen im Vergleich zum isolierten β -Cyclodextrinderivat eine mehr als doppelt so große Fluoreszenzlebensdauer. Der Energietransfer von monomeren β -Cyclodextrin-Naphthylsulfonaten auf die Excimere bewirkt eine weitere starke Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauer.

Für den Nachweis von Homoenergietransfer zwischen den aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringen **5** im Polyrotaxan **14** müssen die Fluoresceinylreste parallel zueinander ausgerichtet sein. In ammoniakalischer Lösung sind diese jedoch negativ geladen. Berücksichtigt man weiterhin, daß die Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** um die Polymerachse im Polyrotaxan **14** rotieren können, dann ist eine bevorzugt antiparallele Ausrichtung der Ringe **5** zu erwarten. Im Fluoreszenzexperiment des reinen Polyrotaxans **14** konnte vermutlich deshalb kein Homoenergietransfer festgestellt werden (s. Kap. 6.1). Um den aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinen **5** eine gemeinsame Vorzugsrichtung aufzuzwingen, sollte das positiv geladene Polyrotaxan an ein Polyanion assoziiert werden. Dadurch sollte die Rotationsfreiheit der Ringe **5** eingeschränkt und so die Wahrscheinlichkeit für einen Homoenergietransfer im System erhöht werden. Als Gegenion wurde Polystyrolsulfonat (PSS) in Form des Natriumsalzes mit einer Molmasse von $M_w = 149\,000$ D eingesetzt. Das Verhältnis von Natriumpolystyrolsulfonat und Ionen_{10,6} Chlorid **10** in der Polyrotaxanlösung **14** wurde auf 5:1 festgelegt. In dieser Mischung assoziiert das Polyrotaxan **14** quantitativ an Polystyrolsulfonat. Die polymeren Ionenpaare **14-PSS** wandern dann infolge einer negativen Überschussladung im Elektrophoreseexperiment in Richtung Anode (s. Kap. 5.1.3). Die Energieübertragungsrate ist vom Abstand der Fluoresceinreste abhängig. Somit sollten bei Energietransfer auch Rückschlüsse hinsichtlich der Verteilung der Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** im System möglich sein. Für den Nachweis von Homoenergietransfer wurde das Assoziat aus Polystyrolsulfonat und Polyrotaxan **14-PSS** in Lösung mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung untersucht. Die experimentelle Durchführung erfolgte analog zum Nachweis des reinen Polyrotaxans **14** in Kapitel 6.1, so daß die Ergebnisse miteinander verglichen werden können.

Für das Experiment wurde die Polyrotaxanlösung **14** mit einem fünffachen Überschuss an Natriumpolystyrolsulfonat bezogen auf Ionen_{10,6} Chlorid **10** in **14** umgesetzt. Danach wurde die homogene Mischung so verdünnt, daß die Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs **5** a) 10^{-3} mol/L, b) 10^{-4} mol/L, c) 10^{-5} mol/L und d) 10^{-6} mol/L betrug. Als Lösungsmittel diente jeweils eine wäßrige 0.01 M NH_4OH -Lösung (pH = 8.0). Die Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung des Polyrotaxans **14** mit und ohne Zusatz von Natriumpolystyrolsulfonat sind in Tabelle 6-3 gegenüber gestellt.

Tab. 6-3: Die Fluoreszenzlebensdauern des Polyrotaxans **14** und des polymeren Ionenpaares **14-PSS**. Der Fitparameter χ^2 betrug 1.5-1.7.²

	τ_1 [ns]	B ₁ [%]	τ_2 [ns]	B ₂ [%]	τ_3 [ns]	B ₃ [%]
Polyrotaxan 14						
10 ⁻³ mol/L	4.7	33	1.6	67	-	-
10 ⁻⁴ mol/L	4.8	29	1.8	71	-	-
10 ⁻⁵ mol/L	3.9	100	1.7 ^{**}	41 ^{**}	-	-
Polyrotaxan 14-PSS						
10 ⁻³ mol/L	6.4	41	3.3	28	0.15	31
10 ⁻⁴ mol/L	6.1	31	3.2	31	0.19	38
10 ⁻⁵ mol/L	9.9	6	4.4	61	0.13	33
10 ⁻⁶ mol/L	15.7	3	4.5	69	0.12	28

** nach Zugabe von α -Cyclodextrin **1a**

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung des Polyrotaxans **14** liefert zwei Lebensdauern. Zuvor konnte gezeigt werden, daß die längere Komponente τ_1 aus der Emission frei rotierbarer Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** resultiert, während die kürzere τ_2 auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen Fluoresceinylrest und α -Cyclodextrin **1a** zurückzuführen ist (s. Kap. 6.1). In Gegenwart von Natriumpolystyrolsulfonat sind drei Lebensdauern zu beobachten. Abbildung 6-4 zeigt die Fluoreszenz-Abklingkurve des polymeren Ionenpaares **14-PSS**.

² Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. A. Braun und PD Dr. Bossmann am Engler-Bunte Institut der Universität Karlsruhe.

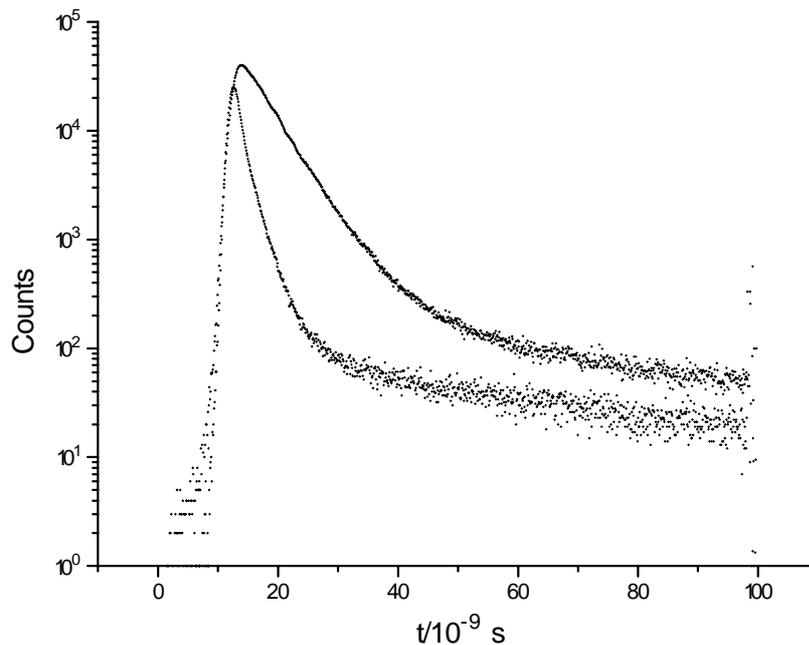


Abb. 6-4: Die Fluoreszenz-Abklingkurve des polymeren Ionenpaares **14-PSS** bei einer Konzentration von 10^{-5} g/L **5** und der Lampenimpuls (untere Kurve).

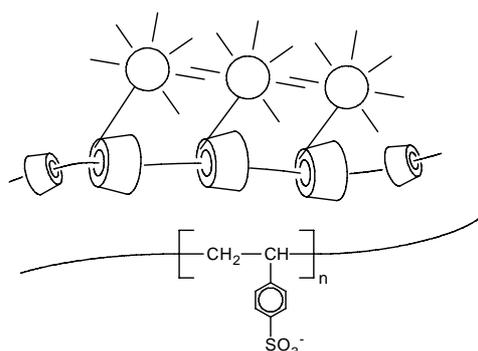
Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_2 von **14-PSS** liegt in derselben Größenordnung wie τ_1 des Fluoresceinyl- β -Cyclodextrins **5** in **14** und ist daher dem aufgefädelten, ungestörten Fluorophor zuzuordnen. Im Gegensatz zu τ_1 von **5** steigt die Lebensdauer τ_2 im polymeren Ionenpaar mit zunehmender Verdünnung schwach an. Einerseits bewirkt der Einfluß desaktivierender Prozesse mit Lösungsmittelmolekülen in einer verdünnten Lösung eine Abnahme der Lebensdauer. Andererseits werden mit zunehmender Verdünnung die intermolekularen Wechselwirkungen, die ebenfalls desaktivierend wirken, unterdrückt. Je nachdem welcher Prozeß überwiegt, sinkt bzw. steigt die Lebensdauer der fluoreszierenden Spezies im System. Da im polymeren Ionenpaar ein fünffacher Überschuß an Natriumpolystyrolsulfonat bezogen auf Ionen_{10,6} Chlorid **10** vorliegt, ist die Konzentrationsabhängigkeit hier auf den Einfluß abnehmender intermolekularer Wechselwirkungen zurückzuführen.

Ein Vergleich der Fluoreszenzlebensdauern τ_1 und τ_2 von **14-PSS** zeigt, daß τ_1 im Gegensatz zu τ_2 ab einer Fluorophorkonzentration kleiner 10^{-5} mol/L sprunghaft ansteigt. Gleichzeitig nimmt der Anteil B_1 dieser Komponente sehr stark ab, während B_2 in gleichem Maße zunimmt. Die Korrelation der Lebensdauern τ_1 und τ_2 deutet darauf hin, daß die aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** im polymeren Ionenpaar unterschiedliche Zustände einnehmen, die ineinander überführbar sind. Der sprunghafte Anstieg der Fluoreszenzlebensdauer τ_1 in **14-PSS** ist charakteristisch für einen resonanten Energietransfer [47]. Die Lebensdauer τ_1 im polymeren

Ionenpaar sollte daher aus der Emission in Nachbarschaft aufgefädelter Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** mit parallel zueinander ausgerichteten Fluoresceinylresten resultieren. Die Konformationen "parallel" und "versetzt" sind im Polyrotaxan durch Rotation der Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** um die Polymerachse ineinander überführbar. Deshalb ist die Fluoreszenzlebensdauer τ_2 den Molekülen **5** zuzuordnen, deren Fluoresceinylreste versetzt orientiert sind.

Unter der Annahme einer statistischen Verteilung der Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinmoleküle **5** auf die Decamethyleneinheiten von Ionen_{10,6} Chlorid **10** in **14** und einer jeweils 5 %-igen Belegung der Einheiten an den Kettenenden durch α -Cyclodextrine **1a**, ergibt sich ein Fluorophorabstand von 189 Å. Der Förster-Abstand für den Homoenergietransfer von Fluorescein beträgt jedoch 44 Å (s. Tab. 6-2). Folglich ist Homoenergietransfer bei einer statistischen Verteilung nicht meßbar. Nach Förster dürfen benachbarte Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** im Polyrotaxan **14** höchstens drei Bindungsstellen voneinander entfernt sein. Dies setzt voraus, daß sich die Ringe **5** auf der Polymerkette konzentrieren.

In Abwesenheit von Natriumpolystyrolsulfonat beobachtet man keinen Homoenergietransfer (s. Tab. 6-3). Dies stützt die Annahme, daß Polystyrolsulfonat von einer Seite an das Polyrotaxan **14** anlagert und dadurch den aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinen **5** eine Vorzugsrichtung aufzwingt. Ein Modell des polymeren Ionenpaares aus Polyrotaxan **14** und Natriumpolystyrolsulfonat ist in Schema 6-3 dargestellt.



Schema 6-3: Der Aufbau des polymeren Ionenpaares aus Polyrotaxan **14** und Polystyrolsulfonat.

Durch die Assoziation von Polystyrolsulfonat an Polyrotaxan **14** wird die Rotationsfreiheit der Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinmoleküle **5** im System erheblich eingeschränkt. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, Homoenergietransfer entlang der Polymerkette zu beobachten. Im Fluoreszenzexperiment konnte der eindimensionale Homoenergietransfer erst bei einer Fluorophorkonzentration kleiner als

10^{-5} mol/L eindeutig nachgewiesen werden. Ursache dafür sind intermolekulare Wechselwirkungen, die einer Erhöhung der Lebensdauer durch resonanten Energietransfer entgegen wirken. Tabelle 6-3 zeigt, daß der Anteil energieübertragender Spezies im polymeren Ionenpaar mit zunehmender Verdünnung der Probelösung stark abnimmt. Wahrscheinlich lockert sich die Bindung zwischen positiv geladenem Polyrotaxan **14** und negativ geladenem Polystyrolsulfonat in der verdünnten Lösung etwas, so daß die Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** leichter um die Polymerachse rotieren können. Dadurch sind im zeitlichen Mittel weniger Fluorophore parallel zueinander ausgerichtet. Gravett und Guillet führten den niedrigen Anteil energieübertragender Spezies in einer Lösung aus β -Cyclodextrin-Naphthylsulfonaten ebenfalls auf die elektrostatische Abstoßung der Fluorophore zurück [30].

Die kurze Fluoreszenzlebensdauer τ_3 im polymeren Ionenpaar ist von der Konzentration unabhängig und damit auf eine intramolekulare Wechselwirkung des Fluorophors zurückzuführen. Zur Identifizierung von τ_3 wurden zusätzlich Referenzmessungen an Lösungen aus Ionen_{10,6} Chlorid **10** und Fluorescein sowie Natriumpolystyrolsulfonat und Fluorescein durchgeführt. Diese belegen, daß die Fluoresceinylreste der aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** eine spezifische Wechselwirkung mit Ionen_{10,6} Chlorid **10** im Polyrotaxan **14** eingehen. Da die Komponente τ_3 ausschließlich in Anwesenheit von Natriumpolystyrolsulfonat beobachtet wurde, liegt möglicherweise ein partieller Einschluß des Fluoresceinylrestes in das polymere Ionenpaar aus **14** und Natriumpolystyrolsulfonat vor. Solche Einschüsse führen zu sehr kurzen Lebensdauern.

Beim isolierten Polyrotaxan **14** bewirkt die Wechselwirkung aufgefädelter Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** mit freien α -Cyclodextrinen in der Lösung das Auftreten einer kurzen Lebensdauer $\tau_2 \approx 1.7$ ns (s. Kap. 6.1). In Gegenwart von Natriumpolystyrolsulfonat ist diese Komponente nicht nachweisbar. Deshalb ist davon auszugehen, daß die an **14** angelagerten α -Cyclodextrinmoleküle durch die Assoziation von Polystyrolsulfonat verdrängt werden.

Mit Hilfe der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung ist es gelungen, den Homoenergietransfer zwischen aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringen im Polyrotaxan **14** erfolgreich nachzuweisen. Die gemessenen Effekte stehen im Einklang mit den aktuellen Forschungen von Tamura, Gravett und Guillet [30, 43]. Es konnte gezeigt werden, daß die Fluoresceinylreste im polymeren Ionenpaar aus **14** und Polystyrolsulfonat bevorzugt parallel ausgerichtet sind. In der Lösung des reinen Polyrotaxans **14** findet kein Homoenergietransfer statt. Die Fluorophore sind infolge elektrostatischer Abstoßung versetzt zueinander angeordnet. Die Abhängigkeit des Energietransfers vom Abstand der Fluorophore ermöglicht eine qualitative Aussage hinsichtlich der Verteilung der Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** auf die Bin-

dungsstellen von Ionen_{10,6} Chlorid **10** im polymeren Ionenpaar. Danach sind die Ringe **5** höchstens drei Bindungsstellen weit voneinander entfernt und nicht statistisch verteilt. Im Vergleich zu den von Tamura, Gao und Ueno untersuchten Polyrotaxanan aus Naphthyl-funktionalisierten Cyclodextrinen und Dansyl-modifiziertem Polyethylenglykol (s. Abb. 6-2) sind weder die Donor- noch die Akzeptormoleküle kovalent an die Polymerkette im Polyrotaxan **14** gebunden. Hier ist der eindimensionale Energietransfer durch die Zugabe von Polystyrolsulfonat schaltbar.

7 Die Abbildung fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane

Infolge der Weiterentwicklung der Licht- und Elektronenmikroskopie ist es heute möglich, Objekte bis in den nanoskopischen Bereich abzubilden. So eignet sich die Fluoreszenzmikroskopie aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit ideal zur Detektion einzelner Makromoleküle. In Verbindung mit der Konfokaltechnik, mit der reale dreidimensionale Abbildungen erzeugt werden können, lassen sich völlig neue Einblicke in die Morphologie und Dynamik von Makromolekülen gewinnen [1]. Sackmann und Dichtel untersuchten auf diese Weise die Reptation eines fluoreszenzmarkierten Aktinfilaments von 20 μm Länge und 7 nm Dicke [2]. Seeger et al. verwendeten die konfokale Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit der Photonenmessung zur Detektion von einzelnen Molekülen [3, 4]. Dazu wurden Antikörper auf der Oberfläche eines Substrates immobilisiert, die in Verbindung mit dem Antigen zur Fluoreszenz angeregt werden können. Bei sehr niedrigen Antigenkonzentrationen lassen sich einzelne Antikörper-Antigen-Komplexe auf der Substratoberfläche durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung detektieren und auszählen. In einer aktuellen Publikation von Tomioka wurde die Aggregation negativ und positiv geladener Porphyrin-Dendrimere in einem äquimolaren Mischungsverhältnis mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die Aggregate hatten zunächst eine Abmessung von 10-20 μm . Mit der Zeit vergrößerten sich die Aggregate und kristallisierten schließlich aus der Lösung aus. Wenn eines der dendritischen Polyelektrolyte im Überschuß vorlag, dann konnte keine Aggregation beobachtet werden [5].

Mit der Entwicklung der Rastersondenmikroskopie (SPM = Scanning Probe Microscopy) begann eine neue Ära der mikroskopischen Verfahren. Durch das lokal hochaufgelöste Erfassen von Objektstrukturen im Nahfeld von Oberflächen lassen sich molekulare Strukturen großflächig bis in den atomaren Bereich abbilden [1, 6]. Das Rastertunnelmikroskop (STM = Scanning Tunneling Microscope) zur Untersuchung elektrisch leitender Materialien wurde 1982 durch Binnig und Rohrer entwickelt, die später dafür mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden [7]. Die Abbildung nichtleitender Oberflächen konnte mittels Rasterkraftmikroskopie (SFM = Scanning Force Microscopy bzw. AFM = Atomic Force Microscopy) erstmals 1986 realisiert werden [8]. Durch die Entdeckung der optischen Nahfeldmikroskopie (SNOM = Scanning Nearfield Optical Microscopy) wurde die lichtmikroskopische Abbildung von Objekten unterhalb der Beugungsgrenze bis hin zur Detektion einzelner Farbstoffmoleküle möglich. Dabei können alle in der Lichtmikroskopie eingesetzten Kontrastarten und Färbetechniken zur Anwendung kommen [9]. Die laterale Auflösung der SPM liegt unter optimalen Bedingungen in der Größenordnung von 1 nm und ist damit um das etwa 300-fache größer als die eines Lichtmikroskops. Die Auflösung

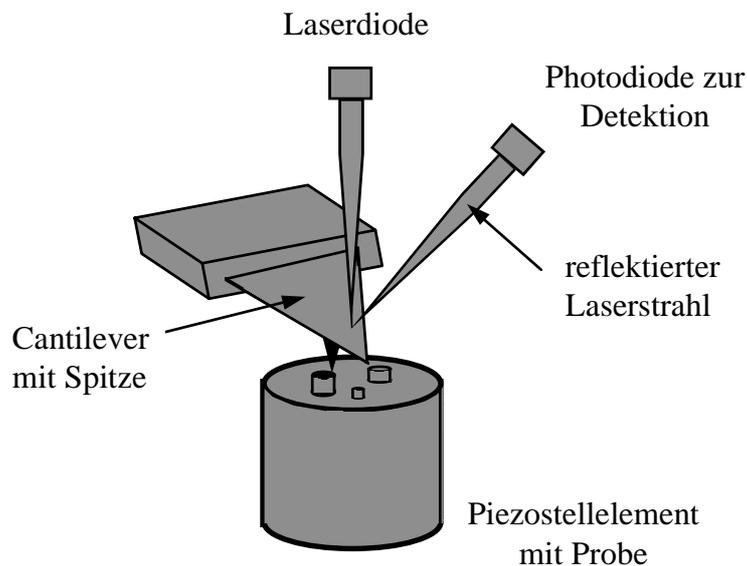
eines Elektronenmikroskops beträgt 0.1 nm. Da die Elektronenmikroskopie jedoch im Hochvakuum durchgeführt werden muß, ist sie für viele Anwendungen in der Biologie und Medizin nicht geeignet. Ein weiterer Nachteil ist die hohe Energie der Elektronenstrahlung, die zur Zerstörung der Objekte führen kann. Im Gegensatz dazu wurden mittels SPM sowohl an Luft als auch in Flüssigkeiten sehr gute Auflösungen erzielt. Besondere Beachtung fand beispielsweise eine Arbeit von Betzig und Chichester, in der mittels SNOM die Fluoreszenz einzelner Carbocyanin-Farbstoffmoleküle in einer Matrix aus Polymethylmethacrylat abgebildet wurde. Anhand der Intensität und der Form der fluoreszierenden Lichtpunkte konnten die Forscher die Orientierung der Übergangsdipolmomente der Cyaninmoleküle bestimmen [10]. Tarrach et al. beobachteten analog die Diffusion von Rhodamin-G6 in einem dünnen Polymerfilm [11]. Sie fanden, daß die Bewegung der einzelnen Moleküle durch die lokalen Gegebenheiten im Film beeinflusst wird. Bereits ein Jahr nach der Entwicklung des Rasterkraftmikroskops konnten feste Substrate mit molekularer Auflösung an der Luft und unter Wasser abgebildet werden. So ist es Karrasch et al. erstmals mittels AFM gelungen, die hexagonale Packung eines natürlichen Proteingitters aufzulösen [12]. Im Gegensatz dazu lassen sich filamentöse Strukturen und Einzelmoleküle, die auf der Oberfläche eines ebenen Substrats adsorbiert wurden, nicht mit vergleichbar guter Auflösung abbilden. Ursache dafür ist die größere natürliche Beweglichkeit dieser Teilchen sowie die bei der AFM auftretenden Reibungskräfte [1, 6]. Die helikale Struktur einzelner Aktinfilamente ist deshalb im AFM-Bild nicht erkennbar. Erst durch Bedampfen mit Platin-Iridium-Kohle gelang es Wepf 1992 die Aktin-Struktur abzubilden [13]. Heute dient die AFM insbesondere zur Untersuchung von biologischen Molekülen, Membranen und Zellen [14, 15]. So wird sie bereits als Methode zur routinemäßigen Bestimmung der Molmasse von Polysacchariden [16-18] und Desoxyribonukleinsäuren eingesetzt [19]. Breite Anwendung findet die AFM auch im Bereich der Oberflächenchemie. So kontrollierte Beyer die Chemisorption von TSHP-Cellulose [20] auf einer Goldoberfläche [21]. Decher verwendete die AFM, um die Homogenität von Multischichten zu überprüfen, die er aus positiv und negativ geladenen Polyelektrolyten herstellte. Mit Hilfe der Röntgenstreuung konnte er einen linearen Zusammenhang zwischen der Dicke einer Multischicht und der Anzahl der Polyelektrolytschichten nachweisen. Darüber hinaus fand er, daß die Schichtdicke vom Salzgehalt in der Polyelektrolytlösung abhängt. So kann eine Polyelektrolytdoppelschicht um 0.5-3.5 nm aufquellen [22, 23]. Die Arbeitsgruppe um Tiede führte ähnliche Untersuchungen durch. Sie berechnete für eine aus Wasser adsorbierte Doppelschicht aus Poly-10,12-Docosadiyn-1,22-disulfat (DCDS) und Polyallylaminhydrochlorid (PAH) eine Dicke von 2.7 nm [24]. In einer aktuellen Arbeit von Chatellier et al. wurde anhand von AFM-Untersuchungen ein einfaches mathematisches Modell hergeleitet, das die

Adsorption eines Polyelektrolytmoleküls aus Wasser an eine ebene, geladene Oberfläche beschreibt [25].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden stabile Polyrotaxane **14** durch Selbstorganisation von Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a** in Lösung hergestellt. Die Aufklärung der supramolekularen Struktur erfolgte mittels Gelelektrophorese (s. Kap. 5, Probe ②). Aufgrund der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung am System konnte eine Aggregation der gelösten Polyrotaxanmoleküle **14** über einen großen Konzentrationsbereich ausgeschlossen werden (s. Kap. 6.1). Um weitere Informationen über den Zustand dieser Teilchen in Lösung zu erhalten, sollten die Polyrotaxane **14** sichtbar gemacht werden. Als Methoden dazu wurde die Rasterkraftmikroskopie (AFM) und die Fluoreszenzmikroskopie (FM) gewählt. Analog zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung erfolgte die Durchführung der Experimente in wässriger Lösung (pH = 8.0). Die Ergebnisse werden in den Kapiteln 7.1 und 7.2 diskutiert.

7.1 Die Abbildung Fluorescein-markierter Polyrotaxane mittels Rasterkraftmikroskopie

Bei der Rasterkraftmikroskopie (AFM) wird die Kraft F oder der Kraftgradient dF/dz zwischen einer Spitze und einer Probe als Funktion der Abstandskoordinate z senkrecht zur Probe gemessen [1, 15]. Mit Hilfe eines piezokeramischen Röhrchens, das in alle drei Raumrichtungen bewegt werden kann, wird die Probe unter der Spitze gerastert. Die Detektion der Wechselwirkungskräfte zwischen der Probe und der Spitze erfolgt optisch über die Auslenkung eines Federbalkens, dem Cantilever. Die Spitze und der Cantilever werden heute üblicherweise in einem Stück aus Silizium oder Siliziumnitrit gefertigt. Der Aufbau eines Kraftmikroskops ist in Schema 7-1 dargestellt.

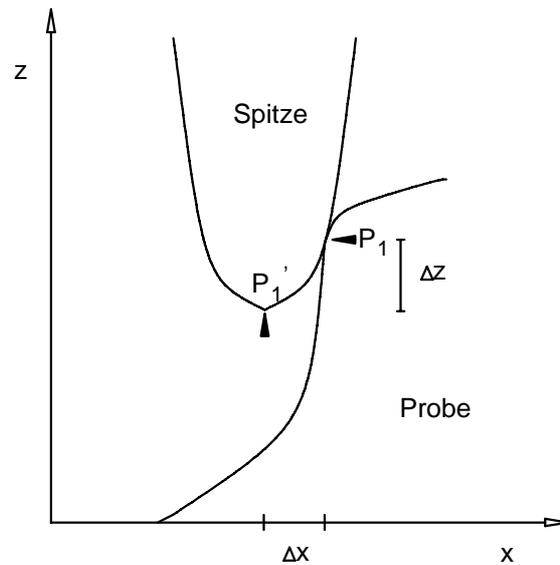


Schema 7-1: Der Aufbau eines Kraftmikroskops mit optischer Detektion. Die Auslenkung des Cantilevers wird über die Auslenkung eines reflektierten Laserstrahls gemessen.

Die AFM-Messung kann auf verschiedene Weise erfolgen [1, 15, 21]: Rastert man die Oberfläche einer Probe im Contact-Mode ab, so steht die Spitze in kontinuierlichem Kontakt mit der Probe. Die Auflagekraft wird während des Rastervorgangs konstant gehalten und die dazu erforderliche Auslenkung des Cantilevers in z -Richtung mit Hilfe der Piezomechanik nachgeregelt. Um eine Deformation der Spitze oder eine Beschädigung der Probe zu vermeiden, sollte die Auflagekraft möglichst gering gewählt werden. Unter optimalen Bedingungen kann dann atomare Auflösung erzielt werden. Eine ungeriegelte Abbildung ist ebenfalls möglich. In

diesem Fall wird die Höhe des Piezostellelements in z-Richtung konstant gehalten und das Höhenprofil der Probe direkt aus dem Auslenkungssignal des Cantilevers gewonnen, was allerdings zu sehr starken Schwankungen der Auflagekraft führen kann. Beim Non-Contact-Mode schwebt die Spitze in einem Abstand von einigen Nanometern (1-40 nm) über der Probe. Die hier auftretende Wechselwirkung ist im Vergleich zum Contact-Mode geringer und weniger abstandsabhängig. Um diese geringen Kräfte messen zu können, versetzt man den Cantilever mit Hilfe eines zusätzlichen Piezokristalls in eine hochfrequente Schwingung (z.B. 300 kHz) nahe der Resonanzfrequenz. Die Schwingungsamplitude Δz des Cantilevers ändert sich mit der Stärke der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe. Diese wird während des Rastervorgangs konstant gehalten. Gegenüber der Messung im Contact-Mode besteht hier der Vorteil in der zerstörungsfreien Abbildung weicher Proben. Die laterale Auflösung in der x,y-Ebene ist jedoch von dem gewählten Abstand zwischen Probe und Spitze abhängig und infolgedessen im Non-Contact-Mode geringer [21]. Ein weiteres Meßverfahren der AFM ist der Tapping-Mode. Dabei schwingt die Spitze wie im Non-Contact-Mode über die Probe. Die Schwingungsamplitude Δz und die Auslenkung des Cantilevers in z-Richtung werden so eingestellt, daß die Spitze die Probe jeweils nur leicht berührt. Die lateralen Reibungskräfte bleiben dadurch gering. Im Vergleich zum Non-Contact-Mode läßt sich eine höhere Auflösungen weicher Proben erzielen.

Für die Entstehung des Höhenbildes ist die Geometrie von Spitze und Probe von großer Bedeutung. Da stets die Position des Endpunktes einer AFM-Spitze abgebildet wird, kann es zu Abbildungsfehlern kommen [21]. Das Prinzip der Entstehung eines AFM-Bildes ist in Schema 7-2 dargestellt.



Schema 7-2: Das Prinzip der Entstehung eines AFM-Bildes mit einer Spitze endlicher Dimension (P_1 : realer Kontaktpunkt, P_1' : abgebildeter Kontaktpunkt).

Insbesondere bei hohen Strukturen treten aufgrund der endlichen Abmessung der Spitze deutliche Abweichungen zwischen der abgebildeten und der realen Oberflächentopographie einer Probe auf. Wenn die Spitze seitlich in einem Punkt P_1 auf die Kante einer Oberflächenstruktur trifft, dann ist dieser Punkt im AFM-Bild um die Strecke Δx nach P_1' verschoben. Der Höhenunterschied beträgt Δz . Der relative Fehler, der durch die Spitzenverbreiterung Δx erzeugt wird, ist somit umso geringer, je feiner die Spitze und je größer und flacher bzw. homogener die Probe ist.

Die Kräfte, die beim Abbildungsprozeß zwischen Spitze und Probe auftreten, beeinflussen ebenfalls die Entstehung des Höhenbildes [26]. Man unterscheidet zwischen attraktiven, repulsiven und dynamischen Kräften [15]. Zu den attraktiven Kräften gehören van der Waals- und anziehende elektrostatische Wechselwirkungen. Repulsive Kräfte wirken aufgrund des Pauliprinzips, wenn die Spitze die Probe berührt, sowie bei elastischer, sterischer oder elektrostatischer Abstoßung. Unter dynamischen Kräften versteht man die vertikale Auslenkung der Spitze an Oberflächenstrukturen der Probe während des Rastervorgangs. Das Zusammenspiel zwischen van der Waals- und elektrostatischen Kräften kann näherungsweise durch die DLVO-Theorie beschrieben werden [27, 28]. Nimmt man für den Apex der AFM-Spitze eine Kugel mit dem Radius R an und für die Probe eine Ebene, dann ist die van der Waals-Kraft F_w dem Quadrat des Abstandes d zwischen Probe und Spitze umgekehrt proportional (Gleichung 7-1). Die Proportionalitätskonstante $H_a \approx 10^{-19}$ J wird als Hamakerkonstante bezeichnet.

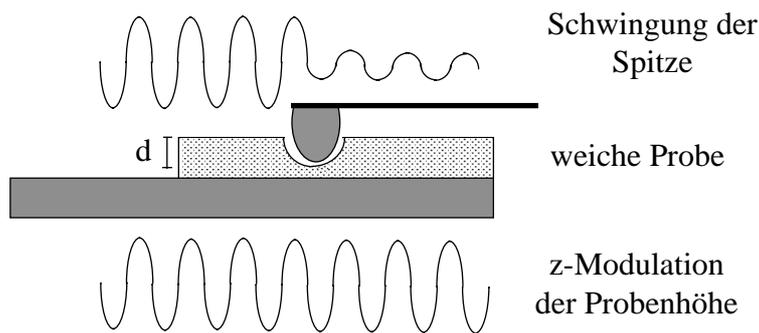
$$F_w(d) = \frac{H_a R}{6 d^2} \quad (7-1)$$

Die elektrostatische Kraft ist eine Funktion der effektiven Oberflächenladungsdichte von Spitze und Probe. Letztere wird bei der AFM-Messung in Lösung von der Elektrolytkonzentration und bei Systemen mit aciden funktionellen Gruppen auch vom pH-Wert bestimmt. Müller und Engel zeigten am Beispiel einer auf Glimmer adsorbierten Biomembran, daß die mittels AFM bestimmte Höhe mit sinkender Elektrolytkonzentration von 5.5 nm auf 12.1 nm zunimmt [26]. Ihren Untersuchungen zufolge setzt sich die gemessene Höhe h aus einem Strukturanteil h' und einem durch elektrostatische Wechselwirkung bedingten Anteil Δz zusammen (Gleichung 7-2).

$$h = h' + \Delta z \quad (7-2)$$

Bei einer Abstoßung der Spitze durch die Probe ist $\Delta z > 0$ und die gemessene Höhe größer als real ($h > h'$). Im umgekehrten Fall überwiegt die elektrostatische Anziehung und man erhält einen Meßwert $h < h'$. Unter optimalen Bedingungen wird die Oberflächenladung von Spitze und Probe durch die entgegengesetzt geladenen Elektrolytionen in der Lösung so kompensiert, daß der Betrag von $|\Delta z| \approx 0$ und $h \approx h'$ ist.

Die plastischen und elastischen Eigenschaften einer Probe können mittels AFM ebenfalls untersucht werden [14, 15]. Durch eine sinusförmige Modulation der Höhe des Piezostellelements läßt sich die Auflagekraft um ihren Arbeitspunkt mit einer bestimmten Amplitude variieren. Das Anregungssignal wird während der Messung (Contact- oder Tapping-Mode) über die Probe und die Spitze auf den Cantilever übertragen. In Abhängigkeit von den viskoelastischen Eigenschaften der Probe erhält man ein Antwortsignal des Cantilevers, das eine bestimmte Amplitude und eine Phasenverschiebung gegenüber dem Anregungssignal aufweist (Schema 7-3).



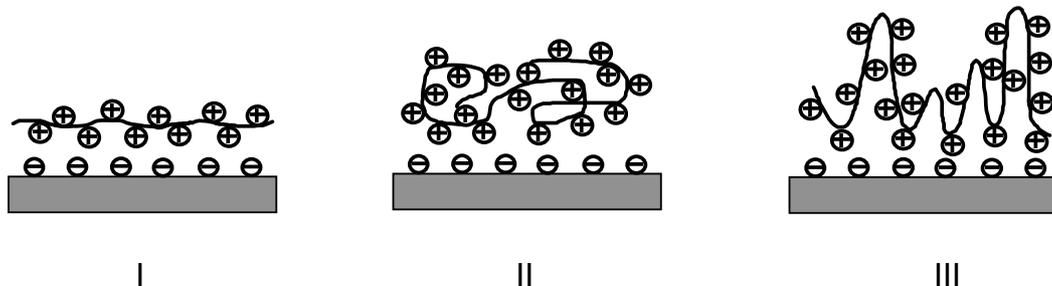
Schema 7-3: Das Prinzip der Kraftmodulation zur Untersuchung der viskoelastischen Eigenschaften einer Probe mittels AFM.

Die Amplitude des Cantilevers ist eine Funktion der Elastizität der Probe und die Phasenverschiebung eine Funktion der Viskosität. Beide Anteile können mit Hilfe eines Lock-in-Verstärkers aufgenommen und getrennt an einen Rechner weitergeleitet werden. Die laterale Abbildung des Amplitudenanteils bezeichnet man als Elastizitätsbild und die der Phasenverschiebung als Viskositätsbild. Im Gegensatz zum Höhenbild enthalten diese Aufnahmen keine Höheninformation ($z = 0$).

Die Rauigkeit einer Probenoberfläche wird durch die AFM-Messung im Friction-Mode untersucht [21, 29]. Dabei rastert die Meßspitze senkrecht zur Längsachse des Cantilevers über die Oberfläche. Aufgrund von lateralen Reibungskräften zwischen Spitze und Probe kommt es zusätzlich zur Auslenkung in z-Richtung auch zu einer Torsion des Cantilevers um seine Längsachse. Beide Auslenkungen können getrennt voneinander detektiert werden. Im Reibungsbild der Probe lassen sich Bereiche mit unterschiedlichen Reibungskoeffizienten unterscheiden.

Um einzelne Moleküle mittels AFM abbilden zu können, müssen diese auf der Oberfläche eines ebenen Substrats (z.B. Glimmer, Glas) immobilisiert werden. Die Adsorption von Polyelektrolyten erfolgt üblicherweise aus wässriger Lösung an entgegengesetzt geladene Substrate [24, 30, 31]. Dabei wirken van der Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen als attraktive Kräfte. Die Bindungsenergie ist eine Funktion der effektiven Oberflächenladungsdichte von Substrat und Probe. Letztere hängt von der Elektrolytkonzentration und bei Systemen mit aciden Gruppen auch vom pH-Wert ab [25, 26, 32]. Je nach der Stärke der Wechselwirkungskräfte unterscheidet man zwei Adsorptionsmechanismen, die Physisorption (≤ 50 kJ/mol) und die Chemisorption (≥ 50 kJ/mol) [27, 33]. Die Struktur der adsorbierten Polyelektrolyte wird nach Decher und Lvov ebenfalls durch die Elektrolytkonzentration in der Lösung beeinflusst [31]. In wässriger und niedrig konzentrierter Salzlösung (≤ 0.1 M) führt die intramolekulare elektrostatische Absto-

ßung zu einer Expansion des Polyelektrolytmoleküls (Schema 7-4, I). Bei hoher Salzkonzentration ($\geq 1.0 \text{ M}$) werden die Ladungen des Polyelektrolytmoleküls durch entgegengesetzt geladene Elektrolytionen kompensiert. In diesem Fall kann das Polymer eine entropisch günstigere, geknäuelte Konformation in Lösung einnehmen. Infolge der elektrostatischen Wechselwirkung mit dem Substrat kollabiert das Knäuel auf der Substratoberfläche (Schema 7-4, II). Analog zur expandierten Kette sollte das Höhenprofil eines flachen Knäuels somit relativ homogen sein. Neben diesen beiden Konformationen ist noch eine weitere denkbar. Voraussetzung dafür ist, daß die Ladungen innerhalb eines Polyelektrolytmoleküls durch lange, hydrophobe Segmente voneinander getrennt sind, die durch hydrophobe Wechselwirkung eine lamellenartige Struktur stabilisieren (Schema 7-4, III). Das Höhenprofil hängt dann von der Verteilung und der Anzahl der bindenden Ladungen ab.

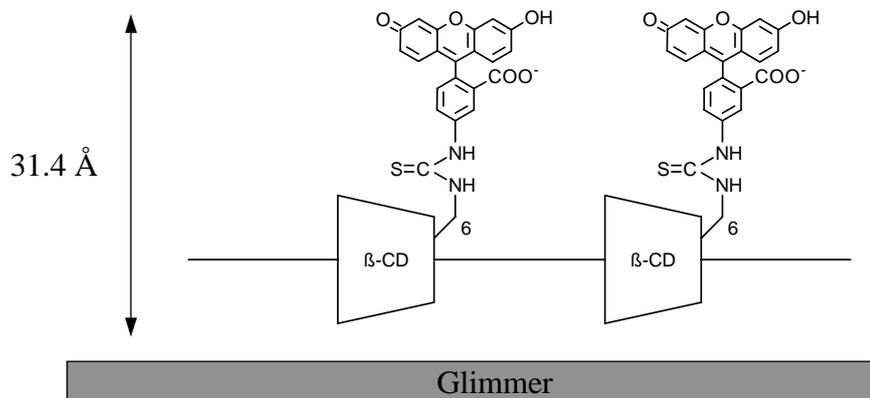


Schema. 7-4: Die Struktur eines adsorbierten Polyelektrolytmoleküls auf der Oberfläche eines ebenen Substrats: Modell I) expandierte Kette, II) kollabiertes Knäuel, III) lamellenartig gefaltete Kette.

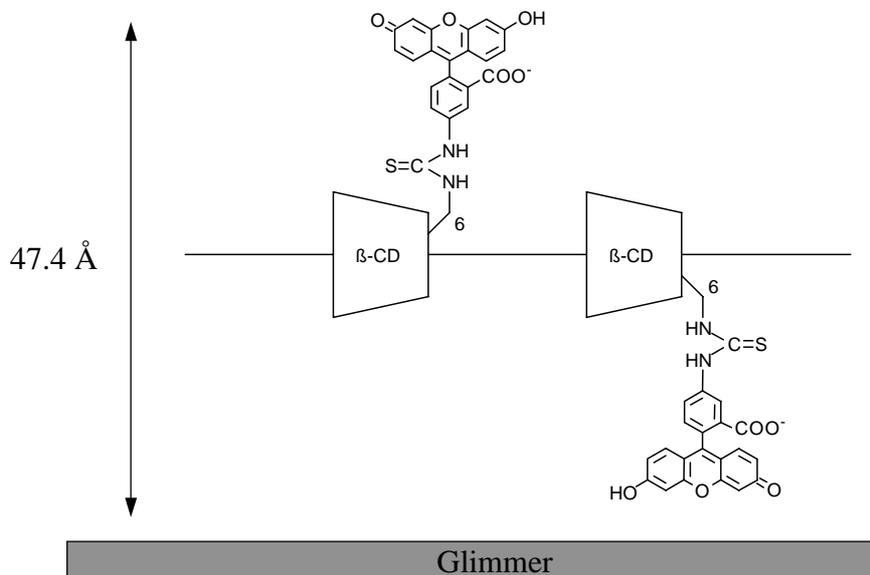
Die Adsorption eines positiv geladenen Polyrotaxans aus Poly(N-4,4'-bipyridinium-N-decamethylendibromid) und α -Cyclodextrin **1a** an eine negativ geladene Glimmroberfläche wurde erstmals 1995 durch Caseri et al. nachgewiesen [34]. Analog dazu sollte das positiv geladene Polyrotaxan **14** aus Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a** (s. Abb. 5-2) an Glimmer adsorbiert und anschließend unter einem Kraftmikroskop untersucht werden. Das Höhenprofil eines aus Lösung adsorbierten Polyrotaxanmoleküls **14** hängt sowohl von seiner Konformation als auch von der Verteilung und Orientierung der aufgefädelten Cyclodextrinringe **5** und **1a** ab: Der Außendurchmesser eines α -Cyclodextrins **1a** beträgt 14.6 \AA , der eines β -Cyclodextrinrings **1b** 15.4 \AA [35, 36]. Unter Berücksichtigung der Atomabstände innerhalb eines Xanthengerüsts ergibt sich für den Fluoresceinylrest eine Länge von näherungsweise 16 \AA [37]. Somit nehmen parallel ausgerichtete Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** eine Höhe von etwa 31.4 \AA und antiparallel

orientierte eine von 47.4 \AA ein (s. Schema 7-5). Entsprechend erhält man für eine freie Bindungsstelle im Ionen $_{10,6}$ Chlorid **10** eine Höhe von etwa $4\text{-}5 \text{ \AA}$.

Die Länge eines ausgestreckten Polyrotaxanmoleküls **14** ist durch den Polymerisationsgrad P des Ionen $_{10,6}$ Chlorids **10** festgelegt. Mit Hilfe der GPC wurde das Zahlenmittel $P_n = 123$ und das Gewichtsmittel $P_w = 151$ von Ionen $_{10,6}$ Chlorid **10** bestimmt (s. Kap. 4.2). Setzt man diese Werte in Gleichung 4-10 ein, so erhält man für das Polyrotaxan **14** eine mittlere Kettenlänge von näherungsweise $L_n = 0.28 \text{ \mu m}$ und $L_w = 0.34 \text{ \mu m}$.



I



II

Schema 7-5: Benachbarte Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** im Polyrotaxan **14**, I) parallel und II) antiparallel orientiert.

Für die Abbildung der Fluorescein-markierten Polyrotaxane **14** wurde eine Konzentration von $3.85 \cdot 10^{-4}$ mol/L bezogen auf das Ionen_{10,6} Chlorid **10** hergestellt. Anschließend wurde die Probe auf Glimmer adsorbiert und in Lösungsmittel (0.01 M NH₄OH, pH = 8.0) unter einem Kraftmikroskop betrachtet. Im Contact-Mode konnte die Probenoberfläche nicht zerstörungsfrei abgebildet werden. Erst die Messung im Tapping-Mode war erfolgreich und ermöglichte eine molekulare Auflösung der adsorbierten Polyrotaxanmoleküle **14**. Zur Auswertung des Experiments wurden die Höhen und Längen der Teilchen ausgemessen. In Abbildung 7-1 ist links das Höhenbild und rechts das Viskositätsbild der Probe dargestellt.

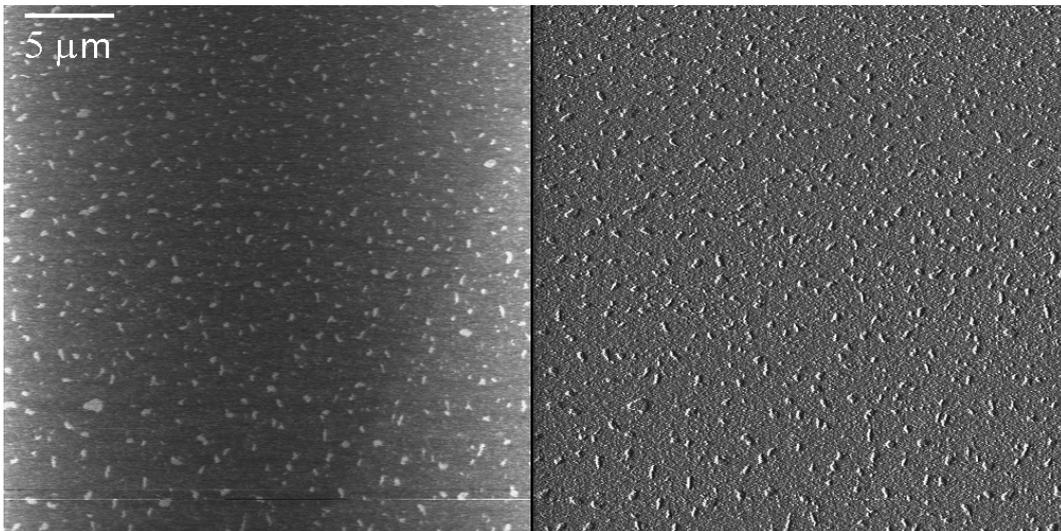


Abb. 7-1: Das Höhenbild (links) und das Elastizitätsbild (rechts) von Polyrotaxan **14** auf Glimmer.¹

Das Höhenbild zeigt kleine Teilchen, die über die gesamte Glimmeroberfläche homogen verteilt sind. Für die Höhe der Teilchen wurde ein Mittelwert von $5.2 \text{ nm} \pm 0.5 \text{ nm}$ bestimmt. Die Abweichung der einzelnen Meßwerte vom Mittelwert liegt in der Größenordnung des Meßfehlers. Das äußerst homogene Höhenprofil der Probe ist durch eine Adsorption der Polyrotaxane **14** unter Ausbildung von Aggregaten oder lamellenartigen Strukturen nicht zu erklären. Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß die Polyrotaxanmoleküle **14** auf der Glimmeroberfläche in Form expandierter Ketten oder flacher Knäuel adsorbieren. Im vergrößerten AFM-Bild sind einige Teilchen eindeutig als Stäbchen zu erkennen, während andere eine rundliche Form

¹ Die Rasterkraftmikroskopie wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Sackmann und Frau C. M. Kacher an der TU München durchgeführt.

aufweisen. Bei sehr kleinen Teilchen ist diese Unterscheidung jedoch nicht mehr möglich. Mißt man die Konturlängen der adsorbierten Teilchen aus, so erhält man ein Spektrum von Werten zwischen 0.1 - 0.8 μm . Aufgrund der endlichen Dimension der AFM-Spitze ($\sim 20 \text{ nm}$) ist ein lateraler Abbildungsfehler von etwa 10-20 % zu berücksichtigen. Die realen Abmessungen der Teilchen sind deshalb um diesen Anteil geringer. Mit Hilfe von Gleichung 4-10 wurde für das Polyrotaxan **14** eine mittlere Kettenlänge von etwa 0.3 μm abgeschätzt (s. Kap. 4.2). Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie die experimentell ermittelten Konturlängen. Letzteres beweist, daß die Polyrotaxanmoleküle **14** als Einzelteilchen an die Glimmeroberfläche adsorbieren. Im Höhenbild ist somit die gesamte Breite der Molmassenverteilung von **14** abgebildet. Zu ähnlichen Ergebnissen führte die Untersuchung der Adsorption des Polyrotaxans nach Caseri et al. [34].

Im Elastizitätsbild erscheinen die Polyrotaxanmoleküle **14** weicher als die Glimmeroberfläche. Letzteres ist auf die größere Beweglichkeit der adsorbierten Polyrotaxanmoleküle **14** zurückzuführen. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, daß die aufgefädelten Cyclodextrinringe **5** und **1a** während der AFM-Messung durch den Kontakt mit der Spitze zusätzlich zur Rotation oder zur Bewegung entlang der Polymerachse angeregt werden [34]. Eine atomare Auflösung ist deshalb mittels AFM nicht möglich. Entsprechend hat die Verteilung der Cyclodextrine **5** und **1a** keinen Einfluß auf die Abbildung der Polyrotaxanmoleküle **14**.

Die herrschenden Kräfte beim Abbilden einer Probe sind sehr komplex und im Detail auch nicht alle verstanden [15]. Das Ergebnis der Höhenmessung wird daher unter verschiedenen Aspekten getrennt diskutiert: Die gemessene Höhe der adsorbierten Polyrotaxanmoleküle **14** stimmt mit der Höhe antiparallel orientierter Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** nahezu überein. Unter der Voraussetzung, daß die Ringe **5** während des Rastervorgangs rotieren und entlang der Polymerachse wandern, kann die Höhe als zeitlicher Mittelwert über alle Orientierungen der Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** interpretiert werden. Bei einer starken Bindung der Polyrotaxanmoleküle **14** an die Glimmeroberfläche liegt ein statisches System vor. Eine Orientierung der negativ geladenen Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** von der gleich geladenen Glimmeroberfläche weg, ist dann am wahrscheinlichsten. In diesem Fall ist die gemessene Höhe etwa doppelt so hoch wie erwartet. Berücksichtigt man die ebenfalls negative Oberflächenladung der AFM-Spitze, so kann der zu hohe Meßwert gemäß Gleichung 7-2 durch die elektrostatische Abstoßung erklärt werden [26].

Im Anschluß an die Arbeiten von Hansma [19] und McIntire [17], die DNA und Polysaccharide mittels AFM abbildeten, ist es erstmals gelungen, einzelne Polyrotaxanmoleküle **14** sichtbar zu machen. Diese adsorbieren aus schwach ammo-

niakalischer Lösung in Form expandierter Ketten oder flacher Knäuel an die Oberfläche von Glimmer. Das Ergebnis der AFM-Untersuchung steht im Einklang mit den Forschungsergebnissen von Caseri et al. [34], Decher [31], Müller und Engel [26].

Eine mögliche Aggregation der Polyrotaxanmoleküle **14** konnte bereits anhand der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung widerlegt werden (s. Kap. 6.1). Durch die AFM wurde dieser Befund nochmals bestätigt.

7.2 Die Abbildung Fluorescein-markierter Polyrotaxane mittels Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der AFM war es bereits gelungen, einzelne Fluorescein-markierte Polyrotaxane **14** auf einer Glimmeroberfläche abzubilden. Dabei konnten sowohl knäuel-förmige als auch stäbchenförmige Moleküle mit einer lateralen Ausdehnung von 0.1 - 0.8 μm beobachtet werden (s. Kap. 7.1).

Zusätzlich zur AFM sollte die Fluoreszenzmikroskopie als Methode zur Abbildung dieser Polyrotaxane **14** angewendet werden. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit eines Fluoreszenzmikroskops können auch Moleküle, deren Dimensionen weit unterhalb der Auflösungsgrenze ($\sim 0.3 \mu\text{m}$) liegen, sichtbar gemacht werden [1]. Im mikroskopischen Bild beobachtet man dann jedoch keine Strukturen, sondern Lichtflecken (Airy-Scheibchen). Letztere sind eine Folge der Lichtstreuung und besitzen einen Durchmesser von etwa $0.3 \mu\text{m}$ im sichtbaren Wellenlängenbereich [38]. Voraussetzung für den Nachweis einzelner, fluoreszierender Moleküle ist, daß sie weit genug auseinander liegen. Beträgt ihr Abstand weniger als die Auflösungsgrenze, dann fallen die Lichtflecke zu einer einzigen Leuchterscheinung zusammen.

Ein Nachteil der Fluoreszenzmikroskopie ist, daß fluoreszierende Moleküle, die sich ober- und unterhalb einer Schärfenebene befinden, durchscheinen und den Kontrast mindern. Dieser Effekt wirkt sich umso stärker aus, je größer die Quantenausbeute des Fluorophors ist. Die Fluoreszenzquantenausbeute von Fluorescein in einer 0.1 N Natronlaugelösung beträgt 85 % [39].

Die Zeit, in der ein fluoreszierendes Molekül unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden kann, wird durch das Bleichverhalten des Fluorophors begrenzt. Dabei handelt es sich um eine irreversible Zerstörung des Farbstoffs infolge photochemischer Desaktivierungsprozesse (Intersystem Crossing). Die Bleichrate ist sowohl von der Intensität des Anregungslichtes als auch von der Umgebung des Fluorophors abhängig [40].

Bei der Fluoreszenzmikroskopie in Lösung (Bulk) stellt die Beweglichkeit der Moleküle eine zusätzliche Einflußgröße für die Auflösung und die Beobachtungszeit dar. So können sehr kleine Moleküle nicht mehr als solche wahrgenommen werden, da sie sich zu schnell bewegen. Ihre Fluoreszenz beeinträchtigt jedoch den Kontrast eines mikroskopischen Bildes. Deshalb werden Studien zur Dynamik von Einzelmolekülen häufig in einer Polymermatrix [2] durchgeführt. Eine andere Möglichkeit, um die Beweglichkeit fluoreszierender Moleküle herabzusetzen, stellt die kovalente Anbindung an ein Polymer [41] oder die Immobilisierung an ein Substrat (z.B. Deckglas) dar [6].

Einzelmoleküle, Aggregate und Artefakte (z.B. Staubpartikel) können im Fluoreszenzmikroskop anhand ihrer Form und Größe, ihrer Dynamik im Bulk sowie ihrer Fluoreszenzintensität unterschieden werden: Einzelne Polymermoleküle (1-10 μm) liegen in Lösung entweder geknäuelte oder in Form expandierter Ketten vor [31]. Im Mikroskop werden sie deshalb in Form rundlicher oder filamentöser Objekte abgebildet. Bei einer Aggregation dieser Polymere entstehen unstrukturierte Objekte mit uneinheitlichen Formen. Ihre Abmessungen können in Lösung bis zu 50 μm erreichen [5]. Im Vergleich dazu sind Staubpartikel häufig wesentlich größer. Die Bewegung von Aggregaten und Staubpartikeln im Bulk wird durch die Bewegung ihres Schwerpunktes beschrieben. Für kettenförmige Polymere hingegen ist eine Dynamik innerhalb des Moleküls charakteristisch. So pflanzt sich die Bewegung eines Segmentes am Kettenanfang über die gesamte Konturlänge fort. Letzteres kann mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden [2]. Ein weiteres Kriterium zur Unterscheidung von Einzelmolekülen, Aggregaten und Staubpartikeln stellt die Fluoreszenzintensität dar. So können fluoreszierende Moleküle, die eine homogene Verteilung der Fluoreszenzintensität aufweisen, von Aggregaten mit einem intensiveren und uneinheitlicheren Fluoreszenzbild unterschieden werden. Staubpartikel gehen häufig unspezifische Wechselwirkungen mit fluoreszierenden Molekülen ein und zeigen infolgedessen ein inhomogenes Fluoreszenzbild.

Das Fluoreszenzbild eines Polyrotaxanmoleküls **14** wird durch die aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** erzeugt (s. Abb.5-2). Der Abstand, den die Ringe **5** zueinander einnehmen, hängt von ihrer Verteilung entlang der Polymerachse sowie von der Sekundärstruktur des Polyrotaxanmoleküls **14** ab. Die mittlere Kettenlänge von **14** wurde nach Gleichung 4-10 abgeschätzt, sie beträgt etwa 0.3 μm (s. Kap. 4-2). Dies entspricht dem Mindestabstand, der zur Detektion einzelner Fluorophore erforderlich ist. Die Verteilung der Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** sollte sich somit nur dann auf das mikroskopische Bild auswirken, wenn das betrachtete Polyrotaxan in gestreckter Konformation vorliegt und seine Kettenlänge größer ist als der Mittelwert (vgl. Kap. 7.1). Letzteres wird anhand eines konkreten Beispiels veranschaulicht:

Ein Polyrotaxanmolekül **14** habe die in Abbildung 5-2 dargestellte Struktur und die Polymerkette, das Ionen_{10,6} Chlorid **10**, einen Polymerisationsgrad von $P_n = 123$. Die Decamethyleneinheiten von **10** sind an den Kettenenden zu jeweils 5 % mit α -Cyclodextrin **1a** belegt. Auf 10 % der verbleibenden 111 Decamethyleneinheiten verteilen sich die Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5**. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Verteilung ist jede 9. Bindungsstelle im Ionen_{10,6} Chlorid **10** von den Ringen **5** besetzt. Der Abstand zwischen benachbarten Ringen **5** läßt sich mit Hilfe von Gleichung 4-10 ($P = 8$) zu etwa $0.02 \mu\text{m}$ abschätzen (s. Kap. 4.2). Die Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** sind folglich weniger als die mikroskopische Auflösungsgrenze voneinander entfernt. Demzufolge sollte das expandierte Polyrotaxanmolekül **14** im Fluoreszenzmikroskop als kontinuierlich fluoreszierende Kette sichtbar sein. Dasselbe gilt für ein um den Faktor 10 längeres Polyrotaxan. Ändert sich jedoch die Verteilung der Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** innerhalb des Moleküls, dann liegt der Abstand benachbarter Ringe **5** teilweise oberhalb der Auflösungsgrenze. Als Fluoreszenzbild ist eine diskontinuierlich fluoreszierende Kette zu erwarten. Im Grenzfall sollten die Airy-Scheibchen der einzelnen, aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** beobachtet werden können.

Die Konturlänge eines unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachteten, expandierten Polyrotaxanmoleküls **14** hängt von der Position der äußersten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** ab. Diese erzeugen im Fluoreszenzbild jeweils ein Airy-Scheibchen mit einem Durchmesser von $0.3 \mu\text{m}$. Zu den Kettenenden hin wird somit eine Distanz von $0.15 \mu\text{m}$ überstrahlt. Wenn die Abstände zwischen diesen Ringen **5** und den Enden der Polymerkette jeweils kleiner sind als $0.15 \mu\text{m}$, dann erscheint das Polyrotaxanmolekül **14** unter dem Fluoreszenzmikroskop länger als real. Im umgekehrten Fall ist die Konturlänge geringer als die Abmessung des betrachteten Moleküls.

Die Probe des Polyrotaxans **14** ist sowohl hinsichtlich der Molmassenverteilung, als auch in Bezug auf den Belegungsgrad durch Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** uneinheitlich. Daher stellt jedes unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtete Polyrotaxanmolekül **14** ein Einzelereignis mit einer definierten Molmasse und einem definierten Belegungsgrad dar. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß sich die aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** in Lösung entlang der Polyrotaxanachse bewegen können, was die Detektion einzelner Ringe **5** zusätzlich beeinträchtigt.

Für die Untersuchung der Fluorescein-markierten Polyrotaxane **14** wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit Auflichtbeleuchtung eingesetzt (s. Schema 9-1). Das Auflösungsvermögen des Mikroskops betrug $0.3 \mu\text{m}$. Von dem Polyrotaxan **14** wurde eine Probelösung ① mit einer Konzentration von $9.63 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L}$ bezogen auf den Fluoreszenzfarbstoff, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, hergestellt und unter dem

Mikroskop betrachtet. So konnte ein optimaler Kontrast im Fluoreszenzbild erzielt werden. Darüber hinaus wurde gewährleistet, daß die Polyrotaxane **14** in Lösung als Einzelmoleküle vorliegen (s. Kap. 7.1). Als Lösungsmittel für die Fluoreszenzmikroskopie diente eine staubfrei filtrierte 0.01 M wäßrige Ammoniaklösung (pH = 8.0).

Im mikroskopischen Bild sind die positiv geladenen Polyrotaxanmoleküle **14** als kleine rundliche Objekte sichtbar. Ein Teil der Moleküle adsorbiert auf der Oberfläche des Deckglases, andere können frei beweglich im Bulk beobachtet werden. Aufgrund der negativen Oberflächenladung des Deckglases nimmt die Anzahl der adsorbierten Moleküle mit der Zeit zu. Infolgedessen verarmt die Lösung an fluoreszierendem Material. Die Teilchendichte auf einem Deckglas ist örtlich unterschiedlich, was auf eine inhomogene Glasoberfläche (Ladungsdichte, Verunreinigung) hindeutet. Abbildung 7-2 zeigt einen Bildausschnitt von der Oberfläche eines Deckglases mit darauf adsorbierten Polyrotaxanmolekülen **14** sowie ein einzelnes Molekül im Bulk.

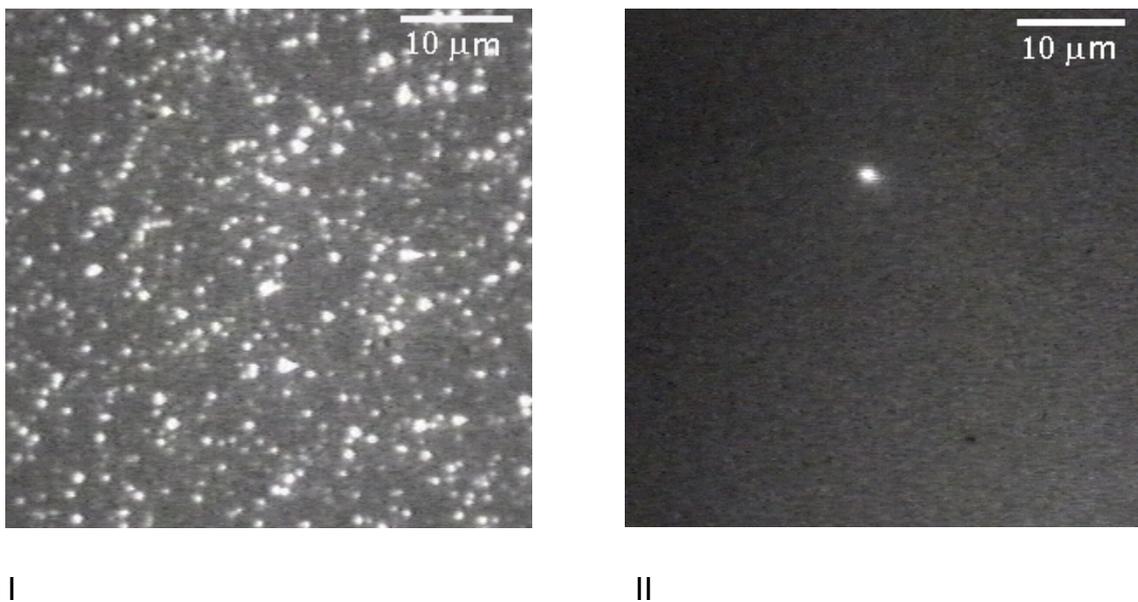


Abb. 7-2: Das Fluoreszenzbild des Polyrotaxans **14** I) auf der Oberfläche eines Deckglases und II) im Bulk.²

Zur Auswertung der Fluoreszenzbilder wurden die fluoreszierenden Objekte auf dem Deckglas und im Bulk ausgemessen. Die Durchmesser der Teilchen im Bulk haben eine nahezu einheitliche Größe von 1.0 µm. Für die adsorbierten Teilchen wurden Werte zwischen 0.3 - 3.0 µm registriert. Der überwiegende Teil der Moleküle besitzt jedoch, analog zur Messung im Bulk, einen Durchmesser ≤ 1.0 µm. Dies legt den

² Die Fluoreszenzmikroskopie wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Sackmann und M. Dichtl an der TU München durchgeführt.

Schluß nahe, daß es sich bei den wenigen größeren Objekten auf dem Deckglas um zufällige Zusammenlagerungen von mehreren Einzelmolekülen **14** handelt (vgl. Kap. 7.1). Ein weiterer Hinweis dafür ist die höhere Fluoreszenzintensität dieser Objekte. Die Beobachtungszeit eines einzelnen Polyrotaxanmoleküls **14** im Bulk beträgt 20-30 s.

Polyrotaxane **14** mit Abmessungen unter $1.0\ \mu\text{m}$ können im Bulk aufgrund ihrer hohen Beweglichkeit nicht beobachtet werden. Im Vergleich zum reinen Lösungsmittel ist der Hintergrund der Probe **14** deutlich aufgehellt, was die Existenz dieser Moleküle indirekt nachweist. Polyrotaxane **14**, die auf der Oberfläche eines Deckglases immobilisiert sind, repräsentieren einen größeren Bereich der Molmassenverteilung. So lassen sich Moleküle, deren Abmessungen unterhalb der Auflösungsgrenze liegen, anhand ihrer Airy-Scheibchen detektieren. Diese haben einen konstanten Durchmesser von $0.3\ \mu\text{m}$. Deshalb ist eine Aussage hinsichtlich der realen Größe und Struktur bei sehr kleinen Molekülen nicht möglich. Zur Unterscheidung, ob ein Molekül geknäuelt oder kettenförmig vorliegt, ist eine Abmessung von mindestens $1\ \mu\text{m}$ erforderlich. Die einheitliche Form der größeren Polyrotaxanmoleküle **14** im Fluoreszenzbild I deutet auf eine überwiegend knäuelförmige Struktur hin. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der AFM-Analyse der Probe (s. Kap. 7.1). Somit wurden einzelne Fluorescein-markierte Polyrotaxane **14** erstmals erfolgreich mittels Fluoreszenzmikroskopie abgebildet.

7.2.1 Der Einfluß des Belegungsgrades auf die Struktur Fluorescein-markierter Polyrotaxane in Lösung

Nachdem es möglich war, Fluorescein-markierte Polyrotaxane **14** mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen (s. Kap. 7.2), sollte der Einfluß des Belegungsgrades auf die Struktur dieser Moleküle in Lösung untersucht werden. Dazu wurde eine Probelösung ② des Polyrotaxans **15** hergestellt und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer Probe ① des Polyrotaxans **14** verglichen. Die Polyrotaxane **15** und **14** unterscheiden sich lediglich durch ihren Gesamtbelegungsgrad (s. Kap. 5.2.1). So enthält das Polyrotaxan **15** zusätzlich aufgefüdelte β -Cyclodextrinringe **1b**. Der Belegungsgrad von **15** durch **1b** beträgt etwa 15 %. Für die mittlere Kettenlänge des Polyrotaxans **15** wurde nach Gleichung 4-10 ein Wert von $0.2\ \mu\text{m}$ abgeschätzt. Die mittlere Kettenlänge des Polyrotaxans **14** beträgt $0,3\ \mu\text{m}$ (s. Kap. 4.2). Das Experiment erfolgte unter den in Kapitel 7.2 beschriebenen Bedingungen.

Das mikroskopische Bild eines Polyrotaxanmoleküls **15** wird ausschließlich durch aufgefüdelte Fluoresceinyll- β -Cyclodextrine **5** erzeugt (vgl. Kap.7.2). Die β -Cyclodextrinringe **1b** sind fluoreszenzaktiv und deshalb unter dem Fluoreszenzmikros-

kop nicht sichtbar. Folglich sollten sich die Fluoreszenzbilder der Proben ① und ② nur dann unterscheiden, wenn sich die Konformation eines gelösten Polyrotaxanmoleküls **14** in Abhängigkeit vom Gesamtbelegungsgrad ändert.

Im Fluoreszenzbild der Probe ② sind die positiv geladenen Polyrotaxanmoleküle **15** hauptsächlich in Form kleiner, rundlicher Objekte sichtbar. Als solche sind sie von den Polyrotaxanen **14** nicht zu unterscheiden. Sowohl das Adsorptionsverhalten, als auch die Beobachtungszeit der fluoreszierenden Teilchen sind in beiden Fällen ähnlich (vgl. Kap. 7.2). Zusätzlich sind einzelne fadenförmige Objekte im Fluoreszenzbild der Probe ② zu erkennen. Diese können adsorbiert auf der Oberfläche des Deckglases oder frei beweglich im Bulk beobachtet werden. Die Fluoreszenzintensität der Filamente ist homogen und ihre Bewegung im Bulk dynamisch. Ebenso wie die fluoreszierenden, rundlichen Objekte bleichen die Filamente nach einer Zeit von 20 - 30 s aus. Dies deutet darauf hin, daß einige Polyrotaxanmoleküle **15** in Form expandierter Ketten vorliegen. Abbildung 7-3 zeigt links einen Bildausschnitt von der Oberfläche des Deckglases mit darauf adsorbierten Polyrotaxanmolekülen **15** und rechts eines der fluoreszierenden Filamente im Bulk.

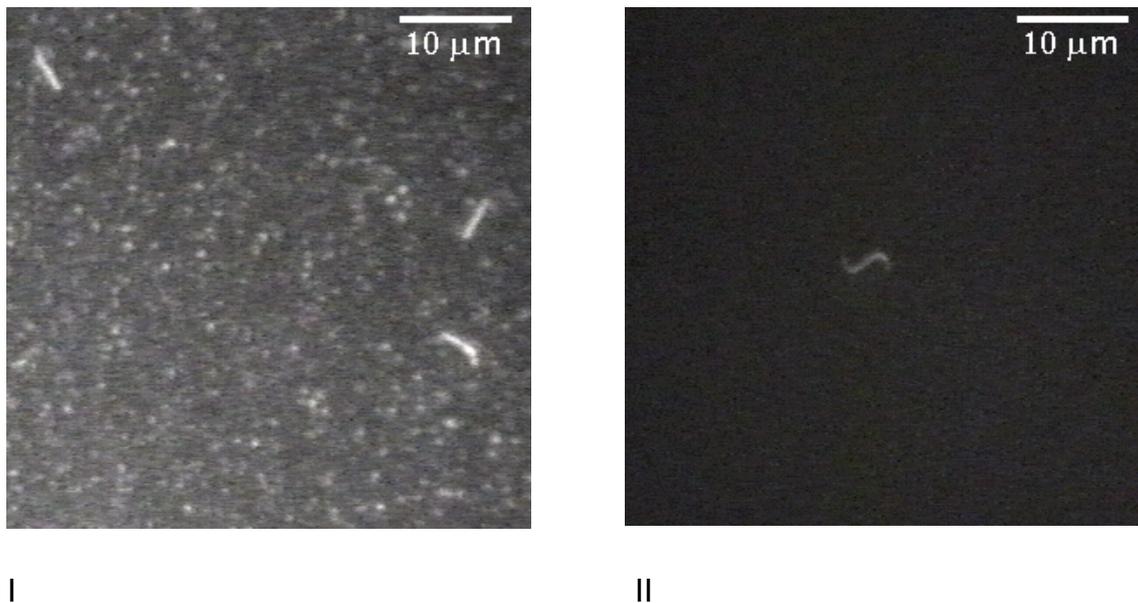


Abb. 7-3: Das Fluoreszenzbild des Polyrotaxans **15** I) auf der Oberfläche eines Deckglases und II) die Abbildung eines fluoreszierenden Filaments im Bulk.

Für die Auswertung des Versuchs wurden die fluoreszierenden Objekte auf dem Deckglas und im Bulk vermessen. Analog zur Fluoreszenzmikroskopie der Polyrotaxane **14** erhält man für die adsorbierten, rundlichen Teilchen einen Durchmesser von 0.3 - 1.5 µm und für diejenigen im Bulk einen von etwa 1 µm. Die Polyrotaxane **15** liegen demnach unabhängig von ihrem Gehalt an aufgefüdeltem β -Cyclodextrin **1b** als Einzelteilchen mit überwiegend knäueiförmiger Struktur vor (vgl. Kap. 7.2).

Die dynamischen Eigenschaften der fadenförmigen Objekte im Bulk lassen ebenfalls auf einzelne, expandierte Polyrotaxanmoleküle **15** schließen. Dementsprechend wurde für die Breite der Filamente ein einheitlicher Wert vom Durchmesser eines Ariy-Scheibchens bestimmt. Für die Konturlänge erhielt man einen Mittelwert von 4.0 μm . Dieser ist um etwa eine Größenordnung größer als die mittlere Kettenlänge des Polyrotaxans **15**. Folglich sind die betrachteten Moleküle **15** dem rechten, äußeren Rand in der Molmassenverteilung zuzuordnen (vgl. Kap. 7.2). Letzteres erklärt die geringe Häufigkeit ($< 0.1\%$), mit der fluoreszierende Filamente dieser Länge beobachtet werden. Da das Auftreten filamentöser Strukturen für das Fluoreszenzbild des Polyrotaxans **15** charakteristisch ist, liegt der Schluß nahe, daß im Grenzfall hoher Belegung durch Cyclodextrine eine Expansion der Polyrotaxanmoleküle **15** in Lösung erfolgt.

Die homogene Fluoreszenzintensität der expandierten Polyrotaxanmoleküle **15** setzt voraus, daß die aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** weniger als die Auflösungsgrenze voneinander entfernt sind. Aufgrund der großen Konturlänge der betrachteten Polyrotaxane **15** ist es wahrscheinlich, daß mehr als 10 % ihrer Bindungsstellen durch die Ringe **5** belegt sind (vgl. Kap.7.2). Berücksichtigt man die Beweglichkeit der aufgefädelten Cyclodextrinringe **5** und **1a** entlang der Polyrotaxanachse, dann könnte das homogene Fluoreszenzbild eines expandierten Moleküls **15** auch als zeitlicher Mittelwert über alle Verteilungen der Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** interpretiert werden. Eine eindeutige Erklärung für das Auftreten der fadenförmigen Objekte war im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich.

7.2.2 Der Einfluß polymerer Gegenionen auf die Struktur Fluoresceinmarkierter Polyrotaxane in Lösung

Mit Hilfe der Gelelektrophorese ist es bereits gelungen, die Bildung polymerer Ionenpaare aus positiv geladenen Polyrotaxanmolekülen **14** und Natriumpolystyrolsulfonat nachzuweisen (s. Kap. 5.1.3). Diese können in Lösung sowohl aggregiert, geknäuelte oder in Form expandierter Ketten vorliegen. Nach Dautzenberg et al. hängt die Löslichkeit solcher Komplexe von der Polyelektrolytkonzentration und die Stabilität von der Ladungsdichte der Polyelektrolyte ab. So bilden anionisch und kationisch funktionalisierte Polyacrylamide in verdünnten, wäßrigen Lösungen ($c \leq 10^{-3}$ g/ml) Aggregate, deren Dimensionen in der Größenordnung von Kolloidalteilchen ($\varnothing: 10^{-9}$ - 10^{-7} m) liegen. Bei höher konzentrierten Lösungen fallen die Polyacrylatkomplexe als Feststoff aus [42]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Assoziation von Natriumpolystyrolsulfonat an Fluorescein-markierte Polyrotaxane **14** mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

Für das Experiment wurde eine Probelösung ③ hergestellt, die das Polyrotaxan **14** und Natriumpolystyrolsulfonat ($M_w = 149\,000$ D) in einem Molverhältnis von 5:1 enthielt. So sollte gewährleistet werden, daß die polymeren Ionenpaare eine positive Überschlußladung besitzen und in wäßriger Lösung löslich sind (s. Kap. 5.1.3). Als Referenz diente die Lösung ① des reinen Polyrotaxans **14**. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte unter jeweils gleichen Bedingungen (s. Kap. 7.2).

Das mikroskopische Bild der Probe ③ wird ausschließlich durch die Fluoreszenz der Polyrotaxanmoleküle **14** erzeugt. Denn Natriumpolystyrolsulfonat ist ein fluoreszenz-inaktiver Stoff und als solcher im Fluoreszenzbild nicht sichtbar. Damit die Bildung polymerer Ionenpaare aus **14** und Natriumpolystyrolsulfonat mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar ist, muß sich die Struktur der Polyrotaxane **14** durch die Assoziation von Natriumpolystyrolsulfonat ändern. Das Fluoreszenzbild der Probe ③ sollte dann von dem des reinen Polyrotaxans **14** unterscheidbar sein. Abbildung 7-4 zeigt links ein Fluoreszenzbild der Probe ③ von der Oberfläche des Deckglases mit darauf adsorbierten Polyrotaxanmolekülen **14** und rechts die Abbildung eines fluoreszierenden Filaments im Bulk.

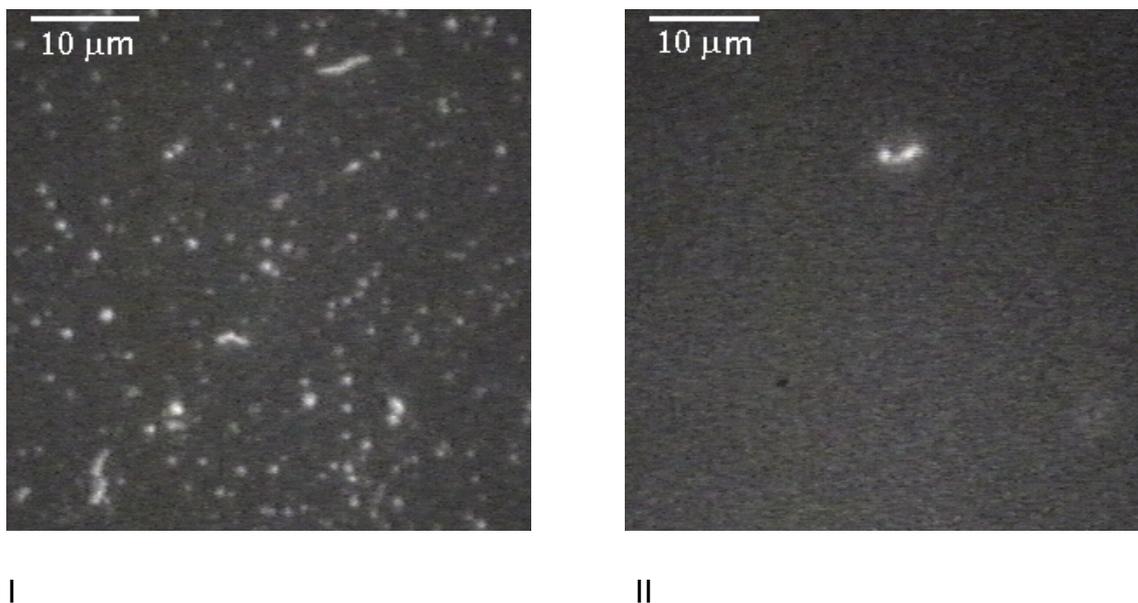


Abb. 7-4: Das Fluoreszenzbild des Polyrotaxans **14** in Gegenwart von Natriumpolystyrolsulfonat I) von der Oberfläche des Deckglases und II) die Abbildung eines fluoreszierenden Filaments im Bulk.

Das Experiment zeigt, daß die Polyrotaxanmoleküle **14** in Gegenwart von Natriumpolystyrolsulfonat überwiegend in Form kleiner, rundlicher Objekte erscheinen. Als solche sind sie vom Fluoreszenzbild des reinen Polyrotaxans **14** nicht zu unterscheiden. Sowohl die Abmessungen als auch das Adsorptions- und Bleichverhalten der fluoreszierenden Objekte ist in beiden Fällen identisch (s. Kap. 7.2). Demzufolge

liegen die Polyrotaxanmoleküle **14** in der Probe ③ geknäuel und voneinander getrennt vor. Eine Aggregation der Polyrotaxane **14** in Gegenwart von Natriumpolystyrolsulfonat ist nicht sichtbar. Berücksichtigt man den Überschuss an Polyrotaxan **14** in der Lösung, so sollten die meisten Moleküle **14** als Einzelteilchen vorliegen.

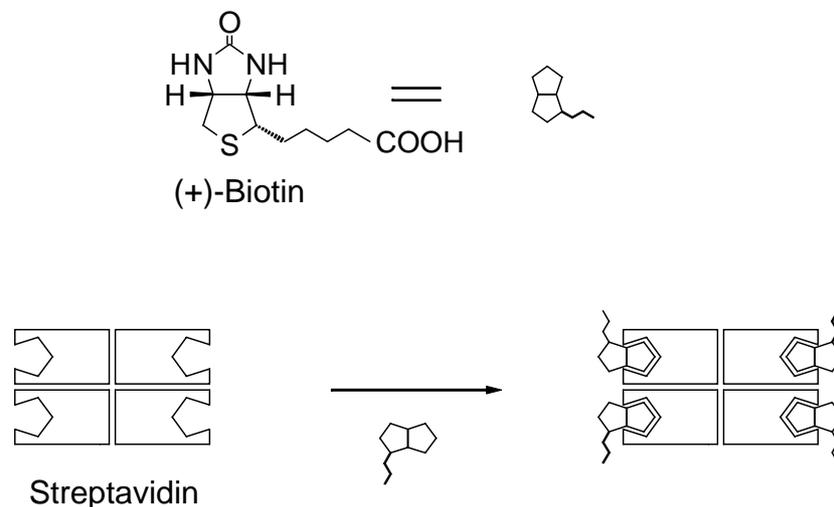
Im Gegensatz zur reinen Probe des Polyrotaxans **14** sind im Fluoreszenzbild der Probe ③ auch fadenförmige Objekte (Häufigkeit < 0.1 %) nachweisbar. Ihre Eigenschaften stimmen mit denen eines einzelnen, expandierten Polyrotaxanmoleküls **15** sehr gut überein (s. Kap. 7.2.1). So wurde für die Dicke der Filamente ein nahezu einheitlicher Wert von 0.3 μm ausgemessen und für die Konturlänge ein Mittelwert von 3.8 μm bestimmt. Die Fluoreszenzintensität entlang der Filamente ist homogen und ihre Bewegung im Bulk dynamisch. Letzteres lässt auf eine Expansion einzelner Polyrotaxanmoleküle **14** infolge Assoziation von Natriumpolystyrolsulfonat schließen. Die hohe Flexibilität der Filamente im Bulk deutet auf eine parallele Anordnung des Polyrotaxans **14** und Natriumpolystyrolsulfonat im Komplex hin. Zu dem gleichen Ergebnis führte die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung des Polyrotaxans **14** in Gegenwart von Natriumpolystyrolsulfonat (s. Kap. 6.2).

In einem weiteren Experiment wurde Natriumpolystyrolsulfonat durch λ -DNA (Fragmentgröße: 2.02 - 23.13 Kb) ersetzt. Dabei zeigte sich, daß λ -DNA-Moleküle als negativ geladene Gegenionen ebenfalls Assoziationsverbindungen mit den positiv geladenen Polyrotaxanmolekülen **14** eingehen. So konnten im Fluoreszenzbild neben fluoreszierenden, rundlichen Objekten auch filamentöse Strukturen beobachtet werden. Die Übereinstimmung mit dem Experiment in Gegenwart von Natriumpolystyrolsulfonat lässt auf eine Expansion einzelner Polyrotaxanmoleküle **14** infolge Assoziation von λ -DNA schließen. Eine Aggregation der Polyrotaxane **14** war nicht nachweisbar.

7.2.3 Die Untersuchung der Wechselwirkung von Biotin-Fluoresceinmarkierten Polyrotaxanen mit Streptavidin

Rezeptor-Ligand-Systeme werden in der Forschung zur Untersuchung molekularer Erkennungsprozesse an Oberflächen eingesetzt. Zielsetzung in der Biologie ist es, die physiologischen Vorgänge an Zellmembranen besser zu verstehen [43]. Im Bereich der Materialforschung und der supramolekularen Chemie nutzt man die molekulare Erkennung zum Aufbau organisierter Strukturen [44]. Eines der bekanntesten Rezeptor-Ligand-Systeme ist das Streptavidin-Biotin-System [45-47]. Letzteres wird bereits in der Affinitätschromatographie, der Diagnostik (Immunoassays) und beim Zelltargeting erfolgreich angewendet [48-51].

Streptavidin ist ein tetrameres Protein mit einer Größe von näherungsweise $4.2 \times 4.2 \times 5.6 \text{ nm}^3$ [52]. Die Kristallstruktur wurde mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt [53, 54]. Das Molekulargewicht beträgt etwa 60 000 Da. Streptavidin verfügt über vier Bindungsstellen für (+)-Biotin (244.31 Da), wobei jeweils zwei Bindungsstellen auf gegenüberliegenden Seiten lokalisiert sind. Die Bindung zwischen Streptavidin und dem als Vitamin H bekannten (+)-Biotin erfolgt nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip [47]. Sie ist sehr spezifisch und gilt als die stärkste, nicht kovalente Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand. Die Bindungskonstante beträgt $K_s = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ [55]. Das Gleichgewicht der Bindungsbildung liegt somit nahezu vollständig auf der Seite des Komplexes. Dieser ist über einen weiten Konzentrations- und pH-Wert-Bereich stabil. Der Mechanismus der Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung ist in Schema 7-6 dargestellt.



Schema 7-6: Die Bindung von (+)-Biotin (Vitamin H) an das tetramere Protein Streptavidin.

(+)-Biotin läßt sich über die Carbonsäuregruppe in eine Vielzahl von Substanzen überführen. So ist in der Literatur die Synthese biotinylierter Polymere [56], Lipide [44] und Nukleinsäuren [57] umfassend beschrieben. Fluoreszenzmarkierte Streptavidin- und Biotinderivate sind bereits kommerziell erhältlich. Da die Komplexbildung zwischen Streptavidin und Biotin durch die Funktionalisierung kaum beeinflusst wird [50, 58], eignet sich das Streptavidin-Biotin-System hervorragend zur Untersuchung der molekularen Erkennung an Modellmembranen aus Mono- [44, 59], Doppel- [60, 61] und Multischichten [62, 63]. Zur Detektion der Streptavidin-Biotin-Bindung können, je nach Modellsystem, unterschiedliche Meßmethoden wie z.B. die Fluoreszenz- [64], Rastertunnel- [44] und Kraftmikroskopie [65, 66] sowie die Röntgen- und Neutronenstreuung [67] angewendet werden. Große Beachtung fand

z.B. eine Arbeit von Blankenburg über die zweidimensionale Kristallisation von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin an biotinylierten Lipidmonoschichten an der Grenzfläche von Wasser und Luft [64, 68]. Decher et al. publizierten den Aufbau von Multischichten durch sequenzielle Adsorption von positiv geladenen, biotinylierten Proteinen und negativ geladenen Polyelektrolyten [30, 31, 69]. Die Bindung von Streptavidin an eine biotinylierte Oberfläche konnte mittels Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden. Die gegenüberliegenden, freien Bindungsstellen der Streptavidinmoleküle stehen demnach weiteren Erkennungsprozessen zur Verfügung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie die Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin-funktionalisierten Polyrotaxanen in Lösung untersucht werden.

Zur Herstellung des Polyrotaxans **16** wurde Ionen_{10,6} Chlorid **10** nacheinander mit Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, Biotinyl- β -Cyclodextrin **8** und α -Cyclodextrin **1a** umgesetzt (vgl. Kap. 5.1.2). Dadurch sollten zuerst die Ringe **5** und **8**, und zuletzt die α -Cyclodextrine **1a** auf die Polymerkette **10** aufgefädelt werden. Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde für das Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** ein Belegungsgrad von 10 % nachgewiesen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die Moleküle **1a** als Sperrgruppen wirken und das Abfädeln der fluoreszenzmarkierten Ringe **5** verhindern. Die durchschnittliche Anzahl der aufgefädelten α -Cyclodextrine **1a** läßt sich näherungsweise aus der Zeit-Umsatzkurve für die Selbstorganisation von Ionen_{10,6} Chlorid **10** und **1a** ablesen [70]. Demnach sind die Bindungsstellen von Ionen_{10,6} Chlorid **10** an den Kettenenden jeweils zu etwa 5 % mit α -Cyclodextrin **1a** belegt. Das Molverhältnis von Ionen_{10,6} Chlorid **10** und Biotinyl- β -Cyclodextrin **8** wurde auf 10:2 festgelegt. Der Belegungsgrad des Polyrotaxans **16** durch **8** muß somit $\leq 20\%$ sein. Abbildung 7-5 zeigt die relative Verteilung der Cyclodextrinringe **5**, **8** und **1a** am Beispiel einer Wiederholeinheit von Ionen_{10,6} Chlorid **10**.

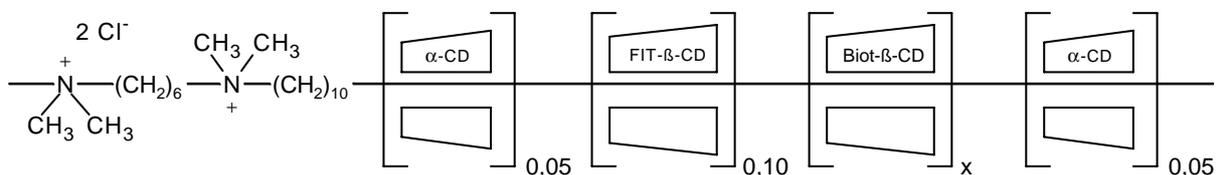


Abb. 7-5: Die Struktur des Biotin-Fluorescein-markierten Polyrotaxans **16** ($x \leq 0.2$).

Für den Nachweis der Wechselwirkung des Polyrotaxans **16** und Streptavidin wurde eine Probelösung ④ des reinen Polyrotaxans **16** sowie eine streptavidinhaltige Probe ⑤ unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Als Referenz diente die Probe ① des Polyrotaxans **14**, die im Gegensatz zu ⑤ kein Biotinyl- β -Cyclodextrin **8** enthält (s. Kap. 7.2). Die Struktur des Polyrotaxans **14** ist in Abbildung 5-2 dargestellt. Damit

eine unspezifische Bindung des Streptavidins an Polyrotaxan **16** ausgeschlossen werden kann, wurde in einem Kontrollexperiment ⑥ zusätzlich die Wechselwirkung zwischen Streptavidin und dem Fluorescein-markierten Polyrotaxan **14** untersucht.

Im Fluoreszenzbild der Probe ④ erscheinen die positiv geladenen Polyrotaxanmoleküle **16** ausschließlich als kleine, rundliche Objekte. Ein großer Teil der Moleküle adsorbiert an das Deckglas, andere können frei beweglich im Bulk beobachtet werden. Vergleicht man das Fluoreszenzbild der Probe ④ mit dem des Polyrotaxans **14** in Probe ①, so ist optisch kein Unterschied feststellbar. Sowohl die Größe als auch das Bleichverhalten der Teilchen ist in beiden Fällen identisch. Demzufolge liegen die Polyrotaxane **16** in der Probelösung ④ ebenfalls als Einzelteilchen mit überwiegend knäueelförmiger Struktur vor (s. Kap. 7.2).

In der streptavidinhaltigen Probe ⑤ aggregieren die Polyrotaxanmoleküle **16**. So ist im Bulk ein großes, unstrukturiertes und stark fluoreszierendes Objekt mit einer Abmessung von etwa $110\ \mu\text{m} \times 18\ \mu\text{m}$ sichtbar (s. Abb. 7-8). Das umgebende Medium enthält kaum noch fluoreszierendes Material. Auch auf der Oberfläche des Deckglases sind nur wenig fluoreszierende Teilchen adsorbiert. Letzteres deutet auf eine Wechselwirkung der Polyrotaxanmoleküle **16** in Gegenwart von Streptavidin hin.

Das Kontrollexperiment ⑥ zeigt, daß das Fluorescein-markierte Polyrotaxan **14** in Gegenwart von Streptavidin keine Aggregate bildet. Die positiv geladenen Polyrotaxanmoleküle **14** erscheinen wie bei Probe ① ausschließlich als kleine, rundliche Objekte (s. Kap. 7.2). Die Aggregation der Polyrotaxane **16** in Probe ⑤ ist somit auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin zurückzuführen. Letzteres beweist die Bildung der Biotin-Fluorescein-markierten Polyrotaxane **16** ($0 < x \leq 0.2$). Da Biotinyl- β -Cyclodextrin **8** und Streptavidin fluoreszenz-inaktive Stoffe sind, kann eine Wechselwirkung zwischen freien Rezeptor- und Ligandmolekülen mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht detektiert werden.

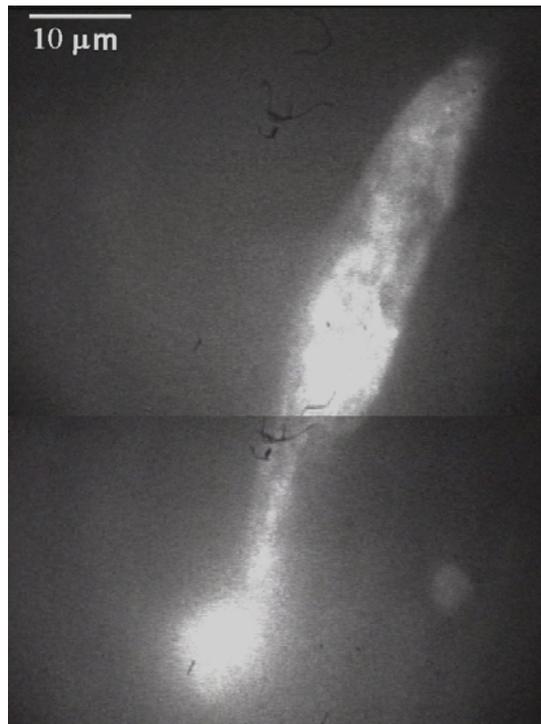


Abb. 7-8: Das Fluoreszenzbild des Polyrotaxans **16** in Gegenwart von Streptavidin im Bulk.

In Analogie zu den Arbeiten von Decher et al. sollte es möglich sein, Doppelschichten aus den biotinylierten Polyrotaxanen **16** und Streptavidin aufzubauen [69]. Aufgrund der Beweglichkeit der aufgefädelten Biotinyl- β -Cyclodextrinringe **8** entlang der Polymerachse ist eine optimale zweidimensionale Organisation der Streptavidinmoleküle zu erwarten. Die Packungsdichte innerhalb einer Schicht sollte vom Belegungsgrad des Polyrotaxans durch Biotinyl- β -Cyclodextrin **8** abhängen. Die Experimente hierzu konnten aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

7.3 Zusammenfassung

Zielsetzung war, die Struktur der Fluorescein-markierten Polyrotaxane **14** in Lösung zu untersuchen. Als Methode dazu kam die AFM und die Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz.

Mittels AFM ist es erstmals gelungen, einzelne Fluorescein-markierte Polyrotaxanmoleküle **14** auf einer Glimmeroberfläche abzubilden. Den Untersuchungen zufolge liegen die Polyrotaxane in verdünnter, wässriger Lösung als Einzelmoleküle vor. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Arbeiten von Cesari et al. [34], Decher [31], Müller und Engel [26].

Unter dem Fluoreszenzmikroskop sind die Fluorescein-markierten Polyrotaxane **14** in Form kleiner, rundlicher Objekte ($\varnothing \leq 1 \mu\text{m}$) sichtbar. Ihre einheitliche Form lässt

auf eine knäuelartige Struktur in Lösung schließen (vgl. Kap. 4.3). Eine Aggregation der Moleküle konnte nicht beobachtet werden. Zu dem gleichen Ergebnis führte bereits die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung der Polyrotaxane (s. Kap. 6.1).

Darüber hinaus wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie der Einfluß des Belegungsgrades auf die Struktur Fluorescein-markierter Polyrotaxane **15** untersucht. Es zeigte sich, daß im Grenzfall hoher Belegung eine Expansion einzelner Moleküle auftritt. Im Fluoreszenzbild erscheinen dann neben fluoreszierenden, rundlichen Objekten auch einzelne filamentöse Strukturen.

Die Bildung polymerer Ionenpaare aus Fluorescein-markierter Polyrotaxanen **14** und negativ geladenen Polyionen konnte ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Im Einzelfall führt die Assoziation der Gegenionen zu einer Expansion der Fluorescein-markierten Polyrotaxane. Diese Ionenpaare sind in Form fluoreszierender Filamente unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Die hohe Flexibilität der Filamente in Lösung läßt auf eine parallele Anordnung der Polyionen im Assoziat schließen. Untersuchungen zum Homoenergietransfer in Fluorescein-markierten Polyrotaxanen deuten ebenfalls darauf hin (s. Kap. 6.2). Eine Aggregation der Polyrotaxane wurde nicht beobachtet. Letzteres steht im Einklang mit einer Arbeit von Dautzenberg zur Assoziation von Polyelektrolyten in Lösung [42].

In einem weiteren Experiment konnte, durch Selbstorganisation von Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und Biotinyl- β -Cyclodextrin **8** das bifunktionelle Polyrotaxan **16** erzeugt werden. Die spezifische Bindung von Streptavidin an das biotinylierte Polyrotaxan wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Der Fluoreszenzfarbstoff diente dabei als optische Sonde für die Polyrotaxane.

8 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden wasserlösliche, fluoreszenzmarkierte Polyrotaxane synthetisiert und mittels abbildender Methoden als Einzelteilchen in Lösung sichtbar gemacht.

Zum Aufbau der fluoreszenzmarkierten Polyrotaxane wurden vier neue, einheitlich monosubstituierte Cyclodextrinbausteine hergestellt. Ausgehend vom β -Cyclodextrin **1b** erfolgte in drei Stufen die regioselektive Synthese des Monoamins **4**, welches als Schlüsselverbindung für die Synthese der Fluorescein-, Eosin-, Rhodamin- und Biotin-markierten β -Cyclodextrine **5-8** eingesetzt wurde. Es konnten effiziente Synthesewege erarbeitet werden, die eine Darstellung der Cyclodextrinbausteine im Grammaßstab und mit hoher Reinheit ermöglicht.

Als Polymerbausteine zum Aufbau wasserlöslicher, fluoreszenzmarkierter Polyrotaxane wurden die hochmolekularen Ionen_{10,6} Chloride **10-12** mit einem maximalen Polymerisationsgrad von $P_n = 123$ bei geringer Polydispersität von $Q = 1.2$ synthetisiert. Mittels Gelpermeationschromatographie konnten die Molmassen dieser Polyelektrolyte erstmals absolut bestimmt werden. Darüber hinaus wurden mittels Viskosimetrie und dynamischer Lichtstreuung Informationen über den Lösungszustand der Polymere in wässriger Lösung erhalten. Demnach liegen die Ionen_{10,6} Chloride **10-12** in salzhaltiger Lösung als flexible, knäueiförmige Einzelteilchen vor.

Der Einschluß von Ionen_{10,6} Chlorid **10** in Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** und Rhodaminyl- β -Cyclodextrin **7** wurde mittels Gelektrophorese untersucht. Von den drei Fluoreszenzfarbstoffen erwies sich insbesondere das Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** als geeigneter Baustein für den Aufbau wasserlöslicher Polyrotaxane. Da freie und aufgefädelt Ringe **5** anhand ihrer Wanderungsrichtung im elektrischen Feld unterscheidbar waren, konnte der Einschluß von Ionen_{10,6} Chlorid **10** in Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** sichtbar gemacht werden. Darüber hinaus ist es gelungen, die Struktur des Polyrotaxans **14** aufzuklären. Die Bindungsstellen von Ionen_{10,6} Chlorid **10** im Polyrotaxan **14** sind zu 10 % durch Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** belegt.

Außerdem konnten die Fluorescein-markierten Ionen_{10,6} Chloride **10-12** im elektrischen Feld nach der Molmasse getrennt werden. Dabei wurde eine reziproke Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität der Ionene von der Molmasse nachgewiesen. Es besteht somit die Möglichkeit, die Molmasse fraktionierter Ionene im Laborbetrieb zukünftig einfach und schnell anhand ihrer Laufstrecke im Elektrophoreseexperiment zu bestimmen.

Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** bildet aufgrund seiner höheren Hydrophilie keine Einschlußverbindung mit Ionen_{10,6} Chlorid **10**. Statt dessen konnte die Anlagerung von **6** an die Polymerkette nachgewiesen werden. Die Untersuchungen mit Rhodaminyl- β -Cyclodextrin **7** gaben keinen Hinweis auf eine Wechselwirkung mit Ionen_{10,6} Chlorid **10**.

Um Informationen über die Struktur der Fluorescein-markierten Polyrotaxanmoleküle **14** in verdünnter Lösung zu erhalten, wurden zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß freie und aufgefädelte Fluoresceinyl- β -Cyclodextrine **5** anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer unterscheidbar sind. Darüber hinaus wurden Informationen über die Orientierung der aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringe **5** erhalten. Im Polyrotaxan **14** sind die Fluoresceinylreste benachbarter Ringe **5** versetzt zueinander orientiert. Voraussetzung für Homoenergietransfer zwischen den aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringen **5** ist eine bevorzugt parallele Orientierung der Fluoresceinylreste. Letzteres konnte durch Assoziation von Natriumpolystyrolsulfonat an das fluoreszenzmarkierte Polyrotaxan **14** erzwungen werden. Unter diesen Bedingungen war erstmals Homoenergietransfer zwischen aufgefädelten Fluoresceinyl- β -Cyclodextrinringen **5** eines Polyrotaxans nachweisbar. Außerdem konnte mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen die intra- bzw. intermolekulare Selbstinclusion des reinen Fluoresceinyl- β -Cyclodextrins **5** zu stabilen Wirt-Gast-Konjugaten in Lösung nachgewiesen werden.

Mittels Rasterkraftmikroskopie ist es erstmals gelungen, Fluorescein-markierte Polyrotaxane **14** als Einzelteilchen auf einer Glimmroberfläche abzubilden. Die ausgemessenen Konturlängen der in Lösung adsorbierten Teilchen lagen zwischen 0.1-0.9 μm . Der berechnete Wert für die mittlere Konturlänge beträgt 0.3 μm . Unter dem Fluoreszenzmikroskop waren die Polyrotaxane **14** in Form kleiner, rundlicher Objekte ($\varnothing \leq 1 \mu\text{m}$) sichtbar. Diese konnten sowohl adsorbiert auf der Oberfläche des Deckglases als auch frei beweglich in Lösung beobachtet werden. Eine Aggregation der Moleküle war nicht nachweisbar. Dies steht in gutem Einklang mit der Gelpermeationschromatographie und der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung der Polyrotaxane **14**.

Aus Biotinyl- β -Cyclodextrin **8** und Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** wurde das bifunktionelle Polyrotaxan **14** hergestellt. Während der Fluoreszenzfarbstoff als optische Sonde für die Polyrotaxane eingesetzt wurde, diente der Biotinrest zur molekularen Erkennung von Streptavidin. Die spezifische Bindung von Biotin und Streptavidin konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Somit ist es gelungen, die erkennende Funktion von Biotin auf die supramolekulare Struktur zu übertragen. Letzteres eröffnet neue Wege zum Aufbau funktioneller Mono- und Multischichten, die beispielsweise in Sensoren Anwendung finden könnten.

9 Experimenteller Teil

9.1 Substanzen

α - und β -Cyclodextrin wurden von der Firma Consortium für elektrochemische Chemie (Wacker Chemie) in Pharmaqualität bezogen und für die Synthese bei 100°C im Vakuum getrocknet. Die Reinheit der Feststoffe betrug 99 %.

Die Feinchemikalien wurden in p.a.-Qualität von der Firma Aldrich bezogen und direkt eingesetzt. Die Natriumpolystyrolsulfonat Standards waren von der Firma Polymer Standards Service. Der Ionenaustauscher 45552 SERDOLIT® CWI wurde von der Firma Boehringer Ingelheim Bioproducts hergestellt. Für die Gelelektrophorese diente Agarose Routine der Firma Eurogentek.

Die chemischen Umsetzungen wurden unter Rückflußkühlung in Inertgasatmosphäre (Stickstoff) durchgeführt, die verwendeten Lösungsmittel destilliert und ggf. nach den üblichen Verfahren absolutiert. Die Trocknung der Produkte erfolgte im Hochvakuum, die Aufbewahrung im Exsikkator über Blaugel.

9.2 Methoden

Die **NMR-Spektren** wurden mit einem Spektrometer vom Typ AM 400 (^1H : 400.14 MHz, ^{13}C : 100.62 MHz) der Firma Bruker bzw. XL-300 (^1H : 299.969 MHz, ^{13}C : 75.436 MHz) der Firma Varian bei Raumtemperatur aufgenommen. Für die Messung der ^1H -NMR-Spektren wurden 10-20 mg Substanz in 1 mL Lösungsmittel gelöst, bei den ^{13}C -NMR-Spektren waren es 50-60 mg/mL. Die Lösungsmittelresonanzen dienten jeweils als interner Standard (^1H -NMR: D_2O 4.80 ppm, DMSO-d_6 2.49 ppm; ^{13}C -NMR: DMSO-d_6 39.50 ppm). Die Auswertung der Kernresonanzspektren erfolgte mit der Software Win Nuts der Firma Acorn.

Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) relativ zu Tetramethylsilan (TMS) bzw. dem Natriumsalz der 3-(Trimethylsilyl)propionsäure-2,2,3,3- d_4 angegeben. Die Protonen bzw. Kohlenstoffatome der Cyclodextrine und Cyclodextrinderivate sind mit 1, 2, 3,... gekennzeichnet. Resonanzen, die eine Verschiebung aufgrund der Substitution aufweisen, sind mit ' markiert. Die Nummerierung beginnt jeweils am anomeren Zentrum. Die Oligomethylengruppen der Polymere sind ausgehend von der quartären Ammoniumgruppe mit a, b, c... bzw. A, B, C... benannt. Me steht als Abkürzung für Methylgruppen. Liegt eine Verschiebung der Methylsignale aufgrund der Ausbildung einer Einschlußverbindung vor, sind die

Methylgruppen mit ' bzw. " markiert. Die Multiplizitäten in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind durch **s** für Singulett, **bs** für breites Singulett, **d** für Duplett, **dd** für Duplett vom Duplett, **t** für Triplett, **sh** für Signalhaufen und **m** für Multipllett angegeben.

Die **Infrarotspektren (IR)** wurden mit einem FT-IR-Spektrometer IFS 28 der Firma Bruker als diffuse Reflexionsspektren (DRIFT) aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur nach Verreiben der festen Proben mit Kaliumbromid. Die Auswertung der Daten wurde am Gerät mit der Standardsoftware des Herstellers oder am PC mit dem Programm Origin 2.9 der Firma Microcal Software Inc. durchgeführt.

Die **Massenspektren (MS)** wurden mit einem Massenspektrometer vom Typ Kratos MS 80RF am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz gemessen. Als Meßmethode kam die FAB- und MALDI-TOF Technik zur Anwendung. Für die FAB-Methode wurde die Probe in eine Thioglycerin-Matrix eingebettet, bei der Laser-desorption diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix.

Die **UV/VIS-Spektren** wurden mit einem Lambda 19 Spektrometer der Firma Perkin Elmer aufgenommen. Für Messungen bei Raumtemperatur kamen 1 cm-Küvetten aus Quarzglas Suprasil der Firma Hellma zum Einsatz. Die Auswertung der Daten erfolgte am Gerät mit der Standardsoftware des Herstellers oder am PC mit dem Programm Origin 2.9 der Firma Microcal Software Inc.

Der **pH-Wert** von Lösungen wurde mit einem pH-Meter vom Typ Delte 320 der Firma Mettler und einer Einstabglaselektrode U402-M6-S7/100 gemessen. Zur Eichung dienten Standardpufferlösungen der Firma Merck.

Die **Dünnschichtchromatographie (DC)** erfolgte auf Fertigfolien aus Kieselgel (ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄; Schichtdicke 0.25 mm) der Firma Marcherey-Nagel & Co. Die Probelösungen hatten eine Konzentration von 0.5-1.0 mg/mL. Als Standardlaufmittel kam ein Gemisch aus n-Butanol/Ethanol/Wasser I im Verhältnis 5:4:3 und II im Verhältnis 5:4:6 zum Einsatz. Anfärbereagens war eine 5%-ige ethanolische Schwefelsäure-Lösung. Durch Erhitzen mit Heißluft wurden die Substanzen sichtbar gemacht.

Die **Ionenaustauschchromatographie (IEC)** wurde mit dem Ionenaustauscher 45552 SERDOLIT[®] CWI der Firma Boehringer Ingelheim Bioproducts durchgeführt. Dabei kam eine Schott Glassäule von 30 cm Höhe und 1 cm Innendurchmesser mit integrierter Filterplatte (Porosität 3) zum Einsatz. Das Austauschmaterial aus Acrylatharz besitzt eine Kapazität von 10 Val/L.

Die **Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)** wurde bei Raumtemperatur mit einer HPLC-Pumpe vom Typ 300 C der Firma Gynkotheek durchgeführt. Für die Umkehrphasentrennung (RP-HPLC) dienten LiChro CART 250/4 HPLC-Kartuschen mit LiChrospher[®] 100 RP/18 Säulen der Firma Merck. Zur Detektion wurde ein Drehwertdetektor der Firma IBZ Meßtechnik sowie ein UV-Detektor vom Typ Soma S-3702 der Firma ERC verwendet. Die Aufgabe der Proben (1-2 mg/mL) erfolgte über ein Rheodyne-Einlaßventil (Volumen 20 µl). Als Lösungsmittel kam standardmäßig ein Gemisch aus Wasser/Acetonitril III im Verhältnis 9:1 mit einem Volumenanteil von 0.1 % Eisessig zum Einsatz. Dieses wurde zuvor mit einem Entgaser vom Typ Degasys DG-1300 der Firma Optilab entgast. Die Flußrate betrug 0.5 mL/min. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte am PC mit der Software Origin 2.9 der Firma Microcal Software Inc.

Die **Gelpermeationschromatographie (GPC)** wurde bei Raumtemperatur mit einer HPLC-Pumpe vom Typ 300 C der Firma Gynkotheek durchgeführt. Für die Normalphasentrennung diente eine HEMA Bio-Säule (1000 DEAE, 8 mm x 300 mm) der Firma Polymer Standards Service (PSS). Die Detektion erfolgte mit einem Drehwertdetektor der Firma IBZ Meßtechnik oder einem UV-Detektor vom Typ Soma S-3702 der Firma ERC. Die Probelösungen (2-4 mg/mL) wurden über ein Rheodyne-Einlaßventil (Volumen 50 µl) aufgegeben. Als Lösungsmittel kam standardmäßig ein Gemisch aus Wasser/Acetonitril im Verhältnis 9:1 mit einem Volumenanteil von 0.1 % Eisessig zur Anwendung. Dieses wurde zuvor mit einem Entgaser vom Typ Degasys DG-1300 der Firma Optilab entgast. Die Flußrate betrug 0.5 mL/min. Für die Auswertung der Meßdaten am PC wurde die Software Origin 2.9 der Firma Microcal Software Inc. verwendet.

Die GPC-Messungen zur Bestimmung der Molmasse von Ionen_{10,6} Chlorid (Kap. 4) wurden von der Firma Polymer Standards Service (PSS) mit einer SP Isochrom HPLC-Pumpe und einem Injektionssystem TSP AS3000 (Volumen 100 µl) durchgeführt. Für die Trennung wurden HEMA Bio-Säulen 100 und 1000 (10 µl, ID 8.0 mm x 300 mm) der Firma PSS eingesetzt. Die Detektion der Lichtstreuungssignale erfolgte in einem Winkelbereich von 10-160°. Dazu wurde ein DAWN-F MALLS Detektor mit Argon Ionen Laser (488 nm) verwendet, der mit einem Shodex Differentialrefrakto-

meter vom Typ RI 71 gekoppelt war. Die Viskosität wurde mit einem Viscotek H502 Differentialviskosimeter gemessen, das mit einem SP 8450 UV/VIS Detektor und dem Differentialrefraktometer verknüpft war. Die Konzentration der Probelösungen betrug etwa 5 mg/mL. Als Lösungsmittel diente eine 0.1 M wäßrige Natriumchlorid-Lösung, die einen Volumenanteil von 0.2 % Trifluoressigsäure enthielt. Die Analyse erfolgte bei 25°C und einer Flußrate von 1.0 mL/min. Die Auswertung der Daten wurde mit der Software WinGPC 4.00-7 der Firma PSS, Win Astra 4.50 von Wyatt Technology sowie der Software Origin 2.9 der Firma Microcal Software Inc. durchgeführt.

Die **Brechungssinkremente dn/dc** wurden mit einem Brice-Phönix-Differentialrefraktometer bei den Wellenlängen $\lambda = 546$ nm (grün) und $\lambda = 436$ nm (blau) im Konzentrationsbereich von 3-14 mg/mL bestimmt und mit Hilfe der Gleichung $dn/dc(\lambda) = a \cdot \lambda^{-2} + b$ interpoliert. Als Lösungsmittel diente 0.1 M Natriumchlorid-Lösung. Für den Brechungsindex des Lösungsmittels wurde der Wert für Wasser mit $n = 0.1339$ eingesetzt. Da die Gleichgewichtsdialyse erfahrungsgemäß mit einem Verlust an Polymermasse verbunden ist, was vor allem bei niedrigen Konzentrationen zu einem erheblichen Fehler bei der Bestimmung von dn/dc führt, wurde auf die Gleichgewichtsdialyse verzichtet. Für das Ionen_{10,6} Chlorid **10** ergab sich ein Brechungssinkrement von 0.159 mL/g und für das Polyrotaxan **14** eines von 0.144 mL/g bei $\lambda = 488$ nm.

Die **Viskositätsmessungen** wurden mit einem Ubbelohde-Durchflußviskosimeter vom Typ 50101 (Kapillare 0a) der Firma Schott in einem Konzentrationsbereich von 3-21 g/L bei 25°C durchgeführt. Als Lösungsmittel diente eine wäßrige 0.1 M Natriumchlorid- bzw. 0.4 M Kaliumbromid-Lösung.

Die **Dialyse** zur Reinigung von Polymeren und Polyrotaxanen erfolgte durch ein Hohlfasermodule vom Typ ALWALL GFE 12 der Firma Gambro GmbH. Lösungsmittel und Polymerlösung wurden im Gegenstromprinzip durch das Hohlfasermodule geleitet. Dazu wurde eine Peristaltikpumpe der Firma Masterflex mit Pumpenschläuchen vom Typ Tygon 1/16 x 3/16 der Firma Bender und Hohbein eingesetzt. Die Pumpenleistung betrug 450 mL/h.

Die **Dynamische Lichtstreuung (DLS)** wurde an einem Gerät der Firma Peters-ALV in einem Streuwinkelbereich von 30-150° durchgeführt. Als Lichtquelle diente ein He/Ne-Laser (50 mW, 632.8 nm). Die Meßküvetten (Volumen ~2.0 mL) aus Quarz-

glas der Firma Hellma wurden vor der Benutzung mit Aceton in einer Spülanlage gereinigt und von Staubpartikeln befreit. Die Herstellung der Probelösungen erfolgte unter staubfreien Bedingungen in einer Flowbox 8580 der Firma Köttermann. Dazu wurde die Stammlösung (2 g/L) der Probe durch einen 0.45 µm Spritzenvorsatzfilter (Nylon-Membran) der Firma Roth in die Küvetten filtriert. Die Konzentrationen wurden durch Zugabe einer staubfrei filtrierten 0.1 M wäßrigen Natriumchlorid-Lösung direkt in der Meßküvette eingestellt. Vor jeder Messung wurden die Proben 15 Minuten lang in der Meßzelle der Lichtstreuanlage temperiert. Der verwendete Kryostat war vom Typ Fisons F3 der Firma Haake C. Als Indexmatchingsubstanz diente Toluol.

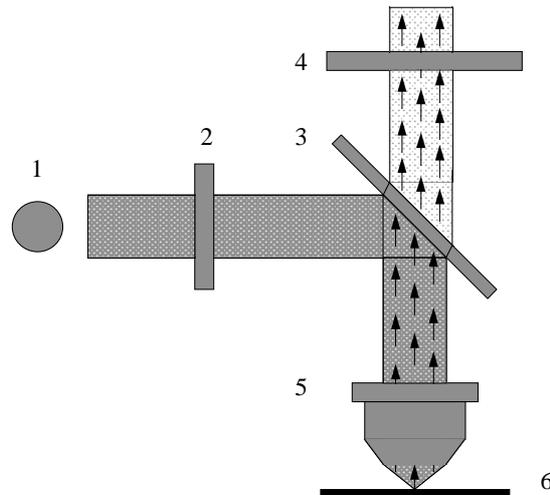
Die **Gelelektrophorese** erfolgte in einer horizontalen Flachbettkammer (12.5 x 13.5 cm²) der Firma Roth, die an ein Gleichspannungsnetzteil Consort E312 der Firma CE angeschlossen war. Das Gel wurde aus einem TRIS-Acetat-EDTA-Standardpuffer (1 x TAE) mit 1.0-1.4 Gew.-% Agarose Routine der Firma Eurogentec in Seraing/ Belgien hergestellt und in der Elektrophoresekammer mit dieser Pufferlösung 1 mm überschichtet. Auf der Mittellinie der Gelplatten waren Geltaschen eingelassen, in welche die Probelösungen pipettiert wurden. Die Präparation der Proben und die Herstellung des Puffers sind in Kap. 9.4 beschrieben. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 60-70 V und einem Strom von 40-46 mA.

Zur Dokumentation wurden die Gele nach einer Laufzeit von 30, 60, 90 bzw. 120 Minuten mit Hilfe einer Kamera vom Typ Leica M2-1143821 der Firma Leitz GmbH in einer Dunkelkammer fotografiert. Das verwendete Objektiv war vom Typ Fotocar 1:45/50. Das Anregungslicht wurde von unten durch das Gel zur Kamera geleitet. Für die Abbildung der Gelelektropherogramme fluoreszenzmarkierter Proben waren vor der Anregungslichtquelle und dem Objektiv der Kamera Fluoreszenzfilter der Firma L.O.T.-Oriol GmbH angebracht, die gewährleisten, daß das Bild nur durch das Emissionslicht des Fluorophors erzeugt wird. Als Emissionsfilter wurde für Fluorescein ein 530 nm und für Eosin und Rhodamin ein 590 nm Glasfilter eingesetzt. Die Anregungswellenlänge wurde durch eine Kombination aus Kantenfiltern und Blaufilter bestimmt (Fluorescein \leq 500 nm, Eosin und Rhodamin \leq 550 nm). Einzelne Bilder wurden im Rechenzentrum der Universität Karlsruhe digitalisiert. Die Auflösung betrug 822 dpi.

Die **zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen** wurden in Kooperation mit Prof. Dr. A. Braun und PD Dr. Bossmann am Engler-Bunte Institut der Universität Karlsruhe durchgeführt. Dazu wurde eine Single-Photon-Counting-Apparatur vom Typ EAI/FL900CDT und EAI/FS900CDT der Firma Edinburgh Analytical Instruments

eingesetzt. Die Anregung erfolgte mit einer Nanosekunden Blitzlichtlampe nF900, die mit einer Wechselspannung von 5000-40000 Hz gepulst wurde. Unter optimierten Bedingungen können so 10^{10} Photonen je Wechselspannungsperiode ausgesendet werden. Die Gittermonochromatoren der Single-Photon-Counting-Anlage wurden auf eine Extinktion von 333 nm und eine Emissionswellenlänge von 550 nm eingestellt, um den Einfluß von Streulicht auf die Fluoreszenzmessung zu eliminieren. Für die Messung wurden Küvetten aus Quarzglas der Firma Hellma verwendet. Vor der Messung wurden die Proben 15 Minuten lang in der Meßzelle der Single-Photon-Counting-Anlage auf 30°C temperiert. Die Fluoreszenz wurde senkrecht zur Lichtenregung gemessen und mit Hilfe eines gekühlten Si-Detektors (-30°C) in einem Zeitfenster von 0-100 ns analysiert. Das Minimum der zeitlichen Auflösung lag bei 110 ps. Die resultierenden Fluoreszenzabklingkurven wurden nach Subtraktion des Referenzsignals (Lampenimpuls) mit der Software des Herstellers iterativ am Gerät ausgewertet.

Die **Fluoreszenzmikroskopie (FM)** wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Sackmann am Lehrstuhl für Biophysik der TU München in Zusammenarbeit mit M. Dichtl durchgeführt. Dazu wurde ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 10 der Firma Zeiss verwendet. Als Anregungslichtquelle diente eine Hochdruck-Quecksilberlampe HBO 100 **1**. Das Mikroskop war mit einem Fluoreszenzschieber für Fluorescein ausgestattet, der aus einem Anregungsfilter (450-470 nm) **2**, einem dichroitischen Filter (510 nm) **3** und einem Emissionsfilter (520 nm) **4** besteht. So konnte gewährleistet werden, daß das Anregungslicht die Emission des Fluorophors (\uparrow) in der Probe **6** nicht überdeckt und ein mikroskopisches Bild mit dunklem Hintergrund und optimalem Kontrast entsteht (Schema 9-1). Als Objektiv wurde ein hochauflösendes Zeiss-Plan-Acromat 63x/1,40 Öl-Immersionsobjektiv **5** eingesetzt. Das Auflösungsvermögen des Fluoreszenzmikroskops betrug 0.3 μm und die Schärfentiefe 30 μm . Die Präparation der untersuchten Proben ist in Kap. 9.5 beschrieben.



Schema 9-1: Der Strahlengang eines Fluoreszenzmikroskops mit Aufsichtbeleuchtung.

Für die digitale Bilddokumentation war das Fluoreszenzmikroskop mit einer SIT-Kamera C2400 der Firma Hamamatsu gekoppelt. Der betrachtete Bildausschnitt betrug $100 \times 67.6 \mu\text{m}^2$. Die Kamera war wiederum an einen S-VHS Videorekorder angeschlossen. Wegen der hohen Bildqualität der S-VHS-Technik konnte ein Verlust der mikroskopischen Auflösung weitgehend verhindert werden. Einzelne Standbilder und Sequenzen des Videofilms wurden im Rechenzentrum der Universität Karlsruhe digitalisiert.

Die **Rasterkraftmikroskopie (AFM)** wurde von Frau C. M. Kacher aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Sackmann am Lehrstuhl für Biophysik der TU München durchgeführt. Es wurde ein Kraftmikroskop NanoScope[®] IIIa der Firma Digital Instruments, Inc. und eine Spitze vom Typ DI-oriented twin dip ($\varnothing \approx 20 \text{ nm}$) verwendet. Das Auflösungsvermögen des Kraftmikroskops betrug lateral etwa 1 nm und vertikal 0.1 nm . Die Funktionsweise ist in Kapitel 7.1 beschrieben.

Die Polyrotaxanprobe **14** wurde im Tapping-Mode bei einer Auflagekraft von 380 pN vermessen. Die Erzeugung des Höhenbildes erfolgte mit Hilfe eines $J-150 \mu\text{m}$ Scanners. Die Scanrate betrug 3 Hz . Zur Auswertung des Experiments wurden am PC die Höhen und Längen der auf Glimmer adsorbierten Polyrotaxanteilchen ausgemessen. Zusätzlich zum Höhenbild wurde das Elastizitätsbild der Probe aufgenommen. Der dazu eingesetzte Lock-in-Verstärker war vom Typ EG&G 5209.

Probenpräparation: Von der Polyrotaxanlösung **14** wird eine Konzentration von 3.85 mol/L bezogen auf das Ionen_{10,6} Chlorid **10** hergestellt und 40 s lang auf Glimmer adsorbiert. Anschließend spült man die Glimmeroberfläche mit dem Lösungsmittel ab und betrachtet sie in Lösung unter dem Kraftmikroskop. Als Lösungsmittel diente eine wäßrige 0.01 M NH₄OH-Lösung, die mit HOAc auf pH = 8.0 eingestellt wurde.

9.3 Synthesen

Mono-(6-O-(*p*-toluylsulfonyl)- β -cyclodextrin **2**

22.0 g (19.4 mmol) wasserfreies β -Cyclodextrin **1b** werden unter Rühren mit 170 mL Pyridin versetzt und langsam im Wasserbad auf 40°C erwärmt. Die Suspension wird solange gerührt, bis sich eine klare, farblose Lösung gebildet hat. Dann tropft man innerhalb 1 h eine Lösung aus 3.5 g (18.4 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und 80 mL Pyridin hinzu und läßt 2 d bei Raumtemperatur ohne Rühren reagieren. Anschließend destilliert man das Lösungsmittel im Vakuum (95 mbar → 40 mbar, 60°C) über eine 15 cm lange Vigreux-Kolonne ab, bis ein oranger, zähflüssiger Rückstand vorliegt. Zur Entfernung der Lösungsmittelreste wird mehrmals mit Wasser als Schlepper weiter destilliert (300 mbar → 260 mbar, 60°C). Die Bildung einer weißen, stark schäumenden Suspension zeigt das Ende der Trennung an. Durch Gefrierdrying erhält man einen weißen Feststoff (29.1 g, Löslichkeit in Wasser ~ 5 g/L), der aufgrund seiner porösen Struktur gut aufgearbeitet werden kann:

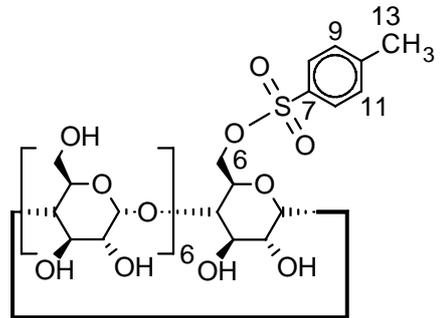
Zur Abtrennung von β -Cyclodextrin und Pyridiniumsalzen löst man das Rohprodukt bei 60°C in 500 mL einer Mischung aus Wasser/*i*-Propanol im Verhältnis 8:2. Dann läßt man bei Raumtemperatur rühren und über Nacht auskristallisieren. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und für die weitere Aufarbeitung in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Zur Abtrennung von Nebenprodukten mit höherem Substitutionsgrad löst man den vorgereinigten Feststoff (8.6 g) in 20 mL *N,N*-Dimethylacetamid und fällt das Produkt tropfenweise in 800 mL Aceton aus. Die Suspension wird 1 d gerührt und der Niederschlag anschließend filtriert. Nach Waschen mit Aceton wird der Rückstand im Hochvakuum bei 60°C getrocknet.

Die Reinigungsschritte werden mittels DC kontrolliert und ggf. wiederholt. Durch den Einschluß von β -Cyclodextrin in **2** ist im HPL-Chromatogramm des isolierten, pulverigen Feststoffs stets ein Anteil von 10-15 % β -Cyclodextrin **1b** nachweisbar.

Dieser beeinträchtigt die folgenden Reaktionen nicht und wird bei der Synthese des Mono-(6-amino-6-desoxy)- β -cyclodextrins **4** vollständig abgetrennt.

Ausbeute: 7.8 g (6.1 mmol), 33 % d. Th.



DC $R_f = 0.55$, LM I

HPLC $V_e/mL = 25.2$, LM III

IR (KBr) $\nu/cm^{-1} = 3344.8$ (O-H), 2930.0 (C-H), 1626.6 (C=C), 1413.1, 1364.3 (R-SO₂-O-R'), 1189.7-945.3 (C-O), 758.2, 705.9, 667.2

¹H-NMR δ/ppm (DMSO-d₆) = 2.43 (s, 3H, H-13), 7.44 (d, 2H, H-9,11, J = 8.4 Hz), 7.75 (d, 2H, H-8,12, J = 8.4 Hz), 3.25-3.41 (m, 14H, H-2,4), 3.42-3.74 (m, 28H, H-3,5,6), 4.10-4.58 (m, 6H, OH-6), 4.77 (d, 2H, H-1, J = 3.4 Hz), 4.84 (t, 5H, H-1, J = 3.4 Hz), 5.60-5.90 (m, 14H, OH-2,3)

¹³C-NMR δ/ppm (DMSO-d₆) = 21.07 (C-13), 59.32 (C-6'), 59.75 (C-6), 72.27 (C-5), 72.52 (C-2), 72.90 (C-3), 81.37 (C-4), 101.12 (C-1'), 101.78 (C-1), 127.44 (C-9,11), 129.75 (C-8,12), 132.50 (C-10), 144.66 (C-7)

MS FAB+ $m/z_{gef.} = 1289.2$ [M+1]⁺
 $m/z_{ber.} = 1288.4$ [M]⁺ für C₄₉H₇₆O₃₇S

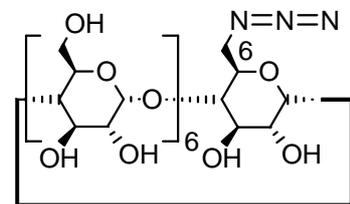
Mono-(6-azido-6-desoxy)- β -cyclodextrin **3**

Eine Suspension aus 7.8 g (6.1 mmol) Monotosylat **2** und 95 mL Wasser wird mit 7.8 g (120.0 mmol) Natriumazid versetzt und 4 h im Ölbad bei 100°C gerührt. Der Reaktionsumsatz wird mittels DC und IR-Spektroskopie kontrolliert. Anschließend kühlt man die Reaktionsmischung im Eisbad rasch ab, fügt 95 mL Aceton hinzu und läßt sie 20 h bei Raumtemperatur stehen. Der ausgefallene weiße Niederschlag wird abgesaugt, mit heißem Ethanol gewaschen und im Hochvakuum bei 60°C getrocknet.

Das Filtrat wird auf 50 mL eingeeengt und mit 8 mL 1,1,2,2-Tetrachlorethan versetzt. Nach 3 h Rühren filtriert man den Niederschlag ab und wäscht ihn mit heißem Ethanol. Zur Freisetzung des Produkts aus dem Tetrachlorethan-Komplex wird die Nachfällung in 50 mL Wasser suspendiert und durch Gefriertrocknung von Lösungsmittelresten befreit.

Zuletzt werden die weißen Niederschläge (5.7 g, Löslichkeit in Wasser ≥ 14 g/L.) vereinigt, aus Wasser umkristallisiert und im Hochvakuum bei 60°C getrocknet. Im kristallinen Produkt bleibt der Anteil von 10-15 % β -Cyclodextrin **1b** aus **2** enthalten. Die vollständige Abtrennung von **1b** erfolgt auf der Stufe des Mono-(6-amino-6-desoxy)- β -cyclodextrins **4**.

Ausbeute: 4.0 g (3.5 mmol), 57 % d. Th.



DC $R_f = 0.49$, LM I

HPLC $V_R/mL = 5.6$, LM III

IR (KBr) $\nu/cm^{-1} = 3339.5$ (O-H), 2929.2 (C-H), 2104.7 (org. Azid), 1643.1, 1412.4, 1366.2, 1299.2, 1155.6-944.9 (C-O), 758.1, 705.3, 577.8, 529.5

1H -NMR δ/ppm (DMSO- d_6) = 3.20-3.45 (m, 14H, H-2,4), 3.47-3.80 (m, 28H, H-3,5,6), 4.42-4.60 (m, 6H, OH-6), 4.82 (d, 6H, H-1, $J = 2.9$ Hz), 4.87 (d, 1H, H-1', $J = 2.9$ Hz), 5.60-5.88 (m, 14H, OH-2,3)

^{13}C -NMR δ/ppm (DMSO- d_6) = 59.75 (C-6), 59.98 (C-6'), 72.25 (C-5), 72.67 (C-2), 72.91 (C-3), 81.37 (C-4), 101.43 (C-1'), 101.79 (C-1)

MS FAB+ $m/z_{gef.} = 1159.4$ $[M]^+$, 1182.0 $[M+Na]^+$

$m/z_{ber.} = 1159.4$ $[M]^+$ für $C_{42}H_{69}N_3O_{34}$

Mono-(6-amino-6-desoxy)- β -cyclodextrin **4**

In einem 1 L Dreihalskolben mit Serumkappe, Abgang mit Hahn und Anschluß zur Hydrierapparatur, wird eine Suspension aus 750 mg Pd/C-Katalysator (10 % Pd,

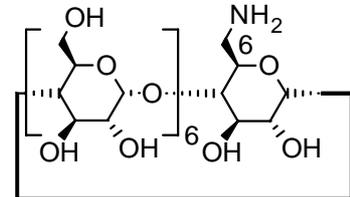
oxidische Form) und 350 mL Wasser vorgelegt, unter Rühren im Vakuum entgast und der Kolben anschließend mit Wasserstoff gespült. Zur Aktivierung des Katalysators läßt man die Apparatur über Nacht unter einem Wasserstoffdruck von 1 m Wasserstoffsäule stehen. Eine klare, farblose Lösung aus 2.5 g (2.2 mmol) des Monoazids **3** und 150 mL Wasser wird in einem Schlenkkolben mit Serumkappe entgast und mit Stickstoff belüftet. Die Lösung wird mit einer Spritze aufgenommen und über die Serumkappe in die Suspension des Katalysators gespritzt. Danach läßt man 24 h bei Raumtemperatur unter Rühren und einem Druck von 1 m Wasserstoffsäule hydrieren. Die Kontrolle des Reaktionsumsatzes erfolgt mittels DC und IR-Spektroskopie.

Anschließend filtriert man den Katalysator ab, engt die Lösung am Rotavapor ein und entfernt das restliche Lösungsmittel durch Gefriertrocknung. Im HPL-Chromatogramm des isolierten Feststoffs, ist ein Anteil von 10-15 % β -Cyclodextrin **1b** aus **3** nachweisbar. Die Ausbeute des weißen pulverigen Rohprodukts betrug 2.4 g (2.1 mmol, 98 % d. Th.).

Zur Abtrennung von β -Cyclodextrin **1b** wird das Rohprodukt durch Ionenaustauschchromatographie (IEC) gereinigt. Dazu werden 5 g des Ionenaustauschers 45552 SERDOLIT[®] CWI nacheinander mit je 50 mL einer 1 %-igen NH_4OH -Lösung, Wasser und einer 0.1 %-igen HOAc -Lösung gewaschen. Die Waschlösung wird nach jedem Reinigungsschritt abdekantiert und verworfen. Das protonierte Ionenaustauschmaterial wird 8 cm hoch in eine Schott Glassäule von 30 cm Höhe und 1 cm Innendurchmesser mit integrierter Filterplatte (Porösität 3) eingefüllt. 175 mg (0.15 mmol) des β -Cyclodextrin enthaltenden Monoamins **4** werden in 4-8 mL der 0.1 %-igen HOAc -Lösung (pH = 5.6) gelöst und auf die Säule gegeben. Nach 1 h läßt man die Lösung langsam durch die Säule laufen, sammelt das Eluat und gibt es erneut auf. Dann wird nacheinander mit 250 mL Wasser, 20 mL 0.1 %-iger NH_4OH -Lösung und 250 mL 1.0 %-iger NH_4OH -Lösung eluiert. Während der IEC wird der pH-Wert mittels Universalindikatorpapier kontrolliert und das Eluat in Fraktionen mit einem pH-Wert von 5-7, 7-8 und 8-14 gesammelt. Die saure und die wäßrige Fraktion enthält ausschließlich natives β -Cyclodextrin. Unmittelbar vor dem Umschlag von pH 7 nach pH 8 werden **1b** und **4** nebeneinander eluiert. Die ammoniakalische Fraktion (pH = 14) enthält das reine Monoamin **4**. Der Nachweis von β -Cyclodextrin **1b** erfolgt durch DC und RP-HPLC-Analyse. Der Gehalt an **4** kann mit Hilfe des Nachweisreagens Ninhydrin oder durch RP-HPLC kontrolliert werden. Die ammoniakalische Fraktion wird durch einen 0.45 μm Membranfilter filtriert und das reine, pulverförmige Produkt (151 mg, 0.13 mmol, 86 Gew.-%) durch Gefriertrocknung isoliert. Waschen des Säulenmaterials in 1.0 %-iger NH_4OH -Lösung, Wasser, 1.0 %-iger und 0.1 %-iger HOAc -Lösung regeneriert den Ionenaustauscher, und die Reinigungsschritte können wiederholt werden.

Umkristallisation aus Wasser liefert das kristalline Produkt, führt aber aufgrund der guten Löslichkeit des Monoamins **4** in Wasser (~ 71 g/L) zu einem erheblichen Substanzverlust von 50-60 %. Daher wurde i.a. auf die Umkristallisation verzichtet.

Ausbeute: 2.1 g (1.8 mmol), 86 % d. Th.¹



DC $R_f = 0.39$, LM II mit 0.1 %-iger HOAc

HPLC $V_R/mL = 4.3$, LM III

IR (KBr) $\nu/cm^{-1} = 3345.9$ (O-H), 2927.5 (C-H), 1646.9 (N-H), 1457.7, 1418.1, 1363.4, 1155.2-946.3 (C-O), 756.9, 707.5, 609.4, 580.4, 534.4

¹H-NMR δ/ppm (DMSO- d_6) = 3.30-3.60 (m, 14H, H-2,4), 3.62-3.80 (m, 28H, H-3,5,6), 4.38-4.62 (d, 6H, OH-6), 4.96 (bs, 6H, H-1), 4.98 (d, 1H, H-1'), 5.60-5.88 (m, 14H, OH-2,3)

¹³C-NMR δ/ppm (DMSO- d_6) = 59.72 (C-6), 71.86 (C-5), 72.21 (C-2), 72.83 (C-3), 81.33 (C-4), 101.50 (C-1'), 101.76 (C-1)

MS FAB+ $m/z_{gef.} = 1134.5$ [M]⁺
 $m/z_{ber.} = 1134.4$ [M]⁺ für $C_{42}H_{71}NO_{34}$

N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*m*-carboxyfluoresceinyl)-thioharnstoff **5**

300 mg (0.27 mmol) des Monoamins **4** werden in 6 mL Pyridin gelöst und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann tropft man eine orange Lösung aus 210 mg (0.54 mmol) Fluoresceinisothiocyanat (Isomer I) in 6 mL Pyridin hinzu, erwärmt auf 60°C und läßt weitere 3 h rühren. Der Reaktionsumsatz wird mittels RP-HPLC kontrolliert. Von der gelben Reaktionslösung wird das Lösungsmittel im Vakuum (95 mbar → 40 mbar, 60°C) bis fast zur Trockne abdestilliert. Anschließend wird mit Wasser als Schlepper weiter destilliert (300 mbar → 260 mbar, 60°C) und der Lösungsmittelrest

¹ Die Berechnung der Ausbeute erfolgte unter der Annahme, daß 14 Gew.-% β -Cyclodextrin **1b** im Mono-(6-amino-6-desoxy)- β -cyclodextrin **4** enthalten waren.

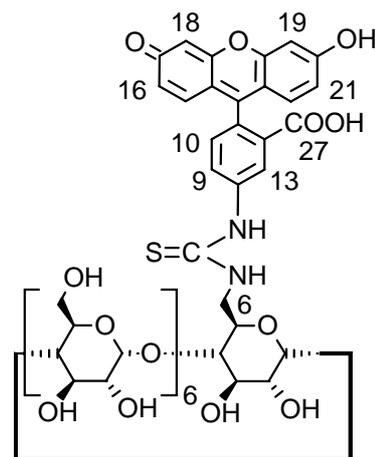
mittels Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt (501 mg) wird als feiner, orangefarbener Feststoff gewonnen und wie folgt aufgearbeitet:

Zur Abtrennung von überschüssigem Fluoresceinisothiocyanat löst man den vorge reinigten Feststoff in 3.3 mL N,N-Dimethylacetamid und fällt das Produkt durch Eintropfen in 33 mL Aceton aus. Die Suspension wird 1 d bei Raumtemperatur gerührt und der Niederschlag anschließend über eine Schott Glasfilternutsche (0.45 µm Membranfilter) filtriert. Nach Waschen mit Aceton wird der Rückstand im Hochvakuum bei 60°C getrocknet.

Um komplex gebundenes N,N-Dimethylacetamid aus dem Produkt zu entfernen, wird der Feststoff in reichlich Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und über Nacht im Hochvakuum bei 60°C nachgetrocknet. Man erhält ein feinpulvriges, orangefarbenes Produkt.

Die Reinigungsschritte werden mittels DC, RP-HPLC und ¹H-NMR-Spektroskopie kontrolliert und ggf. wiederholt.

Ausbeute: 338 mg (0.22 mmol), 84 % d. Th.



DC	$R_f = 0.70$, LM II mit 0.1 %-iger HOAc
UV/VIS	$\lambda(\epsilon) = 493 \text{ nm}$ (0.1 M NaOH, HOAc, pH 8.0)
IR (KBr)	$\nu/\text{cm}^{-1} = 3307.3$ (O-H), 2930.4 (C-H), 1746.5 (C-O Lacton), 1613.9 (C=C), 1539.9, 1504.9, 1453.5, 1402.5, 1365.0, 1328.5, 1258.8, 1154.0-944.9 (C-O), 850.2, 592.9
¹H-NMR	δ/ppm (DMSO- d_6) = 3.10-3.44 (m, 14H, H-2,4), 3.50-3.78 (m, 28H, H-3,5,6), 4.23-4.65 (m, 6H, OH-6), 4.83 (d, 6H, H-1, $J = 2.9 \text{ Hz}$), 4.90 (bs, 1H, H-1'), 5.55-6.00 (m, 14H, OH-2,3), 6.45-6.72 (m, 6H, H-Xanthen), 7.18 (d, 1H, H-10, $J = 7.9 \text{ Hz}$), 7.78 (d, 1H, H-9, $J = 7.4 \text{ Hz}$), 7.90 (bs, 1H, H-13), 10.12 (bs, 2H, OH-20,27)

- ¹³C-NMR** δ /ppm (DMSO-d₆) = 59.75 (C-6), 71.87 (C-5), 72.26 (C-2), 72.89 (C-3), 81.41 (C-4), 101.80-102.10 (C-1,19,18), 109.58 (C-23,24), 112.45 (C-16,21), 126.30 (C-12), 127.10 (C-13), 128.95 (C-15,10,22), 131.00 (C-9), 141.31 (C-11), 151.72 (C-25,26), 159.31 (C-17,20), 168.22, 169.45 (C-27)
- MS FAB+** $m/z_{\text{gef.}} = 1525.2 [M+1]^+$
- MALDI** $m/z_{\text{gef.}} = 1546.6 [M+Na]^+, 1563.3 [M+K]^+$
- $m/z_{\text{ber.}} = 1523.4 [M]^+$ für C₆₃H₈₂N₂O₃₉S

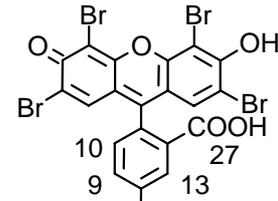
N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*m*-carboxyeosinyl)-thioharnstoff 6

161,5 mg (0.14 mmol) des Monoamins **4** werden in 4 mL Pyridin gelöst und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann tropft man eine rote Lösung aus 100 mg (0.14 mmol) Eosinisothiocyanat (Isomer I) und 3 mL Pyridin hinzu, erwärmt auf 60°C und läßt weitere 10 h rühren. Der Reaktionsumsatz wird mittels RP-HPLC kontrolliert. Von der roten Reaktionslösung wird das Lösungsmittel im Vakuum (95 mbar → 40 mbar, 60°C) bis fast zur Trockne abdestilliert, anschließend mit Wasser als Schlepper weiterdestilliert (300 mbar → 260 mbar, 60°C) und der Lösungsmittelrest durch Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt (236 mg) wird als feiner, roter Feststoff gewonnen und wie folgt aufgearbeitet:

Zur Abtrennung von überschüssigem Eosinisothiocyanat löst man den vorgereinigten in 1.5 mL N,N-Dimethylacetamid und fällt das Produkt durch Eintropfen in 15 mL Aceton aus. Die Suspension wird 1 d bei Raumtemperatur gerührt und der rote Niederschlag über eine Glasfilternutsche (0.45 µm Membranfilter) filtriert. Der Rückstand wird mit Aceton gewaschen und im Hochvakuum bei 60°C getrocknet.

Um komplex gebundenes N,N-Dimethylacetamid aus dem Produkt zu entfernen, wird der Feststoff in reichlich Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und über Nacht im Hochvakuum bei 60°C nachgetrocknet. Man erhält ein feinpulvriges, rotes Produkt.

Die Reinigungsschritte werden mittels DC, RP-HPLC und ¹H-NMR-Spektroskopie kontrolliert und ggf. wiederholt.



Ausbeute: 210 mg (0.11 mmol), 81 % d. Th.

- DC** $R_f = 0.70$, LM II mit 0.1 %-iger HOAc
- UV/VIS** $\lambda(\epsilon) = 520$ nm (0.1 M NaOH, HOAc, pH 8.0)
- IR (KBr)** $\nu/\text{cm}^{-1} = 3306.4$ (O-H), 2929.7 (C-H), 1757.0 (C-O Lacton), 1699.0 (O-H Carbonsäure), 1615.0 (C=C), 1557.1 (C=C), 1498.9, 1459.6, 1419.3, 1349.4, 1153.8-944.9 (C-O), 576.3
- $^1\text{H-NMR}$** δ/ppm (DMSO- d_6) = 3.20-3.50 (m, 14H, H-2,4), 3.52-3.80 (m, 28H, H-3,5,6), 4.30-4.70 (bs, 6H, OH-6), 4.83 (bs, 6H, H-1), 4.91 (bs, 1H, H-1'), 5.72 (bs, 14H, OH-2,3), 6.97-7.22 (m, 6H, H-Xanthen), 7.36 (d, 1H, H-10, $J = 7.8$ Hz), 7.92 (bs, 1H, H-9), 8.04 (bs, 1H, H-13), 10.89 (bs, 2H, OH-20,27)
- $^{13}\text{C-NMR}$** δ/ppm (DMSO- d_6) = 59.59 (C-6), 71.83 (C-5), 72.34 (C-2), 72.90 (C-3), 81.41 (C-4), 99.26, 101.80-102.10 (C-1,18,19), 109.68 (C-21), 118.17 (C-23,24), 127.37 (C-12), 128.90-129.20 (C-8,13,10), 131.30 (C-16,21), 152.71 (C-26,25), 167.97 (C-14), 169.51 (C-27), 180.30 (C-17)
- MS FAB+** $m/z_{\text{gef.}} = 1863.4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$
- MALDI** $m/z_{\text{gef.}} = 1863.1$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$
- $m/z_{\text{ber.}} = 1839.0$ $[\text{M}]^+$ für $\text{C}_{63}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_{36}\text{S}_1\text{Br}_4$

N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*p/m*-carboxyrhodaminyl)-thioharnstoff 7

100 mg (0.09 mmol) des Monoamins **4** werden in 3 mL Pyridin gelöst und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann tropft man eine violette Lösung aus 118 mg (0.22 mmol) Rhodaminisothiocyanat (Isomerengemisch I/II) und 3 mL Pyridin hinzu,

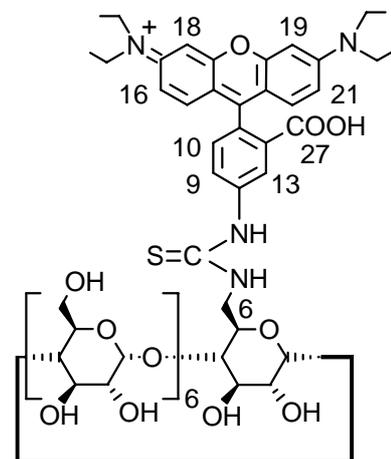
erwärmt auf 60°C und läßt weitere 24 h rühren. Der Reaktionsumsatz wird mittels RP-HPLC kontrolliert. Von der violetten Reaktionslösung wird das Lösungsmittel im Vakuum (95 mbar → 40 mbar, 60°C) bis fast zur Trockne abdestilliert, dann mit Wasser als Schlepper weiter destilliert (300 mbar → 260 mbar, 60°C) und der Lösungsmittelrest durch Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt (204 mg) wird als feiner, violetter Feststoff gewonnen und wie folgt aufgearbeitet:

Zur Abtrennung von überschüssigem Monoamin **4** und Rhodaminisothiocyanat löst man den vorgereinigten Feststoff in 1.5 mL N,N-Dimethylacetamid und fällt das Produkt durch Eintropfen in 15 mL einer Mischung aus Aceton und Wasser im Verhältnis 9:1 aus. Die Suspension wird 1 d bei Raumtemperatur gerührt und der violette Niederschlag anschließend über eine Glasfilternutsche (0.45 µm Membranfilter) filtriert. Nach Waschen mit Aceton wird der Rückstand im Hochvakuum bei 60°C getrocknet.

Um komplex gebundenes N,N-Dimethylacetamid aus dem Produkt zu entfernen, wird der Feststoff fein verrieben, in reichlich Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und über Nacht im Hochvakuum bei 60°C nachgetrocknet. Man erhält ein feinpulvriges, violettes Produkt erhalten.

Die Reinigungsschritte werden mittels DC, RP-HPLC und ¹H-NMR-Spektroskopie kontrolliert und ggf. wiederholt.

Ausbeute: 94 mg (0.06 mmol), 64 % d. Th.



DC $R_f = 0.62, 0.57$, LM II mit 0.1 %-iger HOAc

UV/VIS $\lambda(\epsilon) = 550 \text{ nm}$ (0.1 M NaOH, HOAc, pH 8.0)

IR (KBr) $\nu/\text{cm}^{-1} = 3310.9$ (O-H), 2931.2 (C-H), 1750.0 (C-O Lacton), 1700.0 (C-O Carbonsäure), 1617.5 (C=C), 1415.1, 1340.1, 1263.0, 1181.3, 1154.0-944.9 (C-O), 581.4

- ¹H-NMR** δ /ppm (DMSO-d₆) = 0.90-1.30 (t, 12H, Methyl-H), 3.10-3.50 (m, 14H, H-2,4), 3.50-3.78 (m, 28H, H-3,5,6), 3.78-4.10 (m, 8H, Methylen-H), 4.51 (bs, 6H, OH-6), 4.84 (s, 6H, H-1), 4.96 (s, 1H, H-1'), 5.74 (bs, 14H, OH-2,3), 6.80-7.00 (m, 6H, H-Xanthen), 7.00-7.18 (m, 6H, H-Xanthen), 7.23 (s), 7.37 (m), 7.60-7.75 (m), 7.90 (bs), 8.00-8.08 (bs), 8.08-8.25 (m), 8.39 (bs), 8.52 (bs), 8.56 (d, J = 3.4 Hz), 8.74 (d, J = 4.7 Hz), 10.85 (bs, 2H, OH-20,27), 11.00 (bs, 2H, OH-20,27)
- ¹³C-NMR** δ /ppm (DMSO-d₆) = 12.25 (C-29,31,33,35), 45.12 (C-28,30,32,34), 59.71 (C-6), 71.83 (C-5), 72.23 (C-2), 72.85 (C-3), 81.31 (C-4), 95.63, 101.10-101.72 (C-1,18,19), 112.00-115.00 (C-16,18,23,24), 125.40 (C-13,12), 129.00-130.93 (C-10,9,15,22), 141.40 (C-11), 154.78 (C-25,26), 156.88 (C-17,20), 165.40 (C-27)
- MS FAB+** $m/z_{\text{gef.}}$ = 1634.0 [M-HCl]⁺
- MALDI** $m/z_{\text{gef.}}$ = 1633.7 [M-HCl]⁺, 1658.7 [M-HCl+Na]⁺
- $m/z_{\text{ber.}}$ = 1670.1 [M]⁺ für C₇₁H₁₀₁N₄O₃₇S₁Cl₁

Mono-(6-D(+)-biotinyl-imino-6-desoxy)- β -cyclodextrin 8

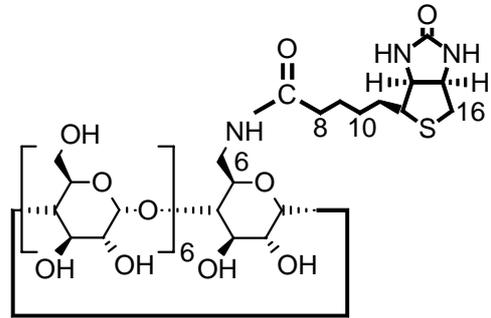
43 mg (0.18 mmol) D(+)-Biotin werden in 3 mL N,N-Dimethylacetamid gelöst und bei Raumtemperatur unter Rühren in eine Lösung aus 200 mg (0.18 mmol) des Monoamins **4** und 2 mL N,N-Dimethylacetamid eingespritzt. Nach 10 min, werden der farblosen Mischung 47.5 mg (0.35 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol-Hydrat zugefügt und diese mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. Dann werden 40 mg (0.19 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 5 mL N,N-Dimethylacetamid gelöst und zu der kalten Reaktionsmischung getropft. Nachdem 1 h bei 0°C, 1 h bei 25°C und 2 h bei 60°C gerührt wurde, läßt man die Lösung noch 1 d bei Raumtemperatur weiter reagieren. Dabei fällt N,N'-Dicyclohexylharnstoff als Nebenprodukt aus der Lösung aus. Der Reaktionsumsatz wird mittels DC und RP-HPLC kontrolliert.

Der weiße N,N'-Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und das Produkt durch Eintropfen des Filtrats in 50 mL Aceton ausgefällt. Nach weiteren 10 h Rühren wird der Niederschlag abgesaugt, mit Aceton gewaschen und im Hochvakuum bei 60°C getrocknet.

Um komplex gebundenes N,N-Dimethylacetamid aus dem Produkt zu entfernen, wird der Feststoff in reichlich Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und über Nacht im Hochvakuum bei 60°C nachgetrocknet. Die Reinigung kann mittels ¹H-

NMR-Spektroskopie überprüft werden und ist ggf. zu wiederholen. Das Produkt wird schließlich als weißer Feststoff isoliert.

Ausbeute: 220 mg (0.16 mmol), 92 % d. Th.



DC $R_f = 0.54$ LM II

IR (KBr) $\nu/\text{cm}^{-1} = 3337.8$ (O-H), 2926.6 (C-H), 1681.2 (C-O Amid I, Lactam), 1624.9 (C-O Lactam, N-H Amid II), 1480.0-1425.0 (C-H), 1365.0-1264.0 (Thioether), 1154.0-944.9 (C-O), 583.4

$^1\text{H-NMR}$ δ/ppm (DMSO- d_6) = 1.20-1.40 (sh, 2H, H-11), 1.40-1.55 (sh, 2H, H-10), 1.55-1.67 (sh, 2H, H-9), 2.10-2.22 (sh, 2H, H-8), 2.59 (d, 1H, H-16, $^2J_{16a-16b} = 12.4$ Hz), 2.82 (d, 1H, H-16, $^3J_{16a-15} = 4.8$ Hz), 2.85 (d, 1H, H-16, $^3J_{16b-15} = 5.6$ Hz), 3.06-3.16 (m, 1H, H-12), 3.20-3.45 (m, 14H, H-2,4), 3.46-3.78 (m, 28H, H-3,5,6), 4.13-4.18 (t, 1H, H-15, $J = 6.0$ Hz), 4.24-4.36 (dd, 1H, H-13), 4.48 (bs, 6H, OH-6), 4.84 (s, 6H, H-1), 5.87-5.60 (m, 14H, OH-2,3), 6.40 (d, 2H, N-H Biotin)

$^{13}\text{C-NMR}$ δ/ppm (DMSO- d_6) = 25.11 (C-9,10), 27.93 (C-11), 28.21 (C-16), 34.44 (C-8), 55.36 (C-12), 59.08 (C-15), 59.77 (C-6), 60.94 (C-13), 71.85 (C-5), 72.24 (C-2), 72.85 (C-3), 81.36 (C-4), 101.77 (C-1), 169.55 (C-14), 172.35 (C-7)

Poly(N,N-dimethylammoniumhexamethylen-N',N'-dimethylammonium-decamethylenedichlorid) 10, 11 und 12

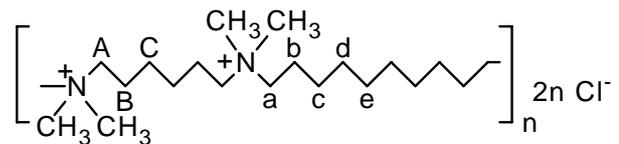
9.82 g (32.74 mmol) 1,10-Dibromdecan und 5.64 g (32.74 mmol) N,N,N',N'-Tetramethyl-1,6-diaminohexan werden in jeweils 5 mL Acetonitril/MeOH (1:1) gelöst und die Lösungen in einem 100 mL Dreihalskolben vereinigt. Nach 12 d Rühren bei 40°C wird die Reaktion abgebrochen. Die Kontrolle des Reaktionsumsatzes erfolgt gravimetrisch oder durch Messung der reduzierten Viskosität ($c = 20$ g/L, 0.4 M KBr,

25°C). Dazu werden in Zeitintervallen von 3 d jeweils 2 mL der Reaktionsmischung entnommen, das Produkt in 100 mL Et₂O selektiv ausgefällt und der Niederschlag im Hochvakuum bei 60°C getrocknet.

Zur Isolierung des Zwischenprodukts, Ionen_{10,6} Bromid **9**, wird die zähe Reaktionsmischung in 750 mL Et₂O aufgenommen. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Et₂O gewaschen und im Hochvakuum bei 60°C getrocknet. Man erhält einen weißen, kristallinen Feststoff (Ausbeute: 12.5 g, 26.5 mmol, 81 % d. Th.). Die reduzierte Viskosität ($c = 20$ g/L, 0.4 M KBr, 25°C) des Ionen_{10,6} Bromids **9** betrug 53.1 mL/g.²

Zur Abtrennung niedermolekularer Bestandteile (Oligomere) sowie zum Austausch des Gegenions wird das Ionen_{10,6} Bromid **9** in 200 mL einer wäßrigen 0.05 M NaCl-Lösung gelöst und mit Hilfe eines Hohlfasermoduls 12 h gegen 20 L dieses Lösungsmittels im Gegenstromprinzip dialysiert. Anschließend dialysiert man nochmals 12 h gegen entionisiertes Wasser, um das überschüssige Salz abzutrennen. Das Produkt wird durch Gefriertrocknung des Retentats isoliert. Nach Trocknung im Hochvakuum bei 60°C liegt das polymere Ionen_{10,6} Chlorid **10** als kristalliner weißer Feststoff vor.

Ausbeute: 3.34 g (8.7 mmol)



Viskosität $[\eta] = 63.9$ mL/g in 0.1 M NaCl, 25°C

$$\eta_{sp}/c = (81.3 \pm 1.0) \text{ mL/g für } c = 20 \text{ g/L}$$

GPC $M_w = (5.78 \pm 0.41) \cdot 10^4$ g/mol

¹H-NMR δ /ppm (D₂O) = 1.25-1.35 (sh, 16H, H-c,d,e,C), 1.67 (bs, 8H, H-b,B), 2.96 (s, 12H, H-Me), 3.18-3.22 (m, 8H, H-a,A)

¹³C-NMR δ /ppm (D₂O) = 23.46, 23.51 (C-c,C), 26.79, 27.14 (C-d,e), 29.84, 30.01 (C-b,B), 52.06 (C-Me), 65.43, 65.82 (C-a,A)

Die Ionen_{10,6} Chloride **11** und **12** wurden von M. Bockstaller im Rahmen seiner Diplomarbeit synthetisiert [1]. Die Charakterisierung erfolgte zusammen mit dem Ionen_{10,6} Chlorid **10**. Man erhielt die Staudinger-Indices $[\eta] = 55.4$ mL/g für **11** und $[\eta] = 38.3$ mL/g für **12**. Die reduzierte Viskosität ($c = 12$ g/L) betrug 66.9 mL/g für **11**

² Die Synthese des Ionen_{10,6} Bromids erfolgte nach einer Vorschrift von M. Bockstaller, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe, 1997.

und 49.8 mL/g für **12**. Mit Hilfe der GPC-Analyse konnten die Molmassen $M_w = (4.49 \pm 0.16) \cdot 10^4$ g/mol für **11** und $M_w = (2.99 \pm 0.15) \cdot 10^4$ g/mol für **12** ermittelt werden (s. Kap.4.2).

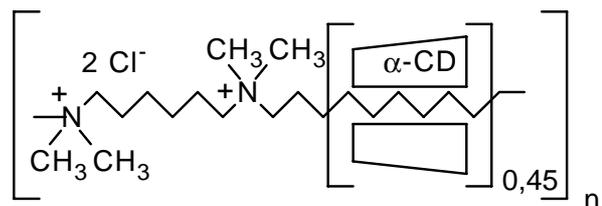
Polyrotaxan aus Poly(N,N-dimethylammoniumhexamethylen-N',N'-dimethylammoniumdecamethylen-dichlorid) und α -Cyclodextrin **13**

322 mg (0.84 mmol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** und 145 mg (149 μ mol) α -Cyclodextrin **1a** werden in 1 L Wasser gelöst und 3 Wochen bei 80°C gerührt. Anschließend wird die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Dadurch wird die Kinetik der Selbstorganisation von **10** und **1a** soweit herabgesetzt, daß das Polyrotaxan unabhängig vom thermodynamischen Gleichgewicht in der Lösung stabil bleibt [2].

Zur Abtrennung überschüssigen α -Cyclodextrins **1a** wird die Lösung mit Hilfe eines Hohlfasermoduls 15 h gegen 24 L entionisiertes Wasser im Gegenstromprinzip dialysiert. Die Kontrolle der Reinigung erfolgt mittels DC. Nach Gefriertrocknung des Retentats und Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum bei 60°C liegt das Polyrotaxan als weißer Feststoff vor. Die Zusammensetzung des Polyrotaxans wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Die Analyse des ¹H-NMR-Spektrums ergab, daß 45 % der Monomereinheiten von Ionen_{10,6} Chlorid in **1a** eingeschlossen sind und 18 % α -Cyclodextrin ungebunden im Produkt vorliegen. Es ist mit einem Fehler von etwa 5 % zu rechnen.

Ausbeute: 836 mg (1.02 mmol)



Viskosität $[\eta] = 32.2$ mL/g in 0.1 M NaCl, 25°C

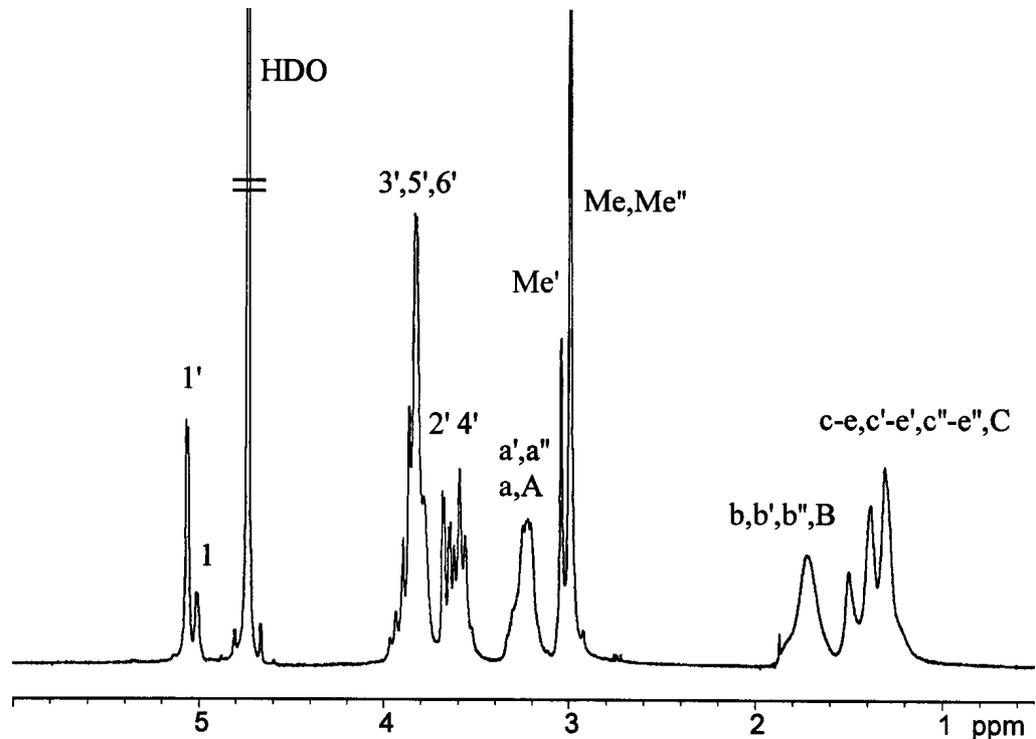
$\eta_{sp}/c = (39.7 \pm 1.0)$ mL/g für $c = 20$ g/L

GPC $M_w = (10.34 \pm 0.38) \cdot 10^4$ g/mol

DLS $R_h = (8.6 \pm 0.5)$ nm

¹H-NMR δ /ppm (D₂O) = 1.15-1.58 (sh, 16H, H-c,d,e,c',d',e',c'',d'',e'',C), 1.72 (bs, 8H, H-b,b',b'',B), 3.00 (s, 6H, H-Me,Me''), 3.04 (s, 6H, H-Me'), 3.10-3.37 (m, 8H, H-a,a',a'',A), 3.59 (t, 6H, H-4', J = 9.0 Hz), 3.67 (dd, 6H, H-

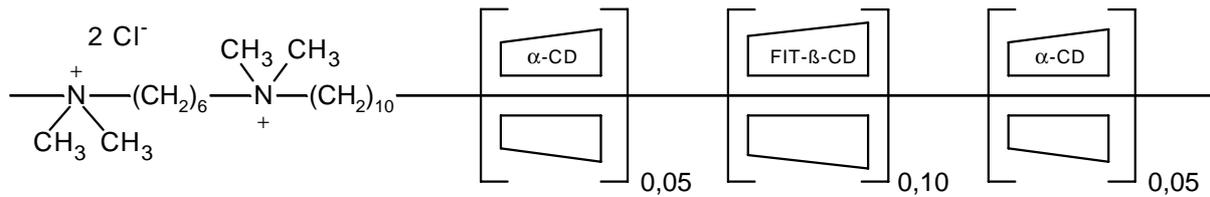
2', J = 10.0 Hz), 3.73-4.00 (sh, 24H, H-3',5',6'), 5.01 (d, 0.4H, H-1, J = 2.4 Hz), 5.06 (d, 5.4H, H-1', J = 3.0 Hz)



Polyrotaxan aus Poly(N,N-dimethylammoniumhexamethylen-N',N'-dimethylammoniumdecamethylendichlorid, N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*m*-carboxyfluoresceinyl)-thioharnstoff und α -Cyclodextrin **14**

Eine wäßrige 0.01 M NH_4OH -Lösung wird mit HOAc auf pH = 8.0 eingestellt. 3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μL dieser Lösung gelöst und 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** versetzt und nochmals 20 h bei 60°C stehen gelassen. Die Bildung des Polyrotaxans in Lösung wird durch Gelelektrophorese nachgewiesen (s. Kap. 5.1, Probe ②).

Die Analyse des Gelelektropherogramms ergab, daß 10 % der Monomereinheiten von Ionen_{10,6} Chlorid in **10** eingeschlossen sind. Aufgrund der Kinetik der Selbstorganisation von Ionen_{10,6} Chlorid und α -Cyclodextrin kann davon ausgegangen werden, daß durchschnittlich 10 % der endständigen Bindungsstellen von **10** durch α -Cyclodextrin **1a** belegt sind [2].

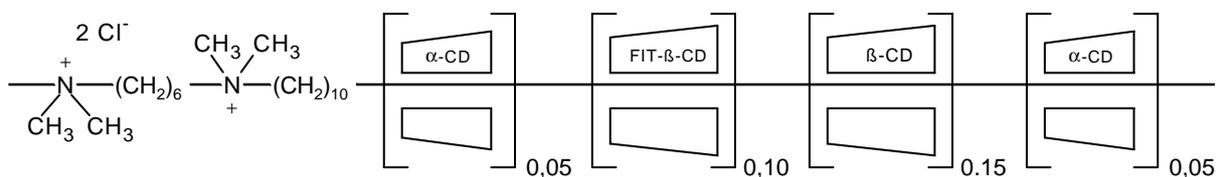


UV/VIS $\lambda(\epsilon) = 497 \text{ nm}$ (0.1 M NaOH, HOAc, pH = 8.0)

Polyrotaxan aus Poly(N,N-dimethylammoniumhexamethylen-N',N'-dimethylammoniumdecamethylendichlorid, N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*m*-carboxyfluoresceinyl)-thioharnstoff, β -Cyclodextrin und α -Cyclodextrin 15

Eine wäßrige 0.01 M NH_4OH -Lösung wird mit HOAc auf pH = 8.0 eingestellt. 3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **11** werden in 550 μL dieser Lösung gelöst und 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 12.0 mg ($1.06 \cdot 10^{-5}$ mol) β -Cyclodextrin **1b** versetzt und wiederum 20 h geschüttelt. Zuletzt werden 18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** hinzugefügt und die Lösung 20 h bei 60°C stehen gelassen. Die Bildung des Polyrotaxans in Lösung wird durch Gelelektrophorese nachgewiesen (s. Kap. 5.1.2, Probe ⑦).

Die Analyse des Gelelektropherogramms ergab, daß 10 % der Monomereinheiten von Ionen_{10,6} Chlorid **11** in **5** eingeschlossen sind. Der Belegungsgrad durch β -Cyclodextrin **1b** wurde näherungsweise zu 15 % bestimmt. Aufgrund der Kinetik der Selbstorganisation von Ionen_{10,6} Chlorid und α -Cyclodextrin kann davon ausgegangen werden, daß bis zu 10 % der endständigen Bindungsstellen von **11** durch α -Cyclodextrin **1a** belegt sind [2].

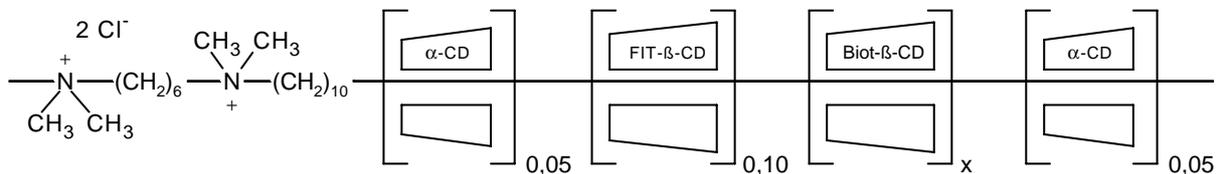


UV/VIS $\lambda(\epsilon) = 497 \text{ nm}$ (0.1 M NaOH, HOAc, pH = 8.0)

Polyrotaxan aus Poly(N,N-dimethylammoniumhexamethylen-N',N'-dimethylammoniumdecamethylendichlorid, N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(m-carboxyfluoresceinyl)-thioharnstoff, Mono-(6-D(+)-biotinyl-imino-6-desoxy)- β -cyclodextrin • und α -Cyclodextrin **16**

Eine wäßrige 0.01 M NH_4OH -Lösung wird mit HOAc auf $\text{pH} = 8.0$ eingestellt. 3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen $_{10,6}$ Chlorid **10** werden in 550 μL dieser Lösung gelöst und 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 5.8 mg ($4.24 \cdot 10^{-6}$ mol) des Biotinyl- β -Cyclodextrins **8** versetzt und wiederum 20 h geschüttelt. Zuletzt werden 14.4 mg ($1.48 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** hinzugefügt und die Lösung 20 h bei 60°C stehen gelassen. Der Nachweis der Bildung des Fluorescein-Biotin-funktionalisierten Polyrotaxans in Lösung erfolgt durch Gelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie.

Die Analyse des Gelelektropherogramms ergab, daß 10 % der Monomereinheiten von Ionen $_{10,6}$ Chlorid in **10** eingeschlossen sind (vgl. Kap. 5). Aufgrund der Kinetik der Selbstorganisation von Ionen $_{10,6}$ Chlorid und α -Cyclodextrin kann davon ausgegangen werden, daß bis zu 10 % der endständigen Bindungsstellen von **10** durch α -Cyclodextrin **1a** belegt sind [2]. Der Einschluß der Biotinyl- β -Cyclodextrinringe **8** wurde qualitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (s. Kap. 7.2.3).



UV/VIS $\lambda(\epsilon) = 497 \text{ nm}$ (0.1 M NaOH, HOAc, $\text{pH} = 8.0$)

9.4 Gelelektrophorese

Herstellung der Pufferlösung (1xTAE)

242 g (2.0 mol) Trishydroxymethylaminomethan, 57.8 mL (1.0 mol) Eisessig und 29.2 g (0.1 mol) Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat (EDTA) werden in Wasser gelöst, der pH-Wert der Lösung mit Eisessig auf 8.3 eingestellt und die Lösung auf 1 L mit Wasser aufgefüllt. Für die Gelelektrophorese wird der Puffer (50xTAE) im Verhältnis 1:50 mit Wasser verdünnt.

Herstellung des Agarosegels

1.0-1.4 g Agarose werden in 100 mL der 1xTAE-Pufferlösung eingerührt und 3 min. aufgeköcht. Die abgekühlte, warme Lösung wird blasenfrei in die Gelkammer eingegossen, bis eine Schichthöhe von etwa 5 mm erreicht ist. Dann wird ein Teflonkamm von 1 mm Dicke entlang der Mittellinie der Gelkammer in die Lösung eingetaucht. Der Abstand zwischen Kamm und Boden sollte mindestens 1 mm betragen. Beim Abkühlen verfestigt sich das Gel. Der Teflonkamm kann nach 30 min. entfernt werden. Die gebildeten Geltaschen haben ein Volumen von etwa 30 μL .

Präparation der Proben ①-⑧

5 μL der Farbstofflösung werden zu 7 μL Wasser pipettiert und zur Erhöhung der Dichte mit 5 μL einer 40 Gew.-%-igen Lösung aus Wasser und Saccharose gemischt. Für die Gelelektrophorese werden jeweils 5 μL dieser Mischung in die Geltaschen eingespritzt.

Präparation der Probe ⑨

25 μL der Farbstofflösung werden zu 7 μL Wasser pipettiert und zur Erhöhung der Dichte mit 5 μL einer 40 Gew.-%-igen Lösung aus Wasser und Saccharose gemischt. Für die Gelelektrophorese werden 12.5 μL dieser Mischung in die Geltasche eingespritzt.

Präparation der Fluoresceinlösungen ①-⑧

Lösungsmittel

Eine wässrige 0.01 M NH_4OH -Lösung wird mit HOAc auf pH = 8.0 eingestellt.

Fluoresceinlösung ①

3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **5**)

Fluoresceinlösung ② = ②_a

3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** versetzt und nochmals 20 h bei 60°C stehen gelassen.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **5**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

Fluoresceinlösung ②_b

3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **11** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** versetzt und nochmals 20 h bei 60°C stehen gelassen.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **5**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **11**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

Fluoresceinlösung ②_c

3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **12** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** versetzt und nochmals 20 h bei 60°C stehen gelassen.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **5**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **12**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

Fluoresceinlösung ③

3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 5.0 mg

($5.17 \cdot 10^{-6}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** versetzt und nochmals 20 h bei 60°C stehen gelassen.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **5**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**; $c = 9.40 \cdot 10^{-3}$ mol/L **1a**)

Fluoresceinlösung ④

3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **5**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**)

Fluoresceinlösung ⑤

18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und 20 h bei 60°C stehen gelassen. Danach wird die Reaktionsmischung mit 3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** versetzt und nochmals 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **5**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

Fluoresceinlösung ⑥

3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **11** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 4.8 mg ($4.24 \cdot 10^{-6}$ mol) β -Cyclodextrin **1b** versetzt und nochmals 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zuletzt werden 18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** hinzugefügt und die Lösung 20 h auf 60°C erwärmt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **5**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **11**; $c = 7.71 \cdot 10^{-3}$ mol/L **1b**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

Fluoresceinlösung ⑦

3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **11** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 12.0 mg ($1.06 \cdot 10^{-5}$ mol) β -Cyclodextrin **1b** versetzt und nochmals 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zuletzt werden 18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** hinzugefügt und die Lösung 20 h auf 60°C erwärmt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **5**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **11**; $c = 1.93 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1b**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

Fluoresceinlösung ⑧

3.2 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **11** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 19.3 mg ($1.70 \cdot 10^{-5}$ mol) β -Cyclodextrin **1b** versetzt und nochmals 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zuletzt werden 18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** hinzugefügt und die Lösung 20 h auf 60°C erwärmt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **5**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **11**; $c = 3.09 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1b**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

Fluoresceinlösung ⑨

4.4 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Natriumpolystyrolsulfonat (PSS) mit $M_w \approx 149\,000$ D werden in 550 μ L einer wässrigen 0.01 M NH_4OH -Lösung (pH = 8.0) gelöst und im Verhältnis 5:1 mit der Fluoresceinlösung ② gemischt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **PSS**, $c = 7.70 \cdot 10^{-4}$ mol/L **5**; $c = 7.70 \cdot 10^{-3}$ mol/L **10**; $c = 6.94 \cdot 10^{-3}$ mol/L **1a**)

Präparation der Eosinlösungen ①-⑤

Lösungsmittel

Eine wässrige 0.01 M NH_4OH -Lösung wird mit HOAc auf pH = 8.0 eingestellt.

Eosinlösung ①

3.9 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **6**)

Eosinlösung ②

3.9 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raum-

temperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** versetzt und nochmals 20 h bei 60°C stehen gelassen.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **6**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

Eosinlösung ③

3.9 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 5.0 mg ($5.17 \cdot 10^{-6}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** versetzt und nochmals 20 h bei 60°C stehen gelassen.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **6**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**; $c = 9.40 \cdot 10^{-3}$ mol/L **1a**)

Eosinlösung ④

3.9 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **6**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**)

Eosinlösung ⑤

18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und 20 h bei 60°C stehen gelassen. Danach wird die Reaktionsmischung mit 3.9 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Eosinyl- β -Cyclodextrin **6** versetzt und nochmals 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **6**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

Präparation der Rhodaminlösungen ①-⑤

Lösungsmittel

Eine wässrige 0.01 M NH_4OH -Lösung wird mit HOAc auf pH = 8.0 eingestellt.

Rhodaminlösung ①

3.5 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Rhodaminyl- β -Cyclodextrin **7** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **7**)

Rhodaminlösung ②

3.5 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Rhodaminly- β -Cyclodextrin **7** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** versetzt und nochmals 20 h bei 60°C stehen gelassen.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **7**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

Rhodaminlösung ③

3.5 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Rhodaminly- β -Cyclodextrin **7** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 5.0 mg ($5.17 \cdot 10^{-6}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** versetzt und nochmals 20 h bei 60°C stehen gelassen.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **7**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**; $c = 9.40 \cdot 10^{-3}$ mol/L **1a**)

Rhodaminlösung ④

3.5 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Rhodaminly- β -Cyclodextrin **7** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und dazu 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **7**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**)

Rhodaminlösung ⑤

18.6 mg ($1.91 \cdot 10^{-5}$ mol) α -Cyclodextrin **1a** und 8.1 mg ($2.12 \cdot 10^{-5}$ mol) Ionen_{10,6} Chlorid **10** werden in 550 μ L Lösungsmittel gelöst und 20 h bei 60°C stehen gelassen. Danach wird die Reaktionsmischung mit 3.5 mg ($2.12 \cdot 10^{-6}$ mol) Rhodaminly- β -Cyclodextrin **7** versetzt und nochmals 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

($c = 3.85 \cdot 10^{-3}$ mol/L **7**; $c = 3.85 \cdot 10^{-2}$ mol/L **10**; $c = 3.47 \cdot 10^{-2}$ mol/L **1a**)

9.5 Fluoreszenzmikroskopie

Präparation des Objektträgers

Die Objektträger und die Deckgläser werden vor dem Gebrauch mit Ethanol gereinigt und an der Luft getrocknet. Für die Begrenzung der Probelösung wird ein hochviskoser Fettrand auf einen Objektträger aufgetragen, der eine Fläche von etwa $1 \times 1 \text{ cm}^2$ eingrenzt. Zur Mikroskopie wird die Probe mit einem Deckglas (Dicke: 0.17 mm) abgedeckt. Die Dicke der Probe beträgt je nach Höhe des Fettwalls zwischen 100-500 μm .

Präparation der Proben

Lösungsmittel

Eine wässrige 0.01 M NH_4OH -Lösung wird mit HOAc auf pH = 8.0 eingestellt und durch einen Spritzenvorsatzfilter (0.45 μm) filtriert.

Polyrotaxanlösung ①

1 μL der Polyrotaxanlösung **14** aus Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a** wird mit dem Lösungsmittel auf 4 mL verdünnt. Davon nimmt man 100 μL ab und verdünnt nochmals um das zehnfache. Anschließend werden 30 μL der Lösung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

($c = 9.63 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L}$ **5**; $c = 9.63 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$ **10**; $c = 8.68 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$ **1a**)

Polyrotaxanlösung ②

1 μL der Polyrotaxanlösung **15** aus Ionen_{10,6} Chlorid **11**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, β -Cyclodextrin **1b** und α -Cyclodextrin **1a** wird mit dem Lösungsmittel auf 4 mL verdünnt. Davon nimmt man 100 μL ab und verdünnt nochmals um das zehnfache. Anschließend werden 30 μL der Lösung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

($c = 9.63 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L}$ **5**; $c = 9.63 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$ **11**; $c = 4.83 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$ **1b**, $c = 8.68 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$ **1a**)

Polyrotaxanlösung ③

550 μL der Polyrotaxanlösung **14** aus Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5** und α -Cyclodextrin **1a** werden mit 0.9 mg ($4.24 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$) Natriumpoly-

styrolsulfonat (PSS) mit $M_w \approx 149\,000$ D versetzt. Dann rührt man die Mischung, bis eine homogene Lösung entstanden ist.

1 μL dieser Lösung wird auf 4 mL mit dem Lösungsmittel verdünnt. Davon nimmt man 100 μL ab und verdünnt nochmals um das zehnfache. Anschließend werden 30 μL der Lösung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

($c = 9.63 \cdot 10^{-8}$ mol/L **5**; $c = 9.63 \cdot 10^{-7}$ mol/L **10**; $c = 8.68 \cdot 10^{-7}$ mol/L **1a**, $c = 1.93 \cdot 10^{-7}$ mol/L **PSS**)

Polyrotaxanlösung ④

1 μL der Polyrotaxanlösung **16** aus Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, Biotinyl- β -Cyclodextrin **8** und α -Cyclodextrin **1a** wird mit dem Lösungsmittel auf 4 mL verdünnt. Davon nimmt man 100 μL ab und verdünnt nochmals um das zehnfache. Anschließend werden 30 μL der Lösung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

($c = 9.63 \cdot 10^{-8}$ mol/L **5**; $c = 9.63 \cdot 10^{-7}$ mol/L **10**; $c = 1.93 \cdot 10^{-7}$ mol/L **8**, $c = 8.68 \cdot 10^{-7}$ mol/L **1a**)

Polyrotaxanlösung ⑤

1 μL der Polyrotaxanlösung **16** aus Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, Biotinyl- β -Cyclodextrin **8** und α -Cyclodextrin **1a** wird mit 0.5 mg Streptavidin ($M_w \approx 60$ kDa) versetzt und mit dem Lösungsmittel auf 4 mL verdünnt. Dann nimmt man 100 μL der homogenen Lösung ab und verdünnt nochmals um das zehnfache. Nach einer Einwirkzeit von einer $\frac{1}{2}$ Stunde werden 30 μL der Lösung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

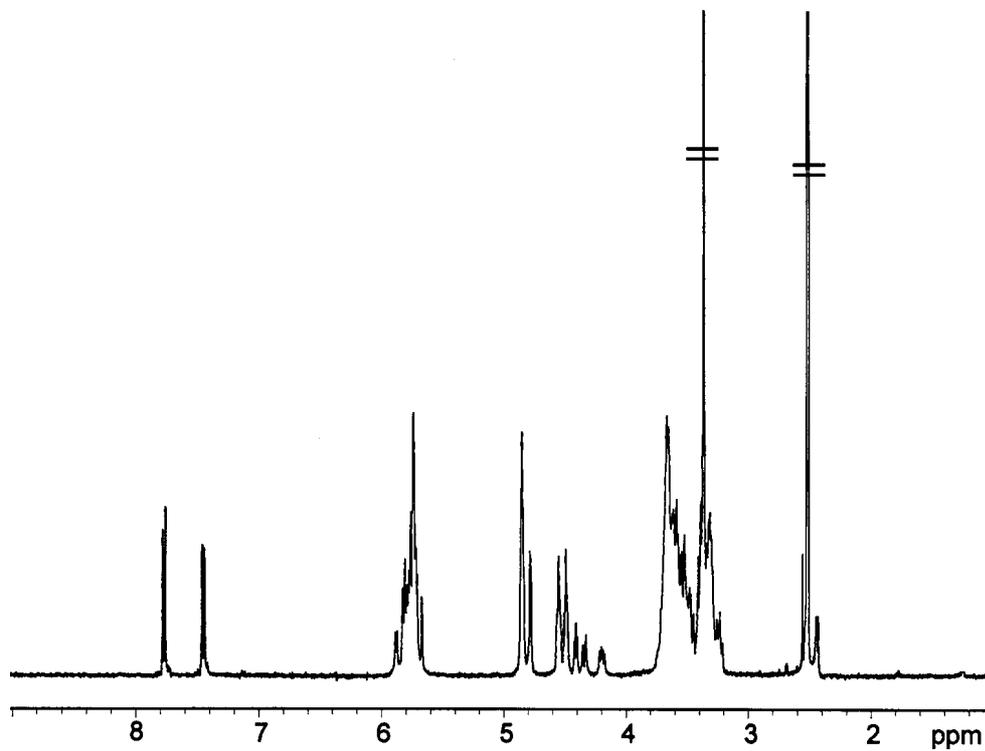
($c = 9.63 \cdot 10^{-8}$ mol/L **5**; $c = 9.63 \cdot 10^{-7}$ mol/L **10**; $c = 1.93 \cdot 10^{-7}$ mol/L **8**, $c = 8.68 \cdot 10^{-7}$ mol/L **1a**)

Polyrotaxanlösung ⑥

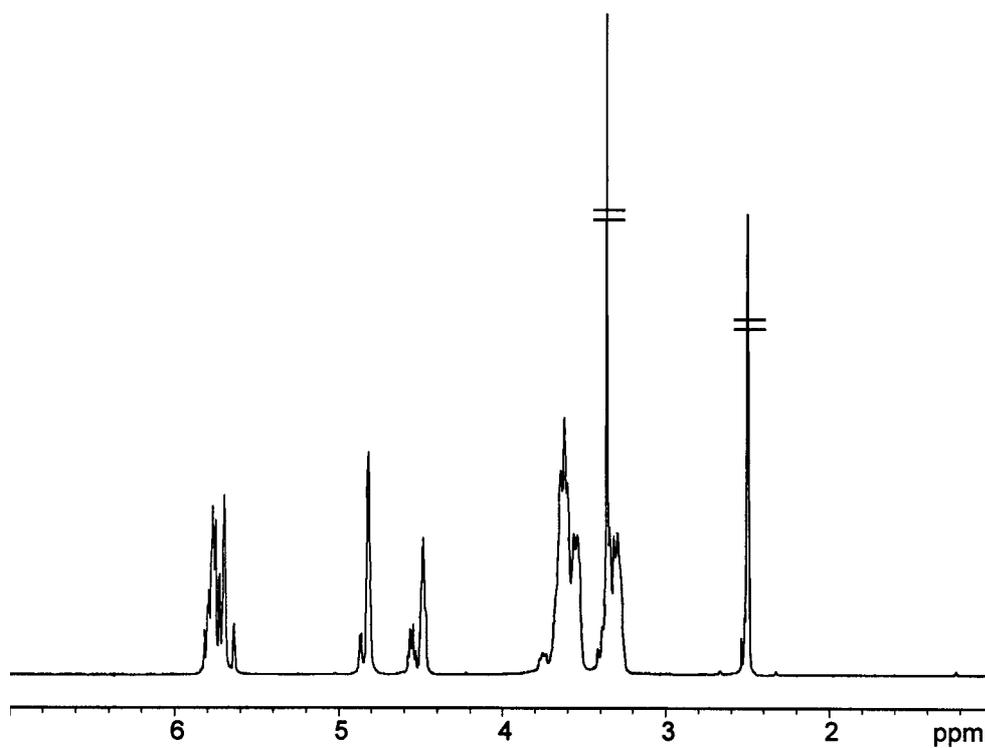
1 μL der Polyrotaxanlösung **14** aus Ionen_{10,6} Chlorid **10**, Fluoresceinyl- β -Cyclodextrin **5**, und α -Cyclodextrin **1a** wird mit 0.5 mg Streptavidin ($M_w \approx 60$ kDa) versetzt und mit dem Lösungsmittel auf 4 mL verdünnt. Davon nimmt man 100 μL ab und verdünnt nochmals um das zehnfache. Nach einer Einwirkzeit von einer $\frac{1}{2}$ Stunde werden 30 μL der Lösung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

($c = 9.63 \cdot 10^{-8}$ mol/L **5**; $c = 9.63 \cdot 10^{-7}$ mol/L **10**; $c = 8.68 \cdot 10^{-7}$ mol/L **1a**)

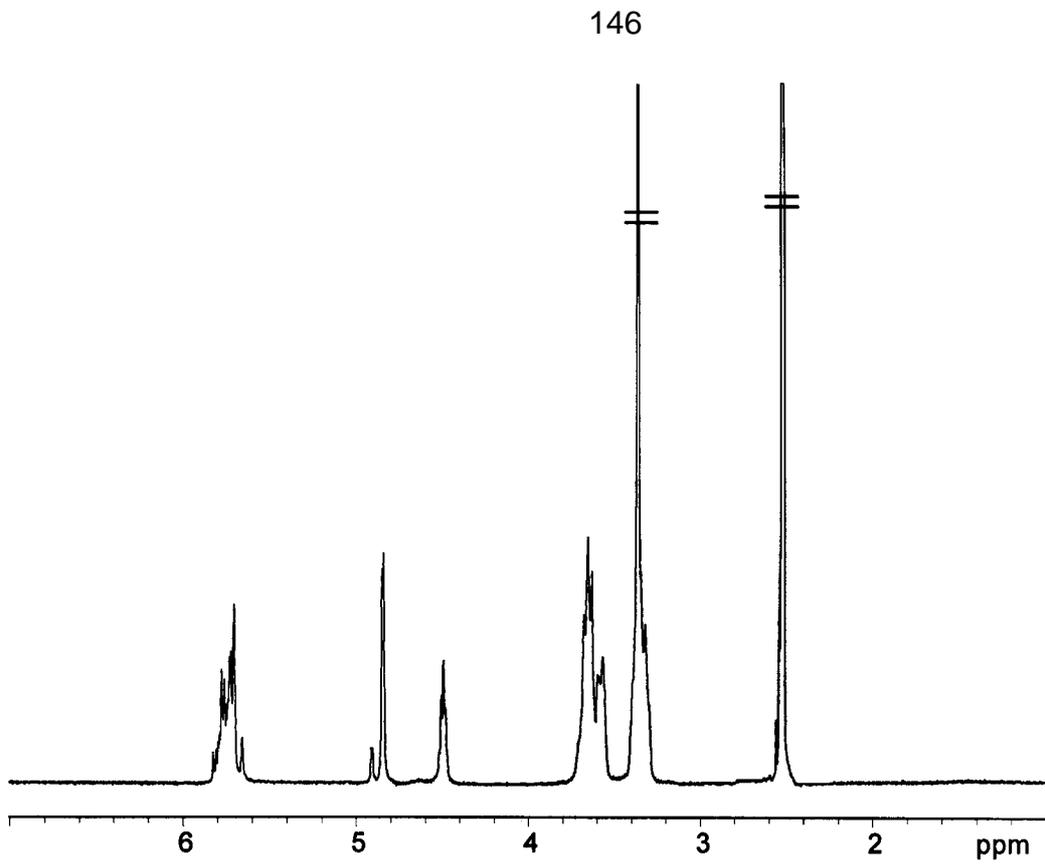
9.6 Spektren



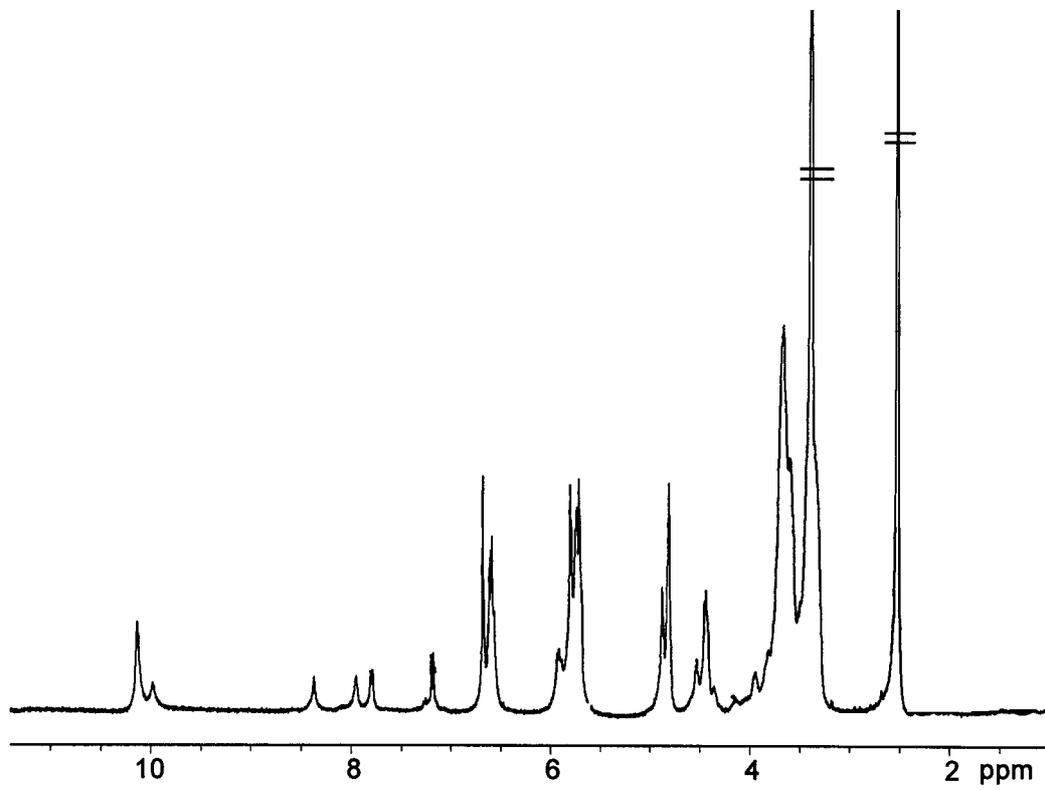
Mono-(6-O-(*p*-tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin 2



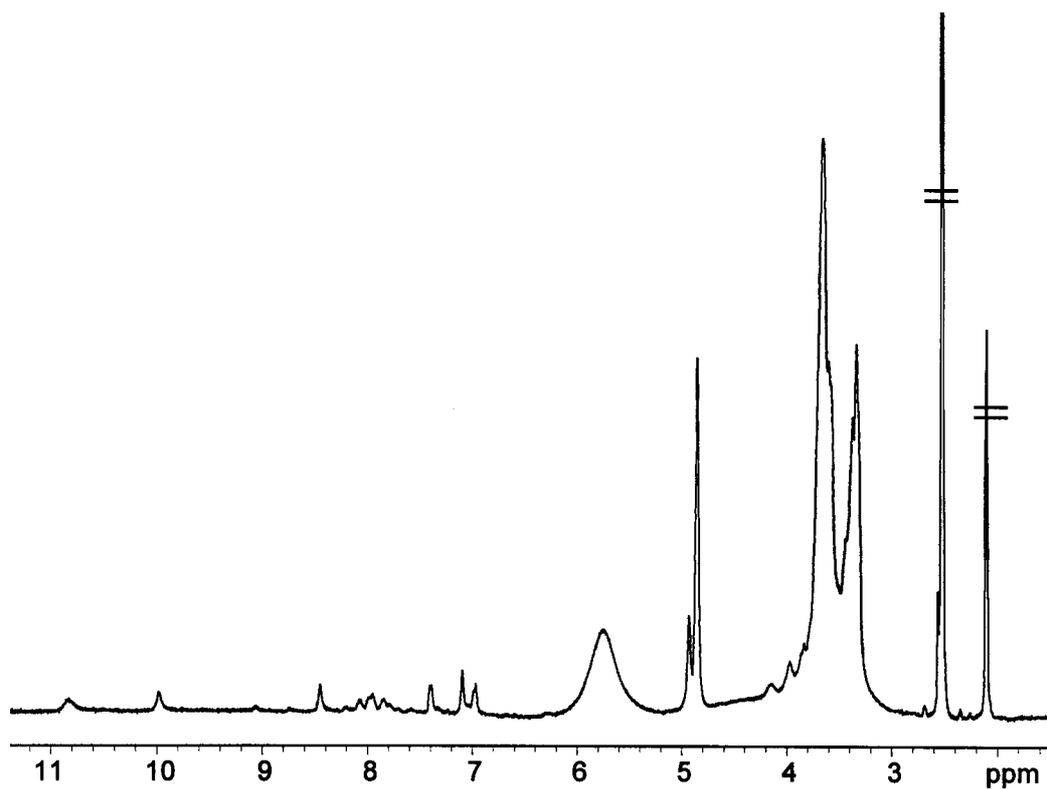
Mono-(6-azido-6-desoxy)- β -cyclodextrin 3



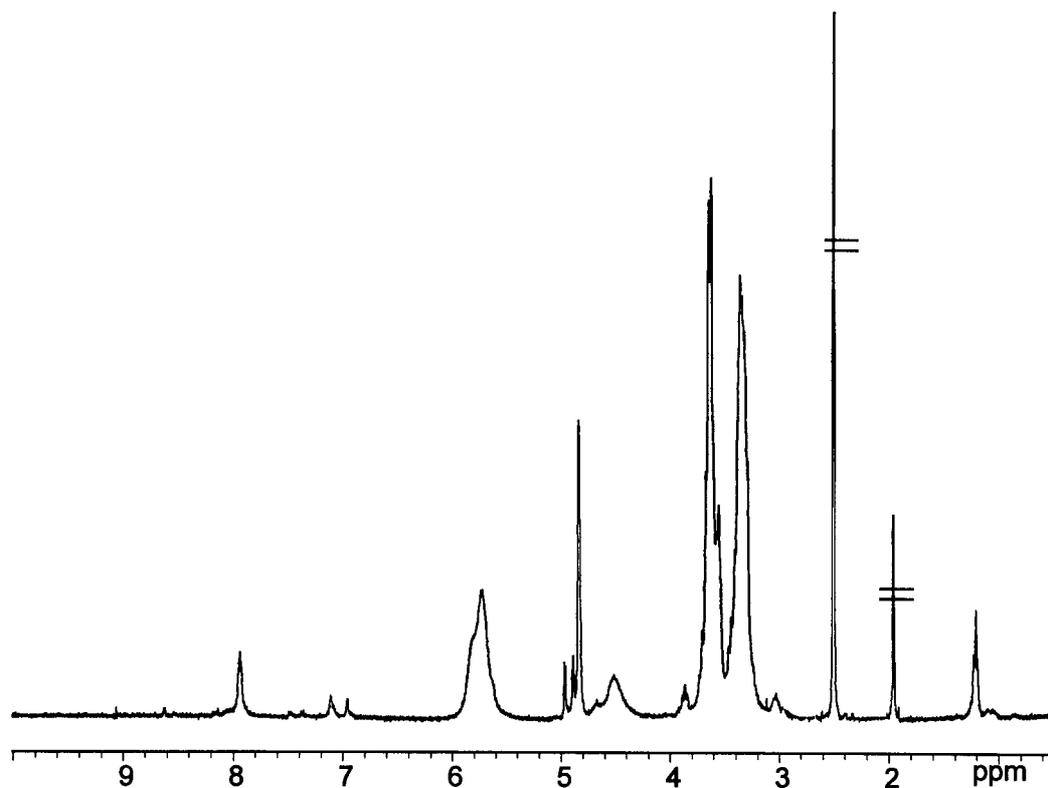
Mono-(6-amino-6-desoxy)- β -cyclodextrin 4



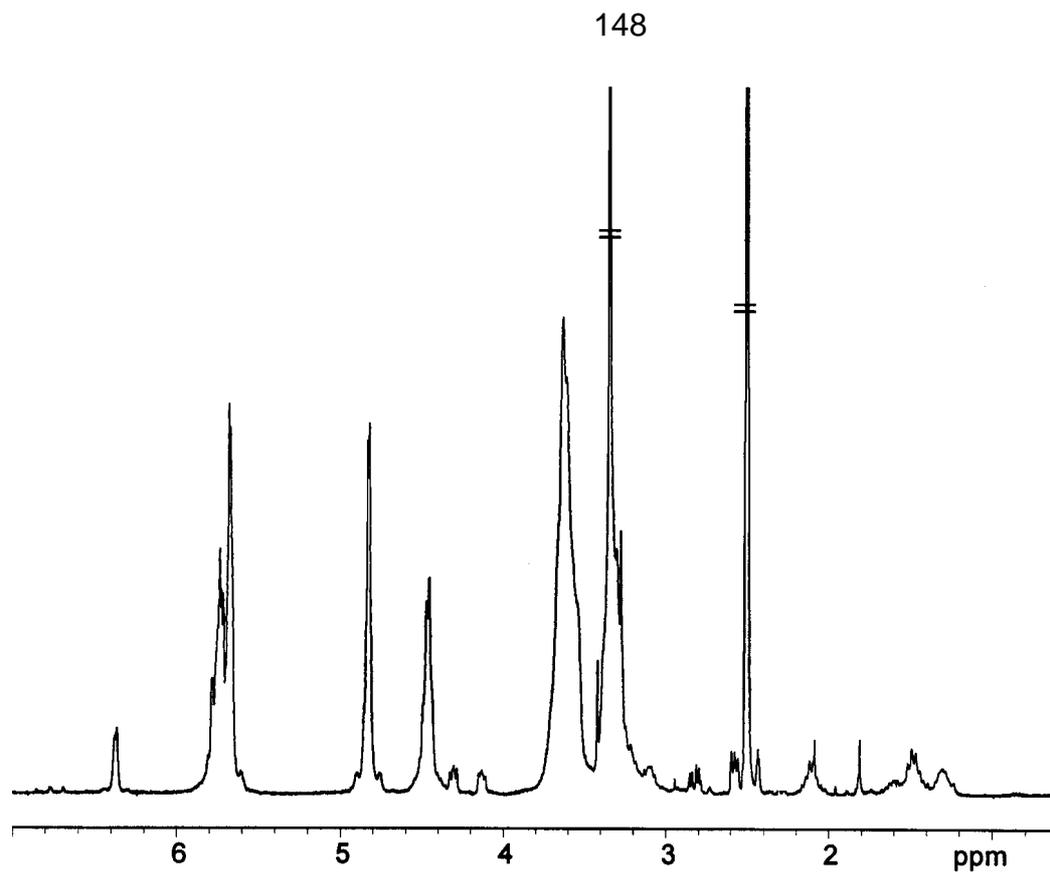
N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*m*-carboxyfluoresceinyl)-thioharnstoff 5



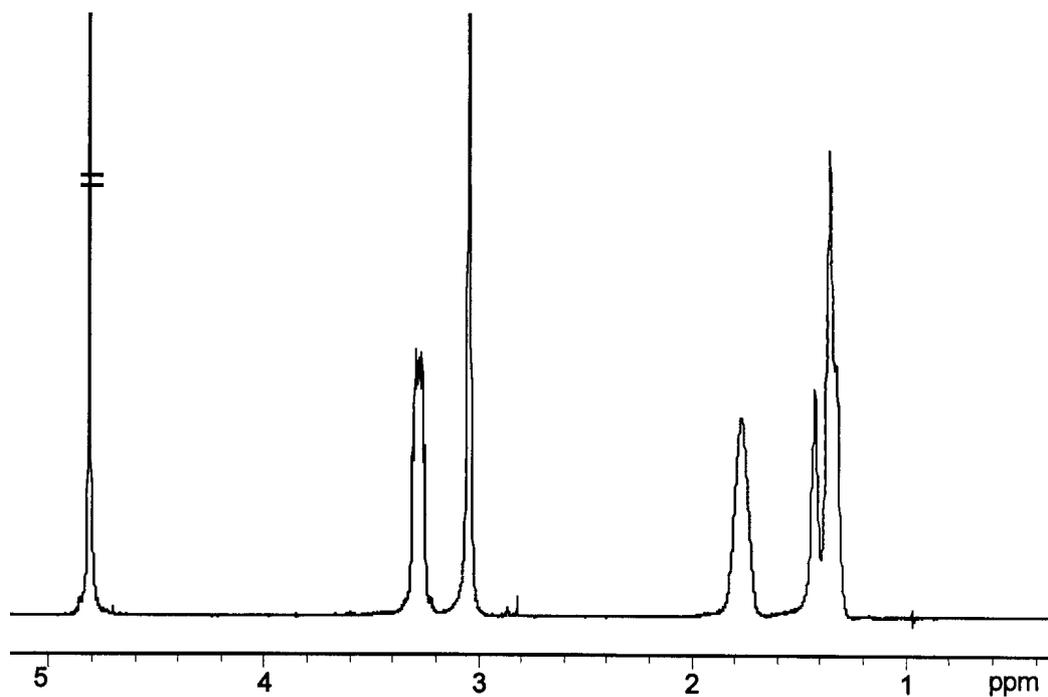
N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*m*-carboxyeosinyl)-thioharnstoff 6



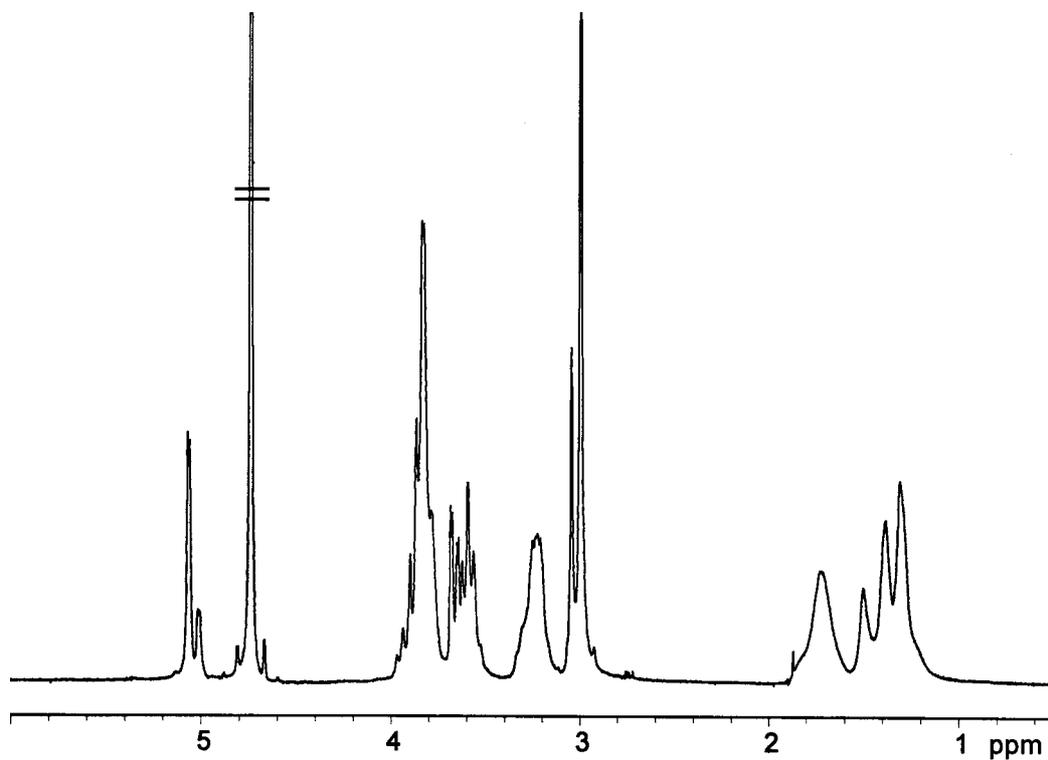
N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*p/m*-carboxyrhodaminy)-thioharnstoff 7



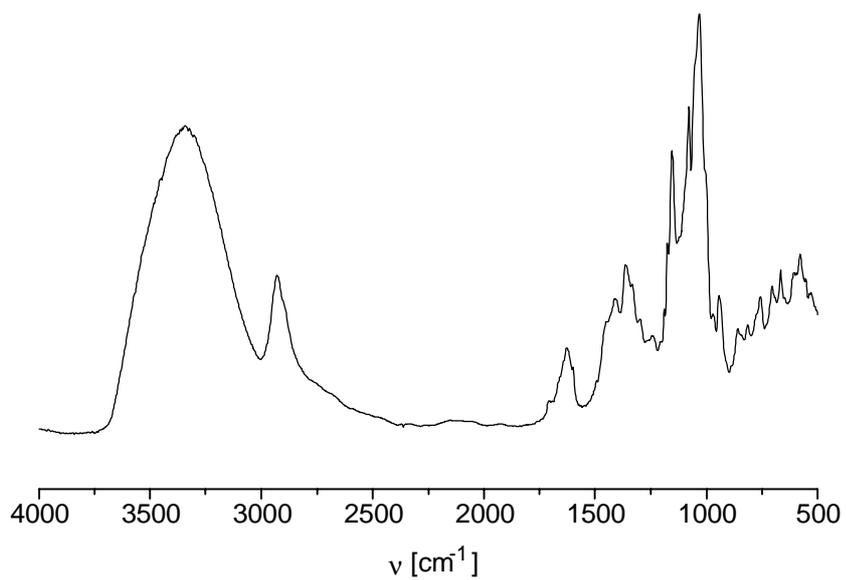
Mono-(6-D(+)-biotinyl-imino-6-desoxy)- β -cyclodextrin 8



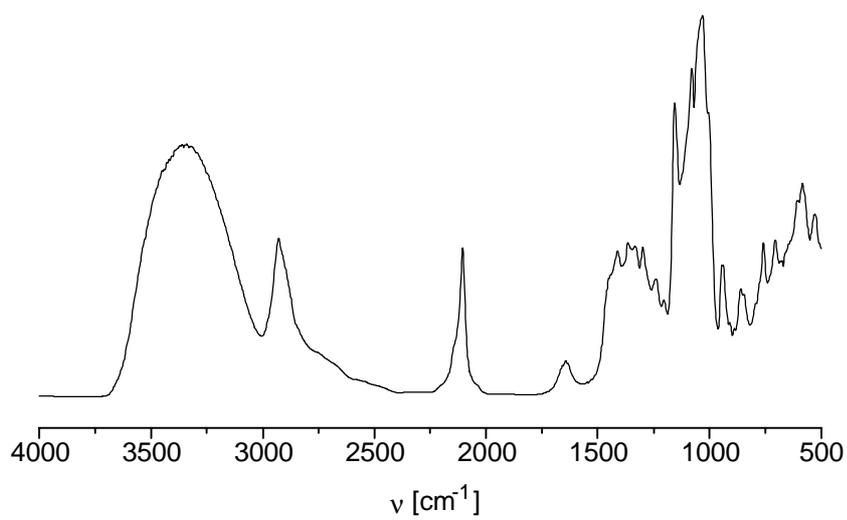
Poly(N,N-dimethylammoniumhexamethylen-N',N'-dimethylammonium-decamethylendichlorid) 10



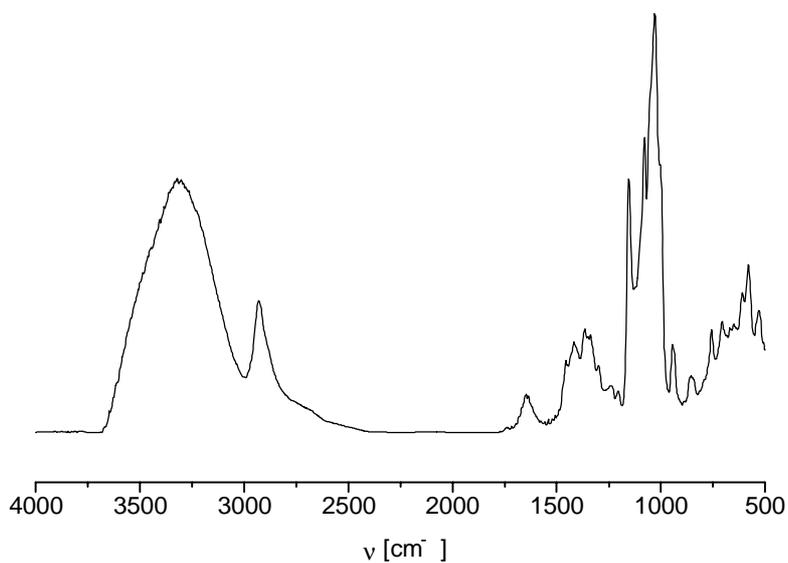
Polyrotaxan aus Poly(N,N-dimethylammoniumhexamethylen-N',N'-dimethylammoniumdecamethylendichlorid) und α -Cyclodextrin 13



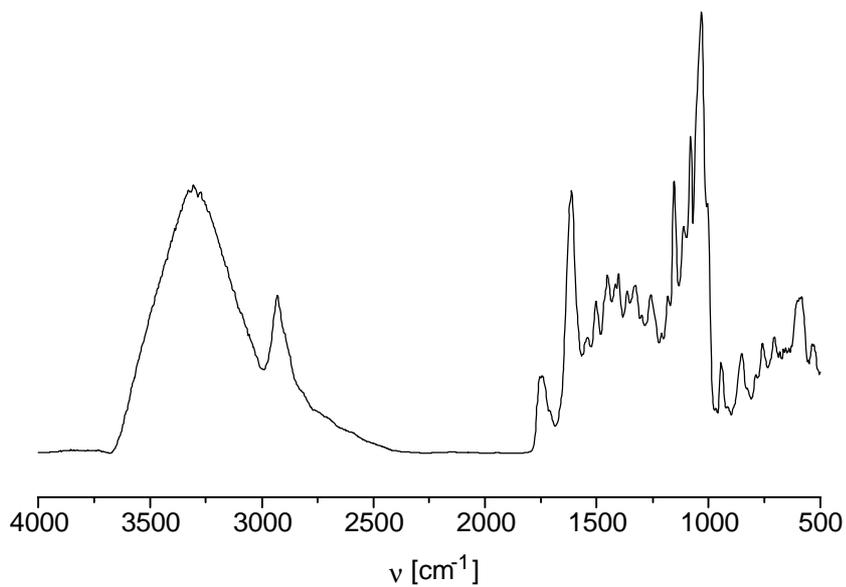
Mono-(6-O-(*p*-tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin 2



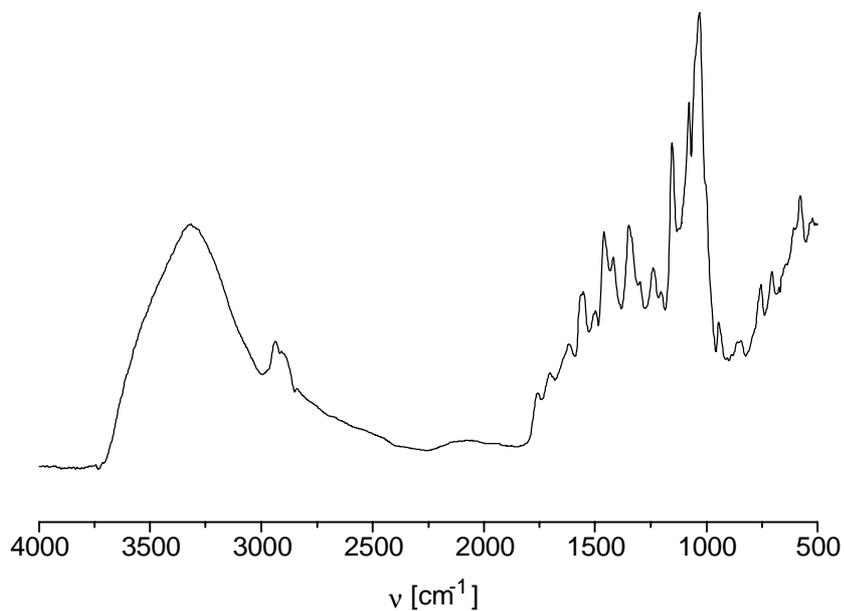
Mono-(6-azido-6-desoxy)- β -cyclodextrin 3



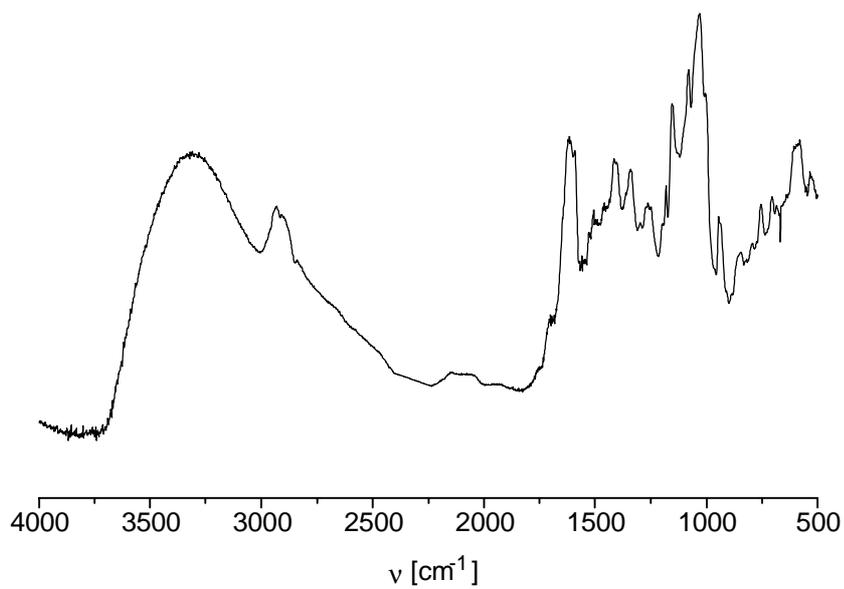
Mono-(6-amino-6-desoxy)- β -cyclodextrin 4



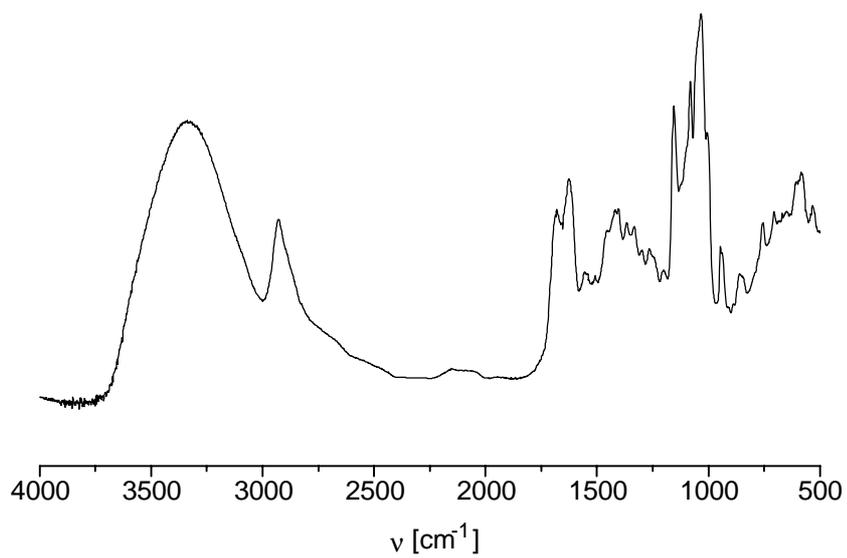
N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*m*-carboxyfluoresceinyl)-thioharnstoff 5



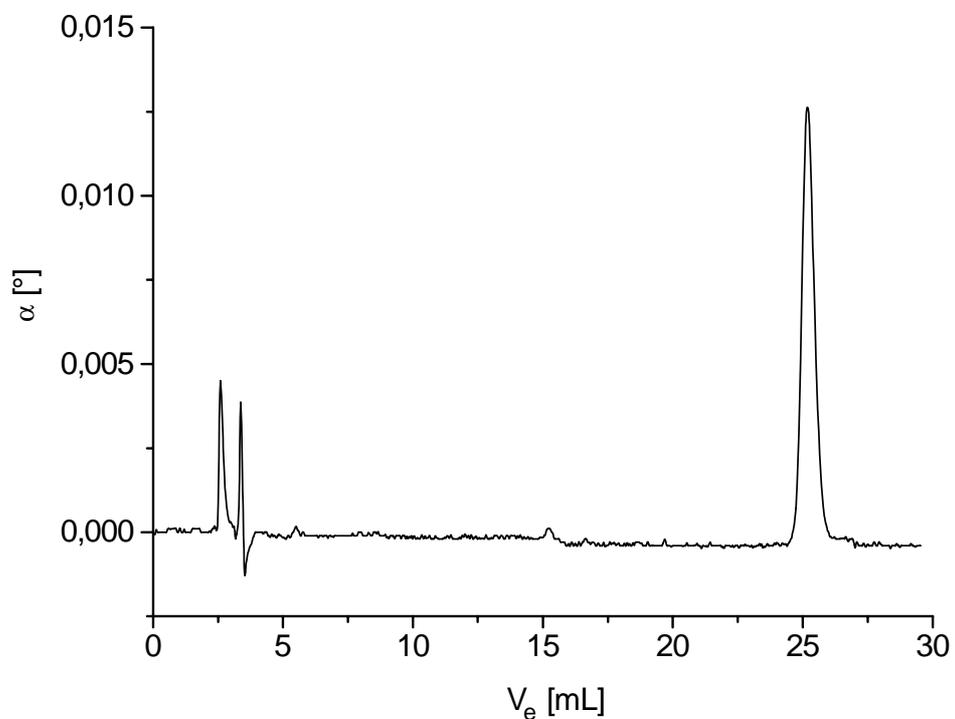
N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*m*-carboxyeosinyl)-thioharnstoff 6



N-(Mono-6-desoxy-cyclodextrinyl)-N'-(*p/m*-carboxyrhodaminy)-thioharnstoff 7

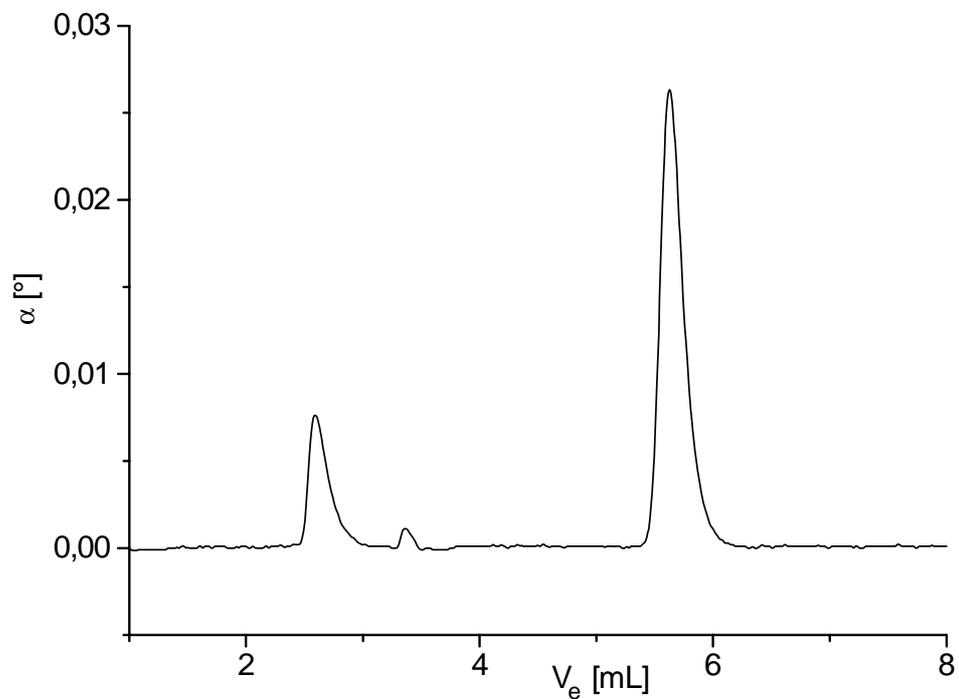


Mono-(6-D(+)-biotinyl-imino-6-desoxy)- β -cyclodextrin 8

Mono-(6-O-(p-tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin 2

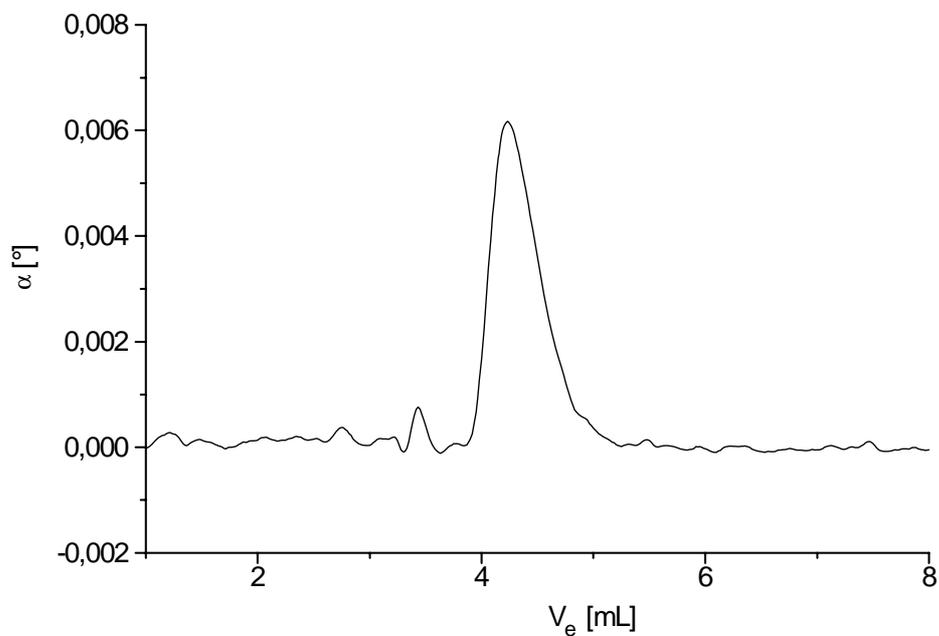
Komponente	Drehwert [°]	Volumen [mL]	Massenanteil [%]
β -Cyclodextrin	0.00452	2.6	12.2
Monotosylat 4	0.01261	25.2	87.8
Laufmittel*	0.00413	3.4	—

* Wasser/Acetonitril/Eisessig (90:10:1)

Mono-(6-azido-6-desoxy)- β -cyclodextrin 3

Komponente	Drehwert [°]	Volumen [mL]	Massenanteil [%]
β -Cyclodextrin	0.00761	2.6	20.1
Monoazid 3	0.02632	5.6	79.9
Laufmittel*	0.00111	3.4	—

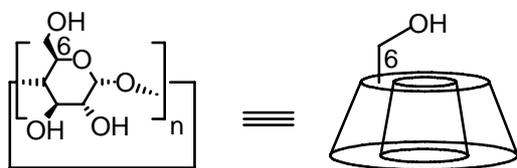
* Wasser/Acetonitril/Eisessig (90:10:1)

Mono-(6-amino-6-desoxy)- β -cyclodextrin 4

Komponente	Drehwert	Volumen [mL]	Massenanteil [%]
β -Cyclodextrin	-	2.6	-
Monoamin 4	0.00614	4.3	100
Laufmittel*	0.00075	3.4	-

* Wasser/Acetonitril/Eisessig (90:10:1)

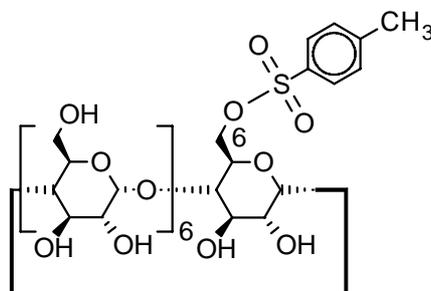
10 Strukturverzeichnis



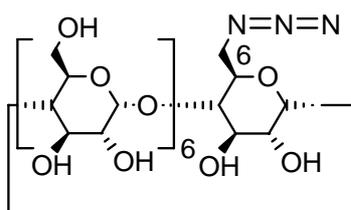
1a ($n = 6$)

1b ($n = 7$)

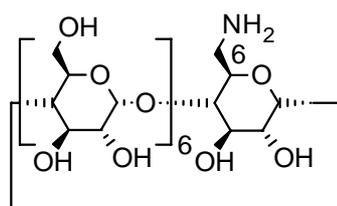
1c ($n = 8$)



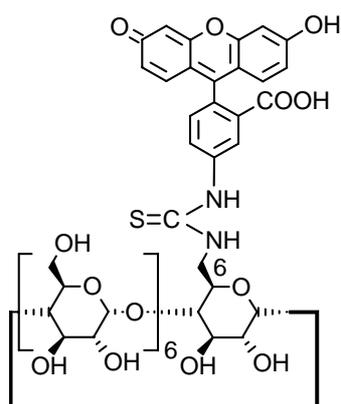
2



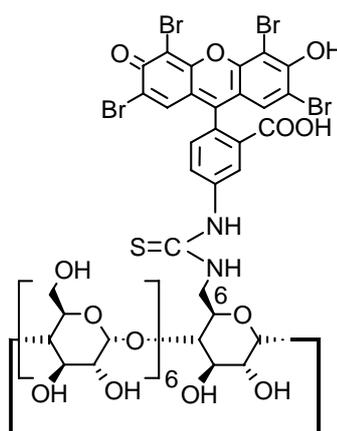
3



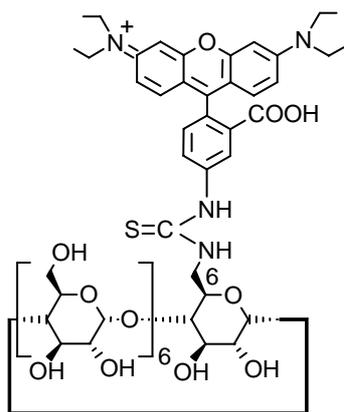
4



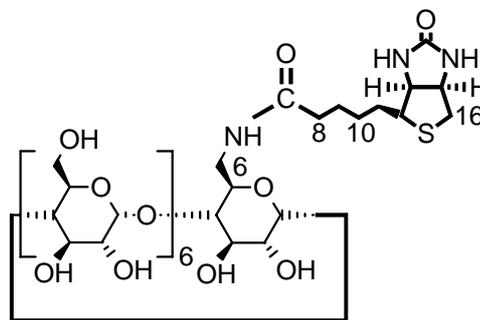
5



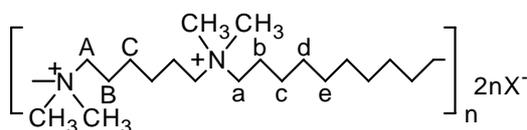
6



7

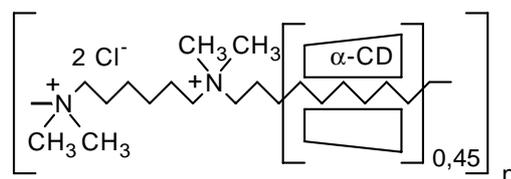


8

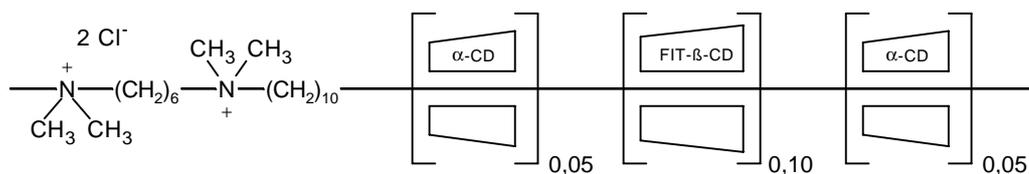


9 (X = Br)

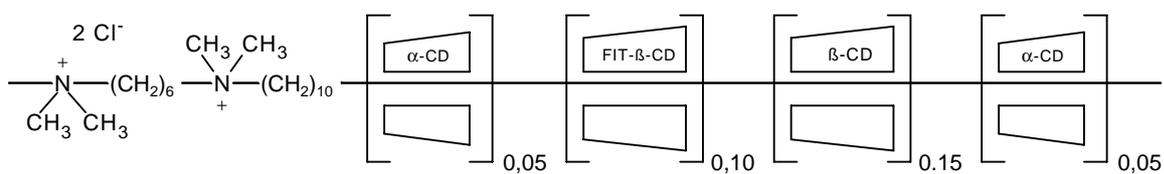
10-12 (X = Cl)



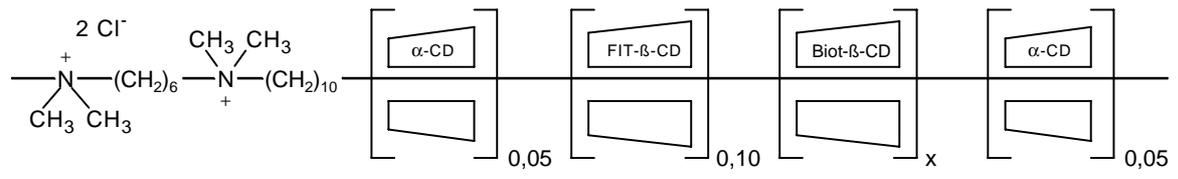
13



14



15

**16**

11 Literaturverzeichnis

Kapitel 1

- [1] G. Wenz, *Angew. Chem.* 106 (1994) 851.
- [2] A. Villiers, *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 112 (1891) 536.
- [3] K. Freudenberg, R. Jakobi, *Liebigs Ann.* 518 (1935) 102.
- [4] K. Freudenberg, M. Meyer-Delius, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 71 (1938) 1596.
- [5] D. French, R. E. Rundle, *J. Am. Chem. Soc.* 64 (1942) 1651.
- [6] W. Saenger, *Angew. Chem.* 92 (1980) 343.
- [7] J. Szejtli, *Cyclodextrin Technology*, Kluwer ISB 90-277-2314-1 1988.
- [8] Y. Takahashi, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* 164 (1987) 277.
- [9] J. Szejtli, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743.
- [10] T. Endo, H. Ueda, S. Kobayashi, T. Nagai, *Carbohydrate, Res.* 269 (1995) 369.
- [11] T. Endo, H. Nagase, H. Ueda, S. Kobayashi, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.* 45 (1997) 532.
- [12] T. Fujiwara, N. Tanaka, S. Kobayashi, *chem. Lett.* 5 (1990) 739.
- [13] H. Ueda, *6TH International Seminar on Inclusion Compounds* (Istanbul) (1995).
- [14] W. Saenger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, et al., *Chem. Rev.* 98 (1998) 1787.
- [15] T. Nakagawa, K. Ueno, M. Kashiwa, J. Watanabe, *Tetraheron Lett.* 35 (1994) 1921.
- [16] G. Gattuso, S. A. Nepogodiev, J. F. Stoddart, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1919.
- [17] W. Saenger, *Structural Aspects of Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Acad. Press ISB 0-12-067101-8 1984.
- [18] W. Linert, P. Margl, I. Lukovits, *Comput. Chem.* 16 (1992) 61.
- [19] K. B. Lipkowitz, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 6357.
- [20] J. E. H. Koehler, W. Saenger, W. F. van Gunsteren, *J. Mol. Biol.* 203 (1988) 241.
- [21] R. I. Gelb, L. M. Schwartz, D. A. Laufer, *Bioorg. Chem.* 11 (1982) 274.

- [22] D. J. Wood, F. E. Hruska, W. Saenger, *J. am. chem. soc.* **99** (1977) 1735.
- [23] M. Sakurai, M. Kitagawa, Y. Inoue, R. Chujo, *Carbohydr. Res.* **198** (1990) 181.
- [24] K. Lindner, W. Saenger, *Angew. Chem.* **90** (1978) 738.
- [25] K. Lindner, W. Saenger, *Carbohydr. Res.* **99** (1982) 103.
- [26] D. French, M. L. Levine, J. H. Pazur, E. Norberg, *J. Am. Chem. Soc.* **71** (1949) 353.
- [27] M. J. Jozwiakowski, K. A. Connors, *Carbohydr. Res.* **143** (1985) 51.
- [28] A. R. Hedges, *Chem. Rev.* **98** (1998) 2035.
- [29] M. Yalpani, *Tetrahedron* **41** (1985) 2957.
- [30] A. P. Croft, R. A. Bartsch, *Tetrahedron* **39** (1983) 1417.
- [31] A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza, *Chem. Rev.* **98** (1998) 1977.
- [32] J. Boger, R. J. Corcoran, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **61** (1978) 2190.
- [33] J. Szejtli, A. Liptak, I. Jodal, P. Fügedi, P. Nanasi, A. Neszmelyi, *Starch* **32** (1980) 165.
- [34] C. T. Rao, B. Lindberg, J. Lindberg, J. Pitha, *J. Org. Chem.* **56** (1991) 1327.
- [35] H. Ryoshi, N. Kunieda, M. Kinoshita, *Makromol. Chem. , Rapid Commun.* (1985) 263.
- [36] M. Komiyama, H. Yamamoto, H. Hirai, *Chem. Lett.* (1984) 1081.
- [37] T. Eiki, T. Horiguchi, Y. Karawazaki, W. Tagaki, *Mem. Fac. Eng. , Osaka City Univ.* **24** (1984) 573.
- [38] S. Bulusu, T. Axenrod, B. Liang, Y. He, L. Yuang, *Magn. Reson. Chem.* **29** (1991) 1018.
- [39] K. Kano, K. Yoshiyasu, S. Hashimoto, *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* **17** (1989) 1278.
- [40] K. Takahashi, K. Hattori, F. Toda, *Tetrahedron Lett.* **25** (1984) 3331.
- [41] K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, *Carbohydr. Res.* **187** (1989) 203.
- [42] H. Parrot-Lopez, C. C. Ling, P. Zhang, A. Baszkin, G. Albrecht, C. d. Rango, A. W. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 5479.
- [43] K. Takeo, K. Uemura, H. Mitoh, *J. Carbohydr. Chem.* **7** (1988) 293.
- [44] S. Kamitori, K. Hirotsu, T. Higuchi, K. Fujita, H. Yamamura, T. Imoto, I. Tabushi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (1987) 7.

- [45] R. C. Petter, J. S. Salek, C. T. Sikorski, G. Kumaravel, F. T. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 3860.
- [46] G. Nelles, *Dissertation, Universität Mainz* (1995) .
- [47] R. I. Gelb, L. M. Schwartz, J. J. Bradshaw, D. A. Laufer, *Bioorg. Chem.* 9 (1980) 299.
- [48] D. Rong, V. T. D'Souza, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 4275.
- [49] P. Fügedi, P. Nanasi, *Carbohydr. Res.* 175 (1988) 173.
- [50] J. Canceill, L. Jullien, L. Lacombe, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* 75 (1992) 791.
- [51] I. Tabushi, K. Yamamura, T. Nabeshima, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5267.
- [52] I. Tabushi, K. Shimokawa, K. Fujita, *Tetrahedron Lett.* 18 (1977) 1527.
- [53] A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem.* 103 (1991) 94.
- [54] B. Casu, M. Reggiani, G. R. Sanderson, *Carbohydr. Res.* 76 (1979) 59.
- [55] G. Wenz, P. Mischnick, R. Krebber, M. Richters, W. A. König, *J. High Resol. Chromatogr. Commun.* 13 (1990) 724.
- [56] G. Wenz, *Carbohydr. Res.* 214 (1991) 257.
- [57] F. Cramer, *Chem. Ber.* 84 (1951) 851.
- [58] F. Cramer, F. M. Henglein, *Chem. Ber.* 90 (1957) 2561.
- [59] H. J. Schneider, *Angew. Chem.* 103 (1991) 1419.
- [60] K. Sasaki, S. D. Christian, E. E. Tucker, *Fluid Phase Equilib.* 49 (1989) 281.
- [61] M. Bastos, L. E. Briggner, I. Shehatta, I. Wadsö, *J. Chem. Thermodyn.* 22 (1990) 1181.
- [62] B. Keller, *Dissertation* xx 1994, p. xx.
- [63] A. Aversa, W. Etter, R. I. Gelb, L. M. Schwartz, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 9 (1990) 277.
- [64] F. W. Lichtenthaler, S. Immel, *Liebigs Ann. Chem.* (1996) 27.
- [65] F. Vögtle, W. M. Müller, V. Werner, H. W. Losenky, *Angew. Chem.* 99 (1987) 930.
- [66] N. Kobayashi, S. Minato, T. Osa, *Makromol. Chem.* 184 (1983) 2123.
- [67] R. I. Gelb, L. M. Schwartz, *J. Inclusion Phenom.* 7 (1989) 465.
- [68] M. Weickenmeier, *Polymer-Institut, Universität, Karlsruhe* 1998, p. 189.

- [69] A. M. d. la Pena, T. Ndou, J. B. Zung, I. M. Warner, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 3330.
- [70] H. Saito, H. Yonemura, H. Nakamura, T. Matsuo, *Chem. Lett.* (1990) 535.
- [71] T. Höfler, *Polymer-Institut*, Universität (TH), Karlsruhe 1996, p. 142.
- [72] B. Steinbrunn, *Polymer-Institut*, Universität, Karlsruhe 1996, p. 152.
- [73] M. B. Steinbrunn, G. Wenz, *Angew. Chem.* 108 (1996) 2274.
- [74] A. Harada, M. Kamachi, *Macromolecules* 23 (1990) 2821.
- [75] J. Li, A. Harada, M. Kamachi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 67 (1994) 2808.
- [76] A. Harada, M. Kamachi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 19 (1990) 1322.
- [77] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *Chem. Lett.* (1993) 237.
- [78] G. Wenz, B. Keller, *Angew. Chem.* 104 (1992) 201.
- [79] G. Wenz, B. Keller, *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 34 (1993) 62.
- [80] W. Herrmann, *Polymer-Institut*, Universität (TH), Karlsruhe 1997, p. 261.
- [81] W. Herrmann, B. Keller, G. Wenz, *Macromolecules* 30 (1997) 4966.
- [82] G. Wenz, B. Keller, *Macromol. Symp.* 87 (1994) 11.
- [83] P. R. Ashton, I. Baxter, M. C. T. Fyfe, F. M. Raymo, N. Spencer, J. F. Stoddart, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 2297.
- [84] S. A. Nepogodiev, J. F. Stoddart, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1959.
- [85] A. Harada, *Acta Polymer.* 49 (1998) 3.
- [86] H. Ogino, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 1303.
- [87] D. L. Dick, T. V. S. Rao, D. Sukumaran, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 2664.
- [88] J. S. Manka, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 2440.
- [89] R. Ishnin, A. E. Kaifer, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 8188.
- [90] M. Kunitake, K. Kotoo, O. Manabe, T. Muramatsu, N. Nakashima, *Chem. Lett.* (1993) 1033.
- [91] I. Kräuter, W. Herrmann, G. Wenz, *J. Incl. Phen. Molec. Recog. in Chem.* 25 (1996) 93.
- [92] M. Born, T. Koch, H. Ritter, *Acta Polymer.* 45 (1994) 68.
- [93] M. Born, H. Ritter, *Angew. Chem.* 107 (1995) 342.

- [94] M. Born, T. Koch, H. Ritter, *Macromol. Chem. Phys.* 196 (1995) 1761.
- [95] M. Born, H. Ritter, *Macromol. Rapid. Commun.* 17 (1996) 197.
- [96] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 3192.
- [97] M. Born, H. Ritter, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 12 (1991) 471.
- [98] I. Yamaguchi, K. Osakada, T. Yamamoto, *Macromolecules* 30 (1997) 4288.
- [99] M. Tamura, A. Ueno, *Chem. Lett.* (1998) 369.
- [100] W. Herrmann, M. Schneider, G. Wenz, *Angew. Chem.* 109 (1997) 2618.

Kapitel 3

- [1] M. Yalpani, *Tetrahedron* 41 (1985) 2957.
- [2] A. P. Croft, R. A. Bartsch, *Tetrahedron* 39 (1983) 1417.
- [3] G. Wenz, *Angew. Chem.* 106 (1994) 851.
- [4] G. Wenz, *Carbohydr. Res.* 214 (1991) 257.
- [5] C. M. Spencer, J. F. Stoddart, R. Zarzycki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* (1987) 1323.
- [6] S. F. Lincoln, J. H. Coates, C. J. Easton, S. J. van Eyk, B. M. May, P. Singh, M. A. Stile, M. L. Williams, *Chem. Abstr.*, Australian Commercial Research and Development Ltd., Au.
- [7] C. T. Rao, B. Lindberg, J. Lindberg, J. Pitha, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 1327.
- [8] K. Koizumi, Y. Kubota, T. Utamura, S. Horiyama, *J. Chromatogr.* 368 (1986) 329.
- [9] Y. Kubota, T. Tanimoto, S. Horiyama, K. Koizumi, *Carbohydr. Res.* 192 (1989) 159.
- [10] L. D. Melton, K. N. Slessor, *Carbohydr. Res.* 18 (1971) 29.
- [11] H. Law, S. Crouzy, N. Evrard, J. Defaye, *9TH International Symposium On Cyclodextrins* (Santiago de Compostela), Selective Electrophilic Monoactivation of β -Cyclodextrin at a Primary Hydroxyl Position (1998).
- [12] K. Takahashi, K. Hattori, F. Toda, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 3331.
- [13] A. Ueno, R. Breslow, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 3451.
- [14] H. Ikeda, Y. Nagano, Y. Q. Du, T. Ikeda, F. Toda, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 5045.
- [15] T. Tahara, K. Fujita, T. Koga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 63 (1990) 1409.

- [16] K. Fujita, S. Nagamura, T. Tahara, T. Koga, *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 3233.
- [17] K. Fujita, T. Tahara, T. Imoto, T. Koga, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 2030.
- [18] A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem.* **103** (1991) 94.
- [19] P. R. Ashton, P. Ellwood, I. Staton, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **103** (1991) 96.
- [20] H. Parrot-Lopez, C. C. Ling, P. Zhang, A. Baszkin, G. Albrecht, C. d. Rango, A. W. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 5479.
- [21] K. Takeo, K. Uemura, H. Mitoh, *J. Carbohydr. Chem.* **7** (1988) 293.
- [22] S. Kamitori, K. Hirotsu, T. Higuchi, K. Fujita, H. Yamamura, T. Imoto, I. Tabushi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (1987) 7.
- [23] R. C. Petter, J. S. Salek, C. T. Sikorski, G. Kumaravel, F. T. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 3860.
- [24] L. Jicsinszky, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **18** (1994) 247.
- [25] Y. Wang, T. Ikeda, A. Ueno, F. Toda, *Tetrahedron Lett.* **34** (1993) 4971.
- [26] F. Djedaini-Pilard, J. Desalos, B. Perly, *Tetrahedron Lett.* **34** (1993) 2457.
- [27] M. T. Reetz, S. R. Waldvogel, *Angew. Chem.* **109** (1997) 870.
- [28] K. Takahashi, M. Kitsuta, K. Imotani, *9TH International Symposium On Cyclodextrins* (Santiago de Compostela), Molecular "Lego" Composed Of Monosubstituted Cyclodextrins (1998).
- [29] A. Ueno, T. Kuwabara, A. Nakamura, F. Toda, *Nature* **356** (1992) 136.
- [30] A. Ueno, S. Minato, I. Suzuki, M. Fukushima, M. Ohkubo, T. Osa, F. Hamada, K. Murai, *Chem. Lett.* **4** (1990) 605.
- [31] Y. Wang, H. Ikeda, A. Ueno, F. Toda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **67** (1994) 1589.
- [32] Q. Chen, I. Suzuki, T. Osa, A. Ueno, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **12** (1991) 113.
- [33] L. Flamigni, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 9566.
- [34] N. O. Mchedlov-Petrossyan, V. I. Kukhtik, *Dyes and Pigments* **24** (1994) 11.
- [35] T. Ikeda, R. Kojin, C. J. Yoon, H. Ikeda, M. Iijima, F. Toda, *J. Inclusion Phenom.* **5** (1987) 93.
- [36] J. M. G. Fernández, C. O. Mellet, S. Maciejewski, J. Defay, *Chem. Commun.* (1996) 2741.

- [37] M. Tamura, A. Ueno, *Chem. Lett.* (1998) 369.
- [38] M. Tamura, D. Gao, A. Ueno, *9TH International Symposium On Cyclodextrins* (Santiago de Compostela), Energy Transfer In Naphthalene-Containing Rotaxane And Polyrotaxane (1998).
- [39] I. Kräuter, *Polymer-Institut, Universität (TH), Karlsruhe* 1995, p. 76.
- [40] G. Nelles, *Dissertation, Universität Mainz* (1995) .
- [41] M. Rahman, A., D. R. Kelly, P. Ravi, R. Underwood, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron* 42 (1986) 2409.
- [42] N. O. Mchedlov-Petrosyan, L. P. Adamovich, L. E. Nikishina, *Zh. Anal. Khim.* 35 (1980) 1495.
- [43] U. Anthoni, C. Christophersen, P. H. Nielsen, A. Püschl, *Structural Chemistry* 6 (1995) 161.
- [44] N. O. Mchedlov-Petrosyan, L. A. Fedorov, S. A. Sokolovskii, Y. N. Surov, R. S. Maiorga, *Izv. Akad. Nauk, Ser. Khim.* 3 (1992) 512.
- [45] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* 103 (1970) 788.
- [46] Y. Matsui, T. Nishioka, T. Fujita, *Topics in Current Chemistry*, Springer 1985, p. 61.

Kapitel 4

- [1] R. Brenneisen, *J. Prakt. Chem.* 14 (1941) 159.
- [2] J. Wang, W. H. Meyer, G. Wegner, *Macromol. Chem. Phys.* 195 (1994) 1777.
- [3] A. Rembaum, *J. Macromol. Sci. Chem.* A3 (1969) 87.
- [4] A. Rembaum, H. Noguchi, *Macromolecules* 5 (1972) 261.
- [5] M. Bockstaller, *Polymer-Institut, Universität (TH), Karlsruhe* 1997, p. 88.
- [6] G. Wenz, *Angew. Chem.* 106 (1994) 851.
- [7] G. Wenz, B. Keller, *Angew. Chem.* 104 (1992) 201.
- [8] W. Herrmann, *Polymer-Institut, Universität (TH), Karlsruhe* 1997, p. 261.
- [9] W. Herrmann, B. Keller, G. Wenz, *Macromolecules* 30 (1997) 4966.
- [10] P. J. Wyatt, *Anal. Chem. Acta* 272 (1993) 1.
- [11] M. Wintermantel, M. Schmidt, A. Becker, R. Dorn, A. Kühn, R. Lösch, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 40 (1992) 331.

- [12] T. Hofe, *Chemie und Pharmazie*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz 1997, p. 116.
- [13] B. H. Zimm, *J. Chem. Phys.* 16 (1948) 1099.
- [14] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie, Vol. 2*, Birkhäuser, Berlin 1996.
- [15] J. Yamanaka, H. Araie, H. Matsuoka, H. Kitano, N. Ise, T. Yamaguchi, S. Saeki, M. Tsubokawa, *Macromolecules* 24 (1991) 6156.
- [16] J. Cohen, Z. Priel, *J. Chem. Phys.* 88 (1988) 7111.
- [17] P. J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca 1986.
- [18] K.-F. Arndt, G. Müller, *Polymer Charakterisierung*, Carl Hanser, München 1996.
- [19] L. Zhoumei, Z. Xuexin, C. Yuanpei, Z. Youanzhen, *Macromolecules* 25 (1992) 450.
- [20] W.-M. Kulicke, A. Jacobs, *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* 61 (1992) 59.
- [21] J. G. Kirkwood, J. Riseman, *J. Chem. Phys.* 16 (1948) 565.
- [22] J. G. Kirkwood, *Theory of solutions*, Gordon & Breach, New York 1968.

Kapitel 5

- [1] B. Michov, *Elektrophorese Theorie und Praxis*, Walter de Gruyter & Co, Berlin 1996.
- [2] P. de Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Cornell University Press 1979.
- [3] L. S. Lerman, H. L. Frisch, *Biopolymers* 21 (1982) 995.
- [4] O. J. Lumpkin, B. H. Zimm, *Biopolymers* 21 (1982) 2315.
- [5] O. J. Lumpkin, P. Dejardin, B. H. Zimm, 24 (1985) 1573.
- [6] P. D. Grossmann, S. Menchen, D. Hershey, *GATA* 9 (1992) 9.
- [7] E. M. Southern, *Anal. Biochem.* 100 (1979) 319.
- [8] D. Rodbard, A. Chrambach, *Proc. Nac. Acad. Sci. USA* 65 (1970) 970.
- [9] J. A. Ogston, *Trans Faraday Soc.* 54 (1958) 1754.
- [10] G. A. Griess, K. B. Guiseley, P. Serwer, *Biophys. J.* 65 (1993) 138.
- [11] W. Herrmann, *Polymer-Institut*, Universität (TH), Karlsruhe 1997, p. 261.

- [12] W. Herrmann, B. Keller, G. Wenz, *Macromolecules* 30 (1997) 4966.
- [13] G. Wenz, *Angew. Chem.* 106 (1994) 851.
- [14] N. O. Mchedlov-Petrossyan, L. A. Fedorov, S. A. Sokolovskii, Y. N. Surov, R. S. Maiorga, *Izv. Akad. Nauk, Ser. Khim.* 3 (1992) 512.
- [15] N. O. Mchedlov-Petrossyan, V. I. Kukhtik, *Dyes and Pigments* 24 (1994) 11.
- [16] G. Wenz, B. Keller, *Angew. Chem.* 104 (1992) 201.
- [17] H. Dautzenberg, J. Koetz, K. J. Linow, B. Philipp, G. Rother, *Static light scattering of polyelectrolyte complex solution*, Springer-Verlag 1994.

Kapitel 6

- [1] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie, Vol. 1*, VCH Weinheim 1994.
- [2] L. M. Davis, F. R. Fairfield, C. A. Harger, J. H. Jett, R. A. Keller, et al., *Genetic Anal.* 8 (1991) 1.
- [3] J. H. Jett, R. A. Keller, J. C. Martin, B. L. Marrone, R. K. Moyzis, et al., *J. Biomol. Struct. Dynamics* 7 (1989) 301.
- [4] P. M. Goodwin, C. W. Wilkerson, W. P. Ambrose, R. A. Keller, *Proc. SPIE* 1895 (1993) 79.
- [5] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, M. E. Johnson, J. C. Martin, et al., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 97 (1993) 1535.
- [6] D. Y. Cheng, K. Adelhelm, X. L. Cheng, N. J. Dovichi, *Analyst* 119 (1994) 349.
- [7] Y. F. Cheng, N. J. Dovichi, *Science* 242 (1988) 562.
- [8] D. Y. Chen, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.* 68 (1996) 690.
- [9] D. M. Pinto, E. A. Arriaga, S. Sia, Z. Li, N. J. Dovichi, *Electrophoresis* 16 (1995) 534.
- [10] D. B. Craig, J. C. Y. Wong, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.* 68 (1996) 697.
- [11] D. Craig, E. Arriaga, P. Banks, Y. Zhang, A. Renborg, et al., *Biochem.* 226 (1995) 147.
- [12] J. Y. Zhao, N. J. Dovichi, O. Hindsgaul, S. Gosselin, M. M. Palcic, *Glycobiology* 4 (1994) 239.
- [13] Y. Zhang, X. C. Li, N. J. Dovichi, C. A. Compston, M. M. Palcic, et al., *Anal. Biochem.* 227 (1995) 368.

- [14] J. Z. Zhang, Y. Fang, J. Y. Hou, H. J. Ren, R. Jiang, et. al., *Anal. Chem.* 67 (1995) 4589.
- [15] H. Swerdlow, J. Z. Zhang, D. Y. Chen, H. R. Harke, R. Grey, et. al., *Anal. Chem.* 63 (1991) 2835.
- [16] S. Bossmann, *Engler-Bunte Institut*, Universität (TH), Karlsruhe 1998.
- [17] W. Xu, J. N. Demas, B. A. DeGraff, M. Whaley, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 6546.
- [18] T. C. Werner, I. M. Warner, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 18 (1994) 385.
- [19] T. C. Werner, K. Colwell, R. A. Agbaria, I. M. Warner, *Appl. Spectrosc.* 50 (1996) 511.
- [20] L. Flamigni, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 9566.
- [21] M. Milewski, M. Sikorski, A. Maciejewski, M. Mir, F. Wilkinson, *J. Chem. Soc. , Faraday Trans.* 93 (1997) 3029.
- [22] R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, A. Panagia, G. Sartor, et al., *Chem. Eur. J.* 2 (1996) 373.
- [23] H. Ikeda, M. Nakamura, N. Ise, N. Oguma, A. Nakamura, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 10980.
- [24] K. Takahashi, M. Kitsuta, K. Imotani, *9TH International Symposium On Cyclodextrins* (Santiago de Compostela), Molecular "Lego" Composed Of Monosubstituted Cyclodextrins (1998).
- [25] J. W. Park, S. H. Park, B. A. Lee, S.-Y. Lee, *Chemistry Letters* (1997) 1043.
- [26] X. Shen, M. Belletete, G. Durocher, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 1877.
- [27] N. J. Dovichi, D. D. Chen, in T. Basche (Ed.): *Single -Mol. Opt. Detect., Imaging Spectrosc.*, VCH Weinheim Germany 1997, p. 223.
- [28] W. Herrmann, *Polymer-Institut*, Universität (TH), Karlsruhe 1997, p. 261.
- [29] W. Herrmann, B. Keller, G. Wenz, *Macromolecules* 30 (1997) 4966.
- [30] D. M. Gravett, J. E. Guillet, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 5970.
- [31] J. Pozuelo, F. Mendicuti, W. L. Mattice, *Macromolecules* 30 (1997) 3685.
- [32] M. Kremm, *Polymer-Institut*, Universität (TH), Karlsruhe 1994, p. 81.
- [33] M. Kasha, *Basic Life Sci.* 58 (1991) 231.
- [34] W. S. Struve, *Adv. Photosynth.* 2 (1995) 297.

- [35] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc., Eugene 1996.
- [36] J. W. Erickson, R. Mittal, R. A. Cerione, *Biochem.* 34 (1995) 8693.
- [37] J. P. Cooper, P. J. Hagerman, *Biochem.* 29 (1990) 9261.
- [38] A. D. Horowitz, J. E. Baatz, J. A. Whitsett, *Biochem.* 32 (1993) 9513.
- [39] J. Ju, A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Nat. Med.* 2 (1996) 246.
- [40] A.-P. Wei, J. N. Herron, D. A. Christensen, *ACS Symp. Ser.* 511 (1992) 105.
- [41] H. F. Glenn, E. Helfand, *Polym. Prepr.* 27 (1986) 375.
- [42] M. Tamura, A. Ueno, *Chem. Lett.* (1998) 369.
- [43] M. Tamura, D. Gao, A. Ueno, *9TH International Symposium On Cyclodextrins* (Santiago de Compostela), Energy Transfer In Naphthalene-Containing Rotaxane And Polyrotaxane (1998).
- [44] V. M. Agranovich, M. D. Galanin, *Electronic Excitation Energy Transfer in Condensed Matter*, New York 1982.
- [45] G. Weber, E. Daniels, *Biochem.* 5 (1966) .
- [46] L. Erijman, G. Weber, *Biochem.* 30 (1991) 1595.
- [47] L. W. Runnels, S. F. Scarlata, *Biophysical Journal* 69 (1995) 1569.

Kapitel 7

- [1] H. Robenek, M. Amrein, J. Bereiter-Hahn, S. Eins, J. Engelhardt, D. Gerlach, R. Gieseler, W. Knebel, R. Reichelt, K. J. Stiller, K. Zierold, *Mikroskopie in Forschung und Praxis*, Robenek, H. 1995.
- [2] M. Dichtl, *Experimentelle Biophysik E22*, Technische Universität München, München 1997, p. 104.
- [3] F. Löscher, S. Böhme, J. Martin, S. Seeger, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3202.
- [4] F. Löscher, T. Ruckstuhl, S. Seeger, *Adv. Mater.* 10 (1998) 1005.
- [5] N. Tomioka, D. Takasu, T. Takahashi, T. Aida, *Angew. Chem.* 110 (1998) 1611.
- [6] S. Nie, R. N. Zare, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26 (1997) 567.
- [7] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, *Phys. Rev. Lett.* 49 (1982) 57.
- [8] G. Brink, *Labo* (1996) 1996.

- [9] T. Basche, *Angew. Chem.* 106 (1994) 1805.
- [10] E. Betzig, R. J. Chichester, *Science* 262 (1993) 1422.
- [11] V. G. Tarrach, M. A. Bopp, M. A. Lieb, *Spektrum der Wissenschaft* (1997) 27.
- [12] S. Karrasch, M. Dolder, F. Schabert, J. Ramsden, A. Engel, *Biophys. j.* 65 (1987) 2437.
- [13] R. Wepf, M. Armrein, A. Bremer, U. Aebi, H. Gross, *Electron Microscopy 3* (1992) 751.
- [14] M. Radmacher, R. W. Tillmann, M. Fritz, H. E. Gaub, *Science* 257 (1992) 1900.
- [15] M. Fritz, *Physik*, TU München, München 1993, p. 107.
- [16] A. R. Kirby, A. P. Gunning, V. J. Morris, *Biopolymers* 38 (1996) 355.
- [17] T. M. McIntire, R. M. Penner, D. A. Brant, *Macromolecules* 28 (1995) 6375.
- [18] T. A. Talashek, *9TH International Symposium On Cyclodextrins* (Santiago de Compostela), A Comparison of Scanning Probe Microscopy and Size Exclusion Chromatography/Multiple Angle Laser Light Scattering for Determination of the Molecular Weight Distribution of Xanthan (1998).
- [19] H. G. Hansma, M. Bezanilla, F. Zenhäusern, M. Adrian, R. L. Sinsheimer, *Nucl. Acid. Res.* 21 (1990) 505.
- [20] S. W. Choi, *Polymer-Institut*, Universität (TH), Karlsruhe 1998.
- [21] H. Beyer, *Institut für Angewandte Physik*, Universität Karlsruhe (TH), Karlsruhe 1997.
- [22] G. Decher, in J. P. Sauvage, M. W. Hosseini (Eds.): *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 9*, Pergamon Press, Oxford 1996, p. 507.
- [23] G. Decher, *Science* 277 (1997) 1222.
- [24] F. Saremi, E. Maassen, B. Tieke, G. Jordam, W. Rammensee, *Langmuir* 11 (1995) 1068.
- [25] X. Chatellier, T. J. Senden, J.-F. Joanny, J.-M. Di Meglio, *Europhys. Lett.* 41 (1998) 303.
- [26] D. J. Müller, A. Engel, *Biophysical Journal* 73 (1997) 1633.
- [27] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, London 1991.
- [28] H. J. Butt, M. Jaschke, W. Ducker, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 38 (1995) 191.
- [29] D. H. Reneker, I. Chun, *Polymer Preprints* 37 (1996) 564.

- [30] G. Decher, B. Lehr, K. Lowack, Y. Lvov, J. Schmitt, *Biosens. Bioelectron.* 9 (1994) 677.
- [31] Y. M. Lvov, G. Decher, *Crystallography Reports* 39 (1994) 628.
- [32] J. Blaakmer, M. R. Böhmer, M. A. C. Stuart, G. J. Fleer, *Macromolecules* 23 (1990) 2301.
- [33] M. Göpel, W. Henzler, *Oberflächenphysik des Festkörpers*, Teubner Verlag, Stuttgart 1991.
- [34] L. P. Meier, M. Heule, W. R. Caseri, R. A. Shelden, U. W. Suter, G. Wenz, B. Keller, *Macromolecules* 29 (1996) 718.
- [35] W. Saenger, *Angew. Chem.* 92 (1980) 343.
- [36] W. Saenger, *Structural Aspects of Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Acad. Press ISBN 0-12-067101-8 1984.
- [37] J. Buddrus, *Grundlagen der Organischen Chemie, Vol. 2*, Walter de Gruyter, Berlin 1990.
- [38] C. Gerthsen, *Physik*, Springer Verlag, Heidelberg 1997.
- [39] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie, Vol. 1*, VCH Weinheim 1994.
- [40] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc., Eugene 1996.
- [41] T. Schmidt, G. J. Schütz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, H. Schindler, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 17662.
- [42] H. Dautzenberg, J. Koetz, K. J. Linow, B. Philipp, G. Rother, *Static light scattering of polyelectrolyte complex solution*, Springer-Verlag 1994.
- [43] J. Spinke, *Chemie und Pharmazie*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz 1992, p. 145.
- [44] L. Häußling, B. Michel, H. Ringsdorf, H. Rohrer, *Angew. Chem.* 103 (1991) 568.
- [45] E. A. Bayer, H. Ben-Hur, M. Wilchek, *Methods in Enzymology* 184 (1990) 80.
- [46] A. Marquet, *Pure & Appl. Chem.* 49 (1977) 183.
- [47] D. Savage, *Avidin-Biotin-Chemistry: A Handbook*, Pierce Chemical Company 1992.
- [48] K. Ernst-Cabrera, M. Wilchek, *Med. Sci. Res.* 16 (1988) 305.
- [49] M. Rehak, M. Snejdarkova, *Biosensors & Bioelectronics* 9 (1994) 337.
- [50] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Anal. Biochem.* 171 (1988) 1.

- [51] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Methods in Enzymology*, Vol. 184, Academic Press, San Diego 1990.
- [52] R. C. Ebersole, J. A. Miller, J. R. Moran, M. D. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 3239.
- [53] W. A. Hendrickson, A. Pähler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merritt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 2190.
- [54] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salem, *Science* 243 (1989) 85.
- [55] R. K. Galick, R. W. Giese, *The Journal of Biological Chemistry* 263 (1988) 210.
- [56] K. A. Marx, L. A. Samuelson, M. Kamath, J. O. Lim, S. Sengupta, e. alt., *Advances in Chemistry Series 240* (1994) 395.
- [57] L. Klevan, G. Gebeyehu, *Methods in Enzymology*, Academic Press 1990.
- [58] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Trends Biochem. Sci.* 14 (1989) 408.
- [59] J. Spinke, M. Liley, F.-J. Schmitt, H.-J. Guder, L. Angermaier, *J. Chem. Phys.* 99 (1993) 7012.
- [60] A. Schmidt, J. Spinke, T. Bayerl, E. Sackmann, W. Knoll, *Biophys. J.* 60 (1991) 716.
- [61] J. Spinke, J. Yang, H. Wolf, M. Liley, H. Ringsdorf, W. Knoll, *Biophys. J.* 63 (1992) 1667.
- [62] W. Müller, H. Ringsdorf, E. Rump, G. Wildburg, X. Zhang, L. Angermaier, W. Knoll, M. Liley, J. Spinke, *Science* 262 (1993) 1706.
- [63] W. Müller, H. Ringsdorf, E. Rump, X. Zhang, L. Angermaier, W. Knoll, J. Spinke, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 6 (1994) 481.
- [64] R. Blankenburg, P. Meller, H. Ringsdorf, C. Salesse, *Biochemistry* 28 (1989) 8214.
- [65] G. U. Lee, D. A. Kidwell, R. J. Colton, *Langmuir* 10 (1994) 354.
- [66] A. L. Weisenhorn, F.-J. Schmitt, W. Knoll, P. K. Hansma, *Ultramicroscopy* 42-44 (1992) 1125.
- [67] H. Zabel, I. K. Robinson, *Surface X-Ray and Neutron Scattering*, Springer-Verlag, Berlin 1992.
- [68] R. Blankenburg, , Universität, Mainz 1989.

- [69] J.-D. Hong, K. Lowack, J. Schmitt, G. Decher, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 93 (1993) 98.
- [70] W. Herrmann, B. Keller, G. Wenz, *Macromolecules* 30 (1997) 4966.

Kapitel 9

- [1] M. Bockstaller, *Polymer-Institut*, Universität (TH), Karlsruhe 1997, p. 88.
- [2] W. Herrmann, B. Keller, G. Wenz, *Macromolecules* 30 (1997) 4966.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Wenz danke ich herzlich für die interessante und vielseitige Themenstellung, seine Anregungen dazu und den gewährten, wissenschaftlichen Freiraum sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Prof. Dr. Sackmann, M. Dichtl, C. M. Kacher, R. Merkel und M. Fritz danke ich für ihre Kooperation bei der Durchführung der Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie und für die zahlreichen fachlichen Diskussionen.

Prof. Dr. Braun und PD S. Bossmann danke ich für eine gute Zusammenarbeit, PD. S. Bossmann für die Durchführung der Fluoreszenzmessungen und die kritische Diskussion der Ergebnisse.

Kerstin Nothhelfer und Susanne Wehrle danke ich für ein lustiges Arbeitsklima unter Frauen mit vielen Witzen und neuen Erkenntnissen. Darüber hinaus danke ich Kerstin Nothhelfer für zahlreiche fachliche Diskussionen, eine gute Zusammenarbeit im Labor, die Messung meiner NMR-Spektren, und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Den "Jungs" Dr. Thomas Höfler, Dr. Wolfgang Herrmann und Dr. Marc Boris Steinbrunn danke ich für die Einweisung in diverse Computer-Programme, Meß- und Arbeitsmethoden, die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren und die kritischen fachlichen Diskussionen. Darüber hinaus danke ich Boris für die ultimative Erkenntnis, daß alles was schwarz ist nicht gleich schlecht sein muß, Thomas für die Antwort auf die Frage "warum der Salat vor das Hauptgericht gehört" und Wolfgang für viele gesellige Abende im Labor, ein klasse Poster und die stets aktuellen Fußballnachrichten.

Dr. Maria Schneider danke ich sehr herzlich für ihre Freundschaft, Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung in allen Stadien dieser Arbeit sowie bei der fachgerechten Entsorgung unzähliger schwarzer und nicht schwarzer Altlasten.

Den Computer-Spezialisten Marc De Paoli und Jens Wiesecke danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz auf der Jagd nach Viren, überflüssigen Programmen und versteckten Dateien sowie ihrem Homeservice in dringenden Notfällen!

Meinen Kollegen Dr. Meik Weikenmeier, Holger Kern, SooWhan Choi, Petra Liepold, Carmen Gruber, Annette Hochgesand und Sebastian Dörr danke ich für ein super Arbeitsklima mit Witz, kulinarischen Hochgenüssen, wissenschaftlichen Sensationen und vielem mehr. Darüber hinaus danke ich Meik und Holger für ihr Engagement rund um das NMR-Spektrometer, Holger und Petra für die Einweisung in die Geheimnisse der Cellulosechemie, Petra für die Messung meiner NMR-Spektren

und Carmen für die akribische Durchsicht dieser Arbeit und ihre wertvollen Anmerkungen zum Text.

Mein Dank gilt auch den ehemaligen Arbeitskreismitgliedern Dr. Gabi Nelles, Dr. Denise Sequeira-Petri, Heike Lauer, Michael Bockstaller und Axel Eisenmann, Gabi für ihre fachliche Unterstützung bei meinem Einstieg in die Cyclodextrinchemie, Michael für seine Kooperation auf dem Gebiet der Ionene, Denise und Heike für Einblicke in die Techniken der Oberflächenbeschichtung und Axel für seine gute Mitarbeit während dem Vertiefungs-Praktikum.

Bei allen Angestellten des Polymer-Instituts bedanke ich mich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, C. Brand besonders für ihre Unterstützung in allen Verwaltungsfragen sowie den technischen Angestellten der Werkstatt, Herrn Kühn und Herrn Zachmann, für ihren Einsatz beim Aufbau der Fotokamera für die Elektrophorese.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Dr. M. Ballauff und Prof. Dr. M. Rehahn möchte ich für das gute Miteinander, die Hilfsbereitschaft und viele gesellige Stunden danken, Dr. Andreas Horvath für seine Hilfe in Sicherheitsfragen sowie bei der Organisation des Chemikalienlagers, Wolfgang Arbogast besonders für die Durchführung der Lichtstremessungen und die damit verbundenen Lehrstunden und Diskussionsrunden, Dr. Axel Weiss für die intensive Vorbereitung auf meine Promotionsprüfung sowie den Physikern Dominic Pötschke und Dr. Nico Dingenouts für viele lustige Stunden in der UNI West (vor allem wegen der Blondinenwitze!).

Dr. Steffen Kelch danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit vom Studium bis zur Promotion, die arbeitskreisübergreifenden wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Diskussionen, die kritische Durchsicht meiner Arbeit und für eine gute Nachbarschaft!

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich sehr herzlich für ihre moralische und tatkräftige Unterstützung.