

A ciklodextrin-kutatás Magyarországon

A ciklodextrinek története hosszú: már 1891-ben leírta *de Villiers*, hogy a burgonya rothadásánál egy kristályos anyag keletkezik. Évszázadunk első-második évtizedében ezt a jelenséget részletesen egy osztrák mikrobiológus, *Franz Schardinger* tanulmányozta. Az izolált kristályos anyag szerkezetét csak a 30-as években derítették fel *Freudenberg* és munkatársai. Az 50-es években két helyen folyt intenzív kutatás: az USA-ban *French* és az NSzK-ban *Cramer* laboratóriumaiban. Fény derült arra, hogy a ciklodextrinek olyan különleges sajátságokkal rendelkeznek, amelyek beláthatatlanul széles körű felhasználási lehetőségeknek nyitnak utat. *French* 1957-ben publikálta az első ciklodextrin monográfiát [1]. A 133 oldalas egyébként kitűnő összeállításban mindössze 8 sort szentelt a toxikológia kérdésének — mindenféle hivatkozás, részletek nélkül — azt közölve, hogy béta ciklodextrinnel etetett patkányok elpusztultak, tehát a ciklodextrin toxikus. Ezzel a ciklodextrin iránti érdeklődés 20 évre álomba merült.

A 70-es évek elején a ciklodextrin-irodalom tanulmányozásából azt lehetett következtetni, hogy a ciklodextrinek

- rendkívül érdekes, sokatígérő vegyületsaladot képeznek,
- előállításuk bonyolult, drága,
- toxicitásuk miatt alkalmazásuk reménytelen.

Két országban: Japánban és Magyarországon a keményítő kémiai foglalkozó kutatók a két utóbbi állítást nem tudták elhinni. Így Japánban és teljesen függetlenül Magyarországon, a Chinoinban intenzív kutatás indult a ciklodextrinek előállítására, biológiai és kémiai sajátságaiknak a felderítésére és főképpen ipari alkalmazási lehetőségeiknek a feltárására.

A Chinoin ciklodextrin-team mindhárom ciklodextrinre kidolgozott gazdaságos ipari technológiát. A ciklodextrin ára az 1978. évi 2000 USD/kg-ról napjainkra már 10 USD/kg alá csökkent és lesz még olcsóbb is. Az állítólagos toxicitás kísérleti hiba volt: a béta ciklodextrinnel végzett krónikus toxicitási vizsgálatok szerint — az anyag, amit ma gyártunk — egyáltalán nem toxikus. Radioaktív ciklodextrin vizsgálatokkal felderítettük az orálisan beadott béta-ciklodextrin sorsát a szervezetben. Dokumentációnk alapján már több országban (Franciaország, Spanyolország, Hollandia, Belgium, Olaszország, NSzK stb.) a ciklodextrinek valamelyike valamilyen termékben, vagy termékcsoportban emberi fogyasztásra engedélyezve van és számos más országban folyamatban van az engedélyezés. Csupán idő kérdése az FDA engedély kiadása

* CYCLOLAB, Cyclodextrin Kutató-Fejlesztő Leányvállalat, Budapest

az első ciklodextrin humán fogyasztásra, illetve alkalmazásra, ami után csupán az USA-ban 32 000 tonnára becsülik a ciklodextrinek piacát. Ez sok új termék, de még több ismert, régi termék új, kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező, versenyképesebb formáinak a gyártását fogja lehetővé tenni.

A Chinoin Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyárának Biokémiai Kutató Laboratóriuma 1975-től kezdve csak a ciklodextrin kutatással foglalkozott és foglalkozik ma is, bár neve először Ciklodextrin Kutató Laboratóriumra változott, majd 1989. január 1-től a jelenleg 24 fővel dolgozó laboratórium CYCLOLAB, Cyclodextrin Kutató-Fejlesztő Leányvállalat néven önállóan gazdálkodik és teljes egészében a ciklodextrin kutatásból él. Bevételeinek kb. 90%-a külföldi gyógyszer- és élelmiszeripari vállalatoktól származik, amelyek számára ciklodextrin alkalmazásával kapcsolatos know-how-kat, licenceket, kutatási jelentéseket szállít. A CYCLOLAB-nak a ciklodextrin „monokultúrán” kívül még egy egyedi vonása van: azon kevés magyar vállalatok közé tartozik, amelyek bevételei kizárólagosan tudományos célokra fordítva eredmények értékesítéséből (exportjából) származnak. Ahhoz azonban, hogy odáig el lehessen jutni, hogy ha pl. egy külföldi gyógyszergyár a szakirodalom alapján arra a következtetésre jut, hogy valamilyen termékében vagy technológiájában a ciklodextrinek alkalmazását érdemes lenne kipróbálni, akkor a CYCLOLAB-hoz érdemes fordulnia, előbb egy évtizedig pénzt nem hozó alaputatást kellett végezni, publikációk, szabadalmak, előadások tucatjait kellett produkálni. Túlzás lenne azt állítani, hogy a Chinoin vezetésében mindig, mindenki támogatta ezt a tényleg sok pénzbe kerülő témát, de a végső döntés végül is mindig pozitív volt. A legkeményebb értetlenségbe a tudományos eredmények publikálására irányuló törekvések ütköztek. Ha ezt nem tettük volna meg, nem lenne ismert Laboratóriumunk, nem lenne munkánk.

1974–1988 között ez a laboratórium 4 könyvet, több mint 140 tudományos közleményt publikált a ciklodextrin kémia minden területéről. Több mint 70 tárlalmányi bejelentést és 12 doktori értekezést dolgoztak itt ki. Magyarországon kb. egy tucat kutatóhely dolgozik vagy dolgozott a ciklodextrin-kutatás valamelyik részterületén. 1975-től kezdve évente szerveztek egy ciklodextrin munkaértekezletet ezen csoportok résztvevőinek és 1981-ben ez lett az első Nemzetközi Ciklodextrin Szimpózium, melyet Budapesten tartottak több mint 200 résztvevővel, 18 országból. Ezt követte a II. Nemzetközi Szimpózium Tokióban 1984-ben, a III. Lancasterben 1986-ban, a IV. Münchenben, az V. szimpóziumot 1990-ben Párizsban fogják tartani, de már az 1992. évi VI. szimpózium helyszíne is megvan: Miami.

Időközben a ciklodextrin-irodalom robbanásszerű növekedést mutatott. 1988-ban kb. 600 (!) új publikáció, szabadalom, konferencia kivonat került közlésre. 1986 óta megjelenik egy havi folyóirat, a Cyclodextrin News, amely havonta átlagosan 50 kivonatot közöl, valamint a vonatkozó információkat a ciklodextrinekről, szimpóziумokról, könyvekről, termelésről, marketingről, licencekről. Manapság nem létezik gyógyszerészeti, aroma, szénhidrát, zárvány, kromatográfia stb. témájú szimpóziум anélkül, hogy azon ne tartanának ciklodextrinokkal kapcsolatos előadásokat. A ciklodextrineket és kémiailag vagy enzimesen modifikált származékaikat lehet használni az:

élelmiszer- gyógyszer- növényvédőszer- kozmetikai-	stabilizálására szagtalanításra oldékonyság növelésre biológiai hasznosít- hatóság növelésre
robbanóanyag- diagnosztikum- műanyag- stb.	iparokban formulázására kellemetlen ízek csök- kentésére irritáló hatások csök- kentésére stb.

Ennek a felsorolásnak nyilván van határa, de azt még nem ismerjük.

A rendkívül szerteágazó lehetőségeket a továbbiakban csak illusztrálni lehetséges néhány területen mint pl.

- biotechnológia,
- vegyipar,
- élelmiszeripar,

de a terjedelem szabta korlátok miatt itt nem kerülhet áttekintésre pl. a ciklodextrinek növényvédőszeripari, analitikai kémiai (főleg kromatográfiai) stb. lehetőségekkel foglalkozó irodalma.

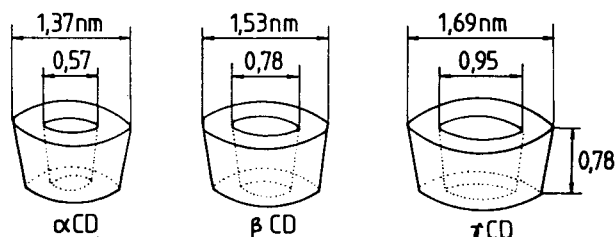
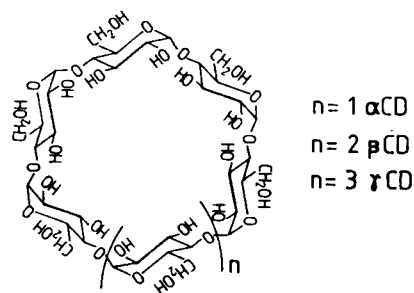
A ciklodextrinek és zárványkomplexeik

A ciklodextrinek kémiája

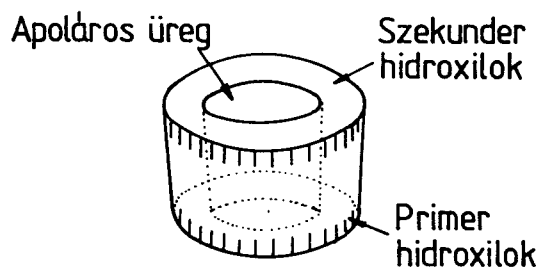
A ciklodextrinek a keményítő enzimes átalakításának a termékei. A részlegesen előhidrolizált keményítőt (=aciklikus dextrinek keveréke) a ciklodextrin-glikozil transzferáz enzim alakítja át ciklikus dextrinekké. Ezt az enzimet különböző mikroorganizmusok, pl. a *Bacillus macerans* tudja termelni. Az olyan keverék előállítása, amely a ciklikus és az aciklikus dextrinek keverékéből áll könnyű, izolálni azonban a ciklodextrineket jó kitermeléssel már nem olyan egyszerű [2,3].

A ciklodextrinek ciklikus, nem redukáló oligoszacharidok. Három különböző ciklodextrin ismeretes: alfa-, béta- és gamma-ciklodextrin. Ezek mindegyikét, mint homogén kristályos anyagot (tisztaság több mint 99,5%) lehet előállítani. A ciklodextrineket nevezik Schardinger dextrineknak, cikloamilózoknak, cikloglükánoknak vagy ciklomaltooligózoknak is.

A béta-ciklodextrin szerkezetét és mindhárom ciklodextrin molekuláris dimenzióját az 1. ábra szemlélteti. Az alfa-ciklodextrin 6, a béta-ciklodextrin 7, és



1. ábra. Alfa-, béta- és gamma-ciklodextrin szerkezete és molekuláris méreteik



2. ábra. A ciklodextrin funkcionális szerkezeti sémája

a gamma-ciklodextrin 8 glükopiranoz egységből áll. Mivel valamennyi glükopiranoz egység C-1 konformációt vesz fel, valamennyi szekunder hidroxil csoport a koszorúszerű ciklodextrin molekula egyik oldalán helyezkedik el és valamennyi primér hidroxil csoport a másik oldalon. A belső üregnek a „bélése” hidrogénatomokból és glikozidos oxigén hid atomokból áll, ezért ez a felület gyengén apoláros (2. ábra). A ciklodextrinek fizikai és szerkezeti sajátosságait az 1. táblázatban láthatjuk.

Ez az egyedülálló szerkezet és a fizikai-kémiai sajátosságok lehetővé teszik azt, hogy ezek a molekulák más anyagok molekuláit magukba zárják, ez a lényege az ún. molekuláris kapszulázásnak. Míg a legutóbbi időig a ciklodextrineket csaknem kizárólagosan „üres” molekuláris méretű kapszuláknak tekintették, az újabb vizsgálatok felfedték alkalmazásuknak a széles körű lehetőségeit, ezért a ciklodextrineket mint egy új ipari nyersanyag csoportot lehet tekinteni.

Molekuláris kapszulázás ciklodextrinnekkel

A ciklodextrin molekulát molekuláris méretű üres kapszulának lehet tekinteni (2. ábra). Ha ez egy más

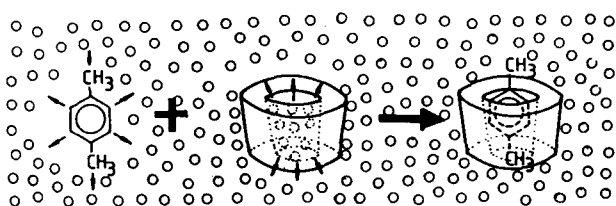
Az alfa-, béta- és a gamma-ciklodextrinek jellemzői

Megnevezés	alfa	béta	gamma
Glükopiranoz egységek száma	6	7	8
Molekulatömeg	972	1135	1297
Oldékonyság g 100 ml vízben szobahőmérsékleten,	14,5	1,85	23,2
$[\alpha]_D^{25}$	150±0,5	162,5±0,5	177,4±0,5
Üregátmérő, nm	0,47–0,53	0,6–0,65	0,75–0,83
Henger magassága, nm	0,79±0,1	0,79±0,1	0,79±0,1
Molekula külső átmérője	1,46±0,04	1,54±0,04	1,75±0,04
Közelítő térfogat, nm ³	0,174	0,262	0,427
Közelítő térfogat, l mol ciklodextrinben, ml	104	151	256
1 g ciklodextrinben, ml	0,10	0,14	0,20

anyag molekulájával van kitöltve, akkor nevezzük „zárványkomplex”-nek.

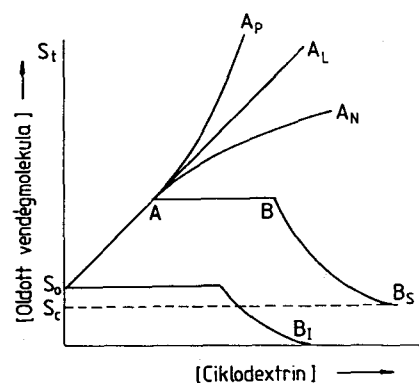
A zárványkomplexek olyan egységek, amelyek két vagy több molekulából állnak, amelyekben egy molekula „gazda” magába zárja teljes egészében vagy részben, fizikai erővel, azaz kovalens kötés nélkül a „vendég” molekulát. A ciklodextrinek tipikus „gazda” molekulák és a legkülönbözőbb molekulákat képesek magukba zárni, olyanokat, amelyeknek a mérete egy vagy két benzolgyűrű nagyságú, vagy nagyobbakat is, amennyiben van olyan oldalláncuk vagy csoportjuk, amely hasonló méretű, mint a ciklodextrin üreg és így képeznek kristályos zárványkomplexet.

Vizes oldatban a gyengén apoláros ciklodextrin-üreget vízmolekulák foglalják el, amelyek energetikailag kedvezőtlen (poláros, apoláros kölcsönhatású) helyzetben vannak és ezért könnyen kicserélhetők alkalmas „vendég” molekulákkal, olyanokkal, amelyek kevésbé polárosak, mint a vízmolekulák. A ciklodextrin a „gazda” molekula és a „hajtóerő” a komplexképzés irányába a magas entalpiájú vízmolekulák kicserélése valamely alkalmas „vendég molekulával” (3. ábra).



3. ábra. A p-xilol ciklodextrinnel történő zárványkomplexképzésének szemléltetése

Ha egy rosszul oldódó potenciális vendégmolekula vizes szuszpenziójához ciklodextrint adunk, akkor a néhány óráig vagy néhány napig tartó rázással elért egyensúlyi állapotban a vendégmolekula oldékonysága megnövekszik oly mértékben, amelyet az oldékonysági izoterma-típus határoz meg. Az oldékonyság növekedés lehet monoton, növekedhet valamely meghatározott határértékig, vagy éppenséggel csökkenhet is. Az ilyen ún. fázisoldékonysági diagramot a 4. ábra szemléltet [4].



4. ábra. Oldékonysági fázisdiagram típusok

Ha csak oldott komplex képződik, akkor a fázisoldékonyság izoterma „A” típusú, ha a komplex oldékonysága limitált, akkor „B” típusú az izoterma. Kivéve azokat az eseteket, amikor csakis oldhatatlan komplex képződik (B_1 -típus, lásd az ábrán) a vendég oldékonysága (S_t) először növekszik a vendégmolekula eredeti vizes oldékonysági értékétől (S_0), amíg eléri „A” pontot, ahol megközelíti a rendszer a komplex oldékonysági értékhatárát. Tovább növelve a ciklodextrin-koncentrációt a vendégmolekula oldékonysága nem növekszik tovább, hanem megkezdődik a komplex mikrokristályos állapotban történő kicsapódása az oldatból (B_S -típusú izoterma). A „B” pont elérése azt jelenti, hogy a rendszerben lévő összes szilárd vendégmolekulát átalakítottuk kevésbé oldódó zárványkomplexé, ezért hiába adunk több ciklodextrint a rendszerhez, az asszociációs egyensúly az asszociáció irányába tolódik el és az oldékonyság értéke asszimmetrikusan közeledik a zárványkomplex inherens oldékonysági értékéhez (S_c). Elméletileg az oldott koncentráció növekedésének az S_0 -tól A-ig azonosnak kellene lennie az S_c értékkel (azaz „A” pontnál az

oldat éppen telített mind a vendégmolekulára, mind pedig a komplexére).

Ez azonban csupán elméleti eset, mivel a legtöbb esetben a képződött komplex sztöchiometriája a koncentráció viszonyoktól is függ, és míg kezdetben csaknem kizárólagosan 1:1 molarányú komplex képződik, magasabb ciklodextrin-koncentrációknál a sztöchiometria bonyolultabbá válik (1:2, 2:3 stb.). A domináns sztöchiometria és komplex szerkezet nem szükségszerűen azonos oldatban és szilárd fázisban.

Ha a vizsgált ciklodextrinkoncentráció-tartományon belül a komplex oldékonysági határát nem érjük el, akkor az izoterma „A” típusú. „A” azt jelenti, hogy az oldékonyság lineárisan növekszik, valószínűleg változatlan sztöchiometria mellett. Az „A_p” típusú izoterma a linearitástól történő pozitív irányú eltérést jelenti, azaz a komplex sztöchiometriája változik, az eredetileg 1:1 molarányú komplex további vendégmolekulákkal asszociálódik és 2:3 stb. molarányú komplexek képződnek. Ha az izoterma „A_N” típusú, akkor a rendszer még bonyolultabb, mert ez utalhat arra, hogy a komplexen belül a gazdamolekula aránya növekszik 1:1-ről 2:1-re, vagy a vendégmolekula, illetve a komplex hidratációja változik pl. a vendégmolekula ionizációja következtében.

A komplex stabilitási állandó értékét (K_c , asszociációs konstans) az 1:1 molarányú komplexekre a kezdeti lineáris szakasz tengelymetszetéből és iránytangenséből a következő módon számítjuk ki:

$$K_c = \frac{(S_t - S_0)}{S_0 \{ [CD]_t - (S_t - S_0) \}} = \frac{\text{tg } \alpha}{S_0(1 - \text{tg } \alpha)}$$

A zárványkomplexek sztöchiometriáját az AB plató szakasz hosszából lehet számítani a következő egyenlet szerint:

$$\frac{\text{vendég}}{CD} = \frac{(\text{rendszerhez adott}) - (\text{a vendégmoldatban})}{(CD)_t \text{ a platótartományban}} \quad \frac{\text{összes vendégmol}}{A - \text{pontnál}}$$

A plató hosszának megfelelő ciklodextrin-mennyiség szükséges az „A” pontnál a rendszerben még megtalálható szilárd szabad vendégmolekulának teljes egészében komplexszé történő alakításához. A „B_I” típusú diagramnál kezdeti emelkedő szakasz nem figyelhető meg, mert a zárványkomplex gyakorlatilag oldhatatlan, így ez a típusú izoterma nem alkalmas a K_c értékének számításához.

Az „A_L” típusú diagramból az első egyenlettel lehet számítani a K_c értékét. Az „A_p” típusú diagramból a K_c értékét iterációval lehet számítani, míg az „A_N” típusú diagramokból a K_c érték ugyancsak nem számítható.

A ciklodextrin-komplexek viszonylag stabilisak, vízdékonyságuk a tiszta ciklodextrinhez képest erősen lecsökken, ezért gyorsan kiválnak az oldatból kristályos formában. Egy, két vagy három ciklodextrin molekula tartalmazhat egy vagy több bezárt „vendég” molekulát. Ez a lényege a molekuláris kapszulásnak.

Ugyanaz a vendégmolekula teljesen különböző stabilitású komplexet képezhet a különböző ciklodextrin-ekkel. Bár a bezárt molekula fizikai-kémiai sajátosságai az üregben nagymértékben megváltoznak, ezek a komplexek könnyen disszociálnak már fiziológiai körülmények között is és így a vendégmolekula ki tudja fejteni a kívánt hatását.

A ciklodextrin zárványkomplexek előállítása egyszerű, de a körülményeknek „testre szabott”-nak kell lenniük mindenfajta vendégmolekulára. A komplexálást el lehet végezni homogén oldatban vagy szuszpenzióban vagy a komponensek egyszerű összekeverésével.

A kristályos ciklodextrin komplexek szerkezete nem szükségszerűen azonos azzal, ami vizes oldatban létezik. Oldott állapotban a vendégmolekulák vagy alkalmas csoportjaik a ciklodextrin üregben helyezkednek el és az egész komplex molekulát többretegű hidrátburok veszi körül. Kristályos állapotban azonban a vendégmolekulák nem csupán a ciklodextrin üregben helyezkednek el, de a ciklodextrin molekulák között is és úgyszintén néhány ciklodextrin molekula csak vizet fog tartalmazni, következésképpen ezek a kristályrácsba víz komplexként épülnek be.

A kristályos komplexek ezért csak ritkán szigorúan sztöchiometrikus összetételűek. Azonban eléggé stabilisak akkor is, ha a ciklodextrin-üreget csak részben töltik az apoláros vendégmolekulák. A zárványkomplexeket lehet tanulmányozni vizes oldatokban különböző spektroszkópiai módszerekkel (UV, fluoreszcencia, cirkulár dikroizmus, NMR) diffúzió, a bezárt molekula modifikált reaktivitása alapján stb. Szilárd állapotban röntgendiffrakció, termoanalízis (különösen a termális evolúciós analízis és a differenciális scanning calorimetria), vákuumszublimáció (szublimálható vendégek esetében), vákuumszárítás (illékony vendég esetében) stb. bizonyíthatják azt, hogy a komplexálási kísérlet eredménye valódi zárványkomplex, vagy pedig csupán egy keveréke a vendégmolekulának és a ciklodextrinnek.

A ciklodextrinneknek legtöbb ipari alkalmazása a komplexálással kapcsolatos. Sok esetben a komplexeket többé-kevésbé tiszta formában izolálják is és mint kristályos anyagot alkalmazzák (gyógyszer és aromaanyag komplexek), míg más esetekben a komplexálás csak egy átmeneti állapotot jelent és megfigyelhetővé csupán csak a végeredmény (ciklodextrin katalízis, keverékek szétválasztása stb.) válik.

A zárványkomplex-képzés primér következményei

A legfontosabb primér következményei a gyengén oldódó vendégmolekula és a ciklodextrin kölcsönhatásának vizes oldatokban a következők:

- a) A vendégmolekula koncentrációja az oldott fázisban jelentősen megnövekszik, míg az oldott ciklodextrin koncentrációja csökken. Ez utóbbi azonban nem mindig igaz: ionizált vendégmolekulák, vagy hidrogén kötést létesítő (pl. fenolok) vegyületek növelhetik a ciklodextrin oldékonyságát.

- b) A vendégmolekula spektrális sajátosságai megváltoznak. Az anizotróp árnyékolású atomok kémiai eltolódása az NMR spektrumban megváltozik és ha akirális vendégmolekulák épülnek be a királis ciklodextrin-üregbe, akkor optikailag aktívvá is válnak, és erős indukált Cotton-effektusokat mutatnak a cirkulár dikroizmus spektrumon, néha az UV maximum néhány nanométerrel eltolódik, a fluoreszcencia erősen fokozódik, mivel a fluoreszkáló molekulák a vizes közegből apoláros környezetbe kerülnek stb.
- c) A bezárt molekulák reaktivitása megváltozik. A legtöbb esetben a reaktivitás csökken, pl. a vendégmolekula stabilizálódik, de sok esetben a ciklodextrin mesterséges enzimeként viselkedve gyorsít bizonyos reakciókat, modifikálja a reakció-utakat.
- d) A diffúzió és az illékonyosság (illékony molekula esetében) jelentősen csökkennek.
- e) A korábban hidrofób vendégmolekulák a komplexálás következtében hidrofíllé válnak, ezért pl. kromatográfiás mobilitásuk is megváltozik.

Szilárd állapotban

- a) A komplexált anyag molekulárisan diszpergálva lesz egy szénhidrát mátrixban, mikrokristályos port képez még gáz alakú vendégmolekulákkal is.
- b) Mindenfajta reakció ellen hatékonyan védve lesznek a vendégmolekulák, kivéve az olyan reakciókat, amelyekben a ciklodextrin hidroxil csoportok szerepet játszhatnak.
- c) A szublimáció és az illékonyosság nagyon alacsony szintre csökkennek.

Ciklodextrinek a biotechnológiában

Ha egy vízben rosszul oldódó apoláros szerves vegyület („vendégmolekula”) vizes szuszpenziójához ciklodextrint („gazdamolekula”) adunk, akkor (amennyiben a komplexképzés egyéb feltételei fennállnak) növekedni fog az oldott vendégmolekula koncentráció. Ha a rendszerben a vendégmolekula teljes egészében oldva van, akkor a ciklodextrin hozzáadása azt eredményezi, hogy az oldott vendégmolekuláknak csak egy része marad „szabad”, másrésze komplexbe lesz zárva és ennek következtében a már ismertett változásokon kívül még egy fontos sajátossága megváltozik: affinitása a sejtmembránokhoz, tehát pl. a toxicitása. Mivel a ciklodextrinek az enzimekre (kivéve az amilolitikus enzimeket) és a mikroorganizmusokra közvetlenül hatást nem gyakorolnak, a mikrobiológiai vagy enzimes folyamatokat meg lehet valósítani ciklodextrin-oldatokban, a megszokottaknál magasabb összes oldott szubsztrát koncentrációknál, ugyanakkor alacsonyabb szabad szubsztrát (kevésbé inhibáló vagy kevésbé toxikus) koncentrációknál. Ezt szemléltetik a következőkben felsorolt példák.

A bioszintetikus aktivitás fokozása

A pertussis-toxin (=leukocitózis promotogén faktor, LPF-hemagglutinin) egyike a fő védőantigéneknek a

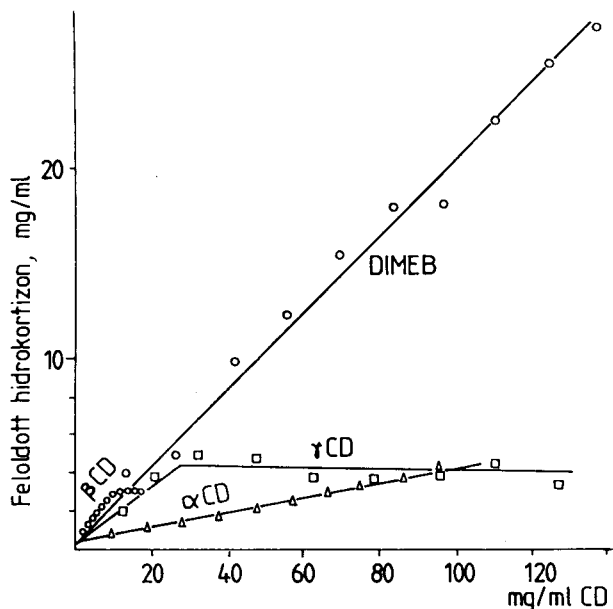
számárköhögés ellen. Ezt a Bordatella pertussis termeli. Egy kevésbé reaktogén vakcina termeléséhez szintetikus táptalaj szükséges, de a pertussis-toxin termelése meglehetősen nehéznek bizonyult szintetikus táptalajon, különösen rázott kultúrákban. A Bordatella pertussis nagyon érzékeny számos inhibitorral, pl. zsírsavakkal (palmitin- vagy oleinsav) szemben, már 10 μ M koncentráció leállítja a sejtszaporodást [5]. Hozzáadva azonban 0,5 mg/ml dimetil-béta ciklodextrint (vagy trimetil-béta-ciklodextrint) fokozott sejtnövekedést lehet megfigyelni, továbbá a pertussis-toxin termelés százszorosáig fokozódott [6,7]. Az eljárást már több országban (Japán, Kanada) alkalmazzák iparilag. A filamentozus hemagglutinin termelése még nagyobb mértékű, néhány százszoros volt a dimetil-béta-ciklodextrin jelenlétében [7]. A Mycobacterium phlei (=M. smegmatis) zsírsav-termelését a ciklodextrinek és különösen a metilézett ciklodextrinek igen jelentős mértékben megjavítják [8].

A lankacidin csoportba tartozó antibiotikumok termelését a béta-ciklodextrin jelenléte jelentősen megjavította. 11 mM béta-ciklodextrint adva a Streptomyces rochei volubilis tenyészetet tartalmazó fermentorba a lankacidin A és C termelése 0,05, illetve 0,04 mM-ról 0,55 és 4,6 mM-ra növekedett. Béta-ciklodextrin hozzáadása nélkül a fermentáció végére mindössze 0,4 mg/ml lankacidin C koncentrációt sikerült elérni, míg a ciklodextrinnel ez elérte a 3,1 mg/ml-t. A béta-ciklodextrin nem gyakorolt észrevehető hatást a sejtszámra, a szénforrás fogyasztási sebességére, vagy pH-ra és maga a béta-ciklodextrin sem metabolizálódott. A keletkezett antibiotikumot béta-ciklodextrin komplex formájában lehet izolálni [9].

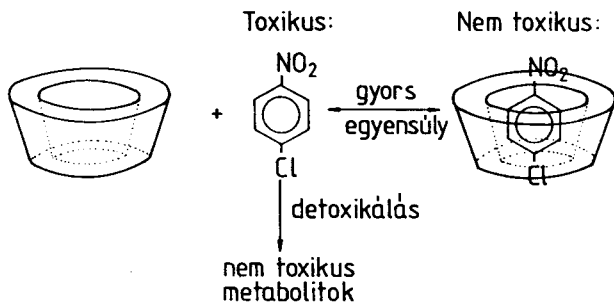
Mikroorganizmusok által végzett biokonverziós folyamatok

Az 5. ábra szemlélteti a hidrokortizon oldékonyosságát különböző ciklodextrin oldatokban. A dimetil-béta ciklodextrin (egyelőre) túlságosan drága ipari célokra, de nagyon jelentős javulást lehet elérni a hidrokortizonnak a prednizolonná történő mikrobiológiai konverziójánál, amely a béta-ciklodextrin oldatban megfigyelhető látszólag kismértékű oldékonyosság fokozásán alapszik. A hidrokortizon oldhatósága vízben mindössze 0,4 mg/ml, ezért nagy térfogatokban viszonylag csak kis mennyiségeit lehetett ennek a szteroidnak konvertálni mikrobiológiai úton. A konverziós folyamat lassú, és a végtermék nem volt homogén, mert keverék kristály is képződött (hidrokortizon + prednizolon). Ezt a folyamatot vizes béta-ciklodextrin oldatban megvalósítva a kapacitás több mint 300%-kal fokozódott. A hidrokortizon oldékonyossága növekszik, 3-4-szer több hidrokortizont lehet betáplálni egy konverterbe, a reakció gyorsabb és a végtermék homogénebb. Az elvet a 6. ábra szemlélteti. Ezt az eljárást már alkalmazza a Kőbányai Gyógyszerárugyár [10].

Gyakorlatilag minden mikrobiológiai szteroid konverziós folyamatot kipróbáltak már vizes ciklodext-



5. ábra. A hidrokortizon oldékonysági izotermája 25°C-nál 9 órás rázásal



6. ábra. Ciklodextrint adva a toxikus p-nitroklórbenzolt tartalmazó szennyvízhez, a ciklodextrin a vegyület egy frakcióját komplexálja.

A ciklodextrin-komplex — lévén hidrofil — kisebb affinitással rendelkezik a lipoprotein sejtmembránokhoz, ezért kevésbé toxikus a mikroba sejtekre. Csak a nem komplexált frakció hat a sejtmembránon.

rin oldatokban, minden esetben ígéretes eredményekkel. A koleszterin Mycobacteriummal végzett mikrobiológiai konverziója androst-4-én-3,17-dionná 180 óra alatt nem ért el jobb kitermelést, mint 40%-ot a koleszterinre vonatkoztatva. A biokonverzió termékátolt, és a szteroid gyűrű is degradálódik. Béta-ciklodextrin jelenlétében 96%-os kitermeléssel sikerült a konverziót rövid idő alatt megvalósítani [11].

A ciklodextrin stimuláló hatását megfigyelték aromás aldehideknek élesztőkkel aromás alkoholokká történő biotranszformációjánál is. Mind a kitermelés, mind a folyamat sebessége jelentősen megjavult [12].

Enzimes reakciók ciklodextrinek jelenlétében

A triglicerideknek a lipázok általi hidrolízise vizes rendszerekben nagyon lassú folyamat. Vagy valamilyen lipidoldó vízzel elegyedő szerves oldószert kell a

rendszerhez adni — amely csak viszonylag alacsony koncentrációkig lehetséges az enzim-protein denaturálódása miatt — vagy pedig egy alkalmas detergenst, pl. természetes epét kell hozzáadni. A 2. táblázat szemlélteti az olivaolajnak a lipáz általi hidrolízisét mindenféle detergens nélkül, vagy pedig sertés-epe vagy dimetil-béta-ciklodextrin jelenlétében. A hidrolízist a felszabaduló zsírsavaknak nátrium-hidroxiddal történő titrálásával követték. Mint látható a dimetil-béta-ciklodextrin számottevő mértékben gyorsította a lipolízist [13]. Egy másik kísérletben glicerin trioleátot hidrolizáltak csirke-epe vagy dimetil-béta-ciklodextrin jelenlétében, hasonló eredménnyel. Ha patkányok vagy nyulak epevezetékét ligálták és az állatokat trigliceridekkel (zsírral) etették, azok nem tudták a lipideket emészteni, az nem szívódott fel. Ha azonban dimetil-béta ciklodextrint is adtak egyidejűleg, akkor helyreállt a lipid emésztés-felszívódás, azaz a dimetil-béta-ciklodextrin képes volt helyettesíteni az epét [14].

2. táblázat

Olivaolaj enzimes hidrolízise 37°C-on, a szabaddá váló zsírsavakat titrálva [11].

Reakció idő, óra	Fogyasztott 0,005 normál NaOH, ml
	a kontroll b epe c dimetil-βCD
0,5	0,0 0,82 1,74
1	0,36 1,17 2,00
2	0,48 1,37 2,20
19	0,63 2,62 4,77

Reakció sebesség gyorsítás

~ 4 ×

~ 7,4 ×

Reakcióelegy: 0,5 ml puffer (50 μmol foszfát puffer, pH 7,4) + 3,54 mg olivaolaj + 12,5 mg sertés pankreasz, 0,52 ml víz + a) 0,75 ml víz (kontroll, detergens nélkül)

b) 0,25 ml sertés epe, hígítva 1:5 arányban vízzel + 0,5 ml víz, vagy

c) 50 mg dimetil-béta-ciklodextrin 0,75 ml vízben.

Az a megfigyelés, hogy a foszfatidok (lignocerinsav, cerebrozidok, ceramidok) a ciklodextrinnekkel szolubilizálhatók, valószínűleg kiaknázásra fog kerülni a lipidek enzimológiájában [15]. Például tanulmányozva a Lignocerin-CoA ligáz enzim aktivitását a patkány agyból készült mikroszómális preparátumokban megfigyelték azt, hogy az alfa-CD-vel szolubizált lignocerin savat a preparátum beépítette, de a Triton WR-rel szolubizált lipidet nem tudta hasznosítani.

A digitalis lanata jelentős mennyiségű ún. primér glikozidot tartalmaz, amelyekből elő kell állítani a farmakológiailag sokkal hatékonyabb szekunder glikozidokat (pl. digoxin). A hidrolízist savval végezve számos bomlástermék képződik, rossz a kitermelés. Kézenfekvő a specifikus enzimes hidrolízis alkalmazása, de a szubsztrát nagyon kismérvű oldékonysága miatt ez csak vizes, szerves oldószeres elegyben képzelhető el, ami részben az enzim aktivitását csökkenti

jelentős mértékben, másrészt ugyancsak számos mellékreakciót eredményez. Dimetil-béta ciklodextrinnel szolubizálva a lanatozid C glikozidot a hidrolízis viszonylag rövid idő alatt és nagyon jó kitermeléssel, szelektivitással megvalósítható [16].

Ciklodextrinek alkalmazása szövettényezetekben

Telítetlen zsírsavak ciklodextrin komplexeit az emlős sejtkultúrákban szérumszűrőhelyettesítőként lehet alkalmazni. Mind az olajsav béta-ciklodextrin, mind a linolénsav béta-ciklodextrin komplexe a humán lymphoblast sejtek esetében növekedéscsökkentő hatást mutatott 100 mg/l közeg koncentrációig. Nagyobb koncentrációknál a zsírsav béta-ciklodextrin komplex toxikusnak bizonyult, de ez nyilvánvalóan a zsírsavaknak tulajdonítható, 100 mg zsírsav ciklodextrin komplex és 1000 mg szabad béta-ciklodextrin komplex együtt még nem eredményeztek toxikus hatást, viszont stabilis és reprodukálható növekedés elősegítő hatást mutattak. Humán diploid fibroblast kultúrákban a borjú albuminnal szupplementált közeghez hasonló növekedést figyeltek meg, ha a zsírsav-béta-ciklodextrin komplex végső koncentráció 10–20 mg/l volt. A borjú szérumszűrő részben vagy egészben helyettesíteni lehet zsírsav-béta-ciklodextrin komplexekkel az emlőssejt kultúrákban [17,18], mint például a humán interferon termelésben [19].

Az oldékonyságfokozás mellett a stabilizálás a másik fontos következménye a Nystatin — egy polyén antibiotikum — gamma-ciklodextrinnel történő komplexálásnak. A Nystatin gyakran alkalmazott antifungális antibiotikum, amelyet a humán gyógyászatban lokális antifungális kezelésre alkalmaznak. A szövettényezetekben — a biotechnológia egy fontos eszköze — szükség van oldható antifungális ágensekre, amelyeket a tápközegben fel kell oldani. A Nystatin nagyon alkalmas lenne ilyen célokra, azonban gyakorlatilag oldhatatlan a vízben és gyorsan tönkremegy az oxidáció révén. A Nystatin gamma-ciklodextrin komplex egy viszonylag stabilis, könnyen oldódó por, jól alkalmazható ilyen célokra [20].

Ciklodextrinek a szennyvíz detoxikálásában

A toxikus szerves vegyületek széles köre (hidroxil-, halogeno-, nitro-, amino- stb. aromás és alifás származékok) található a szerves vegyipar és a gyógyszeripar szennyvizeiben. A biológiai szennyvíztisztítás azt jelenti, hogy ezeket a toxikus vegyületeket bizonyos élesztők és baktériumok degradálják, amelyek a biológiai ún. élőiszapban találhatóak. Ezek a mikroorganizmusok a toxikus vegyületeket csak akkor tudják elviselni, ha azok koncentrációja nem halad túl egy kritikus szintet, ez alatt a toxikus anyagokat metabolikus folyamatok révén nem-toxikus anyagokká konvertálják. Megfelelő adaptációs eljárásokkal a toxikus anyagok tolerábilis koncentrációját lehet fokozni, de ha ezt a kritikus koncentráció-szintet túllépik — akár-

csak rövid időre is — akkor az említett mikroorganizmusok elpusztulnak, azaz az élőiszap detoxikáló kapacitását irreverzibilis károsodás éri. Az ilyen biológiai rendszerek regenerálódása nem gyors folyamat. Ezért a detoxikáló kapacitás megőrzése az élőiszapban a környezetvédelem egyik elsőrendű célja.

Az ilyen kritikus vagy kritikus feletti koncentrációt úgy lehet például elkerülni, hogy a toxikus anyagokat tartalmazó szennyvizet olyan vízzel vagy szennyvízzel hígítják, amelyik ilyen anyagot nem tartalmaz. Ily módon lehet redukálni a toxikus anyag koncentrációját. Néha az ilyen hígítás több ezer köbméter toxikus anyag mentes vizet igényelne, ami nem mindig áll rendelkezésre.

Az ilyen vizekhez ciklodextrint adva — amelynek természetesen nem kell tisztának lennie, a legolcsóbb technikai minőség is megfelelne erre a célra — az említett organikus toxikus vegyületek számottevő része komplexálódik [21,22,23]. A komplexált molekulák nem tudnak behatolni a sejtmembránon keresztül, ezért nem toxikusak. Ily módon a szabad toxikus anyagkoncentráció erősen redukálódik a kritikus koncentrációs szint alá. Amint ez a koncentráció csökken a metabolikus folyamatok révén, a ciklodextrin komplexek, mint dinamikus tartalékok viselkednek: szabadon eresztik a bezárt toxikus molekulákat, és ezt az egész folyamatot a disszociációs egyensúly határozza meg (6. ábra).

Egy olyan kevert ipari és kommunális szennyvizet, amely fenolt, paraklórfenolt, benzolt és egyéb organikus anyagokat tartalmazott, konvencionális módon kezelték, illetve oly módon, hogy hozzáadtak 40 mg/l béta-ciklodextrint is. Az eredményeket a 3. táblázat szemlélteti.

3. táblázat

A β -ciklodextrin hatása a biológiai szennyvíz detoxikálására

Megnevezés	Kezelés előtt	24 óra konvencionális kezelés után, mg/ml	24 óra kezelés után hozzáadva 40 mg/l β -CD-t
Fenol	30	10	1
Paraklórfenol	10	5	1
Benzol	4	3	0,05
Oxigénfogyasztás	800	200	60

A béta-ciklodextrin jelenlétében történő detoxikáció néha jelentősen lelassul, mint ezt a 4. táblázat szemlélteti.

Ellentétben a para- és a 2,4-diklórfenoloknál megfigyeltekkel, a béta-ciklodextrin komplexáló hatása gátolja a pentaklórfenol metabolizációját. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a pentaklórfenol nagyon stabilis komplexet képez a béta-ciklodextrinnel és ez védi a bezáródó vendégmolekulát az enzimikus támadással szemben.

Nem csupán a természetes ciklodextrinek, de néhány származék is szóba jöhet az ilyen detoxikációs folyamatoknál. Polimer gyöngyökben rögzítve *Candida tropicalis* sejteket és oldható béta-ciklodextrin polimert, a szennyvizekből a fenol a toxikus szintet jóval meghaladó koncentrációknál is hatékonyan eliminálható [24].

4. táblázat

A béta-ciklodextrin hatása néhány klórfenol detoxikálására az aktivált iszapban

Mintavételi idő	Vegyület	Átalakult, %	
		β CD nélkül	β CD jelenlétében
2 óra	<i>p</i> -Klórfenol	23,3	9,5
4 óra		25,9	53,4
6 óra		27,6	54,4
1 nap	2,4-Diklórfenol	7,5	1,3
2 nap		25,4	18,5
4 nap		26,0	32,1
7 nap		29,5	73,0
1 nap	penta-Klórfenol	0,7	0,2
2 nap		20,4	1,7
4 nap		23,3	0,3
7 nap		56,7	2,5

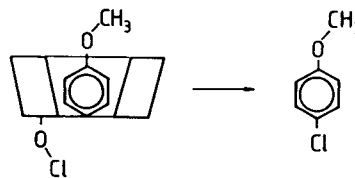
A ciklodextrin-üreg, mint molekuláris méretű reaktor

A ciklodextrin-üregbe zárt „vendégmolekula” függetlenül attól, hogy a komplex szilárd kristályos fázisban vagy oldott állapotban van, mérsékelten apoláros közegben, nem hidratált állapotban van, anélkül, hogy más, hasonló molekulával érintkezhetne. Így polimerizáció, diszproporcionálódás, oxidáció nem történhet, viszont olyan reakciók, amelyekben a ciklodextrin hidroxilok szerepet játszhatnak, jelentősen felgyorsulnak. A ciklodextrinek önmagukban is, de különösen megfelelő módon szubsztituált származékaik formájában enzimmodellként viselkednek. Ennek már eléggé széleskörű irodalma van, itt azonban csak olyan reakciókra szándékozunk röviden utalni, ahol a ciklodextrin molekula nem enzimmodell, hanem a ciklodextrin-üreg, mint valamely reakció lejátékozódásának a helyszíne, azaz mint molekuláris méretű reaktor viselkedik. Különösen a terner komplexek esetében van ez így, azaz, amikor a „fő” vendégmolekula mellett még egy kis méretű, reaktív második vendégmolekula is belép az üregbe: ilyen esetben gyors és nagymértékben szelektív reakciókra számíthatunk [3].

Regioszelektív halogénezés

Anizolt vizes oldatban klórozva kb. 40% orto- és 60% para-klóranizol képződik. Ha a vízben alfa ciklodextrint oldunk, akkor annak koncentrációjával arányosan nő a keletkező para-klóranizol aránya [25]. A reakció úgy is megvalósítható, hogy ciklodextrin

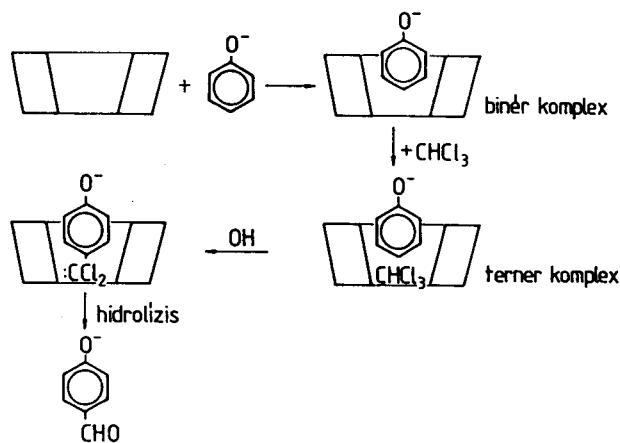
térhálósításával előállított polimerben kötjük az anizolt, majd ezt az anizollal telített polimer-oszlopot hipoklorit oldattal mossuk át. Ilyen esetben a para-klóranizol aránya a 99%-ot is meghaladja [26]. Ciklodextrint immobilizálva grafitelektródok felületén az anizol [27] vagy a toluol [28] anódos klórozása ugyancsak a para-isomer keletkezését fokozza. A reakció első lépése az, hogy a klóratom a ciklodextrin gyűrű primér hidroxiljával lép reakcióba (7. ábra), majd az oxigénatomon kötött klór támadja az aromás gyűrű nem fedett para pozícióját. Az orto és meta pozíció a ciklodextrin gyűrű által fedve van.



7. ábra. Az anizol ciklodextrin jelenlétében történő szelektív *p*-klórozásának valószínű mechanizmusa

Reimer-Tiemann formilezés és karboxilezés

Alkálikus vizes oldatban oldott fenolhoz kloroformot, vagy rézpor katalizátort és széntetrakloridot adva a para- és az orto helyzetben aldehid, illetve karboxil csoport épül be. A reakciót ciklodextrin jelenlétében megvalósítva nagyfokú szelektivitással csak a para helyzetben történik szubsztitúció. A reakciónak az a mechanizmusa, hogy a ciklodextrin-üregbe a fenolmolekula az apoláros részével félig helyezkedik be, az alatta lévő hely azonban alkalmas arra, hogy a halogénezett szénhidrogénből keletkező kation ugyancsak beépüljön és úgy jön létre a szelektív para szubsztitúció [29,30] (8. ábra).



8. ábra. *p*-Hidroxi-benzaldehid szintézis ciklodextrin jelenlétében

Diels-Alder reakció

A ciklopentadién és acetonitril kondenzáció sebessége 9-szeresére fokozódik béta-ciklodextrin jelenlé-

tében, de kb. 20%-kal lassul alfa-ciklodextrin jelenlétében. Molekulamodellek tanulmányozásával megállapítható, hogy míg a béta-ciklodextrinbe mindkét komponens befér, addig az alfa-ciklodextrin üreg túl kicsi ahhoz, hogy mindkét komponenst egyidejűleg magába tudja zárni [31] (9. ábra).



9. ábra. A ciklopentadién és az akril-nitril közötti Diels-Alder reakcióját az alfa-ciklodextrin gátolja, a béta-ciklodextrin pedig gyorsítja

Eliminációs reakciók

A ciklodextrinek vizes közegben katalizálják a metilfenil-cianoecetsav, a szubsztituált acetecetsavak és trihalo-ecetsavak dekarboxileződését [32]. Ez a katalitikus hatás azonban erősen függ a körülményektől. Pl. foszfátpufferben mind az alfa-, mind a béta-ciklodextrin katalizálja a benzoil-ecetsav dekarboxileződését, mivel a disszociált anionnal mindkét ciklodextrin hasonló módon lép kölcsönhatásba. A pH3 körül azonban már zömmel a nem-ionizált sav veszíti el karboxil csoportját, és ekkor már csak a béta-ciklodextrinnek van katalizáló hatása, az alfa-ciklodextrin ellenkezőleg, stabilizálja a molekulát. Ezt konformációs hatással lehet magyarázni. A béta-ciklodextrin üregben a vendégmolekula feszültséggel rendelkező konformációban tud behelyeződni. Az alfa-ciklodextrin oly mértékben korlátozza a molekula mozgási szabadságát, hogy nem reaktív konformációba kényszeríti a molekulát.

Jelentős és egyre növekvő számú publikáció foglalkozik a fentiekhez hasonló megfigyelések leírásával, és már több szabadalom is foglalkozik az ilyen lehetőségek esetleges ipari hasznosításával.

A kézirat beérkezett: 1989. máj. 30.

IRODALOM

- [1] French, D.: Adv. Carbohydrate Chem., 12 189 (1957).
- [2] Szejtli, J.: „Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes” Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.
- [3] Szejtli, J.: Cyclodextrin Technology, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 1988.
- [4] Hirayama, F. — Uekama, K.: in „Cyclodextrins and their Industrial Uses, (Ed.: Duchéne, D.), Editions de Santé, Paris, 1987.
- [5] Suzuki, Y. — Imaizumi, A. — Sato, H. — Sato, Y.: Ipn. J. Med. S. 36 111 (1983).
- [6] Imaizumi, A. — Suzuki, Y. — Onos, S. — Sato, H. — Sato, Y.: Infection and Immun. 41 1138 (1983).
- [7] Suzuki, Y. — Imaizumi, A. — Ono, S. — Sato, H. — Sato, Y.: Abstract Book of 3rd Int. Symp. Clathrate Comp. and 2nd Int. Symp. on Cyclodextrins, Tokyo, (1984) July 23-27.
- [8] Bergeron, A. R. — Machida, Y. — Bloch, K.: J. Biol. Chem. 250 1223 (1975).
- [9] Sawada, H. — Suzuki, T. — Akiyama, S. — Naka, Y.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 26 522 (1987), C. A. 107:196443.
- [10] Udvardy, N. É. — Bartha, I. — Hantos, G. — Trinn, M. — Vida, Zs. — Szejtli, J. — Stadler-Szöke, Á. — Habon, I. — Balázs, M.: (Richter Gedeon) Belg. Pat. (1983) 894, 501, C. A. 99:4069.
- [11] Hesselink, P. G. M. — de Vries, H. — Wilhoit, B.: in Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology. (1987) Vo. 2. (Neijssel, O. M., van der Meer, R. R. and Luyben, K. C. A. M., eds), Elsevier, pp. 299.
- [12] Bar, R.: Trends in Biotechnol. 7 2 (1989).
- [13] Szejtli, J. — Szenté, L. — Kálói, K. — Marton, J. — Gerlóczy, A.: Hung. Pat. Appl. 75/85.
- [14] Gerlóczy, A. — Szenté, L. — Szejtli, J. — Fónagy, A.: in Inclusion Phenomena in Inorganic Organic, and Organometallic Hosts (Eds.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies), Reidel Publ. Co., Dordrecht, 1987. p. 415.
- [15] Singh, I. — Singh, R. — Bhusan, A. — Singh, A. K.: Arch. Biochem. Biophys. 236 418 (1985), C. A. 102:91817.
- [16] Nándori, P. — Lenkey, B. — Szejtli, J.: Nem publikált eredmények (1980).
- [17] Yamane, I. — Kan, M. — Minamoto, Y. — Amatsuji, Y.: Proc. Jpn. Acad. Ser. B. 57 385 (1981), C. A. 96:100488.
- [18] Yamane, I. — Kan, M. — Minamoto, Y. — Amatsuji, Y.: Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation (1982) p. 87, C. A. 97:212006.
- [19] Ajinomoto Co.: Jpn. Kokai (1982) 82, 194, 787, C. A. 98:124208.
- [20] Szejtli, J. — Stadler-Szöke, Á. — Vikmon, A. — Piukovich, S. — Incezy, I. — Kulcsár, G. — Zlatos, G.: Hung. Pat. 4508/83 (1983).
- [21] Oldh, J. — Cserhádi, T. — Szejtli, J.: Magyar Kémikusok Lapja 43 104 (1988).
- [22] Farkas, P. — Oldh, J. — Szejtli, J. — Szenté, L. — Cserhádi, T.: Hung. Pat. (1984) 2650/84.
- [23] Oldh, J. — Cserhádi, T. — Szejtli, J.: Water Res. 22 1345 (1988).
- [24] Bánky, B. — Recseg, K. — Novák, B.: Magy. Kém. Lapja 40 189 (1985).
- [25] Breslow, R. — Campbell, P.: Bioorg. Chem. 1 140 (1971).
- [26] Breslow, R. — Kohn, H. — Siegel, B.: Tetrahedron Lett. 20 1645 (1976).
- [27] Kureha Chem. Ind. Co.: Jpn. Kokai (1980) 80, 85, 684, C. A. 93:194463.
- [28] Osa, T. — Fujihara, M. — Matusé, T. — Senda, J. M. — Yamamuchi, T.: Kuhera Chem. Ind. Co. (1980), Ger. Offen 2, 951, 503, C. A. 93:103846.
- [29] Hirai, H. — Komiyama, M. (Asahi Chemical Industry Co.) PCT Int. Appl. (1982) WO 8203073, 16. 09. 1982, C. A. 98:71670.
- [30] Komiyama, M. — Hirai, H.: Makromol. Chem. Rapid Commun. 2 661, (1981), C. A. 96:34749.
- [31] Breslow, R.: in: „Inclusion Compounds” (1984), Vol. 3. (Eds.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol), Academic Press, London, 1984. p. 473.
- [32] Cramer, F. — Kampe, W.: J. Am. Chem. Soc. 87 1115 (1965).