A protonálódás hatása ciklodextrin zárványkomplexek stabilitására

Doktori értekezés

Csernák Orsolya

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető:	Dr. Barcza Lajos † egyetemi tanár, D.Sc.
Megbízott témavezető:	Barczáné Dr. Buvári Ágnes egyetemi docens, C.Sc.
Hivatalos bírálók:	Kőszeginé Dr. Szalai Hilda, Ph.D. Ungvárainé Dr. Nagy Zsuzsanna egyetemi docens, Ph.D.
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Mátyus Péter egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Török Ilona, a kémiai tudomány kandidátusa Dr. Józan Miklós egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2008

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS 3

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 5

2.1. A ciklodextrinek 5

2.1.1. A ciklodextrinek történetének áttekintése 5
2.1.2. A ciklodextrinek szerkezete 7
2.1.3. Ciklodextrinek előállítása 9
2.1.4. Ciklodextrin származékok 10
2.1.5. A ciklodextrinek zárványkomplex-képzése 10
2.1.5.1. Komplexképzés szerves savakkal 13
2.1.5.2. Komplexképzés alkaloidokkal 15

2.2. Általános alkaloidmeghatározási módszerek 17

3. CÉLKITŰZÉSEK 21

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 23

4.1. A vizsgált anyagok 23

4.1.1. Dikarbonsavak 23
4.1.2. Alkaloidok 25
4.1.3. Ciklodextrinek 30

4.2. Az alkalmazott módszerek 32

4.2.1. pH – potenciometria 32
4.2.1.1. A potenciometriás módszer alkalmazásának feltételei 34
4.2.2. UV-látható spektrofotometria 35
4.2.3. Mérési körülmények 40
4.2.3.1. pH-potenciometria 40
4.2.3.2. UV-látható spektrofotometria 41

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 43

5.1. A vizsgált dikarbonsavak és anionjaik komplexképzése β–ciklodextrinnel .. 43

5.1.1. Potenciometriás titrálással kapott eredmények 43
5.1.2. UV-látható spektrofotometriás mérésekkel kapott eredmények 44
5.1.2.1. Terner komplexek képződése 44
5.1.3. Az eredmények összegzése 45

5.2. Néhány kiválasztott alkaloid vizsgálata 52

5.2.1. Alkaloidmeghatározás ciklodextrinek segítségével 52
5.2.2. Potenciometriás titrálhatóság különböző ciklodextrinek jelenlétében 53
5.2.2.1. Kodein 53
5.2.2.2. Papaverin 55
5.2.2.3. Homatropin 57
5.2.2.4. Pilokarpin 57
5.2.2.5. Kinin 59

5.2.2.6. Efedrin 60
5.2.3. Komplexképződési állandók 61

6. KÖVETKEZTETÉSEK 66

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 69

ÖSSZEFOGLALÁS 70

SUMMARY 71

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 72

IRODALOMJEGYZÉK 74

1. BEVEZETÉS

A XX. század végén az élet kémiai folyamataiból ellesett megoldásainak mesteri utánzása új távlatot nyitott a kémia fejlődése előtt, s létrehozta annak egy új fejezetét, a szupramolekuláris kémiát, azaz a nem-kovalens kémiai kötéssel kapcsolódó molekulák halmazainak kémiáját. A szupramolekuláris rendszerek egyik legkiemelkedőbb csoportját a gyakorlati életben csakúgy, mint az elméleti alapkutatásban, a ciklodextrinek nagy családja, illetve azok komplexei alkotják.

A ciklodextrinek legfontosabb kémiai tulajdonsága a zárványkomplexképző hajlam, mely sajátos szerkezetük következménye. A zárványkomplexek két vagy több molekulából felépülő szupramolekuláris képződmények, melyekben a gazdamolekula részben vagy teljes egészében, kovalens kötés nélkül foglalja magában a vendégmolekulát. Bár a gazda- és vendégmolekula között csak másodrendű kémiai kötések jönnek létre, a ciklodextrin üregének nagy elektronsűrűsége megváltoztathatja a bezáródott vendégmolekula elektron-átmeneteit, ezáltal különböző elektrokémiai és spektrális sajátságait. Ennek következtében a vendégmolekula fizikai és kémiai tulajdonságai nagymértékben megváltozhatnak, így a komplexképződés védelmet nyújthat számos külső hatás ellen (pl. oxidáció, fotokémiai bomlás). Megfelelő körülmények között ez a zárványkomplex könnyen disszociál, és a vendégmolekula visszanyeri eredeti fizikai-kémiai sajátságait. Mindez rendkívül érdekes felhasználásokat tesz lehetővé többek között a gyógyszer- és élelmiszeriparban, illetve az analitikában.

A gazda- és vendégmolekula közötti specifikus kapcsolat kialakulásának feltétele, hogy a vendég mérete, illetve funkciós csoportjainak típusa és térbeli elhelyezkedése a ciklodextrin üregében megfelelő legyen a másodlagos kötőerők (H-kötés, hidrofób, van der Waals erők) létrejöttéhez.

Sav-bázis tulajdonságú molekuláknál a már említett paraméterek mellett az ionizáltsági állapot is alapvetően befolyásolja a kialakuló komplex stabilitását. Egy ionizálható vegyület ténylegesen előforduló állapotait savi/bázikus disszociációs állandóján, a közeg relatív permittivitásán és a hőmérsékleten kívül a közeg pH-ja szabja meg.

A gazda és vendég közötti molekuláris szintű kölcsönhatások megértéséhez a hidrogénkötés és a protonáltsági állapot komplexképződésben betöltött szerepének tanulmányozására 9 kiválasztott savas és 6 bázikus vegyület vizsgálata adott lehetőséget. Ciklodextrinek segítségével az említett bázikus vegyületek vizes közegű tartalmi meghatározására is lehetőség nyílt, ezzel kapcsolódva a gyógyszeranalitika egyik máig részben megoldatlan témaköréhez.

Mindezek alapján Ph.D. munkám alapvetően két részre tagolódik. Az első rész alifás dikarbonsavak különböző protonáltságú ciklodextrin-komplexeinek stabilitásával foglalkozik, míg a második rész ugyanezt néhány kiválasztott alkaloid esetében teszi meg, s a kapott eredmények gyógyszeranalitikai felhasználási lehetőségeit taglalja.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A ciklodextrinek

2.1.1. A ciklodextrinek történetének áttekintése

Az első ciklodextrinre utaló közlemény 1891-ben egy francia kutató, Villiers tollából született, aki a burgonya rothadását vizsgálta *Bacillus amylobacter* baktériumtörzs által [1]. Kultúrája valószínűleg *Bacillus macerans*sal lehetett szennyezett, mert megfigyelte, hogy a keményítő bontásakor igen kis mennyiségben egy kristályos anyag képződik, melyet - mivel ellenállt a savas hidrolízisnek, és nem mutatott redukáló tulajdonságot - valamilyen cellulózféleségnek vélt, ezért cellulozinnak nevezett el. Azt is feltételezte, hogy ezen cellulozin két különféle anyag keveréke.

12 évvel később Franz Schardinger bécsi mikrobiológus elkülönített egy általa *Bacillus macerans*nak nevezett mikroorganizmust, melynek hatására a burgonyából két különböző kristályos anyag keletkezett [2]. Ezek azonosnak tűntek Villiers cellulozinjával. A keményítő és a cellulóz szerkezete akkoriban nem volt ismeretes, de azt már tudták, hogy a keményítő a cellulózzal ellentétben savval könnyen hidrolizálható. Schardinger, mivel a két új anyag a keményítő részleges elbontásának termékeihez volt hasonlatos, α– illetve β–dextrinnek nevezte el őket. További vizsgálatai során sikerült különbséget tennie közöttük kálium-jodidos jódoldattal [3].

A ciklodextrinek (a továbbiakban CD) szerkezetét a harmincas években derítették fel a Heidelbergi Egyetemen Freudenbergnek, a modern polimerkémia megalapítójának laboratóriumában [4]. Ők írták le az első izolációs módszert is, mellyel homogén és tiszta frakciók nyerhetőek. A helyes ciklikus szerkezet leírása ellenére azonban az α– és β–ciklodextrinre tévesen 5 illetve 6 glükózegységet tételeztek föl [5]. A γ–CD-t szintén ők fedezték fel 1948-ban, és 1950-ben sikerült tisztázniuk a szerkezetét.

A ciklodextrinekkel, mint elméletileg érdekes molekulafajtákkal, jó évtizeddel később, az ötvenes évek elején kezdtek foglalkozni a világ két távoli pontján: Dexter

French az Iowai Egyetemen és F. D. Cramer Heidelbergben. Kidolgozták a ciklodextrinek enzimatikus előállításának és tisztításának módját, s felderítették fizikai–kémiai tulajdonságaikat. Ők fedezték fel 1953-ban a ciklodextrinek legfontosabb alkalmazhatóságát, a gyógyszerformulálásban rejlő lehetőségeket. Számos példán keresztül igazolták ciklodextrinek révén a könnyen oxidálódó anyagok stabilizálását, rossz oldhatóságú anyagok oldhatóságnövekedését, illékony komponensek megkötését stb. Ugyancsak French és Rundle határozták meg az α– és β–CD-t alkotó glükózegységek pontos számát [6].

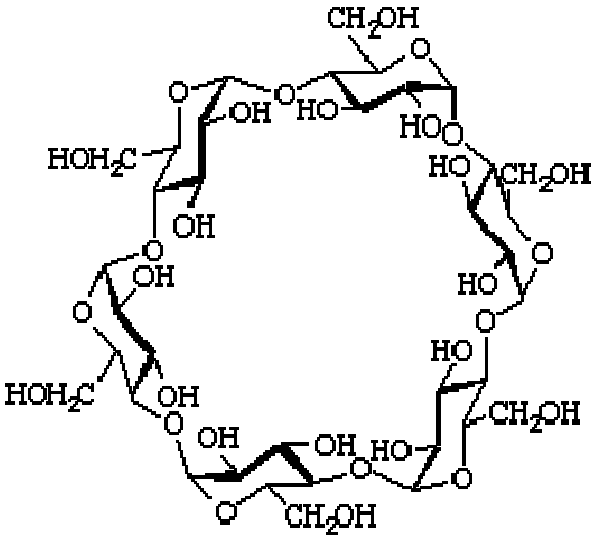
Az első CD-összefoglalót French adta ki 1957-ben [7]. Az egyébként kitűnő monográfiában a CD-ek toxicitásáról a következő információ szerepelt: a kísérleti patkányok elutasították a CD elfogyasztását, és amely állatok kis mennyiségben mégis fogyasztottak belőle, hamarosan elpusztultak. Ebből tévesen a CD-ek nagyfokú toxicitására következtettek, mely évekre visszavetette a CD-ek humán célra történő alkalmazását. Mivel azóta patkányok ezrei kaptak nagy dózisban CD-t, feltételezhető, hogy az akkori tökéletlen előállítási technológia során szerves szennyezők maradtak az anyagban, melyek az érzékeny szaglású állatokból visszautasítást válthattak ki. Ez döntően toluol lehetett, mellyel a β–CD-t kicsapták az oldatból, illetve ezzel tolták el a fermentációt a β–CD irányába. A megfelelően tisztított ciklodextrin nem toxikus, biológiailag degradálódik, fő primer lebomlási terméke pedig a glükóz [8]. Emiatt emberi alkalmazása is hamarosan lehetővé vált.

A ciklodextrinek sikertörténete a nagyüzemi gyártás kidolgozása után indult be igazán. Mivel a keményítő révén olcsó és megújuló forrásból egyszerű enzimatikus hidrolízissel, környezetbarát technológiával állíthatóak elő, a kezdeti magas ár leesett, a ciklodextrinnel foglalkozó tudományos közlemények száma pedig exponenciálisan nőtt. Hamarosan megrendezésre került az első nemzetközi CD szimpózium is, melynek Budapest adott otthont 1981-ben.

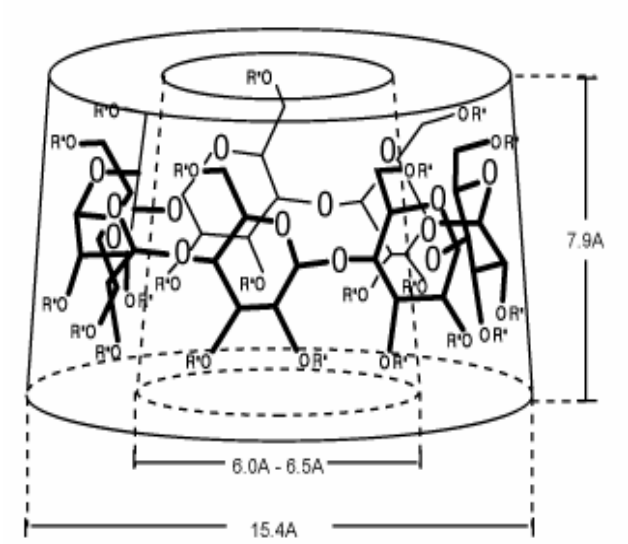
Ma akár évente több ezer tonna mennyiségben gyártják ezeket a vegyületeket, s nehéz olyan vegyipari termékcsoportot (gyógyszerek [9-11], kozmetikumok [12], élelmiszerek [13], peszticidek [14], textíliák [15]) vagy eljárást (formulálás [16,17], elválasztás [18], stabilizálás [19], katalízis [20], biotechnológia [21]) találni, ahol ne lehetne meggyőző példákat hozni a ciklodextrinek alkalmazhatóságára. A „molekuláris kapszulázás” széles körben alkalmazott ipari és analitikai eljárás lett [22,23].

2.1.2. A ciklodextrinek szerkezete

A ciklodextrinek családja 3 fő (major, natív), és számos minor ciklikus oligoszacharidból áll [24]. A major ciklodextrinek kristályos, homogén, nem higroszkópos anyagok, melyek csonka kúp alakú gyűrűit glükopiranóz egységek építik fel.



a



b

1. ábra. Az α–ciklodextrin szerkezete (***a)*** alulnézetben; (***b)*** oldalnézetben (R'=H)

A ciklodextrinek nómenklatúrája nem egzakt. Az α–CD (ciklomaltohexóz, ciklohexaglukán, ciklohexaamilóz) 6 glükopiranóz egységből épül fel (1. ábra), a β–CD (ciklomaltoheptóz, cikloheptaglukán, cikloheptaamilóz) 7, a γ–CD (ciklomaltooktaóz, ciklooktaglukán, cikooktaamilóz) pedig 8 glükózegységből áll. A glükózegységek $^4C_1$ konformációjának köszönhetően az összes primer hidroxil-csoport a gyűrű kisebb átmérőjű peremén helyezkedik el, míg a szekunderek a nagyobb átmérőjű oldalra esnek. Ennek oka az, hogy a primer hidroxil-csoportok szabad rotációja lecsökkenti az üreg peremének átmérőjét, a másik oldalon viszont a szekunder hidroxil-csoportok közti intramolekuláris hidrogénkötések kissé „kimerevítik" azt. Az üreg belsejét hidrogének és glikozidos oxigénhidak alkotják. Ez utóbbiak nemkötő elektronpárjai az üreg belseje felé mutatnak, nagy elektronsűrűséget, ezáltal némi Lewis-bázis karaktert kölcsönözve annak. A sajátos szerkezet eredménye egy hidrofil külsővel rendelkező molekula, relatív jó vízoldhatósággal, és gyengén hidrofób üreggel, mely megfelelő környezetet biztosít apoláris vendégmolekulák számára [25].

A CD-ek legfontosabb fizikai-kémiai tulajdonságait az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat. Az α–, β– és γ–ciklodextrinek legfontosabb jellemzői [26]

Tulajdonságok	α–CD	β–CD	γ–CD
Glükopiranóz egységek száma	6	7	8
Moláris tömeg (g/mol)	972,9	1135	1297,2
Oldhatóság vízben 25 °C-on (g/100mL)	14,5	1,85	23,2
pK_A	12,33	12,20	12,08
$[a]_D^{25°C}$	150 ± 0,5	162 ± 0,5	177 ± 0,5
Külső átmérő (Å)	14,6 ± 0,4	15,4 ± 0,4	17,5 ± 0,4
Üreg átmérője (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Magasság (Å)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Üreg közelítő térfogata ($Å^3$)	174	262	427
Üregbe felvehető vízmolekulák száma	6	11	17

Az adatok alapján szembetűnő, hogy a major ciklodextrinek közül a β–CD-nek a legkisebb a vízoldhatósága. Ebben a molekulában az egyik glükóz C-2 hidroxil-csoportja képes hidrogénkötést létesíteni egy szomszédos egység C-3-OH csoportjával,

így a molekulán belül egy másodlagos öv alakul ki a hidrogénkötések által, mely meglehetősen merevvé teszi a szerkezetet. Ez a jelenség magyarázhatja a csökkent oldhatóságot is, mivel így csökken a lehetőség a vízmolekulákkal való kölcsönhatásra [27]. Az α–CD-ben ezen hidrogénkötésekből létrejött öv nem teljes, mert az egyik glükózegység torzult helyzetben van, így a lehetséges 6 kötésből csak 4 valósulhat meg. A γ–CD nem koplanáris, hanem egy sokkal flexibilisebb szerkezet, így a három fő ciklodextrin közül a legnagyobb vízoldhatósággal bír. Valószínűleg a molekula szimmetriája is szerepet játszik a vízoldhatóság kialakulásánál. A β–CD-hez hasonlóan szintén páratlan gyűrűtagszámú δ–CD, melyet 9 glükózegység épít fel, az α– és γ–CD-hez képest szintén alacsonyabb oldhatósággal rendelkezik, 100 ml víz csak mintegy 8,19 g-ot old belőle 25°C-on [28]. Mivel azonban a β–CD a legkönnyebben hozzáférhető és legolcsóbb mind közül, valamint üregmérete igen kedvező a legtöbb szerves vendégmolekula számára, ezt használják legszélesebb körben.

Természetesen izoláltak nagyobb tagszámú CD-eket is, de ezek hidrolízis iránti stabilitása nagymértékben csökkent. A sorrend a következő:
α–CD < β–CD < γ–CD < δ–CD. Néhány igen nagyméretű molekula kivételével (pl. spironolakton, digitoxin) a δ–CD nem mutatja a többi CD-re jellemző szolubilizációs készséget sem [28]. Ezen nagy tagszámú CD-ekre már a csonka kúp alak sem jellemző, és üregátmérőjük a nagy flexibilitás miatt akár kisebb is lehet a γ–CD-énél. A komplexképződés hajtóereje, azaz a nagy entalpiájú vízmolekulák szubsztitúciója az üregben kisebb a nagyméretű CD-ek esetében, így alkalmazásuk komplexképző ágensként egyelőre nem jellemző.

2.1.3. Ciklodextrinek előállítása

A ciklodextrinek ipari előállítása napjainkban óriási méretű fermentorokban történik keményítőből ciklodextrin glükozil-transzferáz (CGTáz) enzim hatására. A géntechnológia fejlődésével a számos mikroorganizmus (pl. Bacillus macerans, Klebsiella oxytoca, Bacillus circulans, Alkalophylic bacillus) által termelt CGTáz enzimet egyre hatékonyabban lehet előállítani [29,30].

Első lépésként magas hőmérsékleten elfolyósítják a keményítőt, majd lehűtik. A viszkozitás csökkentésének érdekében α–amilázzal történő részleges hidrolízis után

adják hozzá a CGTáz enzimet, melynek eredménye lineáris és gyűrűs dextrinek keveréke. Hozzáadott komplexképző segédanyagok segítségével szabályozható a fő termékként keletkező CD gyűrű tagszáma: α–CD-hez 1-dekanolt, 1-nonanolt vagy Na-laurilszulfátot, míg β–CD-hez többnyire toluolt, hexánt vagy triklóretilént használnak [31]. A komplexet ezután szűréssel izolálják, mossák, majd a komplexképzőt eltávolítják. A toluol eltávolítása pl. vízzel felzagyolva vákuumbepárlóban történik. Ezután aktív szenet kevernek a CD-hez, szűrik és kristályosítják [32]. A melléktermékként keletkező egyéb származékok elválasztása HPLC módszerrel történhet [33].

2.1.4. Ciklodextrin származékok

Tekintve, hogy az α–, β– és γ–ciklodextrin primer és szekunder alkoholos hidroxil-csoportjaik révén rendre 18, 21 ill. 24 szubsztituálható csoportot tartalmaznak, a lehetséges származékok száma majdhogynem végtelen. Napjainkban számos hidrofil, hidrofób és ionos származékot használnak a különböző fizikai-kémiai tulajdonságok és zárványképző igények kielégítésére. A leggyakoribb az alkoholos hidroxil-csoportok éterezése, észterezése (metil-, hidroxipropil-, szulfonált CD-ek), illetve amin-származékká alakítása.

Az irodalomban leírt ciklodextrin származékok száma ma már több százra tehető. Alapvető csoportosításuk a szubsztituensek száma (mono- vagy többfunkciós), elhelyezkedése (random vagy izomertiszta), illetve azok ionizálhatósága (semleges vagy ionizálható) alapján történik.

A módosított ciklodextrinek fontos szerepet játszanak a célzott hatóanyag-leadásban [11], enantioszelektív elválasztásban, és különböző enzimmodellekben.

2.1.5. A ciklodextrinek zárványkomplex-képzése

A zárványkomplex kialakulásának feltétele a megfelelő sztérikus illeszkedés, azaz hogy a vendégmolekula bizonyos részlete, esetleg egésze képes legyen bezáródni a ciklodextrin üregébe [34]. Bár az egyes ciklodextrin molekulák magassága gyűrűtagszámtól függetlenül egyforma, a belső átmérő és ezáltal az üreg térfogata

behatárolja a lehetséges vendégmolekulák körét. Az α–CD inkább a kis molekulatömegű, általában alifás oldalláncot tartalmazó vendégmolekulákat kedveli, a β–CD ezzel szemben az aromás és heterociklusos részecskékkel képez stabilis komplexet, míg a γ–CD méreténél fogva makrociklusok, szteroidok befogadására a legalkalmasabb.

A komplex képződésekor fontos a megfelelő termodinamikai viszonyok kialakulása a rendszer komponensei, azaz a gazda, a vendég, és az oldószer között [35]. Vizes oldatban a gyengén apoláris ciklodextrin-üregben nagy entalpiájú vízmolekulák foglalnak helyet. A kedvezőtlen poláris–apoláris kölcsönhatás eredményeként a víznél kevésbé poláros vendégmolekulák szubsztitúciója preferált. Termodinamikailag négy fő lépés segíti a komplex-egyensúly kialakulását vizes közegben:

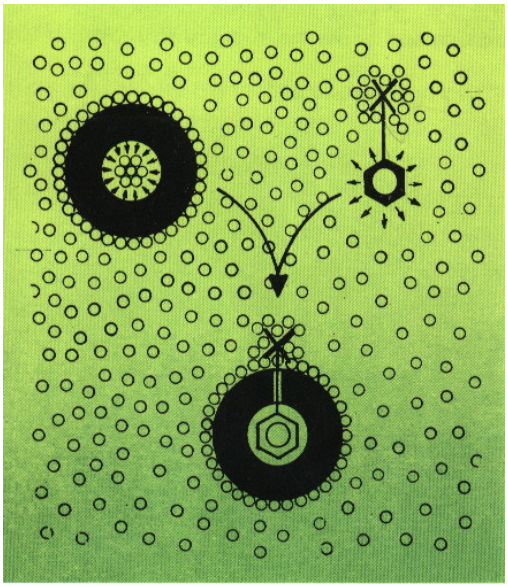
- A vízmolekulák kiszabadulása az üregből
- A kiszabadult vízmolekulák által létrehozott nagyszámú hidrogénkötés létrejötte a többi oldószer-molekulával
- A hidrofób vendégmolekula és a poláros oldószer közötti taszító kölcsönhatások megszűnése
- A ciklodextrin apoláris ürege és a hidrofób vendég között létrejövő másodlagos kötőerők, ezen belül is elsősorban van der Waals, hidrofób kölcsönhatások, illetve hidrogénkötések kialakulása [36].

Ez tehát a zárványkomplex képzés hajtóereje.

A komplexképződés legfontosabb következményei a következők:

1. Nagymértékben megnőhet az eredetileg rosszul oldódó anyagok oldhatósága. A komplex oldhatósága azonban általában kisebb a tiszta CD-énél [37], bár egyes esetekben (pl. H-kötés stabilizáló hatására) akár növekedés is tapasztalható [38].
2. Megváltoznak a vendég spektrális sajátságai. Eltolódhat pl. az elnyelési maximum helye az UV spektrumban. Egy akirális vendégmolekula királis CD-be való ágyazódása révén erős indukált Cotton effektus figyelhető meg a cirkuláris dikroizmus spektrumon [39]. Anizotróp árnyékolású atomok kémiai eltolódása megváltozhat az NMR spektrumban a komplexképződés következtében [40].
3. Megváltozhat a vendégmolekula reakcióképessége. A gyűrű belsejében a vendégmolekula általában stabilizálódik, mivel a bezáródás védi a külső behatásoktól, de néhány esetben a ciklodextrin mesterséges enzimként viselkedik, így felgyorsíthat különböző reakciókat, illetve reakció–utakat módosíthat [20].

4. Erősen csökkenhet a vendég diffúziója és párolgása ill. szublimációja (arra hajlamos anyagok esetében), így gázhalmazállapotú molekulák mikrokristályos vagy amorf por formában megköthetőek [41].
5. A komplex hidrofilitása a szabad hidrofób vendégmolekulához képest nő, emiatt a kromatográfiás mobilitás is módosul. Ugyancsak ebből adódik, hogy a komplex könnyen nedvesíthető és gyorsan oldható.



2. ábra. 1:1 sztöchiometriájú zárványkomplex képződése vizes közegben [26]

A komplexképződés során egy, kettő, esetleg több CD molekula zárhat magába egy vagy több vendégmolekulát. A leggyakoribb (különösen oldatban) s egyben legegyszerűbb sztöchiometria azonban az 1:1 gazda:vendég arány (2. ábra).

A komplexképződési egyensúlyok általános jellemzése

Oldatban a komplexképződés során fennálló egyensúly általánosan az egyensúlyi (képződési, stabilitási) állandóval (β_{qr}) fejezhető ki, a következőképpen:

$$q\,B + r\,D \rightleftarrows B_qD_r \qquad \beta_{qr} = \frac{[B_qD_r]}{[B]^q[D]^r} \qquad (1)$$

ahol D jelenti a ciklodextrint és B a vendégmolekulát.

A β_{qr} stabilitási állandókat felhasználva az anyagmérlegeket a következőképpen adhatjuk meg:

$$c_B = \Sigma\, q\beta_{qr}[B]^q[D]^r \quad (2)$$

$$c_D = \Sigma\, r\beta_{qr}[B]^q[D]^r \quad (3)$$

(c_B a vendég és c_D a gazdamolekula összkoncentrációja)

A tapasztalatok szerint ciklodextrinekkel az esetek túlnyomó részében 1:1 sztöchiometriájú zárványkomplexek képződnek, azaz q=r=1, így összefüggéseink nagyban egyszerűsödnek.

A legtöbb stabilitási állandó meghatározására szolgáló módszer azon alapul, hogy a vendég valamely tulajdonsága a komplexképződés következtében megváltozik. A változás mértékének nyomon követése a koncentrációviszonyok függvényében információt ad a bezáródás mértékéről. A leggyakrabban alkalmazott módszerek a teljesség igénye nélkül: spektroszkópia (UV-VIS, [42,43] NMR [44]), pH–potenciometria [45], oldhatósági vizsgálatok [46], mikrokalorimetria [47], kapilláris elektroforézis [48,49] és kromatográfia [50]. Elektroaktív vendégmolekula esetén számtalan elektrokémiai módszer közül választhatunk (polarográfia, potenciometria, voltammetria), melyek nemcsak a komplexstabilitási állandóról, hanem a vendég redukciójának kinetikájáról, valamint a komplex egyéb fizikokémiai állandóiról is információt adhatnak [51].

2.1.5.1. Komplexképzés szerves savakkal

A ciklodextrinek hidrofób (bár némiképp poláris) ürege kiemelkedő jelentőséggel bír komplexképzésük során. Az üregben elsősorban van der Waals és hidrofób kölcsönhatások kialakulására van lehetőség [36], mely az aromás vendégmolekulák bezáródásának kedvez, de a peremen elhelyezkedő alkoholos hidroxil-csoportokkal kialakítható hidrogénkötések is jelentősen növelhetik a szupramolekula stabilitását [52].

1976-ban Connors és Lipari megfigyelték, hogy néhány szerves sav ill. bázis erőssége ciklodextrinek jelenlétében megváltozik [53]. A savi disszociációs állandó látszólagos eltolódása csak azon molekulák esetében figyelhető meg, amelyek konjugált savi és bázikus formája eltérő stabilitású komplexet képez ciklodextrinnel. Általában a

töltéssel rendelkező forma komplexe a kevésbé stabilis, mivel a gazdamolekula hidrofób ürege jobban kedveli a semleges molekulákat [54].

Néhány esetben, pl. p-nitrofenol és p-nitrofenolát ciklodextrin komplexének stabilitásában mégis fordított tendencia tapasztalható [55]. Ez a jelenség a London-féle diszperziós erők dominanciáját támasztja alá a komplexképződés során. A p-nitrofenolát anionnál fellépő töltés-delokalizáció megnöveli az elektronsűrűséget és a polarizálhatóságot, így a komplex stabilitását is. Az α-CD üregében a szorosabb illeszkedés miatt a van der Waals erők stabilizáló hatása még kifejezettebb, mint β-CD esetén, nincs azonban lehetőség hidrogénhíd kialakulására a gazda- és vendégmolekula fenolos hidroxil-csoportjai között, különösen a para-származékoknál. Mindezekből következik, hogy szubsztituálatlan fenolnál illetve meta-szubsztituált fenolszármazékoknál a jelenség nem figyelhető meg, mert ez a típusú töltés-delokalizáció csak orto- és para-szubsztituált származékoknál lép fel, ez előbbiek bezáródása viszont sztérikus okok miatt gátolt. Egyéb para-fenolát származékoknál a töltésből adódó erős hidratáltság nagyobb mértékben csökkenti a komplex stabilitását, mint a van der Waals erők növelik azt, így szintén nem látható jelentős különbség a stabilitásokban az anion javára.

Az alifás szerves savak komplexképződését többen is vizsgálták, így számos irodalmi adat állt rendelkezésünkre. Végeztek vizsgálatokat többek között fagyáspontcsökkenésen alapuló módszerrel [56], pH-potenciometriás [57], mikrokalorimetriás [58], kompetitív spektrofotometriás és oldhatóságmérésekkel [59] is.

Zsírsavak amilózkomplexét először Mikus [60] és Scoch [61] tanulmányozták részletesen, melynek során azt találták, hogy az α–hélix egy csavarulatára átlagosan öt metiléncsoport jut. Ez az arány ciklodextrinek esetében is igaz, bár lehetnek kismértékű eltérések [62, 63].

α–CD monokarbonsavakkal történő vizsgálata bebizonyította, hogy az alkil lánc hatol be az üregbe, míg a karboxilát anion energetikai okok miatt azon kívül helyezkedik el. [57]. Protonált formában a karboxil csoport hidrogénkötéseket tud kialakítani a peremen lévő hidroxil-csoportokkal, így az alkil lánc is mélyebben képes az üregbe penetrálni.

A disszociálatlan sav és konjugált anionja igen eltérő viselkedést mutathat komplexképződés során, mivel a karboxilát anion jóval hidratáltabb a semleges

formánál, ami bezáródásának kevésbé kedvez. Az irodalomban található méréseket gyakran magasabb pH értéken végzik, így a kapott állandók „kevert” állandók, azaz magukban foglalják a disszociálatlan savra és annak anionjára vonatkozó érték pH-tól függően súlyozott átlagát [47], vagy (főleg a mikrokalorimetriás méréseknél, ahol csak egyfajta protonáltsági állapotú részecske található meg) csak az anionra vonatkoznak [64-68].

2.1.5.2. Komplexképzés alkaloidokkal

Alkaloidok illetve sóik ciklodextrin komplexeinek vizsgálatára szintén találunk példát az irodalomban. Széles körben végeztek méréseket például a pilokarpin, mint hidrofil farmakon α–, β–, γ–CD, HP–β–CD és HE–β–CD komplexének vizsgálatára. ^{1}H- és ^{13}C-NMR, valamint FTIR vizsgálatok igazolták, hogy bár az imidazolgyűrű bezáródása a preferált, valószínűsíthető egy felületi asszociációs kölcsönhatás is az egyes ciklodextrinekkel [69] In vitro kísérletek bizonyítják, hogy α–CD jelenlétében megnő a pilokarpin miotikus aktivitása, hatásának időtartama, ezáltal nő a relatív biohasznosíthatóság is [70].

Történtek vizsgálatok a kínaalkaloidok különböző ciklodextrin-komplexeinek stabilitás-meghatározására, illetve szerkezetének felderítésére is. A ^{1}H-NMR vizsgálatok alapján a ciklodextrin üregében elhelyezkedő H-3 és H-5 protonok kémiai eltolódás-változása egyértelműen bizonyítja a zárványkomplex létét, a külső hidrogének kémiai eltolódás értékeinek változatlansága azonban nem utal felületi asszociációra. A FTIR-spektrum alapján kimutatható a kinin-hidroklorid molekula egészének érintettsége, valamint a szabad rotáció gátlása a komplexképződés következtében. Mivel a kína-alkaloidok és ciklodextrinek közötti komplexképződés főként méret/alak egyezésen alapul, ez a van der Waals és hidrofób kölcsönhatások dominanciáját sugallja a komplexstabilitásban [71-73]. A ciklodextrin fluoreszcens spektrumra gyakorolt hatásának Job függvénye igazolja az 1:1 sztöchiometriájú komplexet [74], melyet szilárd állapotban röntgendiffrakciós mérések is alátámasztanak. ROESY spektrumon egyértelmű keresztcsúcsok láthatóak az etenil és kinuklidin csoport és a β–CD H-3 valamint H-5 protonja között, jelezve, hogy ezen molekularészlet a ciklodextrin üregén belül helyezkedik el [75].

Papaverint β– és dimetil–β–CD-nel vizsgálva csak kismértékű komplexképződést sikerült igazolni [76]. ^{1}H-NMR vizsgálatok alapján mind az izokinolin, mind a benzolgyűrű felületi asszociációja bizonyítható. A kémiai eltolódás-változások csak igen gyenge kölcsönhatást jeleznek a papaverin és β–CD között. Ez dimetil–β–CD esetén jóval kifejezettebb, mely bizonyítja, hogy a papaverin mélyen képes behatolni a dimetil–β–CD belsejébe. A H-3 proton nagyobb érintettsége azt is jelzi, hogy a papaverin feltehetőleg a ciklodextrin szekunder pereme felől közelíti meg az üreget. Kioldódásvizsgálattal igazolható az 1:1 arányú komplex-összetétel.

2.2. Általános alkaloidmeghatározási módszerek

A ma használatos gyógyszerek túlnyomó többsége bázikus jellegű, nagy részük azonban technológiai és farmakokinetikai szempontok alapján vízben oldódó só formájában kerül forgalomba. A szerves bázisok csoportján belül az alkaloidok, sokszor sóik formájában régóta a gyógyszeranyagok egyik jelentős vegyülettípusát adják, és ma is szerves részét képezik a gyógyszerkincsnek. Tartalmi meghatározásuk aktuális analitikai problémát jelent, hiszen annak ellenére, hogy számos megoldás született az idők során, minden szempontból megfelelő módszer a mai napig nem létezik.

Az alkaloidok olyan erős fiziológiai hatással bíró nitrogéntartalmú vegyületek, melyek nagy adagban mérgezőek, kis adagban azonban fontos és értékes gyógyszereink. Az elnevezés bázikus viselkedésükre utal, mely zömmel 10^{-4}-10^{-9}–es nagyságrendű disszociációs állandóval jellemezhető. Ezért, valamint a bázisforma többnyire rossz oldhatósága miatt e vegyületek többsége vizes közegben acidimetriásan nem titrálható.

Az alkaloidsók tartalmi meghatározása a múlt század második feléig, így az ötödik magyar gyógyszerkönyv (Ph.Hg.V.) szerint is az ún. klasszikus alkaloidmeghatározás szerint kétlépéses művelettel, a bázis előzetes elválasztása és szerves oldószerbe, rendszerint kloroformba való átrázása után a szabad alkaloid mérése útján történt [77,78].

A kellően nagy disszociációs állandóval rendelkező alkaloidbázist ($10^{-7} \geq K_b$, pl. efedrin), titrimetriásan mérték. Ez esetben ismert mennyiségű, fölöslegben mért kénsav-oldatot adva az alkaloidbázis kloroformos oldatához sóvá alakították azt, és a kloroform teljes elpárologtatása után a sav feleslegét nátrium-hidroxid mérőoldattal visszatitrálták.

Gyengébb bázisok (pl. pilokarpin), meghatározására a gyógyszerkönyvi cikkely gravimetriát alkalmazott, azaz a kloroformot vízfürdőn teljesen elpárologtatták, és tömegméréssel határozták meg az alkaloid mennyiségét.

A vízben jól oldódó alkaloidsók meghatározására a Schulek-féle „rövidített kirázás” szolgált. Megfelelően nagy szerves/vizes térfogatarány esetén ugyanis már egyszeri kirázással megfelelő fokú kioldás érhető el. Ezért az alkaloidsót csak kevés vízben oldották fel, és a bázis felszabadítása és kloroformba átoldása után a vizes fázist nátrium-szulfáttal megkötötték. Ezt az előzőekben ismertetett gravimetriás mérés (papaverin), vagy acidi-alkalimetriás titrálás követte (kinin, homatropin és kodein).

Bár a kirázásos módszer megfelelően pontos eredményeket szolgáltatott, meglehetősen időigényesnek mondható, ezért az ún. kétfázisú, kiszorításos alkalimetriás titrálást is alkalmazták. Ez a módszer az alkaloidtartalmat az alkaloidsó savkomponensén keresztül méri. Az eljárás során az alkaloidsót szerves oldószer jelenlétében, rázogatás közben, közvetlenül titrálták lúgoldattal. A titrálás során felszabaduló alkaloidbázis a szerves oldószerbe oldódik át, míg a keletkező nátrium-klorid a vizes fázisban marad. Mivel a képződő gyenge bázist folyamatosan eltávolították a titráló közegből, tulajdonképpen egyszerű savmérést végeztek. Így kininsók és a papaverin-klorid is meghatározhatóvá vált. A módszer a papaverinnél erősebb bázisok sóinak meghatározására nem alkalmas, mivel a vizes fázisban maradó kismennyiségű bázis is zavarja a savkomponens pontos mérését.

A hatodik magyar gyógyszerkönyv (Ph.Hg.VI.) szintén használta a kétfázisú titrálást, bizonyos hidroklorid- és hidrobromid-sók halogenid-komponensének meghatározására azonban inkább a Volhard-féle visszaméréses argentometriás eljárást írta elő (efedrin-klorid, homatropin-bromid). Bár mindkét módszer lényegesen egyszerűbb a klasszikus, kétlépéses módszernél, elvi hibájuk, hogy nem a hatást hordozó báziskomponenst, hanem indirekt módon csupán az anyag sav- illetve halogenidtartalmát mérték [79].

Az egyes cikkelyek általában több módszert tartalmaztak az egyes gyógyszeranyagok tartalmi meghatározására. Kinin-klorid esetében például az összalkaloid-tartalom meghatározás mellett a vinilcsoportos kína-alkaloidokat *Schulek* szerint, bromatometriásan is mérték [80].

A múlt század közepétől széles körben elterjedtek a nemvizes közegű módszerek, melyekkel vízmentes közegben, savas oldószert alkalmazva 10^{-8} értéknél kisebb disszociációs állandójú gyenge bázisok is titrálhatóak acidimetriásan [81-84]. A mérőoldat leggyakrabban a jégecetes perklórsav. Az alkaloidsóból (Alk.HCl) jégecetes közegben, higany(II)-acetát hatására rosszul disszociáló higany(II)-klorid képződik, azaz az alkaloidsó ellenionja acetátra cserélődik.

$$2\ \mathrm{Alk.HCl} + \mathrm{Hg(CH_3COO)_2} = \mathrm{HgCl_2} + 2\ \mathrm{Alk.H^+CH_3COO^-} \qquad (4)$$

Az ekvivalens mennyiségben keletkező acetátion perklórsavval titrálható:

$$\mathrm{Alk.H^+CH_3COO^-} + \mathrm{CH_3COOH_2{}^+ClO_4{}^-} = \mathrm{Alk.H^+ClO_4{}^-} + 2\ \mathrm{CH_3COOH} \qquad (5)$$

A higany(II)-acetát feleslege a mérést nem zavarja, mert jégecetben alig disszociál, így igen gyenge bázisként viselkedik [85,86].

A nemvizes közegű titrálások gyors, pontos, megbízható módszereknek bizonyultak, így a hetedik magyar gyógyszerkönyv (Ph.Hg.VII.) is előszeretettel alkalmazta őket [87]. Bár a módszer nem szelektív, hiszen a halogenidkomponenssel ekvivalens mennyiségben felszabaduló acetát mellett az esetlegesen szennyezésként jelen lévő szabad bázistartalmat is méri, ez a cél szempontjából tulajdonképpen még előnynek is mondható, hiszen a biológiailag hatékony komponenseket együtt mérjük, azaz teljesebb képet kapunk a hatóanyag-tartalomról. Ugyanakkor az idegen halogenid- illetve bázisszennyezés szintén pozitív hibát okoz a mérés során. Kifogásolható a módszer még a higany(II)-acetátnak, mint erősen környezetszennyező segédanyagnak a használata miatt.

A japán gyógyszerkönyvek már régóta, így a 2001 óta érvényben lévő 14. kiadás is a N-bázisok esetében jégecetes–ecetsavanhidrides (3:7) oldás után szintén perklórsavas titrálást írnak elő, potenciometriás végpontjelzést alkalmazva [88]. Az eljárás során a halogenidkomponenssel ekvivalens mennyiségű acil-halogenid, és ugyanannyi, perklórsavval titrálható acetátion keletkezik. Bár ez sem szelektívebb az előbb ismertetett nemvizes közegű módszernél, ezzel az igen toxikus higany-sók alkalmazása kiküszöbölhető.

Az 1965-től életbe lépett amerikai gyógyszerkönyv (USP 17.) is használta a potenciometriás végpontjelzést nemvizes közegű titrálásoknál, de elsősorban csak foszfátsók esetében (kodein-foszfát) [89]. Klorid- és bromidsóknál a kristályibolyás módszert írta elő, ahogyan ezt a 23. kiadás is teszi [90]. Érdekesség, hogy itt a homatropin-bromid tartalmi meghatározása a szokásostól eltérően lúgos hidrolízis után, a mandulasav cerimetriás titrálása alapján történik.

Az Európai Gyógyszerkönyvi Bizottság a toxikus reagensek visszaszorításának a jegyében egyre inkább az alkoholos közegben, HCl jelenlétében végzett potenciometriás meghatározást preferálja, mely tulajdonképpen az ún. kétfázisú titrálás módosított változata. A Ph. Eur. 4. számos szubsztancia esetében ezt az eljárást írja elő. [91] Az újonnan kiadott, a Ph. Eur. 4. alapján szerkesztett VIII. magyar gyógyszerkönyv szintén ezt a tartalmi meghatározást írja elő. A mérés során az anyag pontosan lemért mennyiségét sósav és alkohol elegyében oldják, majd az oldatot, potenciometriás végpontjelzést alkalmazva, nátrium-hidroxid mérőoldattal titrálják. Az anyag mennyisége a két inflexiós pont közötti mérőoldat-fogyással ekvivalens [92].

A módszer előnye – a környezetvédelmi megfontolásokon túl – hogy az alkaloidtartalmat nem a halogenidkomponens, hanem a protonált bázistartalom alapján méri. Az alkalmazott alkoholos közeg két úton segíti a mérést: megakadályozza a titrálás során szabaddá váló alkaloidbázis csapadékként való kiválását az oldatból, valamint a bázis protonálódási állandójának és a vízionszorzatnak a csökkentésével javítja a titrálási görbék alakját, ezáltal a kiértékelhetőséget. A hozzáadott sósav funkciója szintén kettős. Elősegíti az alkaloidsó feloldódását az alkoholos közegben, az esetlegesen jelen lévő szabad bázis protonálásával pedig teljesebb képet kapunk a hatásért felelős alkaloidtartalomról. Nem zavar a szubsztancia erős sav szennyezése sem, hiszen ez az első inflexiós pontig, a sósavval együtt mérődik, bár ez utóbbi a cikkelyekben előírt szigorú szennyezésvizsgálatoknak köszönhetően nem jelent reális problémát.

Gondot okozhat azonban az alkoholos közegben a légköri széndioxid megnövekedett oldhatósága. Ezt a hibát az európai gyógyszerkönyv új faktorozási eljárással igyekszik minimalizálni. A faktorozás frissen szublimált benzoesavra történik, melynek savi erőssége a vizsgált szerves ammónium-halogenidekéhez hasonló, a bemérés mennyisége, így a titrálás időtartama is közel megegyezik a mérések idejével. A szén-dioxid okozta pozitív torzítás tehát közelítően meg fog egyezni a mérések során tapasztalttal. A faktorozás így nemcsak a mérőoldat pontos koncentrációját adja meg, hanem egyben üres mérésként is szolgál [93].

Néhány esetben azonban ez a titrálási módszer sem megfelelő, mivel az alhoholtartalommal növekvő savi disszociációs állandó, valamint a hozzáadott sósav az első inflexiós pont észlelését lehetetlenné teszi, ezért a módszer a tapasztalat szerint 7-nél kisebb pK_A-jú anyagok esetében, így például pilokarpin-klorid vagy papaverin-klorid meghatározására nem alkalmas. Ráadásul az alkoholos közegben végzett titrálás sósav hozzáadása nélkül is jó eredményeket adhat [94,95]

Összegzésképp tehát elmondható, hogy a vizes közegű meghatározás két legfontosabb akadálya az alkaloidbázisok rossz vízoldhatósága, illetve a túl kicsi protonálódási állandó. Ezen problémák megoldását próbáltuk ciklodextrinek segítségével megvalósítani.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A protondonor illetve -akceptor csoporttal rendelkező molekulák számára a közeg pH-ja meghatározó szereppel bír. Mind gyógyszerészeti, mind analitikai vagy ipari eljárásokat tekintve a kémiai folyamatok szempontjából elsődleges fontosságú annak ismerete, hogy a vizsgálandó anyag az adott pH-jú közegben milyen molekuláris állapotban van. Nincs ez másként a ciklodextrin komplexek esetében sem. A ciklodextrin üregének enyhén apoláris jellegéből adódóan elsősorban az apoláris, illetve töltéssel nem rendelkező vendégmolekulák bezáródása a kedvező a poláris, esetleg töltéssel is bíró, jóval hidratáltabb formákkal szemben. Ha a vendégmolekula sav-bázis tulajdonsággal is rendelkezik, a különböző protonáltságú formák eltérő stabilitású komplexet képeznek. Kutatásaim legfőbb célja az volt, hogy a protonálódás hatását tanulmányozzam egyes savas vagy bázikus jellegű vegyületek különböző ciklodextrinekkel képzett zárványkomplexeinek stabilitására.

Munkám előzményeként az ELTE Kémiai Intézetében, az Analitikai Kémiai tanszéken működő koordinációs kémiai csoport több évtizedes munkájának során a ciklodextrinek terén elért eredményeit tekinthetjük [55,96]. A csoport egyik kiemelt témája a hidrogénkötés komplexstabilizáló szerepe, melynek során bebizonyítást nyert, hogy ha a vendégmolekula egy-egy csoportja H-kötést létesíthet a CD peremén lévő OH-csoportokkal, ez növeli a komplexek stabilitását [52,97]. A kapcsolódó irodalom tanulmányozása közben néhány meglepő eredményre bukkantunk: egyes alifás dikarbonsavak HA^- típusú részecskéje stabilisabb komplexet képez α-CD-nel, mint a disszociálatlan sav maga [98].

Ezek után érdekesnek tűnt, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a hidrogénkötésnek komplexképződés során betöltött speciális szerepébe. Kiválasztottunk öt vegyületet az alifás α,ω–dikarbonsavak homológ sorából az oxálsavtól az adipinsavig. Összehasonlítás céljából megvizsgáltunk két telítetlen, (maleinsav és a fumársav), valamint egy telített, szubsztituált származékot is (dietil-malonsav).

Mindezek tükrében munkánk célja az volt, hogy vizes oldatokban tanulmányozzuk az említett vegyületek β–ciklodextrinnel szemben mutatott komplexképző hajlamát, valamint meghatározzuk a részecskeeloszlást, és a képződő komplexek stabilitási állandóit.

A savak mellett vizsgálatainkat a bázikus jellegű vegyületek körére is kiterjesztettük. Öt gyógyászatban is fontos szerepet betöltő alkaloid sóját választottuk ki, és komplexképzésüket a pH függvényében vizsgáltuk natív illetve módosított ciklodextrinekkel.

Amennyiben az oldhatóság lehetővé tette, meghatároztuk vizes közegben az alkaloidok protonált formáinak savi disszociációállandóit (K_A). Célunk volt, hogy megvizsgáljuk a modellvegyületek különböző ciklodextrinekkel szemben mutatott komplexképző hajlamát, különös tekintettel a gazdamolekula üregméretének illetve szubsztituáltságának hatására.

A kapott eredményeket igyekeztünk analitikai területen hasznosítani, azaz a komplexképződést felhasználni a vizsgált alkaloidsók új, vizes közegben történő mennyiségi meghatározására. A stabilitási állandók és a molekulaméretek, valamint a sav-bázis sajátságok figyelembevételével (amennyiben van ilyen) kiválasztottuk az egyes vegyületekhez legmegfelelőbben alkalmazható ciklodextrint.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A vizsgált anyagok

4.1.1. Dikarbonsavak

α,ω–dikarbonsavaknak nevezzük a kétértékű telített alifás karbonsavak azon alaptípusát, mikor a két karboxilcsoport egymástól legtávolabb, azaz a lánc két végén helyezkedik el. Elnevezésükre a szisztematikus nevek helyett ma is inkább a régi triviális neveket használjuk. Homológ soruk kezdő tagja az oxálsav, amelyben a két karboxilcsoport közvetlenül egymáshoz kapcsolódik.

Az α,ω–dikarbonsavakhoz tartozó két savi disszociációs állandó nem azonos, az első disszociációs lépés nagyobb mértékű, mint a második. Különösen látszik ez az oxálsavnál, mely a szubsztituálatlan karbonsavak közül a legerősebb. Az első disszociációs lépés feltűnően nagy mértéke a másik karboxilcsoport elektronvonzó hatásának tulajdonítható. Ez a hatás a karboxilcsoportok távolodásával egyre inkább csökken, ezért míg az oxálsav és a malonsav erősebb sav, mint a hangyasav, a homológ sorban tovább haladva a magasabb tagok disszociációs állandója már alig nagyobb, mint a monokarbonsavaké. Az említett két dikarbonsavnál (oxálsav, malonsav) a két disszociációs lépés erőssége közti különbséghez hozzájárul az intramolekuláris hidrogénkötés, mellyel hosszabb szénláncok esetén nem kell számolni.

A második proton leadásában a dikarbonsavak már jóval gyengébb savak, mely arra vezethető vissza, hogy a negatív töltésű karboxilát anion negatív induktív hatása a másik karboxilcsoporton az elektronsűrűség növelésével gyengíti annak savi jellegét. Ez a szénláncon át ható induktív hatás a lánc hosszának növekedésével viszonylag gyorsan csökken, így a magasabb tagoknál már egyáltalán nem kell számolnunk vele. A gyakorlatban azonban a második disszociációs állandó még így is legalább egy nagyságrenddel kisebb, mint az első. Bjerrum értelmezése szerint a hosszú elágazásokat nem tartalmazó szénláncú dikarbonsavak esetében a két karboxilcsoport a láncot alkotó szénatomok rotálása következtében egymás szomszédságába kerülhet, így a karboxilát anion negatív töltése nem a láncon keresztül, hanem közvetlenül a téren át direkt effektus révén érvényesítheti befolyását a másik karboxilcsoport disszociációjára,

megfelelő térbeli viszonyok esetén pedig akár gátolhatja is a disszociációt a COO^----HOOC- intramolekuláris hidrogénkötés [99].

A következőkben röviden ismertetem az általunk vizsgált dikarbonsavakat.

Az **oxálsav** a természetben, különösen a növényvilágban igen elterjedt. Káliumsója az Oxalis és Rumex fajokban (pl. sóska, lóhere) található, régen ismert. Kálciumsójának kristályai számos növényi sejtben kimutathatóak. Általában a legelterjedtebb növényi savak közé tartozik. Az állati szervezetben ugyancsak megtalálható, megjelenik az emlősök vizeletében is. Kóros esetben a vizelettel kiválasztott oxálsav mennyisége lényegesen megnövekedhet (oxaluria). Az oxálsavnak nagy a gyakorlati jelentősége is: mint erős, de nem maró hatású sav gyakran nyer alkalmazást.

A **malonsav** az α,ω–dikarbonsavak preparatív szempontból legjelentősebb képviselője. A természetben alig található meg (csak a cukorrépa nedvében sikerült kimutatni). Közvetlenül vagy észterei alakjában gyakran alkalmazzák kiindulási anyagként szintéziseknél. Ezek a malonsav két kémiai sajátságán alapulnak:

1. A malonsav és metiléncsoportján szubsztituált származékai könnyen dekarboxileződnek.

2. A malonsav metiléncsoportjának hidrogénatomjai lazított kötésűek, s emiatt könnyen lép kondenzációs reakcióba oxovegyületekkel.

A **borostyánkősav** régen ismert vegyület, Agricola írta le először, mint a borostyánkő (latinul succinum) hevítésénél keletkező terméket. A növény- és állatvilágban egyaránt elterjedt. Szerves kémai preparatív szempontból fontosak származékai, pl. a borostyánkősavanhidrid.

A **glutársav** megtalálható a gyapjú mosóvizében, a tarlórépában, általában a növényvilágban elterjedt. Származékai közül észtereit, anhidridjét és nirtiljét alkalmazzák szintéziseknél.

Az **adipinsavat** először különféle zsírok oxidációs termékeként nyerték, innen származik a neve is (az adeps latinul zsírt jelent). A műanyagiparban fontos kiindulási alapanyag.

A **maleinsav** nem fordul elő a természetben. Sztereoizomerje, a **fumársav** viszont sok növényben megtalálható. Műgyanták előállítására használják

A savak legfontosabb fizikai és kémiai paramétereit a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat. Az α,ω–dikarbonsavak néhány fizikai és kémiai jellemzője [100]

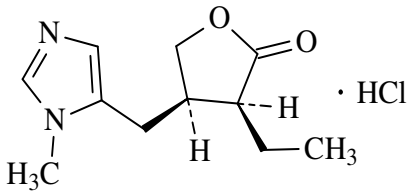
Sav	Képlet	M_t (g/mol)	pK_{a1}	pK_{a2}	Olvadáspont (°C)	Oldhatóság (g/100ml, 25°C)
Oxálsav	$(COOH)_2$	90,04	1,23	4,19	101-102	14,3
Malonsav	$CH_2(COOH)_2$	104,06	2,83	5,69	135,6	153,8
Borostyánkősav	$(CH_2)_2(COOH)_2$	118,09	4,16	5,61	183,8	7,7
Glutársav	$(CH_2)_3(COOH)_2$	132,12	4,34	5,22	99	63,9
Adipinsav	$(CH_2)_4(COOH)_2$	146,14	4,31	5,41	153	1,44
Maleinsav	Cisz- $(CH)_2(COOH)_2$	116,07	1,83	6,07	139-140	78
Fumársav	Transz- $(CH)_2(COOH)_2$	116,07	3,03	4,44	200(sz)	0,63

4.1.2. Alkaloidok

Az alkaloidok jellegzetes fiziológiás hatású, növényi eredetű vegyületek. Elnevezésük alkalikus, azaz bázisos tulajdonságukra utal. Többségük a bázikus hatást biztosító nitrogénatomot gyűrűbe épített formában tartalmazza [101]. Mivel a vizsgált vegyületek közül az alkaloidsók kiemelt gyógyászati jelentőséggel bírnak, ezek részletes ismertetését a következőkben teszem meg.

Pilokarpin

A pilokarpin [(3S,4R)-3-etil-4-[(1-metil-1H-imidazol-5-il)metil]-dihidrofurán-2(3H)-on] a *Pilocarpus jaborandi* és a *Pilocarpus microphyllus* nevű, Dél- és Közép-Amerikában, valamint Nyugat-Indiában honos cserjék alkaloidja, amelyet 1971-ben izoláltak. Farmakológiáját 1976-ban dolgozták ki [102]. A pilokarpin direkt hatású paraszimpatomimetikum, mely serkenti a kolinerg transzmissziót. A természetes



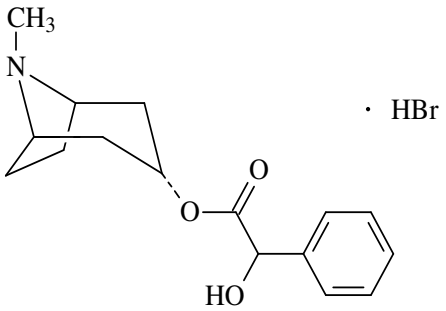
mediátorhelyeken kötődik a receptorokhoz, így az acetil-kolinhoz hasonló módon hat, de a muszkarinos receptorokhoz nagyobb az affinitása.

A hatás létrejöttéhez feltétlenül szükséges egy pozitív töltésű N-atom, ennek környezetében korlátozott méretű alkilcsoportok (elsősorban metil), és ettől kb. 4,4 Å távolságban H-híd kialakítására alkalmas oxigénatom (elsődlegesen észtercsoport részeként). A pilokarpin báziscentruma az N-metil-imidazol sp^3 tercier N-atomja, mely középerős bázisként szöveti pH-n biztosítja a vegyület protonált formájának kb. 30%-os jelenlétét. Észter-csoportjának (γ-butirolakton gyűrű) távolsága a pozitív töltésű N-atomtól optimális a megfelelő receptoriális kötődéshez. A molekulában 2 aszimmetriás szénatom van. A biológiailag aktív pilokarpin 3S,4R konfigurációjú, szereoizomerje, az izopilokarpin (3R,4R) hatástalan [103].

Elsősorban szemészetben használják, glaucoma kezelésére [104].

Homatropin

A homatropin [(1R,3R,5S)-8-metil-8-azabiciklo[3.2.1]okt-3-il]-[(2RS)-2-hidroxi-2-fenilacetát] félszintetikus, tropánvázas alkaloid. Muszkarin–antagonista paraszimpatolitikum, az atropin mandulasav homológja. Erre utal a neve is. Régi, egyre kevésbé használt vegyület. A paraszimpatolitikus hatáshoz elengedhetetlen szerkezeti elemek: tercier vagy kvaterner N-atom, ettől meghatározott távolságban észter–, ritkábban savamidcsoport. Ezek a feltételek az acetil-kolinban, és más agonistákban is rendelkezésre állnak, az antagonisták azonban rendelkeznek egy további közös sajátossággal: az elektronban gazdag funkciós csoportok környezetében nem alifás, hanem aromás gyűrűt tartalmaznak. Ez aromás–aromás kölcsönhatással egy újabb kötőhelyet tesz lehetővé számukra a receptoron, biztosítva az agonistáknál erősebb kötődést intrinzik aktivitás létrejötte nélkül [103].

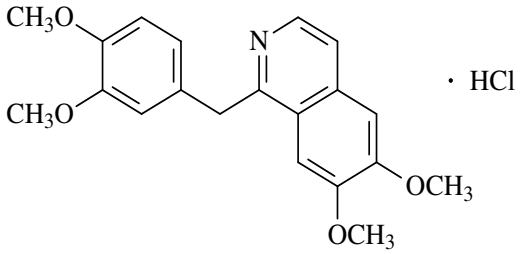


A homatropin királis molekula, az Európai Gyógyszerkönyvben a balra forgató eutomer a hivatalos. Mivel nincs lényeges terápiás előnye az atropinnal szemben, paraszimpatolitikus hatása azonban 4-6-szor gyengébb nála, központi idegrendszeri hatásai pedig csaknem azonos erősségűek (nyugtalanság, izgalom, légzésszaporulat),

ma már kevéssé alkalmazzák. Régebben Parkinson–kórban használták, ma inkább a gyomor-béltraktus görcseinek oldására, illetve a szemészetben pupillatágítónak alkalmazzák diagnosztikus céllal [102].

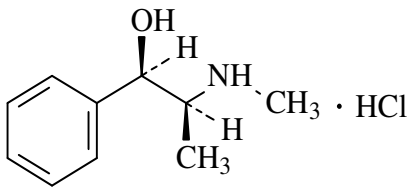
Papaverin

A papaverin [1-(3,4-dimetoxibenzil)-6,7-dimetoxiizokinolin] a mák legfontosabb benzil-izokinolin vázas alkaloidja (0,5-1%) (1). 1848-ban *Merck* izolálta először ópiumból, szerkezetét *Goldschmidt* derítette fel 1888-ban, szintézisét pedig mintegy 20 évvel később, 1909-ben *Pictet* és *Ganz* oldották meg. Szintetikus formában a Chinoin gyógyszergyárban állítottak elő papaverint először ipari méretben 1930-ban *Földi Z.* és munkatársai [102]. A gyógyászatban többnyire vízben oldódó hidroklorid sóját alkalmazzák, ez hivatalos a legtöbb gyógyszerkönyben is. A papaverin Ca^{2+}-csatorna bénító és nem specifikus foszfodiészteráz-gátló hatással egyaránt rendelkezik [105]. Spazmolitikus hatását direkt módon a simaizomsejteken fejti ki. Oldja a gyomor-béltraktus görcseit, a pylorusspazmust és az epekőkólikákat, jól hat a vizeletelvezető rendszer görcsös állapotaiban is. A hörgőket elernyeszti, ezért asztmában is terápiás értékű. Az érfalak tónusát erősen csökkenti, ezért a vérnyomást süllyeszti, a coronariakeringést fokozza. Alkalmazzák parenterálisan és per os is, bár felszívódása a gyomor-béltraktusból lassú [106]. Önmagában is használják, de gyakoribb a kombinációja tropánvázas alkaloidokkal, fájdalomcsillapítókkal, illetve epesav-készítményekkel.



Efedrin

Az efedrin [(1R,2S)-2-(metilamino)-1-fenilpropán-1-ol] a csikófarkok osztályába tartozó Ephedra–fajokban (*Ephedra sinica, E. equisetina*) előforduló alkaloid. Ezeket a gyógynövényeket Kínában már kb. ie. 3000 évvel használták köhögés- és lázcsillapításra. Magát az efedrint csak 1887-ben sikerült *Nagal*nak izolálni, és szintézisét is



aránylag későn, 1920-ban oldotta meg *Späth* és *Göhring*. Terápiásan 1924 óta alkalmazzák kiterjedten.

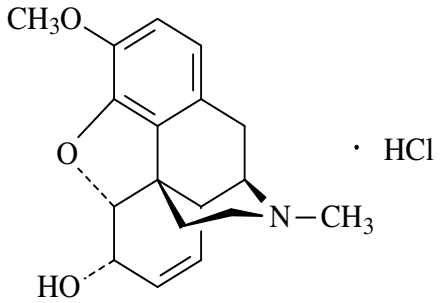
Az efedrin a szimpatomimetikus fenil-alkil-aminok (presszoraminok) családjába tartozik, ezen belül is indirekt szimpatomimetikum, hatását a noradrenalinnak raktárakból történő felszabadításával fejti ki. Kémiai szerkezete nagyon hasonló a noradrenalinéhoz, ezért ahhoz hasonló, vegyes adrenerg-agonista hatásokkal rendelkezik. Mivel a pszichostimuláns amfetaminnal is hordoz közös szerkezeti elemet, nem elhanyagolható a központi idegrendszerre gyakorolt izgató hatása sem.

Az efedrin két kiralitás-centrummal rendelkezik. A balra forgató forma érszűkítő hatása mintegy háromszorosa a jobbra forgatóénak, és 200-ad része az adrenalinénak, de jóval tartósabb annál. A pszeudoefedrinek ennél jóval gyengébb hatásúak. A magyar gyógyszerkönyben a racém efedrin hidroklorid sója hivatalos, mely szintetikusan előállított efedrint tartalmaz [102].

Az efedrin ma is egyik leggyakrabban használt gyógyszerünk [107]. Helyi érösszehúzó hatását orrnyálkahártya-gyulladásban, általános és tartós vazokonstriktor hatását pedig vasomotorgyengeségben használják fel. Alkalmazható továbbá vizelet-inkontinenciában, vazokonstrikció okozta hypotoniában, kombinációban aranyér kezelésére, illetve enyhébb asztmában centrális köhögéscsillapítókkal kombinálva a bronchusok simaizmának ellazítására. Stimulánsként gyakori a visszaélés vele. Tartós szedése során néha tolerancia jön létre [108].

Kodein

A kodein [4,5a-epoxi-3-metoxi-17-metil-7,8-didehidromorfinán-6a-ol] a major analgetikumok családjába, a morfinszármazékok közé tartozik, az ópium egyik mellékalkaloidja (1-2%).



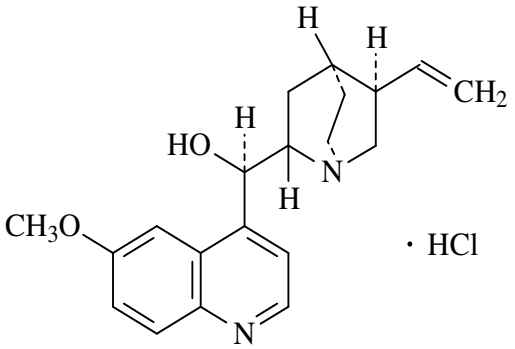
Csupán egy metil-csoportban különbözik a morfintól, azonban ez a kis változtatás is jelentős hatásbeli változásokat eredményez: a fenolos OH éterezésével az analgetikus hatás csökken, és a köhögéscsillapító hatás kerül előtérbe, ezért a kodeint az ún. „gyenge opioidok” közé sorolhatjuk. Tercier nitrogénatomja révén középerős bázis [109].

Két fő indikációs területe a köhögés– és fájdalomcsillapítás. A kodein centrális támadáspontú köhögéscsillapító, a nyúltagyban található köhögési központ ingerlékenységét csökkenti [110]. A hatást létrehozó adag kisebb, mint a fájdalomcsillapításhoz szükséges mennyiség, így a mellékhatások is kevésbé jelentkeznek (addikció, álmosító hatás, légzésdepresszió).

Fő biotranszformációja a glukuronidáció mellett az N-demetiláció, de 10%-ban O-demetiláció is lejátszódik, ami morfin képződéséhez vezet. Valószínűleg ez felelős a fájdalomcsillapító hatásért [111]. 60 mg kodein 5 mg morfinnal egyenlő hatáserősségű. Tartós használat esetén fennáll a hozzászokás veszélye, addikciós potenciálja azonban gyengébb, mint a morfiné. A WHO ellenőrzése alá eső pszichotrop szerek csoportosításában (Schedule of Controlled Substances) a III. osztályba sorolták (medicinális használat, csekély dependenciapotenciállal). Főként szinergista kombinációkban alkalmazzák.

Kinin

A kinin [(R)-[(2S,4S,5R)-5-etenil-1-azabiciklo[2.2.2]okt-2-il](6-metoxikinolin-4-il)metanol] a legrégebben ismert természetes malériaellenes szer. A Dél-Amerikában és Jávában honos kínafa kérgét (Chinchonae succirubrae cortex) már az 1600-as években használták lázcsillapító és antimaláriás szerként. A kinint 1820-ban izolálta belőle *Pellentier és Caventou.* 1926-ig, a szintetikus antimaláriás vegyületek felfedezéséig a malária egyetlen gyógyszere volt. Chloroquin-rezisztens malériában ma is az első számú választandó szer [112,113]. Az antimaláriás szerek a protozoonok életciklusának különböző pontjain fejtik ki hatásukat. A kinin vérschizontocid, azaz a parazita vörösvérsejtekben fejlődő alakjait pusztítja el. Kizárólag terápiára használatos, profilaxisra nem ajánlott.



Sztereoizomerjei (chinchona-alkaloidok): a balra forgató kinin és chinchonidin, valamint a jobbra forgató kinidin és cinchonin antimaláriás hatásában erős szinergista hatás mutatható ki.

A kinin pontos antimaláriás hatásmódja ezidáig ismeretlen. Oly sok enzimrendszer működését gátolja még, hogy régebben „általános protoplaza-méregnek”

nevezték. Orálisan szulfátsója a használatos, súlyos esetben parenteralisan kininkloriddal kezelnek [114].

A kinin számos egyéb farmakológiai hatással rendelkezik. Keserű íze miatt reflektorikusan fokozza a gyomornedv-elválasztást, ezért alkalmas a kínafakéreg kivonat sztomachikumnak. Központi idegrendszeri hatásai általában mellékhatásként jelentkeznek (szédülés, fülzúgás, szemkáprázás). Súlyos mérgezésben delíriumot, görcsöket és collapsusban légzésbénulásos halált okoz [115].

A szívben gátolja az ingerképzést, ezért a pulzus gyérül, és megnyújtja az ingerületvezetést, valamint a refrakter szakot. Ilyen módon bizonyos arrhytmiákat megszüntet. A simaizomzat összehúzódását fokozza. Nő a méhizomzat ingerlékenysége, ezért terhességben a kinin használata kerülendő [116,117].

4.1.3. Ciklodextrinek

Az általunk használt ciklodextrinek néhány jellemzőjét a 3. táblázatban hasonlítottam össze.

3. táblázat. A β–, γ– és dimetil–β–ciklodextrinek néhány jellemzője

Tulajdonságok	β–CD	γ–CD	dimetil–β–CD
Glükopiranóz egységek száma	7	8	7
Moláris tömeg (g/mol)	1135	1297	1331
Oldhatóság vízben 25 °C-on (g/100ml)	1,85	23,2	30>

β–ciklodextrin

A β–CD-t 7 glükózegység alkotja. Jelenleg a gyógyszerformulálásban leggyakrabban alkalmazott, emberi alkalmazást tekintve legszélesebb körben vizsgált ciklodextrin. Orálisan nagy dózisban is biztonsággal és jól tolerálhatóan adagolható. Csekély mennyiségben (1–2%) szívódik fel a gyomor-bél traktus felső részéből. A mellékhatások többsége a vastagbélben bekövetkező bakteriális fermentációból adódik: nagy dózisoknál fokozott gázképződés és hasmenés figyelhető meg. Intramuszkuláris

adagolásban kevésbé irritál, mint az α–CD. Az LD_{50} értéke patkányokon per os > 5000 mg/kg, intravénásan 450-790 mg/kg.

A fontosabb ciklodextrinek közül a legkisebb oldhatósággal bír, ez az alapja néhány toxikus mellékhatásnak, melyek miatt parenterálisan nem használható.

γ-ciklodextrin

A γ–CD 8 glükózegységből áll. Vízben nagyon jól oldódik, oldata meglehetősen viszkózus [118]. A γ–CD-t a gasztrointesztinális rendszer felső szakaszában metabolizálják a bélnedv enzimei, ezért felszívódása 0,1% alatt van. Intravénás adagolást követően változatlan formában ürül [8,119]. A 3 fő ciklodextrin közül a legkevésbé toxikus: patkányokon az LD_{50} értéke per os >> 8 g/kg, intravénásan kb. 4 g/kg.

Dimetil–β–ciklodextrin

Az általunk használt dimetil–β–ciklodextrin (DIMEB, heptakis-2,6-di-O-metil-β-ciklodextrin) gyakorlatilag csak 80%-ban felel meg a kémiai nevéből következő szerkezetnek, 20% egyéb izomer. A teljesen homogén termék előállítása túlságosan drága (és felesleges) lenne a legtöbb gyakorlati célra. Az átlagos szubsztitúciós fok (DS) azonban 14 [120,121].

A metilezés miatt a β–CD-re jellemző H-kötésekből kialakult öv megbomlik, ugyanakkor a metil-csoportok gátolják a CD-CD intermolekuláris kapcsolatok kialakulását, így megnő a lehetőség H-kötések létrejöttére az oldószerként használt vízmolekulákkal. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy a DIMEB több mint egy nagyságrenddel jobban oldódik vízben, mint a β–CD, s a többi ciklodextrintől eltérően oldhatósága a hőmérséklet csökkenésével növekszik.

A szubsztitúció másik következménye, hogy mivel a metil-csoportok döntően 2 és 6 helyzetben, azaz a kónikus gyűrű egyik illetve másik oldalán helyezkednek el, megnövekszik a ciklodextrin magassága, ezzel a vendégmolekula rendelkezésére álló üreg mérete, ugyanakkor a metil-szubsztituensek térszűkítő hatásának következtében a vendégmolekula hozzáférése az üreghez nehezített, és megváltozik a hidrogénkötések kialakulásának lehetősége is.

4.2. Az alkalmazott módszerek

Célkitűzéseink szerint a protonálódás-deprotonálódás hatását kívántuk tanulmányozni ciklodextrin zárványkomplexek stabilitására. Ennek vizsgálatára a komplexkémiában igen régóta és kiváló eredménnyel alkalmazott potenciometriás titrálásos módszer tűnt legalkalmasabbnak [122]. A vizsgált komplexek stabilitási állandóinak meghatározására a pH-potenciometriás titrálásokon túl UV-Vis spektrofotometriás méréseket is végeztünk. A vendégmolekulák protonálódási álladóit pH-potenciometriás titrálások alapján határoztuk meg. Az ekvivalenciapontok megállapítása differenciálhányados-módszerrel történt. A kísérleti adatok kiértékelését a Tanszékünkön korábban készült iteratív számítógépes programmal végeztük, mely a mért és bevitt egyensúlyi állandó értékek változtatásával számolt kötött hidrogénion-koncentrációk közötti eltérés minimalizálásán alapul.

4.2.1. pH – potenciometria

A koordinációs kémia leggyakrabban alkalmazott eszköze a komplex egyensúlyok tanulmányozására, amennyiben a változás az oldat H^+-ion koncentrációjának változásával jár, a pH-potenciometriás titrálás.

A protonálódási és komplexképződési egyensúlyok közötti összefüggés a 3. ábrán látható.

$$\begin{array}{ccccc} \mathbf{H_2A} & \rightleftarrows & \mathbf{HA^-} & \rightleftarrows & \mathbf{A^{2-}} \\ \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow \\ \mathbf{H_2A{\cdot}D} & \rightleftarrows & \mathbf{HA^-{\cdot}D} & \rightleftarrows & \mathbf{A^{2-}{\cdot}D} \end{array}$$

3. ábra. Kétértékű savak deprotonálódási és komplexképzési sémája

Valamely szerves sav oldatában az egyes protonáltsági formák koncentrációinak arányát a savi disszociációs állandókon túl a pH szabja meg. Ha olyan komplexképzőt adunk a rendszerhez, mely valamelyik formával stabilisabb komplexet képez, ennek következtében az egyensúly eltolódik, megváltoznak a koncentrációarányok, így a pH

is. Ez a változás pH-potenciometriás titrálás segítségével nyomon követhető. A komplexképződés a következő általános egyenlettel írható le:

$$p\,H^+ + q\,A^{a-} + r\,D \rightleftarrows H_pA_qD_r^{(qa-p)-} \qquad (6)$$

Ez alapján bármely részecske képződési állandója az alábbi egyensúlyi összefüggéssel jellemezhető:

$$\beta_{pqr} = \frac{[H_pA_qD_r^{(qa-p)-}]}{[H^+]^p[A^{a-}]^q[D]^r} \qquad (7)$$

Dikarboxilát anionok esetében a = 0. Jelen munkában azt találtuk, hogy q = r = 1, azaz 1:1 sztöchiometriájú komplexek képződnek.

A vizsgált sav anionját A^{2-}-val jelölve és ezt tekintve alaprészecskének, a dikarbonsav és különböző mértékben deprotonált formáinak β–ciklodextrinnel való komplexképzése a következőképpen definiálható:

$$A^{2-} + D \rightleftarrows A^{2-}\cdot D \qquad K_{011} = \frac{[A^{2-}\cdot D]}{[A^{2-}][D]} (\equiv \beta_{011}) \qquad (8)$$

$$HA^- + D \rightleftarrows HA^-\cdot D \qquad K_{111} = \frac{[HA^-\cdot D]}{[HA^-][D]} = \frac{\beta_{111}}{\beta_{110}} \qquad (9)$$

$$H_2A + D \rightleftarrows H_2A\cdot D \qquad K_{211} = \frac{[H_2A\cdot D]}{[H_2A][D]} = \frac{\beta_{211}}{\beta_{210}} \qquad (10)$$

Az ismert összkoncentrációk:

$$c_H = 2[H_2A] + [HA^-] + 2[H_2A\cdot D] + [HA^-\cdot D] + [H^+] \qquad (11)$$

$$c_D = [H_2A\cdot D] + [HA^-\cdot D] + [A^{2-}\cdot D] + [D] \qquad (12)$$

$$c_A = [H_2A] + [HA^-] + [A^{2-}] + [H_2A\cdot D] + [HA^-\cdot D] + [A^{2-}\cdot D], \qquad (13)$$

melyek a képződési állandókkal (β_{pqr}) kifejezhetőek, pl.:

$$c_H = 2\beta_{210}[H^+]^2[A^{2-}] + \beta_{110}[H^+][A^{2-}] + 2\beta_{211}[H^+]^2[A^{2-}][D] + \beta_{111}[H^+][A^{2-}][D] + [H^+] \qquad (14)$$

Nátrium-hidroxidos titrálás során változik az oldat összes hidrogénion-koncentrációja, így a pH is. Az összkoncentrációk ismeretében, mérve az egyensúlyi hidrogénion-koncentrációt, egy iteratív számítógépes program és a (12-14) egyenletek segítségével a stabilitási állandó értéke számolható.

Ugyanezt bázisra alkalmazva, és a legegyszerűbb esetet feltételezve egy p-értékű B bázis (ami lehet nitrogénbázis vagy akár egy szerves sav anionja) protonálódása és zárványkomplex-képzése során (a töltéseket elhagyva) valamennyi $H_pB_qD_r$ zárványkomplex kialakulhat. Az általános képződési állandó:

$$p\,H^+ + q\,B + r\,D \rightleftarrows H_pB_qD_r \qquad (15)$$

A rendszerben lévő sav összkoncentrációja:

$$c_H = [H^+] + \Sigma\, p\beta_{pqr}[H^+]^p[B]^q[D]^r \qquad (16)$$

A bázisok sóihoz az oldás során ismert mennyiségű fölöslegben vett erős savat adva a potenciometriás titrálás során pontosan ismert koncentráció-részletekben lúg mérőoldatot adagolunk a rendszerhez, és minden egyes pontban mérjük a $[H^+]$-t. Ismerve ezeket az értékeket, a disszociálatlan részecskefajtákban kötött összes hidrogénion-koncentráció:

$$c^*_H = c_H - c_{NaOH} - [H^+] = \Sigma\, p\beta_{pqr}[H^+]^p[B]^q[D]^r \qquad (17)$$

A számítógépes kiértékelés során a hígulást figyelembe véve, a bemérési adatok (c_B, c_D), felhasználásával, feltételezve valószínű p-q-r sorozatokat hozzájuk tartozó β_{pqr} értékekkel (ez utóbbiakat tág, majd egyre szűkülő határok között változtatva) kerestük a $c^*_{mért} - c^*_{számított}$ értékek legjobb egyezését. A savak disszociációállandóira induló értékként megfelelő irodalmi értékeket használtunk, ezeket a komplexképzőt nem tartalmazó oldatok pH-metriás titrálása alapján szükség szerint kismértékben finomítottuk.

4.2.1.1. A potenciometriás módszer alkalmazásának feltételei

Komplexstabilitás meghatározására a potenciometriás módszer csak abban az esetben alkalmazható, amikor a konjugált sav-bázis pár eltérő stabilitású komplexet képez. Ezt a következő meggondolásokkal támaszthatjuk alá.

Egy egyértékű szerves savnak és komplexált formájának savi disszociációs állandója a tömeghatás törvénye alapján a következőképpen írható le (az indexekben szereplő *d* disszociációt jelent.):

$$K_{d(HA)} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}, \text{(a) és} \quad K_{d(HA\cdot D)} = \frac{[H^+][A^-\cdot D]}{[HA\cdot D]}, \text{(b)} \qquad (18)$$

A megfelelő komplexképződési állandók a következők:

$$K_{A^-\cdot D} = \frac{[A^-\cdot D]}{[A^-][D]}, \text{(a)} \quad \text{és} \quad K_{HA\cdot D} = \frac{[HA\cdot D]}{[HA][D]}, \text{(b)}. \qquad (19)$$

A $[H^+]$-t kifejezve (18a)-ból, és behelyettesítve (18b)-be:

$$[H^+] = \frac{K_{d(HA)}[HA]}{[A^-]} \quad \rightarrow \quad K_{d(HA\cdot D)} = \frac{K_{d(HA)}[HA][A^- \cdot D]}{[A^-][HA \cdot D]}. \tag{20}$$

A számlálót és nevezőt is beszorozhatjuk [D]-vel:

$$K_{d(HA\cdot D)} = \frac{K_{d(HA)}[HA][A^- \cdot D][D]}{[A^-][D][HA \cdot D]} = K_{d(HA)} \frac{K_{A^-\cdot D}}{K_{HA\cdot D}}. \tag{21}$$

Amennyiben tehát $A^-\cdot D$ és $HA\cdot D$ komplex részecskék stabilitási állandója megegyezik, a komplexált és szabad forma savi disszociációs állandója is egyenlő, azaz a CD jelenléte semmiféle változást nem okoz az oldat egyensúlyi hidrogénion koncentrációjában.

4.2.2. UV-látható spektrofotometria

Amint az a 3. ábrán is látható, a komplexképződési és disszociációs folyamatok szorosan összefüggnek, így az egymást követő disszociációs lépésekben keletkező komplexek stabilitási állandóit önmagukban csak potenciometriás mérésekkel nem lehet kellő biztonsággal megállapítani. Szükségesnek láttuk tehát a kapott állandókat egy más, független módszerrel megerősíteni, melyre a spektrofotometria tűnt alkalmasnak.

A CD üregének nagy elektronsűrűsége megváltoztathatja a bezáródott vendégmolekula elektron-átmeneteit, ezáltal a különböző elektrokémiai és spektrális sajátságokat csakúgy, mint pl. indikátormolekulák esetén a színátcsapási pH-tartományt [123,124]. Ezek a vegyületek a CD koncentráció növelésével hasonló változást szenvednek, mintha csökkentenénk a pH-t. Metilnarancs esetében a komplexképződés az indikátor pK értékének látszólagos csökkenését eredményezi, azaz a színátcsapás alacsonyabb pH-értéknél következik be, mint ciklodextrint nem tartalmazó oldatoknál. Ez a viselkedés más sav-bázis indikátorokra is jellemző [26, 53, 125, 126].

UV-látható spektrofotometria segítségével a legegyszerűbb esetben egy adott pH-n dominánsan jelenlévő részecske stabilitási állandója határozható meg önmagában. A mérések alapja egy megfelelő indikátor és a vizsgált vendégmolekula ciklodextrinnel való komplexképzése közötti kompetitív egyensúly. A módszer feltétele, hogy az adott pH-n a kiválasztott indikátormolekula abszorpciója a komplexképződés következtében megváltozzon.

Egyik legismertebb sav-bázis indikátorunk, a fenolftalein (pontosabban annak kétszer deprotonált anionja) lúgos közegben a jól ismert liláspiros színt mutatja, β–CD hozzáadására azonban az oldat elhalványodik, mivel a fenolftalein β–CD-nel képzett komplexe színtelen [125,126]. Ezt a jól ismert jelenséget széles körben tanulmányozták, többek között ezen alapul a kromatográfiás gyakorlatban a ciklodextrin posztkolumn detektálása [127,128], illetve CTGáz enzim produktivitásának gyors ellenőrzése is [129,130]. A fennálló egyensúlyt zavarja meg kompetíció révén a másik vendégmolekula, melynek hozzáadására tehát a liláspiros szín intenzitásának növekedése tapasztalható.

Két különböző pH-n végeztünk méréseket: pH=1-nél a disszociálatlan forma, pH=10,5-nél a dianion komplexképzésének a vizsgálatára, az előbbi esetben metilnarancsot, az utóbbiban a már említett fenolftaleint használva indikátorként.

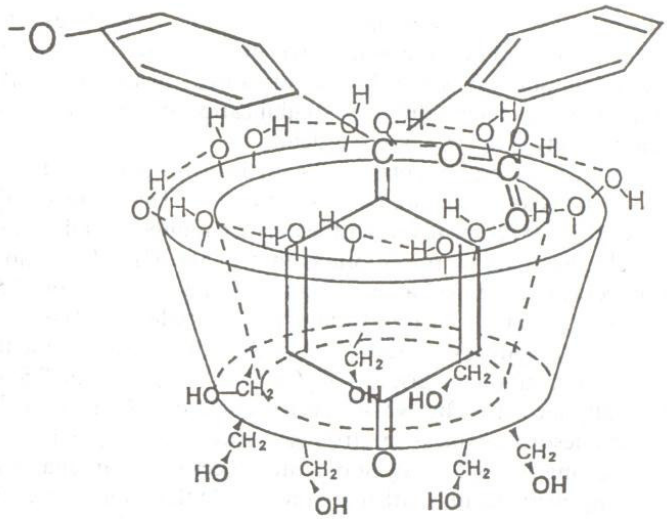
Mérések pH=10,5-nél

A fenolftalein, mely savas és erősen lúgos közegben színtelen, dianionos formája (Ph) pedig liláspiros, β–ciklodextrin jelenlétében elszíntelenedik. UV és cirkuláris dikroizmus spektrumok alapján ennek oka meglepő módon nem a protonált forma megjelenése, hanem maga a komplex (D·Ph).

$$\mathrm{D} + \mathrm{Ph} \rightleftarrows \mathrm{D{\cdot}Ph} \qquad K_{0011} = \frac{[\mathrm{D} \cdot \mathrm{Ph}]}{[\mathrm{D}][\mathrm{Ph}]} \tag{23}$$

(az indexben szereplő negyedik szám a komplexben lévő indikátormolekula sztöchiometrikus arányát adja meg). A mért stabilitási állandó ($K_{0011} = 2{,}3{\cdot}10^4$) mintegy egy nagyságrenddel nagyobb az aromás vegyületeknél egyébként tapasztalható értékeknél. A jelenség felettébb szokatlan, tekintettel arra, hogy a fenolftaleinnek mindössze egy aromás gyűrűje fér be a ciklodextrin üregébe.

A magyarázat a fenolftalein és ciklodextrin közötti hárompontos kölcsönhatás lehet: a ciklodextrin üregében helyezkedik el a fenolát/kinoidális gyűrű (I), melynek oxigénje hidrogénkötéseket tud létrehozni a ciklodextrin primer hidroxil-csoportjaival (II). Szintén hidrogénkötések jöhetnek létre a szekunder hidroxidok és a másik fenolos oxigén, valamint a harmadik gyűrű proton-akceptor karboxilát-csoportja között (III), mely így közel kerülve a központi szénatomhoz létrehozza az elszíntelenedéshez vezető $sp^2 \rightarrow sp^3$ átmenetet a központi karbénium-ion jellegű szénatomon (131).



4. ábra. A fenolftalein-dianion β–ciklodextrinnel képzett komplexének feltételezett szerkezete

A fenolftalein elnyelési maximumának helyén, λ= 550 nm-en így közvetlenül a szabad forma koncentrációja mérhető. $[\mathrm{Ph}] = \frac{A}{\varepsilon}$ (24)

Egy mérési sorozaton belül azonos fenolftalein koncentráció mellett 12 lépésben emelve a ciklodextrin mennyiségét mértük az oldatok abszorbanciáját. A sorozat első és utolsó tagja mindig csak fenolftaleint tartalmazott. Ezen oldatok abszorbanciáinak átlagából határoztuk meg a bemért fenoltalein koncentrációjának segítségével a fenolftalein moláris abszorpciós koefficiensét (ε).

$c_F = [\mathrm{Ph}] + [\mathrm{D{\cdot}Ph}]$ és $c_D = [\mathrm{D}] + [\mathrm{D{\cdot}Ph}]$ (25)

ismeretében a D·Ph komplex stabilitási állandója (K_{0011}) meghatározható:

$$K_{0011} = \frac{c_{Ph} - [\mathrm{Ph}]}{[c_D - (c_{Ph} - [\mathrm{Ph}])[\mathrm{Ph}]} \quad (26)$$

Ha más komplexképző is jelen van, a két potenciális vendégmolekula versengése folytán a szabad fenolftalein egyensúlyi koncentrációja megnő, és így a (26) egyenlet szerint számolva egy látszólagos stabilitási állandót kapunk (K'_{0011}), majd ebből a második vendégmolekula komplexének a képződési állandója (a savanionra K_{0110}) számolható [132].

$$K'_{0011} = \frac{c_{Ph} - [\mathrm{Ph}]}{[c_D - (c_{Ph} - [\mathrm{Ph}])[\mathrm{Ph}]} = \frac{K_{0011}}{1 + K_{0110}[\mathrm{A}^{2-}]} \tag{27}$$

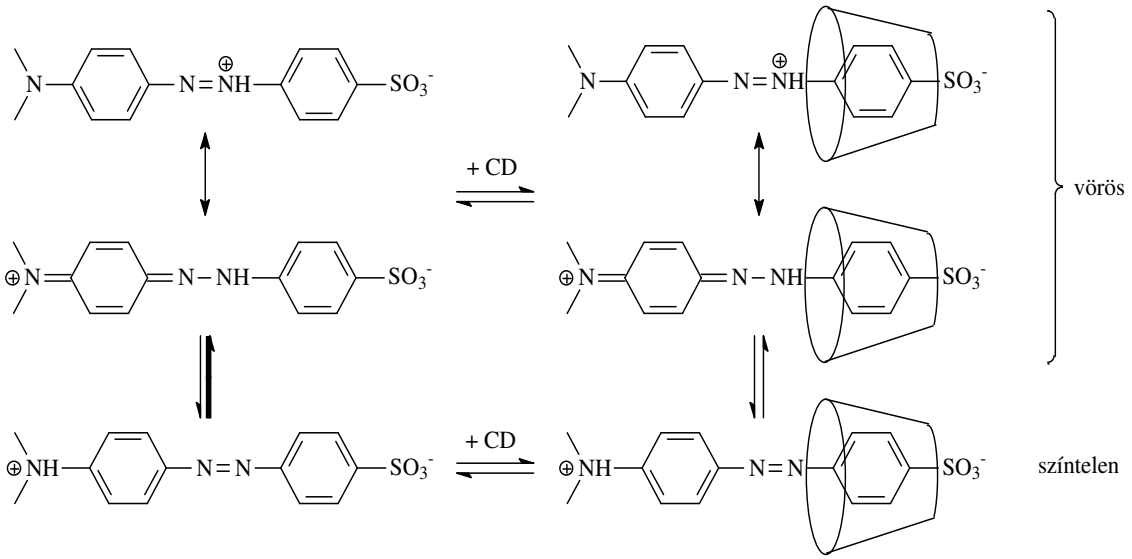
A vendégmolekulát a várható kis stabilitási állandók miatt nagy feleslegben alkalmaztuk, azaz $[\mathrm{A}^{2-}] \approx c_A$, ezért

$$K_{0110} = \frac{K_{0011} - K'_{0011}}{K'_{0011}\, c_A} \tag{28}$$

Mérések pH=1,0-nél

A protonált, savi formák komplexstabilitási állandójának meghatározására pH=1,0-nél egy azofestéket, metilnarancsot, pontosabban ennek protonált formáját (a továbbiakban M) használtunk.

Erősen savas közegben a metilnarancs protonált formában van jelen. Piros színe az azocsoport protonálódása következtében kialakuló azónium-kinoidális szerkezet eredménye [133,134]. A tautomer egyensúly révén létrejövő ammónium-típusú forma, mely a dimetil-amino csoporton van protonálva, színtelen. Vizes oldatban a tautomer egyensúly erősen a kinoidális szerkezet felé van eltolva (5. ábra).



5. ábra. A protonált metilnarancs tautomer egyensúlya, és komplexképzése β-ciklodextrinnel

Ciklodextrin hozzáadására a piros szín intenzitása szignifikánsan csökken, mivel a zárványkomplex-képződés nem kedvez az azo-csoport protonálódásának, így a

tautomer egyensúly eltolódik a színtelen ammónium-típusú forma képződésének irányába. Mivel a metilnarancs illeszkedése a β–ciklodextrin üregébe kevésbé szoros, a stabilitási állandó viszonylag kicsi, és a tautomer egyensúly eltolódása sem teljes, így a komplex sem teljesen színtelen (szemben az α–CD-ével). Tekintettel a β–CD korlátozott oldhatóságára is, nem tudunk 100%-os komplexáltsági fokot elérni, és nem lehet teljesen színtelen ciklodextrines oldatot sem készíteni. A szín intenzitásának csökkenése azonban a kinoidális forma elnyelésének maximumánál, λ_{max}=506 nm-nél jól nyomon követhető. Az ammónium-forma növekvő mennyiségét az annak elnyelési maximumánál, λ =319 nm-nél megfigyelhető intenzitás-növekedés jelzi. Mindkét hullámhosszon mérve az abszorbanciákat, ciklodextrinmentes oldatban meghatározható a szabad indikátor moláris abszorpciós koefficiense (ε_M), a ciklodextrin hozzáadására bekövetkező változások pedig a komplexképződésnek tudhatóak be.

A D·M komplex képződési állandója:

$$\mathrm{D + M \rightleftarrows D{\cdot}M} \qquad \beta_{0011} = \frac{[\mathrm{D \cdot M}]}{[\mathrm{D}][\mathrm{M}]} \tag{29}$$

A mért abszorbancia a következőképpen fejezhető ki:

$$A = \varepsilon_M[\mathrm{M}] + \varepsilon_{D\cdot M}[\mathrm{D{\cdot}M}] = \varepsilon_M[\mathrm{M}] + \varepsilon_{D\cdot M}\beta_{0011}[\mathrm{D}][\mathrm{M}] \tag{30}$$

$\varepsilon_{M\cdot D}$ a komplex moláris abszorpciós koefficiense az adott hullámhosszon.

Az összkoncentrációk:

$$c_M = [\mathrm{M}] + [\mathrm{D{\cdot}M}] = [\mathrm{M}] + \beta_{0011}[\mathrm{D}][\mathrm{M}] \tag{31}$$

és $$c_D = [\mathrm{D}] + [\mathrm{D{\cdot}M}] = [\mathrm{D}] + \beta_{0011}[\mathrm{D}][\mathrm{M}] \tag{32}$$

Mivel a CD relatíve nagy feleslegben van, ezért a $[\mathrm{D}] \approx c_D$ egyszerűsítéssel élhetünk.

Különböző CD koncentrációknál mérve az abszorbanciákat $\varepsilon_{D\cdot M}$ és β_{0011} számolható. A két hullámhosszon mért adatok kiértékelése egyidejűleg történt, a potenciometriás kiértékelésnél alkalmazotthoz hasonló számítógépes programmal.

Egy újabb lehetséges vendégmolekula jelenlétében a λ=506 nm-nél tapasztalható abszorbancia-csökkenés, valamint a λ=319-nél észlelhető növekedés egyaránt kisebb lesz

A ciklodextrin teljes koncentrációja ebben az esetben:

$$c_D = [\mathrm{D}] + [\mathrm{D{\cdot}M}] + [\mathrm{H_2A{\cdot}D}] = [\mathrm{D}] + \beta_{0011}[\mathrm{D}][\mathrm{M}] + K_{2110}[\mathrm{H_2A}][\mathrm{D}] \tag{33}$$

A viszonylag kis stabilitási állandók miatt a második vendégmolekulát az indikátorhoz képest nagy feleslegben kell alkalmaznunk, pH=1-nél pedig a gyenge savak disszociációja (az oxálsav kivételével) elhanyagolható, ezért a $[H_2A] \approx c_{sav}$ egyszerűsítés helytálló, azaz

$$c_D = [D] + \beta_{0011}[D][M] + K_{2110} \cdot c_{sav}[D] \quad (34)$$

4.2.3. Mérési körülmények

A vizsgálatainkhoz használt ciklodextrineket kutatási együttműködés keretében kaptuk a Cyclolab Kft-től. Víztartalmukat szárítószekrényben ellenőriztük 105 °C-on, 2 órán keresztül történő szárítással. A β–CD-t savas oldatból, átkristályosítással tisztítottuk.

Az alkaloidsók mindegyike gyógyszerkönyvi minőségű volt, így további tisztítás nélkül használtuk őket. A dikarbonsavak (Merck, Reanal) közül egyedül a glutársav desztillált vízből való átkristályosítását találtuk szükségesnek.

Az UV-látható spektrofotometriás mérésekhez használt fenolftaleint alkoholos oldatból kristályosítottuk át.

A légköri szén-dioxid zavaró hatásának kiküszöbölésére az oldatok készítéséhez minden esetben frissen kiforralt, kétszer desztillált vizet használtunk.

4.2.3.1. pH-potenciometria

A méréseket Radelkis OP 208/1 digitális pH-mérővel és Radelkis OP 0808P kombinált üvegelektróddal végeztük. A pontosan ismert koncentrációjú NaOH-oldatot Schott-Geräte T80/20 automata bürettával adagoltuk. A karbonátmentes lúgoldat a Sörensen eljárás szerint 50,0 m/m %-os NaOH-oldat hígításával készült. A büretta legkisebb reprodukálható térfogata 0,01 cm^3 volt.

Valamennyi rendszert vizes oldatban vizsgáltuk. A pH-mérőt minden mérési sorozat előtt pufferoldatok segítségével kalibráltuk: a savak vizsgálatánál 4 ponton (pH=4,008; 6,865; 7,413; 9,180), az alkaloidsók mérésénél pedig 2 ponton (pH=4,008 és 9,180), melyet egy közbülső pH-értékű pufferrel ellenőriztünk (pH=7,000). Az

állandó hőmérsékletet (25±0,5°C) termosztáttal, a levegő kizárását valamint a kevertetést pedig tisztított nitrogéngáz átbuborékoltatásával biztosítottuk, amelyet előzőleg 10 m/m %-os NaOH-ot tartalmazó gázmosón vezettünk át. A minták állandó ionerősségét (0,2 mol·dm^{-3}) NaCl-dal állítottuk be.

A minták térfogata 10–25 cm^3 között változott, a rendelkezésünkre álló anyag oldhatóságától függően. A vendégmolekulák teljes kezdeti koncentrációja a mintákban $4\cdot10^{-3}$–10^{-2} mol·dm^{-3} volt. A vendégmolekulák koncentrációját beméréssel illetve a potenciometriás titrálási görbe ekvivalenciapontjai alapján határoztuk meg.

A gazda/vendég arányt 1:2 és 25:1 között változtattuk. A titrálások során fellépő térfogat-növekedést a kiértékelést végző számítógépes program figyelembe vette.

4.2.3.2. UV-látható spektrofotometria

Spektrofotometriás vizsgálatokat a dikarbonsavak esetében végeztünk. Az abszorbanciákat Camspec M330 illetve Spectromom 195D típusú egyutas spektrofotométeren, 1,000 cm hosszúságú kvarcküvettában mértük.

Az előzetesen átkristályosítással tisztított fenolftaleinből pontos beméréssel alkoholos törzsoldatot, majd ebből közbülső hígítást készítettünk frissen kiforralt desztillált vízzel és nátrium–karbonáttal.

Egy mérési sorozat 13 oldatból állt. A sorozat minden egyes tagjába ebből a törzsoldatból azonos mennyiségeket mértünk be, így a fenolftalein végső koncentrációja ($3\cdot10^{-5}$ mol·dm^{-3}) minden esetben azonos volt. A megfelelő pH-t a vizes fenolftalein-oldathoz adott, $2\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} végső koncentrációjú nátrium–karbonáttal biztosítottuk. A β-ciklodextrin koncentrációja egy mérési sorozaton belül 12 lépésben emelkedett $2{,}5\cdot10^{-4}$ mol·dm^{-3}-ig. A sorozat első és utolsó tagja ciklodextrint nem tartalmazott, a fenolftalein moláris abszorpciós koefficiensének meghatározására. Ebből az oldat-sorozatból határoztuk meg a fenolftalein–β–CD komplex stabilitási állandóját.

A kompetitív mérésekhez a vizsgálni kívánt dikarbonsavból beméréssel és számított mennyiségű NaOH hozzáadásával dikarboxilát törzsoldatot készítettünk. Az egyes mérési sorozatok az előzőekben leírt módon készültek azzal a különbséggel, hogy az első és utolsó oldat kivételével minden egyes oldatba azonos mennyiségeket mértünk a dikarboxilát törzsoldatból. Így az oldatok száma eggyel nőtt, és az egyes oldatok csak

a ciklodextrin koncentrációjában különböztek egymástól. Minden savanionnal 4-5 különböző koncentrációval végeztünk méréssorozatot.

Mivel a fenolftalein–β–CD komplex stabilitási állandója erősen hőmérsékletfüggő [135], az oldatokat 25±1°C-ra termosztáltuk. A mérési hullámhossz 550 nm volt.

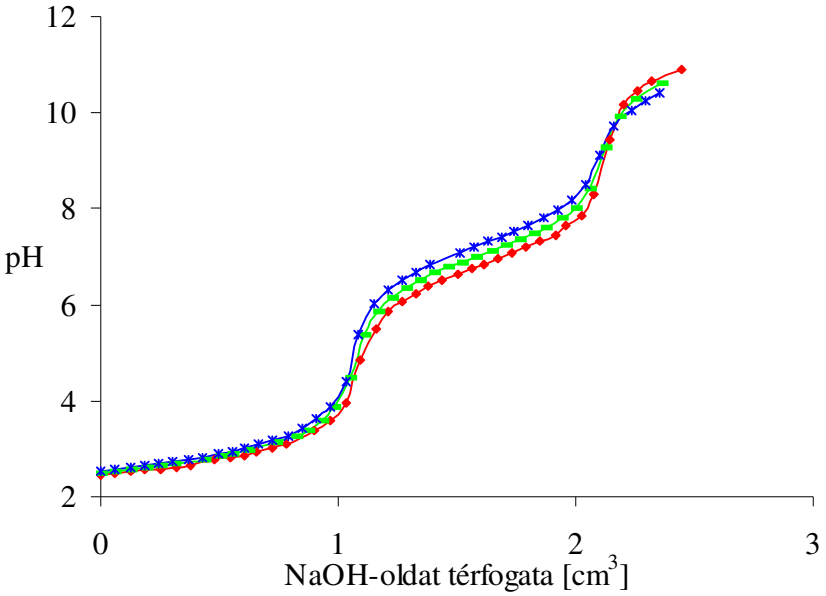
A pH=1-nél végzett mérések esetében a metilnarancs koncentrációja $2{,}0\cdot10^{-5}$ mol·dm^{-3} volt. A pH beállítását 0,1 mol·dm^{-3} végső koncentrációjú HCl-oldattal végeztük. Az oldatsorozatok elkészítése az előbbiekben leírtakkal megegyezett azzal a különbséggel, hogy a savakat eredeti, disszociálatlan formájukban mértük be $3{,}5\cdot10^{-3}$-10^{-3} mol·dm^{-3} koncentrációban, a β–ciklodextrin koncentrációja pedig egy mérési sorozaton belül 0 és $6{,}5\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} között változott. Az oldatok fényelnyelését 506 és 319 nm hullámhosszon mértük.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. A vizsgált dikarbonsavak és anionjaik komplexképzése *β*–ciklodextrinnel

5.1.1. Potenciometriás titrálással kapott eredmények

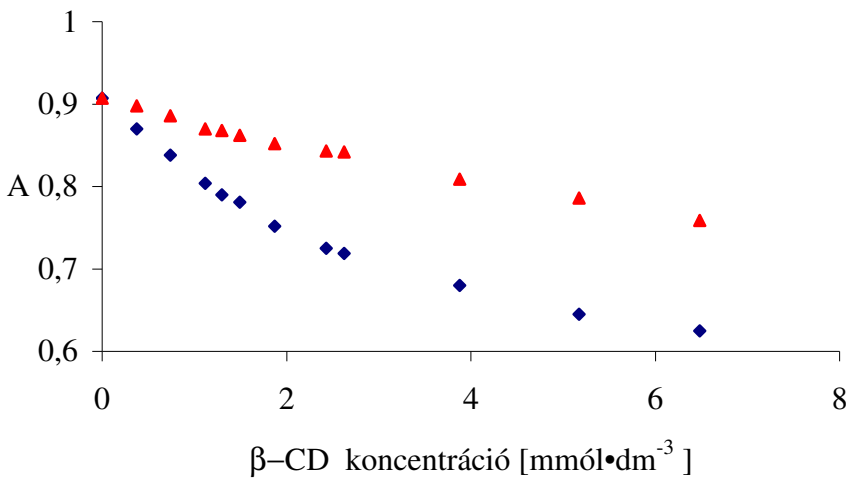
A vizsgált savak pH-potenciometriás titrálási görbéin a ciklodextrin nélkül és ciklodextrin jelenlétében felvett görbék közötti különbség jól látható. Példaként a 6. ábra a dietil-malonsav titrálását mutatja NaOH-oldattal. Növekvő ciklodextrin koncentráció mellett az egyes titrálási görbék magasabb pH értékek felé tolódnak, jelezve ezzel, hogy a komplexképződés következtében csökken a vizsgált sav aciditása, vagyis a kevésbé disszociált forma képez nagyobb stabilitású komplexet.



6. ábra. 10^{-2} mól·dm^{-3} dietil-malonsav (V_0=20 cm^3) titrálása $2\cdot10^{-1}$ mól·dm^{-3} NaOH oldattal (♦) ciklodextrin nélkül (-) $5\cdot10^{-3}$ mól·dm^{-3} β–CD jelenlétében (✳) 10^{-2} mól·dm^{-3} β–CD jelenlétében

5.1.2. UV-látható spektrofotometriás mérésekkel kapott eredmények

Az UV spektrofotometriás méréseknél jól nyomonkövethető a szín intenzitásának változása ciklodextrin hatására a csak indikátort, illetve második vendégmolekulát is tartalmazó oldatban Példaként a 7. ábra az adipinsav hatását mutatja különböző koncentrációjú ciklodextrint tartalmazó oldatokra.



7. Ábra: Az abszorbancia változássa savas metilnarancs oldatban 506 nm-en a hozzáadott β–ciklodextrin koncentrációjának függvényében adipinsav nélkül (♦) és $3 \cdot 10^{-2}$ mól·dm^{-3} adipinsav jelenlétében (▲)

5.1.2.1. Terner komplexek képződése

Egyes esetekben a második vendégmolekula hozzáadására a várttal ellentétben az indikátor színének halványodását, vagyis az indikátor-CD komplex stabilitásának látszólagos növekedését tapasztaltuk. Ezt a jelenséget terner komplexek képződésével magyaráztuk, melyek szintén nem mutatnak elnyelést az adott hullámhosszon.

Terner komplexek képződésére számos helyen találunk bizonyítékokat az irodalomban [97,136]. Az 1:1 sztöchiometriájú benzoesav–β-ciklodextrin komplex mellett például sikerült igazolni 2:1 arányú részecske képződését is. Mivel két aromás gyűrű sztérikus okokból nem képes behatolni egy ciklodextrin üregébe, a második

benzoesav molekula hidrogénkötéssel kapcsolódik a ciklodextrin külső hidroxil-csoportjaihoz. A keletkezett asszociátum a második benzoesav szempontjából nem tekinthető valódi zárványkomplexnek, és hogy a kapcsolódás gyenge kölcsönhatással történik, bizonyítják a valóban kis stabilitási állandó értékek [97].

A terner komplexek képződése megnöveli a fennálló egyensúlyok számát. A metilnarancs esetén pl:

$$H_2A + D + M \rightleftarrows H_2A{\cdot}D{\cdot}M \qquad K_{2111} = \frac{[H_2A \cdot D \cdot M]}{[H_2A][D][M]} \tag{35}$$

segítségével a feltételezett terner komplex koncentrációja kifejezhető:

$$[H_2A{\cdot}D{\cdot}M] = K_{2111}[H_2A][D][M] \tag{36}$$

A (25,30,33) egyenleteket ezen részecskével kiegészítve a kísérleti és a számolt adatok egyezése lényegesen javult.

5.1.3. Az eredmények összegzése

A potenciometriás mérések során először meghatároztuk a savak disszociációállandóit, melyek jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal [137]. (Az oxálsav K_{d1} irodalmi értéktől való eltérésében szerepe lehet az üvegelektród kis pH-n tapasztalható bizonytalanságának.) Az állandók meghatározására azért került sor, hogy megbizonyosodjunk az általunk használt vegyszerek megfelelő tisztaságáról, illetve a módszer helytállóságáról, és pontosan az adott körülményeknek megfelelő értékeket használjuk a számolásban.

A HA^- típusú részecskéknél fellépő intramolekuláris hidrogén-híd szerepe jól szemléltethető a K_{d1} és K_{d2} állandók arányával. Ez különösen szembetűnő a maleinsav – fumársav *cisz-transz* izomer párnál. A C=C kettős kötés rigiditása miatt a *transz* formájú fumársavban a két karboxil-csoport távol helyezkedik el egymástól, interakció nem lehetséges közöttük, így a két savi disszociációs lépés közel független egymástól ($K_{d1}/K_{d2} \approx 25$). A *cisz* formájú maleinsavnál ezzel ellentétben a két karboxil-csoport igen közel tud kerülni egymáshoz, és lehetőség van intramolekuláris hidrogénkötés kialakulására. Az oxigének elektronszívó hatásának köszönhetően az egyik karboxil-csoport disszociációja megnő, míg a másik inkább a H-kötésben marad. Erre utal a savi

disszociációs állandók közötti jelentős különbség is ($K_{d1}/K_{d2} \approx 10^4$), valamint hogy K_{d1} értéke nagyobb, mint a fumársavnál.

4. táblázat. α,ω–dikarbonsavak pH-potenciometriával meghatározott savi disszociációs állandói

Sav	K_{d1}	K_{d2}
Oxálsav	$(1{,}48\pm0{,}29)\times10^{-1}$	$(1{,}70\pm0{,}19)\times10^{-4}$
Malonsav	$(2{,}20\pm0{,}24)\times10^{-3}$	$(6{,}36\pm0{,}85)\times10^{-6}$
Borostyánkősav	$(1{,}03\pm0{,}19)\times10^{-4}$	$(4{,}92\pm0{,}52)\times10^{-6}$
Glutársav	$(9{,}74\pm0{,}81)\times10^{-5}$	$(1{,}27\pm0{,}20)\times10^{-5}$
Adipinsav	$(5{,}91\pm0{,}46)\times10^{-5}$	$(1{,}01\pm0{,}25)\times10^{-5}$
Dietil-malonsav	$(6{,}05\pm0{,}88)\times10^{-3}$	$(1{,}83\pm0{,}15)\times10^{-7}$
Fumársav	$(2{,}14\pm0{,}37)\times10^{-3}$	$(8{,}83\pm0{,}81)\times10^{-5}$
Maleinsav	$(2{,}04\pm0{,}26)\times10^{-2}$	$(1{,}84\pm0{,}21)\times10^{-6}$

Az alifás α,ω- dikarbonsavak homológ sorában a két karboxil-csoportot változó hosszúságú szénlánc választja el egymástól. A kialakuló H-kötés stabilitása a gyűrűtagszámtól nagymértékben függ, amint azt az adatok is bizonyítják. A K_{d1}/K_{d2} arány az oxálsavnál a legmagasabb, míg a különbség az adipinsavnál szinte már elhanyagolható, hibahatáron belüli ($K_{d1}/K_{d2} \approx 6$). A vizsgált savak között a dietil-malonsavnál mutatkozik a legnagyobb különbség a savi disszociációs lépések között ($K_{d1}/K_{d2} \approx 3\times10^4$), mely az etil-szubsztituensek sztérikus hatásának tudható be (számos szubsztituált malonsavnak hasonló vagy ennél is nagyobb K_{d1}/K_{d2} aránya lehet [137]).

Ezen intramolekuláris hidrogénkötések segítségével olyan kompakt szerkezet alakulhat ki, mely kedvezőbb térkitöltést biztosít a vendégmolekulának a CD üregében. Ez magyarázhatja a negatív töltés ellenére az intramolekuláris hidrogén-hidas részecskék stabilisabb zárványkomplexét a lineáris A^{2-} vagy töltés nélküli H_2A részecskékkel szemben. A feltételezés alapja az az irodalomból ismert tény, hogy a

hidrogén-malonát és hidrogén-maleát ionok szokatlanul stabil komplexet képeznek α-CD-nel [98].

Az α,ω–dikarbonsavak és deprotonált formáik komplexképzésére vonatkozó egyensúlyi állandók definíciója az általános képződési egyenletek alapján a következő:

$$A^{2-} + D \rightleftarrows A^{2-}\cdot D \qquad K_{011} = \frac{[A^{2-}\cdot D]}{[A^{2-}][D]} (\equiv \beta_{011}) \tag{37}$$

$$HA^{-} + D \rightleftarrows HA^{-}\cdot D \qquad K_{111} = \frac{[HA^{-}\cdot D]}{[HA^{-}][D]} = \frac{\beta_{111}}{\beta_{110}} \tag{38}$$

$$H_2A + D \rightleftarrows H_2A\cdot D \qquad K_{211} = \frac{[H_2A\cdot D]}{[H_2A][D]} = \frac{\beta_{211}}{\beta_{210}} \tag{39}$$

A különböző protonáltságú formák β–CD-nel képezett komplexeinek számolt stabilitási állandóit az 5. táblázatban foglaltuk össze.

5. táblázat. α,ω–dikarbonsavak β–CD-nel képzett komplexeinek stabilitási állandói a sav/disszociált sav rendszerekre

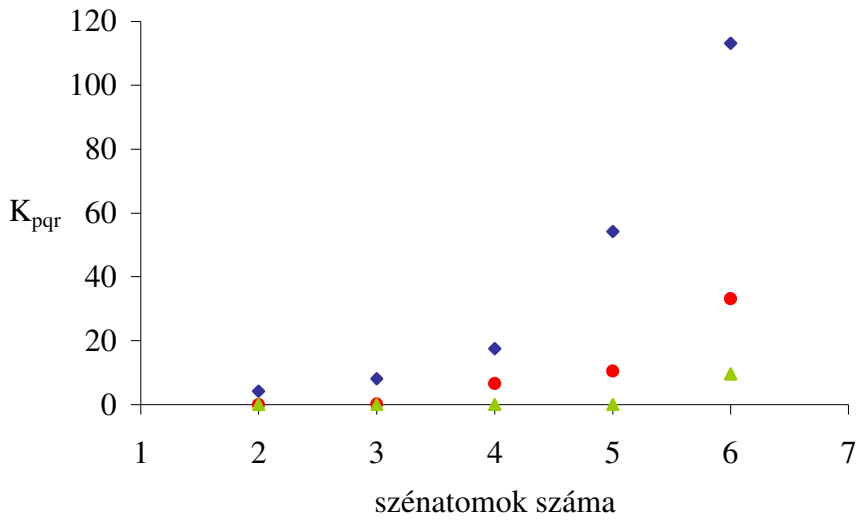
Sav	K_{211}	K_{111}	K_{011}
Oxálsav	4,2±0,1	[n]	[n]
Malonsav	8,1±0,1	[n]	[n]
Borostyánkősav	17,5±0,2	6,6±0,2	[n]
Glutársav	54,2±0,5	10,5±0,2	[n]
Adipinsav	113,2±1,3	33,1±0,8	9,6±0,7
Dietil-malonsav	324,3±2,7	127,0±1,4	5,5±1,8
Fumársav	53,6±0,6	12,3±0,2	4,2±0,5
Maleinsav	18,2±0,1	31,5±0,7	7,1±0,5

[n]: bizonytalan

A vizsgált sorozatban azt tapasztaltuk, hogy a disszociálatlan sav a legtöbb esetben stabilisabb komplexet képez β-CD-nel, mint deprotonált származéka. Az erősen

hidratált kétértékű anionok alig képeznek komplexet. A homológ sorban stabilitási állandót csak az adipát ciklodextrin komplexére tudtunk számolni, de ahogy a 9. ábra koncentrációeloszlás-görbéiből is látszik, a megfelelő komplexek koncentrációja nagyon kicsi. A hat szénatomos adipát viszonylag hosszú hidrofób szénlánca (bizonyos mértékben felcsavarodva) már képes a CD üregének megfelelő betöltésére, így zárványkomplex kialakítására, bár meglehetősen kis stabilitással.

A homológ sorban a növekvő lánchossz folyamatosan növekvő komplex-stabilitásokat eredményezett (8. ábra). A képződési állandók értéke azonban minden esetben kisebb, mint az α-CD esetében mértek [98], ami érthető, hiszen az alifás szénlánchoz képest a β-CD ürege túl nagy, csak kevésbé szoros illeszkedés tud megvalósulni.



8. ábra. A telített alifás α,ω–dikarbonsavak (♦), egyszer (●), illetve kétszer deprotonált formáinak (▲) β–CD-nel képzett komplexstabilitási állandói a szénatomszám függvényében

Az 5. táblázat adatai alapján látható, hogy kivételt képez a hidrogén-maleát ion, mivel stabilisabb zárványkomplexet képez β-CD-nel, mint a megfelelő semleges maleinsav. Mint már említettük, a hidrogén-maleát ion szokatlanul erős intramolekuláris hidrogénkötést tud kialakítani, melynek eredményeként egy hattagú gyűrű jön létre.

Ennek kompaktabb szerkezete megfelelőbb illeszkedést tud biztosítani a CD üregébe. Ebből adódhat a megfigyelt rendhagyó stabilitás.

A borostyánkősav, mint a maleinsav telített származéka, ezt a jelenséget nem mutatja. Bár a hidrogén-szukcinát szintén képes hasonló hidrogénhidas gyűrű kialakítására, azonban a szén-szén szigmakötés körüli szabad rotáció miatt nincs ami stabilizálja azt, a gyűrű könnyen felbomlik, ami megmutatkozik az alacsonyabb stabilitási állandó értékekben is. Míg a megfelelő savi formák komplexstabilitási állandója igen hasonló, az egyszer disszociált anionoknál már jelentős a különbség a hidrogén-maleát javára. Fumársavnál a kettős kötés transz szerkezetű, nincs lehetőség a gyűrűs szerkezet kialakulására, így szintén nem figyelhető meg a rendhagyó viselkedés.

A fumársav, maleinsav és borostyánkősav mindannyian négy szénatomszámú α,ω-dikarbonsavak, stabilitási állandóikat összehasonlítva azonban szembeötlő, hogy a fumársavnál tapasztalt érték meglepően nagy. Bár az egyenes, kimerevített *transz*-forma nem teszi lehetővé *intramolekuláris* hidrogénkötés kialakulását, a merev szerkezet megnöveli a CD üregének peremén lévő hidroxil-csoportokkal kialakítható *intermolekuláris* hidrogénkötés létrejöttének valószínűségét. Mivel a β-CD – hidrogén-fumarát komplex stabilitási állandója körülbelül kétszerese a hidrogén-szukcinátának, nem csak a karboxil-csoport protondonor volta, hanem a karboxilát-csoport protonakceptor jellege is feltételezhetően hozzájárul a hatáshoz.

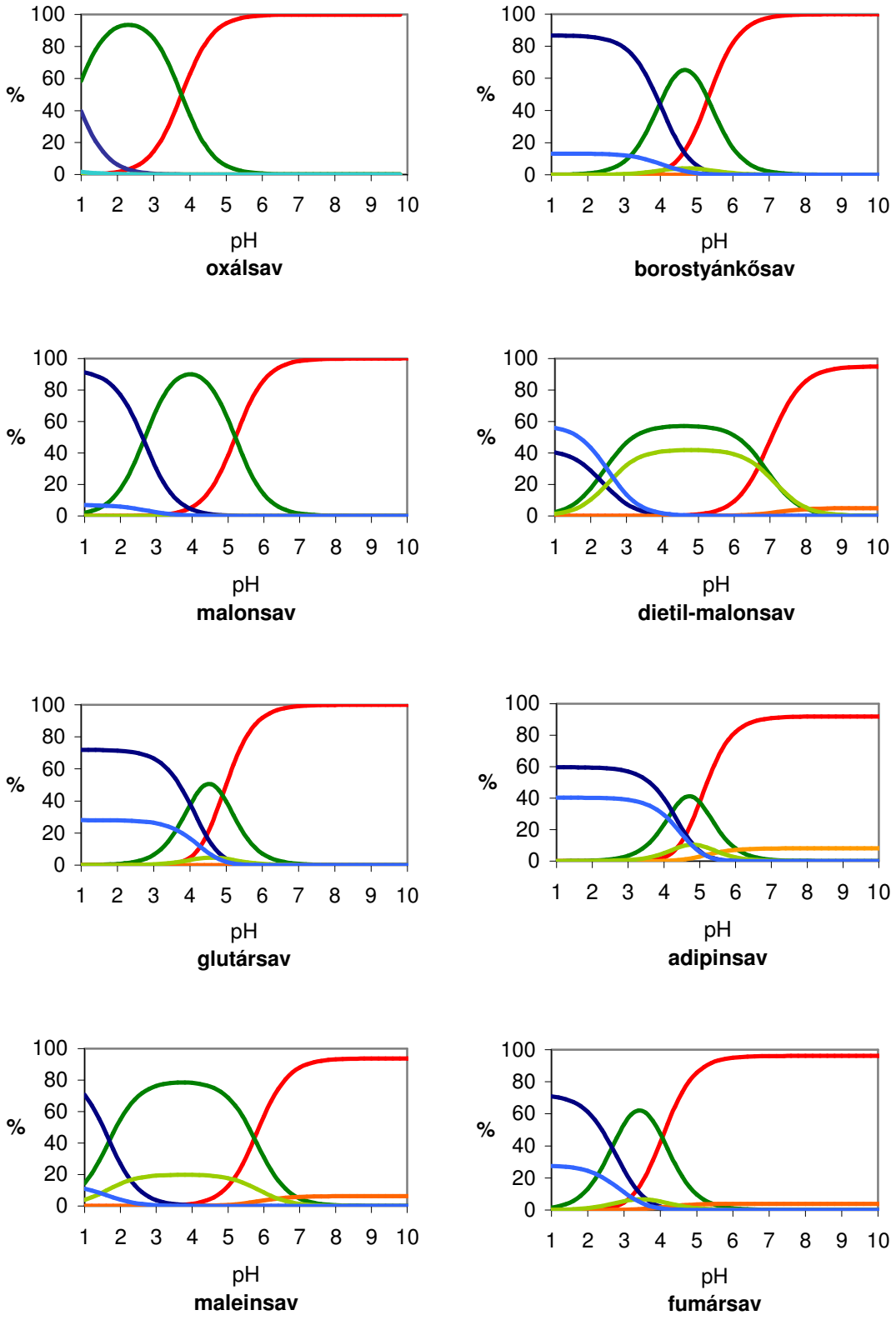
A vizsgált savak között a dietil-malonsav képezi a legstabilisabb komplexet, K_{2110} értéke már-már az aromás tartományba esik: mintegy negyvenszerese a malonsavénak. Ez az érték összefügg az etil-szubsztitúció következményeként kialakuló megnövekedett hidrofóbicitással illetve moláris térfogattal, minthogy a nagyobb mértékű hidrofóbicitás és a növekvő moláris térfogat egyre szorosabb illeszkedést tesz lehetővé a β–CD hidrofób üregében, ezen apoláris csoportok kölcsönhatásba tudnak lépni a CD üregének belső felszínével, amely nagyobb stabilitású komplexet eredményez.

Az UV-látható spektrofotometriás méréseknél tapasztalt terner komplexek képződésére kapott egyensúlyi állandókat a 6. táblázatban foglaltuk össze. Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy elsősorban a telítetlen savak esetében figyelhető meg a terner komplexek képződése.

6. táblázat. Terner komplexek stabilitási állandói

Fenolftalein (K_{0111})			Metilnarancs (K_{2111})	
malonát	glutarát	fumarát	maleinsav	fumársav
1.37±0.12	6.79±0.25	2.70±0.15	2.93±0.20	19.9±1.2

$$\left(K_{0111} = \frac{[\mathrm{A}^{2-} \cdot \mathrm{D} \cdot \mathrm{Ph}]}{[\mathrm{A}^{2-}][\mathrm{D} \cdot \mathrm{Ph}]} \right) \qquad \left(K_{2111} = \frac{[H_2A \cdot D \cdot M]}{[H_2A][D \cdot M]} \right)$$



9. ábra. 10^{-2} mol·dm^{-3} koncentációjú α,ω–dikarbonsavak százalékos részecskeeloszlása a pH függvényében, 10^{-2} mol·dm^{-3} koncentációjú β–ciklodextrin jelenlétében
H_2A, HA^-, A^{2-}, $H_2A \cdot D$, $HA^- \cdot D$, $A^{2-} \cdot D$

5.2. Néhány kiválasztott alkaloid vizsgálata

5.2.1. Alkaloidmeghatározás ciklodextrinek segítségével

A karbonsavak vizsgálata során kapott eredmények alapján azt vártuk, hogy az alkaloidbázisok illetve protonált formáik is hasonló viselkedést mutatnak, azaz a protonált, töltéssel rendelkező forma ciklodextrin komplexe kevésbé stabil a semleges formáéhoz képest.

Feltételeztük, hogy a következő egyensúly fennállása esetén (10. ábra), amennyiben a semleges bázis stabilisabb komplexet képez, mint protonált formája [1380], látszólag lecsökken az alkaloidbázis protonálódási állandója, és a komplexképződés következtében jelentősen megnövekszik vízoldhatósága. A két jelenség – egymást erősítve – potenciometriás végpontjelzés segítségével az alkaloid sójából kiindulva vizes közegben is közvetlen nátronlúgos titrálást tesz lehetővé.

$$\begin{array}{ccccc} & & K_A & & \\ & \mathbf{B} & \leftrightarrow & \mathbf{HB^+} & \\ K_{011} & \updownarrow & & \updownarrow & K_{111} \\ & \mathbf{B{\cdot}D} & \leftrightarrow & \mathbf{HB^+{\cdot}D} & \\ & & K_A' & & \end{array}$$

10. ábra. Egyértékű bázis protonálódási és komplexképződési sémája

Elképzeléseink alátámasztására modellvegyületként a következő, európai és magyar gyógyszerkönyben egyaránt hivatalos alkaloidsókat vizsgáltuk: chinini hydrochloridum, codeini hydrochloridum dihydricum, ephedrini hydrochloridum, homatropini hydrobromidum, papaverini hydrochloridum és pilocarpini hydrochloridum.

Vizsgálatainkban az európai gyógyszerkönyv módszeréhez hasonlóan, hozzáadott sósav jelenlétében végeztük a titrálásokat, és nátrium-hidroxid mérőoldattal titráltunk, potenciometriás végpontjelzést alkalmazva. Alkoholos közeg helyett azonban

kétszer desztillált vizet használtunk, mely mintegy nanofázisú második oldószerként, különböző mennyiségben feloldva tartalmazta az egyes ciklodextrineket.

Minden titrálási görbén 2 inflexiós pont észlelhető, melyek közül az első a hozzáadott sósavra, mint erős savra, a második pedig a protonált bázisra, mint gyenge savra fogyott mérőoldat mennyiségét jelzi. Így a két inflexiós pont közötti mérőoldatfogyás a protonált alkaloidtartalommal ekvivalens.

Amennyiben az alkaloidbázis oldhatósága lehetővé tette, ciklodextrinek nélkül is elvégeztük a sav-bázis titrálást, és a karbonsavaknál ismertetettek szerint meghatároztuk a bázisok protonálódási állandóit.

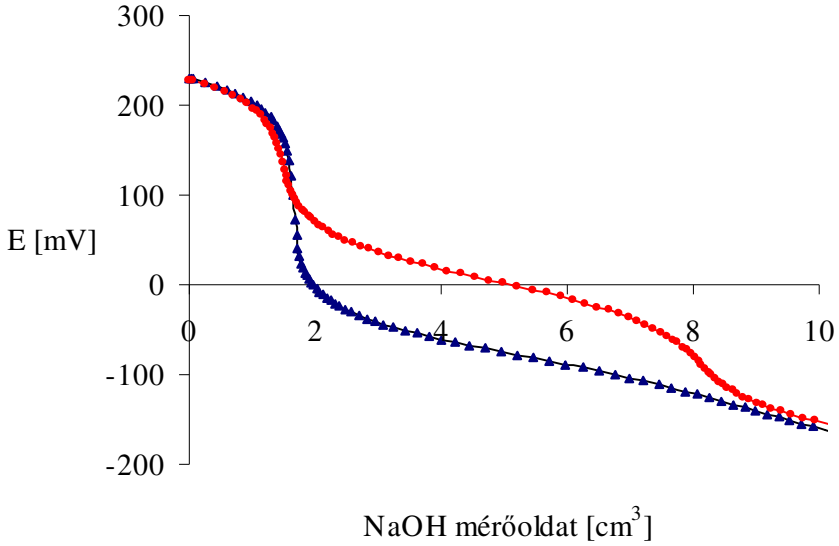
5.2.2. Potenciometriás titrálhatóság különböző ciklodextrinek jelenlétében

Az egyes alkaloidsók különböző ciklodextrinek jelenlétében végzett titrálásainál az alábbi eredményekre jutottunk. Az egyes titrálási görbék bemutatásánál lehetőség szerint feltüntettem a ciklodextrinmentes oldatban végzett titrálások eredményeit is.

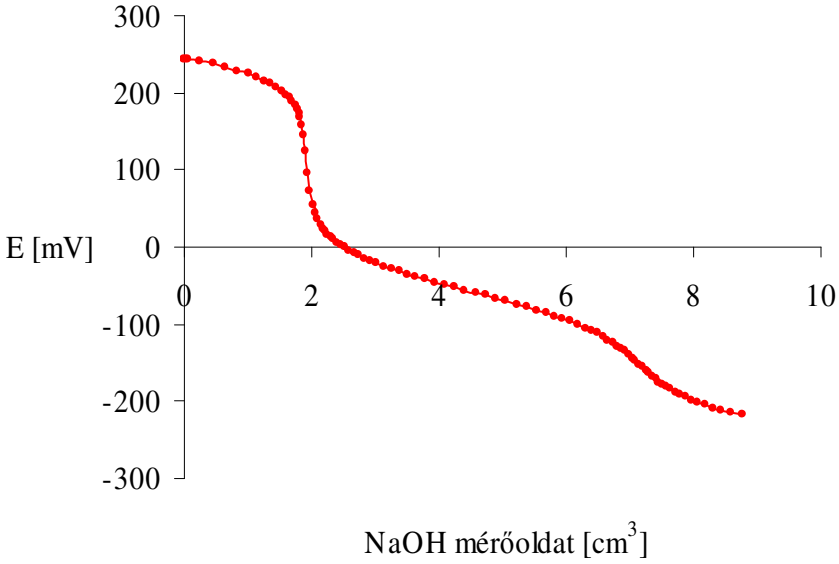
5.2.2.1. Kodein

A kodeinbázis oldhatósága lehetővé teszi számunkra, hogy $5 \cdot 10^{-3}$ $mol \cdot dm^{-3}$ koncentrációjú oldatát csapadékkiválás nélkül titráljuk vizes közegben NaOH mérőoldattal, a protonált bázis gyenge savi jellege miatt azonban a titrálási görbe második inflexiója kiértékelhetetlen.

Vizsgálataink során azonban azt találtuk, hogy a kodein-klorid vizes közegű alkalimetriás titrálása mindhárom általunk kiválasztott CD segítségével megvalósítható. A molekula nagy mérete miatt feltételezhetően a γ-CD nagyobb ürege biztosítja a legmegfelelőbb térkitöltést a kodein számára, így ennél vártuk a legstabilisabb komplex képződését. A tapasztalt eredmények alátámasztják ezt a feltételezést: γ-CD-ből már háromszoros felesleg elégnek bizonyult, hogy jól szeparált inflexiós pontokat kapjunk a potenciometriás titrálási görbén (11. ábra).



11. ábra. $4 \cdot 10^{-3}$ mol·dm^{-3} kodein-klorid és 10^{-3} mol·dm^{-3} sósav (V_0=20 cm^3) titrálási görbéje $1{,}2 \cdot 10^{-2}$ mol·dm^{-3} NaOH mérőoldattal ciklodextrin nélkül (▲), és $1{,}2 \cdot 10^{-2}$ mol·dm^{-3} γ–CD jelenlétében (•)

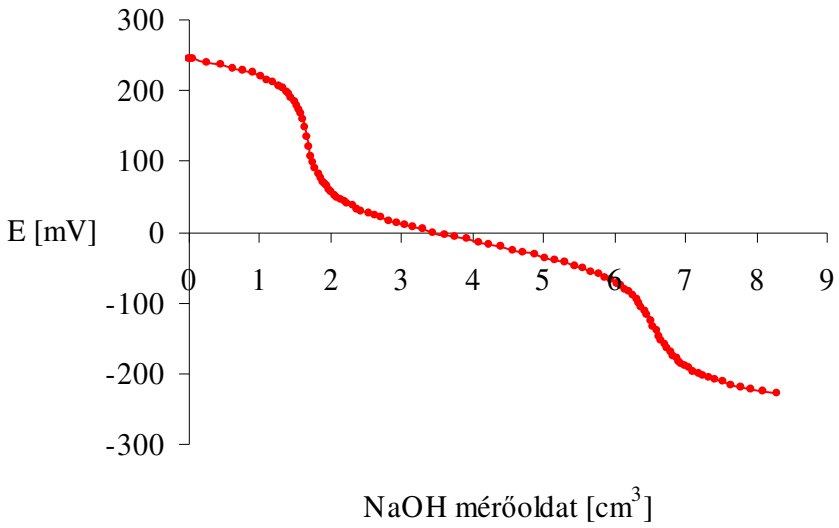


12. ábra. $5 \cdot 10^{-3}$ mol·dm^{-3} kodein-klorid és $2 \cdot 10^{-3}$ mol·dm^{-3} sósav (V_0=20 cm^3) titrálási görbéje $2{,}1 \cdot 10^{-2}$ mol·dm^{-3} NaOH mérőoldattal, $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ mol·dm^{-3} β–CD jelenlétében

A β-CD kisebb ürege nem képes magába foglalni az egész molekulát, így kevésbé stabilis zárványkomplex kialakulására van lehetőség. Mivel a β-CD korlátozott

vízoldhatósága miatt a ciklodextrint csak háromszoros feleslegben tudtuk alkalmazni a kodeinhez képest, a titrálási görbén egy kevésbé határozott, de még mindig jól elkülönülő második inflexiót tapasztaltunk (12. ábra).

Mivel a β–CD alkoholos hidroxil-csoportjait éterezve a metilezett származék oldhatósága többszörösre nő az anyavegyülethez képest, jóval nagyobb feleslegben tudjuk alkalmazni a komplexképzőt. Harmadikként tehát a dimetil-β-CD (DIMEB) hatását vizsgáltuk a titrálási görbék alakjára. A β-CD és DIMEB üregmérete közelítőleg megegyezik, így a kialakuló zárványkomplexek stabilitása várhatóan nagyságrendileg hasonló. A magasabb gazda-vendég arány azonban egyben nagyobb komplexáltsági fokot is jelent, ami a titrálási görbe alakját is nagymértékben javítja (13. ábra).

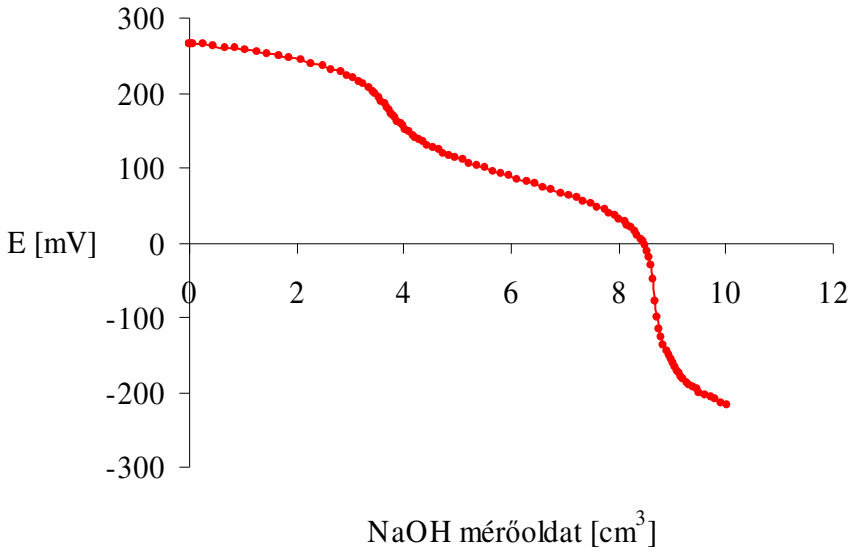


13. ábra. $5\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} kodein-klorid és $2\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} sósav (V_0=20 cm^3) titrálási görbéje $2\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} NaOH mérőoldattal, $7{,}5\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} DIMEB jelenlétében

5.2.2.2. Papaverin

Mint korábban már említettük, a sósav hozzáadásával végzett titrálásoknál az első inflexió észlelését nagymértékben nehezíti, esetenként akár lehetetlenné is teszi a relatíve nagy savi disszociáció állandó (K_A). Különösen igaz ez alkoholos közegben, mely nagymértékben felerősíti a vegyületek aciditását. A vizsgált alkaloidsók között a papaverin bír a legnagyobb K_A értékkel, és ez a komplexképződés következtében (csakúgy, mint alkohol hatására) tovább nő. Ez a növekedés azonban kisebb mértékű,

mint az alkohol hatására tapasztalt, így nem akadálya a kétlépcsős titrálásnak. Ennek, valamint a CD szolubilizációs képességének következtében lehetővé válhat a vizes közegű meghatározás is. Sajnos a β-CD-nel képzett komplex stabilitása, illetve a β-CD oldhatósága nem elég nagy ahhoz, hogy a titrálás során felszabaduló papaverin bázis a titrálás végéig oldatban maradjon. A gazda-vendég arány javítására azonban itt is segítségül hívhatjuk a metilezett ciklodextrin-származékot (DIMEB), amelyet 20-szoros feleslegben alkalmazva megvalósítható a papaverin-klorid vizes közegű titrálása (14. ábra).

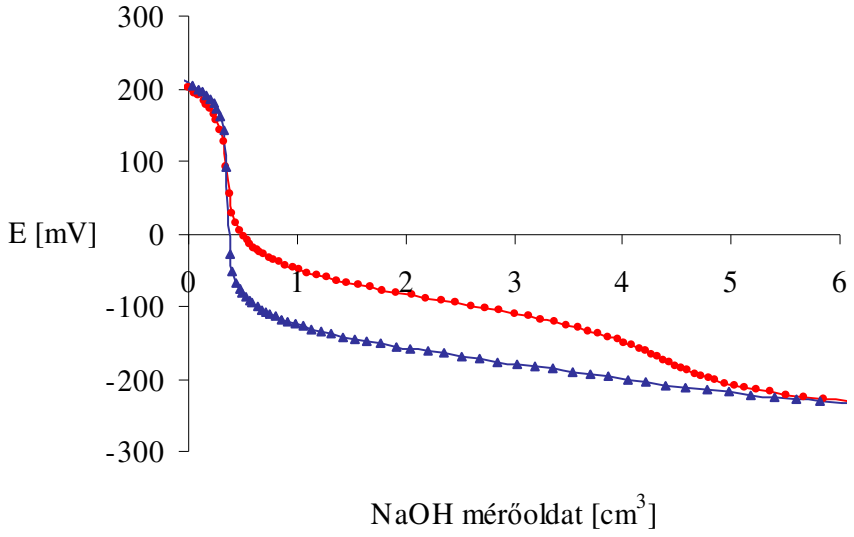


14. ábra. $5\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} papaverin-klorid és $4\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} sósav (V_0=20 cm^3) titrálási görbéje $2\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} NaOH mérőoldattal, 10^{-1} mol·dm^{-3} DIMEB jelenlétében

A γ-CD megfelelően nagy (mintegy huszonötszörös) feleslegben alkalmazva szintén képes a titrálás végéig oldatban tartani a papaverin bázist, ilyen tömény oldatban azonban már fellép a γ-CD–re jellemző asszociációs jelenség [118]. Ez az oldat viszkozitását oly mértékben megnöveli, hogy az a mérés megbízhatóságát a lassú potenciálbeállás miatt kérdésessé teszi, így összességében megállapítható, hogy a γ–CD nem megfelelő segédanyagnak papaverin-klorid vizes közegű tartalmi meghatározásához.

5.2.2.3. Homatropin

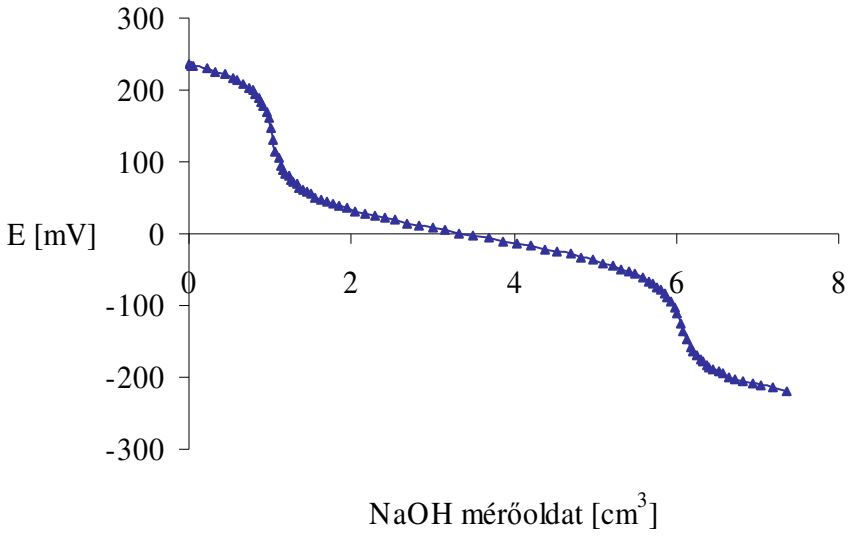
Az általunk vizsgált alkaloidok között a homatropin-bromid a leggyengébb sav. Meghatározása vizes közegben nem oldhatósági problémák, inkább e csekély aciditás, s ennek következtében a második inflexió hiánya miatt lehetetlen. A papaverinhez hasonlóan sem a β-, sem a γ-CD hozzáadásával kapott titrálási görbék nem alkalmasak a meghatározásra, hússzoros feleslegben adott DIMEB esetén azonban már észlelhető inflexiós pontokat kapunk (15.ábra).



15. ábra. $4\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} homatropin-bromid és $3{,}5\cdot10^{-4}$ mol·dm^{-3} sósav (V_0=20 cm^3) titrálási görbéje $2\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} NaOH mérőoldattal, ciklodextrin nélkül (▲), és $8{,}0\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} DIMEB jelenlétében (•)

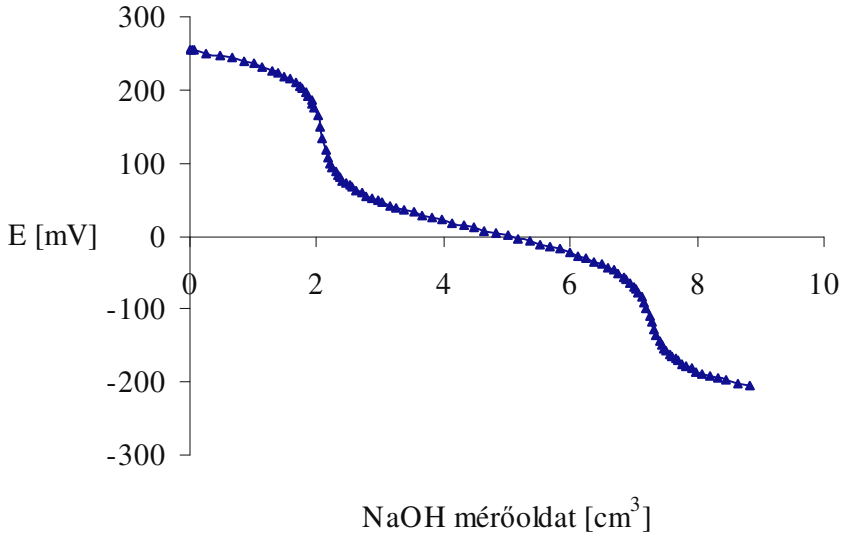
5.2.2.4. Pilokarpin

A pilokarpin-klorid szintén az európai gyógyszerkönyv alkoholos módszerével mérhetetlen alkaloidok közé tartozik. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy $5\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} koncentrációban a pilokarpin-klorid a bázis jó vízoldhatóságának és megfelelő K_A értékének köszönhetően mindenfajta segédanyag hozzáadása nélkül jól titrálható



16. ábra. $5\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} pilokarpin-klorid és 10^{-3} mol·dm^{-3} sósav (V_0=20 cm^3) titrálási görbéje $2\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} NaOH mérőoldattal

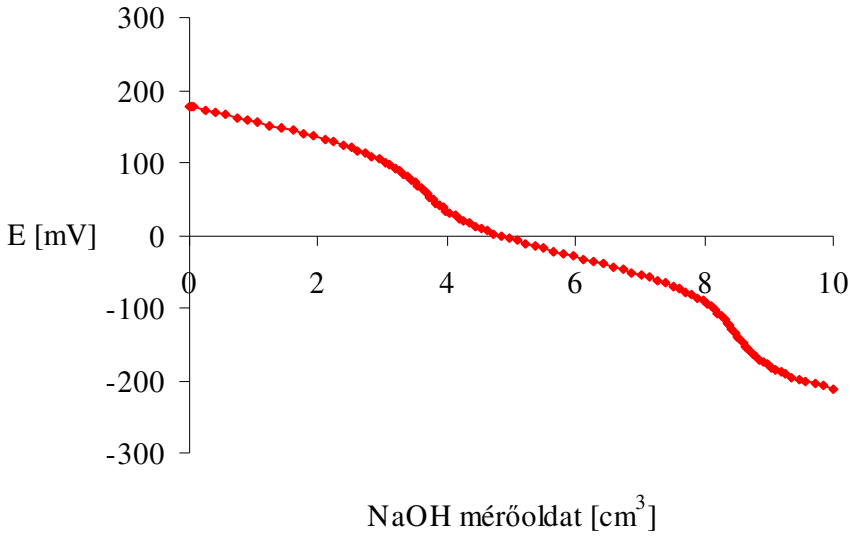
A különböző CD-ek hozzáadása sem okoz különösebb változást a titrálási görbe alakján (17. ábra), ami arra utal, hogy a protonált és semleges forma komplexének stabilitás-különbsége viszonylag kicsi.



17. ábra. $5\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} pilokarpin-klorid és $2\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} sósav (V_0=20 cm^3) titrálási görbéje $2\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} NaOH mérőoldattal, $1{,}5\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} β–CD jelenlétében

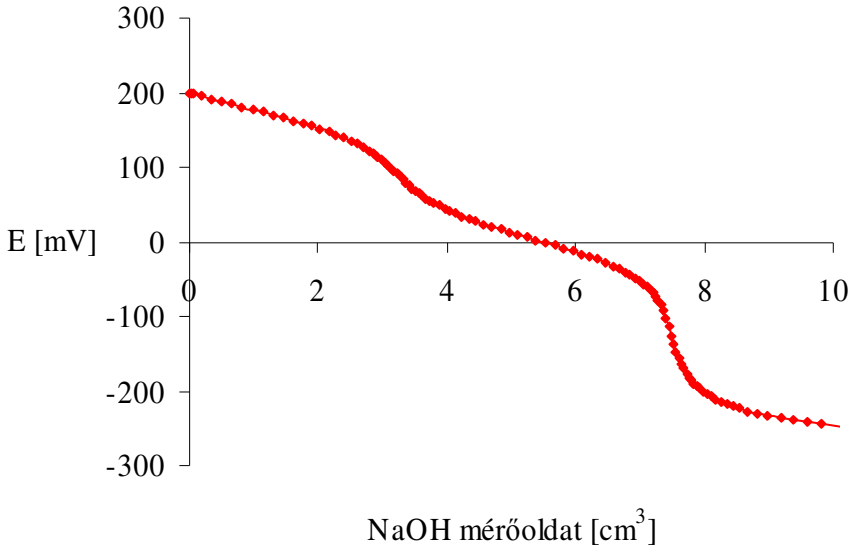
5.2.2.5. Kinin

A kinin-hidroklorid esetében szintén megfigyelhető egy érdekes jelenség. A molekulaméret alapján a kodeinnél tapasztaltakhoz hasonló viselkedést várnánk. Ez β-CD-nél és DIMEB-nél meg is valósul, azaz a metilezett származék nagyobb oldhatóságának köszönhetően nagyobb feleslegben alkalmazható, azáltal nagyobb mértékben képes a görbék alakját javítani (18. és 19. ábra).



18. ábra. $5\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} kinin-klorid és $4\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} sósav titrálási görbéje (V_0= 20 cm^3) $2\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} NaOH mérőoldattal, $1{,}5\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} β–CD jelenlétében

γ-CD-nel azonban intenzív csapadékkiválást észleltünk a titrálás folyamán, mely tipikus példája a GES (guest enforced solubility) jelenségének, azaz amikor a gazda – vendég kölcsönhatás következtében a kialakult szupramolekula hidrofilitása jelentősen megváltozik, és oldhatósága a gazdamolekula oldhatósága alá csökken [37].

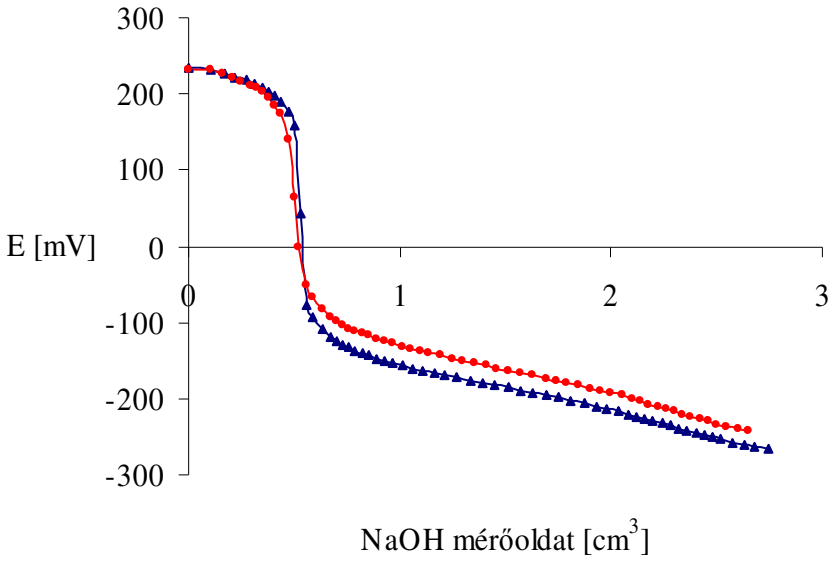


19. ábra. $5\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} kinin-klorid és $4\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} sósav titrálási görbéje (V_0=20cm^3) $2\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} NaOH mérőoldattal, $7{,}5\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} dimetil–β–CD jelenlétében

5.2.2.6. Efedrin

Az efedrin a vizsgált alkaloidok között a homatropin után a második legerősebb bázis, mely egyben a legjobb vízoldhatósággal rendelkezik. Bár a kis molekulaméret sem tesz lehetővé szoros illeszkedést, ez alapján még számíthatnánk komplex kialakulására, a szintén hidrofil pilokarpinhoz hasonlóan azonban a bázis poláris jellegéből adódó erős hidratáció nem kedvez a ciklodextrinek inkább apoláris jellegű üregébe való beágyazódásnak.

Jó vízoldhatóságának köszönhetően az efedrin-klorid vizes közegben végig titrálható, a második inflexió azonban a protonált efedrin igen gyenge savi jellege miatt nem értékelhető ki, és a különböző ciklodextrinek hozzáadása sem javítja a kiértékelhetőséget. Az efedrin-klorid tehát a vizsgált alkaloidsók közül az egyetlen, amelynél a három ciklodextrin egyike sem hozott megoldást a vizes közegű pH-potenciometriás titrálás végzésére.



20. ábra. $2\cdot10^{-3}$ mol·dm^{-3} efedrin-klorid és $5\cdot10^{-4}$ mol·dm^{-3} sósav titrálási görbéje (V_0=20cm^3) $2\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} NaOH mérőoldattal (▲), $1{,}3\cdot10^{-2}$ mol·dm^{-3} β–CD jelenlétében (•)

5.2.3. Komplexképződési állandók

A potenciometriás titrálási görbék kiértékeléséből számolt stabilitási állandókat szórásukkal együtt (±3σ) a 7. táblázatban foglaltuk össze.

A táblázat első oszlopa az alkaloid pK_A ($\log\beta_{110}$) értékét adja meg, mely az adott alkaloid sav-bázis karakterét jellemzi vizes közegben. Az általunk mért értékek jó egyezésben vannak az irodalomban találtakkal [139]. A következő oszlopok a CD – protonált bázis (BH^+) komplexképződési állandóját ($\log K_{111}$):

$$K_{111} = \frac{\beta_{111}}{\beta_{110}} = \frac{[H^+][B][HB^+\cdot D]}{[H^+][B][D][HB^+]} = \frac{[HB^+\cdot D]}{[HB^+][D]}, \qquad (40)$$

és a protonálatlan forma (B) komplexének stabilitási állandóját ($\log\beta_{011}$) tartalmazzák az egyes ciklodextrinekre vonatkozóan:

$$\beta_{011} = \frac{[B\cdot D]}{[B][D]}. \qquad (41)$$

Amennyiben β_{011} megfelelően nagy ahhoz, hogy alkalmas gazda:vendég arány esetén olyan komplexáltsági fokot érjünk el, hogy az alkaloidbázis szabad frakciója

adott hőmérsékleten annak oldhatósága alatti koncentrációban legyen jelen, ezzel kiküszöbölhető a vizes közegű meghatározásokat gátoló egyik tényező, azaz a titrálás folyamán tapasztalt csapadékkiválás.

A másik gátló tényező általában a protonált bázis gyenge savi jellege. A szabad alkaloid sav-bázis tulajdonságait a protonálódási állandóval ($\beta_{110}=1/K_A$)–val jellemezhetjük (v.ö. 10. ábra):

$$\beta_{110} = \frac{[\mathrm{HB}^+]}{[\mathrm{H}^+][\mathrm{B}]}\left(=\frac{1}{K_A}\right), \tag{42}$$

míg ugyanez a komplexált részecske esetében:

$$\frac{[\mathrm{HB}^+\cdot\mathrm{D}]}{[\mathrm{H}^+][\mathrm{B}\cdot\mathrm{D}]} = \frac{\beta_{111}}{\beta_{011}} = \frac{[\mathrm{B}][\mathrm{D}][\mathrm{HB}^+\cdot\mathrm{D}]}{[\mathrm{H}^+][\mathrm{B}][\mathrm{D}][\mathrm{B}\cdot\mathrm{D}]}\left(=\frac{1}{K_A'}\right). \tag{43}$$

A 7. táblázatban foglalt értékek szerint minden esetben:

$$\beta_{011} \quad > \quad K_{111}. \tag{44}$$

Mindkét oldalt $\frac{\beta_{110}}{\beta_{011}}$ -vel szorozva a következőkre juthatunk:

$$\frac{\beta_{011}\times\beta_{110}}{\beta_{011}} = \beta_{110}\left(=\frac{1}{K_A}\right) > \frac{K_{111}\times\beta_{110}}{\beta_{011}} = \frac{\beta_{111}\times\beta_{110}}{\beta_{110}\times\beta_{011}} = \frac{\beta_{111}}{\beta_{011}}\left(=\frac{1}{K_A'}\right). \tag{45}$$

Mindezekből kitűnik, hogy a ciklodextrinbe zárt sav erősebb savi jelleggel bír a szabad formánál. Ennek a ténynek az ismeretében kiküszöbölhető a vizes közegű titrálásokat gátoló másik tényező, azaz a protonált alkaloid gyenge savi jellege.

7. táblázat. Az alkaloidsók savi disszociációs állandói és az egyes ciklodextrinekkel mért stabilitási állandók a bázis/protonált bázis rendszerekre

Alkaloid	$\log\beta_{110}$ (pK_A)	β-CD		Dimetil-β-CD		γ-CD	
		$\log K_{111}$	$\log\beta_{011}$	$\log K_{111}$	$\log\beta_{011}$	$\log K_{111}$	$\log\beta_{011}$
Kodein	8,21±0,03	1,60±0,06	2,74±0,08	0,94±0,13	2,44±0,05	1,35±0,10	3,19±0,03
Homatropin	9,88±0,05	–	–	2,08±0,12	3,34±0,12	–	–
Papaverin	6,40*	–	–	0,36±0,10	1,99±0,05	–	–
Pilokarpin	7,17±0,01	1,04±0,12	1,98±0,07	1,45±0,08	2,02±0,03	1,65±0,04	1,95±0,04
Kinin	8,52*	0,99±0,13	3,09±0,08	0,92±0,11	3,10±0,05	–	–
Efedrin	9,65±0,02	2,20±0,07	2,82±0,11	–	–	–	–

* - irodalmi érték [139]

Várakozásainknak megfelelően tehát minden esetben a semleges bázis képezi a stabilisabb komplexet a protonált alkaloiddal szemben. A kapott stabilitási állandók ismeretében jól magyarázhatóak az egyes titrálási görbék, és az efedrin kivételével mindegyik kiválasztott vegyület esetén található olyan ciklodextrin, amelynek alkalmazásával a titrálási görbén jól észlelhető az analitikai kiértékeléshez szükséges két inflexiós pont. Ezek alapján a ciklodextrineknek a különböző alkaloidsók potenciometriás titrálásában lehetséges szerepét a következőkben foglalhatjuk össze.

A **kodein** γ–CD-nel képezi a legstabilabb komplexet, ezért ebből a komplexképzőből elegendő már a 3-szoros felesleg a megfelelően kiértékelhető titrálási görbéhez. A β–CD-nel és DIMEB-bel kapott komplex-stabilitások a vártnak megfelelően azonos nagyságrendűek. A DIMEB-kodein komplexek némiképp kisebb értéke az üreg peremén elhelyezkedő metil-szubsztituenseknek tudható be, melyek leszűkítik az üreg peremét, ezáltal csökkentik a hozzáférési valószínűséget az alkaloid számára.

A **papaverin**nél csak DIMEB-bel tudtunk stabilitási állandót meghatározni, a kapott kis érték az irodalomban leírtakkal összhangban gyenge kölcsönhatásra utal. A β–és γ–CD-nel történt mérések az 5.2.2.2-ben leírt okok miatt nem tették lehetővé stabilitási állandók meghatározását, DIMEB alkalmazása azonban lehetővé teszi az analitikai kiértékelést.

A **homatropin** a legerősebb bázis a vizsgált alkaloidok között, ezért a második inflexió teljes hiánya teszi lehetetlenné vizes közegű meghatározását. Titrálása γ– és β–ciklodextrinnel nem járt sikerrel, a DIMEB-bel képzett komplex azonban megfelelő stabilitással bír ahhoz, hogy a komplexképző hússzoros feleslege jelenlétében a második inflexió is kiértékelhető.

A legkisebb különbséget a protonált és semleges bázis komplexének stabilitása között a **pilokarpin**nál találtuk. Ezt a konkrét értékeken kívül a titrálási görbék is bizonyítják, a ciklodextrinek hozzáadása ugyanis itt okozta a legkisebb különbséget a görbék lefutásában. Ennek azonban analitikai szempontból nincsen jelentősége, mert a pilokarpin-klorid vizes közegben segédanyag nélkül is jól titrálható.

A **kinin** β–CD és DIMEB komplexének stabilitása a kodeinnél leírtakkal összhangban nagyságrendileg azonos tartományba esik. A stabilabb zárványkomplex kialakulását γ–CD-nel vártuk, itt azonban már a titrálás kezdeti szakaszán intenzív

csapadékkiválást észleltünk, mely nem tette lehetővé stabilitási állandó meghatározását. Analitikai célra a nagy fölöslegben alkalmazható DIMEB látszik a legmegfelelőbbnek.

Az **efedrin,** mely legpolárosabb molekula a vizsgált alkaloidok között, az irodalomban leírtakkal összhangban a mi vizsgálataink szerint is igen kis stabilitású komplexeket képez a vizsgált ciklodextrinekkel. Mivel egyben az egyik legerősebb bázisról van szó, a komplexképződés hatásaként a saverősségben mutatkozó növekedés még nagy komplexképző-feleslegek esetében sem elégséges ahhoz, hogy a második inflexiót kiértékelhetővé tegye. Efedrin-klorid vizes közegű titrálása tehát ezzel a módszerrel nem valósítható meg.

A módszerek analitikai összehasonlítására a következő méréseket végeztem: a Ph.Hg.VII. 2.2. fejezetben ismertetett jégecetes módszere szerint megtitráltam a nevezett alkaloidsókat. Minden esetben három párhuzamos mérést végeztem.

A különböző módszerekkel végzett titrálások kiértékelése során az alkaloid-sók mennyiségére kapott százalékos eredményeket a 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat. Alkaloidsók vizes és nemvizes közegű mennyiségi meghatározásával kapott eredmények a bemérés százalékában

Alkaloid só	Módszer			
	β–CD	Dimetil β–CD	γ-CD	Nemvizes közegű titrálás
Kodein.HCl	104,8 ± 1,1	103,1 ± 0,9	101,0 ± 0,4	100,3 ± 0,3
Homatropin.HBr	–	104,8±1,5	–	100,0 ± 0,2
Papaverin.HCl	–	101,4 ± 0,5	–	100,7 ± 0,5
Pilokarpin.HCl	101,3 ± 1,0	102,9 ± 0,7	102,9 ± 0,9	99,5 ± 0,3
Kinin.HCl	103,5 ± 0,3	103,3 ± 0,5	–	96,9 ± 2,5

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Doktori munkám során pH-potenciometria és UV-spektrofotometria különböző módszereit használtam arra, hogy sav-bázis tulajdonságú anyagokon keresztül a protonálódás hatását tanulmányozzam ciklodextrin zárványkomplexek stabilitására.

1. α,ω–dikarbonsavak vizsgálata

Meghatároztuk az alifás nyíltláncú α,ω–dikarbonsavak homológ sorából az oxálsavtól az adipinsavig terjedő tagok β–CD-nel képzett komplexeinek stabilitási állandóit, kiegészítve néhány telítetlen és szubsztituált származékkal. Eredményeink alapján az alábbi megállapításokat tehetjük.

1.1 Megállapítottuk, hogy a vizsgált savak 1:1 arányú komplexeket képeznek β–CD-nel, és a különböző protonáltsági fokú komplexek stabilitása a szénlánc növekedésével monoton nő.

1.2 A vendégmolekula és a ciklodextrin belső fala között kialakuló van der Waals és hidrofób kölcsönhatások dominanciájára utal, hogy a disszociálatlan savak túlnyomó többségben stabilisabb komplexet képeztek, mint a töltéssel rendelkező részecskék.

1.3 Kivételként a maleinsav – hidrogén-maleát pár esetében azt találtuk, hogy a negatív töltés ellenére a hidrogén-maleát képezte a stabilisabb komplexet. A hidrogén-maleátnál kialakuló intramolekuláris hidrogénkötés következtében létrejövő gyűrűs szerkezet, melyet a merev cisz kettőskötés stabilizál, szorosabb sztérikus illeszkedést tesz lehetővé a ciklodextrin üregében, mint a disszociálatlan molekula esetében. Ez a komplex stabilitását nagyobb mértékben növeli, mint amennyire azt a negatív töltés jelenléte csökkenti.

1.4 A borostyánkősav és maleinsav β–ciklodextrinnel képzett komplexének vizsgálata során azt találtuk, hogy stabilitásuk nem különbözött számottevően egymástól, míg a fumársav hozzájuk képest háromszor stabilisabb komplex kialakítására képes. Ez a CD és a vendégmolekula közötti intermolekuláris hidrogénkötés komplexet stabilizáló hatására hívja fel a figyelmet, mely a már említett gyenge kötőerők mellett jelentősen módosíthatja a komplexek stabilitását.

1.5 Egyes savak UV-látható spektrofotometriás mérésénél kis stabilitású terner komplexek képződését tapasztaltuk. Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy elsősorban a telítetlen savak esetében figyelhető meg a terner komplexek képződése.

2. Alkaloidsók vizsgálata

2.1. A különböző ciklodextrinekkel végzett vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a gazda: vendég arány minden esetben 1:1. Valamennyi alkaloidbázis stabilisabb komplexet képez, mint protonált származékaik, így az alkaloidsók látszólagos savi disszociációs állandója növekszik. A vízoldható komplexek kialakulásával az alkaloidok oldhatósága is nagymértékben javulhat. Ez a két folyamat egymást erősítve lehetővé teszi a vizsgált vegyületek vizes közegű alkalimetriás mennyiségi meghatározását potenciometriás végpontjelzéssel

2.2.a. Az alábbi alkaloidsók vizes közegű mennyiségi meghatározását sikerült megvalósítanunk: A **kodein-klorid** vizes közegű titrálása mindhárom vizsgált CD-nel (β–CD, dimetil–β–CD, γ–CD) megvalósítható. Mivel γ–CD-nel képezi a legstabilisabb komplexet, ebből a komplexképzőből már a 3-szoros felesleg elegendő a megfelelően kiértékelhető titrálási görbéhez. A **papaverin-klorid** esetében csak dimetil–β–CD-nel (DIMEB) tudtunk stabilitási állandót meghatározni. A kapott kis érték a gazda-vendég közötti gyenge kölcsönhatásra utal, de a komplexképző 20-szoros feleslege lehetővé teszi az analitikai kiértékelést. A **homatropin** esetében a második inflexió teljes hiánya teszi lehetetlenné sójának vizes közegű meghatározását. DIMEB-bel képzett komplexe azonban megfelelő stabilitással bír ahhoz, hogy a komplexképző hússzoros feleslegének jelenlétében a második inflexió is kiértékelhető legyen. A **kinin-klorid** β–CD és DIMEB komplexének stabilitása nagyságrendileg hasonló. γ–CD-nel már a titrálás kezdeti szakaszán intenzív csapadékkiválást észleltünk, mely nem tette lehetővé stabilitási állandó meghatározását. Analitikai célra a nagy fölöslegben alkalmazható DIMEB látszik a legmegfelelőbbnek.

2.2.b. A legkisebb különbséget a protonált és a semleges bázis komplexének stabilitása között a **pilokarpin-klorid**nál találtuk. Ezt a konkrét értékeken kívül a titrálási görbéken is látható, a ciklodextrinek hozzáadása ugyanis itt okozta a legkisebb

különbséget a görbék lefutásában. Mivel azt találtuk, hogy a pilokarpin-klorid vizes közegben segédanyag nélkül is jól titrálható, valójában a ciklodextrinek hozzáadása nem eredményez új lehetőségeket.

2.2.c. Az **efedrin-klorid** a mi vizsgálataink szerint is igen kis stabilitású komplexeket képez a vizsgált ciklodextrinekkel. Mivel az efedrin igen erős bázis, a komplexképződés hatására a saverősségben mutatkozó növekedés még nagy komplexképző-feleslegek esetében sem elégséges ahhoz, hogy a második inflexiót kiértékelhetővé és így az analitikai meghatározást lehetővé tegye.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetem kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak dolgozatom elkészülésében

Mindenekelőtt prof. Dr. Barcza Lajos Tanár Úrnak, témavezetőmnek, hogy tapasztalatával, tanácsaival élete végéig egyengette munkámat, és megteremtette, illetve biztosította a munkához szükséges feltételeket.

Köszönetet mondok Barczáné Dr. Buvári Ágnesnek, megbízott témavezetőmnek sokoldalú segítségéért, értékes tanácsaiért és szigorú, de tárgyilagos kritikai észrevételeiért.

Köszönettel tartozom Dr. Orbán Miklósnak és Dr. Záray Gyulának, az ELTE Analitikai Kémiai Tanszék volt és jelenlegi tanszékvezetőjének, hogy lehetővé tették, hogy Ph.D. munkámat a Tanszéken végezhessem.

Hálás vagyok Dr. Pusztai Szabolcsnak a potenciometriás mérésekhez nyújtott technikai segítségéért.

Köszönet illeti az ELTE Analitikai Kémiai Tanszék valamennyi munkatársát támogatásukért és biztatásukért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szeretteimnek a bátorítást, a türelmet és a rengeteg segítséget.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a protonálódás hatását tanulmányoztuk ciklodextrin zárványkomplexek stabilitására. Ennek céljából bizonyos szerves savak és bázisok különböző protonáltsági formáinak ciklodextrinnel képzett zárványkomplexeinek stabilitási viszonyait vizsgáltuk. Modellanyagaink egyik csoportját a szerves alifás kétértékű α,ω–karbonsavak homológ sorának oxálsavtól adipinsavig terjedő tagjai, valamint dietil-malonsav, maleinsav és fumársav képezték. Ezen vegyületek β–ciklodextrinnel alkotott komplexeinek képződési állandóit két módszerrel, pH-potenciometriával és UV-spektrofotometriával határoztuk meg. A kapott állandók alapján néhány érdekes megállapítást sikerült tennünk az inter- és intramolekuláris hidrogénkötések komplex-stabilitásban játszott szerepére vonatkozóan. Bár a semleges részecskék komplexeinek stabilitása általában nagyobb, mint a hidratált, töltéssel rendelkező formáké, bizonyos esetekben az intramolekuláris hidrogénkötés stabilizáló hatásaként kialakuló kompakt szerkezet jobb térkitöltő hatásának köszönhetően ettől eltérő, rendhagyó stabilitási viszonyok is megfigyelhetőek.

A szerves bázisok vizsgálata során meghatároztuk néhány gyógyászatban jelentős alkaloid különböző ciklodextrinekkel képzett zárványkomplexeinek stabilitási állandóit a pH függvényében. Ezen túl vizsgáltuk a komplexképződés gyógyszeranalitikai alkalmazhatóságát is, melynek során azt találtuk, hogy a szabad alkaloid vízoldhatóságának és báziserősségének, valamint molekulaméretének figyelembevételével megfelelően kiválasztott ciklodextrin-származék jelenlétében megvalósíthatóvá válik azok vizes közegű pH-metriás titrálása. Így a jelenleg rendelkezésre álló, de esetenként akadályokba ütköző gyógyszerkönyvi módszerek mellett javaslatot tettünk gyenge bázisok sóinak egy új, vizes közegű, környezetbarát tartalmi meghatározására ciklodextrinek segítségével.

SUMMARY

In the present work, the effect of protonation on the stability of cyclodextrin inclusion complexes was investigated. For this purpose, the complex formation of various organic acid and base protonation forms and cyclodextrins was studied to assess their stability. The behaviour of protonation forms of the following acids has been investigated in the presence of β–cyclodextrin: homologous series of aliphatic α,ω–dicarboxylic acids from oxalic acid up to adipic acid, diethylmalonic acid, maleic acid and fumaric acid. The formation constants were determined by pH-potentiometry combined with competitive UV-Vis-spectrophotometric measurements. Based on the measured constants some very interesting conclusions could be drawn on the role of intra- and intermolecular H-bonds in stabilization of inclusion complexes. Although β–cyclodextrin generally forms more stable complexes with undissociated acids than with their strongly hydrated, deprotonated derivatives, a relatively high and unexpected increase of inclusion complex stability could be detected in some half-dissociated species with intramolecular H-bonds. This is probably due to the better space filling of the compact structure caused by the intramolecular H-bonds.

When investigating organic bases stability of cyclodextrin complexes of some alkaloid salts used as medicaments was determined in different protonation forms. The poor water solubility of the free base and the high dissociation constant (K_A) often hinders the assay of alkaloid salts. Different cyclodextrin derivatives form complexes of appropriate stability to keep the base in solution and at the same time to shift favourably the protonation equilibrium. Based on these findings we have elaborated a new method of alkaloid titration that can be carried out in aqueous media by choosing the most appropriate CDs depending on the solubility and the basicity of the free base and the size of the molecules.

Therefore the use of cyclodextrins can provide an alternative, environment friendly assay for many salts of week bases in aqueous media beside the pharmacopoeial methods.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapját képező közlemények

1. Csernák O, Buvári-Barcza Á, Samu J, Barcza L. (2005) Uncommon Interactions of Aliphatic Dicarboxylic Acids with Cyclodextrins. J. Incl. Phenom, 51: 59- 63.

2. Csernák O, Buvári-Barcza Á, Barcza L. (2006) Cyclodextrin Assisted Nanophase Determination of Alkaloid Salts. Talanta, 69 (2): 425-429.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemény

3. Béni Sz, Szakács Z, Csernák O, Barcza L, Noszál B. (2007) Cyclodextrin/imatinib complexation: binding mode and charge dependent stabilities. Eur. J. Pharm. Sci, 30: 167-174.

Konferencia előadások

1. Csernák O, Barczáné Buvári Á, Barcza L. Savak és anionjaik ciklodextrin-komplexei.
   XXXVIII. Komplexkémiai Kollokvium, Gyula, 2003. május 21-24.

2. Csernák O, Barczáné Buvári Á, Barcza L. Alkaloidsók meghatározása ciklodextrinek segítségével. XXXIX. Komplexkémiai Kollokvium, Agárd, 2004. május 22-25.

3. Csernák O, Barczáné Buvári Á, Barcza L. Alkaloidsók meghatározása ciklodextrinek segítségével. VII. Clauder Ottó emlékverseny, Visegrád, 2004. október 14-15.

4. Csernák O, Buvári-Barcza Á, Barcza L. Inclusion Complexes of β–Cyclodextrin and some Aliphatic Dicarboxylic Acids. 2nd Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference, Somogyaszaló, 2005. május 17-19.

5. Csernák O, Szakács Z, Béni Sz, Barczáné Buvári Á, Barcza L, Noszál B. Az imatinib β–ciklodextrin zárványkomplexének vizsgálata. XL. Komplexkémiai Kollokvium, Dobogókő, 2005. május 18-20.

Poszterek

1. Csernák O, Barczáné Buvári Á, Barcza L. Alifás savak és β–ciklodextrin kölcsönhatása. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XII., Budapest, 2003. május 8-10.

2. Béni Sz, Csernák O, Barcza L, Noszál B. Az imatinib béta-ciklodextrin komplexének vizsgálata. PhD Tudományos Napok Semmelweis Egyetem, Budapest, 2005. április 14-15.

3. Béni Sz, Szakács Z, Csernák O, Barcza L, Buvári-Barcza Á, Noszál B. Cyclodextrin complexation of imatinib in its various protonation forms. Pharmacy: Smart Molecules for Therapy. Semi centennial conference of Semmelweis University, Faculty of Pharmacy, Budapest, 2005. október 12-14.

4. Csernak O, Béni Sz, Szakács Z, Buvári-Barcza A, Barcza L, Noszál B. Characterization of imatinib-cyclodextrin system in view of its acid-base properties. XIII. International Cyclodextrin Symposium, Torinó, Olaszország, 2006. május 14-16.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Villiers A. (1891) Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyriqué. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci, 112: 536-538.

2. Schardinger F. (1903) Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter kristallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. Z. Unters. Nahr. u. Genussm, 6: 865-880.

3. Schardinger F. (1911) Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Stärkekleister durch Mikrobien. Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Abt. II, 29: 188-197.

4. Freudenberg K, Blomquist G, Ewald L, Soff K. (1936) Ber. Dtsch. Chem. Ges, 69: 1258.

5. Freudenberg K, Cramer F. (1948) Die konstitution der Schardinger-dextrine. Z. Naturforsch, 3b: 464.

6. French D, Rundle RE. (1942) The molecular weights of the Schardinger alpha and beta dextrins. J. Am. Chem. Soc, 64: 1651-1653.

7. French D. (1957) The Schardinger dextrins. Adv. Carbohyd. Chem, 12: 189-260.

8. Irie T, Uekama K. (1997) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. J Pharm Sci, 86: 147-62.

9. Rajewski RA, Stella VJ. (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. J. Pharm. Sci, 85(11): 1142-1169.

10. Loftsson T, Duchenne D. (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. Int. J. Pharm, 329(1-2): 1-11.

11. Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. (2005) Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. AAPS PharmSci, 6(2): E329-357.

12. Buschmann HJ, Schollmeyer E. (2002) Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. J. Cosmet. Sci, 53(3): 185-191.

13. Szejtli J, Szente L. (2005) Elimination of bitter tastes of drugs and foods by cyclodextrins. Eur. J. Pharm. Biopharm, 61: 115-125.

14. Sawicki R, Mercier L. (2006) Evaluation of mesoporous cyclodextrin-silica nanocomposites for removal of pesticides from aqueous media. Environ. Sci. Technol, 40(6): 1978-1983.

15. Cireli A, Yurdakul B. (2006) Application of cyclodextrin to the textile dyeing and washing processes. J Appl. Polym Sci, 100(1): 208-218.

16. Loftsson T, Hreinsdottir D, Masson M. (2005) Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. Int. J. Pharm, 302(1-2):18-28.

17. Uekama K. (2004) Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. Chem. Pharm. Bull, 52(8): 900-915.

18. Li S, Purdy WC. (1992) Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. Chem. Rev, 92: 1457-1470.

19. Semenova EM, Cooper E, Wilson CG, Converse CA. (2003) Stabilization of all-trans-retinol by cyclodextrins: a comparative study using HPLC and fluorescence spectroscopy. J. Incl. Phenom. Macro, 44(1-4): 155-158.

20. Easton CJ. (2006) Cyclodextrin-based catalysts and molecular reactors. Pure Appl. Chem, 77(11): 1865-1871.

21. Szejtli J. (1990) The cyclodextrins and their applications in biotechnology. Carbohyd. Polym, 12(4):375-392

22. Del Valle EM. (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochem, 39: 1033-1046.

23. Szejtli J. (2004) Past, present and future of cyclodextrin research. Pure Appl. Chem, 76 (10): 1825-1845.

24. Szejtli J, Osa T. Cyclodextrins. In: Lehn JM, Atwood JL, Davies JED, MacNicol DD, Vögtle F, Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3, Pergamon, Oxford 1996:1-

25. Szejtli J. (1998) Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. Chem. Rev, 98: 1743-1753.

26. Szejtli J. Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982: 162-169.

27. Sabadinib E, Cosgrovea T, Egídiob FC. (2006) Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H_2O and D_2O: a comparative study. Carbohyd. Res, 341(2): 270-274.

28. Miyazawa I, Ueda H, Nagase H, Endo T, Kobayashi S, Nagai T. (1995) Physicochemical properties and inclusion complex formaton of δ–cyclodextrin. Eur. J. Pharm. Sci, 3 (3):153-162.

29. Rahman K, Illias R, Hassan O, Mahmood NAN, Rashid NAA. (2006) Molecular cloning of a cyclodextrin glucanotransferase gene from alkalophilic Bacillus sp.

TS1-1 and characterization of the recombinant enzyme. Enzyme Microb. Tech, 39(1): 74-84.

30. Qi Q, Zimmermann W. (2005) Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. Appl. Microbiol. Biot, 66(5): 475-485.

31. Wadetwar Ri, Upadhye K, Bakhle S, Deshpande S, Nagulwar V. (2006) Production of β–cyclodextrin: effect of pH, time and additives. Ind. J. Pharm. Sci, 68(4): 520-523.

32. Szejtli J. (1990) Ciklodextrinek ipari előállítása. Magyar Kémikusok Lapja 45(3-4)

33. Szemán J, Csabai K, Kékesi K, Szente L, Varga G. (2006) Novel stationary phases for high-performance liquid chromatography analysis of cyclodextrin derivatives. J. Chromatogr. A, 1116: 76-82.

34. Liu L, Guo QX. (2002) The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. J. Incl. Phenom. Macro, 42: 1-14.

35. Charumanee S, Titwan A, Sirithunyalug J, Weiss-Greiler P, Wolschann P, Viernstein H, Okonogi S. (2006) Thermodynamics of the encapsulation by cyclodextrins. J Chem. Technol. Biot, 81(4): 523-529.

36. Gelb RI, Schwartz LM, Cardelino B, Fuhrman HS, Johnson RF, Laufer DA. (1981) Binding mechanisms in cyclohexaamylose complexes. J. Am. Chem. Soc, 103: 1750-1757.

37. Buvári-Barcza Á, Barcza L. (1996) Solubility characteristics of β–cyclodextrin inclusion complexes. J. Incl. Phenom. Macro, 26: 303-309.

38. Fenyvesi É, Vikmon M, Szemán J, Redenti E, Delcanale M, Ventura P,Szejtli J. (1999) Interaction of hydroxy acids with β-cyclodextrin. J. Incl. Phenom. Macro, 33:339-344.

39. Krois D, Brinker U. (1998) Induced cilcular dichroism and UV-Vis absorption spectroscopy of cyclodextrin inclusion complexes: structural elucidation of supramolecular azi-adamantane (spiro[adamantane2.3'diazirine]). J. Am. Chem. Soc, 120(45): 11627-11632.

40. Tárkányi G. (2002) Quantitative approach for the screening of cyclodextrins by nuclear magnetic resonance spectroscopy in support of chiral separations in liquid chromatography and capillary electrophoresis. Enantioseparation of norgestrel with α–, β– and γ–cyclodextrins. J. Chromatogr. A, 961: 257-276.

41. Szejtli J, Szente L, Banky E. (1979) Molecular encapsulation of volatile, easily oxidizable labile flavor substances by cyclodextrins. Acta Chim. Hung, 101(1-2): 27-46.

42. Matsui Y. Mochida K. (1979) Binding forces contributing to the association of cyclodextrin with alcohol in aqueosus solution. Bull. Chem. Soc. Jap, 52(10): 2808-2814.

43. Khomutov SM, Sidorov IA, Dovbnya DV, Donova MV. (2002) Estimation of cyclodextrin affinity to steroids. J. Pharm. Pharmacol, 54(5):617-622.

44. Fernandes CM, Carvalho RA, Costa SP, Veiga FJB. (2003) Multimodal molecular encapsulation of nicardipine hydrochloride by β−cyclodextrin, hydroxypropyl-β−cyclodextrin and triacetyl−β−cyclodextrin in solution. Sructural studies by ^{1}H-NMR and ROESY experiments. Eur. J. Pharm. Sci, 18: 285-296.

45. Boudeville P, Burgot JL, (1995) A new pH-metric methodology for the determination of thermodynamic inclusion constants of guest/cyclodextrin complexes. J. Pharm. Sci, 84(9): 1083-1089.

46. Taneri F, Guneri T, Aigner Z, Kata M, (2003) Influence of cyclodextrin complexation on the physicochemical and biopharmaceutical properties of ketoconazole. J. Incl. Phenom. Macro, 47(1-2): 15-23.

47. Stodeman M, Wadso I. (1995) Scope of microcalorimetry in the area of macrocyclic chemistry. Pure Appl. Chem, 67(7): 1059-68.

48. Plätzer M, Schwarz MA, Neubert RHH. (1999) Determination of formation constants of cyclodextrin inclusion complexes using affinity capillary electrophoresis. J. Macroc. Sep, 11: 215-222.

49. Gyimesi J, Szökő É, Magyar K, Barcza L. (1996) Determination of drug-cyclodextrin binding constants by capillary zone electrophoresis. J. Incl. Phenom. Macro, 25(1-3): 253-256.

50. Armstrong DW, Nome F, Spino LA, Golden TD. (1986) Efficient detection and evaluation of cyclodextrin multiple complex formation. J. Am. Chem. Soc, 108: 1418-1421.

51. Bersier PM, Bersier J, Klingert B. (1991) Electrochemistry of cyclodextrins and cyclodextrin inclusion complexes. Electroanal, 3: 443-455.

52. Buvári Á, Barcza L. (1989) The effect of hydrogen bonds on the inclusion complex formation of β−cyclodextrin. Acta Chim. Hung, 126: 455-462.

53. Connors KA, Lipari JM. (1976) Effect of cycloamyloses on apparent dissociation constants of carboxylic acids and phenols: equilibrium analytical selectivity induced by complex formation. J. Pharm. Sci, 65: 379-383.

54. Bergeron RJ, Channing MA, McGovern KA. (1978) Dependence of cycloamylose-substrate binding on charge. J. Am. Chem. Soc, 100(9): 2878-2883.

55. Buvári Á, Barcza L. (1988) Complex formation of phenol, aniline, and their nitro derivatives with β–cyclodextrin. J. Chem. Soc. Perk. T. 2, 116: 543-545.

56. Suzuki M, Ito K, Fushimi C, Kondo T. (1993) Application of freezing point depression to drug interaction studies. II. A study of cyclodextrin complex formation by a freezing point depression method. Chem. Pharm. Bull, 41(5):942-945.

57. Gelb RI, Schwartz LM. (1989) Complexation of carboxylic acids and anions by α– and β–cyclodextrin. J. Incl. Phenom. Macro, 7(4): 465-476.

58. Höfler T, Wenz G. (1996) Determination of binding energies between cyclodextrins and aromatic guest molecules by microcalorimetry. J. Incl. Phenom. Macro, 25(1-3): 81-84.

59. Gadre A, Connors KA. (1997) Binding of substituted acetic acids to α–cyclodextrin in aqueous solution. J. Pharm. Sci, 86(11):1210-1214.

60. Mikus FF, Hixon RM, Rundle RE. (1946) The complexes os fatty acids with amylose. J. Am. Chem. Soc, 68: 1115-1123.

61. Schoch, William. (1944) Adsorption of fatty acid by the linear component of corn starch. J. Am. Chem. Soc, 66: 1232- 1233.

62. Schlenk H, Sand DM. (1961) The association of α– and β–cyclodextrins with organic acids. J. Am. Chem. Soc, 83: 2312-2320.

63. Makedonopoulou stella, Mavridis I, Yannakopoulou K, Papaioannou J. Organization of long aliphatic monocarboxylic acids in β–cyclodextrin channels: crystal structures of the inclusion complexes of tridecanoic acid and (z)-tetradec-7-enoic acid in β–cyclodextrin. Chem. Commun, (19): 2133-2134.

64. Gomez-Orellana I, Hallen D, Stödeman M. (1994) Microcalorimetric titration of α–cyclodextrin with some straight-chain α,ω–dicarboxylates in aqueous solution at different temperatures. J. Chem. Soc. Faraday Trans, 90(22): 3397-3400.

65. Castronuovo G, Elia V, Fessas D, Giordano A, Velleca F. (1996) Thermodynamics of the interaction of cyclodextrins with aromatic and α,ω–amino acids in aqueous solutions: a calorimetric study at 25°. Carbohyd. Res, 272(1): 31-39.

66. Castronuovo G, Elia V, Velleca F, Viscardi G. (1997) Thermodynamics of interactions of α–cyclodextrin with α,ω–dicarboxylic acids in aqueous solutions. Thermochim. Acta, 292: 31-37.

67. Rekharsky MV, Mayhew MP, Goldberg RN, Ross PD, Yamashoji Y, Inoue Y. (1997) Thermodynamic and nuclear magnetic resonance study of the reactions of α–

and β–cyclodextrin with acids, aliphatic amines, and cyclic alcohols. J. Phys. Chem. B, 101(1): 87-100.

68. Rekharsky MV, Inoue Y. (2000) Supramolecular chirogenesis in bis(zinc porphyrin): an absolute configuration probe 1:1 and 1:2 complexation thermodynamics of γ–cyclodextrin with *n*-carbobenzyloxy aromatic amino acids and ω–phenylalkanoic acids. J. Am. Chem. Soc, 122: 10949-10955.

69. Keipert S, Fedder J, Böhm A, Hanke B. (1996) Interactions between cyclodextrins and pilocarpine - as an example of a hydrophylic drug. Int. J. Pharm, 142: 153-162.

70. Siefert B, Keipert S. (1997) Influence of alpha-cyclodextrin and hydroxyalkylated beta-cyclodextrin derivatives on the in vitro corneal uptake and permeation of aqueous pilocarpine-HCl solutions. J. Pharm. Sci, 86(6): 716-720.

71. Wang XM, Chen HY. (1995) Investigation of the β–cyclodextrin – quinine inclusion complex in aqueous solution by spectroscopic study. Spectrochim. Acta, 51A: 333-339.

72. Liu Y, Li L, Zhang HY, Fan Z, Guan XD. (2003) Selective binding of chiral molecules of cinchona alkaloid by β- and γ-cyclodextrins and organoselenium-bridged bis(β-cyclodextrin)s. Bioorg. Chem, 31: 11-23.

73. Liu Y, Yang YW, Zhang HY, Hu BW, Ding F, Li CJ. (2004) Diastereoisomer-selective inclusion complexation of cinchona alkaloids with a modified β–cyclodextrin: fluorescent behavior enhanced by chiral-theter bindng. Chem. Biodivers, 1: 481-488.

74. Liu Y, Chen GS, Chen Y, Ding F, Chen J. (2005) Cyclodextrins as carriers for cinchona alkaloids: a pH-responsive selective binding system. Org. Biomol. Chem, 3: 2519-2523.

75. Fan Z, Diao CH, Song HB, Jing ZL, Yu M, Chen X, Guo MJ. (2006) Encapsulation of quinine by β–cyclodextrin: Excellent model for mimicking enzyme-substrate interactions. J. Org. Chem, 71: 1244-1246.

76. Pap: Ventura CA, Puglisi G, Zappalá M, Mazzone G. (1998) A physico-chemical study on the interaction between papaverine and natural and modified β–cyclodextrins. Int. J. Pharm, 160: 163-172.

77. Kolthoff IM, Stenger VA. Volumetric analysis. Titration methods, Vol 2., Interscience, New York, 1947

78. Pharmacopoeia Hungarica V, Egészségügyi Kiadó, Budapest, 1954:123-411.

79. Pharmacopoeia Hungarica VI., Medicina, Budapest, 1967: 570-878

80. Schulek E, Kovács J. (1938) Acta Pharm. Hung, 14: 646.

81. Šafarik L, Stánsky Z. Titrimetric analysis in organic solvents, in: C.L. Wilson, D.W:Wilson (Eds), Comprehensive analytical chemistry. Vol. XXII. Elsevier, Amsterdam-London-New York, 1986

82. Kolthoff IM, William A. (1934) The dissociation of some inorganic acids, bases and salts in glacial acetic acid as solvent. J. Am. Chem. Soc, 66:1007-1013.

83. Pifer CW, Wollish EG. (1952) Anal. Chem, 24: 300-306.

84. Miller JHMcB (1989) Determination of halide acid salts of organic bases and quaternary ammonium compounds by titration. J. Pharm. Biomed. Anal, 7(6):771-775.

85. Buvári-Barcza Á, Tóth I, Barcza L. (2005) Anhydrous formic acid and acetic anhydride as solvent or additive in non-aqueous titrations. Pharmazie, 60(9):650-656.

86. Barcza L, Buvari-Barcza Á. (2002) A nemvizes közegű reakciók elvi háttere az analitikai kémia szemszögéből. Acta Pharm. Hung, 72: 176-184.

87. Pharmacopoeia Hungarica VII., Medicina, Budapest, 1986

88. Japanese Pharmacopoeia XIV, English Version, The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, 2001 160-728.

89. United States Pharmacopoeia. 17th Ed. Revision, New York, 1965

90. United States Pharmacopoeia. 23th United States Pharmacopeial Convention, Inc., Ed. Rockville (MD), 1995

91. European Pharmacopoeia 4th Ed. Strasbourg: Council of Europe, 2002

92. Pharmacopoeia Hungarica VIII., Medicina, Budapest, 2004: 1613-2292.

93. Kőszegi-Szalai H, Ráfli-Romvári Zs, Paál T, Török I. (2000) Sources of errors in the Ph. Eur. Assay of halide salts of organic bases by titration with alkali. Acta Pharm. Hung, 70: 203-210.

94. Takács-Novák K, Völgyi G. (2004) Alkalimetry in alcohol-water mixtures with potentiometric end-point detection. Critical remarks on a newer method of European Pharmacopoeia. Anal. Chim. Acta, 507: 275-280.

95. Bye R. (2002) Sci. Pharm, 70:129

96. Buvári Á, Barcza L. (1982) The 1:1 and 1:2 complex formation between β−cyclodextrin and benzoic acid. Acta Chim. Hung, 110: 51-57.

97. Buvári-Barcza Á, Csámpai A, Barcza L. (2002) Ternary beta-cyclodextrin complexes as models of allosteric effects, J. Incl. Phenom. Macro, 42:209-212.

98. Aversa A, Etter W,. Gelb RI, Schwartz LM. (1990) Complexation of aliphatic dicarboxylic acids and anions by alpha-cyclodextrin J. Incl. Phenom. Macro, 9: 277-285.

99. Brukner Gy. Szerves kémia. Kiadó, Budapest, 1976: 622-645.

100. Lide DR. CRC Handbook of chemistry and physics. CRC Press, London, 1992

101. Furka Á. Szerves kémia. Tankönyvkiadó, Budapest, 1991: 671-673.

102. Szász Gy, Takács M, Végh A. Gyógyszerészi kémia. Medicina, Budapest, 1990: 603-1082.

103. Szász Gy, Takács-Novák K. (2003) A vegetatív idegrendszerre ható szerek gyógyszerészi kémiája II. Kolinerg gyógyszerek (paraszimpatomimetikumok és paraszimpatolitikumok). Gyógyszerészet, 47: 703-714.

104. Hoyng PF, Beek LM. (2000) Pharmacological therapy for glaucoma: a review. Drugs, 59(3): 411-434.

105. Anselmi E, Fayos G, Blasco R, Candenas L, Cortes D, D'Ocon P. (1992) Selective inhibition of calcium entry induced by benzylisoquinolines in rat smooth muscle. J Pharm Pharmacol, 44: 337-343.

106. Kraus C, Shaaya A, Ulmer J, Hutchings D, Menon A, Sakr A, Ritschel WA. (1991) Pharmacokinetics and bioavailability of papaverine hydrochloride following intravenous, peroral, rectal, vaginal, topical and buccal administration in Beagle dogs. Biopharm. Drug Dispos, 12(7): 537-46.

107. Bakó Gy. Farmakoterápia. Medicina, Budapest, 2003: 429.

108. MSD Orvosi Kézikönyv. Melania, Budapest, 1999: 511-514.

109. Szász Gy, Takács-Novák K. (2003) A major analgetikumok gyógyszerészi kémiája. Act. Pharm. Hung, 75: 147-159.

110. Chung KF. (2002) Cough: potential pharmacological developments. Expert. Opin. Inv. Drug, (7): 955-963.

111. Sindrup SH, B K. (1995) The pharmacogenetics of codeine hypoalgesia. Pharmacogenetics, 5(6): 335-346.

112. Kremsner PG, Krishna S. (2004) Lancet, 364(9430): 285-294.

113. Whitty CJM, Rowland M, Sanderson F, Mutabingwa TM. (2002) Malaria; clinical review. Brit. Med. J, 325: 1221-1224.

114. Mirghani RA, Hellgren U, Bertilsson L, Gustafsson LL, Ericsson O. (2003) Metabolism and elimination of quinine in healthy volunteers. Eur. J. Clin. Pharmacol, 59(5-6): 423-427.

115. Taylor WRJ, White NJ. (2004) Antimalarial drug toxicity. A review. Drug safety, 27(1): 25-61.

116. Vizi E. Sz, Szabó B. A vegetatív idegrendszer gyógyszertana. In: Vizi E. Sz, Humán farmakológia. Medicina, Budapest, 2002:436-454.

117. Fürst Zsuzsanna, Gyógyszertan. Medicina, Budapest, 1999

118. Szente L, Szejtli J, Kis GL. (1998) Spontaneous opalescence of aqueous γ-cyclodextrin solutions: Complex formation or self-aggregation? J. Pharm. Sci, 87: 778-781.

119. Til HP, Bär A. (1998) Subchronic (13 week) oral toxicity study of γ–cyclodextrin in dogs. Regul. Toxycol. Pharm, 27: 159-165.

120. Takeo K, Mitoh H, Uemura K. (1989) Selective chemical modification of cyclomalto-oligosaccharides via tert-butylmethylsilylation. Carbohyd. Res, 187: 203-221.

121. Irie T, Fukunaga K, Pitha J. (1989) Alkylation of cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins) with dialkyl sulfate-barium hydroxide: heterogeneity of products and the marked effect of the size of the macocycle. Carbohyd. Res, 192: 167-172.

122. Beck M. Komplex egyensúlyok kémiája. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1965

123. Sanchez AM, Rossi R. (1996) Effect of β–cyclodextrin on the thermal cis-trans isomerization of azobenzenes. J. Org. Chem, 61: 3446-3451.

124. Matsui Y, Mochida K. (1978) The microenviromental effect of cyclodextrin on the acid dissociation of some azo dyes in aqueous solutions. Bull. Chem. Soc. Jpn, 51(3): 673-676.

125. Buvári-Barcza Á, Barcza L. (1998) The interaction between phenolphtalein and 2-hydroxypropyl–β–cyclodextrin: on the determination of the formation constants of cyclodextrin inclusion complexes. Anales Quim. Int. Ed, 94: 98-100.

126. Taguchi K. (1986) Transient binding mode of phenolphtalein–β–cyclodextrin complex: An example of induced geometrical distortion. J. Am. Chem. Soc, 108: 2705-2709.

127. Frijlink HW, Visser J, Drenth BFH. (1987) Determination of cyclodextrins in biological fluids by high-performance liquid chromatography with negative colorimetric detection using post-column complexation with phenolphthalein. J. Chromatogr, 415(2): 325-333.

128. Takeushi T, Murayama M, Ishii D. (1990) Indirect detection of cyclodextrins in micro-HPLC. J. Chromatogr, 13(1): 69-70.

129. Park, Cheon Seok; Park, Kwan Hwa; Kim, Seung Ho (1989) A rapid screening method for alkaline β–cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein-methyl orange-containing-solid medium. Agr. Biol. Chem, 53(4): 1167-1169.

130. Lejeune A, Sakaguchi K, Imanaka T. (1989) A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose (α–cyclodextrin) glucanotransferase. Anal. Biochem, 181(1): 6-11.

131. Buvári Á, Barcza L, Kajtár M. (1988) Complex formation of phenolphtalein and some related compounds with β–cyclodextrin. J. Chem. Soc. Perk. T. 2, 1687-1690.

132. Barcza L, Szejtli L, Buvári Á. (1980) Spectrophotometric determination of stability constants of cyclodextrin complexes. Ann. Univ. Sci. Eötvös, Sec. Chim, 16: 11-18.

133. Buvári Á, Barcza L. (1989) Colour change and tautomerism of some azo-indicators on complex formation with cyclodextrins. J. Incl. Phenom. Macro, 7: 313-320.

134. Szejtli J, Budai Zs, Kajtár M. (1978) Cyclodextrin Dye inclusion compounds. Magyar Kém. Foly. 84(2): 68-78.

135. Zarzycki PK, Lamparczyk K. (1998) The equilibrium constant of β–cyclodextrin-phenolphtalein complex; influence of temperature and tetrahydrofuran addition. J. Pharm. Biomed. Anal, 18: 165-170.

136. Ribeiro L, Carvalho RA, Ferreira DC, Veiga FJB. (2005) Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. Eur. J. Pharm. Sci, 24: 1-13.

137. E.P. Serjeant, and B. Dempsey: Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution (Iupac Chemical Data Series 23) Pergamon Press, Oxford (1979)

138. Wong AB, Lin SF, Connors KA. (1983) Stability constants for complex formation between α–cyclodextrin and some amines. J. Pharm. Sci, 72: 388-390.

139. Perrin DD. Dissociation constants of organic bases in aqueous solution. IUPAC, London, 1965