

Pécsi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Általános és Fizikai Kémia Tanszék

Citrinin-ciklodextrin kölcsönhatások fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálata

Derdák Diána

Kémia BSc

Témavezető:
Dr. Peles-Lemli Beáta
egyetemi adjunktus



Pécs

2014

Tartalomjegyzék

Bevezetés	2
I. Irodalmi áttekintés.....	3
I.1 Citrinin általános jellemzése.....	3
I.2 Ciklodextrinek általános jellemzése	5
I.3 Jelen vizsgálatok előzményei	8
I.3.1 Gazda-vendég kölcsönhatások tanulmányozása	8
I.3.2 A citrinin – β -ciklodextrin kölcsönhatás.....	8
I.3.3 Mikotoxinok kölcsönhatásainak fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatai	9
II. Célkitűzés	11
III. Vizsgálati anyagok és módszerek	12
III.1 A vizsgált mikotoxin – ciklodextrin komplexek.....	12
III.2 Oldatkészítés.....	12
III.3 Kísérletes módszerek	13
III.3.1 Fluorimetriás mérések.....	13
III. 3.2 A komplexképződés meghatározása fluorimetriásan.....	14
III.4 Elméleti kémiai számítások	15
IV. Eredmények.....	17
IV. 1 Elővizsgálatok a megfelelő mérési körülmények beállításához	17
IV.1.1 Citrinin emissziós spektrumai a gerjesztési hullámhossz valamint a koncentráció függvényében	17
IV.1.2 A puffer kiválasztása.....	18
IV.2 A citrinin fluoreszcencia intenzitása ciklodextrinek jelenlétében	20
IV.3 A citrinin – ciklodextrin komplexek stabilitási állandói.....	22
IV.4 A citrinin-ciklodextrin komplexképződést kísérő termodinamikai paraméterek.....	24
IV.5 A kísérleti eredmények molekuláris szintű magyarázata elméleti kémiai módszerekkel	27
Összefoglalás.....	30
Irodalomjegyzék.....	31
Köszönetnyilvánítás	35

Bevezetés

A mikotoxin elnevezés a görög mykes = gomba és a latin toxikum = mérge szóból ered. A gombák által termelt mérgeanyagoknak látszólag nincs szerepük a gomba metabolizmusában, mégis potenciális veszélyforrást jelentenek a növényekre és állatokra, továbbá a táplálékláncba bejutva az emberre is. Elsősorban az állati takarmányban találhatók meg nagy mennyiségben. A különböző gabonafélékben, az aratási időszak előtt, illetve azt követően termelődnek. A termények feldolgozása, tárolása és az etetés körülményei is kedvezőek lehetnek szaporodásuknak, mely komoly gazdasági veszteséget okozhat. Statisztikai adatok alátámasztották, hogy az alapvető élelmiszerek 25-50 %-a - melyet világszerte termelnek - fertőzöttek valamilyen mikotoxin által. Biológiai hatásuk rendkívül szerteágazó; elsősorban vese-, idegrendszer- és májkárosító sajátságuk kiemelkedő, valamint egyes származékok karcinogén tulajdonsággal is rendelkeznek.

A mikotoxinok kimutatására alkalmas módszerek fejlesztése napjainkban nagy jelentőségű. Ezen törekvések egy része olyan kölcsönhatások tanulmányozására irányul, melyben általában olyan vegyületeket használnak, amelyek a kimutatandó mikotoxinokkal gyenge kölcsönhatásba lépnek, komplexet alkotnak és ennek eredményeképpen valamely jól mérhető fizikai-kémiai tulajdonságuk megváltozik. Az egyik ilyen eredményesen alkalmazott vegyületcsoport a ciklodextrinek, melyek számos mikotoxinnal, mint például az Ochratoxin A-val, zearalenonnal vagy éppen a citrininnel is komplexet alkotnak és a komplexképződés során erősítik a mikotoxin természetes fluoreszcenciáját. A környezeti, élelmiszer vagy takarmányminták esetében az egyik legnehezebb, ugyanakkor legfontosabb feladat a mikotoxinok szelektív kimutatása mellett a minták toxinmentesítése. Ehhez kapcsolódóan munkánk során mikotoxinok nagy érzékenységgű szelektív kimutatása valamint a toxinmentesítési eljárások fejlesztése céljából tanulmányoztuk e vegyületeknek, mint vendégmolekuláknak ciklodextrinnek mint gazdamolekulákkal létrejövő kölcsönhatását, annak fizikai-kémiai hátterét. Jelen munkánkban öt β -ciklodextrin származék citrininnel alkotott komplexének stabilitását tanulmányoztuk valamint meghatároztuk a komplexképződést kísérő termodinamikai paramétereket. A molekuláris szintű értelmezés céljából méréseinkhez elméleti kémiai számításokat végeztünk.

I. Irodalmi áttekintés

A mikotoxinok különböző fonalas gombák anyagcsere-folyamatainak káros hatású melléktermékei. Szerkezeti és kémiai tulajdonságukat tekintve is különbözőek. Egyes képviselőik között előfordulnak egyszerű, heterociklusos gyűrűből álló molekulák, melyeknek molekulatömege elérheti akár az 50 Da-t, ugyanakkor léteznek 6-8 szabálytalan elrendeződésű, heterociklusos gyűrűket tartalmazó, és 500 Da molekulatömeggel rendelkező vegyületek is.¹

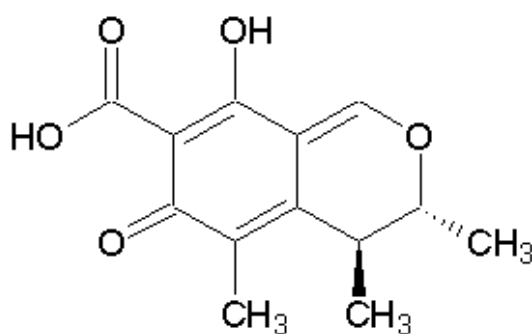
A mikotoxinok egyik csoportját alkotják, az Aflatoxinok, melyeket széleskörűen tanulmányoznak.² Jellemző tulajdonságuk, hogy képesek a sejtek örökítő anyagához hozzákötődni, ezáltal befolyásolva a fehérjeszintézist. Hasonló sajátsággal rendelkezik az Ochratoxinok családjához tartozó Ochratoxin A, melynek szerkezete a fenilalaninhoz hasonló, s ez lehetőséget ad arra, hogy gátolja a sejtek életfolyamatait irányító enzimek működését.^{3,4} A Fusarium gombafajok által termelt mikotoxinoknak több alcsoportja ismert. Ide sorolhatók a Fumonizinek, a Zearalenone és a Trichotecének. Mindhárom toxin nagy hőstabilitást mutat, amellet, hogy enzim inhibítorként jelentős szerepet játszanak a sejtek degradációjában.^{1,5}

I.1 Citrinin általános jellemzése

Az általunk vizsgált mikotoxin a citrinin, melyet először *Penicillium citrinum*,⁶ majd *Aspergillus*⁷ és *Monascus*⁸ fonalas gombákból izoláltak. Figyelembe véve antibakteriális tulajdonságát, kezdetben antibiotikumként tartották számon,⁹ majd később megállapították, hogy az állatokban idegméregként viselkedik,¹⁰ továbbá vese- és krónikus májkárosodást eredményező hatását is igazolták.^{11,12} Közvetett és közvetlen úton történő szervezetbe jutásának megelőzése ezért kiemelt fontosságú. A citrinin elsősorban gabonában található meg, de előfordul különböző gyümölcsökben, húspan és sajtonban is. Korábbi munkák során megfigyelték hő tűrő képességét, mely nehezíti a mérgező sajátságának csökkentésére irányuló eljárások fejlesztését. Kis mennyiségű víz jelenlétében melegítve ugyanakkor már 130 °C-on jelentős csökkenés figyelhető meg a citrinin toxikusságát illetően.¹³

A toxinmentesítési eljárások mellett természetesen számos munka fókuszál a citrinin kimutatására is. Mikotoxinok analizálására a legelterjedtebben a különböző kromatográfiás módszereket használják még ma is,^{14,15} de már az 1980-as és 1990-es években is számos tanulmány született ezen a területen.^{16,17} Kedvelt elválasztás technikai módszer volt a vékonyréteg-kromatográfia, mely gyors, költséghatékony eljárásnak számított a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztás (HPLC) térhódítását megelőzően.

Lehetőséget nyújtott a citrinin minőségi és mennyiségi meghatározására egyaránt, ugyanakkor korábbi munkákban beszámoltak arról, hogy 10-50 ng/g tartományban már kis érzékenységgel rendelkezik.^{18,19,20} Az utóbbi évtizedekben mikotoxinok ételekből és különböző gombafajokból történő kimutatására már HPLC technikát alkalmaznak, mely elválasztás-technikai módszert elsősorban tömegspektrometriás (HPLC-MS)²¹ vagy fluoreszcenciás (HPLC-FLD)²² detektálással kombinálva használják. Ez utóbbi esetben lehetőség nyílik a citrinin mennyiségi meghatározására ng/g koncentrációtartományban.



1. ábra A citrinin szerkezeti képlete. IUPAC-név: (3*R*,4*S*)-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-4,6-dihidro-3*H*-izokromén-7-karbonsav

A citrinin konjugált, planáris szerkezete természetes fluoreszcenciás sajátságot kölcsönöz számára, mely savas környezetben tovább erősíthető (1. ábra). A citrinin kelátképző tulajdonsággal is rendelkezik, két lehetséges tautomere az *orto*-, illetve a *para*-kinon forma. Kristályos állapotban szerkezete rendezetlen, viszont a két izomer azonos mennyiségben van jelen. Ez az 1:1 arány a toxin oldatba vitelével felborul, és döntően az *orto*-kinon kerül túlsúlyba. A reakciómechanizmus felderítése során megállapították, hogy az átalakulás a Michael-féle nukleofil addíció alapján játszódik le. A folyamat reverzibilis, és az izomerek aránya az oldószerrel, illetve a hőmérséklettel is befolyásolható. Valószínűsíthető továbbá, hogy az előzőekben említett antibakterális sajátsága és a szerkezete között kapcsolat áll fenn.^{23,24}

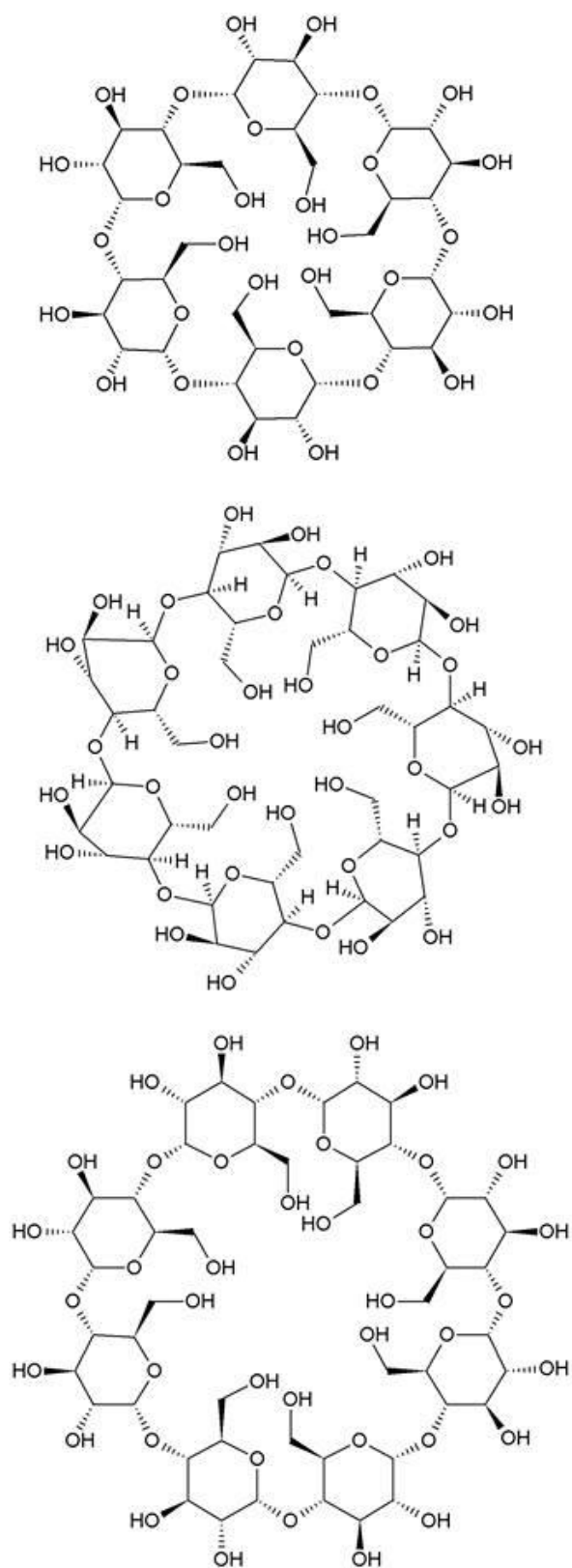
Korábbi tanulmányban vizsgálták a citrinin komplexképző sajátságát réz(II)-ionokkal.²⁵ Ennek kapcsán megállapították, hogy a citrinin a fémionnal 1:1, illetve 1:2 komplexet alkot, ahol – a korábbi tapasztalatokat kísérletekkel alátámasztva – az *orto*-kinon formája dominál. Kutatócsoportunk is tanulmányozta már korábban ezt a mikotoxint, a citrinin glutationnal való kölcsönhatás tanulmányozásával foglalkoztak fluoreszcencia spektroszkópiás módszerek segítségével.²⁶ Az eredményeik szerint a gyenge kölcsönhatás

háttérben a vizsgált molekulák közötti hidrogén-, illetve kénhidrogén kötések kialakulása áll, mely szerepet játszik a citrinin akut toxicitásában, továbbá a sejtekben lévő ionháztartás egyensúlyát felborítva, azok halálát okozhatják.

I.2 Ciklodextrinek általános jellemzése

A ciklodextrinek nagy népszerűségnek örvendenek a különböző iparágak területén, mint például kozmetikai-, élelmiszer- és gyógyszeripar, de alkalmazzák például elválasztástechnikai eljárások során is. Mindez elsősorban kedvező szerkezeti és komplexképző sajátágaiknak köszönhető. Az első ciklodextrinek megjelenése az 1890-es évek végére tehető, amikor egy francia tudós, Villers izolálta emészthető keményítőből.²⁷ Ezt követően Schradinger adott pontos leírást két kristályos vegyületről, az α - és β -ciklodextrinről, melyeket burgonyakeményítőből szintetizált.²⁸ A γ -származék előállítása pedig Freudberg és Jacobi nevéhez fűződik.²⁹ A magyarországi ciklodextrin kutatás úttörője Szejtli József volt, aki éveken át tartó CD-ekkel végzett kutatómunkája után, 1989-ben megalapította a Cyclolab Kft.-t.³⁰

A szakirodalomban több mint, 1500 különböző ciklodextrinről olvashatunk, a legjelentősebbek azonban az előbb említett α -, β - és γ -ciklodextrinek (2. ábra), melyek 6, 7 illetve 8 glükopiranoz egységből felépülő oligoszacharidok. A szék konformációjú cukoregységeket α -1,4 glikozidkötések kötik össze egy körív mentén ismétlődve. Ennek köszönhetően a molekula egy belső üreggel rendelkező csonka kúphoz hasonlít. A perem szélesebb részén találhatók az elsődleges-, míg a szűkebb részen a másodlagos hidroxil-csoportok, így a ciklodextrinek külső fele hidrofil, míg a belső üreg lipofil sajátágú. Ez a felépítés lehetőséget nyújt lipofil molekulák, vagy molekularészek befogadására.



2. ábra Az α -, β - és γ - ciklodextrinek szerkezeti képlete

Gyakori alkalmazásuk hátterében jó komplexképző hajlamuk áll, melyek ún. 'host-guest' vagy 'gazda-vendég' kölcsönhatásokon alapulnak. Ezen folyamatok lejátszódásán keresztül képesek módosítani, vagy akár teljesen megváltoztatni a üregbe beülő gazdamolekula tulajdonságait. Szejtli és munkatársai már 1998-ban megjelent munkájukban összefoglalták a ciklodextrinek lehetséges felhasználásait.³⁰ Eszerint mezőgazdasági térhódításuk mögött az áll, hogy komplexet képeznek a különböző növényvédő-, rovarirtó szerekkel, feromonokkal, és növekedést segítő hatóanyagokkal. Kromatográfiás elválasztásoknál oszlopkomponensként történő alkalmazását is leírták már az említett munkában, melynek során az izomerek és enantiomerek elválasztására, vagy a mérgező komponensek koncentrációjának csökkentésére használják ezen vegyületeket. Élelmiszeriparban való megjelenésük több okból is adódhat. A ciklodextrinek, mintegy kapszulaként viselkedve képesek megkötni az illat-, és ízanyagokat, megtartani az ételek vitamintartalmát, és megóvni azokat a fény-, és egyéb módosító hatásoktól.^{31,32,33} A β -ciklodextrin feldolgozási segédanyagként való felhasználásának kulcsszerepe van a koleszterin tartalom csökkentésében tejtermékekben.^{30,34} További egyedi sajátossága még, hogy segíti a gyógyszerek sejtmembránon való átjutását úgy, hogy először a lipid kettős réteghez szállítja a hatóanyagot. Mivel a β -ciklodextrin mérete, és hidrofíl külső szerkezete miatt nem tud áthatolni a sejt falon, ezért az extracelluláris térben marad vizes fázisban, míg a szállított gyógyszer hatóanyag átlép az intracelluláris térbe.³¹

A ciklodextrinek irányába mutató egyre nagyobb érdeklődés nem utolsó sorban annak is köszönhető, hogy könnyen hozzáférhetőek és viszonylag olcsók. A natív ciklodextrinek kémiaiailag módosított származékai ma már ugyancsak elérhetőek, bár azok sokszor sajnos elég drágák az alapszármazékokhoz képest. A hidroxil csoportok különböző szubsztituensekkel való helyettesítése azonban befolyással van a molekula kémiai és fizikai tulajdonságaira. Módosításuk, például akár hidrofób metoxi csoporttal meglepő módon növeli az oldhatóságukat vizes közegben. A β -ciklodextrin esetében ez a folyamat a hidroxil csoportok háromnegyedének metil csoportokra történő lecserélése után megáll, és további módosítás utána szolubilitása újra lecsökken.³⁵ A kémiaiailag módosított ciklodextrinek oldhatóságában szerepet játszik, hogy hány funkciós csoportot kapcsolunk a hidroxil csoportok helyébe, és ez kapcsolatba hozható azzal, hogy a teljes helyettesítéssel lecsökken a lehetséges izomerek száma. Bár manapság nagy mennyiségben zajlik szintetizálásuk, illetve a szakirodalom is egyre többet foglalkozik velük,^{36,37} potenciális gyógyszeripari felhasználásuknak gátat szab, hogy a toxikológiai vizsgálatok rendkívül költségesek. További nehézséget okoz, hogy

ameddig az új módosulatok nem mutatkoznak előnyösebbnek a korábban alkalmazottaknál, az újonnan kifejlesztett ciklodextrinek elterjedése nem valószínű.

I.3 Jelen vizsgálatok előzményei

I.3.1 Gazda-vendég kölcsönhatások tanulmányozása

A π -elektron-rendszereket tartalmazó molekulák között létrejövő kölcsönhatások közismerten fontos szerepet játszanak a biológiai folyamatokban, valamint a kémia számos területén. A kalixarének kosár alakú befogadó molekulák, melyek például a gyógyszerkémiában molekuláris csomagolóanyagként, a környezeti kémia területén pedig érzékeny detektorként játszhatnak fontos szerepet.

Témavezetőm és munkatársai a kalixarének vizsgálataihoz kapcsolódóan kalixarén-származékok aromás semleges molekulákkal alkotott komplexeit részleteiben tanulmányozták. A gazda-vendég kölcsönhatásokat meghatározó molekuláris háttérfolyamatok tanulmányozására irányuló munkájuk során felderítették a komplexképzési hajlam részletes termodinamikai hátterét, vagyis a komplexképződést kísérő szabadentalpia-, entalpia- és entrópiaváltozások nagyságát, és e változások okát.^{38,39} Kalixarén molekulák molekuláris csomagolóanyagként történő gyakorlati felhasználhatósága céljából molekuláris szinten vizsgálták továbbá a komplexképződési, valamint disszociációs folyamatokat.^{40,41}

Ezen korábbi gazda-vendég típusú kölcsönhatások komplexképződési és disszociációs folyamatainak termodinamikai és kinetikai szempontból történő vizsgálatai során nyert tapasztalatok eredményesen felhasználhatóak a mikotoxin – ciklodextrin kölcsönhatás tanulmányozása során is.

I.3.2 A citrinin – β -ciklodextrin kölcsönhatás

Habár a szakirodalomban számos munka foglalkozik a mikotoxin – ciklodextrin kölcsönhatások vizsgálatával,^{42,43} csupán egyetlen olyan közleményt találtunk, melyben a citrinin és β -ciklodextrin között lejátszódó komplexképződés kémiai hátterét kutatták.⁴⁴ Zhou és munkatársai ezen munkájukban részletekbe menően bemutatják, hogy milyen hatással van a kialakuló kölcsönhatásra a mikrokörnyezet megválasztása. Ennek során különböző típusú és pH-jú puffer oldatokat alkalmaztak, illetve megfigyelték, hogy hogyan változik a citrinin emissziós spektruma emelkedő ciklodextrin-koncentráció mellett. Eredményeik azt mutatták, hogy az oldószer pH-ja és a mikotoxin fluoreszcencia jelének intenzitása szoros kapcsolatban állnak egymással, azaz a puffer pH-értékének csökkentése a fluoreszcencia intenzitás

növekedését vonja maga után. Megállapították továbbá, hogy mivel a β -ciklodextrin lipofil ürege megfelelő mikrokörnyezet biztosít a citrinin számára, a kölcsönhatás kialakul, sőt a komplex fluoreszcencia intenzitása és a tiszta mikotoxiné között akár egy nagyságrendbeli különbség is elérhető.

Igaz ugyan, hogy ezen publikáció alapján előzőekben ismertetett eredmények átfogó képet adtak a citrinin – β -ciklodextrin között létrejövő kölcsönhatás kémiai hátteréről, azonban a komplexképződés mélyebb szintű megértéséhez nélkülözhetetlen a folyamat fizikai-kémiai alapjainak felderítése. Ebben kiemelt szerephez jut a komplexstabilitás, a citrinin – ciklodextrin kölcsönhatás hőmérsékletfüggésének vizsgálata, illetve elemzése. Továbbá felmerül a kérdés, hogy a natív β -ciklodextrinhez képest a citrinin hogyan viselkedik egyéb kémiaailag módosított származékokkal, melyeknek a mikotoxin – ciklodextrin kölcsönhatásra gyakorolt lehetséges előnyeiről számos tanulmányban olvashatunk,^{45,46} mégis citrininnel való kölcsönhatásukat még senki nem vizsgálta.

I.3.3 Mikotoxinok kölcsönhatásainak fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatai

Témavezetőm és munkatársai, korábbi mikotoxinokhoz kapcsolódó kutatómunkájuk során az Ochratoxin A-t részletesen vizsgálták, mely vegyület a citrininhez hasonlóan szintén idegrendszeret károsító mikotoxin.

Mivel az Ochratoxin A (OTA) toxikokinetikájában, és mérgező hatásának kifejtésében kulcsszerepe van a mikotoxin albuminhoz való nagyfokú kötődésének, ezért munkájuk során olyan gyógyszerek azonosításához járultak hozzá, amelyek kölcsönhatása albuminnal erősebb, mint OTA-val.^{47,48} Igaz, hogy az OTA – fehérje kölcsönhatások meghatározóak a toxin hatásmechanizmusában, ugyanakkor a szervezetben jelenlévő ionokkal kialakított kölcsönhatásokon keresztül az ionháztartás egyensúlyának felborítása komoly egészségügyi kockázatokkal jár. Tanszékünkön ezen mikotoxin különböző alkáli-, és alkáliföldfémekkel kialakuló kölcsönhatását vizsgálták, melyek közül az alkáliföldfémek esetében tapasztalták a legjelentősebb intenzitásnövekedést.⁴⁹ Termodinamikai számításaiak alátámasztották továbbá, hogy a folyamat entrópia vezérelt, és hogy a szervezetben nem kötött állapotban az OTA Mg-komplexek formájában van jelen döntő mennyiségben, valamint eredményeik hozzájárultak új, nagyérzékenységű műszeres analitikai eljárások kifejlesztéséhez is.⁵⁰

Az OTA káros hatásának visszaszorítása érdekében, korábbi közleményekben foglaltakra támaszkodva vizsgálták ezen mikotoxin és egy kémiaailag módosított származék, a

kvaterner ammónium béta-ciklodextrinek kölcsönhatását is. Az OTA – kvaterner ammónium béta-ciklodextrin esetében jóval stabilabb komplexet találtak, mint a korábban publikált OTA – β -ciklodextrin komplexképződés esetében.⁵¹ Ezen eredmények rámutattak más mikotoxinok és módosított β -ciklodextrinek között lejátszódó komplexképződés vizsgálatának fontosságára.

II. Célkitűzés

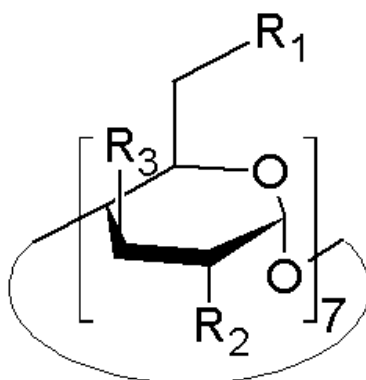
A mikotoxinok káros hatásukat az élet szinte minden területén kifejtik. Ennek teljes megszüntetése nem áll módunkban. Manapság egyre több detoxifikációs stratégiát alkalmaznak, melynek kapcsán a ciklodextrinek megjelenése és potenciális mikotoxint befogadó vendégmolekulaként történő felhasználása további lehetséges alternatív módszerek alapját képezhetik. Kutatócsoportunk korábbi mikotoxin – ciklodextrin kölcsönhatások tanulmányozásához kapcsolódó eredményei felvetik a mikotoxinok és ciklodextrin származékok között lejátszódó komplexképződés tanulmányozásának szükségességét.

Témavezetőm és munkatársai korábbi gazda-vendég típusú kölcsönhatásokra és mikotoxinok molekuláris kölcsönhatásaira vonatkozó, az előzőekben ismertetett eredményei alapján jelen munkánkban a célunk a citrinin – β -ciklodextrin gazda-vendég típusú kölcsönhatásának részletes tanulmányozása optikai spektroszkópai módszerekkel. Habár a kölcsönhatást az alapszármazék esetében már leírták, de a komplexképződését kísérő folyamatokat részleteiben még nem tanulmányozták, ezért a fizikai-kémiai háttér leírásához további vizsgálatok szükségesek. A natív β -ciklodextrin hidroxilcsoportjait egyéb funkciós csoportokkal helyettesítve megváltoznak az alapvegyület fizikai és kémiai tulajdonságai. Ezért további célul tűztük ki olyan kémiaiilag módosított β -ciklodextrinek azonosítását, melyek nagyobb stabilitású komplexet képeznek a citrininnel és/vagy jelentős mértékben fokozzák annak fluoreszcenciáját. Továbbá a citrinin – β -ciklodextrin kölcsönhatás molekuláris folyamatainak leírásához a komplexképződési hajlam részletes termodinamikai háttérének tanulmányozására irányuló vizsgálatainkkal valamint elméleti kémiai számításokkal kívánunk hozzájárulni.

III. Vizsgálati anyagok és módszerek

III.1 A vizsgált mikotoxin – ciklodextrin komplexek

Munkánk során a mikotoxinok közül tehát a citrinint (CIT) tanulmányoztuk. 5 mM-os etanolban oldott oldatát a Sigma Aldrichtól vásároltuk. A citrinin – ciklodextrin kölcsönhatás vizsgálatához a különböző ciklodextrineket (CD) a Cyclolab Ciklodextrin Kutató-fejlesztő Laboratórium^a bocsátotta ingyenesen rendelkezésünkre. A vizsgálataink során a β -, a (2-hidroxi-propil)- β -, a heptakis(2,6-di-O-metil)- β -, a random metil- β - valamint a szulfobutilált β -ciklodextrineket tanulmányoztuk (3. ábra).



3. ábra Az általunk tanulmányozott ciklodextrinek:

BCD: $R_1, R_2, R_3 = OH$; **DIMEB**: $R_1, R_2 = OCH_3, R_3 = OH$; **RAMEB**: $R_1, R_2, R_3 = OR, R = H, CH_3$

HPBCD: $R_1, R_2, R_3 = OR, R = CH_2CH(OH)CH_3$;

SBCD: $R_1, R_2, R_3 = OR, R = H, CH_2CH_2CH_2CH_2SO_3Na$

III.2 Oldatkészítés

A CIT 5mM-os etanolos törzsoldatát a mérés során alkalmazott oldószerrel két lépésben hígítottuk úgy, hogy először egy 100 μ M-os, majd végül 2 μ M-os törzsoldatot kaptunk. A mérésekhez felhasznált CD törzsoldatok pedig 20 mM-osak voltak. A citrinin – ciklodextrin kölcsönhatás tanulmányozásához olyan oldatsorozatot készítettünk, melyben a citrinin koncentrációja állandó 1 μ M, míg a ciklodextrin koncentrációja 0-10 mM között változott. Tizenegy különböző mintát állítottunk össze az I. táblázatban összefoglaltaknak megfelelően. A táblázatból látszik, hogy anyagtakarékosan dolgoztunk és így a mintakészítésnél a térfogatokat additívnek vettük, ami némi pontatlanságot okoz ugyan, de

^a <http://www.cyclolab.hu>

ezek ellenére is mérési hibahatáron belül tudtunk maradni. Oldószerként pH=2 foszfát puffert alkalmaztunk. A puffer összeállításához ultra-tiszta desztillált vízben készült 0,05 M koncentrációjú $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ és 0,05 M-os foszforsav oldatokat használtunk. A puffert 2-es pH-ra a foszforsav-oldat segítségével állítottuk be. A citrinin és ciklodextrin-oldatok minden esetben a mérés előtt frissen készültek. Az oldatkészítést és a puffer pH-jának beállítását egyaránt 25°C-on végeztük.

I. táblázat A méréseinkhez készített oldatsorozat

	2 μM CIT- oldat (μl)	20 mM CD- oldat (μl)	puffer (μl)	CIT- konc. (μM)	CD-konc (mM)	Össztérfogat (μl)
1.	1000	0	1000	1	0,00	2000
2.	1000	25	975	1	0,25	2000
3.	1000	50	950	1	0,50	2000
4.	1000	75	925	1	0,75	2000
5.	1000	100	900	1	1,00	2000
6.	1000	150	850	1	1,50	2000
7.	1000	200	800	1	2,00	2000
8.	1000	300	700	1	3,00	2000
9.	1000	500	500	1	5,00	2000
10.	1000	750	250	1	7,50	2000
11.	1000	1000	0	1	10,00	2000

III.3 Kísérletes módszerek

III.3.1 Fluorimetriás mérések

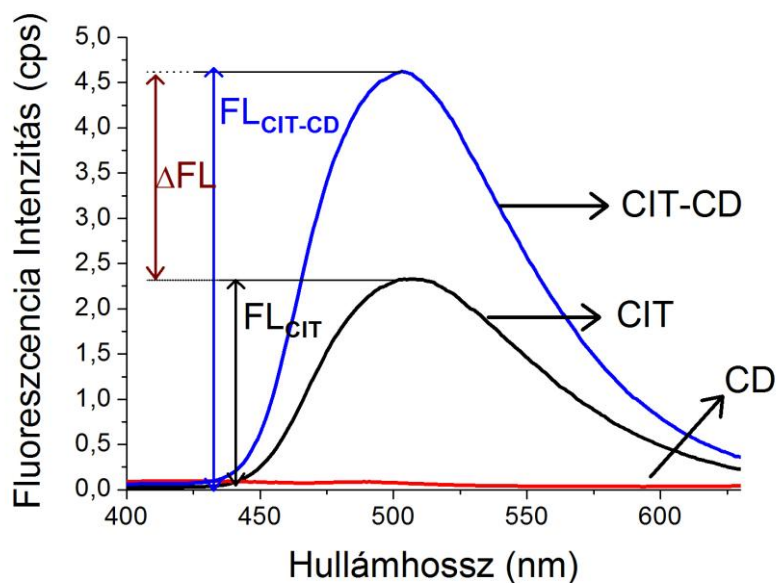
A fluorimetriás vizsgálatok során a méréseket Fluorolog $\tau 3$ spektrofluoriméterrel (Jobin-Yvon/Spex) végeztük (4. ábra). A műszer gerjesztési, emissziós, polarizációs és anizotrópia-lecsengési görbék felvételéhez, valamint fluoreszcencia élettartam mérésére alkalmas. Adatgyűjtési integrációs időnek 0,1 másodpercet választottunk. A monokromátorokon a gerjesztési, illetve az emissziós oldalon a sáv szélességet egyaránt 3-3 nm-re állítottuk. A mérések során 1x1 cm-es akril küvettákat használtunk, valamint merőleges Right Angle, (RA) detektálást alkalmaztunk. A mérések 298,2 K-en, illetve a termodinamikai paraméterek meghatározásához szükséges vizsgálatok öt különböző hőmérsékleten: 293,2 K, 298,2 K 303,2 K 308,2K és 313,2 K-en történtek. A termodinamikai egyensúly beálltához 7 perces várakozási időt állítottunk be minden minta esetében. Az emissziós spektrumokat 400-680 nm hullámhossz-tartományban detektáltuk 330 nm-es gerjesztés mellett.



4. ábra Fluorolog τ-3 spektrofluoriméter az Általános és Fizikai Kémia Tanszéken

III. 3.2 A komplexképződés meghatározása fluorimetrián

A citrinin konjugált, planáris szerkezete (1. ábra) természetes fluoreszcenciás sajátsgot kölcsönöz a molekulának. Ezen mikotoxin fluoreszcenciájának intenzitása ciklodextrinekkal alkotott komplexek képződésekor nő (5. ábra). A detektált fluoreszcenciaintenzitás-változás arányos a komplex koncentrációjával.



5. ábra A citrinin fluoreszcencia intenzitásának változása ciklodextrinekkal történő kölcsönhatása során

A CIT – CD kölcsönhatás vizsgálata során a komplexképződést kísérő stabilitási állandó meghatározására a Benesi-Hildebrand módszert⁵² használtuk, melyet ezt megelőzően

már sikeresen alkalmaztak mikotoxin – ciklodextrin kölcsönhatás tanulmányozásakor.⁵³
Munkánkban az alábbi összefüggést alkalmaztuk:

$$(1) \quad \frac{I_0}{I - I_0} = \frac{1}{AK[CD]^n} + \frac{1}{A}$$

ahol I_0 a CIT maximum FL intenzitása, míg I a CIT- CD komplex maximum FL intenzitása, A konstans, $[CD]$ az oldatban jelenlévő szabad ciklodextrin koncentrációja, és n pedig a kötőhelyek száma. Ha feltételezzük, hogy $[CD] \gg [CIT]$ és ezért élhetünk a $[CD] \approx [CD]_0 = [CD] + [CIT-CD]$ egyszerűsítéssel, ahol tehát $[CD]_0$ a CD bemért analitikai koncentrációja, akkor a CIT-hez képest nagy CD felesleg esetében az $I_0/(I - I_0)$ értékeit az $1/[CD]_0^n$ függvényében ábrázolva a (1) egyenlet alapján a mérési eredményekre illesztett egyenes egyenletéből K értéke meghatározható. 1:1 komplexet feltételezve ($n=1$ esetén), ha a fenti egyenlet bal oldalát a ciklodextrin koncentráció reciprokanak függvényében ábrázoljuk, akkor egyenest kapunk, és a mérési pontokra illesztett egyenes egyenletéből a K stabilitási állandó kiszámolható.

Míg a stabilitási állandó ugyan jellemzi az egyensúlyt, az még egyszerű rendszerek esetén is erősen függ a hőmérséklettől. Ezért célszerű a kémiai egyensúly leírására a termodinamikai paramétereket használni. A stabilitási állandó és a termodinamikai paraméterek között a van't Hoff egyenlet teremt kapcsolatot:

$$(2) \quad \ln K = -\frac{\Delta G}{RT} = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}$$

Az egyenletben a ΔG a szabadentalpia változás, a ΔS az entrópiaváltozás, ΔH pedig entalpiaváltozás a komplexek képződésekor. A fenti összefüggés értelmében az egyensúlyi állandók reciprok hőmérséklet függvényében ábrázolt pontjaira illesztett egyenes meredekségéből az entalpiaváltozás, míg a tengelymetszetből az entrópiaváltozás határozható meg, továbbá ezek ismeretében a szabadentalpia változás is kiszámítható adott hőmérsékleten.

III.4 Elméleti kémiai számítások

A kvantumkémia az atomi szintű szerkezetanalízis egyik leghatékonyabb eszköze, a molekuladinamikai módszerek pedig adott hőmérsékleten a dinamikai tulajdonságok molekuláris tanulmányozására adnak lehetőséget. Így érthető, hogy a szakirodalomban számos, a mikotoxinok és/vagy ciklodextrinek kölcsönhatásaival foglalkozó elméleti számításokon alapuló munkákkal találkozunk.^{54,55,56}

Jelen munkában az elméleti kémiai számítások során az a célunk, hogy a kísérletek során megfigyelt jelenségeket molekuláris szinten tudjuk leírni és értelmezni. Vizsgálataink során első lépésként meghatároztuk a molekuláris dokkolási számításokhoz a kiindulási geometriákat: A citrinin egyensúlyi konformációját vákuumban B3LYP/6-31G(d) sűrűségfunkcionál és bázis kombinációjával tanulmányoztuk. A ciklodextrinek kiindulási szerkezeteit molekuladinamikai szimulációk eredményeként határoztuk meg a víz oldószer molekuláinak explicit figyelembevételével MM+ erőter alkalmazásával. Mind a citrinin, mind a ciklodextrinek esetében az atomi töltéseket a természetes pályák betöltöttségének összegzésével (Natural Population Analysis – NPA) számítottuk B3LYP/6-31G(d) szinten.

Munkánk során a DFT (Density Functional Theory – sűrűségfunkcionál elmélet) számításokat Gaussian 09,^{57,b} a molekuladinamikai számításokat HyperChem Professional 8,⁵⁸ míg a molekuláris dokkolási számításokat a Vina 1.1.2⁵⁹ programokkal végeztük. Ez utóbbihoz szükséges .pdbqt kiindulási fájlokat az OpenBabel programmal állítottuk elő.

^b A Gaussian 09 programcsomaggal végzett kvantumkémiai számítások a Nemzeti Információs Infrastruktúra Fejlesztési Intézet Pécsi Tudományegyetemen található SGI Ultra Violet 1000 szuperszámítógépen történtek.

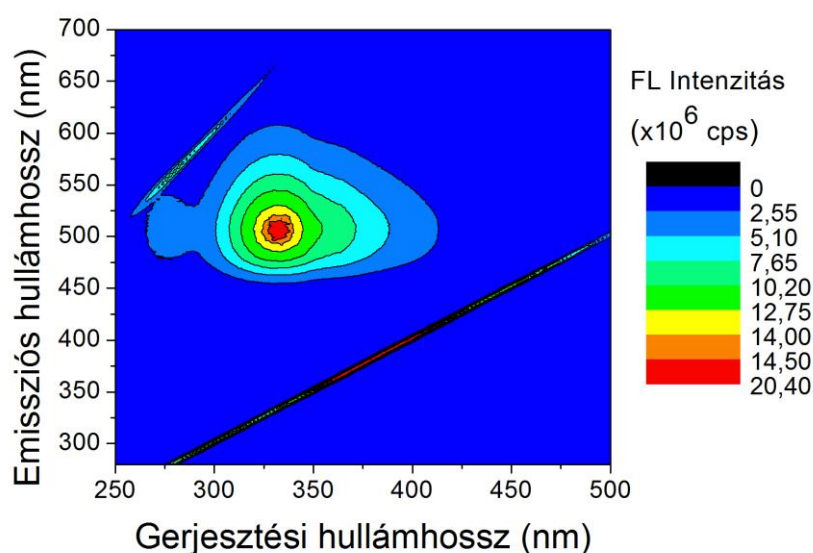
IV. Eredmények

IV. 1 Elővizsgálatok a megfelelő mérési körülmények beállításához

A citrinin-ciklodextrin kölcsönhatásban fontos szerepet játszik a megfelelően megválasztott közeg. A mérési körülmények pontos beállításának érdekében előkísérleteket végeztünk a megfelelő kémiai környezet biztosításának céljából. Ezek során felvettük a gerjesztési és emissziós spektrumokat, valamint vizsgáltuk a puffer és pH hatását a kölcsönhatására, továbbá tanulmányoztuk a kiértékeléshez szükséges optimális CD koncentrációtartományt is.

IV.1.1 Citrinin emissziós spektrumai a gerjesztési hullámhossz valamint a koncentráció függvényében

Az elővizsgálatokat során első lépésként meghatároztuk, hogy melyik az a hullámhossz, amelyen a citrinint gerjesztve maximális fluoreszcencia (FL) intenzitást detektálunk. Ennek érdekében, felvettük pH=2,5 foszfát puffer oldószerben a 25 μM -os citrinin oldat emissziós spektrumait 280-700 nm hullámhossztartományban, míg a gerjesztési hullámhosszakat 250 nm-től 500 nm-ig változtattuk, 2 nm-enként haladva. A 6. ábra a emissziós hullámhosszakat a gerjesztési hullámhossz függvényében ábrázoltuk.



6. ábra A citrinin oldat emissziós fluoreszcencia spektrumai a gerjesztési hullámhossz függvényében foszfát pufferben (pH=2,5)

Az 6. ábra alapján megállapítható, hogy a citrinin maximum fluoreszcencia intenzitása 490-510 nm között figyelhető meg 320-330 nm gerjesztési hullámhossz mellett. Az optimális gerjesztési hullámhossz kiválasztásának érdekében a becsült hullámhossztartományban megvizsgáltuk a mért intenzitásértékeket. Mivel a 326-338 nm közötti intervallumban az intenzitások közel azonosak, a mérések során a továbbiakban 330 nm-es gerjesztési hullámhosszat alkalmaztunk, mely összhangban van Zhou és munkatársai által használt mérési beállításokkal.⁴⁴

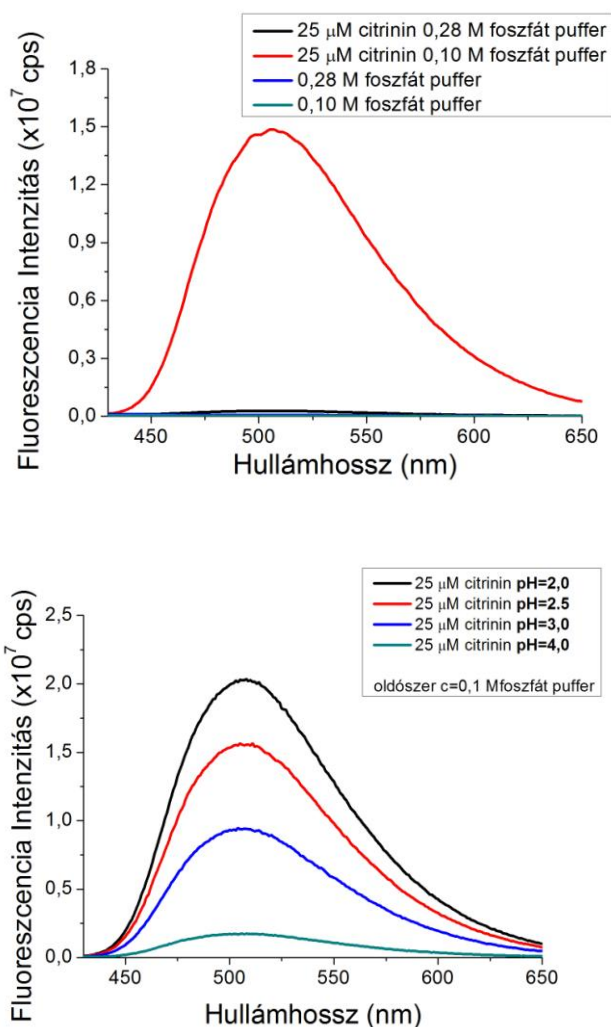
Fluorimetriás méréseink során tanulmányoztuk továbbá a citrinin FL intenzitásának koncentrációfüggését is. A mikotoxin 50 μM -os oldatát szintén pH=2,5 foszfát puffer oldószerben felező hígítással addig hígítottuk, amíg még detektálható fluoreszcencia jelet láttunk. A koncentráció csökkenésével arányosan változik a citrinin mért FL intenzitása is, a vizsgált molekuláris környezetben 3,125 μM citrinin koncentráció mellett még detektálható a citrinin emissziója.

IV.1.2 A puffer kiválasztása

Elsősorban olyan puffereket kerestünk, melyeket 2 és 5 közötti pH tartományban lehet alkalmazni. Habár a szóhajóhető glicin/sósav, citromsav/Na-citrát és foszfát pufferek esetében pH=2-nél már nem vagyunk az optimális puffekapacitást biztosító tartományban, a citrinin alacsony koncentrációja, illetve az általunk vizsgált semleges ciklodextrinek miatt nem volt szükséges a magas puffekapacitás elérése. A FL intenzitásnak a citrinin koncentrációtól függésére vonatkozó méréseinket különböző pufferekben is elvégeztük, eredményeink szerint megállapítottuk, hogy a különböző puffereknek nincs jelentős hatása a citrinin FL intenzitására. Ezt követően a foszfát puffert alkalmaztuk oldószerként, mely választásunkat az indokolja, hogy eredményeinket össze tudjuk vetni Zhou és munkatársai által publikáltakkal.⁴⁴

Összehasonlító méréseket végeztünk továbbá az alkalmazott puffer koncentrációját illetően. Az fenti méréseket - szintén a szakirodalmi ismereteinkre támaszkodva⁴⁴ - 0,28 mol/dm³ koncentrációjú pufferekben végeztük, majd a foszfát-puffer kiválasztása után elkezdtek a puffer koncentrációját csökkenteni először 0,1, majd végül 0,05 mol/dm³-re. A citrinin koncentrációja a mérések során állandó, 25 μM volt. Megállapítottuk, hogy a koncentráció csökkentésével megnő a citrinin fluoreszcencia intenzitása (7. ábra). Ez azt jelenti, hogy az ionerősség csökkenésével a fluoreszcencia intenzitás nő. Ennek hátterében az áll, hogy a pufferben jelenlévő ionok mennyiségének minimalizálásával csökkentjük az

esetleges potenciális zavaró hatásokat, mint például a jelenlévő ionok és citrinin közti kölcsönhatást, melyek a mikotoxin természetes fluoreszcenciáját befolyásolhatják és csökkenthetik. Emellett természetesen az is nyilvánvaló, hogy a koncentráció csökkentésével lecsökken a pufferekapacitás is, viszont ez a már korábban ismertetett okok miatt vizsgálataink eredményességét nem befolyásolta.



7. ábra a) A citrinin emissziós spektrumai különböző koncentrációjú foszfát puffer-oldatokban és a tiszta puffer-oldatok emissziós spektrumai azonos mérési beállítások mellett (pH=2,5) b) A citrinin FL intenzitásának pH-függése

A korábbi tanulmány alapján tudjuk, hogy a citrinin fluoreszcencia intenzitása a pH csökkenésével nő,⁴⁴ ezért munkánk során különböző pH értékeken történő vizsgálatokat is végeztünk. Ehhez pH=2; 2,5; 3; 4 foszfát puffer oldatokat készítettünk. Összhangban a szakirodalommal az általunk kapott eredmények is azt tükrözik, hogy a legkisebb pH-jú

foszfát pufferben a legmagasabb a citrinin fluoreszcencia intenzitása (7. ábra). Ez azzal magyarázható, hogy a CIT egy savas karakterű toxin, pK_s értéke 2,3. Ebből adódóan alacsonyabb pH értékeken a protonált forma dominál. Az alacsony pH-n kapott eredményeinket összehasonlítottuk sósavban mért eredményeinkkel és megállapítottuk, hogy alacsony puffer koncentráció mellett a citrinin FL intenzitása elsősorban az oldószer pH-jától függ, míg az ionerősségtől kevésbé függ, vagyis a pufferben jelenlévő ionok, mint molekuláris környezet már nem vagy csak kis mértékben gyakorol hatást a citrinin fluoreszcenciájára. Sósavas közegben a pH további csökkentésével további FL intenzitás növekedés érhető el. Reményeink szerint eredményeink felhasználhatóak lehetnek majd különböző elválasztás-technikai módszerek esetében mint, például mikotoxinok és így citrinin kimutatása során is alkalmazott nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás analízisnél. Ebből a megfontolásból vizsgálataink során nem tartottuk indokoltnak pH=2-nél alacsonyabb pH-jú oldatokban történő méréseket, mivel a kromatográfiás oszlopok, - beleértve a felületmódosítottakat is - ennél savasabb közeget már nem bírnak el.

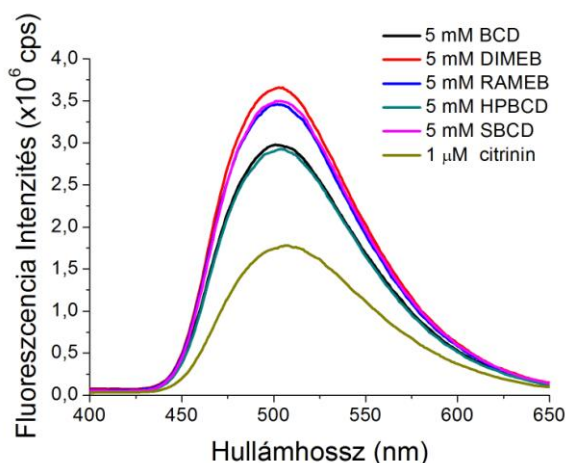
Ahogy a fejezet elején már említettem a foszfát puffer kapacitása alacsony pH-n, így az általunk is használni kívánt pH=2 esetben már nincs benne a puffer optimális alkalmazási tartományában. Kutatómunkánk során azonban számos olyan közleményt találtunk melyekben szintén 2-es pH-jú foszfátionokat tartalmazó oldószert alkalmaztak különböző biológiai alapú folyamatok tanulmányozása során,^{60,61} így esetünkben is elfogadható választásnak tűnik a 2-es pH beállítására 0,05 M koncentrációjú foszfát puffer, melyet a további méréseink során oldószerként használtunk. Itt jegyezném meg, hogy az így megválasztott alacsony puffer koncentráció mellett 1,0 μ M citrinin koncentráció mellett még detektálható a citrinin emissziót mértünk, mely összhangban van az elővizsgálataink során tapasztaltakkal.

IV.2 A citrinin fluoreszcencia intenzitása ciklodextrinek jelenlétében

A különböző natív ciklodextrinek lipofil belső üregének átmérője eltérő: az α -ciklodextrin esetében ez az érték 4,7-5,3 Å, a β -ciklodextriné 6,0-6,5 Å, míg a γ -ciklodextrin 7,5-8,3 Å belső átmérővel rendelkezik. A citrinin a legnagyobb szélesség kb. 6.5 Å, míg a teljes hossza kb. 8.2 Å, mely a β -ciklodextrin belső üregébe illeszkedik a legjobban. Általánosságban is elmondható, hogy a legalkalmasabbnak a mikotoxinok vizsgálatára a β -ciklodextrinek bizonyulnak^{62,63}. Továbbá kutatócsoportunkban erre vonatkozólag történtek próbamérések γ -ciklodextrinnel, ám ezek eredményei a BCD-hez képest lényegesen

alulmaradtak mind intenzitásban, mind komplexstabilitásban. Ezért jelen munkánkban csak a β -ciklodextrinek származékokat tanulmányoztuk.

A korábbi tanulmányban⁴⁴ azt valószínűsítik, hogy van der Waals-, hidrogénhid-, ionos-, $\pi - \pi$ típusú, elektrosztatikus- valamint töltésátadáson alapuló kölcsönhatások befolyásolják a komplexképződés folyamatát. Munkánk során azt a jelenséget használjuk ki, hogy a ciklodextrinek hozzáadásával, a citrinin fluoreszcencia intenzitása megnövekszik (8. ábra). Ez az erősítő hatás főként annak tulajdonítható, hogy a ciklodextrin hidrofób ürege megfelelő mikrokörnyezetet biztosít a citrinin számára és megakadályozza vagy mindenestre csökkenti a víz fluoreszcencia kioltó hatását. A kölcsönhatás során tapasztalt fluoreszcencia intenzitás növekedésének magyarázata tehát a következő: a citrinin aromás π -elektronjai gerjesztés hatására magasabb energiaszintre kerülnek, majd alapállapotba való visszatérésükkor a felvett energiátöbblet egy részétől a molekuláris környezettel történő ütközések révén szabadul meg, míg a fennmaradót fény formájában emittálja. Mivel vizes közegben szolvatált állapotban van, vagyis oldószer molekulák veszik körbe, a gyakoribb ütközések miatt több energiát ad át a környezetének és az emisszió gyengébb, mint mikor ciklodextrin üregében van. Ekkor ugyanis a CD által biztosított molekuláris környezetben a vízmolekulák kevésbé férnek hozzá a mikotoxinhoz és így nem vagy csak alig oltják ki annak fluoreszcenciáját.



8. ábra Ciklodextrinek hatása a citrinin FL intenzitására

A 8. ábra alapján jól látható, hogy a legkisebb mértékben a BCD növelte a citrinin fluoreszcencia intenzitást, míg a legnagyobb növekedést a DIMEB esetében találtuk, ahol

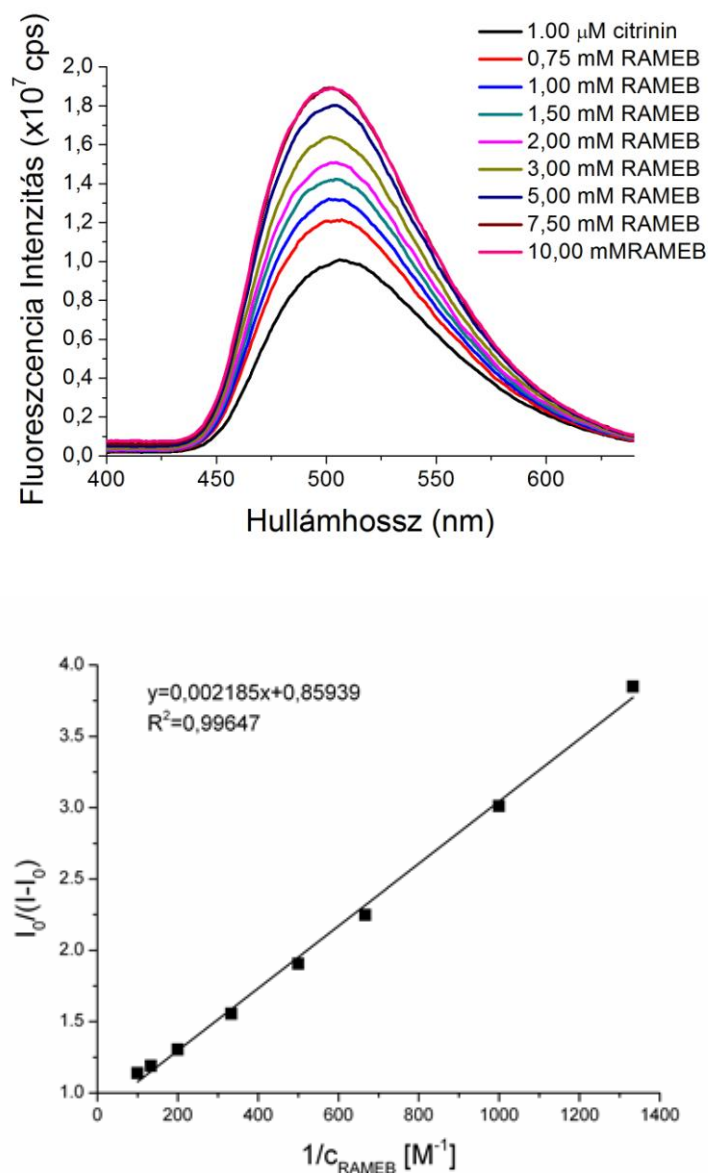
több mint kétszeres intenzitásnövekedést tapasztaltunk. Az oldatban jelenlévő 1 μM koncentrációjú citrinin esetében mintegy 8-10 mM CD koncentráció mellett már elértük a lehető legnagyobb intenzitásnövekedést, mely az SBCD, HPBCD, RAMEB és DIMEB származékok esetében rendre 1,8; 1,8; 2,0 és 2,2-szeres volt, míg a citrinin oldószerben mért FL intenzitásához képest a BCD jelenlétében csupán 1,6-szoros intenzitásnövekedés érhető el.

IV.3 A citrinin – ciklodextrin komplexek stabilitási állandói

A CIT – CD komplexek stabilitási állandóit tehát a Benesi-Hildebrand módszerrel határoztuk meg, amit a random metilált származék példáján ismertetek. Ahogy az 9. a) ábrán látható, a RAMEB koncentrációjának emelésével párhuzamosan a detektált fluoreszcencia intenzitás is nő, és a citrinin maximum FL intenzitását a RAMEB koncentrációjának a függvényében ábrázolva egy telítési görbét kapunk.

Ahhoz, hogy a Benesi-Hildebrand összefüggést jól tudjuk alkalmazni a kölcsönhatás leírására, fontos a megfelelő koncentrációtartomány megválasztása. Habár ahogyan azt már korábban említettem a módszer alkalmazhatóságának feltétele, hogy jelen esetben az oldatban jelenlévő szabad RAMEB koncentrációját a bemért koncentrációval közelíthessük és ezért a citrininhez képest feleslegben alkalmazzuk, ennek ellenére az alacsony ciklodextrin koncentrációhoz tartozó pontok a mérési eredmények kiértékelése során kulcsfontosságúak. Ennek oka, hogy ahogy haladunk a magasabb koncentrációk felé, egyrésztől azok reciprokl értékei, melyek a mérési eredmények kiértékeléséhez szükségesek, egyre kisebb értéket vesznek fel, azaz a pontok egyre közelebb esnek egymáshoz. Másrésztől a ciklodextrin koncentrációjának a növelésével egyre közelebb kerülünk a szaturációhoz, ahol már nincs lényeges intenzitásváltozás. Éppen ezért fontosak számunkra elsősorban a kisebb koncentrációk, amelyek viszont nagymértékben hozzájárulnak a regressziós egyenes meredekségének alakulásához. Viszont ha túl alacsony ciklodextrin koncentrációkat alkalmazunk és nem igaz jelen esetben a $[\text{RAMEB}] \approx [\text{RAMEB}]_0 = [\text{RAMEB}] + [\text{CIT-RAMEB}]$ közelítés, akkor ezen pontok képesek meghamisítani a mérési eredményeinket.

Mivel az 1:1 sztöchiometriájú komplexképződésre alapozott grafikus kiértékelés során kiváló illeszkedést értünk el a mérési pontokra illesztett egyenes esetében (9. b) ábra), ez alátámasztotta a feltételezésünket, miszerint a CIT – CD gazda-vendég típusú kölcsönhatás során 1:1 sztöchiometriájú komplexek képződnek.



9. ábra a) A CIT – RAMEB emissziós spektrumai b) A Benesi-Hildebrand ábrázolás CIT – RAMEB 1:1 komplex esetében.

A számított stabilitási állandókat a II. táblázatban foglaltuk össze, mely értékek 25°C-on történt mérésekből határoztunk meg. A natív BCD-re meghatározott komplexstabilitás $2,69 \cdot 10^2$ -os értéket adott, ettől lényegesen nem tért el a SBCD. Kis mértékben nőtt a random metilált származéknál, míg a DIMEB esetében lényegesen magasabb komplexstabilitást tapasztaltunk. Így ezen származék citrininnel létrejövő kölcsönhatása nemcsak a legnagyobb FL intenzitásnövekedést idézi elő, hanem egyben a legstabilabb komplexet is alkotja a vizsgált CIT – CD rendszerek esetében. A szulfibutilált- β -ciklodextrin citrininnel való

kölcsönhatása egy tipikus példa arra, hogy míg fluoreszcencia intenzitásban meghaladja a CIT-BCD FL intenzitását, addig a CIT-SBCD komplexre számolt stabilitási állandó érték kisebb, mint a CIT-BCD esetében.

II. táblázat A számított stabilitási állandók (25°C)

	log K (dm³/mol)	±SD
HPBCD	2,18·10 ²	0,013·10 ²
BCD	2,69·10 ²	0,013·10 ²
SBCD	2,69·10 ²	0,012·10 ²
RAMEB	3,71·10 ²	0,011·10 ²
DIMEB	8,13·10 ²	0,011·10 ²

IV.4 A citrinin-ciklodextrin komplexképződést kísérő termodinamikai paraméterek

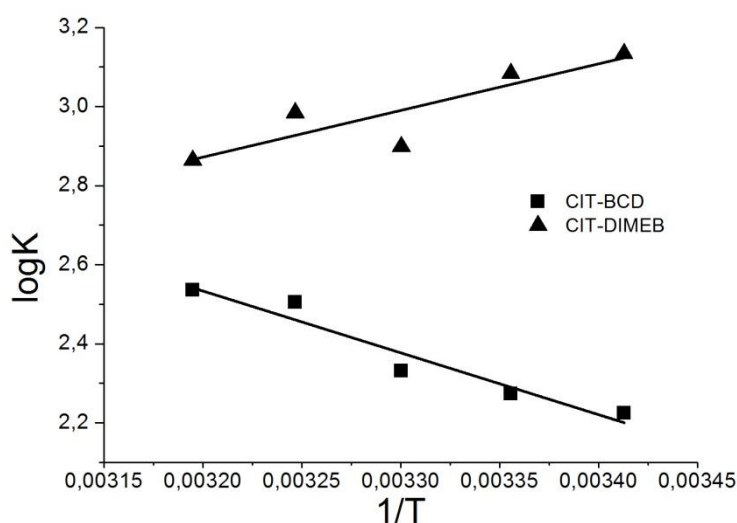
Mivel a dimetilált származék esetében mértük a legerősebb kölcsönhatást a citrininnel, ezért megvizsgáltuk a CIT – DIMEB komplexképződést kísérő termodinamikai paramétereket. Összehasonlítás céljából az entalpia-, entrópia- és szabadentalpia változásokat a CIT – BCD komplex esetében is tanulmányoztuk. Munkánk során 5 különböző hőmérsékleten: 20, 25, 30, 35 és 40 °C-on meghatároztuk a CIT – DIMEB valamint a CIT – BCD komplexek stabilitási állandóit, majd ezt követően a termodinamikai paramétereket a van't Hoff egyenlet segítségével számítottuk ki. Az (1) számú egyenlet a következő, általunk alkalmazott formában is felírható:

$$(3) \quad \log K = \frac{-\Delta H}{2.303 \cdot R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{2.303 \cdot R}$$

A 10. ábra alapján megállapítható, hogy a β-ciklodextrin esetében a hőmérséklet emelésével nő, míg a dimetillált származéknál csökken a komplexstabilitás. Ahhoz, hogy ezt a jelenséget értelmezni tudjuk, tegyünk egy kis kitérőt és röviden foglaljuk össze, hogy mit tudunk a ciklodextrinek oldhatóságáról.

Ismeretes, hogy a β-ciklodextrin oldhatósága sokkal kisebb 25 °C-on (18,5 g/L), mint a többi, α- (145 g/L) ill. γ-ciklodextriné (232 g/L)³⁰, mely jelenséget eleinte azzal

magyaráztak, hogy a β -ciklodextrin esetében intramolekuláris interglükóz hidrogén-kötések stabilizálják ezen makrociklusok 'kerek' szerkezetét, melyek némileg merevvé teszik a molekula vázát. Elméleti kémiai számítások alapján a β -ciklodextrin kisebb oldhatóságának ma elfogadott magyarázata az, hogy a hidratáburkában a vízmolekulák sokkal rendezettebbek, mint az α - és γ -CD esetében, ami a szobahőmérsékleten történő oldáskor nagy entrópiacsökkenést okoz, mely nem kedvez az oldási folyamatnak.⁶⁴ Kevésbé ismeretes ugyanakkor, hogy amíg a hőmérséklet emelésével a natív CD-k oldhatósága nő,⁶⁵ addig a metilált származékaik oldhatósága ezzel ellentétesen változik, azaz csökken: Az általunk vizsgált DIMEB esetében a gyártó Cyclolab cég 25 °C-on 500 g/L feletti, míg 100 °C-on 10 g/L alatti vízben történő oldhatóságot jelöl meg.⁶⁶ Emellett fontos megjegyezni, hogy a metilált származék szobahőmérsékleten több mint 25-ször jobban oldható vízben, mint a natív CD. Az ellentétes hőmérsékletfüggés hátterében molekuláris szinten az állhat, hogy míg a BCD esetében a hőmérséklet növelésével nem változik jelentősen az oldat szerkezete és ezáltal a BCD molekula hidratáltsága, addig a DIMEB első solvatációs héjában jelentős átrendeződések történnek, mely főként a metil csoportokat érinti, előtérbe helyezve ezáltal a molekula hidrofób jellegét.⁶⁷ A hőmérséklet növelésével nem meglepő módon gyorsul a $-\text{CH}_3$ és $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$ csoportok mozgása, mely szerepet játszhat a solvatációs héj átrendeződésében. Ezen csoportok mozgásának gyorsulása azonban megáll 30-35 °C hőmérséklettartományban, majd enyhén lassulni kezd, mely a magasabb hőmérsékleten és/vagy nagyobb koncentrációtartományban létrejövő aggregátumképződéssel magyarázható.⁶⁸



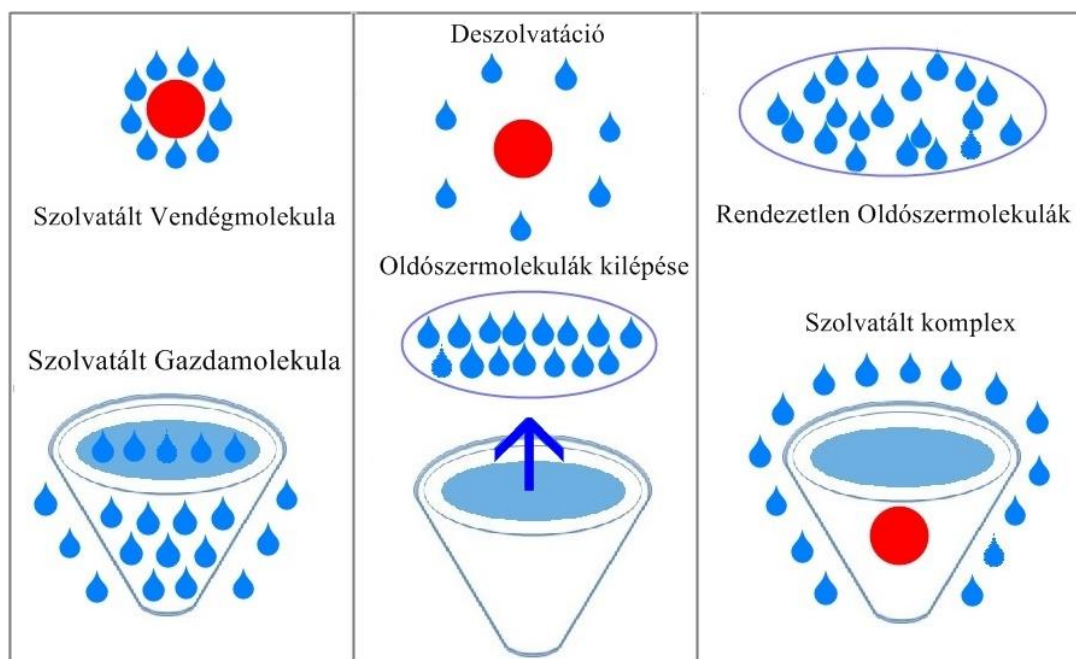
10. ábra van't Hoff ábrázolások

III. táblázat A CIT – BCD és CIT – DIMEB komplexképződést kísérő termodinamikai paraméterek

	CIT-BCD	CIT-DIMEB
ΔH [kJ mol ⁻¹]	30	-23
ΔS [J K ⁻¹ mol ⁻¹]	144	-17
ΔG (25 °C) [kJ mol ⁻¹]	-13	-17

A komplexstabilitás és oldhatóság közti kapcsolat könnyen belátható: ahogy a hőmérséklet emelésével a CD oldhatósága nő/csökken úgy nő/csökken a CIT – CD komplex stabilitása. A CD-k oldása során lejátszódó folyamatoknak azonban ennél nagyobb szerepük van a komplexképződés során, mely a termodinamika paraméterekben válik láthatóvá. A III. táblázatban összefoglalt, a komplexképződést kísérő érdekes entalpia- és entrópia változások is értelmezhetőek a CD-k oldhatóságával, mely a komplexképződés molekuláris szinten lejátszódó folyamataiba enged betekintést.

Ennek megértéséhez tegyünk egy újabb kitérőt, melyben a komplexképződést kísérő entrópiaváltozásra fókuszálunk: A komplexképződés során bekövetkező entrópiaváltozást a 11. ábra sematikus ábrán szeretném szemléltetni. Oldat fázisban a gazda- és vendégmolekulákat egyaránt szolvátburok veszi körül, és az oldószermolekulák elhelyezkedése körülöttük különböző mértékben rendezett. Ahhoz, hogy a komplexképződés lejátszódjon és a vendégmolekula belépjen az üregbe, két energiagátat is le kell győznie. Egyrészt le kell vetkőznie a szolvátburkát, másrészt pedig ki kell szorítania a vízmolekulákat a gazdamolekula belső üregéből. Ez a folyamat nagy entrópianövekedéssel jár, mivel a vízmolekulák egy valamilyen mértékben rendezett állapotból, a hidrátburokból egy sokkal rendezetlenebbé, az oldószertömbfázisába kerülnek. Amennyiben a vendégmolekula bejut a gazdamolekula üregébe, tehát kialakul a kölcsönhatás, úgy ennek eredményeképp létrejövő gazda-vendég komplex egy új rendezett állapotot képvisel, ami kismértékű entrópiacsökkenést produkál. Esetünkben a gazdamolekula hidrátburkának a rendezettsége lesz a meghatározó a komplexképződési folyamat teljes entrópiaváltozása szempontjából.



11. ábra Entrópiaváltozás komplexképződéskor

Mindezek alapján jelen elképzeléseink szerint, mivel a BCD hidrátburkában a vízmolekulák rendezettek, a CIT-BCD komplexképződéskor a BCD esetében a vízmolekulák kiszorítása a BCD üregéből nagy energiát igényel, amit a citrinin – β -ciklodextrin kölcsönhatás nem fedez. Viszont az erősen kötött vízmolekulák szabaddá válásakor felszabaduló entrópia a szabadentalpiát szobahőmérsékleten már negatív tartományba viszi. A CIT-DIMEB komplex kialakulásakor a DIMEB-bel gyengébb kölcsönhatásban lévő és ezáltal kevésbé rendezett vízmolekulák kiszorítása könnyebb, a DIMEB-víz kölcsönhatás megszüntetéséhez szükséges energiát a CIT-DIMEB kölcsönhatás fedezi, ezért az entalpiaváltozás negatív, ugyanakkor az entrópiaprodukciónak kisebb, ami miatt a teljes entrópiaváltozás a negatív tartományban marad.

IV.5 A kísérleti eredmények molekuláris szintű magyarázata elméleti kémiai módszerekkel

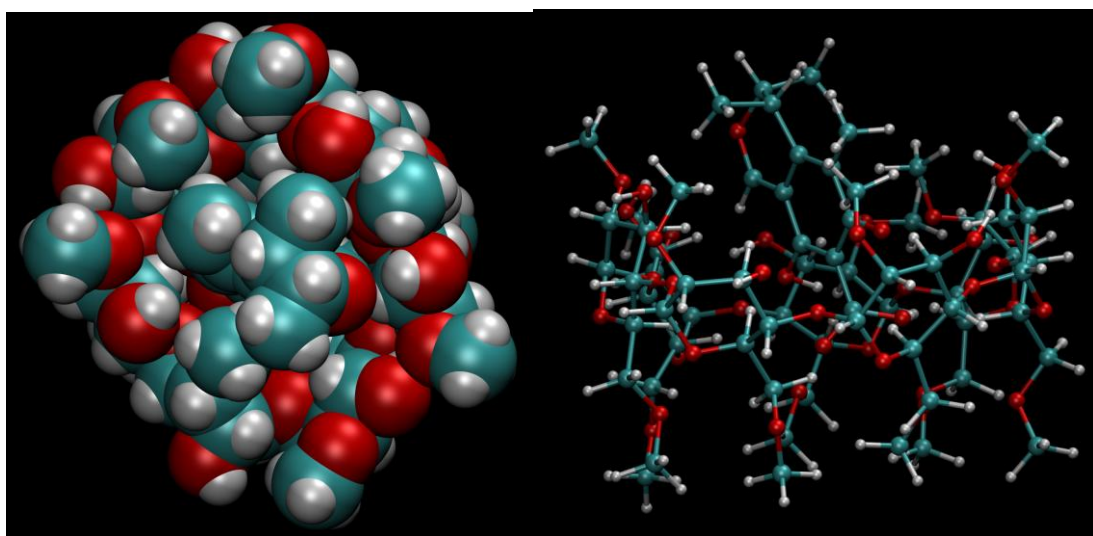
Munkánk során a CIT-DIMEB komplexképződést kísérő folyamatokat elméleti kémiai módszerek alkalmazásával is modelleztük. A számítások során a DIMEB esetében mindegyik glükóz alegységhez kapcsolódó hidroxil csoport hidrogénjét két metil-csoporttal helyettesítjük a cukorgyűrű 2-es és 6-os szénatomján. A RAMEB-nél a $-\text{CH}_3$ szubsztituensek a ciklodextrin szintézisekor véletlenszerűen kapcsolódnak a szénhidrát gyűrűkhöz, ezért a modellezés során minden OH-csoportot egyenértékűnek tekintettünk, így a random metilált származék üregének alsó peremén elhelyezkedő szénatomok esetében 4 metil-csoport szubsztituálta a

hatos helyzetben lévő -OH csoport hidrogénjét, míg a glükopiranoz-gyűrűk által alkotott csonka kúp struktúra felső régióiban a hidroxilcsoportok hidrogénjeit nyolc -CH₃ csoportra cseréltük, 2-es és/vagy 3-as helyzetben. A kísérletes munka során vizes közegben 2-es pH-jú foszfát pufferben végeztük a méréseket, ezért a számítások során pK_s=2,3 értékkel jellemezhető citrinin molekulát semleges töltéssel modelleztük.

A molekuláris dokkolási számítások során először a citrinin lehetséges pozícióját határoztuk meg a ciklodextrin üregében (12. ábra). A citrinin molekulának a dimetilált heteroatomot tartalmazó gyűrűnél a legnagyobb a szélessége (~6.5 Å), így nem meglepő, hogy amikor a citrinin molekula beleül a ciklodextrin üregébe, akkor ez a molekularész található a CD felső pereménél, hiszen ezen kúp alakú molekula belső üreg átmérője itt a legnagyobb (~7.8 Å). Molekuláris dokkolási számítások útján nem csak kötőhely, kötési orientáció és annak kölcsönhatásai határozhatóak meg, hanem számítható a folyamat kötési affinitása is. Az alkalmazott modellben ez az érték tartalmazza a van der Waals kölcsönhatásokból, a hidrogén-kötések kialakulásából és a hidrofob kölcsönhatásokból származó hozzájárulásokat, így tulajdonképpen megadja a dokkolási folyamat kötési szabadentalpia változását, azaz ΔG -t. A legmagasabb kötési affinitást (-27,2 kJ/mol) a CIT – DIMEB esetében határoztuk meg és a CIT – RAMEB esetében ehhez igen közeli értékek (-26,8 kJ/mol), míg a CIT – BCD-hez – összhangban a kísérleti eredményeinkkel – némileg kisebb komplexstabilitás rendelhető (-24,7 kJ/mol). A módosított CD származékok esetében az erősebb kötődést azzal magyarázhatjuk, hogy a citrinin molekula karboxil csoportjai találhatóak a CD üreg alsó pereménél és ezen csoportok orientációja az alsó perem éteres oxigén atomjaihoz képesek erősíteni a CIT – CD kölcsönhatást.

A mérések során a citrinin legnagyobb fluoreszcencia intenzitás növekedését a DIMEB-bel létrejövő kölcsönhatás esetében határoztuk meg, mely a modellezések esetében a legmagasabb kötési affinitás értékkel magyarázható. A DIMEB estében a legjobban hidrofíl tulajdonságú a ciklodextrin belső üregének alsó pereme, ami megvédi a citrinin molekula nagyobb részét az oldószermolekuláktól. Eszerint a ciklodextrin üregében erős komplexképződés során a vízmolekulák fluoreszcencia kioltó hatása csak kismértékben érvényesül, ráadásul az erős komplexstabilitáshoz az -OCH₃ csoportok irányított elhelyezkedése is hozzájárul. A CIT – DIMEB esetében mind a mért mind pedig a számított eredmények némileg nagyobb komplexstabilitást feltételeznek összehasonlítva a CIT – RAMEB komplexekkel, ahol hasonlóan az -OCH₃ csoportok stabilizáló hatása érvényesül. Az eltérés annak tulajdonítható, hogy a CIT – RAMEB komplexek esetében az előbb bemutatott kötési orientáció mellett egy másik szerkezet is igen kedvező, amikor is a citrinin

karboxil csoportjai a RAMEB üregének felső peremén található éteres oxigénekhez orientálódnak. Ebben az esetben a citrinin molekula aromás része kevésbé védett a vízmolekuláktól, ráadásul ez az elrendeződés lehetőséget nyújt a citrinin molekula fel-le mozgásának a ciklodextrin üregében, amely által az üreg felső pereménél és afelett található vízmolekulák fluoreszcencia kioltó hatása kevésbé lesz gátolt és időről időre jól érvényesül. Ezen eredmények rávilágítanak a metilált származékok esetében az $-OCH_3$ csoportok irányított elrendeződésének a fontosságára.



12. ábra DIMEB – CIT komplex kialakulásának legkedvezőbb esete a) felül nézetből b) oldal nézetből

Összefoglalás

Munkánk során a citrinin – ciklodextrin kölcsönhatásokat tanulmányoztuk fluoreszcencia spektroszkópiai és elméleti kémiai módszerekkel. Érdeklődésünk középpontjában a citrinin, mint vendégmolekula és a különböző kémiaiailag módosított ciklodextrinek, mint gazdamolekulák között létrejövő gazda-vendég típusú kölcsönhatás fizikai-kémiai alapjainak megismerése állt.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tettük:

- Megállapítottuk, hogy a citrinin a natív β -ciklodextrin különböző módosított származékaival két-háromszor stabilabb komplexet képez a BCD-hez képest.
- A leghatékonyabb ciklodextrin származéknak a dimetilált- β -ciklodextrin (DIMEB) bizonyult, amelynél a BCD-vel összehasonlítva közel kétszeres fluoreszcencia intenzitás növekedést tapasztaltunk a tiszta CIT oldathoz képest. Továbbá a CIT – DIMEB komplex is háromszor stabilabb szobahőmérsékleten a CIT – BCD komplexnél.
- A CIT – CD komplexek stabilitásának hőmérsékletfüggése rávilágított a ciklodextrinek oldhatóságának és az oldószer molekula – ciklodextrin kölcsönhatásnak a citrinin – ciklodextrin komplexképződés során betöltött fontos szerepére.
- A termodinamikai paraméterek meghatározása alapján megállapítottuk, hogy míg a CIT – DIMEB komplex képződése entalpia-, addig a CIT – BCD entrópia kontrollált folyamat.
- Az elméleti kémiai számítások eredményei rávilágítottak a metilált ciklodextrin származékok esetében az $-OCH_3$ csoportok irányított elrendeződésének a fontosságára. A ciklodextrin üregének alsó peremén található hidroxil csoport hidrogénjének metil-csoporttal történő helyettesítése kulcsfontosságú a kölcsönhatás stabilizálásban, mivel a kölcsönhatás szempontjából az a legkedvezőbb, ha ciklodextrin ezen éteres oxigén atomjaihoz orientálódnak a hidroxil csoportjai a citrininnek.

Reményeink szerint eredményeink hozzájárulhatnak a natív β -ciklodextrin célirányos módosításának tervezhetőségével és a már rendelkezésre álló származékok célirányos megválasztásával a toxinmentesítési eljárások továbbfejlesztéséhez vagy éppen a széleskörűen alkalmazott HPLC-FLD eljáráson alapuló mennyiségi meghatározás kimutatási határának csökkentéséhez.

Irodalomjegyzék

- ¹ M. Bezerra da Rocha, F. da Chagas Oliveira Freire, F. Erlan Feitosa Maia, M. Izabel Florindo Guedes, D. Rondina, *Food Cont.* 36 (2014) 159-165.
- ² L. Goldblatt (Ed.) Academic Press, New York, 1969
- ³ EE. Creppy, E. Röschenthaler, G. Dirheimer, *Food Chem. Toxicol.* 22 (1984) 883-886.
- ⁴ G. Dirheimer, EE. Creppy, *IARC Sci. Publ.* 115 (1991) 171-186.
- ⁵ S. Marin, A.J. Ramos, G. Cano-Sancho, V. Sanchis, *Food Chem. Toxicol.* 60 (2013) 218-237.
- ⁶ A.C. Hetherington, H. Raistrick, *Philos. T. Roy. Soc. B.* 220 (1931) 269-297.
- ⁷ H. Kurata *Mycotoxins and mycotoxicoses*. In: A. E. Pohland, V.R. Dowell & J. L. Richards (Eds.), *Microbial toxin in foods and feeds* 249-259. (1990) New York, USA: Plenum Press.
- ⁸ P.J. Blanc, M.O. Goma, G. Goma, *Biotechnol. Lett.* 17 (1995) 291-294.
- ⁹ H.C. Wong, P.E. Koehler *J. Food Sci.* 46 (1981) 589-592.
- ¹⁰ V. Betina, *Mycotoxins: chemical, biological and enviromental aspects*. New York, USA: Elsevier (1989)
- ¹¹ R.D. Phillips, A.W. Hayes, W.O. Berndt, W. Williams *Toxicology* 16 (1980) 123-137.
- ¹² H.K. Frank, *Z. Ernährungswiss* 31 (1992) 164-177.
- ¹³ N. Kitabatake, A.B. Trivedi, E. Doi, *J. Agr. Food Chemistry* 39 (1991) 2240-2244.
- ¹⁴ B.J. Xu, X.Q. Jia, L.J. Gu, C.K. Sung, *Food Contam.* 17 (2006) 271-285.
- ¹⁵ M. Sokolović, B. Šimpraga, *Food Control* 17 (2006) 733-740.
- ¹⁶ R.D. Phillips, A.W. Hayes, W.O. Berndt, *J. Chromatogr.* 190 (1980) 419-427.
- ¹⁷ A. Gimeno, *J. Assoc. Anal. Chem.* 67 (1984) 194-196.
- ¹⁸ V. Betina, *Dev. Food Sci.* 8 (1984) 217-236.
- ¹⁹ V. Betina, *Journal of Cromatogr. A* 334 (1985) 211-276.
- ²⁰ V. Betina, Elsevier (1993) 210-213.
- ²¹ J. Rubert, C. Soler, J. Mañes *Food Chem.*, 133 (2012) 176-183.
- ²² H. Valenta, *J. Chromatogr. A* 815 (1998) 75-92.
- ²³ H.H. Warren, G. Daugherty, E.S. Wallis, *J. Amer. Chem Soc.* 79 (1957) 3812-3815.
- ²⁴ H.H. Warren, M. Finkelstein, D.A. Scola. *J. Amer. Chem. Soc.* 84 (1961) 1926-1928.
- ²⁵ L. A. Ahles, Q. Fernando, O. R. Roding, J. M. Quante, *Bioorg. Chem.* 5 (1976) 361-366.
- ²⁶ Á. Blaskó, N. Mike, P. Gróf, Z. Gazdag, Zs. Czibulya, L. Nagy, S. Kunsági-Máté, M. Pesti, *Food Chem. Toxicol.* 59 (2013) 636-642.
- ²⁷ A. Villiers, *Compt. Rend. Acad. Sci.* 112 (1891) 536-538 .

-
- ²⁸ F. Schardinger, Z. Unters. Nahr.- Genussm. 6 (1903) 865-880.
- ²⁹ K. Freudenberg, R. Jacobi Ann. Chem. 518 (1935) 102-108.
- ³⁰ J. Szejtli, Chem. Rev. 98 (1998) 1743-1753.
- ³¹ E.M., M. Del Valle, Process Biochem. 39 (2004) 1033-1046.
- ³² J. S. Pagington, β -cyclodextrin and its uses in the flavour industry, In G. G. Birch, & M. G. Lindley (Eds.), Developments in food flavours. London: Elsevier Applied Science (1986)
- ³³ H. Hashimoto, K. Hara, N. Kuwahara, K. Mikuni, K. Kainuma, S. Kobayashi, (1985) Japan Kokai, JP 85 232 070
- ³⁴ Hedges RA, Chem Rev. 98 (1998) 2035-2044.
- ³⁵ K.H. Frömring, J.Szejtli (1994) Cyclodextrins in Pharmacy. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- ³⁶ C.M. Hsu, F.J. Tsai, Y. Tsai, Carbohydr. Polim. 114 (2014) 115-122.
- ³⁷ M. Liu, A. Chen, Y. Wang, C. Wang, B. Wang, D. Sun, Food Chem., 168 (2015) 270-275.
- ³⁸ S. Kunsági-Máté, K. Szabó, B. Lemli, I. Bitter, G. Nagy, L. Kollár, J. Phys. Chem. B, 108 (2004) 15519-15522.
- ³⁹ S. Kunsági-Máté, K. Szabó, B. Lemli, I. Bitter, G. Nagy, L. Kollár, Thermochim. Acta, 425 (2005) 121-126.
- ⁴⁰ B. Lemli, J. Peles, L. Kollár, G. Nagy, S. Kunsági-Máté, Supramol. Chem., 18 (3) (2006) 251-256.
- ⁴¹ B. Peles-Lemli, J. Peles-Lemli, I. Bitter, L. Kollár, G. Nagy, S. Kunsági-Máté, J. Incl. Phen. Macr. Chem., 59(3-4) (2007) 251-256.
- ⁴² A. Amadasi, C. Dall'Asta, G. Ingletto, R. Pela, R. Marchelli, P. Cozzini Bioorgan. Med. Chem. 15 (2007) 4585-4594.
- ⁴³ C. M. Maragos, M. Appell J. Chromatography A 1143 (2007) 252-257.
- ⁴⁴ Y. Zhou, J. Chen, L. Dong, L. Lu, F. Chen, D. Hu, X. Wang, J. Lumin. 132 (2012) 1437-1445.
- ⁴⁵ M. Appell, M. A. Jackson, Toxins 4 (2012) 98-109.
- ⁴⁶ M.M. Warnke, C.R. Mitchell, R.V. Rozhkov, D.E. Emrich, R.C. Larock, D.W. Armstrong, J. Liq. Chromatogr. R. T. 28 (2005) 823-834.
- ⁴⁷ M. Poór, S. Kunsági-Máté, Zs. Czibulya, Y. Li, B. Peles-Lemli, J. Petrik, S. Vladimir-Knežević, T. Kőszegi, Lumin. 28 (2013) 726-733.
- ⁴⁸ M. Poór, S. Kunsági-Máté, T. Bencsik, J. Petrik, S. Vladimir-Knežević, T. Kőszegi, Int. J. Biol. Macromol. 51 (2012) 279-283.

-
- ⁴⁹ M. Poór, S. Kunsági-Máté, G. Matisz, Y. Li, Zs. Czibulya, B. Peles-Lemli, T. Kőszegi, *J. Lumin.* 135 (2013) 276-280.
- ⁵⁰ M. Poór, M. Kuzma, G. Matisz, Y. Li, P. Perjési, S. Kunsági-Máté, T. Kőszegi, *Toxins* 6 (2014) 1295-1307.
- ⁵¹ M. Poór, S. Kunsági-Máté, L. Szenté, G. Matisz, Gy. Secenji, Zs. Czibulya, T. Kőszegi, *Food Chem.* 172 (2015) 143-149.
- ⁵² Benesi, and Hildebrand, *J. J Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 2703-2707.
- ⁵³ R. Verrone, L. Catucci, P. Cosma, P. Fini, A. Agostiano, V. Lippolis, M. Pascale: *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 57 (2007) 475-479.
- ⁵⁴ A. Amadasi, C. Dall'Asta, G. Ingletto, R. Pela, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 4585-4594.
- ⁵⁵ N. Leila, H. Sakina, A. Bouhadiba, F. Madi *J. Mol. Liq.* 160 (2011) 8-13.
- ⁵⁶ Letter to the Editor *Toxicol. letter* 214 (2012) 81-85.
- ⁵⁷ Gaussian 09, Revision C.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- ⁵⁸ Hyperchem Professional 8 Hypercube, Inc.: Gainesville, FL, USA
- ⁵⁹ O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461.
- ⁶⁰ J.D: Smith, D.B. Dunn, *Biochem J.* 72 (1959) 294-301.
- ⁶¹ N. Wangfuengkagul, W. Siangproh, O. Chailapakul, *Talanta* 64 (2004) 1183-1188.
- ⁶² CM. Maragos, M. Appel, V. Lippolis, A. Visconti, L. Catucci, M. Pascale, *Food Addit. Contam. Part A* 25 (2008) 164-171.

-
- ⁶³ A. Amadasi, C. Dall'Asta, G. Ingletto, R. Pela, R. Marchelli, P. Cozzini, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 4585-4594.
- ⁶⁴ K. J. Naidoo, J. Y. Chen, J. L. M. Jansson, G. Widmalm, A. Maliniak, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 4236-4238.
- ⁶⁵ M. J. Jozwiakowski, K.A. Connors, *Carbohydr. Res.* 143 (1985) 51-59.
- ⁶⁶ <http://cyclolab.hu/products/cy20043/tis.pdf>
- ⁶⁷ E.B. Starikov, K. Braesicke, E.W. Knapp, W. Saenger, *Chem. Phys. Lett* 336 (2001) 504-510.
- ⁶⁸ A. Kusmin, R.E. Lechner, M. Kammel, W. Saenger, *J. Phys. Chem. B* 112, (2008) 12888-12898.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Peles-Lemli Beáta egyetemi adjunktus asszonynak a munkám során nyújtott segítségével, dolgozatom lelkiismeretes javításáért.

Köszönetet mondok Dr. Poór Miklós egyetemi tanársegéd úrnak (PTE Általános Orvosi Kar, Farmakológiai-, és Farmakoterápiai Intézet) szakmai tanácsaiért, és munkám támogatásáért.

Köszönetet mondok Dr. Matisz Gergely tudományos munkatárs úrnak (Pécsi Tudományegyetem, Általános és Fizikai Kémia Tanszék) az elméleti számítások során nyújtott segítségével.

Köszönetet mondok Dr. Kunsági-Máté Sándor tanszékvezető egyetemi docens úrnak (Pécsi Tudományegyetem, Általános és Fizikai Kémia Tanszék), hogy munkámat segítette és támogatta.