

Pécsi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Általános és Fizikai Kémia Tanszék

Zearalenon fluoreszcenciájának változása a mikrokörnyezet függvényében

Gerner Zsófia

Kémia BSc

Témavezető:

Dr. Peles-Lemli Beáta
egyetemi adjunktus



Pécs

2014

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	3
I. Irodalmi áttekintés	4
I.1 Mikotoxinok általános jellemzése.....	4
I.2 Zearalenon, egy xenoösztrogén sajátosságú mikotoxin	5
I.3 Jelen vizsgálatok előzményei.....	7
I.3.1 Mikotoxinok vizsgálata fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel	7
I.3.2 Mikotoxin - fehérje kölcsönhatások.....	8
II. Célkitűzés	9
III. Vizsgálati anyagok és módszerek.....	10
IV. Eredményeink.....	11
IV.1 A zearalenon gerjesztési és emissziós spektrumainak vizsgálata	11
IV. 2. A molekuláris környezet hatása a zearalenon fluoreszcencia intenzitására.....	11
IV.2.1 Az oldószerhatás vizsgálata	11
IV.2.2 Zearalenon – ciklodextrin kölcsönhatás	11
IV.3 A zearalenon – HSA kölcsönhatás	12
IV.3.1 A kölcsönhatásnak a zearalenon fluoreszcenciáján alapuló tanulmányozásának nehézségei	12
IV.3.2 A zearalenon – albumin kölcsönhatás vizsgálata fluoreszcencia polarizációs módszerrel	13
Összefoglalás.....	14
Irodalomjegyzék.....	15
Köszönetnyilvánítás	16

Bevezetés

A toxinok élő szervezet által termelt, egyszerű bioszintetikus reakciók útján képződő kisméretű molekulák, melyek mérgező tulajdonsággal bírnak. A toxinok egyik alcsoportját a mikotoxinok képezik, ezek penészgombák szekunder anyagcseretermékei, termelődésüket a gombákat érő környezeti hatások által előidézett élettani stresszhelyzet indítja be. A mikotoxinok megjelenési formái változatosak lehetnek. Habár több száz mikotoxint tartanak számon, közülük csupán 15-20 bír gyakorlati jelentőséggel. A különböző penészgombafajok megjelenését, terjedését főként az éghajlat befolyásolja. Hazánkban más mérsékelt övben elhelyezkedő országokhoz hasonlóan a *Fusarium* gombafajok elterjedése dominál, melyek elsősorban kukoricán fordulnak elő, páradús légköri körülmények között. A legújabb adatok szerint azonban a különböző penészgombafajok által termelt toxinok világszerte kimutathatóak az élelmiszerekben, a terjedés lehetséges okát többek között a globális élelmiszer- és gabonakereskedelem adja.

Jelen munka keretein belül a zearalenon – más néven F-2 toxin – tulajdonságait vizsgáltuk. A zearalenon xenoösztrogén sajátosságú mikotoxin. Már korábban felismerték, hogy haszonállatokban szaporodásbiológiai problémákat idéz elő. A zearalenon feltételezhetően egyéb patológias hatásokkal is rendelkezik: májkárosító, haematotoxikus, immunotoxikus és genotoxikus hatásairól is beszámol a szakirodalom. A zearalenon hazánkban – a mérsékelt éghajlatú országokhoz hasonlóan – egészségügyi és gazdasági problémát jelent, így szükség van a mindennapokban alkalmazható, nagy érzékenységsű analitikai eljárások kifejlesztésére. A zearalenont munkánk során több eltérő karakterű oldószerben, különböző pH-jú oldatokban és egyéb molekulák jelenlétében vizsgáltuk. Eredményeinket a későbbiekben fluoreszcenciás analitikai módszerek érzékenyítésére szeretnénk felhasználni. Jövőbeni célunk olyan szabványos technikák kidolgozása, melyek alacsony koncentráció tartományban is nagy érzékenységgel rendelkeznek, megbízhatóak és jól reprodukálhatók. Továbbá tanulmányozni kívántuk a zearalenon toxikológiai tulajdonságait potenciálisan befolyásoló kölcsönhatásokat, mivel ezen interakciók pontosabb megértése közelebb vihet minket ahhoz, hogy hatékony prevenciós/detoxikációs stratégiákat lehessen kidolgozni. Mivel a fehérjékkel történő interakciók jelentős mértékben befolyásolhatják a zearalenon szervezetbeni viselkedését, jelen munkánkban a zearalenon humán szérum albuminnal történő kölcsönhatását is megvizsgáltuk.

I. Irodalmi áttekintés

I. 1. A mikotoxinok általános tulajdonságai

A XIX. században minden tömeges megbetegedést járványnak tulajdonítottak, csak az 1960-as évek elején nyert igazolást, hogy számos betegség hátterében toxinok állnak. A toxinok élő szervezet által termelt, egyszerű bioszintetikus reakciók útján képződő kisméretű molekulák, melyek mérgező tulajdonsággal bírnak. A toxinok egyik alcsoportját a mikotoxinok képezik, ezek penészgombák szekunder anyagcseretermékei. A mikotoxin név a görög gomba "mykes" és a latin mérge "toxicum" szavakból ered. A penészgombák könnyen megtelepednek különböző növényeken, toxinjaik pedig az élelmiszerekben és a takarmányban előforduló veszélyes mérgek közé tartoznak, így gazdasági és humánegészségügyi szempontból egyaránt jelentős kockázati tényezőnek számítanak.

A gombák megtelepedését és toxintermelését a gazdanövény ellenállóképessége és ökológiai behatások együttesen befolyásolják. A toxinok termelődését a gombákat érő környezeti hatások által előidézett élettani stresszhelyzet indítja be. A toxin termelődéséhez illetve a penészgomba szaporodásához szükséges optimális körülmények eltérőek lehetnek, ezért egy ismert toxin termelő gomba jelenléte a gazdanövényben nem jelenti egyértelműen a toxin jelenlétét, ugyanígy, a látható penész hiányában sem zárható ki a szennyezettség, hisz lehetséges, hogy a penészgomba elpusztulása után toxinok maradnak vissza.

A mikotoxinok ellenállnak számos környezeti behatásnak, ezért nehéz őket az élelmiszerekből, takarmányból és a szervezetből eltávolítani, így elsősorban a megelőzésre, az expozíció elkerülésére fektetnek nagyobb hangsúlyt.¹ Jelentős veszélyt jelentenek, hisz akut és krónikus toxikus hatással egyaránt rendelkezhetnek és mind a növényi, mind az állati eredetű táplálékban megjelenhetnek. A mikotoxinok elleni harc több ponton is nehézségekbe ütközik, például a növényi és állati eredetű termékek feldolgozása során használt magas hőmérsékletű eljárásoknak (kávépörkölés, tej pasztörözése, stb.) gyakran ellenállnak, ezért a már jelenlévő toxin eltávolítása rendkívül nehézkes lehet. Mivel a mikotoxinok eloszlása a terményben nem egyenletes, a védekezés hatékonyságának felméréséhez fontos, hogy rendelkezésre álljanak olyan protokollok, amelyek felhasználásával reprezentatív vizsgálatok végezhetők.

I. 2. Mikotoxinok analitikai vizsgálata

Napjainkban széleskörű kutatások folynak a mikotoxinok kimutatására alkalmazható analitikai eljárásokkal kapcsolatban. A fő cél olyan szabványos technikák kidolgozása, melyek

alacsony koncentráció tartományban is nagy érzékenységgel rendelkeznek, rutin eljárásként, szakszemélyzet nélkül is elvégezhetőek, megbízhatóak, reprodukálhatók, illetve terepmunkára is alkalmazhatók. Mikotoxinok elválasztására számos módszer létezik, ezek közül a legelterjedtebbek a vékonyréteg kromatográfia (TLC), a nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia (HPLC), a gázkromatográfia (GC) és a kapilláris elektroforézis (CE).² Ezen módszerek közül kezdetben a TLC dominált, mára azonban egyre inkább kiszorítják egyéb technikák, illetve inkább csak más módszerekkel kombinálva alkalmazzák. A TLC előnyei a költséghatékonyság, a változatos detektálási rendszerekkel való kompatibilitás és a kvantitatív analízis lehetősége. A HPLC jelenleg a mikotoxinok esetében a legnépszerűbb szeparációs módszer. A polaritástól függően normál vagy fordított fázisú oszlopokat egyaránt alkalmaznak. A kvantitatív értékek megállapítására általában UV, diódasoros (DAD) vagy fluoreszcenciás (FLD)³ detektorokat alkalmaznak, de napjainkban egyre gyakoribbá válik a tömegspektrometriás (MS) analízis is. A fluoreszcenciás detektálás nagyon elterjedt, magas érzékenysége és specificitása miatt, mivel számos mikotoxin természetes fluoreszcenciával rendelkezik, sőt egyes esetekben a mintát származékképzők segítségével teszik fluoreszcenciásan aktívvá. A GC szintén általánosan használt eljárás a mikotoxinok élelmiszermintákból való kimutatására, ennek köszönhetően számos erre épülő protokollt dolgoztak ki, általában tömegspektrométerrel együtt alkalmazzák.⁴ Mivel a toxinok nem illékonyak, a GC hátránya, hogy az analízishez előzetes derivatizáció szükséges.⁵ A CE-t olyan esetben alkalmazzák, amikor két, egymáshoz nagyon hasonló toxin hatékony elválasztására van szükség. A CE-sel vizes puffer oldatokban is gyors szeparáció valósítható meg, így nincs szükség szerves oldószerek felhasználására.^{6,7}

A közelmúltban több módszert is sikeresen adaptáltak mikotoxinok kimutatására (pl. fluoreszcenciásan jelölt antitestek), azonban magasabb érzékenységű eljárások kifejlesztésére a továbbiakban is nagy az igény.

I. 3. Zearalenon általános tulajdonságai

A mikotoxinok megjelenési formái változatosak lehetnek. Habár többszáz toxint tartanak számon, közülük csupán 15-20 bír gyakorlati jelentőséggel. A különböző penészgombafajok megjelenését, terjedését főként az éghajlat befolyásolja. Hazánkban más mérsékelt övben elhelyezkedő országokhoz hasonlóan a *Fusarium* gombafajok elterjedése dominál. A legújabb adatok szerint azonban a különböző penészgombafajok által termelt toxinok világszerte kimutathatóak az élelmiszerekben, mely terjedés lehetséges okát többek között a globális élelmiszer- és gabonakereskedelem adja.²

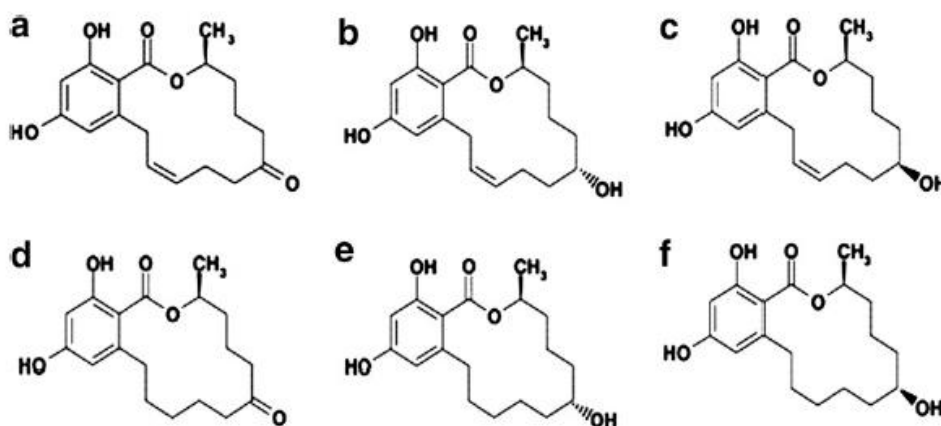
A *Fusarium* gombafajok (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense*, *F. Semitectum*) által termelt toxinok közül gyakorlati jelentőséggel a zearalenon, fumonizin, és trichotecén típusú mikotoxinok rendelkeznek. Jelen munka keretein belül a zearalenon, más nézevn F-2 toxin tulajdonságait vizsgáltuk. A *Fusarium* nemzetségbe tartozó fonalas gombafajok elsősorban kukoricán fordulnak elő, páradús légköri körülmények között (1. ábra). Azonban megjelenhetnek más gabonaféléken is, mint például zab, búza, cirok, köles vagy rizs. A zearalenon képződése elsősorban a betakarítás előtti időszakra tehető, de nem kizárt, hogy a takarmány nem megfelelő kezelése és tárolása során is folytatódik²⁴. A gazdasági veszteségek és az egészségügyi kockázat miatt több stratégia létezik a toxinmentesítésre, ezek között a szakirodalomban biológiai,^{8,9} kémiai^{10,11} és fizikai^{12,13,14} eljárásokra egyaránt találunk példát.



1. ábra: *Fusarium* gomba által fertőzött kukoricacső.

A zearalenon xenoösztrogén sajátosságú mikotoxin. A xenoösztrogénnek olyan xenobiotikumok, melyek ösztrogénszerű hatással rendelkeznek. Már korábban felismerték, hogy a zearalenon haszonállatokban szaporodásbiológiai problémákat idéz elő. Számos tudományos vizsgálat igazolta, hogy a zearalenon és metabolitjai ösztrogénszerű aktivitással rendelkeznek disznóban, szarvasmarhában és juhokban^{15,16}. A zearalenon interperitoneális illetve orális adminisztrációja egérben, patkányban, disznóban viszonylag alacsony akut toxicitást eredményezett,^{17,16} rámutatva, hogy a krónikus expozíció okoz jelentősebb problémákat. A zearalenon feltételezhetően egyéb patológias hatásokkal is rendelkezik: májkárosító,¹⁸ haematotoxikus,¹⁹ immunotoxikus^{20,21} és genotoxikus^{22,23} hatásairól is beszámol

a szakirodalom. Ezen hatásokat figyelembe véve a FAO/WHO szakértői bizottsága 5 µg/kg-ban maximalizálta a tolerálható napi beviteli mennyiséget.²⁴



2. ábra: Zearalenon származékai (a) zearalenon (ZEA), (b) α -zearalenol (α -ZEA), (c) β -zearalenol (β -ZEA), (d) zearalanon (ZAN), (e) α -zearalanol (α -ZAL), (f) β -zearalanol (β -ZAL) (az ábra 25 hivatkozásban szereplő összefoglaló cikkben található).

Állatokban a zearalenon biotranszformációja során két fő metabolit, α -zearalenol és β -zearalenol keletkezik (2. ábra), melyek ezt követően glükoronsavval konjugálódnak. Ezen metabolitokkal kapcsolatban egy korábbi tanulmány arról is beszámolt, hogy ugyan alacsony mennyiségben, de kukoricaterményekben, kukorica szilázsban és szójadarában is előfordulnak.²⁶ További eredmények igazolják, hogy a zearalenon számos származéka szintén megtalálható különböző takarmánynövényekben.²⁷ A gombával fetőzött kukoricaszáron,²⁸ illetve rizskultúrában²⁹ kimutatták az α -zearalanol (α -ZAL) és a β -zearalanol (β -ZAL) nevű származékok jelenlétét is.

A zearalenon takarmányból, valamint élelmiszerből való kimutatására kidolgozott hazai és nemzetközi szabványok elsősorban HPLC és TLC eljárásokon alapulnak.³⁰ Az analízishez rendszerint fluoreszcenciás detektort alkalmaznak, kihasználva ezzel a zearalenon természetes fluoreszcenciás tulajdonságát. A zearalenon savas karakterű, fenolos rezorcisav lakton.

I.4 Zearalenon fluoreszcencia spektroszkópiai tulajdonságai

A ZEA analitikai kimutatása számos esetben a természetes fluoreszcenciás tulajdonságán alapul, amely a rezorcin molekuláris részhez köthető. A ZEA fluoreszcenciás spektrumait két gerjesztési maximum jellemzi, 270-280 nm és 310-320 nm-es tartományban, továbbá egy széles

emissziós csúcs 460-470 nm-es maximummal. A ZEA fluoreszcenciás tulajdonságait a mikrokörnyezet nagymértékben befolyásolhatja, több szerves oldószer alkalmazásakor számoltak már be a toxin jelentősen megemelkedett fluoreszcencia intenzitásáról.³¹ Emellett azt is kimutatták, hogy egyes anyagok vizes oldatban növelni képesek a toxin által adott fluoreszcens jelet.^{32,33,34,35} Ilyenek például a különböző micellaképzők (ionos és nem-ionos detergenssek)^{36,37,38,39} vagy a ciklodextrinek.^{44,35}

Számos mikotoxin példáján beigazolódott, hogy a különböző kémiaiailag módosított ciklodextrinek ígéretes molekulák például toxinmentesítési módszerek⁵³ vagy éppen nagyobb érzékenységű analitikai eljárások kidolgozása kapcsán.⁴⁰ A ciklodextrinek (CD) hat (α -CD), hét (β -CD) vagy nyolc (γ -CD) glükopiranoz egységből felépülő üreges, gyűrű alakú molekulák. Külső részük hidofil sajátságú, míg a belső zseb lipofil tulajdonságú, ezért alkalmasak különböző apoláros karakterű molekulák vagy molekularészek befogadására. Ezen tulajdonságaik miatt főként oldékonyság növelésére használják őket több iparágban.^{41,42,43} Számos korábbi tanulmány mutatott rá, hogy a mikotoxin-ciklodextrin interakciók a legtöbb esetben jelentős mértékben képesek fokozni a mikotoxinok fluoreszcencia intenzitását. A zearalenon-ciklodextrin kölcsönhatások karakterizálásával több korábbi vizsgálat is foglalkozik.⁴⁴ A leginkább releváns interakciót (mind komplexstabilitás, mind fluoreszcencia intenzitás növekedés szempontjából) 2,6-(di-*O*-metil)- β -ciklodextrinnel kapcsolatban írták le.

I. 5. Humán szérum albumin (HSA)

Az albumin a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje a vérplazmában. 66,5 kDa móltömegű, vízzoldékony makromolekula, melynek szintézise a májban történik. Amellett, hogy a vérplazma kolloidozmotikus (onkotikus) nyomásának fenntartásában kulcsszerepet játszik, az albumin puffer- és antioxidáns kapacitással, valamint pszeudo-enzimatis aktivitással is rendelkezik. Ezáltal rendkívül nagy élettani jelentőséggel bír. Mivel számos endogén (pl. zsírsavak, bilirubin, stb.) és exogén (gyógyszerek, xenobiotikumok) molekulával képes stabil komplexet képezni, ezen anyagok esetében ún. depó-hatást eredményez a vérben, ami többek között alacsonyabb szabad plazmakoncentrációt és emellett lassabb szervezetből történő eliminációt eredményez.^{45,50,46}

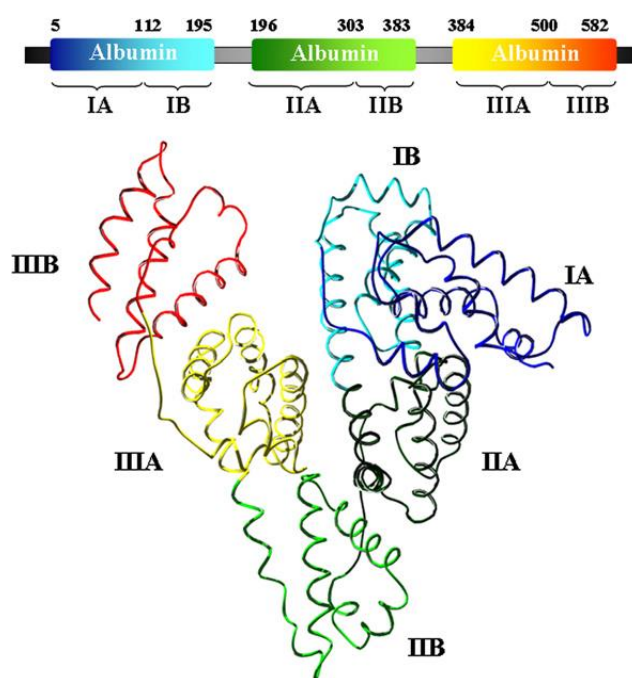
A humán szérum albumin primer struktúráját 585 aminosav alkotja, másodlagos szerkezetét főként α -hélixek építik fel (3. ábra). Térbeli szerkezete jellegzetes, gömbszerű, szívhez hasonló formát mutat. A HSA mindössze egyetlen triptofán aminosavat tartalmaz a 214-es pozícióban, e triptofán fluoreszcencia kioltását gyakran alkalmazzák albumin-ligandum interakciók vizsgálata kapcsán.⁴⁷ A HSA molekula három doménből áll, melyeket római

számokkal jelölünk (I, II és III), mindegyik domén további két-két aldoménre (szubdoménre) osztható (A és B). Az I-II illetve II-III domének együttes elhelyezkedése asszimmetrikus struktúrát hoz létre. A HSA multidomén szerkezetében számos különböző karakterű kötőhely található. Ezek közül a farmakológiailag/toxikológiailag aktív ligandumok többsége elsősorban két kötőhelyet preferál:

Site I (más néven Sudlow's site I, drug binding site I vagy acidic drug binding site), amely a IIA aldoménen helyezkedik el, ez például az antikoaguláns warfarin és számos nem-szteroid gyulladáscsökkentő elsődleges kötőhelye.

Site II (más néven Sudlow's site II, drug binding site II vagy benzodiazepine binding site), amely a IIIA aldoménen helyezkedik el, ez például a benzodiazepinek, az ibuprofen vagy az L-triptofán kötőhelye.

Szakirodalmi adatok alapján számos mikotoxin képes kölcsönhatásba lépni albuminnal (pl. ochratoxin A,^{48,51,47} patulin⁴⁹). Az albuminnal történő interakció több esetben jelentős mértékben meghatározza a molekula toxikokinetikai viselkedését. Ezért a toxin-HSA interakciókkal kapcsolatos kutatások napjainkban is folynak, többek között annak érdekében, hogy mindezek alapján hatékony prevenció és detoxikációs stratégiákat lehessen kidolgozni.



3. ábra: A humán szérum albumin (HSA) szerkezete (az ábra 50 hivatkozásban szereplő összefoglaló cikkben található).

I. 6. Jelen vizsgálatok előzményei

Témavezetőm és munkatársai az elmúlt évek során elsősorban az ochratoxin A (OTA) nevű mikotoxin molekuláris kölcsönhatásainak vizsgálatával foglalkozott. Vizsgálták többek között az OTA interakcióit különböző albumin specieszekkel (humán, marha és patkány),⁵² valamint az OTA leszoríthatóságát humán szérumból különböző gyógyszer molekulákkal és flavonoid aglikonokkal.⁵¹ Elsőként publikálták az OTA kölcsönhatását alkáli- és alkáliföldfém-ionokkal, valamint cink-ionnal, az OTA-magnézium interakciót HPLC-FLD analitikai módszer érzékenységének növelésére használták föl.⁵² Továbbá foglalkoztak OTA és ciklodextrinek (CD) kölcsönhatásainak vizsgálatával is, melynek kapcsán egy olyan kémiaiilag módosított CD-t találtak, ami lényegesen magasabb affinitással képes kötni a mikotoxint, mint a korábban leírt származékok.⁵³

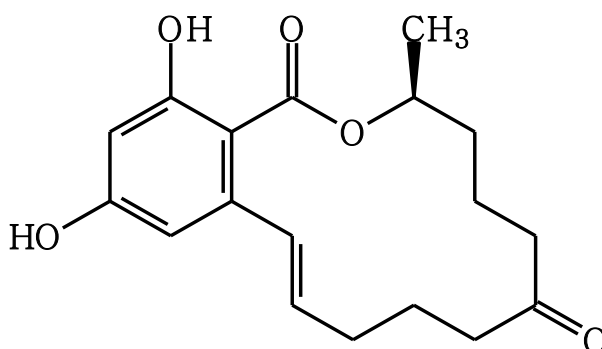
II. Célkitűzés

Jelen munkánkban célul tűztük ki a zearalenon fluoreszcenciás viselkedését befolyásoló mikrokörnyezeti tényezők vizsgálatát, annak érdekében, hogy eredményeinket a későbbiekben érzékenyebb fluoreszcenciás alapú analitikai módszerek kifejlesztésére használjuk fel. A zearalenon hazánkban – a mérsékelt éghajlatú országokhoz hasonlóan - egészségügyi és gazdasági problémát jelent, így szükség van a mindennapokban alkalmazható, nagy érzékenységgű analitikai eljárások kifejlesztésére. Ennek kapcsán munkánk során vizsgálni kívántuk a zearalenon fluoreszcencia spektroszkópiai viselkedését befolyásoló tényezőket: a pH, az eltérő karakterű oldószerek, valamint egyéb anyagok (pl. ciklodextrinek) hatását. Továbbá tanulmányozni kívántuk a zearalenon toxikológiai tulajdonságait potenciálisan befolyásoló kölcsönhatásokat. Mivel a fehérjével történő kölcsönhatás jelentős mértékben befolyásolhatja a zearalenon szervezetbeni viselkedését, jelen munkánkban a zearalenon kölcsönhatását is tanulmányoztuk humán szérum albuminnal.

III. Vizsgálati anyagok és módszerek

III. 1. Vizsgálati anyagok

Munkánk során a zearalenon [*1H*-2-Benzoxacyclotetradecin-1,7(*8H*)-dione,3,4,5,6,9,10-hexahydro-14,16-dihydroxy-3-methyl-,(*3S*,*11E*)] nevű mikotoxin környezetben előforduló legstabilabb formáját vizsgáltuk (4. ábra). A toxint, az analitikai tisztaságú oldószereket (acetonitril, metanol, etanol, *n*-propanol, *n*-butanol, dimetil-szulfoxido, *n*-hexán, toluol), az ammónium-acetátot és a humán szérum albumint a Sigma Aldrich Kft-től szereztük be. A felhasznált ciklodextrineket a Cyclolab Kft. biztosította számunkra, jelen munkánk során a DIMEB [heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin] nevű kémiaiilag módosított β -ciklodextrin származékot alkalmaztuk, mivel korábbi irodalmi adatok alapján ez indukálja a zearalenon fluoreszcencia intenzitásának legnagyobb mértékű növekedését.⁴⁴



4. ábra: A zearalenon (ZEA) kémiai szerkezete.

III. 2. Kísérletes módszerek

A fluorimetriás vizsgálatok során a méréseket egy Fluorolog $\tau 3$ spektrofluoriméterrel (Jobin-Yvon/Spex) végeztük (5. ábra). A műszer gerjesztési, emissziós, fluoreszcencia 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 4 nm-re állítottuk. A mérésekhez 1x1 cm-es kvarcküvetákat, valamint jobboldali detektálást alkalmaztunk. A méréseket 25 °C-on végeztük.

III. 3. Oldatkészítés

Munkánk során 5000 μM -os zearalenon (ZEA) törzsoldattal dolgoztunk, melynek elkészítéséhez spektroszkópiai minőségű etanolt használtunk. Erre azért volt szükség, mert a ZEA oldódása vízben korlátozott, azonban etanollal jól szolubilizálható. Méréseink során állandó 2 μM -os ZEA koncentrációkat alkalmaztunk különböző pufferekben. Emellett a vizsgálatainkhoz egyéb oldószereket is használtunk, a mikrokörnyezeti hatások tanulmányozása céljából: acetonitril, metanol, etanol, *n*-propanol, *n*-butanol, dimetil-szulfoxid, *n*-hexán és toluol. Vizsgálataink nagy részében különböző pH-jú 0,05 M-os ammónium-acetát pufferekkel dolgoztunk: a szükséges mennyiségű ammónium-acetátot vízben feloldottuk, majd ammónium-hidroxid és ecetsav oldatok felhasználásával, kalibrált pH-mérő műszert alkalmazva állítottuk be a kívánt pH-t. A puffer felhasználása előtt a pH ellenőrzését ismételtelen elvégeztünk. Ammónium-acetát puffert azért választottuk, hogy az alkáli- vagy alkáliföldfém kationokkal fellépő potenciális kölcsönhatásokat elkerüljük.

A ZEA-HSA interakció vizsgálatához pH = 7,4-es PBS puffert használtunk, hogy az extracelluláris fiziológiás körülményeket közelítsük. A puffer elkészítéséhez nátrium-kloridot (NaCl), kálium-kloridot (KCl), dinátrium-hidrogén-foszfátot (Na_2HPO_4) és kálium-dihidrogén-foszfátot (KH_2PO_4) alkalmaztunk. A vizsgálat során a HSA koncentrációkat 0-25 μM tartományban változtattuk, állandó 2 μM os toxinkoncentráció mellett.



5. ábra : Fluorolog $\tau 3$ spektrofluoriméter (Jobin-Yvon/Spex).

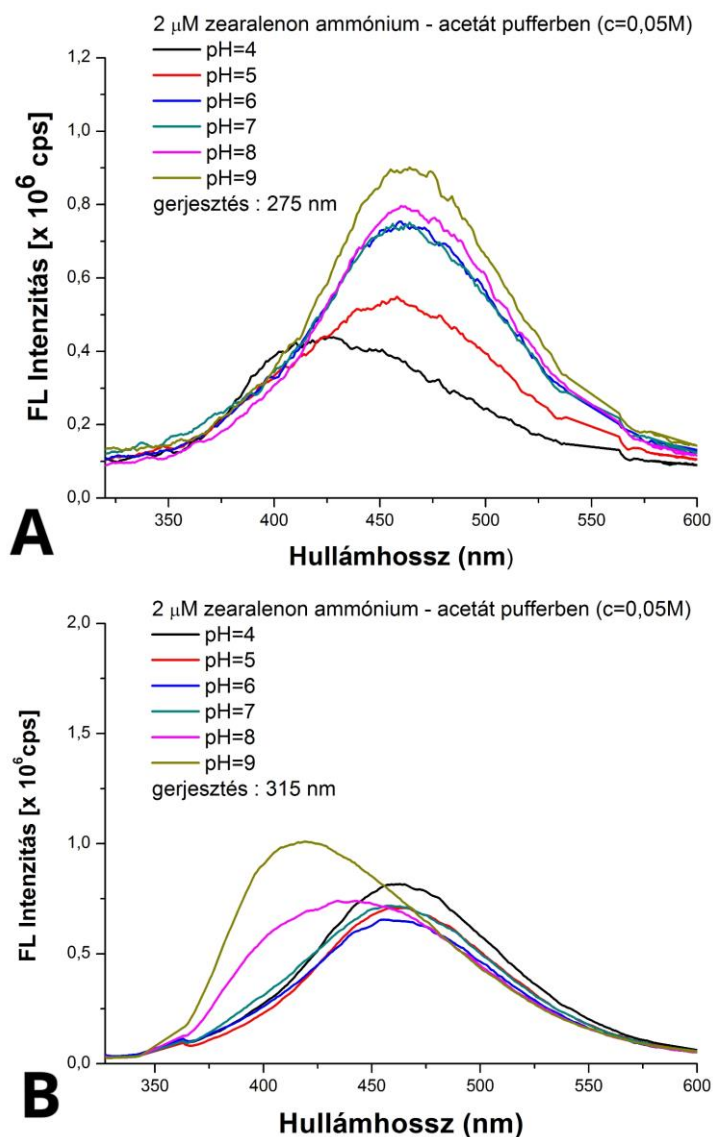
IV. Eredményeink

IV. 1. A zearalenon gerjesztési és emissziós spektrumainak vizsgálata

Elsőként a zearalenon gerjesztési és emissziós maximumait határoztuk meg. Az általunk alkalmazott spektrofluoriméter matrix scan mérési programcsomagot használtuk, melyet felhasználva megvizsgáltuk a gerjesztési és emissziós hullámhossz tartományokat, majd ennek segítségével egy háromdimenziós mátrixban összegeztük a kapott adatainkat. Két gerjesztési maximumot állapítottunk meg: 275 és 315 nm-en. A szakirodalommal összhangban és a jobb kiértékelhetőség kedvéért a továbbiakban a 315 nm-es gerjesztéssel dolgoztunk, azonban a 275 nm-es gerjesztéssel is végeztük megerősítő méréseket. Az eredmények a két gerjesztésen jól korreláltak. A zearalenon vizes oldatban az aktuális pH-tól függően kétféle formában lehet jelen. A savas funkcióval rendelkező mikotoxin alacsony pH-n nem-ionizált, míg magasabb pH-tartományban deprotonálódik, azaz ionizált formába kerül. A 6. ábra a két gerjesztési maximum alkalmazása mellett felvett emissziós spektrumok láthatóak pH = 4,0-9,0 tartományban, 0,05 M-os ammónium-acetát pufferben. A zearalenon deprotonálódása a fluoreszcencia emissziós spektrumokon jól nyomonkövethető. A protonált (nem-ionizált) formát 457 nm-es, míg a deprotonált (ionizált) formát 426 nm-es emissziós maximumok jellemzik.

A zearalenon tehát savas karakterű mikotoxin, mely két fenolos hidroxil csoportot tartalmaz a 13-as és a 15-ös számú szénatomon. Ezek közül átlagos körülmények között csak a 13-as hidroxil-csoport deprotonálódik, amit feltételezésünk szerint a 15-ös hidroxil- és az 17-es oxo-csoport között létrejövő hidrogénhíd-kötés stabilizál. Ebből arra következtetünk, hogy a 15-ös hidroxil-csoport deprotonálódása csak nagyon magas pH esetben következik be.

A ZEA savi disszociációs állandóját a pH = 8-as ammónium-acetát pufferben meghatározott spektrumokból számítottuk ki, mivel ezen a pH-n a toxin protonált és deprotonált formában egyaránt jelen van. A protonált formához rendelhető csúcsnak emissziója van a deprotonált formához tartozó csúcs területén és viszont. Tehát méréseink és a kiértékelések során mindkét forma fluoreszcencia intenzitásával számolnunk kellett. Az oldat teljes koncentrációjából és a 457 nm illetve 426 nm emissziós maximumokhoz tartozó fluoreszcencia értékekből kiszámítottuk a zearalenon savi disszociációs állandóját, amelyre $pK_a = 7,8$ értéket kaptunk. Az általunk számolt és a szakirodalomban szereplő ($pK_a = 7,6$)⁵⁴ értékek jó egyezést mutattak. Ezek alapján tehát kijelenthető, hogy a ZEA fiziológias körülmények között (pH = 7,4) protonált és deprotonált formában egyaránt jelen van, továbbá a nem-ionizált forma dominál.



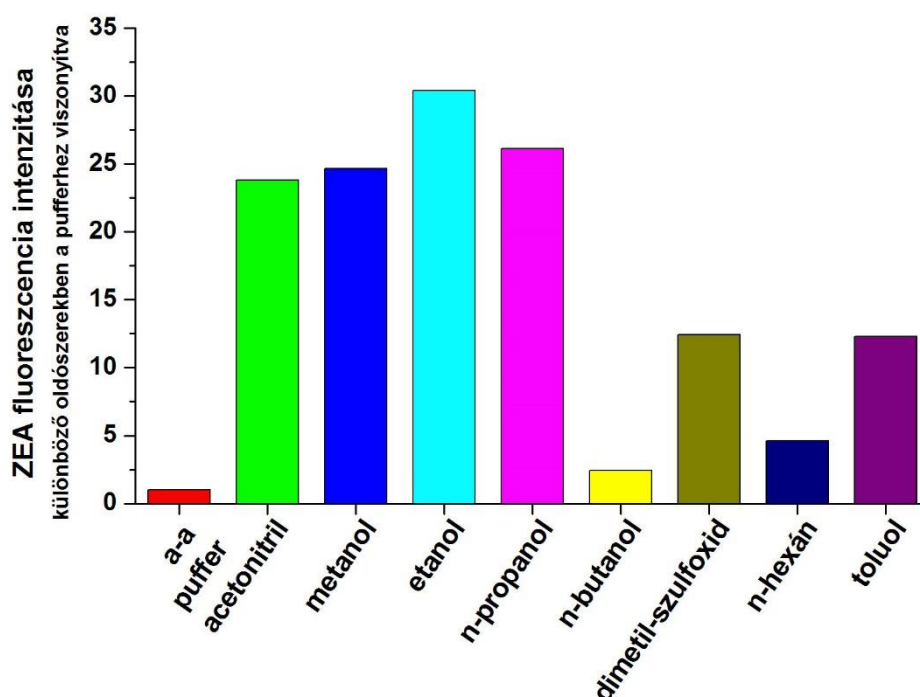
6. ábra : 275nm-es (A ábra) illetve 315 nm-es (B ábra) gerjesztési maximumon felvett emissziós spektrumok, pH=4-9 tartományban, 0,05 M-os ammónium-acetát pufferben, állandó 2 μ M-os ZEA koncentráció mellett.

IV. 2. Oldószerek hatása a ZEA fluoreszcenciájára

A zeaxalenon fluoreszcencia intenzitás változásának különböző molekuláris környezetben történő tanulmányozása céljából felvettük a ZEA emissziós spektrumait több eltérő karakterű szerves oldószerben. A különböző oldószerekben mért maximum fluoreszcencia intenzitásokat a ZEA ammónium-acetát pufferben mért intenzitásához viszonyítottuk (**Error! Reference source not found.**). A legmagasabb értékeket az etanol, propanol, metanol és acetonitril esetében kaptuk, az alkalmazott pufferben mértékhez képest. Mindezek közül a zeaxalenon etanolban történő oldása során érték el a legnagyobb, közel

harmincszoros inenzitás növekedést. Ezen értéket követte a propanol huszonhat, a metanol huszonnégy és az acetonitril közel huszonháromszoros fluoreszcencia intenzitásnövekedéssel. Toluolban közel tizenkétszeres intenzitásnövekedést mértünk, míg hexánban és butanolban a pufferben kapott eredményekhez képest kisebb eltéréseket tapasztaltunk.

A kapott eredmények a zearalenon szolváburkának megváltozásával magyarázhatók. A hidrátburok kialakulása a mikotoxin fluoreszcencia intenzitásának részleges kioltásával jár, mely jelenség ammónium-acetát pufferben jól megfigyelhető. Ezen okból kifolyólag szerves oldószerekben magasabb fluoreszcencia intenzitás értékeket kaptunk.



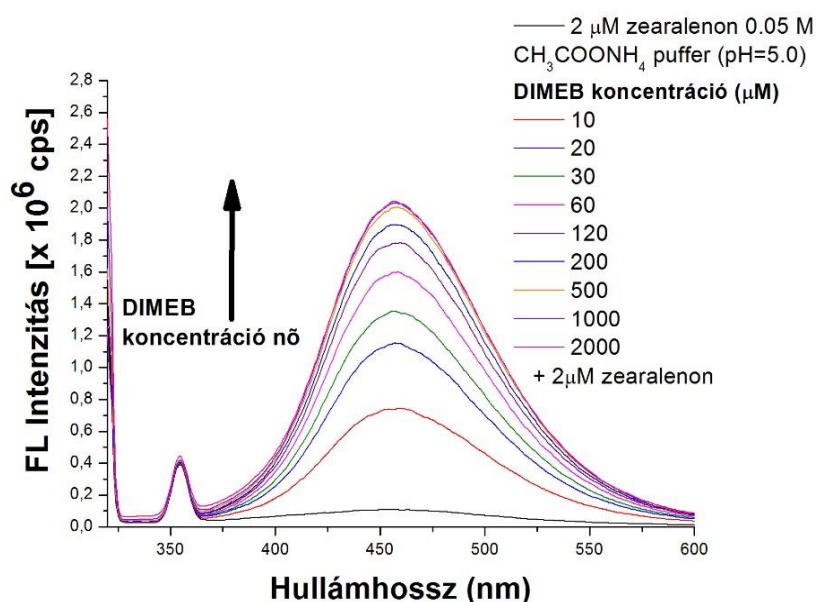
7. ábra: ZEA emissziós spektrumai több eltérő karakterű szerves oldószerben (acetonitril, metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, dimetil-szulfoxid, n-hexán, toluol) 0,05 M-os ammónium-acetát pufferben, állandó 2 μ M-os ZEA koncentráció mellett.

IV. 3. Zearalenon – ciklodextrin kölcsönhatás vizsgálata

Vizsgálataink során a zearalenon fluoreszcencia intenzitásának változását tanulmányoztuk 0,05 M-os pH 5-ös ammónium-acetát pufferben, növekvő DIMEB koncentráció jelenlétében (0-2000 μ M). A kapott eredményeinket az oldószerhatás vizsgálatához hasonlóan a ZEA ammónium-acetát pufferben tapasztalt fluoreszcencia intenzitás értékeihez viszonyítottuk. Eredményeink rámutattak, hogy mintegy 200 μ M-os (100-

szoros) ciklodextrin koncentráció mellett, több mint 20-szoros fluoreszcencia intenzitásnövekedés látható (8. ábra). A megemelkedett fluoreszcenciás jel a ciklodextrin jelenlétében a következőképpen magyarázható: a ciklodextrinnel kölcsönhatásba lépve, azaz a lipofil belső üregbe kerülve a zearalenon legalábbis részlegesen deszolvatálódik és apolárisabb környezetbe kerül. A kromofór az apoláris környezetben magasabb fluoreszcencia intenzitással rendelkezik, mivel a hidratburok részleges kioltó hatása nem érvényesül.³¹

Korábbi kutatások foglalkoztak különböző zearalenon származékok ciklodextrinek hatására mutatott fluoreszcencia intenzitás változásaival.⁵⁵ Az eredmények alapján arra következtettek, hogy a befogadó mechanizmust a hatodik szénatomon levő csoportok befolyásolják. β -ciklodextrin jelenlétében a legmagasabb fluoreszcencia intenzitásról a ZEA esetében számoltak be, származékai esetében valamivel kisebb volt a fluoreszcencia növekedés.⁴⁴



8. ábra: A ZEA-DIMEB komplex képződése során a zearalenon flureszcencia intenzitás növekedése, emelkedő DIMEB koncentráció (0-2000 μM), állandó 2 μM -os ZEA koncentráció és 25 °C hőmérséklet mellett, 0,05 M-os ammónium-acetát pufferben.

IV. 4. A zearalenon – HSA kölcsönhatás

Humán szérum albuminnal történő méréseinket pH = 7,4-es PBS pufferben végeztünk, mely pH és ionerősség tekintetében is jól közelíti az extracelluláris fiziológiás körülményeket. A HSA adagolása során a koncentráció emelkedésével a fluoreszcencia intenzitás folyamatos

növekedését tapasztaltuk (9. ábra). Azonban a ZEA által adott fluoreszcenciás jel mellett, az alkalmazott 315 nm-es gerjesztési hullámhossz esetében a HSA által adott jelentős mértékű háttérfluoreszcenciával is számolnunk kellett (9. ábra). A 9. ábra látható, hogy a ZEA-HSA rendszerben mért fluoreszcencia maximumok intenzitása 0-7,5 μM HSA jelenlétében nem-lineáris, szaturációs jellegű függvényt, míg 10 μM HSA koncentráció felett már lineáris emelkedést mutat. A görbe szokatlan alakját azzal magyarázhatjuk, hogy miután az összes mikotoxin kötött állapotba került, a továbbiakban már csak a HSA által adott fluoreszcenciás jel eredményez intenzitásnövekedést, ami érthető módon lineáris függvényt eredményez. Ha kivonjuk egymásból a 9. ábra A és B részében ábrázolt mérési pontokat, akkor a 9. ábra jutunk, ami megfelel a ZEA albuminhoz való kötődése által indukált intenzitásnövekedésnek. Az így kapott pontokra a Benesi-Hildebrand összefüggést alkalmazva, grafikusan meghatározhatjuk a kölcsönhatást kísérő stabilitási állandót (9. ábra):

$$\frac{I_0}{I-I_0} = \frac{1}{A} + \frac{1}{A * K} * \frac{1}{[HSA]}$$

I_0 – a ZEA fluoreszcencia intenzitása albumin nélkül

I – a mért fluoreszcencia intenzitás a mintában

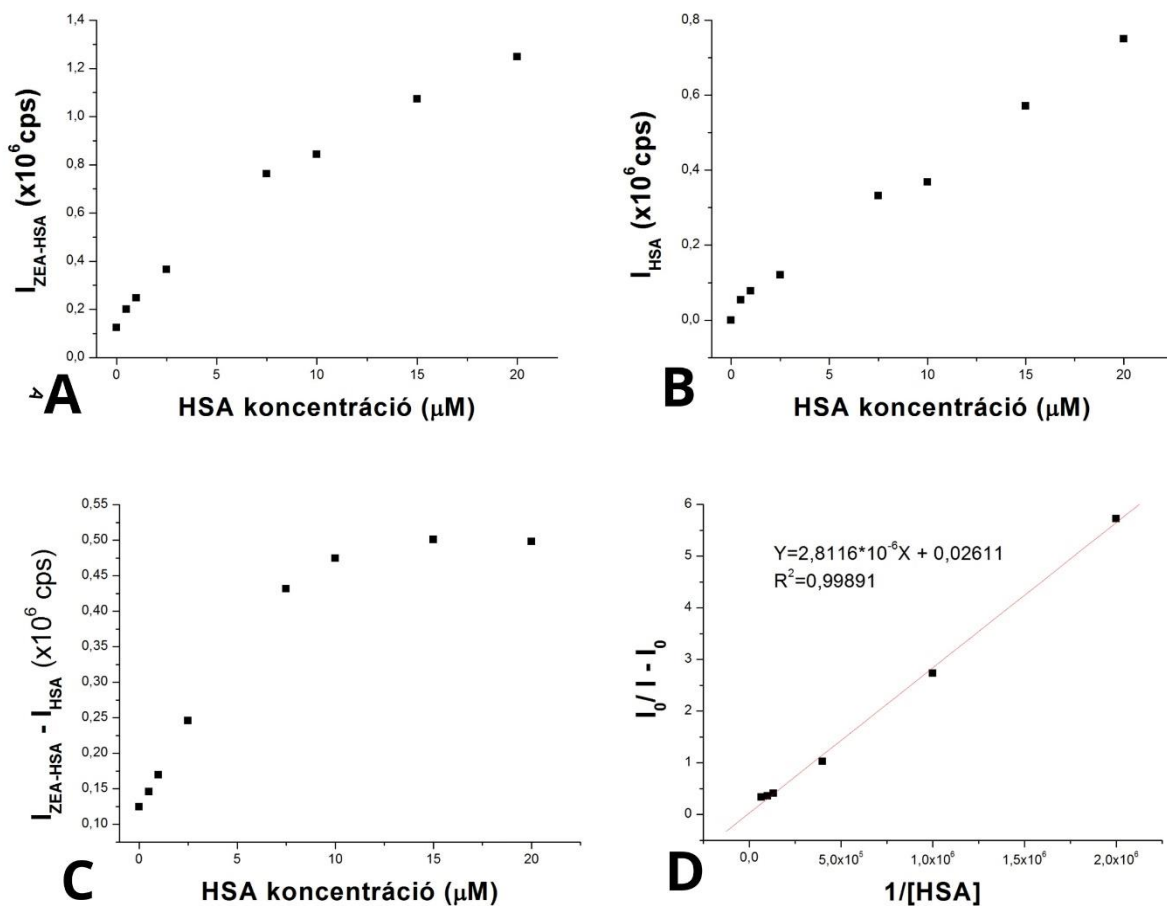
A – konstans

$[HSA]$ – a HSA koncentrációja a mintában

K – stabilitási állandó

n – a kötőhelyek száma

Az 1:1-es sztöchiometriájú modell kiváló illeszkedéséből arra következtetünk, hogy a zearalenon egy fő kötőhellyel rendelkezik a humán albumin esetében. Eredményeink alapján a ZEA-HSA komplex kötési állandója $9,286 \cdot 10^4 \text{ dm}^3/\text{mol}$, ami farmakológiai szempontból egy közepesen erős albuminkötődésnek felel meg.



9. ábra : ZEA-HSA kölcsönhatás fluoreszcenciás tanulmányozása. A: ZEA-HSA fluoreszcencia intenzitása növekvő HSA koncentráció függvényében. B: HSA fluoreszcencia intenzitása növekvő HSA koncentráció függvényében. C: (ZEA-HSA) – HSA fluoreszcencia intenzitása növekvő HSA koncentráció függvényében. D: Benesi-Hildebrand ábrázolás ZEA-HSA 1:1 arányú komplex esetében

A ZEA-HSA kölcsönhatást ezen eredményeink alátámasztásának érdekében fluoreszcencia anizotrópia módszerrel is tanulmányoztuk. A kisméretű molekulák, mint például a zearalenon, vizes oldatban magas rotációs szabadsággal rendelkeznek. Nagy mozgási szabadság esetén a mintát síkban polarizált fénnel megvilágítva nagy valószínűséggel az emittált fény jelentős része depolarizálttá válik (fotoszelekció), így alacsony anizotrópia értéket kapunk. Ha a kis molekula egy makromolekulához (pl. HSA) kötődik, a rotációs szabadsága nagymértékben lecsökken, így a síkban polarizált fénnel megvilágítva az emittált fény nagyobb eséllyel polarizált marad. Tehát az alacsony rotációs szabadsággal rendelkező molekulák (pl. HSA vagy ZEA-HSA komplex) magas anizotrópia értékkel jellemezhetők.

A fluoreszcencia anizotrópia meghatározása a következő egyenlet alapján történt:

$$r = \frac{I_{VV} - G * I_{VH}}{I_{VV} + 2 * G * I_{VH}}$$

r – fluoreszcencia anizotrópia

I_{VV} – a mintában mért fluoreszcencia intenzitás a polarizációs szűrők vertikális-vertikális állásakor

I_{VH} – a mintában mért fluoreszcencia intenzitás amikor a polarizátor és az analizátor szűrők vertikális-horizontális állásban vannak

G – műszeresen meghatározott optikai korrekciós faktor

Mivel az általunk alkalmazott körülmények között a ZEA és a HSA egyaránt ad fluoreszcenciás jelet, és mivel a fluoreszcencia anizotrópia additív sajátosságú, a ZEA és a HSA anizotrópia értékeinek meghatározását követően ki tudjuk számolni, hogy kölcsönhatás hiányában mekkora érték várható az adott összemérésben:

$$r = f_{ZEA} * r_{ZEA} + f_{HSA} * r_{HSA}$$

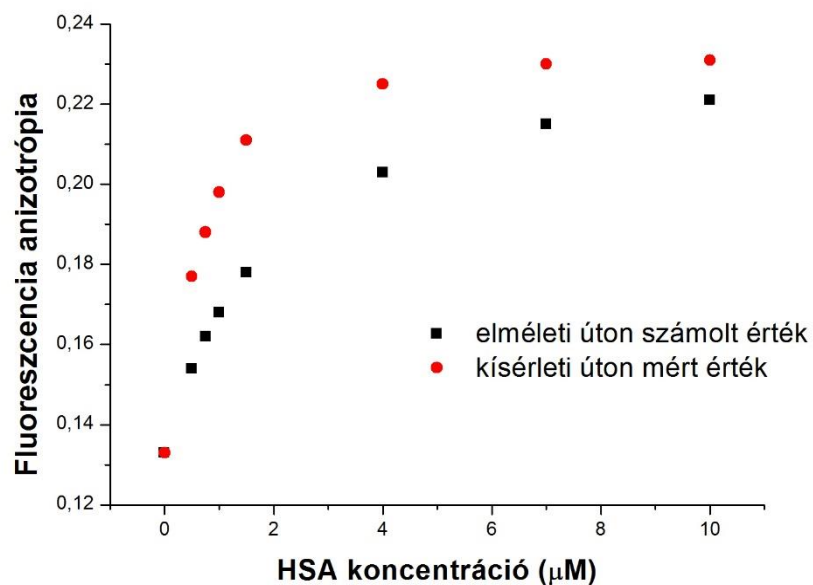
r - fluoreszcencia anizotrópia

f_{ZEA} – ZEA arányos mennyisége a rendszerben

r_{ZEA} – ZEA fluoreszcencia anizotrópia értéke

f_{HSA} – HSA arányos mennyisége a rendszerben

r_{HSA} - HSA fluoreszcencia anizotrópia értéke



10. ábra: Fluoreszcencia anizotrópia elméleti úton számolt értékének és kísérleti úton kapott értékének összehasonlítása, állandó 2 μM zearalenon koncentrációhoz növekvő HSA koncentráció (0-10 μM).

Ezt követően 2 μM zearalenonhoz 0-10 μM közötti HSA koncentrációkat adtunk és megmértük az oldatok fluoreszcencia anizotrópia értékeit. Ahogy az a 10. ábra látható, a mért értékek jelentősen meghaladták a számoltakat. A magyarázat a következő: míg az albumin anizotrópiája egy kismolekula kötődésének hatására nem változik jelentősen, addig a ZEA anizotrópiája a HSA-val történő kölcsönhatás eredményeként jelentős mértékben emelkedik, így fokozva a rendszerben mért „össz-anizotrópiát” is. Tehát ezen eredmények is igazolták a ZEA humán albuminnal történő kölcsönhatását.

Összefoglalás

Munkánk során a zearalenon fluoreszcenciás viselkedését befolyásoló mikrokörnyezeti tényezőket tanulmányoztuk. Érdeklődésünk középpontjában a zearalenon toxikológiai tulajdonságait potenciálisan befolyásoló kölcsönhatások állnak, így jelen munkánkban a zearalenon kölcsönhatását is tanulmányoztuk humán szérum albuminnal.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tettük:

- Megvizsgáltuk a pH hatását a ZEA fluoreszcencia spektrumára mely alapján megállapítottuk, hogy az ionizált és a nem ionizált forma spektroszkópiailag jól elkülöníthető.
- Acetonitril, metanol, etanol, propanol, valamint DIMEB jelenlétében a ZEA fluoreszcenciája jelentős mértékben megemelkedett. Vélhetően ezen oldószerek és a DIMEB pld. eluens komponensként alkalmazva pozitív módon befolyásolják a ZEA fluoreszcencia intenzitását.
- Elsőként azonosítottuk a ZEA-HSA kölcsönhatást, eredményeink farmakológiai értelemben közepesen erős kölcsönhatásra utalnak.

Reményeink szerint eredményeink felhasználhatóak lesznek fluoreszcenciás analitikai módszerek érzékenységének fejlesztéséhez valamint hozzájárulnak a zearalenon szervezetbeni viselkedésének feltérképezéséhez.

Irodalomjegyzék

- ¹ L.B. Bullerman, L.L. Schroeder, K.-Y. Park, 1984. *J. Food Prot.* 47 637.
- ² N. W. Turnera, S. Subrahmanyamb, S. A. Piletsky, 2009. *Analytica Chimica Acta*, 632 168–180
- ³ A. Rahmani, S. Jina, F. Soleimany, 2010. *Food Additives and Contaminants*, 27, 12, 1683–1693
- ⁴ Y. R.-Carrasco, J.C. Moltó, H. Berrada, J. Mañes, 2014. *Food Chemistry* 146. 212–219
- ⁵ P.M. Scott, 1995. *Food Addit. Contam.* 12 395.
- ⁶ R. Pena, M.C. Alcaraz, L. Arce, A. Rios, M. Valcarel, 2002. *J. Chromatogr. A* 967, 303.
- ⁷ J.G. Wilkes, J.B. Sutherland, 1998. *J. Chromatogr. B* 717, 135.
- ⁸ G. Devegowda, B.I.R. Arvind, M.G. Morton, 1996. *Proc. Aust. Poult. Sci. Symp.* 8, 103–106.
- ⁹ M. Megharaj, I. Garthwaite, J.H. Thiele, 1997. *Lett. App. Microbiol.* 24, 329–333.
- ¹⁰ K.S. McKenzie, A.B. Sarr, K. Mayura, R.H. Bailey, D.R. Millar, T.D. Rogers, W.P. Corred, K.A. Voss, R.D. Plattner, L.F. Kubena, T.D. Phillips, 1997. *Food Chem. Toxicol.* 35, 807–820.
- ¹¹ E.S. Abd Alla, 1997. *Nahrung* 41, 362–365.
- ¹² S.L. Lemke, P.G. Grant, T.D. Phillips, 1998. *Food Chem.* 46, 3789–3796.
- ¹³ A.J. Ramos, E. Hernandez, J.M. Pla-Delfina, M. Merino, 1996. *Int. J. Pharm.* 128, 129–137.
- ¹⁴ D. Ryu, M.A. Hanna, L.B. Bullerman, 1999. *J. Food Prot.* 62, 1482–1484.
- ¹⁵ T. Kuiper-Goodman, P.M. Scott, H. Watanabe, 1987. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 7, 253–306.
- ¹⁶ JECFA, 2000. Zearalenone. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Ed.), Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO/FAO Food additives Series 44. IPCS – International Programme on Chemical Safety. WHO, Geneva.
- ¹⁷ B. Flannigan, 1991. Mycotoxins. In: D’Mello, J.P.F., Duffus, C.M., Duffus, J.H. (Eds.), Toxic Substances in Crop Plants. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 226–257.
- ¹⁸ E. ConKova, A. Laciakova, B. Pastorova, H. Seidel, G. Kovac, 2001. *Toxicol. Lett.* 121, 145–149.
- ¹⁹ K. Maaroufi, L. Chekir, E.E. Creppy, F. Ellouz, H. Bacha, 1996. *Toxicon* 34, 534–540.
- ²⁰ J.H. Forsell, M.F. Witt, J.H. Tai, R. Jensen, J.J. Pestka, 1986. *Food. Chem. Toxicol.* 24, 213–219.
- ²¹ J.J. Pestka, J.H. Tai, M.F. Witt, D.E. Dixon, J.H. Forsell, 1987. *Food Chem. Toxicol.* 25, 297–304.
- ²² M.B. Lioi, A. Santoro, R. Barbieri, S. Salzano, M.V. Ursini, 2004. *Mutat. Res.* 557, 19–24.

-
- ²³ L. Ghedira-Chekir, A. Zakhama, F. Ellouz, S. Dhouib, E.E. Creppy, H. Bacha, 1998. *Chem. Biol. Interact.* 113, 15–25.
- ²⁴ CCFAC, 2000. Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Posting date. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Position paper on zearalenone. Publication CCFAC 00/19. Codex Alimentarius Commission, Rome, Italy.
- ²⁵ A. Zinedine, J. Miguel Soriano, J. C. Molto, J. Man, 2007. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1–18
- ²⁶ M. Schollenberger, H.M. Muller, M. Rühle, S. Suchy, S. Planck, W. Drochner, 2006. *Mycopathologia* 161, 43–52.
- ²⁷ J.W. Bennett, M. Klich, 2003. *Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497–516.
- ²⁸ A. Bottalico, A. Visconti, A. Logrieco, M. Solfrizzo, C.J. Mirocha, 1985. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 547–551.
- ²⁹ K.E. Richardson, W.M. Hagler, C.J. Mirocha, 1985. *J. Agric. Food Chem.* 33, 862–866.
- ³⁰ Magyar Szabványügyi Testület, Dokumentumazonosító: 148939, Hivatkozási szám: MSZ EN 15792:2010, Takarmányok. A zearalenon meghatározása takarmányban. Nagy felbontású folyadékkromatográfiás módszer fluoreszcenciás detektálással és immunaффinitás-oszlopon végzett tisztítással, <http://www.mszt.hu>
- ³¹ A. Mallick, P. Purkayastha, N. Chattopadhyay, 2007. *J. Photochem. Photobiol. C: Rev* 8, 109.
- ³² C. Dall'Asta, A. Faccini, G. Galaverna, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, 2008. *Mycotoxin Res.*, 24, 14
- ³³ C.M. Maragos, M. Appell, 2007. *J. Chromatogr. A*, 1143, 252
- ³⁴ P. Cozzini, G. Ingletto, R. Singh, C. Dall'Asta, 2008. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 2474
- ³⁵ M. Appell, C.M. Maragos, American Chemical Society, 2009. Washington DC, 293–305
- ³⁶ D.K. Rana, A. Sarkar, S. Dhar, T.K. Mandal, S.C. Bhattacharya, 2010. *J. Lumin.*, 130, 1106
- ³⁷ N.A. Begum, N. Roy, S. Mandal, S. Basu, D. Mandal, 2009 *J. Lumin.*, 129, 158
- ³⁸ A. Mallick, P. Purkayastha, N. Chattopadhyay, 2007. *J. Photochem. Photobiol. C: Rev*, 8, 109
- ³⁹ P. Goswami, D.K. Das, 2011. *J. Lumin.*, 131, 760
- ⁴⁰ C. M. Maragos, Michael Appell, 2007. *J. Chrom. A*, 1143, 252–257
- ⁴¹ A. Pons, V. Lavigne, Y. Landais, P. Darriet, D. Dubourdieu, 2008. *J. Agric. Food. Chem* 56, 1606–1610
- ⁴² C. Yuan, Z. Jin, X. Xu, H. Zhuang, W. Shen, 2008. *Food Chem* 109, 264–268.

-
- ⁴³ G.P. Blanch, M.L. del Castillo, M. del Mar Caja, M. Perez-Mendez, S. Sanchez-Cortes, 2007. *Food Chem* 105, 1335–1341.
- ⁴⁴ C. Dall'Asta, A. Faccini, G. Galaverna, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, 2009. *J. Incl Phenom Macrocycl Chem* 64:331–340
- ⁴⁵ G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, 1975. *Mol. Pharmacol.* 11, 824–832.
- ⁴⁶ L.L. Brunton, B.A. Chabner, B.C. Knollman, Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, twelfth ed., The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 2011.
- ⁴⁷ J. L. Perry, T. Christensen, M. R. Goldsmith, E. J. Toone, D. N. Beratan, J. D. Simon, 2003. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 7884–7888
- ⁴⁸ Y. V. Il'ichev, J. L. Perry, J. D. Simon, 2002. *J. Phys. Chem. B.*, 106, 460–465
- ⁴⁹ L. Yuqin, Y. Guirong, Y. Zhen, L. Caihong, J. Baoxiu, C. Jiao, G. Yurong, Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, 2014, Article ID 734850, 9
- ⁵⁰ G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, 2012. *Molecular Aspects of Medicine* 33, 209–290
- ⁵¹ M. Poór, S. Kunsági-Máté, T. Bencsik, J. Petrik, S. Vladimir-Knežević, T. Kőszegi, 2012. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 279–283.
- ⁵² M. Poór M, S. Kunsági-Máté, G. Matisz, Y. Li, Zs. Czibulya, B. Peles-Lemli, T. Kőszegi, 2013, *J. Lumin.* 135, 276–280.
- ⁵³ M. Poor, S. Kunsagi-Mate, L. Szente, G. Matisz, Gy. Secenji, Zs. Czibulya, T. Koszegi, 2015, *Food Chemistry* 172 (2015) 143–149
- ⁵⁴ S.L. Lemke, P.G. Grant, T.D. Phillips, 1998. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3789–3796
- ⁵⁵ V. Seidel, E. Poglits, K. Schiller, W. Lindner, 1993, *Journal of Chromatography*, 635, 227–235