

## Levél az Olvasóhoz

Megjelent a megújult *Magyar Kémiai Folyóirat* első évfolyama, eltelt a Magyar Kémikusok Egyesülete szabta moratórium első fele, melyet a lap életképességének bizonyítására adott. Az előfizetők és olvasók lassan már felmérhetik, eddig mennyit sikerült megvalósítani terveinkből, betölti-e hivatását a lap, megérdemli-e a további támogatást, az általa megtestesített hagyomány további őrzését.

A megjelentetés költségeinek fedezetét az elmúlt és a jelen évre is sikerült biztosítani. A Magyar Kémikusok Egyesületének nem kellett anyagi terheket vállalnia ehhez, sőt az is lehetővé vált, hogy a korábbi előfizetési díjat igen jelentősen, az egyéni előfizetők számára az addiginak kevesebb, mint ötöd részére csökkentjük. Ez a *Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Tudományok Osztálya*, a *Magyar Egészségtudományi Társaság*, a *Magyar Elválasztás-technikai Társaság*, az *Ipari Műszaki Fejlesztésért Alapítvány*, a *Merck Kft.*, a *Biogal Rt.* és a *Spektrum-3D Kft* jelentős támogatásának köszönhető. E támogatások kieszközlésében nagyon nagy érdeme van † *Hlavay József*, *Nyiredy Szabolcs* és *Záray Gyula* professzor uraknak, akik szívükön viselve a Magyar Kémiai Folyóirat életben tartásának ügyét, sokat tettek azért, hogy ez sikerülhessen. Rajtuk kívül is többen ajánlották fel segítségüket. Mindnyájuknak köszönet érte – az egész magyar kémikus-közösség nevében!

A *Magyar Kémiai Folyóirat*, mint egyetlen magyar nyelvű tudományos kémiai szaklap fenntartása mellett egyik legfontosabb érv, hogy ez az orgánium juttathatja el a határainkon kívül élő vegyész kollegáinkhoz a folyamatosan gazdagodó és megújuló hiteles szaknyelvet, az általános érvényű nemzetközi szabályokkal összhangban levő és a magyar nyelv természetével is harmonizáló régi és új szakkifejezéseket, amelyeket a közhasználat szentesített, vagy amelyeket a korszerű közlemények szerzői elfogadásra ajánlanak. E cél elérésére kezdeményeztük a környező országokban, határainkon kívül, a történelmi Magyarország területén élő és működő magyar anyanyelvű kémikus kollegáink számára a folyóirat ingyenes eljuttatását. Összegyűjtöttük az erdélyi, felvidéki, vajdasági és kárpátaljai igénylő intézmények és kollegák címét és felszólítottuk a magyarországi kémikusokat, hogy kettős előfizetéssel, illetve külföldi kedvezményezettnek számára befizetve a lap árát, csatlakozzanak a kezdeményezéshez. Örömmel jelenthetem, hogy sikerült minden igénylő számára hazai befizetőt találni, s voltak olyan kémikusok is, akik több példány előfizetését is vállalták. Nevük felsorolásával köszönjük önzetlen segítőkészségüket, amellyel egyúttal a Magyar Kémiai Folyóirat további megjelentetéséhez is hozzájárultak:

*Antus Sándor, Balogh Sándor, Bazsa György, Bánhegyi György, Blaskó Gábor, Czirák Katalin, Csabai Andrea, Deckerné dr. Mayer Zsuzsa, Farkas József, Fogarasi Géza, Fülöp Ferenc, Görög Sándor, Horváth Ágnes, Huszthy Péter, Janurik Endre, Kálmán Alajos, Kálmán Erika, Keglevich György, Körtvélyessy Gyula, Lipták András, Magyarfalvi Gábor, Markó László, Márta Ferenc, Medzihradzky Kálmán, Meiszel László, Pillich Lajos, Pongor Gábor, Schay Zoltán, Sohár Pál, Steinbach Sándor, Surján Péter, Szalontai Gábor, Szepes László, Tarczay György és Tóth Klára.*

A teljes magyar vegyész-társadalom nevében szeretném köszönetem kifejezni valamennyi kollegánknak, aki vállalták a kéziratok elbírálásának nagy szakértelmet, sok fáradságot és gondosságot igénylő, gyakran hálátlan feladatát. Igyekeztünk kompetens, független és a véleményezést készséggel elvállaló szaktekintélyeket keresni, s senkit sem túlterhelni, arra is figyelve, hogy a lektorálás ne okozzon késedelmet a közzétételben, és hogy csak olyan kéziratok kerülhessenek a lapba, amelyek szakmai, formai és nyelvi szempontból egyaránt megfelelnek a követelményeknek, s hozzájárulnak legfőbb célunk eléréséhez, a lap szakmai színvonalának megőrzése, illetve lehetőség szerinti emelése terén.

A 109-110. kötet lektorai:

*Antus Sándor, Árkai Péter, Bárdossy György, Berkó András, Bernáth Gábor, Bruknerné Wein Alice, Csámpai Antal, Csempesz Ferenc, Dékány Imre, Dobosi Gábor, Embey-Isztin Antal, Felinger Attila, Fodor Péter, Fonyó Zsolt, Fórizs István, Fülöp Ferenc, Gáspár Vilmos, Hajós György, Herczegh Pál, Hermecz István, Hidegh Kálmán, † Hlavay József, Horvai György, Horváth Ottó, Horvölgyi Zoltán, Inczédy János, Joó Ferenc, Joó Pál, Keglevich György, Keszei Ernő, Kilár Ferenc, Király Zoltán, Kiricsi Imre, Kollár László, Koncz István, Korbonits Dezső, Kuzsmann János, Kürti Jenő, Lipták András, Marton Lajos, Mátyus Péter, Mayer István, Nógrádi Mihály, Novák Mihály, Nyiredy Szabolcs, Paizs Csaba, Patonay Tamás, Poppe László, Rábai József, Rohonczy János, Sas Barnabás, Schneider Gyula, Simonyi Miklós, Sólyom Sándor, Speier Gábor, Szalontai Gábor, Szántó Zsuzsanna, Szekrényesy Tamás, Szepes László, Szilágyi László, Timári Géza, Tombác Etelka, Tóth Klára, Varga Imre, Varsányi Zoltánné, Verhás József, Vető István, Viczián István és Zrínyi Miklós.*

Útjára indítva a *Magyar Kémiai Folyóirat* 111. évfolyamát köszönöm szerzőink, előfizetőink és olvasóink bizalmát, erkölcsi támogatását és figyelmét, s teszem ezt abban a reményben, hogy a magyar kémia e fontos orgánuma betölti hivatását és továbbra is szolgálja a magyarországi kémiai tudományt, e terület szakembereit.

Sohár Pál  
főszerkesztő

**A 109-110. évfolyam szerzőinek indexe**

Alloul Henri .....	112	Matus Péter .....	112
Balázs Barbara .....	105	Mernyák Erzsébet .....	40
Batta Gyula .....	127	Mucsi Zoltán .....	43
Berecz Endre .....	47	Nagy Krisztina .....	29
Biczók László .....	29	Náray-Szabó Gábor .....	212
Bitter István .....	105	Nemecz Ernő .....	204
Borbás Anikó .....	60	Novák Lajos .....	16
Csokai Viktor .....	105	Pálovics Emese .....	64
Demény Attila .....	192	Pantó György .....	163
Dobosi Gábor .....	166	Pászli István .....	76
Embey-Isztin Antal .....	166	Rigó Tímea .....	116
Fodorné Csányi Piroska .....	48	Rudas Anita .....	81
Fogassy Elemér .....	64	Sajgó Csanád .....	183
Fonyó Zsolt .....	48	Samu Zsuzsa .....	34
Forintos Henrietta .....	37	Schindler József .....	64
Galambos Gézáné .....	43	Schneider Gyula .....	40
Gondi Ferenc .....	204	Simon Kálmán .....	43
Görög Sándor .....	53	Sipos Péter .....	204
Grün Alajos .....	105	Skodáné Földes Rita .....	21
Háger-Veress Ádám .....	34	Sohár Pál .....	94, 120
Hajós György .....	100	Speier Gábor .....	93
Harangi Szabolcs .....	173	Stájer Géza .....	6
Hartányi Zsuzsanna .....	204	Sz. Márczy Judit .....	34
Héberger Károly .....	71	Sz. Németh Ágnes .....	34
Hermez István .....	43	Szabó Anna .....	43
Hetényi Magdolna .....	183	Szabó Kálmán .....	81
Hollósi Miklós .....	211	Szajáni Béla .....	34
Horváth István .....	199	Szalontai Gábor .....	143
Inczédy János .....	3, 85, 89	Szelke Helga .....	37
Jakus Judit .....	71	Szendrei Géza .....	204
Jean Marie Lehn .....	46	Szilágyi László .....	136
Kálmán Erika .....	116	Telegdi Judit .....	116
Keglevich György .....	37	Timári Géza .....	43
Kiss Violetta .....	64	Tompa Kálmán .....	148
Kollár László .....	21	Tóth Gábor .....	105
Kovács János .....	37	Tóth György .....	199
Kovács Péter .....	16	Tóth István .....	40
Körtvélyesi Tamás .....	37	Vanyúr Rozália .....	71
Kriza György .....	112	Vasváriné Debreczy Lelle .....	43
László Krisztina .....	76	Vető István .....	199
Lipták András .....	60	Wölfling János .....	40
Martos János .....	153	Zaránd Pál .....	153

## In memoriam Szejtli József



**Szejtli József**

**1933-2004**

Talán kevesen vannak a szakmában, akik ne ismerték volna Szejtli József vegyészmérnököt, a tudós embert, a tudomány szervezőt, a feltalálót, a vállalat alapító és vállalatépítő üzletembert, a generációkat oktató egyetemi tanárt. Szejtli professzor személyében a hazai és a nemzetközi kémiai tudomány egy kimagasló és sokoldalú alakját veszítette el.

Életműve, neve elválaszthatatlanul összeforrt a ciklodextrin technológiával, a szupramolekuláris kémiával, az általa alapított vállalat neve pedig a megbízható szakmai tudás és innováció garanciája lett itthon és világszerte. Nagy gonddal épített vállalata,

a Cyclolab, ma márkanév a nemzetközi piacon. A ciklodextrin technológiát - Lipták professzor úr szavait kölcsönözve - Szejtli József tette kémiai hungarikummá.

A nyolcvanas években írt két ciklodextrin tárgyú alapl műve (kézikönyvek) ma a világ minden ciklodextrin laboratóriumában fellelhető, neve és az általa népszerűvé és sikeressé tett tudományterület ma már tankönyvi fejezetek. A számos ciklodextrin tartalmú, piacra került sikertermék szinte mindegyikében fellelhető a keze nyoma, 'ércnél maradóbb' nyomot hagyott maga után, mely nemcsak őt, hanem mindannyiunkat túl fog élni. Gyors gondolkodású, gyorsan és dinamikus tervező, mérnöki precíz végrehajtó és pragmatikus cégvezető volt. Dinamizmusa, gyorsasága azonban sosem ment a minőség rovására. Munkássága során több mint 490 tudományos közleményt, 60-nál több találmányt, számos könyvet írt. A munkáira történt összes hivatkozások száma csaknem ötezer. Szejtli lenyűgöző előadó is volt, nemzetközi konferenciákon száznál is több előadást tartott.

Számos magas tudományos elismerésben részesült: 1986-ban Akadémiai-díjat, 1991-ben Moet-Hennessy-díjat, végül, 2003-ban, Széchenyi-díjat kapott. Sikereit is az egyéniségére oly jellemző módon élte meg. Még el sem halkult a taps, már a következő kihívás kerítette hatalmába. Sosem furdözött a sikerben és népszerűségben (megtehetette volna): puritán és egyszerű maradt abban a magasságban is, ahová magát kitartó munkájával juttatta. Korai távozásával a ciklodextrin technológiában hatalmas szellemi örökös keletkezett, melyet nekünk, tanítványainak és követőinek kell kitöltenünk. Nehéz lesz, de tudom, hogy valahol drukkol nekünk.

Szente Lajos

## In memoriam Hlavay József



**Hlavay József**

**1945 - 2005**

Alkotó ereje teljében történt hirtelen távozásának híre 1-2 nap alatt futótűzként járta be az országot, nagy megdöbbenést keltve mindenfelé a kémikus társadalomban.

A hóval borított veszprémi, vámosi úti temetőben, 2005. február 4.-én, a felhők mögül többször előbukkanó, szikrázó napsütésben kísérte el utolsó útjára Dr. Hlavay József tanszékvezető egyetemi tanárt, a gyászoló Család: felesége, leányai, veje, unokája, a Veszprémi Egyetem Rectora, Dékánja, a VEAB Elnöke, barátainak, kollégáinak, tanítványainak, sporttársainak, és ismerőseinek sokszáz főnyi serege.

Vegyésszámológiai oklevelét és Rendszertechnikai szakmérnöki oklevelét a Veszprémi Egyetemen szerezte meg 1971. ill. 1978. évben. Oklevelének megszerzése és a MÁFKI-ban eltöltött néhány hónap után, került a MTA Kutatócsoport tagjaként, a VE Analitikai Kémiai Tanszékére, majd 2 év után, egyetemi oktatóként, tanársegédként dolgozott tovább. Adjunktusi, docensi éveit követően, 1995.-ben lett egyetemi tanár, majd 1998-tól a Föld- és Környezettudományi Tanszék tsz. egyetemi tanára.

Tudományos kutató munkájának területe, már kezdettől fogva széleskörű volt, ugyanis az infravörös spektrometriával kapcsolatos, eredményekben gazdag alapkutatói munkái mellett, eredményes és sikeres munkát végzett, az ivóvíz tisztítást szolgáló, folyamatos működésű, regenerálható szorpciós állógyás, vizes tisztító technológiai rendszerek fejlesztése és alkalmazása területén is. Általa készített oszloptöltetek (hordozók és aktiv borító rétegek)

segítségével, félüzemi kísérletekkel igazolt eljárásokat fejlesztett ki, ammonia, vas, mangán és arzén nyomok szelektív eltávolítására.

Az infravörös spektrometriás módszerek fejlesztése terén jelentős eredményeket ért el a különböző eredetű és szemcseméretű szilárd anyagok (talajok, szállóporok) kémiai alkotóinak, ellenőrzött körülmények között történő, mennyiségi meghatározásának kidolgozásával. Munkája során mintavételi, mintaelőkészítési, elektronmikroszkópos morfológiai, őrlési eljárásokat és szemcseméret meghatározására alkalmas módszereket fejlesztett ki. A kapcsolódó tématerületeken elért eredményeiből készítette egyetemi műszaki doktori- (1975) és kandidátusi- (1985) értekezését; Kémiai tudományok doktora fokozatát egészségre káros, különböző összetételű, levegőben előforduló, nem ülepedő anyagok analitikai meghatározására és eltávolítására kidolgozott módszereivel szerezte meg (1993).

Amerikai tanulmányútjai (New Orleans, Louisiana State Univ.) során kezdett foglalkozni a levegőt szennyező gázalkotók piezoelektromos érzékelővel történő meghatározásával. Szelektív érzékelőket állított elő klór, ammonia stb. meghatározására. A Guibault professzorral közösen írt, korai közleménye (Anal. Chem. **49** [1977] 1890) ma is az egyik legtöbbet idézett forrás a piezoelektromos kémiai érzékelők irodalma területén.

A legutóbbi évtizedekben nagyrészt a mellette dolgozó kiváló PhD hallgatók munkáját irányította, mely munkák a légkörkutató napjainkban legfontosabb, de egyben legnehezebben hozzáférhető, analitikai feladatainak megoldására irányultak. A levegőben előforduló kismolekulás, kistömegű aeroszol anyagok, gázalkotók mintavételének, dúsításának, kromatográfiás elválasztásának, nagy érzékenységű érzékelőkkel, továbbá érzékelő sorokkal és statisztikus jel- és adatfeldolgozással (kemometriás módszerekkel) történő azonosítására és meghatározására kidolgozott eljárásaik, és saját fejlesztésű műszereik világviszonylatban úttörő jelentőségűek.

Tudományos munkásságának eredményeiről, plenáris-, vagy meghívott előadóként, számos helyen, számos nemzetközi fórumon, konferencián tartott előadást. Több ízben az USA-ban, Japánban, Olaszországban, és itthon, Budapesten; továbbá: Németországban, Skóciában, Indiában, s. i. t.

Nagyszámú tudományos közleménye (kb. 160) mellett, jelentősek azok a fejezetek ( kb. 14) is, melyek nemzetközi Kiadók gondozásában megjelent könyvekben láttak napvilágot. Pl. Sample Preparation-fractionation, in Handbook of Elemental Speciation, Wiley 2003.; Aerosol

Sampling for Elemental Analysis, in Comprehensive Anal.Chem. XLI. Sample preparation, Elsevier 2003., stb.

Sokrétű kutató és intenzív egyetemi oktató munkája mellett, rendkívül zsúfolt és széleskörű volt a szakmai közéleti tevékenysége is, melyet nagy alapossággal, hozzáértéssel, és következetességgel látott el. Az Egyetem Rektorhelyettese (1995-1998), a MTA Környezeti Kémia Bizottság Elnöke (1994-2002), VEAB Tud. Titkára (1991-96); MTA Kémiai Doktori Tud. Biz. (2000-), a MTA Kémiai Osztály (1997-2002), MKE IB (1999-2003), Kormányzati Koord. Tud.Tanács Ipari-vegyipari Szakbiz. (2001-), Magyar Akkreditációs Biz. Föld- és Környezet Albiz. (2001-), MKL Szerk.Biz. (1994-96), stb. tagja volt.

Hazánk képviselőjeként, aktív tagja volt az EURACHEM-nek (1993-), és jelentős munkát végzett a IUPAC V.2. Bizottság tagjaként is (1994-).

Sokrétű, eredményes munkásságáért különböző kiténtésekben részesült: Kiváló feltaláló, ezüst fokozat (1986), Pro Aqua Emlékérem (1993), VEAB Emlékplakett (1997), VE Arany érem (1998), Genius érem díj (2000), stb..

Fiatal korától kezdve kiváló, rajongó sportoló volt. Fiatalabb éveiben a Veszprém Városi és Egyetemi labdarúgó csapat aktív tagja, meghatározó egyénisége volt. Sport-szeretetét később is megtartotta, élete végéig aktív tennisező és labdarúgó maradt.

Viszonylag rövid életpályája során végzett tudományos és egyetemi oktató-nevelő munkásságának, közéleti tevékenységének elkápráztatóan sok és értékes eredményei kimagasló teljesítményét tükrözik. A teljesítmény mögött, egy olyan különleges személyiségnek közjót szolgáló magatartása, elkötelezettsége, tisztessége, embersége, fáradhatatlansága jelenik meg, mint amilyenek őt—akik közelében voltunk—mindnyájan ismertük. Ifjúságunknak ezért kiváló példaképe lehet, a hazai kémikus társadalomnak és mindnyájunknak pedig, akik tiszteltük és szerettük, fájdalmas, nagy veszteség és emlék marad.

Áldja meg Őt a Teremtő alkotó, emberséges, munkás életéért !

Inczédy János



# Egy anyarozs-alkaloid szintézise

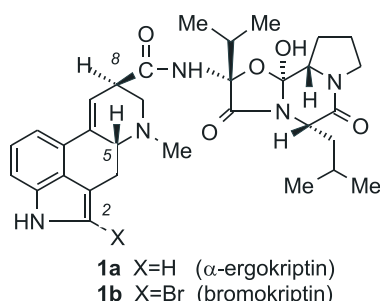
MOLDVAI István,<sup>a</sup> TEMESVÁRI-MAJOR Eszter,<sup>a</sup> INCZE Mária,<sup>a</sup> SZENTIRMAY Éva,<sup>b</sup> GÁCS-BAITZ Eszter<sup>a</sup> és SZÁNTAY Csaba<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>MTA Kémiai Kutatóközpont, Biomolekuláris Kémiai Intézet, Természetes Szerves Anyagok Osztály; 1025 Budapest, Pusztaszeri út 59-67; <sup>b</sup>MTA-BME Alkaloidkémiai Tanszéki Kutatócsoport; 1111 Budapest, Szent Gellért tér 4.

## 1. Bevezetés

Az anyarozs vagy ergot az erő rozskaláson növekvő, többnyire feketéslila képződmény, melyet a *Claviceps* tömlősgombákkal történő fertőzés okoz.<sup>1</sup> A gombák metabolikus termékeiként az anyarozs sok indolváz alkaloidot tartalmaz, amelyek rendkívül erős biológiai hatással rendelkeznek. Mérgező hatásuk az elmúlt évszázadok során sokszor okozott tömegkatasztrófát; több tízezer ember haláláért volt felelős a fertőzött rozsból készített liszt. Valószínű, hogy a „Salemi boszorkányok” tragédiáját is anyarozs-alkaloid fertőzés okozta.

Az erős biológiai hatás a gyógyszerkutatók figyelmét is felkeltette és elsősorban a svájci Sandoz gyógyszergyár kiváló kutatóinak köszönhetően az 1950-es évektől számos anyarozs-alkaloid hatóanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmény került forgalomba. A magyar Richter Gedeon gyógyszergyárban is intenzív kutatások folytak és folynak ezen a területen, jelentős exportot is lebonyolítva anyarozs készítményeikből, különösen  $\alpha$ -ergokriptinből (**1a**; 1. ábra) és brómozott származékából, az úgynevezett bromokriptinből (**1b**).



## 1. Ábra.

„Az ergot alkaloidok, amelyeknek a lizergsav az egyik reprezentánsa, különösen fontosak, mivel a természetes anyagok családjai közül ezen vegyületek biológiai hatásspektruma a legszélesebb”.<sup>2</sup>

A lizergsav (**2a**; 4. ábra) származékai között található a lizergsavidetilamid (LSD), amely a ma ismert szintetikus termékek között a legerősebb idegrendszeri hatással rendelkezik.<sup>3</sup> Az anyarozs-alkaloidok szinte páratlan biológiai aktivitásának fényében nem csoda, hogy hatalmas erőfeszítések történtek és történnek ezen alkaloidok totálszintézisére, de enantiohatékony és ipari méretekre nagyítható módszer a mai napig sem ismeretes. Elsősorban az  $\alpha$ -ergokriptin és a belőle nyerhető, évi mintegy fél milliárd US dollár forgalmat képviselő bromokriptin szintézise volt

a célunk. Retroszintetikus közelítéssel élve az amid kötés hasítása után két szintetikus célpontunk volt, a lizergsav és a peptid komponens.

Foglalkozunk mindenekelőtt a lizergsavval, amelynek *racém* formában történő első szintézisét 1956-ban Woodward és Kornfeld valósította meg.<sup>1,4</sup> Az indolból könnyen hozzáférhető indol-3-propionsavból (**3**; 2. ábra) kiinduló közelítésük egyik fő problémája a C gyűrű kialakítása volt, mivel a megfelelő savklorid gyűrűzárása a benzol helyett a reaktívabb indolgyűrűn történik meg. Ezért a Woodward csoport először redukálta a pirrolgyűrűt, az így kialakuló aminocsoportot benzoilezéssel megvédte. Így sikerült elérniük, hogy az intramolekuláris gyűrűzárás a kívánt regioselektivitással játszódjék le. Ennek a megoldásnak viszont az lett a hátránya, hogy a pirrolidin egységet előbb-utóbb vissza kell oxidálni, továbbá bevezetünk egy fölösleges kiralitáscentrumot, ami megnehezíti egy *enantiohatékony* szintézisút kidolgozását. A végtermék elég gyenge termeléssel képződött, amelynek rezolválása további hosszadalmas és így alacsony hozamú lépéseket igényel.<sup>1</sup> Ezért egy praktikus lizergsavszintézis kidolgozása továbbra is a szintetikus szerves kémia egyik megoldásra váró komoly feladata maradt. A *racém* vegyület totálszintézisét eddig kilenc kutatócsoport valósította meg, de a problémával foglalkozó közlemények száma ennél jóval nagyobb. Az ergolinváz felépítésére irányuló különböző közelítések száma legalább egy tucatra tehető, némelyikük sikeresnek bizonyult, mások pedig csak a kísérlet szintjén maradtak. A kilenc sikeres előállításmódból hét a Woodward-koncepciót követve a redukált indolinszármazékot használta kiindulási anyagnak. Opolzer és munkatársai közölték az első szintézist<sup>1</sup> a redukációs lépés elkerülésével, azaz végig indol-származékokat használva, de több átalakítás méretnövelése megoldhatatlannak tűnik. A második, indol-származékokat felhasználó totálszintézis a közelmúltban jelent meg.<sup>5</sup>

Célul tűztük ki olyan racionális szintézis kidolgozását, amely indol-származékból indul ki, azaz elkerüli a redukció-újraoxidáció problémáját, és egyúttal lehetővé tesz egy enantiohatékony megoldást.

Ideális kiindulási anyagnak kínálkozott az indolgyűrűt tartalmazó úgynevezett Uhle-ke-ton (**4a**; 2. ábra), habár eredeti előállítása igen körülményes.<sup>1</sup> Még így is számos kiváló kutatót – beleértve magát természetesen Uhlét – vonzotta az a feladat, hogy ezt a ketont használja kiindulási anyagként a lizergsav totálszintéziséhez. Uhle acetilezte és brómozta a **4a** ketont, *téves* módon állítva, hogy a nyert **4b** származék különböző aminokkal szubsztitúciós reakciókra

\* Főszerző. Tel.: 463-1195 ; fax: 463-3297 ; e-mail: szantay@mail.bme.hu.

volt készíthető. Bowman és munkatársai vizsgálták felül később ezeket az állításokat és közölték, hogy reprodukciós próbálkozásaik egytől-egyig kudarcot vallottak.<sup>1</sup>

A második, Uhle-ketonból kiinduló próbálkozás Stoll nevéhez fűződik,<sup>1</sup> aki a Stobbe-kondenzációt kívánta alkalmazni kulcslépésként, de számos sikertelen próbálkozása után feladta a küzdelmet.

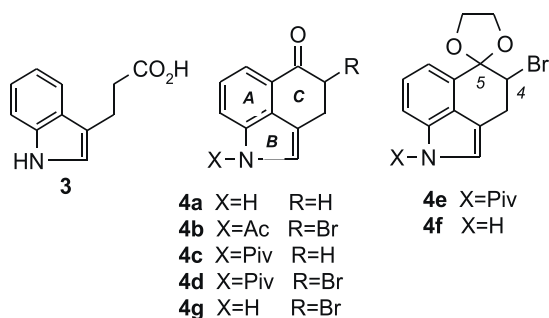
Mindezek a közlemények nagyon elkésérítő; így meglehetősen nagy bátorság és lelkesedés kellett ahhoz, hogy vállalkozunk az ergolinváz és különösen a (+)-lizergsav Uhle-ketonból kiinduló szintézisének ki-dolgozására.

## 2. Eredmények

### 2.1. A (+)-lizergsav szintézise

1994-ben az Uhle-keton N-pivaloil származéka (**4c**) Goto módszerével a **3** savból könnyen hozzáférhetővé vált.<sup>6</sup> Az eredeti eljárást – amely  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, *n*-BuLi felhasználásával építi be a pivaloilcsoportot – sikerült úgy módosítani, hogy porított KOH-t  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on használunk bázisként az *N*-acilezési lépéshez. A **4c** ketont két összevont lépés után 43 %-os termeléssel kristályosítással izoláltuk.

Az ergolinváz szintézise céljából vizsgáltuk a D gyűrű kialakítását, és elsőként írtuk le a sikeres intramolekuláris Stobbe-kondenzáció termékeit egy átmenetileg kialakított lítium komplex segítségével.<sup>7</sup>

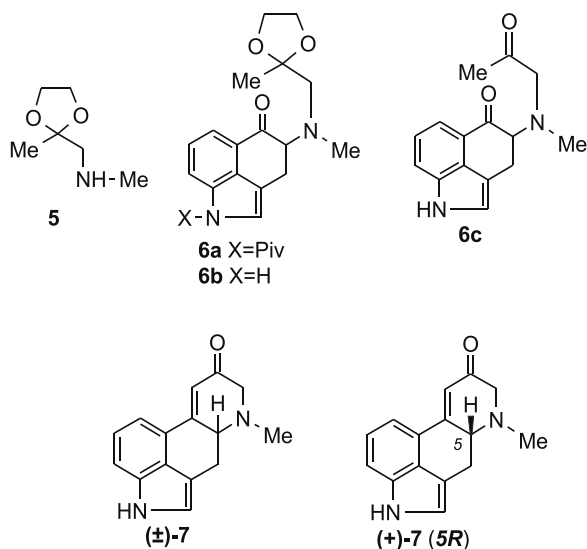


2. Ábra. Az Uhle-keton és származékai

Második közelítésként az ergolinváz D gyűrűjét a megfelelő diészter Dieckmann-kondenzációjával alakítottuk ki, amely utóbbit az alkalmasan szubsztituált **4c** származék módosított Reformatsky-reakciójával és ezt követő vízeliminációjával nyertük.<sup>8</sup> Egyik fentebb említett módszer sem volt alkalmas azonban arra, hogy tovább-fejlesztésével magát a (+)-lizergsavat elő lehessen állítani.

Visszatértünk ezért az alapokhoz és kellemes meglepetésünkre azt találtuk, hogy a **4d** bróm-ke-ton<sup>9</sup> – az irodalomban szinte lehetetlennek leírt alkilezési reakcióban – mégiscsak sikeresen reagált megfelelő reakciókörülmények között az **5** aminnal<sup>10</sup> (3. ábra) (toluol, szobahő, 48 óra), és szolgáltatva a **6a** tercier amint (35%). Metilaminnal történő egyszerű dezacilezés (**6b**; 80%) és a keton funkció felszabadítása után a kívánt **6c** (73%) vegyület („Bowmann álma”) előállítását jelentette az első döntő előrelépést a tervezett szintézisút megvalósításában.

A **6b** termelése még jobb lett (56%), ha az **5** amint a nitrogéne-n nem védett **4g** bróm-ke-tonnal hoztuk reakcióba. Ez utóbbit úgy állítottuk elő, hogy a **4d** ketont ketállá alakítottuk, a kapott **4e** ketálról eltávolítottuk a pivaloil-csoportot, végül deketálozással regeneráltuk a keton-csoportot (**4g**, 3 lépés, termelés: 70%). Ez a **6c**-hez vezető második reakciósor valódi útlévágást jelentett.



3. Ábra. A (+)-7 tetraciklusos keton szintézise

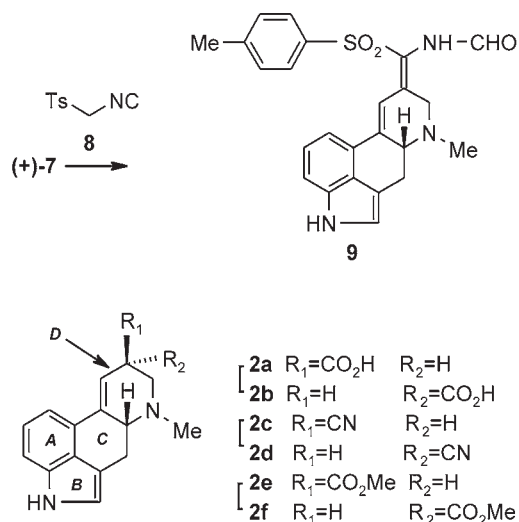
A **6c** diketonnak a **7** telítetlen ketonhoz<sup>11</sup> vezető intramolekuláris aldolkondenzációjára látszatra könnyű feladatnak tűnhet, hiszen aldolkondenzáció kiváltásához több tucat katalizátor is ismeretes. A piperidinszármazékok elő-állításához felhasználható katalizátorok száma már jóval kevesebb és az irodalomban hasonló célokra jól bevált reagensek (a nátrium-etiláttól a superbázisokig) a mi esetünkben még csak *nyomokban sem szolgáltatták* a kívánt tetraciklust. Említésre érdemes és nehezen magyarázható tény, hogy ezzel szemben a Woodward-féle dihidro-származéknál ez a gyűrűzárás viszonylag könnyen megvalósítható volt; míg az indol nitrogén helyett szulfon-csoportot tartalmazó analógon esetében semmilyen reagenssel nem tudták végrehajtani a kívánt gyűrűzárást.<sup>12</sup> *N*-tozil csoportot tartalmazó diketon KF-dal történő gyűrűzárása megvalósítható volt ugyan, de ez a folyamat naftalinszármazékká történő izomerizációval járt együtt.<sup>13</sup>

Hosszas próbálkozások után végül is sikerült a feladatot megoldanunk LiBr+trietilamin<sup>14</sup> rendszer felhasználásával. Ezt a reagenspárt Eschenmoser használta először különböző kéntartalmú vegyületekhez.<sup>15</sup> A LiBr vagy a trietilamin külön-külön teljesen hatástalan. A reakció mechanizmusát illetően feltételezhetjük, hogy a LiBr a két karbonil funkció egymást kiegészítő aktiválását végzi el a bázisos amin jelenlétében. A lítiumionnak nagyobb affinitása van az oxigénhez, mint a nitrogénhez. Az amin szerepe abban áll, hogy az O-komplex keton karbonil  $\alpha$ -helyzetéből protont vesz fel.

Különösen jó eredményt (60% összevont kitermelést a kristályos **7** ketonra vonatkoztatva) lehetett elérni, ha az egymást követő lépéseket (a védő csoport eltávolítását és a

gyűrűzárást, **6b**, **6c**, **7** sorrendben) a meglehetősen érzékeny közbenső termék (**6c**) izolálása nélkül hajtottuk végre.

A **7** vegyületet (-)-dibenzoil-L-tartaráttal rezolváltuk. A kristályosan kiváló tartarátsóból a szintézis továbbviteléhez szükséges (+)-**7** ketont izoláltuk (38%), amit a természetes lizergsav lebontásával az irodalomból ismert módszer<sup>16</sup> szerint is előállítottunk. Így a két anyag optikai forgatóképességének összehasonlításával a szintetikus termék királis szénatomjának abszolút konfigurációját (C5=R) meg tudtuk határozni.



4. Ábra. A (+)-**7** keton átalakítása (+)-lizergsavvá

A karbonilcsoport savvá való átalakításához Schöllkopf módszerét<sup>17</sup> használtuk („TosMIC-módszer”). Az optikailag aktív (+)-**7** vegyületet a **8** izonitrilszármazékkal (4. ábra) bázis jelenlétében regálatva a **9** formamidot nyertük (77%), amelyet savasan hidrolizáltunk. Eredményként lizergsavat (**2a**) és epimerjét (**2b**) nyertük. A keveréket bázissal kezelve a nem kívánt epimer izomerizálódott és tiszta (+)-lizergsavat lehetett izolálni, habár gyenge termeléssel.

Hasznosítható eredményt akkor értünk el, ha a **9** intermediert bázissal kezeltük, amikor is a **2c** és **2d** nitril 1:1 arányú keverékét nyertük 70%-os termeléssel, majd ezt a keveréket Pinner-reakcióban észterre alakítottuk (72%). A keverékben lévő epimer elválasztására *nincsen szükség*, mivel a reakciósor zárólépésében az észter lúgos hidrolízisével egyidejűleg a C8-szénatomon a kívánt epimerizáció is lejátszódik, így a két folyamat eredményeként tiszta (+)-lizergsavhoz (54%) jutottunk. Eljárásunk védelmére találmányi bejelentést tettünk.

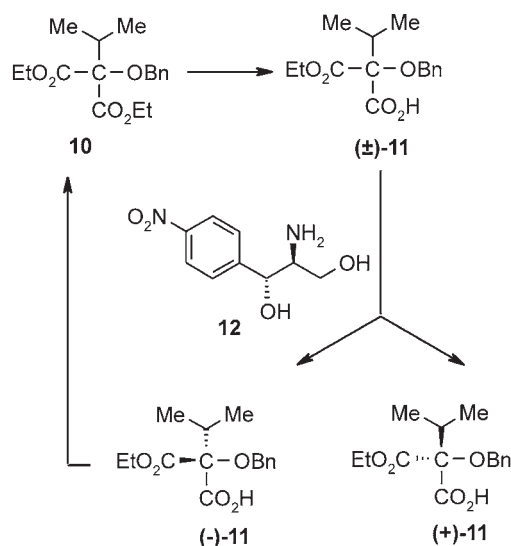
## 2.2. A peptidszintézis enantiohatékonyságának javítása

Az  $\alpha$ -ergokriptin peptid részének szintézisét a Sandoz gyógyszergyár kutatói már leírták.<sup>1</sup> Feladatunknak a szintézis hatékonyságának, különösen pedig enantiohatékonyságának javítását és a nagyíthatóság feltételeinek megteremtését tekintettük.

Első lépésként az izopropil-malonésztert oxidáltuk peroxiddal. Az eredeti eljárás szerint a főlegben lévő benzoil-peroxidot aktív szénnel bontják meg, de ezt

az utat követve az estek mintegy 20%-ában robbanást tapasztaltunk. Ennek elkerülésére sikeresen alkalmaztunk nátrium-tiosulfátot vagy nátrium-biszulfítot az aktív szén helyett. A képződő vegyület debenzoilezése után a szabad hidroxilcsoportot benzilezéssel védtük. Az így kapott **10** diészter (5. ábra) parciális hidrolízise a racém-**11** savhoz vezetett. Az eredeti Sandoz eljárásban ezt a savat a (-), és (+)-pszeudoefedrin konszekutív alkalmazásával rezolválták gyenge hatásokkal.

Ez volt az a lépés, amelyben lényeges javítást valósítottunk meg. Pszeudoefedrin helyett a (+)-1*S*,2*S*-2-amino-1-(4-nitrofenil)-propán-1,3-diolt (**12**) használtuk a rezolváláshoz. A **12** vegyület könnyen hozzáférhető, olcsó vegyület, mivel a klóramfenikol nevű antibiotikum szintetikus gyártásában nem kívánatos melléktermékként keletkezik.<sup>18</sup> A kívánt R-(+)-izomer [(+)-**11**] sója kitűnő hozammal kristályosodik az oldatból. A (+)-**11** izolálása a só savanyításával történhet. Ezzel a módszerrel mind (-)-**11**, mind **12** könnyen visszanyerhető.



5. Ábra. A ( $\pm$ )-**11** sav módosított rezolválása

Hogy a módszert még gazdaságosabbá tegyük, az *S*-enantiomert [(-)-**11**] dietilszulfáttal visszaalakítottuk a **10** diészterre. Ezzel a metodikával az eredeti, akirális diésztert nyertük, azaz reciklizáltuk. Ezt a műveletet *dekiralizációnak* nevezhetjük.

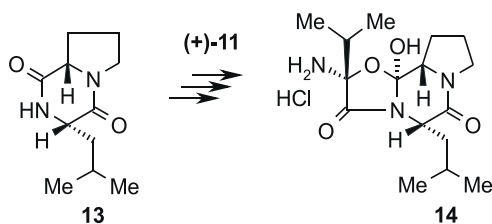
A (+)-lizergsavval történő kapcsoláshoz szükséges partnert, az úgynevezett aminociklol hidrokloridot (**14**) Z-prolinból kiindulva állítottuk elő. A prolin-származékot L-leucinmetilészter p-toluilszulfonát sójával reagáltattunk vegyes anhidrides módszerrel. A védőcsoport hidrogenolízissel történő eltávolítása utáni melegítés az L-prolin-L-leucil laktámot (**13**) szolgáltatja jó termeléssel.

A (+)-**11** malonsavszármazékot savkloriddá alakítottuk, ezzel acileztük a **13** laktámot, a védőcsoportot hidrogenolízissel eltávolítottuk, az így nyert ciklolésztert ciklolkarbonsavvá hidrolizáltuk és néhány további lépés után a **14** vegyülethez jutottunk.

Számos módszert próbáltunk ki a lizergsavnak (**2a**) a **14** peptiddel való kapcsolására. A leg gazdaságosabbnak

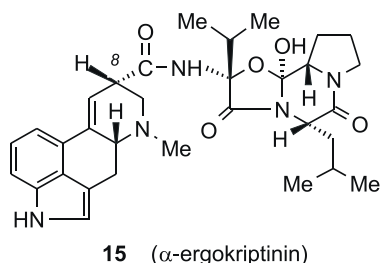


bizonyult megoldás szerint a lizergsav trifluoracetát sóját foszforpentakloriddal reagáltatva készítjük el a savkloridot,<sup>19</sup> amelyet az aminociklol-hidroklorid metilénkloridos szuszpenziójához adagolunk  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, piridin jelenlétében.



6. Ábra.

Ily módon  $\alpha$ -ergokriptint kaptunk 41%-os termeléssel, foszfát só formájában. Ezen túlmenően a diasztereomer szerkezetű  $\alpha$ -ergokriptinint is izolálni lehetett (31%) kromatográfias feldolgozás után.



7. Ábra.

Miután a két sztereoizomer molekula kölcsönösen átalakítható egymásba olyan egyensúlyi folyamatban, amelyben a kívánt ergokriptin van túlsúlyban (forró metanolban 3:1 arányban),<sup>20</sup> a bruttó termelés fokozható az utóbbi transzformáció preparatív jellegű kidolgozásával, de ezt az aspektust nem vizsgáltuk részletesen.

### 3. Összefoglalás

Megmutattuk, hogy a (+)-lizergsav praktikus, enantiohatékony közvetlen szintézise lehetséges oly módon, hogy az indolgyűrű intaktságát a reakciószekvencia során végig megtartjuk elkerülve ezzel annak átmeneti redukcióját és ezzel egy szükségtelen kiralitáscentrum bevezetését. Egy alkalmas intermedier rezolválásával elkerültük a végtermék fáradtságos, hosszadalmas és gyenge termeléssel járó rezolválását.

Miután számos alkaloid [(+)-izoszetoklavin,<sup>16a</sup> (+)-lizergén,<sup>21</sup> (-)-agroklavin<sup>21</sup>] félszintézisét a természetes (+)-lizergsav lebontásával nyert (+)-7 ketonból valósították meg, ezért munkánk lezárásától kezdve ezek az eljárások totálszintézisnek minősülnek.

Számos ergolinvázas gyógyszer van a piacon<sup>1</sup>, ezek előállítására is alternatívát kínálunk.

A fentebb leírt módosított eljárással a peptid rész melléktermék képződése nélkül állítható elő, mivel a rezolválás eredményeként képződő, nem kívánatos enantiomert sikeresen reciklizálni tudtuk a folyamatba.

A (+)-lizergsav és a peptid rész kapcsolásával célkitűzésünket sikeresen elértük.<sup>22</sup>

A bromokriptin előállítása a természetes ergokriptin brómozásával már korábban jól kidolgozott technológiává vált,<sup>1</sup> így totálszintézisünk egyúttal a gyógyszer (1b) gyártási lehetőségét is jelenti.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak az OTKA alapítványnak (T-046015) munkájuk támogatásáért.

### Hivatkozások

- Szántay, Cs.; Söti, F.; Incze, M. Anyarozs alkaloidok és szintézisük. A kémia újabb eredményei. Akadémiai Kiadó: Budapest, **1987**.
- Bur, S. C.; Padwa, A. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4135.
- Hoffmann, A. LSD. Bajkeverő csodagyerekem. Egy "varázs-szer" felfedezése. Edge 2000-NDI: Budapest, **2003**.
- Somei, M.; Yokoyama, Y.; Murakami, Y.; Ninomiya, I.; Kiguchi, T.; Naito, T. *Recent Synthetic Studies on the Ergot Alkaloids and Related Compounds*. In: *The Alkaloid*; Cordell, A.G., Ed.; Academic Press: San Diego, **2000**; Vol. 54, pp 191-257.
- Hendrickson, J. B.; Wang, J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3-5.
- Teranishi, K.; Hayashi, S.; Nakatsuka, S.; Goto, T. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8173.
- Moldvai, I.; Temesvári-Major, E.; Gács-Baitz, E.; Egyed, O.; Gömöry, A.; Nyulászy, L.; Szántay Cs. *Heterocycles* **1999**, *51*, 2321.
- Incze, M.; Moldvai, I.; Temesvári-Major, E.; Dörnyei, G.; Kajtár-Peredy, M.; Szántay, Cs. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4281.
- Moldvai, I.; Temesvári-Major, E.; Balázs, M.; Gács-Baitz, E.; Egyed, O.; Szántay, Cs. *J. Chem. Research (S)* **1999**, 687; *J. Chem. Research (M)* **1999**, 3018.
- Kornfeld, E. C.; Fornefeld, E. J.; Kline, G. B.; Morrison, D. E.; Jones, G.; Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 3087.
- Bach, N. J.; Hall, D. A.; Kornfeld, E. J. *J. Med. Chem.* **1974**, *17*, 312.
- Craig, J. C.; Hurt, S. D. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1113.
- Moldvai, I.; Gács-Baitz, E.; Temesvári-Major, E.; Incze, M.; Poppe, L.; Szántay, Cs. *Heterocycles* (2004, nyomdában).
- Waldvogel, E.; Engeli, P.; Küsters, E. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2084.
- Roth, M.; Dubs, P.; Götschi, E.; Eschenmoser, A. *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 710.
- a) Bernardi, L.; Gandini, E.; Temperilli, A. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 3447-3450. b) Bach, N.J.; Kornfeld, E.C. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 3225.
- a) Schöllkopf, U.; Schröder, R.; Blume, E. *Justus Liebig's Ann. Chem.* **1972**, *766*, 130-141. b) Schöllkopf, U.; Schröder, R. *Angew. Chem.* **1973**, *85*, 402.
- Kollonitsch, J.; Hajós, A.; Kraut, M.; Gábor, V. *Acta Chim. Hung.* **1955**, *6*, 381. (*Chem. Abstr.* **1955**, *49*, 6872h).
- Magó-Karácsony, E.; Balogh, T.; Borsi, J.; Elek, S.; Polgári, I.; Lövinger, L. *Hung. Pat.* **156.385** (1969). (*Chem. Abstr.* **1970**, *72*, 32105r).
- Bandula, R.; Vasilescu, M. *Rev. Roum. Chim.* **1995**, *40*, 1189-1195. (*Chem. Abstr.* **1996**, *125*, 114925k).
- Wheeler, W. J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3469.
- Moldvai, I.; Temesvári-Major, E.; Incze, M.; Szentirmay, É.; Gács-Baitz, E.; Szántay, Cs. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5993.

### Synthesis of an Ergot alkaloid

Fully synthetic  $\alpha$ -ergocryptine (**1a**) has been prepared in an enantioefficient way by using synthetic (+)-lysergic acid [(+)**2a**] and the so called aminocyclol (**14**) as coupling partners. The acid component has been achieved firstly in a direct way by the following reaction sequence which is suitable for scale-up preparation. Bromoketones **4d** or **4g** were allowed to react with amine **5** followed by deprotection, and the resulting diketone **6c** was transformed into the unsaturated ketone ( $\pm$ )-**7** by the LiBr/Et<sub>3</sub>N

system. Resolution afforded (+)-**7** which was further transformed by „TosMIC” method into ester diastereomers (**2e:2f**). Upon hydrolysis the latter mixture afforded (+)-**2a**. The peptid part was prepared according to the Sandoz method; the stereoefficiency, however, has been significantly improved by applying a new resolution method and recycling the undesired enantiomer. Since transformation of **1a** into bromocryptine is an already known technology, manufacturing of **1b** became also a feasible process.

# Szén nanocsövek közötti kölcsönhatások

KÓHALMI Dóra, LÁZÁR Armand, SZABADOS Ágnes és SURJÁN Péter\*

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Elméleti Kémia Tanszék, 1518 Budapest 112, Pf. 32

## 1. Bevezetés

Két kvantumkémiai rendszer  $\Delta E$  kölcsönhatási energiáját az ún. szupermolekula módszerrel egyszerűen különbségképzéssel számíthatjuk ki:

$$\Delta E = E_{AB} - E_A - E_B, \quad (1)$$

ahol  $E_A$  ill.  $E_B$  az izolált  $A$  ill.  $B$  alrendszerek energiája,  $E_{AB}$  pedig az összetett rendszer energiája. Hasonló képleteket írhatunk fel több mint két kölcsönható alrendszer esetére.

A fenti kölcsönhatási energia többféle, egymástól fizikai ill. kémiai szempontból jelentősen különböző komponensre bontható. Ha az alrendszerek töltöttek, a Coulomb-kölcsönhatás dominál, amely a távolság reciprokával csökken, tehát igen hosszú hatótávolságú<sup>a</sup>. Ha semleges rendszerekkel foglalkozunk (ebben a cikkben ezt tesszük), az elektrosztatikus jellegű kölcsönhatások közül csak magasabb multipól kölcsönhatások lépnek fel, amelyek gyorsan lecsengenek a távolsággal (a dipól-dipól kölcsönhatás pl. a távolság harmadik hatványával csökken).

Az elektrosztatikus kölcsönhatások jó közelítéssel leírhatók egyelektron modellekkel (pl. a Hartree-Fock modellel<sup>1</sup>). Vannak azonban olyan effektusok, amelyekről csak az elektronrendszer korrelált mozgásának figyelembevételével tudunk számot adni. Ilyen pl. a diszperzió, amely szemléletesen szólva abból származik, hogy az egyik rendszer elektronsűrűségének fluktuációja (ami dipólmomentum-fluktuációt jelent) pillanatnyi dipólmomentumot indukál a másik rendszerben, s ezek a pillanatnyi dipólusok vonzák egymást. Ez a kölcsönhatás a távolság hatodik hatványával csökken.

Az (1) formula elvben mindezen kölcsönhatásokat tartalmazza, feltéve, hogy a benne szereplő mennyiségeket elegendő pontossággal számítottuk ki. A gyakorlatban a formula alkalmazása feltételezi, hogy az energia kiszámítását mind az izolált, mind az összetett rendszerre el tudjuk végezni.

Ebben a dolgozatban azzal az esettel foglalkozunk, amelyben a vizsgált rendszerek olyan nagyok, hogy az izolált rendszerek energiája még kiszámítható, de az összetett

rendszeré már nem. Tegyük fel például, hogy akkora komputerrel rendelkezünk, amely – egy bizonyos kvantumkémiai módszert alkalmazva – mondjuk 3000 atomot képes befogadni. Ekkor két, egyenként 2000 atomból álló nanocső darab külön-külön még befér a gépünkbe, de a 4000 atomból álló összetett rendszert már nem tudjuk tárgyalni.

Ilyenkor lehet segítségünkre a kvantummechanikában széles körben alkalmazott közelítő eljárás, a Rayleigh-Schrödinger féle perturbációszámítás<sup>1</sup>. Ennek alapján két rendszer kölcsönhatási energiájára egyelektron közelítésben az alábbi másodrendű becslés adódik:

$$\Delta E^{(2)} = - \sum_{i \in A} \sum_{k \in B} \frac{W_{ik} W_{ki}}{\epsilon_k - \epsilon_i} + \{ \text{ugyanaz } A \text{ és } B \text{ felcserélve} \}, \quad (2)$$

ahol  $i$  betöltött,  $k$  pedig virtuális molekulapályát jelöl, ezek energiái  $\epsilon_i$  és  $\epsilon_k$ ,  $W_{ik}$  pedig a kölcsönhatás mátrixeleme. Látható, hogy a másodrendű kölcsönhatási energia kiszámításához elegendő az izolált  $A$  és  $B$  rendszerek molekulapályáinak, ezek energiáinak, valamint a kölcsönhatási operátornak az ismerete.

A fenti képlet akkor ad jó eredményt, ha a számlálóban szereplő  $W_{ik}$  mátrixelemek kicsik, a nevezőben lévő  $\epsilon_k - \epsilon_i$  energiakülönbségek pedig elég nagyok. Az első feltétel gyakran teljesül, a nanocső-nanocső kölcsönhatások esetében mindenképpen ez a helyzet. Gond lehet azonban az energianevezőkkel. Ha a kölcsönhatásban résztvevő mindkét nanocső fémes, a Fermi-nívó közelébe eső energiaszintek különbsége rendkívül kicsi szám, így a fenti képlet alkalmazhatatlanná válik. Az alábbiakban megvizsgáljuk, hogy az igen kicsiny, de nemzérus<sup>b</sup> energianevezők jelenléte esetén milyen lehetőségünk van a kölcsönhatási energia kiszámítására. Hangsúlyozzuk, hogy a kvantumkémia standard fegyvertára ennek a problémának a megoldására nem kínál lehetőséget.

A bevezetés lezárásaképpen szóljunk néhány szót a dolgozatban ismertetett munka háttéréről. Látni fogjuk, hogy egyszerű, gyakorlati feladatok – mint pl. két nanocső kölcsönhatási energiájának kiszámítása – igen könnyen vetnek fel olyan problémákat, amelyek *nem oldhatóak meg korábbról ismert, standard módszerekkel*. Ezért vagy elméleti jellegű alapkutatási feladatot kell elvégeznünk, vagy olyan, korábban mások által megoldott

\*Tel.: 209-0555/1632, Fax: 209-0602,

e-mail: surjan@chem.elte.hu

<sup>a</sup>Gondoljunk pl. arra, hogy egy tekintélyes, 100 atomi egységnyi távolságban (amely mintegy 50 Å-nek felel meg), két elektron közti elektrosztatikus kölcsönhatás 0.01 atomi egység nagyságrendű, ami több, mint 6 kcal/mol, tehát semmiképpen sem elhanyagolható mennyiség.

<sup>b</sup>A pontosan 0 energianevezők esete a standard degenerált perturbációszámítás segítségével tárgyalható.

feladat eredményeit kell felhasználnunk, amelyet nem a mi problémánk inspirált, hanem más okból, esetleg pusztán kíváncsiságból hajtottak végre. Ez a tapasztalat nagyon általános, nem csak a mi problémánkra jellemző: Röntgen sem fedezte volna fel a róla elnevezett sugarakat, ha valaki azt a feladatot adja neki, hogy világítsa át az emberi testet... Érdeemes erre gondolni olyankor, amikor az alap kutatás fontosságát megkérdőjelező kijelentéseket hallunk.

## 2. A modell

Nanorendszerek közti kölcsönhatások leírása céljából tekintjük az alábbi modellt. Mindvégig feltételezzük, hogy az egymással kölcsönható csoportok kémiai szempontból konjugált rendszereknek tekinthetők. Ezek közül is ebben a cikkben kizárólag szén atomokból álló rendszerekkel foglalkozunk.

- Az izolált alrendszereket elsőszomszéd közelítésben, egyelektron modellben írjuk le. Minden atomon csak egyetlen elektron hatását vesszük figyelembe, és egyetlen bázisfüggvényt választunk. Ez a függvény egy, a konjugált rendszer felületére merőleges orientációjú  $2p$  típusú atompálya. Ha az elektron-kölcsönhatás explicit figyelembevétele elkerülhető, maradhatunk az általánosított Hückel modell mellett<sup>c</sup>. Ellenkező esetben az atomokon, esetleg a szomszédos atomok között figyelembe kellene vennünk az elektronok taszítását (Hubbard vagy kiterjesztett Hubbard modell).
- Az alrendszerek közötti vonzó jellegű elektrosztatikus kölcsönhatások, a penetráció, a kinetikus kölcsönhatás átlagos leírását a Hamilton mátrix megfelelő helyére írt távolság- és orientációfüggő taggal vesszük figyelembe:

$$t_{\mu\nu} = t_0 S_{\mu\nu} . \quad (3)$$

Itt  $S_{\mu\nu}$  a  $\mu$  és  $\nu$  indexekkel jelölt atomokon centrált  $2p_z$  pályák átfedési integrálja. A kölcsönhatás amplitúdóját skálázó  $t_0$  konstans a modell paramétere. Egy másik paraméter az  $S_{\mu\nu}$  integrálok kiszámításához szükséges, a  $2p_z$  pályák alakját meghatározó ún. Slater-exponens. Ezeket pontosabb számítások alapján vagy kísérleti adatokat felhasználva, illesztéssel határozzuk meg.

- A rövid hatótávolságú átfedési taszítás és a vonzó jellegű diszperziós kölcsönhatás leírására egy Lennard-Jones típusú 6-12-es (van der Waals) potenciált vezetünk be.

<sup>c</sup> Az általánosítás szó itt arra utal, hogy az alrendszerek nem feltétlenül sík alkatúak, mint azt az eredeti Hückel elmélet feltételezi.

A fenti modell alapján az elvégzendő feladat elvileg az volna, hogy a teljes nanorendszer Hamilton mátrixát felépítjük és diagonalizáljuk, és az energiát mint a betöltött molekulapályák energiáinak összegét számítjuk ki. Ehhez az energiához additív korrekcióképpen adjuk hozzá a van der Waals energiát. Ennek a feladatnak a legnehezebb része a Hamilton mátrix diagonalizálása. Ha a nanorendszer mérete túl nagy, ez lehetetlenné válik, mert a számítás memóriagénye a mátrix méretével négyzetesen, az elvégzendő műveletek száma pedig köbösen növekszik. Ilyenkor siet segítségünkre a perturbációs számítás, amely szerint a kölcsönhatási energiát másodrendű közelítésben a (2) egyenlet adja meg. Ha ezt a formulát használjuk, nincs szükség a teljes Hamilton mátrix diagonalizálására, mert a Hückel problémát elegendő a kisebb méretű, izolált alrendszerekre megoldani.

## 3. A Laplace-transzformáció alkalmazása perturbációs korrekciók számítására

A (2) képlet alkalmazásának a bevezetőben említett elvi probléma mellett számítástechnikai szempontból is van hátránya, t.i. hogy a számlálóban szereplő  $W_{ik}$  mátrix nem ritka. Ennek oka, hogy a kanonikus molekulapályák – amikre az  $i$  és  $k$  indexek utalnak – delokalizáltak: általában kiterjednek az egész nanorendszerre. Ezzel szemben a (3) egyenletben szereplő, atompályákra vonatkozó eredeti kölcsönhatási mátrix – mivel elemei az atomok közti távolsággal exponenciálisan lecsengenek – igen ritka. Ha azonban a (2) formulát az atompálya bázisra visszatranszformáljuk – vagyis behelyettesítjük, hogy az  $i$ -edik molekulapálya a  $\mu$  atompályák  $C_{\mu i}$ -vel súlyozott lineáris kombinációja – az alábbi képletre jutunk:

$$\Delta E^{(2)} = - \sum_{\mu\lambda \in A} \sum_{\nu\sigma \in B} t_{\mu\nu} t_{\lambda\sigma} \sum_{i \in A} \sum_{k \in B} \frac{C_{\mu i} C_{\lambda i} C_{\nu k} C_{\sigma k}}{\epsilon_k - \epsilon_i} \quad (4)$$

+ { ugyanez A és B felcserélve }.

Ez, a ritka  $t$  mátrix megjelenése ellenére, azért nem előnyös, mert az  $i$  és  $k$  indexekre az  $\epsilon_k - \epsilon_i$  energianevezők miatt nem lehet külön-külön felösszegezni. Ezen a problémán Almlőf javaslata nyomán<sup>2</sup> egy integrál bevezetése árán segíthetünk. Írjuk a nevezőt

$$\frac{1}{\epsilon_k - \epsilon_i} = \int_0^{\infty} e^{-(\epsilon_k - \epsilon_i)s} ds \quad (5)$$

alakba! Ez a formula tulajdonképp nem más, mint az azonosan egy függvény Laplace-transzformáltja. Ebben az alakban a jobb oldalon álló integrandus az  $i$  és  $k$  indexekben faktorizálódik, ezekre az integrál elvégzése előtt

egymástól függetlenül fel lehet összegezni. A Laplace-transzformáció bevezetésével a kölcsönhatási energiát az

$$\Delta E^{(2)} = - \int_0^{\infty} \Delta E^{(2)}(s) ds \quad (6)$$

integrál adja, ahol az integrandus a

$$\Delta E^{(2)}(s) = \sum_{\mu \in A} \sum_{\sigma \in B} (t f^v(s))_{\mu\sigma} (f^o(s)t)_{\mu\sigma} \quad (7)$$

+ { ugyanaz  $A$  és  $B$  felcserélve }

képlettel számolható, a molekulapályákra futó összegzést tartalmazó, energia-súlyozott sűrűségmátrixok<sup>3</sup>:

$$f_{\nu\sigma}^v(s) = \sum_k C_{\nu k} e^{-\epsilon_k s} C_{\sigma k}$$

$$f_{\mu\lambda}^o(s) = \sum_i C_{\mu i} e^{\epsilon_i s} C_{\lambda i}$$

Ezen a ponton érdemes összefoglalni, hogy mi a (6) kifejezés programozás-technikai előnye és hátránya a (2)-höz képest. A programozás során természetesen ki szeretnénk használni a  $t$  mátrix ritkaságát, ezért az összegzéseket végző ciklusokat, hacsak lehet, úgy szervezzük, hogy a  $t$  mátrix indexei helyett csupán azokat a  $\mu\nu$  index párosokat kezeljük, amikre  $t_{\mu\nu}$  nem nulla<sup>d</sup>. Az itt következő megfontolás kedvéért tegyük fel, hogy két, egyenként  $N_A$  atomos rendszer kölcsönhatását szeretnénk számolni, a  $t$  mátrix pedig meglehetősen ritka, a nemnulla  $t_{\mu\nu}$  mátrixelemek száma  $N_A^2$  helyett csak  $N_A$ .

A (2) képlet programozásához először a

$$W_{ik} = \sum_{\mu} C_{\mu i} \sum_{\nu} C_{\nu k} t_{\mu\nu} \quad (8)$$

formula szerint a  $t$  mátrixból elő kell állítanunk a  $W_{ik}$  mátrixelemeket. Ehhez úgy a legcélszerűbb eljárni, hogy először minden  $\mu$ -re és minden  $k$ -ra elvégezzük a  $\nu$ -re futó összegzést, majd ezután egy következő lépésben hajtjuk végre a  $\mu$ -re futó összegzést minden  $i$  és minden  $k$  indexre. Az első lépéshez szükséges számítási idő  $N_A N_\nu$ -vel arányos, ahol  $N_\nu$  a virtuális molekulapályák száma. Látható, hogy itt tudtuk kihasználni a  $t$  mátrix ritka voltát. A második lépés számítási időigénye  $N_A N_\nu N_o$ -val arányos, ahol  $N_o$  a betöltött molekulapályák száma. Végül, az így előállt  $W_{ik}$  mátrixelemekkel a (2) képlet kiszámításához szükséges idő csupán  $N_o N_\nu$ -vel arányos, ez a lépés az előző kettő mellett elhanyagolható. A (2) formula kiszámításának a leglassabb lépése tehát a második lépés, durva becsléssel azt mondhatjuk, hogy a (2) formula számítási időigénye a bázisfüggvények számának harmadik hatványával skálázódik. Kétszer nagyobb rendszert véve például nyolcszor hosszabb ideig számol a komputer.

Vizsgáljuk meg ugyanebből a szempontból a (7) képletet! Ehhez szükség van a  $t$  és az  $f$  mátrixok szorzatainak

<sup>d</sup>precízebben: amikre  $t_{\mu\nu}$  abszolút értéke egy előre meghatározott küszöbérték fölé esik.

elkészítésére. Egy-egy szorzás számításiigénye  $N_A N_A$ -val arányos, kihasználva a  $t$  mátrix ritkaságát. Az így kapott mátrixok spurját kell képeznünk, ez a lépés újra  $N_A N_A$ -val arányos időt igényel. Eddig tehát durva becsléssel négyzetesen skálázódik a számítási időigény, ez jóval előnyösebbnek látszik korábbi harmadik hatványnál. Figyelmünk kívül hagytuk azonban az  $f$  mátrixok felépítésének időigényét, holott ennél a képletnél ez a leglassabb lépés. Az  $f^v$  mátrix felépítésének időigénye például  $N_A N_A N_\nu$ -vel, durván szólva a bázisfüggvények számának harmadik hatványával arányos. Úgy látszik tehát, hogy semmit sem nyertünk a (2) formulához képest. A (7) képletnek azonban egy további előnye, hogy a leglassabb lépés – az  $f$  mátrixok felépítése – nem függ  $t$ -től, csupán az izolált alrendszerekre vonatkozó mennyiségeket tartalmaz. Ezért, ha az alrendszereket mereven tartva szeretnénk a kölcsönhatási energia hiperfelületet (pl. nanocső forgása egy grafit sík felett) feltérképezni, a köbös lépést csupán egyetlen egyszer kell elvégeznünk. Így a Laplace-transzformációt alkalmazó képlettel mégis nyerünk egy nagyságrendet, hiszen minden egyes újabb relatív elhelyezkedésnél csupán a bázisfüggvények számának négyzetével arányos a számítás időigénye<sup>e</sup>.

A Laplace-transzformáció bevezetésének hátránya ugyanakkor, hogy a (6) numerikus integrált el kell végeznünk, a (7) képletet ezért olyan sok  $s$  pontban ki kell számolnunk amennyi az integrál kellően pontos közelítéséhez elegendő. Tapasztalataink szerint 8-10  $s$  pont felvételével kellően pontos eredményeket kapunk olyan egyszerű integrálszámító formula segítségével is, mint a Simpson-szabály.

#### 4. Fémcső nanorendszerek tárgyalása

Kis kölcsönhatások perturbációs számítással való leírásakor mindig ügyelni kell arra, hogy a perturbációs közelítés értelmezhetetlenné válhat, ha a perturbálatlan rendszer energianívói között vannak majdnem elfajultak. A mi esetünkben a fémcső karakterű nanocsővek esetén találkozunk ezzel a nehézséggel. Modellünkben a fémcső jelleget az mutatja, hogy a rendszer Hückel problémájának megoldásakor kapott legmagasabb energiájú betöltött molekulapálya (HOMO) és a legalacsonyabb energiájú virtuális molekulapálya (LUMO) energiája a cső hosszának növelésével egymáshoz közelít, a végtelen hosszú cső határesetében nullához tart. Ha két viszonylag hosszú fémcső kölcsönhatását a (2) képlettel szeretnénk leírni, bajba kerülünk, mert  $\epsilon_{LUMO} - \epsilon_{HOMO} \approx 0$  miatt túlságosan nagy, fizikailag értelmetlen számot kapunk.

A nullához közeli értékű nevező okozta probléma feloldására a kvantumkémiai irodalom sok technikát is-

<sup>e</sup>A (7) kifejezés arra is lehetőséget ad, hogy kihasználjuk, ha az  $f$  mátrixok ritkák. Ebben az esetben a bázisfüggvények számának első hatványával, azaz lineárisan skálázódó számításiigény is elérhető.



mer. Ahogy az ilyen eljárások nagy száma sejteti, egyik sem jelent minden szempontból kielégítő megoldást. A legegyszerűbb ilyen technikák egyike, az Unsöld-approximáció szerint a nullaközeli energianevezőket a gerjesztési energiák kiátlagolásával kerüljük el. Ebben a közelítésben a (2) formula a következők szerint módosul

$$\Delta E_{\text{Unsöld}}^{(2)} = - \frac{\left( \sum_{\substack{i \in A \\ k \in B}} W_{ik} W_{ki} + \sum_{\substack{i \in B \\ k \in A}} W_{ik} W_{ki} \right)}{\Delta \varepsilon} \quad (9)$$

ahol  $\Delta \varepsilon$  az átlagos, nem nulla gerjesztési energia. Az energianevezők uniformizálása elméletileg alátámasztható ugyan, de ezzel a lépéssel a Rayleigh-Schrödinger kifejezések adta számértékek pontosságából sokat veszítünk. Ennek kompenzálására érdemes az elvileg tetszőleges  $\Delta \varepsilon$  számot az adott keretek között a lehető legjobb módon megválasztani. Laboratóriumunk egy korábbi eredménye<sup>4</sup> szerint a

$$\Delta \varepsilon = \frac{\langle H^3 \rangle_C}{\langle H^2 \rangle_C} \quad (10)$$

formula az uniformizált energianevező egyfajta optimális választását jelenti. Itt a számlálóban ill. a nevezőben a modell Hamilton operátor harmadik ill. második úgynevezett csatolt momentuma<sup>3</sup> szerepel, az alapállapotú determinánssal számítva. Érdekes módon a (10)-zel számított másodrendű Unsöld korrekció megegyezik az irodalomból ismert<sup>5</sup> Connected Moment Expansion (CMX) második tagjával. A továbbiakban ezért CMX2 néven hivatkozunk erre a közelítésre.

Érdekes pár szóban kitérni a CMX2 formula számítási időigényére, mint azt a Laplace-transzformációt alkalmazó képlet esetén is tettük. A CMX2 formula tetszetős alakot ölt, ha az atompályák bázisán írjuk fel, és a számítandó várható értékeket a sűrűségmátrixokkal fejezzük ki. Esetünkben, minthogy a nanocsövek között csak egyelektron kölcsönhatást veszünk figyelembe, csak az elsőrendű sűrűségmátrixra van szükség. Jelöljük ezt a mátrixot  $P$ -vel, és vezessük be a  $\bar{P} = 2 - P$  ún. lyuk-sűrűségmátrixot. A kiszámítandó formula ezek segítségével a következő alakot ölti:

$$\Delta E_{\text{CMX2}} = - \frac{[\text{Sp}(t \bar{P} t P)]^2}{\text{Sp}(t \bar{P} h \bar{P} t P) - \text{Sp}(t \bar{P} t P h P)} \quad (11)$$

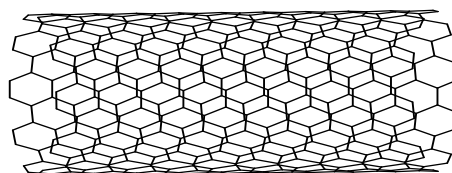
ahol  $t$  a (3) egyenletben definiált kölcsönhatási integrál,  $h$  pedig az izolált csövek Hamilton mátrixainak direkt összege. Ez a képlet jól mutatja, hogy amennyiben a benne szereplő mátrixok ritkák (azaz: a mátrixelemek túlnyomó többsége zérus), a kölcsönhatási energia rendkívül gyorsan számítható. A formulában szereplő spurok képzését ugyanis a mátrixszorzások egymás után való elvégzésével oldhatjuk meg, ritka-mátrixos technológiát alkalmazva. A számítási munka határesetben a

csöveket alkotó atomok számának lineáris függvénye.

## 5. Alkalmazás: Duplafalú nanocső szegmensek forgása

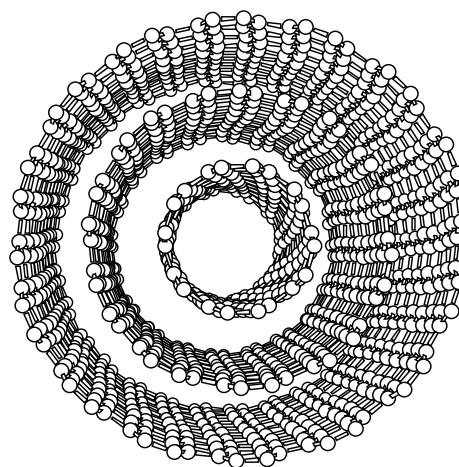
Ismeretes, hogy a szén nanocsövek gondolatban egy sík grafitréteg egy darabjának hengerré tekerésével származtathatók (1. ábra). A valóságban ezek a csövek ritkán keletkeznek egymagukban.

A kísérleti körülményektől függően vagy különböző sugarú, nagyjából koaxiális csövek ágyazódnak egymásba (2. ábra), vagy több egymás mellett párhuzamosan álló csőből ún. nanocső kötegek keletkeznek (3. ábra). Az anyag tulajdonságainak megértéséhez mindkét esetben rendkívül fontos a csövek közötti kölcsönhatások pontos leírása.



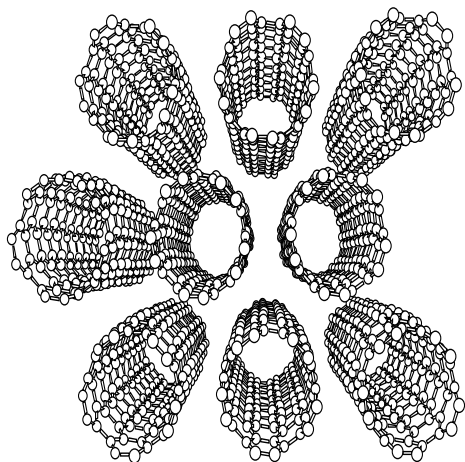
1. ábra. Szén nanocső sematikus szerkezete

Illusztrációképpen tekintsünk egy duplafalú nanocső darabot. A kisebb, mintegy 7 Å átmérőjű belső csövet egy 14 Å átmérőjű külső cső vegye körbe. A külső és belső cső fala közötti legkisebb távolság 3.5 Å, ez tipikusan a van der Waals potenciál minimuma körüli érték ezekre a rendszerekre. A dupla- és sokfalú csövek ezért energetikailag kedvezőbb képződmények lehetnek az egyszerű, egyfalú nanocsöveknél. Ez összhangban van azzal a fent említett kísérleti tapasztalattal, hogy nanocsövek laboratóriumi előállításakor ritkán keletkeznek izolált, egyfalú csövek.



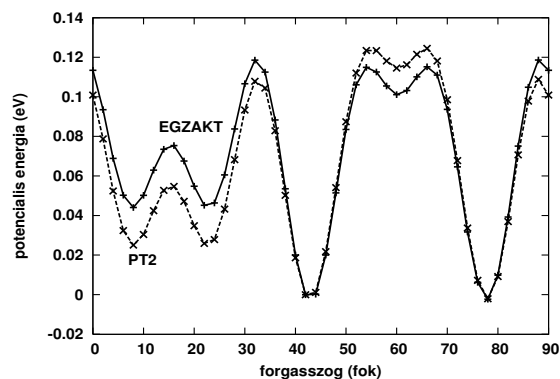
2. ábra. Többfalú nanocső sematikus szerkezete felülnézetből

Példánkban azt vizsgáljuk, milyen energetikai következménye van annak, ha a belső cső a tengelye körül elfordul, miközben a külső cső rögzített marad.



3. ábra. Nanocső kötegek

Az ilyen, és hasonló vizsgálatok arról tájékoztatnak, hogy vajon van-e kitüntetett relatív orientáció a külső és a belső fal egymáshoz képesti elhelyezkedésében, ill. hogy mekkora az elmozduláshoz szükséges energiát egy esetleges kitüntetett pozícióból. A 4. ábra a kölcsönhatási energiát ábrázolja a forgásszög függvényében, a (2) ill. (6) másodrendű Laplace-transzformációt tartalmazó módszerrel számítva.

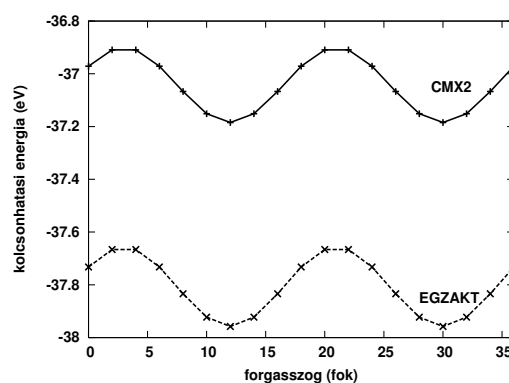


4. ábra. Duplafalú nanocső energiájának függése az egymással párhuzamos csövek relatív orientációjától. A potenciális energia 0-pontját az egzakt Hückel energiagörbe minimumában rögzítettük (szigetelő eset)

Összehasonlításképp feltüntetjük a modell pontos megoldását is, ezt mutatja az 'EGZAKT' feliratú görbe. Ez a számítás olyan nanocső párra készült, amelyek egyike sem fémes természetű, ezért az egyszerű másodrendű perturbációs képlet alkalmazása megengedett. A 4. ábrán bemutatott számok a  $\pi$ -elektron energia mellett az empirikus van der Waals potenciálból származó kölcsönhatási energiát is tartalmazzák. A 4. ábrából kitűnik, hogy ebben a rendszerben nincs számottevő forgási barrier: a minimum és a maximum energiájú pozíció között 0.12 eV-nyi

energiakülönbség van. Ez, minthogy modellünkben mintegy 1000 atomot vettünk figyelembe, alig egytized meV/atom energiának felel meg. Ugyanakkor érdekes megfigyelni, hogy a perturbációs formula milyen pontosan adja vissza az egzakt Hückel görbe lefutását.

Az 5. ábra szintén egy forgási energiagörbét mutat, ez alkalommal két fémes szerkezetű nanocsőből álló duplafalú csőre. Ezért a standard perturbációs képlet helyett a CMX2 átlagolást alkalmaztuk. A módszer pontosságának megítélése érdekében most nem a relatív potenciálértékeket, hanem a csőpár teljes (van der Waals taggal kiegészített) energiáját tüntettük fel. Örvedetes, hogy a viszonylag nagy abszolút értékben vett eltérés ellenére az egzakt Hückel görbe lefutását a CMX2 formula is kitűnően, szinte kvantitatív egyezéssel visszaadja. Mivel a mi szempontunkból általában olyan *energiakülönbségek* hordoznak releváns információt, mint például a rotációs barrier, valójában nincs is szükségünk az egzakt Hückel megoldás előállítására, bőven megelégedhetünk a CMX2 formulával.



5. ábra. Duplafalú nanocső teljes energiájának függése az egymással párhuzamos csövek relatív orientációjától. (fémes eset)

Az 5. ábráról leolvashatjuk, hogy a fémes duplafalú csőünk esetén a forgási energiabarrier szintén tized eV nagyságrendű, bár az energia az előző, nemfémes esethez képest kissé érzékenyebben függ az orientációtól (a figyelembe vett atomok száma a két esetben nagyjából megegyezik).

A fenti példák mutatják, hogy igen egyszerű modellekkel is nyerhetünk hasznos információkat a nanorendszerek elektron- és térszerkezetéről. Konkrétan, a nanocsövek közötti kölcsönhatások gyakran jól leírhatók az egyszerű másodrendű energiakorrekciók kiszámításával, sőt a nevezők átlagolása is megengedett a kémiaileg érdekes energiakülönbségek szempontjából. Ez utóbbi eredmény különösen fontos, mert lehetővé teszi a másképp nehezen tárgyalható fémes jellegű rendszerek leírását. Az itt bemutatott tesztszámítások sikere arra utal, hogy a közeljövőben nemcsak pár száz, hanem sokezer atomot

tartalmazó nanorendszerekre is tudunk majd számításokat végezni.

### Köszönetnyilvánítás

Az itt bemutatott kutatásokat az OTKA folyamatosan támogatta (T-35094-43685-M45294-D-45983). Hálásak vagyunk az NIIF projektnek is az általuk nyújtott számítástechnikai lehetőségért.

### Interactions between carbon nanotubes

This work overviews various kinds of interactions which may arise between nanotubes. Then, to describe hopping-type interactions, a model Hamiltonian is presented which is solved up to second order in the interaction strength. An essential feature of the second order technique we apply

### Hivatkozások

1. Kapuy, E.; Török, F., Az atomok és molekulák kvantumelmélete, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1974
2. Almløf, J., *Chem. Phys. Letters* **1991**, 176 319.
3. Surján, P.; Lázár, A; Szabados, Á., *Phys. Rev. A*, **2003**, 68 062503.
4. Surján, P.; Szabados, Á., *Int. J. Quantum Chem.* **2002**, 90 20–26.
5. Cioslowski, J, *Phys. Rev. Lett.* **1987**, 58 83.

here is that energy denominators are used in a Laplace-transformed representation facilitating a linear scaling algorithm. For metallic systems, the connected moment expansion is applied to avoid divergence caused by zero or very small denominators.

# Naftalinnal kondenzált 1,3-*O,N*-heterociklusok szintézise

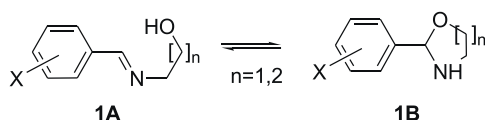
SZATMÁRI István, LÁZÁR László, MARTINEK Tamás és FÜLÖP Ferenc\*

SZTE, Gyógyszerkémiai Intézet, Eötvös utca 6, 6720 Szeged

## Bevezetés

Számos öt- illetve hattagú telített *N*-szubsztituált 1,3-*O,N*-heterociklus szerkezete és reaktivitása az 1,3-*O,N*-heterociklus (**1B**) és a megfelelő Schiff-bázis (**1A**) közötti tautomer egyensúllyal magyarázható (1. ábra).

A telített 1,3-*X,N*-heterociklusok közül az oxazolidinek és a tetrahydro-1,3-oxazinok gyűrű-lánc tautomériáját vizsgálták a leg részletesebben. Ezen vegyületek 2-arilszubsztituált származékai esetén mind folyadék-, mind gázfázisban érvényes lineáris összefüggést (1) találtak az egyensúlyi állandók ( $K_x = [\text{gyűrűs}]/[\text{nyitott}]$ ) logaritmusára és a 2-arilcsoport *X*-szubsztituensének Hammett-Brown paramétere között. <sup>1,2</sup>



1. Ábra. 1,3-*O,N*-Heterociklusok gyűrű-lánc tautomériája

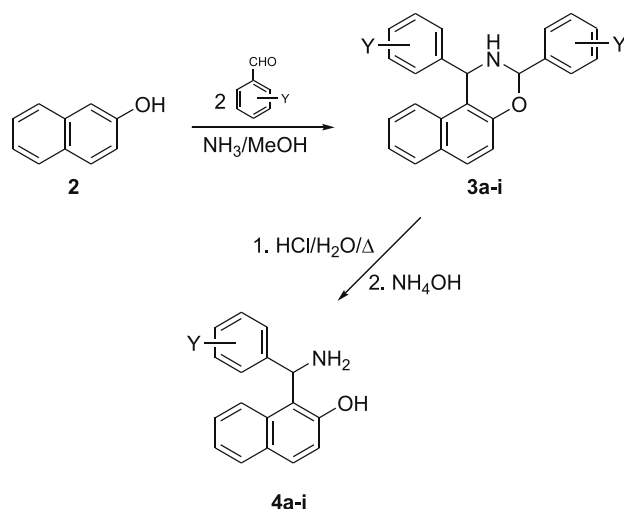
$$\log K_x = \log K_{x=H} + \rho\sigma^+ \quad (1)$$

Míg az 1,3-*O,N*-heterociklusok 2-helyzetű szubsztituenseinek gyűrű-lánc tautomériára gyakorolt befolyását igen részletesen tanulmányozták, az egyéb helyzetű szubsztituensek hatásairól jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk. Az e témában megjelent közlemények a nem 2-helyzetű szubsztituensek tautomériát befolyásoló hatásának matematikai egyenlettel kifejezhető jellemzése helyett kizárólag az (1) egyenlet paramétereire gyakorolt hatásaik kvalitatív leírására korlátozódnak. <sup>3,4</sup> Ezért célul tűztük ki, hogy ( $\alpha$ -aminobenzil)-szubsztituált naftolok gyűrűzárásaival a 2- és 4-helyzetben különféle alkil- ill. arilcsoportokat tartalmazó, naftalinnal kondenzált, telített 1,3-oxazinokat állítsunk elő, melyek vizsgálata révén lehetőségünk nyílik a gyűrű-lánc tautomériát befolyásoló kettős szubsztituenshatások kvantitatív jellemzésére.

A két reaktív funkciós csoport ellenére kevés irodalmi utalást találunk az  $\alpha$ -aminobenzil-szubsztituált naftolszármazékok nem aldehid gyűrűzárására, ezért további célul tűztük ki, hogy néhány gyűrűzárási reakción keresztül tanulmányozzuk ezen vegyületek reaktivitását.

## 1,3-Diarilszubsztituált naftoxazinok szintézise

Modellvegyületünk szintéziséhez a Betti-bázis ( $Y = H$ : **4f**) előállításának klasszikus módszerét (a 2-naftol Mannich-típusú aminoalkilezése, majd az intermedier naftoxazin-származék hidrolízise) alkalmazva 1-( $\alpha$ -amino-*Y*-szubsztituált-benzil)-2-naftolokat (**4a-i**) állítottunk elő (2. ábra). <sup>5-7</sup>



$Y = \text{NO}_2(m)$ : a;  $\text{Br}(m)$ : b;  $\text{NO}_2(p)$ : c;  $\text{Br}(p)$ : d;  
 $\text{Cl}(p)$ : e;  $\text{H}$ : f;  $\text{F}(p)$ : g;  $\text{Me}(p)$ : h;  $\text{OMe}(p)$ : i

2. Ábra. 1-( $\alpha$ -Amino-*Y*-szubsztituált-benzil)-2-naftolok szintézise

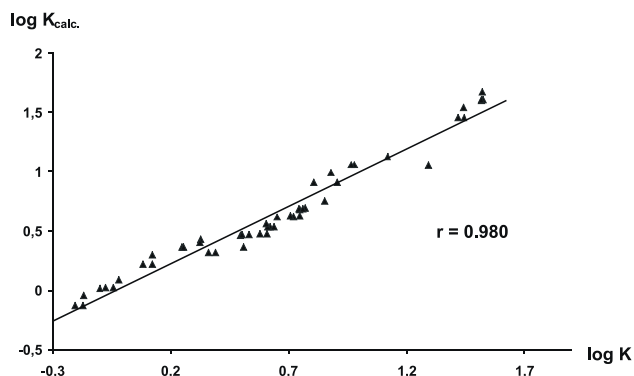
Az 1-( $\alpha$ -amino-*Y*-szubsztituált-benzil)-2-naftolokat (**4a-i**) ekvivalens mennyiségű aromás aldehidekkel reagáltatva kristályos kondenzációs termékeket (**5-13**) kaptunk, melyek az NMR-spektroszkópiás vizsgálatok során  $\text{CDCl}_3$ -ban 300 K-en háromkomponensű /nafto[1,2-*e*][1,3]oxazin diazstereomerek (**5-13B** > **5-13C**) és a nyitott forma (**5-13A**)/gyűrű-lánc tautomer elegyeknek bizonyultak (3. ábra). <sup>6,8</sup>

Az 5-13 vegyületek esetében a 3-helyzetű arilszubsztituens hatását a tautomer egyensúlyra az (1) egyenlettel tudtuk leírni, azaz ábrázolva az egyensúlyi állandók logaritmusát az *X* szubsztituens Hammett-Brown állandója függvényében a pontok egy egyenes mentén helyezkedtek el úgy a transz-nyílt láncú (4. ábra, a), mint a cisz-nyílt láncú (4. ábra, b) egyensúlyok esetében.

\* Fülöp Ferenc: Tel.: 36-62-545564; fax: 36-62-545705; e-mail: fulop@pharma.szote.u-szeged.hu

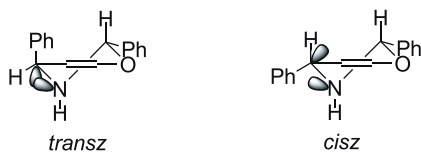






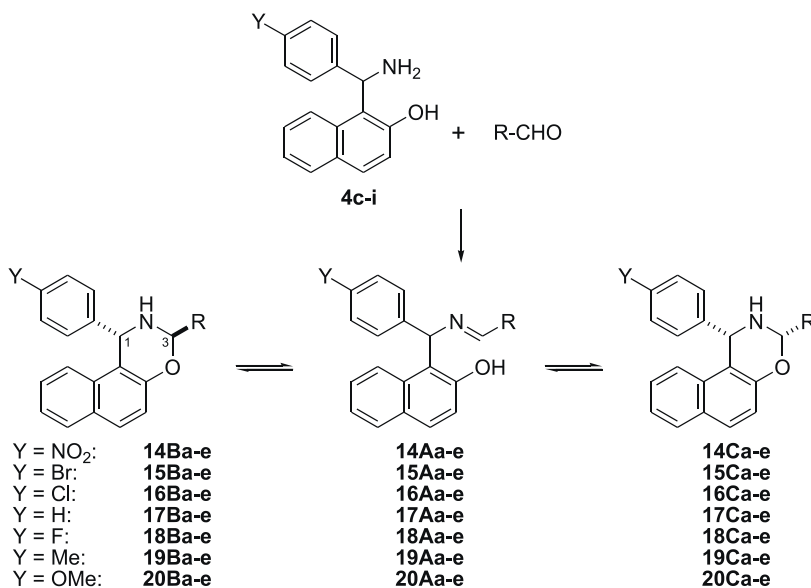
5. Ábra. A számított egyensúlyi állandó értékek ( $\log K_{\text{calc}}$ ) a kísérileg meghatározott  $\log K$  értékek függvényében

A transz gyűrűs formában fellépő anomer hatás kialakulása akkor a legvalószínűbb ha az 1- és 3-helyzetű szubsztituensek a 6. ábrán feltüntetett geometriának megfelelő térállásúak. Ezt a megállapításunkat ab initio kvantumkémiai számításokkal valamint NBO (Natural Bond Orbital) analízissel (bázis: HF/6-31G\*)<sup>12</sup> támasztottuk alá, úgy, hogy kiszámítottuk a nitrogén kötésben részt nem vevő elektronpárjának átfedési energia értékeit a vicinális lazító pályákra és vizsgáltuk az átfedési energia-értékek szubsztituens-függését.



6. Ábra. NBO számítások alapján valószínűsített transz és cisz geometriák

A transz gyűrűs formában fellépő anomer hatás további



R = Me: a; Et: b; Pr: c; iPr: d; tBu: e

8. Ábra. 3-Alkyl-,1-ariszubsztituált nafto[1,2-e][1,3]oxazinok szintézise

vizsgálata érdekében elvégeztük az C-1 szénatom kémiai

eltolódás-változásának (SCS) többváltozós lineáris regresszióanalízisét a (3) egyenletnek megfelelően.

$$\text{SCS} = \rho_F^Y \sigma_F^Y + \rho_R^Y \sigma_R^Y + \rho_F^X \sigma_F^X + \rho_R^X \sigma_R^X \quad (3)$$

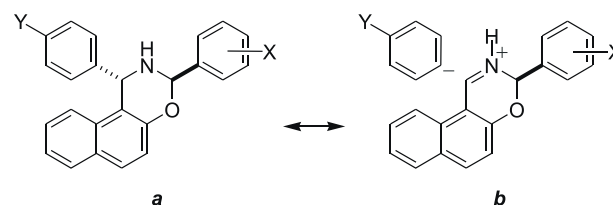
A regresszióanalízis eredményét a 2. táblázat foglalja össze:

2. Táblázat. A 7-13 vegyületekben a C-1 szénatomok kémiai eltolódás-változásának többváltozós lineáris regresszióanalízise

Forma	$\rho_F^Y$	$\rho_R^Y$	$\rho_F^X$	$\rho_R^X$	r
B	-1,12	0,75	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	0,982
C	-1,51	0,60	-0,49	- <sup>a</sup>	0,983

<sup>a</sup> nem szignifikáns (szignifikancia > 0,05)

A 2. táblázatból látható, hogy a C-1 szénatom kémiai eltolódás-változása fordított függést mutat az Y szubsztituens induktív hatásával ( $\rho$ ).<sup>13</sup> A gyűrűs formákban a meredekségi érték-különbséget azzal magyaráztuk, hogy a transz gyűrűs formában a fordított függés mellett egy másik normál szubsztituens függést mutató hatás (anomer hatás) is jelen van. Ezen anomer hatásnak köszönhetően a transz gyűrűs formában az Y szubsztituens kvantitatív módon befolyásolja a C-1–N kötés kettős kötés jellegét, s ezáltal a C-1 szénatom sp<sup>2</sup>-es karakterét (7. ábra), ami a b rezonanciaszerkezetet valószínűsíti. Ez a megállapítás újabb bizonyítékkul szolgál a transz gyűrűs formában jelenlévő anomer hatásra.



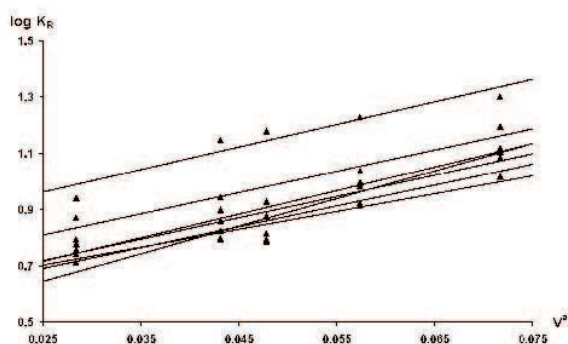
7. Ábra. A 8-13 vegyületek lehetséges rezonanciaszerkezetei

## 3-Alkil-,1-arilszubsztituált naftoxazinok szintézise

Az 1-helyzetű arilszubsztituensek gyűrű-lánc tautomériára gyakorolt hatásának izolált vizsgálata céljából az 1-( $\alpha$ -amino-Y-szubsztituált-benzil)-2-naftolokból (4a-i) alifás aldehidekkel 3-alkil-1-arilszubsztituált naftoxazin modellvegyületeket (14-20) készítettünk (8. ábra), melyek  $\text{CDCl}_3$ -ban 300 K-en nem tartalmaztak kimutatható mennyiségű nyitott formát (14-20A).

A diasztereomer gyűrűs formák (14-20B > 14-20C) arányaiból számított epimerizációs állandók ( $K_R = [14-20B]/[14-20C]$ ) logaritmusai és a 3-helyzetű alkilszubsztituensek térkitöltését jellemző Meyer paraméter<sup>14</sup> ( $V^a$ ) között lineáris összefüggést (4) találtunk (9. ábra).

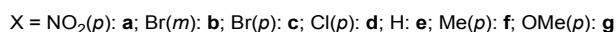
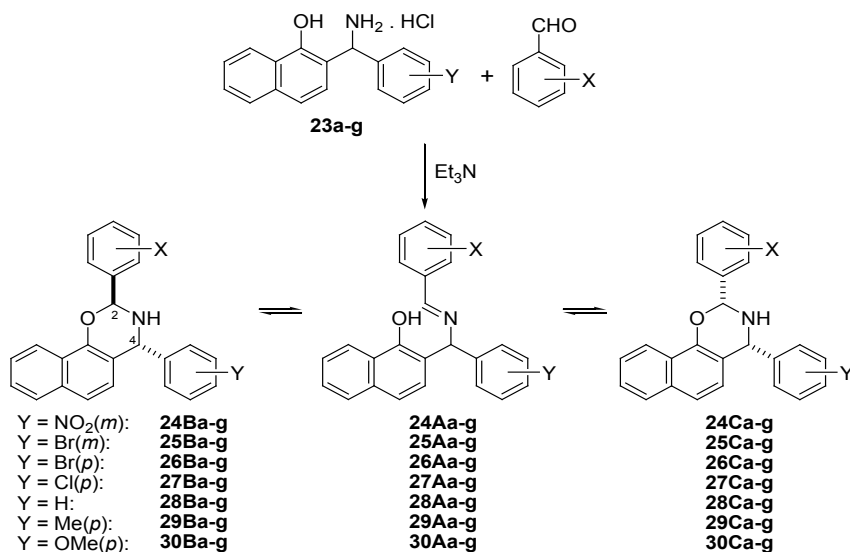
$$\log K_R = 0,55 + 7,88V^a \quad (4)$$



9. Ábra. A 14-20 vegyületek  $\log K_R$  értékei a Meyer paraméter ( $V^a$ ) függvényében

Az epimerizációs állandók (5) egyenlet szerinti többváltozós lineáris regresszióanalízise során szignifikáns összefüggést találtunk a  $\log K_R$  értékek és az Y szubsztituensek induktív hatását leíró  $\sigma_F^Y$  állandó között (1. táblázat), ami újabb bizonyítékul szolgált a transz gyűrűs formában fellépő anomer hatásra.

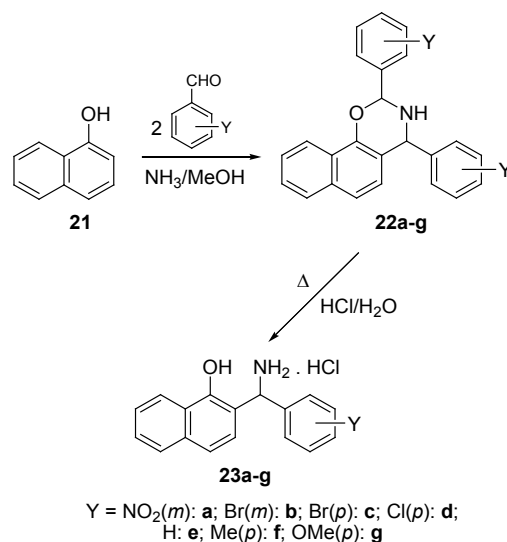
$$\log K_R = k + \rho_F^Y \sigma_F^Y + \rho_R^Y \sigma_R^Y + \rho^R V^a \quad (5)$$



11. Ábra. A 2,4-diarilszubsztituált nafto[2,1-e][1,3]oxazinok szintézise

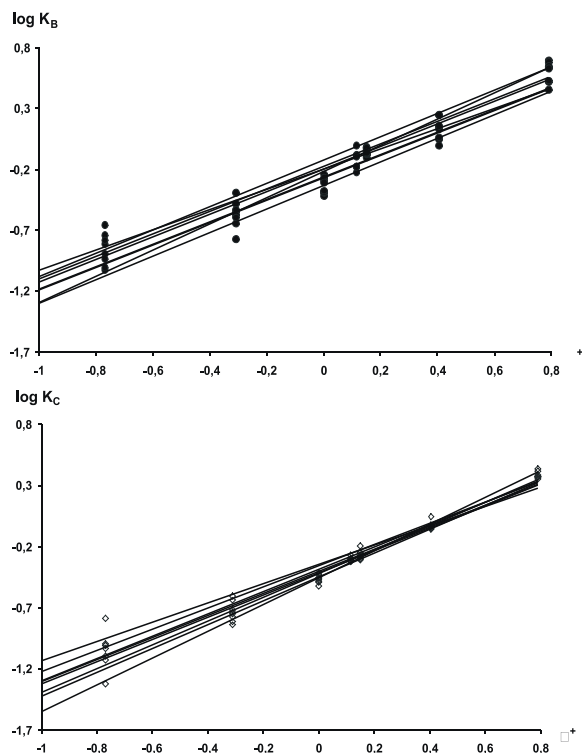
## 2,4-Diarilszubsztituált naftoxazinok szintézise

A Betti-bázis szintézisének klasszikus módszerét alkalmazva, az 1-naftol analóg átalakításaival az irodalomban elsőként sikerült 2-( $\alpha$ -amino-Y-szubsztituált-benzil)-1-naftolokat előállítani, melyeket hidroklorid sóként (23a-g) izoláltunk (10. ábra).<sup>15</sup>



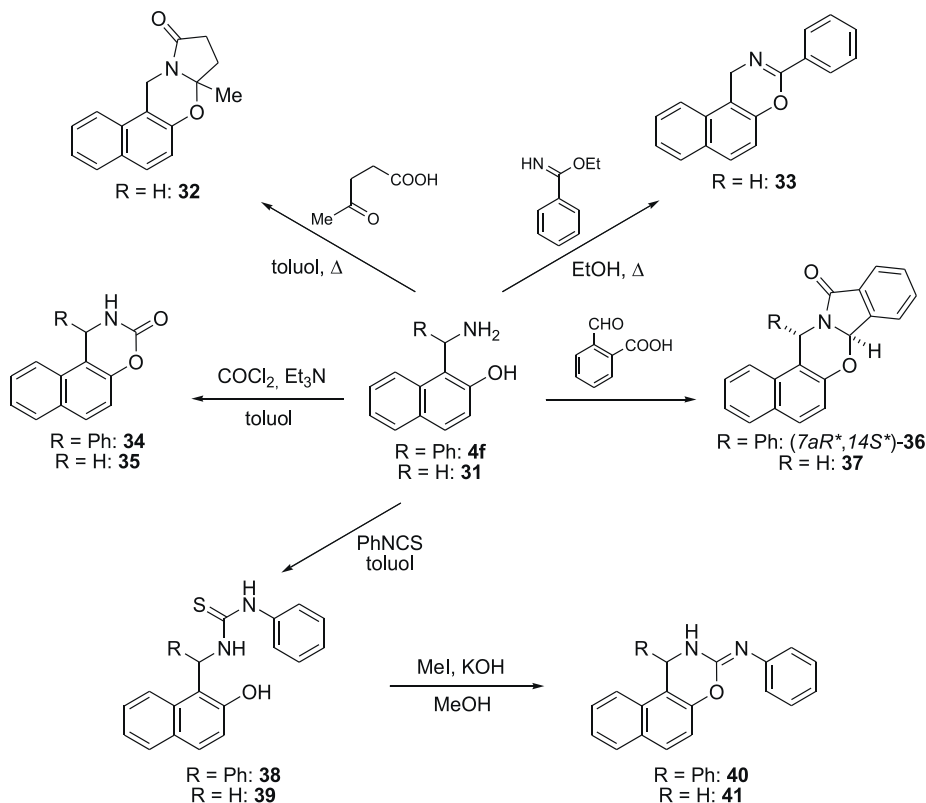
10. Ábra. A 2-( $\alpha$ -amino-Y-szubsztituált-benzil)-1-naftolok szintézise

A 2-( $\alpha$ -amino-Y-szubsztituált-benzil)-1-naftol hidrokloridokból (23a-g) aromás aldehidekkel elkészített modellvegyületek (24-30)  $\text{CDCl}_3$ -ban 300 K-en, regioizomereikhez (5-13) hasonlóan, szintén háromkomponensű /nafto[2,1-e][1,3]oxazin diasztereomerek (24-30B > 24-30C) és a nyitott forma (24-30A)/ gyűrű-lánc tautomer elegyeknek bizonyultak (11. ábra). Megállapítottuk, hogy az (1) egyenlet a 24-30 vegyületek tautomer egyensúlyának jellemzésére is érvényes úgy a transz-nyílt láncú, mint a cisz-nyílt láncú egyensúlyok esetén.<sup>15</sup>



12. Ábra. a: A 24-30 vegyületek  $\log K_B$  értékei a Hammett-Brown állandó ( $\sigma^+$ ) függvényében; b: A 24-30 vegyületek  $\log K_C$  értékei a Hammett-Brown állandó ( $\sigma^+$ ) függvényében

Az egyensúlyi állandók logaritmusát a 2-helyzetű aril-subsztituens Hammett-Brown állandója függvényében ábrázolva, az 1,3-diaril-naftoxazin modellvegyületekkel



13. Ábra. A 4f és 31 vegyületek gyűrűzárási reakciói (I)

analog módon a pontok egyenes mentén helyezkedtek el úgy a transz-nyílt láncú (12. ábra; a), mint a cisz-nyílt láncú (12. ábra; b) egyensúlyok esetében. A 2- és 4-helyzetű arilsubsztituensek együttes hatásának vizsgálata céljából a (2) egyenlet szerint végzett többváltozós lineáris regresszióanalízis során e vegyületek esetén is szignifikáns összefüggést találtunk a transz-nyílt láncú (26-30B-26-30A) egyensúlyi állandók valamint az Y subsztituensek induktív hatását leíró  $\sigma_F^Y$  paraméterek között (3. táblázat), ami azt bizonyítja, hogy ezen modell-vegyületek esetében is számolnunk kell a transz gyűrűs formában fellépő anomer hatással.<sup>15</sup>

3. Táblázat. A log K értékek többváltozós lineáris regresszióanalízise a 26-30 vegyületekre

Egyensúly	k	$\rho_F^Y$	$\rho_R^Y$	$\rho^X$	r
26-30B = 26-30A	0,32	0,33	- <sup>a</sup>	1,44	0,980
26-30C = 26-30A	-0,53	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	1,30	0,971

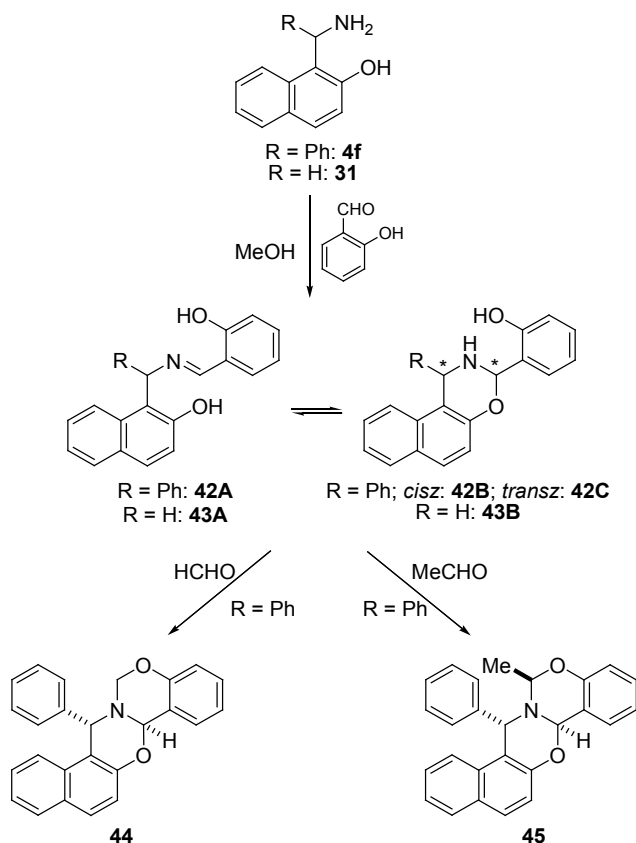
<sup>a</sup> nem szignifikáns (szignifikancia > 0,05)

### *$\alpha$ -Aminobenzil- és 1-aminometil naftolszármazékok átalakításai*

A fenil subsztituens hatását vizsgálva a reaktivitásra első lépésként a 4f és 31 vegyületek levulinsavas,<sup>16-18</sup> illetve etil-benzimidátos<sup>19</sup> reakcióit tanulmányoztuk (13. ábra). A várt pirrolonaftoxazin- (32) valamint naftoxazinszármazékot (33) csak a 31 vegyületből kiindulva tudtuk izolálni. A 4f vegyületet magasabb hőmérsékleten reagáltatva csak a Betti bázis (4f) bomlását tapasztaltuk.<sup>16</sup> A foszgenes gyűrűzárás mindkét aminonaftol esetében a várt 3-oxonaftoxazinszármazékot (34, 35) eredményezte.<sup>16</sup>

A 4f, 31 aminonaftolokat 2-karboxibenzaldehyddel reagáltatva<sup>17,18</sup> a 36, 37 izoindolo-naftoxazinszármazékokat állítottuk elő. A 36 vegyület esetében az ábrán feltüntetett relatív konfigurációjú diasztereomer keletkezett teljes diasztereoselektivitással. A relatív konfigurációt NOE mérésekkel igazoltuk, és MMFF94 kvantumkémiai számításokkal támasztottuk alá.<sup>16</sup> A diasztereoselektivitás valószínűleg azzal magyarázható, hogy a gyűrű-lánc tautomer köztitermék második gyűrűzárási reakciójának a sebessége jelentősen különbözik.<sup>20</sup>

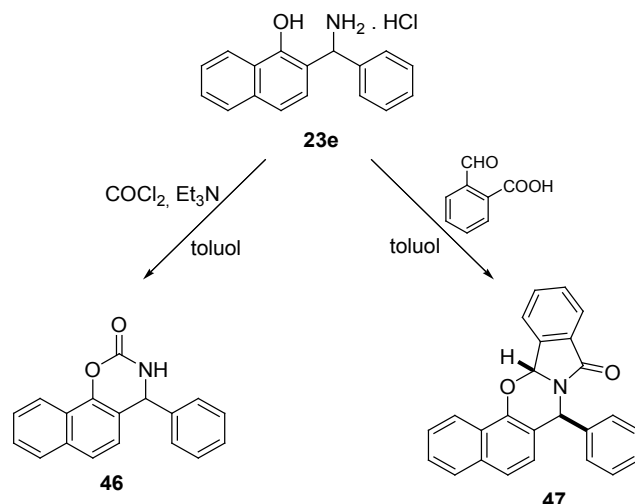
A kiindulási aminonaftolok (4f, 31) fenilizotiocianátos reakciója<sup>21</sup> során a 38, 39 tiokarbamid származékok keletkeztek, amelyek lúgos, metil-jodidos gyűrűzárásával a 40, 41 3-fenilimino-naftoxazinszármazékokat izoláltuk.



14. Ábra. A 4f és 31 vegyületek reakciója szalicilaldehyddel

A 4f, 31 aminonaftolok szalicilaldehydes kondenzációjával<sup>22-24</sup> a 42, 43 naftoxazinszármazékok keletkeztek (14. ábra), amelyeknek formaldehydes és acetaldehydes reakciója csak a 42 vegyület estén eredményezte az ábrán feltüntetett relatív konfigurációjú 44, 45 benzoxazinonaftoxazinszármazékokat teljes diasztereoselektivitással.<sup>16</sup>

A 23e helyzetizomer Betti-bázis gyűrűzárási reakciói esetén a kiindulási aminonaftol bomlékonysága miatt csak a foszgenés és a 2-karboxibenzaldehydes gyűrűzárás vezetett a várt 2-oxo- (46), illetve izoindolonaftoxazin-származékhoz (47). A két aszimmetriacentrumot tartalmazó 47 vegyület esetén is az ábrán feltüntetett relatív konfigurációjú diasztereomert nyertük teljes diasztereoselektivitással (15. ábra).<sup>16</sup>



15. Ábra. A 23e vegyület gyűrűzárási reakciói

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak az OTKA támogatásáért (grant T034901, T030452, TS040888). Köszönetüket fejezik ki továbbá Prof. Dr. Erich Kleinpeternek, Dr. Andreas Kochnak és Hetényi Anasztáziának a kvantum-kémiai számításokban, valamint Dr. Kari Neuvonennek az elméleti szerves kémiai tárgyalásokban nyújtott segítségével.

### Összefoglalás

2-Naftolból és aromás aldehidekből kiindulva 1-( $\alpha$ -amino-Y-szubsztituált-benzil)-2-naftolokat állítottunk elő. Az 1-naftol analóg átalakításaival 2-( $\alpha$ -amino-Y-szubsztituált-benzil)-1-naftolokat nyertünk. A regioizomer Y-szubsztituált aminonaftolokból X-szubsztituált aromás aldehidekkel kapott termékek CDCl<sub>3</sub>-ban, 300 K-en háromkomponensű gyűrű-lánc tautomer elegyeknek bizonyultak. Az egyensúlyi arányok és az X szubsztituens elektronikus tulajdonsága között Hammett-típusú összefüggést találtunk. Az Y-szubsztituált arilsoport a transz gyűrűs formában kialakuló anomer hatáson keresztül befolyásolta a tautomer egyensúlyt, amit a szubsztituens induktív hatását leíró  $\sigma_F$  paramétert tartalmazó Hansch-egyenlettel jellemeztünk. Megállapításunkat a C-1 atomok <sup>13</sup>C NMR kémiai eltolódásának lineáris regresszióanalízisével, valamint NBO molekulamodellzési számításokkal támasztottuk alá. Az Y-szubsztituált aminonaftolokból alifás aldehidekkel nyert 3-alkil-1-aryl-naftoxazinok esetén összefüggést találtunk az epimerizációs állandó ( $K_R$ ) és a szubsztituens térkitöltését jellemző Meyer paraméter, valamint a log  $K_R$  értékek és az Y szubsztituens induktív hatása ( $\sigma_F$ ) között. A regioizomer  $\alpha$ -aminobenzil-naftolok valamint az 1-aminometil-2-naftol foszgenés, etil-benzimidátos, 2-karboxibenzaldehydes, levulinsavas, szalicilaldehyd/form-aldehydes és szalicilaldehyd/acetaldehydes gyűrűzárási reakcióival új heterociklusos származékokat állítottunk elő. Valamennyi több aszimmetriacentrumot tartalmazó nitrogénhidfős vegyület teljes diasztereoselektivitással képződött.

## Hivatkozások

1. Valters, R. E.; Fülöp, F.; Korbonits, D. *Adv. Heterocyclic Chem.* **1996**, *66*, 1.
2. Lázár, L.; Fülöp, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3025.
3. Göblyös, A.; Lázár, L.; Evancis, F.; Fülöp, F. *Heterocycles* **1999**, *51*, 2431.
4. Milman, B. L.; Potekhin, A. A. *Khim. Get. Soedin.* **1973**, 902.
5. Betti, M. *Org. Synth. Coll.* **1941**, *1*, 381.
6. Szatmári, I.; Martinek, T. A.; Lázár, L.; Fülöp, F. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2877.
7. Szatmári, I.; Fülöp, F. *Curr. Org. Synth.* **2004**, *1*, 155.
8. Smith, H. E.; Cooper, N. E. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2212.
9. Taft, R. W.; Topsom, R. D. *Prog. Phys. Org. Chem.* **1987**, *16*, 1.
10. Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165.
11. Szatmári, I.; Martinek, T. A.; Lázár, L.; Koch, A.; Kleinpeter, E.; Fülöp, F. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3645.
12. Gaussian 98, Revision A.7, Frisch, M. J. and 58 co-authors; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
13. Neuvonen, K.; Fülöp, F.; Neuvonen, H.; Koch, A.; Kleinpeter, E.; Pihlaja, K. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4132.
14. Meyer, A., Y. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 1567.
15. Szatmári, I.; Martinek, T. A.; Lázár, L.; Fülöp, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2231.
16. Szatmári I.; Hetényi, A.; Lázár, L.; Fülöp, F. *J. Heterocyclic Chem.* **2004**, *41*, 367.
17. Csende, F.; Stájer, G. *Heterocycles* **2000**, *53*, 1379.
18. Ito, T.; Yamazaki, N.; Kibayashi, C. *Synlett* **2001**, *10*, 1506
19. Fülöp, F.; Bernáth, G.; Pihlaja, K. *Adv. Heterocyclic Chem.* **1998**, *69*, 349.
20. Meyers, I.; Downing, S. V.; Weiser, M.; J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1413.
21. Fülöp, F.; Bernáth, G.; Sohár, P. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 5981.
22. Fülöp, F.; Lázár, L.; Pelczer, I.; Bernáth, G. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2993.
23. Lázár, L.; Fülöp, F.; Bernáth, G.; Kálmán, A.; Argay, G. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 1213.
24. Kukharev, B. F.; Stankevich, V. K.; Klimentko, G. R.; Bayandin, V. V.; Albanov, A. I. *Arkivoc* **2003**, *xiii*, 166.

## Synthesis of naphthalene-condensed 1,3-O,N-heterocycles

Betti's classical procedure (starting from 2-naphthol) was used to prepare 1-[ $\alpha$ -amino-(Y-substituted-benzyl)]-2-naphthols (**4a-i**). The analogous transformation of 1-naphthol led to 2-[ $\alpha$ -amino-(Y-substituted-benzyl)]-1-naphthols (**23a-g**), which were isolated as hydrochlorides. The reactions of 1-[ $\alpha$ -amino-(Y-substituted-benzyl)]-2-naphthols (**4a-i**) and substituted benzaldehydes led to 1,3-diaryl-2,3-dihydro-1H-naphth[1,2-*e*][1,3]oxazines (**5-13**), which at 300 K in CDCl<sub>3</sub> proved to be three-component tautomeric mixtures containing C-3' epimeric naphthoxazines (B > C) besides the open tautomer (A). The influence of aryl substituents at position 3 on the ring-chain tautomeric equilibria could be described by the Hammett equation. In order to examine the influence of aryl substituents at positions 1 and 3 on the ring-chain equilibria of 1,3-diaryl-2,3-dihydro-1H-naphth[1,2-*e*][1,3]oxazines (**7-13**), multiple linear regression analysis of Eqs 2 and 3 was performed. The significant dependence of log K on the inductive parameter  $\sigma_F^Y$  of substituent Y for the tautomeric equilibria trans=chain (B=A) was explained with the aid of the anomeric effect in the trans ring form. Multiple linear regression analysis of the chemical shifts of C-1 and C-3 for the cis and trans diastereomers revealed a significant dependence on  $\sigma_F^Y$ . The differences between the intercepts could be explained nicely in terms of the anomeric effect in the trans ring form. For a deeper examination of this phenomenon, the donation energies of the nitrogen lone pairs to the vicinal antibonding orbitals were calculated by using NBO molecular modelling calculations. These revealed that the donation energies are strongly influenced by the relative configurations of C-1 and C-3.

To find evidence of the substituent effect in the ring form, the tautomeric system of 3-alkyl-1-aryl-2,3-dihydro-1H-naphth[1,2-*e*][1,3]oxazines **14-20** was analysed. The condensations of aminonaphthols **4a-i** with equivalent amounts of aliphatic aldehydes resulted in the naphthoxazine model compounds **14-20**, which at 300 K in CDCl<sub>3</sub> proved to be two-component tautomeric

mixtures containing C-3' epimeric naphthoxazines (B > C). The epimerization constants were calculated from the ratios of the diastereomers ( $K_R = [B]/[C]$ ). The influence of alkyl substituents on log K<sub>R</sub> could be described in terms of their Meyer parameters V<sup>a</sup>. The results of multiple linear regression analysis of the log K<sub>R</sub> values revealed a significant dependence on the inductive effect of substituent Y ( $\sigma_F^Y$ ), which can enhance the anomeric effect in the trans ring form.

The ring-closure reactions of aminonaphthols **23a-g** with equivalent amounts of aromatic aldehydes resulted in 2,4-diaryl-3,4-dihydro-2H-naphth[2,1-*e*][1,3]oxazines (**24-30**), which in CDCl<sub>3</sub> at 300 K formed three-component tautomeric mixtures containing major (B) and minor (C) ring-closed epimeric forms besides the open-chain form (A), and they proved to be good model compounds for study of the double substituent influence on the tautomeric equilibria. Systematic quantitative investigations on the ring-chain tautomeric equilibria of 2,4-diarylnaphth[2,1-*e*][1,3]oxazines demonstrated an analogous inductive influence on the trans-chain (B-A) tautomeric equilibria.

By simple or domino ring-closure reactions of 1-( $\alpha$ -aminobenzyl)-2-naphthol (**4f**), 1-aminomethyl-2-naphthol (**31**) and 2-( $\alpha$ -aminobenzyl)-1-naphthol (**23e**) with phosgene, ethyl benzimidate, 2-carboxybenzaldehyde, levulinic acid, salicylaldehyde/formalin or salicylaldehyde/acetaldehyde, naphth[1,2-*e*][1,3]oxazine and naphth[2,1-*e*][1,3]oxazine derivatives were prepared. All of the nitrogen-bridged polycyclic derivatives of **4f** and **23e** with several centres of asymmetry were formed with nearly total diastereoselectivity. Considerable differences were found in the ring-closing abilities of the unsubstituted and phenyl-substituted aminonaphthols **4f** and **31** and the regioisomeric compounds **4f** and **23e**.



# Bacillus thuringiensis szuszpenzió flokkuláltatása polielektrolitokkal és tenzidekkel

SZEPESSZENTGYÖRGYI Ádám<sup>a</sup>, BÁRÁNY Sándor<sup>b</sup>, SKVARLA Jíri<sup>c</sup> és MÉCS Imre<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Bay Zoltán Kutatóintézet, P.O.Box 2337,6726 Szeged, Magyarország

<sup>b</sup>Miskolci Egyetem, Analitikai Kémiai Tanszék, 3515, Miskolc- Egyetemváros, Magyarország

<sup>c</sup>Kassai Műszaki Egyetem, Kosice, ul. Letná 3, Szlovákia

## 1. Bevezetés:

A *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* (Bti) baktériumokat sikeresen alkalmazzák szúnyog-lárvák gyérítésére, spórája ugyanis tartalmaz egy fehérje kristályt ( $\delta$ -endotoxin), mely a szúnyoglarva táplálkozása közben a bélcsatornába jut, a középbélben aktivizálódik és elpusztítja a szúnyoglarvát<sup>1-2</sup>. A szegedi Bay Zoltán Biotechnológiai Kutatóközpontban kifejlesztettük aránylag híg koncentrációban ( $1-3 \times 10^7$  n/ml) Bti szuszpenziók inkubálásának feltételeit és módszerét<sup>3</sup>. Ugyanakkor a szuszpenzió kiszérelése és gyakorlati célokra való alkalmazása csak sokkal töményebb szuszpenziók esetében lehetséges. Felmerült tehát a híg szuszpenzió sűrítésére alkalmas eljárás kidolgozása. A sejt-suszpenziók koncentrálására mind reagens-nélküli (szeparáció, szűrés, ultra-és mikroszűrés), mind reagensek alkalmazásával párosult (koaguláció, flokkuláció, flotálás, kromatográfia) módszereket használnak. Az előbbi módszerek előnye az, hogy biztosítják a natív oldat, ill. sejtanyag tisztaságát. Ugyanakkor e módszerek hatékonysága rohamosan csökken a kolloidrészecskék/sejtek méreteinek csökkenésével, amikor is nehézségek merülnek fel a szűrésnél, centrifugálásnál, stb. A reagenseket alkalmazó eljárások előnye: a nagymértékű sűrítés, ennek aránylag kis költsége és egyszerű technológiai megvalósítása<sup>4</sup>. Ezek az előnyök természetesen csak hatékony reagensekkel valósíthatók meg.

A mikroorganizmus-suszpenzió sűrítésének sok problémája megoldható nagy molekulatömegű anionos és kationos polielektrolitok alkalmazásával, figyelembe véve ezen anyagok jelentős flokkuláló (aggregáló) hatását, felhasználásuk gazdaságosságát és a biokolloidokra kifejtett kímélő, nem-toxikus hatását. A flokkuláció alkalmazható sejtsuszpenziók sűrítésére önálló módszerként, vagy pedig a hagyományos eljárások - szűrés, flotáció, centrifugálás stb. - hatékonyságának növelésére.

A makromolekulákkal történő flokkuláltatás általános törvényszerűségeit és alkalmazásait a biotechnológiában az egyik szerző monográfiája és összefoglaló cikke tárgyalja<sup>4,5</sup>. Mint ismeretes<sup>5-7</sup> a flokkuláció időbeli lefolyását és hatékonyságát számos tényező befolyásolja, úgymint a polimer szerkezete, oldatban felvett méretei, a makromolekula-szegemesek és a részecskefelület közötti kötési energia, az alkalmazott polimeroldat töménysége és a diszperzióval való elegyítés módja, a polimer molekulatömege, töltéselőjele és töltéssűrűsége (polielektrolitok esetében), az oldat elektrolit-tartalma, a szilárd fázis koncentrációja stb. Ebből is látható, hogy a polimerekkel való flokkuláltatás még szervesetlen (élettelen)

diszperziók esetében is egy igen bonyolult, sok paramétertől függő folyamat. Mint ezt számos esetben kimutattuk<sup>4,5</sup>, a mikroorganizmus szuszpenziók flokkuláltatásának általános törvényszerűségei és mechanizmusa nagyjából megfelelnek a szervesetlen diszperziókra érvényes törvényszerűségeknek. Ugyanakkor az előbbi egy sokkal bonyolultabb folyamat, mint a szervesetlen részecskékből álló szuszpenziók flokkuláltatása. Az utóbbiakkal ellentétben a sejt - flokkuláns kölcsönhatásokat nagymértékben befolyásolják a sejtek életműködése során keletkező sejtmetabolizmus-termékek, a környező oldat komponensei, valamint a sejtfal állandóan változó felépítése, architektúrája<sup>8-10</sup>.

### 1.1. Kutatásunk célja

Nagy térfogatú híg Bti készítmény sűrítése (kiszérelése) gyors és egyszerű módszerrel, vízdékony polimerek és tenzidek alkalmazásával. E célból részletesen tanulmányoztuk a különböző felépítésű anionos és kationos polielektrolitoknak (PE) valamint tenzideknek a Bti szuszpenzió sejt-aggregálódásának kinetikájára és mértékére kifejtett hatását a hozzáadott reagens-mennyiség, a sejttömeg, az adagolás módja, a polimer-oldat koncentrációja stb. függvényében.

## 2. Kísérleti anyagok és módszerek

### 2.1. Bacillus thuringiensis ssp. israelensis törzs

A *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* (Bti) mikroba pálcá alakú, spórás, aerob baktérium<sup>11</sup>. Hossza 3-5  $\mu\text{m}$ , szélessége 0,5-0,8  $\mu\text{m}$ . A spóra 2-3  $\mu\text{m}$  méretű és ovoid alakú. Kísérleteinkben közel 100%-os spórás Bti szuszpenziót használtunk. A Bti baktériumot egy kereskedelmi termékből izoláltuk (VECTOBAC® 12 AS, Valent BioScience Co., Libertyville, IL, USA) és T2<sup>12</sup> tápoldatban kultiváltuk 72 órán át rázótermosztátban ( $T=34\text{C}^\circ$ ; rpm=195). A törzsoldat töménysége  $1,5 \times 10^7$  n/ml (n-sejtszám), az egységnyi térfogatban lévő élő sejtek számát hígítással és széleszétessel határoztuk meg.

### 2.2. Polielektrolitok

Flokkulálószerként SNFH528 (Gyártó:SNF S.A.,41 rue Jean Huss, 42028 SAINT-ETIENNE, CEDEX 01, France), Percol 1697 és DS jelzésű kationos polielektrolitokat, SNFH149, SNFH57 (Gyártó:lásd

fent), Magnafloc 156 és Magnafloc 1011 jelzésű anionos polielektrolitokat (gyártó: Allied Colloids, jelenleg CIBA), valamint hexadecil-piridinium-klorid kationos, illetve nátrium-dodecil-benzol-szulfonát anionos tenzideket és ezek elegyeit alkalmaztuk. Percol 1697 az akril-amid és akrilát kvatener-ammonium só kopolimere, molekulatömege kb. 200.000, töltéssűrűsége 14,9 mmol/g<sup>13</sup>. A Magnafloc 156 és 1011 polimereket nagy molekulatömegű poliakrilamid részleges hidrolízisével állítják elő, a 0,5% töménységű oldat viszkozitása megfelelően 1,0 Pa.s és 1,2 Pa.s (Allied Colloids adat). A gyártótól kapott információk szerint az SNFH 57, 528 és 149 jelzésű polielektrolitok magas, nagyon magas és ultra magas molekulatömegű poliakrilamidok, akrilamid kopolimerek akrilsav származékkal. A 0,5 %-os anionos polielektrolit oldat viszkozitása 0,5-0,7 Pa.s értékek között mozog. Az anionos minták szabad monomer tartalma kevesebb mint 250 ppm, a kationosnál kevesebb mint 1000 ppm. Jelenleg érvényben lévő rendeletek szerint nincs veszélyességi besorolásuk.

Flokkulálószerként alkalmaztunk továbbá anionos (nátrium-dodecil-benzol-szulfonát - NaDS) és kationos (hexadecil-piridinium-klorid - HPyC és cetil-trimetil-ammonium-bromid - CTAB) tenzidek 0,1 % oldatát.

### 2.3. PDA-2000 Diszperzió Analizátor

A flokkulációs méréseket dinamikus feltételek mellett PDA-2000 részecske-méret analízisére alkalmas berendezéssel (Rank Brothers Inc, Anglia) végeztük a <sup>6,13</sup> tanulmányokban leírt módon. A műszer működési elve röviden a következő. Az átlátszó flexibilis csövön áthaladó szuszpenzió egy kis térfogatában (jellemzően 1 mm<sup>3</sup>) lévő részét egy szűk fény-nyalábbal merőlegesen világítják meg. A szuszpenzió áthaladó fény-fluxus értékét érzékeny foto-detektor regisztrálja, amely a fényjelet elektromos jellé alakítja át. A fényjel egy nagy, az áthaladó fény átlag-intenzitását, azaz a szuszpenzió zavarosságát jellemző állandó fluxusból (dc), és egy, a megvilágított zónában megjelenő részecskék számát jellemző fluktuáló fluxusból (ac) tevődik össze. Kimutatták<sup>6</sup>, hogy a fluktuáló jel négyzetes átlaga négyzetgyökének értéke (RMS) arányos a részecskék darabszám szerint átlagolt koncentrációjával és méretével. Az RMS értékek jelentősen növekednek az aggregálódás kezdetével és csökkennek a folyamat végzetével. A kijövő jel mutatja az RMS és az RMS/dc arány értékét is. Mindkettő alkalmazható az aggregálódás mértékének jellemzésére.

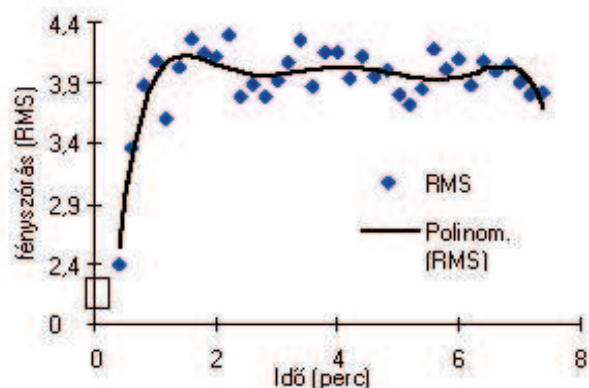
A PDA-2000 műszer korai információval szolgál a rendszerben lejátszódó aggregálódási folyamatokról, akár már másodpercek elteltével a reagens szuszpenzióhoz való hozzáadása után. Az ábrákon bemutatott RMS értékek általában három mérés eredményének az átlaga.

## 3. Eredmények

### 3.1. A flokkuláció kinetikája

A flokkuláció mértékét, melyet az RMS értékkel jellemeztünk, általában a polimer-oldat szuszpenzióhoz való (állandó keverés mellett) hozzáadása után 4-6 perc elteltével

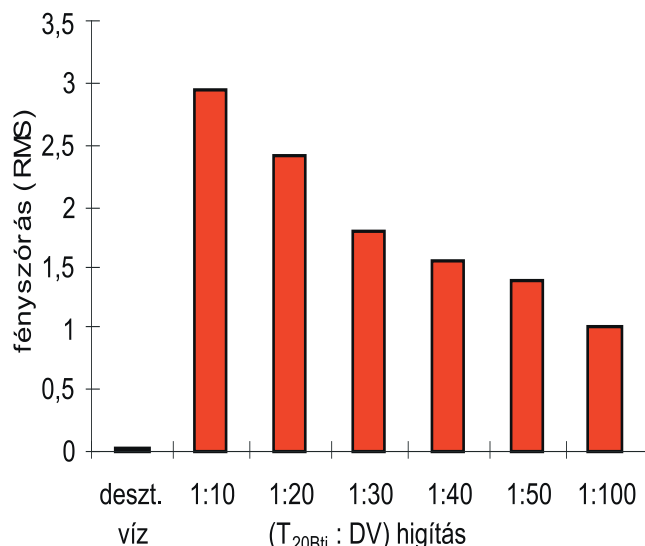
mértük. Fontos volt megállapítani, hogy ez az időtartalom elegendő-e egy kvázi-stabil, időben már lényegesen nem változó állapot elérésére, azaz reprodukálható aggregáció – mértékek meghatározására. A méréseket egy cirkuláló rendszerben valósítottuk meg, a RMS értékeket 12 másodpercenként regisztráltuk. Ezzel a módszerrel részletesen tudtuk követni a flokkuláció időbeli lefolyását. Az 1. ábra adataiból látható, hogy a flokkuláció mértéke a polimer-oldat hozzáadása utáni 1-7 percen nagyjából állandó értéket mutat, csak ezután kezd csökkenni az RMS értéke, ami a nagyméretű flokkulátumok (szabad szemmel is látható) kiüledésével magyarázható.



1. Ábra. Hígított (1: 20) Bti szuszpenzió flokkulációjának kinetikája 10 g/10<sup>11</sup>sejt SNFH 528 kationos polimer jelenlétében. A flokkuláltatást 0,1 % oldattal valósítottuk meg. Itt és a további ábrákon az RMS érték a flokkuláció fokát jellemzi.

Az állandó RMS értékkel jellemezhető tartományban az aggregátumok (flokkulátumok) elérik maximális nagyságukat, amely nyilvánvalóan a keverés intenzitásának és a flokkulátumok stabilitásának, szilárdságának függvénye. A 0 és 1 perc közötti tartományban a RMS értéke rohamosan nő. Ennek oka valószínűleg az, hogy az ellentétes töltésű kationos polimer gyors adszorpciója következtében a sejtek ütközésének hatékonysága jelentősen növekszik, ami az aggregálódás kezdetéhez vezet. Érdekes módon a flokkuláció kinetikai görbéjén nem figyelhető meg jelentős kezdeti lag-szakasz, melyben az aggregáció mértéke nem vagy csak alig növekszik, mint ez jellemző szerves anyagok (kaolin, szilícium-dioxid stb.) diszperzióinak polielektrolitokkal történő flokkuláltatása esetében<sup>14</sup>.

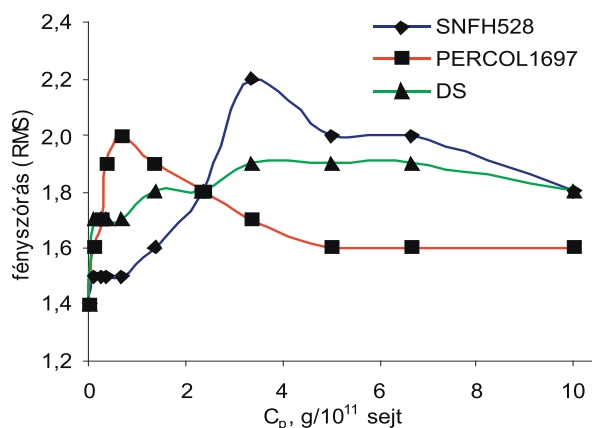
A PDA-2000 műszer érzékeny mérési tartománya az 1,00 és 4,00 RMS értékek között van. A flokkulációs kísérletek előtt meghatároztuk, milyen koncentrációjú tápoldatban végezhető el a makromolekulák sejtek aggregációjára kifejtett hatásának vizsgálata, hogy az effektusok a fenti RMS tartományban jól mérhetőek legyenek. E célból az 1,5·10<sup>7</sup> csíra/ml kiinduló tápoldatból tízszeres, hússzoros, harmincszoros, negyvenszeres, ötvenszeres és százszoros hígítású szuszpenziókat készítettünk és mértük ezek fényszórását. A 2. ábrán látható, hogy a kisebb hígítású oldat alapzavarossága elég nagy és a flokkuláns - hozzáadás következtében fellépő RMS növekedése nem mérhető elég széles tartományban, így a mérések többségét 50x hígítású (élő csíraszám 3·10<sup>5</sup> n/ml) szuszpenziókkal végeztük, melyekben jól mérhetőek az alapzavarosság és a reagens által kiváltott effektusok.



2. Ábra. Bti szuszpenziók fényszórásának (RMS) függése a diszperzió hígításának mértékétől

Az is megfigyelhető, hogy a tápoldat-koncentráció és az RMS értékek között nincs egyenes összefüggés, ami a (reagenst nem tartalmazó) töményebb sejt-suszpenzióban fellépő aggregálódással hozható összefüggésbe. Ezért minden mérés-sorozat előtt meghatároztuk a vizsgálandó sejt-suszpenzió (viszonyítási alapul szolgáló) RMS értékét.

Tanulmányunkban különböző kationos és anionos polielektrolittal végeztünk vizsgálatokat, majd részletesen tanulmányoztuk a leghatékonyabbnak bizonyult minták által kiváltott flokkuláltatás törvényszerűségeit. Az irodalmi adatok szerint a mikroorganizmusok leghatásosabb flokkuláló- szereit a kationos polielektrolitok<sup>4,5,8-10</sup>, kutatásunkban is ezeknek szenteltük a legnagyobb figyelmet. A 3. ábrán mutatjuk be 50x hígítású, azaz  $3.10^5$  sejt/ml tartalmú Bti szuszpenzió SNFH528, Percol 1697 és DS jelzésű kationos polielektrolitok 0,01 % oldata adagolásával megvalósított flokkuláltatás eredményét.

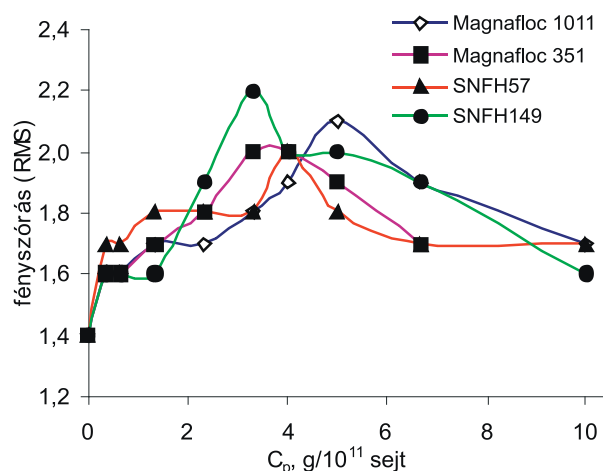


3. Ábra. Hígított (1:50) Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott kationos polimer mennyiségétől. A flokkulációt 0,01% polimer-oldatokkal valósítottuk meg.

Látható, hogy a hozzáadott reagens mennyiségének

növelésével az aggregáció mértéke először növekszik, majd csökken, azaz a híg diszperziókra jellemző klasszikus viselkedés figyelhető meg: kis koncentrációknál a nagy molekulatömegű flokkuláns érzékenyítő, jelentős mennyiségekben pedig stabilizáló hatást fejt ki. Az SNFH528 és DS minták csak a flokkulációs maximumhoz viszonyítva mutatnak részleges stabilizációt. A flokkuláció mértékével arányos maximális RMS értékek néhány g/100 milliárd sejt reagens - koncentrációknál figyelhetők meg, ami összhangban van E. Coli és más sejt-suszpenziókban mért optimális flokkulációt előidéző polimer koncentrációkkal<sup>4,5,8-10</sup>. A nagy töltéssűrűségű Percol 1697 jelzésű kationos polielektrolit, melynek adszorpciós affinitása a negatív töltésű sejtfelülethez valószínűleg a legnagyobb, már 1-2 g/100milliárd mennyiségben is jelentős flokkulációt idéz elő. Ugyanakkor a flokkulációs zóna szélessége ebben az esetben meglehetősen kicsi. Hatékonyabb reagensnek bizonyult az SNFH 528 minta, itt az aggregálódás mértéke nagyobb és flokkulációs tartomány is szélesebb. A kationos DS minta flokkuláltató képessége az előbbi két mintához viszonyítva lényegesen gyengébb. Nyilvánvaló, hogy a kationos polimerek flokkuláció képessége elsősorban a makroionok pozitív és a sejtfal negatív töltései között fellépő elektrosztatikus kölcsönhatások következtében fellépő adszorpcióval van összefüggésben. Ugyanakkor az aggregáció mechanizmusa ellentétes töltéselőjelű polielektrolitokkal nem feltétlenül tisztán elektrosztatikus, azaz nem csak a felületi töltések semlegesítésének eredménye<sup>7</sup>. Merevláncú PE esetében az említett tényező mellett jelentős szerepet játszhat a flokkuláció hidkötéses mechanizmusa is, mint ezt megfigyeltük E.coli szuszpenziók merev- vázú poliszacharidokkal (kitozán és származékai) történő flokkuláltatása során<sup>8,9</sup>. A makro-lánc hajlékonyságától (rigiditásától) függően tehát az aggregáció különböző mechanizmusai dominálnak.

Megfigyeléseink szerint számos anionos polielektrolit is aránylag jól aggregálja a Bti sejteket, mint ez a 4. ábra adataiból jól követhető. A vizsgált négy anionos polimer (SNFH 149, SNFH 57, Magnafloc 351 és Magnafloc 1011 jelzésű minták) közül az első minta bizonyult a leghatásosabbnak.



4. Ábra. Hígított (1:50) Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott anionos polimer mennyiségétől. A flokkulációt 0,01% polimer-oldatokkal valósítottuk meg.

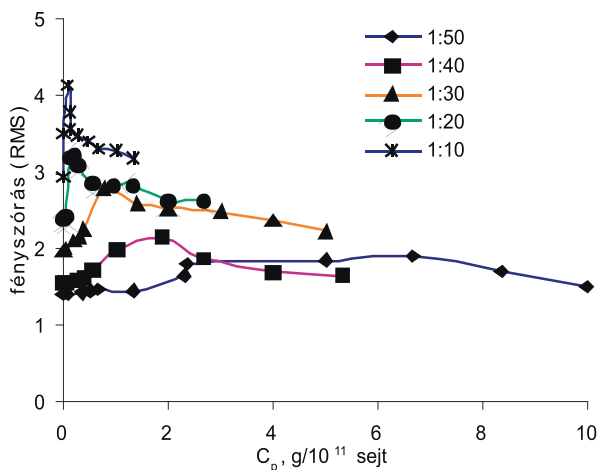


A kísérleteket  $3 \cdot 10^5$  sejt/ml töménységű szuszpenzióval és 0,01 % polielektrolit-oldattal végeztük ugyanolyan módon, mint a kationos polielektrolitok esetében. Itt is a klasszikus viselkedés - kis polimer-töménységeknél aggregálódás, majd jelentős reagens-koncentrációknál a diszperzió újbóli stabilizációja - figyelhető meg. Feltételezhető, hogy a sejtfal mozaikszerű szerkezete, ahol pozitív és negatív töltésű funkciós csoportok váltják egymást, lehetőséget teremt az anionos szegmensek kötődésére is a felülethez. Mivel a pozitív funkciós csoportok száma a sejtfelületen aránylag kicsi (lényegesen kisebb, mint a negatív funkciós csoportok koncentrációja), így az anionos PE csak kisszámú kötődéssel kapcsolódik a sejtfelülethez, és ily módon a kevésbé deformált, jelentős kiterjedésű adszorbeált makro-anion képes hidkötéses mechanizmus révén összekötni, aggregálni több bacillus-sejtet. A sejtfelület és polielektrolit-szegmensek közötti hidrofób kölcsönhatások is szerepet játszhatnak az adszorpciós réteg kialakulásában.

A továbbiakban részletesen vizsgáltuk a szuszpenzió polielektrolitok hozzáadásával történő flokkuláltatásának törvényszerűségeit.

### 3.2. A szuszpenzió töménységének hatása

Ennek tanulmányozására különböző hígítású szuszpenziót flokkuláltattunk az igen hatékonynak bizonyult (2. ábra) SNFH 528 jelzésű kationos polielektrolit 0,01 % oldatával. Mint az 5. ábrán feltüntetett eredményekből látható, a töményebb szuszpenziók maximális flokkulációjához kevesebb polimer szükséges és ez a kevesebb polimer nagyobb mértékű (nagyobb RMS értékkel jellemezhető) aggregációt vált ki.



5. Ábra. Különböző hígítású Bti szuszpenziók RMS értékének függése a hozzáadott kationos polimer mennyiségétől. A flokkulációt 0,01% SNFH 527 oldattal végeztük.

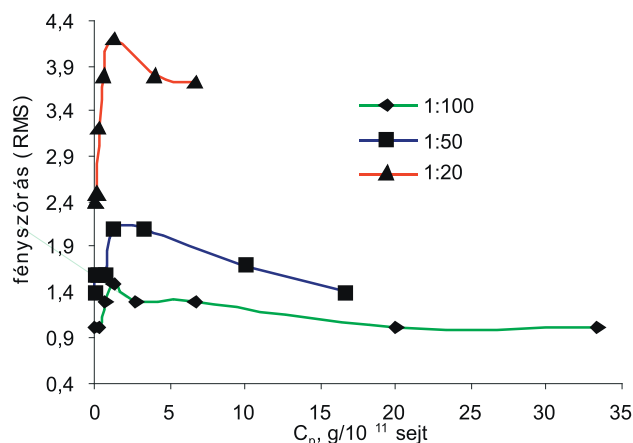
A sejtszám csökkenésével a flokkuláció mértéke csökken, de a destabilizációs zóna kiszélesedik. Tehát, minél nagyobb a sejtek koncentrációja, annál kisebb makromolekulamennyiség (és feltehetően adszorbeált polimer-mennyiség) szükséges a hatékony aggregáció eléréséhez (I. táblázat). Hasonló megfigyeléseink voltak polisztról-latex és más szeretlen szuszpenziók flokkuláltatásának vizsgálata

során kationos és nemionos polimerekkel<sup>15,16</sup>. Az I. táblázat a különböző töménységű szuszpenziók maximális flokkulálását kiváltó polimer mennyiséget mutatja be ugyanazon sejtszámra (100 millió) vonatkoztatva.

I. Táblázat: Különböző töménységű Bti szuszpenziók maximális flokkulációját kiváltó optimális kationos SNFH528 polimer mennyiségek:

Hígítás	Sejtszám (n/50ml)	Optimális polimer tartalom (mg/50ml)	Maximális flokkulációt előidéző PE-mennyiség (mg/100 millió sejt)
50 x	$1,50 \times 10^7$	1	6,7
40 x	$1,87 \times 10^7$	0,35	1,9
30 x	$2,50 \times 10^7$	0,2	0,8
20 x	$3,75 \times 10^7$	0,075	0,2
10 x	$7,50 \times 10^7$	0,05	0,07

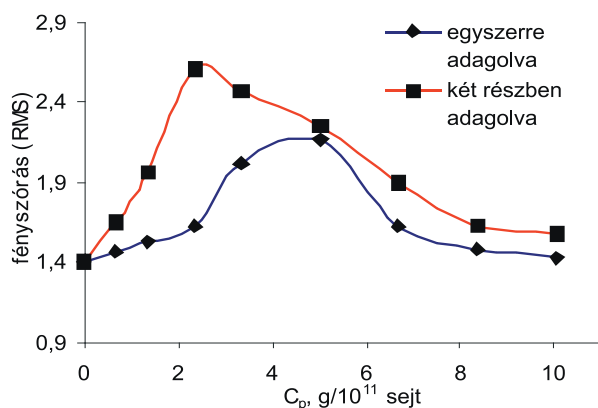
A  $3 \cdot 10^5$  sejt/ml töménységű szuszpenziótól való átmenet az  $1,5 \cdot 10^6$  sejt/ml szuszpenzióig az optimális flokkulációt kiváltó PE mennyiség  $6,7 \text{ mg}/10^8$  sejt-től  $0,07 \text{ mg}/10^8$  sejt-ig, azaz igen jelentősen csökken. Ez valószínűleg a flokkuláció kinetikai aspektusával van összefüggésben: a szuszpenzió töménységének növekedésével a sejtek ütközésének gyakorisága és ennek folytán az adszorbeált polimer által előidézett aggregáció mértéke jelentősen növekszik. A gyakoribb ütközések következtében az oldatba bevitt polimer gombolyagoknak (láncoknak) kevesebb idő áll rendelkezésre, hogy a felülettel való kontaktus után ezen szétterüljenek, felvegyék egyensúlyi konformációjukat. Így a töményebb szuszpenzióban a (hatékonyabb) flokkulációt kevésbé deformált, valószínűleg nagyobb méretű makromolekulák idézik elő, mint híg rendszerekben, ahol a ritkább ütközések eredményeként a polimer molekuláknak a deformálódásra, konformáció-változásra több idő áll rendelkezésükre. Az utóbbi esetben a gyengébb flokkuláció a jobban deformált, a felülethez több kötésponttal kötődő, vékonyabb adszorpciós rétegek képződésével magyarázható. Hasonló összefüggéseket figyeltünk meg a szuszpenzió SNFH 149 és SNFH 57 jelzésű anionos polielektrolittal megvalósított flokkulációja során is (6. ábra).



6. Ábra. Különböző hígítású (feltüntetve) Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott anionos SNFH 57 polimer mennyiségétől. A flokkuláció 0,01% oldattal történt

### 3.3. A polimer adagolási módjának hatása

Ismeretes<sup>2,5</sup>, hogy a polimerek flokkulátató hatását növelhetjük úgy is, hogy a polimert nem egy, hanem két egyenlő vagy több részletben adagoljuk a diszperzióhoz. Az ismert irodalmi adatok szervesen szuszpenziók flokkulátására vonatkoznak. Fontosnak tűnt meghatározni, növelhető-e a sejt-suszpenzió aggregálódásának mértéke, ha a reagenst szakaszosan visszük be a rendszerbe. A 7. ábra alsó görbéje a rendszer RMS értékének változását mutatja be a bevitt SNFH 528 jelzésű kationos polimer koncentrációjának függvényében a reagens egyszerre történő hozzáadása feltételénél, míg a felső görbe a polielektrolit két egyenlő (a második részletet az első után 5 perc elteltével vittük be) részben megvalósított adagolása által előidézett változásokat illusztrálja.



7. Ábra. Hígított (1:50) Bti szuszpenzió kationos SNFH 528 0,01% oldatával megvalósított flokkulációja mértékének (RMS) függése a hozzáadott polimer mennyiségétől a polimer-oldat kétféle adagolási módjánál.

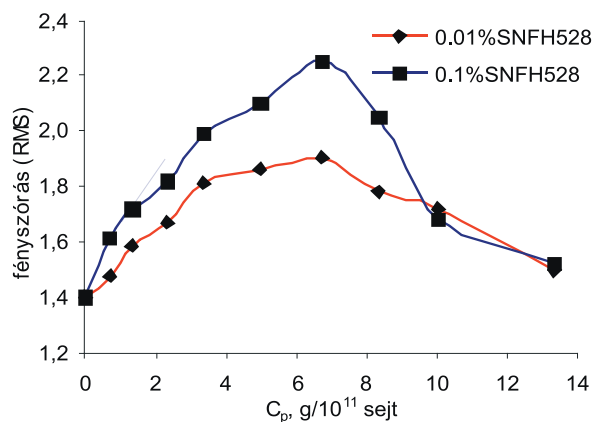
Látható, hogy azonos térfogatú kationos polielektrolit oldat adagolása azonos térfogatú szuszpenzióhoz nagyobb hatást fejt ki, ha a polimer-oldatot két részben adjuk a szuszpenzióhoz. Nemcsak a flokkuláció mértéke lett nagyobb, hanem a maximális flokkuláció eléréséhez is kevesebb polimer mennyiség szükséges. A hatékonyabb flokkulálás oka az lehet, hogy az első polimer-részlet bevitele után képződött flokkulumok a második adaggal bevitt makromolekulák hatására tovább aggregálódnak, azaz a flokkulációs folyamat két lépcsőben játszódik le. Először csak kis flokkulumok képződnek, majd ezek nagyobb aggregátumokká egyesülnek. A másodlagos aggregátumok jóval nagyobbak, mint az elsődlegesek és ez nagyobb RMS értékek megjelenésében tükröződik (7. ábra).

Megjegyzendő azonban, hogy a polimer részletenkénti adagolása nem minden esetben eredményez hatékonyabb flokkulálást<sup>17</sup>, a megfigyelést a szerzők nem magyarázták.

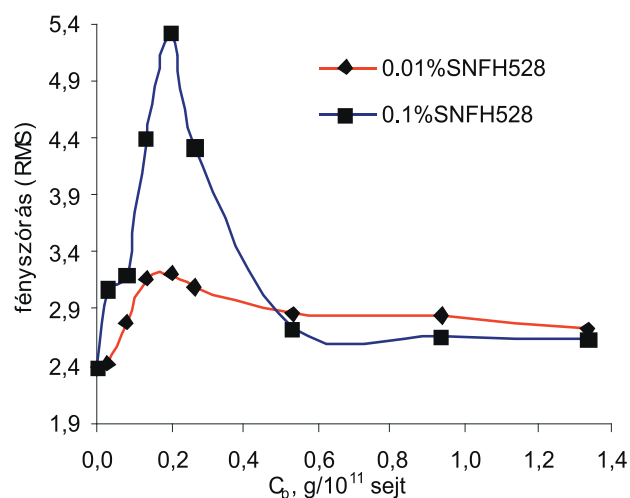
### 3.4. A polimeroldat koncentrációjának hatása

Gyakran az alkalmazott polimeroldat koncentrációjára is befolyásolja a részecskék aggregálásának mértékét<sup>16</sup>. Ennek hatását SNFH 528 jelzésű kationos polielektrolit 0,1 %

és 0,01 % oldatával megvalósított flokkulátás során vizsgáltuk. A töményebb 0,1 % polimer-oldat nagyobb flokkulátató hatást váltott ki a Bti szuszpenzióban a kiinduló tápoldat mind ötvenszeresen hígított, mind hússzorosan hígított mintájában (8-9 ábra).



8. Ábra. 1:50 hígítású Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott SNFH 528 kationos polimer mennyiségétől 0,01 % és 0,1 % oldatokkal megvalósított flokkuláció esetében



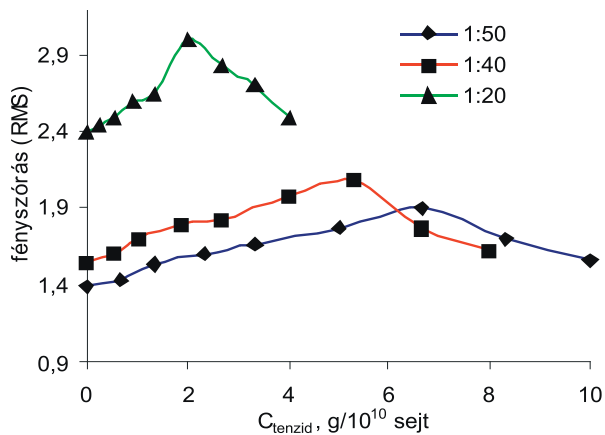
9. Ábra. 1:20 hígítású Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott SNFH 528 kationos polimer mennyiségétől 0,01 % és 0,1 % oldatokkal megvalósított flokkuláció esetében

Különösen jelentős a polimeroldat koncentrációjának hatása a töményebb 7,5·10<sup>5</sup> sejt/ml szuszpenzió esetében. Ennek az oka egyértelműen nem tisztázott. Feltételezhető, hogy a tömény polimeroldatban nagyméretű asszociátumok, szupramolekula-struktúrák képződnek és ezek kötődése, adszorpciója a sejtfelületen határozza meg az aggregálódás mértékét. Elképzelhető az is, hogy a koncentrált(abb) oldatban a polielektrolit töltései jobban le vannak árnyékolva, a makromolekula nagyobb mértékben van begombolyodva és ennek kinyúlása, szétterülése a sejtfelületen, illetve töltéseinek hozzáférhetősége, kölcsönhatása a felület töltéseivel megnehezített, s ennek következtében a gyakori ütközésekkel jellemezhető szuszpenzióban a flokkulált állapotot a kevésbé deformált, kisszámú kötésponttal rendelkező (nagyobb kiterjedésű, azaz nagyobb flokkulátató hatással bíró) adszorbeált makromolekulák hozzák létre.



### 3.5. Bti szuszpenzió flokkuláltatása tenzid oldatokkal és tenzid elegyekkel

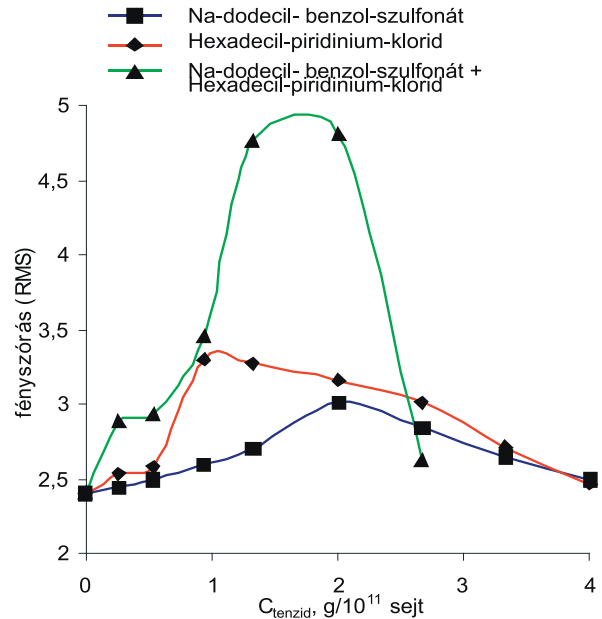
Sejtszuszpenziók flokkuláltatása elérhető kationos tenzid-oldatok adagolásával is. Mint a 10. ábra adataiból látható, hexadecil-piridinium-klorid 0,1 % oldatának növekvő mennyiségben való adagolása - a polimeroldatokhoz hasonlóan - a Bti szuszpenzió RMS értékeinek, azaz a flokkuláció mértékének növekedéséhez, majd csökkenéséhez vezet.



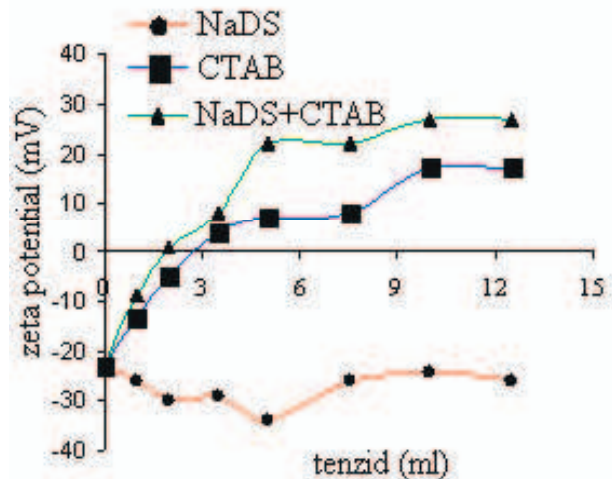
10. Ábra. Különböző hígítású Bti szuszpenziók flokkulációjának mértéke (RMS) a hozzáadott hexadecil-piridinium-klorid mennyiségétől. A tenzid-oldat koncentrációja 0,1 %

A fent leírtakhoz hasonlóan a töményebb szuszpenzió maximális flokkulációjához kevesebb tenzidoldat szükséges, és ez a kevesebb tenzidoldat az adott koncentrációnál egyre nagyobb flokkulációs hatást fejt ki. Az optimális aggregációt kiváltó tenzid-koncentráció nagyságrenddel nagyobb (néhány g/10 milliárd sejt), mint a hasonló effektus eléréséhez szükséges polielektrolit-mennyiség (néhány g/100 milliárd sejt). A kationos tenzid flokkuláltató hatása nyilvánvalóan a pozitív töltésű molekuláknak a sejtfelület negatív töltésű részein megvalósuló adszorpciójával magyarázható. Váratlan módon az anionos nátrium-dodecil-benzol-szulfonát (NaDBS) adagolása is előidézte a sejtszuszpenzió gyenge flokkulációját (11. ábra), ami valószínűleg a negatív töltésű ionoknak a mozaikszerű sejtfelületen található pozitív töltésű funkciók csoportokkal való kölcsönhatásával hozható összefüggésbe.

A flokkuláltató hatás jelentősen növelhető kationos és anionos tenzid- oldatok egymás utáni adagolásával. Mint a 11. ábra felső görbéjéből látható, ha a szuszpenzióhoz először 0,1 % nátrium-dodecil-benzolszulfonát oldatot, majd 5 perc elteltével ugyanolyan mennyiségű szintén 0,1% hexadecil-piridinium-klorid oldatot adunk, az individuális komponensek által kiváltott hatáshoz viszonyítva jelentős RMS érték-, azaz aggregáció mérték-növekedés figyelhető meg. A tenzidek flokkuláltató hatása jól értelmezhető a sejtek elektrokinetikai potenciáljának változásával tenzidek jelenlétében. Ezt a Kassai Műszaki Egyetem Eljárástechnikai és Környezetvédelmi Tanszékén lévő (Doppler-effektuson alapuló) ZetaPlus, Brookhaven Inc, USA, műszer alkalmazásával határoztuk meg, amely lehetőséget nyújt a  $\zeta$ -potenciál sejtenkénti megoszlásának



11. Ábra. Hígított (1:20) Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott anionos és kationos tenzid, illetve ezek 1:1 elegye mennyiségétől. A flokkulációt 0,1 % oldatokkal végeztük.



12. Ábra. Hígított (1:50) Bti szuszpenzió  $\zeta$ -potenciájának változása a hozzáadott tenzid- mennyiség függvényében.

nagy pontosságú mérésére is. A kapott adatokat a 12. ábrán tüntettük fel. Látható, hogy a Bti sejtek  $\zeta$ -potenciál értéke  $-23$  mV, a negatív zéta - potenciál abszolút értéke anionos tenzid hozzáadása során valamelyest, kb.  $-34$  mV-ig növekszik, majd jelentős tenzid-tartalomnál ismét ( $-25$ - $26$  mV-ig) csökken. Az elektrokinetikai potenciál növekedése közvetve a NaDBS sejtfalon megvalósuló adszorpciójára utal, melynek következtében növekszik a felület hidrofobitása, és így elképzelhető, hogy a sejtfelületek között fellépő hidrofob kölcsönhatások (vonzóerők) túlkompenzálják a felület negatív töltéseinek tasztítását, ami az aggregáció kismértékű növekedésével párosul (11. ábra). A cetil-trimetil-ammonium-bromid (12. ábra) és hexadecil-piridinium klorid (nem szerepel az ábrán) koncentrációjának növekedésével a sejtek negatív  $\zeta$ -potenciálja jelentősen csökken, majd áttöltés után a pozitív  $\zeta$ - értékek növekednek. A  $\zeta$ -

potenciál abszolút értékének csökkenése a felületi töltés és potenciálcsökkenés következménye, tehát ebben az esetben a sejtek neutralizációs aggregálódásának mechanizmusáról beszélhetünk. Ugyanakkor - hasonlóan a szervesetlen diszperziókban megfigyeltékhez<sup>18</sup> - a sejtek maximális aggregációjának és izoelektromos pontjának megfelelő tenzid-koncentrációk nem esnek egybe, nagymértékű aggregáció már kis negatív  $\zeta$ -potenciál értékeknél (kb. -5 -6 mV) is megfigyelhető. A kationos és anionos tenzid-oldatok együttes hatása által előidézett jelentős flokkulációt jól magyarázza a két tenzid jelentős negatív  $\zeta$ -potenciál (abszolút értékeit) csökkentő, illetve pozitív - potenciál növelő hatása, melynek mértéke meghaladja az individuális kationos tenzid hatását (12. ábra).

A 11. és 12. ábrák adatainak összehasonlítása azt mutatja, hogy korreláció figyelhető meg a tenzideknek és tenzidelegyeknek a sejtek elektrokinetikai potenciáljára és aggregálódásának mértékre kifejtett hatása között. Ez a pozitív töltésű tenzidek által előidézett aggregálódás elektrosztatikai mechanizmusának jelentős szerepe utal.

Jelentős különbségek figyelhetők meg a tenzidek vagy polielektrolitok által előidézett üledékek (flokulumok) tulajdonságai között. Az előbbieket hozzáadása során keletkezett csapadék kistérfogatú, tömör, látszólagosan sima határfelületű, jelentős mennyiségű vízben újra diszpergálható. A polimerek jelenlétében képződött flokkulumok nagyméretűek, lazák, egyes esetekben fonalszerűek, nem-rediszpergálhatók.

A kationos PE-anionos tenzid vagy anionos PE-kationos tenzid elegyek bizonyultak a legnagyobb hatásfokú flokkuláló szerekeknek. Az ilyen, megfelelő összetételű elegyek adagolása a sejtuszpenzió pillanatszerű kicsapódásához, nagyméretű "túrószerű" üledék keletkezéséhez vezet, amelyet rediszpergálni csaknem lehetetlen. Az aggregálódás mértéke olyan nagy és a folyamat olyan gyors, hogy ezt a PDA műszerrel követni lehetetlen.

#### 4. Összefoglalás

Átfolyós rendszerben végzett fényszórásos módszerrel kimutattuk, hogy *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* szuszpenziók jól flokkulálthatók kationos és anionos polielektrolit-oldatok hozzáadásával. Tehát a megfelelő vízdékony polimerek alkalmasak az iparilag kultivált híg szuszpenzió sűrítésére, ami elengedhetetlenül szükséges a szennygyógyító, környezetbarát baktérium gyakorlati alkalmazása szempontjából. A makromolekulák és sejtek közötti 1-2 perc időtartalmú kontaktus elegendő a polimeroldat maximális aggregáló hatásának kifejtéséhez, és a kontaktus időtartalmának növelése kb. 7 percig nem változtatja meg a flokkuláció mértékét.

A maximális flokkulációhoz szükséges polimer-mennyiség - ami néhány tized g/10<sup>9</sup> sejt és néhány g/10<sup>11</sup> sejt értékek között mozog - a szuszpenzió töménységének növelésével jelentősen csökken. Ezt a flokkuláció kinetikai törvényszerűségeivel hoztuk összefüggésbe.

A polimeroldat két egyenlő részben megvalósított adagolása, illetve a polimeroldat koncentrációjának emelése jelentősen

növeli a reagens flokkuláltató hatását.

A sejtuszpenzió jól flokkuláltható kationos tenzidekkel, illetve különösen jó hatásfokkal kationos és anionos tenzidelegyek alkalmazásával. A tenzidek és elegyeik flokkuláltató hatása és a sejt felület  $\zeta$ -potenciáljára kifejtett hatása között korreláció figyelhető meg. Anionos PE-kationos tenzid és kationos PE-anionos tenzid elegyek a sejtuszpenzió igen hatékony flokkuláló szereit, hozzáadásuk rosszul oldódó üledék formájában azonnal kicsapítja a sejteket. A Bti szuszpenzió polielektrolitokkal történő flokkuláltatása egy igen bonyolult, összetett folyamat, melynek törvényszerűségei a mozaikszerű sejt felülethez kapcsolódó mind pozitív, mind negatív töltésű makroionok kapcsolódásával, a polimeradszorpció és sejt-aggregálódás kinetikai aspektusaival, valamint az aggregálódásban szerepet játszó polimer-hídkötés és felületi töltés-csökkenés figyelembevételével magyarázhatók.

#### Köszönetnyilvánítás

A kutatás részben *BZAKA* finanszírozású belső kutatás, részben az *OTKA* által támogatott T 029033 sz. téma, valamint a 00493 sz. INTAS, és a Magyar-Izraeli 22/98 sz. Tét projekt keretében valósult meg, a nyújtott támogatásokat Sz.Á. és B.S. hálásan köszönik.

#### Hivatkozások

- Margalit, J.; Dean, D. *J. Am. Mosq. Control.* **1985**, *1*, 1.
- Ozer, N. *Mikrobiol. Bul.* **1983**, *17*, 63.
- Guan, X.; Chen, J.; Huang, Z.; Tang, Y.; Gao, R. *Chin. J. Biotechnol.* **1998**, *14*, 45.
- Bárány, S.; Teszlenko A. *Magyar Kémiai Folyóirat.* **1992**, *12*, 463.
- Baran, A. A. (S. Bárány); Teszlenko, A. Ya. *Flokkulánsok a biotechnológiában*, Khimiya Kiadó: Leningrád, **1990**.
- Gregory, J. *Colloids and Surfaces.* **1988**, *31*, 231.
- Bárány, S. *Polimerek diszperz rendszerekben. A kémia újabb eredményei*, 88. Kötet, Akadémiai Kiadó: Budapest, **2000**.
- Baran, A. A.; *Colloids and Surfaces.* **1988**, *31*, 259.
- Baran, A. A.; Teszlenko, A. Ya.; Medvedev, Ju. V.; *Uspekhi kolloidnoj khimii*, Khimiya Kiadó: Leningrád **1991**, 358.
- Eriksson, L. B.; Hardin, A. M. *Flocculation in Biotechnology and Separation Systems*; Attia, Y. A., Ed.; Elsevier Publ.: New York, **1987**, pp. 441.
- Sneath, H.A.P. *Systematic Bacteriology. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci*; Holt, J.G., Ed.; Williams & Wilkins Press: Baltimore, **1986**; pp. 1104-1111.
- Horváth, S. *Mikrobiológiai Praktikum*, Tankönyv kiadó: Budapest, **1980**. 465.
- Bárány, S.; Báder, E. *Magyar Kémiai Folyóirat.* **1998**, *104*, 47.
- Gregory, J.; Lee, S. Y. *J. Water SRT-Aqua.* **1990**, *39*, 265.
- Solementseva, I. M.; Tuszupbaev, N. K.; Baran, A. A. *Ukrainszkij Khim. Zsurnal.* **1980**, *46*, 929..
- Baran, A. A. *Polimerszorgyerzsacsstije diszpesznije szisztemi*, Nauková Dumka kiadó: Kijev, **1986**. 1-203 ol.
- Csempesz F., Rohrsetzer S. *Acta Chimica Acad.Scient. Hungaricae.* **1979**, *99*, 381.
- Lyklema, J. *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, Academic Press: London- San Diego- New York- Boston- Sydney- Tokyo- Toronto, **1998**; Vol. 3.

**Flocculation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (Bti) suspensions by polyelectrolytes and surfactant solutions.**

By measuring the intensity of the scattered laser beam in a flowing system it has been shown that dilute suspensions of Bti bacteria (that are cultivated by microbiological method) can be effectively flocculated and concentrated using different cationic (SNFH528, Percol 1697 and DS grade) and anionic (SNFH 149, SNFH 57, Magnafloc 351 and Magnafloc 1011) polyelectrolytes that is necessary for its formulation and use as anti-mosquito agent. It has been shown that maximum and constant (within 7-8 minutes) degree of aggregation can be reached within 1-2 minute contact of added macromolecules with cells, and the optimum flocculant dosage necessary to reach maximum degree of flocculation substantially decreases with increasing the suspension concentration and it ranges between several tenth of mg polymer/100 million cell to several mg polymer/100 million. This feature is explained by the influence of kinetics factors and adsorbed polymer layer structure on the efficiency of flocculation. It is also shown that adding the optimal polymer dosage in two equal portions enhances the flocculation activity of the flocculant

compared to one-step addition, and the more concentrated (0.1 %) polyelectrolyte solution possess higher flocculation efficiency compared to the more diluted one (0.01%). We have found that Bti cells can be aggregated by cationic surfactants and, with especially good effect, using cationic-anionic surfactant mixtures. A correlation between the flocculating efficiency of surfactants and their effect on the zeta-potential of the cells is observed. Anionic PE- cationic surfactant and cationic PE-anionic surfactant mixtures have shown to be extremely powerful flocculants for the cellular suspension, their addition results in an immediate formation of compact precipitates of cells. Flocculation of cellular suspensions by polymers is a complicated process that can be explained by adsorption of negatively or positively charged macroions on the cell surface with mosaic structure having both positive and negative functional groups, taking into account the kinetics of polymer adsorption and kinetics of aggregation of cells having adsorbed polymers as well as the possible charge neutralization and polymer bridging mechanisms.

## Ciklodextrinek kölcsönhatása kolloidokkal

PUSKÁS István<sup>1</sup>, SZENTE Lajos<sup>2</sup> és CSEMPESZ Ferenc<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Eötvös Loránd Tudományegyetem Kolloidkémiai és Kolloidtechnológiai Tanszék, H-1518 Budapest, 112 Pf. 32

<sup>2</sup>CYCLOLAB Kft., H-1525 Budapest Pf. 435

### Bevezetés

Farmakonok hatékonyságának, biohasznosításának és biztonságának növelését célzó gyógyszer technológiai fejlesztések során fokozott érdeklődés mutatkozik kolloid komponenseket is tartalmazó, komplex gyógyszerhordozó rendszerek iránt<sup>1</sup>.

Az utóbbi évtizedekben emiatt is széleskörű kutatásokat végeztek nanométer mérettartományú liposzómák<sup>2</sup> és ciklodextrinek<sup>3</sup> gyógyszerhordozóként való felhasználhatóságának beható vizsgálatára. A kolloid és a kis molekulájú komponensek eltérő fizikai és kémiai sajátságaiból adódóan gyógyszer- és egyéb oldott molekulákkal való kölcsönhatásuk jellege, mechanizmusa és alkalmazási területeik is számottevően különböznek<sup>4</sup>.

Liposzómákat széles körben használnak kontrollált hatóanyag felszabadulást és célzott hatást biztosító hordozóként, valamint kísérleti biológiai membránmodellként<sup>5</sup>. A foszfolipid kettősrétegek bipoláris karaktere miatt elvben lipofil és hidrofil anyagok befogadására és szállítására is alkalmasak. Megfelelő terápiás hatás eléréséhez ezen szállító rendszerek kinetikai állandóságának, a foszfolipid molekulák és a vezikulumok stabilitásának biztosítása egyaránt szükséges<sup>6,7,8</sup>.

Gyógyszerészeti szempontból is megkülönböztetett figyelmet érdemelnek a 100 nm átmérőjűnél kisebb, egy foszfolipid kettősréteget tartalmazó, ún. SUV (small unilamellar vesicle) liposzómák. Ezek előnyös sajátsága a nagyobb méretű liposzómákkal szemben - többek között -, hogy széles körű a szöveti eloszlásuk. Hosszabb ideig maradhatnak a keringésben, diszperzióik membránszűrővel is sterilizálhatók<sup>9</sup>.

Ciklodextrinek gyógyszerészeti alkalmazásának fontos oka, hogy jelentősen megnövelhetik gyengén vízoldható vegyületek, ún. vendégmolekulák oldhatóságát<sup>10</sup>.

Komplekképzésre alkalmas hidrofób karakterű belső üregük révén (ún. „host-guest”-típusú) kölcsönhatásba léphetnek az oldott farmakonokkal<sup>3</sup>. A ciklodextrinek jól ismert komplekképző sajátsága a sejtek lipofil membránalkotó komponenseivel való kölcsönhatásban is megnyilvánul, ami a membrán összetételének és fizikai stabilitásának változását eredményezheti<sup>11</sup>. Ciklodextrin jelenlétében megnövekedhet a farmakon hatékonysága<sup>12</sup>, de az is ismert, hogy nagyobb koncentrációban a ciklodextrinek sejtmembránkárosító<sup>13</sup> és toxikus hatást fejtenek ki<sup>3</sup>.

Molekuláris és kolloidális gyógyszerhordozók együttes alkalmazása olyan komplex készítmény kifejlesztésének

elvi lehetőségét kínálja, amelyben mindkét komponens „carrier”-sajátságai előnyösen használhatók<sup>14</sup>. Gyakorlati alkalmazás szempontjából azonban alapvető fontosságú a kétféle hordozó kötött lehetséges kölcsönhatások minél részletesebb felderítése.

Jelen munkánk elsődleges célja kolloidális DPPC-liposzómák és különböző szerkezetű ciklodextrinek közötti kölcsönhatások vizsgálata és az oldott ciklodextrin molekulák vezikulumok fizikai stabilitására kifejtett hatásának jellemzése volt.

### Felhasznált anyagok

*Liposzómák* készítéséhez dipalmitoil-foszfa-tidilkolint (DPPC) [Sigma Chemical Co. St. Louis MO] használtunk.

A kísérleti munka során vizsgált  $\alpha$ ,  $\beta$ , és  $\gamma$ -ciklodextrin (CD), valamint módosított szerkezetű DIMEB [heptakis(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciklodextrin] származék a CYCLOLAB Ciklodextrin Kutató, Fejlesztő Laboratórium Kft. (Budapest) terméke.

*Polivinil pirrolidon*: PVP K-30. A vízdékony polimer a Fluka Rt. terméke.  $\bar{M}_n = 4,2 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

### Kísérleti módszerek

A liposzómák előállítására

A liposzómák előállításához Realsonic 40SF ultrahangos készüléket használtunk (maximális teljesítménye: 300 W, a kibocsátott ultrahang frekvenciája 37 kHz). A készülék víztartályának hőmérsékletét 25,0 - 45,0 °C hőmérséklettartományban  $\pm 1$  °C pontossággal termostáttal szabályoztuk.

Kremer és munkatársai által leírt kondenzációs módszer<sup>15</sup> módosításával eljárást dolgoztunk ki SUV liposzómák előállítására. A liposzómákat etanolos foszfolipid oldat befecskendezése helyett a DPPC diszperzió ultrahangos kezelése révén állítottuk elő. A liposzóma diszperzió készítéshez 0,050 g DPPC-t oldottunk 2,50 cm<sup>3</sup> absz. etanolban. A foszfolipid oldatból 0,24 cm<sup>3</sup>-t fecskendővel ellátott vékony üvegpipetta segítségével a kívánt hőmérsékletre termostált  $V = 4,50 \text{ cm}^3$  térfogatú diszperziós közegbe csepegtettük  $\sim 1$  csepp/s sebességgel. Csepegtetés közben ultrahangos kezelést alkalmaztunk. Az adagolás befejeztével az ultrahangos besugárzást további 5 percig folytattuk. Az így kapott liposzóma diszperzió töménysége DPPC-re nézve 0,10 %-os, míg etanolra közel 4 %-os.



### A liposzómák kinetikai állandóságának jellemzése

A vezikulumok mérete, méreteloszlása és a méretparaméterek időbeli változása a liposzóma diszperziók kinetikai állandóságának érzékeny jelzői. A liposzómák ezen jellemzőit fotonkorrelációs spektroszkópiás mérési módszerrel Zetasizer 4 készülékkel (Malvern Inst. UK) 25 °C-on határoztuk meg.

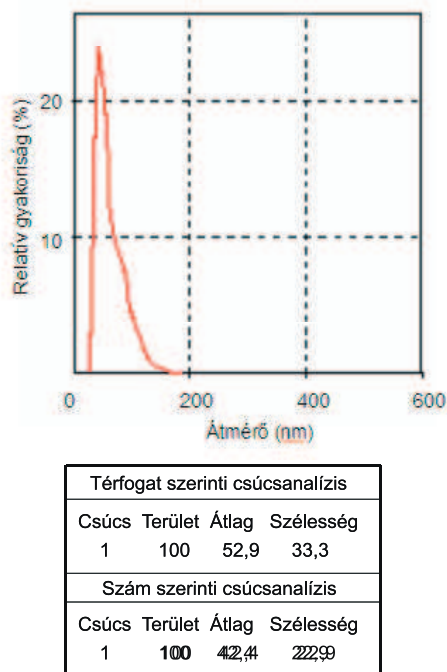
### Membránszerkezet vizsgálata

Differenciál pásztázó kalorimetriás (DSC) módszerrel, NETZSCH DSC 200 típusú készülékkel vizsgáltuk a különböző ciklodextrinek és makromolekulás adalékanyagok hatását a DPPC kettősréteg szerkezetére.

### Kísérleti eredmények és értékelésük

#### DPPC-liposzómák méreteloszlása

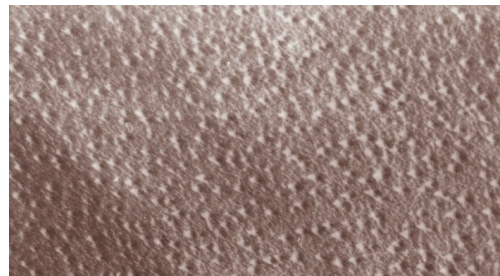
A liposzóma diszperziókat a kísérleti részben leírt formulálási eljárással 36,5 °C hőmérsékleten állítottuk elő. A Zetasizer 4 készülékkel végzett méretanalízis során meghatároztuk a vezikulumok szám szerinti, és térfogat szerinti méreteloszlásfüggvényeit és polidiszperzitasát. Potenciális gyógyszerhordozóként alkalmazható vezikulumok hatóanyag kapacitása a bezárt térfogattól is függ, ezért közleményünkben a liposzóma diszperziók jellemzőiket általában a térfogat szerinti méreteloszlásfüggvényeket, illetve átlagméreteket adtuk meg. (1. ábra)



1. Ábra. 36,5 °C-on előállított DPPC liposzóma diszperzió térfogat szerinti méreteloszlása

Az eloszlásfüggvény és a részecskék átlagmérete alapján megállapítható, hogy az általunk alkalmazott eljárással közel monodiszperz, kis unilamelláris vezikulumok, ún. SUV típusú liposzómák állíthatók elő.

Az 1. képen a diszperzióról fagyasztva-töréses eljárással készített elektronmikroszkópos felvétel látható. A dinamikus fényszórásmérés eredményeit az elektronmikroszkópos felvétel is megerősíti. A képen látható gömb alakú részecskék átlagos mérete: 40-50 nm.

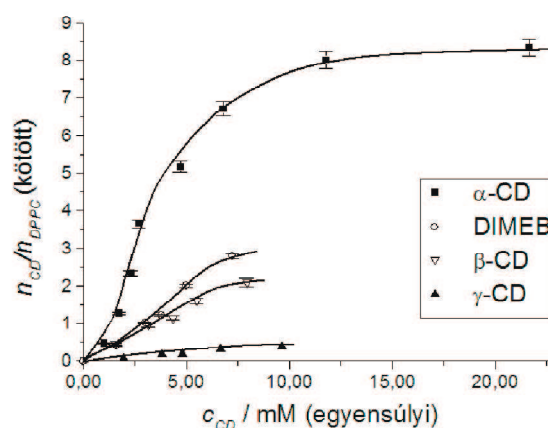


1. Kép. 0,1 tömeg%-os DPPC liposzóma fagyasztva töréses eljárással készített elektronmikroszkópos képe (64000-szeres nagyítás)

### Ciklodextrin molekulák kötődése liposzóma membránokon

Oldott ciklodextrinek kölcsönhatását a liposzómák foszfolipid kettősrétegével a CD-molekulák lipidmembránba történő beépülésének vizsgálatával tanulmányoztuk.

A liposzómákat ismert töménységű ciklodextrint tartalmazó diszperziós közegekben formuláltuk 36,5 °C-on. 2 napi 25 °C-on való tárolás után 30000 ford./perc sebességű centrifugálással (MOM 3170 típusú ultracentrifugával) 30 percig üleptítettük a mintákat, majd a felülúszó oldatban meghatároztuk a ciklodextrinek koncentrációját. A kiindulási és az egyensúlyi CD-koncentrációk ismeretében kiszámítható a liposzóma-membránban megkötött ciklodextrin mennyisége. 0,1 tömeg%-os liposzóma diszperziókkal meghatározott „kötődési izotermákat” a 2. ábrán tüntettük fel. Az ábrán a lipidmembrán által megkötött ciklodextrinek mennyiségét ábrázoltuk az egyensúlyi ciklodextrin koncentráció függvényében.



2. Ábra. Ciklodextrinek kötési izotermái DPPC liposzómákon (T=25 °C)

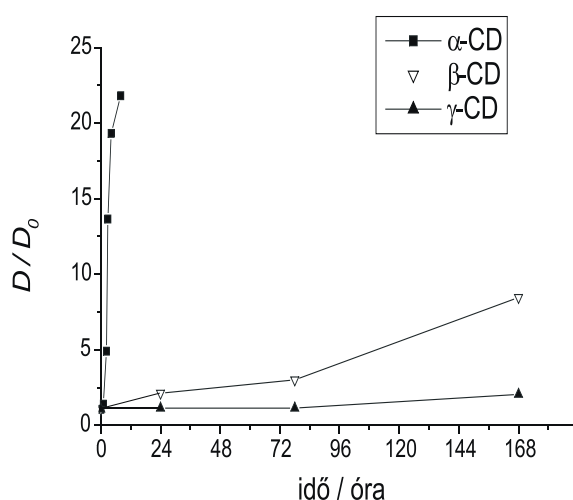
Az ábrán jól látható, hogy a különböző ciklodextrinek jelentősen különböző mennyiségben kötődnek a liposzómákhoz. A kötődés mértéke az  $\alpha$ -CD > DIMEB >  $\beta$ -CD >  $\gamma$ -CD sorrendben csökken. A kötött mennyiségben lévő különbségek feltehetően a ciklodextrinek eltérő



üregméretében lévő eltéréseknek tulajdoníthatók. Vizsgálataink szerint az azonos üregméretű  $\beta$ -ciklodextrin származékok felszínén található funkció csoportok hozzájárulása viszonylag csekély, bár a DIMEB vélhetően O-metil csoportjai miatt valamelyest nagyobb affinitással kötődik a lipidmembránhoz, mint az alapvegyülete, a  $\beta$ -ciklodextrin.

### Ciklodextrinek hatása a liposzóma-membrán stabilitására

Az oldott ciklodextrinek DPPC-liposzómák fizikai stabilitására gyakorolt hatását a CD-tartalmú diszperziókörökben előállított vezikulumok átlagméretének ( $D$ ) időbeni változása révén vizsgáltuk. 3. ábra szemlélteti a liposzóma-diszperziók átlagméretének időbeli változását a ciklodextrin nélküli diszperzió átlagméretéhez ( $D_0$ ) viszonyítva.



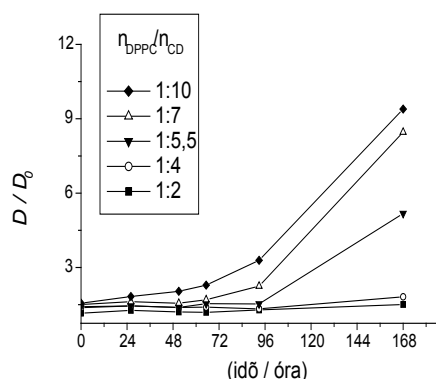
3. Ábra. DPPC liposzómák relatív méretnövekedése ciklodextrinek hatására

Tárolási hőmérséklet: 25 °C  $n_{\text{DPPC}} / n_{\text{CD}} = 1:7$

A 36,5 °C-on előállított DPPC liposzómák CD nélkül 7 napig monomodális eloszlásúak maradnak<sup>16</sup>. Az ábrán jól látszik, hogy ciklodextrinek jelenlétében már néhány napos tárolási idő után jelentős méretnövekedés következik be, polidiszperzzé válik a minta. Ezek a változások a vezikulumok fizikai stabilitásának jelentős csökkenésére (aggregációra és/vagy fúzióra) utalnak.

Az  $\alpha$ -CD membránkárosító hatása a leginkább szembevetendő, de egy hét után a  $\beta$ - és  $\gamma$ -CD is destabilizálja a liposzóma diszperziót. Ez a hatás teljes összhangot mutat a CD-molekulák DPPC membránon való kötődési sorrendjével.

A ciklodextrinek membránkárosító hatása igen jelentősen függ a foszfolipid/CD aránytól is. A 4. ábra alapján a liposzómák változó DPPC :  $\beta$ -CD molarányoknál meghatározott relatív méretnövekedése hasonlítható össze. Figyelmet érdemel az a tény, hogy 1:5-nél nagyobb DPPC:  $\beta$ -ciklodextrin molarányoknál igen jelentős membránkárosító hatás tapasztalható, de kisebb mértékű CD felesleg nem okoz számottevő membránkárosítást. Hasonló tendencia mutatkozott  $\alpha$ - és  $\gamma$ -CD esetében is

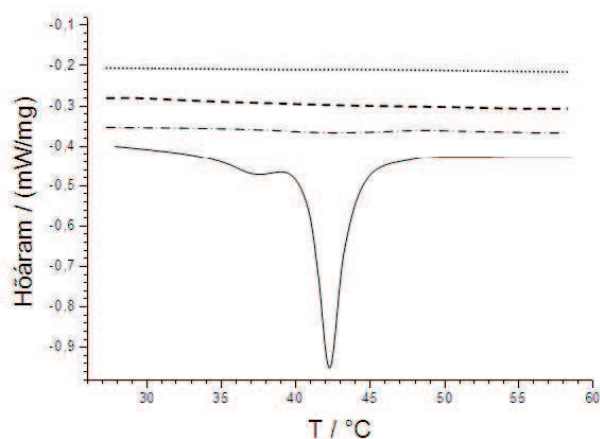


4. Ábra. DPPC liposzómák relatív méretnövekedése  $\beta$ -ciklodextrin jelenlétében különböző foszfolipid/CD arányoknál

### Differenciális pásztázó kalorimetriás vizsgálatok

A kalorimetriás vizsgálatok a ciklodextrinek és a DPPC-liposzómák közötti kölcsönhatás más módszerrel történő kísérleti megerősítésén túlmenően a membránkárosító hatás mechanizmusának felderítését is szolgálták. Fontos kérdés, hogy az oldott CD molekulák a foszfolipid kettősrétegek rendezett szerkezetének megbontását, vagy csak a membrán kooperativitásának csökkenését idézik elő. A vizsgálatokhoz 15 tömeg%-os liposzóma diszperziókat használtunk, mert a DSC-készülék érzékenysége (a PCS-vizsgálatokhoz használt) 0,1 tömeg% töménységű SUV-liposzómák diszperzióiban nem volt elegendő a fázisátalakulások detektálásához.

Az 5. ábrán víz közegű 15 tömeg%-os DPPC liposzóma-diszperzió DSC görbéje látható (folytonos vonal). A minta  $T_c'$  (előfázisátalakulási) hőmérséklete 37,7 °C, a  $T_c$  (főfázisátalakulási) hőmérséklete 42,4 °C.



5. Ábra  $\alpha, \beta, \gamma$ -CD, hatása a DPPC-diszperzió fázisátalakulási görbéjére

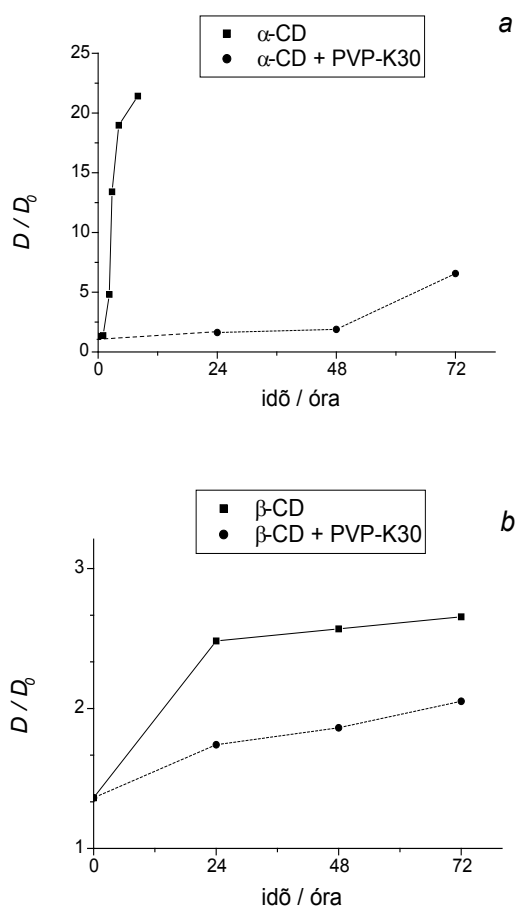
a:  $\alpha$ -CD, b:  $\beta$ -CD, c:  $\gamma$ -CD ( $n_{\text{DPPC}} / n_{\text{CD}} = 1:7$ )  
d: DPPC liposzóma (15 tömeg%)

A ciklodextrinek jelenlétében felvett DSC görbék (szaggatott vonalak) egyértelműen jelzik, hogy a liposzóma diszperzió, 30-45 °C hőmérséklettartományban megfigyelt fázisátalakulásai megszűnnek és nem mutatnak szerkezeti

változásra utaló entalpiaváltozást. Mindebből arra lehet következtetni, hogy a CD-molekulák a lipidmembránba történő beépüléskor (véltetően komplexképzés miatt) teljesen megszüntetik a membránba rendeződött foszfolipid molekulák kooperativitását. Az  $\alpha$ ,  $\beta$ , és  $\gamma$ -ciklodextrinek membránkárosító hatásában ezzel a módszerrel nem tudunk különbséget kimutatni. A DSC-vizsgálatok azonban egyértelműen megerősítik a fotonkorrelációs stabilitási vizsgálatok azon eredményeit, mely szerint a ciklodextrin-molekulák a DPPC-membrán rendezett szerkezetének megbontása révén idézik elő a liposzóma diszperzió nagymértékű destabilizációját.

### Lipidmembrán stabilizálása PVP-vel ciklodextrinek jelenlétében

Megvizsgáltuk, hogy a makromolekulás kolloidok ismert sztérikus stabilizáló hatása<sup>17</sup> hasznosítható-e DPPC-liposzómák stabilizálására, illetve hogy oldott makromolekulák jelenlétében is érvényesül-e ciklodextrinek membránszerkezetet romboló hatása. A liposzómákat 1:7 DPPC/CD molarányú és 4:1 DPPC/PVP tömegarányú közegben formuláltuk 36,5 °C-on. A foszfolipid és a polimer arányát előzetes stabilitási vizsgálatok alapján választottuk ki. A 6. a és b ábrán bemutatott függvények egyértelműen mutatják a makromolekulák stabilizáló hatását.



6. Ábra DPPC-liposzómák relatív méretnövekedése ciklodextrinek jelenlétében a:  $\alpha$ -CD, b:  $\beta$ -CD

Polimer jelenlétében két nap után is csak csekély mértékű méretnövekedés detektálható. Ezekből az eredményekből egyértelműen megállapítható, hogy a PVP hatékonyan blokkolja mind az  $\alpha$ -, mind pedig a  $\beta$ -ciklodextrin jelentős membránkárosító hatását. A stabilizáló hatás vélhetően a PVP molekulák DPPC vezikulákon történő adszorpciójának tulajdonítható. A sztérikus stabilizáló hatáson túlmenően azonban szerepe lehet a CD molekulák és a PVP molekulák oldatbeli kölcsönhatásának is. Ennek felderítése további vizsgálatokat tesz szükségessé.

A szerzők köszönetüket fejezik ki az OTKA T034929 számú pályázati támogatásáért

### Összefoglalás

Kolloidális (SUV) liposzómák, és különböző ciklodextrinek ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD és DIMEB) páronkénti kölcsönhatásait tanulmányoztuk. Kondenzációs módszerrel monomodális méreteloszlású dipalmitoil-foszfátidilkolin (DPPC) liposzómákat állítottunk elő. Vizsgáltuk a vezikulumok fizikai stabilitását, és diszperziókinetikai állandóságának lehetséges szabályozását.

Változó kísérleti körülmények között előállított liposzómák stabilitásának jellemzésére fotonkorrelációs spektroszkópiás (PCS) eljárással meghatározott részecskeméret-eloszlás függvényeket használtunk.

Ciklodextrinek kölcsönhatását a foszfolipid membránnal kötődési izotermákkal jellemeztük.

Kötődési izotermák alapján megállapítottuk, hogy a kötött CD mennyisége  $\gamma$ -CD <  $\beta$ -CD, (DIMEB) <  $\alpha$ -CD sorrendben nő. Igazoltuk, hogy a különböző ciklodextrinek (a kötődési vizsgálatokkal összhangban) adott DPPC/CD arány felett csökkentik a foszfolipid-membrán stabilitását. A membránkárosító hatás sorrendje:  $\gamma$ -CD <  $\beta$ -CD <  $\alpha$ -CD.

Oldott CD molekulák és PVP molekulák hatását a DPPC membrán stabilizálására differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) görbék alapján jellemeztük.

Kimutattuk, hogy a ciklodextrinek membránkárosító hatása hatékonyan gátolható vezikulumokon szorbeálódó vízoldható PVP molekulákkal.

### Irodalom

- Müller, R. H. *Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, **1991**.
- Gregoriadis, G. *Liposomes as Drug Carriers. Recent Trends and Progress*, Wiley: Chichester, **1988**.
- Frömmling, K. H.; Szejtli, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, **1993**.
- McCormack, B.; Gregoriadis, G. *Int. J. of Pharmaceutics* **1994**, *112*, 249.
- Gregoriadis, G.; Allison, A.C. *Liposomes in biological systems*, John Wiley & Sons: New York, **1986**.

6. Grohmann, F. L.; Csempez, F.; Szögyi, M. *Colloid Polym. Sci.* **1998**, *276*, 66.
7. Dékány, Gy.; Csóka, I.; Erős, I. *Colloid and Polymer Science* **2001**, *279*, 966.
8. Dékány, Gy.; Csóka, I.; Erős, I. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2001**, *107*, 491.
9. Crommelin, D.J.A.; Schreier, H. *Colloidal Drug Delivery Systems*, Ed.: Jörg Kreuter Vol. 66., **1994**.
10. Szejtli, J. *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1982**.
11. Nishijo, J.; Shiota, S.; Mazima, K et al. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 48.
12. Sente, L. *Cyclodextrin News*, **2002**, *16*, 59.
13. Irie, T.; Uekama, K. *J. Pharm. Sci* **1997**, *86*, 147.
14. Loukas, Y. L. ; Jayasekera, P.; Gregoriadis G. *Int. J. of Pharmaceutics* **1995**, *117*, 85.
15. Kremer, J.M.H.; Esker; M.W.J.; Pathamano-haran, C.; Wiersema, P.H. *Biochem.* **1977**, *16*, 3932.
16. Puskás István *Ciklodextrinek kölcsönhatása liposzómákkal. Szakdolgozat*, ELTE Kolloidkémiai és Kolloidtechnológiai Tanszék, **2003**.
17. Grohmann Ferenc Levente, Csempez Ferenc *Magyar Kémiai Folyóirat* **1998**, *104./2*, 53.

### Interaction between cyclodextrins and colloids.

Interactions in binary systems between colloidal (SUV) liposomes, dissolved macromolecules (polyvinyl pyrrolidone, PVP) and cyclodextrins (CD) of different chemical compositions, respectively, were studied. Dispersions of dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) liposomes with monomodal size distribution were prepared. The physical stability of liposomes and its possible control were also investigated. The interactions between CD molecules and colloidal components were examined as follows : For characterizing the kinetic stability of the liposomal dispersions under various conditions, size-distribution functions determined by photon-correlation spectroscopy (PCS) were used. The

affinity of cyclodextrins to the phospholipid membranes was characterized by „binding isotherms” The effect of dissolved CD and PVP molecules, respectively, on the physical stability of DPPC membranes was detected by differential scanning calorimetry (DSC). Based on the binding isotherms, the sorption of cyclodextrin molecules onto DPPC liposomes was found to increase in the order:  $\gamma$ -CD <  $\beta$ -CD, (DIMEB) <  $\alpha$ -CD. The order of reducing the physical stability of the DPPC due to the dissolved cyclodextrins was the same, i. e.:  $\gamma$ -CD <  $\beta$ -CD <  $\alpha$ -CD. It has also been shown that the destabilizing effect of cyclodextrin molecules can be well regulated and prevented by adding water-soluble PVP molecules to the dispersion.

# Nyolc európai város légszennyezettségének vizsgálata falevelekről gyűjtött por elemösszetételének diszkriminancia analízisével

MARGITAI Zita<sup>a</sup>, BRAUN Mihály<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

## 1. Bevezetés

A légköri aeroszolak, szálló- és ülepedő porok elemösszetételét gyakran használják a városi környezet jellemzésére.<sup>1,2</sup> A falevelek kémiai összetétele indikálja a levegő minőségét, mert a szennyezőket hordozó szemcsék kiülepednek a levelek felületére, és bizonyos vegyületek beépülhetnek a növényi szövetekbe is.<sup>3</sup> A kifejlett utcai fák jelentősen csökkenthetik a levegő portartalmát, mert leveleik felületén akár több mázsa por is meg tudnak kötni.<sup>4</sup> A porszűrés mértéke függ a fajtól, a fák fejlettségi állapotától, a levelek alakjától és felületétől. Az emberi egészségre veszélyes 2,5-10 µm szemcseméretű frakció is jelentős mértékben megkötődik a levelek felületén.<sup>5</sup> A levél felületén megtapadt anyagot egy nagyobb zápor lemoshatja, és az a lefolyó csapadékkal távozik a városból. A levél megújult felülete ismét képes a por megkötésre. A levelekben felhalmozódott elemek az őszi avarral rendszeresen eltávolíthatók, így csökkenthető a toxikus elemek feldúsulása a parkok, zöldterületek talajában.<sup>4</sup>

Nagyobb földrajzi egységek légszennyezettségi állapotának felmérése igen nehéz feladat, mert csak nagyszámú laboratórium összehangolt munkájával lehetséges.<sup>6</sup> Ezzel szemben a falevelekre tapadt por könnyen és gyorsan begyűjthető és elemezhető. A falevelek analízisére alapozva kidolgozható egy olyan biomonitoring rendszer, amellyel rövid időn belül nagyobb földrajzi egységek szennyezettségi állapotáról kaphatunk képet. Számolnunk kell azzal, hogy az így begyűjtött vizsgálati anyag nem olyan jól definiált, mint a szabványosított technikákkal nyert minták. A légszennyezettség jellemzéséhez adott szemcseméretű frakciók elemösszetételét határozzák meg.<sup>7</sup> Ezzel szemben a falevelekről gyűjtött minták szemcse-összetétele tág határok között változik, az ülepedő- és szállóporok mellett tartalmazzák a felületen megtapadt száraz és nedves aeroszolakot is. A városok eltérő klimatikus sajátosságai miatt a por megkötődésének és lemosódásának mértéke eltérő lehet, ezért nem lehet pontosan megmondani, hogy mennyi idő alatt és mekkora térfogatból ülepedett ki a levél felületéről begyűjtött anyag. A szennyezők koncentrációjának napszakos változásai sem mutathatók ki,<sup>8</sup> és csak a vegetációs időszak vizsgálható.

A kiülepedett szennyezők mennyiségének meghatározására a fent említett okok miatt a falevelek vizsgálatán alapuló monitoring rendszer csak akkor lenne alkalmas, ha a por akkumulációjának sebességét minden egyes mintavételi helyen pontosan ismernénk. Ezen ismeretek hiányában tanulmányunkban a légszennyezettség jellemzésére az elemeknek a por szárazanyag-tartalmára vonatkoztatott koncentrációját használtuk fel és nem a felületegységre megadott mennyiségeket. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy kimutatható-e különbség az egymástól térben jelentős

távolságra lévő városok között a fák levelére rakódott por elemösszetétele alapján.

A környezeti kémia területén gyakran alkalmaznak sokváltozós statisztikai eljárásokat, melyek megkönnyítik a szennyezők azonosítását, a szennyezett területek lehatárolását.<sup>9,10</sup> Az alakfelismerő módszerek<sup>11</sup> csoportjába sorolt technikák közül olyan esetekben használnak diszkriminancia analízist, amikor a megfigyelési egységeket (mintákat) valamilyen előre meghatározott szempont szerint csoportokba lehet sorolni.<sup>12-14</sup> Az eredmények kiértékelésére lineáris diszkriminancia analízist alkalmaztunk. Olyan módszert dolgoztunk ki, mely alkalmas lehet nagyobb földrajzi egységek légszennyezettségének felmérésére és jellemzésére.

A diszkriminancia analízist (DA) Fisher és Mahalanobis vezette be.<sup>11,17</sup> A módszer alapja, hogy valamilyen előre meghatározott kritérium szerint minden megfigyelési egységet csoportba sorolunk. Esetünkben a megfigyelési egységek az egyes fákról származó porminták, a csoportok a városok voltak. Több kvantitatív tulajdonság együttes figyelembevételével eldönthető, hogy van-e szignifikáns különbség a csoportok között. Vizsgálhatjuk a megfigyelési egységek besorolásának helyességét, a csoportok közötti átfedés mértékét és azt, hogy milyen biztonsággal sorolhatók be a vizsgálati egységek az egyik, ill. a másik csoportba. A diszkriminancia függvénnyel eldönthető, hogy egy újabb (ismeretlen besorolású) minta melyik csoportba tartozik. A vizsgált tulajdonságokból létrehozott n-dimenziós térben a megfigyelési egységeink egy-egy pontfelhőt alkotnak. A számításokkal olyan síkokat határozzuk meg, melyek a különböző csoportokat egymástól elhatárolják. A csoportok közötti variancia maximálása és a csoporton belüli variancia minimálása a cél. Az osztályozáshoz a diszkriminancia értékeket az (1) egyenlettel határozzuk meg.

$$S_i = c_i + w_{i1}X_1 + w_{i2}X_2 + \dots + w_{ip}X_p \quad (1)$$

ahol  $i$  jelöli a csoportot,  $1, 2, \dots, p$  a változókat,  $c_i$  az  $i$ -edik csoport konstansa,  $w_{ij}$  a  $j$ -edik változó súlya az  $i$ -edik csoportban,  $X_j$  a  $j$ -edik változó meghatározott értéke,  $S_i$  az osztályozófüggvény értéke. Minden megfigyelési egység abba a csoportba kerül, amelyben legnagyobb az osztályozó függvény értéke. A  $w_{ij}$  diszkriminancia koefficiensek (másnéven súlyok), a  $p$  változók  $i$ -edik csoportbeli középértékéből és az egyesített csoportonbelüli kovariancia mátrixból származnak.

A DA módszer alkalmazásához néhány feltételnek teljesülnie kell: a csoportok kovariancai mátrixai nem különbözhetnek lényegesen, és a változóknak sokváltozós normális



eloszlásúaknak kell lenniük. Azért alkalmaztunk lineáris diszkriminancia analízist (LDA), mert ez a módszer akkor is használható, ha a megfigyelési egységek száma a változók számához képest kicsi, ill. a csoportok kovarianciamátrixai szingulárisak.

## 2. Anyag és módszer

### 2.1. Mintavételi helyek

A vizsgálatokhoz Nyugat-, Közép-, Kelet- és Délkelet-Európában nyolc várost választottunk ki (1. táblázat). Három hársfajról (*Tilia tomentosa*, *T. platyphyllos* és *T. cordata*) gyűjtöttünk levélmintákat 2003 júniusa és augusztusa között. A minták utak mellől, parkokból és játszóterekről származtak. Városonként 10-14 fáról szedtünk 25-30 levelet 150-200 cm magasságból. Debrecen esetében összesen 46 fáról gyűjtöttünk mintát.

### 2.2. Mintaelőkészítés

A leveleket leszedésüket követően papírtasakokban, +4°C-on tároltuk. Felületüket A/4-es szkennelvel határoztuk

1. Táblázat. A vizsgált városok lakossága és ipara<sup>6,16</sup>

Város	Lakosság száma	Ipar
Antwerpen	455 852	gyémántcsiszolás, kőolajfinomítók, élelmiszer-, fém-, elektrotechnikai- és vegyipar, autó- és hajógyártás
Brüsszel	948 122	textil-, gép-, gumi-, csipkegyártás, vegyipar, elektrotechnika, villamosipar, kokszolók, vasöntődéek
München	1 251 100	autó-, gép-, cigarettá-, sörgyártás, vegy- és gyógyszeripar, optikai üzemek
Debrecen	216 130	élelmiszer-, konzerv- és gyógyszeripar, dohánygyártás
Nagyvárad	221 000	vegyipar, szerszámgép-, konzerv-, cukor-, timföldgyártás, hőerőmű és alumínium kohászat
Kolozsvár	319 000	fémgyártás, gyógyszerüzem, porcelángyártás
Nagybánya	152 000	arany-, ezüst-, réz-, ólom-, cinkbányászat, érczúzó- ércelőkészítő üzem, fémfeldolgozás,
Várna	314 900	bányagépgyártás, fa-, vegy-, élelmiszeripar
		hajóépítés, gépgyártás, textil-, bútorigar, élelmiszerfeldolgozás

### 2.3. Elemösszetétel meghatározása

Az Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb és V koncentrációját Spectroflame típusú (Spectro GmbH, Kléve, Németország) induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrométerrel (ICP-OES) határoztuk meg. A cink koncentrációját lángatomabszorpciós módszerrel (FAAS), Unicam SP1900 típusú készülékkel mértük. A kadmium koncentrációja a mintaoldatokban csekély volt, ezért a meghatározást Zeeman háttérkorrekciós grafitkemencés atomabszorpciós módszerrel (GFAAS), Perkin Elmer Analyst 600 készülékkel végeztük.

### 2.4. Diszkriminancia analízis

A számításokhoz SPSS programcsomagot használtunk. A varimax rotáció megkönnyítette annak vizsgálatát, hogy az egyes elemek milyen szerepet játszanak a városok elkülönítésében.<sup>17</sup> Az elemkoncentráció adatok lognormális eloszlásúnak bizonyultak, ezért változónak a (2) egyenlet alapján transzformált elemkoncentrációkat tekintettük.

$$X_i^* = \lg(X_i + 1) \quad (2)$$

A diszkriminancia értékek csoportátlagai (centroidok) alapján vizsgáltuk a városok közötti eltérések nagyságát. Az osztálybasorolás helyessége alapján meghatároztuk a csoportok közötti átfedés mértékét. Debrecen esetében új, a

meg a fekete képpontok területe alapján. A 10-12 dm<sup>2</sup> felületű mintákat műanyag edényekbe helyeztük és 250 cm<sup>3</sup> desztillált vízzel 10 percig rázógéppel ráztattuk. Ezután a mintákat 1 percre ultrahangos fürdőbe helyeztük. A port tartalmazó szuszpenziót 150 µm-es műanyag szitán szűrtük, hogy a szálakat, növényi szőröket és állati maradványokat (pl. levéltetvek) eltávolítsuk. A faleveleket 50 cm<sup>3</sup> desztillált vízzel ismét átmostuk, és ezt is hozzászűrtük a mintához. A szűrletet konyhai mikrohullámú sütőben 20-30 cm<sup>3</sup> térfogatra pároltuk, majd előre lemért tömegű, 50 cm<sup>3</sup> térfogatú főzőpohárba vittük át. A műanyag edény falára tapadt maradékot 25 cm<sup>3</sup> deszt. vízzel távolítottuk el. Az oldatokat egyesítettük és a maradék vizet 105°C-on szárítószekrényben távolítottuk el. Visszamértük a főzőpoharak tömegét és kiszámítottuk a por mennyiségét.

Ezt követően a mintákat nedves roncsolással vittük oldatba.<sup>15</sup> A 0,1-0,2 g közötti tömegű minták roncsolását 5 cm<sup>3</sup> 65% (m/m) HNO<sub>3</sub> és 1 cm<sup>3</sup> 30% (m/m) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hozzáadásával végeztük 80°C-os elektromos főzőlapon. Az így kapott oldatokat 10 cm<sup>3</sup> végtérfogatra töltöttük 0,1 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú salétromsavval. A visszaoldódást ultrahangos fürdővel segítettük elő.

diszkriminancia függvények kiszámításánál figyelmen kívül hagyott minták osztálybasorolásával teszteltük a módszer használhatóságát.

## 3. Eredmények

A nyolc város összehasonlításához 7 diszkriminancia egyenletet határoztunk meg. A diszkriminancia függvények koefficienseit úgy választottuk meg, hogy a csoportok közötti és a csoporton belüli eltérésnégyzet összegek hányadosa (ún. sajátértéke) maximális legyen. Azokhoz a függvényekhez, melyek alapján a csoportok jól elkülöníthetők nagy sajátértékek tartoznak. A sajátértékek alapján (2. táblázat) az első 3 függvény a teljes variancia 88.84%-át foglalta magában.

A kannonikus korreláció, a diszkriminancia értékek és a csoportok közötti asszociáltság mértéke alapján szintén az első három függvényt emelhetjük ki. Bár az első 6 függvény alapján a városok szignifikánsan különbözőnek bizonyultak, a városok közötti különbségek már az első három függvényvel meghatározhatók. Ezekben a függvényekben ólom, bárium, magnézium és kadmium diszkriminancia koefficiense a meghatározó (3. táblázat). Annak ellenére, hogy a benzin ólom koncentrációját a legtöbb országban minimálisra csökkentették,<sup>18</sup> az ólom szerepe jelentősnek



2. Táblázat. A diszkriminancia függvények sajátértékei

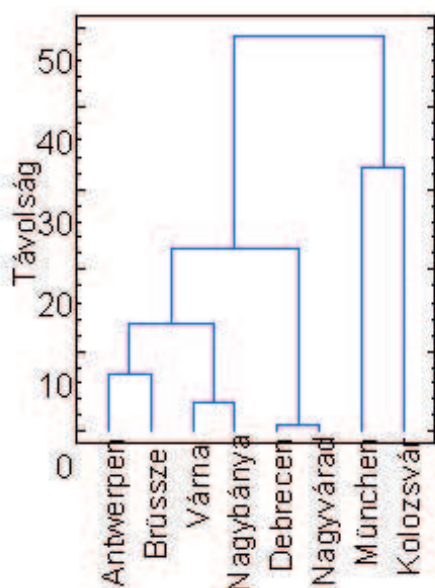
	Sajátérték	%	R <sub>c</sub>	λ	χ <sup>2</sup>	DF	p
1	11,195	46,57	0,958	0,000	628,304	98	0,000
2	5,275	21,94	0,917	0,004	433,227	78	0,000
3	4,887	20,33	0,911	0,024	289,975	60	0,000
4	1,112	4,63	0,726	0,143	151,697	44	0,000
5	0,807	3,36	0,668	0,302	93,372	30	0,000
6	0,658	2,74	0,630	0,546	47,227	18	0,000
7	0,105	0,44	0,309	0,905	7,812	8	0,452

R<sub>c</sub>: kanonikus korrelációs koefficiens, λ: Wilks lambda, DF: szabadsági fok; p valószínűségi szint

bizonyult. Az kőolajfeldolgozással, ill. pakura étetéssel kapcsolatos vanádium és a mangán szennyezés szerepe a

3. Táblázat. Rotált standardizált diszkriminancia koefficiensek

Súly	Pb	Ba	Mg	Cd	Sr	Ca	K	S	Al	Fe	Cu	Zn	Mn	V
w <sub>1</sub>	<b>1.186</b>	<b>-1.137</b>	0.025	-0.057	0.136	-0.405	-0.128	0.172	-0.048	0.096	0.625	-0.152	0.008	0.129
w <sub>2</sub>	0.069	0.196	<b>1.247</b>	0.085	-0.386	-0.028	0.185	0.179	-0.256	-0.132	0.224	-0.067	-0.279	-0.493
w <sub>3</sub>	-0.115	-0.043	0.182	<b>0.890</b>	-0.471	-0.116	0.090	-0.210	0.065	0.270	-0.320	0.176	0.181	0.203
w <sub>4</sub>	0.345	-0.310	-0.260	-0.187	<b>1.687</b>	<b>-1.656</b>	<b>0.553</b>	<b>-0.453</b>	-0.184	0.235	0.335	0.229	0.198	0.254
w <sub>5</sub>	-0.253	0.145	-0.718	-0.166	-0.336	0.679	0.337	0.250	<b>2.492</b>	<b>-2.281</b>	<b>0.632</b>	-0.300	0.182	-0.397
w <sub>6</sub>	-0.001	0.309	-0.026	0.029	-0.110	-0.202	0.028	0.377	-0.625	-1.037	-0.021	<b>1.283</b>	0.348	-0.194
w <sub>7</sub>	0.141	0.382	-0.099	0.022	0.273	0.183	-0.310	-0.088	0.064	0.039	-0.350	0.282	<b>0.650</b>	<b>-0.592</b>



1. ábra. A városok összehasonlítása a diszkriminancia függvény átlagértékei (centroidok) alapján cluster analízissel

A por összetételét a lokális szennyező források közvetlenül meghatározzák. A szennyezők terjedését és kiülepedését meghatározó meteorológiai tényezők már nagyobb földrajzi egységeket kapcsolhatnak össze. Esetünkben olyan elemek koncentrációját is figyelembe vettük, melyek a talajok eróziója révén válhatnak a szállóporok összetevőivé (pl. Al, Ca, Mg). Az egymáshoz térben közel fekvő városok, Antwerpen és Brüsszel, valamint Debrecen és Nagyvárad a por összetételében is hasonlóknak bizonyultak. A Münchent és Kolozsvárt reprezentáló centroidok a többi várostól jelentős távolságban helyezkedtek el a hipertérben.

városok elkülönítésében csekély volt.

A diszkriminancia értékek átlagával (centroidokkal) jellemezni tudjuk a városokat. Egy olyan 7 dimenziós teret hoztunk létre, ahol a koordináta-rendszer tengelyei egymásra merőlegesek. A városokat pontokként ábrázoltuk. A pontok közötti távolság megadta, hogy mekkora az eltérés a levelekről származó porminták összetételében. A sokváltozós térben kialakult mintázat esetében, a két, ill. háromdimenziós vetületek száma áttekinthetetlenül nagy,<sup>19</sup> ezért a kapcsolatrendszert cluster analízissel vizsgáltuk.

A pontok közötti távolságot négyzetes euklideszi távolságként definiáltuk, csoportképző algoritmusnak a Ward-féle eljárást választottuk,<sup>17</sup> amely jól strukturált dendrogramot eredményez (1. ábra).

Annak ellenére, hogy Debrecenről Nagyvárad városstruktúrája, ipara és közlekedése alapján jelentősen eltér (pl. a katalizátoros gépjárművek száma kisebb, még használnak ólomadalékolt benzint) a porminták összetétele alapján ez a két város hasonlított egymáshoz a legjobban.

A diszkriminancia analízissel azt is megvizsgáltuk, hogy milyen a csoportba sorolás helyessége, az elemösszetétel adatok alapján milyen biztonsággal lehet megállapítani egy adott mintáról, hogy mely városból származik. Antwerpen, Brüsszel, München, Várna és Nagyvárad esetében az osztályozás 100%-os volt. Átlagosan a minták 94,4%-os valószínűséggel kerültek abba a csoportba, amelybe eredetük szerint soroltuk őket. A levelekről gyűjtött por összetétele jól jellemzi az egyes városokat. Ismert minták alapján meghatározott diszkriminancia függvényekkel elvégezhető ismeretlen minták azonosítása is. Ezt az eljárást alkalmaztuk a Debrecenből gyűjtött minták esetében, amikor 32 mintát ismeretlen eredetűként kezeltünk, és vizsgáltuk a besorolást (4. táblázat).

4. Táblázat. A debreceni és a nagyvárad minták csoportosítása

Város	N	Diszkriminancia értékek szerinti besorolás		
		Debrecen	Nagyvárad	Egyéb <sup>#</sup>
Debrecen <sup>a</sup>	13	76,9%	15,4%	7,7% <sup>0</sup>
Nagyvárad	11	9,1%	90,9%	0%
Debrecen <sup>b</sup>	32	54,8%	32,3%	12,9%

<sup>a</sup> Ismertként kezelt minták besorolása.

<sup>b</sup> Az ismeretlenként kezelt minták besorolása

<sup>#</sup> A többi városba tartozóként besorolt minta

Az ismertként kezelt debreceni minták besoroltságának helyessége 76,9%, az ismeretlenként kezeltéknél 54,8% volt. A debreceni minták jelentős hányadának összetétele a nagyvárad mintákkal mutatott egyezést.

A mintákban meghatározott toxikus komponensek koncentrációit összevetve (5. táblázat) megállapíthatjuk, hogy a levegő szennyezettsége Nagybányán volt a legnagyobb, ahol színesfémkohó üzemel. Az ólom maximális koncentrációja meghaladta a 6000 mg/kg-ot, a cink, réz és kadmium koncentrációja is többszörösét mutatta a kevésbé szennyezett területekre jellemző értékeknek. A nehézfémek mellett a kén koncentrációja is jelzi a légszennyezést; a kikötővárosokban volt kiugróan nagy. Debrecen ebben az összevetésben viszonylag kedvező helyen szerepelt.

**5. Táblázat.** A falevelekről lemosott porban mért elemek koncentrációjának átlagai és az átlagok 95%-os konfidencia intervallumai.

Város	Pb mg/kg	Zn mg/kg	Cu mg/kg	Cd mg/kg	S g/kg
Antwerpen	145±56	374±226	70±62	0,19±0,09	5,61±2,67
Brüsszel	153±80	295±158	84±58	0,26±0,19	5,77±3,60
München	7±7	140±64	37±31	0,10±0,10	3,97±1,48
Debrecen	41±10	215±27	59±7	0,51±0,09	3,24±0,51
Nagyvárad	86±17	271±56	91±59	1,63±1,06	4,00±1,36
Várna	355±214	388±96	110±23	0,10±0,07	9,18±1,30
Kolozsvár	135±79	452±162	133±85	2,25±1,52	3,57±0,71
Nagybánya	1475±487	768±194	213±53	5,18±1,41	7,52±1,85

Eredményeink alapján már viszonylag kis mintaszám mellett (városonként 10-20 helyről gyűjtünk mintát), is képet kaphatunk nagyobb régiók légszennyezettségéről. Megfelelő referencia területeket kijelölve az eredmények diszkriminancia analízissel történő kiértékelése olyan függvényeket eredményez, melyek alkalmasak a levegőminőség osztályok objektív meghatározására.

### Köszönetnyilvánítás

Köszönet Dr. Tóth Albertnek az angolnyelvű összefoglaló elkészítésében nyújtott segítségéért.

### Air quality assessment via discriminant analysis of element composition data on dust collected from tree leaves

Airborne dust deposited on the leaf surface of Tilia trees were collected from cities across Europe and analyzed for concentrations of Al, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb, V and Zn (mg kg<sup>-1</sup> d.w. dust). Classification of sampling sites was performed via a multivariate statistical procedure termed linear discriminant analysis (LDA) to characterize air inorganic quality characteristics

### Hivatkozások

- Borbély-Kiss, I.; Koltay, E.; Szabó, Gy.; Bozó, L.; Tar, K. *J. Aerosol Sci.* **1999**, *30*, 369.
- Salma, I.; Maenhaut, W.; Zemplén-Papp, É.; Zárai, Gy. *Atmospheric Environment*. **2001**, *35*, 4367.
- Keymeulen, R.; Görgényi, M.; Héberger, K.; Priksane, A.; Van Langehove, H. *Atmospheric Environment*, **2001**, *35*, 6327.
- Kovács M. *A nagyvárosok környezete*. Gondolat Kiadó: Budapest, **1985**.
- Jouraeva, V.A.; Johnson, D.L.; Hassett, J.P.; Nowak, D.J. *Environ. Pollut.* **2002**, *120*, 331.
- Houthuijs, D.; Breugelmans, O.; Hoec, G.; Vaskövi, É.; Miháliková, É.; Pastuszka, J.S.; Jirik, V.; Sachelarescu, S.; Lolova, D.; Meliefste, K.; Uzunova, E.; Marinescu, C.; Volf, J.; de Leeuw, F.; van de Wiel, H.; Fletcher, T.; Leuret, E.; Brunekreef, B. *Atmospheric Environment*, **2001**, *35*, 2757.
- Temesi, D.; Molnár, A.; Mészáros, E.; Feczko, T.; Gelencsér, A.; Kiss, G.; Krivácsy, Z. *Atmospheric Environment*, **2001**, *35*, 4347.
- Temesi, D.; Molnár, A.; Mészáros, E.; Feczko, T. *Atmospheric Environment*, **2003**, *37*, 139.
- Ismail, S.; Grass, K.; Varmuza, K. *J. Trace Microprobe Tech.* **1988**, *6*, 563.
- Einax, J.W.; Soldt, U. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **1999**, *46*, 79.
- Horvay Gy., Ed.; *Sokváltozós adatelemzés (Kemometria)*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, **2001**, pp 32-68.
- Baldovin, A.; Wen, W.; Massart, D.L.; Turello, A. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **1997**, *38*, 25.
- Zimmer, K. *In Archaeometric Research in Hungary*; Járó, M.; Költő L., Eds.; National Centre of Museums: Budapest, **1988**, pp 131-140.
- Worth, A.P.; Cronin, M.T.D. *J. of Molecular Structure*, **2003**, *622*, 97.
- Kovács, B.; Prokisch, J.; Palencsár, J. *Comm. Soil Sci. Plant. Anal.* **2000**, *31*, 1949.
- Palmer, J. *Világjárók lexikona*. Reader's Digest Kiadó Kft., Budapest, **1998**, pp. 10-757.
- Norusis, M.J. *SPSS/PC+ Advanced Statistics 4.0 for IBM PC/XT/AT and PS/2*. SPSS Inc. Chicago, **1990**, pp 1-38.
- Salma, I.; Maenhaut, I.; Dubtsov, S.; Zemplén-Papp, É.; Záray, Gy. *Microchem. J.*, **2000**, *67*, 127.
- Smolinski, A.; Walczak, B.; Einax, J.W. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2002**, *64*, 45.

and their relationships and the role of each element in differentiating between the cities. Our results suggest that elemental composition of leaf-trapped dust reflect various environmental factors including local pollution sources (industry, traffic), city structure and climatic/meteorological features, and can be used as a reliable indicator in air quality assessment and monitoring on local to regional spatial scales.

# Természetes hexénalok előállítása biokatalízissel

SZ. NÉMETH Ágnes<sup>a\*</sup>, SZ. MÁRCZY Judit<sup>a</sup>, SZAJÁNI Béla<sup>a</sup>, SAMU Zsuzsa<sup>b</sup> és

HÁGER-VERESS Ádám<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Veszprémi Egyetem Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Egyetem u.2., 8200 Veszprém, Magyarország

<sup>b</sup>Aroma Bázis Kft., Határ u. 1., 2141 Csömör-Iparterület, Magyarország

## 1. Bevezetés

A természetes aromák világszerte növekvő piacából kb. 20 – 40 millió USD/év értéket képvisel a gyümölcskészítmények „zöld” aromája<sup>1</sup>. Ennek fő összetevői illékony aldehidek – hexanal, *cisz*-3-hexénal és *transz*-2-hexénal. Ezek a 6 szénatomos aldehidek előállíthatók növényekből történő extrakcióval, fermentációval, vagy biokatalitikus úton. Ez utóbbi két lépésben történik a megfelelő telítetlen zsírsavból kiindulva. Az első lépés, amelyet a lipoxigenáz-1 izoenzim (Lox-1, linoleát:oxigén oxidoreduktáz, EC 1.13.11.12) katalizál, a zsírsav hidroperoxidációja. A második lépésben a zsírsav hidroperoxidja a hidroperoxid liáz enzim hatására egy aldehiddé és egy oxosavvá hasad.

A hexénal izomerek előállíthatók linolénsavból (*cisz*-9,*cisz*-12,*cisz*-15-oktadekatriénsav). A hidroperoxidáció során eből 13-hidroperoxi-*cisz*-9,*transz*-11,*cisz*-15-oktadekatrién-sav (a továbbiakban 13-HPOT) keletkezik. Ennek a reakciónak a ko-subsztrátja a molekuláris oxigén. A második lépésben a 13-HPOT *cisz*-3-hexénallá és 12-oxo-*cisz*-9-dodekénsavvá hasad<sup>2</sup>. A *cisz*-3-hexénal nem stabil és könnyen izomerizálódik *transz*-2-hexénallá. Az izomerizáció vagy a *cisz*-3:*transz*-2-enal izomeráz enzim, vagy hő hatására következik be<sup>3</sup>.

Munkánk célja az volt, hogy a hexénal izomereket, mint aroma összetevőket, olcsó ipari nyersanyagból, lenolajból, növényi enzimek segítségével állítsuk elő. Ennek érdekében meghatároztuk a hidroperoxidáció és a hasítási reakció optimális körülményeit<sup>4</sup>. Jelen közleményünkben az eljárás laboratóriumi megvalósításáról számolunk be.

## 2. Kísérleti módszerek

### 2.1. Lipoxigenáz-1 izoenzim izolálása

Az enzim izolálásához petroléterrel zsírtalanított szójalisztet használtunk. A szójalisztet (McCall fajta) a szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht-tól kaptuk. Az izolálás az általunk kidolgozott módszerrel, az alábbiak szerint történt<sup>5</sup>. A szójalisztet tömegére számolva 5 térfogat 0,05 M ecetsavval, mechanikus kevertetés mellett 1 óráig 0 – 5 °C-on extraháltuk. A szuszpenziót centrifugáltuk (4500 g, 40 perc). A felülúszót 5 percig 70 °C-on hőkezeltük, majd lehűtöttük. Ezután a kapott szuszpenziót 20 °C-on centrifugáltuk (4500 g, 40 perc). A felülúszót, amely a Lox-1

izoenzimet tartalmazza, a felhasználásig -60 °C-on tároltuk. A készítmény fajlagos aktivitása 125 ± 10 nkat/mg fehérje volt.

### 2.2. Hidroperoxid liáz izolálása

A hidroperoxid liáz enzimet zöldpaprikából izoláltuk az alábbiak szerint<sup>4</sup>.

A terméseket tömegükhöz viszonyítva 1 térfogat 0,05 M nátrium-foszfát pufferben (pH 7,0), 0 – 5 °C-on homogenizáltuk, majd a homogenizátumot 4 rétegű gézen szűrtük. A szűrletet térfogatához viszonyítva 2 % 1 M kalcium-klorid oldattal 2 óra hosszat kevertettük. Ezután a szuszpenziót centrifugáltuk (4400 g, 45 perc, 4 °C). A csapadékot kis mennyiségű 0,05 M nátrium-foszfát pufferben (pH 7,0) vettük fel és a továbbiakban ezt használtuk a hasítási reakciókhoz. A készítmény 4 °C-on egy hétig tárolható.

Az így nyert hidroperoxid liáz enzimkivonat aktivitása 88,3 ± 23,3 nkat/ml volt.

### 2.3. Az enzimaktivitások meghatározása

A lipoxigenáz aktivitásának meghatározását Axelrod és munkatársai<sup>6</sup> Márczy és munkatársai<sup>7</sup> által módosított módszere szerint végeztük úgy, hogy 234 nm-es hullámhosszon mértük a képződő konjugált dién elnyelését. 1 kat az az enzimmennyiség, amely másodpercenként 1 mol 13-HPOT keletkezését katalizálja 20 °C-on.

A hidroperoxid liáz aktivitásának mérésénél a konjugált dién fogyasztást követtük 234 nm-en<sup>8</sup>. 1 kat az az enzimmennyiség, amely másodpercenként 1 mol 13-HPOT hasítását katalizálja 20 °C-on.

A mérésekhez Biochrom 4060 spektrofotométert használtunk (Pharmacia, Uppsala, Svédország).

### 2.4. Fehérjetartalom meghatározása

A fehérjetartalom meghatározását Lowry és munkatársai<sup>9</sup> szerint végeztük. A kalibrációs görbe felvételéhez marha szérumalbumint (Sigma) használtunk.

## 2.5. Lenolaj hidrolízise

1 kg lenolajat 500 cm<sup>3</sup> 40 %-os nátrium-hidroxid oldattal 100 – 120 °C-on 1 órán át kevertettünk. Ezután az elegyet 3 dm<sup>3</sup> desztillált vizet adtunk, és 40 °C-ra hűtöttük. Az elegyhez folyamatos keverés mellett 600 g 96 %-os kénsavat adagoltunk, és 30 °C-ra hűtöttük. A fázisokat elválasztottuk, és a zsírsavakat tartalmazó felső fázist desztillált

vízzel savmentesre mostuk. Ezt követően vákuumban (60 Hgmm) a vizet eltávolítottuk, és a zsírsavelegyet vízmentes nátrium-szulfát felett szárítottuk. Ily módon 0,74 kg zsírsavelegyet kaptunk, amelynek savszáma 186,6 volt, és amely 56 % linolénsavat, 16 % linolsavat, 18 % olajsavat és 10 % telített zsírsavat tartalmazott.

## 2.6. Analízisek

A lenolaj hidrolizátum zsírsav összetételének, valamint a *cisz*-3-hexénal, a *transz*-2-hexénal és a hexanal koncentrációjának meghatározása gázkromatográfiásan történt, egy lángionizátorral ellátott HP 5890 Series II. gázkromatográfiával (Hewlett Packard). Vivőgázként nitrogént használtunk. A csúcsok alatti területet és a koncentrációkat HP 3394A integrátor (Hewlett Packard) segítségével számítottuk.

A zsírsavak azonosításához HP-FFAB (crosslinked FFAB) típusú oszlopot (30 m x 0,53 mm x 1,0 µm, Hewlett Packard) alkalmaztunk, 220 °C-on, izotermális körülmények között. Az olajsav retenciós ideje 7,8 perc, a linolsavé 9,1 perc, a linolénsavé pedig 11,0 perc volt.

A *cisz*-3-hexénal és *transz*-2-hexénal koncentrációk meghatározásához a mintákat a gázkromatográfiás méréshez dietiléterrel extraháltuk. Az elválasztás OPTIMA 1701 oszlopon (25 m x 0,32 mm x 0,5 µm) történt. A programozott hőmérséklet 50 °C-tól (10 perc) 80 °C-ig, 5 °C/perc sebességgel változott, a mintákat 80 °C-on 4 percig tartottuk. Ezen körülmények között a *cisz*-3-hexénal retenciós ideje 6,1 perc, a *transz*-2-hexénalé 10,1 perc, a hexanalé pedig 5,8 perc volt.

A 13-HPOT koncentrációját HPLC módszerrel mértük UV detektort használva 234 nm-en. A minták elúcióját izokratikusan, tetrahidrofurán/metanol/víz/ecetsav eleggyel (25:30:45:0,1) végeztük, 1 ml/perc átfolyási sebességgel.

## 3. Kísérleti eredmények és értékelésük

### 3.1. A linolénsav hidroperoxidációja

A hidroperoxidációs reakciót az általunk optimalizált körülmények között végeztük<sup>4</sup>.

Egy 1,5 dm<sup>3</sup>-es két csonkkal ellátott reakcióedénybe az alábbiakat mértük be:

0,2 M nátrium-borát puffer (pH=9)	400 cm <sup>3</sup>
lenolaj hidrolizátum	24,9 g
(linolénsav tartalma 13,94 g)	

5 N nátrium-hidroxid	20 cm <sup>3</sup>
lipoxigenáz-1 izoenzim (Lox-1) (aktivitása 1,1 µkat/cm <sup>3</sup> )	57 cm <sup>3</sup>

A reakciót az enzim hozzáadásával indítottuk. Az elegyet külső, jeges vizes hűtés mellett, mágneses keverővel kevertettük. A molekuláris oxigént, amely a reakcióban ko-szubsztrátként vesz részt, levegőárammal biztosítottuk. A reakció előrehaladtával a kezdeti emulzió fokozatosan feltisztult. Egy óra múlva a reakcióelegyhez 25 cm<sup>3</sup> 5 N kénsavat adtunk (pH 3,0). A sav hatására az oldatban levő termék kicsapódott és az enzim irreverzibilisen inaktíválódott. 10 perc állás után 22,5 cm<sup>3</sup> 5 N nátrium-hidroxidot adtunk az elegyhez (pH 7,0) és 20 percig kevertettük, hogy a kicsapódott 13-HPOT feloldódjon. Az így nyert reakcióelegy közvetlenül alkalmazható volt a következő lépéshez, az enzimátikus hasításhoz.

A 13-HPOT koncentrációja a reakcióelegyben 57,0 ± 2,1 mM, a hozam 61,9 % volt. Korábbi kísérleteinkben, melyeket hasonló körülmények között, 10 cm<sup>3</sup>-es térfogatban, tiszta linolénsav és oxigén gáz alkalmazásával, 4 bar nyomáson végeztünk, 56,5 ± 1,5 mM 13-HPOT koncentrációt és 60,7 % hozamot értünk el<sup>4</sup>. Az eredmények igazolják a linolénsav helyett a lényegesen olcsóbb lenolaj hidrolizátum, valamint oxigén gáz helyett a biztonságosabb levegő alkalmazását a hidroperoxidáció ipari megvalósításában.

### 3.2. A 13-HPOT enzimátikus hasítása

A hasítási reakció kiindulási anyagaként a lenolaj hidrolizátum hidroperoxidációja során (3.1. pont) kapott elegyet használtuk. A hasítást az általunk előzetesen optimálisnak talált körülmények között végeztük<sup>4</sup>.

Egy 1 dm<sup>3</sup>-es csiszolatos Erlenmeyer-lombikba az alábbiakat mértük be:

0,2 M nátrium-foszfát puffer (pH 7,0)	356 cm <sup>3</sup>
hidroperoxidációs reakcióelegy (13-HPOT tartalma 49,8 mmól)	305 cm <sup>3</sup>
hidroperoxid liáz enzimekivonat (aktivitása 88,3 nkat/cm <sup>3</sup> )	100 cm <sup>3</sup>

A reakciót az enzim hozzáadásával indítottuk. A reakcióelegyet 10 percen át szobahőmérsékleten (20 – 25 °C) kevertettük. Ezután 18,5 cm<sup>3</sup> 5 N kénsav hozzáadásával leállítottuk a reakciót.

A képződött aldehidek koncentrációja a reakcióelegyben 1,6 ± 0,1 mM *transz*-2-hexénal, illetve 5,9 ± 0,2 mM *cisz*-3-hexénal volt, amely 37,1 %-os hozamnak felel meg. Melléktermékként – a lenolajban jelenlévő linolsav hidroperoxidációja során képződött 13-HPOT-ból – 0,7 ± 0,05 mM hexanal keletkezett. Összehasonlításként megemlítjük, hogy Rehbock és munkatársai<sup>10</sup> mungbab csíranövényekből izolált hidroperoxid liáz enzim alkalmazásával hasonló eredményt értek el, de az eljárás ipari méretre nem tűnik nagyíthatónak. Noordermeer és munkatársai<sup>11</sup> egy rekombináns hidroperoxid liáz felhasználásával 43 %-os hexénal hozamot értek el, annak ellenére, hogy enzimekészítményük a szennyező fehérjétől mentes volt.



A hexénalt a reakcióelegyből ismételt vízgőzdesztillációval nyertük ki. A *transz-2*-hexénal forráspontja légköri nyomáson 147 °C. Vízrel azeotróp elegyet alkot, melynek forráspontja 95,1 °C, és 51,4 % *transz-2*-hexénalt tartalmaz<sup>12</sup>. A hasítási reakcióban elsődlegesen képződő *cisz-3*-hexénal döntő része a vízgőzdesztilláció körülményei között *transz-2*-hexénallá izomerizálódik<sup>3</sup>. Az első desztillációs lépésben kapott megoszlásokat az 1. táblázatban mutatjuk be.

**1. Táblázat.** A 13-HPOT enzimátikus hasítása során kapott reakcióelegy vízgőzdesztillációja

Frakció	Térfogat (cm <sup>3</sup> )	<i>Transz-2</i> -hexénal (mM)	<i>Cisz-3</i> -hexénal (mM)	Hexanal (mM)
1	50	35,8	10,6	5,8
2	50	4,2	1,4	4,2
3	25	1,1	0,9	1,9
4	25	0,7	0,2	0,8

Látható, hogy az aldehidek döntő része az első frakcióban jelenik meg. Míg a hasítási reakcióelegyben a *transz-2*-hexénal : *cisz-3*-hexénal mólarány 1:3,7 volt, addig a víz-gőzdesztilláció során ez az első frakcióban 3,4:1-re módosult. Több reakcióelegy első desztillációjából nyert tömény (1) frakciók újradesztillálásával külön fázisként a következő összetételű aromaanyagot kaptuk:

<i>transz-2</i> -hexénal	78,6 %
<i>cisz-3</i> -hexénal	10,0 %
hexanal	11,4 %

Ebben az elegyben az izomer arány – a desztillációnál alkalmazott hő hatására – még inkább a *transz-2*-hexénal javára tolódott el. Az első desztillációs lépés hexénalra (*transz-2*- és *cisz-3*- izomer együttesen) vonatkoztatott hozama 78,3 %, a második lépésé 66,4 % volt. A tiszta *transz-2*-hexénal előállítása – amennyiben szükséges – frakcionált desztillálással oldható meg. Aromaanyagként való felhasználása ezt nem feltétlenül teszi indokolttá.

A bemutatott kísérleti eredmények alapján a hexénalok (*transz-2*- és *cisz-3*- izomer) „természetazonos” aromaanyagként előállíthatók biokatalitikus úton, lenolaj hidrolizátumból kiindulva növényi enzimek, azaz a szójából

#### Preparation of 'natural' hexenals

Hexenal (*cis-3*- and *trans-2*- isomers) are components of the “green” flavour of fruit products. They were produced biocatalytically from hydrolyzed linseed oil containing linoleic acid. In the first step 13-hydroperoxyoctadeca-*cis-9,trans-11,cis-15*-trienoic acid (13-HPOT) was formed from linoleic acid by soybean lipoxigenase-1 isoenzyme (Lox-1) with dioxygen as co-substrate. Oxygen was

nyert lipoxigenáz-1 izoenzim és a zöldpaprikából kivont hidroperoxid liáz alkalmazásával. A hidroperoxidációs reakcióban ko-szubsztrátként résztvevő molekuláris oxigén levegőárammal biztosítható. A módszer, hasonlóan az ugyancsak „zöld” aromakomponens hexénal előállításához<sup>13,14</sup> egyszerű, gazdaságos és alkalmas ipari megvalósításra.

#### Köszönetnyilvánítás

A kutatási munka az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság támogatásával készült (szerződésszám: 02326/2000).

#### Hivatkozások

- Whitehead, I. M.; Muller, B. L.; Dean, C. *Cereal Foods World* **1995**, *40*, 193.
- Hatanaka, A.; Sekyia, J.; Kajiwara, T. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 869.
- Stone, E. J.; Hall, R. M.; Kazeniac, S. J. *J. Food Sci.* **1975**, *40*, 1138.
- Németh, Á. Sz.; Márczy, J. Sz.; Samu, Zs.; Háger-Veress, Á. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *34*, 667.
- Németh, Á. Sz.; Szajáni, B.; Márczy, J. Sz.; Simon, M. L. *Biotechnol. Tech.* **1998**, *12*, 389.
- Axelrod, B.; Cheesbrough, T. M.; Laakso, S. *Methods Enzymol.* **1981**, *71*, 441.
- Márczy, J. Sz.; Simon, M. L.; Mózsik, L.; Szajáni, B. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 313.
- Vick, B. A.; Zimmermann, D. C. *Plant Physiol.* **1987**, *85*, 1073.
- Lowry, C. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265.
- Rehbock, B.; Gansser, D.; Berger, R. G. *Food Chem.* **1998**, *63*, 161.
- Noordermeer, M. A.; Groot, W.; Kooij, A. J.; Veldsink, J. W.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4270.
- Harsley, L. H. *Azeotropic Data II.*, Am. Chem. Soc.: Washington, **1965**.
- Márczy, J. Sz.; Németh, Á. Sz.; Samu, Zs.; Háger-Veress, Á.; Szajáni, B. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 1673.
- Márczy, J. Sz.; Németh, Á. Sz.; Szajáni, B.; Samu, Zs.; Háger-Veress, Á. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2004**, *109-110*, 34.

supplied by air flow. In the second step 13-HPOT was cleaved by green bell pepper hydroperoxide lyase resulting in *trans-2*- and *cis-3*-hexenal. Hexenals were isolated from the reaction mixture using repeated steam distillation. During distillation the *trans-2*-hexenal : *cis-3*-hexenal isomer ratio was shifted into the direction of *trans-2*- isomer as an effect of heat. The procedure was realized on laboratory scale.