



**CYCLOLAB**  
Cyclodextrin Research & Development Laboratory Ltd.  
Mail address: Budapest, P.O.Box 435, H-1525 Hungary  
Location: Illatos út 7., Budapest, H-1097-Hungary  
TEL: (361) 347-60-60 or -70, FAX: (361) 347-60-68  
E-mail: cyclolab@cyclolab.hu  
Homepage: www.cyclolab.hu



## **Ciklodextrinek hatása a talajfázisok közötti megoszlásra**

### **A kémiai és mutagenitási eredmények összevetése**

**NKFP-3/020/2005**

**MOKKA**


**Kiegészítés a BME-CYCLOLAB II/4-1.2.d jelentéshez**



*Készítették:* Balogh Klára, Dr. Fenyvesi Éva

*Ellenőrizte:* Dr. Sente Lajos

2007. szeptember 15.

	Ciklodextrinek hatása a talajfázisok közötti megoszlásra  A kémiai és mutagenitási eredmények összevetése	Report No: CYL II.3.6
		Compiled by: E.Fenyvesi
		File: CYLII36
		Date: 2007.08.22.
		Page : 2 of 12

## II/4. feladat 6.2 részfeladata A talajfázisok közötti megoszlás jellemzése

### A kémiai és mutagenitási eredmények összevetése

#### Tartalom

<b>Rövid összefoglalás</b> .....	<b>2</b>
<b>Bevezetés</b> .....	<b>3</b>
<b>Anyagok és módszerek</b> .....	<b>6</b>
A felhasznált anyagok.....	6
Oldékonysági izotermák felvétele.....	6
K <sub>ow</sub> és K <sub>oCD</sub> meghatározása .....	6
<b>Eredmények</b> .....	<b>7</b>
A ciklodextrinek hatása a PCP oldékonyságára, pH függés .....	7
A ciklodextrinek hatása az oktanol-víz megoszlási hányados értékére .....	9
<b>Irodalomjegyzék</b> .....	<b>11</b>

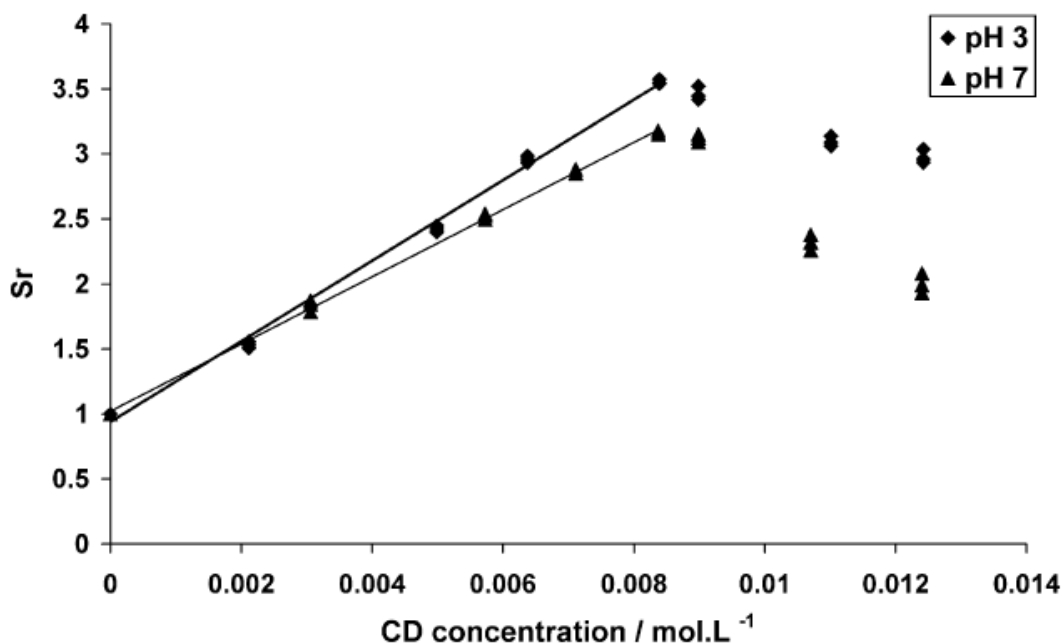
#### Rövid összefoglalás

Pentaklórfenol modell szennyezőanyag esetén kimutattuk a ciklodextrinek oldékonyságnövelő hatását: pH-tól függő mértékben a CD nélküli oldékonysághoz képest akár 50-szeres oldékonyságnövekedést is tapasztaltunk 10%-os RAMEB oldatban. Miközben az oldékonyság legalábbis lineárisan nő a RAMEB koncentrációval, és ezzel összhangban a K<sub>ow</sub> értéke is folytonosan csökken, a BME kutatócsoportjában mért mutagenitás maximum görbe szerint változik a RAMEB koncentrációval. Itt két hatással kell számolnunk: egyrészt a megnövekedett oldékonyság miatti nagyobb szennyezőanyag-koncentráció okoz mutagenitás-növekedést, másrészt a nagy ciklodextrin-koncentráció miatti egyensúlyeltolódás miatt kevesebb lesz a szabadon (ciklodextrines csomagolás nélkül) jelenlevő mutagen anyag, és ez a revertánsok számának csökkenésében nyilvánul meg. Ez a jelenség nem ismert, vizsgálatával a III. munkaszakaszban tovább foglalkozunk.

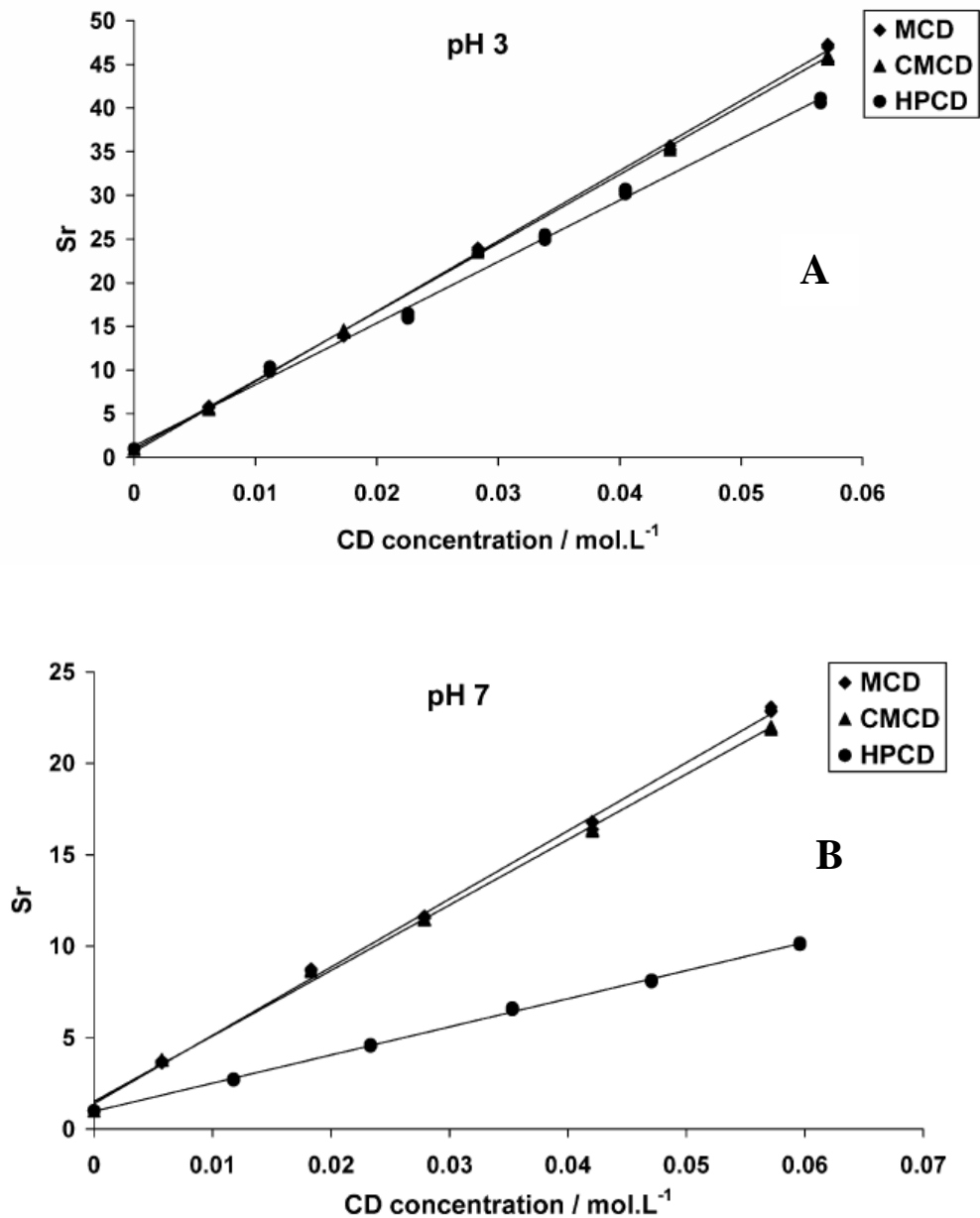
## Bevezetés

A pentaklórfenolt (PCP) növényvédőszerként és favédő anyagként használták az 1930-as évektől kezdődően. Ma már a nagyközönség számára nem hozzáférhető, de vasúti talpfák kezelésére jelenleg is használják. 2002-ben még évi 5500 tonnát gyártottak az USA-ban. Mivel biológiailag viszonylag nehezen bontható, szerepel a perzisztens anyagok listáján 1. Rövid távú hatása az idegrendszer károsítása, hosszabb kitettség esetén máj-, vesekárosodás, a reprodukív rendszer károsodása és rák léphet fel 2. Emiatt ivóvízben a maximális megengedhető koncentráció 1 ppb.

A PCP zárványkomplexet képez a ciklodextrinnekkel. Ennek elsődleges következménye, hogy megváltozik az oldékonysága 3. A  $\beta$ -ciklodextrinnel ( $\beta$ CD) kis oldhatóságnövekedés után oldhatatlan komplex keletkezik (1. ábra), a vízben oldódó  $\beta$ CD-származékokkal: a hidroxipropil-, metil- és karboximetil- $\beta$ CD-vel (HPCD, MCD, CMCD) vízben jól oldódó komplexeket írtak le (2. ábra).



1. ábra PCP relatív oldékonysága a vízhez képest vizes  $\beta$ CD oldatban (kb. 1%  $\beta$ CD koncentráció felett megkezdődik a csapadék kiválása) 3



2. ábra A PCP oldékonysága vízben oldódó  $\beta$ CD-származékok oldataiban  
pH=3 (A) és pH=7 (B) pufferben 3

A felhasznált ciklodextrinek: HPBCD Roquette Freres (Franciaország), MCD Sigma Aldrich, CMBCD Fluka vegyszer volt.

Mind az oldékonyság, mind a ciklodextrinek oldékonyságnövelő hatása függ a pH-tól és az ionerősségtől. A komplexképződés állandója is változik a körülményektől függően: mind az

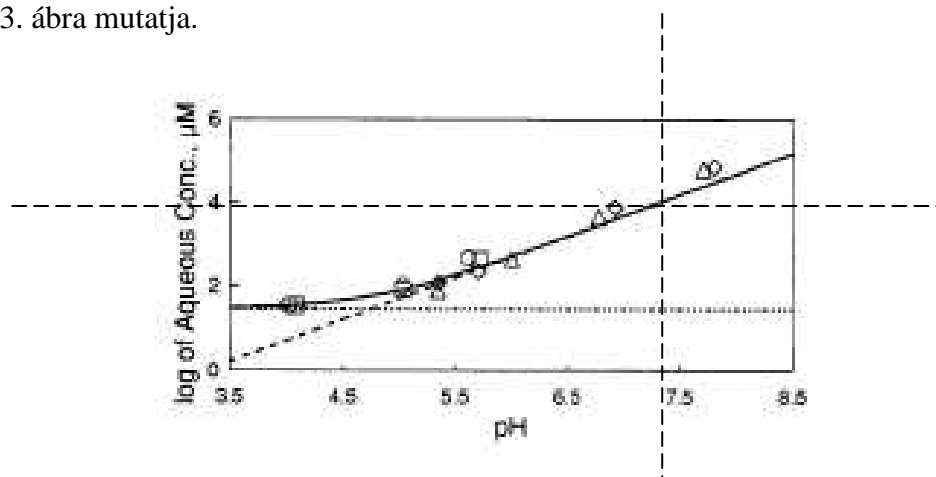


ionerősség, mind a pH növelésével csökken (1. táblázat). A PCP savi disszociációs állandója ( $pK=4,75$ ) alatti pH-n zömmel nem ionos formában jelenlévő PCP-vel inkább kölcsönhatásba lépnek a CDk, mint a pentaklórfenolát-ionnal.

1. táblázat PCP-CD komplexek asszociációs állandói ( $22 \pm 1$  °C) 3

	$K_{\beta CD}$	$K_{HPBCD}$	$K_{MBCD}$	$K_{CMBCD}$
Deszt. víz	433	301	510	501
0,01 mol/l $CaCl_2$	318	216	420	410
0,1 mol/l $CaCl_2$	203	100	315	312
pH 3	309	703	803	789
pH 7	258	153	373	367


Annak ellenére, hogy kisebb pH-n nagyobb a kölcsönhatás, a feloldott PCP mennyisége a nagyobb pH-n több PCP oldódik (2. táblázat), mert eleve nagyobb a PCP oldékonysága, ahogy ezt a 3. ábra mutatja.



3. ábra A PCP oldékonyság pH függése 4

Az 1. és 2. ábrák alapján számított PCP oldékonyságértékeket a négyféle CD oldatában a két pH-n a 2. táblázatban tüntettük fel.

2. táblázat A feloldott PCP koncentrációja (g/L) ref. 3 alapján számítva

	Ciklodextrinek hatása a talajfázisok közötti megoszlásra  A kémiai és mutagenitási eredmények összevetése	Report No: CYL II.3.6
		Compiled by: E.Fenyvesi
		File: CYLII36
		Date: 2007.08.22.
		Page : 6 of 12

	Adalék nélkül	1 % $\beta$ CD	7,5% HPCD	7,5% MCD	7,5% CMCD
pH 3	0,005	0,017	0,20	0,24	0,23
pH 7	1,3	4,0	13,0	29,9	27,3

Saját kísérleteinkben egyrészt az általunk használt ciklodextrineket: a saját gyártású hidroxipropil  $\beta$ CD-t (HPBCD) és a random metil  $\beta$ CD-t (RAMEB, Wacker Chemie) próbáltuk ki, másrészt. vizsgáltuk az oldékonyságfokozó hatást többféle pH-n, és a Kow változást is kimértük.

## Anyagok és módszerek

### *A felhasznált anyagok*

Random metilezett  $\beta$ -ciklodextrin (RAMEB, CYL 1859, Wacker Chemie)

Hidroxipropil  $\beta$ -ciklodextrin (HPBCD, CYL 2278, CycloLab)

Pentaklórfenol (PCP) Reanal

### *Oldékonysági izotermák felvétele*

5 ml desztillált vízhez vagy megfelelő pH-jú puffer oldathoz hozzáadtunk 0-500 mg CD-t, 5 percig kevertettük, majd a CD feloldódása után feleslegben PCP-t. Egy napig kevertettük mágneses keverővel, majd a szuszpenziókat leszűrtük és 50%-os alakohollal megfelelően hígítva felvettük az oldatok UV abszorbancia spektrumát. Az adott pH-jú puffert alkohollal hígítottuk úgy, hogy az alcohol koncentrációja 50% legyen, és ebben a közegben vettük fel a kalibrációs egyenest, melynek alapján a spektrumokból a PCP-koncentráció értékeket számítottuk.

### *Kow és $K_{oCD}$ meghatározása*

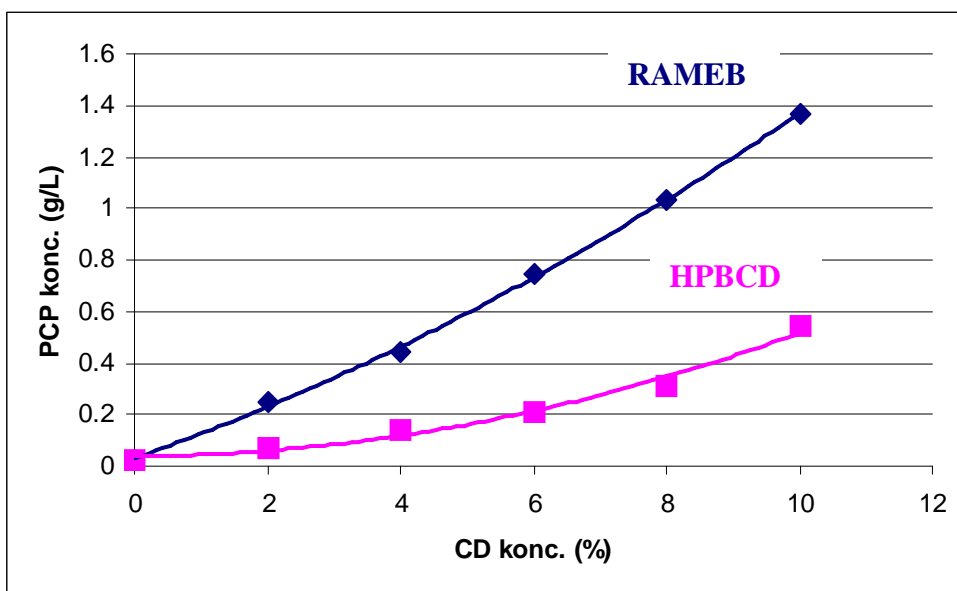
2,5 ml oktanollal telített vizes fázist és 2,5 ml a vizsgált anyagot 5mg/ml-es koncentrációban tartalmazó vízzel telített oktanolt kevertettünk szobahőmérsékleten mágneses keverővel 5 órán át, majd egy éjszakát állni hagytuk. Másnap szétválasztottuk a

fázisokat (szükség esetén centrifugálással), majd megfelelő hígítás után (a vizes fázist kétszeresre hígítottuk 96%-os etanollal, az oktanolos fázist 10-1000-szeresre 50%-os vizes etanollal) felvettük az UV spektrumokat. A koncentrációkat az előzetesen meghatározott kalibrációs egyenes alapján határoztuk meg. A mérésekhez HP 8452 A típusú fotométert használtunk.

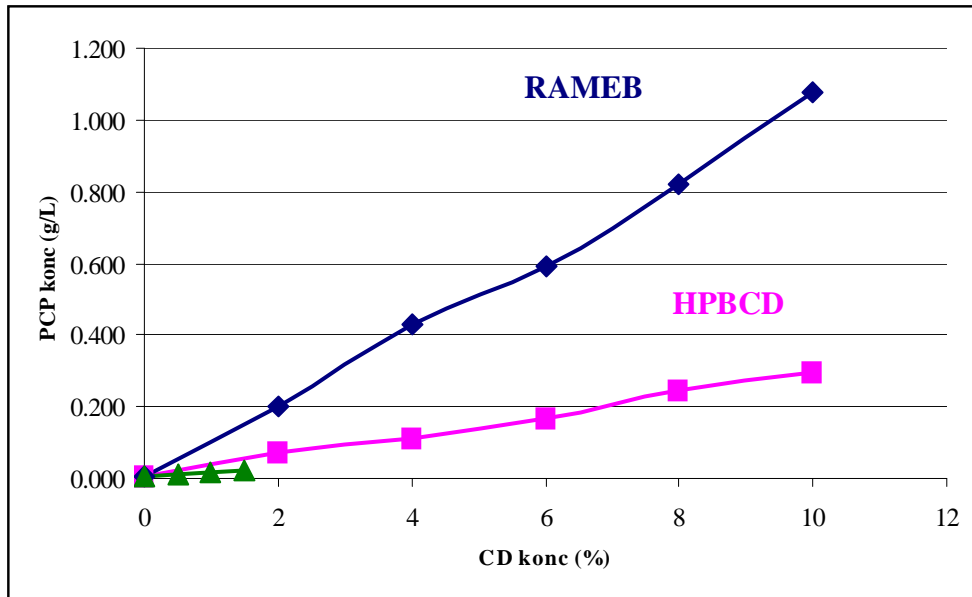
## Eredmények

### *A ciklodextrinek hatása a PCP oldékonyságára, pH függés*

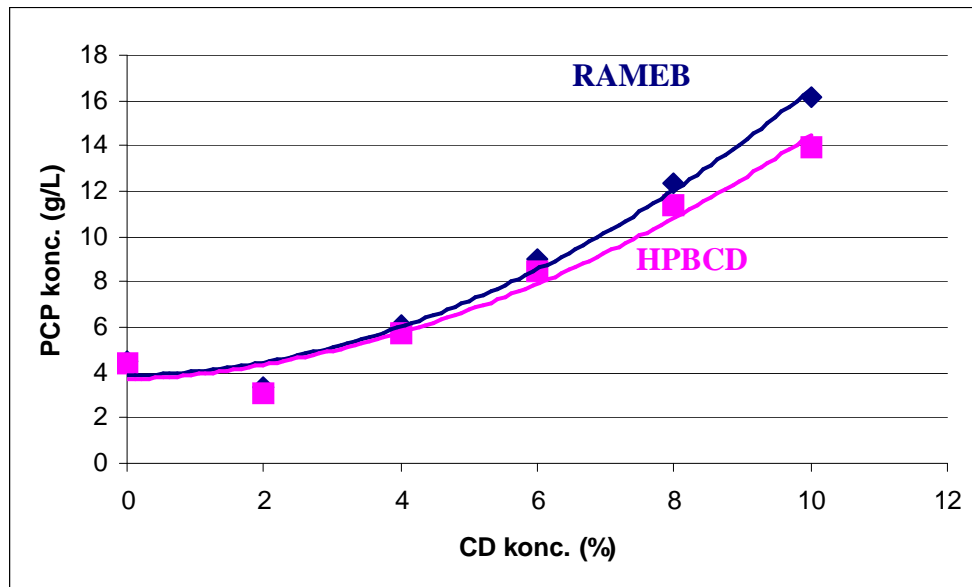
Mind a HPBCD, mind a RAMEB javítják a PCP oldékonyságát. Az oldékonyságfokozás mértéke függ az oldat pH-jától összhangban az irodalmi adatokkal: nagyobb pH-jú oldatokban kisebb a komplexképzés hatása, kisebb pH-nál nagyobb (4-7. ábra). Az irodalomban is használt relatív oldékonyságot a 10%-os CD oldatokban (a ciklodextrin nélkül mért oldékonysághoz viszonyítva) a 3. táblázatban adjuk meg. Jól látszik, hogy a CD inkább a PCP semleges formájával képez komplexet, az pentaklórfenolát ionnal kevésbé lép kölcsönhatásba.



4. ábra A PCP oldékonysága vizes HPBCD és RAMEB oldatokban



4. ábra A PCP oldékonysága vizes HPBCD és RAMEB oldatokban pH=4 citrát pufferben



4. ábra A PCP oldékonysága vizes HPBCD és RAMEB oldatokban pH=8 foszfát pufferben

3. táblázat Oldékonyságnövekedés a CD-koncentráció függvényében

	pH = 4	Vízben (pH ~ 5,5)	pH = 8
10% HPBCD	37.7	24.5	3.2
10% RAMEB	137.8	52.7	3.6



*A ciklodextrinek hatása az oktanol-víz megoszlási hányados értékére*

Az oldékonyságnövekedés következtében az oktanol-víz megoszlási hányados ( $K_{ow}$ ) lecsökken. A ciklodextrin-oldatokban mért  $K_{ow}$  értékeket  $K_{oCD}$ -vel jelöljük. A pentaklórfenolra kapott  $K_{oCD}$  értékeket a 4. és 5. táblázatban soroljuk fel. Az oldékonysági adatokból tudjuk, hogy a legnagyobb kölcsönhatásra akkor számíthatunk, ha a PCP nem disszociál (nincs jelen pentaklórfenolát ion), ezért pH 2 puffert használtunk a meghatározás során.

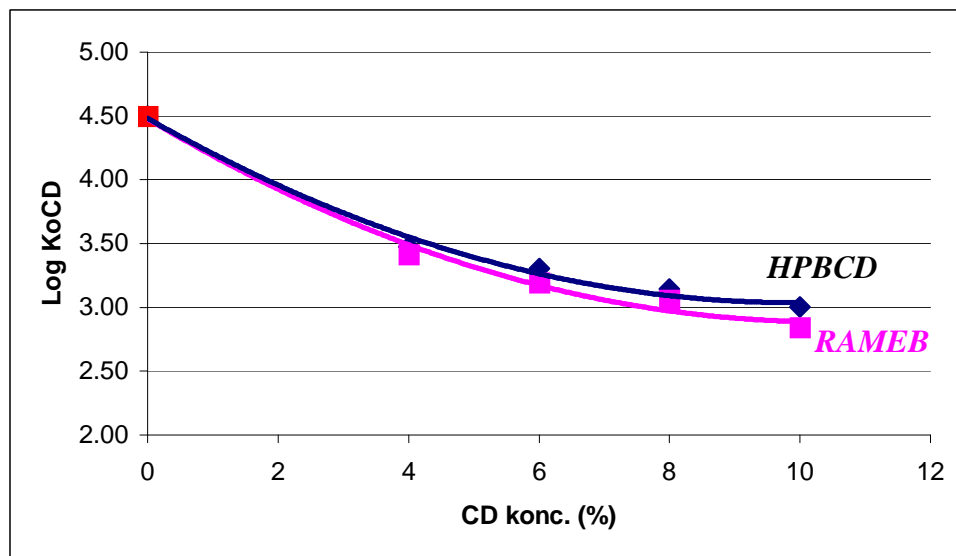
4. táblázat Oktanol - HPBCD oldatok közötti megoszlási hányadosok

HPBCD konc. (%)	Pentaklórfenol konc. a vizes fázisban (mg/l)	Pentaklórfenol konc. az oktanolos fázisban (mg/l)	Log $K_{oCD}$
0	0.43	5110.6	4.50
4	0.77	2386.3	3.44
6	1.2	2577.6	3.33
10	2.37	2505	3.02

5. táblázat Oktanol - RAMEB oldatok közötti megoszlási hányadosok

RAMEB konc. (%)	Pentaklórfenol konc. a vizes fázisban (mg/l)	Pentaklórfenol konc. az oktanolos fázisban (mg/l)	Log $K_{oCD}$
0	0.43	5110.6	4.50
4	3.39	4195.1	3.09
6	6.48	4267.3	2.82
10	13.98	4098.3	2.47
20	40.4	4089.4	2.01

Az 5. ábra mutatja a Log  $K_{oCD}$  értékeket a koncentráció függvényében.



5. ábra Log KoCD értékek a koncentráció függvényében pentaklórfenol esetén


#### *Összevetés a biológiai eredményekkel*

Mind az oldékonysági adatok, mind az oktanol-víz megoszlási hányados értékek folytonosan változnak a CD-koncentráció növekedésével. Az oldékonyságváltozása tehát nem magyarázza a mutagénhatás maximum görbe szerinti változását. Véleményünk szerint két hatással kell számolnunk: egyrészt a megnövekedett oldékonyság miatti nagyobb szennyezőanyag-koncentráció okoz mutagenitás-növekedést, másrészt a nagy ciklodextrin-koncentráció miatti egyensúlyeltolódás miatt kevesebb lesz a szabadon (ciklodextrines csomagolás nélkül) jelenlevő mutagen anyag, és ez a revertánsok számának csökkenésében nyilvánul meg.

Több tanulmányban bebizonyosodott, hogy a ciklodextrinek nem mutagének 5., 6. 7. A RAMEB többféle tesztben sem mutatott mutagén hatást a gyártó(Wacker Chemie) adatlapja szerint 8. A 6. táblázat ezeket a teszteket sorolja fel.

6. táblázat A RAMEB-re kapott mutagenitási eredmények 8

Test system Effect	
Bacterial Reverse Mutation Test	not mutagenic
In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test	not mutagenic

	Ciklodextrinek hatása a talajfázisok közötti megoszlásra  A kémiai és mutagenitási eredmények összevetése	Report No: CYL II.3.6
		Compiled by: E.Fenyvesi
		File: CYLII36
		Date: 2007.08.22.
		Page : 11 of 12

Genetic Toxicology:	DNA Damage and Repair
DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro	not mutagenic
Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test	not mutagenic

Amikor arra használták a CD-t, hogy feloldjanak vele egy mutagén anyagot 9, 10, 11

*Amikor azért csökkent a mutagenitás, mert a CD a füstszűrőben megkötötte a mutagén anyagokat:*


Cigaret filter with nicotine retention and reduced mutagenic properties

Cigaret filters with nicotine retention and reduced mutagenic properties are comprised of a cellulose acetate tow and additives such as carboxylic acids and/or esters, poly- or oligosaccharides, phenolic compds., and proteins. A cigarette filter with a cellulose acetate tow was manufd. and contained citric acid di-Et ester and lignin additives. The filter exhibited enhanced nicotine retention properties and reduced mutagenic activity as detd. by the Ames Test.

**TEUFEL, EBERHARD; SEXAUER, WOLFGANG; WILLMUND, ROLF: (1997) GER.OFFEN., 7 PP.DE 19541873 A1 970515 (126:328243)**

## Irodalomjegyzék

- 1 US Environmental Protection Agency: Pesticides, Topical and Chemical Fact Sheets. [http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemicals/pentachlorophenol\\_main.htm](http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemicals/pentachlorophenol_main.htm)
- 2 US Environmental Protection Agency: Ground water and drinking water. Consumer Fact sheet on Pentachlorophenol. [http://www.epa.gov/safewater/contaminants/dw\\_contamfs/pentachl.html](http://www.epa.gov/safewater/contaminants/dw_contamfs/pentachl.html)
- 3 Hanna, K de Brauer, C Germain, P. (2004) Cyclodextrin-enhanced solubilization of pentachlorophenol in water. J.Environ. Manag. 71, 1-8
- 4 Michael G. Stapleton, It Donald L. Sparks, and Steven K. Dentel Sorption of Pentachlorophenol to HDTMA-Clay as a Function of Ionic Strength and pH *Environ. Sci. Technol.* 1994, 28, 2330-2335

	Ciklodextrinek hatása a talajfázisok közötti megoszlásra  A kémiai és mutagenitási eredmények összevetése	Report No: CYL II.3.6
		Compiled by: E.Fenyvesi
		File: CYLII36
		Date: 2007.08.22.
		Page : 12 of 12

5 Hedges, A.: (1997) TOXICOLOGY STUDIES FOR BETA-CYCLODEXTRIN Conference on Pharmaceutical Application of Cyclodextrins, Lawrence, Kansas, USA, June 29-July 2

6 Coussement, W.; Van Cauteren, H.; Vandenberghe, J.; Vanparys, P.; Teuns, G.; Lampo, A.; Marsboom, R.: (1990) Toxicological profile of hydroxypropyl .beta.-cyclodextrin (HP .beta.-CD) in laboratory animals, Minutes Int. Symp. Cyclodextrins, 5<sup>th</sup>, 522-4. Edited by: Duchene, Dominique. Ed. Sante: Paris, Fr.(115:270645)

7 Abbott, D.; George, C.; Guzzie, P.; Nahas, K.; Rovost, J.P.; Lodola, A.: (1997) SAFETY STUDIES TO CHARACTERIZE CAPTISOLTM, Conference on Pharmaceutical Application of Cyclodextrins, Lawrence, Kansas, USA, June 29-July 2

8

[http://www.wacker.com/internet/noc/Products/PT\\_Bio/P\\_Bio\\_Cy/P\\_CycDer/P\\_CycDer\\_SP\\_W7M/](http://www.wacker.com/internet/noc/Products/PT_Bio/P_Bio_Cy/P_CycDer/P_CycDer_SP_W7M/)

9 Klaus Felix, Sophia Lin, Georg-Wilhelm Bornkamm and Siegfried Janz, Tetravinyl-tetramethylcyclo-tetrasiloxane (tetravinyl D4) is a mutagen in Rat2lacI fibroblasts Carcinogenesis vol.19 no.2 pp.315–320, 1998

10 Klaus Felix, Michael Potter, Georg-Wilhelm Bornkamm and Siegfried Janz: In vitro mutagenicity of the plasmacytomagenic agent pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane) Cancer Letters, 113, 71-76 (1997)

11 Felix, Klaus; Lin, Sophia; Bornkamm, Georg-Wilhelm; Janz, Siegfried: Tetravinyl-tetramethylcyclo-tetrasiloxane (tetravinyl D4) is a mutagen in Rat2.lambd.lacI fibroblasts. Carcinogenesis (1998), 19(2), 315-320