



BERBERIN ALKALOID FLUORESZCENCIÁS SAJÁTSÁGAI ÖNSZERVEZŐDŐ RENDSZEREKBE

Doktori (PhD) értekezés

Megyesi Mónika

Témavezető: Dr. Biczók László

Debreceni Egyetem
Természettudományi Doktori Tanács
Kémiai Doktori Iskola
Debrecen, 2009



BERBERIN ALKALOID FLUORESZCENCIÁS SAJÁTSÁGAI ÖNSZERVEZŐDŐ RENDSZEREKBE

Doktori (PhD) értekezés

Megyesi Mónika

Témavezető: Dr. Biczók László

Konzulens: Dr. Joó Ferenc

Debreceni Egyetem
Természettudományi Doktori Tanács
Kémiai Doktori Iskola
Debrecen, 2009

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémiai Doktori Iskola reakciókinetika és katalizis programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2009. november

Megyesi Mónika

Tanúsítom, hogy Megyesi Mónika doktorjelölt 2008 - 2009 között a fent megnevezett Doktori Iskola reakciókinetika és katalizis programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2009. november

Dr. Biczók László
MTA doktora

**BERBERIN ALKALOID FLUORESZCENCIÁS SAJÁTSÁGAI
ÖNSZERVEZŐDŐ RENDSZEREKBE**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a kémia tudományágban

Írta: Megyesi Mónika okleveles vegyész és okleveles kémia szakos tanár

Készült a Debreceni Egyetem kémiai doktori iskolája
(Reakciókinetika és katalízis programja) keretében

Témavezető: Dr. Biczók László

Konzulens: Dr. Joó Ferenc

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 20....

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20....

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. A szupramolekuláris kémiáról általában	3
2.2. Jablonski-diagram	8
2.3. Kvantumhasznosítási tényezők és a gerjesztett állapot élettartama	11
2.4. Vizsgált vegyületcsaládok	14
2.4.1. Izokinolinvázú alkaloidok, berberin-klorid	14
2.4.2. Kalixarének	17
2.4.3. Kukurbituril	21
2.4.4. Epesavak	25
3. Felhasznált vegyszerek és alkalmazott mérési módszerek	28
3.1. Felhasznált vegyszerek	28
3.2. Mérési módszerek	30
3.2.1. Elnyelési színeképek felvétele	30
3.2.2. Emissziós színeképek felvétele	31
3.2.3. Fluoreszcencia-intenzitás időfüggésének mérése	31
3.2.4. ¹ H NMR spektroszkópia	33
3.2.5. pH mérés	34
4. Számítási módszerek	35
4.1. Alapállapotú egyensúlyi állandó meghatározása elnyelési spektrumokból	35
4.2. Fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőjének meghatározása	36
4.3. A fluoreszcencia-kioltás	37
4.3.1. A kioltási sebességi együttható meghatározása, Stern-Volmer ábrázolás	37
4.3.2. Elektronátadás	40
5. Kísérleti eredmények és diszkussziójuk	42
5.1. Ionpároképződés hatása a berberin fluoreszcenciájára	42
5.1.1. Berberinkoncentráció hatása az elnyelési és fluoreszcencia-színeképre	42
5.1.2. Kloridion koncentráció változtatásának hatása CH ₂ Cl ₂ -ban	47
5.1.3. Perklorátion hatása különböző oldószerekben	51
5.2. Szupramolekuláris komplexképződés berberin és 4-szulfonáto-kalixarének között	54
5.2.1. 4-Szulfonáto-kalixarének (SCX _n) hatása a berberin elnyelési színeképre	54
5.2.2. 4-Szulfonáto-kalixarének hatása a berberin fluoreszcencia-színeképre	56
5.2.3. A pH hatása a berberin és 4-szulfonáto-kalixarének közötti komplexálódásra	59
5.3. Szupramolekuláris komplexképződés berberin és kukurbit[7]uril (CB7) között	64
5.3.1. Abszorpciós sajátosságok és ¹ H-NMR spektrum	64
5.3.2. A komplex fluoreszcenciája	69
5.3.3. Nátriumsók hatása	73
5.3.4. NaCl koncentrációjának a hatása	74
5.3.5. Ionfolyadékok hatása	78
5.4. Epesav aggregáció fluoreszcenciás vizsgálata berberinnel	81
5.4.1. Nátrium-kolát epesav hatása a berberin elnyelési és emissziós színeképre	81
5.4.2. Oldószer hatása az nátrium-kolát aggregációjára	86
6. Összefoglalás	91
7. Summary	95
8. Irodalomjegyzék	100
9. Függelékek	108

1. Bevezetés és célkitűzés

A makrociklusos vegyületek, mint például a β -ciklodextrinek, koronaéterek, kriptandok, kalixarének képesek megkötni ionokat, kisméretű szerves anyagokat, aminosavakat, peptideket. A szupramolekuláris komplexképződést széleskörűen alkalmazzák különböző analitikai eljárások, optikai szenzorok kifejlesztésére, valamint a hidrofób vegyületek, gyógyszerek vízdékonyságának a növelésére. A szupramolekulák reverzibilis folyamatban, alkotórészeik önszerveződésével keletkező, jól definiált szerkezetű részecskék, melyeket másodlagos kötések tartanak össze. Sajátságait eddig főként alapállapotban tanulmányozták, fényelnyelést követő folyamataik kevésbé ismertek. Munkánk egyik fő célja, hogy feltárjuk a gerjesztett szupramolekulák energiavesztési folyamatait befolyásoló tényezőket.

Vizsgálatainkhoz modellvegyületként egy rákellenes hatású, természetes izokinolin-vázis alkaloidot, a berberint választottuk, mert kimutatására fontos lenne kidolgozni egy érzékeny analitikai módszert, ugyanis vízben elhanyagolható mértékben fluoreszkál. Gyógyászati jelentősége ellenére nagyon kevés adat található az irodalomban fotofizikai sajátságairól. Ez azért is meglepő, mert jól ismert, hogy fény hatására bomlik és fototoxikus.

Munkánk első fázisában feltártuk a berberin fluoreszcenciáját befolyásoló fő tényezőket; tanulmányoztuk, hogy milyen kölcsönhatás határozza meg döntő mértékben a gerjesztett állapotból kiinduló folyamatok sebességét. Mivel ez az alkaloid iontranszportgátló sajátságokkal is rendelkezik, megvizsgáltuk a berberinkation és különböző anionok kölcsönhatását.

Különös figyelmet fordítottunk a berberin szupramolekuláris komplexeiben lejátszódó fotoindukált folyamatok megismerésére. Az asszociáció megváltoztatja a gerjesztett állapotok energiáját, ami jelentős változást okozhat az energiavesztési folyamatok sebességében. Szupramolekuláris komplexképzés akadályozhatja a bimolekuláris reakciókat, ezáltal védelmet nyújtva a fotokémiai átalakulások ellen. Ezért vizsgáltuk, hogy a berberin fotoindukált folyamatai miként módosulnak, ha

szupramolekuláris komplexet képez makrociklusokkal, mint szulfonátokalixarénnel és kukurbit[7]urillal.

Munkánkat kiterjesztettük természetes felületaktív anyagok, epesavak aggregációjának tanulmányozására is. Annak ellenére, hogy e vegyületek alapvető szerepet játszanak az élő szervezetben apoláris anyagok vízoldhatóságának növelésében és szállításában, nem volt ismert olyan fluoreszcenciás jelzőanyag, amely különböző jellegű epesav-aggregátumokhoz egyaránt képes kapcsolódni. Mivel a berberin szerkezeti felépítésében úgy hidrofób, mint hidrofil rész is található, ésszerű volt feltételezni, hogy mind az elsődleges, mind a másodlagos aggregátumokba beékelődik.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A szupramolekuláris kémiáról általában

A szupramolekuláris kémia a molekulák közötti nemkovalens kölcsönhatások tanulmányozását helyezi előtérbe. Míg a kémia tudományág korábbi szakaszában a kovalens kötésekre fókuszált, addig a szupramolekuláris kémia a molekulák között kialakuló gyenge és reverzibilis, nemkovalens kötések és az általuk összetartott asszociátumokat vizsgálja.

Az anyagtudomány egyik legnagyobb kihívása az olyan szupramolekulák tervezése, ami modellezni tudja az élő szervezetekben kialakuló specifikus kötődéseket, molekulafelismeréseket. A biológiai rendszerben egy sor olyan funkcionális nanoméretű szerkezet fordul elő, amelyek alkotóelemeik önszerveződésével keletkeznek. Az önszerveződés két anyag megfelelő körülmények közötti elegyítése során spontán és reverzibilisen megy végbe, miközben a komponensek között nemkovalens kötések alakulnak ki. A nemkovalens szintézissel, sokoldalú sajátságokkal rendelkező funkcionális anyagot gyárthatunk, amelyek különböző tulajdonságokat egyesítenek, és reagálnak a külső körülmények megváltozására. Annak ellenére, hogy világszerte nagy érdeklődésnek örvend ez a tudományág, az önszerveződött rendszereket eddig főleg csak alapállapotban tanulmányozták. Sokkal kevesebb figyelmet fordítottak a fény hatására végbemenő folyamataik tanulmányozására. Mivel a foton elnyelése jelentősen megváltoztatja a molekula reaktivitását, redoxi tulajdonságait és savasságát, a fotokémiai folyamatok különösen hasznosak lehetnek a gyors szerkezeti változás és töltésszeparálódás előidézésére, melyek felhasználhatók különböző nanoméretű eszközök kifejlesztésére, információátvitelre. A modern technológiában nagyon fontos szerepet töltenek be a fényel előidézett átalakulások, mivel könnyen kontrollálhatók, térben lokalizáltak és nagy szelektivitással rendelkeznek.

Az élő szervezetben a nemkovalens kölcsönhatások alapvető fontosságúak, például a biomembránok, proteinek, nukleinsavak és sok más bonyolultabb

rendszer háromdimenziós szerkezetének fenntartásában játszanak szerepet. A molekulák között kialakuló specifikus és reverzibilis kötések képezik az alapját különböző biológiai folyamatoknak, mint például enzimreakcióknak. Ennek ellenére kevés információ található az irodalomban arról, hogy ezek miként befolyásolják a fényelnyelést követő folyamatokat biológiai rendszerekben. A káros UV-sugárzás elleni védelem, a lézerek orvosi alkalmazása, valamint különböző fototerápiás módszerek kifejlesztése során fontos ismernünk, hogy a fény milyen folyamatokat idézhet elő. A nemkovalens kölcsönhatások általában jelentősen megváltoztatják a gerjesztett molekula tulajdonságait, így a fluoreszcenciás próbák felhasználhatók lehetnek analitikai célokra.

A szupramolekuláris kémia története az 1960-as évekre nyúlik vissza, amikor Charles J. Pedersen koronaétereket állított elő, bár néhány fogalom és néhány valóban egyszerű szupramolekuláris rendszer a modern kémia kezdetéhez vezethető vissza.

A szupramolekula elnevezés K. L. Wolf és munkatársaitól származik, akik 1937-ben tömény ecetsav oldatokban intermolekuláris kölcsönhatások során képződő dimerek jellemzésére használták az Übermoleküle német kifejezést [1]. Két kérdés azonnal megfogalmazható. Miért nem ismerték fel korábban és miért nem alakult ki a tudományág e területe? Miért került több mint 40 évbe, hogy Lehn megfogalmazza a szupramolekuláris kémia definícióját, mint a molekulák szerveződésének és intermolekuláris kötéseknek a kémiáját [2]? Ehhez hozzátartozik, hogy a ciklodextrinekről már Villiers és Hebd 1891-ben megjelent cikkükben írnak [3]. Amíg a vegyészek elfogadták azt a téveszmét, hogy a molekulák tulajdonságai magukra a molekulákra jellemzőek, miközben a mikrokönyezettel való kölcsönhatás kicsi és első közelítésre elhanyagolható, addig nem volt helye a szupramolekuláris kémia kialakulásának. Bár az oldószerhatás már elég korán ismert volt, mégis ez a tévhit képezte az alapját a kutatók gondolkodásának. Fokozatosan jelentek meg a közlemények, melyek nem elhanyagolható jelentőséget tulajdonítottak a mikrokönyezet hatásának, így az 1960-as években az intermolekuláris kölcsönhatások vizsgálatának is nagyobb

fontosságot tulajdonítottak. A feltett kérdésekre a második válasz nem kevésbé fontos, habár ez sokkal inkább technikai természetű. A szupramolekulákat gyakran gyenge kötések tartják össze, és dinamikus egyensúlyban keletkeznek. Az ilyen jellegű kölcsönhatások vizsgálatára csak az utóbbi évtizedekben vált széles körben hozzáférhetővé megfelelő kísérleti technika és műszerezettség.

A koronaéterek felfedezése után több kutató úgy, mint Donald J. Cram, és Jean-Marie Lehn által vezetett kutatócsoportok is bekapcsolódtak az alak- és ionszelektív receptorok szintézisébe. A szupramolekuláris kémia fontosságát tükrözi, hogy 1987-ben Charles J. Pedersen, Donald J. Cram és Jean-Marie Lehn munkásságukért kémiai Nobel díjat kaptak. J. Fraser Stoddart és Balzani különösen fontos eredményeket ért el a fényrel vezérelt molekuláris eszközök kifejlesztése terén.

A szupramolekulákat összetartó nem kovalens kötések energiája széles tartományban változik. Néhány száz kJ mol⁻¹ kötési energiával jellemezhető az ion-dipól kölcsönhatás, míg a van der Waals kölcsönhatás általában csak néhány kJ mol⁻¹-nyi. Az intermolekuláris erők létezését elsőként Johannes Diderik van der Waals feltételezte 1873-ban. 1890-ben Fischer javasolta, az enzim-szubsztrátum kölcsönhatás „kulcs-zár” típusú szerkezetét [4], ezzel előrevetítette a molekulafelismerés és gazda-vendég kémia fogalmát. Aromás vegyületek között kialakulhat π - π vonzó kölcsönhatás (stacking) is [5]. A hidrogénkötés alapvető fontosságú a biokémiában [6] és széleskörűen alkalmazzák különböző szupramolekuláris jelzőanyagok kifejlesztésében, hisz irányítottságának köszönhetően könnyen kontrollálható a keletkező komplex geometriája. Természetesen a szenzorok kifejlesztése során nagy figyelmet kell fordítani a kimutatni kívánt vegyülettel szembeni érzékenységre, de legalább ugyanilyen fontos a szenzor szelektivitása is. A gazda-vendég kölcsönhatás kialakulása során nemcsak egyfajta nemkovalens kötéstípussal állunk szemben, hanem ezek több fajtája additív, sőt akár kooperatív hatást fejthet ki. Minél kedvezőbb a gazdamolekula molekulaszervezete a vendégmolekula befogadására, annál nagyobb lesz a kötési energia, vagyis a vegyületeknek ki kell egészíteniük egymást. Ez alatt

nemcsak az erős nemkovalens kötések kialakulásának lehetősége értendő, hanem a vendég- és gazdamolekula alakja is döntő lehet, sőt a két vegyület töltéseloszlása is fontos szerepet játszik. Következésképpen a szelektív kötődést több tényező együttesen szabja meg, vagyis röviden összefoglalva maximalizálni kell a vonzó és minimalizálni a taszító erőket a gazda- és vendégmolekula között.

A szupramolekulák alkotórészeik önszerveződésével keletkeznek. De mit is értünk önszerveződésen? Az önszerveződés fogalmát a szupramolekuláris kémiával foglalkozó vegyészek vezették be. Ez lényegében egy olyan szintézisstratégia, amellyel komplex strukturák kifejlesztésére fordított erőfeszítést csökkentették [7-10]. A gyakran többlépcsős szintézissel szemben egyszerűen csak olyan vegyület terveztek, amely ideális pozícióban tartalmazott kötési helyet. Ez a megfelelő anyagfajtaival összekeverve spontán, minden külső beavatkozás nélkül nagy stabilitású, jól definiált szerkezetű asszociátumokat hozhat létre. Hogy az önszerveződés végbemenjen, a következő feltételeknek kell teljesülnie: (i) a molekuláknak mobilisaknak kell lenniük, ez többnyire teljesül, mivel az oldatokban a molekulák bolyonganak (Brown-mozgás); (ii) a gazdamolekulát gondosan kell megtervezni, hogy megfelelő geometriai szerkezettel rendelkezzen, és optimális helyen legyen a kötési helye; (iii) a komponensek között képződő kötéseknek reverzibiliseknek kell lenniük. Ez azt jelenti, hogy a képződő aggregátum termodinamikailag kontrollált egyensúlyi folyamat során képződik. Ez azért is fontos, mert ezáltal körfolyamatban vehetnek részt, például az oxigén és széndioxid szállításban szerepet kapó hemoglobin a körülmények folyamatos megváltozására reagálva képes ellátni feladatát.

Ha a központi molekula koordinációs helyeit nem foglalják el oldószermolekulák, akkor az önszerveződés entrópiacsökkenéssel jár, mivel a képződő komplex legalább két komponens kölcsönhatásával alakul ki (a rendszer rendezetlenségének mértéke csökken). Ahhoz, hogy valamilyen kémiai folyamat végbemenjen a szabadentalpia-változásnak negatívnak kell lennie, így a kedvezőtlen entrópiaváltozást a gazda-vendég kötődés során bekövetkező entalpiaváltozás kell, hogy kompenzálja. Léteznek stratégiák, melyekkel a

komplexxépződés során bekövetkező entrópiacsökkenés minimalizálható. Az egyik ilyen lehetőség, ha a gazdamolekulára egynél több kötőhelyet építünk. Az első kötés kialakulása entrópiacsökkenéssel jár, míg az ugyanazon partnerek között kialakuló második és az ezt követő kötődés már nem jár további jelentős rendezetlenségcsökkenéssel. Ez kelátképződés néven ismert és már rég közismert a koordinációs kémiából, ahol pl. az etilén-diamin vagy 2,2'-bipiridin ligandumok könnyedén helyettesítik az ammóniát vagy piridint az átmenetifém-komplexekben.

Miközben az entrópiahatást tárgyaljuk, nem szabad elfelejtenünk azt, hogy kialakulhat olyan gazda-vendég kölcsönhatás is, amit az entrópiánövekedés segít elő. Ez lehetséges, ha a gazdamolekula több oldószermolekulát tartalmaz, melyek kiszorítódnak egy nagyobb vendégmolekula beékelődésekor. Ebben az esetben a gazda-oldószer komplex több molekulát bocsát szabadon, mint amennyit megköt, így a folyamat entrópiánövekedéssel jár [5].

Az önszerveződés nemcsak a kémikus által tervezett kísérletekben játszódik le, hanem a biológiai rendszerekben is. Talán az egyik legismertebb példa az oxigén és széndioxid szállításában szerepet játszó hemoglobin szupramolekula. A négy spirálisan csavarodott polipeptid-lánc mindegyike egy úgynevezett hem-molekulát tartalmaz, melyek nitrogénatomjaikkal vasionokat kötnek meg. A fehérjéknek a nem aminosavakból álló részét, mely nélkülözhetetlen funkciójuk ellátásához, prosztetikus csoportnak nevezzük. Ilyen prosztetikus csoport a hem is. A vasionok a szállítandó oxigénmolekulákat fogják megkötni.

Általában jellemző a biológiai szupramolekulákra, és az enzimekre, hogy felületükön található egy vagy több olyan üreg, amelybe a szubsztrátmolekula (az a molekula, amelynek átalakulását az enzim katalizálja) pontosan beleillik, és megkötődik az enzim által katalizált kémiai folyamat lejátszódásának idejére. Nagyon lényeges, hogy az üregek váza, alakja és mérete flexibilis legyen. A nyílásaikon és esetleg belső felületükön helyezkednek el az oxigén-, a nitrogén- vagy a kénatomok, amelyek mindegyike erősen vonzódik a fémionokhoz vagy más molekulák hidrogénjeihez.

Természetesen a biológiai rendszerek egésze bonyolult kölcsönhatások összességéből áll, ezért a vegyész többnyire a biomolekula egy kisebb szegmensének viselkedését tanulmányozza. Más szóval modellrendszereken keresztül szerzett információkból próbálja megérteni, magyarázni a bonyolult biológiai folyamatokat.

2.2. Jablonski-diagram

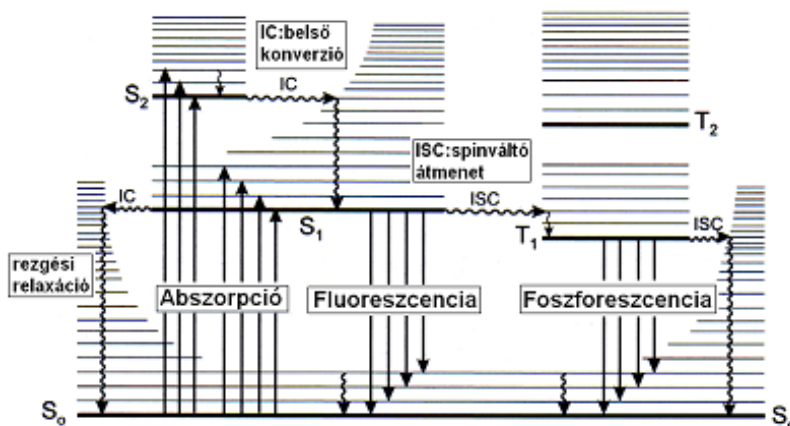
A Jablonski-diagram egy molekula fény hatására bekövetkező lehetséges fotofizikai folyamatainak rövid, tömör összefoglalója. Kiválóan szemlélteti egy molekula energiaszintjei közötti átmenetek típusait, könnyen áttekinthetővé teszi a molekula különböző energiájú állapotainak egymáshoz való viszonyát.

Egy tipikus Jablonski-diagram látható az 1. ábrán [11].

Vastag vonallal jelöltem a szingulett alap S_0 , és gerjesztett $S_1, S_2, \dots S_n$, valamint triplett gerjesztett $T_1, T_2, \dots T_n$ elektronállapotokat, míg a vékony vonalak a megfelelő elektronállapotokhoz tartozó rezgési szinteket jelölik. A függőleges, folytonos vonalú nyilak a fény elnyelését vagy kisugárzását szemléltetik, míg a hullámvonalak a sugárzásmentes folyamatokat mutatják.

A molekula különböző módon gerjeszhető, mi az elektromágneses sugárzás okozta fotolumineszcenciával foglalkozunk, de kémiai reakcióval (kemilumineszcencia), termikusan, sőt biológiai folyamaton (biolumineszcencia) keresztül is kerülhet gerjesztett állapotba egy molekula.

A Boltzmann-törvény értelmében a molekulák szobahőmérsékleten alapállapotban (S_0) vannak. Fotonelnyeléssel a molekula nagyobb energiájú elektronállapotba kerül, többnyire egy magasabb rezgési szintre, ezt a besugárzáshoz használt fény energiája határozza meg.



1. ábra A fotofizikai folyamatok Jablonski diagramja. S_n szingulett állapotok, T_n triplett állapotok.

Az abszorpció nagyon gyorsan, általában 10^{-15} s alatt játszódik le [11].

Ha a molekula egy állapot magasabb rezgési szintjére kerül, akkor a gerjesztett molekula nagyon gyorsan (10^{-12} s) átadja rezgési energiáját az oldószernek. Az S_1 állapotból a molekula fotonkibocsátással az S_0 szint több rezgésileg gerjesztett állapotába mehet át, ezért a fluoreszcencia-színkép kisebb energiáknál jelentkezik és az elnyelési színkép tükörképe, amennyiben az S_0 és S_1 állapotok rezgési szintjei közötti energiakülönbségek megegyeznek.

A gerjesztett állapotból kiinduló folyamatok két nagy csoportba sorolhatók, megkülönböztetünk sugárzásos és sugárzásmentes átmeneteket. Sugárzásos átmenetről akkor beszélünk, ha gerjesztett állapot energiavesztése fotonkibocsátással jár, sugárzásmentes átmenet esetében pedig a molekula gerjesztett állapotból fotonkibocsátás nélkül kerül vissza alapállapotba.

Azonos multiplicitású (pl. szingulett-szingulett vagy triplett-triplett) energiaállapotok között fotonkibocsátással fluoreszcencia (F jelölést fogom használni), míg sugárzásmentes átmenettel, belső konverzió (angol kifejezésből származó rövidítését „internal conversion” IC-t fogom használni) jöhet létre. A belső konverzió függ azon energiaállapotok egymáshoz való viszonyától, amelyek

között a folyamat végbemegy. (1) Gerjesztve a molekulát az S_2 állapot magasabb rezgési szintjére kerül. A rezgési relaxáció következtében a molekula elveszti rezgési gerjesztettségét és az S_2 legalacsonyabb rezgési szintjére megy át. Ezt követően belső konverzió megy végbe az S_2 és S_1 állapotok között (vízszintes átmenet), melyet ismét rezgési relaxáció követ az S_1 legalacsonyabb szintjére. A folyamat általában körülbelül 10^{-13} - 10^{-11} s alatt következik be. Ennek a gyors átmenetnek köszönhető, hogy a kezdetben létrejött gerjesztett állapottól függetlenül a legtöbb esetben a gerjesztett állapot és alapállapot közötti átmenet és a primer fotokémiai folyamatok rezgésileg nem gerjesztett S_1 energiaszintről mennek végbe. (2) Ezután a molekula az S_1 legalacsonyabb rezgési szintjéről átmegy az S_0 állapot ugyanolyan energiájú rezgési szintjére (IC). Ezt egy gyors relaxáció követi miáltal a molekula az alapállapot legalacsonyabb rezgési szintjére mehet át. Az $S_1 - S_0$ közötti sugárzásmentes átmenet általában 10^{-11} - 10^{-9} s alatt következik be [11]. Minél kisebb két állapot közötti energiakülönbség, annál hatékonyabban megy végbe közöttük a belső konverzió.

1. táblázat Egyes fotofizikai átmenetek leggyakoribb időtartama [11]:

Átmenet	Fotofizikai folyamat	Időtartam
$S_0 \rightarrow S_n$	Abszorpció	10^{-15} s
$S_n \rightarrow S_1$	IC	10^{-13} - 10^{-11} s
$S_1 \rightarrow S_0$	IC	10^{-11} - 10^{-9} s
$S_1 \rightarrow S_0 + hv_f$	Fluoreszcencia	10^{-10} - 10^{-8} s
$S_1 \rightarrow T_n$	ISC	10^{-14} - 10^{-8} s
$T_n \rightarrow T_1$	IC	10^{-14} - 10^{-11} s
$T_1 \rightarrow S_0$	ISC	10^{-10} - 10^{-4} s
$T_1 \rightarrow S_0 + hv_p$	Foszforeszcencia	10^{-3} - 10^1 s

Különböző multiplicitású (szingulett-triplett vagy tripllett-szingulett), de azonos energiájú gerjesztett elektronállapotok közötti sugárzás nélküli átmeneteket spinváltó átmeneteknek nevezzük (a továbbiakban az általánosan használt

„intersystem crossing” rövidítését, ISC-t fogom használni). A folyamat tipikusan $10^{-10} - 10^{-4}$ s alatt következik be. Különböző multiplicitású állapotok közötti sugárzásos átmenet is végbemehet, ez a foszforeszcencia (P). Ez spintiltott folyamat, mely általában 10^{-3} - 10 s alatt történik. Oldatban a molekula a T_1 állapotból általában sugárzásmentes folyamat során kerül vissza alapállapotba, mivel a foszforeszcencia valószínűsége sokkal kisebb, mint a sugárzásmentes energiavesztése. Ezért a foszforeszcencia sok esetben csak kis hőmérsékleten és/vagy merev környezetben (üvegben) észlelhető, ahol a sugárzásmentes folyamatok jelentősen lassulnak. Mivel a T_1 állapot energiája kisebb, mint az S_1 állapoté, a foszforeszcencia nagyobb hullámhosszú (kisebb energiájú) fényt eredményez, mint a fluoreszcencia.

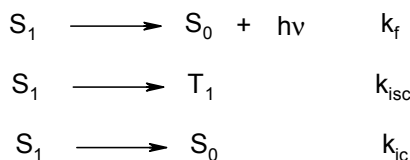
A Jablonski-diagramon feltüntetett fotofizikai változások időtartamait az 1. táblázat tartalmazza.

A felsorolt fotofizikai folyamatokon kívül a gerjesztett molekula energiát veszíthet kémiai átalakulások során, például a kötészakadás, izomerizáció vagy a gerjesztett molekula mikrokörnyezetében található más molekulákkal energia-, proton- vagy elektron-átadás, excimer- és exciplexképződés mehet végbe.

2.3. Kvantumhasznosítási tényezők és a gerjesztett állapot élettartama

Az elnyelt fotonok és a fluoreszcenciaként visszkapott fotonok számának aránya, másképpen a fluoreszcencia kibocsátás és a fényelnyelés sebességének aránya adja a fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőt.

Ha a fotokémiai reakciók sebessége elhanyagolható, akkor egy S_1 gerjesztett állapotban levő anyag az alábbi elsőrendű párhuzamos folyamatokban vehet részt [12]:



ahol k_f a fluoreszcencia kibocsátás sebességi együtthatója,
 k_{isc} a spinváltó átmenet sebességi együtthatója,
 k_{ic} a belső konverzió sebességi együtthatója.

Ha a rendszert stacionárius fényforrás világít meg, és r jelöli a gerjesztés sebességét, ami egységnyi térfogatban egységnyi idő alatt elnyelt fotonok számával egyenlő, valamint az S_1 állapotban a molekula nagyon rövid ideig tartózkodik, akkor felírható a következő összefüggés:

$$d[S_1]/dt = r - (k_f + k_{isc} + k_{ic})[S_1] = 0 \quad (1)$$

$$[S_1] = r / (k_f + k_{isc} + k_{ic}) \quad (2)$$

A fluoreszcencia kibocsátás sebessége $k_f[S_1]$. Akkor a fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője a következő:

$$\phi_f = k_f[S_1] / r \quad (3)$$

a (2) összefüggést behelyettesítve a (3)-ba:

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{isc} + k_{ic}} = k_f \tau_f \quad (4)$$

Vagyis a párhuzamos folyamatok valamelyikének hatásfoka az adott folyamat sebességi együtthatójának és a gerjesztett állapotból kiinduló folyamatokra vonatkozó sebességi együtthatók összegének hányadosa. Hasonlóan megadható a spinváltó átmenet fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője is:

$$\Phi_{isc} = \frac{k_{isc}}{k_f + k_{nr}} = k_{isc} \tau_f \quad (5)$$

A belső konverzió valószínűségére pedig az

$$\Phi_{ic} = \frac{k_{ic}}{k_f + k_{nr}} = k_{ic} \tau_f = 1 - \Phi_f - \Phi_{isc} \quad (6)$$

összefüggés érvényes, ahol $k_{nr} = k_{ic} + k_{isc}$.

A három kvantumhasznosítási tényező értékének összege 1.

A gerjesztett állapot élettartama definíció szerint az az átlagos időtartam, amit a molekula gerjesztett állapotban tölt, mielőtt visszatér alapállapotba.

Figyelembe véve a szingulett gerjesztett állapotból kiinduló lehetséges folyamatokat, a gerjesztő hatás megszűnését követően, a gerjesztett molekula koncentrációjának időbeli változása megadható:

$$-\frac{d[S_1]}{dt} = (k_f + k_{isc} + k_{ic})[S_1] \quad (7)$$

ahol $[S_1]$ a szingulett gerjesztett állapotban levő molekulák koncentrációja, $[S_1]_0$ pedig a kezdeti időpillanathoz tartozó koncentráció, integrálva a kifejezést a következő egyenletet kapjuk,

$$[S_1]_t = [S_1]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) \quad (8)$$

ahol τ_f az S_1 gerjesztett állapot élettartama, ami megadható az alábbi összefüggéssel:

$$\tau_f = \frac{1}{k_f + k_{isc} + k_{ic}} \quad (9)$$

Ha a gerjesztett állapot közvetlenül fényelnyeléssel keletkezik a fluoreszcencia-intenzitás időbeni változása megadható az:

$$I_f = k_f[S_1] = k_f[S_1]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) \quad (10)$$

összefüggéssel. Bármelyik primer folyamat sebességi együtthatója kiszámítható a τ_f és a megfelelő kvantumhasznosítási tényező ismeretében.

2.4. Vizsgált vegyületsaládok

2.4.1. Izokinolinvázú alkaloidok, berberin-klorid

Az alkaloid elnevezés szigorú értelemben véve a természetben növények által termelt, biológiailag hatékony aminokat takar. Számos alkaloidnak gyógyászati hatása van. Az elnevezés az alkáli szóból ered, keserű ízűek, lúgos kémhatásúak. Míg néhány alkaloid mérgező, sok alkaloid érzéstelenítő, fájdalomcsillapító hatású.

Az alkaloidokat a képződésükben fontos szerepet betöltő metabolikus folyamatok alapján csoportosítják. Ha egy vegyület bioszintézise nem ismert, akkor azt a már ismert hasonló szerkezetű vegyületek csoportjába sorolják. Sok alkaloid arról a növényről kapja a nevét, amiből először vonták ki (pl. berberin). Ha egy adott vegyületsaládról újabb kutatási eredmények látnak napvilágot, akkor néha az egész csoport nevét módosítják, hogy még jobban tükröződjének az új ismeretek. Általában egy a szintézis folyamatában fontos szerepet betöltő biológiailag fontos aminról kapja a csoport az új nevet.

A berberin egy természetes izokinolinvázú alkaloid. Az izokinolin benzo[c]piridin illetve 2-benzanin néven is ismert. Heterociklusos aromás szerves vegyület, mely csatolt benzol és piridin gyűrűt tartalmaz. Több ismert és gyógyászatban alkalmazott vegyület tartozik még az izokinolinvázú alkaloidok családjába, ilyen például a gyomorgörcsökre, illetve simaizomrelaxánsként alkalmazott papaverin, a fájdalomcsillapításra használt morfin vagy a köhögéscsillapító hatású kodein.

Hoogewerff és van Dorp 1885-ben izolálta először az izokinolint szénkátrányból frakcionált kristályosítással [13]. 1914-ben Weissgerber egy sokkal könnyebb és gyorsabb eljárást ír le a vegyület kipreparálására. Kihasználva, hogy az izokinolin sokkal bázikusabb, mint a kinolin, szelektív extrakciót, majd ezt követően frakcionált kristályosítást alkalmazott [14].

A berberin egy növényi eredetű alkaloid, mely számos kínai főzetben előfordul. Megtalálható a *Berberis* növénycsaládhoz tartozó növények szinte minden tagjában, valamint a *Coptis chinensis*, *Chelidonium majus* L. és *Hydrastis canadensis* L. növényekben, valószínűleg innen is kapta a nevét. Néhány növény képe látható a 2. ábrán. A *Berberis* növények többnyire sárgán virágoznak és gyümölcük bíborpiros. Gyümölcük ehető, lekvárt készítenek belőle. A berberint erős sárga színe miatt gyapjú és bőr színezésére használták. UV-fénnyel megvilágítva a berberin sárgán fluoreszkál [15].



2. ábra *Berberis darwinii*, *Berberis thunbergii*, *Hydrastis canadensis* L.

Habár a berberint tesztelték cukorbetegség, prosztatarák [16], szívritmuszavar [17] és leukémia kezelésére [18], azonban klinikai kipróbálására még nem került sor e betegségek kapcsán. Vírusos megbetegedések ellen kiváló [19], baktériumellenes hatása is ismert [20], lázcsillapító [21], valamint nem utolsósorban a koleszterinszint is szabályozható segítségével [22].

Számos származékát előállították annak érdekében, hogy feltérképezzék milyen szubsztituensek miként módosítják az alapvegyület antibakteriális hatását [20]. Megállapították, hogy a *Staphylococcus aureus* baktériummal szemben a 13-etil-9-etoxi-berberin származék baktériumellenes aktivitása nyolcszor nagyobb, mint az alapvegyületé. Az antibakteriális hatásban domináns szerepet kap a kvaterner nitrogénatom, egy alkilszubsztituens beépítése a 13-as helyzetbe, valamint növeli az aktivitást, ha a 2 illetve 3-as helyzetben a metoxicsoportot metilén-dioxidra cserélik (7. ábrán a Berberin szerkezeti képlete látható). A

vegyületen végrehajtott szubsztitúciók jelentősen nem módosítják az aktivitást az *Escherichia coli* és *Candida albicans* baktériumokkal szemben.

A *Hydrastis canadensis* L. (Goldenseal) növény szárított gyökerét használták sebek, fekélyek valamint szem- és bőrbetegségek kezelésére [23]. E növényben az alkaloidok közül a berberin van a legnagyobb mennyiségben jelen. Mivel a berberin kölcsönhatásba lép a DNS-sel [24], fontos tudni, hogy a vegyület fény hatására bomlik-e, illetve fotokémiaiilag iniciál-e különféle káros folyamatokat. Néhány közleményben vizsgálták a berberint annak érdekében, hogy jobban megismerjék biológiai aktivitását, citotoxikus hatásának mechanizmusát [25-27].

Szilikagélre impregnált berberin-szulfát fluoreszcencia-intenzitása jelentősen megnő alkánok illetve kis polaritású vegyületek jelenlétében [28, 29], így alkalmazható vékonyréteg-kromatográfiás jelzőanyagként.

Fluoreszcencia-intenzitása diklór-metánban a metanol móltörtjének függvényében maximumgörbe szerint változik, míg a dekán koncentrációjának fokozott növelésével monoton csökkenés tapasztalható [30].

A berberint különböző vegyületek mennyiségi kimutatására használják, mivel fluoreszcenciás sajátságai érzékenyen reagálnak e komponensek jelenlétére [30].

Jun-Sheng Yu és munkatársai berberin és ciklodextrin (CD) közötti komplexálódást vizsgálták vizes közegben [31]. Abszorpciós és fluoreszcenciás vizsgálatokkal 1:1 komplexálódást mutattak ki. Igazolták, hogy fontos szerepet játszik a makrociklus gyűrűjének mérete a komplex kialakulásában, hisz ugyanolyan körülmények között a jóval kisebb méretű α -CD-nel (átmérő 4,5 Å) képződő komplex egyensúlyi állandója $K=60 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3$, míg a β -CD-nel (7,0 Å) alkotott komplexre költött érték 2,3-szor nagyobb. A berberin abszorpciós színeképében β -CD jelenlétében enyhe fényelnyelést csökkentő hatást és kék eltolódást tapasztaltak, miközben a fluoreszcencia-intenzitás tízszeresére nőtt. A komplex fluoreszcencia-intenzitása az oldat pH-jának függvényében maximumgörbe szerint változott, a legnagyobb értéket pH=7,2-nél tapasztalták.

A berberin gyógyászati alkalmazásának szempontjából két kedvezőtlen tulajdonsággal rendelkezik, egyrészt rosszul oldódik vízben, másrészt nagyon keserű ízű. Amikor a berberin a ciklodextrin üregébe ékelődik a vegyület oldékonysága megnő és kevésbé lesz keserű, miközben a gombaölő sajátsága nem változik [32].

A berberin nagy orvosi, biológiai jelentősége ellenére nagyon kevés információ áll rendelkezésre a fényelnyelést követő reakcióiról és fotofizikai sajátságairól. Ez különösen meglepő, hiszen több alkaloidról ismert, hogy fény hatására bomlik és fototoxikus. E farmakológiai aktív vegyület sikeres, biztonságos alkalmazásához alapvető fontosságú a fotokémiai átalakulásai feltárása, és annak megértése, hogy fény hatására milyen kedvezőtlen folyamatokat indítanak az élő szervezetben.

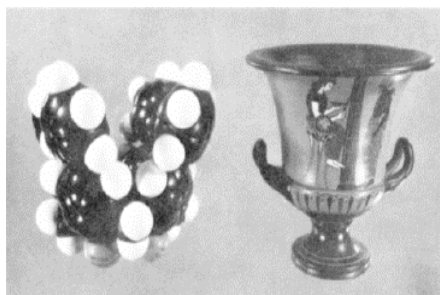
Maurice O. Iwunze kimutatta, hogy a berberin fluoreszcencia-intenzitása maximumgörbe szerint változik a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) koncentrációjának függvényében vízben. A kezdeti növekedést az ionpárképződésnek tulajdonították, majd az SDS aggregátumok megjelenésével csökken az intenzitás és határértéket ér el a kritikus micellaképződési koncentrációnál [33]. A berberin iontranszportgátló, kálium ioncsatorna-blokkoló sajátságokkal is rendelkezik, és csökkenti a kloridion kiválasztását [34, 35]. Ezért fontos feltárni a berberinkation és különféle anionok kölcsönhatását is.

2.4.2. Kalixarének

Ionok, biológiai jelentőségű vegyületek analitikai kimutatása a szupramolekuláris kémia egyik gyorsan fejlődő ága [36, 37]. A szulfonátok kalixarének a szupramolekuláris kémia egyik alapvető fontosságú vegyületcsaládjá, mivel a vegyület jól oldódik vízben, és számos biológiai, farmakológiai hatása ismert valamint analitikai célokra is alkalmazható [38].

A makrociklusos vegyületek, mint például a β -ciklodextrinek, koronaéterek, kriptandok, valamint a kalixarének képesek magukba foglalni más ionokat vagy molekulát, mint például, kisméretű szerves anyagokat, aminosavakat, sőt peptideket is.

A kalixarének felfedezésével kapcsolatos első közleményt 1872-ben Adolph von Bayer írta fenol és formaldehid közötti reakciót vizsgálva nem sikerült izolálnia a terméket, és egyszerűen csak cementhez hasonló vegyületként jellemezte [39]. 1894-ben Lederer és Manasse-nek sikerült hasonló reakcióból izolálniuk egy kristályos anyagot, amelyben egyidejűleg jelen volt az orto és para hidroxil-metil-fenol [40, 41]. Nyilvánvalóan a két izomer jelenléte az orto és para helyzet hasonló aktivitásának tudható be. Zinke és Ziegler 1944-ben ezt a problémát a para helyzet blokkolásával oldotta meg, para-terc-butil-fenolt használt [42]. 1955-ben jelenik meg az első közlemény, mely a kalixarének biológiai hatását teszi közzé. Ebben Cornforth az etilén-glikol szubsztituált para-oktil-kalix[8]arén tüdőbaj (TBC) elleni hatását mutatja be, noha a molekula egzakt szerkezete még mindig ismeretlen volt [43].



3. ábra Kalix[4]arén szerkezete.

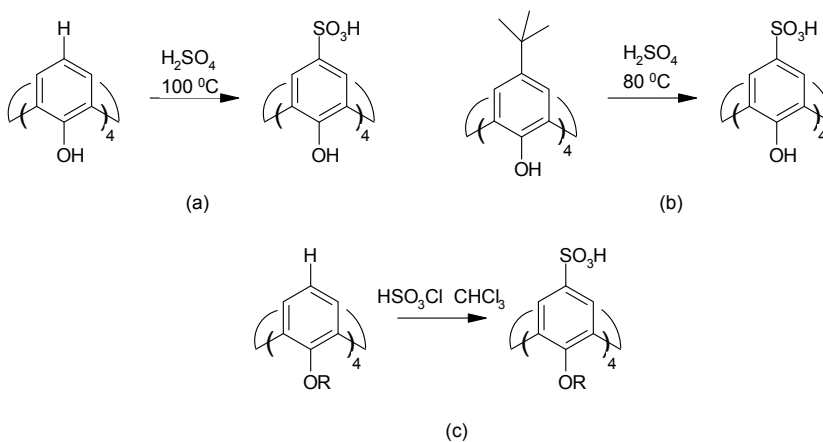
Az 1980-as években Gutsche NMR-mérésekkel igazolta a makrociklusos szerkezetét [44]. Ő javasolta a kalixarén triviális elnevezését. Hasonlóságot látott egy ősi görög kehely és a molekula alakja között. „Calix” görögül kelyhet jelent, természetesen az arén pedig arra utal, hogy aromás gyűrűkből áll a vegyület.

A kalixarének a fenolok orto kondenzációjával képződnek formaldehid jelenlétében, katalizátorként szervesetlen bázist használnak általában.

Egyes kalixarének biológiai hatása is ismert, vírusos megbetegedések ellen, valamint trombózis gyógyítására használhatók [45]. Azonban gyógyászati alkalmazásuknak gátat szab az, hogy vízben teljesen oldhatatlanok, ezért a szerkezetüket kémiai módon módosítani kell, vízben oldhatóvá kell tenni. Könnyebb a kalixaréneket módosítani, mint a természetes szupramolekuláris vegyületet, a ciklodextrineket, sőt nagy előnyük, hogy kevésbé mérgezőek az előbb említett vegyületsaládnál [38].

Az 3. ábrán egy négy fenol egységből álló kalixarén látható. Három lehetőség van, ahol módosíthatjuk a vegyületet: fenolos OH-n, a fenolos OH-tól para helyzetben, valamint a metilénhidat változtathatjuk.

Több kísérlet folyt, hogy vízben oldhatóvá tegyék a molekulát, karbonsavcsoportot, amidcsoportot építettek a fenolos OH-n keresztül, vagy ezzel átellenesen a molekulára, így mmol dm^{-3} nagyságrendűleg vált vízben oldhatóvá. $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ körüli oldhatóságot értek el, ha para helyzetben szulfonálták a kalixarént [38]. Az irodalomban három módszer ismert a kalixarének szulfonálására, hogy melyik módszert alkalmazzák, azt elsősorban a makrociklus természete határozza meg.



4. ábra A kalixarének szulfonálása: (a) közvetlen szulfonálás, (b) ipso-szulfonálás, (c) kloro-szulfonálás.

Közvetlen szulfonálás esetén (a) a kalixarénhez kénsavat adva, a rendszert $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon tartva, szubsztitúciós reakción keresztül képződik a szulfonáto-kalixarén [46,

47]. Ipso-szulfonálás során (b) a terc-butil-kalixarénből kiindulva kénsav jelenlétében, 80 °C-on szulfonálható a kalixarén, ez gyakran nem teljes, és csak a kalix[8]arén szulfonálására javasolják [48]. A klórszulfonálást (c) kénsavra érzékeny vegyületeknél alkalmazzák, kloroformban klórkénsav jelenlétében hajtják végre, melyet elsősorban a hidroxiszubsztituált származékok szulfonálására használnak [49, 50].

Bár a kalixarének szintetikus molekulák, azonban a természetben ciklikus és nem ciklikus analógjaik is előfordulnak. Talán a legközelebbi természetben előforduló analógjuk a makrociklusos bróm-ciklotriverilent, melyet 1978-ban Combaut algából izolált [51].

A kalixarén és vendégmolekula közötti kölcsönhatást (figyelmen kívül hagyva a vendégmolekula szerkezetét) elsősorban a gyűrű mérete és az oldat pH-ja szabja meg. Különböző számú fenolegységekből álló kalix[n]arén gyűrűméreteit foglalja össze a 2. táblázat.

2. táblázat Kalix[n]arének gyűrűinek, elméleti számítások alapján feltételezett paraméterei [38].

Vegyület	Átmérő (nm)	Magasság (nm)
kalix[4]arén	0,59	1,17
kalix[6]arén	0,49	1,62
kalix[8]arén	0,92	2,24

A fenolegységeket összekötő metilénsoport lehetőséget teremt különböző izomerek, konformerek kialakulására. A négy fenolegységből álló kalixarénnek négy konformere létezik, a kalix[6]arénnek nyolc, míg a kalix[8]arénnek tizenhat konformere van [52].

A para-szulfonáto-kalixarének vízben nem vagy nagyon rosszul oldódó vegyületek, gyógyszerek, mint például a nifedipin segítségével vízben oldhatóvá tehetők. Megfigyelték, hogy minél nagyobb a gyűrűméret, annál nagyobb oldékonyságnövekedés érhető el [53].

A para-szulfonáto-kalixaréneket, jelentős biológiai fontossága folytán, széleskörűen tanulmányozták. Kimutatták, hogy a kationos oxazin-1 festék az SCX8-al nemcsak 1:1, hanem 2:1 sztöchiometriájú komplexet is képez [54]. A fullerén a hat fenolegységből álló szulfonáto-kalixarénnel 1:1, míg a jóval kisebb gyűrűméretű para-szulfonáto-tiokalix[4]arénnel 1:2 összetételű komplexet alkot [55].

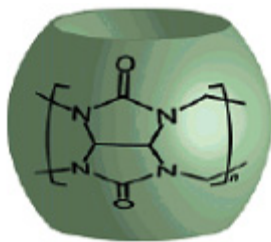
A vizsgált vegyületek túlnyomó többségében a vendégmolekula fluoreszcenciája kioltódik, amikor a szulfonáto-kalixarénbe ékelődik [54, 56-58]. Annak ellenére, hogy a szerves vegyületek asszociációját széleskörűen vizsgálták szulfonáto-kalixarénekkal, csak egyetlen közleményt találtunk, amelyben a komplexálódás fluoreszcencia-intenzitás-növekedéssel járt (Auramin O festék) [59]. Alkaloid és kalixarén közötti kölcsönhatást még nem vizsgálták.

2.4.3. Kukurbituril

A makrociklusos vegyületek szupramolekuláris komplexképződését széleskörűen alkalmazzák a nanotechnológiában különböző analitikai eljárások, szenzorok, fluoreszcenciás próbák tervezésekor, valamint a hidrofób vegyületek oldékonyságának a növelésére [60-62].

Mock, Freeman és Shih kukurbiturilnak nevezték el a glikoluril és formaldehid kondenzációja során képződő ciklikus hexamert [63]. A vegyület triviális neve onnan ered, hogy a fent említett szerzők hasonlóságot láttak a *cucurbitaceae* családba tartozó sütőtök alakja és a kukurbituril szerkezete között (5. ábra).

A Mock és munkatársai által adott triviális nevet később Flinn és munkatársai kiterjesztették, mivel kukurbiturilszármazék előállításában dimetilszubsztituált glikolurilt felhasználva túlnyomórészt ciklikus pentamert és nem hexamert kaptak, amit dekametil-kukurbit[5]urilnak neveztek el [64], így az eredeti kukurbituril neve kukurbit[6]urilra módosult.



5. ábra Kukurbit[n]uril makrociklus.

A vegyület általános képlete a kukurbit[n]uril, ahol n a glikoluril egységek számát jelöli. A közelmúltban előállítottak különböző méretű, 5, 6, 7, 8 és 10 glikoluril egységből álló kukurbiturilt. [65, 66].

Ezek a vegyületek természetesen eltérő gyűrűmérettel rendelkeznek és különböző az oldékonyságuk is. Az 3. táblázat a kukurbit[n]uril ($n= 5, 6, 7, 8$) gyűrűjének paramétereit mutatja.

3. táblázat A különböző tagszámú kukurbituril makrociklusok gyűrűinek paramétereit.

	CB5	CB6	CB7	CB8
Üreg bejáratának átmérője (nm)	0,24	0,39	0,54	0,69
Üreg belső átmérője (nm)	0,44	0,58	0,73	0,88
Üreg térfogata (nm ³)	0,08	0,16	0,28	0,48
Üreg külső átmérője (nm)	1,31	1,44	1,60	1,75
Magassága (nm)	0,91	0,91	0,91	0,91

Érdemes megjegyezni, hogy nincs bizonyíték 5-nél kisebb gyűrűtagszámú kukurbituril létezésére, valamint a legnagyobb méretű analóg, amit eddig izoláltak, tíz glikoluril egységből áll [67].

Behrend és munkatársai állították elő elsőként a CB6-ot már több, mint 100 évvel ezelőtt, de szerkezetét nem tudták meghatározni, csak az összegképletét közölték, C₁₀H₁₁N₇O₄. Kimutatták, hogy komplexet képez aminosavakkal és festékekkel [68]. A CB6 szerkezetének meghatározása 1981-ig váratott magára.

Röntgendiffrakciós módszerrel kimutatták, hogy jól meghatározott elrendezésű gyűrűkből épül fel, melyben a glikoluril egységek ismétlődnek, melyet két metilénsoport választ el egymástól [63].

A karbonilcsoportokkal szegélyezett gyűrű bejáratának átmérője körülbelül 0,2 nm-el kisebb, mint a gyűrű belső átmérője, ami a vendégmolekula kötődését illetve disszociációját szterikusan jelentősen befolyásolja (3. táblázat) [69].

Mivel a glikoluril egységek karbonilcsoportjain nagy a negatív töltéssűrűség, valamint az a tény, hogy az üreg belső felülete hidrofób jellegű [70], a kukurbituril előszeretettel kötődik fémionokhoz, valamint szerves kationokhoz, mint például protonált aminokhoz illetve piridiniumsókhoz [71, 72]. Kukurbiturilba beékelődve a vendégmolekula kémiai és spektroszkópiai sajátosságai változhatnak, fotostabilitása növekedhet [73, 74], sztereoszelektív fotodimerizáció mehet végbe [75, 76].

Számos módszert használtak, a gazda- és vendégmolekula közötti kölcsönhatás vizsgálatára CB6 esetén. $^1\text{H-NMR}$ spektroszkópiai vizsgálatok azt igazolták, hogy CB6 komplexálódása során az üreg belsejében levő vendégmolekula protonjainak jele a nagyobb térerő irányába, míg az üreg külső részén levő protonok által adott jel a kisebb térerő irányába mozdul el [71, 77, 78].

Amennyiben a vendégmolekula elnyelési színe komplexálódás hatására számottevően változik, akkor a komplex egyensúlyi állandója meghatározható UV-látható elnyelési spektroszkópia segítségével. Mock és munkatársai ezzel a módszerrel határozta meg a CB6 és 4-metil-benzil-ammóniumion között létrejövő komplex stabilitását.[71; 77-80].

Az anilino-naftilin-szulfonát fluoreszcencia-intenzitása CB7-be ékelődés hatására nő, amit a 2,6 izomer esetén a fenilrész beágyazódásával magyaráztak. Az 1,8-anilino-naftilin-szulfonát esetében viszont azt tapasztalták, hogy a vendégmolekula két CB7 makrociklus külső felülete közzé ékelődik be, miközben 2:1 komplex jön létre [81].

Bár a kukurbituril az önszerveződő rendszerek körében igen nagy érdeklődésnek örvend, kevés adat van az irodalomban arról, hogy miként

módosítják a különféle jelzőanyagok fluoreszcenciás sajátságait. Egy nemrég megjelent közlemény kitűnő áttekintést ad a festék-kukurbituril komplexekről és a festék komplexálódás hatására bekövetkező fluoreszcenciás sajátságainak változásáról [82]. Feltételezésük szerint a Dapoxyl festék beékelődik a kukurbit[7]uril üregébe, aminek következtében egy új fluoreszcenciasáv jelenik meg az emissziós spektrumban. A Dapoxyl–CB7 rendszer felhasználható enzimek kimutatására enyhén savas közegben [83].

A protonált 2-amino-antracén savassága úgy alap-, mint gerjesztett állapotban csökken, ha CB7-be ágyazódik be, melynek eredményeként az emissziós színek zöldből kékbe tolódik el [84]. Kimutatták, hogy a gombaölő hatással rendelkező metil-2-benzimidazol fluoreszcenciaintenzitása 10-szeresére növekszik, amikor kukurbit[6]uril-ba ékelődik [85], míg a 2,7-dimetil-diaza-pirén és kukurbit[7]uril közötti kölcsönhatás során csak 45%-os fluoreszcencia-intenzitás-növekedés volt megfigyelhető [86]. A többi vizsgált vegyület fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőjének értéke is hasonló mértékben változott [82, 87].

A 2,3-diaza-biciklo[2.2.2]okt-2-én-nak (DBO) a fluoreszcencia kibocsátási sebességi együtthatója CB7-ben kisebbnek bizonyult, mint vízben [88, 89], azonban ellenkező hatást tapasztaltak „Neutral red” (Semleges vörös) festék esetében, valamint ennek protonált formájánál [90].

A DBO-val jelölt biomolekula CB7-be ékelődve rendkívül nagy fluoreszcencia-élettartammal rendelkezik, valamint igen ellenállóvá válik kioltókkal szemben [91]. Jelentős fluoreszcencia-intenzitás-növekedést értek el, ha egy trifenil-metán típusú „Brilliant Green”-nevű fluoreszcenciás festék oldathoz szarvasmarhából kivont fehérjét és CB7-et adagoltak, miközben külön-külön nem módosítják jelentősen a festék fluoreszcenciáját [92].

A vizsgált vegyületek és CB7 között képződő komplexek egyensúlyi állandója csökkent a hozzáadott szervesetlen sók, mint például nátrium-klorid hatására, amit a karbonilcsoport negatív töltésű oxigénatomja és a nátriumion közötti kölcsönhatásnak tulajdonítottak [93-95].

2.4.4. Epesavak

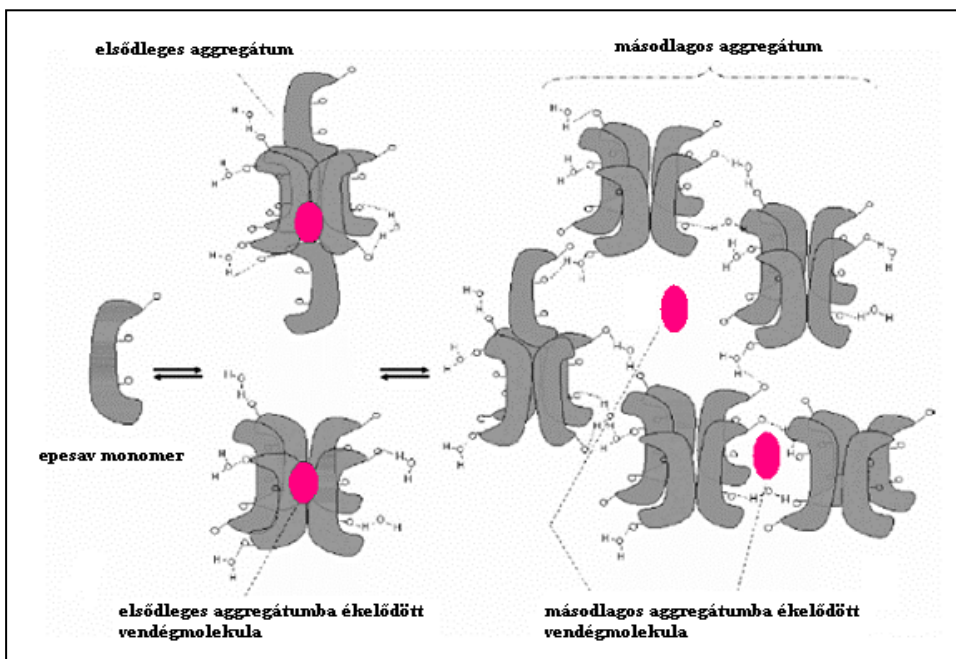
Az epesavak az egyik legismertebb és talán legfontosabb természetes felületaktív anyagok. A máj termeli a koleszterin enzimes átalakításával. Fontos szerepet töltenek be az elő szervezetben, részt vesznek az emésztés folyamatában, nélkülük a zsíremésztés tökéletlen. A bélbe jutó epesavak zsírfölszívódást lehetővé tevő hatásuk révén gondoskodnak a zsírban oldódó vitaminok fölszívódásáról, majd a vérben is keringő epesavak segítségével eljutásáról a vérből a sejtfal kettős zsírféhrje rétegén keresztül a sejtbe, a vitaminok igazi célállomásához.

A vegyület amfifil karakterű, ez a szteroidváz konkáv illetve konvex oldalának eltérő polaritásából ered. A konkáv, hidrofil rész hidroxilcsoportokat tartalmaz, melyeknek száma, iránya és helyzete jelentősen befolyásolja a fizikai-kémiai sajátságokat. A hidrofób rész metilcsoportokkal szubsztituált. Ennek az egyedi szerkezetnek köszönhetően teljesen másként viselkednek vizes közegben, mint a hagyományos felületaktív anyagok, mint például a nátrium-dodecil-szulfát.

Reis és munkatársai 6,1; 7,3; illetve 5,9 mmol dm⁻³ mértek a nátrium-kolát (NaC) „cmc” értékére 0,1 mol dm⁻³ NaCl-ot tartalmazó oldatban szobahőmérsékleten három különböző módszerrel (derivatív spektrofotometria, potenciometria, fényszórás light scattering) [96]. Matsuoka és Moroi statikus fényszórás módszerrel két „cmc” értéket találtak (6,2 és 12,8 mmol dm⁻³) [97]. A fagyáspontcsökkenés-mérések alapján arra következtettek, hogy 0,016 mol kg⁻¹ NaC alatt nem következik be aggregáció [98]. Kalorimetriás méréssel illetve potenciometriával 10 mmol dm⁻³ illetve 11 mmol dm⁻³ értéket találtak a NaC „cmc” értékére 0,1 mol dm⁻³ NaCl-ot tartalmazó oldatban [99, 100].

Az epesav-aggregátumok azon sajátsága, hogy magába foglalhat különböző szerves vendégmolekulákat, lehetővé teszi fotoindukált reakciók szelektivitásának növelését [101], valamint vízben gyengén oldódó gyógyszerek oldhatóvá tehetők segítségükkel [102]. Bohné és munkatársai igazolták, hogy ellentétben a hagyományos micellákkal és makrociklusos gazdamolekulákkal, az epesav-aggregátumok két, jól meghatározott, különböző tulajdonságokkal rendelkező

kötőhellyel rendelkeznek [103]. A hidrofób molekulák az elsődleges aggregátumokba ékelődnek be, mely megfelelő védelmet nyújt a különböző kioltókkal szemben [104]. Az elsődleges aggregátumba ékelődő vegyület kötődésének dinamikája lassú és függ a vendégmolekula méretétől [105, 106]. Kimutatták, hogy azon vegyületek, melyek hidrogénkötés kialakítására képesek, a másodlagos aggregátumokhoz kapcsolódnak. Mivel ez a szerkezet sokkal lazább, a vízben lévő reaktánsok számára könnyebben hozzáférhető. A vendégmolekula alakja, mérete és hidrofób jellege jelentősen befolyásolja az asszociáció hatékonyságát, dinamikáját, valamint befolyásolja kioltókkal szembeni védelmet gerjesztett állapotban [103-109]. Igazolták, hogy az acetonitril megváltoztatja a vendégmolekula oldékonyságát és módosítja a vegyület tartózkodási idejét az epesav aggregátumokban [110].



6. ábra Small és munkatársai által az epesav-aggregációra felállított kétlépcsős asszociációs modell.

Korábban az epesav-aggregációt főként semleges aromás vegyületekkel tanulmányozták, sokkal kisebb figyelmet fordítottak a kationt tartalmazó

vendégmolekula és epesav közötti kölcsönhatásra. Annak ellenére, hogy az alkaloid és epesav közötti kölcsönhatás biológiai szempontból fontos lehet, az irodalomban nem találtunk erről szisztematikus vizsgálatokat.

Small és munkatársai kétlépcsős asszociációs modellt javasolnak az epesavak aggregációjára [111-113]. Az elsődleges aggregátumok kevesebb, mint tíz monomerből tevődnek össze. Ezekben a részecskékben a konvex hidrofób részek egymás felé fordulva vonzzák egymást, míg a poláris hidroxilcsoportok kifelé állnak. Nagyobb epesavkoncentrációknál az elsődleges aggregátumok között hidrogénkötések alakulnak ki, és ezek képezik a másodlagos aggregátumokat (6. ábra).

Mivel a berberin szerkezetében úgy hidrofil (ionos vegyület) mint hidrofób (aromás) rész is van, nagy valószínűséggel úgy az elsődleges, mint a másodlagos aggregátumokba is be fog ékelődni. Az irodalomban még nem közöltek olyan jelzőanyagot, mely elsődleges és másodlagos epesav-aggregátumokhoz egyaránt képes kötődni.

3. Felhasznált vegyszerek és alkalmazott mérési módszerek

3.1. Felhasznált vegyszerek

E fejezetet elsőként a munkám során felhasznált anyagok bemutatásával kezdem, melyek szerkezeti képletét 7-11. ábrákon tüntettem fel.

A vizsgálatainkhoz szükséges berberin-klorid alkaloidot (Sigma) használat előtt szilikagél (Merk) oszlopon kromatografáltuk, etanolt használva eluálószerként. A mérésekhez minden nap friss törzsoldatot készítettem. Meghatároztam a berberin moláris abszorpciós együtthatóját metanolban és a továbbiakban ebből ($\epsilon_{421}^{MeOH} = 5387 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) az értékből számítottam a koncentrációt.

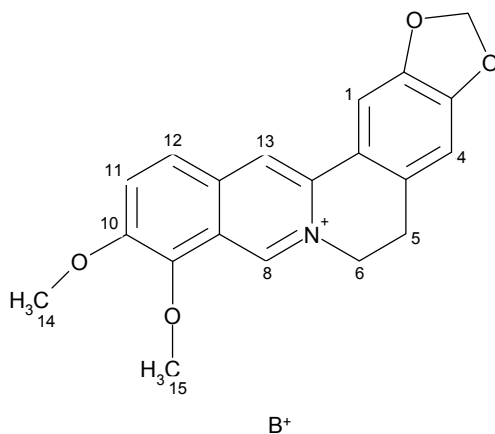
A berberin és kalixarén közötti kölcsönhatás vizsgálatára a mérésekhez 4-szulfonáto-kalix[4]arént (SCX4) (Fluka), 4-szulfonáto-kalix[6]arént (SCX6) és 4-szulfonáto-kalix[8]arént (SCX8) (Acros Organics) használtunk. SCX8, SCX6, SCX4 makrociklusok 1:21, 1:13, és 1:19 sztöchiometriájú vizet tartalmaznak. A 4-szulfonáto-kalix[6]arént felhasználás előtt faszénnel kezeltük és metanolból átkristályosítottuk, a másik kettőt tisztítás nélkül alkalmaztuk.

A kukurbit[7]urilt (CB7) (Aldrich) és az 1-butil-3-metil-imidazolium-kloridot ([C4Mim]Cl) (Fluka) felhasználás előtt több napon át vákuumban szárítottuk.

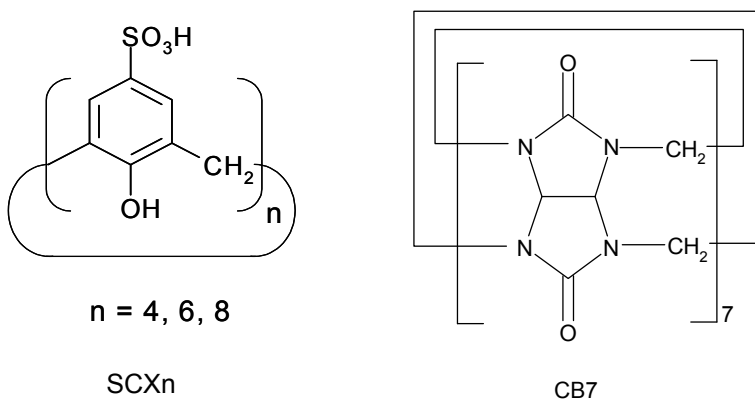
A nátrium-kolát (NaC) epesavat az Aldrich cégtől vásároltuk.

A tetrabutil-ammóniumsókat, bisz(trifenil-foszfin)iminium-kloridot tetrabutil-ammónium-kloridot és -perklorátot (Aldrich) minden további tisztítás nélkül használtuk.

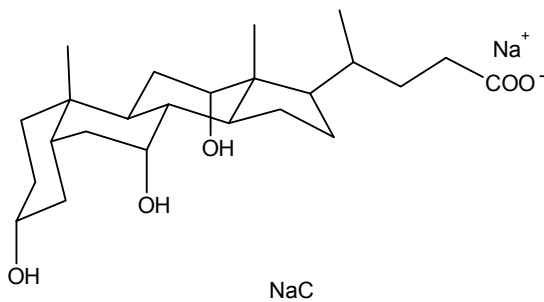
A felhasznált oldószereket az Aldrich, Fluka, Merck cégektől vásároltuk és HPLC minőségűek voltak.



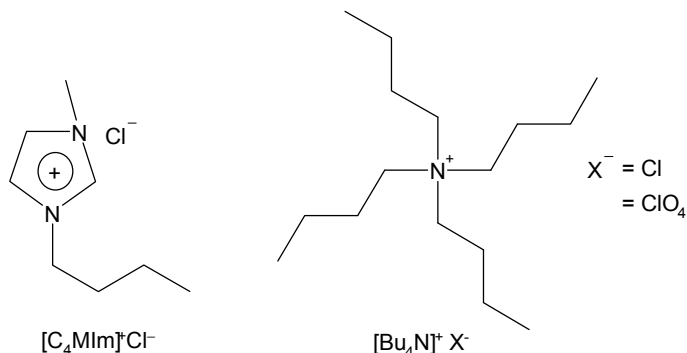
7. ábra A berberinkation szerkezeti képlete.



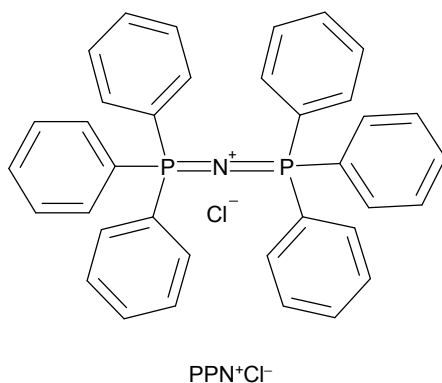
8. ábra A felhasznált makrociklusos vegyületek. Az ábrán balról-jobbra haladva: különböző gyűrűtátságú 4-szulfonáto-kalixarének, illetve kukurbit[7]uril.



9. ábra A nátrium-kolát szerkezeti képlete.



10. ábra Az alkalmazott ionfolyadék (1-butil-3-metil-imidazólium-klorid) és tetrabutil-ammóniumsók.



11. ábra A bisz(trifenil-foszfin)iminium-klorid szerkezeti képlete.

3.2. Mérési módszerek

3.2.1. Elnyelési színeképek felvétele

Az elnyelési színeképeket egy Unicam UV 500 kétsugaras spektrofotométerrel 200-600 nm hullámhossztartományban vettem fel, 1 nm felbontással. A kedvezőbb jel-zaj viszony eléréséért 120 nm / perc léptetési sebességet alkalmaztam. A felhasznált kvarcküvettek úthossza 1 illetve 5 cm-es volt. A kétsugaras készülékeknél a fényforrásból kilépő fényt két fényútra bontják, amelyekből az egyik a referenciaoldaton, a másik a mintán halad keresztül, ezzel kiküszöbölhető a fényforrás esetleges ingadozásából származó hiba, sőt az

adalékanyag elnyelése is könnyedén kivonható amennyiben referenciaoldathoz is fokozatosan, ugyanolyan mértékben adagoljuk az adalékanyagot.

A spektrumok kiértékelését a műszerhez vásárolt Vison 32 nevű programmal végeztem.

3.2.2. Emissziós színeképek felvétele

Az emissziós színeképeket egy fotonszámolásos detektálást alkalmazó, Jobin Yvon Fluoromax-P nagy érzékenységgű spektrofluoriméterrel vettem fel. A fényforrás egy 150 W-os OSRAM gyártmányú xenonlámpa.

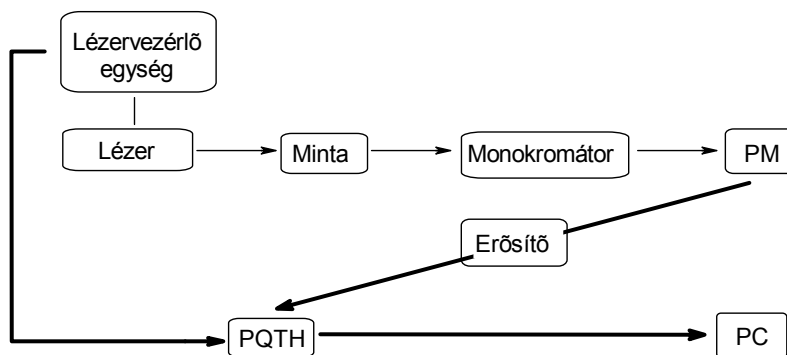
A kedvezőbb jel-zaj viszony elérése érdekében a színeképeket 1 nm/s sebességgel rögzítettem. A fluoreszcenciaspektrumot a fotoelektronsokszorozó és a monokromátor hullámhosszkarakterisztikája torzítja. A spektrumok korrigálását a gyártó cég által biztosított szoftverbe épített korrekciós függvényekkel végeztem. A berendezéssel 5×10^{-4} fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőjű anyagok még jól mérhetők.

3.2.3. Fluoreszcencia-intenzitás időfüggésének mérése

A szingulett gerjesztett molekulák élettartama általában 10 ps és 100 ns közötti időtartományba esik. Az élettartamméréseket lézerből vagy villanólámpából jövő impulzus-besugárással végzik, melyek impulzusszélessége gyakran összemérhető a fluoreszcenciaélettartammal. Így rögtön két probléma tárul elénk, az egyik az impulzusok időbeli kiterjedtségének (szélességének és alakjának) meghatározása, a másik pedig a lézerpulzusok segítségével végzett mérések során eltelt, az impulzusszélességgel összemérhető idő mérése. Ilyen élettartamok mérésére egyik használt eljárás az időkorrelált elsőfoton-számlálás módszere [114]. A mérésekhez használt berendezés vázlata a 12. ábrán látható.

Gerjesztő fényforrásként a Picoquant által forgalmazott 372 illetve 400 nm hullámhosszú diódalézereket használtam. A minta fluoreszcenciáját a gerjesztő fény beesési irányára merőlegesen elhelyezett Oriel monokromátorhoz csatlakoztatott, hűthető, Hamamatsu R3809U-51 fotoelektron-sokszorozó érzékelt. A detektálandó hullámhosszakat a fluoreszcencia-színkép ismeretében monokromátorral választottam ki. A keletkező jel egy erősítőn keresztül kerül a Picoquant Timeharp 100 egységbe.

A lézervezrlő egység kívánt frekvencián villogtatja a lézert. A villanással egyidőben elindítja a belső kondenzátor feltöltődését (START jel). A fényimpulzus által gerjesztett minta fluoreszkálni kezd. A detektált első foton leállítja a kondenzátor feltöltődését (STOP jel).



12. ábra Fluoreszcenciaélettartam mérésére használt berendezés sematikus rajza.

PM: fotoelektron-sokszorozó, PQTH: Picoquant Timeharp elektronika, PC: számítógép,
vékony vonal: optikai jel, vastag vonal: elektronikus jel.

Így a kondenzátoron levő feszültség arányos a START és STOP jel között eltelt idővel. A szoftver a sokcsatornás analízátor ennek az időnek megfelelő csatornájában eggyel növeli a beütésszámot. A leírt folyamat addig ismétlődik, amíg az így keletkező hisztogram a kívánt pontossággal írja le a minta fluoreszcencia lecsengési görbét.

Ha a villanás félértékiséssége és az élettartamok hasonló nagyságrendbe esnek, az észlelt időfüggést a berendezéssel mérhető gerjesztő fényintenzitás időfüggése ($H(t)$), és a valódi lecsengés ($G(t)$) konvolúciójából kapjuk.

$$I(t) = \int_0^t G(t-t')H(t')dt' \quad (11)$$

A $H(t)$ függvényt közvetlenül mérni lehet, ha fényszóró oldatot (LUDOX-ot) helyeztünk a mintatartóba a minta helyére. Az $I(t)$ és a $H(t)$ ismeretében pedig rekonvolúciós módszerrel [115] kiszámíthatók a valódi lecsengési paraméterek.

A számításokat a Picoquant FluoFit programmal, nemlineáris legkisebb négyzetösszeg rekonvolúciós módszerrel végeztem. A fluoreszcencia-lecsengésekre egy, két illetve három ($i=1, 2, 3$) exponenciális tagot tartalmazó függvényeket illesztettem,

$$I(t) = \sum_{i=1}^n (A_i * e^{-\frac{t}{\tau_i}}) \quad (12)$$

így megkaptam a τ_i élettartamok valamint a A_i preexponenciális tényezők értékét. Az illesztés jóságát a χ^2 paraméter és a maradékérték ($r(t_i)$) eloszlása alapján ítélt meg [114].

$$\chi^2 = \frac{1}{N-p} \sum_{i=1}^N \frac{[I_m(t_i) - I_{sz}(t_i)]^2}{I_m(t_i)} \quad (13)$$

$$r(t_i) = \frac{[I_m(t_i) - I_{sz}(t_i)]}{\sqrt{I_m(t_i)}} \quad (14)$$

ahol N a mérési adatok, p az illesztett paraméterek száma. $I_m(t_i)$ az i -edik csatornában mért érték, míg $I_{sz}(t_i)$ ugyanehhez az időhöz tartozó számított érték. A maradékérték egyenletes eloszlása mellett a $\chi^2 < 1,2$ feltételt teljesítő paramétereket fogadtam el.

3.2.4. ^1H NMR spektroszkópia

A berberin és kukurbit[7]uril között kialakuló komplex szerkezetének meghatározásához ^1H NMR méréseket is végeztünk.

A ^1H NMR mérésekhez minden esetben 99,8%-os tisztaságú nehézvizet használtunk oldószerként. A komplexet képző két vegyület ^1H NMR spektrumát is

felvettük összehasonlítás és jelazonosítás céljából. A kémiai eltolódások megállapításához belső standardként a nehézvízben, kis mennyiségben jelen levő HDO jelét alkalmaztuk.

Az ^1H NMR spektrumokat Varian, Gemini Consol 200 MHz készüléken regisztráltuk, a kiértékelésükhöz pedig a gyártó cég által biztosított szoftvert használtuk.

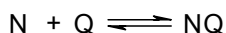
3.2.5. pH mérés

Az oldatok pH-jának méréséhez kombinált üvegelektrodot, melynek külső elektrolitja telített KCl volt, és Consort C832-es pH mérőt használtunk. A műszert minden mérés előtt három különböző 4,01, 7 illetve 10-es pH-jú pufferrel kalibráltam.

4. Számítási módszerek

4.1. Alapállapotú egyensúlyi állandó meghatározása elnyelési spektrumokból

Az alapállapotú komplexálódást, illetve a kialakuló komplex egyensúlyi állandóját az elnyelési színeképekben adalékanyag hatására bekövetkezett változásokból határoztam meg. Ha csak 1:1 összetételű részecske képződik az N és Q anyagot tartalmazó oldatban:



akkor az egyensúlyi állandó megadható az oldatban jelenlevő részecskék egyensúlyi koncentrációival:

$$K = \frac{[NQ]}{[N][Q]} = \frac{\alpha[N]_0}{(1-\alpha)[N]_0([Q]_0 - \alpha[N]_0)} \quad (15)$$

ahol $[N]$ a nem komplexált, vizsgálandó molekula egyensúlyi koncentrációja,

$[Q]$ az adalék egyensúlyi koncentrációja,

$[NQ]$ az 1:1 komplex egyensúlyi koncentrációja,

α az 1:1 komplexált N molekulák hányada,

$[N]_0$ a szabad N molekula kiindulási koncentrációja,

$[Q]_0$ a bemért adalék koncentrációja.

Ha az adalék nincs nagy feleslegben, akkor

$$[Q]_0 = [Q] + [NQ] \quad (16)$$

egyenletből kifejezve a komplex koncentrációját

$$[NQ] = [Q]_0 - [Q] \quad (17)$$

$$[N]_0 = [N] + [NQ] \quad (18)$$

összefüggésből kifejezve a szabad molekula egyensúlyi koncentrációját, valamint a (17) egyenletet felhasználva kapjuk

$$[N] = [N]_0 - [Q]_0 + [Q] \quad (19)$$

Az (17) és (19) összefüggést a (15)-be behelyettesítve

$$K = \frac{[Q]_0 - [Q]}{[Q]([N]_0 - [Q]_0 + [Q])}, \quad (20)$$

rendezve egy másodfokú egyenletet kapunk:

$$K[Q]^2 + (K[N]_0 - K[Q]_0 + 1)[Q] - [Q]_0 = 0 \quad (21)$$

Az egyenletet megoldva [Q]-re, és a Lambert-Beer törvény alapján felírt (22) összefüggést felhasználva,

$$A^\lambda = \varepsilon^N [N]_0 + \varepsilon^{NQ} ([Q]_0 - [Q]), \quad (22)$$

ahol ε^N , ε^{NQ} a szabad N molekula illetve a komplex moláris abszorpciós együtthatója.

Az összefüggés a következő alakot ölti, ha a detektálás hullámhosszán Q fényelnyelése elhanyagolható:

$$A^\lambda = A_0^\lambda + \frac{A_\infty^\lambda - A_0^\lambda}{2} \left\{ 1 + \frac{[Q]_0}{[N]_0} + \frac{1}{K[N]_0} - \left[\left(1 + \frac{[Q]_0}{[N]_0} + \frac{1}{K[N]_0} \right)^2 - 4 \frac{[Q]_0}{[N]_0} \right]^{\frac{1}{2}} \right\} \quad (23)$$

A_0^λ illetve A_∞^λ jelöli az adalékanyag nélküli és a nagyon nagy adalékanyag-koncentráció tartományra extrapolált abszorbanciákat.

A (23) függvény nemlineáris illesztésével a K egyensúlyi állandó a mérési pontokból közvetlenül megkapható [116]. Hasonló összefüggés vezethető le a fluoreszcencia-intenzitásváltozásra is.

A kísérleti eredmények kiértékelését az Origin 7.1 és Excell programokkal végeztem.

4.2. Fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőjének meghatározása

A fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőt (Φ_F) relatív méréssel határoztam meg. Az irodalomból ismert kvantumhasznosítási tényezőjű anyagot vonatkoztatási alapul választva a mérendő anyag fluoreszcencia

kvantumhasznosítási tényezője könnyen számítható, ha ismerjük a két oldat törésmutatóját (n, n_0), a gerjesztő fény hullámhosszán mért abszorbanciákat (A, A_0), illetve a teljes spektrumban kibocsátott fluoreszcenciafotonok számát (I, I_0), (a referenciaanyagra vonatkozó mennyiségeket 0-val jelöltem):

$$\Phi_F = \Phi_F^0 \frac{I (1 - 10^{-A_0}) n^2}{I_0 (1 - 10^{-A}) n_0^2} \quad (24)$$

4.3. A fluoreszcencia-kioltás

4.3.1 A kioltási sebességi együttható meghatározása, Stern-Volmer ábrázolás

Ha a szabad molekula fluoreszkál, de a komplex nem, és a fluoreszcencia élettartama nem változik adalékanyag hozzáadásával, akkor sztatikus kioltással állunk szemben. Alapállapotú komplexálódás hatására a szabad fluoreszkáló anyag koncentrációja csökken, így a mért fluoreszcencia-intenzitás az adalék koncentrációjának növekedésével egyre kisebbé válik. Ha az adalékanyag nagy feleslegben van ($[Q]_{\text{analitikai}} = [Q]_{\text{egyensúlyi}}$), akkor a kialakuló 1:1 sztöchiometriájú komplex egyensúlyi állandójáról információt nyerhetünk, ha ábrázoljuk a fluoreszcencia-intenzitások arányát az adalék koncentrációjának a függvényében:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + \frac{\epsilon^{NQ}}{\epsilon^N} K[Q], \quad (25)$$

ahol $\epsilon^{NQ}, \epsilon^N$ a komplex illetve a szabad Q molekula moláris abszorpciós tényezője,

[Q] a Q adalékanyag bemért koncentrációja,

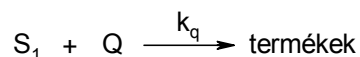
I_0 adalék nélkül mért fluoreszcencia-intenzitás,

I fluoreszcencia-intenzitás adalékanyag hozzáadása után.

Az abszorpciós színekben 1:1 összetételű komplex képződése közben egy vagy több izobesztikus pont alakulhat ki. Ha gerjesztő hullámhosszként az elnyelési színek izobesztikus pontjának helyét választjuk, akkor összefüggés egyszerűbb alakot ölt, mivel $\epsilon^{NQ} / \epsilon^N = 1$.

Ha a szabad molekula nem fluoreszkál, de a képződő komplex igen, akkor az adalékanyag koncentrációjának növelésével fluoreszcencia-intenzitás-növekedés figyelhető meg. Természetesen, ha az oldatban mindkét részecske fluoreszkál, akkor a fluoreszcencia-spektrumban bekövetkező változást a komponensek koncentrációja és kvantumhasznosítási tényezője szabja meg.

Ha a fluoreszkáló jelzőanyaghoz olyan Q anyagot adunk, mely S_1 -et dezaktiválja, miközben az abszorpciós színek nem változik, akkor a fotofizikai folyamatokon túl bekövetkezhethet a k_q (a gerjesztett állapot kioltásának sebességi együtthatója), sebességi együtthatóval jellemezhető folyamat is [12]:



A kvázistacionárius közelítéssel a következő egyenlethez jutunk:

$$[S_1] = r / (k_f + k_{isc} + k_{ic} + k_q [Q]) \quad (26)$$

A fluoreszcencia-intenzitás megfelel az egységnyi idő alatt egységnyi térfogatban kibocsátott fotonok számával, és természetesen függ a gerjesztett állapotban levő molekulák koncentrációjától ($I_f = k_f [S_1]$). Ha r (gerjesztés sebessége) állandó, a fluoreszcencia erősségének aránya a kioltóanyag távollétében (I_0) és jelenlétében (I) a kioltóanyag koncentrációjának függvényében egyenest ad:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{k_f + k_{isc} + k_{ic} + k_q [Q]}{k_f + k_{isc} + k_{ic}} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (27)$$

A fenti összefüggést szokás Stern-Volmer egyenletnek nevezni, a $k_q \tau_0$ szorzatot pedig Stern-Volmer féle állandónak.

Dinamikus kioltás során tehát gerjesztett állapotban jön létre kölcsönhatás a fluoreszkáló vegyület és az adalékanyag között, így fluoreszcencia lecsengési idejének rövidülése figyelhető meg. Ha a fluoreszcencia-lecsengésnél lényegesen rövidebb fényimpulzussal gerjesztjük a mintát, a gerjesztett állapotban levő anyag koncentrációjának időbeni változása megadható a következő összefüggéssel:

$$[S_1]_t = [S_1]_0 \exp\left(-\frac{t}{k_f + k_{isc} + k_{ic}}\right) \quad (28)$$

adalékanyag hiányában és

$$[S_1]_t = [S_1]_0 \exp\left(-\frac{t}{k_f + k_{isc} + k_{ic} + k_q[Q]}\right) \quad (29)$$

kioltó jelenlétében.

A fluoreszkáló részecske élettartama függ tehát a kioltóanyag koncentrációjától. Mivel $1/(k_f+k_{isc}+k_{ic})=\tau_0$ és $1/(k_f+k_{isc}+k_{ic}+k_q[Q])=\tau$, a két élettartam arányára a (27) egyenlettel analóg összefüggéshez jutunk:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (30)$$

mely átrendezhető egy kissé könnyebben kezelhető formára, így a mért élettartam reciprokát ábrázolva a kioltó koncentrációjának a függvényében egyenest ad, melynek meredeksége a kioltási sebességi együttható:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_q [Q] \quad (31)$$

Ha csak a szabad molekula fluoreszkál, és egyidejűleg sztatikus és dinamikus kioltás is végbemegy, akkor a fluoreszcencia-színképben adalékanyag hatására bekövetkező változás, ha széles koncentráció tartományban végezzük a mérést, és figyelembe vesszük a gerjesztő hullámhosszon bekövetkező abszorbanciaváltozást is, egy felfelé hajló görbét eredményez, mely a kibővített Stern-Volmer összefüggéssel írható le:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K[Q])(1 + k_q \tau_0 [Q]) \quad (32)$$

ahol K az alapállapotú egyensúlyi állandót jelenti.

Ha a szabad molekula és a képződő asszociátum is fluoreszkál, Φ_F a komplexképző adalék koncentrációjának bonyolult függvénye [117]. Ha gerjesztett állapotban a komplexképződés és disszociáció sebességi együtthatói nagyon nagyok vagy nagyon kicsik a szabad molekula és a komplex fluoreszcencia-élettartamának reciprokához képest, akkor a kifejezés a következő, egyszerűbb alakot ölti:

$$\Phi_F = \Phi_F^0 \left(\frac{1 + a[Q]_0}{1 + b[Q]_0} \right) \quad (33)$$

Φ_F^0, Φ_F a szabad illetve a komplexált molekula fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője,

a, b a rendszerre jellemző állandók.

a) Ha $k_{képz.} \gg \frac{1}{\tau_{sz}}$ és $k_{felhas.} \gg \frac{1}{\tau_k}$, a és b paraméter a gerjesztett állapot

komplekképzésének egyensúlyi állandóját is tartalmazza.

b) Ha $k_{képz.} \ll \frac{1}{\tau_{sz}}$ és $k_{felhas.} \ll \frac{1}{\tau_k}$, a és b paraméter az alapállapotú egyensúlyi

állandót tartalmazza.

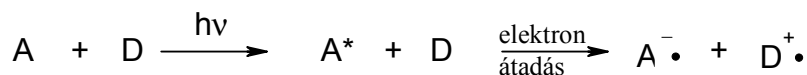
4.3.2. Elektronátadás

Az elektronátadás gyakran felelős a fluoreszcencia-kioltásért. Ez a folyamat részt vesz számos fotokémiai reakcióban. Fontos szerepet tölt be a fotoszintézisben, sőt a napenergia átalakításában is.

Fényelnyelés hatására a molekula oxidációs és redukációs potenciálja megváltozik. Attól függően, hogy elektronátadás során a gerjesztett molekula elektront vesz fel, vagy elektront ad le, megkülönböztethetünk oxidatív és redukív elektronátadást. Ezt a reakciópartner oxidáló-, és redukálóképessége határozza meg.

Az elektronátadás során a gerjesztett részecske élettartama és fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője csökken.

A redukív elektronátadás a következő reakciósémával írható le:



ahol D jelöli az elektrondonor, A pedig az elektronakceptor vegyületet.

A fenti reakció szabadentalpiaváltozása (ΔG^0) megadható a Rehm-Weller összefüggés felhasználásával a redoxipotenciálok (E_{ox} , E_{red}) és a gerjesztési energia ismeretében (E_{00}), (azaz a gerjesztett és alapállapot legalsó vibrációs szintje közötti

energiakülönbség). Ha oldatban játszódik le a folyamat, figyelembe kell vennünk a képződő ionpár közötti elektrosztatikus kölcsönhatást:

$$\Delta G^0 = E_{ox} - E_{red} - E_{00} - \frac{e^2}{4\pi\epsilon r} \quad (34)$$

ahol e az elektron töltését, ϵ az oldószer dielektromos állandóját, r pedig az ionok közötti távolságot jelöli [118, 119].

A redoxipotenciál meghatározható elektrokémiai mérésekből. A Coulomb-féle energiatag poláris oldószerekben elhanyagolható nagyságú.

Az aromás szénhidrogének és aminok közötti fotoindukált elektronátadás felhasználásával különböző fémion- [120, 121] és anionszenzorokat [122] állítottak elő. Az amin okozta fluoreszcencia-kioltás bekövetkeztéhez az szükséges, hogy a nitrogénatomon magános elektronpár legyen. Így ha ez az elektronpár például egy hidrogénkötés kialakításában vesz részt, vagy fémionhoz koordinálódik, akkor az elektronátadás megghiúsul és az aromás vegyület fluoreszcenciája nem oltódik ki.

5. Kísérleti eredmények és diszkussziójuk

Munkám során négy berberint tartalmazó rendszert vizsgáltam. Az első fejezet a berberin alkaloid ionpárképződésével foglalkozik. Vizsgáltuk, hogy különböző anionok miként módosítják a vegyület fluoreszcenciás sajátságait. Az 5.2. és az 5.3 fejezet a berberin és különböző gyűrűméretű p-szulfonátokalix[n]arén, illetve a hét glikoluril egységből felépülő, a kalixarénnél merevebb makrociklus közötti komplexálódást mutatja be. A dolgozat utolsó fejezete az egyik legismertebb és legfontosabb természetes felületaktív anyag, egy epesav aggregációjával foglalkozik.

5.1. Ionpárképződés hatása a berberin fluoreszcenciájára

5.1.1. Berberinkoncentráció hatása az elnyelési és fluoreszcencia-színképre

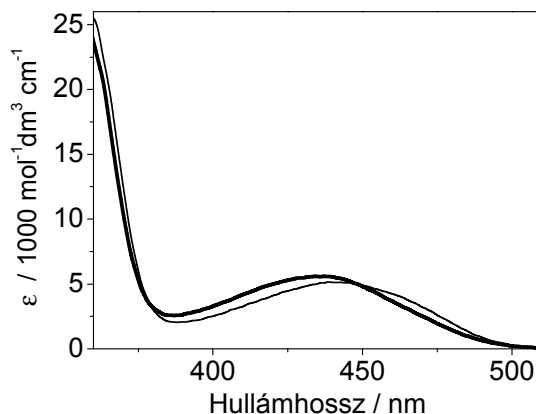
A berberin-klorid abszorpciós színképe CH_2Cl_2 -ban koncentrációfüggést mutat, $10\mu\text{mol dm}^{-3}$ koncentráció felett az abszorbancia nem változik lineárisan az alkaloid koncentrációjának növelésével. Kék eltolódás, valamint enyhe hiperkróm változás tapasztalható a berberin abszorpciós színképében a koncentráció növelésével (13. ábra).

A 372 nm-en mért moláris abszorpciós együttható koncentrációfüggését a 14.A ábra szemlélteti. Ez a változás a B^+ és Cl^- között kialakuló ionpárnak (BCl) tulajdonítható. A folyamat egyensúlyi állandója a következő összefüggéssel adható meg:

$$K = \frac{[\text{BCl}]}{[\text{B}^+][\text{Cl}^-]} \quad (35)$$

A szabad ion formájában jelen levő berberinhányad a teljes berberinkoncentrációból ($[\text{B}]_{\text{T}}$) a következő egyenlettel számítható:

$$\alpha = \frac{-1 + \sqrt{1 + 4K[B]_T}}{2K[B]_T} \quad (36)$$



13. ábra $10,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (vékony vonal) illetve $69,6 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (vastag vonal) koncentrációjú berberin abszorpciós szinképe CH_2Cl_2 -ban.

A mért moláris abszorpciós együttható (ϵ) a szabad ion formájában jelen levő és az ionpárba kötött berberin moláris abszorpciós együtthatóinak segítségével fejezhető ki:

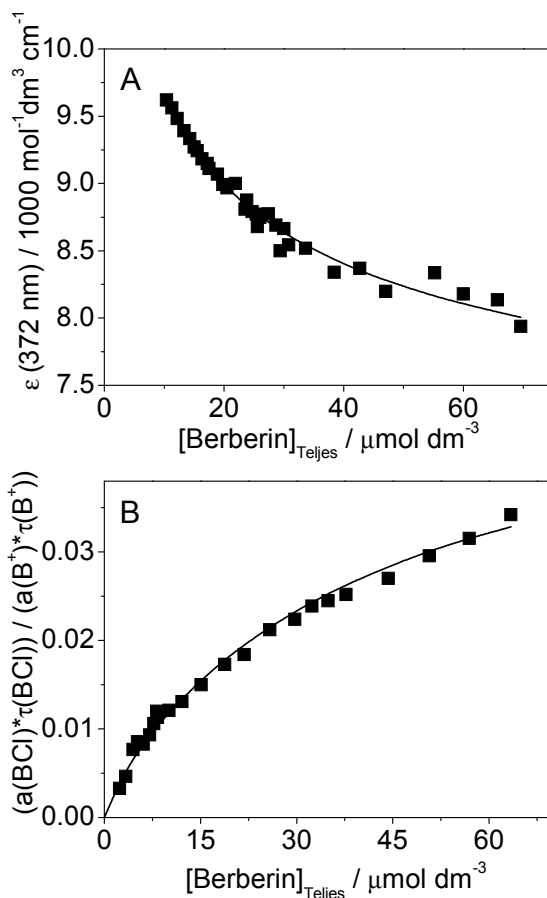
$$\epsilon = \epsilon(\text{B}^+)\alpha + \epsilon(\text{BCl})(1-\alpha) \quad (37)$$

ahol $\epsilon(\text{B}^+)$ és $\epsilon(\text{BCl})$ a szabad kation illetve az ionpár moláris elnyelési együtthatóját jelöli.

A 372 nm hullámhosszon mért ϵ értéke csökken a berberin koncentrációjának növekedésével, mivel $\epsilon(\text{B}^+)$ nagyobb mint $\epsilon(\text{BCl})$.

Az időfelbontott fluoreszcencia-mérések eredményei megerősítik az ionpár képződést CH_2Cl_2 -ban. $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ teljes berberinkoncentráció alatt a mért lecsengések egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel leírhatóak, mivel híg oldatokban az asszociáció elhanyagolható. A szabad formához tartozó élettartamra $\tau(\text{B}^+) = 14,3$ ns-os értéket kaptunk. Nagyobb koncentrációnál ez az élettartam továbbra is koncentrációtól független marad, de megjelenik egy rövidebb, 1 ns körüli élettartam, amelynek a relatív hozzájárulása fokozatosan nő a koncentráció

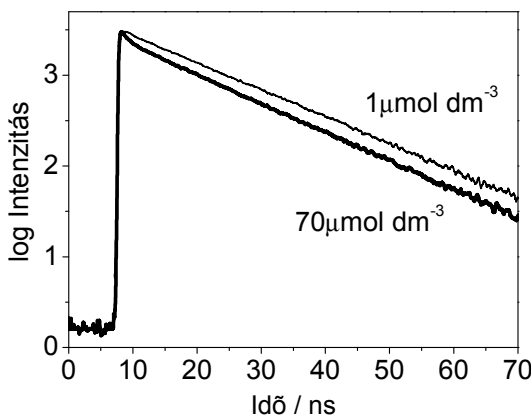
növelésével, miközben értéke állandó marad, $\tau(\text{BCI})=1,0$ ns. Ez a nagyobb koncentrációnál domináns ionpárhoz rendelhető.



14. ábra (A) A berberin moláris elnyelési együtthatójának koncentrációfüggése CH_2Cl_2 -ban 372 nm-en. (B) Az ionpárhoz és a szabad berberinkationhoz tartozó preexponenciális tényező és fluoreszcencia-élettartam szorzatának aránya a teljes berberinkoncentráció függvényében ($\lambda_{\text{det}}=546$ nm). A folytonos vonalak a nemlineáris illesztés legjobb eredményét mutatják.

A fluoreszcencia lecsengéseket két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel lehetett kellő pontossággal kiértékelni $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ teljes berberinkoncentráció felett (15. ábra).

$$I(t) = a(\text{BCl}) \exp[-t/\tau(\text{BCl})] + a(\text{B}^+) \exp[-t/\tau(\text{B}^+)] \quad (38)$$



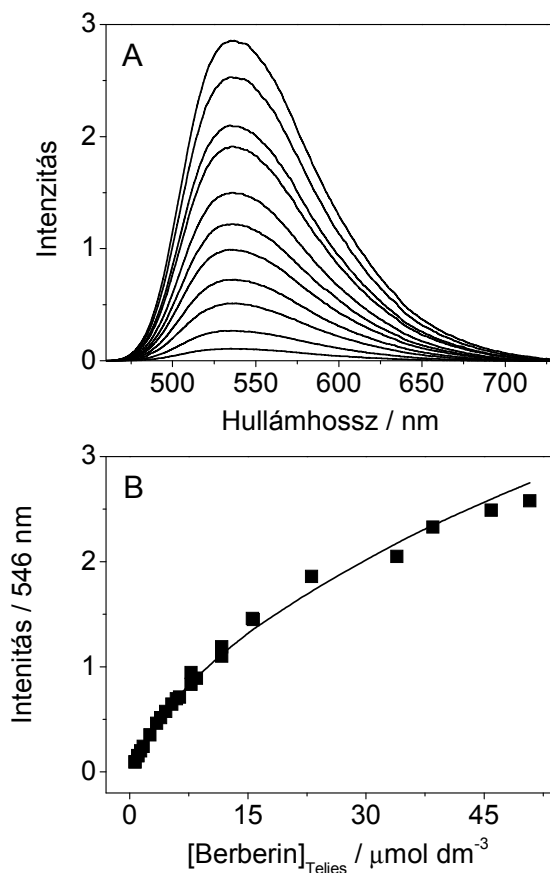
15 ábra $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ és $70 \mu\text{mol dm}^{-3}$ berberin fluoreszcencia-lecsengése CH_2Cl_2 -ban.

Az ionpár és a szabad berberinkation fluoreszcencia-intenzitásának aránya az időfelbontott fluoreszcencia mérésekből számítható:

$$\frac{I(\text{BCl})}{I(\text{B}^+)} = \frac{a(\text{BCl})\tau(\text{BCl})}{a(\text{B}^+)\tau(\text{B}^+)} = \frac{\Phi(\text{BCl})(1 - 10^{-\varepsilon(\text{BCl})(1-\alpha)[\text{B}]_T l})}{\Phi(\text{B}^+)(1 - 10^{-\varepsilon(\text{B}^+)\alpha[\text{B}]_T l})} \quad (39)$$

ahol l az optikai úthossz, a $\Phi(\text{BCl})$ és $\Phi(\text{B}^+)$ a berberin ionpár illetve szabad kation fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője. Az összefüggés levezetése megtalálható a függelékben (108 oldal).

A 14. B ábrán a $[a(\text{BCl})\tau(\text{BCl})]/[a(\text{B}^+)\tau(\text{B}^+)]$ arány látható a teljes berberinkoncentráció függvényében, míg a 16. ábra a fluoreszcencia-spektrum illetve a fluoreszcencia-maximumban (546 nm) mért fluoreszcencia-intenzitás változását szemlélteti a teljes berberinkoncentráció függvényében. A fluoreszcencia-spektrum alakja kissé változik, csak enyhe kiszélesedés tapasztalható nagy berberinkoncentrációnál. A mintát 449 nm-en világítottuk meg, mivel ezen a hullámhosszon a B^+ és BCl moláris abszorpciós együtthatójának értéke nem különbözik ($\varepsilon = 4922 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$).



16. ábra A berberin fluoreszcencia-spektrumának (A) és fluoreszcencia-intenzitásának a változása (546 nm) (B) CH₂Cl₂-ban ($\lambda_{gerj}=449$ nm).

A fluoreszcencia-intenzitás koncentrációfüggését a 16. B ábra szemlélteti. A kísérleti eredmények a következő egyenlettel írhatók le:

$$I = F \left\{ \left[1 - 10^{-\epsilon \cdot (1-\alpha) [B]_{T1}} \right] \Phi(BCl) / \Phi(B^+) + \left[1 - 10^{-\epsilon \cdot \alpha [B]_{T1}} \right] \right\} \quad (40)$$

ahol F egy állandó (mértékegysége: beütés/s), mely függ a detektálás hatékonyságától és $\Phi(B^+)$ -tól. Az abszorpciós, fluoreszcencia-intenzitás illetve időfelbontott fluoreszcencia-mérésekből származó adatokat a (37), (39), (40) összefüggések felhasználásával együttesen értékeltük ki. Az 14. és 16.B ábrán a folytonos vonal a legjobb illesztésnek felel meg. Az illesztésből az egyensúlyi

állandóra $K=1,5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ értéket, 372 nm-en a B^+ illetve BCl moláris abszorpciós együtthatójára $\epsilon(B^+) = 12370 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon(\text{BCl}) = 6470 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ értékeket, a fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezők arányára $\Phi(\text{BCl})/\Phi(B^+) = 0,026$ értéket számítottunk, míg az $F = 1,66 \times 10^8$ volt.

A berberin-klorid és a berberinkation fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényező arányára kapott érték azt bizonyítja, hogy az ionpár fotofizikai sajátságai jelentősen különböznek a berberinétől. Az ionpár sokkal kevésbé fluoreszkál, mint a szabad kation. Felhasználva a $\Phi(\text{BCl})/\Phi(B^+)$ arányt valamint a fent megadott fluoreszcencia-élettartamokat, kiszámítható az ionpár illetve a szabad kation fluoreszcencia kibocsátási sebességi együtthatóinak aránya, $k_F(\text{BCl})/k_F(B^+) = 0,37$. Összehasonlítva ezt az értéket a fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezők arányával $\Phi(\text{BCl})/\Phi(B^+)$, elmondhatjuk, hogy a szingulett gerjesztett állapot sugárzásos átmenete lelassul, míg a sugárzásmentes energiavesztése gyorsul ionpárképződés hatására.

5.1.2. Kloridion koncentráció változtatásának hatása CH_2Cl_2 -ban

A berberin-klorid ionpárképződésének egyensúlya Cl^- hozzáadására várhatóan eltolódik az ionpár képződésének irányába. Kloridion forrásként tetrabutil-ammónium- (Bu_4N^+) és bisz(trifenil-foszfin)iminium- (PPN^+)-sót használtunk, mivel e vegyületek ionpárképződését már széleskörűen vizsgálták. A Bu_4N^+ illetve PPN^+ ionpárképződés egyensúlyi állandójára $K_A = 4,13 \times 10^4$ és $1730 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ CH_2Cl_2 -ban 298 K-en értéket közöl az irodalom [123, 124]. Ezekből az adatokból kiszámítható, hogy miként változik a szabad kloridion-koncentráció ($[\text{Cl}^-]$) a teljes adalékanyag koncentráció ($[\text{A}]_T$) növelésével. A berberin ionpárképződési egyensúlyi állandójának meghatározására szolgáló egyenletet (35), és az adalékanyag ionpárképződésének egyensúlyi állandóját leíró összefüggést (41), valamint az anyagmérleg-egyenleteket felhasználva (42,43,44)

$$K_A = \frac{[ACl]}{[A^+][Cl^-]} \quad (41)$$

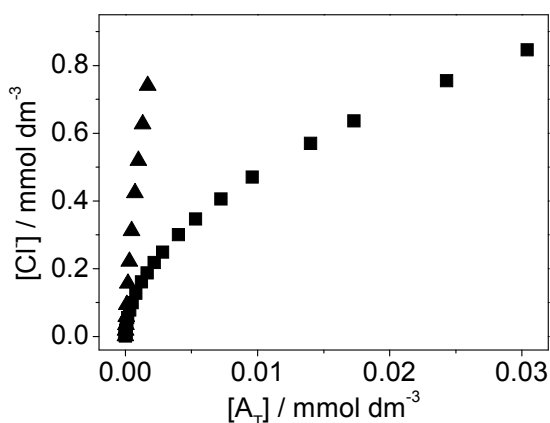
$$[B]_T = [BCl] + [B^+] \quad (42)$$

$$[A]_T = [ACl] + [A^+] \quad (43)$$

$$[Cl^-] = [B^+] + [A^+] \quad (44)$$

a következő összefüggés vezethető le:

$$[Cl^-] = \frac{[B]_T}{1 + K[Cl^-]} + \frac{[A]_T}{1 + K_A[Cl^-]} \quad (45)$$

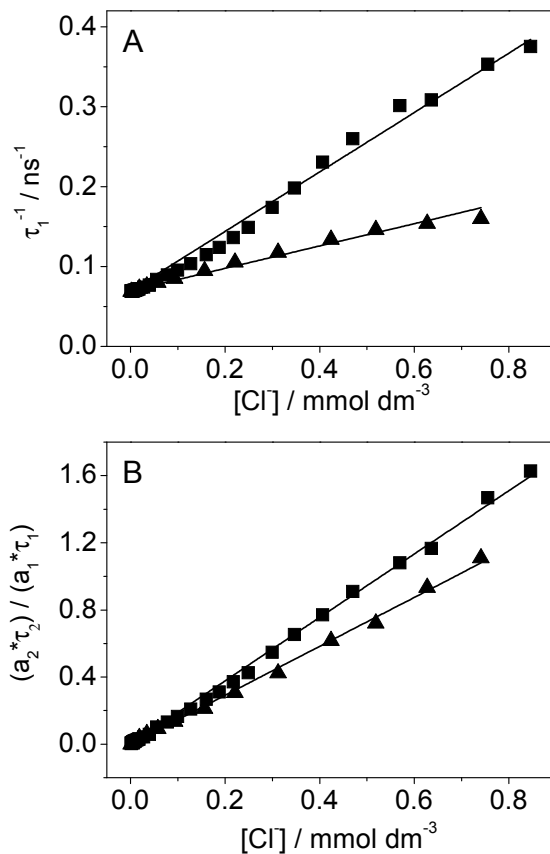


17. ábra A számolt szabad Cl^- koncentrációja tertabutil-ammonium (■) és bis(trifluorimínium-klorid (▲) teljes koncentrációjának függvényében $1,96 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} koncentrációjú berberin-klorid CH_2Cl_2 oldatában.

Felhasználva az irodalmi K_A értékét valamint rögzítve az előzőekben meghatározott K értékét, a Cl^- koncentráció a (45) összefüggés megoldásából számítható az MS Excel Solver program alkalmazásával. A 17. ábra a szabad kloridion koncentrációját ($[Cl^-]$) mutatja az oldathoz hozzáadott só koncentrációjának ($[A]_T$) függvényében.

A berberin fluoreszcencia-intenzitása kloridionkoncentráció növeléskor kezdetben csökken, majd nagy Cl^- -koncentrációnál határértéket ér el. A berberin

fluoreszcencia-lecsengések CH_2Cl_2 -ban két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel írhatók le kellő pontossággal. A $\tau_2=1,0$ ns élettartam a szingulett gerjesztett BCl ionpárnak tulajdonítható, a vizsgált koncentrációtartományban mindvégig jelen van.



18. ábra A berberin ($1,96 \mu\text{mol dm}^{-3}$) fluoreszcencia-lecsengési paramétereinek változása a szabad kloridion koncentrációjának függvényében CH_2Cl_2 -ban. A hosszabb fluoreszcencia-élettartam reciproka (A), valamint a preexponenciális tényező és fluoreszcencia-élettartam szorzatának aránya (B) a kloridion koncentrációjának függvényében ($\lambda_{\text{exc}}=372$ nm, $\lambda_{\text{det}}=546$ nm). Kloridionforrásként tertabutil-ammónium- (■) és bis(trifenil-foszfin)iminium-kloridot (▲) használtunk.

A hosszabb élettartam (τ_1) a szingulett gerjesztett berberinkationhoz rendelhető. A kloridion koncentrációjának növelésével B^+ fluoreszcencia relatív hozzájárulása csökken és τ_1 élettartam egyre rövidül. A 18. A ábra a τ_1 élettartam reciprokának változását szemlélteti a szabad Cl^- koncentrációjának függvényében. Az egyenes meredekségéből a fluoreszcencia kioltási sebességi együtthatóra $3,7 \times 10^{11}$ és $1,4 \times 10^{11} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ értéket kaptunk $Bu_4N^+Cl^-$ és PPN^+Cl^- jelenlétében. A diklór-metán oldószerre a vizsgálat hőmérsékletén érvényes diffúziógátolt sebességi állandó becsülhető a $k_d = 8RT/3\eta$ összefüggéssel [125], ahol R a gázállandó, T a hőmérsékletet Kelvinben, η pedig az oldószer viszkozitását jelöli (a diklór-metán viszkozitása $0,423 \text{ cP}$). A modell alapján a $k_d = 1,56 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ diklór-metánban. Látható, hogy a mérésből származtatott értékek nagyobbak, mint a diffúzió által meghatározott kinetikájú reakció sebességi együtthatója, ami arra utal, hogy a gerjesztett B^+ energiavesztésének felgyorsulása az alkaloid mikro környezetében feldúsuló ionoknak tulajdonítható. Az $1/\tau_1$ jelentős növekedése arra utal, hogy nemcsak 1:1 ionpár képződés, hanem az elektrolit és berberin között nem specifikus kölcsönhatások is hozzájárulnak a gerjesztett B^+ kioltásához. Az alkaloidmolekula környezetének polaritása is változik a hozzáadott só hatására, ami szintén hozzájárulhat ehhez a folyamathoz. A gerjesztett BCl ionpár disszociációja a B^+ és Cl^- közötti erős elektrosztatikus vonzás miatt nem valószínű, hogy bekövetkezik diklór-metánban. Ezt támasztja alá az a tény, hogy a BCl fluoreszcencia-élettartama nem változik a vizsgált koncentráció tartományban.

A 18. B ábra az időfelbontott fluoreszcencia-mérések kiértékeléséből származó preexponenciális tényező és élettartam szorzatának arányát szemlélteti a szabad Cl^- koncentrációjának függvényében. A detektálás 546 nm -en, míg a gerjesztés 372 nm -en történt. A kísérleti adatok leírására a következő összefüggés vezethető le:

$$\frac{a_2 \tau_2}{a_1 \tau_1} = \frac{\varepsilon(BCl)\Phi(BCl)}{\varepsilon(B^+)\Phi(B^+)} K[Cl^-] \quad (46)$$

A moláris abszorpciós együtthatók $\epsilon(\text{BCl})/\epsilon(\text{B}^+)$ és a fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezők arányát ($\Phi(\text{BCl})/\Phi(\text{B}^+)$) az előző fejezetben már meghatároztuk. A 18. B ábrán a folytonos vonallak a legjobb illesztésnek felelnek meg, melyek meredekségéből a BCl ionpároképződés egyensúlyi állandójára $K=1,4 \times 10^5$ és $1,1 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ értékeket számoltunk a $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Cl}^-$ és PPN^+Cl^- adalékanyag jelenlétében végzett mérések eredményeiből. A $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Cl}^-$ adalékanyag alkalmazása esetén kapott egyensúlyi állandó jó egyezést mutat a berberinkoncentráció változásakor meghatározotttal. Ha az egyensúlyi állandót PPN^+Cl^- adalékanyag hozzáadásával határoztuk meg, 30% kisebb értéket kaptunk, ami valószínűleg a PPN^+Cl^- asszociációs állandó alulbecsült irodalmi értékének köszönhető.

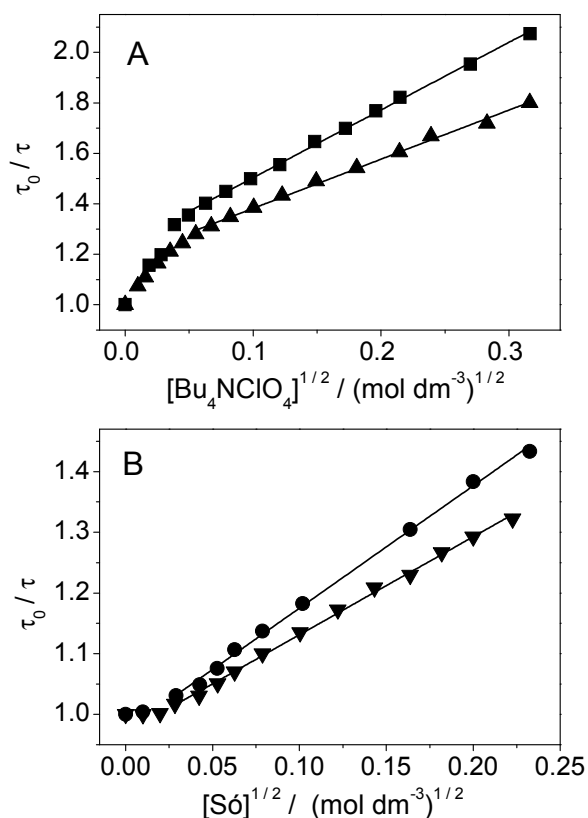
5.1.3. Perklorátion hatása különböző oldószerekben

Feltártuk a tertabutil-ammonium-perklorát (Bu_4NClO_4) és lítium-perklorát (LiClO_4), redoxiinert sók hatását is a berberin fluoreszcenciás sajátosságaira. Bu_4NClO_4 hatására a berberin fluoreszcenciája kioltódik CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$ és butironitril oldószerben. Híg berberinoldatokban az időfelbontott fluoreszcencia-lecsengések exponenciális függést mutatnak még só jelenlétében is. Az elektrolit koncentrációját növelve a mért élettartam rövidül.

Az 19. ábrán a mért fluoreszcencia-élettartamok aránya látható az adalékanyag-koncentráció négyzetgyökének függvényében. A τ_0 a szingulett gerjesztett berberin élettartamát, míg τ só jelenlétében mért élettartamot jelöli. Kis elektrolitkoncentrációnál e két mennyiség aránya viszonylag meredeken nő a kevésbé poláris CH_2Cl_2 és $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$ oldószerekben, ami valószínűleg a B^+ és ClO_4^- közötti ionpároképződéssel magyarázható. Ezzel szemben nem tapasztalható fluoreszcencia-kioltás $4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ -nél kisebb sókoncentráció tartományban butironitrilben, mivel az ionpároképződést a berberinkation és a viszonylag poláris oldószer közötti kölcsönhatás megátolja.

Mivel az ellentétes töltésű ionok között fellépő Coulomb-vonzás verseng az oldószerrel kialakuló ion-dipól kölcsönhatással, az ionpárképződés egyensúlyi állandója csökken az oldószer polaritásának növekedésével [123].

Jól látható a 19.ábrán, hogy töményebb oldatokban lineáris összefüggés van a τ_0 / τ érték és a perklorátsó koncentrációjának négyzetgyöke között. A Bu_4NClO_4 disszociációfoka a (36) egyenlettel analóg összefüggéssel számítható ki. Ebből az összefüggésből következik, hogy a szabad ion koncentrációja a teljes sókoncentráció négyzetgyökével arányos mennyiség, ha az ionpárképződés egyensúlyi állandója jóval nagyobb egynél.



19. ábra Elektrolit hiányában és jelenlétében mért berberin fluoreszcencia-élettartamok aránya a perklorátsó koncentráció négyzetgyökének függvényében. Bu_4NClO_4 hatása CH_2Cl_2 -ban (■), $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$ -ban (▲) (A) és butyronitrilben (●) (B), LiClO_4 (▼) okozta kioltás butyronitrilben (B).

Ez a feltétel mindig teljesül, ha adalékanyagként Bu_4N^+ sót használunk CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$ és butironitril oldószerekben [123, 127, 128]. Így a $[\text{só}]^{1/2}$ -től függő fluoreszcencia-kioltás arra utal, hogy a gerjesztett B^+ környezetében megnövekedő ionkoncentráció az energiavesztési folyamatok felgyorsulásához vezet. Amint a 19. B ábrán látható, a LiClO_4 is a Bu_4NClO_4 -éhoz hasonló hatást fejt ki butironitrilben.

5.2. Szupramolekuláris komplexképződés berberin és 4-szulfonáto-kalixarének között

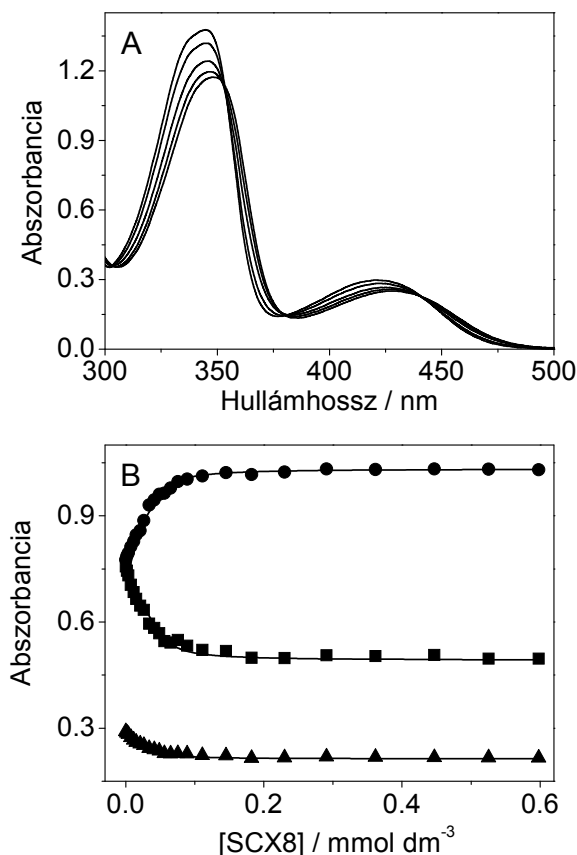
5.2.1. 4-Szulfonáto-kalixarének (SCX_n) hatása a berberin elnyelési színeképére

A használt kalixarének szulfonsavcsoportjai 0,4-es pH-nál teljesen deprotonálódnak [129], míg az első fenolos OH csoport disszociációja 3,26-3,73 pH tartományban következik be gyűrűmérettől függően [129-131]. Ahhoz, hogy biztosítsuk azt, hogy csak a szulfonsavcsoporton következzen be deprotonálódás, következő méréseinket 2-es pH-n végeztük.

A 20. A ábra egy jellemző képet mutat a berberin elnyelési színeképében SCX_n hatására bekövetkező változásról, ez éppen a (nyolc fenol egységből álló szulfonáto-kalixarén) SCX₈ hatását mutatja. Az enyhe vörös eltolódás azt jelzi, hogy alapállapotú komplexálódás történik. Az alsó ábra (20. B ábra) az egyes hullámhosszokon mért abszorbanciaváltozást mutatja az adalék koncentrációjának függvényében. Már 0,1 mmol dm⁻³ SCX₈ jelenlétében a komplexálódás teljes. A színekép változása olyan koncentrációtartományban következik be, ahol a berberin koncentrációja összemérhető az SCX₈ koncentrációjával, vagyis az SCX₈ nincs nagy feleslegben.

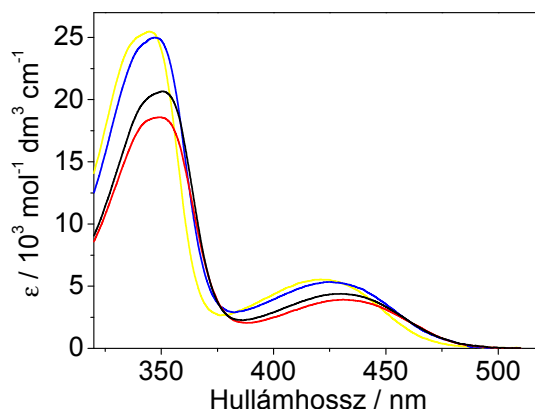
A három izobesztikus pont jelenléte azt sugallja, hogy csak 1:1 komplexképződéssel állunk szemben. A spektrofotometriás méréseket az Excel Solver programot felhasználva a (23) összefüggéssel, 320-510 nm hullámhossz tartományban globális illesztéssel értékeltük ki.

Az alsó ábrán (20. B ábra) 320, 358, 415 nm-en mért abszorbanciaváltozás látható az adalék koncentrációjának a függvényében, a folytonos vonalak a legjobb illesztéseknek felel meg, melyből a származtatott egyensúlyi állandó logaritmusára 5,38-as értéket kaptunk. A hat és négy fenol csoportot tartalmazó 4-szulfonáto-kalixarének (SCX₆ és SCX₄) hasonló változást eredményeztek a berberin színeképében, minden esetben 1:1 komplexálódást találtunk.



20. ábra (A) SCX8 hatása ($0, 7,6, 26, 41$ és $77 \mu\text{mol dm}^{-3}$) $55,3 \mu\text{mol dm}^{-3}$ berberin abszorpciós szinképére $\text{pH}=2$ vizes közegben. (B) 320 nm (■), 358 nm (●) és 415 nm -en (▲) mért abszorbiációt mutatja az adalék koncentrációjának a függvényében. A folytonos vonal a legjobb illesztésnek felel meg.

A 21. ábrán a spektrofotometriás titrálási adatok kiértékeléséből a különböző makrociklusméretű B^+ -SCXn komplexekre nyert elnyelési szinképeket láthatjuk, (különböző színek más-más B^+ -SCXn komplexeket jelölnek). Legkisebb egyensúlyi állandót a SCX4-nél találtunk (4. Táblázat), amint a 21. ábrán látható, ebben az esetben a legkisebb a komplex és a berberin szinkepe közötti eltérés.



21. ábra $B^+ - SCX_4$ (kék) $B^+ - SCX_6$ (piros), $B^+ - SCX_8$ (fekete) 1:1 összetételű komplexek Excel Solver programmal számított elnyelési színeképe. . A berberin elnyelési spektruma a sárga színnek felel meg.

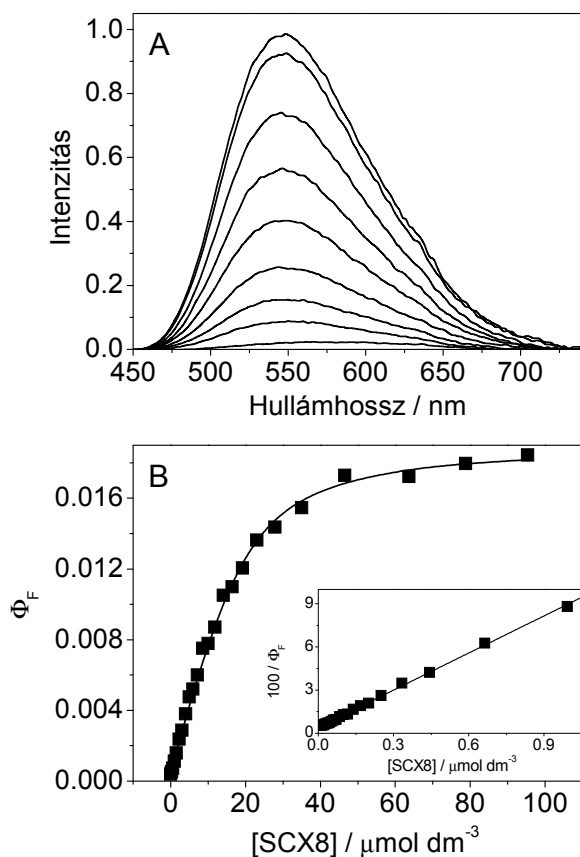
Ez azt mutatja, hogy az SCX4 gyűrűmérete túl kicsi ahhoz, hogy a berberin teljesen beékelődjön, így a berberin mikrokörnyezetében jelentős mennyiségű víz található. Kon és munkatársai kimutatták, hogy az SCX4 ürege valóban túl kicsi, még monoszubsztituált benzolszármazékokat sem képes befogadni [132]. Az SCX6 és SCX8-től nagyobb fényelnyelést csökkentő (hipokróm) hatást tapasztaltunk, ez azt jelzi, hogy a berberin jobban beékelődik a nagyobb és flexibilisebb kalixarén üregekbe.

A gyűrűméret növekedésével, vagyis ha minél több fenolcsoport van a kalixarénben, nő a flexibilitása a molekulának, aminek következtében a berberin könnyebben kötődik. Így a legnagyobb kötési erősség az SCX8-nál észlelhető (4. táblázat).

5.2.2. 4-Szulfonáto-kalixarének hatása a berberin fluoreszcencia-színekére

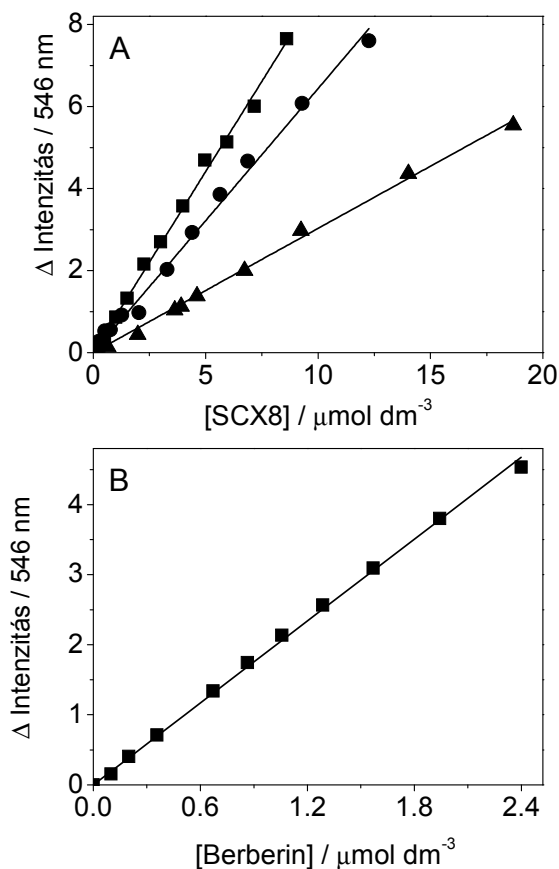
A berberin meglehetősen gyenge fluoreszcenciát mutat vizes közegben, deuterált vízben $4,7 \times 10^{-4}$ fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőt közöltek [27]. A berberin fluoreszcencia-színekében bekövetkező változás látható a 22. A

ábrán SCX8 hatására 2-es pH-nál. A fluoreszcencia-színképben is, mint ahogy már az elnyelési színképben is láttuk, igen kis SCX8 koncentrációnál, már 0,1 mmol/dm³-nél következik be a változás. Jelentős fluoreszcencia-intenzitás-növekedés figyelhető meg, miközben a színkép kisebb hullámhossz felé tolódik el. Inbaraj és munkatársai kimutatták, hogy a berberin fluoreszcencia-színképe kék felé tolódik el az oldószer polaritásának csökkenésével [27]. Következésképpen a berberin mikrokörnyezete kevésbé poláris, amikor a kalixarénhez kapcsolódik.



22. ábra (A) A berberin fluoreszcencia-spektrumának a változása SCX8 hatására vízben. (B) A mért fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényező különböző SCX8 koncentrációk jelenlétében. Az alsó ábra belső része a Φ_F^{-1} változását mutatja az SCX8 koncentráció reciprokának függvényében.

A 22. B ábra a fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőt mutatja az SCX8 koncentrációjának a függvényében. A mért adatokra a (23) összefüggést illetve a spektrofotometriás mérésből származtatott eredménnyel jól egyező $\log K = 5,44$ értéket kaptunk a $B^+ - SCX8$ komplexképződés egyensúlyi állandójának logaritmusára. A komplex kvantumhasznosítási tényezőjére 0,019 értéket kaptunk, ami közel 40-szer nagyobb, mint a berberiné vízben.



23. ábra Az 546 nm-en mért fluoreszcencia-intenzitás változása (ΔI) vízben, 2-es pH-nál: (A) SCX8 koncentráció függvényében (■) $[\text{Berberin}] = 1,93 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 352,5 nm gerjesztve, (●) $[\text{Berberin}] = 1,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 352,5 nm gerjesztve, (▲) $[\text{Berberin}] = 1,03 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 441 nm gerjesztve. (B) berberinkoncentráció függvényében $3,15 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ SCX8 jelenlétében.

Mivel ilyen jelentős fluoreszcencia-intenzitás-növekedést idéz elő a komplexálódás, a berberin alkalmas lehet SCX8 kimutatására. Az 23. ábrán jól látható, hogy elég nagy koncentrációtartományban lineárisan növekszik a fluoreszcencia-intenzitás.

Nagyobb mennyiségű kalixarén kimutatására nagyobb koncentrációjú berberinoldatot kell alkalmazni, de akár $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ -nyi SCX8 is kimutatható, ha gerjesztő hullámhosszként 352 nm -t választjuk és a berberin koncentrációja $1,93 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Természetesen a módszer berberin kimutatására is használható, már $0,01 \mu\text{mol dm}^{-3}$ -nyi berberin is kimutatható, ha a kalixarén koncentrációja $3,15 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

5.2.3. A pH hatása a berberin és 4-szulfonáto-kalixarének közötti komplexálódásra

A berberin és SCX8 közötti kölcsönhatást semleges és bázikus közegben is tanulmányoztuk. Savas közegben történő mérések estén kénsavat használtunk a savanyításhoz. $0,005 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ mellett az ionerősség körülbelül $0,015 \text{ mol dm}^{-3}$ ($J=1/2\sum c_i z_i^2$, ahol z_i és c_i , az oldatban levő ionok töltését illetve koncentrációját jelöli, J pedig az ionerősség). Hasonló ionerősség eléréséért a többi méréseinket $3,7 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ és $3,7 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ elegyben ($\text{pH}=6,96$) illetve $0,015 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$ ($\text{pH}=12,2$) jelenlétében végeztük. Az utóbbi esetben ($\text{pH}=12,2$) a SCX8 négy fenolos OH-ja, míg semleges közegben csak két fenolos OH van deprotonálódva, mivel a fenolos OH-csoportok pK -ja az irodalom szerint $3,44$, $4,26$, $7,78$ és $10,3$ [129]. További protonvesztés csak az általunk alkalmazottnál lényegesen bázikusabb közegben lehetséges.

Amikor a SCXn protont veszít, az OH-csoportok közötti hidrogénkötések száma csökken, aminek következtében a molekula flexibilitása növekszik, így a B^+ könnyebben beékelődhet. Azonban a $\text{B}^+ \text{--SCX8}$ rendszerben a kialakuló komplex

stabilitása olyan nagy savas környezetben, hogy a fenolos OH-k deprotonálódása elhanyagolható változást eredményez az egyensúlyi állandó értékében.

4. táblázat A berberin- SCXn komplex képződés egyensúlyi állandóinak logaritmusai.

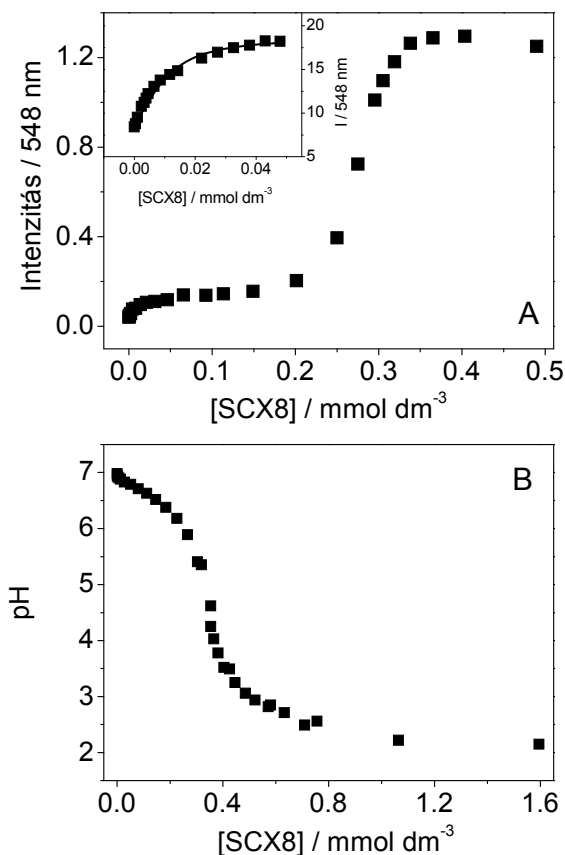
	SCX8			SCX6		SCX4	
	pH=2	pH=6,96	pH=12,2	pH=2	pH=12,2	pH=2	pH=12,2
log K UV-VIS mérésből ^a	5,38	5,48	5,32	3,97	4,31	3,47	3,78
log K fluoreszcencia mérésből ^a	5,44	5,49	b	3,95	b	3,57	b
Φ_F	0,019	0,0087	b	0,0064	b	0,018	b

^a a hiba kb. $\pm 0,06$, ^b elhanyagolható fluoreszcencia

Ez arra utal, hogy a komplex kialakulásában nem játszik domináns szerepet az elektrosztatikus kölcsönhatás, annál inkább a π - π kölcsönhatás erőssége fontos. Ezzel ellentétben B^+ -SCX6 és B^+ -SCX4 komplex képződésének egyensúlyi állandója enyhén növekszik a pH növelésekor. Megfigyelhető, hogy a kalixarén makrociklusméretének változtatásával sokkal nagyobb hatás érhető el, mint a pH változtatásával.

A 24. ábrán fluoreszcencia-intenzitás-növekedés figyelhető meg, valamint az oldat pH-jának változása látható az SCX8 koncentrációjának függvényében, amikor semleges közegből ($3,7 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ és $3,7 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$) indulunk ki.

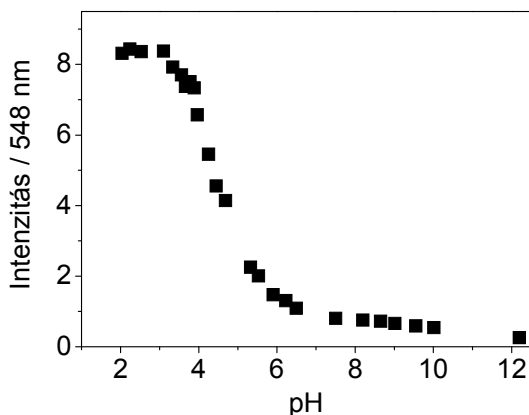
A berberin fluoreszcencia-intenzitásában kis SCX8 koncentrációnál egy lépcső figyelhető meg, amely kb. $0,04 \text{ mmol dm}^{-3}$ adalékkoncentrációnál határértéket ér el, itt még a pufferkapacitás elég nagy, ahhoz hogy a pH-t 7-es értéken tartsa.



24. ábra SCX8 hatása a berberin 548 nm-en mért fluoreszcenciájára $3,7 \text{ mmol dm}^{-3}$ Na_2HPO_4 és $3,7 \text{ mmol dm}^{-3}$ KH_2PO_4 elegyben (A), a belső ábra a kezdeti szakasz kinagyított képe. (B) az oldat pH-jának változását mutatja az SCX8 függvényében.

Ennek a változásnak a kinagyított képe látható a 24.A ábra belső részén, amelyre a (23) összefüggést illesztve 5,49 egyensúlyi állandót kaptunk. Azonban tovább növelve a kalixarén koncentrációját az oldat savassága nő, ez jól látható a 24. B ábrán, ami jelentős fluoreszcencia-intenzitás-növekedést idéz elő. Azonban 4-es pH körüli értéknél, ahol a kalixarének egyetlen fenolátcsoportot tartalmaznak, a fluoreszcencia-intenzitás határértéket ér el.

A komplex fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője is csökken az oldat pH-jának növekedésével, 12,2-es pH-nál a komplex elhanyagolható mértékben fluoreszkál.



25. ábra $140 \mu\text{mol dm}^{-3}$ SCX8 és $4,8 \mu\text{mol dm}^{-3}$ berberint tartalmazó oldat fluoreszcencia-intenzitásának változása pH függvényében.

Mivel a fenolátforma könnyebben oxidálható, mint a fenol, a fenolos OH deprotonálódása elősegíti a szingulett gerjesztett komplexen belüli elektronátadást a gazdavegyületről a gerjesztett berberinre. Ezenkívül a fokozatos deprotonálódás következtében csökken a hidrogénkötések száma a fenolos OH-k között, így a kalixarénygűrű flexibilisebbé válik, jobban beékelődhet a berberin, ami szintén elősegíti a nagyobb hatékonyságú elektronátadást a gazdamolekuláról a gerjesztett vendégmolekulára. A fotoindukált elektronátadás létrejöttének termodinamikai feltétele a Rehm-Weller összefüggéssel ((34) összefüggés) becsülhető meg [133].

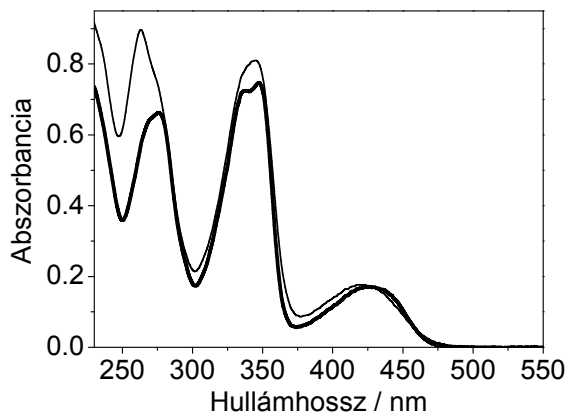
A komplexálódott berberin gerjesztett állapotának energiájára pH-tól függetlenül 2,52 eV-ot mértünk. Ciklikus voltammetriás módszerrel telített kalomel referenciaelektrodot alkalmazva a berberin redukciós potenciáljára $-1,3$ V értéket határoztak meg [134]. Az SCX8 oxidációs potenciáljáról nincs adat az irodalomban, de az SCX6 irreverzibilis oxidációs potenciáljára telített kalomel referenciaelektrodot használva $0,7-0,76$ V-ot becsültek 2-es pH-jú vízben. Növelve az oldat pH-ját azt tapasztalták, hogy az oxidációs potenciál csökken [135], ami azt

sugallja, hogy a fotoindukált elektrontranszfer hajtóereje is nagyobb bázikus körülmények között. A berberin szingulett gerjesztett állapotának energiáját és a fent említett redukciós és oxidációs potenciál értékeit a Rehm-Weller egyenletbe (35) behelyettesítve negatív szabadentalpiaváltozást kapunk, ami arra utal, hogy a kalixarényűrről a szingulett gerjesztett berberinre az elektronátadás termodinamikailag megengedett, de a reakció mértékét elsősorban a szupramolekula geometriai szerkezete szabályozza.

5.3. Szupramolekuláris komplexképződés berberin és kukurbit[7]uril (CB7) között

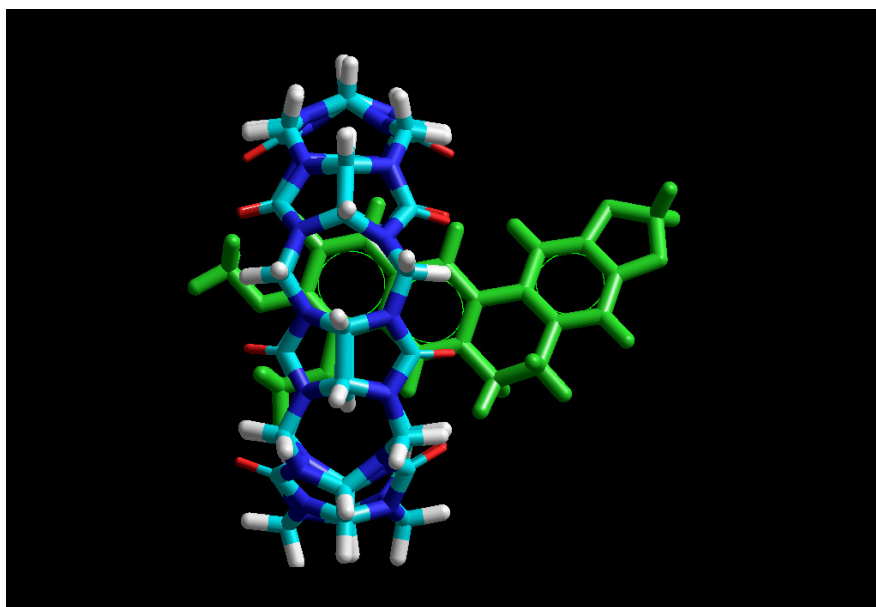
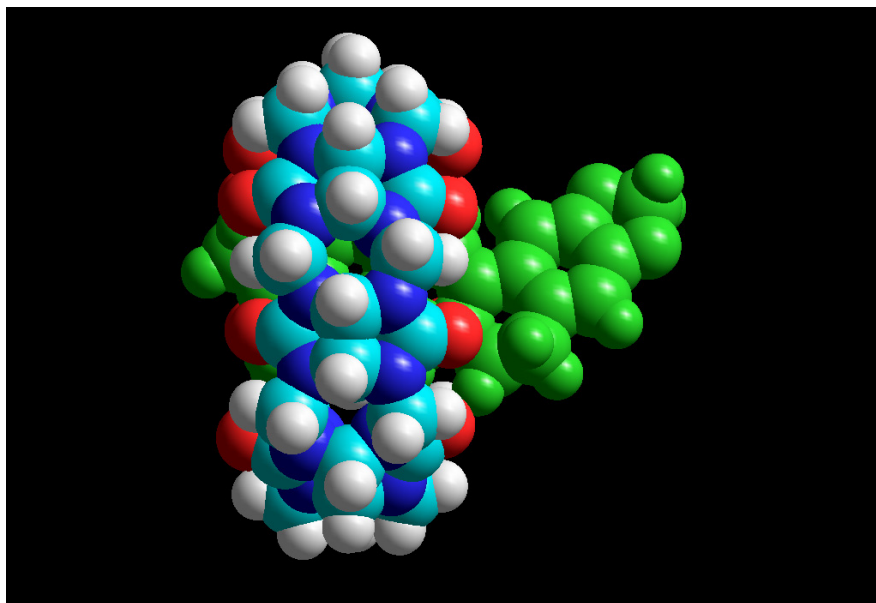
5.3.1. Abszorpciós sajátságok és ^1H -NMR spektrum

Amint a 26. ábrán is látható, ha a berberin vizes oldatához CB7-t adagolunk, megváltozik a berberin elnyelési színe.



26. ábra 31,5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ berberin elnyelési színe vízben (vékony vonal) és 1 mmol dm^{-3} CB7 adalék hatására (vastag vonal).

A színekben bekövetkező vörös eltolódás és hipokróm változás egyértelműen komplex keletkezésére utal. Valószínűleg a kötődés az ion-dipólus kölcsönhatás és az apoláris vegyületek közötti vonzás együttes hatásának eredménye. Erős elektrosztatikus kölcsönhatás alakul ki a vendégmolekula pozitív töltésű nitrogénje és a makrociklus oxigénatomjainak parciális negatív töltése között, miközben a berberin apoláris része beékelődik a gazdamolekulába. HyperChem 7.52 programmal AM1 félempirikus módszerrel végzett számolások megerősítik, hogy a B⁺ csak részben ágyazódik be a CB7 hidrofób részébe (27. ábra).



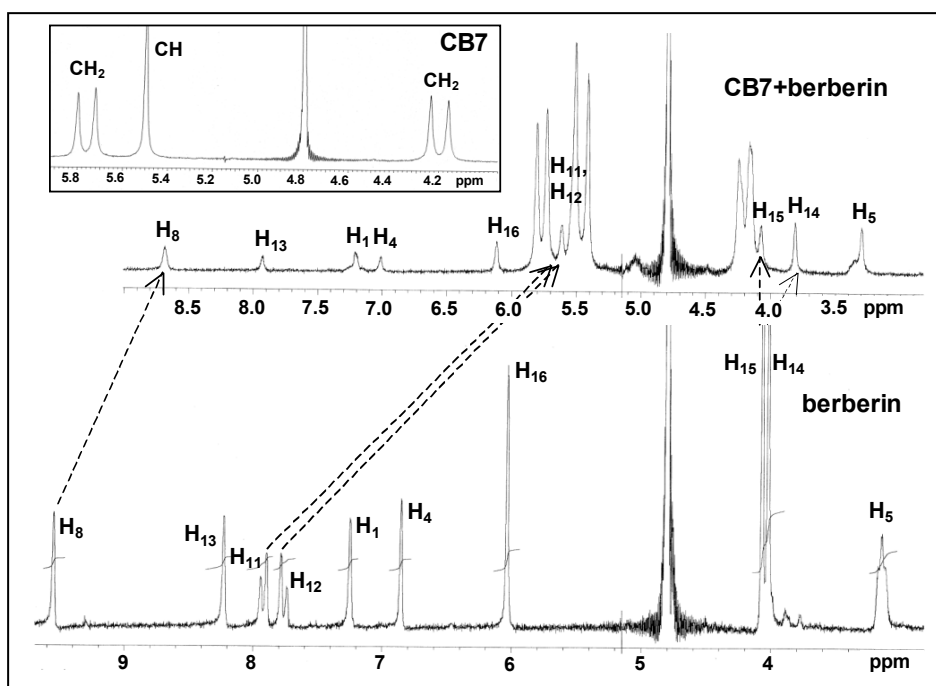
27. ábra B^+ -CB7 komplex energia-minimalizált szerkezete alapállapotban. Színkódok: B^+ ion: zöld, CB7 oxigénje: piros, nitrogénatom: kék, szén: világos kék, hidrogén: fehér.

A metoxi-izokinolin rész úgy ékelődik be a CB7-be, hogy a pozitív töltésű nitrogén a makrociklus üregének nyílásán levő karbonilcsoportok közelében

helyezkedik el. A B^+ molekula másik része az ürege kívül helyezkedik el, mivel a CB7 makrociklus hossza csak 0,91 nm. A benzo-dioxol rész beékelődése nem kedvező, mert kis mérete miatt nem illeszkedhet szorosan a CB7-ba.

A komplex szerkezetének felderítése érdekében ^1H -NMR spektroszkópiai méréseket is végeztünk.

^1H -NMR mérésekből kapott eredmények összhangban vannak az elméleti számítások által valószínűsített szupramolekula-szerkezettel. A fölvetett spektrumokat 28. ábrán tüntettem fel.



28. ábra CB7 ($2,58 \text{ mmol dm}^{-3}$) (belső ábra), B^+ ($2,69 \text{ mmol dm}^{-3}$) (alsó ábra) és B^+ -CB7 komplex (felső ábra) ^1H -NMR spektruma D_2O -ban. A nyilak a vendégmolekula metoxizokinolin részére jellemző spektrális változásokat mutatja.

$2,69 \text{ mmol dm}^{-3}$ B^+ és $2,58 \text{ mmol dm}^{-3}$ CB7 koncentrációjú oldatokban B^+ -nek 98%-a kötődik a CB7-hez. Következésképpen a 28. ábra felső részén a vendégmolekula ^1H -NMR csúcsai nem jelennek meg az 1:1 összetételű B^+ :CB7 nehésvizes oldatban. A spektrumot deuterált vízben regisztráltuk, 1:1 molarányban

oldottunk fel berberint és CB7-et. CB7 hozzáadására a berberin metoxi-izokinolin részéhez rendelhető rezonanciajelek a nagyobb térerők irányába tolódnak el. A jelazonosítás és összehasonlítás céljából úgy a berberin, mint a CB7 $^1\text{H-NMR}$ spektrumát is felvettük.

A B^+ , CB7 és $\text{B}^+-\text{CB7}$ komplex protonjelei a következők: B^+ (D_2O , ppm): 3,14 (t, 2H, H_5), 4,01 (s, 3H, H_{14}), 4,06 (s, 3H, H_{15}), 6,03 (s, 2H, H_{16}), 6,85 (s, 1H, H_4), 7,25 (s, 1H, H_1), 7,76 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, H_{12}), 7,92 (s, 1H, $J=7,6$ Hz, H_{11}), 8,22 (s, 1H, H_{13}), 9,55 (s, 1H, H_8); **CB7** (D_2O , ppm): 4,19 (d, 14H, $J=15,4$ Hz, CH_2), 5,49 (s, 14H, CH), 5,76 (d, 14H, $J=15,4$ Hz, CH_2); $\text{B}^+-\text{CB7}$ (D_2O , ppm): 3,30 (s, 2H, H_5), 3,81 (s, 3H, H_{14}), 4,07 (s, 3H, H_{15}), 4,21 (d, 14H, $J=15,4$ Hz, CH_2), 5,41 (s, 6H, CH), 5,51 (s, 8H, CH), 5,61 (s, 2H, H_{11} és H_{12}), 5,77 (d, 14H, $J=15,4$ Hz, CH_2), 6,11 (s, 2H, H_{16}), 7,01 (s, 1H, H_4), 7,21 (s, 1H, H_1), 7,93 (s, 1H, H_{13}), 8,69 (s, 1H, H_8).

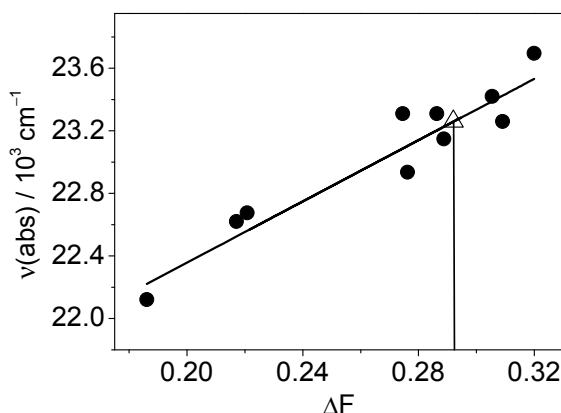
A H_8 , H_{13} , H_{11} , H_{12} valamint H_{14} protonokhoz hozzárendeltető csúcsok jelentősen eltolódnak, szintén a nagyobb térerő irányába. A legjelentősebb eltolódást az aromás gyűrűben levő H_{11} és H_{12} protonok jeleinél figyelhető meg ($\Delta=2,31$ és $2,15$ ppm). A benzo-dioxol rész aromás illetve metilén csoportján levő protonok jelei (H_1 , H_4 , és H_{16}) csak kis mértékben tolódnak el a kisebb térerő irányába, ami arra utal, hogy a CB7 karbonil csoportjai kisebb mértékben árnyékolják a vendégmolekula ezen részét. A H_{15} protonhoz tartozó csúcs praktikusán ugyanolyan térerő mellett jelentkezik attól függetlenül, hogy van-e az oldatban CB7, vagy nincs. Ez azzal magyarázható, hogy CB7-el a berberinmolekulának ez a része nem lép kölcsönhatásba.

A komplexálódás befolyásolja a CB7 makrociklus protonjainak a kémiai eltolódását is. A gazda molekulában levő CH_2 csoportok dublettjei ugyanolyan ppm értékeknél jelentkeznek a szabad CB7-ben és a komplexálódás után. A CH csoport protonjai viszont kémiai és mágneses szempontból nem lesznek egyenértékűek. Ez azzal magyarázható, hogy a B^+ parciális beékelődése jelentős hatással van a spektrumban megjelenő csúcsok kémiai eltolódására.

Annak érdekében, hogy feltárjuk az alap- és gerjesztett állapot közötti energiakülönbség változását komplexálódás hatására, felvettük a berberin elnyelési színeképét különböző oldószerekben. Amint a 29. ábrán is látható, lineáris összefüggés van az S_0-S_1 átmenet elnyelési sávjához tartozó maximum helye ($\nu_{\max}(\text{abs})$) és az orientációs polarizálhatósági paraméter között, mely a következő összefüggéssel határozható meg:

$$\Delta F = (\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1) - (n^2 - 1)/(2n^2 + 1) \quad (47)$$

ahol ε a dielektromos állandót jelöli, n pedig a közeg törésmutatója.



29. ábra A berberin elnyelési színekép legkisebb energiájú maximumának helye az orientációs polarizálhatósági paraméter függvényében különböző oldószerekben (●) illetve CB7 üregében (Δ).

A B^+ -CB7 komplex legkisebb energiákhoz tartozó abszorpciós sávjának maximuma $\nu_{\max}(\text{abs})=23260 \text{ cm}^{-1}$ -nél mutatkozik. A kalibrációs görbén elfoglalt helye alapján leolvasható a hozzá tartozó ΔF érték, 0,292-nek adódott, mely arról nyújt információt, hogy a CB7-be ékelődött berberin mikrokörnyezetében milyen mértékű az orientációs polarizálhatóság. A ΔF érték közel esik az etanoléhoz ($\Delta F = 0,289$), ami főleg annak tulajdonítható, hogy a B^+ mérete túl nagy ahhoz, hogy teljesen beékelődjön a gazdamolekula üregébe. Kimutatták, hogy a berberin hasonló környezetet érez ciklodextrin és etanol jelenlétében [31]. Nau és

munkatársai sokkal kisebb méretű próbákat használtak, 2,3-diaza-biciklo[2.2.2]oct-2-én-t (DBO) és diacetilt, amelyeknek $n\pi^*$ -típusú szingulett és triplett gerjesztett állapota van. Lineáris összefüggést találtak az abszorpciós és emissziós sajátságok és az oldószer polarizálhatósági paramétere ($P=(n^2-1)/(n^2+2)$) között. Megállapították, hogy a kukurbituril üregében nagyon kicsi a polarizálhatóság, a perfluoro-hexán és a gázfázis [88, 89] közötti tartományába esik. A B^+ abszorpciós maximuma és a polarizálhatósági állandó (P) között nincs szoros összefüggés, ami arra utal, hogy a kationos vegyület spektrális sajátságait nemcsak a polarizálhatóság, hanem a mikrokörnyezet dielektromos állandója is befolyásolja.

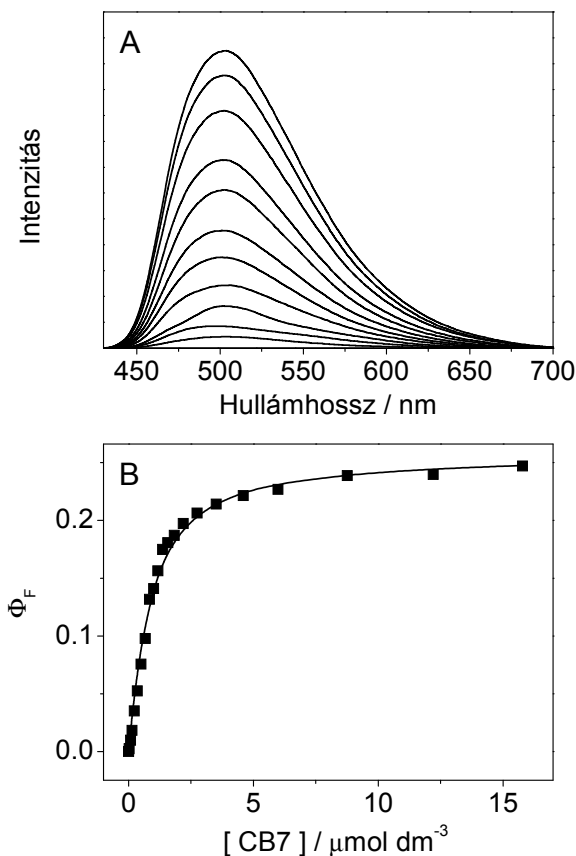
5.3.2. A komplex fluoreszcenciája

A B^+ fluoreszcencia-sajátságai jelentősen változnak miközben a CB7-be ágyazódik be. Vízben a B^+ gyengén fluoreszkál, emissziós maximuma 17900 cm^{-1} körül van. Mint ahogy a 30. ábrán is látható, a berberin vizes oldatához CB7-et adagolva rendkívüli mértékű, körülbelül ötszázszoros fluoreszcencia-intenzitás-növekedést idéz elő, miközben a színek nagyobb energiák irányába tolódik el.

A spektrumban bekövetkező változás azzal magyarázható, hogy a B^+ részben beágyazódik a CB7 hidrofób üregébe, lecsökken a B^+ környezetében a víz koncentrációja, sokkal kevésbé poláris környezetet észlel. Inbaraj és munkatársai azt tapasztalták, hogy a B^+ fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője nő az oldószer polaritásának csökkenésével, miközben a fluoreszcencia-maximum kisebb hullámhosszak irányába tolódik el [27].

A B^+ -CB7 komplex emissziós maximuma 19700 cm^{-1} -en jelentkezik. A Stokes eltolódás jelentősen kisebb, mint gazdavegyületet nem tartalmazó oldószerekben. Ez arra enged következtetni, hogy a CB7 üreg nemcsak apoláris mikrokörnyezetet biztosít a B^+ számára, hanem gátolja a gerjesztett vendégmolekula relaxációs folyamatait.

Az 30.B ábra a fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényező változását mutatja (Φ_F) a gazdamolekula koncentrációjának függvényében. Kezdeti meredek növekedés után Φ_F határértéket ér el. A színekben bekövetkező változás leírható az 1:1 komplexálódásra levezetett (23) összefüggéssel analóg módon.



30. ábra (A) CB7 hatása (0,079, 0,14, 0,23, 0,35, 0,50, 0,67, 0,84, 1,18, 2,19, 5,98 és 15,8 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) a berberin (0,52 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) emissziós színe vizben ($\lambda_{\text{exc}}=400\text{ nm}$). Az alsó ábra (B) a B^+ fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőjét mutatja CB7 koncentrációjának függvényében. A folytonos vonal a legjobb illesztésnek felel meg.

A nemlineáris illesztésből származtatott egyensúlyi állandót és a komplex számított fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőjét, valamint a mért élettartamokat az 5. táblázatban foglaltam össze.

A komplex fluoreszcencia lecsengése egy exponenciális tagot tartalmazó függvényvel jól leírható ($\tau_F=11,6$ ns). A B^+-CB7 komplex fluoreszcencia kibocsátási sebességi együtthatója a Φ_F^∞ és τ_F ismeretében számítható, $k_F=2,3 \times 10^7$ s⁻¹.

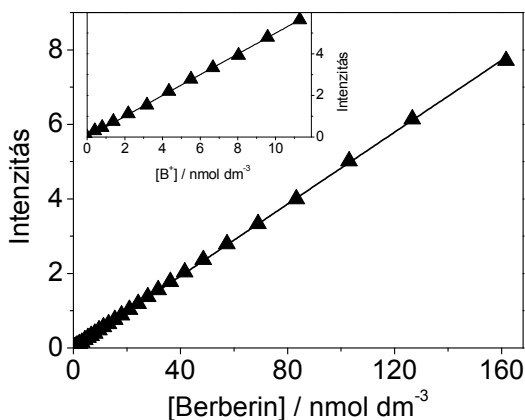
5. táblázat A B^+-CB7 komplex képződés egyensúlyi állandójának logaritmus, illetve fluoreszcenciás sajátosságai Na^+ -ion jelenlétében és hiányában.

Adalék	log K	ν_F (max) cm ⁻¹	Φ_F^∞	τ_F ns
-	6,20	19700	0,26	11,6
[NaCl]=0,05 M	5,29	19700	0,15	7,6
[NaI]=0,05 M	5,50	19700	0,11	7,3
foszfát puffer [Na ⁺]=0,05 M	5,51	19700	0,16	7,8

A B^+ etanolban mért fluoreszcencia élettartama és fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője csaknem egy nagyságrenddel kisebb ($\tau_F=1,3$ ns, $\Phi_F=0,033$), miközben a fluoreszcencia kibocsátási sebességi együtthatójára számított érték közel azonos ($2,5 \times 10^7$ s⁻¹) a B^+-CB7 komplex k_F értékével. Ez arra utal, hogy a komplexálódás elsősorban a szingulett gerjesztett állapot sugárzásmentes energiavesztési folyamatára hat.

Érdekes összehasonlítani a különböző makrociklusokkal (CB7, 4-szulfonáto-kalix[8]arén (SCX8) és β -ciklodextrin (β -CD) kölcsönhatásba lépő B^+ sajátosságait. Mind a három esetben 1:1 sztöchiometriájú komplexképződéssel állunk szemben, de B^+-CB7 komplex egyensúlyi állandója több mint 5-ször nagyobb a fentebb leírt B^+-SCX8 esetén kapott értéknél, illetve 10000-szer nagyobb, mint a $B^+-\beta$ CD komplex egyensúlyi állandója [31]. Másrészt a B^+-CB7 komplex fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője több mint 13-szor nagyobb, mint amit B^+-SCX8 komplex esetében mértünk pH=2 oldatban. A fluoreszcencia-

maximum helye is nagymértékben függ a gazdamolekulától. A B^+ emissziós sáv maximuma vízben 17900 cm^{-1} , a B^+ -SCX8, B^+ - β CD és B^+ -CB7 komplexeké pedig 18280 cm^{-1} , 18870 illetve 19700 cm^{-1} hullámszámnál jelentkeznek. A B^+ fluoreszcencia-maximumának a helye a mikrokörnyezet polaritásáról ad információt, így a CB7 üregnek a legkisebb a polaritása. Következésképpen elmondhatjuk, hogy gazdamolekulaként a CB7 bizonyul a legjobbnak a B^+ kvantitatív meghatározására fluoreszcenciás módszerrel. A nagy egyensúlyi állandónak köszönhetően széles berberinkoncentráció-tartományban teljes a komplexálódás még akkor is, ha CB7 koncentrációja csak $57\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$. Ezt a CB7 koncentrációt állandónak tartva változtattuk a B^+ koncentrációját. Ábrázolva az emissziós sáv maximumában mért intenzitást a berberin koncentrációjának függvényében, lineáris változást kapunk (31. ábra).



31. ábra Fluoreszcencia-intenzitás-növekedés B^+ koncentrációjának fokozatos növelésével $57\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ CB7-et tartalmazó vizes oldatban. A gerjesztő hullámhossz 347 nm . A belső ábra a kis B^+ koncentrációtartomány kinagyított képe.

Látható, hogy legalább 160 nmol dm^{-3} B^+ koncentrációig a linearitás megmarad, és a belső ábrából kitűnik, hogy ilyen körülmények között akár 1 nmol dm^{-3} koncentráció alatti B^+ is kimutatható.

5.3.3. Nátriumsók hatása

Az irodalomból ismert, hogy CBn komplexek stabilitása illetve a vendégmolekula kötődésének kinetikája szabályozható szerves kationokkal [94, 136], de anionok hatásáról az irodalom nem számol be.

Ezért megvizsgáltuk, hogy különböző nátriumsók milyen hatással vannak a B^+ -CB7 komplex egyensúlyi állandójára illetve fluoreszcenciás sajátosságaira. NaCl, NaI, valamint NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 puffer (1:1 mólarány) felhasználásával az oldatban $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ Na^+ -koncentrációt állítottunk be. A komplex egyensúlyi állandója, a fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője illetve a lecsengési paraméterei csak nagyon kis mértékben változtak az alkalmazott ionforrástól, miközben a fluoreszcenciasáv maximumának a helye nem változott. A mért adatokat az 5. táblázatban foglaltam össze.

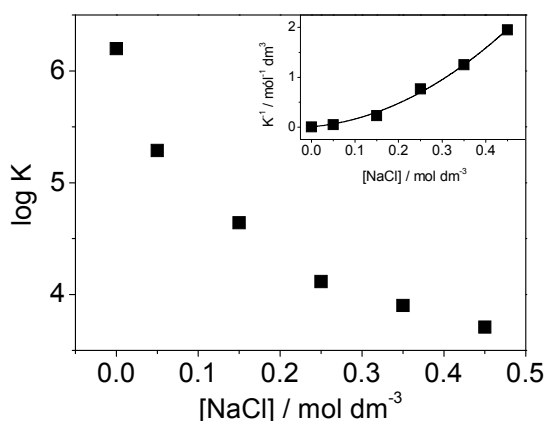
Elméleti számítások alapján feltételezték [137], hogy az anionok a kukurbituril üregének külső részén helyezkednek el, ahol a makrociklus részlegesen pozitív töltésű szénatomjainak vonzó hatását élvezik. Így a CB7 üregébe ékelődött B^+ védve van kioltókkal, mint például I^- szemben, mely diklór-metánban kioltja a gerjesztett B^+ fluoreszcenciáját.

B^+ -CB7 komplex stabilitása jelentősen csökken sók jelenlétében (5. táblázat). Ez összhangban van az irodalmi adatokkal, miszerint az alkáli ionok készséggel koordinálnak a CB7 karbonilcsoportjaihoz, akadályozva ez által a szerves molekula beékelődését [69, 94, 136, 138].

A nátriumsó nemcsak a B^+ és CB7 között kialakuló komplex egyensúlyi állandójára van hatással, hanem csökkenti a kialakuló komplex fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezőjét, illetve fluoreszcencia-élettartamát.

5.3.4. NaCl koncentrációjának a hatása

A B^+ -CB7 komplex egyensúlyi állandójának értéke jelentősen csökken a NaCl koncentrációjának növelésével. A 32. ábra a számított egyensúlyi állandók logaritmusát ($\log K$), illetve az ábra belső része az $1/K$ értéket mutatja a NaCl koncentrációjának függvényében. A folytonos vonal a legjobb illesztésnek felel meg, melyet az $1/K=(6,34 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3)+7,58 \times 10^{-5}[\text{NaCl}]+(7,99 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3)[\text{NaCl}]^2$ függvénnyel kaptunk.



32. ábra B^+ -CB7 komplex képződés egyensúlyi állandójának logaritmusának a NaCl koncentráció függvényében. A belső ábra az egyensúlyi állandó reciprokát mutatja a NaCl-koncentráció függvényében. A folytonos vonal a legjobb illesztésnek felel meg.

A CB7 komplex képződés egyensúlyi állandójának reciproka függ a rendszerben jelen levő Na^+ koncentrációtól és ezt a következő összefüggés írja le [69]:

$$\frac{1}{K} = \frac{1 + K_2[\text{Na}^+] + K_2K_3[\text{Na}^+]^2}{K_1 + K_2K_4[\text{Na}^+]} \quad (48)$$

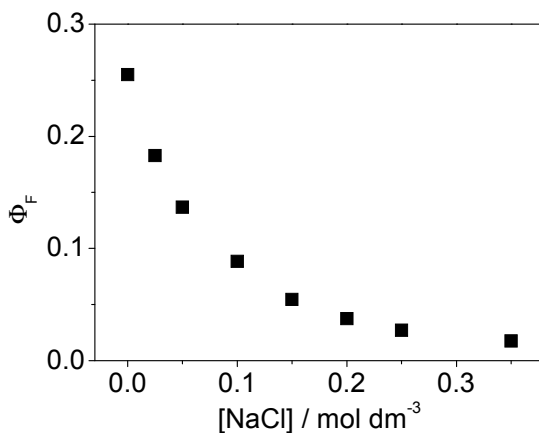
ahol K_1 és K_2 jelöli a vendégmolekula-CB7, és Na^+ -CB7 komplexek egyensúlyi állandóját, K_3 és K_4 , pedig a Na^+ -CB7 és Na^+ illetve a szerves vendégmolekula közötti reakció egyensúlyi állandóját jelöli. Feltételezve, hogy a (48) egyenlet

érvényes a B^+ -CB7 komplexnek Na^+ -al való kölcsönhatására is, négyzetes Na^+ koncentrációfüggés várható, ha $K_1 \gg K_2 K_4 [Na^+]$:

$$\frac{1}{K} = \frac{1 + K_2 [Na^+] + K_2 K_3 [Na^+]^2}{K_1} \quad (49)$$

A kísérleti adatokra a (49) összefüggést illesztettük. Rögzítve a már korábban meghatározott K_1 értékét, a Na^+ és CB7 illetve Na^+ -CB7 és Na^+ közötti reakció egyensúlyi állandójára $K_2 = 120 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ és $K_3 = 11 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ értéket kaptunk.

A K_2 egyensúlyi állandó értéke túl kicsinek tűnik, mivel egy nagyságrenddel nagyobb egyensúlyi állandót közöl az irodalom a Na^+ és CB6 asszociációjára [138, 139]. Ez a különbség abból adódhat, hogy a (49) egyenlet levezetésekor feltételezett mechanizmus mellett más folyamatok is szerepet játszhatnak a B^+ -CB7 és $NaCl$ -ot tartalmazó oldatban. Az irodalomban közölt kvantitatív analízis [69] a kisebb méretű kukurbit[6]urillal alkotott komplexekre vonatkozik. Azonban mi a nagyobb kukurbit[7]uril és B^+ között kialakuló komplexet vizsgáltuk, mely mérete folytán több, Na^+ -nal is kölcsönhatásba léphet.

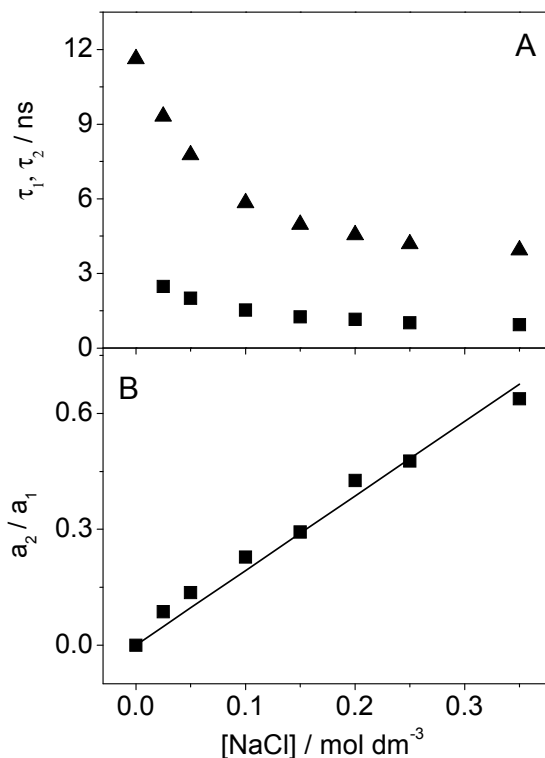


33. ábra A B^+ -CB7 komplex fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezője a $NaCl$ koncentráció függvényében ($2,66 \mu \text{ mol dm}^{-3} B^+$ és $55 \mu \text{ mol dm}^{-3} CB7$ vizes oldata).

A 33. ábra B^+ -CB7 komplex fluoreszcenciás sajátosságainak változását mutatja a hozzáadott só koncentrációjának függvényében.

A fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényező tizenötödére csökken, ha 0-ról $0,35 \text{ mol dm}^{-3}$ -re növeljük a NaCl koncentrációját. A $0,025\text{--}0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl koncentrációtartományban a fluoreszcencia-lecsengéseket két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel lehet kellő pontossággal megilleszteni.

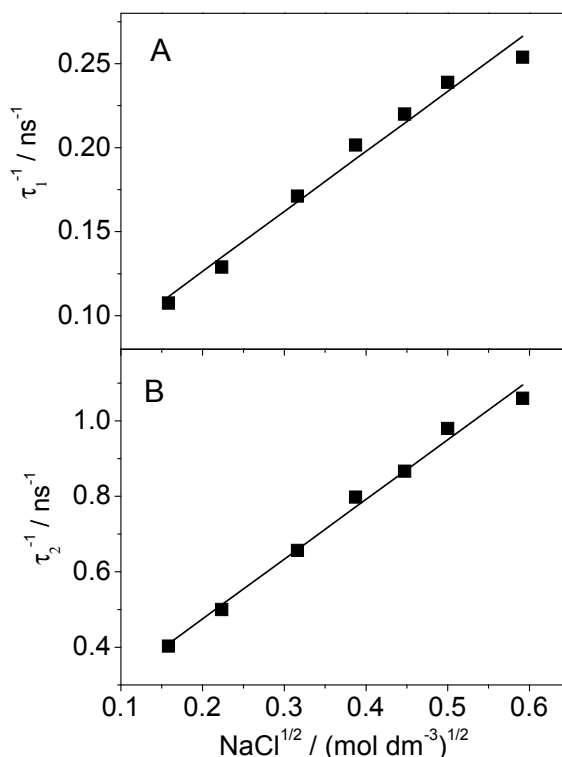
A nagyobb élettartam (τ_1) majdnem harmadára csökken miközben a kisebb élettartamot (τ_2) a só kis mértékben befolyásolja (34. ábra).



34. ábra NaCl hatása a B^+ -CB7 komplex fluoreszcencia-élettartamára (A) illetve a fluoreszcencia-lecsengés preexponenciális tényezőinek arányára ($\lambda_{\text{dei}}=490 \text{ nm}$) (B).

Az időfelbontott fluoreszcencia-kiértékeléséből származtatott preexponenciális tényezők aránya (a_2/a_1) növekszik a NaCl koncentrációjának a növelésével. $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl koncentráció felett megjelenik egy harmadik komponens is, melynek hozzájárulása nagyon kicsi, számértéke pedig a B^+ -CB7

komplexével azonos (11,6 ns), de relatív hozzájárulása ($100a_3/\sum a_i$) mindig 4 % alatt marad.



35. ábra $B^+ - CB7$ (A) és $B^+ - CB7 - Na^+$ (B) komplex fluoreszcencia-élettartamának reciproka ($\lambda_{det}=490$ nm) NaCl mennyiség négyzetgyökének függvényében.

Lineáris összefüggést találtunk a τ_1 és τ_2 fluoreszcencia-élettartam reciproka és a NaCl koncentráció négyzetgyöke között, ami jól látható a 35. ábrán.

Hasonló viselkedést tapasztalunk, amikor perklorátsót adagolunk a butironitrilben oldott berberinhez (5.1.3 fejezet). Ez annak tulajdonítható, hogy megnő a lokális ionkoncentráció a gerjesztett berberin mikrokörnyezetében, ami az energiavesztési folyamatokat felgyorsítja. Valószínűleg a NaCl okozta fluoreszcencia-élettartam-csökkenés is ezzel magyarázható. A rövid élettartamhoz rendelhető preexponenciális tényező értéke növekszik, ahogy növeljük az adalék koncentrációját, ami a Na^+ koordinálódásával magyarázható a $B^+ - CB7$

komplexhez. Ebben az esetben az amplitúdók arányának (a_2/a_1) lineáris kapcsolatot kell mutatnia a só koncentrációjával, mely a következő egyenlettel értelmezhető:

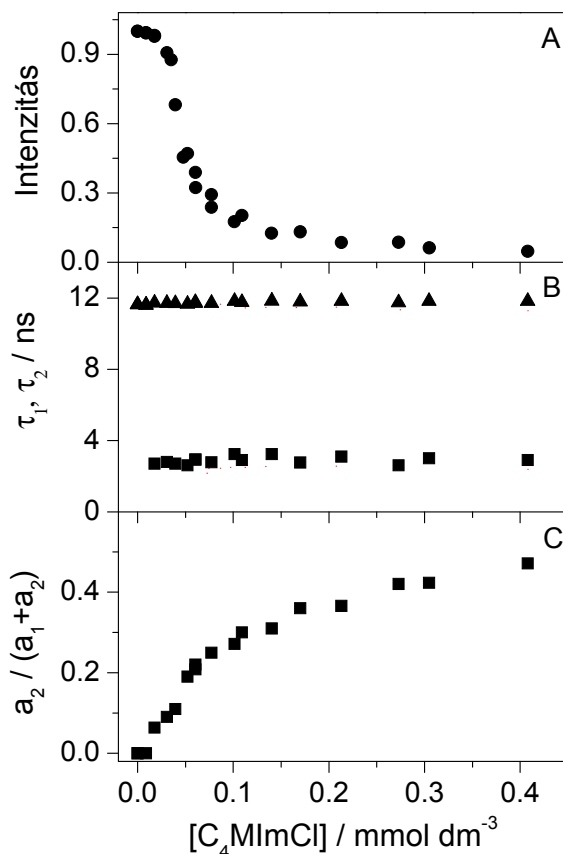
$$\frac{a_2}{a_1} = \frac{\varepsilon_2 k_2^F}{\varepsilon_1 k_1^F} K_T [NaCl] \quad (50)$$

ahol K_T a hármas komplex, ($B^+ - CB7 - Na^+$) egyensúlyi állandója, k_2^F és k_1^F a gerjesztett $B^+ - CB7 - Na^+$ és $B^+ - CB7$ fluoreszcencia kibocsátási sebességi együtthatót jelöli. Mivel az elnyelési színek elhanyagolható mértékben változik, a $B^+ - CB7 - Na^+$ és $B^+ - CB7$ komplexek moláris elnyelési együttható megegyezik, így az arányuk ($\varepsilon_2/\varepsilon_1$) a gerjesztő hullámhosszon 1. A 34. B ábrán látható, hogy valóban lineáris összefüggés van a preexponenciális tényezők aránya és a NaCl koncentrációja között. A mért adatok legkisebb négyzetösszeges illesztésének eredményét az ábrán folytonos vonal jelzi. A (50) egyenletet szerint az egyenes meredekségére $K_T(k_2^F/k_1^F) = 1,9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ értéket számítottunk. Nem lehet olyan kísérleti körülményeket teremteni, ahol csak a három alkotórészből felépülő ($B^+ - CB7 - Na^+$) komplex van jelen, így a k_2^F értékét sem tudjuk pontosan meghatározni. Mivel a $B^+ - CB7 - Na^+$ fluoreszcencia kibocsátás sebességi együtthatója nem valószínű, hogy nagyobb, mint a $B^+ - CB7$ komplexé, ezért a Na^+ és $B^+ - CB7$ közötti reakció egyensúlyi állandója sem lehet nagyobb, mint $K_T \approx 1,9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$.

5.3.5. Ionfolyadékok hatása

Megvizsgáltuk, hogy a $B^+ - CB7$ komplex fluoreszcenciáját miként módosítja az 1-butil-3-metil-imidazólium-klorid ionfolyadék (C_4MImCl).

36. A ábra a $B^+ - CB7$ komplex fluoreszcencia-intenzitásában bekövetkező változást mutatja a hozzáadott $[C_4MIm]Cl$ ionfolyadék koncentrációjának függvényében. A kezdeti oldat $2,66 \mu\text{mol dm}^{-3}$ B^+ -t és $55 \mu\text{mol dm}^{-3}$ $CB7$ -et tartalmazott. Ilyen körülmények között a B^+ komplexálódása gyakorlatilag teljes.



36. ábra C₄MImCl hatása a 2,66 μmol dm⁻³ B⁺ és 55 μmol dm⁻³ CB7 vizes oldatának fluoreszcencia-intenzitására (A), illetve a fluoreszcencia-lecsengési paramétereire (B), és a preexponenciális tényezők arányára (C) (λ_{dei}=490 nm).

Az ábrából kitűnik, hogy három nagyságrenddel kevesebb ionfolyadék okoz ugyanakkora fluoreszcencia-kioltást, mint a NaCl. Időben felbontott fluoreszcencia-mérésekre volt szükség, hogy feltérképezzük a folyamat mechanizmusát. A vizsgált koncentrációtartományban a B⁺-CB7 komplexhez rendelt (11,6±0,3 ns) fluoreszcencia-élettartam mindvégig változatlanul megmarad. 0,03 mmol dm⁻³ ionfolyadék-koncentráció felett megjelenik egy rövidebb (2,8±0,2ns) élettartam is, melyhez tartozó preexponenciális tényező értéke az ionfolyadék koncentrációjának növelésével fokozatosan nő. Ez utóbbi komponens, sokkal hosszabb és intenzívebb, mint a B⁺ emissziója vízben, valamint B⁺ és/vagy

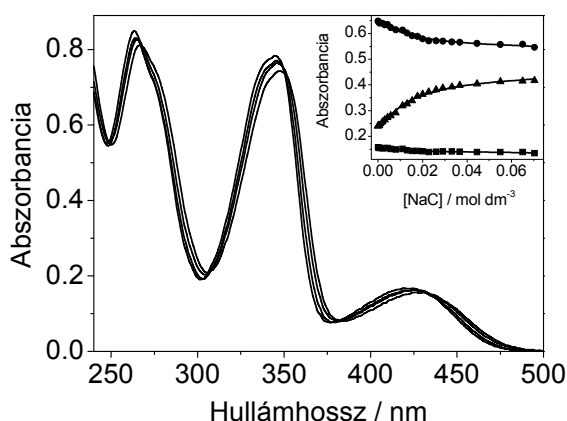
CB7 nélkül nem detektálható. Így egy eddig nem tapasztalt részecske jelenléte feltételezhető, mely nem lehet más, mint a $B^+ - CB7 - C_4Mim^+$ hármes komplex. A CB7 üregében a B^+ beékelődése után nincs hely a C_4Mim^+ ion számára, következésképpen az 1-butil-3-metil-imidazólium ion a gazdamolekula külső részén helyezkedhet csak el. A CB7 és C_4MimCl közötti kölcsönhatást nem lehet kizárni. A hármes komplex és a $CB7 - C_4Mim^+$ komplex egyensúlyi állandója összemérhető kell, hogy legyen, mert ellenkező esetben a $2,8 \pm 0,2$ ns-os élettartamot nem detektálhatnánk. A fluoreszcenciaspektrum $0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ionfolyadék jelenlétében sokkal intenzívebb és a fluoreszcencia maximuma is kisebb hullámhossznál jelenik meg (510 nm), mint a B^+ -é (565 nm). Ez arra utal, hogy a kísérleti körülményeink között a C_4Mim^+ kation nem szorítja ki a B^+ -t a gazdamolekula üregéből. Érdeemes megjegyezni, hogy nem tapasztaltunk jelentős eltérést, ha az 1-alkil-3-metil-imidazólium kationban a butilcsoportot decilcsoportra cseréltük.

Az ionfolyadék okozta hatást olyan kísérleti körülmények között is tanulmányoztuk, amikor a B^+ volt feleslegben, így alig volt jelen szabad CB7 a rendszerben ($[B^+] = 32,5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, $[CB7] = 4 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$). Ebben az esetben is jelentős fluoreszcencia-intenzitás-csökkenést tapasztaltunk, valamint a fluoreszcencia-lecsengések is csak két exponenciális tagot tartalmazó függvényvel értékelhetők ki. Megjelenik egy $2,6 \pm 0,2$ ns körüli élettartamú részecske, melynek relatív hozzájárulása nő C_4MimCl fokozatos hozzáadásával $0 - 200 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ koncentráció tartományban. Ez a jelenség szintén a $B^+ - CB7 - C_4Mim^+$ komplex jelenlétét támasztja alá.

5.4. Epesav aggregáció fluoreszcenciás vizsgálata berberinnel

5.4.1. Nátrium-kolát epesav hatása a berberin elnyelési és emissziós színekére

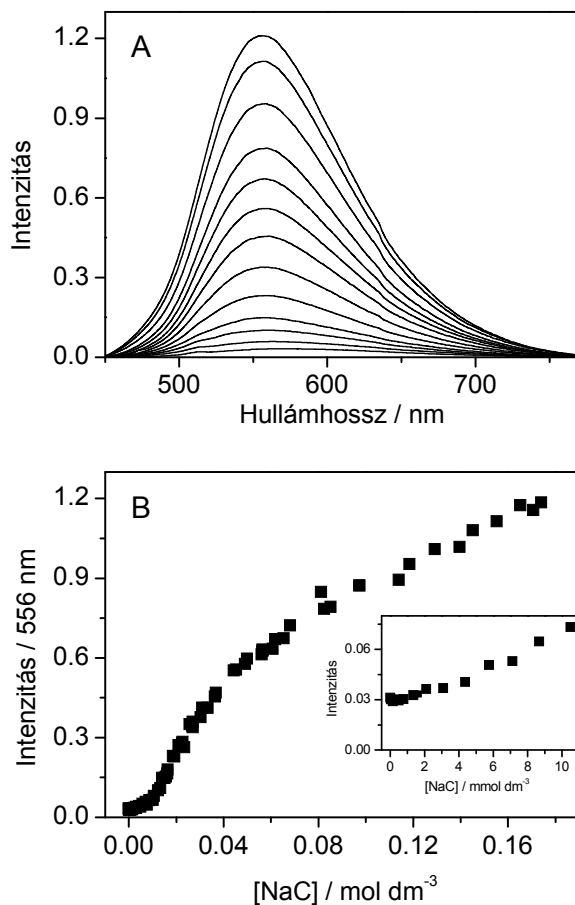
Az 37. ábrán a berberin elnyelési színekében epesav hatására bekövetkező változás látható. Fokozatosan növelve a nátrium-kolát (NaC) koncentrációt a spektrumban vörös eltolódás tapasztalható, ami arra utal, hogy a berberin kölcsönhatásba lép az epesavval, miközben négy izobesztikus pont bontakozik ki.



37. ábra A berberin elnyelési színekében NaC hatására bekövetkező változás. A belső ábra 330, 363, 410 nm-en mért abszorbanciát mutatja az adalékanyag koncentrációjának függvényében. A folytonos vonalak a legjobb illesztéseknek felelnek meg.

Már igen kis nátrium-kolát (NaC) koncentrációtól (2-3 mmol dm⁻³-től) megváltozik a berberin spektruma, ami kisebb, mint az epesavra közölt “micellaképződési” koncentráció (cmc) irodalmi értéke [96-100]. Ez arra utal, hogy a pozitív töltésű berberin elősegíti a NaC aggregációját. A 37. ábra belső része három hullámhosszon mért abszorbancia változását mutatja a NaC koncentrációjának a függvényében. Jól látható, hogy az abszorbanciaértékek 30 mmol dm⁻³-nél határértéket érnek el, következésképpen az abszorpciós színek nem érzékeny a nagyobb aggregátumok keletkezésére.

Az 38. A ábrán a berberin fluoreszcencia-szinképében bekövetkező változás látható NaC fokozatos hozzáadására.



38. ábra (A) NaC hatása a berberin ($36\mu\text{mol dm}^{-3}$) emissziós szinképére vízben ($\lambda_{\text{exc}}=435$ nm). (B) 556 nm-en detektált intenzitásváltozás. A belső ábra a kis NaC koncentrációknál bekövetkező változás kinagyított képe.

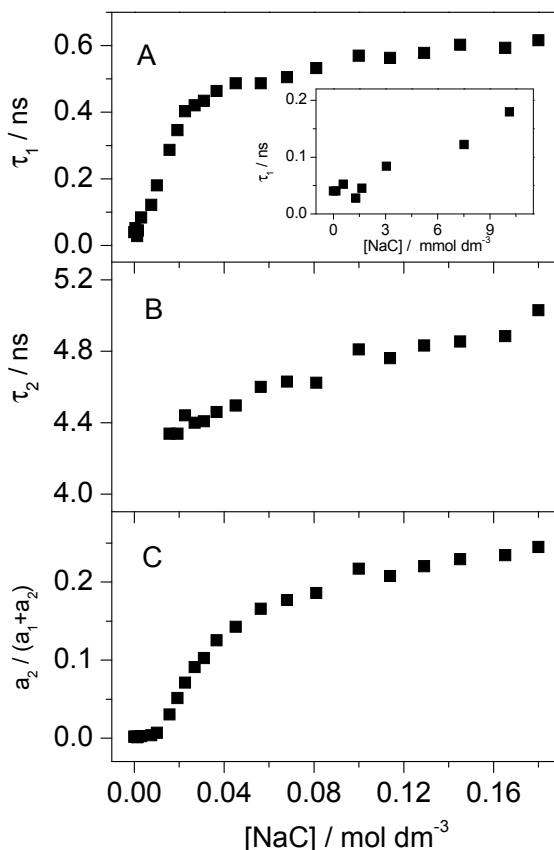
A gerjesztő hullámhossz 435 nm volt, miközben a 4 nm-es réseket használtunk. A berberin vízben igen gyengén fluoreszkál, az irodalom $4,7 \times 10^{-4}$ kvantumhasznosítási tényezőt közöl D₂O-ban. A jelentős fluoreszcencia-intenzitás-növekedés, valamint a szinkép kék eltolódása, ami jellemző a berberinre, ha kisebb polaritású mikrokörnyezetbe kerül, egyértelmű bizonyíték a nátrium-klót

aggregációra. A 38. B ábra az 556 nm-en mért fluoreszcencia-intenzitás epesavkoncentráció-függését mutatja, míg a belső kis ábra a kezdeti rész kinagyított képét szemlélteti. Látható, hogy 2 mmol dm^{-3} NaC koncentráció alatt nem tapasztaltunk fluoreszcencia-intenzitás-növekedést, ami azt sugallja, hogy ilyen híg oldatokban nincs a berberin és epesav között semmilyen kölcsönhatás. Csekély változást tapasztaltunk $2\text{-}10 \text{ mmol dm}^{-3}$ koncentráció tartományban, míg tovább növelve az epesav-koncentrációt jelentős fluoreszcencia-intenzitás-növekedés figyelhető meg.

Érdemes megjegyezni, hogy a NaC a berberin fluoreszcenciáját feltűnően másképp befolyásolja, mint a hagyományos felületaktív anyag, a nátrium-dodecilszulfát (SDS) [33]. A berberin fluoreszcenciája maximumgörbe szerint változik SDS hatására. Fokozatosan növelve az SDS koncentrációját, körülbelül $4 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációig az emissziós színekben fluoreszcencia-intenzitás-növekedést tapasztaltak, amit a berberin és a negatív töltésű dodecilszulfát-ion között kialakuló ionpár képződésével magyaráztak. Tovább növelve az SDS koncentrációját a molekulák asszociálódnak, ami fluoreszcencia-intenzitás-csökkenéshez vezet. A kritikus-micellaképződési koncentrációt elérve a fluoreszcencia-intenzitás határértéket ér el, tovább növelve az SDS koncentrációját változatlan marad. A berberin eltérő fluoreszcenciás viselkedése a NaC aggregátumokban és SDS micellában azt jelzi, hogy ez utóbbi esetben a micella határfelületi rétegében több vízmolekula helyezkedik el, a berberin sokkal polárisabb mikrokörnyezetet észlel, mint a NaC aggregátumok esetében. A másodlagos NaC aggregátumok sokkal nagyobb védelmet biztosítanak a majdnem planáris [28] berberinnek vízzel szemben, mint az SDS micella.

Ahhoz hogy mélyebben megismerjük a kölcsönhatás típusát időfelbontott fluoreszcencia-mérésekre volt szükség. A berberin fluoreszcencia-élettartama vízben, adalékanyag hiányában 40 ps. A mérési eredményeket a 39. ábra szemlélteti. Ahogy a belső ábrán látszik, 2 mmol dm^{-3} alatti koncentrációknál a berberin fluoreszcencia-élettartama változatlan, következésképpen nincs ilyen koncentrációig semmilyen kölcsönhatás a vizsgált alkaloid és epesav között. $2\text{-}10$

mmol dm⁻³ koncentrációtartományban a berberin fluoreszcencia élettartama nő, miközben továbbra is exponenciális lecsengéseket tapasztalunk.



39. ábra A berberin (34 μmol dm⁻³) (A,B) fluoreszcencia-élettartamában NaC hatására bekövetkező változás. (C) Az alsó ábra 650 nm-en mért preexponenciális tényezők relatív hozzájárulásának NaC koncentrációfüggését mutatja (λ_{exc}=400 nm).

10 mmol dm⁻³ feletti koncentrációnál a lecsengéseket már csak két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel lehetett kellő pontossággal kiértékelni. Megjelenik egy 4,3 – 4,9 ns-os élettartam, melynek hozzájárulása növekszik a NaC koncentrációval (39. C ábra). Fokozatosan növekszik a rövid élettartam is, mely határértéket ér el, és 23 mmol dm⁻³ epesav-koncentráció felett csak kis mértékben változik. A mérési eredményeinket Small és munkatársai által feltételezett (2.4.4.

fejezet, [111-113]) kétlépcsős asszociációs modellel lehet értelmezni. Vagyis kezdetben (10 mmol dm^{-3} epesav-koncentrációig) csak elsődleges aggregátumok vannak jelen, míg e feletti koncentrációtartományban már a másodlagos aggregátumok is keletkeznek.

Az elnyelési és fluoreszcencia-színkép valamint az időfelbontott fluoreszcenciás mérések a berberin kötődését jelzik a NaC aggregátumokhoz. A $2\text{--}10 \text{ mmol dm}^{-3}$ koncentráció tartományban képződő elsődleges aggregátumok túl kicsik ahhoz, hogy a berberin teljesen beékelődjön, és izolálva legyen a víztől. Ezért kis változás tapasztalható a spektrális paramétereiben valamint fluoreszcencia-élettartamában. A Coulomb-kölcsönhatás a pozitív töltésű berberin és a kolát anionok között elősegíti az elsődleges aggregátumok keletkezését. A τ_1 élettartam $10\text{--}23 \text{ mmol dm}^{-3}$ epesav koncentráció tartományban bekövetkező jelentős változása az elsődleges aggregátumok fokozatos növekedésének tudható be, mely egyre apolárisabb mikrokörnyezetet teremt a berberin számára. Tovább növelve a NaC koncentrációt a τ_1 élettartamban már csak kis mértékű változás tapasztalható, ami azt sugallja, hogy 23 mmol dm^{-3} felett a berberin mikrokörnyezetének polaritása nem változik jelentősen. Mivel a τ_1 élettartam mindig rövid marad, sohasem haladja meg a $0,6 \text{ ns}$ -ot, arra következtethetünk, hogy az elsődleges aggregátumokba ékelődött berberinhez mindig hozzáfér a víz. A vendégmolekula pozitív töltésű, hidrofílebb része megakadályozza a teljes beékelődést a viszonylag kicsi és apoláris elsődleges aggregátumokba.

A másodlagos NaC aggregátumok nagyobbak és jóval polárisabbak, képesek teljesen magukba foglalni a berberint, így védelmet biztosítanak számára a vízzel szemben. Ezért a másodlagos aggregátumokba ágyazódott berberin fluoreszcencia-élettartama lényegesen hosszabb ($4,3\text{--}4,9 \text{ ns}$) mint az elsődleges aggregátumokhoz kötődötté. Az időfelbontott fluoreszcencia-mérések igazolták, hogy a jelentős fluoreszcencia-intenzitás-növekedés 10 mmol dm^{-3} NaC koncentráció felett elsősorban a másodlagos aggregátumok megjelenésének köszönhető, ahol a berberin fluoreszcencia-élettartama és kvantumhasznosítási tényezője sokkal nagyobb. A gerjesztett állapotból kiinduló folyamatok lassulása

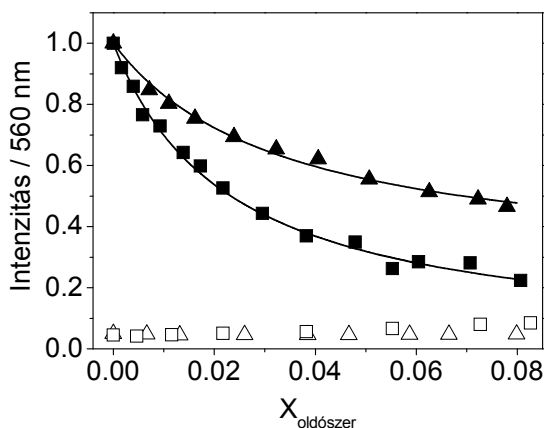
nem eredhet a mikrokörnyezet merevségéből, hiszen etanoltól az 1,2-etándiol felé haladva a viszkozitás nő, miközben egyre gyorsabb fluoreszcencia-lecsengés tapasztalható. A berberin fluoreszcencia-élettartamára 1,24 ns és 0,53 ns értéket közöl az irodalom e két oldószerben. A hidrogénkötés erőssége valamit az oldószer polaritása határozza meg a berberin fluoreszcenciás tulajdonságait, nem a viszkozitás.

Az időfelbontott fluoreszcencia-mérések kiértékeléséből származtatott preexponenciális tényező kapcsolatban áll az emittáló részecske koncentrációjával, így az $a_2/(a_1+a_2)$ értékének epesav-koncentráció függvényében való növekedése (39. C ábra) a másodlagos aggregátumok számának növekedését tükrözi. Mivel a τ_2 élettartam nagy és gyakorlatilag csak 16%-al nő a vizsgált koncentrációtartományban, megállapíthatjuk, hogy a berberin mikrokörnyezete kevésbé módosul a másodlagos aggregátumokban, és kevésbé poláris, mint az izopropanol, melyben a fluoreszcencia-élettartam 2,3 ns.

5.4.2. Oldószer hatása az nátrium-kolát aggregációjára

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, miként befolyásolja a lokális polaritás az aggregátumok sajátságait, különböző hidrofil, vízzel elegyedő szerves oldószereket adagoltunk a $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaC-t tartalmazó vizes oldatokhoz. Ilyen koncentráció mellett jelen vannak az elsődleges és másodlagos aggregátumok is.

A 40. ábrán a teli szimbólumok jelölik a berberin fluoreszcencia-intenzitásának 560 nm-en mért változását dimetil-formamid (DMF) illetve metanol (MeOH) móltörtjének fokozatos növelésével, míg az üres szimbólumok ugyanezen oldószerek hatását mutatják NaC-t nem tartalmazó oldatban. Jól látható, hogy ez utóbbi esetben a berberin fluoreszcencia-intenzitását a DMF és MeOH alig befolyásolja. Hasonlóan kis változást tapasztaltunk, ha formamidot (F) illetve acetonitrilt (AN) adtunk a rendszerhez.

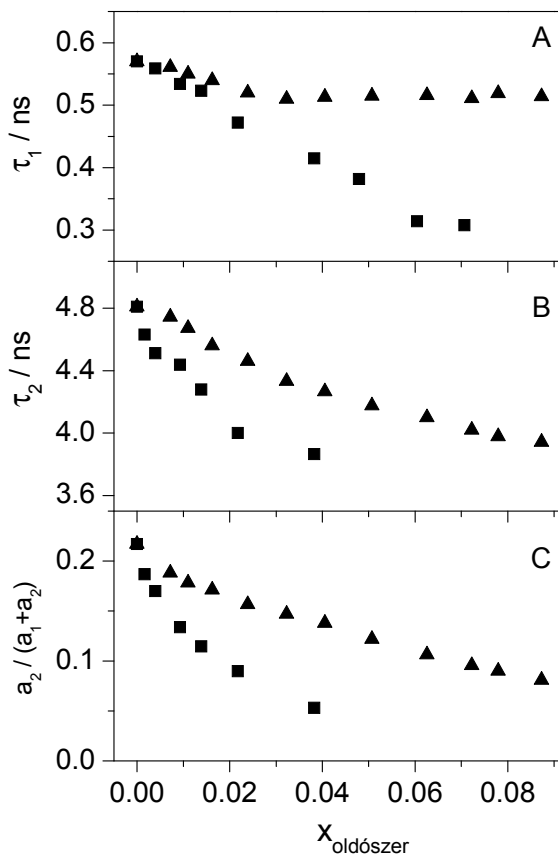


40. ábra 560 nm-en mért fluoreszcencia-intenzitás dimetil-formamid (■) és metanol móltörtjének a függvényében (▲) vízben $33 \mu\text{mol dm}^{-3}$ berberin és $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaC jelenlétében. Az üres szimbólumok az epesav hiányában mért változást mutatják.

A tapasztalt fluoreszcencia-intenzitás-csökkenés arra utal, hogy a berberin sokkal hidrofílebb környezetet érzékel, mint az eredeti aggregátumokban.

Időfelbontott fluoreszcencia-mérésekkel feltártuk az oldószer által okozott változások okát. A 41. ábrán DMF illetve MeOH hatása látható, míg az acetonitril illetve formamid hatását a 6. táblázatban foglaltam össze. Az $a_2/(a_1+a_2)$ érték csökkenése a DMF móltörtjének a függvényében egyértelműen igazolja, hogy a hosszabb élettartam (τ_2), mely a másodlagos aggregátumokhoz kötött berberinhez rendelhető, relatív hozzájárulása fokozatosan csökken, majd körülbelül 0,06 DMF móltörtnél teljesen eltűnik és a fluoreszcencia lecsengések már egy exponenciális függvénnyel írhatóak le. Ez a jelenség a másodlagos aggregátumok számának, koncentrációjának fokozatos csökkenésével magyarázható. Ha a $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaC tartalmú berberin vizes oldatához F-ot illetve MeOH-t adagolunk, a másodlagos aggregátumok még 0,08 mólaránynál is jelen vannak. A vizsgált szerves oldószer az $a_2/(a_1+a_2)$ arányt DMF > AN > F > MeOH sorban csökkentik. Következésképpen nincs kapcsolat az oldószer polaritása, hidrogén-donor- vagy hidrogén-akceptor-képessége és a másodlagos aggregátumok szétesése között. Valószínűleg a szerves oldószer-víz elegyek molekuláris szintű szerkezete határozza meg a szerves

oldószerek hatását a NaC aggregációra. Korábbi közlemények igazolták, hogy a MeOH molekulák asszociálódnak [140-143]. Ez lehet az oka annak, hogy a MeOH kis mértékű változást idéz elő az epesav aggregátumokban.



41. ábra Dimetil-formamid (■) és metanol (▲) hatása a fluoreszcencia-lecsengés kiértékeléséből származtatott (A, B) élettartamokra és (C) preexponenciális tényező hozzájárulásokra $33 \mu\text{mol dm}^{-3} B^+$ és $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{NaC}$ -ot tartalmazó vízben ($\lambda_{\text{exc}}=400$, $\lambda_{\text{dei}}=650 \text{ nm}$).

Ezzel szemben a DMF-nak nagyon kicsi az asszociációra való hajlama, mivel kicsi a kölcsönhatási energiája. Viszont a karbonilsoport oxigénjének nagy hidrogénkötési-képessége folytán [144, 145] a DMF képes befolyásolni a víz szerkezetét és sokkal hatékonyabban bontja meg a NaC aggregátumokat, mint a

metanol. A F-nak nagyobb hajlama van az asszociációra, mint a DMF-nak így a másodlagos epesav-aggregátumokat kevésbé bontja meg. Az AN közbeeső hatást fejt ki, mivel kisebb a hidrogénkötő képessége, mint a DMF-nak [146, 147]. Vizsgálataink során kis mennyiségben alkalmaztuk, ezért nagyrészt szolvatálva volt, így a víz szerkezetét kevésbé befolyásolta.

6. táblázat Formamid és acetonitril hatása a $33 \mu\text{mol dm}^{-3} B^+$ és $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{NaC}$ -ot tartalmazó oldat időben felbontott fluoreszcenciás paramétereire. χ^2 az illesztések jóságát jellemző paraméter (3.2.3. fejezet). A paraméterek hibája $\pm 5\%$.

Oldószer mólaránya	τ_1 / ns	τ_2 / ns	$a_2/(a_1+a_2)$	χ^2
Formamid				
0	0,57	4,81	0,217	1,25
0,0167	0,56	4,63	0,162	1,18
0,0323	0,53	4,44	0,123	1,17
0,0489	0,49	4,24	0,097	1,18
0,0650	0,49	4,16	0,077	1,16
Acetonitril				
0	0,57	4,81	0,217	1,25
0,0034	0,56	4,71	0,191	1,24
0,0084	0,54	4,54	0,175	1,28
0,0168	0,52	4,18	0,159	1,18
0,0330	0,48	3,76	0,114	1,27
0,0488	0,47	3,53	0,071	1,28
0,0640	0,42	3,49	0,041	1,25

A $a_2/(a_1+a_2)$ arányának csökkenése igazolja, hogy egyik alkalmazott oldószer sem szünteti meg az elsődleges aggregátumokat. Hasonló következtetést vont le egy másik kutatócsoport is, amikor szisztematikusan vizsgálta, hogy az acetonitril miként befolyásolja a vendégmolekula NaC aggregátumokba való

ékelődésének dinamikáját [110]. Kimutatták, hogy az elsődleges aggregátumba ékelődött vendégmolekula kilépésének sebességi együtthatója nő az acetonitril koncentrációjának növelésével.

A másodlagos aggregátumokba ékelődött berberin fluoreszcencia-élettartama (τ_2) 20%-al csökken a MeOH és DMF oldószerek móltörtjének növelésével. Az adalékanyag csökkenti a másodlagos aggregátumok számát, azonban nagyon kis mértékű változást idéz elő a megmaradó aggregátumok szerkezetében. Mint ahogy látható a 41. A ábrán, az elsődleges aggregátumokba beékelődött berberin élettartama (τ_1) az adalékanyag hatására másképpen változik. A metanol kis csökkenést idéz elő, míg a DMF jelentős változást okoz. A formamid és az acetonitril hozzáadására mért változás a metanol és DMF által okozott hatás közé esik.

Még 0,09 szerves oldószer móltörtnél is a berberin fluoreszcencia-élettartama jelentősen nagyobb 0,1 mol dm⁻³ NaC jelenlétében, mint ugyanolyan víz szerves oldószer elegyekben, de epesav hiányában. Ez egyértelműen bizonyítja, hogy egyik oldószer sem képes felszámolni az elsődleges aggregátumokat, valamint a berberin nem az oldószerelegyben, hanem NaC aggregátumokban van. A szerves oldószerek valószínűleg csökkentik a kolátionok közötti hidrofób kölcsönhatások erősségét, miközben az elsődleges aggregátumok kevésbé merev szerkezetűvé válnak és csökken az aggregációs számuk is. A víz könnyebben hozzáférhet a berberinhez, ami a fluoreszcencia-élettartam csökkenését okozza.

6. Összefoglalás

A berberin egy természetes izokinolinvázas alkaloid, melynek antitumor, antibakteriális, láz- és koleszterinszint-csökkentő hatása ismert. Gyógyászati jelentősége ellenére nagyon kevés információ áll rendelkezésre a fényelnyelést követő reakcióiról és fotofizikai sajátságairól. Ez meglepő, ugyanis ismert, hogy fény hatására bomlik és fototoxikus.

Szupramolekuláris komplexképzés akadályozhatja a bimolekuláris reakciókat, ezáltal védelmet nyújtva a fotokémiai átalakulások ellen, továbbá megváltoztatja a gerjesztett állapotok energiáját, ami jelentős változást okozhat az energiavesztési folyamatok sebességében. Ezért különböző gyűrűméretű 4-szulfonáto-kalix[n]arén illetve kukurbit[7]uril makrociklusos vegyületek és berberin közötti kölcsönhatást vizsgáltuk.

További célunk volt kidolgozni egy olyan rendszert, amely detektálni tudja az epesav-aggergátumok szerkezetének és nagyságának változását.

Mielőtt az alkaloidot fluoreszcenciás próbaként alkalmaznánk érdemes feltérképeznünk, hogy a berberin fluoreszcenciáját milyen fő tényezők szabják meg. Ezért vizsgáltuk, hogy különböző anionok miként módosítják a vegyület fluoreszcenciáját, feltártuk, hogy milyen kölcsönhatás határozza meg döntő mértékben a gerjesztett állapotból kiinduló folyamatok sebességét.

Mérsékelt poláris közegben a berberin ionpárt képez. Jelentős változást tapasztaltunk a berberin elnyelési színeképében, valamint fluoreszcenciás sajátságaiban diklór-metánban, ami B^+ és Cl^- között kialakuló ionpárnak köszönhető. Spektrofotometriás, fluoreszcenciás és időfelbontott fluoreszcenciás mérések együttes kiértékelésével meghatároztuk a B^+-Cl^- ionpárképződés egyensúlyi állandóját ($1,5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$). Igazoltuk, hogy a fluoreszcencia kibocsátás sebessége együtthatója jelentősen csökken, miközben a sugárzásmentes folyamatok felgyorsulnak ionpár képződéskor. Híg berberin-klorid oldathoz szerves klorid sót adva nemcsak 1:1 sztöchiometriájú ionpár képződése, hanem nemspecifikus kölcsönhatások is közrejátszanak a fluoreszcencia-kioltásban.

Lineáris korrelációt tapasztaltunk a fluoreszcencia-élettartam reciproka értéke és a különféle sók koncentrációjának négyzetgyöke között, ami arra utal, hogy a gerjesztett berberin környezetében elhelyezkedő ionok gyorsítják az energiavesztési folyamatokat. Tetrabutil-ammonium-perklorát is hasonló hatást fejt ki közepes polaritású oldószerekben, de a kioltás mértéke sokkal kisebb. Bár butironitrilben az ionpárképződés nem kap szerepet, mégis csökken a berberin fluoreszcencia-élettartama nagy perklorát koncentráció mellett. Ez igazolja, hogy a berberin alkaloid fluoreszcenciás próbakénti alkalmazásakor figyelembe kell venni nemcsak az ionpár-képződést, de a sóhatást is.

Kimutattuk, hogy a berberin szulfonato-kalixarénnel (SCX_n) és kukurbit[7]uril (CB7) makrociklusos vegyülettel nagy stabilitású szupramolekuláris komplexet képez. Szisztematikus vizsgálatokkal feltártuk, hogy a közeg pH-ja, illetve a kalixarén gyűrűmérete miként befolyásolja a folyamat egyensúlyi állandóját és a keletkezett komplex fluoreszcenciás sajátságait. A berberin abszorpciós és fluoreszcencia-színképében SCX hatására bekövetkező változásból határoztuk meg a kialakuló komplex egyensúlyi állandóját. A két módszerrel kapott értékek jó egyezést mutatnak. Megállapítottuk, hogy a kalixarén gyűrűmérete határozza meg a szupramolekuláris komplex stabilitását, míg a pH sokkal kisebb hatással van az asszociáció erősségére.

A berberin fluoreszcencia-színképének kék eltolódása azt jelzi, hogy az alkaloid kisebb polaritású mikrokörnyezetet észlel SCX8-ba ékelődve. A berberin fluoreszcencia-intenzitása SCX8-hoz kötődés hatására, erősen savas közegben (pH=2) több mint 40-szeresére nőtt, ami lehetővé tette már nyomnyi mennyiségű, 10^{-8} mol dm⁻³ koncentrációjú, berberin kimutatását. Megállapítottuk, hogy a pH alapvetően befolyásolja a komplex fluoreszcenciás tulajdonságait, minden vizsgált B-SCX_n komplex elhanyagolható mértékben fluoreszkál pH=12,2-nél, mivel a szingulett gerjesztett állapotú komplex komponensei közötti gyors elektronátadás hatékony energiavesztést okoz erősen lúgos közegben.

Igazoltuk, hogy a berberin erős, 1:1 sztöchiometriájú komplexet képez a CB7 makrociklusos vegyülettel vízben (logK=6,2). Kvantumkémiai számításaink

összhangban vannak a ^1H NMR mérésekkel, amik igazolják, hogy a fluoreszcenciás festék metoxi-izokinolin része ékelődik csak be a CB7 belső, hidrofób részébe. E folyamat hatására több mint ötszázszoros fluoreszcencia-intenzitás-növekedést tapasztaltunk, ami lehetővé teszi nanomol dm^{-3} alatti berberinkoncentrációk mérését is, és alapul szolgálhat nagy érzékenyséű fluoreszcenciás szenzor kifejlesztéséhez. A NaCl jelentősen megváltoztatja a komplex fluoreszcenciás sajátságait, valamint az egyensúlyi állandó értékét, míg az anion változtatása gyenge hatást fejt ki. Kimutattuk, hogy a szupramolekuláris komplex egyensúlyi állandójának reciproka négyzetgyökös függést mutat a NaCl koncentrációjától.

Az 1-alkil-3-metil-imidazólium-klorid ionfolyadék jobban módosítja B^+ -CB7 komplex fluoreszcencia sajátságait, mint a NaCl. Az ionfolyadék kationja készséggel kötődik a B^+ -CB7-hez, miközben hármas komplex képződik, mely kis fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényezővel és rövid fluoreszcencia-élettartammal jellemezhető.

A B^+ -CB7 komplex alkalmas lehet enzimek analitikai kimutatására, akárcsak a nemrég javasolt Dapoxil-CB7 rendszer. Jelentős előnye azonban a B^+ -CB7 párnak az, hogy széles pH tartományban alkalmazható, mivel a berberin fluoreszcenciája nem érzékeny a pH-ra. Ezzel szemben a Dapoxil-CB7 komplex csak savas oldatokban alkalmazható, mivel a festéket protonálni kell, hogy erős komplexet képezzen a CB7-vel. További előnye B^+ -CB7 rendszernek, hogy a berberin kiszorítása sokkal jelentősebb intenzitásváltozást idéz elő, mint a Dapoxil-CB7 rendszer esetében.

Vizsgálatainkat kiterjesztettük az NaC aggregátumokhoz kötődött berberin vizsgálatára is. Korábban alkalmazott semleges vegyületek vagy csak a primer vagy csak a szekundér aggregátumokhoz kapcsolódtak. Így nem lehetett követni segítségükkel az aggregátumok szerkezetének és nagyságának a változását. Mivel a berberin szerkezetében úgy hidrofil (ionos vegyület) mint hidrofób (aromás) rész is van nagy valószínűséggel úgy az elsődleges mint a másodlagos aggregátumokba is be fog ékelődni.

A berberin fluoreszcencia-intenzitása jelentősen módosul ha a NaC aggregátumokba ékelődik. Az abszorpció, fluoreszcencia és időfelbontott fluoreszcencia mérések azt jelzik, hogy B⁺ jelenlétében az elsődleges NaC aggregátumok már 2 mmol dm⁻³ koncentráció felett képződnek. A viszonylag kis méretű, hidrofób elsődleges aggregátumokba a berberin csak részben ágyazódik be, így a fluoreszcencia-élettartama kicsi (<0,62ps). A nagyobb, lényegesen polárisabb másodlagos asszociátumok 10 mmol dm⁻³ NaC koncentráció felett keletkeznek, és nagyobb védelmet biztosítanak a beékelődött alkaloid számára, mely ez által nem lép kölcsönhatásba vízzel. Ezért a másodlagos aggregátumokba ékelődött B⁺ élettartamára lényegesen nagyobb értéket mérünk (4,3-4,9 ns) .

A B⁺ egyedi tulajdonsága, hogy úgy az elsődleges, mint a másodlagos aggregátumokba beékelődhet, valamint az a tény, hogy fluoreszcencia-élettartama érzékenyen reagál a mikrokörnyezetében bekövetkező változásra, alkalmassá teszi az alkaloidot arra, hogy segítségével különböző szerves oldószerek hatását vizsgáljuk az epesav aggregációra.

Megállapítottuk, hogy a szerves oldószerek hatása a metanol < formamid < acetonitril < dimetil-formamid sorban nő, mert egyre jobban elősegítik a víz behatolását az aggregátumokba, és csökkentik a másodlagos aggregátumok számát.

7. Summary

Berberine (B^+), a clinically important natural isoquinoline alkaloid, is an active substance of traditional Eastern herbal medicines. It is a promising drug for the treatment of Alzheimer's disease, exhibits anticancer, antiviral, antibacterial activity, reduces fever and lowers cholesterol level. Despite the large biological and pharmaceutical importance of B^+ , very few systematic studies are available in the literature on its photophysical characteristics. This is particularly surprising because it is well known that B^+ is phototoxic and decomposes when it is irradiated with light.

Supramolecular complex formation may hinder bimolecular reactions, hereby providing protection against photochemical transformation. Furthermore, it can induce new energy dissipation pathways or modify the kinetics of the existing excited state relaxation processes. Therefore, we studied how complex formation with sulfonatocalixarenes and cucurbit[7]uril of different cavity size affects the fluorescent behavior of berberine cation.

Our other goal was to find such a molecule, which can detect the structure and size of the bile salts aggregates. Since B^+ contains both hydrophilic positively charged and hydrophobic aromatic moieties, we anticipated that unlike previously used probes, which are located in a single defined binding site, B^+ may be incorporated in both primary and secondary bile salts agglomerates.

Before B^+ is used as a fluorescent probe it is important to unveil the most important factors, which affect its fluorescence properties. This alkaloid inhibits intestinal ion transport, reduces Cl^- secretion and can serve as a K^+ channel-blocking agent in cells. Therefore, we examined how different types of anions influence the fluorescence of B^+ .

In solvent of medium polarity B^+ forms ion-pair with anions. In CH_2Cl_2 , the absorption spectrum of berberine chloride was found to be concentration dependent. Above 10 μM solute concentration, the concentration dependence of the absorbance is not linear. We attributed this to ion pairing between B^+ and Cl^- counter ion. In

order to get information about the fluorescence properties of B^+ and B^+-Cl^- ionpair, we recorded the fluorescence spectra and made time-resolved fluorescence measurements as well. Combined analysis of spectrophotometric, steady-state and time-resolved fluorescence results provided $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for the equilibrium constant of ion pairing with Cl^- in CH_2Cl_2 . We concluded that the radiative rate constant was significantly diminished, whereas radiationless deactivation was markedly accelerated due to the association with the counter ion.

Addition of Cl^- anion is expected to shift the ion pairing equilibrium of berberine chloride. We have chosen tetrabutylammonium (Bu_4N^+) and bis(triphenylphosphine)iminium (PPN^+) salts as chloride sources because their ion pairing have been thoroughly examined by electric conductance technique. Time-resolved measurements showed dual exponential fluorescence traces in CH_2Cl_2 . We found a component whose fluorescence lifetime ($\tau_2=1.0 \text{ ns}$) is independent of the anion concentration whereas the long-lived fluorescence is gradually quenched, and its relative contribution diminishes when Cl^- concentration is increased. The short-lived component is assigned to B^+Cl^- ion pair, and the long one to B^+ . If we plot the reciprocal fluorescence lifetime of B^+ as a function of Cl^- concentration, the slope of the linear correlation gives the rate constant of dynamic quenching. For this quantity, we obtained 3.7×10^{11} and $1.4 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$ in the presence of $Bu_4N^+Cl^-$ and PPN^+Cl^- , respectively. These values are larger than the rate constant of diffusion-controlled reactions, which means that not only 1:1 ion pairing but also unspecific interactions between excited B^+ and ions resulted in fluorescence quenching. We found a good linear correlation between the ratio of fluorescence decay parameters and the square root of salt concentration, which indicates that the increase of the local ion concentration in the surroundings of excited B^+ accelerates energy dissipation. Tetrabutylammonium perchlorate caused similar effect to that of $Bu_4N^+Cl^-$ and PPN^+Cl^- in solvent of medium polarity, but the extent of quenching was much smaller. Despite the lack of ion pairing in butyronitrile, the fluorescence lifetime of B^+ decreased at high perchlorate salt concentration. These results clearly

demonstrate that both ion pairing and salt effect should be taken into consideration when B^+ is used as a fluorescence probe in order to achieve an optimized response.

We found remarkably strong binding of B^+ to 4-sulfonatocalix[8]arene (SCX8) and cucurbit[7]uril (CB7) in aqueous solution. We unveiled how the size of the cavity of sulfonatocalixarenes and the pH influence the fluorescence properties and the stability of supramolecular complex. The stability of the complexes was determined from the alteration in the absorption and fluorescence spectra of B^+ upon addition of gradually increasing amount of sulfonatocalixarenes. We have demonstrated that the size of the macrocycle is the dominant factor determining the equilibrium constant of B^+ binding to p-sulfonated calixarenes, whereas the pH affects the association strength to a much lesser extent.

Addition of SCX8 to B^+ solution brings about a blue shift of the fluorescence peak, which means that B^+ senses less polar microenvironment when bound to SCX8. The fluorescence intensity of B^+ increases significantly upon complexation, which can be exploited to develop a sensitive fluorimetric method for the quantitative determination of SCX8 or B^+ .

While the cavity size has a great effect on the equilibrium constants, the pH influences the fluorescence quantum yield of the supramolecular complexes. All B^+ complexes proved to be practically nonfluorescent at pH=12.2 because of excited state quenching by the hosts via electron transfer.

Instead of the flexible sulfonatocalixarene type of macrocyclic compounds, we also used a relatively new, rigid host, cucurbit[7]uril (CB7), which is comprised of seven glycoluril units linked by pair of methylene groups.

We proved that B^+ forms very stable 1:1 inclusion complex with CB7 in water ($\log K = 6,2$). The results of AM1 semiempirical calculations with Hyperchem 7.52 program are in accord with that of the $^1\text{H-NMR}$ measurements, which confirms the partial inclusion of B^+ in the hydrophobic cavity of CB7. The methoxy-isoquinoline moiety is embedded in the host, and the heterocyclic nitrogen is located in the vicinity of the carbonyl-laced portal. The formation of the 1:1

inclusion complex led to about 500-fold fluorescence intensity enhancement. This behavior can be utilized to detect B^+ even below nanomolar concentration.

Due to the high electron density of the carbonyl oxygens of the macrocycle the stability of CB7 complexes and the kinetics of guests binding can be modified by inorganic cations. The association constant and the fluorescence quantum yield of the complex diminish significantly with increasing salt concentration, but the change of the anion causes a small effect. We found a quadratic NaCl concentration dependence of the reciprocal equilibrium constant of inclusion complex formation for B^+ -CB7.

We also studied how 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (C_4MImCl) ionic liquid affects the fluorescence behavior of B^+ -CB7 complex. C_4MImCl modify the fluorescent properties of B^+ -CB7 much more efficiently than NaCl. The fluorescence lifetime measurements proved the formation of a ternary complex between B^+ , CB7 and C_4MImCl . The ternary complex has a small fluorescence quantum yield and short fluorescence lifetime.

B^+ -cucurbit[7]uril complex may find practical applications in enzyme assays, similar to those recently reported by Nau and coworkers for the dapoxyl-CB7 fluorescent dye-macrocyclic host pair. The considerable advantage of the B^+ -CB7 pair studied in our work is that it can be utilized in a wide pH range, whereas dapoxyl-CB7 complex is useful only in slightly acidic solution. Moreover, larger fluorescence intensity change occurs upon displacement of B^+ from CB7 cavity into aqueous phase compared that reported for dapoxyl-CB7 pair, which permits the development of more sensitive analytical assays with the former alkaloid host.

We examined the absorption and fluorescence properties of B^+ upon binding to sodium cholate (NaC) bile salt aggregates in aqueous solution. The probes reported in the literature bind either to primary or to secondary aggregates. Hence, the structure change and the size alteration of bile salt aggregates cannot be followed with these probes.

The fluorescence intensity of B^+ increased significantly as we raised the NaC concentration in water. The alteration of the absorption spectrum, fluorescence intensity and lifetime clearly indicated binding of B^+ to NaC aggregates. The fluorescence lifetime of B^+ proved to be highly sensitive to the structure and size of the aggregates. At 2-10 mM NaC concentrations only primary aggregates were detected. Under this condition, B^+ is partially incorporated into the relatively small primary aggregates, where its fluorescence lifetime is lesser than 0.62 ns. The larger and more polar secondary aggregates, which provide better protection from interaction with water, are formed above 10 mM NaC concentration,. The fluorescence lifetime of B^+ in secondary aggregates is between 4.3–4.9 ns.

Because B^+ can be encapsulated into both type of bile salt aggregates and its fluorescence lifetime is very sensitive to the change in its microenvironment, this alkaloid an excellent probe for the study of the effect of organic solvents on bile salt agglomerates. The effect of cosolvent used in this study diminishes in the series of dimethylformamide > acetonitrile > formamide > methanol. The cosolvents enhanced the water accessibility of the probe bound to the primary bile salt aggregates, decreased the number of secondary aggregates but induced limited change in the structure of the remaining secondary aggregates.

8. Irodalomjegyzék

- [1] K. L. Wolf, H. Frahm, H. Harms, *J. Phys. Chem. B*, **36**, 237 (1937)
- [2] J. M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **50**, 871 (1979).
- [3] A. Villiers, C. R. Hebd, *Sciences Acad. Sci.*, **112**, 435 (1891).
- [4] E. Fischer, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **27**, 2985 (1894).
- [5] C. A. Schalley, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH:Weinheim, (2007).
- [6] G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, Oxford (1997).
- [7] J. S. Lindsey, *New J. Chem.*, **15**, 153 (1991).
- [8] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science*, **254**, 1312 (1991).
- [9] D. Philip, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **108**, 1243 (1996).
- [10] C. A. Schalley, A. Lützen, M. Albrecht, *Chem. Eur. J.*, **10**, 1072 (2004).
- [11] B. Valeur, *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, Wiley-VCH:Weinheim, Chapter 3 (2002).
- [12] M. J. Pilling, W. Paul Seakins, *Reakciókinetika*, Nemzeti Tankönyvkiadó, (1997).
- [13] S. Hoogewerff, W. A. v. Dorp, *Rec. Pays Bas*, **4**, 125 (1885).
- [14] R. Weissgerber, *Ber.*, **47**, 3175 (1914)
- [15] R. V. W. Dimlich, *Stain Technol.* **55**, 217 (1980).
- [16] S. K. Mantena, S. D. Sharma, S. K. Katiyar, *Mol. Cancer Ther*, **5**, 296 (2006).
- [17] C. W. Lau, X. Q. Yao, Z. Y. Chen, W. H. Ko, Y. Huang, *Cardiovasc Drug Rev*, **19**(3), 234 (2001).
- [18] C. C. Lin, L. T. Ng, F. F. Hsu, D. E. Shieh, L. C. Chiang, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **31**(1-2), 65 (2006).
- [19] A. Lesnau, J. Hils, G. Pohl, G. Beyer, M. Janka, L. T. T. Hoa, *Pharmazie*, **45**, 638 (1990).

- [20] K. Iwasa, M. Kamigauchi, M. Ueki, M. Taniguchi, *Eur. J. Med. Chem.*, **31**, 469 (1996).
- [21] E. Kupeli, M. Kosar, E. Yesilada, K. Husnu, C. Baser, C. Baser, *Life Sci.*, **72**, 645 (2002).
- [22] W. Kong, J. Wie, P. Abidi, M. Lin, S. Inaba, C. Li, Y. Wang, Z. Wang, S. Si, H. Pan, S. Wang, J. Wu, Y. Wang, Z. Li, J. Liu, J-D. Jiang, *Nat. Med.*, **10**, 1344 (2004).
- [23] N. W. Harmon, *Can. Pharm. J.*, **123**, 508 (1990).
- [24] V. M. Borodina, E. E Kiranova, O. V. Fedorova, A. V. Zelenin, *Exp. Cell Res.*, **122**, 391 (1979).
- [25] S. Jantová, S. Letašiová, V. Brezová, L. Čipák, J. Lábaj, *J. Photochem. Photobiol. B Biology*, **85**, 163 (2006).
- [26] J. J. Inbaraj, B. M. Kukielczak, P. Bilski, Y.-Y. He, R. H. Sik, and C. F. Chignell, *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 739 (2006).
- [27] J. J. Inbaraj, B. M. Kukielczak, P. Bilski, S. L. Sandvik, and C. F. Chignell, *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1529 (2001).
- [28] F. P. Cossio, A. Arrieta, V. L. Cebolla, L. Membrado, M. P. Domingo, P. Henrion, J. Vela, *Anal. Chem.*, **72**, 1759 (2000).
- [29] F. P. Cossio, A. Arrieta, V. L. Cebolla, L. Membrado, J. Vela, R. Garriga, M. P. Domingo, *Org. Lett.* **2**, 2311 (2000).
- [30] E. M. Gálvez, M. Matt, V. L. Cebolla, F. Fernandes, L. Membrado, F. P. Cossio, R. Garriga, J. Vela, M. H. Guermouche, *Anal. Chem.*, **78**, 3699 (2006).
- [31] J. S. Yu, F. D. Wei, Gao W, C. C. Zhao, *Spectrochim. Acta Part A*, **58**, 249 (2002).
- [32] M. Kamigauchi, N. Kanbara, M. Iwasa, H. Ohishi, T. Ishida, *Helvetica Chim. Acta*, **87**, 264 (2004).
- [33] M. O. Iwunze, *Monatshefte für Chemie*, **131**, 429 (2000).

- [34] C. T. Taylor, D. C. Winter, M. M. Skelly, D. P. O'Donoghue, G. C. O'Sullivan, B. J. Harvey, A. W. Baird, *Eur. J. Pharmacol.*, **368**, 111 (1999).
- [35] S. N. Wu, H. S. Yu, H. F. Li, C. L. Yu, *Life Sci.*, **62**, 2283 (1998).
- [36] U. S. Spichiger-Keller (Ed.), *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, Wiley-VCH: Weinheim; Germany, (1998).
- [37] J. P. Desvergne, A. W. Czarnik (Eds.), *Chemosensors of Ion and Molecular Recognition*, Kluwer Academic, Dordrecht, Netherland, (1997).
- [38] E. Da Silva, A. N. Lazar, A. W. Coleman, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **14**, 3 (2004).
- [39] A. Baeyer. *Ber.*, **5**, 1094 (1872).
- [40] L. Lederer, *J. Prakt. Chemie*, **50**, 223 (1894).
- [41] O. Manasse, *Ber.*, **27**, 2409 (1894).
- [42] A. Zinke, E. Ziegler, *Ber.*, **77**, 264 (1944).
- [43] J. W. Cornforth, P.D. Hart, G. A. Nicholls, R.J. W. Rees, J. A. Stock, *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **10**, 73, (1955).
- [44] C. D. Gutsche, *Calixarenes Revisted*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, (1998).
- [45] E. Da Silva., D. Ficheux, A. W. Coleman, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, **52**, 201-206 (2005).
- [46] S. Shinkai, S. Mori, T. Tsubaki, T. Stone and O. Manabe, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 5315 (1984).
- [47] S. Shinkai, T. Tsubaki, T. Stone and O. Manabe, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **11**, 2297 (1987).
- [48] R. Lamartine, J.-B. Regnouf-de-Vains, P. Choquar and A. Marcillac, *World Patent*, WO 97/49677 (1997).
- [49] Y. Morzheriny, D. M. Rudkevich, W. Verboom and D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.*, **58**, 7602 (1993).
- [50] M. Makha and C. L. Raston, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 6215 (2001).

- [51] G. Combaut, J. M. Chantraine, J. Teste, K. W. Glombitza, *Photochem.*, **17**, 1791 (1978).
- [52] C. D. Gutsche, *Acc. Chem. Res.*, **16**, 161 (1983).
- [53] W. Yang, M. M. de Villiers, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, **58**, 629 (2004).
- [54] M. Kubinyi, T. Vidóczy, O. Varga, K. Nagy, I. Bitter, *Appl. Spectrosc.*, **59**, 134 (2005).
- [55] M. S. Kunsági, K. Szabó, I. Bitter, G. Nagy, M. Kollár, *Tetrahedron Lett.*, **45**, 1387 (2004).
- [56] Y. Liu, B. H. Han, T. T. Chen, *J. Org. Chem.*, **65**, 6227 (2000).
- [57] Y. Liu, B. H. Han, T. T. Chen, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 4678 (2002).
- [58] K. Lang, P. Kubát, P. Lhoták, J. Mosinger, D. M. Wagnerová, *Photochem. Photobiol.*, **74**, 558 (2001).
- [59] Y. L. Zhang, R. A. Agbaria, I. M. Warner, *Supramol. Chem.*, **8**, 309 (1997).
- [60] V. Balzani, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, 459 (2003).
- [61] R. L. Fresenius, *J. Anal. Chem.*, **367**, 103 (2000).
- [62] S. Li, W. C. Purdy, *Chem Rev.*, **92**, 1457 (1992).
- [63] W. A. Freeman, W. L. Mock, N. Y. Shih., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 7367 (1981).
- [64] A. Flinn, G. C. Hough, J. F. Stoddart, D. J. Williams, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **31**, 1475 (1992).
- [65] J. Kim, I.-S. Jung, S.-Y. Kim, E. Lee, J.-K. Kang, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, *J Am. Chem. Soc.*, **122**, 540 (2000).
- [66] A. Day, A. P. Arnold, R. J. Blanch, B. Snushall, *J. Org. Chem.*, **66**, 8094 (2001).
- [67] A. I. Day, R. J. Blanch, A. P. Arnold, S. Lorenzo, G. R. Lewis, I. Dance, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 275 (2002).
- [68] R. Behrend, E. Meyer, F. Rusche, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **399**, 1 (1905).
- [69] C. Márquez, R. R. Hudgins, W. Nau, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5806 (2004).

- [70] J.-W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H.-J. Kim, K. Kim, *Acc. Chem. Res.*, **36**, 621 (2003).
- [71] W. L. Mock, N. Y. Shih, *J. Org. Chem.*, **48**, 3618 (1983)
- [72] P. Cintas, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **17**, 205 (1994).
- [73] J. Mohanty, H. Pal, A. K. Ray, S. Kumar, W. M. Nau, *Chem. Phys. Chem.* **8**, 54 (2007).
- [74] J. Mohanty, W. M. Nau, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 3750 (2005).
- [75] R. Wang, L. Yuan, D. H. Macartney, *J. Org. Chem.*, **71**, 1237 (2006).
- [76] M. Pattabiraman, L. S. Kaanumalle, A. Natarajan, V. Ramamurthy, *Langmuir*, **22**, 7605 (2006).
- [77] W. L. Mock, N. Y. Shih, *J. Org. Chem.*, **51**, 4440 (1986).
- [78] W. L. Mock, N. Y. Shih, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4706 (1988).
- [79] W. L. Mock, N. Y. Shih, *Am. Chem. Soc.*, **111**, 2697 (1989)
- [80] W. A. Freeman, *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Sci.*, **B40**, 382 (1984).
- [81] B. D Wagner, N. Stojanovic, A. I. Day, R. J. Blanch, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 10741 (2003).
- [82] A. L. Koner, W. M. Nau, *Supramol. Chem.*, **19**, 55 (2007).
- [83] A. Hennig, H. Bakirci, W. M. Nau, *Nature Methods*, **4**, 629 (2007).
- [84] R. Wang, L. Yuan, D. H. Macartney, *Chem. Commun.*, 5867 (2005).
- [85] N. Saleh, N. A. F. Al-Rawashdeh, *J. Fluoresc.*, **16**, 487 (2006).
- [86] W. Sindelar, M. A. Cejas, F. M. Raymo, A. E. Kaifer, *New J. Chem.*, **29**, 280 (2005).
- [87] W. M. Nau, J. Mohanty, *Int. J. Photoenergy*, **7**, 133 (2005).
- [88] C. Márquez, W. M. Nau, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 4387 (2001).
- [89] J. Mohanty, W. M. Nau, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 1026 (2004).
- [90] J. Mohanty, A. C. Bhasikuttan, W. M. Nau, H. Pal, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5132 (2006).
- [91] C. Márquez, F. Huang, W. M. Nau, *IEEE Trans. Nanobioscience*, **3**, 39 (2004).

- [92] A. C. Bhasikuttan, J. Mohanty, W. M. Nau, H. Pal, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4120 (2007).
- [93] J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 4844 (2005).
- [94] W. Ong, A. E. Kaifer, *J. Org. Chem.*, **69**, 1383 (2004).
- [95] H.-J. Buschmann, E. Cleve, E. Schollmeyer, *Inorg. Chim. Acta*, **193**, 93 (1992).
- [96] S. Reis, C. G. Moutinho, C. Matos, B. de Castro, P. Gameiro, J. L. F. C. Lima, *Anal. Biochem.*, **117**, 334 (2004).
- [97] K. Matsuoka, Y. Moroi, *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 1580 (2002).
- [98] A. Coello, F. Meijide, E. Rodríguez Núñez,; Vázquez Tato, *J. Phys. Chem.*, **97**, 10186 (1993).
- [99] P. Garidel, A. Hildebrand, R. Neubert, A. Blume, *Langmuir*, **16**, 5267 (2000).
- [100] T. Nakashima, T. Anno, H. Kanda, Y. Sato, T. Kuroi, H. Fujii, S. Nagadome, G. Sugihara, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **24**, 103 (2002).
- [101] M. Pattabiraman, L. S. Kaanumalle, V. Ramamurthy, *Langmuir*, **22**, 2185 (2006).
- [102] T. S. Wiedmann, W. Liang, L. Kamel, *Pharm. Res.*, **19**, 1203 (2002).
- [103] C. Ju, C. Bohne, *Photochem. Photobiol.*, **63**, 60 (1996).
- [104] C. Ju, C. Bohne, *J. Phys. Chem.*, **100**, 3847 (1996).
- [105] O. Rinco, M. C. Nolet, R. Ovans, C. Bohne, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, 1140 (2003).
- [106] G. Li, L. B. McGown, *J. Phys. Chem.*, **98**, 13711 (1994).
- [107] M. Chan, M. Grätzel, J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2052 (1975).
- [108] O. L. Waissbluth, M. C. Morales, C. Bohne, *Photochem. Photobiol.*, **82**, 1030 (2006).
- [109] S. M. Meyerhoffer, L. B. McGown, *Anal. Chem.*, **63**, 2082 (1991).
- [110] C. Yihwa, F. H. Quina, C. Bohne, *Langmuir*, **20**, 9983 (2004).

- [111] D. M. Small, *Adv. Chem. Ser.*, **84**, 31 (1968).
- [112] M. C. Carey, D. M. Small, *J. Colloid Interface Sci.*, **31**, 382 (1969).
- [113] M. C. Carey, D. M. Small, *Arch. Intern. Med.*, **130**, 506 (1972).
- [114] D. V. O'Connor, D. Phillips, *Time-correlated Single Photon Counting*, Academic Press (1984).
- [115] J. N. Demas, *Excited State Lifetime Measurements*, Academic Press (1983).
- [116] C. Clower, K. M. Solntsev, J. Kowalik, L. M. Tolbert, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, **106**, 3114 (2002).
- [117] N. Mataga, T. Kubota, *Molecular Interactions and Electronic Spectra*, Marcel Dekker, Inc., New York, 348 (1970).
- [118] A. Horváth, *Szervetlen fotokémia*, Veszprémi Egyetemi Kiadó, (1998).
- [119] B. Valeur, *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, Wiley-VCH: Weinheim, 92 (2002).
- [120] E. U. Akkaya, M. E. Huston, A. W. Czarnik *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3590-3593 (1990).
- [121] A. P. de Silva, S. A. de Silva, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1709 (1986).
- [122] M. E. Huston, E. U. Akkaya, A. W. Czarnik *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8735 (1989).
- [123] I. Svorstøl, H. Høiland, J. Songstad, *Acta Chem. Scand. B*, **38**, 885 (1984).
- [124] I. Svorstøl, J. Songstad, *Acta Chem. Scand. B*, **39**, 639 (1985).
- [125] P. W. Atkins, *Fizikai kémia III*, Fejezet 28, Nemzeti Tankönyvkiadó (1998).
- [126] Y. Marcus, G. Hefter, *Chem. Rev.*, **106**, 4585 (2006).
- [127] T. Sigvartsen, B. Gestblom, E. Noreland, J. Songstad, *Acta Chem. Scand. B*, **43**, 103 (1989).
- [128] A. D'Aprano, R. M. Fuoss, *J. Sol. Chem.*, **3**, 45 (1974).
- [129] K. Suga, T. Ohzono, M. Negishi, K. Deuchi, Y. Morita, *Supramol. Sci.* **5**, 9 (1998).

- [130] A. F. Danil de Namor, R. M. Cleverly, M. L. Zapata-Ormachea, *Chem. Rev.*, **98**, 2495 (1998).
- [131] M. Sonoda, K. Hayashi, M. Nishida, D. Ishii, I. Yoshida, *Anal. Sci.*, **14**, 493 (1998).
- [132] N. Kon, N. Iki, S. Miyano, *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 751 (2003).
- [133] D. Rehm, A. Weller, *Isr. J. Chem.*, **8**, 259 (1970).
- [134] J. F. Song, Y. Y. He, W. Guo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**, 355 (2002).
- [135] A. Pailleret, N. Magan-Oliva, S. Olivier, D. W. M. Arrigan, *J. Electroanal. Chem.*, **508**, 81 (2001).
- [136] Y. M. Jeon, J. Kim, D. Whang, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9790 (1996).
- [137] K. B. Tarmyshov, F. Müller-Plathe, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 14463 (2006).
- [138] H. J. Buschmann, K. Jansen, C. Meschke, E. Schollmeyer, *J. Solution Chem.*, **27**, 135 (1998).
- [139] R. Hoffmann, W. Knoche, C. Fenn, H. J. Buschmann, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **90**, 1507 (1994).
- [140] S. Dixit, J. Crain, W. C. K. Poon, J. L. Finney, A. K. Soper, *Nature*, **416**, 829 (2002).
- [141] J. H. Guo, Y. Luo, A. Augustsson, S. Kashtanov, J. E. Rubensson, D. K. Shuh, H. Agren, Nordgren, *J. Phys. Rev. Lett.*, **91**, 157401/1 (2003).
- [142] L. Dougan, S. P. Bates, R. Hargreaves, J. P. Fox, J. Crain, J. L. Finney, V. Reat, A. K. Soper, *J. Chem. Phys.*, **121**, 6456 (2004).
- [143] I. Adamovic, M. S. Gordon, *J. Phys. Chem. A*, **110**, 10267 (2006).
- [144] M. A. M. Cordeiro, W. P. Santana, R. Cusinato, J. M. M. Cordeiro, *J. Mol. Structure (THEOCHEM)*, **759**, 159 (2006).
- [145] G. Eaton, M. C. R Symons, P. P. Rastogi, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **85**, 3257 (1989).
- [146] Y. Marcus, Y. J. Migron, *J. Phys. Chem.*, **95**, 400 (1991).
- [147] J. Bertie, Z. J. Lan, *J. Phys. Chem. B*, **95**, 400 (1991).

9. Függelék

9.1 Függelék

A fluoreszcencia kvantumhasznosítási tényező definíció szerint

$$\phi_F = \frac{I_F}{I_a} \quad (1)$$

ahol I_a az elnyelt, míg I_F a fluoreszcenciként visszakapott fotonok száma

$$I_F = I_a \phi_F \quad (2)$$

A fényelnyelésre felírható a Lambert-Beer törvény

$$\lg \frac{I_0}{I} = A = \lg \frac{I_0}{I_0 - I_a} \quad (3)$$

ahol I_0 az időegység alatt a mintára eső fotonok száma, I pedig a mintából kilépő fotonok száma

A (3) egyenletet átrendezve kapjuk

$$I_a = \frac{I_0 10^A}{10^A} - \frac{I_0}{10^A} = I_0 (1 - 10^{-A}) \quad (4)$$

Két fényelnyelő és fluoreszkáló anyag egyidejű jelenlétekor (jelzettel jelölve a második anyag jellemzőit) az (1) és (4) összefüggést felhasználva felírható:

$$I_F = I_0 (1 - 10^{-A}) \phi_F \quad (5)$$

$$I'_F = I_0 (1 - 10^{-A'}) \phi'_F \quad (6)$$

az (5) és (6) egyenletet elosztva egymással

$$\frac{I_F}{I'_F} = \frac{1 - 10^{-A} \phi_F}{1 - 10^{-A'} \phi'_F} \quad (7)$$

A fluoreszcencia intenzitásának lecsengését a következő összefüggés adja meg

$$I_F(t) = a \exp(-t/\tau) \quad (8)$$

ahol t az időt, a a preexponenciális tényezőt, τ pedig a fluoreszcencia élettartamot jelöli.

A (8) egyenletet integrálva kapjuk meg a fluoreszcencia lecsengés során kibocsájtott fotonok számát összesen:

$$I_F = \int_0^{\infty} a \exp(-t/\tau) dt = \lim_{t \rightarrow \infty} \int_0^t a \exp(-t/\tau) dt \quad (9)$$

$$I_F = \lim_{t \rightarrow \infty} \left\{ \left[-\frac{a \exp(-t/\tau)}{1/\tau} + C \right] - \left[-\frac{a \exp(-0/\tau)}{1/\tau} + C \right] \right\} \quad (10)$$

ahol C egy állandót jelöl. A (10) egyenletet átrendezve kapjuk a (11) összefüggést

$$I_F = \lim_{t \rightarrow \infty} \{ [-a\tau \exp(-t/\tau) + C] - [-a\tau + C] \} \quad (11)$$

$$I_F = \lim_{t \rightarrow \infty} [-a\tau \exp(-t/\tau)] + \lim_{t \rightarrow \infty} (a\tau) \quad (12)$$

$$I_F = a\tau \quad (13)$$

Ha a fluoreszcencia és az időfelbontott fluoreszcencia mérések során a gerjesztő fény hullámhossza és a detektálás hullámhossza megegyezik, akkor (13) és (7) egyenlet felhasználásával felírható a következő összefüggés:

$$\frac{I_F}{I'_F} = \frac{1 - 10^{-A} \phi_F}{1 - 10^{-A'} \phi'_F} = \frac{a\tau}{a'\tau'} \quad (14)$$

9.2 Függelék

Az értekezés alapját képző közlemények:

1. Mónika Megyesi, László Biczók

„Considerable fluorescence enhancement upon supramolecular complex formation between berberine and p-sulfonated calixarenes”;

Chemical Physics Letters, **424**, 71 (2006)

IF 2,462, Független idézetek száma:10

2. Mónika Megyesi, László Biczók

„Berberine Alkaloid as a Sensitive Fluorescent Probe for Bile Salt Aggregates”

Journal of Physical Chemistry B, **111**, 5635 (2007)

IF 4,086, Független idézetek száma:5

3. Mónika Megyesi, László Biczók

„Effect of ion pairing on the fluorescence of berberine, a natural isoquinoline alkaloid”

Chemical Physics Letters, **447**, 247 (2007)

IF 2,207, Független idézetek száma:3

4. Mónika Megyesi, László Biczók, István Jablonkai

„Highly sensitive fluorescence response to supramolecular complex formation of berberine alkaloid with cucurbit[7]uril”

Journal of Physical Chemistry C, **112**, 3410 (2008)

IF 3,396, Független idézetek száma:4

További közlemények:

5. Mónika Megyesi, László Biczók, Helmut Görner

„Dimer-promoted fluorescence quenching of coralyne by binding to anionic polysaccharides”

Photochemical and Photobiological Sciences, **8**, 556 (2009)

IF 2,144

6. Zsombor Miskolczy, László Biczók, Mónika Megyesi, István Jablonkai

„Inclusion complex formation of ionic liquids and other cationic organic compounds with cucurbit[7]uril studied by 4',6-diamidino-2-phenylindole fluorescent probe”

Journal of Physical Chemistry B, **113**, 1645 (2009)

IF 4,189, Független idézetek száma:2

7. Mónika Megyesi, László Biczók, Helmut Görner

„Effects of solvent polarity and hydrogen bonding on the fluorescence properties of *trans*-4-hydroxynitrostilbene”

J. Photochem. Photobiol. A Chemistry (közlés alatt)

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások és poszterek:

1 Megyesi Mónika, Biczók László:

„Berberin alkaloid szupramolekuláris komplex képzése szulfokalixarénnel“;

Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottsági Ülés, Balatonalmádi, 2006. április 27-28.

2 Megyesi Mónika, Biczók László:

„Szupramolekuláris komplex képződés alkalmazása a berberin alkaloid kimutatására“;

IX. Doktori Kémiai Iskola, Tahi 2006.április 24-25.

3 Biczók László, Miskolczy Zsombor, Megyesi Mónika (poszter)

„Compounds of biological importance as fluorescent probes“

Central European Conference on Photochemistry, Bad Hofgastein, Austria, 2006.
március 5-9.

4 Megyesi Mónika, Biczók László:

„Epesav aggregáció fluoreszcenciás vizsgálata berberin alkaloiddal”

X. Doktori Kémiai Iskola, Mátraháza, 2007.május 7-9.

5 Megyesi Mónika, Miskolczy Zsombor, Biczók László

„Gerjesztett szupramolekulák fluoreszcenciás sajátságai“

Kutatóközponti Tudományos Napok 2007. május 22-24.

6 Megyesi Mónika, Biczók László:

„Fluorescent properties of berberine alkaloid in self-assembled systems“

The International Conference on Molecular/Nano-Photochemistry, Photocatalysis
and Solar Energy Conversion, Kairo, Egyiptom, 2008. február 24-28.

További előadások és poszterek:

7 Megyesi Mónika, Várhelyi Csaba (poszter):

„Szemi- és tioszemikarbazonok előállítása és jellemzése“;

VIII.Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, Románia, 2002. november15-17.

8. Megyesi Mónika, Miskolczy Zsombor, Biczók László

„Competitive Binding of Ionic Liquids and Fluorescent Probes to Cucurbit[7]uril”

1st International Conference on Cucurbiturils, POSTECH, Pohang, Korea, 2009. július.
10-11.

- 9.** Mónika Megyesi, Zsombor Miskolczy, László Biczók (poszter)
„Cucurbit[7]uril-induced basicity change of sanguinarine natural alkaloid”
1st International Conference on Cucurbiturils, Pohang, Korea, július. 10-11, 2009 P-3
- 10.** Miskolczy Zsombor, Megyesi Mónika, Biczók László (poszter)
„Interaction of Ionic Liquids with 4-Sulfonatocalixarenes Studied by Berberine Alkaloid Fluorescent Probe”
10th International Conference on Calixarenes, Seoul, Korea, 2009. július. 13-16.
- 11.** Miskolczy Zsombor, Megyesi Mónika, Biczók László
„Beékelődési komplex képződés kukurbituril és 4-szulfonátokalixarén makrociklusokkal”
MTA Reakciókinetika és Fotokémiai Munkabizottság ülése, Gyöngyöstarján, 2009. október 29-30.
- 12.** Miskolczy Zsombor, Megyesi Mónika, Biczók László, Jablonkai István
„Ionfolyadékok szupramolekuláris komplexképződése makrociklusos vegyületekkel”
Kutatóközponti Tudományos Napok 2009. november. 24-26.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Biczók Lászlónak, hogy lehetővé tette számomra a doktori munkám elkészítését az MTA Kémiai Kutatóközpont Lézerspektroszkópai Laboratóriumában. Köszönöm értékes szakmai tanácsait, hogy tevékenységemet folyamatosan figyelemmel kísérte és segítette.

Köszönettel tartozom Dr. Jablonkai Istvánnak az NMR mérésekben nyújtott segítségéért.

Köszönöm szüleimnek támogatásukat és türelmüket. Férjemnek Dr. Miskolczi Zsombornak egyformán hálás vagyok szakmai tanácsaiért és gyakorlati segítségéért.

Köszönet illeti a doktori munka anyagi támogatóit: OTKA T049645, NKFP MediChem2 1/A/005/2004.