

# **Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai szérum albuminnal és ciklodextrinekkel**

**Doktori (PhD) - értekezés**



**Dr. Faisal Anna Zelma**

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola, Toxicológia program**

**Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika**

**Programvezető: Prof. Dr. Pethő Gábor**

**Témavezető: Dr. Poór Miklós**

**Pécsi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Kar  
Gyógyszerhatástani Tanszék**

**OGYDHT**

**Pécs, 2021.**

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
1. Bevezetés .....	6
2. Irodalmi áttekintés .....	7
2.1. Zearalenon .....	7
2.1.1. Zearalenon előfordulása, tulajdonságai és detektálása .....	7
2.1.2. A zearalenon toxikokinetikai tulajdonságai.....	11
2.1.3. Fonalas gombák és növények által termelt módosított és maszkolt zearalenon származékok.....	12
2.1.4. Zearalenon és metabolitjainak toxikus hatásai .....	14
2.2. Szérum albumin .....	17
2.2.1. Az albumin szerkezete és főbb tulajdonságai .....	17
2.2.2. Mikotoxin-albumin interakciók .....	19
2.3. Ciklodextrinek .....	21
2.3.1. Ciklodextrinek szerkezete és jellemzői.....	21
2.3.2. A ciklodextrinek felhasználási területei.....	23
2.3.3. Mikotoxin-ciklodextrin kölcsönhatások és alkalmazhatóságuk .....	25
3. Célkitűzések.....	29
4. Anyagok és módszerek .....	30
4.1. Reagensek .....	30
4.2. Zearalenon és metabolitjainak interakciói szérum albuminnal.....	31
4.2.1. Spektroszkópiai mérések .....	31
4.2.2. Nagyhatékonyságú affinitáskromatográfia (HPAC).....	32
4.3. Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai ciklodextrinekkel.....	32
4.3.1. Fluoreszcencia spektroszkópiai módszerek .....	32
4.3.2. Mikotoxin extrakció vizes oldatokból és összetett mátrixból vízben nem oldódó $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel .....	33
4.3.3. BBP regenerálhatóságának és többszöri felhasználásának vizsgálata .....	34
4.3.4. Zearalenon extrakció kukoricásörből BBP-rel .....	34
4.3.5. A BBP hatásának vizsgálata a kukoricásör színére és összpolicfenol tartalmára .....	35
4.4. HPLC analízis .....	36
4.5. Statisztika.....	37
5. Eredmények .....	38
5.1. Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai szérum albuminnal .....	38
5.1.1. Fluoreszcencia kioltás alapú vizsgálatok .....	38

5.1.2. Mikotoxin-albumin komplexek kötési állandójának meghatározása.....	38
5.1.3. Nagyhatékonyságú affinitáskromatográfiás mérések .....	40
5.1.4. Zearalenon és metabolitjainak hatásai a warfarin-HSA kölcsönhatásra.....	41
5.2. Konjugált zearalenon származékok ciklodextrinekkal kialakított kölcsönhatásai .....	42
5.2.1. Zearalenon-14-glükozid kölcsönhatása natív és kémiaiilag módosított ciklodextrinekkal .....	42
5.2.2. Zearalenon-14-szulfát interakciója ciklodextrinekkal .....	47
5.3. Zearalenon és metabolitjainak extrakciója vizes oldatokból és összetett mátrixból $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel .....	51
5.3.1. Zearalenon és zearalenolok extrakciója vizes oldatokból $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel.....	51
5.3.2. $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimer regenerálhatóságának vizsgálata.....	54
5.3.3. Zearalenon extrakciója kukoricásörből $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel ...	55
5.3.4. Zearalenon-14-glükozid extrakciója vizes oldatból $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel.....	57
5.3.5. Zearalenon-14-szulfát extrakciója vizes oldatból $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel.....	58
6. Megbeszélés, következtetések .....	60
6.1. Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai szérum albuminnal .....	60
6.2. Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai ciklodextrinekkal.....	63
7. Új megfigyelések .....	71
8. Saját közlemények listája.....	72
9. Irodalomjegyzék .....	78
10. Köszönetnyilvánítás.....	97
11. Mellékletek .....	98

## Rövidítések jegyzéke

ACD	$\alpha$ -ciklodextrin
ANOVA	analysis of variance
BBP	$\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimer
BCD	$\beta$ -ciklodextrin
BSA	marha szérum albumin
CD	ciklodextrin
CYP	citokróm P450
DIMEB	dimetil- $\beta$ -ciklodextrin
EFSA	European Food Safety Authority
ER	ösztrogénreceptor
FA	fatty acid (zsírsav)
FLD	fluoreszcens detektor
GCD	$\gamma$ -ciklodextrin
GOT	glutamát-oxálacetát-aminotranszferáz
GPT	glutamát-piruvát-transzamináz
HPAC	nagyhatékonyságú affinitáskromatográfia
HPBCD	(2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciklodextrin
HPGCD	(2-hidroxipropil)- $\gamma$ -ciklodextrin
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HSA	humán szérum albumin
HSD	3 $\alpha$ / $\beta$ -hidroxi-szteroid-dehidrogenáz
IARC	International Agency for Research on Cancer
$K$	kötési állandó
$K_{SV}$	Stern-Volmer kioltási állandó
MABCD	monoamino- $\beta$ -ciklodextrin
NPC	Niemann-Pick C betegség
PBS	phosphate-buffered saline
PSA	sertés szérum albumin
QABCD	kvaterner-ammónium- $\beta$ -ciklodextrin
RAMEB	random metilált $\beta$ -ciklodextrin



RAMEG	random metilált $\gamma$ -ciklodextrin
RLU	relative light unit
RSA	patkány szérum albumin
SBCD	szulfobutil- $\beta$ -ciklodextrin
SEM	standard hiba
Trp	triptofán
ttkg	testtömeg kilogramm
UV	ultraibolya
UV-Vis	ultraibolya-látható
Z14G	zearalenon-14-glükozid
Z14S	zearalenon-14-szulfát
ZAN	zearalanon
ZEN	zearalenon
$\alpha$ -ZAL	$\alpha$ -zearalanol
$\alpha$ -ZEL	$\alpha$ -zearalenol
$\beta$ -ZAL	$\beta$ -zearalanol
$\beta$ -ZEL	$\beta$ -zearalenol
$\lambda_{em}$	emissziós hullámhossz
$\lambda_{ex}$	gerjesztési hullámhossz

## 1. Bevezetés

A zearalenon (ZEN) *Fusarium* gombafajok által termelt, főleg gabonafélékben előforduló, xenoösztrogén hatású mikotoxin. Orális expozíciót követő biotranszformációja során redukált származékok ( $\alpha$ -/ $\beta$ -zearalenol, zearalanon,  $\alpha$ -/ $\beta$ -zearalanol), valamint szulfát és glükuronid konjugátumok képződnek. A redukált metabolitok az anyavegyülettel közel azonos, vagy akár még erősebb xenoösztrogén hatásokkal rendelkeznek (pl.  $\alpha$ -zearalenol és  $\alpha$ -zearalanol). A fonalas gombák is képesek a ZEN szulfát konjugátumainak létrehozására, míg a mikotoxin növényekben lejátszódó biotranszformációja során ún. „maszkolt mikotoxinok” (pl. glükozid származékok) képződnek, melyek analitikai detektálása nehézkes, főleg az analitikai standardok hiányából adódóan. A konjugált metabolitok szintén megjelennek a takarmányban és egyes élelmiszerekben, ezáltal állati és humán expozíciójuk is jelentős lehet.

Az albumin a keringésben legnagyobb mennyiségben megtalálható plazmafehérje, mely egyéb funkciói mellett endogén és exogén molekulák (pl. egyes mikotoxinok) megkötésére is képes. A kölcsönhatás során kialakuló komplexek stabilitása befolyásolhatja a kötődő molekulák szöveti disztribúcióját és eliminációjuk sebességét.

A ciklodextrinek (CD) széleskörben alkalmazott, glükóz egységekből felépülő, gyűrű alakú molekulák. Belső, lipofil üregüknek köszönhetően gazda-vendég típusú zárványkomplexek kialakítására képesek apoláros molekulákkal, többek között egyes mikotoxinokkal is. Míg külső, hidrofil részük kiváló vízoldhatóságot biztosít számukra. A fluoreszcens tulajdonságú mikotoxinokkal történő komplexképződés a vendégmolekulák fluoreszcens jelének jelentős emelkedésével jár, így a CD technológia alkalmas lehet a mikotoxinok analitikai detektálásának érzékenyítésére. Emellett a vízben nem oldódó felülethez kapcsolt CD polimerek ígéretes mikotoxin kötőnek tűnnek vizes oldatok toxinmentesítésére.

Értekezésemben röviden bemutatom a ZEN-t és metabolitjait, a szérum albumint, a mikotoxin-albumin kölcsönhatásokat, a CD-eket és felhasználási területeiket, valamint a mikotoxin-CD interakciókat. Emellett részletes tárgyalásra kerülnek az általam megvizsgált mikotoxin-albumin és mikotoxin-ciklodextrin interakciók és a kapcsolódó új megfigyeléseim, kitérve e kölcsönhatások lehetséges gyakorlati hasznosíthatóságára is.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Zearalenon

#### 2.1.1. Zearalenon előfordulása, tulajdonságai és detektálása

A mikotoxinok fonalas gombák másodlagos anyagcseretermékei, melyek a táplálékkal az állati és emberi szervezetbe kerülve egészségkárosító hatásokat okozhatnak [Bennett és Klich, 2003]. A zearalenon (ZEN vagy F2-toxin; **1. ábra**) *Fusarium* penészgombafajok (pl. *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*) által, poliketid útvonalon bioszintetizált mikotoxin [Bennett és Klich, 2003]. A mérsékelt égövön (pl. Európa, Észak-Amerika, Ázsia) jellemző, főként gabonaféléket szennyező *Fusarium* fajok számos mikotoxin (pl. trichotecének, fumonizinek) termelésére képesek [Yazar és Omurtag, 2008; Mostrom, 2011]. A ZEN-t az 1960-as évek elején izolálták a *Gibberella zae* (*Fusarium graminearum*) gombafaj szekunder anyagcseretermékeként [Stob és mtsai., 1962]. Kis mennyiségben termelődik a szántóföldeken, azonban a betakarított gabonafélék nem megfelelő, magas nedvességtartalmú (30-40%) helyen történő tárolása további ZEN képződést eredményezhet [Gupta és mtsai., 2018]. Leggyakrabban kukoricában, és egyéb gabonafélékben (pl. árpa, búza, zab, cirok), valamint az ezekből készült takarmányban, tápokban, élelmiszerekben és italokban fordul elő [Zinedine és mtsai., 2007; Rai és mtsai., 2020]. A gabonaalapú élelmiszerek közül lisztben, tésztában, kenyérben, péksüteményekben, finomított kukoricaolajban, kekszekben, müzlikben, gabonapelyhekben, valamint csecsemőknek és kisgyermekeknek készített kukorica alapú ételekben is kimutatták [Mousavi Khaneghah és mtsai., 2018; Ropejko és Twaruzek, 2021]. Az italok közül leginkább sörben fordul elő, jellemzően nmol/L koncentrációban [Okoye, 1986; Odhav és Naicker, 2002; Nkwe és mtsai., 2005; Kuzdraliński és mtsai., 2013]. A ZEN-nal szennyezett takarmányt fogyasztó tehének tejében a mikotoxin mellett metabolitjai is megjelennek, ami a lehetséges humán expozíció esélyét tovább növeli [Mirocha és mtsai., 1981; Prelusky és mtsai., 1990; Coffey és mtsai., 2009]. A takarmány alapanyagának szánt gabonafélék és gabonakészítmények (kukorica melléktermékek kivételével) Európai Unió által ajánlott maximális ZEN tartalma 2000 µg/kg, míg a kukorica melléktermékek esetében 3000 µg/kg értéket határoztak meg [European Commission, 2006]. Az élelmiszerekre vonatkozó ZEN határértéket feldolgozatlan gabonafélék (kukorica kivételével) esetében 100 µg/kg-ban, feldolgozatlan kukorica esetében (kivéve nedves őrlésre szánt) 350 µg/kg-ban maximalizálták, míg a közvetlen

emberi fogyasztásra szánt élelmiszerek ZEN határértéke 100 µg/kg vagy az alatti [European Commission, 2007].

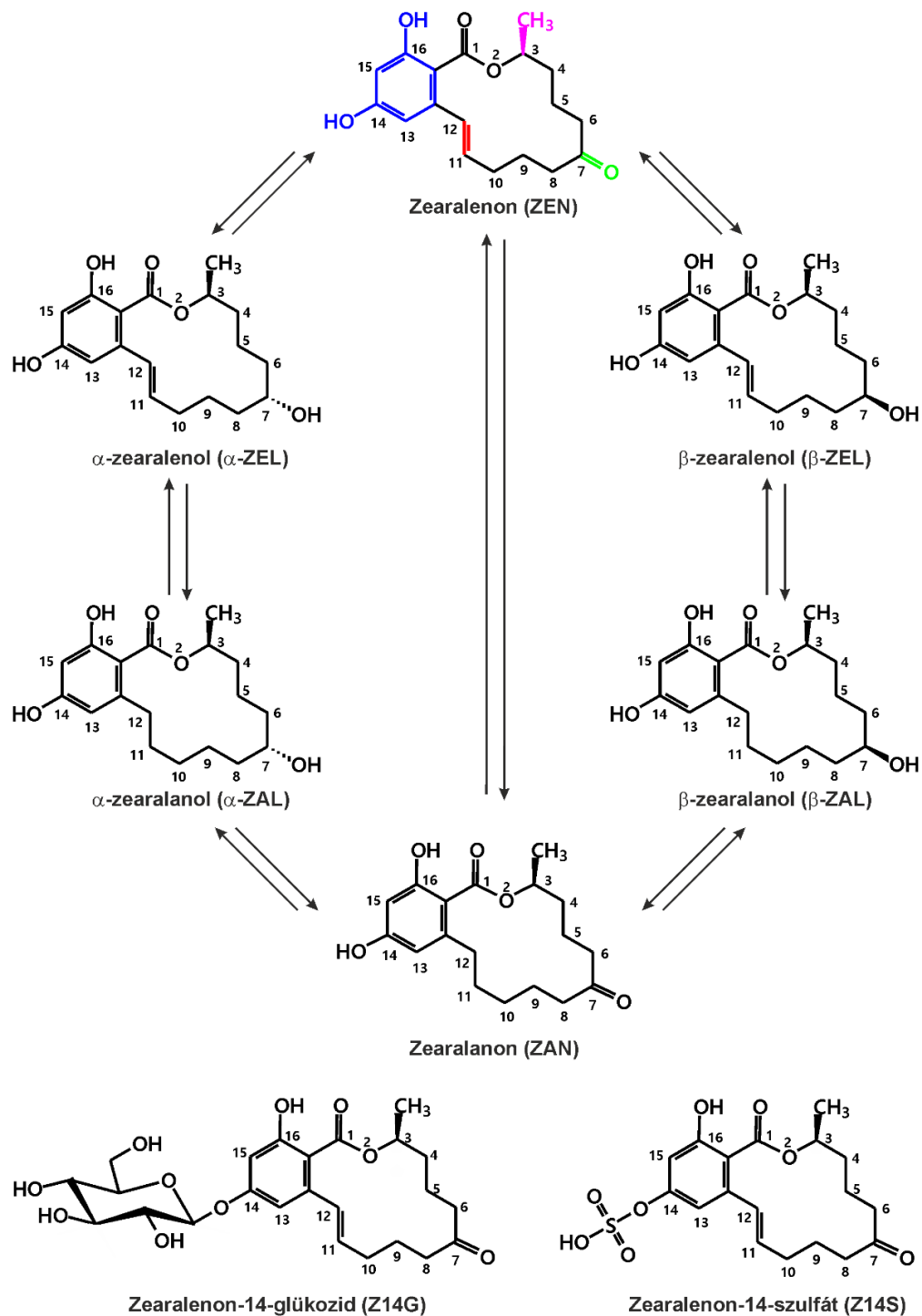
A ZEN β-rezorcilsav laktin szerkezettel rendelkezik: a rezorcin részhez egy keton és metil szubsztituált, 14 tagból álló makrociklusos laktongyűrű kapcsolódik, amely egy transz kettős kötést tartalmaz (**1. ábra**) [Urry és mtsai., 1966]. A zearalenon név első része a kukoricában (*Zea mays*) való gyakori előfordulására, a „ral” tag a β-rezorcilsav laktin szerkezeti részre, az „en” a kettős kötés jelenlétére, az „on” pedig a ketocsoportra utal [Ropejko és Twaruzek, 2021]. A ZEN vízben rosszul, azonban lúgos kémhatású oldatokban és szerves oldószerekben (pl. etanol, aceton) jól oldódik [Hidy és mtsai., 1977]. Szerkezetéből adódóan savas karakterű vegyület ( $pK_a = 7,62$ ) a fenolos hidroxilcsoportjainak köszönhetően [Lemke és mtsai., 1998]. A ZEN metanolban mért UV abszorpciós maximuma 236 nm-en figyelhető meg, valamint két fluoreszcencia excitációs csúcsot mutat 274 és 316 nm-en. Etanolban 314 nm-es gerjesztést alkalmazva 450 nm-en detektálták a fluoreszcencia emissziós maximumát [Gajęcka és mtsai., 2011]. A ZEN a nagy laktongyűrűje ellenére magas hőstabilitással rendelkezik [Ryu és mtsai., 2003]. A mikotoxin 100°C-on történő hőkezelés során nem degradálódott, de a hőmérséklet 175°C fölé emelése jelentősebb bomlást eredményezett, mely alkalikus (pH 10,0) körülmények között már alacsonyabb hőmérsékleten is megindult [Ryu és mtsai., 2003].

Korábbi vizsgálatok során gabonafélék flotációjával sikeres ZEN-mentesítést végeztek [Huff és Hagler, 1985]. Tekintve, hogy a ZEN jól oldódik alkalikus környezetben [Hidy és mtsai., 1977], a ZEN-nal kontaminált gabonafélék lúgos kémhatású oldatban történő mosása és áztatása jelentős mikotoxin koncentráció csökkenést eredményezett [Trenholm és mtsai., 1992; Rotter és mtsai., 1995; Lefyedi és Taylor, 2006]. A ZEN-tartalmú gabonafélék őrléssel történő feldolgozását követően a mikotoxin a rostban gazdag részekben koncentrálnak [Schwake-Anduschus és mtsai., 2015]. A kukorica nedves őrlése során a mikotoxin sikériben való feldúsulását figyelték meg, míg száraz őrlést követően a ZEN a csíra és korpafrakciókban koncentrálnak [Bennett és mtsai., 1976; Kuiper-Goodman és mtsai., 1987]. A ZEN-tartalmú kukoricadara extrudálása során szintén jelentős mikotoxin csökkenést tapasztaltak [Ryu és mtsai., 1999]. A mikotoxinnal szennyezett gabonafélék élelmiszeripari feldolgozása során részleges mikotoxin koncentráció csökkenés jellemző, ami a hőmérséklet emelésével fokozható [Bullerman és Bianchini, 2007; Yumbe-Guevara és mtsai., 2003]. Összeségében azonban elmondható, hogy a ZEN széleskörű előfordulása és magas

hőstabilitása miatt nehezen távolítható el az élelmiszerekből a hagyományos konyhatechnikai módszerek alkalmazásával [Yazar és Omurtag, 2008].

Korábbi tanulmányok szerint a gabonafélék ZEN tartalma, és az étkezési szokások alapján az európai és észak-amerikai felnőttek esetében átlagosan 0,8-29 ng/ttkg, míg gyerekeknél 6-55 ng/ttkg a napi becsült ZEN bevitel [Minervini és mtsai., 2005]. Azonban egyes tanulmányok szerint a vegetáriánus étrendet folytatók esetében 50-200 ng/ttkg közötti a napi becsült átlagos ZEN bevitel, sőt a vegán/makrobiotikus étrend szerint táplálkozók esetében akár 570 ng/ttkg/nap értéket is elérheti az expozíció mértéke [Leblanc és mtsai., 2005]. Az Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmészügyi és Mezőgazdasági Szervezete és az Egészségügyi Világszervezet az ideiglenes tolerálható napi beviteli értéket 0,5 µg/ttkg-ban határozta meg [FAO/WHO, 2000]. Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) ZEN és származékainak együttes tolerálható napi beviteli értékét 0,25 µg/ttkg-ban maximalizálta [EFSA, 2014]. Bár jellemzően az Európai Unióban és Észak-Amerikában az átlagos napi becsült ZEN bevitel jóval alacsonyabb, mint a tolerálható napi beviteli értékek, a fejlődő országokban szélsőséges esetekről is beszámoltak: pl. az Elefántcsontparton a napi ZEN bevitel becsült értéke akár az 1,56 µg/ttkg-ot is elérheti [Sangare-Tigori és mtsai., 2006].

Az élelmiszerek, takarmányok ZEN tartalmának meghatározása során kromatográfiás (pl. nagyhatékonyságú kromatográfia) módszereket, valamint immunkémiai eljárásokat is alkalmaznak [Alshannaq és Yu, 2017]. Ezek közül az enzimkapcsolt immunszorbens vizsgálatok a leggyakoribbak, azonban gyors, szemi-quantitatív ZEN meghatározásra alkalmas laterális tesztesíkok, és a *Fusarium* toxinok szimultán meghatározását lehetővé tevő immunkémiai módszerek is elérhetőek [Alshannaq és Yu, 2017]. Továbbá kolorimetrikus és elektrokémiai aptaszenzorokat, kapilláris elektroforézist, fluoreszcens módszereket (pl. fluoreszcencia polarizáció), bioszenzorokat és polimereket is alkalmaznak a ZEN-szennyezés mértékének meghatározására [Alshannaq és Yu, 2017; Caglayan és mtsai., 2020].



**1. ábra:** A zearalenon (ZEN) kémiai szerkezete: a rezorcin részt késsel, a metil csoportot magenta színnel, a 7-es pozíciójú karbonil szubsztituenszt zölddel, a makrociklusos laktongyűrűt feketével, míg a 11-12-es pozíciójú transz kettős kötést piros színnel jelöltem. Emellett az ábrán az  $\alpha$ - és  $\beta$ -zearalenol ( $\alpha$ - és  $\beta$ -ZEL),  $\alpha$ - és  $\beta$ -zearalanol ( $\alpha$ - és  $\beta$ -ZAL), zearalanon (ZAN), zearalenon-14-glükózid (Z14G) és zearalenon-14-szulfát (Z14S) metabolitok kémiai szerkezete látható.

### 2.1.2. A zearalenon toxikokinetikai tulajdonságai

A ZEN-nal szennyezett táplálék fogyasztása útján a szervezetbe kerülő mikotoxin nagymértékű és gyors felszívódását figyelték meg patkányokban, nyulakban, sertésekben és az emberi szervezetben [Kuiper-Goodman és mtsai., 1987]. Azonban a ZEN alacsony abszolút orális biohasznosulással rendelkezik a preszisztémás eliminációjának köszönhetően [EFSA, 2011]. Intravénás adagolást követően patkányokban [EFSA, 2011], valamint *ex vivo* humán placenta perfúziós modellben [Warth és mtsai., 2019] is átjutott a placentán. A ZEN eliminációs felezési ideje *per os* ( $t_{1/2} = 0,34-5,3$  h) és *i.v.* adagolást ( $t_{1/2} = 0,29-16,8$  h) követően meglehetősen tág időintervallumban mozog a különböző állatfajokban [EFSA, 2017].

A ZEN fázis I metabolizmusa során jellemzően  $3\alpha/\beta$ -hidroxil-szteroid-dehidrogenáz (HSD) által katalizált redukciós folyamatok játszódnak le, emellett citokróm P450 (CYP) enzimrendszer által katalizált oxidáció is zajlik [EFSA, 2011]. A ZEN C7 oxocsoportjának HSD által katalizált redukciója során  $\alpha$ - és  $\beta$ -zearalenol ( $\alpha$ - és  $\beta$ -ZEL; **1. ábra**) képződik [EFSA, 2011]. Az anyavegyület és a képződő ZEL-ok 11-12-es C-atomjai között lévő kettős kötés redukciója kisebb mennyiségben zearalanon (ZAN; **1. ábra**), valamint  $\alpha$ - és  $\beta$ -zearalanol ( $\alpha$ - és  $\beta$ -ZAL; **1. ábra**) képződéshez vezet [EFSA, 2011; Frizzell és mtsai., 2011]. A ZEN redukált formáinak aránya eltérő a különböző fajokban: az  $\alpha$ -származékok sertésben, kutyában, pulykában, és az emberben; míg a  $\beta$ -ZEL és  $\beta$ -ZAL a szarvasmarha, kecske, ló, brojlercsirke és tojótyúk esetében gyakoribbak [Kuiper-Goodman és mtsai., 1987; EFSA, 2017].

*In vitro* vizsgálatok alapján a fázis I oxidációs folyamat során leginkább CYP1A2 által katalizált aromás (C13/15) monohidroxiláció történik, valamint kisebb mértékben a CYP3A4 enzim is részt vesz a folyamatban [EFSA, 2011]. Az így képződő katekolok orto- és para-kinonná oxidálódva szerepet játszhatnak a ZEN toxikus hatásainak kialakulásában [Pfeiffer és mtsai., 2009; EFSA, 2011]. Emellett a ZEN alifás (C6/8) hidroxilációját is leírták, melyért nagyrészt a CYP2C8 és CYP3A4/5 izoformák felelősek [Bravin és mtsai., 2009]. Ezek a metabolitok a májokban és a kutyákban lejátszódó biotranszformáció során nagyobb, azonban rágcsálókban és a humán metabolizmus során kisebb mértékben képződnek [Bravin és mtsai., 2009].

A fázis II metabolizmus során az anyavegyületnek és redukált származékainak szulfát és glükuronid konjugátumai képződnek, mely reakciókat szulfotranszferáz, valamint uridin-difoszfát-glükuronil-transzferáz enzimek katalizálnak [EFSA, 2011]. A

májban történő biotranszformációján túl, a ZEN intesztinális metabolizmusáról is beszámoltak patkány modellben [Ieko és mtsai., 2020], valamint kocák intesztinális mucosáján [Olsen és mtsai., 1987] és humán CaCo-2 sejtvonalon végzett *in vitro* kísérletek alapján [Videmann és mtsai., 2008]. A ZEN redukált ( $\alpha$ -ZEL) és szulfatált származékainak képződését *ex vivo* humán placenta perfúziós modellben is leírták [Warth és mtsai., 2019]. A ZEN egyszeri, 100 mg-os orális beadását követően a humán metabolizmusa során csak glükuronid konjugátumok képződött [Mirocha és mtsai., 1981]. A mikotoxin glükuronsav metabolitja részt vesz az enterohepatikus körforgásban, aminek következtében jelentősen megnő a ZEN eliminációs felezési ideje [EFSA, 2017]. Az anyavegyület és metabolitjainak együttes (össz-ZEN) eliminációs felezési idejeként 28,6 órát írtak le kecskékben, 86,6 órát sertésekben, valamint 89 órát brojlercsirkék esetében [EFSA, 2017]. Sertésekben az enterohepatikus körforgás megzavarását követően az össz-ZEN eliminációs felezési ideje 86,6 órától mindössze 3,3 órára csökkent [Biehl és mtsai., 1993]. Sertésekben csak az anyavegyület eliminációs felezési idejének detektálása során 2,6 órától 1,1 órára [Dänicke és mtsai., 2005], míg patkányokban 16,8 órától 7 órára való csökkenést tapasztaltak az enterohepatikus körforgás megzavarása esetén [Shin és mtsai., 2009]. A ZEN és redukált metabolitjai főként epével és vizelettel ürülnek [Minervini és Dell'Aquila, 2008; EFSA, 2011]. Nigériai férfiak vizeletében  $\beta$ -glükuronidáz kezelést követően 19,99  $\mu\text{g/L}$  ZEN, 2,52  $\mu\text{g/L}$   $\alpha$ -ZEL és 2,74  $\mu\text{g/L}$   $\beta$ -ZEL maximális koncentrációkat mutattak ki [Šarkanj és mtsai., 2018]. Továbbá nigériai csecsemők vizeletét vizsgálva a kizárólag anyatejjel tápláltak mintái átlagban 148 ng/L ZEN-t tartalmaztak, azonban 784 ng/L ZEN-tartalmú mintát is találtak. A nem csak anyatejjel tápláltak között hasonló átlagértéket (140 ng/L) mértek, de a ZEN maximális detektált értéke elérte a 678 ng/L-t is [Ezekiel és mtsai., 2020].

### 2.1.3. Fon alas gombák és növények által termelt módosított és maszkolt zearalenon származékok

A fon alas gombák anyagcsere útvonalain keresztül képződő mikotoxinokat szabad mikotoxinoknak nevezzük, míg a szerkezetükben történő kémiai (pl. hőhatás, UV fény) vagy biológiai változtatás (biotranszformáció) hatására keletkező származékok tartoznak a módosított mikotoxinok közé [Rychlik és mtsai., 2014]. A biológiailag módosított mikotoxinok között külön csoportot alkotnak a növények védekezőmechanizmusai során



képződő mikotoxin származékok, az ún. maszkolt mikotoxinok [Rychlik és mtsai., 2014]. Ezek a metabolitok általában az anyavegyületnél hidrofílebb, kevésbé toxikus származékok, analízisük nehézkes főként az analitikai standardok hiányából adódóan, ezért detektálásuk nem tartozik a rutin analitikai eljárások közé [Berthiller és mtsai., 2013; Freire és Sant'Ana, 2018].

A ZEN növényekben történő metabolizmusa során redukált metabolitok, és ezek vagy az anyavegyület glükozid, malonil-glükozid, dihexozid és pentozil-hexozid származékai is képződhetnek [Berthiller és mtsai., 2013]. A redukált és konjugált ZEN származékok élelmiszerekben történő előfordulását is megfigyelték [EFSA, 2017]. Elsőként, a zearalenon-14-*O*- $\beta$ -D-glükozid (Z14G; régi számozás szerint zearalenon-4-glükozid; **1. ábra**) képződését írták le 1988-ban, azonban csak 2002-ben találtak vele búzában, mint természetes szennyező [Di Mavungu, 2011]. Gareis és mtsai. használták elsőként a maszkolt mikotoxin elnevezést, miután kimutatták, hogy a Z14G sertésekben intesztinális hidrolízis során visszaalakul ZEN-ná és szerepet játszhat az anyavegyület által kiváltott toxikus hatásokban [Gareis és mtsai., 1990]. A Z14G sertésekben megfigyelt orális biohasznosulása nagyon hasonló a ZEN-éhoz, ami a maszkolt mikotoxin teljes hidrolízisére utal *per os* bevitt követően. Emellett, *i.v.* adagolás esetében is megfigyelték a Z14G átalakulását ZEN-ná [Catteuw és mtsai., 2019]. A Z14G patkányokban tapasztalt alacsony, 8,9%-os abszolút orális biohasznosulása szintén az anyavegyületté való hidrolízisére utal [Sun és mtsai., 2019]. Orális adagolását követően 55 perc alatt a Z14G 16-19%-a ZEN-ná alakult a vizsgált patkányok gyomrában [Veršilovskis és mtsai., 2012]. Ezzel szemben a Z14G *in vitro* körülmények között stabil a humán nyálban, gyomornedvben és a duodenális folyadékban; hidrolízise a bélbaktériumok (colon mikrobióta) által történik [Dall'Erta és mtsai., 2013]. A biotranszformációja során főként  $\alpha$ - és  $\beta$ -ZEL-14-glükozid,  $\alpha$ -ZEL, Z14G-16-glükuronid és ZEN-14-glükuronid képződik, fajonként eltérően [Binder és mtsai., 2017; Yang és mtsai., 2018]. A metabolitok nagyrészt vizelettel és/vagy széklettel ürülnek [Binder és mtsai., 2017].

A ZEN metabolizmusa már a fonalas gombákban elkezdődhet. A *Fusarium* gombafajokban 12:1-2:1 arányú ZEN:zearalenon-14-szulfát (Z14S; régi számozás szerint zearalenon-4-szulfát; **1. ábra**) képződést írtak le a gombafajtól és a környezeti tényezőktől függően [Plasencia és Mirocha, 1991]. A Z14S jelenlétét számos élelmiszerben (pl. búza, liszt, kenyér, keksz, müzli) is megfigyelték [Vendl és mtsai., 2010; Berthiller és mtsai., 2013]. A szulfát konjugátum hidrolízis során könnyen

visszaalakulhat az anyavegyületté [Plasencia és Mirocha, 1991]. A Z14S hidrolízise a Z14G-hoz hasonlóan *in vitro* körülmények között a colon mikrobióta által történik [Dall'Erta és mtsai., 2013]. Sertésekben a Z14S *per os* adagolása után több mint 4 órával detektáltak ZEN-14-glükuronidot; a metabolit megjelenésének ideje összhangban van a korábban leírt, Z14S gasztrointesztinális traktus hátsó szakaszában történő hidrolízisével [Catteuw és mtsai., 2019]. A Z14S és Z14G orális adagolását követően a konjugált metabolitok teljes hidrolízisét figyelték meg sertésekben [Binder és mtsai., 2017].

A mikotoxinok és módosított származékaik élelmiszerekben, takarmányban való együttes előfordulása növelheti az anyavegyület által kiváltott egészségkárosító hatások mértékét [De Boevre és mtsai., 2012; Freire és Sant'Ana, 2018], ezért az EFSA irányelvei alapján, a Z14S és Z14G expozícióval kapcsolatos kockázatokat a ZEN-éhoz hasonlóknak kell tekinteni [EFSA 2017]. Az EFSA CONTAM panel által ZEN-ra és annak módosított származékaira együttesen (ZEN-ekvivalensként) felállított humán tolerálható napi beviteli mennyiség 0,25 µg/ttkg [EFSA 2014].

#### 2.1.4. Zearalenon és metabolitjainak toxikus hatásai

A ZEN alacsony akut toxicitással rendelkezik, azonban krónikus expozíció esetén endokrin diszruptorként viselkedik [Rai és mtsai., 2020]. Annak ellenére, hogy a ZEN és redukált származékai nem szteránvázis vegyületek, szerkezetük a 17β-ösztadiolhoz hasonló, ezért alacsonyabb affinitással ugyan, de kötődnek az ösztrogén receptorokhoz (ER) és képesek aktiválni azokat [Hurd, 1977; Shier és mtsai., 2001; Zinedine és mtsai., 2007]. E mikotoxinok az ER-ok α és β altípusához is kötődnek, bár preferenciát mutatnak az α iránt [EFSA, 2017]. A ZEN és metabolitjainak ER iránti affinitása állatfajonként eltérő: pl. sertés > patkány > csirke [Fitzpatrick és mtsai., 1989; Metzler és mtsai., 2010].

Az α-ZEL metabolit rendelkezik a legnagyobb, az anyavegyületnél több mint 70-szer magasabb ösztrogénhatással, mely alig marad el az endogén 17β-ösztadioltól [Frizzell és mtsai., 2011]. Az α-ZAL szintén lényegesen nagyobb affinitással kötődik ER receptorokhoz, mint a ZEN [Shier és mtsai., 2001], ezért egyes régiókban, országokban (Észak-Amerika, Chile, Ausztrália, Új-Zéland, a Dél-afrikai Köztársaság, Japán) Zeranol néven alkalmazzák az állattenyésztésben mint anabolikus növekedéscsökkentő, azonban az Európai Unióban a használata nem engedélyezett [Mukherjee és mtsai., 2014; EFSA, 2017]. A β-ZAL 3,5-ször, míg a ZAN 2,5-ször potensebb ösztrogén-aktivitást mutat, mint a ZEN, ezzel szemben a β-ZEL kb. feleakkora affinitással kötődik az ER-okhoz, mint az

anyavegyület [Shier és mtsai., 2001; Frizzell és mtsai., 2011]. A ZEN CYP-katalizált biotranszformációja során képződő 6/8-hidroxi-ZEN metabolitok kb. egy nagyságrenddel alacsonyabb ER aktiváló képességgel rendelkeznek, mint az anyavegyület [Bravin és mtsai., 2009]. A növények által képzett Z14G nagy térkitöltésű glükózid oldallánca miatt nem tud kapcsolódni az ER-okhoz [Poppenberger és mtsai., 2006], míg a fonalas gombákban és emlősökben is képződő Z14S kb. 100-szor alacsonyabb affinitással kötődik a receptorokhoz, mint a ZEN [Drzymala és mtsai., 2015]. Azonban az EFSA ajánlása alapján a Z14G és Z14S toxicitása az anyavegyületével egyenértékűnek tekinthető a konjugátumok nagymértékű hidrolízise miatt [EFSA, 2017]. A sertések a legérzékenyebbek a ZEN-indukálta ösztrogénszerű hatásokra: a mikotoxin expozíció hatására gyakran vulvovaginitis alakul ki kocákban, de a folliculus stimuláló hormon szintézisének és szekréciójának gátlását is leírták [Fink-Gremmels és Malekinejad, 2007; Yazar és Omurtag, 2008; He és mtsai., 2018].

Az ER-hoz való kompetitív kötődésen túl egyes vizsgálatok során a ZEN és ZEL-ok jelenléte fokozta a progeszteron affinitását saját receptorai iránt [Frizzell és mtsai., 2011]. Emellett alacsony koncentrációban emelték az ösztradiol, progeszteron, tesztoszteron és kortizol képződését *in vitro* H295R szteroidogenezis esszében [Frizzell és mtsai., 2011]. Továbbá a szteroidszintézisben szerepet játszó HSD enzimek kompetitív szubsztrátjaként is befolyásolni tudják az endokrin folyamatokat [Fink-Gremmels és Malekinejad, 2007]. A ZEN és ZEL-ok fertilitás csökkenést, infertilitást, petefészek- és méhmegnagyobbodást, spermiumszám és tesztoszteronszint csökkenést, vetélést, magzati fejlődési zavarokat, csökkent születési súlyt, valamint a mellékvesevelő és az agyalapi mirigy tömegének változását okozták különböző állatfajokban [Yang és mtsai., 2007; Zinedine és mtsai., 2007; Minervini és Dell'Aquila, 2008; Wang és mtsai., 2013; Zhao és mtsai., 2014]. A ZEN és származékainak humán reprodukív toxicitása nem teljesen ismert, de endokrin diszruptorként viselkedhetnek az emberi szervezetben is [Rai és mtsai., 2020]. Korábbi vizsgálatok alapján endometrium adenocarcinomával, hyperplasiával rendelkező nők endometriumában [Tomaszewski és mtsai., 1998], valamint emlőmirigy daganatban szenvedő nők vérében is kimutattak ZEN-t [Kuciel-Lisieska és mtsai., 2008]. Emellett számos tanulmány rávilágított a ZEN és metabolitjainak potenciális szerepére az idiopátiás, korai pubertás, gynecomastia és *thelarche praecox* kialakulásában [Sáenz de Rodríguez, 1984; Sáenz de Rodríguez és mtsai., 1985; Szuets és mtsai., 1997; Massart és mtsai., 2008; Massart és Saggese, 2010; Mukherjee és mtsai., 2014]. Régebben az  $\alpha$ -ZAL alkalmazása felmerült

posztmenopauzális panaszok kezelésében és orális fogamzásgátlóként [Utian, 1973; Hidy és mtsai., 1977], azonban egyéb toxikus hatásai miatt a humán alkalmazást elvetették.

A ZEN endokrin diszruptor tulajdonságain túl haematotoxikus, hepatotoxikus, immunotoxikus, genotoxikus és karcinogén hatásokkal is rendelkezik [Zinedine és mtsai., 2007; Rai és mtsai., 2020]. Egyes állatfajokban egyszeri adagolást követően a vérlemezkék számának csökkenését, haematocrit, haemoglobin, eritrocyta és a fehérvérsejt szám emelkedést figyeltek meg [EFSA, 2011], emellett egerekben, nyulakban és patkányokban krónikus ZEN expozíciót követően májenzim-szint eltéréseket és szérum protein szint csökkenést írtak le [Conková és mtsai., 2001; Sun és mtsai., 2014; Zhou és mtsai., 2015].

Korábbi vizsgálatok alapján a ZEN és/vagy  $\alpha$ -ZEL expozíció befolyásolja az immunsejtek, citokinek (pl. interleukinek, tumor nekrosis faktor  $\alpha$ , interferon  $\gamma$ ), immunglobulinok, valamint egyes B- és T-sejt altípusok expresszióját/mennyiségét [Marin és mtsai., 1996; Ben Salah-Abbès és mtsai., 2008; Marin és mtsai., 2010; Islam és mtsai., 2017]. Az immunsejteken kifejeződő ER-ok célpontként szolgálhatnak a ZEN-nak és származékainak, és az ezeken keresztül kifejtett hatások szerepet játszhatnak immunotoxicitásukban [Lang, 2004; Rai és mtsai., 2020].

A ZEN CYP enzimek általi biotranszformációja során keletkező catekol származékok oxidációt követően kinonokká alakulhatnak [Pfeiffer és mtsai., 2009; Fleck és mtsai., 2012], a keletkező vegyületek DNS adduktok, valamint reaktív oxigén származékok kialakítására képesek [Pfohl-Leszkowicz és mtsai., 1995; Fleck és mtsai., 2012]. Továbbá a ZEN lipidperoxidációt, kromoszóma aberrációkat, testvérkromatida kicserélődést indukáló, citotoxikus, valamint DNS- és fehérjeszintézist gátló hatásairól is beszámol a szakirodalom [Ghédira-Chékir és mtsai., 1998; Abid-Essefi és mtsai., 2004; Kouadio és mtsai., 2005].

A Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (IARC) a ZEN-t a 3. karcinogenitási osztályba (humán karcinogénként nem klasszifikálható) sorolja [IARC, 1993]. Azonban egyes tanulmányok alapján a ZEN expozíció növeli a hepatokarcinóma és az agyalapi mirigy daganatos megbetegedéseinek incidenciáját egerekben [National Toxicology Program, 1982]. Továbbá a ZEN indukálja az ER-ral rendelkező humán emlőkarcinóma sejtek növekedését [Ahamed és mtsai., 2001]. Yu és mtsai. szerint a ZEN expozíció hozzájárulhat az emlőkarcinóma incidenciájának növekedéséhez is [Yu és mtsai., 2005].

Emellett, a ZEN metabolitjaival, valamint különböző mikotoxinokkal, mikotoxin metabolitokkal, egyéb élelmiszer szennyezőkkel és fitoösztogénekkal való együttes

előfordulása kombinatív hatásokat eredményezhet [Lorenz és mtsai., 2019], melyről számos *in vitro* tanulmány beszámolt [Ren és mtsai., 2016; Vejdovszky és mtsai., 2017; Marin és mtsai., 2019; Agahi és mtsai., 2020; Aichinger és mtsai., 2020]. E ko-expozíciók akár a mikotoxinok egészségügyi kockázatának jelentős emelkedését is eredményezhetik.

## 2.2. Szérum albumin

### 2.2.1. Az albumin szerkezete és főbb tulajdonságai

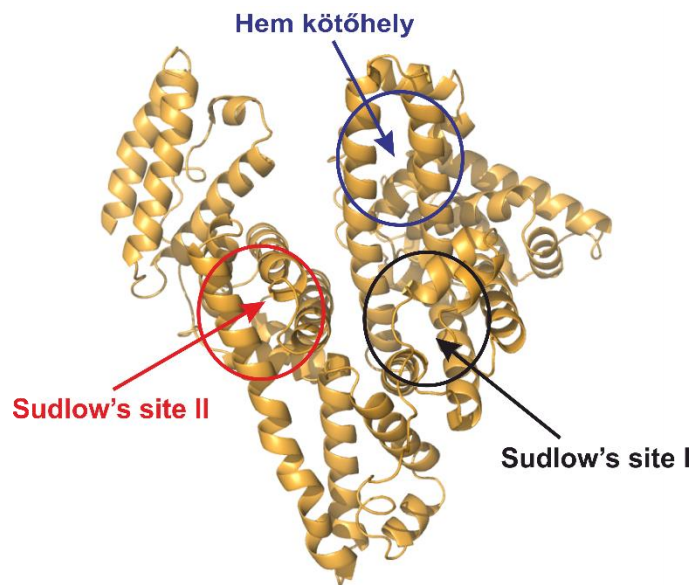
A 66,5 kDa molekulatömegű humán szérum albumin (HSA; **2. ábra**) a keringésben legnagyobb mennyiségben megtalálható fehérje. A plazmakoncentrációja 35-50 g/L értékek között mozog [Peters, 1985; Carter és Ho, 1994; Roche és mtsai., 2008]. Felépítését tekintve, nem glikozilált fehérje; az albumint fajonként eltérően 580-585 aminosavból álló peptidlánc alkotja. Leginkább savas és bázikus oldalláncú aminosavakból (glutaminsav, aszparaginsav, lizin és arginin) áll, emellett kiemelkedően magas a cisztein tartalma (35%), míg kevés triptofánt (Trp; 1-2), glicint és metionint (4-6) tartalmaz [Rothschild és mtsai., 1988; Carter és Ho, 1994]. Az albumin semleges pH-n jellemzően negatív töltéssel rendelkezik, például a HSA töltése: -15; marha szérum albumin (BSA) töltése: -18, míg a patkány szérum albuminé (RSA): -12; ennek köszönhetően az albuminok jó vízdékonyságot mutatnak [Peters, 1985; Carter és Ho, 1994]. Legnagyobb részben az albumin Trp tartalma felelős a fluoreszcens tulajdonságaiért (pl. BSA: Trp-134 és Trp-212; HSA: Trp-214; RSA: Trp-214), mely 295-305 nm excitációs hullámhosszon gerjeszhető, emissziós maximumát 340 nm körül detektálhatjuk [Peters, 1985]. A BSA és a sertés szérum albumin (PSA) 76%-ban azonos szekvenciával rendelkezik, mint a HSA, míg RSA és HSA esetében 73%-os egyezőséget írtak le [Weinstock és Baldwin, 1988; Carter és Ho, 1994; Stehle és mtsai., 1999]. A fehérje három homológ doménből (I, II, III) áll, melyek további két-két (jellemzően helikális szerkezetű) aldoménre oszthatók (A és B), az albumin másodlagos szerkezetét diszulfid hidak stabilizálják [Carter és Ho, 1994].

Az albumin szintézise a máj endoplazmatikus retikulumában zajlik [Peters, 1977; Roche és mtsai., 2008]. A felnőtt emberi szervezetben mintegy napi 15-20 g/L HSA szintetizálódik főként a táplálkozástól függően, de egyéb tényezők (pl. stressz, hormonális változás, hőmérsékletváltozás) is befolyásolhatják a képződését [Rothschild és mtsai., 1988; Rozga és mtsai., 2013]. Szintézisét követően azonnal a vérkeringésbe kerül, ahol plazma eliminációs-felezési ideje átlagosan 20 nap [Roche és mtsai., 2008].

Az albumin számos funkcióval rendelkezik, többek között az albumin felel a vér onkotikus nyomásának fenntartásáért, emellett enzimatis (pl. észteráz, enoláz, foszfatáz), antioxidáns és szabadgyökfogó tulajdonságokkal is rendelkezik. Pufferkapacitásának köszönhetően felelős a vér megfelelő pH-jának fenntartásáért [Peters, 1985; Carter és Ho, 1994; Roche és mtsai., 2008; Kragh-Hansen, 2013], továbbá képes endogén és exogén molekulák megkötésére és szállítására, ezáltal fontos szerepet játszik a vegyületek (pl. zsírsavak, hormonok, fémionok, gyógyszerek) farmako- és toxikokinetikájában. Mivel a vegyületek szabad (plazmafehérjéhez nem kötött) frakciója felelős a biológiai hatások kialakításáért, az albuminkötődés gyakran befolyásolja a kötődő ligandumok szöveti felvételét és eliminációjuk ütemét [Peters, 1985; Rothschild és mtsai., 1988; Carter és Ho, 1994]. Több, az albumin iránt nagy affinitást mutató vegyület együttes alkalmazása leszorítási interakciókat eredményezhet (kompetitív vagy akár allosztérikus módon), ami a ligandum szabad frakciójának jelentős emelkedéséhez vezethet. A megnövekedett szabad plazmakoncentráció hatásfokozódást és nemkívánt hatások megjelenését, de akár gyorsabb kiürülést is eredményezhet. Ezért az albumin-ligandum kölcsönhatások toxikokinetikai aspektusai jelentősek lehetnek [Ascenzi és mtsai., 2006; Ascenzi és Fasano, 2010; Fanali és mtsai., 2012; Yamasaki és mtsai., 2013].

A HSA kilenc zsírsavkötőhellyel (FA 1-9) rendelkezik; a IIA aldóménen található FA7 alkotja a Sudlow's site I kötőhelyet (**2. ábra**), amely a HSA egyik legismertebb ligandumkötőhelye. Emellett a IIIA aldómén üregében elhelyezkedő, hat hélixből felépülő FA3 és FA4 alkotja a Sudlow's site II (**2. ábra**) néven ismert másik fontos kötőhelyet [Sudlow és mtsai., 1975; Sudlow és mtsai., 1976; Fanali és mtsai., 2012]. A site I kötőhelyre jellemzően negatív töltéssel rendelkező, nagyméretű, heterociklusos molekulák kötődnek, amelyek elsősorban az apoláris részeket foglalják el és hidrogénhidakat alakítanak ki a tirozin-150 hidroxilcsoportjával [Otagiri, 2005; Ascenzi és Fasano, 2010; Fanali és mtsai., 2012]. A FA7 kötőhelyet elfoglaló ligandumok közé tartozik pl. a warfarin, a fenilbutazon, és az azapropazon [Ascenzi és Fasano, 2010; Fanali és mtsai., 2012]. A site II kötőhely kisebb, kevésbé flexibilis kötőhely, ahova főként aromás karbonsav szerkezettel rendelkező molekulák kötődnek. Jellemző ligandumai pl. a diazepam és az ibuprofén [Otagiri, 2005; Fanali és mtsai., 2012]. A site II régió esetében nagymértékű sztereoselektivitást írtak le; a hozzá kötődő molekula szerkezetében bekövetkező változás (pl. szubsztitúció) jelentősen befolyásolhatja a ligandum FA3-FA4 régió iránti affinitását [Otagiri, 2005]. A HSA harmadik, egyre jelentősebbnek tűnő

kötőhelye az IB aldoménon található FA1 kötőhely, melynek jellemző liganduma a hem, így ezt Hem kötőhelynek is nevezik (**2. ábra**) [Fanali és mtsai., 2012; Zsila, 2013]. Emellett a bilirubin, fuzidinsav és lidokain esetében is az FA1 régiót határozták meg elsődleges kötőhelyként, valamint számos gyógyszer másodlagos kötőhelyeként is azonosították [Zunszain és mtsai., 2008; Hein és mtsai., 2010; Yamasaki és mtsai., 2013; Zsila, 2013]. A Hem kötőhely allosztérikus kapcsolatban áll többek között a site I régióval is [Fasano és mtsai., 2005; Ascenzi és Fasano, 2010].



**2. ábra:** A humán szérum albumin (HSA) szerkezete és fő ligandumkötőhelyei.

### 2.2.2. Mikotoxin-albumin interakciók

Korábbi tanulmányok alapján számos mikotoxin és mikotoxin metabolit (pl. aflatoxinok, citrinin, dihidrocitrinon, ZEN) lép kölcsönhatásba HSA-nal [Poór és mtsai., 2015a; 2017a; 2017b; Faisal és mtsai., 2019a]. Az *Aspergillus* fajok által termelt aflatoxin B1, B2, G1, G2, és az aflatoxin B1 metabolizmusa során képződő aflatoxin M1 a site I kötőhely elfoglalásával közepesen stabil komplexeket ( $\log K = 4,3-4,7$ ) képeznek HSA-nal [Poór és mtsai., 2017b]. Emellett az aflatoxin B1 reaktív metabolitja (aflatoxin B1-8,9-epoxid) kovalens adduktokat is képez albuminnal és DNS-sel (aflatoxin B1-N<sup>7</sup>-guanin addukt). Ezek az adduktok az aflatoxin expozíció biomarkereinek is tekinthetők [Vidyasagar és mtsai., 1997].

Az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok által termelt, nefrotoxikus tulajdonságokkal rendelkező citrinin szintén a site I régióhoz kötődve lép kölcsönhatásba HSA-nal. Albumin iránti affinitása ( $\log K = 5,3$ ) egy nagyságrenddel nagyobb az aflatoxinokéhoz képest [Poór és mtsai., 2015a]. A citrinin metabolitja, a dihidrocitrinon, az anyavegyülethez hasonló stabilitású komplexet képez ( $\log K \sim 5$ ) HSA-nal, azonban a Hem kötőhelyhez kapcsolódik [Faisal és mtsai., 2019a]. A citrinin és dihidrocitrinon a humán, marha, sertés és patkány albuminok közül PSA-nal képezték a legalacsonyabb ( $\log K \sim 4,7-5,0$ ), míg RSA-nal a legmagasabb ( $\log K \sim 5,3-5,7$ ) stabilitású komplexeket [Poór és mtsai., 2015a; Faisal és mtsai., 2019a].

Az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok által termelt ochratoxinok közé tartozó, nefrotoxikus tulajdonságú ochratoxin A a site I régióhoz kötődve rendkívül stabil komplexet alakít ki HSA-nal ( $\log K = 7,3-7,6$ ) [Kőszegi és Poór, 2016]. Az ochratoxin A szinte teljes mértékben albuminkötött formában van jelen a keringésben [Hagelberg és mtsai., 1989; Kőszegi és Poór, 2016], ami jelentősen befolyásolja eliminációjának sebességét: albuminhiányos patkányokban az ochratoxin A 20-70-szer gyorsabb renális exkrécióját figyelték meg [Kumagai, 1985]. Az ochratoxin A HSA iránt mutatott magas affinitásának köszönhetően plazma eliminációs-felezési ideje kb. 1 hónap [Studer-Rohr és mtsai., 2000]. Azonban egyéb fajokban jellemzően rövidebb plazma eliminációs-felezési időket (pl. patkányban *i.v.*  $t_{1/2} = 170$  h, *p.o.*  $t_{1/2} = 120$  h) figyelték meg [Hagelberg és mtsai., 1989]. Ezt az ochratoxin A albuminkötődésében tapasztalt jelentős faji eltérések magyarázhatják: BSA-hoz ( $\log K = 6,5$ ) és RSA-hoz ( $\log K = 6,2$ ) kb. 15- és 30-szor alacsonyabb affinitással kötődik, mint HSA-hoz; azonban ezekkel az albuminokkal is meglehetősen stabil komplexeket képez [Kőszegi és Poór, 2016]. Az ochratoxinok családjába tartozó ochratoxin B és ochratoxin C szintén a Sudlow' site I régióhoz kötődnek, azonban az ochratoxin B valamivel alacsonyabb ( $K \sim 10^6$  L/mol) stabilitású komplexet képez HSA-nal [Perry és mtsai., 2003a; Faisal és mtsai., 2020a], míg az ochratoxin C HSA iránti affinitása ( $K \sim 10^7$  L/mol) az ochratoxin A-hoz hasonló [Faisal és mtsai., 2020a]. Az ochratoxin A-val szennyezett kávé pörkölése során képződő termális degradációs termék (2'R-ochratoxin A) szintén kölcsönhatásba lép szérum albuminnal [Sueck és mtsai., 2018]. Bár a képződő komplexek stabilitása valamivel alacsonyabb ( $\log K = 6,6-7,3$ ) mint ochratoxin A esetében, kötőhelye megegyezik az anyavegyületével [Sueck és mtsai., 2018; Faisal és mtsai., 2018a]. A 2'R-ochratoxin A különböző fajok albuminjai iránti affinitása eltérő tendenciát mutat az anyavegyülethez



képest: HSA ( $\log K = 6,6$ ) < PSA ( $\log K = 6,8$ ) < RSA ( $\log K = 7,2$ ) < BSA ( $\log K = 7,3$ ) [Faisal és mtsai., 2018a].

Az *Alternaria* gombafajok által termelt alternariol HSA-kötődése során a citrininéhez hasonló [Poór és mtsai., 2015a], kb.  $10^5$  L/mol stabilitású komplexeket képez. Primer kötőhelyeként a site I régiót azonosították [Fliszár-Nyúl és mtsai., 2019a]. A HSA és PSA iránt ( $\log K = 5,6$ ) hasonló affinitást mutatott, míg BSA-nal ( $\log K = 5,9$ ) és RSA-nal ( $\log K = 6,5$ ) stabilabb komplexeket alakított ki [Fliszár-Nyúl és mtsai., 2019a].

A ZEN-albumin kölcsönhatás kapcsán szintén stabil komplexek képződését írták le [Poór és mtsai., 2017a; Ma és mtsai., 2018]. Korábbi vizsgálatok alapján a ZEN-HSA komplex kötési állandója ( $\log K = 5,1$ ) kb. hatszor magasabb a ZEN-BSA ( $\log K = 4,3$ ) komplexhez viszonyítva [Poór és mtsai., 2017a; Ma és mtsai., 2018]. Fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok és molekulamodellzés segítségével a ZEN HSA-on elfoglalt kötőhelyét egy nem-konvencionális, a IIA és IIIA aldomén közötti, kötőhelyként határozták meg; valamint az elfoglalt kötőhely allosztérikus kapcsolatát is leírták a site I kötőhellyel [Poór és mtsai., 2017a].

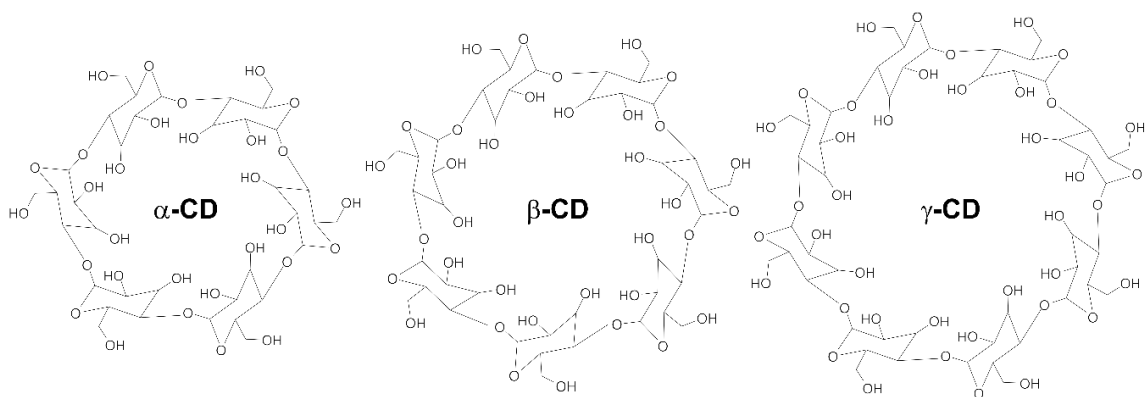
## 2.3. Ciklodextrinek

### 2.3.1. Ciklodextrinek szerkezete és jellemzői

A ciklodextrinek (CD) keményítő eredetű,  $\alpha$ -1,4 glikozidos kötésekkel kapcsolódó D-glükopiranoz egységekből felépülő, gyűrű alakú oligoszacharidok [Crini, 2014]. A természetben előforduló, hat, hét és nyolc glükózegységből álló natív  $\alpha$ -,  $\beta$ -, és  $\gamma$ -ciklodextrinek (ACD, BCD és GCD; **3. ábra**) a *Bacillus macerans* baktérium glikozil-tanszferáz enzime által képződnek [Welliver és McDonough, 2007]. A natív ACD, BCD és GCD természetes megjelenése mellett, egyes enzim- és hőkezelt keményítőt tartalmazó élelmiszerekben glikozilált és maltozilált CD-eket mutattak ki [Szente és mtsai., 2006; Fenyvesi és mtsai., 2016]. Továbbá enzim módosított CD-ek jelenlétét írták le sörmintákban, kukorica szirupban és kenyérben [Fenyvesi és mtsai., 2016]. A CD-ek lipofil belső üreggel rendelkeznek, mely apoláros molekulák befogadására képes, ez lehetővé teszi a gazda-vendég típusú zárványkomplexek kialakulását [Crini, 2014]. Az 1:1 sztöchiometriájú komplexképzés a leggyakoribb, azonban 2:1, 1:2, 2:2 arányú, esetleg még bonyolultabb asszociációk is kialakulhatnak [Szejtli, 1998]. A CD-ek belső üregének mérete a felépítő glükózegységek számától függően változik: az ACD (belső üreg: kb.

0,5 nm), BCD (belső üreg: kb. 0,6 nm) és GCD (belső üreg: kb. 0,8 nm) kónikus cylinder alakzatot vesznek fel, míg a kilenc vagy több glükózegységből felépülő további CD-ek szerkezete összenyomódik, ami egy „összeesett” cylinderformát eredményez. Ennek köszönhetően ezek a CD-ek kisebb belső üreggel rendelkeznek, mint a GCD [Szejtli, 1998; Sharma és Sharma, 2001; Welliver és McDonough, 2007]. Emellett, a felépítőegységek számának növelésével a komplexképződés hajtóereje (nagy entalpiájú vízmolekulák kiszorítása a belső üregből) gyengül, ezért e CD-ek kedvezőtlenebb inklúziós sajátságokkal bírnak [Szejtli, 1998]. Ez a jelenség magyarázza az ACD, BCD és GCD preferenciális elterjedését a különböző alkalmazási területeken a többi CD-nel szemben [Szejtli, 1998].

A CD-ek külső része hidrophil tulajdonságokkal bír: az összes elsőrendű hidroxilcsoport a gyűrű egyik oldalán, míg a másodrendű hidroxilcsoportok a másik oldalán helyezkednek el [Szejtli, 1998]. A primer és szekunder hidroxilcsoportok lokalizációja kiváló vízoldhatóságot biztosít a CD-ek számára [Szente és Szemán, 2013; Crini, 2014]. A natív CD-ek elsőrendű vagy másodrendű hidroxilcsoportjainak különböző kémiai módosítása (pl. aminálás, észterifikálás) során ún. kémiailag módosított CD-ek jönnek létre. A szubsztituens típusától és a szubsztitúció foktól függően ezek a CD-ek előnyösebb oldhatósági, stabilitási és/vagy komplexképzési tulajdonságokkal rendelkezhetnek [Croft és Bartsch, 1983; Del Valle, 2004].



**3. ábra:** Az  $\alpha$ -,  $\beta$ -, és  $\gamma$ -ciklodextrinek kémiai szerkezete.

### 2.3.2. A ciklodextrinek felhasználási területei

A CD-eket széleskörben alkalmazzák (pl. kozmetikai- és textilipar) a gazda-vendég típusú komplexképzési tulajdonságaik miatt [Crini, 2014]. Annak ellenére, hogy, az első generációs CD-ek közül a BCD rendelkezik a legalacsonyabb oldhatósággal, egyéb kedvező tulajdonságainak (pl. könnyű beszerezhetőség és alacsony ár) köszönhetően mégis a BCD és egyes módosított származékainak alkalmazása terjedt el leginkább [Del Valle, 2004].

A natív CD-ek és hidrofil származékaik alacsony orális biohasznosulással rendelkeznek, ezért *per os* alkalmazásuk során jellemzően nem váltanak ki toxikus hatásokat, ami lehetővé teszi az élelmiszer- és gyógyszeripari felhasználásukat [Irie és Uekama, 1997; Crini, 2014; Jansook és mtsai., 2018]. A CD-ek gyűrűs szerkezete és a szubsztituensek jelenléte megóvják őket a humán testnedvekben megtalálható  $\alpha$ -amiláz által katalizált hidrolízistől, ez alól a natív GCD az egyetlen kivétel. A CD-ek degradációja a colon mikrobióta által történik [Jansook és mtsai., 2018]. Egyes CD-ek (pl. 2-hidroxipropil- $\beta$ -CD, szulfobutiléter- $\beta$ -CD, szulfatált- $\beta$ -CD és maltozil- $\beta$ -CD) parenterális alkalmazásuk során jól tolerálhatók, míg a BCD *i.v.* alkalmazás esetén nefrotoxikus hatásokat váltott ki patkányokban [Irie és Uekama, 1997; Gould és Scott, 2005; Stella és He, 2008; Jansook és mtsai., 2018]. Az orális és parenterális alkalmazásuk mellett topikális gyógyszerkészítmények segédanyagaiként is alkalmazzák a CD-eket [Laza-Knoerr és mtsai., 2010]. A CD-ek zárványkomplexeket képeznek a lipofil hatóanyagokkal, mely reakció asszociációs és disszociációs sebességi konstansa  $10^8$ - $10^7$   $M^{-1} s^{-1}$  között mozog. A komplexált hatóanyag felszabadulása az adminisztráció során bekövetkező hígulásnak köszönhetően történik meg, azonban erősen kötött ( $K = 10^4$  L/mol vagy afölötti) gyógyszerek esetében az endogén molekulák kiszorító hatása, a szabad hatóanyag plazmafehérje/szöveti kötődése, valamint szöveti felvétele okozhatja a vendégmolekula felszabadulását [Stella és mtsai., 1999]. Ebből kifolyólag gyakran alkalmaznak CD-eket lipofil hatóanyagok szolubilizálószerként, mely az orális biohasznosulás javulásához, jobb oldhatósági tulajdonságokhoz és a helyileg alkalmazott hatóanyagok jobb felszívódásához, valamint a hatóanyagok fizikokémiai stabilitásának növekedéséhez vezet [Laza-Knoerr és mtsai., 2010; Jansook és mtsai., 2018]. A topikálisan alkalmazandó készítmények között jellemzően szemcseppek (pl. indometacin, diklofenák, klóramfenikol hatóanyagú) és kenőcsök (pl. dexametazon

tartalmú) érhetőek el, de nazális adagolású készítmények segédanyagai között is előfordulnak CD-ek [Loftsson és Brewster, 2010].

Emellett a sugammadex (kémiaailag módosított  $\gamma$ -CD származék) forgalomban van a nem-depolarizáló izomrelaxáns rocuronium és vecuronium által kiváltott neuromuscularis blokádnak felfüggesztésére [Keating, 2016]. A rocuronium  $10^7$  L/mol stabilitású komplexet képez sugammadexszel. A kialakuló komplex hatására az aminoszteroid izomrelaxánsok (rocuronium > vecuronium >> pancuronium) szabad plazmakoncentráció csökkenése gradienst hoz létre a plazma és a szövetek között, aminek köszönhetően a neuromuszkuláris junctionban található nikotinos acetilkolin receptorról ledisszociálva a plazmába áramlanak a perifériás izomrelaxánsok [Nag és mtsai., 2013]. Emellett állatkísérletes eredmények alapján a (2-hidroxi-propil)- $\beta$ -ciklodextrin (HPBCD) alkalmas a genetikai eredetű, lizoszomális tárolási rendellenességet okozó Niemann-Pick C betegség (NPC) kezelésére. A betegség során a késői endoszómákban/lizoszómákban koleszterin és lipidfelhalmozódás történik, ami főként neurodegeneratív tüneteket eredményez [Vance és Karten, 2014]. A HPBCD stabil zárványkomplexet képez koleszterinnel, aminek köszönhetően jelentősen lecsökken a koleszterinraktározás *NPCI*<sup>-/-</sup> egerekben és meghosszabbítja élettartamukat [Ramirez és mtsai., 2010; Vance és Karten, 2014]. Az Amerikai Egyesült Államokban jelenleg is folyik a HPBCD klinikai vizsgálata Niemann-Pick C betegség kezelésére [ClinicalTrials.gov, 2016]. Napjainkban több mint 60 humán, és 10 állatgyógyászati készítmény van forgalomban, amelyek CD-t tartalmaznak [Szente, 2017].

A CD-ek élelmiszeripari felhasználása az 1970-es években kezdődött, amikor Japánban kimondták, hogy a BCD enzimatikusan módosított keményítőnek tekinthető, ezért engedélyezték az élelmiszeripari alkalmazását [Fenyvesi és mtsai., 2016]. Számos toxikológiai és élelmiszerbiztonsági vizsgálatot követően, a BCD mellett az ACD és GCD élelmiszeripari felhasználását is jóváhagyták [Fenyvesi és mtsai., 2016]. Az íztelen, színtelen, szagtalan CD-ek alkalmazhatók szolubilizáló-, stabilizáló- és tartósítószerként, emellett felhasználásukkal az élelmiszerek kellemetlen íze (pl. keserűség) és szaga (pl. szójatej) is elfedhető vagy csökkenthető [Astray és mtsai., 2009; Fenyvesi és mtsai., 2016].

A CD technológia alkalmas a különböző környezetszennyező ágensek megkötésére is, így a talaj- és víztisztítás területén is alkalmazhatók, továbbá egyes szerves szennyezők (pl. toluol, fenol származékok) bakteriális degradációját is leírták CD-ek jelenlétében

[Landy és mtsai., 2012; Morin-Crini és Crini, 2013; Wang és mtsai., 2017; Wang és mtsai., 2019; Morillo és mtsai., 2020].

Emellett a CD-eket az analitikában is széleskörben használják, többek között sztereoszelektív komplexképző sajátosságuk miatt [Szente és Szemán, 2013]. Az 1980-as években kifejlesztett, CD-alapú enantioszelektív kromatográfiás oszlopokat napjainkban rendszeresen alkalmazzák az enantio-szeparáció területén [Armstrong, 1984; Szente és Szemán, 2013]. Valamint gázkromatográfiás, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztás és kapilláris elektroforézis során is használhatók a szeparáció szelektivitásának és a módszerek hatékonyságának javítására [Szente és Szemán, 2013]. A CD-ek lumineszcens spektroszkópai módszerek érzékenységének és szelektivitásának növelésére is alkalmasak [Szente és Szemán, 2013], mivel a lumineszcens tulajdonságokkal rendelkező vegyületek intenzitás emelkedése figyelhető meg a CD-ek apoláros üregében való elhelyezkedésük során, hasonlóan a fluorofór szerves oldószerekben is tapasztalható intenzitás emelkedéséhez. A lumineszcenciát kioltó vízmolekulák CD üregből történő részleges kiszorításának köszönhetően a vízmolekulák által okozott részleges kioltó hatás csökken, ami a fluorofór emissziós intenzitásának jelentős emelkedését eredményezi [Wagner, 2006; Szente és Szemán, 2013].

### *2.3.3. Mikotoxin-ciklodextrin kölcsönhatások és alkalmazhatóságuk*

A CD-ek képesek zárványkomplexek kialakítására számos mikotoxinnal és egyes (az anyavegyületnél hidrofilebb tulajdonságokkal rendelkező) mikotoxin metabolitokkal is [Galaverna és mtsai., 2008; Maragos és mtsai., 2008; Dall'Asta és mtsai., 2009]. A fluoreszcens mikotoxinok emissziós intenzitását a CD-ekkel történő komplexképzés jelentős mértékben képes növelni [Verrone és mtsai., 2007; Dall'Asta és mtsai., 2009; Zhou és mtsai., 2012]. Ennek köszönhetően a mikotoxin-CD komplexképződés alkalmas a fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkező mikotoxinok analitikai detektálhatóságának és az analitikai szeparáció javítására (pl. kromatográfia, kapilláris elektroforézis) [Galaverna és mtsai., 2008; Maragos és mtsai., 2008], valamint, sikeresen használtak különböző CD-alapú mikotoxinkötőket egyes italok (pl. almalé, bor) toxintartalmának csökkentésére [Fenyvesi és mtsai., 2016].

Korábbi vizsgálatok alapján az aflatoxinok kölcsönhatásba lépnek  $\beta$ -CD-ekkel, a képződő komplexek stabilitása jellemzően  $10^2$  L/mol nagyságrendű [Dall'Asta és mtsai., 2003; Aghamohammadi és Alizadeh, 2007; Wu és mtsai., 2018]. Az inklúzió során az

aflatoxin B1, G1 és M1 fluoreszcenciájának jelentős emelkedését figyelték meg, a legjelentősebb fluoreszcencia erősítést a szukcinil- $\beta$ -CD eredményezte [Dall'Asta és mtsai., 2003]. Ennek köszönhetően, a korábban az aflatoxinok HPLC-FLD analízise során alkalmazott derivatizálás helyett a CD technológia felhasználásával is javítható a detektálásuk érzékenysége [Holcomb és mtsai., 1992; Maragos és mtsai., 2008].

A citrinin és metabolitja a dihidrocitrinon BCD-nel kialakított kölcsönhatása során jelentősebb fluoreszcencia intenzitás emelkedés tapasztalható, mint GCD jelenlétében, míg az ACD nem befolyásolta e mikotoxinok fluoreszcenciáját [Zhou és mtsai., 2012; Poór és mtsai., 2016; Faisal és mtsai., 2019b]. A CD-ek kémiai módosítása előnyösen befolyásolta a mikotoxinokra kifejtett fluoreszcencia erősítő hatásukat [Poór és mtsai., 2016; Faisal és mtsai., 2019b]. Érdekes módon a dihidrocitrinon stabilabb komplexeket képzett GCD-nel és módosított származékaival ( $\log K = 2,7-3,4$ ), mint a natív és a kémiaailag módosított  $\beta$ -CD-ekkel ( $\log K = 2,2-3,2$ ) [Faisal és mtsai., 2019b]. Ezzel szemben, a citrinin affinitása a metilált  $\beta$ -CD származékok iránt volt magasabb ( $\log K = 2,6-2,9$ ) [Poór és mtsai., 2016].

Az ochratoxin A natív BCD-nel kialakított kölcsönhatása során a mikotoxin L-fenilalanin szerkezeti részének fenolos gyűrűje ül be a BCD lipofil üregébe, míg a kilógó részek H-hidak létesítésével stabilizálják a komplexet, azonban jelentősebb fluoreszcencia intenzitás emelkedés nem tapasztalható a kölcsönhatás során. [Amadasi és mtsai., 2007; Galaverna és mtsai., 2008]. Korábbi vizsgálatok alapján az ochratoxin A nemionos, monoanion (a karboxil csoport deprotonálódik,  $pK_a = 4,2-4,4$ ) és dianion (a fenolos hidroxil csoport is deprotonálódik,  $pK_a = 7,0-7,3$ ) formái is erősebben kötődnek a kémiaailag módosított származékokhoz, mint a natív BCD-hez ( $\log K = 1,6-2,2$ ) [Perry és mtsai., 2003b; Hashemi és Alizadeh, 2009; Poór és mtsai., 2015b]. Lúgos közegben az ochratoxin A dianion formája kb. 200-szor stabilabb komplexet alakított ki kvaterner-ammónium- $\beta$ -CD-nel (QABCD;  $\log K = 4,5$ ), mint BCD-nel ( $\log K = 2,2$ ), ami valószínűleg a kationos oldallánc és a mikotoxin dianion között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatással magyarázható [Poór és mtsai., 2015b].

Az *Alternaria* gombafajok által termelt mikotoxin, az alternariol előnyösebb tulajdonságú komplexeket alakított ki natív GCD-nel és kémiaailag módosított származékaival, mint  $\beta$ -CD-ekkel [Fliszár-Nyúl és mtsai., 2019b]. A legnagyobb fluoreszcencia intenzitás emelkedést natív GCD jelenlétében figyelték meg, fiziológias körülmények között, míg a legstabilabb komplexeket a kvaterner-ammónium- $\gamma$ -CD-nel képezte ( $\log K = 3,6$ ), lúgos körülmények között [Fliszár-Nyúl és mtsai., 2019b].

A CD technológia alkalmazhatóságának vizsgálata során vizes oldatok és italok mikotoxin mentesítését írták le vízben nem oldódó felülethez kötött CD-ek segítségével [Appell és Jackson, 2010; 2012; Shirasawa és mtsai., 2013; Fliszár-Nyúl és mtsai., 2020]. Ilyen technikák felhasználásával sikeresen csökkentették vörösbor ochratoxin A tartalmát poliuretán BCD polimerrel [Appell és Jackson, 2012]. Továbbá mintadúsítás céljából is sikerrel alkalmaztak poliuretán CD polimert szőlőlé és bor ochratoxin A [Appell és mtsai., 2018], valamint almalé patulin tartalmának meghatározása kapcsán [Shirasawa és mtsai., 2013]. Korábbi vizsgálatok alapján a CD-ek polimerizációja jelentős mértékben befolyásolhatja a ligandumok iránti affinitásukat [Harada és mtsai., 1976; Saenger, 1980]. Az alternariol kb. 10-szer, illetve kb. 19-szer stabilabb komplexeket képez szolubilis BCD polimerrel ( $\log K = 3,4$ ) és  $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel (BBP;  $\log K = 3,7$ ), mint BCD monomerrel ( $\log K = 2,4$ ) [Fliszár-Nyúl és mtsai., 2019b]. Ennek köszönhetően, BBP segítségével sikeresen csökkentették vizes oldatok, valamint paradicsomlé és vörösbor alternariol tartalmát [Fliszár-Nyúl és mtsai., 2019b; Fliszár-Nyúl és mtsai., 2020].

#### *2.3.3.1. Zearalenon és redukált származékainak kölcsönhatásai ciklodextrinekkel*

Korábbi vizsgálatok során a ZEN és fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkező redukált metabolitjainak CD-ekkel kialakított kölcsönhatását számos módszer (pl. NMR, molekulamodellés, fluoreszcencia spektroszkópia) segítségével tanulmányozták: az inklúzió szignifikáns fluoreszcencia jelerősítő hatást okozott [Dall'Asta és mtsai., 2008; 2009; Poór és mtsai., 2015c; 2017c]. A ZEN GCD-nel és hidroxipropil származékával kialakított kölcsönhatása során is stabil, bár a BCD-nél ( $\log K = 4,0$ ) alacsonyabb stabilitású komplexek képződtek ( $\log K = 3,8$ ), azonban a fluoreszcencia intenzitás emelő hatásuk jóval alacsonyabbnak bizonyul, mint a BCD esetében (kb. 7-szeres vs. 18-szoros) tapasztalt [Poór és mtsai., 2015c].

A  $\beta$ -CD-ekkel kialakított interakciók során 1:1 sztöchiometriájú komplexek képződnek, melyek  $10^4$  L/mol nagyságrendű kötési állandóval rendelkeznek [Dall'Asta és mtsai., 2009; Poór és mtsai., 2015c]. A ZEN és ZEL-ok a dimetilált származékhoz kötődtek a legnagyobb affinitással, és a legmagasabb fluoreszcencia jelerősítést is a 2,6-di-O-metil- $\beta$ -CD (DIMEB) okozta [Dall'Asta és mtsai., 2009; Poór és mtsai., 2015c; 2017c]. Az  $\alpha$ -ZEL hasonló stabilitású komplexeket képez CD-ekkel, mint az anyavegyület, azonban a  $\beta$ -ZEL-CD komplexek stabilitása kb. egy nagyságrenddel alacsonyabb [Poór és mtsai., 2015c; 2017c].

A ZEN fluoreszcenciájának CD által indukált emelkedése az analitikai gyakorlatban is felhasználható. Kapilláris elektroforézissel kapcsolt lézer indukálta fluoreszcencia detektálás során különböző CD-eket alkalmaztak érzékenyítés céljából kukoricaminták ZEN tartalmának meghatározáshoz: a vizsgálat során a DIMEB bizonyult a legjobb fluoreszcencia jelerősítőnek [Maragos és Appell, 2007]. Valamint kukorica ZEN koncentrációjának gyors fluorimetriás meghatározása során is sikeresen alkalmaztak HPBCD-t [Dall'Asta és mtsai., 2008].

A stabil ZEN-CD komplexek kialakulása miatt feltételezhető, hogy a CD-ek képesek a mikotoxin celluláris felvételét limitálni és ezáltal védő hatást fejthetnek ki a toxinnal szemben [Poór és mtsai., 2015c; Faisal és mtsai., 2020b]. Ezért a CD-ek protektív hatását megvizsgálták a ZEN-indukálta toxicitásra *in vitro* sejt kísérletekben és zebrahalmódban [Poór és mtsai., 2015c; Faisal és mtsai., 2020b]. A natív BCD jelentős mértékben csökkentette a ZEN toxikus hatásait HepG2 sejteken [Poór és mtsai., 2015c]. Továbbá a BCD kismértékű védőhatást mutatott, míg a random metilált  $\beta$ -CD (RAMEB), a szulfobutil- $\beta$ -CD (SBCD) és a szukcinil-metil- $\beta$ -CD koncentrációfüggő módon csökkentették és szinte teljesen meg is szüntették a ZEN-indukált életképesség csökkenést HeLa sejteken és a mortalitást, valamint a súlyos deformitásokat zebrahalmó embriókban. Ez alapján egyes módosított CD-ek alkalmasak lehetnek *in vivo* toxinkötőként mikotoxinok kedvezőtlen hatásainak csökkentésére [Faisal és mtsai., 2020b].



### 3. Célkitűzések

Bár korábbi tanulmányok beszámoltak a ZEN albuminkötődéséről, metabolitjainak szérumban albuminnal kialakított kölcsönhatásáról kevés információ áll rendelkezésre, azonban e mikotoxinok plazmafehérjekötődése is befolyásolhatja toxikokinetikájukat. Továbbá, a ZEN és egyes metabolitjainak CD-ekkel kialakított kölcsönhatásairól szóló eddigi szakirodalmi adatok alapján, a ZEN mellett élelmiszerekben és takarmányban szintén előforduló módosított és maszkolt származékainak nehézkes detektálása kapcsán, valamint lehetséges dekontaminálási módszerek fejlesztése szempontjából is érdekesnek tűnik a CD technológia. Ezért munkám során a következő aspektusok vizsgálatát tűztem ki célul:

- ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, ZAN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL, Z14G és Z14S szérumban albuminnal kialakított kölcsönhatásainak vizsgálata, a mikotoxinok toxikokinetikai tulajdonságainak mélyebb szintű megismerése és megértése céljából. Elsősorban a képződő komplexek stabilitásának meghatározását terveztem, különös tekintettel a különböző fajokból származó (humán, marha, sertés és patkány) albuminokkal kialakított interakciójukra, az esetleges faji eltérések feltárására érdekében.
- A HSA-on nem konvencionális kötőhellyel rendelkező ZEN, valamint a metabolitok ( $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, ZAN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL, Z14G és Z14S) hatásainak vizsgálata a Site I marker warfarin albuminkötődésére.
- Maszkolt (Z14G) és módosított (Z14S) mikotoxinok kölcsönhatásainak vizsgálata natív és kémiai módon módosított CD-ekkel, melynek során a képződő komplexek stabilitására és a CD-ek által indukált fluoreszcencia erősítésre voltam kíváncsi.
- A  $\beta$ -CD gyöngypolimer extrakciós hatékonyságának vizsgálata ZEN és metabolitjai esetében, melynek analitikai mintadúsítás, valamint egyes vizes oldatok (pl. szennyezett italok) mikotoxinmentesítése kapcsán lehet jelentősége.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Reagensek

A mérések során felhasznált reagensek és oldószerek spektroszkópai vagy analitikai minőségűek voltak. A zearalenon (ZEN),  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL), zearalanon (ZAN),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL), humán szérum albumin (HSA), marha szérum albumin (BSA), sertés szérum albumin (PSA), patkány szérum albumin (RSA) és warfarin beszerzése a Sigma-Aldrich Kft-től (Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) történt. A zearalenon-14-*O*- $\beta$ -D-glükozidot (Z14G) a Fluka-Honeywell (Charlotte, NC, Amerikai Egyesült Államok), míg a zearalenon-14-szulfátot (Z14S) az ASCA GmbH (Berlin, Németország) cégektől vásároltuk. A mikotoxinokat etanolban (96 v/v%, spektroszkópai minőség; VWR; Debrecen, Magyarország) oldottuk, majd az 5000  $\mu$ M-os törzsoldatokat -20 °C-on tároltuk. A fluoreszcencia spektroszkópai kísérletek során a minták etanol tartalma nem haladta meg a 0,2%-ot.

A natív  $\beta$ -CD-t (BCD), natív  $\gamma$ -CD-t (GCD), heptakisz-2,6-di-*O*-metil- $\beta$ -CD-t (dimetil- $\beta$ -CD vagy DIMEB), (2-hidroxipropil)- $\beta$ -CD-t (HPBCD), (2-hidroxipropil)- $\gamma$ -CD-t (HPGCD), 6-monodeoxi-6-monoamino- $\beta$ -CD-t (monoamino- $\beta$ -ciklodextrin vagy MABCD), random metilált  $\beta$ -CD-t (RAMEB), random metilált  $\gamma$ -CD-t (RAMEG), (2-hidroxi-3-N,N,N-trimetilamino)propil- $\beta$ -CD-t (kvaterner-ammónium- $\beta$ -ciklodextrin vagy QABCD), szulfobutil- $\beta$ -CD-t (szulfobutiléter- $\beta$ -CD vagy SBCE), szolubilis  $\beta$ -CD polimert (epiklórhidrin keresztkötésekkel kialakított, 70 m/m% BCD-tartalmú polimer), szolubilis QABCD polimert (epiklórhidrin keresztkötésekkel kialakított, 60 m/m% QABCD-tartalmú polimer) és vízben nem oldódó  $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimert (BBP; epiklórhidrin keresztkötésekkel kialakított, 50 m/m% BCD-tartalmú gyöngypolimer) a CycloLab Cyclodextrin Research & Development Laboratory, Ltd. (Budapest, Magyarország) biztosította számunkra.

Fluoreszcencia spektroszkópai és mikotoxin extrakciós vizsgálataink során 0,05 M nátrium-foszfát (pH 3,0 és pH 7,4), 0,05 M nátrium-acetát (pH 5,0), 0,05 M nátrium-borát (pH 10,0) és phosphate-buffered saline (PBS: pH 7,4; 8,00 g/L NaCl, 0,20 g/L KCl, 1,81 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 0,24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) puffereket használtunk. A nagyhatékonyságú affinitáskromatográfiás (HPAC) vizsgálataink során 0,01 M ammónium-acetát puffert alkalmaztunk (pH 7,0). A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) és HPAC

méréseink során HPLC minőségű acetonitrilt, metanolt, és izopropanolt használtunk, melyeket a VWR-től szereztünk be.

## 4.2. Zearalenon és metabolitjainak interakciói szérum albuminnal

### 4.2.1. Spektroszkópai mérések

Fluoreszcencia spektroszkópai méréseink során Hitachi F-4500 fluorimétert (Tokió, Japán) alkalmaztunk. Spektroszkópai méréseinket levegő jelenlétében, 25°C-on végeztük. A mikotoxin-albumin kölcsönhatások fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálata során PBS puffert használtunk (pH 7,4). A fluoreszcencia kioltás típusú méréseinknél standard mennyiségű (2,0 µM) albuminhoz emelkedő mikotoxin koncentrációkat (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 µM) adva a mintákat 295 nm-en gerjesztettük, majd az albumin emissziós maximumán (340 nm) értékeltük az eredményeket. A mikotoxin-albumin kölcsönhatásokat a Stern-Volmer egyenlet grafikus ábrázolásával értékeltük [Ma és mtsai., 2018, Sueck és mtsai., 2018]:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \times [Q] \quad (1)$$

ahol az  $I_0$  és az  $I$  az albumin fluoreszcencia intenzitását jelenti 340 nm-en mikotoxin nélkül és annak jelenlétében, a  $K_{SV}$  a Stern-Volmer kioltási konstanst (L/mol) jelöli, míg a  $[Q]$  a mikotoxin moláris koncentrációja (mol/L).

Emellett a kötési állandókat ( $K$ ; mértékegység: L/mol) a Hyperquad2006 szoftver alkalmazásával, nem-lineáris illesztéssel határoztuk meg [Gans és mtsai., 1996; Sueck és mtsai., 2018].

A ZEN és ZEN metabolitok warfarin-HSA interakcióra gyakorolt hatásának tanulmányozása során a warfarin (1,0 µM) fluoreszcens jelét vizsgáltuk standard mennyiségű HSA (3,5 µM) és emelkedő mikotoxin koncentrációk (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 és 10,0 µM) jelenlétében ( $\lambda_{ex} = 317$  nm,  $\lambda_{em} = 379$  nm) [Poór és mtsai., 2017a; Faisal és mtsai., 2018b]. Mivel az albumin-kötött warfarin fluoreszcenciája kb. 15-ször magasabb a szabad warfarinéhoz képest [Poór és mtsai., 2013], az emissziós intenzitás 379 nm-en mért változásai alapján a mikotoxinok hatását vizsgálhatjuk a warfarin albuminkötődésére.

A teszthevegyületek belső szűrő effektusából adódó hibák elkerülése érdekében a vegyületek UV-Vis spektrumait Specord Plus 210 (Analytic Jena AG, Jéna, Németország) vagy Jasco-V730 (Tokió, Japán) spektrofotométerekkel vettük föl. Majd a

fluoreszcencia spektroszkópiai méréseinkből származó adatokat a következő egyenlet alapján korrigáltuk [Hu és Liu, 2015; Sueck és mtsai., 2018]:

$$I_{korr} = I_m \times e^{(A_{ex} + A_{em})/2} \quad (2)$$

ahol  $I_{korr}$  a korrigált és  $I_m$  a megfigyelt fluoreszcencia emissziós intenzitásokat jelölik, míg  $A_{ex}$  és  $A_{em}$  a mikotoxinok abszorbanciáját jelentik az alkalmazott gerjesztési és emissziós hullámhosszakon.

A mikotoxin-albumin kölcsönhatások fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatai során alkalmazott körülmények között a ZEN, a ZEL-ok, a Z14G és a Z14S fluoreszcens jele nem interferált az albumin és a warfarin-albumin komplex emissziós maximumával. Továbbá, az alkalmazott koncentrációtartományban a ZAN és a ZAL-ok egyáltalán nem mutattak fluoreszcenciát.

#### 4.2.2. Nagyhatékonyságú affinitáskromatográfia (HPAC)

A mikotoxin-HSA kölcsönhatás megerősítése érdekében immobilizált HSA-nal módosított oszlop segítségével HPAC méréseket is végeztünk szobahőmérsékleten [Faisal és mtsai., 2020c]. A HPLC rendszer (Jasco, Tokió, Japán) egy automata injektorból (AS-4050), pumpából (PU-4180), valamint egy diódasoros detektorból (MD 4017) állt. Az analízis során a minták (5  $\mu$ L) egy előtét szűrőn (Waters, Milford, MA, Amerikai Egyesült Államok), majd a Chiralpak<sup>®</sup> HSA oszlopon (50  $\times$  3.0 mm, 5  $\mu$ m; Daicel, Tokió, Japán) haladtak át. Az izokratikus elúcióhoz izopropanolból és 0,01 M pH 7,0-es ammónium-acetát pufferből (15:85 v/v%) álló eluentet használtunk 0,5 ml/min áramlási sebességgel, majd a mikotoxinokat 235 nm-en detektáltuk. A kapott eredményeket ChromNAV (V2) szoftver segítségével értékeltük.

### 4.3. Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai ciklodextrinokkal

#### 4.3.1. Fluoreszcencia spektroszkópiai módszerek

A konjugált ZEN származékok CD-ekkel kialakított kölcsönhatása során a módosított mikotoxinok (1,0  $\mu$ M; Z14G:  $\lambda_{ex}$  = 315 nm,  $\lambda_{em}$  = 455 nm; Z14S:  $\lambda_{ex}$  = 320 nm,  $\lambda_{em}$  = 460 nm) fluoreszcens jelének változását vizsgáltuk emelkedő CD koncentrációk (0,0-2,0 mM) jelenlétében, 25°C-on, különböző pufferekben (pH 3,0-

10,0). A mikotoxin-CD komplexek kötési állandóit ( $K$ ) a Benesi-Hildebrand egyenlet grafikus alkalmazásával határoztuk meg [Zhou és mtsai., 2012; Faisal és mtsai., 2019b]:

$$\frac{I_0}{(I - I_0)} = \frac{1}{A} + \frac{1}{A \times K \times [H]^n} \quad (3)$$

ahol  $I_0$  és  $I$  a mikotoxin fluoreszcencia emissziós intenzitását jelöli CD nélkül és annak jelenlétében,  $A$  egy konstans,  $K$  a kötési állandó (L/mol), míg  $[H]$  a CD molekula koncentrációja (mol/L), és  $n$  a kötőhelyek száma.

#### 4.3.2. Mikotoxin extrakció vizes oldatokból és összetett mátrixból vízben nem oldódó $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel

A  $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimer (BBP) ZEN,  $\alpha$ - és  $\beta$ -ZEL, Z14G és Z14S kötőképességének vizsgálata során 1,5 mL térfogatú mintákat készítettünk, mely standard mennyiségű mikotoxint és 0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; vagy 20,0 mg (végkoncentráció: 0,0; 0,67; 1,67; 3,33; 6,67; vagy 13,33 mg/mL) BBP-t tartalmazott, majd termomixerben (1000 rpm) inkubáltuk a mintákat. Az inkubációt követően pulzus centrifugálást (4000 g, 6 s, szobahőmérséklet) alkalmaztunk, és a felülúszó mikotoxin tartalmát HPLC-FLD módszerrel határoztuk meg. A ZEN és ZEL-ok (10  $\mu$ M) BBP általi extrakciójának időfüggését vizsgálva 0, 5, 10, 30 és 60 min inkubációs időket alkalmaztunk, míg a pH-függés tesztelése során különböző pufferekben (0,05 M nátrium-acetát, pH 5,0; PBS, pH 7,4; 0,05 M nátrium-borát, pH 10,0) végeztük az inkubációt (40 min, 1000 rpm, 25°C). A hőmérsékletfüggés vizsgálata érdekében 15°C, 25°C és 35°C-on inkubáltuk (40 min, 1000 rpm) a mintákat.

A BBP mikotoxinkötő képességének kvantitatív meghatározása során standard mennyiségű BBP-hez emelkedő mikotoxin koncentrációkat adva inkubáltuk (1000 rpm, 25°C) a mintákat, és pulzus centrifugálást (4000 g, 6 s) követően analizáltuk a felülúszókat. A ZEN esetében a 1,5 mL térfogatú minták 1,67 mg/mL BBP-t és 0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; és 10,0  $\mu$ M végkoncentrációjú mikotoxint tartalmaztak vízben. A Z14G minták (1,5 mL) elkészítése során 1,67 mg/mL BBP-hez 0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 és 12,5  $\mu$ M végkoncentrációjú mikotoxint adtunk 0,05 M nátrium-acetát pufferben (pH 5,0). Az 1,5 mL térfogatú Z14S minták 0,05 M nátrium-acetát pufferben (pH 5,0) készültek és 1,33 mg/mL BBP-t, valamint 0,0; 0,2; 2,5; 5,0; 7,5 és 10,0  $\mu$ M végkoncentrációjú Z14S-t tartalmaztak. Az eredményeket a Langmuir és Freundlich

szorpciós izotermák segítségével értékeltük [Appell és Jackson, 2012]. A Langmuir egyenlet:

$$q_e = \frac{Q_0 \times K_L \times C_e}{1 + K_L \times C_e} \quad (4)$$

ahol  $q_e$  az 1 g BBP által megkötött, mg-ban kifejezett mikotoxin mennyiséget jelöli;  $Q_0$  az 1 g BBP által maximálisan megköthető mikotoxin mennyiséget (mg) mutatja;  $K_L$  a Langmuir ekvilibrium állandót (L/mg) jelenti, míg  $C_e$  a szabad mikotoxin egyensúlyi koncentrációját jelöli. A Freundlich egyenlet:

$$q_e = K_F \times C_e^{1/n} \quad (5)$$

ahol  $K_F$  a Freundlich konstanst, míg  $n$  a heterogenitási indexet jelöli.

#### 4.3.3. BBP regenerálhatóságának és többszöri felhasználásának vizsgálata

A BBP regenerálhatóságának és többszöri felhasználásának tesztelése érdekében 1,5 mL térfogatú mintákat készítettünk, amelyek 6,67 mg/mL BBP-t és 10,0  $\mu$ M ZEN-t tartalmaztak 0,05 M nátrium-acetát pufferben (pH 5,0). A mintákat 20 perces termomixerben történő inkubálást (1000 rpm, 25°C) követően centrifugáltuk (4000 g, 6 s), és a felülúszót eltávolítottuk. Majd mosási lépésként a BBP-t 1,5 mL 50 v/v% etanol-víz eleggyel inkubáltuk (20 min, 1000 rpm, 25°C) és centrifugálást követően (4000 g, 6 s) eltávolítottuk az etanol-víz elegyet, majd megismételtük a mosási lépést. Ezután 15 s-ig kondicionáltuk a polimert 1,5 mL nátrium-acetát pufferrel (0,05 M; pH 5,0), majd centrifugálást (4000 g, 6 s) követően leszívtuk a felülúszót. A mikotoxin extrakcióból és a mosási lépésekből származó felülúszók mikotoxin tartalmát HPLC-FLD módszerrel analizáltuk.

Ezután újabb mikotoxin extrakciót végeztünk a gyöngypolimerrel és megismételtük a mosási folyamatot, majd harmadszorra is megvizsgáltuk a BBP mikotoxinkötő képességét.

#### 4.3.4. Zearalenon extrakció kukoricasörből BBP-rel

A BBP mikotoxinkötő képességét összetett mátrixban is teszteltük, ZEN-nal spikeolt (adalékolt) Corona<sup>®</sup> kukoricasörből. A mintaelőkészítés során ultrahangos vízfürdőben gázmentesítettük a mintákat, majd 1,5 mL mintához ismert mennyiségben adalékoltunk ZEN-t (500 nM), illetve 0,0; 5,0; 20,0; vagy 40,0 mg BBP-t (BBP

végkoncentráció: 0,0; 3,33; 13,33 és 26,67 mg/mL). A mintákat 15, 25, és 35°C-on termomixerben inkubáltuk (40 min, 1000 rpm), majd pulzus centrifugálást követően (4000 g, 6 s) a felülúszó ZEN tartalmát kétlépéses diklórmetános extrakciót követően határoztuk meg. Az oldószeres extrakció során 2 mL diklórmetánt adtunk a felülúszóhoz (1000 µL), majd 10 perces rázatást (250 rpm, 25°C) követően az alsó fázist gyűjtöttük és a felső vizes fázissal megismételtük a folyamatot. Az oldószeres extrakció második lépését követően egyesítettük a szerves fázisokat, majd a maradék víztartalom eltávolítására vízmentes nátrium-szulfátot alkalmaztunk. Ülepítést követően 2000 µL szerves fázist leszívtunk, és bepároltuk 40°C-on rotációs vákuumbepárló (Büchi Rotavapor R-3, Vacuum Pump, Büchi V-850 Vacuum Controller; Flawil, Svájc) segítségével. Az extrahált ZEN-t 500 µL metanol-víz (50 v/v%) elegyben oldottuk és a mikotoxin tartalmát HPLC-FLD módszerrel határoztuk meg. A ZEN sörből történő BBP-es extrakcióját alacsonyabb és magasabb mikotoxin koncentrációk (100-600 nM) adalékolásával is elvégeztük, ezek alapján a mikotoxin koncentrációtól független visszanyerési arányt (recovery értéket) kaptunk.

#### 4.3.5. A BBP hatásának vizsgálata a kukoricásör színére és összpolicenol tartalmára

Mivel a BBP nem mikotoxin szelektív kötővegyület, a sörben megtalálható egyéb komponensekkel is interakcióba léphet. Ezért egy korábbi tanulmányban leírt szín és polifenol meghatározást végeztünk a sörmintákon a BBP-rel történő extrakció után [Jurić és mtsai., 2015]. Egy HALO DB-20 (Dynamica, Livingston, Egyesült Királyság) spektrofotométer segítségével felvettük a gázmentesített minták UV-Vis spektrumait. A sör színmeghatározása az alábbi egyenlet alapján történt:

$$C = A_{430} \times f \times 25 \quad (6)$$

ahol  $C$  a színt,  $A_{430}$  a minta 430 nm-en mért abszorbanciáját jelöli,  $f$  a hígítási faktor.

A sör összpolicenol tartalmának vizsgálata során a BBP extrakció után 1 mL gázmentesített sört adtunk 0,8 mL CMC/EDTA reagenshez (2% nátrium-karboxi-metil-cellulóz és 0,4% dinátrium-etilén-diamin-tetraecetsav vizes oldata), majd vortexeltük a mintát. Ezután 50 µL ferric-reagenst (3,5% ammónium-vas(III)-citrát vizes oldata) és 50 µL ammónia reagenst (cc NH<sub>3</sub> kétszeres vízmennyiséggel hígítva) adtunk hozzá, majd kiegészítettük a térfogatot 2,5 mL-re és ismét vortexeltük. A minták optikai denzitását vizsgáltuk 600 nm-en 10 perces szobahőmérsékleten történő inkubálást követően. Az összpolicenol meghatározás a következő egyenlet segítségével történt:

$$P = A_{600} \times 820 \quad (7)$$

ahol  $P$  az összpolicfenol mennyiség (mg/L), az  $A_{600}$  pedig a minták 600 nm-en mért abszorbanciája.

#### 4.4. HPLC analízis

A korábban Visconti és Pascale által közölt módszer [Visconti és Pascale, 1998] alapján végeztük a ZEN és ZEL-ok kvantitatív meghatározását a módszer kisebb módosításával. A mikotoxinok analízise a következő HPLC rendszerrel történt: Waters 510 pumpa (Milford, MA, Amerikai Egyesült Államok), 20  $\mu$ L térfogatú loop-pal felszerelt Rheodyne 7125 manuális injektor (Middleboro, MA, Amerikai Egyesült Államok) és Jasco FP-920 fluoreszcens detektor (Tokió, Japán;  $\lambda_{\text{ex}} = 274$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 440$  nm). Az kromatogramok kiértékelése Millennium Chromatography Manager szoftverrel (Milford, MA, Amerikai Egyesült Államok) történt. A ZEN,  $\alpha$ - és  $\beta$ -ZEL minták (20  $\mu$ L) analíziséhez egy SecurityGuard (C18; 4,0  $\times$  3,0 mm; Phenomenex, Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok) előtétoszlopot és egy Kinetex XB-C18 (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m; Phenomenex, Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok) analitikai oszlopot használtunk. Az izokratikus elúciót szobahőmérsékleten 1 mL/min áramlási sebességgel végeztük acetonitril, víz és metanol (46:46:8 v/v%) összetételű eluens felhasználásával.

A módosított mikotoxinok analíziséhez egy integrált HPLC (Jasco, Tokió, Japán) rendszert alkalmaztunk, amely egy automata injektorból (AS-4050), pumpából (PU-4180), és egy fluoreszcens detektorból (FP-920) állt. Az adatok kiértékelése ChromNAV (V2) szoftverrel történt. A Z14G minták (injektált térfogat: 20  $\mu$ L) mikotoxin tartalmának mennyiségi meghatározása egy Security Guard™ (C8; 4,0  $\times$  3,0 mm; Phenomenex, Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok) előtétoszloppal és egy Mediterranea Sea 8 (C8; 150  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m; Teknokroma, Barcelona, Spanyolország) analitikai oszloppal történt. A mozgó fázis acetonitrilt és 175 mM-os ecetsav oldatot (35:65 v/v%) tartalmazott. Az izokratikus elúciót 1 mL/min áramlási sebességgel végeztük szobahőmérsékleten. A Z14G-ot 465 nm-en detektáltuk ( $\lambda_{\text{ex}} = 315$  nm).

A Z14S-tartalmú felülúszó (injektált térfogat: 20  $\mu$ L) analízise során egy Security Guard™ (C18; 4,0  $\times$  3,0 mm; Phenomenex, Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok) előtétoszlopot, valamint egy Kinetex XB-C18 (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m; Phenomenex, Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok) analitikai oszlopot használtunk. Az eluens metanolból, acetonitrilből és vízből (6:35:59 v/v%) állt. Az izokratikus elúciót 1 mL/min



áramlási sebességgel, szobahőmérsékleten végeztük. A Z14S-ot 465 nm detektáltuk ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 330 nm).

#### **4.5. Statisztika**

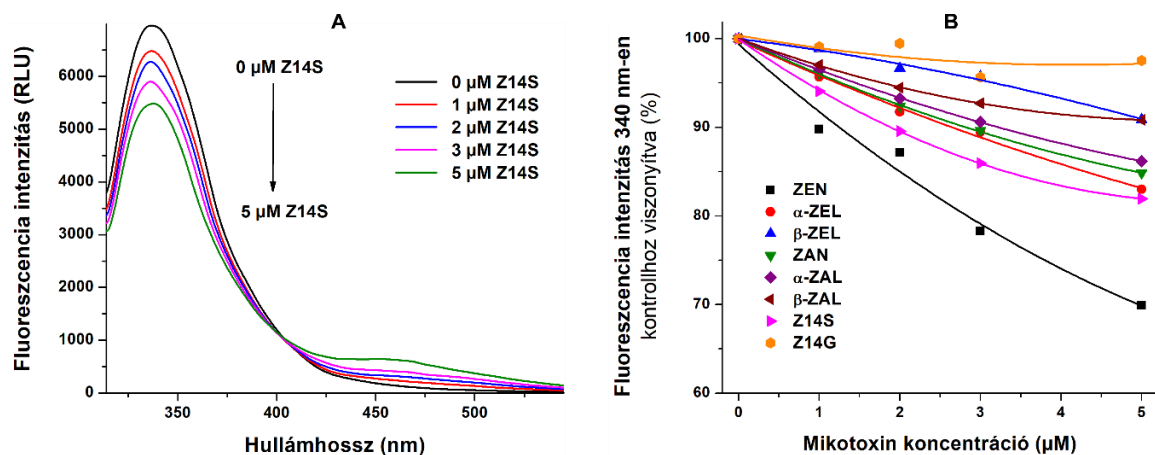
Az ábrák és táblázatok minimum három párhuzamos mérésből származó eredmény átlagát és a hozzájuk tartozó standard hibát (SEM) mutatják be. A statisztikai értékelés során one-way ANOVA (és Tukey's post-hoc) tesztet végeztünk (IBM SPSS Statistics, 26. verzió; New York, NY, Amerikai Egyesült Államok;  $p < 0,01$ ).

## 5. Eredmények

### 5.1. Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai szérum albuminnal

#### 5.1.1. Fluoreszcencia kioltás alapú vizsgálatok

A ZEN és metabolitjainak humán, marha, sertés és patkány albuminnal kialakított kölcsönhatásait fluoreszcencia kioltás módszerrel vizsgáltuk. A belső szűrő effektus korrekciója (**2. egyenlet**) után a ZEN, ZEL-ok, ZAN, ZAL-ok és Z14S koncentrációfüggő módon csökkentették az albuminok emissziós jelét 340 nm-en. A **4./A ábra** a HSA fluoreszcenciájának Z14S által okozott intenzitáscsökkenést ábrázolja, valamint kb. 460 nm-en egy második csúcs is megjelenik. Ezzel szemben a ZAN és ZAL-ok az esetében ez a második csúcs nem tapasztalható (nincs bemutatva). A Z14G volt az egyetlen metabolit, ami nem befolyásolta az albuminok emissziós jelét 340 nm-en. A mikotoxin-indukált kioltó hatásokat a **4./B ábra** demonstrálja.

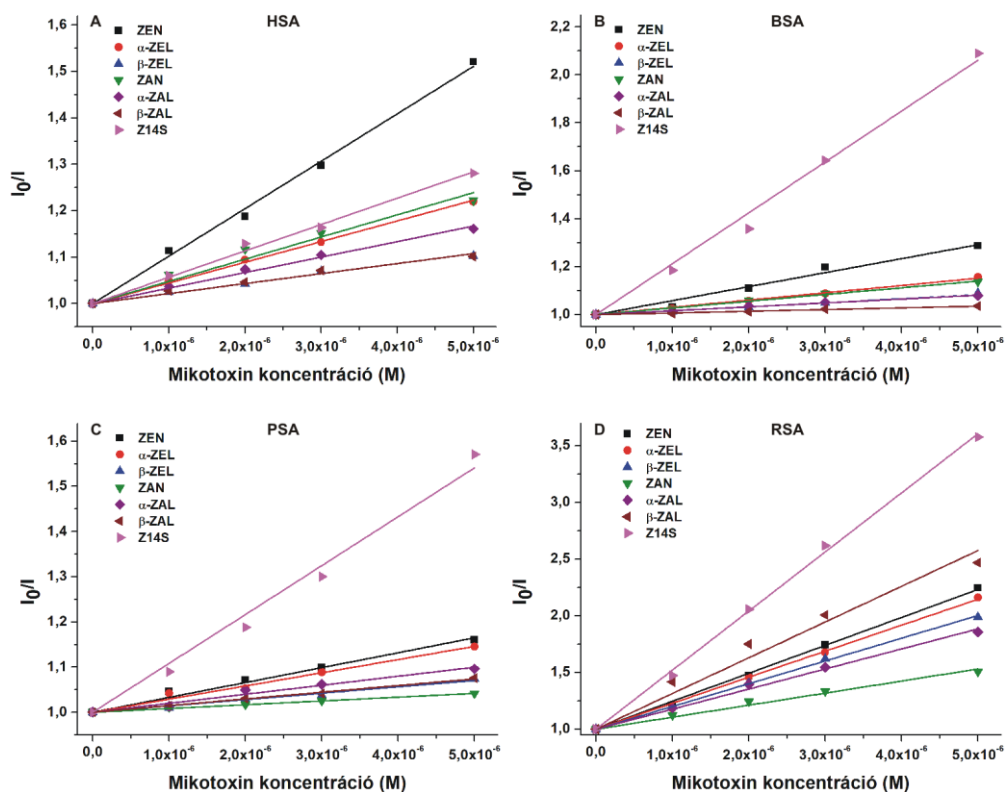


**4. ábra:** (A) A HSA fluoreszcencia emissziós spektruma emelkedő Z14S koncentrációk (0,0-5,0 μM) jelenlétében PBS-ben (pH 7,4;  $\lambda_{ex} = 295$  nm,  $\lambda_{em} = 340$  nm). (B) A HSA (2,0 μM) fluoreszcencia intenzitása 340 nm-en emelkedő mikotoxin koncentrációk (0,0-5,0 μM) jelenlétében PBS-ben (pH 7,4;  $\lambda_{ex} = 295$  nm).

#### 5.1.2. Mikotoxin-albumin komplexek kötési állandójának meghatározása

A ZEN és metabolitjainak albumin komplexeit a Stern-Volmer egyenlet (**1. egyenlet**) grafikus alkalmazásával vizsgáltuk. A Stern-Volmer függvények (**5. ábra**) jó illeszkedést ( $R^2 = 0,97-0,99$ ) mutattak az 1:1 sztöchiometriájú modellel, hasonlóan a Hyperquad módszerrel végzett kötési állandó meghatározáshoz. A Stern-Volmer kioltási

konstansok ( $K_{SV}$ ; **1. táblázat**) és kötési állandók ( $K$ ; **2. táblázat**) jó egyezést mutattak. A fluoreszcencia kioltás módszer alapján  $10^3$ - $10^5$  L/mol kötési állandójú mikotoxin-albumin komplexek képződtek.



**5. ábra:** A humán (A; HSA;  $2,0 \mu\text{M}$ ), marha (B; BSA;  $2,0 \mu\text{M}$ ), sertés (C; PSA;  $2,0 \mu\text{M}$ ), és patkány (D; RSA;  $2,0 \mu\text{M}$ ) szérum albuminnal képzett mikotoxin ( $0,0$ - $5,0 \mu\text{M}$ ) komplexek Stern-Volmer függvényei PBS-ben ( $\text{pH } 7,4$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ ).

	$\log K_{SV} (\pm \text{SEM})$			
	HSA	BSA	PSA	RSA
<b>ZEN</b>	$5,09 \pm 0,01$	$4,81 \pm 0,01$	$4,56 \pm 0,02$	$5,50 \pm 0,01$
<b><math>\alpha</math>-ZEL</b>	$4,70 \pm 0,02$	$4,54 \pm 0,02$	$4,47 \pm 0,07$	$5,32 \pm 0,04$
<b><math>\beta</math>-ZEL</b>	$4,28 \pm 0,04$	$4,27 \pm 0,04$	$4,18 \pm 0,07$	$5,29 \pm 0,02$
<b>ZAN</b>	$4,52 \pm 0,04$	$4,41 \pm 0,04$	$3,97 \pm 0,06$	$5,00 \pm 0,03$
<b><math>\alpha</math>-ZAL</b>	$4,50 \pm 0,02$	$4,20 \pm 0,05$	$4,30 \pm 0,05$	$5,21 \pm 0,00$
<b><math>\beta</math>-ZAL</b>	$4,34 \pm 0,04$	$3,88 \pm 0,06$	$4,13 \pm 0,09$	$5,43 \pm 0,01$
<b>Z14S</b>	$4,64 \pm 0,03$	$5,32 \pm 0,02$	$5,04 \pm 0,02$	$5,70 \pm 0,02$

**1. táblázat:** Mikotoxin-albumin komplexek  $K_{SV}$  (mértékegység: L/mol) értékeinek tízes alapú logaritmusai (HSA: humán szérum albumin; BSA: marha szérum albumin; PSA: sertés szérum albumin; RSA: patkány szérum albumin).

	<b>logK (<math>\pm</math> SEM)</b>			
	<b>HSA</b>	<b>BSA</b>	<b>PSA</b>	<b>RSA</b>
<b>ZEN</b>	5,09 $\pm$ 0,01	4,78 $\pm$ 0,01	4,57 $\pm$ 0,01	5,42 $\pm$ 0,00
<b><math>\alpha</math>-ZEL</b>	4,72 $\pm$ 0,00	4,46 $\pm$ 0,02	4,49 $\pm$ 0,01	5,43 $\pm$ 0,00
<b><math>\beta</math>-ZEL</b>	4,33 $\pm$ 0,00	4,37 $\pm$ 0,01	4,05 $\pm$ 0,05	5,43 $\pm$ 0,00
<b>ZAN</b>	4,58 $\pm$ 0,00	4,51 $\pm$ 0,00	3,97 $\pm$ 0,01	5,12 $\pm$ 0,00
<b><math>\alpha</math>-ZAL</b>	4,55 $\pm$ 0,00	4,34 $\pm$ 0,00	4,38 $\pm$ 0,00	5,31 $\pm$ 0,01
<b><math>\beta</math>-ZAL</b>	4,37 $\pm$ 0,01	4,12 $\pm$ 0,01	4,15 $\pm$ 0,01	5,61 $\pm$ 0,01
<b>Z14S</b>	4,71 $\pm$ 0,03	5,43 $\pm$ 0,02	5,12 $\pm$ 0,02	5,93 $\pm$ 0,02

**2. táblázat:** Mikotoxin-albumin komplexek kötési állandóinak ( $K$ , mértékegység: L/mol) tízes alapú logaritmusai (HSA: humán szérum albumin; BSA: marha szérum albumin; PSA: sertés szérum albumin; RSA: patkány szérum albumin).

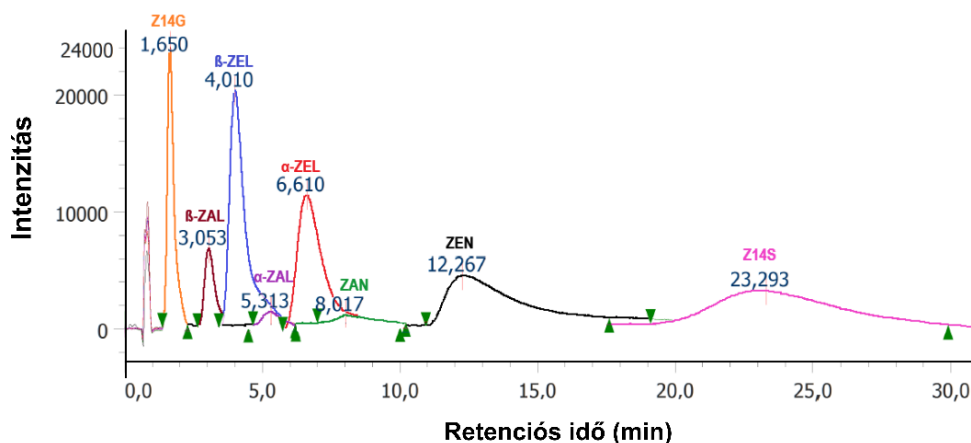
Jellemzően a Z14S alakította ki a legstabilabb kölcsönhatást a különböző albuminokkal, azonban a Z14S HSA iránti affinitása alacsonyabbnak bizonyult a ZEN-hoz és  $\alpha$ -ZEL-hoz képest (**2. táblázat**). A redukált metabolitok hasonló, vagy alacsonyabb affinitást mutattak az albuminok iránt, mint az anyavegyület. A ZEN és redukált származékai a legalacsonyabb stabilitású komplexek BSA-nal vagy PSA-nal képezték, ezzel szemben a Z14S HSA iránti affinitása volt a legalacsonyabb (**2. táblázat**). Az összes vizsgált mikotoxin RSA-nal alakította ki a legstabilabb komplexeket. A  $\beta$ -ZEL és  $\beta$ -ZAL jellemzően alacsonyabb affinitást mutattak az albuminok iránt, mint az  $\alpha$ -ZEL és az  $\alpha$ -ZAL, azonban RSA-hoz a  $\beta$ -ZAL kötődött a legnagyobb affinitással a redukált származékok közül (**2. táblázat**).

A mikotoxin-albumin kölcsönhatások esetében jelentős faji eltéréseket figyeltünk meg. Az anyavegyület kapcsán tapasztaltuk a legkisebb eltérést, amely RSA-nal kb. 7-szer stabilabb komplexet képez, mint PSA-nal (**2. táblázat**). A  $\beta$ -ZEL és  $\beta$ -ZAL esetében tapasztaltuk a legjelentősebb eltéréseket. A  $\beta$ -ZEL kb. 24-szer nagyobb affinitással kötődött RSA-hoz, mint PSA-hoz, míg a  $\beta$ -ZAL RSA iránti affinitása több mint 30-szor magasabbnak bizonyult, mint BSA esetében (**2. táblázat**).

### 5.1.3. Nagyhatékonyságú affinitáskromatográfiás mérések

A fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok során kapott eredményeink alátámasztása érdekében HSA-nal módosított oszlop segítségével HPAC méréseket végeztünk. A mikotoxinok HSA iránti affinitásuknak megfelelően, különböző retenciók

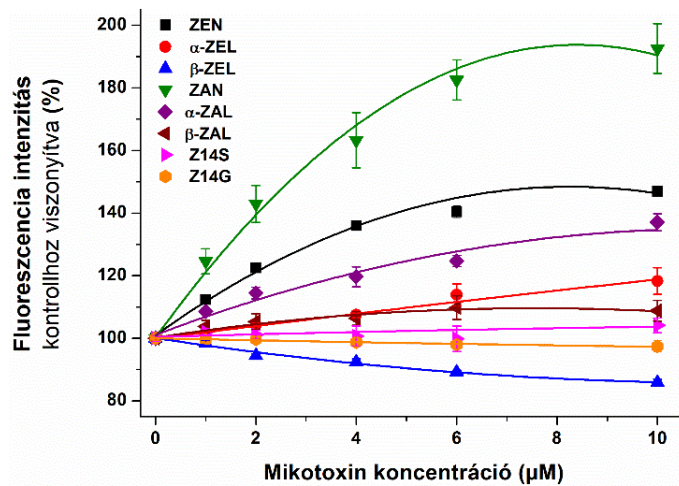
idővel eluálódnak az oszlopról: a nagyobb affinitással kötődő vegyületek retenciós ideje hosszabb. Az oldószercsúcsot követve 1,65 min retenciós idővel eluálódott a Z14G, majd ezt a  $\beta$ -ZAL (3,05 min),  $\beta$ -ZEL (4,01 min),  $\alpha$ -ZAL (5,31 min),  $\alpha$ -ZEL (6,61 min), ZAN (8,02 min), ZEN (12,27 min) és a Z14S (23,29 min) követte (**6. ábra**).



**6. ábra:** ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, ZAN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL, Z14G, és Z14S HPAC kromatogramjai.

#### 5.1.4. Zearalenon és metabolitjainak hatásai a warfarin-HSA kölcsönhatásra

További vizsgálataink során a ZEN metabolitok hatását teszteltük a warfarin-HSA komplex fluoreszcenciájára ( $\lambda_{\text{ex}} = 317 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 379 \text{ nm}$ ). A Z14S és  $\beta$ -ZAL jelenlétében enyhe intenzitás emelkedést tapasztaltunk, míg az  $\alpha$ -ZEL,  $\alpha$ -ZAL, ZEN és ZAN nagymértékű emelkedést okozott (**7. ábra**). A vizsgált mikotoxinok közül a ZAN fokozta a legnagyobb mértékben a komplex intenzitását, míg a  $\beta$ -ZEL jelenléte kismértékű intenzitáscsökkenést eredményezett. A Z14G gyakorlatilag nem befolyásolta a warfarin-HSA komplex fluoreszcenciáját.

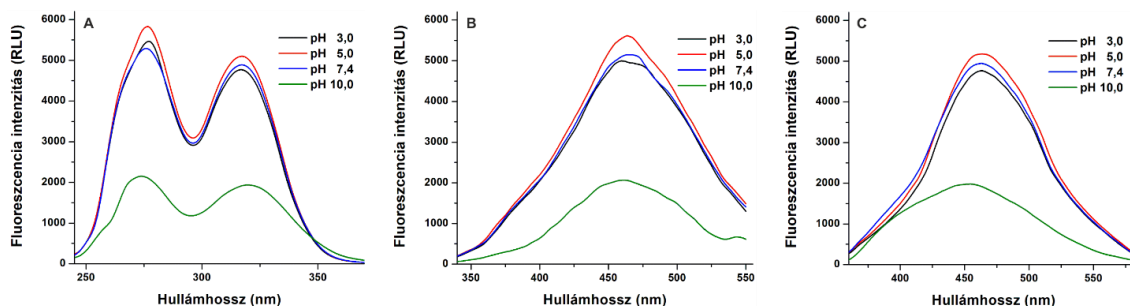


**7. ábra:** A warfarin ( $1,0 \mu\text{M}$ ) - HSA ( $3,5 \mu\text{M}$ ) komplex fluoreszcencia intenzitásának változása növekvő mikotoxin koncentrációk ( $0,0$ - $10,0 \mu\text{M}$ ) jelenlétében (PBS, pH 7,4;  $\lambda_{ex} = 317 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 379 \text{ nm}$ ).

## 5.2. Konjugált zearalenon származékok ciklodextrinekkel kialakított kölcsönhatásai

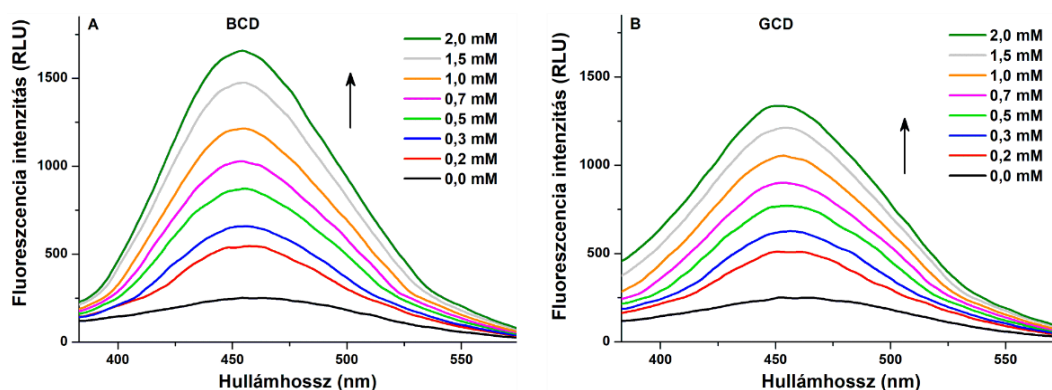
### 5.2.1. Zearalenon-14-glükozid kölcsönhatása natív és kémiai módosított ciklodextrinekkel

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a környezeti pH hatását a maszkolt mikotoxinként ismert Z14G fluoreszcens tulajdonságaira, a mikotoxin gerjesztési és emissziós spektrumát vizsgáltuk különböző pufferekben (pH 3,0-10,0). Az alkalmazott körülmények között a Z14G két excitációs csúcsot mutatott 275 és 315 nm-en ( $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$ ; **8./A ábra**). A Z14G gerjesztési spektrumai nagyon hasonlóak bizonyultak pH 3,0-7,4 között, azonban pH 10,0-en a maszkolt mikotoxin excitációs intenzitása jelentősen lecsökkent (**8./A ábra**). A Z14G emissziós spektrumait meghatároztuk a 275 nm-es (**8./B ábra**) és a 315 nm-es (**8./C ábra**) gerjesztési hullámhosszak alkalmazásával is. Mindkét esetben hasonló spektrumokat figyeltünk meg pH 3,0-7,4 között, azonban a gerjesztési spektrumokhoz hasonlóan, 10,0-es pH-n a Z14G fluoreszcenciájának jelentős csökkenését tapasztaltuk és az emissziós maximumok kékeltolódását figyeltük meg (**8./B ábra**:  $\lambda_{em} = 465 \text{ nm} \rightarrow 460 \text{ nm}$ ; **8./C ábra**:  $\lambda_{em} = 465 \text{ nm} \rightarrow 450 \text{ nm}$ ).



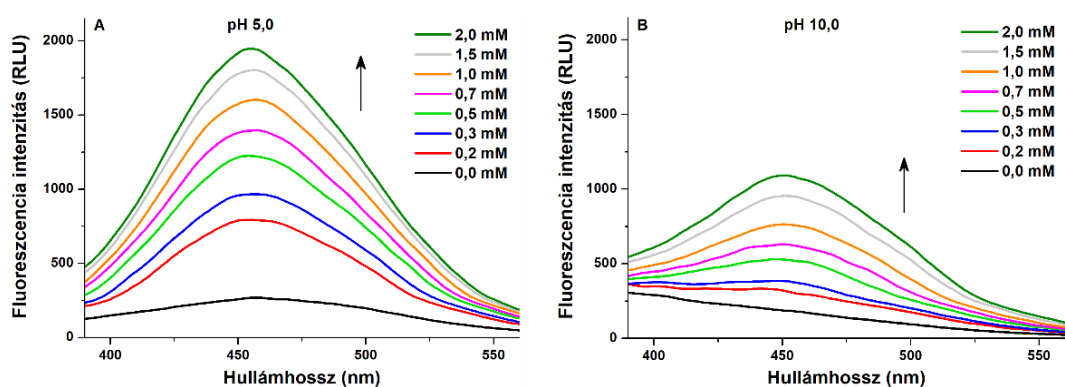
**8. ábra:** A Z14G ( $20,0 \mu\text{M}$ ) fluoreszcencia gerjesztési (A;  $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$ ) és emissziós spektrumai (B;  $\lambda_{ex} = 275 \text{ nm}$ ; C;  $\lambda_{ex} = 315 \text{ nm}$ ) különböző pufferekben ( $0,05 \text{ M}$  nátrium-foszfát, pH 3,0;  $0,05 \text{ M}$  nátrium-acetát, pH 5,0;  $0,05 \text{ M}$  nátrium-foszfát, pH 7,4; és  $0,05 \text{ M}$  nátrium-borát, pH 10,0).

A Z14G CD-ekkel kialakított kölcsönhatásainak vizsgálata során elsőként natív BCD-nel és GCD-nel való komplexképződését tanulmányoztuk. Standard mikotoxin koncentrációhoz ( $1,0 \mu\text{M}$ ) emelkedő mennyiségű ( $0,0$ ;  $0,2$ ;  $0,3$ ;  $0,5$ ;  $0,7$ ;  $1,0$ ;  $1,5$ ; és  $2,0 \text{ mM}$ ) CD-t adtunk nátrium-acetát pufferben ( $0,05 \text{ M}$ ; pH 5,0) és a mikotoxin fluoreszcencia emissziós spektrumát detektáltuk ( $\lambda_{ex} = 315 \text{ nm}$ ; **9. ábra**). A natív BCD és GCD jelenléte jelentős mértékben emelte a Z14G saját fluoreszcenciáját, azonban BCD nagyobb fluoreszcencia erősítő hatást eredményezett (**9. ábra**). Továbbá a mikotoxin emissziós maximumának enyhe kékeltolódását ( $\lambda_{em} = 465 \text{ nm} \rightarrow 455 \text{ nm}$ ) figyeltük meg a CD-ek jelenlétében (**9. ábra**).



**9. ábra:** A Z14G ( $1,0 \mu\text{M}$ ) fluoreszcencia emissziós spektrumai emelkedő BCD (A) és GCD (B) koncentrációk ( $0,0$ - $2,0 \text{ mM}$ ) jelenlétében  $0,05 \text{ M}$  nátrium-acetát pufferben (pH 5,0;  $\lambda_{ex} = 315 \text{ nm}$ ).

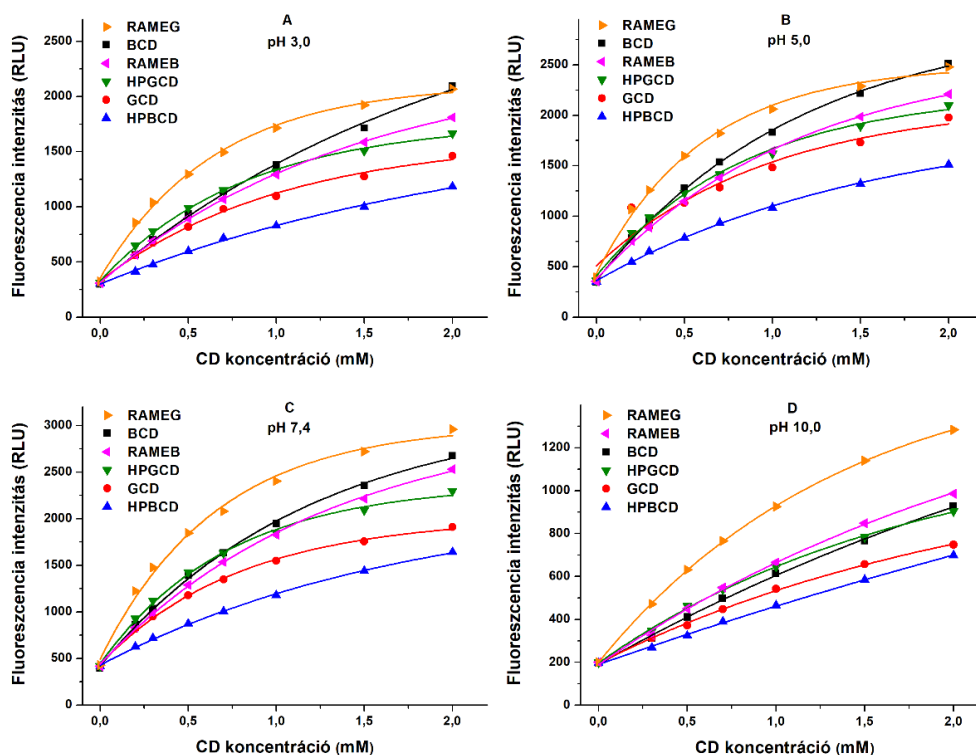
További vizsgálataink során a Z14G fluoreszcencia spektrumát teszteltük natív BCD és GCD, valamint random metilált (RAMEB és RAMEG) és hidroxil-propil származékaik (HPBCD és HPGCD) jelenlétében különböző pH-kon (pH 3,0-10,0). A CD-ek kisebb mértékű fluoreszcencia intenzitás emelkedést okoztak 10,0-es pH-n, mint az alacsonyabb pH-kon, továbbá az emissziós maximum vöröseltolódását ( $\lambda_{em} = 450 \text{ nm} \rightarrow 455 \text{ nm}$ ) figyeltünk meg CD-ek jelenlétében (**10. ábra**).



**10. ábra:** A Z14G ( $1,0 \mu\text{M}$ ) fluoreszcencia emissziós spektrumai emelkedő RAMEG koncentrációk (0,0-2,0 mM) jelenlétében 0,05 M nátrium-acetát (A; pH 5,0) és 0,05 M nátrium-borát pufferben (B; pH 10,0;  $\lambda_{ex} = 315 \text{ nm}$ ).

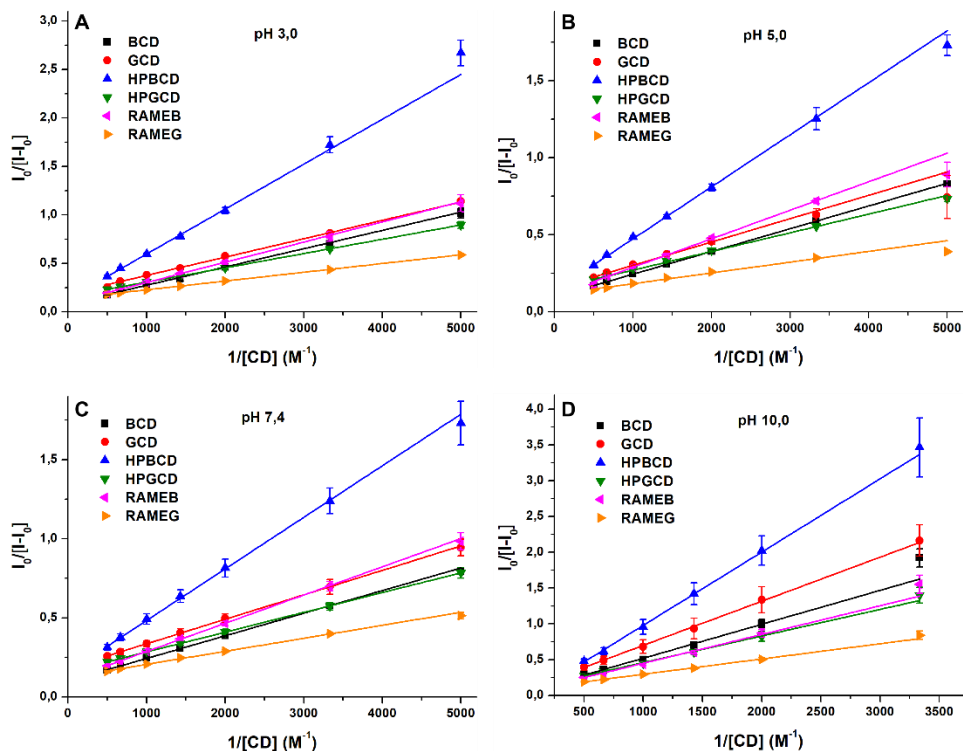
A vizsgált CD-ek által indukált fluoreszcencia erősítés pH 3,0-7,4 között hasonló tendenciákat mutatott (**11. ábra**). A BCD kémiai módosítása nem eredményezett jobb fluoreszcencia erősítő hatást pH 3,0-7,4 között, azonban pH 10,0-en a RAMEB-indukálta fluoreszcencia erősítés volt a legmagasabb a  $\beta$ -CD-ek között. A kémhatástól függetlenül, a HPBCD bizonyult a leggyengébb fluoreszcencia jelerősítőnek a vizsgált CD-ek közül. Azonban a GCD kémiai módosítása jelentősen emelte a CD-ek fluoreszcencia jelerősítő hatását: HPGCD jelenlétében enyhe, míg RAMEG esetében jelentős javulást tapasztaltunk a natív GCD-hez viszonyítva. Jellemzően a RAMEG bizonyult a legjobb fluoreszcencia erősítőnek, azonban savas körülmények között (pH 3,0-5,0) a BCD jelenléte hasonló intenzitás emelkedést eredményezett (**11. ábra**).





**11. ábra:** A Z14G ( $1,0 \mu\text{M}$ ) fluoreszcencia emissziós intenzitásának emelkedése CD-ek ( $0,0\text{-}2,0 \text{ mM}$ ) jelenlétében  $0,05 \text{ M}$  nátrium-foszfát (A;  $\text{pH } 3,0$ ),  $0,05 \text{ M}$  nátrium-acetát (B;  $\text{pH } 5,0$ ),  $0,05 \text{ M}$  nátrium-foszfát (C;  $\text{pH } 7,4$ ) és  $0,05 \text{ M}$  nátrium-borát (D;  $\text{pH } 10,0$ ) pufferekben ( $\lambda_{\text{ex}} = 315 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$ ).

A Z14G-CD komplexek kötési állandóit a Benesi-Hildebrand egyenlet (3. egyenlet) grafikus alkalmazásával határoztuk meg. A függvények jó egyezést mutattak ( $R^2 = 0,96\text{-}0,99$ ) az 1:1 sztöchiometriájú modellel minden vizsgált pH-n (12. ábra). A maszkolt mikotoxin stabil komplexeket ( $\log K = 2,0\text{-}3,3$ ) alakított ki a tesztelt  $\beta$ - és  $\gamma$ -CD-ekkel (3. táblázat). A Z14G pH 3,0-7,4 között nagyobb affinitással kötődött  $\gamma$ -CD-ekhez ( $\log K = 3,0\text{-}3,3$ ), mint a  $\beta$ -CD-ekhez ( $\log K = 2,6\text{-}2,9$ ). Azonban 10,0-es pH-n alacsonyabb komplexstabilitásokat tapasztaltunk ( $\log K = 2,0\text{-}2,4$ ). A Z14G-RAMEG komplex (pH 5,0 és 7,4) bizonyult a legstabilabbnak (3. táblázat).



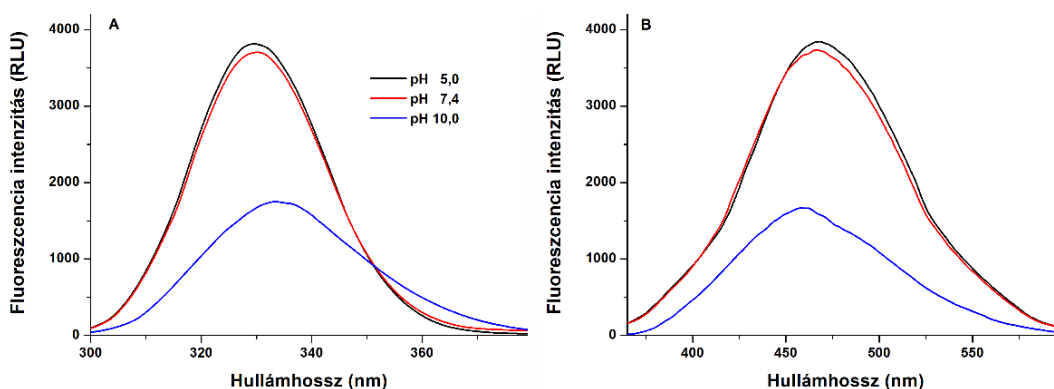
**12. ábra:** A Z14G-CD komplexek stabilitásának meghatározása a Benesi-Hildebrand egyenlet grafikus ábrázolásával 0,05 M nátrium-foszfát (pH 3,0; **A**), 0,05 M nátrium-acetát (pH 5,0; **B**), 0,05 M nátrium-foszfát (pH 7,4; **C**), és 0,05 M nátrium-borát pufferben (pH 10,0; **D**;  $\lambda_{ex} = 315 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$ ).

	<b>logK (<math>\pm</math> SEM)</b>			
	<b>pH 3,0</b>	<b>pH 5,0</b>	<b>pH 7,4</b>	<b>pH 10,0</b>
<b>Z14G-BCD</b>	2,74 $\pm$ 0,05	2,81 $\pm$ 0,02	2,93 $\pm$ 0,01	2,10 $\pm$ 0,07
<b>Z14G-RAMEB</b>	2,64 $\pm$ 0,07	2,81 $\pm$ 0,05	2,85 $\pm$ 0,05	2,21 $\pm$ 0,05
<b>Z14G-HPBCD</b>	2,55 $\pm$ 0,06	2,71 $\pm$ 0,06	2,82 $\pm$ 0,03	1,95 $\pm$ 0,05
<b>Z14G-GCD</b>	2,99 $\pm$ 0,06	3,03 $\pm$ 0,05	3,14 $\pm$ 0,02	2,30 $\pm$ 0,05
<b>Z14G-RAMEG</b>	3,18 $\pm$ 0,03	3,27 $\pm$ 0,02	3,25 $\pm$ 0,01	2,38 $\pm$ 0,07
<b>Z14G-HPGCD</b>	3,03 $\pm$ 0,02	3,13 $\pm$ 0,01	3,13 $\pm$ 0,03	2,41 $\pm$ 0,02

**3. táblázat:** A Z14G-CD komplexek kötési állandóinak ( $K$ ; mértékegység: L/mol) tízes alapú logaritmus értékei (BCD:  $\beta$ -CD; RAMEB: random metilált  $\beta$ -CD; HPBCD: (2-hidroxi-propil)- $\beta$ -CD; GCD:  $\gamma$ -CD; RAMEG: random metilált  $\gamma$ -CD; HPGCD: (2-hidroxi-propil)- $\gamma$ -CD; pufferek: 0,05 M nátrium-foszfát, pH 3,0; 0,05 M nátrium-acetát, pH 5,0; 0,05 M nátrium-foszfát, pH 7,4; 0,05 M nátrium-borát, pH 10,0).

### 5.2.2. Zearalenon-14-szulfát interakciója ciklodextrinekkel

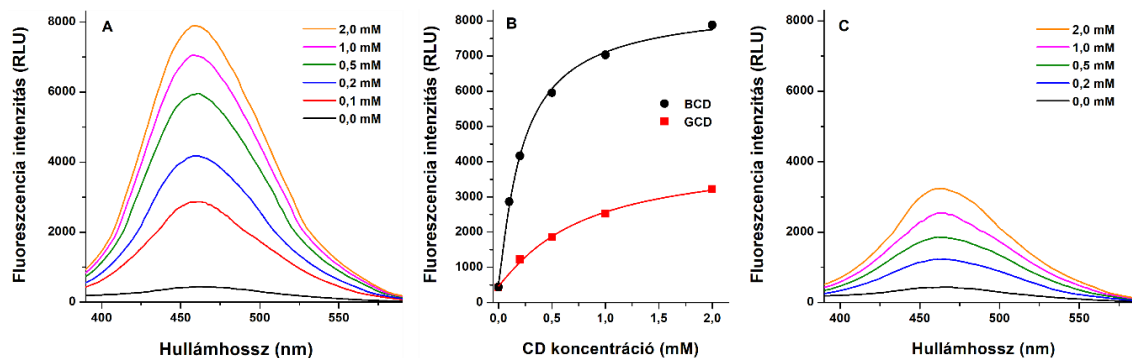
A fonalas gombák által is előállított Z14S fluoreszcencia spektrumait enyhén savas (pH 5,0), fiziológiás (pH 7,4) és lúgos (pH 10,0) körülmények között vizsgáltuk. A Z14S gerjesztési spektrumának maximumát 330 nm körül detektáltuk enyhén savas, és fiziológiás körülmények között, azonban magasabb pH-n (pH 10,0) a Z14S fluoreszcens jelének jelentős csökkenését és gerjesztési maximumának vöröseltolódását ( $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm} \rightarrow 334 \text{ nm}$ ) figyeltük meg (**13./A ábra**). Az emissziós spektrumok hasonlóak voltak 5,0-ös és 7,4-es pH-n, ahol a Z14S 465 nm-en adott maximumot, míg 10,0-es pH-n alacsonyabb fluoreszcens jelet és az emissziós maximum kékeltoadását ( $\lambda_{em} = 465 \text{ nm} \rightarrow 458 \text{ nm}$ ) tapasztaltuk (**13./B ábra**).



**13. ábra:** A Z14S (25,0  $\mu\text{M}$ ) fluoreszcencia gerjesztési (A; pH 5,0 és pH 7,4:  $\lambda_{em} = 465 \text{ nm}$ ; pH 10,0:  $\lambda_{em} = 458 \text{ nm}$ ) és emissziós (B; pH 5,0 és pH 7,4:  $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$ ; pH 10,0:  $\lambda_{ex} = 334 \text{ nm}$ ) spektrumai különböző pufferekben (0,05 M nátrium-acetát, pH 5,0; 0,05 M nátrium-foszfát, pH 7,4; 0,05 M nátrium-borát, pH 10,0).

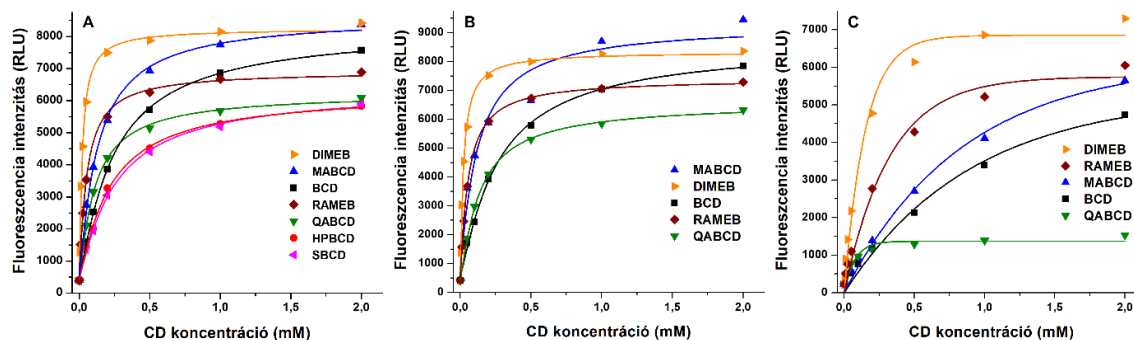
A Z14S CD-ekkel kialakított zárványkomplexeinek vizsgálata során elsőként a mikotoxin fluoreszcencia emissziós spektrumait vizsgáltuk. Mivel a CD-ek jelenlétében a Z14S excitációs maximumának kékeltoadását ( $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm} \rightarrow 320 \text{ nm}$ ; nincs bemutatva) figyeltük meg, ezért a mikotoxin fluoreszcencia emissziós spektrumait emelkedő BCD (0,0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; és 2,0 mM; **14./A ábra**) és GCD koncentrációk (0,0; 0,2; 0,5; 1,0; és 2,0 mM; **14./C ábra**) jelenlétében 320 nm gerjesztési hullámhosszt alkalmazva vettük fel nátrium-acetát pufferben (0,05 M; pH 5,0). A CD-ek jelenlétében jelentős emissziós intenzitás emelkedést figyeltünk meg, valamint a Z14S emissziós maximumának enyhe kékeltoadását ( $\lambda_{em} = 465 \text{ nm} \rightarrow 460 \text{ nm}$ ; **14. ábra**). A natív BCD

jelentősebb fluoreszcencia erősítő hatást mutatott, mint a GCD (**14./B ábra**), ezért további vizsgálataink során Z14S natív és kémiaailag módosított  $\beta$ -CD-ekkel kialakított kölcsönhatásait vizsgáltuk különböző pufferekben (pH 5,0-10,0).



**14. ábra:** A Z14S (1,0  $\mu$ M) fluoreszcencia emissziós spektrumai emelkedő BCD (A) és GCD (C) koncentrációk (0,0-2,0 mM) jelenlétében 0,05 M nátrium-acetát pufferben (pH 5,0;  $\lambda_{ex} = 320$  nm). (B) BCD- és GCD-indukálta intenzitás emelkedés a Z14S fluoreszcenciájában ( $\lambda_{ex} = 320$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm).

A Z14S fluoreszcenciájának legjelentősebb emelkedését pH 5,0-ön és 7,4-en tapasztaltuk (**15./A és 15./B ábra**). A kémiaailag módosított  $\beta$ -CD származékok közül a DIMEB és a MABCD bizonyultak a legjobb jelerősítőnek enyhén savas és fiziológiás körülmények között, míg a HPBCD, QABCD, RAMEB és SBCD kevésbé voltak hatékonyak a BCD-hez viszonyítva (**15./A és 15./B ábra**). Lúgos környezetben (pH 10,0) a DIMEB okozta a legnagyobb, míg a QABCD egyértelműen a legkisebb intenzitás emelkedést (**15./C ábra**). Emellett pH 10,0-en, egyedül a QABCD esetében a Z14S emissziós maximumának kékeltolődését (460 nm  $\rightarrow$  447 nm) tapasztaltuk (nincs bemutatva).



**15. ábra:** A Z14S ( $1,0 \mu\text{M}$ ) fluoreszcencia emissziós intenzitásának emelkedése növekvő CD koncentrációk ( $0,0$ - $2,0 \text{ mM}$ ) mellett  $0,05 \text{ M}$  nátrium-acetát (**A**;  $\text{pH } 5,0$ ),  $0,05 \text{ M}$  nátrium-foszfát (**B**;  $\text{pH } 7,4$ ) és  $0,05 \text{ M}$  nátrium-borát (**C**;  $\text{pH } 10,0$ ) pufferekben ( $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ).

A Z14S-CD komplexek kötési állandóit a Benesi-Hildebrand egyenlet (**3. egyenlet**) alapján határoztuk meg. A Benesi-Hildebrand függvények kiváló illeszkedést ( $R^2 = 0,99$ ) mutattak az 1:1 sztöchiometriájú modellel, és az eredmények stabil Z14S-CD komplexek ( $\log K = 3,0$ - $4,7$ ) kialakulására utalnak (**4. táblázat**). Enyhén savas körülmények között ( $\text{pH } 5,0$ ) a BCD hidroxipropil- és szulfobutil-szubsztitúciói nem eredményeztek jobb komplexképzési sajátságokat (**4. táblázat**), ezért a további kísérleteink során nem vizsgáltuk e kölcsönhatásokat.

Savas és fiziológias körülmények között ( $\text{pH } 5,0$  és  $7,4$ ) a metilált  $\beta$ -CD-ek Z14S iránti affinitása volt a legmagasabb, továbbá a MABCD és a QABCD is erősebben kötődtek a mikotoxinhoz, mint a natív BCD (**4. táblázat**). Azonban alacsonyabb stabilitású Z14S-CD komplexek képződését tapasztaltuk  $10,0$ -es  $\text{pH}$ -n, kivéve a QABCD-t, ami e körülmények között képezte a legstabilabb komplexeket a mikotoxinnal.

	<b>logK (± SEM)</b>		
	<b>pH 5,0</b>	<b>pH 7,4</b>	<b>pH 10,0</b>
<b>Z14S-BCD</b>	3,60 ± 0,02	3,55 ± 0,02	3,05 ± 0,02
<b>Z14S-RAMEB</b>	4,29 ± 0,04	4,27 ± 0,05	3,67 ± 0,04
<b>Z14S-DIMEB</b>	4,66 ± 0,05	4,63 ± 0,03	4,20 ± 0,08
<b>Z14S-MABCD</b>	3,90 ± 0,03	3,99 ± 0,05	3,04 ± 0,03
<b>Z14S-QABCD</b>	3,98 ± 0,03	3,74 ± 0,01	4,21 ± 0,01
<b>Z14S-HPBCD</b>	3,61 ± 0,02		
<b>Z14S-SBCD</b>	3,59 ± 0,01		
<b>Z14S-GCD</b>	3,14 ± 0,01		

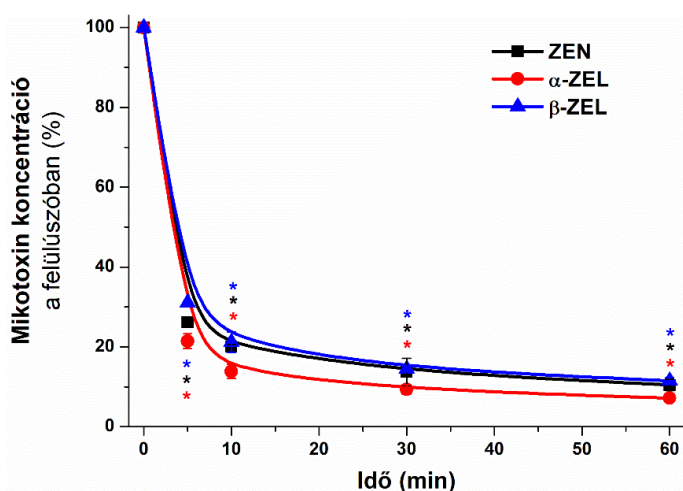
**4. táblázat:** A Z14S-CD komplexek kötési állandóinak ( $K$ ; mértékegység: L/mol) tízes alapú logaritmus értékei (BCD:  $\beta$ -CD; RAMEB: random metilált  $\beta$ -CD; DIMEB: dimetil- $\beta$ -CD; MABCD: monoamino  $\beta$ -CD; QABCD: kvaterner-ammónium- $\beta$ -CD; HPBCD: (2-hidroxi-propil)- $\beta$ -CD; SBCD: szulfobutil- $\beta$ -CD; GCD:  $\gamma$ -CD; pufferek: 0,05 M nátrium-acetát, pH 5,0; 0,05 M nátrium-foszfát, pH 7,4; 0,05 M nátrium-borát, pH 10,0).

Annak érdekében, hogy összehasonlítsuk a Z14S kölcsönhatását BCD és QABCD monomerekkel és szolubilis polimerekkel, a korábban használt fluoreszcencia spektroszkópai modellt alkalmaztuk. Standard mennyiségű mikotoxinhoz (1,0  $\mu$ M) a monomerekre normalizált szolubilis BCD és QABCD polimer koncentrációkat (0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 és 2,0 mM) adva vizsgáltuk meg a Z14S fluoreszcencia emissziós spektrumait ( $\lambda_{\text{ex}} = 320$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm). Tekintettel arra, hogy a Z14S-CD komplex képződése során enyhén savas (pH 5,0) és fiziológiás (pH 7,4) körülmények között hasonló eredményeket tapasztaltunk, viszont pH 10,0-en jelentős eltéréseket figyeltünk meg (**4. táblázat**), a monomer vs. szolubilis polimer összehasonlítást pH 5,0-ön és pH 10,0-en végeztük. A Benesi-Hildebrand egyenlet (**3. egyenlet**) grafikus alkalmazásával  $3,65 \pm 0,04$  log $K$  értéket határoztunk meg 5,0-ös pH-n a szolubilis BCD polimerre, míg lúgos körülmények között a kötési állandó ennél alacsonyabb (log $K = 2,74 \pm 0,06$ ) volt. A szolubilis QABCD polimer azonban kb. 3-szor magasabb stabilitású komplexeket alakított ki a mikotoxinnal savas (log $K = 4,48 \pm 0,01$ ), mint lúgos körülmények között (log $K = 3,96 \pm 0,03$ ).

### 5.3. Zearalenon és metabolitjainak extrakciója vizes oldatokból és összetett mátrixból $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel

#### 5.3.1. Zearalenon és zearalenolok extrakciója vizes oldatokból $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel

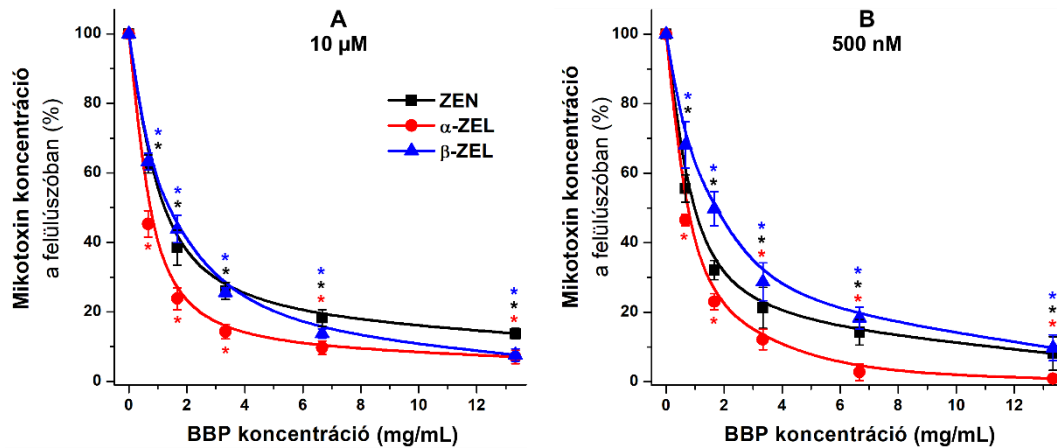
A ZEN,  $\alpha$ - és  $\beta$ -ZEL BBP-rel történő eltávolíthatóságának vizsgálata során elsőként az extrakció időfüggését vizsgáltuk. A kísérletek során a mikotoxinok vizes oldatához (10,0  $\mu$ M) 6,67 mg/mL BBP-t adva 5, 10, 30 és 60 percig inkubáltuk a mintákat termomixerben (25°C, 1000 rpm). Az inkubációt követően a felülúszó mikotoxin tartalmának HPLC-FLD meghatározása során a ZEN és származékainak látványos csökkenését tapasztaltuk (**16. ábra**). Már 5 perces inkubációt követően a mikotoxin koncentrációk meredek, kb. 70-80%-os csökkenését figyeltük meg. Majd 30 perc után kb. 85-90%-os redukciót tapasztaltunk a kezdeti mikotoxin koncentrációkhoz képest, ami az inkubációs idő további növelésével már nem változott jelentősen (**16. ábra**).



**16. ábra:** A ZEN és ZEL-ok (10,0  $\mu$ M)  $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimer (6,67 mg/mL) általi extrakciójának időfüggése vízben (inkubáció: 0-60 min, 25°C, 1000 rpm; \*  $p < 0,01$ ).

Ezt követően a BBP mikotoxin extrakciójának koncentrációfüggését teszteltük. Vizsgálataink során alacsony (500 nM) és magas (10,0  $\mu$ M) mikotoxin koncentrációkhoz adtunk emelkedő mennyiségű BBP-t (0,0-13,33 mg/mL), majd termomixerben történő inkubáció (40 min, 25°C, 1000 rpm) után vizsgáltuk a felülúszók mikotoxin tartalmát. A BBP koncentrációfüggő módon csökkentette a minták ZEN és ZEL tartalmát (**17. ábra**). A 10,0  $\mu$ M-os (**17./A ábra**) és 500 nM-os (**17./B ábra**) mintákból hasonló

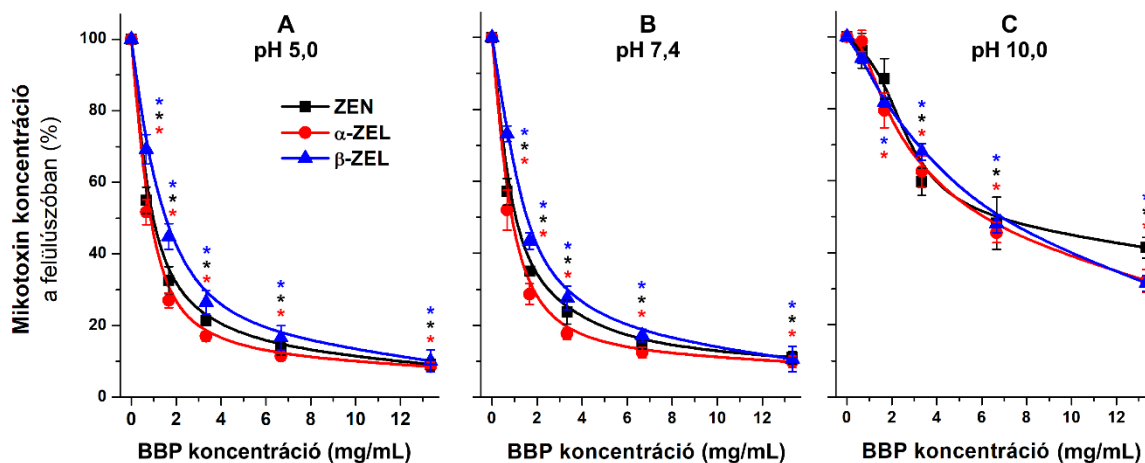
hatékonysággal távolította el a mikotoxinokat a polimer. Mindkét esetben legalább 85-90%-os ZEN,  $\alpha$ - és  $\beta$ -ZEL csökkenést tapasztaltunk a legmagasabb BBP koncentráció jelenlétében. Jellemzően a 6,67 mg/mL-es BBP koncentráció már közel azonos extrakciót eredményezett, mint a legmagasabb tesztelt BBP koncentráció (17. ábra).



**17. ábra:** A ZEN és ZEL-ok (A: 10,0  $\mu$ M; B: 500 nM) extrakciója vízből emelkedő mennyiségű  $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimer (0,0-13,33 mg/mL) jelenlétében (inkubáció: 40 min; 25°C, 1000 rpm; \*  $p < 0,01$ ).

További vizsgálataink során a ZEN és ZEL-ok BBP általi extrakciójának pH-függését vizsgáltuk nátrium-acetát (0,05 M; pH 5,0), PBS (pH 7,4) és nátrium-borát (0,05 M; pH 10,0) pufferekben. Enyhén savas (pH 5,0) és fiziológiás (pH 7,4) körülmények között a BBP vízben tapasztalt extrakciós képességéhez hasonló eredményeket figyeltünk meg (18./A és B ábra). Azonban a pH további emelése jelentős mértékben csökkentette a BBP ZEN- és ZEL-kötő képességét: még a legmagasabb vizsgált BBP koncentráció (13,33 mg/mL) jelenlétében is csak kb. 60-70%-os mikotoxin extrakciót figyeltünk meg (18./C ábra).

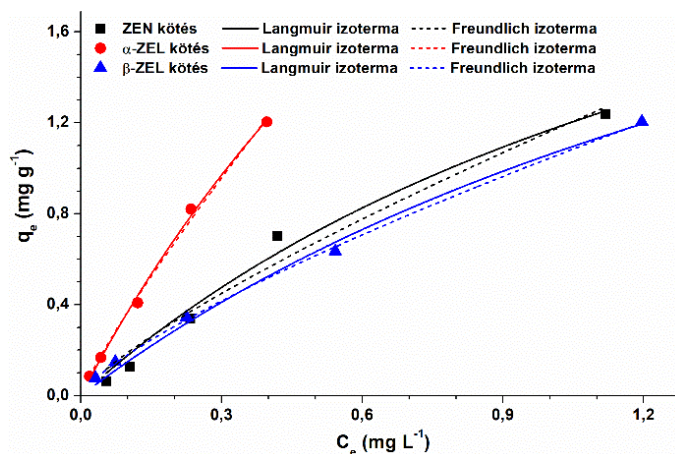




**18. ábra:** A ZEN és ZEL-ok ( $10,0 \mu\text{M}$ ) extrakciója  $0,05 \text{ M}$  nátrium-acetát (A; pH 5,0), PBS (B; pH 7,4) és  $0,05 \text{ M}$  nátrium-borát pufferből (C; pH 10,0)  $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolymerrel (0,0-13,33 mg/mL; inkubáció: 40 min,  $25^\circ\text{C}$ , 1000 rpm; \*  $p < 0,01$ ).

A BBP mikotoxinkötő képességének hőmérsékletfüggését  $0,05 \text{ M}$  nátrium-acetát pufferben (pH 5,0) vizsgáltuk. A  $10 \mu\text{M}$  ZEN-t és 0,67, 2,0 vagy 6,67 mg/mL BBP-t tartalmazó mintákat 15, 25 és  $35^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk (1000 rpm, 40 min), majd centrifugálást követően a leszívott felülúszókat szobahőmérsékletűre melegítettük/hűtöttük és HPLC-FLD módszerrel meghatároztuk mikotoxin tartalmukat. A hőmérséklet változtatása nem okozott szignifikáns eltéréseket a mikotoxin extrakcióban (nincs bemutatva).

A ZEN és ZEL-ok BBP-rel kialakított kölcsönhatásának kvantitatív jellemzése érdekében emelkedő mennyiségű mikotoxin koncentrációkat (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 és  $10,0 \mu\text{M}$ ) adtunk BBP-hez (végkoncentráció: 1,67 mg/mL), majd inkubációt (40 min,  $25^\circ\text{C}$ , 1000 rpm) és centrifugálást (4000 g, 6 s) követően meghatároztuk a felülúszó mikotoxin tartalmát. A Langmuir (**4. egyenlet**) és Freundlich (**5. egyenlet**) izotermák jól illeszkedtek a mérési eredményekre (**19. ábra**; Langmuir:  $R^2 = 0,98-0,99$ ; Freundlich:  $R^2 = 0,97-0,99$ ). Az illesztések alapján meghatározott értékeket az **5. táblázat** szemlélteti.



19. ábra: ZEN és ZEL-ok  $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel történő megkötésének Langmuir (egyenes vonal) és Freundlich (szaggatott vonal) izotermái vízben.

	Langmuir			Freundlich		
	$Q_0$ (mg/g)	$K_L$ (L/mg)	$R^2$	$K_F$ (mg/g)(L/mg) <sup>1/n</sup>	$1/n$	$R^2$
<b>ZEN</b>	3,11 ± 0,86	0,60 ± 0,25	0,98	1,16 ± 0,07	0,79 ± 0,10	0,97
<b><math>\alpha</math>-ZEL</b>	5,28 ± 1,41	0,75 ± 0,25	0,99	2,72 ± 0,16	0,87 ± 0,05	0,99
<b><math>\beta</math>-ZEL</b>	3,31 ± 0,75	0,47 ± 0,15	0,99	1,04 ± 0,01	0,76 ± 0,02	0,99
<b>Z14G</b>	3,77 ± 0,49	0,0197 ± 0,006	0,96	0,18 ± 0,01	0,64 ± 0,03	0,92
<b>Z14S</b>	9,53 ± 4,49	0,096 ± 0,051	0,99	0,827 ± 0,019	0,895 ± 0,045	0,99

5. táblázat: A mikotoxin-BBP kölcsönhatások Langmuir és Freundlich izotermáinak paramétereit ( $\pm$  SEM).

### 5.3.2. $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimer regenerálhatóságának vizsgálata

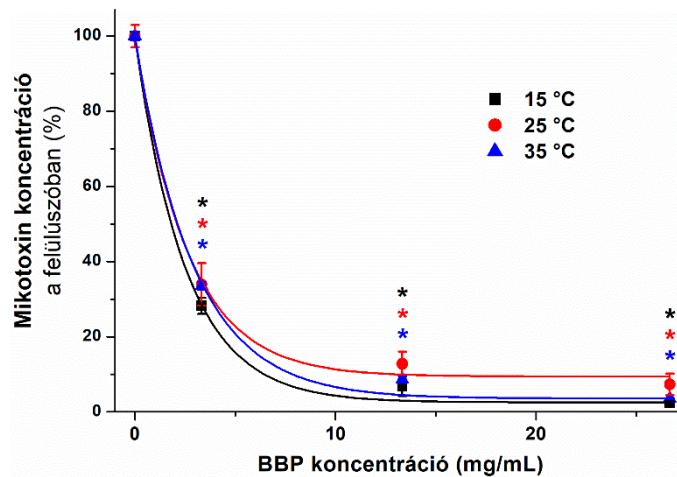
Kísérleteink során a ZEN BBP-rel történő extrakcióját követően kétlépéses 50 v/v%-os etanol-víz eleggyel történő mosás segítségével vizsgáltuk a mikotoxin kiszoríthatóságát a CD üregből, majd a BBP többszöri felhasználhatóságát (lásd 2.3.3. szekció). Eredményeink alapján a mosási lépéseket követően a kezdeti ZEN koncentrációval közel azonos mikotoxin mennyiséget detektáltunk a felülúszókban (**6. táblázat**), ez alapján a szerves oldószeres mosás után a BBP által megkötött teljes ZEN-mennyiség visszanyerhető. Emellett a BBP ZEN extrakciós képessége a mosási lépéseket követően történő második és harmadik felhasználás során ugyanolyan eredményesnek bizonyult, mint az első alkalmazása esetében (**6. táblázat**).

BBP felhasználás	Mosási lépés	ZEN-mennyiség (%) a pufferben (A) és a mosófolyadékban (B, C)	$\Sigma$ ZEN-mennyiség (%) a felülúszókban
1.	A: BBP-es extrakció után	8,0 ± 0,3	99,8
	B: 1. mosási lépés után	85,8 ± 1,6	
	C: 2. mosási lépés után	6,0 ± 0,7	
2.	A: BBP-es extrakció után	7,1 ± 0,2	98,3
	B: 1. mosási lépés után	84,8 ± 1,5	
	C: 2. mosási lépés után	6,4 ± 0,8	
3.	A: BBP-es extrakció után	7,4 ± 0,4	-

**6. táblázat:** *A  $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimer többszöri felhasználásának vizsgálata: ZEN (10,0  $\mu$ M) extrakciója BBP-rel (6,67 mg/mL) 0,05 M nátrium acetát pufferből (A; pH 5,0), majd ZEN mosása BBP-ből két lépésben 50 v/v% etanol-víz eleggyel (B és C).*

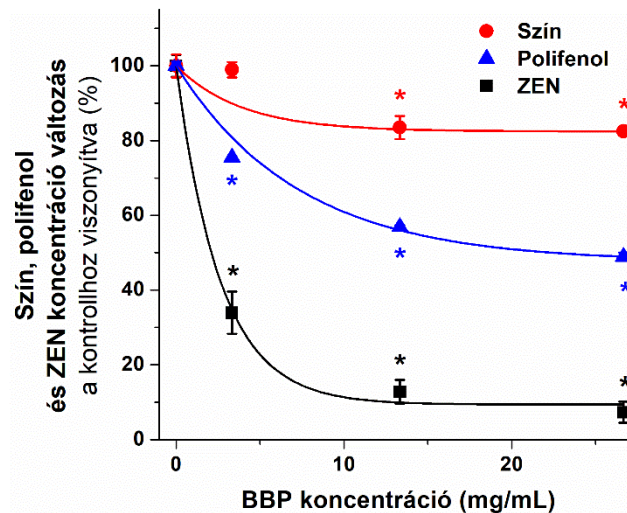
### 5.3.3. Zearalenon extrakciója kukoricasörből $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel

A következő kísérleteinkben a BBP ZEN-kötő képességét vizsgáltuk összetett mátrixban. A minták előkészítését követően a mikotoxinnal (500 nM) adalékolt kukoricasört BBP jelenlétében inkubáltuk (40 min, 1000 rpm) különböző hőmérsékleteken (15-35°C), majd a felülúszó oldószeres extrakcióját és vákuumbepárlását követően a meg nem kötött ZEN mennyiséget HPLC-FLD módszerrel határoztuk meg. A kukoricasör minták nem tartalmaztak kimutatható mennyiségű ZEN-t az adalékolás (spike-olás) előtt. Mivel a BBP nem szelektíven köti meg a ZEN-t, feltételeztük, hogy a kukoricasör egyéb komponenseinek részleges extrakciója is megtörténik. Ezért a sikeres mikotoxin extrakció érdekében magasabb BBP koncentrációkat is alkalmaztunk (0,0; 3,33; 13,33 és 26,67 mg/mL). A 3,33 mg/mL-es BBP a kiindulási ZEN mennyiségének hozzávetőlegesen 65%-át távolította el a sörből, míg 13,33 és 26,67 mg/mL BBP jelenlétében a ZEN kb. 90 és 95%-os extrakcióját figyeltük meg (**20. ábra**). A nátrium-acetát pufferben (pH 5,0) végzett korábbi kísérletünkhöz hasonlóan, a BBP mikotoxinkötő képességében csak kismértékű hőmérsékletfüggést figyeltünk meg a kukoricasörben is.



**20. ábra:** A ZEN (500 nM) mennyiségének csökkenése kukoricasörben eltérő hőmérsékleteken (15-35°C) emelkedő mennyiségű  $\beta$ -CD gyöngypolimer jelenlétében (0,0-26,67 mg/mL; inkubáció: 40 min, 1000 rpm; \* $p < 0,01$ ).

A mikotoxin tartalom mellett a BBP valószínűleg más vegyületeket is képes eltávolítani a sörből. Ezért a kukoricasörminták színének és összpolicenol tartalmának változását vizsgáltuk a BBP-rel (0,0-26,67 mg/mL) történő inkubációt (1000 rpm, 40 min, 25°C) követően. A kontrollként alkalmazott mintákban a színérték ( $C$ )  $4,85 \pm 0,15$ , míg policenol koncentráció ( $P$ )  $77,1 \pm 0,8$  mg/L volt. A BBP mennyiségének növelésével a sör színének és policenol tartalmának fokozatos csökkenését figyeltük meg (**21. ábra**). A minták színének és policenol tartalmának relatív csökkenése sokkal alacsonyabbnak mutatkozott a ZEN mennyiségének relatív csökkenéséhez képest, azonban a 13,33 mg/mL BBP jelenléte 16%-os színintenzitás és 43%-os összpolicenol koncentráció csökkenést okozott.

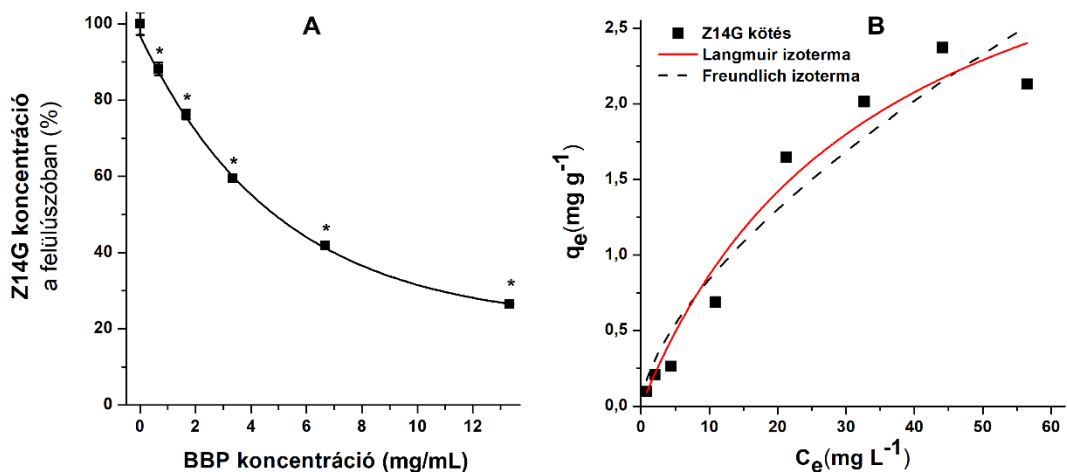


**21. ábra:** Kukoricásör színének, valamint polifenol- és ZEN-tartalmának relatív változása emelkedő mennyiségű  $\beta$ -CD gyöngypolimer jelenlétében (0,0-26,6 mg/mL; inkubáció: 40 min, 25°C, 1000 rpm; \* $p < 0,01$ ).

#### 5.3.4. Zearalenon-14-glükozid extrakciója vizes oldatból $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel

További vizsgálataink során a ZEN konjugált származékainak extrakcióját teszteltük vizes oldatokból BBP-rel. A BBP koncentrációfüggő módon csökkentette a kiindulási Z14G (2,0  $\mu$ M) mennyiséget nátrium-acetát pufferben (0,05 M; pH 5,0; **22./A ábra**). Már a legalacsonyabb BBP koncentráció (0,67 mg/mL) is kb. 10%-os csökkenést okozott, míg 6,67 és 13,33 mg/mL BBP jelenlétében kb. 60 és 75%-os Z14G extrakciót figyeltünk meg (**22./A ábra**).

A BBP Z14G-kötő képességének mennyiségi meghatározásához standard mennyiségű BBP-hez (végkoncentráció: 1,67 mg/mL) emelkedő Z14G koncentrációkat (0,2; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 és 12,5  $\mu$ M) adtunk majd az inkubációt (termomixer: 30 min, 25°C, 1000 rpm), és centrifugálást (4000 g, 6 s) követően a felülúszó mikotoxin tartalmát HPLC-FLD módszerrel határoztuk meg. A Langmuir és Freundlich szorpciós izotermákat a **22./B ábrán** tüntettem fel, a szorpciós modellek paraméterei az **5. táblázatban** szerepelnek.

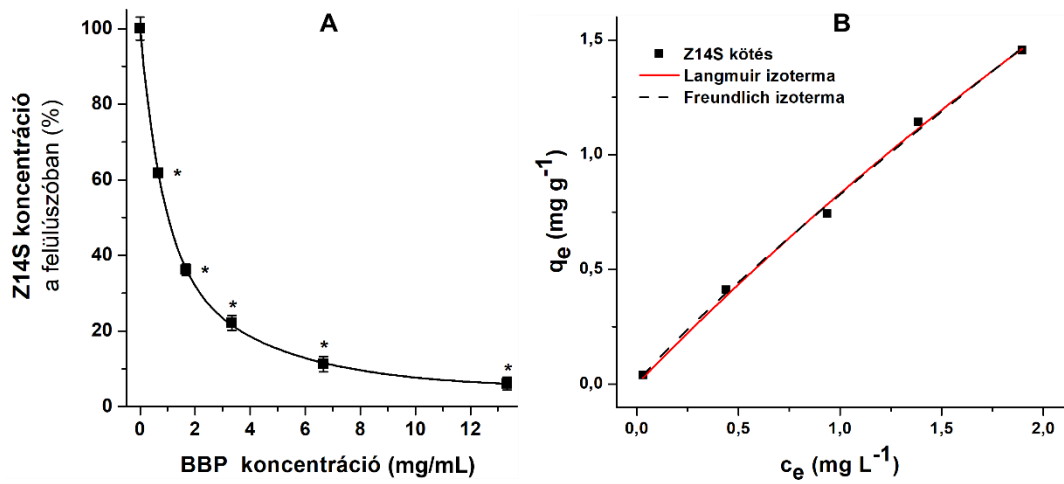


**22. ábra:** (A) A Z14G (2,0  $\mu$ M) extrakciója 0,05 M nátrium-acetát pufferből (pH 5,0) emelkedő mennyiségű  $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimer (0,0-13,33 mg/mL) jelenlétében (inkubáció: 30 min, 25°C, 1000 rpm; \*  $p < 0,01$ ). (B) A Z14G-BBP kölcsönhatás Langmuir (egyenes vonal) és Freundlich (szaggatott vonal) izotermái.

### 5.3.5. Zearalenon-14-szulfát extrakciója vizes oldatból $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimerrel

Az előző kísérlethez hasonlóan, a Z14S BBP által történő eltávolítását teszteltük 0,05 M nátrium acetát pufferből (pH 5,0). Már az alacsony BBP koncentráció (0,67 mg/mL) is közel 40%-os csökkenést okozott a minták mikotoxin tartalmában (**23./A ábra**). A BBP koncentráció növelésével tovább emelkedett a Z14S extrakció mértéke, 13,3 mg/mL polimer eltávolította a mikotoxin kb. 95%-át.

A Z14S-BBP kölcsönhatás kvantitatív vizsgálata során 1,33 mg/mL BBP-hez Z14S-ot (0,2; 2,5; 5,0; 7,5 és 10,0  $\mu$ M) adtunk 0,05 M nátrium-acetát pufferben (pH 5,0) majd az inkubációt (termomixer: 40 min, 25°C, 1000 rpm) és centrifugálást (4000 g, 6 s) követően meghatároztuk a felülúszók Z14S-tartalmát. Mind a Langmuir, mind a Freundlich izotermák esetén jó illeszkedést ( $R^2 = 0,99$ ) tapasztaltunk (**23./B ábra**). A Langmuir és Freundlich modellek alapján számolt paramétereket az **5. táblázat** tartalmazza.



**23. ábra:** (A) A Z14S (1,0  $\mu$ M) extrakciója 0,05 M nátrium-acetát pufferből (pH 5,0) növekvő mennyiségű  $\beta$ -ciklodextrin gyöngypolimer (0,0-13,33 mg/mL) jelenlétében (inkubáció: 40 min, 25°C, 1000 rpm; \*  $p < 0,01$ ). (B) A Z14S-BBP kölcsönhatás Langmuir (egyenes vonal) és Freundlich (szaggatott vonal) izotermái.

## 6. Megbeszélés, következtetések

### 6.1. Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai szérumban albuminnal

Tekintettel a korábban tapasztalt jelentős faji eltérésekre egyes mikotoxinok albuminkötődése kapcsán (pl. ochratoxin A, 2'R-ochratoxin A és alternariol esetében) [Kőszegi és Poór, 2016; Faisal és mtsai., 2018a; Fliszár-Nyúl és mtsai., 2019a], a ZEN és metabolitjainak humán, marha, sertés és patkány albuminnal kialakított kölcsönhatásait fluoreszcencia kioltás módszerrel vizsgáltuk. A belső szűrő effektus korrekcióját követően (**2. egyenlet**) a HSA (**4. ábra**), BSA, PSA és RSA fluoreszcencia emissziós intenzitásainak jelentős csökkenését tapasztaltuk emelkedő ZEN,  $\alpha/\beta$ -ZEL, ZAN,  $\alpha/\beta$ -ZAL és Z14S koncentrációk jelenlétében, ami az albuminok fluoreszcenciájáért felelős aminosavak (főként a 214-es pozíciójú Trp) fluoreszcenciájának részleges kioltásából adódik. Ez a jelenség a mikotoxin-albumin komplexek kialakulására utal [Fanali és mtsai., 2012; Poór és mtsai., 2015a; 2017a; Ma és mtsai., 2018; Tan és mtsai., 2019]. A Z14G jelenléte nem befolyásolta az albuminok fluoreszcencia intenzitását 340 nm-en, ami alapján a Z14G nem kötődik, vagy csak nagyon gyenge kölcsönhatást alakít ki szérumban albuminnal.

Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan [Poór és mtsai., 2017a; Ma és mtsai., 2018], ZEN és egyes fluoreszcens sajátosságokkal rendelkező metabolitjainak (pl. Z14S, **4./A ábra**) szérumban albuminokkal kialakított interakciója során kb. 455-460 nm körül egy második csúcs megjelenése tapasztalható. Ez a jelenség a mikotoxinok intrinszik fluoreszcenciájából adódik, ezért a fluoreszcens tulajdonsággal nem rendelkező metabolitok (ZAN és ZAL-ok) esetében nem figyelhető meg. Emellett a jelenség kialakulásában részben szerepet játszhat a Förster-féle rezonancia energiatranszfer is, mely során a gerjesztett állapotú donor molekula és a megfelelő távolságban lévő, jellemzően fluoreszcens sajátosságokkal rendelkező akceptor molekula között kialakuló dipól-dipól kölcsönhatás következtében energiatranszfer játszódik le (amennyiben a donor fluoreszcens emissziós spektruma jelentős átfedést mutat az akceptor abszorpciós spektrumával) [Berney és Danuser, 2003; Periasamy és mtsai., 2015].

A képződő mikotoxin-albumin komplexek  $K_{SV}$  és  $K$  értékei alapján stabil kölcsönhatások alakulnak ki (**1. és 2. táblázat**). A ZEN-HSA és ZEN-BSA komplexek kötési állandóira hasonló értékeket kaptunk, mint a korábban közölt vizsgálatokban [Poór és mtsai., 2017a; Ma és mtsai., 2018]. A tesztelt mikotoxinok közül jellemzően a Z14S



képezte a legstabilabb komplexeket az albuminokkal (**1. és 2. táblázat**), a RSA iránti affinitása ( $\log K = 5,93$ ) megközelíti az alternariol-albumin komplexek stabilitását ( $\log K = 5,61-6,53$ ) [Fliszár-Nyúl és mtsai., 2019a]. A ZEN és redukált metabolitjainak albuminok iránti affinitása (**1. és 2. táblázat**) az aflatoxinok (aflatoxinok-HSA:  $\log K = 4,34-4,65$ ), citrinin ( $\log K = 4,96-5,50$ ) és dihidrocitrinon ( $\log K = 4,93-5,65$ ) mikotoxinokéhoz hasonló [Poór és mtsai., 2015a; 2017b; Faisal és mtsai., 2019a]. A  $\beta$ -ZEL alacsonyabb stabilitású komplexeket alakított ki a vizsgált albuminokkal, mint a ZEN és az  $\alpha$ -ZEL, valamint hasonló tendenciát figyeltünk meg a legtöbb esetben  $\beta$ -ZAL vs. ZAN és  $\alpha$ -ZAL esetében is (**1. és 2. táblázat**). Érdekes módon  $\beta$ -ZAL és  $\beta$ -ZEL RSA iránti affinitása az anyavegyületéhez hasonlóan bizonyult (**1. és 2. táblázat**). Korábbi vizsgálatok alapján a ZEN nem konvencionális kötőhelyet foglal el HSA IIA és IIIA aldóménjei között [Poór és mtsai., 2017a], ami a molekulamodellzés szerint az  $\alpha$ -ZEL kötőhelyéhez nagyon hasonló (**1. melléklet/A és B**). Azonban  $\beta$ -ZEL esetében a kötési pozíció (**1. melléklet/C**) vagy akár a kötőhely (**1. melléklet/D**; kb. 15 Å távolságra azonosították a ZEN és  $\alpha$ -ZEL kötőhelyétől) is eltérhet [Faisal és mtsai., 2018b]. A ZEN és  $\alpha$ -ZEL vs.  $\beta$ -ZEL kötődésében megfigyelt eltérések lehetnek felelősek a  $\beta$ -ZEL-HSA komplexek alacsonyabb stabilitásáért [Faisal és mtsai., 2018b].

A ZEN és származékainak affinitása jelentős, akár több tízszeres különbséget mutatott HSA, BSA, PSA és RSA iránt, melyek közül RSA-nal képezték a legstabilabb komplexeket (**1. és 2. táblázat**). Hasonlóan jelentős faji eltérések figyelhetők meg ochratoxin A albuminkötődésében is [Kőszegi és Poór, 2016]. A BSA (76,34%), PSA (75,86%) és RSA (73,23%) aminosavsorrendje nagy hasonlóságot mutat HSA-nal [Weinstock és Baldwin, 1988; Carter és Ho, 1994; Stehle és mtsai., 1999; Faisal és mtsai., 2018b]. Azonban a ZEN kötéséért felelős régióban a 205 és 478 pozíciójú aminosavak az RSA (arginin, szerin), valamint a HSA, BSA és PSA (lizin, treonin) esetében eltérőek. E szerkezeti eltérések érintettek lehetnek a ZEN és metabolitjainak RSA iránti lényegesen magasabb affinitásában [Faisal és mtsai., 2018b].

A ZEN és metabolitjainak különböző állatfajokon végzett *in vivo* toxikokinetikai vizsgálatait során jelentős különbségeket figyeltek meg [Mukherjee és mtsai., 2014; Catteuw és mtsai., 2019; Fruhauf és mtsai., 2019], melyek kialakulásáért részben felelősek lehetnek az albuminkötődésükben tapasztalt eltérések [Fruhauf és mtsai., 2019]. Catteuw és mtsai. sertésen végzett kísérletei alapján a ZEN és származékainak keringésből történő eliminációja a PSA iránti affinitásuk szerint zajlott ( $Z14G < \beta$ -ZEL <  $\alpha$ -ZEL < ZEN; **1. és 2. táblázat**) [Catteuw és mtsai., 2019], ami arra utal, hogy az

albuminkötődés nagymértékben befolyásolhatja a ZEN és származékainak toxikokinetikáját. Továbbá ZEN és  $\alpha$ -ZAL esetében hosszabb plazma eliminációs felezési időt figyeltek meg patkányokban, mint emberben [Mukherjee és mtsai., 2014], ami szintén összhangban van a mikotoxinok RSA iránti magasabb affinitásával (**1. és 2. táblázat**).

A HSA-nal módosított HPAC oszloppal végzett kísérleteink eredményei (**6. ábra**) megerősítették a fluoreszcencia kioltás típusú vizsgálataink során megfigyelt mikotoxin-HSA komplexek képződését, ami a statikus kioltást igazolja. A ZEN és redukált származékainak HSA-oszlopról történő elúciója (**6. ábra**) jellemzően hasonló tendenciát mutatott, mint a spektroszkópai módszerekkel meghatározott HSA iránti affinitásuk (**1. és 2. táblázat**), azonban kismértékű eltéréseket tapasztaltunk. A Z14G eluálódott a leghamarabb a HSA-oszlopról, ami jól összeegyeztethető spektroszkópai megfigyeléseinkkel. A maszkolt mikotoxin az oldószeresúctól elkülönülten jelent meg (**6. ábra**), ami gyenge Z14G-HSA kölcsönhatás kialakulására utal. Dellafiora és mtsai. korábbi tanulmánya alapján a HSA képes a Z14G nagyon lassú hidrolízisére, ami szintén a Z14G és HSA közötti alacsony affinitású komplexképződésre utal [Dellafiora és mtsai., 2017]. A fluoreszcencia kioltás módszerrel meghatározott kötési állandók alapján a ZEN kötődik legnagyobb affinitással a HSA-hoz (**1. és 2. táblázat**). Ezzel szemben, a HPAC vizsgálataink során a Z14S még az anyavegyületnél is hosszabb retenciós idővel eluálódott (**6. ábra**). Spektroszkópai méréseinket az extracelluláris fiziológiás körülményekhez hasonló környezetben (PBS, pH 7,4) végeztük, míg HPAC kísérleteink során a gyártó leírásának megfelelő eluent alkalmaztunk, amely izopropanolból és 0,01 M pH 7,0-es ammónium-acetát pufferből (15:85 v/v%) állt. Az eltérő kísérleti körülmények, úgymint az alkalmazott eluens szerves oldószer tartalma, valamint a vizes fázis eltérő ionerőssége és pH-ja magyarázhatják a komplexek stabilitásában tapasztalt eltéréseket [Kaspchak és mtsai., 2018].

Korábbi tanulmányok allosztérikus kapcsolatot írtak le a HSA-on megtalálható különböző kötőhelyek között (pl. Hem kötőhely és Sudlow's site I régió) [Fasano és mtsai., 2005; Ascenzi és Fasano, 2010; Fanali és mtsai., 2012]. Továbbá, a ZEN kötőhelyeként azonosított IIA és IIIA aldómén közötti régió és a site I kötőhely allosztérikus kapcsolatára utaló mérési eredményekről is beszámoltak [Poór és mtsai., 2017a]. A redukált és konjugált ZEN származékok közül a ZAN,  $\alpha$ -ZAL és  $\alpha$ -ZEL jelenléte az anyavegyületéhez hasonló vagy erősebb fluoreszcencia intenzitást emelő hatást eredményezett a site I markerként ismert warfarin HSA-nal kialakított

komplexének fluoreszcenciájában (**7. ábra**). Megfigyeléseink alapján arra következtethetünk, hogy a ZEN, ZAN,  $\alpha$ -ZAL és  $\alpha$ -ZEL kötődése növeli a HSA warfarin iránti affinitását, ami a mikotoxinok és warfarin kötőhelyeinek allosztérikus kapcsolatára utal. A Z14G nem befolyásolta a warfarin-HSA komplexek fluoreszcens jelét, ez a megfigyelés korrelál a fluoreszcencia kioltás és HPAC kísérleteink alapján meghatározott gyenge Z14G-HSA kölcsönhatással. A Z14S és  $\beta$ -ZAL jelenléte nem befolyásolta jelentős mértékben, míg a  $\beta$ -ZEL csökkentette a warfarin-HSA komplexek fluoreszcenciáját (**7. ábra**). A  $\beta$ -ZEL ZEN-től eltérő viselkedése valószínűleg a primer kötőhelyük közötti különbségekkel magyarázható (**1. melléklet**) [Poór és mtsai., 2017a ; Faisal és mtsai., 2018b]. A Z14S és  $\beta$ -ZAL esetében tapasztalt eltérések szintén utalhatnak az eltérő kötőhelyre vagy kötési pozícióra [Faisal és mtsai., 2020c].

E megfigyeléseink hangsúlyozzák a ZEN és ZEN metabolitok szérumban albuminnal kialakított komplexeinek lehetséges toxikokinetikai jelentőségét. A ZEN és redukált metabolitjainak albuminkötődésében tapasztalt jelentős faji eltéréseket szem előtt kell tartani a különböző állatfajokon végzett kísérletek tervezése és az eredmények extrapolálása során. Továbbá, a stabil mikotoxin-albumin komplexek kialakulásának köszönhetően lehetőség nyílik az albumin affinitásfehérjeként történő alkalmazására a ZEN és metabolitjainak extrakciója során, ahogy ezt leírták az ochratoxin A borból történő szilárd fázisú extrakciójánál immobilizált BSA-nal [Leal és mtsai., 2019] vagy alternariol esetében paradicsomléből BSA-nal [Fliszár-Nyúl és mtsai., 2020]. Így a ZEN és metabolitjainak albuminkötődése analitikai jelentőséggel is bírhat.

## **6.2. Zearalenon és metabolitjainak kölcsönhatásai ciklodextrinekkel**

A maszkolt mikotoxin, Z14G fluoreszcens spektruma a ZEN-hoz és ZEL-okhoz hasonlóan [Gajęcka és mtsai., 2011; Poór és mtsai., 2015c; 2017c] két gerjesztési csúcsot mutat 275 és 315 nm körül (**8. ábra**). A Z14G tág pH tartományban (pH 3,0-10,0) rendelkezik fluoreszcens tulajdonságokkal, azonban lúgos körülmények között (pH 10,0) fluoreszcens spektruma jelentősen megváltozik (**8. ábra**). A Z14G szerkezetét tekintve rezorcilsav lakton (**1. ábra**), azonban a ZEN két szabad fenolos hidroxilcsoportjával (C14 és C16; **1. ábra**) ellentétben, a Z14G C14-es hidroxilcsoportjának glükóz konjugációja miatt, csak a C16-os hidroxilcsoportja képes deprotonálódni a pH emelkedésével, így lúgos körülmények között részben anion formában jelenik meg. Mivel a fluorofór ionizáltsági állapota befolyásolhatja a molekula fluoreszcens tulajdonságait [Enoch és

mtsai., 2010; 2013; Yousuf és mtsai., 2015], a Z14G ionizációja a gerjesztési és emissziós spektrumainak változását eredményezheti.

Az alkalmazott körülmények között a vizsgált CD-ek nem rendelkeznek fluoreszcens tulajdonságokkal, így a Z14G fluoreszcencia emissziós intenzitásának CD-indukálta emelkedése és emissziós maximumának enyhe kékeltolódása (**9. ábra**) a Z14G-CD komplexek kialakulására utalnak. A CD-ek jelenlétében a Z14G fluoreszcenciájának jelentős emelkedése valószínűleg a vízmolekulák kioltó hatásának csökkenésével [Aghamohammadi és Alizadeh, 2007; Amadasi és mtsai., 2007; Maragos és mtsai., 2008; Dall'Asta és mtsai., 2009], valamint a CD üreg apoláros sajátságával magyarázható. Emellett a szerves fluorofór molekulák BCD üreggel történő interakciója tipikusan a ligandumok emissziós maximumának kékeltolódását eredményezik [Enoch és mtsai., 2010; 2013]. Az anyavegyülethez hasonlóan [Poór és mtsai., 2015c], 5,0-ös pH-n a Z14G fluoreszcenciájának nagyobb mértékű emelkedését tapasztaltuk BCD jelenlétében, mint GCD esetében (**9. ábra**), amit esetleg magyarázhat az, hogy a nagyobb belső átmérővel rendelkező GCD üregébe több vízmolekula fér be, ezért a vízmolekulák kioltó hatásnak csökkenése nem annyira kifejezett.

A különböző pufferekben (pH 3,0-10,0) végzett Z14G-CD kölcsönhatások vizsgálata során a pH 10,0-en tapasztalt gyengébb CD-indukálta fluoreszcencia intenzitásfokozó hatás (**10. és 11. ábra**) valószínűleg a mikotoxin lúgos közegben történő deprotonálásából adódik, melyet ZEN és ZEL-ok esetében is megfigyeltek [Poór és mtsai., 2015c; 2017c]. A CD-ek a kölcsönhatás során a mikotoxin nem-ionizált formáját részesítik előnyben. Továbbá, a kémhatástól függetlenül, magas CD koncentrációk jelenlétében tapasztalt azonos emissziós maximum ( $\lambda_{em} = 455$  nm; **10. ábra**) szintén azzal magyarázható, hogy a komplexképződés során a CD-ek a Z14G nem-ionizált formáját preferálják, mellyel stabilabb kölcsönhatást alakítanak ki, mint az ionizált mikotoxinnal. Lúgos környezetben (pH 10,0) azonban a Z14G túlnyomó részt anionos formában van jelen a mintákban, ezért magasabb CD koncentráció szükséges. Ezt az elméletet szintén alátámasztja a Z14G emissziós maximumának vöröseltolódása 10,0-es pH-n a CD-ek jelenlétében (**10. ábra**), valamint a képződő komplexek alacsonyabb stabilitása a 455 nm-en mért emissziós intenzitások alapján (**3. táblázat**).

A maszkolt mikotoxin, Z14G alacsonyabb stabilitású (pH 5,0:  $\log K = 2,7-3,3$ ) komplexeket képez CD-kkel, mint a ZEN (pH 5,0:  $\log K = 3,8-4,8$ ) [Poór és mtsai., 2015c]. Emellett a Z14G (az anyavegyülettel ellentétben) stabilabb komplexeket alakít ki  $\gamma$ -CD-kel, mint  $\beta$ -CD-kel (**3. táblázat**) [Poór és mtsai., 2015c]. A GCD metil- és

hidroxipropil szubsztitúciója kismértékű affinitásemelkedést eredményezett a Z14G-dal kialakított kölcsönhatás során, azonban a  $\beta$ -CD-k kémiai módosítása a képződő komplexek kötési állandóit nem befolyásolta előnyösen (**3. táblázat**). Ezzel szemben korábbi vizsgálatokban a  $\beta$ -CD metil szubsztitúciója szignifikánsan növelte a ZEN-nal kialakított komplexek stabilitását [Dall'Asta és mtsai., 2009; Poór és mtsai., 2015c].

Eredményeink alapján, savas és fiziológiai körülmények között (pH 3,0-7,4) a kémhatás változása alig befolyásolja a Z14G-CD komplexek stabilitását. Azonban a kötési állandók kb. 3-6-szoros csökkenését figyeltük meg lúgos körülmények között (pH 10,0) a tesztelt CD-ek esetében (**3. táblázat**). Ez alátámasztja azt, hogy a Z14G lúgos közegben történő deprotonálódása kedvezőtlen a CD-ekkel történő komplexképződés szempontjából.

Molekulamodellezés alapján a Z14G poláros, glükozid részével ül be a BCD hidrofób üregében, míg a GCD esetében a Z14G aromás gyűrűje az üregben és a glikozid szerkezeti egység az üregen kívül helyezkedik el (**2. melléklet**) [Faisal és mtsai., 2019c]. Ez magyarázatot adhat a képződő Z14G-BCD komplexek alacsonyabb stabilitására a Z14G-GCD komplexekéhez képest. Ezzel szemben az anyavegyület aromás gyűrűjével ül be a BCD belső üregébe (**2. melléklet**) és a komplexképződést hidrofób-hidrofób kölcsönhatások stabilizálják [Faisal és mtsai., 2019c], ami összhangban van a ZEN-BCD komplex korábbi, NMR-alapú vizsgálati eredményeivel [Dall'Asta és mtsai., 2008]. Míg a ZEN-GCD kölcsönhatás során a mikotoxin alifás része helyezkedik el a CD üregben, és a fluoreszcenciáért felelős aromás rész az üregen kívül marad (**2. melléklet**). Ez alacsonyabb fluoreszcencia intenzitás emelő hatást eredményez [Faisal és mtsai., 2019c].

A módosított mikotoxinok közé tartozó Z14S, a Z14G-hoz hasonlóan, széles pH tartományban (pH 5,0-10,0) rendelkezik fluoreszcens tulajdonságokkal (**8. és 13. ábra**). Azonban a ZEN, ZEL-ok, és Z14G (**8. ábra**) spektrumaitól eltérően [Poór és mtsai., 2015c; 2017c], fluoreszcens spektruma egy gerjesztési csúcsot mutatott, 330 nm körül (**13. ábra**). A Z14S fluoreszcens jele 10,0-es pH-n jelentős mértékben lecsökken, emellett gerjesztési maximumának vöröseltolódását, míg emissziós maximumának kékeltoadódását figyelhetjük meg (**13. ábra**). A Z14S spektrumában történt változások valószínűleg szintén a szabad fenolos hidroxilcsoport deprotonálódásával magyarázhatók [Enoch és mtsai., 2010; 2013; Yousuf és mtsai., 2015], hasonlóan a ZEN, ZEL-ok és Z14G esetében tapasztaltakhoz (**8. ábra**) [Poór és mtsai., 2015c; 2017c].

A Z14S-CD kölcsönhatás vizsgálata során megfigyelt jelentős intenzitás emelkedés, és a Z14S emissziós maximumának enyhe kékeltoadódása (**14. ábra**)

zárványkomplexek kialakulására utal [Aghamohammadi és Alizadeh, 2007; Ramírez-Galicia és mtsai., 2007; Enoch és mtsai., 2010; 2013], mivel a CD-ek önmagukban nem mutattak fluoreszcenciát az alkalmazott körülmények között (pH 5,0;  $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ). Az anyavegyületnél és a Z14G-nál (**9. ábra**) tapasztaltakhoz hasonlóan [Poór és mtsai., 2015c], a BCD magasabb emelkedést eredményezett a Z14S fluoreszcenciájában, mint a GCD (**14. ábra**).

A Z14S-CD komplexképződés során megfigyelt fluoreszcencia intenzitás emelő hatás pH 5,0 és 7,4 között hasonló (**15./A és 15./B ábra**). Ezzel szemben lúgos közegben alacsonyabb intenzitás értékeket tapasztaltunk a CD-ek jelenlétében (**15./C ábra**), amit a mikotoxin deprotonálódása okozhat. CD-ek jelenlétében (kivéve: QABCD, nincs bemutatva), a Z14S emissziós hullámhossz maximuma kémhatástól függetlenül jellemzően azonos, 460 nm körüli. Ez, és a lúgos közegben tapasztalt alacsonyabb intenzitások arra utalnak, hogy a Z14S-CD komplexek képződése során is jellemzően a mikotoxin nem-ionizált formája preferált. Ezzel szemben 10,0-es pH-n a QABCD jelenlétében tapasztalt alacsony fluoreszcencia erősítés (**15./C ábra**) és a Z14S emissziós maximumának kékeltolódása arra utal, hogy QABCD a mikotoxin deprotonált (ionizált) formájával lép kölcsönhatásba.

A ZEN-hoz hasonlóan [Poór és mtsai., 2015c], a Z14S stabilabb komplexeket alakított ki BCD-nel, mint natív GCD-nel (**4. táblázat**). Az enyhén savas körülmények között (pH 5,0) képződő Z14S-BCD komplex (**4. táblázat**) hasonló stabilitású az anyavegyület BCD-nel kialakított komplexéhez [Poór és mtsai., 2015c], de kb. 6-szor stabilabb a Z14G-BCD komplexnél (**3. táblázat**). A Z14S az anyavegyülethez hasonlóan, a metilált  $\beta$ -CD származékokkal (DIMEB, RAMEB) alakította ki a legstabilabb komplexeket (**4. táblázat**) [Poór és mtsai., 2015c]. A Z14S affinitása SB CD iránt alacsonyabb, míg QABCD iránt magasabb, mint az anyavegyületé (**4. táblázat**) [Poór és mtsai., 2015c]. A lúgos környezetben megfigyelt alacsonyabb kötési állandók (**4. táblázat**) alátámasztják, hogy a vizsgált CD-ek jellemzően nem a lúgos környezetben domináns anion formával, hanem a protonált Z14S-tal lépnek kölcsönhatásba. Ezzel szemben a Z14S-QABCD komplexek stabilitása lúgos közegben a legmagasabb (**4. táblázat**), ez alapján a kvaterner-ammónium származék az ionizált Z14S-tal alakít ki stabilabb komplexet. A QABCD jelenlétében a 10,0-es pH-n tapasztalt eltérések a fluoreszcencia jelerősítő hatásban és a kötési állandókban (**15./C ábra, 4. táblázat**) valószínűleg a kvaterner-ammónium származék tetraalkil-ammónium oldalláncai és a mikotoxin anion között kialakuló elektrostatikus kölcsönhatással magyarázhatók.

Molekulamodellés alapján a Z14S az alifás szerkezeti részével helyezkedik el mind a BCD, mind a GCD lipofil üregében, és a komplexképződést a mikotoxin szulfát- és ketocsoportjainak poláros kölcsönhatásai stabilizálják (**3. melléklet**) [Faisal és mtsai., 2020d]. A Z14S-BCD vs. Z14S-GCD komplexek eltérő tulajdonságait magyarázhatja, hogy a mikotoxin mélyebbre süllyed a GCD nagyobb átmérőjű üregében (**3. melléklet**), ami a fentebb leírt stabilizáló interakciók kialakulása szempontjából kevésbé előnyös [Faisal és mtsai., 2020d]. Emellett a DIMEB 2,6-di-*O*-metil szubsztitúciójának köszönhetően további hidrofób kölcsönhatások kialakítására képes a mikotoxin aromás gyűrűjével (**4. táblázat, 3. melléklet**), ami magasabb stabilitású komplexeket eredményez [Faisal és mtsai., 2020d].

A CD polimerek esetében olykor a gyűrűk kooperatív/szinergista hatásai figyelhetők meg [Harada és mtsai., 1976; Ma és mtsai., 2019]. Például az alternariol mikotoxin BCD monomerrel ( $\log K = 2,4$ ) és szolubilis BCD polimerrel ( $\log K = 3,4$ ) képzett komplexeinek stabilitása során jelentős eltéréseket tapasztaltak [Fliszár-Nyúl és mtsai., 2019b]. Ezzel szemben a Z14S CD monomerekkel és szolubilis polimerekkel kialakított kölcsönhatásainak összehasonlítása alapján a Z14S-BCD monomer és szolubilis polimer komplexek stabilitása hasonlóan bizonyult. A QABCD szolubilis polimer (kb. háromszor) stabilabb komplexeket képzett Z14S-tal pH 5,0-ön, mint 10,0-es pH-n; míg érdekes módon a monomer esetében ennek ellenkezőjét tapasztaltuk (**4. táblázat**).

Tekintettel arra, hogy a CD indukált fluoreszcencia intenzitás emelkedést korábban sikeresen alkalmazták ZEN-nal szennyezett kukoricaminták mikotoxin tartalmának analitikai meghatározására [Maragos és Appell, 2007; Dall'Asta és mtsai., 2008], a CD technológia ígéretesnek tűnik a ZEN és a rutin analitikai eljárásokkal nehezen azonosítható módosított/maszkolt származékainak nagyobb érzékenységgű fluoreszcens detektálásának gyakorlatában is.

A ZEN és ZEL-ok BBP-nel történő inkubációja során már rövid idő után jelentős csökkenést figyeltünk meg a mikotoxin tartalomban (**16. ábra**). A BBP hasonló mértékben csökkentette a magas és alacsony ZEN/ZEL koncentrációjú oldatok mikotoxin tartalmát (**17. ábra**), ami alapján a BBP erősen szennyezett minták toxinmentesítésére is felhasználható. Korábbi vizsgálatok alapján a ZEN jellemzően nmol/L-es koncentráció tartományban mutatható ki a mikotoxinnal kontaminált sörmintákban [Okoye, 1986; Odhav és Naicker, 2002; Nkwe és mtsai., 2005; Kuzdraliński és mtsai., 2013]. Azonban szélsőséges esetekben akár  $\mu\text{mol/L}$ -es koncentrációkat is elérhet a szennyezés mértéke:

egy zambiai házi készítésű sör ZEN tartalma meghaladta a 14  $\mu\text{M}$ -t [Lovelace és Nyathi, 1977].

Az extrakció pH-függése alapján a BBP a mikotoxinok alacsonyabb pH-n domináns, nem-ionizált formája iránt mutatott nagyobb affinitást (**18. ábra**), hasonlóan a korábban leírt ZEN/ZEL-CD kölcsönhatásokhoz [Poór és mtsai., 2015c; 2017c]. A lúgos közegben Z14G és Z14S kapcsán tapasztalt fenolos hidroxilcsoportok deprotonálódása a ZEN és ZEL-ok esetében is végbemegy [Poór és mtsai., 2015c; 2017c], az így képződő anionokkal gyengébb kölcsönhatást alakít ki a BBP.

Korábbi megfigyelések alapján a szerves oldószerek befolyásolhatják a ligandum-CD komplexképződést a vendégmolekulák CD üregből történő kiszorításával [Pitha és Hoshino, 1992; Al-Rawashdeh, 2004]. Ennek köszönhetően egyes szerves oldószerek (mint az etanol) alkalmasak lehetnek a BBP regenerálására a toxinkötést követően. Eredményeink alapján, az 50 v/v%-os etanol-víz elegy kétlépéses mosás után gyakorlatilag az összes BBP által kötött ZEN-t kiszorította a CD üregekből (**6. táblázat**). A mosással történő regenerálást követően a BBP ugyanolyan mértékben kötött ZEN-t a második – majd újabb kétlépéses mosást követően – a harmadik felhasználása során is. Ez alapján, a BBP egyszerű regenerálhatóságának köszönhetően alkalmasnak tűnik a ZEN-nal szennyezett vizes oldatok dekontaminálására. Továbbá lehetőséget nyújt a BBP analitikai mintadúsítás területén való felhasználására.

A BBP toxinkötő hatékonyságát összetett mátrixban is teszteltük. Mivel a ZEN kukoricában fordul elő leggyakrabban, és korábbi vizsgálatok sörminták ZEN szennyezettségéről is beszámoltak [Okoye, 1986; Odhav és Naicker, 2002; Nkwe és mtsai., 2005; Zinedine és mtsai., 2007; Kuzdraliński és mtsai., 2013; Rai és mtsai., 2020], kísérleteink során ZEN-nal adalékolt (500 nM) kukoricásört alkalmaztunk. A CD-ek számos élelmiszer komponenssel is kölcsönhatásba lépnek [Astray és mtsai., 2009; Fenyvesi és mtsai., 2016], ezért a sör bizonyos minőségi paramétereit is teszteltük. Kísérleteink során magasabb BBP koncentrációkat (13,3 és 26,7 mg/mL; **20. ábra**) alkalmazva hasonlóan eredményes mikotoxin extrakciót tapasztaltunk, mint vizes oldatokban 6,67-13,3 mg/mL BBP jelenlétében (**17./B ábra**). Az extrakció mértékét a hőmérséklet nem befolyásolta (15-35°C), azonban a kukoricásör polifenol tartalmának csökkenését és színének halványulását tapasztaltuk a BBP kezelést követően (**21. ábra**). Azonban a ZEN-tartalom BBP-indukálta relatív csökkenése sokkal nagyobb volt, mint a polifenolok mennyiségében és a színintenzitásban megfigyelt relatív változások (**21. ábra**). Az élelmiszerek, italok mikotoxin mentesítési lehetőségeit továbbá árnyalja a tény,



hogy egyes élelmiszeripari eljárások során a mikotoxinok részleges degradációja során képződő termékekkel is számolnunk kell (módosított mikotoxinok). Emellett az élelmiszeripari feldolgozás az anyavegyület kovalens adduktjainak kialakulásához is vezethet egyes mátrix komponensekkel (pl. fehérjékkel, keményítővel), melyek csak emésztést követően szabadulnak fel [González-Arias és mtsai., 2013; Stadler és mtsai., 2020]. Továbbá, a növényi mátrixhoz asszociált mikotoxin szennyezésről sem szabad megfeledkeznünk [Rychlik és mtsai., 2014].

Szintén fontos megfigyelés, hogy a BBP sikeresen alkalmazható az anyavegyületnél jóval hidrofilebb tulajdonságú, konjugált ZEN metabolitok vizes oldatból történő extrakciójára. A Z14G esetében alacsonyabb extrakciós képességet tapasztaltunk (**22./A ábra**), mint a ZEN-nél (**17. ábra**), azonban a Z14S-ot az anyavegyülethez hasonló sikerességgel távolította el a mintákból a polimer (**23./A ábra**). E megfigyelések összhangban vannak a Z14G, a Z14S és a ZEN BCD-nel képzett komplexeinek stabilitásával (**3. és 4. táblázat**) [Poór és mtsai., 2015c].

A ZEN és metabolitjainak BBP-rel kialakított kölcsönhatásának kvantitatív meghatározása a polimerek kötőképeségének mennyiségi jellemzésére alkalmas Langmuir és Freundlich szorpciós izotermák (**4. és 5. egyenlet**) alapján történt [García-Zubiri és mtsai., 2009; Foo és Hameed 2010; Appell és Jackson, 2012]. A BBP adszorptív kapacitásának és kötőhelyek átlagos affinitásának jellemzésére szolgáló  $K_F$  érték [Appell és Jackson, 2012] alapján a ZEN-t és  $\beta$ -ZEL-t hasonló kapacitással köti a polimer, míg  $\alpha$ -ZEL Freundlich konstansa jóval magasabb (**5. táblázat**). A konjugált metabolitok közül a BBP adszorptív kapacitása kissé alacsonyabb Z14S esetében, mint az anyavegyületnél meghatározott érték, ellenben Z14G esetében jóval alacsonyabb értéket kaptunk (**5. táblázat**). Az összes vizsgált mikotoxin esetében 0,5 és 1,0 közé esett az  $1/n$  érték, ami a Freundlich izotermák pseudo-linearitására utal [Tseng és mtsai., 2008]. A Langmuir modell jobb illeszkedést mutatott Z14G esetében, a meghatározott  $K_L$  érték szignifikánsan alacsonyabb volt a ZEN-éhoz viszonyítva (**5. táblázat**). A Freundlich konstansnál tapasztaltakhoz hasonlóan, a  $\beta$ -ZEL esetében alacsonyabb, míg  $\alpha$ -ZEL esetében valamivel magasabb  $K_L$  értéket kaptunk, mint az anyavegyületé (**5. táblázat**). Ezek az eredmények szintén összhangban vannak a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a  $\beta$ -ZEL kevésbé stabil komplexeket képez CD-ekkel, mint a ZEN és az  $\alpha$ -ZEL [Poór és mtsai., 2015c; 2017c]. A  $Q_0$  értékek alapján az 1 g BBP maximális Z14S kötő kapacitása kb. 3-szor magasabb az anyavegyületénél (**5. táblázat**); a Z14G és  $\beta$ -ZEL  $Q_0$  értéke ZEN-

hoz hasonló, míg  $\alpha$ -ZEL esetében több mint 1,5-szer magasabb értéket kaptunk (**5. táblázat**).

Eredményeink alapján a BBP alkalmas lehet ZEN és származékainak vizes oldatokból, akár italokból (pl. sör) történő eltávolítására. Mivel a BCD kémiai módosítása befolyásolja a mikotoxin-CD komplexek stabilitását [Croft és Bartsch, 1983; Del Valle, 2004], feltételezhető, hogy a BBP kémiai módosításával akár még előnyösebb tulajdonságú CD polimerek is kifejleszthetők (**3. és 4. táblázat**) [Dall'Asta és mtsai., 2008; 2009; Poór és mtsai., 2015c; 2017c]. Annak ellenére, hogy az ochratoxin A a ZEN-nél több mint 60-szor gyengébb kölcsönhatást alakít ki BCD-nel [Poór és mtsai., 2015b; 2015c], korábban sikeresen alkalmaztak  $\beta$ -CD poliuretán polimer alapú mikotoxinkötőket vizes oldatok és vörösbor ochratoxin A tartalmának csökkentésére [Appell és Jackson, 2012], továbbá patulin almaléből történő extrakciójára is [Appell és Jackson, 2010; Shirasawa és mtsai., 2013]. Emellett nemrégiben szőlőlé és bor ochratoxin A tartalmának meghatározása során, mintaelőkészítés céljából is alkalmaztak  $\beta$ -CD polimereket [Appell és mtsai., 2018], és a BBP-t sikeresen alkalmazták vörösbor és paradicsomlé alternariol tartalmának csökkentésére [Fliszár-Nyúl és mtsai., 2020]. Mindezeket figyelembe véve és szem előtt tartva azt, hogy a BBP regenerálást követően újra felhasználható, a CD technológia ígéretesnek tűnik italok mikotoxinmentesítésére alkalmas módszerek kifejlesztésére.

## 7. Új megfigyelések

- A ZEN,  $\alpha$ -/ $\beta$ -ZEL, ZAN,  $\alpha$ / $\beta$ -ZAL és Z14S stabil komplexeket képeznek szérum albuminnal ( $K = 10^4$ - $10^5$  L/mol), ezért a mikotoxinok plazmafehérjekötődése befolyásolhatja toxikokinetikai tulajdonságaikat.
- A  $\beta$ -ZEL/ZAL lényegesen alacsonyabb stabilitású komplexeket képeznek HSA-nal, mint a ZEN vagy akár az  $\alpha$ -ZEL/ZAL. A kötési állandókban megfigyelt eltérések e mikotoxinok eltérő kötőhelyére vagy kötési pozíciójára utalhatnak.
- A ZEN, a redukált ZEN metabolitok és a Z14S albuminkötődése jelentős faji eltéréseket mutat. Ezeket szem előtt kell tartani a különböző állatfajokon végzett kísérletek és azok eredményeinek egyéb fajokra történő extrapolációja során.
- A ZEN és metabolitjai eltérő módon befolyásolják a site I marker warfarin albuminkötődését, feltehetőleg allosztérikus módon.
- A ZEN konjugált metabolitjai kölcsönhatásba lépnek CD-ekkel, ami a mikotoxinok fluoreszcencia intenzitásának jelentős emelkedésével jár, ezért e kölcsönhatások alkalmasak lehetnek fluoreszcens analitikai módszerek érzékenyítésére.
- A Z14G stabilabb komplexeket képez GCD-nel és származékaival, mint  $\beta$ -CD-ekkel; azonban a lúgos környezet nem kedvez a kölcsönhatásoknak.
- A Z14S metil- $\beta$ -CD származékokkal képezte a legstabilabb komplexeket savas és fiziológiás környezetben, azonban pH 10,0-en QABCD-nel alakította ki a legstabilabb komplexet.
- A ZEN és metabolitjai sikeresen megköthetők BBP-rel vizes oldatokból és/vagy sörből; lúgos közegben az extrakció kevésbé hatékony.
- A BBP szerves oldószeres (50 v/v% etanol-víz elegy) mosással regenerálható és újra felhasználható, valamint analitikai mintadúsítás területén történő felhasználásra is alkalmasnak tűnik.

## 8. Saját közlemények listája

### *Jelen dolgozat alapjául szolgáló folyóiratcikkek:*

Miklós Poór, **Zelma Faisal**, Afshin Zand, Tímea Bencsik, Lajos Szenté. Removal of zearalenone and zearalenols from aqueous solutions using insoluble beta-cyclodextrin bead polymer. *Toxins* **2018**, 10, 216. [IF: 3,895; Q1]

**Zelma Faisal**, Beáta Lemli, Dénes Szerencsés, Sándor Kunsági-Máté, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Mónika Kuzma, Mátyás Mayer, Miklós Poór. Interactions of zearalenone and its reduced metabolites  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol with serum albumins: species-dependent alternations, binding sites, and thermodynamics. *Mycotoxin Research* **2018**, 34, 269-278. [IF: 3,741; Q2]

**Zelma Faisal**, Eszter Fliszár-Nyúl, Luca Dellafiora, Gianni Galaverna, Chiara Dall'Asta, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Lajos Szenté, Miklós Poór. Cyclodextrins Can Entrap Zearalenone-14-Glucoside: Interaction of the Masked Mycotoxin with Cyclodextrins and Cyclodextrin Bead Polymer. *Biomolecules* **2019**, 9, 354. [IF: 4,082; Q1]

**Zelma Faisal**, Eszter Fliszár-Nyúl, Luca Dellafiora, Gianni Galaverna, Chiara Dall'Asta, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Lajos Szenté, Miklós Poór. Interaction of zearalenone-14-sulfate with cyclodextrins and the removal of the modified mycotoxin from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, 310, 113236. [IF: 5,065\*; Q1]

**Zelma Faisal**, Virág Vörös, Eszter Fliszár-Nyúl, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Miklós Poór. Interactions of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol, zearalenone-14-sulfate, and zearalenone-14-glucoside with serum albumin. *Mycotoxin Research* **2020**, 36, 389-397. [IF: 3,164\*; Q2]

\*2019-es évre számított impakt faktorok

**A dolgozat alapjául szolgáló folyóiratcikkek összesített impakt faktora: 19,947**

*Jelen dolgozat alapjául szolgáló egyéb közlemények:*

**Zelma Faisal**, Afshin Zand, Tímea Bencsik, Lajos Szente, Miklós Poór. Removal of zearalenone and its metabolites from aqueous solutions by insoluble  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer. *4<sup>th</sup> International Cholnoky Symposium* (Pécs, Magyarország, 2018.05.10-11.; előadás)

**Zelma Faisal**, Virág Vörös, Rita Csepregi, Tamás Kószegi, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Lajos Szente, Miklós Poór. Interactions of zearalenone and its reduced metabolites with serum albumins and cyclodextrins. *5<sup>th</sup> International Cholnoky Symposium* (Pécs, Magyarország, 2019.04.25.; előadás)

**Faisal Zelma**, Fliszár-Nyúl Eszter, Dellafiora Luca, Galaverna Gianni, Dall'Asta Chiara, Szente Lajos, Poór Miklós. Zearalenon-14-glükózid interakcióinak vizsgálata ciklodextrinekkal és béta-ciklodextrin gyöngypolimerrel – vajon a ciklodextrinek kölcsönhatásba lépnek a maszkolt mikotoxinnal? *TOX2019 Tudományos Konferencia* (Szeged, Magyarország, 2019.10.09-11.; előadás)

**Faisal Anna Zelma**, Gődér Beatrix, Szerencsés Dénes, Lemli Beáta, Poór Miklós. Zearalenon,  $\alpha$ -zearalenol és  $\beta$ -zearalenol kölcsönhatásainak vizsgálata human és egyéb albuminokkal. *TOX2017 Tudományos Konferencia* (Bükfürdő, Magyarország, 2017.10.11-13.; poszter)

Miklós Poór, Virág Vörös, Dénes Szerencsés, **Zelma Faisal**, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Interaction of zearalenone and its reduced metabolites with serum albumins. *40<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop* (München, Németország, 2018.06.11-13.; poszter)

***Egyéb folyóiratcikkek:***

Franziska Sueck, Miklós Poór, **Zelma Faisal**, Christoph G. W. Gertzen, Benedikt Cramer, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Holger Gohlke, Hans-Ulrich Humpf. Interaction of ochratoxin A and its thermal degradation product 2'R-ochratoxin A with human serum albumin. *Toxins* **2018**, 10, 256. [IF: 3,895; Q1]

**Zelma Faisal**, Diána Derdák, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Franziska Sueck, Hans-Ulrich Humpf, Benedikt Cramer, Miklós Poór. Interaction of 2'R-ochratoxin A with Serum Albumins: Binding Site, Effects of Site Markers, Thermodynamics, Species Differences of Albumin-binding, and Influence of Albumin on Its Toxicity in MDCK Cells. *Toxins* **2018**, 10, 353. [IF: 3,895; Q1]

**Zelma Faisal**, Virág Vörös, Beáta Lemli, Diána Derdák, Sándor Kunsági-Máté, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Dominik Bergmann, Franziska Sueck, Hans-Ulrich Humpf, Florian Hübner, Miklós Poór. Interaction of the mycotoxin metabolite dihydrocitrinone with serum albumin. *Mycotoxin Research* **2019**, 35, 129-139. [IF: 3,164; Q2]

**Zelma Faisal**, Sándor Kunsági-Máté, Beáta Lemli, Lajos Sente, Dominik Bergmann, Hans-Ulrich Humpf, Miklós Poór. Interaction of dihydrocitrinone with native and chemically modified cyclodextrins. *Molecules* **2019**, 24, 1328. [IF: 3,267; Q1]

**Zelma Faisal**, Edina Garai, Rita Csepregi, Katalin Bakos, Eszter Fliszár-Nyúl, Lajos Sente, Adrienn Balázs, Mátyás Cserhádi, Tamás Kőszegi, Béla Urbányi, Zsolt Csenki, Miklós Poór. Protective effects of beta-cyclodextrins vs. zearalenone-induced toxicity in HeLa cells and *Tg(vtg1:mCherry)* zebrafish embryos. *Chemosphere* **2020**, 240, 124948 [IF: 5,778\*; D1/Q1]

**Zelma Faisal**, Virág Vörös, Eszter Fliszár-Nyúl, Beáta Lemli, Sándor Kunsági-Máté, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Ferenc Zsila, Miklós Poór. Probing the Interactions of Ochratoxin B, Ochratoxin C, Patulin, Deoxynivalenol, and T-2 toxin with Human Serum Albumin. *Toxins* **2020**, 12, 392. [IF: 3,531\*; Q1]

**Zelma Faisal**, Violetta Mohos, Eszter Fliszár-Nyúl, Kateřina Valentová, Kristýna Káňová, Miklós. Interactions of silymarin components and their sulfated metabolites with human serum albumin and cytochrome P450 enzymes. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2021**, 138, 111459 [IF: 4,545\*; Q1]

Eszter Fliszár-Nyúl, **Zelma Faisal**, Violetta Mohos, Diána Derdák, Beáta Lemli, Tamás Kálai, Cecília Sár, Balázs Z. Zsidó, Csaba Hetényi, Ádám I. Horváth, Zsuzsanna Helyes, Ruth Deme, Dóra Bogdán, Andrea Czompa, Péter Mátyus, Miklós Poór. Interaction of SZV 1287, a novel oxime analgesic drug candidate, and its metabolites with serum albumin. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, online, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115945> [IF: 5,065\*; Q1]

***Egyéb közlemények:***

Virág Vörös, **Zelma Faisal**, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Beáta Lemli, Rita Csepregi, Miklós Poór. Interactions of mycotoxin metabolites 2'R-ochratoxin A and dihydrocitrinone with human serum albumin. *4<sup>th</sup> International Cholnoky Symposium* (Pécs, Magyarország, 2018.05.10-11.; előadás)

**Faisal Zelma**, Vörös Virág, Derdák Diána, Lemli Beáta, Bálint Mónika, Hetényi Csaba, Csepregi Rita, Sueck Franziska, Humpf Hans-Ulrich, Cramer Benedikt, Poór Miklós. Ochratoxin A és 2'R-ochratoxin A kölcsönhatásainak vizsgálata szérum albuminnal. *TOX2018 Tudományos Konferencia* (Lillafüred, Magyarország, 2018.10.17-19.; előadás)

Poór Miklós, **Faisal Zelma**, Csepregi Rita, Lemli Beáta, Kunsági-Máté Sándor, Sente Lajos. Mikotoxin-ciklodextrin kölcsönhatások vizsgálata és gyakorlati hasznosíthatóságuk. *TOX2018 Tudományos Konferencia* (Lillafüred, Magyarország, 2018.10.17-19.; előadás)

Miklós Poór, Eszter Fliszár-Nyúl, Violetta Mohos, **Zelma Faisal**, Beáta Lemli. Pharmacological/toxicological importance of albumin-ligand interactions. *5<sup>th</sup> International Cholnoky Symposium* (Pécs, Magyarország, 2019.04.25.; előadás)

**Zelma Faisal**, Sándor Kunsági-Máté, Beáta Lemli, Lajos Szente, Dominik Bergmann, Hans-Ulrich Humpf, Miklós Poór. Interaction of the mycotoxin metabolite dihydrocitrinone with native and chemically modified cyclodextrins. *4<sup>th</sup> Symposium on Weak Molecular Interactions* (Matsue, Japán, 2019.05.17-19.; előadás)

Miklós Poór, Eszter Fliszár-Nyúl, Violetta Mohos, **Zelma Faisal**, Beáta Lemli, Csaba Hetényi, Sándor Kunsági-Máté. Pharmacological/toxicological importance and investigation of albumin-ligand interactions. *4<sup>th</sup> Symposium on Weak Molecular Interactions* (Matsue, Japán, 2019.05.17-19.; előadás)

Poór Miklós, **Faisal Zelma**, Fliszár-Nyúl Eszter. Mikotoxin-albumin kölcsönhatások vizsgálata és jelentőségük. *TOX2019 Tudományos Konferencia* (Szeged, Magyarország, 2019.10.09-11.; előadás)

**Zelma Faisal**, Virág Vörös, Beáta Lemli, Mónika Bálint, Csaba Hetényi, Rita Csepregi, Franziska Sueck, Benedikt Cramer, Hans-Ulrich Humpf, Miklós Poór. Interaction of 2'R-ochratoxin A with serum albumins. *40<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop* (München, Németország, 2018.06.11-13.; poszter)

Vörös Virág, **Faisal Zelma**, Derdák Diána, Lemli Beáta, Bálint Mónika, Hetényi Csaba, Csepregi Rita, Poór Miklós. Dihydrocitrinon kölcsönhatásának vizsgálata szérum albuminnal. *TOX2018 Tudományos Konferencia* (Lillafüred, Magyarország, 2018.10.17-19.; poszter)

**Zelma Faisal**, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Lajos Szente, Miklós Poór. Effects of native and chemically modified beta-cyclodextrins on the in vitro cytotoxicity of zearalenone. *41<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop* (Lisszabon, Portugália, 2019.05.06-08.; poszter)

Virág Vörös, **Zelma Faisal**, Rita Csepregi, Tamás Kőszegi, Miklós Poór. Testing the interactions of deoxynivalenol, patulin, and T-2 toxin with human serum albumin. *41<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop* (Lisszabon, Portugália, 2019.05.06-08.; poszter)



Garai Edina, **Faisal Zelma**, Bakos Katalin, Szente Lajos, Urbányi Béla, Poór Miklós, Csenki Zsolt, A béta-cyclodextrinek védőhatása a zearalenon által indukált toxicitásra TG(VTG1:MCHERRY) zebradánió embriókban. ***TOX2019 Tudományos Konferencia*** (Szeged, Magyarország, 2019.10.09-11.; poszter)

**Kumulatív impakt faktor: 53,087**

**Független hivatkozások összesen: 32**

## 9. Irodalomjegyzék

Abid-Essefi S, Ouanes Z, Hassen W, Baudrimont I, Creppy E, Bacha H. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol In Vitro*. **2004**, 18, 467-74.

Agahi F, Font G, Juan C, Juan-García A. Individual and combined effect of zearalenone derivatives and beauvericin mycotoxins on SH-SY5Y cells. *Toxins*. **2020**, 12, 212.

Aghamohammadi M, Alizadeh N. Fluorescence enhancement of the aflatoxin B1 by forming inclusion complexes with some cyclodextrins and molecular modeling study. *J Lumines*. **2007**, 127, 575-582.

Ahamed S, Foster JS, Bukovsky A, Wimalasena J. Signal transduction through the Ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells. *Mol Carcinog*. **2001**, 30, 88-98.

Aichinger G, Pantazi F, Marko D. Combinatory estrogenic effects of bisphenol A in mixtures with alternariol and zearalenone in human endometrial cells. *Toxicol Lett*. **2020**, 319, 242-249.

Al-Rawashdeh N. Effect of organic solvents on the inclusion of sparfloxacin and norfloxacin with  $\beta$ -cyclodextrin. *Asian J Chem*. **2004**, 16, 483-488.

Alshannaq A, Yu JH. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int J Environ Res Public Health*. **2017**, 14, 632.

Amadasi A, Dall'asta C, Ingletto G, Pela R, Marchelli R, Cozzini P. Explaining cyclodextrin-mycotoxin interactions using a 'natural' force field. *Bioorg Med Chem*. **2007**, 15, 4585-94.

Appell M, Evans KO, Jackson MA, Compton DL. Determination of ochratoxin A in grape juice and wine using nanosponge solid phase extraction clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. **2018**, 41, 949-954.

Appell M, Jackson MA. Sorption of ochratoxin A from aqueous solutions using  $\beta$ -cyclodextrin-polyurethane polymer. *Toxins*. **2012**, 4, 98-109.

Appell M, Jackson MA. Synthesis and evaluation of cyclodextrin-based polymers for patulin extraction from aqueous solutions. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. **2010**, 68, 117-122.

Armstrong DW. Chiral Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers: A Mini-Review. *J Liq Chromatogr*. **1984**, 7, 353-376.

Ascenzi P, Bocedi A, Notari S, Fanali G, Fesce R, Fasano M. Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin. *Mini Rev Med Chem.* **2006**, 6, 483-9.

Ascenzi P, Fasano M. Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin. *Biophys Chem.* **2010**, 148, 16-22.

Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto JC, Rial-Otero R, Simal-Gándara J. A review on the use of cyclodextrins in food. *Food Hydrocoll.* **2009**, 23, 1631-1640.

Ben Salah-Abbès J, Abbès S, Houas Z, Abdel-Wahhab MA, Oueslati R. Zearalenone induces immunotoxicity in mice: possible protective effects of radish extract (*Raphanus sativus*). *J Pharm Pharmacol.* **2008**, 60, 761-70.

Bennett GA, Peplinski AJ, Brekke OL, Jackson LK, Wichser WR. Zearalenone—distribution in dry-milled fractions of contaminated corn. *Cereal Chem.* **1976**, 53, 299-307.

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* **2003**, 16, 497-516.

Berney C, Danuser G. FRET or no FRET: a quantitative comparison. *Biophys J.* **2003**, 84, 3992-4010.

Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger SD, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J. Masked mycotoxins: a review. *Mol Nutr Food Res.* **2013**, 57, 165-86.

Biehl ML, Prelusky DB, Koritz GD, Hartin KE, Buck WB and Trenholm HL. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1993**, 121, 152-159.

Binder SB, Schwartz-Zimmermann HE, Varga E, Bichl G, Michlmayr H, Adam G, Berthiller F. Metabolism of Zearalenone and Its Major Modified Forms in Pigs. *Toxins.* **2017**, 9, 56.

Bravin F, Duca RC, Balaguer P, Delaforge M. In vitro cytochrome p450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: possible occurrence of this metabolite in vivo. *Int J Mol Sci.* **2009**, 10, 1824-37.

Bullerman LB, Bianchini A. Stability of mycotoxins during food processing. *Int J Food Microbiol.* **2007**, 119, 140-6.

Caglayan MO, Şahin S, Üstündağ Z. Detection strategies of zearalenone for food safety: A Review. *Crit Rev Anal Chem.* **2020**, 1-20. online, DOI: <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1797468>

Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.* **1994**, 45, 153-203.

Catteuw A, Broekaert N, De Baere S, Lauwers M, Gasthuys E, Huybrechts B, Callebaut A, Ivanova L, Uhlig S, De Boevre M, De Saeger S, Gehring R, Devreese M, Croubels S. Insights into In vivo absolute oral bioavailability, biotransformation, and toxicokinetics of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol, zearalenone-14-glucoside, and zearalenone-14-sulfate in pigs. *J Agric Food Chem.* **2019**, 67, 3448-3458.

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT02939547, A Phase I Study to Evaluate the Single and Multiple-dose Pharmacokinetics of Intravenous Trappsol Cyclo (HP-Beta-CD) in Patients With Niemann-Pick Disease Type C (NPC-1) and the Effects of Dosing Upon Biomarkers of NPC Disease; **2016** Sept 21, online, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02939547?term=NCT02939547&draw=2&rank=1>

Coffey R, Cummins E, Ward S. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. *Food Control.* **2009**, 20, 239-249.

Conková E, Laciaková A, Pástorová B, Seidel H, Kovác G. The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. *Toxicol Lett.* **2001**, 121, 145-9.

Crini G. Review: a history of cyclodextrins. *Chem Rev.* **2014**, 114, 10940-75.

Croft AP, Bartsch RA. Synthesis of chemically modified cyclodextrins. *Tetrahedron.* **1983**, 39, 1417-1474.

Dall'Asta C, Faccini A, Galaverna G, Corradini R, Dossena A, Marchelli R. Complexation of the mycotoxin zearalenone with  $\beta$ -cyclodextrin: study of the interaction and first promising applications. *Mycotoxin Res.* **2008**, 24, 14-18.

Dall'Asta C, Faccini A, Galaverna G, Corradini R, Dossena A, Marchelli R. Complexation of zearalenone and zearalenols with native and modified  $\beta$ -cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* **2009**, 64, 331-340.

Dall'Asta C, Ingletto G, Corradini R, Galaverna G, Marchelli R. Fluorescence enhancement of aflatoxins using native and substituted cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* **2003**, 45, 257-263.

Dall'Erta A, Cirilini M, Dall'Asta M, Del Rio D, Galaverna G, Dall'Asta C. Masked mycotoxins are efficiently hydrolyzed by human colonic microbiota releasing their aglycones. *Chem Res Toxicol.* **2013**, 26, 305-12.

Dänicke S, Swiech E, Buraczewska L, Ueberschär KH. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr.* **2005**, 89, 268-76.

De Boevre M, Diana Di Mavungu J, Landschoot S, Audenaert K, Eeckhout M, Maene P, Haesaert G, De Saeger S. Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotoxin J.* **2012**, 5, 207-219.

Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* **2004**, 39, 1033-1046.

Dellafiora L, Galaverna G, Righi F, Cozzini P, Dall'Asta C. Assessing the hydrolytic fate of the masked mycotoxin zearalenone-14-glucoside - A warning light for the need to look at the "maskedome". *Food Chem Toxicol.* **2017**, 99, 9-16.

Di Mavungu JD: Masked mycotoxins in food and feed: challenges and analytical approaches. In: De Saeger S (szerk.): Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Sawston, Egyesült Királyság, **2011**, 385-400.

Drzymala SS, Binder J, Brodehl A, Penkert M, Rosowski M, Garbe LA, Koch M. Estrogenicity of novel phase I and phase II metabolites of zearalenone and cis-zearalenone. *Toxicon.* **2015**, 105, 10-2.

EFSA – European Food Safety Authority, Panel on contaminants in the food chain. Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA J.* **2014**, 12, 3916.

EFSA – European Food Safety Authority, Panel on contaminants in the food chain. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA J.* **2011**, 9, 2197.

EFSA – European Food Safety Authority, Panel on contaminants in the food chain. Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA J.* **2017**, 15, 4851.

Enoch MV, Rajamohan R, Swaminathan M. Fluorimetric and prototropic studies on the inclusion complexation of 3,3'-diaminodiphenylsulphone with beta-cyclodextrin and its unusual behavior. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **2010**, 77, 473-7.

Enoch MV, Yousuf S.  $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complexes of 2-hydroxyfluorene and 2-hydroxy-9-fluorenone: differences in stoichiometry and excited state prototropic equilibrium. *J Solution Chem.* **2013**, 42, 470-484.

European Commission Commission recommendation (2006/576/EU) of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off. J. Eur. Union.* **2006**, 49, 7–9.

European Commission Commission regulation (1126/2007) of 28 September 2007 amending Regulation (1881/2006) on setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. *Off. J. Eur. Union.* **2007**, 50, 14-17.

Ezekiel CN, Abia WA, Braun D, Šarkanj B, Ayeni KI, Oyedele OA, Michael-Chikezie EC, Ezekiel VC, Mark B, Ahuchaogu CP, Krska R, Sulyok M, Turner PC, Warth B. Comprehensive mycotoxin exposure biomonitoring in breastfed and non-exclusively breastfed Nigerian children. *MedRxiv* 2020, online, DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.05.28.20115055>

Faisal Z, Derdák D, Lemli B, Kunsági-Máté S, Bálint M, Hetényi C, Csepregi R, Kőszegi T, Sueck F, Cramer B, Humpf HU, Poór M. Interaction of 2'R-ochratoxin A with serum albumins: binding site, effects of site markers, thermodynamics, species differences of albumin-binding, and influence of albumin on its toxicity in mdck cells. *Toxins*. **2018a**, 10, 353.

Faisal Z, Fliszár-Nyúl E, Dellafiora L, Galaverna G, Dall'Asta C, Lemli B, Kunsági-Máté S, Sente L, Poór M. Cyclodextrins can entrap zearalenone-14-glucoside: interaction of the masked mycotoxin with cyclodextrins and cyclodextrin bead polymer. *Biomolecules*. **2019c**, 9, 354.

Faisal Z, Fliszár-Nyúl E, Dellafiora L, Galaverna G, Dall'Asta C, Lemli B, Kunsági-Máté S, Sente L, Poór M. Interaction of zearalenone-14-sulfate with cyclodextrins and the removal of the modified mycotoxin from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer. *J Mol Liq*. **2020d**, 310, 113236.

Faisal Z, Garai E, Csepregi R, Bakos K, Fliszár-Nyúl E, Sente L, Balázs A, Cserhádi M, Kőszegi T, Urbányi B, Csenki Z, Poór M. Protective effects of beta-cyclodextrins vs. zearalenone-induced toxicity in HeLa cells and Tg(vtg1:mCherry) zebrafish embryos. *Chemosphere*. **2020b**, 240, 124948.

Faisal Z, Kunsági-Máté S, Lemli B, Sente L, Bergmann D, Humpf HU, Poór M. Interaction of dihydrocitrinone with native and chemically modified cyclodextrins. *Molecules*. **2019b**, 24, 1328.

Faisal Z, Lemli B, Szerencsés D, Kunsági-Máté S, Bálint M, Hetényi C, Kuzma M, Mayer M, Poór M. Interactions of zearalenone and its reduced metabolites  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol with serum albumins: species differences, binding sites, and thermodynamics. *Mycotoxin Res*. **2018b**, 34, 269-278.

Faisal Z, Vörös V, Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Kunsági-Máté S, Csepregi R, Kőszegi T, Zsila F, Poór M. Probing the Interactions of Ochratoxin B, Ochratoxin C, Patulin, Deoxynivalenol, and T-2 Toxin with Human Serum Albumin. *Toxins*. **2020a**, 12, 392.

Faisal Z, Vörös V, Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Kunsági-Máté S, Poór M. Interactions of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol, zearalenone-14-sulfate, and zearalenone-14-glucoside with serum albumin. *Mycotoxin Res*. **2020c**, 36, 389-397.

Faisal Z, Vörös V, Lemli B, Derdák D, Kunsági-Máté S, Bálint M, Hetényi C, Csepregi R, Kőszegi T, Bergmann D, Sueck F, Humpf HU, Hübner F, Poór M. Interaction of the mycotoxin metabolite dihydrocitrinone with serum albumin. *Mycotoxin Res.* **2019a**, 35, 129-139.

Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med.* **2012**, 33, 209-90.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization - World Health Organization), **2000**. Zearalenone. Prepared by the Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). In: Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, WHO Food Additives Series 44. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.

Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, Notari S, Ascenzi P. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life.* **2005**, 57, 787-96.

Fenyvesi É, Vikmon M, Szente L. Cyclodextrins in food technology and human nutrition: benefits and limitations. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2016**, 56, 1981-2004.

Fink-Gremmels J, Malekinejad H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim Feed Sci Technol.* **2007**, 137, 326-341.

Fitzpatrick DW, Picken CA, Murphy LC, Buhr MM. Measurement of the relative binding affinity of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol.* **1989**, 94, 691-4.

Fleck SC, Hildebrand AA, Müller E, Pfeiffer E, Metzler M. Genotoxicity and inactivation of catechol metabolites of the mycotoxin zearalenone. *Mycotoxin Res.* **2012**, 28, 267-73.

Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Kunsági-Máté S, Dellafiora L, Dall'Asta C, Cruciani G, Pethő G, Poór M. Interaction of mycotoxin alternariol with serum albumin. *Int J Mol Sci.* **2019a**, 20, 2352.

Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Kunsági-Máté S, Szente L, Poór M, Interactions of mycotoxin alternariol with cyclodextrins and its removal from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer. *Biomolecules*, **2019b**, 9, 428.

Fliszár-Nyúl E, Szabó Á, Szente L, Poór M, Extraction of mycotoxin alternariol from red wine and from tomato juice with beta-cyclodextrin bead polymer. *J Mol Liq.* **2020**, 319, 1141.

Foo KY, Hameed BH. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chem Eng J.* **2010**, 156, 2-10.

Freire L, Sant'Ana AS. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food Chem Toxicol.* **2018**, 111, 189-205.

Frizzell C, Ndossi D, Verhaegen S, Dahl E, Eriksen G, Sørli M, Ropstad E, Muller M, Elliott CT, Connolly L. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicol Lett.* **2011**, 206, 210-7.

Fruhauf S, Novak B, Nagl V, Hackl M, Hartinger D, Rainer V, Labudová S, Adam G, Aleschko M, Moll WD, Thamhesl M, Grenier B. Biotransformation of the mycotoxin zearalenone to its metabolites hydrolyzed zearalenone (HZEN) and decarboxylated hydrolyzed zearalenone (DHZEN) diminishes its estrogenicity in vitro and in vivo. *Toxins.* **2019**, 11, 481.

Gajęcka M, Zielonka L, Dąbrowski M, Gajęcki M. Threats resulting from the presence of zearalenone in water. *Med Weter.* **2011**, 67, 10.

Galaverna G, Dall'Asta C, Corradini R, Dossena A, Marchelli R. Cyclodextrins as selectors for mycotoxin recognition. *World Mycotoxin J.* **2008**, 1, 397-406.

Gans P, Sabatini A, Vacca A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta.* **1996**, 43, 1739.

García-Zubiri IX, González-Gaitano G, Isasi JR. Sorption models in cyclodextrin polymers: Langmuir, Freundlich, and a dual-mode approach. *J Colloid Interface Sci.* **2009**, 337, 11-8.

Gareis M, Bauer J, Thiem J, Plank G, Grabley S, Gedek B. Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxin, during digestion in swine. *Zentralbl Veterinarmed B.* **1990**, 37, 236-40.

Ghédira-Chékir L, Maaroufi K, Zakhama A, Ellouz F, Dhouib S, Creppy EE, Bacha H. Induction of a SOS repair system in lysogenic bacteria by zearalenone and its prevention by vitamin E. *Chem Biol Interact.* **1998**, 113, 15-25.

González-Arias CA, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: A review. *World Mycotoxin J.* **2013**, 6, 167-184.

Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. *Food Chem Toxicol.* **2005**, 43, 1451-9.

Gupta RC, Mostrom MS, Evans TJ: Chapter 76 - Zearalenone. In: Gupta RC (szerk.). *Veterinary Toxicology* (3. kiadás), Academic Press. Cambridge, MA, Amerikai Egyesült Államok, **2018**, 1055-1063.



- Hagelberg S, Hult K, Fuchs R. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J Appl Toxicol.* **1989**, 9, 91-6.
- Harada A, Furue M, Nozakura S. Cyclodextrin-containing polymers. 2. Cooperative effects in catalysis and binding. *Macromolecules.* **1976**, 9, 705-710.
- Hashemi J, Alizadeh N. Investigation of solvent effect and cyclodextrins on fluorescence properties of ochratoxin A. *Spectroc Acta Pt A-Molec Biomolec Spectr.* **2009**, 73, 121-126.
- He J, Wei C, Li Y, Liu Y, Wang Y, Pan J, Liu J, Wu Y, Cui S. Zearalenone and alpha-zearalenol inhibit the synthesis and secretion of pig follicle stimulating hormone via the non-classical estrogen membrane receptor GPR30. *Mol Cell Endocrinol.* **2018**, 461, 43-54.
- Hein KL, Kragh-Hansen U, Morth JP, Jeppesen MD, Otzen D, Møller JV, Nissen P. Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. *J Struct Biol.* **2010**, 171, 353-60.
- Hidy PH, Baldwin RS, Greasham RL, Keith CL, McMullen JR. Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. *Adv Appl Microbiol.* **1977**, 22, 59-82.
- Holcomb M, Wilson DM, Trucksess MW, Thompson HC Jr. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *J Chromatogr.* **1992**, 624, 341-52.
- Hu T, Liu Y. Probing the interaction of cefodizime with human serum albumin using multi-spectroscopic and molecular docking techniques. *J Pharm Biomed Anal.* **2015**, 107, 325-332.
- Huff WE, Hagler WM Jr. Density segregation of corn and wheat naturally contaminated with aflatoxin, deoxynivalenol and zearalenone. *J Food Prot.* **1985**, 48, 416-420.
- Hurd RN: Structure activity relationships in zearalenones. In: Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA (szerk.) *Mycotoxins in Human and Animal Health*, Pathotox Publishers. Park Forest South, IL, Amerikai Egyesült Államok, **1977**, 379-391.
- Ieko T, Inoue S, Inomata Y, Inoue H, Fujiki J, Iwano H. Glucuronidation as a metabolic barrier against zearalenone in rat everted intestine. *J Vet Med Sci.* **2020**, 82, 153-161.
- International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 56. *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*. Lyon, France: IARC; **1993**. online, <https://publications.iarc.fr/74>
- Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci.* **1997**, 86, 147-62.

- Islam MR, Kim JW, Roh YS, Kim JH, Han KM, Kwon HJ, Lim CW, Kim B. Evaluation of immunomodulatory effects of zearalenone in mice. *J Immunotoxicol.* **2017**, 14, 125-136.
- Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* **2018**, 535, 272-284.
- Jurić A, Ćorić N, Odak A, Herceg Z, Tišma M. Analysis of total polyphenols, bitterness and haze in pale and dark lager beers produced under different mashing and boiling conditions. *J Inst Brew.* **2015**, 121, 541-547.
- Kaspchak E, Mafra LI, Mafra MR. Effect of heating and ionic strength on the interaction of bovine serum albumin and the antinutrients tannic and phytic acids, and its influence on in vitro protein digestibility. *Food Chem.* **2018**, 252, 1-8.
- Keating GM. Sugammadex: A Review of Neuromuscular Blockade Reversal. *Drugs.* **2016**, 76, 1041-1052.
- Kouadio JH, Mobio TA, Baudrimont I, Moukha S, Dano SD, Creppy EE. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology.* **2005**, 213, 56-65.
- Kőszegi T, Poór M. Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins.* **2016**, 8, 111.
- Kragh-Hansen U. Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin–ligand complexes. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* **2013**, 1830, 5535-5544.
- Kuciel-Lisieska G, Obremski K, Stelmachów J, Gajecka M, Zielonka Ł, Jakimiuk E, Gajecki M. Presence of zearalenone in blood plasma in women with neoplastic lesions in the mammary gland. *Bull Vet Inst Pulawy.* **2008**, 52, 671-674.
- Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol.* **1987**, 7, 253-306.
- Kumagai S. Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food Chem Toxicol.* **1985**, 23, 941-3.
- Kuzdraliński A, Solarska E, Muszynska M. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Food Control.* **2013**, 29, 22-24.
- Landy D, Mallard I, Ponchel A, Monflier E, Fourmentin S. Remediation technologies using cyclodextrins: an overview. *Environ Chem Lett.* **2012**, 10, 225-237.
- Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol.* **2004**, 113, 224-30.

- Laza-Knoerr AL, Gref R, Couvreur P. Cyclodextrins for drug delivery. *J Drug Target*. **2010**, 18, 645-56.
- Leal T, Abrunhosa L, Domingues L, Venâncio A, Oliveira C. BSA-based sample clean-up columns for ochratoxin A determination in wine: Method development and validation. *Food Chem*. **2019**, 300, 125204.
- Leblanc JC, Tard A, Volatier JL, Verger P. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Addit Contam*. **2005**, 22, 652-72.
- Lefyedi ML, Taylor JRN. Effect of dilute alkaline steeping on the microbial contamination, toxicity and diastatic power of sorghum malt. *J Inst Brew*. **2006**, 112, 108-116.
- Lemke SL, Grant PG, Phillips TD. Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. *J Agric Food Chem*. **1998**, 46, 3789-3796.
- Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol*. **2010**, 62, 1607-21.
- Lorenz N, Dänicke S, Edler L, Gottschalk C, Lassek E, Marko D, Rychlik M, Mally A. A critical evaluation of health risk assessment of modified mycotoxins with a special focus on zearalenone. *Mycotoxin Res*. **2019**, 35, 27-46.
- Lovelace CE, Nyathi CB. Estimation of the fungal toxins, zearalenone and aflatoxin, contaminating opaque maize beer in Zambia. *J Sci Food Agric*. **1977**, 28, 288-92.
- Ma L, Maragos CM, Zhang Y. Interaction of zearalenone with bovine serum albumin as determined by fluorescence quenching. *Mycotoxin Res*. **2018**, 34, 39-48.
- Ma Y, Fan B, Zhou T, Hao H, Yang B, Sun H. Molecular assembly between weak crosslinking cyclodextrin polymer and trans-cinnamaldehyde for corrosion inhibition towards mild steel in 3.5% NaCl solution: experimental and theoretical studies. *Polymers*. **2019**, 11, 635.
- Maragos CM, Appell M. Capillary electrophoresis of the mycotoxin zearalenone using cyclodextrin-enhanced fluorescence. *J Chromatogr A*. **2007**, 1143, 252-7.
- Maragos CM, Appell M, Lippolis V, Visconti A, Catucci L, Pascale M. Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. **2008**, 25, 164-71.
- Marin DE, Pistol GC, Bulgaru CV, Taranu I. Cytotoxic and inflammatory effects of individual and combined exposure of HepG2 cells to zearalenone and its metabolites. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. **2019**, 392, 937-947.

- Marin DE, Taranu I, Burlacu R, Tudor DS. Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. *Toxicol*. **2010**, 56, 956-63.
- Marin ML, Murtha J, Dong W, Pestka JJ. Effects of mycotoxins on cytokine production and proliferation in EL-4 thymoma cells. *J Toxicol Environ Health*. **1996**, 48, 379-96.
- Massart F, Meucci V, Saggese G, Soldani G. High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. *J Pediatr*. **2008**, 152, 690-695.e1.
- Massart F, Saggese G. Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *Int J Androl*. **2010**, 33, 369-76.
- Metzler M, Pfeiffer E, Hildebrand AA. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin J*. **2010**, 3, 385-401.
- Minervini F, Dell'Aquila ME. Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. *Int J Mol Sci*. **2008**, 9, 2570-2584.
- Minervini F, Giannoccaro A, Cavallini A, Visconti A. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicol Lett*. **2005**, 159, 272-83.
- Mirocha CJ, Pathre SV, Robison TS. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet Toxicol*. **1981**, 19, 25-30.
- Morillo E, Madrid F, Lara-Moreno A, Villaverde J. Soil bioremediation by cyclodextrins. A review. *Int J Pharm*. **2020**, 591, 119943.
- Morin-Crini N, Crini G. Environmental applications of water-insoluble  $\beta$ -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *Prog Polym Sci*. **2013**, 38, 344-368.
- Mostrom M: Chapter 54 - Trichothecenes and zearalenone. In: Gupta RC (szerk.) Reproductive and Developmental Toxicology, Academic Press. Cambridge, MA, Amerikai Egyesült Államok, **2011**, Pages 739-751.
- Mousavi Khaneghah A, Fakhri Y, Raeisi S, Armoon B, Sant'Ana AS. Prevalence and concentration of ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and total aflatoxin in cereal-based products: A systematic review and meta-analysis. *Food Chem Toxicol*. **2018**, 118, 830-848.
- Mukherjee D, Royce SG, Alexander JA, Buckley B, Isukapalli SS, Bandera EV, Zarbl H, Georgopoulos PG. Physiologically-based toxicokinetic modeling of zearalenone and its metabolites: application to the Jersey girl study. *PLoS One*. **2014**, 9, e113632.

Nag K, Singh DR, Shetti AN, Kumar H, Sivashanmugam T, Parthasarathy S. Sugammadex: A revolutionary drug in neuromuscular pharmacology. *Anesth Essays Res.* **2013**, 7, 302-6.

National Toxicology Program. Carcinogenesis Bioassay of Zearalenone (CAS No. 17924-92-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Study). Natl Toxicol Program Tech Rep Ser. **1982**, 235, 1-155.

[https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt\\_rpts/tr235.pdf?utm\\_source=direct&utm\\_medium=prod&utm\\_campaign=ntpgolinks&utm\\_term=tr235](https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr235.pdf?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpgolinks&utm_term=tr235)

Nkwe DO, Taylor JE, Siame BA. Fungi, aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. *Mycopathologia.* **2005**, 160, 177-86.

Odhav B, Naicker V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Addit Contam.* **2002**, 19, 55-61.

Okoye ZSC. Zearalenone in native cereal beer brewed in Jos metropolis of Nigeria. *J Food Saf.* **1986**, 7, 233-239.

Olsen M, Pettersson H, Sandholm K, Visconti A, Kiessling KH. Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa in vitro. *Food Chem Toxicol.* **1987**, 25, 681-3.

Otagiri M. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab Pharmacokinet.* **2005**, 20, 309-23.

Periasamy A, Mazumder N, Sun Y, Christopher KG, Day RN: Chapter 7 - FRET Microscopy: Basics, Issues and Advantages of FLIM-FRET Imaging. In: Becker W (szerk.) *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*. Springer Series in Chemical Physics, vol 111. Springer, Cham, Svájc, **2015**, 249-276.

Perry JL, Christensen T, Goldsmith MR, Toone EJ, Beratan DN, Simon JD. Binding of ochratoxin A to human serum albumin stabilized by a protein–ligand ion pair. *J Phys Chem B.* **2003b**, 107, 31, 7884-7888.

Perry JL, Il'ichev YV, Kempf VR, McClendon J, Park G, Manderville RA, Rüker F, Dockal M, Simon JD. Binding of ochratoxin A derivatives to human serum albumin. *J. Phys. Chem. B* **2003a**, 107, 6644-6647.

Peters T Jr. Serum albumin. *Adv Protein Chem.* **1985**, 37, 161-245.

Peters T Jr. Serum albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clin Chem.* **1977**, 23, 5-12.

Pfeiffer E, Hildebrand A, Damm G, Rapp A, Cramer B, Humpf HU, Metzler M. Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone in vitro. *Mol Nutr Food Res.* **2009**, 53, 1123-33.

- Pfohl-Leszkowicz A, Chekir-Ghedira L, Bacha H. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis*. **1995**, 16, 2315-20.
- Pitha J, Hoshino T. Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl orange. *Int J Pharm*. **1992**, 80, 243-251.
- Plasencia J, Mirocha CJ. Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. *Appl Environ Microbiol*. **1991**, 57, 146-50.
- Póór M, Bálint M, Hetényi C, Góder B, Kunsági-Máté S, Kőszegi T, Lemli B. Investigation of non-covalent interactions of aflatoxins (B1, B2, G1, G2, and M1) with serum albumin. *Toxins*. **2017b**, 9, 339.
- Póór M, Kunsági-Máté S, Bálint M, Hetényi C, Gerner Z, Lemli B. Interaction of mycotoxin zearalenone with human serum albumin. *J Photochem Photobiol B*. **2017a**, 170, 16-24.
- Póór M, Kunsági-Máté S, Sali N, Kőszegi T, Sente L, Peles-Lemli B, Interactions of zearalenone with native and chemically modified cyclodextrins and their potential utilization. *J Photochem Photobiol B, Biol*. **2015c**, 151, 63-68.
- Póór M, Kunsági-Máté S, Sente L, Matisz G, Secenji G, Czibulya Z, Kőszegi T. Interaction of ochratoxin A with quaternary ammonium beta-cyclodextrin. *Food Chem*. **2015b**, 172, 143-9.
- Póór M, Lemli B, Bálint M, Hetényi C, Sali N, Kőszegi T, Kunsági-Máté S. Interaction of citrinin with human serum albumin. *Toxins*. **2015a**, 7, 5155-66.
- Póór M, Li Y, Kunsági-Máté S, Petrik J, Vladimir-Knežević S, Kőszegi T. Molecular displacement of warfarin from human serum albumin by flavonoid aglycones. *J Lumin*. **2013**, 142, 122-127.
- Póór M, Matisz G, Kunsági-Máté S, Derdák D, Sente L, Lemli B. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction of citrinin with native and chemically modified cyclodextrins. *J Lumines*. **2016**, 172, 23-28.
- Póór M, Zand A, Sente L, Lemli B, Kunsági-Máté S. Interaction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenols with  $\beta$ -cyclodextrins. *Molecules*. **2017c**, 22, 1910.
- Poppenberger B, Berthiller F, Bachmann H, Lucyshyn D, Peterbauer C, Mitterbauer R, Schuhmacher R, Krska R, Glössl J, Adam G. Heterologous expression of Arabidopsis UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-O-glucoside. *Appl Environ Microbiol*. **2006**, 72, 4404-10.

- Prelusky DB, Scott PM, Trenholm HL, Lawrence GA. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *J Environ Sci Health B*. **1990**, 25, 87-103.
- Rai A, Das M, Tripathi A. Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **2020**, 60, 2710-2729.
- Ramirez CM, Liu B, Taylor AM, Repa JJ, Burns DK, Weinberg AG, Turley SD, Dietschy JM. Weekly cyclodextrin administration normalizes cholesterol metabolism in nearly every organ of the Niemann-Pick type C1 mouse and markedly prolongs life. *Pediatr Res*. **2010**, 68, 309-15.
- Ramírez-Galicia G, Garduño-Juárez R, Gabriela Vargas M. Effect of water molecules on the fluorescence enhancement of aflatoxin B1 mediated by aflatoxin B1:beta-cyclodextrin complexes. A theoretical study. *Photochem Photobiol Sci*. **2007**, 6, 110-8.
- Ren ZH, Deng HD, Deng YT, Deng JL, Zuo ZC, Yu SM, Shen LH, Cui HM, Xu ZW, Hu YC. Effect of the Fusarium toxins, zearalenone and deoxynivalenol, on the mouse brain. *Environ Toxicol Pharmacol*. **2016**, 46, 62-70.
- Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. **2008**, 582, 1783-7.
- Ropejko K, Twarużek M. Zearalenone and its metabolites-general overview, occurrence, and toxicity. *Toxins*. **2021**, 13, E35.
- Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Serum albumin. *Hepatology*. **1988**, 8, 385-401.
- Rotter RG, Rotter BA, Thompson BK, Prelusky DB, Trenholm HL. Effectiveness of density segregation and sodium carbonate treatment on the detoxification of Fusarium-contaminated corn fed to growing pigs. *J Sci Food Agric*. **1995**, 68, 331-336.
- Rozga J, Piatek T, Małkowski P. Human albumin: old, new, and emerging applications. *Ann Transplant*. **2013**, 18, 205-217.
- Rychlik M, Humpf HU, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H, Lorenz N. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins. *Mycotoxin Res*. **2014**, 30, 197-205.
- Ryu D, Hanna MA, Bullerman LB. Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *J Food Prot*. **1999**, 62, 1482-1484.
- Ryu D, Hanna MA, Eskridge KM, Bullerman LB. Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system. *J Agric Food Chem*. **2003**, 51, 1746-8.
- Saenger W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew Chem Int Ed Eng*. **1980**, 19, 344.

Sáenz de Rodríguez CA, Bongiovanni AM, Conde de Borrego L. An epidemic of precocious development in Puerto Rican children. *J Pediatr.* **1985**, 107, 393-6.

Sáenz de Rodríguez CA. Environmental hormone contamination in Puerto Rico. *N Engl J Med.* **1984**, 310, 1741-2.

Sangare-Tigori B, Moukha S, Kouadio HJ, Betbeder AM, Dano DS, Creppy EE. Co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire. *Food Addit Contam.* **2006**, 23, 1000-7.

Šarkanj B, Ezekiel CN, Turner PC, Abia WA, Rychlik M, Krska R, Sulyok M, Warth B. Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. *Anal Chim Acta*, **2018**, 1019, 84-92.

Schwake-Anduschus C, Proske M, Sciarba E, Muenzing K, Koch M, Maul R. Distribution of deoxynivalenol, zearalenone, and their respective modified analogues in milling fractions of naturally contaminated wheat grains. *World Mycotoxin J.* **2015**, 8, 433-443.

Sharma L, Sharma A. Influence of cyclodextrin ring substituents on folding-related aggregation of bovine carbonic anhydrase. *Eur J Biochem.* **2001**, 268, 2456-63.

Shier WT, Shier AC, Xie W, Mirocha CJ. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol.* **2001**, 39, 1435-8.

Shin BS, Hong SH, Bulitta JB, Hwang SW, Kim HJ, Lee JB, Yang SD, Kim JE, Yoon HS, Kim do J, Yoo SD. Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels. *J Toxicol Environ Health Part A.* **2009**, 72, 1406-1411.

Shirasawa T, Ueda M, Appell M, Goto T. Use of cyclodextrin-based polymer for patulin analysis in apple juice. *Mycotoxins.* **2013**, 63, 1-8.

Stadler D, Berthiller F, Suman M, Schuhmacher R, Krska R. Novel analytical methods to study the fate of mycotoxins during thermal food processing. *Anal Bioanal Chem.* **2020**, 412, 9-16.

Stehle G, Wunder A, Schrenk HH, Hartung G, Heene DL, Sinn H. Albumin-based drug carriers: comparison between serum albumins of different species on pharmacokinetics and tumor uptake of the conjugate. *Anticancer Drugs.* **1999**, 10, 785-90.

Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol.* **2008**, 36, 30-42.

Stella VJ, Rao VM, Zannou EA, Zia VV. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Adv Drug Deliv Rev.* **1999**, 36, 3-16.



- Stob M, Baldwin RS, Tuite J, Andrews FN, Gillette KG. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*. **1962**, 196, 1318.
- Studer-Rohr I, Schlatter J, Dietrich DR. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Arch Toxicol*. **2000**, 74, 499-510.
- Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*. **1976**, 12, 1052-61.
- Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*. **1975**, 11, 824-32.
- Sueck F, Poór M, Faisal Z, Gertzen CGW, Cramer B, Lemli B, Kunsági-Máté S, Gohlke H, Humpf HU. Interaction of ochratoxin A and its thermal degradation product 2'R-ochratoxin A with human serum albumin. *Toxins*. **2018**, 10, 256.
- Sun F, Tan H, Li Y, De Boevre M, De Saeger S, Zhou J, Li Y, Rao Z, Yang S, Zhang H. Metabolic profile, bioavailability and toxicokinetics of zearalenone-14-glucoside in rats after oral and intravenous administration by liquid chromatography high-resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Int J Mol Sci*. **2019**, 20, 5473.
- Sun LH, Lei MY, Zhang NY, Zhao L, Krumm CS, Qi DS. Hepatotoxic effects of mycotoxin combinations in mice. *Food Chem Toxicol*. **2014**, 74, 289-93.
- Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev*. **1998**, 98, 1743-1754.
- Szente L, Harangi J, Greiner M, Mandel F. Cyclodextrins found in enzyme- and heat-processed starch-containing foods. *Chem Biodivers*. **2006**, 3, 1004-14.
- Szente L, Szemán J. Cyclodextrins in analytical chemistry: host-guest type molecular recognition. *Anal Chem*. **2013**, 85, 8024-30.
- Szente L. A fehérje-ciklodextrin kölcsönhatás terápiás és diagnosztikai jelentősége. *Magyar Kémiai Folyóirat - Kémiai Közlemények*, **2017**, 123, 210-216.
- Szuets P., Mesterhazy Á, Falkay G, Bartók T. Early telarche symptoms in children and their relations to zearalenon contamination in foodstuffs. *Cereal Res Commun*. **1997**, 25, 429-436.
- Tan H, Chen L, Ma L, Liu S, Zhou H, Zhang Y, Guo T, Liu W, Dai H, Yu Y. Fluorescence spectroscopic investigation of competitive interactions between quercetin and aflatoxin B<sub>1</sub> for binding to human serum albumin. *Toxins*. **2019**, 11, 214.
- Tomaszewski J, Miturski R, Semczuk A, Kotarski J, Jakowicki J. Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium. *Ginekol. Pol*. **1998**, 69, 363-6.

Trenholm HL, Charmley LL, Prelusky DB, Warner RM. Washing procedures using water or sodium carbonate solutions for the decontamination of three cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *J Agric Food Chem.* **1992**, 40, 2147-2151.

Tseng RL, Wu FC. Inferring the favorable adsorption level and the concurrent multi-stage process with the Freundlich constant. *J Hazard Mater.* **2008**, 155, 277-87.

Urry WH, Wehrmeister HL, Hodge EB, Hidy PH. The structure of zearalenone. *Tetrahedron Lett.* **1966**, 27, 3109-3114.

Utian WH. Comparative trial of P1496, a new non-steroidal oestrogen analogue. *Br Med J.* **1973**, 1, 579-81.

Vance JE, Karten B. Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *J Lipid Res.* **2014**, 55, 1609-21.

Vejdovszky K, Schmidt V, Warth B, Marko D. Combinatory estrogenic effects between the isoflavone genistein and the mycotoxins zearalenone and alternariol in vitro. *Mol Nutr Food Res.* **2017**, 61, 1600526.

Vendl O, Crews C, MacDonald S, Krska R, Berthiller F. Occurrence of free and conjugated Fusarium mycotoxins in cereal-based food. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* **2010**, 27, 1148-52.

Verrone R, Catucci L, Cosma P, Fini P, Agostiano A, Lippolis V, Pascale M. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin on spectroscopic properties of ochratoxin A in aqueous solution. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* **2007**, 57, 475-479.

Veršilovskis A, Geys J, Huybrechts B, Goossens E, De Saeger S, Callebaut A. Simultaneous determination of masked forms of deoxynivalenol and zearalenone after oral dosing in rats by LC-MS/MS. *World Mycotoxin J.* **2012**, 5, 303-318.

Videmann B, Mazallon M, Tep J, Lecoœur S. Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol.* **2008**, 46, 3279-86.

Vidyasagar T, Sujatha N, Sashidhar RB. Direct synthesis of aflatoxin B1-N7 guanine adduct: a reference standard for biological monitoring of dietary aflatoxin exposure in molecular epidemiological studies. *Food Addit Contam.* **1997**, 14, 457-67.

Visconti A, Pascale M. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A.* **1998**, 815, 133-140.

Wagner BD: Chapter 2 - The Effects of Cyclodextrins on Guest Fluorescence. In: Douhal A (szerk.) Cyclodextrin Materials Photochemistry, Photophysics and Photobiology, Elsevier Science. Amsterdam, Hollandia, **2006**, 27-59.

- Wang L, Kang Y, Xing CY, Guo K, Zhang XQ, Ding LS, Zhang S, Li BJ.  $\beta$ -Cyclodextrin based air filter for high-efficiency filtration of pollution sources. *J Hazard Mater.* **2019**, 373, 197-203.
- Wang Y, Li L, Wang CC, Leung LK. Effect of zearanol on expression of apoptotic and cell cycle proteins in murine placentae. *Toxicology.* **2013**, 314, 148-54.
- Wang Z, Zhang P, Hu F, Zhao Y, Zhu L. A crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin polymer used for rapid removal of a broad-spectrum of organic micropollutants from water. *Carbohydr Polym.* **2017**, 177, 224-231.
- Warth B, Preindl K, Manser P, Wick P, Marko D, Buerki-Thurnherr T. Transfer and metabolism of the xenoestrogen zearalenone in human perfused placenta. *Environ Health Perspect.* **2019**, 127, 107004.
- Weinstock J, Baldwin GS. Nucleotide sequence of porcine liver albumin. *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 9045.
- Welliver M, McDonough J. Anesthetic related advances with cyclodextrins. *Sci World J.* **2007**, 7, 364-71.
- Wu Q, Xu J, Xu H. Interactions of aflatoxin B1 and related secondary metabolites with native cyclodextrins and their potential utilization. *Food Control*, **2018**, 94, 102-107.
- Yamasaki K, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2013**, 1830, 5435-5443.
- Yang JY, Wang GX, Liu JL, Fan JJ, Cui S. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod Toxicol.* **2007**, 24, 381-7.
- Yang S, Zhang H, Zhang J, Li Y, Jin Y, Zhang S, De Saeger S, Li Y, Zhou J, Sun F, De Boevre M. Deglycosylation of zearalenone-14-glucoside in animals and human liver leads to underestimation of exposure to zearalenone in humans. *Arch Toxicol.* **2018**, 92, 2779-2791.
- Yazar S, Omurtag GZ. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *Int J Mol Sci.* **2008**, 9, 2062-2090.
- Yousuf S, Alex R, Selvakumar PM, Enoch IV, Subramanian PS, Sun Y. Picking out logic operations in a naphthalene  $\beta$ -diketone derivative by using molecular encapsulation, controlled protonation, and dna binding. *ChemistryOpen.* **2015**, 4, 497-508.
- Yu Z, Zhang L, Wu D, Liu F. Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells. *Ecotoxicol Environ Saf.* **2005**, 62, 441-6.

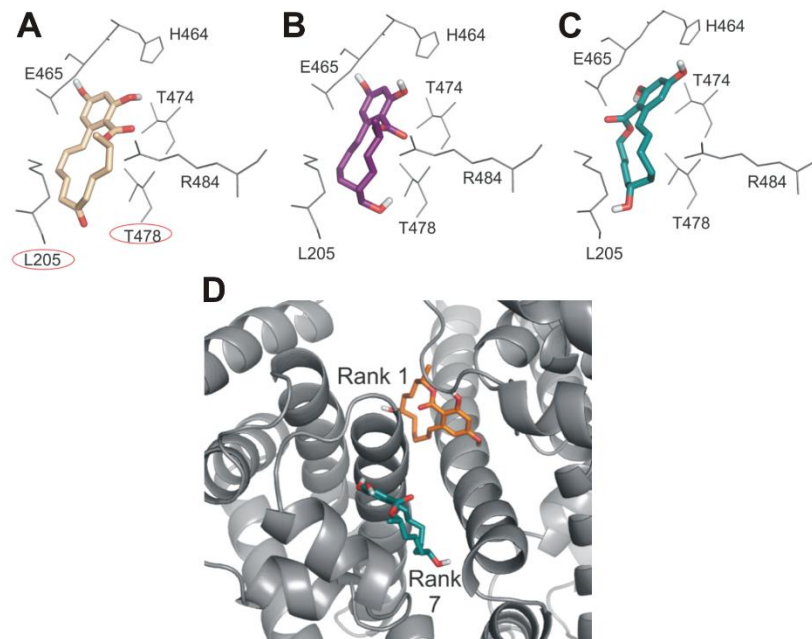
- Yumbe-Guevara BE, Imoto T, Yoshizawa T. Effects of heating procedures on deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone levels in naturally contaminated barley and wheat. *Food Addit Contam.* **2003**, 20, 1132-40.
- Zhao F, Li R, Xiao S, Diao H, El Zowalaty AE, Ye X. Multigenerational exposure to dietary zearalenone (ZEA), an estrogenic mycotoxin, affects puberty and reproduction in female mice. *Reprod Toxicol.* **2014**, 47, 81-8.
- Zhou C, Zhang Y, Yin S, Jia Z, Shan A. Biochemical changes and oxidative stress induced by zearalenone in the liver of pregnant rats. *Hum Exp Toxicol.* **2015**, 34, 65-73.
- Zhou Y, Chen J, Dong L, Lu L, Chen F, Hu D, Wang X. A study of fluorescence properties of citrinin in  $\beta$ -cyclodextrin aqueous solution and different solvents. *J Lumin.* **2012**, 132, 1437-1445.
- Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol.* **2007**, 45, 1-18.
- Zunszain PA, Ghuman J, McDonagh AF, Curry S. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha. *J Mol Biol.* **2008**, 381, 394-406.
- Zsila F. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. *Mol Pharm.* **2013**, 10, 1668-82.

## 10. Köszönetnyilvánítás

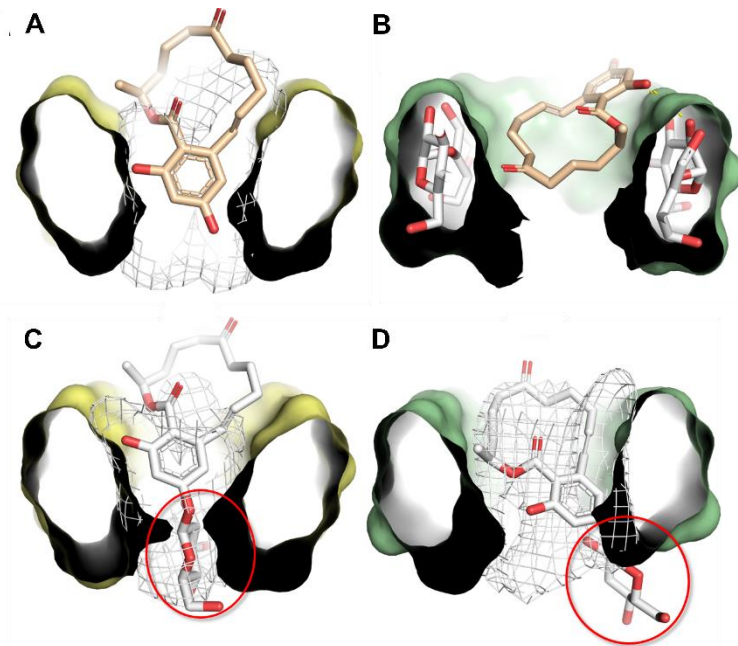
Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Poór Miklós egyetemi adjunktusnak a PhD tanulmányaim során nyújtott szakmai útmutatásáért, tanácsaiért, segítségéért és lelkiismeretes munkájáért. Szeretném megköszönni Prof. Dr. Pethő Gábornak, a Gyógyszerhatástani Tanszék, és a Toxicológia program vezetőjének, segítőkészségét, példamutató oktatói munkáját és hogy lehetőséget nyújtott a Tanszéken való munkámra. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Németi Baláznak, a Gyógyszerhatástani Tanszék korábbi vezetőjének, valamint Prof. Dr. Gregus Zoltánnak, a Toxicológia program korábbi vezetőjének, példamutató szakmai elhivatottságáért, segítőkészségéért és lelkiismeretes munkájáért. Köszönetet szeretnék mondani a disszertációm alapjául szolgáló közleményekben közreműködő kollaborátorainknak, Dr. Afshin Zandnak, Dr. Bálint Mónikának, Dr. Bencsik Tímeának, Dr. Chiara Dall’Astanak, Dr. Gianni Galavernanak, Dr. Hetényi Csabának, Dr. Kunsági-Máté Sándornak, Dr. Kuzma Mónikának, Dr. Lemli Beátának, Dr. Luca Dellafioranak, Dr. Mayer Mátyásnak, Dr. Sente Lajosnak és Szerencsés Dénesnek. Továbbá, szeretném megköszönni minden megjelent közleményünkben közreműködő és a jelenleg is futó kutatásainkban részt vállaló kollaborátorunk munkáját, valamint külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak és Csepregi Ritának a közös munkáink során nyújtott segítségükért. Továbbá, szeretnék köszönetet mondani Dr. Fliszár-Nyúl Eszter és Fábián Katalin kolléganőimnek, valamint Dr. Almásiné Rubint Eszternek és Schweibert Istvánnak a HPLC-analízisek kapcsán nyújtott segítségükért. Köszönöm korábbi és jelenlegi TDK-hallgatóim, Dr. Vörös Virág és Skaper Renáta, fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletek során végzett munkáját. Kiemelt köszönettel tartozom a Gyógyszerhatástani Tanszék munkatársainak, hogy vidám, örömteli környezetet biztosítottak a mindennapi munkámhoz. Köszönöm PhD-hallgató társamnak, Dr. Mohos Violetának, hogy jelenlétével és támogatásával átsegített a tanulmányaim során felmerülő nehézségeken. Továbbá köszönöm a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden tagjának, hogy helyet és szívélyes környezetet biztosítottak számunkra.

Végül szeretném megköszönni családomnak, szeretteimnek és barátaimnak a mérhetetlen támogatást, biztatást, és a biztos háttérrel, amit biztosítottak számomra, és ami nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat.

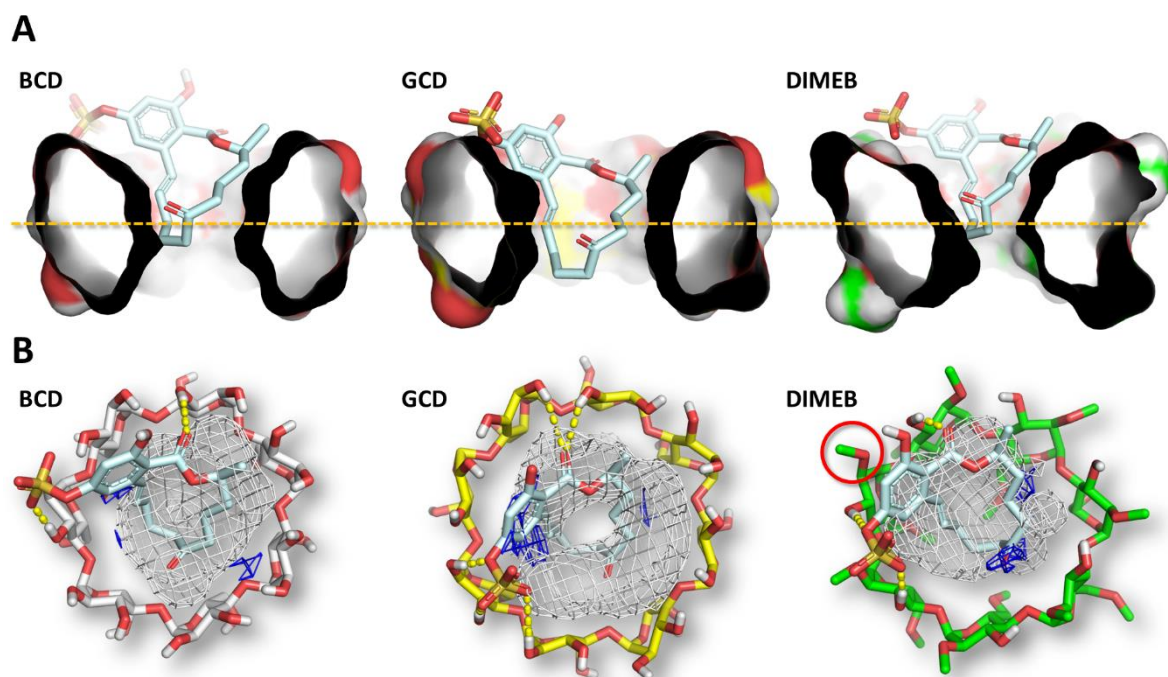
## 11. Mellékletek



**1. melléklet:** A ZEN (A) konformációja és kötőhelye HSA-on [Poór és mtsai., 2017a]. Az  $\alpha$ -ZEL (B) Rank 1, valamint  $\beta$ -ZEL (C) Rank 7 konformációja és kötőhelye HSA-on vak dokkolás alapján. A  $\beta$ -ZEL (D) vak dokkolás szerinti Rank 1 és Rank 7 kötőhelyei HSA-on [Faisal és mtsai., 2018b].



**2. melléklet:** A ZEN és Z14G CD-ekkel (metszett felület) kialakított kölcsönhatásának reprezentatív ábrázolása. (A) A ZEN-BCD komplexek reprezentatív ábrája, amelyen a fehér háló a BCD hidrofób üregét szemlélteti. (B) A ZEN-GCD komplexet szemléltető ábra. (C) A Z14G-BCD komplexet reprezentáló ábra, ahol a fehér háló a BCD hidrofób üregét szemlélteti, míg a piros kör a Z14G glükózid csoportját jelöli. (D) A Z14G-GCD komplexet bemutató ábra, amelyen a fehér háló a GCD hidrofób üregét szemlélteti, míg a piros kör a Z14G glükózid csoportját jelöli [Faisal és mtsai., 2019c].



**3. melléklet:** Z14S kölcsönhatásai BCD-nel, GCD-nel, és DIMEB-nel. **(A)** A CD-ek (metszett felület) és Z14S (pálcikák) komplexképződésének ábrázolása. **(B)** A komplexek ábrázolása, ahol a sárga pontozott vonalak a poláros kölcsönhatások kialakulását szemléltetik, míg a szürke háló a hidrofób, a kék háló a hidrogénkötés donor, a piros háló pedig a hidrogénkötés akceptor csoportok befogadására szterikusan és energetikailag alkalmas régiókat jelölik. A piros kör a DIMEB 2-O-metilációjának helyzetét jelzi, amely elősegítheti a Z14S aromás gyűrűjével való kölcsönhatást [Faisal és mtsai., 2020d].



Article

# Removal of Zearalenone and Zearalenols from Aqueous Solutions Using Insoluble Beta-Cyclodextrin Bead Polymer

Miklós Poór <sup>1,2,\*</sup>, Zelma Faisal <sup>1</sup>, Afshin Zand <sup>1</sup>, Tímea Bencsik <sup>3</sup>, Beáta Lemli <sup>2,4</sup>, Sándor Kunsági-Máté <sup>2,4</sup> and Lajos Szente <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary; faisal.zelma@gytk.pte.hu (Z.F.); af.zand@gmail.com (A.Z.)

<sup>2</sup> János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság útja 20, H-7624 Pécs, Hungary; lemli.beata@gytk.pte.hu (B.L.); kunsagi-mate.sandor@gytk.pte.hu (S.K.-M.)

<sup>3</sup> Institute of Pharmacognosy, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Rókus utca 2, H-7624 Pécs, Hungary; timea.bencsik@aok.pte.hu

<sup>4</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Rókus utca 2, H-7624 Pécs, Hungary

<sup>5</sup> CycloLab Cyclodextrin Research & Development Laboratory, Ltd., Illatos út 7, H-1097 Budapest, Hungary; szente@cyclolab.hu

\* Correspondence: poor.miklos@pte.hu; Tel.: +36-536-000 (ext. 34646)

Received: 17 April 2018; Accepted: 23 May 2018; Published: 25 May 2018



**Abstract:** Zearalenone (ZEN) is a *Fusarium*-derived mycotoxin, exerting xenoestrogenic effects in animals and humans. ZEN and its derivatives commonly occur in cereals and cereal-based products. During the biotransformation of ZEN, its reduced metabolites,  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL) and  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL), are formed;  $\alpha$ -ZEL is even more toxic than the parent compound ZEN. Since previous studies demonstrated that ZEN and ZELs form stable complexes with  $\beta$ -cyclodextrins, it is reasonable to hypothesize that cyclodextrin polymers may be suitable for mycotoxin removal from aqueous solutions. In this study, the extraction of ZEN and ZELs from water, buffers, and corn beer was investigated, employing insoluble  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer (BBP) as a mycotoxin-binder. Our results demonstrate that even relatively small amounts of BBP can strongly decrease the mycotoxin content of aqueous solutions (including beer). After the first application of BBP for mycotoxin binding, BBP could be completely reactivated through the elimination of ZEN from the cyclodextrin cavities by washing with a 50 v/v% ethanol-water mixture. Therefore, our study suggests that insoluble cyclodextrin polymers may be suitable tools in the future to deplete mycotoxins from contaminated drinks.

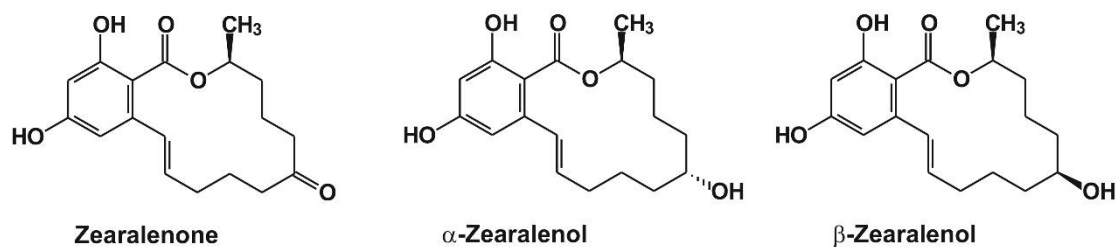
**Keywords:** zearalenone; zearalenols; beta-cyclodextrin bead polymer; toxin removal; beer

**Key Contribution:** In this study, the application of insoluble  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer (BBP) as mycotoxin binder was tested. BBP effectively removed zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol, and  $\beta$ -zearalenol from aqueous solutions and zearalenone from spiked corn beer samples, after which the reusability of BBP was verified as well.

## 1. Introduction

Zearalenone (ZEN) is a widespread mycotoxin produced by *Fusarium* fungi [1]. Despite ZEN having a non-steroidal structure (Figure 1), it is an endocrine disruptor molecule, exerting estrogenic effects in animals and humans [1,2]. After oral exposure to ZEN (through the consumption of

contaminated foodstuffs), it is extensively metabolized in humans and animals, during which both phase I and phase II reactions are involved, namely the reduction of ZEN to  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL) and  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL) (Figure 1), and the conjugation of ZEN and ZELs with glucuronic acid [3]. Glucuronidation yields less toxic compounds [4]; however,  $\alpha$ -ZEL is much more toxic than  $\beta$ -ZEL or even the parent compound ZEN, due to its higher affinity towards estrogen receptors [5–7]. The wide occurrence and high thermal stability of ZEN make its elimination from the food chain difficult [8]. ZEN commonly occurs as a contaminant in cereals (e.g., maize, wheat, rye, sorghum, or barley), and it also appears in spices, edible oils, milk, beer, and even in drinking water [1,9,10]. Contamination of milk and soy meal with ZELs has also been reported [11,12].



**Figure 1.** Chemical structure of zearalenone and its reduced metabolites,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol.

One of the most important cereal-based beverages is beer, which can be contaminated with several mycotoxins including ochratoxin A, aflatoxins, and *Fusarium*-derived mycotoxins [13]. The appearance of ZEN in beer has been described in numerous studies, showing a wide concentration range (from few nanomolar to micromolar) [14–18]. European and South American industrially produced beers are infrequently contaminated with mycotoxins [14]. However, home brewed South African beers commonly contain large amounts of ZEN due to the unregulated brewing procedure [15]. Furthermore, because yeasts are able to convert ZEN to ZELs [19] (e.g., during beer fermentation), lower amounts of  $\alpha$ - or  $\beta$ -ZEL can also appear in some beers [20].

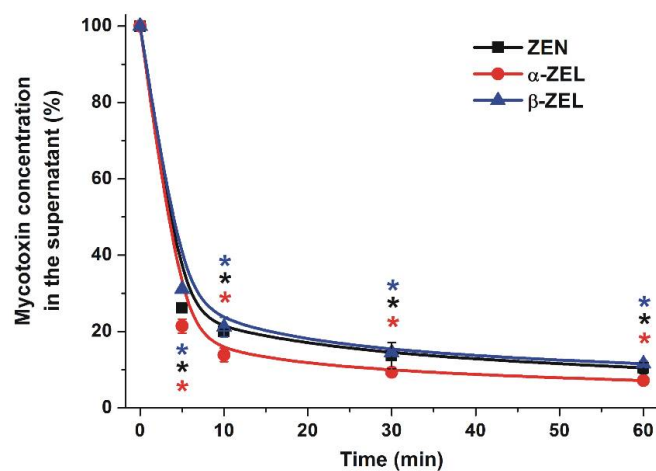
Cyclodextrins (CDs) are ring-shaped host molecules commonly applied in food, cosmetic, and pharmaceutical industries. The most important CDs are  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -CDs, containing six, seven, and eight glucose units, respectively. The external part of CDs is hydrophilic, leading to their perfect aqueous solubility, while their internal cavity is hydrophobic, permitting CDs to accommodate lipophilic molecules or moieties [21]. As previous investigations have highlighted,  $\beta$ -CDs can form complexes with several mycotoxins, including aflatoxins, citrinin, ochratoxin A, and ZEN [22–25]. The stability of mycotoxin-CD complexes is highly variable. For example, whereas the binding constants ( $K$ ) of aflatoxin B1- $\beta$ -CD ( $K = 400$  L/mol), citrinin- $\beta$ -CD ( $K = 220$  L/mol), and ochratoxin A- $\beta$ -CD ( $K = 150$  L/mol) complexes are relatively low, the stability of ZEN- $\beta$ -CD complex ( $K = 10,000$  L/mol) is more than 20 times higher [22–25]. Similarly to ZEN, its reduced metabolites,  $\alpha$ - and  $\beta$ -ZEL, also form stable complexes with  $\beta$ -CDs [26,27]. Considering the observations that both patulin [28] and ochratoxin A [29] can be successfully extracted from aqueous solutions by  $\beta$ -CD polymers, it is reasonable to hypothesize that ZEN can also be removed from water or beverages through the efficient complexation of ZEN with CDs.

In this study, the removal of ZEN,  $\alpha$ -ZEL, and  $\beta$ -ZEL from aqueous solutions by insoluble  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer (BBP) has been tested. Because  $\beta$ -CD molecules were bound to insoluble beads, after their interaction with mycotoxins, CDs (together with the bound mycotoxins) are easily removable from solutions by filtration or sedimentation. First, we determined the dependence of mycotoxin removal on the time, dose, pH, and temperature, and then tested the reusability of BBP after its regeneration with 50 v/v% ethanol-water mixture. Finally, the frequent occurrence of ZEN in maize led us to investigate the suitability of BBP for the removal of ZEN from corn beer. Our results demonstrate that BBP seems a promising tool to remove even high concentrations of ZEN (and/or ZELs) from aqueous solutions, including beverages.

## 2. Results

### 2.1. Removal of ZEN, $\alpha$ -ZEL, and $\beta$ -ZEL from Aqueous Solutions by BBP

In our first experiments, the time-dependence, dose-dependence, pH-dependence, and temperature-dependence of the removal of the mycotoxins from aqueous solutions were tested. In order to investigate the time-dependence, a relatively high amount of BBP was applied: 10 mg BBP was added to 1.5 mL of 10  $\mu$ M ZEN or ZEL solutions (dissolved in distilled water), and then the samples were incubated for 5, 10, 30, and 60 min at 25 °C in a thermomixer (1000 rpm). Figure 2 demonstrates that BBP remarkably decreased the concentrations of ZEN and ZELs in aqueous solutions, leading to approximately 85–90% reduction of their mycotoxin content after 60 min incubation. Furthermore, even after a 5 min incubation, approximately 70–80% decreases in ZEN and ZEL concentrations were observed, after which the mycotoxin concentrations decreased slightly during the following 55 min.

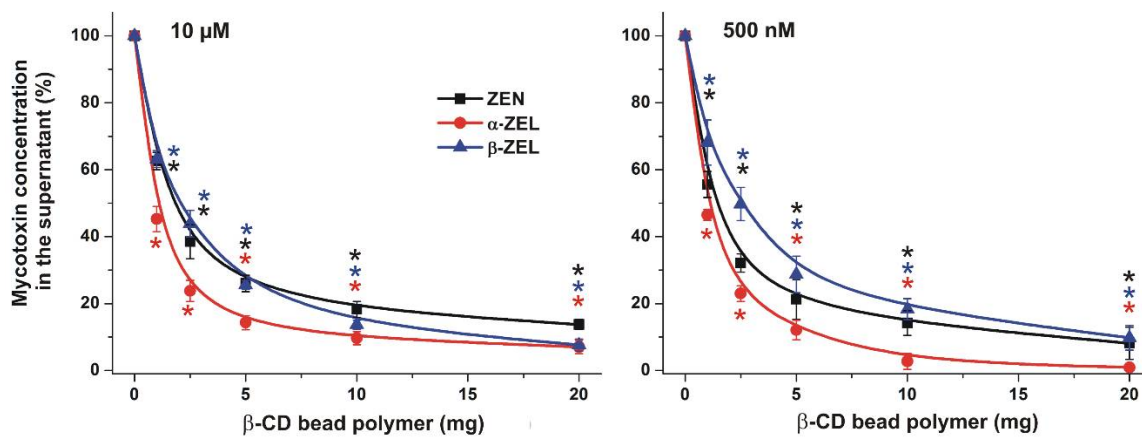


**Figure 2.** Time-dependent decreases in the concentrations (% of control) of ZEN and ZELs (10  $\mu$ M each) in water in the presence of 10 mg BBP, after 0–60 min incubation periods (\*  $p < 0.01$ ).

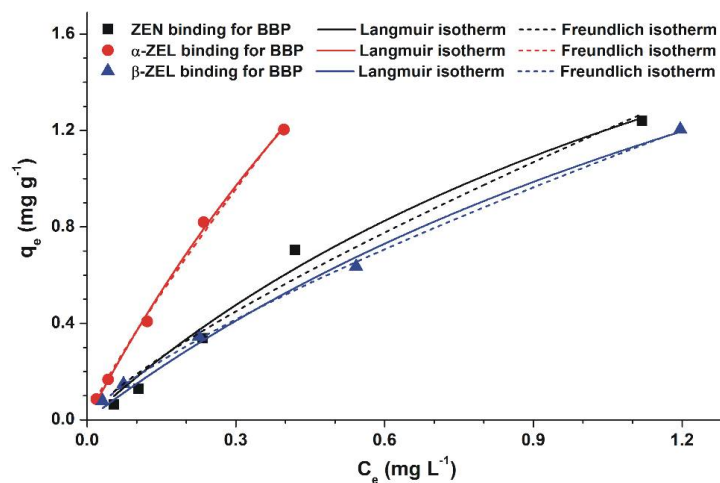
Thereafter, the concentration-dependence of mycotoxin removal was examined. In these studies, the extraction of the mycotoxins was tested from solutions containing relatively high (10  $\mu$ M or 3.2 ppm) and low (500 nM or 0.16 ppm) concentrations of ZEN or ZELs. The mycotoxin solutions (1.5 mL, in distilled water) were incubated for 40 min at 25 °C, in the presence of increasing amounts of BBP (0, 1, 2.5, 5, 10, and 20 mg). In a dose-dependent fashion, BBP caused significant decreases in the mycotoxin concentrations (Figure 3). In the presence of 10  $\mu$ M mycotoxin concentrations, BBP was more potent in binding  $\alpha$ -ZEL than ZEN or  $\beta$ -ZEL (the relative removal of the latter two mycotoxins was very similar) (Figure 3, left). In the presence of 500 nM mycotoxin concentrations, the extraction of  $\alpha$ -ZEL was again the most effective, followed by ZEN and  $\beta$ -ZEL (Figure 3, right). At both initial mycotoxin levels (10  $\mu$ M and 500 nM), at least 85–90% depletion of ZEN or ZEL was observed in the presence of 20 mg BBP. At 5–10 mg BBP, the removal of mycotoxins was near maximal, and higher amounts of the bead polymer only slightly reduced the mycotoxin content further.

To investigate the mycotoxin-binding ability of BBP, increasing mycotoxin concentrations (0.5, 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0  $\mu$ M) were added to 2.5 mg BBP. After 40 min incubation at 25 °C, BBP was centrifuged and mycotoxin-content of the supernatant was determined. Figure 4 demonstrates the binding isotherms of ZEN and ZELs with BBP. Even though the Langmuir and Freundlich models are different, no preference was found between the two models under the applied conditions. Table 1 indicates isotherm parameters obtained by the graphical application of Langmuir and Freundlich models. The Langmuir equilibrium constant ( $K_L$ ), Freundlich constant ( $K_F$ ), and maximum amount of mycotoxins bound by BBP ( $Q_0$ ) were similar for ZEN and  $\beta$ -ZEL, while these parameters were

much higher regarding  $\alpha$ -ZEL. On the other hand, the heterogeneity index ( $n$ ) was similar for each mycotoxin tested.



**Figure 3.** The BBP (0–20 mg) dose-dependently decreased the concentrations (% of control) of ZEN and ZELs (10  $\mu$ M: left; 500 nM: right) after 40 min incubation in water (\*  $p < 0.01$ ).



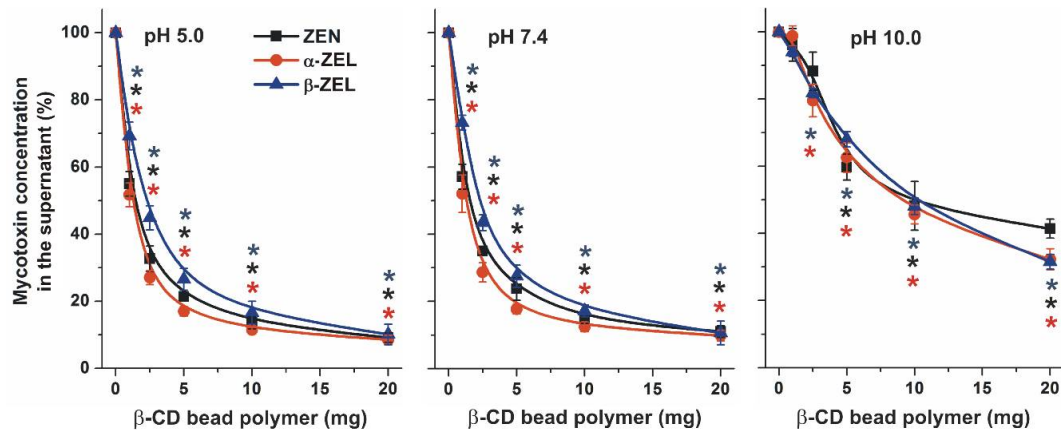
**Figure 4.** Langmuir (solid lines) and Freundlich (dashed lines) isotherms for the mycotoxin binding of BBP in water.

**Table 1.** Isotherm parameters ( $\pm$ SEM) obtained by the graphical application of Langmuir and Freundlich models (Equations (1) and (2)) for the extraction of ZEN and ZELs by BBP in water.

Model		ZEN	$\alpha$ -ZEL	$\beta$ -ZEL
Langmuir	$Q_0$ (mg/g)	3.11 ( $\pm$ 0.86)	5.28 ( $\pm$ 1.41)	3.31 ( $\pm$ 0.75)
	$K_L$ (L/mg)	0.60 ( $\pm$ 0.25)	0.75 ( $\pm$ 0.25)	0.47 ( $\pm$ 0.15)
	$R^2$	0.982	0.997	0.993
Freundlich	$K_F$ (mg/g)(L/mg) $^{1/n}$	1.16 ( $\pm$ 0.07)	2.72 ( $\pm$ 0.16)	1.04 ( $\pm$ 0.01)
	$1/n$	0.79 ( $\pm$ 0.10)	0.87 ( $\pm$ 0.05)	0.76 ( $\pm$ 0.02)
	$R^2$	0.967	0.995	0.999

In order to further characterize the properties of BBP as a mycotoxin binder, the removal of ZEN and ZELs was also tested in three different buffers (pH 5.0, 7.4, and 10.0). Because ZEN and ZELs are weak acids, deprotonation (and consequently the ionization) of these molecules can influence their interaction with CDs (including BBP). Therefore, increasing quantities of BBP (0–20 mg) were added to

1.5 mL of 10  $\mu$ M ZEN or ZEL solutions, dissolved in sodium acetate (pH 5.0), PBS (pH 7.4), or sodium borate (pH 10.0) buffers. As Figure 5 demonstrates, at pH 5.0 and 7.4, the extents of the removal of the mycotoxins by BBP were very similar to those seen in the previous experiment performed in water (Figure 3). However, the significantly lower toxin-binding ability of BBP was noticed for each mycotoxin at pH 10.0 than at lower pH values.



**Figure 5.** The BBP (0–20 mg) dose-dependently decreased the concentrations (% of control) of ZEN and ZELs (10  $\mu$ M each) after 40 min incubation in sodium acetate (**left**; 0.05 M, pH 5.0), PBS (**middle**; pH 7.4), and sodium borate (**right**; 0.05 M, pH 10.0) buffers (\*  $p < 0.01$ ).

The effect of temperature on mycotoxin removal was also examined. Solutions of 10  $\mu$ M ZEN (1.5 mL) with 1, 3, or 10 mg BBP added were incubated in sodium acetate buffer (pH 5.0) for 40 min at 15, 25, and 35  $^{\circ}$ C in a thermomixer (1000 rpm). Immediately after the incubations, beads were rapidly centrifuged and the supernatants were removed. After the temperature of supernatants reached room temperature, their mycotoxin contents were analyzed. Only slight, non-significant temperature-related differences were observed (data not shown).

## 2.2. Testing of the Reusability of BBP as Mycotoxin Binder, after Its Regeneration with Ethanol-Water Mixture

In the next series of experiments, the reusability of BBP was examined. After the removal of ZEN from aqueous solution, BBP was regenerated with 50  $v/v\%$  ethanol-water mixture. Then, the ZEN-extracting ability of the polymer was retested two more times (see further details in Section 4.3). Table 2 demonstrates the relative concentration (% of control) of ZEN in aqueous solution after the extraction of ZEN with BBP (row A), as well as the relative amounts of ZEN in ethanol-water mixtures after the elution of the mycotoxin from the polymer once (row B) and twice (row C). Our results highlight that after the regeneration of BBP with  $2 \times 1.5$  mL ethanol-water mixture, BBP removed the same amounts of ZEN (92–93%) from aqueous solutions during its second and third application than at first time. Furthermore, after the two alcoholic elution steps, we completely recovered ZEN that had been extracted from the aqueous buffer by BBP.



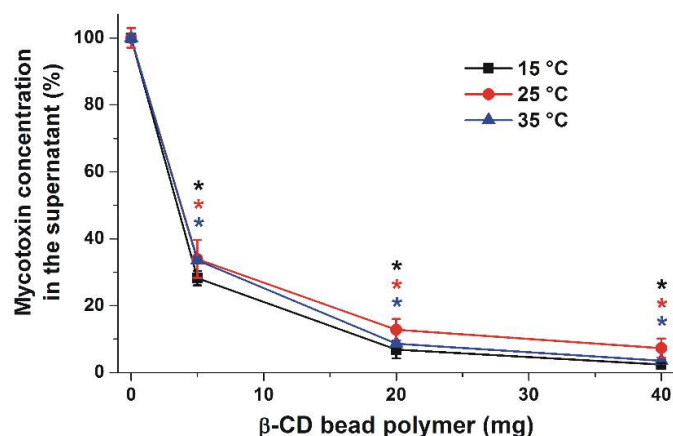
**Table 2.** Testing the reactivation and the reusability of BBP as a mycotoxin binder: Extraction of ZEN by BBP and elution of the mycotoxin from BBP by ethanol-water mixture.

Number of Applications	Procedure Performed	ZEN (%) in the Buffer (A) or the Eluent (B, C)	$\Sigma$ (%)
1st application of the polymer	A: After extraction with BBP	8.0 $\pm$ 0.3	99.8
	B: After the 1st elution	85.8 $\pm$ 1.6	
	C: After the 2nd elution	6.0 $\pm$ 0.7	
2nd application of the polymer	A: After extraction with BBP	7.1 $\pm$ 0.2	98.3
	B: After the 1st elution	84.8 $\pm$ 1.5	
	C: After the 2nd elution	6.4 $\pm$ 0.8	
3rd application of the polymer	A: After extraction with BBP	7.4 $\pm$ 0.4	-

A: Percent of ZEN (10  $\mu$ M) remaining in 1.5 mL sodium acetate buffer (pH 5.0), after its incubation with 10 mg BBP for 40 min at 25  $^{\circ}$ C. B: Percent of ZEN recovered in the ethanol-water mixture, after the first elution from the polymer with 1.5 mL 50 v/v% ethanol for 10 min at 25  $^{\circ}$ C. C: Percent of ZEN recovered in the ethanol-water mixture, after the second elution from the polymer with 1.5 mL 50 v/v% ethanol for 10 min at 25  $^{\circ}$ C.

### 2.3. Removal of ZEN from Spiked Corn Beer by BBP

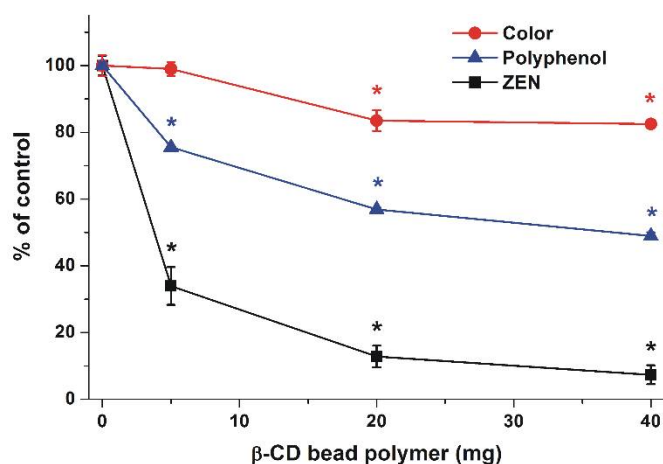
In order to test our hypothesis that BBP may be suitable for reducing the mycotoxin content of different drinks, the removal of ZEN from spiked corn beer samples was also investigated. It is reasonable to hypothesize that BBP may interact with other compounds in beer as well; therefore, higher amounts of the polymer (5, 20, and 40 mg) were applied in these experiments. Beer samples were spiked with 500 nM ZEN and then 1.5 mL volumes of the samples were incubated with BBP at 15, 25, and 35  $^{\circ}$ C. After centrifugation, the supernatant was removed and tempered to 25  $^{\circ}$ C, and the residual ZEN was then extracted from beer with dichloromethane. Following this, dichloromethane was evaporated, the residue was dissolved in methanol-water mixture, and ZEN was quantified by HPLC-FLD (see details in Sections 4.4 and 4.5). ZEN in the beer samples not spiked with ZEN was not detectable. Approximately 65% of added ZEN was removed from the beer by 5 mg BBP, while more than 80 and 90% of ZEN was depleted in the presence of 20 and 40 mg BBP, respectively (Figure 6). Similarly to our previous experiment in sodium acetate buffer (pH 5.0), only slight temperature-related differences of mycotoxin-binding were observed in corn beer.

**Figure 6.** The BBP (0–40 mg) dose-dependently decreased the concentrations (% of control) of ZEN (500 nM) after 40 min incubation in corn beer at each temperature tested (\*  $p$  < 0.01).

### 2.4. Effect of BBP on the Color and Polyphenol Content of Corn Beer

Besides mycotoxins, BBP is likely able to remove other compounds from beer as well. To investigate the extent of this effect, the color and polyphenol content of corn beer (1.5 mL) were examined after its treatment with 0, 5, 20, and 40 mg BBP for 40 min at 25  $^{\circ}$ C (see details in Section 4.6).

Color value (C) was  $4.85 (\pm 0.15)$ , while polyphenol concentration (P) was  $77.1 (\pm 0.8)$  mg/L in controls (in the absence of BBP). As Figure 7 demonstrates, increasing amounts of BBP induced the gradual decrease of the color of beer and its polyphenol content. Even if the relative decreases in color and polyphenol content are much lower compared to the removal of ZEN, it is important to note that 20 mg of BBP caused a 16 and 43% decrease of color and polyphenol concentration, respectively.



**Figure 7.** Changes of color, polyphenol content, and ZEN concentration (spiked, 500 nM) of corn beer (1.5 mL) after 40 min incubation with 5, 20, or 40 mg BBP at 25 °C (\*  $p < 0.01$ ).

### 3. Discussion

As our results demonstrated, BBP rapidly interacts with ZEN and ZELs in aqueous solution (Figure 2). Thus, the mycotoxin content can be significantly decreased by incubation with BBP, even within a few minutes. Furthermore, only a few milligrams of BBP was needed to deplete the toxin in water. Interestingly, BBP caused similar relative decreases of mycotoxin concentrations in the presence of 500 nM or 10  $\mu$ M of ZEN/ZELs (Figure 2), suggesting that BBP can be applied to remove these mycotoxins, even from highly contaminated samples. Previous studies indicate that usually nanomolar concentrations of ZEN are found in beverages [14–17]. However, in some extreme cases, ZEN may be present at micromolar concentrations. One of the most extreme contaminations has been reported in Zambia, where more than 14  $\mu$ M ZEN was quantified in a beer sample [18].

The equilibrium relationship between the amounts of ZEN or ZELs bound by BBP and the quantities of free ZEN or ZELs left in the solution can be described by adsorption isotherms. There are several models to predict the equilibrium isotherm. In our study, the most commonly used Langmuir and Freundlich models were applied. These models have also been successfully applied to investigate and evaluate the sorption of ochratoxin A by the  $\beta$ -cyclodextrin-polyurethane polymer [29]. Similarly good fitting of Langmuir and Freundlich models occurs when the concentration of the adsorbate is small and the adsorptive capacity of the adsorbent is relatively large. Based on the Freundlich model, the heterogeneity index ( $n$ ) is close to 1, indicating the relatively homogenous sorption of mycotoxins by BBP. Isotherm parameters clearly show the differences between the binding affinities of ZEN and ZELs towards BBP (Table 1). Both the equilibrium constant ( $K_L$ ) calculated by the Langmuir model and the adsorptive capacity ( $K_F$ ) determined using the Freundlich model support the previous observation that the interaction between  $\alpha$ -ZEL and BBP is stronger compared to ZEN and  $\beta$ -ZEL. The maximum amount of mycotoxins bound by BBP was estimated based on the Langmuir model: the higher  $Q_0$  value for  $\alpha$ -ZEL (compared to ZEN and  $\beta$ -ZEL) is also in accordance with the previous investigations.

The pH-dependence of mycotoxin removal is in agreement with our previous observations that CDs bind the non-ionized form of ZEN and ZELs with a much higher affinity than the ionized mycotoxins [25,27]. ZEN and ZELs are weak phenolic acids, therefore, their non-ionized forms are dominant at acidic and neutral pH, while alkaline conditions (e.g., sodium borate buffer, pH 10.0)

favor the deprotonation of ZEN and ZELs, resulting in their poor interaction with  $\beta$ -CDs [25,27] and decreased the binding of ZEN and ZELs to BBP.

Organic solvents (including ethanol) influence the interaction of CDs with guest molecules, because they can displace the guest compound from the CD cavity. Using this principle, it was reasonable to hypothesize that after its first application for mycotoxin removal, BBP can be regenerated with ethanol or ethanol-water mixture. As it is demonstrated in Table 2, the sequestered ZEN was entirely released from BBP during the two-step washing of the polymer with 50 v/v% ethanol-water mixture, after which the regenerated BBP bound to the same extent as the unused BBP. As the regeneration of BBP is simple, CD polymers may be suitable tools in the future for the removal of mycotoxins from contaminated aqueous solutions.

After verifying the mycotoxin-binding ability of BBP in water and in aqueous buffers, the effectiveness of BBP in a complex matrix, e.g., in corn beer, was also determined. Because a nanomolar concentration of ZEN in beverages is typical, corn beer samples were spiked with 500 nM ZEN. In beer samples, 20–40 mg BBP produced a similar extent of ZEN removal (Figure 3, right) to 10–20 mg BBP in water (Figure 6), suggesting that only somewhat larger amounts of BBP are needed for mycotoxin removal from drinks than from water. Extraction of mycotoxins from beverages is complicated because different matrix components may interact with ZEN/ZELs, making their removal more difficult. Furthermore, mainly in naturally contaminated foods/drinks, mycotoxin molecules can be partly sequestered by the food matrix, resulting in these molecules possibly becoming accessible only after the digestion of the meal [30]. In addition, CDs can bind other components of drinks (e.g., polyphenols) as well, which may result in the decrease in quality of beverages. Since CDs can form (usually low-affinity) complexes with numerous compounds, the suitability of BBP to bind ZEN in beverages was questionable. However, the high stability of ZEN- $\beta$ -CD and ZEL- $\beta$ -CD complexes [25,27] may give some selectivity in removing these mycotoxins over other compounds naturally occurring in drinks. As it was demonstrated, BBP caused a significant decrease of polyphenol content and color of corn beer (Figure 7), suggesting the decrease of some beer constituents during mycotoxin removal. On the other hand, the relative decrease of ZEN was significantly higher compared to polyphenols. Nevertheless, we have to estimate some reduction in the quality of beer as a result of its treatment with BBP.

Despite the stability of the ochratoxin A- $\beta$ -CD complex being approximately 65-fold lower than the ZEN- $\beta$ -CD complex [24,25], Appell and Jackson demonstrated that the  $\beta$ -cyclodextrin-polyurethane polymer could significantly decrease the ochratoxin-content of aqueous solutions and red wine [29]. Patulin was also successfully extracted from apple juice by the  $\beta$ -cyclodextrin-polyurethane polymer for analytical purposes [27]. Besides these studies, our results further support the hypothesis that CD technology may be used for mycotoxin extraction from different drinks. Furthermore, chemical modification of the native  $\beta$ -CD can significantly improve its mycotoxin-binding ability: 2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD binds ZEN with a six-fold higher affinity than  $\beta$ -CD [25], while the stability of the ochratoxin A complex with (2-hydroxy-3-*N,N,N*-trimethylamino)propyl- $\beta$ -CD is approximately 200-fold higher compared to the ochratoxin A- $\beta$ -CD complex [24]. Therefore, chemical modification of the native  $\beta$ -CD may be a promising strategy in producing more effective mycotoxin-binding polymers. Since mycotoxins are common contaminants of different drinks (including wine, beer, fruit juices, coffee, and milk), removal of these harmful compounds from beverages could be of high importance.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Reagents

Reagents and solvents were of analytical or spectroscopic grade. Zearalenone (ZEN),  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL), and  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL) were purchased from Sigma-Aldrich (Waltham, MA, USA). Insoluble  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer (BBP;  $\beta$ -cyclodextrin-epichlorohydrin cross-linked bead polymer; CY-2011) was obtained from CycloLab Cyclodextrin Research & Development Laboratory,



Ltd. (Budapest, Hungary). The polymer has a beta-cyclodextrin content of approximately 70% by weight. Stock solutions of mycotoxins (5000  $\mu\text{M}$ ) were prepared in ethanol (Renal, spectroscopic grade), stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and protected from light.

#### 4.2. Removal of ZEN and ZELs from Aqueous Solutions by BBP

In order to investigate the sorption of mycotoxins (ZEN,  $\alpha$ -ZEL, and  $\beta$ -ZEL) by BBP, 1.5 mL of 500 nM (0.16 ppm) or 10  $\mu\text{M}$  (3.2 ppm) mycotoxin solutions were incubated with 0, 1, 2.5, 5, 10, or 20 mg BBP in a thermomixer (1000 rpm,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). To test the time-dependence of the process, five different time periods were applied (0, 5, 10, 30, and 60 min). During the investigation of the pH-dependence of the extraction procedure, incubations were performed in sodium acetate (0.05 M, pH 5.0), phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), and sodium borate (0.05 M, pH 10.0) buffers. Thereafter, the samples were centrifuged (pulse centrifugation for 3 s at 4000 g), 500  $\mu\text{L}$  supernatants were gently removed, and the mycotoxin content was analyzed by HPLC-FLD (see details in Section 4.5).

Binding of mycotoxins by BBP was also tested in the presence of a standard amount of BBP (2.5 mg) and increasing concentrations of mycotoxins (0.5, 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0  $\mu\text{M}$ ), after which the results were evaluated employing the Langmuir and Freundlich isotherms. The Langmuir equation is described as [29]:

$$q_e = (Q_0 \times K_L \times C_e) / (1 + K_L \times C_e) \quad (1)$$

where  $q_e$  is the amount of ZEN/ZEL bound (mg) per BBP (g), while  $C_e$  is the free ZEN/ZEL (mg) in the solution at equilibrium.  $K_L$  is the Langmuir equilibrium constant (L/mg) and  $Q_0$  is the maximum quantity of ZEN/ZEL bound per gram of BBP. The Freundlich equation is expressed as [29]:

$$q_e = K_F \times C_e^{1/n} \quad (2)$$

where  $K_F$  is the Freundlich constant, while  $n$  is the heterogeneity index.

#### 4.3. Regeneration of BBP and Its Reusability as Mycotoxin Binder

In order to test the reusability of BBP as a mycotoxin binder, the following experiments were performed. BBP (10 mg) was added to 1.5 mL of 10  $\mu\text{M}$  ZEN solution (sodium acetate buffer, pH 5.0). After 20 min incubation at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a thermomixer (1000 rpm), the polymer was centrifuged (pulse centrifugation for 3 s at 4000 g) and the supernatant was completely removed. Thereafter, the bead polymer was washed two times with 1.5 mL of 50 v/v% ethanol (20 min,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1000 rpm). Ethanol-water mixtures (containing the eluted mycotoxin) were removed after centrifugation (3 s at 4000 g). Finally, BBP was conditioned for 15 s with 1.5 mL sodium acetate buffer (pH 5.0), the polymer was centrifuged (pulse centrifugation for 3 s at 4000 g), and the supernatant was removed. ZEN contents of each supernatants (including the aqueous solutions and the two fractions of ethanol-water mixture) were measured by HPLC-FLD (see details in Section 4.5).

Thereafter, the whole procedure (mycotoxin binding from aqueous solution then washing the polymer two times with 50 v/v% ethanol then once with the buffer) was repeated, after which the mycotoxin binding ability of the same polymer was tested again, applying the same conditions.

#### 4.4. Removal of ZEN from Spiked Corn Beer by BBP

Coronita<sup>®</sup> corn beer was degassed with an ultrasonic water bath and spiked with ZEN at a 500 nM final ZEN concentration. Thereafter, BBP (0, 5, 20, or 40 mg) was added to each spiked beer fraction (1.5 mL) and incubated for 40 min in a thermomixer (1000 rpm; at 15, 25 or  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). At the end of the incubations, samples were centrifuged (pulse centrifugation for 3 s at 4000 g) and 1000  $\mu\text{L}$  of the supernatants was carefully removed. The ZEN remaining in beer samples was extracted by two-step extraction with dichloromethane, during which dichloromethane (2.0 mL) was added to the supernatant (1000  $\mu\text{L}$ ) and the mixtures were shaken at 250 rpm for 10 min at room temperature. Then, the lower liquid phase was collected and the above described extraction was repeated with

the upper (aqueous) phase. After the second extraction step, the organic phases were combined, from which the residual water was removed with anhydrous sodium sulfate. After the sedimentation of sodium sulfate, 2000  $\mu\text{L}$  aliquots of the organic phase were removed and completely evaporated with a rotary evaporator (Büchi Rotavapor R-3) under reduced pressure (Vacuum Pump, Büchi V-850 Vacuum Controller) at 40 °C. Then, the extracted ZEN was dissolved in 500  $\mu\text{L}$  methanol-distilled water mixture (50  $v/v\%$ ) and the ZEN content of the produced solution was analyzed by HPLC-FLD (see details in Section 4.5). Extraction of ZEN from beer was tested at higher and lower mycotoxin concentrations (i.e., 100–600 nM) as well. These experiments indicated that the recovery of ZEN was constant regardless of its concentration.

#### 4.5. HPLC Analyses

Quantitation of ZEN and ZELs was performed by the method of Visconti and Pascale [31] with minor modifications. The analyses applied an HPLC pump (model 510, Waters, Milford, MA, USA) to drive eluent through an injector (Rheodyne 7125) supplied with a 20- $\mu\text{L}$  sample loop onto a SecurityGuard Cartridge (C18 4.0  $\times$  3.0 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) coupled to a Kinetex XB-C18 analytical column (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle size, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase contained acetonitrile (VWR), distilled water, and methanol (VWR): 46:46:8  $v/v\%$ . After injecting 20  $\mu\text{L}$  samples, the isocratic elution was performed at room temperature with a 1 mL/min flow rate. Since the examined mycotoxins are fluorescent molecules [27,32], ZEN and ZELs were quantified by a fluorescent detector (Jasco FP-920;  $\lambda_{\text{ex}} = 274 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ). Data were recorded and evaluated using the Millennium Chromatography Manager (Waters, Milford, MA, USA), which also controlled the HPLC pump.

#### 4.6. Testing the Influence of BBP on the Color and Polyphenol Content of Corn Beer

Since BBP is not a selective binder of ZEN and ZELs, it is reasonable to hypothesize that not only mycotoxins, but also other compounds, may be extracted from beer by BBP. To test this effect of BBP, the color and the polyphenol content of corn beer samples were examined applying the previously described methods [33]. UV-Vis spectroscopic analyses were performed applying the HALO DB-20 (Dynamica) spectrophotometer. Color of the degassed beer was evaluated based on its absorbance at 430 nm, using the following equation [33]:

$$C = A_{430} \times f \times 25 \quad (3)$$

where  $C$  denotes the color,  $A_{430}$  is the absorbance of samples at 430 nm, and  $f$  is the dilution factor.

During the investigation of the total polyphenol content of beer, a 1 mL fraction of degassed beer sample was added to 0.8 mL of CMC/EDTA reagent (2% of carboxymethylcellulose sodium salt and 0.4% of ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt in water) and vortexed. Then, 50  $\mu\text{L}$  of ferric reagent (3.5% ammonium ferric citrate in water) and 50  $\mu\text{L}$  of ammonia reagent (pure concentrated ammonia diluted with two volumes of water) were added to the mixture. After making it up to a 2.5 mL final volume, the solution was mixed again. Samples were incubated for 10 min at room temperature, the optical density was measured at 600 nm, and polyphenol content was determined applying the following equation [33]:

$$P = A_{600} \times 820 \quad (4)$$

where  $P$  denotes the total polyphenol content (mg/L), while  $A_{600}$  is the absorbance of samples at 600 nm.

#### 4.7. Statistics

Mean  $\pm$  SEM values were derived from at least three independent experiments. During the statistical analyses of data, a One-Way ANOVA test was applied (using IBM SPSS Statistics, Version 21). The level of significance was set as  $p < 0.01$ .

**Author Contributions:** M.P. and L.S. conceived and designed the study and wrote the paper. M.P., Z.F., and A.Z. performed toxin extraction from water and from aqueous buffers. Z.F. and T.B. carried out toxin extraction from corn beer samples. M.P. and Z.F. performed the investigation of polyphenol content and color of beer samples. B.L. and S.K.-M. carried out the evaluation of mycotoxin extraction by BBP using Langmuir and Freundlich models. All authors have read, edited, and approved the final version of the paper.

**Acknowledgments:** The authors thank István Schweibert for his excellent assistance in the experimental work. This project was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (M.P.). M.P. is thankful for support of the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (FK125166). The project was supported by the University of Pécs in the frame of Pharmaceutical Talent Centre program (M.P.) and the GINOP-2.3.2-15-2016-00049 grant (S.K.).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Zinedine, A.; Soriano, J.M.; Moltó, J.C.; Mañes, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Shier, W.T.; Shier, A.C.; Xie, W.; Mirocha, C.J. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon* **2001**, *39*, 1435–1438. [[CrossRef](#)]
3. Minervini, F.; Dell’Aquila, M.E. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 2570–2584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Frizzell, C.; Uhlig, S.; Miles, C.O.; Verhaegen, S.; Elliott, C.T.; Eriksen, G.S.; Sørlie, M.; Ropstad, E.; Connolly, L. Biotransformation of zearalenone and zearalenols to their major glucuronide metabolites reduces estrogenic activity. *Toxicol. Vitro* **2015**, *29*, 575–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Fleck, S.C.; Churchwell, M.I.; Doerge, D.R. Metabolism and pharmacokinetics of zearalenone following oral and intravenous administration in juvenile female pigs. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *106*, 193–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Frizzell, C.; Ndossi, D.; Verhaegen, S.; Dahl, E.; Eriksen, G.; Sørlie, M.; Ropstad, E.; Muller, M.; Elliott, C.T.; Connolly, L. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicol. Lett.* **2011**, *206*, 210–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Filannino, A.; Stout, T.A.; Gadella, B.M.; Sostaric, E.; Pizzi, F.; Colenbrander, B.; Dell’Aquila, M.E.; Minervini, F. Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2011**, *9*, 134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ryu, D.; Hanna, M.A.; Bullerman, L.B. Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *J. Food Prot.* **1999**, *62*, 1482–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Yazar, S.; Omurtag, G.Z. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 2062–2090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Maragos, C.M. Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin J.* **2010**, *3*, 369–383. [[CrossRef](#)]
11. Huang, L.C.; Zheng, N.; Zheng, B.Q.; Wen, F.; Cheng, J.B.; Han, R.W.; Xu, X.M.; Li, S.L.; Wang, J.Q. Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. *Food Chem.* **2014**, *146*, 242–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Schollenberger, M.; Müller, H.M.; Rühle, M.; Suchy, S.; Plank, S.; Drochner, W. Natural occurrence of 16 fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia* **2006**, *161*, 43–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Antep, H.M.; Merdivan, M. Development of new dispersive liquid–liquid microextraction technique for the identification of zearalenone in beer. *Anal. Methods* **2012**, *4*, 4129. [[CrossRef](#)]
14. Nkwe, D.O.; Taylor, J.E.; Siame, B.A. Fungi, aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. *Mycopathologia* **2005**, *160*, 177–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Odhav, B.; Naicker, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Addit. Contam.* **2002**, *19*, 55–61. [[CrossRef](#)]
16. Kuzdralinski, A.; Solarska, E.; Muszynska, M. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Food Control* **2013**, *29*, 22–24. [[CrossRef](#)]

17. Okoye, Z.S.C. Zearalenone in native cereal beer brewed in Jos metropolis of Nigeria. *J. Food Saf.* **1986**, *7*, 233–239. [[CrossRef](#)]
18. Lovelace, C.E.A.; Nyathi, C.B. Estimation of the fungal toxins, zearalenone and aflatoxin, contaminating opaque maize beer in Zambia. *J. Sci. Food Agric.* **1977**, *28*, 288–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Keller, L.; Abrunhosa, L.; Keller, K.; Rosa, C.A.; Cavaglieri, L.; Venâncio, A. Zearalenone and Its Derivatives  $\alpha$ -Zearalenol and  $\beta$ -Zearalenol Decontamination by *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Bovine Forage. *Toxins* **2015**, *7*, 3297–3308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Abia, W.A.; Warth, B.; Sulyok, M.; Krska, R.; Tchana, A.N.; Njobeh, P.B.; Dutton, M.F.; Moundipa, P.F. Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control* **2013**, *31*, 438–453. [[CrossRef](#)]
21. Szente, L.; Szejtli, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 17–28. [[CrossRef](#)]
22. Dall’asta, C.; Ingletto, G.; Corradini, R.; Galaverna, G.; Marchelli, R. Fluorescence enhancement of aflatoxins using native and substituted cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2003**, *45*, 257–263. [[CrossRef](#)]
23. Poór, M.; Matisz, G.; Kunsági-Máté, S.; Derdák, D.; Szente, L.; Lemli, B. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction of citrinin with native and chemically modified cyclodextrins. *J. Lumin.* **2016**, *172*, 23–28. [[CrossRef](#)]
24. Poór, M.; Kunsági-Máté, S.; Szente, L.; Matisz, G.; Secenji, G.; Czibulya, Z.; Kőszegi, T. Interaction of ochratoxin A with quaternary ammonium beta-cyclodextrin. *Food Chem.* **2015**, *172*, 143–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Poór, M.; Kunsági-Máté, S.; Sali, N.; Kőszegi, T.; Szente, L.; Peles-Lemli, B. Interactions of zearalenone with native and chemically modified cyclodextrins and their potential utilization. *J. Photochem. Photobiol. B* **2015**, *151*, 63–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dall’Asta, C.; Faccini, A.; Galaverna, G.; Corradini, R.; Dossena, A.; Marchelli, R. Complexation of zearalenone and zearalenols with native and modified  $\beta$ -cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2009**, *64*, 331–340. [[CrossRef](#)]
27. Poór, M.; Zand, A.; Szente, L.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S. Interaction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenols with  $\beta$ -cyclodextrins. *Molecules* **2017**, *22*, 1910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Appell, M.; Jackson, M.A. Synthesis and evaluation of cyclodextrin-based polymers for patulin extraction from aqueous solutions. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2010**, *68*, 117–122. [[CrossRef](#)]
29. Appell, M.; Jackson, M.A. Sorption of ochratoxin A from aqueous solutions using  $\beta$ -cyclodextrin-polyurethane polymer. *Toxins* **2012**, *4*, 98–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. González-Arias, C.A.; Marín, S.; Sanchis, V.; Ramos, A.J. Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: A review. *World Mycotoxin J.* **2013**, *6*, 167–184.
31. Visconti, A.; Pascale, M. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, *815*, 133–140. [[CrossRef](#)]
32. Poór, M.; Kunsági-Máté, S.; Bálint, M.; Hetényi, C.; Gerner, Z.; Lemli, B. Interaction of mycotoxin zearalenone with human serum albumin. *J. Photochem. Photobiol. B* **2017**, *170*, 16–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jurić, A.; Ćorić, N.; Odak, A.; Herceg, Z.; Tišma, M. Analysis of total polyphenols, bitterness and haze in pale and dark lager beers produced under different mashing and boiling conditions. *J. Inst. Brew.* **2015**, *121*, 541–547. [[CrossRef](#)]





# Interactions of zearalenone and its reduced metabolites $\alpha$ -zearalenol and $\beta$ -zearalenol with serum albumins: species differences, binding sites, and thermodynamics

Zelma Faisal<sup>1,2</sup> · Beáta Lemli<sup>2,3,4</sup> · Dénes Szerencsés<sup>3</sup> · Sándor Kunsági-Máté<sup>2,3,4</sup> · Mónika Bálint<sup>5</sup> · Csaba Hetényi<sup>5</sup> · Mónika Kuzma<sup>6</sup> · Máttyás Mayer<sup>6</sup> · Miklós Poór<sup>1,2</sup>

Received: 9 May 2018 / Revised: 5 July 2018 / Accepted: 10 July 2018 / Published online: 16 July 2018  
© Society for Mycotoxin Research and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Zearalenone (ZEN) is a mycotoxin produced by *Fusarium* species. ZEN mainly appears in cereals and related foodstuffs, causing reproductive disorders in animals, due to its xenoestrogenic effects. The main reduced metabolites of ZEN are  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL) and  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL). Similarly to ZEN, ZELs can also activate estrogen receptors; moreover,  $\alpha$ -ZEL is the most potent endocrine disruptor among these three compounds. Serum albumin is the most abundant plasma protein in the circulation; it affects the tissue distribution and elimination of several drugs and xenobiotics. Although ZEN binds to albumin with high affinity, albumin-binding of  $\alpha$ -ZEL and  $\beta$ -ZEL has not been investigated. In this study, the complex formation of ZEN,  $\alpha$ -ZEL, and  $\beta$ -ZEL with human (HSA), bovine (BSA), porcine (PSA), and rat serum albumins (RSA) was investigated by fluorescence spectroscopy, affinity chromatography, thermodynamic studies, and molecular modeling. Our main observations are as follows: (1) ZEN binds with higher affinity to albumins than  $\alpha$ -ZEL and  $\beta$ -ZEL. (2) The low binding affinity of  $\beta$ -ZEL toward albumin may result from its different binding position or binding site. (3) The binding constants of the mycotoxin-albumin complexes significantly vary with the species. (4) From the thermodynamic point of view, the formation of ZEN-HSA and ZEN-RSA complexes are similar, while the formation of ZEN-BSA and ZEN-PSA complexes are markedly different. These results suggest that the toxicological relevance of ZEN-albumin and ZEL-albumin interactions may also be species-dependent.

**Keywords** Zearalenone · Zearalenols · Serum albumin · Species-dependent alternations · Fluorescence spectroscopy

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12550-018-0321-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Miklós Poór  
poor.miklos@pte.hu

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Szigeti út 12, Pécs 7624, Hungary

<sup>2</sup> János Szentágothai Research Center, Ifjúság útja 20, Pécs 7624, Hungary

<sup>3</sup> Department of General and Physical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Pécs, Ifjúság útja 6, Pécs 7624, Hungary

<sup>4</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Rókus u. 2, Pécs 7624, Hungary

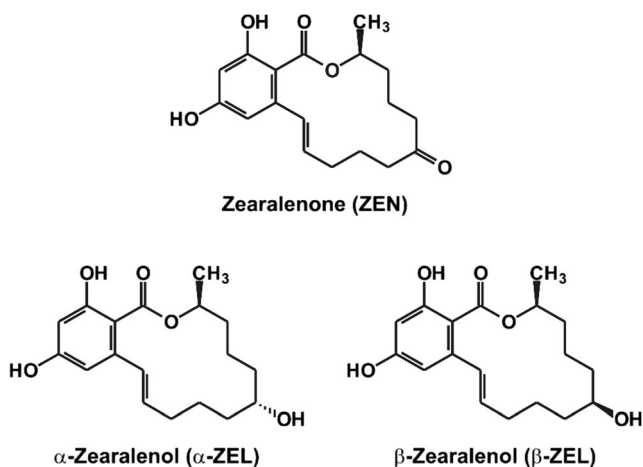
<sup>5</sup> Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, Szigeti út 12, Pécs 7624, Hungary

<sup>6</sup> Department of Forensic Medicine, Medical School, University of Pécs, Szigeti út 12, Pécs 7624, Hungary

## Introduction

Zearalenone (ZEN; Fig. 1) is a *Fusarium*-derived mycotoxin, which occurs as a contaminant in cereals (e.g., maize, wheat, or barley), spices, milk, and beer (Yazar and Omurtag 2008; Maragos 2010). Because ZEN is a xenoestrogen, it induces reproductive disorders in farm animals (European Food Safety Authority (EFSA) 2017; Shier et al. 2001). After its absorption from the gastrointestinal tract, ZEN is extensively biotransformed, during which reduced metabolites and glucuronic acid conjugates are formed (European Food Safety Authority (EFSA) 2017). Most important reduced derivatives of ZEN are  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL) and  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL) (Fig. 1); however, lower amounts of zearalenone,  $\alpha$ -zearalanol, and  $\beta$ -zearalanol are produced as well (Minervini and Dell'Aquila 2008). ZELs also bind with high affinity to estrogen receptors;  $\alpha$ -ZEL even exerts significantly stronger toxic effect than the parent compound ZEN (Fleck et al. 2017;





**Fig. 1** Chemical structures of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol, and  $\beta$ -zearalenol

Frizzell et al. 2011; Filannino et al. 2011). Besides ZEN, the appearance of ZELs has been also reported in some food-stuffs, including milk and soy meal (Huang et al. 2014; Schollenberger et al. 2006). ZEN and its metabolites are rapidly absorbed from the gastrointestinal tract and distributed among several organs/tissues; glucuronic acid conjugates of ZEN and ZELs are excreted through the biliary route then undergo enterohepatic circulation (European Food Safety Authority (EFSA) 2017).

Serum albumin is the most abundant plasma protein in the circulation. Albumin maintains the oncotic pressure of blood as well as it has important buffer, antioxidant, and pseudo-enzymatic functions. Albumin forms non-covalent complexes with several endogenous compounds, drugs, and xenobiotics, affecting significantly their tissue distribution and plasma elimination half-life (Fanali et al. 2012; Yamasaki et al. 2013). Albumin is built up from three domains (I, II, and III); each domain contains two subdomains (A and B). The two major binding sites of albumin are located in subdomain IIA (Sudlow's site I) and subdomain IIIA (Sudlow's site II). However, recent studies highlighted the importance of a third binding site located in subdomain IB (Heme binding site) (Fanali et al. 2012; Zsila 2013). As previous studies demonstrated, many mycotoxins (e.g., aflatoxins, citrinin, deoxynivalenol, ochratoxins, patulin, and ZEN) form stable non-covalent complexes with albumins (Poór et al. 2012, 2015, 2017a, b; Li et al. 2013; Perry et al. 2003; Yuqin et al. 2014). Some of these interactions could be of high toxicological importance. Aflatoxins, deoxynivalenol, and patulin form less stable complexes with human albumin ( $K \sim 10^4$  L/mol) (Poór et al. 2017a; Li et al. 2013; Yuqin et al. 2014) than citrinin and ZEN ( $K \sim 10^5$  L/mol) (Poór et al. 2015, 2017b), while the stability of ochratoxin A-albumin complex is extremely high ( $K \sim 10^7$  L/mol) (Kőszegi and Poór 2016; Sueck et al. 2018).

As demonstrated in our previous study, ZEN binds to human albumin with high affinity, occupying a non-conventional binding site between subdomains IIA and IIIA (Poór et al. 2017b). In another study, Ma et al. investigated the complex formation of ZEN with bovine albumin (Ma et al. 2018). Based on these two studies, the complex formation of ZEN with human and bovine albumins shows large differences. Therefore, the investigation of species-dependence of ZEN-albumin interactions seems reasonable. Furthermore, while ZEN is known to bind to albumin with high affinity, we have no information regarding the interactions of  $\alpha$ - and  $\beta$ -ZEL with serum albumin.

In this study, the interactions of ZEN,  $\alpha$ -ZEL, and  $\beta$ -ZEL with human (HSA), bovine (BSA), porcine (PSA), and rat (RSA) serum albumins were investigated using fluorescence spectroscopy in order to determine the binding constants of mycotoxin-albumin complexes by fluorescence quenching method. The mycotoxin-HSA interactions were also evaluated by high-performance affinity chromatography (HPAC). To characterize further the species-dependence of the albumin-binding of ZEN, thermodynamic studies were performed. Finally, mycotoxin-albumin interactions were also examined employing molecular modeling studies. Our results demonstrate that  $\alpha$ -ZEL and especially  $\beta$ -ZEL binds with significantly lower affinity to albumin than ZEN, and albumin-binding of each mycotoxin (ZEN,  $\alpha$ -ZEL, and  $\beta$ -ZEL) show very significant species-dependence.

## Materials and methods

### Reagents

All reagents and solvents were spectroscopic or analytical grade. Zearalenone (ZEN; MW = 318.36 g/mol),  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL; MW = 320.38 g/mol),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL; MW = 320.38 g/mol), human serum albumin (HSA; MW = 66.4 kDa), bovine serum albumin (BSA; MW = 66.4 kDa), porcine serum albumin (PSA; MW = 67.5 kDa), rat serum albumin (RSA; MW = 64.6 kDa), and warfarin were purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions of mycotoxins (5000  $\mu$ mol/L; ZEN: 1.592 g/L; ZELs: 1.601 g/L) were prepared in ethanol (VWR, spectroscopic grade) and stored at  $-20$  °C.

### Spectroscopic measurements

Fluorescence and absorption spectra were recorded employing a Hitachi F-4500 fluorimeter (Tokyo, Japan) and a Specord Plus 210 (Analytic Jena AG, Jena, Germany) UV-Vis spectrophotometer, respectively. Mycotoxin-albumin interactions were investigated in phosphate-buffered saline (PBS: 8.00 g/L NaCl, 0.20 g/L KCl, 1.81 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times$

2H<sub>2</sub>O, 0.24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH = 7.4). Spectroscopic measurements were carried out in the presence of air, at +25 °C (except thermodynamic studies).

Complex formation of ZEN and its reduced metabolites with serum albumins was examined based on fluorescence quenching effects of the mycotoxins, applying the Stern-Volmer equation:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \times [Q] \quad (1)$$

where  $I$  and  $I_0$  are the emission intensities of albumins with and without mycotoxins, respectively.  $K_{SV}$  (unit: L/mol) is the Stern-Volmer quenching constant and  $[Q]$  is the molar concentration of the quencher (ZEN or ZELs). To eliminate the inner-filter effects of mycotoxins, emission intensities were corrected based on the following equation (Poór et al. 2017a):

$$I_{cor} = I_{obs} \times e^{(A_{ex}+A_{em})/2} \quad (2)$$

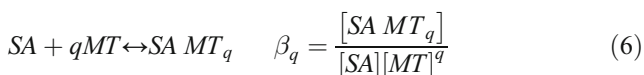
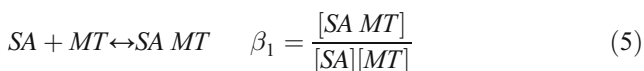
where  $I_{cor}$  and  $I_{obs}$  denote the corrected and observed emission intensities, respectively, while  $A_{ex}$  and  $A_{em}$  are the absorbance of mycotoxins at 295 and 340 nm, respectively.

Binding constants ( $K$ ; unit: L/mol) of mycotoxin (MT)-serum albumin (SA) complexes were calculated by non-linear fitting using Hyperquad2006 program package (Poór et al. 2018; Sueck et al. 2018), during which the following equations were implemented in the Hyperquad code:



$$\beta_{pq} = \frac{[SA_p MT_q]}{[SA]^p [MT]^q} \quad (4)$$

where  $p$  and  $q$  denote the coefficients which indicate the stoichiometry associated with the equilibrium. All equilibrium constants ( $\beta$ ) were defined as overall binding constants.



The relationship between the overall binding constants and the stepwise binding constants was calculated by Hyperquad based on the following.

$$\beta_1 = K_1; \quad \beta_q = K_1 \times K_2 \dots \times K_q \quad (7)$$

The stoichiometry and binding constants of mycotoxin-albumin complexes were determined by the model associated with the lowest standard deviation.

## High-performance affinity chromatography

Mycotoxin-HSA complex formation was confirmed by high-performance affinity chromatography (HPAC) analyses at room temperature. The HPLC system (Jasco) was equipped with an intelligent pump (PU-980), a degasser (DG-2080-54), a manual injector with a 5- $\mu$ l sample loop, and a diode-array detector (MD 2010 Plus). Data were recorded and evaluated by ChromNAV Software. The eluent which contained isopropanol (HPLC grade, VWR) and 0.01 mol/L pH 7.0 ammonium acetate buffer (15:85 v/v%) was pumped with 0.5 mL/min flow rate through an injector (Rheodyne 7725i) and the HPAC column coated with immobilized HSA (50  $\times$  3.0 mm, 5  $\mu$ m particle size, Chiralpak® HSA). The isocratically eluted compounds were detected by diode-array detector at 235 nm.

## Thermodynamic studies

In the thermodynamic studies, fluorescence spectra were recorded using Fluorolog  $\tau$ 3 spectrofluorometric system (Jobin-Yvon/SPEX) at six different temperatures (298, 301, 304, 307, 310, and 313 K). Based on our earlier work (Poór et al. 2017b), binding constants of ZEN-albumin complexes were calculated applying Hyperquad2006 program package (Gans et al. 1996) assuming 1:1 stoichiometry. Thermodynamic parameters associated to the complex formations between ZEN and albumins were computed using the van't Hoff equation:

$$\log K = -\frac{\Delta G}{RT} = -\frac{\Delta H}{2.303 \cdot R \cdot T} + \frac{\Delta S}{2.303 \cdot R} \quad (8)$$

where  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ , and  $\Delta S$  reflect the Gibbs free energy, enthalpy, and entropy changes of the binding reaction, respectively, while  $R$  is the gas constant and  $T$  refers to the temperature.

## Modeling studies

The ligand molecules ( $\alpha$ -ZEL and  $\beta$ -ZEL) were built in Maestro (Schrödinger 2013). The raw structure was energy minimized, using the semi-empirical quantum chemistry program package, MOPAC (Stewart 1990) and the PM6 parameterization. The gradient norm was set to 0.001. The energy minimized structure was subjected to force calculations. The force constant matrices were positive definite. Apo crystallographic structure (PDB code: 1ao6) was used as a target molecule in our calculations. Acetyl and amide capping groups were attached to the N- and C-termini, respectively, using the Schrödinger Maestro program package v. 9.6 (Schrödinger 2013). As 1ao6 contains a homodimer structure, only chain A was used for calculations. Co-crystallized ions and water molecules were removed before minimizing the

protein structure. The target molecule was minimized using a two-step protocol with the GROMACS software package (Abraham et al. 2015), including a steepest descent and a conjugate gradient step, using AMBER99-ildn force field (Lindorff-Larsen et al. 2010). Exit tolerance levels were set to 1000 and 10 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-1</sup> while maximum step sizes were set to 0.5 and 0.05 nm, respectively.

Using the optimized ligand and target structures, blind docking calculations were performed with AutoDock 4.2 program package (Morris et al. 2009) as described in our previous publications (Hetényi and van der Spoel 2002, 2006, 2011). Gasteiger-Marsili partial charges were added to both ligands and target atoms using AutoDock Tools (Morris et al. 2009) and a united atom representation was applied for non-polar moieties. A grid box of 250 grid points was assigned in all axes, and 0.375 Å spacing was calculated and centered on the center of mass of the target by AutoGrid 4.2. Lamarckian genetic algorithm was used for global search. Flexibility at three active torsions was allowed on both ligands. Number of docking runs was set to 100, whereas numbers of energy evaluations and generations were 20 million (Hetényi and van der Spoel 2002). The docked ligand copies were ordered according to AutoDock 4 scores (Morris et al. 2009), and subsequently clustered using a 2 Å distance tolerance between cluster representatives.

## Results and discussion

### Investigation of mycotoxin-albumin interactions using fluorescence quenching method

In this study, fluorescence emission spectra of albumins (2 μmol/L; HSA/BSA: 0.133 g/L; PSA/RSA: 0.135 g/L) were recorded in the presence of increasing mycotoxin concentrations (0–10 μmol/L; ZEN: 0.000–3.184 mg/L; ZELs: 0.000–3.204 mg/L) in PBS buffer (pH = 7.4; λ<sub>ex</sub> = 295 nm). In order to exclude the inner-filter effect, emission intensities were corrected by Eq. 2. In a concentration-dependent fashion, each tested mycotoxin induced the decrease of fluorescence at 340 nm (emission maximum of albumins), resulted from the quenching effects of ZEN and ZELs on albumins and suggesting the formation of mycotoxin-albumin complexes (Poór et al. 2015, 2017a, b). The Stern-Volmer plots of mycotoxin-albumin complexes showed good linearity (Fig. 2; R<sup>2</sup> = 0.97–0.99). Based on the mycotoxin-induced quenching of fluorescence, Stern-Volmer quenching constants (K<sub>SV</sub>) and binding constants (K) of mycotoxin-albumin complexes were calculated (see details in “Spectroscopic measurements” section). Both Stern-Volmer equation (Eq. 1) and Hyperquad2006 program (Eqs. 3–7) suggest 1:1 stoichiometry of complex formation. As demonstrated in Table 1, logK<sub>SV</sub> and logK values correlate, and suggest the formation of stable

mycotoxin-albumin complexes (logK = 4.05–5.43). Judged from the logK<sub>SV</sub> and logK values, HSA, BSA, and PSA form the most stable complexes with ZEN followed by α-ZEL and β-ZEL, while each mycotoxin bind to RSA with similar affinity. The binding constant of ZEN-HSA complex is 2.3-fold and 5.8-fold higher compared to α-ZEL-HSA and β-ZEL-HSA, respectively. ZEN and ZELs formed by far the most stable complexes with RSA, while the least stable mycotoxin-albumin complexes were typically formed with PSA. Significant species differences were observed in binding to albumin with each mycotoxin tested, approaching tenfold or higher differences when comparing the stabilities of ZEN-PSA vs. ZEN-RSA, α-ZEL-BSA vs. α-ZEL-RSA, or β-ZEL-HSA vs. β-ZEL-RSA, for example. These results suggest that the influence of albumin on the toxicokinetics of ZEN and ZELs may also be species-dependent.

### High-performance affinity chromatography of ZEN and ZELs

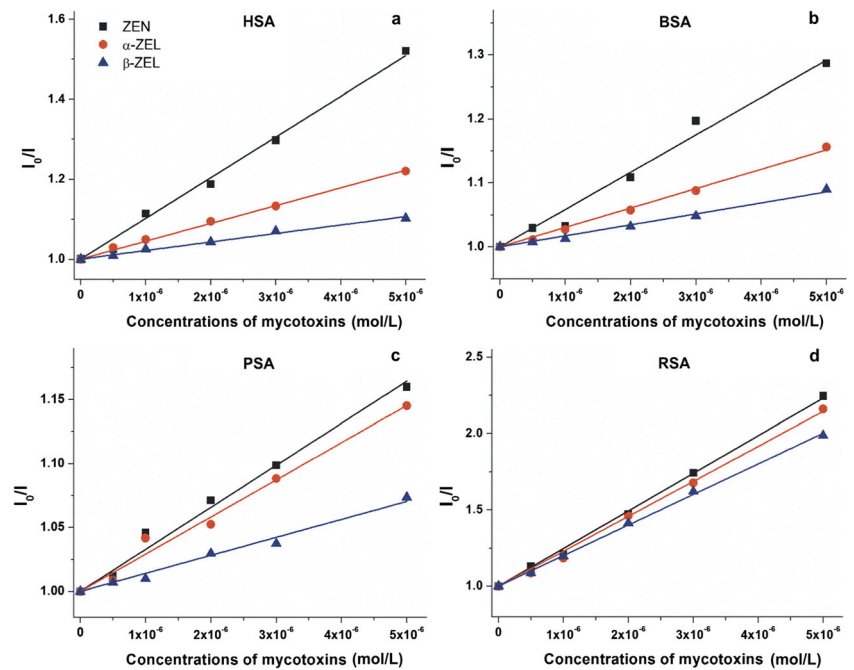
HPAC column coated with immobilized HSA was applied to confirm the results of our fluorescence spectroscopic studies. Because the data in Table 1 indicate that ZEN and ZELs bind with significantly different affinities to HSA, it is reasonable to expect that these compounds are eluted from the HSA-HPAC column at different retention times. Applying the suggested experimental conditions of the column, we tried to elute the mycotoxins both with 0.01 mol/L ammonium acetate (pH 7.0) and with 0.01 mol/L sodium phosphate (pH 7.0) buffers containing isopropanol (5–15 v/v%). In the sodium phosphate buffer, elution of ZEN was excessively delayed; therefore, further experiments were performed with the ammonium acetate buffer containing 15 v/v% isopropanol. The significant differences in the retention times of ZEN, α-ZEL, and β-ZEL (Fig. 3) clearly indicate the different binding affinities of these mycotoxins toward HSA. At pH 7.0, the longest retention time was observed for ZEN (15.6 min), while α-ZEL (8.1 min) and β-ZEL (4.6 min) were eluted more rapidly from the HSA-coated column. These results are in agreement with the spectroscopic studies, which yielded the following complex stabilities: ZEN-HSA > α-ZEL-HSA > β-ZEL-HSA (Table 1).

### Thermodynamic studies

Serum albumins are multifunctional proteins which are highly conserved in both sequence and structure (Chruszcz et al. 2013). Therefore, it is expected that their biological behaviors, such as their ligand binding properties, are usually very similar. Indeed, the mycotoxin aflatoxin B1 and citrinin bind to different albumins with similar affinity (Poór et al. 2015, 2017a). Nevertheless, some ligands, such as ochratoxin A, show marked species-dependence (Poór et al. 2014; Köszegei



**Fig. 2** Stern-Volmer plots of mycotoxin complexes formed with HSA (a), BSA (b), PSA (c), and RSA (d) ( $\lambda_{ex} = 295$  nm,  $\lambda_{em} = 340$  nm; *ZEN* zearalenone,  $\alpha$ -*ZEL*  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -*ZEL*  $\beta$ -zearalenol, *HSA* human serum albumin, *BSA* bovine serum albumin, *PSA* porcine serum albumin, *RSA* rat serum albumin)



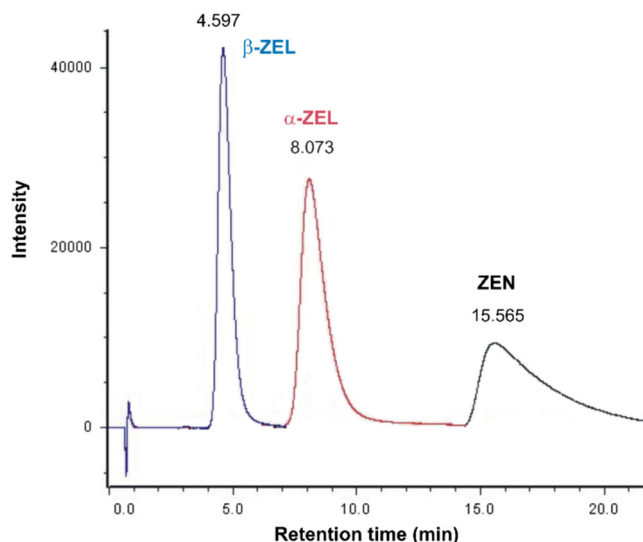
and Poór 2016). Therefore, the interactions of ZEN with different serum albumins have been analyzed in details. Since the binding constants of ZEN to albumin from various species differ substantially (Table 1), the temperature dependence of the ZEN-albumin complex formation, using HSA, BSA, PSA, and RSA, was also examined. Figure 4 demonstrates the van't Hoff plot of ZEN-albumin complexes, based on equilibrium constants determined at different temperatures. Thermodynamic parameters were calculated from the slope and the intercept after linear fitting (according to Eq. 8). The negative  $\Delta G$  values suggest spontaneous interaction of ZEN with albumins at room-temperature (Table 2). These values are in the typical range of non-covalent interactions. During

the formation of protein-ligand complexes, the interaction forces are derived from van der Waals interactions, hydrophobic forces, multiple hydrogen bonds, and/or electrostatic interactions. Thermodynamic data give deeper insights into the nature of these binding forces (Ross and Subramanian 1981). Comparing enthalpy and entropy values raised during the formation of ZEN-albumin complexes, the higher enthalpy change is associated with smaller entropy gain resulting in an enthalpy-driven process regarding ZEN-HSA and ZEN-RSA complexes in agreement with the known enthalpy-entropy compensation. Negative values of both enthalpy and entropy changes indicate that van der Waals forces and hydrogen bond formation are involved in the complex formation of

**Table 1** Decimal logarithmic values of the Stern-Volmer quenching constants ( $K_{SV}$ ; unit: L/mol) and binding constants ( $K$ ; unit: L/mol) of mycotoxin-albumin complexes

Mycotoxin-albumin complex <sup>a</sup>	$\log K_{SV} \pm SD$ (unit of $K_{SV}$ : L/mol)	$\log K \pm SD$ (unit of $K$ : L/mol)
ZEN-HSA	$5.09 \pm 0.01$	$5.09 \pm 0.01$
ZEN-BSA	$4.81 \pm 0.01$	$4.78 \pm 0.01$
ZEN-PSA	$4.56 \pm 0.02$	$4.57 \pm 0.01$
ZEN-RSA	$5.50 \pm 0.01$	$5.42 \pm 0.00$
$\alpha$ -ZEL-HSA	$4.70 \pm 0.02$	$4.72 \pm 0.00$
$\alpha$ -ZEL-BSA	$4.54 \pm 0.02$	$4.46 \pm 0.02$
$\alpha$ -ZEL-PSA	$4.47 \pm 0.07$	$4.49 \pm 0.01$
$\alpha$ -ZEL-RSA	$5.32 \pm 0.04$	$5.43 \pm 0.00$
$\beta$ -ZEL-HSA	$4.28 \pm 0.04$	$4.33 \pm 0.00$
$\beta$ -ZEL-BSA	$4.27 \pm 0.04$	$4.37 \pm 0.01$
$\beta$ -ZEL-PSA	$4.18 \pm 0.07$	$4.05 \pm 0.05$
$\beta$ -ZEL-RSA	$5.29 \pm 0.02$	$5.43 \pm 0.00$

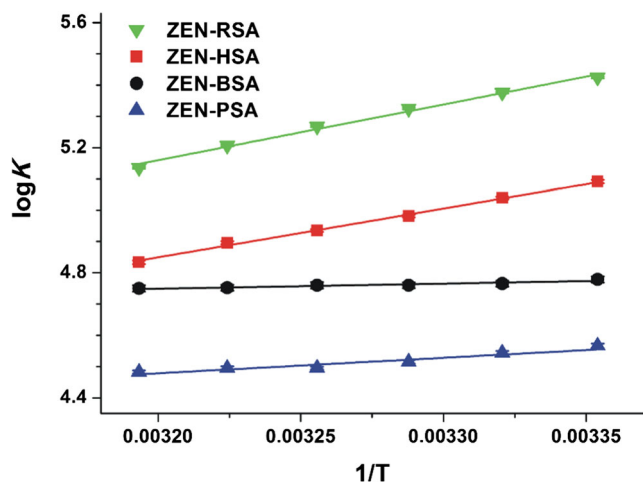
<sup>a</sup> *ZEN* zearalenone,  $\alpha$ -*ZEL*  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -*ZEL*  $\beta$ -zearalenol, *HSA* human serum albumin, *BSA* bovine serum albumin, *PSA* porcine serum albumin, *RSA* rat serum albumin



**Fig. 3** HPLC chromatograms of  $\beta$ -ZEL,  $\alpha$ -ZEL, and ZEN eluted from the HSA-coated column (see details in “High-performance affinity chromatography” section)

ZEN with HSA and RSA. Furthermore, the low entropy gain of these interactions reflects that ZEN may keep its solvation shell during the complex formation processes.

The formation of ZEN-BSA and ZEN-PSA complexes is entropy driven, in which smaller enthalpy changes are associated with higher entropy gain, showing enthalpy-entropy compensation. The positive values of entropy changes suggest the partial decomposition of the solvation shell of the interacting molecules and/or local changes (e.g., unfolding) in the conformation of albumin. The negative enthalpy change is associated with positive entropy change, suggesting the role of electrostatic forces in the formation of ZEN-BSA and ZEN-PSA complexes. According to these thermodynamic data, the binding characteristics of the more stable ZEN-RSA and



**Fig. 4** The van't Hoff plots of zearalenone-albumin complexes (ZEN zearalenone, HSA human serum albumin, BSA bovine serum albumin, PSA porcine serum albumin, RSA rat serum albumin)

**Table 2** Thermodynamic parameters of zearalenone-albumin complexes

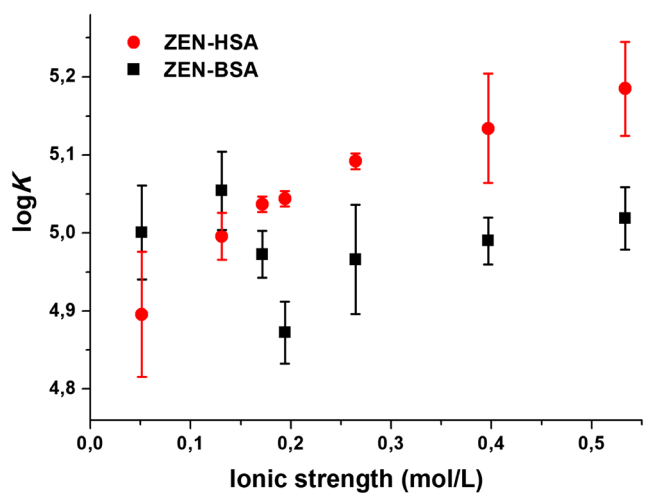
Thermodynamic parameters	HSA	BSA	PSA	RSA
$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	-30.09	-3.13	-10.04	-34.20
$\Delta S$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	-3.45	80.90	53.62	-10.65
$\Delta G_{298K}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	-29.06	-27.25	-26.03	-31.03

ZEN zearalenone, HSA human serum albumin, BSA bovine serum albumin, PSA porcine serum albumin, RSA rat serum albumin. The parameters for the ZEN-HSA complex are from our earlier study (Poór et al. 2017a, b)

ZEN-HSA complexes seem different from those of the less stable ZEN-BSA and ZEN-PSA.

HSA and BSA are extensively studied macromolecules. Due to their structural similarity, the significantly cheaper BSA is more commonly applied to examine albumin-ligand interactions than HSA (Poór et al. 2014). However, some previous studies demonstrated that major differences may occur between HSA and BSA complexes, e.g., ochratoxin A binds to HSA with approximately ten times higher affinity than to BSA (Poór et al. 2014). The present study gives a new example, when ligand binding shows significant species differences, as related by both the dissimilar binding constants and binding characteristics of ZEN-HSA and ZEN-BSA complexes.

To further analyze the differences between HSA and BSA, the effect of ionic strength on the ZEN-HSA and ZEN-BSA interactions were also investigated in different sodium phosphate buffers (0.05–0.53 mol/L), as it is well-known that variations in ionic strength affect the albumin-ligand interactions (Kaspchak et al. 2018). High ionic strength may decrease or increase the binding constant, depending on the involvement of electrostatic or hydrophobic forces, respectively. Figure 5



**Fig. 5** Binding constants of ZEN-HSA and ZEN-BSA complexes plotted against the ionic strength of the applied phosphate buffer at 298 K (ZEN zearalenone, HSA human serum albumin, BSA bovine serum albumin)

**Table 3** The results of Uniprot alignment of BSA, PSA, and RSA with HSA

Comparison to HSA	Identical residues	Identity %	Residues
HSA-BSA	465	76.34	106
HSA-PSA	462	75.86	99
HSA-RSA	446	73.23	128

HSA human serum albumin, BSA bovine serum albumin, PSA porcine serum albumin, RSA rat serum albumin

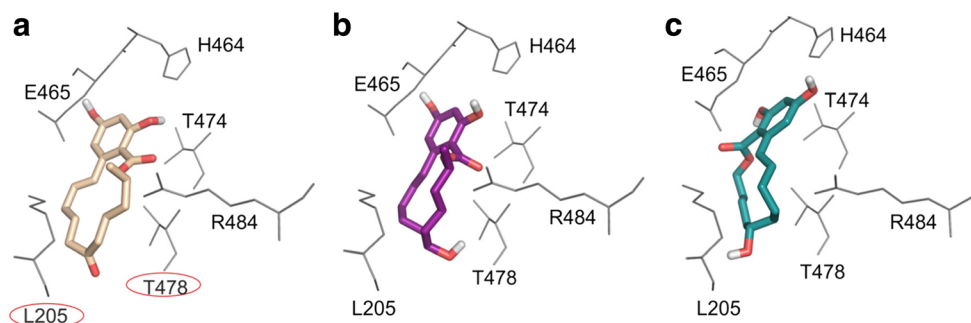
demonstrates binding constants of ZEN-HSA and ZEN-BSA complexes as a function of the ionic strength. Although the ionic strength of the media slightly affects the binding constant of the ZEN-HSA and ZEN-BSA complexes, the different binding characteristics of the two albumin species with ZEN is apparent. At an increased ionic strength, higher binding affinity was observed, reflecting dominance of hydrophobic interaction between ZEN and HSA. This means that the positive entropy change associated with hydrophobic processes is also balanced by the negative contribution of entropy change caused by formation of hydrogen bonds and action of van der Waals forces (Ross and Subramanian 1981). Therefore, hydrophobic interactions play an important role in the complex formation of ZEN with HSA. However, the investigation of ZEN-BSA interaction did not reveal a clear correlation between the ionic strength and the binding constant (Fig. 5). In the study of Ma et al. (Ma et al. 2018) on ZEN-BSA interaction, similar observations were made. Based on the positive entropy change, they proposed that hydrophobic forces played a major role, although it is held that positive entropy change with a negative enthalpy change is suggestive for the involvement of electrostatic interactions (Ross and Subramanian 1981). Considering that the partial decomposition of solvation shells of the interacting molecules facilitates hydrophobic interactions, our observation that the binding constant of ZEN-BSA complex is independent of the ionic strength suggests the involvement of hydrophobic and electrostatic interactions.

## Molecular modeling studies

First, the similarities between HSA and three other albumins from other species (BSA, PSA, and RSA) were analyzed. Initially, Uniprot alignment of bovine (BSA), porcine (PSA), and rat (RSA) serum albumins were performed compared to HSA. The results of alignment (Fig. S1) and overall statistics (Table 3) demonstrate high similarities between serum albumins from the four species. The binding site of ZEN on HSA was described in our previous publication (Poór et al. 2017b). In the present study, the amino acid composition in the corresponding binding region was compared for HSA, BSA, PSA, and RSA (Fig. S1). The ZEN binding site in HSA, BSA, and PSA contains identical amino acids (Fig. S1), while RSA contains different amino acids at positions 205 and 478: charged K (lysine) is replaced by a bulkier, but also positively charged R (arginine), while T (threonine) is replaced by S (serine), maintaining the hydroxyl group within the binding site. These minor structural differences in RSA might be responsible for the observation that ZEN and ZELs bind much higher affinity to RSA compared to other albumins tested.

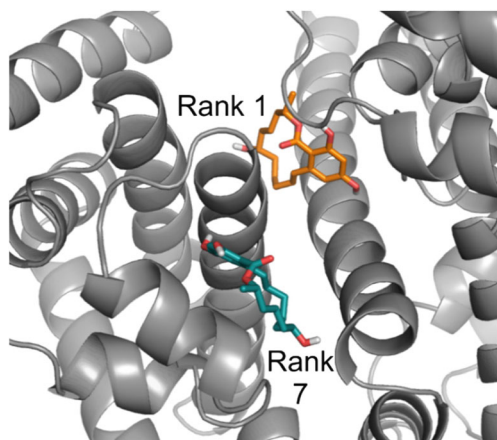
Thereafter, the available X-ray structures of BSA (4f5s) and HSA (1a06) were compared. After their CA alignment of these two structures (Fig. S2, left), a 1.2 Å RMSD was obtained, which also demonstrates high similarity of the structures. Identical amino acids and similar amino acid conformations were observed in the binding site of ZEN in HSA and BSA (Fig. S2, right).

Using the docking parameters described in our previous publication (Poór et al. 2017b), blind docking of  $\alpha$ -ZEL and  $\beta$ -ZEL was performed on HSA. Then these results were compared with previous docking studies performed with ZEN (Fig. 6a). As Fig. 6 demonstrates, the binding site and binding position of  $\alpha$ -ZEL (obtained in the first rank) on HSA were very similar to those of ZEN. However, this binding site was obtained only in the seventh rank for  $\beta$ -ZEL (Fig. 6c). The binding site of  $\beta$ -ZEL with the highest binding energy (ranking the first after blind docking) was found at approximately 15 Å away from the binding site of ZEN (Fig. 7). The similar



**Fig. 6** **a** Zearalenone conformation and binding site on human albumin, as described in our previous study (Poór et al. 2017b). **b**  $\alpha$ -Zearalenol conformation and binding site on human albumin obtained in the first

rank of blind docking calculation. **c**  $\beta$ -Zearalenol conformation and binding site on human albumin obtained in the seventh rank of blind docking calculation

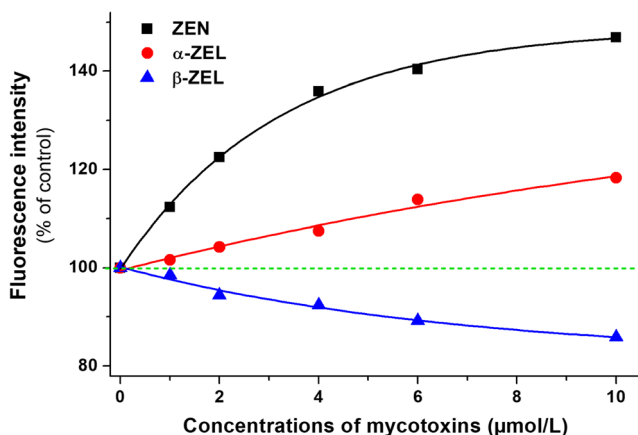


**Fig. 7** First (rank 1) and seventh (rank 7) rank binding sites of  $\beta$ -zearalenol on human albumin based on blind docking

binding site and position of  $\alpha$ -ZEL on HSA explain why the affinity of  $\alpha$ -ZEL toward HSA is relatively close to ZEN. However, the much weaker interaction of  $\beta$ -ZEL with HSA (compared to ZEN and  $\alpha$ -ZEL) may result from a different binding position of  $\beta$ -ZEL in the same binding site (Fig. 6c) or from a different binding site of  $\beta$ -ZEL, which is also located between subdomains IIA and IIIA (Fig. 7). Nevertheless, modeling studies demonstrated that, similarly to ZEN,  $\alpha$ - and  $\beta$ -ZEL also occupy non-conventional binding site(s) on HSA.

### Effects of ZEN and its reduced metabolites on warfarin-HSA interaction

Our previous study demonstrated that ZEN interacts allosterically with Sudlow's site I ligands, thus increasing the binding affinity of warfarin toward HSA (Poór et al. 2017b). Since the albumin-bound warfarin expresses much stronger fluorescence than free warfarin, the increase in the HSA-bound



**Fig. 8** Fluorescence emission intensity of warfarin (1  $\mu$ mol/L; 0.308 mg/L) complexed with HSA (3.5  $\mu$ mol/L; 0.233 g/L) in the presence of increasing zearalenone or zearalenol concentrations in PBS (pH 7.4;  $\lambda_{\text{ex}} = 317$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 379$  nm; ZEN zearalenone,  $\alpha$ -ZEL  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -ZEL  $\beta$ -zearalenol)

warfarin significantly enhance its fluorescence at 379 nm (Poór et al. 2015, 2017a, b). To test whether or not ZELs exert similar effects, ZELs at increasing concentrations (0–10  $\mu$ mol/L) were added to warfarin (1  $\mu$ mol/L; 0.308 mg/L) and HSA (3.5  $\mu$ mol/L; 0.233 g/L) in PBS. As Fig. 8 demonstrates,  $\alpha$ -ZEL induced a smaller rise in the fluorescence signal of warfarin-HSA complex than ZEN. In contrast,  $\beta$ -ZEL caused concentration-dependent decrease in the fluorescence intensity of warfarin. Under the applied conditions, free or HSA-bound ZEN and ZELs gave negligible fluorescence as compared to warfarin-HSA complex, and the very slight inner-filter effect of mycotoxins was corrected based on Eq. 2. Therefore, the observed changes in fluorescence likely resulted from the changes in the bound fraction of warfarin in the presence of these mycotoxins. The different effect of  $\beta$ -ZEL further supports the hypothesis that binding site or position of  $\beta$ -ZEL is different than that of ZEN and  $\alpha$ -ZEL.

In conclusion, fluorescence spectroscopic and HPLC studies on the interactions of ZEN,  $\alpha$ -ZEL, and  $\beta$ -ZEL with HSA indicated that mycotoxin-albumin complexes were formed and their stabilities decreased in the order: ZEN-HSA >  $\alpha$ -ZEL-HSA >  $\beta$ -ZEL-HSA. The lower binding affinity of  $\beta$ -ZEL (compared to ZEN and  $\alpha$ -ZEL) may have resulted from its different binding position or binding site on HSA. Furthermore, when comparing albumins from various species (i.e., HSA, BSA, PSA, and RSA), significant differences of ZEN-albumin and ZEL-albumin interactions were observed, even exceeding tenfold differences in the binding constants. ZEN and ZELs typically formed the most stable complexes with RSA and the less stable complexes with PSA. Thermodynamic studies also revealed significant species differences in ZEN-albumin interactions: the binding characteristics of ZEN to HSA and RSA were similar, whereas the binding forces involved in ZEN-BSA and ZEN-PSA complex formation appear different. Thus, the in vivo toxicological relevance of ZEN-albumin and ZEL-albumin interactions may also be different in various species.

**Acknowledgements** This project was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (M.P.). M.P. is thankful for support of the University of Pécs for grant in the frame of Pharmaceutical Talent Centre program. This work was supported by the GINOP-2.3.2-15-2016-00049 grant. We acknowledge a grant of computer time from CSCS Swiss National Supercomputing Centre, and NIFI Hungarian National Information Infrastructure Development Institute. We acknowledge that the results of this research have been achieved using the DECI resource Archer based in the UK at the National Supercomputing Service with support from the PRACE aisbl. M.B. and C.H. are thankful to the University of Pécs for the grant in the frame of “Supporting Individual Research and Innovation Activity of Young Researchers, 2018” program.

**Source of funding** This project was supported by the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (FK125166) (M.P.). The work of M.B. and C.H. is supported by the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (K123836).



## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interest. We have full control of all primary data and we agree to allow the journal to review our data if requested.

## References

- Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E (2015) GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Chruszcz M, Mikolajczak K, Mank N, Majorek KA, Porebski PJ, Minor W (2013) Serum albumins—unusual allergens. *Biochim Biophys Acta* 1830:5375–5381. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.016>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2017) Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA J* 15:4851. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4851>
- Fanali G, Di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P (2012) Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Asp Med* 33:209–290. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>
- Filannino A, Stout TA, Gadella BM, Sostaric E, Pizzi F, Colenbrander B, Dell'Aquila ME, Minervini F (2011) Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm. *Reprod Biol Endocrinol* 9:134. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-134>
- Fleck SC, Churchwell MI, Doerge DR (2017) Metabolism and pharmacokinetics of zearalenone following oral and intravenous administration in juvenile female pigs. *Food Chem Toxicol* 106:193–201. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.048>
- Frizzell C, Ndossi D, Verhaegen S, Dahl E, Eriksen G, Sørli M, Ropstad E, Muller M, Elliott CT, Connolly L (2011) Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicol Lett* 206:210–217. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.07.015>
- Gans P, Sabatini A, Vacca A (1996) Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* 43:1739–1753. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(96\)01958-3](https://doi.org/10.1016/0039-9140(96)01958-3)
- Hetényi C, van der Spoel D (2002) Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein Sci* 11:1729–1737. <https://doi.org/10.1110/ps.0202302>
- Hetényi C, van der Spoel D (2006) Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues. *FEBS Lett* 580:1447–1450. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.074>
- Hetényi C, van der Spoel D (2011) Toward prediction of functional protein pockets using blind docking and pocket search algorithms. *Protein Sci* 20:880–893. <https://doi.org/10.1002/pro.618>
- Huang LC, Zheng N, Zheng BQ, Wen F, Cheng JB, Han RW, Xu XM, Li SL, Wang JQ (2014) Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and alpha-zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. *Food Chem* 146:242–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.047>
- Kaspchak E, Mafra LI, Mafra MR (2018) Effect of heating and ionic strength on the interaction of bovine serum albumin and the antinutrients tannic and phytic acids, and its influence on in vitro protein digestibility. *Food Chem* 252:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.089>
- Kőszegi T, Poór M (2016) Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins* 8:111. <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>
- Li Y, Wang H, Jia B, Liu C, Liu K, Qi Y, Hu Z (2013) Study of the interaction of deoxynivalenol with human serum albumin by spectroscopic technique and molecular modelling. *Food Addit Contam Part A* 30:356–364. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.742573>
- Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78:1950–1958. <https://doi.org/10.1002/prot.22711>
- Ma L, Maragos CM, Zhang Y (2018) Interaction of zearalenone with bovine serum albumin as determined by fluorescence quenching. *Mycotoxin Res* 34:39–48. <https://doi.org/10.1007/s12550-017-0297-7>
- Maragos CM (2010) Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin J* 3:369–383. <https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1240>
- Minervini F, Dell'Aquila ME (2008) Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int J Mol Sci* 9:2570–2584. <https://doi.org/10.3390/ijms9122570>
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30:2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Perry JL, Il'ichev YV, Kempf VR, McClendon J, Park G, Manderville RA, Rüker F, Dockal M, Simon JD (2003) Binding of ochratoxin A derivatives to human serum albumin. *J Phys Chem B* 107:6644–6647. <https://doi.org/10.1021/jp034284w>
- Poór M, Kunsági-Máté S, Bencsik T, Petrik J, Vladimír-Knežević S, Kőszegi T (2012) Flavonoid aglycones can compete with ochratoxin A for human serum albumin: a new possible mode of action. *Int J Biol Macromol* 51:279–283. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.05.019>
- Poór M, Li Y, Matisz G, Kiss L, Kunsági-Máté S, Kőszegi T (2014) Quantitation of species differences in albumin-ligand interactions for bovine, human and rat serum albumins using fluorescence spectroscopy: a test case with some Sudlow's site I ligands. *J Lumin* 145:767–773. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.08.059>
- Poór M, Lemli B, Bálint M, Hetényi C, Sali N, Kőszegi T, Kunsági-Máté S (2015) Interaction of citrinin with human serum albumin. *Toxins* 7:515–5166. <https://doi.org/10.3390/toxins7124871>
- Poór M, Bálint M, Hetényi C, Góder B, Kunsági-Máté S, Kőszegi T, Lemli B (2017a) Investigation of non-covalent interactions of aflatoxins (B1, B2, G1, G2, and M1) with serum albumin. *Toxins* 9:339. <https://doi.org/10.3390/toxins9110339>
- Poór M, Kunsági-Máté S, Bálint M, Hetényi C, Gerner Z, Lemli B (2017b) Interaction of mycotoxin zearalenone with human serum albumin. *J Photochem Photobiol B* 170:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.07.009>
- Poór M, Boda G, Kunsági-Máté S, Needs PW, Kroon PA, Lemli B (2018) Fluorescence spectroscopic evaluation of the interactions of quercetin, isorhamnetin, and quercetin-3'-sulfate with different albumins. *J Lumin* 194:156–163. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2017.10.024>
- Ross PD, Subramanian S (1981) Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* 20:3096–3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>
- Schollenberger M, Müller HM, Rühle M, Suchy S, Plank S, Drochner W (2006) Natural occurrence of 16 fusarium toxins in grains and feed-stuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia* 161:43–52. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0199-7>
- Schrödinger LLC (2013) Schrödinger release 2013–3: SiteMap, Version 2.9. Schrödinger, LLC, New York
- Shier WT, Shier AC, Xie W, Mirocha CJ (2001) Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol* 39:1435–1438. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00259-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00259-2)
- Stewart JJ (1990) MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. *J Comput Aided Mol Des* 4(1):105

- Sueck F, Poór M, Faisal Z, Gertzen CGW, Cramer B, Lemli B, Kunsági-Máté S, Gohlke H, Humpf HU (2018) Interaction of ochratoxin A and its thermal degradation product 2'R-ochratoxin A with human serum albumin. *Toxins* 10:E256. <https://doi.org/10.3390/toxins10070256>
- Yamasaki K, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M (2013) Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta* 1830: 5435–5443. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.005>
- Yazar S, Omurtag GZ (2008) Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *Int J Mol Sci* 9:2062–2090. <https://doi.org/10.3390/ijms9112062>
- Yuqin L, Guirong Y, Zhen Y, Caihong L, Baoxiu J, Jiao C, Yurong G (2014) Investigation of the interaction between patulin and human serum albumin by a spectroscopic method, atomic force microscopy, and molecular modeling. *Biomed Res Int* 2014:734850. <https://doi.org/10.1155/2014/734850>
- Zsila F (2013) Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. *Mol Pharm* 10: 1668–1682. <https://doi.org/10.1021/mp400027q>

# **Interactions of zearalenone and its reduced metabolites $\alpha$ -zearalenol and $\beta$ -zearalenol with serum albumins: species differences, binding sites, and thermodynamics**

## **Mycotoxin Research**

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Zelma Faisal,<sup>1,2</sup> Beáta Lemli,<sup>2,3,4</sup> Dénes Szerencsés,<sup>3</sup> Sándor Kunsági-Máté,<sup>2,3,4</sup> Mónika Bálint,<sup>5</sup> Csaba Hetényi,<sup>5</sup> Mónika Kuzma,<sup>6</sup> Mátyás Mayer,<sup>6</sup> Miklós Poór<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Szigeti út 12, Pécs H-7624, Hungary

<sup>2</sup>János Szentágothai Research Center, Ifjúság útja 20, Pécs H-7624, Hungary

<sup>3</sup>Department of General and Physical Chemistry, University of Pécs, Faculty of Sciences, Ifjúság útja 6, Pécs H-7624, Hungary

<sup>4</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Rókus u. 2, Pécs H-7624, Hungary

<sup>5</sup>Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs, Medical School, Szigeti út 12, Pécs H-7624, Hungary

<sup>6</sup>Department of Forensic Medicine, Medical School, University of Pécs, Szigeti út 12, Pécs H-7624, Hungary

\*Corresponding author: Miklós Poór, PharmD, PhD

Department of Pharmacology, University of Pécs, Faculty of Pharmacy, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary

Phone: +36-72-536-000/31646

Fax: +36-72-536-218

E-mail address: poor.miklos@pte.hu

HUMAN MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDRAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLIIFAQYLQCCPF 60  
 BOVINE MKWVTFISLLLLLSSAYSRGVFRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQCCPF 60  
 PIG MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDRTYKSEIAHRFKDLGEGYFKGLVLIAFSQHLQCCPY 60  
 RAT MKWVTFLLLLLFIGSAFSGVFRREAHKSEIAHRFKDLGEGHFKGLVLIAFSQYLQKCPY 60

HUMAN EDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP 120  
 BOVINE DEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCCKQEP 120  
 PIG EEHVKLVREVTEFAKTCVADESAENCDSIHTLFGDKLCAIPSLREHYGDLADCCEKEEP 120  
 RAT EEHIKLVQEVTDFAKTCVADENAENCDSIHTLFGDKLCAIPKLRDNYGELADCCAKQEP 120

HUMAN ERNECFLQHKDDNPPLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELFF 180  
 BOVINE ERNECFLSHKDDSPDLPKL-KPDPNTLCDEFKADEKFKWGKYLEIARRHPYFYAPPELLY 179  
 PIG ERNECFLQHKNDNPDI PKL-KPDPVALCADFQEDEQKFWGKYLEIARRHPYFYAPPELLY 179  
 RAT ERNECFLQHKDDNPPLPPFQRPEAEAMCTSFQENPTSFLGHYLHEVARRHPYFYAPPELLY 180

HUMAN FAKRYKAAFTCECCQAADKAAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAV 240  
 BOVINE YANKYNGVFQECQAEDKGACLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGERALKAWSV 239  
 PIG YAI IYKDVFSQECQAADKAAACLLPKIEHLREKVLTSAAKQRLKASIQKFGERAFKAWSL 239  
 RAT YAEKYNEVLTQCCTESDKAAACLLPKLDAVKEKALVAAVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAV 240

HUMAN ARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLG 300  
 BOVINE ARLSQKRFKAEFVEVTKLVDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLG 299  
 PIG ARLSQRFPKADFTIEISKIVTDLAKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDTISTKLG 299  
 RAT ARMSQRFPNAEFAEITKLATDVTKINKECCHGDLLECADDRADLAKYICENQATISSKLG 300

HUMAN ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR 360  
 BOVINE ECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAQDAFLGSFLYEYSR 359  
 PIG ECCDKPLLEKSHCIAEAKRDEL PADLNP LEHDFVEDKEVCKNYKEAKHVFLGTFLYEYSR 359  
 RAT ACCDKPVLQKSQCLAEIEHDNIPADLPSIAADFVEDKEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSR 360

HUMAN RHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFE 420  
 BOVINE RHPEYAVSVLLLLRAKEYEATLECCAKDDPHACYSTVFDKLGKHLVDEPQNLIKQNCQDQFE 419  
 PIG RHPDYSVLLLLRIAKIYEATLEDCCAKEDPPACYATVDFKQPLVDEPKNLIKQNCLEFE 419  
 RAT RHPDYSVLLLLRLAKKYEATLEKCCAEAGDPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCELYE 420

HUMAN QLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVV 480  
 BOVINE KLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESEMPCTEDYLSLI 479  
 PIG KLGEYGFQNALIVRYTKKVPQVSTPTLVEVARLGLVGSRCCKRPEEERLSAEDYLSLV 479  
 RAT KLGEYGFQNAVLVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEAQRLPCVEDYLSAI 480

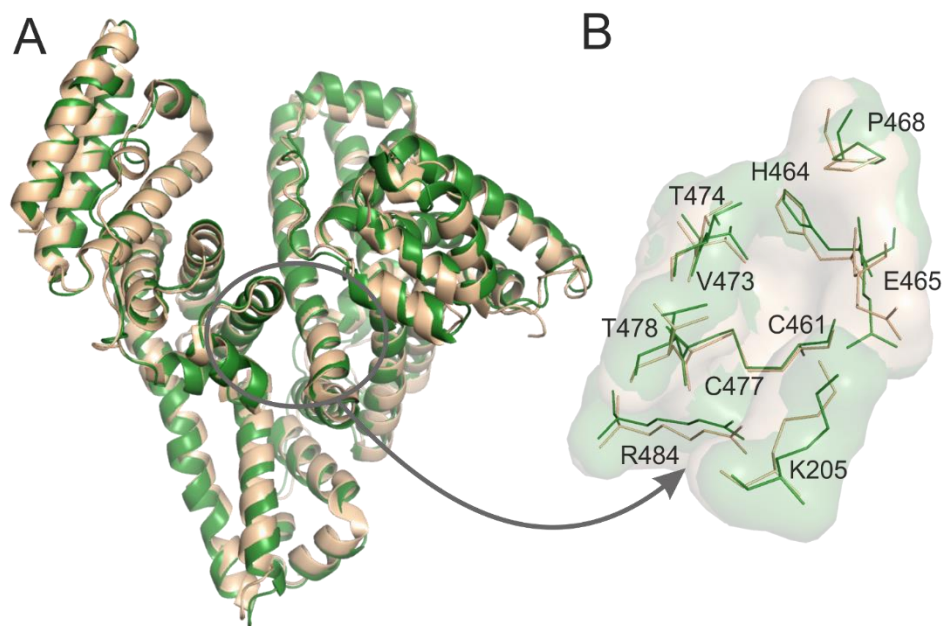
HUMAN LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTL 540  
 BOVINE LNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPEDETYVPKAFDEKLFTHADICTL 539  
 PIG LNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFVEGTFTFHADLCTL 539  
 RAT LNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCSGSLVERRPCFSALTPEDETYVPKEFKAETFTFHSDICTL 540

HUMAN SEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLV 600  
 BOVINE PDTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLV 599  
 PIG PEDEKQIKKQTALVELLKHKPHATEEQLRTVLGNFAAFVQKCCAAPDHEACFAVEGPKFV 599  
 RAT PDKEKQIKKQTALAEVLKHKPKATEDQLKTVMGDFAQFVDKCCAADKDNCFATEGPNLV 600

HUMAN AASQAALGL 609  
 BOVINE VSTQTALA- 607  
 PIG IEIRGILA- 607  
 RAT ARSKEALA- 608

**Fig. S1** Uniprot alignment of BSA (P02769), PSA (P08835), and RSA (P02770) amino acid sequences with HSA (P02768). Green color indicates the binding site of zearalenone on HSA, including the differences at 205 and 478 position (marked by red squares)





**Fig. S2** A: Cartoon representation of HSA (green), and BSA (beige) demonstrate structural similarities of these albumins. B: The residues (green and beige sticks, and surface) of the ZEN binding site seem also very similar in HSA and BSA

Article

# Cyclodextrins Can Entrap Zearalenone-14-Glucoside: Interaction of the Masked Mycotoxin with Cyclodextrins and Cyclodextrin Bead Polymer

Zelma Faisal <sup>1,2</sup>, Eszter Fliszár-Nyúl <sup>1,2</sup>, Luca Dellaflora <sup>3</sup> , Gianni Galaverna <sup>3</sup> , Chiara Dall'Asta <sup>3</sup>, Beáta Lemli <sup>2,4</sup>, Sándor Kunsági-Máté <sup>2,4</sup>, Lajos Szente <sup>5</sup> and Miklós Poór <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary

<sup>2</sup> János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság útja 20, H-7624 Pécs, Hungary

<sup>3</sup> Department of Food and Drug, University of Parma, Via G.P. 7 Usberti 17/A, 43124 Parma, Italy

<sup>4</sup> Institute of Organic and Medicinal Chemistry, Medical School, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary

<sup>5</sup> CycloLab Cyclodextrin Research & Development Laboratory, Ltd., Illatos út 7, H-1097 Budapest, Hungary

\* Correspondence: poor.miklos@pte.hu; Tel.: +36-72-536-000 (ext. 35052)

Received: 19 July 2019; Accepted: 7 August 2019; Published: 9 August 2019



**Abstract:** Zearalenone (ZEN) is a *Fusarium*-derived xenoestrogenic mycotoxin. In plants, zearalenone-14-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside (Z14G) is the major conjugated metabolite of ZEN, and is a masked mycotoxin. Masked mycotoxins are plant-modified derivatives, which are not routinely screened in food and feed samples. Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides built up from *D*-glucopyranose units. CDs can form stable host–guest type complexes with lipophilic molecules (e.g., with some mycotoxins). In this study, the interaction of Z14G with native and chemically modified  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs was examined employing fluorescence spectroscopy and molecular modeling. Furthermore, the removal of Z14G from aqueous solution by insoluble  $\beta$ -CD bead polymer (BBP) was also tested. Our results demonstrate that Z14G forms the most stable complexes with  $\gamma$ -CDs under acidic and neutral conditions ( $K \approx 10^3$  L/mol). Among the CDs tested, randomly methylated  $\gamma$ -CD induced the highest increase in the fluorescence of Z14G (7.1-fold) and formed the most stable complexes with the mycotoxin ( $K = 2 \times 10^3$  L/mol). Furthermore, BBP considerably reduced the Z14G content of aqueous solution. Based on these observations, CD technology seems a promising tool to improve the fluorescence analytical detection of Z14G and to discover new mycotoxin binders which can also remove masked mycotoxins (e.g., Z14G).

**Keywords:** zearalenone-14-glucoside; masked mycotoxin; cyclodextrins; host–guest interaction; fluorescence spectroscopy; cyclodextrin bead polymer; mycotoxin binder; toxin removal

## 1. Introduction

Mycotoxins are toxic secondary metabolites of filamentous fungi, occurring in several food products (e.g., cereals, meat, fruits, and numerous beverages) [1]. Due to the consumption of contaminated food, mycotoxin exposure induces health problems in both animals and humans [2]. Zearalenone (ZEN) is a *Fusarium*-derived mycotoxin; it appears in cereals (e.g., in maize), beer, milk, spices, etc. [3,4]. Despite its non-steroidal structure, ZEN can cause reproductive disorders in animals and humans, due to its xenoestrogenic effect [5–7]. Furthermore, ZEN is a strongly phytotoxic compound, a protonophoric uncoupler, and it alters the permeability of some plant tissues [8,9]. Plants possess detoxification system, which protects them from harmful xenobiotics, including mycotoxins [10–12]. The formation of hydrophilic conjugates of mycotoxins is a common detoxification process in plants [11,12], such as the glucose conjugation of ZEN, from which zearalenone-14-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside is the main product

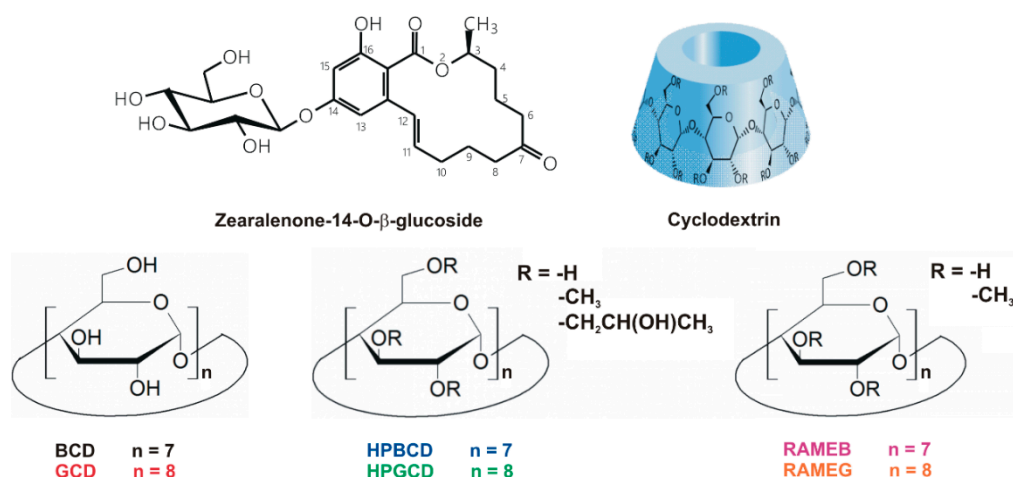
(Z14G; also known as zearalenone-4-glucoside) [11,13]. These mycotoxin derivatives also appear in food, and after their oral consumption, they can be converted into the original mycotoxin (mainly by the colonic microbiota) [13]. The conversion of the conjugated mycotoxins into the more toxic parent mycotoxin increases the toxicological risk of exposure to the mycotoxin-contaminated food [14]. Since their determination and quantification is challenging, these plant-derived conjugates are not routinely analyzed in food samples [11,14,15]. Based on the systematic definition of Rychlik et al. [16], the plant-conjugated mycotoxins are known as “masked mycotoxins”, due to the difficulty of their analytical determination.

Z14G (Figure 1) is one of the few proven, naturally occurring masked mycotoxins in cereals (e.g., wheat, maize, and barley) [11]. During the biotransformation of ZEN in plants, several metabolites are formed, Z14G accounts for up to 30% of the total metabolites [11]. The glucose conjugation of the parent compound leads to its decreased estrogenicity, because the lactone ring and the hydroxyl group in position C<sub>14</sub> are involved in the interaction of ZEN with estrogen receptors [14,17]. However, Z14G is deglycosylated in the gastrointestinal tract, and the formed ZEN can induce toxic effects due to its better absorption and higher affinity towards estrogen receptors [18]. In addition, it has also been proved that cell metabolism may convert Z14G to ZEN and  $\alpha$ -ZEL eliciting estrogenic stimulation [19].

Cyclodextrins (CD) are starch-derived oligosaccharides, built up by D-glucopyranose units [20]. The most frequently used CDs are  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -CDs containing six, seven, and eight glucose units, respectively. CDs are commonly applied in the pharmaceutical, cosmetic, and food industries, due to their ability to form host–guest type complexes with several compounds [21]. CDs have a nonpolar internal cavity, and a hydrophilic external surface. The apolar cavity can accommodate lipophilic guest molecules, while the hydrophilic external part ensures excellent aqueous solubility [20,22]. The chemical modification of CDs can significantly affect their interaction with the guest molecules [20].

CDs can form stable complexes with some mycotoxins, including aflatoxins, citrinin, ochratoxin A, ZEN, and zearalenols [23–29]. The inclusion of these fluorescent mycotoxins by the CD cavity is commonly useful in analytics, because it can improve their chromatographic properties and/or increase their fluorescence signal [30–32]. Furthermore, previous studies demonstrated that CD polymers may be useful as mycotoxin binders: the extraction of ZEN, zearalenols, ochratoxin A, and patulin mycotoxins was successfully executed from aqueous solutions and from different beverages [33–35]. Despite masked mycotoxins (e.g., Z14G) also appearing in food products, we have no information regarding the potential interactions of CDs with these mycotoxin derivatives. ZEN forms stable complexes with CDs ( $K \sim 10^4$  L/mol) [25,27]; however, Z14G contains the large hydrophilic glucose structure, which does not make obvious the interaction of the masked mycotoxin with CDs.

In this study, the interaction of Z14G with native and chemically modified  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs (Figure 1) was investigated in a wide pH range (pH 3.0–10.0) employing steady-state fluorescence spectroscopy. In addition to the stability of the complexes formed, the CD-induced increase in the fluorescence signal of Z14G was also evaluated. For the deeper understanding of Z14G-CD interactions, molecular modeling studies were performed. Furthermore, the removal of Z14G from aqueous solution by insoluble  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer (BBP) was also tested. Our results demonstrate that Z14G can form stable host–guest type complexes with CDs, and the interactions result in the strong increase in the fluorescence of the mycotoxin. Moreover, BBP significantly decreased the Z14G content of the spiked solution, showing that CD technology is suitable for the removal of the masked mycotoxin Z14G from aqueous solutions.



**Figure 1.** Chemical structures of zearalenone-14-O-β-D-glucoside (Z14G) as well as native, randomly methylated (DS = 12), and hydroxypropyl (DS = 4.5) β- and γ-CDs (BCD, β-cyclodextrin; GCD, γ-cyclodextrin; HPBCD, (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin; HPGCD, (2-hydroxypropyl)-γ-cyclodextrin; RAMEB, randomly methylated β-cyclodextrin; RAMEG, randomly methylated γ-cyclodextrin; DS: average degree of substitution per CD ring).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents

Zearalenone-14-O-β-D-glucoside (Z14G) was purchased from ASCA GmbH (Berlin, Germany). Stock solutions of Z14G (5000 μM) were prepared in ethanol (96 v/v%, spectroscopic grade; Reanal, Budapest, Hungary) and stored at −20 °C. Cyclodextrins, including β-CD (BCD), γ-CD (GCD), (2-hydroxypropyl)-β-CD (HPBCD), (2-hydroxypropyl)-γ-CD (HPGCD), randomly methylated β-CD (RAMEB), randomly methylated γ-CD (RAMEG), and insoluble β-cyclodextrin bead polymer (BBP) were provided by CycloLab Cyclodextrin Research and Development Laboratory, Ltd. (Budapest, Hungary). Sodium phosphate (0.05 M, pH 3.0 and pH 7.4), sodium acetate (0.05 M, pH 5.0), and sodium borate (0.05 M, pH 10.0) buffers were applied as media during fluorescence spectroscopic measurements.

BBP was produced in three main steps: (1) Pre-polymerization of monomeric BCD by cross-linking it with epichlorohydrin under alkaline circumstances. (2) Forming emulsion from the pre-polymer: the pre-polymer was emulsified in toluene-polyvinyl alcohol system with vigorous stirring. (3) Further polymerization: the emulsified BCD pre-polymer is further polymerized with butanediol bis(epoxypropyl)ether. During the latter step, the water-soluble pre-polymer became water-insoluble. The formed polymer droplets were filtered from the reaction mixture, washed with acetone, and dried. BBP does not dissolve but it swells in water (swelling capacity: 5–8 mL/g at 25 °C). The BCD content of BBP is 50 m/m%; the average polymer bead particle size is between 0.1 and 0.3 mm.

### 2.2. Fluorescence Spectroscopic Measurements

Steady-state fluorescence spectroscopic measurements were carried out at +25 °C, in the presence of air, using a Hitachi F-4500 fluorimeter (Hitachi, Tokyo, Japan). Fluorescence emission spectra of Z14G (1 μM) was recorded in the absence and presence of increasing concentrations of CDs (0.0, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, and 2.0 mM) in different buffers (pH 3.0–10.0; see 2.1), applying 315 nm excitation wavelength. Binding constants of Z14G-CD complexes were determined employing the graphical application of the Benesi-Hildebrand equation [26]:

$$\frac{I_0}{(I - I_0)} = \frac{1}{A} + \frac{1}{A \times K \times [H]^n} \quad (1)$$

where  $I_0$  and  $I$  denote the fluorescence emission intensities of Z14G in the absence and presence of CDs, respectively;  $A$  is a constant,  $K$  is the binding constant (unit: L/mol),  $[H]$  is the concentration of the host molecule, and  $n$  is the number of binding sites.

### 2.3. Modeling Studies

The molecular modeling approach relied on a combination of pharmacophoric analysis of CD cavity, docking studies, and rescoring procedures. The 3D structures of BCD and GCD derived from the crystallographic structures recorded in the Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) database (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures>) having accession code WEWTOJ and LAJLALO2, respectively. The ideal 3D coordinates of ZEN was retrieved from the Protein DataBank (<https://www.rcsb.org>; compound accession ID: ZER) [36]. The consistency of atom and bond types assignments were checked with the Sybyl software (version 8.1; [www.certara.com](http://www.certara.com)) and the structure was energetically minimized using Powell algorithm, as described [37]. As an exception, the maximum number of iterations was set at 250 with a coverage gradient of  $\leq 0.05$  kcal/(mol  $\times$  Å). The 3D structure of Z14G was derived from editing the 3D structure of ZEN using the Sybyl software (version 8.1; [www.certara.com](http://www.certara.com)) as follow: the 3D coordinates of glucose was retrieved using the “Get Fragment” module. Then, its hydroxyl group in position C<sub>1</sub> was joined to the ZEN hydroxyl group on C<sub>14</sub> using the “Join Molecule” option. The structure of Z14G finally underwent energy minimization.

#### 2.3.1. Pharmacophoric Analysis of the CD Cavity

The description of CD sites was done using the Flapsite tool of the FLAP software (Fingerprint for Ligand and Protein; <https://www.moldiscovery.com>), while the GRID algorithm was used to investigate the corresponding pharmacophoric space [38,39] in agreement with our previous study [40]. As an exception, it was used only the DRY probe to describe hydrophobic space of CD cavities.

#### 2.3.2. Docking Study

The GOLD software [41] was used to perform all the docking simulations as it previously proved to be reliable in predicting the binding architectures of host–guest complexes [42,43]. In addition, a rescoring procedure using the HINT scoring function [44] was carried out, for the better evaluation of mycotoxin–CD interactions [45]. In particular, the HINT score may be related to the free energy of binding (the higher the score, the stronger the interaction), and it was previously proved to assess reliably the host–guest type complex formation, also in the specific case of mycotoxin–CD interactions [45–47]. The GOLD setting reported by Dellafiora and co-workers was used [42]. Ten poses were generated for each compound in each CD, and all of them underwent a rescoring procedure with HINT. Only the best-scored pose for each run was considered [45,46].

### 2.4. Extraction of Z14G from Aqueous Solution by BBP

To test the mycotoxin binding ability of BBP, Z14G (2  $\mu$ M, 1.5 mL) was incubated in the presence of increasing amounts of BBP (0.0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, and 20.0 mg/1.5 mL). The incubation was performed in a thermomixer (1000 rpm, 30 min, 25 °C) in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0). Thereafter, BBP was sedimented by pulse centrifugation (4000 g, 3 s), and the concentration of Z14G in the supernatant was directly determined by HPLC-FLD (see details in Section 2.5).

For the quantitative characterization of the interaction, Langmuir and Freundlich isotherms were also obtained. Using the same experimental conditions, increasing concentrations of Z14G (0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, and 12.5  $\mu$ M in 1.5 mL buffer) were added to a standard amount of BBP (2.5 mg). The evaluation was performed using the Langmuir equation [35]:

$$q_e = \frac{(Q_0 \times K_L \times C_e)}{(1 + K_L \times C_e)} \quad (2)$$



where  $q_e$  represents the bound Z14G (mg) per BBP (g),  $Q_0$  is the maximum amount of Z14G bound per g of BBP,  $C_e$  denotes the free Z14G (mg) in the solution at equilibrium, and  $K_L$  is the Langmuir equilibrium constant (L/mg). Data were then also evaluated based on the Freundlich equation [35]:

$$q_e = K_F \times C_e^{1/n} \quad (3)$$

where  $K_F$  and  $n$  are the Freundlich constant and the heterogeneity index, respectively.

### 2.5. HPLC Analysis

The concentrations of Z14G in the supernatants were quantified by an integrated HPLC system (Jasco, Tokyo, Japan) contained an autosampler (AS-4050), a binary pump (PU-4180), and a fluorescence detector (FP-920). Samples (with a 20- $\mu$ L injected volume) were driven through a Phenomenex Security Guard™ (C8, 4.0  $\times$  3.0 mm) guard column linked to a Teknokroma Mediterranea Sea8 (C8, 150  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) analytical column. The mobile phase contained acetonitrile and 175 mM acetic acid (35:65 v/v%), the isocratic elution was performed with 1.0 mL/min flow rate at room temperature. Z14G was detected at 465 nm ( $\lambda_{ex}$  = 315 nm), and the chromatographic data were evaluated employing ChromNAV (V2) software.

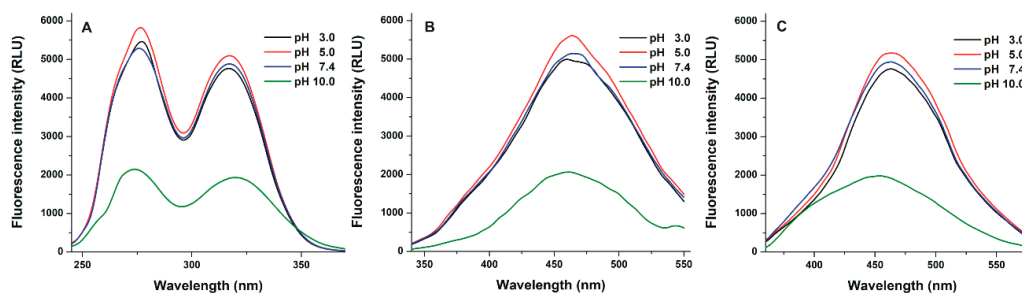
### 2.6. Statistical Analyses

Data represent means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) values determined based on at least three independent experiments. The One-Way ANOVA test (IBM SPSS Statistics, V21, New York, NY, USA) was applied for the statistical analyses. The level of significance was set as  $p < 0.01$ .

## 3. Results

### 3.1. Fluorescence Excitation and Emission Spectra of Z14G

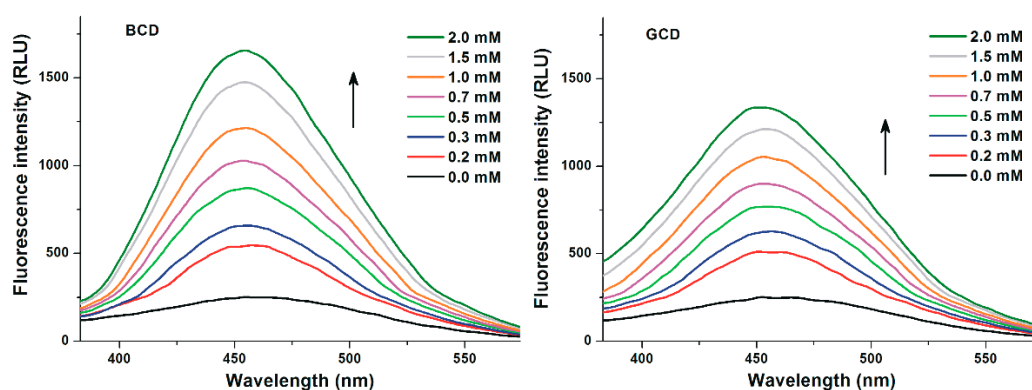
To investigate the effects of the environmental pH on the fluorescence of Z14G, its fluorescence excitation and emission spectra were recorded in different buffers (pH 3.0–10.0). At each pH value tested, two peaks appeared in the fluorescence excitation spectrum of Z14G, approximately at 275 and 315 nm (Figure 2A). At pH 3.0–7.4, the excitation spectra of Z14G barely changed; however, at pH 10.0, the significantly lower excitation signal of Z14G was observed compared to the other buffers. Then the fluorescence emission spectra of Z14G were also recorded using both 275 (Figure 2B) and 315 nm (Figure 2C) excitation wavelengths. Again, at acidic and physiological pH, similar emission spectra were observed. Nevertheless, the strong decrease in the fluorescence emission signal of Z14G was noticed under alkaline conditions. Furthermore, as Figure 2B,C demonstrates, a blue shift of emission maxima was observed with regard to both excitation wavelengths used ( $\lambda_{ex}$  = 275 nm: from 465 to 460 nm;  $\lambda_{ex}$  = 315 nm: from 465 to 450 nm).



**Figure 2.** Fluorescence spectra of Z14G. (A) Excitation spectra of Z14G (20  $\mu$ M) in different buffers ( $\lambda_{em}$  = 455 nm); (B) emission spectra of Z14G (20  $\mu$ M) using 275 nm excitation wavelength; (C) and emission spectra of Z14G (20  $\mu$ M) applying 315 nm excitation wavelength. (Buffers used: 0.05 M sodium phosphate, pH 3.0; 0.05 M sodium acetate, pH 5.0; 0.05 M sodium phosphate, pH 7.4; 0.05 M sodium borate, pH 10.0).

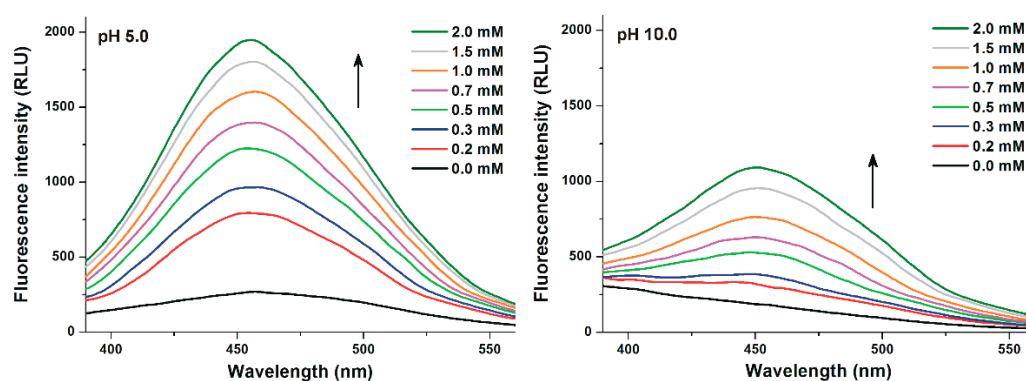
### 3.2. Effects of Cyclodextrins on the Fluorescence Signal of Z14G

First, the interactions of Z14G with native BCD and GCD were investigated. Therefore, increasing amounts of CDs (final concentrations: 0.0–2.0 mM) were added to Z14G (1.0  $\mu$ M) in sodium acetate buffer (pH 5.0), and then fluorescence emission spectra were recorded ( $\lambda_{\text{ex}} = 315$  nm). Both BCD and GCD strongly increased the emission signal of the mycotoxin (Figure 3), during which a slight blue shift of its emission wavelength maximum (from 465 to 455 nm) was observed. Furthermore, BCD induced a higher increase in the fluorescence signal of Z14G than GCD.



**Figure 3.** Fluorescence emission spectra of Z14G (1  $\mu$ M) in the presence of increasing BCD (left) and GCD (right) concentrations (0.0–2.0 mM) in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0;  $\lambda_{\text{ex}} = 315$  nm).

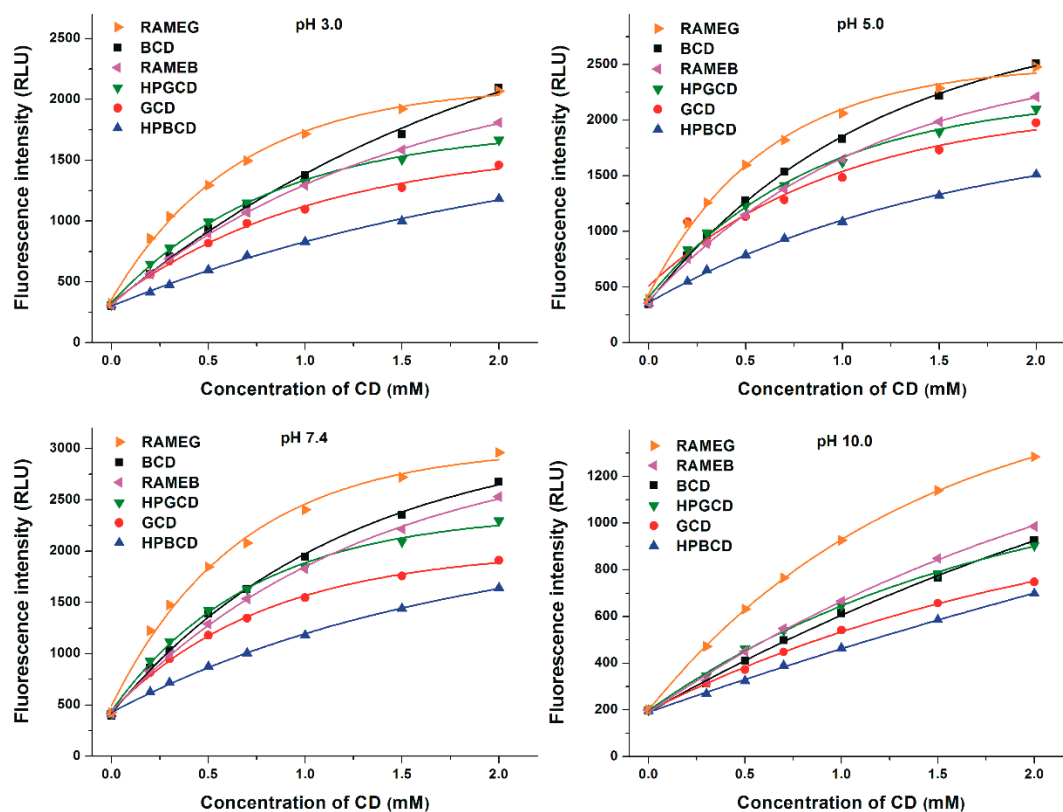
Thereafter, the spectral changes of Z14G were also investigated with native and chemically modified CDs (methyl and hydroxypropyl derivatives) in different buffers (pH 3.0–10.0). At pH 10.0, a much lower increase in the fluorescence of the mycotoxin was observed compared with other buffers used (Figure 4). Furthermore, a red shift in the fluorescence spectrum of Z14G was observed at pH 10.0, resulting in the same emission wavelength maximum (455 nm) in the presence of higher CD concentrations which was noticed in other buffers with lower pH values.



**Figure 4.** Fluorescence emission spectra of Z14G (1  $\mu$ M) in the presence of increasing concentrations of RAMEG (0.0–2.0 mM) in 0.05 M sodium acetate (pH 5.0; left) and in 0.05 M sodium borate (pH 10.0; right) buffers ( $\lambda_{\text{ex}} = 315$  nm).

The fluorescence emission intensities ( $\lambda_{\text{ex}} = 315$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 455$  nm) of Z14G in the presence of CDs are demonstrated in Figure 5, while the relative enhancement in the fluorescence of Z14G ( $I/I_0$ ; 1  $\mu$ M mycotoxin + 2 mM CD) is represented in Table 1. RAMEB caused slightly weaker increase (except at pH 10.0) in the fluorescence of Z14G than BCD, while HPBCD showed a much weaker effect compared to the other  $\beta$ -CDs tested. However, both chemically modified  $\gamma$ -CDs proved to be better fluorescence enhancers than the native GCD: HPGCD and RAMEG induced slight and considerable increases in the fluorescence signal of Z14G, respectively (Table 1). Typically, RAMEG was the most

suitable, and HPBCD was the least successful fluorescence enhancer; however, BCD exhibited similar effectiveness at pH 3.0 and 5.0 to RAMEG (Figure 5). Among the CDs tested, RAMEG resulted in the highest (7.1-fold) increase in the fluorescence signal of Z14G under weakly alkaline conditions (pH 7.4). BCD, HPBCD, GCD, and HPGCD induced the strongest relative increase in fluorescence at pH 5.0; while RAMEB and RAMEG were most effective at pH 3.0 and 7.4, respectively (Table 1). Each CD tested produced the weakest fluorescence enhancement at pH 10.0.



**Figure 5.** CD-induced increase in the fluorescence signal of Z14G (1  $\mu$ M) in different buffers (0.05 M sodium phosphate, pH 3.0; 0.05 M sodium acetate, pH 5.0; 0.05 M sodium phosphate, pH 7.4; 0.05 M sodium borate, pH 10.0;  $\lambda_{\text{ex}} = 315$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 455$  nm).

**Table 1.** CD-induced relative increase in the fluorescence emission signal of Z14G ( $I/I_0$ ; 1  $\mu$ M mycotoxin + 2 mM CD) in different buffers ( $\lambda_{\text{ex}} = 315$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 455$  nm).

pH	Relative Increase in the Fluorescence of Z14G ( $I/I_0 \pm \text{SEM}$ )					
	BCD	RAMEB	HPBCD	GCD	RAMEG	HPGCD
3.0	$6.72 \pm 0.12$	$6.23 \pm 0.29$	$3.70 \pm 0.09$	$5.03 \pm 0.32$	$6.53 \pm 0.08$	$5.38 \pm 0.08$
5.0	$6.98 \pm 0.19$	$6.16 \pm 0.02$	$4.32 \pm 0.03$	$5.49 \pm 0.09$	$6.73 \pm 0.22$	$5.79 \pm 0.03$
7.4	$6.87 \pm 0.10$	$5.93 \pm 0.24$	$4.21 \pm 0.21$	$4.92 \pm 0.25$	$7.13 \pm 0.10$	$5.53 \pm 0.11$
10.0	$4.44 \pm 0.14$	$4.99 \pm 0.15$	$3.13 \pm 0.14$	$3.62 \pm 0.27$	$6.24 \pm 0.17$	$4.37 \pm 0.09$

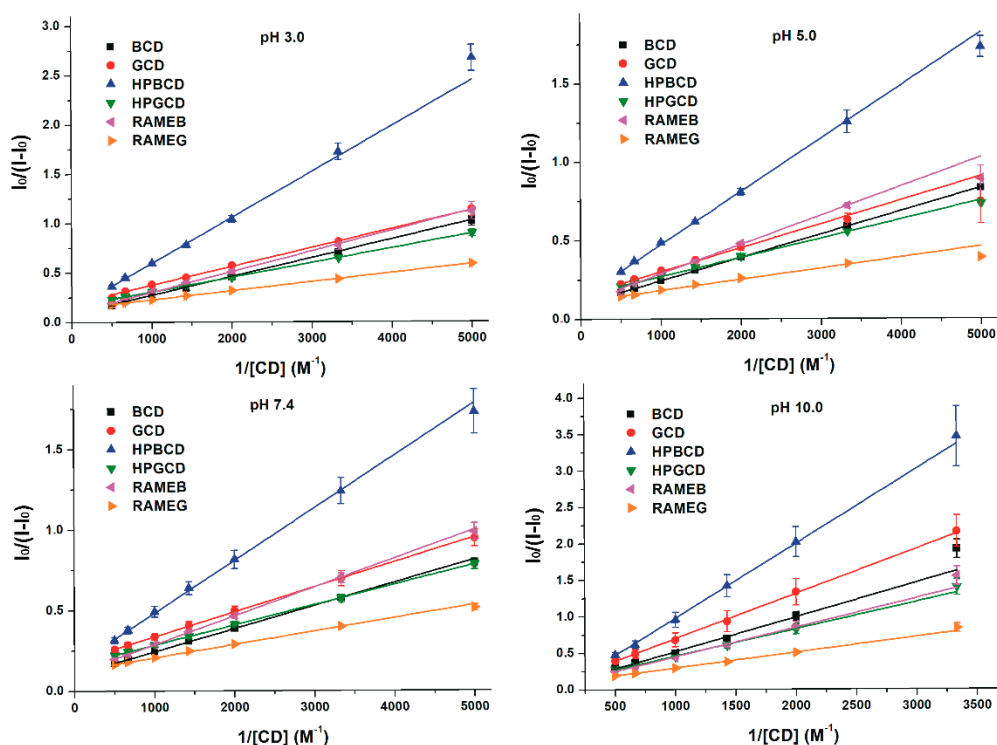
BCD,  $\beta$ -CD; RAMEB, randomly methylated  $\beta$ -CD; HPBCD, (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -CD; GCD,  $\gamma$ -CD; RAMEG, randomly methylated  $\gamma$ -CD; HPGCD, (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD; SEM, standard error of the mean; buffers used: 0.05 M sodium phosphate, pH 3.0; 0.05 M sodium acetate, pH 5.0; 0.05 M sodium phosphate, pH 7.4; 0.05 M sodium borate, pH 10.0.

### 3.3. Binding Constants of Z14G-CD Complexes

Binding constants ( $K$ , unit: L/mol) of Z14G-CD complexes were determined using the Benesi-Hildebrand equation (Equation (1)). Figure 6 demonstrates the Benesi-Hildebrand plots, which showed good correlation ( $R^2 = 0.96$ – $0.99$ ) with the 1:1 stoichiometry model at each pH tested. As demonstrated in Table 2, Z14G formed stable complexes with both  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs,  $\log K$  values were



typically in the 2.5–3.3 range (except at pH 10.0). In the 3.0–7.4 pH range,  $\gamma$ -CDs formed more stable complexes with Z14G ( $\log K = 3.0$ – $3.3$ ) than  $\beta$ -CDs ( $\log K = 2.5$ – $2.9$ ). At pH 10.0,  $\log K$  values were the lowest with regard to both  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs ( $\log K = 1.9$ – $2.4$ ). The most stable Z14G-CD complex was formed with RAMEG at pH 5.0.



**Figure 6.** Benesi-Hildebrand plots of Z14G-CD complexes in different buffers (0.05 M sodium phosphate, pH 3.0; 0.05 M sodium acetate, pH 5.0; 0.05 M sodium phosphate, pH 7.4; 0.05 M sodium borate, pH 10.0;  $\lambda_{\text{ex}} = 315$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 455$  nm).

**Table 2.** Decimal logarithmic values of binding constants ( $K$ ; unit: L/mol) of Z14G-CD complexes in different buffers.

pH	LogK ( $\pm$ SEM)					
	BCD	RAMEB	HPBCD	GCD	RAMEG	HPGCD
3.0	$2.74 \pm 0.05$	$2.64 \pm 0.07$	$2.55 \pm 0.06$	$2.99 \pm 0.06$	$3.18 \pm 0.03$	$3.03 \pm 0.02$
5.0	$2.81 \pm 0.02$	$2.81 \pm 0.05$	$2.71 \pm 0.06$	$3.03 \pm 0.05$	$3.27 \pm 0.02$	$3.13 \pm 0.01$
7.4	$2.93 \pm 0.01$	$2.85 \pm 0.05$	$2.82 \pm 0.03$	$3.14 \pm 0.02$	$3.25 \pm 0.01$	$3.13 \pm 0.03$
10.0	$2.10 \pm 0.07$	$2.21 \pm 0.05$	$1.95 \pm 0.05$	$2.30 \pm 0.05$	$2.38 \pm 0.07$	$2.41 \pm 0.02$

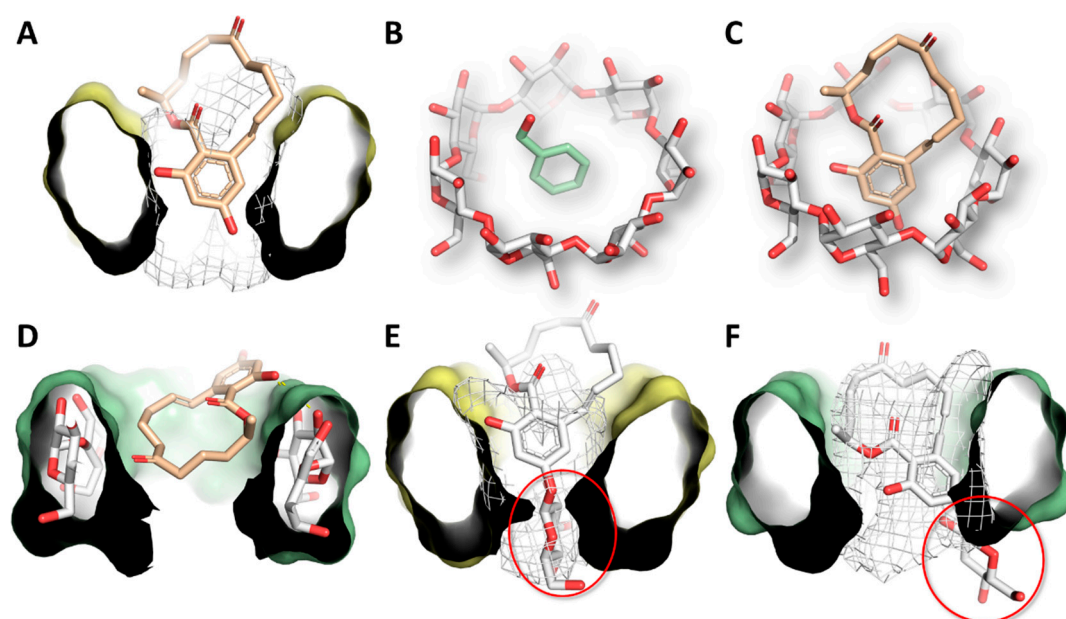
BCD,  $\beta$ -CD; RAMEB, randomly methylated  $\beta$ -CD; HPBCD, (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -CD; GCD,  $\gamma$ -CD; RAMEG, randomly methylated  $\gamma$ -CD; HPGCD, (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD; SEM, standard error of the mean; buffers used: 0.05 M sodium phosphate, pH 3.0; 0.05 M sodium acetate, pH 5.0; 0.05 M sodium phosphate, pH 7.4; 0.05 M sodium borate, pH 10.0.

### 3.4. Molecular Modeling Studies

The molecular details of the interaction of Z14G within the native BCD and GCD were investigated and compared to those of ZEN using a molecular modeling approach. Concerning the ZEN-BCD complex, ZEN sank into the CD cavity with its aromatic ring. The calculated pose (179.4 HINT score units) was found to be well embedded within the hydrophobic environment of the BCD cavity (Figure 7A), retracing the crystallographic mode of interaction with phenyl alcohol (accession code of BCD-phenyl alcohol: DEBGOG) (Figure 7B,C). In this architecture of binding, no direct ZEN-CD polar contacts were found, and hydrophobic–hydrophobic interactions were thought to be the main contributors to the complex formation. Regarding the ZEN-GCD complex (64.7 HINT score units), in

contrast to the pose observed within BCD, ZEN posed the aliphatic part within the cavity, exposing the aromatic ring to the solvent (Figure 7D). The hydroxyl group in position C<sub>16</sub> was found to be engaged in polar contacts with the C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub> hydroxyl groups of GCD sugars. Therefore, the establishment of polar interactions was found to be likely to concur with the complex formation.

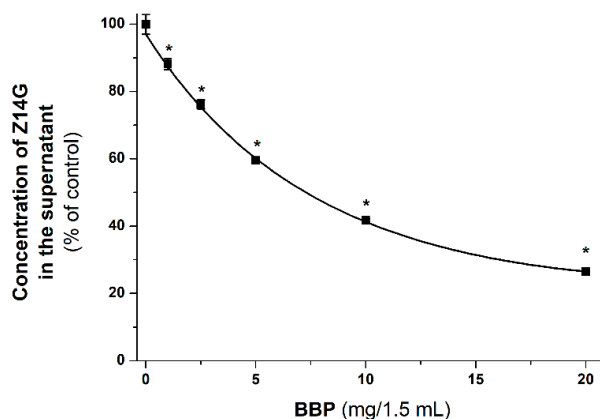
Concerning the Z14G-BCD complex (101.3 HINT score units), Z14G posed the polar glucoside portion within the hydrophobic cavity of BCD (Figure 7E), causing hydrophobic–polar interactions that may explain the lower capability of Z14G to interact with BCD than with GCD. Indeed, regarding the Z14G-GCD complex (257.3 HINT score units), Z14G embedded the aromatic ring within the hydrophobic cavity of GCD while posing the glycoside moiety outside the cavity and exposing it to the solvent (Figure 7F). In this orientation, the glycoside moiety did not cause hydrophobic–polar interferences with the apolar cavity of GCD.



**Figure 7.** Representation of CD host–guest-type complexes. In most parts of the figure, CDs are represented as cut surfaces for the better clarity. (A) Representation of the calculated ZEN-BCD complex. The white mesh indicates the hydrophobic space of the BCD cavity; (B) Crystallographic coordinates of phenyl alcohol-BCD complex (CCDC accession code DEBGOG); (C) Calculated pose of ZEN within BCD; (D) Representation of the calculated ZEN-GCD complex. GCD is represented as sticks and cut surface. Yellow dashed lines indicate polar interaction; (E) Representation of the calculated Z14G-BCD complex. The white mesh indicates the hydrophobic space of BCD cavity while the red ring indicates the glucoside group of Z14G; (F) Representation of the calculated Z14G-GCD complex. The white mesh indicates the hydrophobic space of GCD cavity, while the red ring indicates the glycoside group of Z14G.

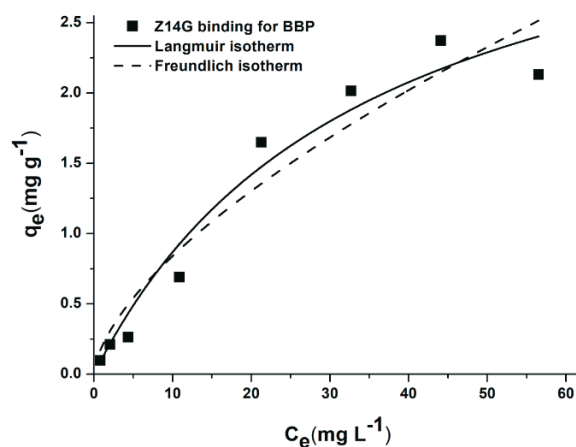
### 3.5. Extraction of Z14G from Aqueous Solution by BBP

Since BBP has been successfully applied to remove ZEN and zearalenols from aqueous solutions and/or from spiked corn beer samples [33], the ability of BBP to extract the masked mycotoxin Z14G from aqueous solution was also investigated. In BBP, the  $\beta$ -cyclodextrin polymer is attached to insoluble beads, therefore, the formed Z14G-BCD complex can be removed from the solution by sedimentation. To test the effect of BBP on the mycotoxin content of the solution, Z14G was incubated with increasing amounts of BBP in sodium acetate buffer (pH 5.0). In a concentration-dependent fashion, BBP considerably decreased the Z14G (2  $\mu$ M) content of the aqueous solutions (Figure 8). Even 1.0 mg/1.5 mL of BBP significantly reduced the mycotoxin content; while 10.0 and 20.0 mg/1.5 mL of BBP removed approximately 60 and 75% of Z14G, respectively.



**Figure 8.** The decrease of Z14G (2  $\mu$ M in 1.5 mL) content of the supernatant after 30 min incubation with increasing amounts of BBP (0.0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, and 20.0 mg/1.5 mL) in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0; 25  $^{\circ}$ C; \*  $p < 0.01$ ).

To characterize quantitatively the mycotoxin-binding ability of BBP, increasing concentrations of Z14G were incubated with standard amount of BBP (see details in Section 2.4.). After incubation, the mycotoxin content of the supernatants was quantified (see in Sections 2.4 and 2.5), and then the data were evaluated employing the Langmuir (Equation (2)) and Freundlich (Equation (3)) sorption isotherms. The data showed better fitting with the Langmuir ( $R^2 = 0.96$ ) than with the Freundlich ( $R^2 = 0.92$ ) isotherm (Figure 9). The Langmuir affinity constant ( $K_L$ ) was  $0.0197 \pm 0.006$  L/mg and the  $Q_0$  value was  $3.77 \pm 0.49$  mg/g. The Freundlich model indicates a  $0.18 \pm 0.01$  (mg/g)  $\times$  (L/mg) $^{1/n}$  Freundlich constant and a  $0.64 \pm 0.03$   $1/n$  value.



**Figure 9.** Langmuir (solid line) and Freundlich (dashed line) isotherms for the Z14G binding of BBP in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0; see further details in Section 2.4.).

#### 4. Discussion

Similar to ZEN and zearalenols [27,48], the masked mycotoxin Z14G also shows two excitation peaks at 275 and 315 nm (Figure 2). Z14G exerted fluorescence in the whole pH range tested (pH 3.0–10.0); however, its fluorescence spectra were markedly changed under alkaline conditions (pH 10.0). Regarding Z14G, only one of the phenolic hydroxyl groups ( $C_{14}$  and  $C_{16}$ ) of ZEN is conjugated with glucose. Therefore, Z14G can lose a proton and consequently it forms an anion at higher pH values. Thus, Z14G appears partly in ionized form at pH 10.0, resulting in the changes in its fluorescence excitation and emission spectra.

Similarly to our previous studies with ZEN and zearalenols [27,48], we recorded the emission spectra of Z14G-CD complexes using 315 nm excitation wavelength. In the presence of CDs, the

fluorescence emission signal of Z14G strongly increased (Figures 3 and 5). Since the applied CDs do not exert fluorescence, this observation suggests the formation of Z14G-CD complexes. The strong increase in the fluorescence of Z14G in the presence of CDs can be likely explained by the decreased quenching effects of solvent molecules. Usually, water molecules partly quench the fluorescence signal of aromatic fluorophores; therefore, the disruption of the hydration shell during the host-guest-type complex formation, as well as the less polar environment of Z14G in the CD cavity, results in the significant increase in the fluorescence signal of Z14G [23,25,30,45]. Similarly to ZEN [27], BCD induced a stronger increase in the fluorescence emission signal of Z14G than GCD (Figure 3). Concerning the ZEN-BCD complex, the calculated pose presented in this work (Figure 7) is in strong agreement with the NMR-derived model of ZEN-BCD complex proposed previously [31], supporting the geometrical reliability of the model. Keeping in mind that the inclusion direction can enhance or quench the fluorescence signal [46], the diverse calculated geometry of ZEN within BCD or GCD might partially explain the previously reported experimental results [27]. In particular, the deep inclusion of the fluorescent group (the aromatic ring of ZEN in this case) within the BCD cavity may reduce the capacity of the solvent molecules to absorb vibrational quanta, as previously described [46]. Therefore, BCDs protected the fluorescence emission of ZEN from the quenching effect of water molecules, during which the fluorescence signal is consequently enhanced. Conversely, the exposure of the aromatic ring to the solvent with widely spaced vibrational level (as in the case of ZEN-GCD complex in aqueous solution) allows the solvent to accept the large quantum of electronic energy, resulting in the higher quenching of the emission intensity [46]. In addition to the diverse orientation within BCD or GCD, the lower computational score of ZEN within GCD in comparison to BCD may indicate discrepancies in the favors of interaction between the two CDs, where the BCD is the most suitable to interact with ZEN. Nevertheless, a specific validation for the cavitand-ligand complex formation is still missing and further studies are needed to tune and validate the model for a more thorough quantitative comparison.

The interaction of Z14G with native and chemically modified  $\beta$ -, and  $\gamma$ -CDs was tested in a wide pH range (pH 3.0–10.0). Approximately, a 3- to 7-fold CD-induced increase in the fluorescence of Z14G was observed (Table 1), which is significant but lower compared to ZEN (6- to 19-fold, pH 5.0) and zearalenols (2- to 26-fold, pH 5.0–10.0) [27,48]. The chemical modification (methyl or hydroxypropyl substitution) of CDs improved and decreased the CD-induced fluorescence enhancement regarding  $\gamma$ -CD and  $\beta$ -CD, respectively (Table 1). The poor elevation of the fluorescence signal of Z14G in the presence of CDs at pH 10.0 (Figures 4 and 5) is likely resulted from the deprotonation of the mycotoxin, as it has been also reported regarding ZEN and zearalenols [27,48]. The same emission wavelength maximum of Z14G (455 nm) was observed in the presence of high CD concentrations, regardless the buffer used (Figure 4). It can be explained by the formation of the same Z14G-CD complexes. CDs form more stable complex with the non-ionized form of the mycotoxin; however, higher CD concentrations are necessary at pH 10.0, where most of the Z14G molecules are likely to occur in anionic form [27,48]. This hypothesis is also supported by the red shift in the fluorescence spectrum of Z14G during its interaction with CDs (Figure 4) and by the low binding constants of Z14G-CD complexes at pH 10.0 (Table 2).

According to our data, the masked mycotoxin Z14G ( $\log K = 2.8$ – $3.3$ , at pH 5.0) formed less stable complexes with CDs compared to ZEN ( $\log K = 3.8$ – $4.8$ , at pH 5.0) [25,27,31]. Furthermore, Z14G forms more stable complexes with  $\gamma$ -CDs, while ZEN prefers  $\beta$ -CDs [27]. At pH 3.0–7.4, Z14G binds to GCD with approximately 2.5-fold higher affinity than to BCD (Table 2). The highly diverse arrangement of the glucose group regarding BCD and GCD may explain the higher affinity of Z14G toward the latter CD, wherein the hydrophobic-polar interferences were thought to be less pronounced than in the former (Figure 7). The chemical modifications (methyl and hydroxypropyl substitutions) of the native GCD slightly improved the stability of Z14G- $\gamma$ -CD complexes; however, the same chemical modifications did not change, or slightly decreased, the binding constants of Z14G- $\beta$ -CD complexes (Table 2). These observations highlight again the differences between the interactions of Z14G and

ZEN with CDs, because methyl substitution of BCD strongly increased the stability of ZEN-CD complexes [27].

As our results demonstrate, the binding constants of Z14G complexes are barely affected by the pH under acidic and physiological conditions (pH 3.0–7.4). However, an approximately five-fold decrease in the binding constants was observed at pH 10.0 for each CD tested (Table 2). Under acidic and weakly alkaline conditions (pH 3.0, 5.0, and 7.4), Z14G likely appears in its nonionic form. However, at pH 10.0, several mycotoxin molecules become ionized (see spectral changes in Figure 2). Since the deprotonation of the hydroxyl group in C<sub>16</sub> can affect the complex formation of Z14G with CDs, it is reasonable to hypothesize that CDs strongly prefer the nonionic Z14G vs. its anionic form.

As a general remark, the computational modeling reliably estimated the relative interaction of ZEN and Z14G with the two CDs, but it failed to estimate the absolute rank of affinity found experimentally [27]. In particular, the scores of Z14G were unexpectedly higher than those of ZEN, which recorded the best experimental affinity values within both the CDs, although the relative affinity of both ligands within each CD was correctly predicted. Keeping in mind that the HINT scoring is an expression of the sum of all the interatomic contributions [44], the overall score can be affected by the absolute dimension of ligands (i.e., by the total atoms count), as already shown for other scoring functions (in particular, the larger the molecule, the higher the value) [49]. The systems under analysis are relatively small, and they consist of a maximum of 234 atoms (e.g., the Z14G-GCD complex). The presence of glucose (24 atoms) accounts for nearly 10% of the total atom count of the complex and may reasonably introduce biases in comparing ligands with a relatively relevant difference in the total atom count. Therefore, the results of ZEN (45 atoms) cannot be quantitatively compared with those of Z14G (66 atoms; 46% bigger than ZEN). Although such a bias has been excluded for protein-ligand complex assessments, it still deserves further investigation regarding the assessment of cavitation-ligand complex formations. In the present form, our procedure proved to be reliable when comparing ZEN or Z14G within different CDs, but it failed to provide reliable quantitative intra-ligand comparison. Taken together, the computational results presented here can explain the diverse affinity of ZEN or Z14G with BCD and GCD. In particular, the different orientation of ZEN observed within the two CDs, along with the worse interaction within GCD (according to the scores recorded), may explain the stronger interaction with BCD found experimentally. On the other hand, our results can also explain the preferential interaction of Z14G with the GCD as the glucose moiety could be placed outside the cavity reducing the establishment of polar-hydrophobic interferences in comparison to those found for Z14G-BCD complex.

Based on our results, BBP can greatly reduce the Z14G content of aqueous solution, in a concentration-dependent fashion. However, the removal of Z14G by BBP was less effective compared to ZEN. Under similar experimental conditions, BBP (20.0 mg/1.5 mL) removed approximately 75% and 90% of Z14G (Figure 8) and ZEN [33], respectively. The lower ability of BBP to extract Z14G is in a good agreement with the lower affinity of the masked mycotoxin (Table 2) towards BCD compared to ZEN [27]. It is reasonable to hypothesize that  $\gamma$ -CD polymers would be more effective in the removal of Z14G; however, BBP is the only CD bead polymer that was available for our studies. Furthermore, it was interesting to compare the Z14G-binding ability of BBP with our previous experiments regarding ZEN [33].

The sorption isotherms can quantitatively characterize of the mycotoxin-binding ability of BBP [35]. The Langmuir and Freundlich models were employed to investigate the interaction of Z14G with BBP (Figure 9). Based on our results, the Langmuir showed a better fitting vs. the Freundlich model. The Langmuir affinity constant of Z14G was significantly lower ( $0.0197 \pm 0.006$  L/mg) compared to ZEN ( $0.60 \pm 0.25$  L/mg) [33], which is in agreement with the lower binding affinity of BCD towards Z14G. The Freundlich constant of Z14G ( $0.18 \pm 0.01$  (mg/g)  $\times$  (L/mg)<sup>1/n</sup>) was also lower compared to the  $K_F$  value of ZEN ( $1.16 \pm 0.07$  (mg/g)  $\times$  (L/mg)<sup>1/n</sup>) [33], again supporting the better ability of BBP to remove ZEN vs. Z14G.



## 5. Conclusions

In summary, the interaction of Z14G with  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs, as well as with insoluble  $\beta$ -CD bead polymer, was examined. Despite the large hydrophilic glucose part of Z14G, it is able to form stable complexes with CDs; however, unlike ZEN, Z14G prefers the larger  $\gamma$ -CD cavity. CDs strongly increase the fluorescence signal of Z14G, and the methyl substitution of the native GCD can further increase both the fluorescence enhancement and the stability of formed complexes. BBP proved to be a suitable tool to decrease the Z14G content of aqueous solution, showing its ability to bind both the masked mycotoxin and the parent compound. Based on our observations, CD technology seems a promising tool to improve the fluorescence analytical detection of Z14G as well as to decrease the mycotoxin exposure through the removal of certain mycotoxins (e.g., Z14G, ZEN, and zearalenols) from aqueous solutions (including some beverages).

**Author Contributions:** Conceptualization, L.S. and M.P.; Formal analysis, Z.F., E.F.-N., L.D., G.G., B.L. and S.K.-M.; Funding acquisition, S.K.-M. and M.P.; Investigation, Z.F., E.F.-N., L.D., G.G., C.D., B.L., S.K.-M. and M.P.; Methodology, Z.F., E.F.-N., L.D., G.G., C.D., B.L. and S.K.-M.; Supervision, M.P.; Writing—original draft, Z.F., L.D. and M.P., M.P. and L.S. conceived the study. Z.F., M.P., and L.D. wrote the paper. Z.F. performed fluorescence spectroscopic studies. E.F.-N. carried out mycotoxin extraction experiments and HPLC analyses. B.L. and S.K.-M. performed the evaluation of mycotoxin binding by BBP based on Langmuir and Freundlich isotherms. L.D., G.G., and C.D. performed molecular modeling studies. All authors have read, edited, and approved the final version of the paper.

**Funding:** This study was supported by the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (FK125166) (M.P., Z.F., and E.F.-N.). This work was supported by the GINOP-2.3.2-15-2016-00049 grant (S.K.-M.).

**Acknowledgments:** This project was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (M.P.). L.D., C.D. and G.G. would acknowledge Gabriele Cruciani for the courtesy of FLAP software ([www.moldiscovery.com](http://www.moldiscovery.com)), as well as Pietro Cozzini and Glen E. Kellogg for the courtesy of HINT scoring function.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Pitt, J.I. Mycotoxins. In *Foodborne Infections and Intoxications*, 4th ed.; Morris, J.G., Jr., Potter, M.E., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013; Volume 30, pp. 409–418.
2. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Yazar, S.; Omurtag, G.Z. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 2062–2090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Maragos, C.M. Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin J.* **2010**, *3*, 369–383. [[CrossRef](#)]
5. European Food Safety Authority (EFSA). Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA J.* **2017**, *15*, 4851. [[CrossRef](#)]
6. Shier, W.; Shier, A.; Xie, W.; Mirocha, C. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol.* **2001**, *39*, 1435–1438. [[CrossRef](#)]
7. Filannino, A.; Stout, T.A.; Gadella, B.M.; Sostaric, E.; Pizzi, F.; Colenbrander, B.; Dell'Aquila, M.E.; Minervini, F. Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2011**, *9*, 134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Vianello, A.; Macri, F. Inhibition of plant cell membrane transport phenomena induced by zearalenone (F-2). *Planta* **1978**, *143*, 51–57. [[CrossRef](#)]
9. Macri, F.; Vianello, A. Zearalenone-dissipated Electrochemical Gradient in Higher Plant Mitochondria and Microsomes. *J. Plant Physiol.* **1990**, *136*, 754–757. [[CrossRef](#)]
10. Berthiller, F.; Lemmens, M.; Werner, U.; Krska, R.; Hauser, M.-T.; Adam, G.; Schuhmacher, R. Short review: Metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone in plants. *Mycotoxin Res.* **2007**, *23*, 68–72. [[CrossRef](#)]
11. Berthiller, F.; Crews, C.; Dall'Asta, C.; De Saeger, S.; Haesaert, G.; Karlovsky, P.; Oswald, I.P.; Seefelder, W.; Speijers, G.; Stroka, J. Masked mycotoxins: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 165–186. [[CrossRef](#)]

12. De Saeger, S.; Van Egmond, H.P. Special issue: Masked mycotoxins. *World Mycotoxin J.* **2012**, *5*, 203–206. [[CrossRef](#)]
13. Zhang, Z.; Nie, D.; Fan, K.; Yang, J.; Guo, W.; Meng, J.; Zhao, Z.; Han, Z. A systematic review of plant-conjugated masked mycotoxins: Occurrence, toxicology, and metabolism. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Freire, L.; Sant'Ana, A.S. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *111*, 189–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Berthiller, F.; Schuhmacher, R.; Adam, G.; Krska, R. Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1243–1252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rychlik, M.; Humpf, H.-U.; Marko, D.; Dänicke, S.; Mally, A.; Berthiller, F.; Klaffke, H.; Lorenz, N. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Res.* **2014**, *30*, 197–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Poppenberger, B.; Berthiller, F.; Bachmann, H.; Lucyshyn, D.; Peterbauer, C.; Mitterbauer, R.; Schuhmacher, R.; Krska, R.; Glössl, J.; Adam, G. Heterologous Expression of Arabidopsis UDP-Glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for Production of Zearalenone-4-O-Glucoside. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4404–4410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Dall'Erta, A.; Cirlini, M.; Del Rio, D.; Galaverna, G.; Dall'Asta, C.; Dall'Asta, M.; Dall'Asta, M. Masked Mycotoxins Are Efficiently Hydrolyzed by Human Colonic Microbiota Releasing Their Aglycones. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 305–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Dellafiora, L.; Ruotolo, R.; Perotti, A.; Cirlini, M.; Galaverna, G.; Cozzini, P.; Buschini, A.; Dall'Asta, C. Molecular insights on xenoestrogenic potential of zearalenone-14-glucoside through a mixed in vitro/in silico approach. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *108*, 257–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Szente, L. Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 17–28. [[CrossRef](#)]
21. Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940–10975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Szente, L.; Szemán, J. Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host–Guest Type Molecular Recognition. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8024–8030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Aghamohammadi, M.; Alizadeh, N. Fluorescence enhancement of the aflatoxin B1 by forming inclusion complexes with some cyclodextrins and molecular modeling study. *J. Lumin.* **2007**, *127*, 575–582. [[CrossRef](#)]
24. Wu, Q.; Xu, J.; Xu, H. Interactions of aflatoxin B1 and related secondary metabolites with native cyclodextrins and their potential utilization. *Food Control.* **2018**, *94*, 102–107. [[CrossRef](#)]
25. Dall'Asta, C.; Faccini, A.; Galaverna, G.; Corradini, R.; Dossena, A.; Marchelli, R. Complexation of zearalenone and zearalenols with native and modified  $\beta$ -cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2009**, *64*, 331–340. [[CrossRef](#)]
26. Zhou, Y.; Chen, J.; Dong, L.; Lu, L.; Chen, F.; Hu, D.; Wang, X. A study of fluorescence properties of citrinin in  $\beta$ -cyclodextrin aqueous solution and different solvents. *J. Lumin.* **2012**, *132*, 1437–1445. [[CrossRef](#)]
27. Poór, M.; Kunsági-Máté, S.; Sali, N.; Kőszegi, T.; Szente, L.; Peles-Lemli, B. Interactions of zearalenone with native and chemically modified cyclodextrins and their potential utilization. *J. Photochem. Photobiol. B Boil.* **2015**, *151*, 63–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Poór, M.; Kunsági-Máté, S.; Szente, L.; Matisz, G.; Secenji, G.; Czibulya, Z.; Kőszegi, T. Interaction of ochratoxin A with quaternary ammonium beta-cyclodextrin. *Food Chem.* **2015**, *172*, 143–149. [[CrossRef](#)]
29. Poór, M.; Matisz, G.; Kunsági-Máté, S.; Derdák, D.; Szente, L.; Lemli, B. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction of citrinin with native and chemically modified cyclodextrins. *J. Lumin.* **2016**, *172*, 23–28. [[CrossRef](#)]
30. Maragos, C.M.; Appell, M.; Lippolis, V.; Visconti, A.; Catucci, L.; Pascale, M. Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins. *Food Addit. Contam. Part A* **2008**, *25*, 164–171. [[CrossRef](#)]
31. Dall'Asta, C.; Faccini, A.; Galaverna, G.; Corradini, R.; Dossena, A.; Marchelli, R. Complexation of the mycotoxin zearalenone with  $\beta$ -cyclodextrin: Study of the interaction and first promising applications. *Mycotoxin Res.* **2008**, *24*, 14–18. [[CrossRef](#)]
32. Larionova, D.A.; Goryacheva, I.Y.; Van Peteghem, C.; De Saeger, S. Thin-layer chromatography of aflatoxins and zearalenones with  $\beta$ -cyclodextrins as mobile phase additives. *World Mycotoxin J.* **2011**, *4*, 113–117. [[CrossRef](#)]

33. Poór, M.; Faisal, Z.; Zand, A.; Bencsik, T.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Sente, L. Removal of Zearalenone and Zearalenols from Aqueous Solutions Using Insoluble Beta-Cyclodextrin Bead Polymer. *Toxins* **2018**, *10*, 216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Appell, M.; Jackson, M.A. Synthesis and evaluation of cyclodextrin-based polymers for patulin extraction from aqueous solutions. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2010**, *68*, 117–122. [[CrossRef](#)]
35. Appell, M.; Jackson, M.A. Sorption of Ochratoxin A from Aqueous Solutions Using  $\beta$ -Cyclodextrin-Polyurethane Polymer. *Toxins* **2012**, *4*, 98–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Berman, H.M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Dellafiora, L.; Dall'Asta, C.; Cozzini, P. Ergot alkaloids: From witchcraft till in silico analysis. Multi-receptor analysis of ergotamine metabolites. *Toxicol. Rep.* **2015**, *2*, 535–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Baroni, M.; Cruciani, G.; Sciabola, S.; Perruccio, F.; Mason, J.S. A Common Reference Framework for Analyzing/Comparing Proteins and Ligands. Fingerprints for Ligands And Proteins (FLAP): Theory and Application. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 279–294. [[CrossRef](#)]
39. Carosati, E.; Sciabola, S.; Cruciani, G. Hydrogen Bonding Interactions of Covalently Bonded Fluorine Atoms: From Crystallographic Data to a New Angular Function in the GRID Force Field. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5114–5125. [[CrossRef](#)]
40. Dellafiora, L.; Warth, B.; Schmidt, V.; Del Favero, G.; Mikula, H.; Fröhlich, J.; Marko, D. An integrated in silico/in vitro approach to assess the xenoestrogenic potential of *Alternaria* mycotoxins and metabolites. *Food Chem.* **2018**, *248*, 253–261. [[CrossRef](#)]
41. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Boil.* **1997**, *267*, 727–748. [[CrossRef](#)]
42. Dellafiora, L.; Marchetti, M.; Spyrakis, F.; Orlandi, V.; Campanini, B.; Cruciani, G.; Cozzini, P.; Mozzarelli, A. Expanding the chemical space of human serine racemase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4297–4303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Rollinger, J.M.; Schuster, D.; Baier, E.; Ellmerer, E.P.; Langer, T.; Stuppner, H. Taspine: Bioactivity-Guided Isolation and Molecular Ligand–Target Insight of a Potent Acetylcholinesterase Inhibitor from *Magnolia x soulangiana*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1341–1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kellogg, G.E.; Abraham, D.J. Hydrophobicity: Is LogPo/w more than the sum of its parts? *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 651–661. [[CrossRef](#)]
45. Amadasi, A.; Dall'Asta, C.; Ingleto, G.; Pela, R.; Marchelli, R.; Cozzini, P. Explaining cyclodextrin–mycotoxin interactions using a 'natural' force field. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4585–4594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Cozzini, P.; Ingleto, G.; Singh, R.; Dall'Asta, C. Mycotoxin Detection Plays “Cops and Robbers”: Cyclodextrin Chemosensors as Specialized Police? *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 2474–2494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Cozzini, P.; Fornabai, M.; Marabotti, A.; Abraham, D.J.; Kellogg, G.E.; Mozzarelli, A. Simple, Intuitive Calculations of Free Energy of Binding for Protein–Ligand Complexes. 1. Models without Explicit Constrained Water. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2469–2483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Poór, M.; Zand, A.; Sente, L.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S. Interaction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenols with  $\beta$ -cyclodextrins. *Molecules* **2017**, *22*, 1910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Verdonk, M.L.; Berdini, V.; Hartshorn, M.J.; Mooij, W.T.M.; Murray, C.W.; Taylor, R.D.; Watson, P. Virtual Screening Using Protein–Ligand Docking: Avoiding Artificial Enrichment. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 793–806. [[CrossRef](#)]







# Interaction of zearalenone-14-sulfate with cyclodextrins and the removal of the modified mycotoxin from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer

Zelma Faisal<sup>a,b</sup>, Eszter Fliszár-Nyúl<sup>a,b</sup>, Luca Dellaflora<sup>c</sup>, Gianni Galaverna<sup>c</sup>, Chiara Dall'Asta<sup>c</sup>, Beáta Lemli<sup>b,d</sup>, Sándor Kunsági-Máté<sup>b,d</sup>, Lajos Szente<sup>e</sup>, Miklós Poór<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary

<sup>b</sup> János Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Ifjúság útja 20, H-7624 Pécs, Hungary

<sup>c</sup> Department of Food and Drug, University of Parma, Via G.P. 7 Usberti 17/A, 43124 Parma, Italy

<sup>d</sup> Institute of Organic and Medicinal Chemistry, Medical School, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary

<sup>e</sup> CycloLab Cyclodextrin Research & Development Laboratory, Ltd., Illatos út 7, H-1097 Budapest, Hungary

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 25 February 2020

Received in revised form 23 April 2020

Accepted 25 April 2020

Available online 28 April 2020

### Keywords:

Zearalenone-14-sulfate

Modified mycotoxin

Cyclodextrins

Host-guest interaction

Fluorescence spectroscopy

Mycotoxin binder

## ABSTRACT

The xenoestrogenic mycotoxin zearalenone is a common food contaminant produced by *Fusarium* strains. The modified mycotoxin zearalenone-14-sulfate (Z14S) is formed in both fungi and mammals during the biotransformation of zearalenone. Cyclodextrins (CD) are cyclic oligosaccharides which can form host-guest type complexes with some mycotoxins, including zearalenone, zearalenols, and zearalenone-14-glucoside. As a result of the complex formation, the fluorescence signal of these mycotoxins strongly increases. Furthermore, CD polymers seem to be suitable for the extraction of some mycotoxins from aqueous solutions and beverages. In this study, the interaction of Z14S with CDs and soluble CD polymers was examined with fluorescence spectroscopy and molecular modeling. Furthermore, the removal of Z14S from aqueous solution by  $\beta$ -CD bead polymer (BBP) was also tested. Our results demonstrate the formation of stable Z14S-CD complexes ( $K = 0.1$  to  $5.0 \times 10^4$  L/mol). Dimethyl- $\beta$ -CD (DIMEB) produced the most stable complexes with Z14S at pH 5.0 and 7.4. At pH 10.0, the binding constant of Z14S-DIMEB complex decreased and quaternary ammonium- $\beta$ -CD showed similar affinity toward the mycotoxin than DIMEB. In addition, Z14S was successfully removed from aqueous solutions by BBP. Considering the above-listed observations, besides the parent mycotoxins, some of their modified/masked derivatives can also interact with CDs.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Zearalenone is a toxic secondary metabolite of *Fusarium* species, which frequently contaminate grains (especially maize) and other commodities (e.g., fruits, meat, pastry, and beverages) [1,2]. The consumption of zearalenone-contaminated food and feed can result in the development of reproductive disorders in animals and humans, due to the xenoestrogenic effect of the mycotoxin and its metabolites [2–4]. Zearalenone is highly biotransformed by mammals, plants, and fungi, during which reduced (zearalenols, zearalanone, and zearalanols) and conjugated metabolites are formed [4,5].

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary.

E-mail addresses: [faisal.zelma@gytk.pte.hu](mailto:faisal.zelma@gytk.pte.hu) (Z. Faisal), [eszter.nyul@aok.pte.hu](mailto:eszter.nyul@aok.pte.hu) (E. Fliszár-Nyúl), [luca.dellaflora@unipr.it](mailto:luca.dellaflora@unipr.it) (L. Dellaflora), [gianni.galaverna@unipr.it](mailto:gianni.galaverna@unipr.it) (G. Galaverna), [chiara.dallasta@unipr.it](mailto:chiara.dallasta@unipr.it) (C. Dall'Asta), [beata.lemli@aok.pte.hu](mailto:beata.lemli@aok.pte.hu) (B. Lemli), [kunsagi-mate.sandor@gytk.pte.hu](mailto:kunsagi-mate.sandor@gytk.pte.hu) (S. Kunsági-Máté), [szente@cyolab.hu](mailto:szente@cyolab.hu) (L. Szente), [poor.miklos@pte.hu](mailto:poor.miklos@pte.hu) (M. Poór).

Mycotoxin conjugates produced by plants are designated as masked mycotoxins, while other compounds formed by structural modification of the parent mycotoxins are referred to modified mycotoxins [5,6]. Zearalenone-14-sulfate (Z14S; also termed as zearalenone-4-sulfate; Fig. 1) is produced by different strains (e.g., *Aspergillus oryzae*, *Fusarium* and *Rhizopus* species) as a fungal metabolite or by sulfotransferase (SULT) enzyme during the phase II metabolism of zearalenone in mammals [4,5]. Generally, the sulfate conjugation results in less toxic derivatives, due to the increased hydrophilicity of the metabolite formed. However, Z14S can be degraded partly to the more toxic parent compound by the human intestinal microbiome [7]. Therefore, we need to consider Z14S as a similarly toxic compound to zearalenone, and should take into consideration during the health risk assessment of the exposure [5].

Cyclodextrins (CDs) are cyclic glucose oligomers joined through 1–4 glycosidic linkage. CDs possess a lipophilic internal cavity and a hydrophilic external part, the latter provides them high aqueous solubility [8,9]. Since CDs can entrap nonpolar molecules in their internal cavity,

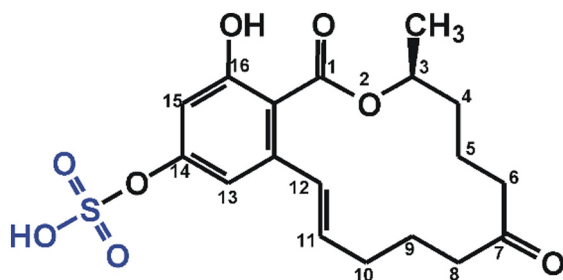


Fig. 1. Chemical structure of zearalenone-14-sulfate (Z14S).

they are commonly utilized by pharmaceutical, cosmetic, and food industries. The three most frequently applied CDs are  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -CDs, containing six, seven, and eight *D*-glucopyranose units, respectively [9]. The complexation of guest molecules by CDs is strongly influenced by the chemical modification of the host [9,10]. As it has been reported, CDs can interact with some mycotoxins (and their derivatives), including aflatoxins, citrinin, dihydrocitrinone, ochratoxin A, zearalenone, zearalenols, and zearalenon-14-glucoside [11–17]. Typically, the complex formation of fluorescent mycotoxins with CDs increases their fluorescence signal, which may be beneficial from the analytical point of view [18,19]. Furthermore, based on previous studies, CD polymers seem to be suitable for the removal of certain mycotoxins (e.g., patulin, ochratoxin A, alternariol, zearalenone, and zearalenols) and masked mycotoxins (e.g., zearalenone-14-glucoside) from aqueous solutions, including beverages (such as fruit juices, wine, or beer) [17,20–23].

Despite the fact that modified mycotoxins commonly appear in grains and in other commodities, we have only limited information regarding their interactions with CDs. Since the masked mycotoxin zearalenone-14-glucoside forms complexes with CDs [17], it is reasonable to hypothesize that other modified mycotoxins may also be entrapped by CDs. Therefore, in this study, the complex formation of Z14S with native and chemically-modified CDs and soluble CD polymers (pH 5.0–10.0) was investigated employing fluorescence spectroscopy and molecular modeling. Furthermore, the removal of Z14S from aqueous solution by insoluble  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer (BBP) was also investigated. Our results demonstrate that, similarly to zearalenone, Z14S also formed stable complexes with native and chemically-modified CDs and BBP successfully removed the modified mycotoxin from aqueous solution.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Zearalenone-14-sulfate ammonium salt (Z14S) was obtained from ASCA GmbH (Berlin, Germany). Z14S stock solution (5000  $\mu$ M) was prepared in spectroscopic grade ethanol (96 v/v%; Reanal, Budapest, Hungary) and stored at  $-20$  °C. Cyclodextrins, including  $\beta$ -CD (BCD),  $\gamma$ -CD (GCD), randomly methylated  $\beta$ -CD (RAMEB), heptakis-2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -cyclodextrin (DIMEB), 6-monodeoxy-6-monoamino- $\beta$ -cyclodextrin (MABCD), (2-hydroxy-3-*N,N,N*-trimethylamino)propyl- $\beta$ -cyclodextrin (QABCD), (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -CD (HPBCD), sulfobutyl- $\beta$ -cyclodextrin (SBCD), epichlorohydrin cross-linked soluble BCD polymer (BCD content: 70 m/m%), epichlorohydrin cross-linked soluble QABCD polymer (QABCD content: 60 m/m%), and insoluble (water-swellaible)  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer (BBP; cyclodextrin-epichlorohydrin cross-linked bead polymer; BCD content: 50 m/m%) were provided by CycloLab Cyclodextrin Research and Development Laboratory, Ltd. (Budapest, Hungary).

### 2.2. Spectroscopic measurements

Fluorescence spectra were recorded at 25 °C in the presence of air, using a Hitachi F-4500 fluorimeter (Tokyo, Japan). In spectroscopic studies, sodium acetate (0.05 M, pH 5.0), sodium phosphate (0.05 M, pH 7.4), and sodium borate (0.05 M, pH 10.0) buffers were applied. Fluorescence emission spectra of Z14S were examined in the presence of increasing CD concentrations, applying 320 nm excitation wavelength.

Binding constants ( $K$ ; unit: L/mol) of Z14S-CD complexes were determined based on the graphical application of Benesi-Hildebrand equation [13]:

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

where  $I_0$  and  $I$  are the fluorescence emission intensity of Z14S in the absence and presence of CDs, respectively.  $A$  is a constant,  $n$  is the number of binding sites, and  $[CD]$  is the concentration (unit: L/mol) of the host molecule.

### 2.3. Molecular modeling studies

The molecular modeling approach relied on a combination of pharmacophoric analysis of CD cavity integrated with docking studies to provide a plausible architecture of binding. The 3D structures of  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, and DIMEB derived from the crystallographic structures recorded in the Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) database (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures>) having accession code WEWTOJ, LAJLALO2, and ZULQAY, respectively. The 3D coordinates of Z14S were retrieved from PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>; CID = 45359500, accessed on November 21, 2019). The consistency of atom and bond types assignment of Z14S and CDs were checked with the Sybyl software (version 8.1; [www.certara.com](http://www.certara.com)), as previously reported [24]. Z14S was computed in the deprotonated form and the 3D structure was energetically minimized using Powell algorithm (with a coverage gradient of  $\leq 0.05$  kcal/(mol  $\times$  Å) and a maximum of 250 iterations) before the analysis, as it has been reported [17].

The description of CD sites was carried out using the Flapsite tool of the FLAP software (Fingerprint for Ligand And Protein; <https://www.moldiscovery.com>) while the GRID algorithm was used to investigate the corresponding pharmacophoric space [25,26] in agreement with previous studies [27]. The GOLD software [28] was used to perform all the docking simulations as it previously proved to be reliable in predicting the binding architectures of host-guest type complexes [17,29,30]. GOLD setting reported by Dellaflora and co-workers was used [29]. As exception, ten poses were generated for each compound in each CD and the best-scored pose according to the GOLDScore scoring function was considered to represent the most probable architecture of binding, in agreement with previous works [17,31–33].

### 2.4. Extraction of Z14S from aqueous buffer by BBP

To investigate the removal of Z14S by BBP, the mycotoxin (2  $\mu$ M in 1.5 mL volume) was incubated with increasing amounts of the bead polymer (0.0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, and 20.0 mg/1.5 mL) in sodium acetate buffer (0.05 M, pH 5.0; 40 min, 1000 rpm, 25 °C). Then BBP was sedimented by pulse centrifugation (4000g, 6 s, room temperature) and the mycotoxin content of the supernatant was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC; see in Section 2.5).

Using the same experimental conditions, increasing mycotoxin concentrations (0.2, 2.5, 5.0, 7.5, and 10.0  $\mu$ M in 1.5 mL volume) were added to standard amount of BBP (2.0 mg/1.5 mL), after which the Z14S content of the supernatants were quantified. Data were evaluated applying the Langmuir and Freundlich sorption isotherms [21,23]. The Langmuir

equation was described as:

$$q_e = \frac{Q_0 K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (2)$$

where  $q_e$  is the bound amount of Z14S (mg/g BBP),  $Q_0$  represents the maximum amount of Z14S bound (mg/g BBP),  $C_e$  denotes the free amount of Z14S (mg) in the solution at equilibrium, and  $K_L$  is the Langmuir equilibrium constant (L/mg). The Freundlich equation was described as:

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (3)$$

where  $n$  and  $K_F$  are the heterogeneity index and the Freundlich constant, respectively.

### 2.5. HPLC analysis

Z14S concentrations in the supernatants were quantified by an integrated HPLC system (Jasco, Tokyo, Japan), which includes an autosampler (AS-4050), a binary pump (PU-4180), and a fluorescence detector (FP-920). A 20- $\mu$ L volume of samples was driven through a Phenomenex Security Guard™ (C18, 4.0  $\times$  3.0 mm) guard column joined to a Kinetex (C18, 250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) analytical column. The isocratic elution was performed with 1.0 mL/min flow rate at room temperature. The mobile phase contained methanol, acetonitrile, and distilled water (6:35:59 v/v%). Z14S was detected at 465 nm ( $\lambda_{ex}$  = 330 nm), and the chromatograms were evaluated with ChromNAV software.

### 2.6. Statistics

Statistical analyses were performed with one-way ANOVA test (IBM SPSS, New York, NY, USA). The level of significance was set to  $p < 0.01$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Fluorescence excitation and emission spectra of zearalenone-14-sulfate

First, the fluorescence excitation and emission spectra of Z14S were recorded in different buffers (pH 5.0, 7.4, and 10.0; Fig. 2). The excitation wavelength maximum of Z14S was noticed around 330 nm under weakly acidic (pH 5.0) and physiological (pH 7.4) circumstances. However, at pH 10.0, a slight red shift of the maximum (330 nm  $\rightarrow$  334 nm) and a significant decrease in the fluorescence signal were noticed (Fig. 2A). Furthermore, at pH 5.0 and 7.4, the emission spectra of the

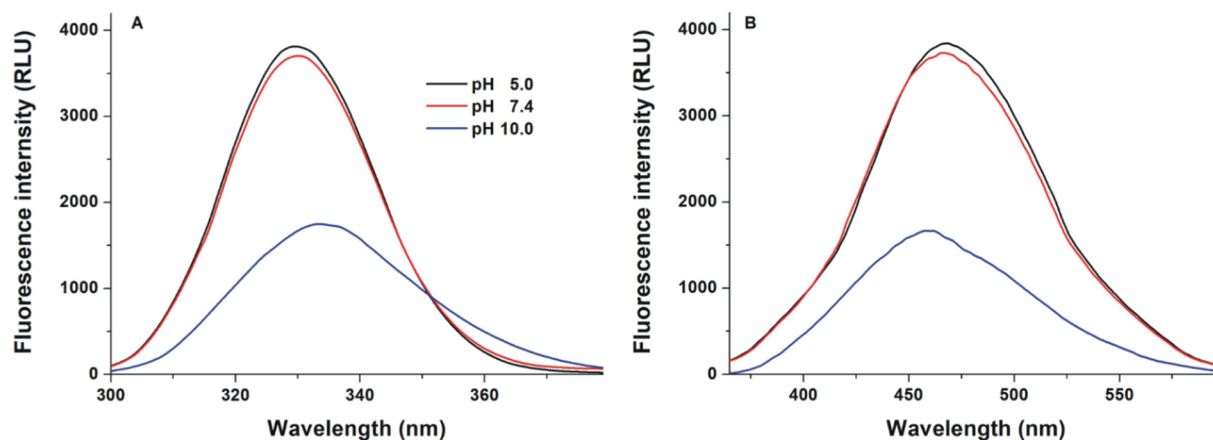
mycotoxin were similar, while a blue shift of the wavelength maximum (465 nm  $\rightarrow$  458 nm) and the decreased emission signal were observed at pH 10.0 (Fig. 2B). Since the protonation state can influence the absorption and fluorescence spectra of the fluorophores [34–36], these spectral changes are likely resulted from the deprotonation of the mycotoxin at the highest pH tested (similarly to zearalenone, zearalenols, and zearalenone-14-glucoside [17,37,38]): The phenolic hydroxyl group of Z14S on C16 may lose its proton under alkaline conditions.

### 3.2. Effects of cyclodextrins on the fluorescence emission signal of zearalenone-14-sulfate

Fluorescence spectra of Z14S were also examined in the presence of native  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs at pH 5.0. CDs induced a blue shift in the excitation wavelength maximum of Z14S (data not shown); therefore, emission spectra were recorded using 320 nm excitation wavelength. In the presence of CDs, the fluorescence emission signal of the mycotoxin was considerably increased and a slight blue shift of the emission wavelength maximum (465 nm  $\rightarrow$  460 nm) was observed (Fig. 3). Typically, the inclusion of organic fluorophores by  $\beta$ -CDs results in a blue shift in their fluorescence emission wavelength maxima [34,35]. This fact and the observation that CDs alone did not exert significant fluorescence under the applied conditions suggest the formation of host-guest type Z14S-CD complexes. The fluorescence enhancement observed can be explained by the decreased quenching effect of water molecules due to the inclusion of Z14S in the nonpolar CD cavity [39,40]. BCD induced higher fluorescence enhancement of the mycotoxin (Fig. 3B) and formed more stable (approximately three-fold; see details later in Section 3.3) complexes with Z14S than GCD. Thus, Z14S favors the smaller cavity of BCD vs. GCD, similarly to zearalenone [37]. Interestingly, the masked mycotoxin zearalenone-14-glucoside showed the opposite [17]. In the following experiments, BCD and its chemically modified derivatives were studied further.

### 3.3. Interaction of zearalenone-14-sulfate with native and chemically modified cyclodextrins in different buffers

Emission spectrum of Z14S was recorded in the presence of increasing CD concentrations in different buffers. At pH 5.0,  $\beta$ -CDs induced 14- to 21-fold increase in the emission signal of the mycotoxin at 460 nm (Fig. 4 and Table 1). Monoamino- (MABCD) and dimethyl- $\beta$ -CDs (DIMEB) caused stronger while other derivatives resulted in weaker fluorescence enhancement than the native BCD (Fig. 4). Binding constants of Z14S-CD complexes were determined using the Benesi-Hildebrand equation (Eq. (1)). Benesi-Hildebrand plots showed excellent fitting ( $R^2 = 0.990$ – $0.999$ ) with the 1:1 stoichiometry model



**Fig. 2.** Fluorescence spectra of Z14S (25  $\mu$ M). Excitation (A; pH 5.0 and pH 7.4:  $\lambda_{em}$  = 465 nm; pH 10.0:  $\lambda_{em}$  = 458 nm) and emission (B; pH 5.0 and pH 7.4:  $\lambda_{ex}$  = 330 nm; pH 10.0:  $\lambda_{ex}$  = 334 nm) spectra of the mycotoxin in different buffers (0.05 M sodium acetate, pH 5.0; 0.05 M sodium phosphate, pH 7.4; 0.05 M sodium borate, pH 10.0). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



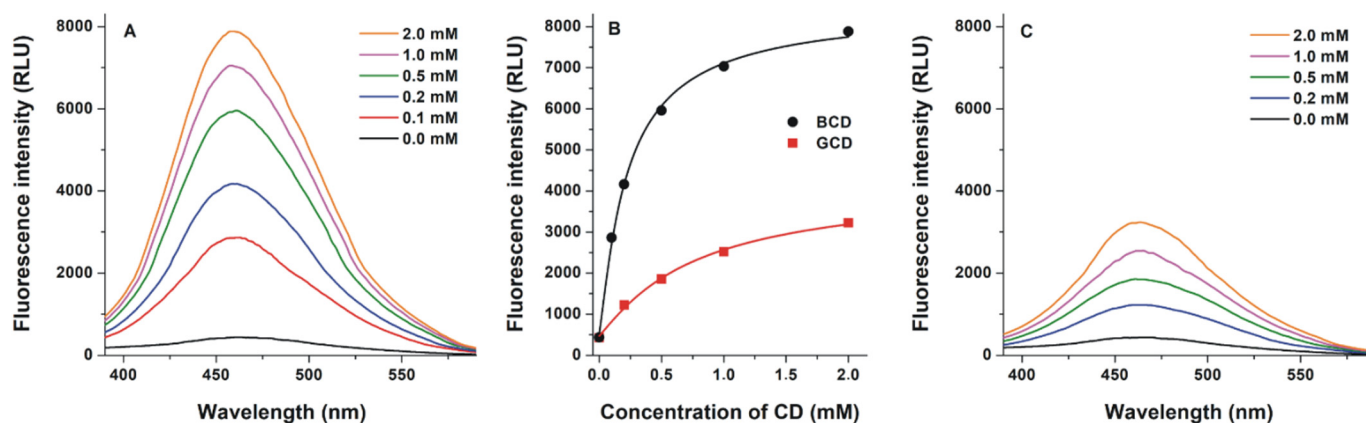


Fig. 3. Fluorescence emission spectra of Z14S (1 μM) in the presence of increasing BCD (A) and GCD (C) concentrations (0.0–2.0 mM) in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0;  $\lambda_{ex}$  = 320 nm). (B) BCD- and GCD-induced increase in the fluorescence of Z14S ( $\lambda_{ex}$  = 320 nm,  $\lambda_{em}$  = 460 nm).

(Fig. S1). The  $\beta$ -CDs examined, formed stable complexes with Z14S ( $\log K$  = 3.6 to 4.7) at pH 5.0 (Table 1). Hydroxypropyl- (HPBCD) and sulfobutyl-substitution (SBCD) did not affect the affinity of  $\beta$ -CD toward Z14S; therefore, these derivatives were not tested further. MABCD and QABCD complexes showed approximately two-fold higher binding constants vs. Z14S-BCD. Furthermore, the methylated  $\beta$ -CDs, namely DIMEB and RAMEB formed the most stable complexes with the mycotoxin (approximately 11- and 5-fold compared to BCD, respectively) (Table 1). As it has been reported, the masked mycotoxin zearalenone-14-glucoside formed less stable complexes with BCD ( $\log K$  = 2.8) than Z14S [17]; however, the binding constants of Z14S-BCD ( $\log K$  = 3.6) and zearalenone-BCD ( $\log K$  = 4.0) [37] complexes were similar at pH 5.0. Furthermore, the stability of Z14S complexes with RAMEB and DIMEB is practically identical to zearalenone complexes; however, SBCD is less while QABCD is more suitable for the entrapment of Z14S compared to zearalenone [37].

The interaction of Z14S with BCD, RAMEB, DIMEB, MABCD, and QABCD were also investigated at pH 7.4 and 10.0. The absolute fluorescence intensities of Z14S-CD complexes were the highest at pH 5.0 (see in Fig. 4). Furthermore, the relative enhancement in the fluorescence of Z14S by CDs is demonstrated in Table 1. At pH 7.4, the CD-induced relative increase in fluorescence was similar to observed at pH 5.0. Despite the fact that the absolute intensities of Z14S-CD complexes were the

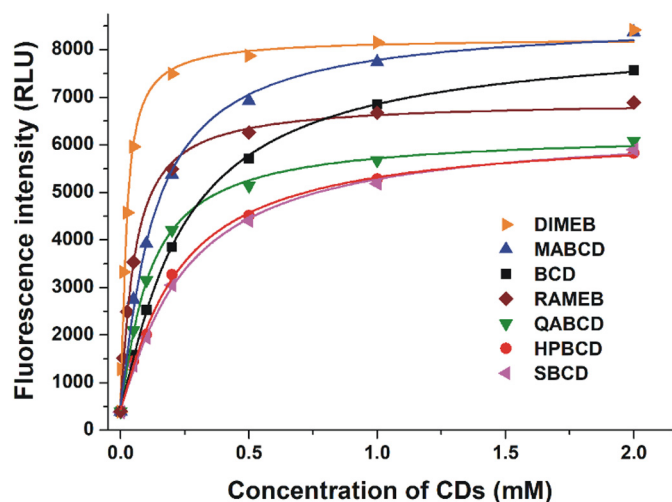


Fig. 4. Fluorescence emission intensities of Z14S (1 μM) in the presence of increasing CD concentrations (0–2 mM) in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0;  $\lambda_{ex}$  = 320 nm;  $\lambda_{em}$  = 460 nm).

lowest at pH 10.0 (see representative spectra in Fig. S2), the relative enhancement was significantly higher under these conditions (Table 1). The only exception was Z14S-QABCD complex, which showed poor emission signal at pH 10.0 (Fig. S2, bottom right). Under alkaline circumstances, the phenolic hydroxyl group of Z14S likely becomes deprotonated which results in a blue shift in its emission maximum and the significant decrease in its emission signal (see in Fig. 2). CDs tested (except QABCD) behaved similarly and likely favor the protonated form of the mycotoxin. Because the same emission wavelength maximum (approximately at 460 nm) was observed at each pH examined, it is reasonable to hypothesize that most of the CDs formed stable complexes with the same (protonated) form of Z14S. This hypothesis is supported by the following observations: (1) the relative increase in the fluorescence is larger at pH 10.0 due to the higher fluorescence signal of protonated Z14S (since CDs produce more stable complexes with this form, the equilibrium changes in favor of the protonated Z14S); (2) the higher relative fluorescence enhancement accompanied with significantly lower binding constant at pH 10.0, because CDs form complexes with the protonated mycotoxin which is presumably not the dominant form under alkaline conditions. On the other hand, QABCD seems to favor the deprotonated form based on the following observations (Fig. S2): (1) At pH 10.0, the emission wavelength maximum of Z14S-QABCD (447 nm) is different from the other CD complexes tested; (2) Z14S-QABCD complex has much lower emission signal than other complexes at pH 10.0, despite the fact that it was an effective enhancer at pH 5.0 and 7.4; (3) Z14S-QABCD shows the highest stability at pH 10.0. Since QABCD contains cationic substituents (tetraalkylammonium moieties), it is reasonable to hypothesize that its ionic interaction with the deprotonated mycotoxin may stabilize the formed complex.

### 3.4. Molecular modeling studies

Z14S showed a similar mode of binding regarding  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD (Fig. 5), even though the capability to get sunk within the diverse cavities was found dependent on the internal radius of CDs. Specifically, the interaction with either BCD or DIMEB was more superficial, while it was deeper within the GCD (whose internal radius is higher in comparison to that of BCD and DIMEB). The analysis of the binding poses showed that Z14S arranged the aliphatic ring within the hydrophobic core of CD cavity, while it used the sulfate and keto groups to engage the large border of the CDs with polar contacts. The binding poses calculated in the light of the affinity to CDs observed experimentally (DIMEB  $\gg$  BCD > GCD) suggested the stark importance of hydrophobic interactions to stabilize the Z14S-CD complexes. Indeed, the 2-O-methylation regarding DIMEB was thought providing an additional

**Table 1**

CD-induced relative increase in the fluorescence emission signal of Z14S ( $I/I_0$ ; 1  $\mu\text{M}$  Z14S + 2.0 mM CD) in different buffers ( $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ). Decimal logarithmic values of binding constants ( $K$ ; unit: L/mol) of Z14S-CD complexes.

	$I/I_0 \pm \text{SEM}$			$\log K \pm \text{SEM}$		
	pH 5.0	pH 7.4	pH 10.0	pH 5.0	pH 7.4	pH 10.0
BCD	18.51 $\pm$ 0.32	19.29 $\pm$ 0.50	20.24 $\pm$ 0.49	3.60 $\pm$ 0.02	3.55 $\pm$ 0.02	3.05 $\pm$ 0.02
RAMEB	16.55 $\pm$ 0.46	16.95 $\pm$ 0.21	26.49 $\pm$ 0.18	4.29 $\pm$ 0.04	4.27 $\pm$ 0.05	3.67 $\pm$ 0.04
DIMEB	20.10 $\pm$ 0.90	21.02 $\pm$ 0.79	33.31 $\pm$ 0.16	4.66 $\pm$ 0.05	4.63 $\pm$ 0.03	4.20 $\pm$ 0.08
MABCD	21.03 $\pm$ 0.11	21.76 $\pm$ 0.41	25.10 $\pm$ 0.66	3.90 $\pm$ 0.03	3.99 $\pm$ 0.05	3.04 $\pm$ 0.03
QABCD	14.77 $\pm$ 0.06	15.62 $\pm$ 0.17	6.67 $\pm$ 0.06	3.98 $\pm$ 0.03	3.74 $\pm$ 0.01	4.21 $\pm$ 0.01
HPBCD	14.25 $\pm$ 0.08			3.61 $\pm$ 0.02		
SBCD	14.96 $\pm$ 0.25			3.59 $\pm$ 0.01		
GCD	7.51 $\pm$ 0.05			3.14 $\pm$ 0.01		

hydrophobic patch that could better stabilize the interaction with the aromatic ring of Z14S in comparison to either BCD or GCD. Concerning the diverse affinity between BCD and GCD observed experimentally, it could be partially explained by the differential sinking of Z14S within the two hydrophobic cavities. In particular, keeping in mind that keto group in position #7 and the 2-oxabicyclo group represent hydrophilic patches in the aliphatic ring of Z14S, the more superficial interaction with BCD is likely more favored than that within GCD, wherein both groups are deeper included within the hydrophobic core of GCD's cavity.

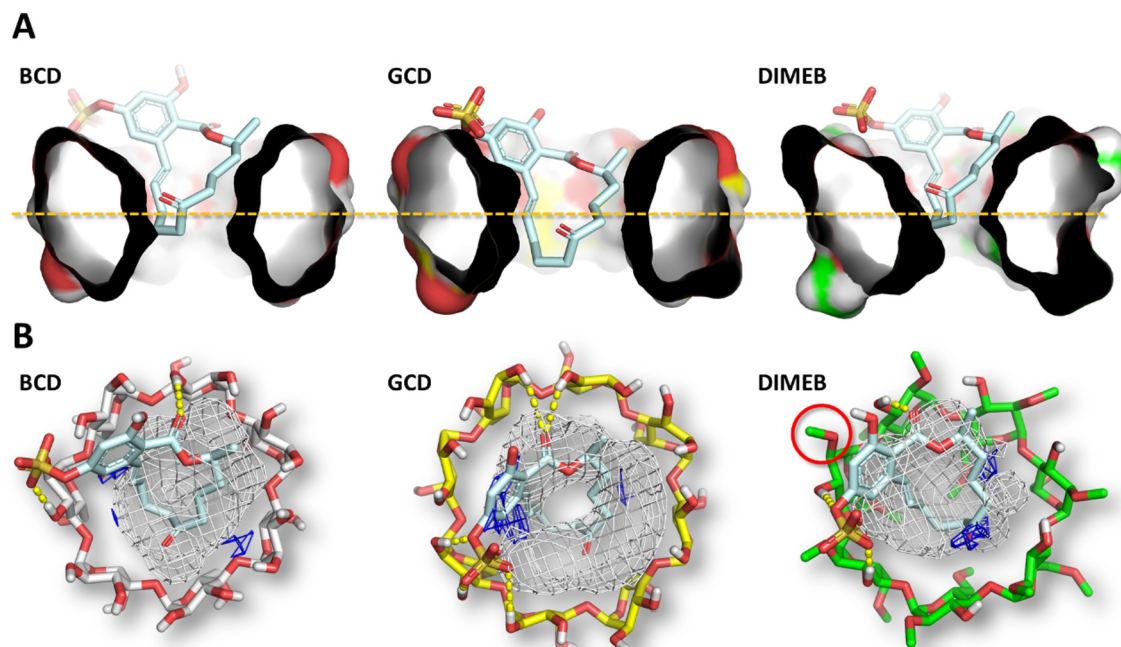
### 3.5. Interaction of zearalenone-14-sulfate with soluble $\beta$ -cyclodextrin polymers

We also tested the interactions of the mycotoxin with soluble (epichlorohydrin cross-linked) BCD and QABCD polymers at pH 5.0 and 10.0 (the soluble polymer of DIMEB is not available). The fluorescence emission spectrum of Z14S (1  $\mu\text{M}$ ) was recorded in the presence of increasing concentrations of soluble polymers. In order to apply comparable CD concentrations with the previous investigations, the polymer was normalized to its CD "monomer" content (0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5,

1.0, and 2.0 mM). Sometimes the CD polymers have higher affinity toward guest molecules due to the cooperativity of the monomers [22,41,42]. Therefore, the binding constants of the formed complexes were calculated based on the CD content of polymers applied (Eq. (1)), as it has been reported previously [22]. The complexes of Z14S with soluble BCD polymer showed 3.65 ( $\pm 0.04$ ) and 2.74 ( $\pm 0.06$ )  $\log K$  values at pH 5.0 and 10.0, respectively. These data are in good agreement with our previous results with the BCD monomer (Table 1). The soluble QABCD polymer formed slightly less stable complexes with Z14S at pH 10.0 ( $\log K = 3.96 \pm 0.03$ ) than the QABCD monomer. However, approximately three-fold higher affinity of the polymer ( $\log K = 4.48 \pm 0.01$ ) vs. the monomer was noticed at pH 5.0. These observations suggest that soluble QABCD polymer is suitable to form highly stable complexes with Z14S at both pH 5.0 and 10.0, in agreement with the data presented in Table 1.

### 3.6. Extraction of zearalenone-14-sulfate from aqueous solution by insoluble (water-swellaable) $\beta$ -cyclodextrin bead polymer

As it has been demonstrated, insoluble CD polymers are suitable for mycotoxin removal from aqueous solutions, including certain beverages



**Fig. 5.** Interactions of Z14S with BCD, GCD, and DIMEB. (A) Representation of the calculated complexes in cut surfaces (CDs) and sticks (Z14S). The dashed line serves as geometrical reference point and it indicates the centroid of hexose sugars of each CD: the inclusion of Z14S is deeper within GCD than within either BCD or DIMEB. (B) Representation of the calculated complexes in sticks. Yellow dotted lines indicate the formation of polar contacts while the grey, blue, and red mesh indicates regions sterically and energetically suitable to receive hydrophobic, hydrogen bond donor and hydrogen bond acceptor groups, respectively. The red ring indicates the position of the 2-O-methylation of DIMEB, which is thought favoring the interaction with the aromatic ring of Z14S. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

[21,23]. Zearalenone was successfully extracted from spiked corn beer [23] and the zearalenone-14-glucoside content of aqueous solution was also effectively decreased by BBP [17]. Some chemically-modified CDs have higher affinity toward Z14S than BCD; however, only the BCD polymer is available in insoluble (water-swellable) form. Therefore, the removal of Z14S by BBP was tested in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0). In a concentration-dependent fashion, BBP considerably decreased the Z14S content of the solution, resulting in 95% reduction of the mycotoxin concentration in the presence of 20.0 mg/1.5 mL BBP (vs. 1  $\mu$ M Z14S) (Fig. 6A). Based on these results, Z14S can be extracted by BBP with similar efficacy from aqueous solution than zearalenone [23].

In order to describe quantitatively the interaction of Z14S with BBP, increasing Z14S concentrations were added to standard amount of BBP (see details in Section 2.4) in sodium acetate buffer (0.05 M, pH 5.0). The binding ability of BBP was evaluated using the Langmuir (Eq. (2)) and Freundlich (Eq. (3)) isotherms (Fig. 6B). The Langmuir affinity constant ( $K_L$ ) was  $0.096 \pm 0.051$  L/mg and the  $Q_0$  value was  $9.53 \pm 4.49$  mg/g. The Freundlich model showed a  $0.827 \pm 0.019$  (mg/g)  $\times$  (L/mg) $^{1/n}$  Freundlich constant ( $K_F$ ) and a  $0.895 \pm 0.045$  1/ $n$  value.  $K_L$  and  $K_F$  values of Z14S-BBP interaction were lower compared to zearalenone-BBP ( $K_L = 0.60$  L/mg,  $K_F = 1.16$  (mg/g)  $\times$  (L/mg) $^{1/n}$ ) [23], suggesting the slightly lower adsorptive capacity of BBP regarding Z14S vs. the parent mycotoxin. The  $n$  value suggests the relatively homogenous sorption of Z14S to BBP.

#### 4. Conclusions

In summary, the interaction of the modified mycotoxin Z14S with native and chemically-modified CDs as well as with soluble CD polymers was investigated. Furthermore, the extraction of Z14S from aqueous solution by insoluble  $\beta$ -CD bead polymer was examined. Z14S form similarly stable complexes with CDs than zearalenone, and also favors  $\beta$ - vs.  $\gamma$ -CDs. CDs induced strong increase in the fluorescence signal of Z14S: MABCD, DIMEB, and BCD proved to be the most effective enhancers. The methyl derivatives (DIMEB and RAMEB) formed the most stable complexes with Z14S at pH 5.0 and 7.4. Furthermore, at pH 10.0, Z14S-QABCD showed similarly high stability to the Z14S-DIMEB complex. Soluble BCD and QABCD polymers demonstrated comparable binding ability regarding Z14S than CD monomers. BBP successfully decreased the Z14S content of aqueous solution, suggesting its possible suitability as mycotoxin binder. Based on the above-listed observations, CD technology seems to be a promising tool to make more sensitive the fluorescence detection of Z14S as well as to develop

mycotoxin binders which can entrap modified mycotoxins besides the parent compound.

#### Funding

The project was supported by the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (FK125166; M.P., Z.F., and E.F.-N.), and by the GINOP-2.3.2-15-2016-00049 grant (S.K.-M.).

#### CRedit authorship contribution statement

**Zelma Faisal:** Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Eszter Fliszár-Nyúl:** Methodology, Investigation. **Luca Dellaflora:** Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Gianni Galaverna:** Methodology, Investigation. **Chiara Dall'Asta:** Methodology, Investigation. **Beáta Lemli:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **Sándor Kunsági-Máté:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Funding acquisition. **Lajos Szente:** Conceptualization, Resources. **Miklós Poór:** Conceptualization, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

#### Declaration of competing interest

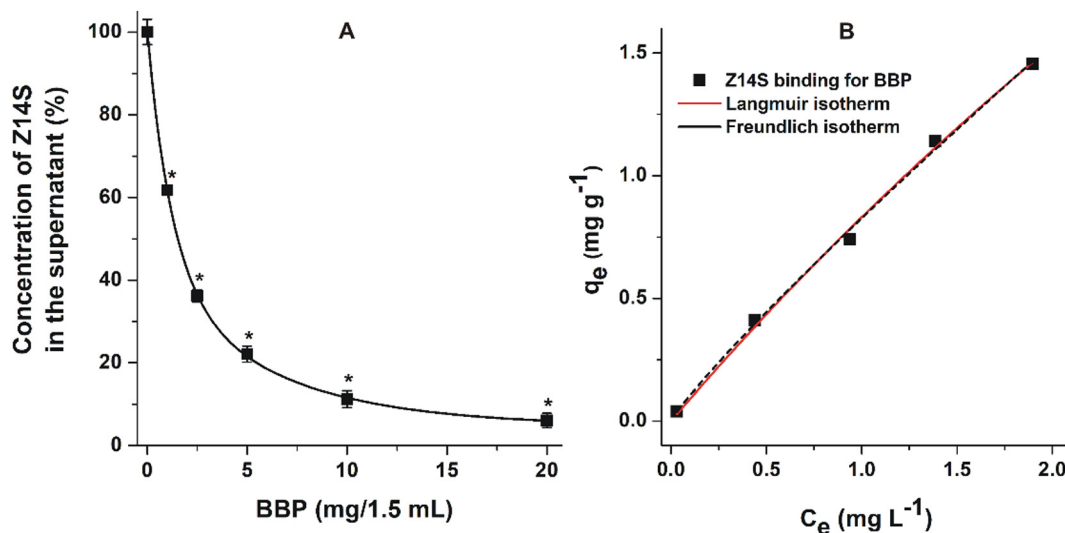
The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

The authors thank to Katalin Fábíán for her excellent assistance in the experimental work. This project was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (M.P.). In addition, the authors would like to acknowledge Prof. Gabriele Cruciani for the courtesy of FLAP software ([www.moldiscovery.com](http://www.moldiscovery.com)).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113236>.



**Fig. 6.** (A) Removal of Z14S (1  $\mu$ M in 1.5 mL volume) from aqueous solution (0.05 M sodium acetate buffer; pH 5.0) by  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer (BBP); incubation: 40 min, 1000 rpm, 25  $^{\circ}$ C; \* $p < 0.01$ ). (B) Langmuir (solid line) and Freundlich (dashed line) isotherms for the Z14S-BBP interaction.



## References

- [1] J.I. Pitt, Mycotoxins, in: J.G. Morris Jr., M.E. Potter (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications*, 4th ed., Volume 30, Academic Press, Cambridge, MA, USA 2013, pp. 409–418.
- [2] S. Yazar, G.Z. Omurtag, Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals, *Int. J. Mol. Sci.* 9 (2008) 2062–2090.
- [3] C.M. Maragos, Zearalenone occurrence and human exposure, *World Mycotoxin J.* 3 (2010) 369–383.
- [4] European Food Safety Authority (EFSA), Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed, *EFSA J.* 15 (2017) 4851.
- [5] European Food Safety Authority (EFSA), EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed, *EFSA J.* 12 (2014) 3916.
- [6] M. Rychlik, H.U. Humpf, D. Marko, S. Dänicke, A. Mally, F. Berthiller, H. Klaffke, N. Lorenz, Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins, *Mycotoxin Res.* 30 (2014) 197–205.
- [7] A. Dall’Erta, M. Cirilini, M. Dall’Asta, D. Del Rio, G. Galaverna, C. Dall’Asta, Masked mycotoxins are efficiently hydrolyzed by human colonic microbiota releasing their aglycones, *Chem. Res. Toxicol.* 26 (2013) 305–312.
- [8] L. Szenté, Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 17–28.
- [9] G. Crini, Review: a history of cyclodextrins, *Chem. Rev.* 114 (2014) 10940–10975.
- [10] L. Szenté, J. Szemán, Cyclodextrins in analytical chemistry: host–guest type molecular recognition, *Anal. Chem.* 85 (2013) 8024–8030.
- [11] M. Poór, S. Kunsági-Máté, L. Szenté, G. Matisz, G. Secenji, Z. Czibulya, T. Kőszegi, Interaction of ochratoxin A with quaternary ammonium beta-cyclodextrin, *Food Chem.* 172 (2015) 143–149.
- [12] Q. Wu, J. Xu, H. Xu, Interactions of aflatoxin B1 and related secondary metabolites with native cyclodextrins and their potential utilization, *Food Control* 94 (2018) 102–107.
- [13] Y. Zhou, J. Chen, L. Dong, L. Lu, F. Chen, D. Hu, X. Wang, A study of fluorescence properties of citrinin in  $\beta$ -cyclodextrin aqueous solution and different solvents, *J. Lumin.* 132 (2012) 1437–1445.
- [14] Z. Faisal, S. Kunsági-Máté, B. Lemli, L. Szenté, D. Bergmann, H.U. Humpf, M. Poór, Interaction of dihydrocitrinin with native and chemically modified cyclodextrins, *Molecules* 24 (2019) E1328.
- [15] C. Dall’Asta, A. Faccini, G. Galaverna, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, Complexation of the mycotoxin zearalenone with  $\beta$ -cyclodextrin: study of the interaction and first promising applications, *Mycotoxin Res.* 24 (2008) 14–18.
- [16] C. Dall’Asta, A. Faccini, G. Galaverna, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, Complexation of zearalenone and zearalenols with native and modified  $\beta$ -cyclodextrins, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 64 (2009) 331–340.
- [17] Z. Faisal, E. Fliszár-Nyúl, L. Dellafiara, G. Galaverna, C. Dall’Asta, B. Lemli, S. Kunsági-Máté, L. Szenté, M. Poór, Cyclodextrins can entrap zearalenone-14-glucoside: interaction of the masked mycotoxin with cyclodextrins and cyclodextrin bead polymer, *Biomolecules* 9 (2019) 354.
- [18] C.M. Maragos, M. Appell, V. Lippolis, A. Visconti, L. Catucci, M. Pascale, Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins, *Food Addit. Contam. A* 25 (2008) 164–171.
- [19] D.A. Larionova, I.Y. Goryacheva, C. Van Peteghem, S. De Saeger, Thin-layer chromatography of aflatoxins and zearalenones with  $\beta$ -cyclodextrins as mobile phase additives, *World Mycotoxin J.* 4 (2011) 113–117.
- [20] M. Appell, M.A. Jackson, Synthesis and evaluation of cyclodextrin-based polymers for patulin extraction from aqueous solutions, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 68 (2010) 117–122.
- [21] M. Appell, M.A. Jackson, Sorption of ochratoxin A from aqueous solutions using  $\beta$ -cyclodextrin polyurethane polymer, *Toxins* 4 (2012) 98–109.
- [22] E. Fliszár-Nyúl, B. Lemli, S. Kunsági-Máté, L. Szenté, M. Poór, Interactions of mycotoxin alternariol with cyclodextrins and its removal from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer, *Biomolecules* 9 (2019) 428.
- [23] M. Poór, Z. Faisal, A. Zand, T. Bencsik, B. Lemli, S. Kunsági-Máté, L. Szenté, Removal of zearalenone and zearalenols from aqueous solutions using insoluble beta-cyclodextrin bead polymer, *Toxins* 10 (2018) 216.
- [24] L. Dellafiara, R. Ruotolo, A. Perotti, M. Cirilini, G. Galaverna, P. Cozzini, A. Buschini, C. Dall’Asta, Molecular insights on xenoestrogenic potential of zearalenone-14-glucoside through a mixed in vitro/in silico approach, *Food Chem. Toxicol.* 108 (2017) 257–266.
- [25] M. Baroni, G. Cruciani, S. Sciabola, F. Perruccio, J.S. Mason, A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. Fingerprints for Ligands and Proteins (FLAP): theory and application, *J. Chem. Inf. Model.* 47 (2007) 279–294.
- [26] E. Carosati, S. Sciabola, G. Cruciani, Hydrogen bonding interactions of covalently bonded fluorine atoms: from crystallographic data to a new angular function in the GRID force field, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 5114–5125.
- [27] L. Dellafiara, B. Warth, V. Schmidt, G. Del Favero, H. Mikula, J. Fröhlich, D. Marko, An integrated in silico/in vitro approach to assess the xenoestrogenic potential of Alternaria mycotoxins and metabolites, *Food Chem.* 248 (2018) 253–261.
- [28] G. Jones, P. Willett, R.C. Glen, A.R. Leach, R. Taylor, Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, *J. Mol. Biol.* 267 (1997) 727–748.
- [29] L. Dellafiara, M. Marchetti, F. Spyrikis, V. Orlandi, B. Campanini, G. Cruciani, P. Cozzini, A. Mozzarelli, Expanding the chemical space of human serine racemase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 4297–4303.
- [30] J.M. Rollinger, D. Schuster, E. Baier, E.P. Ellmerer, T. Langer, H. Stuppner, Taspine: bioactivity-guided isolation and molecular ligand-target insight of a potent acetylcholinesterase inhibitor from Magnolia x soulangiana, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 1341–1346.
- [31] A. Amadasi, C. Dall’asta, G. Ingletto, R. Pela, R. Marchelli, P. Cozzini, Explaining cyclodextrin-mycotoxin interactions using a ‘natural’ force field, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 4585–4594.
- [32] P. Cozzini, G. Ingletto, R. Singh, C. Dall’Asta, Mycotoxin detection plays “cops and robbers”: cyclodextrin chemosensors as specialized police? *Int. J. Mol. Sci.* 9 (2008) 2474–2494.
- [33] P. Cozzini, M. Fornabai, A. Marabotti, D.J. Abraham, G.E. Kellogg, A. Mozzarelli, Simple, intuitive calculations of free energy of binding for protein-ligand complexes. 1. Models without explicit constrained water, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2469–2483.
- [34] M.V. Enoch, R. Rajamohan, M. Swaminathan, Fluorimetric and prototropic studies on the inclusion complexation of 3,3’-diaminodiphenylsulphone with beta-cyclodextrin and its unusual behavior, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 77 (2010) 473–477.
- [35] I.V.M.V. Enoch, S. Yousuf,  $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complexes of 2-hydroxyfluorene and 2-hydroxy-9-fluorenone: differences in stoichiometry and excited state prototropic equilibrium, *J. Solut. Chem.* 42 (2013) 470–484.
- [36] S. Yousuf, R. Alex, P.M. Selvakumar, I.V.M.V. Enoch, P.S. Subramanian, Y. Sun, Picking out logic operations in a naphthalene b-diketone derivative by using molecular encapsulation, controlled protonation, and DNA binding, *ChemistryOpen* 4 (2015) 497–508.
- [37] M. Poór, S. Kunsági-Máté, N. Sali, T. Kőszegi, L. Szenté, B. Peles-Lemli, Interactions of zearalenone with native and chemically modified cyclodextrins and their potential utilization, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 151 (2015) 63–68.
- [38] M. Poór, A. Zand, L. Szenté, B. Lemli, S. Kunsági-Máté, Interaction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenols with  $\beta$ -cyclodextrins, *Molecules* 22 (2017) 1910.
- [39] G. Ramirez-Galicia, R. Garduno-Juarez, M.G. Vargas, Effect of water molecules on the fluorescence enhancement of Aflatoxin B1 mediated by Aflatoxin B1: $\beta$ -cyclodextrin complexes. A theoretical study, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (2007) 110–118.
- [40] M. Aghamohammadi, N. Alizadeh, Fluorescence enhancement of the aflatoxin B1 by forming inclusion complexes with some cyclodextrins and molecular modeling study, *J. Lumin.* 127 (2007) 575–582.
- [41] A. Harada, M. Furue, S. Nozakura, Cyclodextrin-containing polymers. 2. Cooperative effects in catalysis and binding, *Macromolecules* 9 (1976) 705–710.
- [42] W. Saenger, Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 19 (1980) 344.

# **Interaction of zearalenone-14-sulfate with cyclodextrins and the removal of the modified mycotoxin from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer**

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

Zelma Faisal <sup>a,b</sup>, Eszter Fliszár-Nyúl <sup>a,b</sup>, Luca Dellafiora <sup>c</sup>, Gianni Galaverna <sup>c</sup>, Chiara Dall'Asta <sup>c</sup>, Beáta Lemli <sup>b,d</sup>, Sándor Kunsági-Máté <sup>b,d</sup>, Lajos Szente <sup>e</sup>, Miklós Poór <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary; faisal.zelma@gytk.pte.hu (Z.F.); eszter.nyul@aok.pte.hu (E.F-N.)

<sup>b</sup>János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Ifjúság útja 20, H-7624 Pécs, Hungary; beata.lemli@aok.pte.hu (B.L.); kunsagi-mate.sandor@gytk.pte.hu (S.K.)

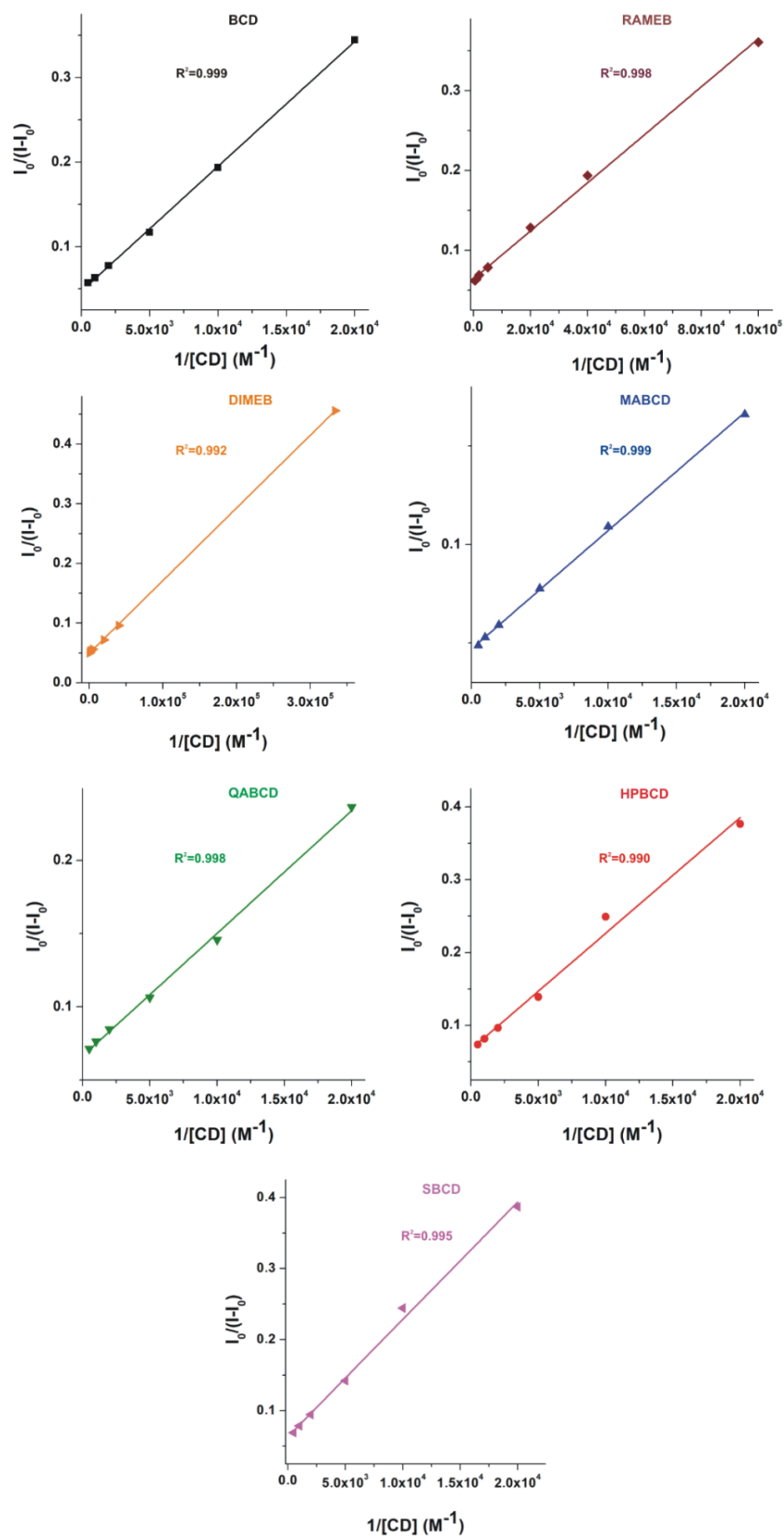
<sup>c</sup>Department of Food and Drug, University of Parma, Via G.P. 7 Usberti 17/A, 43124 Parma, Italy; luca.dellafiora@unipr.it (L.D.); gianni.galaverna@unipr.it (G.G.); chiara.dallasta@unipr.it (C.D.)

<sup>d</sup>Institute of Organic and Medicinal Chemistry, Medical School, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary

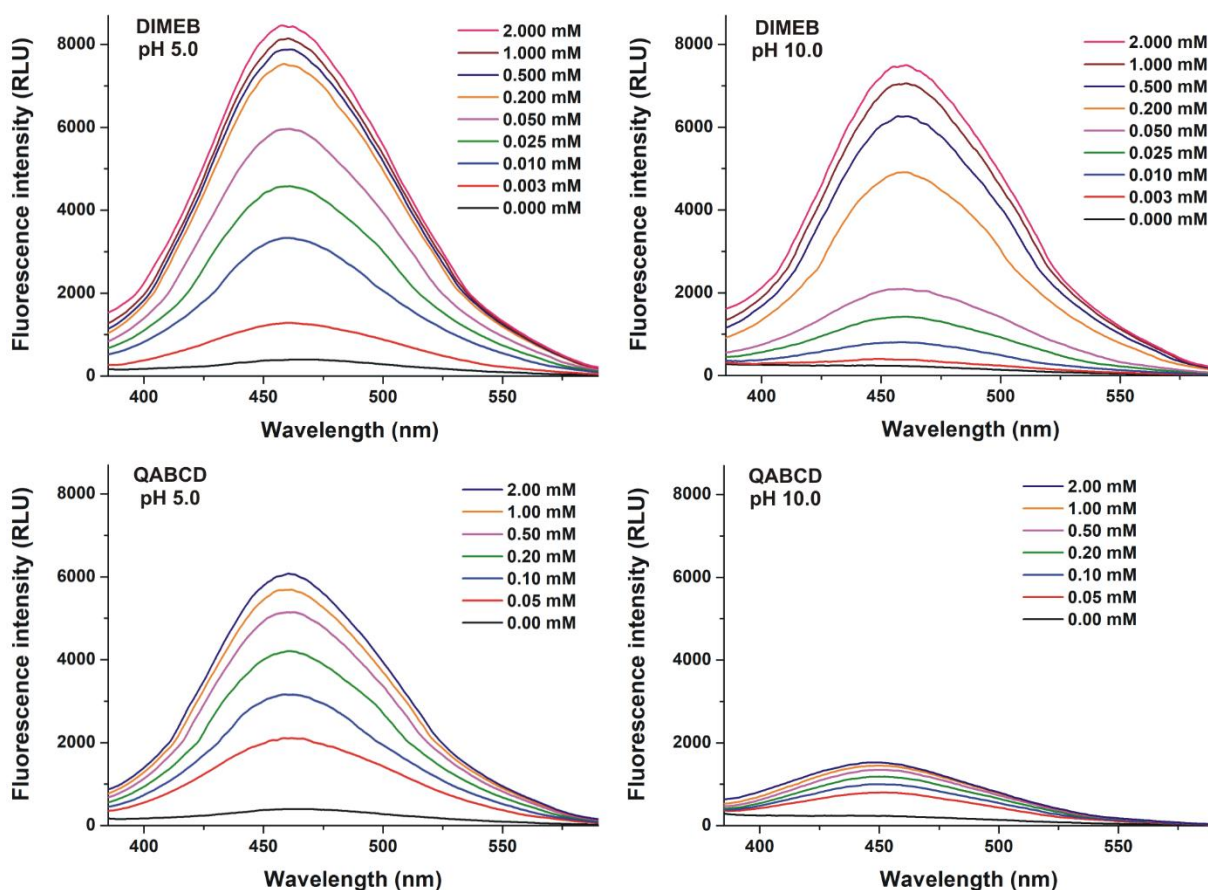
<sup>e</sup>CycloLab Cyclodextrin Research & Development Laboratory, Ltd., Illatos út 7, H-1097 Budapest, Hungary; szente@cyloab.hu (L.S.)

\*Correspondence: poor.miklos@pte.hu; Tel.: +36-72-536-000 ext: 35052 (M.P.)





**Fig. S1:** Benesi-Hildebrand plots of Z14S-CD complexes in 0.05 M sodium phosphate buffer ( $\lambda_{\text{ex}} = 320$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm).



**Fig. S2:** Fluorescence emission spectrum of Z14S (1  $\mu\text{M}$ ) in the presence of increasing concentrations of DIMEB in 0.05 M sodium acetate (pH 5.0; top left) and 0.05 M sodium borate (pH 10.0; top right) buffers, as well as in the presence of QABCD in 0.05 M sodium acetate (pH 5.0; bottom left) and 0.05 M sodium borate (pH 10.0; bottom right) buffers ( $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ).



# Interactions of zearalanone, $\alpha$ -zearalanol, $\beta$ -zearalanol, zearalenone-14-sulfate, and zearalenone-14-glucoside with serum albumin

Zelma Faisal<sup>1,2</sup> · Virág Vörös<sup>1,2</sup> · Eszter Fliszár-Nyúl<sup>1,2</sup> · Beáta Lemli<sup>2,3</sup> · Sándor Kunsági-Máté<sup>2,3</sup> · Miklós Poór<sup>1,2</sup>

Received: 29 April 2020 / Revised: 16 July 2020 / Accepted: 22 July 2020  
© The Author(s) 2020

## Abstract

The xenoestrogenic mycotoxin zearalenone is a *Fusarium*-derived food and feed contaminant. In mammals, the reduced (e.g., zearalanone,  $\alpha$ -zearalanol, and  $\beta$ -zearalanol) and conjugated (e.g., zearalenone-14-sulfate) metabolites of zearalenone are formed. Furthermore, filamentous fungi and plants are also able to convert zearalenone to conjugated derivatives, including zearalenone-14-sulfate and zearalenone-14-glucoside, respectively. Serum albumin is the dominant plasma protein in the circulation; it interacts with certain mycotoxins, affecting their toxicokinetics. In a previous investigation, we demonstrated the remarkable species differences regarding the albumin binding of zearalenone and zearalenols. In the current study, the interactions of zearalanone,  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -zearalanol, zearalenone-14-sulfate, and zearalenone-14-glucoside with human, bovine, porcine, and rat serum albumins were examined, employing fluorescence spectroscopy and affinity chromatography. Zearalanone, zearalanols, and zearalenone-14-sulfate form stable complexes with albumins tested ( $K = 9.3 \times 10^3$  to  $8.5 \times 10^5$  L/mol), while the albumin binding of zearalenone-14-glucoside seems to be weak. Zearalenone-14-sulfate formed the most stable complexes with albumins examined. Considerable species differences were observed in the albumin binding of zearalenone metabolites, which may have a role in the interspecies differences regarding the toxicity of zearalenone.

**Keywords** Zearalanone · Zearalanols · Zearalenone-14-sulfate · Zearalenone-14-glucoside · Serum albumin · Species differences

## Introduction

Zearalenone (ZEN) is a xenoestrogenic mycotoxin produced by *Fusarium* species. It appears as a contaminant in crops, cereal-based products (e.g., flour, bakery goods, and beer), and in other commodities (Rogowska et al. 2019). Despite its nonsteroidal structure, ZEN can bind to estrogen receptors (Loi et al. 2017; Shier et al. 2001) causing reproductive disorders, as well as its potential genotoxic, hepatotoxic, teratogenic, and immunotoxic effects are also suggested (Rai et al. 2019; Rogowska et al. 2019). The involvement of ZEN in the

development of breast and esophageal cancers has been emerged; however, ZEN is classified as a group 3 carcinogen by the IARC (Rai et al. 2019).

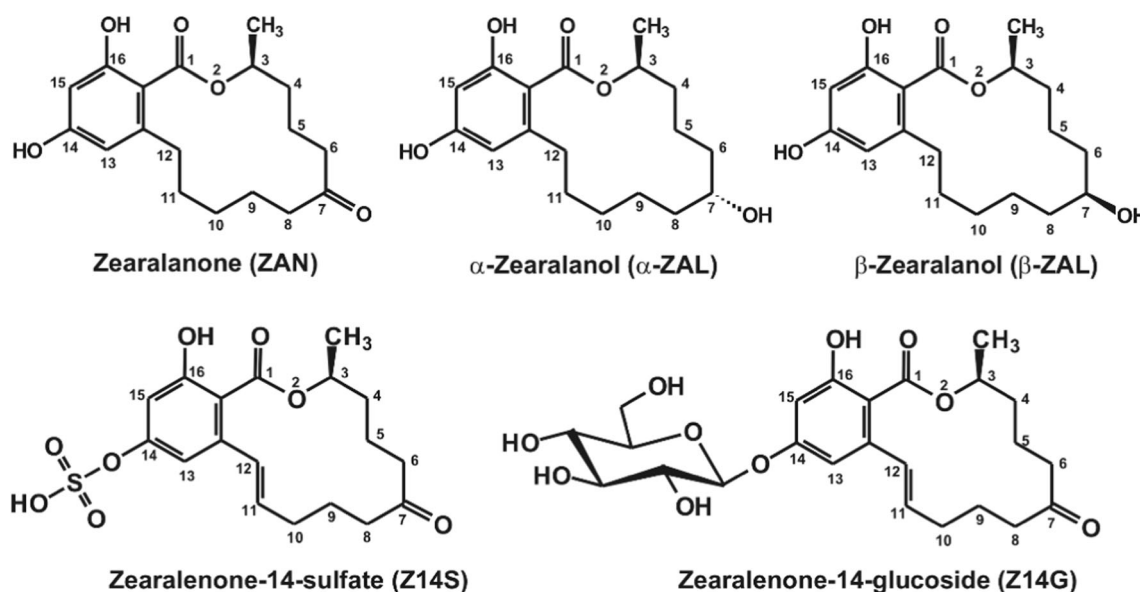
ZEN is extensively biotransformed in mammals (Rai et al. 2019). Its reduction by hydroxysteroid dehydrogenases leads to the formation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenols ( $\alpha$ - and  $\beta$ -ZELs), zearalanone (ZAN, Fig. 1), and  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalanols ( $\alpha$ - and  $\beta$ -ZALs, Fig. 1) (EFSA 2017). Some of these metabolites (e.g.,  $\alpha$ -ZEL and  $\alpha$ -ZAL) show considerably higher xenoestrogenic effects than ZEN (EFSA 2017; Fleck et al. 2017; Frizzell et al. 2011; Filannino et al. 2011). Furthermore,  $\alpha$ -ZAL (also known as zeranol) is administered as a growth promoter to farm animals, leading to the appearance of the residual  $\alpha$ -ZAL in food, mainly in beef (Mukherjee et al. 2014; EFSA 2017). Therefore, this application of  $\alpha$ -ZAL is prohibited in the EU (while it is still available in some countries/regions, such as North America, Chile, Australia, New Zealand, South Africa, and Japan) (Mukherjee et al. 2014). In addition, the exposure to ZEN and  $\alpha$ -ZAL may be responsible for the more frequent development of precocious puberty among young girls (Mukherjee et al. 2014).

✉ Miklós Poór  
poor.miklos@pte.hu

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Szigeti út 12, Pécs H-7624, Hungary

<sup>2</sup> János Szentágothai Research Centre, Ifjúság útja 20, Pécs H-7624, Hungary

<sup>3</sup> Institute of Organic and Medicinal Chemistry, Medical School, University of Pécs, Szigeti út 12, Pécs H-7624, Hungary



**Fig. 1** Chemical structures of zearalanone (ZAN),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL), zearalenone-14-sulfate (Z14S), and zearalenone-14-glucoside (Z14G)

As a result of the phase II metabolism of ZEN, the glucuronic acid and sulfate conjugates of ZEN, ZELs, and ZALs are produced, such as zearalenone-14-glucuronide and zearalenone-14-sulfate (Z14S; also known as zearalenone-4-sulfate; Fig. 1) (Mirocha et al. 1981; Olsen et al. 1986; Dänicke and Winkler 2015; EFSA 2017; Warth et al. 2019). In mammals, glucuronide conjugates take part in enterohepatic circulation, during which they are cleaved in the intestines, and the reabsorption of the deconjugated products considerably increases their elimination half-life (Dänicke et al. 2005; EFSA 2017).

Plants and filamentous fungi can also modify the structures of parent mycotoxins (Berthiller et al. 2013). Mycotoxin derivatives formed during these reactions, and via other biological or chemical degradation processes, are classified as modified mycotoxins (Rychlik et al. 2014; Freire and Sant'Ana 2018). Among modified mycotoxins, the plant-produced conjugates are called masked mycotoxins (Rychlik et al. 2014). Plants and/or filamentous fungi can convert ZEN to Z14S (molar ratios of ZEN to Z14S are between 12:1 and 2:1); therefore, the latter compound appears as a food contaminant (Freire and Sant'Ana 2018; Plasencia and Mirocha 1991; Berthiller et al. 2006). The amount of Z14S in cereal-based products showed high variations (1–417  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), depending on the product tested and the year of harvest (Vendl et al. 2010; De Boevre et al. 2012). Zearalenone-14-glucoside (Z14G; also known as zearalenone-4-glucoside; Fig. 1) is an abundant plant-produced conjugate of ZEN, which has been found in ZEN-contaminated grain-based products (Berthiller et al. 2013; Vendl et al. 2010). Typically, *in vitro* models demonstrate the lower toxicity of ZEN conjugates compared with the parent mycotoxin. Previous *in vitro* studies described

that the glucoside conjugation of ZEN prevents the binding of these derivatives to the human estrogen receptors (Poppenberger et al. 2006), and the significantly lower (100-fold) estrogenicity of Z14S vs. ZEN has been also reported (Drzymala et al. 2015). However, the gut microbiota can hydrolyze these metabolites, leading to the formation of ZEN (Berthiller et al. 2013; EFSA 2017). After the oral administration of Z14S and Z14G to pigs, their complete intestinal hydrolysis to ZEN was observed (Binder et al. 2017). Therefore, the EFSA evaluation suggests that the risks regarding the exposure to Z14S and Z14G should be considered similar to ZEN (EFSA 2017). The European Food Safety Authority (EFSA) CONTAM Panel established human tolerable daily intake (TDI) of 0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight per day, denoted as ZEN equivalents for ZEN and its modified forms jointly (EFSA 2014).

Serum albumin is the major protein in the circulation; it binds to several endogenous compounds and xenobiotics. The complex formation can affect the tissue distribution and the elimination half-life of ligand molecules (Fanali et al. 2012; Yamasaki et al. 2013). ZEN and ZELs form stable complexes with serum albumin, showing considerable species differences (Poór et al. 2017; Ma et al. 2018; Faisal et al. 2018). For example, the affinity of ZEN and ZELs towards rat albumin is approximately tenfold higher compared with albumins from other species (Faisal et al. 2018). The differences in albumin binding may be partly responsible for the high variations in the toxicokinetics of ZEN and its derivatives, and may help to understand the vulnerability of some species vs. these mycotoxins. Cirlini et al. reported the absorption and partial deglycosylation of Z14G in an *in vitro* model with CaCo-2 cells, the absorption of Z14G was considerably

lower compared with ZEN (Cirlini et al. 2016). After the oral administration of Z14G to rats, its low plasma concentrations were detected (Sun et al. 2019). Furthermore, approximately 61% of the orally administered Z14G was absorbed in pigs, which was followed by the significant presystemic hydrolysis of the masked mycotoxin (Catteuw et al. 2019). These data indicate that a lower fraction of Z14G can reach the systemic circulation. A previous study suggests the interaction of Z14G with human serum albumin (HSA), during which albumin can slowly hydrolyze the masked mycotoxin to ZEN (Dellafiora et al. 2017).

In this study, the interactions of ZAN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL, Z14S, and Z14G with human (HSA), bovine (BSA), porcine (PSA), and rat (RSA) serum albumins were investigated by fluorescence spectroscopy. Furthermore, to confirm the results of spectroscopic studies, the interactions of ZEN metabolites with HSA were also examined with high-performance affinity chromatography (HPAC).

## Materials and methods

### Reagents

Zearalenone (ZEN; MW = 318.36 g/mol; purity: 99.7%, HPLC), zearalanone (ZAN; MW = 320.38 g/mol; purity: 100%, TLC),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL; MW = 322.40 g/mol; purity: 98%, HPLC),  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL; MW = 322.40 g/mol; purity: 98%, HPLC), HSA (MW = 66.4 kDa), BSA (MW = 66.4 kDa), PSA (MW = 67.5 kDa), RSA (MW = 64.6 kDa), and warfarin (MW = 308.3 g/mol) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Zearalenone-14-sulfate ammonium salt (Z14S; MW = 415.46 g/mol; purity: 98.5%, HPLC, NMR, LC-MS) was purchased from ASCA GmbH (Berlin, Germany). Zearalenone-14- $\beta$ -D-glucoside (Z14G; MW = 480.50 g/mol; purity: 99.4%, HPLC, NMR) was obtained from Honeywell (Charlotte, NC, USA). Stock solutions of mycotoxins (5000  $\mu$ mol/L; ZEN: 1.592 g/L; ZAN: 1.602 g/L; ZALs: 1.612 g/L; Z14S ammonium salt: 2.078 g/L; and Z14G: 2.403 g/L) were prepared in ethanol (96 v/v%, spectroscopic grade; VWR, Debrecen, Hungary) and stored at  $-20$  °C.

### Spectroscopy

Fluorescence spectroscopic measurements were carried out employing a Hitachi F-4500 fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan) to investigate the effect of increasing mycotoxin concentrations on the fluorescence signal of albumins as well as on the emission spectrum of warfarin-HSA complex. Our studies were executed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4; 8.00 g/L NaCl, 0.20 g/L KCl, 1.81 g/L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.24 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) at room temperature, in the presence of air.

For spectral correction of fluorescence emission intensities, absorption spectra of mycotoxins were also recorded applying a Jasco-V730 spectrophotometer (Jasco, Tokyo, Japan). The inner-filter effect of mycotoxins was corrected as described previously (Hu and Liu 2015; Faisal et al. 2018):

$$I_{\text{cor}} = I_{\text{obs}} \times e^{(A_{\text{ex}}+A_{\text{em}})/2} \quad (1)$$

where  $I_{\text{cor}}$  and  $I_{\text{obs}}$  indicate the corrected and observed fluorescence emission intensities, respectively.  $A_{\text{ex}}$  and  $A_{\text{em}}$  denote the absorbance of mycotoxins at the excitation and emission wavelengths used, respectively.

To investigate the stability of mycotoxin-albumin complexes, mycotoxin-induced quenching effects on the intrinsic fluorescence of albumins were tested. The emission signal of albumins (2  $\mu$ mol/L;  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 340$  nm) were measured in the presence of increasing concentrations of mycotoxins (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, and 10.0  $\mu$ mol/L). Stern-Volmer quenching constants ( $K_{\text{SV}}$ ; unit: L/mol) were determined employing the Stern-Volmer equation (Ma et al. 2018; Faisal et al. 2018):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{\text{SV}} \times [Q] \quad (2)$$

where  $Q$  is the concentration of the mycotoxin (unit: mol/L).  $I_0$  and  $I$  are the fluorescence emission signal of albumin in the absence and presence of mycotoxins, respectively. Z14S and Z14G exert fluorescence; their excitation and emission spectra, under different environmental conditions, have been reported previously (Faisal et al. 2019, 2020). Under the applied circumstances, the emission signals of Z14S and Z14G did not interfere with the evaluation of fluorescence studies (e.g., the emission maxima of albumins and warfarin-HSA complex). Furthermore, ZAN and ZALs did not exert fluorescence at the concentrations applied.

Binding constants ( $K$ ; unit: L/mol) of mycotoxin-albumin complexes were determined by nonlinear fitting employing Hyperquad2006 software, as described in details in our previous studies (Sueck et al. 2018; Faisal et al. 2018).

To test the effects of ZEN metabolites on warfarin-HSA interaction, our previously reported method was applied (Faisal et al. 2018; Fliszár-Nyúl et al. 2019). In this experiment, the fluorescence emission signal of warfarin (1  $\mu$ mol/L;  $\lambda_{\text{ex}} = 317$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 379$  nm) was examined in the presence of HSA (3.5  $\mu$ mol/L) without and with mycotoxins (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, and 15  $\mu$ mol/L) in PBS (pH 7.4). Under these conditions, approximately 70% of warfarin is albumin-bound. Since albumin-bound warfarin shows much higher fluorescence than the free fluorophore (Faisal et al. 2018), the changes in its fluorescence can indicate the increased or decreased albumin binding of warfarin.



## High-performance affinity chromatography

HPAC was performed with a HSA-coated column (Faisal et al. 2018). The HPLC system (Jasco, Tokyo, Japan) used for the analysis included an autosampler (AS-4050), a binary pump (PU-4180), and a diode-array detector (MD-4017). A 5- $\mu$ L volume of samples (ZAN: 200  $\mu$ mol/L; ZEN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL, and Z14S: 100  $\mu$ mol/L; Z14G: 50  $\mu$ mol/L) was driven through a pre-column filter (Waters, Milford, MA, USA) linked to an immobilized HSA-coated HPAC column (Chiralpak<sup>®</sup> HSA, 50  $\times$  3.0 mm, 5  $\mu$ m; Daicel, Tokyo, Japan). The isocratic elution was performed with 0.5-mL/min flow rate at room temperature. The mobile phase contained isopropanol (HPLC grade; VWR, Debrecen, Hungary) and 0.01 mol/L pH 7.0 ammonium acetate buffer (15:85 v/v%). Mycotoxins were detected at 235 nm, and chromatograms were evaluated with ChromNAV software.

## Results and discussion

### Fluorescence quenching studies

In this experiment, the fluorescence quenching effects of ZAN, ZALs, Z14S, and Z14G (0–10  $\mu$ mol/L each) on albumins (2  $\mu$ mol/L) were investigated in PBS, using 295 nm excitation wavelength. Under these circumstances, albumins showed their emission wavelength maxima around 340 nm. Inner-filter effects of ZEN metabolites were eliminated employing Eq. 1. Z14G did not affect the emission signals of albumins (data not shown); therefore, it is reasonable to hypothesize that Z14G does not interact or forms only low-affinity complexes with albumins. However, other mycotoxins tested induced concentration-dependent decrease in the fluorescence of albumins at 340 nm (Fig. 2), suggesting the formation of albumin-ligand complexes (Tan et al. 2019; Ma et al. 2018; Faisal et al. 2018; Fliszár-Nyúl et al. 2019). The strongest quenching effect was shown by Z14S, and an increasing second peak appeared in these spectra at approximately 460 nm (Fig. 2d), which is the fluorescence signal of Z14S. Despite the fact that ZEN and ZELs exert intrinsic fluorescence (Faisal et al. 2018), ZAN and ZALs showed negligible fluorescence under the applied conditions. Therefore, no secondary peaks appeared in Fig. 2a–c.

Based on the mycotoxin-induced quenching effects, Stern-Volmer quenching constants ( $K_{SV}$ , unit: L/mol; Table 1) and binding constants ( $K$ , unit: L/mol; Table 2) of albumin-ligand complexes were determined employing the graphical application of the Stern-Volmer equation (Eq. 2) and the Hyperquad2006 software, respectively. Stern-Volmer plots are demonstrated in Fig. 3, displaying good linearity for interactions tested ( $R^2 = 0.97$ – $0.99$ ). Hyperquad evaluation showed the best fitting with the 1:1 stoichiometry of complex

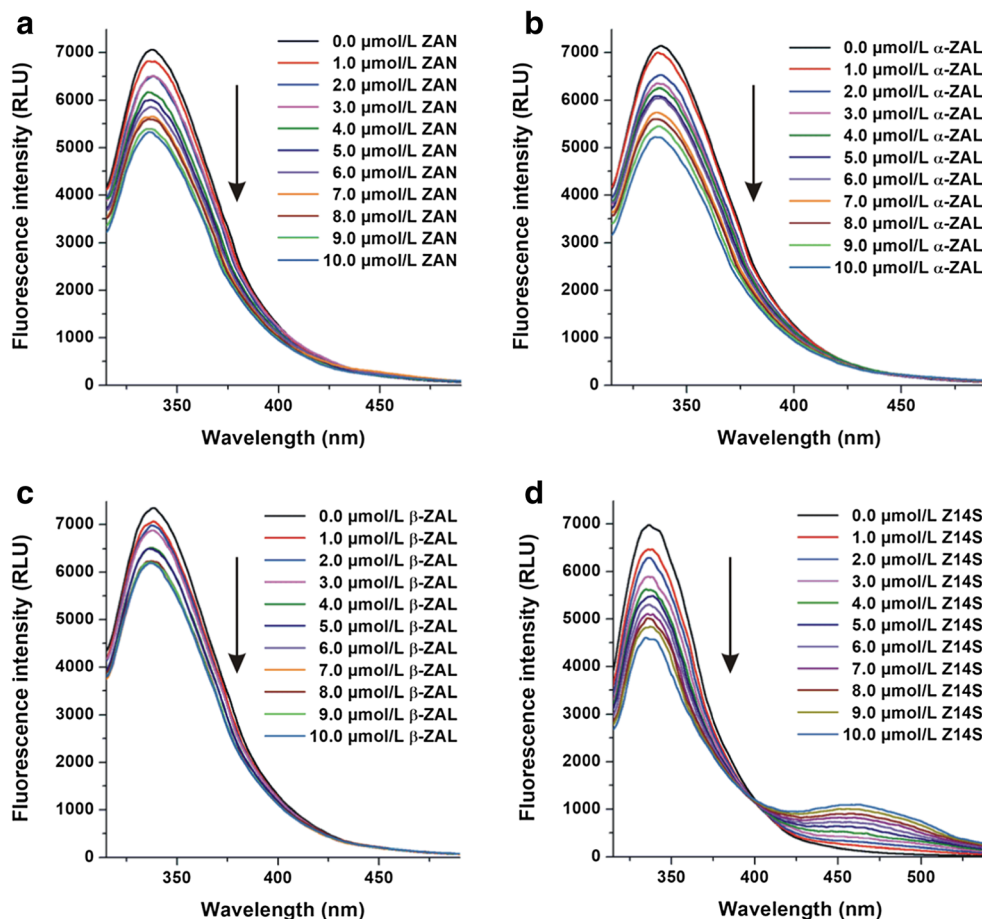
formation; furthermore, good correlation of  $K_{SV}$  and  $K$  values was observed (see in Tables 1 and 2). ZEN metabolites tested (except Z14G) formed stable complexes with albumins, showing  $K$  values in a wide range ( $10^4$  to  $10^6$  L/mol). Similarly to ZEN and ZELs (Faisal et al. 2018), mycotoxins formed the most stable complexes with RSA (Table 2). ZAN and ZALs bound with the lowest affinity to PSA or BSA, while Z14S formed the least stable complex with HSA among albumins tested. Furthermore, Z14S bound to each albumin with higher affinity than ZAN and ZALs, showing considerably stronger interactions with BSA and PSA compared with the reduced metabolites examined in this study. The binding constants of ZAN and ZALs showed minor differences regarding one individual albumin (Table 2). Typically, ZAN and ZALs formed less stable complexes with albumins than the parent compound ZEN; in contrast, Z14S-albumin displayed higher stability vs. ZEN-albumin complexes, except HSA (Faisal et al. 2018). Remarkable species-dependent differences were noticed regarding the albumin binding of ZAN, ZALs, and Z14S. For example, the binding affinity of ZAN-RSA vs. ZAN-PSA (14-fold),  $\alpha$ -ZAL-RSA vs.  $\alpha$ -ZAL-BSA (9-fold),  $\beta$ -ZAL-RSA vs.  $\beta$ -ZAL-BSA (30-fold), and Z14S-RSA and Z14S-HSA (16-fold) showed major differences (Table 2). Similarly, high species-dependent differences in albumin binding have been also reported regarding ZEN, ZELs, and ochratoxin A (Faisal et al. 2018; Hagelberg et al. 1989; Poór et al. 2014).

The toxicokinetics of ZEN show large variances in different species, which may be partly resulted from the species-dependent alternations in albumin binding of ZEN and its metabolites (Fruhauf et al. 2019). Some of the recent in vivo studies support this hypothesis (Fruhauf et al. 2019; Catteuw et al. 2019; Mukherjee et al. 2014). In pigs, the lower affinity of the mycotoxin towards PSA (Z14G <  $\beta$ -ZEL <  $\alpha$ -ZEL < ZEN) was accompanied with its earlier disappearance from the circulation (Catteuw et al. 2019; Faisal et al. 2018), which propose the potential impact of albumin binding on the toxicokinetics of these mycotoxins. Furthermore, the significantly longer plasma elimination half-lives of ZEN and  $\alpha$ -ZAL have been reported in rats vs. in humans (Mukherjee et al. 2014), which is in agreement with the considerably higher affinity of ZEN (Faisal et al. 2018) and  $\alpha$ -ZAL (Table 2) towards RSA compared to HSA.

### Elution of ZEN and its metabolites from HSA-HPAC column

To confirm the results of quenching studies, the interactions of ZEN, ZAN, ZALs, Z14S, and Z14G with HSA were also examined employing HPAC. The stronger interaction of the ligand molecule with HSA leads to its longer elution from the HSA-HPAC column. The mycotoxins tested were eluted with the following retention times ( $t_R$ ) from the affinity column

**Fig. 2** Fluorescence quenching effects of ZEN metabolites on HSA. Emission spectra of HSA (2  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence of increasing concentrations of ZAN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL, and Z14S in PBS (pH 7.4;  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ). Z14G did not affect the emission spectra of albumins (ZAN zearalanone,  $\alpha$ -ZAL  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -ZAL  $\beta$ -zearalanol, Z14S zearalenone-14-sulfate, Z14G zearalenone-14-glucoside)



(Fig. 4): Z14G (1.7 min),  $\beta$ -ZAL (3.1 min),  $\alpha$ -ZAL (5.3 min), ZAN (8.0 min), ZEN (12.3 min), and Z14S (23.3 min). The  $t_R$  of Z14G was very short but it was not eluted with the solvent front, indicating the weak interaction of Z14G with HSA. The formation of low-affinity Z14G-HSA complexes is in

agreement with the previously reported very slow hydrolysis of Z14G by the protein (Dellafiora et al. 2017). The  $t_R$  of ZEN metabolites (Fig. 4) suggests the same orders in complex stability than quenching studies (Table 2): Z14S > ZAN >  $\alpha$ -ZAL >  $\beta$ -ZAL > Z14G. Furthermore, the longer  $t_R$  of ZEN vs.

**Table 1** Decimal logarithmic values of the Stern-Volmer quenching constants ( $K_{SV}$ ; unit: L/mol) of mycotoxin-albumin complexes

Mycotoxin*	$\log K_{SV} \pm \text{SEM}$			
	HSA	BSA	PSA	RSA
ZEN	$5.09 \pm 0.01^a$	$4.81 \pm 0.01^a$	$4.56 \pm 0.02^a$	$5.50 \pm 0.01^a$
ZAN	$4.52 \pm 0.04$	$4.41 \pm 0.04$	$3.97 \pm 0.06$	$5.00 \pm 0.03$
$\alpha$ -ZAL	$4.50 \pm 0.02$	$4.20 \pm 0.05$	$4.30 \pm 0.05$	$5.21 \pm 0.00$
$\beta$ -ZAL	$4.34 \pm 0.04$	$3.88 \pm 0.06$	$4.13 \pm 0.09$	$5.43 \pm 0.01$
Z14S	$4.64 \pm 0.03$	$5.32 \pm 0.02$	$5.04 \pm 0.02$	$5.70 \pm 0.02$
Z14G	-	-	-	-

\*ZEN zearalenone, ZAN zearalanone,  $\alpha$ -ZAL  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -ZAL  $\beta$ -zearalanol, Z14S zearalenone-14-sulfate, Z14G zearalenone-14-glucoside, HSA human serum albumin, BSA bovine serum albumin, PSA porcine serum albumin, RSA rat serum albumin

<sup>a</sup>Based on Faisal et al. (2018)

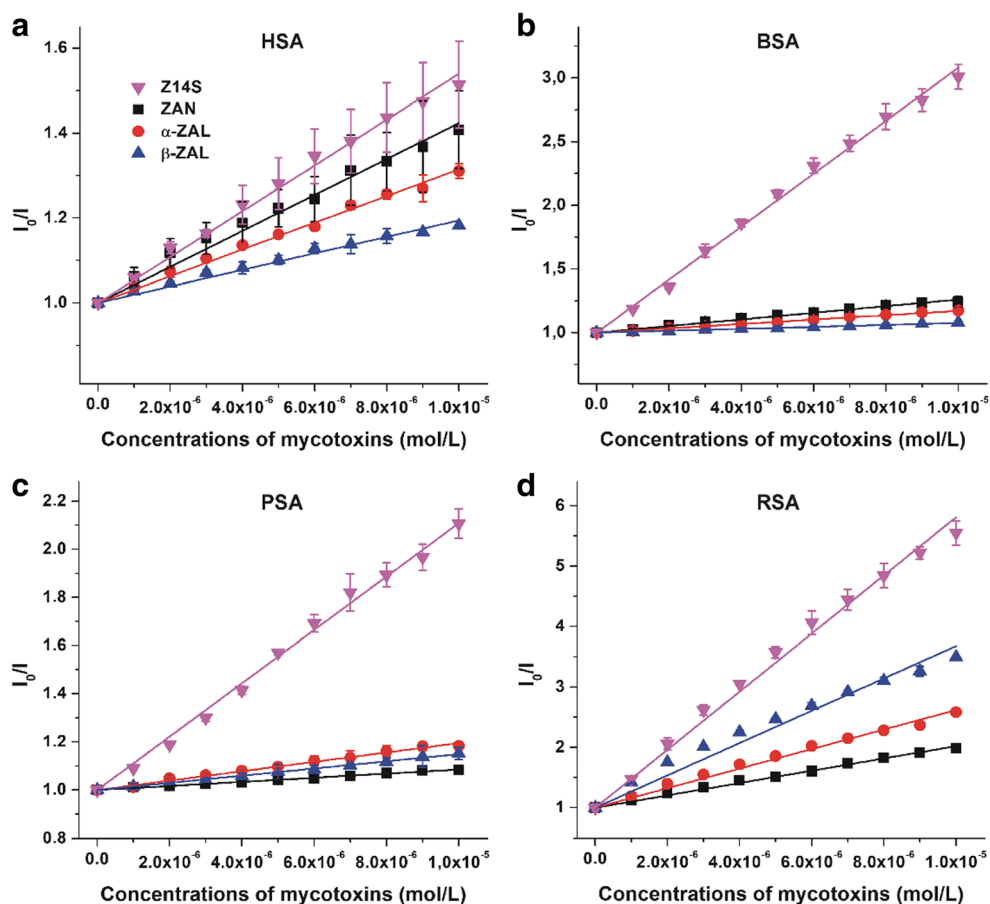
**Table 2** Decimal logarithmic values of binding constants ( $K$ ; unit: L/mol) of mycotoxin-albumin complexes

Mycotoxin*	$\log K \pm \text{SEM}$			
	HSA	BSA	PSA	RSA
ZEN	$5.09 \pm 0.01^a$	$4.78 \pm 0.01^a$	$4.57 \pm 0.01^a$	$5.42 \pm 0.00^a$
ZAN	$4.58 \pm 0.00$	$4.51 \pm 0.00$	$3.97 \pm 0.01$	$5.12 \pm 0.00$
$\alpha$ -ZAL	$4.55 \pm 0.00$	$4.34 \pm 0.00$	$4.38 \pm 0.00$	$5.31 \pm 0.01$
$\beta$ -ZAL	$4.37 \pm 0.01$	$4.12 \pm 0.01$	$4.15 \pm 0.01$	$5.61 \pm 0.01$
Z14S	$4.71 \pm 0.03$	$5.43 \pm 0.02$	$5.12 \pm 0.02$	$5.93 \pm 0.02$
Z14G	-	-	-	-

\*ZEN zearalenone, ZAN zearalanone,  $\alpha$ -ZAL  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -ZAL  $\beta$ -zearalanol, Z14S zearalenone-14-sulfate, Z14G zearalenone-14-glucoside, HSA human serum albumin, BSA bovine serum albumin, PSA porcine serum albumin, RSA rat serum albumin

<sup>a</sup>Based on Faisal et al. (2018)

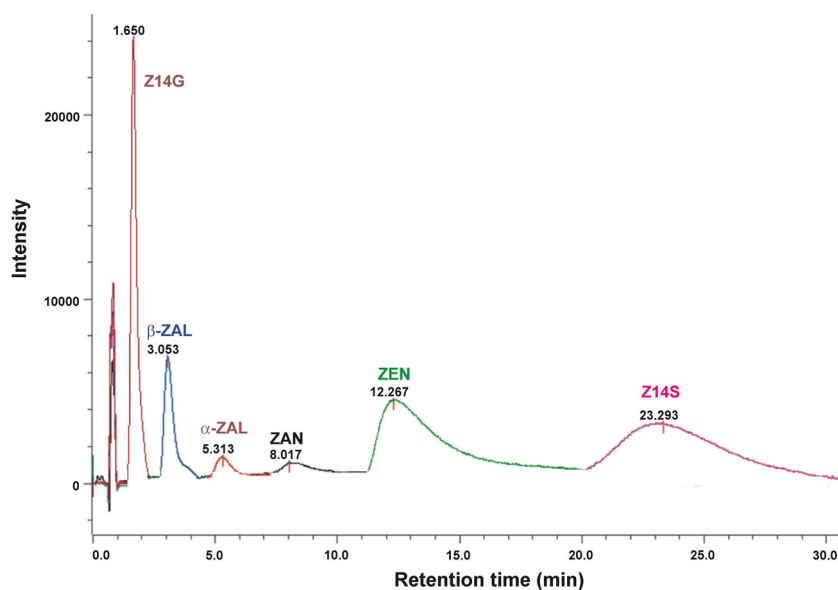
**Fig. 3** Stern-Volmer plots ( $R^2 = 0.969\text{--}0.997$ ) of mycotoxin-albumin interactions: HSA (a), BSA (b), PSA (c), and RSA (d) ( $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ ; ZAN zearalanone,  $\alpha$ -ZAL  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -ZAL  $\beta$ -zearalanol, Z14S zearalenone-14-sulfate, HSA human serum albumin, BSA bovine serum albumin, PSA porcine serum albumin, RSA rat serum albumin)



ZAN, ZALs, and Z14G are also in agreement with the current results (Table 2) and previous observations (Faisal et al. 2018). However, the  $t_R$  of Z14S was even longer compared with ZEN, despite its binding affinity is lower ( $\log K_{\text{Z14S-HSA}} = 4.7$ ;  $\log K_{\text{ZEN-HSA}} = 5.1$ ) based on quenching studies (Faisal

et al. 2018). This discrepancy may be explained by the different experimental conditions in quenching and HPLC studies, which can influence the stability of albumin-ligand complexes (Kaspchak et al. 2018). In quenching studies, PBS (pH 7.4) was applied to mimic extracellular physiological condition.

**Fig. 4** HPLC chromatograms of ZEN, ZAN,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL, Z14S, and Z14G eluted from the HSA-coated column (see details in “High-performance affinity chromatography” section; ZAN zearalanone,  $\alpha$ -ZAL  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -ZAL  $\beta$ -zearalanol, Z14S zearalenone-14-sulfate, Z14G zearalenone-14-glucoside)

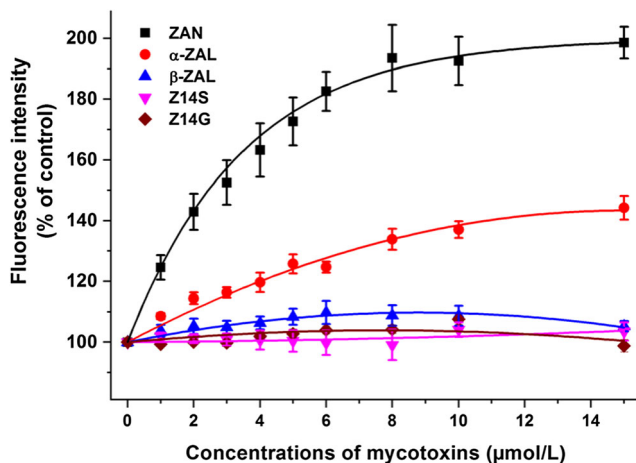




However, in the HPAC studies, we created appropriate conditions for the affinity column (based on the manufacturer's guide); therefore, the buffer was different, the ionic strength and the pH were lower than in quenching studies, and the eluent contained isopropanol (see details in the "Materials and methods" section).

### Effects of ZEN metabolites on warfarin-HSA interaction

In previous studies, the allosteric interactions of ZEN and ZELs with the Sudlow's site I ligand warfarin have been reported (Poór et al. 2017; Faisal et al. 2018): Since the binding sites of ZEN and ZELs are relatively close to the site I region, these mycotoxins can increase (ZEN and  $\alpha$ -ZEL) or decrease ( $\beta$ -ZEL) the binding affinity of warfarin towards HSA. Therefore, the effects of ZAN, ZALs, Z14S, and Z14G on warfarin-HSA interaction were also examined. Because albumin-bound warfarin exerts considerably higher fluorescence signal at 379 nm than free warfarin, the increase or decrease in the fluorescence at 379 nm indicate its elevated or reduced albumin binding, respectively (Faisal et al. 2018; Fliszár-Nyúl et al. 2019). Importantly, the inner-filter effects of mycotoxins were also corrected in these experiments (see Eq. 1). As Fig. 5 demonstrates, ZAN and  $\alpha$ -ZAL considerably increased the emission signal of warfarin, similar to ZEN and  $\alpha$ -ZEL in our previous study (Faisal et al. 2018). These observations suggest that ZAN and  $\alpha$ -ZAL can increase the binding affinity of warfarin towards HSA. However,  $\beta$ -ZAL, Z14S, and Z14G did not affect the fluorescence at 379 nm. Because Z14G forms low-affinity complexes with HSA, it is not surprising that it did not modify the albumin binding of warfarin.



**Fig. 5** Allosteric effects of ZEN analogs on the binding of warfarin to HSA. Fluorescence emission signal of warfarin (1  $\mu$ mol/L) with HSA (3.5  $\mu$ mol/L) in the presence of increasing mycotoxin concentrations in PBS (pH 7.4;  $\lambda_{\text{ex}} = 317$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 379$  nm; ZAN zearalanone,  $\alpha$ -ZAL  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -ZAL  $\beta$ -zearalanol, Z14S zearalenone-14-sulfate, Z14G zearalenone-14-glucoside; the inner-filter effects of mycotoxins were corrected based on Eq. 1)

In our previous study,  $\beta$ -ZEL showed different effect compared with ZEN and  $\alpha$ -ZEL, likely due to its different binding position or binding site (Faisal et al. 2018). Therefore, the observation that  $\beta$ -ZAL and Z14S have no effect on warfarin-HSA interaction (despite their binding affinities are similar to ZAN and  $\alpha$ -ZAL) suggests their different binding positions/sites compared with ZEN, ZAN,  $\alpha$ -ZEL, and  $\alpha$ -ZAL.

In conclusion, fluorescence spectroscopic and HPAC experiments suggest the weak interaction of Z14G with HSA; however, ZAN, ZALs, and Z14S form stable complexes with serum albumins investigated ( $K = 10^4$  to  $10^6$  L/mol). In addition, significant species-dependent differences were observed in the affinity of ZAN, ZALs, and Z14S towards albumins from various species (human, bovine, porcine, and rat). These results suggest that albumin binding may be partly responsible for the species-dependent alterations in the toxicokinetics and toxic effects of ZEN and its metabolites previously described in mammals. For example, the formation of highly stable complexes of ZEN and  $\alpha$ -ZAL with RSA can explain the long elimination half-lives of these mycotoxins in rat (Mukherjee et al. 2014). Furthermore, the binding constants determined in the current (Table 1) and previous (Faisal et al. 2018) studies show good correlation with the recently reported in vivo experiments performed in pigs (Catteuw et al. 2019): the higher binding constant causes the longer lifetime of the mycotoxin in the circulation. These observations underline the potential toxicokinetic importance of the albumin-ligand interactions of ZEN and its metabolites. Based on our data, it is reasonable to hypothesize that the albumin-bound fraction of ZEN derivatives is significant in the circulation; therefore, the appropriate sample preparation is highly important during the analyses of blood samples. In addition, the formation of stable mycotoxin-albumin complexes likely makes possible the application of albumin as an affinity protein for the extraction of ZEN and its metabolites, as it has been reported during the extraction of ochratoxin A with BSA from wine (Leal et al. 2019). Thus, these interactions may also have some analytical importance.

**Acknowledgments** This project was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (M.P.) and by the János László Doctoral Student Research Scholarship (Z.F.).

**Funding information** Open access funding provided by University of Pécs. This study was supported by the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (FK125166; M.P., Z.F., and E.F.-N.). S.K.-M. is thankful for the support of GINOP-2.3.2-15-2016-00049 grant.

**Data availability** We have full control of all primary data and we agree to allow the journal to review our data if requested.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger SD, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J (2013) Masked mycotoxins: a review. *Mol Nutr Food Res* 57:165–186. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100764>
- Berthiller F, Werner U, Sulyok M, Krska R, Hauser MT, Schuhmacher R (2006) Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Food Addit Contam* 23:1194–1200. <https://doi.org/10.1080/02652030600778728>
- Binder SB, Schwartz-Zimmermann HE, Varga E, Bichl G, Michlmayr H, Adam G, Berthiller F (2017) Metabolism of zearalenone and its major modified forms in pigs. *Toxins* 9:56. <https://doi.org/10.3390/toxins9020056>
- Catteuw A, Broekaert N, De Baere S, Lauwers M, Gasthuys E, Huybrechts B, Callebaut A, Ivanova L, Uhlig S, De Boevre M, De Saeger S, Gehring R, Devreese M, Croubels S (2019) Insights into in vivo absolute oral bioavailability, biotransformation, and toxicokinetics of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol, zearalenone-14-glucoside, and zearalenone-14-sulfate in pigs. *J Agric Food Chem* 67:3448–3458. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05838>
- Cirlini M, Barilli A, Galaverna G, Michlmayr H, Adam G, Berthiller F, Dall'Asta C (2016) Study on the uptake and deglycosylation of the masked forms of zearalenone in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 98:232–239. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.003>
- Dänicke S, Swiech E, Buraczewska L, Ueberscha K (2005) Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr* 89:268–276. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2005.00516.x>
- Dänicke S, Winkler J (2015) Invited review: diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). *Food Chem Toxicol* 84:225–249. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.009>
- De Boevre M, Di Mavungu JD, Landschoot S, Audenaert K, Eeckhout M, Maene P, Haesaert G, De Saeger S (2012) Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotoxin J* 5:207–219. <https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1410>
- Dellafiora L, Galaverna G, Righi F, Cozzini P, Dall'Asta C (2017) Assessing the hydrolytic fate of the masked mycotoxin zearalenone-14-glucoside—a warning light for the need to look at the “maskedome”. *Food Chem Toxicol* 99:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.013>
- Drzymala SS, Binder J, Brodehl A, Penkert M, Rosowski M, Garbe L-A, Koch M (2015) Estrogenicity of novel phase I and phase II metabolites of zearalenone and cis-zearalenone. *Toxicol* 105:10–12. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2015.08.027>
- EFSA – European Food Safety Authority, Panel on contaminants in the food chain (2014) EFSA Panel on contaminants in the food chain, scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA J* 12:3916. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3916>
- EFSA – European Food Safety Authority, Panel on contaminants in the food chain (2017) Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA J* 15:4851. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4851>
- Faisal Z, Fliszár-Nyúl E, Dellafiora L, Galaverna G, Dall'Asta C, Lemli B, Kunsági-Máté S, Sente L, Poór M (2019) Cyclodextrins can entrap zearalenone-14-glucoside: interaction of the masked mycotoxin with cyclodextrins and cyclodextrin bead polymer. *Biomolecules* 9:354. <https://doi.org/10.3390/biom9080354>
- Faisal Z, Fliszár-Nyúl E, Dellafiora L, Galaverna G, Dall'Asta C, Lemli B, Kunsági-Máté S, Sente L, Poór M (2020) Interaction of zearalenone-14-sulfate with cyclodextrins and the removal of the modified mycotoxin from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer. *J Mol Liq* 310:113236. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113236>
- Faisal Z, Lemli B, Szerencses D, Kunsági-Mate S, Balint M, Hetenyi C, Kuzma M, Mayer M, Poór M (2018) Interactions of zearalenone and its reduced metabolites  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol with serum albumins: species differences, binding sites, and thermodynamics. *Mycotoxin Res* 34:269–278. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0321-6>
- Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P (2012) Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Asp Med* 33:209–290. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>
- Filannino A, Stout TA, Gadella BM, Sostaric E, Pizzi F, Colenbrander B, Dell'Aquila ME, Minervini F (2011) Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm. *Reprod Biol Endocrinol* 9:134. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-134>
- Fleck SC, Churchwell MI, Doerge DR (2017) Metabolism and pharmacokinetics of zearalenone following oral and intravenous administration in juvenile female pigs. *Food Chem Toxicol* 106:193–201. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.048>
- Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Kunsági-Máté S, Dellafiora L, Dall'Asta C, Cruciani G, Pethő G, Poór M (2019) Interaction of mycotoxin alternariol with serum albumin. *Int J Mol Sci* 20:2352. <https://doi.org/10.3390/ijms20092352>
- Freire L, Sant'Ana AS (2018) Modified mycotoxins: an updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food Chem Toxicol* 111:189–205. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.021>
- Frizzell C, Ndossi D, Verhaegen S, Dahl E, Eriksen G, Sørli M, Ropstad E, Muller M, Elliott CT, Connolly L (2011) Endocrine disrupting effects of zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicol Lett* 206:210–217. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.07.015>
- Fruhauf S, Novak B, Nagl V, Hackl M, Hartinger D, Rainer V, Labudová S, Adam G, Aleschko M, Moll W-D, Thamhesl M, Grenier B (2019) Biotransformation of the mycotoxin zearalenone to its metabolites hydrolyzed zearalenone (HZEN) and decarboxylated hydrolyzed zearalenone (DHZEN) diminishes its estrogenicity in vitro and in vivo. *Toxins* 11:481. <https://doi.org/10.3390/toxins11080481>
- Hagelberg S, Hult K, Fuchs R (1989) Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J Appl Toxicol* 9:91–96. <https://doi.org/10.1002/jat.2550090204>
- Hu T, Liu Y (2015) Probing the interaction of cefodizime with human serum albumin using multi-spectroscopic and molecular docking

- techniques. *J Pharm Biomed Anal* 107:325–332. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.010>
- Kaspchak E, Mafra LI, Mafra MR (2018) Effect of heating and ionic strength on the interaction of bovine serum albumin and the antinutrients tannic and phytic acids, and its influence on in vitro protein digestibility. *Food Chem* 252:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.089>
- Leal T, Abrunhosa L, Domingues L, Venâncio A, Oliveira C (2019) BSA-based sample clean-up columns for ochratoxin A determination in wine: method development and validation. *Food Chem* 300:125204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125204>
- Loi M, Fanelli F, Liuzzi VC, Logrieco AF, Mulè G (2017) Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: present and future perspectives. *Toxins* 9:111. <https://doi.org/10.3390/toxins9040111>
- Ma L, Maragos CM, Zhang Y (2018) Interaction of zearalenone with bovine serum albumin as determined by fluorescence quenching. *Mycotoxin Res* 34:39–48. <https://doi.org/10.1007/s12550-017-0297-7>
- Mirocha CJ, Pathre SV, Robison TS (1981) Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet Toxicol* 19:25–30. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(81\)90299-6](https://doi.org/10.1016/0015-6264(81)90299-6)
- Mukherjee D, Royce SG, Alexander JA, Buckley B, Isukapalli SS, Bandera EV, Zarbl H, Georgopoulos PG (2014) Physiologically-based toxicokinetic modeling of zearalenone and its metabolites: application to the Jersey girl study. *PLoS One* 9:e113632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113632>
- Olsen M, Mirocha CJ, Abbas HK, Johansson B (1986) Metabolism of high concentrations of dietary zearalenone by young male turkey poults. *Poult Sci* 65:1905–1910. <https://doi.org/10.3382/ps.0651905>
- Plasencia J, Mirocha C (1991) Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. *Appl Environ Microbiol* 57:146–150
- Poór M, Kunsági-Máté S, Bálint M, Hetényi C, Gerner Z, Lemli B (2017) Interaction of mycotoxin zearalenone with human serum albumin. *J Photochem Photobiol B* 170:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.07.009>
- Poór M, Li Y, Matisz G, Kiss L, Kunsági-Máté S, Kőszegi T (2014) Quantitation of species differences in albumin-ligand interactions for bovine, human and rat serum albumins using fluorescence spectroscopy: a test case with some Sudlow's site I ligands. *J Lumin* 145:767–773. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.08.059>
- Poppenberger B, Berthiller F, Bachmann H, Lucyshyn D, Peterbauer C, Mitterbauer R, Schuhmacher R, Krska R, Glössl J, Adam G (2006) Heterologous expression of *Arabidopsis* UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-O-glucoside. *Appl Environ Microbiol* 72:4404–4410. <https://doi.org/10.1128/AEM.02544-05>
- Rai A, Das M, Tripathi A (2019) Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Crit Rev Food Sci Nutr*:1–20. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655388>
- Rogowska A, Pomastowski P, Sagandykova G, Buszewski B (2019) Zearalenone and its metabolites: effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicol* 162:46–56. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2019.03.004>
- Rychlik M, Humpf H-U, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H, Lorenz N (2014) Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Res* 30:197–205. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0203-5>
- Shier WT, Shier AC, Xie W, Miroch CJ (2001) Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol* 39:1435–1438. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00259-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00259-2)
- Sueck F, Poór M, Faisal Z, Gertzen CGW, Cramer B, Lemli B, Kunsági-Máté S, Gohlke H, Humpf HU (2018) Interaction of ochratoxin A and its thermal degradation product 2'R-ochratoxin A with human serum albumin. *Toxins* 10:E256. <https://doi.org/10.3390/toxins10070256>
- Sun F, Tan H, Li Y, De Boevre M, De Saeger S, Zhou J, Li Y, Rao Z, Yang S, Zhang H (2019) Metabolic profile, bioavailability and toxicokinetics of zearalenone-14-glucoside in rats after oral and intravenous administration by liquid chromatography high-resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Int J Mol Sci* 20:5473. <https://doi.org/10.3390/ijms20215473>
- Tan H, Chen L, Ma L, Liu S, Zhou H, Zhang Y, Guo T, Liu W, Dai H, Yu Y (2019) Fluorescence spectroscopic investigation of competitive interactions between quercetin and aflatoxin B<sub>1</sub> for binding to human serum albumin. *Toxins* 11:214. <https://doi.org/10.3390/toxins11040214>
- Vendl O, Crews C, MacDonald S, Krska R, Berthiller F (2010) Occurrence of free and conjugated *Fusarium* mycotoxins in cereal based food. *Food Addit Contam Part A* 27:1148–1152. <https://doi.org/10.1080/19440041003801166>
- Warth B, Preindl K, Manser P, Wick P, Marko D, Buerki-Thumherr T (2019) Transfer and metabolism of the xenoestrogen zearalenone in human perfused placenta. *Environ Health Perspect* 127:1–10. <https://doi.org/10.1289/EHP4860>
- Yamasaki K, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M (2013) Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta* 1830:5435–5443. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.005>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.