

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

**REAKCJE IZOTIOCYJANIANÓW Z HETEROCYKLIKALNYMI AMINAMI
AROMATYCZNYMI I ICH ROLA W INAKTYWACJI KANCEROGENÓW
W ŻYWNOŚCI**

mgr inż. Anna Śmiechowska

Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Gdańsk 2010

Składam serdeczne podziękowania

Prof. dr hab. inż. Jackowi Namieśnikowi
za wszechstronną pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy,
cierpliwość i poświęcony mi czas, zainteresowanie podczas
studiów doktoranckich oraz nieustanną mobilizację do pracy

Dr inż. Agnieszce Bartoszek
za cenne wskazówki pomocne przy wykonywaniu i pisaniu
niniejszej pracy

Dr hab. inż. Witoldowi Przychodzeniowi
za okazaną pomoc i rzeczowe konsultacje

Rodzicom i Grzegorzowi
za nieustanne wsparcie i wiarę we mnie

Podziękowania kieruję również do
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
oraz **Unii Europejskiej**
za wsparcie finansowe w trakcie realizacji badań

*„Ludzkie poznanie wyznaczają granice
ale nie wiemy, gdzie one leżą”*

Konrad Zacharias Lorenz

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	4
SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	7
WSTĘP	13
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	14
1. RODZAJE HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH (HAA) I ICH WYSTĘPOWANIE W ŻYWNOSCI	14
2. WPŁYW PRZEBIEGU PROCESU OBRÓBKI ŻYWNOSCI NA POWSTAWANIE HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH (HAA)	20
3. INTERAKCJE HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH ZE SKŁADNIKAMI UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH	26
3.1. <i>Metabolizm heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA)</i>	26
3.2. <i>Wiązanie się heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) z DNA</i>	32
3.3. <i>Działanie mutagenne heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) in vitro</i>	35
3.4. <i>Wiązanie się heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) z białkami</i>	38
3.5. <i>Heterocykliczne aminy aromatyczne (HAA) jako związki zaburzające gospodarkę hormonalną</i>	39
4. ZAGROŻENIE CHOROBYMI NOWOTWOROWYMI WYNIKAJĄCE ZE SPOŻYWANIA HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH (HAA)	40
4.1. <i>Badania in vivo</i>	41
4.2. <i>Czynniki ochronne</i>	43
5. METODYKI OZNACZANIA HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH W PRÓBKACH ŻYWNOSCI	50
II. CEL I ZAKRES PRACY	55
III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	58
1. APARATURA I ODCZYNNIKI	58
1.1. <i>Odczynniki chemiczne i biochemiczne</i>	58
1.2. <i>Aparatura</i>	60
2. OPIS SYNTEZ I PROCEDUR ANALITYCZNYCH	61
2.1. <i>Procedury wykorzystywane na etapie syntezy substratu o strukturze analogicznej do heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) wykazujących właściwości rakotwórcze</i>	61
2.1.1. <i>Reakcja addycji 2-aminobenzimidazolu (ABI) z izotiocyjanianem allilu (AITC)</i>	61
2.1.2. <i>Synteza 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) z 2-aminobenzimidazolu (ABI)</i>	62
2.2. <i>Opis procedur wykorzystywanych na etapie sprawdzenia roli izotiocyjanianów (ITC) w procesach inaktywacji kancerogenów z grupy heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) obecnych w żywności</i>	62
2.2.1. <i>Reakcja 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) z izotiocyjanianami – allilu (AITC), benzylu (BITC) i fenyloetylu (PEITC)</i>	62
2.2.2. <i>Reakcja 2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksaliny (MeIQx) z izotiocyjanianami – allilu (AITC), fenyloetylu (PEITC) i sulforafanem (SFN)</i>	64
2.2.3. <i>Reakcja 2-amino-1-metylo-6-fenyloimidazo[4,5-b]pirydyna (PhIP) z izotiocyjanianami – allilu (AITC), fenyloetylu (PEITC) i sulforafanem (SFN)</i>	65
2.3. <i>Procedury wykorzystywane na etapie identyfikacji tiomoczników ITC-MABI, ITC-MeIQx oraz ITC-PhIP</i>	66
2.3.1. <i>Wykorzystanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i spektrometrii mas (MS) do identyfikacji związków powstających podczas reakcji chemicznych izotiocyjanianów (ITC)</i>	70
2.3.2. <i>Wykorzystanie analizy elementarnej do ustalania składu pierwiastkowego produktów uzyskanych w wyniku reakcji 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) z izotiocyjanianami – allilu (AITC), benzylu (BITC) oraz fenyloetylu PEITC</i>	71

2.3.3.	Wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni (IR) do badania struktur tautomerycznych produktów reakcji 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) i izotiocyjanianów (ITC)	71
2.3.4.	Zastosowanie rentgenowskiej analizy strukturalnej do badania struktury krystalograficznej produktów reakcji 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) i izotiocyjanianów (ITC)	71
2.4.	Analiza próbek roztworów tiomoczników ITC-MeIQx z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD pod kątem ich identyfikacji i sprawdzenia czystości	72
2.5.	Ocena mutagenności tiomoczników ITC-MeIQx i MeIQx z wykorzystaniem testu Ames w wersji mikropłytkowej MPF	72
2.5.1.	Przygotowanie szczepu <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 do oznaczeń mutagenności	73
2.5.2.	Inkubacja szczepu <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 z tiomocznikami ITC-MeIQx i heterocykliczną aminą aromatyczną MeIQx	73
2.5.3.	Oznaczenie liczby rewertantów	75
2.5.4.	Analiza statystyczna	76
2.6.	Badania nad opracowaniem metodyki oznaczania izotiocyjanianów (ITC) w próbkach soków z kapusty z wykorzystaniem derywatyzacji za pomocą N-acetylo-L-cysteiny (NAC)	76
2.6.1.	Przygotowanie próbek soków z kapusty do badań	76
2.6.2.	Synteza substancji wzorcowych ditiokarbaminianów na drodze kondensacji izotiocyjanianów allilu (AITC), benzylu (BITC) oraz fenyloetylu (PEITC) z N-acetylo-L-cysteiną (NAC)	77
2.6.3.	Synteza ditiokarbaminianu PITC-NAC używanego jako wzorzec wewnętrzny na drodze kondensacji izotiocyjanianu fenylu (PITC) i N-acetylo-L-cysteiny (NAC)	78
2.6.4.	Określenie długości fali absorpcji odpowiadającej maksimum absorpcji ditiokarbaminianów ITC-NAC	78
2.6.5.	Wykorzystanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i spektrometrii mas (MS) do identyfikacji związków powstających podczas reakcji chemicznych izotiocyjanianów (ITC) z N-acetylo-L-cysteiną (NAC)	79
2.6.6.	Synteza związków z grupy NAC-ITC po derywatyzacji izotiocyjanianów (ITC) za pomocą N-acetylo-L-cysteiny (NAC) w próbkach materiału roślinnego	81
2.6.7.	Oznaczanie izotiocyjanianów (ITC) w próbkach soków z kapusty z wykorzystaniem substancji wzorcowych otrzymanych na drodze syntezy	82
2.7.	Procedury wykorzystywane na etapie wyznaczania całkowitej zawartości izotiocyjanianów (ITC) w próbkach soków z kapusty przy użyciu metodyki Zhanga	83
2.7.1.	Synteza substancji wzorcowej 1,3-benzenodiolu-2-tionu na drodze kondensacji izotiocyjanianów (ITC) z 1,2-benzenoditiolem	83
2.7.2.	Wykorzystanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) do identyfikacji związków powstających podczas reakcji izotiocyjanianów (ITC) z 1,2-benzenoditiolem	83
2.7.3.	Oznaczanie izotiocyjanianów (ITC) w próbkach soków z kapusty z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD	83
3.	WYNIKI I WNIOSKI	85
3.1.	2-aminobenzimidazol (ABI) jako strukturalny analog heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) i jego koniugaty z izotiocyjanianami (ITC)	85
3.2.	2-amino-1-metylobenzimidazol (MABI) jako strukturalny analog heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) i jego koniugaty z izotiocyjanianami (ITC)	87
3.3.	Otrzymanie tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI	87
3.3.1.	Reakcja 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) z izotiocyjanianem allilu (AITC), izotiocyjanianem benzylu (BITC) i izotiocyjanianem fenyloetylu (PEITC)	87
3.3.2.	Zastosowanie techniki spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) na etapie identyfikacji tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI	92
3.3.3.	Zastosowanie techniki spektroskopii w podczerwieni (IR) na etapie badania struktury tautomerów tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI	96
3.3.4.	Zastosowanie rentgenowskiej analizy strukturalnej na etapie badania struktury krystalograficznej tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI	98
3.4.	Reakcje 2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksaliny (MeIQx) z izotiocyjanianem allilu (AITC), izotiocyjanianem fenyloetylu (PEITC) i sulforafanem (SFN)	104
3.4.1.	Synteza tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx	104
3.4.2.	Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) na etapie identyfikacji tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx	108

3.4.3.	Zastosowanie spektrometrii mas (MS) na etapie identyfikacji tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx	112
3.4.4.	Zastosowanie techniki HPLC-DAD na etapie identyfikacji tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx	114
3.5.	Reakcja PhIP z izotiocyjanianem allilu (AITC), izotiocyjanianem fenyloetylu (PEITC) i sulforafanem (SFN)	114
3.6.	Wnioski dotyczące rzeczywistej struktury adduktów ITC-MeIQx	117
3.7.	Ocena mutagenności koniugatów izotiocyjanianów (ITC) i heterocyklicznej aminy aromatycznej (HAA)	118
3.7.1.	Kontrola genotypu szczepu <i>Salmonelli typhimurium</i> TA 98	118
3.7.2.	Wpływ stosowanych substancji na poziom mutacji w szczepie <i>Salmonella typhimurium</i> TA98	119
3.7.2.1.	Sprawdzenie mutagenności rozpuszczalnika DMSO	119
3.7.2.2.	Sprawdzenie właściwości mutagennych tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx, SFN-MeIQx oraz heterocyklicznej aminy aromatycznej – MeIQx bez aktywacji metabolicznej	120
3.7.3.	Ocena właściwości mutagennych heterocyklicznej aminy aromatycznej MeIQx i tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx w obecności frakcji mikrosomalnej	120
3.8.	Opracowanie procedury analitycznej oznaczania izotiocyjanianów (ITC) z wykorzystaniem substancji wzorcowych ITC-NAC otrzymanych na drodze syntezy	125
3.8.1.	Synteza ditiokarbaminianów AITC-NAC, BITC-NAC, PEITC-NAC i PITC-NAC	126
3.8.2.	Zastosowanie techniki NMR na etapie identyfikacji produktów uzyskanych w wyniku reakcji AITC, BITC oraz PEITC z NAC	127
3.8.3.	Zastosowanie techniki MS/MS na etapie identyfikacji produktów uzyskanych w wyniku reakcji AITC, BITC oraz PEITC z NAC	129
3.8.4.	Dobór optymalnych warunków procedury analitycznej oznaczania izotiocyjanianów (ITC) z wykorzystaniem substancji wzorcowych otrzymanych na drodze syntezy	129
3.8.5.	Wykorzystanie zoptymalizowanej drogi syntezy wzorców ditiokarbaminianów ITC-NAC w procesie derywatywacji izotiocyjanianów (ITC) za pomocą N-acetylo-L-cysteiny (NAC) w próbkach roślinnych	135
3.9.	Zastosowanie techniki spektrofotometrycznej na etapie doboru optymalnych warunków reakcji kondensacji izotiocyjanianów (ITC) z 1,2-benzenoditiolem w próbkach roztworów substancji wzorcowej izotiocyjanianu fenyloetylu (PEITC)	141
3.10.	Zastosowanie techniki HPLC do oznaczania izotiocyjanianów (ITC) w ekstraktach z próbek soków z kapusty	144
3.10.1.	Synteza substancji wzorcowej 1,3-benzenoditiolo-2-tionu	145
3.10.2.	Zastosowanie techniki NMR na etapie identyfikacji produktu uzyskanego w wyniku reakcji kondensacji izotiocyjanianu metylu (MITC) z 1,2-benzenoditiolem	145
3.10.3.	Wykorzystanie substancji wzorcowej - 1,3-benzenoditiolo-2-tionu do wyznaczenia całkowitej zawartości izotiocyjanianów (ITC) w próbkach materiału roślinnego	146
IV.	PODSUMOWANIE	149
V.	STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	152
VI.	STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	153
VI.	LITERATURA	154
VII.	DOROBEK NAUKOWY	180

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

Skrót/Akronim	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
A	<i>Adenine</i>	Adenina
A α C	<i>2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indole</i>	2-Amino-9H-pirydo[2,3-b]indol
ABI	<i>2-Aminobenzimidazole</i>	2-Aminobenzimidazol
ACF	<i>Aberrant crypt foci</i>	Ogniska nieprawidłowych krypt
AITC	<i>Allyl isothiocyanate</i>	Izotiocyjanian allilu
AITC-ABI	<i>N-(1-benzimidazolyl)-N'-allylthiourea</i>	<i>N</i> -(1-benzimidazolilo)- <i>N'</i> -allilotiocmocznik
AITC-MABI	<i>N-(1-methylbenzimidazolyl)-N'-allylthiourea</i>	<i>N</i> -(1-metylobenzimidazolilo)- <i>N'</i> -allilotiocmocznik
AITC-MeIQx	<i>N-(3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-N'-allylthiourea</i>	<i>N</i> -(3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalino)- <i>N'</i> -allilotiocmocznik
AITC-NAC	<i>N-Acetyl-S-(N-2-propenylthiocarbamoyl)-L-cysteine</i>	<i>N</i> -acetylo-S-(<i>N'</i> -alliotiokarbamoilo)-L-cysteina
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionisation</i>	Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
Ar	<i>Aromatic</i>	Aromatyczny
ATR	<i>Attenuated total reflectance</i>	Oslabione całkowite wewnętrzne odbicie
Benz	<i>Benzene</i>	Benzen
BITC	<i>Benzyl isothiocyanate</i>	Izotiocyjanian benzylu
BITC-NAC	<i>N-acetyl-S-(N-benzylthiocarbamoyl)-L-cysteine</i>	<i>N</i> -acetylo-S-(<i>N'</i> -benzylotiokarbamoilo)-L-cysteina
BITC-MABI	<i>N-(1-methylbenzimidazolyl)-N'-benzylthiourea</i>	<i>N</i> -(1-metylobenzimidazolilo)- <i>N'</i> -benzylotiocmocznik
C	<i>Cytosine</i>	Cytozyna
C18	<i>Octadecyle</i>	Oktadecyl
CE	<i>Collision energy</i>	Energia zderzeń
CG	<i>Cytosine-guanine</i>	Połączenie cytozyna-guanina
CHL	<i>Chlorophyll</i>	Chlorofil
4-CH ₂ OH-8-MeIQx	<i>2-Amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline</i>	2-Amino-4-hydroksymetylo-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina
¹³ C NMR	<i>Carbon nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego węgla ¹³ C
Cre-P-1	<i>4-Amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1H,6H-pyrrolo[3,4-f]benzimidazole-5,7-dione</i>	4-Amino-1,6-dimetylo-2-metyloamino-1H,6H-pirololo[3,4-f]benzimidazo-5,7-dion

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW c.d.

Skrót/Akronim	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
CUR	<i>Curtain gas</i>	Gaz osłonowy
D	<i>Doublet</i>	Dublet
DAD	<i>Diode array detector</i>	Detektor z matrycą diodową
dA	<i>Deoxyadenosine</i>	Deoksyadenozyna
dG	<i>Deoxyguanosine</i>	Deoksyguanozyna
4,8-DiMeIQx	<i>2-Amino-3,4,8-trimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline</i>	2-Amino-3,4,8-trimetyloimidazo[4,5-f]-chinoksalina
7,8-DiMeIQx	<i>2-Amino-3,7,8-trimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline</i>	2-Amino-3,7,8-trimetyloimidazo[4,5-f]-chinoksalina
7,9-DiMeIqQx	<i>2-Amino-1,7,9-trimethyl-imidazo[4,5-g]quinoxaline</i>	2-Amino-1,7,9-trimetyloimidazo[4,5-g]-chinoksalina
DMIP	<i>2-Amino-1,6-dimethylimidazo-[4,5-b]pyridine</i>	2-Amino-1,6-dimetyloimidazo[4,5-b]-pirydyna
DP	<i>Declustering potential</i>	Potencjał fragmentacyjny
ECD	<i>Electrochemical detector</i>	Detektor elektrochemiczny
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	Receptor nabłonkowego czynnika wzrostu
EP	<i>Entrance potential</i>	Potencjał wejściowy
ER	<i>Estrogen receptor</i>	Receptor estrogenowy
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>	Kinazy regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe
ESI	<i>Electrospray ionization</i>	Jonizacja przez elektrorozpraszanie
FIA	<i>Flow injection analysis</i>	Wstrzykowa analiza przepływowa
GC	<i>Gas chromatography</i>	Chromatografia gazowa
Gb	<i>Globin</i>	Globina
Glu-P-1	<i>2-Amino-6-methyldipyrido-[1,2-α:3',2'-d]imidazole</i>	2-Amino-6-metylopirydo[1,2- α :3',2'-d]-imidazol
Glu-P-2	<i>2-Aminodipyrido-[1,2-α:3',2'-d]-imidazole</i>	2-Aminopirydo[1,2- α :3',2'-d]imidazol
GS1	<i>Ion source gas 1</i>	Gaz źródła jonów 1
GS2	<i>Ion source gas 2</i>	Gaz źródła jonów 2
GSH	<i>Glutathione</i>	Glutation
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>	S-transferaza glutationowa
HAA	<i>Heterocyclic aromatic amines</i>	Heterocykliczne aminy aromatyczne
Hb	<i>Hemoglobine</i>	Hemoglobina

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW c.d.

Skrót/Akronim	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
¹ H NMR	<i>Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego protonu
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
I3C	<i>Indole-3-carbinole</i>	Indolo-3-karbinol
IFP	<i>2-Amino-1,6-dimethylfuro[3,2-e]-imidazo[4,5-b]pyridine</i>	2-Amino-1,6-metylofuro[3,2-e]imidazo[4,5-b]pirydyna
IGF-IR	<i>Insulin-like growth factor-I receptor</i>	Receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1
IL	<i>Ionic liquid</i>	Ciecz jonowa
Imid	<i>Imidazole</i>	Imidazol
IQ	<i>2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline</i>	2-Amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinolina
IQ-[4,5-b]	<i>2-Amino-1-methylimidazo[4,5-b]-quinoline</i>	2-Amino-1-metyloimidazo[4,5-b]chinolina
IQx	<i>2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoxaline</i>	2-Amino-3-metyloimidazo[4,5-f]-chinoksalina
IS	<i>Ion source voltage</i>	Napięcie rozpylania
1-Iso-IQ	<i>2-Amino-1-methylimidazo[4,5-f]-quinoline</i>	2-Amino-1-metyloimidazo[4,5-f]chinolina
ITC	<i>Isothiocyanates</i>	Izotiocyjaniany
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
J	<i>Coupling constant</i>	Stała sprzężenia
m	<i>Multiplet</i>	Multiplet
MABI	<i>2-Amino-1-methylbenzimidazole</i>	2-Amino-1-metylobenzimidazol
MAE	<i>Microwave assisted extraction</i>	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	Mitogennie aktywowane kinazy białkowe
MeAαC	<i>2-Amino-3-methyl-9H-pyrido-[2,3-b]indole</i>	2-Amino-3-metylo-9H-pirydo[2,3-b]indol
MeCN	<i>Dichloromethane</i>	Dichlorometan
6-MeIgQx	<i>2-Amino-1,6-dimethyl-imidazo-[4,5-g]quinoxaline</i>	2-Amino-1,6-dimetyloimidazo[4,5-g]-chinoksalina

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW c.d.

Skrót/Akronim	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
7-MeIQx	<i>2-Amino-1,7-dimethyl-imidazo[4,5-g]quinoxaline</i>	2-Amino-1,7-dimetyloimidazo[4,5-g]-chinoksalina
MeIQ	<i>2-Amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoline</i>	2-Amino-3,4-dimetyloimidazo[4,5-f]chinolina
4-MeIQx	<i>2-Amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline</i>	2-Amino-3,4-dimetyloimidazo[4,5-f]-chinoksalina
7-MeIQx	<i>2-amino-3,7-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline</i>	2-amino-3,7-dimetyloimidazo[4,5-f]-chinoksalina
8-MeIQx	<i>2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline</i>	2-Amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]-chinoksalina
MITC	<i>Methyl isothiocyanate</i>	Izotiocyjanian metylu
MS	<i>Mass spectrometry</i>	Spektrometria mas
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>	Tandemowa spektrometria mas
NAC	<i>N-acetyl-L-cysteine</i>	N-acetylo-L-cysteina
NAT	<i>N-acetyltransferase</i>	N-acetylotransferaza
NICI	<i>Negative ion chemical ionization</i>	Jonizacja w trybie jonów ujemnych
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
¹⁵ N-NMR	<i>Nitrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego azotu
NOE	<i>Nuclear overhauser effect</i>	Jądrowy efekt Overhausera
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i>	Ekstrakcja ciecz-ciecz
Lys-P-1	<i>3,4-Cyclopentenopyrido[3,2-a]carbazole</i>	3,4-Cyklopentenopirydo[3,2-a]imidazol
OAT	<i>O-acetyltransferase</i>	O-acetylotransferaza
OD ₆₀₀	<i>Optical density</i>	Gęstość optyczna mierzona przy długości fali λ=600 nm
4'-OH-PhIP	<i>2-Amino-1-methyl-6-(4'-hydroxyphenyl)imidazo[4,5-b]pyridine</i>	2-Amino-1-metylo-6-(4'-hydroksyfenylo)imidazo[4,5-b]pirydyna
Orn-P-1	<i>4-Amino-6-methyl-1H-[2,5,10,10b]tetraazafluoranthene</i>	4-Amino-6-metylo-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranten
PEITC	<i>Phenethyl isothiocyanate</i>	Izotiocyjanian fenyloetylu
PEITC-MABI	<i>N-(1-methylbenzimidazolyl)-N'-phenethylthiourea</i>	N-(1-metylobenzimidazolilo)-N'-fenyloetylotiomocznik

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW c.d.

Skrót/Akronim	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
PEITC-MeIQx	<i>N</i> -(3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoksaline- <i>N'</i> -phenethylthiourea	<i>N</i> -(3,8-dimetyloimidazo[4,5- <i>f</i>]chinoksalino- <i>N'</i> -fenyloetylotiomocznik
PEITC-NAC	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(<i>N</i> -phenylethylthiocarbamoyl)- <i>L</i> -cysteine	<i>N</i> -acetylo- <i>S</i> -(<i>N'</i> -fenyloetylotiokarbamoilo)- <i>L</i> -cysteina
Ph	<i>Phenyl group</i>	Grupa fenylowa
Phe-P-1	<i>2-Amino-5-phenylpyridine</i>	2-Amino-5-fenylopirydyna
PhIP	<i>2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-<i>b</i>]pyridine</i>	2-Amino-1-metylo-6-fenyloimidazo[4,5- <i>b</i>]-pirydyna
PITC	<i>Phenyl isothiocyanate</i>	Izotiocyanian fenylu
PITC-NAC	<i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(<i>N</i> -phenylthiocarbamoyl)- <i>L</i> -cysteine	<i>N</i> -acetylo- <i>S</i> -(<i>N'</i> -fenyloetiokarbamoilo)- <i>L</i> -cysteina
1,5,6-TMIP	<i>2-Amino-1,5,6-trimethylimidazo[4,5-<i>b</i>]pyridine</i>	2-Amino-1,5,6-trimetyloimidazo[4,5- <i>b</i>]-pirydyna
3,5,6-TMIP	<i>2-Amino-3,5,6-trimethylimidazo[4,5-<i>b</i>]pyridine</i>	2-Amino-3,5,6-trimetyloimidazo[4,5- <i>b</i>]-pirydyna
ROESY	<i>Rotation frame nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>	Spektroskopia NOE w rotującym układzie współrzędnych
SA	<i>Albumin</i>	Albumina
SD	<i>Standard deviation</i>	Odchylenie standardowe
SFN	<i>Sulforaphane</i>	Sulforafan
SFN-MeIQx	<i>N</i> -(3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoksaline- <i>N'</i> -methylsulfinylbutylthiourea	<i>N</i> -(3,8-dimetyloimidazo[4,5- <i>f</i>]chinoksalino)- <i>N'</i> -metylosulfinylobutyliotiomocznik
SIM	<i>Selective ion monitoring</i>	Monitoring wybranych jonów
SPE	<i>Solid phase extraction</i>	Ekstrakcja do fazy stałej
SPME	<i>Solid phase microextraction</i>	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
SULT	<i>Sulfotransferase</i>	Sulfotransferaza
SRM	<i>Selective reaction monitoring</i>	Monitoring wybranych reakcji
Sz s	<i>Broad singlet</i>	Szeroki singlet
t	<i>Triplet</i>	Tryplet
T	<i>Tyrosine</i>	Tyrozyna
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>	Chromatografia cienkowarstwowa

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW c.d.

Skrót/Akronim	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
Trp-P-1	<i>3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole</i>	3-Amino-1,4-dimetylo-5H-pirydo[4,3- <i>b</i>]-indol
Trp-P-2	<i>3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole</i>	3-Amino-1-metylo-5H-pirydo[4,3- <i>b</i>]indol
Q	<i>Quartet</i>	Kwartet
UV	<i>Ultra violet</i>	Promieniowanie ultrafioletowe
δ	<i>Chemical shift</i>	Przesunięcie chemiczne

WSTĘP

Jest rzeczą powszechnie znaną, że wraz ze spożywaną żywnością do organizmu ludzkiego dostają się substancje wpływające niekorzystnie na zdrowie człowieka. Stopień narażenia organizmu na te związki zależy od rodzaju diety, przyzwyczajzeń żywieniowych i sposobu przyrządzania potraw, który często związany jest z tradycjami regionalnymi [1]. Wśród tych niepożądanych substancji największe zagrożenie stanowią związki mutagenne i rakotwórcze. Mutagenem określanym jest czynnik fizyczny lub chemiczny, często zdolny do wywoływania uszkodzeń DNA, zwiększający istotnie częstość mutacji. Natomiast kancerogen stanowi czynnik, który przyczynia się do rozwoju choroby nowotworowej. Szczególnie obfitym źródłem rakotwórczych związków jest żywność o wysokiej zawartości białka poddana obróbce termicznej, przede wszystkim mięso. W podwyższonej temperaturze tworzą się mutagenne substancje, takie jak heterocykliczne aminy aromatyczne (HAA) [2]. Jednak przetwórstwo i obróbka termiczna żywności mają też nieocenione zalety. Jako najważniejsze należy wymienić:

- zwiększenie trwałości produktów żywnościowych,
- obniżenie ceny,
- poprawienie walorów smakowych i odżywczych.

Sprawiają one, że nie należy oczekiwać obniżenia spożycia przetworzonej i poddanej obróbce termicznej żywności pochodzenia zwierzęcego.

Wyniki badań epidemiologicznych sugerują jednak, że wysoka zawartość mięsa w diecie zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów żołądka, jelita grubego, płuc, trzustki, piersi i prostaty [3]. Jednym z czynników odpowiedzialnych za to żywieniowe zagrożenie jest właśnie obecność związków z grupy HAA w wyrobach mięsnych. W związku z tym w wielu laboratoriach podjęto w ostatnich latach badania, których wynikiem ma być określenie warunków przygotowania żywności pozwalających na obniżenie zawartości albo wyeliminowanie składników szkodliwych [4]. Rozwiązaniem może być także jednoczesne dostarczanie do organizmu substancji przeciwdziałających aktywności niepożądanych składników produktów żywnościowych. Uważa się, że niektóre fitozwiązki zawarte w owocach i warzywach dostarczane wraz z mięsem poddanym obróbce termicznej mogłyby niwelować mutagenne i rakotwórcze wpływy związków z grupy HAA [5].

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Rodzaje heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) i ich występowanie w żywności

Heterocykliczne aminy aromatyczne są substancjami tworzącymi się w trakcie procesu obróbki termicznej mięsa [6]. Pierwsze związki z grupy HAA obecne w przetworzonej żywności opisano w roku 1977 [7]. Natomiast do tej pory, w żywności o dużej zawartości białka, takiej jak mięso, drób i ryby, zidentyfikowano ponad 25 różnych heterocyklicznych amin aromatycznych (tabela 1) [8].

Wszystkie związki z grupy HAA posiadają w swej strukturze dwa do pięciu pierścieni aromatycznych, pierścień heterocykliczny z jednym lub większą liczbą atomów azotu i zazwyczaj jedną egzocykliczną grupę aminową [2]. W opracowaniach Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC) [9] dziewięć heterocyklicznych amin aromatycznych (MeIQ, MeIQx, PhIP, A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2 i Glu-P-1 oraz IQ) zostało zaliczonych do grupy związków wykazujących odpowiednio możliwe (klasa 2B) lub prawdopodobne (klasa 2A) działanie rakotwórcze w stosunku do organizmu człowieka. W związku z tym zalecono ograniczenie ich konsumpcji. Heterocykliczne aminy aromatyczne można podzielić na dwie następujące klasy:

- 1) aminoimidazoazareny (pochodne imidazochinoliny (związki IQ), pochodne imidazochinoksaliny (związki IQx), pochodne imidazopirydyny (związki IP),
- 2) pochodne aminokarbony (pirydoindole oraz pirydoimidazole) [10].

Związki z grupy HAA powstają w niewielkich ilościach (ppb) w trakcie domowych sposobów przygotowywania mięsa. Jednakże przypieczone mięso czerwone czy też drób, jak również sos z pozostałości na patelni może zawierać heterocykliczne aminy aromatyczne nawet na poziomie 500 ppb [11]. Przy tym ilość związków z grupy HAA tworzących się podczas obróbki termicznej mięsa wołowego jest 20-krotnie mniejsza w mięsie niż w sosie własnym [12, 13]. Na szczególną uwagę zasługują dwie pochodne, a mianowicie PhIP i 8-MeIQx, bowiem występują w największych ilościach w żywności takiej jak dobrze upieczony drób, bekon, grilowana wołowina, wywar z wołowiny, stek i ryby [14, 15]. Przy czym PhIP tworzy się łatwiej podczas obróbki termicznej mięsa z kurcząt niż w przypadku wołowiny, wieprzowiny albo ryb. Z kolei zawartość MeIQx jest ogólnie niższa w przetworzonym mięsie z drobiu niż w wołowinie i wieprzowinie [4, 11]. Związane jest to z różnicami w zawartości

tłuszczu, glukozy i kreatyny oraz rodzaju występujących aminokwasów w mięsie białym (drób) i mięsie czerwonym (wołowina i wieprzowina) [16, 17]. Informacje na temat występowania związków z grupy HAA w produktach żywnościowych zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Informacje literaturowe o występowaniu niektórych heterocyklicznych amin aromatycznych w produktach żywnościowych

Heterocykliczna amina aromatyczna	Źródło pochodzenia	Piśmiennictwo [przykład]
PhIP	Dobrze upieczony drób, bekon, grilowana wołowina, wywar z wołowiny, stek, ryby	[14, 15]
8-MeIQx	Dobrze upieczony drób, bekon, grilowana wołowina, wywar z wołowiny, stek, ryby, także mocz osób spożywających takie potrawy	[14, 15, 18]
IQ	Pieczony łosoś i wywar z wołowiny	[11]
MeIQ	Pieczony łosoś i wywar z wołowiny	[11]
IQ-[4,5- <i>b</i>]	Mięso przygotowane do spożycia w warunkach domowych	[11, 19]
7-MeIgQx	Mięso przygotowane do spożycia w warunkach domowych	[19, 20]
7,9-DiMeIgQx	Mięso przygotowane do spożycia w warunkach domowych	[19, 20]
AαC	Przypieczone mięso	[10]

W 2007 roku odkryto w mięsie wołowym 6 nowych związków zawierających w swej strukturze szkielet IQx. Dwa z nich, 6-MeIgQx i 7-MeIgQx charakteryzują się taką samą masą cząsteczkową jak 4-MeIQx oraz 8-MeIQx [19]. Cztery pozostałe są izomerami DiMeIQx [20].

Heterocykliczne aminy aromatyczne wyizolowano i zidentyfikowano nie tylko w poddanym obróbce termicznej mięsie [21, 22], drobiu [6] i rybach [23], wywarze mięsny [24], kostkach rosółowych [25], ale również w dymie kuchennym [26, 27], produktach sojowych [28], otrębach pszenicy [29], kawie [30], napojach alkoholowych [31] i nawet mieszaninach pochodzenia środowiskowego, w tym w dymie papierosowym [32, 33], powietrzu [34], wodzie rzecznej [35]. i wodzie deszczowej [36] oraz glebie [37]. Poza tym kilka HAA zidentyfikowano w ludzkich tkankach [38], włosach [39, 40] i w płynach biologicznych, takich jak osocze, mocz oraz żółć [41, 42, 43, 44], jak również w mleku zdrowych kobiet [8, 45]. Natomiast obecność związku IQ-[4,5-*b*] stwierdzono m.in. w moczu zarówno konsumentów mięsa jak i wegetarian co sugeruje, że jego źródłem nie jest mięso poddane obróbce termicznej, ale tworzenie się tej pochodnej następuje w sposób endogeny w organizmie człowieka [8]. Związki

norharman i harman poza powstawaniem w trakcie obróbki termicznej mięsa, często występują w roślinach, np. w męczennicy i są znanymi inhibitorami monoaminoooksydaz, stąd ich działanie halucynogenne.

Struktury wszystkich opisanych dotychczas związków z grupy HAA, których obecność stwierdzono w produktach żywnościowych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Heterocykliczne aminy aromatyczne powstające podczas procesu obróbki termicznej produktów żywnościowych

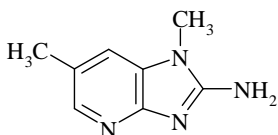
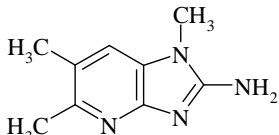
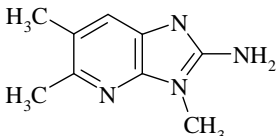
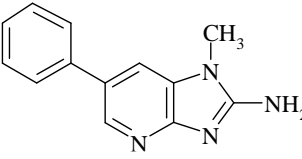
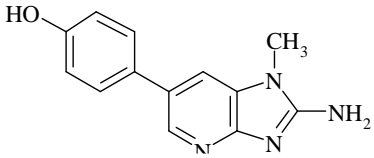
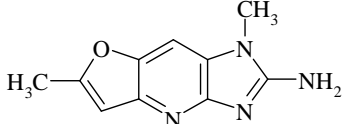
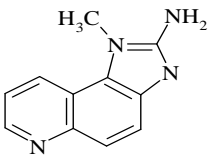
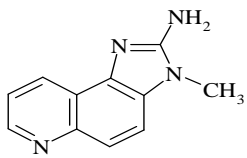
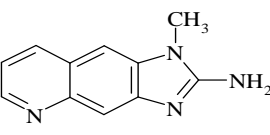
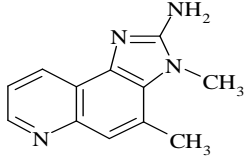
HAA tworzące się podczas obróbki termicznej: aminoimidazoazareny	
Pochodne imidazopirydyny	
 <p>2-amino-1,6-dimetyloimidazo[4,5-<i>b</i>]pirydyna (DMIP)</p>	 <p>2-amino-1,5,6-trimetyloimidazo[4,5-<i>b</i>]pirydyna (1,5,6-TMIP)</p>
 <p>2-amino-3,5,6-trimetyloimidazo[4,5-<i>b</i>]pirydyna (3,5,6-TMIP)</p>	 <p>2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-<i>b</i>]pirydyna (PhIP)</p>
 <p>2-amino-1-metylo-6-(4'-hydroksyfenilo)-imidazo[4,5-<i>b</i>]pirydyna (IFP)</p>	 <p>2-amino-1-metylo-6-(4'-hydroksyfenilo)-imidazo[4,5-<i>b</i>]pirydyna (IFP)</p>
Pochodne imidazochinoliny	
 <p>2-amino-1-metyloimidazo[4,5-<i>f</i>]chinolina (1-Iso-IQ)</p>	 <p>2-amino-3-metyloimidazo[4,5-<i>f</i>]chinolina (IQ)</p>
 <p>2-amino-1-metyloimidazo[4,5-<i>b</i>]chinolina (IQ-[4,5-<i>b</i>])</p>	 <p>2-amino-3,4-dimetyloimidazo[4,5-<i>f</i>]chinolina (MeIQ)</p>

Tabela 2. c.d.

Pochodne imidazochinoksaliny

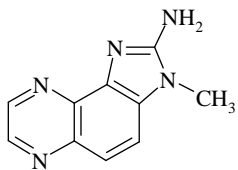
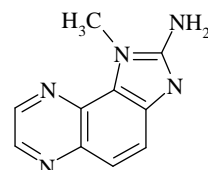
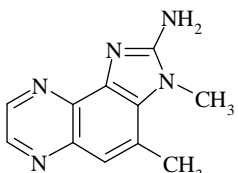
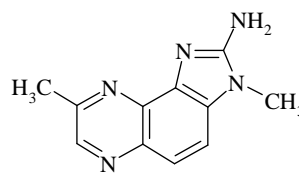
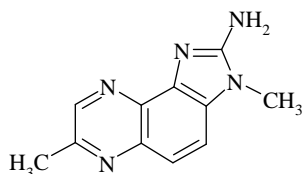
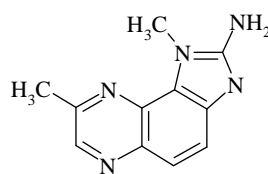
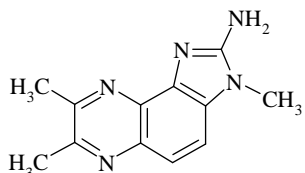
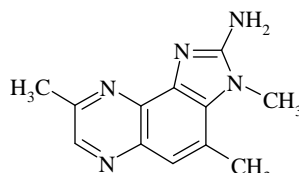
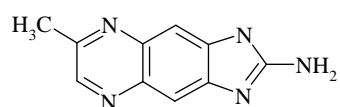
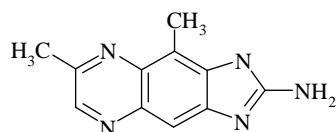
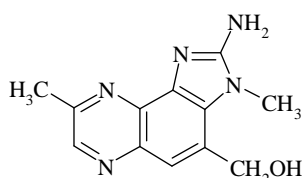
2-amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinoksalina
(IQx)2-amino-1-metyloimidazo[4,5-f]chinoksalina
(1-Iso-IQx)2-amino-3,4-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina
(4-MeIQx)2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina
(8-MeIQx)2-amino-3,7-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina
(7-MeIQx)2-amino-1,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina
(1-Iso-8-MeIQx)2-amino-3,7,8-trimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina
(7,8-DiMeIQx)2-amino-3,4,8-trimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina
(4,8-DiMeIQx)2-amino-1,7-dimetyloimidazo[4,5-g]chinoksalina
(7-MeIqQx)2-amino-1,7,9-trimetyloimidazo[4,5-g]chinoksalina
(7,9-DiMeIqQx)2-amino-4-hydroksymetylo-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina
(4-CH₂OH-8-MeIQx)

Tabela 2. c.d.

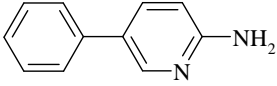
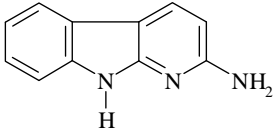
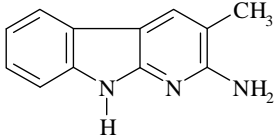
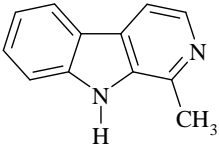
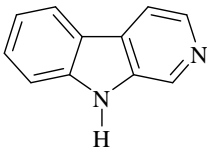
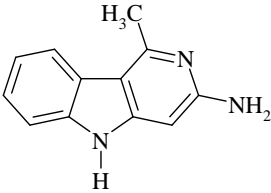
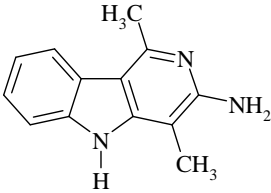
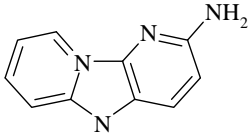
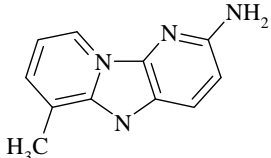
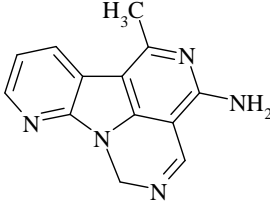
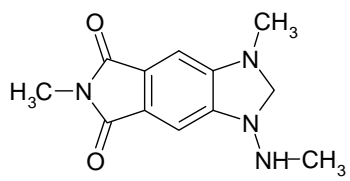
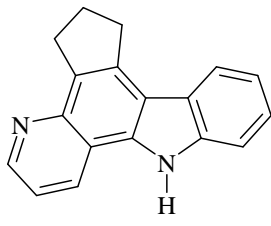
HAA tworzące się podczas pirolizy: aminokarbony	
Pochodne fenylopirydyny	
	
2-amino-5-fenylopirydyna (Phe-P-1)	
Pochodne pirydoindoli: α-karbony	
	
2-amino-9H-pirydo[[2,3-<i>b</i>]indol (A α C)	2-amino-3-metylo-9H-pirydo[2,3-<i>b</i>]indol (MeA α C)
β-karbony	
	
1-metylo-9H-pirydo[3,4-<i>b</i>]indol (harman)	9H-pirydo[3,4-<i>b</i>]indol (norharman)
γ-karbony	
	
3-amino-1-metylo-5H-pirydo[4,3-<i>b</i>]indol (Trp-P-2)	3-amino-1,4-dimetylo-5H-pirydo[4,3-<i>b</i>]indol (Trp-P-1)

Tabela 2. c.d.

<p>Pochodne pirydoimidazoli: δ-karboliny</p>	
	
<p>2-aminopyrido[1,2-α:3',2'-d]imidazol (Glu-P-2)</p>	<p>2-amino-6-metylopyrido[1,2-α:3',2'-d]imidazol (Glu-P-1)</p>
<p>Pochodne tetraazafluorantenu</p>	
	
<p>4-amino-6-metylo-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranten (Orn-P-1)</p>	
<p>Pochodne benzimidazoli</p>	
	
<p>4-amino-1,6-dimetylo-2-metyloamino-1H,6H-pirol[3,4-f]benzimidazolo-5,7-dion (Cre-P-1)</p>	
<p>Pochodne karbazoli</p>	
	
<p>3,4-cyklopentenopirydo[3,2-a]karbozol (Lys-P-1)</p>	

2. Wpływ przebiegu procesu obróbki żywności na powstawanie heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA)

W zależności od temperatury obróbki żywności powstają dwie główne grupy heterocyklicznych amin aromatycznych. Pierwszą grupę, określaną jako „pirolityczne HAA” czy też typu „nie-IQ”, stanowią produkty pirolizy aminokwasów (przede wszystkim aminokwasów aromatycznych, głównie tryptofanu) i białek, powstające w temperaturze powyżej 300°C. Należą do niej głównie pochodne pirydinoindolowe i pirydinoimidazolowe (tabela 2) [25]. Piroliza prowadzi do powstania wielu reaktywnych cząsteczek w wyniku reakcji o mechanizmie rodnikowym. Cząsteczki te ulegają łatwo kondensacji tworząc nowe heterocykliczne struktury w wyniku dalszych reakcji wolnorodnikowych [4].

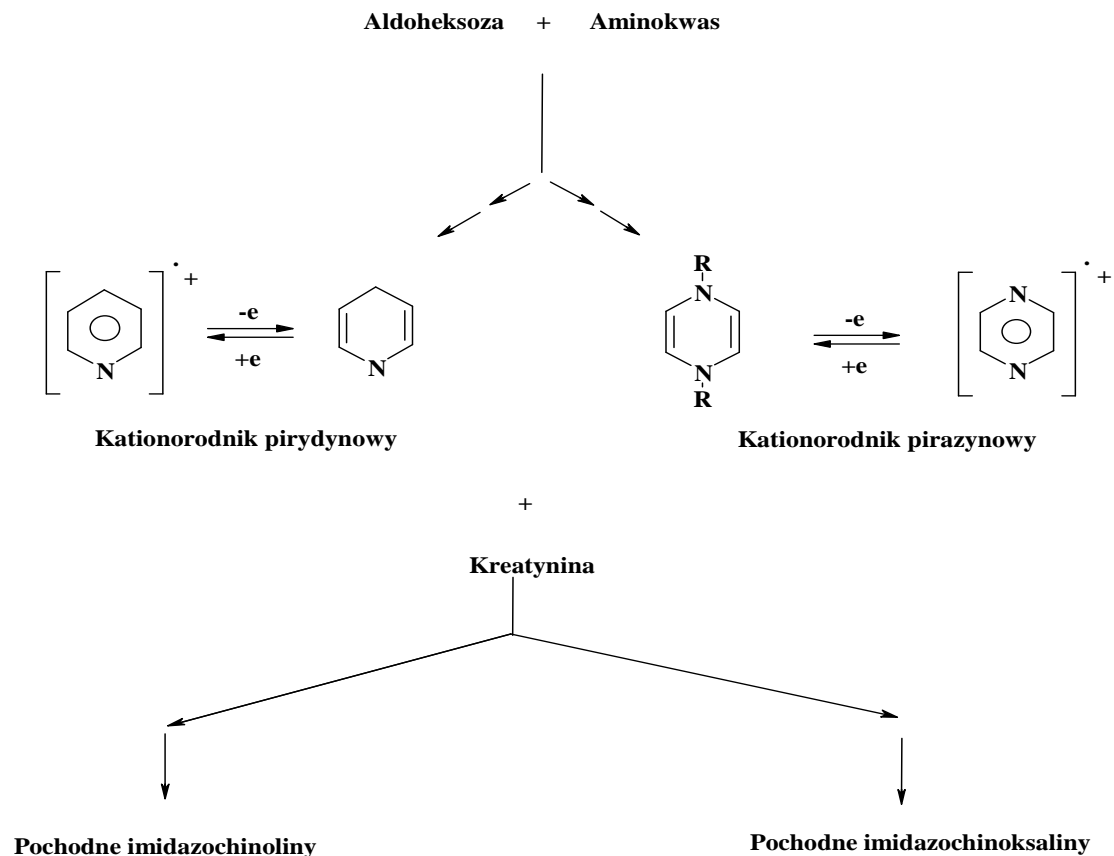
Natomiast w niższych temperaturach (150-200°C) powstają tzw. „termiczne HAA”, typu „IQ” czy też aminoimidazoazareny, zawierające w swej strukturze fragment 2-amino-*N*-metyloimidazolu [25]. Te ostatnie tworzą się z obecnych w mięsie aminokwasów, kreatyny lub kreatyniny oraz cukrów redukujących (np. glukozy) [46]. Substancje prekursorowe ulegają reakcji dehydratacji i cyklizacji prowadząc do powstania pochodnych pirolu i pirydiny. W wyniku reakcji Maillarda zachodzącej między heksozą i aminokwasem tworzy się kationorodnik pirydynowy i dialkiloopirazynowy. Następnie ulegają one dalszym przemianom Streckera z udziałem aldehydów i kreatyny oraz kreatyniny prowadzącym do powstania pochodnych odpowiednio imidazochinoliny i imidazochinoksaliny (rysunek 1) [47, 48].

Produkty te tworzą się prawdopodobnie w wyniku złożonych reakcji przebiegających według mechanizmu rodnikowego. Jednakże w temperaturze wyższej niż 225°C powstałe produkty ulegają degradacji lub reagują z innymi związkami [49]. Mechanizm tworzenia się związków Trp-P-1, Trp-P-2, AαC i MeAαC jest nadal nieznan [50].

Rodzaj tworzących się heterocyklicznych amin aromatycznych i ich zawartość w poddanym obróbce termicznej mięsie zależy od wielu czynników, takich jak:

- rodzaj mięsa (wieprzowina, wołowina, drób, ryby) i jego jakość,
- kształt i wielkość przetwarzanego produktu,
- sposób przetwarzania (smażenie, grilowanie, pieczenie, opiekanie, pieczenie w głębokim tłuszczu czy przygotowywanie w kuchence mikrofalowej),
- temperatura i czas trwania obróbki termicznej,

- pH produktów mięsnych,
- stężenie prekursorów związków z grupy HAA,
- zawartość wody oraz tłuszczu i stopień utlenienia tłuszczów [1, 39, 51, 52, 53, 54, 55].



Rysunek 1. Uproszczony schemat syntezy wybranych aminoazaarenów z uwzględnieniem etapu tworzenia przejściowych produktów wolnorodnikowych [25]

Zawartość związków z grupy HAA w zależności od warunków może zmienić się nawet 100-krotnie [46]. Należy podkreślić jednak, że temperatura i w mniejszym stopniu czas ogrzewania mają główne znaczenie w ich tworzeniu [47, 56, 57].

Przygotowywanie potraw w temperaturze niższej niż 100°C nie powoduje powstawania albo jedynie powstawanie śladowych ilości heterocyklicznych amin aromatycznych [13]. Wyniki badań wskazują, że przetwarzanie produktów wysokobiałkowych w niskiej i średniej temperaturze (poniżej 250°C) prowadzi do utworzenia głównie związków z grupy imidazochinoksalin, natomiast w potrawach bardzo spieczonych, przeważa zawartość pochodnej imidazopirydyny – PhIP [58]. Największe ilości związków z grupy HAA powstają podczas zastosowania wysokiej temperatury i długiego czasu obróbki termicznej [57, 59].

Gotowanie w wodzie i ogrzewanie z wykorzystaniem kuchenki mikrofalowej są sposobami przyrządzania potraw, którym towarzyszy tworzenie się niewielkiej ilości wspomnianych substancji [53]. Istnieje jedno doniesienie o występowaniu Trp-P-2, Trp-P-22, A α C, MeA α C, harmanu oraz norharmanu w udkach z kurczęcia przyrządzonych w kuchenke mikrofalowej [60] i tylko dwóch ostatnich z wymienionych związków w gotowanym mięsie [61]. W przypadku stosowania kuchenki mikrofalowej ciepło jest generowane we wnętrzu produktu i temperatura powierzchni nie wzrasta powyżej temperatury innych jego części [21].

Szybkość tworzenia się heterocyklicznych amin aromatycznych wzrasta wraz ze wzrostem temperatury [62]. Można zaobserwować wyraźny wpływ temperatury obróbki termicznej na stężenie MeIQ x i PhIP, podczas gdy zawartość IQ, MeIQ x oraz DiMeIQ x utrzymuje się na pewnym stałym poziomie [63]. Temperatury powszechnie stosowane podczas grillowania, smażenia i często podczas pieczenia (z zakresu 100–200°C) przyczyniają się do zwiększenia intensywności procesu tworzenia się związków z grupy HAA [20], natomiast w temperaturach począwszy od 225°C do 250°C wspomniane substancje ulegają rozpadowi lub też reagują z innymi związkami tworząc nowe pochodne [64]. Przy czym w temperaturach do 150°C ma miejsce nieznaczny wzrost szybkości tworzenia się związków z grupy HAA, natomiast duży wzrost szybkości zaobserwowano w temperaturach bliskich 200°C.

Niepolarne związki z grupy HAA: TrpP1, TrpP2, A α C i MeA α C powstają w dużych ilościach tylko wtedy, gdy proces obróbki żywności jest prowadzony w temperaturze powyżej 300°C [12]. Przeprowadzenie procesu smażenia wieprzowiny w kontrolowanych warunkach pozwoliło stwierdzić, że całkowite zawartości heterocyklicznych amin aromatycznych w smażonej wieprzowinie w temperaturach 100°C, 125°C i 150°C wynoszą odpowiednio 48, 58 i 91 ng/g. Z kolei ilości IQ x , MeIQ x , PhIP i 4,8-DiMeIQ x powstających podczas obróbki termicznej mięsa wołowego przez 5 min wzrastają odpowiednio 2,5-krotnie, 6-krotnie i 8-krotnie wraz ze wzrostem temperatury od 170 do 200°C [13]. Związek PhIP nie tworzy się podczas smażenia w temperaturze 100°C [65]. Mniejsze ilości polarnych amin IQ i MeIQ w porównaniu do IQ x i MeIQ x uzyskano w przypadku przetwarzania mięsa wołowego w najwyższej z podanych temperatur i w trakcie najdłuższego czasu trwania procesu [12, 48].

Kinetyka tworzenia się związków z grupy HAA, jako funkcja czasu była przedmiotem badań opisanych w wielu pracach. Została ona zmierzona m.in.

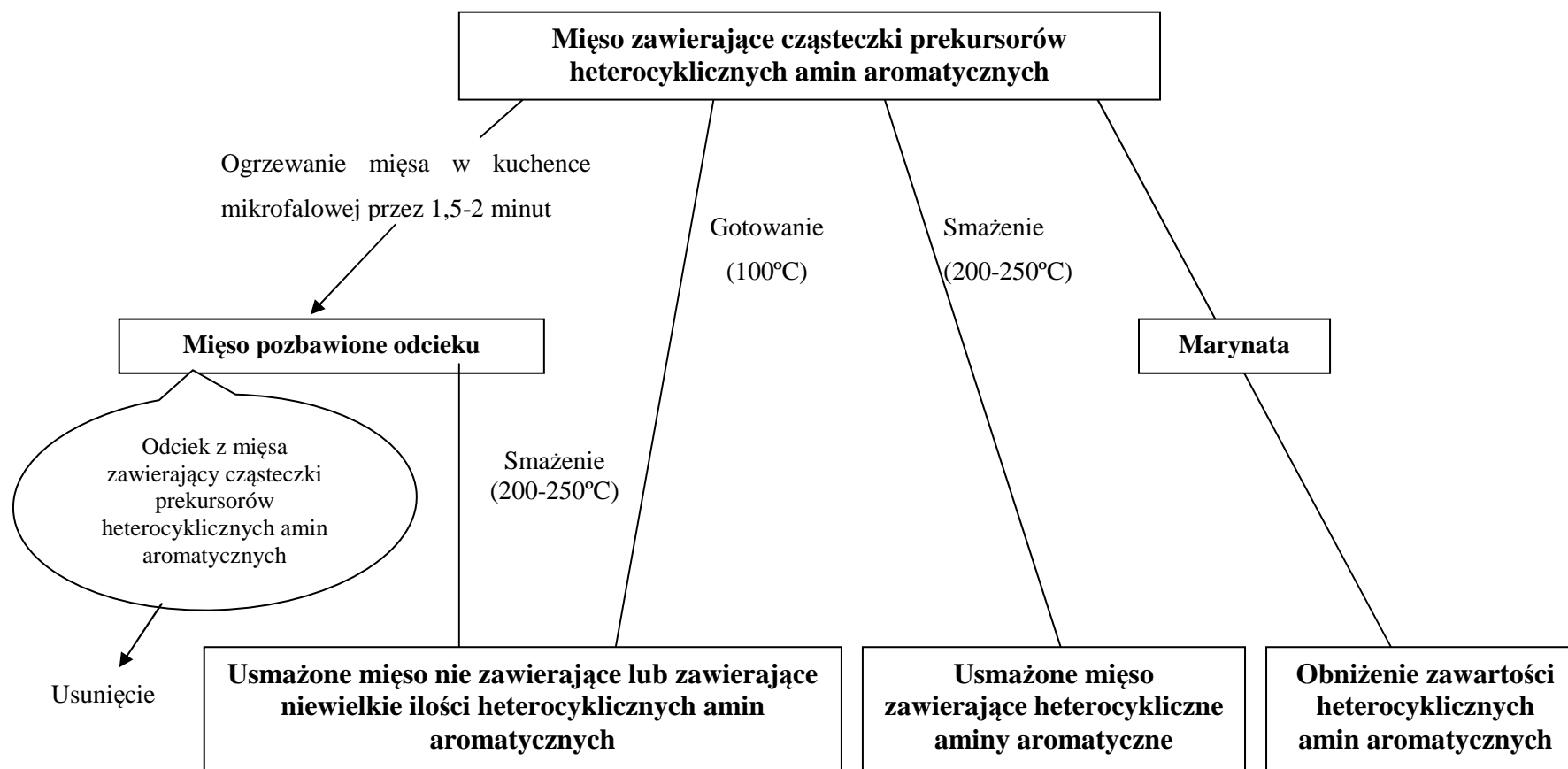
dla procesu smażenia wołowiny mielonej w temperaturach 150-180°C. Stężenie tworzących się związków z grupy HAA było stosunkowo niewielkie po upływie 3 min, jednak wzrastało wraz z czasem trwania procesu obróbki termicznej [20]. Większość heterocyklicznych amin aromatycznych tworzy się w smażonej wołowinie w szybkim tempie po 5-minutowym okresie ogrzewania we wszystkich temperaturach, jedynie w przypadku IQ, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, harmanu i A α C zaobserwowano powolny wzrost ich ilości po okresie 5 albo 10 minut przetwarzania wołowiny w temperaturze 180°C. Z kolei zawartość związków z grupy HAA tworzących się podczas smażenia mięsa wołowego w temperaturze 225°C przez 6 minut jest 6-razy większa niż stosując temperaturę 175°C [63]. Inne doniesienie literaturowe wskazuje, że ogrzewanie wołowiny w temperaturze 160 °C przez mniej niż 15 minut nie przyczynia się do powstawania heterocyklicznych amin aromatycznych. Znaczne ilości polarnych amin - IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx i PhIP i niepolarnych amin – norharmanu, harmanu i A α C tworzą się dla temperatury obróbki w zakresie 180-220°C przez okres 20 minut. Większe ilości MeIQ tworzą się jedynie podczas obróbki termicznej mięsa w najwyższej temperaturze (200 °C) przez okres 20 minut (2 ng/g) [12]. Przy dłuższym czasie obróbki termicznej (rzędu 1 godziny) w temperaturze 150°C, w wieprzowinie wykryto siedem związków z grupy HAA: Glu-P-2, norharman, harman, Trp-P-2, PhIP, A α C, MeA α C. Ich zawartość wzrasta wraz ze wzrostem temperatury przetwarzania [65].

Analizując proces przekazywania ciepła i mierząc temperatury powierzchni mięsa poddawanego procesowi obróbki termicznej wskazano na znaczenie inercji termicznej w opóźnieniu tworzenia się związków z grupy HAA, szczególnie w żywności występującej w postaci stałej. Większość doniesień określa ilości tworzących się heterocyklicznych amin aromatycznych w mięsie jako sumy tych związków podzielonej przez masę produktu, a tymczasem w głębszych warstwach mięsa znajdują się miejsca, gdzie temperatura będzie dużo niższa niż na zewnątrz, a zatem często bez możliwości tworzenia się związków z grupy HAA [13]. Zależność tę potwierdzają wyniki pomiarów zawartości heterocyklicznych amin aromatycznych znalezionych w mięsie i sosie własnym; te ostatnie są ponad 20 razy większe niż w mielonej wołowinie. Aminy IQx i 4,8-DiMeIQx występują średnio w 3-4-krotnie większej ilości w sosie własnym niż w plasterkach wołowiny, podczas gdy zawartość MeIQx i PhIP jest porównywalna w obu tych produktach mięsnych [50].

Mylący przy wizualnej ocenie poziomu związków rakotwórczych, w tym związków z grupy HAA, może być także kolor powierzchni przetwarzanego produktu, który zmienia się wraz z temperaturą obróbki termicznej [65]. Jednak właściwość ta służąca często do charakteryzowania procesu obróbki termicznej mięsa [66] jest tylko ogólnym wskaźnikiem i niewystarczającym do określenia warunków przetwarzania [13], ponieważ na barwę mogą wpływać inne zmienne, np. różnice pH mięsa.

Dostępnych jest wiele prac szczegółowo analizujących wpływ sposobu przyrządzania mięsa tj. smażenia na patelni, smażenia w głębokim tłuszczu, pieczenia na ruszcie i procesu duszenia, na rodzaj i zawartość tworzących się heterocyklicznych amin aromatycznych [67, 68]. Wspomniane związki tworzą się gwałtownie, kiedy mięso jest w bezpośrednim kontakcie z gorącą płaską powierzchnią tak jak w przypadku smażenia na patelni lub przy stosowaniu bardzo wysokich temperatur obróbki (225-300°C) wykorzystywanych w pieczeniu na ruszcie [4, 57, 61, 69,] czy „barbecue”, natomiast wolniej podczas duszenia [65]. Należy wziąć po uwagę, że największe ilości związków z grupy HAA tworzą się w zewnętrznej części, czyli na powierzchni przetwarzanej żywności [13]. Przy czym pieczenie na grilu mięsa z drobiu bez skóry powoduje powstawanie większych ilości heterocyklicznych amin aromatycznych [70]. Także pieczone na ruszcie z węglem drzewnym mięso charakteryzuje się wyższą zawartością związków z grupy HAA [71]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku obróbki termicznej ryb [51]. Duże ilości PhIP tworzą się w trakcie procesów obróbki żywności prowadzących do wysuszenia posiłków [16]. Natomiast powstawanie MeIQx jest przyspieszone w przypadku stosowania tzw. mokrych technik przyrządzania mięsa [13].

Przetestowano również sposoby ograniczenia intensywności tworzenia się związków z grupy HAA podczas obróbki termicznej kotletów wołowych przy temperaturze wewnętrznej mięsa wynoszącej 70°C, bowiem temperatura patelni może być zmienna (rysunek 2). W przypadku, gdy kotlety obracano tylko raz w ciągu pięciu minut smażenia i prowadzono proces do osiągnięcia wskazanej wcześniej temperatury 70°C, zauważono duży wpływ temperatury patelni na tworzenie się heterocyklicznych amin aromatycznych. Natomiast obracanie mięsa co minutę podczas smażenia powodowało powstawanie mniejszej ilości tych amin. W związku z tym obróbka termiczna mięsa mielonego wołowego w niższej temperaturze (160-180°C) z jednoczesnym obracaniem mięsa co minutę prowadzi do znacznego zmniejszenia



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie dróg tworzenia się heterocyklicznych amin aromatycznych podczas smażenia mięsa oraz sposobów zmniejszania intensywności procesu ich powstawania poprzez wcześniejsze ogrzewanie mięsa w kuchence mikrofalowej lub zastosowanie innej techniki obróbki termicznej (na podstawie[72])

intensywności procesu tworzenia się związków z grupy HAA [73]. Jednocześnie wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że wzrost temperatury patelni ze 160 do 250°C wpływa tylko w nieznacznym stopniu na skrócenie czasu potrzebnego do przygotowania kotletów wołowych, natomiast w sposób istotny (odpowiednio 5 i 15-krotnie) wzrost ilości powstających heterocyklicznych amin aromatycznych obserwuje się, gdy smażenie odbywa się odpowiednio bez obracania i z obracaniem mięsa. Jak widać zastosowanie wyższej temperatury patelni tylko nieznacznie przyspiesza proces obróbki termicznej, a skutkuje tworzeniem się większej ilości związków z grupy HAA, podczas gdy częste obracanie mięsa przyspiesza smażenie i prowadzi do ograniczenia ich tworzenia.

Innym sposobem zmniejszania intensywności procesu powstawania heterocyklicznych amin aromatycznych jest usunięcie substancji prekursorowych z mięsa przed obróbką termiczną [74]. Możliwe jest to poprzez wcześniejsze ogrzewanie mięsa w kuchence mikrofalowej przez 1,5-2 min [72]. W tym miejscu warto wspomnieć o jeszcze jednym sposobie ograniczania intensywności procesu tworzenia się związków z grupy HAA, a mianowicie wcześniejsze zastosowanie odpowiedniej marynaty m.in. z herbaty, czerwonego wina czy też piwa. Marynowanie powoduje zmniejszenie ilości heterocyklicznych amin aromatycznych, tworzących się z prekursorów, podczas dalszej obróbki termicznej mięsa, a przy tym wpływa na poprawę smaku, miękkości i wilgotności produktu.

Podsumowując powyższe rozważania można stwierdzić, że jest nadzieja na spożywanie zdrowszych produktów mięsnych przy zastosowaniu odpowiedniej technologii obróbki termicznej (rysunek 2). Pomimo braku jednoznacznych wniosków dotyczących wpływu temperatury na proces tworzenia się związków z grupy HAA w produktach żywnościowych, rozsądne jest stosowanie niskich temperatur, unikanie nagłych wzrostów temperatury i przedłużonego traktowania wysoką temperaturą [11].

3. Interakcje heterocyklicznych amin aromatycznych ze składnikami układów biologicznych

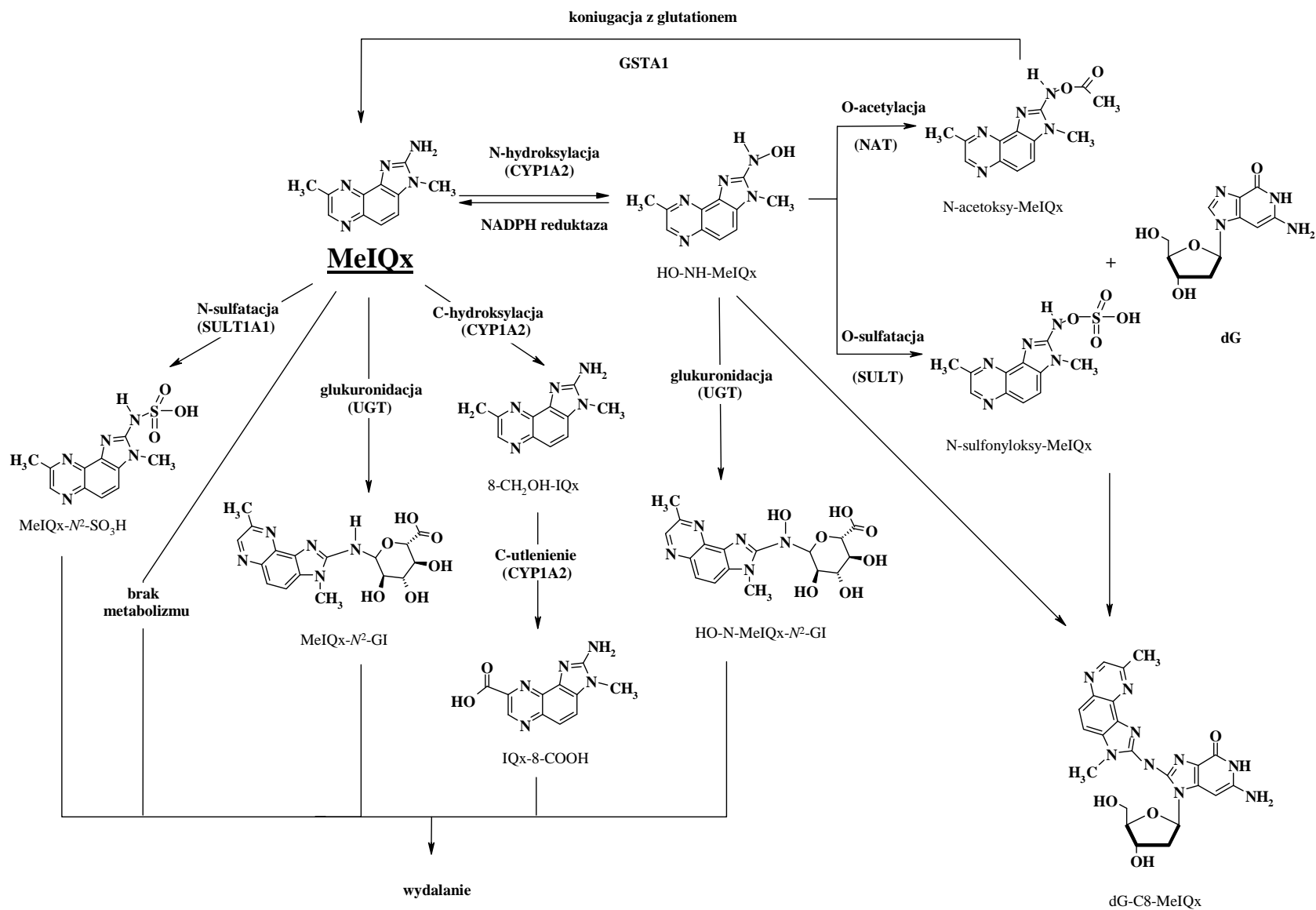
3.1. Metabolizm heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA)

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych z udziałem zwierząt i ludzi wskazują na złożony proces metabolizmu heterocyklicznych amin aromatycznych [75]. Z uwagi na fakt, że MeIQx i PhIP tworzą się w największych ilościach w żywności poddanej

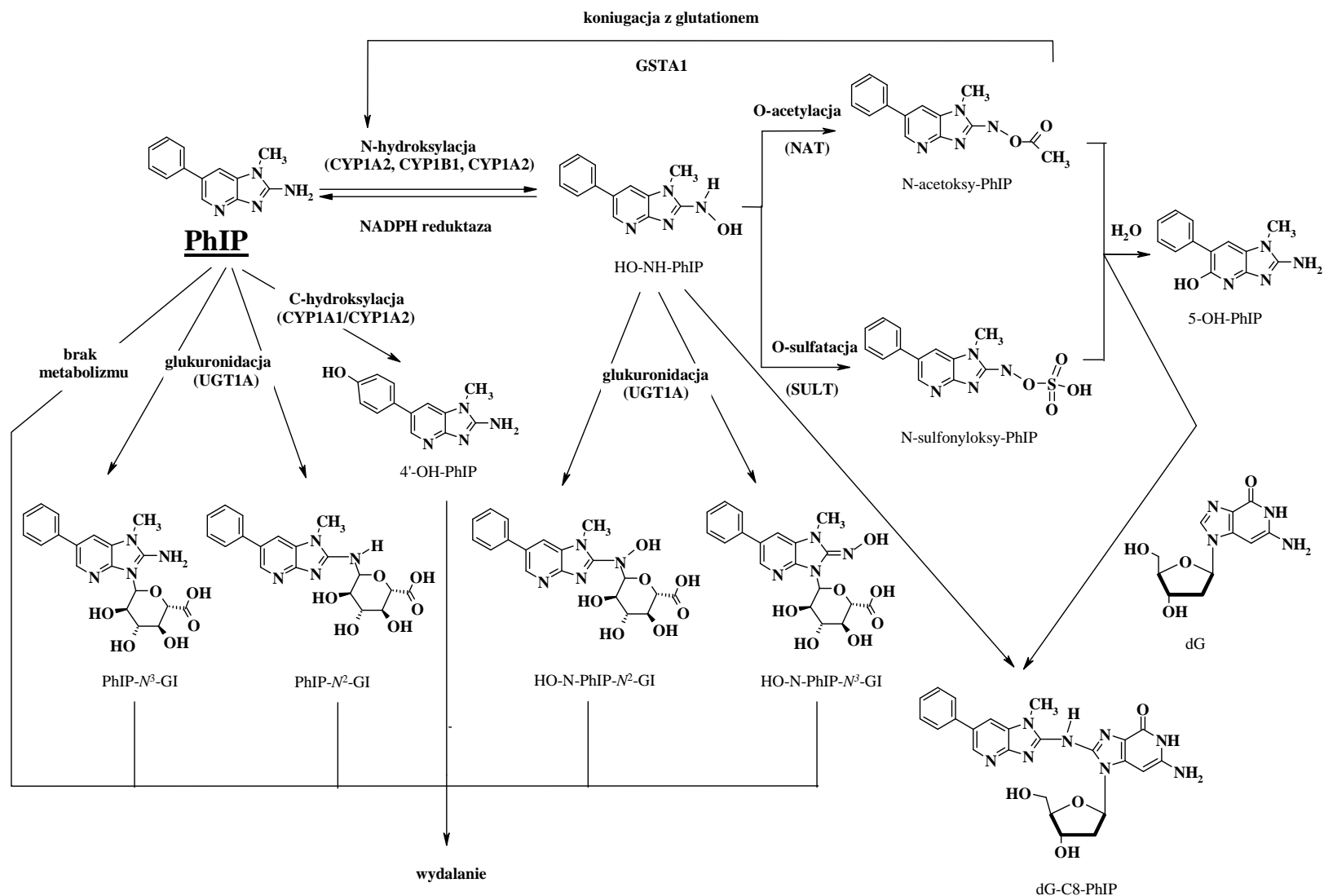
obróbce termicznej, metabolizm tych właśnie związków zbadano szczegółowo *in vitro* przy wykorzystaniu tkanek [76, 77], oczyszczonych i rekombinantowych enzymów [78, 79, 80] oraz hepatocytów [81], a także *in vivo* z wykorzystaniem organizmów zwierzęcych [82, 83] i ludzkich [5, 84]. Główne szlaki metabolizmu MeIQx i PhIP w organizmie ludzkim są przedstawione na rysunkach 3 i 4.

Jak w przypadku większości związków genotoksycznych, właściwości mutagenne i rakotwórcze związków z grupy HAA ujawniają się po aktywacji metabolicznej w organizmie, prowadzącej do powstania elektrofilowych pochodnych zdolnych do kowalencyjnego wiązania się z centrami nukleofilowymi w DNA. Główne produkty detoksykacji heterocyklicznych amin aromatycznych powstają w wyniku reakcji utlenienia pierścienia heterocyklicznego i grupy metylowej. Heterocykliczne aminy aromatyczne są aktywowane w wyniku N-hydroksylacji egzocyklicznej grupy aminowej katalizowanej głównie przez cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) w wątrobie [85] i przez P450 1A1 (CYP1A1) oraz P450 1B1 (CYP1B1) w tkankach pozawątrobowych [2, 75, 86] z utworzeniem pochodnych N-hydroksy-HAA [46]. Izoenzym CYP1A2 katalizuje również reakcje detoksykacji PhIP i MeIQx z utworzeniem odpowiednio 2-amino-4'-hydroksy-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-*b*]-pirydyny (4'-HO-PhIP) [87] i kwasu 2-amino-3-metyloimidazo[4,5-*f*]chinoksalino-8-karboksylowego (IQx-8-COOH) [81]. Ten ostatni metabolit jest głównym produktem detoksykacji MeIQx w hepatocytach [81] i w organizmie ludzkim [88]. Godne uwagi jest to, że IQx-8-COOH wydaje się nie powstawać w organizmach gryzoni oraz innych przedstawicieli zwierząt naczelnych [81].

Powstające pochodne N-hydroksy-HAA mogą bezpośrednio reagować z DNA, jednak zwykle ulegają dalszej reakcji sulfatacji lub acetylacji z udziałem enzymów II fazy odpowiednio sulfotransferazy 1A1 (SULT1A1) [89] i N-acetylotransferaz (NAT) [90]. Enzymy z grupy NAT kodowane są u człowieka przez geny *NAT1* i *NAT2*, przy czym produkt ostatniego z nich uczestniczy częściej jako katalizator w aktywacji biologicznej związków z grupy HAA. N-hydroksylowane metabolity PhIP i AαC są aktywowane przez obie izoformy [75]. Izoenzym NAT2 zaangażowany jest zarówno w N-acetylację związków z grupy HAA, jak i O-acetylację ich N-hydroksylowanych pochodnych. Ogólnie proces N-acetylacji stanowi mechanizm detoksykacji, natomiast O-acetylacja prowadzi do aktywacji heterocyklicznych amin aromatycznych [90]. W przypadku enzymu SULT, również kilka izoform bierze udział w aktywacji biologicznej związków z grupy HAA u człowieka. Izoenzym SULT1A1 jest jednak



Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie głównych szlaków aktywacji metabolicznej MeIQx w organizmie ludzkim [88]



Rysunek 4 Schematyczne przedstawienie głównych szlaków aktywacji metabolicznej PhIP w organizmie ludzkim [88Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.]

najaktywniejszą izoformą w katalizie wspomnianych substancji, w tym N-hydroksyloowanej pochodnej PhIP i MeA α C [91].

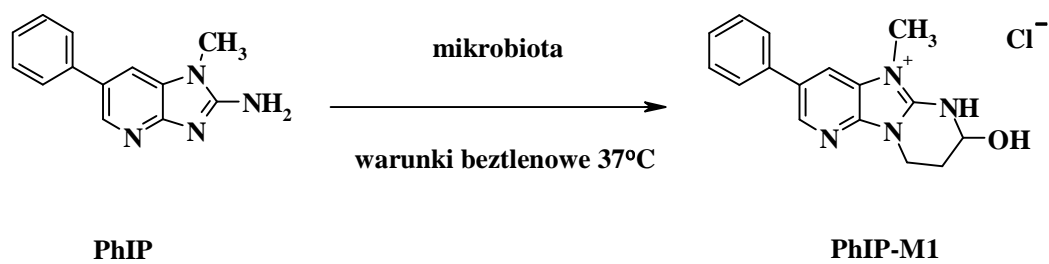
Estry powstałe w wyniku reakcji sulfatacji i acetylacji, są wysoce niestabilnymi elektrofilami zdolnymi do reakcji z DNA [75, 92] oraz białkami [2, 93], natomiast w przypadku PhIP mogą one samorzutnie ulec redukcji do 2-amino-1-metylo-6-(5-hydroksy)fenyloimidazo[4,5-*b*]pirydyny (5-HO-PhIP) [94]. W wyniku wiązania się estrów z DNA powstają addukty DNA, które wskutek tej reakcji mogą powodować mutacje [46, 95]. Drogą detoksykacji reaktywnych estrów utworzonych w wyniku N-acetylacji heterocyklicznych amin aromatycznych jest ich redukcja z udziałem transferazy S-glutationowej (GST) do źródłowej aminy. Przy czym izoenzym GSTA1 jest najaktywniejszym katalizatorem przyłączenia zredukowanej formy cząsteczki glutationu do tych potencjalnie genotoksycznych związków (rysunek 3 i 4) [96].

Hydroksylowane metabolity mogą także ulegać biokoniugacji przez sulfatację i glukuronidację z udziałem enzymów II fazy, odpowiednio sulfotransferazy i UDP-glukuronozylotransferazy (UGT) [97], prowadzących do utworzenia polarnych związków, które są łatwo wydalane z żółcią czy też moczem [82]. Mogą one również zostać przetransportowane do dróg żółciowych, gdzie zachodzą dalsze etapy metabolizmu [2]. Między innymi możliwa jest detoksykacja w wyniku redukcji N-hydroksyloowanych pochodnych heterocyklicznych amin aromatycznych do źródłowych amin przebiegającej z udziałem reduktazy NADPH [75].

Reakcja N-glukuronidacji może być reakcją konkurencyjną w stosunku do reakcji acetylacji i sulfatacji odpowiedzialnych za aktywację związków z grupy HAA [98]. Wiadomo także, że aktywność enzymu UGT wobec PhIP i HO-NH-PhIP występuje w ludzkiej wątrobie i mikrosomach okrężnicy [83, 81]. Wyniki badań parametrów kinetycznych glukuronidacji N-hydroksyloowanych pochodnych PhIP dla różnych izoform enzymu UGT wskazują, że najaktywniejsza biologicznie jest izoforma UGT1A1 [98]. Glukuronidacja, szczególnie w pozycji N2 i N3, stanowi istotną drogę detoksykacji heterocyklicznych amin aromatycznych, bowiem utworzone w jej wyniku polarne, nieaktywne związki są usuwane wraz z moczem [99, 100, 101]. Natomiast tylko kilka procent z całej puli dostarczanych do organizmu z pożywieniem związków z grupy HAA jest wydalanych w niezmienionej formie wraz z moczem po 12 h od konsumpcji mięsa poddanego obróbce termicznej [102, 103].

Również glukuronidacja i sulfatacja egzocyklicznej grupy aminowej kilku heterocyklicznych amin aromatycznych katalizowana przez enzymy odpowiednio UGT

i SULT prowadzi do utworzenia produktów detoksykacji. Natomiast N-acetylacja jest ważnym mechanizmem detoksykacji pierwszorzędowych aryloamin [104], nie jest jednak znaczącą drogą detoksykacji związków z grupy HAA zawierających ugrupowanie N-metyloaminoimidazolowe, chociaż enzym NAT katalizuje detoksykację AαC i kilku innych pirolitycznych heterocyklicznych amin aromatycznych [75]. Podczas gdy układ enzymatyczny uczestniczy w aktywacji bądź detoksykacji biologicznej związków z grupy HAA prowadząc do utworzenia wielu pochodnych, jelitowe mikroorganizmy w organizmie człowieka uczestniczą w powstawaniu jednego głównego metabolitu – chlorku 7-hydroksy-5-metylo-3-fenyl-6,7,8,9-tetrahydropirydo[3',2',4,5]-imidazo[1,2-α]pirymidyn-5-owego (PhIP-M1) (rysunek 5) [105,106]. Metabolit ten oznaczono w ludzkim moczu [107].



Rysunek 5. Schemat powstawania metabolitu PhIP - chlorku 7-hydroksy-5-metylo-3-fenyl-6,7,8,9-tetrahydropirydo[3',2',4,5]imidazo[1,2- α]pyrimidyn-5-owego (PhIP-M1) tworzącego się w organizmie człowieka z udziałem mikroorganizmów jelitowych u człowieka [105]

Charakter zachodzących reakcji metabolicznych w dużym stopniu zależy od specyficzności enzymów uczestniczących w metabolizmie ksenobiotyków (XME) i aktywności enzymów I i II fazy [46]. W organizmie człowieka, ponad 15 enzymów jest zaangażowanych w proces metabolizmu heterocyklicznych amin aromatycznych. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach kodujących enzymy cytochromu P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6), S-transferaza glutationowa (GSTM1, GSTA1, GSTM3, GSTP1, GSTT1), UDP-glukuronozylotransferazy (UGT1A), sulfotransferazy (SULT1A1 i SULT1A2) i N-acetylotransferazy (NAT1, NAT2) może skutkować zróżnicowanym metabolizmem heterocyklicznych amin aromatycznych z utworzeniem różnych produktów pośrednich [108]. Polimorfizm w genach CYP1A2 i NAT2 (zidentyfikowano ok. 40 alleli) w populacji ludzkiej wiąże się z różnicami w aktywności kodowanych enzymów u poszczególnych osób i specyficzną zdolnością metaboliczną. W populacji ludzkiej można wyróżnić dwie odmienne fenotypowo grupy wykazujące zdolność do szybkiego

i wolnego przebiegu procesu N-utleniania i O-acetylacji (ang. *slow and rapid N-oxidizers and O-acetylators*) [109]. Ponieważ zarówno enzymy I i II fazy uczestniczą w aktywacji biologicznej związków z grupy HAA, teoretycznie większe ryzyko wystąpienia szkodliwych skutków zdrowotnych może wystąpić u osób ze zdolnością organizmu do szybkiego przebiegu procesu zarówno utleniania, jak i acetylacji. Podwyższone ryzyko rozwoju nowotworów dostrzeżono tylko u osób, których organizmy wykazują zdolność do szybkiego procesu utleniania, jak i acetylacji heterocyklicznych amin aromatycznych i częściej konsumują produkty zawierające duże ilości tych związków [110].

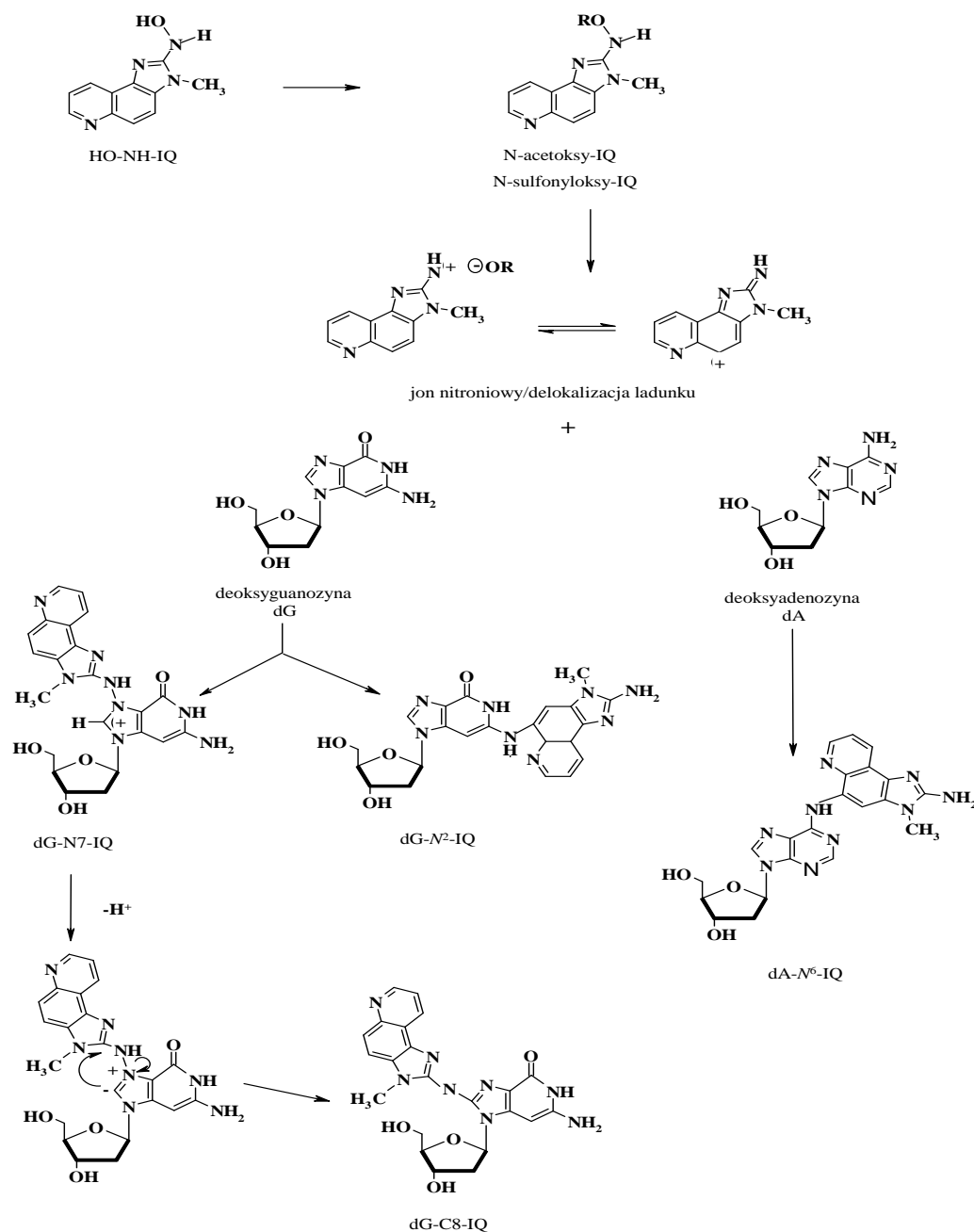
W obrębie różnych gatunków występują także różnice w aktywności katalitycznej i regioselektywności enzymów wątrobowych biorących udział w metabolizmie PhIP i MeIQx [81]. Wydajność katalityczna ludzkiego izoenzymu CYP1A2 jest większa niż izoenzymu szczurzego w przypadku reakcji N-utleniania MeIQx i PhIP. Międzygatunkowe różnice w aktywności CYP1A2 są wysoce zależne od struktury substratu [46]. Szczurzy izoenzym CYP1A2 nie katalizuje reakcji tworzenia IQx-8-COOH, jednak katalizuje proces detoksykacji 8-MeIQx przez C-5 hydroksylację [87]. Poziom ekspresji tego białka w ludzkiej wątrobie jest ogólnie 10-krotnie większy niż w wątrobie gryzoni [46]. Z tych względów porównanie aktywności katalitycznej, regioselektywności i poziomów ekspresji CYP1A2 oraz innych izoenzymów pomiędzy różnymi gatunkami jest niezbędne w ocenie ryzyka zdrowotnego człowieka wynikającego z narażenia na związki z grupy HAA [111, 112].

Warianty genetyczne enzymów wpływają w różny sposób na metabolizm związków z grupy HAA i w ten sposób również na konsekwencje zdrowotne dostarczania tych związków wraz z mięsem np. na rozwój nowotworu. W związku z tym predyspozycje genetyczne w połączeniu z obecnością heterocyklicznych amin aromatycznych w diecie wspólnie stanowią o zagrożeniu nowotworowym u danej osoby.

3.2. Wiązanie się heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) z DNA

Rakotwórcze właściwości związków z grupy HAA wiążą się ze zdolnością ich metabolitów do tworzenia kowalencyjnych adduktów z DNA, określanych jako uszkodzenia promutagenne, bowiem bez skutecznego zadziałania mechanizmów naprawczych mogą prowadzić do powstania mutacji podczas replikacji DNA [113]. Utrzymujące się uszkodzenia DNA w komórkach mogą powodować różnego rodzaju

mutacje genowe czy aberracje chromosomalne, przyczyniające się do uzłośliwienia komórek i rozwoju chorób nowotworowych [114]. Addukty HAA-DNA powstają głównie w wyniku reakcji estrów N-hydroksy-HAA i atomu C-8 deoksyguanozyny (dG) z utworzeniem adduktów dG-C8-HAA. Wspomniana reakcja przebiega z udziałem reaktywnego jonu nitroniowego jako produktu pośredniego [92]. W przypadku IQ i 8-MeIQx addukty DNA tworzą się również z udziałem grupy aminowej deoksyguanozyny i atomu C-5 pierścienia heterocyklicznego z jednoczesną delokalizacją ładunku jonu nitroniowego na heterojądrowych cząsteczkach heterocyklicznych amin aromatycznych [115] (rysunek 6).



Rysunek 6. Mechanizm tworzenia się adduktów IQ z purynami występującymi w DNA [46, 110]

Ilość adduktów dG-N2 obserwowana w wyniku zastosowania metod biomimetycznych *in vitro* w systemach bezkomórkowych jest niewielka w stosunku do izomerów dG-C8. Uważa się jednak, że trwałe *in vivo* addukty dG-N2 są powodem znacznych uszkodzeń w tkankach szczurów i naczelnych podczas przewlekłego narażenia na IQ lub w następstwie różnego poziomu jednorazowego narażenia na 8-MeIQx [115].

Ostatnio, w trakcie badania reaktywności wspomnianych dwóch związków z grupy HAA – PhIP i MeIQx w stosunku do deoksynukleozydów, oprócz znanych adduktów dG-C8-PhIP, dG-C8-IQ i dG-N²-IQ, zidentyfikowano nieznane dotąd addukty - dG-N7-IQ i dA-N⁶-IQ (rysunek 6). Wykrycie obecności adduktów dA-N⁶-IQ wskazuje na możliwość tworzenia się adduktów DNA z zasadą inną niż deoksyguanozyna. Powstają one w wyniku utworzenia wiązania między atomem N6 grupy aminowej deoksyadenozyny (dA) i atomem C5 aromatycznego atomu węgla IQ [116]. Wspomniana informacja może przyczynić się do lepszego zrozumienia mutacji w obrębie pary zasad AT *in vivo* [117], które nie są związane z tworzeniem się adduktów z dG. Natomiast drugi nowy addukt dG-N7-IQ [118] powstaje z udziałem atomu azotu grupy aminowej IQ i atomu N7 deoksyguanozyny. Następnie w wyniku przegrupowania powstaje addukt dG-C8-IQ (rysunek 6). Przedstawiony mechanizm stanowi jedyną drogę tworzenia się adduktu dG-N7 bez destabilizacji wiązania glikozydowego prowadzącej do reakcji depurynacji [119]. Wiązanie się PhIP z atomem N7 deoksyguanozyny zaproponowano także w przypadku adduktów wykrytych *in vivo* u szczurów [118].

Wiele adduktów DNA tworzonych przez metabolity PhIP [120, 121] i MeIQx [122] wykryto w takich ludzkich tkankach jak nerki [123], żołądek [2], prostata [124, 125] czy odbył [126]. Addukt dG-C8-MeIQx występował u kilku osób w DNA komórek okrężnicy na poziomie kilku adduktów na 10⁹ zasad DNA [127]. Doniesienia literaturowe wskazują także na powstawanie adduktów dG-C8-PhIP w tkance gruczołu piersiowego na poziomie mniej niż 1 addukt na 10⁷ zasad [123]. Tą samą modyfikację guaniny, w ilości średnio 4,7 adduktów/10⁷ nukleotydów, dostrzeżono w komórkach nabłonka złuszczonego z mlekiem karmiących matek w 30 na 64 próbek badanych z wykorzystaniem metody analizy hydrolizatów DNA znakowanych ³²P-γ-ATP na końcu 5' (tzw. metoda ³²P-*postlabeling*) [121]. Niepokojące jest, że związki z grupy HAA obecne w żywności są natychmiast wydzielane do mleka karmiących matek i mogą przez to powodować powstawanie adduktów DNA w wątrobie noworodków [46].

W wyniku tworzenia się adduktów DNA-HAA zachodzą zmiany konformacyjne w DNA, które mogą mieć konsekwencje biologiczne, wpływając na zmianę właściwości polimeraz DNA i efektywność naprawy DNA [113]. Addukty, które występują głównie w konformacji *syn* mogą wywołać większe odkształcenie helisy DNA w miejscu przyłączenia kancerogenu niż addukty istniejące w normalnie występującej konformacji DNA - *anty*, łatwiej rozpoznawanej oraz usuwanej enzymatycznie. W celu wyjaśnienia wpływu uszkodzeń DNA przez związki z grupy HAA na strukturę kwasów nukleinowych wykorzystano oligonukleotydy w postaci 11-merowego dupleksu zawierającego addukt C8-dG utworzony w wyniku reakcji z N-acetoksy-PhIP. Zaobserwowano istnienie konformacji *syn* i powolną zmianę konformacyjną, podczas której ligand PhIP albo interkaluje do helisy DNA w trakcie procesu denaturacji (główna forma) albo jest położony na zewnątrz helisy minimalnie zakłócając dupleks B-DNA (podrzędna forma) [128]. Równowaga konformacyjna jest uzależniona od topologii pierścienia [113]. Addukt dG-C8 występuje w konformacji *syn*, natomiast addukt dG-N2 jest obserwowany w konformacji *anty* [87]. Istnieją doniesienia, że w przypadku adduktu IQ, ustala się równowaga między dwiema konformacjami [129, 130, 131].

Ilość adduktów DNA jest nieznacznie wyższa u osób palących papierosy oraz spożywających duże ilości mięsa niż u osób, które spożywały mięso mniej niż 5 razy tygodniowo [46].

3.3. Działanie mutagenne heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) *in vitro*

Działanie mutagenne heterocyklicznych amin aromatycznych określano przy użyciu bakteryjnego testu mutagenności - testu Ames [6], pozwalającego na ocenę zdolności tych związków do indukowania mutacji powrotnych z histydynowej autotrofii do prototrofii w wielu specjalnie skonstruowanych zmutowanych szczepach *Salmonella thypimurium*. W przypadku promutagenów, bakterie są poddawane działaniu testowanych substancji w obecności frakcji mikrosomalnej (na ogół izolowanej z wątroby szczura), umożliwiającej ich metaboliczną aktywację [132].

Wśród związków z grupy HAA, najsilniejszymi mutagenami w teście Ames okazały się być MeIQ, IQ i 8-MeIQx [6]. Potencjał mutageny PhIP był około 100 razy słabszy niż MeIQx, kiedy użyto do aktywacji frakcji mikrosomalnej S9 wyizolowanej z wątroby szczura [133]. Związek PhIP w znacznie większym stopniu ulega utlenieniu pod wpływem mikrosomów lub szczurzych cytochromów P450 głównie izoenzymów

CYP1A1 i CYP1A2 [134]. Harman i norharman często są określane jako związki ko-mutagenne. Nie wykazują one właściwości mutagennych w teście Ames. Jednak mają wpływ na wzrost aktywności mutagennej innych związków, m.in. norharman podwyższa częstość mutacji wywołanych działaniem Trp-P-1 i Trp-P-2 [135]. W związku z tym, nie powinno się ignorować obecności harmanu i norharmanu w żywności poddanej obróbce termicznej [4].

Heterocykliczne aminy aromatyczne u bakterii *Salmonelli typhimurium* indukują głównie mutacje ramki odczytu i niekiedy również mutacje punktowe [136]. Silna tendencja wspomnianych związków z grupy HAA do indukowania rewersji mutacji *his⁻* u szczepów *Salmonella typhimurium* TA98 i TA1538 jest przypisywana preferencji tych związków do wiązania się w obrębie 9 par zasad końca 5' oryginalnej delekcji CG w genie *hisD⁺*. [137]. Wspomniana sekwencja nie stanowi miejsca wiązania w przypadku PhIP i innych tricyklicznych heterocyklicznych amin aromatycznych [19]. Mutacja jest bowiem konsekwencją obecności adduktów dG-HAA, które mogą doprowadzić do delekcji CG podczas naprawczej syntezy DNA. Stosunkowo wysoki potencjał mutageny związków z grupy HAA określany w trakcie badań z wykorzystaniem testu Ames może również być związany z ekspresją enzymu O-acetylotransferazy (OAT) w szczepach *Salmonella typhimurium*, takich jak YG1012, YG1021 i YG1024 [138]. Enzym OAT skutecznie aktywuje promutagenne N-hydroksy-HAA tworząc wysoce reaktywne N-acetoksy produkty pośrednie, wiążące się łatwo z DNA.

Zdolność wywoływania mutacji kilku heterocyklicznych amin aromatycznych, w tym IQ i MeIQx, które ulegają aktywacji z udziałem OAT, jest znacznie niższa przy niskiej aktywności tego enzymu w szczepach *Salmonella typhimurium* TA98/1,8DNP6 [139]. Natomiast szczep *Salmonella typhimurium* YG1024, który charakteryzuje się podwyższonym poziomem OAT [140] jest znacznie bardziej wrażliwy na skutki genotoksyczne kilku aktywowanych przez ten enzym związków z grupy HAA, takich jak 6-MeIQx, 7-MeIQx, 7,9-MeIQx, 8-MeIQx i PhIP niż szczep TA98 [19] (tabela 3). W przypadku szczepu *Salmonella typhimurium* TA1538/1,8-DNP nie wykazującym aktywności acetylotransferazy, za aktywację jest odpowiedzialna sulfotransferaza fenolowa 1A1 katalizująca przemianę N-OH-PhIP do mutagennych produktów pośrednich. Enzymy tego typu ulegają ekspresji także w ludzkiej wątrobie i okrężnicy [141, 142].

Tabela 3. Potencjał mutageny heterocyklicznych amin aromatycznych w szczepach *Salmonella typhimurium* TA98 i YG1024 [19]

Związek z grupy HAA	Liczba rewertantów / μg	
	TA98	YG1024
6-MeIQx	6	46
7-MeIQx	22	348
7,9-MeIQx	638	2 420
PhIP	931	3 110
8-MeIQx	117 000	1 400 000

Ocena uszkodzeń DNA indukowanych przez heterocykliczne aminy aromatyczne jest możliwa przy użyciu testu opierającego się na indukcji procesu naprawy DNA systemem SOS w szczepie *Salmonella typhimurium* NM2009, który charakteryzuje się wysoką aktywnością OAT i zawiera sekwencje regulatorową *umuC* dla genu reporterowego *lacZ*. Dostępne są także tzw. humanizowane szczepy. Stosując metody inżynierii genetycznej uzyskano w nich ekspresję ludzkich izoenzymów cytochromu P450, reduktazy cytochromu P450 zależnej od NADPH i OAT [143]. Szczepy te są wysoce wrażliwe w stosunku do kilku związków z grupy HAA i dzięki ich wykorzystaniu w prosty sposób i w krótkim czasie można uzyskać wyniki lepiej obrazujące rzeczywiste zagrożenie człowieka. Stosowano również szczepy *Salmonella typhimurium* TA1538 z koekspresją ludzkiego cytochromu P450 izoformy CYP1A1 oraz CYP1A2 i reduktazy cytochromu P450 zależnej od NADPH [144].

Potencjał mutageny heterocyklicznych amin aromatycznych ściśle zależy od struktury chemicznej i zdolności do tworzenia reaktywnego jonu nitroniowego w wyniku N-utleniania [145]. Pomimo, że mutagenność poszczególnych związków z grupy HAA różni się ponad 1000-krotnie w przypadku stosowania testów bakteryjnych, taka różnica nie występuje w przypadku komórek linii jajnika chomika CHO, gdzie aktywność genotoksyczna jest na podobnym poziomie [87, 146]. Rozbieżności między zdolnością związków z grupy HAA do uszkodzania DNA w różnych testach *in vitro* są związane z odmiennymi egzogennymi i endogennymi systemami metabolicznej aktywacji, różnymi zdolnościami naprawy adduktów DNA, różnicami w sekwencji docelowych zasad azotowych i sąsiednich. Wszystkie te czynniki wpływają na częstość mutacji. Przykładem mogą być wyniki badań, w których komórki HepaRG traktowano przez 24 h aminami MeIQx i PhIP. Okazało się, że jedynie w przypadku tej ostatniej zauważono powstawanie uszkodzeń DNA pomimo,

że obie aminy wykazują silny potencjał mutageny określony na podstawie wyników badań z wykorzystaniem testu Ames. Stwierdzono również, że obecność MeIQx może czasami znosić genotoksyczność PhIP. Hamujący efekt związany jest ze znacznym spadkiem aktywności izoenzymu CYP1A2, który jest odpowiedzialny za aktywację PhIP do genotoksycznych pochodnych [112].

Potencjał mutageny heterocyklicznych amin aromatycznych może być znacznie podwyższony w przypadku genetycznie modyfikowanych komórek ssaków o podwyższonej ekspresji enzymów II fazy, takich jak NAT2 albo SULT1A1, zaangażowanych w biologiczną aktywację związków z grupy HAA [91, 146]. Jak to wcześniej podkreślano, także u ludzi podwyższona ekspresja tych enzymów może skutkować zwiększonym zagrożeniem ze strony heterocyklicznych amin aromatycznych.

3.4. Wiązanie się heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) z białkami

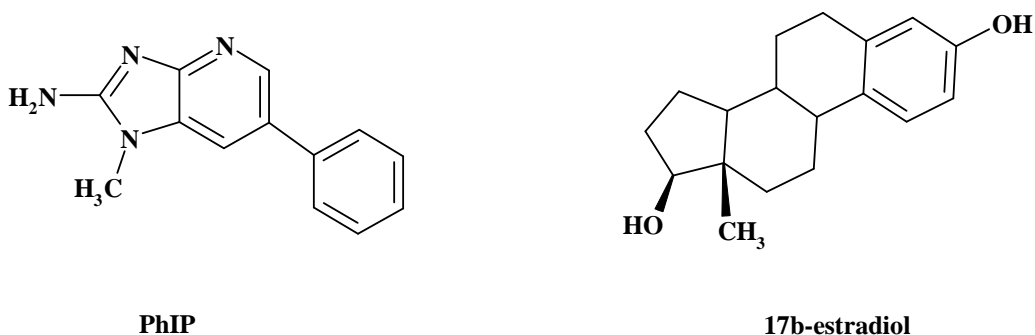
2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina (MeIQx) tworzy addukty z albuminą (SA), które stanowią biomarker narażenia i aktywacji biologicznej związków z grupy HAA. W grupie ochotników badano proces wiązania kowalencyjnego pomiędzy związkiem MeIQx dostarczanym wraz z pożywieniem z albuminą i hemoglobina (Hb). Poziom adduktów HAA-białka tworzących się u ludzi po 4 godzinach od konsumpcji porównano z danymi uzyskanymi dla szczurów F344. Addukt MeIQx-SA tworzył się w największej ilości w organizmach ludzkich [147]. Jednakże, w badaniach PhIP prowadzonych *in vitro* z albuminą surowicy szczura i *in vivo* z wykorzystaniem szczurów Fischer 344 z zastosowaniem wysokiej dawki 0,1; 0,5; 1 i 10 mg/kg masy ciała, wykazano, że addukty PhIP-białko we krwi są niestabilne i w związku z tym stanowią niezbyt przydatny biomarker. W badaniach, w których wykorzystano szczury testowano również addukty PhIP i globiny (Gb). Poziom adduktów PhIP-SA i PhIP-Gb wzrastał liniowo wraz ze wzrostem dawki. Wyniki badań przeprowadzonych z udziałem 35 ochotników pokazały wpływ różnych żywieniowych zwyczajów na tworzenie się obu adduktów. Poziom adduktów PhIP-SA jest znacznie wyższy u konsumentów mięsa niż u wegetarian ($6,7 \pm 1,6$ i $0,7 \pm 0,3$ fmole/mg SA), natomiast ilość tworzących się adduktów PhIP-Gb jest niższa w porównaniu z SA ($3,0 \pm 0,8$ u konsumentów mięsa i $0,3 \pm 0,1$ fmole/mg u wegetarian). Nie zauważono żadnej różnicy w zawartości PhIP - SA u palaczy i osób niepalących papierosów [148].

W trakcie innych badań przeprowadzonych również z udziałem ochotników stwierdzono, że addukty PhIP-SA i PhIP-Hb tworzą się w ilości odpowiednio $11,52 \pm 9,29$ fmole PhIP/g białka i $0,22 \pm 0,13$ fmole PhIP /g białka oraz $11,52 \pm 9,29$ i $0,22 \pm 0,13$ pmole PhIP/kg masy ciała, przy czym połączenia PhIP-SA są znacznie silniejsze niż PhIP-Hb. Porównanie profili tworzenia się adduktów SA i Hb w czasie wskazało na różnice między poszczególnymi osobami. Poziom zawartości adduktów SA i Hb u większości osób zwiększał się stopniowo wraz z czasem ze stabilizacją po okresie 12 godzin [149].

3.5. *Heterocykliczne aminy aromatyczne (HAA) jako związki zaburzające gospodarkę hormonalną*

Związki wpływające na stan równowagi hormonalnej w organizmach żywych wpływają na funkcję układu endokrynnego przez naśladowanie albo blokowanie działania hormonów, zmieniając sygnalizację zależną od hormonów lub zakłócając ich biosyntezę [150]. Sugeruje to, że heterocykliczne aminy aromatyczne jako związki zaburzające gospodarkę hormonalną mogą prowadzić do powstawania nowotworów okrężnicy, żołądka i piersi [151].

Estrogeny grają decydującą rolę w regulowaniu wzrostu, różnicowania i funkcjonowaniu tkanek rozrodczych. Główny estrogen stymulujący podziały komórkowe – 17β -estradiol – w pewnych warunkach może stanowić czynnik ryzyka rozwoju nowotworów [152]. W przypadku PhIP i estradiolu można znaleźć pewne podobieństwa strukturalne, co sugeruje, że PhIP może mieć efekt estrogeny [133, 153] (rysunek 7).



Rysunek 7. Struktura molekularna PhIP i 17β -estradiolu

Wyniki przeprowadzonych badań rzeczywiście wskazują, że PhIP wykazuje aktywność estrogeną w niskich stężeniach [154, 155]. Jednakże dane literaturowe dotyczące takiego działania PhIP i przypuszczalnego mechanizmu są często sprzeczne. Istnieją doniesienia na temat znacznego wpływu PhIP na wzrost intensywności rozmnażania komórek poprzez aktywację receptora estrogenu α (ER- α) w ER- α pozytywnych komórkach nowotworu piersi MCF-7 [154]. Natomiast wyniki przedstawione w innych pracach [153] wskazują na tylko nieznaczną stymulację proliferacji tych komórek przez PhIP. Podobnie *in vivo* z jednej strony stwierdzono, że PhIP wpływa na szybkość rozmnażania się komórek prostaty u szczurów [156], natomiast wyniki innych badań [157] nie potwierdzają endokrynej aktywności tego związku w macicy szczura.

Inne wyniki wskazują, że estrogeny efekt PhIP może być związany z innym mechanizmem niż łączenie się z ER [158]. Okazało się bowiem, że PhIP wpływa na wzrost proliferacji komórek gruczołu sutka ER-negatywnych MCF10A oraz migrację komórek nowotworu prostaty PC-3 wskutek mechanizmu niezależnego od ER poprzez aktywację szlaku sygnalizacyjnego z udziałem kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK) oraz zewnątrzkomórkowej sygnalizacji związanej ze szlakiem kinaz ERK. Związek PhIP wywołuje szybki, przejściowy wzrost fosforylacji zarówno kinaz MAPK / ERK 1/2 jak i ERK [159].

Wobec silnego związku między estrogenem, progesteronem, prolaktyną i nowotworem piersi, potencjalna aktywność hormonalna PhIP stanowi dodatkowy mechanizm odpowiedzialny za rakotwórcze właściwości tego związku [154].

4. Zagrożenie chorobami nowotworowymi wynikające ze spożywania heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA)

Wyniki licznych badań wskazują na mutageny i rakotwórczy charakter heterocyklicznych amin aromatycznych [160]. Jednocześnie wyniki badań epidemiologicznych wskazują na zwiększone ryzyko rozwoju pewnych nowotworów wśród osób preferujących dietę bogatą w produkty mięsne, będące źródłem związków z grupy HAA. W związku z tym poza sprecyzowaniem zależności pomiędzy narażeniem na te związki a rozwojem nowotworów, wiele ośrodków badawczych podjęło próby oceny ochronnego wpływu innych spożywanych równocześnie substancji w celu niwelowania niekorzystnego działania heterocyklicznych amin aromatycznych.

4.1. *Badania in vivo*

Heterocykliczne aminy aromatyczne wykazują właściwości rakotwórcze w stosunku do gryzoni i indukują powstawanie nowotworów w wielu organach, takich jak jama ustna, wątroba, jelito cienkie, okrężnica, żołądek, płuco, gruczoł Zembala, skóra, naczynia krwionośne, pęcherz moczowy i prostata oraz gruczoł sutkowy podczas przedłużonego okresu karmienia gryzoni poddanym obróbce termicznej mięsem [6, 161, 162, 163, 164]. Rakotwórczy potencjał związków z grupy HAA u gryzoni waha się ~ 10-krotnie w zależności od gatunku i atakowanego organu. Informacje na temat wielkości dawki toksycznej oraz miejsca docelowego związków z grupy HAA u gryzoni zestawiono w tabeli 4.

W przypadku gryzoni dostępne są wyniki licznych badań, natomiast dla zwierząt naczelnych można znaleźć dane tylko dla IQ. Amina IQ okazała się być silnym kancerogenem prowadzącym do rozwoju raka wątroby u małp. Indukcja guza występowała w ciągu kilku lat traktowania tych zwierząt wspomnianym kancerogenem [6].

Dostępnych jest wiele danych literaturowych dotyczących mechanizmu mutagenności heterocyklicznych amin aromatycznych w badaniach *in vivo*, wynikającej z tego aktywacji onkogenów (*H-ras*, *Ki-ras*) i wyciszenia genów supresorów nowotworów (*apc*, *p53*) [165]. Mutacje wywołane przez MeIQ, IQ i PhIP w kilku znanych genach, odpowiedzialnych za rozwój nowotworów zostały scharakteryzowane u gryzoni [166]. Tytułem przykładu można podać, że ustalone genetyczne zmiany wśród genów z rodziny *ras* są rzadkie w przypadku nowotworu gruczołu okrężnicy u szczura. W żołądku myszy i gruczole Zymbala szczura zaobserwowano transwersję G→T w kodonie 13 na drugiej pozycji genu *H-ras* wywołaną przez MeIQ. Natomiast IQ ma zdolność indukcji wielu typów mutacji w genach rodziny *ras* - *H-ras*, *Ki-ras* oraz *p53* w gruczole Zymbala szczura [167].

Wyniki badań epidemiologicznych sugerują, że związki z grupy HAA spożywane z mięsem u ludzi mają wpływ na zwiększenie ryzyka wystąpienia nowotworów żołądka, jelita grubego, płuc, trzustki, piersi [168], odbytu [169] i prostaty [154]. Konsumpcja heterocyklicznych amin aromatycznych przez człowieka mieści się w zakresie od 1 µg do więcej niż 50 µg dziennie [170]. Należy przy tym podkreślić, że ludzie narażeni są zwykle na działanie nie pojedynczych substancji, ale mieszaniny związków z grupy HAA. Jednakże, efekty toksyczności i związane z tym mechanizmy

narażenia ze strony mieszaniny heterocyklicznych amin aromatycznych

Tabela 4. Informacje literaturowe na temat kancerogenności heterocyklicznych amin aromatycznych [6, 165]

Związek	Model (rasa gryzoni)	Organ docelowy	Stężenie w diecie (ppm)	TD (mg/kg masy ciała/dzień)
Trp-P-1	Szczury (F344)	Wątroba	150	0,1
	Myszy (CDF ₁)	Wątroba	200	8,8
Trp-P-2	Szczury (F344)	Wątroba, pęcherz moczowy	100	-
	Myszy (CDF ₁)	Wątroba	200	2,7
Glu-P-1	Szczury (F344)	Wątroba, jelito cienkie i grube, gruczoł Zymbala, żołądź łechtaczki	500	0,8
	Myszy (CDF ₁)	Wątroba, naczynia krwionośne	500	2,7
Glu-P-2	Szczury (F344)	Wątroba, jelito cienkie i grube, gruczoł Zymbala, żołądź łechtaczki	500	5,7
	Myszy (CDF ₁)	Wątroba, naczynia krwionośne	500	4,9
AαC	Szczury (F344)	Brak guza	800	-
	Myszy (CDF ₁)	Wątroba, naczynia krwionośne	800	-
MeαC	Szczury (F344)	Wątroba	200; 100	6,4
	Myszy (CDF ₁)	Wątroba, naczynia krwionośne	800	5,8
IQ	Szczury (F344)	Wątroba, jelito cienkie i grube, gruczoł Zymbala, żołądź łechtaczki, skóra, jama	300	0,7
	Myszy (CDF ₁)	Wątroba, żołądek, płuca, jelito grube	300	14,7
MeIQ	Szczury (F344)	Gruczoł Zymbala, jelito grube, gruczoł sutkowy, skóra, jama ustna	300	0,1
	Myszy (CDF ₁)	Wątroba, żołądek	400; 100	8,4
MeIQx	Szczury (F344)	Wątroba, gruczoł Zymbala, gruczoł sutkowy, skóra	400	0,7
	Myszy (CDF ₁)	Wątroba, płuca, układ krwiotwórczy	600	11,0
PhIP	Szczury (F344)	Jelito grube, gruczoł sutkowy, prostata, tkanka limfatyczna	400	2,2
	Myszy (CDF ₁)	Jelito cienkie, tkanka limfatyczna	400	64,4

oraz pojedynczych substancji u ludzi pozostają nieznane [112]. Różnice we wzorze mutacji homologu MeIQx związane są z obecnością w strukturze dodatkowej grupy metylowej [171].

4.2. Czynniki ochronne

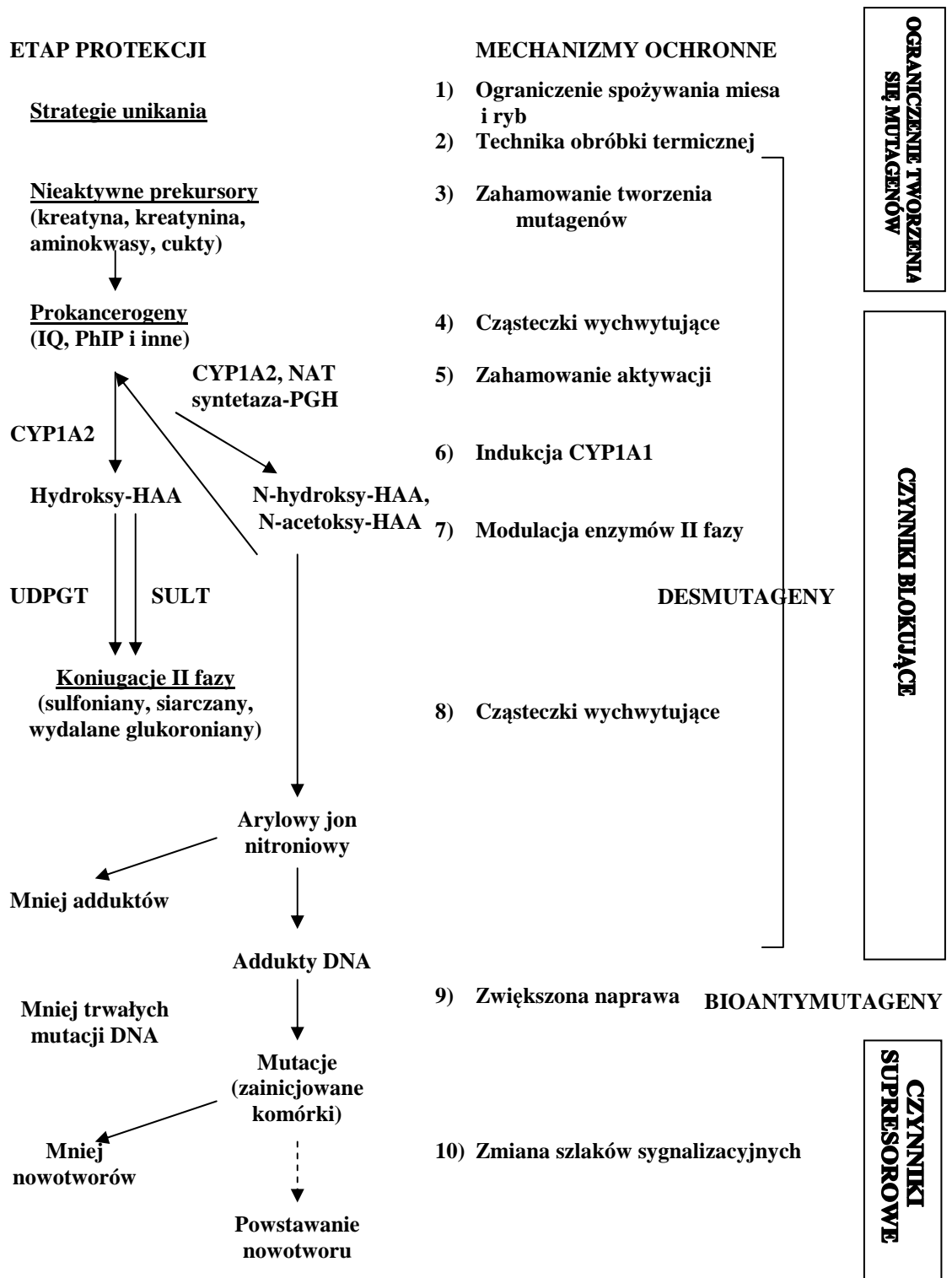
Dieta bogata w poddane obróbce termicznej mięso i ryby stanowi źródło heterocyklicznych amin aromatycznych wpływających niekorzystnie na zdrowie człowieka, mogących prowadzić do powstawania nowotworów. Spożywane są również substancje mogące działać ochronnie na różnych etapach procesu kancerogenezy. Ogólnie rzecz biorąc, wśród związków przeciwmutagennych można wyróżnić dwie grupy – biomutageny i desmutageny. Biomutagenami określane są substancje występujące naturalnie w roślinach, które mają wpływ na zmniejszenie ilości mutacji przez wpływ na proces replikacji i stymulowanie procesów naprawczych DNA. Komponenty te zapobiegają uszkodzeniom DNA w związku z utworzeniem adduktów DNA. Natomiast desmutageny stanowią wszystkie czynniki oddziałujące przeciwmutagennie przez mechanizmy, inne niż naprawa DNA lub replikacja, takie jak, chemiczna i enzymatyczna inaktywacja mutagenów, zahamowanie metabolicznej aktywacji promutagenów oraz blokowanie aktywacji mutagenów [172]. Specyficznym mechanizmem jest mechanizm oparty na działaniu substancji „przechwytyjących”, które ograniczają biodostępność mutagenów poprzez bezpośrednie tworzenie kompleksów ze związkami z grupy HAA [173].

Substancje przeciwrakotwórcze mogą działać, jako czynniki blokujące, zapobiegające powstawaniu uszkodzeń DNA, lub supresorowe, wpływające na proces przemiany komórki przedrakowej w rakową. Ogólny schemat metabolizmu związków heterocyklicznych amin aromatycznych z uwzględnieniem głównych miejsc działania inhibitorów kancerogenezy przedstawiono na rysunku 8.

➤ **Ograniczenie spożywania mięsa i ryb oraz wybór odpowiedniej techniki obróbki termicznej**

Ograniczenie spożywania poddanych obróbce termicznej potraw mięsnych i rybnych może prowadzić do zmniejszenia narażenia ze strony związków z grupy HAA, bowiem obserwuje się wzrost liczby zachorowań na różne nowotwory w tych krajach, gdzie spożywa się duże ilości produktów mięsnych (kraje europejskie i Stany Zjednoczone) [174]. Natomiast w przypadku częstej konsumpcji mięsa i ryb zmniejszenie narażenia na wspomniane substancje kancerogenne może zapewnić wybór

odpowiedniej techniki przetwarzania. Gotowanie i podgrzewanie mięsa w kuchence mikrofalowej okazało się być najbardziej przyjazną zdrowiu metodą obróbki termicznej, w której zauważono niewielką ilość tworzących się heterocyklicznych amin aromatycznych.



Rysunek 8. Schematyczne przedstawienie klasyfikacji inhibitorów heterocyklicznych amin aromatycznych hamujących mutagenezę i kancerogenezę [175]

➤ **Hamowanie procesu tworzenia się mutagenów**

Zapobieganie tworzeniu się mutagenów i kancerogenów z prekursorów stanowi inne rozwiązanie niwelujące wpływ związków z grupy HAA. Mając na uwadze mechanizm wolnorodnikowy powstawania heterocyklicznych amin aromatycznych przeprowadzono badania w celu sprawdzenia wpływu przeciwutleniaczy na ich syntezę [176, 177, 178, 179]. Okazało się, że dodatek produktów zawierających przeciwutleniacze, tak naturalne jak syntetyczne (flawonoidy, witamina C i E [180]) do mięsa może prowadzić do usuwania wolnych rodników i w efekcie wpływać na zmniejszenie ilości związków z grupy HAA w poddanym obróbce termicznej mięsie i układach modelowych [85]. Ważną rolę w hamowaniu tworzenia się heterocyklicznych amin aromatycznych wykazano dla produktów żywnościowych bogatych w przeciwutleniacze, takie jak herbata [181, 182] wiśnie, soki owocowe [183], przyprawy [184, 185] świeża oliwa z oliwek [186], karotenoidy pochodzące z pomidorów [187, 188, 189, 190]. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że świeżo tłoczony olej z oliwek, charakteryzujący się wysoką zawartością pochodnych fenolowych, w badaniach modelowych *in vitro* skuteczniej hamuje powstawanie związków z grupy HAA niż jednoroczny [191]. Oleożywica rozmarynu (0,5% i 1% roztwór - Herbalox®) dodana do wołowiny powoduje zmniejszenie tworzenia się AαC [192]. Ponadto, mięso marynowane w napojach alkoholowych, takich jak piwo czy czerwone wino powoduje znaczne obniżenie ilości tworzących się heterocyklicznych amin aromatycznych [193]. Marynowanie w czerwonym winie może znacząco zmniejszyć tworzenie się związków z grupy HAA w mięsie z kurczęcia [194]. Ilość PhIP i MeIQx została obniżona w odpowiednio 88 i 40% po okresie 6-cio godzinowego marynowania wołowiny w piwie lub w winie przed smażeniem, przy czym stwierdzono występowanie dużych różnic w zawartości AαC w zakresie 7-77% w zależności od czasu marynowania. Hamujący efekt (85% po 6 godzinach) marynaty z zielonej herbaty na tworzenie się AαC w smażonym mięsie był wyraźniejszy od obserwowanego podczas marynowania mięsa w piwie (32% po 6 godzinach) albo winie (47% po 6 godzinach). Natomiast tylko marynata z piwa spowodowała znaczne zmniejszenie się poziomu 4,8-DiMeIQx po okresie marynowania wynoszącym odpowiednio 1, 2 i 4 godziny. Całkowita zawartość heterocyklicznych amin aromatycznych po 6 godzinach marynowania mięsa w zielonej herbacie, piwie

i czerwonym winie i dalszej obróbce termicznej mięsa uległa redukcji w około 70% [182, 193].

Czosnek i cebula są powszechnie dodawane, jako przyprawy do dań mięsnych oraz jako składniki marynat do mięsa [183]. Wpływ czosnku i wybranych siarkoorganicznych związków na hamowanie intensywności procesu tworzenia się heterocyklicznych amin aromatycznych obserwowano w prowadzonych badaniach modelowych [178, 195] i w przypadku smażonej wołowiny [190], jak również w sosie z wieprzowiny poddanym obróbce termicznej [196]. Również dodatek cebuli prowadzi do zmniejszenia mutagenności poddanych obróbce termicznej hamburgerów [180]. Zmniejszenie stężenia MeIQx i 4,8-DiMeIQx nastąpiło, kiedy paszteciki wołowe poddano procesowi marynowania w marynatach zawierających czosnek i/albo cebulę [183]. Mała zawartość związków z grupy HAA w smażonych hamburgerach i kiełbasie wołowej może być związana z obecnością innych składników podczas obróbki termicznej, takich jak ditlenek siarki, który używany często jako konserwant w kiełbasach jest inhibitorem reakcji Maillarda [22].

➤ **Cząsteczki wychwytyjące heterocykliczne aminy aromatyczne**

Związki, które oddziałują bezpośrednio z kancerogenem i mutagenem, zmniejszając jego biodostępność mogą stanowić pierwszą linię obrony organizmu przed heterocyklicznymi aminami aromatycznymi. Chlorofil (CHL) jest jedną z najlepiej zbadanych cząsteczek wychwytyjących [197]. Wyniki badań wskazują na tworzenie się kompleksu między chlorofilem i aktywowaną formą związków z grupy HAA [198]. Pomimo, że oddziaływanie było odwracalne, siła tworzenia kompleksu była dobrze skorelowana z potencjałem przeciwmutagennym CHL w stosunku do kilku heterocyklicznych amin aromatycznych w trakcie badań z wykorzystaniem testu bakteryjnego Ames [199]. W badaniach prowadzonych z wykorzystaniem szczurów, podawanie doustne CHL i IQ prowadziło do ograniczenia absorpcji kancerogenów z jelita i wzrostu wydalania źródłowych związków wraz z moczem i kałem [200, 201], przy czym zahamowanie procesu tworzenia się adduktów IQ-DNA w wątrobie i okrężnicy wymagało równoczesnego podania kancerogenu oraz CHL. Stopień hamowania tworzenia się adduktów IQ-DNA ulega zwiększeniu wraz ze wzrostem dawki CHL [202]. Wyniki badań dotyczących innych cząsteczek wychwytyjących są ograniczone, jednakże można znaleźć informacje na temat wiązania związków z grupy HAA przez dietetyczny błonnik. Błonnik zawarty w łopianie, kapuście, rzodkiewce, marchwi i zielonym pieprzu tworzy silne wiązanie z Trp-P-2, Trp-P-1 i Glu-P-2.

Błonnik występujący zarówno w produktach fermentowanych i niefermentowanych wykazuje silne powinowactwo do heterocyklicznych amin aromatycznych *in vitro* i prowadzi do zmniejszenia absorpcji kancerogenów u szczurów karmionych równocześnie błonnikiem z sorgo albo z otręb pszenicy i MeIQx [203, 204, 205]. Wyniki badań potwierdzają również ochronny efekt lignanu wyizolowanego z nasion łośnianu o nazwie *arctiin*, zapobiegając indukowanemu przez PhIP nowotworowi piersi, natomiast może mieć słaby przeciwrakotwórczy wpływ w indukowanym przez MeIQx rozwoju nowotworu wątroby [206].

➤ **Hamowanie aktywacji heterocyklicznych amin aromatycznych**

Wydaje się, że wiele substancji wykorzystywanych w chemoprewencji działa hamująco na jednym lub więcej etapach aktywacji związków z grupy HAA. Dostępne są liczne informacje literaturowe wskazujące na przeciwrakotwórcze właściwości fitozwiązków zawartych w warzywach krzyżowych [207]. Fitozwiązki te dostarczane wraz z mięsem poddanym obróbce termicznej mogłyby niwelować mutageny i rakotwórczy wpływ heterocyklicznych amin aromatycznych [5]. Potwierdzeniem tych przypuszczeń są wyniki badań prowadzonych na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Ich analiza prowadzi do wniosku, że sok z kapusty bardzo efektywnie obniża mutagenność związków z grupy HAA występujących w mięsie poddanym obróbce termicznej [208]. Wszystkie badane soki wykazywały silne właściwości przeciwmutagenne w stosunku do modelowych mutagenów – MeIQx i PhIP. Zmniejszenie liczby rewertantów szczepu *Salmonella typhimurium* TA98 mieściło się w zakresie od ok. 40% ochrony - sok z kapusty kiszzonej gotowanej, do ponad 80% ochrony - sok ze świeżej surowej kapusty. Co więcej, zmniejszenie częstości mutacji indukowanych przez oba mutageny było liniowo skorelowane z dawką soku.

Indolo-3-karbinol (I3C), związek występujący w kapuście, kalafiorze i brokułach, tworzy produkty kondensacji w niskim pH żołądka i niektóre z tych pochodnych oligomerów I3C powodują zahamowanie cytochromu P450 [209]. Szczególne zahamowanie aktywności izoform CYP1A1 i CYP1A2 występuje na poziomie spotykanym w żywności < 100 ppm I3C. Zahamowanie aktywacji enzymów mogłoby być głównym mechanizmem ochronnym I3C przeciw tworzonym adduktom DNA-IQ i DNA-PhIP i przednowotworowym zmianom określanym jako aberracje krypt (ACF – aberrant crypt foci) indukowanym przez związki z grupy HAA u szczura [210, 211, 212]. Powyższe wyniki sugerują, że obecność warzyw

krzyżowych w diecie może zmniejszać stopień narażenia ludzkiego organizmu na substancje genotoksyczne obecne w żywności.

W innych pracach zawarte są informacje, że polifenole pochodzące z herbaty i CHL osłabiają aktywność mutageną heterocyklicznych amin aromatycznych w trakcie badań z wykorzystaniem testu Ames przez konkurencyjne zahamowanie reduktazy cytochromu P450 zależnej od NADPH, a więc ingerując pośrednio w aktywność cytochromu P450 [213, 214]. Natomiast Galusa epigalokatechiny (EGCG) powoduje zahamowanie aktywacji PhIP przez ludzki CYP1A2 w genetycznie modyfikowanym szczepie *Salmonella typhimurium* TA1538 [215]. Jednakże, hamujący efekt wobec mikrosomalnych enzymów nie jest odpowiedzialny za cały mechanizm ochrony *in vitro*, bowiem polifenole zawarte w herbacie i CHL również hamują mutageną aktywność N-hydroksyloowanych heterocyklicznych amin aromatycznych w przypadku braku frakcji S9 [216, 217]. W trakcie badań z wykorzystaniem odpowiedniego testu stwierdzono, że przeciwmutagenna aktywność polifenoli z herbaty jest częściowo zależna od O-acetylotransferazy bakteryjnej i sugerowało to zahamowanie przez herbatę reakcji acetylacji w ochronie przeciw ACF wywołanymi przez IQ u szczurów [216]. Natomiast CHL oddziaływał bezpośrednio na N-hydroksylowane metabolity związków z grupy HAA i zwiększył ich przemianę do nieaktywnych źródłowych produktów [218].

Sulforafan, jako silny stymulator szlaku II fazy detoksykacji, *in vivo* chroni przed indukowanymi przez IQ pęknięciami łańcucha DNA w komórkach THLE przez bezpośrednie zahamowanie aktywności CYP1A2 [219].

➤ **Zahamowanie indukcji CYP1A1**

Niektóre związki, w tym I3C, w żywieniowych stężeniach (> 100 ppm) preferencyjnie indukują CYP1A1 zamiast CYP1A2 [210]. W wyniku stosowania u szczurów dawki I3C w zakresie 100-1000 ppm, odpowiadającej naturalnemu spożyciu warzyw kapustowatych, aktywacja metaboliczna została przesunięta z egzocyklicznej grupy aminowej do pozycji w pierścieniu IQ oraz PhIP i w konsekwencji została zwiększona glukuronidacja i sulfatacja prowadząca do wydalania wraz z moczem, a także znacznie został zmniejszony poziom siarczanów [220]. W związku z tym, indukcja CYP1A1 zamiast CYP1A2 także może stanowić ochronny mechanizm przeciw związkom z grupy HAA.

➤ **Modulacja enzymów II fazy**

Indukowane formy S-transferazy glutationowej, mianowicie GST 1a, GST 1b

(szczur) i GST A1 (człowiek), są włączane w ważnym szlaku detoksykacji obejmującym zależną od glutationu transformację N-acetoksy-HAA do wyjściowej aminy [221]. W związku z tym, związki indukujące GST mogą służyć jako efektywne chemoprewencyjne związki przeciw heterocyklicznym aminom aromatycznym.

Mieszanka kafeolu i kahweolu powoduje indukcję wątrobowych α -GST i stanowi ochronę przed tworzeniem adduktów IQ–DNA u szczurów [222], podczas gdy dodatek białej herbaty indukuje π -GST u szczurów, przyczyniając się do zahamowania ACF wywołanych przez PhIP w okrężnicy [223]. W długookresowych badaniach, oltipraz, silny induktor niektórych izoform GST powodował hamowanie tworzenia chłoniaka wywołanego przez PhIP u szczurów F344 [224].

Indukcja UDPGT może być także ważnym mechanizmem ochrony przeciwko niekorzystnemu oddziaływaniu związków z grupy HAA. Zdolność indukcji wspomnianego enzymu posiadają polifenole [225]. W związku z tym biała, zielona i czarna herbata zawierające te związki wykazują hamującą aktywność przeciw ACF indukwanym przez IQ i PhIP, a także adduktom DNA u szczurów. Szczury spożywające ekstrakty z białej albo zielonej herbaty (1,5 albo 2 %) zamiast wody pitnej i dalej traktowane PhIP albo IQ wydalają wraz moczem większe ilości wyjściowych amin i glukuronianów [223]. Przebieg metabolizmu PhIP i MeIQx może być także modulowany przez spożywanie warzyw kapustowatych aktywujących glukuronidację, której efektem jest zwiększona ilość wydalanych z moczem koniugatów PhIP i MeIQx z kwasem glukuronowym [46].

SULT odgrywa rolę w II fazie koniugacji heterocyklicznych amin aromatycznych, prowadząc do wydalania siarczanów i źródłowych związków. W związku z tym indukcja SULT może stanowić efektywny mechanizm w chemoprewencji przeciw związkom z grupy HAA. Wiele substancji występujących w owocach i warzywach wpływa hamująco na aktywność sulfotransferazy [46].

➤ **Cząsteczki przechwytyjące (połączenie z aktywowanymi kancerogenami)**

Cząsteczki przechwytyjące mogłyby tworzyć kompleksy z metabolitami heterocyklicznych amin aromatycznych w tkankach i zapobiegać tworzeniu się właściwych kancerogenów. Tworzenie kompleksów z *N*-hydroksylowanymi związkami z grupy HAA, prowadzi do szybkiej degradacji tych mutagenów i jest związane z aktywnością przeciwmutageną CHL oznaczoną w trakcie badań z wykorzystaniem testu Ames [217].

➤ **Zwiększona naprawa**

Wanilina, kumaryna i kofeina w stężeniach do 5 µg/mL prowadzi do znacznego obniżenia (75–90 %) częstości pojawiania się mikrojąder w komórkach wątrobowych. Chociaż mechanizmy te nie zostały zbadane, wydaje się, że wanilina promuje procesy łączenia nowo syntetyzowanych nici DNA, w których polimeraza odgrywa główną rolę. Z kolei kofeina przedwcześnie wprowadza komórki z uszkodzonym genomem w stan mitozy przyspieszając procesy naprawy DNA [226].

➤ **Czynniki supresorowe**

Mechanizmy działania supresorowego różnych polifenoli, retinoidów, karotenoidów oraz niektórych witamin obejmują zahamowanie transdukcji sygnału, zwiększenie apoptozy, wzmocnienie sygnalizacji wewnątrzkomórkowej czy też funkcje odpornościowe. Nie wszystkie modulatory wpływają zarówno na fazy inicjacji, jak i postinicjacji kancerogenezy wywołanej przez heterocykliczne aminy aromatyczne. Izotiocyjanian fenyloetylu (PEITC) i izotiocyjanian benzylu (BITC) są efektywnymi czynnikami blokującymi związki z grupy HAA [227]. Natomiast dieta bogata w wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3, występujące m. in. w tłuszczu ryb, znacząco redukuje pojawienie się aberracji chromosomalnych u szczurów [228].

Najlepszą drogą ochrony przed szkodliwym działaniem heterocyklicznych amin aromatycznych jest zastosowanie takich metod przetwarzania żywności (np. gotowanie), które nie prowadzą lub ograniczają powstawanie wspomnianych związków. Jednak trudno jest zmienić preferencje żywieniowe konsumentów spożywających duże ilości poddanych obróbce termicznej produktów mięsnych stanowiących źródło związków z grupy HAA. W tym przypadku ochronę organizmu stanowi spożywanie równocześnie produktów zawierających substancje, które działają ochronnie na różnych etapach procesu kancerogenezy.

5. Metodyki oznaczania heterocyklicznych amin aromatycznych w próbkach żywności

Z uwagi na to, że heterocykliczne aminy aromatyczne wykazują właściwości kancerogenne i mutagenne bardzo ważne jest znalezienie jak najlepszego sposobu identyfikacji i ilościowego oznaczania tych związków w wysokobiałkowej żywności poddanej różnym technikom obróbki termicznej.

Do oznaczania zawartości związków z grupy HAA w próbkach żywności wykorzystywane są głównie techniki chromatograficzne i elektrochemiczne z różnym sposobem detekcji [229, 230, 231, 232, 233, 234, 235]. W tabeli 5 zestawiono dane literaturowe na temat najczęściej stosowanych technik analitycznych do oznaczania zawartości heterocyklicznych amin aromatycznych w próbkach żywności. Identyfikacja i ilościowe oznaczanie związków z grupy HAA w próbkach żywności, których matryca charakteryzuje się złożonym składem, a oznaczane związki występują na niskich poziomach stężeń (rzędu ng/g) jest możliwe w przypadku odpowiedniego przygotowania próbki do etapu oznaczeń końcowych. Powszechnie stosowanymi technikami izolacji i wzbogacania analitów z próbek żywności są takie techniki jak:

- ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE) [236],
- ekstrakcja do fazy stałej (SPE) [237],
- mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME) [234, 235, 238].

Większość heterocyklicznych amin aromatycznych z powodu ich jonowej natury nie może być oznaczanych bezpośrednio z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej (GC) i konieczne jest wprowadzenie etapu przedkolumnowej derywatywacji w celu oznaczenia niższych stężeń szkodliwych substancji. Natomiast derywatywacja związków z grupy HAA prowadzi nie tylko do obniżenia ich polarności, ale również prowadzi do zwiększenia ich lotności, selektywności, czułości i rozdzielania tych substancji [239]. Z kolei technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) jest obecnie powszechnie stosowana do oznaczania heterocyklicznych amin aromatycznych charakteryzujących się dużą polarnością. Procedury analityczne oparte na wykorzystaniu tej techniki są stosowane do analizy próbek odpowiednio przygotowanych ekstraktów z mięsa i ryb bez konieczności przeprowadzenia ich w lotne pochodne. Wszystkie związki z grupy HAA mają charakterystyczne widma UV i duże wartości liczbowe współczynnika ekstynkcji. Związki te ulegają również utlenieniu elektrochemicznemu. Kilka z tych substancji, zwłaszcza niepolarne heterocykliczne aminy aromatyczne oraz PhIP, wykazują zdolność do fluorescencji w polarnych rozpuszczalnikach. W związku z tym, identyfikacja tych związków jest możliwa z wykorzystaniem detektora fluorescencyjnego, co skutkuje 100-400-krotnym wzrostem czułości w porównaniu do powszechnie stosowanego detektora UV [240, 241].

Tabela 5. Informacje literaturowe na temat metodyk analitycznych stosowanych do oznaczania zawartości heterocyklicznych amin aromatycznych w próbkach produktów żywnościowych

TECHNIKA ANALITYCZNA	DETEKTOR	GRANICA WYKRYWALNOŚCI (ng/g)	ZALETY	PROBLEMY
Wysokosprawna chromatografia cieczowa z układem faz odwróconych (HPLC)	UV-DAD	0,02-50	Duża sprawność rozdzielania	Mała czułość, wpływ interferencji
	Fluorescencyjny	0,03-2,0	Duża selektywność i czułość	Brak możliwości potwierdzenia piku, zastosowanie tylko w przypadku mniej polarnych związków z grupy HAA
	ECD	0,05-2,0	Dobra selektywność i czułość, dobre rozdzielanie analitów przy zastosowaniu kolumn z mniejszą średnicą i przy małym natężeniu przepływu strumienia fazy ruchomej	Brak możliwości potwierdzenia piku, warunki izokratyczne
	MS	0,01-2	Duża czułość i specyficzność	Duże zużycie rozpuszczalników (w przeliczeniu na analizę)
Chromatografia gazowa (GC)	MS	0,01	Duża sprawność rozdzielania z zastosowaniem kolumny kapilarnej	Skomplikowane i czasochłonne operacje przygotowania próbek do analizy, konieczność przeprowadzenia związków z grupy HAA w lotne pochodne
Elektroforeza kapilarna (CE)	UV, ED, MS	35-50	Duża sprawność rozdzielania, mały koszt oznaczania analitów	Brak wzorców, przeciwciała monoklonalne dostępne tylko dla ograniczonej ilości związków z grupy HAA

Rozdzielanie zasadowych związków z wykorzystaniem techniki HPLC jest nadal problematyczne w związku z możliwością silnych oddziaływań z grupami silanolowymi obecnymi na powierzchni krzemionki [242]. Jednakże ten niekorzystny wpływ można ograniczyć poprzez zastosowanie cieczy jonowej (IL), która wpływa na zmniejszenie współczynnika retencji, czyli zmniejszenie stosunku ilości czasu jaki substancja rozpuszczona spędza w fazie stacjonarnej i ruchomej, oraz szerokości pików odpowiadającym heterocyklicznym aminom aromatycznym oznaczanym z wykorzystaniem HPLC–ECD. Najlepszy efekt jest widoczny w przypadku dodania octanu amonu do strumienia fazy ruchomej [243] i zastosowania fazy stacjonarnej C18. Stosując procedurę analityczną polegającą na wykorzystaniu najpierw ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE), a następnie techniki SPE i HPLC-ECD można z powodzeniem oznaczyć heterocykliczne aminy w próbkach produktów mięsnych z granicą wykrywalności rzędu ng/g [237].

Niedoskonałości wspomnianych wcześniej technik detekcji wraz z niepewnością oszacowania zawartości związków z grupy HAA w przypadku stosowania metodyki z dodatkiem wzorca wewnętrznego wskazywały na konieczność znalezienia lepszego narzędzia analitycznego [244]. Spektrometria mas okazała się być nieocenionym narzędziem w identyfikacji i wyjaśnieniu struktury związków z grupy HAA. Niezwykle cenną grupę technik stanowią: HPLC-MS oraz GC-MS. Pozwalają one na uzyskanie informacji o masie cząsteczkowej nieznaną substancji, rodzaju grup funkcyjnych jakie posiada oraz strukturze chemicznej. W przypadku heterocyklicznych amin aromatycznych najczęściej stosowaną techniką jonizacji jest jonizacja poprzez elektrorozpraszanie (ESI) ze względu na większą czułość oznaczania związków z tej grupy.

Wykorzystanie techniki GC-MS z jonizacją za pomocą jonów ujemnych (NICI) pozwoliło na uzyskanie optymalnej czułości i dzięki temu możliwe było oznaczenie niektórych heterocyklicznych amin aromatycznych w próbkach wołowiny poddanej obróbce termicznej na poziomie < 1 ppm [245]. Kilka niepolarnych związków z grupy HAA oznaczono w próbkach pieczonego mięsa z użyciem techniki GC-MS po zastosowaniu jonizacji elektronowej z monitorowaniem wybranych jonów (SIM) [246]. We wcześniejszych badaniach wykorzystywano technikę HPLC/MS z jonizacją za pomocą termorozpraszania (praca w trybie SIM) [247, 248]. Obecnie częściej stosowana jest jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI)

z monitoringiem wybranych reakcji (SRM) [249] albo jonizacja za pomocą elektrorozpraszania w trybie SRM [22]. Poprawa czułości poprzez zastosowanie techniki LC-ESI/MS umożliwiło ilościowe oznaczenie i identyfikacje śladowych ilości poszczególnych związków z grupy HAA w mięsie poddanym obróbce termicznej [20]. Istnieją również doniesienia literaturowe na temat zastosowania chromatografii cieczowej z tandemowym detektorem mas (LC-MS/MS) do oznaczania heterocyklicznych amin aromatycznych [250].

Informacje zebrane w tabeli 5 na temat stosowanych technik badań analitycznych wskazują, że wciąż brakuje idealnej techniki do oznaczania związków z grupy HAA. Każda z wymienionych technik, jak zwykle, ma swoje wady i zalety. Większość wymienionych metodyk wymaga dużego nakładu czasu i środków finansowych, bowiem wymagają tego czynności poprzedzające analizę.

Uzyskanie wyników, które będą źródłem wiarygodnych i rzetelnych informacji o obecności i ilości heterocyklicznych amin aromatycznych wykazujących właściwości mutagenne i kancerogenne w próbkach żywności stanowi poważne wyzwanie analityczne ze względu na:

- bardzo niskie poziomy stężeń związków będących przedmiotem zainteresowania w próbkach (rzędu ng/g), które charakteryzują się złożonym zmiennym składem matrycy;
- niebezpieczeństwo interferencji pochodzących od związków o podobnych właściwościach fizykochemicznych (a więc trudnych do rozdzielenia) i mogących występować w badanych próbkach nawet na znacznie większych poziomach zawartości niż anality;
- pracochłonne i czasochłonne operacje przygotowania próbek do analizy; co w zdecydowanym stopniu przyczynia się do kłopotów na etapie stosowanych procedur analitycznych oraz kalibracji przyrządów pomiarowych;
- ograniczony dostęp do odpowiednich wzorców i materiałów odniesienia niezbędnych do:
 - kalibracji przyrządów pomiarowych,
 - walidacji procedur analitycznych,
 - sprawdzenia kompetencji personelu laboratoriów analitycznych.

II. CEL I ZAKRES PRACY

Wyniki badań epidemiologicznych wskazują, że warzywa kapustowate – źródło przeciwrautowrczych izotiocyjanianów (ITC) mogą przeciwdziałać rozwojowi nowotworów, zagrożenie którymi skorelowane jest z ilością spożywanego mięsa [251]. Termiczne przetwarzanie mięsa prowadzi do powstawania mutagenów i kancerogenów m. in. z grupy heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) [4]. To właśnie te rakotwórcze związki uznawane są za jeden z czynników odpowiedzialnych za stymulację kancerogenezy u osób preferujących dietę bogatą w mięsne produkty. Z kolei przeciwdziałanie rakotwórczemu wpływowi heterocyklicznych amin aromatycznych przypisywane izotiocyjanianom polega na zdolności tych ostatnich do stymulacji ekspresji genów, których produkty mogą chronić przed kancerogenami [252]. Przyjęty sposób postrzegania relacji związków z grupy HAA i ITC ma zatem podłoże biologiczne. Natomiast brakuje doniesień o możliwości chemicznych reakcji pomiędzy tymi grupami związków w żywności. Własności chemiczne izotiocyjanianów, tzn. ich zdolność do wchodzenia w reakcje z ugrupowaniami nukleofilowymi [253] sugeruje, że tworzenie koniugatów ITC-HAA mogłoby mieć istotne znaczenie dla obniżenia zagrożenia wspomnianymi kancerogenami. Oczywistym warunkiem jest mniejsza toksyczność takich połączeń. W związku z powyższymi założeniami, podjęte badania były ukierunkowane na ustalenie zdolności związków z grupy ITC do wchodzenia w reakcje z heterocyklicznymi aminami aromatycznymi powstającymi w trakcie termicznej obróbki mięsa i ocenę mutagenności powstałych produktów.

Wyniki prac badawczych, które były realizowane w ramach pracy doktorskiej mają stanowić podstawę do próby wyjaśnienia roli izotiocyjanianów występujących w kapuście i innych warzywach kapustowatych w procesie nie tyle biologicznej co chemicznej detoksykacji kancerogenów z grupy HAA obecnych w żywności.

Realizacja powyższych założeń wymagała przede wszystkim poznania chemicznej reaktywności izotiocyjanianów w stosunku do heterocyklicznych amin aromatycznych występujących w żywności, bowiem brak jest na ten temat danych. Potwierdzeniem postawionej hipotezy byłoby udokumentowanie niższego potencjału mutagennego, a więc potencjalnie rakotwórczego, produktów reakcji związków z grupy ITC ze związkami z grupy HAA.

Postawiony cel pracy doktorskiej realizowano poprzez wykonanie następujących zadań:

- studia literaturowe ukierunkowane na zakres informacji dotyczących:
 - reaktywności izotiocyanianów w stosunku do amin, w tym heterocyklicznych amin aromatycznych;
 - roli związków z grupy ITC w przeciwdziałaniu mutagennym i rakotwórczym efektom kancerogenów pochodzenia żywnościowego zawierającym ugrupowania aminowe (N-nitrozaminy i heterocykliczne aminy aromatyczne);
 - metodyk oznaczania związków zaliczanych do ITC i HAA w próbkach żywności;
- opracowanie warunków reakcji naturalnie występujących izotiocyanianów – izotiocyanianu allilu (AITC), benzylu (BITC), fenyloetylu (PEITC) i sulforafanu (SFN) z analogami związków z grupy HAA poprzez:
 - przeprowadzenie reakcji AITC z 2-aminobenzimidazolem (ABI) w celu sprawdzenia możliwości uzyskania koniugatów ITC-HAA;
 - określenie zdolności AITC do reakcji z 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) przy doborze optymalnych warunków reakcji;
- opracowanie warunków prowadzenia reakcji naturalnie występujących izotiocyanianów – AITC, PEITC i SFN z najczęściej występującymi w produktach żywnościowych związkami z grupy HAA:
 - MeIQx (2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina)
 - PhIP (2-amino-1-metylo-6-fenyloimidazo[4,5-b]pirydyna);
- identyfikację i określenie czystości produktów będących koniugatami związków z grupy ITC i analogów oraz właściwych związków z grupy HAA przy użyciu technik NMR i MS;
- ocenę mutagenności koniugatów MeIQx-ITC oraz wyjściowych MeIQx i PhIP z wykorzystaniem testu Ames;
- podjęcie próby opracowania metodyki równoczesnego ilościowego i jakościowego oznaczania izotiocyanianów z wykorzystaniem derywatyzacji za pomocą N-acetylocysteiny, szczególnie uzasadnionego w przypadku prac z próbkami żywności, bowiem dotychczasowe techniki albo umożliwiają wyznaczenie jedynie całkowitej zawartości tych związków (technika HPLC) lub prowadzą do ich rozkładu (technika GC);

- syntezę chemiczną koniugatów izotiocyjanianów - AITC, BITC i PEITC z *N*-acetylo-L-cysteiną (NAC), które były wykorzystywane w badaniach jako substancje wzorcowe;
- opracowanie metodyki oznaczania związków z grupy ITC z wykorzystaniem derywatywacji za pomocą NAC w próbkach żywności;
- przeprowadzenie badań próbek materiału roślinnego na zawartość izotiocyjanianów (po ich kondensacji z 1,2-benzenoditiolem) z wykorzystaniem techniki HPLC w celu porównania wyników oznaczeń związków z grupy ITC w próbkach żywności po etapie ich derywatywacji (przed analizą chromatograficzną) za pomocą NAC.

Zrozumienie chemicznych podstaw oddziaływania izotiocyjanianów z wykazującymi szkodliwe działanie biologiczne heterocyklicznymi aminami aromatycznymi ma nie tylko walor czysto poznawczy. Ta wiedza być może w przyszłości pozwoli na wykorzystanie związków z grupy ITC jako dodatków do żywności zagrożonej zanieczyszczeniem związkami z grupy HAA oraz jednocześnie dostarczy naukowych podstaw dla oświadczeń zdrowotnych umieszczanych na etykietach tychże produktów. Wysokobiałkową żywnością są także produkty sojowe przeznaczone dla wegetarian. Ich obróbka termiczna również wiąże się z powstawaniem heterocyklicznych amin aromatycznych i w tym przypadku ochronny wpływ izotiocyjanianów, naturalnie występujących w żywności, mógłby być przemysłowo wykorzystany. Zrozumienie przebiegu tworzenia koniugatów ITC-HAA będzie mogło mieć duże znaczenie także dla rekomendacji żywieniowych skierowanych do konsumentów odnośnie spożywania dań mięsnych wraz z warzywami kapustowatymi.

Natomiast dla przemysłu mięsnego, wspomniana wiedza otwiera możliwość opracowania technologii ograniczających powstawanie rakotwórczych związków z grupy HAA w trakcie przetwarzania żywności pochodzenia zwierzęcego. Natomiast wzorce koniugatów HAA-ITC otrzymywane dzięki opracowanym metodom syntezy pozwolą na śledzenie powstawania takich połączeń w rzeczywistych produktach żywnościowych poddawanych obróbce termicznej przy wykorzystaniu technik chromatograficznych.

III. CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Aparatura i odczynniki

1.1. Odczynniki chemiczne i biochemiczne

- aceton (cz.d.a), *Sigma Aldrich*;
- chloroform (cz.d.a.), *Sigma Aldrich*;
- dichlorometan (cz.d.a.), *Chempur*;
- izopropanol (cz.d.a.), *P.P.H. STANLAB*
- dimetyloformamid (cz.d.a.), *Sigma Aldrich*;
- dichlorometan (do chromatografii HPLC 99,9%), *Sigma Aldrich*;
- izopropanol (do chromatografii HPLC 99,9%), *Sigma Aldrich*;
- tetrahydrofuran (cz.d.a.), *Sigma Aldrich*;
- 2,2,2-trifluoroetanol (99,9%), *Fluka*;
- acetonitryl (do chromatografii HPLC 99,9%), *Merck*;
- metanol (do chromatografii HPLC 99,9%), *Merck*;
- chloroform (do chromatografii HPLC 99,9%), *Merck*;
- etanol (96%), *P.P.H. STANLAB*;
- sulfotlenek dimetlu (DMSO, 99,5%), *Sigma*;
- woda demineralizowana z urządzenia Q_{PLUS}185, *Millipore*;
- heksan (cz.d.a), *POCH S.A.*;
- metanol (cz.d.a.), *POCH S.A.*;
- octan etylu (cz.d.a.), *POCH S.A.*;
- eter dietylowy (cz.d.a.), *Chempur*;
- cykloheksan (cz.d.a.), *Chempur*;
- toluen (cz.d.a.), *Chempur*;
- izotiocyanian fenylu (98%), *Sigma-Aldrich*;
- 1,2-benzenoditiol (99%), *Aldrich*;
- 2-aminobenzimidazol (97%), *Aldrich*;
- 2-amino-1-metylobenzimidazol (95%), *Aldrich*;
- izotiocyanian fenylu – związek otrzymany z Katedry Chemii Organicznej, Wydziału Chemicznego, Politechniki Gdańskiej;

- izotiocyanian allilu (98%), *Fluka*;
- izotiocyanian fenyletylu (99%), *Aldrich*;
- izotiocyanian metylu (97%), *Aldrich*;
- izotiocyanian benzylu (98%), *Aldrich*;
- izotiocyanianem 4-(metylosulfinylo)butanu - produkt syntetyzowany w Katedrze Chemii Organicznej, Wydziału Chemicznego, Politechniki Gdańskiej;
- *N*-acetylo-L-cysteina (99%), *Aldrich*;
- boran sodu (99%), *Sigma-Aldrich*;
- bezwodny siarczan magnezu (97%), *POCH S.A.*;
- bezwodny chlorek wapnia (cz.d.a), *POCH S.A.*;
- chlorek sodu (cz.d.a.), *P.P.H. STANLAB*;
- wodorek sodu - odczynnik otrzymany z Katedry Chemii Organicznej, Wydziału Chemicznego, Politechniki Gdańskiej;
- żel krzemionkowy 60, 0,040-0,063 (230-400 mesh), *Alfa Aesar*;
- jod, *Merck*;
- arkusze aluminiowe do chromatografii cienkowarstwowej TLC - żel krzemionkowy 60 F₂₅₄, grubość warstwy 0,25 mm. 20 x 20 cm, *Merck*;
- kwas mrówkowy (98%), *Merck*;
- kwas solny (98%), *Merck*;
- kwas octowy (98%), *POCH S.A.*;
- bufor fosforanowy (0,01 M, pH=7,4), *Sigma*;
- 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pirydyna (PhIP),
2-amino-3,8-dimetylimidazo[4,5-*f*]chinoksalina (MeIQx),
Toronto Research Chemicals lub *Apollo Scientific Ltd*;
- glukozo-6-fosforan (98%), *Sigma*;
- podłoże wzrostowe do testu *Amesa*, *Xenometrix*;
- podłoże do ekspozycji do testu *Amesa*, *Xenometrix*;
- podłoże wskaźnikowe do testu *Amesa*, *Xenometrix*;
- szczep *Salmonella Thypimurium* TA98, *Xenometrix*;
- chlorek potasu (99%), *POCH S.A.*;
- chlorek magnezu (98%), *POCH S.A.*;
- fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP, 95%), *Sigma*;

- frakcja S9 (z wątroby szczura indukowanego *Aroclorem* 1254), *Xenometrix*;
- ampicylina, *Xenometrix*;

1.2. Aparatura

- Analizator C,H,N,S model *CHNS EA-1108*, *Carlo Erba*;
- Chromatograf cieczowy model 1200 firmy *Agilent* wyposażony w detektor UV-VIS-DAD oraz MS;
 - kolumna chromatograficzna *Zorbax Bonus-RP Analytical* (4,6 mm ID x 150 mm, 5 μ m);
 - kolumna chromatograficzna *Nucleosil 50-3 μ m* (4 mm ID x 240);
- Chromatotron model 7924T, *Harrison*;
- Dyfraktometr rentgenowski model *KM4CCD*, *Oxford Diffraction*;
- filtry strzykawkowe, *Millex GP*, wielkość porów 0,22 μ m, średnica 33 mm, *Millipore*
- Lampa UV, *Cobrabid*;
- Łażnia ultradźwiękowa model *Bandelin*, *Sonore*;
- pH-metr laboratoryjny model *Basic 20+*, *CRISON*;
- Tandemowy spektrometr mas MS/MS model 4000 Q *TRAP*, *Agilent*;
- Spektrometr mas MS model 1100, *Agilent*;
- Spektrometr FTIR model *Nicolet 8700*, *Thermo Electron*;
- Spektrofotometr z płynną regulacją długości fali model *Infinite M200*, *Tecan*;
- Spektrofotometr UV/VIS model *NanoDrop 2000c*, *Thermo Scientific*;
- Spektrometr NMR model *Unity 500 plus*, *Varian*;
- Urządzenie do odparowywania nadmiaru rozpuszczalnika w atmosferze azotu model *Turbovap LV*, *Caliper Life Sciences*;
- Waga analityczna model *WAX 110*, *RADWAG*;
- Wirówka model *Conrifuge 5702*, *Eppendorf*;
- Wyparka obrotowa model *Laborota 4000*, *Heidolph*;
- Wyrząsarka typu vortex model *REAX Control*, *Heidolph*
- Zestaw do chromatografii kolumnowej wyposażony w kolumny szklane o wymiarach: długość 30 cm, średnica 1,5 cm i 1,0 cm;
- Zestaw do SPE model *SPE-12 G*, *J. T. Baker*;
 - kolumny do SPE *Bakerbond SPE C18* (100 mg/1 mL);

- Zestaw do testu *Amesa* w wersji mikro płytkowej MPF;
- Inkubator z wytrząsaniem, model *Ecotron, Infors HT*;
- Cieplarka laboratoryjna, model 182, *Pozamet*;
- Dygestorium laboratoryjne, model KS12, *HeraSafe Thermo Scientific*.

2. Opis syntez i procedur analitycznych

2.1. Procedury wykorzystywane na etapie syntezy substratu o strukturze analogicznej do heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) wykazujących właściwości rakotwórcze

2.1.1. Reakcja addycji 2-aminobenzimidazolu (ABI) z izotiocyanianem allilu (AITC)

W kolbie kulistej połączonej z chłodnicą zwrotną, zaopatrzoną w rurkę zabezpieczającą przed wilgocią, umieszczano 1 g (5,51 mmoli) ABI i 11,50 mL przedestylowanego dimetylotetrafuranu, po czym dodawano 0,54 mL AITC (5,51 mmoli). Mieszaninę reakcyjną intensywnie mieszano wykorzystując mieszadło magnetyczne i chroniono przed dostępem światła (poprzez owinięcie kolbki folią aluminiową). Reakcję prowadzono przez 0,5 godziny w temperaturze ok. 50°C. Po ochłodzeniu, do mieszaniny reakcyjnej dodawano octan etylu w ilości 60 mL i produkt kondensacji ekstrahowano 3 porcjami wody (3 x 10 mL). Ekstrakty po połączeniu przemywano nasyconym roztworem NaCl (1 x 6 mL) i suszono za pomocą bezwodnego MgSO₄. Rozpuszczalnik odparowywano z wykorzystaniem wyparki obrotowej. Do oceny przebiegu reakcji wykorzystywano technikę chromatografii cienkowsarstwowej (TLC). Na płytkę pokrytą żelem krzemionkowym ze znacznikami fluorescencyjnymi наносzono próbkę mieszaniny reakcyjnej, a także wzorce poszczególnych substratów. Chromatogram rozwijano stosując układ chloroform: metanol (10:1). Do obserwacji chromatogramu wykorzystano barwienie za pomocą stężonego kwasu siarkowego. Płytki po spryskaniu umieszczono na 10 min w suszarce o temperaturze 100°C. Dodatkowo do wywołania AITC zastosowano inną metodę, polegającą na przeprowadzeniu izotiocyanianu w barwny produkt poprzez spryskanie płytki roztworem 1,2-benzenoditiolu i ogrzewanie w temperaturze 65°C przez 10 min. W wyniku reakcji ABI z AITC otrzymano *N*-(1-benzimidazolilo)-*N'*-alliliotiomocznik (AITC-ABI) w postaci jasnożółtych kryształów z wydajnością rzędu 37%.

2.1.2. Synteza 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) z 2-aminobenzimidazolu (ABI)

Związek MABI otrzymano poprzez metylowanie ABI. W tym celu wykorzystano procedurę opisaną w pracy [254].

Sproszkowany KOH w ilości 910 mg (16,25 mmoli) dodawano do mieszanej zawiesiny ABI (3,25 mmoli) w 13 mL acetonu. Po kilku minutach dodawano jodek metylu (507,7 mg, 3,58 mmoli) silnie mieszając. Po okresie 10 min mieszaninę reakcyjną przenoszono do rozdzielacza i wytrząsano z toluenem (120 mL) w celu ekstrakcji produktu. Warstwę organiczną zawierającą produkt przemywano wodą (1 x 20 mL) i w dalszej kolejności nasyconym roztworem NaCl (1 x 6 mL), po czym suszono za pomocą bezwodnego MgSO₄. Rozpuszczalnik odparowywano przy użyciu wyparki obrotowej. Postęp reakcji śledzono za pomocą techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym. Chromatogram rozwijano stosując układ heksan : octan etylu (7:3) i wizualizowano korzystając z lampy UV oraz wywoływano za pomocą par jodu. W pierwszym etapie przeprowadzano wizualizację chromatogramu, aby sprawdzić obecność w mieszaninie reakcyjnej związków posiadających ugrupowania aromatyczne i allilowe. Natomiast wywołanie chromatogramu za pomocą par jodu pozwalało dostrzec obecność wszystkich związków w analizowanej próbce bez informacji o obecności określonych ugrupowań w cząsteczkach analitów. W wyniku reakcji metylowania ABI otrzymano 2-amino-1-metylobenzimidazol (MABI) w postaci jasnożółtych kryształów z wydajnością rzędu 47%.

2.2. Opis procedur wykorzystywanych na etapie sprawdzenia roli izotiocyanianów (ITC) w procesach inaktywacji kancerogenów z grupy heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) obecnych w żywności

2.2.1. Reakcja 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) z izotiocyanianami – allilu (AITC), benzylu (BITC) i fenyloetylu (PEITC)

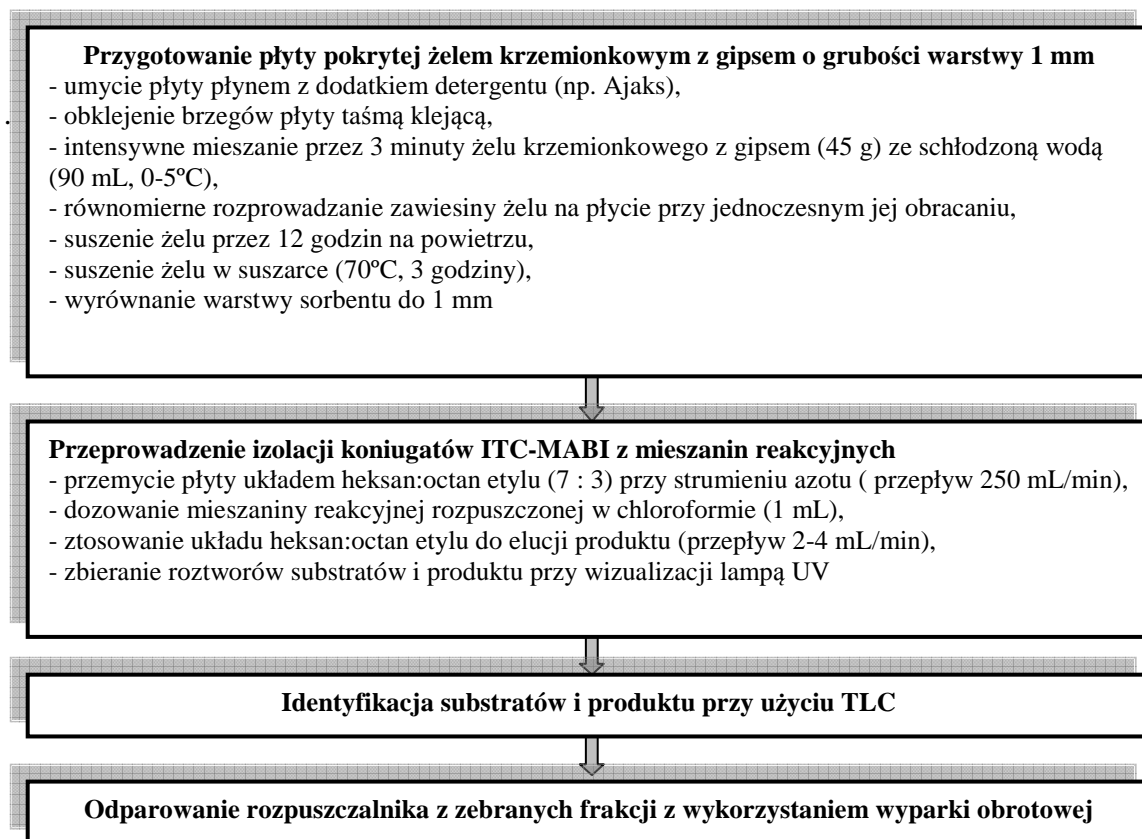
W literaturze znaleziono trzy doniesienia o reakcji MABI z izotiocyanianami [255, 256, 257]. Jednakże podstawą do opracowania procedury syntezy produktów związków z grupy ITC i MABI były informacje znalezione w pracy [257].

Poszczególne izotiocyaniany (6,79 mmoli) dodawano w jednej porcji do roztworu MABI (1 g, 6,79 mmoli) w MeCN (5 mL). Po 2 godzinach (dla AITC) lub 6 godzinach (dla BITC i PEITC) intensywnego mieszania substratów

w temperaturze 50°C usuwano rozpuszczalnik przy użyciu wyparki obrotowej. Postęp reakcji śledzono za pomocą techniki TLC na płytkach pokrytych żelom krzemionkowym. Chromatogramy rozwijano stosując układ heksan : octan etylu (7:3) i wizualizowano korzystając z lampy UV oraz wywoływano za pomocą par jodu. Produkty reakcji poszczególnych związków z grupy ITC z MABI oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii radialnej. Etapy procedury oczyszczania przedstawiono schematycznie na rysunku 9.

W wyniku reakcji MeIQx z AITC, BITC i PEITC oraz zastosowania oczyszczania chromatograficznego otrzymano produkty:

- *N*-(1-metylobenzimidazolilo)-*N'*-allilotiomicznik (AITC-MABI),
- *N*-(1-metylobenzimidazolilo)-*N'*-fenyloetylotiomicznik (BITC-MABI),
- *N*-(1-metylobenzimidazolilo)-*N'*-benzylotiomicznik (PEITC-MeIQx) w postaci bezbarwnych (pierwszy produkt) albo żółtych kryształów z wydajnością odpowiednio 42, 59 i 63%



Rysunek 9. Schemat postępowania wykorzystywanego podczas izolacji tiomoczników ITC-MABI przy użyciu chromatografii radialnej

2.2.2. *Reakcja 2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksaliny (MeIQx) z izotiocyjanami – allilu (AITC), fenyloetylu (PEITC) i sulforafanem (SFN)*

Poszczególne izotiocyjaniany (0,234 mmoli) dodawano w jednej porcji do roztworu MeIQx (0,234 mmoli) w izopropanolu (10 mL). Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 6 godzin (dla PEITC), 5 godzin (dla AITC) lub 3 godziny (dla SFN). Rozpuszczalnik odparowywano z wykorzystaniem wyparki obrotowej. Postęp reakcji śledzono poddając badaniu próbki mieszaniny reakcyjnej za pomocą techniki TLC na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym. Chromatogramy rozwijano stosując dichlorometan : metanol (12 : 1 dla reakcji AITC oraz PEITC z MeIQx; 9 : 1 dla reakcji SFN z MeIQx) i wizualizowano korzystając z lampy UV oraz wywoływano za pomocą par jodu. Produkty reakcji AITC oraz PEITC z MeIQx oczyszczano wykorzystując chromatografię kolumnową. W każdym przypadku wypełnienie kolumny stanowiła warstwa żelu krzemionkowego, natomiast jako układy służące do elucji reagentów zastosowano mieszaninę rozpuszczalników dichlorometan : metanol (12 : 1). Natomiast produkt reakcji SFN z MeIQx oczyszczano z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD. W trakcie analizy chromatograficznej próbki roztworu SFN-MeIQx w mieszaninie chloroform-metanol (10:1) do oddzielnych probówek zbierano frakcje zawierające nieprzereagowane substraty reakcji oraz produkt. W tabeli 6 zestawiono parametry pracy układu HPLC-DAD w trakcie prowadzenia izolacji tiomocznika SFN-MeIQx z próbki mieszaniny reakcyjnej.

Tabela 6 Podstawowe parametry toku postępowania analitycznego na etapie chromatograficznej izolacji tiomocznika SFN-MeIQx z próbki mieszaniny reakcyjnej

Parametr	Wartość
Objętość dozowanych próbek	50 µL
Skład fazy ruchomej	A- chloroform : metanol (10:1)
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,75 mL/min
Program elucji	izokratycznie
Kolumna chromatograficzna	<i>Nucleosil</i> 50-3 µm (4 mm ID x 240)
Temperatura kolumny	30°C
Długość fali	273 nm

W celu zebrania jak największej ilości frakcji z substancją SFN-MeIQx proces frakcjonowania powtórzono kilkadziesiąt razy zbierając tylko frakcje zawierającą produkt podczas analizy próbki mieszaniny reakcyjnej. Zebrane frakcje połączono i odparowano w strumieniu gazu obojętnego nadmiar rozpuszczalnika, po czym poddano analizie z wykorzystaniem techniki NMR.

W wyniku reakcji MeIQx z AITC, PEITC oraz SFN otrzymano Produkty:

- *N*-(3,8-dimetyloimidazo[4,5-*f*]chinoksalino-*N'*-allilotiomocznik (AITC-MeIQx),
- *N*-(3,8-dimetyloimidazo[4,5-*f*]chinoksalino-*N'*-fenyloetylotiomocznik (PEITC-MeIQx),
- *N*-(3,8-dimetyloimidazo[4,5-*f*]chinoksalino)-*N'*-metylosulfinylobutylotiomocznik (SFN-MeIQx)

w postaci żółtych kryształów oraz żółtej cieczy o dużej lepkości (ostatni produkt) z wydajnościami odpowiednio 12, 17 i 20%.

2.2.3. Reakcja 2-amino-1-metylo-6-fenyloimidazo[4,5-*b*]pirydyna (PhIP) z izotiocyjanami – allilu (AITC), fenyloetylu (PEITC) i sulforafanem (SFN)

Poszczególne izotiocyjaniany (0,895 mmoli) dodawano w jednej porcji do roztworu PhIP (0,895 mmoli) w trifluoroetanolu (10 mL). Po 3 godzinach (dla SFN), 8 godzinach (dla AITC i PEITC) intensywnego mieszania substratów w temperaturze 37°C usuwano rozpuszczalnik przy użyciu wyparki obrotowej. Postęp reakcji śledzono za pomocą techniki TLC na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym. Chromatogramy rozwijano stosując układ chloroform : metanol (12:1 dla reakcji AITC oraz PEITC z PhIP; 9:1 dla reakcji SFN-PhIP) i wizualizowano korzystając z lampy UV oraz wywoływano za pomocą par jodu. Produkty reakcji PhIP z AITC i PEITC oczyszczano wykorzystując chromatografię kolumnową oraz technikę HPLC-DAD. W każdym przypadku wypełnienie kolumny stanowiła warstwa żelu krzemionkowego, natomiast jako układy służące do elucji reagentów zastosowano mieszaniny rozpuszczalników chloroform : metanol (12 : 1). W tabeli 7 zestawiono parametry pracy układu HPLC-DAD w trakcie prowadzenia izolacji tiomoczników AITC-PhIP i PEITC-PhIP z próbek mieszanin reakcyjnych.

W wyniku reakcji PhIP z AITC i PEITC powstawały śladowe ilości produktu i w związku z tym trudno było wyizolować produkt z mieszaniny reakcyjnej. Natomiast w przypadku reakcji SFN z PhIP nie uzyskano produktu reakcji.

Tabela 7. Podstawowe parametry toku postępowania analitycznego na etapie chromatograficznej izolacji tiomoczników AITC-PhIP oraz PEITC-PhIP z próbki mieszaniny reakcyjnej

Parametr	Wartość
Objętość dozowanych próbek	75 μ L
Skład fazy ruchomej	A- chloroform : metanol (12:1)
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0,75 mL/min
Program elucji	izokratyczna
Kolumna chromatograficzna	<i>Nucleosil</i> 50-3 μ m (4 mm ID x 240)
Temperatura kolumny	30°C
Długość fali	316 nm

2.3. Procedury wykorzystywane na etapie identyfikacji tiomoczników ITC-MABI, ITC-MeIQx oraz ITC-PhIP

Dane uzyskane dla poszczególnych tiomoczników ITC-MABI oraz ITC-MeIQx przy użyciu różnych technik (NMR, rentgenowska analiza strukturalna, analiza elementarna) przedstawiono poniżej.

***N*-(1-metylobenzimidazolilo)-*N'*-allilotiomocznik (AITC-MABI):**

wydajność 42%; temperatura topnienia 81–82°C;

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 3,52; 3,55; 3,78 (3 x s, CH₃, odpowiednio T1B, T1A i T2A), 4,00; 4,12; 4,35 (2 x t i sz t, $J = 6$ Hz, CH₂NH, odpowiednio T1A, T1B i T2A), 5,08 (2 x d, $J = 10$ Hz, CH=CH₂ cis, odpowiednio T1A i T1B), 5,16 (2 x d, $J = 17$ Hz, CH=CH₂ trans, odpowiednio T1A i T1B), 5,20 (d, $J = 10$ Hz, CH=CH₂ cis, T2A), 5,32 (d, $J = 17$ Hz, CH=CH₂ trans, T2A), 5,85–5,95 (2 x m, CH=CH₂, T1A i T1B), 5,95–6,06 (m, CH=CH₂, T2A), 7,15–7,25 (m, 2H, H-3 i H-4), 7,37 (d, $J = 7,7$ Hz, H-5, T1B), 7,43 (d, $J = 7,7$ Hz, H-5, T1A), 7,46; 7,50 (2 x d, $J = 7,7$ Hz, H-2 i H-5, T2A), 7,55 (d, $J = 7,7$ Hz, H-2, T1B), 7,61 (d, $J = 7,7$ Hz, H-2, T1A), 8,15 (t, $J = 6$ Hz, N4-H, T1A), 8,48 (t, $J = 6$ Hz, N4-H, T1B), 10,80 (s, N3-H, T2A), 11,60 (t, $J = 6$ Hz, N4-H, T2A), 13,10 (s, N2-H, T1B), 13,25 (s, N2-H, T1A),

^1H NMR (CDCl₃) δ 3,57; 3,55; 3,70 (2 x s i sz s, CH₃, odpowiednio T1B, T1A i T2A), 4,20; 4,32; 4,48 (2 x t i sz t, $J = 6$ Hz, CH₂NH, odpowiednio T1A, T1B i T2A), 5,18;

5,21 (2 x d, $J = 10$ Hz, $\text{CH}=\underline{\text{CH}}_2$ *cis*, odpowiednio T1A i T1B), 5,28; 5,32 (2 x d, $J = 17$ Hz, $\text{CH}=\underline{\text{CH}}_2$ *trans*, odpowiednio T1A i T1B), 5,90-6,00 (2 x m, $\underline{\text{CH}}=\text{CH}_2$, T1A i T1B), 6,35 (sz s, N4-H, T1A), 6,60 (sz s, N4H, T1B), 7,18-7,36 (m, Ar-H, T1A i T1B), 13,60 (sz s, N2-H, T1A i T1B),

Dodatkowe szerokie piki widoczne na widmie NMR przy 3,70; 4,48; 5,40 i 6,05 ppm odpowiadają, występującemu w śladowych ilościach, tautomerowi T2A (około 3–4 %);

^{13}C NMR (125,7 MHz, CDCl_3): 28,1 (CH_3), 46,5; 47,0 (NCH_2 , odpowiednio T1A i T1B), 108,8; 109,0 (C5, odpowiednio T1B i T1A), 111,3; 111,7 (C2, odpowiednio T1B i T1A), 116,8; 117,0 (C12, dla odpowiednio T1A i T1B), 123,1; 123,2; 123,4 (C3/4, T1A i T1B), 128,0 (C6), 130,5 (C1), 134,0; 134,5 (C11, odpowiednio T1B i T1A), 153,8 (C=N), 184,7 (C=S);

IR ν_{max} 3230, 3174, 2989, 2925, 1624, 1612, 1581, 1514, 1479, 1446, 1429, 1402, 1377, 1332, 1315, 1294, 1254, 1242, 1192, 1163, 1144, 1126, 1095, 1064, 999, 980, 941, 918, 874, 837, 812, 739, 661, 644, 611, 573 cm^{-1} ;

Analiza elementarna, obliczono dla $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}$: C, 58,51; H, 5,73; N, 22,74; S, 13,02%, znaleziono: C, 58,56; H, 5,73; N, 22,74; S, 13,01%.

***N*-(1-metylobenzimidazolilo)-*N'*-benzylotiomocznik (BITC-MABI):**

wydajność 59%; temperatura topnienia 161–163°C;

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3,50; 3,53; 3,78 (3 x s, CH_3 , odpowiednio T1A, T1B i T2A), 4,59; 4,75; 4,97 (3 x d, $J = 6$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$, odpowiednio T1A, T1B i T2A), 7,13–7,60 (m, ArH), 8,55 (t, $J = 6$ Hz, N2-H, T1A), 8,85 (t, $J = 6$ Hz, N2-H, T1B), 10,80 (s, N3-H, T2A), 11,85 (t, $J = 6$ Hz, N4-H, T2A), 13,10 (s, N2-H, T1B), 13,27 (s, N2-H, T1A);

^{15}N NMR ($\text{DMSO}-d_6$, CH_3NO_2) δ -261,0 (N3, T2A), -257,5 (N2, T1B), -256,0 (N2, T1A), -250,5 (N4, T2A), -247,5 (N4, T1A), -245,5 (N4, T1B);

^1H NMR (CDCl_3) δ 3,58 (s, CH_3 , T1A), 3,70 (sz s, CH_3 , T1B), 4,78; 4,90 (2 x d, $J = 6$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$, odpowiednio T1A i T1B), 6,25 (sz s, N4-H, T1B), 6,60 (t, N4-H, T1A), 7,20-7,50 (m, Ar-H), 13,65 (sz s, N2-H, T1A, T1B);

^{13}C NMR (125,7 MHz, CDCl_3) δ 28,2 (CH_3), 48,0; 48,5 (NCH_2 , odpowiednio T1A i T1B), 109,0 (C5), 111,7 (C2), 123,4; 123,4 (C3 i C4), 127,5 (C14), 127,7 i 127,8 (C12/16, odpowiednio T1B i T1A), 128,0 (C6), 128,8 i 128,9 (C13/15, odpowiednio T1A i T1B), 130,5 (C1), 138,7 (C11), 153,8 (C=N), 184,7 (C=S);

IR ν_{\max} : 3236, 3185, 3072, 3026, 2935, 1622, 1610, 1581, 1529, 1491, 1442, 1400, 1383, 1346, 1308, 1254, 1190, 1153, 1095, 1080, 931, 912, 739, 702, 656, 642, 621, 658, 571 cm^{-1} ;

Analiza elementarna, obliczono dla $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$: C, 64,84; H, 5,44; N, 18,90; S, 10,82%,
znaleziono: C, 64,86; H, 5,45; N, 19,01; S, 10,81%.

***N*-(1-metylobenzimidazolilo)-*N'*-fenyloetylotiomocznik (PEITC-MABI):**

Wydajność 63%; temperatura topnienia 141–142°C;

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ 2,88; 2,90; 2,98 (3 x t, $J = 7$ Hz, PhCH_2 , odpowiednio T1A, T1B i T1B), 3,52; 3,59; 3,74 (3 x s, CH_3 , T1B, T1A and T2A), 3,59; 3,70; 3,90 (3 x q, $J = 7$ Hz, NHCH_2 , odpowiednio T1A, T1B i T2A), 7,14–7,62 (m, 9H, Ar–H), 8,10 (t, $J = 6$ Hz, N4–H, T1A), 8,42 (t, $J = 6$ Hz, N4–H, T1B), 10,70 (s, N4–H, T2A), 11,55 (t, $J = 6$ Hz, N3–H, T2A), 13,10 (s, N2–H, T1B), 13,27 (s, N2–H, T1A),

Sygnatów pochodzących od alifatycznych protonów dla tautomerów związku PEITC-MABI nie można jednoznacznie przypisać ze względu na ich prawie równe populacje (tabela 13).

^1H NMR (CDCl_3) δ 2,95; 3,02 (2 x t, $J = 7$ Hz, PhCH_2 , odpowiednio T1A i T1B), 3,52; 3,65 (2 x s, CH_3 , odpowiednio T1B i T1A), 3,80; 3,95 (2 x q, $J = 7$ Hz, NHCH_2 , odpowiednio T1A, T1B), 6,38 (sz s, N4–H, T1A), 6,60 (sz s, N4–H, T1B), 7,18–7,40 (m, 9H, Ar–H), 13,65 (sz s, N2–H, T1A i T1B),

Dodatkowe szerokie piki widoczne na widmie NMR przy 3,10 i 4,08 ppm odpowiadają, występującemu w śladowych ilościach, tautomerowi T2A (około 7%);

^{13}C NMR (125,7 MHz, CDCl_3) δ 28,2 (CH_3), 35,3; 35,9 (CH_2Ph , odpowiednio T1B i T1A), 45,3; 45,5 (NCH_2 , odpowiednio T1A i T1B), 108,7; 109,0 (C5, odpowiednio T1B i T1A), 111,3; 111,7 (C2, odpowiednio T1B i T1A), 123,0; 123,2; 123,4 (C3/4, odpowiednio T1B i T1A), 126,7 (C15), 128,0 (C6), 128,8, 128,9, 129,0; 129,1 (C13/17 i C14/16, T1A i T1B), 130,5 (C1), 139,3 (C11), 153,8 (C=N), 184,7 (C=S);

IR ν_{\max} 3296, 3186, 3062, 3026, 2935, 1622, 1614, 1595, 1479, 1446, 1402, 1373, 1350, 1322, 1286, 1246, 1149, 1128, 1093, 1064, 999, 933, 742, 698, 661, 634, 617, 573 cm^{-1} ;

Analiza elementarna, obliczono dla $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{S}$: C, 65,78; H, 5,84; N, 18,05; S, 10,33%,
znaleziono: C, 65,93; H, 5,90; N, 17,81; S, 10,23%.

***N*-(3,8-dimetyloimidazo[4,5-*f*]chinoksalino-*N'*-allilotiomocznik (AITC-MeIQx):**

wydajność 12%; T2/T1=0,2

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2,76 (s, 2,4H, 8-CH₃, T1); 2,78 (s, 0,6H, 8-CH₃, T2), 3,72 (s, 0,6H, N-CH₃, T2); 3,82 (s, 2,4H, N-CH₃, T1); 4,12 (t, 1,6H, CH₂NH, T1), 4,16 (sz t, 0,4H, CH₂NH, T2), 5,09-5,20 (d, 2,4H, CH=CH₂, T1 i T2), 5,53 (d, *J* = 16,75 Hz, 1,6H, CH=CH₂ *trans*, T1), 5,90-6,10 (m, CH=CH₂, T1 i T2), 7,86 (d, *J* = 8,8 Hz, 0,8H, H-4, T1), 7,95 (d, *J* = 8,75 Hz, 0,8H, H5, T1), 8,82 (s, 0,2H, H7, T2), 8,87 (s, 0,8H, H7, T1), 10,95 (s, 0,2H, N-H, T2), 11,69 (sz t, 0,2H, N-H, T2), 14,37 (sz s, 0,8H, N-H, T1), 14,61 (s, 0,8H, N-H, T1);

MS/MS (m/z) 313,1 [M+1H]⁺.

N*-(3,8-dimetyloimidazo[4,5-*f*]chinoksalino-*N'*-fenyloetylotiomocznik*(PEITC-MeIQx):**

wydajność 17%; T2/T1=0,2

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2,78 (s, 0,6H, 8-CH₃, T2); 2,81 (s, 2,4H, 8-CH₃, T1); 2,97 (t, 0,4H, PhCH₂, T2); (3,03 (t, 1,6H, PhCH₂, T1); 3,76 (s, 0,6H, N-CH₃, T2); 3,86 (s, 2,4H, N-CH₃, T1); 7,1-7,40 (m, 5H, Ar); 7,88 (d, *J* = 8,8 Hz, 0,8H, H-4, T1); 8,00 (d, *J* = 8,8 Hz, 0,8H, H-5, T1); 8,85 (s, 0,8H, H-7, T1); 8,87 (s, 0,2H, H-7, T2); 10,85 (sz s, 0,2H, N-H, T2), 11,45 (sz s, N-H, T1), 14,61 (s, 0,8H, N-H, T1);

MS/MS (m/z) 377,0 [M+1H]⁺.

N*-(3,8-dimetyloimidazo[4,5-*f*]chinoksalino-*N'*-metylosulfinylobutyliotiomocznik*(SFN-MeIQx):**

wydajność 20%; T2/T1=0,3

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1,69-1,74 (m, CH₂-CH₂, T1 i T2), 1,81-1,96 (m, CH₂-CH₂, T1 i T2), 2,78 (s, 2,1H, 8-CH₃, T1), 2,72 (t, *J* = 5,8 Hz, 0,6H, CH₂S(O), T2), 2,90 (sz s, 1,4H, CH₂S(O), T1), 3,75 (sz s, 0,6H, NHCH₂, T1), 3,92 (s, 2,1H, N-CH₃, T1), 7,96 (d, *J* = 8,8 Hz, 0,6H, H5), 8,00 (d, *J* = 8,8 Hz, 1,4H, H-4, T1), 8,05 (d, *J* = 8,8 Hz, 0,6H, H5, T1), 8,82 (s, 0,7H, H7), 8,88 (s, 0,3H, H7), 10,85 (sz s, 0,7H, N-H, T1), 11,56 (sz s, 0,7H, N-H, T1), 14,41 (sz s, N-H, 0,3H, T2), 14,62 (sz s, 0,3H, N-H, T2)

MS/MS (m/z) 391,5 [M+1H]⁺.

2.3.1. Wykorzystanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i spektrometrii mas (MS) do identyfikacji związków powstających podczas reakcji chemicznych izotiocyjanianów (ITC)

Ustalenie struktury chemicznej otrzymanych produktów było możliwe dzięki wykorzystaniu techniki NMR. Badanie strukturalne otrzymanych substancji wzorcowych przeprowadzono w Międzyuczelnianym Laboratorium NMR działającym przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Wszystkie zsyntetyzowane produkty zostały scharakteryzowane dzięki analizie widm protonowych (^1H NMR) otrzymanych w temperaturze 298 K przy użyciu spektrometru *Varian Unity 500 Plus* w CDCl_3 i $\text{DMSO}-d_6$ oraz CD_3CN (BITC-MABI). W przypadku koniugatów ITC-MABI wykonano dodatkowe widma węglowe (^{13}C NMR) i azotowe (^{15}N NMR) oraz eksperymenty 1D NOE i ROESY dla pełnej identyfikacji tych związków. W celu uproszczenia widma protonowego tiomocznika PEITC-MeIQx wykonano wysokotemperaturowe widmo protonowe (zakres temperatur od 22 °C do 100 °C).

Natomiast do potwierdzenia obecności produktów w badanych probkach zastosowano spektrometr mas *4000 Q TRAP* z potrójnym kwadrupolem. W tabeli 8 zestawiono parametry pracy urządzenia MS/MS.

Tabela 8. Zestawienie parametrów pracy urządzenia MS/MS na etapie określenia struktury molekularnej oraz czystości produktów reakcji ITC z MeIQx

Parametr	Wartość		
	PEITC-MeIQx	AITC-MeIQx	SFN-MeIQx
Sposób jonizacji	elektrozpraszanie	elektrozpraszanie	elektrozpraszanie
Warunki jonizacji	dotatnia jonizacja	dotatnia jonizacja	dotatnia jonizacja
Potencjał wejściowy (EP)			10 V
Potencjał fragmentacyjny (DP)	20 V	20 V	100 V
Napięcie rozpylania (IS)	5000 V	5000 V	5000 V
Energia zderzeń (CE)	30 V	30 V	
Gaz osłonowy (CUR)	10 psi	10 psi	10 psi
Gaz źródła jonów 1 (GS1)	20 psi	20 psi	20 psi
Gaz źródła jonów 2 (GS2)	0 psi	0 psi	0 psi

Analizie z wykorzystaniem techniki MS/MS poddano próbki roztworów metanolowych produktów AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx o stężeniu 100 ng/ml i 50 ng/mL (w przypadku AITC-MeIQx z uwagi na słabą rozpuszczalność związku w metanolu).

2.3.2. *Wykorzystanie analizy elementarnej do ustalania składu pierwiastkowego produktów uzyskanych w wyniku reakcji 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) z izotiocyjanianami - allilu (AITC), benzylu (BITC) oraz fenyloetylu PEITC*

Ustalenie składu pierwiastkowego C, H, N oraz S produktów reakcji MABI z AITC, BITC oraz PEITC umożliwiło wykorzystanie analizatora CHNS EA-1108 firmy Carlo Erba.

2.3.3. *Wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni (IR) do badania struktur tautomerycznych produktów reakcji 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) i izotiocyjanianów (ITC)*

Do badania struktur tautomerycznych produktów zastosowano technikę osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR). Widma oscylacyjne tiomoczników ITC-MABI (wykres zależności wielkości absorpcji od energii promieniowania wyrażonej za pomocą liczby falowej ($\tilde{\nu}$ (cm⁻¹)), otrzymano z użyciem spektrometru Nicolet 8700 z oprogramowaniem OMNIC będącego na wyposażeniu Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Temperatura podczas pomiarów wynosiła $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ i była kontrolowana przez zastosowanie elektronicznego regulatora temperatury. Każde widmo zostało zarejestrowane za pomocą zebranych 64 skanów z rozdzielczością 4 cm⁻¹. Analizę widm przeprowadzono w oparciu o przypisanie pasm drganiom konkretnych grup funkcyjnych występujących w cząsteczce badanego związku chemicznego stosując tabele korelacyjne drgań.

2.3.4. *Zastosowanie rentgenowskiej analizy strukturalnej do badania struktury krystalograficznej produktów reakcji 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) i izotiocyjanianów (ITC)*

Zbadanie struktury krystalicznej tiomoczników ITC-MABI umożliwiło wykorzystanie techniki rentgenowskiej analizy strukturalnej. Pojedyncze kryształy

produktów niezbędne do przeprowadzenia badania uzyskano poprzez rekrytalizację ITC-MABI z mieszaniny octan etylu – cykloheksan (1:1) z wykorzystaniem techniki powolnego schładzania nasyconego roztworu. Badania rentgenograficzne prowadzono przy użyciu dyfraktometru KM4CCD z monochromatorem grafitowym będącego na wyposażeniu Katedry Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

2.4. Analiza próbek roztworów tiomoczników ITC-MeIQx z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD pod kątem ich identyfikacji i sprawdzenia czystości

W tabeli 9 zestawiono parametry pracy układu HPLC-DAD w trakcie prowadzenia badań próbek roztworów metanolowych zawierających produkty reakcji MeIQx z AITC, PEITC oraz SFN.

Tabela 9. Podstawowe parametry toku postępowania analitycznego na etapie chromatograficznego oznaczania tiomoczników ITC-MeIQx w próbkach produktów reakcji MeIQx z AITC, PEITC oraz SFN

Parametr	Wartość/Metoda
Objętość dozowanych próbek	5 µL
Skład fazy ruchomej	MeOH
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	1 mL/min
Program elucji	izokratyczna
Temperatura kolumny	30°C
Długość fali	273 nm

2.5. Ocena mutagenności tiomoczników ITC-MeIQx i MeIQx z wykorzystaniem testu Ames w wersji mikropłytkowej MPF

Ocenę mutagenności tiomoczników ITC-MeIQx oraz MeIQx przeprowadzono przy zastosowaniu testu Ames w wersji mikropłytkowej MPF z wykorzystaniem gotowych zestawów wprowadzonych na polski rynek w 2009 roku przez firmę *Xenometrix*. Potencjał mutageny związków był oceniany w stosunku do szczepu *Salmonella typhimurium* TA98, który charakteryzuje się szerokim spektrum wrażliwości na mutageny.

2.5.1. Przygotowanie szczepu *Salmonella typhimurium* TA98 do oznaczeń mutagenności

W pierwszym etapie przygotowano płynną hodowlę bakteryjną. Do dwóch sterylnych kolbek o pojemności 50 mL oznaczonych jako „kontrola negatywna” i „TA98” dodawano po 10 mL podłoża wzrostowego. Następnie do kolbki oznaczonej jako „TA98” dodawano 10 μ L ampicyliny (50 mg/mL) i jeden krążek hodowli bakteryjnej, którą uprzednio namnożono i przechowywano w banku w celu zapewnienia bezpiecznego i powtarzalnego stosowania szczepów testowych. „Kontrolę negatywną” stanowiło samo podłoże wzrostowe. Obie kolbki inkubowano w wytrząsarce (obroty 140 rpm) w temperaturze 37 °C przez 14-16 godzin.

Po inkubacji mierzono gęstość optyczną (OD_{600}) hodowli bakteryjnej i „kontroli negatywnej” przy użyciu spektrofotometru (długość fali $\lambda=600$ nm). Spektrofotometr kalibrowano wykorzystując kuwetę zawierającą 900 μ L podłoża wzrostowego. Natomiast pomiaru absorbancji dokonywano po dodaniu do dwóch kuwet zawierających 900 μ L podłoża wzrostowego po 100 μ L komórek z kolbki z hodowlą bakteryjną lub z kontrolą negatywną. Uzyskanie wartości (po pomnożeniu razy 10) wynoszących:

- $OD_{600} \geq 2,0$ dla hodowli bakteryjnej,
- $OD_{600} \leq 0,05$ dla kontroli negatywnej

stanowiło kryterium przejścia do kolejnego etapu prac. W przypadku stosowania testu Amesa wykorzystuje się bakterie z drugiego pasażu, a więc po zbadaniu wartości OD_{600} przenoszono 1 mL zawiesiny bakteryjnej z kolbki z pierwszego pasażu do nowej sterylnej kolbki zawierającej 3 mL podłoża wzrostowego i inkubowano w wytrząsarce przez 1,5 godziny (140 rpm, 37 °C). Po tym czasie, otrzymywano około 10^7 komórek bakteryjnych w 1 mL, co potwierdzano mierząc przy pomocy spektrofotometru wartość absorbancji. Powinna ona wynosić co najmniej 70% wartości OD_{600} odczytanej dla hodowli bakteryjnej z pierwszego pasażu. Tak przygotowaną hodowlę wykorzystywano do celów badawczych.

2.5.2. Inkubacja szczepu *Salmonella typhimurium* TA98 z tiomocznikami ITC-MeIQx i heterocykliczną aminą aromatyczną MeIQx

W kolejnym etapie przygotowano roztwory badanego mutagenu MeIQx (stężenia wyjściowe w zakresie 0,0030 - 34 μ M) i tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx (stężenia wyjściowe – 0,31 μ M oraz 1,5 μ M)

w DMSO. Do dołków 24-dołkowej płytki do ekspozycji wprowadzano badane próbki tiomoczników ITC-MeIQx (o objętości 20 μ L). Badaniu poddano również próbki rozpuszczalnia (DMSO) i 2-aminoantracenu (związek mutageny będący w zestawie do prowadzenia badań z wykorzystaniem testu Ames firmy *Xenometrix*) o stężeniu 125 μ g/mL, które traktowano jako kontrola negatywna i pozytywna. Dla każdej próbki badanych związków przeprowadzono po 3 równoległe próby. Końcowe stężenia badanych związków wynosiły:

- MeIQx – 0,2 nM oraz 2 nM,
- tiomoczniki ITC-MeIQx – 2 nM oraz 10 nM,
- 2-aminoantracenen – 10 μ g/mL.

Następnie do sterylnej kolbki o pojemności 50 mL dodawano 6 mL podłoża do ekspozycji zawierającego histydynę, 0,8 mL hodowli bakteryjnej TA98 oraz 1,2 mL mieszaniny 30% v/v frakcji S9 z wątroby szczura dołączonej do zestawu. Sposób przygotowania mieszaniny 30% v/v frakcji S9 przedstawiono w tabeli 10. W innej sterylnej kolbce sporządzono mieszaninę złożoną z 3 mL podłoża do ekspozycji i 0,35 mL hodowli bakteryjnej. Natychmiast po dodaniu mieszaniny zawierającej frakcję S9 do kolbki z hodowlą bakteryjną, całość mieszaniny rozdzielono do dołków 24-dołkowej płytki do ekspozycji (próbki o objętości 240 μ L). W przypadku badania mutagenności związków bez aktywacji enzymatycznej, do studzienek płytki dodawano 240 μ L mieszaniny hodowla/podłoże do ekspozycji bez frakcji S9.

Tabela 10. Sposób przygotowania mieszaniny 30% v/v frakcji z wątroby szczura S9

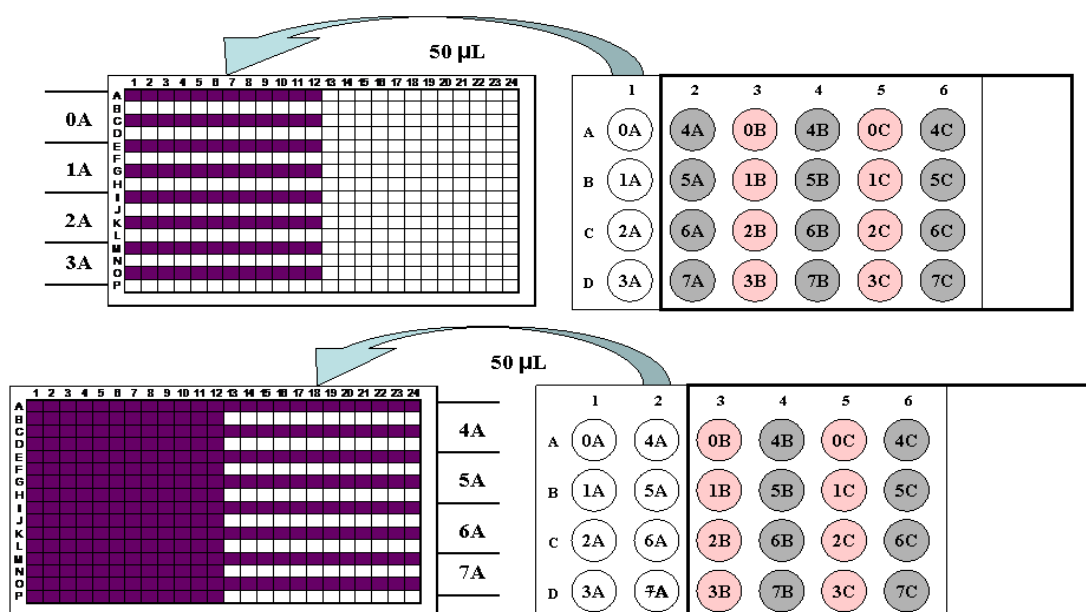
Stężenie roztworu wyjściowego [M]	Odczynnik	Całkowita objętość [mL]
1,00	KCl	0,050
0,25	MgCl x 6 H ₂ O	0,048
0,20	Glukoza-6-fosforan	0,038
0,04	NADP	0,150
0,20	Bufor NaH ₂ PO ₄	0,765
	Frakcja S9 (z wątroby szczura indukowana Aroclorem 1254)	0,450
	Objętość końcowa	1,501

Płytkę inkubowano dokładnie przez 90 minut w temperaturze 37 °C przy obrotach 120 rpm.

2.5.3. Oznaczenie liczby rewertantów

Po upływie 90 minut hodowle po ekspozycji rozcieńczano przez dodawanie do każdego dołka 24-dołkowej płytki 2,8 mL podłoża wskaźnikowego zawierającego wskaźnik pH i nie zawierającego histydyny. W związku z tym tylko bakterie, u których zaszła rewersja do fenotypu histydyno-niezależnego mogły się namnażać. Przy pomocy 8-kanałowej pipety automatycznej wymieszano roztwory w dołkach kolumny płytki 24-dołkowej. Następnie przenoszono próbki o objętości 50 μ L do kolumn 1-24 trzech 384-dołkowych płytek według schematu przedstawionego na rysunku 10. Trzy 384-dołkowe płytki z przeniesionymi hodowlami umieszczano w zamykanych woreczkach strunowych (aby zapobiec odparowaniu medium). Tak zabezpieczone płytki inkubowano w temperaturze 37 °C przez 2 dni, bowiem w tym czasie komórki, w których nastąpiło przywrócenie funkcjonalnego genu dla histydyny, mogły wzrastać i utworzyć kolonie.

Po upływie czasu inkubacji, płytki wyjmowano z inkubatora i zliczano dołki w każdej 48-dołkowej sekcji (rysunek 10), w których bakterie namnażały się.



Rysunek 10. Schematyczne przedstawienie sposobu przenoszenia hodowli po ekspozycji z płytki 24-dołkowej do płytek 384-dołkowych

Za próbki pozytywne uważa się te, w których podłoże zmieniło zabarwienie z fioletowego na żółte lub w których na dnie dołka zaobserwowano kolonię bakterii. Przyczyną zmiany koloru podłoża w dołku było obniżenie pH podłoża w wyniku metabolizmu kolonii bakteryjnych. Zliczaną dla każdej dawki związku liczbę dołków zawierających kolonie z rewersją mutacji porównywano z próbkami kontroli negatywnej. W celu przeprowadzenia analizy statystycznej danych każdą dawkę związku testowano w trzech powtórzeniach.

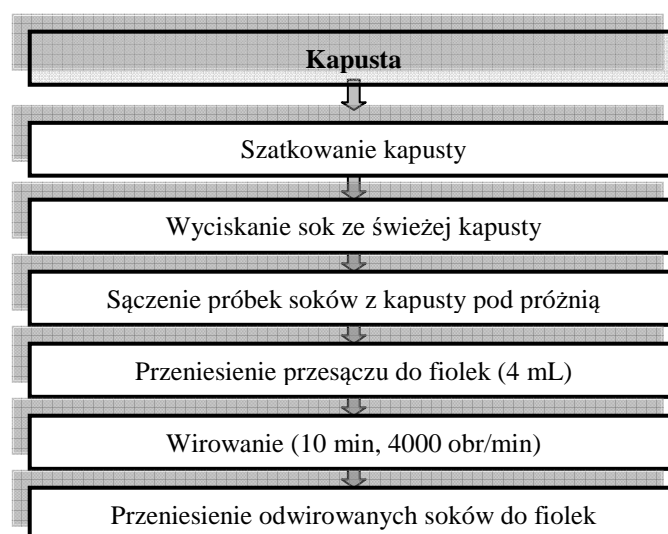
2.5.4. Analiza statystyczna

Wartości średnie (z trzech pomiarów) oraz wartości liczbowe odchylenia standardowego obliczono dla wyników uzyskanych z trzech niezależnych doświadczeń (trzy lub dwa powtórzenia). Analizę danych przeprowadzono przy użyciu statystycznego programu GraphPad PRISM 5. W tym celu zastosowano jednostronny test Dunnetta.

2.6. Badania nad opracowaniem metodyki oznaczania izotiocyjanianów (ITC) w próbkach soków z kapusty z wykorzystaniem derywatyzacji za pomocą *N-acetylo-L-cysteiny* (NAC)

2.6.1. Przygotowanie próbek soków z kapusty do badań

Soki ze świeżej kapusty pochodzące z wcześniejszych zbiorów przygotowano według schematu przedstawionego na rysunku 11.



Rysunek 11. Schemat przygotowania próbek soków z kapusty użytych do prowadzenia procesu derywatyzacji izotiocyjanianów przy użyciu *N-acetylo-L-cysteiny*

W celu uniknięcia niebezpieczeństwa utraty izotiocyjanianów, soki wyciskano do schładzanych naczyń, a następnie przechowywano w szczelnie zamkniętych naczyniach w temperaturze - 20°C. Do bieżących doświadczeń z soków usunięto resztki osadu oraz białka poprzez proces ultrafiltracji przy użyciu filtrów wirówkowych zatrzymujących związki chemiczne o masie cząsteczkowej powyżej 10 kDa mogące przeszkadzać na etapie oznaczeń końcowych.

2.6.2. Synteza substancji wzorcowych ditiokarbaminianów na drodze kondensacji izotiocyjanianów allilu (AITC), benzylu (BITC) oraz fenyloetylu (PEITC) z *N*-acetylo-L-cysteiną (NAC)

Syntezę ditiokarbaminianów będących koniugatami najważniejszych izotiocyjanianów występujących w warzywach kapustowatych, których źródłem jest np. kapusta:

- izotiocyjanianu fenyloetylu,
- izotiocyjanianu benzylu
- izotiocyjanianu allilu

z *N*-acetylo-L-cysteiną zaplanowano na podstawie informacji literaturowych dotyczących syntezy tego typu produktów [258].

W kolbie okrągłodennej (50 mL) rozpuszczono NAC (5,12; 3,12; 3,12 mmoli odpowiednio dla reakcji z AITC, BITC, PEITC) i wodorowęglan sodu (5,63; 3,27; 3,27 mmoli odpowiednio dla reakcji z AITC, BITC, PEITC) w wodzie (5 mL dla AITC) lub roztworze etanolowym (8,5 mL, 82% dla BITC i 6,5 mL, 70% dla PEITC) z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. W celu zwiększenia szybkości reakcji z izotiocyjanianami przeprowadzono przekształcenie NAC do soli sodowej przy użyciu wodorowęglanu sodu. Po rozpuszczeniu substratów, porcjami dodawano poszczególne izotiocyjaniany AITC (5,72 mmoli w 5 mL etanolu), BITC (3,72 mmole) i PEITC (3,45 mmoli). Reakcję prowadzono przez okres 5 godzin. Postęp reakcji związków z grupy ITC z NAC śledzono prowadząc badania mieszaniny reakcyjnej za pomocą techniki TLC na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym. Chromatogram rozwijano stosując układ rozpuszczalników octan etylu-woda-kwas octowy (80:10:8) i wizualizowano korzystając z lampy UV oraz wywoływano za pomocą par jodu. Etanol odparowywano przy użyciu wyparki obrotowej, a pozostałość izotiocyjanianu usuwano przeprowadzając ekstrakcję za pomocą heksanu. W celu przekształcenia soli merkapturowej do kwasu merkapturowego (słabo

rozpuszczalnego w wodzie), mieszaninę reakcyjną zakwaszono z pomocą HCl o stężeniu 36% (do pH=3,0). Produkty reakcji ekstrahowano trzykrotnie z wykorzystaniem octanu etylu (10 mL). Następnie łączono poszczególne frakcje organiczne i usuwano rozpuszczalnik przy użyciu wyparki obrotowej. Otrzymano produkty:

- N-acetylo-S-(N'-allilotiokarbamoilo)-L-cysteinę (AITC-NAC),
- N-acetylo-S-(N'-benzyloitiokarbamoilo)-L-cysteinę (BITC-NAC),
- N-acetylo-S-(N'-fenyloetyloitiokarbamoilo)-L-cysteinę (PEITC-NAC),

w postaci cieczy o dużej lepkości (pierwszy produkt) lub kryształów z wydajnościami odpowiednio 82, 50 i 73%.

2.6.3. *Synteza ditiokarbaminianu PITC-NAC używanego jako wzorzec wewnętrzny na drodze kondensacji izotiocyjanianu fenylu (PITC) i N-acetylo-L-cysteiny (NAC)*

W kolbie okrągłodennej (50 mL) rozpuszczano NAC (1,0 g, 6,12 mmoli) w tetrahydrofuranie (35 mL). Następnie małymi porcjami dodawano PITC (0,794 mL, 6,65 mmoli) rozpuszczony w mieszaninie etanol : woda (8:2; 7,5 mL). W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodawano wodorowęglan sodu (0,588 g, 6,70 mmoli) rozpuszczony w wodzie (15 mL). Reakcję prowadzono przez okres 24 godzin. Postęp reakcji PITC z NAC śledzono prowadząc badania mieszaniny reakcyjnej za pomocą techniki TLC na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym. Chromatogram rozwijano stosując układ rozpuszczalników octan etylu-woda-kwas octowy (80:10:8) i wizualizowano korzystając z lampy UV oraz wywoływano za pomocą par jodu. Następnie tetrahydrofuran odparowywano przy użyciu wyparki obrotowej. Otrzymaną mieszaninę zakwaszono za pomocą HCl o stężeniu 36% (do pH=3,0). Produkt krystalizowano z gorącej mieszaniny octan etylu : metanol. Otrzymano produkt N-acetylo-S-(N'-fenyloitiokarbamoilo)-L-cysteinę (PITC-NAC) w postaci białych kryształów z wydajnością rzędu 75%.

2.6.4. *Określenie długości fali absorpcji odpowiadającej maksimum absorpcji ditiokarbaminianów ITC-NAC*

Kolejnym krokiem badań było określenie dla wspomnianych ditiokarbaminianów ITC-NAC długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji przy użyciu spektrofotometru z płynną regulacją długości fali model *Infinite M200*

firmy *Tecan*. Substancje wzorcowe ITC-NAC (0,5 mg) otrzymane w wyniku przeprowadzonych syntez rozpuszczano w metanolu (1 mL) i przenoszono do studzienek płytki 48-dołkowej. Następnie dokonano analizy zarejestrowanych widm absorpcyjnych. Na podstawie uzyskanych widm UV-VIS dokonano wyboru charakterystycznych długości fal 251, 272 nm, przy których może być prowadzona identyfikacja pochodnych z tej grupy związków.

2.6.5. Wykorzystanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i spektrometrii mas (MS) do identyfikacji związków powstających podczas reakcji chemicznych izotiocyjanianów (ITC) z *N*-acetylo-*L*-cysteiną (NAC)

Badanie struktury chemicznej otrzymanych ditiokarbaminianów ITC-NAC przeprowadzono w Międzyuczelnianym Laboratorium NMR działającym przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Wszystkie zsyntetyzowane produkty zostały scharakteryzowane dzięki analizie widm protonowych ^1H NMR otrzymanych w temperaturze 298 K przy użyciu spektrometru *Varian Unity 500 Plus* zarejestrowanych w CD_3OD .

Natomiast potwierdzenia obecności w badanych próbkach produktów otrzymanych na drodze syntezy chemicznej produktów wykorzystano tandemowy spektrometr mas *4000 Q TRAP* z jonizacją poprzez elektropraszanie. W tabeli 11 zestawiono parametry pracy urządzenia MS/MS.

Tabela 11. Zestawienie parametrów pracy urządzenia MS/MS na etapie określenia struktury molekularnej oraz czystości produktów reakcji izotiocyjanianów z *N*-acetylo-*L*-cysteiną

Parametr	Wartość		
	AITC-NAC	BITC-NAC	PEITC-NAC
Sposób jonizacji	elektrozpraszanie	elektrozpraszanie	elektrozpraszanie
Warunki jonizacji	ujemna jonizacja	ujemna jonizacja	ujemna jonizacja
Potencjał wejściowy (EP)	10 V	10 V	10 V
Potencjał fragmentacyjny (DP)	80 V	80 V	80 V
Napięcie rozpylania (IS)	4200 V	4200 V	4200 V
Energia zderzeń (CE)	40 V	40 V	40 V
Gaz osłonowy (CUR)	25 psi	25 psi	25 psi
Gaz źródła jonów 1 (GS1)	40 psi	40 psi	40 psi
Gaz źródła jonów 2 (GS2)	30 psi	30 psi	30 psi

Analizie z wykorzystaniem techniki MS/MS poddano próbki roztworów metanolowych AITC-MeIQx, BITC-MeIQx oraz PEITC-MeIQx o stężeniu 100 ng/ml.

Dane uzyskane dla poszczególnych ditiokarbaminianów ITC-NAC przy użyciu techniki NMR, i ESI-MS/MS przedstawiono poniżej.

***N*-acetylo-*S*-(*N'*-allilotiokarbamoilo)-*L*-cysteina (AITC-NAC)**

wydajność 82%;

^1H NMR (CD_3OD) δ 1,98 (s, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 3,59 (q, $J = 8$ Hz, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2$), 3,95 (dd, $J = 4,5$ Hz, 2H, CH_2-S), 4,31-4,33 (m, 1H, $\text{N}-\text{CH}$), 5,17 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$ *cis*), 5,24 (d, $J = 17,5$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$ *trans*), 5,88-5,96 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 8,3-8,4 (1H, OCNH , wymiana z D_2O), 9,9-10,2 (1H, SCNH , wymiana z D_2O), 12,5-12,7 (1H, OH , wymiana z D_2O);

MS/MS (m/z) 261,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

***N*-acetylo-*S*-(*N'*-benzylotiokarbamoilo)-*L*-cysteina (BITC-NAC)**

wydajność 50%;

^1H NMR (CD_3OD) δ 1,96 (s, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 3,58 (dd, 1H, $J_{AB} = 14\text{Hz}$, $J_{BX} = 8,5\text{Hz}$, CH_B), 4,02 (dd, $J_{AX} = 4,75\text{Hz}$, 1H, CH_A), 4,10-4,15 (m, 2H, CH_2-S), 4,61-4,67 (m, 1H, $\text{N}-\text{CH}$), 7,26-7,30 (m, 5H, Ar-H), 8,2-8,4 (1H, OCNH , wymiana z D_2O), 10,3-10,50 (1H, SCNH , wymiana z D_2O), 12,6-12,8 (1H, OH , wymiana z D_2O);

MS/MS (m/z) 311,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

***N*-acetylo-*S*-(*N'*-feynyloetylotiokarbamoilo)-*L*-cysteina (PEITC-NAC)**

wydajność 73%;

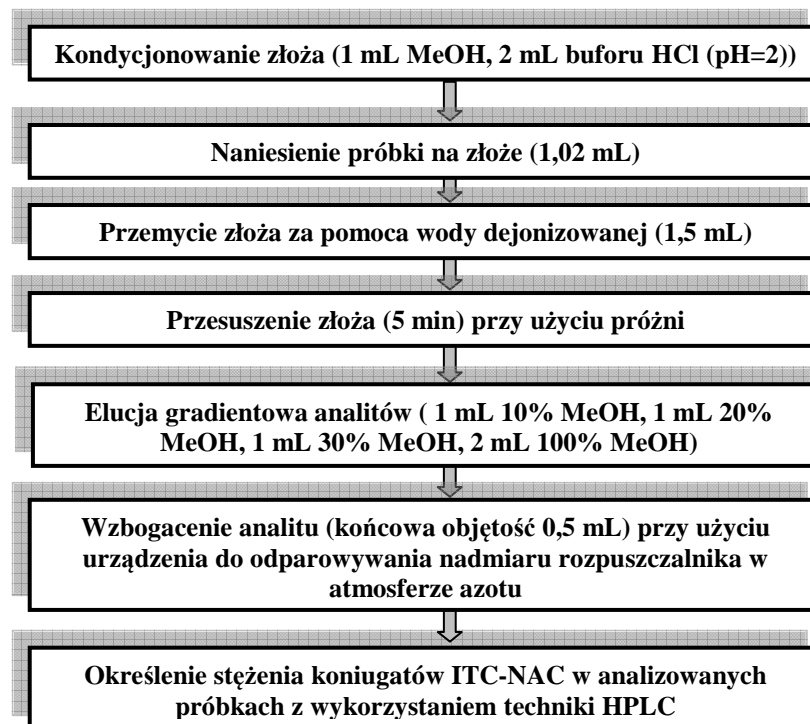
1,97 (s, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2,92 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, PhCH_2), 3,60 (q, $J = 8$ Hz, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2$), 3,82-3,94 (m, 2H, CH_2-S), 4,51-4,53 (m, 1H, $\text{N}-\text{CH}$), 7,20-7,32 (m, 5H, Ar-H); 7,46 (t, 1H, SCNH), 8,0-8,2 (1H, OCNH , wymiana z D_2O), 10,0-10,2 (1H, SCNH , wymiana z D_2O), 12,7-12,9 (1H, OH , wymiana z D_2O);

MS/MS (m/z) 325,3 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

2.6.6. Synteza związków z grupy NAC-ITC po derywatacji izotiocyjanianów (ITC) za pomocą N-acetylo-L-cysteiny (NAC) w próbkach materiału roślinnego

Dalszym krokiem do opracowania procedury oznaczania izotiocyjanianów było przeprowadzenie syntezy koniugatów ITC-NAC w próbkach materiału roślinnego (po dodaniu NAC).

We fiolece 12 mL rozpuszczono NAC (0,10 mmoli) i wodorowęglan sodu (0,12 mmoli) w wodzie (0,5 mL) z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. Po rozpuszczeniu substratów porcjami dodawano sok z kapusty (0,5 mL). Reakcję prowadzono przez okres 5 godzin. W kolejnym etapie, do mieszanin reakcyjnych dodawano wzorzec wewnętrzny – PITC-NAC (20 μ L; 1 mg/mL). Następnie produkty reakcji związków z grupy ITC z NAC ekstrahowano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Schemat procedury ekstrakcji koniugatów ITC-NAC przy użyciu techniki SPE przedstawiono na rysunku 12. Optymalne warunki ekstrakcji ITC-NAC z próbek soków z kapusty za pomocą SPE dobrano wykorzystując procedurę opisaną w pracy [259]. Uzyskane ekstrakty poddawano następnie analizie przy użyciu techniki HPLC-DAD. Identyfikacji ditiokarbaminianów AITC-NAC, BITC-NAC oraz PEITC-NAC dokonywano na podstawie czasów retencji oraz poprzez porównanie widm UV i MS substancji wzorcowych.



Rysunek 12. Schemat postępowania podczas ekstrakcji koniugatów ITC-NAC z próbek soku z kapusty przy użyciu techniki SPE (po badaniach optymalizacyjnych)

2.6.7. *Oznaczanie izotiocyjanianów (ITC) w próbkach soków z kapusty z wykorzystaniem substancji wzorcowych otrzymanych na drodze syntezy*

Syntetycznie uzyskane ditiokarbaminiany AITC-NAC, BITC-NAC i PEITC-NAC posłużyły, jako substancje wzorcowe niezbędne do walidacji procedury oznaczania izotiocyjanianów w próbkach roślinnych przy wykorzystaniu zestawu HPLC-DAD-MS na etapie oznaczeń końcowych i identyfikacji poszczególnych analitów.

W tabeli 12 zestawiono parametry pracy zestawu HPLC-DAD-MS w trakcie analizy próbek metanолоwych roztworów substancji wzorcowych koniugatów ITC-NAC (bez dodatku wzorca wewnętrznego).

Tabela 12. Podstawowe parametry toku postępowania analitycznego na etapie chromatograficznego oznaczania ditiokarbaminianów ITC-NAC w próbkach soków z kapusty

Parametr	Wartość
Objętość dozowanych próbek	10 μ L
Skład fazy ruchomej	A - woda z 0,1% HCOOH, B - acetonitryl z 0,1% HCOOH
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	1 mL/min
Program elucji	0 min - 20% składnika B; 10 min – 40% składnika B, 20 min – 65% składnika B, 25 min – 100% składnika B
Temperatura kolumny	30°C
Długość fali	272 nm
Sposób jonizacji	Elektrozpraszanie (ESI)
Tryb pracy detektora MS	negatywny (SIM)
Fragmentacja	m/z = 261-325
Natężenie przepływu strumienia gazu suszącego (azot)	12 L/min
Ciśnienie gazu w rozpylaczu	50 psi
Temperatura gazu suszącego	350°C
Temperatura pracy kwadrupola	90°C

2.7. Procedury wykorzystywane na etapie wyznaczania całkowitej zawartości izotiocyjanianów (ITC) w próbkach soków z kapusty przy użyciu metodyki Zhanga

2.7.1. Synteza substancji wzorcowej 1,3-benzenoditiolo-2-tionu na drodze kondensacji izotiocyjanianów (ITC) z 1,2-benzenoditiolem

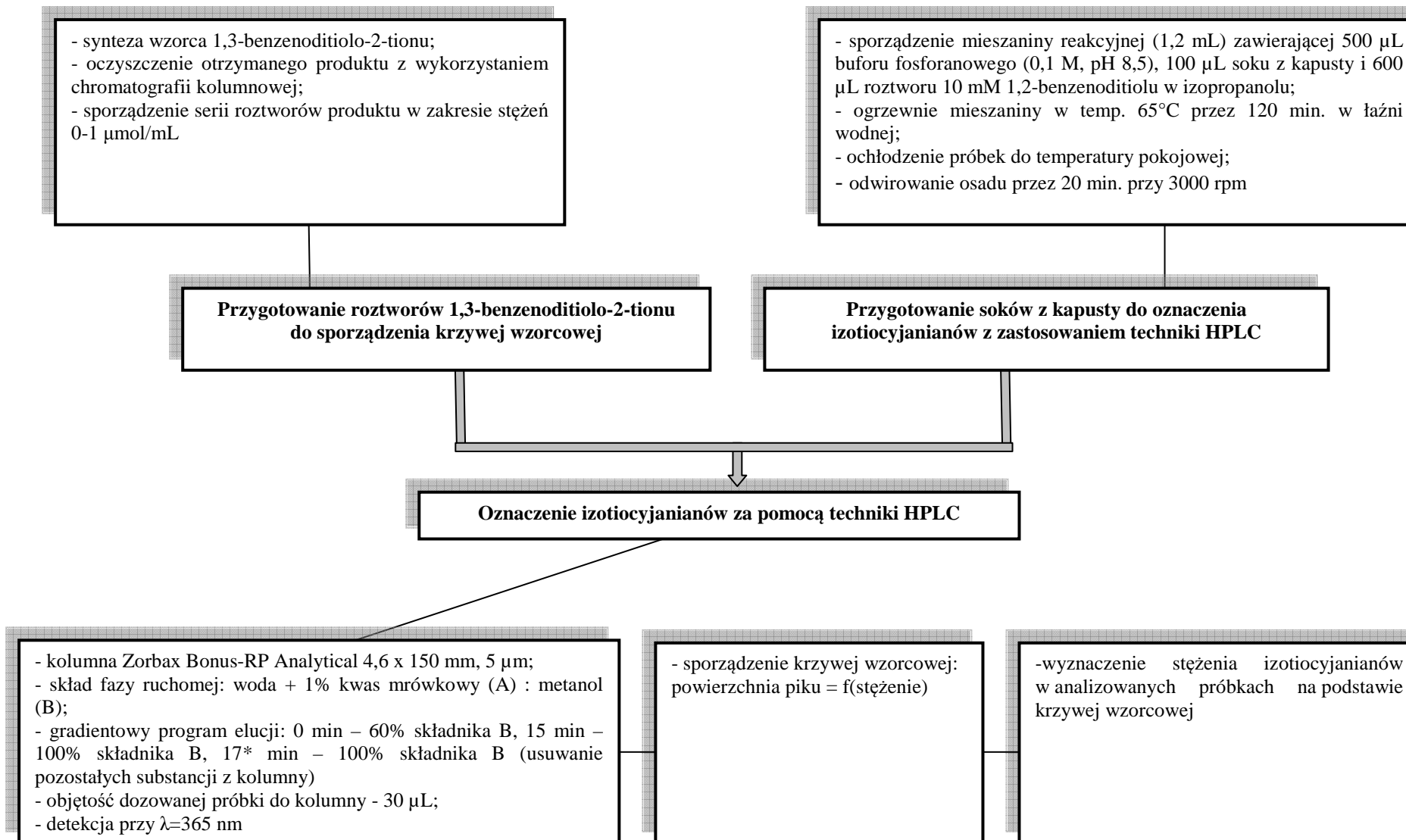
W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL odważano 71 mg 1,2-benzenoditiolu (0,5 mmoli) i rozpuszczano w 10 mL metanolu. Następnie przez 10 minut dodawano kroplami mieszając pod azotem 74 mg izotiocyjanianu metylu (MITC, 1 mmol) rozpuszczonego w 5 mL metanolu. Otrzymany roztwór mieszano przez 5 godzin w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji związków z grupy ITC z 1,2-benzenoditiolem śledzono za pomocą techniki TLC. Chromatogram rozwijano stosując układ rozpuszczalników heksan: dichlorometan (3 : 1) i wizualizowano korzystając z lampy UV oraz wywoływano za pomocą par jodu. Po zakończeniu reakcji odparowywano rozpuszczalnik pod próżnią otrzymując produkt – 1,3-benzenoditiolo-2-tion w postaci jasnożółtych kryształów z wydajnością rzędu 92 %.

2.7.2. Wykorzystanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) do identyfikacji związków powstających podczas reakcji izotiocyjanianów (ITC) z 1,2-benzenoditiolem

Badanie struktury chemicznej otrzymanej substancji wzorcowej – 1,3-benzenoditiolo-2-tionu przeprowadzono przy użyciu spektrometru *Varian Unity* 500 Plus (500 MHz). Widmo ^1H NMR zarejestrowano w DMSO- d_6 .

2.7.3. Oznaczanie izotiocyjanianów (ITC) w próbkach soków z kapusty z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD

Schemat prowadzenia oznaczeń całkowitej zawartości izotiocyjanianów w próbkach soków kapusty przedstawiono na rysunku 13.

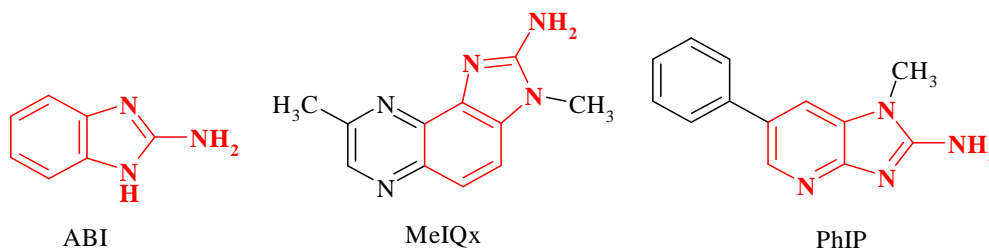


Rysunek 13. Schemat postępowania analitycznego wykorzystywanego do oznaczania zawartości izotiocyanianów w badanych próbkach soków z kapusty przy użyciu techniki chromatograficznej

3. Wyniki i wnioski

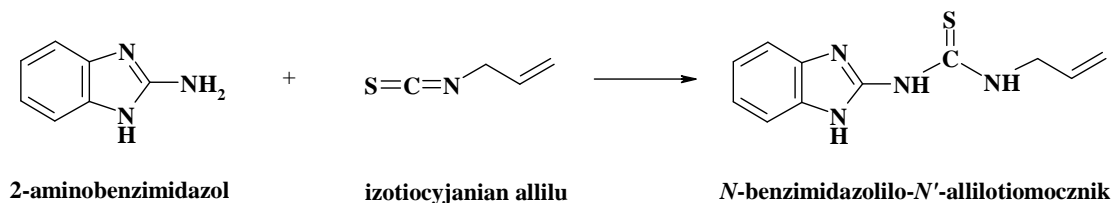
3.1. 2-aminobenzimidazol (ABI) jako strukturalny analog heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) i jego koniugaty z izotiocyjanianami (ITC)

Pierwszym etapem na drodze do sprawdzenia roli izotiocyjanianów w inaktywacji rakotwórczych heterocyklicznych amin aromatycznych było otrzymanie koniugatów tych związków, których mutagenność mogła być doświadczalnie zweryfikowana. Jednakże, z uwagi na wysoki koszt zarówno PhIP (2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pirydyna), jak i MeIQx (2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-*f*]chinoksalina) w reakcji wykorzystano substancję modelową ABI, której struktura stanowi wspólną część struktury obu wymienionych rakotwórczych związków z grupy HAA (rysunek 14). 2-Aminobenzimidazol użyto w celu opracowania warunków wydajnej syntezy koniugatów HAA i ITC przy użyciu tańszego modelu i co najmniej ważne mniej toksycznego.



Rysunek 14. Porównanie struktury 2-aminobenzimidazolu ze strukturami heterocyklicznych amin aromatycznych (MeIQx oraz PhIP)

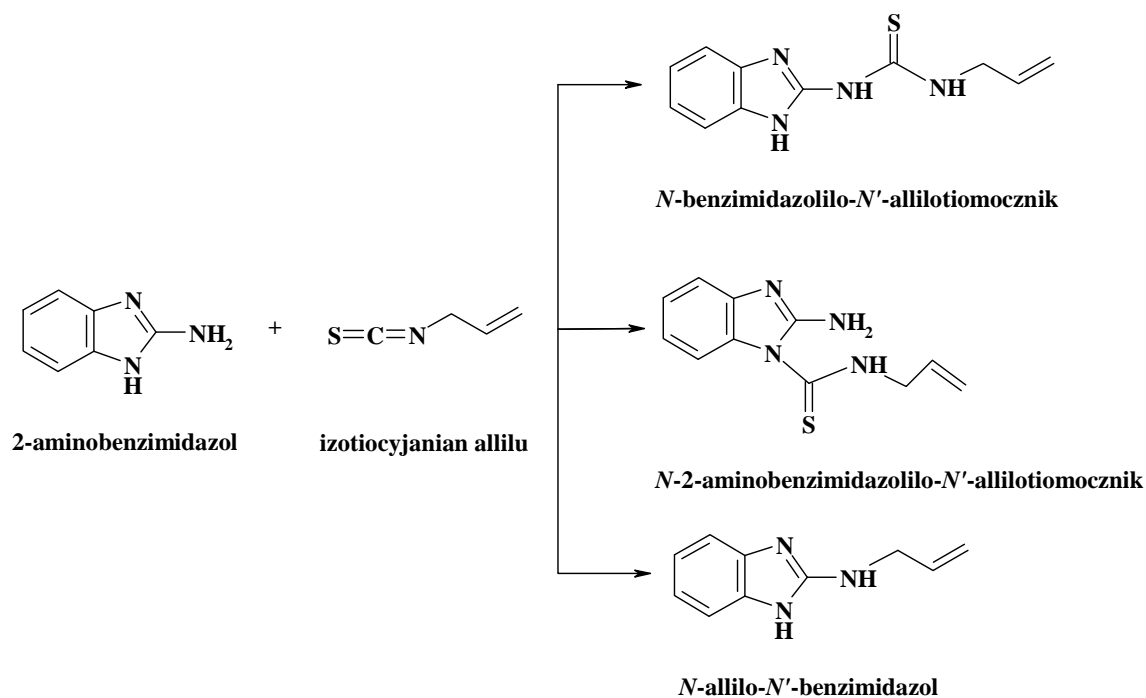
Rozważania teoretyczne pozwalały przypuszczać, że ABI może reagować z AITC poprzez grupę aminową tworząc stabilny produkt - *N*-benzimidazolilo-*N'*-allilotiocznik (rysunek 15).



Rysunek 15. Oczekiwany przebieg reakcji kondensacji 2-aminobenzimidazolu z izotiocyjanianem allilu

Reakcja ABI z AITC może mieć jednak inny przebieg, o czym świadczy przykład 2-aminotiazoli (związków izoelektronowych z 2-aminoimidazolami), które w reakcji ze związkami z grupy ITC uczestniczą w wymianie reszty alkilowej izotiocyjanianu [260]. Dominującym produktem ubocznym reakcji z udziałem 2-aminoimidazoli jako nukleofili jest produkt ataku pary elektronowej iminowego atomu azotu N1 [261, 262]. Na rysunku 16 przedstawiono najbardziej prawdopodobne ścieżki reakcji ABI z AITC.

Zastosowanie techniki TLC pozwoliło śledzić postęp reakcji AITC z ABI i powstawanie produktu, o czym świadczył odmienny od substratów profil związków obecnych na chromatogramie. Widmo NMR uzyskane dla próbki mieszaniny reakcyjnej wskazywało niestety na obecność w niej więcej niż jednej substancji. Trudności w interpretacji uzyskanego widma NMR uniemożliwiły więc jednoznaczne ustalenie struktury związku powstającego podczas reakcji ABI z AITC.



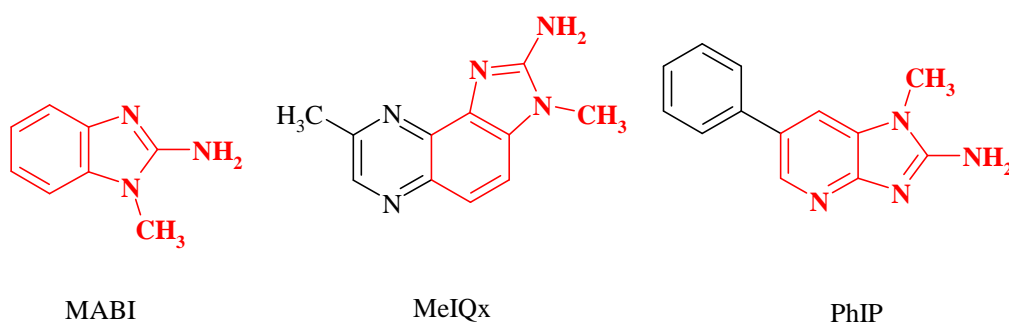
Rysunek 16. Najbardziej prawdopodobne ścieżki reakcji 2-aminobenzimidazolu z izotiocyjanianem allilu (reakcja prowadzona w toluenie przez 16 godzin w temperaturze 105°)

Jak wspomniano wcześniej, prowadzenie reakcji AITC z ABI miało na celu wykorzystanie bezpieczniejszego, a przy tym tańszego modelowego substratu do opracowania wydajnej syntezy koniugatów HAA i ITC, jednakże z uwagi na możliwość powstawania dodatkowych produktów wynikającą z nieobecności grupy metylowej w pozycji N1, występującej również w przypadku wymienionych rakotwórczych heterocyklicznych amin aromatycznych powstających w przetworzonej

żywności (rysunek 14), do dalszych badań wykorzystano pochodną 2-amino-1-metylobenzimidazol (MABI) o bardziej zbliżonej strukturze.

3.2. 2-amino-1-metylobenzimidazol (MABI) jako strukturalny analog heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) i jego koniugaty z izotiocyjanianami (ITC)

Związkiem, którego struktura jak wspomniano jest jeszcze bardziej zbliżona do heterocyklicznych amin aromatycznych o właściwościach rakotwórczych i obecnych w żywności w największych ilościach, jest związek MABI (rysunek 17), dlatego też przeprowadzono jego syntezę jako kolejny etap prac.



Rysunek 17. 2-Amino-1-metylobenzimidazol jako integralny fragment struktury heterocyklicznych amin aromatycznych

Przeprowadzenie metylacji ABI według procedury [254] doprowadziło do otrzymania pożądanego produktu MABI z wydajnością 47%, zamiast oczekiwanej 75%. Przyczyną takich strat mogło być zastosowanie podczas rozdzielania zamiennie toluenu zamiast benzenu sugerowanego w doniesieniach literaturowych. Benzen zastąpiono innym rozpuszczalnikiem ze względu na zalecenia zawarte w Dyrektywie Rady Nr 89/677/EWG odnośnie ograniczenia stosowania tego związku chemicznego (Nr CAS 71-34-2).

3.3. Otrzymanie tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI

3.3.1. Reakcja 2-amino-1-metylobenzimidazolu (MABI) z izotiocyjanianem allilu (AITC), izotiocyjanianem benzylu (BITC) i izotiocyjanianem fenyloetylu (PEITC)

Z uwagi na fakt, że MABI jest ponad 100-krotnie tańszym analogiem związków z grupy HAA możliwe było staranniejsze dobranie warunków reakcji tego związku

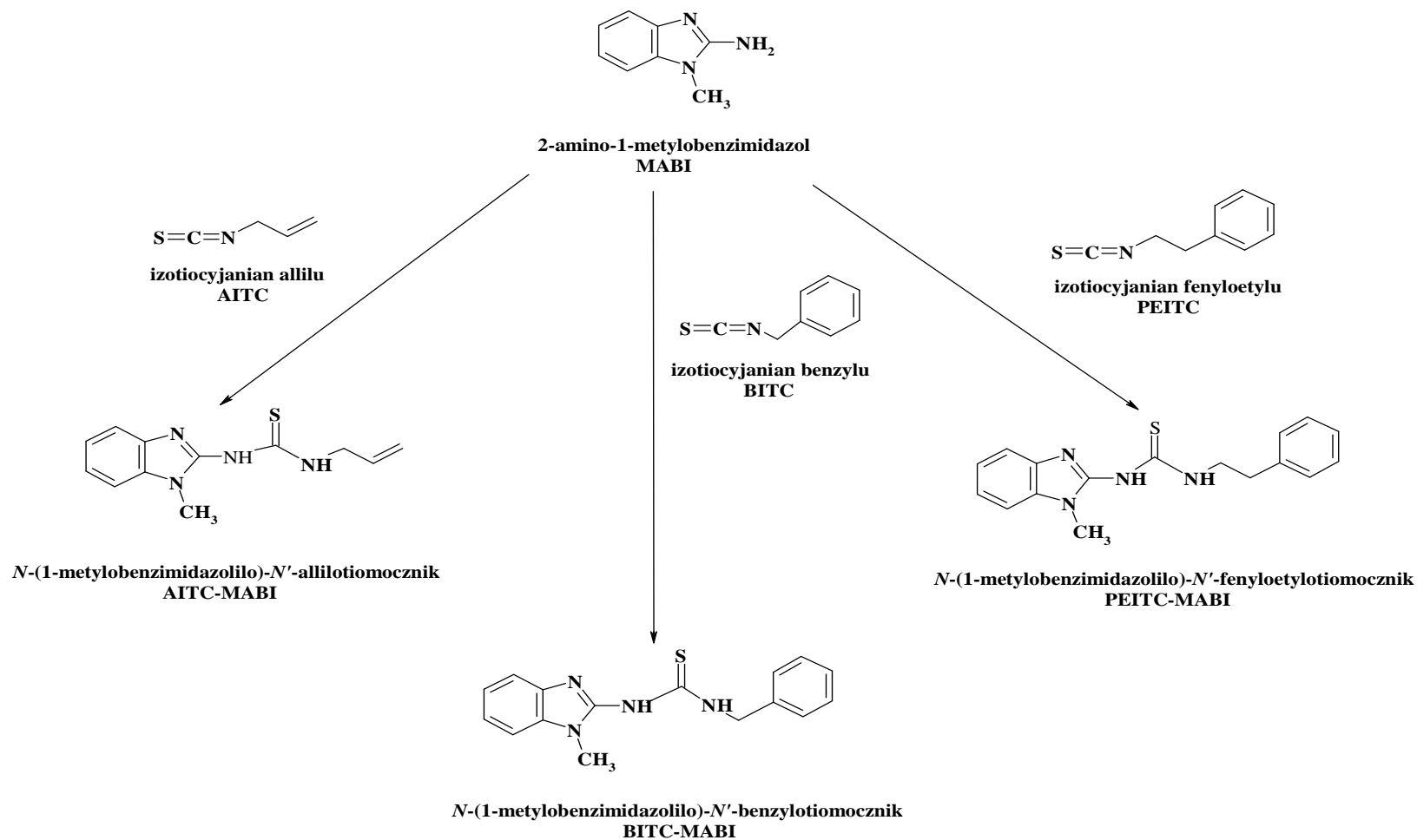
z izotiocyanianami. Dodatkowym argumentem przemawiającym za użyciem MABI do wspomnianych reakcji stanowi jego brak toksyczności. Na rysunku 18 przedstawiono prawdopodobny przebieg reakcji.

Pomimo prostego mechanizmu reakcji MABI ze związkami z grupy ITC (AITC, BITC i PEITC) można było oczekiwać niskiej reaktywności układu MABI – alifatyczny izotiocyanian. Wynikało to z faktu, że mechanizm reakcji aminolizy został szczegółowo zbadany tylko dla aromatycznych izotiocyanianów [263]. Wyniki badań kinetyki reakcji aminolizy aromatycznych związków z grupy ITC wskazują, że szybkość tej reakcji jest większa w przypadku użycia niewodnych, zawierających w swej cząsteczce atom tlenu i protycznych rozpuszczalników [264, 265]. Dodatek kwasu karboksylowego hamuje reakcję aminolizy z udziałem silnych zasad przez utworzenie nieaktywnych kompleksów amina-kwas (stosunek stechiometryczny 1:2). Najlepsze rezultaty uzyskano stosując stechiometryczne ilości substratów, natomiast zastosowanie nadmiaru aminy nie ma znaczenia dla przebiegu reakcji [263].

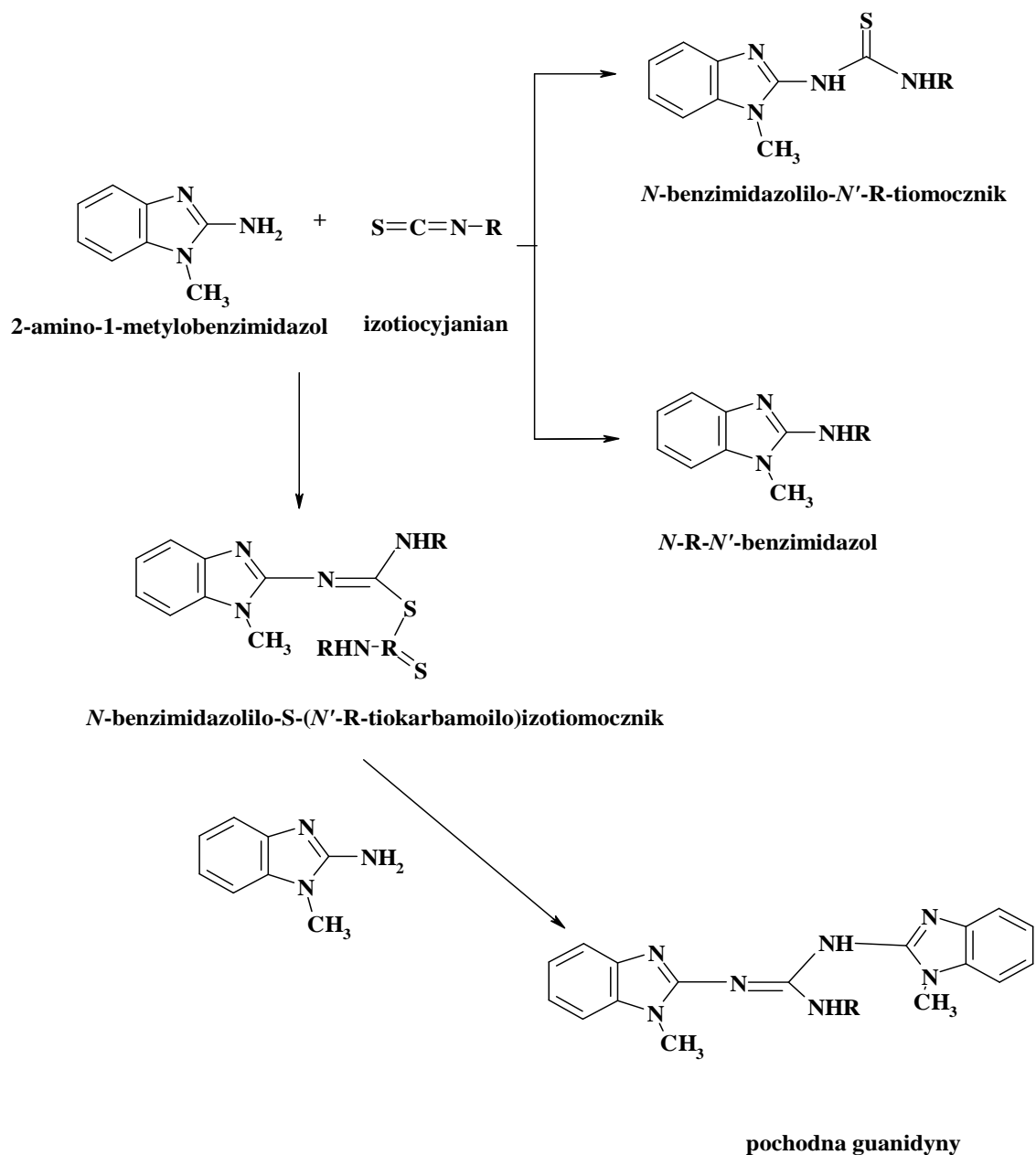
2-amino-1-metylobenzimidazol jest zasadą około 1000 razy słabszą niż typowe alifatyczne aminy, natomiast alifatyczne izotiocyaniany są mniej reaktywne niż arylowe izotiocyaniany (z powodu braku silnego ujemnego efektu rezonansowego pierścienia fenyloвого). Deprotonacja znacznie zwiększa nukleofilowość MABI, jednakże wtedy preferowane jest tworzenie się produktów ubocznych w wyniku następczej addycji, jak w przypadku reakcji związku o zbliżonej strukturze – 2-amino-1-metylo-5-nitroimidazolu ze związkami z grupy ITC [255]. Na rysunku 19 przedstawiono najbardziej prawdopodobne ścieżki reakcji MABI z izotiocyanianami.

Syntezę docelowych 1-benzimidazolilotiomiczników izotiocyanianów (AITC-MABI, BITC-MABI, PEITC-MABI) przeprowadzono po optymalizacji warunków modelowej reakcji między MABI i PEITC. Uzyskane wyniki przeprowadzonych wcześniej badań dotyczących wpływu:

- rozpuszczalnika (iPrOH, EtOH, MeOH, THF, DMF) ,
- dodatku zasady (NaH),
- temperatury (pokoju i podwyższona),
- czasu reakcji,
- różnych proporcji poszczególnych substratów (niedomiar, nadmiar, stechiometryczna ilość) pozwoliły na wybór optymalnych warunków reakcji.



Rysunek 18. Schemat prawdopodobnego przebiegu reakcji addycji 2-amino-1-metylobenzimidazolu z izotiocyjanianami



Rysunek 19. Najbardziej prawdopodobne ścieżki reakcji 2-amino-1-metylobenzimidazolu z izotiocyanianami

W wyniku tych prób stwierdzono, że prowadzenie reakcji w acetonitrylu w podwyższonej temperaturze z użyciem stechiometrycznych ilości reagentów gwarantuje uzyskanie tiomoczników MABI-AITC, MABI-BITC i MABI-PEITC z maksymalną wydajnością.

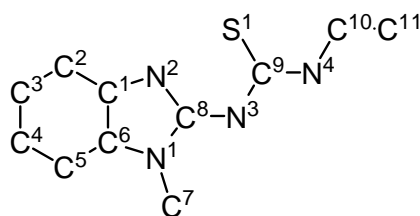
Reakcje AITC, BITC i PEITC z MABI prowadzono w temperaturze 40°C przez odpowiednio okres 2 i 6 godzin (PEITC i BITC). W przypadku dłuższego czasu ogrzewania mieszaniny reakcyjnej AITC i MABI zauważono powstawanie produktów rozkładu izotiocyanianu, co stwierdzono na podstawie chromatogramu uzyskanego

w trakcie analizy próbki mieszaniny reakcyjnej i AITC ogrzewanych w jednakowej temperaturze i przez jednakowy okres czasu uzyskanego z wykorzystaniem techniki TLC. Powstawanie produktów rozkładu AITC związane było z niestabilnością termiczną tego związku. Również prowadzenie reakcji BITC i PEITC przez dłuższy niż 6 godzin okres czasu prowadziło do powstawania dodatkowych produktów.

Jednakże, ani zmiana proporcji substratów (użycie 2 molarnego nadmiaru MABI lub izotiocyanianów), ani dłuższy czas reakcji nie doprowadziło do całkowitego przereagowania substratów.

W wyniku zastosowania oczyszczania chromatograficznego wyizolowano oczekiwane produkty – tiomoczniki AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI z wydajnością 42-63% (wydajności wyznaczone zostały jako średnie wartości trzech eksperymentów). Pomimo, że wydajności odpowiednich tiomoczników były tylko umiarkowane, to uzyskane wyniki są zbliżone do danych literaturowych dotyczących reakcji aminolizy alifatycznych ITC z użyciem 2-aminoazoli [266, 267]. Przyczyna niepełnego przereagowania substratów nie jest zrozumiała.

Uzyskane tiomoczniki AITC-MABI, BITC-MABI i PEITC-MABI zostały poddane badaniom strukturalnym (techniki NMR, rentgenowska analiza strukturalna). Natomiast czystość i jednorodność produktów potwierdziły wyniki analizy elementarnej. Dane uzyskane dla poszczególnych tiomoczników – AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI przedstawiono w punkcie 2.3. Przy numerowaniu poszczególnych atomów produktów ITC-MABI nie posługiwano się numeracją zalecaną przez IUPAC ze względu na znacznie wygodniejszy dla stosowanych technik badawczych sposób numerowania atomów pokazany na rysunku 20.



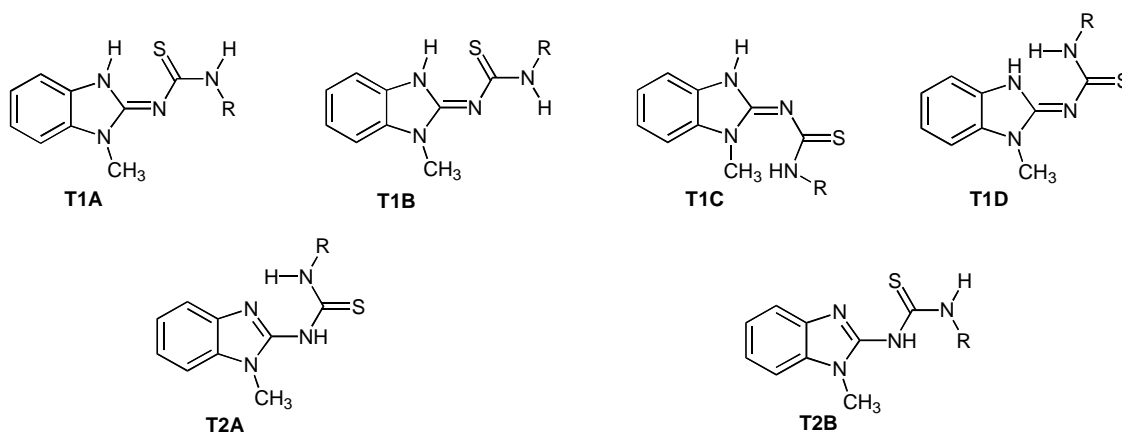
Rysunek 20. Numeracja atomów w cząsteczkach tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI i PEITC-MABI

3.3.2. Zastosowanie techniki spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) na etapie identyfikacji tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI

Dotychczas istnieje tylko jedna praca opisująca reakcję między MABI i izotiocyjanianem fenylu (PITC). Według tego doniesienia [268], otrzymany produkt *N*-(1-metylobenzimidazolilo)-*N'*-fenylotiomocznik (MABI-PITC) przyjmuje w roztworach CDCl₃ i DMSO w temperaturze pokojowej tylko jedną formę tautomeryczną. Analizując widma NMR uzyskane dla tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI, PEITC-MABI można stwierdzić, że związki te w obu rozpuszczalnikach występują w postaci mieszaniny co najmniej trzech izomerów. Na podstawie wstępnej analizy widm ¹H NMR chloroformowych roztworów tiomoczników można zaobserwować tylko dwukrotną ilość sygnałów rezonansowych dla każdego protonu CH i trzech sygnałów wymiennych protonów NH. Jednakże, dokładniejsza analiza widma NMR pozwoliła ujawnić obecność dodatkowych szerokich pików (4-7 %) będących rezultatem dynamicznego procesu przejścia między dwoma dodatkowymi izomerami. W przypadku widma zarejestrowanego w DMSO, dostrzeżono również sygnały (potrójne sygnały CH i sześć wyraźnych pików wymiennych protonów NH) wskazujące na obecność trzech izomerów dla związków AITC-MABI, BITC-MABI i PEITC-MABI.

Jeśli rozważy się tylko częściowy podwójny charakter czterech wiązań C-N (N2-C8, C8-N3, N3-C9 i C9-N4), wtedy możliwe jest występowanie ośmiu izomerów otrzymanych tiomoczników. Przy tym obecność czterech sąsiednich zasadowych miejsc - trzy na atomie azotu i jedno na atomie siarki z dwoma kwaśnymi protonami - sugeruje możliwe istnienie dodatkowych tautomerów. Istnieją dane literaturowe wskazujące, że izomery ZE dwupodstawionych niesymetrycznych tiomoczników są bardziej stabilne niż izomery ZZ/EE i preferowane są izomery zdolne do tworzenia silnych wiązań wewnątrzcząsteczkowych [269].

Należy podkreślić, że forma enaminiolowa nigdy nie została wykryta w stanie podstawowym tiomoczników z powodu jej niezmiernie niskiej populacji w stanie równowagi. W pracy [270] można znaleźć informację na temat obecności niestabilnej enaminiolowej formy tautomerycznej tiomoczników w matrycy argonu w temperaturze kriogenicznej po naświetlaniu promieniowaniem UV. Biorąc pod uwagę powyższe dane wśród możliwych struktur tautomerycznych wybrano najbardziej prawdopodobne izomery, który spełniają powyższe warunki (rysunek 21).



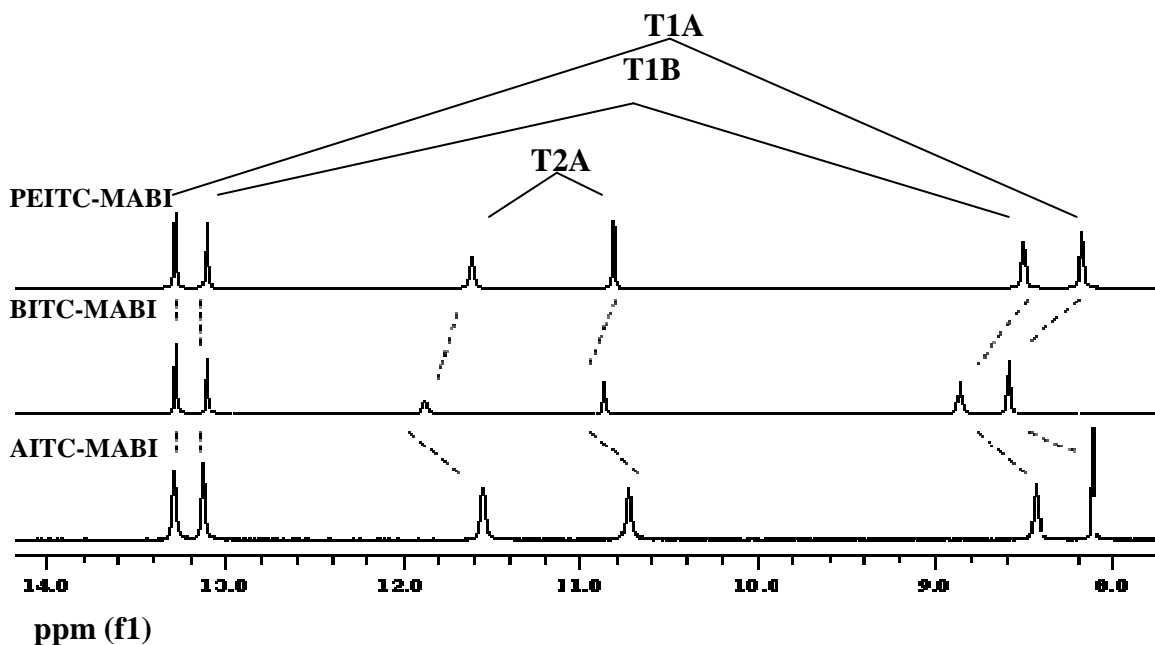
Rysunek 21. Najbardziej prawdopodobne izomery tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI

Jak już wspomniano wcześniej, analizując widmo NMR zarejestrowane w rozpuszczalniku CDCl_3 zaobserwowano trzy sygnały protonów grupy NH (jeden około 14 ppm i dwa przy niższych częstotliwościach (6-7 ppm)). Sygnał grupy NH obserwowany przy wyższej częstotliwości pochodzi od międzycząsteczkowego wiązania wodorowego, a zatem odpowiada strukturom izomerów T1A, T1B albo T2A. Mała różnica w chemicznych przesunięciach niechelatowanych protonów NH ($\Delta\delta = 0,5$ ppm) dwóch tautomerów T1A i T1B sugeruje strukturalne podobieństwo między nimi.

Rozróżnienie poszczególnych sygnałów w każdym widmie ^1H NMR zarejestrowanym w DMSO było możliwe dzięki obserwowanej multipletowości sygnałów protonów N(4) (triplety) (rysunek 22).

Oba piki pochodzące od protonów grupy NH tautomeru T2A występują między pikami pochodzącymi od protonów N(2)H i N(4)H izomerów T1A i T1B. Proton N(4)H w tautomerze T2A był zawsze bardziej odsłaniany (około 12 ppm) niż proton N(3)H (około 11 ppm).

W przypadku tautomerów T1B i T2A tendencja jest odwrotna. We wszystkich otrzymanych tiomocznikach protony N(2)H były najbardziej odsłaniane (δ 13,3 i 13,1 ppm kolejno dla tautomeru T1A i T1B). Natomiast sygnały protonów N(4)H występowały przy wyższych o około 4 ppm wartościach przesunięć chemicznych (δ 8,1 i 8,4 kolejno dla tautomerów T1A i T1B). Znaczne różnice w otoczeniu protonu N(4)H tautomeru T2A i jego większe odsłanianie w porównaniu do odpowiednich sygnałów dla tautomerów T1A i T1B ($\Delta\delta \sim 4$ ppm) jest efektem występowania wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych.



Rysunek 22. Widma ^1H NMR związków AITC-MABI, BITC-MABI, PEITC-MABI zarejestrowane w $\text{DMSO-}d_6$

Interesującą cechą zaobserwowano dla protonów CH. Chemiczne przesunięcie zmierzone w $\text{DMSO-}d_6$ zmniejszało się w następujący sposób: $\text{T1A} < \text{T1B} < \text{T2A}$ (dla protonów NCH_2) i $\text{T1A} \sim \text{T1B} < \text{T2A}$ (dla protonów CH_3). Ostatnia przedstawiona kolejność wskazuje, że struktura tautomerów T2A różni się znacząco zarówno od struktury tautomeru T1A, jak i T1B (głównie we fragmencie benzimidazoliu). Ważne informacje uzyskano w wyniku przeprowadzonych eksperymentów ROESY. Znalezione znaczące efekty NOE jednoznacznie wskazywały na orientację głównych jednostek strukturalnych poszczególnych tiomoczników. Zatem protony N-CH_3 tautomeru T1A są skorelowane z protonami N(4)CH_2 , podczas gdy protony N-CH_3 tautomeru T2A są skorelowane z protonem N(3)H . Brak efektów NOE w przypadku N-CH_3 i N(4)H wskazuje na strukturę tautomeru T1C jako głównego tautomeru. Jednak dopiero widmo korelacyjne $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ gHSQC związku BITC-MABI zarejestrowane w DMSO pozwala rozróżnić wszystkie obserwowane tautomery. Na ich podstawie można stwierdzić, że dla wszystkich trzech tautomerów, atomy azotu N4 są bardziej odsłaniane niż atomy N2/N3. W przypadku tautomerów T1A i T1B, sygnały N2 i N4 znajdują się blisko siebie, natomiast dla tautomeru T2A oba sygnały są oddalone.

Zaobserwowane przesunięcia chemiczne potwierdzają, że atomy azotu N2 w tautomerach T1A i T1B, jak również atomu azotu N3 w tautomerze T2A występują w hybrydyzacji sp^3 .

Analizując widma ^{13}C NMR uzyskano dodatkowe informacje. Obserwowane znaczne zasłanianie (w odniesieniu do MABI) trzeciorzędowego węgla C1 ($\Delta\delta_{2-1} = -11,4$ ppm), równocześnie z zasłanianiem aromatycznego węgla C2 ($\Delta\delta_{2-1} = -3,4$ ppm) potwierdza, że azot N2 występuje w hybrydyzacji sp^3 . Stanowi to dodatkowy dowód na istnienie proponowanych struktur tautomerycznych T1A i T1B. Interesujący jest fakt, że wszystkie sygnały T1B w widmie ^{13}C NMR zarejestrowanym w chloroformie są szerokie i nie zawsze możliwe do wykrycia. Poszerzenie poszczególnych sygnałów w przypadku tautomerów T1B i T2A w widmie 1H NMR może wskazywać na relację między tymi tautomerami i ich możliwe wzajemne odwracalne przekształcanie się. Mechanizm przekształcania pozostaje wciąż niewyjaśniony. Jednakże zamiana T1A na T1B może wynikać z ograniczonej rotacji wokół wiązania C9-N4.

Należy wspomnieć również, że w przypadku widma 1H NMR związku BITC-MABI zarejestrowanego bezpośrednio po rozpuszczeniu w DMSO zaobserwowano tylko sygnały tautomerów T1A i T1B, natomiast sygnały T2A pojawiały się powoli w czasie.

Przesunięcie chemiczne tiokarbonylu C=S wynoszące 184,7 ppm (jednakowe dla wszystkich produktów) jest inne niż dla innych niesymetrycznych tiomoczników zawierających reszty alkilowe i pierścienie heteroarylowe ($\delta = 176-181$ ppm) [266, 267]. Dodatkowe odsłanianie jest wywołane przez częściowo jonowy charakter wiązania C=S.

Na podstawie spektroskopii 1H NMR oszacowano populacje wytypowanych tautomerów dla poszczególnych tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI i PEITC-MABI. W przypadku roztworu produktów AITC-MABI, BITC-MABI w DMSO, obserwowane reakcje wymiany zachodzą dostatecznie wolno by zobaczyć wszystkie protony NH jako wyraźne oddzielne sygnały, co pozwala na łatwy pomiar populacji wszystkich trzech tautomerów. Jednakże, to podejście nie może zostać wykorzystane w przypadku tiomocznika PEITC-MABI, gdzie populacje wszystkich trzech tautomerów są porównywalne (tabela 13) [271].

Tabela 13. Względna populacja (%) izomerów w zależności od rozpuszczalnika obliczona na podstawie danych ^1H NMR dla tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI i PEITC-MABI (średnia z wyników integracji sygnałów protonów CH_3 , CH_2 i NH ; no = nie obserwowany)

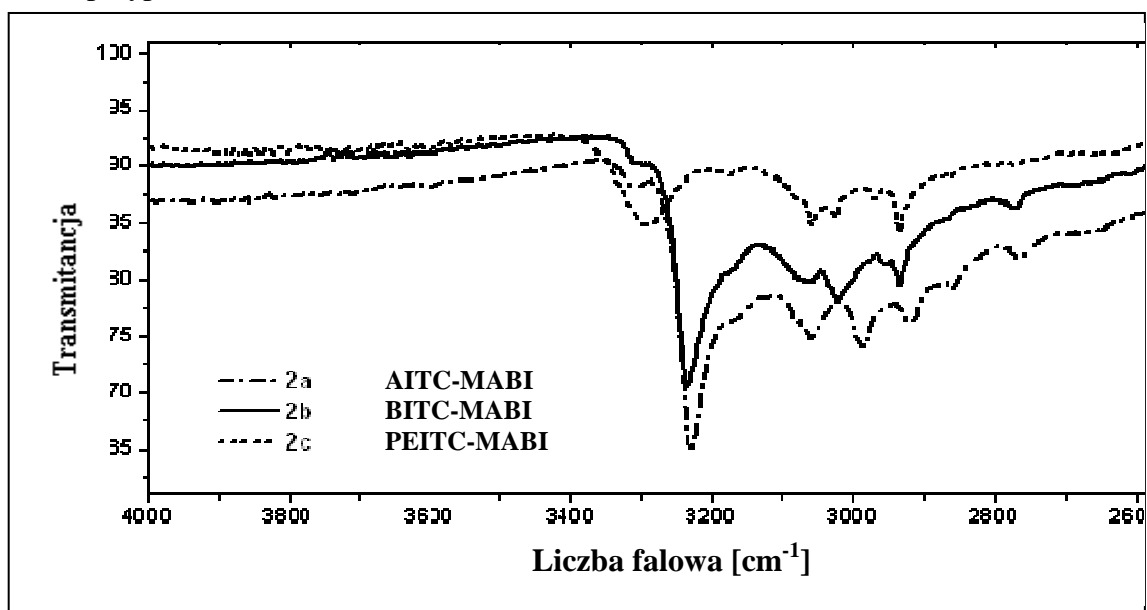
Związek	CDCl_3			$\text{DMSO-}d_6$		
	T1A	T1B	T2A	T1A	T1B	T2A
AITC-MABI	60	37	3	39	34	27
BITC-MABI	55	45	no	43	36	21
PEITC-MABI	55	37	7	35	32	33

3.3.3. Zastosowanie techniki spektroskopii w podczerwieni (IR) na etapie badania struktury tautomerów tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI

Na podstawie wyników uzyskanych dzięki zastosowaniu techniki NMR stwierdzono występowanie produktów ITC-NAC w postaci form tautomerycznych. Potwierdzenie tej informacji mogło umożliwić zastosowanie techniki IR, która pozwala na rozróżnienie izomerów strukturalnych. W związku z tym wykorzystano ją do badania struktury występujących w stanie stałym produktów uzyskanych w wyniku reakcji MABI z AITC, BITC i PEITC. Doświadczenia te przeprowadzono we współpracy z Katedrą Chemii Fizycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

Do badania struktur tautomerycznych wymienionych tiomoczników zastosowano technikę osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR), która wykorzystuje zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia światła od próbki. W zjawisku tym wiązka światła jest wprowadzana do przezroczystego dla podczerwieni materiału, o dużym współczynniku załamania światła (np. diamentu) i pada na jego wewnętrzną powierzchnię. Do zewnętrznej strony tej powierzchni w miejscu odbicia przyciśnięta jest badana próbka. Promieniowanie ulega zjawisku całkowitego wewnętrznego odbicia i nie wydostaje się z ośrodka, w którym się poruszało, ale jego energia może zostać zaabsorbowana przez próbkę znajdującą się po drugiej stronie. Następnie wiązka światła wyprowadzana jest z ośrodka, w którym nastąpiło całkowite wewnętrzne odbicie i możliwe jest zmierzenie jej intensywności oraz pomiar widma w podczerwieni.

Na rysunku 23 przedstawiono widma oscylacyjne badanych tiomoczników w charakterystycznym zakresie $2500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ uzyskane z wykorzystaniem techniki ATR. W regionie większych liczb falowych ($3100\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$) występuje kilka pasm, które są charakterystyczne dla asymetrycznych i symetrycznych drgań rozciągających wiązania NH biorącego udział w tworzeniu wewnątrz- i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych w kryształach. Przesunięcie $\nu(\text{N-H})$ w przypadku tiomocznika PEITC-MABI w stronę większych liczb falowych (3300 cm^{-1}) może sugerować, że wiązania wodorowe biorące udział w tworzeniu dimerów w kryształach są słabsze niż w przypadku tiomoczników AITC-MABI i BITC-MABI [272].



Rysunek 23. Widma IR (w zakresie $4000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$) uzyskane dla tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI i PEITC-MABI w stanie krystalicznym

Brak drgań rozciągających S-H przy 2550 cm^{-1} oraz występowanie pasm w zakresie $739\text{--}742\text{ cm}^{-1}$ charakterystycznych dla $\nu(\text{C}=\text{S})$ wskazuje, że produkty w stanie stałym występują wyłącznie w tionej formie tautomerycznej [273].

Pasma absorpcyjne obserwowane w zakresach $1479\text{--}1491$ [274] i $1093\text{--}1095\text{ cm}^{-1}$ odpowiadają drganiom rozciągającym N-C-N tiomoczników. Wzrost częstości wspomnianych drgań rozciągających w stosunku do opisanej dla tiomoczników w literaturze [275] może być związany z silniejszym podwójnym charakterem wiązania C-N otrzymanych produktów.

3.3.4. Zastosowanie rentgenowskiej analizy strukturalnej na etapie badania struktury krystalograficznej tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI

Powszechnie wiadomo, że tautomery wykazują różne właściwości krystalograficzne (długości wiązań, parametry wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego, kąty w cząsteczkach). W związku z tym, korzystając z wszechstronnej pomocy dr hab. inż. Jarosława Chojnackiego z Katedry Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, wykorzystano rentgenowską analizę strukturalną do zbadania struktury krystalograficznej badanych tiomoczników. Za pomocą techniki rentgenowskiej analizy strukturalnej podobnie jak techniki IR można opisać stan stały tiomoczników, dlatego możliwe było również porównanie wyników badań spektralnych produktów AITC-MABI, BITC-MABI i PEITC-MABI w roztworze z wynikami badań krystalograficznych w stanie stałym. Należy przy tym podkreślić, że wyniki uzyskane z wykorzystaniem rentgenowskiej analizy strukturalnej świadczyły jednoznacznie o strukturze tiomoczników.

W tabeli 14 umieszczono dane krystalograficzne struktury związków AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI. Natomiast główne cechy geometryczne struktur tych produktów przedstawiono w tabeli 15. Wszystkie dane zawarte w tabelach 15-17 były porównywane z dostępnymi w literaturze parametrami dla tiomocznika PITC-MABI [268]. W przypadku kryształów otrzymanych na drodze syntezy tiomoczników występuje tylko jeden izomer i jego struktura odpowiada jednej spośród tych ustalonych na podstawie analizy NMR, mianowicie T1A (rysunek 21). Forma T1A dominuje we wszystkich produktach w trakcie ich badań w stanie stałym i w roztworze.

Struktury krystaliczne tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI otrzymanych na drodze syntezy chemicznej są podobne do opisanych w literaturze analogicznych *N*-podstawionych pochodnych MABI i PITC. Jednakże, wiązanie C9-N4 związków AITC-MABI, BITC-MABI i PEITC-MABI jest krótsze niż w przypadku PITC-MABI z powodu bezpośredniego wiązania atomu N4 z pierścieniem aromatycznym (pierścień fenyłowy) zamiast węglem alkilowym.

Typowa długość wiązania C=S wynosi 1,60 Å [276], natomiast w przypadku wszystkich badanych produktów wiązanie C9-S1 ulega wydłużeniu (1,72). Fakt, że pierścień benzimidazolowy jest prawie w jednej płaszczyźnie z rdzeniem tiomocznika (tabela 15) wskazuje na istotny udział poszczególnych form rezonansowych tiomoczników AITC-MABI i BITC-MABI.

Tabela 14. Dane krystalograficzne struktury związków AITC-MABI, BITC-MABI i PEITC-MABI

Związek	AITC-MABI	BITC-MABI	PEITC-MABI
Kod	CCDC 751508	CCDC 752764	CCDC 751509
Kolor kryształów i budowa	Żółty pryzmat	Żółty pryzmat	Bezbarwny pryzmat
Wzór empiryczny	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ S ₁	C ₁₆ H ₁₅ N ₄ S ₁	C ₁₇ H ₁₈ N ₄ S ₁
M_r	246,33	296,39	310,41
Temperatura (K)	120(2)	120(2)	120(2)
Długość fali (Å)	0,71073	0,71073	0,71073
Układ krystalograficzny, grupa przestrzenna	triclinic, <i>P</i> -1	triclinic, <i>P</i> -1	triclinic, <i>P</i> -1
Parametry komórki elementarnej			
<i>a</i> (Å)	9,672(3)	9,1003(5)	9,6509(9)
<i>b</i> (Å)	7,541(3)	9,1926(5)	9,7089(13)
<i>c</i> (Å)	9,267(3)	10,2034(4)	10,3757(17)
α (°)	90,39(3)	89,760(4)	65,086(14)
β (°)	111,58(3)	82,410(4)	64,455(12)
γ (°)	104,63(3)	60,603(5)	79,705(9)
Objętość komórki (Å ³)	604,5(4)	735,33(6)	795,5(2)
<i>Z</i>	2	2	2
Gęstość (g cm ⁻³)	1,353	1,339	1,296
Współczynnik absorpcji (mm ⁻¹)	0,251	0,219	0,205
<i>F</i> (000)	260	312	328

W przypadku związku PEITC-MABI występuje godne uwagi odkształcenie cząsteczki na co wskazuje duży kąt dwuściennym między pierścieniem benzimidazolilu i płaszczyzną tiomocznika (*P1* i *P2*) (13,3 °) i odchylenie od planarności rdzenia tiomocznika (θ_1 i θ_2 : -8.3 oraz 169,2°).

W przypadku PEITC-MABI, w układzie dimerów połączonych wiązaniem wodorowym występuje najmniejsza odległość międzypłaszczyznowa pomiędzy płaszczyznami tiomocznika *P2-P2'* (0,16 Å, prawie płaski dimer) i krótsza odległości H...S. Pomimo tego nie można utworzyć międzycząsteczkowej sieci wiązań wodorowych, która byłaby silniejsza niż w tiomocznikach AITC-MABI i PEITC-MABI.

Tabela 15. Wybrane długości wiązań (Å) w cząsteczkach tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI, PEITC-MABI oraz PITC-MABI (na podstawie [268])

Związek	C9-S1	C9-N3	C9-N4	C8-N3	C8-N2	C8-N1	N1-C7	N4-C10
AITC-MABI	1,724(2)	1,343(2)	1,340(2)	1,322(2)	1,361(2)	1,362(2)	1,457(2)	1,462(2)
BITC-MABI	1,726(2)	1,348(2)	1,344(2)	1,325(2)	1,360(2)	1,361(2)	1,457(2)	1,464(2)
PEITC-MABI	1,721(2)	1,349(2)	1,341(2)	1,327(2)	1,354(2)	1,364(2)	1,455(2)	1,456(2)
PITC-MABI	1,725(1)	1,341(2)	1,364(2)	1,335(2)	1,350(2)	1,367(2)	1,458(2)	1,417(2)

Tabela 16. Wybrane odległości międzyatomowe (°), kąty walencyjne, torsyjne i dwuścienne w cząsteczkach AITC-MABI, BITC-MABI, PEITC-MABI oraz PITC-MABI (na podstawie [268])

Związek	Parametry wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego			Kąty dwuścienne		Kąty torsyjne	
	N(2)H...S(1)	N(2)... S(1)	< N(2)HS	< (P1, P2)	< (P1, P3)	θ_1	θ_2
AITC-MABI	2,352	2,990	130	4,1	47,4	-1,8	177,4
BITC-MABI	2,356	2,984	131	5,6	139,2	-1,6	177,4
PEITC-MABI	2,315	2,975	131	13,3	66,5	-8,3	169,2
PITC-MABI	2,287	2,946	133	5,3	7,0	-0,5	179,9

$\theta_1 = \text{C8-N3-C9-S1}$; $\theta_2 = \text{S1-C9-N4-C10}$; $P1 = \text{pierścień benzimidazolilu}$, $P2 = \text{powierzchnia tiomocznika}$, $P3 = \text{pierścień fenylowy lub powierzchnia etenu}$

Tabela 17. Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe i parametry oddziaływania $\pi-\pi$ (°, Å) dla dimerów AITC-MABI, BITC-MABI, PEITC-MABI oraz dla PITC-MABI (na podstawie [268]), Imid: pierścień C1-N2-C8-N1-C6, Benz: pierścień C1-C6, Ph: C11-C16

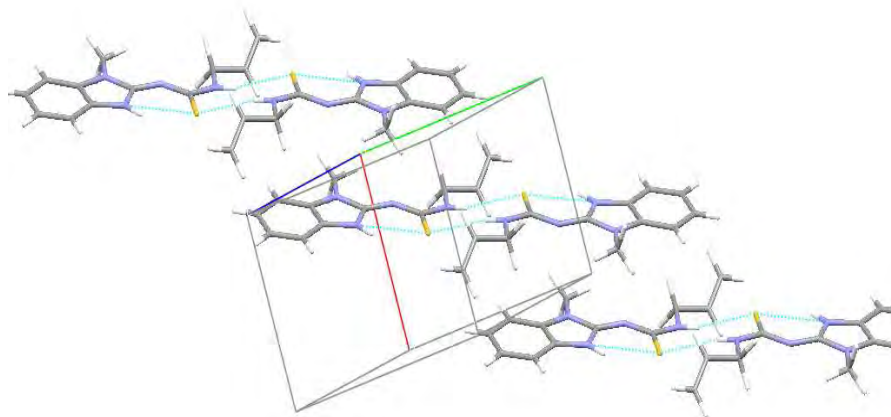
Związek	< N(2)HS'	N(2)H...S(1)'	N(2)...S(1)'	Odległość między płaszczyznami P2-P2' w dimerach	Najkrótsza odległość między środkami ciężkości
AITC-MABI	167,0	2,565	3,379	1,05	4,153(2) (Imid→Imid')
BITC-MABI	161,4	2,596	3,407	0,33	3,905(2) (Imid→Benz) 4,023(2) (Ph→Ph)
PEITC-MABI	166,9	2,546	3,399	0,16	4,443(2) (Imid→Benz)
PITC-MABI	163,5	2,627	3,466	0,60	-

Wyjaśnieniem tego może być większa strata energii podczas zmiany konformacyjnej związanej z tworzeniem dimeru. Należy podkreślić, że wyniki uzyskane dzięki wykorzystaniu techniki ATR potwierdzają, że pasmo drgań rozciągających N-H związku PEITC-MABI jest przesunięte w lewo (około 100 cm^{-1}), co wskazuje na słabsze wiązania międzycząsteczkowe występujące w dimerach.

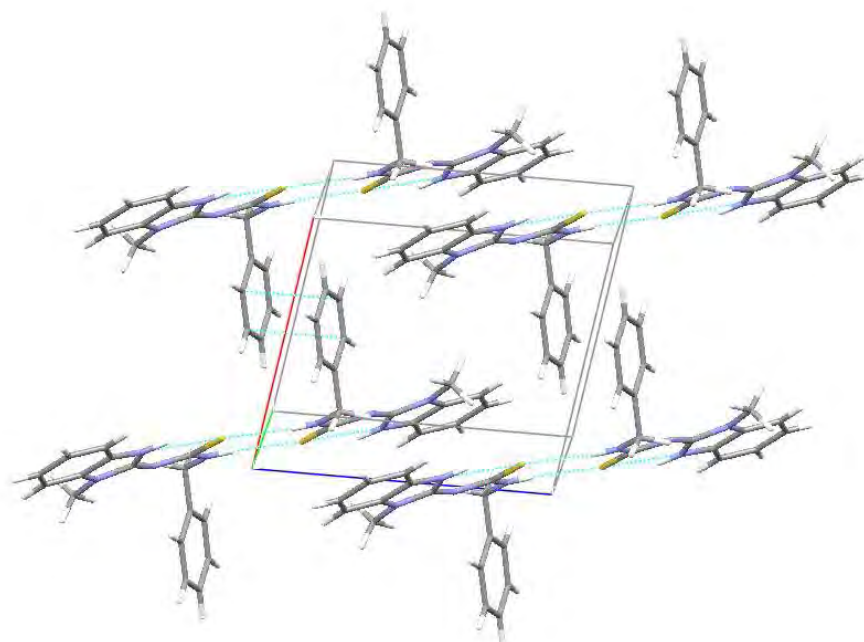
Z drugiej strony, w przypadku tiomocznika PEITC-MABI siła połączenia między dimerami jest mniejsza niż oddziaływanie między dimerami AITC-MABI i BITC-MABI (rysunek 24-26). Brak oddziaływań π - π (tabela 17; dla porównania: odległość międzypłaszczyznowa w graficie wynosi $3,35\text{ \AA}$) oraz innych istotnych połączeń jest powodem większych odległości między dimerami w łańcuchach i między równoległymi łańcuchami.

Na podstawie określonych właściwości krystalograficznych badanych 2-benzimidazolilotiomoczników można stwierdzić, że w stanie stałym związku te, podobnie jak opisany w literaturze koniugat PITC i MABI [268], występują w postaci jednej formy tautomerycznej T1A (jako symetryczny względem środka dimer T1A-T1A dimer). Dane spektroskopowe wskazują na występowanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych dla głównego izomeru T1A, obserwowanych zarówno dla kryształów jak i roztworów związków w DMSO.

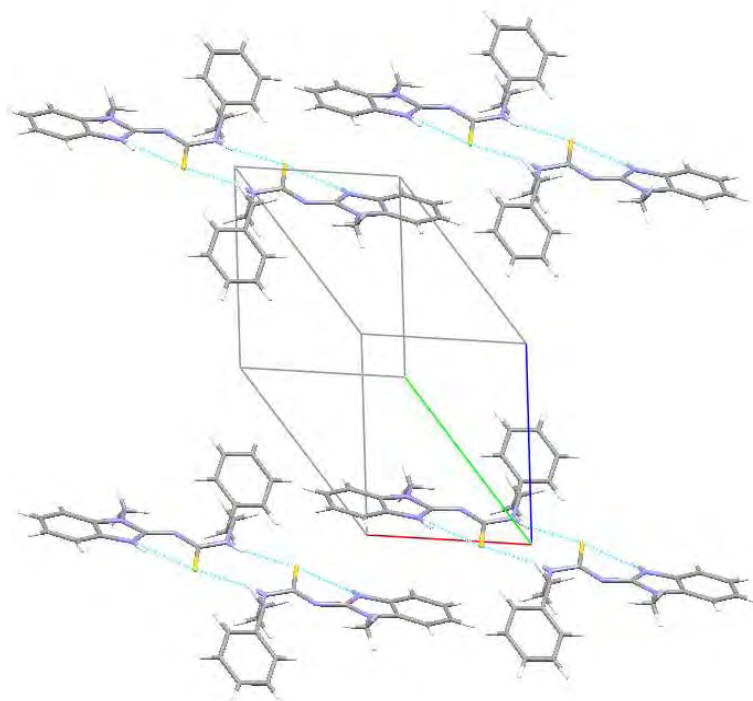
Związki AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI podobnie jak typowe niesymetryczne tiomoczniki występują w postaci dimerów tworzących się z udziałem podwójnego międzycząsteczkowego wiązania $\text{NH}\cdots\text{S}$. Natomiast produkty ITC-MABI po rozpuszczeniu istnieją jako mieszanina trzech tautomerów. W przypadku widm NMR rejestrowanych w chloroformie, forma tautomeryczna T1A zdecydowanie przeważa w stosunku do form T1B i T2A, natomiast w DMSO wszystkie trzy izomery występują w prawie równych proporcjach. Teoretycznie przewidziane struktury wszystkich tautomerów potwierdzono jednoznacznie za pomocą wspomnianych technik. W przypadku roztworów produktów znaleziono rzadziej spotykane oddziaływania NOE dla formy T1A. Fakt ten stanowi dodatkowe potwierdzenie zwiększonego charakteru podwójnego wiązania N4-C9 w tiomocznikach, przez co ich budowa jest bardziej sztywna, jak również wzmocnione są międzycząsteczkowe oddziaływania w ich dimerach.



Rysunek 24. Upakowanie kryształu AITC-MABI (dimery tiomocznika połączone za pomocą słabych wiązań π - π między pierścieniami Imid-Imid)



Rysunek 25. Upakowanie kryształu BITC-MABI (dimery tiomocznika połączone za pomocą dwóch wiązań π - π między pierścieniami Imid - Benz i Ph - Ph)



Rysunek 26. Upakowanie kryształu PEITC-MABI (dimery tiomocznika połączone za pomocą słabych wiązań π - π między pierścieniami Imid-Benz)

W strukturze krystalicznej badanych tiomoczników stwierdzono obecność formy T1A. Po rozpuszczeniu w DMSO, dimery tiomoczników T1A-T1A zaczynają wolno dysocjować. W wyniku rotacji wokół wiązania C9-N4, T1A jest przekształcony do izomeru T1B. Wówczas przestaje być możliwe utworzenie dimerów z powodu przeciwnych pozycji grupy akceptorowej C=S i donorowej N(4)H. Tautomery T2A powstają w wyniku przeniesienia protonu z atomu azotu N(2) na atom azotu N(3). Izomer T2A podobnie jak T1B nie jest zdolny do tworzenia dimerów.

DMSO jako rozpuszczalnik wyrównuje różnice energii między wszystkimi izomerami ze specjalną stabilizacją T2A (najbardziej polarny izomer w roztworze).

Wszystkie trzy izomery niesymetrycznych tiomoczników znajdują się w stanie równowagi przy szybkości wymiany jaka występuje w temperaturze pokojowej. Mała szybkość wymiany pozwala na jednoznaczne określenie struktur tautomerycznych. Fakt, że analogiczny związek PITC-MABI istnieje jako jeden izomer w temperaturze pokojowej wskazuje, że zaobserwowane różne zachowanie tiomoczników AITC-MABI, BITC-MABI oraz PEITC-MABI należy traktować jako ich specyficzną cechę [271].

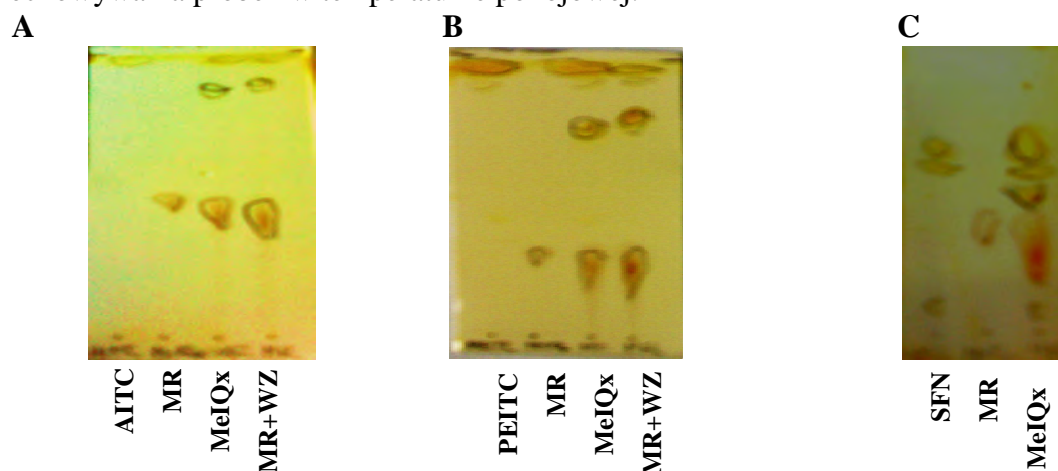
3.4. Reakcje 2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksaliny (MeIQx) z izotiocyjanianem allilu (AITC), izotiocyjanianem fenyloetylu (PEITC) i sulforafanem (SFN)

3.4.1. Synteza tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx

Opracowana wcześniej procedura syntezy produktów poszczególnych izotiocyjanianów z MABI - analogiem związków z grupy HAA została wykorzystana do przeprowadzenia reakcji PEITC (największa wydajność przypadku reakcji z MABI) z jedną z HAA – MeIQx. Jednak w przypadku tej reakcji nie uzyskano produktu. Nieznaczna rozpuszczalność aminy w acetonitrylu utrudniała jej reagowanie z izotiocyjanianem i postęp reakcji w kierunku tworzenia produktu. W związku z tym sprawdzono przebieg reakcji wykorzystując w tym celu inne rozpuszczalniki, takie jak THF, MeOH, DMSO i DNA i izopropanol.

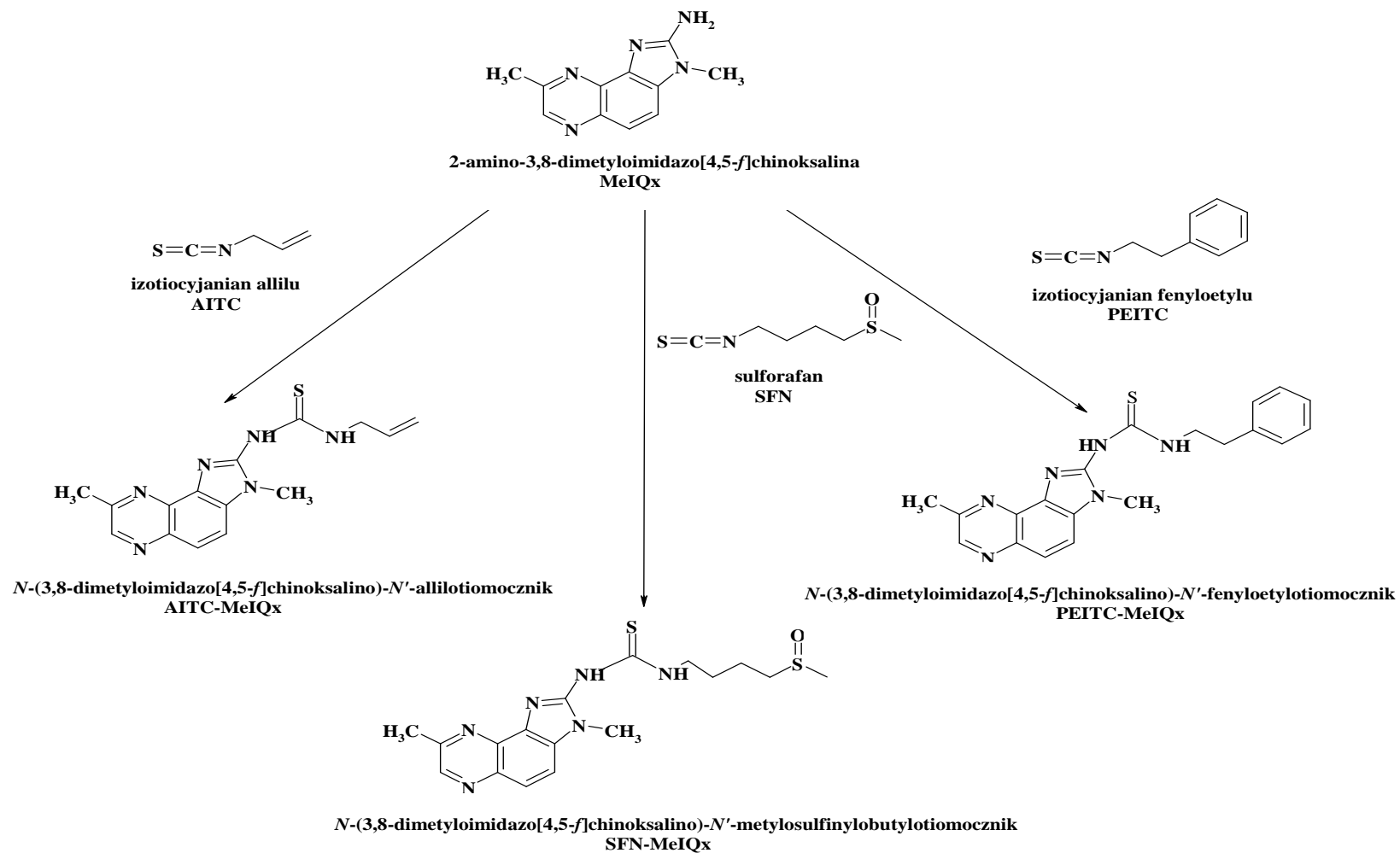
Dopiero zastosowanie izopropanolu jako rozpuszczalnika i prowadzenie reakcji w temperaturze 37°C przez okres 3, 5 i 6 godzin pozwoliło na uzyskanie produktów reakcji odpowiednio AITC, PEITC, SFN z MeIQx. Chromatogramy przedstawiające profil wzorców ITC i MeIQx oraz mieszanin reakcyjnych uzyskane z wykorzystaniem techniki TLC przedstawiono na rysunku 27. Na rysunku 28 przedstawiono prawdopodobny przebieg reakcji.

W przypadku próbek roztworów izopropanolowych PEITC i SFN, na chromatogramie TLC stwierdzono obecność dodatkowego związku. Nowy związek powstawał prawdopodobnie w wyniku rozkładu izotiocyjanianów w trakcie dłuższego przechowywania próbek w temperaturze pokojowej.



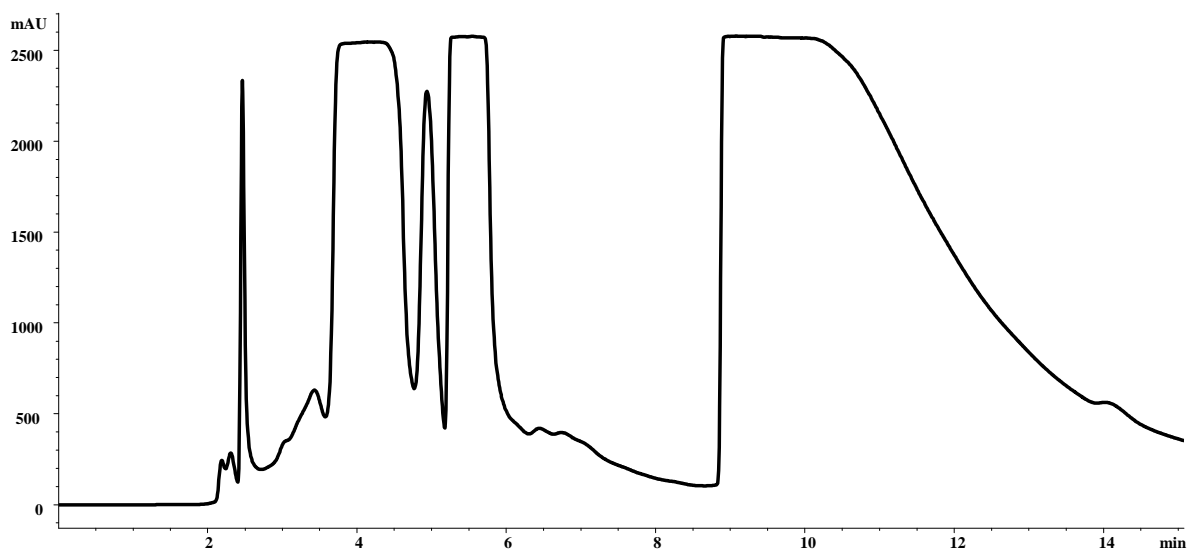
Rysunek 27. Chromatogramy (TLC) uzyskane w trakcie analizy próbek roztworów zawierających substancje wzorcowe AITC, PEITC, SFN i MeIQx, mieszaniny reakcyjnej (MR) oraz mieszaniny reakcyjnej wraz z wzorcami (MR+WZ)

(układ rozwijający: A, B - dichlorometan : metanol (12 : 1), C – dichlorometan : metanol (9 : 1), wizualizacja za pomocą promieniowania UV, wywoływane za pomocą par jodu)



Rysunek 28. Schemat prawdopodobnego przebiegu reakcji addycji izotiocyjanianu allilu, fenyloetylu i sulforafanu z heterocykliczną aminą aromatyczną MeIQx

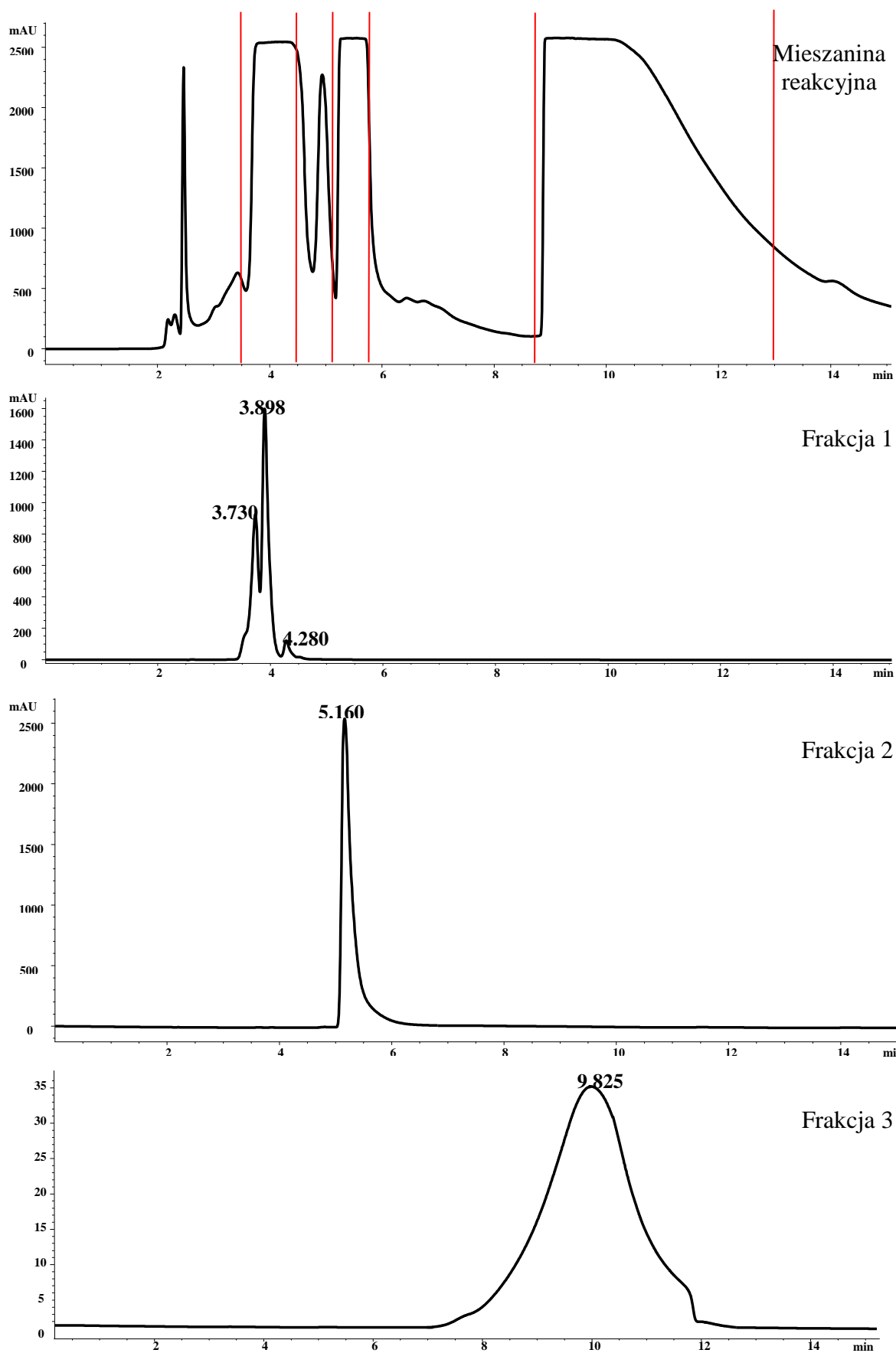
Z uwagi na fakt, że SFN jest związkiem niestabilnym, aby uniknąć powstawania produktów rozkładu SFN produkt reakcji SFN z MeIQx oczyszczano z wykorzystaniem techniki HPLC zamiast chromatografii kolumnowej. W tym celu w trakcie analizy chromatograficznej próbki roztworu SFN-MeIQx do oddzielnych probówek zbierano frakcje zawierające związki o czasach retencji (t_r): 3,9; 5,2 i 9,8 (rysunek 29).



Rysunek 29. Chromatogram uzyskany podczas procesu frakcjonowania mieszaniny reakcyjnej SFN-MeIQx uzyskany dzięki zastosowaniu układu HPLC-DAD

Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy frakcji 2 i 3 wskazują na obecność w każdej z nich jednej substancji (rysunek 30). Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że we frakcji 2 wyodrębnionej z mieszaniny reakcyjnej znajduje się prawdopodobny produkt SFN-MeIQx.

W wyniku oczyszczania produktów z wykorzystaniem techniki chromatografii kolumnowej i techniki HPLC (w przypadku SFN-MeIQx) uzyskano koniugaty AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx z niewielką wydajnością (odpowiednio 12, 17 i 21 %). Brak jest danych literaturowych dotyczących syntezy tych związków. Można jedynie znaleźć prace na temat reakcji izotiocyanianów i związków heterocyklicznych wskazujące na wydajności rzędu 40-80 % [267]. Jednakże reakcje z udziałem związków z grupy ITC z egzocykliczną grupą aminową związków heterocyklicznych mogą mieć nieprzewidywalny przebieg jak wskazano w pracy [260]. Natomiast niskie wydajności otrzymanych produktów mogą wynikać między innymi ze:

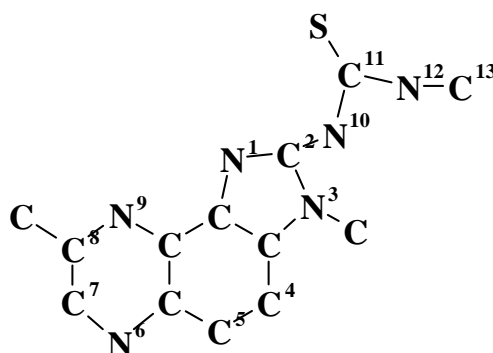


Rysunek 30. Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek mieszaniny reakcyjnej oraz poszczególnych wyodrębnionych z nich frakcji otrzymanych dzięki zastosowaniu techniki HPLC

- słabej rozpuszczalności MeIQx (utrudnione oddziaływanie cząsteczek substratów i tworzenie produktów),
- ograniczonego czasu prowadzenia reakcji z uwagi na niestabilność izotiocyanianów,
- strat podczas oczyszczania produktów.

Należy wspomnieć, że dzięki wykorzystaniu chromatografii kolumnowej odzyskiwano nieprzereagowany cenny substrat – MeIQx, który wykorzystywano do przeprowadzania kolejnych reakcji.

Produkty uzyskane w wyniku reakcji poszczególnych związków z grupy ITC z MeIQx zostały poddane badaniu z wykorzystaniem technik NMR i MS/MS. Dane uzyskane dla poszczególnych tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx przedstawiono w punkcie 2.3. Wzór ogólny badanych związków wraz z oznaczeniami poszczególnych atomów węgla i azotu przedstawiono na rysunku 31.



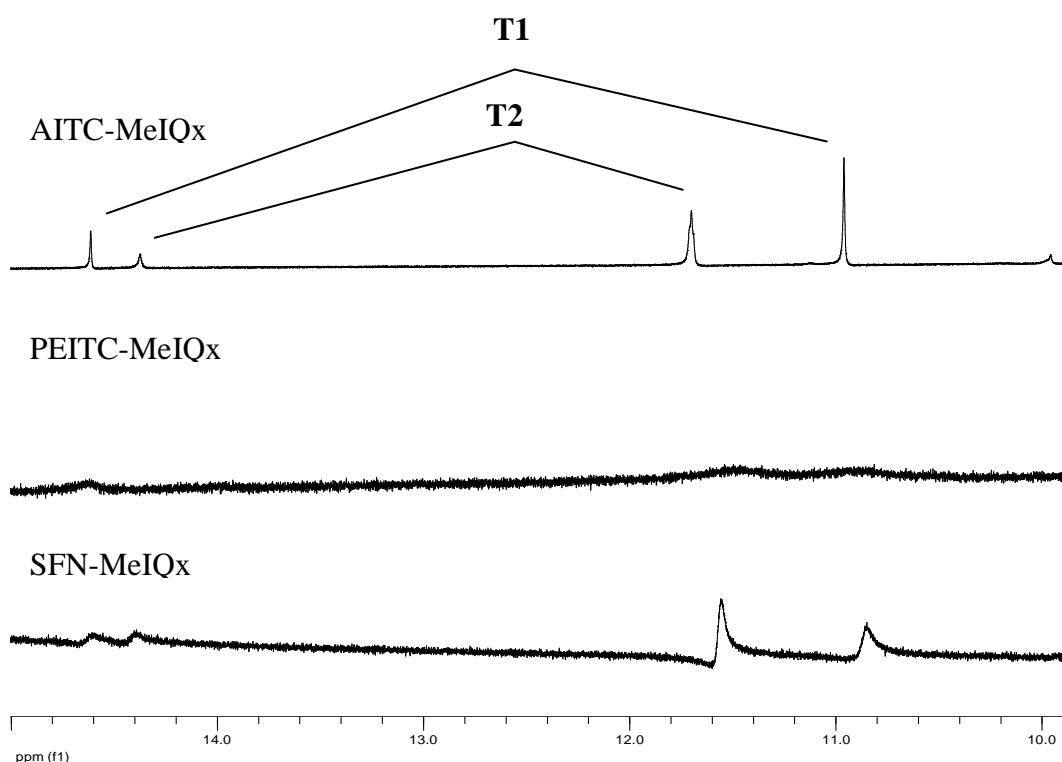
Rysunek 31. Wzór ogólny tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx wraz z oznaczeniem poszczególnych atomów

3.4.2. Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) na etapie identyfikacji tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx

Produkty uzyskane w wyniku reakcji MeIQx z AITC, PEITC oraz SFN poddano analizie strukturalnej z wykorzystaniem techniki NMR. Ze względu na niewielką ilość produktów możliwe było wykonanie jedynie widm protonowych tych związków.

Widma ^1H NMR produktów reakcji ITC-MeIQx zarejestrowane w chloroformie były trudne do interpretacji. Związane to było ze słabą rozpuszczalnością tych produktów we wspomnianym rozpuszczalniku i małą intensywnością sygnałów odpowiadających tiomocznikom ITC-MeIQx, na poziomie intensywności sygnałów

pochodzących od zanieczyszczeń. Dopiero widma zarejestrowane w DMSO stanowiły źródło informacji o badanych związkach. Jednak jedynie sygnały protonów C-4H, C-5H, C-7H oraz sygnały NH zostały przypisane. Natomiast z powodu małej intensywności i dużej bliskości sygnałów, nie było możliwe dokładne określenie pozycji wszystkich sygnałów w widmie protonowym. Rozróżnienie poszczególnych sygnałów NH w każdym widmie ^1H NMR zarejestrowanym w DMSO dla PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx nie było możliwe z uwagi na brak różnorodności sygnałów protonów, bowiem obserwowano wyłącznie cztery singlety (rysunek 32).



Rysunek 32. Widma ^1H NMR związków AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx, SFN-MeIQx zarejestrowane w DMSO- d_6

Sygnały protonów C-4H oraz C-5H tiomoczników ITC-MeIQx w widmie NMR występują przy wyższych wartościach przesunięć chemicznych niż ma to miejsce dla odpowiadających im sygnałów obecnych na widmie MeIQx. Większe odślanianie protonów aromatycznych obserwowano również w przypadku tiomoczników ITC-MABI. Fakt ten może wskazywać na obecność struktury produktu reakcji ITC z MeIQx zamiast aminy (substrat reakcji ITC z MeIQx) w analizowanej próbce. Jednak

brak pewności odnośnie struktury tautomerów tiomoczników ITC-MeIQx powoduje, że nie jest możliwe porównanie różnicy przesunięć sygnałów protonów aromatycznych w przypadku ITC-MABI/MABI z odpowiednią różnicą dla ITC-MeIQx/MeIQx. W tabeli 18 przedstawiono porównanie odczytanych z widm NMR wartości przesunięć chemicznych sygnałów wspomnianych wyżej protonów uzyskane dla tiomoczników ITC-MeIQx oraz odpowiednie dane literaturowe dla MeIQx [277].

Tabela 18. Wartości przesunięć chemicznych ^1H NMR sygnałów protonów C-4H oraz C-5H uzyskane dla tiomoczników ITC-MeIQx oraz MeIQx

	MeIQx	AITC-MeIQx	PEITC-MeIQx	SFN-MeIQx
C-4H	7,55 ppm	7,86 ppm	7,88 ppm	8,00 ppm
C-5H	7,72 ppm	7,95 ppm	8,00 ppm	8,05 ppm

W celu uproszczenia widma protonowego uzyskanego dla tiomocznika PEITC-MeIQx rejestrowano widma protonowe tego związku w wyższej temperaturze do 100°C (rysunek 33), bowiem spodziewano się, że wówczas zostanie pokonana bariera rotacji. W przypadku zastosowania temperatury 60°C widoczne były pojedyncze sygnały. Natomiast w temperaturze 100°C następował rozkład związku PEITC-MABI. Wskazuje to możliwość występowania tych samych struktur tautomerycznych.

W przypadku tiomocznika PEITC-MABI w wyniku rotacji wokół wiązania C9-N4, izomer T1A był przekształcony do izomeru T1B. Wyznaczona bariera rotacji wokół wspomnianego wiązania wynosiła 18-20 kcal/mole. Aby sprawdzić możliwość występowania tych struktur tautomerycznych również w przypadku tiomocznika PEITC-MeIQx obliczono barierę rotacji dla badanego związku. Do jej wyznaczenia wykorzystano równanie Eyringa:

$$\Delta G^\ddagger = 4,57Tc \left(10,32 + \log \frac{Tc}{Kt} \right) \quad 1 / \text{równanie Eyringa}$$

gdzie:

- ΔG^\ddagger to energia aktywacji przy koalescencji;
- Tc to temperatura koalescencji (temperatura, w której zanika minimum między sygnałami),

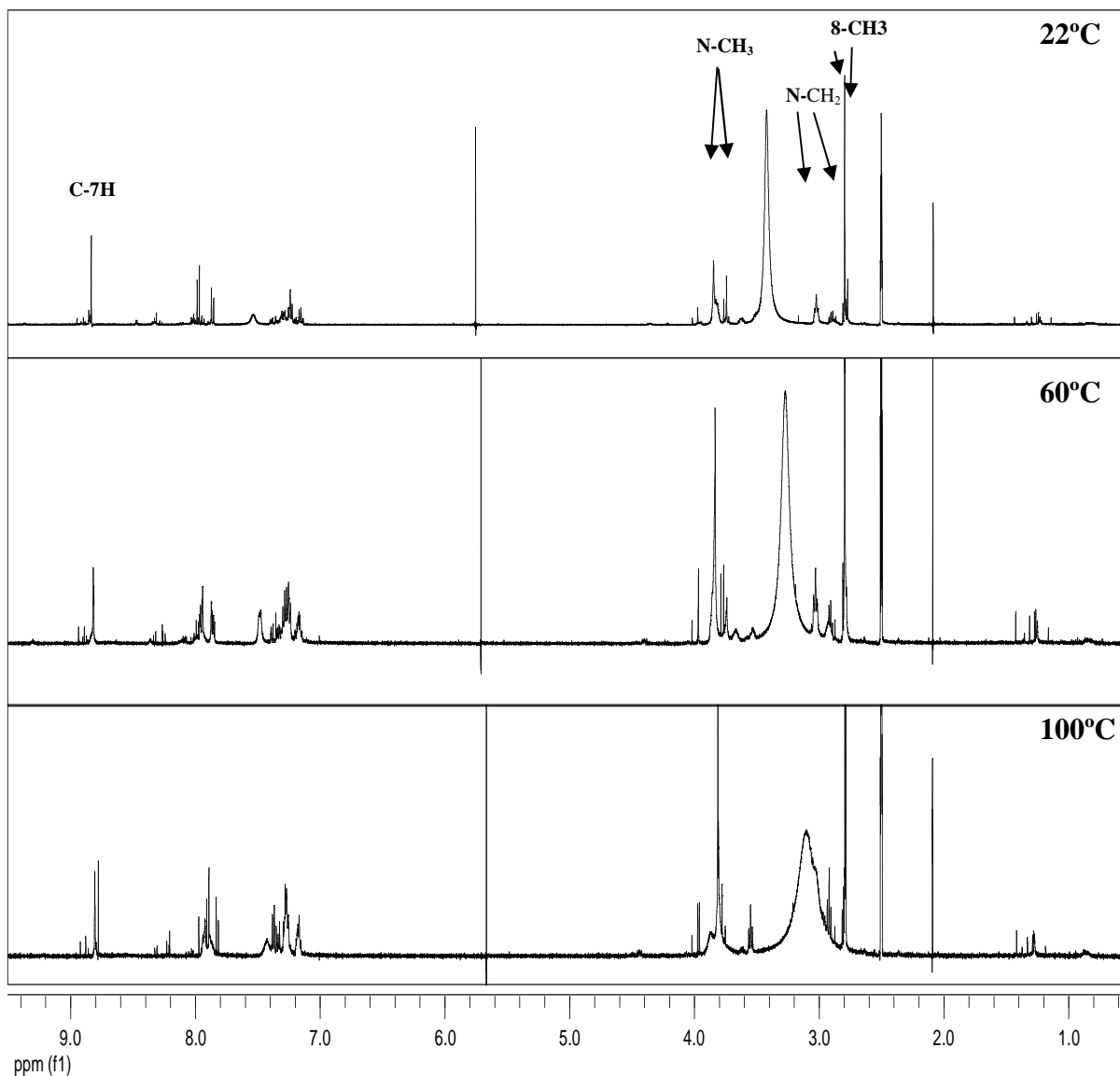
- Kt to stała szybkości dwóch protonów w temperaturze koalescencji i można ją wyznaczyć korzystając z zależności:

$$Kt = \frac{\pi\Delta\nu}{\sqrt{2}}$$

2 / równanie Eyringa

gdzie:

- $\Delta\nu$ to różnica przesunięć chemicznych dwóch sygnałów pochodzących od tautomerów.



Rysunek 33. Widma NMR ^1H NMR tiomocznika PEITC-MelQx zarejestrowane w różnych temperaturach (22-100°C) w $\text{DMSO-}d_6$

Dla temperatury 60°C jako temperatury koalescencji i $\Delta\nu = 37,5$ Hz czyli 0,075 ppm bariera rotacji wynosi 16,6 kcal/mole i jest zbliżona do wartości uzyskanej w przypadku

Analizując uzyskane widma $^1\text{H-NMR}$ tiomoczników AITC-MeIQ_x, PEITC-MeIQ_x oraz SFN-MeIQ_x można stwierdzić, że produkty te występują prawdopodobnie w postaci dwóch izomerów, zaobserwowano bowiem dwukrotną ilość sygnałów rezonansowych dla protonu C-7H i cztery sygnały protonów grupy NH (dwa w zakresie 14-15 ppm i dwa przy niższych częstotliwościach (11-12 ppm)). Mała różnica w wartościach liczbowych przesunięcia chemicznego niechelatowanych protonów NH ($\Delta\delta = 0,2$ ppm) tautomerów sugeruje strukturalne podobieństwo między nimi. Wartość bariery rotacji i poszerzenie sygnałów NH może być związane z obecnością dwóch izomerów będących w relacji między sobą i ich wzajemnym odwracalnym przekształcaniem się (rysunek 34). Jednak z uwagi na małe ilości uzyskanych związków nie przeprowadzono dodatkowych badań umożliwiających pełną identyfikację poszczególnych tautomerów.

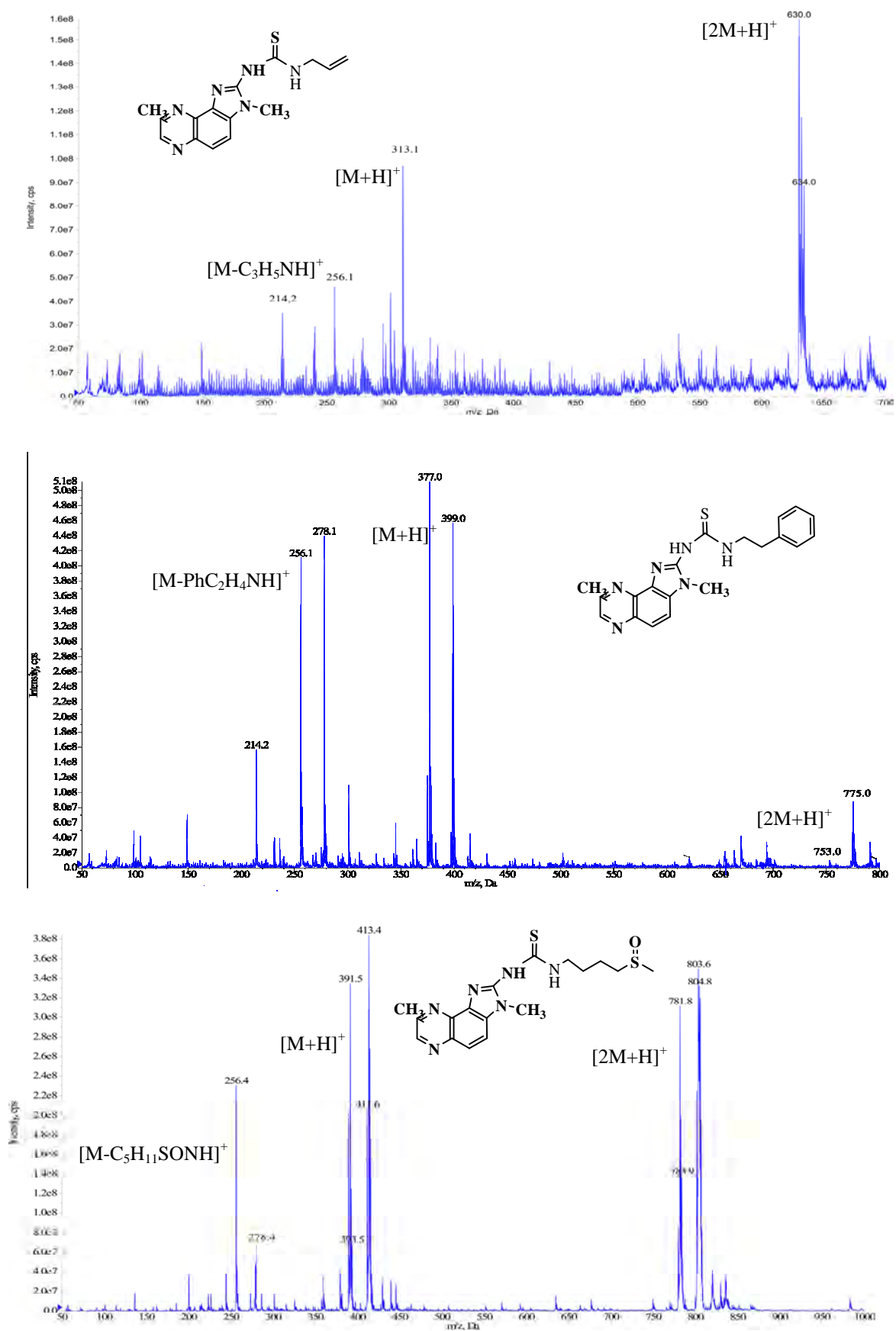


Rysunek 34. Prawdopodobne izomery tiomoczników AITC-MeIQ_x, PEITC-MeIQ_x oraz SFN-MeIQ_x

3.4.3. Zastosowanie spektrometrii mas (MS) na etapie identyfikacji tiomoczników AITC-MeIQ_x, PEITC-MeIQ_x oraz SFN-MeIQ_x

Zastosowanie techniki ESI-MS/MS z łagodną metodą jonizacji pozwoliło na potwierdzenie obecności tiomoczników ITC-MeIQ_x w badanych próbkach na podstawie masy jonów pseudomolekularnych.

Na rysunku 35 przedstawiono widma mas zarejestrowane podczas analizy produktów reakcji MeIQ_x z izotiocyjanianami. Analizując otrzymane widma mas można stwierdzić obecność sygnałów odpowiadających jonom pseudomolekularnym $[\text{M}+\text{H}]^+$, jonom dimerów $[2\text{M}+\text{H}]^+$, oraz jonom fragmentacyjnym $[\text{M}-\text{RNH}]^+$. W widmach zaobserwowano również sygnały odpowiadające adduktom wspomnianych wyżej jonów z sodem.



Rysunek 35. Widma mas zarejestrowane podczas analizy próbek roztworów metanolowych tiomoczników ITC-MeIQx z wykorzystaniem techniki ESI-MS/MS

3.4.4. Zastosowanie techniki HPLC-DAD na etapie identyfikacji tiomoczników AITC-MeIQ_x, PEITC-MeIQ_x oraz SFN-MeIQ_x

W celu identyfikacji produktów uzyskanych w wyniku reakcji MeIQ_x z AITC, PEITC oraz SFN oraz oceny ich czystości wykorzystano technikę HPLC-DAD.

Na rysunku 36 przedstawiono chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek roztworów metanolowych tiomoczników AITC-MeIQ_x, PEITC-MeIQ_x oraz SFN-MeIQ_x. Uzyskane wyniki wskazują na obecność we wszystkich badanych próbkach produktów reakcji MeIQ_x ze związkami z grupy ITC.

Zgodnie z danymi literaturowymi widmo absorcyjne tiomocznika charakteryzuje się maksimum absorpcji przy długości fali 236 nm [278]. Widma UV badanych związków zawierały niewielkie maksimum przy długości fali 236 nm wskazujące na obecność grupy tiomocznikowej w ich strukturze, jednakże główne maksimum absorpcji obserwowano przy długości fali 295 nm, która jest charakterystyczna dla pochodnych benzimidazolowych [279].

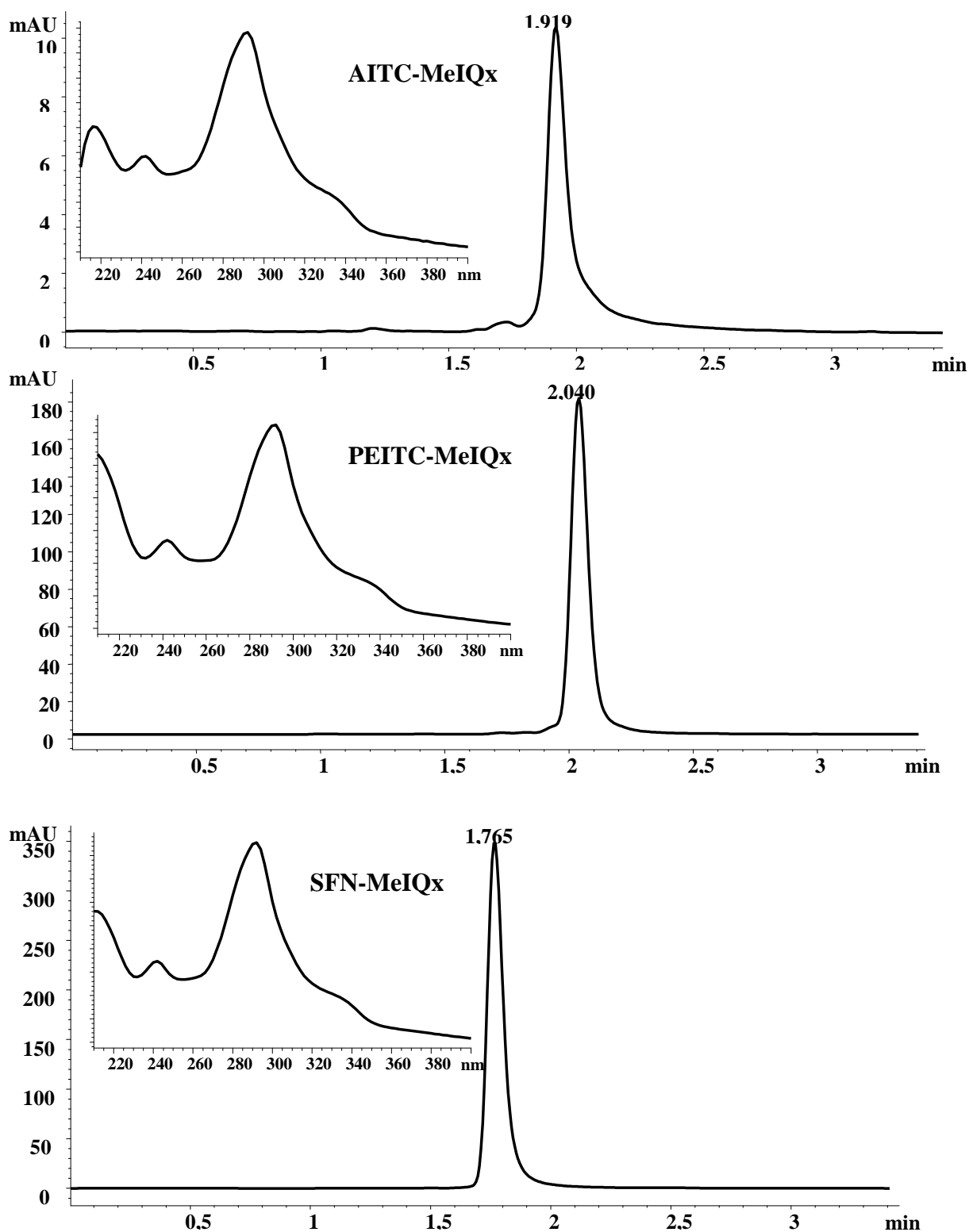
Uzyskane widma UV dla tiomoczników ITC-MeIQ_x różnią się od widm MeIQ_x, co wskazuje, że pochodzą one od produktu reakcji MeIQ_x ze związkami z grupy ITC, natomiast nie są wynikiem obecności w próbce nieprzereagowanego substratu. Na podstawie widm UV tiomoczników AITC-MeIQ_x, PEITC-MeIQ_x oraz SFN-MeIQ_x można stwierdzić, że wszystkie badane produkty należą do jednej grupy związków.

3.5. Reakcja PhIP z izotiocyjanianem allilu (AITC), izotiocyjanianem fenyloetylu (PEITC) i sulforafanem (SFN)

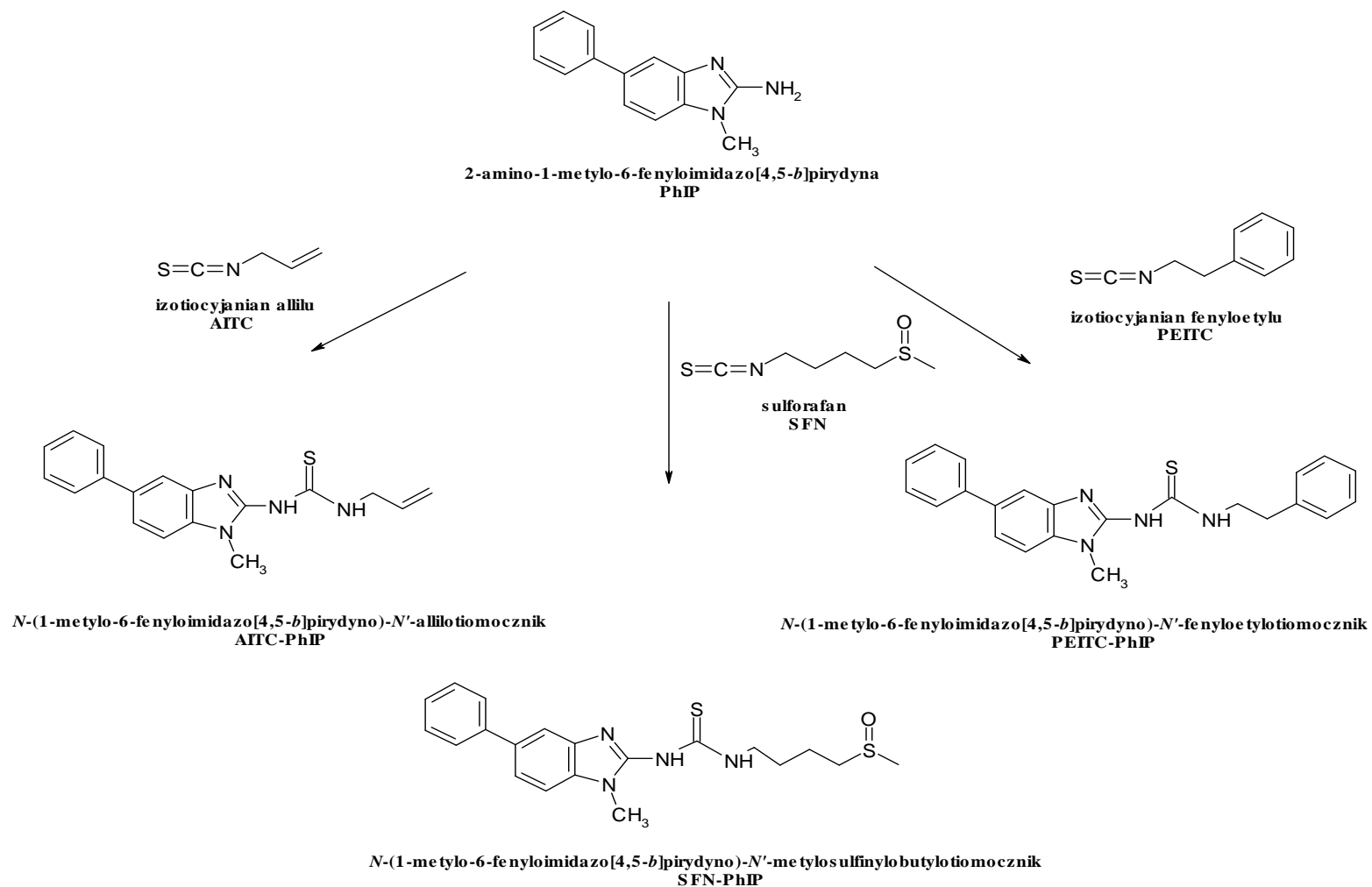
W ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto także próby uzyskania tiomoczników w reakcji najczęściej występującego w żywności kancerogenu z grupy HAA - 2-amino-1-metylo-6-fenyloimidazo[4,5-*b*]pirydyna (PhIP).

Rozpuszczalność wspomnianego związku była jeszcze mniejsza niż w przypadku pierwszej stosowanej heterocyklicznej aminy aromatycznej – MeIQ_x. Dopiero zastosowanie trifluoroetanolu umożliwiło rozpuszczenie substratu i przeprowadzenie reakcji PhIP z AITC, PEITC oraz SFN. Jednakże w ich wyniku uzyskano małe ilości produktów lub brak w przypadku ostatniej reakcji. W związku z tym trudno było wyizolować produkty i ustalić ich struktury.

Na rysunku 37 przedstawiono prawdopodobny przebieg reakcji PhIP z izotiocyjanianami.



Rysunek 36. Chromatogramy oraz widma UV tiomoczników ITC-MeIQx uzyskane w trakcie analizy odpowiednich próbek przy użyciu techniki HPLC-DAD



Rysunek 37. Schemat prawdopodobnego przebiegu reakcji addycji izotiocyjanianu allilu, fenyletylu i sulforafanu z heterocykliczną aminą aromatyczną PhIP

3.6. Wnioski dotyczące rzeczywistej struktury adduktów ITC-MeIQx

Jak wspomniano wcześniej, struktura chemiczna związku z grupy HAA występującego w żywności w największych ilościach - MeIQx zawiera fragment 2-amino-1-metylobenzimidazolu i dlatego można było się spodziewać zbliżonej do MABI reaktywności tego związku w stosunku do izotiocyjanianów. Wykorzystanie nietoksycznej substancji modelowej – MABI miało na celu dobranie warunków wydajnej syntezy tiomoczników ITC-MABI i zastosowanie ich podczas przeprowadzania reakcji heterocyklicznych amin aromatycznych ze związkami z grupy ITC. Wprawdzie jak się później okazało nie otrzymano koniugatów ITC-MeIQx w wyniku reakcji prowadzonych w opracowanych wcześniej warunkach i należało od początku przeprowadzić dobór optymalnych parametrów reakcji prowadzących do powstawania tiomoczników ITC-MeIQx. Jednak, informacje dotyczące otrzymanych tiomoczników ITC-MABI uzyskane w wyniku badań strukturalnych z wykorzystaniem techniki NMR, IR i rentgenowskiej analizy strukturalnej pozwoliły przewidzieć występowanie struktur tautomerycznych dla odpowiadających im tiomoczników ITC-MeIQx. W związku z tym można było się spodziewać bardziej skomplikowanych widm ^1H NMR również dla produktów reakcji MeIQx ze związkami z grupy ITC.

Podobnie jak w przypadku tiomoczników ITC-MABI w widmach protonowych produktów reakcji MeIQx z izotiocyjanianami zaobserwowano wielokrotną ilość sygnałów rezonansowych dla protonów grupy NH oraz niektórych protonów CH (sygnały, którym jednoznacznie można było przypisać wartości przesunięć chemicznych). Porównanie widm protonowych ułatwiło określenie pozycji poszczególnych sygnałów.

Z uwagi na niewielkie wydajności reakcji MeIQx ze związkami z grupy ITC nie możliwe było potwierdzenie struktury otrzymanych produktów w oparciu o wszystkie techniki stosowane na etapie identyfikacji struktury tiomoczników ITC-MABI. Natomiast wykorzystano technikę HPLC, dzięki której można przeprowadzić analizę niewielkiej ilości próbki. Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek roztworów metanolowych produktów reakcji MeIQx z ITC zawierały pojedyncze, symetryczne piki odpowiadające tiomocznikom ITC-MeIQx.

3.7. Ocena mutagenności koniugatów izotiocyjanianów (ITC) i heterocyklicznej aminy aromatycznej (HAA)

Głównym celem tej pracy jest sprawdzenie obniżenia działania mutagennego MeIQ_x w wyniku powstawania pochodnych tej aminy - tiomoczników AITC-MeIQ_x, PEITC-MeIQ_x oraz SFN-MeIQ_x w reakcji z izotiocyjanianami. Efekt ograniczenia działania mutagennego został oceniony na podstawie porównania efektu mutagennego związku MeIQ_x aktywowanego frakcją mikrosomalną, izolowaną z wątroby szczura i wspomnianych tiomoczników. Do przeprowadzenia badań wykorzystano test Ames w wersji mikroplótkowej MPF zamiast standardowego testu Ames plótkowego z uwagi na jego wiele zalet, takich jak:

- wymagana mała ilość testowanego związku,
- oszczędność zużywanych surowców,
- mniejszy nakład czasu pracy.

Przed wszystkim jednak w kilkunastu publikacjach i doniesieniach konferencyjnych można znaleźć informację o dużej korelacji (89-100%) między wynikami uzyskanymi przy użyciu obu testów tzn. klasycznego testu Ames i jego o wiele szybszej i wygodniejszej wersji mikroplótkowej MPF zaproponowanej przez firmę *Xenometrix* [280].

3.7.1. Kontrola genotypu szczepu *Salmonelli typhimurium* TA 98

Szczep *Salmonelli typhimurium* TA98 zawiera mutacje punktowe wprowadzone do operonu biosyntezy histydyny (His) i wykrywa mutageny, które wywołują zmianę ramki odczytu (GCGCGCGC). Oprócz mutacji w operonie biosyntezy histydyny (*hisD3052*) testowy szczep posiada mutacje dodatkowe znacznie zwiększające jego zdolność do wykrywania mutagenów, takie jak:

- mutacja *rfa* powodująca częściową utratę warstwy lipopolisacharydowej (LPS), co powoduje zwiększenie przepuszczalności ściany komórkowej bakterii i w ten sposób umożliwia wnikanie do komórki dużych cząsteczek aromatycznych;
- mutacja *uvrB* polegająca na utracie genu kodującego enzymy wycinające dimery pirymidynowe, co zmniejsza zdolność naprawy uszkodzeń DNA przez wycinanie, powodując większą wrażliwość na wiele mutagenów;
- plazmid *pKM101* (czynnik R), zawierający gen *mucAB*, warunkujący mutagenezę zależną od systemu błędnej naprawy DNA, jak również czynnik R nadający oporność bakterii na ampicylinę.

Testowy szczep *Salmonelli typhimurium* TA98 jest mutantem i cechuje go duża niestabilność genetyczna, dlatego aby w teście Ames otrzymać wiarygodne wyniki zawsze przed doświadczeniami sprawdzano testowy szczep na obecność plazmidu *pKM101*. Wzrost bakterii na podłożu z dodatkiem ampicyliny, na co każdorazowo wskazywał wynik pomiaru gęstości optycznej hodowli mieszczącej się w zakresie 2,0-2,2 po 16 godzinnej inkubacji hodowli bakteryjnej, świadczył o obecności wspomnianego plazmidu. Natomiast uzyskanie za każdym razem wartości OD_{600} z zakresu 0,02-0,03 oznaczało, że nie występuje zanieczyszczenie innymi bakteriami.

3.7.2. Wpływ stosowanych substancji na poziom mutacji w szczepie *Salmonella typhimurium* TA98

Oprócz rutynowo wykonywanych kontroli oceny genotypu dla szczepu TA98 przeprowadzono dodatkowe doświadczenia sprawdzające wpływ związków wykorzystywanych w dalszych etapach badań na liczbę kolonii rewertantów. Zarówno zmniejszenie ich liczby wskutek toksyczności, jak i wzrost liczby rewertantów ze względu na wprowadzenie substancji sprzyjających wzrostowi bakterii mogłyby prowadzić do uzyskania fałszywych informacji odnośnie oceny właściwości mutagennych tiomoczników ITC-MeIQx.

Badaniom poddano następujące roztwory:

- DMSO, rozpuszczalnik użyty do sporządzenia roztworów badanych związków,
- mutageny MeIQx i tiomoczniki AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx bez frakcji S9 odpowiedzialnej za ich aktywację do form reagujących z DNA.

3.7.2.1. Sprawdzenie mutagenności rozpuszczalnika DMSO

W przypadku korzystania z testu Ames należy przeprowadzić kontrolę wpływu rozpuszczalnika, jakim w przypadku opisywanych badań był DMSO, który służył do przygotowania roztworów mutagenów. Taki tok postępowania miał na celu wykluczenie mutagennego wpływu samego rozpuszczalnika na testowy szczep TA98. Badania te wykonano stosując próbki o objętości 20 μ L. W przypadku tej objętości rozpuszczalnika liczba kolonii z rewersją mutacji wynosiła 0, w związku z tym takie objętości roztworów tiomoczników ITC-MeIQx oraz MeIQx w DMSO były wykorzystywane do badania działania mutagennego.

3.7.2.2. Sprawdzenie właściwości mutagennych tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx, SFN-MeIQx oraz heterocyklicznej aminy aromatycznej – MeIQx bez aktywacji metabolicznej

Doświadczenie to miało na celu wykluczenie mutagennego czy toksycznego wpływu zbadanie wpływu mutagenu MeIQx i tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx pod nieobecność aktywacji metabolicznej. W badaniach tych mutageny nie były poddawane działaniu frakcji mikrosomalnej, która odpowiedzialna jest za ich aktywację do formy oddziaływującej z DNA. Badanie to potwierdziło, że nawet w najwyższych użytych stężeniach (10nM) zarówno MeIQx jak i tiomoczniki ITC-MeIQx nie indukują mutacji w szczepie TA98 pod nieobecność aktywacji metabolicznej (tabela 19).

Tabela 19. Liczba rewertantów indukowanych przez MeIQx i tiomoczniki AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx przy stężeniu 10 nM, oznaczona w trakcie badań z wykorzystaniem testu Amesa w wersji mikropłytkowej MPF dla szczepu TA98

Szczep TA 98	Kontrola z dawką zero (rozpuszczalnik)	MeIQx	AITC-MeIQx	PEITC-MeIQx	SFN-MeIQx
Liczba rewertantów	0	1	0	2	3

3.7.3. *Ocena właściwości mutagennych heterocyklicznej aminy aromatycznej MeIQx i tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx w obecności frakcji mikrosomalnej*

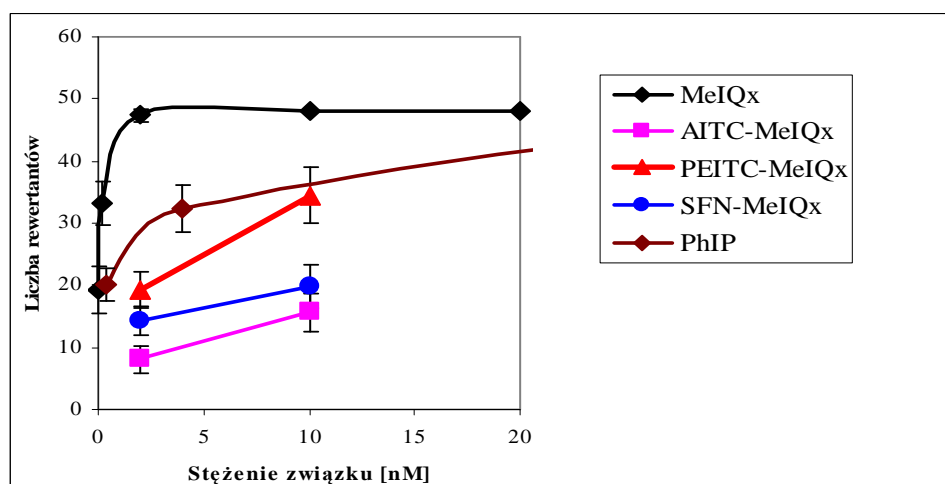
Celem tego doświadczenia jak wspomniano wcześniej, było sprawdzenie obniżenia potencjału mutagennego MeIQx w wyniku przekształcenia jej do tiomoczników podczas reakcji ze związkami z grupy ITC. Przeprowadzenie takich badań było związane z koniecznością uprzedniego sprawdzenia właściwości mutagennych zarówno modelowego mutagenu, jak i badanych tiomoczników ITC-MeIQx.

Całe doświadczenie rozpoczęto poprzez określenia efektu mutagennego wywołanego przez związek MeIQx w szerokim zakresie stężeń (0,02 nM - 0,22 µM) z wykorzystaniem testu Amesa. W efekcie końcowym dobrano stężenie końcowe (0,2 nM) stosowane w kolejnych doświadczeniach. Próbkę o takim stężeniu MeIQx stanowiły próbkę kontrolną na etapie oceny mutagenności tiomoczników ITC-MeIQx

i na jego podstawie określono testowane stężenia tiomoczników ITC-MeIQ_x – 2 nM i 10 nM. Większe dawki tiomoczników ITC-MeIQ_x wynikały z możliwego mniejszego potencjału mutagennego niż MeIQ_x. Po 48-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C liczono dołki zawierające kolonie z rewersją mutacji dla każdej dawki tiomoczników AITC-MeIQ_x, PEITC-MeIQ_x oraz SFN-MeIQ_x i porównywano uzyskane wyniki z wynikami badań próbki kontrolnej (rozpuszczalnik) oraz z liczbą kolonii rewertantów szczepu TA98 traktowanego modelowym mutagenem MeIQ_x (0,2 nM na dołek).

Liczba rewertantów indukowanych w obecności frakcji S9 wynosiła $33,2 \pm 3,3$ (stężenie 0,2 nM) i $47,37 \pm 0,92$ (stężenie 2 nM). Za obniżenie efektu mutagennego tiomoczników ITC-MeIQ_x można uznać efekt, który objawia się tym, że liczba rewertantów jest mniejsza od liczby rewertantów powstałych w wyniku działania mutagenu MeIQ_x. Taki spadek liczby rewertantów świadczyłby o obniżeniu przez izotiocyjaniany obecne w warzywach kapustowatych działania tego silnego mutagenu i potencjalnym obniżeniu ryzyka procesu nowotworzenia. Odbывałoby się to za sprawą reakcji związków z grupy ITC z MeIQ_x prowadzącej do utworzenia odpowiednich tiomoczników.

W badaniach ukierunkowanych na oznaczenie działania mutagennego tiomoczników AITC-MeIQ_x, PEITC-MeIQ_x i SFN-MeIQ_x oznaczona liczba rewertantów była statystycznie istotnie mniejsza niż liczba rewertantów indukowanych przez silny mutagen MeIQ_x i spadała ze zmniejszeniem dawki tiomoczników ITC-MeIQ_x (rysunek 38).

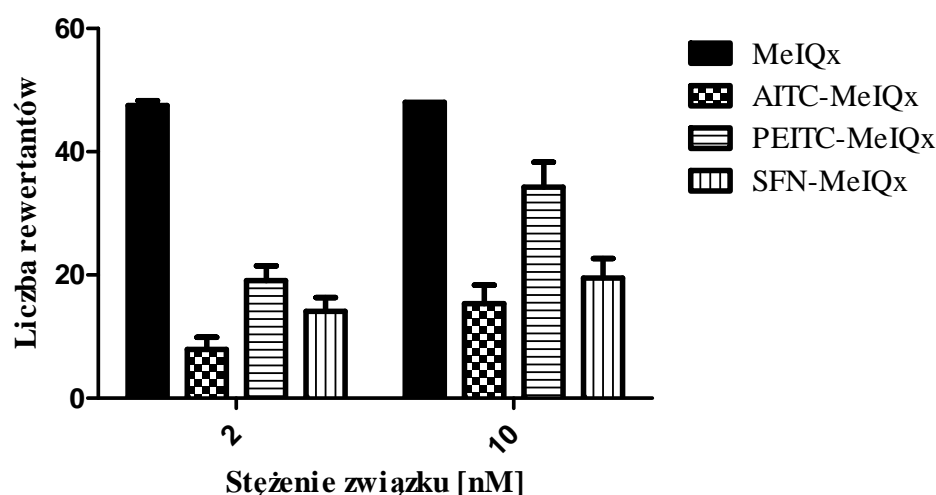


Rysunek 38. Wykres obrazujący efekt mutagenny tiomoczników AITC-MeIQ_x, PEITC-MeIQ_x oraz SFN-MeIQ_x o stężeniu 2 i 10 nM w stosunku do mutagenu MeIQ_x występującego w zakresie stężeń 0,02-20 nM (dla porównania mutagenności związków przedstawiono liczbę rewertantów indukowanych przez mutagen PhIP)

Przy tym należy podkreślić, że w prowadzonych badaniach z wykorzystaniem testu Amesa stężenie MeIQx było 50 razy większe niż stężenie tiomoczników ITC-MeIQx. Na rysunku 40 i 41 przedstawiono wyniki uzyskane podczas oceny mutagenności tiomoczników ITC-MeIQx przy użyciu testu Amesa.

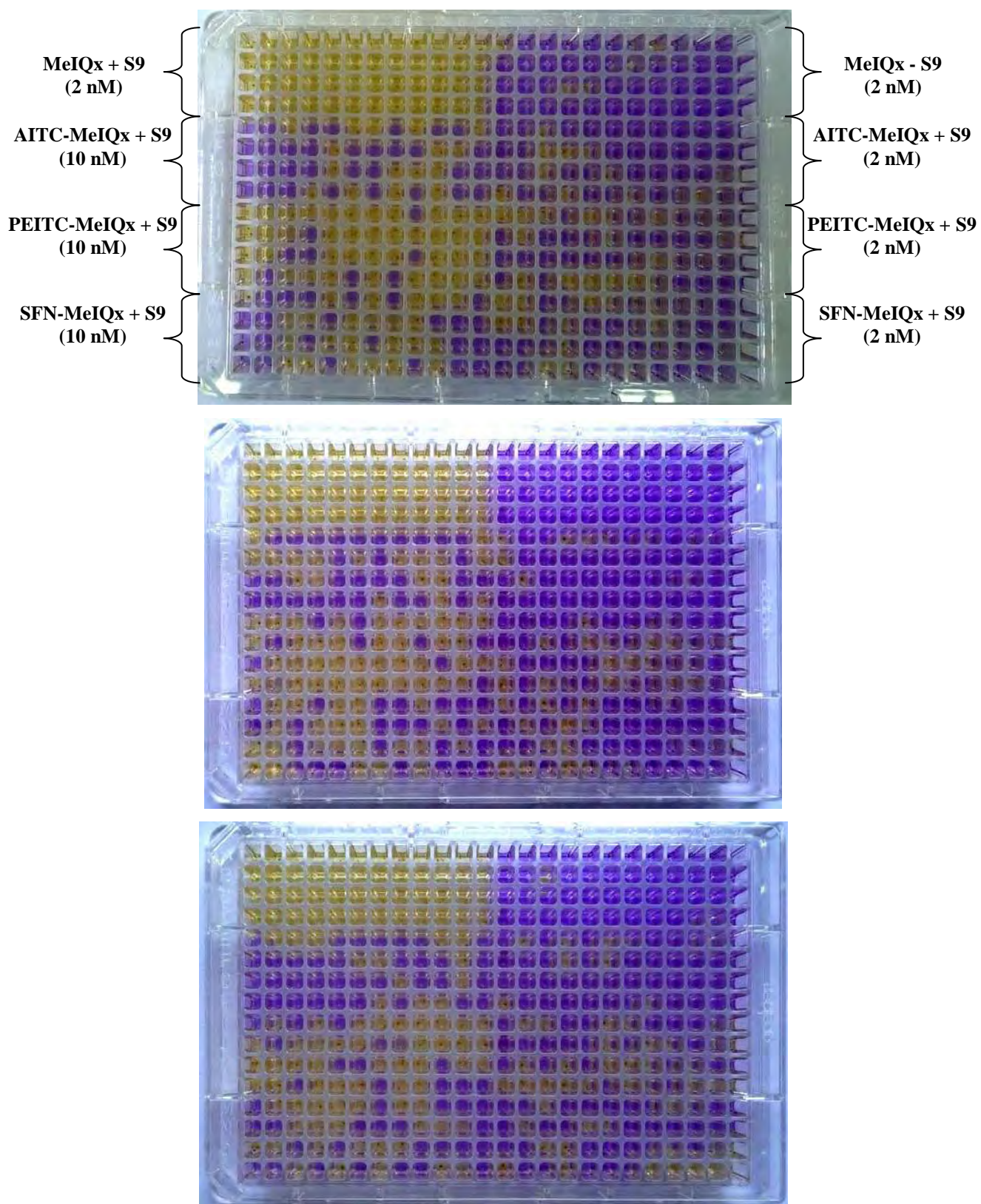
Efekt obniżonej mutagenności w stosunku do MeIQx obserwowano dla wszystkich tiomoczników ITC-MeIQx, jednakże najmniejszą liczbę rewertantów uzyskano w przypadku związku AITC-MeIQx. Liczba rewertantów dla wspomnianego produktu była około 2-krotnie mniejsza niż dla pozostałych tiomoczników. Głównym źródłem AITC jest kapusta, a efekt ochronny, powstałych w wyniku reakcji z MeIQx, tiomoczników AITC-MeIQx wskazuje na korzystny wpływ spożywania jej wraz z poddanym obróbce termicznej mięsem.

Wyniki uzyskane w trakcie badań z wykorzystaniem testu Amesa poddano analizie statystycznej dla porównania zdolności poszczególnych tiomoczników do indukcji rewertantów w porównaniu do wyjściowej aminy MeIQx, o której wiadomo, że jest związkiem silnie mutagennym (rysunek 39). W tym celu zastosowano jednostronną analizę wariancji przy użyciu testu wielokrotnych porównań Dunnetta, za odniesienie uznając liczbę rewertantów indukowanych przez mutagen MeIQx. Analiza ta wykazała statystyczną istotność ($P < 0,05$) różnic pomiędzy liczbą rewertantów indukowanych przez tiomoczniki ITC-MeIQx (w stężeniach 2 nM i 10 nM) w porównaniu do bakterii *Salmonella typhimurium* traktowanych wyjściową aminą w tych samych dawkach.

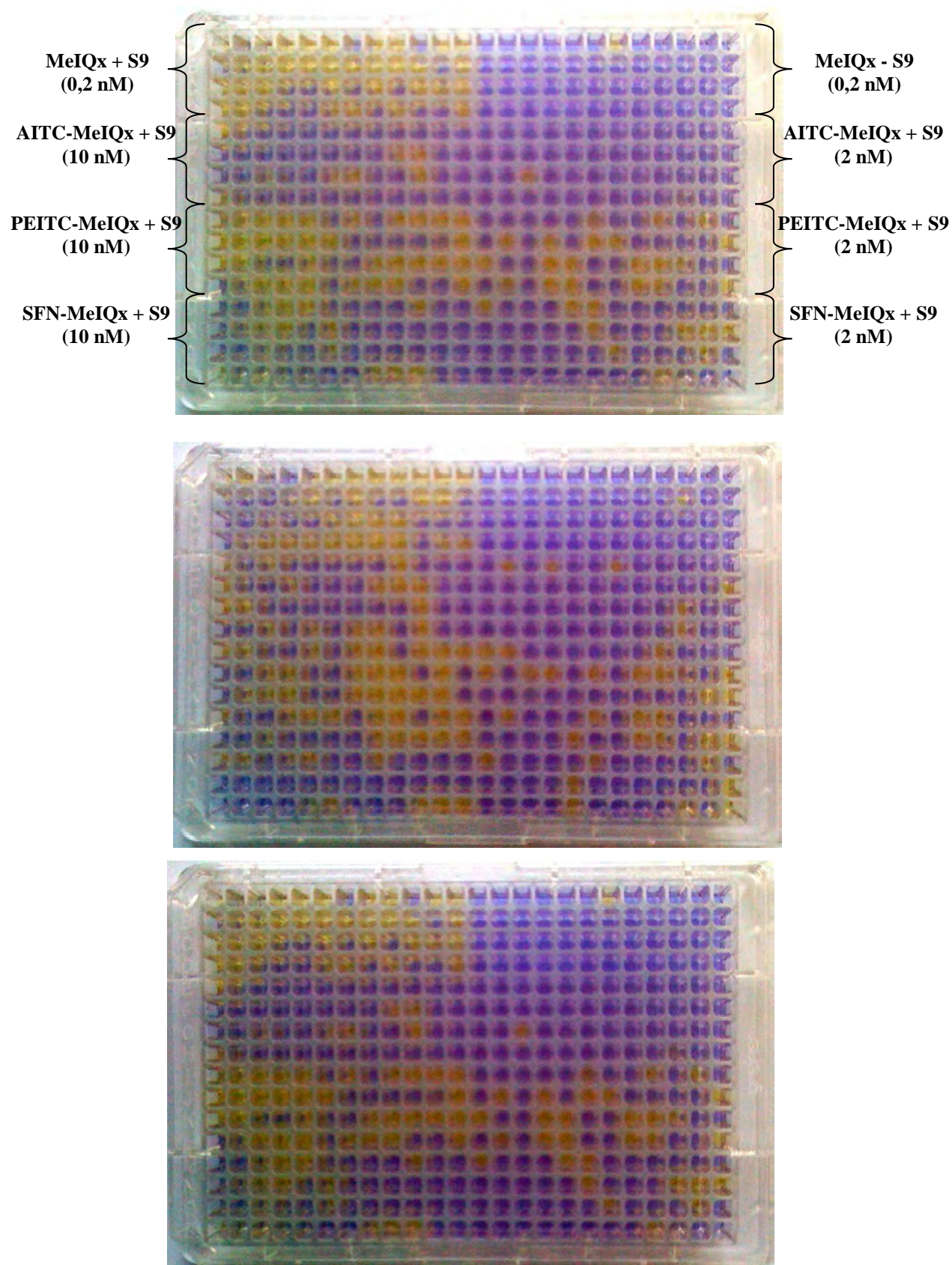


Rysunek 39. Diagramy obrazujące efekt mutageny tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx oraz SFN-MeIQx o stężeniu 2 i 10 nM w stosunku do mutagenu MeIQx o stężeniu 2 i 10 nM.

Wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych doświadczeń $\bar{x}_s \pm SD$. Statystyczna istotność różnic pomiędzy wynikiem pomiarów próbek kontrolnych – MeIQx i próbek tiomoczników ITC-MeIQx została określona na podstawie jednostronnej analizy wariancji przy użyciu testu wielokrotnych porównań Dunnetta



Rysunek 40. Wyniki uzyskane w trakcie jednej z trzech serii pomiarów mutagenności tiomoczników ITC-MEIQx z wykorzystaniem testu Ames (stężenie MeIQx – 2nM)



Rysunek 41. Wyniki uzyskane w trakcie jednej z trzech serii pomiarów mutagenności tiomoczników ITC-MEIQx z wykorzystaniem testu Ames (stężenie MeIQx – 0,2nM)

3.8. Opracowanie procedury analitycznej oznaczania izotiocyjanianów (ITC) z wykorzystaniem substancji wzorcowych ITC-NAC otrzymanych na drodze syntezy

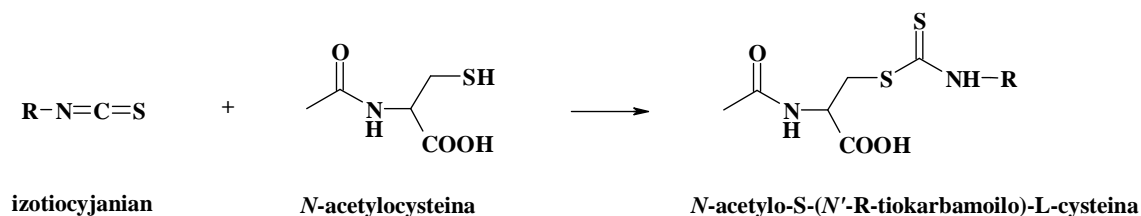
Wyniki badań epidemiologicznych oraz wyniki doświadczeń prowadzonych z wykorzystaniem zwierząt wskazują, że wysoki poziom spożycia warzyw z rodziny kapustowatych, takich jak brokuły, brukselka, kalafior, kapusta może chronić organizm ludzki przed rozwojem nowotworów [281]. W związku z tym, wspomniane warzywa wzbudzają zainteresowanie badaczy jako potencjalne źródło substancji mogących znaleźć zastosowanie w profilaktyce chorób nowotworowych. Przeciwrakotwórcze właściwości roślin kapustowatych wiązane są głównie z obecnością glukozynolanów (GLS), a dokładniej produktów ich enzymatycznego rozpadu, w szczególności izotiocyjanianów. Rośliny kapustowate są też uważane za najbardziej użyteczne w biologicznej ochronie roślin uprawnych jako biocydy w procesie biofumigacji. Syntetyczne związki z grupy ITC są też stosowane w chemicznej ochronie roślin [282]. Praktyczne znaczenie związków z grupy ITC wskazuje na konieczność opracowania jak najlepszej metody identyfikacji i ilościowego oznaczania tych związków w próbkach odpowiednio przygotowanych tkanek roślinnych.

Pomimo znaczenia tych związków nadal są problemy z ich oznaczaniem w próbkach materiałów charakteryzujących się złożonym składem chemicznym. Związane jest to z ich lotnością i brakiem stabilności chemicznej. Powszechnie wykorzystywana technika chromatografii gazowej (GC) pozwala wprowadzić na wykrycie obecności izotiocyjanianów w badanych próbkach, jednak konieczność zastosowania wysokiej temperatury często powoduje rozkład tych związków [283]. Natomiast przeprowadzenie związków z grupy ITC w stabilne pochodne w wyniku ich kondensacji z 1,2-benzenoditiem [284] i użycie techniki HPLC - która nie wymaga stosowania wysokiej temperatury - umożliwia wyznaczenie jedynie całkowitej zawartości izotiocyjanianów. W związku z tym zauważyć można potrzebę opracowania metodyki oznaczania związków z grupy ITC z wykorzystaniem techniki HPLC, która umożliwiłaby wykrycie, identyfikację oraz oznaczenie ilościowe poszczególnych izotiocyjanianów w próbkach materiału roślinnego.

W literaturze można znaleźć informacje na temat oznaczania w próbkach płynów ustrojowych metabolitów związków z grupy ITC, produktów transformacji - ich koniugatów z glutationem powstających po spożyciu roślin kapustowatych. Metodyka ta jest oparta na wykorzystaniu techniki HPLC na etapie rozdzielania i oznaczeń

końcowych [285, 286, 287]. Powstawanie *N*-acetylocysteinowych pochodnych izotiocyanianów w wyniku metabolizmu związków pochodzących z roślin kapustowatych stanowi podstawę powyższych oznaczeń. W poniżej omówionych badaniach ten naturalny metabolizm izotiocyanianów posłuży za podstawę do zaproponowania podejścia polegającego na przeprowadzeniu tych niestabilnych związków w *N*-acetylocysteinowe pochodne poprzez derywatyzację za pomocą *N*-acetylo-L-cysteiny (NAC) i oznaczania ditiokarbaminianów ITC-NAC w próbkach materiału roślinnego przy użyciu techniki HPLC-DAD.

Byłoby to inne praktyczne wykorzystanie reaktywności związków z grupy ITC w stosunku do nukleofilów (rysunek 42). Sprawdzenie czy takie podejście może doprowadzić do opracowania skutecznej metodyki oznaczania izotiocyanianów stało się dodatkowym zadaniem niniejszej pracy.



Rysunek 42. Schemat reakcji izotiocyanianów z *N*-acetylo-L-cysteiną prowadzącej do otrzymania ditiokarbaminianów ITC-NAC

3.8.1. Synteza ditiokarbaminianów AITC-NAC, BITC-NAC, PEITC-NAC i PITC-NAC

W pozycjach literaturowych [288, 289] można znaleźć informacje o przebiegu reakcji syntezy ditiokarbaminianów AITC-NAC i BITC-NAC. W pierwszym wymienionym doniesieniu opisano izolację wspomnianego koniugatu z moczu szczura i syntezę znakowanego ^{14}C związku AITC-NAC. Podobne informacje można znaleźć również w pracy [290]. W publikacji [291] znajduje się opis syntezy ditiokarbaminianu PEITC-NAC, podczas której dodawano izotiocyanian do metanolowego roztworu NAC i uzyskano produkt z małą wydajnością rzędu 39%. Natomiast syntezę chemiczną ditiokarbaminianów AITC-NAC, BITC-NAC, PEITC-NAC oraz PITC-NAC przeprowadzono na podstawie procedur opisanych w pracy [258].

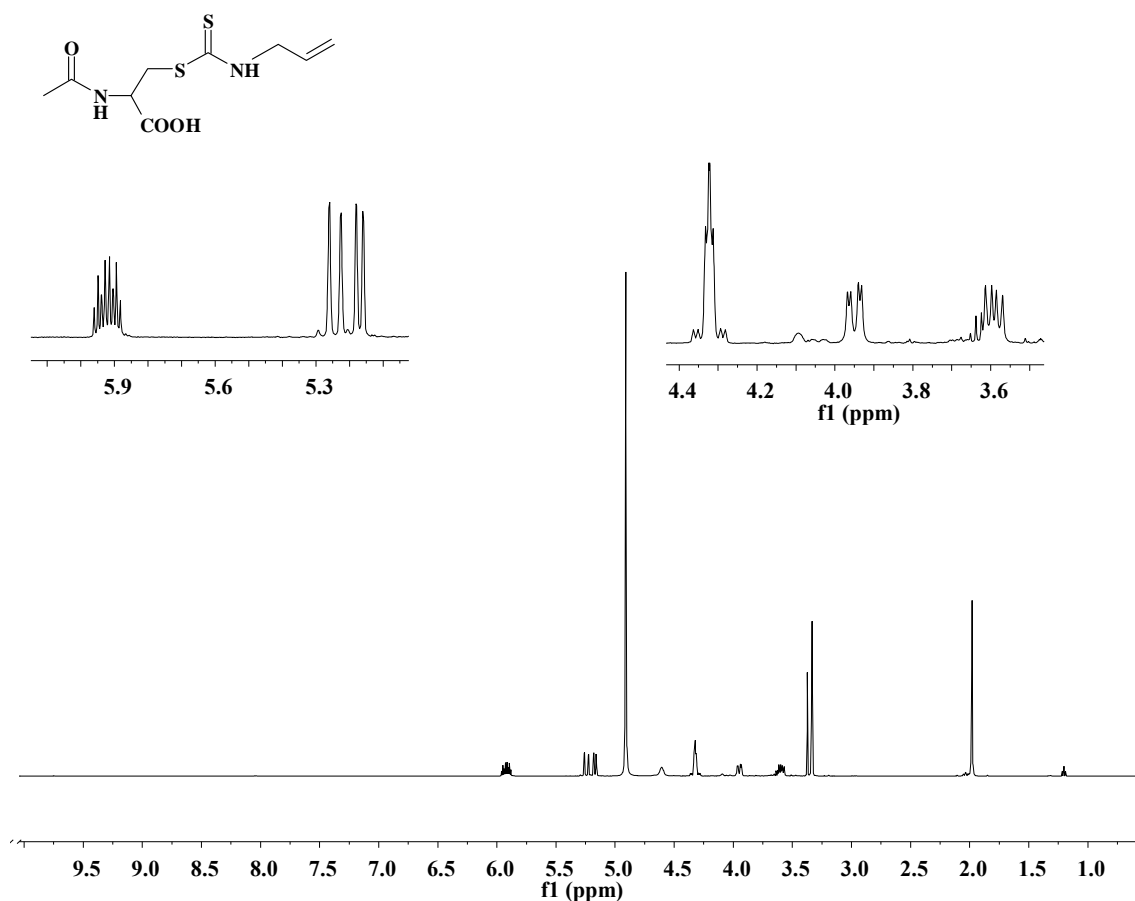
Uzyskane ditiokarbaminiany AITC-NAC, BITC-NAC oraz PEITC-NAC posłużyły jako substancje wzorcowe zarówno na etapie opracowania: doborze optymalnych warunków i walidacji nowej procedury analitycznej, a także na etapie analizy jakościowej czyli wykrywania obecności związków z grupy ITC w próbkach

rzeczywistych. Ditiokarbaminian PITC-NAC wykorzystano jako wzorzec wewnętrzny do oznaczania koniugatów izotiocyjanianów z NAC ze względu na fakt, że glukozynolan fenylu, z którego mógłby powstać PITC, nie występuje naturalnie w roślinach kapustowatych [259].

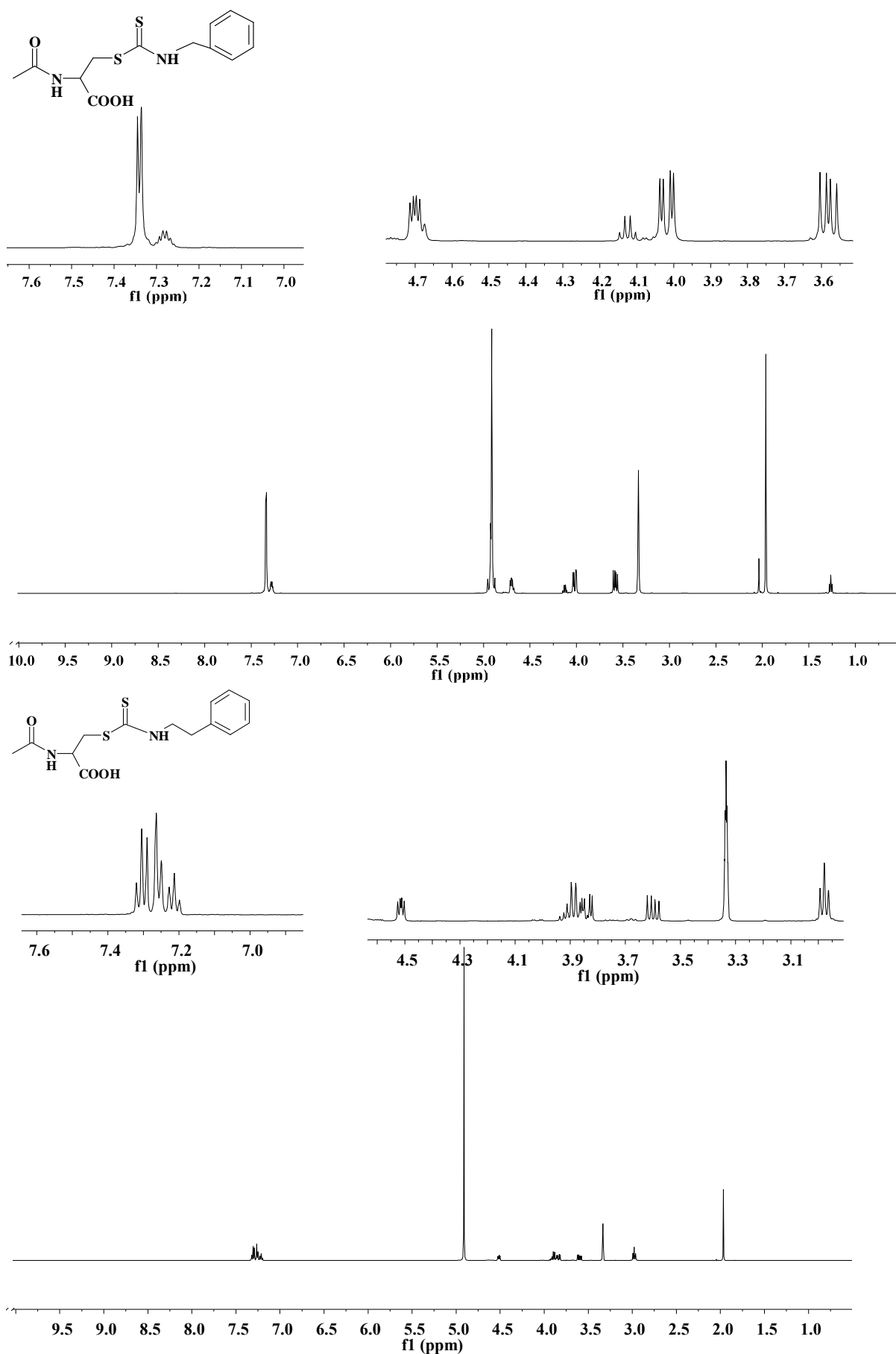
Produkty uzyskane w wyniku reakcji poszczególnych izotiocyjanianów z NAC zostały poddane badaniu z wykorzystaniem technik NMR i ESI-MS/MS. Dane uzyskane dla poszczególnych ditiokarbaminianów AITC-NAC, BITC-NAC oraz PEITC-NAC przedstawiono w punkcie 2.6.5.

3.8.2. Zastosowanie techniki NMR na etapie identyfikacji produktów uzyskanych w wyniku reakcji AITC, BITC oraz PEITC z NAC

W celu identyfikacji produktów reakcji AITC, BITC i PEITC z NAC wykonano widma protonowe $^1\text{H-NMR}$ roztworów metanolowych tych produktów (rysunek 43).



Rysunek 43. Widma $^1\text{H-NMR}$ produktów reakcji kondensacji izotiocyjanianów z N-acetylo-L-cysteiną uzyskane z wykorzystaniem techniki NMR



Rysunek 43. c.d. Widma $^1\text{H-NMR}$ produktów reakcji kondensacji izotiocyanianów z N-acetylo-L-cysteiną uzyskane z wykorzystaniem techniki NMR

W widmie protonowym każdego produktu zauważono obecność sygnałów protonów N-CH₂, CH₂-S oraz N-CH charakteryzujących się wartościami przesunięcia odpowiednio 3,6; 3,8-4,1 oraz 4,3-4,6. Większe wartości przesunięć dwóch ostatnich sygnałów zarejestrowanych dla ditiokarbaminianów BITC-NAC oraz PEITC-NAC niż dla ditiokarbaminianu AITC-NAC związane są z obecnością w ich strukturze pierścienia aromatycznego.

Przedstawione w tej pracy wartości przesunięć sygnałów protonów są zgodne z danymi literaturowymi. W pracy [289] wskazano na zanik sygnałów pochodzących od -NH- oraz -COOH- w trakcie wymiany z D₂O, co zaobserwowano również w przypadku widm NMR ditiokarbaminianów uzyskanych w ramach tej pracy.

3.8.3. Zastosowanie techniki MS/MS na etapie identyfikacji produktów uzyskanych w wyniku reakcji AITC, BITC oraz PEITC z NAC

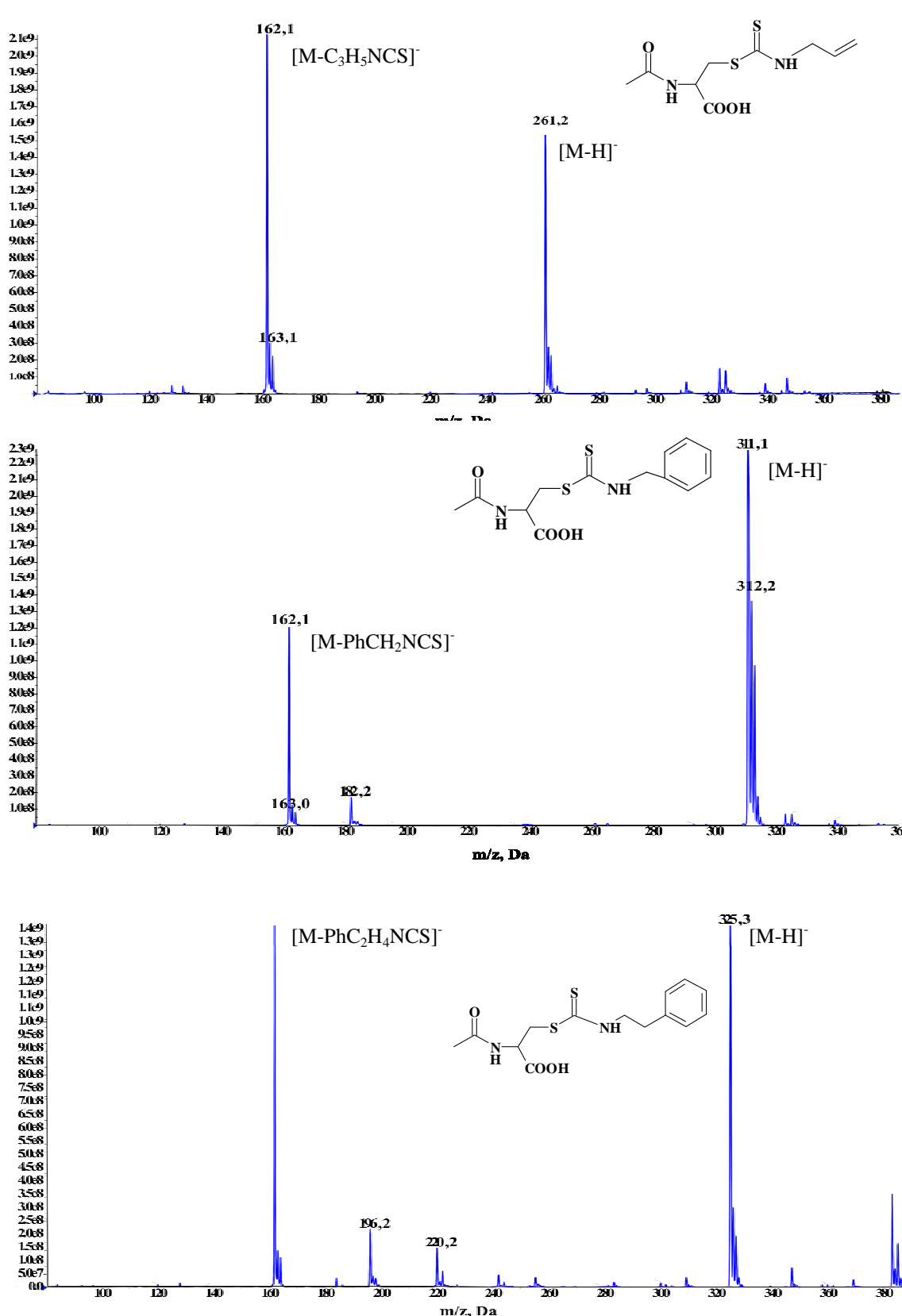
Potwierdzenie obecności ditiokarbaminianów AITC-NAC, BITC-NAC oraz PEITC-NAC w badanych próbkach umożliwiło wykorzystanie techniki ESI-MS/MS. Widma mas powyższych związków przedstawiono na rysunku 44.

W widmach mas produktów reakcji NAC z AITC, BITC oraz PEITC zauważono obecność piku o dużej intensywności (kolejno m/z 261,1; 311,1 i 325,3) odpowiadającego jonowi molekularnemu [M-H]⁻. W widmach mas stwierdzono również występowanie piku odpowiadającego jonowi fragmentacyjnemu [M-R]⁻ charakteryzującego się wartością parametru m/z=162,1. Uzyskane dane dotyczące widm mas są zgodne z wcześniej opisywanymi dla tego typu związków [258, 286, 292].

3.8.4. Dobór optymalnych warunków procedury analitycznej oznaczania izotiocyjanianów (ITC) z wykorzystaniem substancji wzorcowych otrzymanych na drodze syntezy

Syntetycznie uzyskane koniugaty NAC z AITC, BITC i PEITC posłużyły jako substancje wzorcowe do opracowania i optymalizacji procedury oznaczania koniugatów przy wykorzystaniu techniki HPLC-DAD-MS.

Podstawę przy opracowaniu procedury oznaczania wspomnianych wyżej produktów w próbkach roślin kapustowatych i produktów żywnościowych z dodatkiem tych roślin z wykorzystaniem techniki HPLC-MS jak wcześniej wspomniano stanowiły doniesienia literaturowe dotyczące oznaczania związków powstałych w reakcji związków z grupy ITC z NAC w próbkach płynów ustrojowych [259, 293, 294].



Rysunek 44. Widma mas ditiokarbaminianów ITC-NAC, BITC-NAC oraz PEITC-NAC uzyskane z wykorzystaniem techniki ESI-MS/MS

Pomocne były one do opracowania warunków prowadzenia procesu rozdzielania, a mianowicie doboru:

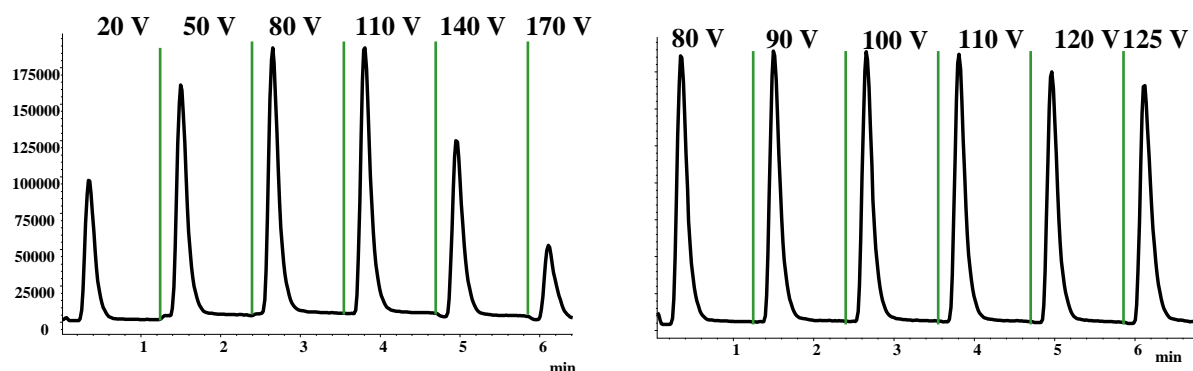
- składu fazy stacjonarnej i ruchomej,
- parametrów pracy układu chromatograficznego.

W pierwszym etapie prac, nad doбором optymalnych warunków procedury oznaczania ditiokarbaminianów ITC-NAC przy wykorzystaniu techniki HPLC-DAD-MS, ustalono optymalne napięcie fragmentora (90 V) dla poszczególnych substancji wzorcowych w trakcie prowadzenia badań z wykorzystaniem techniki wstrzykowej analizy przepływowej (FIA). Na rysunku 45 przedstawiono chromatogramy, na których widoczne są piki odpowiadające ditiokarbaminianom ITC-NAC przy różnym napięciu fragmentora uzyskane w trakcie analizy próbek roztworów ditiokarbaminianów ITC-NAC.

W celu opracowania warunków prowadzenia procesu rozdzielania sprawdzono wpływ składu fazy stacjonarnej i ruchomej. W tym celu do rozdzielania analitów wykorzystano różne kolumny chromatograficzne - ZORBAX RX-C18 i Eclipse XDB-C18. Natomiast jako fazy ruchome zastosowano:

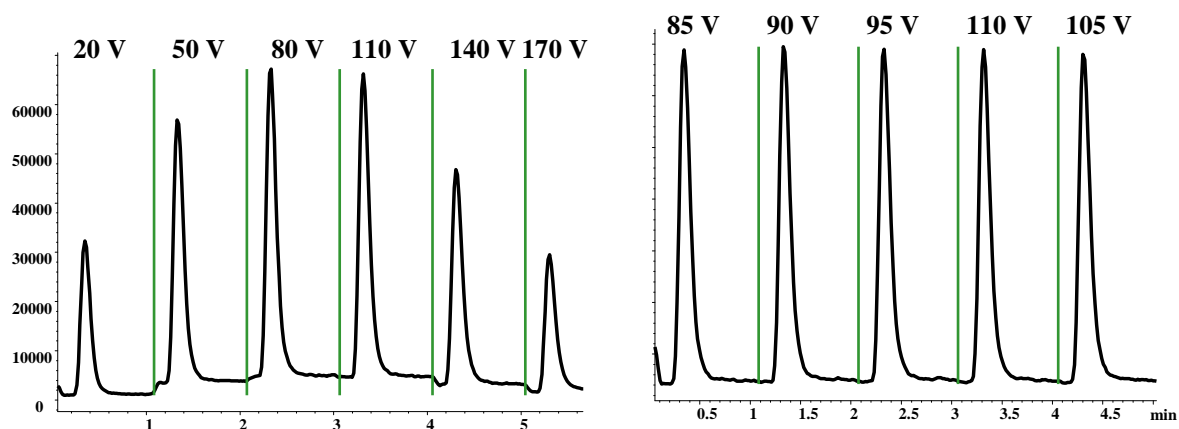
- 1) A – acetonitryl z 0,1 % HCOOH, B – metanol z 0,1 % HCOOH;
- 2) A – 10 % acetonitryl w buforze octanowym (10 mM, pH 5,7), B - 80 % acetonitryl w buforze octanowym. Ostatecznie dobrane warunki rozdzielania przedstawiono w części metodycznej (punkt 2.6.7).

PEITC-NAC

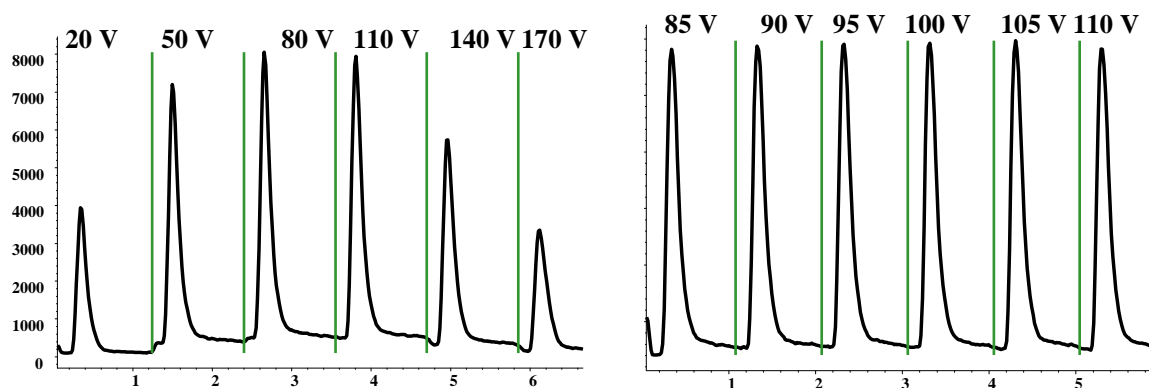


Rysunek 45. Widma uzyskane w trakcie analizy próbek substancji wzorcowych ditiokarbaminianów ITC-NAC (uzyskane w wyniku zastosowania wstrzykowej analizy przepływowej z wykorzystaniem detektora MS)

AITC-NAC

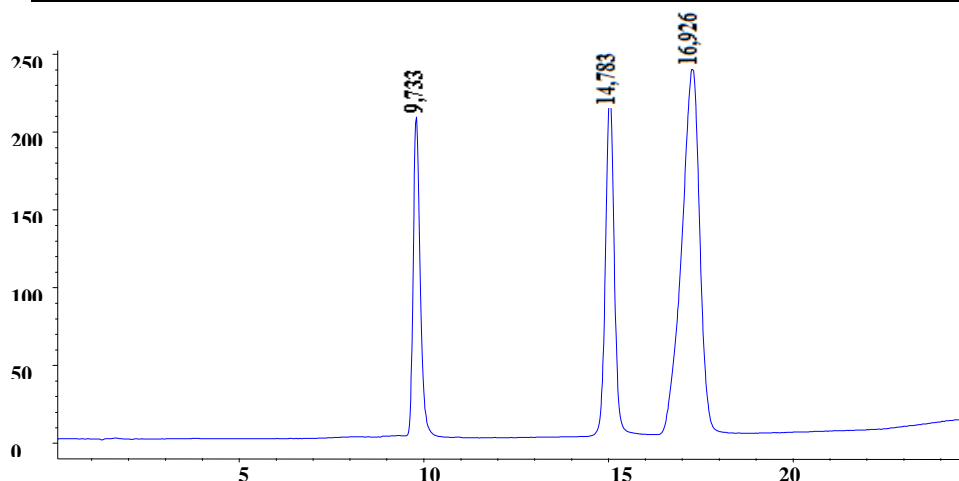


BITC-NAC



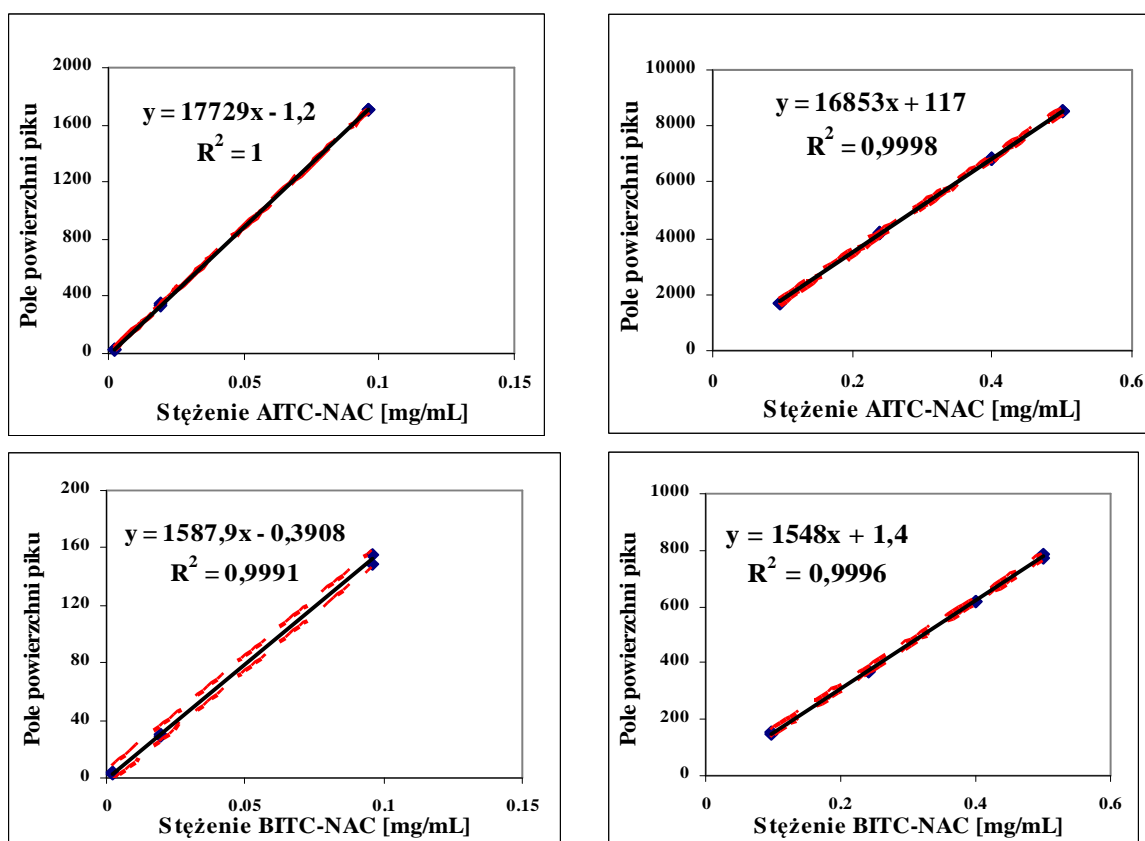
Rysunek 45. c.d. Widma uzyskane w trakcie analizy próbek substancji wzorcowych ditiokarbaminianów ITC-NAC (uzyskane w wyniku zastosowania wstrzykowej analizy przepływowej z wykorzystaniem detektora MS)

Opracowana procedura została wykorzystana do oznaczenia zawartości ditiokarbaminianów ITC-NAC (powstających po derywatywacji za pomocą NAC) w próbkach roślin kapustowatych. W oparciu o czasy retencji i widma UV oraz widma mas substancji wzorcowych: ditiokarbaminianu AITC-NAC, BITC-NAC oraz PEITC-NAC (rysunek 46) w badanych próbkach zidentyfikowano wspomniane koniugaty.

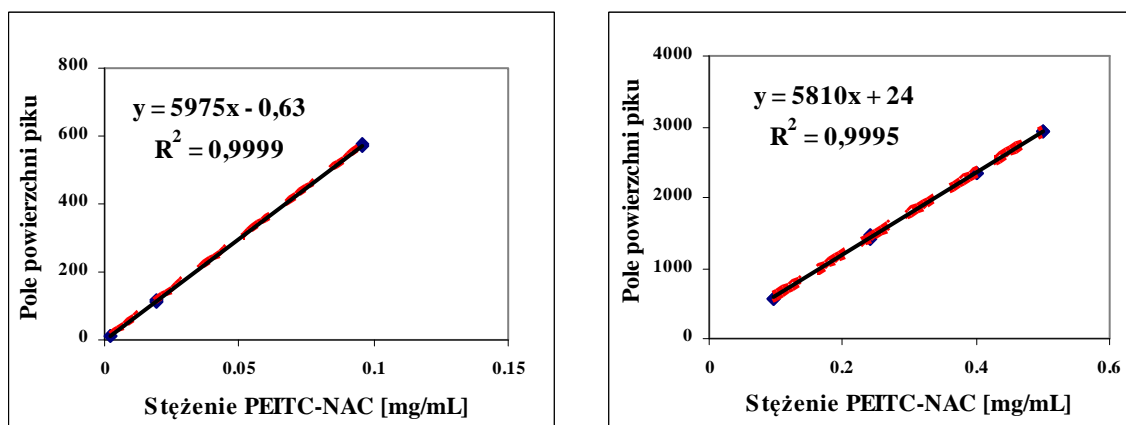


Rysunek 46. Chromatogram uzyskany w trakcie analizy próbek roztworów wzorcowych ditiokarbaminianów ITC-NAC (AITC-NAC, PEITC-NAC, BITC-NAC) przy użyciu techniki HPLC-DAD ($\lambda=272$ nm)

Korzystając z równań krzywych kalibracyjnych (rysunek 47) wyznaczonych na podstawie analizy próbek metanolowych roztworów substancji wzorcowych (AITC-NAC, BITC-NAC, PEITC-NAC) obliczono zawartość poszczególnych ditiokarbaminianów ITC-NAC w próbkach soków z kapusty.



Rysunek 47. Krzywe kalibracyjne uzyskane w wyniku analizy próbek roztworów wzorcowych ditiokarbaminianów ITC-NAC z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD



Rysunek 47. c.d. Krzywe kalibracyjne uzyskane w wyniku analizy próbek roztworów wzorcowych ditiokarbaminianów ITC-NAC z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD

Po etapie doboru optymalnych warunków procedury oznaczania ditiokarbaminianów ITC-NAC przeprowadzono proces walidacji metodyki oznaczania (tabela 20) poprzez wyznaczenie wartości liczbowych podstawowych parametrów walidacyjnych (granica wykrywalności i oznaczalności, współczynnik regresji, niepewność).

Tabela 20. Parametry walidacyjne opracowanej metodyki oznaczania ditiokarbaminianów ITC-NAC w próbkach ekstraktów z soków z kapusty z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD

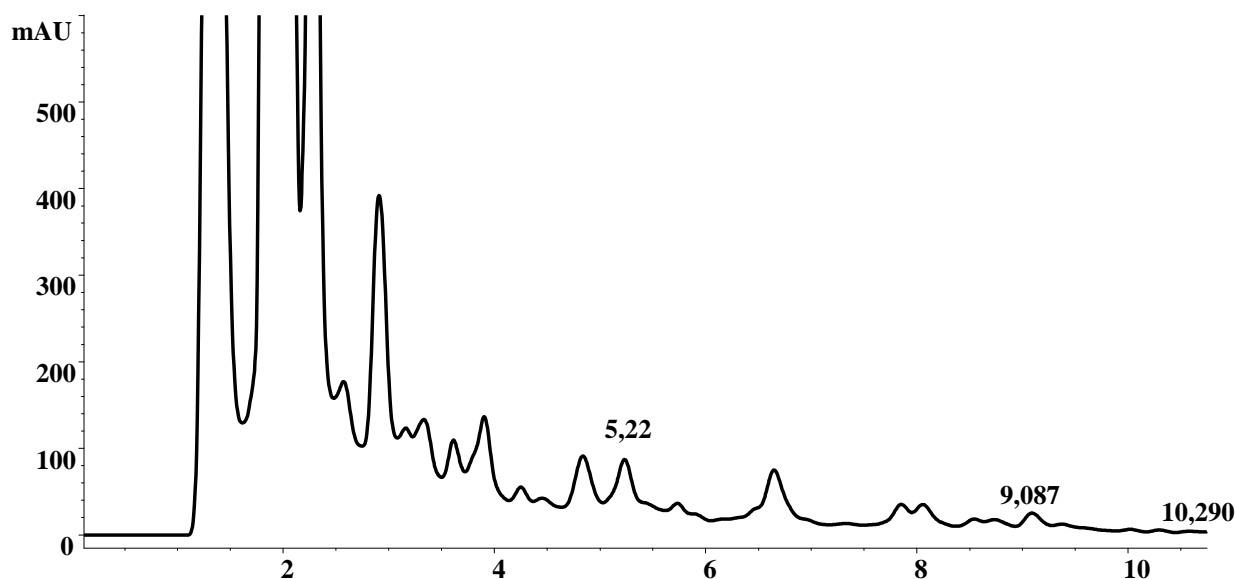
Substancja wzorcowa	Pole powierzchni pików	Stężenie substancji wzorcowej [mg/mL]	Równanie krzywej kalibracyjnej	Współczynnik regresji (R)	Granica wykrywalności (LOD) [mg/mL]	Granica oznaczalności (LOQ) [mg/mL]
AITC-NAC	<31-1701,5>	<0,0019-0,096>	$y=17729x-1,2$	1,000	0,00040	0,0011
	<1699,6-8533>	<0,096-0,50>	$y=16853x+117$	0,9999	0,0072	0,022
BITC-NAC	<2,3-155,4>	<0,0019-0,096>	$y=1587x-0,4$	0,9995	0,0039	0,012
	<148,8-769,9>	<0,096-0,50>	$y=1548x+1,4$	0,9998	0,010	0,031
PEITC-NAC	<10,9-574,1>	<0,0019-0,096>	$y=5975x-0,63$	0,9999	0,0010	0,0030
	<571,9-2935,7>	<0,096-0,50>	$y=5810x+24$	0,9997	0,012	0,033536

3.8.5. *Wykorzystanie zoptymalizowanej drogi syntezy wzorców ditiokarbaminianów ITC-NAC w procesie derywatacji izotiocyjanianów (ITC) za pomocą N-acetylo-L-cysteiny (NAC) w próbkach roślinnych*

Drugim krokiem do opracowania procedury oznaczania izotiocyjanianów było sprawdzenie czy zachodzi proces syntezy ditiokarbaminianów ITC-NAC w próbkach materiału roślinnego po dodaniu NAC i dobranie optymalnych warunków tego procesu.

Sprawdzono celowość zastosowania procesu derywatacji izotiocyjanianów za pomocą NAC do oznaczania związków z grupy ITC w przypadku próbek charakteryzujących się złożoną matrycą. W tym celu śledzono przy użyciu techniki HPLC-DAD przebieg reakcji w przypadku dodania NAC do próbki soku jabłkowego. Wybór soku jabłkowego był związany z faktem, że nie zawiera naturalnie izotiocyjanianów i często występuje mieszanina jabłka z roślinami kapustowatymi w produktach żywnościowych. W kolejnym etapie do układu reakcyjnego dodawano AITC i sprawdzano czy w próbce obecne są ditiokarbaminiany ITC-NAC. Obecność tych związków wskazywała na zasadność zastosowania procesu derywatacji izotiocyjanianów zawartych w sokach z kapusty za pomocą NAC. Natomiast w przypadku próbek soków z kapusty dodawano różne ilości NAC (zarówno nadmiar jak i niedomiar w stosunku do ilości stechiometrycznej) oraz prowadzono reakcję przez określony okres czasu (1-6 godzin). Miało to na celu określenie ilości dodawanej do próbek soków z kapusty NAC prowadzącej do uzyskania jak najlepszej wydajności tworzenia ditiokarbaminianów ITC-NAC oraz zdefiniowanie optymalnego czasu reakcji związków z grupy ITC z NAC

Wypróbowano także możliwość zastosowania opisanej w pracy [295] metodyki syntezy ditiokarbaminianów ITC-NAC w próbkach ekstraktów z liofilizatów warzyw krzyżowych do syntezy tych produktów w próbach soków z kapusty. Biorąc pod uwagę informacje dotyczące tej procedury, NAC rozpuszczano w trietyloaminie, po czym dodawano sok z kapusty. Reakcję prowadzono w temperaturze 30°C przez okres 1 godziny. Niestety analiza chromatograficzna próbki po zakończonej reakcji pozwoliła na stwierdzenie obecności jedynie indolowych pochodnych zamiast ditiokarbaminianów ITC-NAC (rysunek 48). W tym przypadku zaobserwowano wprawdzie obecność pików o czasach retencji, które mogłyby odpowiadać ditiokarbaminianom ITC-NAC, jednakże widma UV różniły się od widm uzyskanych dla substancji wzorcowych ditiokarbaminianów AITC-NAC, BITC-NAC oraz PEITC-NAC.



Rysunek 48. Chromatogram uzyskany podczas analizy próbki ekstraktów ze świeżej kapusty po reakcji derywatacji izotiocyjanianów za pomocą *N*-acetylo-*L*-cysteiny przy użyciu techniki HPLC-DAD

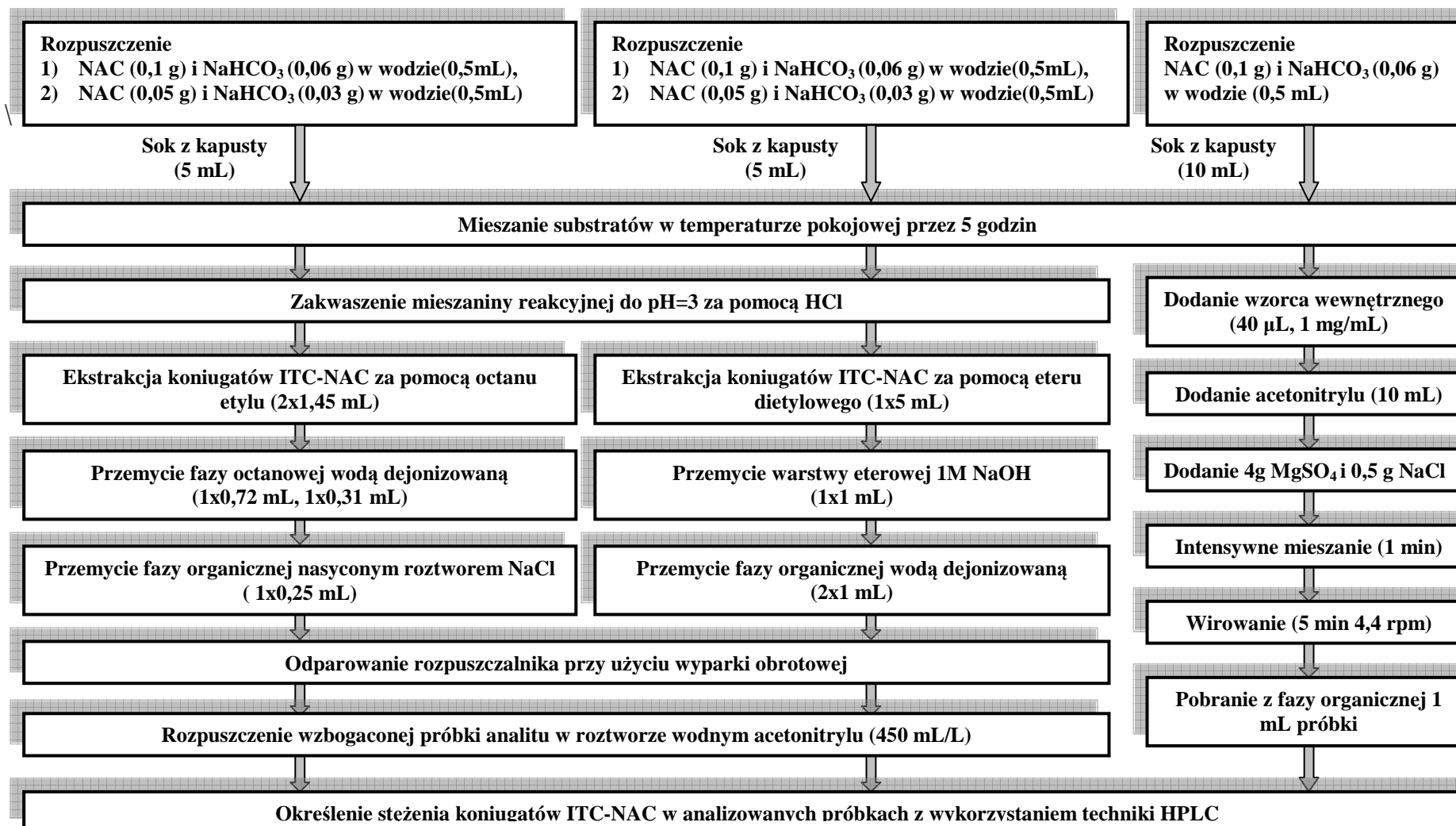
3.8.6. Dobór optymalnych warunków ekstrakcji ditiokarbaminianów ITC-NAC z próbek soków z kapusty

Sprawdzono różne procedury ekstrakcji powstałych koniugatów NAC-ITC z próbek soków z warzyw kapustowatych. Na tym etapie zostały przetestowane najczęściej stosowane przy tego typu analitach media ekstrakcyjne [295]. Zastosowano następujące techniki ekstrakcji ditiokarbaminianów ITC-NAC z próbek soków z kapusty:

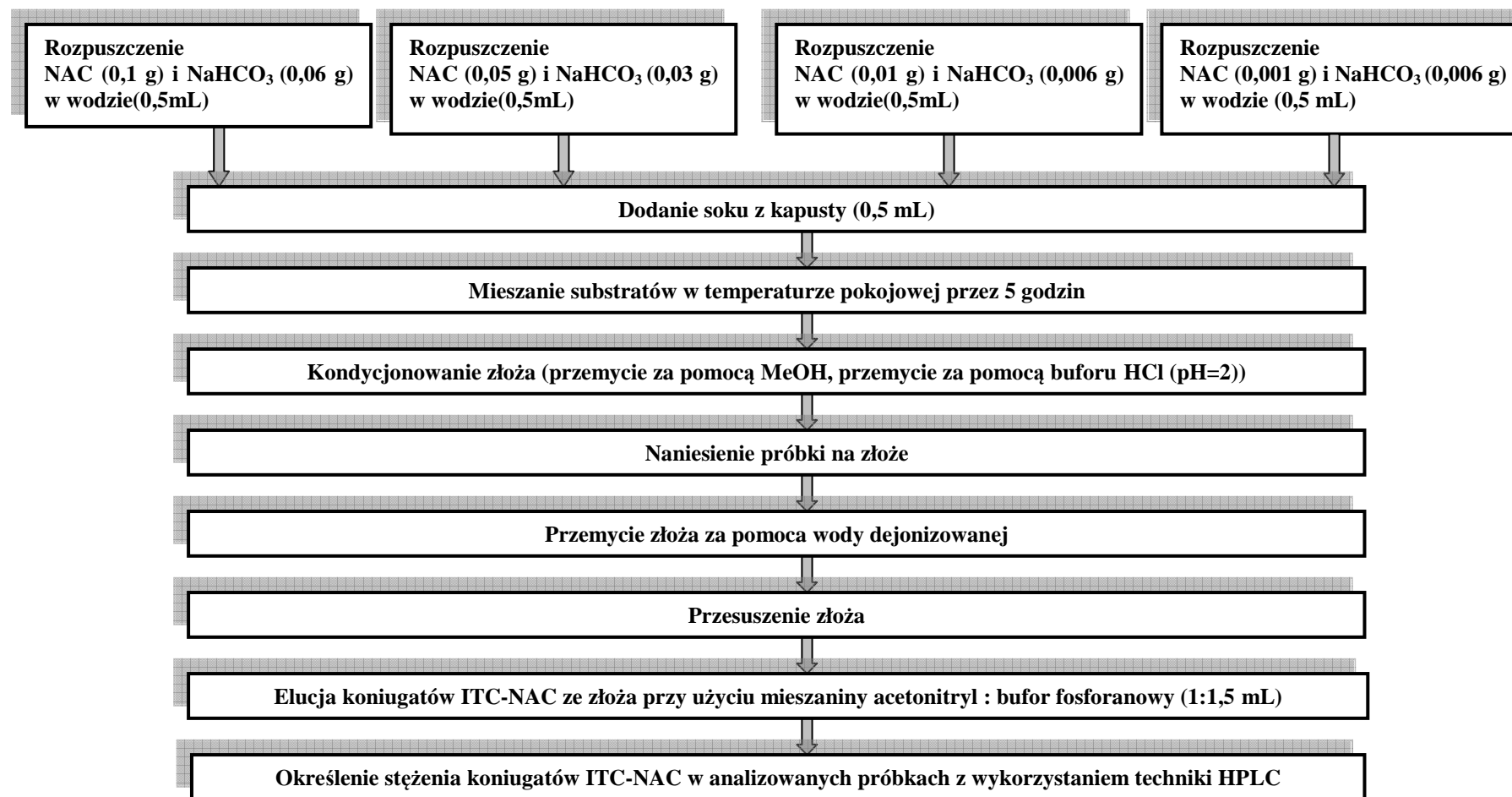
- ekstrakcja za pomocą octanu etylu [296],
- ekstrakcja za pomocą eteru dietylowego [286],
- ekstrakcja za pomocą acetonitrylu [297],
- technika SPE [259] (rysunki 49 i 50).

Uzyskane próbki ekstraktów analizowano wykorzystując opracowaną wcześniej metodykę analityczną opartą na zastosowaniu techniki HPLC-DAD na etapie rozdzielania i oznaczeń końcowych. Chromatogramy substancji koniugatów ITC-NAC uzyskane w wyniku analizy próbek ekstraktów koniugatów ITC-NAC z próbek soków z kapusty przedstawiono na rysunku 51.

W przypadku zastosowania techniki SPE do ekstrakcji koniugatów – ITC-NAC z próbek soków z kapusty uzyskano wszystkie koniugaty ITC-NAC, gdy prowadzono reakcję, w której NAC występował z najmniejszym stężeniem.

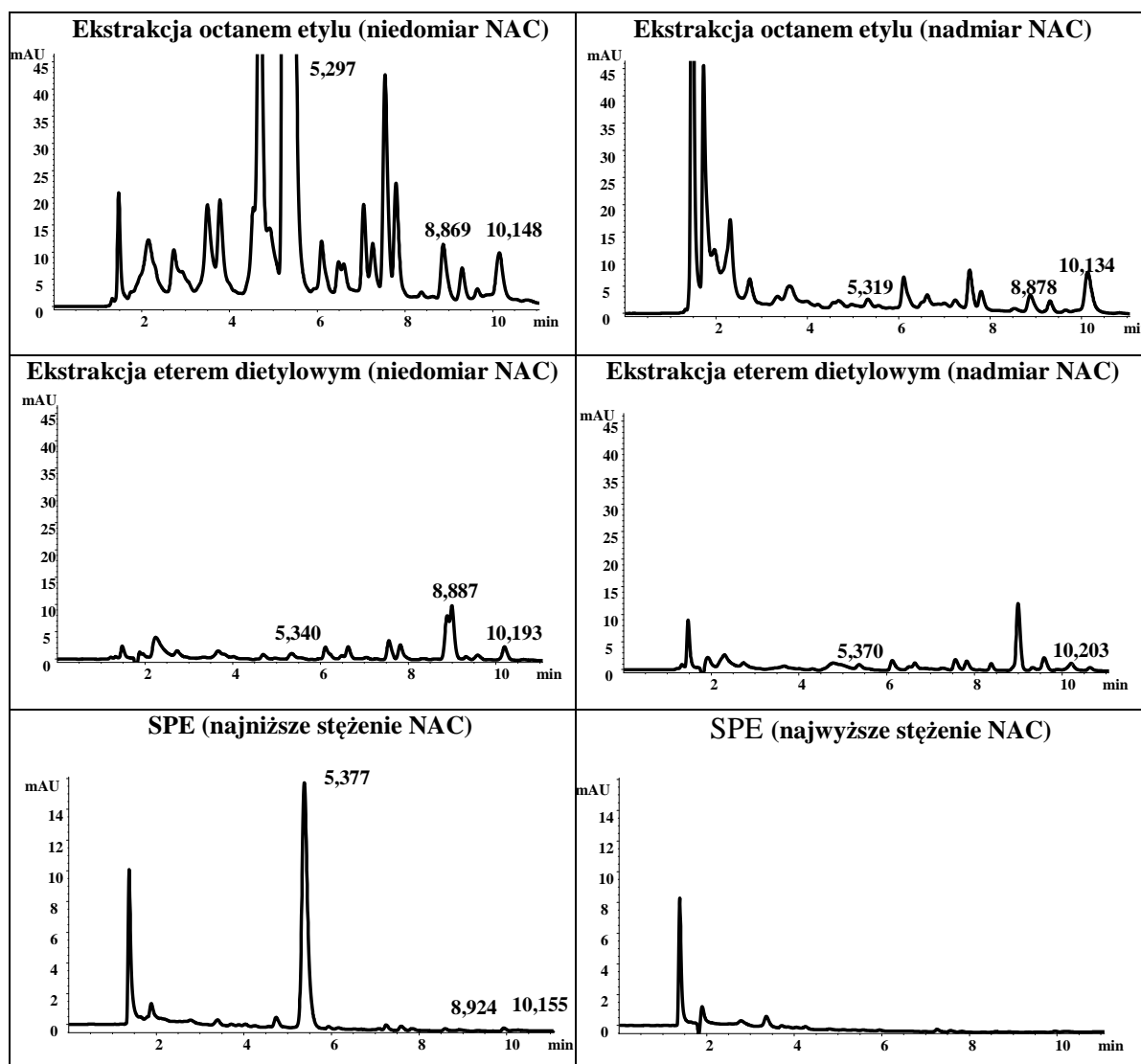


Rysunek 49. Schemat postępowania wykorzystywany podczas ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz koniugatów ITC-NAC z próbek soków z kapusty



Rysunek 50. Schemat postępowania wykorzystywany podczas ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe koniugatów ITC-NAC z próbek soków z kapusty

Natomiast pozostałe próbki po procesie ekstrakcji z wykorzystaniem techniki SPE nie zawierały tiokarbamylowych pochodnych.



Rysunek 51. Chromatogramy substancji koniugatów ITC-NAC uzyskane w wyniku analizy odpowiednich próbek ekstraktów z soków z kapusty przy użyciu opracowanej metodyki analitycznej

W wyniku zastosowania octanu etylu do ekstrakcji ditiokarbaminianów ITC-NAC otrzymano koniugat AITC-NAC jedynie w przypadku prowadzenia reakcji z nadmiarem NAC. Przy tym ten sposób ekstrakcji pozwolił na uzyskanie wyższego stężenia tiokarbaminianu niż w przypadku stosowania pozostałych technik (rysunek 51). Jednak na chromatogramie uzyskanym w wyniku analizy próbek ekstraktów octanowych z soków z kapusty dostrzeżono obecność wielu innych związków poza oczekiwanymi produktami AITC-NAC, BITC-NAC oraz PEITC-NAC. Podobnie było

w przypadku ekstrakcji koniugatów ITC-NAC z wykorzystaniem eteru dietylowego (rysunek 51).

Uzyskane wyniki nie pozwalają na jednoznaczne zdefiniowanie najbardziej odpowiedniej techniki ekstrakcji ditiokarbaminianów ITC-NAC z próbek soków z kapusty po zastosowaniu derywatywacji związków z grupy ITC za pomocą NAC. Jednak do dalszych badań wybrano technikę SPE ze względu na:

- najwyższy stopień oczyszczenia produktów ITC-NAC z dodatkowych związków występujących w próbkach ekstraktów z soków z kapusty,
- mniejsze ilości zużywanych rozpuszczalników do ekstrakcji ditiokarbaminianów AITC-NAC, BITC-NAC oraz PEITC-NAC.

Zastosowanie techniki SPE i optymalnych warunków ekstrakcji ditiokarbaminianów AITC-NAC, BITC-NAC oraz PEITC-NAC z próbek roztworów substancji wzorcowych pozwoliło na izolację analitów i uzyskanie odzysku analitów rzędu 90 %. Natomiast w wyniku badania wpływu matrycy poprzez dodanie soku z kapusty do mieszaniny substancji wzorcowych o znanym stężeniu i ekstrakcji ditiokarbaminianów ITC-NAC odzysk analitów uległ zmniejszeniu do 78 %.

3.8.7. Zastosowanie techniki HPLC-DAD-MS na etapie końcowych oznaczeń zawartości ditiokarbaminianów ITC-NAC powstających po derywatywacji izotiocyjanianów (ITC) za pomocą N-acetylo-L-cysteiny (NAC) w próbkach roślin kapustowatych

Spośród produktów rozpadu glukozynolanów z grupy ITC najlepiej przebadanymi są produkty rozpadu synigryny (izotiocyjanian allilu (AITC)), glukotrapeoliny (izotiocyjanian benzylu (BITC)) oraz glukonasturcyny (izotiocyjanian fenyloetylu (PEITC)) [298]. Związki te, występujące w warzywach kapustowatych, wykazują działanie przeciwrakotwórcze. Wyniki badań opisują wiele prawdopodobnych mechanizmów zapobiegania powstawaniu nowotworów przez wspomniane izotiocyjaniany. Stąd też wynika potrzeba ilościowego i jakościowego oznaczenia tych produktów rozpadu glukozynolanów. Jak wspomniano wcześniej, dane na temat metodyk oznaczania poszczególnych związków z grupy ITC są jednak nadal ograniczone. Powszechnie opisywane w literaturze procedury umożliwiają jedynie ilościowe oznaczenie związków z grupy ITC, bez możliwości ich identyfikacji. Stanowi to dużą wadę tych metodyk, ponieważ biologiczna aktywność poszczególnych

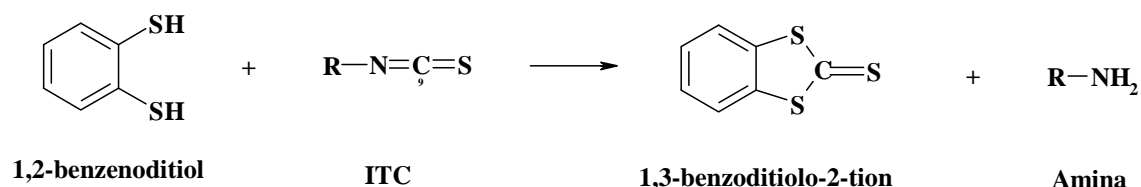
izotiocyanianów jest bardzo zróżnicowana, a co się z tym wiąże ważna jest nie tylko ogólna zawartość, ale i skład.

Celem tego etapu badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było oznaczenie trzech związków z grupy ITC- AITC, BITC oraz PEITC w próbkach soków z kapusty z wykorzystaniem opracowanej metodyki polegającej na przeprowadzeniu procesu derywatywacji wspomnianych związków za pomocą NAC prowadzącej do utworzenia ditiokarbaminianów ITC-NAC. Do oznaczania zawartości tych związków w próbkach roślin kapustowatych wykorzystano technikę HPLC-DAD-MS. Wykonano badania próbek ekstraktów uzyskanych z soków z kapusty w celu oznaczenia poszczególnych izotiocyanianów. Przeprowadzone wcześniej oznaczenia zawartości glukozynolanów w próbkach tych soków pokazały, że charakteryzują się one różną zawartością prekursorów związków z grupy ITC w zależności od warunków uprawy. W związku z tym można było się spodziewać również zróżnicowanej zawartości izotiocyanianów w badanych próbkach. Jednak pomimo, że metodyka oznaczania związków z grupy ITC po derywatywacji za pomocą NAC wygląda obiecująco w przypadku próbek roztworów wzorcowych to dla próbek rzeczywistych wymaga jeszcze dopracowania, szczególnie na etapie derywatywacji tak by zapewniał pełne przejście w ditiokarbaminiany.

3.9. Zastosowanie techniki spektrofotometrycznej na etapie doboru optymalnych warunków reakcji kondensacji izotiocyanianów (ITC) z 1,2-benzenoditiem w próbkach roztworów substancji wzorcowej izotiocyanianu fenyloetylu (PEITC)

W celu porównania wyników oznaczenia związków z grupy ITC z zastosowaniem nowego narzędzia analitycznego, równolegle wyznaczana była całkowita zawartość izotiocyanianów z wykorzystaniem znanej metodyki polegającej na cyklokondensacji izotiocyanianów z 1,2-benzenoditiem do stabilnego produktu 1,3-benzoditiolo-2-tionu i jego oznaczenia z użyciem HPLC [284, 285]. Procedura wyznaczania całkowitej zawartości izotiocyanianów była traktowana jako procedura odniesienia na etapie oznaczania związków z grupy ITC z wykorzystaniem nowej, opracowywanej metodyki. Wiedza na temat całkowitej zawartości związków z grupy ITC była pomocna do oceny wydajności reakcji izotiocyanianów zawartych w próbkach soków roślin kapustowatych z NAC.

Przeprowadzenie reakcji kondensacji izotiocyanianów z 1,2-benzenoditiem eliminuje problem lotności i niestabilności związków z grupy ITC. Związek ten reaguje ze związkami z grupy ITC poprzez grupy tiolowe tworząc stabilny produkt kondensacji - 1,3-benzoditiol-2-tion o jasnożółtym zabarwieniu. Przebieg reakcji cyklokondensacji przedstawiono schematycznie na rysunku 52.



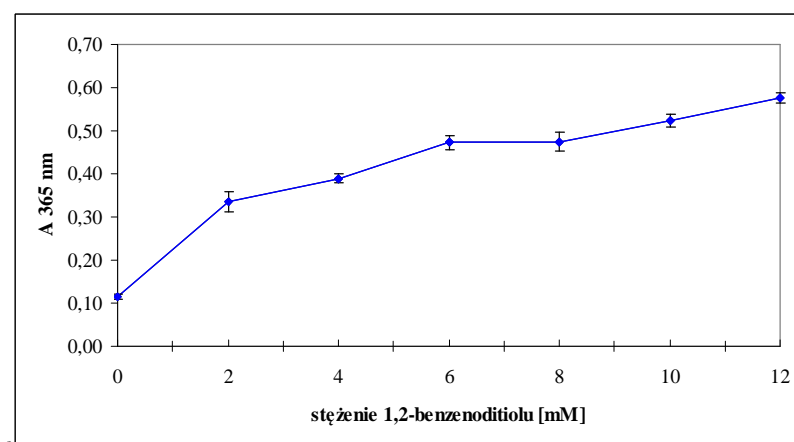
Rysunek 52. Schemat reakcji cyklokondensacji izotiocyanianów z 1,2-benzenoditiem

W celu dobrania optymalnych warunków reakcji izotiocyanianów z 1,2-benzenoditiem sprawdzono wpływ:

- stężenia 1,2-benzenoditiolu,
- czasu ogrzewania,
- temperatury na wydajność reakcji kondensacji.

Na tym etapie badań, do oznaczania produktów wspomnianej reakcji kondensacji wykorzystano technikę spektrofotometryczną.

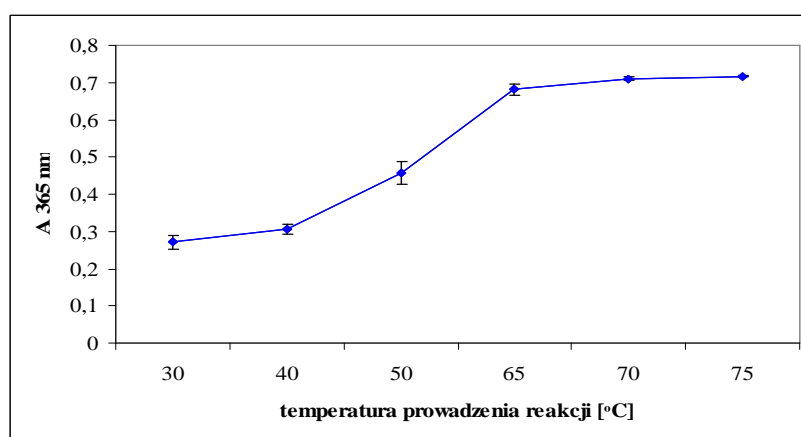
W pierwszym etapie zastosowano różne stężenia 1,2-benzenoditiolu (0-12 mM) w reakcji z PEITC (rysunek 53). Na podstawie pomiaru absorbancji próbki, uzyskanej



Rysunek 53. Wpływ stężenia 1,2-benzenoditiolu na przebieg reakcji kondensacji izotiocyanianu fenyloetylu za pomocą 1,2-benzenoditiolu

w wyniku reakcji związków z grupy ITC z 1,2-benzenoditiolem, począwszy od stężenia 6 mM do 8 mM inicjatora reakcji kondensacji można zauważyć stabilizację wartości absorbancji, co wskazuje na nieznaczne dalsze powstawanie produktu w reakcji izotiocyanianów z 1,2- benzenoditiolem. Jednak dopiero zastosowanie stężenia 10 mM prowadzi do ilościowego przereagowania 1,2-benzenoditiolu. W związku z tym do dalszych badań wykorzystano to stężenie jako optymalne do przebiegu reakcji kondensacji związków z grupy ITC z 1,2-benzenoditiolem.

Zbadano również wpływ temperatury na wydajność reakcji kondensacji izotiocyanianów za pomocą 1,2-benzenoditiolu. W tym celu mieszaninę reakcyjną ogrzewano w różnych temperaturach (rysunek 54).

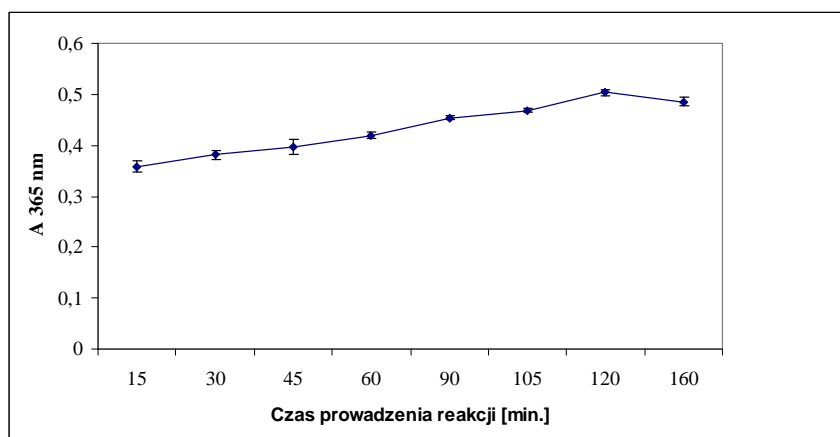


Rysunek 54. Wpływ temperatury na przebieg reakcji kondensacji izotiocyanianu fenyloetylu za pomocą 1,2-benzenoditiolu

Analizując dane przedstawione na rysunku 54 można stwierdzić, że wzrost temperatury powyżej 65°C nie prowadzi do dalszego powstawania produktu podczas reakcji kondensacji PEITC za pomocą 1,2-benzenoditiolu

Wydajność reakcji kondensacji PEITC za pomocą 1,2-benzenoditiolu może być zależna także od czasu reakcji. Pomiar absorbancji pozwolił śledzić postęp reakcji. Wraz z upływem czasu wzrastała ilość powstającego produktu. Dopiero po czasie dłuższym niż 120 min zaobserwować można spadek wartości absorbancji co może sugerować rozpad powstałego produktu kondensacji (rysunek 55). W związku z tym w dalszych badaniach reakcję kondensacji związków z grupy ITC prowadzono przez okres 120 min.

Kolejnym etapem badań było określenie optymalnych warunków kondensacji ITC za pomocą 1,2-benzenoditiolu w próbkach soków z kapusty.



Rysunek 55. Wpływ czasu prowadzenia reakcji na przebieg reakcji kondensacji izotiocyanianu fenyloetylu za pomocą 1,2-benzenoditiolu

Zastosowanie roztworu metanolowego 1,2-benzenoditiolu i zoptymalizowanych wcześniej warunków reakcji kondensacji (temperatura 65°C, 120 min, stężenie 1,2-benzenoditiolu – 10 mM) prowadziło do powstawania osadu w mieszaninie reakcyjnej. Związane to było z wytrąceniem się białek zawartych w próbkach soków z kapusty pod wpływem metanolu. Odwirowanie osadu eliminowało tylko częściowo tę niedogodność, bowiem w efekcie końcowym nie uzyskano idealnie klarownych roztworów. W związku z tym zastosowano izopropanol, który ułatwiał precypitację białek w mieszaninie reakcyjnej i po odwirowaniu osadu uzyskano klarowne roztwory. Sprawdzone również zastosowanie innego rozpuszczalnika, jakim był acetonitryl. Nie było to jednak trafne rozwiązanie ze względu na uzyskanie dwóch warstw po zmieszaniu poszczególnych składników. Wynikało to ze zbyt wysokiego stężenia buforu fosforanowego (100 mM) użytego do reakcji. Zmniejszenie stężenia buforu fosforanowego eliminowało problem braku mieszania się poszczególnych składników. Sprawdzone również wpływ pH na wydajność reakcji kondensacji poprzez zmianę buforu fosforanowego (pH 8,5) na boranowego (pH 9,25). Jednakże najlepsze rezultaty uzyskano stosując izopropanol do przygotowania roztworu 1,2-benzenoditiolu i mniej zasadowe środowisko reakcji dlatego te warunki zostały zastosowane do oznaczenia zawartości związków z grupy ITC w pozostałych próbkach soków z kapusty.

3.10. Zastosowanie techniki HPLC do oznaczania izotiocyanianów (ITC) w ekstraktach z próbek soków z kapusty

Wyznaczenie całkowitej zawartości izotiocyanianów w próbkach soków uzyskanych z roślin kapustowatych czy też ekstraktów roślinnych umożliwia

zastosowanie techniki spektrofotometrycznej, której zasadą jest zdolność związków z grupy ITC do ilościowej reakcji z handlowo dostępnym 1,2-benzenoditiolem z utworzeniem nietłotnego, barwnego produktu - 1,3-benzenoditiolo-2-tionu. Jednak czułość pomiaru z wykorzystaniem wyżej opisanej metodyki jest rzędu 1 nmola [284, 299]. Wykorzystanie techniki HPLC zamiast techniki spektrofotometrycznej zapewnia możliwość uzyskania zdecydowanie bardziej korzystnych wartości liczbowych tak ważnego parametru metrologicznego jakim jest granica oznaczalności metodyki analitycznej [285]. W związku z tym została ona wykorzystana do oznaczenia zawartości izotiocyjanianów w ekstraktach z próbek soków z kapusty po reakcji kondensacji tych związków z 1,2-benzenoditiolem.

3.10.1. Synteza substancji wzorcowej 1,3-benzenoditiolo-2-tionu

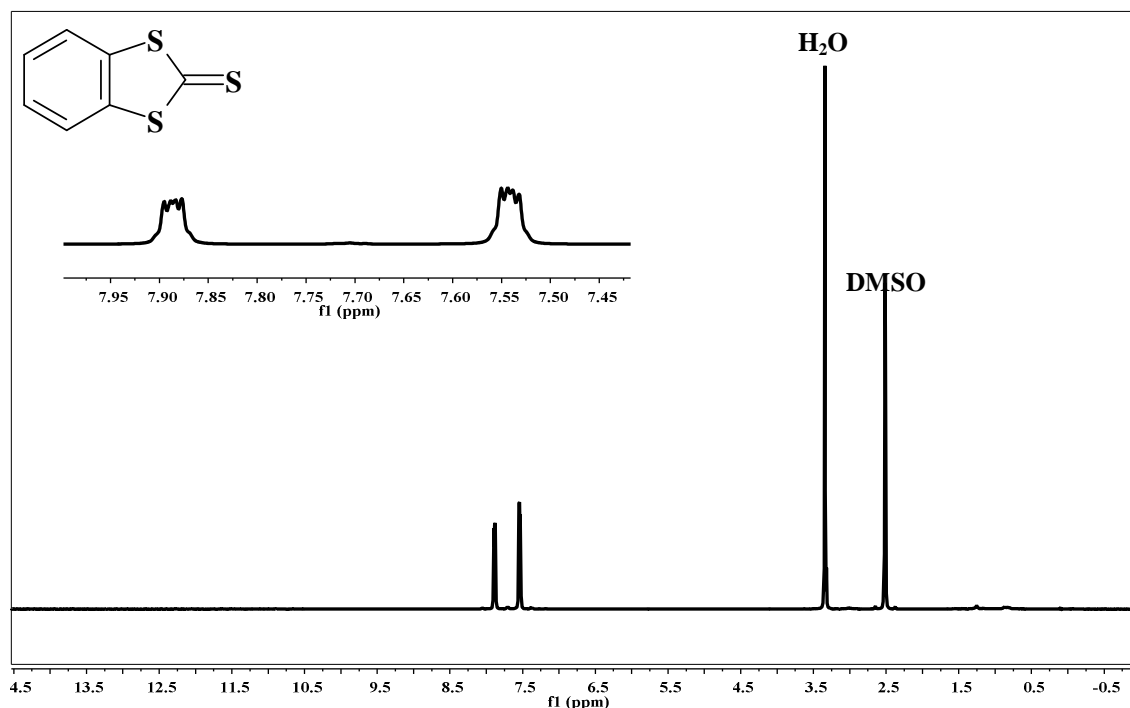
W przypadku oznaczania związków z grupy ITC w próbkach soków z kapusty z wykorzystaniem metodyki opierającej się na reakcji kondensacji izotiocyjanianów z 1,2-benzenoditiolem niezbędne było przeprowadzenie syntezy produktu wspomnianej reakcji z użyciem substancji wzorcowej izotiocyjanianu. 1,3-Benzenoditiol-2-tion wykorzystano jako substancję wzorcową do wyznaczania całkowitej zawartości izotiocyjanianów w próbkach soków z kapusty stosując metodykę opartą na zastosowaniu techniki HPLC-DAD na etapie rozdzielania i oznaczania analitów.

W celu uzyskania wspomnianego produktu skorzystano z procedury opisanej w pracy [296] polegającej na dodaniu PITC do roztworu metanolowego 1,2-benzenoditiolu oraz 100 mM buforu fosforanowego (pH 8,5) i prowadzeniu reakcji przez noc w atmosferze azotu. Jednakże w przypadku tej reakcji nie uzyskano oczekiwanego produktu. Dopiero w wyniku zastosowania procedury syntezy 1,3-benzenoditiolo-2-tionu opisanej w doniesieniu [296] otrzymano wspomniany produkt z wysoką wydajnością rzędu 92 %.

3.10.2. Zastosowanie techniki NMR na etapie identyfikacji produktu uzyskanego w wyniku reakcji kondensacji izotiocyjanianu metylu (MITC) z 1,2-benzenoditiolem

Wykorzystanie techniki NMR pozwoliło na identyfikację produktu reakcji MITC z 1,2-benzenoditiolem. Na rysunku 56 przedstawiono widmo ^1H NMR uzyskane w wyniku analizy próbki produktu wspomnianej reakcji.

W widmie protonowym otrzymanego na drodze syntezy produktu można zauważyć obecność dwóch multipletów (δ 7,53-7,57, 2H oraz δ 7,87-7,91, 2H) odpowiadających protonom występującym w pierścieniu aromatycznym. Zarejestrowane widmo jest zgodne z widmami przedstawionymi dla 1,3-benzenoditiolo-2-tionu w literaturze [299] i można jednoznacznie uznać, że odpowiada ono strukturze wspomnianego związku.

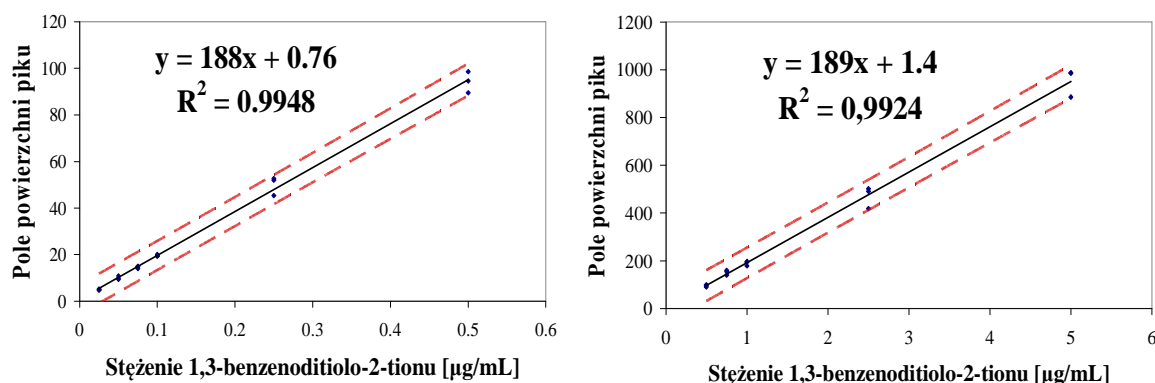


Rysunek 56. Widmo ^1H NMR uzyskane w wyniku analizy próbki produktu uzyskanego w trakcie reakcji izotiocyjanianu metylu z 1,2-benzenoditiolem

3.10.3. Wykorzystanie substancji wzorcowej - 1,3-benzenoditiolo-2-tionu do wyznaczenia całkowitej zawartości izotiocyjanianów (ITC) w próbkach materiału roślinnego

Oznaczenia związków z grupy ITC po kondensacji z 1,2-benzenoditiolem prowadzono w tych samych próbkach soków z kapusty jak w przypadku oznaczania izotiocyjanianów po derywatywacji za pomocą NAC.

Produkt kondensacji związków z grupy ITC i 1,2-benzenoditiolu wykorzystano do sporządzenia krzywej wzorcowej, na której podstawie wyznaczono zawartość związków z grupy ITC w próbkach soków z kapusty (rysunek 57).



Rysunek 57. Krzywe kalibracyjne uzyskane w wyniku analizy próbek roztworów wzorcowych 1,3-benzenoditiolo-2-tionu z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD (punkty pomiarowe stanowią wartość średnią z trzech równoległych oznaczeń $\bar{X}_{gr} \pm SD$)

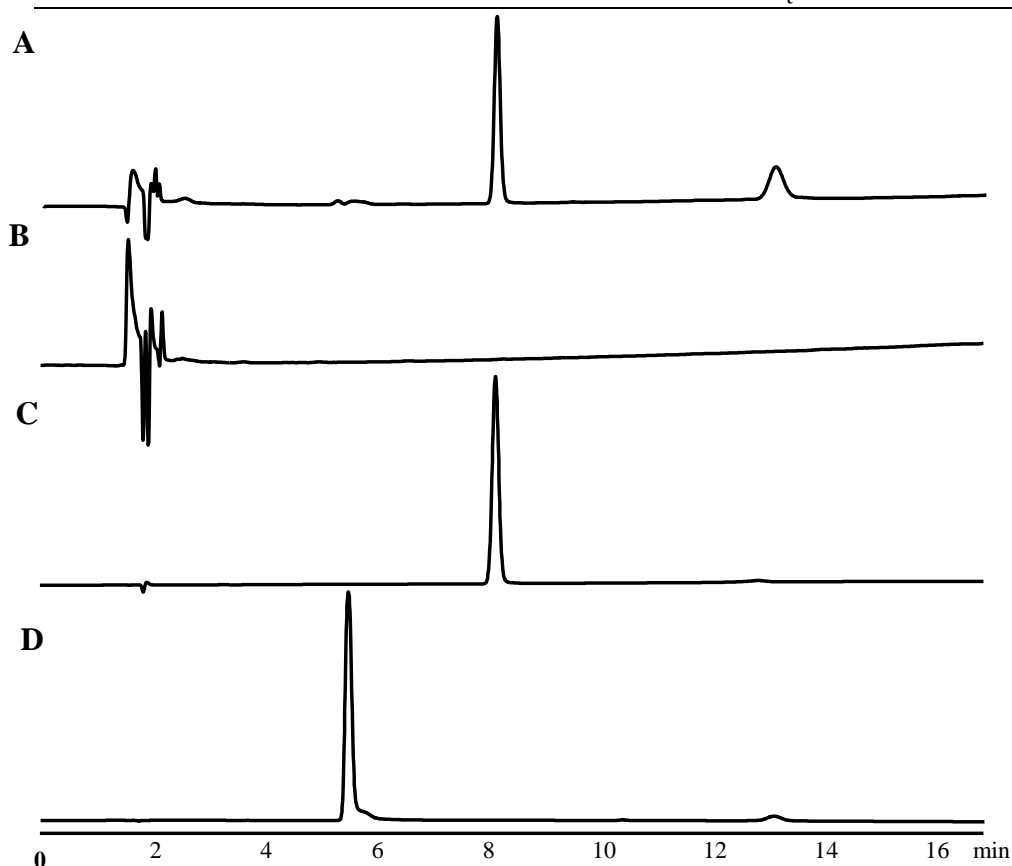
Proces walidacji metodyki oznaczania izotiocyjanianów przeprowadzono poprzez wyznaczenie wartości liczbowych podstawowych parametrów walidacyjnych (granica wykrywalności i oznaczalności, współczynnik regresji, niepewność). W tabeli 21 przedstawiono parametry walidacyjne stosowanej metodyki oznaczania izotiocyjanianów w próbkach soków z kapusty z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD.

Tabela 21. Parametry walidacyjne stosowanej metodyki oznaczania izotiocyjanianów w próbkach soków z kapusty z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD

Pole powierzchni pików	Stężenie substancji wzorcowej [µg/mL]	Równanie krzywej kalibracyjnej	Współczynnik regresji (R)	Granica wykrywalności (LOD) [µg/mL]	Granica oznaczalności (LOQ) [µg/mL]
<5,2-98,6>	<0,025-0,50>	$y=188x+0,76$	0,9974	0,028	0,084
<89,5-986,9>	<0,50-5,0>	$y=16853x+117$	0,9962	0,36	1,1

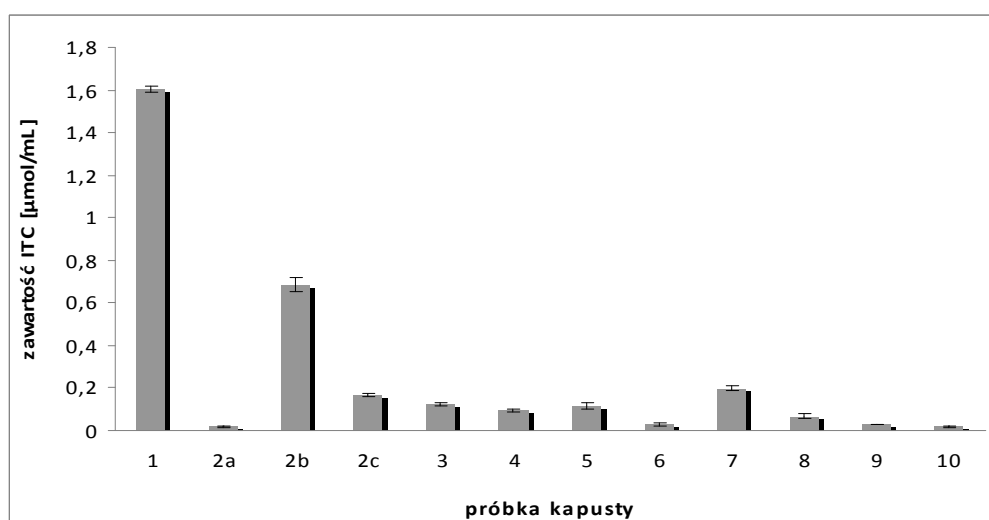
Chromatogramy otrzymane w wyniku analizy próbek soków z kapusty przedstawiono na rysunku 58.

Korzystając z krzywych kalibracyjnych wyznaczonych na podstawie wyników analizy próbek izopropanolowych roztworów substancji wzorcowej (zakres stężeń 0-5 µg/mL) obliczano zawartość związków z grupy ITC w poszczególnych próbkach soków z kapusty (rysunek 59).



Rysunek 58 Chromatogramy otrzymane w wyniku analizy próbek A – soku z kapusty po derywatywacji za pomocą NAC 2b, B – tła kapusty 2b, C – wzorca 1,3-benzenoditolu-2-tionu, D – wzorca 1,2-benzenoditiolu przy użyciu techniki HPLC

Z uwagi na fakt, że podczas oznaczania izotiocyjanianów po derywatywacji za pomocą NAC nie uzyskano jednoznacznych wyników nie było możliwe porównanie ich z wynikami oznaceń uzyskanymi przy użyciu stosowanej metodyki.



Rysunek 59. Zawartość związków z grupy ITC w próbkach soków z kapusty oznaczona za pomocą techniki HPLC-DAD (punkty pomiarowe stanowią wartość średnią z trzech równoległych oznaczeń $\bar{X}_{sr} \pm SD$)

IV. PODSUMOWANIE

Zwiększona zachorowalność na różne typy nowotworów, przy niewłaściwych preferencjach żywieniowych konsumentów stanowi poważny problem. Szczególnie dobrze udokumentowanym żywieniowym czynnikiem ryzyka w przypadku chorób nowotworowych jest wysokie spożycie wyrobów z mięsa. Wynika to m.in. z faktu, że obróbka termiczna mięsa, powszechny zwyczaj smażenia i grillowania, prowadzą do tworzenia się mutagennych substancji, takich jak heterocykliczne aminy aromatyczne (HAA) [4]. Z drugiej strony wyniki badań epidemiologiczne wskazują, że warzywa kapustowate - źródło przeciwrautowczych izotiocyjanianów (ITC) - mogą przeciwdziałać rozwojowi nowotworów, zagrożenie którymi skorelowane jest z ilością spożywanego mięsa. Uważa się, że przeciwdziałanie rakotwórczemu wpływowi heterocyklicznych amin aromatycznych polega na zdolności izotiocyjanianów do stymulacji ekspresji genów, których produkty mogą chronić przed tymi kancerogenami [252]. Przyjęty sposób postrzegania relacji związków z grupy HAA i ITC ma zatem podłoże biologiczne. Natomiast brakuje doniesień o możliwości chemicznych reakcji pomiędzy tymi grupami związków w żywności.

Własności chemiczne izotiocyjanianów, tzn. ich zdolność do wchodzenia w reakcje z ugrupowaniami nukleofilowymi sugeruje, że tworzenie koniugatów ITC-HAA może mieć istotne znaczenie dla obniżenia zagrożenia wspomnianymi kancerogenami. W wyniku blokowania grupy aminowej niemożliwa staje się bowiem aktywacja tych kancerogenów do elektrofilowych metabolitów, które mogą powodować uszkodzenia DNA.

Ponieważ obie grupy związków – rakotwórcze heterocykliczne aminy aromatyczne i przeciwrautowcze izotiocyjaniany – stanowią składniki żywności, wyniki uzyskane w trakcie realizacji procesu badawczego, będące przedmiotem rozprawy doktorskiej, pozwoliły między innymi na nowe spojrzenie na rolę interakcji pomiędzy produktami mięsnymi, a warzywami kapustowatymi, odmienne od dotychczas postulowanego w literaturze. Zbadanie zdolności izotiocyjanianów do kowalencyjnego wiązania się z heterocyklicznymi aminami aromatycznymi umożliwiło zrozumienie roli tych związków w chemoprewencji nowotworów z chemicznego punktu widzenia. Warto dodać, że omawiane badania, mimo iż dotyczą znanych i szeroko opisanych w literaturze naukowej substancji o istotnym znaczeniu dla ludzkiego zdrowia, do tej pory nie były prowadzone.

Pokazana reaktywność trzech naturalnie występujących izotiocyanianów, takich jak AITC, PEITC i SFN w stosunku do jednego z najbardziej mutagennych związków z grupy HAA – MeIQx pozwała przypuszczać, że powstawanie tiomoczników ITC-MeIQx może stanowić „chemiczną detoksykację” wspomnianej silnie mutagennej heterocyklicznej aminy aromatycznej. Zostało to zweryfikowane poprzez zbadanie mutagenności uzyskanych na drodze syntezy tiomoczników AITC-MeIQx, PEITC-MeIQx i SFN-MeIQx w trakcie badań z wykorzystaniem testu Amesa z użyciem szczepu *Salmonella typhimurium* TA98. Wyniki badań pozwalają stwierdzić, że powstawanie koniugatów ITC-MeIQx podczas reakcji addycji izotiocyanianów i MeIQx wiąże się z około 50-krotnym obniżeniem mutagenności heterocyklicznej aminy aromatycznej. Przy tym spożywanie wraz z poddanym obróbce termicznej mięsem niedocenianego przez konsumentów warzywa, jakim jest kapusta, może stanowić lepszą ochronę przed mutagennym działaniem związków z grupy HAA niż spożywanie popularnych brokułów. Potwierdzeniem tego spostrzeżenia jest 2-krotnie mniejsza liczba rewertantów indukowanych przez tiomocznik AITC-MeIQx w stosunku do związku SFN-MeIQx.

Pomimo ogromnego znaczenia związków z grupy ITC, zarówno praktycznego jak i zdrowotnego nadal są problemy z ich oznaczaniem w materiałach o złożonym składzie chemicznym. Związane jest to z ich lotnością i brakiem stabilności chemicznej. Wykorzystanie w ramach tej pracy podejścia polegającego na przeprowadzeniu niestabilnych izotiocyanianów w *N*-acetylocysteinowe pochodne poprzez derywatyzację za pomocą *N*-acetylo-L-cysteiny i oznaczania ditiokarbaminianów ITC-NAC w próbkach materiału roślinnego przy użyciu techniki HPLC wydaje się być obiecującym podejściem i po dopracowaniu warunków procesu derywatyzacji pozwoli nie tylko na oznaczenie ilościowe tych związków, ale umożliwi również ich identyfikację.

Wyniki badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej mogą się okazać użyteczne dla różnych grup odbiorców. Na ich podstawie technolodzy żywności będą mieli możliwość opracowania technologii ograniczających powstawanie rakotwórczych heterocyklicznych amin aromatycznych w trakcie przetwarzania mięsa i wykorzystujących izotiocyaniany jako dodatki do żywności zagrożonej związkami z grupy HAA. Czysto biologiczne rozumienie roli izotiocyanianów nie daje producentom żywności żadnych możliwości kontrolowania procesu technologicznego. Możliwa będzie także weryfikacja założeń dotyczących właściwości fitokompleksu

warzyw kapustowatych odnośnie wiązania mutagenów powstających podczas obróbki mięsa w produktach mięsnych z dodatkiem tych roślin. Wiedza ta jest niezbędna dla zamieszczenia oświadczeń zdrowotnych na etykietach już produkowanych wyrobów oraz tych, których produkcja może być podjęta w przyszłości.

Przede wszystkim wyniki badań pozwolą konsumentowi na bardziej właściwy dobór dostarczanych do organizmu produktów żywnościowych, bez konieczności ograniczenia spożywania poddanych obróbce termicznej produktów mięsnych. Udowodnienie występowania zjawiska „chemicznej detoksykacji” rakotwórczych heterocyklicznych amin aromatycznych przez izotiocyjaniany użyte do syntezy koniugatów HAA-ITC ma ważne implikacje żywieniowe, wskazuje bowiem, że kojarzenie dań mięsnych z warzywami kapustowatymi może chronić organizm ludzki przed kancerogennymi związkami powstającymi w trakcie popularnego smażenia czy też grilowania mięsa.

Z kolei pełne dopracowanie metodyki chromatograficznego oznaczania związków z grupy ITC po derywatywacji za pomocą NAC powinno umożliwić oznaczenie zawartości i identyfikację izotiocyjanianów zarówno w próbkach warzyw kapustowatych, jak i produktach żywnościowych zawierających ich dodatek. Otworzy to nowe możliwości projektowania żywności o podwyższonych walorach zdrowotnych. Nowe narzędzie analityczne może być również pomocne przy projektowaniu produkcji żywności funkcjonalnej, której wytwarzanie jest zgodne z obecnym trendem światowym. Byłoby ono także niezbędne w przypadku podejmowania produkcji preparatów do biofumigacji w biologicznej ochronie roślin czy też preparatów do ochrony mikrobiologicznej żywności.

V. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wyniki licznych badań epidemiologicznych wskazują na pozytywny wpływ diety bogatej w warzywa na zdrowie człowieka. Szczególne znaczenie roślin z rodziny kapustowatych, a wśród nich najważniejszej dietetycznie kapusty, wiąże się z obecnością w tych warzywach biologicznie aktywnych składników: glukozynolanów i produktów ich rozpadu – związków indolowych i izotiocyjanianów.

Na zainteresowanie zasługują izotiocyjaniany ze względu na ich zdolność do wiązania się z grupami tiolowymi (-SH) i aminowymi (-NH₂). Grupy -NH₂ występują w wielu biologicznie aktywnych substancjach endogennych i egzogennych m.in. najważniejszych kancerogenach obecnych w poddanej obróbce termicznej żywności takich jak heterocykliczne aminy aromatyczne. W tym przypadku reakcja z izotiocyjanianami mogłaby obniżyć zagrożenie nowotworowe wynikające z ich spożywania.

Brakuje na ten temat doniesień literaturowych, ale wydaje się, że izotiocyjaniany powinny wchodzić w reakcję z heterocyklicznymi aminami aromatycznymi. W wyniku blokowania grupy aminowej niemożliwa staje się aktywacja tych kancerogenów do elektrofilowych metabolitów, które mogą uszkadzać DNA. Z tą myślą podjęto prace mające na celu sprawdzenie roli izotiocyjanianów w procesach inaktywacji kancerogenów obecnych w żywności takich jak heterocykliczne aminy aromatyczne. Substancje wzorcowe koniugatów izotyocyjanianów z heterocykliczną aminą aromatyczną - 2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksaliną (MeIQ_x) uzyskane na drodze syntezy chemicznej wykazują niższą aktywność mutagenną wobec szczepu *Salmonella thypimurium* TA 98 niż odpowiadające im heterocykliczne aminy aromatyczne. Wzorce te mogą posłużyć do identyfikacji takich koniugatów w próbkach żywności. Wyniki uzyskane w trakcie badań stanowią podstawę do obiektywnej oceny właściwości chemoprewencyjnych roślin kapustowatych i wpływu ich spożywania na narażenie na niekorzystne działanie takich związków rakotwórczych jak heterocykliczne aminy aromatyczne.

VI. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Several epidemiological studies have shown that high intake of vegetables has beneficial influence on human health. The special role of cruciferous vegetables and cabbage in particular – due to its popularity in diets – is associated with the presence of biologically active compounds, such as glucosinolates and the products of their decomposition – indoles and isothiocyanates.

Isothiocyanates deserve special attention due to their ability to bind with thiol (-SH) and amine (-NH₂) groups. Amine groups are present in many biologically active endogenous and exogenous substances, including the most important carcinogens present in heat treated foods – heterocyclic aromatic amines. Consequently, a reaction with isothiocyanates could reduce the cancer risk from the consumption of these substances.

There are no available published reports but it would seem that the isothiocyanates could react with the foodborne heterocyclic aromatic amines. After the amine groups are bound by isothiocyanates their activation to electrophilic metabolites – which can damage DNA - is no longer possible. This thesis was the basis of research aimed at verifying the role of isothiocyanates in the inactivation processes of carcinogens present in foods, such as heterocyclic aromatic amines. Standards of heterocyclic aromatic amine and isothiocyanate conjugates obtained through chemical synthesis are showing a lower mutagenic activity than respective heterocyclic aromatic amines in the Ames test. These standards can be used for the identification of such conjugates in food samples. The results obtained during the course of the research are a basis for an objective evaluation of both the chemopreventive properties of cruciferous vegetables and of the impact of the consumption of these plant foods on the risk of adverse effects of carcinogenic compounds from heterocyclic aromatic amines group.

VI. LITERATURA

- [1] Janoszka B.: Heterocyclic amines and azaarenes in pan-fried meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic. *Food Chem.* **120**, 463–473, 2010.
- [2] Alaejos M.S., Pino V., Afonso A.M.: Metabolism and toxicology of heterocyclic aromatic amines when consumed in diet: Influence of the genetic susceptibility to develop human cancer. A review. *Food Res. Int.* **41**, 327-340, 2008.
- [3] Smith J.S., Ameri F., Gadgil P.: Effect of marinades on the formation of heterocyclic amines in grilled beef steaks. *J. Food Sci.* **73**, 100-105, 2008.
- [4] Liao G.Z., Wang G.Y., Xu X.L., Zhou G.H.: Effect of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and duck breast. *Meat Sci.* **85**, 149–154, 2010.
- [5] Walters D.G., Young P.J., Agus C., Knize M.G., Boobis A.R., Gooderham N.J., Lake B.G.: Cruciferous vegetables consumption alters the metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in humans. *Carcinogenesis* **25**, 1659-1669, 2004.
- [6] Sugimura T., Wakabayashi K., Nakagama. H. and Nagao M.: Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.* **95**, 290-299, 2004.
- [7] Sugimura T., Nagao M., Kawachi T., Honda M., Yahagi T., Seino Y., Sato S., Matsukura N., Matsushima T., Shirai A., Sawamura M., Matsumoto H.: Mutagen-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. In: *Origins of Human Cancer* (Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA, eds), Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1977, 1561-1577.
- [8] Scott K.A., Turesky R.J., Wainman B.C., Josephy P.D.: HPLC/electrospray ionization mass spectrometric analysis of the heterocyclic aromatic amine carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in human milk. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 88-94, 2007.
- [9] International Agency for Research on Cancer, IARC: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 56, 1993.
- [10] De Andrés F., Zougagh M., Castañeda G., Ríos A.: Determination of heterocyclic amines in urine samples by capillary liquid chromatography with evaporated light-scattering detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 223-31, 2010.

- [11] Skog K.I., Johansson M.A., Jagerstad M.I.: Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 879–896, 1998.
- [12] Ahn J., Grün I.U.: Heterocyclic amines: 1. Kinetics of formation of polar and nonpolar heterocyclic amines as a function of time and temperature. *J. Food Sci.* **70**, 173–179, 2005.
- [13] Kondjoyan A., Chevolleau S., Grève E., Gatellier P., Santé-Lhoutellier V., Bruel S., Touzet C., Portanguen S., Debrauwer L.: Formation of heterocyclic amines in slices of *Longissimus thoracis* beef muscle subjected to jets of superheated steam. *Food Chem.* **119**, 19–26, 2010.
- [14] Felton J.S., Knize M.G., Wu R.W., Colvin M.E., Hatch F.T., Malfatti: Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines. *Mutat. Res.* **616**, 90-94, 2007.
- [15] Ferguson L.R.: Meat and cancer. *Meat Sci.* **84**, 308–313, 2010.
- [16] Lee H., Tsai S.-J.: Detection of IQ-type mutagens in canned roasted eel. *Food Chem. Toxicol.* **29**, 517–522, 1991.
- [17] Borgen E., Solyakov A., Skog K.: Effects of precursor composition and water on the formation of heterocyclic amines in meat model systems. *Food Chem.* **74**, 11–19, 2001.
- [18] Holland R.D., Taylor J., Schoenbachler L., Jones R.C., Freeman J.P., Miller T.W., Lake B.G., Gooderham N.J., Turesky R.J.: Rapid biomonitoring of heterocyclic aromatic amines in human urine by tandem solvent solid phase extraction liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1121-36, 2004.
- [19] Turesky R.J., Goodenough A.K., Ni W.J., McNaughton L., LeMaster D.M., Holland R.D., Wu R.W., Felton J.S.: Identification of 2-amino-1,7-dimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline: an abundant mutagenic heterocyclic aromatic amine formed in cooked beef. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 520-530, 2007.
- [20] Turesky R.J., Taylor J., Schnackenberg L., Freeman J.P., Holland R.D.: Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3248-3258, 2005.
- [21] Skog K., Solyakov A.: Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1213-1221, 2002.
- [22] Busquets R., Puignou L., Galceran T.: Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. *J. Chromatogr. B* **802**, 79-86, 2004.

- [23] Costa M., Viegas O., Melo A., Petisca C., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O.: Heterocyclic aromatic amine formation in barbecued sardines (*Sardina pilchardus*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3173–3179, 2009.
- [24] Olsson J.C., Dyremark A., Karlberg B.: Determination of heterocyclic aromatic amines by micelar electrokinetic chromatography with amperometric detection, *J. Chromatogr. A* **765**, 329-335, 1997.
- [25] Janoszka B.: Heterocyclic aromatic amines (HAA) in food: Content of aminoazaarenes in protein-rich food and estimated human exposure to those compounds. *Bromat. Chem. Toxycol.* **39**, 345–352, 2006.
- [26] Vainiotalo S., Matveinen K., Reunanen A.: A GC/MS determination of the mutagenic heterocyclic amines MeIQx and DiMeIQx in cooking fumes. *Fresenius J. Anal. Chem.* **345**, 462-466, 1993.
- [27] Thiébaud H.P., Knize M.G., Kuzmicky P.A., Felton J.S., Hsieh D.P.: Mutagenicity and chemical-analysis of fumes from cooking meat. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1502-1510, 1994.
- [28] Thiébaud H.P., Knize M.G., Kuzmicky P.A., Hsieh D.P., Felton J.S.: Airborne mutagens produced by frying beef, pork and a soy-based food. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 821-828, 1995.
- [29] Helsby N.A., Zhu S., Pearson A.E., Tingle M.D., Ferguson L.R.: Antimutagenic effects of wheat bran diet through modification of xenobiotic metabolising enzymes. *Mutat. Res.* **454**, 77–88, 2000.
- [30] Casal S., Mendes E., Fernandes J.O., Oliveira M.B.P.P., Ferreira M.A.: Analysis of heterocyclic aromatic amines in foods by gas chromatography–mass spectrometry as their tert-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr. A* **1040**, 105-114, 2004.
- [31] Richling E., Decker C., Haring D., Herderich M., Schraier P.: Analysis of heterocyclic aromatic amines in wine by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **791**, 71-77, 1997.
- [32] Sasaki T.A., Wilkins J.M., Forehand J.B., Moldoveanu S.C.: Analysis of heterocyclic amines in mainstream cigarette smoke using a new nci gc-ms technique. *Anal. Lett.* **34**, 1749-1761, 2001.
- [33] Smith C.J., Qian X.L., Zha Q.M., Moldoveanu S.C.: Analysis of alpha- and beta-carbolines in mainstream smoke of reference cigarettes by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1046**, 211-216, 2004.
- [34] Manabe S., Kurihara N., Wada O., Izumikawa S., Asakuno K., Morita M.: Detection of a carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine, in airborne particles and diesel-exhaust particles. *Environ. Pollut.* **80**, 281-286, 1993.

- [35] Ohe T.: Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2 and PhIP, contributing highly to genotoxicity of river water. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* **393**, 73-79, 1997.
- [36] Wu J., Wong M.K., Lee H.K., Ong C.N.: Capillary zone electrophoretic determination of heterocyclic aromatic amines in rain. *J. Chromatogr. Sci.* **33**, 712-716, 1995.
- [37] Manabe S., Wada O., Morita M., Izumikawa S., Asakuno K., Suzuki H.: Occurrence of carcinogenic amino-alpha-carbolines in some environmental samples. *Environ. Pollut.* **75**, 301-305, 1992.
- [38] Prabhu S., Lee M.J., Hu W.Y., Winnik B., Yang I., Buckley B., Hong J.Y.: Determination of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and its metabolite 2-hydroxyamino-PhIP by liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal. BioChem.* **298**, 306-313, 2001.
- [39] Hegstad S., Lundanes E., Reistad R., Haug L.S., Becher G., Alexander J.: Determination of the food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in human hair by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* **52**, 499-504, 2000.
- [40] Bessette E.E., Yasa I., Dunbar D., Wilkens L.R., Le Marchand L., Turesky R.J.: Biomonitoring of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in hair: A validation study. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1454-1463, 2009.
- [41] Strickland P.T., Qian Z., Friesen M.D., Rothman N., Sinha R.: Measurement of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP) in acid-hydrolyzed urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomarkers* **6**, 313-325, 2001.
- [42] Sentellas S., Moyano E., Puignou L., Galcerán M.T.: Optimization of a clean-up procedure for the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1032**, 193-201, 2004.
- [43] Viberg P., Wahlund K.G., Skog K.: On-line capillary based quantitative analysis of heterocyclic amine in human urine. *J. Chromatogr. A* **1133**, 347-352, 2006.
- [44] Shah F.U., Barri T., Jönsson J.A., Skog K.: Determination of heterocyclic aromatic amines in human urine by using hollowfibre supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-ultraviolet detection system. *J. Chromatogr. B* **870**, 203-208, 2008.
- [45] DeBruin L.S., Martos P.A., Joseph P.D.: Detection of PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine) in the milk of healthy women. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1523-1528, 2001.
- [46] Turesky R.J.: Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol. Lett.* **168**, 219-227, 2007.

- [47] Kikugawa K.: Prevention of mutagen formation in heated meats and model systems. *Mutagenesis* **19**, 431–439, 2004.
- [48] Ni W., McNaughton L., LeMaster D.M., Sinha R., Turesky R.J.: Quantitation of 13 heterocyclic aromatic amines in cooked beef, pork, and chicken by liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 68–78, 2008.
- [49] Arvidsson P., van Boekel M.A.J., Skog K., Jägerstad M.: Kinetics of formation of polar heterocyclic amines in a meat model system. *J. Food Sci.* **62**, 911–916, 1997.
- [50] Skog K., Knize M.G., Felton J.S., Jägerstad M.: Formation of new heterocyclic amine mutagens by heating creatinine, alanine, threonine and glucose. *Mutat. Res.* **268**, 191–197, 1992.
- [51] Oz F., Kaban G., Kaya M.: Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species trout. *Food Chem.* **104**, 67–72, 2007.
- [52] Janoszka B., Błaszczuk U., Damasiewicz-Bodzek A., Sajewicz M.: Analysis of heterocyclic amines (HAs) in pan-fried pork meat and its gravy by liquid chromatography with diode array detection. *Food Chem.* **113**, 1188–1196, 2009.
- [53] Jautz U., Gibis M., Morlock G.E.: Quantification of heterocyclic aromatic amines in fried meat by HPTLC/UV-FID and HPLC/UV-FLD: a comparison of two methods. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 4311–4319, 2008.
- [54] Melo A., Viegas O., Eca R., Petisca C., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O.: Extraction, detection, and quantification of heterocyclic aromatic amines in Portuguese meat dishes by HPLC/diode array. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **31**, 772–787, 2008.
- [55] Polak T., Dosler D., Zlender B., Gasperlin L.: Heterocyclic amines in aged and thermally treated pork longissimus dorsi muscle of normal and PSE quality. *LWT Food Sci, Technol.* **42**, 504–513, 2009.
- [56] Błaszczuk U., Janoszka B.: Analysis of azaarenes in pan fried meat and its gravy by liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chem.* **109**, 235–242, 2008.
- [57] Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S., Zhao B., Seow A.: Heterocyclic aromatic amines in domestically prepared chicken and fish from Singapore Chinese households. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 484–492, 2006.
- [58] Janoszka B.: Heterocykliczne aminy aromatyczne w żywności: Wpływ antyoksydantów i dodatków pochodzenia roślinnego na stężenie aminoazaarenów w żywności wysokobiałkowej. *Bromat. Chem. Toxicol.* **39**, 353–360, 2006.

- [59] Jackson L.S., Hargraves W.A.: Effects of time and temperature on the formation of MeIQx and DiMeIQx in a model system containing threonine, glucose, and creatine. *J. Agric. Food. Chem.* **43**, 1678–1684, 1995.
- [60] Chiu C.P., Yang D.Y., Chen B.H.: Formation of heterocyclic amines in cooked chicken legs. *J. Food Prot.* **61**, 712–719, 1998.
- [61] Solyakov A., Skog K.: Screening for heterocyclic amines in chicken cooked in various ways, *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1207–1212, 2002.
- [62] Keating G.A., Layton D.W., Felton J.S.: Factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. *Mutat. Res.* **443**, 149–56, 1999.
- [63] Balogh Z., Gray J.I., Gomaa E.A., Booren A.M.: Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 394–401, 2000.
- [64] Chiu C.P., Chen B.H.: Stability of heterocyclic amines during heating. *Food Chem.* **68**, 267–272, 2000.
- [65] Liao G., Xu X., Zhou G.: Effects of cooked temperatures and addition of antioxidants on formation of heterocyclic aromatic amines in pork floss. *J. Food Process. Preserv.* **33**, 159–175, 2009.
- [66] Sinha R., Rothman N., Salmon C.P., Knize M.G., Brown E.D., Swanson C.D., Rhodes D., Rossi S., Felton J.S., Levander O.A.: Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods and to varying degrees of doneness and gravy made from meat drippings. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 279–287, 1998.
- [67] Sinha R., Knize M.G., Salmon C.P., Brown E.D., Rhodes D., Felton J.S., Levander O.A., Rothman N.: Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 289–297, 1998.
- [68] Warzecha L., Janoszka B., Blaszczyk U., Stróżyk M., Bodzek D., Dobosz C.: Determination of heterocyclic aromatic amines (HAs) content in samples of household-prepared meat dishes. *J. Chromatogr. B* **802**, 95–106, 2004.
- [69] Abdulkarim B.G., Smith J.S.: Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4680–4687, 1998.
- [70] Gašperlin L., Lukan B., Žlender B., Polak T.: Effects of skin and grilling method on formation of heterocyclic amines in chicken pectoralis superficialis muscle, *LWT Food Sci. Technol.* **42**, 1313–1319, 2009.
- [71] Knize M, G., Sinha R., Salmon C.P., Mehta S.S., Dewhirst K.P., Felton J.S.: Formation of heterocyclic amine mutagens/carcinogens during home and commercial cooking of muscle foods. *J. Muscle Foods* **7**, 271–279, 1996.
- [72] Felton J.S., Salmon C.P., Knize M.G.: Carcinogens formed when meat is cooked. proceedings of the 56th American Meat Sci. Association Reciprocal Meat Conference (77-81) June 15-18, 2003. Columbia, Missouri.

- [73] Salmon C.S., Knize M.G., Panteleakos F.N., Wu R., Nelson D.O., Felton J.S.: Minimization of heterocyclic amines and thermal inactivation of *Escherichia coli* in fried ground beef. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1773-1778, 2000.
- [74] Felton J.S., Fultz E., Dolbeare F.A., Knize M.G.: Reduction of heterocyclic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties by microwave pretreatment. *Food Chem. Toxicol.* **32**, 897-903, 1994.
- [75] King R.S., Kadlubar F.F., Turesky R.J.: *In vivo* metabolism of heterocyclic amines. In: Nagao, M., Sugimura, T. (Eds.), *Food Borne Carcinogens: Heterocyclic Amines*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England, 90-111, 2000.
- [76] Zhao K., Murray S., Davies D.S., Boobis A.R., Gooderham N.J.: Metabolism of the food derived mutagen and carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) by human liver microsomes. *Carcinogenesis* **15**, 1285-1288, 1994.
- [77] Chen C., Ma X., Malfatti M.A., Krausz K.W., Kimura S., Felton J.S., Idle J.R., Gonzalez F.J.: A comprehensive investigation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) metabolism in the mouse using a multivariate data analysis approach. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 531-542, 2007.
- [78] Hammons G.J., Milton D., Stepps K., Guengerich F.P., Kadlubar F.F.: Metabolism of carcinogenic heterocyclic and aromatic amines by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Carcinogenesis* **18**, 851-854, 1997.
- [79] Turesky R.J., Constable A., Richoz J., Varga N., Markovic J., Martin M.V., Guengerich F.P.: Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 925-936, 1998.
- [80] Crofts F.G., Sutter T.R., Strickland P.T.: Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis* **19**, 1969-1973, 1998.
- [81] Langouët, S., Welti, D. H., Kerriguy, N., Fay, L. B., Huynh-Ba, T., Markovic, J., Guengerich, F. P., Guillouzo, A., Turesky, R. J.: Metabolism of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline in human hepatocytes: 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline-8-carboxylic acid is a major detoxification pathway catalyzed by cytochrome P450 1A2. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 211-221, 2001.
- [82] Kulp K.S., Knize M.G., Fowler N.D., Salmon C.P., Felton J.S.: PhIP metabolites in human urine after consumption of wellcooked chicken. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **802**, 143-153, 2004.
- [83] Girard H., Thibaudeau J., Court M.H., Fortier L.C., Villeneuve L., Caron P., Hao Q., von Moltke L.L., Greenblatt D.J., Guillemette C.: UGT1A1 polymorphisms are important determinants of dietary carcinogen detoxification in the liver. *Hepatology* **42**, 448-457, 2005.

- [84] Frandsen H.: Biomonitoring of urinary metabolites of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) following human consumption of cooked chicken. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 3200–3205, 2008.
- [85] Vanhaecke L., Derycke L., Le Curieux F., Lust S., Marzin D., Verstraete W., Bracke M.: The microbial PhIP metabolite 7-hydroxy-5-methyl-3-phenyl-6,7,8,9-tetrahydropyrido[3',2':4,5]imidazo[1,2- α]pyrimidin-5-ium chloride (PhIP-M1) induces DNA damage, apoptosis and cell cycle arrest towards Caco-2 cells. *Toxicol. Lett.* **178**, 61-69, 2008.
- [86] Fede J-M., Thakur A.P., Gooderham N.J., Turesky R.J.: Biomonitoring of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*B*]pyridine (PhIP) and its carcinogenic metabolites in urine. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1096–1105, 2009.
- [87] Turesky R.J., Guengerich F.P., Guillouzo A., Langouet S.: Metabolism of heterocyclic aromatic amines by human hepatocytes and cytochrome P4501A2. *Mutat. Res.* **506–507**, 187–195, 2002.
- [88] Gu D., McNaughton L., LeMaster D., Lake B.G., Gooderham N.J., Kadlubar F.F., Turesky R.J.: A comprehensive approach to the profiling of the cooked meat carcinogens 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, and their metabolites in human urine. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 788-801, 2010.
- [89] Glatt H.: Metabolic factors affecting the mutagenicity of heterocyclic amines. In acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods (Skog, K., and Alexander J., Eds.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, 358-404, 2006.
- [90] Minchin R.F., Reeves P.T., Teitel C.H., McManus M.E., Mojarrabi B., Ilett K.F., Kadlubar F.F.: N- and O-acetylation of aromatic and heterocyclic amine carcinogens by human monomorphic and polymorphic acetyltransferases expressed in COS-1 cells, *BioChem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 839–844, 1992.
- [91] Glatt H., Pabel U., Meinel W., Frederiksen H., Frandsen H., Muckel E.: Bioactivation of the heterocyclic aromatic amine 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-*b*]indole (MeA α C) in recombinant test systems expressing human xenobioticmetabolizing enzymes. *Carcinogenesis* **25**, 801–807, 2004.
- [92] Schut H.A., Snyderwine E.G.: DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **20**, 353–368, 1999.
- [93] Frandsen H., Alexander J.: N-Acetyltransferase-dependent activation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine: formation of 2-amino-1-methyl-6-(5-hydroxy)phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine, a possible biomarker for the reactive dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Carcinogenesis* **21**, 1197–1203, 2000.
- [94] Frandsen H., Frederiksen H., Alexander J.: 2-Amino-1-methyl-6-(5-hydroxy)-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (5-OH-PhIP), a biomarker for the genotoxic dose

of the heterocyclic amine, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1125–1130, 2002.

[95] Borosky G.L.: Ultimate carcinogenic metabolites from aromatic and heterocyclic aromatic amines: A computational study in relation to their mutagenic potency. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 171-180, 2007.

[96] Lin D.-X., Meyer D.J., Ketterer B., Lang N.P., Kadlubar F.F.: Effects of human and rat glutathione-S-transferase on the covalent binding of the *N*-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens *in vitro*: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis. *Cancer Res.* **54**, 4920–4926, 1994.

[97] Malfatti M.A., Ubick E.A., Felton J.S.: The impact of glucuronidation on the bioactivation and DNA adduction of the cooked-food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine *in vivo*. *Carcinogenesis* **26**, 2019–2028, 2005.

[98] Malfatti M.A., Felton J.S.: Human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 is the primary enzyme responsible for the *N*-glucuronidation of *N*-hydroxy-PhIP *in vitro*. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1137–1144, 2004.

[99] Malfatti M.A., Dingley K.H., Nowell-Kadlubar S., Ubick E.A., Mulakken N., Nelson D., Lang N.P., Felton J.S., Turteltaub K.W.: The urinary metabolite profile of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine is predictive of colon DNA adducts after a low-dose exposure in humans. *Cancer Res.* **66**, 10541–10547, 2006.

[100] Dellinger R.W., Chen G., Blevins-Primeau A.S., Krzeminski J., Amin S., Lazarus P.: Glucuronidation of PhIP and N-OHPhIP by UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *Carcinogenesis* **28**, 2412–2418, 2007.

[101] Bellocq D., Molina J., Rathahao E., Canlet C., Taché S., Martin P.G.P., Pierre F., Paris A.: High potency of bioactivation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in mouse colon epithelial cells with *Apc*^{Min} mutation. *Mutat. Res.* **653**, 34–43, 2008.

[102] Stillwell W.G., Turesky R.J., Sinha R., Tannenbaum S.R.: N-oxidative metabolism of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in humans: Excretion of the N-2-glucuronide conjugate of 2-hydroxyamino-MeIQx in urine. *Cancer Res.* **59**, 5154–5159, 1999.

[103] Lynch A.M., Knize M.G., Boobis A.R., Gooderham N.J., Davies D.S., Murray S.: Intra- and interindividual variability in systemic exposure in humans to 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, carcinogens present in cooked beef. *Cancer Res.* **52**, 6216–23, 1992.

[104] Hein D.W.: Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat. Res.* **506-507**, 65–77, 2002.

[105] Vanhaecke L., Van Hoof N., Van Brabandt W., Soenen B., Heyerick A., De Kimpe N., De Keukeleire D., Verstraete W., Van de Wiele T.: Metabolism

of the food-associated carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by human intestinal microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **54**,3454–3461, 2006.

[106] Vanhaecke L., Vercruyssen F., Boon N., Verstraete W., Cleenwerck I., De Wachter M., De Vos P., Van de Wiele T.: Isolation and characterisation of human intestinal bacteria, capable of transforming the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Appl. Environ. Microbiol.* **74**,1469–1477, 2008.

[107] Vanhaecke L., Knize M.G., Noppe H., De Brabander H., Verstraete W., Van de Wiele T.: Intestinal bacteria metabolize the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine following consumption of a single cooked chicken meal in humans. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 140–148, 2008.

[108] Felton J.S., Knize M.G.: A meat and potato war: Implications for cancer etiology. *Carcinogenesis* **27**, 2367–2370, 2006.

[109] Moonen H.J.J., Moonen E.J.C., Maas L., Dallinga J.W., Kleinjans J.C.S., de Kok T.M. C.M.: CYP1A2 and NAT2 genotype/phenotype relations and urinary excretion of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in a human dietary intervention study. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 869–878, 2004.

[110] Le Marchand L., Hankin J.H., Pierce L.M., Sinha R., Nerurkar P.V., Franke A.A., Wilkens L.R., Kolonel L.N., Donlon T., Seifried A., Custer L.J., Lum-Jones A., Chang W.: Well-done red meat, metabolic phenotypes and colorectal cancer in Hawaii. *Mutat. Res.* **506-507**, 205–214, 2002.

[111] Turesky R.J., Parisod V., Huynh-Ba T., Langouet S., Guengerich F.P.: 2001. Regioselective differences in C⁸- and N-oxidation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline by human and rat liver microsomes and cytochromes P450 1A2. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 901–911, 2001.

[112] Dumont J., Jossé R., Lambert C., Anthérieu S., Le Hegarat L., Aninata C., Robin M.-A., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A.: Differential toxicity of heterocyclic aromatic amines and their mixture in metabolically competent HepaRG cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **245**, 256-63, 2010.

[113] Broyde S., Wang L., Zhang L., Rechkoblit O., Geacintov N.E., Patel D.J.: DNA adduct structure-function relationships: comparing solution with polymerase structures. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 45-52, 2008.

[114] Stachelska A.: Obecność mutagenów i kancerogenów w żywności oraz ich wpływ na organizm człowieka. *Żywność, Nauka, Jakość* **1**, 21-29, 2006.

[115] Turesky R.J., Vouros P.: Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **802**, 155–166, 2004.

[116] Jamin E.L., Canlet D.A.C., Rathahao E., Tulliez J., Debrauwer L.: New insights in the formation of deoxynucleoside adducts with the heterocyclic aromatic amines

PhIP and IQ by means of Ion Trap MSn and accurate mass measurement of fragment ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 2107–2118, 2007.

[117] Kakiuchi H., Watanabe M., Ushijima T., Toyota M., Imai K., Weisburger J.H., Sugimura T., Nagao M.: Specific 5'-GGGA-3' → 5'-GGA-3' mutation of the *Apc* gene in rat colon tumors induced by 2-amino-3-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**, 910–914, 1995.

[118] Goodenough A.K., Schut H.A.J., Turesky R.J.: Novel LC/MS/MSn method for the characterization and quantification of 2'-deoxyguanosine adducts of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by 2-D linear quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 263–276, 2007.

[119] Gates K.S., Nooner T., Dutta S.: Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 839–856, 2004.

[120] Magagnotti C., Pastorelli R., Pozzi S., Andreoni B., Fanelli R., Airoidi L.: Genetic polymorphisms and modulation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-DNA adducts in human lymphocytes. *Int. J. Cancer* **107**, 878–884, 2003.

[121] Gorlewska-Roberts K., Green B., Fares M., Ambrosone C.B., Kadlubar F.F.: Carcinogen-DNA adducts in human breast epithelial cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **39**, 184–192, 2002.

[122] Fukutome K., Ochiai M., Wakabayashi K., Watanabe S., Sugimura T., Nagao M.: Detection of guanine-C8-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine adduct as a single spot on thin-layer chromatography by modification of the ³²P-postlabeling method. *Jpn. J. Canc. Res.* **85**, 113–117, 1994.

[123] Zhu J., Chang P., Bondy M.L., Sahin A.A., Singletary S.E., Takahashi S., Shirai T., Li D.: Detection of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine-DNA adducts in normal breast tissues and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **12**, 830–837, 2003.

[124] Tang D, Liu J.J., Bock C.H., Neslund-Dudas C., Rundle A., Savera A.T., Yang J.J., Nock N.L., Rybicki B.A.: Racial differences in clinical and pathological associations with PhIP-DNA adducts in prostate. *Int. J. Cancer* **121**, 1319–24, 2007.

[125] Tang D., Liu J.J., Rundle A., Neslund-Dudas C., Savera A.T., Bock C.H., Nock N.L., Yang J.J., Rybicki B.A.: Grilled meat consumption and PhIP-DNA adducts in prostate carcinogenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **16**, 803–8, 2007.

[126] Friesen M.D., Kaderlik K., Lin D., Garren L., Bartsch H., Lang N.P., Kadlubar F.F.: Analysis of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rat and human tissues by alkaline hydrolysis and gas chromatography/electron capture mass spectrometry: validation by comparison with ³²Ppostlabeling. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 733–739, 1994.

- [127] Totsuka Y., Fukutome K., Takahashi M., Takashi S., Tada A., Sugimura T., Wakabayashi K.: Presence of *N*2-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (dG-C8-MeIQx) in human tissues. *Carcinogenesis* **17**, 1029–1034, 1996.
- [128] Brown K., Hingerty B.E., Guenther E.A., Krishnan V.V., Broyde S., Turteltaub K.W., Cosman M.: Solution structure of the 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine C8-deoxyguanosine adduct in duplex DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **98**, 8507–8512, 2001.
- [129] Wang F., DeMuro N.E., Elmquist C.E., Stover J.S., Rizzo C.J., Stone M.P.: Base-displaced intercalated structure of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in the recognition sequence of the *NarI* restriction enzyme, a hotspot for -2 bp deletions. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10085–10095, 2006.
- [130] Wang F., Elmquist C.E., Stover J.S., Rizzo C.J., Stone M.P.: DNA sequence modulates the conformation of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in the recognition sequence of the *nari* restriction enzyme. *Biochemistry* **46**, 8498–8516, 2007.
- [131] Elmquist C.E., Wang F., Stover J.S., Stone M.P., Rizzo C.J.: Conformational differences of the C8-deoxyguanosine adduct of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) within the *NarI* recognition sequence. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 445–454, 2007.
- [132] Bentzien J., Hickey E.R., Kemper R.A., Brewer M.L., Dyekjær J.D., East S.P., Whittake M.: (2010) An in silico method for predicting ames activities of primary aromatic amines by calculating the stabilities of nitrenium ions. *J. Chem. Inf. Model.* **50**, 274–297, 2010.
- [133] Gooderham N.J., Zhu H., Lauber S., Boyce A., Creton S.: Molecular and genetic toxicology of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Mutat. Res.* **506-507**, 91-99, 2002.
- [134] Turesky R.J., Constable A., Richoz J., Varga N., Markovic J., Martin M.V., Guengerich F.P.: Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 925–936, 1998.
- [135] Sugimura T., Nagao M., Wakabayashi K.: Metabolic aspects of the comutagenic action of Norharman. *Adv. Exp. Med. Biol.* **136B**, 1011–1025, 1982.
- [136] Sugimura T.: Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **376**, 211-219, 1997.
- [137] Fuscoe J.C., Wu R., Shen N.H., Healy S.K., Felton J.S.: Basechange analysis of revertants of the hisD3052 allele in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* **201**, 241–251, 1988.

- [138] Watanabe M., Sofuni T., Nohmi T.: Comparison of the sensitivity of *Salmonella typhimurium* strains YG1024 and YG1012 for detecting the mutagenicity of aromatic amines and nitroarenes. *Mutat. Res.* **301**, 7-64, 1993.
- [139] McCoy E.C., Anders M., Rosenkranz H.S.: The basis of the insensitivity of *Salmonella typhimurium* strain TA98/1,8-DNP6 to the mutagenic action of nitroarenes. *Mutat. Res.* **121**, 17-23, 1983.
- [140] Watanabe M., Ishidate M., Nohmi T.: Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: New derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat. Res.* **234**, 337-348, 1990.
- [141] Teubner W., Meinel W., Florian S., Kretzschmar M., Glatt H.: Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochem. J.* **404**, 207-215, 2007.
- [142] Muckel E., Frandsen H., Glatt H.R.: Heterologous expression of human N-acetyltransferases 1 and 2 and sulfotransferase 1A1 in *Salmonella typhimurium* for mutagenicity testing of heterocyclic amines. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1063-1068, 2002.
- [143] Oda Y., Aryal P., Terashita T., Gillam E.M.J., Guengerich F.P., Shimada T.: Metabolic activation of heterocyclic amines and other procarcinogens in *Salmonella typhimurium* umu tester strains expressing human cytochrome P4501A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2D6, 2E1, and 3A4 and human NADPH-P450 reductase and bacterial O-acetyltransferase. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **492**, 81-90, 2001.
- [144] Yamazaki Y., Fujita K.I., Nakayama K., Suzuki A., Nakamura K., Yamazaki H., Kamataki T.: Establishment of ten strains of genetically engineered *Salmonella typhimurium* TA1538 each co-expressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase sensitive to various promutagens. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **562**, 151-162, 2004.
- [145] Hatch F.T., Knize M.G., Colvin M.E.: Extended quantitative structure-activity relationships for 80 aromatic and heterocyclic amines: structural, electronic, and hydrophobic factors affecting mutagenic potency. *Environ. Mol. Mutagen.* **38**, 268-291, 2001.
- [146] Wu R.W., Tucker J.D., Sorensen K.J., Thompson L.H., Felton J.S.: Differential effect of acetyltransferase expression on the genotoxicity of heterocyclic amines in CHO cells. *Mutat. Res.* **390**, 93-103, 1997.
- [147] Dingley K.H., Freeman S.P.H.T., Nelson D.O., Garner R.C., Turteltaub K.W.: Covalent binding of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline to albumin and hemoglobin at environmentally-relevant doses: a comparison of humans and the F344 rat. *Drug Metab. Dispos.* **26**, 825-828, 1998.

- [148] Reistad R., Frandsen H., Grivas S., Alexander J.: *In vitro* formation and degradation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) protein adducts. *Carcinogenesis* **14**, 2547-2552, 1994.
- [149] Dingley K.H., Curtis K.D., Nowell S., Felton J.S., Lang N.P., Turteltaub K.W.: DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **8**, 507–512, 1999.
- [150] Skinner M.K., Manikkam M., Guerrero-Bosagna C.: Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 214-222, 2010.
- [151] Wogan G.N, Hecht S.S., Felton J.S., Conney A.H., Loeb L.A.: Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Canc. Biol.* **14**, 473–486, 2004.
- [152] English M.A., Stewart P.M., Hewison M.: Estrogen metabolism and malignancy: analysis of the expression and function of 17 α -hydroxysteroid dehydrogenases in colonic cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **171**, 53–60, 2001.
- [153] Bennion B.J., Cosman M., Lightstone F.C., Knize M.G., Montgomery J.L., Bennett L.M., Felton J.S., Kulp K.S.: PhIP carcinogenicity in breast cancer: computational and experimental evidence for competitive interactions with human estrogen receptor. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 1528–1536, 2005.
- [154] Lauber S.N., Ali S., Gooderham N.J.: The cooked food derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine is a potent oestrogen: a mechanistic basis for its tissue-specific carcinogenicity. *Carcinogenesis* **25**, 2509–2517, 2004.
- [155] Gooderham N.J., Creton S., Lauber S.N., Zhu H.: Mechanisms of action of the carcinogenic heterocyclic amine PhIP. *Toxicol. Lett.* **168**, 269–277, 2007.
- [156] Nakai Y., Nelson W.G., De Marzo A.M.: The dietary charred meat carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine acts as both a tumor initiator and promoter in the rat ventral prostate. *Cancer Res.* **67**, 1378–1384, 2007.
- [157] Kawamori T., Uchiya N., Watanabe K., Ohta T., Sugimura T., Wakabayashi K.: Effects of heterocyclic amines with mammary gland carcinogenic potential on estrogenic response of uterus in ovariectomized rats. *Cancer Lett.* **162**, 31–37, 2001.
- [158] Felton J.S., Knize M.G., Bennett L.M., Malfatti M.A., Colvin M.E., Kulp K.S.: Impact of environmental exposures on the mutagenicity/carcinogenicity of heterocyclic amines. *Toxicology* **198**, 135–145, 2004.
- [159] Creton S.K., Zhu H., Gooderham N.J.: The cooked meat carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine activates the extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res.* **67**, 11455–11462, 2007.

- [160] Martinez M.E., Jacobs E.T., Ashbeck E.L., Sinha R., Lance P., Alberts D.S., Thompson P.A.: Meat intake, preparation methods, mutagens and colorectal adenoma recurrence. *Carcinogenesis* **28**, 2019-2027, 2007.
- [161] Ito N., Hasegawa R., Imaida K., Tamano S., Hagiwara A., Hirose M., Shirai T.: Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in the rat. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **376**: 107-114, 1997.
- [162] Shirai T., Sano M., Tamano S., Takahashi S., Hirose M., Futakuchi M., Hasegawa R., Imaida K., Matsumoto K., Wakabayashi K., Sugimura T., Ito N.: The prostate: A target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) derived from cooked foods. *Cancer Res.* **57**, 195-198, 1997.
- [163] Norrish A.E., Ferguson L.R., Knize M.G., Felton J.S., Sharpe S.J., Jackson R.T.: Heterocyclic amine content of cooked meat and risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 2038-2044, 1999.
- [164] Knize M.G., Felton J.S.: Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat. *Nutr. Res. Rev.* **63**, 158-165, 2005.
- [165] Turesky R.J.: Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis. *Drug Metab. Rev.* **34**, 625-650, 2002.
- [166] Nagao M., Ushijima T., Toyota M., Inoue R., Sugimura T.: Genetic changes induced by heterocyclic amines. *Mutat. Res.* **376**, 161-167, 1997.
- [167] Nagao M., Sugimura T.: Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development. *Mutat. Res.* **290**, 43-51, 1993.
- [168] Dai Q., Shu X.O., Jin F., Gao Y.T., Ruan Z.X., Zheng W.: Consumption of animal foods, cooking methods, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11**, 801-808, 2002.
- [169] Cross A.J., Sinha R.: Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ. Mol. Mutagen.* **44**, 44-55, 2004.
- [170] Knize M.G., Dolbeare F.A., Cunningham P.L., Felton J.S.: Mutagenic activity and heterocyclic amine content of the human diet. *Princess Takamatsu Symp.* **23**, 30-38, 1995.
- [171] Burnouf D.Y., Miturski R., Nagao M., Nakagama H., Nothisen M., Wagner J., Fuchs R.P.P.: Early detection of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) induced mutations within the *apc* gene of rat colon. *Carcinogenesis* **22**, 329-335, 2001.
- [172] Kardasz M., Pawłowska D.: The role of dietary components and different substance in the development of cancer. *Nowa Medycyna* **2**, 7-14, 2008.
- [173] Hartman P.E., Shankel D.M.: Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ. Mol. Mutagen.* **15**, 145-182, 1990.

- [174] Wolinsky H.: Processed meat linked to higher ovarian cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **14**, 2010.
- [175] Dashwood R.H.: Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutat. Res.* **511**, 89–112, 2002.
- [176] Oguri A., Suda M., Totsuka Y., Sugimura T., Wakabayashi K.: Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines. *Mutat. Res.* **402**, 237–245, 1998.
- [177] Kikugawa K.: Involvement of free radicals in the formation of heterocyclic amines and prevention by antioxidants. *Cancer Lett.* **143**, 123–126, 1999.
- [178] Shin H.S., Strasburg G.M., Gray J.I.: A model system study of the inhibition of heterocyclic aromatic amine formation by organosulfur compounds. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7684–7690, 2002.
- [179] Vitaglione P., Fogliano V.: Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *J. Chromatogr. B* **802**, 189–199, 2004.
- [180] Kato T., Hiramoto K., Kikugawa K.: Mutagenicity of cooked hamburger is reduced by addition of ascorbate and erythorbate to ground beef. *JHS* **46**, 389–392, 2000.
- [181] Weisburger J.H., Veliath E., Larios E., Pittman B., Zang E., Hara Y.: Tea polyphenols inhibit the formation of mutagens during the cooking of meat. *Mutat. Res.* **516**, 19–22, 2002.
- [182] Quelhas I., Petisca C., Viegas O., Melo A., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O.: Effect of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef. *Food Chem.* **122**, 98–104, 2010.
- [183] Gibis M.: Effect of oil marinades with garlic, onion, and lemon juice on the formation of heterocyclic aromatic amines in fried beef patties. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10240–10247, 2007.
- [184] Johansson M.A.E., Jägerstad M.: Influence of pro- and antioxidants on the formation of mutagenic–carcinogenic heterocyclic amines in model system. *Food Chem.* **56**, 69–75, 1996.
- [185] Zöchling S., Murkovic M., Pfannhauser W.: Effects of industrially produced flavours with pro- and antioxidative properties on the heterocyclic amine PhIP in a model system. *J. BioChem. Bioph. Methods* **53**, 37–44, 2002.
- [186] Persson E., Graziani G., Ferracane R., Foligliano V., Skog K.: Influence of antioxidants in virgin olive oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 1587–1597, 2003.

- [187] Vitaglione P., Monti S.M., Ambrosino P., Skog K., Fogliano V.: Carotenoids from tomatoes inhibit heterocyclic amine formation. *Eur. Food Res. Technol.* **215**, 108–113, 2002.
- [188] Cheng K.W., Chen F., Wang M.: Inhibitory activities of dietary phenolic compounds on heterocyclic amine formation in both chemical model system and beef patties. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 969–976, 2007.
- [189] Murkovic M., Steinberger D., Pfannhauser W.: Antioxidant species reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Z Lebensm Unters Forsch A* **207**, 477–480, 1998.
- [190] Shin H.S.: Inhibition of heterocyclic aromatic amine formation in fried ground beef patties by garlic and selected garlic-related sulfur compounds. *J. Food Prot.* **65**, 1766–1770, 2002.
- [191] Monti S.M., Ritieni A., Sacchi R., Skog K., Borgen E., Fogliano V.: Characterization of phenolic compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic amines in a model system. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3969–3975, 2001.
- [192] Ahn J., Grun I.U.: Heterocyclic amines: 2, Inhibitory effects of natural extracts on the formation of polar and nonpolar heterocyclic amines in cooked beef. *J. Food Sci.* **70**, C263–C268, 2005.
- [193] Melo A., Viegas O., Petisca C., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O.: Effect of beer/red wine marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan fried beef. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10625–10632, 2008.
- [194] Busquets R., Puignou L., Galceran M.T., Skog K.: Effect of red wine marinades on the formation of heterocyclic amines in fried chicken breast. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8376–8384, 2006.
- [195] Trompeta V., O'Brien J.: Inhibition of mutagen formation by organosulfur compounds. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4318–4323, 1998.
- [196] Tsai S.J., Jenq S.N., Lee H.: Naturally occurring diallyl disulfide inhibits the formation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in boiled pork juice. *Mutagenesis* **11**, 235–240, 1996.
- [197] Waters M.D., Stack H.F., Jackson M.A., Brockman H.E., de Flora S.: Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. *Mutat. Res.* **350**, 109–129, 1996.
- [198] Dashwood R., Yamane S., Larsen R.: Study of the forces stabilizing complexes between chlorophylls and heterocyclic amine mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.* **27**, 211–218, 1996.
- [199] Dashwood R.H., Guo D.: Antimutagenic potency of chlorophyllin in the *Salmonella* assay and its correlation with binding constants of mutagen–inhibitor complexes. *Environ. Mol. Mutagen.* **22**, 164–171, 1993.

- [200] Dashwood R.H.: Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) to rat liver DNA. *Carcinogenesis* **13**, 113–118, 1992.
- [201] Dashwood R.H., Liew C.: Chlorophyllin-enhanced excretion of urinary and fecal mutagens in rats given 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline. *Environ. Mol. Mutagen.* **20**, 199–205, 1992.
- [202] Guo D., Dashwood R.H.: Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ)–DNA binding in rats given chlorophyllin: dose–response and time-course studies in the liver and colon. *Carcinogenesis* **15**, 763–766, 1994.
- [203] Vikse R., Bålsrud Mjelva B., Klungsoyr L.: Reversible binding of the cooked food mutagen MeIQx to ligninenriched preparations from wheat bran. *Food Chem. Toxicol.* **30**, 239–246, 1992.
- [204] Sjodin P., Nyman M., Nielsen L.L., Wallin H., Jägerstad M.: Effect of dietary fiber on the disposition and excretion of a food carcinogen (2-14C-labeled MeIQx) in rats. *Nutr. Cancer* **17**, 139–151, 1992.
- [205] Ryden P., Robertson J.A.: The effects of pH and bile salts on the binding of MeIQx to wheat bran fibre. *Mutat. Res.* **351**, 45–52, 1996.
- [206] Hirose M., Yamaguchi T., Lin C., Kimoto N., Futakuchi M., Kono T., Nishibe S., Shirai T.: Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Lett.* **155**, 79–88, 2000.
- [207] Thomson C.A., Newton T.R., Graver E.J., Jackson K.A., Reid P.M., Hartz V.L., Cussler E.C., Hakim I.A.: Cruciferous vegetables intake questionnaire improves cruciferous vegetables intake estimates. *J. Am. Diet. Assoc.* **107**, 631–643, 2007.
- [208] Borowska A., Klajn P., Mielżyńska D., Siwińska E., Bartoszek A.: Anti-mutagenic activity of white cabbage, raw and processed, juices towards food mutagens MeIQx and PhiP. 29th Meeting of the Federation of The European Biochemical Societies, Warszawa, 2004. P6.2-43, str. 234.
- [209] He Y.H., Smale M.H., Schut H.A.: Chemopreventive properties of indole-3-carbinol (I3C): inhibition of DNA adduct formation of the dietary carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), in female F344 rats. *J. Cell. BioChem.* **27**, 42–51, 1997.
- [210] Xu M., Schut H.A.J., Bjeldanes L.F., Williams D.E., Bailey G.S., Dashwood R.H.: Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline–DNA adducts by indole-3-carbinol: dose–response studies in the rat colon. *Carcinogenesis* **18**, 2149–2153, 1997.
- [211] Guo D., Schut H.A.J., Davis C.D., Snyderwine E.G., Bailey G.S., Dashwood R.H.: Protection by chlorophyllin and indole-3-carbinol against 2-amino-1-methyl-6-

phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcinogenesis* **16**, 2931–2937, 1995.

[212] Schut H.A., Dashwood R.H.: Inhibition of DNA adduct formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) by dietary indole-3-carbinol (I3C) in the mammary gland, colon, and liver of the female F344 rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **768**, 210–214, 1995.

[213] Stavric B., Matula T.I., Klassen R., Downie R.H.: The effect of teas on the in vitro mutagenic potential of heterocyclic aromatic amines. *Food Chem. Toxicol.* **34**, 515–523, 1996.

[214] Yun C.H., Jeong H.G., Jhoun J.W., Guengerich F.P.: Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis* **16**, 1437–1440, 1995.

[215] Muto S., Fujita K., Yamazaki Y., Kamataki T.: Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. *Mutat. Res.* **479**, 197–206, 1992.

[216] Hayatsu H., Inada N., Kakutani T., Arimoto S., Negishi T., Mori K., Okuda T., Sakata I.: Suppression of genotoxicity of carcinogens by (–)-epigallocatechin-gallate. *Prev. Med.* **21**, 370–376, 1992.

[217] Hernaez J., Xu M., Dashwood R.H.: Effects of tea and chlorophyllin on the mutagenicity of *N*-hydroxy-IQ: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation, and degradation/scavenging of the active metabolites. *Environ. Mol. Mutagen.* **30**, 468–474, 1997.

[218] Negishi T., Arimoto S., Nishizaki C., Hayatsu H.: Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis* **10**, 145–149, 1989.

[2191] Barcelo S., Mace K., Pfeifer A.M., Chipman J.K.: Production of DNA strand breaks by *N*-trosodimethylamine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in THLE cells expressing human CYP isoenzymes and inhibition by sulforaphane. *Mutat. Res.* **402**, 111–120, 1998.

[220] Yen G.C., Chau C.F.: Inhibition by xylose-lysine Maillard reaction products of the formation of MeIQx in a heated creatinine, glycine, and glucose model system. *Biosci. Biotechnol. BioChem.* **57**, 664–665, 1993.

[221] Apostolides Z., Balentine D.A., Harbowy M.E., Hara Y., Weisburger J.H.: Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters. *Mutat. Res.* **389**, 167–172, 1997.

[222] Huber W.W., McDaniel L.P., Kaderlik K.R., Teitel C.H., Lang N.P., Kadlubar F.F.: Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in the rat. *Mutat. Res.* **376**, 115–122, 1997.

- [223] Santana-Rios G., Orner G.A., Xu M., Izquierdo-Pulido M., Dashwood R.H.: Inhibition by white tea of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Nutr. Cancer* **41**, 98-103, 2001.
- [224] Rao C.V., Rivenson A., Zang E., Steele V., Kelloff G., Reddy B.S.: Inhibition of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine-induced lymphoma formation by oltipraz. *Cancer Res.* **56**, 3395–3398, 1996.
- [225] Stoner G.D., Morse M.A., Kelloff G.J.: Perspectives in cancer chemoprevention. *Environ. Health Perspect.* **105**, 945–954, 1997.
- [226] Sanyal R., Darroudi F., Parzefall W., Nagao M., Knasmuller S.: Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens. *Mutagenesis* **12**, 297–303, 1997.
- [227] Ito N., Hirose M., Futakuchi M., Tamano S., Shirai T.: Chemoprevention of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by exogenous agents: stage dependent paradoxical effects, in: A.H. Conney, N. Ito, T. Sugimura, M. Terada, K. Wakabayashi, I.B. Weinstein (Eds.). *Fundamentals of Cancer Prevention*, Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo, Japan, 48–51, 1997.
- [228] Takahashi M., Totsuka Y., Masuda M., Fukuda K., Oguri A., Yazawa K., Sugimura T., Wakabayashi K.: Reduction in formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced aberrant crypt foci in the rat colon by docosahexanoic acid (DHA). *Carcinogenesis* **18**, 1937-1941, 1997.
- [229] Alaejos M.S., Ayala J.H., Gonzalez V., Afonso A.M.: Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *J. Chromatogr. B* **862**, 15–42, 2008.
- [230] Barceló-Barrachina E., Moyano E., Puignou L., Galcerán M.T.: Evaluation of reversed-phase columns for the analysis of heterocyclic aromatic amines by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **802**, 45-59, 2004.
- [231] Berthod A., Cardá-Broch S.: Use of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate in countercurrent chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **380**, 168-170, 2004.
- [232] Anderson J.L., Armstrong D.W.: Immobilized ionic liquids as high-selectivity/high-temperature/high-stability gas chromatography stationary phases. *Anal. Chem.* **77**, 6453-6462, 2005.
- [233] Seo J., Kim H.-Y., Chung B.C., Hong J.: Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1067**, 303-309, 2005.
- [234] Cárdenes L., Martín-Calero A., Ayala J.H., González V., Afonso A.M.: Experimental design optimization of solid-phase microextraction conditions

for the determination of heterocyclic aromatic amines by high-performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* **39**, 405-423, 2006.

[235] Martín-Calero A., Ayala J.H., González V., Afonso A.M.: Determination of less polar heterocyclic amines in meat extracts: fast sample preparation method using solid-phase microextraction prior to high-performance liquid chromatography-fluorescence quantification. *Anal. Chim. Acta.* **582**, 259–266, 2007.

[236] Han X., Armstrong D.W.: Ionic Liquids in Separations. *Acc. Chem. Res.* **40**, 1079-1086, 2007.

[237] Pino A.V., Ayala J.H., González V., Afonso A.M.: Ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: Application to the determination of heterocyclic aromatic amines in meat-based infant foods. *Talanta* **79**, 590–597, 2009.

[238] Cárdenes L., Ayala J.H., Afonso A.M., González V.: Solidphase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the analysis of heterocyclic aromatic amines. *J. Chromatogr. A* **1030**, 87–93, 2004.

[239] Jautz U., Morlock G.: Efficacy of planar chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry for employment in trace analysis. *J. Chromatogr. A* **1128**, 244-250, 2006.

[240] Warzecha L., Strózyk M., Janoszka B., Blaszczyk U., Bodzek D.: The analysis of heterocyclic aromatic amines using high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* **47**, 539-557, 2002.

[241] Shin H.-S., Park H., Park D.: Influence of different oligosaccharides and inulin on heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried ground beef patties. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6726-6730, 2003.

[242] Rogers S.D., Dorsey J.G.: Chromatographic silanol activity test procedures: The quest for a universal test. *J. Chromatogr. A* **892**, 57-65, 2000.

[243] Martín-Calero A., Pino V., Ayala J.H., González V., Afonso A.M.: Focused microwave-assisted extraction and HPLC with electrochemical detection to determine heterocyclic amines in meat extracts. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **30**, 27-42, 2007.

[244] Pais P., Knize M.G.: Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *J. Chromatogr. B* **747**, 139-169, 2000.

[245] Murray S., Lynch A.M., Knize M.G., Gooderham M.J.: Quantification of the carcinogens 2-amino-3,8-dimethyl- and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]-quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in food using a combined assay based on gas chromatography-negative ion mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **616**, 211-219, 1993.

- [246] Skog K., Solyakov A., Arvidsson P., Jagerstad M.: Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **803**, 227-233, 1998.
- [247] Turesky R.J., Bur H., Huynh-Ba T., Aeschbacher H.U., Milon H.: Analysis of mutagenic heterocyclic amines in cooked beef products by high-performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry. *Food Chem. Toxicol.* **26**, 501-509, 1988.
- [248] Fay L.B., Ali S., Gross G.A.: Determination of heterocyclic aromatic amines in food products: automation of the sample preparation method prior to HPLC and HPLC-MS quantification. *Mutat. Res.* **376**, 29-35, 1997.
- [249] Guy P.A., Gremaud E., Richoz J., Turesky R.J.: Quantitative analysis of mutagenic heterocyclic aromatic amines in cooked meat using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **883**, 89-102, 2000.
- [250] Gerbl U., Cichna M., Zsivkovits M., Knasmüller S., Sontag G.: Analytical technologies in the biomedical and life sciences. *J. Chromatogr. B* **802**, 107-113, 2004.
- [251] Steinkellner H., Rabot S., Freywald C., Nobis E., Scharf G., Chabicovsky M., Knasmüller S., Kassie F.: Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat. Res.* 2001, **480-481**, 285-297.
- [252] Pool-Zobel, B., Verriah, S., Bohmer, F.D.: Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens - focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2005, **591**, 74-92.
- [253] Conaway, C.C, Krzemiński, J., Amin, S., Chung, F.L.: Decomposition rates of isothiocyanate conjugates determine their activity as inhibitors of cytochrome p450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 2001, **9**, 1170-6.
- [254] Kikugawa Y.: A facile *N*-alkylation of imidazoles and benzimidazoles. *Synthesis* **2**, 124-125, 1981.
- [255] Sudarsanam V., Nagrajan K., Arya V.P., Kaulgud A.P., Shenoy S., Shah R.K.: Nitroimidazoles: part VIII - 2-amino-1-methyl-5-nitroimidazoles and derivatives. *Indian J. Chem.* **21B**, 989-996, 1982.
- [256] Bell F.W., Cantrell A.S., Högberg M., Jaskunas S.R.: Phenethylthiazolethiourea (PEITC) compounds, a new class of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors 1. Synthesis and basic structure - activity relationship studies of PETT analogs. *J. Med. Chem.* **38**, 4929-4936, 1995.
- [257] Singh V., Gupta M., Jain A., Verma K.K.: Determination of aromatic primary amines at $\mu\text{g l}^{-1}$ level in environmental waters by gas chromatography-mass

spectrometry involving *N*-allyl-*N'*-arylthiourea formation and their on-line pyrolysis to aryl isothiocyanates. *J. Chrom. A* **1010**, 243–253, 2003.

[258] Vermeulen M., Zwanenburg B., Chittenden G.J.F., Verhagen H.: Synthesis of isothicyanate-derived mercapturic acids. *Eur. J. Med. Chem.* **38**, 729-737, 2003.

[259] Vermeulen M., van Rooijen, H.J.M., Vaes, W.H.J.: Analysis of isothicyanate mercapturic acids in urine: a biomarker for cruciferous vegetable intake. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 3554–5559, 2003.

[260] Shin D., Lee J., Dal Nam K., Hanh H.-G.: Novel isothiocyanate transposition in 2-alkyliminothiazoles: a simple solution for regiochemical problem. *Tetrahedron Lett.* **48**, 3089-3092, 2007.

[261] Katritzky A.R., Rees C.W.: Comprehensive heterocyclic compounds: The structure, reactions, synthesis and uses of heterocyclic compound, Pergamon Press, Nowy York, NY, 1984.

[262] Wahe H., Asobo P.F., Cherkasov R.A., Fomum Z.T., Doepp D. Heterocycles of biological importance: Part 8.1 Formation of pyrimido[1,2-*a*]benzimidazoles and oxazolo[3,2-*a*]benzimidazoles by conjugate addition of 2-aminobenzimidazoles to 4-hydroxy-2-alkynenitriles. *ARKIVOC* (**i**), 130-137, 2004.

[263] Satchell D.P.N., Satchell R.S.J.: The kinetics and mechanism of aminolysis of isothiocyanates. *Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 1415-1420, 1990.

[264] Williams A., Jencks W.P.: Urea synthesis from amines and cyanic acid: kinetic evidence for a zwitterionic intermediate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2**, 1753-1759, 1974.

[265] Pavlík M., Voburka Z., Kluh I. Kostka V.: Evaluation of aminolysis of anilinothiazolinones to phenylthiocarbonyl amino acid methyl amides as an alternative conversion method in protein sequencing. *Anal. Biochem.* **201**, 9-16, 1992.

[266] Tsogoeva S.B., Hateley M.J., Yalalov D.A., Meindl K., Weckbecker C., Huthmacher K.: Thiourea-based non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase as bifunctional organocatalysts in the asymmetric Strecker synthesis. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 5680-5685, 2005.

[267] Saxena A., Pike R.D.: Hydrogen-bonding networks in heterocyclic thioureas. *J. Chem. Crystallogr.* **37**, 755-764, 2007.

[268] Morkovnik A.S., Divaeva L.N., Nelyubina Y.V., Lyssenko K.A., Vasilchenko I.S.: Structure and tautomerism of 2-benzimidazolylthiourea. *Mendeleev Commun.* **17**, 224-226, 2007.

[269] Sudha L.V., Sathyanarayana D.N.: Conformation of some *N,N'*-arylalkyl thioureas by ¹H-NMR and infrared spectral analysis. *J. Mol. Struct.* **40**, 751-755, 1984.

- [270] Rostkowska H., Lipiński L., Khvorostov A., Nowak M.J.: UV-induced trithione trithiol - triple proton transfer in trithiocyanuric acid isolated in low-temperature matrixes *J. Phys. Chem. A* **107**, 6373-6380, 2003.
- [271] Śmiechowska A., Przychodzeń W., Chojnacki J., Bruździak P., Namieśnik J., Bartoszek A.: Synthesis and structural characterization of novel 2-benzimidazolylthioureas – adducts of natural isothiocyanates and 2-amino-1-methylbenzimidazole. *Struct. Chem.* **21**, 955-964.
- [272] Marechal Y.: The hydrogen bond and the water molecule. Elsevier, Amsterdam, 85-89, 2007.
- [273] Weiqun Z., Wen Y., Lihu Q., Yong Z., Zhengfeng Y.: *J. Mol. Struct.* **749**, 89-95, 2005.
- [274] Kirubavathi K., Selvaraju K., Kumararaman S.: Growth and characterization of a new metal-organic nonlinear optical bis (thiourea) cadmium zinc chloride single crystals. *Spectrochim. Acta, Part A* **71**, 1-4, 2008.
- [275] Kirubavathi K., Selvaraju K., Valluvan R., Kumararaman S.: Growth and characterization of cobalt thiourea sulfate, a new nonlinear optical material. *Mater Lett.* **61**, 4173-4176, 2007.
- [276] Borjesson K., Sandin P., Wilhelmsson L.M.: Nucleic acid structure and sequence probing using fluorescent base analogue tCO. *Biophys. Chem.* **139**, 24-28, 2009.
- [277] Felton J.S., Knize M.G.: Occurrence, identification, and bacterial mutagenicity of heterocyclic amines in cooked food. *Mutat. Res.* **259**, 205-217, 1991.
- [278] Rethmeier J., Neumann G., Stumpf C., Rabenstein A., Vogt C.: Determination of low thiourea concentrations in industrial process water and natural samples using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A* **934**, 129-134, 2001.
- [279] Donkor K.K., Kratochvil B.: Determination of thermodynamic aqueous acid-base stability constants for several benzimidazole derivatives, *J. Chem. Eng. Data* **38**, 569-570, 1993.
- [280] Kamber M., Flückiger-Isler S., Engelhardt G., Jaeckh R., Zeiger E.: Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis* **24**, 359-366, 2009.
- [281] Higdon J.V., Delage B., Williams D.E., Dashwood R.H.: Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol. Res.* **55**, 224-236, 2007.
- [282] Gimsing A.L., Kirkegaard J.A.: Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phyt. Reviews* **8**, 299-310, 2008

- [283] Liang H., Yuan Q.P., Dong H.R., Liu Y.M.: Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 473–476, 2006.
- [284] Zhang Y., Wade K.L., Prestera T., Talalay P.: Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide, and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation with 1,2-benzenedithiol. *Anal. Biochem.* **239**, 160–167, 1996.
- [285] Zhang Y.: Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat. Res.* **555**, 173-190, 2004.
- [286] Hwang E.S., Jeffery E.H.: Evaluation of urinary N-acetyl cysteinyl allyl isothiocyanate as a biomarker for intake and bioactivity of Brussels sprouts. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 1817-1825, 2003.
- [287] Navarro S.L., Peterson S., Chen Ch., Makar K.W., Schwarz Y., King I.B., Li S.S., Li, L., Kestin M., Lampe J.W.: Cruciferous vegetable feeding alters UGT1A1 activity: diet – and genotype – dependent changes in serum bilirubin in a controlled feeding trial. *Cancer Prev. Res.* **2**, 345-352, 2009.
- [288] Ioannou Y.M., Burka L.T., Matthews H.B.: Allyl isothiocyanate: Comparative disposition in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **75**, 173, 1984.
- [289] G. Brüsewitz, B.D. Cameron, L.F. Chasseaud, K. Görler, D.R. Hawkins, H. Koch, W.H.: Mennicke, The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate. *Biochem. J.* **162**, 99, 1977.
- [290] Bollard M., Stribbling S., Mitchell S., Caldwell J.: The disposition of allyl isothiocyanate in the rat and mouse. *Food Chem. Toxicol.* **35**, 933-943, 1997.
- [291] Ekland K.I., Morse M.A., Chung F.L.: Distribution and metabolism of the natural anticarcinogen phenethyl isothiocyanate in A/J mice. *Carcinogenesis* **11**, 2033, 1990.
- [292] Jiao D., Ho C.T., Foiles P., Chung F.L.: Identification and quantification of the N-acetylcysteine conjugate of allyl isothiocyanate in human urine after ingestion of mustard. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **3**, 487–492, 1994.
- [293] Kassahun K., Davis M., Hu P., Martin B., Baillie T.: Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: identification of phase I metabolites and glutathione conjugates. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1228-1233, 1997.
- [294] Kristensen M., Krogholm K.S., Frederiksen H., Duus F., Cornett C., Bögel S.H., Rasmussen S.E.: Improved synthesis methods of standards used for quantitative determination of total isothiocyanates from broccoli in human urine. *J. Chrom. B* **852**, 229–234, 2007.
- [295] Vermeulen M., van den Berg R., Freidig A.P., van Bladeren P.J., Vaes W.H.J.: Association between consumption of cruciferous vegetables and condiments

and excretion in urine of isothiocyanate mercapturic acids. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5350-5358, 2006.

[296] Jiao D., Yu M.C., Hankin J.H., Low S.-H., Chung F.-L.: Total isothiocyanate contents in cooked vegetables frequently consumed in Singapore. *J. Agr. Food Chem.* **46**, 1055–1058, 1998.

[297] Lehotay S.J.: Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.* **90**, 485-520, 2007.

[298] Bianchini F., Vainio H.: Isothiocyanates in cancer prevention. *Drug Metab. Rev.* **36**, 655, 2004.

[299] Zhang Y., Cho Ch.-G., Posner G.H., Talalay P.: Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols. *Anal. Biochem.* **205**, 100-107, 1992.

VII. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje:

1. Kusznierewicz B., Piasek A., Lewandowska J., **Śmiechowska A.**, Bartoszek A. Właściwości przeciwrakotwórcze kapusty białej, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **6(55)**, 20-34.
2. Kusznierewicz B., **Śmiechowska A.**, Bartoszek A., Namieśnik J. The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage, *Food Chemistry*, 2008, **108**, 853-861.
3. **Śmiechowska A.**, Bartoszek A., Namieśnik J. Przeciwrakotwórcze właściwości glukozynolanów zawartych w kapuście i produktów ich rozpadu, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2008, **62**, 125-140.
4. **Śmiechowska A.**, Kusznierewicz B., Bartoszek A., Namieśnik J. Badania właściwości przeciwutleniających związków pochodzących z najczęściej spożywanych owoców i warzyw, *Analityka*, 2008, **4**, 26-30.
5. Bartoszek A., Kusznierewicz B., Piasek A., **Śmiechowska A.**, Namieśnik J. Glukozynolany – znaczenie i metody oznaczania, *Analityka*, 2009, **3**, 16-21.
6. Kusznierewicz B., Lewandowska J., Kruszyna A., Piasek A., **Śmiechowska A.**, Namieśnik J., Bartoszek A., The antioxidative properties of white cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. alba) fresh and submitted to culinary processing, *Journal of Food Biochemistry* (w druku).
7. **Śmiechowska A.**, Bartoszek A., Namieśnik J., Determination of Glucosinolates and Their Decomposition Products–Indoles and Isothiocyanates in Cruciferous Vegetables, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2010, **40**, 202–216;
8. **Śmiechowska A.**, Przychodzeń W., Chojnacki J., Bruździak P., Namieśnik J., Bartoszek A., Synthesis and structural characterization of novel 2-benzimidazolylthioureas: adducts of natural isothiocyanates and 2-amino-1-methylbenzimidazole, *Structural Chemistry*, 2010, **21**, 955-964.

Doniesienia konferencyjne:

1. Kusznierewicz B., Lewandowska J., Kruszyna A., Piasek A., **Śmiechowska A.**, Wolska L., Namieśnik J., Bartoszek A. Badania potencjału przeciwutleniającego kapusty białej przed i po obróbce kulinarnej oraz jej zdolności do indukowania komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych, Materiały: Konferencja

- Naukowa "Naturalne przeciwutleniacze - od surowca do organizmu", Poznań, 29-30.01.2007, Poznań, Polska (str. 61-62).
2. Kusznierec B., **Śmiechowska A.**, Bartoszek A., Wolska L., Namieśnik J. Partial characterization of white cabbages from different regions by glucosinolates and total antioxidant activities, Proc. 13th International Symposium on Separation Sciences & 13th Advances and Applications of Chromatography in Industry, 27-29.06.2007, Štrbské Pleso, Słowacja, K06 (CD-rom).
 3. **Śmiechowska A.**, Kusznierec B., Bartoszek A., Piasek A., Namieśnik J. Cancer chemopreventive agents: glucosinolates and products of their decomposition in white cabbage, Materiały: 50-ty Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i 11-stej Międzynarodowej Konferencji Chemii Środowiska, 09-12.09.2007, 09-12.09.2007, Toruń, Polska (str. 277).
 4. Kusznierec B., **Śmiechowska A.**, Wolska L., Bartoszek A., Namieśnik J. The influence of culinary processes on content of bioactive compounds in white cabbage from non-organic and organic farming, Materiały: 50-ty Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i 11-stej Międzynarodowej Konferencji Chemii Środowiska, 09-12.09.2007, Toruń, Polska (str. 203).
 5. **Śmiechowska A.**, Kusznierec B., Bartoszek A., Piasek A., Namieśnik J. Charakterystyka warzyw kapustnych pod kątem obecnych w nich biologicznie aktywnych składników, Materiały: XXXVIII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności PAN „Żywność a jakość życia. Uwarunkowania technologiczne, higieniczne, żywieniowe i kulturowe”, 20-22.09.2007, Olsztyn, Polska (str. 83).
 6. **Śmiechowska A.**, Piasek A., Czapiewska K., Kusznierec B., Bartoszek A., Namieśnik J. The influence of fresh cabbage and sauerkraut juices on the activity of protective enzymes in human cell lines, Proc. COST Action 926 Conference „Benefits and Risks of Bioactive Plant Compounds”, 27-28.03.2008, Kraków, Polska, Acta Biochim. Pol. 55 (2008) 28-29.
 7. Kusznierec B., **Śmiechowska A.**, Bartoszek A., Namieśnik J. Antioxidants formed during culinary processing of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*), Proc. COST Action 926 Conference „Benefits and Risks of Bioactive Plant Compounds”, 27-28.03.2008, Kraków, Polska, Acta Biochim. Pol. 55 (2008) 49-50.

8. **Śmiechowska A.**, Piasek A., Kuszniereicz B., Szumska A., Kawecka A., Zemło D., Sikora I., Konieczka P., Namieśnik J., Bartoszek A. HPLC analysis of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) from different cultivations in relation to metal content in soils, Proc. 6th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP): The Application of Chromatographic Methods in Phytochemical & Biomedical Analysis, 15-18.06.2008, Lublin, Polska (str. 193).
9. Kuszniereicz B., **Śmiechowska A.**, Namieśnik J., Bartoszek A. The attempt of isolation and identification of antioxidant compound formed during thermally treated cabbage, Proc. 6th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP): The Application of Chromatographic Methods in Phytochemical & Biomedical Analysis, 15-18.06.2008, Lublin, Polska (str. 134);
10. **Śmiechowska A.**, Szumska A., Kawecka A., Bartoszek A., Namieśnik J. Characterization of white cabbages from different cultivations by isothiocyanates content and antioxidant activities, Proc. 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF "Natural products with Pharmaceutical, Nutraceutical, Cosmetic and Agrochemical Interest", 03-08.08.2008, Ateny, Grecja, *Planta Medica: An International Journal of Natural Products and Medicinal Plant Research*, 74 (9) (2008) 1076.
11. Chrzanowski W., Kuszniereicz B., **Śmiechowska A.**, Kochanowski R., Bartoszek A. Estimation of concentration equilibrium constants of reaction between mutagenic HAA and antimutagenic cabbage phytochemicals based on data from Ames test, Proc. The Congress of Biochemistry and Cell Biology, the 43rd Meeting of the Polish Biochemical Society and the 10th Conference of the Polish Cell Biology Society, 7-11.09.2008, Olsztyn, Polska, *Acta Biochim. Pol.* 55 (2008) 275.
12. Kuszniereicz B., **Śmiechowska A.**, Namieśnik J., Bartoszek A., Isolation and identification of antioxidant compound formed during thermally treated cabbage using chromatographic techniques, Proc. 27th International Symposium on Chromatography, 21-28.09.2008, Münster, Germany (CD-rom).
13. Kielbratowska M., Krzyżanowska A., Kuszniereicz B., **Śmiechowska A.**, Szumska A., Kawecka A., Bartoszek A. The comparison of bioactivities displayed by fresh cabbage juices and corresponding sauerkraut juices obtained

- from vegetables grown in different locations, Proc. 2nd Glucosinolate Conference, 24-27.05.2009, Helsingør, Denmark (str. 50);
14. Kuszniereicz B., **Śmiechowska A.**, Konieczka P., Szumska A., Kawecka A., Zemło D., Sikora I., Namieśnik J., Bartoszek A. GLS content and composition as well as antioxidant potential determined for white cabbage cultivated in different locations, Proc. 2nd Glucosinolate Conference, 24-27.05.2009, Helsingør, Denmark (str. 75);
 15. **Śmiechowska A.**, Piasek A., Szumska A., Kawecka A., Kuszniereicz A., Zemło D., Szulfer I., Kielbratowska M., Konieczka P., Namieśnik J., Bartoszek A., The impact of cultivation conditions on phytochemical composition and chemopreventive properties of white cabbage, Proc. „NCC-09”, Natural Compounds in Cancer Prevention and Treatment, 13-15.10.2009, Smolenie, Słowacja (str. 49).
 16. **Śmiechowska A.**, Namieśnik J., Bartoszek A., Znaczenie izotiocyjanianów w wychwytywaniu heterocyklicznych amin aromatycznych i ich rola w inaktywacji kancerogenów w żywności, 24-26.05.2010, Materiały: Seminarium Politechnika Gdańska - uniwersytet przedsiębiorczy XXI wieku (str. 28).
 17. **Śmiechowska A.**, Namieśnik J., Bartoszek A., Wyznaczanie całkowitej zawartości izotiocyjanianów w sokach z kapusty (*Brassica oleracea* var. capitata f. alba) pochodzącej z różnych upraw z wykorzystaniem techniki HPLC i spektrofotometrycznej, 4-9.07.2010, Materiały: VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej: Analityka dla społeczeństwa XXI wieku, Kraków, Polska (str. 547).
 18. Bartoszek A., Dziedziul K., Kuszniereicz B., Konieczka P., Szymańska K., **Śmiechowska A.**, Namieśnik J., Wpływ metali obecnych w glebie na właściwości biobójcze soku z kapusty : analiza statystyczna = The influence of metalcontent in soil on biocidalactivity of cabbage juice : the statistical analysis, Proc. VI International Scientific Conference : Toxic substances in environment, 7-8.09.2010, Kraków, Polska (str. 7).

Wystąpienia ustne:

1. **Śmiechowska A.** Charakterystyka warzyw kapustnych pod kątem obecnych w nich składników biologicznie aktywnych, Materiały: Sesja Sprawozdawcza

Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 24-25.09.2007, Gdańsk, Polska (str. 35).

2. **Śmiechowska A.**, Szumska A., Kawecka A., Bartoszek A., Namieśnik J. Wpływ warunków uprawy na aktywność przeciwutleniającą kapusty białej świeżej i kiszonej, Materiały: XIII Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności "Żywność współczesna – szanse i zagrożenia" z cyklu "Jakość i prozdrowotne cechy żywności", 28-29.05.2008, Łódź, Polska (str. 21).
3. **Śmiechowska A.** Znaczenie izotiocyjanianów w wychwytywaniu heterocyklicznych amin aromatycznych i ich rola w inaktywacji kancerogenów w żywności, Materiały: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 22-23.09.2008, Gdańsk, Polska (str. 35).
4. **Śmiechowska A.**, Kusznierecz A., Szumska A., Kawecka A., Kielbratowska M., Namieśnik J., Bartoszek A. Porównanie aktywności przeciwutleniającej, zawartości substancji biologicznie aktywnych oraz aktywności cytotoksycznej kapusty świeżej uprawianej w różnych lokalizacjach, Materiały: XXXIX Sesja Komitetu Nauk o Żywności PAN, Postęp w wytwarzaniu i ocenie żywności, 29.06-01.07.2009, Poznań, Polska (str. 68).

Nagrody i wyróżnienia:

- 1) Targi Techniki Przemysłowej, Nauki i Innowacji – TECHNICON INNOWACJE 2007, 23-25.10.2007, Gdańsk, Polska, nagroda przyznana za: *Prozdrowotne wyroby mięsne o znamionach żywności funkcjonalnej wzbogacone w naturalne substancje przeciwrakotwórcze obecne w kapuście Brassica Oleracea.*
- 2) „Reakcje izotiocyjanianów z heterocyklicznymi aminami aromatycznymi i ich rola w inaktywacji kancerogenów w żywności”, przyznanie stypendium w ramach projektu "InnoDoktorant - stypendia dla doktorantów, I edycja" przez Urząd Marszałkowski Województwa Pomorskiego w Gdańsku (grudzień 2008).
- 3) Stypendium naukowe przyznane w ramach PO KL „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” na rok akademicki 2009/2010.

Projekty badawcze finansowane ze środków finansowych na naukę:

- 1) Grant KBN własny: "Badanie wpływu modyfikacji biologicznie istotnych amin aromatycznych (i ich metabolitów) za pomocą izotiocyanianów z warzyw krzyżowych na proces żywieniowej chemoprewencji nowotworów", termin realizacji: 07.05.2009-06.05.2012, Umowa 244336, Agnieszka Bartoszek - kierownik tematu, Anna Śmiechowska, Barbara Kusznierewicz, Witold Przychodzeń, Jacek Namieśnik;
- 2) Grant KBN promotorski: „Opracowanie nowej procedury oznaczania zawartości izotiocyanianów w próbkach roślin krzyżowych i produktów żywnościowych z dodatkiem tych roślin”, termin realizacji: 31.03.2010-30.11.2010, Jacek Namieśnik - kierownik tematu, Anna Śmiechowska;
- 3) European Master in Quality in Analytical Laboratories – EMQAL, umowa 018145, Wykorzystanie kapusty białej na potrzeby fitoremediacji i biofumigacji gleby (AGROBIOKAP), Innowacyjna Gospodarka, dr inż. A. Bartoszek-Pączkowska, dr hab. inż. P. Konieczka, dr inż. B. Kusznierewicz.