

Received: 10.05.2020
Accepted: 03.09.2020
Published: 23.04.2021

Barwniki karmelowe w świetle badań naukowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich toksyczności

Caramel colors in terms of scientific research, with particular consideration of their toxicity

Marta Buczkowska¹, Kamila Paciorek², Anna Kapcińska², Michał Górski³

¹Zakład Toksykologii i Ochrony Zdrowia w Środowisku Pracy, Katedra Toksykologii i Uzależnień, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Drugie Koło Naukowe przy Zakładzie Toksykologii i Ochrony Zdrowia w Środowisku Pracy, Katedra Toksykologii i Uzależnień

³Szkoła Doktorska Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu Śląski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie:

Barwniki karmelowe to jedne z najbardziej rozpowszechnionych na świecie dodatków do żywności, które podzielono na cztery klasy (I–IV), oznaczone odpowiednio symbolami E150 a–d. Poszczególne klasy karmeli różnią się właściwościami fizyko-chemicznymi oraz sposobem otrzymywania, co wpływa na powstawanie różnych związków, istotnych dla oceny bezpieczeństwa żywności.

Przeprowadzono wiele badań wszystkich klas karmeli, w tym badania toksykokinetyczne, genotoksyczne, rakotwórcze oraz badania toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej, które nie wykazały ich szkodliwości, w dawkach nieprzekraczających ADI. Rośnie jednak liczba doniesień naukowych o możliwym działaniu toksycznym, obecnych w karmelach związków niskocząsteczkowych. Obecnie za ważne z toksykologicznego punktu widzenia oraz ze względu na możliwe stężenie w produkcie końcowym, uznaje się trzy związki: 5-HMF (występujący we wszystkich klasach), 4(5)-MeI (obecny w karmelu klasy III i IV) czy THI (obecny w karmelu klasy III). 4(5)-MeI działa neurotoksycznie, a w 2011 r. został uznany za związek o możliwym działaniu rakotwórczym dla człowieka (klasa 2B, wg IARC). W przypadku THI badania potwierdziły jego aktywność limfopeniczną, prawdopodobnie wtórną do działania immunosupresyjnego. W latach 80. ub. w. JECFA ustalił dopuszczalne stężenia 4(5)-MeI oraz THI w odniesieniu do klas karmeli, w których związki te mogą występować. Toksyczność 5-HMF nie została jednoznacznie potwierdzona, ale przeprowadzone badania wskazują, że związek ten nie jest obojętny dla organizmów żywych.

Obecnie większość organizacji międzynarodowych i instytutów naukowych, uznaje te dodatki za bezpieczne dla konsumentów, ale jednocześnie naukowcy podkreślają potrzebę prowadzenia dalszych badań.

Celem pracy jest przegląd dostępnego piśmiennictwa i doniesień dotyczących karmeli ze szczególnym uwzględnieniem ich charakterystyki toksykologicznej.

Słowa kluczowe:

barwniki karmelowe, karmel siarczynowy, karmel amoniakalny, karmel amoniakalno-siarczynowy, 5-HMF (5-hydroksymetylofurfural), 4(5)-MeI (4(5)-metyloimidazol), THI (2-acetylo-4(5)-tetrahydroksybutyloimidazol)

Summary:

Caramel colors, the most common food additives in the world, are divided into four classes (I–IV), marked with the symbols E150 a–d, respectively. Individual classes of caramel colors differ from each other in physico-chemical properties and the method of preparation, which affects the formation of various compounds that are important for the assessment of food safety.

Keywords:	A number of studies on all caramel classes of have been performed, including toxicokinetic, genotoxic, carcinogenic and reproductive and developmental toxicity studies, which have not shown harmful effects of these additives at doses not exceeding ADI. However, there is an increasing number of scientific reports of the possible toxic effects present in caramels of low-molecular compounds. Currently, three compounds are considered to be toxicologically important and resulting from the possible concentration in the final product: 5-HMF (present in all classes), 4(5)-MeI (present in caramel classes III and IV) or THI (present in caramel class III). 4(5)-MeI has a neurotoxic effect and was considered in 2011 as a possible human carcinogen (class 2B, according to IARC). In the case of THI, studies have confirmed its lymphopenic activity, probably secondary to its immunosuppressive effect. Consequently, in the 1980s, JECFA set acceptable levels 4(5)-MeI and THI, for the caramel classes in which these compounds may be present. The toxicity of 5-HMF has not been confirmed unequivocally, but studies have shown that this compound is not neutral to living organisms. Currently, most international organizations and scientific institutes recognize these additives as safe for consumers, but at the same time scientists emphasize the need for further research. caramel colors, sulfite caramel, ammonia caramel, sulfite ammonia caramel, 5-HMF (5-Hydroxymethylfurfural), 4(5)-Mel (4(5)-Methylimidazole), THI (2-Acetyl-4(5)-tetrahydroxy-butylimidazole)
GICID DOI: Word count: Tables: Figures: References:	01.3001.0014.8497 10.5604/01.3001.0014.8497 10 460 2 3 64
Adres autorki:	mgr Marta Buczkowska, Zakład Toksykologii i Ochrony Zdrowia w Środowisku Pracy, Katedra Toksykologii i Uzależnień, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, 41-902 Bytom, ul. Piekarska 18; e-mail: mbuczkowska@sum.edu.pl
Wykaz skrótów:	3-DG – 3-deoksyglukozon (3-deoxyglucosone), 4(5)-MeI – 4(5)-metyloimidazol (4(5)-methylimidazole), 5-HMF, HMF – 5-hydroksymetylo-2 furaldehyd, 5-hydroksymetylofurfural (5-hydroxymethylfurfural), A6770 – 1-[4(5)-(hydroksymetylo)-1H-imidazol-2-il]etanon, ADI – dopuszczalne dzienne spożycie (acceptable daily intake), ANS – Panel ds. Dodatków do Żywności i Składników Pokarmowych Dodawanych do Żywności (Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), APTT – czas kaolinowo-kefalinowy (activated partial thromboplastin time), BHMF – 2,5-bis(hydroksymetylo)-furan (2,5-bis(hydroxymethyl)-furan), CA – Kodeks Żywnościowy (Codex Alimentarius), CAFAM – 5-hydroksymetylo-2-furoilo-aminometan (5-hydroxymethyl-2-furoyl-aminomethane), CAFG – (5-karboksylo-2-furoilo)-glicyna ((5-carboxylicacid-2-furoyl)-glycine), CEPA – Kalifornijska Agencja Ochrony Środowiska (California Environmental Protection Agency), CMF – 5-chlorometylofurfuralu (5-chloromethylfurfural), DDF – dihydroksydimetylofuranon (dihydroxydimethylfuranone), EFSA – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority), FA – wolny kwas 2-furoinowy (2-furoic acid), FDA – Agencja Żywności i Leków (Food and Drug Administration), FDCA – kwas furano-2,5-dikarboksylowy (furan-2,5-dicarboxylic acid), GABA – kwas γ-aminomasłowy (gamma-aminobutyric acid), GAD – dekarboksylaza glutaminianowa (glutamate decarboxylase), h – godzina (hour), HDF – hydroksydimetylofuranon (hydroxydi-methylfuranone), HMCF – frakcja o wysokiej masie cząsteczkowej (high molecular weight colour fraction), HMFA – kwas 5-hydroksymetylo-2-furoinowy (5-hydroxymethyl-2-furoic acid), HMFG – N-(5-hydroksymetylo-2-furoilo)-glicyna (N-(5-hydroxymethyl-2-furoyl)-glycine), HMW – związki o dużej masie cząsteczkowej (high molecular weight), HSA – ludzkie albuminy osocza (human serum albumin), IARC – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer), JECFA – Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives),

LD50 – medialna dawka śmiertelna (lethal dose 50%), **LMW** – związki o małej masie cząsteczkowej (low molecular weight), min – minuta, **MMC** – mitomycyna C (mitomycin C), **NOAEL** – stężenie nie-wywołujące dających się zaobserwować szkodliwych skutków (No-Observed-Adverse-Effect Level), **NSRL** – stężenie bezistotnego ryzyka (No Significant Risk Level), **NTP** – Krajowy Program Toksykologiczny (National Toxicology Program), **OEHA** – Gabinet Oceny Zagrożeń dla Zdrowia Środowiskowego (Office of Environmental Health Hazard Assessment), **PAPS** – 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarzan (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulphate), **S1P** – sfingozyno-1-fosforan (sphingosine 1-phosphate), **S1PL** – liaza sfingozyno-1-fosforanu (sphingosine 1-phosphate lyase), **SCF** – Komitet Naukowy UE ds. Żywności (EU Scientific Committee for Food), **SMF** – 5-sulfoooksymetylofurfuralu (5-sulphooxymethylfurfural), **SULT** – sulfotransferaz (sulphotransferase), **THI** – 2-acetylo-4(5)-tetrahydroksybutyloimidazol (2-Acetyl-4(5)-tetrahydroxybutylimidazole).

WPROWADZENIE

Karmele to naturalne barwniki spożywcze i jednocześnie jedne z najbardziej rozpowszechnionych na świecie dodatków do żywności. Są używane w przemyśle spożywczym od ponad 150 lat. Stosuje się je przede wszystkim w celu poprawy, przywrócenia lub nadania różnych odcieni brązowej barwy produktom żywnościowym. Substancje te są również wykorzystywane w innych gałęziach przemysłu np. podczas produkcji karm dla zwierząt, kosmetyków i farmaceutyków [60].

Termin karmele stosowany jest do całej rodziny związków, różniących się między sobą właściwościami fizyko-chemicznymi. Barwniki karmelowe to dobrze rozpuszczalne w wodzie polimery o właściwościach koloidalnych. W zależności od wartości punktu izoelektrycznego (pI), czyli wartości pH, przy której związek nie zawiera ładunku, barwniki karmelowe można podzielić na 3 typy: dodatnie (pI 5,0–7,0), ujemne (pI 4,0–6,0) i spirytusowe (pI < 3,0). Średnia masa cząsteczkowa związków wchodzących w skład karmeli waha się od 5 kDa (karmel elektropozytywny) do 10 kDa (karmel elektroujemny). Smak karmeli jest determinowany przez dwa czynniki: modyfikowalny, czyli kwasowość nasilającą się w przebiegu karmelizacji oraz niemodyfikowalny, czyli charakterystyczny dla karmelu aromat. Dobrej jakości karmel ma słodko-gorzki smak oraz delikatny aromat.

Barwniki karmelowe podzielono na cztery klasy: I – karmel prosty; II – karmel siarczynowy; III – karmel amoniakalny; IV – karmel amoniakalno-siarczynowy. Poszczególne klasy karmeli różnią się właściwościami fizycznymi i chemicznymi, sposobem otrzymywania, a także możliwością późniejszego zastosowania (tabela 1) [51].

Przed dopuszczeniem do stosowania w żywności wszystkie klasy karmeli oceniano pod kątem bezpieczeństwa dla konsumenta przez liczne organizacje i instytucje naukowe, w tym m.in. przez: Komitet Naukowy UE ds. Żywności (EU Scientific Committee for Food, SCF); obecnie Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności - European Food Safety Authority, EFSA), Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) oraz Nordycką Radę Ministrów (Tema-Nord). Przyjęte przez EFSA dopuszczalne dzienne spożycie (acceptable daily intake, ADI) karmeli różni się w zależności od ich klasy. W ramach całej grupy barwników karmelowych

ADI nie może przekraczać 300 mg/kg masy ciała/dzień, przy założeniu, że ADI dla karmeli klasy III wynosi 0–100 mg/kg masy ciała/dzień. Jednak, w zależności od organizacji, a także regionu świata, ustalone dla karmeli wartości ADI, różnią się, np. amerykańska Agencja Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA) w ogóle nie ustaliła wartości ADI dla tych dodatków (tabela 1) [8, 60].

Stosowanie karmeli jako barwników podlega regulacjom prawnym. W krajach Unii Europejskiej obowiązującym aktem prawnym jest Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności. Karmele oznaczone są symbolami E150 a-d, w zależności od ich rodzaju: E150a karmel, E150b karmel siarczynowy, E150c karmel amoniakalny, E150d karmel amoniakalno-siarczynowy (tabela 1). Barwniki karmelowe nie mogą być dodawane do niektórych kategorii produktów spożywczych, w tym m.in. do: żywności nieprzetworzonej, mleka konserwowanego i fermentowanego (bez dodatków smakowych i środków aromatyzujących), jaj i produktów jajecznych, mąki i innych produktów przemiału zbóż (z wyjątkiem śniadaniowych przetworów zbożowych z dodatkami smakowymi lub środkami aromatyzującymi), chleba i produktów podobnych (z wyjątkiem chleba słodowego), owoców i warzyw w puszkach (z wyjątkiem konserw z czerwonych owoców oraz warzyw w occie, oleju lub solance), cukru, makaronów, żywności dla niemowląt i małych dzieci, olejów i tłuszczów pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego oraz ryb, mięczaków, skorupiaków, mięsa, drobiu i dziczyzny i ich przetworów (z wyjątkiem analogów ikry rybniej opartych na wodorostach, kielbas, pasztetów, past rybnych, past ze skorupiaków, wstępnie obgotowanych skorupiaków). W pozostałych kategoriach żywności, nieobjętych zakazem barwienia, stosowanie karmeli jest dopuszczone na poziomie *quantum satis*, czyli w ilości nie większej niż potrzebna do osiągnięcia zamierzonego celu, zgodnie z zasadami dobrej praktyki produkcyjnej [48].

Wszystkie karmele powstają podczas termicznej degradacji cukrów w procesie karmelizacji, którą po raz pierwszy szczegółowo opisał w 1985 r., francuski chemik M.A. Gelis. Jest to wiele reakcji chemicznych zachodzących w następstwie ogrzewania cukrów, w postaci stałej lub roztworów. Przebieg poszczególnych reakcji i czas ich trwania są uzależnione głównie od temperatury i pH środowiska. Temperatura procesu powinna być dostosowana do rodzaju cukru

Tabela 1. Rodzaje i charakterystyka karmeli [wg 8, 15, 22, 47, 60, 61]

	Karmel klasy I	Karmel klasy II	Karmel klasy III	Karmel klasy IV
Nazwa	Karmel zwykły; kaustyczny, prosty	Karmel siarczynowy	Karmel amoniakalny, karmel piekarniczy, cukier piwny	Karmel amoniakalno-siarczynowy, karmel napojów bezalkoholowych
Symbol	E150a	E150b	E150c	E150d
Typ	CP-1 CP-2	CCS-1	AC-1 AC-2 AC-3	SAC-1 SAC-2 SAC-3 SAC-4
Reagenty użyte do produkcji	tylko kwasy i zasady	kwasy i zasady; związki siarczynowe	kwasy i zasady; związki amonowe	kwasy i zasady; związki amonowe i siarczynowe
Zastosowanie	zboża, batony, ciastka ryżowe, grzanki i farsze, Whiskey i inne alkohole wysokoprocentowe, pieczywo, lody, jogurty	alkohole destylowane np. koniak, niektóre octy, fermentowane napoje mleczne	piwo, pieczywo, wyroby cukiernicze, polewy, herbatniki, płatki zbożowe, sosy (ostrogowy, sojowy), marynaty	napoje bezalkoholowe (np. typu cola), piwa typu porter, wypieki, przekąski, wyroby cukiernicze, płatki zbożowe, brązowy sos do mięs
ADI (EFSA)	300 mg/kg mc/ dzień (łącznie dla wszystkich klas)	300 mg/kg mc/ dzień (łącznie dla wszystkich klas)	100 mg/kg mc/ dzień	300 mg/kg mc/ dzień (łącznie dla wszystkich klas)
ADI (JECFA)	brak	160 mg/kg mc/ dzień	200 mg/kg mc/ dzień (łącznie z klasą IV)	200 mg/kg mc/ dzień (łącznie z klasą III)
Dopuszczalne poziomy wg Rozporządzenia Komisji UE nr 231/2012				
4-Mel	nieokreślony	nieokreślony	200 mg/kg ¹	250 mg/kg ¹
THI	nieokreślony	nieokreślony	10 mg/kg ¹	nieokreślony
Azot amoniakalny	nieokreślony	nieokreślony	<0,3% ¹	<0,6% ¹
Dwutlenek siarki	nieokreślony	<0,2% ¹	nieokreślony	<0,2% ¹
Dopuszczalne poziomy wg JECFA 2011				
4-Mel	nieokreślona	nieokreślona	200 mg/kg ¹	250 mg/kg ¹
THI	nieokreślona	nieokreślona	25 mg/kg ¹	nieokreślona
Azot amoniakalny	nieokreślony	nieokreślony	<0,4%	<2,8%
Dwutlenek siarki	nieokreślony	<0,2%	nieokreślony	<0,5%
Pozostałości wybranych związków (odnotowane w badaniach)				
5-HMF	700–27300 mg/kg	3300–33700 mg/kg	10–3900 mg/kg	4900–21400 mg/kg
4-Mel	brak danych; nie powinien być obecny	brak danych; nie powinien być obecny	0,025–463 mg/kg	0–1276 mg/kg
THI	brak danych; nie powinien być obecny	brak danych; nie powinien być obecny	1,0–74,3 mg/kg	nie potwierdzono obecności

¹ w przeliczeniu na ekwiwalent bazy barwnika (w przeliczeniu na produkt o intensywności barwy wynoszącej 0,1 jednostek absorpcji).

stanowiącego substrat dla reakcji, np. dla fruktozy reakcja rozpoczyna się już w $T = 110^{\circ}\text{C}$, a glukozy czy sacharozy dopiero w $T = 160^{\circ}\text{C}$. Stwierdzono, że karmelizacja zachodzi szybciej w środowisku kwaśnym ($\text{pH} < 3$) oraz zasadowym ($\text{pH} > 9$); najłatwiej procesowi karmelizacji ulegają cukry redukujące [21].

Karmelizacja cukrów redukujących rozpoczyna się od otwarcia pierścienia hemiacetalowego, z następującą po tym enolizacją w środowisku kwasowym lub zasadowym, prowadzącą do izomeryzacji szkieletu węglowodanowego (transformacja Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein). W kwaśnym środowisku powstaje mniej form izomerycznych, a dominującym procesem jest odwodnienie, powodujące wytworzenie: 5-hydroksymetylo-2-furaldehydu (5-HMF, HMF, 5-hydroksymetylofurfural) w przypadku heksoz oraz 2-furaldehydu (furfural) z pentoz. Natomiast w alkalicznym pH reakcje odwodnienia przebiegają wolniej niż w środowisku obojętnym lub kwaśnym, co powoduje wytwarzanie większych ilości związków, takich jak: acetylol (hydroksyaceton), acetoina i diacetyl. Ponadto podczas karmelizacji w obecności tlenu dochodzi do rozszczepienia oksydacyjnego, z wytworzeniem kwasów organicznych, w tym m.in.: kwasu mrówkowego i octowego. Przedłużający się proces karmelizacji w temperaturze przekraczającej 240°C kończy się pirolizą cukrów, czyli ich rozkładem prowadzącym do spalania.

PRODUKTY KARMELIZACJI

Produkty karmelizacji składają się w 90–95% z lotnych i nielotnych frakcji o niskiej i wysokiej masie cząsteczkowej, których zawartość różni się w zależności od: temperatury, pH, czasu ogrzewania oraz substratu wyjściowego. W początkowych etapach karmelizacji powstają produkty lekko zabarwione, o przyjemnym karmelowym smaku, natomiast w miarę postępu reakcji zaczynają dominować związki o większej masie cząsteczkowej, intensywnie brązowym zabarwieniu, nieprzyjemnym gorzkim smaku i zapachu spalenizny [59]. Dokładny przebieg reakcji karmelizacji nie został jeszcze dokładnie poznany, dlatego nie jest dostępna pełna charakterystyka produktów końcowych tego procesu. Finalna frakcja nielotna (związki o dużej masie cząsteczkowej – high molecular weight, HMW), odpowiadająca za barwę karmelu, została podzielona na trzy ogólne grupy związków: jasnobrązowe karmelany (rozpuszczalne w wodzie i alkoholu; rozmiar cząstek: $0,46\ \mu\text{m}$), brązowe karmeleny (nie rozpuszczalne w alkoholu; rozmiar cząstek: $0,95\ \mu\text{m}$) oraz ciemnobrązowe karmeliny (podział: rozpuszczalne w gorącej wodzie, w zimnej wodzie, nierozpuszczalne w większości rozpuszczalników; rozmiar cząstek: $4,33\ \mu\text{m}$). Frakcja lotna (związki o małej masie cząsteczkowej – low molecular weight, LMW), wpływająca na końcowy aromat, najczęściej obejmuje produkty, takie jak: acetylfuran, 2-furfurol, 5-HMF, 3-hydroksy-2-acetylofuran, 3-hydroksy-2(5H)-furonyny, 4-hydroksy-3(2H)-furonyny i pochodne 4-pironowe [21, 51].

Karmelizacja może zachodzić jednocześnie z reakcją Maillarda, jeśli w środowisku, oprócz cukrów, obecne są związki

zawierające azot (najczęściej w postaci wolnej grupy aminowej). Z tego względu reakcja Maillarda ma istotne znaczenie w powstawaniu karmeli klasy III i IV, ponieważ do ich produkcji wykorzystuje się związki amonowe, np.: wodorotlenek amonu, fosforan amonu czy siarczan amonu [51]. Reakcja Maillarda, podobnie jak karmelizacja, ma złożony charakter, a jej przebieg, uzależniony od wielu czynników, nie został dokładnie poznany. W 1953 r. Hodge przedstawił pierwszy, wyczerpujący opis tej reakcji, dzieląc ją na trzy fazy: (1) wczesną, kończącą się powstawaniem produktu Amadori, (2) zaawansowaną, związaną z degradacją produktów Amadori oraz (3) późną, podczas której wytwarzane są melanoidyny [14]. Początkowy etap reakcji Maillarda polega na kondensacji grupy aminowej z grupą karbonylową cukru redukującego (aldozy lub ketozy), w wyniku tego następuje utrata cząsteczki wody i wytworzenie N-podstawionych glukozyloamin – aldozyloamin lub ketozyloamin, w zależności od rodzaju cukru redukującego. Glukozyloaminy są niestabilne i szybko ulegają przegrupowaniu. Powstaje związek Amadori (1-amino-1-deoksy-ketoza), gdy cukrem redukującym jest aldoza lub związek Heynsa (2-amino-2-deoksy-aldoza), gdy substratem dla reakcji jest ketoza [57]. W zaawansowanym etapie reakcji Maillarda, związek Amadori/Heynsa ulega degradacji, co powoduje wytworzenie głównych dla tego etapu produktów α -dikarbonylowych, wśród których dominuje 3-deoksyglukozon (3-DG). Prawdopodobnie 3-DG jest prekursorem w syntezie 5-HMF w reakcji Maillarda. Związki α -dikarbonylowe mogą ulegać rozpadowi do: krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych, czy odpowiadających za charakterystyczny aromat, związków karbonylowych, a także produktów homo- i heterocyklicznych (pirazyny, pirany, furany, furanony np. hydroksydimetylofuranon – HDF i dihydroksydimetylofuranon – DDF, pirole oraz związki zawierające siarkę np. tiofeny i tiazole). Wysoce reaktywne związki pośrednie utworzone w fazie zaawansowanej reagują tworząc stabilne produkty w końcowej fazie reakcji. Faza końcowa obejmuje przede wszystkim reakcje kondensacji wolnych grup aminowych i silnie elektrofilowych związków dikarbonylowych, z wytworzeniem melanoidyn. Melanoidyny to brązowa mieszanina polimerów i kopolimerów zawierających azot, o zróżnicowanej masie cząsteczkowej. W skład melanoidyn wchodzi zarówno związki o małej masie cząsteczkowej (LMW), jak i o dużej masie (HMW), bardzo zróżnicowane w zależności od warunków prowadzenia reakcji. Nie jest znana dokładna charakterystyka melanoidyn, ponieważ w zależności od składu mieszaniny wyjściowej, liczba zachodzących interakcji może być bardzo duża i trudno określić wszystkie powstające produkty końcowe [14, 57]. Obecnie więcej uwagi poświęca się produktom LMW, ponieważ jak wykazały badania, niektóre spośród nich mogą mieć działanie toksyczne, np. 4(5)-metyloimidazol (4(5)-MeI) czy 2-acetylo-4(5)-tetrahydroksybutyloimidazol (THI) [60].

METABOLIZM KARMELI

Dotąd opublikowano niewiele badań toksykokinetycznych dotyczących barwników karmelowych. EFSA powołuje się na wyniki dwóch doświadczeń – z 1951 r. poświęconych karmelowi klasy III oraz z 1992 r. odnoszących się do karmelu klasy IV.

Tabela 2. Podstawowe badania toksyczności karmeli [wg 8, 26, 34, 60]

Rodzaj karmelu	Materiał i metody badań	Wyniki
Toksyczność podprzewłoka		
E150a	Szczury Wistar (samice); Droga doustna (pasza); Czas: 12 tygodni (narażenie: 8 tyg.; rekonwalescencja: 4 tyg.); Dawkę: 0, 15 i 30 g/kg mc.	Odnutowano: przebarwienie krezkowych węzłów chłonnych, biegunki, wzrost masy stołka – wszystkie zmiany zmniejszały się lub ustąpiły w okresie rekonwalescencji
	Szczury Crj: CD (SD) (obie płci); Czas: 28 dni; Droga narażenia: doustna (z wody); Dawkę: 0, 0,5, 1 i 2 ml/kg mc/dzień.	Odnutowano: spadek wartości APTT, wzrost liczby limfocytów i znaczący spadek liczby neutrofilii; zmiany histopatologiczne m.in. w nerkach. Wniosek: odnutowane zmiany nie były związane z ekspozycją na karmel; nietoksyczna dawka E150a to co najmniej 2,66 g /kg mc/dzień
	Szczury Fischer F-344 (obie płci); Droga doustna (z wodą); Czas narażenia: 90 dni; Dawkę: 0, 4, 8, 12, 16 g/kg mc/dzień.	Odnutowano: zmniejszenie objętości i obniżenie pH moczu, wzrost ciężaru właściwego moczu, wzrost bezwzględnej i względnej masy nerek i jelita ślepego; zmniejszenie masy ciała oraz spożycia pokarmów i płynów; zmiany pigmentacyjne w przewodzie pokarmowym i krezkowych węzłach chłonnych (zależne od dawki) Wniosek: zmniejszenie przyrostu masy ciała i wzrost masy nerek były skutkiem zmniejszonego spożycia pokarmu i płynów, prawdopodobnie wynikającego z obniżonych wartości smakowych wody ze względu na obecność karmelu. Pigmentacja krezkowych węzłów chłonnych i powiększenie kątnicy nie miały znaczenia toksykologicznego; NOAEL=16 g/kg mc/dzień
E150b	Szczury Sprague Dawley (obie płci); Droga doustna (pasza); Czas narażenia: 13 tygodni; Dawkę: 0, 4, 8, 16 g/kg mc/dzień.	Odnutowano zmniejszenie przyrostu masy ciała, zmniejszoną masę grasicy i śledziony; wzrost względnej masy wątroby i nerek; zmniejszenie stężenia hemoglobiny (od 6 tygodnia); limfopenia (obserwowana we wszystkich dawkach). Brak zmian histopatologicznych powiązanych ze spożyciem karmeli Wniosek: obserwowane zmiany nie zostały uznane za przejaw działania toksycznego karmeli.
E150c	Szczury Wistar (obie płci); Droga doustna (pasza); Czas narażenia: 2 lata; Dawkę: 0, 0,5, 1,5, 3 g/kg mc/dzień.	Odnutowano: znaczący spadek masy ciała i spożycia pokarmu, nasilający się ze wzrostem dawki (nieistotnie statystycznie), istotne różnice w względnej masie mózgu, tarczycy i nerek w porównaniu z grupą kontrolną; limfopenia przy dawkach: 1,5 i 3 g/kg mc/dzień (u obu płci). Wniosek: obserwowane zmiany były nieistotne z toksykologicznego punktu widzenia. W opinii JECFA odnotowano, że limfopenia była wynikiem obecności THI.
E150c	Szczury Fischer F-344 (obie płci); Droga doustna (z wodą); Czas narażenia: 90 dni; Dawkę: 0, 0,5, 1,5, 3 g/kg mc/dzień.	Odnutowano zmniejszenie przyrostu masy ciała (we wszystkich dawkach), zmniejszone spożycie pokarmu i wody; zmniejszenie objętości i zwiększenie ciężaru właściwego moczu; leukopenia, w tym limfopenia zależna od dawki (istotna statystycznie w przypadku próbki B THI) - powrót parametrów do normy po zakończeniu badań; nagromadzenie karmelu E150c w przewodzie pokarmowym i krezkowych węzłach chłonnych (bez uszkodzenia tkanki); zmniejszenie bezwzględnej masy grasicy- konsekwencja zmniejszenia masy ciała.
	Dawkę THI: 15 mg /kg karmelu w postaci stałej (próbka A; dla wszystkich dawek E150c) i 1295 mg /kg karmelu w postaci stałej (próbka B; wyłącznie dla dawki E150c=20 g/kg mc/dzień) Zawartość przydostaw w diecie: > 10 mg/kg	Wniosek: wpływ na przyrost masy ciała był częściowo spowodowany zmniejszonym poborem wody spowodowanym gorszymi walorami smakowymi wody pitnej, a nie toksycznym wpływem karmelu; NOAEL=20 g/kg mc/dzień
E150d	Szczury Fischer F-344 (obie płci); Droga doustna (z wodą); Czas narażenia: 13 tygodni; Dawkę: 0, 15, 20, 25, 30 g/kg mc/dzień.	Odnutowano: zmniejszenie przyrostu masy ciała oraz przyjmowania pokarmu i wody (nasilające się ze wzrostem dawki); zmniejszenie objętości i zwiększenie ciężaru właściwego moczu; niższe poziomy azotu mocznikowego, fosforu i alkalizacji oraz białka całkowitego we krwi (niezależnie od dawki); zmiana masy narządów m.in. grasicy, śledziony, mózgu, wątroby, nerek (bez zmian histopatologicznych); nagromadzenie pigmentu w krezkowych węzłach chłonnych, wraz z pogrubieniem błony śluzowej jelita ślepego i mięśni brzusznicy kąticy Wniosek: większość zmian była wynikiem zmniejszonego przyjmowania pokarmu (prawdopodobnie na skutek nieodpowiedniego smaku roztworów karmelu); zmiany morfologiczne w obrębie jelita były niespecyficznymi konsekwencjami podania dużych ilości karmelu; NOAEL=30 g/kg mc/dzień
Toksyczność przewłoka ze szczególnym uwzględnieniem działania rakotwórczego		
E150c	Szczury Fischer F-344 (obie płci); Droga doustna (z wodą); Czas narażenia: 2 lata; Dawkę: 0, 0,5 i 2 g/kg mc/dzień; Zawartość THI: <25 mg/kg;	Zabserwowano częstsze występowanie nowotworów przysadki mózgowej u samców przyjmujących najwyższą dawkę karmelu. Wniosek: Występowanie nowotworów w grupie badanej nie było znacząco wyższe niż w grupie kontrolnej (występowania nowotworów przysadki zostało przypisane częstszemu występowaniu tego typu guza u szczurów F344); NOAEL=2 g/kg mc/dzień

Tabela 2. Podstawowe badania toksyczności karmeli [wg 8, 26, 34, 60]

	Mysz B6C3F1 (obie płci); Droga: doustna (z wodą); Czas: 2 lata (narażenie: 96 tyg.; rekonwalescencja: 8 tyg.); Dawkę E150c: 0, 2, 1 i 8, 4 g/kg mc/dzień; Zawartość THF: <25 mg/kg; Zawartość pirydoksyny w diecie: nieokreślona	U samców zaobserwowano statystycznie istotne zwiększenie całkowitej liczby leukocytów, ale uznano, że mieszczą się w prawidłowym zakresie dla myszy B6C3F1; większa śmiertelność samców, przyjmujących najwyższą dawkę karmelu obserwowana od 100 tygodnia do końca badania; <u>Wnioski:</u> Brak istotnych różnic w częstości występowania nowotworów w porównaniu z grupą kontrolną
Toksyczność rozrodcza i rozwojowa		
E150c	Ciążame samice: myszy CD-1, szczury Wistar i króliki holenderskie; Droga: doustna (z użyciem zgłębnika); Czas narażenia: wybrany okres trwania ciąży (6–15 dzień ciąży – myszy i szczury; 6–18 dzień ciąży – króliki); Dawki: 0, 16, 74, 345, 1600 mg/kg mc/dzień Szczury Wistar (obie płci); Droga: doustna (z wodą); Czas narażenia: 100 dni (F0) + 100 dni (F1) Dawki: 0 i 10% roztwory. Szczury Wistar (obie płci); Droga: doustna (z paszą); Czas narażenia: 12 tygodni (pokolenie F0) Dawkę E150d (o pojedynczej i podwójnej sile barwienia), 2–15% w diecie. Zawartość 4(5)-Met: 200–850 mg/kg E150d Szczury Fischer F-344 (obie płci); Droga: doustna (z wodą); Czas narażenia: od 21 dnia przed skojarzeniem do laktacji Dawki: 8–28 g/kg mc/dzień	<u>Wnioski:</u> Liczba nieprawidłowości tkanek miękkich lub szkieletowych w grupach testowych nie różniła się od tych występujących spontanicznie w grupie kontrolnej; nie odnotowano zmian masy płodu <u>Wnioski:</u> Brak wpływu E150d na konsumpcję, wzrost i zmiany histopatologiczne oraz na liczbę żywych miotów i liczbę osobników w miocie Odnotowano: niewielki wzrost śmiertelności przy urodzeniu. <u>Wnioski:</u> brak niekorzystnego wpływu E150d na płodność samic, wielkość miotu, średnią masę ciała i wzrost młodych oraz liczbę miejsc implantacji lub proporcję płci młodych; brak zaburzeń rozwojowych Odnotowano: zmniejszenie przyrostu masy ciała w pokoleniu F0 i F1 (zależne od dawki); łysienie i gorszą kondycję młodych w ostatnich 7 dniach karmienia (częstsze przy najwyższej dawce) – uznano, że było to wynikiem braku pielęgnacji zwierząt w tym okresie; zwiększenie bezwzględnej i względnej masy wątroby, nerek i jelita ślepego (zależne od dawki); zmiany błony śluzowej dolnej części jelita i krezkowych węzłów chłonnych. <u>Wnioski:</u> nie stwierdzono zmian we wskaźnikach płodności i ciąży, a także istotnych zmian hematologicznych
Genotoksyczność i cytotoksyczność		
Sacharoza poddana karmelizacji (180°C, 90 min)	Test Ames <i>Salmonella</i> Typhimurium TA-98 * Test Ames <i>Salmonella</i> Typhimurium TA-100 * Analiza konwersji genów (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>); * Test aberracji chromosomowych (linia komórkowa CHO – komórki jajnika chomika chińskiego) Test Ames (<i>Salmonella</i> Typhimurium); Dawka: 0–20 mg/płytkę Test Ames (<i>Salmonella</i> Typhimurium); Dawka: 0–10 mg/płytkę Test aberracji chromosomowych (linia komórkowa CHO) Dawka: 0–10 mg/ml Mutacje komórkowe (<i>in vitro</i>) (linia komórkowa L5178Y – komórki chłoniaka myszy); Dawka: 0–9 mg/ml Test mikrojader (<i>in vivo</i>) (erytrocyty myszy CD-1) Dawka: 0–5000 mg/kg mc Test Ames (<i>Salmonella</i> Typhimurium);	<u>Wynik negatywny</u> Wynik pozytywny (preinkubacja z frakcją S9 zmniejszała mutagenne działanie karmelizowanej sacharozy) W testie aberracji chromosomowych (z wykorzystaniem skarmelizowanej sacharozy poddanej frakcjonowaniu na związki lotne i nielotne) stwierdzono, że nielotne składniki skarmelizowanej sacharozy wykazywały najwyższą aktywność klastogenną. <u>Wynik negatywny</u> <u>Wynik negatywny</u> <u>Wynik pozytywny</u> (znaczący wzrost uszkodzenia chromosomów jedynie przy najwyższej dawce bez aktywacji frakcją S9; brak zmian przy niższych dawkach) <u>Wynik pozytywny</u> (wzrost częstotliwości mutacji bez aktywacji wraz ze wzrostem dawki; aktywacja metaboliczna eliminowała mutację) <u>Wynik negatywny</u>

Tabela 2. Podstawowe badania toksyczności karmeli [wg 8, 26, 34, 60]

ET50c	Test aberracji chromosomowych (linia komórkowa CHO); Dawka: 0–5 mg/ml	Wynik negatywny
	Test Ames (<i>Salmonella Typhimurium</i>); Dawka: 0–20 mg/płytkę	Wynik negatywny
	Test Ames (<i>Salmonella Typhimurium</i>); Dawka: 0–50 mg/płytkę	Wynik negatywny
	Analiza konwersji genów (<i>Saccharomyes cerevisiae</i>); Dawka: 0–20 mg/płytkę	Wynik negatywny
	Test aberracji chromosomowych (linia komórkowa CHO); Dawka: 0–5 mg/ml	Wynik negatywny
	Test aberracji chromosomowych (linia komórkowa CHO); Dawka: 0–5 mg/ml	Wynik pozytywny (znaczący wzrost uszkodzeń chromosomowych bez aktywacji metabolicznej frakcją S9; zniesiony w obecności frakcji S9)
	Test mikrojader (<i>in vivo</i>) (erytrocyty myszy CD-1) Dawka: 1,05 i 3,5 mg/kg mc	Wynik negatywny
	Test Ames (<i>Salmonella Typhimurium</i>); Dawka: 0–10 mg/płytkę	Wynik negatywny
	Test Ames (<i>Salmonella Typhimurium</i>); Dawka: 0–50 mg/płytkę	Wynik negatywny
	Analiza konwersji genów (<i>Saccharomyes cerevisiae</i>); Dawka: 0–20 mg/płytkę	Wynik negatywny
ET50d	Test aberracji chromosomowych (linia komórkowa CHO); Dawka: 0–5 mg/ml	Wynik negatywny (bez aktywacji metabolicznej frakcją S9)
	Test u <i>Drosophila melanogaster</i> Dawka: 0, 0,03, 0,125 i 0,25 mg/ml	Wynik negatywny
	Test fragmentacji DNA, Test kometowy (linia komórkowa HL-60 – komórki białaczki ludzkiej) Dawka: 0, 0,03, 0,125 i 0,25 mg/ml	Wynik negatywny
	Test modulacji epigenetycznej – status metylacji regionów: LINE-1, Alu-M4, Sat-α (linia komórkowa HL-60). Dawka: 0,12 i 4 mg/ml	Wynik pozytywny (hipometylacja przy dawce 4 mg/ml – może mieć znaczenie w kancerogenezie, w zależności od regionu, którego dotyczy – autorzy podkreślają potrzebę przeprowadzenia dalszych badań)
	APTT – czas kaolinowo-kefalinowy (activated partial thromboplastin time).	

Badania karmelu amoniakalnego przeprowadzono na szczurach, którym podawano 10 i 20% roztwory tego barwnika przez 100 dni. Analiza kału zwierząt wykazała, że około 1/3 składników barwiących karmelu zostaje zaabsorbowana w organizmie, jednak w badaniu nie sprawdzano losów składników bezbarwnych.

Toksykokinetyka karmelu amoniakalno-siarczynowego została lepiej scharakteryzowana. Selim i wsp. [50] oceniali wchłanianie, dystrybucję i wydalanie barwnej frakcji karmelu klasy IV o dużej masie cząsteczkowej (high molecular weight colour fraction, HMCF), zawierającej glukozę znakowaną radioizotopem C14 (14C-HMCF). Dokładny skład frakcji HMCF nie został scharakteryzowany. Doświadczenie wykonywano na samcach szczurów F-344, po doustnym podaniu 14C-HMCF (2,5 g/kg mc.), w pojedynczych lub wielokrotnych dawkach. W obu schematach dawkowania zdecydowana większość (~90%) radioizotopów była wydalaona z kałem w ciągu pierwszych 24 h, a po 96 h wydalaone było już ponad 99% 14C-HMCF. Niewielkie ilości 14C-HMCF były usunięte z moczem oraz z wydychanym powietrzem. Mniej niż 0,5% podanej dawki pozostało w organizmie do 4 dnia. W sekcji szczurów wykazano, że większość obecnych w organizmie radioizotopów znajdowała się w przewodzie pokarmowym. Niski poziom radioaktywności stwierdzono także we krwi i pozostałych tkankach, przy czym stężenie radioizotopów w grasicy, kręzkowych węzłach chłonnych, śledzionie, nerkach i wątrobie było wyższe niż we krwi. Ponadto dystrybucja 14C-HMCF do kręzkowych węzłów chłonnych była powiązana z ich pigmentacją. Nie zaobserwowano większych różnic we wchłanianiu, dystrybucji czy wydalaniu, między pojedynczym i wielokrotnym doustnym schematem dawkowania.

Obecnie zwraca się szczególną uwagę na brak badań toksykokinetycznych karmeli, zwłaszcza ich frakcji niskocząsteczkowej (LMW). W opinii EFSA składniki frakcji LMW barwników karmelowych prawdopodobnie są wchłaniane ze światła przewodu pokarmowego, chociaż dostępnych jest niewiele informacji potwierdzających to założenie [8, 50].

TOKSYCZNOŚĆ POSZCZEGÓLNYCH KLAS KARMELI - PRZEGLĄD BADAŃ I DONIESIEŃ

Bezpieczeństwo barwników karmelowych po raz pierwszy zakwestionowano po opublikowaniu badań wskazujących na obecność w karmelu amoniakalnym i amoniakalno-siarczynowym 4(5)-MeI o działaniu neurotoksycznym. Następnie, w latach 70 ub.w., pojawiły się doniesienia wskazujące na potencjalną immunotoksyczność THI – związku powstającego podczas otrzymywania karmelu amoniakalnego. W latach 80 ub.w. JECFA ustalił dopuszczalne stężenie: 4(5)-MeI, dla karmeli klasy III i IV oraz THI dla klasy III [60].

Jednocześnie prowadzono badania nad toksycznością ostrą i przewlekłą tych dodatków. Doustne testy toksyczności ostrej wykonano w ograniczonym zakresie. Nie ustalono medialnej dawki śmiertelnej (lethal dose 50%, LD50) dla barwników karmelowych, a pojedyncze badania przeprowadzone na karmelu klasy III pozwoliły jedynie na

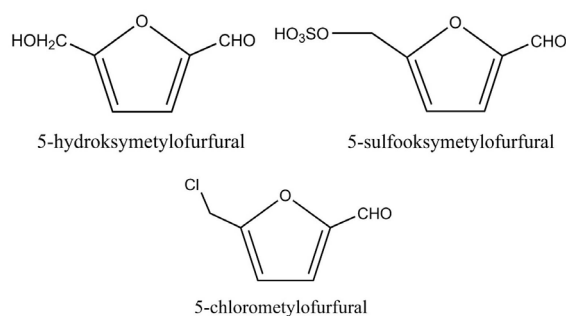
oszacowanie LD50. Stwierdzono, że wartość ta znacznie przekracza 17500 mg/kg mc i nie ma potrzeby wykonywania dalszych testów toksyczności ostrej. Wyniki badań podprzewlekłych i przewlekłych również wykazały małą toksyczność wszystkich klas karmeli, a także pozwoliły określić wartość NOAEL, czyli stężenie substancji, dla którego nie stwierdza się działania niepożądanego (No-Observed-Adverse-Effect Level, NOAEL). NOAEL dla wszystkich barwników karmelowych ustalono na poziomie 30 g/kg mc/dzień (najwyższa testowana dawka) i wartość ta stała się podstawą do wyznaczenia ADI. Początkowo w Europie wartość ADI dla całej grupy karmeli mieściła się w granicach 0-300 mg/kg mc/dzień, jednak potwierdzona immunotoksyczność THI, spowodowała obniżenie przez EFSA, ADI dla karmelu klasy III (tabela 1).

Dalsze badania nie potwierdziły również działania genotoksycznego, ani toksyczności rozrodczej czy reprodukcyjnej karmeli, w dawkach nieprzekraczających ADI. Zestawienie badań toksyczności karmeli przedstawiono w tabeli 2 [8, 26, 34, 60].

TOKSYCZNOŚĆ WYBRANYCH ZWIĄZKÓW WYSTĘPUJĄCYCH W KARMELACH

5-HMF

5-HMF to związek O-heterocykliczny, pochodna furanu (ryc. 1). Powstaje w czasie termicznej obróbki węglowodanów, zarówno podczas karmelizacji, jak i w reakcji Mailarda (reakcja amino-karbonylowa). Reakcja tworzenia 5-HMF przebiega głównie przez 1,2- lub 2,3-enolizację cukru i β -eliminację wody, z wytworzeniem 1-, 3- i 4-heksuloz. Wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja i dalsze odwodnienie powodują powstanie wielu różnorodnych związków O-heterocyklicznych typu furan i piran z przewagą HMF, HDF i HAF (hydroksyacetylofuran). 5-HMF może wchodzić w następne reakcje, stanowiąc prekursor w tworzeniu innych związków, np. 5-sulfooksymetylofurfuralu (5-sulphooxymethylfurfural, SMF) i 5-chlorometylofurfuralu (5-chloromethylfurfural, CMF) (ryc. 1). 5-HMF jest również jednym z produktów rozkładu kwasu askorbinowego [28, 58].



Ryc. 1. Wzory chemiczne HMF (5-hydroksymetylofurfural), SMF (5-sulfooksymetylofurfural) i CMF (5-chlorometylofurfural) [opracowanie własne z użyciem Chem Draw Professional 16.0, wg 31]

W świeżej, niepoddanej obróbce żywności, 5-HMF jest nieobecny; jego stężenie zwiększa się podczas podgrzewania, dlatego jest użytecznym narzędziem do oceny uszkodzeń termicznych w produktach spożywczych. Jest to również uznany parametr świeżości i jakości żywności – kontrola analityczna 5-HMF została wykorzystana w nadzorze nad żywnością, zarówno do oceny jakości metody przetwarzania, jak i właściwości organoleptycznych produktu końcowego. Kodeks Żywnościowy (Codex Alimentarius, CA) i Unia Europejska ustaliły maksymalny poziom zawartości 5-HMF m.in. w miodzie (<40 mg/kg) i w soku jabłkowym (<50 mg/l), gdzie jest przede wszystkim wskaźnikiem intensywności obróbki cieplnej. Nadal brakuje jednak określenia dopuszczalnego stężenia 5-HMF dla barwników karmelowych [8, 58, 60].

Badania z 1992 r. wykazały obecność 5-HMF we wszystkich klasach karmeli w stężeniu 700–33700 mg/kg, przy czym jego koncentracja była najniższa w karmelu amoniakalnym (tabela 1). Późniejsze analizy karmeli klasy III i IV, wykonane przez ekspertów EFSA wykazały, że zawartość 5-HMF w karmelu amoniakalnym mieściła się w zakresie 5–140 mg/kg, a w karmelu amoniakalno-siarczynowym koncentracja 5-HMF zależała od mocy barwienia – dla pojedynczej mocy barwienia wynosiła 48–183 mg/kg, dla podwójnej: 22,7–147 mg/kg [8, 60].

Co się dzieje z HMF w organizmie nadal jeszcze dokładnie nie poznano; jest tylko kilka raportów dotyczących absorpcji, transportu i szlaków metabolicznych HMF. W 2008 r. oceniono transport HMF za pomocą modelu jelita ludzkiego *in vitro*. Wartość stężenia HMF w komórkach jelita Caco-2 była dodatnio skorelowana z zawartością HMF w pożywce. Badania myszy i szczurów również wykazały, że 5-HMF szybko wchłania się w przewodzie pokarmowym, skąd trafia przede wszystkim do wątroby, nerek i pęcherza moczowego [27]. Zhou i wsp. wykazali, że HMF wiąże się z ludzkimi albuminami osocza (human serum albumin, HSA) w subdomenie IIA, głównie za pomocą wiązań wodorowych i sił van der Waalsa. Stwierdzono również, że obecność niektórych składników pokarmowych, takich jak: kwas askorbinowy, chlorogenowy, czy floretyna, mogą osłabiać wiązanie 5-HMF z HSA [64]. Wydalanie HMF odbywa się głównie z moczem – w zależności od badania 60–80% lub 95–100% podanej dawki tego związku, było wydane odpowiednio w ciągu 48 h i 24 h. Dokładnie produkty przemian ustrojowych HMF jeszcze nie zostały poznane, ale przeprowadzone badania wskazują na występowanie pewnych różnic gatunkowych. U szczurów HMF jest wydany głównie jako kwas 5-hydroksymetylo-2-furoinowy (5-hydroxymethyl-2-furoic acid, HMFA) i jego koniugat z glicyną – N-(5-hydroksymetylo-2-furoilo)-glicyna (N-(5-hydroxymethyl-2-furoyl)-glycine, HMFG). Wskazuje to na istotne znaczenie w biotransformacji HMF reakcji utleniania (I faza biotransformacji) i sprzężenia z glicyną (II faza biotransformacji) [27]. Natomiast pierwsze obserwacje u ludzi wykazały, że HMF jest prawie w 50% przekształcany do HMFA i kwasu furano-2,5-dikarboksylowego (furan-2,5-dicarboxylic acid, FDCA), które są wydane z moczem, ale tylko w 38 lub 74%, w zależności od dawki.

Pozostała część HMF prawdopodobnie jest zatrzymywana w organizmie, w postaci związanej z grupami tiolowymi i aminowymi białek. Warto wspomnieć, że Jellum i wsp. nie stwierdzili obecności HMFG w moczu, co mogło być spowodowane zastosowaną metodą analityczną, uniemożliwiającą wyizolowanie tego związku lub też zmniejszoną dostępnością wolnej glicyny w organizmie [23]. Późniejsze badania wykazały bowiem funkcjonowanie alternatywnego szlaku przemian HMF – przy braku glicyny nasila się wydalanie HMF w postaci wolnego kwasu 2-furoinowego (2-furoic acid, FA) lub FDCA. W 2006 r. potwierdzono, że głównym metabolitem HMF jest HMFA, ale oprócz niego w moczu oraz w osoczu zidentyfikowano obecność: HMFG, (5-karboksylo-2-furoilo)-glicyny ((5-carboxylic acid-2-furoyl)-glycine, CAFG) i 5-hydroksymetylo-2-furoilo-aminometanu (5-hydroxymethyl-2-furoyl-aminomethane, CAFAM). Nie uzyskano natomiast dowodów na powstawanie FDCA. Naukowcy zwracają również uwagę, na możliwy udział w metabolizmie HMF, mikroflory jelitowej, która prawdopodobnie przekształca go do 2,5-bis(hydroksymetylo)-furanu (2,5-bis(hydroxymethyl)-furan, BHMF) [27].

Toksyczne działanie HMF nie zostało jeszcze dokładnie określone. Badania przeprowadzone w latach 60. i 70. XX w. wskazywały na niewielką toksyczność ostrą i podprzewlekłą HMF u myszy i szczurów [1]. Stwierdzono wówczas, że w wysokich stężeniach – nieistotnych w żywieniu – HMF może być cytotoksyczny oraz może podrażniać oczy, górne drogi oddechowe, skórę i błonę śluzową [38]. Jednak budowa chemiczna HMF (w tym obecność pierścienia furanowego, α,β -nienasyconej grupy karbonylowej oraz allilowej grupy hydroksylowej) wskazuje na możliwe działanie genotoksyczne i rakotwórcze tego związku. Zhang i wsp. wykazali, że HMF inicjuje i promuje zmiany przednowotworowe (nieprawidłowości w kryptach jelitowych) w okolicy szczura [64]. Dowodem na potencjalne działanie rakotwórcze HMF były również badania wskazujące na możliwość inicjowania zmian nowotworowych w naskórku myszy. Niejednoznaczne wyniki uzyskano w 2-letnich badaniach, związanych z narażeniem doustnym na HMF u szczurów Fischer 344N i myszy B6C3F1, prowadzonych w ramach Krajowego Programu Toksykologicznego (National Toxicology Program, NTP) Amerykańskiego Departamentu Zdrowia [40]. U szczurów obu płci oraz u samców myszy, HMF nie miał działania rakotwórczego, ale wpływał na występowanie zmian patologicznych w nabłonku węchowym i oddechowym jamy nosowej. Natomiast u samic myszy narażonych na HMF zaobserwowano częstsze występowanie raka wątrobowokomórkowego, wynoszące około 53% dla dawek: 134 i 268 mg/kg mc/dzień (dla porównania 28% w grupie kontrolnej). Trzecia grupa dawkowania – 750 mg/kg mc, nie została uwzględniona w ocenie potencjału rakotwórczego, ze względu na zmniejszoną przeżywalność oraz występowanie objawów klinicznych związanych z leczeniem. W oparciu o uzyskane wyniki, szacuje się, że dzienne narażenie na HMF nie powinno przekraczać 60–300 mg/kg mc, ale ze względu na brak dokładniejszych analiz, trudno określić dopuszczalną dawkę. Według wcześniejszych doniesień, dzienne spożycie HMF z pożywieniem waha się w granicach 30–150 mg/osobę, co odpowiada 0,4–2,1 mg/kg

mc dla osoby o masie 70 kg [1, 40]. ESFA w opinii poświęconej karmelom nie uznaje wyników badań NTP uzyskanych w badaniach na myszach, istotnych dla oceny ryzyka działania kancerogennego HMF u ludzi, głównie ze względu na brak analogicznych objawów u szczurów [8].

Toksyczność HMF może wynikać nie tylko z jego działania bezpośredniego, ale również z działania związków, do których jest metabolizowany. Wykazano, że w cytozolu komórek wątrobowych szczurów, związek ten może ulec aktywacji do elektrofilowego estru kwasu siarkowego – 5-sulfooksymetylofurfuralu (ryc. 1). Aktywacja jest możliwa jedynie w obecności 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarczanu (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulphate, PAPS), dawcy grupy sulfonowej oraz pod wpływem sulfotransferaz (sulphotransferase, SULT) [1]. Cytozolowe sulfotransferazy są jednymi z ważniejszych enzymów uczestniczących w II fazie biotransformacji, których celem jest ułatwienie eliminacji ksenobiotyków, chociaż w niektórych związkach, np. HMF, sulfonowanie przyczynia się do ich bioaktywacji. SULT w postaci wielu izoform występują powszechnie w organizmach żywych, w tym również u człowieka, m.in. w: wątrobie, płucach, mózgu, skórze, płytkach krwi, nerkach i przewodzie pokarmowym [54]. Powstały na skutek sulfonowania SMF jest wysoce elektrofilową postacią chemiczną, która może wchodzić w interakcje z DNA, tworząc różne addukty, przez co wykazuje działanie mutagenne bez aktywacji metabolicznej [31, 35]. Warto podkreślić, że wytwarzanie SMF u ludzi wiąże się z podwyższonym ryzykiem działania toksycznego, ze względu na swoistość substratową i dystrybucję tkankową SULT. Wykazano, że sulfonowanie HMF jest najczęściej katalizowane przez ludzką SULT1A1, która ulega silnej ekspresji w wątrobie i wielu tkankach pozawątrobowych. Natomiast u gryzoni, które najczęściej są obiektem doświadczalnym, sulfonowanie przebiega mniej intensywnie a stężenie sulfotransferazy jest znacznie niższe, zwłaszcza poza wątrobą [35].

Powstawanie SMF z HMF w organizmach żywych zbadano w 2009 r. na myszach. Maksymalne stężenie SMF w osoczu myszy zaobserwowano w pierwszej próbce, pobranej po 2,5 min od podania HMF. Na podstawie danych kinetycznych oszacowano, że 452-551 mg/kg początkowej dawki HMF, wynoszącej 500 mg/kg, ulegało przekształceniu do SMF. W opinii autorów rzeczywiste stężenie SMF w osoczu mogło być jeszcze wyższe, ponieważ związek ten prawdopodobnie reagował z białkami i DNA już w miejscu powstawania [35].

Toksyczne działanie SMF również poddano badaniom. Mutagenność SMF potwierdzono w teście Ames z użyciem *Salmonella Typhimurium* szczep TM677, a także w stosunku do ludzkich limfoblastów, w zależności od dawki [27]. Natomiast badania na myszach *in vivo* dowiodły, że SMF stosowany miejscowo na skórę, ma dużą aktywność pronowotworową, większą niż HMF [55]. Bauer-Marino i wsp. podawali SMF dootrzewnowo myszom FVB/N, w dawkach 0, 31,25, 62,5, 125 i 250 mg/kg mc, z uwzględnieniem różnych systemów dawkowania (1, 2 lub 4 dawki). Stwierdzono, że głównym celem toksycznego działania SMF były kanaliki proksymalne, których uszkodzenia były

największe przy najwyższej dawce. Ponadto SMF działał hepatotoksycznie i powodował zapalenie błon surowiczych otrzewnej. W drugiej części badania autorzy podawali HMF myszom w wodzie pitnej (0, 134 i 536 mg/kg mc/dzień) przez 12 tygodni. Wykorzystano typowy szczep FVB/N myszy, a także szczep FVB/N-hSULT1A1/2, zawierający wiele kopii genu *hSULT1A1* – głównej sulfotransferazy u ludzi. Zaobserwowano uszkodzenia nefronów i zwiększoną proliferację hepatocytów, ale tylko w najwyższej dawce HMF. Wszystkie zmiany były łagodne i co istotne, nie były skorelowane z ekspresją genu *hSULT1A1*. Autorzy stwierdzili, że SMF w czystej postaci wykazuje działanie nefrotoksyczne, ale jego ilość powstająca z HMF w organizmie nie jest wystarczająca do wywołania podobnego efektu [1]. Możliwe działanie SMF, po biotransformacji HMF, zostało również sprawdzone przez NTP [40]. W badaniu, roztworem HMF traktowano komórki HepG2, zdolne do ekspresji zarówno cytochromu P450 (CYP), jak i SULT. W teście kometowym widoczne były pewne oznaki uszkodzenia DNA, ale bez zmiany struktury i liczby chromosomów [40]. W 2009 r. określano działanie genotoksyczne HMF w teście kometowym, kilku linii komórkowych o różnym poziomie ekspresji SULT1A1. Wykazano, że HMF jest czynnikiem uszkadzającym DNA *in vitro*, niezależnie od aktywności SULT1A1 w badanych komórkach. Indukowane przez HMF uszkodzenie DNA obserwowano tylko przy wysokich stężeniach, co zwykle wiązało się z jednoczesnym spadkiem żywotności komórek [4].

HMF może również ulegać przemianom w obecności jonów chlorkowych, z wytworzeniem 5-chlorometylofurfuralu (CMF) (ryc. 1). Związek ten wykazuje silniejsze działanie mutagenne i cytotoksyczne na komórki bakteryjne (*S. Typhimurium* TM677) niż HMF i SMF. Ponadto dodatek glutationu do hodowli bakteryjnej nie chroni komórek przed toksycznością CMF. Wykazano również, że chlorometylowe pochodne HMF mają dużą aktywność kancerogenną – u myszy H6C3F, CMF indukował rozwój zmian nowotworowych w obrębie skóry (stosowany miejscowo) i w wątrobie (stosowany doustnie). Jednoczesne stosowanie SMF i CMF może nasilać ich działanie toksyczne [56].

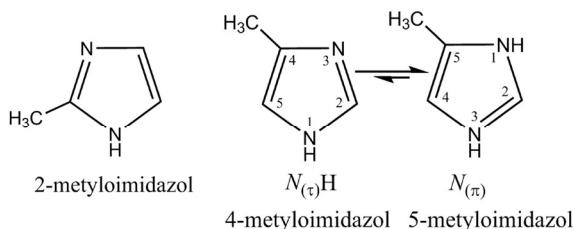
5-HMF, oprócz nie do końca poznanych mechanizmów toksyczności, ma kilka zalet. Coraz częściej zgłaszane są jego właściwości przeciwutleniające i trwają badania nad stosowaniem tej substancji jako naturalnego przeciwutleniacza. Ponadto wykazano zdolność 5-HMF do regulacji procesów alergicznych, a także jego działanie przeciwnadciśnieniowe. W Afryce trwają badania kliniczne związane z możliwością wykorzystania HMF w leczeniu anemii sierpowatej. Sugeruje się również możliwość stosowania HMF w leczeniu chorych z cukrzycą, ze względu na jego ochronę śródbłonna naczyń przed stresem oksydacyjnym, wywołanym podwyższonym stężeniem glukozy. Zaobserwowano także korzystne działanie metabolitów HMF, np. HMFA hamuje mitozę w komórkach rakowych i dlatego rozpatruje się możliwość wykorzystania tego związku w terapii nowotworowej [27].

Obecnie dostępnych jest wiele możliwości pozwalających na obniżenie poziomu 5-HMF w żywności, tj. zastosowanie

promieniowania UV (redukcja o 62%) i mikrofal (redukcja o 40%), dodawanie związków fenolowych (redukcja o 50-86%), fermentacja (redukcja o 61-99%), pakowanie próżniowe (redukcja o 20-50%), homogenizacja ultrawysokociśnieniowa (redukcja o 84-99%) czy zastępowanie glukozy sacharozą (redukcja o 75-88%) [29].

4(5)-MeI

4(5)-MeI to metylowa pochodna imidazolu, dobrze rozpuszczalna w wodzie i etanolu, o masie cząsteczkowej 82,1 Da. Istnieją trzy izomery metyloimidazolu: 2-, 4- lub 5-metyloimidazol (ryc. 2). Spośród nich 4- i 5-MeI występują jako tautomery w roztworze wodnym o pH od obojętnego do zasadowego. Tautomery różnią się między sobą pozycją protonowania. 4-metyloimidazol to bardziej stabilny, $N\tau$ -protonowany tautomer ($N\tau$ -H), a 5-metyloimidazol to $N\pi$ -protonowany tautomer ($N\pi$). Zawartość tautomeru 4- i 5-MeI w roztworze wodnym wynosi odpowiednio około 57 i 43%. W obu postaciach grupa metylowa pozostaje w tym samym miejscu, w pierścieniu imidazolowym, ale zmienia się numer atomu węgla (z 4 na 5) z powodu transferu protonu. Obecnie nazwę chemiczną 4-MeI często zastępuje się określeniem 4(5)-MeI [15]. Natomiast 2-MeI nie został wykryty w komercyjnych barwnikach karmelowych oraz w produktach spożywczych z ich dodatkiem, dlatego nie zostanie ujęty w artykule [60].



Ryc. 2. Wzory chemiczne izomerów metyloimidazolu [opracowanie własne z użyciem Chem Draw Professional 16.0, wg 15]

Alkiloimidazole (w tym 4(5)-MeI) po raz pierwszy zsyntetyzowano w połowie XIX w., w reakcji związków α -dikarbonylowych (metylogliksalu lub metylogliksalu-dimetyloacetalu z formaldehydem) w obecności wodnego roztworu soli amonowych, nazywanej później reakcją Debuse-Radziszewskiego [15, 20, 63]. Inną reakcją wykorzystywaną w chemicznej syntezie 4(5)-MeI, może być katalityczna cyklizacja propylen-1,2-diaminy i kwasu mrówkowego z wytworzeniem 4-metyloimidazolinylu, z której następnie usuwa się wodór [13]. Mimo wielu doniesień naukowych na temat powstawania 4(5)-MeI dokładny mechanizm tej reakcji w dalszym ciągu nie jest znany [15, 60].

Ugrupowanie imidazolowe odgrywa istotną rolę w systemach biologicznych. Pierścień imidazolowy, charakterystyczny dla 4(5)-MeI, występuje w histydynie oraz w zawierających ją białkach i enzymach. 4(5)-MeI może być również obecny w wielu produktach, takich jak: leki, barwniki, środki chemiczne wykorzystywane w rolnictwie,

chemikalia fotograficzne czy kauczuk. Ponadto badano jego zastosowanie jako surowca w syntezie stymulatorów układu sercowo-naczyniowego, środków obniżających stężenie cholesterolu, antagonistów neuroprzekazników, środków przeciwpierwotniakowych i inhibitorów aromatazy. Odnotowano także uwalnianie 4(5)-metyloimidazolu do środowiska podczas jego produkcji i stosowania. Narażenie na 4(5)-MeI może być również spowodowane paleniem papierosów, wykryto go w dymie tytoniowym w zakresie od 2,3 (niska zawartość substancji smolistych w papierosie) do 15,0 (papierosy niefiltrowane) $\mu\text{g}/\text{papieros}$. Jednak szczególne znaczenie ma obecność tego związku w produktach spożywczych. Źródłem metyloimidazoli w żywności i napojach jest reakcja Maillarda, która może przebiegać bezpośrednio w produkcji, podczas jego obróbki termicznej lub poza żywnością, np. w czasie produkcji barwników karmelowych klasy III i IV [19, 24, 36].

Ilość 4(5)-MeI powstająca w produktach, może być różnicowana. W wielu badaniach sprawdzano przebieg tego procesu z wykorzystaniem układu modelowego charakterystycznego dla reakcji Maillarda. Stwierdzono, że ilość powstającego 4(5)-MeI zależy od rodzaju cukru stanowiącego substrat dla reakcji – ogrzewanie L-ramnozy i amoniaku ($T = 100^\circ\text{C}$, $t = 2\text{ h}$) spowodowało wytworzenie większych ilości 4(5)-MeI (0,91 mg/ml), niż w przypadku ogrzewania ($T = 100^\circ\text{C}$, $t = 6\text{ h}$) D-glukozy z amoniakiem (0,70 mg/ml) [15]. Wykazano również, że istotną rolę w tworzeniu metyloimidazoli odgrywają sole kwasu siarkowego (IV). W układzie reakcyjnym D-glukoza/amoniak, dodatek siarczynu w stężeniu 0,1M był związany ze wzrostem stężenia 4(5)-MeI o 54%, podczas gdy największą redukcję w syntezie tego związku (o 68%) odnotowano przy stężeniu siarczynu wynoszącym 0,2 M [30]. Przeprowadzono także badanie, w którym w zastępstwie amoniaku stosowano mieszaninę aminokwasów (L-alanina, L-arginina, glicyna, L-lizyna, L-seryna). Wykazano, że wytwarzanie 4(5)-MeI zależy od rodzaju aminokwasu (w obecności L-argininy powstawało najwięcej 4(5)-MeI) oraz od stężenia reagentów (w najwyższym badanym stężeniu D-glukozy-aminokwasu – 0,15 M, powstawało więcej 4(5)-MeI). Ponadto istotne znaczenie w tworzeniu metyloimidazoli, miała temperatura procesu – w $T = 60^\circ\text{C}$ nie stwierdzono obecności 4(5)-MeI, podczas gdy w $T = 160^\circ\text{C}$ odnotowano istotny wzrost jego stężenia (0,15–1,0 mg/kg) [24].

Przeprowadzone badania potwierdziły obecność 4(5)-MeI w barwnikach karmelowych klasy III i IV, przy czym karmel klasy IV (0–1276 ppm), w większości analiz, charakteryzował się większą zawartością tego związku, niż karmel klasy III (0,025–463 ppm). W karmelach klasy I i II alkiloimidazole nie występują ze względu na brak źródła azotu dla reakcji (tabela 1). Duże stężenia 4(5)-metyloimidazolu odnotowywano również w produktach zawierających barwniki karmelowe, takich jak: napoje gazowane, zwłaszcza typu cola (0–692 ppm), ciemne piwa (0–424 ppm), sos Worcestershire (0,027–3,4 ppm), sos sojowy (0,002–4,8 ppm), whiskey (0,12–0,14 ppm), czy napoje energetyczne (0–37 ppm) [15]. Obecność 4(5)-MeI w tych produktach była bezpośrednio związana z obecnością dodatków karmelowych.

Potwierdzeniem tego mogą być badania przeprowadzone przez Yamaguchi i Masuda, którzy zaobserwowali, że w naturalnie warzonym sosie sojowym koncentracja 4(5)-MeI była bardzo niska, 0,002–0,023 µg/g, podczas gdy w sosie sojowym z dodatkiem karmelu amoniakalno-siarczynowego odnotowano znacznie wyższe stężenie tego związku (na poziomie 0,43–4,8 µg/g) [62]. Druga grupa produktów spożywczych, w której stwierdza się obecność metyloimidazoli, to produkty poddane obróbce termicznej. W tym przypadku odnotowane stężenia 4(5)-MeI były znacznie niższe i mieściły się w granicach: od <0,01 ppm dla gotowanych warzyw, prażonych orzechów, chleba, grillowanych ryb, czy soków owocowych, przez 0,22–0,29 ppm w przypadku grillowanego mięsa i kakao, do 2,05 ppm dla palonej kawy [11, 15].

Stężenie 4(5)-MeI w barwnikach karmelowych podlega pewnym regulacjom prawnym. Komisja Europejska oraz JECFA ustaliły limit zawartości 4(5)-MeI do 200 mg/kg dla karmelu klasy III oraz 250 mg/kg dla karmelu klasy IV (tabela 1) [22, 47]. Natomiast w przepisach amerykańskiego prawa krajowego nie ma zapisów dotyczących dopuszczalnego stężenia 4(5)-MeI w karmelach. Są jedynie rekomendacje United States Pharmacopeial Convention (USP) z 2016 r., ale nie są przestrzegane. W opinii USP zawartość 4(5)-MeI w karmelach klasy III i IV nie powinna przekraczać 250 mg/kg (indywidualnie) [11].

Metabolizm 4(5)-MeI był poddawany wielu badaniom, które wykazały występowanie pewnych różnic gatunkowych. U szczurów związek był wydalany w postaci niezmienionej z moczem po około 30 min od wstrzyknięcia (pojedyncza dawka=216 mg/kg mc), a w ciągu 8 h usunięciu ulegało prawie 90% dawki początkowej. Największy wychwyt 4(5)-MeI zaobserwowano głównie w jelitach, a następnie w wątrobie, krwi, żołądku i nerkach. U owiec połowa podanej oralnie dawki była wchłaniana poniżej 30 min, a maksymalne stężenie 4(5)-MeI w osoczu osiągnęto w ciągu 5 h po podaniu. Biodostępność 4(5)-MeI wynosiła 68%, a jego okres biologicznego półtrwania około 9 h 30 min. Tylko 0,07 mg/kg, z początkowej dawki wynoszącej 20 mg/kg, było wydalone z moczem, jako niezmieniony związek macierzysty. Próba wykrycia metabolitów 4-MeI nie powiodła się. U innych zwierząt (np. kóz) 4(5)-MeI był dystrybuowany głównie do wątroby, nerek i płuc, natomiast jego wydalenie odbywało się przede wszystkim z moczem, a w mniejszym stopniu z mlekiem i kałem. W badaniu u samców szczurów Fischer F344, 4(5)-MeI podawany zgłębnikiem do żołądka, osiągał maksymalne stężenie w osoczu po 0,5, 1 i 3 h, odpowiednio dla dawek wynoszących: 5, 50 i 150 mg/kg mc. Biodostępność związku wynosiła 60–70%, a jego okres półtrwania zależał od dawki początkowej. Związek prawdopodobnie podlegał niewielkim przemianom w organizmie, ponieważ w moczu oraz w osoczu stwierdzono obecność jednego hydrofilowego metabolitu. Po 48 h główną drogą wydalania 4(5)-MeI był układ moczowy (85%), ale wykazano również znikome ilości tego związku w kale (3%) i w wydychanym powietrzu (0,6% jako CO₂, 0,04% jako lotne związki organiczne). Fennell i wsp. porównali metabolizm 4(5)-MeI u myszy i szczurów *in vivo*. Po doustnym podaniu związku w dawkach 50 i 150 mg/kg

mc, stwierdzono, że po 48 h eliminacja odbywała się głównie z moczem, w 79–89% u szczurów i w 41–70% u myszy. U obu gatunków zwierząt związek przeważnie (71–88%) był usuwany w niezmienionej postaci [9, 19].

Metabolity 4(5)-MeI nadal nie są jeszcze dokładnie poznane i scharakteryzowane. Większość przeprowadzonych analiz wykazała, że przemiany tego związku w organizmach żywych są bardzo ograniczone. W 1993 r. zidentyfikowano w moczu kóz i jałówek trzy metabolity 4(5)-MeI: 5-metylohydantoinę, kwas 2-metylohydantoinowy i mocznik [19]. Odnotowano jeszcze obecność czwartego związku, ale jego wysoka polarność uniemożliwiła dalszą charakterystykę. W 2008 r. w oparciu o przemiany innych 5-członowych związków heterocyklicznych, zaproponowano metabolizm 4(5)-metyloimidazolu do potencjalnie reaktywnego związku epoksydowego [3]. Nie zostało to jednak potwierdzone w przeprowadzonych badaniach. W 2019 r. Fennell i wsp. wykazali, że 4(5)-MeI jest metabolizowany do glukuronidów oraz innych utlenionych związków, w tym do metylohydantoiny [9, 19].

Dokładny mechanizm działania 4(5)-MeI pozostaje nieznan, ale wykazano, że związek ten może wpływać na funkcjonowanie komórek przez tworzenie kompleksów z enzymami zawierającymi hem, np. z cytochromem P450 (CYP). Udowodniono, że 4(5)-MeI w istotny sposób hamuje aktywność izoformy CYP2E1 w wątrobie szczura oraz CYP2C9 (hydroksylaza tolbutamidowa) w mikrosomach u ludzi i szczurów. Jednocześnie stymuluje fosforylację Na⁺ i K⁺-trifosfatazy adenosynowej oraz wykazuje znaczącą aktywność przeciwutleniającą [19].

Wyniki badań toksyczności ostrej 4(5)-MeI są zróżnicowane. Nishie i wsp. ustalili wartość LD₅₀ dla 4(5)-MeI, po podaniu doustnym, na poziomie 370 mg/kg mc dla myszy oraz 599 mg/kg mc dla kurcząt. W dawkach zbliżonych do LD₅₀ głównym objawem narażenia zwierząt na ten związek były silne drgawki [7]. Natomiast późniejsze badania, przeprowadzone przez NTP, wykazały, że stosowanie wysokich dawek 4(5)-MeI (300 i 800 mg/kg mc) w przypadku szczurów i myszy nie tylko nie powoduje śmierci zwierząt, ale nie odnotowano nawet różnic w masie ciała i narządów oraz w wynikach badań klinicznych w porównaniu z grupą kontrolną. Dla szczurów istotne zmiany zaobserwowano dopiero przy narażeniu na dawkę 2500 mg/kg mc – znaczny spadek masy ciała, zwiększenie masy wątroby i spadek masy śledziony, a przy dawkach 5000 i 10000 mg/kg mc widoczne były jeszcze zmiany w wyglądzie zwierząt, problemy z oddychaniem, łagodne drżenie, zaburzona koordynacja ruchowa, ataksja czy zwężenie źrenic. Ponadto 4(5)-MeI w dwóch najwyższych dawkach, indukował przejściową erytrocytozę i minimalną, zależną od stężenia, niedokrwistość mikrocytarną (u szczurów obu płci), a u samców szczurów widoczny był znaczny spadek stężenia albumin (w 14 tygodniu) oraz zwyrodnienie jąder. U myszy narażenie na 4(5)-MeI było związane z występowaniem niedokrwistości makrocytarnej, a w przypadku samców – ze wzrostem stężenia trójiodotyroniny i z przejściowym spadkiem stężenia tyroksyny (brak zmian

w tarczycy). Przy dawce ≥ 2500 mg/kg mc u samic myszy nastąpił znaczny spadek bezwzględnej masy ciała i wzrost względnej masy serca, prawej nerki i wątroby [39].

Badania wykazały możliwe działanie neurotoksyczne 4(5)-MeI. Sivertsen i wsp. stwierdzili w testach *in vitro*, że 4(5)-metyloimidazol w stężeniu 2-20 mM znacząco hamuje aktywność mózgowej dekarboksylazy glutaminianowej (glutamate decarboxylase, GAD), ale słabiej niż inna postać izomerowa metyloimidazolu – 2-MeI. 5-20 mM 4(5)-MeI hamował kompetycyjnie wiązanie kwasu γ -aminomasłowego (gamma-aminobutyric acid, GABA) do mózgowych receptorów GABA, bez wpływu na poziom glutamianu i GABA [52].

Opublikowano również badania nad możliwym wpływem 4(5)-metyloimidazolu na homeostazę glukozy. Zaobserwowano, że u myszy otrzymujących 4(5)-MeI w dawce 32 $\mu\text{g/kg mc/dzień}$, występowała ciężka hipoglikemia i hiperinsulinemia. Stwierdzono również rozrost komórek beta-trzustki, indukcję zaburzeń homeostazy glukozy i lipidów oraz promocję lipogenezy. Badania u ludzi spożywających napoje bezalkoholowe z dodatkiem barwników karmelowych wykazały zwiększone stężenia peptydu C, cholesterolu frakcji LDL i trójglicerydów [45].

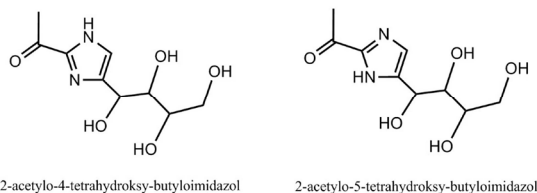
4(5)-metyloimidazol został przebadany również pod kątem działania rakotwórczego po podaniu doustnym. Podstawowy jest raport opublikowany przez NTP w 2007 r., który zawiera wyniki 2-letnich badań narażenia na 4(5)-MeI myszy i szczurów. Stwierdzono, że związek ten zwiększał częstość występowania gruczolaka pęcherzykowego/oskrzelikowego u samic myszy (dawki: 40, 80, 170 mg/kg mc), raka pęcherzykowego/oskrzelikowego u samców myszy (dawka: 170 mg/kg mc) oraz współistniejących gruczolaka i raka pęcherzykowego/oskrzelikowego u samców (dawka: 170 mg/kg mc) i samic myszy (dawki: 80, 170 mg/kg mc). Natomiast wyniki badań na szczurach, nie były jednoznaczne. Podawany doustnie 4(5)-MeI w najwyższej dawce – 260 mg/kg mc, zwiększał częstość występowania białaczki z komórek jednojądrzastych u samic szczurów. Jednocześnie naukowcy podkreślają, że ten rodzaj nowotworu często występuje u wykorzystanej w badaniach rasy szczurów F344/N. Przypuszcza się, że 4(5)-MeI mógł jedynie zaostrzyć już występujące u zwierząt zmiany, zwłaszcza że u samic z grupy kontrolnej białaczka była odnotowana w 624 dniu badania, podczas gdy u samic narażonych na 260 mg 4(5)-MeI/kg mc zaobserwowano ją już w 368 dniu [41]. W 2011 r., głównie w oparciu o wyniki badań NTP, Gabinet Oceny Zagrożeń dla Zdrowia Środowiskowego (Office of Environmental Health Hazard Assessment, OEHA) Kalifornijskiej Agencji Ochrony Środowiska (California Environmental Protection Agency, CEPA) uznał 4(5)-MeI za związek rakotwórczy, uwzględniając go w wykazie Proposition 65 (tzw. Ustawa o bezpieczeństwie wody pitnej i egzekwowaniu przepisów dotyczących substancji toksycznych z 1986 r.). Ustalony przez OEHA poziom bez istotnego ryzyka (No Significant Risk Level, NSRL) dla 4(5)-MeI wynosi 29 $\mu\text{g/dzień}$, czyli znacznie poniżej stężenia tego związku wykrywanego w produktach spożywczych, np. w napojach gazowanych (maksymalna

wykryta zawartość 4(5)-MeI, wynosiła 690 ppm, czyli ~ 690 tys. $\mu\text{g/kg}$ produktu) [46]. W marcu 2012 r., pod naciskiem organizacji konsumenckich, koncerny takie jak Coca-Cola i Pepsi podjęły decyzję o modyfikacji procesów technologicznych w taki sposób, aby sprostać nowym wymaganiom. Stężenie 4(5)-MeI zostało znacząco obniżone w napojach tych firm (poniżej wartości NSRL), ale jedynie w stanie Kalifornia. Ponadto w 2011 r. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer, IARC) zaklasyfikowała 4(5)-MeI do grupy 2B, czyli substancji o możliwym działaniu rakotwórczym dla człowieka [19, 37]. Natomiast w opinii EFSA oszacowane narażenie na 4(5)-MeI, jako składnika barwników karmelowych, nie budzi obaw [7].

Działanie genotoksyczne 4(5)-MeI było sprawdzane w wielu badaniach. Testy mutacji powrotnych z użyciem *Salmonella Typhimurium* (szczepy: TA97, TA98, TA100, TA1535, TA153, TA102, TA1538) (dawki: 5-10 000 $\mu\text{g}/\text{płytkę}$) oraz *Escherichia coli* (dawki: 9,77-5000 $\mu\text{g}/\text{płytkę}$), dały wynik negatywny, zarówno z, jak i bez aktywacji metabolicznej frakcją S9. W teście mikrojader, na komórkach krwi obwodowej myszy i na komórkach szpiku kostnego myszy i szczurów, dla dawek 25-3200 mg/kg mc/dzień, również uzyskano wyniki negatywne [19, 37]. Natomiast badania z użyciem testu aberracji chromosomowych na komórkach szpiku kostnego myszy (Swiss Albino) wykazały, że 4(5)-metyloimidazol w stężeniu: 100-160 mg/kg mc, znacząco zwiększał odsetek aberracji chromosomowych podczas 12 h narażenia. Związek dodatkowo obniżał indeks mitotyczny (MI) badanych komórek we wszystkich stężeniach po 24 h, a po 12 h, wyłącznie w najwyższej dawce (16 mg/kg mc) [42]. Działanie genotoksyczne i cytotoksyczne 4(5)-MeI wykazały również analizy przeprowadzone przez Celik i Topaktas na ludzkich limfocytach krwi obwodowej traktowanych 4(5)-MeI (300, 450, 600 i 750 mg/ml) przez 24 i 48 h. Badany związek indukował wymianę chromatyd siostrzanych (we wszystkich stężeniach, po 48 h) oraz aberracje chromosomowe i tworzenie mikrojader (w dwóch najwyższych dawkach: 600 i 750 mg/ml, po 24 i 48 h). Ponadto zaobserwowano, że 4(5)-MeI w najwyższym stężeniu (750 mg/ml) silniej wpływał na tworzenie mikrojader w ciągu 24 h, niż mitomycyna C (mitomycin C, MMC) w kontroli pozytywnej [2].

THI

2-acetylo-4-tetrahydroksy-butyloimidazol to pochodna imidazolu, o nazwie: 2-acetylo-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroksy-butylo)-imidazol. THI w wyniku spontanicznej przemiany izomerycznej może występować pod postacią tautomeru – 2-acetylo-5-tetrahydroksy-butyloimidazolu, dlatego podobnie jak w przypadku 4(5)-MeI, zamiennie stosuje się nazwę 2-acetylo-4(5)-tetrahydroksy-butyloimidazol (ryc. 3) [32]. THI jest jednym ze związków LMW powstających podczas ogrzewania cukrów ze związkami azotowymi. Reakcja syntezy pochodnych acetyloimidazolowych jest podobna do syntezy metyloimidazoli. Produkt pirolizy węglowodanów – metyloglioksal, kondensuje z jednocześnie wytworzonymi związkami azotowanymi, takimi jak: formamid lub iminofruktozamina. Stereochemia łańcucha bocznego THI zależy od cukru stanowiącego substrat dla reakcji [6].



Ryc. 3. Wzory chemiczne 2-acetylo-4-tetrahydroksy-butyloimidazolu i jego tautomer – 2-acetylo-5-tetrahydroksy-butyloimidazolu [opracowanie własne z użyciem Chem Draw Professional 16.0, wg 32]

Obecność THI potwierdzono w karmelu klasy III w zróżnicowanej ilości: 2,4–10 mg/kg, 14,03 mg/kg i 1,0–74,3 mg/kg [8, 25, 61]. Nie stwierdzono występowania tego związku w karmelu klasy IV, mimo potencjalnie odpowiednich warunków do jego syntezy. Przypuszcza się, że dodatek związków siarki podczas otrzymywania E150d może hamować powstawanie acyloimidazoli [8]. THI może być również obecny w produktach spożywczych, co prawdopodobnie wynika z dodawania do nich E150c. Badania przeprowadzone w Belgii w 2018 r. wykazały, że THI występował w 22,4% analizowanych produktów (n=552) na poziomie nieprzekraczającym 551 µg/kg, przy czym największe koncentracje związku odnotowano w takich produktach jak: chleb i zboża (<5–145 µg/kg), produkty mięsne (<5–184 µg/kg), napoje alkoholowe, w tym piwo (<5–328 µg/kg), ciastka i przekąski (<5–376 µg/kg), gotowe zupy i sosy (<5–551 µg/kg) [10]. Wang i wsp. także wykazali obecność THI w wybranych produktach – w occie winnym (0,5–119,2 µg/L) oraz w napojach bezalkoholowych (0,5–2,7 µg/L) (tabela 1) [61].

Dopuszczalna zawartość THI w karmelu amoniakalnym została określona w Rozporządzeniu Komisji nr 231/2012z dnia 9 marca 2012 r. Zgodnie ze specyfikacją E150c, zawartość THI nie może przekraczać 10 mg/kg w przeliczeniu na ekwiwalent bazy barwnika [47]. Natomiast JECFA w 2011 r. określił dopuszczalną ilość THI w karmelu klasy III na poziomie 25 mg/kg, w przeliczeniu na ekwiwalent bazy barwnika (tabela 1) [22].

Toksyczność THI została potwierdzona już w latach 70 ub.w., kiedy wykazano, że związek indukuje limfopenię [8]. MacKenzie i wsp. określili NOAEL w odniesieniu do działania limfopenicznego THI wynoszący: 380 µg/kg mc/dzień u samców i 120 µg/kg mc/dzień u samic szczurów [33]. Badania prowadzone w latach 80. i 90. ub.w. pozwoliły zbliżyć się do określenia mechanizmu toksyczności tego związku, z możliwą główną rolą niedoboru witaminy B6. W badaniach na szczurach (czas trwania: 7 dni), którym podawano karmel klasy III (dawka THI=200–2000 µg/kg mc/dzień), zaobserwowano istotny spadek liczby limfocytów krwi obwodowej oraz wszystkich leukocytów. Jednak dopiero obniżenie stężenia witaminy B6 w diecie szczurów (2–3 mg/kg) wiązało się z silniejszym działaniem limfopenicznym THI, widocznym już przy dawce 20 µg/kg mc/dzień [8]. Limfopenię związaną z narażeniem na THI, przy jednoczesnym niedoborze witaminy B6, potwierdzono również w innych badaniach z wykorzystaniem zwierząt [12, 17]. Przeprowadzono również doświadczenie

z udziałem ludzi (n=24, zdrowi mężczyźni, wiek ≥ 65 lat, z niskim poziomem witaminy B6), którzy spożywali przez 7 dni karmel klasy III na poziomie 200 mg/kg mc/dzień, zawierający 23 ppm THI (karmel komercyjny) lub 143 ppm THI (próbka karmelu zszyntetyzowana na potrzeby badania). Nie stwierdzono znaczących różnic w średniej liczbie limfocytów we krwi między grupą kontrolną, a grupami badanymi. Ponadto, u żadnej z osób nie zaobserwowano różnic w liczbie limfocytów w trakcie doświadczenia. Autorzy porównali swoje wyniki z dawkami THI, które wywołują limfopenię u szczurów i uznali, że ludzie mogą być mniej wrażliwi na działanie tego związku, co prawdopodobnie wynika z metabolicznych różnic gatunkowych [16, 18]. Późniejsze analizy wykazały, że działanie limfopeniczne THI może być wtórne do jego działania immunosupresyjnego. Ustalono, że związek ten zmniejsza aktywność liazy sfingozyno-1-fosforanu (sphingosine 1-phosphate lyase, S1PL). Sfingozyno-1-fosforan (sphingosine 1-phosphate, S1P) odgrywa główną rolę jako regulator układu odpornościowego i sercowo-naczyniowego – działając na powierzchniowe receptory komórkowe sprzężone z białkiem G, reguluje ruch komórek układu immunologicznego między tkanką limfatyczną a krwią i resztą organizmu. W prawidłowych warunkach poziom S1P w większości tkanek, w tym w tkance limfatycznej, jest niski natomiast we krwi i limfie utrzymywany jest na wysokim poziomie, co stanowi siłę napędową do migracji limfocytów i innych komórek immunokompetentnych do krążenia obwodowego. Inhibicja S1PL wpływa na zaburzenie gradientu S1P między narządami limfatycznymi a krwią/limfą, hamując ruch komórek immunokompetentnych [8, 49]. Obserwowano więc gromadzenie dojrzałych limfocytów T w grasicy czy blokowanie wyjścia limfocytów z węzłów chłonnych, co wywoływało spadek ich liczby w badaniach krwi [49].

Wciąż nie poznano jeszcze mechanizm toksycznego działania THI. Nie wiadomo czy związek ten działa bezpośrednio, czy istotną rolę w jego toksyczności odgrywają mechanizmy pośrednie. Coraz częściej sugeruje się, że istotne znaczenie w działaniu THI może mieć aktywacja metaboliczna tego związku, zwłaszcza, że w badaniach *in vitro* (komórkowych i bezkomórkowych) nie potwierdzono aktywności hamującej samego THI w stosunku do S1PL [44]. Potwierdzeniem tej hipotezy mogą być badania Ohtoyo i wsp. Autorzy odkryli nowy inhibitor S1PL – A6770 (1-[4(5)-(hydroksymetylo)-1H-imidazol-2-il]etanon), który (po uprzedniej fosforylacji) wykazywał identyczne działanie limfopeniczne do THI, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ponadto A6770 wykryto w osoczu szczurów po doustnym podaniu THI, dlatego autorzy sugerują, że A6770 może być podstawowym metabolitem THI [43]. Innym wyjaśnieniem zmniejszonej aktywności S1PL jest hamowanie powstawania kofaktora tego enzymu, czyli fosforanu pirydoksalu [44]. Bazując na wynikach badań na zwierzętach już wcześniej sugerowano, że główną rolę w mechanizmie toksyczności THI może odgrywać hamowanie kinazy pirydoksalu, która katalizuje zależną od ATP fosforylację pirydoksalu do fosforanu pirydoksalu, czyli aktywnej postaci witaminy B6 [53]. Ponadto wykazano, że enzym ten jest hamowany przez wiele substancji pochodzenia naturalnego

i syntetycznego, zwłaszcza przez niskocząsteczkowe związki heterocykliczne. Elsinghorst i wsp. zaobserwowali, że THI rzeczywiście hamuje kinazę pirydoksalu w procesie inhibicji kompetycyjnej, ale jego powinowactwo do enzymu określono na poziomie od niskiego do umiarkowanego. Autorzy zauważają, że uwzględniając maksymalny dozwolony poziom THI w E150c wynoszący 10 mg/kg, nie oczekuje się istotnego hamowania kinazy pirydoksalu, ponieważ przy 80 kg masy ciała maksymalne dzienne pobranie THI wynosi 240 mg. Przy założeniu średniej zawartości wody w organizmie wynoszącej 60% i całkowitej resorpcji THI z równomiernym rozkładem w całym ciele zapewniłoby to lokalne stężenie THI na poziomie 20 nM. Należy jednak pamiętać, że zróżnicowany lokalnie rozkład witaminy B6 może być bardzo istotny w działaniu THI w różnych częściach organizmu [5].

SPOŻYCIE KARMELI I ICH WYBRANYCH SKŁADNIKÓW

Dotąd opublikowano jedynie kilka raportów dotyczących spożycia karmeli i ich składników z żywnością [7, 8, 10, 11]. W 2011 r. EFSA, na podstawie przeprowadzonych obliczeń, określił że poziom narażenia na poszczególne barwniki karmelowe u dzieci i dorosłych przekracza ustalone wartości ADI (tabela 1). Wyjątkiem był karmel klasy II, dla którego oczekiwana ekspozycja była znacznie poniżej dopuszczalnego limitu [8]. W 2012 r. zakończono szczegółową ocenę narażenia na barwniki karmelowe klasy I, III i IV, ponownie przeprowadzoną przez EFSA. Ze względu na wyniki poprzedniej analizy ocena nie uwzględniała karmelu klasy II. Stwierdzono, że łączna ekspozycja na badane klasy karmeli nie przekraczała wartości ADI zarówno u dzieci, jak i u dorosłych. Całkowity poziom narażenia na E150a, c, d był nawet 20-krotnie niższy, niż wynikało to z wcześniejszej opinii EFSA. Oszacowano natomiast, że indywidualne narażenie na karmel klasy III może się kształtować na poziomie zbliżonym do ADI dla tego związku (100 mg/kg mc/dzień). Głównymi źródłami ekspozycji na barwniki karmelowe u dzieci (wiek: 36 miesięcy–9 lat) były: napoje (bezalkoholowe), przyprawy, zupy, sosy, sałatki i produkty białkowe, lody oraz produkty mleczne. Narażenie osób dorosłych na karmele najczęściej wynikało z ich obecności w dwóch kategoriach żywności: napojach (alkoholowych i bezalkoholowych) oraz w przyprawach, zupach, sosach, sałatkach i produktach białkowych [7].

Natomiast w oparciu o opinię Panelu ds. Dodatków do Żywności i Składników Pokarmowych Dodawanych do Żywności (Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, ANS) oraz dane przedstawione przez producentów karmeli, EFSA dokonał oceny potencjalnego narażenia na 4(5)-MeI (z E150c i E150d) i THI (E150c). W zależności od przyjętego scenariusza ekspozycyjnego, szacowane narażenie na 4(5)-MeI z E150c kształtowało się na poziomie 0,009–0,015 mg/kg mc/dzień oraz 0,016–0,022 mg/kg mc/dzień dla E150d. W raporcie z 2011 r. wyrażono pogląd, że zawartość obu tych związków w barwnikach karmelowych

nie zagraża zdrowiu [8]. Duże badanie w zakresie ekspozycji na 4(5)-MeI przeprowadzono w USA w latach 2013–2015. Stwierdzono, że narażenie na ten związek było istotnie wyższe w przypadku spożywania produktów barwionych karmelem (zwłaszcza napojów gazowanych typu cola) niż dla żywności poddanej obróbce termicznej (głównie kawa palona). Szacowana całkowita ekspozycja na 4(5)-MeI w zależności od przyjętego scenariusza ekspozycyjnego, mieściła się w zakresie 0,033–0,093 mg/kg mc/dzień dla osób dorosłych oraz 0,01–0,054 mg/kg mc/dzień dla dzieci w wieku 1–12 lat [11]. Średnie spożycie 4(5)-MeI oraz THI poddano również badaniom w Belgii. Autorzy oszacowali, że przeciętne narażenie na 4(5)-MeI kształtowało się na poziomie: 0,4–3,7 µg/kg mc/dzień, natomiast dla THI wynosiło: 0,02–0,36 µg/kg mc/dzień. Stwierdzono, że ekspozycja na te związki w największym stopniu była powiązana z konsumpcją kawy, coli oraz piwa [10].

PODSUMOWANIE

Barwniki karmelowe, chociaż są długo stosowane jako dodatki do żywności, w dalszym ciągu nie zostały dobrze scharakteryzowane. Ich produkcja, oparta na procesach wysokotemperaturowych, wpływa na możliwość powstania bardzo różnych produktów. Dzięki systematycznemu rozwojowi technik analitycznych możliwa stała się identyfikacja wielu związków, jednak naukowcy podkreślają, że podstawowe mechanizmy powstawania karmeli (karmelizacji i reakcji Maillarda), nadal nie zostały poznane. Nawet, jeśli udało się wyizolować z barwników karmelowych konkretne związki, to często trudno określić ich dokładny poziom w produkcie końcowym ze względu na dużą złożoność procesu i wiele czynników wpływających na jego przebieg.

Badania nad toksycznością karmeli są prowadzone systematycznie od lat 70. ub.w. Obecnie większość organizacji międzynarodowych i instytutów naukowych uznaje te dodatki za bezpieczne dla konsumentów. Ogólne testy toksyczności dla poszczególnych klas karmeli nie wykazały ich szkodliwości w dawkach nieprzekraczających wartości ADI. Jednocześnie rośnie liczba doniesień naukowych o możliwym działaniu toksycznym, obecnych w karmelach związków niskocząsteczkowych, takich jak: 5-HMF, 4(5)-MeI oraz THI. Udowodniono już możliwe działanie rakotwórcze dla ludzi (klasa 2B, wg IARC) 4(5)-MeI obecnego w karmelu klasy III i IV oraz działanie immunosupresyjne THI występującego w karmelu klasy III. Określono też ich dopuszczalne limity w wybranych klasach barwników karmelowych. Natomiast w przypadku 5-HMF, który może występować we wszystkich klasach karmeli, toksyczność nie została jednoznacznie potwierdzona, ale przeprowadzone badania wskazują, że związek ten nie jest obojętny dla organizmów żywych.

Ze względu na wiele wątpliwości nasuwających się w związku z działaniem toksycznym barwników karmelowych, konieczne jest prowadzenie dalszych badań.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Bauer-Marinovic M., Taugner F., Florian S., Glatt H.: Toxicity studies with 5-hydroxymethylfurfural and its metabolite 5-sulphooxymethylfurfural in wild-type mice and trans-genic mice expressing human sulphotransferases 1A1 and 1A2. *Arch. Toxicol.*, 2012; 86: 701–711
- [2] Celik R., Topaktas M.: Genotoxic effects of 4-methylimidazole on human peripheral lymphocytes in vitro. *Drug Chem. Toxicol.*, 2018; 41: 27–32
- [3] Chan P.C., Hill G.D., Kissling G.E., Nyska A.: Toxicity and carcinogenicity studies of 4-methylimidazole in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Arch. Toxicol.*, 2008; 82: 45–53
- [4] Durling L.J., Busk L., Hellman B.E.: Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases. *Food Chem. Toxicol.*, 2009; 47: 880–884
- [5] Elsinghorst P.W., di Salvo M.L., Parroni A., Contestabile R.: Inhibition of human pyridoxal kinase by 2-acetyl-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl) imidazole (THI). *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2015; 30: 336–340
- [6] Elsinghorst P.W., Raters M., Dingel A., Fischer J., Matissek R.: Synthesis and application of ¹³C-labeled 2-acetyl-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl) imidazole (THI), an immunosuppressant observed in caramel food colorings. *J. Agric. Food Chem.*, 2013; 61: 7494–7499
- [7] European Food Safety Authority (EFSA): Refined exposure assessment for caramel colours (E 150a, c, d). *EFSA J.*, 2012; 10: 3030
- [8] European Food Safety Authority (EFSA): Scientific opinion on the re-evaluation of caramel colours (E 150 a,b,c,d) as food additives. *EFSA J.*, 2011; 9: 2004
- [9] Fennell T.R., Watson S.L., Dhungana S., Snyder R.W.: Metabolism of 4-methylimidazole in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *Food Chem. Toxicol.*, 2019; 123: 181–194
- [10] Fierens T., Van Holderbeke M., Cornelis C., Jacobs G., Sioen I., De Maeyer M., Vinkx C., Vanermen G.: Caramel colour and process contaminants in foods and beverages: Part II – Occurrence data and exposure assessment of 2-acetyl-4-((1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-imidazole (THI) and 4-methylimidazole (4-MEI) in Belgium. *Food Chem.*, 2018; 255: 372–379
- [11] Folmer D.E., Doell D.L., Lee H.S., Noonan G.O., Carberry S.E.: A U.S. population dietary exposure assessment for 4-methylimidazole (4-MEI) from foods containing caramel colour and from formation of 4-MEI through the thermal treatment of food. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, 2018; 35: 1890–1910
- [12] Gobin S.J., Phillips J.A.: Immunosuppressive effects of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutyl imidazole (THI) in the rat. *Clin. Exp. Immunol.*, 1991; 85: 335–340
- [13] Graf F.: Preparation of 4-methylimidazoles. U.S. Patent No. 4,377,696A. U.S. Patent and Trademark Office, 1983
- [14] Hellwig M., Henle T.: Baking, ageing, diabetes: A short history of the Maillard reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014; 53: 10316–10329
- [15] Hengel M., Shibamoto T.: Carcinogenic 4(5)-methylimidazole found in beverages, sauces, and caramel colors: Chemical properties, analysis, and biological activities. *J. Agric. Food Chem.*, 2013; 61: 780–789
- [16] Houben G.F., Abma P.M., van den Berg H., van Dokkum W., van Loveren H., Penninks A.H., Seinen W., Spanhaak S., Vos J.G., Ockhuizen T.: Effects of the colour additive caramel colour III on the immune system: A study with human volunteers. *Food Chem. Toxicol.*, 1992; 30: 749–757
- [17] Houben G.F., van den Berg H., Kuijpers M.H., Lam B.W., van Loveren H., Seinen W., Penninks A.H.: Effects of the color additive caramel color III and 2-acetyl-4 (5)-tetrahydroxybutylimidazole (THI) on the immune system of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992; 113: 43–54
- [18] Houben G.F., van Dokkum W., van Loveren H., Penninks A.H., Seinen W., Spanhaak S., Ockhuizen T.: Effects of caramel colour III on the number of blood lymphocytes: A human study on caramel colour III immunotoxicity and a comparison of the results with data from rat studies. *Food Chem. Toxicol.*, 1992; 30: 427–430
- [19] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: 4-Methylimidazole. W: Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-Water. International Agency for Research on Cancer. Lyon 2013 447–459
- [20] Jang H.W., Jiang Y., Hengel M., Shibamoto T.: Formation of 4(5)-methylimidazole and its pre-cursors, α -dicarbonyl compounds, in Maillard model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2013; 61: 6865–6872
- [21] Jarosławski L., Zielonka R.: Karmel a kształtowanie brązowej barwy żywności. *Post. Nauki Technol. Przem. Rol.-Spoż.*, 2017; 72: 52–69
- [22] JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives): Combined compendium of food additive specifications. Caramel Colour. Monograph 11, 2011. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph11/additive-102-m11.pdf (02.05.2020)

- [23] Jellum E., Børresen H.C., Eldjarn L.: The presence of furan derivatives in patients receiving fructose-containing solutions intravenously. *Clin. Chim. Acta*, 1973; 47: 191–201
- [24] Karim F., Smith, J.S.: Formation of 4 (5)-Methylimidazole in aqueous D-glucose-amino acids model system. *J. Food Sci.*, 2016; 81: T268–T274
- [25] Kim T.R., Kim S.U., Shin Y., Kim J.Y., Lee S.M., Kim J.H.: Determination of 4-methylimidazole and 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxybutylimidazole in caramel color and processed foods by LC-MS/MS. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 2013; 18: 263–268
- [26] Kitts D.D., Wu C.H., Kopec A., Nagasawa T.: Chemistry and genotoxicity of caramelized sucrose. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006; 50: 1180–1190
- [27] Kowalski S., Lukasiewicz M., Duda-Chodak A., Zięć G.: 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) – heat-induced formation, occurrence in food and biotransformation – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2013; 63: 207–225
- [28] Kroh L.W.: Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.*, 1994; 51: 373–379
- [29] Lee C.H., Chen K.T., Lin J.A., Chen Y.T., Chen Y.A., Wu J.T., Hsieh C.W.: Recent advances in processing technology to reduce 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 2019; 93: 271–280
- [30] Lee K.G., Jang H., Shibamoto T.: Formation of carcinogenic 4 (5)-methylimidazole in caramel model systems: A role of sulphite. *Food Chem.*, 2013; 136: 1165–1168
- [31] Lee Y.C., Shlyankevich M., Jeong H.K., Douglas J.S., Surh Y.J.: Bioactivation of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde to an electrophilic and mutagenic allylic sulfuric acid ester. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995; 209: 996–1002
- [32] Lojková L., Klejdus B., Moravcová J., Kubáň V.: Super-critical fluid extraction (SFE) of 4(5)-methylimidazole (4-MeI) and 2-acetyl-4(5)-(1,2,3,4)-tetrahydroxybutylimidazole (THI) from ground-coffee with high-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric quantification (HPLC/ESI-MS). *Food Addit. Contam.*, 2006; 23: 963–973
- [33] MacKenzie K.M., Boysen B.G., Field W.E., Petsel S.R., Chappel C.I., Emerson J.L., Stanley J.: Toxicity studies of caramel colour III and 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxybutylimidazole in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 1992; 30: 417–425
- [34] Mateo-Fernández M., Alves-Martínez P., Del Río-Celestino M., Font R., Merinas-Amo T., Alonso-Moraga Á.: Food safety and nutraceutical potential of caramel colour class IV using in vivo and in vitro assays. *Foods*, 2019; 8: 392
- [35] Monien B.H., Frank H., Seidel A., Glatt H.: Conversion of the common food constituent 5-hydroxymethylfurfural into a mutagenic and carcinogenic sulfuric acid ester in the mouse in vivo. *Chem. Res. Toxicol.*, 2009; 22: 1123–1128
- [36] Moon J.K., Shibamoto T.: Formation of carcinogenic 4(5)-methylimidazole in Maillard reaction systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2011; 59: 615–618
- [37] Morita T., Uneyama C.: Genotoxicity assessment of 4-methylimidazole: Regulatory perspectives. *Genes Environ.*, 2016; 38: 20
- [38] Murkovic M., Pichler N.: Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006; 50: 842–846
- [39] National Toxicology Program, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health: NTP technical report on the toxicity studies of 2- and 4-Methylimidazole (CAS No. 693-98-1 and 822-36-6) administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic. Rep. Ser.*, 2004; 67: 1–G12
- [40] National Toxicology Program: NTP toxicology and carcinogenesis studies of 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural (CAS No. 67-47-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, 2010; 554: 7–13, 15–19, 21–31
- [41] National Toxicology Program: Toxicology and carcinogenesis studies of 4-methylimidazole (Cas No. 822-36-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, 2007; 535: 1–274
- [42] Norizadeh Tazehkand M., Topaktas M., Yilmaz M.B.: Assessment of chromosomal aberration in the bone marrow cells of Swiss Albino mice treated by 4-methylimidazole. *Drug Chem. Toxicol.*, 2016; 39: 307–311
- [43] Ohtoyo M., Machinaga N., Inoue R., Hagihara K., Yuita H., Tamura M., Hashimoto R., Chiba J., Muro F., Watanabe J., Kobayashi Y., Abe K., Kita Y., Nagasaki M., Shimozato T.: Component of caramel food coloring, THI, causes lymphopenia indirectly via a key metabolic intermediate. *Cell Chem. Biol.*, 2016; 23: 555–560
- [44] Ohtoyo M., Tamura M., Machinaga N., Muro F., Hashimoto R.: Sphingosine 1-phosphate lyase inhibition by 2-acetyl-4-(tetrahydroxybutyl) imidazole (THI) under conditions of vitamin B6 deficiency. *Mol. Cell. Biochem.*, 2015; 400: 125–133
- [45] Rekha B., Velmurugan G., Freddy A.J., Anusha S., Ramprasath T., Karthik K.V., Suresh S., Kulshrestha P., Mithieux G., Lyon A.R., Selvam G.S., Ramasamy S.: Chronic intake of 4-methylimidazole induces hyperinsulinemia and hypoglycaemia via pancreatic beta cell hyperplasia and glucose dyshomeostasis. *Sci. Rep.*, 2018; 8: 17037

- [46] Reproductive and Cancer Hazard Assessment Branch Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHHA), California Environmental Protection Agency: No significant risk level (NSRL) for the proposition 65 carcinogen 4-methylimidazole. 2011 <https://oehha.ca.gov/media/downloads/crnrr/010711nsrlrisk4ei.pdf>
- [47] Rozporządzenie Komisji (UE) nr 231/2012 z dnia 9 marca 2012 r. ustanawiające specyfikacje dla dodatków do żywności wymienionych w załącznikach II i III do rozporządzenia (WE) nr 1333/2008 Parlamentu Europejskiego i Rady (Dz.U. L 83 z 22.3.2012, s. 1)
- [48] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności (Dz.U. L 354 z 31.12.2008, s. 16)
- [49] Schwab S.R., Pereira J.P., Matloubian M., Xu Y., Huang Y., Cyster J.G.: Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*, 2005; 309: 1735–1739
- [50] Selim S., Chappel C.I., Schoenig G.P.: Absorption, distribution and excretion of the colour fraction of caramel colour IV in the rat. *Food Chem. Toxicol.*, 1992; 30: 445–451
- [51] Sengar G., Sharma H.K.: Food caramels: A review. *J. Food Sci. Technol.*, 2014; 51: 1686–1696
- [52] Sivertsen T., Nygaard A.K., Mathisen G., Fonnum F.: Effects of 4-methylimidazole on cerebral glutamate decarboxylase activity and specific GABA receptor binding in mice. *Toxicol. Mech. Methods*, 2009; 19: 214–218
- [53] Spector R., Huntoon S.: Effects of caramel color (ammonia process) on mammalian vitamin B6 metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1982; 62: 172–178
- [54] Suiko M., Kurogi K., Hashiguchi T., Sakakibara Y., Liu M.C.: Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2017; 81: 63–72
- [55] Surh Y.J., Liem A., Miller J.A., Tannenbaum S.R.: 5-Sulfooxy-methylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxy-methylfurfural. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 2375–2377
- [56] Surh Y.J., Tannenbaum S.R.: Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chem. Res. Toxicol.*, 1994; 7: 313–318
- [57] Taş N.G., Gökmen V.: Maillard reaction and caramelization during hazelnut roasting: A multi-response kinetic study. *Food Chem.*, 2017; 221: 1911–1922
- [58] Teixidó E., Núñez O., Santos F.J., Galceran M.T.: 5-Hydroxymethylfurfural content in food-stuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem.*, 2011; 126: 1902–1908
- [59] Villamiel M., del Castillo M.D., Corzo N.: Browning Reactions. W: *Food Biochemistry and Food Processing*, red.: Y.H. Hui. Blackwell Publishing, Ames 2006, 71–100
- [60] Vollmuth T.A.: Caramel color safety – An update. *Food Chem. Toxicol.*, 2018; 111: 578–596
- [61] Wang L., Ren B., Liu Y., Lu Y., Chang F., Yang L.: 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole and 4-methylimidazole in caramel colours, vinegar, and beverages in China. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.*, 2015; 8: 163–168
- [62] Yamaguchi H., Masuda T.: Determination of 4(5)-methylimidazole in soy sauce and other foods by LC-MS/MS after solid-phase extraction. *J. Agric. Food Chem.*, 2011; 59: 9770–9775
- [63] Yu P., Xu X.B., Yu S.J.: Comparative study of the effect of glucosamine and free ammonium on 4-methylimidazole formation. *J. Agric. Food Chem.*, 2015; 63: 8031–8036
- [64] Zhou Z., Hu X., Hong X., Zheng J., Liu X., Gong D., Zhang G.: Interaction characterization of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde with human serum albumin: Binding characteristics, conformational change and mechanism. *J. Mol. Liq.*, 2020; 297: 111835

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.