

Научная статья

МИКОТОКСИНЫ В КОФЕ И ЦИКОРИИ: ОТ РЕГЛАМЕНТИРУЕМЫХ К ЭМЕРДЖЕНТНЫМ

И.Б. Седова, М.Г. Киселева, З.А. Чалый

Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Россия, 109240,
г. Москва, Устьинский проезд, 2/14

Кофе является продуктом повседневного потребления для большей части населения во всем мире. В России и ряде стран Европы приверженцы здорового образа жизни все чаще используют его заменитель – цикорий. Целью нашего исследования было изучение загрязненности образцов кофе и цикория, представленных на рынке РФ, вторичными метаболитами микромицетов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* и *Alternaria*.

Методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (УВЭЖХ-МС/МС) в 48 образцах кофе и цикория определяли содержание 29 микотоксинов. В число аналитов входили регламентируемые в пищевых продуктах микотоксины (афлатоксины, охратоксин А, дезоксиниваленон, фумонизины, Т-2 токсин, зеараленон), их производные и структурные аналоги (трихотецены групп А и В), альтернатоксины (альтерналиол, его метиловый эфир, альтенуен, тентоксин), цитринин, а также малоизученные эмерджентные микотоксины (стеригматоцистин, цитреовиридин, циклопиазоновая, микофеноловая кислота, энниатины, боверицин).

Впервые в РФ получены данные, свидетельствующие о выявлении нерегламентируемых эмерджентных микотоксинов: в цикории – боверицина (в 9 из 16 образцов, содержание – от 2,4 до 1173 мкг/кг) и энниатина В (в 6 из 16 образцов, 2,8–1109 мкг/кг), в зеленом и жареном кофе – микофеноловой кислоты (в 11 из 20 образцов на уровне 23,5–58,3 мкг/кг и в 3 из 12 образцов – 155,7–712,2 мкг/кг соответственно). В единичных образцах черного и зеленого кофе и цикория были детектированы регламентируемые в пищевых продуктах афлатоксины, охратоксин А и фумонизин В2. Их содержание в исследованных пробах не превышало максимальных допустимых уровней, однако наличие положительных проб свидетельствует о потенциальном риске здоровью человека при их поступлении и необходимости гигиенической оценки загрязненности данной группы продукции не только регламентируемыми в кофе афлатоксином В1 и охратоксином А.

Ключевые слова: микотоксины, эмерджентные микотоксины, кофе, цикорий, охратоксин А, афлатоксины, загрязнение, УВЭЖХ-МС/МС.

Одним из наиболее часто употребляемых натуральных напитков в мире является кофе. На его долю приходится 75 % от потребления безалкогольных напитков [1]. В Российской Федерации в 2019 г. потребление кофе на 12 % превысило потребление чая. Самыми распространенными сортами кофе являются арабика (*Coffea arabica*) и робуста (*Coffea canephora* var. *Robusta*) [2]. Кроме них известно еще 125 сортов кофе, в частности, либерика (*Coffea liberica*, *Coffea excelsa*), выращиваемый в Юго-Восточной Азии и известный своим горьким вкусом, эужениоидис (*Coffea eugenoides*), произрастающий в Эфиопии, и камерунский (*Coffea charrieriana*), выращиваемый в Камеруне [3]. В последние годы были отмечены полезные свойства

зеленого кофе, что привело к увеличению потребления напитков на его основе [4]. В качестве альтернативы кофе выступает цикорий (*Dorema aucheri*), принадлежащий к семейству сложноцветных. По своему вкусу он напоминает кофе, но при этом не содержит кофеина.

Как любые сельскохозяйственные продукты растительного происхождения, кофе и цикорий могут быть контаминированы большим количеством плесневых грибов – микромицетов, включая их токсигенные виды. Заражение кофе может происходить на всех этапах его производства, до и после сбора урожая. Кофейное дерево, являясь теплолюбивым растением, приживается только в тропическом и субтропическом климате. Для растительной продук-

© Седова И.Б., Киселева М.Г., Чалый З.А., 2022

Седова Ирина Борисовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории энзимологии питания (e-mail: isedova@ion.ru; тел.: 8 (495) 698-53-65; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6011-4515>).

Киселева Мария Геннадьевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории энзимологии питания (e-mail: kiseleva_mg@ion.ru; тел.: 8 (495) 698-53-65; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1057-0886>).

Чалый Захар Андреевич – младший научный сотрудник лаборатории энзимологии питания (e-mail: brew@ion.ru; тел.: 8 (495) 698-53-65; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9371-8163>).

ции стран с жарким и влажным климатом наиболее характерна контаминация микромицетами родов *Aspergillus* и *Penicillium* – продуцентами наиболее опасных микотоксинов (МТ) – афлатоксинов (АФЛ) и охратоксина А (ОТА) [5, 6]. Известно, что ОТА на плантациях кофе в тропических и субтропических регионах продуцируют преимущественно аспергиллы видов *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* и *A. westerdijkiae*, а в регионах с умеренным климатом – *Penicillium verrucosum*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii* и *P. oxalicum* [7, 8]. Способность штаммов, продуцирующих ОТА, загрязнять кофейные зерна зависит от нескольких факторов, таких как климатические условия, условия хранения и транспортировки, а также способы обработки кофе (влажный или сухой) [9]. К естественным загрязнителям кофе также относят грибы рода *Fusarium* [5].

Наибольшее количество сообщений, связанных с контаминацией зерна кофе МТ, посвящено его загрязнению ОТА. Имеются сведения о выявлении этого токсина в кофе из Бразилии, Вьетнама, Гватемалы, Индонезии, Китая, Кот-д'Ивуара [10], Южной Кореи, Малайзии, Тайваня, Филиппин и Эфиопии [11–15]. Метаанализ, выполненный Khanakhan et al., позволил подтвердить информацию о повсеместном распространении ОТА в кофе и кофейных напитках разных стран: самая низкая частота обнаружения этого токсина была в кофе из Южной Кореи (3%), Вьетнама (10%) и Панамы (19%); напротив, все образцы из Кувейта и Чили были загрязнены [13]. ОТА обнаруживали не только в зеленом кофе [10, 14, 16], но и в продуктах его переработки [8, 11, 12, 17–19]. Реже сообщают о загрязнении кофе АФЛ и стеригматоцистином (СТЦ) [5, 10, 20, 21]. Garcia-Mogalez et al. выявили 100%-ную частоту обнаружения АФЛ В1 в натуральном кофе на уровне от 0,25 до 2,33 мкг/кг [22], а по сведениям Bessire et al. в 18% проб зеленого кофе выявляли от 0,1 до 1,2 мкг/кг АФЛ В1 [10].

Разработка и внедрение прецизионных аналитических методов мультидетекции позволили проводить комплексную оценку контаминации кофе и кофейных напитков большим числом МТ, а также эмерджентных МТ (ЭМТ). В кофе-бобах были обнаружены фумонизины В2 и В4 [23], в других видах кофе и напитков – эрниатины (ЭНН) В, В1, А1, альтернариотоксин (метиловый эфир альтернариола, АМЭ), боверицин (БО), цитринин (ЦИТ) и патулин, фумонизин В1 (ФВ1), трихотеченовые МТ и микофеноловая кислота (МФК) [8, 10, 17–19, 24]. Установлено, что обжарка кофе может снижать содержание ОТА на 97% в зависимости от температуры и размера частиц [25].

В нескольких странах для кофе установлены гигиенические регламенты содержания МТ: в РФ максимальный допустимый уровень (МДУ) АФЛ В1 составляет 0,005 мг/кг¹; в странах Евросоюза МДУ ОТА в обжаренном кофе в зернах и молотом кофе – 5 мкг/кг, в растворимом (инстантном) кофе – 10 мкг/кг [26]. В Италии, Финляндии и Греции также регламентируется содержание ОТА в зеленом кофе на уровнях 8, 10 и 20 мкг/кг соответственно [5].

Вопрос о загрязнении цикория МТ в мире до настоящего времени не изучен. В Российской Федерации практически отсутствует информация о загрязнении МТ потребляемых в стране кофе и цикория.

Цель настоящего исследования – изучение частоты и уровней контаминации различных видов кофе, включая зеленый и черный (молотый и зерновой), его заменителя – цикория широким спектром токсических метаболитов: МТ, регламентируемые в пищевых продуктах растительного происхождения (АФЛ В1, В2, G1, G2; ОТА, ДОН, ФВ1, ФВ2, Т-2, ЗЕН), их производными и структурными аналогами (ДАС, НТ-2, Т-2 триол, НЕОС – производные Т-2 токсина; 3- и 15-ацДОН, ФУЗ Х – производные ДОН), циклопиазоновой кислотой (ЦПК), цитреовиридином (ЦТВ), ЦИТ, а также ЭМТ (СТЦ, МФК, ЭНН А и ЭНН В, БО, тентоксином (ТЕН), токсинами *Alternaria* sp. – альтернариолом (АОН), АМЭ и альтенуеном (АЛТ)). Всего перечень исследованных микотоксинов включал 29 видов МТ и ЭМТ.

Материалы и методы. Образцы кофе и цикория были отобраны в торговой сети Москвы и Московской области. Проанализировано 20 образцов зеленого кофе в зернах (сортов арабика и робуста из Центральной и Южной Америки, Африки, Индии и Индокитая) и 12 образцов жареного кофе: в зернах (7 проб сорта арабика) и молотого (5 проб). Цикорий был представлен 15 образцами растворимого напитка (13 порошкообразных, 2 жидких) и одной пробой цикория жареного в кусочках.

Перед экстракцией навески тщательно перемешанных образцов кофе в зернах и жареного цикория массой 50 г размалывали на мельнице до однородного порошкообразного состояния. Образцы молотого кофе тщательно перемешивали, дополнительно не размалывали. Подготовку пробы проводили в соответствии с модифицированной методикой, предложенной для определения МТ в зеленом кофе Bessaire et al. [10]. В центрифужную пробирку вместимостью 50 мл отбирали 1,0 г порошка, добавляли 10 мл дистиллированной воды, перемешивали и оставляли на 10 мин для набухания. Приливали 10 мл ацетонитрила, подкисленного уксусной кислотой (1% об.), перемешивали и помещали в ульт-

¹ ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции: технический регламент Таможенного союза (с изменениями на 14 июля 2021 г.) / утв. решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 880 [Электронный ресурс] // КОДЕКС: электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/902320560> (дата обращения: 11.11.2021).

развучковую ванну на 10 мин, затем встряхивали в шейкере в течение 10 мин. Затем в пробирку добавляли 1 г хлорида натрия и 4 г безводного сульфата магния, центрифугировали при 4500 об./мин в течение 15 мин. В центрифужную пробирку вместимостью 15 мл вносили аликвоту объемом 5 мл, добавляли 3 мл гексана для обезжиривания, перемешивали в шейкере 10 мин. Далее в пробирку вносили 0,7 г безводного $MgSO_4$. Ацетонитрильную фракцию объемом 3 мл отдували в токе азота и перерастворяли последовательным добавлением 100 мкл метанола и 400 мкл воды milliQ. Полученный раствор центрифугировали, супернатант переносили в хроматографическую виалу для анализа.

Для подготовки проб растворимого цикория образцы тщательно перемешивали и отбирали навеску массой 1,0 г в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл, добавляли 10 мл дистиллированной воды, перемешивали и приливали 10 мл ацетонитрила, подкисленного уксусной кислотой (1 % об.), вновь перемешивали и помещали в ультразвуковую ванну на 10 мин, затем встряхивали в шейкере в течение 10 мин. Затем в пробирку добавляли 2 г хлорида натрия, центрифугировали при 4500 об./мин в течение 15 мин. Отбирали 800 мкл экстракта в микроцентрифужную пробирку типа «эппендорф» и добавляли 800 мкл воды milliQ, перемешивали, вновь центрифугировали и переливали супернатант в хроматографические виалы для анализа. Пробы готовили для анализа в двух повторностях.

Анализ проводили с использованием ВЭЖХ системы Vanquish UHPLC, соединенной с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором с подогреваемым источником (TSQ Endura), контролируемым программным обеспечением Xcalibur 4.0 QF2 Software (Thermo Scientific, USA). Разделение аналитов осуществляли на колонке, заполненной силикагелем с привитыми группами октадецилсилана (Titan C18, 2,1×100 мм, 1,9 мкм, Supelco). Температура колонки – 25 °С. Скорость потока элюента – 0,4 мл/мин. Объем вносимой пробы – 10 мкл.

Подвижные фазы для проведения анализа в *положительной полярности* ионизации: фаза А – вода – метанол (90–10, % об.); Б – метанол – вода – ацетонитрил (10–10–80, % об.), обе фазы модифицированы муравьиной кислотой (0,1, % об.) и 1 мМ формиата аммония. Состав растворителей в подвижных фазах для проведения анализа в *отрицательной полярности* ионизации был тот же, обе фазы модифицированы 1 мМ формиата аммония, рН фазы А доведен до 9,0 добавлением водного раствора аммиака, тот же объем водного аммиака добавляли в фазу Б. Схема градиента: старт – 0 % Б, 20-я мин – 100 % Б, 20–23,5 мин – 100 % Б, 23,5–24 мин – 0 % Б, с 24-й по 26-ю мин – уравнивание системы при 0 % Б.

МС/МС детектирование осуществляли в режиме электрораспылительной ионизации в положительной или отрицательной полярности (табл. 1 и 2).

Параметры источника: температура испарителя – 225 °С, напряжение скиммера – 4500 В, температура транспортной трубки – 200 °С, газ завесы – 35, направляющий газ – 10, сметающий газ – 2 единицы (все азот); давление газа для соударений (аргон) – 2 мТорр; минимальное время измерения перехода (dwell time) – 100 мс, разрешение на первом и третьем квадрупольях 0,7 и 1,4 FWHM соответственно.

Стандартные растворы 29 МТ готовили из сухих стандартов (Sigma-Aldrich; Fermentek, Jerusalem, Israel). Стандартные растворы хранения готовили в ацетонитриле (АФЛ, СТЦ, ЦИТ, трихотецены групп А и В, ЗЕН и аналоги, ОТА), метаноле (токсины Alternaria, ЭНН А, ЭНН В, БО, МФК) или смеси «ацетонитрил / вода» – 50 / 50 (% об.) – ФВ1, ФВ2 с концентрацией 100 или 500 мкг/мл. Из стандартных растворов готовили мультистандарт и калибровочные растворы. Все растворы хранились при температуре –18 °С.

Для количественного определения МТ использовали внешние градуировки на «чистой» матрице. «Положительные» образцы были разделены на две подгруппы: к первой были отнесены те, в которых был выявлен МТ в количествах, превышающих предел обнаружения метода (ПО), ко второй – содержание МТ в которых превысило минимальную определяемую концентрацию метода (МОК). ПО и МОК, рассчитанные по 3-σ и 10-σ критериям, составили соответственно: 17 и 52 мкг/кг для токсинов ДОН и 3- и 15-ацДОН; 8,7 и 26 мкг/кг для ФУЗ Х; 5 и 17 мкг/кг для МФК; 4 и 12 мкг/кг для Т-2 триола; 2,8 и 8,5 мкг/кг для ЦТВ и ЦПК; 2,3 и 6,8 мкг/кг для АЛТ, АОН, АМЭ и токсина НТ-2; 1,1 и 3,4 мкг/кг для ФВ1, АФЛ G2, ЗЕН и ДАС; 0,7 и 2,0 мкг/кг для ЭНН А; 0,5 и 1,7 мкг/кг для НЕОС, ЦИТ, ТЕН, ЭНН В, БО и Т-2; 0,2 и 0,7 мкг/кг для ОТА и ФВ2; 0,09 и 0,3 мкг/кг для АФЛ G1 и В2; 0,05 и 0,15 мкг/кг для СТЦ и АФЛ В1. Степени извлечения МТ варьировали от 60 до 108 %.

Результаты и их обсуждение. Загрязненность кофе микотоксинами. Изучены частота обнаружения и уровни загрязнения МТ 32 проб зеленого и жареного кофе. Из 29 детектируемых МТ в пробах выявляли шесть видов: МФК, ОТА, БО, АФЛ В1, АФЛ В2 и СТЦ. В 6 % образцов зеленого кофе были обнаружены регламентируемые АФЛ в количествах, не превышающих 5 мкг/кг (0,37 и 1,07 мкг/кг). Наиболее часто, в 44 % случаев, в кофе обнаруживали МФК, реже – БО (в 3 %) и МТ «грибов хранения»: ОТА (6 %), АФЛ В2 (6 %), АФЛ В1 (3 %), а также в следовых количествах СТЦ (табл. 3).

Содержание МФК варьировалось в широком диапазоне от 23,5 до 712,2 мкг/кг. Все исследованные пробы соответствовали требованиям по содержанию АФЛ В1 в кофе, установленным в ТР ТС 021/2011¹.

Более детальное изучение загрязненности кофе МТ в зависимости от способа его термической обработки представлено в табл. 4.

Таблица 1

Переходы МТ, детектируемых в положительной полярности в режиме мониторинга множественных реакций (MRM)

МТ	t_R , мин	Аддукт	Материнский ион, m/z	Дочерние ионы*, m/z	Энергия соудар., В	Фрагментор, В
ДОН	11,2	$[M+H]^+$	297,1	249,1; 267,1	10,6; 17,9	100
Г-2 триол	11,3	$[M+NH_4]^+$	400,2	365,2; 145,2	10; 25	76
ФУЗ X	11,4	$[M+H]^+$	355,4	247,0; 229,1	12,3; 16,0	103
НЕОС	11,4	$[M+NH_4]^+$	400,2	215,1; 197,2	16,6; 16,7	79
НТ-2	12,3	$[M+NH_4]^+$	442,3	215,1; 263,1	10; 10	91
3- и 15- ацДОН	13,5	$[M+H]^+$	339,1	137,1; 231,1	10; 12,9	97
АФЛ G2	14,1	$[M+H]^+$	331,1	245,1; 189,1; 285,1	30; 41; 27	170
АФЛ G1	14,3	$[M+H]^+$	329,1	243; 200	26; 41	150
ФВ1	14,4	$[M+H]^+$	722,5	704,5; 352,4	28; 36	217
АФЛ В2	14,8	$[M+H]^+$	315,1	287,1; 259,0	32; 29	170
ДАС	14,9	$[M+NH_4]^+$	384,2	307,2; 247,1	10,3; 14	89
АФЛ В1	16,1	$[M+H]^+$	313,1	241,0; 213,0	37; 45	166
ГЕН	16,2	$[M+H]^+$	415,3	312,2; 256,2	19; 29	129
ФВ2	16,9	$[M+H]^+$	706,5	336,4; 354,4	36; 34	150
МФК	17,5	$[M+H]^+$	321,0	207,0; 303,1	22; 10	113
Г-2	18,9	$[M+NH_4]^+$	484,3	215,1; 185,1; 305,2	17; 21; 13	138
ЦТВ	19,1	$[M+H]^+$	403,2	297; 315	10; 10	45
ОТА	19,3	$[M+H]^+$	404,1	239; 221	24; 35	123
СТЦ	21,1	$[M+H]^+$	325,1	281,0; 253,0	36; 44	152
ЦПК	21,8	$[M+H]^+$	337,1	182,0; 196,1	19; 23	165
ЭНН В	24,6	$[M+NH_4]^+$	657,6	214,2; 527,4	31; 27	142
БО	25,2	$[M+NH_4]^+$	801,4	244,2; 134,2	32; 54	215
ЭНН А	25,5	$[M+H]^+$	682,7	210,2; 228,2	24; 24	255

Примечание: * первым указан ион, использованный для количественного определения.

Таблица 2

Переходы МТ, детектируемых в режиме MRM, в отрицательной полярности

МТ	t_R , мин	Аддукт	Материнский ион, m/z	Дочерние ионы*, m/z	Энергия соудар., В	Фрагментор, В
ЦИТ 1	12,0	$[M+CH_3OH-H]^-$	281	249	10	50
ЦИТ 2	12,0	$[M-H]^-$	249,2	115,2; 205,1	52; 18	200
АЛТ	14,2	$[M-H]^-$	291,2	189,2; 203	32; 32	188
АОН	16,2	$[M-H]^-$	256,9	213; 215; 212,1	22; 25; 32	195
ЗЕН	20,0	$[M-H]^-$	317,2	175; 73,1; 131,1	23; 18; 28	228
АМЭ	20,1	$[M-H]^-$	271,1	256; 228; 227,1	21; 29; 37	194

Примечание: * первым указан ион, использованный для количественного определения.

Таблица 3

Частота обнаружения выявленных МТ в образцах кофе и цикория

МТ	Доля загрязненных МТ проб (> ПО), %		Содержание токсинов в загрязненных пробах, мкг/кг	Доля загрязненных проб (> МОК), %	Содержание МТ в загрязненных пробах, мкг/кг
	< МОК	> МОК			
	<i>Кофе, n = 32</i>			<i>Цикорий, n = 16</i>	
АФЛ В1	3	–	0,05	6	5,76
АФЛ В2	6	–	0,09; 0,11	–	–
ОТА	3	3	0,37; 1,07	6	1,6
СТЦ	3	–	–	–	–
МФК	–	44	23,5 – 712,2	–	–
ФВ2	6	3	0,2–2,6	–	–
ЭНН В	–	–	–	38	2,8–1109,0
БО	3	–	0,50	56	2,4–1173,0

Примечание: * ПО – предел обнаружения, МОК – минимальная определяемая концентрация.

Частота обнаружения и уровни загрязнения МТ зеленого и черного кофе

Токсин	Количество проб		Содержание МТ в загрязненных пробах, мкг/кг		Содержание МТ в пробах всего ряда, мкг/кг		
	исследовано	контаминировано, абс. (%)	диапазон	среднее	<i>M</i>	<i>Me</i>	90 % ур.
<i>Зеленый кофе</i>							
МФК	20	11 (55)	23,5–58,3	36,6	20,1	24,1	51,3
АФЛ В2		2 (10)	0,09; 0,11	0,10	0,010	0	0,05
ОТА		1 (5)	1,07	1,07	0,05	0	0
АФЛ В1		1 (5)	0,05	0,05	0,003	0	0
ФВ2		1 (5)	2,60	2,60	0,13	0	0
<i>Черный кофе в зернах</i>							
МФК	7	2 (25,6)	155,7; 712,2	434,0	124,0	0	155,7
ОТА		1 (14,3)	0,37	0,1	0,01	0	0,05
<i>Черный молотый кофе</i>							
МФК	5	1 (20,0)	72,8	72,8	14,6	0	36,4
БО		1 (20,0)	0,46	0,46	0,09	0	0,23

Проведенные исследования впервые позволили подтвердить присутствие в исследованных пробах кофе значительных количеств ЭМТ МФК и БО. МФК была обнаружена в 55 % образцов зеленого кофе (диапазон загрязнения от 23,5 до 58,3 мкг/кг). Частота загрязнения МФК черного обжаренного кофе была более чем в два раза ниже, при этом уровни были значительно выше – 151,7 и 712,2 мкг/кг в образцах зернового кофе, по сравнению с черным молотым и зеленым кофе. БО был также обнаружен в образце черного молотого кофе в количестве 0,5 мкг/кг.

ОТА был выявлен в единичных пробах черного зернового и зеленого кофе в количестве, в несколько раз превышающем нормы гигиенического регламента, установленного в странах Евросоюза. В зеленом кофе содержание ОТА было почти в 3 раза выше – 1,07 мкг/кг, чем в обжаренном кофе, что согласуется с опубликованными данными [5, 10].

Следует отметить, что АФЛ были контаминированы только образцы зеленого кофе: в одной пробе содержание АФЛ В1 составило 0,05 мкг/кг, в двух других образцах был найден АФЛ В2 в количествах 0,09 и 0,11 мкг/кг. Только в образце кофе робуста были найдены АФЛ В1, ФВ2 и следовые количества СТЦ. Подобные результаты были полу-

чены на образцах молотого кофе, следовые количества ОТА были выявлены только в смеси сортов. О более высокой загрязненности МТ кофе сорта робуста по сравнению с арабикой сообщали также Bessaire et al. [5].

Совместное присутствие нескольких МТ в кофе обнаруживали редко: в двух образцах было выявлено одновременное загрязнение двумя токсинами: МФК+ОТА и МФК+АФЛ В2. Подобные результаты для зеленого кофе были получены и другими исследователями [10]. Оценка риска контаминации кофе МТ, проведенная на основе анализа результатов по данной выборке проб кофе различных сортов и способов приготовления, показывает, что кофе, в сравнении с другими продуктами растительного происхождения, не является существенным источником МТ.

В данном исследовании впервые было изучено загрязнение микотоксинами **растворимого цикория**. В качестве загрязнителей этого продукта были выявлены четыре токсина, наиболее часто обнаруживали эмерджентные фузариотоксины БО и ЭНН В (табл. 5).

Более половины образцов содержали БО в количестве от 2,8 до 1109,0 мкг/кг, среднее содержание составляло: в загрязненных образцах – 152,8 мкг/кг, во всех изученных пробах – 85,9 мкг/кг. В шести

Таблица 5

Загрязненность цикория микотоксинами

Токсин	Количество проб		Диапазон загрязнения, мкг/кг	Среднее содержание в загрязненных пробах, мкг/кг	Содержание МТ в пробах всего ряда, мкг/кг		
	исследовано	контаминировано, абс. (%)			<i>M</i>	<i>Me</i>	90 % ур.
БО	16	9 (56)	2,4–1176,2	152,8	85,9	2,5	84,5
ЭНН В		6 (38)	2,8–1109,0	390,5	156,2	0	604,8
АФЛ В1		1 (6)	5,76	5,76	0,64	0	0
ОТА		1 (6)	1,6	1,6	0,1	0	0

пробах цикория был обнаружен ЭНН В в количестве от 2,8 до 1109,0 мкг/кг, его среднее содержание в загрязненных пробах достигало 390,5 мкг/кг, во всех изученных пробах – 156,2 мкг/кг, в 90 % – 604,8 мкг/кг. Обращает на себя внимание выявление в единичных случаях ОТА (на уровне 1,6 мкг/кг) и АФЛ В1 (5,76 мкг/кг), что превышает гигиенические регламенты содержания АФЛ В1, установленные для некоторых видов продуктов растительного происхождения в РФ (чай, кофе, какао-продукты, зерно и продукты его переработки).

Пробы жидких экстрактов цикория также были загрязнены ЭМТ: один образец содержал 2,8 мкг/кг ЭНН В и 3,6 мкг/кг БО, второй – 1060,2 мкг/кг ЭНН В и 1172,6 мкг/кг БО. Следует отметить, что в жареном цикории был выявлен регламентируемый в пищевых продуктах растительного происхождения АФЛ В1 (в количестве 5,76 мкг/кг) совместно с БО (3,0 мкг/кг).

Выводы:

1. Разработана методика количественного определения микотоксинов методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием: подобраны условия хроматографического и масс-спектрометрического определения для 29 МТ; установлены пределы детектирования и количественного определения и степени извлечения токсинов.

2. Впервые в РФ проведены исследования различных видов кофе и цикория на наличие расширенного спектра из 29 микотоксинов (МТ и ЭМТ), их производных и структурных аналогов. Получены данные, свидетельствующие о широкой распространенности в этих видах продукции малоизученных видов МТ: частота обнаружения ЭМТ,

представленных МФК и БО, в зеленом и жареном кофе составила 47 % от общего числа исследованных проб, в цикории БО и ЭНН В обнаружены в 94 % проб. Уровни загрязнения МФК кофе достигали 712,2 мкг/кг; максимальное содержание в цикории ЭНН В и БО составило 1109 и 1173 мкг/кг соответственно.

3. Из числа регламентируемых в пищевой продукции МТ в образцах кофе были обнаружены ОТА, АФЛ и ФВ2, в цикории – АФЛ В1 и ОТА. Обнаружение в растительных продуктах токсинов АФЛ, ОТА и фумонизинов, обладающих канцерогенными свойствами, является фактором потенциального риска здоровью человека при их поступлении с пищей.

4. Полученные в экспериментальных условиях данные о контаминации МТ и ЭМТ кофе и цикория свидетельствуют о необходимости углубленной гигиенической оценки поступающей на российский рынок растительной продукции, особенно из географических регионов с тропическим и субтропическим климатом, условия окружающей среды в которых благоприятны для вегетирования токсигенных плесневых грибов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, а также других малоизученных продуцентов микотоксинов и эмерджентных микотоксинов.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-16-00077-П) «Эмерджентные микотоксины в пищевых продуктах растительного происхождения: разработка методов анализа, изучение контаминации, видовая характеристика микромицетов-продуцентов, разработка гигиенических нормативов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Coffee Adulteration: More than Two Decades of Research / A.T. Toci, A. Farah, H.R. Pezza, L. Pezza // Crit. Rev. Anal. Chem. – 2016. – Vol. 46, № 2. – P. 83–92. DOI: 10.1080/10408347.2014.966185
2. Ergin E., Tokusoglu O., Vural H. Coffee toxicology, processing of the coffee and liver diseases (is it a miracle of nature?) // Food Process. Preserv. – 2021. – Vol. 45, № 4. – P. e15243. DOI: 10.1111/jfpp.15243
3. Виды и сорта кофе [Электронный ресурс]. – URL: <https://bengusta.com.ua/blog/likbez/vidy-i-sorta-kofe/> (дата обращения: 21.11.2021).
4. Coffee: biochemistry and potential impact on health / I.A. Ludwig, M.N. Clifford, M.E.J. Lean, H. Ashihara, A. Crozier // Food Funct. – 2014. – Vol. 5, № 8. – P. 1695–1717. DOI: 10.1039/c4fo00042k
5. Vierra V., Cunha S., Casal S. Mycotoxins in coffee // Coffee in Health and Disease Prevention. – 2015. – Chapter 25. – P. 225–233. DOI: 10.1016/B978-0-12-409517-5.00025.5
6. Impact of toxigenic fungi and mycotoxins in chickpea: a review / L.M. Ramirez, E. Cendoya, M.J. Nichea, V.G.L. Zchetti, S.N. Chulze // Current Opinion in Food Science. – 2018. – Vol. 23. – P. 32–37. DOI: 10.1016/j.cofs.2018.05.003
7. Abdel-Hadi A., Magan N. Influence of physiological factors on growth, sporulation and ochratoxin A/B production of the new *Aspergillus ochraceus* grouping // World Mycotoxin J. – 2009. – Vol. 2, № 4. – P. 429–434. DOI: 10.3920/WMJ2009.1156
8. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal / A.J. Benites, M. Fernandes, A.R. Boleto, S. Azevedo, S. Silva, A.L. Leitao // Food Control. – 2017. – Vol. 73, Part B. – P. 1223–1228. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.10.037
9. Perez De Obanos A., Gonzalez-Penas E., Lopez De Cerain A. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion // Food Addit. Contam. – 2005. – Vol. 22, № 5. – P. 463–471. DOI: 10.1080/02652030500090042
10. Mycotoxins in green coffee: Occurrence and risk assessment / T. Bessaire, I. Perrin, A. Tarres, A. Bebius, F. Reding, V. Theurillat // Food Control. – 2019. – Vol. 96. – P. 59–67. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.08.033

11. Lindenmeier M., Schieberle P., Rychlik M. Determination of ochratoxin A in food: comparison of a stable isotope dilution assay, liquid chromatography-fluorescence detection and an enzyme-linked immunosorbent assay // *Mycotoxin Res.* – 2011. – Vol. 27, № 2. – P. 115–121. DOI: 10.1007/s12550-010-0084-1
12. Molecularly imprinted polymer as sorbent in micro-solid phase extraction of ochratoxin A in coffee, grape juice and urine / T.P. Lee, B. Saad, W.S. Khayoon, B. Salleh // *Talanta.* – 2012. – Vol. 88. – P. 129–135. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.10.021
13. The concentration and prevalence of ochratoxin A in coffee and coffee-based products: A global systematic review, meta-analysis and meta-regression / A.M. Khaneghah, Y. Fakhri, L. Abdi, C.F.S.C. Coppa, L.T. Franco, C.A. Fernandes de Oliveira // *Fungal Biol.* – 2019. – Vol. 123, № 8. – P. 611–617. DOI: 10.1016/j.funbio.2019.05.012
14. Culliao A.G.L., Barcelo J.M. Fungal and mycotoxin contamination of coffee beans in Benguet province, Philippines // *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* – 2015. – Vol. 32, № 2. – P. 250–260. DOI: 10.1080/19440049.2014.1001796
15. Barcelo J.M., Barcelo R.C. Post-harvest practices linked with ochratoxin A contamination of coffee in three provinces of Cordillera Administrative Region, Philippines // *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* – 2018. – Vol. 35, № 2. – P. 328–340. DOI: 10.1080/19440049.2017.1393109
16. Ayelign A., De Saeger S. Mycotoxins in Ethiopia: Current status, implications to food safety and mitigation strategies // *Food Control.* – 2020. – Vol. 113. – P. 107163. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107163
17. UHPLC-MS/MS determination of ochratoxin A and fumonisins in coffee using QuEChERS extraction combined with mixed-mode SPE purification / K.F. Nielsen, A.F. Ngemela, L.B. Jensen, L.S. de Medeiros, P.H. Rasmussen // *J. Agric. Food Chem.* – 2015. – Vol. 63, № 3. – P. 1029–1034. DOI: 10.1021/jf504254q
18. Ochratoxin A in commercial soluble coffee and coffee substitutes / S. Casal, T. Vieira, R. Cruz, S.C. Cunha // *Food Res. Int.* – 2014. – Vol. 61. – P. 56–60. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.04.045
19. Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults / A. García-Moraleja, G. Font, J. Mañes, E. Ferrer // *Food Chem. Toxicol.* – 2015. – Vol. 86. – P. 225–233. DOI: 10.1016/j.fct.2015.10.014
20. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination / P. Karlovsky, M. Suman, F. Berthiller, J. De Meester, G. Eisenbrand, I. Perrin, I.P. Oswald, G. Speijers [et al.] // *Mycotoxin Research.* – 2016. – Vol. 32, № 4. – P. 179–205.
21. Токсиколого-гигиеническая характеристика микотоксина стеригматоцистина и методы его определения в пищевых продуктах / И.Б. Седова, М.Г. Киселева, Л.П. Захарова, В.А. Тутельян // *Гигиена и санитария.* – 2019. – Т. 98, № 1. – С. 105–117. DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-1-105-117
22. Simultaneous determination of mycotoxin in commercial coffee / A. García-Moraleja, G. Font, J. Mañes, E. Ferrer // *Food Control.* – 2015. – Vol. 57. – P. 282–292. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.04.031
23. Paterson R.R.M., Lima N., Taniwaki M.H. Coffee, mycotoxins and climate change // *Food Research International.* – 2014. – Vol. 61. – P. 1–15. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.03.037
24. Bokhari F.M., Aly M.M. Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia // *Advances in Biological Research.* – 2009. – Vol. 3, № 3–4. – P. 71–78.
25. Effect of different roasting levels and particle sizes on ochratoxin A concentration in coffee beans / G. Oliveira, D.M. da Silva, R. Pereira, L.C. Paiva, G. Prado, L.R. Batista // *Food Control.* – 2013. – Vol. 34, № 2. – P. 651–656. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.06.014
26. COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [Электронный ресурс] // *Official Journal of the European Union.* – December 20, 2006. – URL: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX: 32006R1881&from=EN](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=EN) (дата обращения: 01.11.2021).

Седова И.Б., Киселева М.Г., Чалый З.А. Микотоксины в кофе и цикории: от регламентируемых к эмерджентным // Анализ риска здоровью. – 2022. – № 2. – С. 64–72. DOI: 10.21668/health.risk/2022.2.06



Research article

MYCOTOXINS IN COFFEE AND CHICORY: FROM REGULATED TO EMERGENT**I.B. Sedova, M.G. Kiseleva, Z.A. Chalyy**

Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14 Ustinskiy proezd, Moscow, 109240, Russian Federation

*Coffee is a daily basic food product for many people all over the world. In Russia and some European countries, people who try to pursue healthy lifestyle often prefer chicory as a substitute to coffee. Our research goal was to evaluate occurrence of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria* secondary metabolites in coffee and chicory distributed on the RF market.*

29 mycotoxins were determined in 48 samples of coffee and chicory using ultra high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass-spectrometric detection (UHPLC-MS/MS).

*The range of analyzed contaminants included regulated mycotoxins (aflatoxins, ochratoxin A, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin, and zearalenone), their derivatives and structural analogs (A and B trichothecenes), *Alternaria* metabolites (alternariol, its methyl ether, altenuene, tentoxin), citrinin and several emergent mycotoxins (citroviridin, cyclopiatic and mycophenolic acids, enniatins, beauvericin).*

To the best of our knowledge, the present study is the first to report results indicating that unregulated emergent mycotoxins occur in the examined products. Chicory samples contained beauvericin (9 of 16 samples, the contents varied from 2.4 to 1173 µg/kg) and enniatin B (6 of 16 samples, 2.8–1109 µg/kg). Green and roasted coffee samples contained mycophenolic acid (11 of 20 samples, 23.5–58.3 µg/kg; 3 of 12 samples, 155.7–712.2 µg/kg accordingly). Several samples were contaminated with aflatoxins, ochratoxin A and fumonisin B2. Their contents in the examined samples did not exceed maximum levels; however, their occurrence indicates a potential health risk for consumers. This requires hygienic assessment and monitoring of these products with the focus on their contamination not only with regulated aflatoxin B1 and ochratoxin A but also with other potentially hazardous mycotoxins.

Keywords: mycotoxins, emergent mycotoxins, coffee, chicory, ochratoxin A, aflatoxins, contamination, UHPLC-MS/MS.

References

1. Toci A.T., Farah A., Pezza H. R., Pezza L. Coffee Adulteration: More than Two Decades of Research. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2016, vol. 46, no. 2, pp. 83–92. DOI: 10.1080/10408347.2014.966185
2. Ergin E., Tokusoglu O., Vural H. Coffee toxicology, processing of the coffee and liver diseases (is it a miracle of nature?). *Food Process. Preserv.*, 2021, vol. 45, no. 4, pp. e15243. DOI: 10.1111/jfpp.15243
3. Vidy i sorta kofe [Types and varieties of coffee]. Available at: <https://bengusta.com.ua/blog/likbez/vidy-i-sorta-kofo/> (21.11.2021) (in Russian).
4. Ludwig I.A., Clifford M.N., Lean M.E.J., Ashihara H., Crozier A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct.*, 2014, vol. 5, no. 8, pp. 1695–1717. DOI: 10.1039/c4fo00042k
5. Vierra V., Cunha S., Casal S. Mycotoxins in coffee. *Coffee in Health and Disease Prevention*, 2015, Chapter 25, pp. 225–233. DOI: 10.1016/B978-0-12-409517-5.00025.5
6. Ramirez L.M., Cendoya E., Nichea M.J., Zchetti V.G.L., Chulze, S.N. Impact of toxigenic fungi and mycotoxins in chickpea: a review. *Current Opinion in Food Science*, 2018, vol. 23, pp. 32–37. DOI: 10.1016/j.cofs.2018.05.003
7. Abdel-Hadi A., Magan N. Influence of physiological factors on growth, sporulation and ochratoxin A/B production of the new *Aspergillus ochraceus* grouping. *World Mycotoxin J.*, 2009, vol. 2, no. 4, pp. 429–434. DOI: 10.3920/WMJ2009.1156
8. Benites A.J., Fernandes M., Boletto A.R., Azevedo S., Silva S., Leitao A.L. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control*, 2017, vol. 73, part B, pp. 1223–1228. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.10.037
9. Perez De Obanos A., Gonzalez-Penas E., Lopez De Cerain A. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. *Food Additives and Contaminants*, 2005, vol. 22, no. 5, pp. 463–471. DOI: 10.1080/02652030500090042

© Sedova I.B., Kiseleva M.G., Chalyy Z.A., 2022

Irina B. Sedova – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory for Enzymology of Nutrition (e-mail: isedova@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-53-65; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6011-4515>).

Mariya G. Kiseleva – Candidate of Chemical Sciences, Senior Researcher at the Laboratory for Enzymology of Nutrition (e-mail: mg_kiseleva@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-53-65; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1057-0886>).

Zakhar A. Chalyy – Junior Researcher at the Laboratory for Enzymology of Nutrition (e-mail: brew@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-53-65; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9371-8163>).

10. Bessaire T., Perrin I., Tarres A., Bebius A., Reding F., Theurillat V. Mycotoxins in green coffee: Occurrence and risk assessment. *Food Control*, 2019, vol. 96, pp. 59–67. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.08.033
11. Lindenmeier M., Schieberle P., Rychlik M. Determination of ochratoxin A in food: comparison of a stable isotope dilution assay, liquid chromatography-fluorescence detection and an enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycotoxin Res.*, 2011, vol. 27, no. 2, pp. 115–121. DOI: 10.1007/s12550-010-0084-1
12. Lee T.P., Saad B., Khayoon W.S., Salleh B. Molecularly imprinted polymer as sorbent in micro-solid phase extraction of ochratoxin A in coffee, grape juice and urine. *Talanta*, 2012, vol. 88, pp. 129–135. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.10.021
13. Khaneghah A.M., Fakhri Y., Abdi L., Coppa C.F.S.C., Franco L.T., Fernandes de Oliveira C.A. The concentration and prevalence of ochratoxin A in coffee and coffee-based products: A global systematic review, meta-analysis and meta-regression. *Fungal Biol.*, 2019, vol. 123, no. 8, pp. 611–617. DOI: 10.1016/j.funbio.2019.05.012
14. Culliao A.G.L., Barcelo J.M. Fungal and mycotoxin contamination of coffee beans in Benguet province, Philippines. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 2015, vol. 32, no. 2, pp. 250–260. DOI: 10.1080/19440049.2014.1001796
15. Barcelo J.M., Barcelo R.C. Post-harvest practices linked with ochratoxin A contamination of coffee in three provinces of Cordillera Administrative Region, Philippines. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 2018, vol. 35, no. 2, pp. 328–340. DOI: 10.1080/19440049.2017.1393109
16. Ayelign A., De Saeger S. Mycotoxins in Ethiopia: Current status, implications to food safety and mitigation strategies. *Food Control*, 2020, vol. 113, pp. 107163. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107163
17. Nielsen K.F., Ngemela A.F., Jensen L.B., de Medeiros L.S., Rasmussen P.H. UHPLC-MS/MS determination of ochratoxin A and fumonisins in coffee using QuEChERS extraction combined with mixed-mode SPE purification. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, vol. 63, no. 3, pp. 1029–1034. DOI: 10.1021/jf504254q
18. Casal S., Vieira T., Cruz R., Cunha S.C. Ochratoxin A in commercial soluble coffee and coffee substitutes. *Food Res. Int.*, 2014, vol. 61, pp. 56–60. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.04.045
19. García-Moraleja A., Font G., Mañes J., Ferrer E. Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults. *Food Chem. Toxicol.*, 2015, vol. 86, pp. 225–233. DOI: 10.1016/j.fct.2015.10.014
20. Karlovsky P., Suman M., Berthiller F., De Meester J., Eisenbrand G., Perrin I., Oswald I.P., Speijers G. [et al.]. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 2016, vol. 32, no. 4, pp. 179–205.
21. Sedova I.B., Kiseleva M.G., Zakharova L.P., Tutelyan V.A. Toxicological and hygienic characteristics of mycotoxin sterigmatocystin and methods for its determination in food products. *Gigiena i sanitariya*, 2019, vol. 98, no. 1, pp. 105–117. DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-1-105-117
22. García-Moraleja A., Font G., Mañes J., Ferrer E. Simultaneous determination of mycotoxin in commercial coffee. *Food Control*, 2015, vol. 57, pp. 282–292. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.04.031
23. Paterson R.R.M., Lima N., Taniwaki M.H. Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, 2014, vol. 61, pp. 1–15. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.03.037
24. Bokhari F.M., Aly M.M. Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia. *Advances in Biological Research*, 2009, vol. 3, no. 3–4, pp. 71–78.
25. Oliveira G., da Silva D.M., Pereira R., Paiva L.C., Prado G., Batista L.R. Effect of different roasting levels and particle sizes on ochratoxin A concentration in coffee beans. *Food Control*, 2013, vol. 34, no. 2, pp. 651–656. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.06.014
26. COMMISSION REGULATION (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, December 20, 2006. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=EN> (01.11.2021).

Sedova I.B., Kiseleva M.G., Chalyy Z.A. Mycotoxins in coffee and chicory: from regulated to emergent. *Health Risk Analysis*, 2022, no. 2, pp. 64–72. DOI: 10.21668/health.risk/2022.2.06.eng

Получена: 30.11.2021

Одобрена: 13.04.2022

Принята к публикации: 21.06.2022