

Oszacowanie pobrania ochratoksyny A z kawą

Assessment of ochratoxin A intake with coffee

JOLANTA PIERZYNOWSKA, MAGDALENA GÓRNICKA, JOANNA FRĄCKIEWICZ, AGNIESZKA TOMCZAK

Katedra Żywnienia Człowieka, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wprowadzenie. Kawa jest jednym z najpopularniejszych i najczęściej spożywanych produktów na świecie. Jednak poza działaniem korzystnym na organizm, kawa może także być źródłem związków toksycznych, do których należy między innymi ochratoksyna A (OTA).

Cel. Oznaczenie ochratoksyny A w naparach wybranych marek kawy znajdujących się na rynku krajowym oraz oszacowanie jej pobrania wśród osób dorosłych spożywających kawę.

Materiały i metody. Zawartość ochratoksyny A oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), przy użyciu kolumn powinowactwa immunologicznego (IACs). W celu oszacowania pobrania OTA z kawą przeprowadzono wśród 152 osób badanie ankietowe dotyczące rodzaju, częstotliwości i ilości spożywanej kawy. Na podstawie zawartości OTA oznaczonej analitycznie i ilości spożywanej kawy oszacowano dzienne pobranie, które następnie porównano z poziomem Tymczasowego Tolerowanego Dziennego Pobrania (PTDI).

Wyniki. Wyniki badań wykazały obecność OTA we wszystkich próbkach kawy, ale oznaczone ilości w kawach czarnych nie przekraczały dopuszczalnych poziomów. Średnia zawartość OTA w kawach czarnych (1,5 µg/kg) nie zależała od rodzaju kawy (mielona vs. rozpuszczalna). Najwyższe średnie stężenie (10,5 µg/kg) stwierdzono w kawi zielonej. Respondenci najczęściej spożywali kawę instant w ilości 1-3 filiżanek dziennie. Otrzymane wyniki wskazały, że pobranie OTA z czarną kawą może stanowić 2 do 19% wartości PTDI, natomiast dla kawy zielonej 16 do 116% PTDI.

Wnioski. Ochratoksyna A została wykryta we wszystkich badanych próbkach kawy, ale oznaczone ilości nie przekraczały dopuszczalnych poziomów, podobnie jak średnie oszacowane pobranie OTA w badanej grupie osób. Konieczne wydaje się ustalenie najwyższego dopuszczalnego poziomu OTA dla kawy zielonej, która nie jest poddawana procesowi palenia. Wobec powszechnego spożywania kawy niezbędne jest kontrolowanie zawartości OTA w kawach znajdujących się na polskim rynku.

Słowa kluczowe: ochratoksyna A, kawa, HPLC

Introduction. Coffee is one of the most popular and most widely consumed products all over the world. However, apart from the positive effect on the body, coffee can also be a source of toxic compounds, which include ochratoxin A (OTA).

Aim. To determine OTA in coffee infusions of selected brands on the domestic market and the dietary exposure assessment among adults drinking coffee.

Material & Method. OTA was determined by the high performance liquid chromatography (HPLC) using immunoaffinity columns (IACs). The study to estimate the daily intake of OTA with coffee was conducted in 152 persons. The survey included questions about type, frequency and amount of consumed coffee. Based on the analytically determined OTA and on the amount of consumed coffee the daily intake was estimated and then compared with the PTDI level.

Results. The results showed the OTA presence in all samples of coffee, but the determined amounts of black coffees did not exceed the acceptable levels. The average OTA content in black coffees (1.5 µg/kg) did not depend on the coffee type (ground vs. instant). The highest average concentration (10.5 µg/kg) was found in green coffee. The respondents most frequently consumed instant coffee in quantities of 1 to 3 cups a day. The results indicated that the OTA consumption with black coffee contributed to 2-19% of the PTDI, whereas green coffee to 16-116% of the PTDI.

Conclusion. Ochratoxin A was detected in all the analyzed coffee samples, but the determined amount did not exceed acceptable levels, as well as the estimated average OTA intake in the studied group. It seems necessary to establish a maximum level for ochratoxin A for green coffee, which is not subjected to the roasting process. The occurrence of OTA in all the analyzed coffee samples confirmed the importance of effective control in the food sector.

Key words: ochratoxin A, coffee, HPLC

© Probl Hig Epidemiol 2016, 97(1): 87-90

www.phie.pl

Nadesłano: 14.10.2015

Zakwalifikowano do druku: 06.03.2016

Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr hab. Magdalena Górnicka

Katedra Żywnienia Człowieka, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, SGGW

ul. Nowoursynowska 159 c, 02-776 Warszawa

tel. 225 93 71 12, e-mail: magdalena_gornicka@sggw.pl

Wprowadzenie

Kawa jest jednym z najpopularniejszych i najczęściej spożywanych produktów na świecie. W badaniach epidemiologicznych zwraca się uwagę na korzystne działanie związków zawartych w kawie,

takich jak: polifenole (kwas chlorogenowy, chinowy i kawowy), witamina PP oraz cafestol i kahweol [1]. Jednak kawa może także być źródłem związków toksycznych, do których należy m.in. ochratoksyna A (OTA). Jest to mikotoksyna wytwarzana przez grzyby

strzępkowe, głównie z rodzaju *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Rhizopus*. W kawie OTA jest głównie wytwarzana przez *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*. Porażone grzybem mogą być już owoce kawy w skutek błędów agrotechnicznych. Dalsze skażenie może nastąpić podczas złego magazynowania i przechowywania wilgotnych ziaren kawy [2]. Ochratoksyna A została sklasyfikowana przez IARC (*International Agency for Research on Cancer*) jako karcinogen (grupa 2B) [3]. Ochratoksyna A spożyta z żywnością przez długi czas pozostaje w organizmie i stanowi zagrożenie dla zdrowia, wykazując działanie nefrotoksyczne, neurotoksyczne, hepatotoksyczne, mutagenne, kancerogenne i teratogenne [4-9].

Ochratoksynę A wykryto w kawie zielonej, palonej oraz ekstraktach kawy [10-12], przy czym stwierdzono, że OTA w kawie rozpuszczalnej wykazuje wyższą stabilność. Podczas procesu palenia kawy część OTA ulega zniszczeniu, a jej obecność w produkcie przeznaczonym do spożycia świadczy o znacznym skażeniu surowca [13].

Ze względu na zagrożenie zdrowotne, jakie stwarza OTA wyznaczono ściśle limity jej zawartości w produktach spożywczych, które dla kawy palonej wynosi 5 µg/kg, dla rozpuszczalnej 10 µg/kg [14]. W przypadku zielonej kawy wg Rozporządzenia Komisji UE [15] „obecność OTA jest monitorowana na bardziej odpowiednim etapie produkcji”. We wcześniejszym Rozporządzeniu (EC) 123/2005 ustalono maksymalny poziom w ziarnach kawy zielonej na 8 µg/kg [16]. W 2007 r. Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Substancji Dodatkowych (JECFA – *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) ustanowił dla OTA Tymczasowe Tolerowane Tygodniowe Pobranie (PTWI) na poziomie 100 ng/kg m.c./tydzień [17], natomiast Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA – *European Food Safety Authority*) na poziomie 120 ng/kg m.c./tydzień [18], co daje wartość PTDI 14-17 ng/kg m.c.

Cel

Oszacowanie pobrania OTA z naparem wybranych kaw, znajdujących się na rynku krajowym. Przeprowadzono badanie ankietowe na temat spożycia wybranych rodzajów kawy, a następnie na podstawie zawartości OTA oznaczonej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), przy użyciu kolumn powinowactwa immunologicznego (IACs), oszacowano jej pobranie z naparami kawy.

Materiały i metody

Do badania pobrano próbki 3 popularnych na rynku polskim marek kaw mielonych (Tchibo Classic,

Elite Pedros, Prima), 4 marek kaw rozpuszczalnych (Prima, Jacobs, Nescafe Classic, Maxwell House) oraz jednej – kawy zielonej, z 5 placówek handlowych. Dla poszczególnych rodzajów i marek kawy sporządzono próbki laboratoryjne, które bezpośrednio po pobraniu poddawano analizie chemicznej. Dla każdego rodzaju i marki kawy wykonywano 3 powtórzenia oznaczenia OTA. Wszystkie poddane badaniom produkty znajdowały się, zgodnie z deklaracją producenta, w okresie przydatności do spożycia. Kawy były zapakowane w hermetycznie zamknięte opakowania, zabezpieczone przed dostępem powietrza i wilgoci warstwą folii metalizowanej oraz nakrętką lub wieczkiem z tworzywa sztucznego.

Oznaczanie stężenia OTA w próbkach kawy wykonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym (HPLC HEWLETT PACKARD – T-Series 1050; Detektor – Agilent 1100 Series). Zastosowano kolumnę Waters Spherisorb ODS2 5 µm/25 cm/5 nm. Do wyekstrahowania OTA z próbek kawy użyto kolumn powinowactwa immunologicznego Ochraprep (R-Biopharm Rhone Ltd, UK). Detekcji dokonywano przy długości fali emisji wynoszącej 443 nm i fali ekstynkcji 333 nm wg zaleceń firmy R-Biopharm Rhone Ltd [19]. Zawartość OTA w badanej próbce odczytywano w odniesieniu do standardu OTA (Sigma-Aldrich). Dane poddano analizie statystycznej wykorzystując testy Kruskal-Wallis i U Mann-Whitney, przyjmując poziom istotności $p=0,05$.

Celem oszacowania pobrania OTA z naparem kawy przeprowadzono badanie ankietowe wśród 152 osób w wieku 18-35 lat. Dobór próby był celowy – wybierano osoby deklarujące codzienne spożywanie kawy. Poza metryczką, w której pytano o płeć, wiek, masę ciała, pytania zamknięte zawarte w ankiecie dotyczyły marki, rodzaju, ilości kawy użytej jednorazowo do przyrządzania naparu oraz ilości filiżanek kawy wypijanych w ciągu dnia. Dzielne pobranie OTA oszacowano biorąc pod uwagę jej średnią i maksymalną zawartość dla każdego rodzaju kawy (tab. I), najczęściej deklarowaną ilość wypijanych filiżanek kawy na dzień i ilość łyżeczek kawy (przyjęto dla kawy palonej 1 łyżeczkę – 5 g, kawa instant i zielona – 6 g) do przyrządzania naparu oraz średnią masę ciała badanych ($57 \pm 1,7$ kg). Otrzymane wartości porównano do poziomu PTDI – 14 ng/kg m.c.

Wyniki

Wyniki badań wykazały obecność OTA we wszystkich próbkach kawy (tab. I). Średnia zawartość OTA w kawach czarnych nie zależała od rodzaju kawy (mielona vs. rozpuszczalna). W kawach czarnych stwierdzono, że zawartość OTA we wszystkich ba-

danych próbkach nie przekroczyła dopuszczalnych poziomów. Z kolei najwyższe średnie stężenie, przekraczające kilkukrotnie zawartość OTA w kawach czarnych, stwierdzono w zyskującej coraz większą popularność kawie zielonej. Uzyskane wyniki analiz zawartości OTA w kawie, oceniano pod względem przekroczenia najwyższych dopuszczalnych poziomów (NDP), zawartych w rozporządzeniu Komisji (UE) nr 105/2010 [20]. Jak wskazują otrzymane wyniki (tab. I), w badanych rodzajach kawy zawartość OTA nie przekraczała wartości NDP.

Wśród analizowanych rodzajów kaw najczęściej spożywano kawę rozpuszczalną (67% badanych), co piąta osoba deklarowała konsumpcję kawy palonej (20%); najrzadziej była spożywana kawa zielona (13%). Ponad połowa respondentów (52%) wypijała od 1 do 3 filiżanek dziennie; co piąta osoba deklarowała spożywanie powyżej 3 filiżanek lub po jednej filiżance, ale nie codziennie. Napar przyrządzany był najczęściej z 2 łyżeczek kawy (60% badanych), rzadziej była to jedna łyżeczka (39%); jedynie tylko 1 osoba zadeklarowała, że przyrządza kawę z 3 i więcej łyżeczek.

Dzienne pobranie OTA zależy od liczby wypijanych filiżanek kawy. Oszacowano, że sporządzając napar z 2 łyżeczek czarnej kawy, dzienne pobranie OTA mogło stanowić 2-19% wartości PTDI, natomiast dla kawy zielonej 16-116% PTDI (tab. II).

Dyskusja

Otrzymane wyniki, wskazujące na obecność OTA we wszystkich próbkach kawy, są zbliżone do uzyskanych w badaniach przeprowadzonych w innych krajach, które dla kawy czarnej były następujące: 0,67-4,70 µg/kg (kawa parzona) [21], <0,15-11,8 µg/kg (kawa rozpuszczalna) [22], 0,32-6,40 µg/kg (kawa rozpuszczalna) [23]. Jak wykazał Vecchio i wsp [23] poziom zanieczyszczeń OTA jest podobny także w kawach bezkofeinowych. Z kolei zawartość OTA w kawie zielonej jest dość zróżnicowana i mieści się w zakresie 2-32 µg/kg [24].

W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w badaniu Ostry i wsp. [25], w których wykazano, że w porównaniu do innych grup populacyjnych, kobiety w wieku 18-59 lat ze względu na wysokie spożycie kawy i wina narażone są na nadmierne pobranie OTA, w niniejszym badaniu nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu płci na spożycie (ilość, rodzaj) kawy (dane nie przedstawiane), dlatego pobranie OTA oszacowano dla całej grupy.

Oszacowany poziom dziennego pobranie OTA z czarną kawą był zbliżony do wyników otrzymanych w innych badaniach, w których wykazano pobranie OTA z kawą rozpuszczalną na poziomie 2-9% PTDI [22], czy na poziomie 0,7-6,3% PTWI [23]. Dziennego pobranie OTA zależy od rodzaju i ilości wypijanej kawy, ale także od masy ciała konsumentów. Według

Tabela I. Zawartość OTA w badanych próbkach kawy, % ustalonego maksymalnego poziomu (% NDP; dla kawy palonej – 5 µg/kg; instant – 10 µg/kg) oraz szacunkowa ilość OTA w jednej filiżance kawy [ng]

Table I. OTA content in test samples of coffee, % of maximum level (for roasted coffee – 5 µg/kg; instant – 10 µg/kg) and estimated OTA amount in one cup of coffee [ng]

Rodzaj kawy /Coffee	Ochratoksyna A /Ochratoxin A [µg/kg]		P	% NDP /% Maximum level	Szacunkowa ilość OTA w jednej filiżance naparu z 2 łyżeczek kawy /Estimated OTA amount in one cup with 2 teaspoons of coffee [ng]
	M±SD	Min-Max			
Palona /Roasted					
1	1,98±0,48	1,48-2,50	ns	40	20
2	1,07±0,29	0,85-1,40		21	11
3	1,43±0,32	1,10-1,76		29	14
średnio /average	1,49a±0,10			30	15
Instant /Instant					
1	1,39±0,06	1,32-1,44	ns	14	17
2	1,76±0,04	1,72-1,81		18	21
3	1,82±0,21	1,69-2,07		18	22
4	1,07±0,21	0,84-1,33		11	13
średnio /average	1,51 ^a ±0,09			15	18
Zielona /Green	10,53 ^b ±2,43	8,01-12,87	<0,001		126

^{a, b} – różnice istotne statystycznie /statistically significant differences

Tabela II. Oszacowane średnie i maksymalne pobranie OTA dla naparu sporządzonego z 2 łyżeczek kawy (PTDI – 14 ng/kg m.c.)

Table II. Estimated average and maximum OTA level for brew made with 2 teaspoons of coffee (PTDI – 14 ng/kg b.w.)

OTA [ng/kg m.c./d] /OTA [ng/kg b.w./d]	Kawa palona /Roasted coffee		Kawa instant /Instant coffee		Kawa zielona /Green coffee	
	średnie /average 1,49 [µg/kg]	maksymalne /maximum 2,50 [µg/kg]	średnie /average 1,51 [µg/kg]	maksymalne /maximum 2,07 [µg/kg]	średnie /average 10,53 [µg/kg]	maksymalne /maximum 12,87 [µg/kg]
1 filiżanka /1 cup (% PTDI)	0,3 (2)	0,4 (3)	0,3 (2)	0,4 (2)	2,2 (16)	2,7 (19)
3 filiżanki /3 cups (% PTDI)	0,8 (6)	1,3 (9)	0,9 (6)	1,3 (9)	6,6 (47)	8,1 (58)
≥6 filiżanek /≥6 cups (% PTDI)	1,6 (11)	2,7 (19)	1,9 (14)	2,6 (19)	13,3 (95)	16,3 (116)

badania Malir [26] na zawartość OTA w parzonej kawie istotnie wpływają również takie czynniki jak: ilość użytej wody, temperatura wody, a także pH.

Obecność mikotoksyn, w tym OTA stwierdza się w różnych produktach spożywczych i płodach rolnych, dla których ustalone są określone limity zanieczyszczeń [20, 27]. Według de Almeida i wsp. [28] maksymalne poziomy OTA w ziarnach kawy ustalono tylko w kilku krajach. Przepisów legislacyjnych odnośnie mikotoksyn nie ustalono w krajach będących głównymi producentami kawy: Brazylii i Indonezji. Z uwagi na powszechne spożywanie różnego rodzaju kawy i fakt, że kawa zielona staje się coraz bardziej popularna, zasadne byłoby urzędowe monitorowanie zawartości OTA.

Wnioski

1. Ochratoksyna A została wykryta we wszystkich badanych próbkach kawy, ale oznaczone ilości nie przekraczały dopuszczalnych poziomów, podobnie jak średnie oszacowane pobranie OTA w badanej grupie osób.
2. Konieczne wydaje się ustalenie najwyższego dopuszczalnego poziomu OTA dla kawy zielonej, która nie jest poddawana procesowi palenia.
3. Wobec powszechnego spożywania kawy niezbędne jest kontrolowanie zawartości OTA w kawach znajdujących się na polskim rynku.

Piśmiennictwo / References

1. Wobszal P, Grzegorzewska AE. Wpływ kawy na metabolizm lipidów z odniesieniem do zdrowotnych skutków picia kawy. *Now Lek* 2009, 78(2): 148-152.
2. Pardo E, Marin S, Ramos AJ, Sanchis V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. *Food Sci Technol Int* 2004, 10(1): 45-49.
3. WHO-IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC. Monographs of the evaluation of carcinogenic risks to humans. WHO-IARC, Lyon France 1993, 56: 489-521.
4. Aish JL, Rippon EH, Barlow T, Hattersley SJ. Ochratoxin A. [in:] *Mycotoxins in food*. Magan N, Olsen M. Food Standards Agency, UK 2004: 307-338.
5. Atroshi F, Biese I, Saloniemi H. Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2000, 3(3): 281-291.
6. Dortant PM, Peters-Volleberg GW, Van Loveren H, et al. Age-related differences in the toxicity of ochratoxin A in female rats. *Food Chem Toxicol* 2001, 39(1): 55-65.
7. Fuchs R, Peraica M. Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Addit Contam* 2005, 22(1): 53-57.
8. Grajewski J. Możliwości inaktywacji ochratoksyny A w badaniach in vitro oraz in vivo u kurcząt. *Akademia Bydgoska, Bydgoszcz* 2003.
9. Niemiec J. Ochratoksyna A w paszy a wyniki produkcji kur i brojlerów. *Materiały IV Konferencji Naukowej „Mikotoksyny w żywności i paszach”*, Bydgoszcz 15-17.06.1998: 74.
10. Joosten HMLJ, Pittet A, Schellenberg M, Bucheli P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *Int J Food Microbiol* 2001, 65(1-2): 39-44.
11. Leoni LA, Soares LM, Oliveira PL. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. *Food Addit Contam* 2000, 17(10): 867-870.
12. Taniwaki MH, Pitt JI, Teixeira AA, Iamanaka BT. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int J Food Microbiol* 2003, 82(2): 173-179.
13. Patel S, Hazel CM, Winterton AGM, Gleadle AE. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. *Food Addit Contam* 1997, 14(3): 217-222.
14. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do ochratoksyny A.
15. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 105/2010 zmieniające rozporządzenie WE nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do ochratoksyny A.
16. Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union*.
17. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Evaluation of certain food additives and contaminants. [in:] 68th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical report series no 947, Geneva, WHO 2007: 208.
18. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *EFSA J* 2007, 365: 1-56.
19. Quantitative detection of ochratoxin A. R-Biopharm Rhône LTD 2002: 1-5.
20. Pokrzywa P, Cieślak E, Topolska K. Ocena zawartości mikotoksyn w wybranych produktach spożywczych. *Żywność Nauk Tech Jakość* 2007, 3(52): 139-146.
21. 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, 86: 225-233.
22. Casal S, Vieira T, Cruz R, Cunha SC. Ochratoxin A in commercial soluble coffee and coffee substitutes. *Food Res Int* 2014, 61: 56-60.
23. Vecchio A, Mineo V, Planeta D. Ochratoxin A in instant coffee in Italy. *Food Control* 2012, 28(2): 220-223.
24. Vatinno R, Aresta A, Zamboni CG, et al. Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 2008, 1187(1-2): 145-150.
25. Ostry V, Malir F, Dofkova M, et al. Ochratoxin A dietary exposure of ten population groups in the Czech Republic: comparison with data over the world. *Toxins* 2015, 7: 3608-3635.
26. Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, et al. Transfer of ochratoxin A into tea and coffee beverages. *Toxins* 2014, 6: 3438-3453.
27. Stanisławczyk R, Rudy M, Świątek B. Występowanie mikotoksyn w zbożach i przetworach zbożowych znajdujących się w placówkach handlowych województwa podkarpackiego. *Żywn Nauk Technol Jakość* 2010, 6(73): 58-66.
28. de Almeida AP, Alaburda J, Shundo L, et al. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. *Braz J Microbiol* 2007, 38: 300-303.