

ZNANSTVENO MIŠLJENJE

o patulinu u sokovima od jabuka

Donositelj znanstvenog mišljenja (sukladno članku 7. st. 3. ovoga Pravilnika)

(Zahtjev HAH – Z – 2017-3)

Usvojeno 31. listopada 2017.

ČLANOVI ZNANSTVENOG ODBORA ZA KEMIJSKE OPASNOSTI

- izv. prof. dr. sc. Jelka Pleadin, HVI, Zagreb, *predsjednica ZO*
- prof. dr. sc. Helga Medić, PBF, Zagreb, *zamjenica predsjednice ZO*
- prof. dr. sc. Jasna Bošnjir, NZZJZ „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb
- prof. dr. sc. Tomislav Klavec, PTF, Osijek
- dr. sc. Nino Dimitrov, HZJZ, Zagreb

KOORDINATOR IZ HAH-a

- Leonard Matijević, mag.nutr

SAŽETAK

U ovom znanstvenom mišljenju obuhvaćeni su rezultati monitoringa mikotoksina patulina u uzorcima sokova od jabuka koje je Hrvatska agencija za hranu (HAH) prikupila unutar trogodišnjeg razdoblja (2014. – 2016. god.).

Ukupno je uzorkovano 122 uzorka pri čemu je uočeno 5 nesukladnih uzoraka (4,1 %) te je u 26 uzoraka (21,3 %) kvantificiran patulin uz prosječne količine od 6,61, 8,57 i 10,54 µg/kg (zavisno od primijenjenog scenarija koji se odnosi na obradu onih podataka ispod granice kvantifikacije). Podaci o konzumaciji sokova od jabuka dobiveni su iz Nacionalnog istraživanja o prehrambenim navikama odrasle populacije RH te je dobivena prosječna konzumacija sokova od jabuka u iznosu od 66 g/dan (0,88 g/kg t.m./dan). Za procjenu izloženosti konzumenata sokova od jabuka patulinu, koristio se računalni model „Improrisk 1.3.4“, koji je ugrađen u „MS Excel“ te se koristi za izračun izloženosti populacije određenim kontaminantima. Izračuni iz „Improriska“ pokazali su da niti u jednom slučaju nije došlo do prekoračenja toksikološke granice, odnosno uspostavljenog privremenog najvećeg podnošljivog dnevnog unosa (engl. *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake, PMTDI*) za patulin od 0,4 µg/kg t.m. U scenariju najgoreg slučaja, koji obuhvaća „Scenarij 3“ (za sve vrijednosti ispod granice kvantifikacije koristila se puna vrijednost limita kvantifikacije) i izloženost na 95. percentili, vidljivo je da je izloženost 0,025 µg/kg t.m., što je čak 16 puta niže od uspostavljenog PMTDI-a za patulin. Stoga se može zaključiti da je rizik zanemariv.

Na temelju dosadašnjih rezultata monitoringa, HAH je objavila na svojim web stranicama „Smjernice za prevenciju i smanjenje kontaminacije patulinom u sokovima od jabuka i sastojcima sokova od jabuka u drugim pićima“. Smjernice su namijenjene svim zainteresiranim stranama, a napose proizvođačima sokova od jabuka kako bi se educirali o mjerama koje se mogu poduzimati kod proizvodnje, prerade te skladištenja jabuka i njihovih proizvoda.

KLJUČNE RIJEČI

patulin, mikotoksini, sokovi od jabuka, procjena rizika, Improrisk

SUMMARY

Results from three years monitoring (2014 – 2016) of mycotoxin patulin occurrence in apple juice were obtained by Croatian Food Agency (HAH) and summarized in this scientific opinion.

In total there were 122 samples which contained 5 samples (4,1 %) above maximum permitted levels and 26 samples (21,3 %) in which patulin was quantified at average concentrations: 6,61, 8,57 and 10,54 µg/kg (depending on scenarios used for dealing with left-censored data). Data on consumption of apple juices were obtained from National food consumption survey in Republic of Croatia which determined an average consumption of 66 g/day (0,88 g/kg b.w./day). For the purposes of dietary exposure assessment of consumers to patulin, the “Improrisk” (a model built in MS Excel) was used. Calculations obtained from “Improrisk” showed that no consumer exceeded the toxicological limit, i.e. established Provisional maximum tolerable daily intake, PMTDI for patulin of 0,4 µg/kg b.w. Worst case scenario, which uses “Scenario 3” (all values reported as below limit of quantification were replaced by their respective limit of quantification) and exposure at 95th percentile, estimated exposure of 0,025 µg/kg b.w., which is 16 times lower than PMTDI for patulin. Therefore, it was concluded that risk from patulin was negligible.

Croatian Food Agency, based on its records of monitoring results published “Code of practice for the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages”. This code of practice is for all stakeholders, but mainly for manufacturers as an education tool about measures which can be taken during manufacture, processing and storage of apples and apple products.

KEY WORDS

patulin, mycotoxins, apple juices, risk assessment, Improrisk

ZAHVALE

Hrvatska agencija za hranu zahvaljuje svim članovima Znanstvenog odbora za kemijske opasnosti na doprinosu u izradi ovog znanstvenog mišljenja.

SADRŽAJ	
SAŽETAK	2
SUMMARY	3
ZAHVALE	4
UVOD	6
PROCJENA RIZIKA	7
1. Identifikacija opasnosti	7
Biosinteza patulina	7
Toksokinetika i toksodinamika patulina	9
2. Karakterizacija opasnosti	12
Zakonska regulativa	12
3. Procjena izloženosti	14
Izvori izloženosti	14
Podaci o pojavnosti patulina u sokovima od jabuka dobivenih hladnim prešanjem	14
Podaci o konzumaciji sokova od jabuka	20
Improrisk v1.3.4	20
Procjena izloženosti	21
4. Karakterizacija rizika	23
ZAKLJUČCI	24
PREPORUKE	25
LITERATURA (REFERENCE)	25

UVOD

Patulin se ubraja u mikotoksine, a proizvode ga određene vrste plijesni, kao što su *Penicillium* (pogotovo *P. expansum*), *Aspergillus* i *Byssosclamyces* koje mogu rasti na/u različitim namirnicama uključujući voće, žitarice i sir (FDA, 2001). Najvažnijim izvorom patulina u ljudskoj prehrani smatraju se sokovi od jabuka. Ostali voćni sokovi također mogu biti potencijalni izvor patulina ako su pomiješani sa sokom od jabuka (Preedy i Watson, 2004).

Patulin je toksičan za mnoge biološke sustave (toksičan za stanice i tkiva u životinja), ali točni mehanizmi izazivanja bolesti u ljudi i životinja još nisu u potpunosti objašnjeni. Simptomi akutne toksičnosti su: uznemirenost, u nekim slučajevima grčevi, otežano disanje, kongestija pluća, edem i ulceracija, hiperemija i distenzija gastrointestinalnog trakta. Kod subakutne i subkronične toksičnosti najčešći simptomi su: poremećaji u gastrointestinalnom traktu s pojavom ulceracija, nadutosti i krvarenja, a pri visokim dozama i promjene u funkciji bubrega (Puel i sur., 2010). Također je toksičan za bakterije (u početnim istraživanjima nakon otkrića je smatran antibiotikom širokog spektra), plijesni, praživotinje, sisavce i biljke (Vasić – Rački i sur., 2010). Zbog nedovoljnih spoznaja o karcinogenosti patulina, Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *The International Agency for Research on Cancer*, IARC) ga je svrstala u Grupu 3 (ne može se klasificirati) (IARC, 1987). Trenutno važeći, privremeni najveći podnošljivi dnevni unos (engl. *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*, PMTDI) za patulin iznosi 0,4 µg/kg/ t.m. (SCF, 2000).

Prisutnost patulina je zakonski regulirana na području Europske unije s nekoliko pravnih akata u kojima su između ostalog propisane i najveće dopuštene količine patulina u određenoj hrani. Osim toga, pravnim aktima su propisane zadaće nadležnih tijela, koja kao takva planiraju i osiguravaju provedbu monitoringa i druge službene kontrole, te izrađuju izvješća koja prosljeđuju u Europsku komisiju i Europsku agenciju za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA). Unutar svog plana rada, Ministarstvo zdravstva svake godine provodi monitoring patulina u odabranim proizvodima, u svrhu nadzora i zaštite potrošača. Od 2015. godine, na inicijativu Ministarstva zdravstva uz potporu Upravnog vijeća Hrvatske agencije za hranu (HAH) provodi se dodatni monitoring kojim su obuhvaćeni sokovi od jabuka.

Do sada je HAH izradila dva znanstvena izvješća o pojavnosti patulina u određenim proizvodima na osnovi rezultata do sada provedenih monitoringa te su ista dostupna na web stranici HAH-a (HAH, 2014; 2015). Ovo znanstveno mišljenje objedinjuje podatke dobivene iz monitoringa u 2014., 2015. i 2016. godini, a na osnovi kojih je izrađena kompletna procjena rizika.

PROCJENA RIZIKA

1. Identifikacija opasnosti

Patulin (4-hidroksi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-on; CAS broj 149-29-1) je mikotoksin ili sekundarni metabolit određenih vrsta plijesni, kao što su *Penicillium*, *Aspergillus* i *Byssoschlamys*, a koje mogu rasti na različitoj hrani uključujući voće, žitarice i sir (FDA, 2001). Patulin je poliketid lakton, u obliku relativno male molekule (C₇H₆O₄) topive u vodi (Lawley, 2013). Na **Slici 1** je prikazana 3D struktura molekule patulina. Može se izolirati u obliku bezbojnih do bijelih kristala. Točka tališta mu je na oko 110 °C, a sublimira u visokom vakuumu na 70 – 100 °C. Osim u vodi, topiv je i u metanolu, etanolu, acetonu i etil ili amil acetatu, a manje je topiv u dietil eteru i benzenu. Stabilan je u kiselim otopinama, ali se može razgraditi kuhanjem u sumpornoj kiselini (H₂SO₄) u trajanju od 6 sati. Kada se SO₂ koristi kao konzervans u voćnim sokovima ili drugoj hrani, patulin se razgrađuje (Leo i Nollet, 2004).

Birkinshaw i sur. (1943) prvi su uspjeli izolirati patulin iz plijesni *Penicillium griseofulvum* i *Penicillium expansum* u nadi da će pronaći nove metabolite plijesni koji će imati antibiotska svojstva. Iz tog razloga je patulin prvotno bio klinički testiran kao antibiotik i kao lijek za prehladu, ali je interes za njegova antibiotska svojstva ubrzo nestao nakon otkrića njegove toksičnosti za ljude i životinje (Puel i sur., 2010).



Slika 1 3D prikaz strukture molekule patulina

Biosinteza patulina

Najveći proizvođač patulina je plijesan *Penicillium expansum* koja je odgovorna za čestu bolest koja se pojavljuje na jabukama nakon berbe (gnjiljenje, truljenje), odnosno tijekom skladištenja. Na **Slici**

2 je prikazana jabuka u podmakloj fazi zaraze s *Penicillium expansum*. Intenzitet biosinteze patulina ovisi o sljedećim okolišnim i endogenim čimbenicima:

- a_w -vrijednosti
- temperaturi
- pH- vrijednosti
- stanju atmosfere (%-tni udio O₂ i CO₂)

Povećana koncentracija CO₂ tijekom skladištenja može utjecati na biosintezu patulina, no visoke koncentracije dovode do smanjenja kakvoće jabuka, što se očituje gubitkom okusa i promjenama na kori. Utjecaj nižeg udjela O₂ (pri 25 °C) rezultira određenim povećanjem koncentracije patulina, ali i fiziološkim promjenama na plodu jabuke. Sljedeći parametar koji utječe na biosintezu je temperatura. Iako rast ovisi o soju, plijesni optimalno rastu i biosintetiziraju patulin pri temperaturama od 4 °C do 25 °C. Niže temperature ne zaustavljaju u potpunosti njegovu sintezu, već ju samo odgađaju, uslijed sporijeg rasta plijesni. Neke sorte plijesni (kao npr. *Byssoclamys nivea*) su termostabilne, kao i sami patulin u kiselim uvjetima. Stoga se može reći da standardna pasterizacija (pri temperaturama od 70 do 85 °C, 10-30 min) nije učinkovita da bi se osigurao krajnji proizvod bez patulina (Arnér, 2015). Osim toga, zabilježeno je da kratko izlaganje visokim temperaturama (150 °C) smanjuje koncentraciju patulina za otprilike 20 %. Minimalni aktivitet vode za germinaciju spora plijesni je 0,82, a kisela sredina pozitivno utječe na sintezu patulina (FAO, 2003; Motarjemi i sur., 2014; Vasić – Rački i sur., 2010).

Još neki čimbenici mogu utjecati na konačne koncentracije patulina u jabukama. Jabuke koje imaju oštećenja (djelovanjem insekata, nepažljivom berbom i daljnjom mehaničkom obradom i sl.) i koje su natučene uslijed pada na zemlju sa stabla, podložnije su mogućnosti zaraze plijesnima od drugih jabuka (čak i ako plijesan nije vidljiva jer tako oštećene jabuke svejedno mogu imati velike koncentracije patulina). Uočeno je da jabuke koje su pokupljene sa zemlje imaju veće koncentracije patulina od onih koje su ubrane sa stabla. Kako se u zadnjih nekoliko godina podiže svijest o tome da se pokuša umanjiti bacanje hrane te postići što veća iskoristivost, u kontekstu pojavnosti patulina to može imati negativan utjecaj (Arnér, 2015). Američka agencija za hranu i lijekove (*engl. Food and Drug Administration, FDA*) izračunala je kako jedna trula jabuka unutar 200 zdravih, može dovesti do premašivanja zakonskih najvećih dopuštenih koncentracija patulina u konačnom proizvodu (FDA 2004).

Neprikladni uvjeti skladištenja, koje obilježava visoka vlažnost, prljave posude u kojima su jabuke pohranjene te povišena temperatura, mogu pridonijeti jačem razvoju i rastu plijesni. Ako su jabuke uskladištene zajedno s nečistoćama, kao što su ostaci drugih jabuka, grane i lišće, može doći do potencijalnog prijenosa zaraze. Nadalje, duži period skladištenja također može utjecati na pojavnost plijesni. S druge strane, sudbina patulina u uskladištenim proizvodima nije posve jasna. Ipak Arnér (2015) navodi da je u soku od jabuka, koji je bio uskladišten 3 tjedna na 22 °C, uočena mala redukcija patulina, dok je kod soka u limenkama uskladištenog 5 tjedana, uočeno smanjenje razina patulina.

Na pojavnost patulina može utjecati i sorta jabuka. Na primjer, sorta koksoranž (Cox's Orange pippin) podložnija je napadima plijesni, nego sorta zlatni delišes (Golden Delicious) (Arnér, 2015).

Međutim, bez obzira na posvećivanje pažnje svim nabrojanim čimbenicima koji doprinose pojavnosti patulina, on i dalje može biti prisutan i u naizgled zdravom voću (Arnér, 2015).

Među najprikladnije mjere kojima se doprinosi smanjenju pojavnosti plijesni, a samim time i koncentracija patulina, ubraja se pranje plodova prije same prerade (pogotovo ozoniranom vodom). Nadalje, procesi u proizvodnji sokova, kao što su bistrjenje i filtracija, u pravilu smanjuju količine patulina. Smatra se da patulin tvori aduktove s proteinskim česticama u gustom soku, koje se odstrane filtracijom te su razine patulina u bistrom soku smanjene. Sumporni dioksid i askorbinska kiselina su se pokazali kao dodaci koji utječu na smanjenje koncentracija patulina (Arnér, 2015).



Slika 2 Jabuka zaražena s *Penicillium expansum* (izvor: Puel i sur., 2010)

Toksokinetika i toksodinamika patulina

Većina primijenjene doze patulina izlučena je iz organizma putem fecesa i urina unutar 48 sati, prema studijama na štakorima. Manje od 2 % izlučilo se u obliku ugljičnog dioksida te nisu bili uočeni drugi metaboliti. Oko 2 % od početne doze zadržalo se u organizmu i nakon 7 dana, većinom u eritrocitima (Wouters i Speijers, 1996).

Patulin ima snažan afinitet prema sulfhidrilnim skupinama, što objašnjava njegovo inhibirajuće djelovanje na mnoge enzime (ATP-sintetazu, alkalnu fosfatazu, aldolazu i heksokinazu). S druge strane, patulin je pokazao svojstvo aktivacije glikogen fosforilaze u jetri, što je dovelo do povećanja razine glukoze u krvi za 60 %. Spojevi patulina s cisteinom pokazali su manju toksičnost od nepromijenjenog oblika u studijama o akutnoj toksičnosti, teratogenosti i mutagenosti (Wouters i Speijers, 1996).

Većina informacija o toksičnosti patulina dobivena je iz studija na životinjama, odnosno postoji vrlo ograničena količina podataka (eksperimentalnih ili epidemioloških) o akutnoj ili kroničnoj toksičnosti na ljudima (Lawley, 2013).

U studijama o **akutnoj toksičnosti** patulina na glodavcima, oralna doza LD₅₀ se kretala od 29 do 55 mg/kg t.m. Kod oralne aplikacije patulina peradi, LD₅₀ iznosio je 170 mg/kg t.m. Kada se primjeni intravenozno, intraperitonealno ili subkutano, patulin je 3 do 6 puta toksičniji. Simptomi toksičnosti su: uznemirenost, u nekim slučajevima grčevi, otežano disanje, kongestija pluća, edem i ulceracija, hiperemija i distenzija gastrointestinalnog trakta. Treba spomenuti da postoje neki spojevi koji utječu na akutnu toksičnost patulina. Na primjer, inhibitori citokroma P450, kao što je proadifen (SKF 525A) značajno doprinose smanjenju toksičnosti ovog mikotoksina, dok indukcija citokroma P450 nema utjecaja (Puel i sur., 2010).

Subakutna reakcija na primjenu patulina najviše se proučavala na štakorima, pri čemu je zamijećeno smanjenje tjelesne mase, želučane i crijevne promjene kao i one vezane za funkcije bubrega. Ponavljajuće doze dovodile su do znakova neurotoksičnosti (drhtavica i grčenje), kao i do inhibicije nekoliko enzima (ATPaza) u crijevima i mozgu, što je posebno imalo utjecaj na metabolizam lipida. Slični klinički znakovi su primijećeni i kod miševa, hrčaka i kokoši. Kod majmuna nisu bili zamijećeni znakovi toksičnosti nakon dnevne primjene patulina od 5 do 500 µg/kg t.m. kroz četiri tjedna. Jedino su majmuni, koji su primali 5 mg patulina/kg t.m. u periodu od dva tjedna, počeli odbijati hranu u zadnja 3 dana studije (Puel i sur., 2010).

Selmanoglu i Kockaya (2004) su mjerili tiroidne i muške spolne hormone kod štakora koji su primali 0,1 mg patulina/kg t.m./dan oralnim putem u razdoblju od 60 do 90 dana. 60-dnevna izloženost povećala je razine testosterona u plazmi i smanjila razine hormona tiroksina, dok s druge strane promjene u razinama trijodtironina, tiroidnog stimulirajućeg hormona (TSH), luteinizirajućeg hormona i hormona rasta nisu zabilježene. Kada je izloženost trajala 90 dana, uočeno je povećanje razina testosterona i luteinizirajućeg hormona bez kliničkih znakova. Histološki pregled tiroidne žlijezde pokazao je infiltraciju limfoidnih stanica te povećanje intersticijskog tkiva. Pri testiranoj razini su još uočeni edemi, fibroza, lokalna hiperplazija Leydigovih stanica i dezorganizacija sjemenskih cjevčica. Ovo sve je bilo povezano sa smanjenim brojem spermija.

Studije koje su provođene u uvjetima bez patogena na Wistar štakorima, koji su patulin primali putem vode za piće u trajanju od 4 i 13 tjedana, pokazale su drugačiji toksikološki profil patulina. Najveća razlika uočena pri dozama koje se mogu međusobno usporediti je što u ovim studijama nije zabilježena smrtnost životinja. Štoviše, pravi učinak po organizam uočen je tek pri dozama koje bi izazvale smrtnost kod konvencionalnih štakora. U 4-tjednoj studiji toksičnosti, zabilježen je smanjeni unos hrane i tekućine kod grupa koje su dobivale umjerene i visoke doze (85 i 295 mg patulina/l vode za piće). Smanjena je bila i tjelesna masa kod grupe s visokom dozom, kao i funkcionalna sposobnost bubrega, ali nije bilo primijećeno njihovo morfološko oštećenje. Kod ove grupe su još zabilježeni neki poremećaji probavnog sustava. Kao razina bez uočenog štetnog učinka (engl. *No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL) je označena ona od 25 mg patulina/l vode za piće (Speijers i Franken, 1989). U 13-tjednoj studiji zabilježeni su slični učinci, ali manje ozbiljni, nego oni iz 4-tjedne studije. Pri srednjim i visokim dozama (30 i 150 mg patulina/l vode za piće), uočena je manja promjena funkcije bubrega, kao i promjene na dvanaesniku štakora. Stoga je NOAEL u ovoj studiji bio 6 mg patulina/l vode za piće, što je ekvivalent 0,8 mg patulina/kg t.m./dan (Speijers i sur., 1986).

U **Tablici 1** prikazan je pregled studija o subkroničnoj toksičnosti patulina te je vidljivo da patulin u prvom redu uzrokuje poremećaje intestinalnog trakta koji se očituju s ulceracijom, nadimanjem i krvarenjem, a pri većim dozama i promjenama u normalnim funkcijama bubrega.

Tablica 1 Pregled studija koje opisuju subkronična djelovanja patulina (Puel i sur., 2010)

Vrsta životinje	Doza patulina	Izloženost	Uočeni učinci
Miševi	24-36 mg/kg t.m. svaki dan ili svaki drugi dan	14 dana	Poremećaji intestinalnog trakta
Štakori	28-41 mg/kg t.m. svaki dan ili svaki drugi dan	14 dana	Poremećaji intestinalnog trakta
Štakori	25-295 mg/l u vodi za piće	28 dana	Smanjena tjelesna težina, snižen klirens kreatinina, čir na želucu pri visokim dozama
Štakori	0,1 mg/kg t.m. svaki dan	30 dana	Sniženi lipidi, sniženi trigliceridi, povećan kolesterol, inhibicija crijevne ATP-aze
Štakori	6-150 mg/L u vodi za piće	13 dana	Smanjeni unos hrane, smanjena tjelesna težina pri visokim dozama
Štakori	0,1 mg/kg t.m. svaki dan	60 i 90 dana	Povišene razine testosterona i LH-a, promjene u morfologiji testisa i tiroidne žlijezde
Štakori	0,1 mg/kg t.m. svaki dan	60 i 90 dana	Smanjen broj spermija i promjene u njihovoj morfologiji
Hrčci	16 mg/kg t.m. svaki dan ili svaki drugi dan	14 dana	Poremećaji intestinalnog trakta
Kokoši	100 µg svaki drugi dan	30 dana	Poremećaji intestinalnog trakta, promjene u funkciji bubrega, inhibicija crijevnih i bubrežnih ATP-aza
Majmuni	5; 50; 500 µg/kg t.m. te 5 mg/kg t.m. svaki dan	30 dana; 45 dana	Nema toksičnosti, odbijanje hrane (pri visokoj dozi), promjene u funkciji bubrega (srednja doza)

Iako postoje različiti podaci o **genotoksičnosti** patulina, većina testova provedenih na stanicama sisavaca bila je pozitivna, dok su testovi na bakterijama bili negativni. Osim toga, neke studije pokazuju da patulin slabi sintezu DNA. Ovi genotoksični učinci mogu se odnositi na njegovu sposobnost da reagira sa sulhidrilnim skupinama te da izaziva oksidativna oštećenja. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO.), zaključila je temeljem dostupnih podataka da je patulin genotoksičan (WHO, 1998).

Nekoliko studija dugoročne toksičnosti patulina nije dokazalo nastajanje tumora kod štakora koji su bili oralno izloženi patulinu u dozama od 0,1 do 2,5 mg/kg t.m./dan u trajanju od 74 do 104 tjedna. Prema IARC-u, patulin je svrstan u grupu 3 kao „ne može se klasificirati“ kao karcinogen za ljude (IARC, 1987).

U studijama na štakorima, koje su ispitivale **embriotoksičnost** i **teratogenost**, patulin je pri dozama od 1,5 mg/kg t.m./dan uzrokovao smanjenje tjelesne mase kod potomaka, a pri dozi od 2 mg/kg t.m. pobačaj svih embrija. Kod miševa, ista oralna doza je uzrokovala smrt potomaka s krvarenjima mozga, pluća i kože. Kada se patulin ubrizgavao u kokošja jaja, pokazivao je embriotoksične učinke pri dozama od 2,35 do 68,7 µg/jaje i teratogenost pri dozama od 1 do 2 µg/jaje.

Kao što je slučaj i kod drugih mikotoksina, patulin može promijeniti **imunološki** odgovor domaćina. Mnogobrojne *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da patulin ima antibiotsko djelovanje. Međutim, razine pri kojima je uočeno takvo djelovanje su veće od razine bez uočenog učinka (engl. *No Observed Effect Level*, NOEL) za akutnu, reproduktivnu, kroničnu toksičnost i kancerogenost (Puel i sur., 2010; Wouters i Speijers, 1996).

2. Karakterizacija opasnosti

Glavnim mehanizmom djelovanja patulina koji je odgovoran za citotoksičnost, neke genotoksične učinke, kao i neke učinke na imunološki sustav, smatra se njegova sposobnost vezanja za sulfhidrilnu skupinu. Ovaj afinitet također objašnjava zašto je patulin manje toksičan kada se unosi putem hrane, nego putem puferirane vode za piće. Naime, reakcija sa sulfhidrilnom skupinom proteina iz hrane čini ga daleko manje biorasploživim, nego iz vode za piće. Pošto su ljudi izloženi patulinu najčešće putem pića, studije koje su proučavale patulin u vodi za piće smatraju se najreprezentativnijim (Magan i Olsen, 2004).

Zajednički stručni odbor FAO/WHO za prehrambene aditive (engl. *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, JECFA) je prvotno 1990. god. na svom 35. zasjedanju uspostavio PTWI za patulin od 7 µg/kg t.m (JECFA, 1990). Ova odluka se temeljila na 109 – tjednoj studiji hranjenja koju su proveli Becci i sur. (1981). U njoj su koristili doze od 0; 0,1; 0,5 i 1,5 mg/kg t.m. koje su se primjenjivale na oba spola štakora, 3 puta tjedno. Patulin je pri visokim dozama uzrokovao značajno povećanje smrtnosti štakora oba spola (u odnosu na kontrolnu grupu). Nisu zabilježeni štetni učinci, odnosno NOAEL u grupi koja je primala najnižu dozu od 0,1 mg/kg t.m./tri puta tjedno.

Naknadno je JECFA, na svom 44. zasjedanju 1995. donijela PMTDI (JECFA, 1995), na temelju iste studije (Becci i sur., 1981), jer je patulin bio primjenjivan samo 3 puta tjedno (a ne nakuplja se u tijelu), izračunao NOEL od 43 µg/kg t.m./dan. Korištenjem faktora nesigurnosti od 100, uspostavljen je **PMTDI od 0,4 µg/kg t.m.** Znanstveni odbor za hranu Europske unije (engl. *Scientific Committee on Food*, SCF.), preteča EFSA-e, tijekom svog plenarnog zasjedanja 2000. god., potvrdio je ovaj PMTDI te isti vrijedi i danas (SCF, 2000).

Zakonska regulativa

Patulin se ubraja u mikotoksine (aflatoksin, ohratoksin A, zearalenon, fumonizin i trihoteceni) čija je razina u hrani zakonski regulirana u mnogim zemljama diljem svijeta, pa tako i europskim, koje su među prvima postavile granice u njegovim razinama. Na području Europske unije, patulin je zakonski reguliran sljedećim pravnim aktima:

- Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani,
- Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani.

Osim toga Europska komisija je izdala preporuke o sprječavanju i smanjivanju kontaminacije patulinom u soku od jabuka i ostalim pićima koja sadrže sok od jabuka (Commission Recommendation of 11 August 2003 on the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages (2003/598/EC)).

Uredbom 1881/2006 uspostavljene su najveće dopuštene količine za patulin u određenim prehrambenim proizvodima. **Tablica 2** prikazuje isječak iz tablice koja se nalazi u Prilogu Uredbe 1881/2006, Odjeljak 2.: *Mikotoksini*, a koja propisuje najveće dopuštene količine za patulin.

Tablica 2 Najveće dopuštene količine za patulin u određenim prehrambenim proizvodima (1881/2006/EZ)

2.3.	Patulin	Najveće dopuštene količine (µg/kg)
2.3.1.	Voćni sokovi, rekonstituirani koncentrirani voćni sokovi i voćni nektari ¹⁴	50
2.3.2.	Alkoholna pića ¹⁵ , jabukovača i druga fermentirana pića dobivena od jabuka ili koja sadrže jabučni sok	50
2.3.3.	Jabučni proizvodi u krutom stanju, uključujući jabučni kompot i jabučni pire, za izravnu prehranu ljudi, osim hrane navedene u točkama 2.3.4. i 2.3.5.	25
2.3.4.	Jabučni sok i jabučni proizvodi u krutom stanju, uključujući jabučni kompot i jabučni pire, za dojenčad i malu djecu ¹⁶ , označeni i stavljeni na tržište kao takvi ⁴	10,0
2.3.5.	Dječja hrana, osim prerađene hrane na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu ^{3 4}	10,0

³ Hrana navedena u ovoj kategoriji kako je definirana u Direktivi Komisije 96/5/EZ od 16. veljače 1996. o prerađenoj hrani na bazi žitarica i hrani za dojenčad i malu djecu (SL L 49, 28.2.1996., str. 17.), kako je zadnje izmijenjena Direktivom 2003/13/EZ (SL L 41, 14.2.2003., str. 33.).

⁴ Najveća dopuštena količina odnosi se na proizvode spremne za uporabu (koji se kao takvi stavljaju na tržište ili nakon pripreme prema uputama proizvođača).

¹⁴ Hrana navedena u ovoj kategoriji kako je definirana u Direktivi Vijeća 2001/112/EZ od 20. prosinca 2001. o voćnim sokovima i određenim sličnim proizvodima namijenjenim prehrani ljudi (SL L 10, 12.1.2002., str. 58.).

¹⁵ Hrana navedena u ovoj kategoriji kako je definirana u Uredbi Vijeća (EEZ) br. 1576/89 od 29. svibnja 1989. o utvrđivanju općih pravila za definiranje, opis i prezentiranje jakih alkoholnih pića (SL L 160, 12.6.1989., str. 1.), kako je zadnje izmijenjena Protokolom o uvjetima i aranžmanima pristupanja Republike Bugarske i Rumunjske Europskoj uniji.

¹⁶ Dojenčad i mala djeca kako su definirana u Direktivi 91/321/EEZ i Direktivi 96/5/EZ.

Uredba 401/2006 točno propisuje metode uzorkovanja za pojedine prehrambene proizvode te kriterije učinkovitosti primjenjivane laboratorijske metode.

Preporuka 2003/598/EC donosi čitav niz preventivnih mjera koje se trebaju poduzeti kako bi se smanjila kontaminacija patulinom soka od jabuka i ostalih napitaka koji sadrže sok od jabuka. Codex Alimentarius je također 2003. god. donio preporuku s nizom sličnih preventivnih mjera (Codex Alimentarius, 2003). Nastavno na zaključke Znanstvenih izvješća vezanih za patulin (HAH, 2014; 2015), HAH je 2017. godine izdao „Smjernice za prevenciju i smanjenje kontaminacije patulinom u sokovima od jabuka i sastojcima sokova od jabuka u drugim pićima“ koje su kombinacija prijevoda prethodno

spomenute preporuke Codex Alimentariusu i prilagodbe teksta za potrebe RH te je dostupan na mrežnim stranicama HAH-a (HAH, 2017; <https://www.hah.hr/pdf/smjernice-patulin.pdf>).

U Republici Hrvatskoj (RH), patulin je zakonski reguliran Zakonom o kontaminantima (2013), koji sadrži odredbe koje su u skladu s Uredbama 1881/2006/EZ i 401/2006/EZ.

3. Procjena izloženosti

Izvori izloženosti

Patulin je pronađen u plodovima jabuka i krušaka zahvaćenim smeđom truleži, soku od jabuka, grožđu i brašnu. Međutim, patulin ne bi trebao predstavljati sigurnosni problem ukoliko se uzme u obzir dobra higijenska praksa u tehnološkom procesu obrade ili načinu konzumacije hrane. Na primjer, truli dijelovi većine voća i žitarica obično se odstranjuju prije konzumacije. U namirnicama kao što je sir, visoke koncentracije cisteina reagiraju s patulinom i tako ga inaktiviraju. Isto tako, zabilježeno je da se patulin uništava fermentacijom i stoga nije pronađen niti u voćnim alkoholnim pićima niti u octu napravljenom od voćnih sokova, ali jest u jabučnom vinu (cideru) u koje se dodaje nefermentirani sok od jabuka. Termička obrada dovodi do umjerenog smanjenja razina patulina te je stoga moguće patulin pronaći u soku od jabuka i nakon pasterizacije (FDA, 2001). Jabuke i sok od jabuka, najvažniji su izvor kontaminiranih namirnica patulinom u ljudskoj prehrani, a posebno sokovi koji se proizvode prešanjem jabuka, zbog same sirovine, ali i tehnoloških postupaka koji se kasnije upotrebljavaju u proizvodnji, a koji ne utječu na smanjenje patulina. Ostali voćni sokovi također mogu biti potencijalni izvor patulina ako su pomiješani sa sokom od jabuka (FAO, 2003; Preedy i Watson, 2004).

Podaci o pojavnosti patulina u sokovima od jabuka dobivenih hladnim prešanjem

Ovo Znanstveno mišljenje obuhvaća analitičke podatke o koncentracijama patulina u sokovima od jabuka prikupljenim u 2013., 2015. i 2016. godinu.

U 2013. godini analizirano je 12 uzoraka tijekom ljeta i jeseni (HAH, 2014), a kako se radilo o nekoliko različitih vrsta proizvoda (različite vrste voćnih sokova i proizvodi za malu djecu na bazi voća), za potrebe ovog Znanstvenog mišljenja, izdvojeno je ukupno 4 rezultata, tj. samo oni koji su se odnosili na proizvod „sok od jabuke dobiven hladnim prešanjem“ (**Tablica 3**). Na toj vrsti proizvoda patulin se nastavio ispitivati sljedeće dvije godine.

U 2015. god. uzorkovan je isključivo sok od jabuka (kao proizvod u kojem je moguće očekivati pojavnost patulina u većim koncentracijama). Istraživanje je provedeno u suradnji s Centrom za kontrolu namirnica (CKN) pri Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Uzorkovanje je bilo provedeno u dva navrata, u proljeće i u jesen 2015. god. čime se htjelo obuhvatiti jabuke iz berbe iz 2014. god. (HAH, 2015), te je ukupno uzorkovano 60 uzoraka.

U 2016. god. nastavlja se uzorkovanje u suradnji s CKN-om, te se osim utvrđivanja patulina u soku od jabuka, provodi dodatna analiza na prisutnost sljedećih prehrambenih aditiva iz skupine konzervansa: sorbinska kiselina (E 200), benzojeva kiselina (E 210) i sumporni dioksid (E 220). Naime, htjela se utvrditi i eventualna pojavnost navedenih konzervansa u sokovima, koja u toj vrsti proizvoda

nije dozvoljena. Na patulin je analizirano svih 48 uzoraka, dok je iz financijskih razloga na konzervanse analizirano 12 uzoraka, ali tako da je od svakog proizvođača analiziran barem po jedan uzorak). Svi uzorci u 2016. godini prikupljeni su u maloprodaji na području grada Zagreba te je ukupno bilo zastupljeno 13 različitih proizvođača, odnosno njihovih proizvoda. Proizvodi su bili u staklenoj ambalaži (kapaciteta 0,2 l, i 1 l) ili u tzv. „bag in box“ (kapaciteta 3 l i 5 l) (**Slika 3**). Osim ovih (48) rezultata, prikupljeno je dodatnih 10 rezultata iz godišnjeg monitoringa za 2016. god. (analize napravljene u NZZJZ-a „Dr. Andrija Štampar“ za potrebe Ministarstva zdravstva).

Rezultati analiza soka od jabuka na patulin za sve tri godine prikazani su u **Tablici 3**.

Sorbinska i benzojeva kiselina nisu kvantificirane u niti jednom uzorku, dok je ukupni sumporni dioksid određen u koncentracijama nešto većim od granice kvantifikacije (engl. *Limit of Quantification*, LOQ) u ukupno 3 uzorka i to: 5,76 mg/l, 6,4 mg/l i 7,04 mg/l. Iako u ovoj vrsti proizvoda ne bi smjelo uopće biti sumpornog dioksida (o ovim rezultatima je obaviješteno Ministarstvo zdravlja), treba napomenuti da tek koncentracije iznad 10 mg/l mogu imati štetne učinke po organizam (u ovom slučaju alergijske reakcije), kao i to da ovo nisu količine koje bi imale tehnološku funkciju u proizvodu, nego da se vjerojatno radi o križnoj kontaminaciji.



Slika 3 Ambalaža „bag in box“

Ispitivanje patulina provodilo se metodom tekućinske kromatografije visokog učinka (HPLC). Ispitna metoda je preuzeta međunarodna norma HRN EN 15890:2010 za određivanje sadržaja patulina u soku od jabuke i proizvodima, akreditirana 2011. godine prema normi HRN EN ISO/IEC 17025:2006. Princip metode je bio sljedeći: patulin se iz uzorka ekstrahirao otapalom za ekstrakciju (smjesa etilacetata i n-heksana), ekstrakt se pročišćavao na silica SPE koloni i eluirao istim otapalom. Dobiveni se eluat upario do suha u struji dušika, rezidua se otapala u vodi pri pH = 4 i određivala HPLC-metodom uz UV detekciju. Pročišćavanje uzoraka provelo se na SPE kolonama Sampli Q Silica 500 mg / 3 ml proizvođača Agilent Technologies. Kromatografska separacija provodila se na koloni Hypersil ODS dimenzija 250 x 4,6 mm, veličine punila 5 µm, na HPLC instrumentima Agilent 1100 i Thermo Scientific Accela, uz detekciju na 276 nm. Kalibracijske otopine za izradu baždarnog pravca patulina, na temelju

kojeg je bila provedena identifikacija i izračun količine patulina u uzorcima, bile su priređene korištenjem certificiranog referentnog materijala Patulin solution, 100 µg/ml in acetonitrile, Oekanal Sigma – Aldrich Product 34127. Kromatografski uvjeti na instrumentima bili su kako slijedi:

- protok: oko 1 ml/min
- MF: voda + acetonitril + perklorna kiselina 95 + 5 + 0,1
- volumen injektiranja: oko 100 µl
- temperatura kolone: oko 40°C
- detektor: UV, valna duljina 276 nm

Granica kvantifikacije je bila utvrđena na 5 µg/kg, kao i prethodnih godina.

Za određivanje benzojeve i sorbinske kiseline, korištena je ispitna metoda koja je akreditirana „*In house metoda*“ prema radnoj uputi RU-OK-M/07. Metoda je razvijena na temelju rada izdanog u *Z Lebensm Unters Forsch.* 1992 Jun; 194(6):517-9 – «*Analysis of acesulfame-K, saccharin and preservatives in beverages and jams by HPLC*», Shimadzu aplikacije «*Determination of the preservatives benzoic and sorbic acid in food by HPLC*» i norme HRN EN 12856:2000, *Foodstuffs – «Determination of acesulfame-K, aspartame and saccharin – High performance liquid chromatography.*“ Metoda je primjenjiva za sve proizvode kod kojih se benzojeva i sorbinska kiselina mogu u potpunosti ekstrahirati u vodenu fazu. Princip metode je bio sljedeći: benzojeva i sorbinska kiselina se iz uzorka ekstrahiraju vodom tako da je konačna koncentracija konzervansa do 0,1 mg/ml. Uzorak se po potrebi filtrira kroz filter veličine pora 0,45 µm. Kromatografija se odvija na reverzno-faznoj koloni uz UV-detekciju na 227 i 254 nm. Kalibracijske otopine za izradu baždarnog pravca pripremaju se iz *stock* otopine: u odmjernu tikvicu od 50 ml odvaže se oko 59,0 mg Na-benzoata i oko 67,0 mg K-sorbata, otopi u vodi pomoću ultrazvučne kupelji i nadopuni istom do oznake. Kromatografski uvjeti na instrumentu bili su kako slijedi:

- protok: oko 1,2 ml/min
- volumen injektiranja: oko 20 µl
- temperatura kolone: oko 40°C
- detektor: DAD ili VWD, valne duljine:
 - o 227 nm (za DAD BW 8 nm, ref. 400 nm, BW 80 nm) benzojeva kiselina
 - o 254 nm (za DAD BW 8 nm, ref. 400 nm, BW 80 nm) sorbinska kiselina
- *run time*: oko 15 min za baždarne otopine, oko 30 min za otopine uzoraka (odnosno do elucije ostalih supstanci s kolone).

Granica kvantifikacije (LOQ) je za obje kiseline utvrđena na 0,02 mg/l.

Uzorci su analizirani na sadržaj ukupnog sumpornog dioksida destilacijskom modificiranom Monier-Williams metodom. Metoda se primijenjuje za određivanje ukupnog sumpornog dioksida u tekućim i krutim namirnicama. Princip metode je bio sljedeći: sumporni dioksid iz uzorka se oslobađa dodatkom kiseline (fosforna kiselina) uz zagrijavanje te se u struji dušika prevodi u otopinu vodikovog peroksida, gdje se oksidira u sumpornu kiselinu, koja se titrira s natrijevim hidroksidom uz indikator bromfenol-plavo. Destilacija se provodi bez zagrijavanja za određivanje slobodnog sumpornog dioksida te nakon toga uz zagrijavanje za oslobađanje vezanog sumpornog dioksida. Količina ukupnog dobiva se zbrajanjem slobodnog i vezanog sumpornog dioksida.

Granica kvantifikacije (LOQ) za sumporni dioksid bila je utvrđena na 5 mg/l.

U **Tablici 3** su prikazane prosječne vrijednosti pronađenih koncentracija patulina u sokovima od jabuka i to prema godinama uzorkovanja. Broj pozitivnih uzoraka označava ukupan broj uzoraka u kojima je kvantificiran patulin, a broj nesukladnih uzoraka broj onih u kojima su pronađene veće količine od zakonski dozvoljenih (> 50 µg/kg). Osim toga, kako se u većem broju uzoraka nije pronašao patulin u dovoljnim koncentracijama da ga se točno odredi (ispod LOQ vrijednosti), za obradu takvih podataka, korištena je standardna procedura s tri scenarija:

- scenarij 1: rezultati <LOQ-a su zamijenjeni su s brojkom nula (0 µg/kg)
- scenarij 2: rezultati <LOQ-a su zamijenjeni s pola vrijednosti LOQ-a (2,5 µg/kg)
- scenarij 3: rezultati <LOQ-a su zamijenjeni s punom vrijednošću LOQ-a (5 µg/kg).

Tablica 3 Analitički rezultati pojavnosti patulina u sokovima od jabuka dobivenim hladnim prešanjem

Godina uzorkovanja	Ukupan br. uzoraka	Prosječna koncentracija patulina [µg/kg]			Br. pozitivnih uzoraka	Br. nesukladnih uzoraka
		Scenarij 1	Scenarij 2	Scenarij 3		
2013.	4	14,75	16,63	18,5	1	1
2015.	60	4,5	6,5	8,5	12	1
2016.	58	8,22	10,16	12,10	13	3
Ukupno	122	6,61	8,57	10,54	26	5

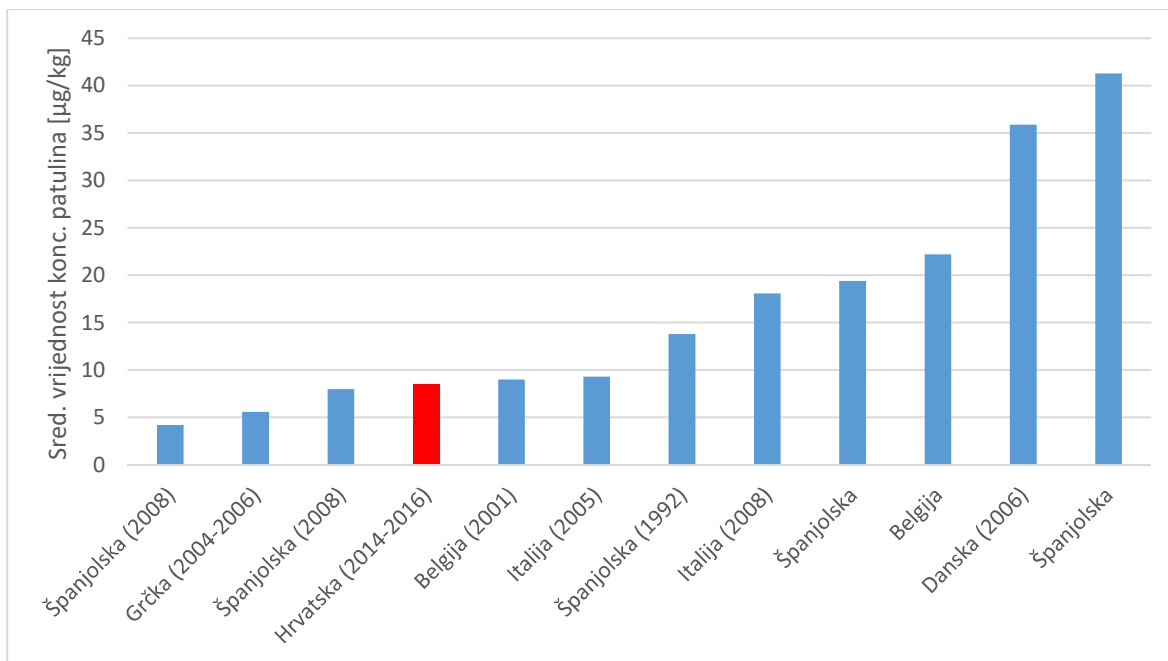
Kako je u 2013. god. bilo samo 4 uzorka sokova od jabuka u kojima se istraživao patulin, na temelju jednog pozitivnog i jednog nesukladnog, ne može se donijeti statistički opravdan zaključak. Stoga je studija je nastavljena i 2015. god. na većem broju uzoraka (60) radi preciznije i adekvatnije procjene rizika. Kako je u toj godini zabilježeno 12, odnosno 20 % pozitivnih i 1 ili 1,66 % nesukladnih uzoraka, odlučeno je da se studija nastavi i u 2016. god. Rezultati iz te godine su pokazali su još veći broj pozitivnih uzoraka (13 ili 22,4 %) i 3 (5,17 %) nesukladnih uzoraka. Prosječna koncentracija pri Scenarijima se također pokazala većom u 2016. u odnosu na 2015. god. Uzimajući u obzir trogodišnje razdoblje ukupan broj pozitivnih uzoraka bio je 26, što iznosi 21,3 %, dok je nesukladnih uzoraka bilo 5 ili 4,1 %. Praćenjem mikotoksina kroz dulje razdoblje može se djelomično isključiti nesigurnost utjecaja klimatskih čimbenika na prisutnost mikotoksina u hrani koja se prati. Iako rezultati u ovom trogodišnjem praćenju ne odstupaju puno od godišnjih prosjeka, osim u slučaju 2013. godine, ali tada su uzorkovana samo 4 uzorka. Ovdje valja napomenuti da je najveća zabilježena koncentracija bila 2016. godine u iznosu od 154 µg/kg, što je preko 3 puta više od najveće dopuštene koncentracije (Uredba 1881/2006/EZ).

U **Tablici 4** te **Slikama 4** i **5** uspoređeni su rezultati trogodišnjeg praćenja s europskim istraživanjima o pojavnosti patulina u sokovima od jabuka (Pique i sur., 2013). Ovdje je važno napomenuti kako su neki autori za pozitivne uzorke uzimali one koji premašuju LOQ, a neki one koji premašuju LOD (engl. *Limit of Detection*), odnosno granicu detekcije, što u konačnici dovodi do različitih rezultata koje je teško međusobno usporediti. Osim toga, kako za rezultate iz ostalih studija ne postoji pojašnjenje koji scenarij su uzimali u obzir prilikom izračuna srednjih vrijednosti, za rezultat srednje

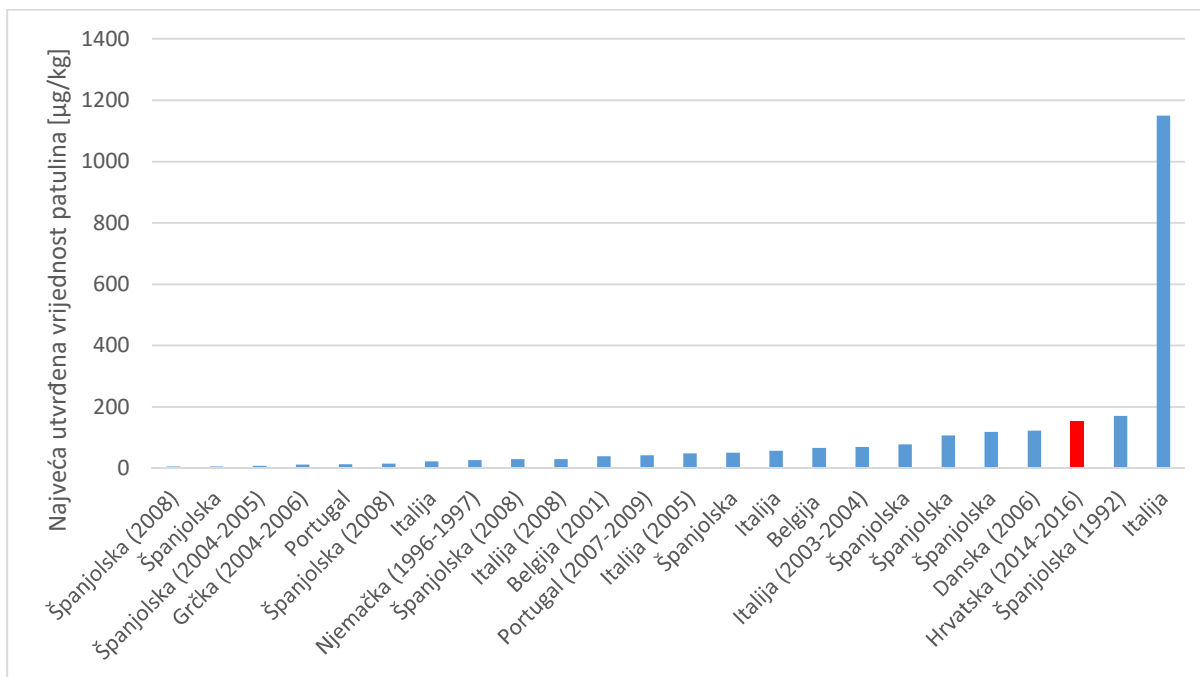
vrijednosti koncentracije patulina u RH se uzimao Scenarij 2, koji se smatra najrealnijim te se kao takav usporedio s rezultatima iz drugih studija.

Tablica 4 Usporedba rezultata analiza proizvoda na patulin u RH s rezultatima nekih europskih istraživanja (Pique i sur, 2013)

Zemlja (period istraživanja)	Broj uzoraka	% pozitivnih	Najveća utvrđena vrijednost [µg/kg]	Srednja vrijednost [µg/kg]
Belgija	177	12	65,7	22,2
Belgija (2001)	43	81,4	38,8	9
Danska (2006)	20	70	122,5	35,9
Njemačka (1996-1997)	12	nema podatka	26	nema podatka
Grčka (2004-2006)	29	100	11,8	5,6
Italija (2008)	35	88,6	30	18,1
Italija (2005)	53	47,2	47,9	9,3
Italija	26	58	22	nema podatka
Italija (2003-2004)	57	49	69,3	nema podatka
Italija	15	40	56,4	nema podatka
Italija	33	nema podatka	1150	nema podatka
Portugal (2007-2009)	68	41	42	nema podatka
Portugal	12	83,3	12,6	nema podatka
Španjolska (2008)	28	7,14	6	4,2
Španjolska (2008)	20	70	29,61	8
Španjolska (2008)	83	39,7	15	nema podatka
Španjolska	100	67	118	19,4
Španjolska	28	7,1	6	nema podatka
Španjolska	20	100	107	41,3
Španjolska	17	29,4	50,9	nema podatka
Španjolska (2004-2005)	25	8	7,5	nema podatka
Španjolska (1992)	100	82	170	13,8
Španjolska	8	75	78	nema podatka
Švedska	39	12,8	<50	nema podatka
Nizozemska	10	20	nema podatka	nema podatka
Hrvatska (2016)	122	21,3	154	8,57



Slika 4 Prikaz srednjih vrijednosti konc. patulina, dobivenih iz raznih europskih studija s rezultatima iz RH



Slika 5 Prikaz najvećih utvrđenih vrijednosti konc. patulina, dobivenih iz raznih europskih studija s rezultatima iz RH

Kao što je vidljivo iz **Slike 5**, u Hrvatskoj je zabilježena jedna od najvećih količina patulina u pojedinačnom uzorku soka od jabuka (154 µg/kg), ali je zato prosječna koncentracija (**Slika 4**) među nižima.

Podaci o konzumaciji sokova od jabuka

Podaci o konzumaciji sokova od jabuka dobiveni su iz Nacionalnog istraživanja o prehranbenim navikama stanovništva RH, koje je HAH provela 2011. i 2012. god. na ukupno 2002 ispitanika, a u skladu s EFSA-inim vodičem „General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey ¹“.

Za potrebe ovog znanstvenog mišljenja, izvučeni su podaci o konzumaciji 100 %-tnih sokova od jabuka (10 ispitanika), nektara (jabuka), razrijeđenog soka od jabuka, bezalkoholnih pića od voća (jabuka). Utvrđeno je da je 131 ispitanik konzumirao nešto od sokova spomenutih u prijašnjoj rečenici. Udio ispitanika koji su konzumirali sokove od jabuka, čini oko 6,55 % (N=2002) od ukupne populacije stanovništva u RH od 18 do 64 godina. Udio soka od jabuka u ovim vrstama sokova računao se ovisno o udjelu soka, kako je prikazano u **Tablici 5**.

Tablica 5 Udjeli 100 %-tnog soka od jabuke u određenim sokovima

Vrsta soka	Udio soka od jabuke
100 %-tni sok od jabuke	100 %
Nektar (jabuka)	50 %
Razrijeđeni sok (jabuka)	17 %
Bezalkoholna pića od voća (jabuka)	56 %

Od 131 ispitanika koji su konzumirali sokove od jabuka, bilo je zastupljeno 63 muškarca i 68 žena. Tjelesna masa ispitanika se kretala od 48 kg do 130 kg. Najviše je ispitanika bilo iz regije „Zagreb i okolica“ (N=32), a najmanje iz „Lika i Banovina“ (N=12).

Prosječna konzumacija sokova od jabuka je 66 g/dan (0,88 g/kg t.m./dan), uz minimalnu konzumaciju od 8,5 g/dan te maksimalnu od 1050 g/dan. Visoki konzumenti (95. percentila) imali su prosječnu konzumaciju od 181,03 g/dan.

Improrisk v1.3.4

Za procjenu izloženosti konzumenata sokova od jabuka na patulin, koristio se računalni model „Improrisk 1.3.4“, koji je ugrađen u „MS Excel“ te se koristi za izračun izloženosti populacije određenim kontaminantima (Improvast, 2016). Ovaj model kombinira podatke o prehranbenim navikama ispitanika (konzumacija hrane) s podacima o prisutnosti pojedinog kontaminanta u hrani, dobivenih iz određenog istraživanja te računa izloženosti za promatranu populaciju. Za izračune se koriste svi zabilježeni unosi hrane jer se pretpostavlja da je svaka osoba, pri svakom obroku (zabilježenom unosu hrane) izložena kontaminantu.

¹ Dostupno na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2009.1435/epdf>

Procjena izloženosti

U nastavku slijede razni statistički izračuni i procjena izloženosti dobiveni pomoću „Improriska“ na temelju podataka o pojavnosti patulina u sokovima od jabuka te podacima o konzumaciji takvih sokova. Prilikom izračuna izloženosti koristio se u ovom slučaju PMTDI od 0,4 µg/kg t.m.

Tablica 6 Izloženost konzumenata patulinu iz soka od jabuka prema scenarijima

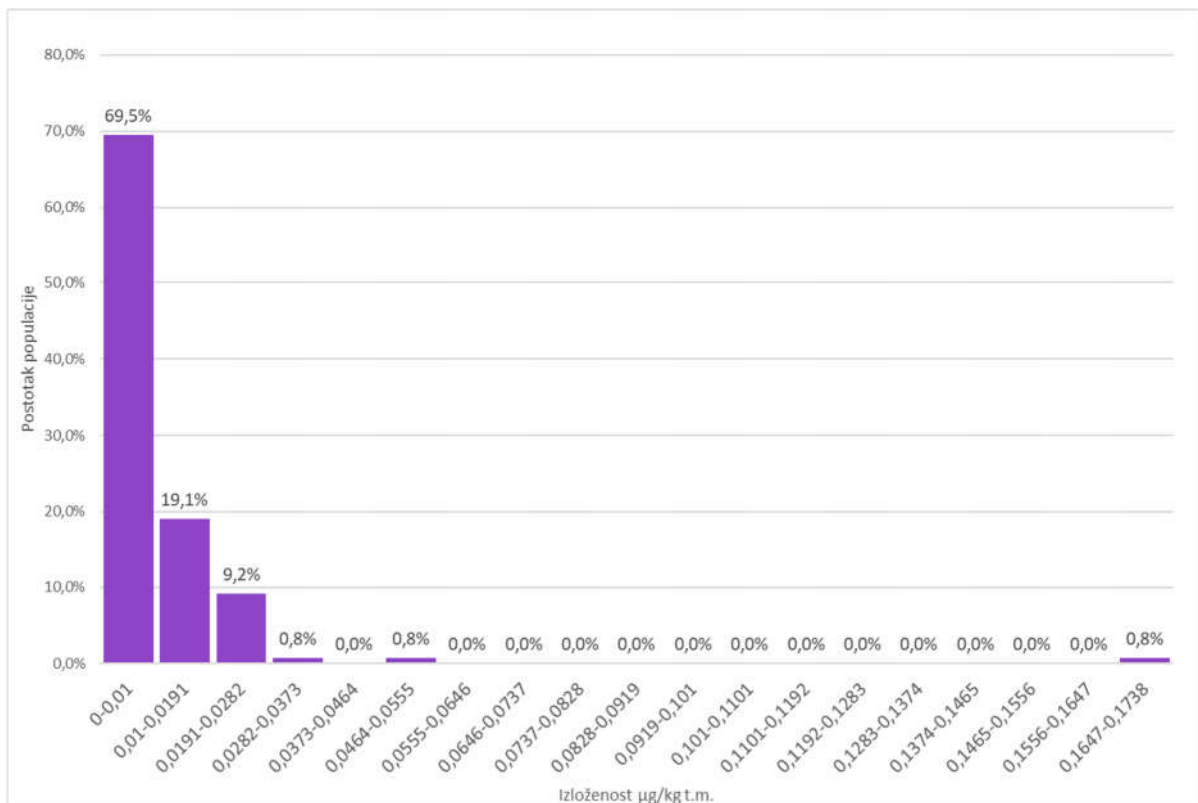
Vrsta izloženosti			
	Scenarij 1	Scenarij 2	Scenarij 3
Prosječna izloženost (µg/kg t.m.)	0,0061	0,0080	0,0098
Medijan izloženosti (µg/kg t.m.)	0,0040	0,0050	0,0060
Izloženost na 95. percentili (µg/kg t.m.)	0,0160	0,0200	0,0250
Vrijednost ISPOD toksikološke granice (%)	100	100	100
Vrijednost IZNAD toksikološke granice (%)	0	0	0

Iz **Tablice 6** je vidljivo da niti jedan konzument soka od jabuka ne prelazi toksikološku granicu, odnosno PMTDI od 0,4 µg/kg t.m. U najgorem mogućem scenariju, koji obuhvaća „Scenarij 3“ i izloženost na 95. percentili, vidljivo je da je izloženost 0,025 µg/kg t.m., što je čak 16 puta niže od zadanog PMTDI-a za patulin. Podaci o izloženosti su još dodatno prikazani u **Tablici 7** iz koje je vidljivo da je prosječna izloženost konzumenata soka od jabuke 0,01 µg/kg t.m./dan, a najveća 0,17 µg/kg t.m./dan pri „Scenariju 3“.

Tablica 7 Prikaz vrijednosti izloženosti za konzumente u „Scenariju 3“

N=131

Statistika izloženosti	(µg/kg t.m./dan)
Najmanja	0,001
Najveća	0,17
Medijan	0,006
Prosječna izloženost	0,01
St. devijacija izloženosti	0,016
Izloženost populacije u usporedbi s PMTDI-em	
Broj ispitanika ispod PMTDI-a	131
Broj ispitanika IZNAD PMTDI-a	0
Postotak ispitanika IZNAD PMTDI-a	0 %



Slika 6 Distribucija vjerojatnosti izloženosti pri „Scenariju 3“

Na **Slici 6** je prikazana distribucija vjerojatnosti izloženosti pri „Scenariju 3“ te je vidljivo da je najveći postotak promatrane populacije konzumenata (69,5 %) izložen koncentracijama patulina od 0 do 0,01 µg/kg t.m.

Pomoću „Improriska“ moguće je izračunati i razlike među spolovima po pitanju izloženosti, ukoliko postoje, kao i razlike između pojedinih geografskih regija RH.

U **Tablici 8** prikazani su podaci o statistički značajnoj razlici između spolova. Vidljivo je da na nivou značajnosti $P=0,05$ nema statistički značajne razlike među spolovima, odnosno ne može se reći da je jedan od spolova više izložen patulinu od drugog.

Tablica 8 Određivanje statistički značajne razlike između spolova

Usporedba između MUŠKARACA I ŽENA	
T - test za nezavisne uzorke	
Združena st. devijacija	0,01
t vrijednost	1,008
p vrijednost	0,315
Cohenov D	0,18
Rezultat	
NE postoji statistički značajna razlika u prosječnim vrijednostima izloženosti [µg/kg t.m.] između muškog i ženskog spola pri nivou značajnosti od $P=0,05$	

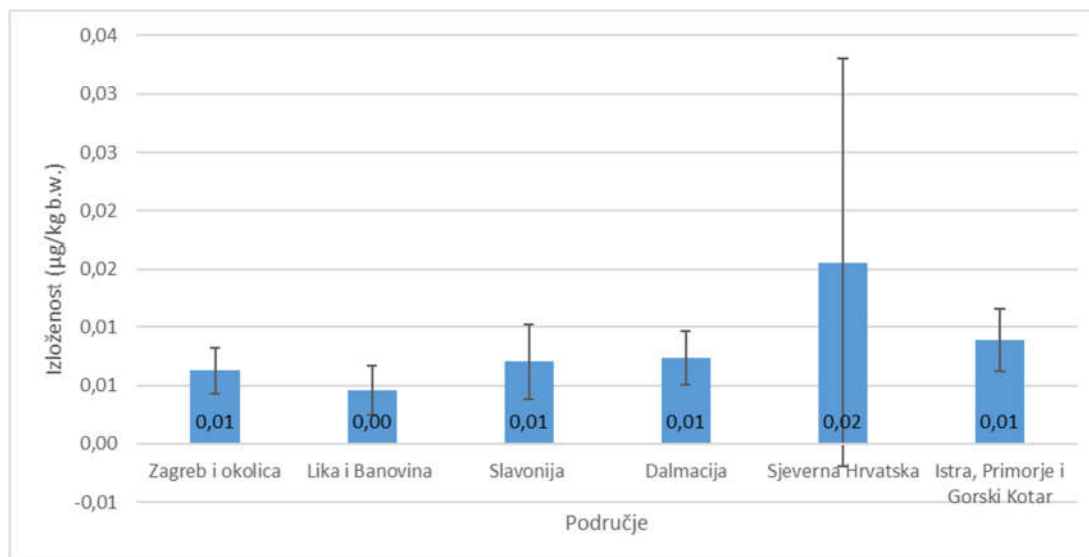
Cohenov D smjernice*

D ~ 0,20 -> mala razlika

D ~ 0,50 -> umjerena razlika

D > 0,80 -> velika razlika

*Cohen J (1977). Statistical power analysis for the behavioral sciences.



Slika 7 Prosječna izloženost pri „Scenariju 2“ prema geografskim područjima (na nivou pouzdanosti od 95 %)

Slika 7 prikazuje prosječnu izloženost pri „Scenariju 2“ prema različitim geografskim područjima u RH. Linije greške koje prolaze kroz stupce predstavljaju nižu i višu granicu za interval pouzdanosti od 95 % za procjenu prave prosječne izloženosti. Vidljivo je da je najveća prosječna izloženost stanovništva u Sjevernoj Hrvatskoj, zbog toga što su ispitanici iz ove regije prijavili najveće konzumacije soka od jabuke.

Kako u RH trenutno ne postoje prehrambene navike za dojenčad i malu djecu, za njih nije napravljena procjena izloženosti. Iz tog razloga se ne mogu potvrditi ili odbaciti rezultati koje je dobio Plunkett i sur. (1992). Prema njihovom istraživanju djeca imaju vrlo visoku konzumaciju proizvoda od jabuka u usporedbi s odraslima. Tijekom prve godine života, djeca u prosjeku konzumiraju 6,4 g jabuka/kg t.m./dan, dok odrasli konzumiraju samo 0,4 g/kg t.m./dan.

4. Karakterizacija rizika

Prilikom procjene izloženosti, koristila su se tri scenarija koja različito procjenjuju izloženost, a razlikuju se ovisno o obradi analitičkih rezultata. Tako je u „Scenariju 1“ dobivena najmanja srednja vrijednost izloženosti od 0,0061 µg/kg t.m., u „Scenariju 2“ je iznosila 0,080 µg/kg t.m, a u „Scenariju 3“, kako je bilo i očekivano, najviše, odnosno 0,098 µg/kg t.m. Izloženost je prikazana i na 95. percentili u scenariju 3, (najgori mogući scenarij) te je procijenjena izloženost iznosila 0,025 µg/kg t.m. što je čak

16 puta manje od uspostavljenog PMTDI-a od 0,4 µg/kg t.m. Iz tog razloga, rizik se može smatrati zanemarivim.

Iako se zbog izostanka prehrambenih navika nije mogla napraviti procjena izloženosti za dojenčad i malu djecu u RH, pokušalo se osvrnuti i na njih jer su oni prema Piquéu (2013) zbog visoke konzumacije proizvoda od jabuka, najizloženija skupina u populaciji na patulin. Tijekom prve godine života, djeca u prosjeku konzumiraju 6,4 g jabuka/kg t.m./dan, dok odrasli konzumiraju samo 0,4 g/kg t.m./dan (Plunkett i sur., 1992). Ipak, kada bi se i ta razina konzumacije od 6,4 g/kg t.m./dan uzela u obzir zajedno s prosječnom koncentracijom patulina u sokovima od jabuka pri „Scenariju 3“ (10,54 µg/kg), dobila bi se izloženost od 0,0675 µg patulina/kg t.m. što je skoro 6 puta niže od vrijednosti PMTDI-a (0,4 µg/kg t.m.). Samim time, i u ovom slučaju bi rizik po zdravlje bio zanemariv.

ZAKLJUČCI

- Patulin se ubraja u mikotoksine kojeg proizvode određene vrste plijesni, kao što su *Penicillium* (pogotovo *P. expansum*), *Aspergillus* i *Byssoschlamys*.
- Kao najvažniji izvor kontaminiranih namirnica patulinom u ljudskoj prehrani označeni su sokovi od jabuka, a posebno sokovi koji se proizvode prešanjem svježih jabuka. Ostali voćni sokovi također mogu biti potencijalni izvor patulina ako su pomiješani sa sokom od jabuka.
- Patulin je toksičan za mnoge biološke sustave pri čemu su simptomi akutne toksičnosti: uznemirenost, u nekim slučajevima grčevi, otežano disanje, plućna zagušenja, edemi i ulceracija, krvarenje i nadimanje gastrointestinalnog trakta.
- Kod subakutne i subkronične toksičnosti najčešći simptomi su: poremećaji u gastrointestinalnom traktu s pojavom ulceracija, nadimanja i krvarenja, a pri visokim dozama i promjene u funkciji bubrega.
- Zbog nedovoljnih spoznaja o karcinogenosti patulina, Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *The International Agency for Research on Cancer*, IARC) ga je svrstala u Skupinu 3, kao spoj kojeg se na osnovi trenutnih znanstvenih spoznaja ne može klasificirati po pitanju kancerogenosti.
- Trenutno važeći, privremeni najveći podnošljivi dnevni unos (engl. *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*, PMTDI) za patulin iznosi 0,4 µg/kg/ t.m.
- Prisutnost patulina zakonski je regulirana s nekoliko pravnih akata u kojima su, između ostalog, propisane i najveće dopuštene količine patulina u određenim namirnicama koje za sokove od jabuka iznose 50 µg/kg.
- HAH je unutar trogodišnjeg monitoringa ukupno prikupila podatke za 122 uzorka soka od jabuka dobivenih hladnim prešanjem, pri čemu je uočeno ukupno 5 nesukladnih uzoraka (4,1 %) te je u ukupno 26 uzoraka (21,3 %) kvantificiran patulin uz prosječne koncentracije od 6,61, 8,57 i 10,54 µg/kg (zavisno od primijenjenog scenarija).
- Podaci o konzumaciji sokova od jabuka dobiveni su iz Nacionalnog istraživanja o prehrambenim navikama stanovništva RH te je ukupno zabilježen 131 konzument ove vrste sokova, što čini 6,55 % od ukupne populacije.

- Prosječna konzumacija sokova od jabuka je iznosila 66 g/dan (0,88 g/kg t.m./dan), uz minimalnu konzumaciju od 8,5 g/dan te maksimalnu od 1050 g/dan.
- Za procjenu izloženosti konzumenata sokova od jabuka na patulin, koristio se računalni model „Improrisk 1.3.4“, koji je ugrađen u „MS Excel“.
- Procjena izloženosti je pokazala da niti jedan konzument soka od jabuka nije izložen patulinu u količini koja prelazi toksikološku granicu, odnosno PMTDI od 0,4 µg/kg t.m. U najgorem mogućem scenariju, koji obuhvaća „Scenarij 3“ i izloženost na 95. percentili, vidljivo je da je izloženost 0,025 µg/kg t.m., što je čak 16 puta niže od zadanog PMTDI-a za patulin.
- Rizik se može smatrati zanemarivim.

PREPORUKE

Kako za dojenčad i malu djecu u RH ne postoje podaci o prehranbenim navikama, nije moguće preciznije odrediti njihovu izloženost i procijeniti rizik. Stoga se preporučuje izrada procjene rizika za dojenčad i malu djecu nakon prikupljanja prehranbenih navika za tu dobnu skupinu.

SAVJET

Hrvatska agencija za hranu je temeljem dosadašnjim rezultata monitoringa, koji ukazuju na oko 4 % nesukladnih uzoraka te 21,3 % uzoraka u kojima je kvantificiran patulin, izdala „Smjernice za prevenciju i smanjenje kontaminacije patulinom u sokovima od jabuka i sastojcima sokova od jabuka u drugim pićima²“. Smjernice su namijenjene svim zainteresiranim stranama, a napose proizvođačima kako bi se njihovom edukacijom o mjerama koje se mogu poduzimati kod proizvodnje, prerade te skladištenja jabuka i njihovih proizvoda, te skretanjem pozornosti konzumentima na mogućnost prisutnosti ovog mikotoksina u sokovima od jabuka, doprinijelo zaštiti zdravlja potrošača.

LITERATURA (REFERENCE)

Arnér J (2015): A risk assessment of patulin in home-made apple must. *Institutionen för mikrobiologi*. 2015:4, ISSN 1101-8151

Becci PJ, Hess FG, Johnson WD, Gallo MA, Babish JG, Dailey RE, Parent RA (1981): Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. *Journal of Applied Toxicology*, 1(5):256-261.

Commission Recommendation of 11 August 2003 on the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages (2003/598/EC). Official Journal of the European Union, L203/54.

² Dostupno na: <https://www.hah.hr/pdf/smjernice-patulin.pdf>

Birkinshaw JH, Michael SE, Bracken A, Raistrick H (1943): Patulin in the common cold collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier. II. Biochemistry and Chemistry. *Lancet*, 245, 625.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2003): *Code of Practice for the Prevention and Reduction of Patulin Contamination in Apple Juice and Apple Juice Ingredients in Other Beverages*. Codex Alimentarius, CAC/RCP 50-2003.

FDA, U.S. Food and Drug Administration (2001): *Patulin in Apple Juice, Apple Juice Concentrates and Apple Juice Products*. Dostupno na:

<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/NaturalToxins/ucm212520.htm> (12.04.2017.).

FDA, U.S. Food and Drug Administration (2004): *Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition; Final Guidance*. Dostupno na:

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm> (16.06.2017.)

HAH, Hrvatska agencija za hranu (2014): *Znanstveno izvješće Hrvatske agencije za hranu vezano uz nalaz patulina u odabranim prehrambenim proizvodima*. Dostupno na: <https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/Znanstveno-izvjesce-Hrvatske-agencije-za-hranu-vezano-uz-nalaz-patulina-u-odabranim-prehrambenim-proizvodima.pdf> (11.04.2017.).

HAH, Hrvatska agencija za hranu (2015): *Znanstveno izvješće o patulinu u sokovima od jabuka*. Dostupno na: <https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/Znanstveno-izvjesce-o-patulinu-u-sokovima-od-jabuka-2015.pdf> (11.04.2017.).

HAH, Hrvatska agencija za hranu (2017): *Smjernice za prevenciju i smanjenje kontaminacije patulinom u sokovima od jabuka i sastojcima sokova od jabuka u drugim pićima*. Dostupno na: <https://www.hah.hr/pdf/smjernice-patulin.pdf> (20.07.2017.).

IARC, International Agency for Research on Cancer (1987): Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *Volume 40*. Lyon Dostupno na:

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mono40.pdf> (19.06.2017.)

Improvast (2016): *Improrisk v1.3.4* (računalni program): Dostupno na: <http://www.improrisk.com/>.

JECFA, The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1990): *Evaluation of certain food additives and contaminants*. WHO Technical Report Series, No.789,1990, and corrigenda.

JECFA, The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1995): *Evaluations of certain food additives and contaminants*. WHO Technical Report Series, No.859,1995.

Lawley R (2013): *Patulin*. Food Safety Watch, dostupno na:
<http://www.foodsafetywatch.org/factsheets/patulin/> (12.04.2017.).

Leo M i Nollet L (2004): *Handbook of Food Analysis: Residues and other food component analysis*, CRC Press, Vol. 2

Magan N i Olsen M (2004): *Mycotoxins in food: Detection and control*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge.

Motarjemi Y, Moy G, Todd E (2014): *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier, Inc. San Diego.

Piqué E, Vargas-Murga L, Gomez-Catalan J, Llobet JM (2013): 8. Occurrence of patulin in organic and conventional apple juice. Risk assessment. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III. 131-144 ISBN: 978-81-7895-605-3

Puel O, Galtier P, Oswald IP (2010): Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins*, 2, 613-631; doi:10.3390/toxins2040613.

Plunkett L, Turnbull D, Rodricks J (1992): Differences between adults and children affecting exposure assessment. In: Guzelian P., Henry C., Olin S., editors. Similarities and Differences between Children and Adults, Implications for Risk Assessment. *ILSI Press*; Washington, DC, USA, pp. 79–94.

Preedy V i Watson RR (2004): *Reviews in Food and Nutrition Toxicity*. CRC Press. Vol. 2.

SCF, Scientific Committee on Food (2000): *Minute Statement on Patulin Expressed by the Scientific Committee on Food during the plenary meeting on 8 March 2000*.

Selmanoglu G i Kockaya EA (2004): Investigation of the effects of patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats. *Food Chem. Toxicol.* 42, 721–727.

Speijers GJA, Franken MAM, Van Leeuwen FXR, Van Egmond HP, Boot R, Loeber JG (1986): Subchronic oral toxicity study of patulin in the rat. Report no. 618314 001. *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne*.

Speijers GJA i Franken MAM (1989): Subacute and subchronic toxicity of patulin in Lintas C and Spadoni M.A. *Food Safety and Health Protection*, Monografia No 28, Rim, Consiglio Nazionale Delle Ricerche.

Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. Official Journal of the European Union, L364/5.

Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani. Official Journal of the European Union, L70/12.

Vasić – Rački Đ, Galić K, Delaš F, Klapeć T, Kipčić D, Katalenić M, Dimitrov N, Šarkanj B (2010): *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek.

WHO, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives (JECFA) (1998): *Position paper on patulin, 30th session.* The Hague, The Netherlands, 9-13.

Wouters MFA, Speijers GJA (1996): *Patulin.* Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva.

Zakon o kontaminantima (2013). Narodne novine, br. 39/13.