

ZNANSTVENO MIŠLJENJE

o deoksinivalenolu (DON) i njegovim derivatima (3-acetil-DON, 15-acetil-DON, DON-3-glukozid) u žitaricama i proizvodima od žitarica

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

(Zahtjev HAH – Z –2018-1)

Usvojeno 19. travnja 2018.

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 Klačec, PTF, Osijek
- dr. sc. Nino Dimitrov, HZJZ, Zagreb

KOORDINATOR IZ HAH-a

- Danijela Stražanac, dipl. ing. preh. teh.

SAŽETAK

Mikotoksin deoksinivalenol (DON) je sekundarni metabolit plijesni roda *Fusarium* (*F. graminearum* i *F. culmorum*), a pripada velikoj grupi trihotecena. Osim DON-a, u žitaricama i proizvodima od žitarica mogu se pojaviti i njegovi **acetilirani derivati** (3-acetil-deoksinivalenol (3-Ac-DON), 15-acetil-deoksinivalenol (15-Ac-DON)), kao i tzv. **maskirani mikotoksini** (deoksinivalenol-3-glukozid (DON-3-glukozid)).

Žitarice i proizvodi od žitarica predstavljaju glavni izvor izloženosti ljudi DON-u i njegovim derivatima. Uzorci za određivanje količina DON-a, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON-a i DON-3-glukozida u hrani prikupljeni su u razdoblju 2014. – 2016. i obuhvatili su 21 grupu hrane.

DON se brzo apsorbira, distribuira i izlučuje iz organizma. Budući da su 3-Ac-DON i 15-Ac-DON u velikoj mjeri deacetilirani i da se DON-3-glukozid razgrađuje u crijevima, mogu se očekivati isti toksični učinci kao i kod DON-a. Stoga je podnošljiv dnevni unos (eng. *Tolerable Daily Intake*, TDI) od 1 µg/kg t.m./dan, koji je prvo utvrđen za DON na temelju smanjenog prirasta tjelesne mase kod miševa, sada uspostavljen kao grupni TDI za zbroj DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i DON-3-glukozida.

Rezultati procjene izloženosti pokazuju da je prosječni unos DON-a i njegovih derivata u scenariju izloženosti sa srednjim vrijednostima koncentracija (UB*) 0,27 µg/kg t.m./dan, a u scenariju s visokim vrijednostima koncentracija 0,36 (UB) µg/kg t.m./dan. U oba scenarija čak i 95. percentil izloženosti (UB) je ispod TDI vrijednosti (1 µg/kg t.m./dan). U scenariju izloženosti sa srednjim vrijednostima koncentracija (UB), 2,65 % populacije prelazi TDI vrijednosti, a 4 % u scenariju s visokim vrijednostima koncentracija (UB).

Uzimajući u obzir navedene rezultate i postojeće nesigurnosti u procjeni izloženosti može se zaključiti kako je potencijalni zdravstveni rizik za odraslu populaciju RH vrlo nizak, gotovo zanemariv.

KLJUČNE RIJEČI

deoksinivalenol, 3-acetil-DON, 15-acetil-DON, DON-3-glukozid, mikotoksini, žitarice i proizvodi od žitarica, procjena rizika

* (UB-upper bound): rezultati <LOD-a su zamijenjeni s punom vrijednošću LOD-a

SUMMARY

Mycotoxin deoxynivalenol (DON) is secondary metabolite of *Fusarium* fungi, and belongs to the large group of mycotoxins called trichothecenes. DON can co-occur in grains and in cereal-based food together with its acetyl derivatives (3-acetyl-deoxynivalenol (3-Ac-DON), 15-acetyl-deoxynivalenol (15-Ac-DON), as well as etc. "masked mycotoxins" (deoxynivalenol-3-glucoside (DON-3-glucoside)).

Grains and grain-based products are main sources for human exposure to DON and its derivatives. Samples intended for the determination DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON and DON-3-glucoside were collected in period from 2014 to 2016 and included 21 food groups.

DON is rapidly absorbed, distributed, and excreted from body. Since 3-Ac-DON and 15-Ac-DON are largely deacetylated and DON-3-glucoside cleaved in the intestines the same toxic effects as DON can be expected. The TDI of 1 µg/kg bw per day, that was established for DON based on reduced body weight gain in mice, was therefore used as a group-TDI for the sum of DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON and DON-3-glucoside.

Results of exposure assessment show that average intake for DON and its derivatives for average occurrence scenario (UB) is 0,27 µg/kg bw/day and for high occurrence scenario (UB) 0,36 µg/kg bw/day. In both scenarios even 95th percentile of exposure (UB) is below TDI value (1 µg/kg bw per day). In average occurrence scenario (UB) 2,65% of population exceeds the TDI level and 4% in high occurrence scenario (UB).

Considering this results and taking into account the existing uncertainties in exposure assessment, it is possible to conclude how potential health risk for adult Croatian population is very low, almost negligible.

KEY WORDS

deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside, mycotoxins, grains and grain-based products, risk assessment

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
2. Karakterizacija opasnosti	9
2.1. Podnošljiv dnevni unos.....	10
2.2. Zakonska regulativa i najveće dopuštene količine DON-a	11
3. Procjena izloženosti	13
3.1. Pojavnost DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i DON-3-glukozida u različitim grupama hrane	13
3.2. Podaci o prehrambenim navikama.....	17
3.3. Rezultati procjene izloženosti.....	18
4. Karakterizacija rizika	23
LITERATURA.....	24

UVOD

Deoksinivalenol (DON) je mikotoksin kojeg proizvode plijesni roda *Fusarium* (*F. graminearum* i *F. culmorum*). Osim DON-a, plijesni proizvode i njegove acetilirane derivate: 3-acetil-deoksinivalenol (3-Ac-DON) i 15-acetil-deoksinivalenol (15-Ac-DON), koji se u hrani mogu pronaći zajedno s DON-om i njihova razina je obično manja od 10 % ukupne količine DON-a. Deoksinivalenol-3-glukozid (DON-3-glukozid) je najčešći biljni metabolit DON-a i pripada u grupu tzv. maskiranih mikotoksina, te doprinosi rezistentnosti biljke prema infekciji plijesnima roda *Fusarium* (EFSA, 2017).

Monitoringom mikotoksina u Republici Hrvatskoj do 2014. godine bilo je obuhvaćeno određivanje samo DON-a u hrani, ali ne i njegovih acetiliranih oblika, kao ni maskiranog oblika. Kako je obveza RH bila slati podatke monitoringa i službenih kontrola o ovim kontaminantima Europskoj agenciji za sigurnost hrane (eng. *European Food Safety Authority*, EFSA), Hrvatska agencija za hranu (HAH) je na inicijativu Ministarstva zdravstva provela istraživanje u kojem su određivane količine DON-a i njegovih derivata.

Prikupljanje uzoraka putem monitoringa provodilo se tri godine, u razdoblju od 2014. do 2016. godine. Isto tako, HAH je paralelno tijekom 2014. godine, u sklopu vlastitog, već ranije započetog projekta, također prikupljala uzorke koji su analizirani na DON, 3-acetil-DON, 15-acetil-DON i DON-3-glukozid.

Prisutnost DON-a zakonski je regulirana na području Europske unije *Uredbom Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani*, gdje su propisane i najveće dopuštene količine (NDK) DON-a u određenoj hrani.

EFSA je 2017. godine donijela Znanstveno mišljenje „*Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed*“ prema kojem je uspostavljen grupni podnošljiv dnevni unos (eng. *Tolerable Daily Intake*, TDI) od 1 µg/kg t.m./dan za zbroj DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i DON-3-glukozida.

Cilj projekta bio je na osnovu dobivenih rezultata za DON, 3-acetil-DON, 15-acetil-DON i DON-3-glukozid u uzorcima žitarica i proizvoda od žitarica na tržištu RH, napraviti procjenu izloženosti populacije RH u slučaju kronične izloženosti, te vrijednosti usporediti s uspostavljenim grupnim TDI-u od 1 µg/kg t.m./dan.

PROCJENA RIZIKA

1. Identifikacija opasnosti

Mikotoksin deoksinivalenol je sekundarni metabolit plijesni roda *Fusarium* (*F. graminearum* i *F. culmorum*), a pripada velikoj grupi trihotecena koja sadrži više od 200 strukturno povezanih mikotoksina niske molekularne mase (EFSA, 2017). Trihoteceni su seskviterpenoidi s dvostrukom vezom između C-9 i C-10 te epoksidom između C-12 i C-13. Ostale kemijske grupe različito utječu na njihovu toksičnost (Pestka, 2010). DON i njegovi metaboliti (Slika 1) imaju keto grupu na C-8 i nazivaju se još i 8-keto-trihoteceni (trihoteceni B grupe) (Döll i Dänicke, 2011).

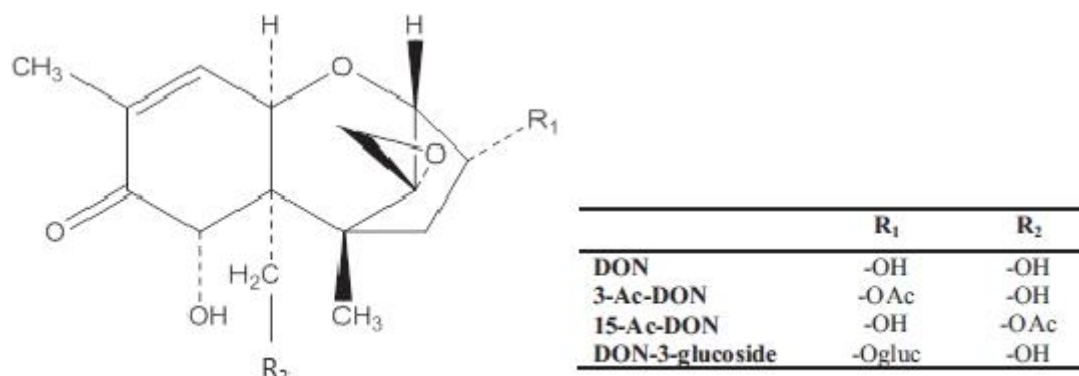
Osim DON-a, u žitaricama i proizvodima od žitarica mogu se pojaviti i njegovi **acetilirani derivati** (3-acetil-DON, 15-acetil-DON) i 3,15-diacetilDON (3,15-Ac-DON). Kao i DON, i njegove acetilirane oblike proizvode plijesni *F. graminearum* i *F. culmorum* kao toksične metabolite i stoga se smatraju slobodnim ili nepromijenjenim mikotoksinima (Berthiller i sur., 2013; Varga i sur., 2013; Rychlik i sur., 2014). Oni se u hrani mogu pronaći zajedno s DON-om u količini obično manjoj od 10 % ukupne količine DON-a. Primijećeno je da se acetilirani derivati DON-a javljaju u puno manjim količinama nego matični spoj DON (Usleber i sur., 1996; Pestka, 2010a; FAO/WHO, 2011), ali i oni također pokazuju određenu toksičnost (Pinton i Oswald, 2014). Nadalje, EFSA-in Znanstveni odbor za kontaminante u prehrambenom lancu (CONTAM) istaknuo je kako se 3,15-Ac-DON javlja čak pri nižim količinama od 3-Ac-DON-a i 15-Ac-DON-a (Usleber i sur., 1996).

Biljke su razvile obrambeni mehanizam protiv infekcije plijesnima na način da modificiraju kemijsku strukturu mikotoksina te dolazi do konjugacije mikotoksina s drugim staničnim komponentama biljke pri čemu nastaje biljni metabolit mikotoksina, odnosno spoj smanjene toksičnosti. Ovi promijenjeni mikotoksini se obično ne detektiraju prilikom analize hrane, te su stoga poznati kao "**maskirani mikotoksini**" (Gareis i sur., 1990).

Takvi spojevi nazvani su maskiranim mikotoksinima jer, iako modificirani oblik mikotoksina često pokazuje manju toksičnost, prilikom probave dolazi do oslobađanja nativnog spoja koji može djelovati toksično. Trenutno najpoznatiji maskirani mikotoksin je **deoksinivalenol-3-glukozid (DON-3-glukozid)** koji je i najčešći biljni metabolit deoksinivalenola, te doprinosi rezistentnosti biljke prema infekciji plijesnima roda *Fusarium* (Brodar i sur., 2016).

Novije spoznaje ukazuju na mogućnost konvertiranja DON-3-glukozida u DON u probavnom traktu ljudi i životinja te na taj način doprinosi ukupnoj izloženosti DON-u (EFSA, 2017).

CONTAM Odbor EFSA-e napominje kako je DON jedan od najčešće proučavanih mikotoksina širom svijeta i stoga se može očekivati kako će se u nadolazećim istraživanjima otkriti još više njegovih promijenjenih oblika, te je stoga važno razjasniti biosintezu DON-a i njegovih promijenjenih oblika.



Slika 1 Kemijska struktura DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i DON-3-glukozida

DON najčešće nastaje na polju, ali može nastati i tijekom skladištenja te je u velikoj mjeri otporan na preradu (Rocha i sur., 2014). Uglavnom se pojavljuje u zrnima žitarica kao što su kukuruz, pšenica i ječam, rjeđe kod zobi, raži i riže, ponajprije u uvjetima umjerene klime, kakve se obično nalaze u Europi. Kontaminacija usjeva s plijesnima iz roda *Fusarium* ovisi o vremenskim uvjetima i pogoduje joj visoka vlažnost u vrijeme cvatnje biljke (WHO, 2001).

Osim hranom biljnog podrijetla, mikotoksine je moguće unijeti u organizam i mlijekom, sirom, mesom te drugim namirnicama životinjskog podrijetla (Rocha i sur., 2014; Pleadin i sur., 2015).

U buragu preživača DON se metabolizira u deoksinivalenol metabolit 1 (DOM-1) koji je manje toksičan. DON i njegovi metaboliti brzo se izlučuju iz organizma prije svega putem urina, ali i u vrlo malim koncentracijama putem mlijeka (Whitlow i sur., 2006.)

DON je bezbojan sitan prah, topiv u polarnim otapalima, kao što su voda, metanol, etanol, acetonitril i etilacetat (EFSA (2017); Pleadin i sur. (2015)). Kemijski je stabilan i u određenoj mjeri otporan na toplinsku obradu, te se također može naći u proizvodima od žitarica kao što su proizvodi od brašna, kukuruzne pahuljice, hrana za dojenčad, slad, pivo i dr. (Šarkanj i sur., 2010; Kabak, 2009). Veća redukcija DON-a utvrđena je u proizvodima čija je tehnologija proizvodnje povezana s višim temperaturama i dužim vremenom prerade (EFSA, 2017).

Sušenje uroda nakon žetve ne utječe na razinu DON-a u zrnu.

Tijekom mehaničkog čišćenja, sortiranja i mljevenja zrna, DON se kao i drugi toksini koje proizvode plijesni iz roda *Fusarium*, neravnomjerno raspodjeljuje između frakcija zrna (mekinje, endosperm i

klice). Uglavnom se pričvrsti na vanjsko dio zrna i zbog toga se toksin javlja u puno većim količinama u mekinjama nego u drugim dijelovima zrna. Kao rezultat procesa ljuštenja nastaju nusproizvodi koji se koriste u industrijama za hranu i hranu za životinje, a u kojima su količine DON-a znatno veće nego u izvornom zrnu. Nedostatne studije koje su proučavale i 3-Ac-DON, 15-Ac-DON i DON-3-glukozid pokazale su kako su količine ovih oblika također smanjene u oljuštenim proizvodima, ali u različitim stupnjevima.

DON je topiv u vodi, tako se npr. kuhanjem tjestenine od pšenice smanjuje njegova količina u kuhanom proizvodu (EFSA, 2017).

2. Karakterizacija opasnosti

U usporedbi s drugim trihotecenima DON se smatra jednim od manje toksičnih. U buragu preživača DON se metabolizira u deoksinivalenol metabolit 1 (DOM-1), koji je znatno manje toksičan od izvornog oblika. Kod životinja, akutna izloženost DON-u izaziva smanjen unos hrane i povraćanje, a kod kronične izloženosti dolazi do smanjenog prirasta te promjena na prsnoj žlijezdi (timusu), slezeni, srcu i jetri. Najosjetljivije životinje na ovaj mikotoksin su svinje. Količina DON-a u hrani za svinje od 5 mg/kg smanjuje iskorištenje hrane za 30-50 %, jer svinje odbijaju konzumaciju takve hrane. Način na koji svinje u hrani prepoznaju prisutnost plijesni koje proizvode DON nije poznat, ali se pretpostavlja da odbijaju hranu zbog promjena u mirisu i okusu. Manje količine DON-a u hrani za svinje ne izazivaju odbijanje hrane, a smatra se da količina od 3,5 mg/kg hrane DON-a uzrokuje smanjenje težine tijekom graviditeta te utječe i na daljnju laktaciju.

DON se brzo i djelotvorno apsorbira i slabo metabolizira, pa se više od 95 % unesenog DON-a izluči mlijekom, urinom i fecesom krava i svinja. Ostaci DON-a mogu se naći u organima svinja (srcu, bubrezima, jetri, slezeni) koje su hranidbom dobivale kontaminiranu hranu, ali se ne može detektirati ukoliko se DON ukloni iz hrane 12 sati prije klanja (Whitlow i sur., 2006).

Kod ljudi u akutnim slučajevima uzrokuje mučninu, povraćanje, proljev, bol u trbuhu, glavobolju, vrtoglavicu i groznicu. DON je poznat kao inhibitor sinteze proteina, što za posljedicu ima povećanje koncentracije aminokiseline triptofana i sinteze serotonina.

DON mijenja odgovor serumskih imunoglobulina IgA, koji se nalaze u sekreciji sluznica crijeva, gdje je glavna zaštita od antigena u hrani. Učinci na imunološki odgovor dovode do povećane osjetljivosti kod zaraznih bolesti pri izloženosti srednjim i visokim količinama DON-a (8-10 mg/kg tjelesne mase). Studije o imunološkom odgovoru 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i DON-3-glukozida su rijetke.

Dokazano je da DON u kombinaciji s drugim mikotoksinima (npr. u kombinaciji s aflatoksinom B1) ima izraženo mutageno djelovanje, dok samostalno u istraživanjima na eksperimentalnim životinjama nije pokazao kancerogeni učinak. Zbog nedostatka dokaza o kancerogenosti ovog mikotoksina

Međunarodna agencija za istraživanje raka (eng. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) ga je svrstala u skupinu 3 (IARC, 1993).

Konzumacija visoko kontaminirane hrane kod životinja može dovesti do akutnih gastrointestinalnih simptoma kao što su povraćanje, odbijanje hrane i krvavi proljev. Zbog svoje sposobnosti da potakne akutno povraćanje kod svinja (Vesonder i sur., 1973), DON je također dobio i trivijalni naziv 'vomitoksin'.

Dostupni podaci nisu dokazali hemato- ili mijelotoksičnost DON-a, te se u tom smislu razlikuje od ostalih trihotecena. Podaci o neurotoksikološkim učincima DON-a bili su ograničeni i CONTAM Odbor EFSA-e nije našao dokaze koji bi bili prikladni za karakterizaciju opasnosti ili bilo koju poveznicu s podacima o načinu djelovanja DON-a. Kancerogenost DON-a, nije potvrđena novim dokazima, nakon prethodnih procjena u kojima jedina dostupna dugotrajna studija nije pokazala kancerogena svojstva DON-a kod miševa. Za 3-Ac-DON, 15-Ac-DON i DON-3-glukozid, CONTAM Panel nije našao podatke o kroničnoj toksičnosti, hemato- i mijelotoksičnosti, neurotoksičnosti i kancerogenosti.

Oralna izloženost DON-u posljedično dovodi do razvojne i reproduktivne toksičnosti kod eksperimentalnih životinja, uključujući smanjenu plodnost, embriotoksičnost, skeletne abnormalnosti, učinke na tjelesnu težinu, postnatalnu smrtnost. Nema podataka za 3-Ac-DON, 15-Ac-DON i DON-3-glukozid.

DON je potvrđeno genotoksičan *in vitro*, a podaci dostupni o genotoksičnosti DON-a *in vivo* bili su neuvjerljivi. Dostupni dokazi upućuju na to da mehanizmu genotoksičnosti više doprinosi oksidativni stres, nego izravna interakcija DON-a (stvaranje adukata) sa staničnom DNA. Slično kao i DON, 3-Ac-DON bio je neaktivan u analizi bakterijske mutacije i nisu identificirani podaci o testovima *in vitro* genotoksičnosti s 15-Ac-DON ili DON-3-glukozidom.

Nema *in vivo* ispitivanja genotoksičnosti na 3-Ac-DON, 15-Ac-DON i DON-3-glukozid.

Slučajevi akutne izloženosti ljudi zabilježeni su u Aziji i to sa simptomima kao što su mučnina, povraćanje, proljev, bolovi u trbuhu, glavobolje, vrtoglavica, krvava stolica. Nije prijavljena smrtnost. Međutim, nedostaju dokazi o štetnim učincima na zdravlje ljudi kod kronične izloženosti DON-u.

2.1. Podnošljiv dnevni unos

Godine 1999. Znanstveni odbor za hranu (eng. *Scientific Committee on Food*, SCF) Europske komisije usvojio je znanstveno mišljenje o DON-u i uspostavio TDI od 1 µg/kg t.m./dan.

Godine 2004. na zahtjev Europske Komisije, EFSA je donijela znanstveno mišljenje o DON-u. U to vrijeme nije se smatralo potrebnim razmotriti posebne mjere zbog pojavljivanja 3-Ac-DON i 15-Ac-DON kako bi se zaštitilo zdravlje ljudi.

Godine 2010. Zajednički stručni odbor FAO / WHO-a za prehrambene aditive (JECFA) evaluirao je DON i odlučio promijeniti privremeni maksimalni podnošljiv dnevni unos (eng. *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*, PMTDI) u grupni PTMDI od 1 µg/kg t.m. za DON i njegove derivate 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, budući da se 3-Ac-DON pretvara u DON *in vivo* i zbog toga doprinosi ukupnoj toksičnosti, a smatra se da je njihova toksičnost jednaka onoj od DON-a. Tada nije bilo dovoljno podataka da se i DON-3-glukozid uključi u grupni PMTDI.

JECFA je uspostavila i grupnu akutnu referentnu dozu (ARfD) od 8 µg/kg t.m. za DON i njegove derivate. U posljednjih nekoliko godina izvještava se o prisutnosti maskiranih oblika DON-a, posebno DON-3-glukozida, te je stoga EFSA odlučila i njega uključiti u procjenu.

Godine 2017. EFSA je usvojila Znanstveno mišljenje *Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed* u kojem je uspostavljen grupni TDI od 1 µg/kg t.m./dan za zbroj DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i DON-3-glukozida (EFSA, 2017).

2.2. Zakonska regulativa i najveće dopuštene količine DON-a

Količine DON-a u hrani su zakonski regulirane u mnogim zemljama diljem svijeta, pa tako i europskim, koje su među prvima postavile granice u njegovim količinama. Na području Europske unije, DON 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, sa svim izmjenama i dopunama
- Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani, sa svim izmjenama i dopunama.

Uredbom 1881/2006 uspostavljene su najveće dopuštene količine za DON u određenim prehrambenim proizvodima, navedene kao „najveće dopuštene količine“ izražene u mikrogramu po kilogramu proizvoda, navedene u Prilogu spomenute Uredbe, Odjeljak 2.: *Mikotoksini (Tablica 1.)*. Raspon dozvoljenih NDK kreće se od 200 do 1750 µg/kg, ovisno o vrsti proizvoda.

Tablica 1. Najveće dopuštene količine za DON u određenim prehrambenim proizvodima (EZ/1881/2006/)

	Hrana ^(a)	Najveće dopuštene količine (µg/kg)
1.	Neprerađene žitarice ^{(b), (c)} , osim tvrde pšenice, zobi i kukuruza	1250

2.	Neprerađena tvrda pšenica i zob ^{(b), (c)}	1750
3.	Neprerađeni kukuruz ^(b) , osim neprerađenog kukuruza namijenjenog za preradu mokrom meljavom ^(d)	1750
4.	Žitarice namijenjene za izravnu prehranu ljudi, žitno brašno, mekinje i klice kao konačni proizvod stavljen na tržište za izravnu prehranu ljudi, osim hrane navedene u točkama 7, 8 i 9	750
5.	Tjestenina (suha) ^(e)	750
6.	Kruh (uključujući male pekarske proizvode), kolači, keksi, snack proizvodi od žitarica i žitarice za doručak	500
7.	Prerađena hrana na bazi žitarica i hrana za dojenčad i malu djecu ^{(f), (g)}	200
8.	Frakcije meljave kukuruza s veličinom čestica > 500 mikrona, uvrštene pod oznaku CN 1103 13 ili 1103 20 40 i drugi proizvodi meljave kukuruza s veličinom čestica > 500 mikrona koji se ne upotrebljavaju za izravnu prehranu ljudi uvršteni pod oznakom CN 1904 10 10	750
9.	Frakcije meljave kukuruza s veličinom čestica ≤ 500 mikrona, uvrštene pod oznaku CN 1102 20 40 i drugi proizvodi meljave kukuruza s veličinom čestica ≤ 500 mikrona koji se ne upotrebljavaju za izravnu prehranu ljudi uvršteni pod oznakom CN 1904 10 10	1250

(a) Za potrebe primjene najvećih dopuštenih količina za deoksinivalenol utvrđenih u Tablici 1. riža nije uključena u „žitarice” i proizvodi od riže nisu uključeni u „proizvode od žitarica”.

(b) Najveća dopuštena količina primjenjuje se na neprerađene žitarice koje se stavljaju na tržište za prvi stupanj prerade.

„Prvi stupanj prerade” znači svaka fizikalna ili toplinska obrada zrna ili na zrnu, osim sušenja. Postupci čišćenja, uključujući ljuštenje, sortiranja i sušenja ne smatraju se „prvim stupnjem prerade” ako cijelo zrno ostane netaknuto nakon čišćenja i sortiranja. Ljuštenje je čišćenje žitarica snažnim četkanjem i/ili ribanjem.

(c) Najveća dopuštena količina primjenjuje se na požete i preuzete žitarice, od tržišne godine 2005./2006., u skladu s Uredbom Komisije (EZ) br. 824/2000 od 19. travnja 2000. o utvrđivanju postupaka za preuzimanje žitarica od strane intervencijskih agencija i o utvrđivanju metoda analize za određivanje kakvoće žitarica (SL L 100, 20.4.2000., str. 31.), kako je zadnje izmijenjena Uredbom (EZ) br. 1068/2005 (SL L 174, 7.7.2005., str. 65.).

(d) Izuzeće se primjenjuje samo za kukuruz za koji je jasno vidljivo, na primjer putem označivanja, odredišta, da je namijenjen za upotrebu samo u preradi mokrom meljavom (proizvodnja škroba).

(e) Tjestenina (suha) znači tjestenina sa sadržajem vode od otprilike 12 %.

(f) Hrana popisana u ovoj kategoriji kako je definirana u Uredbi (EU) br. 609/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 12. lipnja 2013. o hrani za dojenčad i malu djecu, hrani za posebne medicinske potrebe i zamjeni za cjelodnevnu prehranu pri redukcijskoj dijeti te o stavljanju izvan snage Direktive Vijeća 92/52/EEZ, direktiva Komisije 96/8/EZ, 1999/21/EZ, 2006/125/EZ i 2006/141/EZ, Direktive 2009/39/EZ Europskog parlamenta i Vijeća i uredbi Komisije (EZ) br. 41/2009 i (EZ) br. 953/2009 (SL L 181, 29.6.2013., str. 35.).

(g) Najveća dopuštena količina odnosi se na suhu tvar. Suha tvar određuje se u skladu s Uredbom (EZ) br. 401/2006.

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

U Republici Hrvatskoj, DON je zakonski reguliran Zakonom o kontaminantima (NN 39/13), koji je preuzeo odredbe iz Uredbi EZ/1881/2006/EZ i EZ/401/2006/.

3. Procjena izloženosti

3.1. Pojavnost DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i DON-3-glukozida u različitim grupama hrane

Uzorci za određivanje količina DON-a, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON-a i DON-3-glukozida u hrani potječu iz dva izvora. Jedan dio uzoraka prikupila je inspekcija Ministarstva zdravstva na tržištu RH tijekom trogodišnjeg (2014., 2015., 2016.) nacionalnog monitoringa, dok je drugi dio uzoraka prikupljen 2014. godine za potrebe projekta koji je dodatno provodila Hrvatska agencija za hranu. Uzorci prikupljeni samo u 2014. obuhvatili su hranu koja bi mogla prema literaturnim navodima biti kontaminirana DON-om i njegovim derivatima, a koja se konzumira u RH, u skladu s prehrambenim navikama prikupljenim istraživanjem „*Nacionalno istraživanje o prehrambenim navikama odrasle populacije RH*“ koje je provela Hrvatska agencija za hranu 2012. godine.

Reprezentativnost uzoraka obzirom na njihov broj varira u pojedinim grupama hrane.

Uzorci su analizirani u laboratoriju NZZJZ „Dr. Andrija Štampar“. Laboratorij je priredio i pohranio po jedan homogenizirani uzorak nakon svakog određivanja DON-a, za određivanje acetiliranih i maskiranog oblika. Navedeni uzorci su prikupljeni i periodično prosljeđivani na Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, nakon čega su slani na analizu u laboratorij u Tull-u, Austrija.

Uzorci prikupljeni u sklopu HAH-ovog projekta u cijelosti su analizirani u Austriji.

PRIPREMA I ODREĐIVANJE UZORAKA

Za određivanje DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i DON-3-glukozida u uzorcima korištena je „razrijedi i mjeri“ LC-MS/MS metoda koja je provedena prema uvjetima opisanim u radu Malachove i sur. (2014). Uzorci hrane homogenizirani su te usitnjeni na mlinu M20 (IKA, Staufen, Njemačka). Od homogeniziranog uzorka redukcijom na Retsch RT 12.5 razdvajaču uzoraka odvojen je laboratorijski poduzorak od 5 grama i ekstrahiran s 20 mL ekstrakcijskog otapala (acetonitril/voda/octena kiselina 79:20:1, v/v/v) u plastičnim epruvetama od 50 mL (Falcon). Ekstrakcija je provedena na orbitalnoj tresilici 3017 (GFL), tijekom 90 min, pri 180 okretaja u minuti uz sobnu temperaturu. Nakon ekstrakcije, 500 µL uzorka razrijeđeno je s 500 µL otopine za razrjeđivanje (acetonitril/voda/octena kiselina 20:79:1, v/v/v) u vialama za LC-MS/MS, koje su zatim dobro izmiješane na vorteks mješalici.

Detekcija i kvantifikacija provedena je s QTrap 5500 MS/MS sustavom (Applied Biosystems) opremljenim s TurboV elektrosprej ionizacijskim (ESI) izvorom i serijom 1290 UHPLC sustava (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).

ESI-MS/MS detekcija provedena je u SRM (selective reaction monitoring) modu uz dvije tranzicije svakog analita: DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON te DON-3-glukozid. SRM mjerenje tranzicije svakog analita

postavljeno je na odgovarajuće vrijeme retencije ± 27 i ± 42 sekunde u pozitivnom i negativnom modu. Ciljano vrijeme skeniranja bilo je podešeno na 1 sekundu. Postavke ESI izvora bile su slijedeće: temperatura izvora 550 °C, zastorni plin 30 psi (206,8 kPa s maksimalno 99,5 % dušika), plin s izvorom iona 1 (nosioc) 80 psi (551,6 kPa dušika), plin s izvorom iona 2 (plin za sušenje) 80 psi (551,6 kPa dušika), napon ionskog raspršivanja -4500 V i +5500 V, kao kolizijski plin koristio se dušik. Optimizacija analitički ovisnih MS/MS parametara izvedena je izravnim injektiranjem standarda (razrijeđenog u smjesi eluenta A i B u omjeru 1:1) u MS izvor pomoću injektora šprice pri brzini protoka od 10 μ L/min.

Grupe hrane i broj uzoraka obuhvaćeni ovom procjenom, kao i broj uzoraka ispod granice detekcije (LOD) prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Broj uzoraka po grupama hrane te broj uzoraka ispod granice detekcije (LOD)

Grupe hrane	Pivo	Kruh	Kukuruzne pahuljice	Muesli	Pločice od žitarica	Zobene pahuljice	Pizza	Čokolino	Keksi	Punjeni pekarski proizvodi	Kuhani kukuruz	Pšenična krupica	Kukuruzno brašno	Kukuruzna krupica	Pšenično brašno	Heljda	Proso	Ječam	Riža	Kuhana tjestenina	Ispucane kokice	Ukupno
Ukupan broj uzoraka	4	15	8	6	3	4	3	3	8	14	2	2	7	12	34	4	5	11	21	6	3	175
Broj uzoraka ispod LOD ⁽¹⁾	1	-	1	1	3	1	-	-	1	1	2	-	-	-	-	3	1	-	11	1	3	30

(1) –LOD (engl. *limit of detection*) granica detekcije

U 30 uzoraka (17 %) nisu određeni DON i njegovi derivati u količinama iznad granice detekcije (LOD) pa je za uključivanje tih podataka u obradu, korišten pristup s tri slučaja:

- LB slučaj (*LB-lower bound*): rezultati <LOD-a zamijenjeni su s brojkom nula
- MB slučaj (*MB-middle bound*): rezultati <LOD-a su zamijenjeni s pola vrijednosti LOD-a
- UB slučaj (*UB-upper bound*): rezultati <LOD-a su zamijenjeni s punom vrijednošću LOD-a

Tablica 3. Deskriptivna statistička analiza količine DON-a i njegovih derivata u različitim grupama hrane po slučajevima (LB, MB, UB)

Hrana	N ⁽¹⁾	LB ⁽²⁾ (µg/kg)						MB ⁽²⁾ (µg/kg)						UB ⁽²⁾ (µg/kg)					
		Min ⁽³⁾	Srednja vrijednost	Max ⁽⁴⁾	P 95 ⁽⁵⁾	Medijan	SD ⁽⁶⁾	Min ⁽³⁾	Srednja vrijednost	Max ⁽⁴⁾	P 95 ⁽⁵⁾	Medijan	SD ⁽⁶⁾	Min ⁽³⁾	Srednja vrijednost	Max ⁽⁴⁾	P 95 ⁽⁵⁾	Medijan	SD ⁽⁶⁾
Kukuruzna krupica	12	75,87	632,97	1632,40	-	641,70	533,75	76,22	634,56	1632,40	-	644,65	534,39	76,57	636,16	1632,40	-	647,60	535,04
Kukuruzno brašno	7	157,60	535,80	1206,20	-	464,50	388,92	157,90	537,70	1209,20	-	465,40	389,66	158,30	539,60	1212,10	-	466,30	390,41
Kukuruzne pahuljice	8	0	219,79	599,80	-	115,00	215,27	0,45	220,99	602,75	-	116,27	216,03	0,91	222,20	605,70	-	117,55	216,81
Pšenično brašno	34	10,90	121,44	615,90	193,35	106,19	101,76	14,85	123,32	617,00	194,31	108,31	101,34	17,70	125,19	618,10	195,27	110,81	100,94
Muesli	6	0	118,40	324,45	-	72,77	127,36	0,45	119,04	324,80	-	73,40	127,32	0,91	119,69	325,16	-	74,05	127,28
Kruh	15	18,53	85,56	147,77	-	84,78	41,35	18,89	85,91	148,12	-	85,13	41,35	19,24	86,26	148,48	-	85,48	41,34
Pšenična krupica	2	38,32	70,68	103,03	-	70,67	45,75	38,67	71,03	103,38	-	71,03	45,75	39,03	71,38	103,73	-	71,38	45,74
Pizza	3	19,98	54,53	104,14	-	39,47	44,05	20,34	54,88	104,49	-	39,82	44,05	20,69	55,23	104,84	-	40,17	44,05
Zobene pahuljice	4	0,41	48,92	110,43	-	42,42	46,68	1,36	50,54	110,68	-	45,06	46,68	2,31	52,17	110,93	-	47,72	46,79
Čokolino	3	43,76	50,93	62,01	-	47,03	9,73	44,11	51,29	62,37	-	47,38	9,73	44,47	51,64	62,72	-	47,74	9,73
Keksi	8	0	39,55	103,56	-	33,75	31,11	4,45	40,82	103,92	-	34,12	30,19	8,90	42,10	104,27	-	36,12	29,36
Ječam	11	8,60	35,33	83,00	-	33,55	23,47	10,71	37,68	84,10	-	34,40	23,01	11,07	40,03	85,20	-	35,25	22,65
Pločice od žitarica	3	16,05	35,47	64,26	-	26,10	25,43	16,41	35,82	64,61	-	26,45	25,43	16,76	36,18	64,97	-	26,80	25,43

Punjeni pekarski proizvodi	14	0	30,54	72,58	-	26,98	19,10	0,45	30,89	72,93	-	27,33	19,08	0,91	31,26	73,28	-	27,68	19,07
Pivo	4	0	24,58	42,02	-	28,15	17,74	0,45	24,96	42,38	-	28,50	17,69	0,91	25,34	42,73	-	28,86	17,64
Riža	21	0	19,32	131,10	66,35	1,26	33,68	0,95	21,83	131,20	67,20	4,45	32,98	1,91	24,35	131,30	68,05	8,90	32,36
Kuhana tjestenina	6	0	20,70	45,27	-	15,20	16,35	0,69	21,11	45,62	-	15,55	45,62	1,37	21,52	45,97	-	15,09	16,18
Proso	5	0	4,54	6,30	-	5,60	2,57	0,96	6,12	9,25	-	6,71	3,10	1,91	7,71	12,90	-	7,81	3,91
Heljda	4	0	0,13	0,50	-	0	0,25	0,96	2,52	6,30	-	1,41	2,53	1,91	4,91	12,60	-	2,56	5,13
Ispucane kokice	3	0	0	0	-	0	0	0,46	0,46	0,46	-	0,46	0	0,91	0,91	0,91	-	0,91	0
Kuhani kukuruz	2	0	0	0	-	0	0	0,45	0,45	0,45	-	0,46	0	0,91	0,91	0,91	-	0,91	0

- (1) N-broj uzoraka;
- (2) LB-lower bound; MB-middle bound; UB-upper bound;
- (3) Min-najmanja određena koncentracija;
- (4) Max-najveća određena koncentracija;
- (5) P 95 – 95. percentil; određen je za grupe hrane u kojima je $N \geq 20$;
- (6) SD-standardna devijacija

Za potrebe izračuna procjene izloženosti, kod grupa hrane: proso, ječam, riža, heljda, pšenično brašno, pšenična krupica, kukuruzno brašno, kukuruzna krupica korištene su vrijednosti koncentracija DON-a i njegovih derivata koje su određene u sirovom stanju. Prema dostupnim podacima o utjecaju termičke obrade na količinu DON-a za očekivati je da će daljnjom termičkom obradom (kuhanje, pečenje i sl.) te hrane doći će u određenoj mjeri do redukcije DON-a i njegovih derivata, što bi moglo dovesti do niže ukupne izloženosti.

3.2. Podaci o prehrambenim navikama

Podaci o potrošnji hrane u Hrvatskoj dobiveni su iz istraživanja koje je provela Hrvatska agencija za hranu tijekom 2011. i 2012. godine, i to na nacionalnom, reprezentativnom uzorku po dobi, spolu i regiji. Istraživanje je obuhvatilo 2002 ispitanika u dobi od 18 do 64 godine. Koristio se intervju „licem u lice“ i metoda 24-satnog prisjećanja, u trajanju od 3 dana (dva radna dana i jedan dan vikenda), a podaci o učestalosti potrošnje pojedine hrane dobiveni su putem Upitnika o učestalosti konzumacije.

U podacima dobivenim istraživanjem, osim podataka o potrošnji hrane (g/dan) nalaze se i demografski podaci kao što su: dob, spol, tjelesna masa i regija iz koje ispitanik dolazi.

Od ukupnog broja ispitanika koji su sudjelovali u spomenutom istraživanju, za potrebe procjene izloženosti DON-u i njegovim derivatima uzeto je u obzir 1997 konzumenata koji su prijavili konzumaciju najmanje jedne vrste hrane koja je analizirana na DON i njegove derivate (Tablica 4).

Tablica 4. Deskriptivna statistička analiza podataka o prehrambenim navikama prema različitim grupama hrane korištenim u procjeni izloženosti

Vrsta hrane	Broj konzumenata	Minimum	Srednja vrijednost	Maksimum	95. percentil ⁽¹⁾	Medijan	Standardna devijacija
		g/dan					
Pločice od žitarica	6	9,00	104,00	400,00	-	61,50	147,20
Pizza	256	0,66	78,38	1350,00	300,00	36,00	139,22
Proso	8	3,99	510,02	3969,00	-	12,16	1397,72
Pšenično brašno	1804	0,03	13,94	335,66	56,83	5,10	1397,72
Punjeni pekarski proizvodi	775	0,24	67,60	770,00	224,12	36,00	88,85
Riža	714	0,01	17,13	332,85	82,72	5,29	32,89

Pšenična krupica	45	0,08	6,25	60,75	26,78	1,62	13,06
Zobene pahuljice	31	14,00	86,70	300,00	230,00	70,00	72,89
Kuhana tjestenina	712	0,23	36,34	441,39	127,01	1,91	55,07
Pivo	509	0,24	497,91	5400,00	1800,00	300,00	575,64
Kruh	1864	0,10	118,05	657,33	250,57	100,26	79,64
Čokolino	36	0,50	26,03	128,00	102,00	15,60	31,90
Heljda	4	5,16	11,45	22,58	-	9,00	7,71
Ječam	28	0,90	4,16	26,25	13,34	2,39	5,39
Ispucane kokice	32	0,60	45,38	500,00	135,20	21,00	90,39
Kuhani kukuruz	66	0,03	45,28	700,00	252,00	6,68	108,46
Kukuruzna krupica	125	0,07	62,38	254,75	248,78	27,86	75,92
Kukuruzne pahuljice	67	7,00	96,64	376,67	276,60	72,00	82,36
Kukuruzno brašno	41	0,27	50,52	299,44	235,87	14,74	72,90
Muesli	88	2,80	115,80	600,00	300,00	76,00	110,60
Keksi	383	0,003	30,28	250,00	95,90	18,20	33,75

P 95 – 95. percentil; određen je za grupe hrane u kojima je $N \geq 20$;

Prehrambene navike za proso, ječam, heljdu, pšenično brašno, pšeničnu krupica, kukuruzno brašno, kukuruznu krupica izražene su u količinama danim za njihovo sirovo stanje. Naime, količine ove pojedine hrane dobivene su iz preračuna njihovih udjela iz kompozitnih jela i korištenja *yield* faktora konverzije (Bognar, 2002) kako bi se dobila količina hrane u sirovom stanju.

3.3. Rezultati procjene izloženosti

Potencijalno štetni učinak DON-a i njegovih derivata posljedica je dugotrajne izloženosti, pa se zbog toga računala kronična izloženost odrasle populacije RH prema sljedeća dva scenarija:

S1 – scenarij izloženosti sa srednjim vrijednostima koncentracija

U ovom scenariju procjena izloženosti se temelji na prosječnoj dnevnoj konzumaciji određene grupe hrane za svakog konzumenta, uzimajući u obzir njegovu tjelesnu masu, i srednjoj vrijednosti zbroja količina DON-a i njegovih derivata za svaku pojedinu grupu hrane, za LB, MB i UB slučaj.

S2 – scenarij izloženosti s visokim vrijednostima koncentracija

U ovom scenariju procjena izloženosti napravljena je kao i u S1, s tom razlikom da su za grupu hrane (kruh) koja najviše doprinosi izloženosti DON-u i njegovim derivatima umjesto srednjih vrijednosti zbroja količina DON-a i njegovih derivata korištene vrijednosti 95. percentila.

Vrijednosti su prikazane za LB, MB i UB slučaj.

Procjena izloženosti temelji se na kombinaciji probabilističkog pristupa u slučaju vrijednosti za prehrabne navike i determinističkog pristupa za količinu DON-a u pojedinoj grupi hrane, a za statističku obradu podataka korišten je programski jezik „R“.

Tablica 5. Unos DON-a i njegovih derivata te postotak populacije koja prelazi TDI u odnosu na scenarij izloženosti sa srednjim vrijednostima koncentracija (S1) i scenarij izloženosti s visokim vrijednostima koncentracija (S2)

	Slučajevi scenarija	N ⁽²⁾	Minimum	Srednja vrijednost	Maksimum	95. percentil	Medijan	SD ⁽³⁾	broj ispitanika iznad TDI ⁽⁴⁾	% ispitanika iznad TDI
			(µg/kg t.m./dan)							
S1	LB ⁽¹⁾	1997	0,000065	0,2698	4,145	0,7473	0,1857	0,3097	52	2,60
	MB ⁽¹⁾	1997	0,000071	0,2729	4,157	0,7502	0,1886	0,3117	52	2,60
	UB ⁽¹⁾	1997	0,000072	0,2746	4,170	0,7522	0,1898	0,3128	53	2,65
S2	LB ⁽¹⁾	1997	0,000065	0,3533	4,2438	0,8745	0,2720	0,3356	77	3,85
	MB ⁽¹⁾	1997	0,000075	0,3571	4,2565	0,8867	0,2751	0,3382	79	3,95
	UB ⁽¹⁾	1997	0,000081	0,3594	4,2691	0,8941	0,2760	0,3399	80	4,00

(1) LB-lower bound; MB-middle bound; UB-upper bound;

(2) N-broj konzumenata;

(3) SD-standardna devijacija;

(4) TDI-podnošljiv dnevni unos

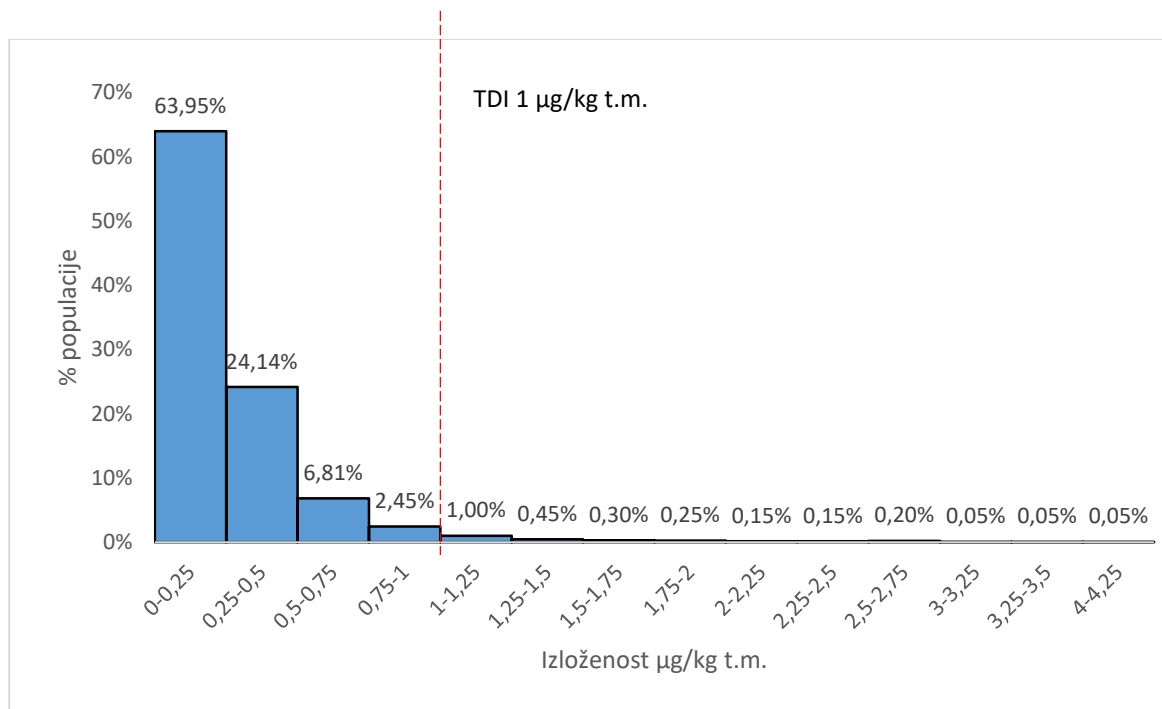
Obzirom na najvažnije izvore hrane koja sadrži DON i njegove derivate, njihov prosječni unos za scenarij izloženosti sa srednjim vrijednostima koncentracija (UB) iznosi 0,27 µg/kg t.m./dan, a za scenarij izloženosti s visokim vrijednostima koncentracija (UB) 0,36 µg/kg t.m./dan (Tablica 5). U oba scenarija čak je i 95. percentil (UB) ispod TDI vrijednosti (za S1 iznosi 0,7522 µg/kg t.m./dan, odnosno 75 % TDI-a, a za S2 0,8941 µg/kg t.m./dan, odnosno 89 % TDI-a).

Razlike u dobivenim vrijednostima izloženosti DON-u i njegovim derivatima između LB, MB i UB slučaja u oba scenarija su zanemarive, što je posljedica malog broja uzoraka (30) čije su koncentracije DON-a

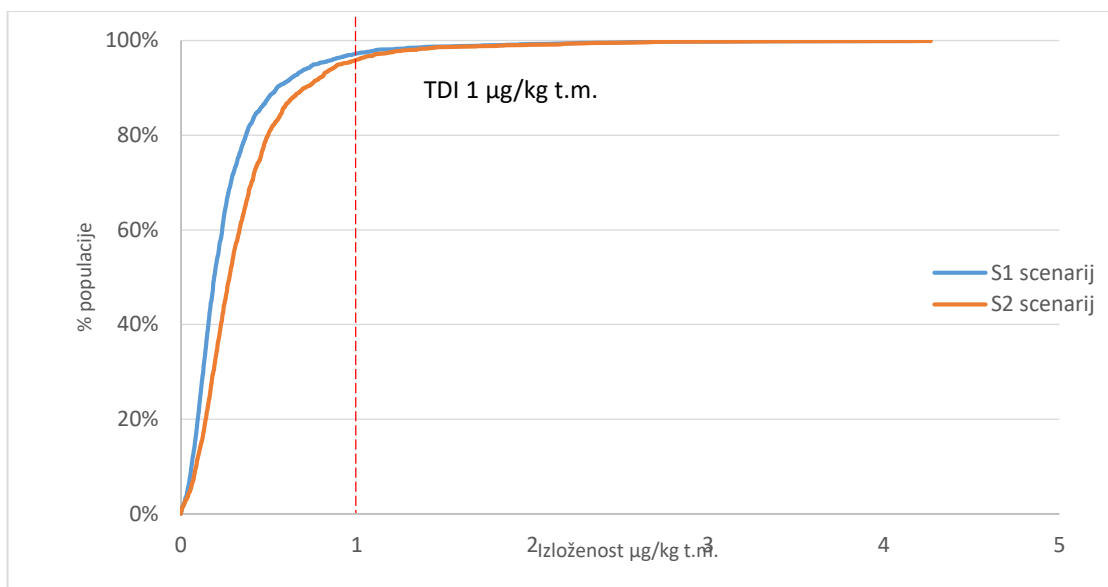
i njegovih derivata bili ispod granice detekcije (LOD). Iz toga razloga daljnji prikazi rezultata dani su za UB slučajeve za oba scenarija.

Iz izračuna je vidljivo kako je većina vrijednosti izloženosti manja od TDI vrijednosti, koja iznosi 1 µg/kg t.m./dan. Točnije, u S1 scenariju (UB) 2,65 % konzumenata izloženo je unosu DON-a i njegovih derivata iznad toksikološke granice od 1 µg/kg t.m./dan, dok u S2 scenariju (UB) to iznosi 4 %.

Iz distribucije vjerojatnosti izloženosti DON-u i njegovim derivatima (Slika 2) je vidljivo kako je 97,35% konzumenata u scenariju sa srednjim vrijednostima koncentracija (UB) ispod TDI vrijednosti.



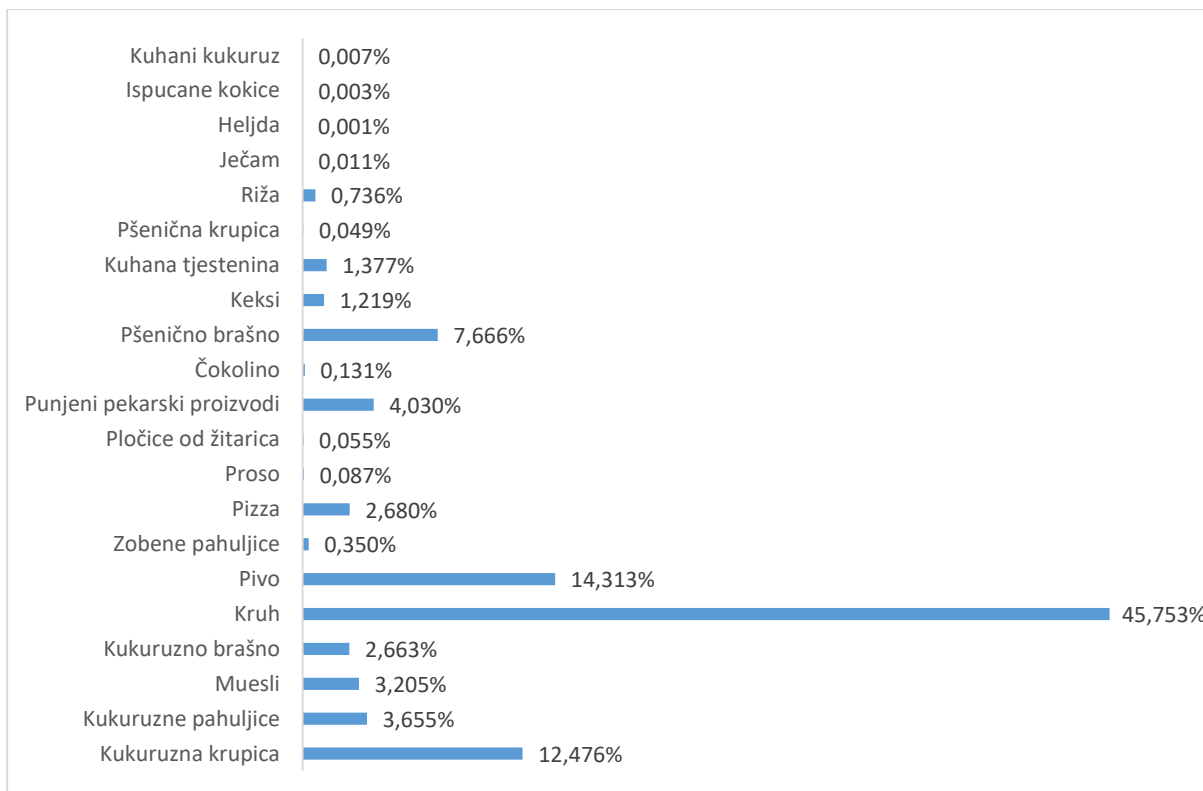
Slika 2. Distribucija vjerojatnosti izloženosti DON-u i njegovim derivatima za scenarij izloženosti sa srednjim vrijednostima koncentracija (UB)



Slika 3. Kumulativna distribucija izloženosti DON-u i njegovim derivatima (UB) za S1 i S2

Usporedba između kumulativnih distribucija izloženosti za oba scenarija (S1 (UB) i S2 (UB)) prikazana je na Slici 3., te je vidljivo kako je izloženost za scenarij s visokim vrijednostima koncentracija (S2) veća od izloženosti scenarija sa srednjim vrijednostima koncentracija (S1). S obzirom da su u S2 scenariju korištene vrijednosti zbroja količina DON-a i njegovih derivata na 95. percentilu za kruh, tj. grupu koja najviše doprinosi izloženosti, ovakav rezultat je očekivan. Premda se kruh ne bi mogao ubrojiti u hranu u kojoj je utvrđena najveća količina DON-a i njegovih derivata, zbog učestale konzumacije značajno doprinosi njihovom unosu.

Kao što je spomenuto najvažniji izvor DON-a i njegovih derivata u prehrani je kruh (45,75 %), zatim slijede pivo (14,31 %), kukuruzna krupica (12,48 %), pšenično brašno (7,67 %), dok kokice, kuhani kukuruz, heljda i ječam najmanje doprinose unosu DON-a i njegovih derivata (0,01 % i manje) (Slika 4.). Ovaj poredak posljedica je prvenstveno prehrambenih navika jer je vidljivo kako su srednje vrijednosti zbroja količina (UB) DON-a i njegovih derivata za kruh (86,26 µg/kg) i pivo (25,34 µg/kg) značajno manje od vrijednosti za kukuruznu krupicu (636,16 µg/kg) i kukuruzno brašno (539,60 µg/kg), što je vidljivo iz Tablice 3.



Slika 4. Doprinosi pojedinih vrsta hrane ukupnoj izloženosti DON-u i njegovim derivatima u scenariju sa srednjim vrijednostima koncentracija (UB)

Utvrđena je statistički značajna razlika u izloženosti DON-u i njegovim derivatima između spolova za scenarij sa srednjim vrijednostima koncentracija (UB) Welchovim t-testom ($p=9,59 \cdot 10^{-7}$) i Kolmogorov-Smirnovljevom testom ($p=3,44 \cdot 10^{-15}$), na razini značajnosti 0,05.

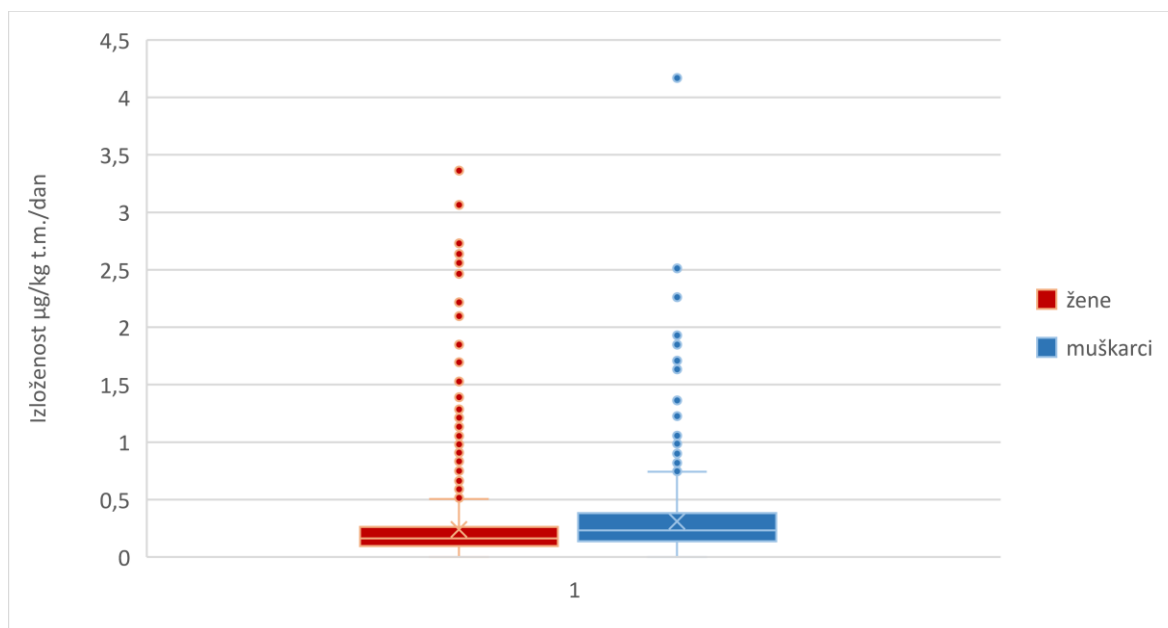
Žene su značajno manje izložene unosu DON-a i njegovih derivata nego muškarci, što je posljedica razlike u prehranbenim navikama. Posebno velika razlika je uočena u konzumaciji piva koja kod muškaraca iznosi 0,072 g/danu, dok je kod žena 0,008 g/danu. Temeljem toga doprinos piva ukupnoj izloženosti DON-u i njegovim derivatima iznosi kod muškaraca 23 %, a kod žena 3,4 %.

Slika 5. prikazuje varijabilnost u izloženosti DON-u i njegovim derivatima za oba spola.

Tablica 6. Deskriptivna statistika izloženosti po spolovima

Spol	Broj konzumenata	Minimum	Srednja vrijednost	Maksimum	95 percentil	Medijan	Standardna devijacija
		(µg/kg t.m./dan)					
Žene	1026	0,000072	0,2413	3,3616	0,6825	0,1630	0,3164

Muškarci	971	0,000086	0,3098	4,1700	0,8246	0,2305	0,3052
-----------------	-----	----------	--------	--------	--------	--------	--------



Slika 5. Varijabilnost u izloženosti DON-u i njegovim derivatima kod žena i muškaraca za scenarij sa srednjim vrijednostima koncentracija (UB)

4. Karakterizacija rizika

Potencijalno štetni učinak DON-a i njegovih derivata rezultat je dugotrajne izloženosti, pa se zbog toga računala kronična izloženost odrasle populacije RH prema dva scenarija, te su vrijednosti uspoređene s uspostavljenim grupnim TDI-u od 1 µg/kg t.m./dan.

Rezultati procjene izloženosti pokazuju da je prosječni unos DON-a i njegovih derivata u scenariju izloženosti sa srednjim vrijednostima koncentracija (UB) 0,27 µg/kg t.m./dan, a u scenariju s visokim vrijednostima koncentracija (UB) 0,36 µg/kg t.m./dan. U oba scenarija čak i 95. percentil izloženosti (UB) je ispod TDI vrijednosti (1 µg/kg t.m.). U scenariju izloženosti sa srednjim vrijednostima koncentracija (UB), 2,65 % populacije prelazi TDI vrijednosti, a 4 % u scenariju s visokim vrijednostima koncentracija (UB).

Najvažniji izvor DON-a i njegovih derivata u prehrani su kruh (45,75 %), zatim slijede pivo (14,31 %), kukuruzna krupica (12,48 %), pšenično brašno (7,67 %), dok kokice, kuhani kukuruz, heljda i ječam najmanje doprinose unosu DON-a i njegovih derivata (0,01 % i manje).

Srednje vrijednosti koncentracija u svim grupama hrane bile su niže od najviše dopuštenih količina propisanih *Uredbom Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani* za istu grupu hrane.

Uzimajući u obzir navedene rezultate i postojeće nesigurnosti u procjeni izloženosti može se zaključiti kako je potencijalni zdravstveni rizik za odraslu populaciju RH vrlo nizak, gotovo zanemariv.

LITERATURA

Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, De Saeger SD, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J (2013): Masked mycotoxins: a review, *Molecular and Nutrition Food Research*, 57, 165–186.

Bognar A (2002): Tables on weight yield of food and retention factors of food constituents for the calculation of nutrient composition of cooked foods (dishes). Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe.

Brodar L, Klapac T, Šarkanj B (2016): Maskirani mikotoksini, *10. Konferencija o sigurnosti i kvaliteti hrane u RH Opatija*, Hrvatska.
<http://www.bib.irb.hr/830909>, pristupljeno 22.11.2017.

Döll S, Dänicke S (2011): The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding, *Preventive Veterinary Medicine* 102:132-145.

EFSA, European Food Safety Authority, Panel on Contaminants in the Food Chain (2017): Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed, *EFSA Journal*.

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (2011): Safety evaluation of certain contaminants in food (deoxynivalenol). Prepared by the Seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee in Food Additives (JECFA), WHO Food Additives Series 63, FAO JECFA Monographs 8. World Health Organization, Geneva, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 799 pp.
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v63je01.pdf>, pristupljeno 22.11.2017.

Gareis M, Bauer J, Thiem J, Plank G, Grabley S, Gedek B (1990): Cleavage of zearalenone-glycoside, a 'masked' mycotoxin, during digestion in swine, *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 37, 236 – 240.

IARC, International Agency for Research on Cancer (1993) Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, Vol. 56. IARC, Lyon.

Kabak B (2009): The fate of mycotoxins during thermal food processing, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 549 –554.

Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R (2014): Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices, *Journal of Chromatography A* 1362:145-156.

Pestka JJ (2010): Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance, *Archive of Toxicology* 84:663-679.

Pestka JJ (2010a): Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure and toxicological relevance, *Archives of Toxicology*, 84, 663–679.

Pinton P, Oswald IP (2014): Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: a review, *Toxins*, 6, 1615–1643.

Pleadin J, Frece J, Vasilj V, Markov K (2015): Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 10 (1-2), 6-13.

Rocha MEB, Freire FCO, Maia FEF, Guedes MIF, Rondina D (2014): Mycotoxins and their effects on human and animal health, *Food Control* 36:159-165.

Rychlik M, Humpf H-U, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H, Lorenz N (2014): Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins, *Mycotoxins Research*, 30, 197–205.

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

Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani; sa svim izmjenama i dopunama
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20170728&qid=1517214227128&from=HR>, pristupljeno 25.01.2018.

Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službeni kontrolu razina mikotoksina u hrani; sa svim izmjenama i dopunama
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R0401&from=HR>, pristupljeno 25.01.2018.

Usleber E, Abramson D, Gessler R, Smith DM, Clear RM, Maertlbauer E (1996): Natural contamination of Manitoba barley by 3,15-diacetyldeoxynivalenol and its detection by immunochromatography, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3858–3860.

Usleber E, Martlbauer E, Dietrich R, Terplan G (1991): Direct enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of the 8-ketotrichothecene mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol in buffer solutions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 2091–2095.

Varga E, Malachova A, Schwartz H, Krska R, Berthiller F (2013): Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer sample, *Food Additives and Contaminants*, 30, 137–146.

Vesonder RF, Ciegler A, Jensen AH (1973): Isolation of the emetic principle from fusarium-infected corn. *Applied Microbiology*, 26, 1008–1010.

WHO, World Health Organization (2001): Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 906, Geneva.

Withlow LW, DE, Diaz BA, Hopkins, Hagler WM (2006): Mycotoxins and milk safety: the potential to block transfer to milk
<https://en.engormix.com/mycotoxins/articles/mycotoxins-milk-safety-t33450.htm>, pristupljeno 01.12.2017.

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