



## KONTAMINACIJA ORAŠASTIH PLODOVA AFLATOKSINIMA U HRVATSKOJ

## AFATOXIN CONTAMINATION IN EDIBLE NUTS IN CROATIA

M. Šapina<sup>1</sup>, D. Puntarić<sup>2</sup>, Dunja Vujčić<sup>3</sup>, Eda Puntarić<sup>4</sup>, Ida Puntarić<sup>5</sup>, Dijana Mayer<sup>6</sup>Izvorni znanstveni članak - Original scientific paper  
Primljeno - Received: 25. Lipanj - June 2014.

## SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost te količinu prisutnih ukupnih aflatoksina u različitim vrstama košunjičavog voća koje se konzumira na području Republike Hrvatske. Tijekom 2007. godine s hrvatskog je tržišta prikupljeno ukupno 106 uzoraka različitog košunjičavog voća (badema, lješnjaka, pistacija i oraha). U svim je uzorcima pomoću imunoenzimskog testa (ELISA testa) utvrđena prisutnost te količina prisutnih ukupnih aflatoksina. Istraživanje je pokazalo da su u 91,5% (97/106) analiziranih uzoraka košunjičavog voća utvrđene razine ukupnih aflatoksina bile unutar, dok su u 8,5% (9/106) analiziranih uzoraka košunjičavog voća utvrđene razine ukupnih aflatoksina bile iznad, maksimalno dopuštenih vrijednosti u Europskoj Uniji od 4,0  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Sukladno preporukama nutricionista, posljednjih je godina zamijećena povećana konzumacija košunjičavog voća u svakodnevnoj prehrani opće populacije u Republici Hrvatskoj zbog čega kontinuirano praćenje te nadzor nad prisutnosti aflatoksina u spomenutim namirnicama ima veliko javnozdravstveno značenje.

Cljučne riječi: aflatoksini, Hrvatska, kontaminacija hrane, sigurnost hrane, orašasti plodovi, javno zdravstvo

## UVOD

Aflatoksini su skupina strukturno povezanih toksičnih sporednih metabolita koje uglavnom stvaraju sojevi *Asperillus flavus* i *Asperillus parasiticus* (Yu i sur., 2005.). Iako su kroz povijest dugo predstavljali problem, u poljoprivredi su prepoznati kao značajni kontaminanti tek od 1960. godine (Strosnider i sur., 2006.). Tada su prvotno izolirani nakon izbijanja bolesti i smrti purana u Engleskoj (tzv. X bolest purana, engl. „Turkey-X disease“) i razvijanja raka u kalifornijskih pastva hranjenih obrocima sastavljenim od kikirikija i sjemenki pamuka (Rucker i sur., 2002.; Williams i sur., 2004.). Aflatoksini predstavljaju ozbiljnu prijetnju zdravlju ljudi i domaćih životinja, jer često kontaminiraju poljoprivredne proizvode, poput kukuruza, pšenice, riže, kikirikija te mnogih dru-

gih kultura (Baydar i sur., 2005.; Brown i sur., 1999.). Aflatoksini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub>) su 4 glavna, među 16 strukturno sličnih toksina (Leszczynska i sur., 2000.; Younis i Malik, 2003.; Yu i sur., 2005.). Aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) je najčešći, ali i najpotentniji oblik toksina (Williams i sur., 2004.) te je i najpotentniji prirodni hepatokancerogeni spoj (Leszczynska i sur., 2000.; Baydar i sur., 2005.; Yu i sur., 2005.; Liu i Wu, 2010.).

Unos aflatoksina zagađenom ljudskom ili stočnom hranom uzrokuje aflatoksikozu (Williams i sur., 2004.; Yu i sur., 2005.). Akutna aflatoksikoza nastaje kada se konzumira umjerena ili visoka doza aflatoksina (Yu i sur., 2005.). Simptomi uključuju akutno oštećenje jetre, akutnu nekrozu, ciroze ili

<sup>1</sup>Matej Šapina, dr.med., [sapina.matej@yahoo.com](mailto:sapina.matej@yahoo.com), ZZJZ Osječko baranjske županije, Franje Krežme 1, 31000 Osijek; <sup>2</sup>prof.dr.sc. Dinko Puntarić, dr.med. Medicinski fakultet Osijek, Josipa Hutlera 4, 31000 Osijek; <sup>3</sup>Dunja Vujčić, dr.med., KBC Osijek, Josipa Hutlera 4, 31000 Osijek; <sup>4</sup>Eda Puntarić, mag.ing.biol. – Biološki odsjek, PMF, Rooseveltov trg 6., 10000 Zagreb; <sup>5</sup>Ida Puntarić, dr.med. – Dom zdravlja zagrebačke županije, Ulica grada Vukovara 72/IV, 1000 Zagreb; <sup>6</sup>Dijana Mayer, dr.med. – HZJZ, Rockefellerova 7, 10000 Zagreb

u težim slučajevima akutno zatajenje jetre te smrt (Fung i Clark, 2004.; Williams i sur., 2004.; Lewis i sur., 2005.; Yu i sur., 2005.). U ljudi, oboljeli doživljavaju visoku temperaturu, brzu i progresivnu žuticu, edeme ekstremiteta, bol, povraćanje, promjene u probavi, apsorpciji i/ili metabolizmu hranjivih tvari i hepatomegaliju (Yu i sur., 2005.; Strosnider i sur., 2006.). Epidemije akutne aflatoksikoze uzrokovane kontaminiranom hranom u ljudi zabilježene su u Keniji, Indiji, Malaziji i Tajlandu (CAST, 2003.; Yu i sur., 2005.). U srpnju 2004. godine incident trovanja aflatoksinima u Keniji uzrokovao je 317 slučajeva trovanja i 125 smrtnih slučajeva zbog konzumiranja kontaminiranog kukuruza (u zrnu) što je najveća i najteža opisana epidemija akutne aflatoksikoze u svijetu (CDC, 2004.; Lewis i sur., 2005.).

Kronično izlaganje aflatoksinima putem prehrane predstavlja veliki rizik za razvoj hepatocelularnog karcinoma (Fung i Clark, 2004.; Williams i sur., 2004.; Yu i sur., 2005.; Strosnider i sur., 2006.; Gunterus i sur., 2007.; Sugiyama i sur., 2008.; Liu i Wu, 2010.), a veću incidenciju imaju ljudi s kroničnom infekcijom virusom hepatitisa B (HBV) (Fung i Clark, 2004.; Omer i sur., 2004.; Williams i sur., 2004.; Strosnider i sur., 2006.; Liu i Wu, 2010.; Wild i Gong, 2010.). Rizik za razvoj hepatocelularnog karcinoma u ljudi koji boluju od kronične HBV infekcije i izloženi su aflatoksinima je i do 30 puta veći nego u osoba izloženih samo aflatoksinima (Groopman i sur., 2008.; Liu i Wu, 2010.). Čini se da aflatoksini imaju sinergistički učinak i s hepatitis C virusom (HCV) u indukciji razvoja hepatocelularnog karcinoma (Kuang i sur., 2005.; Kirk i sur., 2006.; Wild i Montesano, 2009.), iako kvantitativna povezanost nije toliko dobro uspostavljena kao kod aflatoksina i HBV (Liu i Wu, 2010.). Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *The International Agency for Research on Cancer*, IARC) je prva prepoznala aflatoksine kao kancerogene 1976. godine (Strosnider i sur., 2006.). To je dodatno opravdalo smještanje prirodnih aflatoksina u skupinu I kancerogenih tvari (kancerogeni za čovjeka) te je pokazalo kancerogenost među mnogim životinjskim vrstama, uključujući glodavce, neljudske primata i ribe (IPCS i WHO, 1998.; IARC, 2002.; Williams i sur., 2004.; Strosnider i sur., 2006.; Liu i Wu, 2010.). Dodatni učinci kroničnog izlaganja aflatoksinima nisu široko istraživani, ali se smatra da uzrokuju imunosupresiju, usporen rast i prehranbene smetnje (Fung i Clark, 2004.; Williams i sur., 2004.; Yu i sur., 2005.; Strosnider i sur., 2006.).

Većina orašastih plodova sadrži masnoće i značajan su izvor proteina i vlakana (Sabaté, 2003.; Blomhoff i sur., 2006.). U posljednje vrijeme, mnogi takvi plodovi su identificirani kao naročito bogati antioksidantima (Blomhoff i sur., 2006.). Takvi plodovi, dakle, predstavljaju jednu od najvažnijih nutritivno koncentriranih raspoloživih vrsta hrane zbog čega se njihova konzumacija preporučuje na dnevnoj bazi (Blomhoff i sur., 2006.). Istraživanje u Hrvatskoj, provedeno 2004. godine, unutar Data Food Initiative (DAFNE) inicijative, pokazalo je da se u Hrvatskoj, zbog javnozdravstvenih napora i promicanja zdravijih prehranbenih navika, povećala dostupnost orašastih plodova u dnevnoj prehrani Hrvata (Antonić-Degač i sur., 2010.).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati prisutnost i ukupnu količinu aflatoksina (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub>) u različitim vrstama orašastih plodova (badema, lješnjaka, oraha i pistacija) namijenjenih za izravnu prehranu ljudi ili kao sastojak u prehranbenim proizvodima dostupnim na hrvatskom tržištu

## MATERIJALI I METODE

### *Materijali*

Istraživanje je uključilo 106 različitih vrsta orašastih plodova (orasi, bademi, lješnjaci i pistacije) namijenjenih za izravnu ljudsku potrošnju ili uporabu kao sastojak hrane prikupljeni na hrvatskom tržištu tijekom 2007. godine. Prikupljeno je 25 uzoraka badema, 19 lješnjaka, 33 oraha i 29 pistacija. Odmah nakon prikupljanja uzorci su dostavljeni u laboratorij gdje su analizirani na ukupni sadržaj aflatoksina u svakom pojedinačnom uzorku (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub>).

### *Metode*

Analitičke analize su provedene u Laboratoriju za sigurnost i kvalitetu hrane, Odjela za analize hrane i predmeta opće uporabe u Zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu. Laboratorij je akreditiran u skladu s HRN EN ISO/IEC (2005.) putem Hrvatske akreditacijske agencije, koja je članica Europske akreditacijske agencije. Svaki uzorak je ispitan zasebno, što znači da je provedeno 106 pojedinačnih analiza. Komercijalno dostupni

AgraQuant® Total Aflatoxin Assay test je korišten za određivanje aflatoksina u orašastim plodovima strogo prateći upute proizvođača (Romer Labs, 2004). AgraQuant® Total Aflatoxin Assay test je direktni ELISA test namijenjen za kvantitativno određivanje aflatoksina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub>) u žitaricama, orašastim plodovima, stočnoj hrani i drugoj robi. Najmanja granica detekcije je 3,0 µgkg<sup>-1</sup>.

#### Postupak ekstrakcije

Svaki uzorak usitnjen je do veličine čestica finog praha. Oko 20 g na taj način pripremljenog uzorka izvagano je i ekstrahirano sa 100 ml 70% metanola. Omjer uzorka s ekstrahirajućim otapalom je 1:5 (w/v). Takva smjesa uzorka i metanola se zatim homogenizira miješanjem u zatvorenoj posudi ili u mikseru velikom brzinom kroz 3 minute. Nakon toga, smjesa odstoji (oko 3 minute) te se filtrira kroz Whatman #1 filter papir. Prikupi se oko 5-10 ml filtrata kako bi se izvršilo ELISA testiranje.

#### Postupak ispitivanja

Odgovarajući broj traka za razrjeđivanje plavoga ruba stavljen je u jažice, a za svaki standard (npr. 0, 4, 10, 20 i 40 µgkg<sup>-1</sup>) ili uzorak potrebna je jedna jažica za razrjeđivanje. Kako je preporučeno, svi standardi i uzorci analizirani su u duplikatu. Nakon toga jednak broj traka prevučениh antitijelima stavljen je u jažice. Korišten je Bio-Tek precision 2000 automatski sustav mikro pločica s jažicama za davanje 100 ml konjugata u svaku jažicu s plavim rubom. Ručno, koristeći multipipete, 50 µl svakog standarda aflatoksina i 50 µl svakog uzorka se dodaje u jažice. Vrh multipipete je zamijenjen između svakog standarda ili uzorka. Bio-Tek precision 2000 automatski sistem mikro pločica s jažicama korišten je zatim za miješanje standarda i uzoraka u svakoj jažici 3 puta, a neposredno nakon toga 100 µl sadržaja iz svakog razrjeđenja prebačen je u odgovarajuću mikrojažicu obloženu antitijelima. Zatim se pločica inkubira na sobnoj temperaturi (18°C do 25°C) 15 minuta. Nakon inkubacije sadržaji jažica se bace i ispiru dispensorom destilirane vode. Ovaj postupak se ponavlja 5 puta. Na kraju svakog pranja, pločica se stavlja na apsorpcijski papir što je potrebno kako bi dno jažica ostalo potpuno suho. Poslije ispiranja,

100 µl supstrata se dodaje u svaku jažicu, a ploča se inkubira na sobnoj temperaturi (18°C do 25°C) 5 minuta, pa se nakon inkubacije u 100 µl zaustavne otopine dodaje u svaku jažicu. Kao posljednji korak optička gustoća od 450 nm je crvena koristeći spektrometar (spektrometar za ELISA-test Anthos winread 2010., Wals, Austria; Anthos Labtec Instrumental, 1999.). Koristeći pet standarda, radi se baždarna krivulja. Budući da je količina aflatoksina u svakom pojedinačnom standardu poznata, nepoznanice se mjere interpolacijom standardne krivulje, odnosno optičke gustoće uzoraka su uspoređene s optičkim gustoćama standarda te su određena interpretativna tumačenja.

#### Statistička analiza

Izvorni rezultati ELISA metode korišteni su za statističku analizu. Prikupljeni podaci su statistički obrađeni u računalnom programu R (www.r-project.org). Rezultati analize prikazani su u odgovarajućim tablicama. Deskriptivni podaci za nominalne varijable prikazani su apsolutnim frekvencijama i udjelom te aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, medijanom, prvom i trećom kvartilom za numeričke varijable. Statističke razlike nominalnih varijabli ispitane su pomoću  $\chi^2$  i Fisherovog egzaktnog testa. Razina statističke značajnosti prihvaćena je s  $p < 0,05$ .

## REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 1. sadrži prikaz ukupnog uzorka orašastih plodova po vrsti, gdje je vidljivo da nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti vrste ploda koja se analizirala ( $p=0,26$ ). Istraživanje je otkrilo da je među svim uzorcima orašastih plodova bilo 8,5% (9/106) plodova s ukupnom razinom aflatoksina (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub>) iznad najveće dopuštene količine propisane od strane Europske unije (EU) koje je Hrvatska također usvojila kao svoje standarde (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja Republike Hrvatske, 2008. godine).

Među orašastim plodovima (bademi, lješnjaci, orasi, pistacije) postoji statistički značajna razlika u broju uzoraka koji prelaze maksimalnu razinu od 4,0 µgkg<sup>-1</sup> ( $p < 0,01$ , Tablica 2.). Niti jedan od uzoraka oraha (0/33) nije premašio dozvoljenu razinu, ali je bilo 20% (5/25) uzoraka badema, 15,8% (3/19)

**Tablica 1. Ukupan uzorak orašastih plodova**

**Table 1 Total amount of nut samples**

	N (%)	p
Bademi - Almonds	25 (23,6%)	0,26†
Lješnjaci - Hazelnuts	19 (17,9%)	
Pistacio - Pistachios	29 (27,4%)	
Orasi - Walnuts	33 (31,1%)	
Ukupno - Total	106 (100%)	

N – broj uzoraka - number of samples, † - rezultati  $\chi^2$  testa – results of  $\chi^2$  test

**Tablica 2. Usporedba vrsta orašastih plodova prema razini aflatoksina**

**Table 2 Comparison of types of nuts by level of aflatoxin**

	>4 $\mu\text{gkg}^{-1}$	<4 $\mu\text{gkg}^{-1}$	Ukupno - Total	p
Bademi - Almonds	5 (55,6%)	20 (20,6%)	25 (23,6%)	< 0,01†
Lješnjaci - Hazelnuts	3 (33,3%)	16 (16,5%)	19 (17,9%)	
Pistacio - Pistachios	1 (11,1%)	28 (28,9%)	29 (27,4%)	
Orasi - Walnuts	0 (0,0%)	33 (34,0%)	33 (31,1%)	
Ukupno - Total	9 (8,5%)	97 (91,5%)	106 (100%)	

† - Rezultati Fisherovog egzaktnog testa – Results of Fisher exact test

uzoraka lješnjaka i 3,4% (1/29) uzoraka pistacija s ukupnom razinom aflatoksina iznad najveće dopuštene granice (Tablica 2.). Ovaj nalaz je u skladu s dokazima da bademi, pistacije i orasi pokazuju različitu otpornost na kontaminaciju aflatoksinom (Molyneux i sur., 2007.).

Vrijednosti aflatoksina u pojedinačnim uzorcima koji premašuju dozvoljenu razinu prikazani su u Tablici 3., dok su prosječne vrijednosti prikazane u Tablici 4. Srednja razina ukupnih aflatoksina u svim uzorcima koji premašuju maksimalnu razinu od 4,0  $\mu\text{gkg}^{-1}$  jest 4,68±0,63  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (Tablica 4.). Najveća je razina pronađena u jednom uzorku badema (6,0  $\mu\text{gkg}^{-1}$ ), a najmanja u jednom uzorku pistacija (4,1  $\mu\text{gkg}^{-1}$ ) (Tablica 3.).

Istraživanje je pokazalo prisutnost aflatoksina u orašastim plodovima namijenjenim za izravnu ljudsku konzumaciju ili uporabu kao sastojak hrane dostupne na hrvatskom tržištu. Zbog nalaza aflatoksina u razinama koje premašuju maksimalnu razinu od 4,0  $\mu\text{gkg}^{-1}$  8,5% uzoraka orašastih plodova proglašeno je nesigurno za prehranu ljudi te je uklonjeno s tržišta. U istraživanju provedenom u Turskoj, tijekom 2008. i 2009. godine, pokazalo se da je bilo 1,1% uzoraka pistacija koji su imali ukupni sadržaj aflatoksina preko dozvoljenih granica od 4,0  $\mu\text{gkg}^{-1}$ , što je oko tri puta manje od vrijednosti koja se nalazi u ovom istraživanju, 3,4% (Set i Erkmén, 2010.). Nasuprot tomu, u istraživanju provedenom u Iranu, 2002. i 2003. godine, bilo je 7,5% uzoraka pistacija

**Tablica 3. Učestalost orašastih plodova s razinom aflatoksina više od 4 µgkg<sup>-1</sup>**

**Table 3 The frequency of nuts with the level of aflatoxin more than 4 µgkg<sup>-1</sup>**

Uzorak ploda - Sample	> 4 µgkg <sup>-1</sup>
Badem - Almonds	6
Badem - Almonds	5,2
Badem - Almonds	5,1
Badem - Almonds	4,4
Badem - Almonds	4,2
Lješnjak - Hazelnuts	4,6
Lješnjak - Hazelnuts	4,3
Lješnjak - Hazelnuts	4,2
Pistacio - Pistachios	4,1

**Tablica 4. Prosječne razine aflatoksina u orašastih plodova s više od 4 µgkg<sup>-1</sup>**

**Table 4 Average levels of aflatoxin in nuts with more than 4 µgkg<sup>-1</sup>**

	N	Mean	S.D.	25%	Mdn	75%
Lješnjak-Hazelnuts	3	4,37	0,21	4,2	4,3	4,6
Badem-Almonds	5	4,98	0,72	4,4	5,1	5,2
Pistacio-Pistachios	1	4,1	-	4,1	4,1	4,1
Ukupno-Total	9	4,68	0,63	4,2	4,4	5,1

Mean – prosječna vrijednost, S.D. – standardna devijacija – *standard deviation*, 25% - prva kvartila – *the first quartile*, Mdn – medijan - *median*, 75% - treća kvartila – *third quartile*

sa ukupnim sadržajem aflatoksina iznad dozvoljene granice, što je više nego dva puta u usporedbi s ovim istraživanjem (Cheragali i sur., 2007.). U istraživanju provedenom u Poljskoj tijekom 1999. godine, većina ispitanih uzoraka je imala ukupan sadržaj aflatoksina ispod maksimalne razine od  $4,0 \mu\text{gkg}^{-1}$ , a samo je jedan uzorak oraha bio s većim sadržajem (Leszczynska i sur., 2000.). Ovaj posljednji nalaz je u suprotnosti s ovim istraživanjem, jer nije pronađeni niti jedan orah s ukupnom razinom aflatoksina iznad maksimalne razine od  $4,0 \mu\text{gkg}^{-1}$  (Tablica 2.).

U Hrvatskoj, kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrti i čine više od polovice ukupne smrtnosti (Kern i sur., 2005.). Hrvatsko zdravstveno istraživanje odraslih, provedeno tijekom ljeta 2003. godine istaknulo je činjenicu da su pretilost i neadekvatna prehrana glavni čimbenici koji pridonose tako visokoj učestalosti kardiovaskularnih bolesti u zemlji (Kern i sur., 2005.). Zbog tog nalaza, javnozdravstveni djelatnici u suradnji s drugim važnim sudionicima i predstavnicima civilnog društva nastoje promovirati zdraviji život i zdravije prehrambene navike kako bi se poboljšalo i očuvalo zdravlje stanovništva.

Epidemiološka istraživanja su izuzetno dosljedna u prikazivanju povezanosti između konzumacije orašastih plodova i smanjenog rizika od koronarne bolesti srca (Sabaté i Ang, 2009.; Sabaté i Wien, 2010.). Dugoročna konzumacija orašastih plodova je povezana s manjom tjelesnom težinom i manjim rizikom pretilosti i dobivanja tjelesne težine (Sabaté i Ang, 2009.). Istraživanja su također pokazala da unos različitih vrsta orašastih plodova smanjuje ukupni LDL kolesterol te LDL/HDL omjer u zdravih ispitanika ili bolesnika s umjerenom hiperkolesterolemijom (Sabaté i sur., 2010.; Sabaté i Wien, 2010.). Osim toga, nedavno provedena istraživanja ukazala su na prednosti uključivanja orašastih plodova u prehrane osoba sa šećernom bolešću i metaboličkim sindromom (Sabaté i Ang, 2009.; Kendall i sur., 2010.), a osim toga, orašasti plodovi su identificirani kao bogati izvori antioksidansa (Blomhoff i sur., 2006.; Gupta i Nagar, 2010.). To je potaknulo preporuke za povećanjem njihove konzumacije (Mattes i Dreher, 2010.), a nedavno istraživanje pokazuje da se dostupnost takvih plodova u dnevnoj prehrani povećala i u Hrvata (Antonić-Degač i sur., 2010.).

S obzirom na navedeno, vrlo je važno osigurati i kontrolirati sigurnost hrane kako bi se zaštitilo zdravlje i dobrobit potrošača. U cilju održavanja učinkovite kontrole aflatoksina u ljudskoj i stočnoj prehrani, moraju se primijeniti određene analitičke procedure (Leszczynska i sur., 2000.). Različite analitičke metode, tankoslojna kromatografija (*eng. thin layer chromatography*, TLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl. high-performance liquid chromatography*, HPLC), plinska kromatografija (*engl. gas chromatography*, GC), spektrofotometrija (*eng. spectrophotometry*) i spektrofotometrija (*eng. spectrophotometry*) su predložene za određivanje aflatoksina u hrani (Leszczynska i sur., 2000.). One zahtijevaju ekstrakciju toksina otapalom ili kombinacijom otapala te pročišćavanje ekstrakta. Međutim, aflatoksini koji se prirodno pojavljuju mogu biti vezani za proteine i nukleinske kiseline, zbog čega njihova ekstrakcija iz kontaminiranih proizvoda može biti otežana (Leszczynska i sur., 2000.). Osim toga, takve metode zahtijevaju posebne i skupe aparate i instrumente, a primijenjeni na hranu ili stočnu hranu, daju rezultate unutar nekoliko sati ili dana (Leszczynska i sur., 2001.; Zheng i sur., 2006.). Konkurencija unutar industrije ljudske i stočne prehrane prisiljava ih na smanjenje troškova, zapošljavanje jeftinije radne snage i brzo isporučivanje robe, a povećana analitička kompleksnost u prehrambenoj industriji zahtijeva brzo izvješće za svaki posebni zagađivač. Dakle, brze metode za analizu mikotoksina postale su vrlo važne (Zheng i sur., 2006.).

U posljednjih nekoliko godina, mnogi su imuno-enzimatski testovi razvijeni za analizu aflatoksina. Izravni ELISA test se obično koristi u analizi aflatoksina (Zheng i sur., 2006.). U usporedbi s konvencionalnim metodama, kao što su TLC i HPLC, ELISA ima prednost kao visoko rezultatni test s potrebama za manjom količinom uzorka i s manjim potrebama za višestrukim pročišćavanjem ekstraktnog uzorka za završetak procedure. Ove brze metode su jeftinije, jednostavnije za uporabu i mogu se preseliti na mjesto uzimanja uzorka (Zheng i sur., 2006.). U usporedbi s konvencionalnim postupcima jednako su specifične i osjetljive, ali su puno brže (Leszczynska i sur., 2000.). Mogu pomoći u određivanju učinkovitosti mjera sigurnosti hrane, odrediti pravnu usklađenost, postići logističke i operative ciljeve kako bi se roba i proizvodi brže kretali kroz marketinške kanale radi uštede vremena i troškova (Scanlan, 2005.).

## ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir ograničeni i nejednak broj analiziranih uzoraka, što je, naravno, slabost ovog istraživanja, ipak, se s izvjesnom dozom sigurnosti može zaključiti da se na hrvatskom tržištu još uvijek pojavljuju uzorci orašastih plodova s ukupnom razinom aflatoksina iznad maksimalne razine od 4,0 µg/kg-1. Upravo zbog trenda povećanja konzumacije orašastih plodova u ljudskoj prehrani, ovi rezultati ukazuju na nužnost strože inspekcije hrane zbog kontaminacije aflatoksinima. Daljnja su istraživanja i analize potrebni u obliku stalnog monitoringa orašastih plodova na hrvatskom tržištu hrane, radi kontroliranja i praćenja prisutnosti aflatoksina. Tek stalnim nadzorom na velikom broju uzoraka moći ćemo s velikom vjerojatnošću govoriti postoji li opasnost kod konzumiranja ovih zdravih plodova.

## LITERATURA

1. Anthos Labtec Instrumental. (1999). User's manual. Spectrometer for ELISA-test Anthos winread 2010. Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria.
2. Antonić-Degač K., Kamenski M., Katić D., Butigan M., Laido Z., Kaić-Rak A., Pucarín-Cvetković J., Trichopoulou A., Naska A., Bountziouka V. (2010). Using of household budget survey data for public health monitoring of dietary habits in Croatia-DAFNE initiative. *Acta Medica Croatica*, 64 (1) 17–24.
3. Baydar T., Engin A. B., Girgin G., Aydin S., Şahin G. (2005). Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12 (2) 193–197.
4. Blomhoff R., Carlsen M. H., Andersen L. F., Jacobs D. R. Jr. (2006). Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition*, 96 (Suppl 2) S52–S60.
5. Brown R. L., Chen Z. Y., Cleveland T. E., Russin J. S. (1999). Advances in the development of Host Resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 89 (2) 113–117.
6. CAST (Council for Agricultural Science and Technology). (2003). Mycotoxins: Risk in plant, animal, and human systems. Task Force Report No.139, CAST, Ames, Iowa, USA.
7. CDC (Center for Disease Control and Prevention). (2004). Outbreak of aflatoxin poisoning – eastern and central province, Kenya, January-July, 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 53 (34) 790–792.
8. Cheraghali A. M., Yazdanpanah H., Doraki N., Abouhossain G., Hassibi M., Ali-Abadi S., Aliakbarpoor M., Amirahmadi M., Askarian A., Fallah N., Hashemi T., Jalali M., Kalantari N., Khodadadi E., Maddah B., Mohit R., Mohseny M., Phaghiy Z., Rahmani A., Setoodeh L., Soleimany E., Zamanian F. (2007). Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 45 (5) 812–816.
9. Fung F., Clark R. F. (2004). Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology*, 42 (2) 217–234. Groopman J. D., Kensler T. W., Wild C. P. (2008). Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. *Annual Review of Public Health*, 29 187–203.
10. Gunterus A., Roze L. V., Beaudry R., Linz J. E. (2007). Ethylene inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* grown on peanuts. *Food Microbiology*, 24 (6) 658–663.
11. Gupta V., Nagar R. (2010). Effect of cooking, fermentation, dehulling and utensils on antioxidants present in pearl millet rabadi – a traditional fermented food. *Journal of Food Science and Technology*, 47 (1) 73–76.
12. IARC (International Agency for Research on Cancer). (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 82 171–300.
13. IPCS (International Programme on Chemical Safety) & WHO (World Health Organization). (1998). International Programme on Chemical Safety. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organization Food Additives Series 40. World Health Organization, Geneva. Dostupno na: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je01.htm>, Pristupljeno: 10.10.2010.
14. Kendall C. W., Josse A. R., Esfahani A., Jenkins D. J. (2010). Nuts, metabolic syndrome and diabetes. *British Journal of Nutrition*, 104 (4) 465–473.
15. Kern J., Strnad M., Coric T., Vuletic S. (2005). Cardiovascular risk factors in Croatia: struggling to provide the evidence for developing policy recommendations. *British Medical Journal*, 331 208–210.
16. Kirk G. D., Bah E., Montesano R. (2006). Molecular epidemiology of human liver cancer: insights into etiology, pathogenesis and prevention from The Gambia, West Africa. *Carcinogenesis*, 27 (10) 2070–2082.
17. Klak Mršić I. (2009). Određivanje prisutnosti aflatoksina u koštunjičavom voću. Master's thesis. Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia.

18. Kuang S. Y., Lekawanvijit S., Maneekarn N., Thongsawat S., Brodovicz K., Nelson K., Groopman J. D. (2005). Hepatitis B 1762T/1764A mutations, hepatitis C infection, and codon 249 p53 mutations in hepatocellular carcinomas from Thailand. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14 (2) 380–384.
19. Leszczynska J., Kucharska U., Żegota H. (2000). Aflatoxins in nuts assayed by immunological methods. *European Food Research and Technology*, 210 (3) 213–215.
20. Leszczynska J., Maslowska J., Owczarek A., Kucharska U. (2001). Determination of aflatoxins in food products by the ELISA method. *Czech Journal of Food Sciences*, 19 (1) 8–12.
21. Lewis L., Onsongo M., Njapau H., Schurz-Rogers H., Lubber G., Kieszak S., Nyamongo J., Backer L., Dahiye M. D., Misore A., Decock K., Rubin C., Kenya Aflatoxicosis Investigation Group. (2005). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113 (12) 1763–1767.
22. Liu Y., Wu F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 118 (6) 818–824.
23. Mattes R. D., Dreher M. L. (2010). Nuts and healthy body weight maintenance mechanisms. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 19 (1) 137–141.
24. Ministry of Agriculture, Fishery and Rural Development of the Republic of Croatia. (2008). Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. U: Narodne novine No. 154, str. 106–115. Narodne novine, Zagreb, Croatia.
25. Molyneux R. J., Mahoney N., Kim J. H., Campbell B. C. (2007). Mycotoxins in edible tree nuts. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2) 72–78.
26. Omer R. E., Kuijsten A., Kadaru A. M., Kok F. J., Idris M. O., El Khidir I. M., Van 't Veer P. (2004). Population-attributable risk of dietary aflatoxins and hepatitis B virus infection with respect to hepatocellular carcinoma. *Nutrition and Cancer*, 48 (1) 15–21.
27. Romer Labs. (2004). The AgraQuant® Total Aflatoxin Assay. Romer Labs, Singapore.
28. Rucker R. R., Yasutake W. T., Wolf H. (2002). Trout hepatoma – a preliminary report. *Progressive Fish Culturist*, 23 3–7.
29. Sabaté J. (2003). Nut consumption and body weight. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78 (3 Suppl) 647S–650S.
30. Sabaté J., Ang Y. (2009). Nuts and health outcomes: new epidemiologic evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89 (5) 1643S–1648S.
31. Sabaté J., Wien M. (2010). Nuts, blood lipids and cardiovascular disease. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 19 (1) 131–136.
32. Sabaté J., Oda K., Ros E. (2010). Nut consumption and blood lipid levels: a pooled analysis of 25 intervention trials. *Archives of Internal Medicine*, 170 (9) 821–827.
33. Scanlan F. P. (2005). Why rapid testing? U: Van Amerongen, A., Barug, D., Lauwaars, M. (ed): Rapid methods for biological, chemical contaminants in food and feed, str. 19–29. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands.
34. Set E., Erkmen O. (2010). The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (8–9) 2532–2537.
35. Strosnider H., Azziz-Baumgartner E., Banziger M., Bhat R. V., Breiman R., Brune M. N., Decock K., Dilley A., Groopman J., Hell K., Henry S. H., Jeffers D., Jolly C., Jolly P., Kibata G. N., Lewis L., Liu X., Lubber G., Mccoy L., Mensah P., Miraglia M., Misore A., Njapau H., Ong C. N., Onsongo M. T. K., Page S. W., Park D., Patel M., Phillips T., Pineiro M., Pronczuk J., Rogers H. S., Rubin C., Sabino M., Schaafsma A., Shephard G., Stroka J., Wild C., Williams J. T., Wilson D. (2006). Workgroup report: public health strategies for reducing Aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental Health Perspectives*, 114 (12) 1898–1903.
36. Sugiyama K. I., Hiraoka H., Sugita-Konishi Y. (2008). Aflatoxin M1 contamination in raw bulk milk and the presence of Aflatoxin B1 in corn supplied to dairy cattle in Japan. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 49 (5) 352–355.
37. Wild C. P., Gong Y. Y. (2010). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31 (1) 71–82.
38. Wild C. P., Montesano R. (2009). A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Letters*, 286 (1) 22–28.
39. Williams J. H., Phillips T. D., Jolly P. E., Stiles J. K., Jolly C. M., Aggarwal D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (5) 1106–1122.



40. Younis Y. M. H., Malik K. M. (2003). TLC and HPLC assays of aflatoxin contamination in Sudanese peanuts and peanut products. *Kuwait Journal of Science*, 30 (1) 79–94.
41. Yu J., Cleveland T. E., Nierman W. C., Bennett J. W. (2005). *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22 (4) 194–202.
42. Zheng M. Z., Richard J. L., Binder J. (2006). A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161 (5) 261–273.

### SUMMARY

The aim of the study was to analyze the presence and the quantity of aflatoxin levels in various types of commonly consumed nuts in Croatia. The total amount of 106 nut samples (almonds, hazelnuts, pistachios and walnuts) were collected on the Croatian market during the year 2007, after which the total aflatoxin content was determined using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) test. The results showed that 91.5% (97/106) of the analyzed samples contained the total aflatoxin levels within the permitted range, while in 8.5% (9/106) of nut samples the aflatoxin levels were above the maximum permitted level of 4.0  $\mu\text{gkg}^{-1}$ , set by the European Union. Following nutritionists' recommendation, the nut consumption in daily nutrition in the Croatian general population has recently increased, thus continuous monitoring and control of aflatoxin levels in nuts is of great public health importance.

Key words: aflatoxins, Croatia, food contamination, food safety, nuts, public health