

Provjera valjanosti HPLC metode za određivanje patulina u prehranbenim proizvodima na području Slavonije

Iljkić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:933151>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Matea Ilkić

**Provjera valjanosti HPLC metode za određivanje
patulina u prehrambenim proizvodima na području
Slavonije**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Matea Ilkić

**Provjera valjanosti HPLC metode za određivanje
patulina u prehrambenim proizvodima na području
Slavonije**

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Mirela Samardžić

Komentor: doc. dr. sc. Suzana Čavar, mag. pharm., spec. analitičke toksikologije

Neposredni voditelj: Andrijana Modić Šabić, mag. ing. proc., univ. spec. oecol.

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

**PROVJERA VALJANOSTI HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE PATULINA U
PREHRAMBENIM PROIZVODIMA NA PODRUČJU SLAVONIJE**

Matea Ilkić

Rad je izrađen na: Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije

Mentor: doc. dr. sc. Mirela Samardžić

Sažetak:

Kvalitetno analitičko mjerenje osigurava pouzdane analitičke rezultate. Kako bismo dobili pouzdan i točan analitički rezultat, potrebno je validirati metodu. Provjera valjanosti analitičke metode ili validacija dokumentirani je postupak kojim se dokazuje namjena i svrha analitičke metode. Cilj je diplomskog rada provesti djelomičnu validaciju metode za određivanje patulina u soku od jabuke i u kašicama od jabuke na način da se analiziraju samo neki parametri (linearnost, preciznost, točnost, granica detekcije i kvantifikacije). Patulin je prirodni mikotoksin, sekundarni proizvod u metabolizmu plijesni. Plijesni su glavni uzročnici kvarenja voća i kao takvi predstavljaju rizik za zdravlje ljudi. U radu su se odredile i koncentracije patulina u ekološkim i ne ekološkim uzorcima soka od jabuke i u kašicama.

Diplomski rad obuhvaća: 52 stranica, 14 slika, 7 tablica, 55 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: mikotoksini, parametri validacije, patulin, validacija

Rad prihvaćen:

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Suzana Čavar, mag. pharm., spec. analitičke toksikologije
2. doc. dr. sc. Mirela Samardžić
3. doc. dr. sc. Olivera Galović

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry; Research Study
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

**VALIDATION OF THE HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF
PATULIN IN FOOD PRODUCTS IN THE SLAVONIA AREA**

Matea Iljkić

Thesis completed at: Institute of Public Health for the Osijek Baranja County

Supervisor: Mirela Samardžić, Ph.D., assistant prof.

Abstract:

Quality analytical measurement gives reliable analytical results. It is necessary to validate method, if we want to get reliable and accurate analytical result. Validation or checking of validity of analytical method is documented procedure which proves the purpose of analytical method. The aim of this thesis is to do partial validation (analysis of linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification) of method for determination of patuline in apple juice and in apple porridge. Patuline is natural mycotoxine and secondary byproduct in mold metabolism. Molds are main factor for fruit spoilage and they represent big risk for human health. Concentrations of patuline in eco- and non-eco apple juice and apple porridge samples are determined in this thesis.

Thesis includes: 52 pages, 14 figures, 7 tables, 55 references

Original in: croatian

Keywords: mycotoxin, validation parameters, patulin, validation

Thesis accepted:

Reviewers:

1. Suzana Ćavar, assistant prof., mag. pharm., spec. analytical toxicology
2. Mirela Samardžić, Ph. D., assistant prof
3. Olivera Galović, Ph. D., assistant prof

Thesis deposited in: Library Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, Osijek, Croatia

Ta Bogu ništa nije nemoguće! (Lk 1,37)

Zahvala:

Veliku zahvalnost dugujem mojim mentoricama doc. dr. sc. Mireli Samardžić i doc. dr. sc. Suzani Čavar te neposrednoj voditeljici Andrijani Modić Šabić, mag. ing. proc. na ukazanoj ljubaznosti, susretljivosti te pruženoj pomoći.

Dragi Tata, Mama i Brate hvala Vam na svemu što ste mi omogućili. Što ste vjerovali u mene i onda kada ja nisam.

Hvala mome Ivanu na razumijevanju, strpljenju i podršci.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Cilj i svrha rada.....	2
2. LITERATURNI DIO	3
2.1. Kvaliteta analitičkih rezultata i analitičkog laboratorija.....	3
2.2. Validacija analitičkih metoda – definicija i osnovni pojmovi	6
2.3. Validacijski parametri koji su ispitivani u radu.....	8
2.3.1. Linearnost (eng. <i>linearity</i>)	8
2.3.2. Preciznost (eng. <i>precision</i>)	9
2.3.3. Točnost (eng. <i>accuracy</i>)	11
2.3.4. Granica detekcije (eng. <i>limit of detection</i> , LOD) i kvantifikacije (eng. <i>limit of quantification</i> , LOQ).....	12
2.4. Mikotoksini	13
2.5. Patulin	16
2.5.1. Toksičnost patulina.....	17
2.5.2. Biosinteza patulina	19
2.5.2.1. Utjecaj temperature	19
2.5.2.2. Utjecaj aktiviteta vode.....	20
2.5.2.3. Utjecaj pH.....	21
2.5.3. Metode određivanja patulina	21
2.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	28
3.1. Oprema i pribor.....	28
3.2. Kemikalije	28
3.3. Metoda i uvjeti metode	29
3.4. Uzorci i priprema uzoraka.....	29
3.5. Priprema kalibracijskih otopina.....	30
3.6. Izražavanje rezultata.....	31
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. Validacija analitičke metode za određivanje patulina	32

4.1.1.	Linearnost	32
4.1.2.	Preciznost	34
4.1.3.	Točnost	36
4.1.4.	Granica detekcije	38
4.1.5.	Granica kvantifikacije	38
4.2.	Koncentracija patulina u prehrambenim uzorcima	39
5.	ZAKLJUČAK	41
6.	PRILOZI	42
7.	LITERATURA.....	48

1. UVOD

„Neka tvoja hrana bude tvoj lijek i neka tvoj lijek bude tvoja hrana.“ Hipokrat

Tema ovog diplomskog rada je provjera valjanosti analitičke metode za određivanje mikotoksina patulina u prehrambenim proizvodima metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Hrana je izvor energije. Bogata je vitaminima i mineralima, ali i nenutritivnim tvarima. Sigurnost hrane je usko povezana s brigom o zdravlju. Pojavom suvremenih tehnologija obje su teme postale vrlo važne i zastupljene. Industrijalizacija koja se pojavljuje u proizvodnji i pripremi hrane, dovela je do učestalije pojave kontaminanata u prehrambenim proizvodima. Sekundarni metaboliti plijesni, mikotoksini, smatraju se onečišćivačima hrane, koji ovisno o vremenu izloženosti i koncentraciji, predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje. *Penicillium expansum* voćna je gljivica koja proizvodi mikotoksin patulin. Najčešće ga možemo pronaći na voću i proizvodima od voća. Patulin može izazvati štetne učinke na zdravlje.

Brinući o kvaliteti hrane koju konzumiramo, brinemo o svom zdravlju. Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation* - WHO) naglašava kako je važna zajednička odgovornost znanosti, vlade, prehrambene industrije i potrošača za dobivanje sigurne hrane. Važno je ispitati zdravstvenu ispravnost hrane kako bi stanovništvo konzumiralo sigurnu hranu.

Kvaliteta analitičkih mjerenja osigurava pouzdane analitičke rezultate. Pouzdan rezultat od velike je važnosti posebno za pacijente kojima se dijagnoza temelji na laboratorijskim analizama. Kako bi istraživanje u laboratoriju bilo potpuno te kako bismo dobili kvalitetan analitički rezultat, potrebno je pridržavati se pravila.

Cilj je svakog laboratorija objavljivanje vjerodostojnih rezultata. Kako bismo dobili pouzdane i točne rezultate, potrebno je validirati metodu. Validacija ili provjera valjanosti analitičke metode postupak je dokazivanja svrhe analitičke metode. Kada je metoda validirana, analitičar je siguran u točnost izdanih rezultata.

1.1. Cilj i svrha rada

Na Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije u upotrebi je modificirana normirana metoda HRN EN 15890:2017 za određivanje mikotoksina patulina u soku i pireu od jabuka HPLC metodom s UV detekcijom (eng. *High Performance Liquid Chromatography*).

Cilj i svrha ovog rada su: validacija analitičke metode koja uključuje ispitivanje parametara linearnosti, preciznosti, istinitosti te granice kvantifikacije i granice detekcije, provedenim istraživanjem provjeriti jesu li zadovoljeni svi parametri validacije te odrediti koncentraciju patulina u uzorcima deset sokova od jabuke i dva uzorka pirea od jabuke. Na pet sokova od jabuke označena je eko proizvodnja te će se usporediti rezultati eko i ne-eko proizvodnje.

2. LITERATURNI DIO

2.1. Kvaliteta analitičkih rezultata i analitičkog laboratorija

Osnovni element za dobivanje vjerodostojnih i pouzdanih rezultata osiguranje je kvalitete analitičkog laboratorija [1]. U laboratoriju se primjenjuje niz postupaka kojima se nastoje osigurati visoko kvalitetni rezultati ili proizvod. Svako analitičko mjerenje daje rezultat koji je dovoljno točan kako bi omogućio analitičaru donošenje odgovarajuće odluke [2]. Kvaliteta je relativan pojam za koji se nikada ne može reći da je niska ili visoka, nego se radije kaže da je prikladna ili neprikladna u ovisnosti o tome na koji proizvod, proces ili uslugu se odnosi te ispunjava li određene uvjete koji su bitni za cilj ili kupca [3]. Osiguranje kvalitete uvodi se u rad laboratorija kroz radne postupke koji obuhvaćaju sve korake rada laboratorija od uzorkovanja do analitičkog izvještaja. Važno je da se svaki rezultat, podatak ili postupak može provjeriti, odnosno da su postupci sustava kvalitete temeljeni na sljedivosti. Unaprjeđenje rada laboratorija postiže se kroz rješavanje problema, pronalaženje pogreški te unutarnju i vanjsku kontrolu [1].

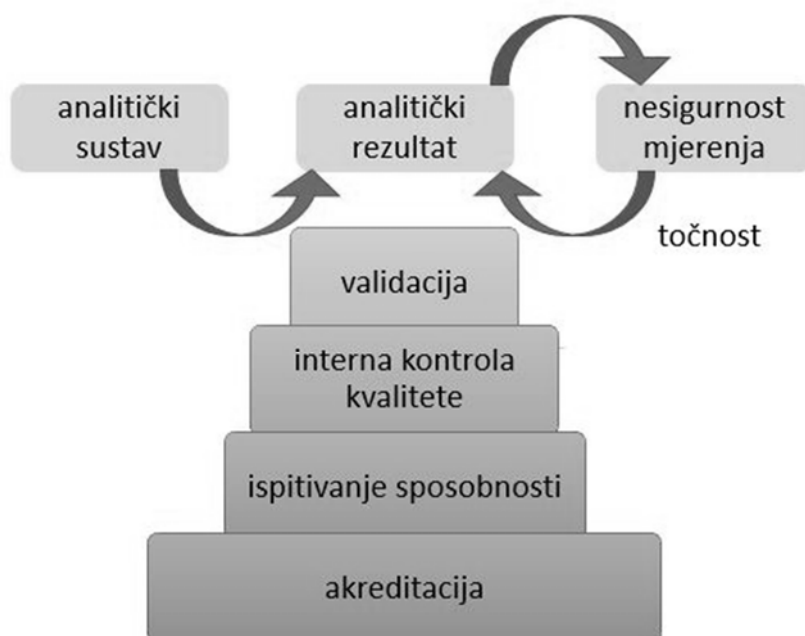
Pod osiguranje kvalitete ubrajamo upravljanje kvalitetom, kontrolu kvalitete i sustav kvalitete [1].

Glavna je zadaća upravljanja kvalitetom svesti pogreške na minimum ili ih u potpunosti spriječiti predviđanjem tehnika koje ispunjavaju zahtjeve kvalitete. Važna je educiranost i odgovornost osoblja laboratorija te adekvatna opremljenost laboratorija (oprema mora biti kalibrirana i ispravno održavana). Zahtjeva se da laboratorij vodi dokumentaciju o svim postupcima koji se provode tijekom analize jednako kao i o održavanju te umjeravanju instrumenata. Svi su djelatnici laboratorija jednako odgovorni za osiguranje kvalitete laboratorija. Dobra laboratorijska praksa pokazatelj je čistoće pojedinog laboratorija. Potrebno je voditi računa o rukovanju, skladištenju i odlaganju kemikalija. Važno je obuhvatiti sve segmente kako bismo bili što sigurniji u točnost i kvalitetu rezultata tijekom analize u laboratoriju [1].

Kontrola kvalitete otkriva prihvatljivost rezultata koji su ispitivani, kako bi se utvrdila efikasnost upravljanja kvalitetom. Razlikujemo unutarnju i vanjsku kontrolu kvalitete (eng. *Proficiency Testing*) [1].

Pod sustav kvalitete ubrajamo organizacijsku strukturu, procese i postupke. Svaki laboratorij ima svoj sustav kvalitete jer ne postoji model pomoću kojeg bi se definirao sustav kvalitete [1].

Validacija analitičke metode tvori prvu razinu osiguranja kvalitete u laboratoriju. Upotreba validiranih metoda važna je za analitički laboratorij kako bi se pokazala kvalifikacija i kompetencija [3]. Validacija je postupak utvrđivanja značajki određenog mjernog postupka te provjera zadovoljavaju li značajke prethodno postavljene kriterije [4]. Validacija je alat koji se koristi kako bi se pokazalo da specifična analitička metoda zapravo mjeri ono što namjerava mjeriti te je stoga pogodna za određenu namjenu ili svrhu [3]. Validacija metode istražuje analitičku svrhu metode koja je primijenjena i koja sadrži analitičke rezultate s prihvatljivom razinom netočnosti [5].



Slika 1. Različiti nivoi osiguranja kvalitete u analitičkom laboratoriju [3].

Validacija je potrebna kako bi se pokazalo da je analitička metoda usklađena s osnovnim kriterijem za različite karakteristike provođenja [6]. Različiti nivoi osiguranja kvalitete na slici 1. predstavljaju različite postupke kojima se laboratorij mora podvrgnuti kako bi osigurao svoju kvalificiranost i kompetentnost za provođenje analitičkih mjerenja koja osiguravaju sporazumne zahtjeve. Akreditacija je zadnji korak osiguranja kvalitete u analitičkom laboratoriju.

Kvaliteta znanstvene informacije općenito se prije objavljivanja procjenjuje međunarodno prihvaćenim standardima objektivnosti, integriteta, ponovljivosti i sljedivosti.

Esencijalni kriteriji za kvalitetu nastale kemijske informacije su korisnost i pouzdanost. Oni su usko povezani s marginama nesigurnosti u rezultatima koji su dobiveni mjerenjem te zahtijevaju poznavanje identiteta i koncentracije ciljanih komponenti [2]. Za različite razine osiguranja kvalitete, koje su prikazane na slici 1., smjernice i vođenje detaljno su opisani pomoću nekoliko regulatornih tijela, agencija za standardizaciju i radnih grupa ili odbora. Relevantne smjernice, agencije za standardizaciju te radne skupine prikazane su u tablici 1. [2].

Tablica 1. Pregled europskih i međunarodnih regulatornih tijela i njihove smjernice i standardi pri različitim aspektima osiguranja kvalitete.

Tijelo	Puni naziv	Smjernice
Eurachem	Europska udruga kemijskih laboratorija	Validacija metode
CITAC	Suradnja na međunarodnoj sljedivosti u analitičkoj kemiji	Ispitivanje sposobnosti
		Osiguravanje kvalitete
EA	Europska organizacija za akreditaciju	Akreditacija
CEN	Europski odbor za normizaciju	Standardizacija
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju	Validacija metode
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju	Standardizacija
AOAC	Međunarodno udruženje službenih analitičkih kemičara	Unutarnja kontrola kvalitete
		Ispitivanje sposobnosti
		Akreditacija
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove	Validacija metode
USP	Američka farmakopeja	
ICH	Međunarodna konferencija o harmonizaciji	
FAO/WHO	Organizacija za hranu i poljoprivredu/ Svjetska zdravstvena organizacija	Validacija metode
Codex/CCMAS	Codex odbor za metode analize i uzorkovanja	
ILAC	Međunarodna organizacija za akreditaciju laboratorija	Ispitivanje sposobnosti
		Akreditacija

Na međunarodnoj razini razlikujemo IUPAC (eng. *International Union for Pure and Applied Chemistry*), ISO (eng. *International Standardization Organisation*) i AOAC (eng. *Association of Official Analytical Chemists*). Sva tri tijela otkrivaju validacijske i standardizacijske okosnice za analitičku kemiju [2].

2.2. Validacija analitičkih metoda – definicija i osnovni pojmovi

Metoda validacije može se smatrati jednom od najpoznatijih područja analitičke kemije. To je vidljivo zadnjih dvadesetak godina u velikom broju članaka koji se svake godine objavljuju u znanstvenim časopisima. Analitičari tvrde da je to sastavni dio struke te da su temeljna načela validacije primjenjivali i prije pojave regulative. Danas prema regulatornim zahtjevima, kako bi osigurali točnost, ponovljivost i pouzdanost analitičkih rezultata, analitičke metode trebaju biti validirane. Validacija je dokumentirani postupak kojim dokazujemo da metoda služi svrsi koju smo joj namijenili [7]. Ne postoji opće primjenjiv propis kako validirati metodu te se svakoj pristupa individualno. Postoje smjernice pomoću kojih procjenjujemo što treba napraviti za dokaz svrhovitosti [8].

Zakonodavstvo, struka i regulativa prihvatili su nekoliko izvedbenih značajki validacije. Plan validacije za svaku metodu oblikuje se kombinacijom sljedećih parametara:

- specifičnost;
- linearnost;
- područje;
- preciznost;
 - ✓ ponovljivost (eng. *repeatability*)
 - ✓ međupreciznost (eng. *intermediate precision*)
 - ✓ obnovljivost (eng. *reproducibility*)
- istinitost (eng. *trueness*);
- granica kvantifikacije;
- granica detekcije;
- postojanost [7].

Prvi je korak u validaciji definirati svrhu metode, zatim treba odrediti koji su parametri važni, postaviti kriterij prihvatljivosti, izvesti eksperimente, obraditi podatke i usporediti ih s kriterijem prihvatljivosti te na kraju utvrditi da je metoda namijenjena svrsi.

Validacijski se plan određuje pomoću analitičkih zahtjeva koji su određeni na temelju potreba kupaca ili kako je navedeno u propisima. Koji kriterij provođenja metode će se izračunati, ovisi također o namjeni metode [3].

Razlike se mogu događati u ovisnosti i o polju primjenjivanja metode, a validacijska izučavanja mogu postati puno teža kako kompleksnost analize raste [9]. Svaki postupak koji se primjenjuje tijekom ispitivanja mora biti dokumentiran, jednostavno, razumljivo i detaljno opisan kako bi se osigurala dosljednost u provođenju radnji. Dokumentirani trebaju biti i dobiveni rezultati te izjava da je metoda validirana. Važno je naglasiti da je validacija metode osnova kvalitete analitičkog mjerenja. Sav trud oko validacije možemo smatrati ulaganjem. Svaka pogreška koja se otkrije tijekom provođenja validacijskih eksperimenata za vrijeme razvoja metode štedi vrijeme, ali i financijske gubitke tijekom primjene.

Kako znamo kada treba metodu validirati? Metoda se treba validirati kada je potrebno pokazati da su njezine karakteristike provođenja adekvatne za određenu svrhu. U točki 7.2 HRN EN ISO/IEC 17025: 2017 stoji da laboratorij treba validirati:

- nestandardne metode;
- metode koje je laboratorij sam dizajnirao;
- standardne metode koje se koriste izvan svog opsega rada;
- modificirane standardne metode.

Opsežnost validacije ovisi o primjeni, prirodi promjena koje su napravljene i okolnostima u kojima se metoda koristi. Validacija je također potrebna kada treba pokazati ekvivalentnost rezultata dobivenih pomoću dvije metode, npr. novo razvijene metode i već postojeće standardne metode [8]. Kada razvijamo novu metodu, uzimamo sve parametre u obzir i govorimo o potpunoj validaciji. Kada želimo metodu poboljšati, prenijeti u drugi laboratorij ili je došlo do promjene u sastavu proizvoda, analitičkog postupka, onda ne uzimamo sve parametre i tada govorimo o djelomičnoj validaciji. Danas je validacija profesionalna odgovornost svakog analitičara i zato je važna kontinuirana edukacija. Analitičar koji

provodi istraživanja mora biti kompetentan u polju rada istraživanja. On mora imati dovoljno znanja koja se odnose na rad kako bi se donijele odgovarajuće odluke koje su napravljene tijekom istraživanja. Važno je biti svjestan da rezultat analitičkog mjerenja daje određenu vrijednost uzorku, koja je dalje odgovorna za ljudsko zdravlje ili kvalitetu proizvoda [8].

2.3. Validacijski parametri koji su ispitivani u radu

U radu su se ispitivali sljedeći parametri validacije: linearnost, preciznost, točnost, granica detekcije (eng. *Limit of detection*, LOD) i granica kvantifikacije (eng. *Limit of quantification*, LOQ). Provedena je djelomična validacija.

2.3.1. Linearnost (eng. *linearity*)

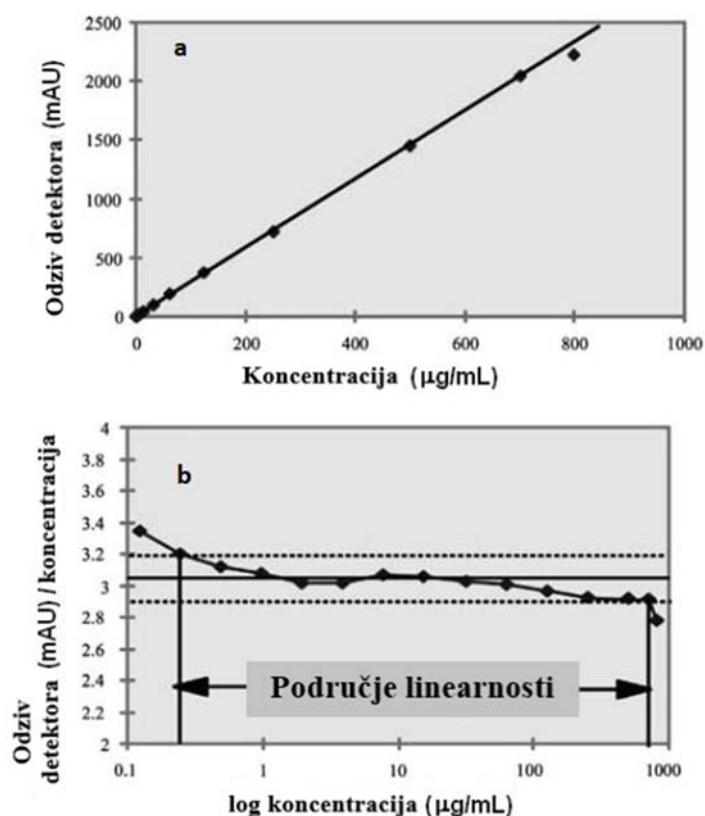
Linearnost definiramo kao mogućnost metode da, unutar danog područja, daje ispitne rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Mjeri se odziv metode za nekoliko različitih poznatih koncentracija referentnog materijala. Jednostavno se odrede kalibracijski grafovi za analit u širokom rasponu koncentracija i izaberu linearna područja, najčešće pet točaka u 3 ponavljanja, a može i više. Osim grafički, linearnost možemo odrediti i matematički [7].

Matematički se linearnost određuje preko linearne regresije, tako da se izvede jednadžba pravca u obliku $y = ax + b$ i izračuna koeficijent korelacije (k). Nagib pravca (a) parametar je koji ukazuje na osjetljivost metode. Odsječak pravca (b) ukazuje na sustavnu pogrešku. Za koeficijent korelacije postavlja se kriterij $k \geq 0,99$. Za vrlo niske koncentracije prihvaća se i kriterij $k \geq 0,98$ [7].

Grafički prikazi ovisnosti signala o koncentraciji analita važni su zbog mogućnosti vizualnog nadzora. Najčešće se upotrebljavaju dva načina grafičkog prikaza:

- grafički prikaz odstupanja od regresijskog pravca prema koncentraciji ili logaritmu koncentracije – za linearna područja odstupanja jednoliko raspoređena između pozitivnih i negativnih vrijednosti (slika 2a);

- grafički prikaz relativnih signala (omjer signala i odgovarajuće koncentracije) na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi x log skale. Dobivena linija treba biti vodoravna u cijelom linearnom području, a područje linearnosti prestaje pri koncentracijama gdje linija relativnog odziva siječe paralelne linije koje odgovaraju 95 postotnoj ili 105 postotnoj koncentraciji (slika 2b) [7].



Slika 2. Prikaz linearnosti na dva grafička načina [10].

2.3.2. Preciznost (eng. *precision*)

Preciznost se definira kao izraz slaganja između niza ponovljenih mjerenja koja su izvedena iz istog uzorka, u zadanim uvjetima. Važno je dobro odrediti preciznost jer nam otkriva slučajne pogreške metode - numerički iz standardne devijacije koeficijenta varijacije ili varijance. Za rezultate koji ne zadovoljavaju važno je otkriti izvor pogreške i nastojati ga ukloniti. Određuje se na način da se napravi nekoliko određivanja na homogenom, umjetno pripremljenom uzorku. Prema zahtjevu statistike određuje se broj ponavljanja. Kriterij prihvatljivosti ovisi o matrici uzorka, vrsti analize i koncentraciji analita [7].

Parametar preciznosti iskazujemo kroz:

- ponovljivost;
- međupreciznost;
- obnovljivost [7].

Preciznost pod uvjetom ponovljivosti ili preciznost pri istim uvjetima uključuje istog analitičara, jedan laboratorij, istu aparaturu, iste reagense u kratkom vremenskom razdoblju. Međupreciznost je preciznost pri različitim uvjetima, ali i dalje unutar jednog laboratorija. Uvjeti uključuju različite analitičare, različite instrumente, različite dobavljače reagenasa te duži period. Cilj je pokazati da će metoda davati iste rezultate tijekom upotrebe u laboratoriju. Obnovljivost se odnosi na promjenljive uvjete u više različitih laboratorija. Rezultati se ostvaruju istom metodom na identičnom uzorku, ali u različitim laboratorijima gdje su oprema i analitičar različiti. Obnovljivost potvrđuje da će metoda davati iste rezultate u različitim laboratorijima [7]. Preciznost se izražava pomoću standardne devijacije (SD), relativne standardne devijacije (RSD) i kao raspon pouzdanosti srednje vrijednosti.

Standardna devijacija i relativna standardna devijacija računaju se prema navedenim jednadžbama [11]:

$$S = \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (1)$$

$$\% \text{ relativna standardna devijacija (RSD)} = S \times 100 / x \quad (2)$$

gdje je:

$S = \sigma$ = standardna devijacija;

N = broj mjerenja;

x_i = i-ti uzorak;

\bar{x} = srednja vrijednost uzorka.

2.3.3. Točnost (eng. *accuracy*)

Točnost ili istinitost stupanj je slaganja između srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih (referentnih) vrijednosti dobivenih od nekoliko uzastopnih mjerenja. Pokazuje nam koliko smo blizu referentnoj vrijednosti. Dokazuje se nakon određivanja parametara selektivnosti, linearnosti i preciznosti, minimalno tri puta za najmanje tri koncentracije unutar radnog područja metode. Raspon koncentracija treba odgovarati stvarnom uzorku [7].

Istinitost metode moguće je procijeniti na nekoliko načina:

- cijepljenjem uzorka ili matrice poznatom koncentracijom referentnog materijala;
- usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim uhodanom referentnom metodom;
- analizom uzorka poznate koncentracije, npr. certificiranoga referentnog materijala i usporedbom izmjerenih rezultata i certificiranih vrijednosti.

Rezultati se prikazuju grafički kao odnos teorijske (očekivane) vrijednosti prema izmjerenoj koncentraciji. Iskorištenje metode ovisi o koncentraciji analita, postupku uzorkovanja i matrici uzorka. Na samome početku postupka, matrica ili uzorak se cijepe dodatkom referentnog materijala tako da cijepljeni uzorak bude podvrgnut cjelokupnom postupku od pripreme uzorka do mjerenja [7]. Točnost se izražava preko iskorištenja. Iskorištenje (eng. *recovery*) je postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka. Određuje se tijekom vrednovanja metode [12].

Računa se prema sljedećoj jednadžbi :

$$\% Rec = \frac{(C_F - C_U)}{C_A} \times 100 \quad (3)$$

gdje je:

C_F - izmjerena koncentracija nacijepljenog uzorka;

C_A - dodana koncentracija u uzorak

C_U - izmjerena koncentracija uzorka prije nacijepljanja [13].

2.3.4. Granica detekcije (eng. *limit of detection*, LOD) i kvantifikacije (eng. *limit of quantification*, LOQ)

Ne postoji analitički termin ili parametar za koji je postojala veća raznolikost terminologije i formulacije od granice detekcije i kvantifikacije. Sve službene organizacije imaju isto poimanje da je granica detekcije „najniža količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne i nužno kvantificirati kao prava vrijednost“ [3]. Granica kvantifikacije je najniža koncentracija u uzorku koja se može kvantificirati s prihvatljivom razinom preciznosti i točnosti. Određuje se razrjeđivanjem osnovne otopine ili cijepljenjem uzorka s odgovarajućom koncentracijom analita. Procjeniti ju možemo statistički ili vizualno pomoću omjera signal/šum. Vizualna procjena je primjenjiva kod instrumentalnih i kod neinstrumentalnih metoda, a procjenjuje se najmanji signal koji se može detektirati. Omjer signal/šum primjenjuje se samo na analitičke postupke s baznom linijom [7].

Za granicu detekcije prihvatljiv je omjer 3:1. Statistički se određuje na bazi standardne devijacije signala i nagiba kalibracijskog pravca prema jednadžbi:

$$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{a} \quad (4)$$

σ - standardna devijacija;

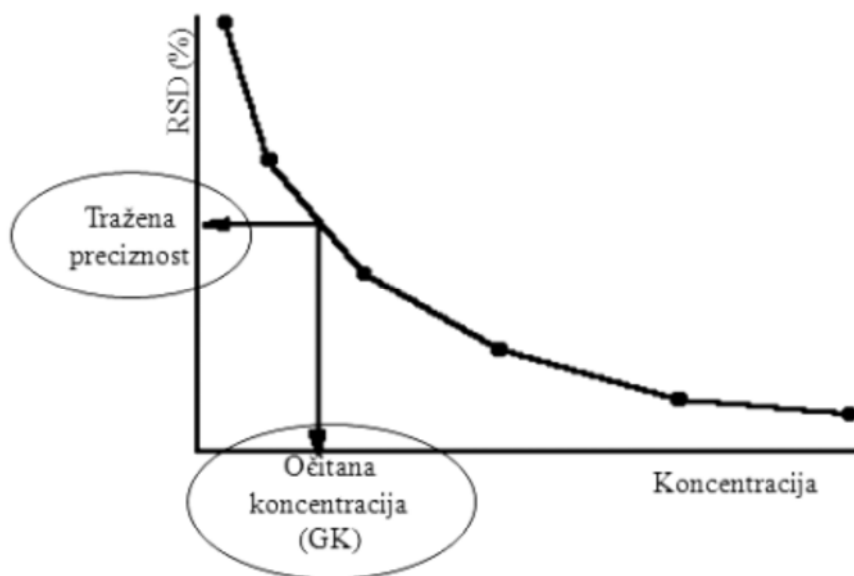
a - nagib kalibracijskog pravca.

Za granicu kvantifikacije prihvatljiv je omjer 10:1. Statistički se određuje na bazi standardne devijacije signala i nagiba prema jednadžbi:

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a} \quad (5).$$

Kada se zahtijeva da metoda na granici kvantifikacije ima zadanu preciznost, tada se pripremi nekoliko uzoraka poznate koncentracije u području oko moguće granice kvantifikacije. Svaki se izmjeri pet puta i izračunaju se za svaku koncentraciju relativne

standardne devijacije. Odnos RSD-a prema koncentraciji se prikaže grafički i iz grafa se odredi granica kvantifikacije sa zadanom preciznošću kao što je vidljivo na slici 3. [7].



Slika 3. Određivanje granice kvantifikacije s točno određenom preciznošću [7].

2.4. Mikotoksini

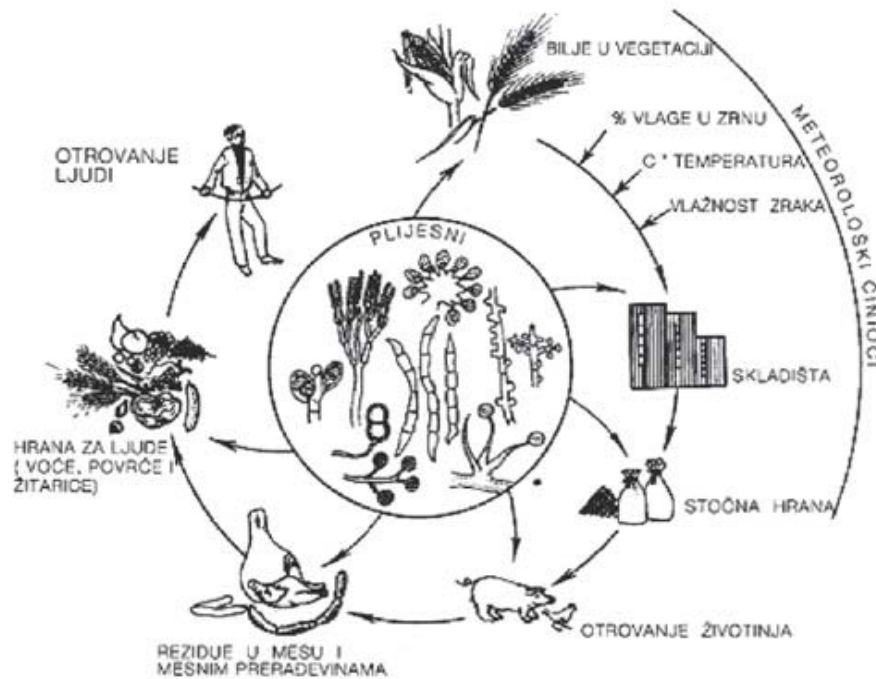
Danas smo svjedoci sve veće brige o zdravlju. Svakodnevna konzumacija voća i povrća dovela je do većeg unosa mikotoksina putem hrane, što rezultira trovanjem mikotoksinima.

Za kvarenje i trovanje hrane odgovorne su gljive, koje su široko rasprostranjene u okolišu [14]. Gljive su razlagači. Prije su se svrstavale u carstvo biljaka, ali danas su one zasebna vrsta zbog njihove nemogućnosti proizvodnje vlastite hrane. Zbog mogućnosti sprječavanja infekcija zastupljene su u farmaciji, ali i u agrikulturni jer često tvore simbiozu s korijenjem biljaka. One se hrane razlaganjem organske materije i na taj način rastu [15]. Njihov rast može ugroziti ljudsko zdravlje jer uzrokuju nastanak mikotoksina [16]. Mikotoksini su prirodni produkti male molekulske mase, velike strukturne raznolikosti koji nastaju kao sekundarni metaboliti gljiva [17]. Oni mogu inficirati hranu i uzrokovati intoksikaciju kod životinja ili usjeva. Naziv dolazi od grčkih riječi *mykes* (gljiva) i *toxicum* (otrovan) [15]. Ovi spojevi jesu otrovni, no kada se kaže „mikotoksin“, to se odnosi na spoj koji je toksičan za

kralješnjake već pri niskim koncentracijama [16]. Ipak, nisu svi spojevi koji su nastali pomoću gljiva toksični. Primjerice, penicilin koji je nastao od gljivica *Penicillium* toksičan je samo za bakterije pa se koristi kao antibiotik [15]. Svaka vrsta plijesni može proizvesti više od jedne vrste mikotoksina, a taj isti mikotoksin može nastati iz različitih vrsta plijesni [18]. Najviše rasprostranjeni mikotoksini većinom su izazvani rodovima: *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* [19]. Unatoč razvoju i industrijalizaciji zemlje, mikotoksini se mogu pojaviti kada se okolišni, socijalni i ekonomski uvjeti isprepletu meteorološkim (vlažnost, temperatura) koji potiču rast gljivica, plijesni. Stoga se s ekološkog stajališta ne smije zanemariti uloga mikotoksina u poticanju bolesti. Mikotoksikoze koje nastaju zbog onečišćene hrane, lokalno uzgojene ili uvezene, mogu se pojaviti u cijelom svijetu. Kao posljedica toga, bilo bi pogrešno tvrditi da se izlaganje mikotoksinima događa samo u nerazvijenim zemljama u kojima je populacija pothranjena i gdje se smatra da nije adekvatno skladištenje i rukovanje hranom. Korištenje preventivnih tehnika za kontrolu rasta gljiva u agrikulturi i poboljšanje metoda za pripremu hrane u industriji nije uspješno. Okus, veličina, oblik, tekstura i izgled osnovne su značajke u procjenjivanju voća te one diktiraju konačno odredište voća, potrošnju i procesiranje. S druge strane, kvaliteta prehrambenih proizvoda napravljenih od voća klasificira se korištenjem indikatora zagađenja. U prehrambenim proizvodima kvaliteta se može okarakterizirati rastom gljiva, prisutnošću neugodnog mirisa i raspadanjem voća. Kod zagađenja gljivicama, voće može biti izloženo velikoj promjeni, a to se pripisuje nastanku pektinolitičkih enzima koji su odgovorni za raspadanje voćnog tkiva [15].

Kontaminacija se može dogoditi tijekom rasta, žetve, transporta, pohrane i/ili procesiranja prehrambenih proizvoda [20]. Na primjer, *Aspergillus* i *Penicillium* se obično vežu za kontaminaciju tijekom skladištenja, dok *Fusarium* može uzrokovati zagađenje prije ili nakon žetve [21]. Jedna od najistraženijih vrsta je *Penicillium expansum* [22]. To je parazitska gljiva koja napada voće kroz oštećenja koja su izazvana nepogodnim vremenskim uvjetima prije žetve (nepogoda, jak vjetar) ili grubim rukovanjem, žetvom ili transportom [23]. Sveprisutna plijesan obično se nađe na koštuničavom voću i uzrokuje ozbiljne bolesti nakon žetve. Tada dolazi do proizvodnje velike količine patulina što dovodi do značajnih gubitaka voća i do ozbiljne opasnosti za ljudsko zdravlje [24]. Kontaminacija životinja također može utjecati na ljude kroz hranidbeni lanac (slika 4.).

Ljudi se hrane životinjskim proizvodima kao što su: mlijeko, jaja i meso te ukoliko su zagađeni gljivicama ljudi se također zaraze [25]. To može uzrokovati kod ljudi pojavu karcinoma, teratogenost ili poremećaj u razvoju [26].



Slika 4. Put mikotoksina u hranidbenom lancu [27].

Razumijevanje fiziologije plijesni *Penicillium expansum* može pomoći pri procjeni njihovog ponašanja u prirodnim uvjetima i predvidjeti njihov potencijalni rizik za voće, ali i za zdravlje potrošača [17]. U nekoliko posljednjih desetljeća, mikrobiologija je korisno oruđe u industriji hrane koje se koristi kako bi se predvidjelo ponašanje mikroorganizama kroz otkriće nekoliko matematičkih modela koji su sposobni opisati odgovore ovih patogenih organizama na određene uvjete okoliša [28]. Za rast mikotoksina potrebni su određeni uvjeti. To su: temperatura, vlažnost, pH, pogodan mikrobnii sastav, oštećenje insektima [29]. Temperatura tijekom vremena skladištenja i aktivitet vode (a_w) prihvaćeni su kao najvažniji [30]. Budući da je voće kiselog karaktera, na njemu se lako razvijaju plijesni i kvasci koji podnose kiselu sredinu te su zbog toga glavni uzročnici kvarenja voća. Mikoze su infekcije koje su uzrokovane rastom gljiva u domaćinu, a mikotoksikoze su intoksikacije koje se

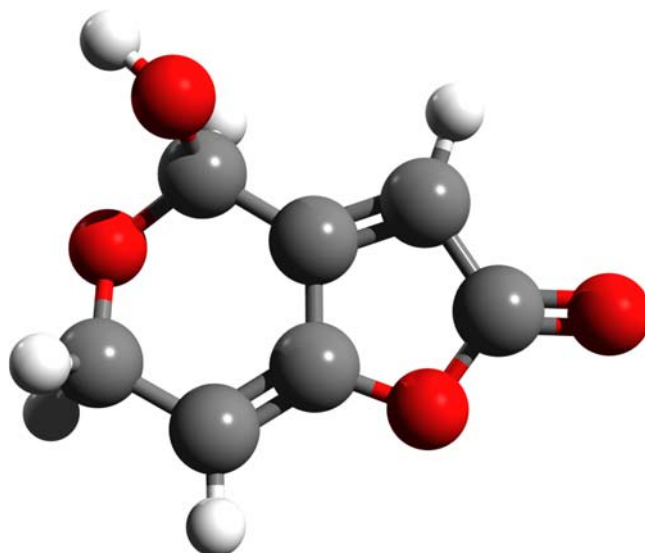
javljaju kao posljedica različitih izloženosti hrani ili dišnog ili kožnog kontakta s gljivicama. Postoje različite vrste mikotoksikoza, a simptomi ovise o: opsegu izloženosti, dobi, spolu i zdravlju pojedinca, genetici i uzimanju lijekova. Mikotoksikoze mogu biti akutne ili kronične te mogu uzrokovati smrt ili tumore.

Ljudska izloženost mikotoksinima se može nadgledati biološki ili kroz okoliš [14]. Kod okoliša, mikotoksini se većinom mjere u zraku, hrani i ostalim uzorcima koji mogu biti u kontaktu s osobom, dok se kod biološke kontrole mjere i računaju razine mikotoksina u tkivima, izlučevinama i tjelesnim tekućinama [31]. U zadnjih nekoliko godina najviše se proučavaju mikotoksini kao što su: aflatoksini, citrinin, fumonisin, ohratoksin, patulin, trihoteceni i zearalenon [19].

2.5. Patulin

Patulin (PAT) je sekundarni metabolit plijesni ili mikotoksin. IUPAC-ovo ime patulina je 4-hidroksi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-on. To je hemiacetalni lakton, empirijske formule $C_7H_6O_4$ i molekulske mase 154,12 g/mol, topljiv u vodi i većini organskih otapala. Nalazi se u obliku bijelog praha koji se tali pri 110 °C [14]. Predstavlja vrlo intenzivan apsorpcijski maksimum u UV dijelu spektra pri 276 nm [31]. Stabilan je u razrijeđenim kiselinama i postojan pri 125 °C u pH rasponu 3,5-5,5 [32]. Na slici 5. prikazana je 3D struktura patulina.

Patulin se prvo klasificirao kao antifungalni antibiotik širokog spektra. Kasnije se saznalo da inhibira više od 75 različitih bakterija [14]. Otkriveno je i da ima toksične učinke na biljke i životinje [33].



Slika 5. 3D prikaz strukture molekule patulina [34].

Većina gljivica koja proizvodi patulin u hrani su: *Aspergillus*, *Penicillium* i *Byssochlamys* [14]. *Penicillium expansum* je najveći proizvođač patulina od svih vrsta *Penicillium* [33]. *Penicillium* i *Aspergillus* imaju sposobnost rasta pri niskim temperaturama. Iako se patulin najčešće pojavljuje u jabukama i soku od jabuke, nađen je i u drugom voću poput grejpa, kruške i marelice [35]. Patulin može izdržati različite procese poput zagrijavanja i mljevenja te je zbog toga veća mogućnost opstanka u različitim proizvodima. To upućuje na veću brigu o namirnicama i proizvodima koje unosimo u naš organizam.

2.5.1. Toksičnost patulina

Patulin se klasificira kao karcinogen treće skupine od strane međunarodne agencije za istraživanje raka, a ta skupina uključuje sve one spojeve za koje nema još dovoljno podataka o karcinogenosti [36]. Uzimanje voća i povrća koje sadrži patulin može dovesti do raznih zdravstvenih komplikacija kao što su suzbijanje imunoloških reakcija, karcinogeneza, gastrointestinalne upale, čirevi, krvarenja, mutageničnost, karcinogeničnost, embriotoksičnost i teratogeni učinci [37]. Istraživanja su pokazala da su većina mjesta na kojima se zadržava patulin eritrociti i organi bogati krvlju (slezena, bubreg, pluća i jetra) [38]. Budući da su zabilježeni toksični učinci patulina kao što su: mučnina, povraćanje i neurološki te gastrointestinalni poremećaji, patulin se ne može koristiti kao učinkoviti lijek. Do sada je provedeno puno *in vitro* i *in vivo* istraživanja kako bi se izračunali toksikološki rizici povezani s konzumiranjem patulina kroz svježu i procesuiranu hranu [14].

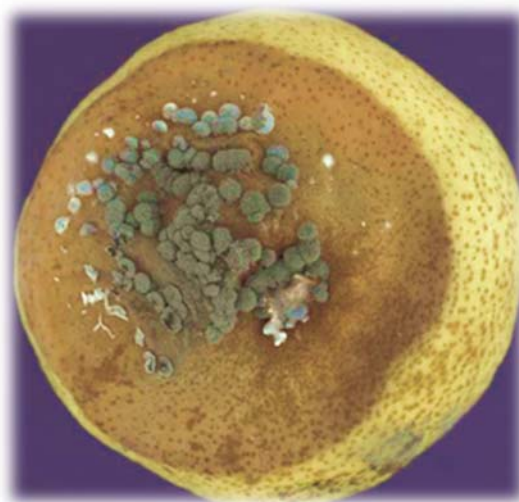
U nekoliko istraživanja, zaključeno je da reaktivne kisikove vrste imaju ključnu ulogu u toksičnosti koja je posredovana patulinom. Zaključeno je da trošenje glutaciona pomoću patulina rezultira nastankom reaktivnih kisikovih vrsta u hepatocitama kod štakora. Elektrofili patulin tvori kovalentne adukte s nukleofilnim ostacima određenih staničnih tiola uključujući glutation, koji je važan u neutraliziranju slobodnih radikala i oksidansa [39]. Nadalje, zaključeno je da lipidna peroksidacija stanične membrane uzrokovana tretiranjem patulinom može također voditi do nastanka reaktivnih kisikovih vrsta koje su sposobne uzrokovati oštećenje DNA [40].

Postoje istraživanja koja su opisala klastogeni potencijal patulina. U stanicama jajnika kineskog hrčka, krvnim limfocitima i stanicama bubrega ljudskog embrija, patulin je povećavao pukotinu i lom u DNA, a sestrinska kromatida se mijenjala frekvencijski. To ukazuje da je u ljudskim stanicama patulin potencijalni klastogen sa sposobnošću uzrokovanja oksidativnih oštećenja DNA. Dobro je poznata utvrđena činjenica da mikotoksini mogu mijenjati imuni odgovor, a patulin je jedan od njih [37]. Stoga, na temelju štetnih učinaka patulina dokazanih u studijama na životinjama, FDA (eng. *Food and Drug Administration*) vjeruje da ljudi mogu biti ugroženi pri dugotrajnim izloženostima patulinu [37].

Izdana je maksimalna dopuštena doza patulina u hrani i prehrambenim proizvodima. Prema *European countries the regulation* (eng. *The European Commission, EC*) No 1425/2003 u sokovima od jabuke dopuštene su maksimalne razine patulina od 50 µg/L, 25 µg/L za čvrste jabuke i njihove proizvode te 10 µg/L za sokove i hranu za bebe (*Commission regulation* (EC) No 1881/2006). Udruženje FAO (eng. *Food and Agriculture Organization*)/WHO (eng. *The World Health Organization*) *Expert Committee on Food Additives* (eng. *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA*) također je odobrilo maksimalni dnevni unos od 0,4 µg/kg tjelesne mase dnevno (JECFA, 1995). FDA je ograničila patulin na 50 µg/L [14].

2.5.2. Biosinteza patulina

Djelotvornost biosinteze ovisi o brojnim faktorima (temperaturi, pH, a_w – vrijednosti, stanju atmosfere – postotni udio kisika i ugljikovog dioksida). Neadekvatnim skladištenjem voća, nakon nekog vremena, primjećuju se promjene na kori voćke. Kora jabuke posmeđi i dolazi do truljenja (slika 6.).



*Slika 6. Trulež jabuke zbog rasta plijesni *Penicillium expansum* [41].*

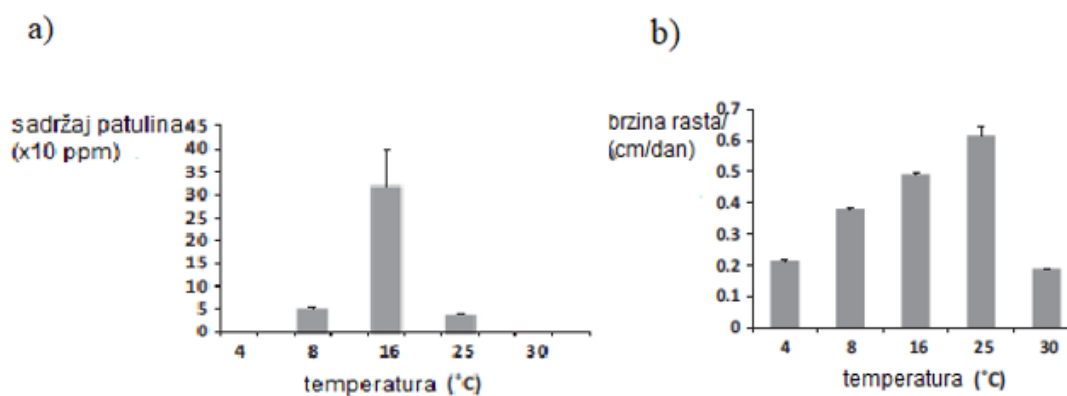
Te promjene dovode do smanjene kakvoće i okusa jabuke. Zaključuje se da je došlo do porasta koncentracije patulina zbog uvjeta koji su pogodni za rast (veća koncentracija CO_2) [41].

2.5.2.1. Utjecaj temperature

Plijesni *Penicillium expansum* rastu na nižim temperaturama tako da hladna skladišta ne sprječavaju kvarenje već ga samo usporavaju [41].

Histogram proizvodnje patulina u odnosu na temperaturu vidi se na slici 7a te ima karakterističan oblik zvona. Najveća koncentracija patulina postignuta je pri 16 °C. Daljnji porast temperature do 25 i 30 °C uzrokuje pad proizvodnje patulina. Ovaj podatak povezan je s prethodnim istraživanjem gdje se uspoređivala proizvodnja patulina na jabukama koje su čuvane pri različitim temperaturama skladištenja (0, 3, 6, 17 i 25 °C). U ovom istraživanju, najveća koncentracija patulina pronađena je pri 17 °C [17]. Usporedba

histograma rasta plijesni *Penicillium expansum* i patulina u ovisnosti o temperaturi otkriva da su temperaturni rasponi potrebni za nastanak patulina bili različiti od histograma rasta plijesni (slika 7b).

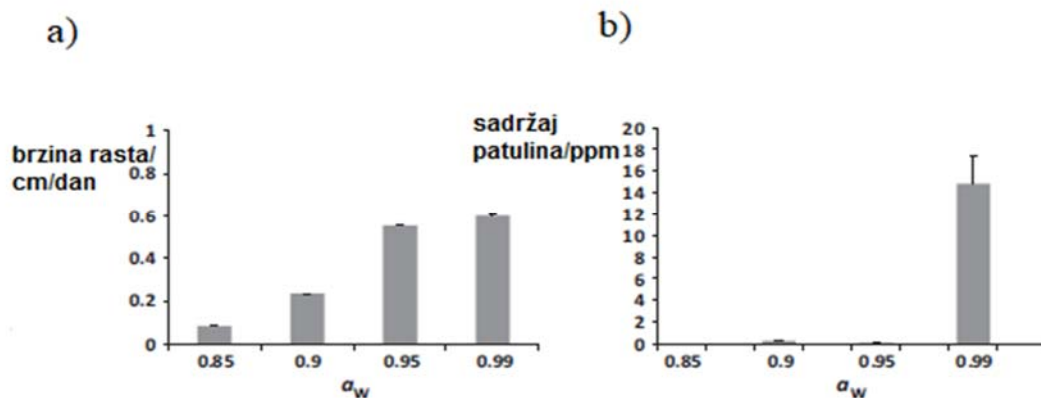


Slika 7. Histogrami rasta patulina (7a) i plijesni *Penicillium expansum* (7b) u ovisnosti o temperaturi [17].

Slični rezultati zabilježeni su i za ostale vrste gljiva. Naime, visoke se razine mikotoksina proizvode pri nižim temperaturama (10 do 15 °C), a to je povezano sa smanjenim rastom plijesni [42].

2.5.2.2. Utjecaj aktiviteta vode

Uvjeti aktiviteta vode koji potiču proizvodnju patulina puno su restriktivniji nego oni koji omogućuju rast plijesni. Kao što je prikazano na slici 8., kod rasta plijesni *Penicillium expansum*, nema značajnih razlika pri aktivitetima vode od 0,95 i 0,99 (slika 8a), dok se proizvodnja patulina značajno povećava pri 0,99 (slika 8b). Pri 0,95 detektirani su samo tragovi patulina [17].



*Slika 8. Histogrami rasta patulina i plijesni *Penicillium expansum* u ovisnosti o aktivitetu vode [17].*

2.5.2.3. Utjecaj pH

Također, ostali unutrašnji faktori, naročito pH proizvoda, mogu puno utjecati na razvoj plijesni [43]. Istraživanja upućuju na to da je patulin najstabilniji u pH rasponu od 2,5 do 5,5 [17]

2.5.3. Metode određivanja patulina

Analiza patulina uključuje sljedeće korake: uzorkovanje, pripremu uzorka, izolaciju i/ili identifikaciju, kvantifikaciju i ponekad statističke izračune. Svaki je korak jednako važan za postizanje točnih rezultata. Za uzorkovanje je bitan odabir metode te da se prethodno zna hoće li uzorak biti u čvrstom ili tekućem stanju [14]. Važno je napomenuti da mikotoksini nisu jednako raspoređeni u proizvodu zbog čega je jako važno uzeti reprezentativan uzorak.

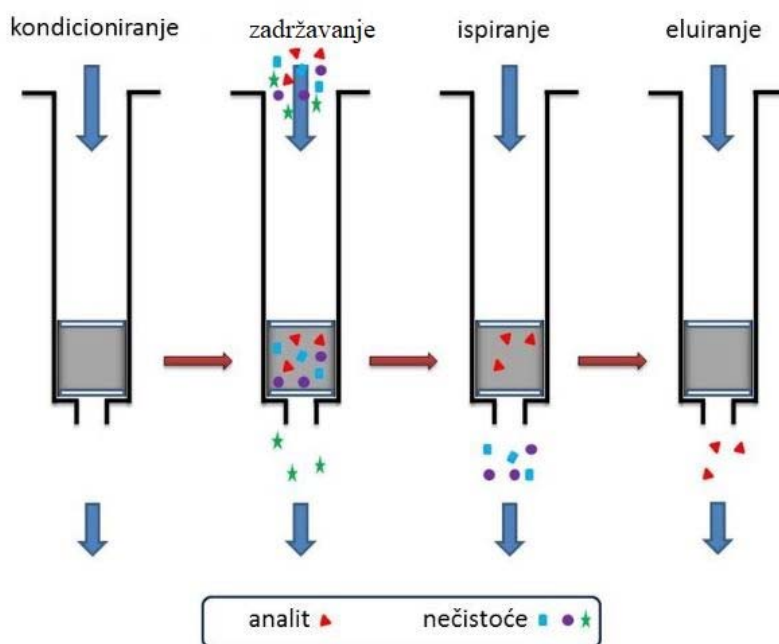
Većinom je za pripremu uzorka potrebno izolirati patulin iz matrice uzorka, imajući u vidu kemijska svojstva i kompleksnost matrice.

Disperzija čvrste faze matriksa (eng. *matrix solid-phase dispersion*, MSPD) je pokazana kao pogodna metoda za ekstrakciju patulina iz jabuka [44]. Mala porcija jabuke izmiješa se u C-18 čvrstom silika podupiraču. Nakon ispiranja s heksanom, patulin se ekstrahira ispiranjem

s diklormetanom. Nakon isparavanja otapala, ekstrakt se otopi u otopini pufera octene kiseline te se analizira tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

AOAC (eng. *Association of Official Analytical Chemists*) je prihvatila ekstrakciju tekuće-tekuće kao metodu pripreme uzorka za analizu patulina iz soka jabuke [14]. Metoda uključuje početni korak multi-ekstrakcije s etil-acetatom te nakon toga ekstrakciju s vodenom otopinom natrijeva karbonata. Ekstrakti se suše i isparavaju te otope u otopini octene kiseline nakon čega se patulin analizira kromatografski [45]. Da bi se poboljšala čistoća sokova i pirea, prije analize uključuje se pre-tretiranje s pektinazom. Takva metoda pogodna je za zamućeni sok od jabuke i pire od jabuke [46].

Ekstrakcija na čvrstoj fazi ili SPE (eng. *solid phase extraction*) pokazala se vrlo svestranom kod pripreme matrice uzorka koji sadrže patulin. Principi se zasnivaju na kromatografiji: tvari se otope ili suspendiraju u tekućini i isperu kroz čvrstu fazu te se ovisno o afinitetu događa razdvajanje (slika 9.). Na koloni se zadržavaju nečistoće ili se ispiru s kolone, nakon toga se eluira čisti ekstrakt s kolone. Čvrste faze su najčešće silikagel, silikati, C₁₈, polimerne smole, ionsko-izmjenjivačke tvari, antitijela. SPE se koristi kako bi se pročistile matrice i koncentrirale tvari u tragovima, kao što je patulin. SPE je popularna tehnika zbog brzine ali i manje potrošnje otapala. Ova tehnika također ima ograničenja: utjecaj matriksa i neželjeno natjecanje između analita i ostalih komponenata matrice [14].



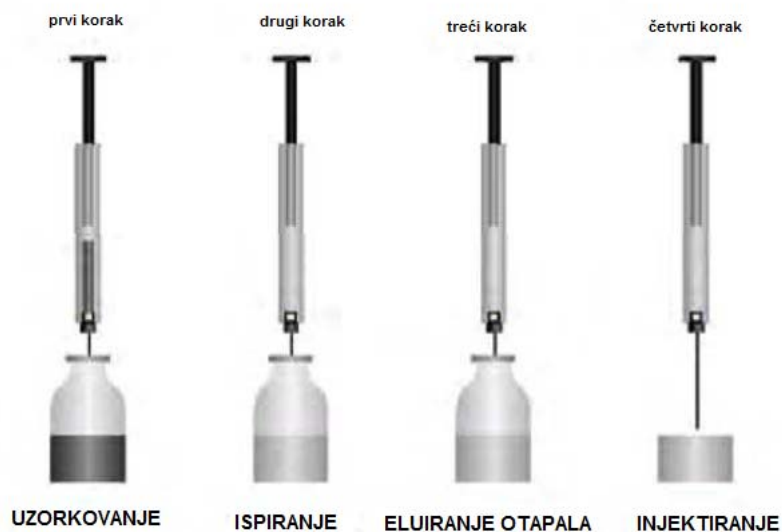
Slika 9. Koraci kod SPE [47].

Za analizu patulina u sokovima jabuke dva SPE sustava koriste tandem polivinilpolipirrolidon-oktadecil (PVPP-C18) uložak i hidrofilni lipofilni balansirani (HLB) makroporozni kopolimerni uložak sorbensa. Tehnika zahtijeva 5 mL soka, a ispiranje se odvija uz dietil-eter. Nakon isparavanja otapala, ostatak se otopi u smjesi acetonitrila i vode s malim dijelom octene kiseline te se tada podvrgne kromatografiji [14]. Za analizu jabučnog sirupa uzorak sirupa razrijedi se s otopinom pufera octene kiseline te se time napuni stupac. Nakon ispiranja heksanom, uložak se suši jakom strujom zraka 15 min i ispiri se smjesom otapala (heksan/etil acetat/acetone). Nakon zakiseljavanja, patulin se analizira uz HPLC [14].

Otkriće minijaturiziranih tehnika uvelike je doprinijelo ubrzanju analiza te je snizilo cijenu i zagađenje okoliša. Mikroekstrakcija pakiranim sorbensom ili pakiranom štrcaljkom (eng. *microextraction by packed sorbent, MEPS*) (slika 10.) čini se kao obećavajuća metoda u analizi patulina. Ova tehnika koristi malu količinu stacionarne faze koja je pakirana u bubnju koji se zove BIN (eng. *Barrel Insert and Needle Assembly*) plinotijesna štrcaljka (100-250 μL) (sonda kojoj se vrhu nalazi sloj čvrste faze koji se uranja u ekstrakt). Kao i kod SPE, MEPS-u je cilj eliminacija interferenata te selektivna izolacija i koncentracija određenih spojeva, ali na mikro skali. Koraci su slični kao i kod SPE (slika 11.) [14].



Slika 10. MEPS štrcaljka i BIN [48].



Slika 11. Koraci MEPS-a [49].

Kromatografske metode su najpogodnije analitičke metode (jednostavne, točne i niskih granica detekcije) za analizu patulina u hrani, osobito u jabukama i njihovim sokovima. Kromatografske metode su: tankoslojna kromatografija (eng. *Thin Layer Chromatography*, TLC), plinska kromatografija (eng. *Gas Chromatography*, GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC). Zbog jednostavnosti i niske cijene, prva metoda koja se koristila bila je tankoslojna kromatografija. AOAC ju je koristio za analizu mikotoksina koristeći kolonu od silikagela. Za detekciju se koristila reakcija patulina s 3-metil-2-hidrazon benzotiazolinom i s klorovodičnom kiselinom [14]. Za analizu patulina najviše se koristi HPLC s UV detekcijom ili fotodiodama. Patulin se jednostavno kvantificira i identificira kroz njegov apsorpcijski spektar. Za pripremu uzorka koristi se ekstrakcija tekuće-tekuće. HPLC se provodi sa stupcem C₁₈ obrnute faze s veličinom čestica od 5 μm i veličinom pora 12-25 nm te izokratskim eluiranjem protoka 1 mL/min.

Otapalo je acetonitril u zakiseljenoj vodi [14]. Koristi se UV detekcija pri 276 nm [24]. Granica detekcije je niska i iznosi 5 μg/L [14]. HPLC tehnika može biti povezana s masenom spektrometrijom, a opisana je i tehnika gdje se patulin detektira pomoću kolizijski izazvane disocijacije (eng. *Collision-induced dissociation*, CID) uz kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (eng. *Atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). Pri tome je granica detekcije bila oko 4 μg/L [50].

Za analizu patulina primjenjuje se i plinska kromatografija. Može se spojiti s masenom spektrometrijom i analizirati ionizacijom elektronskog udara korištenjem sililiranog derivata patulina [51]. Ostale GC metode koristile su injektiranje izravno na kolonu i snimanje odabranih iona (eng. *Selected ion monitoring*, SIM) [24]. Za detekciju i kvantifikaciju patulina u voćnim sokovima razvijen je protokol koji uključuje dvofaznu ekstrakciju dijalizom, *in situ* acilaciju kao pripremu uzorka i GC-MS analizu [52].

Kao alternativna metoda za analizu patulina može poslužiti i kapilarna elektroforeza (eng. *Capillary electrophoresis*, CE). To je brza i jako osjetljiva metoda za analizu patulina. Koristi se silika kapilarni stupac, a elucija se odvija s vodenom otopinom. Razdvajanje se odvija migracijom čestica kroz pufer. Kationi migriraju na katodu, a anioni na anodu pod utjecajem elektroosmotskog protoka (eng. *Electroosmotic Flow*, EOF). Spojevi i smjese koji su neutralni ili nabijeni mogu se analizirati pomoću micelarne elektrokinetičke kapilarne elektroforeze ili micelarne elektrokinetičke kapilarne kromatografije (eng. *Micellar electrokinetic capillary chromatography*, MECC). Za ovu je metodu potrebna mala količina uzorka i još manja količina organskih otapala u usporedbi sa HPLC [53].

2.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je fizikalna metoda separacije. Koristi se za razdvajanje i identifikaciju komponenata smjese. Razdvajanje se postiže različitim raspodjelom određenih komponenti između dvije faze, od kojih je jedna stacionarna (nepokretna), a druga mobilna (pokretna) faza. Prema fizičkom stanju pokretne faze, kromatografske tehnike dijelimo na: plinsku kromatografiju (eng. *Gas Chromatography*, GC), tekućinsku kromatografiju (eng. *Thin Layer Chromatography*, LC), fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (eng. *Supercritical fluid chromatography*, SFC) i tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

HPLC je važna kvalitativna i kvantitativna tehnika. To je pouzdana, sigurna i najbrža kromatografska tehnika za kontrolu kvalitete proizvoda. Primjenjiva je za toplinski nestabilne i nehlapljive uzorke. Najvažniji dijelovi su: kolona koja je punjena stacionarnom fazom, pumpa koja pomiče mobilnu fazu kroz kolonu i detektor koji bilježi retencijsko vrijeme (vrijeme zadržavanja) molekula. Vrijeme zadržavanja varira ovisno o interakcijama između stacionarne faze, molekula koje se analiziraju i korištenog otapala. Stoga se komponente eluiraju različitom brzinom s kolone [54]. Detektori koji se najčešće koriste temelje se na apsorpciji ultraljubičastog (eng. *Ultra-violet*, UV) ili vidljivog zračenja (eng. *Visible*, VIS). Eluat protječe kroz UV/VIS detektor koji mjeri apsorpciju svjetla određene valne duljine u eluatu. Primjena odgovarajuće mobilne i stacionarne faze te brzina protoka mobilne faze kroz kolonu, odgovorne su za učinkovitost separacije molekula. Za tekućinsku kromatografiju s promjerom zrna od 5 do 10 μm potrebni su tlakovi od nekoliko milijuna Pa kojima se dobiva dovoljna brzina protoka kroz kolonu. Zbog visokih tlakova potrebna je skuplja i složenija oprema. Kolone su izrađene od čeličnih cijevi, ukoliko je tlak manji onda se upotrebljavaju i staklene cijevi debljih stijenki. Punilo koje se najviše upotrebljava je silikagel [55]. Za analizu patulina najviše se koristi HPLC s UV detekcijom ili fotodiodama (slika 12.).



Slika 12. HPLC uređaj na Zavodu za javno zdravstvo, Osijek.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Oprema i pribor

- Aparat: Tekućinski kromatograf s DAD detektorom (detektor s nizom dioda, eng. *Diode Array Detector*), 1290 Infinity System Agilent Technologies
- Kolona: zorbax Eclipse C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm ili ekvivalentna
- PTFE (eng. *Polytetrafluoroethylene*) kivete od 50 mL
- centrifuga
- vortexer
- pipete odgovarajućeg volumena
- staklene kapalice
- čašice
- C₁₈ kolone za pročišćavanje na SPE
- SPE vakuum Manifold

3.2. Kemikalije

Sve se kemikalije čuvaju u hladnjaku, a *stock* standard patulina u zamrzivaču.

- voda demineralizirana, $\leq 0,1 \mu\text{S}/\text{cm}^3$, svježa, svakodnevno profiltrirana na membrani 0,2 µm; stupanj čistoće 1 – prema SEP 034
- metanol (HPLC čistoće, proizvođač Merck)
- 10 % izopropanol, za ispiranje šprice (proizvođač Merck)
- standardna otopina patulina (osnovni, *stock* standard), 100 µg/mL (proizvođač Romer Labs)
- etil-acetat (proizvođač Merck)
- heksan (proizvođač Merck)
- octena kiselina (proizvođač Kemika d.d.)
- natrijev sulfat, bezvodni (proizvođač Kemika d.d.)
- natrijev hidrogenkarbonat (proizvođač Kemika d.d.)

3.3. Metoda i uvjeti metode

Metoda koja je primijenjena u ovome radu modificirana je normirana metoda HRN EN 15890:2010 koja opisuje postupke određivanja patulina u soku i pireu od jabuke. Princip metode je da se patulin ekstrahira iz uzorka dodatkom smjese otapala (etilacetat:heksan (3:2)) zatim vortexira i centrifugira. Alikvot ekstrakta pročisti se preko C₁₈ na SPE te se upari u struji dušika i otopi u vodi. Kvalitativno se patulin određuje HPLC-om pomoću UV detekcije.

Mobilna faza je smjesa metanola i vode, a ukupni protok je 1 mL/min. Maksimalni je tlak oko 202 bara. Volumen injektiranja je 20 µL, a temperatura kolone 20 °C. Vrijeme trajanja metode je 8 minuta dok je vrijeme nakon analize 1 minutu.

3.4. Uzorci i priprema uzoraka

Za analizu je prikupljeno 10 uzoraka soka od jabuke i 2 uzorka pirea od jabuke (dječje kašice). Na pet uzoraka označena je eko proizvodnja, dok na preostalih pet nije.

Uzorke je važno analizirati odmah s obzirom da se patulin raspada u baznom mediju. Odvagano je 1 g natrijevog hidrogen karbonata u PTFE kivetu i 10 g bezvodnog natrijevog sulfata. Zatim je dodano 10 mL smjese otapala etil-acetat:heksan (3:2). U pripremljenu je smjesu dodano 10 g pirea ili soka od jabuke. Oko 1 minutu miješalo se na vortexu i oko 1 minutu centrifugiralo na 900 okretaja u minuti.

Gornji organski sloj prebačen je u SPE C₁₈ kolonu za pročišćavanje te se zatim s 3 mL smjese otapala ispralo. Isprano je skupljeno u epruvetu gdje je prethodno dodano 50 µL 3% octene kiseline u etil-acetatu. Eluat je uparen u dušiku i zatim odmah otopljen u 1 mL vode. Zatim je uslijedila analiza na HPLC uređaju. Opisani tijek analize određivanja patulina prikazan je na slici 13.



Slika 13. Tijek analize određivanja patulina u prehrambenim proizvodima.

3.5. Priprema kalibracijskih otopina

MEDUSTANDARDNA OTOPINA PATULINA (1 µg/mL)

U odmjernu tikvicu od 10 mL, pipetirano je 0,1 mL standardne otopine (*stock* standard patulina, $c = 100 \mu\text{g/mL}$) te je nadopunjeno ultračistom vodom do oznake. Koncentracija dobivene otopine je 1 µg/mL.

RADNA STANDARDNA OTOPINA

U odmjernu tikvicu od 10 mL pipetirano je 0,20 mL, 0,25 mL, 0,375 mL, 0,60 mL i 0,75 mL međustandardne otopine patulina koncentracije 1 µg/mL i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.

3.6. Izražavanje rezultata

Masena koncentracija patulina izražava se u mjernoj jedinici $\mu\text{g}/\text{kg}$. Za masene koncentracije manje od granice kvantifikacije izražava se vrijednost manja od vrijednosti granice kvantifikacije na jednu značajnu znamenku. Za masene koncentracije veće od granice kvantifikacije vrijednost se izražava s jednom značajnom znamenkom. U tablici 2. parametri su validacije koji se određuju i njihovi kriteriji prihvatljivosti.

Tablica 2. Parametri validacije i kriterij prihvatljivosti.

Parametar	Kriterij prihvatljivosti
Linearnost	$r \geq 0,995$
Preciznost	$\text{RSD} \leq 20\%$
Točnost	$100 \pm 20\%$
Granica detekcije	informacija
Granica kvantifikacije	informacija

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Validacija analitičke metode za određivanje patulina

Točni podaci mogu se dobiti samo pomoću validiranih metoda. Prvi eksperimentalni dio je određivanje parametara validacije. U radu su se odredili sljedeći parametri: linearnost, preciznost (ponovljivost mjerenja i ponovljivost pripreme uzorka), točnost, granica detekcije i granica kvantifikacije.

4.1.1. Linearnost

Linearnost definiramo kao mogućnost metode davanja ispitnih rezultata unutar danog područja koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Ispitana je trostrukim mjerenjem svake koncentracije u rasponu od 0,02 do 0,075 $\mu\text{g/mL}$. U tablici 3. prikazani su rezultati određivanja linearnosti, a na slici 14. je grafički prikaz rezultata.

Kriterij prihvatljivosti za linearnost $k \geq 0,995$.

Tablica 3. Prikaz odnosa različitih koncentracija patulina i površina ispod pika.

Broj točaka	Koncentracija patulina $\gamma_1 / \mu\text{g mL}^{-1}$	Izmjerena površina pika (eng. <i>area</i>) ¹
1	0,02	2,38756
2	0,025	2,97057
3	0,0375	4,33870
4	0,05	5,59687
5	0,0625	7,32181
6	0,075	8,51451

¹ Izmjerena površina pika (μSmin) srednja je vrijednost tri mjerenja koja su očitana s uređaja

Pomoću sljedećih jednažbi određen je nagib pravca (a), odsječak na osi y (b) i koeficijent korelacije (r):

$$\text{jednažba pravca: } y = ax + b \quad (6)$$

$$\text{nagib pravca: } a = \frac{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})(yi - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2} \quad (7)$$

$$\text{odsječak na osi y: } b = \bar{y} - a\bar{x} \quad (8)$$

$$\text{koeficijent korelacije: } r = \frac{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})(yi - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (yi - \bar{y})^2}} \quad (9)$$

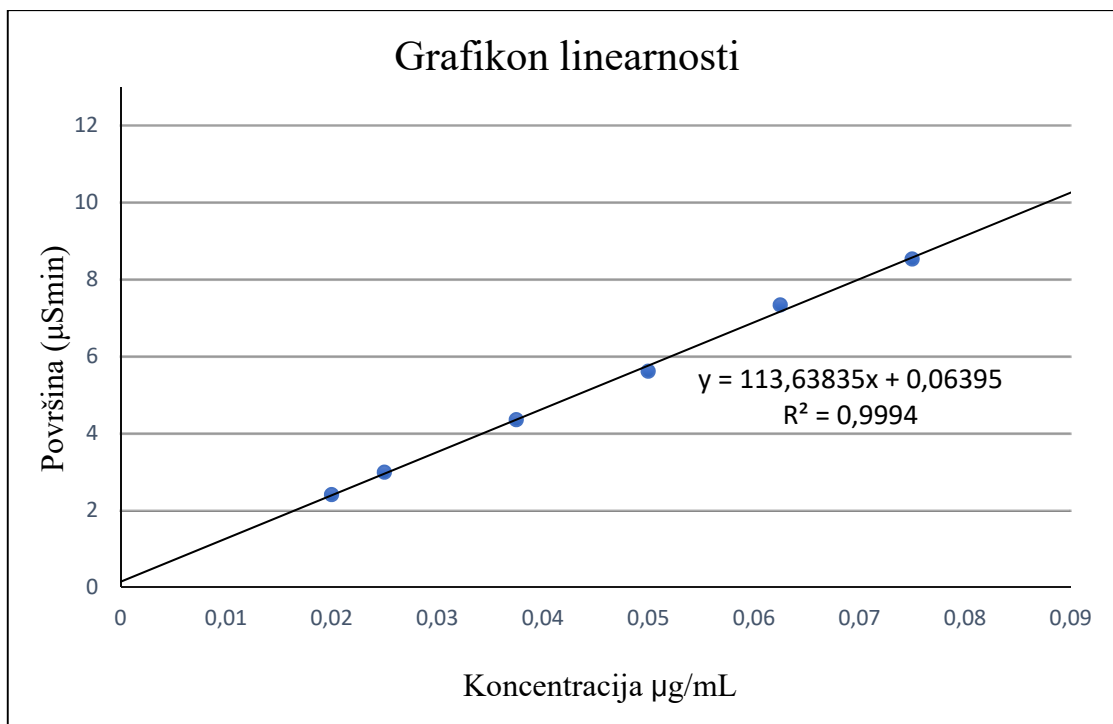
pri čemu je:

xi – koncentracija standardne otopine ($\mu\text{g/mL}$);

yi – površina pika kromatograma;

\bar{x} – srednja vrijednost koncentracija standardnih otopina;

\bar{y} – srednja vrijednost površina pika kromatograma.



Slika 14. Linearnost patulina u područjima koncentracija 0,020-0,075 µg/mL.

Iz podataka (tablica 3.) i jednadžbi (6)-(9) izračunati su navedeni koeficijenti:

nagib pravca: 113,63835

odsječak na osi y: 0,06395

koeficijent korelacije: $R^2 = 0,9994$

jednadžba pravca: $y = 113,63835x + 0,06395$.

Iz dobivenih podataka vidljiv je linearan odnos površina pikova kromatograma i koncentracija, a koeficijent korelacije iznosi 0,9994. Zaključujemo da je **zadovoljen** kriterij prihvatljivosti.

4.1.2. Preciznost

Preciznost definiramo kao slaganje između mjernih rezultata niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzorka, a izražava se kao relativna standardna devijacija (eng. *relative standard deviation*, RSD %). Izražena je preko ponovljivosti pripreme uzorka i ponovljivosti mjerenja. Kriterij prihvatljivosti je $RSD \leq 20\%$.

PONOVLJIVOST PRIPREME UZORKA

Za provjeru ponovljivosti pripreme uzorka, pripremljen je isti uzorak ne eko soka od jabuke tri puta. Svaki uzorak je mjeran dva puta te su izračunati SD i RSD (%). Dobiveni su rezultati prikazani u tablici 4. kao srednje vrijednosti površina ispod pikova i koncentracija.

Tablica 4. Prikaz rezultata ponovljivosti pripreme uzorka.

Uzorak	Površina ispod pika	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)
Ne eko1-1	1,1764	<0,00986
	1,4865	0,00992
Ne eko1-2	1,1883	<0,00986
	1,3047	<0,00986
Ne eko1-3	1,3838	<0,00986
	1,2607	<0,00986
Srednja vrijednost	1,3001	<0,00986
SD	0,1089	0,00078
RSD (%)	8,4	9,1

Iz dobivenih podataka zaključujemo da ponovljivost pripreme uzorka **zadovoljava** kriterij prihvatljivosti jer je RSD 8,4%, a kriterij prihvatljivosti iznosi $\text{RSD} \leq 20\%$.

PONOVLJIVOST MJERENJA

Pripremljen je jedan uzorak soka od jabuke za provjeru ponovljivosti mjerenja, koji je mjeran 12 puta. U uzorak je dodan standard, kako bi se mogla odrediti ponovljivost. Rezultati su izraženi preko srednje vrijednosti retencijskih vremena, koncentracije i površine pikova te SD i RSD (%) što je vidljivo u tablici 5.

Tablica 5. Prikaz ponovljivosti mjerenja vremena zadržavanja.

Broj injektiranja	Rt (min)	Površina ($\mu\text{S}/\text{min}$)	Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	4,727	3,6389	0,0254
2	4,709	4,5750	0,0321
3	4,705	4,9784	0,0350
4	4,703	4,8279	0,0339
5	4,705	4,7384	0,0333
6	4,705	4,1032	0,0287
7	4,709	4,8182	0,0339
8	4,707	5,1131	0,0360
9	4,710	4,8609	0,0342
10	4,703	4,5148	0,0317
11	4,707	4,5039	0,0316
12	4,707	4,3954	0,0308
Srednja vrijednost	4,708	4,5890	0,0322
SD	0,006	0,3896	0,0028
RSD (%)	0,1	8,5	8,7

Iz tablice je vidljivo da sve relativne standardne devijacije **zadovoljavaju** kriterij prihvatljivosti $\text{RSD} \leq 20\%$. Ponovljivost retencijskog vremena (R_t) za određivanje patulina iznosi 0,1%, ponovljivost mjerenja površine pika iznosi 8,5%, a ponovljivost koncentracije patulina 8,7%.

4.1.3. Točnost

Točnost definiramo kao stupanj slaganja između srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih (referentnih) vrijednosti dobivenih pri nekoliko uzastopnih mjerenja. Točnost je provjerena na dva uzorka soka od jabuke i jednom uzorku pirea od jabuke. Istinitost odnosno točnost izražavamo računajući iskorištenje. Iskorištenje računamo kao omjer izmjerene koncentracije patulina u uzorku i nacijske koncentracije, a izražava se kao postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analize. Uzorci su se

nacijepljivali s 1 mL standardne otopine koncentracije 0,05 µg/mL. Kriterij prihvatljivosti za točnost odnosno iskorištenje patulina je $100 \pm 20\%$.

Točnost za ne ekološki sok 1:

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,14715443 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,3821 \text{ g}} = 0,057 \mu\text{g/g}$$

$$REC = \frac{\gamma(\text{uzorka})}{\gamma(\text{nacijepljeno})} = \frac{0,0567 \mu\text{g/g}}{0,0480 \mu\text{g/g}} = 1,18125 \times 100 = 118,1\%$$

Točnost za ekološki sok 1:

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,1280279 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,4785 \text{ g}} = 0,04887 \mu\text{g/g}$$

$$REC = \frac{\gamma(\text{uzorka})}{\gamma(\text{nacijepljeno})} = \frac{0,04887 \mu\text{g/g}}{0,04785 \mu\text{g/g}} = 1,0213 \times 100 = 102,1\%$$

Točnost za kašicu 1:

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,1023329 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,1397 \text{ g}} = 0,04037 \mu\text{g/g}$$

$$REC = \frac{\gamma(\text{uzorka})}{\gamma(\text{nacijepljeno})} = \frac{0,04037 \mu\text{g/g}}{0,049747 \mu\text{g/g}} = 0,8115 \times 100 = 81,2\%$$

Zaključujemo da iskorištenja za ne ekološki uzorak 1 (118,1%) i za ekološki uzorak 1 koji iznosi 102,1% **zadovoljavaju** kriterij prihvatljivosti. Primjećujemo da i kašica 1 (81,2%) **zadovoljava** kriterij prihvatljivosti koji je u rasponu od 80 do 120%.

4.1.4. Granica detekcije

Granica detekcije najniža je koncentracija analita u uzorku koja se može detektirati (dokazati) uz odgovarajuću preciznost i točnost.

Određuje se pomoću jednadžbe :

$$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{a}$$

σ - standardna devijacija iznosi 0,11204²

a – nagib pravca iz jednadžbe pravca 113,63835.

Uvrštavanjem u jednadžbu granica detekcije iznosi **0,00325 µg/mL (3,25 µg/kg)**.

4.1.5. Granica kvantifikacije

Pod pojmom granica kvantifikacije podrazumjeva se najniža koncentracija analita u uzorku koja se može kvantificirati (odrediti) uz odgovarajuću preciznost i točnost.

Određuje se pomoću jednadžbe:

$$LOD = \frac{10 \times \sigma}{a}$$

σ - standardna devijacija iznosi 0,11204³

a – nagib pravca iz jednadžbe pravca 113,63835.

Uvrštavanjem u jednadžbu granica kvantifikacije iznosi **0,00986 µg/mL (9,86 µg/kg)**.

² Očitano sa kromatograma kalibracije.

³ Očitano sa kromatograma kalibracije.

4.2. Koncentracija patulina u prehrambenim uzorcima

Određene su i masene koncentracije patulina u prehrambenim proizvodima. Točnije, u deset uzoraka soka od jabuke i 2 pirea od jabuke određene su koncentracije patulina. Koncentracije su izračunate prema jednadžbi (8). Rezultati za pojedini uzorak nalaze se u tablici 7.

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} \quad (11)$$

$\gamma(\text{uzorka})$ = masena koncentracija patulina u uzorku;

$\gamma(\text{izmjerena})$ = srednja vrijednost masenih koncentracija patulina u uzorku;

V = volumen;

m = masa uzorka.

Tablica 7. Prikaz koncentracija patulina u pojedinom uzorku.

Broj	Proizvod	Koncentracija patulina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1.	Ne eko 1	<9,86
2.	Ne eko 2	<9,86
3.	Ne eko 3	<9,86
4.	Ne eko 4	<9,86
5.	Ne eko 5	<9,86
6.	Eko 1	<9,86
7.	Eko 2	<9,86
8.	Eko 3	<9,86
9.	Eko 4	<9,86
10.	Eko 5	<9,86
11.	Kašica 1	<9,86
12.	Kašica 2	<9,86

Kao što je navedeno u pravilniku o najvećim dopuštenim količinama kontaminanata u hrani (NN 146/12), maksimalna dopuštena količina patulina u sokovima od jabuke iznosi 50 µg/kg, a za dječju hranu na bazi voća granica je puno manja i iznosi 10 µg/kg. U 10 analiziranih sokova od jabuke nisu pronađene veće količine patulina. Iz tablice 7. vidljivo je da su sve vrijednosti u analiziranim uzorcima manje od granice kvantifikacije. Promatrajući ekološku i ne ekološku proizvodnju zaključujemo da je, s obzirom na patulin, kvaliteta proizvoda jednaka. S ovog gledišta ne možemo sa sigurnošću tvrditi, da su ekološki proizvodi bolji u odnosu na ne ekološke. Kao što je vidljivo u tablici 7., koncentracija patulina u kašicama za djecu zadovoljava maksimalno dopuštenu količinu. Zaključujemo da proizvođači kvalitetno vode brigu o skladištenju jabuka kao i o samoj proizvodnji te da su količine nastanka mikotoksina na voću minimalne. U tablici 8. prikazani su određivani parametri validacije, kriterij prihvatljivosti i dobiveni rezultati validacije HPLC metode za određivanje patulina u prehrambenim proizvodima.

Tablica 8. Sažetak rezultata parametara validacije.

Parametar validacije	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat	Zadovoljava kriterij (DA/NE)
Linearnost	$r \geq 0,995$	0,999	DA
Preciznost	RSD	RSD=8,5%	DA
Ponovljivost mjerenja	$RSD \leq 20\%$	RSD(Rt) = 0,1% RSD(y) =8,5%	DA
Ponovljivost pripreme uzorka	$RSD \leq 20\%$	RSD = 8,4%	DA
Točnost	$100 \pm 20\%$	118,1% 102,1% 81,2%	DA DA DA
Granica detekcije	informacija	3,25 µg/kg	DA
Granica kvantifikacije	informacija	9,86 µg/kg	DA

5. ZAKLJUČAK

Mikotoksin patulin jedan je od indikatora kvalitete u sokovima od jabuke. Kao i ostali mikotoksini, njegova prisutnost povećava zabrinutost za zdravlje potrošača. Voće je kiselog karaktera, a plijesni i kvasci izvrsno podnose kiselu sredinu. Upravo zbog toga, plijesni su glavni uzročnici kvarenja voća. Problem niske kvalitete je čest za jabuke proizvedene kod malih proizvođača čija kontrola kvalitete nije standardizirana. Kvalitetno analitičko mjerenje osigurava pouzdane analitičke rezultate. Kako bismo dobili pouzdan i točan analitički rezultat, potrebno je validirati metodu.

U ovome radu provedena je djelomična validacija normirane HPLC metode za određivanje patulina u prehrambenim proizvodima na području Slavonije. Normirane metode omogućuju djelomičnu validaciju dok ne normirane zahtijevaju potpunu validaciju. Djelomičnom validacijom analiziraju se samo neki parametri. Tako su analizirani linearnost, preciznost, točnost, granica detekcije i kvantifikacije. Parametri linearnost, preciznost te granica detekcije i kvantifikacije zadovoljavaju zakonsku regulativu. Parametar točnosti određivan je na tri različita uzorka soka od jabuke i kašice. Kašica i uzorci ekološki i ne ekološki zadovoljili su kriterij prihvatljivosti. Zbog toga potvrđujemo da ova metoda odgovara namijenjenoj svrsi.

U radu su se odredile i koncentracije patulina u ekološkim i ne ekološkim uzorcima soka od jabuke i u kašicama. Prema pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/12) koncentracije patulina u svim određivanim uzorcima su ispod maksimalne dopuštene granice. Promatrajući ekološku i ne ekološku proizvodnju, zaključili smo da je s obzirom na patulin kvaliteta proizvoda jednaka. Ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su ekološki proizvodi bolji u odnosu na ne ekološke sa ovog gledišta.

6. PRILOZI

Izračuni masenih koncentracija patulina u 12 uzoraka soka od jabuke te izračun točnosti za 2 uzorka kašica od jabuka.

Ne ekološki sok od jabuke:

$$V(\text{otapala}) = 10 \text{ mL}$$

$$V(\text{vode}) = 1 \text{ mL}$$

$$V(\text{aliquot}) = 2,5 \text{ mL}$$

1.

$$m(\text{uzorka}) = 10,3904 \text{ g}$$

$$\gamma(\text{srednja vrijednost 2 mjerenja}) = 0 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,3904 \text{ g}} = 0 \text{ } \mu\text{g/g}$$

2.

$$m(\text{uzorka}) = 10,3156 \text{ g}$$

$$\gamma(\text{srednja vrijednost 2 mjerenja}) = 0,01560 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,01560 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,3156 \text{ g}} =$$

$$0,00605 \text{ } \mu\text{g/g}$$

3.

$$m(\text{uzorka}) = 10,3942 \text{ g}$$

$$\gamma(\text{srednja vrijednost dva mjerenja}) = 0,00020113 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,00020113 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,3942 \text{ g}} =$$

$$0,0000774 \text{ } \mu\text{g/g}$$

4.

$$m(\text{uzorka}) = 10,2519 \text{ g}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost dva mjerenja}) = 0 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,2519 \text{ g}} = 0 \text{ } \mu\text{g/g}$$

5.

$$m(\text{uzorka}) = 10,4138 \text{ g}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost dva mjerenja}) = 0 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,4138 \text{ g}} = 0 \text{ } \mu\text{g/g}$$

Ekološki sok od jabuke:

1.

$$m(\text{uzorka}) = 10,3875 \text{ g}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost dva mjerenja}) = 0,00440136 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,00440136 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,3875 \text{ g}} = 0,0016949 \text{ } \mu\text{g/g}$$

2.

$$m(\text{uzorka}) = 10,4046 \text{ g}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost dva mjerenja}) = 0,0058123 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,0058123 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,4046 \text{ g}} = 0,0022345 \text{ } \mu\text{g/g}$$

3.

$$m(\text{uzorka}) = 10,2907 \text{ g}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost dva mjerenja}) = 0,00205593 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,00205593 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,2907 \text{ g}} = 0,00079914 \mu\text{g/g}$$

4.

$$m(\text{uzorka}) = 10,4777 \text{ g}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost dva mjerenja}) = 0,00144122 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,00144122 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,4777 \text{ g}} = 0,0005502 \mu\text{g/g}$$

5.

$$m(\text{uzorka}) = 10,5659 \text{ g}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost dva mjerenja}) = 0,00180687 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,00180687 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,5659 \text{ g}} = 0,000684038 \mu\text{g/g}$$

Kašica od jabuke:

1.

$$m(\text{uzorka}) = 10,002 \text{ g}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost dva mjerenja}) = 0,0021673 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,0021673 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,002 \text{ g}} = 0,000866746 \mu\text{g/g}$$

2.

$$m(\text{uzorka}) = 10,0364 \text{ g}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost dva mjerenja}) = 0,000411 \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,000411 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,0364 \text{ g}} = 0,000163803 \mu\text{g/g}$$

Točnost:

Nacijepljena koncentracija ne ekološki 1

$$m(\text{neeko 1 REC}) = 19,8382 \text{ g} + 1 \text{ g}$$

$$m(\text{ukupno}) = 20,8247 \text{ g}$$

$$\gamma(\text{nacijepljeno}) = \frac{\gamma(\text{std}) \times V(\text{dodano})}{m(\text{ukupna})} = \frac{1 \mu\text{g/mL} \times 1 \text{ mL}}{m(\text{soka}) + 1 \text{ g}} = \frac{1 \mu\text{g}}{20,8247 \text{ g}} = 0,04802 \mu\text{g/g}$$

$$m(\text{uzorka}) = 10,3821 \text{ g}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost; nacijepljena}) = 0,14715443 \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma (\text{srednja vrijednost; SP}) = 0 \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{izmjerena}) = \gamma(\text{ nacijepljeno}) - \gamma(\text{slijepa proba})$$

$$= (0,14715443 - 0) \mu\text{g/mL} = 0,14715443 \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,14715443 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,3821 \text{ g}} = 0,05669544 \mu\text{g/g}$$

Iskorištenje:

$$REC = \frac{\gamma(\text{uzorka})}{\gamma(\text{nacijepljeno})} = \frac{0,0567 \mu\text{g/g}}{0,0480 \mu\text{g/g}} = 1,18125 \times 100 = 118,1\%$$

Nacijepljena koncentracija ekološki 1 REC:

$$m(\text{ukupno}) = 20,8991 \text{ g}$$

$$\gamma(\text{nacijepljeno}) = \frac{\gamma(\text{std}) \times V(\text{dodano})}{m(\text{ukupna})} = \frac{1 \mu\text{g/mL} \times 1 \text{ mL}}{m(\text{soka}) + 1 \text{ g}^*} = \frac{1 \mu\text{g}}{20,8991 \text{ g}} = 0,047849 \mu\text{g/g}$$

$$m(\text{uzorka}) = 10,4785 \text{ g}$$

$$\gamma(\text{srednja vrijednost, nacijepljena}) = 0,12859 \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{srednja vrijednost, SP}) = 0,000562131 \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{izmjerena}) = \gamma(\text{nacijepljena}) - \gamma(\text{SP})$$

$$= (0,12859 - 0,000562131) \mu\text{g/mL} = 0,12802787 \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{uzorka}) = \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,1280278 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,4785 \text{ g}} =$$

$$0,04887 \mu\text{g/g}$$

Iskorištenje:

$$REC = \frac{\gamma(\text{uzorka})}{\gamma(\text{nacijepljeno})} = \frac{0,04887 \mu\text{g/g}}{0,04785 \mu\text{g/g}} = 1,0213 \times 100 = 102,13\%$$

Nacijepljena koncentracija kašica 1 REC:

$$m(\text{neeko 1 REC}) = 19,082 \text{ g} + 1 \text{ g}$$

$$m(\text{ukupno}) = 20,1016 \text{ g}$$

$$\gamma(\text{nacijepljeno}) = \frac{\gamma(\text{std}) \times V(\text{dodano})}{m(\text{ukupna})} = \frac{1 \mu\text{g/mL} \times 1 \text{ mL}}{m(\text{soka}) + 1 \text{ g}^*} = \frac{1 \mu\text{g}}{20,1016 \text{ g}} = 0,049747 \mu\text{g/g}$$

$$m(\text{uzorka}) = 10,1397 \text{ g}$$

$$\gamma(\text{srednja vrijednost, nacijepljena}) = 0,1045002 \mu\text{g/mL}$$

$$\gamma(\text{srednja vrijednost, SP}) = 0,0021673 \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{aligned}\gamma_I (\text{izmjerena}) &= \gamma(\text{nacijepljena}) - \gamma(\text{SP}) \\ &= (0,1045002 - 0,0021673) \mu\text{g/mL} = 0,1023329 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\gamma(\text{uzorka}) &= \frac{\gamma(\text{izmjerena}) \times V(\text{otapala}) \times V(\text{vode})}{V(\text{aliquot}) \times m(\text{uzorka})} = \frac{0,1023329 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} \times 10,1397 \text{ g}} = \\ &0,04037 \mu\text{g/g}\end{aligned}$$

Iskorištenje:

$$REC = \frac{\gamma(\text{uzorka})}{\gamma(\text{nacijepljeno})} = \frac{0,04037 \mu\text{g/g}}{0,049747 \mu\text{g/g}} = 0,8115 \times 100 = 81,2\%$$

7. LITERATURA

1. Z. Knežević, Osiguranje kvalitete u analitičkom laboratoriju, *Hrana i zdravlje* 3, (2007) 1-5.
2. P. van Zoonen, R. Hoogerbrugge, S. M. Gort, H. J. van de Wiel, H. A. van 't Klooster, Some practical examples of method validation in the analytical laboratory, *Trends in Analytical Chemistry* 18 (1999) 584-593.
3. I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, *Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004) 535-552.
4. <http://struna.ihjj.hr/naziv/validacija/8718/> (12.10.2018.)
5. M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835-855.
6. European Commission, Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Commun.* L 221/8, 17.8.2002.
7. K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, *Svijet po mjeri: časopis za mjeriteljstvo, normizaciju, akreditaciju i ocjenjivanje sukladnosti* 1 (2012) 61-64.
8. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf (12.10.2018.)
9. D.B. Hibbert, Method validation of modern analytical techniques. *Accred. Qual. Assur.* 4 (1999) 352-356.
10. <https://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/analytical-method-validation> (6.11.2018.)
11. https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/4_AK2_stat.pdf (24.11.2018.)
12. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_01_2_16.html (7.12.2018.)
13. J. Peris-Vicente, J. Esteve-Rimero, S. Carda-Broch, Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An overview, *Analytical Separation Science*, (2015) 1757-1804.
14. J. Tannous, A. Atoui, A. E. Khoury¹, Z. Francis¹, I. P. Oswald, O. Puel, R. Lteif, A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: effect of temperature, pH, and water activity, *Food Science & Nutrition* 2016; 4(4): 611–622.

15. S. Pires, J. Lopes, I. Nunes, E. Gaspar, Patulin Analysis: Sample Preparation Methodologies and Chromatographic Approaches, InTech (2012) 75-87.
16. J. W. Bennett, Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. *Mycopathologia*, Vol.100, No.1, (1987) 3-5.
17. J. W. Bennett, M. Klich, Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol.16, No.3, (2003) 497-516.
18. C. A. Robbins, L. J. Swenson, M. L. Neally, B. J. Kelman, R. E. Gots, Health Effects of Mycotoxins in Indoor Air: A Critical Review. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, Vol.15, No.10, (2000) 773-784.
19. E. M. Binder, L. M. Tan, L. J. Chin, J. Handl, J. Richard. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients, *Animal Feed Science Technology* 137 (2007) 265–282.
20. A. D. Sant'Ana, A. Rosenthal, P. R de Massaguer, The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Research International*, Vol.41, No.5, (2008) 441-453.
21. D. Abramson, J. T. Mills, R. R. Marquardt, A. A Frohlich, (Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from western Canada, 1982-1994 *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol.61, No.1, (1997) 49-52.
22. B. Andersen, J. Smedsgaard, and J. C. Frisvad. *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *J.Agric. Food Chem* 52 (2004) 2421–2428.
23. P. G. Sanderson, and R. A. Spotts. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology* 85 (1995) 103–110.
24. M. M. Moake, O. I. Padilla-Zakour, and R. W. Worobo. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 4 (2005) 8–21.
25. R. Krska, P. Schubert-Ullrich, A. Molinelli, M. Sulyok, S. Macdonald, C. Crews, Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants*, Vol.25, No.2, (2008) 152-163.
26. G.S. Shephard, Determination of mycotoxins in human foods. *Chemical Society Reviews*, Vol.37, No.11, (2008) 2468-2477.
27. https://www.hah.hr/arhiva/index_potrosacki.php?id=900 (11.1.2019.)
28. T. Ross, and T. A. McMeekin. Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 23 (1994) 241–264.

29. A. D. Sant'Ana, A. Rosenthalde, P. R. Massaguer, The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Research International*, Vol.41, No.5, (2008) 441-453.
30. W. L. Bryden, Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16 (2007) 95–101.
31. K. F. Nielsen, J. Smedsgaard, Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*, Vol.1002, No.1-2, (2003) 111-136.
32. S. Collin, E. Bodart, C. Badot, A. Bouseta, S. Nizet, Identification of the main degradation products of patulin generated through heat detoxication treatments. *Journal of the Institute of Brewing*, Vol.114, No.2, (2008) 167-171.
33. A. Ciegler, R.W. Detroy, E. B. Lillehoj, Patulin, penicillic acid, and other carcinogenic lactones. in: *Microbial toxins*, Vol. 6 (1971) 409-414.
34. https://sh.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Patulin_3d_structure.png (4.12.2018.)
35. N. F. Sommer, J. R. Buchanan, R. J. Fortlage, Production of Patulin by *Penicillium-Expansum*. *Applied Microbiology*, Vol.28, No.4 (1974) 589-593.
36. IARC, An updating of IARC monographs Volumes 1 to Supplement 7. IARC, Lyon.
37. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6062217/> (17.01.2019.)
38. R. E. Dailey, A. M. Blaschka, E. A. Brouwer, Absorption,distribution and excretion of [14C] patulin by rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 3 (1977) 479–489.
39. R. Fliege, M. Metzler, Electrophilic properties of patulin. Adduct structures and reaction pathways with 4-bromothiophenol and other model nucleophiles, *Chemical Research in Toxicology* 13 (2000) 373-381.
40. R. T. Riley, J. L. Showker, The mechanism of patulin's cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids, *Toxicol Appl Pharmacol.* 109 (1991) 108-26.
41. K. Baert, A. Valero, B. De Meulenaer, S. Samapundo, M.M. Ahmed, L. Bo, Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. *Int. J. Food Microbiol.* 118 (2007) 139–150.
42. L. Nazari, E. Patteri, V. Terzi, C. Morcia, V. Rossi, Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F.sporotrichioides* in durum wheat, *Food Microbiol.* 39 (2014) 19–26.

43. J. Rousk, P. C. Brookes, and E. Baath, Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 1589–1596.
44. R. N. Wu, F. L. Han, J. Shang, H. Hu, L. Han, Analysis of patulin in apple products by liquid-liquid extraction, solid phase extraction and matrix solid-phase dispersion methods: a comparative study. *European Food Research and Technology*, Vol.228, No.6, (2009) 1009-1014.
45. M. H. Iha, M. Sabino, Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography, *Journal of AOAC International*, Vol.89, No.1, (2006) 139-143.
46. S. MacDonald, M. Long, J. Gilbert, I. Felgueiras, Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, Vol.83, No.6, (2000)1387-1394.
47. https://www.researchgate.net/figure/Stages-of-solid-phase-extraction-SPE_fig3_312498761 (15.5.2019.)
48. <http://www.sge.com/products/meps> (14.1.2019.)
49. https://www.researchgate.net/figure/MEPS-procedure-steps-SGE_2009_fig2_221923800 (14.1.2019.)
50. V. Sewram, J. J. Nair, T. W. Nieuwoudt, N. L. Leggott, G. S. Shephard, Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Vol.897, No.1-2, (2000) 365-374.
51. A. Moukas, P. Markaki, V. Panagiotopoulou, Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. *Food Chemistry*, Vol.109, No.4, (2008) 860-867.
52. F. Sheu, Y. T. Shyu, Analysis of patulin in apple juice by diphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.47, No.7, (1999) 2711-2714
53. R. Tsao, T. Zhou, Micellar electrokinetic capillary electrophoresis for rapid analysis of patulin in apple cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.48, No.11, (2000) 5231-5235.
54. V. Bansal, R. Malviya, O. P. Pal, P. K. Sharma, High performance liquid chromatography: a short review, *Journal of Global Pharma Technology* 2 (2010) 22-26.

55. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.