



HPLC METODU İLE PATULİN TAYİNİNDE TEK LABORATUVAR METOT VALİDASYON ÇALIŞMASI

Ceren BAYRAÇ^{1,*}, Gülnur CAMIZCI¹

¹Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Karaman, Türkiye

ÖZET

Patulin, başlıca olarak *Penicillium* türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir. Başta elma olmak üzere birçok meyve, meyve suyu, badem, fındık gibi gıdalarda sentezlendiği bilinmektedir. İnsan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle çeşitli gıdalarda patuline ait maksimum bulunma limitleri belirlenmiştir. Bu nedenle, günümüzde doğru ve güvenilir patulin tespit yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, HPLC yöntemiyle patulin varlığının tespiti ve miktar tayini için metot validasyon çalışması yürütülmüş ve metot performans parametreleri belirlenmiştir. Validasyon çalışması sonucuna göre 5.0, 25.0 ve 50.0 µg/mL patulin konsantrasyonlarına sahip tampon çözelti içerisindeki standart patulin çözeltileri için metoda ait geri kazanım (%) ve tekrarlanabilirlik (% RSDr) değerleri aynı gün ve farklı günlerde yapılan çalışma sonuçlarına göre kabul edilebilir limitler içindedir. Ayrıca, metoda ait belirsizlik bütçesinde kalibrasyon eğrisinden, geri kazanımdan ve tekrarlanabilirlikten gelen bileşenler hesaplanmış ve % 95 güven aralığında (k=2) 5.0 (µg /mL) ± 1.8449 (µg /mL), 25.0 (µg /mL) ± 0.7974 (µg /mL) ve 50.0 (µg /mL) ± 0.0819 (µg /mL) olarak rapor edilmiştir. Valide edilmiş bu yöntem ile elma suyuna dışarıdan 5 µg/mL olacak şekilde eklenen patulinin güvenilir tayini de gerçekleştirilmiştir. Metoda ait ölçüm belirsizliği aralığında kabul edilebilir % geri kazanım ve % RSDr değerleri ile elma suyu örneklerindeki patulin miktarı 3.678 µg /mL olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Patulin, HPLC, Metot validasyonu, Ölçüm belirsizliği

SINGLE LABORATORY VALIDATION OF HPLC METHOD FOR PATULIN DETERMINATION

ABSTRACT

Patulin is a mycotoxin that is produced mainly by *Penicillium* species. It is known to be synthesized in many foods such as fruits, especially apple, fruit juices, almonds and hazelnuts. Due to its adverse effect on human and animals, the maximum limits of patulin have been determined in certain foods. Therefore, accurate and reliable detection methods are required for patulin nowadays. In this study, method validation study was carried out for determination and quantification of patulin by HPLC method and method performance parameters were determined as results. Based on validation results obtained at the same day and different days, the recovery (%) and repeatability (RSDr %) values for standard patulin solutions prepared in buffers at the patulin concentration of 5.0, 25.0 and 50.0 mg /mL were found within the acceptable limits. Moreover, the contribution of uncertainties from calibration curve, recovery and repeatability were calculated and the results were reported as 5.0 (µg /mL) ± 1.845 (µg /mL), 25.0 (µg /mL) ± 0.797 (µg /mL) and 50.0 (µg /mL) ± 0.082 (µg/mL) within the confidence level of 95% (k=2). Also, a reliable determination of patulin added to the apple juice at 5 µg /mL was performed with this validated method. In the range of method's measurement uncertainty, patulin amount were determined as 3.678 µg /mL in apple juice samples.

Keywords: Patulin, HPLC, Method Validation, Measurement uncertainty

1. GİRİŞ

Patulin özellikle *Penicillium* olmak üzere *Aspergillus*, *Paecilomyces* ve *Byssoschlamys* gibi mantarlarının çeşitli türleri tarafından ikincil metabolit olarak üretilen bir mikotoksindir [1,2]. Patulin, 4-hidroksi- 4H-furo [3, 2- C] piran-2 (6H)-on olarak da bilinir. Kapalı formülü C₇H₆O₄, molekül ağırlığı 154,12 g/mol ve yoğunluğu 1,52 g/cm³'tür. Su, etil alkol, aseton, etil asetat ve kloroformda çok iyi çözüldüğü bilinmektedir [3]. Doğada toprak, hava ve su gibi doğal kaynaklarda bulunmasının yanı sıra ortam sıcaklığı, pH, süre, ortamdaki besin maddeleri ve ozmotik basınca bağlı olarak özellikle elma ve elma ürünleri

* Sorumlu yazar / Corresponding author, e-posta / e-mail: cbayrac@kmu.edu.tr

Geliş / Recieved: 01.04.2019 Kabul / Accepted: 20.11.2019 doi: 10.28948/ngumuh.547635

B. Ceren, C. Gülmur

gibi gıdalarda da bulunmaktadır. İlk olarak suda çözünebilir geniş kapsamlı bir antibiyotik olarak kullanılan patulin, daha sonraları insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri nedeniyle toksin olarak değerlendirilmiştir [2-6]. İnsan ve hayvan sağlığı üzerindeki etki mekanizması incelendiğinde sülfidril gruplarına karşı gösterdiği yüksek bağlanma afinitesinden dolayı birçok enzimin fonksiyonlarını değişme veya engelleme durumları belirlenmiştir [2,7,8]. Patulin üreten mantarların çeşitli meyve ve meyve ürünlerinde bulunması sonucu akut, kronik ve hücre seviyesinde sağlık problemlerine sebep olduğu bilinmektedir [1]. Yapılan çalışmalarda elma, üzüm, kiraz, armut, kayısı, hurma, çilek, nektarin, ahududu, karadut, beyaz dut, şeftali, erik, domates, muz, yaban mersini, siyah kuş üzümü, badem, ceviz, yer fıstığı ve fındık gibi kontamine olmuş ürünlerin tüketimi bağırsak iltihabı, kusma, böbrek hasarı, ödem, sindirim sisteminde şişkinlik, kanama, dejenerasyon ve bunun gibi akut semptomlara sebep olduğu bulunmuştur. Bunların yanı sıra patulinin nörotoksik, immunotoksik, genotoksik, teratojenik ve karsinojenik etkilerinin olduğu da belirtilmektedir [9-16].

Immunolojik, nörolojik, karsinojenik ve gastrointestinal sağlık problemine neden olması nedeniyle pek çok ülkede maksimum bulunma limitleri belirlenmiştir [17-22]. Codex Alimentarius ile Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) elma suları ve elma içerikli diğer gıda ürünleri için izin verilen en yüksek düzeyi 50 µg/kg olarak belirlemiş, Avrupa Birliği ise bu üst sınırı elma suyu ürünlerinde 50 µg/kg, katı elma ürünlerinde 25 µg/kg ve bebek mamalarında 10 µg/kg olarak belirlenmiştir [6]. Ülkemizde ise 2011 yılında 28157 sayılı resmi gazetede yayınlanan "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği"nde Avrupa Birliğine uyumlu olarak patulin için elma suyunda maksimum limit 50 µg/kg olarak belirtilmiştir [23]. Daha önce yapılan çalışmalarda ülkemizde patulin içeren elma suyu örneklerine rastlanmıştır. Örneğin; 1994 yılında yapılan çalışmada bir firmanın değişik zamanlarda ürettiği 215 adet elma suyu örneğinden 98 tanesinde standartlar üzerinde patulin miktarı tespit edilmiş [24], 2001 yılında yapılan çalışmada ise piyasadaki 45 elma suyu örneğinin 42'sinde 50 µg/L düzeyinin üzerinde patulin saptanmıştır [25]. Dolayısıyla, patulin varlığının tespit edilmesi ve miktar tayininin yapılması çok önemlidir. Literatüre bakıldığında, ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC) ve gaz-kromatografisi kütle spektroskopisi (GC-MS) ile patulin ve patulin türevlerinin tayinine yönelik çalışmalar bulunmaktadır [26-28]. Günümüzde patulin tayini için sıklıkla kullanılan metot Ultraviyole (UV) ya da fotodiyot (DAD) dedeksiyon ile HPLC metodudur [29-31]. Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC)'nin yayınladığı standart metoda göre elma sularında patulin tayini 276 nm'de UV dedektör ile gerçekleştirilmektedir [32].

Bu çalışma kapsamında, patulin tayini için belirlenen HPLC metodunun tek laboratuvar metot validasyon çalışması yapılmış ve bu verilerle metoda ait ölçüm belirsizliği belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Kimyasallar ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan patulin (\geq %98.0), HPLC analizinde kullanılan asetik asit (%99.0) ve asetonitril (%99.0) Sigma Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Çalışmalar 0.01 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle 0.1 M tampon çözelti 40 g NaCl, 1 g KCl, 7.2 g Na₂HPO₄ ve 1.2 g KH₂PO₄ tartılarak 500 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Daha sonra bu tampon çözelti 1/10 oranında seyreltilerek 0.01M olarak patulin çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Stok patulin çözelti 0.01 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) kullanılarak hazırlanmıştır. 5 mg patulin 1 mL 0.01 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Standart patulin çözeltileri ise stok çözeltinin 0.01 M fosfat tamponu ile seyreltilmesiyle elde edilmiştir. Hazırlanan stok ve standart patulin çözeltileri -20°C'de saklanmıştır.

Elma suyu örnekleri marketten temin edilen %99.5 elma suyu konsantrasyonundan üretilmiş ve 11.35 °Briks değerine sahip elma suyu örnekleridir. Elma suları çalışma boyunca 4°C'de saklanmıştır.

2.2 HPLC koşulları

HPLC analizi için Agilent 1260 Infinity cihazı kullanılmıştır. Standart patulin çözeltileri filtreledikten sonra 250 mm uzunluğunda, 4.6 mm çapında C18 kolonunda (ACES C18 250 mm*4.6 mm, 5 µm parçacık boyutu) DAD dedektörü ile 276 nm 'de analiz edilmiştir. Analiz koşulları; 25°C sıcaklık, 1.0mL/dak akış hızı, 20 µL enjeksiyon hacmidir ve % 0.1 asetik asit içeren asetonitril:su (10:90, h:h) mobil fazdır. Patulin miktar tayini her örnek için üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

2.3 Metot validasyon çalışması

Bu çalışma kapsamında yapılan metot validasyon çalışmasında değerlendirilen parametreler özgünlük, doğruluk, tespit ve tayin limitleri, gerçeklik ve tekrar edilebilirliktir. Tüm metot validasyon çalışmaları stok patulin çözeltisinin fosfat tampon çözelti ile seyreltilmesiyle elde edilen farklı konsantrasyonlardaki standart patulin çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir.

Özgünlük (specificity) analiz yönteminin hedef analiti matrikste bulunabileceği düşünülen diğer bileşenler varlığında doğru ve özgün olarak tanıma ve ölçme yapabilmesidir. Yani diğer bileşenler (safsızlıklar, matriks bileşenleri ve bozulma ürünleri)

HPLC METODU İLE PATULİN TAYİNİNDE TEK LABORATUVAR METOT VALİDASYON ÇALIŞMASI

varlığında hedef analite ait alıkonma zamanında sadece analite ait piklerin gözlenmesidir. Potansiyel bileşenlerin matrikse dışarıdan eklenmesi ya da matriksin çeşitli stres durumlarına (ısıl işlem, asidik/bazik ortam, ışık vb.) maruz bırakılmasıyla bozulmuş ürünlerin elde edilmesi ile oluşan yeni matriksin analiz edilmesiyle değerlendirilir. Hedef analit ve diğer bileşenlerin HPLC kromatogramındaki piklerin etiketlenmesi ve çözünürlüklerinin incelenmesiyle analiz edilir.

$$R_s = 2 * \frac{(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)} \quad (1)$$

Çözünürlük formülünde R_s ayırım gücünü, t_1 ve t_2 iki pike ait alıkonma zamanlarını, w_1 ve w_2 'de pik genişliklerini temsil etmektedir. Genellikle, hedef analite ait pik ile diğer bileşene ait en yakın pik arasındaki kabul edilen çözünürlük değeri $R_s \geq 2$ 'dir [33].

Bu çalışmada, sıcaklık stres koşulları altında patuline ait pikler değerlendirilmiştir. Stok çözeltinin fosfat tampon çözelti ile seyreltilmesi ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart patulin çözeltileri (5.0, 25.0 ve 50.0 µg/mL) 40°C, 50°C, 60°C ve 80°C sıcaklıkta 4 saat boyunca inkübe edilmiş ve çözeltiler belirlenen HPLC koşullarında analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan patuline ait pik ve ona en yakın pik arasındaki çözünürlük değerleri her sıcaklık için yukarıda belirtilen formülle (1) hesaplanmıştır.

Metodun doğrusallığı (linearity) belirli bir konsantrasyon aralığında analitten alınan cevabın analit konsantrasyonu ile orantılı olmasıdır. Bu parametre kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasıyla analiz edilir. Her konsantrasyon için konsantrasyona karşılık metodun verdiği cevaba ait grafik oluşturulur ve regresyon formülü ($y=ax+b$) ve korelasyon katsayısı (R^2) hesaplanır. Bu değer 0.99'a eşit ya da 1'e yakın olması beklenir [34].

Bu çalışmada, HPLC analizi ile patulin miktar tayininin yapılabilmesi için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu amaçla, fosfat tampon çözeltisi (0,01M, pH 7.4) içerisinde 0.01-50 µg/mL aralığında çeşitli konsantrasyonlarında hazırlanan standart patulin çözeltileri üçer tekrarlı olarak belirlenen HPLC koşullarında analiz edilmiştir. Bu patulin çözeltilerine ait alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

Metoda ait tespit limiti (Limit of Detection, LOD) analitin tespit edilebildiği en düşük analit konsantrasyonudur. LOD hesaplaması için farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Örneğin; en düşük konsantrasyondaki örneğin sinyali ile kör örneğin sinyali değerlendirilerek sinyalin gürültüye oranı hesaplanmaktadır. Bu oranın 3'e 1 ya da 2'ye 1 olması kabul edilebilir değerlerdir [35]. Bu çalışmada kullanılan metotta patulin konsantrasyonu kalibrasyon eğrisinin formülünden hesaplandığı için kalibrasyon eğrisinin eğimi ve regresyon doğrusundaki y kesişim noktasının standart sapması kullanılarak LOD değeri hesaplanmıştır. Kullanılan formül aşağıda belirtilmiştir.

$$LOD = 3.3 * \frac{SD}{eğim} \quad (2)$$

Tayin limiti (Limit of Quantification, LOQ) ise analitin miktar tayininin yapılabilildiği en düşük analit konsantrasyonudur. LOD gibi LOQ da farklı yaklaşımlarla hesaplanmaktadır. En düşük konsantrasyondaki örneğin sinyalinin kör örneğin sinyaline oranının 10 olması beklenmektedir [35]. Bu çalışmada ise LOQ hesaplamasında aşağıda belirtilen formülden yararlanılmıştır.

$$LOQ = 10 * \frac{SD}{eğim} \quad (3)$$

Gerçeklik (trueness) parametresi ölçüm sonuçlarının gerçek değere yakınlığı ile ifade edilir ve doğruluğun (accuracy) bir parametresidir. Metoda ait geri kazanım (%) değerleri sonuçların gerçekliği hakkında bilgi vermektedir. Bu değerlerin hesaplanması için stok patulin çözeltisinden fosfat tampon çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanan ve son konsantrasyonları 5.0, 25.0 ve 50.0 µg/mL olan standart patulin çözeltileri HPLC ile analiz edilmiş ve kalibrasyon eğrisine ait formülden yararlanılarak patulin miktarları hesaplanmıştır. Bu konsantrasyonlara ait metodun geri kazanım (recovery) değerleri aşağıda belirtilen formül (4) ile hesaplanmıştır.

$$Geri\ Kazanım\ (\%) = \frac{C_1}{C_2} * 100 \quad (4)$$

Bu formülde verilen C_1 kalibrasyon eğrisinden hesaplanan konsantrasyon değerini (µg/mL), C_2 ise bilinen konsantrasyon değerini (µg/mL) ifade etmektedir.

Keskinlik (Precision) parametresi ölçüm sonuçlarının birbirlerine olan yakınlığı hakkında bilgi verir ve doğruluğun ikinci parametresidir. Bu parametre tekrarlanabilirlik değerleri (rölatif standart sapma, % RSDr) ile ifade edilir ve rastgele hataların dağılımını göstermektedir. 5.0, 25.0 ve 50.0 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan standart patulin çözeltileri için kalibrasyon eğrisine ait formülden yararlanılarak ortalama patulin miktarları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Bu üç konsantrasyona ait metodun % RSDr değerleri aşağıda belirtilen formül (5) ile hesaplanmıştır.

B. Ceren, C. Gülmur

$$\%RDSr = \frac{SD}{C_{ort}} * 100 \quad (5)$$

Bu formülde verilen SD kalibrasyon eğrisinden hesaplanan konsantrasyon değerinin standart sapmasını ($\mu\text{g/mL}$), Cort ise kalibrasyon eğrisinden hesaplanan konsantrasyon değerinin ortalamasını ($\mu\text{g/mL}$) ifade etmektedir.

Laboratuvarda patulin miktar tayini için kullanılan HPLC yönteminin ölçüm belirsizliğinin hesaplamak amacıyla bu çalışma kapsamında üç belirsizlik bileşeni belirlenmiş ve bu bileşenlere ait formüller aşağıda belirtilmiştir. Kalibrasyon eğrisinden gelen ölçüm belirsizliği (lineerlik);

$$u(cal) = \frac{s}{b_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{m} + \frac{(co-c')^2}{sxx}} \quad (6)$$

Tekrarlanabilirlikten gelen ölçüm belirsizliği;

$$u(RSD) = \sqrt{\frac{RSDr^2}{n}} \quad (7)$$

Geri kazanımdan gelen ölçüm belirsizliği;

$$u(Rec) = Rec \sqrt{\frac{sm^2}{n * cm^2}} \quad (8)$$

Bu formüllerde verilen s kalibrasyon eğrisinin kesişim noktasının standart sapmasını, b kalibrasyon eğrisinin eğimini, p ölçüm sayısını, m kalibrasyon eğrisindeki ölçüm sayısını, Co kalibrasyon eğrisinden hesaplanan konsantrasyon değerini, c' kalibrasyon eğrisindeki konsantrasyonlarının aritmetik ortalamasını, sxx tüm konsantrasyonların aritmetik ortalamasından farklarının karelerinin toplamını, n tekrar sayısını, Rec geri kazanım değerini, sm dışarıdan patulin eklenen tampon çözeltinin standart sapmasını ve cm dışarıdan patulin eklenen tampon çözeltinin konsantrasyon değerini ifade etmektedir.

Üç farklı patulin konsantrasyonu (5.0, 25.0 ve 50.0 $\mu\text{g/mL}$) için bu üç bileşene ait belirsizlikler yukarıda belirtilen formüller (6, 7 ve 8) ile hesaplanmış ve değerlerin kareler toplamının karekökü alınarak birleştirilmiş ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır. Birleştirilmiş ölçüm belirsizliği,

$$u = \sqrt{u(cal)^2 + u(RSD)^2 + u(Rec)^2} \quad (9)$$

Birleştirilmiş ölçüm belirsizliği istenen güvenilirlik limitine göre seçilmiş kapsam faktörü ile çarpılarak genişletilmiş ölçüm belirsizliği hesaplanır. Bu çalışmada % 95 güven aralığında kapsam faktörü k=2 alınmış ve genişletilmiş ölçüm belirsizliği (U) aşağıda verilen formül sonucuna göre belirlenmiştir.

$$U = k * u \quad (10)$$

2.4 Elma sularında patulin analizi

Dışarıdan 5.0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda patulinin eklenen elma sularında patulin analizi için patulin elma sularından ISO 8128 standart metoduna göre ekstrakte edilmiştir [36]. Bu yöntemde göre, patulin içeren elma suları eşit hacimlerde etil asetat ile karıştırılmış ve karışım iki faza ayrılana kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üst faz temiz bir tüpe alındıktan sonra altta kalan faza tekrar etil asetat eklenmiştir ve bu işlem iki kere daha tekrar edilmiştir. Temiz tüpte toplanan etil asetat fazı 2 mL sodyum karbonat çözeltisi (14 g/L) ile karıştırılmış ve etil asetat fazı alındıktan sonra kalan sodyum karbonat fazı tekrar etil asetat ile temizlenmiştir. Toplanan etil asetat fazı üzerine bir iki damla asetik asit damlatılmış ve vakum altında evapore edilmiştir. Evaporasyondan sonra kalan pelet 0.01 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde çözülmüş ve aynı koşullarda HPLC ile analiz edilmiştir.

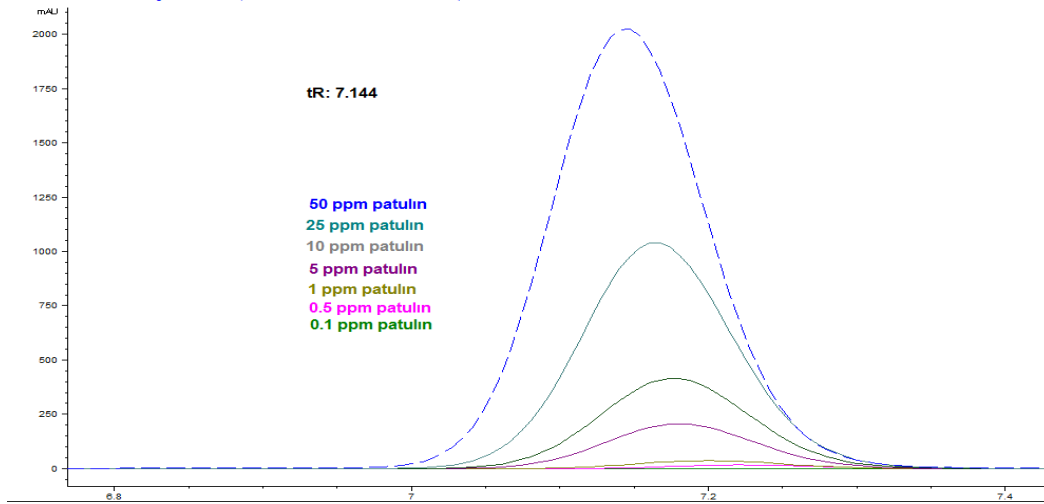
HPLC METODU İLE PATULİN TAYİNİNDE TEK LABORATUVAR METOT VALİDASYON ÇALIŞMASI

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Metot validasyonu metodun geçerli kılınması yani metot parametrelerinin belirlenmesi için metodun performans kriterlerine uygunluğunun değerlendirilmesidir [37]. Metot validasyonu standart olarak kullanılan bir metodun laboratuvarında ilk defa uygulanması durumunda, laboratuvarında kullanılan bir metotta değişiklik yapıldığı durumda, geçerliliği belirlenmiş bir metodun başka bir laboratuvarında kullanımı ya da metodun farklı cihaz ve farklı kişi tarafından uygulanması durumunda, iki farklı metodun karşılaştırılması durumunda ve metot performans parametrelerinin belirlenen kontrol sınırlarının dışına çıkması durumunda yapılmaktadır. Metotlara ait performans parametreleri metoda ve uygulama amacına göre kategorize edilir ve tanımlama ya da kalitatif analizlerde özgünlük parametresi önem kazanmaktadır. Miktar tayini için uygulanan metotlarda ise özgünlük, doğrusalılık, çalışma aralığı, tespit ve tayin limitleri, doğruluk, gerçeklik ve kesinlik parametreleri test edilir.

Patulinin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin belirlenmesinden sonra birçok ülke, elma suyu gibi mikotoksin oluşumuna elverişli olan gıdalarda maksimum bulunma limitleri belirlenmiştir [6,23]. Bu nedenle, patulinin kantitatif analizlerinin yapılması büyük önem kazanmıştır. Bu çalışma kapsamında patulin miktarının bulunmasına yönelik belirlenen kromatografik bir yöntemin metot validasyon çalışması yürütülmüştür.

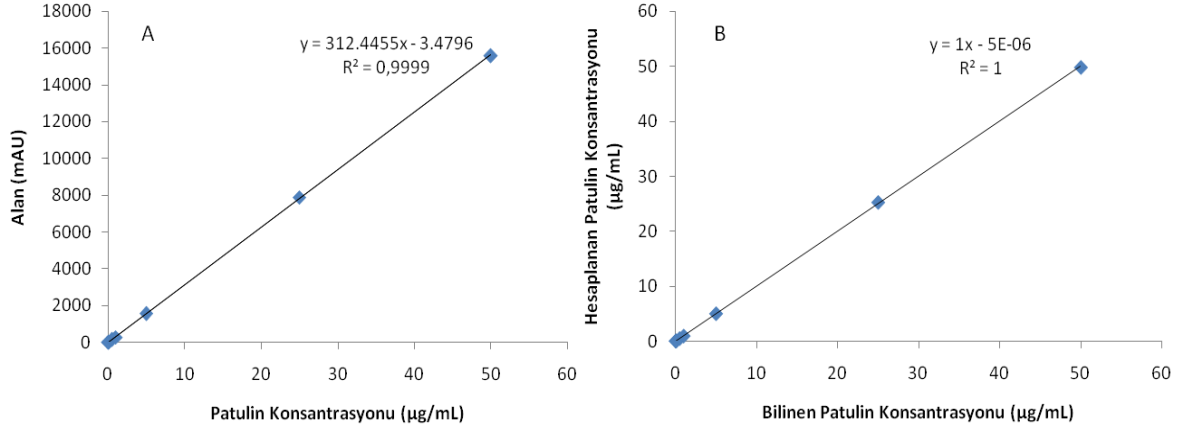
Metot validasyon parametresi olarak ilk değerlendirilen parametre özgünlüktür. Patulin ile ısıtılma işlem sonrası oluşan ve girişim yapma olasılığı bulunan maddelerin kromatogramdaki alıkonma zamanları ve piklerin genişlikleri temel alınarak ayırım güçleri hesaplanmıştır. Şekil 1, ısıtılma işlem uygulanmamış, farklı konsantrasyonlardaki standart patulin çözeltilerine ait kromatogramları göstermektedir. Patulin için belirlenen HPLC koşullarında alıkonma zamanı 7.14 dakika olarak belirlenmiştir. Bu çözeltilerin 40°C, 50°C, 60°C ve 80°C sıcaklıkta 4 saat boyunca ısıtılma işlemine maruz kalması sonrası örneklerin HPLC sonuçları karşılaştırıldığında tüm sıcaklıklardaki her patulin konsantrasyonu için Rs değeri en az 2.1 bulunmuştur. Bu sonuç, metodun özgünlük parametresi açısından kabul edilebilir olduğunu göstermektedir.



Şekil 1. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan farklı patulin konsantrasyonlarına sahip standart patulin çözeltilerinin kromatogramları (7.144 değeri patuline ait alıkonma zamanını temsil etmektedir, her örnek üç tekrarlı olarak çalışılmıştır).

Lineerite ya da doğrusalılık parametresi metodun uygulama aralığının ölçüm aralığına göre belirlenmesi için değerlendirilen bir parametredir. Bu parametrenin bulunması için bilinen analit konsantrasyonlarına karşı metodun yanıtına ait kalibrasyon eğrisinden yararlanılır. EuroChem rehber dokümanına göre en az altı farklı konsantrasyondaki örneğin üçer tekrarlı okunmasıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisi kabul edilirken [37], ISO standardına göre [38] en az üç farklı konsantrasyondaki örneğin en az ikişer tekrarlı sonuçlarına göre oluşturulması gerekmektedir. Bu çalışmada her bir konsantrasyon üçer tekrarlı olacak şekilde 0.01-50 µg/mL konsantrasyon aralığında 8 farklı standart patulin çözeltisi ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Patulin konsantrasyonlarına karşılık HPLC kromatogramlarının pik alan değerleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 2A'da gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi bu eğriye ait formül $y=312.445x-3.479$ ($R^2=0.999$) olarak belirlenmiş ve bu kalibrasyon grafiğine ait değerler Tablo 1'de belirtilmiştir. Ayrıca, bu formülden yararlanarak bilinen patulin konsantrasyonlarına karşılık hesaplanan patulin konsantrasyonlarına ait lineer regresyon grafiği Şekil 2B'de gösterilmiştir. Sonuç olarak, bu grafikler ve Tablo 1'de verilen değerler doğrultusunda çalışma aralığının doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır.

B. Ceren, C. Gülnur



Şekil 2. A) Patulin konsantrasyonuna karşı HPLC alan değerleri ile oluşturulan kalibrasyon grafiği; B) Doğrusallık değerlendirmesi için kalibrasyon eğrisinden hesaplanan patulin konsantrasyonlarıyla bilinen değerlere karşı oluşturulan grafik.

Tablo 1. Standart patulin çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisine ait parametreler

Eğim	312.445	Eğimin standart sapması	0.851
Kesişim noktası	-3.479	Kesişim noktası standart sapması	16.893
Kalibrasyon aralığı	0.01-50 µg/mL	y değerlerinin standart sapması	47.772
R ²	0.999	LOD (µg/mL)	0.505
R _{adj} ²	0.999	LOQ (µg/mL)	1.529

Ölçüm yapılan metotlarda ölçüme ait sonuçların gerçek/referans değere yakınlığı ve ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığı doğruluk hakkında bilgi verir. Dolayısıyla, doğruluk (accuracy), içerisinde gerçekliği (trueness) ve kesinliği (precision) barındırır.

Gerçeklik parametresi sertifikalı referans malzeme kullanımı, valide edilmiş metot kullanımı ya da yeterlilik test sonuçlarıyla belirlenmektedir. Bu üç durumun olmadığı koşullarda ise, metoda ait geri kazanım değerinin hesaplanmasıyla metodun gerçekliği hakkında bilgi edinilir. Dışarıdan bilinen miktarlarda (en az üç farklı konsantrasyonda) eklenen analitin metodun cevabına (en az 5 tekrar) göre hesaplanan miktarının değerlendirilmesiyle sonuçların kalitesi belirlenir [35]. Bu çalışmada dışarıdan üç farklı konsantrasyonda patulin eklenen tampon çözeltilerinin HPLC metoduyla analizi gerçekleştirilmiş ve metodun geri kazanım (%) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 2). Aynı gün içerisinde yapılan tekrarlı çalışmalar sonucunda en düşük ve en yüksek geri kazanım değerleri 5 µg/mL patulin çözeltilisi için % 92.875 ve % 95.333 olarak; 25 µg/mL patulin çözeltilisi için % 92.669 ve % 93.929 olarak; 50 µg/mL patulin çözeltilisi için ise % 94.232 ve % 100.477 olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım değerinin kabul edilebilir değeri konsantrasyon ve analizin amacına göre değişkenlik gösterebilir. Örneğin; Codex Alimentarius'un gıdalarda veteriner ilaç kalıntılarında ait analizler için kabul edilebilir geri kazanım (%) değerleri 1 µg/kg ve düşük konsantrasyonlarda % 50-120; 1-10 µg/kg aralığı için % 60-120; 10-100 µg/kg aralığı için % 70-110 ve 100 µg/kg ve daha yüksek konsantrasyonlarda % 80-110 olarak belirtilmiştir [39]. Buna karşılık SANCO dokümanına göre validasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen geri kazanım çalışmalarında % 70-120 aralığı esas alınmaktadır [34]. Bu çalışma sonuçlarına bakıldığında üç farklı konsantrasyon değeri için metodun geri kazanım değerleri (Tablo 2) % 70-% 120 arasında olduğundan geri kazanım değerleri kabul edilir değerlerdir. Aynı patulin konsantrasyonlarına sahip örneklerin farklı günlerde aynı metotla elde edilen analizi sonuçlarına bakılacak olunursa (Tablo 3) geri kazanım değerlerinin yine kabul edilen aralıkta olduğu görülmektedir. En düşük ve en yüksek geri kazanım değerleri, 5 µg/mL patulin çözeltilisi için % 77.162 ve % 95.140 olarak; 25 µg/mL patulin çözeltilisi için % 88.571 ve % 103.235 olarak; 50 µg/mL patulin çözeltilisi için ise % 93.520 ve % 97.201 olarak hesaplanmıştır.

HPLC METODU İLE PATULİN TAYİNİNDE TEK LABORATUVAR METOT VALİDASYON ÇALIŞMASI

Tablo 2. Üç farklı konsantrasyona sahip patulin çözeltilerine ait aynı gün içerisinde aynı koşullarda yapılan tekrarlı çalışma sonuçları

Eklenen Patulin konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan patulin konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Geri kazanım (%)	Tekrarlanabilirlik RSDr (%)
50	50.239	100.477	1.832
	47.341	94.681	1.031
	50.008	100.017	2.341
	47.220	94.439	3.359
	49.898	99.797	3.482
	47.116	94.232	2.386
25	23.301	93.204	1.702
	23.212	92.848	1.871
	23.482	93.929	1.197
	23.190	92.758	1.677
	23.334	93.338	0.414
	23.167	92.669	0.096
5	4.672	93.445	0.305
	4.767	95.333	0.188
	4.659	93.170	0.838
	4.755	95.109	1.936
	4.644	92.875	1.051
	4.749	94.979	2.466

Kesinlik parametresi aynı şartlarda ölçülen analite ait sonuçların birbirlerine yakınlığını ifade etmektedir. Bu nedenle kesinlik parametresinin belirlenmesinde doğru değere ya da referans malzemeye ihtiyaç yoktur. Metodun cevabı olarak elde edilen ölçüm sonuçlarının standart sapması (Sr) ya da rölatif standart sapması (% RSDr) olarak hesaplanır. Bu parametre içerisinde iki bileşen barındırır. Tekrarlanabilirlik (repeatability) bileşeninin TS 5822-2 ISO 5725 standardına göre tanımı “bağımsız deney sonuçlarının, kısa zaman aralıkları içinde, aynı donanım kullanılarak, aynı deneyi yapan kişi tarafından, aynı laboratuvar, eş değer deney maddeleri üzerinde aynı metot ile elde edildiği şartlar (tekrarlanabilirlik şartları) altındaki kesinliktir” iken aynı standartta tekrar üretilebilirlik (reproducibility) “farklı donanım kullanılarak, deneyi yapan farklı kişiler tarafından, farklı laboratuvarlarda, benzer deney maddeleriyle aynı metot uygulanarak deney sonuçlarının elde edildiği şartlar (tekrar üretilebilirlik şartları) altındaki kesinliktir” olarak tanımlanmıştır [40]. Kesinlik % RSDr değeri analiz edilen analitin konsantrasyonuna bağlı olarak değerlendirilir. AOAC tarafından hazırlanan dokümanlara göre 1 $\mu\text{g/kg}$ birime sahip örneklerde beklenen % RSDr değerinin % 30, 10 $\mu\text{g/kg}$ birime sahip örneklerde beklenen % RSDr değerinin ise % 21 olduğu belirtilmiştir [41]. Literatüre bakıldığında ise genel olarak % RSDr değeri için kabul edilebilir değerinin ≤ 20 olması beklenmektedir [42,43]. Bu çalışmada belirlenen üç farklı konsantrasyondaki patulin çözeltileri için hem aynı güne ait verilerden hem de farklı günlerdeki verilerden hesaplanan % RSDr değerleri kabul edilebilir en yüksek limit olan % 20’den küçüktür.

B. Ceren, C. Gülmur

Tablo 3. Üç farklı konsantrasyona sahip patulin çözeltilerine ait farklı günlerde aynı koşullarda yapılan tekrarlı çalışma sonuçları

Eklenen Patulin (µg/mL)	Bulunan patulin konsantrasyonu (µg/mL)	Geri kazanım (%)	Tekrarlanabilirlik RSDr(%)
50	46.944	93.888	0.822
	48.601	97.201	0.183
	46.760	93.520	0.588
	48.507	97.014	0.567
	46.860	93.720	0.657
	48.530	97.059	0.294
25	22.270	89.081	0.309
	25.683	102.734	0.268
	22.143	88.571	0.348
	25.809	103.235	0.138
	22.162	88.648	0.101
	25.669	102.674	0.380
5	3.933	78.665	4.033
	3.914	78.279	2.872
	3.858	77.162	4.032
	4.658	93.164	1.987
	4.757	95.140	2.865
	3.902	78.035	2.942

Ölçüm belirsizliği Uluslararası Temel ve Genel Metroloji Terimleri Sözlüğü'nde "ölçülen büyüklüğe mantıklı bir şekilde atfedilebilecek bütün değerlerin dağılımını karakterize eden ve ölçüm sonucuyla ilişkili olan bir parametre" olarak tanımlanmıştır[44]. Ölçüm sonucuna ait değerlerin dağılımı ve kalitesi hakkında bilgi vermektedir. Bu parametrenin hesaplanması için belirsizliğe sebep olabileceği düşünülen belirsizlik kaynaklarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada üç belirsizlik kaynağı belirlenmiş ve belirsizlik kaynaklarının hesaplanma yöntemleri metod bölümünde özetlenmiştir. Tampon çözeltideki patulin miktarının belirlenmesi için HPLC analizi ile elde edilen alan verilerine karşılık patulin konsantrasyonuna ait kalibrasyon eğrisi kullanıldığından ilk belirsizlik kaynağı kalibrasyon eğrisine ait belirsizliktir. Bu bileşen kalibrasyon eğrisinin eğimi, standart sapması ve kalibrasyon eğrisinden elde edilen konsantrasyonlarla ilişkilidir. Bu çalışmada, stok patulin çözeltilisinin fosfat tampon çözeltisi ile seyreltilmesiyle elde edilen sekiz farklı konsantrasyonda standart patulin çözeltisi HPLC ile belirlenen koşullarda analiz edilmiş ve alan değerlerine karşılık konsantrasyona ait kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 2A). Üç farklı patulin konsantrasyonu (5.0, 25.0 ve 50.0 µg/mL) için kalibrasyon eğrisinden gelen ölçüm belirsizliği Tablo 4'de belirtilmiştir.

İkinci belirsizlik bileşeni tekrarlanabilirlik gelen belirsizlik olarak belirlenmiş. Bu belirsizlik üç farklı patulin konsantrasyonuna karşı metodun verdiği cevaba göre hesaplanan rölatif standart sapma değerlerine bağlıdır. Bu belirsizliğe ait sonuçlar yine Tablo 4'de gösterilmiştir.

HPLC METODU İLE PATULİN TAYİNİNDE TEK LABORATUVAR METOT VALİDASYON ÇALIŞMASI

Tablo 4.Üç farklı patulin konsantrasyonu için belirsizlik bütçe çizelgesi

Patulin konsantrasyonu (µg/mL)	Kalibrasyon eğrisinden gelen ölçüm belirsizliği, u(cal)	Tekrarlanabilirlikten gelen belirsizliği, u(RSD)	Geri kazanımdan gelen ölçüm belirsizliği, u(Rec)	Birleştirilmiş ölçüm belirsizliği, u	Genişletilmiş ölçüm belirsizliği, U (%95 güven aralığında k=2)
50	0.058	0.921	0.011	0.922	1.845
25	0.040	0.397	0.009	0.399	0.797
5	0.037	0.017	0.002	0.041	0.082

Belirsizlik bileşenlerinden sonuncusu gerçeklikten gelen belirsizliktir. Bu bileşen metoda ait geri kazanım değerinden hesaplanır. Üç farklı patulin konsantrasyonuna sahip standart patulin çözeltilerinin HPLC analizi sonrası patulin içerikleri hesaplanmış ve başlangıçta dışarıdan eklenen patulin miktarı ile karşılaştırılmıştır. Tablo 2 ve 3’de de görüldüğü gibi üç farklı konsantrasyon için metodun geri kazanım değerleri %70-%120 arasında olup kabul edilir değerler olarak belirtilmiştir. Geri kazanımdan gelen belirsizlikler ise bu konsantrasyonlar için Tablo 4’de belirtilmiştir.

Tüm bu belirsizlik bileşenlerinin birleştirilmesi ve % 95 güven aralığında kapsam faktörü k=2 ile genişletilmesinin ardından üç farklı konsantrasyonda patulin çözeltilerine ait sonuçların raporlandırılması;

5.0 (µg /mL) ± 1.845 (µg /mL),

25.0 (µg /mL) ± 0.797 (µg /mL),

50.0 (µg /mL) ± 0.082 (µg /mL)

şeklinde olmuştur. Sonuç olarak, kullanılan metot patulin tayini için valide edilmiş ve kullanımı uygun bir metot olarak belirlenmiştir.

Fosfat tampon çözeltisi içerisine eklenen belirli konsantrasyonlardaki patulinin çalışma kapsamında validasyonu yapılan HPLC yöntemiyle tespit ve tayin edilmesine ek olarak, dışarıdan 5 µg /mL olacak şekilde patulin eklenen elma suyu örneklerinden ekstraksiyon sonrası aynı yöntemle patulin tayinleri yapılmıştır. Altışar tekrarlı yapılan çalışma sonucunda 5 µg /mL patulin içeren elma suyu örneklerinin HPLC analizi sonucu ortalama 3.678 µg/mL (±0.017 µg /mL standart sapma ile) patulin değeri tayin edilmiştir. Metodun elma suyu örneğinde geri kazanım değeri % 73.562 olarak hesaplanmıştır ve bu sonuç % 70-% 120 arasında olduğundan geri kazanım değeri kabul edilir bir değer olarak belirtilmiştir. Ayrıca, % RSDr değeri % 0.453 olarak en yüksek limit olan % 20’den küçüktür ve dolayısıyla kabul edilebilir bir değer olarak değerlendirilmiştir.

Metoda ait ölçüm belirsizliği sonuçlarına bakıldığında, elma suyunda dışarıdan eklenen patulinin konsantrasyonu 5.0 µg /mL patulin için % 95 güven aralığında rapor edilen 5.0 (µg /mL) ± 1.845 (µg /mL) sonuç aralığında bulunmuştur.

4. SONUÇLAR

Patulin insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen bir mikotoksindir. Meyvelerin üzerinde çeşitli şartlarda mantarlar tarafından üretilir ve bu meyvelerden elde edilen meyve sularında bulaşan olarak bulunma riski vardır. Bu nedenle meyve sularında patulin için maksimum bulunma miktarları standartlarla belirlenmiştir ve patulinin doğru ve güvenilir tayini gıda güvenliğinin sağlanmasında önemli role sahiptir.

Bu çalışma kapsamında, patulinin tespit ve tayin edilmesi için kullanılan analitik yönteminin tek laboratuvar validasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Metot validasyon çalışması gereği özgünlük, doğrusallık, gerçeklik ve kesinlik parametreleri değerlendirilmiş ve bu parametrelerin standartlarca kabul edilebilir değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. 0.01-50 µg/mL konsantrasyonları arasında doğrusallığa ve R²=0.999 değerine sahip kalibrasyon eğrisi patulin konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır. Üç farklı patulin konsantrasyonu için (5.0, 25.0 ve 50.0 µg /mL) gerçeklik parametresi metoda ait geri kazanım değerleri ile ifade edilmiş ve tüm konsantrasyonlar için geri kazanım değerleri %70-%120 arasında bulunmuştur. Kesinlik parametresi ise tekrarlı çalışmaların sonucuna göre yorumlanmış ve üç konsantrasyon için % RSDr değerlerinin ≤20 olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca, metoda ait ölçüm belirsizliğini etkileyen bileşenler kalibrasyon eğrisinden, tekrarlanabilirlik ve geri kazanımdan gelen belirsizlikler olarak belirlenmiş ve üç farklı konsantrasyon için birleştirilmiş ölçüm belirsizlikleri hesaplanmıştır.

Tampon çözelti kullanılarak tek laboratuvar validasyonu yapılan HPLC yöntemi ile patulin tayini elma suyu örneklerinde de test edilmiş ve 5 µg /mL patulin içeren elma sularına ait metot performans parametreleri (% geri kazanım ve % RSDr) kabul

B. Ceren, C. Gülmur

edilebilir değerler arasında bulunmuştur. Ayrıca, patulin konsantrasyonları metoda ait ölçüm belirsizliği aralığında bulunmuştur.

Bu çalışma kromatografik yöntemlerin tek laboratuvar metot validasyonu için izlenilmesi gereken yol hakkında temel bilgi vermekte ve bunu patulin örneği üzerinden yapmaktadır. Bu çalışmada valide edilen HPLC metodunun tampon çözelti ve elma suyu içerisinde bulunan patulinin tayininin laboratuvarlarca güvenilir metot olduğu kullanılabilirliğini belirlemiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (Proje No: 33-M-16) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] M. M. Moake, O. I Padilla-Zakour, and R. W. Worobo, “Comprehensive review of patulin control methods in foods”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 4, no.1, pp. 8–21, 2005.
- [2] O. Puel, P. Galtier, and I. P. Oswald, “Biosynthesis and toxicological effects of patulin”, *Toxins*, vol. 2, no. 4, pp. 613-631, 2010.
- [3] Ç. Kadakal, and S. Nas, “Elma ve Elma Ürünlerinde Patulin Miktarını Etkileyen Faktörler”, *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, vol. 6, no. 1, pp. 87-96, 2000.
- [4] F.J. Philpot, “A penicillin-like substance from *Aspergillus giganteus* Wehm”, *Nature*, vol. 152, no. 725, 1943.
- [5] T. Korzybski, Z. Kowszyk-Gindifier, and S. Kurylowicz, *Antibiotics: Origin, Nature, and Properties*, (2nd ed.), Pergamon Press, New York, 1967.
- [6] G. Şahin, S. Ünüvar, and T. Baydar, “Patulin: toksisitesi ve bebek beslenmesinde kullanılan ürünlerde olası bulaşma”, *TurkArchPed*, vol. 46, pp. 275-279, 2011.
- [7] R. Fliege, and M. Metzler, “Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts”, *Chemical Research Toxicology*, vol. 13, pp. 373-381, 2000.
- [8] D. M. Schumacher, C. Müller, M. Metzler, and L. Lehmann, “DNA–DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin”, *Toxicology Letters*, vol. 166, pp. 268-275, 2006.
- [9] C. F. Pierson, M. J. Ceponis, and L. P. Mccolloch, “Market diseases of apples, pears, and quinces” in *Agriculture Handbook*, no. 376, 1971.
- [10] J.M Harvey, JR. W. L. Smith, and J. Kaufman, “Market diseases of stone fruits: cherries, peaches, nectarines, apricots, and plums” in *Agriculture Handbook*, no. 414, 1972.
- [11] J.R. Buchanan, N. F. Sommer, R. J. Fortlage, E. C. Maxie, F. G. Mitchell, and D.P.H. Hseih, “Patulin from *Penicillium expansum* in Stone fruits and pears”, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 99, no. 3, pp. 262–265, 1974.
- [12] J. Lovett, B. Boutin, and R. G. Thompson, “Patulin production in cherry by *Penicillium* and *Aspergillus* species”, *Journal of Milk and Food Technology*, vol. 37, pp. 530, 1974.
- [13] N. F. Sommer, J. R. Buchanan, and R. J. Fortlage, “Production of patulin by *Penicillium expansum*”, *Applied Microbiology*, vol. 28, pp. 589–593, 1974.
- [14] K. Akerstrand, A. Molander, A. Andersson, and G. Nilsson, “Occurrence of moulds and mycotoxins in frozen blueberries”, *VårFöda*, vol. 28, pp. 197–200, 1976.
- [15] N. L. Leggott, and G.S. Shephard, “Patulin in South African commercial apple products”, *Food Control*, vol. 12, pp. 73–76, 2001.
- [16] M. Demirci, M. Arici, and T. Gumus, “Presence of patulin in fruit and fruit juices produced in Turkey”, *Ernaehrungs-Umschau*, vol. 50, no. 7, pp. 262–263, 2003.
- [17] A. Ciegler, A. C. Beckwith, and L. K. Jackson, “Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 31, pp. 664–667, 1976.
- [18] H. Osswald, H. K. Frank, D. Komitowski, and H. Winter, “Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawleyrats and Swissmice”, *Food and Cosmetics Toxicology*, vol. 16, pp. 243–247, 1978.

HPLC METODU İLE PATULİN TAYİNİNDE TEK LABORATUVAR METOT VALİDASYON ÇALIŞMASI

- [19] A.W. Hayes, T. D. Phillips, W. L. Williams, and A. Ciegler, “Acute toxicity of patulin in mice and rats”, *Toxicology*, vol.13, pp. 91–100, 1979.
- [20] P.J. Becci, F. G. Hess, W. D. Johnson, M. A. Gallo, J. G. Babish, R. E. Dailey, and R. A. Parent, “Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in therat”, *Journal of Applied Toxicology*, vol. 1, pp. 256–261, 1981.
- [21] WHO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives (JECFA), Position paper on patulin, 30th session, The Hague, The Netherlands, 9–13 March, 1998.
- [22] F.E. Wurgler, U. Friederich, and J. Schlatter, “Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cneistine in *Salmonella typhimurium* TAI02”, *Mutation Research*, vol. 261, pp. 209–216, 1991.
- [23] Resmi Gazete No: 28157. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. 2011. [Online]. Available: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229m3-8.htm> . [Accessed Apr. 01, 2019].
- [24] V. Gökmen, and J. Acar, “Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey”, *Journal of Chromatography A*, vol. 815, no. 1, pp. 99-102, 1998.
- [25] T. Yurdun, G. Z. Omurtag, and Ö. Ersoy, “Incidence of patulin in apple juices marketed in Turkey”, *Journal of Food Protection*, vol. 64, no. 11, pp. 1851-1853, 2001.
- [26] V. Gökmen, J. Acar, and K. Sarioglu, “Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 543, no. 1-2, pp.64-69, 2005.
- [27] A. Moukas, P. Markaki, and V. Panagiotopoulou, “Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques”, *Food Chemistry*, vol. 109, no. 4, pp. 860-867, 2008.
- [28] M. Rychlik, and P. Schieberle, “Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 9, pp. 3749-3755, 1999.
- [29] D.R. Katerere, S. Stockenström, G. Balducci, and G. S. Shephard, “Determination of patulin in apple juice: comparative evaluation of four analytical methods”, *Journal of AOAC International*, vol. 90, pp. 162-166, 2007.
- [30] J.K. Li, R. N. Wu, Q. H. Hu, and J.H. Wang, “Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate”, *Food Control*, vol. 18, pp. 530-534, 2007.
- [31] S.R Sargenti, and C. A. A. Almeida, “Determination of patulin in apple juice by HPLC using a simple and fast sample preparation method”, *EclQui m Sao Paulo*, vol. 35, pp. 14–21, 2010.
- [32] AOAC Official Method 995.10, Patulin in Apple Juice, Liquid Chromatographic Method.
- [33] H.V. Paithankar, “HPLC Method Validation For Pharmaceuticals: A Review”, *International Journal of Universal Pharmacy and BioSciences*, vol. 2, no. 4, pp. 229-240, 2013.
- [34] SANCO/12495/2011, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, 2011.
- [35] EURACHEM Guide, The Fitness for purpose of analytical methods, A laboratory guide to method validation and related topics, 1998.
- [36] ISO 8128-1:1993, Apple Juice, Apple Juice Concentrates and Drinks Containing Apple Juice – Determination of Patulin Content-Part 1: Method Using High-performance Liquid Chromatography, ISO, 1993.
- [37] B. Magnusson, and U. Örnemark, Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2014.
- [38] ISO 11095:1996, Linear calibration using reference materials, ISO, 1996.
- [39] Codex Alimentarius Commission Procedural Manual, Joint FAO/WHO Food Standards Programme Twenty-first ed. Rome, 2013.
- [40] TS 5822-2 ISO 5725-2 Ölçme Metotlarının ve Sonuçlarının Doğruluğu (Gerçeklik ve Kesinlik) Bölüm 2: Standard Bir Ölçme Metodunun Tekrarlanabilirliğinin ve Uyarlılığın Tayini için Temel Metot (Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a Standard measurement method), 2000.
- [41] AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, Official Methods of Analysis, 19th Ed, Appendix K, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, 2012.
- [42] SANTE/11945/2015: Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, 2015.

B. Ceren, C. Gülnur

[43] R. T. Dimitrova, I. I. Stoykova, T. T. Yankovska-Stefanova, S. A. Yaneva, and T.T. Stoyanchev, “Development of analytical method for determination of organochlorine pesticides residues in meat by GC-ECD”, *Revue de Médecine Vétérinaire*, vol. 169, no. 4-6, pp. 77-86, 2018.

[44] Uluslararası Temel ve Genel Metroloji Terimleri Sözlüğü, JCGM 200:2008, TÜBİTAK UME, 2008.

