

鲜食苹果中棒曲霉素 HPLC 检测及 前处理条件的优化

Optimization on HPLC detection and pre-treatment conditions of patulin in fresh apple

孙丽华¹ 钱卉苹¹ 李志文^{2,3}
SUN Li-hua¹ QIAN Hui-ping¹ LI Zhi-wen^{2,3}
陈计峦¹ 庞学群⁴ 闫师杰^{2,3}

CHEN Ji-luan¹ PANG Xue-qun⁴ YAN Shi-jie^{2,3}

(1. 石河子大学食品学院, 新疆 石河子 832003; 2. 天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300384;
3. 天津市农副产品深加工技术工程中心, 天津 300384; 4. 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642)
(1. Food College Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China;
2. College of Food Science and Biological Engineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;
3. Tianjin Engineering and Technology Research Center of Agricultural Products Processing, Tianjin 300384, China;
4. College of Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

摘要:为建立快速、准确的鲜食苹果中棒曲霉素含量检测方法, 试验以红富士苹果为试材, 分别研究不同 HPLC 条件对分离效果的影响, 不同提取方法及纯化技术对鲜食苹果中棒曲霉素提取效果的影响。结果表明: 在流动相配比为乙腈: 水=10: 90, 流速 0.8 mL/min 的 HPLC 条件下, 鲜食苹果样品中棒曲霉素色谱峰达到最好的分离效果; 在不同的提取方法中, 直接研磨提取法获得最高的加标回收率 (81.9%), PEP-SPE 技术较普通液液萃取技术具有更高的加标回收率 (82.42%~95.57%) 及检测精密度 (3.26%~4.41%), 同时具有更方便、快捷的特点。综上, 研究建立的 PEP-SPE—HPLC 技术可操作性强, 结果准确, 具有很好的适用性, 为鲜食苹果中棒曲霉素的含量检测及有效控制提供了灵敏高效的测定方法。

关键词: 高效液相色谱; 固相萃取; 棒曲霉素; 鲜食苹果

Abstract: A rapid and sensitive method was established for the accurate determination of patulin in fresh apples. Experimental

parameters including extraction methods, mobile phase composition and flow rate for HPLC which always affect the sensitivity and analysis efficiency of the method were optimized systemically. The results indicated that solid phase extraction (SPE) techniques using functionalized polystyrene-divinylbenzene column (PEP) exhibited satisfactory recoveries comparing with other extraction methods. Under the optimized chromatographic conditions, patulin could be well separated from other impurities within 4 min, and detected with a wide linear range between 10—25 000 $\mu\text{g/L}$ and a detection limit of 10 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=3$) using acetonitrile/water (90:10, v/v) as mobile phase, 0.8 mL/min as flow rate. The proposed PEP-SPE—HPLC method was further applied to the determination of patulin in fresh apples in the range of 82.42%—95.57%, indicating it might serve as an efficient tool for the accurate quantification of patulin in food samples.

Keywords: high performance liquid chromatography; solid-phase; patulin; fresh apple

基金项目: 国家科技支撑计划农业领域项目 (编号: 2015BAD16B07); 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (编号: 15JCYBJC51300)

作者简介: 孙丽华, 女, 石河子大学在读硕士研究生。
通讯作者: 闫师杰 (1971—), 男, 天津农学院教授, 博士。
E-mail: yanshijie@126.com

收稿日期: 2016—01—13

中国苹果总产量、栽培面积、人均占有量与出口量均居世界第一, 已成为世界上最大的苹果生产和消费国^[1], 每年由于贮藏加工能力不足, 导致大量残次果及腐烂果产生。此外, 苹果浓缩汁是中国苹果加工业主导产品, 其生产采用的原料往往是生长期和收获期的残次落果, 甚至腐烂果, 直接导致苹果汁产品中棒曲霉素含量超标而被退货, 造成极大的

经济损失。因此,开发鲜食苹果中棒曲霉素含量准确、快速的检测方法,不但可以有效保障苹果入口安全,更可从生产加工源头及时抑制污染品的产生,对中国苹果产业及整个国民健康具有十分重要的现实意义。

棒曲霉素(patulin)又名展青霉素,是由曲霉和青霉等常见食源性真菌所产生的一种次级代谢产物。毒理学试验表明,棒曲霉素具有致癌、致畸和免疫等毒理作用,对人体的危害较大,可导致呼吸、泌尿、神经等系统的损害甚至衰竭^[2]。棒曲霉素广泛存在于各种霉变水果中,甚至部分有霉变趋势的好果中其含量也较高^[3]。因而,欧美各国对苹果及其制品中的棒曲霉素限量有严格规定,最高限量为 50 μg/kg^[4]。

目前,中国生产企业仅有针对苹果浓缩汁中棒曲霉素含量的检测标准 SN/T 2008—2007。该方法主要适合于苹果汁中棒曲霉素的测定,并且操作繁琐、溶剂消耗量大、废弃液污染、提取率低等问题一直无法解决。针对上述问题,近年来国内外开展了一些研究^[5-6],主要集中在检测浓缩苹果汁中的棒曲霉素方面,但在纯化技术方法研究领域报道较少,尤其是采用固相萃取结合高效液相技术(SPE—HPLC)检测鲜食苹果中棒曲霉素含量的研究鲜有报道。孟瑾等^[7]采用 Mycosep·228AflaPat 净化柱测定苹果及山楂制品中的棒曲霉素,其回收率为 78%~117%,RSD 为 2.1~8.2%,但是固体、半固体需静置 2 h,还需要 21 mL 的乙腈萃取,再过柱,其方法耗时、操作繁琐。Wu 等^[8]采用氰基柱固相萃取苹果(汁)中的棒曲霉素,苹果清汁的回收率为 80.17%~81.45%,鲜食苹果却不适合采用氰基柱固相萃取。

本试验拟以红富士苹果为试材,研究不同 HPLC 条件对棒曲霉素分离效果的影响并筛选出最佳检测条件,不同提取方法及纯化技术对鲜食苹果中棒曲霉素提取效果的影响,旨在为鲜食果蔬原料中棒曲霉素的检测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

红富士苹果:85 级(苹果直径 85 mm),采购于天津红旗农贸市场;

棒曲霉素标准品:纯度≥98%,加拿大 TRC 公司;
果胶酶:活力为 2 600 PG/mL,广州明远工贸有限公司;
乙腈、乙酸乙酯:色谱纯,美国 Fisher 公司;
甲醇:色谱纯,天津江天化工技术有限公司。

1.1.2 仪器设备

高效液相色谱仪:LC-1200 型,美国安捷伦公司;
旋转蒸发器:RE-2000 型,上海亚荣生化仪器厂;
固相萃取装置:Visiprep™SPE-12 型,美国 Supelco 公司;
数控超声波清洗器:KQ-500DE 型,昆山市超声仪器有限公司;

微量过滤器:NY13022L 型,德国 Origin Membranes 公司。

1.2 方法

1.2.1 高效液相色谱条件的优化

(1) 流动相配比的优化:采用 AlltimaTM C₁₈ 色谱柱

(5 μm,4.6 mm×150 mm),紫外可见检测器,波长 276 nm,进样量 20 μL,流动相为乙腈和水,在柱温 30 ℃,流速 0.8 mL/min,比较不同流动相配比(乙腈:水体积配比分别为 20:80,15:85,10:90)对棒曲霉素的分离效果。

(2) 流速的优化:采用 AlltimaTM C₁₈ 色谱柱(5 μm,4.6 mm×150 mm),紫外可见检测器,波长 276 nm,进样量 20 μL,流动相为乙腈和水,在柱温为 30 ℃,乙腈:水流动相溶剂体积配比为 10:90,比较不同流速(1.0,0.8,0.6 mL/min)对棒曲霉素的分离效果。

1.2.2 棒曲霉素标准液的配制 准确称取 5.0 mg 的棒曲霉素标准品,用乙酸盐缓冲液溶解并定容于 100 mL 的棕色容量瓶中,配制成 50 000 μg/L 的储备液^[9]。准确量取棒曲霉素储备液,用乙酸盐缓冲液溶解并稀释,配制成 10,50,100,250,500,1 000,5 000,10 000,25 000 μg/L 的工作液。避光于 0 ℃下保存。

1.2.3 鲜食苹果中棒曲霉素提取方法的优化 将鲜食苹果削皮、切块,称取 10.0 g,添加 1 mL 1 000 μg/L 的棒曲霉素标准液,研磨成糊状为样品 A。分别采用超声波辅助提取(用乙酸盐缓冲液将样品 A 定容至 25 mL,在温度 25 ℃、频率 40 kHz、功率 300 W 的超声波条件下处理 30 min)、果胶酶辅助提取(在样品 A 中添加 3 mL 果胶酶,用乙酸盐缓冲液定容至 25 mL,放置过夜)、乙酸乙酯辅助提取(用乙酸乙酯将样品 A 定容至 25 mL,摇匀,静置)、直接研磨提取(直接用乙酸盐缓冲液定容至 25 mL,摇匀,静置)处理,于 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液待用。采用液液萃取的方法^[10],最优 HPLC 条件测定。

1.2.4 鲜食苹果中棒曲霉素纯化方法的优化 在优化的色谱条件下测定,比较液液萃取与 PEP 柱固相萃取对棒曲霉素分离效果及溶剂的用量、回收率、变异系数、操作时间等方面的影响。

(1) 液液萃取(LLE):根据文献^[10],修改如下:准确吸取 1.2.3 中处理 4 制备的上清液 2.5 mL 于分液漏斗中,加入 5 mL 水及 10 mL 乙酸乙酯,振摇 1 min,静置分层。将水层移入另一分液漏斗中,用乙酸乙酯重复上述振摇提取过程两次(每次用量为 10 mL),弃去水层,合并 3 次乙酸乙酯提取液于分液漏斗中,加入 5 mL 碳酸钠水溶液,立即振摇,静置分层。再加入 5 mL 乙酸乙酯提取碳酸钠水层一次,弃去碳酸钠水层,合并乙酸乙酯提取液并在装有 5 g 无水硫酸钠的漏斗过滤,再用 5 mL 乙酸乙酯洗涤无水硫酸钠、漏斗 2 次,滤液加入 3 滴冰乙酸后,在旋转蒸发器 40 ℃下蒸发至近干,用 1 mL 乙酸盐缓冲溶液溶解残留物,经 0.45 μm 针头过滤器滤至 1 mL 离心管内。供 HPLC 测定。

(2) PEP 柱固相萃取方法(PEP-SPE):依次用 2 mL 甲醇,2 mL 水冲洗小柱,控制流速每秒 1 滴,处理过程中保持柱子湿润。准确吸取 1.2.3 中处理 4 制备的上清液 2.5 mL,并加入 1 mL 乙酸盐缓冲溶液混匀作为试样^[11]。当水下降到柱顶时,立即将试样移入小柱。用 1 mL 碳酸钠溶液、1 mL 乙酸盐缓冲溶液洗柱,再抽干^[12]。依次用 1 mL 乙醚和 1 mL 乙酸乙酯洗脱分析物,小试管接收洗脱后的液体,控

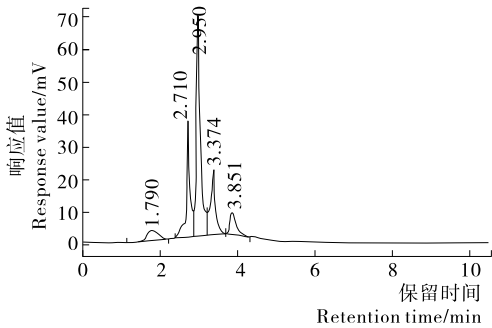
制流速每秒 1 滴,抽干。用氮气吹干,再用 1 mL 乙酸盐缓冲溶液溶解残留物,经 0.45 μm 针头过滤器滤 1 mL 离心管内。供 HPLC 测定。

1.2.5 加标回收率试验 将鲜食苹果削皮、切块,称取 10.0 g,分别添加 50,100,1 000 μg/L 3 个水平级的棒曲霉素标准溶液 1 mL,按 1.2.4 中的 2 种方法处理,并按优化的色谱条件测定。每个添加水平重复测定 3 次,计算回收率和变异系数。

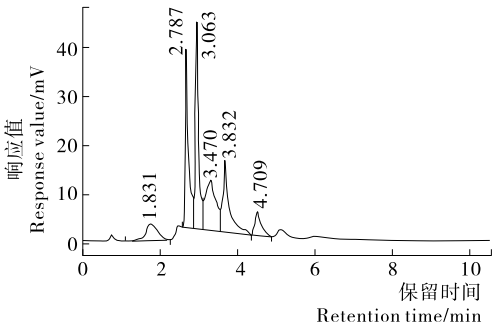
2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

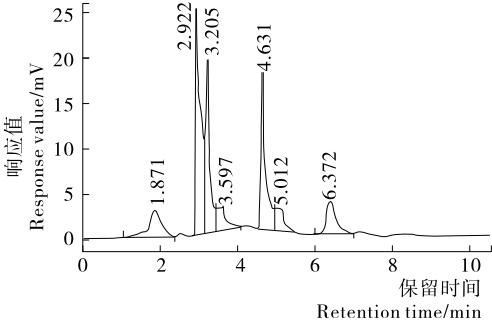
2.1.1 流动相对比对分离效果的影响 棒曲霉素是一种低分子量高极性化合物,分离时流动相中需加入高比例水相才能与反相柱有很强的保留作用^[13]。由图 1 可知:流动相中的乙腈含量对棒曲霉素的出峰时间影响很大,乙腈的含量由 20%调节到 10%,棒曲霉素出峰时间在 3.850~6.372 min,乙腈的含量越少其保留时间越长。乙腈:水体积比为 20:80,15:85 时未能很好与其它峰分离开,故选取流动相乙腈:



(a) 乙腈:水体积比20:80



(b) 乙腈:水体积比15:85



(c) 乙腈:水体积比10:90

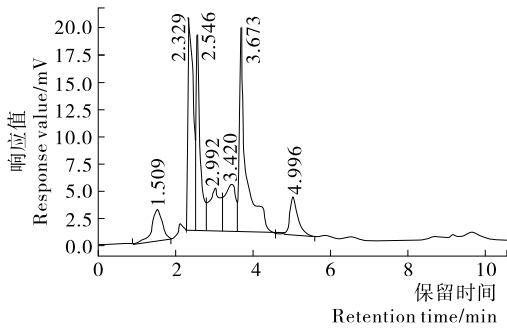
图 1 流动相对比对分离效果的影响

Figure 1 Effect of different mobile phase ratio on separation

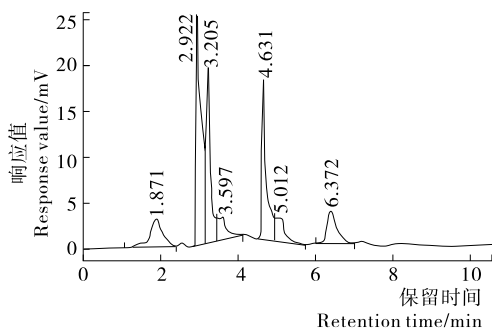
水体积比为 10:90。

2.1.2 流速对分离效果的影响 流速不同,出峰的时间有很大的差异。由图 2 可知:流速越快,棒曲霉素出峰时间越早,反之亦然。选取流速时不宜过大,流速大,柱效低;流速小,分析时间长,最终选取流速为 0.8 mL/min,其保留时间为 6.372 min。

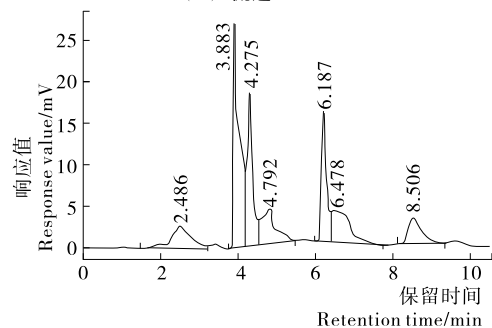
2.1.3 线性关系、精密度及最小检出限 在本法确定的试验条件下,棒曲霉素在 10~25 000 μg/L 范围内进行峰面积测定,棒曲霉素浓度和峰面积有很好的线性关系(见图 3)。其回归方程为 $Y=0.897\ 2X+14.49$,相关系数 $R=0.999\ 98$ ($n=9$)。选择 1 000 μg/L 的棒曲霉素标准溶液,做 6 次平行,标准差 0.53;RSD 值 0.072%,具有较好的精密度。本方法以样品峰高大于或等于 3 倍基线噪声峰高计算最小检出量为 10 μg/L。李俊设等^[14]采用 Agilent1100 ODS(5 μm, 150 mm×4.6 mm)色谱柱,流动相乙腈:水体积比 5:95,流速 1 mL/min 的色谱条件分离的结果要好,与 Zaied 等^[15]采用 Spherisorb ODII 柱,乙腈:水体积比 10:90,流速 1 mL/min 的色谱条件具有相同的分离效果。



(a) 流速1.0 mL/min



(b) 流速0.8 mL/min



(c) 流速0.5 mL/min

图 2 流速对分离效果的影响

Figure 2 Effect of different flow ratio on separation

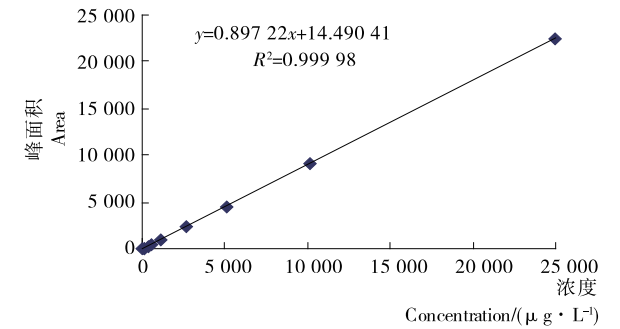


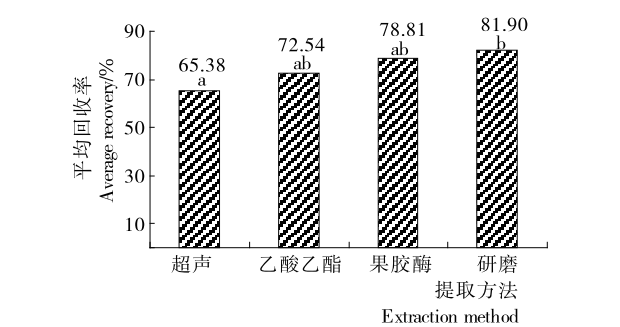
图3 棒曲霉素标准曲线
Figure 3 Standard curve of patulin

2.2 鲜食苹果中棒曲霉素提取方法的优化

由图4可知:直接研磨提取鲜食苹果中的棒曲霉素的回收率最高为81.90%,而超声波辅助提取回收率较低为65.38%。直接研磨提取与果胶酶辅助提取、乙酸乙酯辅助提取无显著差异($P>0.05$),与超声波辅助提取差异显著($P<0.05$)。果胶酶处理破坏果实细胞的网状结构,提高果实的破碎程度,能有效降低其粘度,改善压榨性能,提高出汁率和可溶性固形物含量,但对其棒曲霉素无显著影响^[16]。超声波辅助提取不能提高其回收率,并且其回收率只有65.37%,原因是超声波促使形成的空化气泡、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{H}$,导致棒曲霉素被降解,但是苹果中所含的类黄酮、 V_A 、胡萝卜素和 V_C 等均是非常有效的自由基清除成分,可能影响棒曲霉素的降解^{[17]21-22}。这与高振鹏等^[18]报道的超声波能够降解苹果汁中的棒曲霉素相一致,但与王丽^{[17]23-24}报道超声波处理不能降解对果汁中的棒曲霉素含量相反。乙酸乙酯辅助提取步骤增加,易造成损失,操作过程中有机溶剂易和果汁分层,易造成精密度低。直接研磨提取,方便、快捷,回收率较高,精密度高。故采用直接研磨提取的方法。

2.3 鲜食苹果中棒曲霉素纯化技术的优化

2.3.1 纯化方式对鲜食苹果中棒曲霉素 HPLC 分离效果的影响 由图5可知:PEP-SPEC 纯化技术能较好地使苹果中的棒曲霉素与其它杂峰分离开,洗脱效果较好,保留时间在6.372 min。LLE 萃取在7.090 min有个较小的杂峰未能很好地与棒曲霉素分离开,但能满足检测要求。两种前处理均适合于苹果汁中棒曲霉素的检测。



不同小写字母表示提取方法之间差异显著
图4 提取方法对加标回收率的影响

Figure 4 Effect of different extraction methods on recoveries

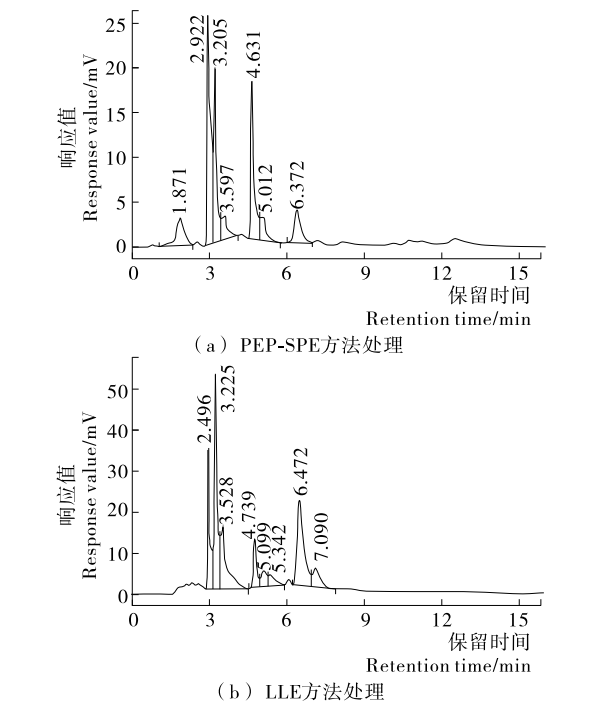


图5 纯化方式对鲜食苹果中棒曲霉素 HPLC 分离效果的影响

Figure 5 Effect of different purification techniques on HPLC separation for patulin in fresh apple

2.3.2 纯化方式对鲜食苹果中棒曲霉素加标回收率的影响 由表1可知:LLE 和 PEP-SPE 纯化对鲜食苹果中棒曲霉素的回收率和变异系数均很好,能够满足检测要求。PEP-SPE 纯化鲜食苹果中棒曲霉素回收率为82.42%~95.57%,LLE 的回收率在78.54%~80.73%,PEP-SPE 纯化鲜食苹果中棒曲霉素在3个加标水平下回收率都显著($P<0.05$)高于LLE。PEP-SPE 纯化技术的变异系数也优于LLE,重现性较好。

2.3.3 综合比较 由表2可知:PEP-SPE 与传统的LLE 纯化技术相比,PEP-SPE 溶剂的用量是液液萃取溶剂用量的1/7,大大减少了溶剂的用量,这与张苗等^[19]采用液液萃取浓缩苹果汁中的棒曲霉素,一个处理就需要96 mL 的溶剂量相比,更是降低了溶剂的使用量,避免了溶剂浪费对环境造成的污染。PEP 柱的回收率在82.42%~95.57%,显著高于液液萃取,与Beltran等^[20]采用LLE 纯化浓缩苹果汁中的棒曲霉素其回收率为71%~75%,Gaspar等^[21]采用液液萃取

表1 LLE 和 PEP-SPE 回收率和变异系数[†]
Table 1 LLE and PEP-SPE recoveries and coefficient of variation

添加量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	LLE 方法		PEP-SPE 方法	
	回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%
50	80.73 ^a	6.30	95.57 ^b	4.34
100	78.54 ^a	5.74	83.65 ^b	3.26
1 000	79.35 ^a	6.58	82.42 ^b	4.41

[†] 同行不同字母表示两种方法间差异显著。

混浊苹果汁的回收率为 60% 相比显著低于 PEP-SPE 纯化技术的回收率。PEP-SPE 方法操作简单,可操作性强,样品的提取和净化过程可同时完成,使得样品处理时间缩短。PEP-SPE 处理单个样品需 15 min,而液液处理需要 60 min,一个固相萃取装置能同时处理 12 或更多个样品,多个样品处理时更能体现 PEP-SPE 的快速,PEP-SPE 能够较快地处理大量的样品。固相萃取因其方便、快捷而逐渐引入到苹果测定棒曲霉素的含量的前处理中。Boonzaaijer 等^[22]采用 C₁₈ 柱纯化苹果及制品中的棒曲霉素,其回收率为 63%,RSD 为 17%,处理一个样品需 26 mL 溶剂量。本试验的 PEP-SPE 方法回收率为 82.42~95.57%,RSD 为 3.26~4.41%,溶剂用量为 8 mL。PEP-SPE 纯化技术的回收率远远高于 Boonzaaijer 等^[22]的结果,所需的溶剂量也远远少于 C₁₈ 柱所需的量。

表 2 LLE 与 PEP-SPE 纯化技术的综合比较⁺

Table 2 Comprehensive comparison with PEP-SPE and LLE purification techniques

方法	溶剂用量/mL	回收率/%	变异系数/%	图谱	操作时间/min
LLE	56	79.35~80.73	5.74~6.58	较好	60
PEP-SPE	8	82.42~95.57	3.26~4.41	较好	15

3 结论

本试验结果表明,测定棒曲霉素的 HPLC 的最佳色谱条件:乙腈与水体积比为 10:90;流速 0.8 mL/min;最佳提取方法是直接研磨提取;最佳纯化技术是 PEP 柱固相萃取其回收率在 82.42%~95.57%、变异系数 3.26%~4.41%,建立了灵敏高效的测定鲜食苹果中棒曲霉素的方法,为鲜食果蔬原料中棒曲霉素的检测提供理论依据。但是在提取苹果中的棒曲霉素时苹果浆易褐变,褐变对棒曲霉素的影响有待进一步研究。

参考文献

[1] 孙佳佳. 中国苹果进口贸易研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014: 5-6.

[2] 蒋雄图, 虞左向. 棒曲霉素[J]. 无锡轻工业学院学报, 1989, 8 (2): 73-84.

[3] 朱从会. 扩展青霉拮抗放线菌的分离、鉴定及其液体培养研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008: 1-2.

[4] Abdorreza M, Rouya T, Marzieh K, et al. Enzyme-assisted extraction and ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of patulin in apple juice and method optimization using central composite design [J]. *Analytica Chimica Acta.*, 2013, 804: 104-110.

[5] 宁水平, 尤杰玉, 于梅娥. 高效液相色谱法测定浓缩苹果汁中棒曲霉素[J]. 检验检疫科学, 2007, 17(1/2): 77-78.

[6] 王素梅, 杨文领. 高效液相色谱法测定浓缩苹果汁中棒曲霉素 [J]. 生物科技, 2003, 13(1): 18-19.

[7] 孟瑾, 黄菲菲, 吴榕, 等. 高效液相色谱法测定苹果及山楂制品中的展青霉素[J]. 上海农业学报, 2009, 25(1): 27-31.

[8] Wu Ri-na, Han Feng-lan, Shang Jie, et al. Analysis of patulin in apple products by liquid-liquid extraction solid phase extraction and matrix solid-phase dispersion methods:a comparative study [J]. *Eur. Food Res. Technol.*, 2009(228): 1 009-1 014.

[9] Gokmen V, Acar J, Sarioglu K. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction[J]. *Analytica Chimica Acta.*, 2005, 543: 64-69.

[10] Cho M S, Kim K, Seo E, et al. Occurrence of patulin in various fruit juices from South Korea: an exposure assessment [J]. *Food Sci. Biotechnol.*, 2010, 19(1): 1-5.

[11] 李静, 岳田利, 陈冬梅, 等. 基于 SPE—HPLC 的浓缩苹果汁中棒曲霉素检测方法的研究[J]. 食品科技, 2007(5): 242-245.

[12] Li Jian-ke, Wu Ri-na, Hu Qiu-hui, et al. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate [J]. *Food Control*, 2007, 18: 530-534.

[13] Li T P, Sakai R, Manaf N A, et al. High performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia [J]. *Food Control*, 2014, 38: 142-149.

[14] 李俊设, 宁水平, 尤杰玉. 高效液相色谱法测定浓缩苹果汁中棒曲霉素[J]. 医学动物防制, 2007, 23(5): 350-351.

[15] Zaied C, Abid S, Hlel W. Occurrence of patulin in apple-based- foods largely consumed in Tunisia[J]. *Food Control*, 2013, 31: 263-267.

[16] 金莹. 浓缩苹果汁中棒曲霉毒素的降解及苹果多酚抗肿瘤作用的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010: 38-41.

[17] 王丽. 展青霉素降解技术方法研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.

[18] 高振鹏, 岳田利, 袁亚宏, 等. 苹果汁中展青霉素的超声波降解 [J]. 农业机械学报, 2009, 40(9): 138-142.

[19] 张苗, 陶琳, 项海波, 等. 高效液相色谱法检测浓缩苹果汁中的棒曲霉素[J]. 粮食与食品工业, 2008, 15(3): 50-51.

[20] Beltran E, Ibanez M, Sancho J V, et al. Determination of patulin in apple and derived products by UHPLC—MS/MS: study of matrix effects with atmospheric pressure ionisation sources [J]. *Food Chemistry*, 2014, 142: 400-407.

[21] Gaspar E M S M, Lucena A F F. Improved HPLC methodology for food control-furfurals and patulin as markers of quality[J]. *Food Chemistry*, 2009, 114: 1 576-1 582.

[22] Boonzaaijer G, Bobeldijk I, Osenbruggen W A. Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method [J]. *Food Control*, 2005, 16: 587-591.