

고체상 추출법(SPE: Solid Phase Extraction)을 이용한 국내 사과주스 중 Patulin 간편·신속 분석방법

임종갑 · 장혜원 · 이광근*
동국대학교 식품공학과

Rapid and Simple Analytical Method for Removing Patulin from Apple Juice Using Solid Phase Extraction

Jong-Gab Yim, Hae-Won Jang, and Kwang-Geun Lee*
Department of Food Science and Technology, Dongguk University-Seoul

Abstract Patulin, a secondary metabolite of mold, is commonly found in rotten apples. Many countries regulate patulin at levels ranging from 30 to 50 µg/L. Most analytical methods for removing patulin from apple juice include liquid-liquid extraction (LLE), which is time and labor intensive. To replace the LLE method, a solid-phase extraction (SPE) method has been developed for apple juice and unfiltered apple juice. A portion of the test sample was applied to a macroporous copolymer cartridge and washed with 5 mL of 1% sodium bicarbonate, followed by 5 mL of 1% acetic acid. Patulin was eluted with 5 mL of 2% acetonitrile in anhydrous ethyl ether. The mobile phase was tetrahydrofuran in water (0.8:99.2) and was detected with a UV detector at 276 nm. Recoveries ranged from 95 to 101% in test samples, and the minimum detectable level was 30 ppb. Because this SPE method is fast, easy, reliable, and inexpensive, it could be applicable for companies or analytical agencies to analyze patulin concentrations in apple juice.

Key words: Solid Phase Extraction, Apple juice, HPLC, Patulin

서 론

현재, 농산물과 그 가공품의 경우 중금속, 농약 및 미생물이 생산하는 각종 진균 독소의 오염에 대한 관심이 높아져 이 분야에 대한 체계적인 연구가 요구되고 있다. 곰팡이 독소는 고온 다습하거나 건기가 심한 경우 곰팡이에 오염된 곡류, 견과류 및 이것으로 만든 생선에서 생성된다. 사람과 동물은 주로 소화기관을 통하여 중독되어 독성을 유발한다(1,2). 현재까지 약 300-400 종류의 곰팡이 독소가 알려져 있지만, 식품이나 사료 등에 존재하며 잠재적으로 인체에 유해한 영향을 줄 수 있는 곰팡이 독소는 10-20 종류가 있다(3). 곰팡이에 의한 독소 중 특히 문제가 되고 있는 것은 aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, patulin, penicillic acid, citrinin, zearalenone, trichothecenes(T-2 toxin) 등을 들 수 있다(4). 이중 patulin(2-Hydroxy-3,7-dioxabicyclo[4.3.0]nona-5,9-dien-8-one)은 사과 부패균인 *Penicillium expansum*을 포함해, *P. griseofulvum*, *P. patulum* 등과 *Aspergillus clavatus*, *A. terreus*, *A. giganteus*, *Bassochlamys fulva*, *B. nivea* 등 30속 60여 종의 곰팡이들이 생산한 미생물 독소로(5,6) 이중 *P. expansum*이 patulin

을 생성하는 가장 주요한 곰팡이이다(7). Patulin은 주로 사과의 병반에 서식하는 곰팡이의 이차 대사산물로서(8) 사과 이외에도 포도, 복숭아, 배 등에서도 검출된다. Patulin은 aflatoxin 등의 다른 곰팡이 독에 비하여 상대적으로 독성이 낮다고 알려져 있으나, 급성독소로 소화기의 장애를 유발하며 특히 영유아에게는 심각한 식중독 증상을 나타낸다. 1961년 쥐를 이용한 실험으로(Dickens and Jones) patulin의 발암성에 대한 논란이 있던 후(9), IARC(국제 암연구소)에 의해 발암물질 3그룹으로 분류되어 있다(8). Mice에 대한 LD₅₀은 0.3 mg/20 g(피하), 0.5 mg/20 g(정맥), 0.7 mg/20 g(경구)이고, rat은 경구 투여 시 4일 이내에 치사한다. FAO와 WHO의 합동 식품첨가물전문가위원회(The Joint of FAO/WHO Expert Community on Food Additives: JECFA)에서는 patulin의 잠정 일일 최대 허용량(TDI: Tolerable Daily Intake)을 0.4 µg/kg body weight로 정해놓았으며(10), 우리나라의 경우 사과주스 및 사과주스 농축액에 대해 50 µg/kg body weight/day의 일일 최대섭취 허용량을 정해놓았다(식품의약품안전청 고시 제 2004-18호).

식품의 안전성 평가를 위해서는 우선 체계화되고, 효율성이 높은 patulin 분석방법 확립이 갖춰져야 할 것이다. Patulin 분석은 특히 정확도·정밀도가 높고 간단한 분석방법의 수요가 매우 높은 상황이다. Patulin 분석을 위한 전처리 방법 중 LLE(liquid-liquid extraction) 법은 혼합되어 있는 오염물과 원하고자 하는 물질을 분리하는데 유용한 방법으로써 각종 용매에 대한 시료의 용해도 차이를 이용한 방법이다. 하지만 이 방법은 많은 양의 유기용매가 필요해 유기용매의 소모로 인한 경제적인 문제와 환경오염과 관련된 문제가 발생할 수 있으며, 실험자가 유기용매에 노

*Corresponding author: Kwang-Geun Lee, Department of Food Science and Technology, Dongguk University-Seoul, Seoul 100-715, Korea
Tel: 82-2-2260-3370
Fax: 82-2-2285-3370
E-mail: kwglee@dongguk.edu
Received October 22, 2009; revised January 12, 2010;
accepted January 22, 2010

출될 가능성이 클 뿐만 아니라 시간소모가 큰 단점을 갖고 있다(11). SPE(solid-phase extraction)는 liquid 형태의 시료를 solid phase(고체상)에 흡착시켜 용질을 흡착시킨 후 원하는 용질만을 선택적으로 탈착시키는 전처리 방법이다. 사과주스를 바로 cartridge에 주입하여 추출 정제시키므로 실험이 용이하고 여러 시료를 신속하게 분석할 수 있다는 장점이 있다(12,13). 하지만, 결과 값이 SPE cartridge의 종류에 따라 차이를 보이므로 column 선택에 어려움이 있을 수 있다. 현재 식품공전상의 시험법은 LLE에 대한 실험방법으로 고체상 추출에 의한 실험법은 이루어지지 않고 있다. 가장 흔히 사용되고 있는 AOAC 분석법도 ethyl acetate로 patulin을 추출하고 sodium bicarbonate 용액으로 분획하는 LLE 법이다(14). 따라서 본 연구에서는 이미 알려진 LLE 법에 비해 좀더 효율적인 전처리 조건을 탐색하고자 하였다. 이를 위해 시중에 유통되는 국내 사과주스 3가지를 대상으로 식품공전상의 일반 LLE 법과, 두 가지의 SPE cartridge(Strata/Merck)를 이용한 전처리법 비교 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

시료

실험에 사용한 사과 주스는 제품명이 다른 3개 제품으로 모두 과즙함량이 100%인 국내산 제품을 대형 마트에서 구입하여 사용하였으며, 냉장(5°C) 보관하였다.

표준물질 및 시약

실험에 사용한 patulin 표준물질은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, ethyl acetate(HPLC grade), water(HPLC grade), acetic acid, acetonitrile, tetrahydrofuran(THF, HPLC grade)은 Burdick & Jackson 사 제품(Muskegon, MI, USA)을 사용하였다. Sodium bicarbonate와 메탄올은 Wako사(Wako, Tokyo, Japan) 제품을 사용하였다.

표준용액의 제조

Patulin은 ethyl acetate로 용해한 후 200 µg/mL 농도가 되도록 조제하여 표준원액으로 사용하였다. 이 표준원액은 알루미늄 호일로 봉한 후 냉암소에 보관하며 사용하였다. 표준용액은 표준원액을 최종 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 µg/mL 농도가 되도록 질소가스를 통과시키면서 농축 후 초산용액으로 적절히 희석하여 조제한 다음 냉암소에 보관하며 사용하였다.

시험용액의 제조

Mobile phase는 tetrahydrofuran(THF, HPLC grade) 8 mL를 1 L 정용 플라스크에 넣고 3차 증류수로 채워 사용했다. 초산용액은 3차 증류수에 acetic acid로 pH 4.0을 조정하여 제조하였으며, 1.5%(w/v) sodium bicarbonate 용액은 sodium bicarbonate 1.5 g을 3차 증류수 100 mL에 녹여 사용하였다.

LLE(liquid-liquid extraction)법 추출

LLE 법은 사과주스 5 g을 시험관(I)에 정확히 취하여 ethyl acetate 10 mL를 넣고 1분간 격렬히 흔들어서 섞은 후 정치하여 Pasteur pipette으로 상층액을 다른 시험관(II)에 옮겼다. 시험관(I)에 ethyl acetate를 다시 10 mL를 넣고 1분간 흔들어서 섞은 후 정치하여 상층액을 위의 시험관(II)에 합하였다. 이 ethyl acetate 추출액에 1.5% sodium bicarbonate 용액 2 mL를 넣고 흔들어서 섞어 정치한 후 상층액을 Pasteur pipette으로 또 다른 시험관(III)에 옮

Table 1. Analytical conditions for patulin using HPLC

Items	Conditions
Instrument	HPLC (Shiseido Nanospace)
Column	C ₁₈ (4.6×250 mm, 5 µm)
Flow rate	0.7 mL/min
Injection volume	20 µL
Mobile phase	THF:Water (0.8:99.2)
Run time	25 min
Detector	UV Detector (276 nm)

긴다. 시험관(II)에 ethyl acetate 5 mL를 넣고 흔들어서 섞어 정치한 후 상층액을 시험관(III)에 합하였다. 이 ethyl acetate 추출액에 sodium sulfate 1 g을 넣고 30초간 흔들어서 준 후 마지막으로 상층액을 시험관(IV)에 옮겨 담아 질소 농축한 후 ethyl acetate 용액이 완전히 농축되면 잔류물을 acetic acid 용액 0.5 mL에 용해하여 시험용액으로 사용하였다.

SPE(solid-phase extraction) Strata-X법

SPE 방법 중 Strata-X cartridge의 경우 column에 3차 증류수 7 mL를 흘려보낸 후 methanol 7 mL를 흘려 안정화(conditioning) 시켜주었다. 안정화된 column에 사과주스 5 mL를 loading 시킨 후 1% sodium bicarbonate 5 mL와 1% acetic acid 5 mL를 차례로 흘려 방해물질 등을 제거해 준 다음 세척이 끝난 column을 상온에서 1시간 정도 방치한 후 ethyl acetate/ethyl ether 5 mL를 이용해 추출하였다. 추출된 용액을 질소 농축기를 이용해 완전히 농축한 후 1% acetic acid 용액 0.5 mL를 넣고 혼합(vortexing)한 후 syringe filter로 여과하여 amber via에 보관하여 분석에 사용하였다.

SPE(solid-phase extraction) Merck법

Merck사의 Extrelut NT20 cartridge는 안정화 없이 바로 column에 사과주스를 loading 한 후 20분 가량 방치한 다음 ethyl acetate/ethyl ether를 이용하여 추출한 용액을 질소 농축기로 완전히 농축 후 1% acetic acid 용액 0.5 mL를 넣고 혼합한 후 분석에 사용하였다.

HPLC 분석

Shiseido HPLC Nanospace SI-2와 Shiseido Nanospace 3002 UV Detector를 사용하여 분석하였으며, column은 Shiseido사의 C₁₈ (4.6×250 mm, 5 µm) column을 택하여 사용하였다. Mobile phase (THF 8 mL/water 1 L)는 0.7 mL/min 유속으로 흘려 276 nm에서 흡광도를 측정하였고(Table 1), patulin peak의 면적 대 patulin 농도의 표준곡선을 이용하여 patulin 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

회수율 및 추출법 비교 실험

LLE 방법은 앞서 언급한 바와 같이, 혼합되어 있는 오염물과 원하고자 하는 물질을 분리하는데 유용한 방법으로써 곰팡이 독(mycotoxin), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs) 및 여러 가지 수용성 물질의 실험법으로 널리 이용되고 있다. 본 연구에서도 시험관을 사용한 반복적인 추출조작을 통하여 방해물질을 제거함으로써 정확도와 회수율이 높은 HPLC 분석결과를 얻을 수 있었다. 본 연구에서도 LLE 방법을 이용한 사과주스 중 patulin 분석 시 주스에 첨가한 patulin 표준물질 200 ng/mL 및 500 ng/mL

Table 2. Recovery rates of patulin using LLE and SPE

Added (ng/mL)	LLE			SPE					
	Recovery (%)	SD ¹⁾ (%)	RSD ²⁾ (%)	Strata-X			Extrelut-NT20		
				Recovery (%)	SD (%)	RSD (%)	Recovery (%)	SD (%)	RSD (%)
200	106	11.4	10.8	101	9.7	9.6	101	12.1	12.0
500	92	2.9	3.2	96	1.2	1.2	95	4.7	5.0

¹⁾Standard deviation

²⁾Calculated as (standard deviation/mean)×100, expressed as the coefficient of variance (%CV)

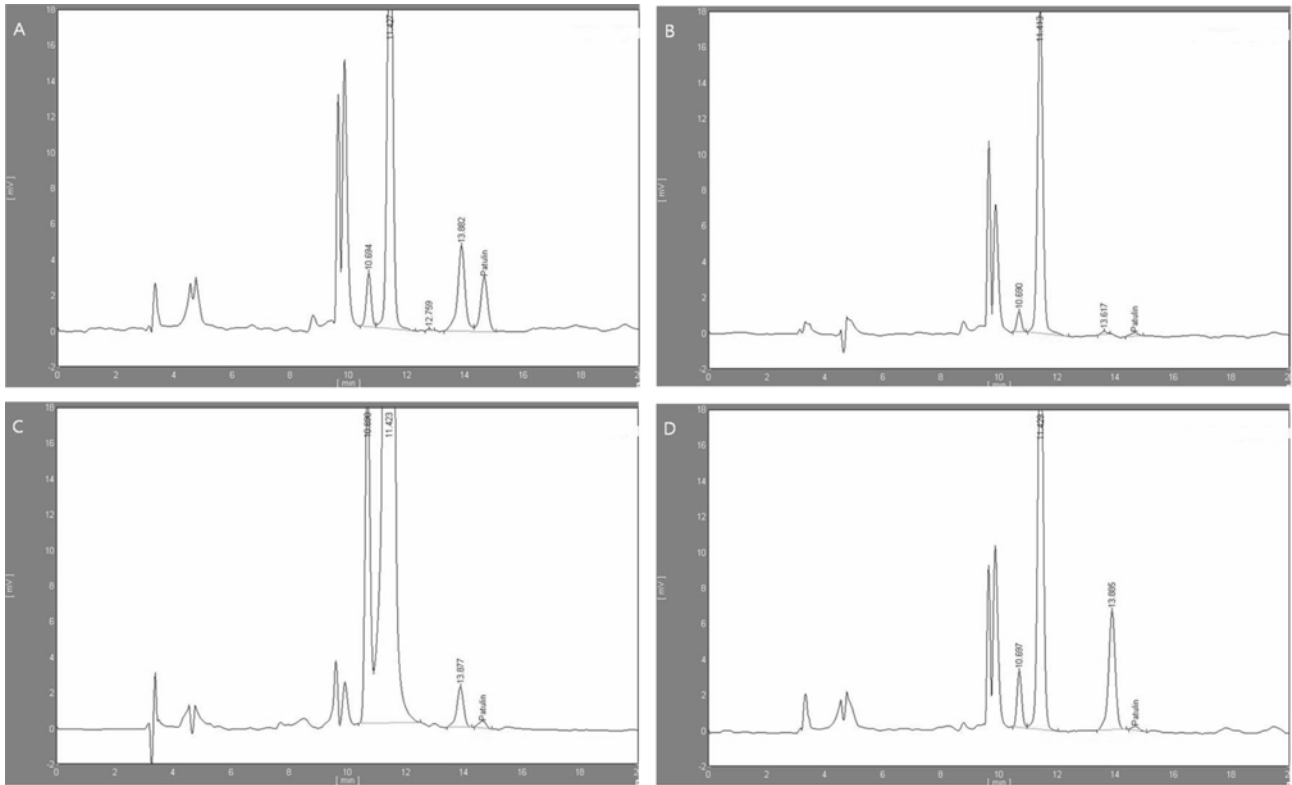


Fig. 1. HPLC chromatogram of patulin in apple juice using LLE method. (A) standard, (B) apple juice I, (C) apple juice II and (D) apple juice III.

에 대해 92-106%의 회수율을 보였고(Table 2), 실험에 사용한 국내 사과주스(과즙함량 100%)의 분석 결과 또한 patulin이 검출되는 13-15분 사이 방해되는 peak가 검출되지 않아 정제가 잘 이루어진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). Patulin이 검출되는 시간에 주스성분과의 분리가 용이하기 위해서 추출 정제 과정이 중요하다고 보고되었다(17). 엄 등(18)은 LLE 법을 통해 사과주스의 허용 기준인 50 µg/kg를 고려하여 사과주스, 오렌지주스, 배주스에 patulin을 첨가(spiking)한 회수율을 측정된 결과, 각각 85-92%, 97-99%, 100-104%의 높은 회수율을 보였다. 검출 한계(LOD: limit of detection)는 신호 대 잡음비가(signal/noise, S/N)가 3 이상인 농도를 검출 한계값으로 정하였고 30 ng/mL 수준이었다. SPE 방법은 LLE 방법과 비교 시 정제율이 동일하거나 비슷한 수준으로 처리시간이 짧으며, 조작이 간편하다는 이점으로 다량의 시료를 신속하고 정확하게 처리해야 하는 식품 및 환경 분야 등에서 많이 사용되고 있다. 현재 약 200여종의 SPE cartridge가 출시되어 있는데 그 중 Phenomenex사의 Strata-X 시리즈와 Merck사의 Extrelut NT 20을 사용하여 실험을 진행하였다. Strata-X의 경우 일반 SPE 방법과 동일하게 안정화 및 세척과정을 거쳐 추출 및

정제가 진행되는데 초당 1-2방울의 속도로 추출을 하기 위해선 vacuum pump나 syringe를 cartridge에 연결하여 압력을 가해 주어야 한다(19). 이 실험에서는 vacuum pump를 이용하여 추출 및 정제를 수행하여 신속한 분석이 가능하였다. 국내 사과주스 A, B, C를 분석한 결과 patulin 오염도는 각각 1.5-3.2 ng/mL 이었으며, 회수율은 96-101% 수준이었다(Table 3, Fig. 2). Li 등(20)은 Agilent Technologies사의 Accu-BoNDII ODS-Cartridge를 사용한 SPE 방법을 통해 사과주스의 patulin 추출 및 분석한 결과 96.4-114.1%의 회수율을 나타내었고, SPE 방법이 patulin 추출방법으로 타당하다고 확인하였다. Cho 등(17), Gonzalez-Osnaya 등(21)의 보고에 의하면 국내외 사과주스의 patulin 함량이 50 ng/mL 이하인 것으로 보고되고 있다.

일반 SPE 방법은 추출 및 정제 시 1시간 정도 표면 건조시간을 가지는데, cartridge의 안정화 과정 중 사용된 물을 완전히 증발시키기 위한 과정이다(22). Extrelut-NT20의 경우 안정화 및 세척 과정이 생략됨으로 cartridge 표면을 건조할 필요가 없고, 추출 또한 vacuum pump나 syringe를 사용하지 않아도 될 만큼 빠른 속도로 진행되었다. Patulin이 표준물질분석 시에 peak를 보

Table 3. Concentrations of patulin in apple juice using various extraction methods

Apple juice	LLE			SPE					
	Concentration (ppb)	SD ¹⁾ (%)	RSD ²⁾ (%)	Concentration (ppb)	SD (%)	RSD (%)	Concentration (ppb)	SD (%)	RSD (%)
A	1.6	6.1	38.1	ND ³⁾	-	-	ND	-	-
B	3.2	3.2	10.0	ND	-	-	ND	-	-
C	2.2	5.8	26.4	ND	-	-	1.5	6.5	43.3

¹⁾Standard deviation

²⁾Calculated as (standard deviation/mean)×100, expressed as the coefficient of variance (%CV)

³⁾Not detected

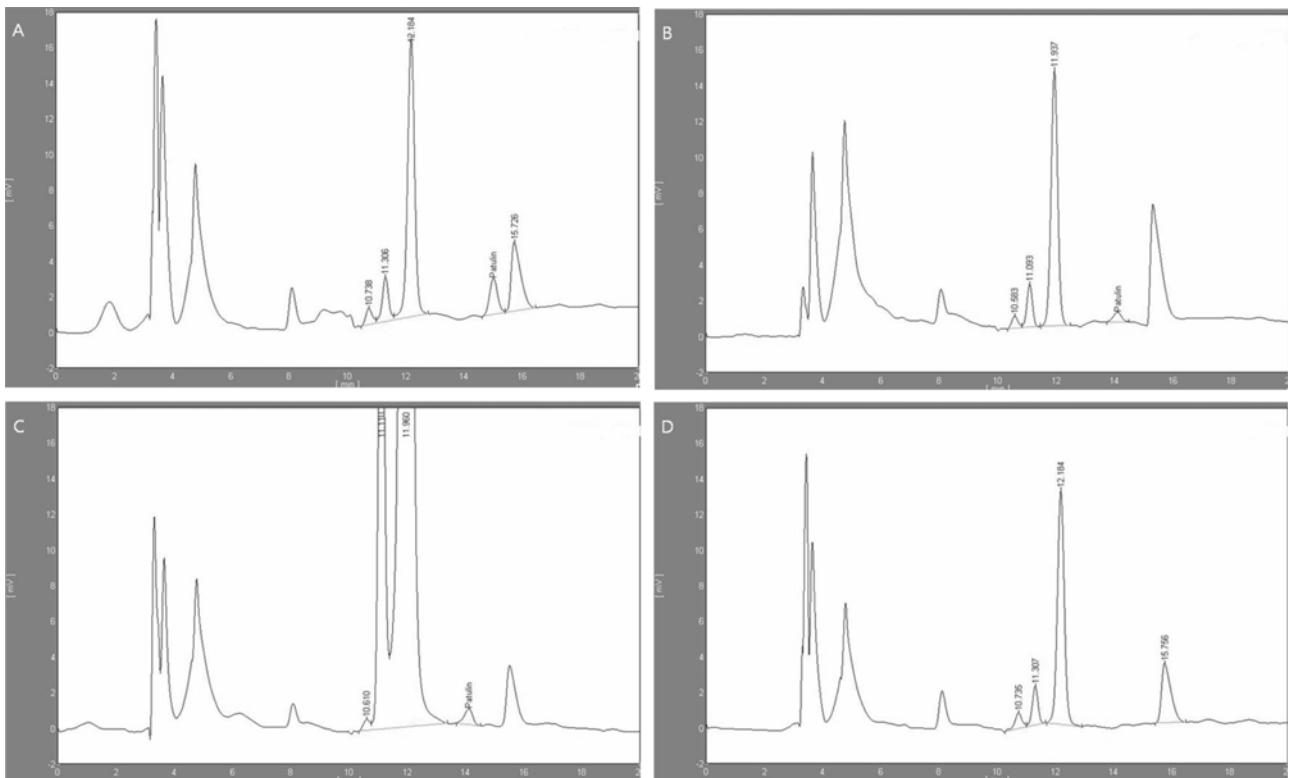


Fig. 2. HPLC chromatogram of patulin in apple juice using SPE (strata-x) method. (A) standard, (B) apple juice I, (C) apple juice II and (D) apple juice III.

여, 분석이 가능하였으나, 국내 사과주스 A, B, C 분석결과에서는 patulin이 불검출되었다(Fig. 3). 세척 과정이 생략된 만큼 정제율이 LLE나 Strata-X에 비해 낮은 수준이었는데, 이와 같은 추출 방법이 국내 사과주스 분석결과에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

실험방법의 유효성 검증

Patulin 표준물질에 대한 검량곡선은 정량 범위 내에서 상관계수(R^2) 0.9998 이상의 직선성을 보였으며, 검출한계는 30.0 ng/mL 농도로 측정되었다. HPLC를 통한 분석 시 mobile phase의 tetrahydrofuran(THF) 첨가 비율에 따라 검출시간이 차이를 보였는데 조성을 달리하며 실험한 결과 3차 증류수에 THF 8 mL를 용해시켜 1 L로 정용했을 때 가장 이상적인 chromatogram pattern을 보였다.

기기분석 시 HPLC column의 선택도 결과에 매우 중요한 요소가 되는데 patulin 분석의 경우 3.0×250 mm와 4.6×250 mm C_{18}

column을 사용한 분석사례가 대부분이었다. 3.0×250 mm C_{18} column을 사용했을 경우 patulin의 검출시간이 6-7분 수준으로 구경이 큰 4.6×250 mm C_{18} column과 비교 시 7분 정도 검출시간(RT)이 빠른 것을 확인할 수 있었다. 하지만, patulin과 비슷한 시간대에 확인되는 HMF(Hydroxy methyl furfural) 등과 peak가 겹쳐 분석 값을 계산할 수 없었다. 4.6×250 mm C_{18} column을 사용하여 분석한 경우 그래프 상에 patulin이 약 13-15분 사이에 나타났으며, HMF와는 1분 정도 검출시간의 차이를 보여 정확한 분석 값을 얻을 수 있었다(Fig. 4). Li 등(20), Gaspar 등(23)의 보고에 의하면 사과주스의 patulin 분석방법을 향상시키기 위해서 4.6×250 mm C_{18} column을 사용하였다. LLE와 SPE를 이용한 분석법의 상대회수율은 LLE 추출의 경우 92-106%, SPE 추출의 경우 strata-X가 96-101% Extrelut-NT20이 95-101% 수준으로 모두 대상물질 회수율 승인기준(acceptance criteria) 범위를 만족시키는 것으로 나타났다(Table 1). 그리고 SPE를 이용한 분석 값의 표준편차는 strata-X가 1.2-9.7%, Extrelut-NT20이 4.7-12.1% 수준이었

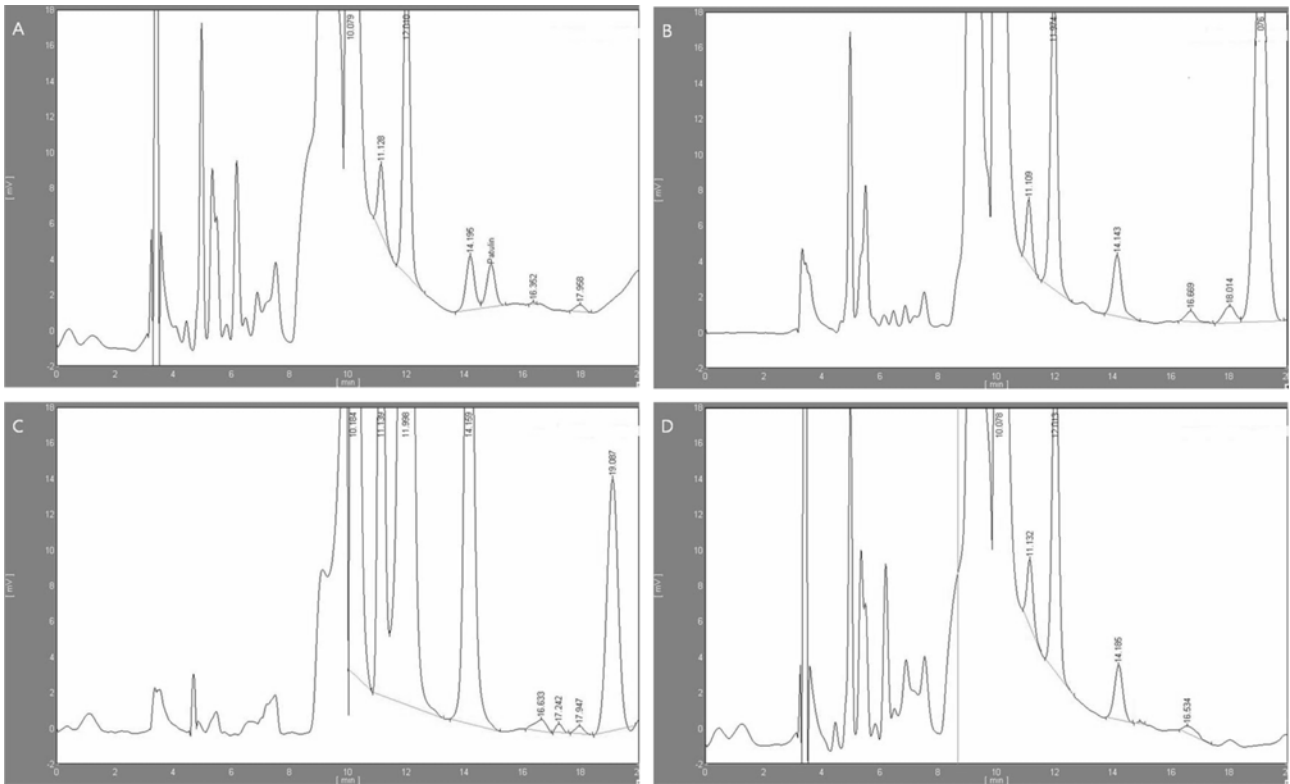


Fig 3. HPLC chromatogram of patulin in apple juice using SPE (Extrelut-NT20) method. (A) standard, (B) apple juice I, (C) apple juice II and (D) apple juice III.

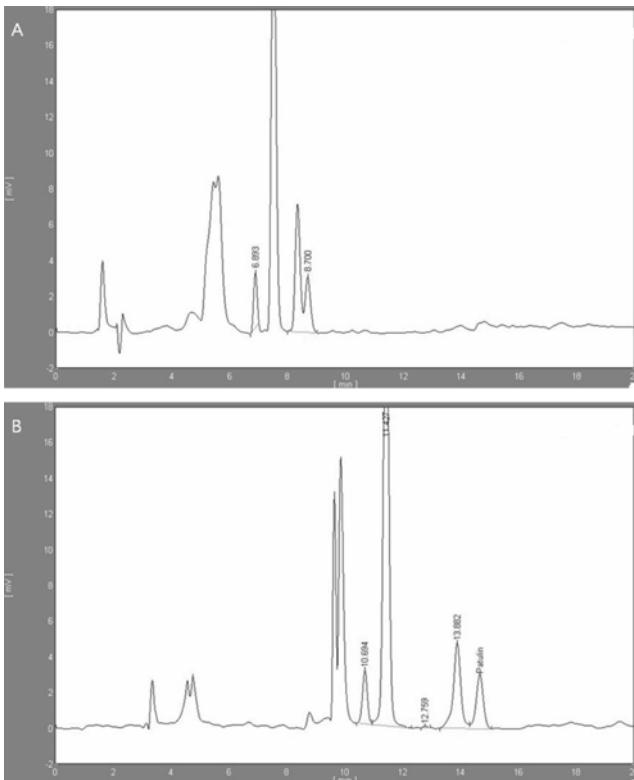


Fig. 4. HPLC chromatogram of patulin using various C18 columns. (A) 3.0x250 mm C₁₈ column, (B) 4.6x250 mm C₁₈ column.

다. 정밀도의 경우 strata-X가 1.2-9.6%, Extrelut-NT20이 5.0-12.0%로 재현성이 우수하였다.

요 약

Patulin은 곰팡이의 이차 대사산물로 주로 썩은 사과의 병반에서 발견된다. 사과주스 중에 포함된 patulin에 대한 실험법은 LLE법을 이용한 방법이 대부분이다. 이를 대체하기 위해 SPE법을 통한 사과주스 중 patulin 분석법을 본 연구에서 시행하였다. 시료인 사과주스를 다공성 중합체인 고체상 카트리지에 주입한 후 1% sodium bicarbonate 용액 5 mL와 1% acetic acid 5 mL를 차례로 흘려 방해물질 등을 제거해준 다음 정제가 끝난 카트리지를 상온에서 1시간 정도 방치한 후 ethyl acetate/ethyl ether 5 mL를 이용해 추출하였다. 추출된 용액을 질소 농축기를 이용해 완전 농축한 후 1% acetic acid 용액 0.5 mL를 넣고 혼합 후 syringe filter로 여과하여 amber vial에 보관하여 분석에 사용하였다. HPLC 분석에 사용된 이동상은 THF 8 mL를 1 L 정용 플라스크에 넣고 물로 채워 사용하였다. HPLC 분석조건은 이동상을 0.7 mL/min 유속으로 흘려 276 nm에서 흡광도를 측정하였고, 샘플주입은 20 µg/L로 하였다. LOD는 30 ng/mL 수준이었다. 실험 결과 SPE법은 기존의 식품공전시험법(LLE)보다 분석시간이 1/3로 줄어들었고, 적은 양의 용매만으로 추출 및 정제가 가능하였으며 실험과정이 간단하여 공전의 방식보다 손쉽게 분석할 수 있었다. 특히, strata-X를 통한 SPE 추출방법은 재현성과 회수율 또한 우수해 저 농도 분석에도 적합하였다. 이와 같이 기존 분석법에 비해 신속하고 간소하며 정확한 정량분석 및 우수한 회수율과 신뢰도를 얻을 수 있어 다량의 분석을 요하는 연구기관 및 단

체에 매우 효율적일 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 동국대학교의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

문헌

- Train A, Rosell MG, Guardino X. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins: Aflatoxin and ochratoxin A. *J. Chromatogr. A* 1047: 235-240 (2004)
- Dorner JW, Cole RJ, Connick WJ, Daigle DJ, McGuire MR, Shasha BS. Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxin contamination in peanuts. *Biol. Control* 26: 318-324 (2003)
- Rief K, Metzger W. Determination of aflatoxins in medicinal herbs and plant extracts. *J. Chromatogr. A* 692: 131-136 (1995)
- Park KY. Factors affecting aflatoxin production. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 13: 117-126 (1984)
- Papp E, H-Otta K, Zaray G, Mincsovcics E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *J. Microchem.* 73: 39-46 (2002)
- Harrison MA. Presence and stability of patulin in apple products: A review. *J. Food Safety* 9: 147-153 (1989)
- Steiman R, Seigle-Murandi F, Sage L, Krivobok S. Production of patulin by micromycetes. *Mycopathologia* 105: 129-133 (1989)
- IARC. Patulin, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 40: 83-98 (1986)
- Ukai T, Yamamoto Y, Yamamoto T. Studies on the poisonous substance from a strain of *Penicillium*, II. Culture method of Hori Yamamoto strain and chemical structure of its poisonous substance. *J. Pharmacol. Sci.* 74: 450-454 (1954)
- Rief K, Metzger W. Determination of aflatoxins in medicinal herbs and plant extracts. *J. Chromatogr. A* 692: 131-136 (1995)
- Trucksess MW, Tang Y. Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. *J. AOAC Int.* 82: 1109-1113 (1999)
- Gil BD. Poisoning and preventive measures caused by organic solvent. *Ind. Health* 5: 30-34 (1997)
- Huand Z, Zhang S. Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA, and MDMA in urine samples using disk solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry after immunoassay screening. *J. Chromatogr. B* 792: 241-247 (2003)
- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International 16th ed. Method 995.10. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD, USA (1997)
- Lee MR, Yu SC, Lin CL, Hu SH. Solid-phase extraction in amphetamine and methamphetamine analysis of urine. *J. Anal. Toxicol.* 21: 278-282 (1997)
- Fidente P, Seccia S, Vanni F, Morrica P. Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1094: 175-178 (2005)
- Cho WI, Choi YB, Moon TW. Determination of patulin in commercial apple juice in Korea by high performance liquid chromatography. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 412-415 (1997)
- Eom JH, Byun JA, Park YG, Seo EC, Lee EM, Kim MR, Sun NK, Kim CS, Jung WY, Jung RS, Na MA, Lee JH. Monitoring of patulin levels in fruit juices and beverages. *J. Fd Hyg. Safety* 24: 56-62 (2009)
- Österdahl BG, Johnsson H, Nordlander I. Rapid extrelut column method for determination of levamisole in milk using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 337: 151-155 (1985)
- Li JK, Wu RN, Hu QH, Wang JH. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. *Food Control* 18: 530-534 (2007)
- González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. Exposure to patulin from consumption of apple-based products. *Food Addit. Contam.* 24: 1268-1274 (2007)
- Thomas AE, Midori ZG. Syringe-cartridge solid-phase extraction method for patulin in apple juice. *J. AOAC Int.* 86: 1160-1163 (2003)
- Gaspar EMSM, Lucena AFF. Improved HPLC methodology for food control-furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chem.* 114: 1576-1582 (2009)