

## 食品中棒麴毒素之檢驗方法探討

賴君宜 劉佳鑫 蕭舜元 郭敬安 蔡乙禎 彭冠智  
沈盈如 張淑涵 高雅敏 林美智 曾素香

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

### 摘要

棒麴毒素存在於多種發黴的水果、蔬菜及穀物中，尤以蘋果及其加工製品最常受到棒麴毒素污染。衛生福利部於「食品中污染物質及毒素衛生標準」訂有蘋果製品、飲料類及嬰幼兒食品中棒麴毒素之限量標準，亦公告「食品中黴菌毒素檢驗方法－棒麴毒素之檢驗(MOHWT0005.02)」對應衛生標準執行檢驗。惟有實驗室反映現行公告檢驗方法於前處理添加果膠酶會影響回收率，且部分檢體於光譜分析時因基質干擾無法判讀數據。本研究針對上述問題優化前處理流程及評估以液相層析串聯質譜儀分析棒麴毒素之可行性。優化內容包括減少取樣量、刪除果膠酶及減壓濃縮步驟、調整以25%乙腈溶液作為回溶液及採用同位素內標校正流程，並改以液相層析串聯質譜儀分析。本研究依衛生標準挑選不含棒麴毒素之蘋果汁、蘋果醋、黑棗汁及綜合果泥等4件不同類型之空白檢體，分別添加5及50  $\mu\text{g/kg}$ 棒麴毒素依優化之檢驗方法執行添加回收試驗，結果顯示，同日內之平均回收率介於96.1-110.5%，CV為1.2-6.6%，異日間之平均回收率介於97.0-112.0%，CV為2.3-6.6%，測試結果皆符合「食品化學檢驗方法之確效規範」，定量極限均為5  $\mu\text{g/kg}$ 。優化後之方法可節省2-4小時之檢驗時間，且方法之準確度及精密度皆有所提升。以本研究優化之方法進行市售產品之方法適用性驗證，17件檢體皆為未檢出棒麴毒素，符合衛生標準。後續將依研究成果進行現行檢驗方法修訂及公告，供各界參考使用。

**關鍵詞：**棒麴毒素、蘋果製品、嬰幼兒食品、液相層析串聯質譜儀

### 前言

棒麴毒素(Patulin)為食品及飼料間常見的污染物，由青黴菌屬(*Penicillium*)、麴黴菌屬(*Aspergillus*)等黴菌產生，主要存在於發霉腐爛的蘋果中<sup>(1-3)</sup>。棒麴毒素之急毒性為腸胃道出血及潰瘍，長期毒性為肝、腎毒性、基因毒性及致畸胎性，國際癌症研究機構(International Agency for Research on Cancer, IARC)將其列入第3類－對人的致癌性無法被

分類(Not classifiable)<sup>(4)</sup>。

美國FDA公布棒麴毒素之每日可接受攝取量為0.43  $\mu\text{g/kg}$ <sup>(5)</sup>。我國「食品中污染物質及毒素衛生標準」<sup>(6)</sup>及歐盟Commission Regulation (EC) No 2023/915<sup>(7)</sup>皆針對棒麴毒素訂定規範，蘋果製品之限量標準為25  $\mu\text{g/kg}$ ，飲料類為50  $\mu\text{g/kg}$ ，嬰幼兒食品為10.0  $\mu\text{g/kg}$ 。

由於棒麴毒素可能存在於各種蘋果產品中，以蘋果汁為例，其成分複雜：包括糖、酚類化合物、山梨醇、胺基酸、酯、有機酸和

礦物質等，須以適當前處理流程進行萃取及淨化，再以分析儀器進行偵測<sup>(1,8)</sup>。目前棒麴毒素常見之前處理流程係採用乙酸乙酯之液液萃取(Liquid-liquid extraction, LLE)、QuEChERS或固相萃取(Solid-Phase Extraction, SPE)為主，分析儀器則以HPLC-UV或LC-MS/MS為主。由於質譜具有高靈敏度、高選擇性及高準確度等特點<sup>(8)</sup>，故本研究擬開發以液相層析串聯質譜儀分析之方法。

目前衛生福利部(下稱衛福部)公告之「食品中黴菌毒素檢驗方法－棒麴毒素之檢驗(MOHWT0005.02)」<sup>(9)</sup>係108年「天然毒素及污染物檢驗方法開發」委託辦理計畫之研究成果<sup>(10)</sup>，該研究參考AOAC Official Method 2000.02<sup>(11)</sup>，並比較樣品經酵素水解處理對棒麴毒素回收率之影響。結果顯示，添加果膠酶對於回收率並無顯著提升，但可使前處理之分層效果更明顯，故將果膠酶納入前處理流程。

由於該公告檢驗方法陸續收到外界實驗室反映添加果膠酶影響回收率、部分檢體於吹氮流程無法吹乾、方法具基質干擾無法判讀數據及建議加入液相層析串聯質譜儀輔助判定等意見回饋，故本研究擬優化現行檢驗方法及建立以液相層析串聯質譜儀定量方法，評估包含果膠酶適用性、基質效應及內標之使用等，以建立簡便、準確並可符合衛生標準之檢驗方法為目標。未來將依研究成果進行檢驗方法修訂，供各界參考使用。

## 材料與方法

### 一、檢體來源

本研究於111至113年自超市及網路商店購買蘋果製品及嬰幼兒食品，共17件。檢體未開封前於常溫保存，開封後於冷藏保存。

### 二、試驗藥品

#### (一)對照用標準品

棒麴毒素(Patulin)標準品(純度98%)購自Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada)。棒麴毒素-<sup>13</sup>C<sub>7</sub> (Patulin-<sup>13</sup>C<sub>7</sub>)內部標準品(25 µg/mL in Acetonitrile)購自LGC Ltd. (Teddington, UK)。

#### (二)試劑

乙腈為液相層析級，購自J.T. Baker (Center Valley, PA, USA)；乙酸乙酯為液相層析級、甲基第三丁基醚為試藥特級，均購自Macron Fine Chemicals (Center Valley, PA, USA)；無水硫酸鈉為試藥特級，購自Honeywell Fluka (Seelze, Germany)；醋酸、碳酸鈉及甘油均為試藥特級，購自MERCK (Darmstadt, Germany)；果膠酶(Pectinase, 16 U/mg)，購自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)；實驗過程所使用的水為比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上之去離子水。

## 三、儀器設備

- (一)離心機(Allegra 25R Centrifuge, Beckman, USA)。
- (二)旋渦混合器(Vortex-Genie 2 Mixer, Scientific Industries, USA)。
- (三)氮氣濃縮裝置(Nitrogen evaporator, EYELA, 東京理化學株式會社，日本)。
- (四)超音波振盪器(DELTA DC300H, 臺灣原拓科技公司，臺灣)。
- (五)液相層析串聯質譜儀(Acquity UPLC及Xevo®TQ-S micro, Waters, USA)

## 四、器具及材料

- (一)濾膜(直徑17 mm，孔徑0.2 µm，聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene difluoride, PVDF)材質，ThermoFisher, USA)。
- (二)固相萃取匣(Oasis® HLB, 200 mg, 6 mL, Waters, USA)。

## 五、試藥及標準品調製

- (一)標準原液：取棒麩毒素對照用標準品約5 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷藏避光貯存。
- (二)內部標準原液：取棒麩毒素- $^{13}\text{C}_7$ 內部標準品40  $\mu\text{L}$ ，以乙腈定容至1 mL，作為內部標準原液，冷藏避光貯存。
- (三)移動相溶液A：取醋酸1 mL，加去離子水使成1,000 mL
- (四)移動相溶液B：取醋酸1 mL，加乙腈使成1,000 mL。

## 六、檢液之調製

### (一)液液萃取

將檢體均質混勻，取約2 g，精確稱定，置於15 mL離心管中，加入內部標準原液50  $\mu\text{L}$ 及去離子水2 mL，加入乙酸乙酯4 mL，振盪1分鐘，以2,000  $\times g$ 離心3分鐘。收集上層液，下層液加入乙酸乙酯4 mL，重複上述萃取步驟，合併上層液，加入1.5%碳酸鈉溶液0.8 mL，振盪1分鐘，以2,000  $\times g$ 離心3分鐘，收集上層液移至另一15 mL離心管，下層液加入乙酸乙酯2 mL，重複上述萃取步驟，合併上層液，加入無水硫酸鈉1 g，旋渦混合30秒，振盪1分鐘，以2,000  $\times g$ 離心3分鐘，收集上層液移至另一15 mL離心管，下層液加入乙酸乙酯2 mL，重複上述萃取步驟，合併上層液，於40°C以氮氣吹乾，殘留物加入25%乙腈溶液1 mL，旋渦混合30秒，以超音波振盪溶解，經濾膜過濾，供作檢液。

### (二)固相萃取匣方法

將檢體混勻後，取約2 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準原液50  $\mu\text{L}$ 、去離子水2 mL及乙酸乙酯4 mL，振盪1分鐘，以2,000  $\times g$ 離心3分鐘。收集上層液於40°C以氮氣吹乾，殘留物加入去離子

水5 mL使溶解，旋渦混合30秒，以超音波振盪溶解供淨化用。取淨化用溶液，注入預先以甲醇6 mL及去離子水6 mL潤洗，並抽真空使去離子水完全去除之固相萃取匣，棄流出液，加入1%碳酸鈉溶液5 mL，棄流出液，抽真空使1%碳酸鈉溶液完全去除，加入0.1%醋酸溶液2 mL，棄流出液，抽真空使0.1%醋酸溶液完全去除。以10%乙酸乙酯之甲基第三丁基醚溶液3 mL沖提2次，收集沖提液，於40°C以氮氣吹乾，殘留物加入25%乙腈溶液1 mL，旋渦混合30秒，以超音波振盪溶解，經濾膜過濾，供作檢液。

## 七、儀器參數之設定

### (一)液相層析儀

層析管柱為ACQUITY UPLC BEH C18，1.7  $\mu\text{m}$ ，內徑2.1 mm  $\times$  10 cm，管柱溫度40°C，注入量為3  $\mu\text{L}$ ，移動相A為0.1%醋酸溶液，移動相B為含0.1%醋酸之乙腈溶液，流速0.3 mL/min，層析梯度如表一。

### (二)串聯質譜儀

離子源採電灑離子化(Electrospray ionization)負離子模式，毛細管電壓0.8

表一、層析梯度條件

層析條件	時間(min)	A (%)	B (%)
梯度一	0.0 $\rightarrow$ 1.0	98 $\rightarrow$ 98	2 $\rightarrow$ 2
	1.0 $\rightarrow$ 3.0	98 $\rightarrow$ 55	2 $\rightarrow$ 45
	3.0 $\rightarrow$ 3.5	55 $\rightarrow$ 1	45 $\rightarrow$ 99
	3.5 $\rightarrow$ 5.0	1 $\rightarrow$ 1	99 $\rightarrow$ 99
	5.0 $\rightarrow$ 5.5	1 $\rightarrow$ 98	99 $\rightarrow$ 2
	5.5 $\rightarrow$ 10.0	98 $\rightarrow$ 98	2 $\rightarrow$ 2
	0.0 $\rightarrow$ 5.0	97 $\rightarrow$ 97	3 $\rightarrow$ 3
梯度二	5.0 $\rightarrow$ 5.1	97 $\rightarrow$ 1	3 $\rightarrow$ 99
	5.1 $\rightarrow$ 6.6	1 $\rightarrow$ 1	99 $\rightarrow$ 99
	6.6 $\rightarrow$ 6.7	1 $\rightarrow$ 97	99 $\rightarrow$ 3
	6.7 $\rightarrow$ 10.2	97 $\rightarrow$ 97	3 $\rightarrow$ 3

表二、棒麩毒素及其同位素內標以LC-MS/MS分析之MRM參數

分析物	離子對 前驅離子( <i>m/z</i> ) > 產物離子( <i>m/z</i> )	進樣錐 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
棒麩毒素	153 > 81*	12	8
	153 > 53	19	13
	153 > 109	12	12
棒麩毒素- <sup>13</sup> C <sub>7</sub> (I.S.)	160 > 115	28	7

\*定量離子對

KV，離子源溫度150℃，溶媒揮散溫度450℃，溶媒揮散氣體流速1,200 L/hr，進樣錐氣體流速200 L/hr。搭配多重反應偵測模式(Multiple Reaction Monitoring, MRM)進行偵測，MRM偵測離子對如表二。

## 八、鑑別及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各3 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，參照七、儀器參數之設定條件。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間(Retention time)及MRM相對離子強度鑑別之，並依下列計算式求出檢體中棒麩毒素之含量(μg/kg)。

$$\text{檢體中棒麩毒素之含量}(\mu\text{g/kg}) = \frac{C \times V}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中棒麩毒素之濃度(ng/mL)

V：檢液最後溶解之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

## 九、添加回收試驗

將檢體均質混勻，取約2 g，精確稱定，置於15 mL離心管中，加入適量標準原液及內部標準原液，使檢體內棒麩毒素含量分別為5及50 μg/kg (含內部標準品25 μg/kg)，靜置30分鐘，依所建立之方法進行添加回收試驗，每種

濃度進行5重複。計算5重複試驗之平均回收率及變異係數(Coefficient of variation, CV)，評估本方法之準確度及精密度。

## 十、定量極限之評估

將檢體均質混勻，取約2 g，精確稱定，置於15 mL離心管中，加入適量標準溶液，依所建立之方法製備檢液並以LC-MS/MS分析。經分析後層析圖中待測物波峰之定量離子對S/N ≥ 10；定性離子對S/N ≥ 3。且回收率和重複性符合「食品化學檢驗方法之確效規範」<sup>(12)</sup>要求。

## 結果與討論

### 一、儀器條件參數評估

#### (一)質譜參數評估

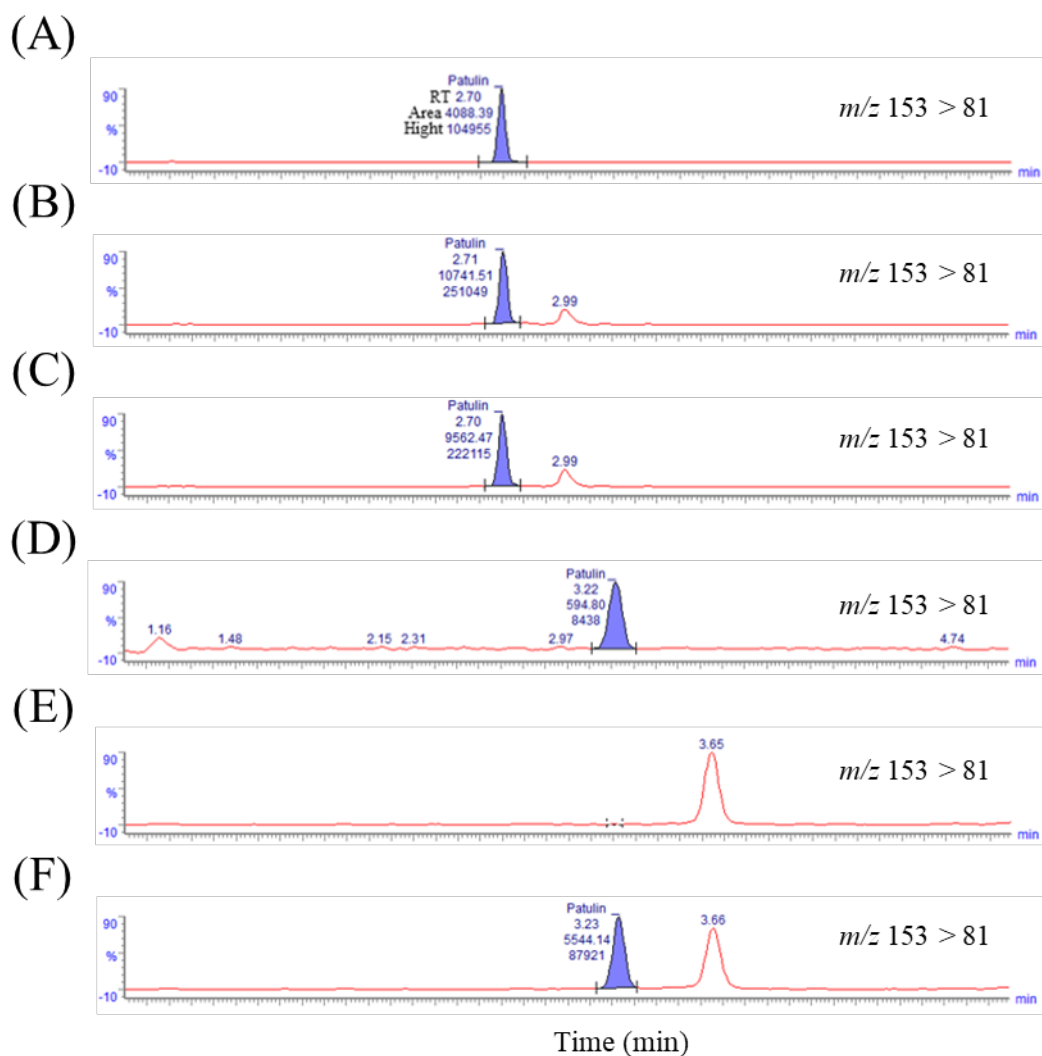
由於公告方法係以高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器分析，部分基質因光譜干擾無法判讀數據，故本研究改以液相層析串聯質譜儀進行偵測。考量嬰幼兒食品成分複雜及檢驗流程繁瑣，為減少目標物損失、人為操作產生之變異及基質效應所造成之影響，故另搭配同位素內部標準品進行流程校正。本研究參考文獻<sup>(8,13)</sup>選擇棒麩毒素-<sup>13</sup>C<sub>7</sub>作為內部標準品；質譜參數方面，利用電噴灑游離法之離子化方式建立MRM參數(如表二)，以標準品進行離子對測試，其中153 > 109為感度最佳之離子對，惟於蘋果醋基質添加實驗中，離子強度為0.40-0.49 (容許範圍0.27-0.46)稍微偏高，而153 > 81作為定量離子對之回收率較佳，且離子強度可符合容許範圍，故將153 > 81作為定量離子對，153 > 53及153 > 109作為定性離子對，分析時可依基質特性選擇適合的離子對進行分析。

#### (二)層析條件測試

選擇ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm ×

2.1 mm × 100 mm)管柱搭配含0.1%醋酸之乙腈及水溶液作為動相，當以98%水相作為起始動相維持1分鐘，隨後於1至3分鐘將水相由98%降至55%時(梯度一，如表一)，蘋果醋空白基質之干擾物約在2.7分鐘出峰，與標準品出峰時間相近(如圖一

C)。經測試，調整層析梯度於前5分鐘維持97%A動相(梯度二，如表一)，可將棒麴毒素及干擾物分開(如圖一F)，其他蘋果汁、黑棗汁及綜合果泥基質亦無干擾現象，故將此訂為本方法之層析條件。



圖一、以層析條件梯度一分析(A)25 ng/mL棒麴毒素標準品、(B)空白蘋果醋、(C)空白蘋果醋添加10 ng/g棒麴毒素及以梯度二分析(D)5 ng/mL棒麴毒素標準品、(E)空白蘋果醋及(F)空白蘋果醋添加50 ng/g棒麴毒素之MRM層析圖譜



## 二、前處理流程評估

### (一)實驗流程調整與測試

考量公告方法所使用之減壓濃縮流程繁瑣，可能造成分析標的損失，故調整前處理步驟，將取樣量由5 g減少為2 g，萃取溶液體積亦隨之減少，使轉溶時可省略減壓濃縮流程，直接以40℃氮氣吹乾。原以pH 4.0醋酸溶液作為吹乾後之回溶液，發現殘留物有無法完全溶解之情形，考量添加有機溶劑可增加溶解度，參考文獻<sup>(14,15)</sup>分別以10%甲醇及25%乙腈進行測試。依實驗結果，以10%甲醇及25%乙腈回溶之回收率分別為113.0-117.0%及96.2-98.6%，RPD分別為1.6-1.7%及0.2-0.7%，因25%乙腈作為回溶液之回收率較接近100%，且移動相溶液為乙腈水溶液，可降低溶劑效應，故本研究以25%乙

腈作為回溶液及配製標準溶液之溶劑，取代原方法pH4.0醋酸溶液。

### (二)果膠酶適用性評估

依據AOAC文獻，如檢體為混濁蘋果汁及蘋果泥等檢體，可添加果膠酶幫助果膠分解<sup>(11)</sup>。因大多數文獻分析蘋果汁、混濁蘋果汁或蘋果泥中棒麴毒素並未添加果膠酶<sup>(1,8,14,16)</sup>，且有實驗室反映添加果膠酶造成回收率降低，故本研究挑選果膠含量高之綜合果泥及蘋果泥進行果膠酶適用性評估。液液萃取時，添加果膠酶可使分層更明顯，且經果膠酶處理可獲得較多上層液(圖二)，惟即使未添加果膠酶，其離心後亦可順利分層，不致影響上層液之收集，且添加回收率可達94.2-105.5%(表三)，為增加檢驗效益，故刪除果膠酶流程。

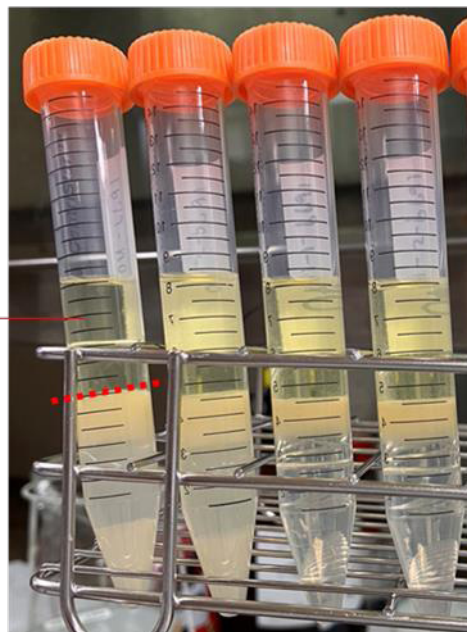
### (三)液液萃取與固相萃取匣流程之比較

果膠酶濃度

0 U/mg

1.4 U/mg

取有機層



圖二、以不同果膠酶添加量(0與1.4 U/mg)處理之蘋果醋，經乙酸乙酯液液萃取後的分層效果比較

表三、果膠酶之適用性評估

Matrix (No.)	Pectinase conc. (U/mg)	Spiked level ( $\mu\text{g/kg}$ )	Recovery (%)	RPD (%)
綜合果泥 (A3)	0	20	103.1	6.5
	1.4	20	105.5	7.0
蘋果泥 (FAPAS1679)	0	20	95.1	1.5
	1.4	20	94.2	11.5

棒麴毒素常見之前處理流程，除液液萃取外，亦有採用固相萃取匣<sup>(17)</sup>淨化技術，故本研究就兩種前處理流程進行棒麴毒素添加回收測試。結果顯示，液液萃取回收率介於91.4-112.0%，相對差異百分比為3.3-6.6%，SPE淨化之回收率介於99.9-117.3%，相對差異百分比為0.5-9.6%，兩種前處理之結果皆良好。由於液液萃取流程具不需使用有異味之毒性化學物質甲基第三丁基醚之優點，且流程僅需約4小時，相較於檢液進入固相萃取匣前後皆需轉溶之耗時過程，本研究維持沿用原液液萃取前處理技術。

#### (四)基質效應評估

本研究採用LC-MS/MS進行棒麴毒素定量，為確保分析結果準確性，挑選蘋果汁

及綜合果泥等不同型態之檢體進行基質效應評估。結果顯示，棒麴毒素於蘋果汁及綜合果泥之基質效應分別為21.88及19.76%。續以基質匹配檢量線校正基質效應，評估檢驗流程之回收率，其回收率約為77.6-82.5%。另評估以同位素內標校正之標準曲線，回收率可達96.2-99.0%。考量同位素內標可同時校正流程損失與基質效應，故本研究採用溶劑標準曲線搭配內標進行定量。

#### (五)標準曲線之線性範圍評估

棒麴毒素於嬰幼兒食品、蘋果製品及飲料類之限量標準分別為10.0、25及50  $\mu\text{g/kg}$ <sup>(6)</sup>。經評估，本研究檢量線之線性範圍訂為5-250 ng/mL (相當於檢體濃度2.5-125  $\mu\text{g/kg}$ )，可符合衛生標準要求，且相關係數 $r$ 為0.9998，顯示該濃度範圍線性關係良好。

### 三、確效試驗

依上述確立之實驗流程進行確效試驗，本研究選擇空白蘋果汁、蘋果醋、黑棗汁及綜合果泥等不同類型之基質進行添加回收試驗，分別添加5及50  $\mu\text{g/kg}$  (各5重複)棒麴毒素進行同日及異日試驗，試驗結果如表四，所得回收率

表四、棒麴毒素於不同基質中之回收率、變異係數及定量極限

Matrix	Spiked level ( $\mu\text{g/kg}$ )	Intraday (n=5)		Interday (n=10)		Linear range (ng/mL)	LOQ ( $\mu\text{g/kg}$ )
		Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)		
蘋果汁	5	110.5	6.6	112.0	6.6	5-250	5
	50	106.3	2.0	104.4	2.8		
黑棗汁	5	101.9	4.1	99.5	5.2		
	50	106.2	2.6	105.4	2.5		
綜合果泥	5	102.9	3.6	102.9	3.3		
	50	96.1	2.5	97.0	2.3		
蘋果醋	5	102.6	5.3	102.0	4.6		
	50	96.3	1.2	98.1	2.6		

表五、市售產品中棒麴毒素檢驗結果

檢體編號	檢體名稱	產地	檢驗結果(μg/kg)
A2	鮮果米泥 <sup>a</sup>	法國	N.D. <sup>b</sup>
A3	綜合水果泥 <sup>a</sup>	匈牙利	N.D.
A6	綜合蘋果葡萄汁 <sup>a</sup>	匈牙利	N.D.
S1	蘋果汁	臺灣	N.D.
S2	蘋果醋	臺灣	N.D.
S3	黑棗汁 <sup>a</sup>	匈牙利	N.D.
S4	綜合果泥 <sup>a</sup>	匈牙利	N.D.
S5	蘋果茶	韓國	N.D.
S6	蘋果乾	臺灣	N.D.
S7	蘋果草莓果泥 <sup>a</sup>	奧地利	N.D.
S8	水蜜桃野莓果泥 <sup>a</sup>	奧地利	N.D.
S9	蘋果香蕉果泥 <sup>a</sup>	法國	N.D.
S10	蘋果醋	臺灣	N.D.
S11	蘋果醋	臺灣	N.D.
S12	蘋果汁	臺灣	N.D.
S13	蘋果香蕉泥 <sup>a</sup>	匈牙利	N.D.
S14	黑棗汁 <sup>a</sup>	臺灣	N.D.

<sup>a</sup>嬰幼兒食品<sup>b</sup>未檢出

之準確度及精密度皆可符合確效規範，本方法之定量極限訂為5 μg/kg。

#### 四、市售產品之方法適用性驗證

本研究參考衛生標準價購蘋果製品及嬰幼兒食品等17件檢體，以所建立之檢驗方法進行方法適用性驗證，結果棒麴毒素皆為未檢出(表五)。

### 結 論

本研究係將現行衛福部公告之「食品中黴菌毒素檢驗方法－棒麴毒素之檢驗」進行優化，優化內容包括減少取樣量、刪除果膠酶及減壓濃縮流程、調整以25%乙腈作為回溶液

及採用同位素內標校正流程，並改以LC-MS/MS分析。優化後之檢驗方法可節省2-4小時檢驗時間、增加準確度及精密度，相較光譜法提升專一性，減少基質干擾；質譜部分，提供3對離子對，供不同基質選用。確效試驗以5及50 μg/kg棒麴毒素進行添加回收試驗，同日內之平均回收率介於96.1-110.5%，CV為1.2-6.6%，異日間之平均回收率介於97.0-112.0%，CV為2.3-6.6%，皆可符合確效規範，定量極限均為5 μg/kg，可符合檢驗需求。以本研究建立之方法進行市售產品之方法適用性驗證，17件檢體皆為未檢出棒麴毒素。後續將依研究成果進行現行公告檢驗方法修訂及公告，供各衛生單位與檢驗機構參考使用。

### 參考文獻

1. da Silva, C.R., Simões, C.T., Vidal, J.K., Reghelin, M.A. *et al.* 2022. Development and validation of an extraction method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine patulin in apple juice. *Food Chem.* 366: 130654.
2. Moake, M.M., Padilla-Zakour, O.I. and Worobo, R.W. 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 4(1): 8-21.
3. Mahato, D.K., Kamle, M., Sharma, B., Pandhi, S. *et al.* 2021. Patulin in food: A mycotoxin concern for human health and its management strategies. *Toxicon.* 198: 12-23.
4. International Agency for Research on Cancer. 2023. Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-135. [https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications]
5. U.S. Food and Drug Administration. 2001. Patulin in apple juice, apple juice concentrates and apple juice products. [https://web.archive.



- org/web/20130815072813/http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/NaturalToxins/ucm212520.htm]
6. 衛生福利部。2022。食品中污染物質及毒素衛生標準。111年5月31日衛授食字第1111300972號令。
  7. European Community. 2023. Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. Off. J. Eur. Commun. L119: 103-157. [<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0915>]
  8. Li, X., Li, H., Ma, W., Guo, Z. *et al.* 2018. Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* 257: 1-6.
  9. 衛生福利部。2021。食品中黴菌毒素檢驗方法－棒麴毒素之檢驗(MOHWT0005.02)。110年9月3日衛授食字第1101901990號公告修正。
  10. 吳淑慇、丘如茵、喻敏甄、羅可涵等。2019。天然毒素及污染物檢驗方法開發。衛生福利部食品藥物管理署108年度委外計畫研究成果報告。
  11. MacDonald, S., Long, M., Gilbert, J. and Felgueiras, I. 2000. AOAC Official Method 2000.02 Patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree. *J AOAC Int.* 83(6): 1387-1394.
  12. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品化學檢驗方法之確效規範。110年11月1日公布。
  13. Beltrán, E. Ibáñez, M. Sancho, J.V. and Hernández, F. 2014. Determination of patulin in apple and derived products by UHPLC-MS/MS. Study of matrix effects with atmospheric pressure ionisation sources. *Food Chem.* 142: 400-407.
  14. Vaclavikova, M., Dzuman, Z., Lacina, O., Marie Fenclova, M. *et al.* 2015. Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC-MS/MS analytical procedure. *Food Control* 47: 577-584.
  15. Dias, J.V., da Silva, R.C., Pizzutti, I.R., dos Santos, I.D. *et al.* 2019. Patulin in apple and apple juice: method development, validation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and survey in Brazilian south supermarkets. *J. Food Compos. Anal.* 82: 103242.
  16. Baert, K., Meulenaer, B., Kasase, C., Huyghebaert, A. *et al.* 2007. Free and bound patulin in cloudy apple juice. *Food Chem.* 100: 1278-1282.
  17. Karakose, A., Sanli, S., Sanli, N. and Bulduk, I. 2015. Evaluation of patulin in commercial baby foods by solid phase extraction and liquid chromatography PDA detection. *Czech J. Food Sci.* 33(1): 52-57.

# Optimization of Analytical Method for Patulin in Foods

CHUN-YI LAI, CHIA-HSIN LIU, SHUN-YUAN HSIAO, CHING-AN KUO,  
YI-CHEN TSAI, YING-RU SHEN, SHU-HAN CHANG, YA-MIN KAO,  
MEI-CHIH LIN AND SU-HSIANG TSENG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

## ABSTRACT

Patulin has been found in many kinds of fruits, vegetables and grains, especially apple and apple products. The Ministry of Health and Welfare in Taiwan announced the “Sanitation Standard for Contaminants and Toxins in Food” to limit the maximum level of patulin in apple products, beverage, and food for infant and young child. The “Method of Test for Mycotoxins in Foods-Test of Patulin (MOHWT0005.02)” was also announced for tests corresponding with the sanitation standards. However, it was reflected that the pretreatment with pectinase in the current method would affect the recovery of patulin. Besides, matrix interference occurred during spectral analysis for some samples. The aim of this research was to solve the above problems and to evaluate the feasibility of liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis. The optimized conditions included: reducing the sampling size, omitting the pectinase and vacuum concentration steps, using 25% acetonitrile to dissolve the residue, using an isotope-labeled internal standard of patulin to calibrate the data and analyzing by LC-MS/MS. The recovery was tested by spiking patulin at 5 and 50 µg/kg into four types of blank matrices without patulin, including apple juice, apple cider vinegar, black date juice and mixed puree, which were chosen according to the sanitation standards. The average recoveries ranged from 96.1 to 110.5%, with the coefficients of variance between 1.2 and 6.6% in intra-day analysis; the average recoveries ranged from 97.0 to 112.0%, with the coefficients of variance between 2.3 and 6.6% in inter-day analysis. The results all fulfilled the « Validation Guideline of the Food Chemical Testing Method” published by the TFDA. The limits of quantification of patulin were all 5 µg/kg. The optimized method could save 2 to 4 hours of experimental time, with improved accuracy and precision. The optimized method was employed to verify the applicability of marketed products. None of a total of 17 samples was tested to contain patulin, which is in accordance with the sanitation standards. The current method will be further revised and announced based on this study for public use.

Key words: patulin, apple products, food for infant and young child, LC-MS/MS