

Application News

高效液相色谱

利用集成 HPLC 和荧光检测器定量大麻中的黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2 和赭曲霉毒素 A

No.SSI-HPLC-019

■ 引言

黄曲霉毒素和赭曲霉毒素均属于真菌毒素，是曲霉属霉菌物种产生的次生代谢产物。研究发现，包括黄曲霉毒素G1、G2、B1、B2和赭曲霉毒素 A 在内的众多真菌毒素均具有免疫抑制性、致癌性、神经毒性和肝毒性^[1,3]。霉菌本身也会引起肺部感染和曲霉病等疾病^[1,3]。考虑到大麻中存在的真菌毒素以及可能的霉菌生长会对消费者健康构成巨大的风险^[1,2]，所以开发准确检测大麻中真菌毒素的方法至关重要。

随着各大州相继出台允许药用或娱乐用大麻使用的政策，也出现了更多关于大麻产品检测的法规。现有的大麻检测方法包括 ELISA、qPCR 和 MALDI-ToF-MS；它们在成本、范围、制备时间和质量精度方面各有利弊。例如，ELISA 并不十分精确，还会经常给出假阳性或阴性结果，并且需要进行昂贵的额外仪器检测才能确认 ELISA 的结果。此外，由于大麻产品的基质极其复杂，因此检测大麻中的真菌毒素极富挑战性。本研究旨在开发一种强大的检测方法，以供大麻检测实验室有效获得低于法规限值的浓度 - 黄曲霉毒素B1、B2、G1 和 G2 合并为 20 ppb，赭曲霉毒素 A 单独为 20 ppb。

■ 实验

样品制备

在 50ml 离心管中称出1克样品，并使用 SPEX 研磨仪均匀研磨。然后将10mL甲醇和水（80:20）的混合液加入管中。

标准品和校准

使用 SPEX Geno Grinder高通量组织研磨仪，将混合物剧烈振荡10分钟，然后以 3600rpm 的转速离心3分钟。将 2.0mL 上清液转移到含有 8.0mL 含2%吐温的PBS洗涤缓冲液的新管中并充分混合。将 10ml 稀释的提取物以每秒 1-2 滴的速率通过 AflaOchra 固相萃取柱（参见图1），直到空气通过色谱柱。注意，在使用这些色谱柱时，流速请勿超过每秒 1-2 滴，否则会降低回收率。同样地，用 10mL 含2%吐温的PBS缓冲液洗涤色谱柱，然后用 10mL HPLC 级水洗涤。最后，用 2mL 甲醇洗涤色谱柱，每次使用1mL，并在同一管中合并。



图1：用于萃取/提纯的 Afla-Ochra 色谱柱

使用高灵敏度模式来构建标准曲线，2、5、10、14、20和50 ppb 用于黄曲霉毒素检测，10、14、20和50 ppb 用于赭曲霉毒素 A，每个浓度点平行进三份。所有标准品均加入基质中并进行提取，因此用于黄曲霉毒素的进样的实际浓度为0.2、0.5、1.0、1.4、2和5 ppb。赭曲霉毒素 A 不需要较低的检出限，因为其本身的检出限为20 ppb；四种黄曲霉毒素总和为20 ppb。

分析条件

色谱柱	NexLeaf CBX for Potency 2.7 μm x 150 mm x 4.6 mm
流动相	A: 含有 0.1% 甲酸的水, B: 含有 0.1% 甲酸的甲醇, C: 含有 0.1% 甲酸的乙腈
时间程序	浓度 A/浓度 B/浓度 C = 65/30/5 (0.00 – 2.00) → 升至 23/40/37 (2.00 – 10.00) → 23/40/37 (10.00 – 12.00) → 65/30/5 (12.01 – 14.00)
流速	1.3 mL/min
色谱柱温度	50 °C
进样量	10 μL
检测	RF-20AXS, 通道1: Ex= 365nm Em=450nm, 通道2: Ex=336, Em=464, 通道3: Ex=330 Em=460, 通道4: Ex=350 Em=450,高灵敏度模式
池温度	30 °C

此处使用的色谱柱和液相色谱系统 (i-Series LC-2030) 也适用于大麻效力分析，因此大麻实验室可以在当前装置中添加 RF-20AXS 来扩展其分析能力。

■ 结果和讨论

通道1, 365 nm激发和450 nm发射, 为所有黄曲霉毒素提供了最佳响应; 赭曲霉毒素 A 选择通道3, 330 nm激发和460 nm的发射, 不过通道2也很合适 (参见图2)。黄曲霉毒素 G1 在所有黄曲霉毒素中响应最低, 但即使在最低浓度 2 ppb 条件下, 通道1仍然为分析提供了高质量的数据。每种化合物的标准曲线 R^2 值为0.998或更大, 表明线性良好。

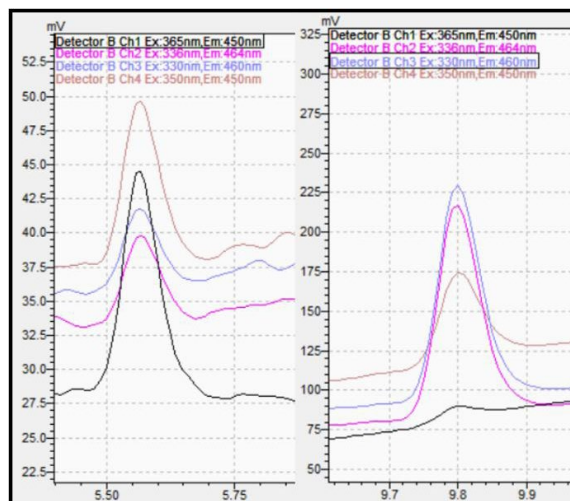


图2: 黄曲霉毒素 G1 2 ppb (左) 和赭曲霉毒素 A 10 ppb (右) 的色谱

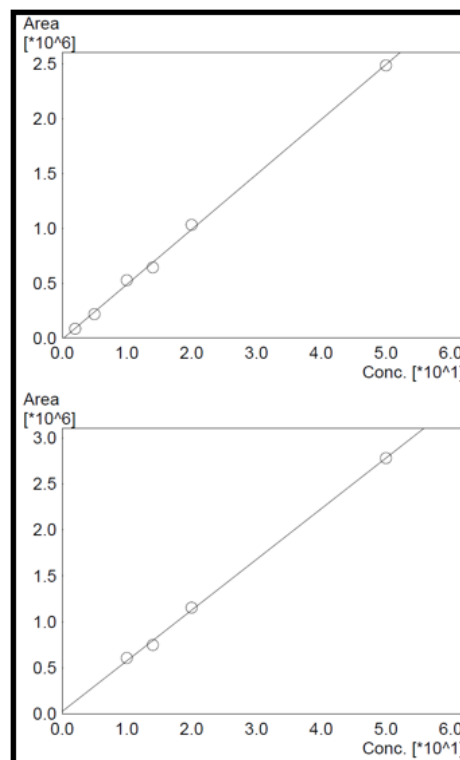


图3: 黄曲霉毒素 G1 (上图) 和赭曲霉毒素 A (下图) 的标准曲线

样品加标10 ppb真菌毒素，并以未知样品运行。图4显示了色谱图，表1的回收率结果表明方法具有极高的精确度。

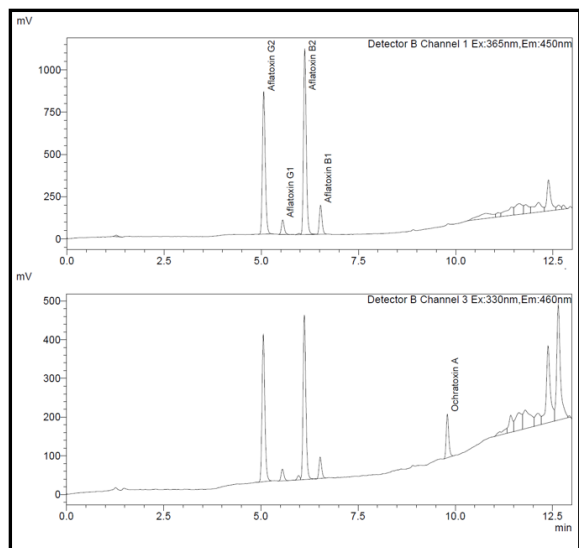


图4: 10 ppb 加标样品通道1 (顶部) 和3 (底部) 全色谱图

表 1: 10 ppb 加标样品结果

真菌毒素	浓度(ppb)	回收率(%)	浓度(ppb)	回收率(%)
黄曲霉毒素 G2	8.022	80.22	8.380	83.80
黄曲霉毒素 G1	8.534	85.34	8.958	89.58
黄曲霉毒素 B2	7.901	79.01	8.363	83.63
黄曲霉毒素 B1	7.704	77.04	8.044	80.44
赭曲霉毒素 A	8.781	87.81	10.925	109.25

本文由美国岛津科学仪器有限公司提供。

■ 结论

开发出了一种测定大麻中真菌毒素的新荧光检测方法。该方法十分灵敏且抗干扰能力强，只需将我们的 RF-20AXS 检测器添加到 i-Series LC-2030 即可。

■ 参考文献

- 1) Hazenkamp A. An evaluation of the quality of medicinal grade cannabis in the Netherlands. *Cannabinoids*. 2006; 1(1):1-9.
- 2) Llewellyn G. C., O'Rear C. E. Examination of fungal growth and aflatoxin production on marihuana. *Mycopathologia*. 1977; 62(2): 109-112.
- 3) Sedmikova M., Reiserova H., Dufkova Z., Barta I., Jilek F. Potential hazard of simultaneous occurrence of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Veterinary Medicine - Czech*. 2001; 46(6): 169-174.



岛津企业管理(中国)有限公司
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日:2019年4月