

实验技术与方法

藻类保健品中 β -N-甲基-L-丙氨酸及其同分异构体的检测方法
及污染分析王琛^{1,2},袁冠湘²,罗青²,秦道云²,杨胜园¹,刘桂华^{1,2}

(1. 南华大学公共卫生学院,湖南衡阳 421001;2. 深圳市疾病预防控制中心,广东深圳 518055)

摘要:目的 建立藻类保健品中 β -N-甲基-L-丙氨酸(BMAA)类毒素基于6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚氨基甲酸酯(AQC)衍生的液质联用检测方法,了解当前国内藻类保健品中BMAA类毒素的污染水平。方法 样品经酸水解、氮气浓缩、AQC衍生后采用超高效液相色谱串联质谱分析,2种同位素内标法定量。结果 在线性范围0.25~100 μ g/L内,3种BMAA类毒素的相关系数均在0.998以上;当取样15 mg,定容至20.0 mL时,藻类保健品中BMAA、N-2-氨基乙基甘氨酸(AEG)和2,4-二氨基丁酸(DAB)的检出限分别为133、133和200 μ g/kg,定量限分别为443、443和667 μ g/kg;回收率在86.7%~126.0%之间,相对标准偏差为1.1%~14.0%。国产藻类保健品中DAB的检出率(86%)最高,其次为AEG(23%)和BMAA(14%);在检出的样品中DAB、AEG和BMAA浓度范围依次为385~2305 μ g/kg、250~518 μ g/kg和472~698 μ g/kg。结论 本研究建立的AQC衍生-液质联用法操作时间短、准确性高,检测的国产藻类保健品中BMAA类毒素的污染水平较高,应引起重视。

关键词:藻类保健品; β -N-甲基-L-丙氨酸(BMAA); 2,4-二氨基丁酸(DAB); N-2-氨基乙基甘氨酸(AEG)

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)06-0672-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.06.006

The determination and pollution analysis of β -N-methylamino-L-alanine and its isomers
in algal health products

WANG Chen^{1,2}, YUAN Guanxiang², LUO Qing², QIN Xiaoyun², YANG Shengyuan¹, LIU Guihua^{1,2}

(1. School of Public Health, University of South China, Hu'nan Hengyang 421001, China;

2. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Shenzhen 518055, China)

Abstract: Objective To investigate the pollution levels of algal health products in China, the liquid chromatography-mass spectrometry method based on AQC derivation for BMAA and its isomers in algal health products was established.

Methods The samples were treated by acid hydrolysis, nitrogen concentration and AQC derivatization, and then analyzed by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, quantified by internal standard methods of two commercial isotope standards. **Results** In the linear range of 0.25-100 μ g/L, the correlation coefficients of BMAA toxins were all above 0.998. When the samples were 15 mg and the volume were 20.0 mL, the detection limits of BMAA, AEG and DAB were 133, 133 and 200 μ g/kg, respectively. And the quantitative limits were 443, 443 and 667 μ g/kg, respectively. The recoveries were between 86.7% and 126.0%, with the relative standard deviations between 1.1% and 14.0%. The detection rate for DAB was the highest in all samples (86%), followed by AEG (23%) and BMAA (14%). The concentrations of DAB, AEG and BMAA in the detectable samples were between 385-2305, 250-518 and 472-698 μ g/kg, respectively. **Conclusion** The established method based on AQC derivation LC-MS/MS method is more efficient and accurate. The levels of BMAA toxins in domestic algae health products were relatively high, it should be paid more attention and to strengthen the supervision.

Key words: Algal health products; β -N-methylamino-L-alanine; 2,4-diaminobutyric acid; N-(2-aminoethyl) glycine

β -N-甲基-L-丙氨酸(β -N-methylamino-L-alanine, BMAA)是一种非蛋白质氨基酸,相对分子

收稿日期:2024-01-30

基金项目:国际原子能机构合作研究基金(CRP_D52044_24959);深圳市医学重点学科建设经费(SZXK066)

作者简介:王琛 女 初级检验技师 研究方向为食品安全与残留物检测 E-mail:wang_chen2020@163.com

通信作者:刘桂华 女 主任技师 研究方向为食品安全与残留物检测 E-mail:1106126629@qq.com

质量为 118.1, 具有神经毒性^[1], 被认为是肌萎缩侧索硬化-帕金森痴呆综合征产生的可能原因之一^[1]。BMAA 的同分异构体中有两种较为常见^[2], 分别为 2, 4-二氨基丁酸 (2, 4-diaminobutyric acid, DAB) 和

N-2-氨基乙基甘氨酸 [*N*-(2-aminoethyl) glycine, AEG] (图 1)。DAB 主要表现为肝毒性和神经毒性^[3], 在多种环境和生物样本中与 BMAA 共存^[4]; AEG 具有肝毒性^[4], 在 BMAA 同分异构体中毒性最强^[5]。

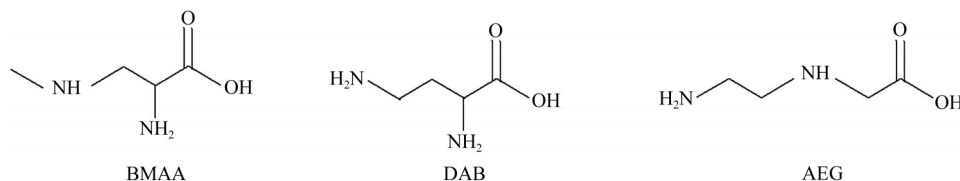


图 1 BMAA、DAB 和 AEG 的化学结构式

Figure 1 Chemical formulae of BMAA, DAB, and AEG

尽管 BMAA 是在苏铁种子中首次被发现^[6], 但在环境水体和藻类中也常被检出^[7]。有研究表明, 95% 的蓝藻会产生 BMAA 毒素, 且当环境适宜时, 几乎所有的蓝藻均有能力产生 BMAA 毒素^[8], 此外, 在小球藻^[9]、褐藻^[9]中均检出了 BMAA 类毒素。近年来, 随着生活水平的提高, 人们对藻类保健品的需求不断增长。藻类保健品由于在免疫方面的出色功效而备受青睐, 其制作原料藻多为螺旋藻、小球藻等^[10], 食用藻类保健品可能带来 BMAA 类毒素的暴露及健康风险, 但目前我国对藻类保健品中 BMAA 类毒素的关注和调查却极少, 仅有 2013 年的一篇调查报告^[2], 且只报道了 BMAA 和 DAB, 并未关注到其毒性较大的同分异构体如 AEG, 因此有必要开展国内市售藻类保健品中 BMAA 类毒素的污染水平调查。

目前, BMAA 最常用的检测方法是液相色谱-串联质谱法 (Liquid chromatography tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)^[11], 其中又根据是否衍生化被分为衍生法和直接分析法。由于 BMAA 类毒素分子量小, 易受环境中各类杂质的干扰, 在复杂基质检测时更常用衍生法, 常用的衍生剂为 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯 (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, AQC)^[12]。经 AQC 衍生后 BMAA 类毒素会生成分子量更大的喹啉化合物, 在反相色谱柱上具有更好的保留和分离特性, 该方法也是唯一根据美国分析化学家协会 (Association of Official Analytical Chemists, AOAC) 方法验证指南进行过验证的方法 (针对藻类保健品)^[13-15]。该方法采用一种自主合成的同位素标准 (BMAA-¹⁵N₂D₃) 作为内标物来校正 3 种 BMAA 类毒素, 但该内标物无商业化产品; 此外, 考虑到 BMAA 及其同分异构体 AEG 和 DAB 结构上的差异, 单一的内标可能不足以校准多种毒素。本研究拟建立采用 2 种商业化同位素标准 BMAA-D₃ 和 DAB-D₃ 为内标来校正基质效应和过程损失的 AQC 衍生液质联用方法, 并应用于藻类保健品中 3 种

BMAA 类毒素的污染调查分析。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Shimadzu LCMS-8060NX 高效液相色谱质谱联用仪 (日本岛津公司); XS205 分析电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q IQ 7000 超纯水机 (美国 Millipore 公司); Centrifuge 5424R 台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); ED115 干燥箱 (德国 Binder 公司); DC-12 氮吹仪 (上海安谱公司)。

浓盐酸 (分析纯, 广州化学试剂公司); 甲酸、甲酸铵 (质谱级, 上海安谱公司); 甲醇 (色谱纯, 美国赛默飞世尔公司); 实验用水为超纯水 (电阻率 $\geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$); AQC 衍生试剂包 (美国 Waters 公司); 0.22 μm PVDF 滤膜 (天津津腾公司); BMAA 和 DAB 标准品 (纯度 99%, 美国 CFWLABS 公司)、AEG 标准品 (纯度 98%, 美国 CFWLABS 公司)、BMAA-D₃ 标准品 (纯度 $\geq 98\%$, 比利时 Eurofins 公司)、DAB-D₃ 标准品 (纯度 99%, 加拿大 C/D/N 公司)。

1.2 标准溶液配制

1.2.1 BMAA 类毒素标准储备液的配制

准确称取适量标准品于 5 mL 容量瓶中, 先用 20 mmol/L 盐酸溶液溶解后定容, 配成浓度为 100.0 mg/L 的单个标准储备液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。

1.2.2 BMAA 类毒素混合标准工作液的配制

分别取 3 种 BMAA 类毒素 (BMAA、DAB、AEG) 单个标准储备液 0.5 mL 加入 5 mL 容量瓶中, 用 20 mmol/L 盐酸溶液定容, 配制成浓度为 10.0 mg/L 的混合标准工作液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。

1.2.3 BMAA 类毒素混合内标工作液的配制

分别取 2 种 BMAA 类毒素内标单个标准储备液 0.5 mL 加入 5 mL 容量瓶中, 用 20 mmol/L 盐酸溶液定容, 配制成浓度为 10.0 mg/L 的混合内标工作液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。

1.3 样品采集

通过深圳线下超市、商店和线上平台等多途径购买可获取国产藻类保健品,共计购买到22个品牌的22个产品。相关产品多为片剂或粉末,其中20份为螺旋藻、1份为褐藻、1份为小球藻和螺旋藻复合藻。

1.4 样品前处理

1.4.1 试样制备

片剂样品研磨至粉末状,胶囊样品取出粉末混匀,均转移至50 mL离心管中,在-20 °C下保存。

1.4.2 样品处理

称取样品约15 mg至顶空瓶中,加入1.0 mL 6 mol/L盐酸溶液和10.0 mg/L内标混合液适量,混匀后在110 °C下水解24 h。水解结束后,将样品冷却至室温,经0.22 μm PVDF滤膜过滤、在12 500 r/min下离心后,取上清液在50 °C下吹干,随后用20.0 mL 20 mmol/L盐酸溶液复溶,用于后续衍生。

1.4.3 AQC衍生

取10.0 μL样品提取液,依次加入30.0 μL硼酸缓冲溶液和10.0 μL AQC衍生剂,混匀后在55 °C下反应10 min。充分混匀并冷却至室温后立刻上机分析。

1.5 仪器条件

1.5.1 液相色谱条件

ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司);柱温:55 °C;流速:0.3 mL/min;进样量:10 μL。流动相 A 为20 mmol/L 甲酸铵水溶液(pH=5)、B 为甲醇。梯度洗脱程序:0~3 min, 28%~38% B; 3~4 min, 38%~85% B,维持85% B 1 min;5~6 min, 85%~28% B;6~13 min, 28% B。

1.5.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源,采用多反应监测(Multiple reaction monitoring, MRM),正离子模式扫描;雾化气流量3 L/min,加热气流量15 L/min,接口温度300 °C,脱溶剂管温度250 °C,加热块温度400 °C,干燥气流量5 L/min。目标物质及内标的MRM参数如表1所示。

2 结果

2.1 方法建立

2.1.1 建立仪器方法

AQC(图2)是一种用于伯胺(-NH₂)或仲胺(-NH-)柱前衍生的衍生剂,多用于氨基酸、肽等含胺物质的衍生。BMAA类毒素均含有2个胺基,可与

表1 BMAA类毒素及同位素内标的MRM参数

Table 1 MRM parameters of BMAA and its isomers and their isotopic internal standards

分析物	保留时间/ min	母离子	子离子	Q ₁ Pre bias/V	CE	Q ₃ Pre bias/V
BMAA	3.62	458.9	258.1	12	26	20
			171.2*	22	44	20
BMAA-D ₃	3.60	462.1	145.3	14	19	18
			171.2*	11	44	12
DAB	3.93	459.1	188.2	23	29	14
			171.3*	11	35	13
DAB-D ₅	3.95	462.1	116.2	17	84	12
			171.0*	11	65	25
AEG	3.32	459.1	214.3*	14	30	25
			171.1	18	37	20

注:*为定量离子

2个AQC衍生剂反应,生成结构稳定的、含有2个喹啉基团的衍生化合物。在正离子模式下,该类化合物均会产生171和145的典型碎片离子,这两个碎片分别为BMAA类毒素的AQC衍生产物经氨基氮和羰基碳的C-N键断裂形成,常用来定量。此外,由于3种BMAA类毒素为同分异构体,胺基的位置存在差异,生成的衍生物会产生特征碎片离子(图3):其中,BMAA、DAB、AEG衍生物的特征碎片分别为258.1、188.2和214.3,可用于这类物质的定性。在实际藻类样品分析中,我们发现,采用171.1对AEG进行定量时存在较大干扰,故改用214.3作为定量离子。

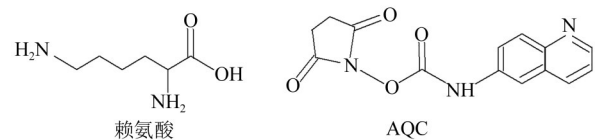


图2 赖氨酸和AQC的化学结构式

Figure 2 Chemical formulae of lysine and AQC

液相色谱条件是在参考已有文献报道的情况下进行优化确认的,在酸性条件下采用C18色谱柱可有效实现对3种BMAA类毒素衍生物的基线分离。特别值得注意的是,文献中的色谱柱温度并不是常见的40 °C,而均采用55 °C^[13]。为此,比较不同色谱柱温度(30、40、50、55 °C)对BMAA类毒素色谱行为的影响,发现只有当柱温为55 °C时3种物质才会出峰。因此,最终选择55 °C作为柱温。

2.1.2 水解条件优化

GLOVER等^[13]采用冷冻干燥浓缩水解液,考虑到设备可用性、同时为提高样品处理效率,本研究采用55 °C氮吹处理样品,结果表明,氮吹方式基本不会损失目标物质,但节省处理时间至少12 h。此外,在水解过程中还发现以下需要注意的操作细节,如果处理不当会严重影响结果。水解前,需先

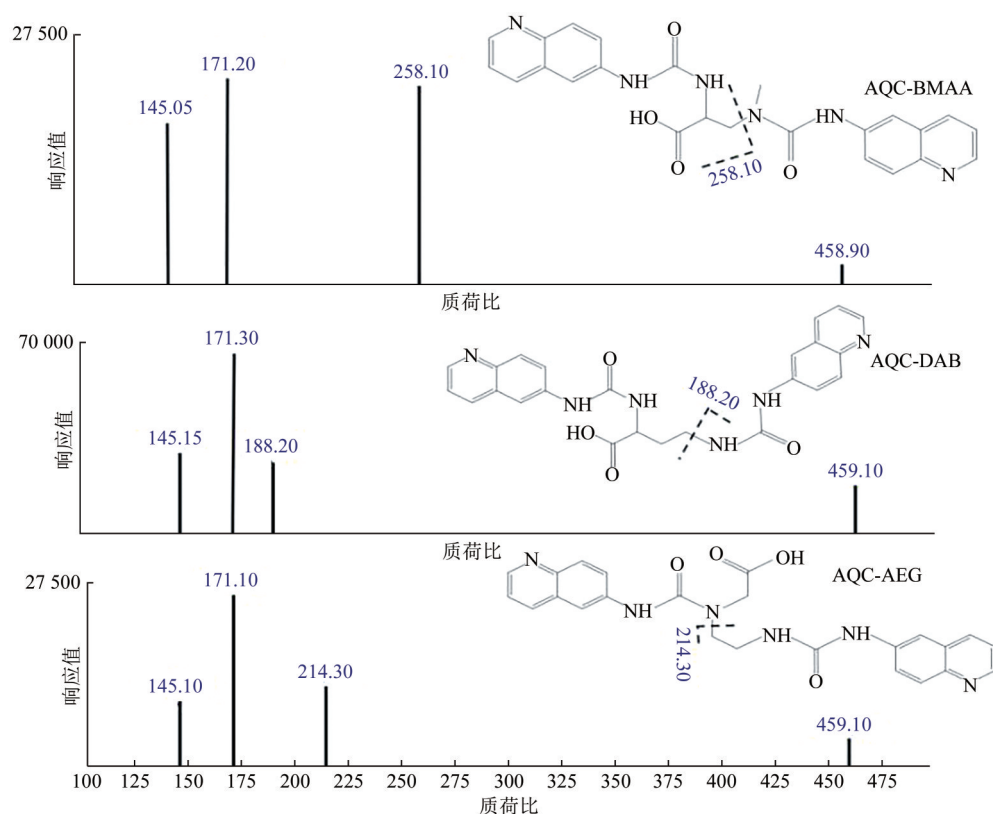


图3 BMAA、DAB和AEG的特征峰二级质谱图

Figure 3 Secondary mass spectra of characteristic peaks of BMAA, AEG and DAB

将样品氮吹 30 s 以排净瓶中空气,防止氨基酸(包括 BMAA 类毒素)在水解过程中发生氧化,影响定量准确性;氮吹浓缩时,需保证 6 mol/L 盐酸溶液完全挥发(以氮吹针上无明显液体残留为参考),否则可能导致酸度过大,影响衍生效果;6 mol/L 盐酸腐蚀性较强,挥发过程中会腐蚀相关设备的金属或不锈钢组件,应注意保护相关组件或选择防腐的设备进行操作。

2.1.3 衍生条件及衍生效率

AQC 衍生条件参照试剂盒说明书进行,由于商业化 AQC 衍生剂价格昂贵,为降低实验成本,本研究将整个衍生体系(样品/标准、衍生剂、缓冲溶液)等比例缩小一倍,衍生效率未受影响。由于藻类保健品中含有大量的蛋白质,经酸解后释放的氨基酸,可能干扰 BMAA 类毒素的衍生效率,需要特别关注。衍生效率差会造成两方面的影响。一是影响 BMAA 类毒素在样品中的检出限;二是影响无对应同位素内标的 AEG 定量的准确性。赖氨酸(图 2)是少数可以产生单、双衍生物的氨基酸之一:其单衍生物可通过 317.2/171.1 离子对进行监测,由于存在 2 个位置不同的胺基,故其单衍生物通常为双峰,而其双衍生物可通过 487.2/171.1 离子对进行监测,完全衍生后仅存在 1 种结构,故为单峰(图 4),因此可通过赖氨酸与 AQC 的单、双衍生物的峰面积

比值来粗略评估^[16]整个衍生反应的效率。本研究经多次测试发现:当赖氨酸-AQC 的单衍生物与双衍生物比值低于 0.5 时,衍生较为完全(图 5b);而当赖氨酸单、双衍生物比值大于 0.5 时,衍生不完全(图 5a),BMAA 类毒素定量准确性可能受到影响,此时影响最严重的毒素通常为无对应同位素标准的 AEG,可通过稀释来改善衍生效率。在空白保健品基质进行加标实验,若水解后复溶体积为 5.0 mL 时,AEG 回收率仅为 16%;而复溶体积为 20.0 mL 时,AEG 回收率可提高至 86%,准确性显著提升。

2.1.4 内标选择

考虑到 BMAA 同分异构体性质可能存在差异,采用两种商业化、可购买的同位素标准 BMAA-D₃ 和 DAB-D₅ 作为内标进行加标回收试验,结果表明,当采用 BMAA-D₃ 作内标时,DAB 的校正回收率高达 274%,AEG 的校正回收率在 110%,BMAA 的校正回收率为 101%;但采用 DAB-D₅ 作为内标时,DAB 的回收率为 95%,而 BMAA 和 AEG 的回收率分别高达 220% 和 300%。因此,选择 BMAA-D₃ 作为 BMAA 和 AEG 的内标,选择 DAB-D₅ 作为 DAB 的内标,定量准确性更高。

以上结果表明,在测试用的藻类保健品中 BMAA 和 DAB 的回收率表现出明显的差异性,而

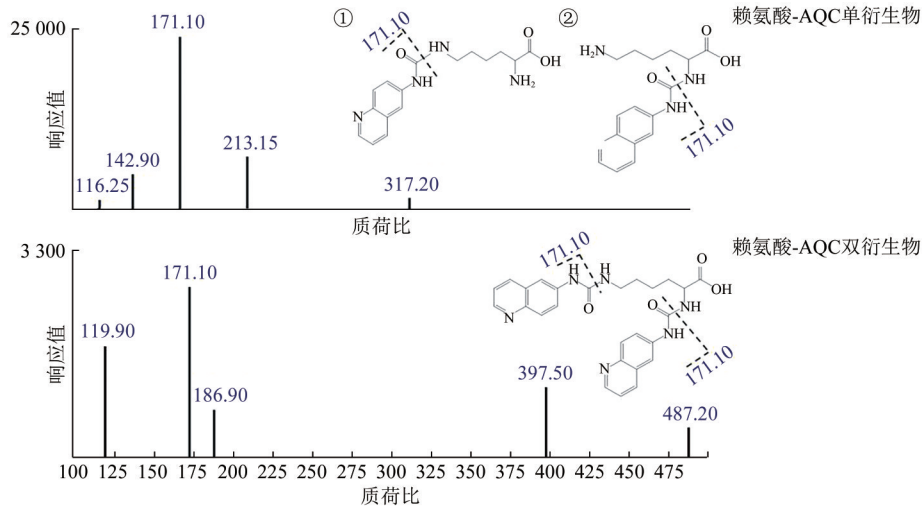


图4 赖氨酸-AQC单、双衍生物质谱图

Figure 4 Mass spectra of lysine-AQC single and double derivatives

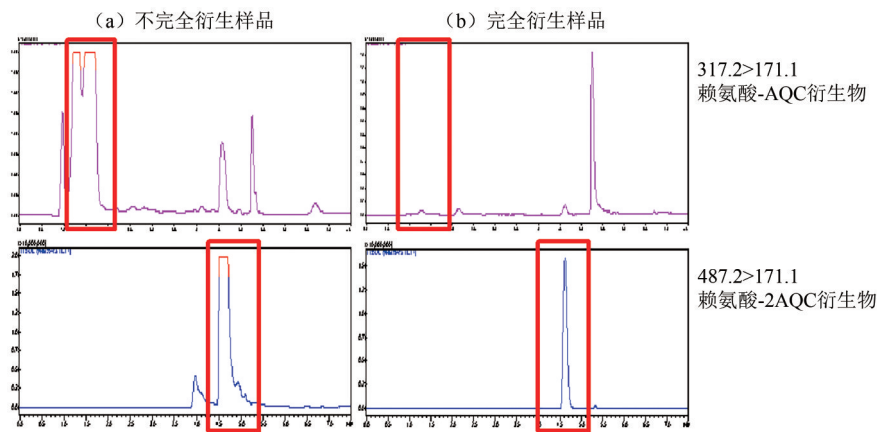


图5 不同藻类保健品样品中赖氨酸-AQC单、双衍生物色谱图

Figure 5 Chromatogram of lysine-AQC single and double derivatives in different algal health products

GLOVER 等^[13]仅采用一种 BMAA 的同位素内标 ($D_3^{15}N_2$ -BMAA)同时校正 BMAA、DAB 和 AEG,可能存在对 DAB 定量不够准确的问题。由于市场上缺乏商品化的 $D_3^{15}N_2$ -BMAA 稳定同位素内标,我们无法对其方法进行直接评价,但两个方法的差异也可能是由于测试用的藻类保健品来源不一致等因素导致的。后者采用加拿大的螺旋藻类保健品样品,而本研究测试的是国内的螺旋藻和褐藻,未来还需要进一步确认。

2.2 方法的线性、检出限及定量限

用 20 mmol/L 盐酸溶液将混合标准工作液稀释成 0.25、1.00、5.00、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g/L}$ 的标准系列溶液,每个溶液添加混合内标工作液(浓度为 50.0 $\mu\text{g/L}$)。以目标毒素的浓度为横坐

标,目标毒素与对应内标的峰面积比值为纵坐标,绘制 BMAA、AEG 和 DAB 的标准曲线,得到每种毒素的线性方程如表 2 所示,3 种毒素的线性良好,相关系数均 ≥ 0.998 。对藻类基质加标样品(加标浓度为 532 $\mu\text{g/kg}$)按照 1.4 中所述方法进行前处理和仪器分析,以 3 倍信噪比为检出限,10 倍信噪比为定量限,分别得到 BMAA、AEG 和 DAB 的检出限为 133、133 和 200 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 443、443 和 667 $\mu\text{g/kg}$,满足方法的检测需求。

2.3 准确性和精密度

以 3 种毒素均未检出的 2 个不同品种的藻类(包括螺旋藻和褐藻)保健品为空白基质,综合考虑了 3 种毒素的定量限水平,在低(532 $\mu\text{g/kg}$)、中(1 333 $\mu\text{g/kg}$)和高(6 667 $\mu\text{g/kg}$) 3 种水平下做加

表2 BMAA、AEG 和 DAB 的线性、检出限和定量限

Table 2 Linearity, detection limits and quantitative limits of BMAA, AEG and DAB

毒素	线性方程	相关系数	检出限/($\mu\text{g/kg}$)	定量限/($\mu\text{g/kg}$)
BMAA	$y=0.670\ 3x+0.003\ 4$	0.999	133	443
AEG	$y=0.393\ 1x+0.006\ 0$	0.999	133	443
DAB	$y=2.798\ 6x-0.087\ 9$	0.998	200	667

表3 BMAA、AEG和DAB在藻类保健品中的加标回收率($n=6$)
Table 3 Recoveries of BMAA, AEG and DAB in algae health products($n=6$)

检测毒素	加标浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	螺旋藻		褐藻	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
BMAA	532	126.0	14.0	91.3	12.0
	1 333	107.0	2.1	117.0	3.1
	6 667	116.0	5.3	103.0	2.3
AEG	532	105.0	2.3	86.7	7.4
	1 333	126.0	11.0	96.8	2.4
	6 667	124.0	2.2	108.0	3.3
DAB	532	97.4	1.1	112.0	10.0
	1 333	115.0	8.2	114.0	8.4
	6 667	88.6	14.0	106.0	1.2

标回收试验,每个加标水平做6个平行,得到加标回收率和相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)结果见表3,两种藻类基质中BMAA、AEG和DAB在3个水平下的加标回收率分别为91.3%~126.0%、86.7%~126.0%、88.6%~115.0%,RSD均<15%,具有良好的精密度和准确性。

2.4 BMAA类毒素的总体污染水平分析

本研究购买到的国产藻类保健品主要为螺旋藻,其中大部分为钝顶螺旋藻,相关检测结果见图6。样品中DAB的检出率最高,达到86%,检出样品中的含量为385~2 305 $\mu\text{g}/\text{kg}$;其次为AEG,检

出率为23%,检出样品中的含量为250~518 $\mu\text{g}/\text{kg}$;BMAA的检出率为14%,检出样品中的含量为472~698 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。这一结果远高于樊华等^[2]在2013年对国内藻类保健品中BMAA类毒素的调查结果,其DAB含量仅为4~27 $\mu\text{g}/\text{kg}$,而BMAA均未检出。产生差异的原因一方面可能与产品原料的污染水平相关,另一方面也不排除分析方法的影响,直接分析法在分析复杂基质时可能存在低估其含量的问题^[4]。此外,本研究中1个褐藻和1个小球藻/螺旋藻复合产品中3种毒素均未检出,但由于样本量较小,还需要持续关注。

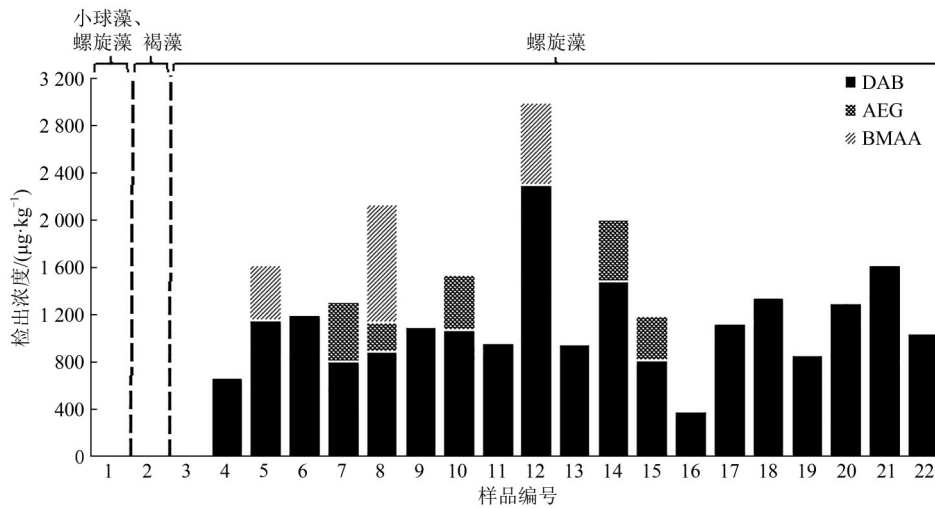


图6 BMAA、AEG、DAB在藻类保健品中的浓度水平

Figure 6 The concentrations of BMAA, AEG and DAB in algal health products

3 讨论

目前关于藻类保健品中BMAA类毒素的调查研究非常有限,且多来自国外。如表4所示,除一项研究外^[13],加拿大和西班牙相关调查结果与本研究结果类似。如MCCARRON等^[17]在加拿大调查的10份样品中都检出了490~2 493 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的DAB和191~1 348 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的AEG,但BMAA未检出;APARICIO-MURIANA等^[10]调查了西班牙的9种藻类保健品,其中7种检出浓度为432~2 408 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的DAB,2种检

出浓度为194 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的AEG,而BMAA也未检出。尽管ROY-LACHAPPELLE等^[18]仅检测了18份加拿大藻类保健品中的BMAA,检出率为11%,检出浓度为40~550 $\mu\text{g}/\text{kg}$,与本研究BMAA调查结果类似。KRUGER等^[19]分析了2003—2009年德国市场上流通的33种藻类保健品,结果显示DAB也是检出率最高的毒素。

由此可见,藻类保健品中DAB为检出率和检出浓度最高的毒素,AEG与BMAA次之,这一特征与

表4 不同研究藻类保健品中BMAA类毒素的浓度比较($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Table 4 Comparison of BMAs in algal health products in different studies ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

参考文献	国家	检测总数	采样年份	检测方法	BMAA		AEG		DAB	
					检出率/%	检出范围	检出率/%	检出范围	检出率/%	检出范围
KRUGER 等 ^[19]	德国	33	2009	直接进样法	n.d.	n.d.	—	—	3	80
MCCARRON 等 ^[17]	加拿大	10	2014	AQC衍生法	n.d.	n.d.	100	191~1 348	100	490~2 493
GLOVER 等 ^[13]	加拿大	5	2015	AQC衍生法	80	130~740	100	140~6 480	100	9 320~107 060
ROY-LACHAPPELLE 等 ^[18]	加拿大	18	2016	DNS*衍生法	11	40~550	—	—	—	—
APARICIO-MURIANA 等 ^[10]	西班牙	9	2022	直接进样法	n.d.	n.d.	22	71~194	78	432~2 408
樊华等 ^[2]	中国	11	2013	直接进样法	n.d.	n.d.	—	—	100	4~27
本研究	中国	22	2023	AQC衍生法	14	472~698	23	250~518	86	385~2 305

注:n.d.:未检出;—:未检测;DNS*:一种衍生剂

环境藻类中结果非常一致,表明藻类保健品中BMAA类毒素主要来自于原料藻。PETERS等^[20]检测了澳大利亚的4份藻类样本,BMAA、AEG和DAB的检出率为100%,检出浓度分别为5~33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、11~186 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、171~670 $\mu\text{g}/\text{kg}$;而KRUGER等^[19]调查了来自全球多个国家(包括巴西、澳大利亚、加拿大、德国、波兰、中国、南非)的33种藻类中的BMAA和DAB,结果显示DAB的检出率为3%,检出浓度为80 $\mu\text{g}/\text{kg}$,而BMAA未检出。可见,在原始藻类中DAB的检出率和检出浓度也为最高。

4 结论

本研究建立了藻类保健品中BMAA类毒素基于AQC衍生的液质联用方法,建立的方法样品前处理时间较短,各项性能参数良好,结果准确可靠,可为藻类保健品的质量安全监测提供技术支持。本研究的调查结果显示,国产藻类保健品中DAB的检出率和污染水平最高,AEG和BMAA也均有一定的检出,这一特征与原藻的特征类似。此外,保健品中最高污染水平可达 mg/kg 级别,依据保健品包装上的推荐用量估算出的成人(体质量以60 kg计)BMAA类毒素的每日摄入量为0~0.83 $\mu\text{g}/\text{kg}$,远低于APARICIO-MURIANA等^[10]提出藻类保健品中BMAA、AEG、DAB的每日容许摄入量(1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$),表明所检测的藻类保健品中存在BMAA类毒素污染,但人群总体健康风险较小,处于安全水平。值得注意的是,本研究调查的藻类保健品的标称产地均为国内,但由于无法核实藻类来源,可能存在低估或高估国产藻类保健品中BMAA类毒素污染的可能,未来还需要进一步开展藻原料-生产-运输-销售全产业链中BMAA类毒素的污染特征的相关研究。

参考文献

[1] 陈咏梅,赵以军,陈默,等.武汉官桥湖蓝藻毒素BMAA的生物累积与健康风险评估[J].水生生态学杂志,2019,40(4):22-29.

CHEN Y M, ZHAO Y J, CHEN M, et al. Bioaccumulation and health risk assessment of the cyanobacterial neurotoxin BMAA in Guanjiao Lake, Wuhan[J]. Journal of Hydroecology, 2019, 40(4): 22-29.

[2] 樊华.淡水蓝藻产生神经毒素BMAA和DAB的潜力及其环境影响因子研究[D].青岛:中国海洋大学,2013.

FAN H. Potential production of neurotoxins BMAA and DAB in freshwater cyanobacteria and effects environmental factors[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.

[3] 罗丛强,马泽民,陈龙,等. UPLC-MS法同时测定蓝藻中BMAA和DAB[J].环境监测管理与技术,2022,34(5):49-52.

LUO C Q, MA Z M, CHEN L, et al. Simultaneous determination of BMAA and DAB in cyanobacteria by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2022, 34(5): 49-52.

[4] 王琛,刘桂华,秦道云,等.水环境和水产品中 β -N-甲氨基-L-丙氨酸(BMAA)检测方法和检出情况的研究进展[J].环境化学,2024,43(3):1-11.

WANG C, LIU G H, QIN X Y, et al. Research progress on detection methods and detection levels of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in water environment and aquatic samples[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43(3): 1-11.

[5] SCHNEIDER T, SIMPSON C, DESAI P, et al. Neurotoxicity of isomers of the environmental toxin L-BMAA[J]. Toxicon, 2020, 184: 175-179.

[6] BRENNER E D, STEVENSON D W, MCCOMBIE R W, et al. Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most primitive living seed plant[J]. Genome Biology, 2003, 4(12): R78.

[7] MANOLIDIS K, TRIANTIS T M, KALOUDIS T, et al. Neurotoxin BMAA and its isomeric amino acids in cyanobacteria and cyanobacteria-based food supplements[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 365: 346-365.

[8] COX P A, BANACK S A, MURCH S J, et al. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(14): 5074-5078.

[9] LOPICIC S, SVIRCEV Z, MALESEVIC T P, et al. Environmental neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) as a widely occurring putative pathogenic factor in neurodegenerative diseases[J]. Microorganisms, 2022, 10(12): 1-37.

[10] APARICIO-MURIANA M D M, LARA F J, OLMO-IRUELA M D, et al. Determination of multiclass cyanotoxins in blue-green

- algae (BGA) dietary supplements using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Toxins*, 2023, 15(2): 1-17.
- [11] METCALF J S, BANACK S A, WYATT P B, et al. A direct analysis of β -N-methylamino-L-alanine enantiomers and isomers and its application to cyanobacteria and marine mollusks [J]. *Toxins*, 2023, 15(11): 639-654.
- [12] ROSEN J, WESTERBERG E, HELLENAS K E, et al. A new method for analysis of underivatized free beta-methylamino-alanine: Validation and method comparison [J]. *Toxicon*, 2016, 121: 105-108.
- [13] GLOVER W B, BAKER T C, MURCH S J, et al. Determination of beta-N-methylamino-L-alanine, N-(2-aminoethyl) glycine, and 2,4-diaminobutyric acid in food products containing cyanobacteria by ultra-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry: Single-laboratory validation [J]. *Journal of AOAC International*, 2015, 98(6): 1559-1565.
- [14] BISHOP S L, MURCH S J. A systematic review of analytical methods for the detection and quantification of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) [J]. *Analyst*, 2019, 145(1): 13-28.
- [15] BANACK S A. Correction to: Second laboratory validation of β -N-methylamino-L-alanine, N-(2-aminoethyl) glycine, and 2,4-diaminobutyric acid by ultra-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. *Neurotoxicity Research*, 2021, 39(1): 117-118.
- [16] GLOVER W B, COHEN S A, MURCH S J. Liquid chromatography and mass spectrometry for the analysis of N- β -methylamino-L-alanine with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1208: 379-391.
- [17] MCCARRON P, LOGAN A C, GIDDINGS S D, et al. Analysis of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in spirulina-containing supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Aquatic Biosystems*, 2014, 10(5): 1-7.
- [18] ROY-LACHAPPELLE A, SOLLIEC M, BOUCHARD M F, et al. Detection of cyanotoxins in Algae dietary supplements [J]. *Toxins*, 2017, 9(3): 1-17.
- [19] KRUGER T, MONCH B, OPPENHAUSER S, et al. LC-MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revoluta* and *Lathyrus latifolius* [J]. *Toxicon*, 2010, 55(2-3): 547-557.
- [20] PETERS S J, RODGERS K J, MITROVIC S M, et al. The changes in cyanobacterial concentration of beta-methylamino-L-alanine during a bloom event [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 1-11.