

UPLC-MS法同时测定蓝藻中BMAA和DAB

罗丛强,马泽民,陈龙,杨品红

(环洞庭湖水产健康养殖及加工湖南省重点实验室,水产生物资源与环境生态
湖南省工程研究中心,湖南文理学院,湖南 常德 415000)

摘要:用超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS)测定经6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(AQC)柱前衍生后的两种神经毒素 β -N-甲基-L-丙氨酸(BMAA)和2,4-二氨基丁酸(DAB),通过优化试验条件,使方法在1.00 $\mu\text{g/L}$ ~250 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好,BMAA和DAB的方法检出限分别为0.5 $\mu\text{g/L}$ 和0.9 $\mu\text{g/L}$ 。对空白蓝藻样品做低、中、高3个质量浓度水平的加标回收试验,BMAA和DAB的平均回收率分别为(88.2 \pm 4.0)%和(87.7 \pm 14.2)%,6次测定结果的RSD分别为2.6%~7.9%和2.1%~11.3%。

关键词: β -N-甲基-L-丙氨酸;2,4-二氨基丁酸;超高效液相色谱-质谱法;蓝藻

中图分类号:O657.63 文献标志码:B 文章编号:1006-2009(2022)05-0049-04

Simultaneous Determination of BMAA and DAB in Cyanobacteria by Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LUO Cong-qiang, MA Ze-min, CHEN Long, YANG Pin-hong

(Hunan Provincial Key Laboratory for Healthy Aquaculture and Product Processing around Dongting Lake,
Hunan Engineering Research Center for Aquatic Biological Resources and Environmental
Ecology, Hunan University of Arts and Science, Changde, Hunan 415000, China)

Abstract: Two neurotoxins, β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and 2,4-diaminobutyric acid (DAB) were determined by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), using pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). By optimizing the test conditions, the method had good linearity in the range of 1.00 $\mu\text{g/L}$ ~250 $\mu\text{g/L}$. The detection limits of BMAA and DAB were 0.5 $\mu\text{g/L}$ and 0.9 $\mu\text{g/L}$ respectively. The average spiked recoveries of BMAA and DAB at low, medium and high concentration levels in blank samples were (88.2 \pm 4.0)% and (87.7 \pm 14.2)%, respectively, and the RSDs of 6 measurements were 2.6%~7.9% and 2.1%~11.3% respectively.

Key words: β -N-methylamino-L-alanine; 2,4-diaminobutyric acid; Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry; Cyanobacteria

β -N-甲基-L-丙氨酸(BMAA)是一种L-型非蛋白氨基酸神经毒素,最先分离自苏铁(*Cycas circinalis*)种子^[1-2]。2,4-二氨基丁酸(DAB)为BMAA的同分异构体,最先分离自山豆属(*Lathyrus*)和豇豆属(*Vicia Lathyrus*)的植物^[3]。BMAA和DAB的分子中均含有羧基、一级胺和二级胺的结构,两者化学性质均十分稳定,不容易发生降解,水溶性强,可通过食物链进行生物

积累和生物放大作用累积,被人体大量富集吸收^[4]。苏铁中的BMAA被认为与大脑神经性退行病变“肌萎缩性侧索硬化-帕金森群痴呆综合症”

收稿日期:2021-10-05;修订日期:2022-08-06

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(2021JJ50135);常德市科技创新专项基金资助项目(2020G178,2020S006)

作者简介:罗丛强(1988—),男,吉林白山人,讲师,博士,主要研究方向为水环境生态修复。

(ALS/PDC)之间存在关联^[5-7]。DAB毒性弱于BMAA,主要表现为肝毒性和神经毒性,其致毒机理还未完全阐明。

蓝藻水华及其产生的有害物质是目前我国面临的重要环境问题之一^[8-9],除了常见的藻毒素外,近年来已在很多蓝藻样品及水生动物组织中检出痕量BMAA和DAB^[10-11],蓝藻暴露的增加可能增大患神经退行性疾病的风险^[12]。BMAA和DAB因结构相近,在色谱分析时难以被分离,极易被混淆。为了评估环境样品中BMAA和DAB的潜在生态健康风险,准确检测和定量痕量毒素水平很重要。

目前,文献报道的测定生物样品中BMAA和DAB的方法包括高效液相色谱-荧光法(HPLC-FLD)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)等。HPLC-FLD分析BMAA需要先使用衍生化试剂AQC等进行衍生化处理,生成含荧光基团的稳定喹啉化合物,用荧光检测器测定。而AQC对很多氨基酸都具有衍生作用,特异性较低,故该方法分析蓝藻样品时,会产生复杂的背景色谱干扰峰,可能会导致蓝藻痕量毒素级别样品的分析出现假阳性的结果^[13-14],如Esterhuizen等^[15]使用PhenomexEZ:faastTM作为衍生化试剂建立BMAA的GC-MS分析方法。LC-MS具有灵敏度高、特异性好、检出限低等优点,因而在痕量分析方面具有明显优势,虽然已被广泛应用于环境样品的污染物检测^[16-17],但对样品的纯度要求较高,分析前必须进行纯化处理。今在已报道相关分析方法的基础上,建立超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)同时测定痕量BMAA和DAB的方法,以期为蓝藻生物样品中BMAA和DAB毒素的检测分析提供方法学参考。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

Acquity UPLC-H-Class-Xevo TQ-S型超高效液相色谱质谱联用仪,美国Waters公司;MiliQ超纯水仪,美国Millipore公司。

BMAA和DAB标准品(分析纯),美国Sigma公司;甲酸(色谱级),美国Fisher公司;甲酸(色谱级),上海阿拉丁公司;AQC(6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯类)衍生化试剂盒,美国Waters公司。

1.2 蓝藻中BMAA和DAB的提取与纯化

目前,关于生物样品中BMAA和DAB毒素的分析一般同时考虑游离态和蛋白结合态两种形态。游离态毒素提取:收集适量冷冻干燥蓝藻细胞,加入6 mL预冷体积分数为75%的甲醇溶液,超声破碎后置于离心机中8 000 r/min转速条件下离心10 min;转移上清液后,重复上述提取步骤1次;合并上清液,使用氮吹仪吹至近干,得到粗毒素,于-20 ℃保存。蛋白结合态毒素提取:在上述离心后的残渣样品中加入0.8 mL体积分数为50%的盐酸溶液,于110 ℃水解蛋白质,反应24 h,冷却至室温,用液氮吹至近干,得到粗毒素,于-20 ℃保存^[18]。

Oasis-MCX固相萃取小柱依次用5 mL甲醇和超纯水活化。用体积分数为1.65%的稀盐酸溶液将上述粗毒素复溶,经过活化后的Oasis-MCX固相萃取小柱,依次用5 mL体积分数为8.25%的稀盐酸溶液和5 mL甲醇淋洗,再用体积分数为5%的氨水洗脱毒素。洗脱液用氮气吹至近干,加入0.5 mL体积分数为1.65%的稀盐酸溶液复溶,经0.22 μm滤膜过滤后,于-20 ℃保存^[18]。

1.3 BMAA和DAB柱前衍生化处理

样品中BMAA和DAB经AQC试剂衍生后,可生成含荧光基团的稳定喹啉化合物。按照操作说明,在60 μL硼酸钠溶剂中加入20 μL样品和20 μL AQC衍生试剂,在室温条件下孵化1 min,55 ℃水浴条件下衍生10 min。衍生后的样品在-20 ℃条件下可稳定保存1周^[18]。

1.4 仪器条件

色谱条件:采用Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 50 mm,填充物粒径1.7 μm),流动相A为体积分数为0.1%的甲酸水溶液,流动相B为甲醇,流量为0.20 mL/min,柱温为40 ℃,进样体积为20 μL。

质谱条件:采用电喷雾正离子模式(ESI+);离子源温度为150 ℃;毛细管电压为1.50 kV,锥孔电压为30 V;碰撞气体氩气流量为0.12 mL/min,去溶剂气体氮气流量为650 L/h,锥孔气氮气流量为20 L/h;采用多反应监测离子模式(MRM),经AQC衍生化后的监测离子BMAA为459.1 > 258.1, DAB为459.1 > 188.1;数据采集分析工作站为MassLynx V4.1软件。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离条件

经 AQC 衍生后的 BMAA 和 DAB 分子极性较大且两者极性相近,使用体积分数为 0.1% 的甲醇水溶液流动相体系,优化后的最佳流动相洗脱条件为:0~4.0 min, $\varphi(B)$ 为 20%;4.0 min~4.1 min, $\varphi(B)$ 为 20%→15%;4.1 min~6.3 min, $\varphi(B)$ 为 15%。在该条件下低体积分数的流动相 B(15%~20%)即可将目标化合物洗脱下来,且两者能够有效分离,BMAA(0.05 mg/L)和 DAB(0.900 mg/L)的保留时间分别为 3.02 min 和 3.22 min,见图 1。

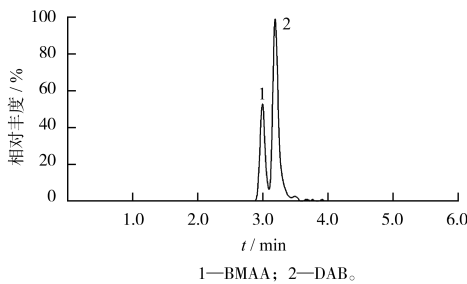


图 1 混合标准溶液色谱峰

Fig.1 Chromatogram of mixed standard solution

2.2 方法效能验证

配制 10 mg/L BMAA 和 DAB 标准溶液,稀释成 1.00 $\mu\text{g/L}$ 、5.00 $\mu\text{g/L}$ 、50.0 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、250 $\mu\text{g/L}$ 的标准系列,按照 1.3 所述处理后,在 1.4 条件下分析。以质量浓度为横坐标,对应的峰面积响应值为纵坐标,建立 BMAA 和 DAB 的标准曲线,得到回归方程分别为 $Y = 8.66 \times 10^3 X - 21.5$ 和 $Y = 3.81 \times 10^3 X - 3.08$, R^2 分别为 0.996 和 0.992。

将最低质量浓度标准溶液(1.00 $\mu\text{g/L}$)进样分析,平行测定 7 次,测定结果的标准偏差为 S ,按照 $\text{MDL} = t \times S$ 计算方法检出限。得到 BMAA 和 DAB 的检出限分别为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 和 0.9 $\mu\text{g/L}$,表明 UPLC-MS 检测方法灵敏度高,适合分析痕量毒素样品。

2.3 加标回收试验

对空白蓝藻样品做低、中、高 3 个不同质量浓度水平的加标回收试验,每个质量浓度设置 6 个平行。按照 1.2 所述游离态毒素提取纯化方法处理加标样品,按照 1.3 所述处理后,在 1.4 条件下测定,结果见表 1。由表 1 可知,BMAA 和 DAB 的平

均回收率分别为 $(88.2 \pm 4.0)\%$ 和 $(87.7 \pm 14.2)\%$,6 次测定结果的 RSD 分别为 2.6%~7.9% 和 2.1%~11.3%,表明该方法准确度与精密度良好。

表 1 加标回收试验结果

Table 1 Test results of spiked recovery

化合物	加标量 ρ / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	测定值 ρ / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	RSD/%	回收率/%
BMAA	5.00	4.60 ± 2.10	4.3	92.1 ± 4.0
	50.0	42.0 ± 11.2	2.6	84.2 ± 22.0
	250	220 ± 17.3	7.9	88.0 ± 6.9
DAB	5.00	5.20 ± 2.00	3.8	104 ± 4.0
	50.0	39.0 ± 8.00	2.1	78.0 ± 16.0
	250	203 ± 23.1	11.3	81.2 ± 9.2

2.4 实际样品测定

将上述方法用于测定 5 份干燥蓝藻样品,结果在铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) PCC7806 中检测到 BMAA 质量比为 $(0.010 \pm 0.005) \mu\text{g/g}$ (以干重计),鱼腥藻(*Anabaena* sp.) PCC7120 中检测到 BMAA 干重为 $(14.2 \pm 3.65) \mu\text{g/g}$ 。其余藻株鱼腥藻(*Anabaena* sp.) FACHB-1388、席藻(*Phormidium* sp.) FACHB-1099 和念珠藻(*Nostoc* sp.) FACHB-973 中未检测出 BMAA,所有藻株均未检出 DAB。

3 结语

建立了同时分析蓝藻中两种神经毒素 BMAA 和 DAB 的 UPLC-MS 法,该方法对两种神经毒素分离效果较好,检测灵敏度要高于其他文献报道方法^[11,19]。该方法准确度与精密度良好,适用于对蓝藻样品中痕量 BMAA 和 DAB 的分析,可为蓝藻生物样品中 BMAA 和 DAB 毒素的检测分析提供方法技术参考。

[参考文献]

- [1] VEGA A, BELL E A. α -Amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis* [J]. *Phytochemistry*, 1967, 6(5): 759-762.
- [2] MOURA S, PINTO E. One-pot synthesis of *N*-Cbz-*L*-BMAA and derivatives from *N*-Cbz-*L*-serine [J]. *Tetrahedron Letters*, 2007, 48(13): 2325-2327.
- [3] RESSLER C, REDSTONE P A, ERENBERG R H. Isolation and identification of a neuroactive factor from *Lathyrus latifolius* [J]. *Science*, 1961, 134(3473): 188-190.

- [4] SAMARDZIC K, STEELE J R, VIOLI J P, et al. Toxicity and bioaccumulation of two non-protein amino acids synthesised by cyanobacteria, β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and 2,4-diaminobutyric acid(DAB), on a crop plant[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 208: 111515 – 111522.
- [5] NICOLAS D, THOMAS C, THOMAS M, et al. Cellular and molecular aspects of the β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) mode of action within the neurodegenerative pathway: facts and controversy[J]. Toxins, 2018, 10(1): 6 – 21.
- [6] COX P A, DAVIS D A, MASH D C, et al. Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain[J]. Proceedings Biological Sciences, 2016, 283(1823): 2397 – 2407.
- [7] BROWNSON D M, MABRY T J, LESLIE S W. The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 82(2/3): 159 – 167.
- [8] 王霞, 刘雷, 何跃, 等. 洪泽湖水体富营养化时空分布特征与影响因素分析[J]. 环境监测管理与技术, 2019, 31(2): 58 – 61.
- [9] 张玉平, 张丹, 刘金金. 淀山湖富营养化驱动力初探[J]. 环境监测管理与技术, 2021, 33(5): 26 – 30.
- [10] BRAND L E, PABLO J, COMPTON A, et al. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine(BMAA) in South Florida aquatic food webs[J]. Harmful Algae, 2010, 9(6): 620 – 635.
- [11] MANOLIDI 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.
- [12] TORBICK N, ZINITI B, STOMMEL E, et al. Erratum to: assessing cyanobacterial harmful algal blooms as risk factors for amyotrophic lateral sclerosis [J]. Neurotoxicity Research, 2018, 33(1): 227.
- [13] FAASSEN E J, GILLISSEN F, LÜRLING M. A comparative study on three analytical methods for the determination of the neurotoxin in BMAA in cyanobacteria[J]. PLoS One, 2012, 7(5): 1 – 8.
- [14] METCALF J S, BANACK S A, LINDSAY J, et al. Co-occurrence of β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004[J]. Environmental Microbiology, 2010, 10(3): 702 – 708.
- [15] ESTERHUIZEN M, DOWNING T G. Beta-N-methylamino-L-alanine(BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates[J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2008, 71(2): 309 – 313.
- [16] ABBAS F, POROJAN C, MOWE M A D, et al. Sample extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method development and validation for the quantitative detection of cyanobacterial hepatotoxins and neurotoxins in Singapore's reservoirs [J]. Marine and Freshwater Research, 2020, 71(5): 673 – 688.
- [17] 陈婧, 支红峰, 胡中豪, 等. UPLC-MS/MS 测定地表水中总微囊藻毒素的快速前处理方法探究[J]. 环境监测管理与技术, 2021, 33(1): 47 – 50.
- [18] 焦一莹. 蓝藻神经毒素 β -N-甲基-L-丙氨酸在太湖食物链中赋存与环境行为研究[D]. 南京: 南京大学, 2014.
- [19] BAKER T C, TYMM F J, MURCH S J. Assessing environmental exposure to β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in complex sample matrices: A comparison of the three most popular LC-MS/MS methods[J]. Neurotoxicity Research, 2017, 33: 43 – 54.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2023 年《环境监控与预警》杂志

《环境监控与预警》是经中华人民共和国新闻出版广电总局批准,由江苏省生态环境厅主管、江苏省环境监测中心主办、南京大学环境学院协办的期刊。是中国科技核心期刊,被中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)收录。期刊面向全国公开发行,国内统一刊号 CN 32-1805/X,国际标准刊号 ISSN 1674-6732。

本刊致力于传播和推广先进的环保科技成果,聚焦环境前沿科技,介绍国内外环境监测、环境预警、环境信息等领域的新技术、新成果、新发展,跟踪国家及地方的环境政策、环境标准的变化。读者对象主要是从事环境管理、环境监测、环境监察、环境信息、环境治理、环境科学研究及其他领域的环境工作者。常设栏目有:前沿评述、环境预警、监测技术、解析评价、监管新论等。

本刊为双月刊,大 16 开国际标准版,92 页,每逢单月 30 日出版。国内定价(含邮费)35 元/期,全年 210 元。

订阅方法:

1. 邮局订阅:邮发代号:28-414。

2. 自行订阅:汇款后将回执单 E-mail 至联系人:朱滢;电话:025-69586548;邮箱:hjkyjy@163.com。

(电子版回执单下载地址: <http://www.hjkyjy.com>)

汇款信息:

单位名称:江苏省环境监测中心

开户行:中行南京凤凰花园城支行

账号:530058192469