

文章

鲨鱼翅中的蓝藻神经毒素 β -N-甲氨基-L-丙氨酸 (BMAA)

Kiyo Mondo¹、Neil Hammerschlag^{2,3,4}、Margaret Basile¹、John Pablo¹、Sandra A. Banack⁵
和 Deborah C. Mash^{1,*}

¹ 美国迈阿密大学米勒医学院神经内科，地址：美国佛罗里达州迈阿密；邮编：33136；电子邮箱：kmondo@med.miami.edu (K. M.)、mbasile@med.miami.edu (M B)、jpp71@hotmail.com (J. P.)

² 美国迈阿密大学 Rosensteil 海洋和大气科学学院，地址：美国佛罗里达州迈阿密；邮编：33136；电子邮箱：nhammerschlag@rsmas.miami.edu

³ 美国迈阿密大学 Leonard 和 Jayne Abess 生态系统科学与政策中心，地址：美国佛罗里达州科勒尔盖布尔斯；邮编：33124

⁴ 美国迈阿密大学 RJ Dunlap 海洋保护项目，美国佛罗里达州迈阿密；邮编：33149

⁵ 民族医药所，地址：美国怀俄明州杰克逊霍尔 3464 号邮箱；邮编：83001；电子邮箱：sandra@ethnomedicine.org

* 通讯作者联系方式：电子邮箱：dmash@med.miami.edu；
电话：+1-305-243-5888；传真：+1-305-243-3649。

收稿日期：2012 年 1 月 19 日；修订：2012 年 2 月 10 日 / 录稿日期：2012 年 2 月 15 日 / 出版日期：2012 年 2 月 21 日

摘要：鲨鱼已成为海洋濒危物种，随着鲨鱼翅羹需求的日渐增长，全球鲨鱼总数不断减少。已有证据表明，鲨鱼体内会累积毒素，由此可对鲨鱼产品消费者构成健康危害。鲨鱼食性庞杂，捕食范围包括鱼类、哺乳类、甲壳类和浮游生物。在自由生活的海洋蓝藻中已检测到蓝藻神经毒素 β -N-甲氨基-L-丙氨酸 (BMAA)，而 BMAA 还可能通过生物累积效应进入海洋食物网。本次研究中，我们对南佛罗里达的七种鲨鱼进行了剪鳍取样，采用 HPLC-FD 和三重四极杆 LC/MS/MS 法研究是否存在 BMAA。在所有鲨鱼的鳍中均检测到了 BMAA，富集量范围为 144 至 1836 ng/mg (按湿重计)。由于 BMAA 与神经退行性疾病有关，这些结果可能与人类健康息息相关。我们认为，鲨鱼翅消费可能会增加人类摄入蓝藻神经毒素 BMAA 的风险。

关键词： β -N-甲氨基-L-丙氨酸；神经毒素；神经退行性疾病；蓝藻；软骨鱼；保护

1. 引言

鲨鱼基本上可以看作所有海洋环境中的顶级掠食者, 它们通过食物链影响生态系统的结构和功能 [1、2]。然而, 过度捕杀导致了全球鲨鱼数量的减少, 而这从很大程度上是由于鲨鱼翅交易的迅速发展 [3-5]。为满足亚洲市场庞大的鲨鱼翅需求量, 每年专门捕捞和附带捕捞所捕杀的鲨鱼总数至少有 26, 000, 000 至 73, 000, 000 头, 总重量达 1, 700, 000 吨 [6]。鱼翅非常珍贵, 是世界上最贵的水产品之一, 可做成鱼翅羹, 是一道亚洲美食。为满足日益增长的鱼翅需求, 鱼翅的高利用率每年持续增长 [7]。鲨鱼翅主要由软骨组成, 含纤维蛋白类胶原蛋白 (fibrous protein collagens), 使羹更稠, 口感更好。鱼翅越大, 翅针 (胶原纤维) 越多, 以其烹制的鱼翅羹越贵。但是, 鲨鱼体内累积了汞和其他重金属 [8], 会给包括鱼翅羹在内的鲨鱼产品的消费者带来健康风险。

神经毒素 BMAA 是由在陆生和水生环境 [9] 及蓝藻共生体 [10] 中发现的多种自由生活的蓝藻生成。现已发现 BMAA 与阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 等神经退行性疾病的发病有关 [11、12]。蓝藻分布于湖泊、河流、河口及海洋水域, 而农业和工业排水、农场动物粪便、污水、地下水入流和大气沉降中的营养物会加剧蓝藻水华 [13]。在波罗的海 [14]、中国 [15]、荷兰 [16]、南非 [17]、不列颠岛 [18] 和秘鲁 [19] 的水域中, 以及实验室培养的自由生活的海洋蓝藻 [20] 中均分离出了 BMAA。

经检测, 南佛罗里达沿海水域 [21] 和波罗的海 [14] 中的海洋鱼类和无脊椎动物 BMAA 富集量高。由于海洋生态系统中普遍存在蓝藻, BMAA 可通过生物累积效应进入到鲨鱼的海洋食物网中, 并可能会对鲨鱼产品的消费者带来健康风险。

由于对鲨鱼的利用日益增长, 以及海洋食物网中 BMAA 生物累积效应所带来的潜在健康危害增长, 我们对此展开研究, 确定是否能在鲨鱼鳍内检测到 MBAA。我们特别对南佛罗里达水域 (美国) 中的七种普通鲨鱼的鱼鳍和特定器官进行了采样, 用多种分析技术进行 BMAA 分析和检测。

2. 结果和讨论

采用高效液相色谱荧光测定法 (HPLC-FD) 分析了从南佛罗里达沿海水域获取的七种鲨鱼鳍样本 (表 1)。采用 HPLC-FD 检测总酸水解液中的 BMAA, 并采用液相色谱-三重四极杆串联质谱法 (LC/MS/MS) 验证 BMAA。采用荧光标记 6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚胺基-氨基甲酸酯 (AQC) 对样本中的氨基酸进行了柱前衍生。一般情况下, AQC 能标记一次氮和二次氮生成复杂分子中的氨基酸, 后者在高压分离过程中不会降解 [22]。

AQC 衍生 BMAA 标准溶液的洗脱与蛋氨酸 (Met) 最接近。图 1A 所示为标准氨基酸、BMAA 及其同分异构体 *N*-2 (氨基) 乙基甘氨酸 (AEG) 和 2, 4-二氨基丁二酸 (2, 4-DAB) 的 HPLC-FD 分离。BMAA 的相对保留时间为 30.89 分钟, 与 AEG (29.67 分钟) 和 2, 4-DAB (32.91 分钟) 的保留时间明显不同。

上述结果表明, BMAA 不会与鲨鱼胞间质中所含的任何天然酸或二氨基酸发生共洗脱现象。图 1B 为无沟双髻鲨鱼鳍样本的标准 HPLC-FD 色谱图, 样本中 BMAA 峰值如图所示。图 1 所示鲨鱼样本中的 BMAA, 采用三重四极杆 LC/MS/MS (图 2) 予以确认。BMAA 峰值的质谱验证证实鲨鱼样本中 BMAA 的 HPLC 测定结果 [9、16、17、23]。样本和 BMAA 标准溶液的第三重四极杆中均检测到了质荷比为 171、289 和 119 的产物离子, 并且, 这三种裂解产物离子的比例均处于前述正常变化范围内 [18]。

20 世纪 80 年代, 南佛罗里达沿海水域爆发蓝藻水华, 并一直持续至今 [21]。据知, 大多数蓝藻均会产生与神经退行性疾病发病有关的神经毒素 BMAA [10、11、24]。Brand 等人 [21] 近期报告称, 已在本次研究所涉调查地点-南佛罗里达沿海相同水域中的多种甲壳类和鱼类体内检测出 BMAA。这些海洋物种是某些鲨鱼的部分食物。鲨鱼处于食物链的最顶端, 所以, 可能会因鲨鱼频繁出入蓝藻水华区, 致使其体内不断累积 BMAA。本次研究共包括七种鲨鱼, 每种鲨鱼的鱼鳍中均检测出大量 BMAA。有趣的是, 鱼鳍中 BMAA 富

集量虽高,但并非所有鲨鱼均来自蓝藻水华活跃区域。鲨鱼具有高度迁徙性,因此,随着时间的推移,他们可能出入过曾经发生过蓝藻水华的区域 [21、25]。由于浮游蓝藻数量多,分布在海底,并附生在海草上,同时还有大型叶,这就为 BMAA 创造了条件,从同一海洋生态环境中最低营养级流向较高营养级高等动物。

表 1 HT 鲨鱼种类和地点 (标明是否有蓝藻水华发生)

种类	学名	地点	月份	蓝藻水华
黑吻真鲨 ^a	<i>Carcharhinus acronotus</i>	25. 62099°N 80. 15602°W	8 月	无
黑边鳍真鲨 ^b	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 00644°N 80. 99969°W	3 月	有
黑边鳍真鲨 ^b	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 00644°N 80. 99969°W	9 月	有
黑边鳍真鲨 ^a	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 59968°N 80. 15205°W	7 月	无
黑边鳍真鲨 ^b	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 01109°N 80. 99832°W	9 月	有
黑边鳍真鲨 ^b	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 00644°N 80. 99969°W	3 月	有
黑边鳍真鲨 ^a	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 62592°N 80. 15442°W	10 月	无
黑边鳍真鲨 ^a	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 61905°N 80. 1714°W	10 月	无
黑边鳍真鲨 ^a	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 64757°N 80. 1881°W	4 月	无
黑边鳍真鲨 ^a	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 67199°N 80. 18144°W	9 月	无
黑边鳍真鲨 ^b	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 01089°N 81. 00419°W	9 月	有
黑边鳍真鲨 ^b	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 00976°N 81. 00079°W	9 月	有
黑边鳍真鲨 ^b	<i>Carcharhinus limbatus</i>	25. 01715°N 81. 01056°W	9 月	有
窄头双髻鲨 ^a	<i>Sphyrna tiburo</i>	25. 36711°N 80. 14806°W	3 月	无
窄头双髻鲨 ^a	<i>Sphyrna tiburo</i>	25. 36711°N 80. 14806°W	3 月	无
窄头双髻鲨 ^a	<i>Sphyrna tiburo</i>	25. 40807°N 80. 21806°W	10 月	无
公牛鲨 ^b	<i>Carcharhinus leucas</i>	25. 01715°N 81. 01056°W	9 月	有
公牛鲨 ^b	<i>Carcharhinus leucas</i>	25. 01309°N 81. 00129°W	9 月	有
无沟双髻鲨 ^a	<i>Sphyrna mokarran</i>	25. 62138°N 80. 15656°W	7 月	无
无沟双髻鲨 ^b	<i>Sphyrna mokarran</i>	25. 01715°N 81. 01056°W	9 月	有
柠檬鲨 ^b	<i>Negaprion brevirostris</i>	25. 00644°N 80. 99969°W	6 月	有
柠檬鲨 ^b	<i>Negaprion brevirostris</i>	25. 00644°N 80. 99969°W	6 月	有
护士鲨 ^a	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	25. 61942°N 80. 1835°W	9 月	无
护士鲨 ^b	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	24. 88335°N 80. 84475°W	4 月	有
护士鲨 ^b	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	25. 00644°N 80. 99969°W	3 月	有
护士鲨 ^a	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	25. 62311°N 80. 15626°W	8 月	无
护士鲨 ^a	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	25. 60062°N 80. 15214°W	8 月	无
护士鲨 ^a	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	25. 60569°N 80. 1534°W	8 月	无
护士鲨 ^a	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	25. 62311°N 80. 15626°W	8 月	无

^a 比斯坎湾; ^b 佛罗里达湾。

经检测和量化发现,在所有种类鲨鱼的鱼鳍中, BMAA 富集量均介于 144 至 1836 ng/mg (按湿重计) 之间 (表 2)。在所测定的 29 份剪鳍样本中, 仅 6 份样本未检测出 BMAA。这一结果表明, 在蓝藻水华活跃或不活跃的区域所采集的鱼鳍中, BMAA 富集量均较高。观察发现, 身长相近且来自同一地点的同种类鲨鱼间, 亦存在很大差异。例如, 在身长为 76 至 79cm 的窄头双髻鲨中, BMAA 富集量为 320 至 1836 ng/mg。在所研究的 7 种软骨鱼类中, 仅护士鲨和黑边鳍真鲨的剪鳍样本中未含 BMAA (见表 2)。有趣的是, 佛罗里达湾取得的两份护士鲨样本中均检测出 BMAA (呈阳性), 而比斯坎湾取得的五份样本中, 仅一份样本检测出峰值 (表 2)。因此推断, BMAA 富集量与取样时鲨鱼大小或年龄无明显相关性。

表 2 南佛罗里达沿海水域鲨鱼鳍中 BMAA 富集量

种类	大小 (cm)	BMAA 平均值 (ng/mg)	标准误	BMAA (ng/100 cm 鲨鱼长度)
黑吻真鲨 ^a (1)	120	1, 663		1, 386
黑边鳍真鲨 ^{b, *} (4)	61	280	84	460
黑边鳍真鲨 ^{b, *} (4)	99	144	18	210
黑边鳍真鲨 ^a (1)	162	未检出		未检出
黑边鳍真鲨 ^{b, *} (1)	165	未检出		未检出
黑边鳍真鲨 ^{b, *} (1)	173	286		165
黑边鳍真鲨 ^a (1)	174	168		97
黑边鳍真鲨 ^a (1)	177	247		140
黑边鳍真鲨 ^a (1)	148	794		537
黑边鳍真鲨 ^a (1)	155	811		522
黑边鳍真鲨 ^{b, *} (1)	165	303		184
黑边鳍真鲨 ^{b, *} (1)	165	745		453
黑边鳍真鲨 ^{b, *} (1)	168	252		150
窄头双髻鲨 ^a (4)	76	632	96	860
窄头双髻鲨 ^a (4)	79	320	59	408
窄头双髻鲨 ^a (4)	77	1, 836	364	2, 385
公牛鲨 ^{b, *} (4)	163	232	60	142
公牛鲨 ^{b, *} (4)	183	264	96	144
无沟双髻鲨 ^a (4)	247	1, 528	212	619
无沟双髻鲨 ^{b, *} (4)	175	528	211	291
柠檬鲨 ^{b, *} (4)	168	556	210	332
柠檬鲨 ^{b, *} (4)	201	628	66	312
护士鲨 ^a (1)	226	223		99
护士鲨 ^{b, *} (1)	213	169		79
护士鲨 ^{b, *} (1)	168	161		96
护士鲨 ^a (1)	165	未检出		未检出
护士鲨 ^a (1)	235	未检出		未检出
护士鲨 ^a (1)	207	未检出		未检出
护士鲨 ^a (1)	241	未检出		未检出

圆括号中的数字表示样本大小; SE: 标准误差; ND: 未检出;^a比斯坎湾;^b佛罗里达湾; * 蓝藻水华活跃。

在休闲钓鱼活动导致死亡的无沟双髻鲨的器官和肌肉中, 采用 HPLC-FD 检测 BMAA。检测结果如表 3 所示。由表可知, 该种鲨鱼的肾脏、肝脏和肌肉中均检测出 BMAA, 但心脏组织中未检测出 BMAA。经检测发现, 肾脏中的 BMAA 富集量最高, 这说明 BMAA 及其他天然氨基酸的吸收及分泌均在肾脏中进行。虽然未在心脏样本中检测到 BMAA, 但仍需进一步进行研究, 排除收缩性心肌组织中累积 BMAA 的可能性。

本次研究中, 窄头双髻鲨所含 BMAA 富集量最高的原因在于, 其主要以底栖带生物为食, 包括蓝蟹和紫虾。据报告, 蓝蟹和桃红对虾的 BMAA 富集量极高 (平均富集量分别为 2505 $\mu\text{g/g}$ 和 2080 $\mu\text{g/g}$ [21])。鲨鱼寿命长, 且为顶级掠食者, 因此, 随着时间的推移, 鲨鱼某些组织内可能会累积与蛋白质相关的 BMAA。据观察, 在鲨鱼的一生中, 汞和其他重金属毒素都是以这样的模式生物累积起来的 [8]。调查研究过程中所得的不同鲨鱼体内 BMAA 富集量, 最有可能反映鲨鱼的生态位、不同觅食特性、大小和年龄差异。

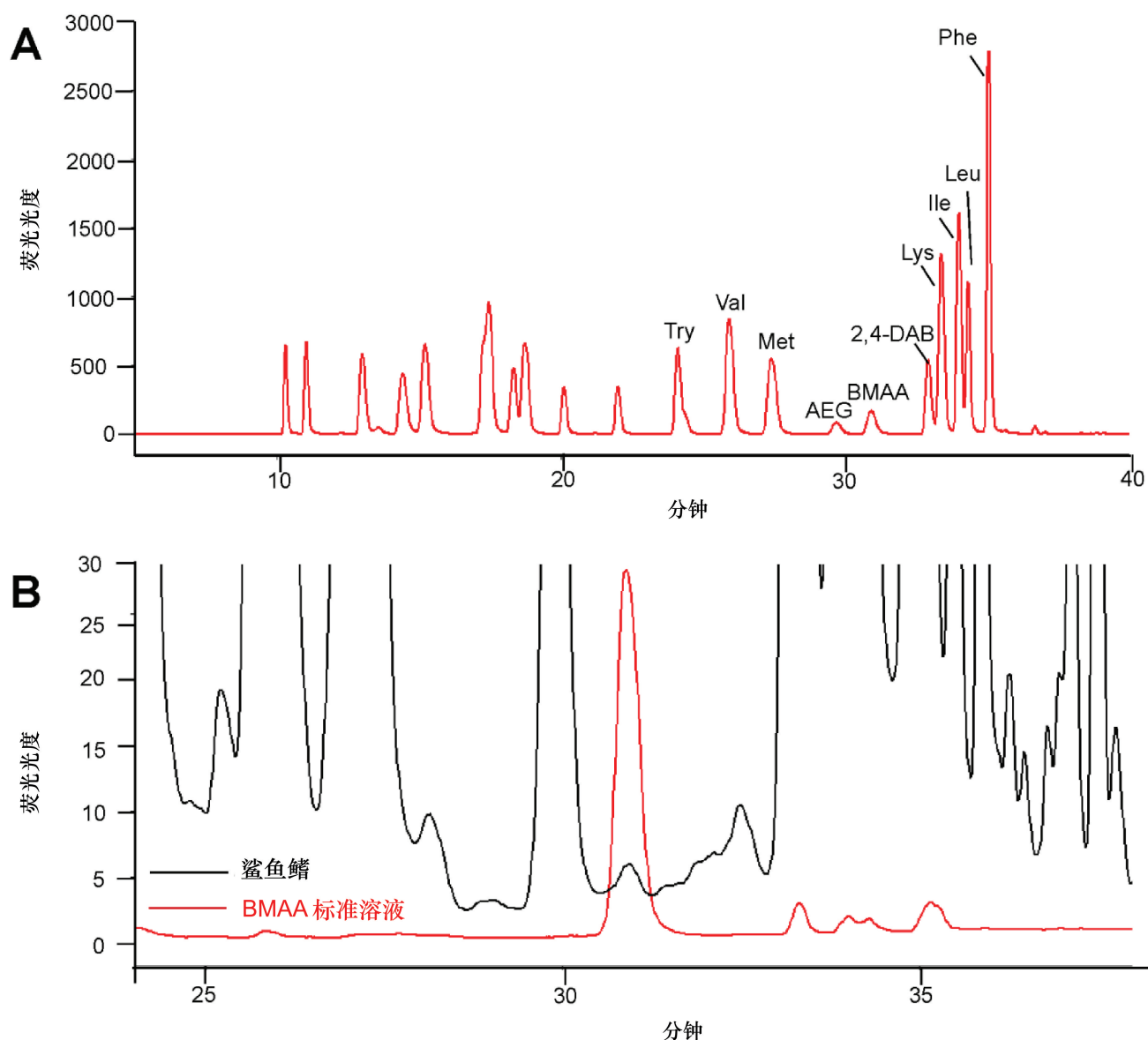


图1 鲨鱼鳍中BMAA的HPLC测定。其中，(A)为非水解AQC衍生氨基酸和二氨基酸的HPLC-FD分离：酪氨酸(Try)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、*N*-2(氨基)乙基甘氨酸(AEG)、 β -*N*-甲氨基-L-丙氨酸(BMAA)、2,4-二氨基丁二酸(2,4-DAB)、赖氨酸(Lys)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯基丙氨酸(Phe)；(B)为浸以BMAA标准溶液(红色)的无沟双髻鲨鱼鳍样本(黑色)的标准色谱图。衍生氨基酸和二氨基酸的分离在C18色谱柱上予以优化。

已对无沟双髻鲨(学名: *Sphyrna mokarran*) 器官组织(包括肾脏、肝脏和肌肉)中的BMAA进行测定。以前有报告称,波罗的海海底栖鱼类的大脑和肌肉组织中均含BMAA [14]; 南佛罗里达沿海水域中的鱼类和甲壳类动物的肌肉和组织中均含BMAA [21]; 关岛狐蝠的大脑、肌肉、皮肤、肠道、肾脏和皮毛组织中均含BMAA [23]。综上所述,这些研究说明,重复摄入BMAA导致的生物累积,可能会导致BMAA错掺入蛋白质中。

鲨鱼鳍由软骨组成,而软骨含纤维胶原蛋白。市场上出售鲨鱼鳍软骨粉和胶囊,作为膳食补充物,并称其可治疗和/或预防各种疾病。然而,这种补充物的效用尚无明显证据可依,鲨鱼软骨粉也未经美国食品药品监督管理局(FDA)审核。Field等人[26]近期提出假设,散发性ALS患者皮肤胶原蛋白异常可能源自错掺BMAA,导致胶原蛋白错误折叠。关岛狐蝠皮肤组织(据知胶原蛋白为主要成分)中检测出大量

BMAA, 刚好切合上述假设 [23]。

表 3 南佛罗里达沿海水域无沟双髻鲨 (学名: *Sphyrna mokarran*) 不同组织中 BMAA 富集量

器官	BMAA 平均值 (ng/mg)	标准误差	BMAA (ng/100 cm 鲨鱼长度)
肾脏 (3)	1450	687	598
肝脏 (4)	588	81	243
鳍 (8)	1028	211	487
肌肉 (3)	58	41	24
心脏 (2)	ND		未检出

圆括号中的数字表示样本大小; SE: 标准误差; ND: 未检出。

鲨鱼鳍中 BMAA 富集量增高这一发现亦切合海洋蓝藻是人类摄入 BMAA 一大途径的说法。但是, 尚待进一步研究, 以证实这一说法, 并证明南佛罗里达沿海水域以外鲨鱼体内亦可能含 BMAA。近期发现, 在受污水源中, BMAA 和其他蓝藻毒素共存。这说明世界上许多地方的人均可能或多或少地摄入 BMAA [17]。BMAA 和进行性神经系统退行性疾病 [9] 基因/环境交互作用之间可能存在联系, 这就引发人们对饮食中摄入 BMAA 的关注。鱼翅羹是一道亚洲美食, 拉动了人类对鱼翅的高消费需求。我们所作报告表明, 食用鱼翅可能会摄入 BMAA, 引发人体健康风险, 尤其是在鱼翅含汞或其他毒素的情况下。

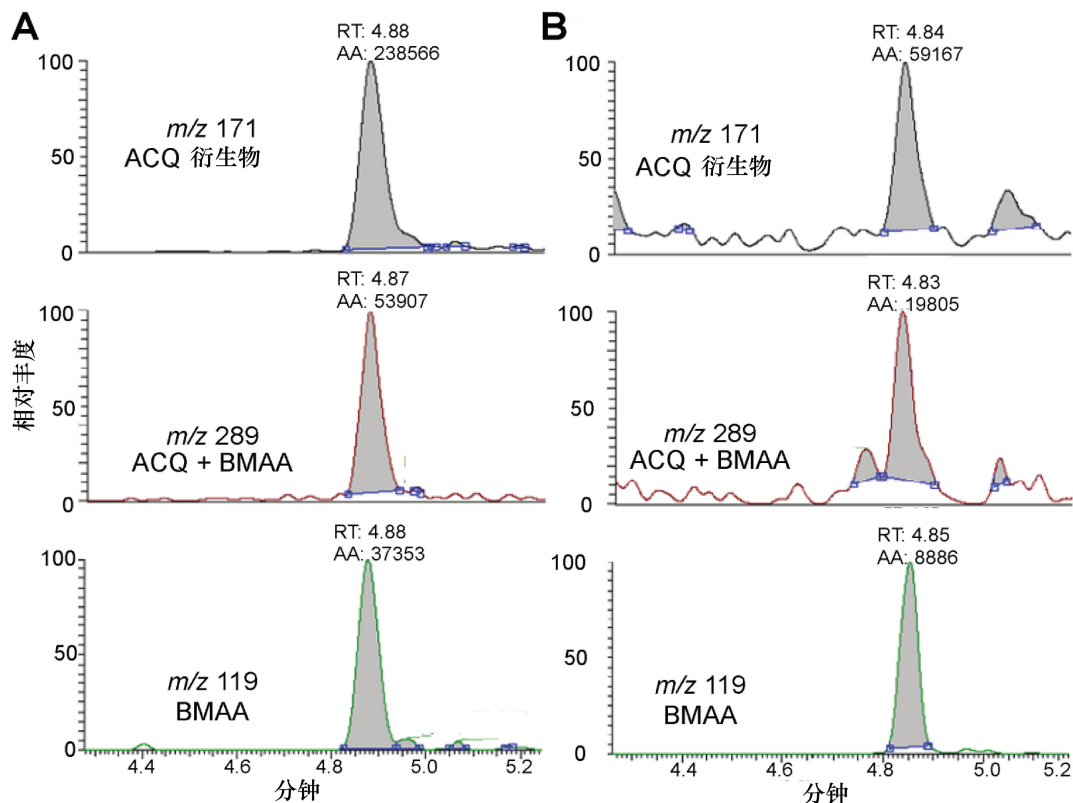


图 2 南佛罗里达湾水域中单个无沟双髻鲨所含 BMAA 的 LC/MS/MS 测定和验证。其中, (A) 为 BMAA 标准溶液的三重四极杆 LC/MS/MS 验证。质荷比为 459 的碰撞诱导解离产生的三种主要离子的色谱为: (顶板) 质子化 AQC 衍生离子 (质荷比为 171), 即定量离子; (中间板) 质子化-BMAA AQC 离子 (质荷比为 289), 即第一参比离子; (底板) 质子化-BMAA 离子 (质荷比为 119), 即第二参比离子。(B) 为无沟双髻

鲨中 BMAA 的标准三重四级杆 LC/MS/MS 验证。色谱与柱 A 相同。

3. 实验部分

3.1. 采样

如上文 [21] 所述, 所载的鲨鱼鳍样本均采自南佛罗里达 (美国) 各海域。这些海域或有或无蓝藻水华记录。在佛罗里达海湾及比斯坎湾 (表 1) 沿海开展鲨鱼调查过程中采集了剪鳍样本。采用鲨鱼钩鼓线 (一种改良性捕鱼设备) 临时捕捉鲨鱼。鼓线装置的底座配重块锚固在海底, 配备有 75 英尺长、700 磅重的试验单丝, 单丝通过一个转环连接至一根 4 股式 900 磅重的试验旋转钩吊钩线。钓钩线允许被捕捉的鲨鱼沿静止的底座配重块周围旋转环游。将鲨鱼拉到捕鱼船舷旁边, 采集非致命性组织, 由此从第一背鳍的后缘剥下一片 2×2 cm 的剪鳍, 并从鲨鱼左侧腹部的轴下躯干肌上取下一份 4 mm 肌肉活检样本。随后, 释放鲨鱼。即刻冷冻并归档所采的标本。从休闲渔业捕捞活动致死的鲨鱼中, 随机采集鲨鱼鳍、肌肉、肝、心脏及肾样本。取自护士鲨 (学名: *Ginglymostoma cirratum*)、黑边鳍真鲨 (学名: *Carcharhinus limbatus*)、无沟双髻鲨 (学名: *Sphyrna mokarran*)、公牛鲨 (学名: *Carcharhinus leucas*)、黑吻真鲨 (学名: *Carcharhinus acronotus*)、柠檬鲨 (学名: *Negaprion brevirostris*) 及窄头双髻鲨 (学名: *Sphyrna tiburo*) 的组织样本, 均已纳入本次研究 (表 1)。

3.2. 蛋白质相关 BMAA 分析方法-高效液相色谱荧光检测法

3.3. 采用之前经验证的高效液相色谱 (HPLC) 法, 作少许修正 [20, 27], 对神经毒素 (BMAA) 进行检测及量化。将鲨鱼剪鳍与组织样本置于 110°C 温度条件下, 在 6 N 盐酸 (1: 8, 重量/体积) 中水解 18 小时。水解产物在 15, 800 \times g 过滤 3 分钟, 并浓缩在真空离心蒸发浓缩器中 (Thermo-Savant SC250DDA 真空离心蒸发浓缩器, 加上一个 Savant 冷藏室 RVT 4104)。将已干燥的萃取物重新悬浮在 0.1 M 的三氯乙酸中, 再用三氯甲烷冲洗, 除去其中所含的残余脂类。采用 AccQ-Fluor 试剂 (Waters Crop, Millford, MA), 用 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚胺基-氨基甲酸酯 (AQC), 对已冲洗的萃取物及标准溶液进行衍生; 采用反相高压色谱法 (Waters Nova-Pak C18 色谱柱, 3.9 mm \times 300 mm) 进行洗脱, 洗脱梯度为 140 mM 乙酸钠、5.6 mM 三乙胺、pH 5.2 (流动相 A), 以及 52% (体积比) 乙腈水溶液 (流动相 B), 洗脱温度为 37°C 、洗脱流速为 1.0 毫升/分、样本加注体积 10 微升, 从而分离出蛋白质氨基酸中的 BMAA。

按下述梯度洗脱样本 60 分钟: 0.0 分钟 = 100% 流动相 A; 2 分钟 = 90% 流动相 A 曲线 11; 5 分钟 = 86% 流动相 A 曲线 11; 10 分钟 = 86% 流动相 A 曲线 6; 18 分钟 = 73% 流动相 A 曲线 6; 30 分钟 = 57% 流动相 A 曲线 10; 35 分钟 = 40% 流动相 A 曲线 6; 37.5 分钟 = 100% 流动相 B 曲线 6; 47.5 分钟 = 100% 流动相 B 曲线 6; 50 分钟 = 100% 流动相 A 曲线 6; 60 分钟 = 100% 流动相曲线 6。采用沃特斯多波长 (λ) 荧光检测器, 励磁 250 纳米, 发射波长 395 纳米, 完成 AQC 荧光标记检测。实验鲨鱼样本与标准的加标样鲨鱼鳍胞间质进行了比较, 其内生 BMAA (含商用 BMAA 参考标准样) 呈阴性 (西格玛 B-107; 纯度 >95%, 圣路易斯, MO, 美国)。检测限值 (LOD) 及量化限值 (LOQ) 分别为 2.7 和 7.0 纳克。BMAA 回收百分比为 88%。

3.3. 三重四级杆 LC/MS/MS

采用液相色谱法/质谱分析法/质谱分析法 (LC/MS/MS), 分析三重四级杆系统中的产物离子方式, 进而证明反相 HPLC 所测 BMAA 峰值。在 110°C 下冷冻鲨鱼鳍组织, 在 6 N 盐酸中水解 18 小时, 再用 Thermo-Savant SC250DDA 真空离心蒸发浓缩器 (Speed Vac Plus) 装置 (美国马萨诸塞州沃尔瑟姆) 予以干燥。在稀

释 HCl (20 mM) 中重组样本, 再用 AQC 衍生, 增加 BMAA 分析物的摩尔质量 (118 至 458)。在 0.1% (体积比) 甲酸水溶液 (洗脱剂 A) 和 0.1% (体积比) 甲酸的乙腈溶液 (洗脱剂 B) 中, 以 0.65 毫升/分的流速按下述梯度洗脱, 分离衍生样本: 0.0 分钟 = 99.1% 洗脱剂 A; 0.5 分钟 = 99.1% 洗脱剂 A 曲线 6; 2 分钟 = 95% 洗脱剂 A 曲线 6; 3 分钟 = 95% 洗脱剂 A 曲线 6; 5.5 分钟 = 90% 曲线 8; 6 分钟 = 15% 洗脱剂 A 曲线 6; 6.5 分钟 = 15% 洗脱剂 A 曲线 6; 6.6 分钟 = 99.1% 洗脱剂 A 曲线 6; 8 分钟 = 99.1% 洗脱剂 A 曲线 6。向已加热的电喷雾电离 (H-ESI) 探头中供应氮气, 雾化压力 40 磅/平方英寸, 气化温度 400 °C。质谱仪的操作条件如下: 毛细管温度设置在 270 °C, 毛细管补偿 35, 管镜头补偿 110, 辅助气体压力 35, 喷雾电压 3500, 源碰撞能量 0, 倍增电压 -1719。净化及梯度平衡部位过程中, 曾采用换向阀。第二重四极杆用 100% 氦气加压至 1.0 托尔。BMAA 的产物离子分析中, 用 m/z 459 作为碰撞诱导解离 (CID) 的先驱离子, 因此第一重四极杆中排除了所有其他离子。此外, 还在第二重四极杆中 CID 后, BMAA 的选择反应监测 (SRM) 过程中作两步质量过滤, 监测下述过渡情况: m/z 459 至 119, CE 21 eV; m/z 459 至 289 CE 17 eV; m/z 459 至 171 CE 38 eV。通过第三重四极杆后, 均检测出源自衍生 BMAA 的三类产物离子 (m/z 119、289、171), 其相对丰度均已量化。

4. 结论

BMAA 可从营养级较低 (硬骨鱼及甲壳类) 的蓝藻细菌转移至海洋中的顶级掠食者。由于鲨鱼鳍存在食用及药用价值, 致使鲨鱼成为濒危海洋脊椎动物 [28] 之一。服用/食用含蓝藻毒素 BMAA 的鲨鱼产品会增加风险, 引发神经退行性疾病, 包括阿耳茨海默氏病及肌萎缩侧索硬化症 (ALS) [11, 24]。据估计, 至 2050 年, 世界范围内阿耳茨海默氏病的患病率将增加四倍。届时, 世界范围内 85 人中就有 1 人患此病 [29]。在知悉更多有关 BMAA 与阿耳茨海默氏病及其他神经退行性疾病的可能联系前, 应谨慎限制人类通过饮食摄入 BMAA。我们所作报告表明, 食用鱼翅会增加人体摄入 BMAA 的风险。BMAA 属氨基酸类, 其在生物组织累积后, 会毒害神经。

致谢

感谢 Herbert W. Hoover 基金会为本次调查研究提供资金支持。鲨鱼标本样品的采集经国家海洋渔业服务高度洄游鱼种处 (National Marine Fisheries Service Highly Migratory Species Division) (SHK-EFP-10-01)、佛罗里达凯斯国家海洋保护区 (FKNMS-2010-006)、佛罗里达鱼类与野生动物保护委员会 (SAL-957)、埃弗格莱兹国家公园 (EVER-2011 -SCI-0012) 授权许可, 经迈阿密大学机构动物护理和使用委员会 (09-187 号协议) 批准。

参考文献

- 1 Ferretti, F.; Worm, B.; Britten, G. L.; Heithaus, M. R.; Lotze, H. K. Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecol. Lett.* 2010, 13, 1055-1071.
- 2 Estes, J. A.; Terborgh, J.; Brashares, J. S.; Power, M. E.; Berger, J.; Bond, W. J.; Carpenter, S. R.; Essington, T. E.; Holt, R. D.; Jackson, J. B. C.; et al. Trophic downgrading of planet earth. *Science* 2011, 333, 301-306.
- 3 Baum, J. K.; Myers, R. A.; Kehler, D. G.; Worm, B.; Harley, S. J.; Doherty, P. A. Collapse and conservation of shark populations in the northwest Atlantic. *Science* 2003, 299, 389-392.
- 4 Dulvy, N. K.; Baum, J. K.; Clarke, S. You can swim but you can't hide the global status and conservation of oceanic pelagic sharks. *Aquat. Conserv.* 2008, 18, 459-482.
- 5 Lucifora, L. O.; Garcia, V. B.; Worm, B. Global diversity hotspots and conservation priorities for sharks. *PLoS*

- One 2011, 6, doi: 10.1371/journal.pone.0019356.
- 6 Clarke, S. ; McAllister, M. K. ; Milner–Gulland, E. J. ; Kirkwood, G. P. ; Mechielsens, C. G. J. ; Agnew, D. J. ; Pikitch, E. K. ; Nakano, H. ; Shivji, M. S. Global estimates of shark catches using trade records from commercial markets. *Ecol. Lett.* 2006, 9, 1115–1126.
 - 7 Verlecar, X. N. ; Snigdha, D. S. R. ; Dhargalkar, V. K. Shark hunting—An indiscriminate trade endangering elasmobranchs to extinction. *Curr. Sci.* 2007, 92, 1078–1082.
 - 8 Hueter, R. E. ; Fong, W. G. ; Henderson, G. ; French, M. F. ; Manire, C. A. Methylmercury concentration in shark muscle by species, size and distribution of sharks in Florida coastal waters. *Water Air Soil Pollut.* 1995, 80, 893–899.
 - 9 Cox, P. A. ; Banack, S. A. ; Murch, S. J. ; Rasmussen, U. ; Tien, G. ; Bidigare, R. R. ; Metcalf, J. S. ; Morrison, L. F. ; Codd, G. A. ; Bergman, B. Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 5074–5078.
 - 10 Cox, P. A. ; Banack, S. A. ; Murch, S. J. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 13380–13383.
 - 11 Pablo, J. ; Banack, S. A. ; Cox, P. A. ; Johnson, T. E. ; Papapetropoulos, S. ; Bradley, W. G. ; Buck, A. ; Mash, D. C. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 2009, 120, 216–225.
 - 12 Murch, S. J. ; Cox, P. A. ; Banack, S. A. ; Steele, J. C. ; Sacks, O. W. Occurrence of P-methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol. Scand.* 2004, 110, 267–269.
 - 13 Anderson, D. M. ; Gilbert, P. M. ; Burkholder, J. M. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 2002, 25, 704–726.
 - 14 Jonasson, S. ; Eriksson, J. ; Berntzon, L. ; Spacil, Z. ; Ilag, L. L. ; Ronnevi, L. ; Rasmussen, U. ; Bergman, B. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 9252–9257.
 - 15 Li, A. ; Tian, Z. ; Li, J. ; Yu, R. ; Banack, S. A. ; Wang, Z. Detection of the neurotoxin BMAA within cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Toxicon* 2010, 55, 947–953.
 - 16 Faassen, E. J. ; Gillissen, F. ; Zweers, H. A. J. ; Lurling, M. Determination of the neurotoxins BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (α -, γ -diaminobutyric acid) by LC-MS/MS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms. *Amyotroph. Lateral Scler.* 2009, 2, 79–84.
 - 17 Esterhuizen, M. ; Downing, T. G. Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008, 71, 309–313.
 - 18 Metcalf, J. S. ; Banack, S. A. ; Lindsay, J. ; Morrison, L. F. ; Cox, P. A. ; Codd, G. A. Co-occurrence of β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British water bodies, 1990–2004. *Environ. Microbiol.* 2008, 10, 702–708.
 - 19 Johnson, H. E. ; King, S. A. ; Banack, S. A. ; Webster, C. ; Callanaupa, W. J. ; Cox, P. A. Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *J. Ethnopharmacol.* 2008, 118, 159–165.
 - 20 Banack, S. A. ; Johnson, H. E. ; Cheng, R. ; Cox, P. A. Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Mar. Drugs* 2007, 5, 180–196.
 - 21 Brand, L. E. ; Pablo, J. ; Compton, A. ; Hammerschlag, N. ; Mash, D. C. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), in South Florida aquatic food webs.

- Harmful Algae 2010, 9, 620–635.
- 22 Cohen, S. A. ; Michaud, D P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N- hydroxy-succinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1993, 211, 279–287.
 - 23 Banack, S. A. ; Murch, S. J. ; Cox, P. A. Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 106, 97–104.
 - 24 Murch, S. J. ; Cox, P. A. ; Banack, S. A. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 12228–12231.
 - 25 Hammerschlag, N. ; Gallagher, A. J. ; Lazarre, D M. ; Slonim, C. Range extension of endangered great hammerhead shark *Sphyrna mokarran* in the Northwest Atlantic: Preliminary data and significance for conservation. *Endanger. Species Res.* 2011, 13, 111–116.
 - 26 Field, N. C. ; Caller, T. A. ; Stommel, E. W. An explanation for the changes in collagen in sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Med. Hypotheses* 2011, 77, 565–567.
 - 27 Banack, S. A. ; Cox, P. A. Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: Implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology* 2003, 6, 387–389.
 - 28 IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011. 1. Available online: www.iucnredlist.org (accessed on 15 February 2012) .
 - 29 Brookmeyer, R. ; Johnson, E. ; Ziegler-Graham, K. ; Arrighi, M. Forecasting the global burden of Alzheimer' s disease. *Alzheimer' s Dement.* 2007, 3, 186–191.

样本可用性：可从作者处获取。

© 2012 年，版权归作者所有；被许可方：国际分子多样性保护组织（MDPI）-地址：瑞士巴塞尔。本文属依据《知识共享许可协议》条款公开发布的文章（参见网址：<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>）。