

麻痹性贝毒在毛蚶体内的转化过程研究*

林卓如^{1,3} 耿慧霞¹ 唐文娇^{1,5} 于仁成^{1,2,3,4}

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 山东青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 山东青岛 266071; 3. 中国科学院大学 北京 100049; 4. 中国科学院海洋大科学研究中心 山东青岛 266071; 5. 中国海洋大学海洋生命学院 山东青岛 266003)

摘要 麻痹性贝毒能够在贝类体内累积,威胁海产品消费者健康。在以往调查中,多次在毛蚶(*Scapharca subcrenata*)体内发现高含量的麻痹性贝毒,但对于毛蚶体内麻痹性贝毒的转化过程及其食品安全风险还缺乏认识。通过室内模拟实验,选择太平洋亚历山大藻(*Alexandrium pacificum*)和链状裸甲藻(*Gymnodinium catenatum*)作为产毒藻种,研究了两种有毒藻种所产麻痹性贝毒在毛蚶体内的转化过程。结果表明,毛蚶体内主要出现了三种麻痹性贝毒转化过程,一是 R1 位羟基的还原反应,二是 *N*-磺酰氨基甲酰基类毒素 R4 位磺酸基团的水解反应,三是含羟基苯甲酸(hydroxybenzoate)基团的链状裸甲藻毒素在 R4 位的水解反应。毛蚶体内麻痹性贝毒的生物转化过程复杂,对毛蚶毒性的影响具有一定的不确定性,未来仍需要进一步深化毛蚶体内毒素累积、代谢、转化过程的研究,同时加强对毛蚶体内毒素含量的全面监测,防范毛蚶可能导致的麻痹性贝毒中毒风险。

关键词 麻痹性贝毒; 毛蚶; 太平洋亚历山大藻; 链状裸甲藻; 链状裸甲藻毒素; 毒素转化

中图分类号 X174

doi: 10.11693/hyh20220100024

麻痹性贝毒中毒(paralytic shellfish poisoning, PSP)是沿海地区常见的一类中毒事件,多因消费者误食含有麻痹性贝毒(paralytic shellfish toxins, PSTs)的贝类造成,严重时可能导致死亡。麻痹性贝毒是一类神经毒素,能够与神经细胞的钠离子通道结合,阻断信号传导,对人体产生毒害作用(Kao *et al.*, 1965; Ritchie *et al.*, 1977)。麻痹性贝毒中毒的典型症状包括肢体麻木、皮肤刺痛、恶心、呕吐、发烧、肌肉麻痹等,严重时可能出现呼吸衰竭和休克等(于仁成等, 2016)¹⁵⁶。在海洋环境中,麻痹性贝毒主要由甲藻产生,常见的产毒甲藻包括亚历山大藻属(*Alexandrium*)中的部分藻种(如太平洋亚历山大藻 *A. pacificum*、链状亚历山大藻 *A. catenella*、微小亚历山大藻 *A. minutum* 等)、裸甲藻属的链状裸甲藻(*Gymnodinium catenatum*)和梨甲藻属中的个别藻种(*Pyrodinium bahamense* var. *compressum*)。其中,亚历山大藻属和裸甲藻属的产毒

藻种在我国近海较为常见(于仁成等, 2016)^{159~160}。麻痹性贝毒通常累积在贝类中,我国沿海地区曾多次发生过因食用染毒贝类导致的麻痹性贝毒中毒事件,对消费者身体健康构成严重威胁(林燕棠等, 1999; 于仁成等, 2016)^{156~157}, 陈火荣, 2018)。

麻痹性贝毒是一类具有四氢嘌呤环结构的化合物(图 1),已知毒素同系物近 60 种,在不同位点取代基种类的差异会影响毒素成分的性质和毒性。在以往研究中,通常根据 R4 位点取代基的差异,将常见麻痹性贝毒分为 3 类: *N*-磺酰氨基甲酰基类毒素、氨基甲酸酯类毒素和脱氨基甲酰基类毒素(表 1)。其中氨基甲酸酯类毒素的毒性最高,而 *N*-磺酰氨基甲酰基毒素由于 R4 基团过大,影响与钠离子通道的结合,表现出最低的毒性(Leal *et al.*, 2022)¹³。近年来,在链状裸甲藻中发现了一类新的羟基苯甲酸酯石房蛤毒素,并依据产毒藻名称将其命名为链状裸甲藻毒素(*Gymnodinium*

* 国家重点研发计划, 2017YFC1600701 号; 科技基础资源调查专项, 2018FY100202 号; 国家自然科学基金委员会联合基金项目, U20A20104 号。林卓如, 博士研究生, E-mail: linzhuoru@qdio.ac.cn

通信作者: 于仁成, 博士生导师, 研究员, E-mail: rcyu@qdio.ac.cn

收稿日期: 2022-01-26, 收修改稿日期: 2022-03-21

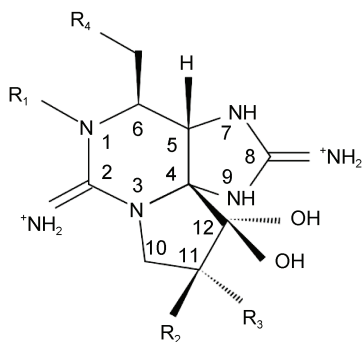
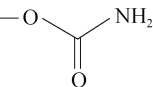
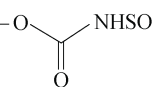
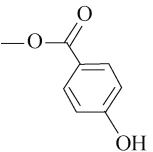


图 1 麻痹性贝毒结构
Fig.1 Structure of paralytic shellfish toxins

表 1 不同种类麻痹性贝毒的结构
Tab.1 Substituents of different paralytic shellfish toxins

毒素种类	取代基				
	R1	R2	R3	R4	
STX	H	H	H		氨基甲酸酯类毒素
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻		
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H		
NEO	OH	H	H		
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻		
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H		
GTX5	H	H	H		
C1	H	H	OSO ₃ ⁻		N-磺酰氨基甲酸酯基类毒素
C2	H	OSO ₃ ⁻	H		
GTX6	OH	H	H		
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻		
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H		
dcSTX	H	H	H		
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻		
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H		脱氨基酰基类毒素
dcNEO	OH	H	H		
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻		
dcGTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H		
GC3	H	H	H		GC 毒素
GC1	H	H	OSO ₃ ⁻		
GC2	H	OSO ₃ ⁻	H		
GC6	OH	H	H		
GC4	OH	H	OSO ₃ ⁻		
GC5	OH	OSO ₃ ⁻	H		

catenatum toxins), 简称 GC 毒素(Negri *et al*, 2003)。这类毒素 R4 位点上的取代基为羟基苯甲酸基团。大部分麻痹性贝毒为水溶性毒素, 而 GC 毒素因其羟基苯甲酸基团而具有一定的脂溶性特征。GC 毒素与小鼠脑神经细胞的钠离子通道具有较强的结合能力,

说明其可能具有较高的毒性(Llewellyn *et al*, 2004)¹⁰¹。此外, 由于 GC 毒素具备一定的脂溶性, 研究者推测其在生物体内的保留时间会长于其他麻痹性贝毒, 可能会对消费者身体健康造成更大的危害(Llewellyn *et al*, 2004)¹⁰³。

贝类在摄食麻痹性贝毒产毒藻后, 体内的麻痹性贝毒具有明显的蓄积、转化和排出过程, 进而影响贝类的毒性状况。根据以往研究得到的认识, 贝体内麻痹性贝毒具有多类转化过程, 根据其转化条件可分为化学转化过程和酶促转化过程(Suzuki *et al*, 1998)。麻痹性贝毒 R2 与 R3 基团的差向异构化反应属于典型的化学转化过程, 由藻类中占据优势的 β 异构体逐渐转化为贝类中占据优势的 α 异构体(Jaime *et al*, 2007)。此外, N-磺酰氨基甲酸酯类毒素水解产生氨基甲酸酯类毒素也是化学转化过程, 该反应倾向于在酸性条件下发生(田华, 2009)。贝类体内发生的毒素酶促转化过程主要是通过水解反应生成脱氨基甲酸酯类毒素, 包括氨基甲酸酯基水解酶对氨基甲酸酯类毒素的水解以及磺氨基甲酸酯基水解酶对 N-磺酰氨基甲酸酯类毒素的水解(Raposo *et al*, 2020)⁴。目前, 对于 GC 毒素在贝体内的转化过程仍缺乏足够的了解, 有研究认为 GC 毒素在贝体内也会通过酶促水解产生脱氨基甲酸酯类毒素(Vale, 2008)¹⁹¹。贝类对于麻痹性贝毒的转化具有明显的种间差异, 扇贝和蛤对麻痹性贝毒的转化过程较为强烈, 其体内的毒素组成与产毒藻存在较大差异; 牡蛎和贻贝对麻痹性贝毒的转化相对较弱, 更多表现为毒素比例的变化(Botelho *et al*, 2020; 包振民等, 2021⁴)。还有研究表明, 贝类摄食产毒藻后能够将麻痹性贝毒快速代谢转化为新型的低毒性 M 类毒素(Dell'Aversano *et al*, 2008; Li *et al*, 2012), 并将其快速排出体外, 以达到脱毒的目的。因此, 深入探究贝体内麻痹性贝毒的转化过程, 解析不同贝类对毒素的转化特征, 有助于准确评估贝体内麻痹性贝毒的致毒风险, 更好地防控麻痹性贝毒中毒事件。

毛蚶(*Scapharca subcrenata*)广泛分布于我国沿海地区, 是常见的海产经济贝类。主要产区位于渤海和黄海海域, 包括渤海湾、辽东半岛和黄海大陆架海域等(张福崇等, 2020)。到目前为止, 我国沿海尚未出现因食用毛蚶导致的麻痹性贝毒中毒事件。但是, 以往调查中发现毛蚶体内麻痹性贝毒含量可以达到较高水平, 在天津汉沽和河北秦皇岛海域的毛蚶样品中, 麻痹性贝毒毒性甚至超出农产品安全质量限量标准(柳阳, 2017)⁷⁰, 极有可能导致中毒事件发生。目前对

于毛蚶体内麻痹性贝毒的累积、转化和排出过程还缺乏科学认识,有必要通过科学研究深入了解毛蚶暴露于有毒藻后体内麻痹性贝毒的动态变化过程,进而阐明其对毛蚶毒性的影响。对此,本研究通过模拟实验,选择太平洋亚历山大藻(*A. pacificum*)和链状裸甲藻(*G. catenatum*)作为典型产毒藻种,研究了毛蚶体内麻痹性贝毒的转化过程,以期揭示毛蚶中麻痹性贝毒转化特征和规律,为防控麻痹性贝毒中毒事件提供基础科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

实验中用到的有机溶剂包括甲醇(色谱级, Merck, 德国)、乙腈(色谱级, Merck, 德国)、甲酸(色谱级, $\geq 99\%$, 麦克林)、硝酸(工艺超纯, $66.6\%\sim 68.0\%$, 国药)、磷酸(优级纯, 国药)、盐酸(优级纯, $\geq 36\%$, 国药)、乙酸(色谱级, $\geq 99.0\%$, 科密欧)、氨水(优级纯, $25\%\sim 28\%$, 国药)、四丁基磷酸二氢铵($\geq 99.00\%$, Fulka, 美国)、庚基磺酸钠(Wako, 日本)、高碘酸 $\text{H}_5\text{IO}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99.0\%$, Sigma, 美国)。实验中使用的超纯水由超纯水机(Millipore Simplicity, 美国)制备。毒素标准物质(GTX1&4、GTX2&3、STX、NEO、dcGTX2&3、dcSTX、dcNEO、C1&2、GTX5、GTX6)购自加拿大国家研究院海洋生物科学研究所,在有效使用期内使用。

1.2 实验生物

实验所用藻株包括太平洋亚历山大藻(MEL2 株)和链状裸甲藻(MEL11 株)。太平洋亚历山大藻(以往通过形态学方法鉴定为塔玛亚历山大藻复合种 *A. tamarense* species complex, ATHK 藻株)来自暨南大学,分离自南海;链状裸甲藻于 2017 年分离自福建莆田近海,并经形态学和分子生物学鉴定(Lin *et al.*, 2022)。实验用海水取自青岛市汇泉湾,经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后,煮沸灭菌,冷却后加入到经过高温灭菌的锥形瓶中,按照 L1 培养基配方(Guillard *et al.*, 1993)加入营养盐、微量元素和维生素,接入藻种后进行培养。太平洋亚历山大藻培养温度为 $18\ ^\circ\text{C}$,光照强度为 $3\ 000\ \text{lx}$,光暗循环为 L:D=12 h:12 h;链状裸甲藻培养温度为 $20\ ^\circ\text{C}$,光照条件同上。

实验用毛蚶(*S. subcrenata*)采自山东青岛近海,壳长(4.50 ± 0.27) cm,壳宽(3.45 ± 0.24) cm,壳高(2.82 ± 0.28) cm,软组织净重(6.94 ± 1.04) g。购入后先在实验室内驯化,期间持续通气并每天更换培养海

水。挑取驯化后健康活跃的毛蚶用于实验,每 6 只毛蚶分为 1 组,培养于装有 3 L 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤海水的烧杯中,实验期间持续通气并定期更换海水。

1.3 毛蚶摄食太平洋亚历山大藻的室内培养实验

取一定量的太平洋亚历山大藻培养液,用 $10\ \mu\text{m}$ 筛网浓缩藻液中的藻细胞并置于一定量海水中混匀。取 1 mL 混匀后的藻液,加入 $20\ \mu\text{L}$ 鲁哥试剂(Lugol's agent)固定,在显微镜(Zeiss, Axio Vert A1, 德国)下计数藻细胞密度。量取一定体积的藻液,在 $\leq 0.05\ \text{MPa}$ 压力下抽滤至 $1.2\ \mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜(GF/C, Whatman, 直径 $47\ \text{mm}$)上,置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冷冻保存,用于麻痹性贝毒分析。将剩余藻液加入烧杯中,通过加入灭菌海水调整亚历山大藻初始密度至 $2\ 000\ \text{cells/mL}$,每只毛蚶投喂量约为 1.0×10^6 藻细胞。实验进行 48 h,分别于投喂毛蚶后的第 2、4、6、8 和 10 h 取烧杯中水样 10 mL,加鲁哥试剂固定后计数剩余亚历山大藻细胞密度,用于计算毛蚶实际摄食的藻细胞数量。分别于投喂前和投喂后的第 1、2、4、8、12、24 和 48 h 取毛蚶样品,解剖毛蚶并采集全部软组织,于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 下冷冻保存,统一进行麻痹性贝毒分析。

1.4 毛蚶摄食链状裸甲藻的室内培养实验

链状裸甲藻的浓缩和取样方法与 1.3 部分中太平洋亚历山大藻的浓缩与取样方法相同。链状裸甲藻初始密度设置为 $400\ \text{cells/mL}$,每只毛蚶投喂量约 2.0×10^5 藻细胞,实验进行 96 h。分别于投喂后第 2、4、6、8、10 和 12 h 取烧杯中水样 10 mL,鲁哥试剂固定后计数剩余藻细胞密度,用于计算毛蚶摄食藻细胞数量。分别于投喂毛蚶后的第 2、4、8、12、24、48、72 和 96 h 取毛蚶样品,解剖毛蚶并采集全部软组织,于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 下冷冻保存,统一进行麻痹性贝毒分析。

1.5 麻痹性贝毒分析

亚历山大藻细胞及投喂亚历山大藻的毛蚶样品均采用高效液相色谱-柱后衍生-荧光检测法进行麻痹性贝毒分析,毒素提取和分析过程参照柳阳(2017)³⁷⁻⁴²检测方法进行。链状裸甲藻及投喂链状裸甲藻的毛蚶样品,因其中含有 GC 毒素成分,均采用高效液相色谱-质谱联用方法进行麻痹性贝毒分析,毒素提取和分析过程如下。

1.5.1 链状裸甲藻中毒素提取 将滤有藻细胞的玻璃纤维滤膜剪碎,置于 15 mL 离心管中,加入 3 mL $0.05\ \text{mol/L}$ 醋酸溶液。使用涡旋振荡器(IKA, MS1 Minishaker, 美国)混合均匀后,在冰浴条件下使用超声波细胞破碎仪(JY96- 型超声波细胞粉碎机,宁波

新芝科器研究所, 国产)对藻类样品进行破碎(设置功率为 100 W, 每次处理 2 s 后静置 2 s, 持续处理 5 min)。镜检确认藻细胞完全破碎后, 将离心管置于高速冷冻离心机(Sigma 3-16K, 德国)中, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液待基质净化。

1.5.2 毛蚶中麻痹性贝毒提取 冷冻的贝类组织在室温下解冻后, 用组织匀浆机(IKA, T10BS25, 美国)匀浆, 取 5 g 混匀的贝组织, 置于 15 mL 聚丙烯离心管中, 加入 5 mL 0.05 mol/L 醋酸溶液, 使用涡旋振荡器震荡混合, 混匀样品置于水浴锅(DK-8D, 上海一恒, 国产)中煮沸约 5 min, 自然冷却至室温后, 于高速离心机中 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液待进行基质净化。

1.5.3 提取液基质净化 水溶性麻痹性贝毒提取: 使用甲醇-水交替活化固相萃取柱(Supelclean LC-18, 3 mL, Supelco, 美国)后, 将 1 mL 藻类或贝类提取液加入固相萃取柱中, 使用真空泵缓慢抽干(压力 ≤ 20 kPa), 并将洗脱液收集于 5 mL 离心管中。再加入 1.5 mL 超纯水洗脱柱上残留的水溶性麻痹性贝毒, 缓慢抽干后, 与上一步洗脱液合并收集于 5 mL 离心管中。加入少量超纯水将收集的洗脱液定容至 2.5 mL。取 1 mL 洗脱液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后上机分析。

GC 毒素提取: 向上一步洗脱水溶性麻痹性贝毒后的固相萃取小柱, 加入 0.5 mL 20%甲醇洗脱, 洗脱液收集于 1.5 mL 离心管中。再加入 0.5 mL 80%甲醇洗脱, 洗脱液与上一步洗脱液合并收集于 1.5 mL 离心管中。加入少量超纯水将收集的洗脱液定容至 1 mL, 震荡混匀后, 取 1 mL 洗脱液经 0.22 μ m 有机相滤膜过滤后上机分析。

1.5.4 麻痹性贝毒的高效液相色谱-质谱联用分析 参照 Costa 等(2015)^{2055~2058} 建立的方法进行麻痹性贝毒的液-质联用分析。采用超高效液相色谱仪(UltiMate 3000, Thermo Fisher, 美国)配合三重四极杆线性离子阱质谱仪(Qtrap[®]-4500, AB Sciex, 美国)进行毒素分析, 所用色谱柱为酰胺键合硅胶色谱柱(TSK-gel Amide-80, 5 μ m, 2.0 mm $\times$ 250 mm, 日本)。流动相 A 为 50 mmol/L 甲酸水溶液(pH=2.6), 流动相 B 为含有 50 mmol/L 甲酸的 95%乙腈水溶液(pH=2.6), 采用梯度洗脱(表 2), 流速 200 μ L/min, 进样量 2 μ L, 柱温箱温度 30 $^{\circ}$ C, 样品池温度 4 $^{\circ}$ C。以标准毒素对质谱仪的响应进行调谐并优化检测参数。优化后的质谱参数如下: 电喷雾离子源进行离子化, 气帘气电压 20 V, 雾化气电压设置为 Medium, 电喷雾电压

5 500(+) V, 离子源温度 550 $^{\circ}$ C, 加热辅助电压 1 和 2 分别为 45 Pa 和 55 Pa, 碰撞室入口电压为 10 V, 碰撞室出口电压为 9 V, 电子倍增管电压 CEM 为 1 800 V。在此基础上对去簇电压和碰撞能参数进行调谐优化。由于 GC 毒素尚无标准品, 其去簇电压和碰撞能参照 Costa 等(2015)²⁰⁵⁸ 提出的方法进行设置。采用正离子扫描模式下的多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)对毒素进行检测, 优化后毒素离子对及去簇电压和碰撞能设置见表 3。在对无标准品的麻痹性贝毒进行分析时, 假定其与结构相近的其他有标毒素具有相同的质谱响应, 即 C3、C4、GC1、GC2、GC3、GC4、GC5 与 GC6 分别参照 C1、C2、GTX2、GTX3、STX、GTX1、GTX4 和 NEO 的标准品进行定量分析。

表 2 液-质联用法分析麻痹性贝毒的洗脱梯度
Tab.2 Elution gradient in paralytic shellfish toxin analysis by HPLC-MS

洗脱时间/min	洗脱液 A/%	洗脱液 B/%	洗脱流速/(mL/min)
0.00	35	65	0.2
20.00	55	45	0.2
21.00	35	65	0.2
25.00	35	65	0.2

表 3 麻痹性贝毒质谱检测参数
Tab.3 Mass spectrometry detection parameters of paralytic shellfish toxins

毒素	离子对/(m/z)	碰撞能/eV	去簇电压/V
C1	396.0>316.3	23.0	30.0
	396.0>298.0	29.0	30.0
C2	396.0>298.0	29.0	30.0
	396.0>316.3	23.0	30.0
GTX2	316.1>298.1	25.0	50.0
	316.1>220.0	30.0	50.0
GTX3	396.0>298.0	29.0	30.0
	396.0>316.3	23.0	30.0
GTX1	332.1>314.1	26.0	80.0
	332.1>236.1	31.0	80.0
GTX4	412.1>313.9	32.0	30.0
	412.1>332.2	23.0	30.0
dcGTX2	273.1>126.1	28.0	80.0
	273.1>255.3	24.0	80.0
dcGTX3	353.1>273.1	17.0	35.0
	353.1>255.1	28.0	40.0
GTX5	380.0>300.0	20.0	30.0
	380.0>282.2	30.0	30.0
GTX6	396.0>316.3	23.0	30.0

续表			
毒素	离子对/(<i>m/z</i>)	碰撞能/eV	去簇电压/V
STX	396.0>298.0	29.0	30.0
	300.2>204.1	35.0	50.0
	300.2>179.0	34.0	50.0
dcSTX	257.1>126.0	27.0	50.0
	257.1>239.2	25.0	50.0
NEO	396.0>316.3	23.0	30.0
	396.0>298.0	29.0	30.0
dcNEO	273.1>255.1	25.0	50.0
	273.1>225.1	25.0	50.0
GC1	393.1>320.1	40.0	30.0
	473.1>393.1	40.0	30.0
GC2	473.0>375.0	40.0	30.0
	473.0>454.9	40.0	30.0
GC3	377.3>204.0	40.0	50.0
	377.3>359.1	40.0	50.0
GC4	489.1>409.0	40.0	40.0
	489.2>391.1	40.0	40.0
GC5	489.2>471.5	40.0	30.0
	393.2>220.2	40.0	30.0
GC6	393.2>220.2	40.0	30.0
	393.2>374.9	40.0	30.0

2 结果

2.1 太平洋亚历山大藻与链状裸甲藻产毒情况

本研究中太平洋亚历山大藻产生的麻痹性贝毒主要包括 GTX1&4、GTX5 和 C1&2 等, 毒素比例从高到低依次为 GTX4 (45.6%)、GTX1 (24.3%)、C1

(17.7%)、C2 (7.8%)和 GTX5 (4.5%)(图 2a)。毒素含量约 8.38 fmol/cell。链状裸甲藻产生的水溶性毒素成分主要为 GTX5、GTX6、C1、C2、C3、C4, 以及微量的 dcSTX 和 dcGTX2&3, 约占毒素总量的 59%; 脂溶性的 GC 毒素主要包括 GC2、GC3、GC5 和 GC6 以及微量的 GC1(图 2b), 约占毒素总量的 41%。各种水溶性毒素的比例从高到低依次为 GTX6 (37.58%)、C2 (12.63%)、C4 (5.90%)、GTX5 (1.66%)、C1 (0.82%)、C3 (0.16%)、dcSTX (0.08%)和 dcGTX2&3 (0.02%); 而 GC 毒素比例由高到低依次为 GC5 (27.38%)、GC6 (6.38%)、GC3 (5.24%)和 GC2 (2.16%), GC1 毒素含量低于定量限。经统计计算, 该株藻种麻痹性贝毒的含量约为 456 fmol/cell。

2.2 毛蚶摄食太平洋亚历山大藻后体内麻痹性贝毒变化情况

投喂亚历山大藻前, 毛蚶体内未检出麻痹性贝毒。投喂 8 h 内毛蚶已几乎完全滤食藻细胞, 12 h 后水体内无剩余藻细胞。在投喂后第 1 h 内毛蚶体内即检测到麻痹性贝毒, 含量为 0.03 nmol/g。毒素含量在 1~12 h 内逐渐增加, 至 12 h 时达到峰值 1.41 nmol/g (图 3a)。在此期间, 毛蚶毒性也逐步上升, 并在 12 h 达到最高值 111 μg STXeq/kg。计算结果表明, 毛蚶几乎将投喂的太平洋亚历山大藻中全部毒素都摄入体内。此后, 毛蚶开始排出毒素, 毒素含量逐渐下降, 毒性也相应下降, 至 48 h 毒性下降到 44 μg STXeq/kg。实验过程中毛蚶的毒性变化与其体内毒素含量变化基本一致。

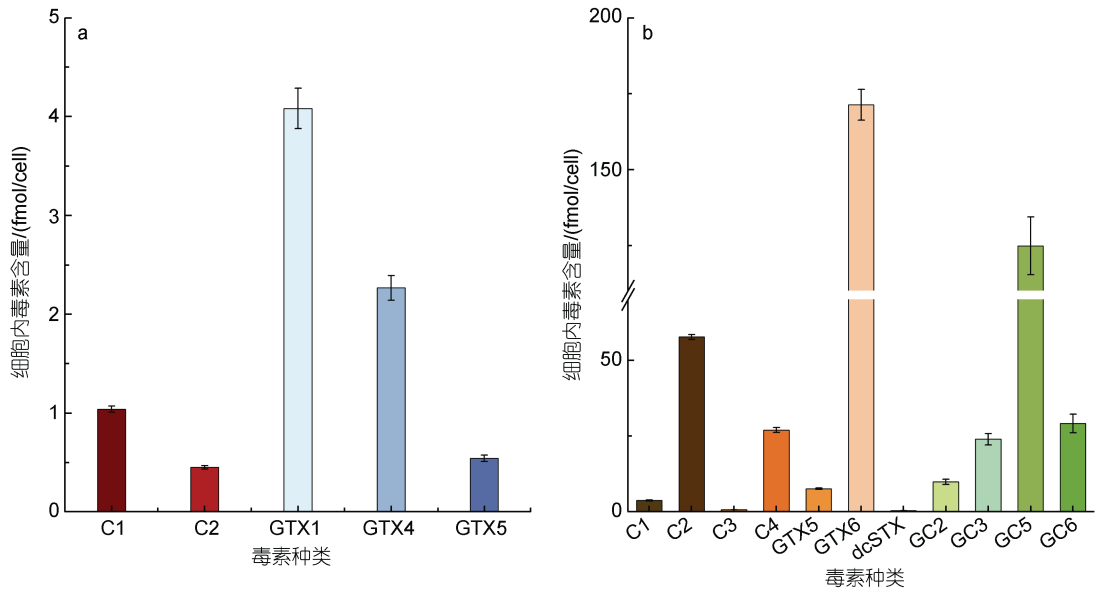


图 2 太平洋亚历山大藻(a)与链状裸甲藻(b)产毒状况
Fig.2 Toxin profile of *Alexandrium pacificum* (a) and *Gymnodinium catenatum* (b)

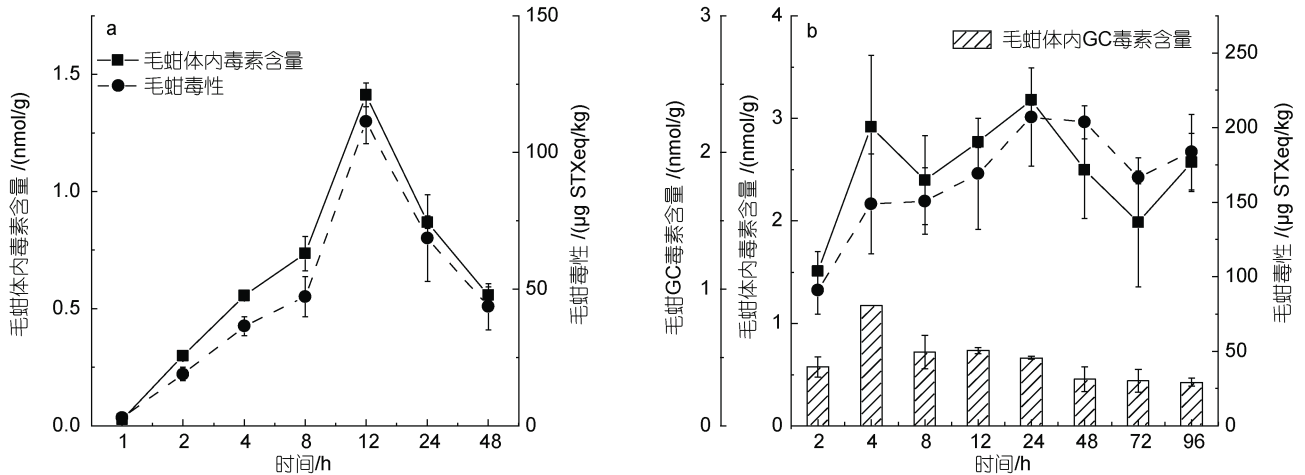


图3 毛蚶摄食太平洋亚历山大藻(a)和链状裸甲藻(b)后体内毒素含量与毒性变化情况

Fig.3 Variation of toxin concentration and toxicity of *Scapharca subcrenata* after ingestion of *Alexandrium pacificum* (a) and *Gymnodinium catenatum* (b)

实验期间毛蚶体内共检测到4种麻痹性贝毒,分别是 GTX2、GTX3、C1、C2。其中 GTX2、GTX3 在亚历山大藻中未检出,而亚历山大藻中的 GTX1、GTX4 和 GTX5 在毛蚶中未检出。毛蚶中最主要的毒素成分是 C1 和 GTX2, C2 和 GTX3 占比较低。实验期间毛蚶体内 C1 占比逐渐下降,而 GTX2 占比逐渐上升(图 4a)。

2.3 毛蚶摄食链状裸甲藻后体内麻痹性贝毒变化情况
投喂链状裸甲藻前,毛蚶体内未检出麻痹性贝毒。投喂链状裸甲藻 12 h 内,毛蚶几乎完全滤食链状裸甲藻细胞。利用液-质联用法检测毛蚶体内麻痹性贝毒的谱图见图 5。毛蚶暴露于链状裸甲藻中 2 h 后体内即可检出麻痹性贝毒,暴露后前 4 h 毛蚶体内毒

素保持快速增加,达到 2.91 nmol/g,毛蚶毒性达到 149 $\mu\text{g STXeq/kg}$ (图 3b)。此后毛蚶体内毒素总量虽然保持上升趋势,但上升速率明显降低,第 24 h 毒素含量达到最高水平 3.18 nmol/g,毒性也达到峰值 207 $\mu\text{g STXeq/kg}$ 。据估算,毛蚶未能将投喂的链状裸甲藻中全部毒素摄入体内,累积毒素总量约占链状裸甲藻中毒素总量的 24%。自 24 h 后,毛蚶开始排出毒素,体内毒素总量逐渐下降。

在摄入链状裸甲藻后,毛蚶体内检出的水溶性麻痹性贝毒成分主要包括 GTX5、GTX6、dcSTX、STX、C1&2、C3&4、GTX2&3 和 dcGTX2&3,其中 GTX2&3 和 STX 在链状裸甲藻中未检出。毒素累积

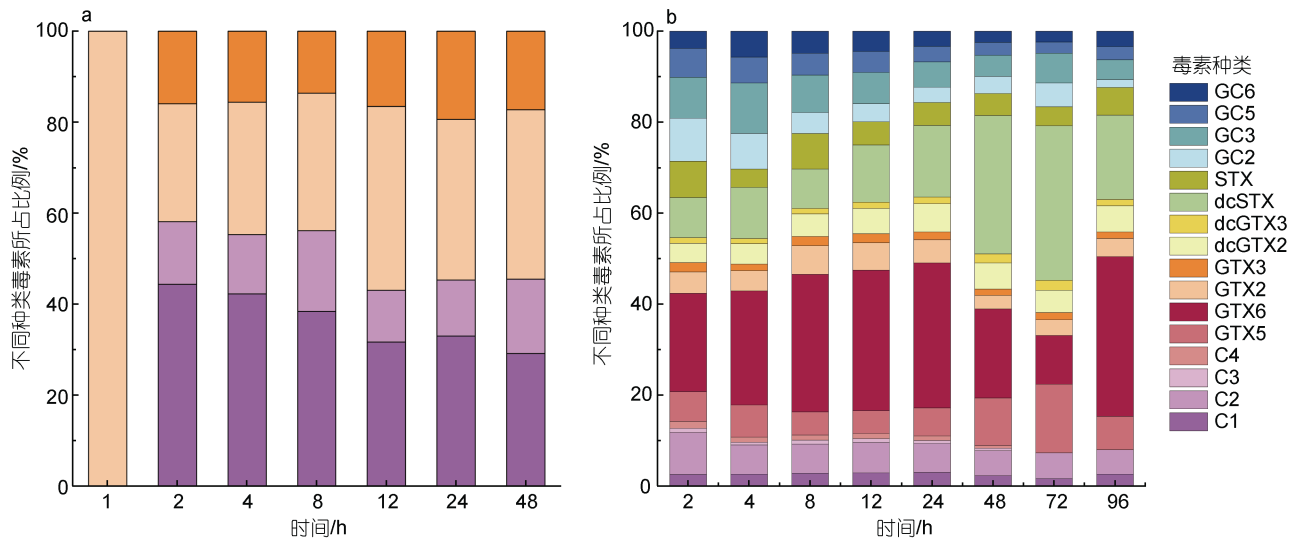


图4 毛蚶摄食太平洋亚历山大藻(a)和链状裸甲藻(b)后体内麻痹性贝毒占比变化情况

Fig.4 Variation of molar toxin proportion of *Scapharca subcrenata* after ingestion of *Alexandrium pacificum* (a) and *Gymnodinium catenatum* (b)

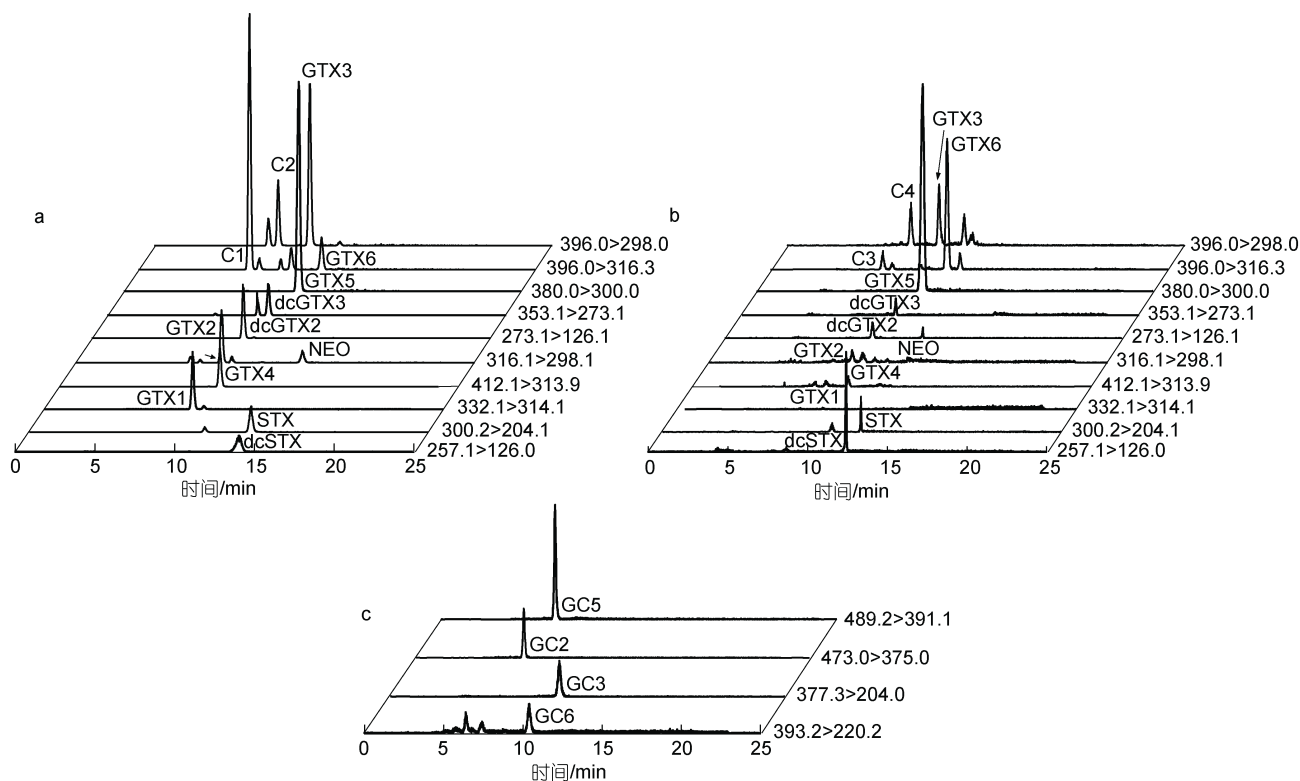


图 5 利用液-质联用法分析毛蚶体内麻痹性贝毒的色谱图

Fig.5 Chromatographs of paralytic shellfish toxins analyzed by HPLC-MS

注: a: 水溶性麻痹性贝毒标准品色谱图; b: 毛蚶样品中水溶性麻痹性贝毒色谱图; c: 毛蚶样品中 GC 毒素色谱图

阶段, 毛蚶体内 GTX6 占比最高, 且逐渐增加; 其次是 dcSTX 和 GTX5(图 4b), dcSTX 和 dcGTX2&3 占比也明显高于链状裸甲藻。在毒素排出阶段, dcSTX 逐渐成为毛蚶体内主要的水溶性毒素组分, 最高占比达到 34%, 而 GTX6 所占比例逐渐下降。在链状裸甲藻产生的麻痹性贝毒中, dcSTX 所占比例极小, 但在毛蚶体内逐渐成为最主要的毒素成分。毛蚶体内的 C1&2、C3&4、dcGTX2&3、GTX2&3 和 STX 毒素含量较低, 占毒素总量的比例也较小。对脂溶性麻痹性贝毒的分析结果表明, 实验过程中毛蚶体内 GC 毒素占比略低于链状裸甲藻。实验开始后 4 h 内, 毛蚶体内 GC 毒素含量逐渐增加, GC2 是主要的脂溶性麻痹性贝毒成分, GC3 含量略低于 GC2(图 4b)。4 h 后, GC 毒素总量逐渐下降, GC3 开始成为主要的毒素成分, 其次是 GC2、GC5 和 GC6 则含量较低。

3 讨论

毛蚶是我国近海常见的贝类, 具有较高的经济价值(陈辰, 2015)。本研究发现, 毛蚶在暴露于产毒藻后, 会快速累积麻痹性贝毒, 具备一定的毒素累积能力。在产毒藻赤潮期间, 毛蚶有可能通过摄食产毒藻

而蓄积高含量的麻痹性贝毒, 对消费者健康乃至生命安全造成威胁。因此, 对毛蚶体内麻痹性贝毒转化过程与规律的探究对于深入了解麻痹性贝毒风险、保护海产品消费者健康具有重要意义。目前, 针对贝类体内麻痹性贝毒的累积、转化和排出过程已开展了大量研究, 揭示了贻贝、扇贝、牡蛎等诸多贝类中麻痹性贝毒的转化过程和规律(Choi *et al*, 2003; Kwong *et al*, 2006; Wiese *et al*, 2010)。本研究选择了太平洋亚历山大藻和链状裸甲藻作为产毒藻种, 前者主要产生 *N*-磺酰氨基甲酰基类毒素和氨基甲酸酯类毒素, 后者主要产生 *N*-磺酰氨基甲酰基类毒素和脂溶性的 GC 毒素, 二者毒素组成存在一定的互补性, 通过对比分析毛蚶暴露于上述两种产毒藻后体内麻痹性贝毒含量和组成的变化, 对毛蚶转化麻痹性贝毒的过程进行了研究和分析。

3.1 R1 位点羟基还原反应

毛蚶暴露于太平洋亚历山大藻后, 体内出现了较多的 GTX2&3, 这在投喂的太平洋亚历山大藻中没有检测到; 而太平洋亚历山大藻产生的 GTX1&4, 在毛蚶中却未被检出。说明在毛蚶体内发生了麻痹性贝毒的转化。毛蚶体内出现的 GTX2&3 可能是由

GTX1&4 通过 R1 位点的羟基还原反应产生, 这一反应目前也已在扇贝、贻贝等多种贝类中被确认 (Shimizu *et al*, 1981; Andres *et al*, 2019)。本研究发现, 暴露于太平洋亚历山大藻后, 毛蚶体内未检测到 GTX1&4, 这可能由于贝类对不同毒素的选择性排出 (DeGrasse *et al*, 2014; Tobke *et al*, 2021)造成的。然而, 实验结果表明, 暴露于太平洋亚历山大藻的毛蚶体内毒素总量与投喂的亚历山大藻中毒素总量基本相当, 表明实验期间毛蚶对毒素的选择性排出过程可以忽略。由此推测, 毛蚶中的 GTX1&4 主要通过羟基还原过程生成了 GTX2&3。在向毛蚶投喂太平洋亚历山大藻的实验中, 所有取样阶段均未在毛蚶体内检测到 GTX1&4, 表明毛蚶中 R1 位点羟基的还原反应具有较高的反应速率。在部分贝类中, 当存在谷胱甘肽等还原剂时, R1 位点羟基还原反应还可能伴有 R2 和 R3 位点磺酸基团的还原 (Bricelj *et al*, 1998³⁶²; 朱明远等, 2003)。本研究发现, 毛蚶在暴露于太平洋亚历山大藻时, GTX2&3 产生后并未出现 STX, 推测毛蚶体内麻痹性贝毒的还原反应具有一定的位点特异性。

对比分析实验结果推测, R1 位点的羟基还原反应与毛蚶摄入链状裸甲藻后 STX 的产生也有一定关系。STX 的产生源自 GTX5 R4 位点的磺酸基水解过程。本实验中使用的太平洋亚历山大藻和链状裸甲藻均能产生少量 GTX5, 但毛蚶在摄入链状裸甲藻后体内出现 STX, 而摄入太平洋亚历山大藻后却未检测到 STX, 推测链状裸甲藻中高含量的 GTX6 在毛蚶体内发生 R1 位点羟基的还原反应, 持续转化生成 GTX5 并进一步通过水解反应产生了可检测到的 STX。而太平洋亚历山大藻中 GTX5 含量较少, 即便发生了转化, STX 含量也不足以被检测。

3.2 R4 位点磺酸基和羟基苯甲酸基团的水解反应

根据以往研究, 毛蚶体内出现的 GTX2&3 还可能源自 C1&2 R4 位磺酸基的水解过程, 这一过程也在多种贝类中被证实。Asakawa 等(1995)研究认为, 紫贻贝和牡蛎中可能存在 C1&2 水解转化为 GTX2&3 的过程, Choi 等(2003)⁹³³ 发现在翡翠贻贝消化腺中也存在类似过程, 郝晓菲等(2017)也证实了栉孔扇贝中同样存在此类毒素转化过程。将毛蚶摄食太平洋亚历山大藻和链状裸甲藻后体内毒素成分的变化情况进行对比发现, 在摄入同样产 C1&2 但不产生 GTX1&4 的链状裸甲藻后, 毛蚶体内也出现了 GTX2&3, 而链状裸甲藻中的其他麻痹性贝毒都无法直接转化为 GTX2&3, 这说明毛蚶中的 GTX2&3 可以来自 C1&2

的水解。

在暴露于链状裸甲藻的毛蚶体内检测到藻中含量极低的脱氨甲酰基类毒素 dcGTX2&3 与 dcSTX, 表明链状裸甲藻产生的某些毒素在毛蚶体内发生了转化, 生成了脱氨甲酰基类毒素。毛蚶在摄入太平洋亚历山大藻后, 体内并未检测到任何脱氨甲酰基类毒素, 侧面反映了太平洋亚历山大藻产生中的 C1&2, GTX1&4 等毒素成分不会在毛蚶体内转化生成脱氨甲酰基类毒素。毛蚶摄入链状裸甲藻后体内出现的脱氨甲酰基类毒素只可能来自链状裸甲藻中的独特的 GC 毒素。Vale(2008)¹ 已通过研究指出, GC 毒素可以通过 R4 位羟基苯甲酸基团的水解反应, 生成相应的脱氨甲酰基类毒素。因此, 毛蚶体内的脱氨甲酰基类毒素最有可能来自 GC 毒素的水解反应, 如 GC1&2 转化生成 dcGTX2&3, GC3 转化生成 dcSTX。毛蚶摄入太平洋亚历山大藻后未产生脱氨甲酰基类毒素, 说明此类水解反应具有一定的特异性, 仅对 R4 位点为羟基苯甲酸基团的 GC 毒素有作用。本研究未在毛蚶体内检测到 GC4&5 和 GC6 的水解产物 dcGTX1&4 和 dcNEO, 其中, dcGTX1&4 并未被纳入本研究的检测范围, 无法证明 GC4&5 的水解反应是否发生; 而本研究对 dcNEO 的检测限相对较高, 对 dcNEO 的检测具有一定局限性。因此, 目前仍无法确证毛蚶体内是否存在 GC4&5 和 GC6 的水解转化过程。本研究中使用的链状裸甲藻 GC5 占比很高, 而毛蚶体内 GC5 占比明显下降, 说明 GC5 很可能在毛蚶体内发生了转化。毛蚶中 GC2 占比的明显增加, 说明 GC5 极有可能通过 R1 位点羟基还原反应生成了相应的 GC2。这些转化过程仍有待于更深入的研究进行确证。

3.3 毛蚶体内毒素转化过程与其他贝类的差异

本研究发现, 毛蚶体内主要存在三类麻痹性贝毒的转化反应过程, 分别是 R1 位点羟基还原反应、R4 位点磺酸基团的水解反应和 R4 位点羟基苯甲酸基团的水解反应(图 6)。但是, 也有以往报道过的麻痹性贝毒转化过程在此次实验并未发现。首先是麻痹性贝毒空间异构体的差向异构化反应。在产毒藻种中, 通常 β 型毒素占比更高, 而在贝类中麻痹性贝毒会通过差向异构化生成更为稳定的 α 型毒素 (Asakawa *et al*, 2006), 最后达到 $\alpha:\beta=3:1$ 的比例 (Bricelj *et al*, 1998³⁵⁹; 柳阳, 2017⁹²)。本次实验中没有观察到明显的差向异构化反应, 可能与实验时间较短、差向异构化反应速率较慢有关。但研究中也发现, 链状裸甲藻中 α 型的 GC1 的含量很低, 占比远低于其 β 型同分异构体

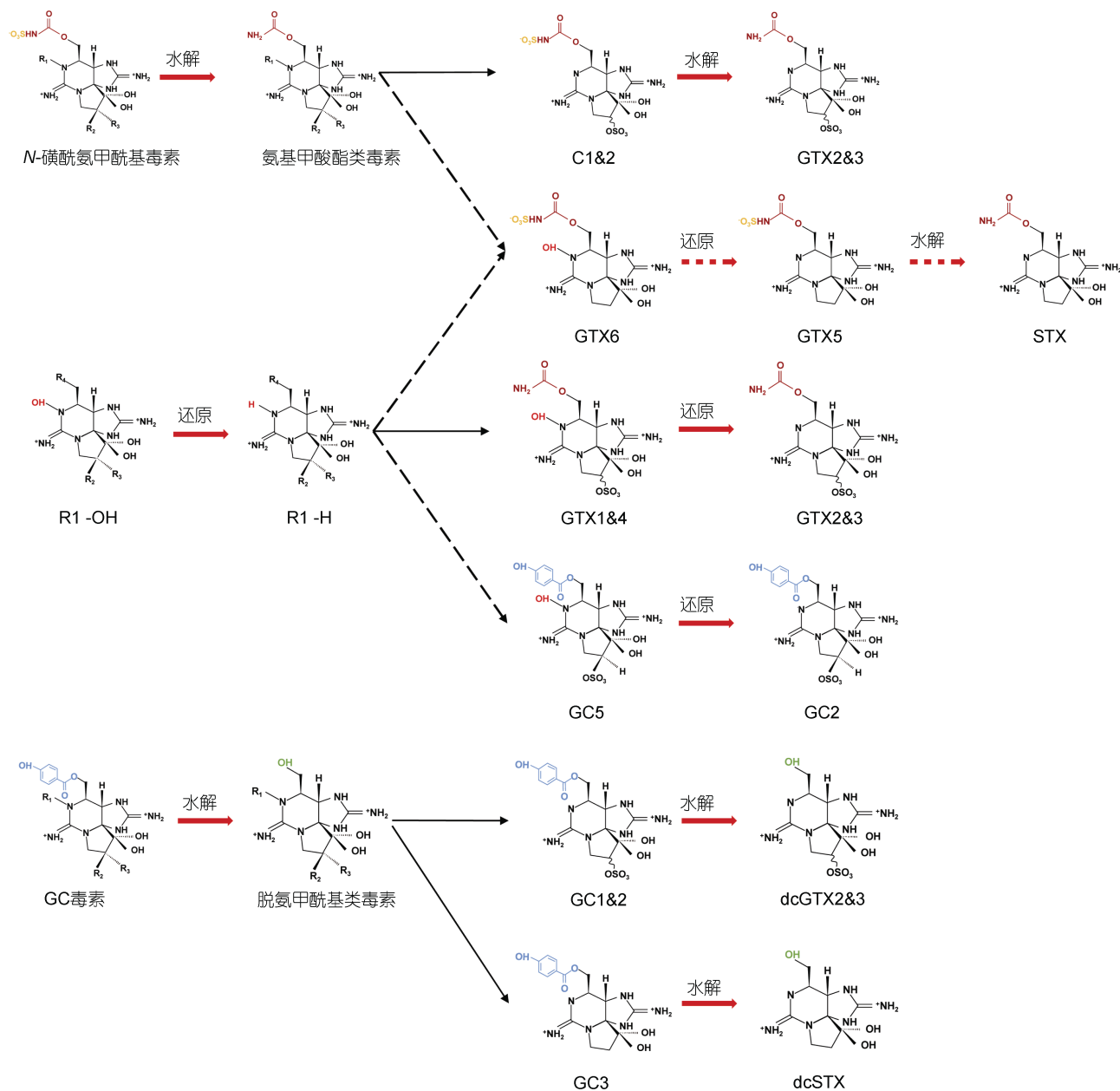


图6 毛蚶体内可能发生的各类毒素转化过程

Fig.6 Biotransformation of paralytic shellfish toxins in *Scapharca subcrenata*

注: 虚线箭头表示该反应为理论上可能发生的过程

GC2; 而在毛蚶体内, 由 GC1 转化而来的 dcGTX2 占比却高于由 GC2 转化而来的 dcGTX3。这说明在 GC1&2 发生羟基苯甲酸基团水解反应的同时, 也出现了差向异构化反应。但目前无法确定毒素的差向异构化反应与水解反应时间的先后, 仍有待于进一步研究。

此外, 本研究也未在毛蚶体内发现 *N*-磺酰氨基甲酰基类毒素或氨基甲酸酯类毒素水解生成脱氨甲酰基类毒素的酶促转化过程(Raposo *et al*, 2020)⁴。

Samsur 等(2006)在锦蛤(*Tapes japonica*)中发现 C1&2 可以被转化生成 dcGTX2&3。在象拔蚌(*Panopea globosa*)中也发现 C1&2 转化为 GTX5 后水解生成 dcSTX 的转化反应(Medina-Elizalde *et al*, 2018)。毛蚶在摄入产 C1&2 的太平洋亚历山大藻后, 体内未检测到脱氨甲酰基类毒素, 说明毛蚶中可能缺乏磺酰氨基甲酰基水解酶, 难以促成 *N*-磺酰氨基甲酰基的水解反应。同样, 在多种贝类中发现的氨基甲酸酯类毒素转化生成相应的脱氨甲酰基类毒素的转化过程, 也是一

种典型的酶促水解反应。在中国飞蛤(*Macra chinensis*)中分离出了能够转化氨基甲酸酯类毒素为脱氨甲酰基类毒素的氨甲酰基水解酶(Lin *et al*, 2004)。在本研究中,毛蚶摄入太平洋亚历山大藻后体内并未检测到脱氨甲酰基类毒素,说明了毛蚶中也可能缺乏氨甲酰基水解酶,无法催化进行此类转化反应。综上,毛蚶中可能缺少催化 *N*-磺酰氨甲酰基或氨甲酰基水解的酶类,但是存在能够催化羟基苯甲酸基团水解反应的酶。

3.4 毒素转化过程对毛蚶毒性的影响

毛蚶体内发生的麻痹性贝毒转化过程可能会显著影响毛蚶的毒性。本研究发现毛蚶体内麻痹性贝毒转化过程主要包括 R1 位点羟基还原反应、R4 位点磺酸基团水解反应和 R4 位点羟基苯甲酸基团水解反应。R1 位点羟基还原反应对毛蚶的毒性可能有重要影响。一般来说, R1 位点为羟基的麻痹性贝毒组分毒性高于对应的 R1 位点为氢的麻痹性贝毒组分(Leal *et al*, 2022)²¹, 因此, 毛蚶体内的 R1 位点羟基还原反应会导致毒性降低。同样, R4 位点的水解反应也会显著改变毛蚶体内毒素组成, 从而影响其毒性。在麻痹性贝毒中, *N*-磺酰氨甲酰基类毒素与钠离子通道的结合能力最差, 毒性也相对最低; 而氨基甲酸酯类毒素则是毒性最高的毒素, 脱氨甲酰基类毒素的毒性位于两者之间。*N*-磺酰氨甲酰基类毒素通过水解反应生成相应的氨基甲酸酯类毒素, 会导致贝类毒性的显著上升。目前, 对于毛蚶中 GC 毒素的水解反应, 仍难以判断其对毛蚶毒性的影响。此外, M 毒素是贝类摄食麻痹性贝毒产毒藻后的重要代谢物, 毒性水平较低, 有助于其快速脱毒(Vale, 2010; Ding *et al*, 2017)。本研究聚焦于各类型麻痹性贝毒的转化过程, 并未分析该类代谢物, 需要在后续研究中予以关注。总体而言, 毛蚶体内的麻痹性贝毒转化过程较为复杂, 对毒性的影响需要结合产毒藻的毒素种类进行具体分析。为防范毛蚶带来的麻痹性贝毒中毒风险, 仍需加强对毛蚶体内麻痹性贝毒的监测, 避免造成中毒事件。

4 结论

本研究通过选择典型产毒藻种开展模拟实验, 揭示了毛蚶体内麻痹性贝毒的三类主要转化过程, 包括 R1 位点羟基的还原反应、R4 位点磺酸基团的水解反应, 以及 R4 位点羟基苯甲酸基团的水解反应, 推测毛蚶体内缺少可催化 *N*-磺酰氨甲酰基类毒素和

氨基甲酸酯类毒素水解过程的酶。这些发现说明毛蚶对麻痹性贝毒的转化反应较为多样化, 且有一定的独特性, 可能导致毛蚶体内毒素组成与产毒藻种或其他贝类存在差异, 需要加强对毛蚶体内麻痹性贝毒的监测和研究。

参 考 文 献

- 于仁成, 罗璇, 2016. 我国近海有毒藻和藻毒素的研究现状与展望[J]. 海洋科学集刊(1): 155-166.
- 田华, 2009. 麻痹性贝毒的累积、转化、排出过程及预警诊断指标研究[D]. 青岛: 中国海洋大学: 18.
- 包振民, 孔令玲, 史姣霞, 等, 2021. 双壳贝类积累转化麻痹性贝毒的研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 51(10): 1-11.
- 朱明远, 邹迎麟, 吴荣军, 等, 2003. 栉孔扇贝体内麻痹性贝毒的累积与排出过程研究[J]. 海洋学报, 25(2): 75-83.
- 郝晓菲, 吴海燕, 王群, 等, 2017. 麻痹性贝类毒素在栉孔扇贝体内的代谢轮廓[J]. 中国水产科学, 24(3): 623-632.
- 张福崇, 宋学章, 石延港, 等, 2020. 毛蚶池塘养殖技术研究[J]. 科学养鱼(12): 61-62.
- 陈火柴, 2018. 2017 年福建海域链状裸甲藻赤潮事件应急处置与思考[J]. 渔业研究, 40(4): 308-314.
- 陈辰, 2015. 毛蚶群体遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学: 22-24.
- 林燕棠, 贾晓平, 杨美兰, 等, 1999. 中国沿岸染毒贝类的麻痹性毒素[J]. 热带海洋, 18(1): 90-96.
- 柳阳, 2017. 我国近海藻毒素污染状况研究与毒素标准物质制备[D]. 青岛: 中国科学院大学: 37-42, 70, 92.
- ANDRES J K, YÑIGUEZ A T, MAISTER J M, *et al*, 2019. Paralytic shellfish toxin uptake, assimilation, depuration, and transformation in the southeast Asian green-lipped mussel (*Perna viridis*) [J]. Toxins (Basel), 11(8): 468.
- ASAKAWA M, BEPPU R, ITO K, *et al*, 2006. Accumulation of paralytic shellfish poison (PSP) and biotransformation of its components in oysters *Crassostrea gigas* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), 47(1): 28-32.
- ASAKAWA M, MIYAZAWA K, TAKAYAMA H, *et al*, 1995. Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the source of paralytic shellfish poison (PSP) contained in bivalves from Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan [J]. Toxicon, 33(5): 691-697.
- BOTELHO M J, MARQUES F, FREITAS R, *et al*, 2020. Paralytic shellfish toxin profiles in mussel, cockle and razor shell under post-bloom natural conditions: evidence of higher biotransformation in razor shells and cockles [J]. Marine Environmental Research, 154: 104839.
- BRICELJ V M, SHUMWAY S E, 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation [J]. Reviews in Fisheries Science, 6(4): 315-383.
- CHOI M C, HSIEH D P H, LAM P K S, *et al*, 2003. Field depuration and biotransformation of paralytic shellfish toxins in scallop *Chlamys nobilis* and green-lipped mussel

- Perna viridis* [J]. Marine Biology, 143(5): 927-934.
- COSTA P R, ROBERTSON A, QUILLIAM M A, 2015. Toxin profile of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from the Portuguese coast, as determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Marine Drugs, 13(4): 2046-2062.
- DEGRASSE S, VANEGAS C, CONRAD S, 2014. Paralytic shellfish toxins in the sea scallop *Placopecten magellanicus* on Georges Bank: implications for an offshore roe-on and whole scallop fishery [J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 103: 301-307.
- DELL' AVERSANO C, WALTER J A, BURTON I W, *et al*, 2008. Isolation and structure elucidation of new and unusual saxitoxin analogues from mussels [J]. Journal of Natural Products, 71(9): 1518-1523.
- DING L, QIU J B, LI A F, *et al*, 2017. Proposed biotransformation pathways for new metabolites of paralytic shellfish toxins based on field and experimental mussel samples [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(27): 5494-5502.
- GUILLARD R R L, HARGRAVES P E, 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte [J]. Phycologia, 32(3): 234-236.
- JAIME E, GERDTS G, LUCKAS B, 2007. In vitro transformation of PSP toxins by different shellfish tissues [J]. Harmful Algae, 6(3): 308-316.
- KAO C Y, NISHIYAMA A, 1965. Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems [J]. The Journal of Physiology, 180(1): 50-66.
- KWONG R W M, WANG W X, LAM P K S, *et al*, 2006. The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates [J]. Aquatic Toxicology, 80(1): 82-91.
- LEAL J F, CRISTIANO M L S, 2022. Marine paralytic shellfish toxins: chemical properties, mode of action, newer analogues, and structure-toxicity relationship [J]. Natural Product Reports, 39(1): 33-57.
- LI A, MA J, CAO J, *et al*, 2012. Analysis of paralytic shellfish toxins and their metabolites in shellfish from the North Yellow Sea of China [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 29(9): 1455-1464.
- LIN H P, CHO Y, YASHIRO H, *et al*, 2004. Purification and characterization of paralytic shellfish toxin transforming enzyme from *Mactra chinensis* [J]. Toxicon, 44(6): 657-668.
- LIN Z R, GENG H X, ZHANG Q C, *et al*, 2022. Toxin production of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from the East China Sea [J]. Harmful Algae, 113: 102188.
- LLEWELLYN L, NEGRI A, QUILLIAM M, 2004. High affinity for the rat brain sodium channel of newly discovered hydroxybenzoate saxitoxin analogues from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* [J]. Toxicon, 43(1): 101-104.
- MEDINA-ELIZALDE J, GARCÍA-MENDOZA E, TURNER A D, *et al*, 2018. Transformation and depuration of paralytic shellfish toxins in the geoduck clam *Panopea globosa* from the Northern Gulf of California [J]. Frontiers in Marine Science, 5: 335.
- NEGRI A, STIRLING D, QUILLIAM M, *et al*, 2003. Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* [J]. Chemical Research in Toxicology, 16(8): 1029-1033.
- RAPOSO M I C, GOMES M T S R, BOTELHO M J, *et al*, 2020. Paralytic shellfish toxins (PST)-transforming enzymes: a review [J]. Toxins (Basel), 12(5): 344.
- RITCHIE J M, ROGART R B, 1977. The binding of saxitoxin and tetrodotoxin to excitable tissue [J]. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 79: 1-50.
- SAMSUR M, YAMAGUCHI Y, SAGARA T, *et al*, 2006. Accumulation and depuration profiles of PSP toxins in the short-necked clam *Tapes japonica* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* [J]. Toxicon, 48(3): 323-330.
- SHIMIZU Y, YOSHIOKA M, 1981. Transformation of paralytic shellfish toxins as demonstrated in scallop homogenates [J]. Science, 212(4494): 547-549.
- SUZUKI T, YAMASAKI M, OTA H, 1998. Comparison of paralytic shellfish toxin profiles between the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Fisheries Science, 64(5): 850-851.
- TOBKE J, GIARRATANO E, ORTIZ A, *et al*, 2021. Chitosan performance during Paralytic Shellfish Toxins (PST) depuration of *Mytilus chilensis* exposed to *Alexandrium catenella* [J]. Toxicon, 195: 48-57.
- VALE P, 2008. Fate of benzoate paralytic shellfish poisoning toxins from *Gymnodinium catenatum* in shellfish and fish detected by pre-column oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 1190(1/2): 191-197.
- VALE P, 2010. Metabolites of saxitoxin analogues in bivalves contaminated by *Gymnodinium catenatum* [J]. Toxicon, 55(1): 162-165.
- WIESE M, D'AGOSTINO P M, MIHALI T K, *et al*, 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs [J]. Marine Drugs, 8(7): 2185-2211.

BIOTRANSFORMATION OF PARALYTIC SHELLFISH TOXINS IN BLOOD CLAM *SCAPHARCA SUBCRENATA*

LIN Zhuo-Ru^{1, 3}, GENG Hui-Xia¹, TANG Wen-Jiao^{1, 5}, YU Ren-Cheng^{1, 2, 3, 4}

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 5. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract The accumulation of paralytic shellfish toxins in marine bivalves pose severe threats to human health. *Scapharca subcrenata* may contain high concentrations of paralytic shellfish toxins, yet toxin biotransformation in *S. subcrenata* and its effect on the toxicity of the bivalve remain largely unknown. Therefore, biotransformation of paralytic shellfish toxins in *S. subcrenata* were investigated by feeding *S. subcrenata* with two toxin-producing dinoflagellates, *Alexandrium pacificum* and *Gymnodinium catenatum*. Reduction of hydroxyl at R1, hydrolysis of sulfocarbamoyl group at R4 in *N*-sulfocarbamoyl toxins, and hydrolysis of hydroxybenzoate group at R4 in *Gymnodinium catenatum* toxins are the main biotransformation processes in *S. subcrenata*. The complex biotransformation of paralytic shellfish toxins in *S. subcrenata* contributes to the uncertainty of toxicity. To reduce risks associated with paralytic shellfish poisoning, further investigations on accumulation, transformation, and elimination of paralytic shellfish toxins in *S. subcrenata* should be carried out, and more efforts are needed to monitor toxins in *S. subcrenata*.

Key words paralytic shellfish toxins; *Scapharca subcrenata*; *Alexandrium pacificum*; *Gymnodinium catenatum*; *Gymnodinium catenatum* toxins; toxin biotransformation