

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17025

氮杂螺环酸毒素在栉孔扇贝体内的代谢规律

吴海燕¹, 李清云^{1,2}, 邴晓菲¹, 郭萌萌¹, 顾海峰³, 翟毓秀¹, 谭志军¹

1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 青岛科技大学 化学与分子工程学院, 山东 青岛 266011;

3. 国家海洋局 第三研究所, 福建 厦门 361000

摘要: 氮杂螺环酸毒素(azaspiracids, AZAs)隶属八大类海洋贝类毒素, 为一类含氮且具独特螺环结构的聚醚类毒素。采用液相色谱-三重四级杆复合离子阱质谱, 研究了分离自中国近海的 1 株氮杂螺环酸产毒藻腹孔环胺藻(*Azadinium poporum*, AZDY06)所产氮杂螺环酸毒素在栉孔扇贝体内的蓄积、分布和生物转化机制。通过将栉孔扇贝暴露产毒藻的方式, 分析扇贝内脏团、裙边、闭壳肌和其他可食组织 4 个组织部位的 AZAs 及其代谢产物分布, 研究栉孔扇贝对毒素的代谢机理。结果表明, AZDY06 主要产生 AZA2 毒素, 单细胞产毒能力最高为(7.05±0.52) fg/cell; 扇贝 12 h 内摄食 5×10^7 个产毒藻细胞后, 体内 AZAs 毒素含量已超欧盟安全限量, 达 165.3 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$, 蓄积效率为 78.2%。AZAs 毒素在扇贝各组织间分布存在显著差异: 内脏团>其他可食组织>外套膜>闭壳肌。AZA2 在扇贝中潜在转化方式为羟基化、去羧基化和氧化, 共生成 4 种代谢产物: AZA6、AZA12、AZA19 和 AZA23, 其中 AZA19 为最主要代谢产物, 约占总毒素 40%, 其他代谢产物含量较低。本研究证明中国近海分布氮杂螺环酸产毒藻毒性危害较强, 建议有关部门加快制定 AZAs 限量标准。

关键词: 氮杂螺环酸毒素; 栉孔扇贝; 蓄积能力; 生物转化

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1298-09

氮杂螺环酸毒素(azaspiracids, AZAs)隶属八大类海洋贝类毒素, 为一类含氮且具独特螺环结构的聚醚类毒素, 目前已发现有 40 余种同系物^[1]。AZAs 主要由甲藻(*Azadinium*)类产生, 并通过食物链传递蓄积到贝类组织中, 给消费者健康和贝类产业发展带来巨大威胁。因此, 欧盟、美国、加拿大等国家将其鲜贝可食组织中限量标准设定为 160 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$, 主要限制目标为 AZA1-3^[2]。中国研究者于 2010 年首次在东部沿海城市市售贝类中发现了 AZA1 的存在^[3], 随后又在北黄海养殖虾夷扇贝中发现了这类毒素^[4], 且顾海峰等^[5]在中国近海共发现 22 株腹孔环胺藻(*Azadinium poporum*), 其中 19 株可产生 AZAs。比较而言, AZAs 毒性甚至强于常见的麻痹性贝类

毒素(paralytic shellfish toxins, PSTs)^[6]。因此, AZAs 及其产毒藻在中国的广泛分布, 势必对中国近海环境、消费者安全和贝类产业带来严重的潜在威胁, 需要加以重点关注。

截止到目前, AZAs 代谢机理研究主要集中在围绕双壳贝类对产毒藻的摄食率、转化率等指标开展的代谢动力学研究^[7], 同时分析了 AZAs 的 I 相代谢产物并对其结构进行鉴定。AZAs 主要代谢反应包括 C₃ 和 C₂₃ 位点的羟基化, C₈ 和 C₂₂ 位点的甲基化以及羧基化^[8-9], 说明 AZAs 在贝类组织中发生了复杂的生物转化而生成其他代谢产物, 甚至烹调也可能造成 AZAs 代谢产物之间的转换^[8]。然而目前的研究仍然无法解释关键性的毒素作用模式以及毒素受体。研究发现, 作为一种脂溶性

收稿日期: 2017-01-17; 修订日期: 2017-03-02.

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2017HY-YJ0201; 2017GH14); 山东省重点研发计划(2016GSF120018)项目.

作者简介: 吴海燕(1985-), 女, 助理研究员, 硕士研究生, 主要从事贝类毒素安全评价研究. E-mail: wuhy@ysfri.ac.cn

通信作者: 谭志军, 研究员. E-mail: tanzj@ysfri.ac.cn

贝类毒素, AZAs 蓄积具有一定的贝类相关性。AZAs 在贻贝中的蓄积能力最强, 扇贝次之, 而在牡蛎、蛤蜊中蓄积含量较低^[10]; 此外, 不同于其他毒素蓄积的组织差异性特点^[11], AZAs 在双壳贝类组织中的分布相对平均, 除了内脏团, 在其他组织中也具有较高浓度的分布^[12]。目前, 欧盟等国际组织针对 AZAs 限量毒素仅包括 AZA1-3, 对其他代谢产物不做安全性评价。但根据国际食品法典委员会(CAC)制定的毒性当量因子(toxic equivalency factor), 其他代谢物如 AZA17 和 AZA19 不仅 TEF 大于 AZA1, 甚至其残留能力也强于 AZA1^[13]。由于 AZAs 在可食组织中的高浓度分布, 与其他毒素比具有更高的食用风险性。鉴于此, EFSA 认为现有标准低估了 AZAs 毒性, 不足以保护消费者安全, 因此计划将 AZAs 限量标准降低至 30 μg AZA1eq/kg, 并建议加强 AZAs 在不同双壳贝类中的代谢途径和产物形成研究, 以科学评估 AZAs 代谢过程对其风险大小的最终影响^[14]。

栉孔扇贝是中国最重要的经济贝类之一, 主要分布在中国北黄海和渤海区域, 对中国贝类产业和消费者具有巨大的影响。而作为一种新型毒素, AZAs 即是首次在中国栉孔扇贝中得到确证^[3-4], 顾海峰等^[5]也在北黄海发现高比例的 AZAs 产毒藻孢囊, 因此 AZAs 风险对扇贝产业具有潜在的不利影响。鉴于此, 本研究以栉孔扇贝为研究对象, 采用直接暴露于 1 株分离自中国近海 AZA2 产毒藻的方式, 以了解和评估 AZA2 在栉孔扇贝体内的蓄积、分布和生物转化。本研究将探究 AZA2 在栉孔扇贝体内的代谢转化机制, 评价其代谢产物对双壳贝类污染的风险性评估, 为后续实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

氮杂螺环酸毒素产毒藻(*Azadinium poporum*, AZDY06 株)由国家海洋局第三海洋研究所提供。实验室以 f/2 培养液单种培养, 温度(20 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照 6000 lx, 光暗比 12 h : 12 h。饵料藻选用三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin), 同样条件下以 f/2 Medium 培养液培养。海水盐度 31.3,

pH 为 8.07。

栉孔扇贝为产自青岛市胶南灵山湾养殖海域的 2 龄贝, 壳长(67 \pm 4) mm, 经测定未受 AZAs 污染, 平均每只扇贝的干重为(1.60 \pm 0.3) g, 根据生物当量的 0.8%投喂产毒藻(以干重计)。实验室暂养 2 d 后用于实验, 暂养期间不投喂饵料藻, 水温控制在(16 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 24 h 不间断充气。

1.2 方法

1.2.1 AZDY06 生长及产毒能力的评估 为使藻细胞快速达到指数生长期, 藻细胞初始接种密度为 2×10^4 cell/mL, 分 4 组平行实验, 进行生长曲线的绘制。采用血球计数板法记录藻细胞密度并绘制生长曲线。

同时量取 50 mL 藻液并将藻细胞抽滤到到孔径为 0.20 μm 滤膜上, 用于测定藻细胞毒素含量, 以评估 AZDY06 生长过程中产毒能力的变化。采用文献方法^[15]进行藻毒素提取, 加入 1 mL 丙酮, 冰浴超声破碎 20 min, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 8000 r/min 离心 15 min, 取上清液超滤离心(8000 r/min, 5 min), 待测定。

1.2.2 栉孔扇贝暴露实验

(1) 暴露实验 根据预实验结果, 暴露实验共持续 25 d, 其中蓄积阶段为 2 d, 代谢阶段为 23 d。随机选取 80 只栉孔扇贝置于 4 个盛有 30 L 海水的塑料容器中进行暴露实验。实验开始后, 分别在第 0.25、0.5、1、3、5、7、9、11、13、15、19、25 天采样。其中, 蓄积阶段不投喂饵料藻, 每天分别于 8:00 和 20:00 定时向养殖水体添加浓缩指数期 AZDY06 藻液, 确保有毒藻投喂量为 5×10^7 cell/(ind·d)。暴露过程中, 随时检查暴露液是否有沉降现象, 并在投喂 AZDY06 后 12 h 采样以确认是否全部藻细胞被摄食。采样时, 随机取 4 只栉孔扇贝, 清洗后现场分离其内脏团、外套膜、闭壳肌和其他可食组织, 均质后, -80 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻保存。

(2) 清滤率和摄食率测定

暴露实验过程中, 同时测定栉孔扇贝对产毒藻的清滤率和摄食率^[16]。具体方法为: 在每次投喂产毒藻后每隔 2 h 取一次水样, 显微镜下观察剩余产毒藻密度以及是否有假粪存在。计算公式如下:

清滤率 $CR(\text{clearance rate})=V(\ln C_0-\ln C_t)/T$

摄食率 $IR(\text{ingestion rate})=V(C_0-C_t)/T$

式中, V 为实验海水体积, C_0 为实验开始时的饵料密度, C_t 为 T 时间时的饵料密度。

1.2.3 贝类样品处理 参考文献[4]进行样品前处理。主要操作步骤如下: 准确称取(2.00±0.02) g 样品于 15 mL 离心管中, 加入 4 mL 甲醇, 涡旋并超声, 6000 r/min 离心 10 min, 取上清液转移至 10 mL 具塞离心管(带刻度)。残渣重复提取 1 次, 合并上清液用甲醇定容到 10 mL。于 45℃ 氮吹至 1 mL, 加入 3 mL 水涡旋混匀, 待净化。

依次用 1 mL 甲醇、1 mL 30% 甲醇水溶液活化 Strata™-X 固相萃取柱, 注入提取液, 再用 1 mL 20% 甲醇水溶液淋洗, 用 1 mL 0.3% 氨水甲醇溶液进行洗脱, 最后用甲醇溶液定容洗脱液至 1 mL, 过 0.2 μm 滤膜于进样小瓶中, 4℃ 保存待上机测试。

1.2.4 AZAs 毒素 LC-MS/MS 分析

(1) 色谱条件

色谱柱: Kinetex XB-C₁₈ 柱(100 mm×2.10 mm, 2.60 μm); 柱温: 40℃; 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 5 μL; 流动相: A 为水(含有 2 mmol/L 甲酸铵和 50 mmol/L 甲酸), B 为 95% 乙腈水溶液(含 2 mmol/L 甲酸铵和 50 mmol/L 甲酸); 流动相梯度洗脱程序为 0~4.00 min: 90% A; 4.00~6.00 min: 20% A; 6.50~9.00 min: 90% A。

(2) 质谱条件

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子模式; 喷雾电压: 5.50 kV; 气帘气压力: 0.24 MPa; 碰撞气压力: 0.02 MPa; 温度: 500℃; 碰撞室入口电压: 10 V; 碰撞室出口电压: 12 V; 离子源 Gas 1: 0.34 MPa; Gas 2: 0.34 MPa。其他参数见表 1。

表 1 19 种氮杂螺环酸毒素(AZAs)的主要参考质谱参数
Tab. 1 Main reference mass spectra parameters of 19 azaspiracid (AZAs) profiles

毒素名称 toxins	定量离子对/ (m·z ⁻¹) quantitative ion	碰撞能/V collision energy	定性离子对/(m·z ⁻¹) qualitative ion	碰撞能/V collision energy	去簇电压/V declustering potential	毒性当量因子 toxic equivalent factor (TEF)
AZA1	842.5/824.5	40	842.5/806.5	55	50	1.0
AZA2	856.5/838.5	40	856.5/820.4	50	50	1.8
AZA3	828.5/810.5	40	828.5/792.5	50	60	1.4
AZA4	844.5/826.5	40	844.5/658.5	50	60	-
AZA5	844.5/826.5	40	844.5/674.5	50	60	-
AZA6	842.5/824.5	40	842.5/658.5	50	60	1.0 ^[17]
AZA7	858.5/840.5	40	858.5/672.5	50	60	-
AZA8	858.5/840.5	40	858.5/688.5	50	60	-
AZA9	858.5/840.5	40	858.5/658.5	50	60	-
AZA10	858.5/840.5	40	858.5/674.5	50	60	-
AZA11	872.5/854.5	40	872.5/672.5	50	60	-
AZA12	872.5/854.0	40	872.5/688.5	50	60	1.0 ^[17]
AZA17	872.5/810.5	40	872.5/658.5	50	60	1.4 ^[17]
AZA19	886.5/824.5	40	886.5/658.5	50	60	1.4 ^[17]
AZA21	888.5/826.5	40	888.5/658.5	50	60	-
AZA23	902.5/840.5	40	902.5/658.5	50	60	-
AZA37	846.0/828.0	40	846.0/348.0	50	60	-
AZA40	842.0/658.0	40	842.0/348.0	50	60	-
AZA41	854.0/846.0	40	854.0/670.0	50	60	-

注: “-”表示该化合物目前没有毒性当量因子。

Note: “-” means the compound is no toxicity equivalent factor.

1.3 数据分析

采用 Excel 和 OriginPro 8 软件处理数据、做图。各代谢产物含量根据自身峰面积与 AZA2 标准曲线峰面积计算。其中, 总毒性大小以各毒素毒性当量因子(toxic equivalency factor, TEF)换算成 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$ 进行比较, 各毒素 TEF 见图 1。具体计算公式如下:

$$X = \sum_{i=1}^n X_i \cdot r_i$$

式中, X 为 AZA 总量, X_i 为各种 AZAs 的含量, r_i 为毒性因子。

2 结果与分析

2.1 AZDY06 生长过程中产毒能力的变化

本研究所用的 AZDY06 是一种体积相对较小 ($<20 \mu\text{m}$) 的海洋甲藻。实验中, AZDY06 的初始接种密度为 $2 \times 10^4 \text{ cell/mL}$, 接种 3 d 后即迅速进入指数生长前期, 并于接种第 10 天达到最高细胞密度 ($2.5 \times 10^5 \pm 7500$) cell/mL , 随后缓慢下降直至培养期结束, 其藻细胞密度仍达 ($4.5 \times 10^4 \pm 1350$) cell/mL 。在藻细胞生长过程中, 单位体积毒素含量在指数生长中期(接种后第 5 天)迅速达到最高值 (0.70 ± 0.035) ng/mL , 随后开始缓慢下降。比较而言, 产毒最高时期为指数生长中期, 后随着产毒藻数量的增加, 单位体积培养液中毒素含量缓慢下降, 单细胞产毒能力下降。

2.2 AZA2 向栉孔扇贝中蓄积及传递的能力评估

暴露过程中, AZDY06 未出现沉降现象, 且在

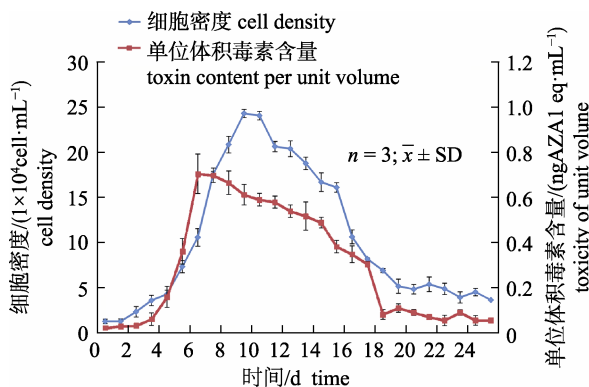


图 1 腹孔环胶藻(AZDY06)生长过程中产毒能力的变化
Fig. 1 Variety of AZAs production of AZDY06 during its growth

第 0.5 天分别采集海水样品和扇贝内脏团进行显微镜计数, 未观察到完整藻细胞, 无假粪产生, 产毒藻已被栉孔扇贝完全摄食。经计算, 栉孔扇贝滤食 AZDY06 的平均清滤率为 $3.3 \text{ L}/(\text{ind} \cdot \text{h})$, 摄食率为 $1.62 \times 10^6 \text{ cell}/(\text{ind} \cdot \text{h})$, 表明栉孔扇贝对 AZDY06 具有较好的摄食能力。每只贝完全摄食产毒藻需约 4.90 h, 即开始采样时(第 0.25 天)栉孔扇贝已完全摄入产毒藻。实验中, 全部组织中 AZAs 含量均在第 3 天达到最高值, 在取样点第 0.5 天时测定毒素对扇贝的传递速率, 此时扇贝体内总 AZAs 含量为 $165.3 \mu\text{g AZA1eq/kg}$, 根据投喂的全部藻细胞数量计 ($5 \times 10^7 \text{ cell}$), 暴露过程中投喂产毒藻中毒素总量为 $211.2 \mu\text{g AZA1eq/kg}$ 。初步估算出栉孔扇贝对 AZA2 的蓄积传递量为产毒藻所含毒素的 78.2%。

从图 2 可以看出, 仅暴露 6 h, 扇贝体内就已出现所有的 AZAs 组分, 说明栉孔扇贝对 AZA2 具有良好的蓄积和转化作用。扇贝各组织中毒素组成除有毒藻所产毒素 AZA2(总量占比约 99%) 外, 另有 4 种代谢产物, 分别为 AZA6、AZA12、AZA19 和 AZA23, 其中 AZA19 和 AZA12 为主要代谢产物。总体来说, 各毒素毒性在暴露阶段的变化趋势相似, 都是在蓄积阶段呈现迅速上升的趋势, 达到最高点随后呈现总体下降趋势。其中, AZA2 和代谢产物 AZA12 是在最后一次蓄积 24 h (第 3 天)达到峰值, 而代谢产物 AZA19 和 AZA6 在扇贝体内毒性最大的时间点是 7 d。蓄积 12 h 扇贝总毒性既已超过国际限量标准, 持续到实验阶段 15 d。扇贝体内实际平均毒素峰值为

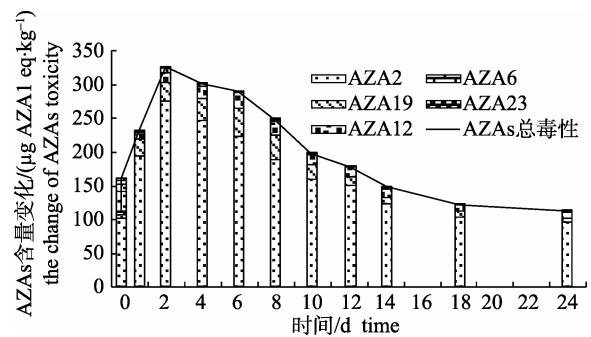


图 2 栉孔扇贝中氮杂螺环酸毒素(AZAs)总毒性和不同 AZA 组分毒性变化
Fig. 2 Total toxicity changes and different toxicity of azaspiracid (AZAs) of *Chlamys farreri*

373.4 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$ (第 3 天), 此时, 各毒素含量百分比为 AZA2 84.1%, AZA19 8.5%, AZA12 4.3%, AZA6 2.44%, AZA23 0.36%。

2.3 AZAs 代谢产物在栉孔扇贝各组织部位累积分布

一般来说, 生物体内化学物质之间的转化是以等物质的量进行的^[18]。因此, 将各代谢物质以等物质的量转化的方式换算为 AZA1, 以此来衡量 AZAs 的总蓄积含量。总体来说, 各组织中 AZAs 总毒性在暴露阶段的变化趋势相似, 都是在蓄积阶段呈现迅速上升趋势, 直至最后一次暴露的 24 h 达到最高点(第 3 天), 随后总体呈现下降趋势。比较而言, 各组织对 AZAs 毒素蓄积能力由大到小顺序为: 其他可食组织 > 内脏团 > 外套膜 > 闭壳肌, 且其他可食组织所含 AZAs 在蓄积阶段一直高于其他组织。全部组织中 AZA 含量均在第 3 天时达到最高值, 扇贝体内实际平均毒素总量为 373.4 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$, 各组织中 AZAs 含量分别为内脏团 472.6 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$, 其他可食组织 464.9 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$, 外套膜 326.6 $\mu\text{g AZA1 eq/kg}$, 闭壳肌 81.3 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$ 。代谢阶段, 各组织中 AZAs 均以不同速率下降, 其中其他可食组织中代谢毒素最快, 内脏团次之, 而且实验期间一直保持在较高水平, 在代谢末期内脏团中 AZAs 总量仍超出安全限量。但其他可食组织和外套膜只在实验 0.25~13 d 和 1~13 d 期间超出安全限量, 闭壳肌中总毒性则一直低于安全限量。按照 Bricelj 等^[19]对毒素排除速率的划分, 实验所用栉孔扇贝归于慢速排毒者, 排毒速率仅为蓄积速率的 1/5。在实验代谢阶段, 各组织中 AZAs 均以不同速率下降。由图 3 可知, 各组织对毒素代谢消除能力大小为内脏团>其他可食组织>外套膜>闭壳肌, 实验期间内脏团中 AZAs 含量为闭壳肌含量的 4.7~8.7 倍。

2.4 AZAs 在栉孔扇贝体内的生物转化

在栉孔扇贝各组织中共检测到 5 种毒素, 包括产毒藻自身所产毒素 AZA2, 以及 4 种代谢产物包括 AZA19、AZA12、AZA6、AZA23。实验过程中, AZA2(占比 77%~84%)和 AZA19(占比 7.9%~12%)和 AZA12(占比 2.9%~8.5%)含量较高

(图 4), 说明栉孔扇贝能够快速蓄积 AZA2 并产生代谢物质 AZA12、AZA19。产毒藻被栉孔扇贝摄食 0.5 d 时, 扇贝体内各组织均检测到 AZA12 和 AZA19, 只在内脏团中检测到少量 AZA6, 在第 7 天内脏团检测到少量 AZA23; 且各组织毒素含量大小为 AZA19>AZA12>AZA6>AZA23, 在暴露实验蓄积和代谢过程中没有检测到其他 AZAs 毒素类似物。4 种代谢物质中 AZA19 含量最高, 仅次于 AZA2, AZA19/AZA2 值(1/9~1/5)呈现先增加后减少的趋势, 在各组织中的大小为外套膜>其他可食组织>内脏团>闭壳肌。内脏团中 AZA2 和代谢物质(AZA12、AZA19)含量最高, 因此内脏团为生物转化最为活跃的部位。

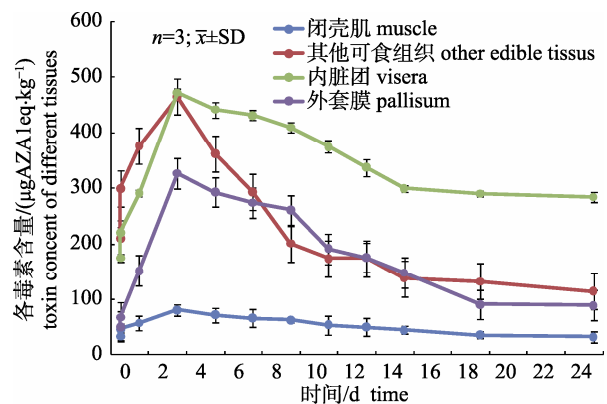


图 3 栉孔扇贝各组织中氮杂螺环酸毒素(AZAs)总毒性变化

Fig. 3 Azaspiracid (AZAs) toxicity changing in difference tissues of *Chlamys farreri*

3 讨论

调查发现, 具刺环胺藻(*A. spinosum*)与腹孔环胺藻是目前全球分布较为广泛的 AZAs 产毒藻。具刺环胺藻主要分布在 AZA 污染最为严重的欧洲地区^[12], 该藻在低温条件下产毒能力更强, 高达 220 fg/cell, 产毒组分主要为 AZA1 和 AZA2。而在中国, AZAs 优势产毒藻主要为腹孔环胺藻, AZAs 产毒情况也较为复杂。本研究所用 AZDY06 株分离自中国南海海域, 主要产生 AZA2 组分, 单细胞产毒能力一般为(7.05±0.52) fg/cell, 但最优条件下可达 40 fg/cell^[20]。比较而言, 中国分布的腹孔环胺藻较具刺环胺藻产毒能力弱, 这也可能是目前

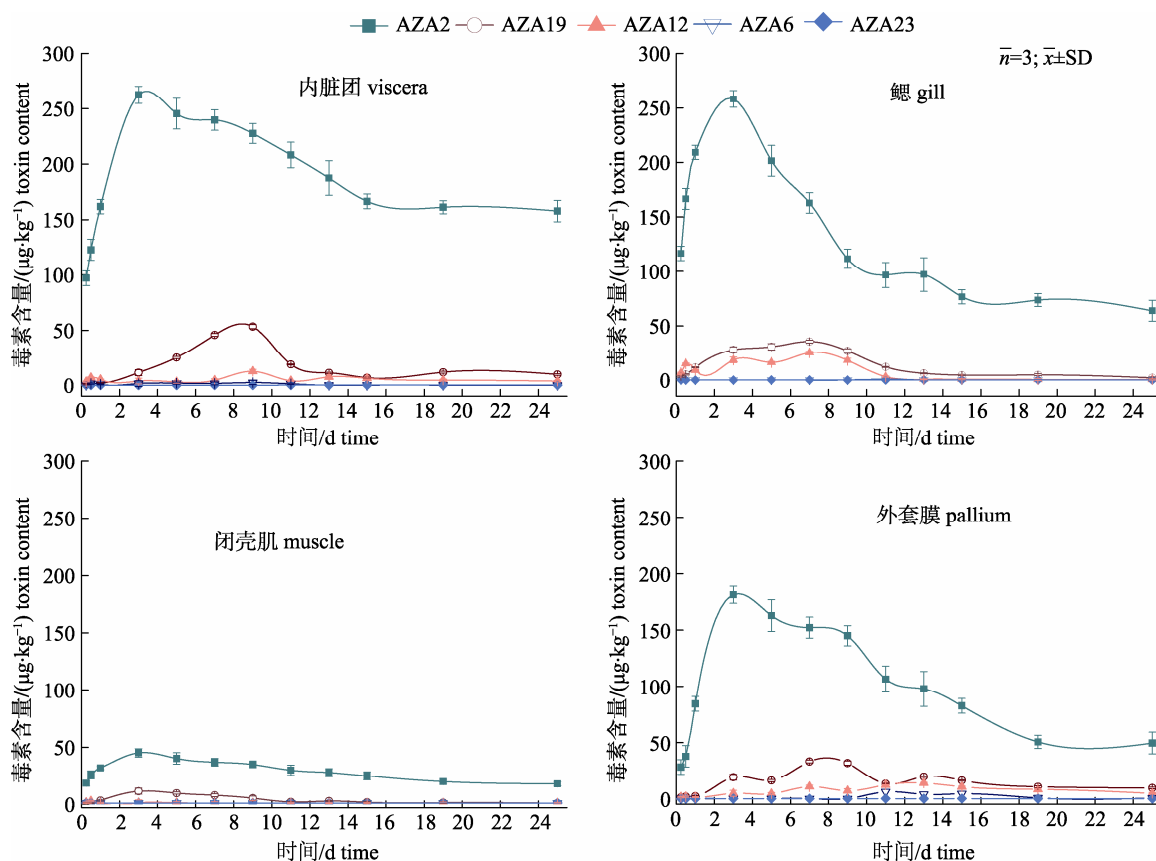


图 4 栉孔扇贝各组织中氮杂螺环酸毒素(AZAs)含量变化

Fig. 4 Accumulation and depuration of azaspiracid (AZAs) in difference tissues of *Chlamys farreri*

未发现大范围污染的原因之一。但由于腹孔环胺藻具有极高的生长能力,单位体积密度可达数十万;加之 AZAs 毒性较高,以及其自身脂溶性特点所导致的蓄积能力极强而消除能力较弱,因此该类毒素在贝类中的蓄积具有严峻的健康风险。

双壳贝类对产毒藻中毒素蓄积能力受多方面因素影响,其中清滤率和滤过率为主要影响因素,直接决定有毒细胞的摄入量。有研究表明^[7],扇贝暴露于 AZAs 产毒藻后,其清除率和滤过率均显著降低,甚至在第 7 天降为负值。而本实验中,扇贝对 AZDY06 表现出较好的摄食能力,可能原因是暴露时间较短还不足以影响栉孔扇贝对其的摄取。栉孔扇贝对产毒藻中的毒素蓄积效率以毒素生物量守恒计,暴露 0.5 d 后扇贝体内蓄积的 AZAs 总量为 165.3 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$,约为藻毒素摄入的 78.2%。这种差异可能是由于暴露过程中部分毒素溶解在水中,以及毒素在扇贝体内的代谢消除等多重因素造成的^[21]。此外,双壳贝类中毒

素含量与摄食的有毒藻毒性大小、密度和摄食时间有一定的相关性。本次暴露实验所用扇贝处于繁殖后期,致使扇贝的摄食率普遍偏低,Jauffrais 等^[22]也发现双壳贝类在非繁殖季节的冬季对 AZAs 毒素的蓄积能力更高。

Jauffrais 等^[23]发现, AZAs 在双壳贝类中的蓄积代谢并未表现出显著的组织相关性,各组织中 AZAs 含量相差不大。然而本研究中栉孔扇贝不同组织对 AZA2 的蓄积代谢能力却不相同,毒素含量最高时内脏团所含毒素占总毒素的 45.6%,外套膜为 24.1%,其他可食组织为 24.2%,而闭壳肌仅为 6.94%。这一规律与其他毒素相似,首先内脏团是 AZAs 蓄积代谢的主要靶器官,且其 AZAs 含量大约是闭壳肌含量的 6 倍^[24]。实验末期,扇贝个体 AZAs 总含量高达 113 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$,但剔除内脏团后毒素总量下降到 39.2 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$,显然,剔除内脏团后栉孔扇贝的食用安全性更高。因此,为保障消费者安全,建议食用栉孔扇贝

时尽量剔除内脏团。本研究中,消除阶段仅维持 11 d,扇贝总毒性已低于国际限量标准,但内脏团中毒素含量仍然超标,如果以实验中内脏团最低代谢速率(15~25 d)为依据计算,毒素代谢阶段至少需要维持 22 d,内脏团中毒素含量才能低于安全食用限量(160 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$)。据此可知,该水平 AZAs 污染的栉孔扇贝在 33 d 左右能够通过自身的代谢消除作用将全部组织毒素降低到安全限量标准。

AZA2 在扇贝体内共出现 4 种代谢产物: AZA19、AZA12、AZA6、AZA23,潜在代谢通路可能有 4 条,分别为 I AZA2 \rightarrow AZA19, II AZA2 \rightarrow AZA12, III AZA19 \rightarrow AZA6, IV AZA19 \rightarrow AZA23,其代谢速度大小为 I>II>III>IV,转化方式则为羟基化、羧基化和氧化。此外, AZA12 是 C23(AZA2)的羟基化产物, AZA19 是 C22(AZA2)的氧化产物, AZA6 是 C22(AZA2)的去羧基化产物, AZA23 是 C3(AZA2)的羟基化产物。在蓄积代谢实验过程中各毒素整体含量大小为 AZA19>AZA12>AZA6>AZA23,以暴露实验 3 d 的内脏团为例,各毒素含量百分比为 AZA2 61%, AZA19 28.1%,其余毒素(AZA12、AZA6 和 AZA23)占 11.9%。AZA2 在扇贝体内蓄积含量最高,代谢产物 AZA19 和 AZA12 次之,在实验过程各个组织部位均有分布,表明当 AZA2 进入扇贝体内,在蓄积毒素 AZA2 的同时发生 2 条代谢通路,分别转化为 AZA19 和 AZA12,且代谢转化路径 AZA2 \rightarrow AZA19, AZA2 \rightarrow AZA12 在各个组织均有发生。同时 AZA19 的含量高于 AZA12,说明 AZA2 在扇贝体内发生代谢作用时 C22(AZA2)的氧化作用>C23 (AZA2)的羟基化作用。这 5 类 AZAs 组分的毒性当量因子大小依次为 AZA2>AZA19>AZA12 (AZA6)>AZA23,说明毒素在扇贝体内由高毒物质向低毒代谢产物转化。AZA6 含量少,而 AZA23 只在内脏团检出,表明有少量的 AZA19 被转化为 AZA6 和 AZA23,转化过程主要发生在内脏团。而且, Jauffrais 等^[23]发现,由 AZA2 污染的贝类在受热情况下, AZA6 毒素的检出比例会增加,说明转化反应受温度影响较大。该结论对于 AZAs 的消费风险评价具有积极的指导意义。

4 结论

栉孔扇贝对分离自中国南海的氮杂螺环酸产毒藻 AZDY06 株具有较强蓄积能力,对其所产 AZA2 具有显著的蓄积和代谢作用。栉孔扇贝各组织对 AZAs 总体表现出相似的蓄积代谢规律,蓄积迅速但代谢缓慢,各组织间蓄积代谢能力大小依次为内脏团>其他可食组织>外套膜>闭壳肌,内脏团是 AZAs 毒素在栉孔扇贝体内蓄积代谢的靶器官,其蓄积的 AZAs 为闭壳肌的 4.7~8.7 倍;栉孔扇贝对 AZA2 潜在转化方式主要有羟基化、羧基化和氧化等作用,转化途径为: I AZA2 \rightarrow AZA19, II AZA2 \rightarrow AZA12, III AZA19 \rightarrow AZA6, IV AZA19 \rightarrow AZA23,代谢产物含量大小依次为 AZA19>AZA12>AZA6>AZA23,其中以 AZA19 为主要代谢产物。因此,这种持续时间长且含量高的毒素代谢物质需要被重点监测。实验数据可用于评估 AZAs 危害的形成机制,为系统研究中国 AZAs 风险性提供数据支持。

参考文献:

- [1] Jauffrais T, Marcaillou C, Herrenknecht C, et al. Azaspiracid accumulation, detoxification and biotransformation in blue mussels (*Mytilus edulis*) experimentally fed *Azadinium spinosum*[J]. *Toxicon*, 2012, 60(4): 582–595.
- [2] EU. laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004[J]. *Official Journal of the European Union*, 2005, 338: 27–59.
- [3] Yao J H, Tan Z J, Zhou D Q, et al. Determination of azaspiracid-I in shellfishes by liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2010, 28(4): 363–367. [姚建华, 谭志军, 周德庆, 等. 液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中的原多甲藻酸贝类毒素[J]. *色谱*, 2010, 28(4): 363–367.]
- [4] Wu H Y, Guo M M, Tan Z J, et al. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for multiclass screening and identification of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1358: 172–180.

- [5] Gu H, Luo Z, Krock B, et al. Morphology, phylogeny and azaspiracid profile of *Azadinium poporum* (Dinophyceae) from the China Sea[J]. Harmful Algae, 2013, 21–22: 64–75.
- [6] Jan A, Diane B, Andrew C, et al. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-azaspiracids[J]. EFSA J, 2008, 723: 1–52.
- [7] Jauffrais T, Contreras A, Herrenknecht C, et al. Effect of *Azadinium spinosum* on the feeding behaviour and azaspiracid accumulation of *Mytilus edulis*[J]. Aquatic Toxicol, 2012, 124–125: 179–187.
- [8] Rehmann N, Hess P, Quilliam M A. Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Sp, 2008, 22(4): 549–558.
- [9] Mccarron P, Kilcoyne J, Miles C O, et al. Formation of azaspiracids-3, -4, -6, and -9 via decarboxylation of carboxyazaspiracid metabolites from shellfish[J]. J Agr Food Chem, 2009, 57(1): 160–169.
- [10] Hess P, Mccarron P, Quilliam M A. Fit-for-purpose shellfish reference materials for internal and external quality control in the analysis of phycotoxins[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 387(7): 2463–2474.
- [11] Rehmann N, Hess P, Quilliam M A. Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Sp, 2008, 22(4): 549–558.
- [12] Ofuji K, Satake M, McMahon T, et al. Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe[J]. Biosci Biotech Bioch, 2001, 65(3): 740–742.
- [13] Salas R, Tillmann U, John U, et al. The role of *Azadinium spinosum* (Dinophyceae) in the production of azaspiracid shellfish poisoning in mussels[J]. Harmful Algae, 2011, 10(6): 774–783.
- [14] Jauffrais T, Séchet V, Herrenknecht C, et al. Effect of environmental and nutritional factors on growth and azaspiracid production of the dinoflagellate *Azadinium spinosum*[J]. Harmful Algae, 2013, 27(7): 138–148.
- [15] Krock B, Tillmann U, Witt M, et al. Azaspiracid variability of *Azadinium poporum* (Dinophyceae) from the China Sea[J]. Harmful Algae, 2014, 36(6): 22–28.
- [16] Zhao J M, Fang J G, Bao Z M, et al. Filter-feeding of three bivalves on *Alexandrium tamarense*[J]. Marine Fisheries Research, 2004, 25(4): 17–22. [赵俊梅, 方建光, 包振民, 等. 3 种滤食性贝类对塔玛亚历山大藻的摄食研究[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(4): 17–22.]
- [17] Jauffrais T, Marcaillou C, Herrenknecht C, et al. Azaspiracid accumulation, detoxification and biotransformation in blue mussels (*Mytilus edulis*) experimentally fed *Azadinium spinosum*[J]. Toxicon, 2012, 60(4): 582–595.
- [18] Ferron P J, Dumazeau K, Beaulieu J F, et al. Combined effects of lipophilic phycotoxins (okadaic acid, azaspiracid-1 and yessotoxin) on human intestinal cells models[J]. Toxins, 2016, 8(2): 50.
- [19] Bricelj V M, Shumway S E. A overview of the occurrence and transfer kinetics of paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs[J]. Harmful Algae, 1998, 6(4): 431–436.
- [20] Li A, Jiang B, Chen H, et al. Growth and toxin production of *Azadinium poporum* strains in batch cultures under different nutrient conditions[J]. Ecotox Environ Safe, 2016, 127: 117–126.
- [21] Jauffrais T, Kilcoyne J, Herrenknecht C, et al. Dissolved azaspiracids are absorbed and metabolized by blue mussels (*Mytilus edulis*)[J]. Toxicon, 2013, 65: 81–89.
- [22] Jauffrais T, Séchet V, Truquet P, et al. Effect of dilution rate on *Azadinium spinosum* and azaspiracid (AZA) production in pilot scale photobioreactors for the harvest of AZA1 and -2[M]// Sauvé G. Molluscan Shellfish Safety. Netherlands: Springer, 2014, 197–204.
- [23] Jauffrais T, Herrenknecht C, Séchet V, et al. Quantitative analysis of azaspiracids in *Azadinium spinosum* cultures[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 403(3): 833–846.
- [24] Blanco J, Mariño C, Martín H, et al. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. Toxicon, 2007, 50(8): 1011–1018.

Metabolic regulation of azaspiracids in *Chlamys farreri*

WU Haiyan¹, LI Qingyun^{1,2}, BING Xiaofei¹, GUO Mengmeng¹, GU Haifeng³, ZHAI Yuxiu¹, TAN Zhijun¹

1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;
2. College of Chemistry and Molecular Engineering, The Science and Technology University of Qingdao, Qingdao 206011, China;
3. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361000, China

Abstract: Azaspiracids (AZAs) are a group of lipophilic polyether compounds first discovered in Ireland and have been implicated in shellfish poisoning incidents. Known toxin-producing genera have rapidly increased and now comprise six species, including *Azadinium spinosum*, *A. obesum*, *A. poporum*, *A. polongum*, *A. caudatum*, and *A. dexteroporum*. Approximately 40 different analogs have been reported to differ in structure and toxicity, of which AZA1, AZA2, and AZA3 are the most important ones based on occurrence and toxicity. AZAs are a variety of nitrogen-containing polyether toxins, which include a unique spiral ring assembly, a heterocyclic amine, and an aliphatic carboxylic acid moiety. The consumption of polluted shellfish can cause human intoxication, with symptoms including nausea, vomiting, diarrhea and stomach cramps, which is similar to diarrhetic shellfish poisoning (DSP). Nowadays, in order to guarantee food security, the developed countries have begun to prioritize shellfish monitoring. A regulatory level of 160 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$ in the shellfish tissues is implemented in many countries all over the world, but our country does not have a regulation about this. *Azadinium poporum* is a small dinoflagellate member of the family *Amphidomataceae*, which is known for the production of AZAs. Twenty two out of 25 *A. poporum* strains isolated in China have proven to be AZA-producing strains, and show a large variability in the AZA profile among different strains. This status underlines the high-risk potential of *A. poporum* blooms and subsequent shellfish intoxication for the Asian Pacific Ocean. AZA accumulation by bivalve mollusks occurs frequently, while blue mussels were found to accumulate by far the highest concentration. Meanwhile, AZAs have been found in various species of bivalve mollusks such as oysters, mussels, scallops, and clams along Chinese coastline. As AZA is a recently discovered toxin, the bloom dynamics, transfer kinetics, and pathways of AZAs into bivalve mollusks are just beginning to be explored. Accumulation and distribution of AZA toxins in bivalve shellfish could be correlated in time and space to blooms of *Azadinium* species. Subsequent accumulation and trophic transfer can intoxicate higher trophic-level consumers and eventually pass into human beings. To investigate the hazard formation process, two transfer routes must be taken into consideration: AZAs could be accumulated by bivalve shellfish or plankton vectors from toxin producing algae. In conclusion, a direct link between AZA accumulation by bivalve shellfish and *A. poporum* must be investigated for food safety control and monitoring plans. Liquid chromatography coupled with quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry was established for the evaluation of AZA accumulation, distribution, and biotransformation in scallops. Toxin-producing alga *A. poporum* (AZDY06), isolated from China, was cultured and exposed to *Chlamys farreri*. The results showed that AZA2 is the dominant toxin of AZDY06, with toxin production capacity up to (7.05 ± 0.52) fg/cell. After 12 h exposure experiments with 5×10^7 cells AZDY06 ingested by every *C. farreri*, AZAs in mussels reached the highest concentration and exceeded EU regulatory limits. The concentration was 165.3 $\mu\text{g AZA1eq/kg}$, while total accumulation efficiency reached 78.2%. The distribution of AZA toxins showed significant differences between organs, with gill > viscera > pallium > muscle. Four AZA analogs including AZA19, AZA12, AZA6, and AZA23 were found in all organs. AZA19 was the main metabolite with a proportion of 40%, while other metabolites were found more rarely. This study proved that the hazard of *A. poporum* (AZDY06) isolated from China is strong and underlined that AZA19 was present at significant levels after only 6 h and until the end of the study. Therefore, this analog needs to be considered as the major metabolite that can affect human health. It is highly recommended to quickly formulate AZA limits, based on this analysis of raw bivalves by LC-MS/MS.

Key words: azaspiracids; *Chlamys farreri*; accumulation; biotransformation

Corresponding author: TAN Zhijun, Professor. E-mail: tanzj@ysfri.ac.cn