

LC-MS/MS를 이용한 마비성패류독소 분석조건 검토

송기철* · 이가정¹ · 유홍식¹ · 목종수² · 김지회¹ · 임근식¹ · 이미애¹

국립수산과학원 서해수산연구소 해역산업과, ¹국립수산과학원 식품안전과, ²국립수산과학원 남동해수산연구소

Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) Analysis using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Ki Cheol Song*, Ka Jeong Lee¹, Hong Sik Yu¹, Jong Soo Mok², Ji Hoe Kim¹,
Keun Sik Lim¹ and Mi Ae Lee¹

West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Incheon 400-420, Korea

¹Food Safety Research Division, National Fisheries Research & Development Institute, Busan 619-705, Korea

²Southeast Sea Fisheries Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Tongyeong 650-943, Korea

The AOAC Mouse Bioassay method (MBA) has been widely used for routine monitoring of paralytic shellfish poisoning (PSP) for more than 50 years. However, this method has low sensitivity and experiences interference from other components in the extract. Also, ethical issues have been raised against the continued use of this live-mouse assay. To establish an alternative method for PSP analysis, we attempted to develop PSP analysis conditions using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The LC-MS/MS analysis of reference material showed very reasonable accuracy, and the analysis time was just 15 min. However, the recovery rate of toxin spike samples using the LC-MS/MS analysis was 59.4-91.0%. We also attempted to remove the matrix effect using shellfish extracts, but recoveries of C1 and C2 did not improve. A comparison between the results of MBA and LC-MS/MS analysis revealed good correlations, with values of 0.8878 and 0.9211 for oyster and mussel matrices, respectively.

Key words: Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), LC-MS/MS, MBA (Mouse Bioassay)

서 론

마비성패류독소는 *Alexandrium* sp., *Gymnodinium* sp., *Pyrodinium* sp. 등 편모조류에 속하는 식물성 플랑크톤이 생산하는 독소로(Hall et al., 1990), 독소가 축적된 패류를 사람이 섭취하고 중독되면 마비를 유발하게 된다(Mortensen et al., 1985; Bricelj and Shumway, 1998). 중독 원인은 플랑크톤이 생산하지만 패류독소라는 명칭이 붙여진 것은 독소를 생성하는 원인생물이 밝혀지기 전에 이때패류에서 주로 검출되었기 때문이다. 마비성패류독소는 특정한 한 성분으로 되어 있는 것이 아니라 약 20종의 유독성분의 복합체로 구성되어 있다(Luckas et al., 2003). Saxitoxin (STX)은 마비성패류독소의 구성성분 중 가장 잘 알려진 독소로(Fig. 1) 다른 화합물들의 독성은 saxitoxin 기준으로 개별 독소성분의 상대독성을 고려하여 saxitoxin 당량으로 변환 후 얻어진다(Oshima, 1995) (Table 1).

마비성패류독소의 분석은 AOAC 959.08 official method (OM)에 근거한 마우스 시험법(Mouse Bioassay)을 표준법(AOAC, 2005)으로 하여 전 세계적으로 이루어지고 있는데 이 방법은 패류 균질액에서 묽은 염산을 이용하여 독소를 추출하고 추출액을 마우스의 복강에 주사하여 사망에 이르는 시간을 측정하여 그 농도를 추정하는 것이다. 이 방법의 검출한계는 40 µg STX equivalent/100 g으로 알려져 있다(Hall, 1991). 마우스 시험법의 높은 검출한계에도 불구하고 시료 중 총 독소량 분석에는 신뢰성 있는 방법으로 지난 50여년간 지속적으로 이용되어 오고 있다. 그러나 최근 전 세계적으로 시험동물의 사용을 억제하거나 금지하고자 하는 여론이 확산되고 있으며 독성 프로파일에 대한 정보를 얻을 수 없는 단점이 부각되고 있다. 그래서 동물시험법의 사용범위 축소나 배제를 위한 대체법 개발이 필요한 실정이다. 지금까지 동물시험법을 대체하기 위하여 기기를 이용한 여러 다양한 시도가 이루어졌으나 액체크로마토그

Article history;

Received 16 October 2012; Revised 8 March 2013; Accepted 18 March 2013

*Corresponding author: Tel: +82. 32. 745. 0750 Fax: +82. 32. 745. 0619

E-mail address: kcsong76@korea.kr

Kor J Fish Aquat Sci 46(2) 154-159, April 2013

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2013.0154>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science. All rights reserved

Table 1. PSP (Paralytic shellfish poisoning) toxins and their relative toxicities (see Fig. 1 for structures)

Toxin	ReTx	Toxin	ReTx	Toxin	ReTx	R1	R2	R3
STX	1.0000	GTX5	0.0644	dcSTX	0.5131	-H	-H	-OSO ₃ ⁻
GTX2	0.3592	C1	0.0060	dcGTX2	0.1538	-H	-H	-H
GTX3	0.6379	C2	0.0963	dcGTX3	0.3766	-H	-OSO ₃ ⁻	-H
NEO	0.9243	GTX6	0.0644	dcNEO	-	-OH	-H	-OSO ₃ ⁻
GTX1	0.9940	C3	0.0133	dcGTX1	-	-OH	-H	-H
GTX4	0.7261	C4	0.0576	dcGTX4	-	-OH	-OSO ₃ ⁻	-OH

ReTx, Relative toxicity; STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protogonyautoxin.

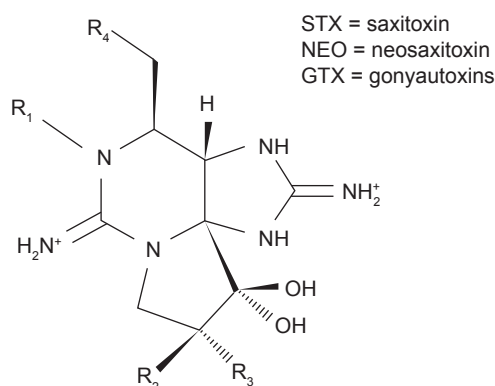


Fig. 1. Structure of PSP toxins.

래피를 응용하여 pre-column oxidation (Lawrence et al., 1991; 2005) 또는 post-column oxidation (Franco and Fernández-Vila, 1993; Oshima, 1995; Asp et al., 2004; Thomas et al., 2006) 과 형광검출을 조합한 방법이 알려져 있다. 그러나 이 방법들은 독소 함량이 높은 시료의 분석에 긴 시간이 소요되며(Ben-Gigirey et al., 2007), 한번에 모든 독소를 분석할 수 없다는 단점이 있다. 짧은 분석시간은 규제를 목적으로 한 시험환경에서는 매우 중요한 요소이다.

한편, 마비성패류독소는 강한 염기성을 가지는 물질로 강력한 $[M+H]^+$ 이온을 발생시켜 liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)에서 효과적으로 검출될 수 있다(Quilliam et al., 1989). 또한 LC-MS/MS를 이용한 분석법은 분석시간이 상대적으로 짧고 대부분의 마비성패류독소 구성 성분을 동시에 분석할 수 있는 장점이 있다.

따라서 본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용한 시험방법을 검토하고 우리나라 시료특성에 부합되는 분석조건을 수립한 후 동 시험법에 대한 유효성 확인 및 마우스시험법과의 비교를 실시하여 모니터링과 규제를 목적으로 한 분석환경에 사용될 수 있는지 그 타당성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

LC-MS/MS를 이용한 마비성패류독소의 분석을 위한 패류시

료는 경남 진해만의 굴(*Crassostrea gigas*)과 진주담치(*Mytilus galloprovincialis*) 어장에서 직접 채취하여 사용하였다. 채취한 패류시료는 외부를 세척하고 패각근을 잘라 패각을 열고 내부를 수돗물로 헹구어 모래와 기타 이물질을 제거한 다음 체에 담아 물을 빼고 패육을 균질화하였다.

마비성패류독소 표준물질은 C1, C2, dcGTX2, dcGTX3, dcSTX, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, GTX5, NEO 및 STX (National Research Council Institute for Marine Biosciences, Halifax, NS)를 사용하였고, 추출에 사용한 hydrochloric acid (analytical grade)는 Merck (Darmstadt, Germany)에서, trichloroacetic acid (analytical grade)와 sodium hydroxide (analytical grade)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 이동상 제조에는 ammonium formate (Fluka, Buchs, Germany) 및 formic acid (Fluka, Buchs, Germany), acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였으며, 탈이온수는 Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA)에서 정제하여 사용하였다.

추출

마우스시험으로 독이 없는 것이 확인된 굴(*C. gigas*)과 진주담치(*M. galloprovincialis*)를 blank로 사용하고, 거기에 일정량의 표준물질을 첨가한 시료를 시험법 검증에 사용하였다.

균질화 한 시료 5 g을 칭량하여 50 mL 폴리프로필렌 시험관에 담고, 5 mL 0.1 N HCl을 가한 후 혼합하여 pH 2.0-4.0이 되도록 조정된 후 5분간 중탕하였다. 중탕한 시료를 실온까지 냉각하고 pH 2.0-4.0 범위에 있는지 확인하였으며, 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 여액은 따로 모으고, 500 μ L를 취하여 30% trichloroacetic acid 25 μ L를 가하고 혼합하여 8,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 모아 1.0 M sodium hydroxide를 30 μ L 가하여 trichloroacetic acid를 중화한 다음 다시 8,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상등액은 0.2 μ m syringe filter (MFS-25; Advantec, Dublin, CA, USA)로 여과하여 기기분석에 사용하였다.

또한, 마우스시험법과의 비교를 위하여 마비성패류독소가 검출되었던 굴과 진주담치 각각 50개의 시료를 선별하여 위와 동일한 전처리 과정을 거쳐 LC-MS/MS 분석에 사용하였다.

Table 2. Mass spectrometry (MS/MS) parameters

Toxins	Parent ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	Mode	Collision Energy
STX	300	282	ESI ⁺	20 eV
NEO	316	298	ESI ⁺	20 eV
GTX1	412	332	ESI ⁺	20 eV
GTX2	396	316	ESI ⁺	20 eV
GTX3	396	298	ESI ⁺	20 eV
GTX4	412	314	ESI ⁺	20 eV
GTX5	380	300	ESI ⁺	20 eV
dcSTX	257	196	ESI ⁺	20 eV
dcGTX2	353	273	ESI ⁺	20 eV
dcGTX3	353	335	ESI ⁺	20 eV
C1	396	316	ESI ⁺	20 eV
C2	396	298	ESI ⁺	20 eV

ESI, Electrospray ionization; STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protogonyautoxin.

LC-MS/MS 분석조건

LC-MS/MS를 이용한 마비성패류독소 분석법 확립을 위하여 TSQ Quantum discovery triple-quadrupole mass spectrometer (Thermo electron, Finnigan, San Jose, CA, USA)와 Surveyor MS Pump plus (Thermo electron, Finnigan, San Jose, CA, USA)를 사용하였고, column은 TSK Gel-amide-80 column (5 μ m, 0.2 \times 25 cm; Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

LC분리를 위한 이동상 A와 B는 ammonium formate와 formic acid의 최종농도가 각각 2.0 mM과 3.6 mM이 되도록 탈이온수 및 95% acetonitrile에 95:5 비율로 희석한 용액을 사용하였다. A용액과 B용액의 비율 75 : 25로 조정된 이동상을 flow rate 0.2 mL/min으로 흘리면서 총 분석시간을 15분으로 유지하였다. 질량분석은 electrospray ionization (ESI)법으로 하였다.

마비성패류독소 검출을 위한 MS/MS parameters는 Table 2에 나타내었다. Quadrupole type의 mass에서 SRM (Selected Reaction Monitoring)법 및 positive mode를 사용하였으며, spray voltage는 5.0 kv, capillary temperature는 350 $^{\circ}$ C, sheath gas 17 (Arb) 및 aux gas는 19 (Arb)로 설정하였고, collision energy는 모든 독소가 20 eV로 동일하였다.

분석법 유효성 시험

분석조건을 유효성 시험은 최적의 분석조건에서 각 독소의 농도가 0.1, 0.5, 1.0 μ g/g이 되도록 표준용액을 각각 조제하고 LC-MS/MS로 분석하였다.

분석기기의 검출한계(LOD; limit of detection)는 신호대 잡음비(S/N)가 >3으로 하였으며, 정량한계(LOQ; limit of quantification)는 LOD \times 3일 때의 농도로 구하였다.

시험방법의 정확도(accuracy)와 정밀성(precision)는 3가지 농도로 조제한 표준물질을 이용하여 일내(intra-day) 및 일간

(inter-day) 반복시험을 1일 5회 및 5일간 1회/1일로 실시하였다.

또한, 회수율 측정을 위하여 독이 없는 것으로 확인된 굴 및 진주담치 시료에 12종의 표준물질을 최종 1.0 μ g/g 농도가 되도록 첨가하여 위의 방법과 동일한 방법으로 추출한 뒤 기기분석에 사용하였다.

결과 및 고찰

독소의 분리 및 분석법 유효성 시험결과

LC-MS/MS법을 이용하여 마비성패류독소를 구성하는 성분 중 12종의 표준물질 혼합용액을 분석한 결과 모든 독소가 8분 이내에서 분리되었다(Fig. 2).

대부분의 액체크로마토그래피와 형광검출법을 조합한 분석에서는 이동상에서 전하를 가진 마비성패류독소 성분의 유지를 위하여 heptanesulfonic acid, heptafluorobutyric acid 및 tetrabutylammonium sulfate 등의 이온쌍 시약이 사용된다(Oshima, 1995). 이와 같은 시약들은 MS/MS 시스템의 이온 소스 (ion source)를 오염시키고, 이온화를 억제시키는 등의 방해작용을 한다. 또한 C toxins은 STXs 그룹이나 GTXs 그룹과 다른 전하를 가지기 때문에 다른 조건에서 따로 분리하여야 하는 단점이 있다. 본 연구에서는 MS/MS와 HILIC (Hydrophilic interaction liquid chromatography)를 결합하여 분석에 사용하였으며, HILIC은 극성화합물의 분리에 매우 유용한 방법이다 (Alpert, 1990). 이 방법에서는 친수성인 컬럼과 이동상의 상호작용에 의해 물질이 분리되기 때문에 이온쌍 시약이 포함된 이동상을 사용하지 않아 이온화 효율을 감소시키지 않고, 빠른 시간 안에 선택적으로 마비성패류독소 성분들을 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있다(Dell'Aversano et al., 2005).

시험방법의 검증을 위하여 0.1-1.0 μ g/g 범위의 표준물질을 사용하여 5회 반복 측정 후 구한 검량선의 직선성은 12종의 표준물질 모두 $r^2=0.9993$ 이상이었다. 각 표준물질의 검출한계(detection limit)는 독소마다 차이가 있었는데, S/N (signal to noise)비가 3:1인 표준물질의 peak를 기준으로 측정하였다. STX, GTX1, GTX3, GTX4, GTX5, dcSTX, C1 등의 독소는 0.001 μ g/g이었으며, NEO, GTX2, dcGTX2, dcGTX3, C2 등의 독소는 0.01 μ g/g이었다. 또한, 정량한계는 검출한계의 3배로 계산하였다(Table 3).

또한 본 분석법의 정확성(accuracy)과 정밀성(precision)를 확인하기 위하여 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 반복시험을 실시하였다.

3가지 농도의 각 독소성분 표준물질에 대하여 1일 5회 및 5일간 1회/1일로 반복시험을 실시한 결과, 분석법의 일내 정확성 및 정밀성은 각각 88.6%-106.1%의 정확성과 1.0-5.4%의 정밀성을 나타내었다. 또한, 일간 정확성 및 정밀성은 5일간 반복하여 구하였으며, 각각 88.5%-105.9%의 정확성과 1.0%-4.4%의

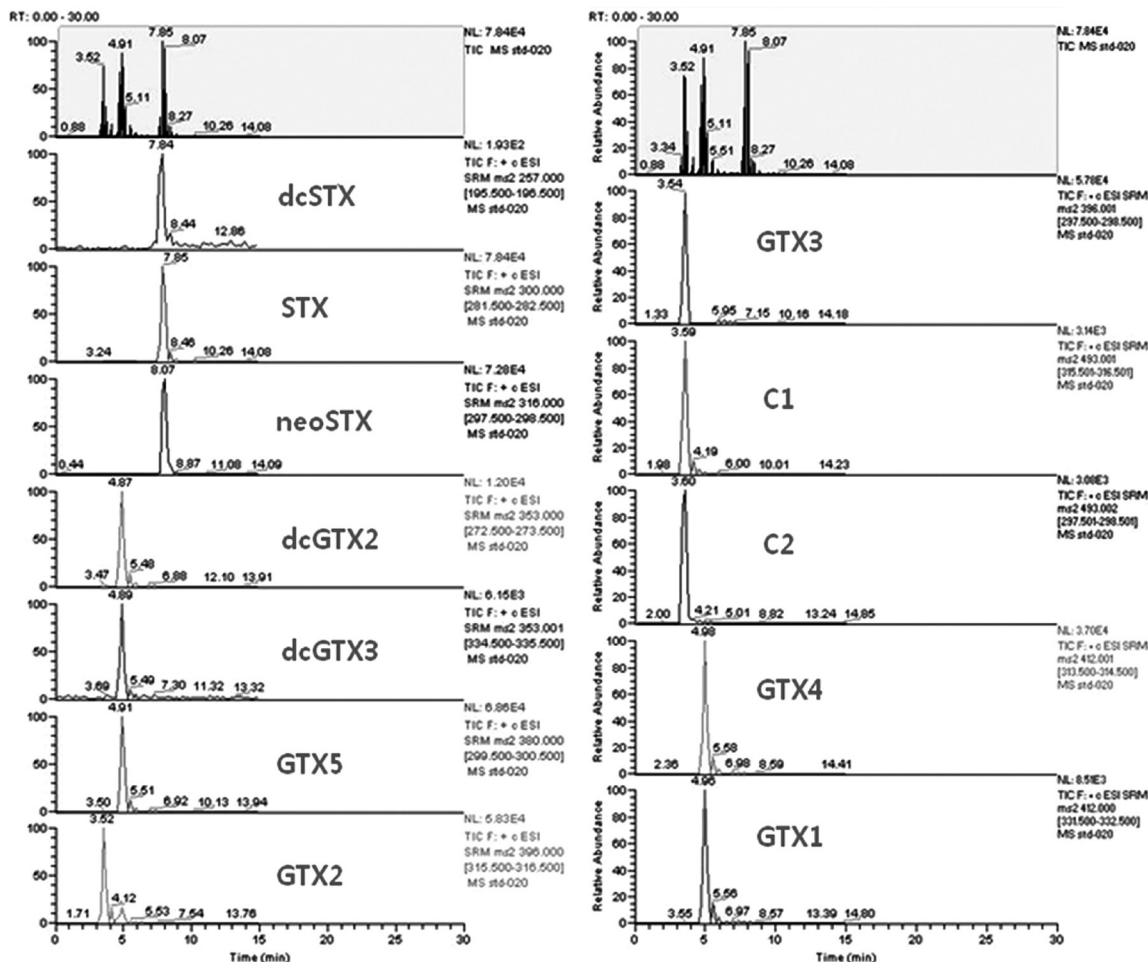


Fig. 2. Chromatogram of working solution (0.1 µg/g); STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protogonyautoxin.

Table 3. Estimated limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for individual toxin (n=5)

	Linearity (r ²)	LOD (µg/g) ¹	LOQ (µg/g) ²
STX	0.9998	0.001	0.003
NEO	1.0000	0.010	0.030
GTX1	0.9999	0.001	0.003
GTX2	0.9999	0.010	0.030
GTX3	1.0000	0.001	0.003
GTX4	0.9998	0.001	0.003
GTX5	1.0000	0.001	0.003
dcSTX	0.9996	0.001	0.003
dcGTX2	0.9999	0.010	0.030
dcGTX3	0.9993	0.010	0.030
C1	0.9993	0.001	0.003
C2	0.9999	0.010	0.030

¹LOD=3×S/N; ²LOQ=3×LOD; STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protogonyautoxin.

정밀성을 나타내었다(Table 4).

Codex (2008)에서는 첨가한 표준물질의 농도가 0.1-10 µg/g 범위에서는 80-110%, 0.01 µg/g에서는 60-115% 및 0.001 µg/g에서는 40-120%의 정확성을 요구하고 있으며, 본 시험 방법은 이에 부합되는 것으로 확인되었다.

마비성패류독소에 오염되지 않은 굴과 진주담치 시료에 각 독소를 일정농도 첨가한 시료를 각각 5개씩 제조한 후, 분석하였을 때의 회수율은 Table 5에 나타내었다. 품종에 따른 회수율은 굴에서는 59.4%-91.0%, 진주담치에서는 60.2%-90.2%의 범위를 보였다. 굴 및 진주담치에서는 특히 C1, C2등의 C toxins 이 다른 독소들에 비해 낮은 비율로 나타났는데, 이것은 전처리 과정에서 미처 제거되지 않은 염에 의한 방해 때문인 것으로 사료된다. Dell'Aversano et al. (2005)는 LC-MS/MS를 이용하여 진주담치 시료에서 마비성패류독소를 분석한 결과 C toxins 이 다른 독소들에 비하여 낮게 검출되었다고 하였다. 조추출물에 포함된 염은 부분적으로 C toxins의 이온화를 억제할 수 있다

Table 4. Intra-day and inter-day accuracy and precision for STXs & GTXs and C toxins analyzed by LC-MS/MS method

Analyte	Concentration (µg/g)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=5)	
		Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)
STX	0.1	98.4	2.0	101.5	1.0
	0.5	102.3	1.5	99.2	1.2
	1.0	104.2	1.4	102.8	1.5
NEO	0.1	99.3	4.5	99.1	4.2
	0.5	97.9	2.9	101.2	2.3
	1.0	105.1	1.5	100.3	1.2
GTX1	0.1	94.0	2.5	104.4	3.0
	0.5	108.8	3.2	105.9	2.4
	1.0	102.8	1.8	101.3	1.6
GTX2	0.1	98.9	3.0	94.8	1.8
	0.5	102.3	2.1	99.6	1.9
	1.0	102.4	2.0	107.8	2.7
GTX3	0.1	100.2	2.8	105.1	4.4
	0.5	98.9	1.4	96.7	2.0
	1.0	100.6	1.0	99.4	1.6
GTX4	0.1	94.9	2.2	105.2	1.5
	0.5	106.1	1.6	99.8	1.9
	1.0	99.9	1.1	101.5	1.2
GTX5	0.1	101.4	2.6	98.5	3.1
	0.5	101.1	3.4	97.2	2.4
	1.0	99.7	2.9	96.8	3.7
dcSTX	0.1	90.5	5.4	91.4	1.1
	0.5	96.6	2.9	96.2	3.8
	1.0	101.0	2.7	100.3	3.6
dcGTX2	0.1	89.7	4.1	92.4	3.6
	0.5	92.8	2.4	96.9	2.8
	1.0	96.8	1.6	98.0	2.7
dcGTX3	0.1	90.1	3.2	89.4	3.4
	0.5	98.4	2.5	90.3	3.9
	1.0	99.6	2.8	97.8	2.5
C1	0.1	97.2	2.4	88.5	2.6
	0.5	101.7	1.8	98.7	2.1
	1.0	95.1	1.2	99.6	1.2
C2	0.1	88.6	2.6	100.2	3.0
	0.5	104.5	2.0	101.5	2.5
	1.0	99.9	1.1	100.0	1.8

STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protoconyautoxin; RSD, Relative standard deviation.

(Dell’Aversano et al., 2005). 그러나, C toxins 이외의 다른 성분들은 굴과 진주담치에서 모두 양호한 수준으로 확인되었다. 본 연구에서 낮은 회수율을 보인 독소들에 대하여는 향후 이를 개선하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

마우스 시험법과 LC-MS/MS에 의한 분석결과 비교

마비성패류독소의 허용기준치인 80 µg/100 g의 농도가 포함되도록 마우스시험법에서 불검출부터 200 µg/100 g STX equiv.로 검출되었던 굴과 진주담치 시료를 각각 50개씩 선별

Table 5. Recovery (%) of toxins in the different matrix by the extraction and purification method (n=5, 1.0 µg/g)

Analyte	Oyster	Mussel
STX	80.2±1.5	80.7±2.6
NEO	75.6±2.1	80.3±3.3
GTX1	89.8±3.3	81.3±1.8
GTX2	82.3±2.6	86.5±3.0
GTX3	79.8±0.8	86.0±2.7
GTX4	87.5±3.1	90.1±2.4
GTX5	91.0±3.6	90.2±3.0
dcSTX	73.5±2.2	72.2±2.5
dcGTX2	72.6±2.4	78.9±2.1
dcGTX3	71.4±1.1	77.5±1.5
C1	59.4±2.0	60.2±1.2
C2	62.5±3.4	61.4±1.6
Range (%)	59.4-91.0	60.2-90.2

STX, saxitoxin; NEO, neosaxitoxin; GTX, gonyautoxin; C, protoconyautoxin.

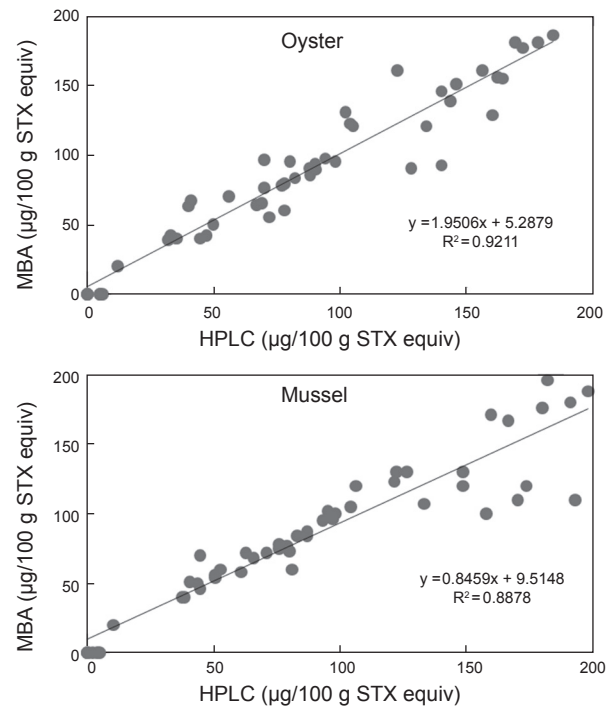


Fig. 3. Correlation between MBA and LC-MS/MS analysis of PSP toxins in oyster (n=50) and mussel (n=50).

하여 위의 방법으로 전처리하고 LC-MS/MS로 12종의 개별독소를 분석한 후 독량을 saxitoxin당량으로 변환시켜 상관관계를 확인하였다. 본 연구에서 상관계수(r²)는 굴에서는 0.9211, 진주담치에서 0.8878로 의미있는 상관관계를 나타내었다(Fig. 3). 기기를 사용한 분석법은 동물시험법에서 방해물질로 작용하는 carbamate와 같은 신경독소와 유기인계 살충제에 영향을 받지 않는 점과 blank 시료에 대한 false positive 결과를 배제할

수 있는 점 등의 특이성을 가지고 있다(Van de Riet et al., 2009).

LC-MS/MS를 이용한 마비성패류독소의 분석은 동물시험법으로는 알아낼 수 없는 시료 중 마비성패류독소 구성성분을 밝힐 수 있고, 많은 독소를 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서의 결과는 마비성패류독소의 원인 플랑크톤과 패류 중 독소 구성성분의 비교에 적용하여 독성 프로파일을 밝히고, 나아가 우리나라 마비성패류독소 관리를 위한 대안으로 활용될 수 있을 것이라 판단된다.

사 사

본 연구는 국립수산물품질관리원(수출패류 생산해역 및 수산물 위생 조사, RP-2013-FS-001)의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Alpert AJ. 1990. The term HILIC(Hydrophilic interaction liquid chromatography) was introduced by Alpert in 1990. *J Chromatogr A* 499, 177-196. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)96972-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(00)96972-3).
- Asp TN, Larsen S and Aune T. 2004. Analysis of PSP toxins in Norwegian mussels by a post-column derivatization HPLC method. *Toxicon* 43, 319-327. <http://dx.doi.org/10.1021/j.toxicon.2004.01.004>.
- AOAC. 2005. AOAC Official Method 959.08. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. In: AOAC Official methods for analysis, 18th Edition Chapter 49: Natural toxins (Chapter ed. Truckses MW), AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 79-80.
- Ben-Gigirey B, Rodríguez-Velasco ML, Villar-González A and Botana LM. 2007. Influence of the sample toxic profile on the suitability of a high performance liquid chromatography method for official paralytic shellfish toxins control. *J Chromatogr A* 1140, 78-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.048>.
- Bricelj VM and Shumway SE. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve mollusks. Occurrence, transfer kinetics and bio-transformation. *Rev Fish Sci* 6, 315-383.
- Carmela DA, Hess P and Quilliam MA. 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning(PSP) toxins. *J Chromatogr A* 1081, 190-201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.056>.
- Codex Alimentarius Commission. 2008. Report of the Thirty-first session, ALINORM 08/31/REP. Geneva, Switzerland.
- Franco JM and Fernández-Villa P. 1993. Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography with postcolumn reaction and fluorometric detection. *Chromatographia* 35, 613-620.
- Hall S, Strichartz G, Moczydlowski E, Ravindran A and Reichardt PB. 1990. Marine Toxins: Origin, Structure, and Molecular Pharmacology. In: Hall S and Strichartz G.(Eds.), American Chemical Society, Washington D.C., USA, 29-65.
- Hall S. 1991. Natural toxins. In: Ward DR and Hackney CR.(Eds.), Microbiology of Marine Food Products. Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 301-330.
- Lawrence JF and Menard C. 1991. Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation. *J Assoc Off Anal Chem* 74, 1006-1012.
- Lawrence JF, Niedzwiedek B and Menard C. 2005. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study. *J AOAC Int* 88, 1714-1732.
- Luckas B, Hummert C and Oshima Y. 2003. Analytical methods for paralytic shellfish poisons. In: Hallegfaeff GM., Anderson DM, Cembella DA, Enevoldsen HO. (Eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO, Paris, France, 191-209.
- Mortensen AM. 1985. Massive fish mortalities in the Faroe Islands caused by a *Gonyaulax excavate* red tide. In: Andersen DM, White AW and Baden DG. (Eds.), Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York, USA, 165-170.
- Oshima Y. 1995. Post-column derivatization liquid-chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J AOAC Int* 78, 528-532.
- Quilliam MA, Thomson BA, Scott GJ and Siu KW. 1989. Ion-spray mass spectrometry of marine neurotoxins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 3, 145-150.
- Thomas K, Chung S, Ku J, Reeves K and Quilliam MA. 2006. Analysis of PSP toxins by liquid chromatography with post column oxidation and fluorescence detection. In: Molluscan Shellfish Safety. Henshilwood K, Deegan B, McMahon T, Cusack C, Keaveney S, Silke J, O'Conneide M, Lyons D and Hess P. eds. The Marine Institute, Galway, Ireland. 132-138.
- Van de Riet JM, Gibbs RS, Chou FW, Muggah PM, Rourke WA, Burns G, Thomas K and Quilliam MA. 2009. Liquid chromatographic post-column oxidation method for analysis of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, scallops, and oysters: single-laboratory validation. *J AOAC Int* 92, 1690-1704.