

마비성패류독소 검출을 위한 분석법 비교

이가정* · 권순재 · 정연중 · 손광태 · 하광수¹ · 목종수¹ · 김지회²

국립수산과학원 남동해수산연구소, ¹국립수산과학원 식품위생가공과, ²국립수산과학원 연구기획과

Comparison of Analytical Methods for the Detection of Paralytic Shellfish Toxins (PSTs)

Ka Jeong Lee*, Soon Jae Kwon, Yeoun Joong Jung, Kwang Tae Son, Kwang Soo Ha¹, Jong Soo Mok¹ and Ji Hoe Kim²

Southeast Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Tongyeong 53085, Korea

¹Food Safety and Processing Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

²Research and Development Planning Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Paralytic shellfish toxins (PSTs) are produced by marine dinoflagellate phytoplankton *Alexandrium* spp. and *Gymnodinium* spp. These toxins accumulate in filter feeding organisms such as bivalves and the ingestion of contaminated shellfish can cause illness in humans. The mouse bioassay (MBA) has been the preferred PST testing method worldwide for more than 50 years. However, this assay has several disadvantages, such as detection limits, non-toxic-profiles, and the ethical issues of using animals. The aim of this study was to establish an alternative to the MBA method for testing for PSTs. We optimized the analysis conditions of a post-column oxidation-high performance liquid chromatography (PCOX-HPLC) method and the Scotia Rapid Test Kit, and then compared the accuracy of these methods to the MBA method. The results demonstrated a strong correlation between the PCOX-HPLC method and the MBA, although the PCOX-HPLC method required expensive equipment and standard material, and was time consuming. The Scotia Rapid Test Kit promises to be a useful tool, as it provided rapid and qualitative results, although the method sometimes gave a false positive result that could not be explained by toxin profiles.

Key words: Paralytic shellfish toxins (PSTs), Mouse bioassay (MBA), Scotia Rapid Test Kit, Post-column oxidation-HPLC (PCOX-HPLC)

서론

마비성패류독소(Paralytic Shellfish Toxins, PSTs)는 *Alexandrium* spp., *Gymnodinium* spp. 등 특정 플랑크톤에 의해 자연적으로 생산되는 것으로 여과섭식(filter feeding)의 특성을 가진 이매패류에 주로 축적되며 인간이 오염된 패류를 섭취하는 경우 심각한 중독증상이 유발된다(Thomas et al., 2006). 매년 한국의 남해안에서 주로 마비성패류독소가 발생하는데, 근년에는 전국 연안으로 검출 범위가 확대되고 있으며, 마비성패류독소의 분석 물량은 점점 더 증가하고 있는 실정이다(NIFS, 2016) (Fig. 1). 따라서, 마비성패류독소의 독화 패류에 의한 식중독을 예방하기 위해서 신속하고 정확한 분석이 반드시 필요하다. 지금까지의 마비성패류독소 분석은 전세계적으로 AOAC 959.08

official method (OM)에 근거한 동물시험법(mouse bioassay; AOAC MBA)을 표준법으로 하고 있는데(AOAC, 2005), 이 방법의 검출한계는 40 µg/100 g STX equivalent (equiv.) 으로 비교적 높은 검출한계에도 불구하고 시료 중 총 독소량 분석에는 신뢰성 있는 방법으로 지난 50여년간 지속적으로 이용되어 오고 있다(Schantz et al., 1958). 그러나, 최근 전 세계적으로 윤리적인 문제 등으로 인한 시험동물의 사용을 억제하거나 금지하고자 하는 여론이 확산되고 있으며(Hess et al., 2006), 높은 검출한계 및 독성 프로파일에 대한 정보를 얻을 수 없는 등의 단점이 부각되고 있다(Park et al., 1986). 따라서, 동물시험법의 사용범위 축소나 배제를 위한 대체법 개발의 필요성이 설득력을 얻고 있다. AOAC (Association of analytical communities)에서는 HPLC로 독소를 분리하기 전 형광유도체를 만들어 분

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0669>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(6) 669-674, December 2017

Received 31 October 2017; Revised 16 November 2017; Accepted 8 December 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 55. 640. 4761 Fax: +82. 55. 641. 2036

E-mail address: kajlee@korea.kr

석하는 pre-column oxidation-HPLC법을 시작으로 형광화합물을 생성하는 산화처리를 독소성분 분리 후 실시하는 post-column oxidation-HPLC (PCOX-HPLC)법을 등재(AOAC 2011.02 Official method)하였다(AOAC, 2011). 또한, 미국 패류위생계획(US National shellfish sanitation program, NSSP)에는 마우스 시험법을 비롯하여 PCOX-HPLC법 및 Scotia rapid test법이 포함되어 있다(NSSP, 2005).

본 연구에서는 매년 마비성패류독소가 발생하고 있는 경남 진해만 일원에서 한 지점을 설정하고, 지중해담치(*Mytilus galloprovincialis*), 굴(*Crassostrea gigas*), 바지락(*Ruditapes philippinarum*) 및 미더덕(*Styela clava*) 등 우리나라 사람들이 주로 섭취하는 패종을 대상으로 마우스 시험법, PCOX-HPLC법 및 면역시험키트(Scotia Rapid Test Kit)법을 사용한 기기분석법을 비교하여 마비성패류독소 검출에 대한 분석법의 적용 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

시료 채취 및 운반

패류 시료는 경남 진해만 명동 일원에 지중해담치(*Mytilus galloprovincialis*), 굴(*Crassostrea gigas*), 바지락(*Ruditapes philippinarum*) 및 미더덕(*Styela clava*)을 각각 채취 후, 2015년 3-5월 마비성패류독소 발생시기에 정기적으로 채취하여 실험에 사용하였다. 또한, 시료 채취 기간 동안의 수온은 8.7-17.4℃ 범위였고, 염분은 31.2-33.7 psu 범위였다.

시약 및 표준물질

마비성패류독소의 추출은 염산(analytical grade, Merck, Darmstadt, Germany)을 0.1 N로 희석하여 사용하였으며, 추출액은 각각 마우스 시험법, 면역시험키트법 및 PCOX-HPLC 법에 사용하였다. PCOX-HPLC법을 위한 추출액은 Song et al. (2013)에 따라 정제하여 사용하였고, 기기분석을 위한 표준물질 NEO (neosaxitoxin), STX (saxitoxin), dcSTX (decarbamoylsaxitoxin), GTX1 (gonyautoxin-1), GTX2 (gonyautoxin-2), GTX3 (gonyautoxin-3), GTX4 (gonyautoxin-4), GTX5 (gonyautoxin-5), dcGTX2 (decarbamoylgonyautoxin-2), dcGTX3 (decarbamoylgonyautoxin-3), C1 (N-sulfocarbamoylgonyautoxin-C1) 및 C2 (N-sulfocarbamoylgonyautoxin-C2) 은 NRC (Halifax, Canada)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 면역시험키트는 Scotia rapid testing Ltd. (Halifax, Canada)에서 구입하여 사용하였다.

마우스 시험

마우스 시험은 식품공전(KMFDS, 2015)에 따라 1 mL 염산 추출액을 체중19-21 g ICR계 마우스의 복강에 주사하여 치사 시간에 따라 Sommer's Table을 이용하여 시료 중에 존재하는 마비성패류독소 농도를 계산하였다.

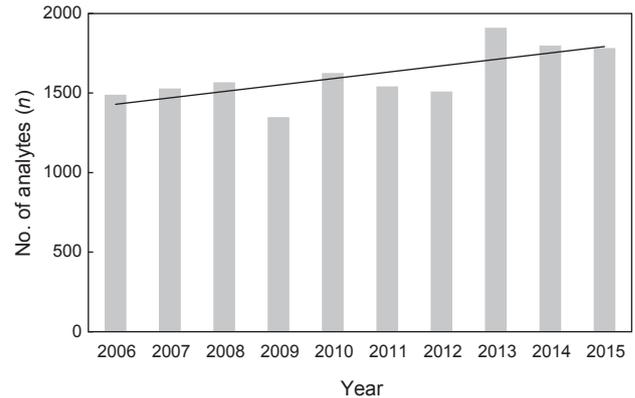


Fig. 1. Number of analytes for paralytic shellfish toxins (2006-2015).

PCOX-HPLC 시험

PCOX-HPLC 시험은 AOAC (2011) 및 Song et al. (2013)에 의해 독소별로 분석 후, 총 독소량을 계산하였다. 즉, 독소의 분리를 위한 HPLC와 fluorescence detector는 e2695와 2475 FLR Detector (Waters, MA, USA)를 각각 사용하였고, detector의 excitation wavelength는 330 nm, emission wavelength는 390 nm로 설정하였다. Post-column reaction system은 post-column derivatizer (Waters, MA, USA)를 사용하여 반응온도를 80℃로 유지하였다. GTXs/STXs 그룹의 분석을 위하여 column의 오븐 온도를 40℃로 설정하고 100% 용액 A를 0.8 mL/min 유속으로 흘렸고, C1 및 C2의 경우 column 오븐 온도를 15℃로 설정하고 100% 용액 C를 0.8 mL/min 유속으로 흘려 독소의 분리를 유도하였다.

분석에 사용된 column은 GTX 및 STX의 분리에 Zorbax Bonus-RP (Agilent, CA, USA, 863668-901T, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm), C1 및 C2의 분리에 Phenosphere-NEXT, (Phenomenex, CA, USA, 00G-4307-E0, 4.6 × 250 mm, 5 μm)를 사용하였다.

정량 및 독소의 계산은 single point calibration을 사용하여 peak 면적을 측정하였으며 독소 성분 별 saxitoxin 상대독성을 고려하여 개별 독소성분의 기여도를 합하여 시료 중 총 독소농도를 계산하고 μg/100 g STX equiv.으로 표시하였다.

면역시험키트 시험

면역시험키트 시험은 추출액에 Scotia에서 제공하는 buffer 용액을 혼합하여 키트에 주입하여 positive (양성) 및 negative (음성) 결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

마우스 시험법

경남 진해만 일원의 패류 4종에 대하여 마우스 시험법 결과

를 토대로 PCOX-HPLC법 및 면역시험키트법을 이용하여 마비성패류독소를 분석하였다. 마우스 시험에서는 총 52개 시료 중 지중해 담치 10개, 굴 6개 및 바지락 7개 시료에서 마비성패류독소가 검출되었고, 미더덕에서는 모두 불검출 되었다. 특히 지중해담치에서는 7개 시료에서 85-627 µg/100 g STX equiv.으로 기준치를 초과하여 검출되었다. 우리나라에서는 지중해담치에서 매년 매년 가장 높은 독성으로 마비성패류독소가 검출되어 마비성패류독소의 지표종으로 사용되고 있으며, 산업적으로 중요한 굴에 대한 조사도 강화하고 있다(Lee et al., 2006). 굴에서는 6개 시료에서 42-57 µg/100 g STX equiv.으로 검출되었고, 바지락에서는 7개 시료에서 42-94 µg/100 g STX equiv.의 농도로 검출되었다. 같은 시기 및 장소에서 채취한 패류임에도 불구하고 패종에 따라 독의 축적 속도 및 독소의 검출 농도에 차이가 있는 이유는 여과섭식(filter feeding)을 하는 생물은 해수를 걸러주는 여수율이 다르며(Kim et al., 1998), 여수 속도에 의해 독의 축적 속도 및 축적 농도가 달라지기 때문이다.

PCOX-HPLC법

Post column oxidation HPLC (PCOX-HPLC)법을 이용하여 마비성패류독소의 독성 프로파일을 분석한 후 총독소량을 계산하고 이 결과를 마우스 시험법 분석결과와 비교하였다. 패류 시료 52개에 대한 개별 독소의 값을 살펴보면, 마우스 시험에서 검출된 시료 중 가장 높은 농도를 나타낸 구성성분은 지중해담치, 굴, 바지락 모두 GTX2,3이 45-92%로 가장 높았고, GTX1,4는 1-48%, STX는 18-39%로 검출되었으며, 패류의 종류에 따라 구성성분에는 차이가 있었다(Table 1). 또한, C1이나 C2 등의 독소는 검출되지 않았다. 마우스 시험법과 PCOX-HPLC법 사이 결과값의 상관관계는 상관계수(r^2)가 0.9878로 매우 좋은 상관관계를 나타내었다(Fig. 3).

이 결과를 살펴보면 특히 마우스시험에서 검출한계인 40 µg/100 g STX equiv. 이하로 불검출이었던 시료가 PCOX-HPLC 시험에서는 검출되어 보다 정확한 정량이 가능하다는 것이 확인되었다. PCOX-HPLC법은 마우스 시험법에 비하여 전처리 과정의 단백질 제거, 크로마토그래피를 이용한 독소성분의 분리, 독소성분의 산화를 통한 형광성 퓨린의 형성과 특이적 파장을 이용한 형광검출과 같은 단계를 가지고 있어 특이성이 더 높다(Rourke et al., 2008). 그러나, 시료의 전처리 시간이 길고 고가의 시험장비 및 지속적인 표준물질의 공급이 필요한 실정이다.

면역시험키트법

마우스 시험법의 결과를 토대로 면역시험키트법을 이용하여 마비성패류독소를 분석하고, PCOX-HPLC법의 결과와도 비교하였다. 면역시험키트법은 제조회사의 이름을 따서 Scotia rapid test 또는 Jellet rapid test라고도 한다. 이 시험법은 polyclonal PSP toxin antibodies를 사용하는 면역 크로마토그래피(lateral flow immunochromatography)로 임신키트와 유사한



Fig. 2. Results of Scotia rapid test strips. C, control line; T, test line; A, Negative (not detected); B, Positive(detected).

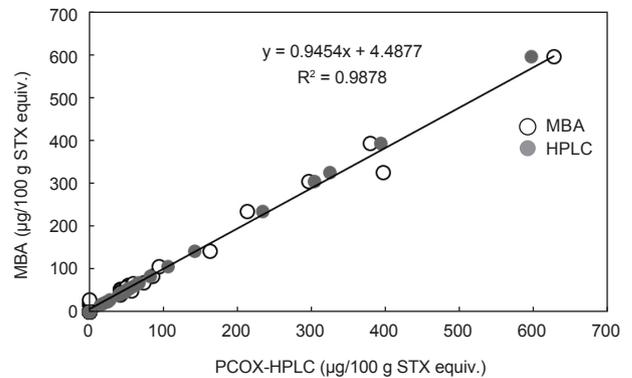


Fig. 3. Correlation between mouse bioassay and post-column oxidation-high performance liquid chromatography (HPLC) method.

스트립 형식으로 사용한다. 이 시험은 35분 내에 40 µg/100 g STX equiv.의 검출한계로 패류 조직의 마비성패류독소를 검출한다. 면역시험키트법은 패류의 조직에서 마비성패류독소의 스크리닝을 위해 상업적으로 이용 가능한 신속 테스트로 개발되었는데, 분석은 키트에 포함된 running buffer에 패류 추출액을 희석하여 검출 스트립에 시료를 로딩하고 35분간 발색반응을 기다리는 것을 포함한다. 이 때 test line (시험선 또는 T line)의 색상 강도를 control line (대조선 또는 C 라인)의 색상 강도와 비교하여 시료가 검출(양성, positive)되었는지 불검출(음성, negative)되었는지 판독한다. Fig. 2는 이 시험법의 결과를 보여주는데, test line이 발색되면 마비성패류독소가 검출되지 않은 것이고, 발색되지 않으면 검출된 것으로 구분한다(Cefas, 2007).

본 연구에서 마우스 시험법과 면역시험키트법을 비교한 결과를 table 1에 나타내었다. 불검출된 시료는 키트에서 두 줄로 표시되고, 검출된 시료는 한 줄로 표시되는데, 지중해담치 추출액을 마우스시험 한 결과 false positive (위양성) 및 false negative (위음성)은 나타나지 않았다. 그러나, 굴 추출액의 키트 시험 결

Table 1. Continued

Sample	PSTs Toxicity by MBA ¹ (µg/100 g STX equiv.)	Scotia Rapid Kit	PSTs concentration by PCOX-HPLC								
			(µg/100 g STX equiv.)	% Molar fraction							
				Total	STX ³	dc-STX ⁴	NEO ⁵	GTX1,4 ⁶	GTX2,3 ⁷	GTX5 ⁸	dc-GTX2,3 ⁹
1	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Warty Sea Squirt (n=13)	6	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	ND	-	0	0	0	0	0	0	0	0

¹MBA, Mouse Bioassay; ²ND, Not detected; ³STX, Saxitoxin; ⁴dc-STX, Decarbamoylsaxitoxin; ⁵NEO, Neosaxitoxin; ⁶GTX1,4, Gonyautoxin 1,4; ⁷GTX2,3, Gonyautoxin 2,3; ⁸GTX5, Gonyautoxin 5; ⁹dc-GTX2,3, decarbamoylgonyautoxin 2,3;¹⁰-, negative (not detected); ¹¹+, positive (detected).

과 false positive는 없었으나, 마우스 시험에서 42-45 µg/100 g STX equiv.로 검출된 2개의 시료에서 false negative가 나타났다. 또한, 바지락 추출액에서도 false positive 및 false negative는 나타나지 않았다. 마우스 시험 결과 모든 시료에서 불검출되었던 미더덕 시료에서는 false positive 및 false negative가 나타나지 않고 모두 negative로 나타났다. 면역시험키트는 STX, GTX2,3, C1,2, GTX5 및 dcSTX에 높은 감도를 가지고, NEO 및 GTX1,4에 대해서는 낮은 감도를 가지고 있는데(Laycock et al., 2001), 독소별 항체의 교차 반응도는 STX (100%), dcSTX (30%), GTX2,3 (60%), GTX5 (40%), C1,2 (33%), dcGTX2,3 (7%), NEO (20%) 및 GTX1,4 (2%)이다 (Jellet et al., 2002). 특히, GTX2, GTX3에 대해서는 검출한계가 23.3 µg/100 g STX equiv., STX는 19.9 µg/100 g STX equiv.로 매우 낮았으며, GTX1,4는 345.2 µg/100 g STX equiv.의 검출한계를 나타내었다(Cefas, 2007). 본 연구에서 2개의 굴 시료 중 false negative가 나타난 이유는 GTX2,3이 독의 구성성분 중 가장 높게 검출되었으나(53-55%) 면역시험키트에서의 검출한계인 23.3 µg/100 g STX equiv. 이하였기 때문인 것으로 사료된다. 면역시험키트법은 분석시간이 적게 소요되고 간편하다는 장점이 있지만, positive와 negative 두 가지의 결과만을 알 수 있기 때문에 정성분석만 가능하다는 단점이 있다.

분석방법의 비교

마비성패류독소의 검출에 사용되는 세가지 분석법을 비교

해본 결과, 마우스 시험법, PCOX-HPLC법 및 면역시험키트법은 서로 좋은 상관관계를 가지고 있었다. 마우스 시험법 및 PCOX-HPLC법은 패류독소의 정량이 가능하지만, PCOX-HPLC법은 분석에 비용이 많이 들고, 분석시간이 오래 걸린다는 단점이 있으며, 패류나 플랑크톤의 독성 프로파일을 알 수 있다는 장점이 있다. 한편, 면역시험키트법은 분석시간이 적게 소요된다는 장점이 있고, 현재 우리나라의 마비성패류독소 기준치인 80 µg/100 g STX equiv. 보다 낮은 검출한계를 가지고 있지만, positive와 negative 두가지 결과만을 알 수 있으므로 정성만 가능하다. 또한, 본 연구에서는 false positive가 나타나지 않았지만, 검출한계인 40 µg/100 g STX equiv. 부근에서는 false positive가 많이 나타나므로(Cost et al., 2009; Oshiro et al., 2009) 패류 양식의 현장에 적용하기는 어려울 것으로 사료된다. 현재, 미국, 유럽 및 일본 등의 국가에서는 마우스시험법을 일상적인 분석에 사용하면서 PCOX-HPLC를 이용한 기기분석법을 함께 사용하고 있는 추세이다(FAO/WHO, 2016).

따라서, 식품안전 정보 확보와 규제를 위한 모니터링 환경에서 PCOX-HPLC법은 마우스시험법의 보조시험법으로 사용하면서, 보다 정확한 마비성패류독소 및 원인 플랑크톤 등의 독성 프로파일 분석의 수단으로 활용하는 등 대체시험법으로도 적용이 가능하다. 또한, 면역시험키트법은 정성만이 가능한 특성상 동물시험법의 보조시험법으로 적합하므로 마우스시험법을 기본으로 사용하면서 다른 두가지 방법을 병행하는 것이 적합한 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2017년도 국립수산물과학원 수산과학연구사업 수출 패류 생산해역 및 수산물 위생조사(R2017057)의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

References

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 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, U.S.A., 79-80.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2011. AOAC Official Method 2011.02. Post column oxidation method(PCOX) AOAC International, Gaithersburg, MD, U.S.A., 12.
- CEFAS (The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science). 2007. The use of the Jellett rapid testing kit for PSP toxins detection in the UK statutory monitoring programme for marine biotoxins. CEFAS, Lowestoft, UK, 7-8.
- Costa PR, Baugh KA, Bruce W, Raymond R, Shelly LN, Natália T, Stacey ME and Kathi AL. 2009. Comparative determination of paralytic shellfish toxins (PSTs) using five different toxin detection methods in shellfish species collected in the Aleutian Islands, Alaska. *Toxicon* 54, 313-320. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.04.023>.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations /World Health Organization). 2016. Technical report. Toxicity equivalency factors for marine biotoxin associated with bivalve molluscs. FAO/WHO, Rome, Italy, 9-13, 27.
- Hess P, Grune B, Anderson DB, Aune T, Botana LM, Caricato P, van Egmond HP, Halder M, Hall S, Lawrence JF, Moffat C, Poletti R, Richmond J, Rossini GP, Seamer C and Vilageliu JS. 2006. Three Rs approaches in marine biotoxin testing: the report and recommendations of a Joint ECVAM/DG SANCO Workshop (ECVAM Workshop 54). *Altem Lab Aanim* 34, 193-224.
- Jellet JF, Roberts RL, Laycock MV, Quilliam MA and Barrett RE. 2002. Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST AlertTM, a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC mouse bioassay. *Toxicon* 40, 1407-1425. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00153-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00153-8).
- Kim YS and Moon TS. 1998. Filtering rate with effect of water temperature and size of two farming ascidians *Styela clava* and *S. plicata*, and a farming mussel *Mytilus edulis*, *J Korean Fish Soc* 31, 272-277.
- KMFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety). 2015. Korean Food Standard. Chapter 6.3. Shellfish toxins 6.3.1. Paralytic shellfish toxins. KMFDS, Cheongju, Korea, 1185-1189.
- Laycock MV, Jellet JF, Belland ER, Bishop PC, Thérault BL, Russel-Tattrie AL, Quilliam MA, Cembella AD and Richards RC. 2001. MIST AlertTM: a rapid assay for paralytic shellfish poisoning toxins . In: Hallegraff GM, Blackburn SI, Bolch CJ and Lewis RJ. (Eds.), *Harmful Algal Blooms* 2000. International Oceanographic Commission, Paris, France, 254-256.
- Lee TS, Mok JS, Son KT, Oh EG, Kim PH, Lee KJ, Lee HJ and Kim JH. 2006. Paralytic shellfish poisoning in mussel from coastal area of Korea. *National Institute of Fisheries Science, Busan, Korea* 18-21.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2016. Annual report of National Fisheries Research and Development Institute. NIFS, Busan, Korea, 63.
- Oshiro M, Pham L, Csuti D, Dodd M, Inami GB and Brenden RA. 2006. Paralytic shellfish poisoning surveillance in California using the Jellet Rapid PSP test. *Harmful Algae* 5, 69-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2005.05.006>.
- Park DL, Adams WN, Graham SL and Jackson RC. 1986. Variability of mouse bioassay for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *J Assoc Off Anal Chem* 69, 547-550.
- Rourke WA, Murphy CJ, Pitcher G, Van de Riet JM, Burns G, Thomas KM and Quilliam MA. 2008. Rapid postcolumn methodology for determination of paralytic shellfish toxins in shellfish tissue. *JAOAC Int* 91, 589-597.
- Schantz EJ, McFarren EF, Schafer ML and Lewis KH. 1958. Purified shellfish poison for bioassay standardization. *J Assoc Off Anal Chem* 41, 160-168.
- Song KC, Lee KJ, Yu HS, Mok JS, Kim JH, Lim KS, Lee MA and Kim MH. 2013. Intra-laboratory validation of an HPLC Post-column oxidation method for the analysis of PSP toxins in oysters and mussels. *Korean J Food Sci and Tech* 45, 241-247. <http://dx.doi.org/10.9721/KJFST.2013.45.2.241>.
- 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' 'Cinneide M, Lyons D, Hess p (ed). Marine Institute, Galway, Ireland. 132-138.
- NSSP (US National Shellfish Sanitation Program). 2005. NSSP Guidance Document. Proposal 05-110, Rapid Screening Method for PSP, NSSP, AL, U.S.A., 66-68.