

Paralityczne toksyny morskie jako zagrożenie dla zdrowia konsumenta

MIROSŁAW MICHALSKI

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Michalski M.

Paralytic shellfish poisoning as a health risk

Summary

Shellfish poisoning is caused by a group of toxins elaborated by planktonic algae (dinoflagellates), in most cases upon which the shellfish feed. The main groups of biotoxins harmful for human beings are: DSP, NSP, ASP and PSP. The most frequent and dangerous for our lives is paralytic shellfish poisoning (PSP). In the case of PSP, the effects are predominantly neurological and include tingling, burning, numbness, drowsiness, incoherent speech, and respiratory paralysis. The 20 toxins responsible for paralytic shellfish poisoning are all derivatives of the saxitoxin group. Saxitoxin is heat-stable and unaffected by standard cooking or steaming; it is water-soluble, and can be concentrated in broth. To prevent outbreaks of PSP and other shellfish intoxications, samples of susceptible mollusks are periodically collected in the coastal states and tested for toxin by mouse bioassay. When toxin levels exceed 80 µg/100 g, affected growing areas are quarantined, and sale of shellfish is prohibited. Modern chemical techniques, for instance immunoassay, phosphatase test or chromatography (HPLC, LC-MS), are quite suitable for the detection of PSP.

Keywords: paralytic shellfish poisoning, saxitoxin, food intoxication

Plankton jest w oceanach podstawowym pożywieniem dla mięczaków, takich jak: ostrygi, małże, przegrzebki czy też omułki oraz dla larw skorupiaków. Wśród około 5000 istniejących gatunków alg morskich około 300 może występować w bardzo dużej ilości, powodując tzw. kwitnienie wody połączone ze zmianą barwy powierzchni wód i to zarówno słonych, jak i słodkich. Kwitnienie wód nosi również nazwę czerwonego przyływu (red tides), chociaż nie zawsze wody zabarwiają się na czerwono. Wody zabarwiają się również na kolor żółty, zielony, brązowy lub niebieski w zależności od rodzaju planktonu, jego ilości i głębokości na jakiej występuje. Plankton wytwarza w korzystnych warunkach związki toksyczne dla ludzi. Szczególnie dużo rozmaitych toksyn jest wytwarzanych w czasie kwitnienia wód (13, 20, 22). W ostatnich latach częstotliwość występowania kwitnienia alg jednokomórkowych znacznie się zwiększyła. Przyczyny tej ekspansji są nie do końca poznane. Wydaje się, że zanieczyszczenie środowiska substancjami mineralnymi, ścieki przemysłowe, zmiany klimatyczne, zmiana zasolenia wód, podniesienie się temperatury wód przybrzeżnych wpływa znacznie na okresowy i gwałtowny rozwój jednokomórkowców. Ruchy tektoniczne w obszarze dna morskiego i zakłócenia hydrograficzne mają również wpływ na ich rozwój.

Okresów i miejsc występowania nadmiernych ilości planktonu nie można przewidzieć (2, 10, 22).

Plankton zawierający substancje toksyczne przedostaje się do organizmu mięczaków jako ich pożywienie. Termin „morskie biotoksyny” oznacza biologiczne substancje trujące odkładające się w żywych małżach wskutek spożywania przez nie planktonu zawierającego toksyny. Toksyny są tym bardziej niebezpieczne, gdyż ich obecność w mięsie małży przeznaczonych do konsumpcji nie powoduje zmian sensorycznych spożywanego produktu. Kraje produkujące małże dwuskorupowe mają rozwinięty system kontrolowania hodowli oraz ostrzegania zbieraczy małży przed ich zbieraniem z obszarów występowania toksycznych alg. Nadzór nad obszarem produkcji polega na monitorowaniu obecności glonów na różnych głębokościach, określaniu gatunku i ilości fitoplanktonu/glonów oraz obecności składników odżywczych (azotany, azotyny, amoniak, fosforany, krzemiany) w środowisku. Monitorowaniu podlega również woda w kierunku na obecność metali, pestycydów, związków chloroorganicznych, pomiar temperatury i stopnia zasolenia, pH, zawartość tlenu rozpuszczonego w wodzie, jej przejrzystość itd. Kolejnymi etapami nadzoru jest oznaczanie obecności biotoksyn w glonach, biotoksyn w mięczakach i mikrobiologia obszaru produkcyjnego.

Otrzymane dane pozwalają dokonać klasyfikacji obszarów produkcyjnych, tzn. dopuszczenia z nich do zbioru małży i przekazania do handlu lub do zakładów oczyszczania, gdzie toksyny są wymywane z małży blaszkoskrzelnych (dwuskorupowych) czystą wodą. Proces wymywania w zależności od rodzaju małży i toksyny trwa od kilku dni do kilkunastu tygodni. Badaniu podlegają również małże przeznaczone do obrotu (22).

Coraz większą popularnością w naszym kraju cieszą się tzw. owoce morza, w tym małże blaszkoskrzelne (mięczaki). W krajach takich jak np. Hiszpania, Francja, Portugalia, USA czy Japonia owoce morza są spożywane powszechnie, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zatruc pokarmowych po ich konsumpcji. Główne biotoksyny występujące u mięczaków to PSP – toksyny paraliżujące, NSP – neurotoksyny, ASP – toksyny anamnesticzne, DSP – wywołująca biegunki oraz AZA (kwas azaspirowy) wywołujący biegunki (5, 6, 22).

W niniejszej publikacji omówiono najbardziej niebezpieczną biotoksynę morską, a mianowicie toksynę paralityczną – PSP (Paralytic Shellfish Poisoning). Toksyny paralityczne są najbardziej niebezpieczne dla człowieka i stanowią istotny problem w krajach, gdzie powszechne jest spożywanie małży – zarówno tych pochodzących z hodowli, jak i zbieranych indywidualnie na wybrzeżu (5, 12, 22).

Aktywną i podstawową toksyną jest saksytoksyna (STX) oraz jej 21 izomerów (pochodne tetrahydropuryn, SXT's). Wszystkie te toksyny zostały zidentyfikowane w glonach i małżach, które spożywały te glony. Grupa toksyn paralitycznych to toksyny ściśle związane z toksynami purynowymi. Należą one do 4 podgrup (I-IV), tj. I – karbaminiany (STX, neoSTX i gonyautoksyny GNTX1-4), II – N-sulfokarbaminiany (GNTX5-6, C1-4), III – dekarbaminiany (dcSTX, deneoSTX, dcGNTX1-4) oraz IV – deoksydekarbaminiany (doSTX, doneoSTX i doGNTX1). W 1975 r. po raz pierwszy uzyskano krystaliczną syntetyczną pochodną saksytoksyny i zbadano jej strukturę (4). Toksyny PSP są termostabilne w środowisku kwaśnym, z wyjątkiem pochodnych N-sulfo-karbamylowych, które są niestabilne i łatwo ulegają utlenieniu w środowisku zasadowym. Grupy ketonowe są odpowiedzialne za toksyczność saksytoksyn, a ich uwodornienie powoduje utratę właściwości toksycznych (25).

Pierwotnym źródłem SXT są glony z rodzaju *Alexandrium*, a więc np. *A. catenella*, *A. tamarensis*, *A. minutum (excavata)*, *A. fundyense*, *A. fraterculus* i *A. cohorticula*. Również inne glony wytwarzają STX's, takie jak *Pyrodinium bahamense* i *Gymnodinium catenatum*. Glony te występują na całym świecie (23). Jednokomórkowce te rozwijają się w zakresie temperatur 13-25°C. Rodzaj, ilość i toksyczność wytwarzanych przez nie toksyn zależy od temperatury, ilości dostępnego światła słonecznego, fazy rozwoju i obecności substancji odżywczych. Najwięcej toksyn

wytwarzanych jest w fazie stacjonarnej rozwoju. Toksyczność mięczaków dla ludzi jest wypadkową pochodnych STX, rodzaju glonów przez nie spożywanych i miejsca występowania. Przykładowo, w regionach Nowej Zelandii głównym jednokomórkowcem będącym źródłem SXT's jest *Alexandrium minutum*, u którego dominującymi pochodnymi są: GNTX1, GNTX2, GNTX4 neoSTX i STX (20). Również cysty glonów mogą być źródłem saksytoksyny. Cysty toksycznych glonów *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense* czy z rodzaju *Alexandrium* stwierdzano wzdłuż całego wybrzeża Portugalii (1).

Podczas procesu odżywiania się małży (filtrowania wody) glony i ich cysty są transportowane do żołądka i przełyku. Podczas trawienia toksyny są uwalniane i wprowadzane do ciała małży. Największe stężenie toksyn występuje w jelitach (stanowią one ok. 30% wagi ciała mięczaka), które zawierają do 97% toksyczności. Gruczoły trawienne, gonady i skrzela zatrzymują wszystkie toksyny, lecz ich stężenie jest zróżnicowane w zależności od rodzaju tkanki i gatunku małży. Z reguły mięsień przywodziciel nie akumuluje toksyn. Im dłużej małże spożywają glony zawierające PSP, tym większe ich stężenie stwierdza się w mięśniach (23). Toksyny paralityczne ulegają wypłukaniu z małży w wodzie czystej. Proces wymywania trwa od kilku dni do kilkunastu miesięcy w zależności od stężenia, rodzaju PSP i gatunku małży. Do małży, u których proces wymywania przebiega powoli, zalicza się *Saxidomus giganteus*, *Spisula solidissima*, *Placopecten magellanicus* czy też *Petinopecten yessoensis*. Małże, u których wymywanie przebiega szybko, to *Mytilus edulis* (omułki) i *Mya arenaria*. U niektórych małży dochodzi do transformacji PSP w jej izomery, które z reguły są mniej toksyczne. Toksyny szybciej wymywają się z wnętrza małży niż z tkanki mięśniowej (3).

Toksyny paralityczne działają na układ nerwowy poprzez blokowanie (przewodzenia) kanałów sodowych we włóknach nerwowych. Przyczyną śmierci przy zatruciach jest z reguły niewydolność układu oddechowego. Saksytoksyna drastycznie obniża ciśnienie krwi. Duże stężenia PSP w organizmie powodują zawał serca. Toksyna jest usuwana z organizmu poprzez układ moczowy. Objawami zatrucia saksytoksyną są: drętwienie języka, brak czucia, porażenie mięśni oddechowych i układu motorycznego, porażenie układu sercowo-naczyniowego, drżenie rąk i palców u nóg, bełkotliwa mowa, ślinienie się i kłopoty z oddychaniem. Drżenie warg czy też drętwienie języka występuje już po 30 min. od zatrucia. Śmiertelność wynosi około 10% (12, 23).

Minimalna dawka saksytoksyny powodująca zatrucie u ludzi to 20 µg/kg masy ciała. Dawka śmiertelna dla człowieka zaczyna się od 150 µg (duża zmienna wrażliwość u ludzi). Dopuszczalna zawartość toksyny PSP wynosi 80 µg/100 g mięsa mięczaków. SXT jest silniejsza od np. cyjanku. W latach zimnej wojny

amerykańscy szpiedzy byli wyposażeni właśnie w kapsułki z saksytoksyną.

Najwcześniejsze zatrucia PSP odnotowano w Norwegii już w 1901 r., a następnie w latach 1939, 1959, 1979, 1981, 1991 i 1992 r. Łącznie zatruty się 32 osoby, w tym 2 śmiertelnie (23). Pierwsze udokumentowane zatrucie saksytoksyną w Japonii wystąpiło w 1948 r., a w USA w połowie lat 60. W innych krajach Europy częste zatrucia PSP notuje się od wczesnych lat 80. Pod koniec 1987 r. w Wielkiej Brytanii zanotowano 187 przypadków zatrucia toksyną paralityczną, w tym 26 przypadków śmiertelnych po spożyciu małży *Amphichacena kindermanni*. Problemy z toksycznymi omułkami nie ominęły jednego z głównych ich producentów, a mianowicie Hiszpanii. Omułki pochodzenia hiszpańskiego, z rejonu Galicji, spowodowały w 1976 r. zatrucia 120 konsumentów w Niemczech, Francji, Szwajcarii i Włoszech. Na szczęście, obyło się bez ofiar śmiertelnych (4). W Chile w latach 1972-1997 zmarło 26 osób w wyniku zatrucia saksytoksyną (18).

Toksyny PSP są potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia ludzi i wymagane są szybkie i czułe metody ich wykrywania. Tradycyjną metodą jest test na myszach (Mouse Bioassay – MBA) jako metoda referencyjna lub na szczurach (RBA). Metodą referencyjną jest także wysokosprawna chromatografia ciekłowa (HPLC). Metoda MBA była rozwinięta ponad 50 lat temu i została zatwierdzona przez AOAC do oznaczania PSP. Metoda polega na podaniu 5 standaryzowanym myszom o masie 20 g 1 ml odpowiednio przygotowanego ekstraktu z małży i obserwacji objawów zatrucia, czasu śmierci i liczby padłych myszek. Toksyczność badanej próbki wylicza się z krzywej: ilość STX v. jednostki mysie (Mouse unit – MU = 0,18 µg STX). Limit detekcji wynosi 40 µg STX/100 g mięsa małży z precyzją ± 15-20% (15). Potrzeba jednak kilku zwierząt (5 sztuk) do określenia obecności toksyn w małżach. Badania międzylaboratoryjne wskazują na niski odzysk i duży rozrzut wyników analiz przeprowadzanych na tym samym materiale w różnych laboratoriach (8, 19). Są to metody kontrowersyjne z punktu widzenia użycia zwierząt do badań i w wielu krajach istnieje zakaz prowadzenia takich oznaczeń przy użyciu zwierząt laboratoryjnych. Skutkiem tego nastąpił w ostatnich latach szybki rozwój metod alternatywnych.

Z metod biochemicznych coraz większą popularnością cieszą się testy ELISA, dostępne już w wersjach komercyjnych. Testy nie zawsze są specyficzne dla STX z powodu istnienia wielu jej izomerów. Jednakże Cembela i Lamoreux (6) opisali poliklonalny test, który wykrywa STX, neoSTX, GNTX1 i GNTX3 z czułością przewyższającą metodę chromatografii ciekłowej i jest bardziej specyficzny niż MBA. Porównanie wykonane na dużej liczbie próbek trzech testów ELISA wykazało również ich zgodność z testem MBA (7). Jednakże w świetle innych badań test na myszach nie może być w pełni zastąpiony testem ELISA ze

względem na występowanie niespodziewanych reakcji krzyżowych (13). W świetle informacji uzyskanych podczas spotkań przedstawicieli krajowych laboratoriów badających biotoksyny morskie wydaje się, że testy ELISA mogą mieć zastosowanie do monitoringu, lecz każdy wynik fałszywie ujemny/dodatni powinien zostać potwierdzony testem MBA lub chromatografią ciekłową. Testy ELISA są nadal rozwijane nie tylko do wykrywania STX i jej pochodnych, lecz również innych biotoksyn morskich (16).

Techniki chromatografii ciekłowej zyskują coraz większą popularność i są uznawane za metody oficjalne (referencyjne) w odniesieniu do saksytoksyny. W ostatnim dziesięcioleciu opublikowano wiele metod do rutynowego oznaczania toksyn paralitycznych. Zasady metody to rozdział chromatograficzny toksyn, a następnie utlenienie ich w celu uzyskania łatwo wykrywalnych pochodnych. Metoda została zwalidowana przez USFDA w stosunku do referencyjnej metody na myszach, uzyskując współczynnik korelacji $r > 0,9$ (29). Problemem jest jednak brak standardów wszystkich pochodnych STX. W badaniach międzylaboratoryjnych prowadzonych przez FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) w 2003 r. na 15 laboratoriów biorących udział 7 zastosowało chromatografię ciekłową. Jednakże wyniki dotyczące STX mieściły się w granicach od „nie wykryto” do 83 µg/100 g tkanki, a dla dcSTX 25-130 µg/100 g badanej tkanki małży. Wszystkie laboratoria stosowały kwasową ekstrakcję toksyn PSP z mięśni małży z HCl, na gorąco (8). Metoda jest ciągle rozwijana i jest lub była przedmiotem programów badawczych, i to w zakresie metody, jak i uzyskania standardów STX i jej pochodnych (9, 31, 32).

Do wykrywania toksyny paralitycznej mają zastosowanie również techniki elektroforetyczne (na żelu lub bibule) z detekcją w ultrafiolecie (15, 25, 30). Elektroforeza kapilarna (CE) jako relatywnie nowa technika nie ma za wiele aplikacji w oznaczaniu toksyn paralitycznych, jednakże jest techniką mającą możliwości rozwoju. Wright (33) połączył technikę CE z laserowym detektorem fluorescencyjnym, co pozwoliło wykryć PSP na poziomie 1 µg/kg tkanki, przy nanieśieniu 1-10 nl ekstraktu. Technika CE może mieć zastosowanie do skreningowych metod wykrywania PSP (28). Szybki rozwój spektrofotometrii masowej połączonej z technologiami komputerowymi otworzył nowe możliwości w wykrywaniu toksyn paralitycznych. Mimo wysokiego kosztu aparatury metoda jest rozwijana, szczególnie w połączeniu z chromatografią ciekłową (24, 26, 28) czy też elektroforezą kapilarną (26).

Zasady wprowadzania do handlu żywych małży są ściśle określone prawodawstwem unijnym, szczegółowo regulującym wszystkie etapy ich produkcji, od środowiska hodowlanego, hodowlę, oczyszczanie po limity pozostałości w tkankach małż przeznaczonych zarówno do bezpośredniego spożycia, jak i do prze-

twórstwa. Wymienione akty prawne to: Decyzja Komisji z dnia 15 marca 2002 r. (2002/225/EC) ustanawiająca szczegółowe zasady wykonania dyrektywy Rady 91/492/EWG w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu zawartości i metod analizy niektórych morskich biotoksyn w małżach, szkarłupniach, osłonnicach i ślimakach morskich; sekcja VII w Rozporządzeniu (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiającej szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego; Decyzja Komisji z 14 listopada 2003 r. w sprawie warunków zdrowotnych i wymagań certyfikacyjnych przy imporcie małży, ich jaj, gamet przeznaczonych do rozmnażania, hodowli, tuczenia z przeznaczeniem do spożycia przez ludzi (2003/804/EC); Decyzja Komisji z dnia 15 marca 2002 r. (2002/226/EC) ustanawiająca specjalne kontrole zdrowotne w odniesieniu do zbierania i przetwarzania określonych małży dwuskorupowych o poziomie toksyny ASP (Amnesic Shellfish Poison) przekraczającym limity określone w dyrektywie Rady 91/492/EWG (notyfikowana jako dokument nr C(2002) 1009); Decyzja Komisji nr z dnia 18 stycznia 1996 r. (96/77/EC) ustanawiająca warunki dla zbioru i przetwórstwa pewnych małży dwuskorupowych pochodzących z obszarów, gdzie poziom PSP przekracza dopuszczalne limity określone dyrektywą 91/492; Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 15 lipca 2005 roku w sprawie szczegółowych wymagań weterynaryjnych dla umieszczania na rynku zwierząt i produktów akwakultury (Dz.U. nr 138 poz. 1158).

Piśmiennictwo

1. *Amorim A., Dale B.*: Distribution of cysts from toxic or potentially toxic dinoflagellates along the Portuguese coast, [w:] Reguera B., Blanco J., Fernandez M., Wyatt T.: Harmful Algae, Proc. VIII Internat. Conf. Harmful Algae, June 1997, Vigo, Spain, s. 64-65.
2. *Anderson D. M.*: Red tides. Scientific American 1994, 271, 62-68.
3. *Andrinolo D., Michea L. F., Lagos N.*: Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP) in cats. Toxicol. 1999, 37, 447-464.
4. *Anon.*: IPCS. International Programme on Chemical Safety. Aquatic (Marine and Freshwater) Biotoxins. Environmental Health Criteria 37. WHO, Rome 1984.
5. *Bower D. J., Hart R. J., Matthews P. A., Howden M. E. H.*: Nonprotein neurotoxins. Clin. Toxicol. 1981, 18, 813-843.
6. *Cembela A. D., Lamoreux G.*: Rev. Int. Oceanogr. Med. 1991, [w:] Egmond H. P. Van: Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. J. Nat. Toxins 1993, 2, 41-83.
7. *Chu F. S., Hsu K. H., Huang X., Barrett R., Allison C.*: Screening of paralytic shell fish poisoning toxins in naturally occurring samples with three different direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays. J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 4034-4047.
8. *Earnshaw A.*: Marine toxins, pilot study. Report Food Analysis Performance Assessment Scheme, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, UK 2003.
9. *Egmond H. P. Van, Mouriño A., Burdaspal P. A., Bustos J., Legarda T., Mesego A., Paulsch W. E., Saldago C., Van de Top H. J., Boenke A.*: The certification of the mass fractions of saxitoxin and dc-saxitoxin in two mussel reference materials (CRM 542 & 543) including the identification of other PSP toxins, and a spiking procedure based on an enrichment solution (CRM 663) with a certified mass concentration of saxitoxin. Publication of the European Communities. Directorate-General Science, Research and Development, 1998. Report EUR Report 18318.
10. *Egmond H. P. Van., Speijers G. J. A.*: Natural Toxins II. Phycotoxins, [w:] Van der Heijden K. i in.: International Food Safety Handbook. Science, International Regulation and Control. Marcel Dekker Inc. New York 1999, 357-368.
11. *Garthwaite I., Ross K. M., Miles C. O., Briggs L. R., Towers N. R., Borrell T., Busby P.*: Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand. J. AOAC Int. 2001, 84, 1643-1648.
12. *Gessner B. D., Bell P., Doucette G. J., Moczydlowski E., Poli M. A., Van Dolah F., Hall S.*: Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. Toxicol. 1997, 35, 711-722.
13. *Hallegraef G. M., Anderson D. M., Cembella A. D.*: Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33., UNESCO, Rzym 1995.
14. *Hollingsworth T., Wekell M. M.*: Fish and other Marine Products. 959.08. Paralytic shellfish poisoning. Biological Method, Final Action, [w:] Hellrich K.: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA 1990, 881-882.
15. *Ikawa M., Van Egmond H. P.*: Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. J. Nat. Toxins 1985, 1, 41-83.
16. *Kasuga F., HaraKudo Y., Machii K.*: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for paralytic shellfish poisoning toxins. J. Food Hyg. Soc. Japan 1996, 37, 407-410.
17. *Kawatsu K., Hamano Y., Sugiyama A., Hashizume K., Noguchi T.*: Development and application of an enzyme immunoassay based on a monoclonal antibody against gonyautoxin components of paralytic shellfish poisoning toxins. J. Food Prot. 2002, 65, 1304-1308.
18. *Lagos N.*: Microalgal blooms: A global issue with negative impact in Chile. Biol. Res. 1998, 31, 375-386.
19. *LeDoux M., Hall S.*: Proficiency testing of eight French laboratories in using the AOAC mouse bioassay for paralytic shellfish poisoning: interlaboratory collaborative study. Food Chem. Contam. 2000, 83, 305-310.
20. *Lindahl O.*: Occurrence and monitoring of harmful algae in the marine environment. Proc. of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Fort Collins, Colorado 1998, s. 409-423.
21. *MacKenzie L., Berkett N.*: Cell morphology and PSP-toxin profiles of Alexandrium minutum in the Marlborough Sounds, New Zealand. New Zealand J. Mar. Freshwater Res. 1997, 31, 403-409.
22. *Michalski M. M.*: Biotoksyny morskie – występowanie i metody analizy. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 2006, 3 (13), 16-22.
23. *Mons M. N., Van Egmond H. P., Speijers G. J. A.*: Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005, June 1998.
24. *Oikawa H., Fujita T., Satomi M., Suzuki T., Kotani Y., Yano Y.*: Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in the edible shore crab *Telmessus acutidens*. Toxicol. 2002, 40, 1593-1599.
25. *Onoue Y., Tamao N., Maruyama J., Hashimoto K., Seto H.*: Properties of two toxins newly isolated from oysters. J. Agric. Food Chem. 1983, 31, 420-423.
26. *Pleasant S., Ayer S. W., Laycock M. V., Thibault P.*: Ion spray mass spectrometry of marine toxins. III. Analysis of paralytic shellfish poisoning toxins by flow-injection analysis, liquid chromatography/mass spectrometry and capillary electrophoresis/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1992, 6, 14-24.
27. *Quilliam M. A., Janecek M., Lawrence J. F.*: Characterization of the oxidation products of paralytic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1993, 6, 14-24.
28. *Quilliam M., Hess P., Dell'Aversano C.*: Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry, [w:] DeKoe W. J., Samson R. A., Van Egmond H. P., Gilbert J., Sabino M.: Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the century. Wageningen, Netherlands, Ponsen&Looyen 2001, 383-391.
29. *Sullivan J. J.*: Methods of analysis for DSP and PSP toxins in shellfish: a review. J. Shellfish Res. 1988, 7, 587-595.
30. *Thibault P., Pleasance S., Laycock M. V.*: Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. 1991, 542, 483-501.
31. *Top H. J., Van den, Boenke A., Burdaspal P. A.*: The development of reference materials for paralytic shellfish poisoning toxins in lyophilized material. II: Certification study. Food Add. Contam. 2001, 18, 810-824.
32. *Top H. J., Van den, Boenke A., Burdaspal P. A., Bustos J., Van Egmond H. P., Legarda T., Mesego A., Mourino A., Paulsch W. E., Salgado C.*: The development of reference materials for paralytic shellfish poisoning toxins in lyophilized mussel. I: Interlaboratory studies of methods of analysis. Food Add. Contam. 2000, 17, 419-433.
33. *Wright J. L. C., Boyd R. K., De Freitas A. S. W., Falk M., Foxall R. A., Jamieson W. D., Laycock M. V., McCulloch A. W., McInnes A. G., Odens P., Pathak V. P., Quilliam M. A., Ragan M. A., Sim P. G., Thibault P., Walter J. A., Gilgan M., Richard D. J., Dewar D.*: Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. Can. J. Chem. 1989, 67, 481-490.