



Traballo de Fin de Mestrado

Aplicabilidade do método oficial de análise
(OMA AOAC 2005.06) para a semicuantificación de biotoxinas
paralizantes en moluscos bivalvos mediante HPLC/FLD con
oxidación pre-columna.

Aplicabilidad del método oficial de análisis (OMA AOAC 2005.06) para la
semicuantificación de biotoxinas paralizantes en moluscos bivalvos mediante
HPLC/FLD con oxidación pre-columna.

*Applicability of the official method of analysis (OMA AOAC 2005.06) for the
semi-quantification of paralytic toxins in bivalve molluscs through
HPLC/FLD with pre-column oxidation.*

Fernández Rodríguez, Adrián
Traballo de Fin de Mestrado
Xuño, 2021

Directora TFM:
Gago Martínez, Ana
Titara académica:
Veiga Barbazán, María del Carmen

Facultade de Ciencias

Laboratorio Europeo de Referencia para as Biotoxinas Marinas (Universidade de Vigo)

Aplicabilidade do método oficial de análise (OMA AOAC 2005.06) para a semi cuantificación de biotoxinas paralizantes en moluscos bivalvos mediante HPLC/FLD con oxidación pre-columna.

Aplicabilidad del método oficial de análisis (OMA AOAC 2005.06) para la semi cuantificación de biotoxinas paralizantes en moluscos bivalvos mediante HPLC/FLD con oxidación pre-columna.

Applicability of the official method of analysis (OMA AOAC 2005.06) for the semi-quantification of paralytic toxins in bivalve molluscs through HPLC/FLD with pre-column oxidation.

Autor: Adrián Fernández Rodríguez



A Dra. Ana Gago Martínez como Directora del TFM e a Dra. María del Carmen Veiga Barbazán como titora académica autorizan á presentación de este traballo ante o Tribunal Evaluador.

Vigo, 29 de xuño de 2021

GAGO MARTINEZ
ANA MARIA
CONSUELO -
36011552S
Firmado digitalmente por
GAGO MARTINEZ ANA
MARIA CONSUELO -
36011552S
Fecha: 2021.07.01 10:36:58
+02'00'

VEIGA BARBAZAN
MARIA DEL
CARMEN -
33242943P
Firmado digitalmente por
VEIGA BARBAZAN MARIA
DEL CARMEN - 33242943P
Fecha: 2021.07.02 10:24:57
+02'00'

Firmado:

Firmado:

ÍNDICE

RESUMO	4
RESUMEN	4
SUMMARY	5
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. A saxitoxina, derivados e propiedades químicas	2
1.2. Lexislación reguladora europea	4
1.3. Métodos de análise.....	5
2. OBXECTIVOS.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1. Instrumentos.....	8
3.2. Materiais	8
3.3. Reactivos.....	9
3.4. Método oficial OMA AOAC 2005.06	11
4. RESULTADOS E DISCUSIÓN	17
4.1. Mostra 1	18
4.2. Mostra 2	24
5. CONCLUSIÓNS.....	31
5.1. CONCLUSIONES	32
5.2. CONCLUSIONS	32
6. BIBLIOGRAFÍA.....	33

RESUMO

As toxinas paralizantes de moluscos, PSP polas súas siglas en inglés, son producidas por dinoflaxelados mariños e detectáronse en bivalvos mariños arredor do mundo. Existen máis de 21 formas moleculares diferentes de estas toxinas que comparten unha mesma estrutura cíclica pero difiren nos grupos funcionais de 4 posicións que outorgan diferentes propiedades químicas e toxicolóxicas.

O Regulamento do Parlamento Europeo e do Consello establece que os moluscos que se poñan no mercado para o consumo humano non conterán toxinas paralizantes en cantidades totais que sobreparen os 800 µg/kg de tecido.

O método de referencia establecido pola Comisión para a detección e cuantificación total das toxinas consiste nunha cromatografía de líquido de alta eficacia acoplada a unha detección por fluorescencia (HPLC-FLD) e con unha oxidación pre-columna baseado no método oficial de análise (OMA AOAC 2005.06). Este método está constituído por unha serie de etapas que inclúen sucesivas separacións e fraccionamentos mediante extracción en fase sólida (SPE) coa finalidade de alcanzar a maior selectividade para a determinación dos diversos análogos de PSP implicados na toxicidade.

O método permite a determinación robusta, sensible e selectiva dos compoñentes PSP implicados na toxicidade da mostra, mentres que o desenvolvemento levado a cabo neste estudo permite facilitar a aplicación do método para a toma de decisións no análise rutineiro levado a cabo polos laboratorios de control oficial, sen necesidade de aplicar o procedemento na súa totalidade e sen por en risco a saúde do consumidor.

Palabras chave: biotoxinas mariñas, PSP, oxidación, cromatografía, FLD, extracción en fase sólida.

RESUMEN

Las toxinas paralizantes de moluscos, PSP por sus siglas en inglés, son producidas por dinoflagelados marinos y han sido detectadas en bivalvos marinos alrededor del mundo. Existen más de 21 formas moleculares diferentes de estas toxinas que comparten una misma estructura cíclica, pero difieren en los grupos funcionales de 4 posiciones que otorgan diferentes propiedades químicas y toxicológicas. El Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo establece que los moluscos que se pongan en el mercado para el consumo

humano no contendrán toxinas paralizantes en cantidades totales que sobrepasen los 800 µg/kg de tejido.

El método de referencia establecido por la Comisión para la detección y cuantificación total de estas toxinas consiste en una cromatografía de líquido de alta eficacia acoplada a una detección por fluorescencia (HPLC-FLD) y con una oxidación pre-columna, basado en el método oficial de análisis (OMA AOAC 2005.06). Este método está constituido por una serie de etapas, que incluyen sucesivas separaciones y fraccionamientos mediante extracción en fase sólida (SPE) con el fin de alcanzar la mayor selectividad para la determinación de los distintos análogos de PSP implicados en la toxicidad.

El método permite la determinación robusta, sensible y selectiva de los componentes PSP implicados en la toxicidad, mientras que el desarrollo llevado a cabo en este estudio permite facilitar la aplicación del método para la toma de decisiones en el análisis de rutina llevado a cabo por los laboratorios de control oficial, sin necesidad de aplicar el procedimiento en su totalidad y sin poner en riesgo la salud del consumidor.

Palabras clave: biotoxinas marinas, PSP, oxidación, cromatografía, FLD, extracción en fase sólida.

SUMMARY

Paralytic shellfish toxins, PSP for the poisoning occurred by them, are produced by marine dinoflagellates and have been detected in marine bivalves all over the world. There are more than 21 different molecular forms of these toxins that share the same cyclic structure but differ in the functional groups of four positions that confer different chemical and toxicological properties.

The European Parliament and Council Regulation establishes that molluscs placed on the market shall not contain paralyzing toxins in total amounts greater than 800 µg/kg of tissue. The reference method established by the Council for detection and total quantification of these toxins consists in a high efficiency liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-FLD) and with a pre-column oxidation, based on official method of analysis (OMA AOAC 2005.06). This method is composed by various steps which include successive separations and fractionations by solid phase extraction (SPE) to achieve the highest selectivity for the determination of the different PSP analogues involved in toxicity.

The method allows the sensitive, robust, and selective determination of the PSP components involved in toxicity, while the development carried out in this study facilitates the application of the method for the decision making during the routine analysis carried out by official control laboratories, without needing to apply the full procedure and without putting the consumer's health at risk.

Keywords: marine biotoxins, PSP, oxidation, chromatography, FLD, solid phase extraction.

1. INTRODUCCIÓN

A intoxicación paralizante de moluscos, PSP polas siglas en inglés (*paralytic shellfish poisoning*), é un problema común de intoxicación que presenta unha distribución global. Esta doenza está asociada ó consumo de gasterópodos, bivalvos mariños e outros moluscos contaminados polas toxinas paralizantes de moluscos, ou toxinas PSP pola enfermidade que lles da o nome (FAO, 2004; Etheridge, 2010). Estas poden acumularse nos moluscos bivalvos filtrantes converténdooos en vectores delas podendo ser transferidas ó ser humano a través do seu consumo (Costa et al., 2021).

As toxinas PSP están conformadas pola saxitoxina (STX) e os seus derivados. As súas principais fontes produtoras inclúen a certas especies de microalgas, xeralmente a dinoflaxelados mariños dos xéneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium*, e máis especificamente a *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium fundyense*, *Alexandrium catenella*, *G. catenatum* e *Pyrodinium bahamense*, responsables da maioría dos informes de PSP (FAO, 2004; Etheridge, 2010).

As toxinas PSP teñen como diana os canais de sodio dependentes de voltaxe. Nestes canais, formados por unha subunidade α principal e ata dúas subunidades β auxiliares, o sitio de unión das toxinas atópase na subunidade principal, nos residuos aminoacídicos que forman o filtro de selectividade do paso dos ións, producindo o bloqueo da condutividade iónica e da xeración de potencias de acción (Etheridge, 2010; Munday et al., 2013).

Os síntomas resultantes da unión destas toxinas ós canais de sodio dependentes de voltaxe inclúen:

- Sensación de formigueo en beizos, boca e lingua.
- Entumecemento de extremidades
- Parestesia
- Debilidade
- Ataxia
- Náuseas e vómitos
- Depresión sistólica e diastólica
- Morte

A maioría destes síntomas aparecen nos 30 minutos posteriores ó consumo de moluscos contaminados pola saxitoxina e os seus derivados (Etheridge, 2010).

1.1.A saxitoxina, derivados e propiedades químicas

A saxitoxina (STX) é un alcaloide e potente neurotoxina de baixo peso molecular que da nome ó grupo de toxinas causantes da intoxicación paralizante do marisco, tamén chamadas saxitoxinas, debido ó seu illamento da ameixa *Saxidomus giganteus* na primeira evidencia desta intoxicación (Alexander et al., 2009; Harju et al., 2015).

As especies de algas produtoras de saxitoxinas atópanse tanto en zonas de clima tropical como moderado, mais nas últimas décadas parece que a aparición e intensidade dos afloramentos destes algas estase a incrementar debido ó aumento da temperatura do océano e á crecente eutrofización costeira (Costa et al., 2021). En Europa ocorren dende a costa de Portugal ata Noruega, así como tamén no Mar Mediterráneo (Alexander et al., 2009).

A STX é o composto de referencia para un grupo de máis de 50 análogos hidrófilos de tetrahidropurinas (Fig. 1). Estes análogos da STX, como a maioría das toxinas mariñas, son termoestables, especialmente a pH ácido e poden sufrir interconversións entre eles dependendo da temperatura e do pH (Botana et al., 2019).

Este grupo de toxinas comparte unha estrutura cíclica común pero presentan diferentes grupos funcionais, modificando as súas propiedades químicas e toxicolóxicas e permitindo a súa agrupación en diferentes subgrupos.

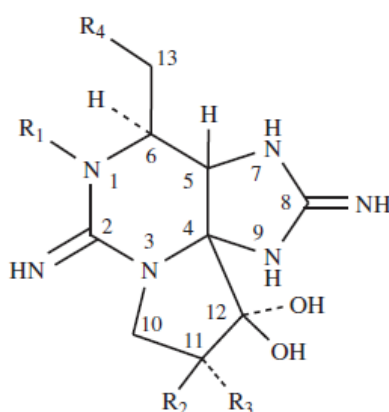
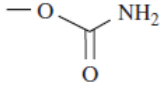
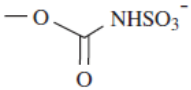


Figura 1. Estrutura química xeral das toxinas PSP

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		
				-OH	
H	H	H	STX	dcSTX	GTX5 (B1)
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX2	dcGTX2	C1
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX3	dcGTX3	C2
OH	H	H	NEO	dcNEO	GTX6 (B2)
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX1		C3
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX4		C4

STX = saxitoxina
 GTX = gonyautoxinas
 NEO = neosaxitoxina

Táboa 1. Estrutura da maioría dos análogos das toxinas PSP

Dentro das moitas clasificacións nas que se poden dividir os análogos da STX existen 3 grupos principais segundo o grupo funcional que presenten na posición R₄ (Táboa 1). Aqueles análogos que presentan un grupo carbamato (-OCONH₂) nesta posición son coñecidos como carbamoil saxitoxinas, mentres que aqueles con un grupo hidroxilo (-OH) son coñecidos como as decarbamoil saxitoxinas. O terceiro grupo está conformado por aqueles análogos que conteñen un grupo sulfato na posición R₄ denominados N-sulfocarbamoil saxitoxinas (Munday et al., 2013).

O grupo dos análogos carbamoil é o máis importante e inclúe á saxitoxina (STX) e derivados como a neosaxitoxina (NEO) e as gonyautoxinas 1,2,3 e 4 (GTX1-4). Dentro dos derivados sulfocarbamoilados atópanse as gonyautoxinas 5 e 6 (GTX5, GTX6) e as C1,2,3 e 4. Ao último conxunto de análogos con grupo hidroxilo pertencen a decarbamoil saxitoxina (dcSTX), a decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO) e as decarbamoil gonyautoxinas 3 e 4 (dcGTX3-4). As substitucións dos diferentes grupos funcionais na posición R₄ afecta á toxicidade relativa de cada análogo, onde os derivados carbamoil e sulfocarbamoil son os máis e menos tóxicos, respectivamente.

1.2. Lexislación reguladora europea

As toxinas paralizantes do marisco están suxeitas baixo regulación en moito países, mais a determinación dos límites reguladores é un proceso complexo debido a que diferentes análogos de STX poden estar presentes simultaneamente na comida consumida polos humanos. Existen diversos métodos químicos de análise para moitas das toxinas PSP que permiten determinar o perfil tóxico de mostras contaminadas. Así mesmo, é necesario obter información sobre a toxicidade dos compoñentes individuais presentes no alimento para estimar a súa toxicidade total. Para iso empréganse os factores de equivalencia de toxicidade, TEFs polas siglas en inglés, que permite expresar a toxicidade dunha mestura de toxinas PSP en termos de equivalentes de saxitoxina que resulta na comparación da toxicidade de cada derivado co da propia STX (Alexander et al., 2009; Munday et al., 2013).

Os diferentes valores para os TEF de cada toxina (Táboa 2) foron propostos polo comité de expertos da *European Food Safety Authority* (EFSA). Na súa avaliación, empregaron os datos de varios estudos de bioensaio en ratos (MBA) sobre as actividades relativas da STX e análogos. Este ensaio permite determinar a relación entre a dose de STX e derivados administrada a ratos mediante inxección intraperitoneal ata o tempo de morte dos animais (Sommer et al., 1937; Alexander et al., 2009).

Carbamoil (-OCONH ₂)		Decarbamoil (-OH)		N-sulfocarbamoil (-OOCNHSO ₃ ⁻)	
Toxina	TEF	Toxina	TEF	Toxina	TEF
STX	1	dcSTX	1	C1	0.1
NEO	1	dcNEO	0.4	C2	0.1
GTX1	1	dcGTX2	0.2	C3	0.1
GTX2	0,4	dcGTX3	0.4	C4	0.1
GTX3	0,6			GTX5 (B1)	0.1
GTX4	0,7			GTX6 (B2)	0.1

Táboa 2. Factores de equivalencias de toxicidade (TEF) para os principais análogos de STX propostos pola EFSA.

Para o control das toxinas PSP dentro da Unión Europea, o Regulamento da Comisión (EC) N°. 853/2004 establece que os moluscos bivalvos vivos que se poñan no mercado non deben conter biotoxinas mariñas en cantidades totais que excedan os 800 µg STX equivalente/kg de molusco (Regulation (EU) n° 853/2004)

1.3. Métodos de análise

Existen varios métodos publicados para a detección de toxinas PSP en plancton e bivalvos. De entre eles, o primeiro en ser empregado foi o bioensaio en ratos, o cal apenas se aplica debido á crecente preocupación polo uso de ensaios con mamíferos por atentar contra o benestar animal (Alexander et al., 2009). Alén do ensaio biolóxico (AOAC 959.08, 2005), existen diferentes metodoloxías para a detección dos análogos de SXT mais soamente están aceptados pola *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) os métodos oficiais: o método de HPLC-FLD con oxidación pre-columna (AOAC 2005.06) o método de HPLC-FLD con oxidación post-columna (AOAC 2011.02) e o ensaio de unión o receptor (RBA) (AOAC 2011.27).

Tras empregar o método de análise biolóxico como método de referencia para a monitorización de PSP dentro da Unión Europea, no Regulamento de Execución (UE) 2019/627 da Comisión, de 15 de marzo 2019 establécese como método de referencia ao Método Oficial 2005.06 da AOAC para a detección e cuantificación das toxinas paralizantes de molusco no corpo enteiro ou nas partes comestibles do molusco (Regulation (EU) n° 2019/627).

O Método Oficial AOAC 2005.06, denominado coloquialmente como método de Lawrence, é unha metodoloxía analítica que emprega a oxidación das toxinas PSP previamente a súa separación e detección mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, siglas de *high performance liquid chromatography* en inglés) acoplada a un detector de fluorescencia (FLD, siglas de *fluorescence detection* en inglés) (Lawrence & Niedzwiadek, 2001; Lawrence et al., 2005). O método tamén inclúe un proceso de extracción a pH ácido e procesos de purificación e fraccionamento co uso de sucesivas extraccións en fase sólida (SPE, siglas de *solid phase extraction* en inglés) para alcanzar unha maior selectividade na determinación dos distintos análogos de PSP implicados na toxicidade.

A oxidación lévase a cabo coa finalidade de producir produtos fluorescentes derivados das toxinas, as cales carecen de fluorescencia de maneira natural. Os principais produtos resultantes da oxidación, correspondentes a cada pico cromatográfico, son derivados de purinas, os cales posúen unha estrutura aromática necesaria para a detección destas moléculas.

Para a oxidación das toxinas empréganse dous oxidantes: o peróxido de hidróxeno (H_2O_2) e unha solución oxidante con ácido periodico (H_5IO_4).

A oxidación con peróxido de hidróxeno non ten capacidade para producir a oxidación completa e eficaz nas toxinas con grupos hidroxilo en posición R1, oxidándoas parcialmente, de maneira que para a súa oxidación completa e para unha determinación eficaz dos mesmos é necesario recorrer á oxidación con ácido periódico.

Sen embargo, o peróxido de hidróxeno si produce un produto de oxidación naquelas toxinas que non presentan grupos hidroxilo. Estes produtos xeran unha intensidade elevada permitindo a detección destes compostos con gran sensibilidade. Por outra parte, o periodato produce produtos de oxidación tanto para toxinas con grupos hidroxilo como sen eles. Naquelas toxinas que presenten grupos hidroxilo, o periodato produce 3 produtos de oxidación e, do mesmo xeito que o peróxido de hidróxeno, tamén xera un produto derivado da oxidación para aquelas toxinas sen grupos hidroxilo. Así mesmo, ambos oxidantes producen 2 produtos de oxidación para aquelas toxinas que pertencen ao grupo decarbamoíl (Táboa 3).

		Nº de produtos de oxidación	
		<i>Periodato</i>	<i>Peróxido de hidróxeno</i>
<i>Toxinas non N-OH</i>	STX	1	1
	GTX2&3	1	1
	C1&2	1	1
	GTX5 (B1)	1	1
	dcSTX	2	2
	dcGTX2&3	2	2
<i>Toxinas N-OH</i>	GTX1&4	3	-
	NEO	3	-
	dcNEO	2	-
	GTX6 (B2)	3	-
	C3&4	3	-

Táboa 3. Produtos de oxidación das diferentes toxinas tras o emprego de periodato e de peróxido de hidróxeno

O método HPLC-FLD con oxidación precolumna permite a determinación de saxitoxina (STX), neosaxitoxina (NEO), gonyautoxinas 1 e 4 xuntas (GTX1&4), gonyautoxinas 2 e 3 xuntas (GTX2&3), decarbamoil saxitoxina (dcSTX), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO) gonyautoxina 5 (GTX5), gonyautoxina 6 (GTX6), C1&2, C3&4, e as decarbamoil goniautoxinas 2 e 3 (dcGTX2&3) (AOAC 2005.06; Ben-Gigirey et al., 2012; Turner & Hatfield, 2012)

Malia ser un método robusto na cuantificación dos diferentes análogos de PSP, na maioría dos programas de monitorización un alto porcentaxe das mostras analizadas resultan negativas ou están por debaixo do límite regulamentario de toxicidade. Por outra parte, a

aplicación do procedemento completo implicaría un tempo de análise longo que podería simplificarse na análise rutineira que implica un gran número de mostras reducindo así o tempo de resposta para os laboratorios de control oficial.

Ca finalidade de optimizar a aplicabilidade do método AOAC 2005.06 para os laboratorios de control oficial das toxinas paralizantes, sería interesante reducir o tempo de análise podendo empregar a parte inicial do devandito método, que permite levar a cabo un *screening*, descartando así as mostras negativas nunha primeira fase do procedemento, para posteriormente, aplicar a etapa seguinte de semicuantificación. Esta semicuantificación daríanos unha estimación da toxicidade equivalente sen ter que recorrer á aplicación de todas as etapas incluídas no método naqueles casos nos que a semicuantificación proporcionase valores por debaixo do límite legal.

A semicuantificación permitiría estimar a concentración total de toxinas na mostra asumindo que os picos cromatográficos identificados na mostra se corresponden cos análogos de PSP máis tóxicos. Como as mostras conteñen unha mestura de análogos máis e menos tóxicos, baixo circunstancias normais este enfoque outorgaría as mostras unha sobreestimación da súa toxicidade. Con esta semicuantificación obteríamos unha sobreestimación do valor que aseguraría en calquera momento que as mostras descartadas estarían moi por debaixo do límite legal permitido, evitando ter que recorrer a cuantificación completa.

No presente traballo aplicouse o Método Oficial de Análise AOAC 2005.06, método de referencia da Unión Europea, ca extensión do mesmo levada a cabo polo EURLMB co fin de ampliar o alcance a novos análogos de PSP que xurdiron posteriormente á validación oficial do método, mostrando así a aplicabilidade do mesmo para a determinación de todos os análogos, para a comprobación da aplicabilidade do método na semicuantificación das toxinas en varias mostras de moluscos

2. OBXECTIVOS

Os obxectivos formulados neste estudo son:

- Avaliar a aplicabilidade do método de HPLC/FLD mediante oxidación pre-columna (OMA AOAC 2005.06) para a semicuantificación das toxinas paralizantes presentes en moluscos bivalvos, facilitando o seu uso e a toma de decisións en análises rutineiras que impliquen un elevado número de mostras.

- Avaliar a idoneidade de establecer un valor límite de corte por debaixo do límite regulador, que permita simplificar o análise de mostras coa máxima seguridade de maneira que baixo ningún caso se reduza a eficacia do control e se protexa tamén de maneira eficaz a saúde do consumidor.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Instrumentos

- *Cromatógrafo líquido de alto rendimento (HPLC) con detector fluorescente (FLD)(Agilent).*- Equipado cunha bomba cuaternaria capaz de realizar un gradiente binario e de inxectar 100 μ L da solución. Emprega unha columna C18 de fase reversa con dimensións 150 x 4,6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula e 100 Å de tamaño de poro. Cun caudal de 1 mL/min o tempo necesario para obter unha correcta separación dos produtos de oxidación das toxinas é de 16 minutos. Para a detección fluorescente as lonxitudes de onda de excitación e de emisión axustáronse a 340 e 395 nm respectivamente. Ademais, tamén está equipado cun software de análise dos datos cromatográficos xerados.
- *Sistema de auga ultra pura Milli-Q® (Millipore)*
- *Sistema colector para realizar a extracción en fase sólida*
- *Sistema de baleiro*
- *Vortex*
- *Centrífuga (Eppendorf). 4000g*
- *Balanza analíticas.- Precisión \pm 0,1 mg*
- *pHmetro*
- *Axitador*
- *Sonicador*
- *Placa calefactora*

3.2. Materiais

- *Columnas SPE-C18.- Columnas Supelclean™ LC-18 de 500 mg/3 mL (Supelco, Sigma-Aldrich)*
- *Columnas SPE-COOH de intercambio iónico.- Columnas Bakerbond™ de ácido carboxílico de 500 mg/3 mL (J.T.Baker, Avantor)*

- *Filtros de membrana PVDF.*- De 0,45µm e 33 mm i.d. (Millex, Millipore)
- *Filtros de membrana PVDF.*- De 0,45µm e 47 mm i.d. (Durapore, Millipore)
- *Material volumétrico de vidro calibrado*
- *Tubos cónicos Falcon™.*- Polipropileno, de 50 e de 15 mL.
- *Viais ámbar con tapa.*- Viais introducidos no sistema HPLC/FLD (Agilent)
- *Pipetas de vidro desbotables*
- *Micropipetas automáticas.*- Con diferentes capacidades (2-20, 20-100, 20-200; 100-1000, 1000-5000 µL)
- *Puntas de pipeta desbotables.*- Con diferentes capacidades (5, 20, 100, 200, 1000, 5000 µL)
- *Xiringas.*- Xiringas desbotables de 1 mL
- *Tubos Eppendorf®.*- Polipropileno, 1,5 mL

3.3. Reactivos

- *Material certificado de referencia de STX, NEO, GTX1,4, GTX2,3, GTX5 (B1), GTX6 (B2), dcSXT, dcNEO, dcGTX2,3 e C1,2 .-* Ampolas con solucións estándar certificadas dos diferentes análogos de PSP, para os cales foi validado o método oficial, obtidos no *National Research Council Canada (NRC)*. Todos os estándares están diluídos en ácido acético con concentracións que varían dende os 50 ata os 140 µM. Para obter solucións stock de traballo con concentracións de 2 µM diluíronse en ácido acético 0,03M.

Para facilitar o análise, estes estándares combináronse en 6 misturas mediante a dilución das solucións estándar certificadas de cada unha das toxinas. A unha concentración de 2 µM para cada toxina, preparáronse as seguintes solucións stock:

- *MIX Screening:* Esta solución stock empregada para o *screening* e a semicuantificación contén GTX1,4, C1,2, dcSTX, GTX2,3, GTX 5 e STX a unha concentración de 2 µM. A partir de esta solución stock elaboráronse 5 dilucións de 0'125, 0'25, 0'5 e 1 µM. Estas dilucións xunto coa solución stock a 2 µM oxidáronse con periodato para a obtención da curva de calibrado.
- *MIX I:* Esta solución stock contén unha mestura do grupo das toxinas non hidroxiladas, que comprenden a STX, dcSTX, dcGTX2,3, C1,2, GTX2,3 e GTX5. A partir desta solución stock elaboráronse 5 dilucións en auga ultra

pura con concentracións finais de 0'06, 0'125, 0'25, 0'5 e 1 μ M. Estas 5 dilucións xunto ca solución stock a 2 μ M empregáronse como os diferentes niveis da curva de calibrado na oxidación con peróxido para a cuantificación das toxinas non hidroxiladas.

- *MIX II*: Esta mestura comprende a GTX1,4 e a NEO. A partir de esta solución elaboráronse 5 dilucións en auga ultra pura con concentracións finais de 0'06, 0'125, 0'25, 0'5 e 1 μ M. Estas 5 dilucións xunto ca solución stock a 2 μ M empregáronse como os diferentes niveis da curva de calibrado na oxidación con periodato para a determinación das toxinas GTX1,4 e NEO na mostra.
 - *MIX III*: Solución stock composta por dcNEO. A partir de esta solución fixéronse 5 disolucións en auga ultra pura que foron dende 0'125, 0'25, 0'5, 0,75 a 1 μ M. Estas 5 disolucións foron oxidadas con periodato para a obtención da curva de calibrado que permite a cuantificación de dcNEO.
 - *MIX IV*: Esta solución stock contén a dcSTX. De esta solución stock elaboráronse soamente dúas disolucións a 2 concentracións, 0'5 e 1 μ M, respectivamente. Ambas disolucións oxidáronse con periodato para avaliar o ratio entre os dous picos cromatográficos correspondentes a dcSTX e así poder discriminar a presenza de dcNEO nunha mostra debido a coelución dos produtos de oxidación de ambos.
 - *MIX V*: Esta solución stock contén GTX6. A partir de esta solución elaboráronse 4 disolucións de 0'125, 0'25, 0'5 e 1 μ M. Estas catro disolucións e a solución stock de 2 μ M foron oxidadas con periodato para ser utilizadas como niveis da curva de calibrado para a cuantificación de GTX6.
- *Modificador de matriz para a oxidación con periodato.*- Modificador de matriz extraído e purificado a partir de tecido de ostra non contaminada. Emprégase para aumentar o rendemento da eficiencia da reacción de oxidación con peróxido das toxinas N-hidroxiladas. Axustouse o pH á 6,5 (\pm 0,2) mediante NaOH a 0,2M e 0,1M e con ácido acético 0,1M.
- *Auga ultra pura*

- *Ácido acético (CH₃COOH)*.- Glacial (puro) e solucións acuosas a 0,03 e 0,1 M e 1% (v/v).
- *Hidróxido de sodio (NaOH)*.- Solucións acuosas a 0,1, 0,2 e 1 M.
- *Acetonitrilo*.- Grao HPLC
- *Metanol*.- Grao HPLC
- *Acetato de amonio (NH₄CH₃COO)*.- Solución acuosa a 0,01M
- *Cloruro de sodio (NaCl)*.- Solucións acuosas a 0,05 e 0,3 M
- *Formiato amónico (NH₄HCO₂)*.- Solución acuosa 0,3 M
- *Hidroxenofosfato de disodio (Na₂HPO₄)*.- Solución acuosa a 0,3 M
- *Ácido periódico (H₅IO₄)*.- Solución acuosa a 0,03 M
- *Solución oxidante de periodato (IO₄⁻)*.- Solución preparada a partir de 5 mL das solucións de formiato amónico, hidroxenofosfato de disodio e ácido periódico respectivamente e axustada a pH 8,2 con NaOH 1 M.
- *Peróxido de hidróxeno*.- Solución acuosa a 10% (v/v).
- *Fase móbil A*.- Solución acuosa a 0,1 M de formiato amónico. Axustada a pH 6, filtrada e desgaseada mediante sonicación.
- *Fase móbil B*.- Solución acuosa a 0,1 M de formiato amónico e acetonitrilo 5% (v/v). Axustada a pH 6, filtrada e desgaseada mediante sonicación.

As fases móbiles empregáronse nun gradiente para eluír os produtos de oxidación dentro do sistema HPLC/FLD nas seguintes condicións: do 0 ao 5% de fase móbil B ó minuto 5; do 5 ao 70% de fase móbil B ó minuto 9; do 70 ao 0% ó minuto 11 e manténdose ao 0% de fase móbil B ata o minuto 16.

3.4. Método oficial OMA AOAC 2005.06

Aplicable para a determinación de saxitoxina (STX), neosaxitoxina (NEO), goniautoxinas 1 e 4 (GTX1, 4; xuntas), goniautoxinas 2 e 3 (GTX 2,3, xuntas), GTX5, GTX6, decarbamoil saxitoxina (dcSTX), decarbamoil goniautoxinas 2 e 3 (dcGTX2,3; xuntas) e C1 e C2 xuntas en mostras de moluscos. Nesta aplicación do método foron aceptables valores cunha desviación estándar relativa (RSD) < 20% e R² ≥ 0,98 na linearidade das curvas de calibrado das solucións patrón do material certificado de referencia. Así mesmo, establecéronse diferentes límites de cuantificación para cada unha das toxinas individualmente (Táboa 4). Estes límites de cuantificación defínense como a

cantidade de analito máis baixa que pode ser detectada cuantitativamente con un determinado nivel de precisión e exactitude (Vashist & Luong, 2018).

	LOQ	
	μM	$\mu\text{mol/Kg}$
GTX1/4	0,054	0,864
dcGTX2/3	0,097	1,18728
C1/2	0,134	1,072
dcSXT	0,03	0,24
NEO	0,052	1,04
GTX2/3	0,053	0,424
GTX5	0,067	0,536
GTX6	_*	_*
STX	0,027	0,216
dcNEO	0,092	1,84

Táboa 4. Límites de cuantificación para os distintos análogos de PSP. *LOQ non establecido.

3.4.1. Principio do método

Dúas mostras de moluscos bivalvos son extraídas en ácido acético nun baño con auga en ebulición. Todos os compostos solubles en auga incluíndo ás toxinas serán extraídos. Cada extracto é purificado (*clean-up*) mediante columnas C18 de extracción en fase sólida (SPE). Tras a oxidación con peróxido de hidróxeno e periodato, estes extractos son analizados mediante cromatografía líquida (HPLC) con detección fluorescente. Varios análogos como STX, C1/2, dcGTX2,3, GTX5 e GTX 2/3 poden ser cuantificados tras a primeira purificación dos extractos coa columna C18. Aqueles extractos que conteñan NEO, dcNEO, GTX1/4, GTX6 (B2) e C3/4 deberán ser purificados e fraccionados mediante columnas de intercambio iónico SPE-COOH para realizar a cuantificación completa de todos os análogos de PSP incluídos en mostras contaminadas. As concentracións de toxinas PSP son calculadas mediante a interpolación da área do pico cromatográfico da mostra na curva de calibración das solucións estándar para obter a concentración final da toxina no extracto da mostra.

3.4.2. Extracción

Extraéronse as toxinas de dúas mostras distintas de moluscos, cada mostra por triplicado. Para cada mostra pesáronse $5 \pm 0,1\text{g}$ de tecido homoxeneizado en tres tubos de centrífuga de 50 mL. A continuación, engadíronselle a cada tubo 3 mL da solución de ácido acético 1% (v/v) para despois axitarse durante dous minutos nun vortex. Seguidamente,

introducíronse as mesturas nun baño con auga en ebulición, cas mostras por debaixo da liña da auga, durante 5 minutos. Tras pasar os 5 minutos, retiráronse do baño e deixáronse atemperar para logo volveras a axitar nun vortex por dous minutos. Posteriormente, centrifugáronse as mostras a 3600 x g durante dez minutos, tras os cales, transferíuselles o sobrenadante resultante a tubos *Falcon*™ de 15 mL. Co pellet xerado na centrifugación volvéronse a engadir 3 mL de ácido acético 1% (v/v) para repetir o mesmo proceso de extracción agás co baño en auga en ebulición. Ambos sobrenadantes das dúas extraccións combináronse no mesmo tubo para despois axustarse o volume a 10 mL con auga ultra pura.

3.4.3. Purificación

Cada un dos extractos obtidos anteriormente foron purificados mediante o emprego de tres columnas de extracción en fase sólida SPE C18 (Supelco, Sigma-Aldrich) por extracto, obtendo 3 réplicas purificadas por cada réplica da extracción, 9 extractos purificados en total.

Previamente á purificación dos extractos, acondicionáronse as columnas con 6 mL de metanol e despois con 6 mL de auga ultra pura. Tras o acondicionamento cargouse 1 mL de extracto de cada réplica por columna e recolleuse o eluído nun tubo de propileno de 15 mL. A continuación cargáronse 2 mL de auga ultra pura para o lavado da columna, que se combinaron co eluído recollido anteriormente. O caudal xerado nas columnas axustouse a 1 mL/min sen deixar que a columna se secase.

A cada extracto purificado axustóuselle o pH a $6,5 \pm 0,2$ con NaOH 0,1 e 0,2 M e ácido acético 0,1 M para finalmente axustar o volume final a 4 mL. Posteriormente, todos os extractos foron filtrados mediante o emprego de filtros PVDF de 0,45 μm (Millipore).

Alícuotas destes extractos purificados foron as empregadas na oxidación con ácido periódico para realizar o *screening* e a semicuantificación de ambas mostras. Así mesmo, tamén se oxidaron alícuotas con peróxido de hidróxeno para determinar a concentración das toxinas non hidroxiladas. Ademais, tamén se analizaron alícuotas destes extractos sen oxidar para verificar que os picos cromatográficos que se atopan nos cromatogramas son debidos a presenza de toxinas PSP e non á presenza de moléculas fluorescentes naturais.

3.4.4. Fraccionamento

O fraccionamento das mostras purificadas soamente se leva a cabo cando os extractos son positivos na presenza de toxinas hidroxiladas despois da purificación coas columnas C18 e cando o obxectivo é a cuantificación completa das mostras. Por tanto, non é necesario cando o obxectivo é o emprego do método no *screening* e para análises semicuantitativas.

Para levar a cabo o fraccionamento empregáronse columnas SPE-COOH de intercambio iónico, as cales permiten a separación das toxinas en diferentes fraccións en base a súa carga formal (Táboa 5).

Neutras	Carga +1	Carga +2
C1	GTX1/4	SXT
C2	GTX2/3	dcSXT
C3	GTX5 (B1)	NEO
C4	GTX6 (B2)	dcNEO
	dcGTX2/3	

Táboa 5. Clasificación das toxinas PSP en función da súa carga formal nas posicións R1 e R2.

Inicialmente acondicionáronse as columnas con 10 mL de acetato de amonio a 0,01 M, que se desbotaron tras seren eluídos, para despois cargar 2 mL de cada extracto purificado por columna, que foron recollidos nun tubo de 15 mL correspondente á fracción 1. Realizouse un lavado con 4 mL de auga ultra pura que foron recollidos no mesmo tubo da fracción 1. De estar presentes, esta fracción contería as toxinas neutras (C1, C2, C3 e C4).

A continuación, para obter a fracción 2 cargáronse 4 mL da solución de NaCl 0,05 M na mesma columna na que se recolleu a fracción 1, para obter 4 mL de eluído nun tubo de 15 mL marcado como fracción 2. De estar presentes, nesta fracción atoparíanse as toxinas con carga +1 (GTX1/4, GTX2/3, GTX5, GTX6 e dcGTX2/3). Por último, engadíronse 5 mL da solución de NaCl 0,3 M. Os 5 mL eluídos recolléronse noutro tubo de polipropileno de 15 mL correspondente coa fracción 3. Nesta fracción atoparíanse as toxinas con maior carga (STX, NEO, dcSTX, dcNEO). O caudal nas columnas axustouse a 1 mL/min en todo momento sen deixar que a columna se secase.

Obtivéronse 3 fraccións por cada unha das 9 réplicas resultantes da purificación na columna SPE-C18, obtendo por tanto 9 réplicas da fracción 1, 9 da fracción 2 e 9 da fracción 3. Todas estas fraccións foron filtradas mediante filtros PVDF de 0,45 μ m (Millipore).

Alícuotas destes extractos foron as empregadas para a súa oxidación con ácido periódico co fin de realizar a cuantificación completa das toxinas PSP presentes na mostra.

3.4.5. Reaccións de derivatización pre-columna

As reaccións de derivatización leváronse a cabo mediante o emprego de dous compostos oxidantes, o ácido periódico e o peróxido de hidróxeno. Ambos compostos converten aos diferentes análogos da saxitoxina en compostos derivados das purinas con capacidade para emitir fluorescencia e poder ser detectados e cuantificados *a posteriori*.

- *Oxidación con ácido periódico.*- Para as oxidacións con periodato transferíronse a un tubo Eppendorf™ de 1,5 mL 100 µL de cada unha das diferentes réplicas ou da solución estándar e 100 µL de modificador de matriz, que se axitaron mediante vórtex. A continuación engadíronse 500 µL da solución de periodato, axitouuse a mestura nun vórtex e deixouse actuar a reacción durante un minuto. Tras finalizar o minuto, parouse a reacción engadindo 5 µL de ácido acético glacial e mesturando cun vortex.
- *Oxidación con peróxido de hidróxeno.*- Para as oxidacións con peróxido transferíronse a un tubo Eppendorf™ de 1,5 mL 25 µL da solución de peróxido de hidróxeno 10 % (v/v) e 250 µL da solución de NaOH 1 M, que se axitaron nun vortex para despois engadir 100 µL das diferentes réplicas ou das solucións estándar. Tras a adición da mostra ou dos estándares, axitouuse a mestura inmediatamente permitindo a reacción de oxidación durante 2 minutos tras os cales se engadiron 20 µL de ácido acético glacial para parar a reacción.

As solucións estándar oxidáronse para obter as curvas de calibrado coas que determinar a concentración das toxinas presentes nas mostras. Ademais, co fin de evitar unha mala interpretación dos datos pola presenza de compostos fluorescentes naturais da matriz, por cada réplica oxidada seguiuuse o mesmo protocolo de oxidación noutra alícuota pero substituíndo ó periodato e peróxido de hidróxeno das solucións oxidantes por auga ultra pura.

Tanto as solucións oxidadas con periodato como con peróxido teñen unha estabilidade de 8 horas e previamente á introdución no sistema HPLC/FLD filtráronse todas as alícuotas mediante filtros de membrana PVDF de 0,45µm (Millipore). Finalmente, as mostras oxidadas e as non oxidadas introducíronse en viais ámbar con rosca (Agilent) para comezar co seu análise.

3.4.6. Cálculos

Tras a análise do HPLC/FLD empregáronse os picos cromatográficos xerados nos cromatogramas para a identificación e cuantificación das toxinas.

A identificación levouse a cabo mediante a comparación entre os tempos de retención dos estándares oxidados e os tempos de retención das mostras oxidadas. Tamén se identificou a presenza ou ausencia de picos cromatográficos correspondentes a fluorescentes naturais mediante a comparación entre as mostras oxidadas e as non oxidadas. Así mesmo, para a correcta identificación, foi necesaria a presenza de todos os picos cromatográficos dos produtos de oxidación propios de cada toxina (Táboa 3).

A cuantificación das diferentes toxinas realizouse mediante a interpolación da área asociada a cada pico cromatográfico na curva de calibrado realizada cos estándares certificados de referencia.

Malia que algunhas das toxinas producen máis de 1 produto de oxidación soamente un deses picos permiten unha correcta cuantificación. Para a cuantificación de dcSTX empregouse o segundo na oxidación coa solución de ácido periódico e o primeiro coa de peróxido, mentres que para a de dcGTX2/3 foi o segundo o usado na cuantificación tras ser oxidado co ácido periódico. Na cuantificación de NEO, GTX1/4 e GTX6 empregouse o segundo pico. Para a cuantificación de dcNEO utilizouse o primeiro na oxidación coa solución de periodato.

Sen embargo, diversos produtos de oxidación das toxinas coeluen ao mesmo tempo de retención dificultando tanto a súa identificación como a posterior cuantificación total. Ademais, algúns aparecen na mesma fracción tras o fraccionamento como é o caso dos produtos de oxidación de dcSTX e dcNEO. Dous escenarios son posibles segundo a presenza ou ausencia de dcSTX para a cuantificación de ambas, mais so se seguiu un debido á presenza de dcSTX en ambas mostras.

Tras a detección dos picos cromatográficos correspondentes aos produtos de oxidación de dcSTX co peróxido, comparouse o ratio entre os dous picos producidos na oxidación con ácido periódico da posible coelución de dcSTX/dcNEO co ratio entre os picos xerados na oxidación con mesmo oxidante do estándar de referencia de dcSTX. Ao ser tales ratios coincidentes, asumíuse a presenza de dcSTX e a súa cuantificación realizouse mediante a interpolación da área do primeiro pico da oxidación con peróxido na curva de calibración realizada cos estándares.

Para a obtención da concentración das toxinas en $\mu\text{M}/\text{kg}$ de tecido de molusco aplicouse a seguinte fórmula:

$$\text{Concentración de toxina, } \mu\text{M}/\text{kg} = C_x (\mu\text{M}) \times \frac{V (\text{mL})}{\text{mH}(\text{g})} \times D_f$$

onde C_x = concentración en μM da toxina no extracto analizado tras a interpolación da área do pico cromatográfico coa curva de calibrado; V = volume final do extracto (10 mL); mH = masa en g da mostra susceptible de ser extraída, purificada e fraccionada; D_f = factores de dilución derivados dos procesos de extracción en fase sólida, 4 para aquelas toxinas cuantificables na purificación, 8 naquelas cuantificables na fracción 2 do fraccionamento e 10 naquelas soamente cuantificables na fracción 3 do fraccionamento.

Para a obtención da toxicidade total da mostra calculouse inicialmente a toxicidade de cada análogo de PSP por separado seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Toxicidade por toxina, } \mu\text{g STXeq}/\text{kg} = (C_x (\mu\text{M}) \times \text{TEF}) \times \text{MM} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times \frac{V (\text{mL})}{\text{mH}(\text{g})} \times D_f$$

onde C_x = concentración en μM da toxina no extracto analizado tras a interpolación da área do pico cromatográfico coa curva de calibrado; TEF = factor equivalente de toxicidade propio de cada toxina establecido pola EFSA; MM = masa molecular da saxitoxina (372,2 g/mol); V = volume final do extracto (10 mL); mH = masa en g da mostra susceptible de ser extraída, purificada e fraccionada; D_f = factores de dilución xa mencionados.

Unha vez calculados os valores da toxicidade de cada toxina obtívose a toxicidade total en $\mu\text{g STX eq}/\text{kg}$ mediante a suma de todas as toxicidades individuais.

4. RESULTADOS E DISCUSIÓN

Dúas mostras de mexillón contaminadas e con diferentes perfís tóxicos foron analizadas neste estudo seguindo o Método AOAC 2005.06. Ambas mostras xa homoxeneizadas pertencían ao Laboratorio Europeo de Referencia de Biotoxinas Mariñas, EURLMB, e permanecían conservadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Cada unha das mostras foi extraída por triplicado e de cada extracto purificáronse 3 réplicas (n = 9). Estas 9 réplicas purificadas foron analizadas mediante HPLC/FLD para obter co *screening* e a semicuantificación as estimacións das concentracións das toxinas e da toxicidade das mostras. Posteriormente, cada unha das 9 réplicas foron fraccionadas (27 viais, 9 réplicas por fracción) para determinar a concentración total de toxinas e a toxicidade real da mostra. A toxicidade real da mostra comparouse coa toxicidade estimada da semicuantificación para obter o ratio da sobreestimación.

4.1. Mostra 1

4.1.1. Resultados da semicuantificación (*screening*)

Para a obtención dos resultados da semicuantificación comparáronse os tempos de retención dos produtos de oxidación das 9 réplicas purificadas nas columnas SPE-C18 cos tempos de retención dos produtos de oxidación das toxinas GTX1/4, C1/2, dcSTX, GTX2/3, GTX 5 e STX, incluídas no *MIX screening*, tras a oxidación coa solución de ácido periódico. Así, debido a coelución baixo o mesmo tempo de retención entre os produtos dos diferentes análogos das toxinas (Táboa 6) asumíuse a presenza na mostra dos análogos máis tóxicos.

Superposición de picos (coelución)	Toxinas de referencia para a semicuantificación	TEF asociado á toxina de referencia
GTX1/4 dcGTX2/3 C3/4	GTX1/4	1
C1/2 GTX6 (B2) (primeiro pico) NEO (primeiro pico)	C1/2	0,1
NEO (segundo pico) GTX6 (B2) (segundo pico) dcNEO (segundo pico) dcSTX	dcSTX	1
GTX2/3 GTX1/4 (terceiro pico) C3/4 (terceiro pico)	GTX2/3	0,6
GTX5	GTX5 (B1)	0,1
NEO (terceiro pico) GTX6 (terceiro pico) STX	STX	1

Táboa 6. Toxinas de referencia empregadas na semicuantificación e picos cromatográficos de produtos de oxidación de outras toxinas que poidan coeluir tras a súa oxidación coa solución oxidante de periodato.

Tras a identificación das toxinas segundo os tempos de retención dos produtos de oxidación obtivéronse as concentracións dos análogos de PSP (Táboa 7), presuntamente presentes na mostra, resultantes da interpolación coa curva de calibrado obtida da oxidación do *MIX screening* cos estándares de referencia.

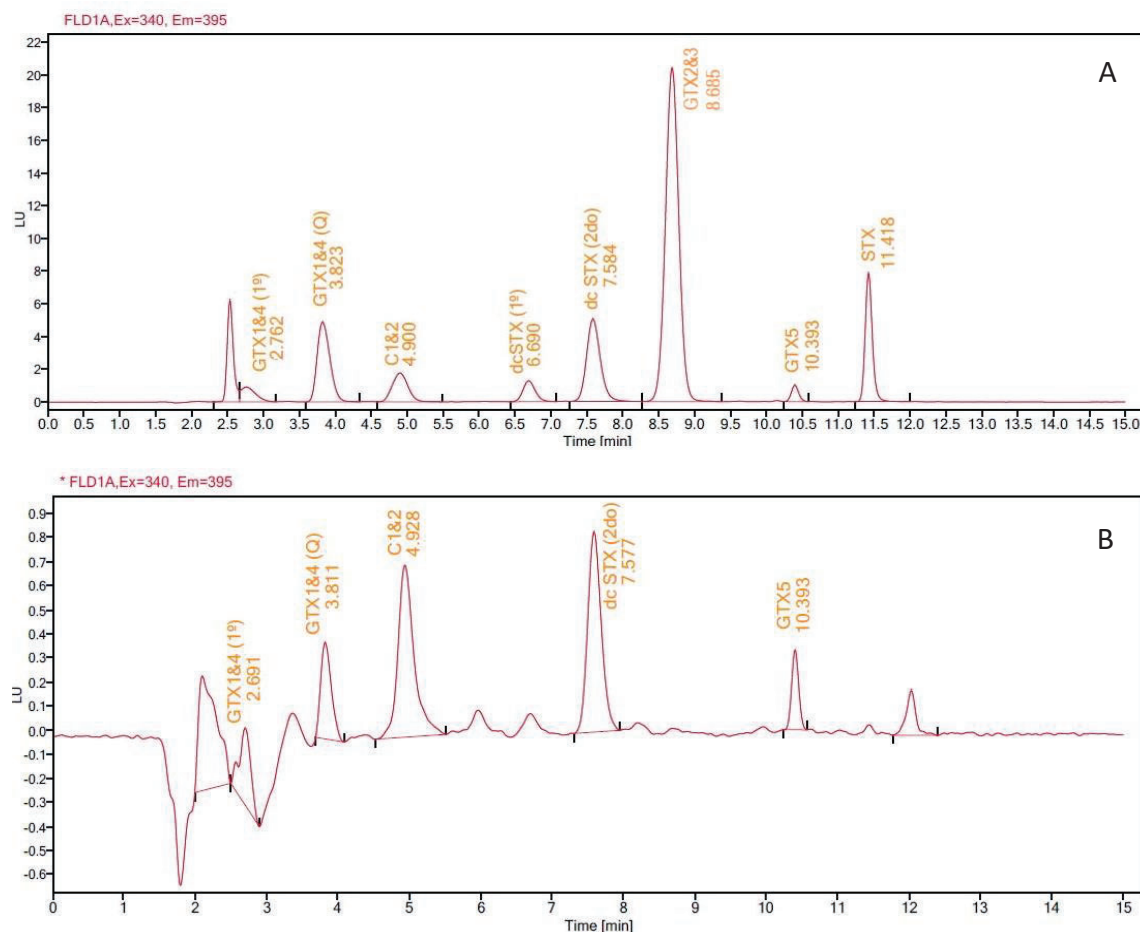


Figura 2. (A) Cromatograma do estándar *MIX screening* oxidado coa solución de ácido periódico. (B) Cromatograma da mostra 1 tras ser purificada coas columnas SPE-C18 e oxidada co mesmo oxidante.

Toxinas PSP	GTX1/4	C1/2	dcSTX	GTX5
Media ($\mu\text{mol/kg}$)	<LOQ	4,05	1,14	2,93
Desv. Estándar ($\mu\text{mol/kg}$)	-	0,36	0,14	0,51
RSD (%)	-	8,8	12,7	17,2

Táboa 7. Datos obtidos na semicuantificación das 9 réplicas da mostra 1 tras a purificación coas columnas SPE-C18.

Os resultados da semicuantificación obtidos da oxidación das 9 réplicas indicaron concentración variables para C1/2 dcSTX e GTX5 así como a presenza de GTX1/4 cunha concentración inferior ao límite de cuantificación ($< 0,864 \mu\text{mol/kg}$, ver Táboa 4), e polo tanto, non cuantificable. Non se detectou a presenza de SXT. Os valores da desviación estándar relativa pese a ser algo elevados entraron dentro do rango de valores de reproducibilidade aceptables ($\text{RSD} < 20\%$). Estes valores poden estar relacionados con variables dificilmente estandarizables como o mantemento do mesmo caudal durante a extracción en fase sólida en todas as columnas C18, ou con lixeiras variacións no tempo de inicio e parada nas oxidacións.

A partir das concentracións mostradas anteriormente calculouse a toxicidade equivalente de saxitoxina de cada un dos análogos presentes na mostra coa que se obtivo a semicuantificación da toxicidade total (Táboa 8).

Nº de réplicas	9
Toxicidade total ($\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$)	682,77
Desv. Estándar ($\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$)	79,51
RSD (%)	11,6
Intervalo de confianza ($t=0,975;8$)	$\pm 61,11$

Táboa 8. Datos da toxicidade total obtidos na semicuantificación da Mostra 1 tras a súa purificación coas columnas SPE-C18.

Aplicando o enfoque semicuantitativo a toxicidade total da mostra foi $682,77 \mu\text{g STX2HCl eq/kg}$. A partir do erro estándar da media mostral determinouse o intervalo de confianza de $\pm 61,11 \mu\text{g STX2HCl eq/kg}$ entre o que se atopa o valor verdadeiro da media poboacional. A desviación estándar relativa demostrouse dentro do valor aceptable ($\text{RSD} < 20\%$).

4.1.2. Resultados da cuantificación total

Os resultados da cuantificación total das toxinas da mostra 1 foron obtidos tras a súa oxidación con peróxido de hidróxeno e o posterior fraccionamento dos extractos purificados permitindo a separación dos análogos de PSP en diferentes fraccións segundo a súa carga formal (Táboa 4).

Do mesmo modo que na semicuantificación, a determinación das toxinas realizouse mediante a interpolación das áreas dos picos cromatográficos cuantitativos que aparecían tanto nas replicas purificadas, no caso das toxinas non hidroxiladas, como cos picos de cada fracción coa curva de calibrado creada cos estándares certificados que conformaban os diferentes stocks de mesturas.

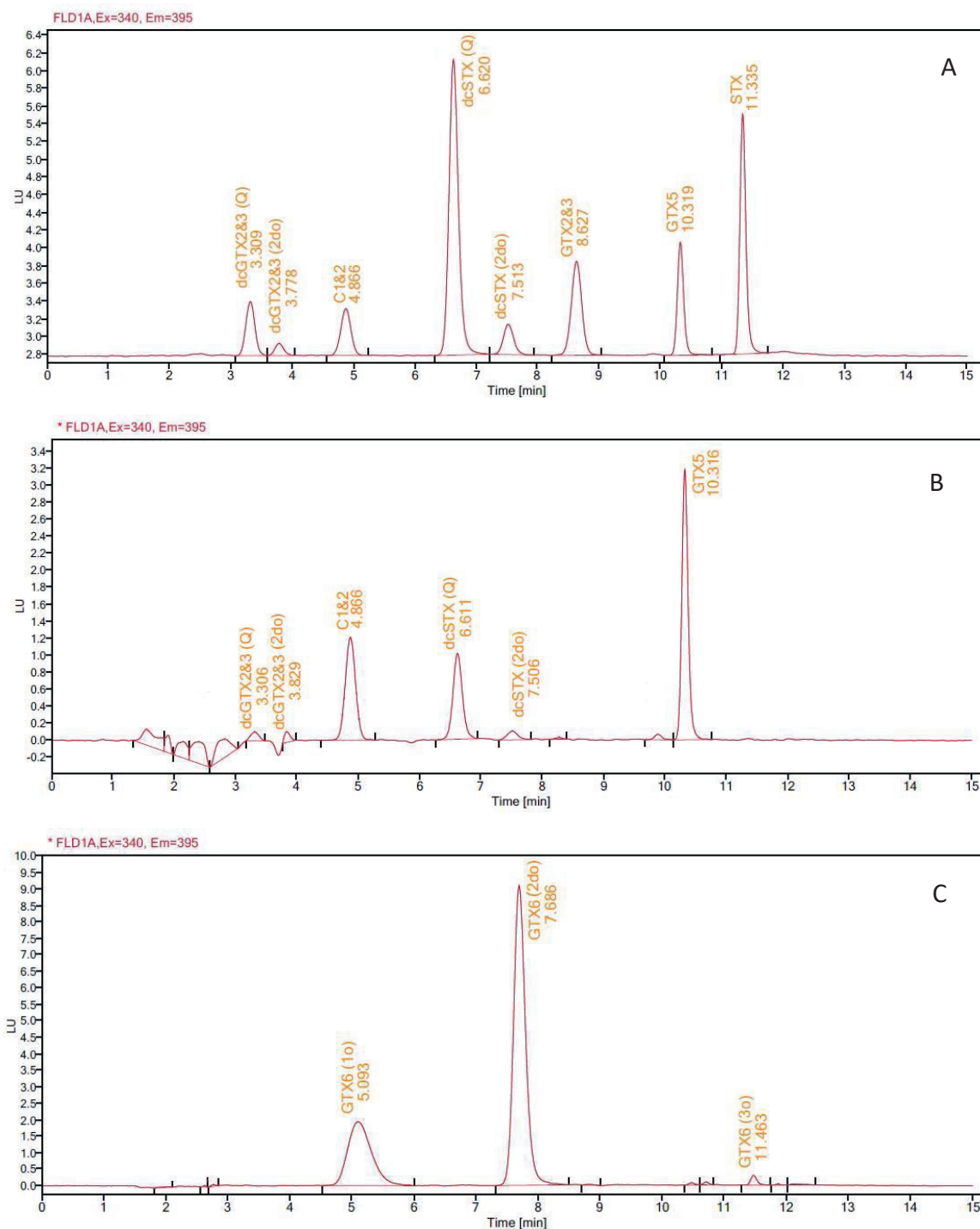


Figura 3. (A) Cromatograma do estándar MIX I oxidado con peróxido de hidróxeno. (B) Cromatograma da mostra 1 purificada coas columnas SPE-C18 tras ser oxidada con peróxido de hidróxeno. (C) Cromatograma do estándar MIX V (GTX6) oxidado coa solución de ácido periódico.

Toxinas PSP	dcGTX2/3	C1/2	dcSTX	GTX5	GTX6
Media ($\mu\text{mol/kg}$)	<LOQ	2,38	0,45	2,88	<LOQ
Desv. Estándar ($\mu\text{mol/kg}$)	-	0,15	0,02	0,14	-
RSD (%)	-	6,5	5,1	4,7	-

Táboa 9. Datos obtidos a partir da oxidación con peróxido de hidróxeno dos 9 extractos purificados e da oxidación coa solución de periodato das fraccións obtidas no fraccionamento coas columnas SPE-COOH dos mesmos extractos da Mostra 1.

Analizáronse as 9 réplicas purificadas para a determinación das toxinas non hidroxiladas e 9 réplicas de cada unha das tres fraccións correspondentes co fraccionamento das 9 réplicas purificadas. Determináronse as toxinas C1/2, dcSTX e GTX5 nas concentracións que aparecen na Táboa 9. A concentración das tres toxinas obtívose mediante a interpolación dos produtos de oxidación xerados na oxidación coa solución de peróxido na curva de calibrado creada coa oxidación co mesmo oxidante do MIX I (Fig. 3.A, 3.B). Pola contra, malia ser detectadas dcGTX2/3 e GTX6 non se determinou a súa concentración ó atoparse por debaixo do seu LOQ. Por un lado, a concentración de dcGTX2/3 foi inferior a $1,18728 \mu\text{mol/kg}$, o límite para a súa cuantificación e no caso de GTX6 non se conseguiu a súa cuantificación completa ao non apareceren a totalidade dos seus picos cromatográficos nos tempos de retención correspondentes cos seus produtos de oxidación (Fig. 3.C). Tratáronse os datos como aceptables ao estar por debaixo do límite de reproducibilidade (RSD <20%).

Resultado da cuantificación total de cada un dos análogos antes mencionados, calculouse a toxicidade equivalente de cada un deles para determinar a toxicidade total da mostra (Táboa 10).

Nº de replicas por fracción	9
Toxicidade total ($\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$)	364,13
Desv. Estándar ($\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$)	17,41
RSD (%)	4,8
Intervalo de confianza ($t=0,975;8$)	$\pm 13,38$

Táboa 10. Datos da toxicidade total da Mostra 1 obtidos tras o fraccionamento coa columnas SPE-COOH e a cuantificación total.

A toxicidade total da mostra aplicando o método para conseguir a súa cuantificación completa foi de $364 \mu\text{g STX2HCl eq/kg}$. Esta toxicidade total resultou da media das

toxicidades totais das 9 réplicas fraccionadas, polo que o valor verdadeiro oscila entre os $364 \pm 13,38 \mu\text{g STX2HCl eq/kg}$. Cunha RSD = 4,8% aceptáronse os datos.

4.1.3. Comparativa entre as cuantificacións

A semicuantificación e a cuantificación amosaron diferencias, como era esperable, tanto na determinación da concentración dos análogos de PSP presentes na mostra como, consecuentemente, da toxicidade da mesma (Táboas 11, 12). Na semicuantificación, por comparación cos estándares do MIX *screening* asúmese a presenza de GTX1/4, análogo cun valor TEF de 1, mentres que na cuantificación total esta toxina non aparece e incluso se detecta dcGTX2,3, análogo que coelúe baixo o mesmo tempo de retención e que ten un valor TEF por debaixo da metade (TEF = 0,4). No caso de C1/2, redúcese significativamente a concentración para a cuantificación total. Isto pode ser debido a coelución na semicuantificación de C1/2 co primeiro produto de oxidación de GTX6 ao oxidarse co ácido periódico. Esta coelución evitouse mediante o fraccionamento, xa que ambas toxinas aparecen en fraccións diferentes. De xeito semellante tamén ocorreu unha sobreestimación da concentración de dcSTX na semicuantificación debido á coelución do seu segundo produto de oxidación co segundo da oxidación de GTX6 tras a oxidación de ambos co ácido periódico. Este segundo produto de oxidación de GTX6, e por tanto, segundo pico cromatográfico correspóndese co pico empregado na súa cuantificación e produce unha sinal intensa. Sen embargo, malia que este segundo pico xere unha intensidade elevada non se puido calcular a concentración de GTX6 pola ausencia nos cromatogramas do terceiro pico correspondente coa oxidación coa solución de ácido periódico. A cuantificación de GTX5 en ambos enfoques é semellante xa que ningún produto de oxidación das toxinas analizadas coelúe con ela.

Toxinas PSP	GTX1/4	dcGTX2/3	C1/2	dcSTX	GTX6	dcNEO	GTX5
Media semicuantificación ($\mu\text{mol/kg}$)	<LOQ		4,05	1,14			2,93
Media cuantificación ($\mu\text{mol/kg}$)	ND*	<LOQ	2,38	0,45	<LOQ	ND	2,88

Táboa 11. Comparación entre ambos protocolos de cuantificación para cada unha das toxinas en $\mu\text{mol/kg}$. O segundo pico cromatográfico de GTX6 é o empregado para a súa cuantificación. *ND= non detectado.

	Toxicidade total ($\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$)
Semicuantificación	682,77
Cuantificación completa	364,13
Ratio de sobreestimación	1,88

Táboa 12. Comparación entre as toxicidades totais outorgadas por ambos métodos de cuantificación e o ratio de sobreestimación resultante da semicuantificación.

Estas diferencias na determinación das concentracións das distintas toxinas provocan a diferenza entre ambas toxicidades totais na mesma mostra. O valor que outorga a semicuantificación é $117 \mu\text{g STX2HCl eq/kg}$ menor que o límite legal establecido pola EFSA e sobreestima a toxicidade real da mostra 1,88 veces. Isto indica que baixo un posible valor límite de $600 \mu\text{g STX eq/kg}$ como resultado da semicuantificación non sería necesario realizar a cuantificación completa xa que asúmese que o valor real de toxicidade sería inferior e manteríase baixo todo momento a seguridade do consumidor.

4.2. Mostra 2

4.2.1. Resultados da semicuantificación (*screening*)

Do mesmo modo que na mostra 1, os datos da semicuantificación (Táboa 13) obtivéronse tras a oxidación coa solución de ácido periódico das 9 réplicas purificadas nas columnas SPE-C18 da mostra 2 e do MIX *screening*, a solución estándar composta por GTX1/4, C1/2, dcSTX, GTX2/3, GTX 5 e STX. Para a identificación das toxinas comparáronse os tempos de retención dos produtos de oxidación das toxinas cos tempos de retención dos produtos de oxidación das toxinas da solución estándar (Fig. 4). As áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos produtos oxidados das toxinas nas mostras interpoláronse na curva de calibración, feita a partir da oxidación da solución MIX *screening* a diferentes concentracións, coa que se obtiveron as concentracións das toxinas.

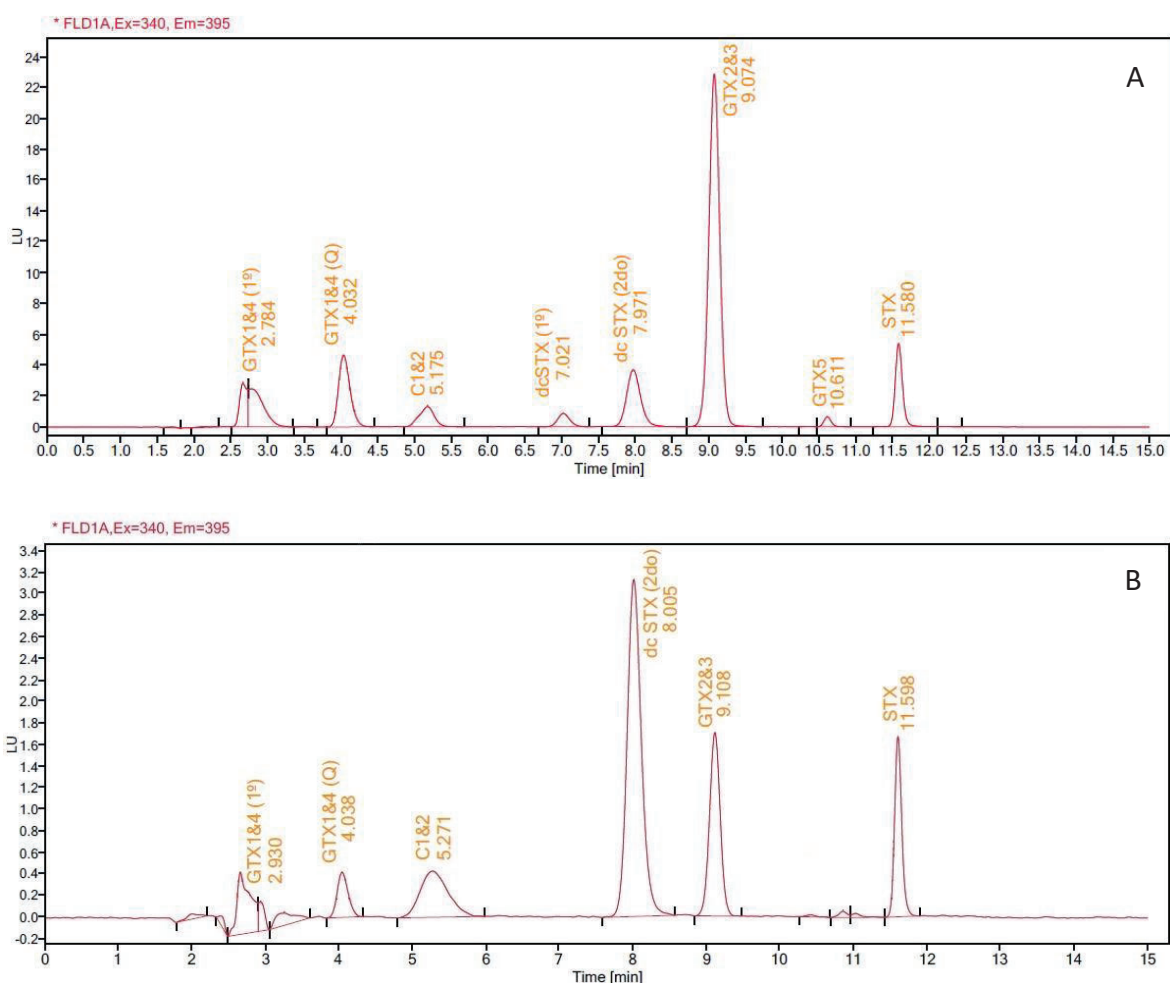


Fig 4. (A) Cromatograma do estándar MIX *screening* oxidado coa solución de ácido periódico. (B) Cromatograma da mostra 2 tras ser purificada coas columnas SPE-C18 oxidada co mesmo oxidante.

Toxinas PSP	GTX1/4	C1/2	dcSTX	GTX2/3	STX
Media ($\mu\text{mol/kg}$)	0,89	6,36	7,97	0,61	2,83
Desv. Estándar ($\mu\text{mol/kg}$)	0,03	0,27	0,22	0,01	0,08
RSD (%)	3,0	4,2	2,7	2,3	2,9

Táboa 13. Datos obtidos na semicuantificación das 9 réplicas purificadas coas columnas SPE-C18 da mostra 2 tras o análise por HPLC/FLD

Os datos obtidos tras o análise por HPLC/FLD da oxidación das 9 réplicas para a semicuantificación amosaron concentracións variables para GTX1/4, C1/2, dcSTX e GTX2/3 e STX, sen embargo non se detectou a presenza de GTX5 (Fig. 4B). Ademais, reducíronse os valores da desviación estándar relativa en relación cos da semicuantificación da mostra 1, posiblemente debido a unha maior experiencia no control dos equipos e das

variables implicadas na extracción en fase sólida coas columnas C18 así como dos tempos de oxidación.

A partir das concentracións obtidas na semicuantificación das toxinas calculouse a toxicidade total da mostra en base ás toxicidades equivalentes de cada un dos análogos de PSP (Táboa 14).

Nº de réplicas	9
Toxicidade total ($\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$)	4719,67
Desv. Estándar ($\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$)	114,52
RSD (%)	2,4
Intervalo de confianza ($t=0,975;8$)	$\pm 88,03$

Táboa 14. Datos da toxicidade total obtidos na semicuantificación da Mostra 1 tras a súa purificación coas columnas SPE-C18

A elevada toxicidade da mostra, de 4719,67 $\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$ foi a esperable debido a dous factores. Por un lado, á elevada concentración das toxinas e, por outro, a que tres das cinco toxinas que aparecen na mostra, GTX1/4, dcSTX e STX, presentan factores equivalentes de toxicidade iguais a 1. A partir do erro estándar da media mostral determinouse o intervalo de confianza de 4719,67 \pm 88,03 $\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$ entre o que se atopa o valor verdadeiro da media poboacional. Cun valor de desviación estándar relativa de 2,4 % aceptouse a reproducibilidade da toxicidade entre as réplicas (RSD < 20%).

4.2.2. Resultados da cuantificación total

Os resultados da cuantificación total das toxinas da mostra 2 foron obtidos coa oxidación con peróxido de hidróxeno das 9 réplicas purificadas e co tratamento con ácido periódico das 9 réplicas obtidas de cada unha das tres fraccións a partir do fraccionamento da mostra coas columnas SPE-COOH (Táboa 15), separando os análogos de PSP segundo a súa carga formal en diferentes fraccións.

Toxinas PSP	GTX1/4	NEO	GTX2/3	GTX6	STX
Promedio ($\mu\text{mol/kg}$)	1,30	2,66	0,88	<LOQ	0,320
Desv. Estándar ($\mu\text{mol/kg}$)	0,03	0,15	0,03	-	0,003
RSD (%)	2,2	5,6	3,9	-	0,8

Táboa 15. Datos obtidos a partir do fraccionamento coas columnas SPE-COOH de cada un dos 9 extractos purificados da Mostra 2.

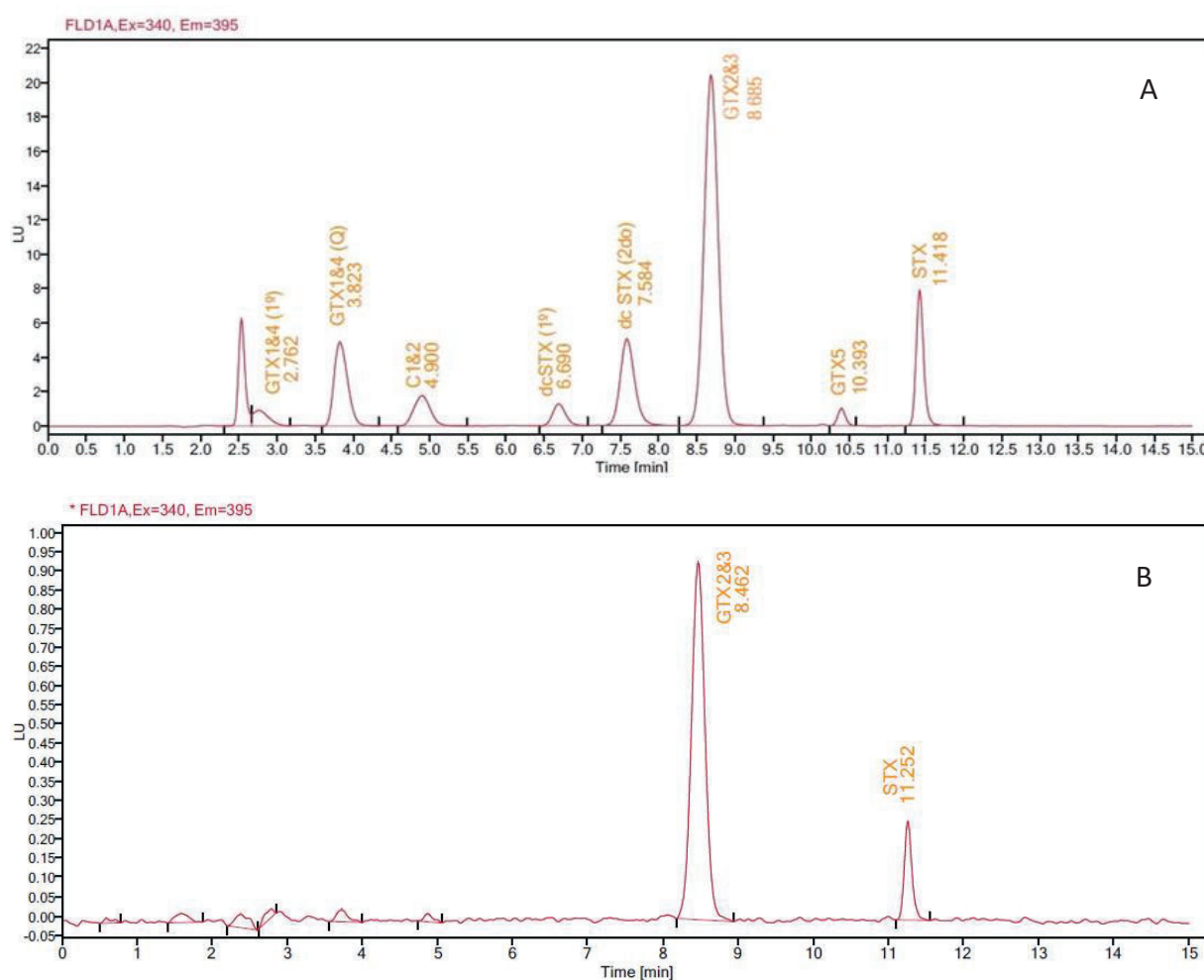


Figura 5. (A) Cromatograma do estándar MIX I oxidado con peróxido de hidróxeno. (B) Cromatograma da mostra 2 purificada coas columnas SPE-C18 tras ser oxidada con peróxido de hidróxeno.

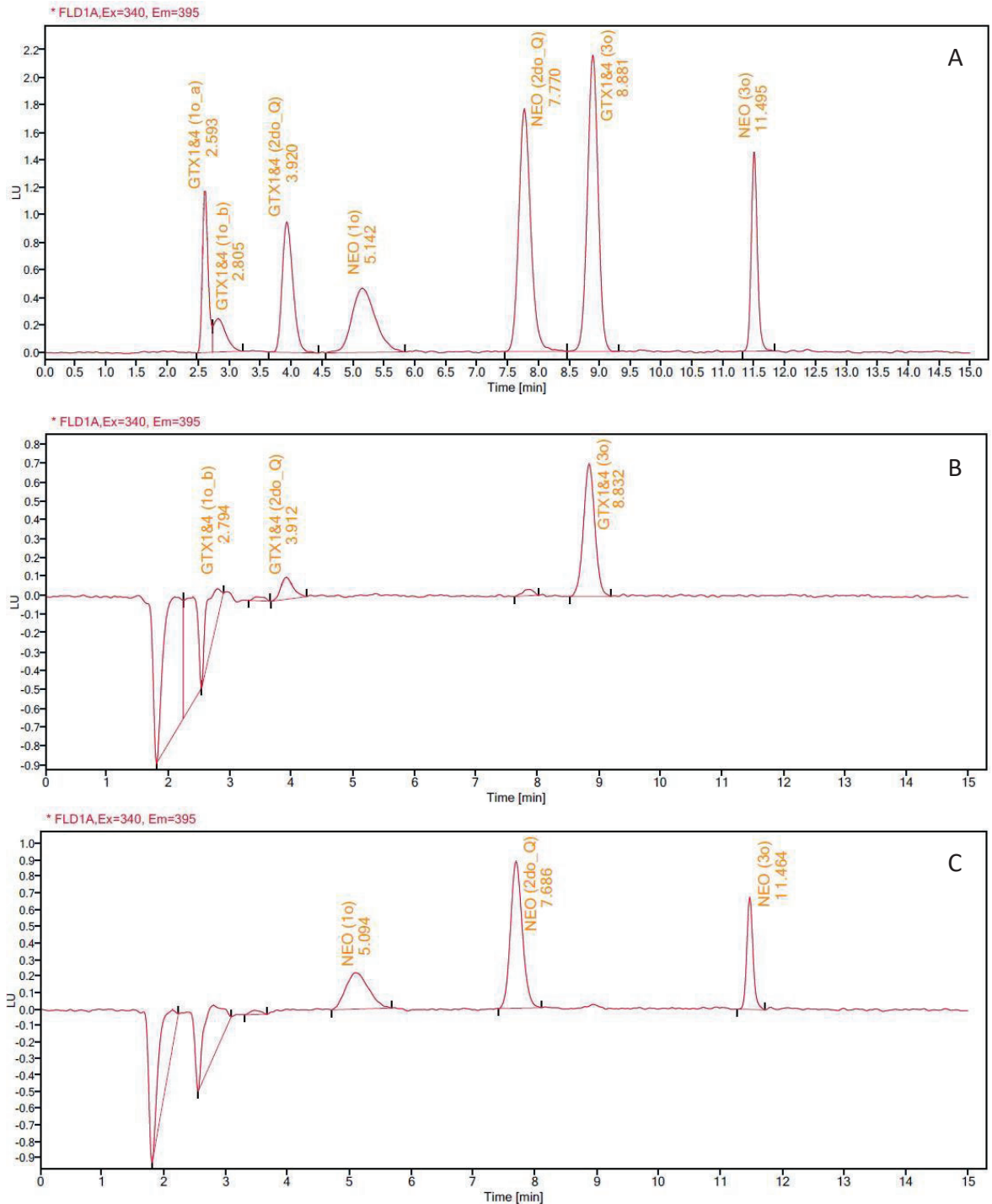


Figura 6. (A) Cromatograma do estándar MIX II oxidado coa solución de ácido periódico. (B) Cromatograma da fracción dúas da mostra 2 fraccionada coas columnas SPE-COOH tras ser oxidada coa solución de ácido periódico. (C) Cromatograma da fracción tres da mostra 2 fraccionada coas columnas SPE-COOH tras ser oxidada coa solución de ácido periódico.

Coa oxidación con peróxido de hidróxeno dos extractos purificados determinouse a concentración de STX e de GTX2/3 mediante a interpolación das áreas dos seus respectivos picos cromatográficos (Fig. 5B), xa que ambas toxinas xeran soamente un produto de

oxidación tras ser oxidadas con peróxido de hidróxeno, na curva de calibrado realizada coa oxidación do MIX I co mesmo oxidante (Fig. 5A).

Así mesmo, analizáronse 9 réplicas de cada unha das tres fraccións correspondentes co fraccionamento das 9 réplicas purificadas. Determináronse as toxinas GTX1/4 e NEO nas concentracións que aparecen na táboa anterior. A concentración de GTX1/4 e de NEO obtívose mediante a interpolación dos produtos de oxidación xerados na oxidación coa solución de ácido periódico da fracción 2 e 3 (Fig. 6B, 6C) coa curva de calibrado producida pola oxidación do MIX II co mesmo oxidante (Fig. 6A)

Pola contra, e do mesmo xeito que na mostra 1, detectouse a presenza de GTX6 na mostra mais a ausencia do terceiro produto de oxidación non permite a súa detección con precisión e exactitude. Aceptáronse os valores dos resultado xa que a desviación estándar relativa entre réplicas mantívose moi por debaixo do 20%.

Toxinas PSP	GTX1/4	NEO	GTX2/3	GTX6	STX
Promedio (µmol/kg)	1,30	2,66	0,88	<LOQ	0,320
Desv. Estándar (µmol/kg)	0,03	0,15	0,03	-	0,003
RSD (%)	2,2	5,6	3,9	-	0,8

Táboa 15. Datos obtidos a partir do fraccionamento coas columnas SPE-COOH de cada un dos 9 extractos purificados da Mostra 2.

Tras obter a concentración de cada un dos análogos de PSP presentes na mostra, mediante o emprego dos seus factores de equivalencia propios de cada un calculouse a súa toxicidade equivalente a saxitoxina que, tras a suma de todos, proporcionou a toxicidade total da mostra que aparece na táboa 16.

Nº de réplicas	9
Toxicidade total (µg STX2HCl eq/kg)	1790,76
Desv. Estándar (µg STX2HCl eq/kg)	52,03
RSD (%)	2,9
Intervalo de confianza (t=0,975;8)	± 39,99

Táboa 16. Datos da toxicidade total obtidos na semicuantificación da Mostra 1 tras a súa purificación coas columnas SPE-C18.

A toxicidade total da mostra empregando o método para conseguir a súa cuantificación completa foi de 1790,76 $\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$. Esta toxicidade total resultou da media das toxicidades totais das 9 réplicas fraccionadas, polo que o valor verdadeiro oscila entre os $1790,76 \pm 39,99 \mu\text{g STX2HCl eq/kg}$. Como sucedeu na semicuantificación, a toxicidade foi bastante elevada xa que a 3 (GTX1,4, NEO e STX) dos 4 análogos de PSP determinados co enfoque cuantitativo correspóndenlle TEFs = 1. Cunha RSD = 3 % aceptáronse os datos da toxicidade entre as réplicas.

4.2.3. Comparación entre as cuantificacións

Como ocorreu na mostra 1, atopáronse diferenzas entre ambos protocolos de cuantificación á hora de determinar a concentración dos diferentes análogos de PSP e, por tanto, para asignar un valor de toxicidade total á mostra (Táboa 17).

Toxinas PSP	GTX1,4	C1,2	dcSTX	NEO	GTX6	GTX2,3	STX
Media semicuantificación ($\mu\text{mol/kg}$)	0,89	6,36	7,97			0,61	2,83
Media cuantificación total ($\mu\text{mol/kg}$)	1,30	ND*	ND	2,66	<LOQ*	0,88	0,32

Táboa 17. Comparación entre ambos protocolos de cuantificación para cada unha das toxinas en $\mu\text{mol/kg}$ na mostra 2. O segundo pico cromatográfico de GTX6 é o empregado para a súa cuantificación. *ND= non detectado; LOQ= límite de cuantificación

A concentración de GTX1/4 aumenta na cuantificación total en relación a semicuantificación. Isto pode ser debido á presenza de compostos endóxenos fluorescentes dependentes da matriz que dificultan a determinación das toxinas con análogos de oxidación que elúen a tempos de retención de entre o inicio da análise e o minuto 4.

Por outra parte, C1/2 e dcSTX malia ser determinadas na semicuantificación non foron detectadas na cuantificación total debido á presenza de NEO na mostra. A oxidación de NEO coa solución de ácido periódico produce 3 produtos de oxidación que coelúen: o primeiro con C1/2, o segundo con dcSTX e o terceiro co único pico cromatográfico que produce a oxidación de STX. Ademais, confírmase a presenza de NEO coa ausencia dos picos cromatográficos respectivos a C1/2 e a dcSTX tras a oxidación da mostra coa solución de peróxido (Figura 5B). De maneira semellante ocorre coa concentración de STX, menor na cuantificación total debido ao citado anteriormente. Tamén con GTX6, que pese a non

detectarse na semicuantificación, os produtos derivados da oxidación coa solución de ácido periódico coelúen cos respectivos produtos de NEO. Sen embargo, así como non se observou ningún produto de oxidación correspondente a C1/2 e dcSTX nas fraccións 1 e 3, si apareceron 2 dos 3 picos cromatográficos na fracción 2 correspondentes a GTX6, polo que non se puido determinar a súa concentración.

No caso de GTX2/3 as diferencias que se atopan entre concentracións poden deberse as diferentes eficacias na oxidación do mesma toxina entre os dous oxidantes empregados na semicuantificación e na cuantificación total.

As diferencias mencionadas na identificación e determinación das concentracións das distintas toxinas provocan as variacións entre ambas toxicidades totais na mesma mostra. Como se esperaba, a semicuantificación sobreestimou o valor da toxicidade real da mostra 2,63 veces. En comparación co ratio observado na mostra 1 parece que a medida que aumenta a toxicidade das mostras aumenta tamén o ratio de sobreestimación observado entre a semicuantificación e a cuantificación total.

	Toxicidade total ($\mu\text{g STX2HCl eq/kg}$)
Semicuantificación	4719,67
Cuantificación completa	1790,76
Ratio de sobreestimación	2,63

Táboa 18. Comparación entre as toxicidades totais outorgadas por ambos métodos de cuantificación e o ratio de sobreestimación resultante da semicuantificación.

Un valor tan alto na semicuantificación facía indicar que o valor real da mostra ía superar o límite legal de 800 $\mu\text{g STX eq/kg}$ establecido polo Parlamento Europeo e o Consello e que a mostra debía ser cuantificada totalmente. Por tanto, parece necesario propor un valor límite na semicuantificación que permita discernir entre mostras non perigosas para a saúde, que estean por debaixo de dito valor, daquelas posiblemente tóxicas, tendo en conta os diferentes perfís tóxicos asociados a afloramentos propios de cada rexión.

5. CONCLUSIÓNS

Os resultados obtidos permitiron concluír que o enfoque semicuantitativo é aplicable dentro do Método Oficial AOAC 2005.06, tamén coñecido como método de Lawrence, para

a análise de mostras contaminadas con toxinas paralizantes de moluscos. Este enfoque semicuantitativo facilita a análise de mostras naqueles laboratorios que empreguen o Método Oficial de forma rutineira e para un elevado número de mostras ao permitir a redución do número de mostras e do procedemento, correspondente á cuantificación total, naquelas mostras negativas na presenza de toxinas. Ademais, os datos obtidos na sobreestimación da toxicidade das mostras permiten aceptar a idoneidade de establecer un valor límite semicuantitativo inferior ó límite regulador establecido polo Parlamento Europeo e o Consello sen por en perigo a integridade do consumidor, simplificando o número de mostras con máxima seguridade e sen reducir a eficacia do control oficial.

5.1. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron concluir que el enfoque semicuantitativo es aplicable dentro del Método Oficial AOAC 2005.06, también conocido como método de Lawrence para el análisis de muestras contaminadas con toxinas paralizantes de moluscos. Este enfoque semicuantitativo facilita el análisis de muestras en aquellos laboratorios que empleen el Método Oficial de forma rutinaria y para un elevado número de muestras al permitir la reducción del número de muestras y del procedimiento, correspondiente a la cuantificación total, en aquellas muestras negativas a la presencia de toxinas. Además, los datos obtenidos en la sobreestimación de la toxicidad de las muestras permiten aceptar la idoneidad de establecer un límite semicuantitativo inferior al límite regulador establecido por el Parlamento Europeo y el Consejo sin poner en peligro la integridad del consumidor, simplificando el número de muestras con la máxima seguridad y sin reducir la eficacia del control oficial.

5.2. CONCLUSIONS

The results obtained led to the conclusion that the semi-quantitative approach is applicable within the AOAC Official Method 2005.06, also known as the Lawrence method for the analysis of samples contaminated with paralytic shellfish poison. This semi-quantitative approach facilitates the analysis of samples in those laboratories using the Official Method on a routine basis and for a large number of samples by allowing the reduction of the sample size and of the procedure, including in the total quantification, for those samples negative for the presence of toxins. In addition, the data obtained from the

overestimation of the toxicity of the samples allow to accept the suitability of establishing a semi-quantitative limit lower than the regulatory limit established by the European Parliament and the Council that does not endanger the integrity of the consumer by simplifying the number of samples with maximum safety and without reducing the efficiency of the official control.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, J., Benford, D., Boobis, A., Ceccatelli, S., Cravedi, J., Domenico, A. Di, Doerge, D., Dogliotti, E., Edler, L., Farmer, P., Fink-gremmels, J., Fürst, P., Guerin, T., Knutsen, H. K., Livesey, C., Machala, M., Mutti, A., Schlatter, J., & Leeuwen, R. Van. (2009). Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain Adopted on 2 July 2009. *The EFSA Journal*, 1181, 1–61.
- Ben-Gigirey, B., Rodríguez-Velasco, M. L., & Gago-Martínez, A. (2012). Extension of the Validation of AOAC Official MethodSM 2005.06 for dc-GTX2,3: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*, 95(1), 111–121. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.10-446>
- Botana, L. M., Alonso, E., Sáinz, M. J., Alfonso, A., Botana, A. M., Louzao, C., Vilariño, N., Vale, C., Camiña, M., & Vieytes, M. R. (2019). Toxins | neurotoxins. *Encyclopedia of Analytical Science*, 10, 141–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14396-3>
- Costa, A., Alio, V., Sciortino, S., Nicastro, L., Cangini, M., Pino, F., Servadei, I., La Vignera, A., Fortino, G., Monaco, S., & Dall'ara, S. (2021). Algal blooms of alexandrium spp. And paralytic shellfish poisoning toxicity events in mussels farmed in sicily. *Italian Journal of Food Safety*, 10(1), 21–27. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2021.9062>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2004). Marine Biotoxins. *FAO Food and Nutrition*, 80, 5–52.
- EU. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/625 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls (2019). *Off. J. Eur. Union*. L131, 51
- EU. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Union and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs (2004). *Off. J. Eur. Union*. L139, 55
- Etheridge, S. M. (2010). Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives. *Toxicon*, 56(2), 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.013>

- Harju, K., Rapinoja, M. L., Avondet, M. A., Arnold, W., Schär, M., Luginbühl, W., Kremp, A., Suikkanen, S., Kankaanpää, H., Burrell, S., Söderström, M., & Vanninen, P. (2015). Results of a saxitoxin proficiency test including characterization of reference material and stability studies. *Toxins*, 7(12), 4852–4867. <https://doi.org/10.3390/toxins7124852>
- Lawrence, J. F., & Niedzwiadek, B. (2001). Quantitative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish by Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of AOAC International*, 84(4), 1099–1108.
- Lawrence, J. F., Niedzwiadek, B., & Menard, C. (2005). Quantitative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88(6), 1714–1732.
- Munday, R., Thomas, K., Gibbs, R., Murphy, C., & Quilliam, M. A. (2013). Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration. *Toxicol*, 76, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2013.09.013>
- Official Methods of Analysis* (2005) 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Method 959.08
- Official Methods of Analysis* (2005) 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Method 2005.06
- Official Methods of Analysis* (2012) 19th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Method 2011.02
- Official Methods of Analysis* (2012) 19th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Method 2011.27
- Sommer, H., Meyer, K. F. (1937) Paralytic shell-fish poisoning. *Arch. Pathol.* 24, 560-598.
- Turner, A. D., & Hatfield, R. G. (2012). Refinement of AOAC Official MethodSM 2005.06 Liquid Chromatography-Fluorescence Detection Method to Improve Performance Characteristics for the Determination of Paralytic Shellfish Toxins in King and Queen Scallops. *Journal of AOAC International*, 95(1), 129–142. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-184>
- Vashist, S. K., & Luong, J. H. T. (2018). Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays. In *Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811762-0.00004-9>