

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapport: 388802 002

**Onderzoek naar de toxiciteit van
extracten van zeeslakken**

G.J.A. Speijers, H.P. van Egmond, J. Beenen,
M.J. Poelen, J. van Soolingen en W.E. Paulsch

april 1990

Dit onderzoek werd als spoedopdracht uitgevoerd, na telefonisch verzoek van de Hoofdinspectie Gezondheidsbescherming, in het kader van project 388802.

VERZENDLIJST

- 1- 5 Hoofdinspecteur Gezondheidsbescherming, Staatstoezicht
op de Volksgezondheid
- 6 Secretaris-Generaal van het Ministerie van Welzijn,
Volksgezondheid en Cultuur
- 7 Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
- 8 De plv. Directeur-Generaal van de Volksgezondheid, tevens de
Hoofddirecteur Financiering en Planning
- 9 Hoofddirecteur van de Gezondheidsbescherming
- 10 Hoofddirecteur van de Gezondheidszorg
- 11 Dr. F. Huf, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor Land- en
Tuinbouwprodukten
- 12 Ir. L.G.M.Th. Tuinstra, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor Land- en
Tuinbouwprodukten
- 13 Dr. P. Hagel, Rijksinstituut voor Visserijonderzoek
- 14 Drs. J. Goebbels, Veterinaire Hoofdinspectie, Staatstoezicht op de
Volksgezondheid
- 15 K.A. Taal, Rijksdienst voor de Keuring van Vee en Vlees
- 16 Mr. L.J. Zijp, Produktschap voor Vis en Visprodukten
- 17 Ir. J. van der Linden, Regionale Inspectie Gezondheidsbescherming te
Goes
- 18 Ir. N. Olie, Regionale Inspectie Gezondheidsbescherming
te 's Hertogenbosch
- 19 Redactie "Ware(n)-chemicus"
- 20 Depot van Nederlandse publikaties en Nederlandse bibliografie
- 21 Directie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en
Milieuhygiëne
- 22 Drs. C.A. van der Heijden
- 23 Drs. A.E. Toet
- 24 Drs. P. de Vrey, Dr. C.F.M. Hendriksen
- 25 Dr. H.A. van 't Klooster
- 26 Dr. R.W. Stephany
- 27 Wetenschappelijke staf Laboratorium voor Toxicologie
- 28 Wetenschappelijke staf Laboratorium voor Analytisch Residu-onderzoek
- 29-34 Auteurs

- 35 Bureau Projecten- en rapportenregistratie
- 36-37 Bibliotheek RIVM
- 38-48 Reserve exemplaren

Mede ter vertrouwelijke informatie aan:

- 49 Prof. Dr. A. Ruiter, Vakgroep Voedingsmiddelen van Dierlijke Oorsprong, Rijksuniversiteit Utrecht
- 50 Ir. A. Bal, Landbouwadviescommissie Milieukritische stoffen, Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij

INHOUDSOPGAVE

	Blz.
VERZENDLIJST	ii
INHOUDSOPGAVE	iv
SUMMARY	v
SAMENVATTING	vi
1. INLEIDING	1
2. MATERIALEN EN METHODE	3
2.1. Saxitoxine standaardoplossing	3
2.2. Schelpdierextracten	3
2.3. Muizen	3
2.4. Methode van onderzoek	3
3. RESULTATEN	5
4. DISCUSSIE	9
LITERATUUR	11

National Institute of Public Health and Environmental Protection

Report no. 388802 002

April 1990

Investigations of the toxicity of extracts of sea-snails

G.J.A. Speijers, H.P. van Egmond, J. Beenen, M.J. Poelen, J. van Soolingen and W.E. Paulsch

SUMMARY

On behalf of the Chief Inspectorate for Health Protection, an emergency investigation was carried out, in cooperation with the State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT), of the toxicity of sea-snails offered for consumption as whelks (Buccinum undatum). The whelks were thought to be associated with three cases of possible Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) at Weert, The Netherlands.

The toxicity of 5 extracts, prepared and submitted to chemical analysis at the RIKILT (no PSP detected), was tested in a mouse-bioassay according to the official method of the Association of Official Analytical Chemists. In one of the extracts toxicity was noticed, corresponding to ca. 35-40 μg saxitoxin-equivalents per 100 g shellfish meat. The other extracts tested in the mouse-bioassay were not lethal.

The day after the toxicity experiment it became known that the suspected lot of shellfish contained "red" whelks (Neptunea antiqua) in addition to whelks. Red whelks naturally contain the poisonous substance tetramine. Consumption of these red whelks might have caused the observed intoxications. A second toxicity experiment with mice was carried out, directed towards differences in symptoms caused by saxitoxin (one of the PSP) and the positive extract. The results of the latter experiment strengthened the assumption that tetramine rather than PSP had caused the shellfish poisoning.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne

Rapport nr. 388802 002

April 1990

Onderzoek naar de toxiciteit van extracten van zeeslakken

G.J.A. Speijers, H.P. van Egmond, J. Beenen, M.J. Poelen, J. van Soolingen
en W.E. Paulsch

SAMENVATTING

Op dringend verzoek van de Hoofdinspectie Gezondheidsbescherming werd, in samenwerking met het Rijks-Kwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwprodukten (RIKILT), spoedonderzoek verricht naar de toxiciteit van zeeslakken, die als wulken (Buccinum undatum) voor consumptie waren verkocht. De wulken waren in verband gebracht met 3 gevallen van mogelijke Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in Weert.

De toxiciteit van 5 extracten, bereid op het RIKILT en aldaar onderworpen aan een chemische analyseprocedure (waarbij geen PSP werd aangetoond), werd getest in een muis-bioassay volgens de officiële methode van de Association of Official Analytical Chemists. In een der extracten werd toxiciteit geconstateerd, overeenkomend met ca. 35-40 µg saxitoxine-equivalenten per 100 g schelpdiervlees. De andere extracten waren in de muizen-proef niet lethaal.

Daags na de toxiciteits-proef werd bekend, dat de verdachte partij niet alleen uit wulken doch ook uit noordhoorns bestond, die van nature het giftige tetramine bevatten. Consumptie van deze noordhoorns (Neptunea antiqua) zou geleid kunnen hebben tot de waargenomen vergiftigingsverschijnselen. Een tweede toxiciteits-experiment met muizen gericht op verschillen in symptomen, veroorzaakt door saxitoxine (een van de PSP) en het positieve extract, versterkte het vermoeden dat niet PSP, maar tetramine de oorzaak is geweest van de schelpdiervergiftiging.

1. INLEIDING

Op 6 april 1990 meldde Drs. J. Jansen, Hoofdinspectie Gezondheidsbescherming (HIGB) telefonisch bij het Laboratorium voor Analytisch Residu-onderzoek (ARO) drie gevallen van vermoedelijke vergiftiging door schelpdieren in Brabant. De patiënten waren opgenomen in het ziekenhuis te Weert met ziekteverschijnselen (o.a. verlammingen en dubbel zien), die veroorzaakt zouden kunnen zijn door Paralytic Shellfish Poison(s) (PSP). Vermoed werd dat consumptie van wulken (zeeslakken van de soort: Buccinum undatum) tot de vergiftiging had geleid. In de literatuur wordt melding gemaakt van het voorkomen van PSP in wulken, dat zich daarin had opgehoopt doordat de wulken zich voedden met PSP-bevattende tweekleppige schelpdieren (Caddy, 1986). Gezien de ernst van PSP-vergiftigingen (World Health Organisation, 1984) (Krogh, 1987) en het feit dat de wulken afkomstig waren uit een grotere partij, die in Nederland gedeeltelijk reeds in de handel was gebracht, achtte de HIGB spoedonderzoek noodzakelijk. Het RIVM werd dringend verzocht in samenwerking met het Rijks-Kwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwprodukten (RIKILT) zo snel mogelijk te onderzoeken of de verdachte partij schelpdieren PSP bevatte.

De kist zeeslakken, waaruit de schelpdieren afkomstig waren die door de patiënten waren geconsumeerd, was door de Rijkskeuringsdienst van Waren te Den Bosch in beslag genomen. Een gedeelte daarvan werd naar het RIKILT gebracht voor onderzoek op PSP met een analytisch-chemische procedure (Sullivan, 1984). Deze analysemethode is bij ARO in ontwikkeling, doch nog niet operationeel. In direkt overleg met HIGB en RIKILT werd besloten een gedeelte van de extracten, die door het RIKILT zouden worden bereid, op het RIVM op toxiciteit te onderzoeken met een muis-bioassay. Deze bioassay voor PSP (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 1984) werd uitgevoerd door het Laboratorium voor Toxicologie (TOX) en de Centrale Dierproef Faciliteit van Hoofdsector II (CDF), met analytische ondersteuning van het Laboratorium voor Analytisch Residu-onderzoek (ARO). Bij deze bioassay wordt een ijking uitgevoerd met oplossingen van saxitoxine, de meest toxische der PSP.

Nadat de voorlopige resultaten van het toxiciteitsonderzoek aan de HIGB waren gerapporteerd, bleek uit nader onderzoek van het Rijksinstituut voor Visserijonderzoek (RIVO) dat de partij zeeslakken niet alleen uit

wulken doch ook uit (op wulken gelijkende) noordhoorns (Neptunea Antiqua) bestond. Deze laatste bevatten van nature het giftige tetramine (Anthoni, 1989^a en 1989^b) en zijn daarom niet geschikt voor consumptie. Op verzoek van de HIGB werd een tweede toxiciteitsexperiment uitgevoerd waarbij vooral gelet werd op de symptomen bij de muis, die afwijken van die van PSP, maar die mogelijk wel aan tetramine zijn toe te schrijven.

2. MATERIALEN EN METHODE

2.1. Saxitoxine standaardoplossing

Saxitoxine standaardoplossing, 100 µg/ml (aangezuurde oplossing, 20% ethanol in water) was afkomstig van de Food and Drug Administration, Cincinnati, Ohio, U.S.A. De geconcentreerde oplossing werd vervolgens voorschrift (AOAC, 1984) met gedestilleerd water verdund tot een werkoplossing van 1 µg/ml, die bij +4°C werd bewaard tot gebruik.

2.2. Schelpdierextracten

Vijf flesjes met bevroren schelpdierextract (RIKILT nrs. I, II, III, IV en V; ARO nrs. 90M0335 tot en met 90M0339), werden bij het RIKILT opgehaald in de ochtend van 9 april 1990. De extracten waren kort tevoren op het RIKILT als volgt bereid: vijf monsters van 100 g schelpdiervlees werden, elk afzonderlijk, gehomogeniseerd met 100 ml HCl (0,1 mol/l) en gecentrifugeerd bij ca. 3000 tpm. Hoeveelheden van 25 ml supernatant (overeenkomend met ca. 12,5 g schelpdiervlees) werden in flesjes overgebracht en ingevroren. Na ontvangst op het RIVM en ontdooien van de oplossingen werd de pH van elk extract gecontroleerd (de pH varieerde van 5,0-5,3) en met HCl (5 mol/l) gebracht op pH = ca. 3,5.

2.3. Muizen

De muizen waren afkomstig van het Centraal Dieren Laboratorium van het RIVM. Voor het onderzoek werden vrouwelijke NIH muizen (SPF) gebruikt, die in gewicht varieerden van 17,0 - 21,0 gram. In totaal werden 47 muizen gebruikt.

2.4. Methode van onderzoek

In essentie werd de door de AOAC voorgeschreven muis-bioassay voor het bepalen van PSP (AOAC, 1984) gevolgd. Deze bepalingmethode is erop gericht acute toxiciteit van extracten van schelpdieren vast te stellen en uit te drukken als equivalenten van saxitoxine dat als standaard in verschillende

concentraties wordt toegediend. Daartoe werden hoeveelheden van 10 ml saxitoxine werkoplossing ($1 \mu\text{g/ml}$) verdund met HCl ($0,001 \text{ mol/l}$) in hoeveelheden van respectievelijk 10; 15; 20; 22,5; 25; 30 ml. Na controle van de pH (3,0-3,2) werden 1,00 ml hoeveelheden van deze ijkoplossingen intraperitoneaal aan gewogen muizen toegediend (steeds 1 ml aan een enkele muis), waarna het gedrag van de dieren werd geobserveerd en de sterftetijd werd geregistreerd. Uit de verdunningsreeks werd die verdunning gekozen, waarbij een mediane sterftetijd voor de muizen tussen 5-7 minuten werd verwacht. Vervolgens werd steeds 1 ml van die verdunning ($10+22,5 \text{ ml}$), overeenkomend met $0.31 \mu\text{g}$, in 8 afzonderlijke muizen geïnjecteerd, waarna de sterftetijden werden vastgesteld.

Hoeveelheden van 1 ml van de vijf schelpdierextracten (onverdund en 1:1 verdund met HCl ($0,001 \text{ mol/l}$)) werden vervolgens in drievoud toegediend op dezelfde wijze als voor de saxitoxine standaardoplossing was geschied, waarna de muizen wederom werden geobserveerd en de eventuele sterftetijd werd geregistreerd. In later stadium, nadat via de HIGB was vernomen dat mogelijk tetramine de oorzaak van de schelpdiervergiftiging was geweest, werden 1 ml hoeveelheden van extract I (het enige extract dat tot sterfte van de muizen leidde) opnieuw bij twee muizen toegediend. Tegelijkertijd werd saxitoxine ijk-oplossing ($0,31 \mu\text{g/ml}$) aan twee andere muizen toegediend. Gelet werd in het bijzonder op verschillen in effecten, die optraden bij toediening van extract I en saxitoxine ijkoplossing.

3. RESULTATEN

De resultaten van de standaardisatie van de bioassay met saxitoxine standaardoplossingen zijn in de tabellen 1 en 2 weergegeven. De mediane sterftetijd bij toediening van de saxitoxine standaardoplossing met concentratie 0,31 $\mu\text{g/ml}$ viel binnen het gewenste tijdsbestek van 5-7 minuten.

Tabel 1: Sterfte bij muizen na intraperitoneale toediening van 1 ml van verschillende concentraties saxitoxine standaard-oplossing.

Concentratie saxitoxine in $\mu\text{g/ml}$	Gewicht muis in g	Sterftetijd in minuten en seconden
0,50	19,46	3:39
0,40	17,63	3:03
0,33	18,98	3:55
0,31	18,60	5:32
0,29	18,55	5:09
0,25	18,04	23:47

Tabel 2: Sterfte bij muizen na intraperitoneale toediening van 1 ml van een saxitoxine standaardoplossing, concentratie 0,31 $\mu\text{g/ml}$.

Gewicht muis in g	Sterftetijd in minuten en seconden
18,55	5:09
18,15	4:47
18,48	5:42
18,20	4:36
17,90	5:28
19,06	5:22
20,80	5:25
17,05	5:27
gemiddeld 18,54	mediaan 5:15

De resultaten van het onderzoek met de intraperitoneaal toegediende extracten zijn weergegeven in tabel 3.

Tabel 3: Sterfte bij muizen na intraperitoneale toediening van 1 ml van extracten van zeeslakken.

Monster ¹	gewicht muis in g	sterftetijd
Extract I	19,20	10:00 minuten
Extract I	18,00	8:46 minuten
Extract I	18,43	7:50 minuten
Extract II	18,46	> 24 uur
Extract II	19,64	> 24 uur
Extract II	18,86	> 24 uur
Extract III	20,24	> 24 uur
Extract III	18,66	> 24 uur
Extract III	18,24	> 24 uur
Extract IV	19,42	> 24 uur
Extract IV	18,95	> 24 uur
Extract IV	19,25	> 24 uur
Extract V	18,66	> 24 uur
Extract V	18,91	> 24 uur
Extract V	18,32	> 24 uur

¹ Bij intraperitoneale toediening van 1 ml van de 1:1 (V/V) verdunde extracten werd geen enkele sterfte waargenomen binnen 24 uur, evenmin bij het toedienen van verdund HCl, (0,001 mol/l).

Sterfte trad alleen op bij de muizen die extract I kregen toegediend. De gemiddelde sterftetijd was 8:52 minuten. Uit de sterftetijden kon, ervan uitgaande dat het hier PSP betrof, via een omrekeningstabel en een correctietabel voor het lichaamsgewicht van de gebruikte muizen (AOAC, 1984) de acute toxiciteit in saxitoxine equivalenten worden uitgedrukt. Deze toxiciteit was 35-40 µg saxitoxine-equivalenten/100 g schelpdier-

vlees. Deze concentratie komt ongeveer overeen met de grens die in Nederland krachtens de Warenwet wordt gesteld: Het gehalte aan in water oplosbare biotoxinen van dinoflagellaten mag niet meer dan 40 µg/100 g schelpdiervlees bedragen (Warenwet, 1987; 1988). De resultaten van het onderzoek werden op 9 april 1990 telefonisch doorgegeven aan de HIGB en op 10 april 1990 bevestigd per fax-brief 781/90 ARO vE/ih.

De resultaten van het tweede toxiciteitsonderzoek, waarbij de aandacht vooral werd gericht op vergelijking van symptomen bij de muizen die saxitoxine kregen toegediend en bij de muizen die extract I kregen toegediend, zijn in tabel 4 weergegeven.

De muizen die ca. 15 µg saxitoxine/kg lichaamsgewicht intraperitoneaal kregen toegediend, vertoonden de eerste minuten weinig symptomen van intoxicatie, pas daarna werden zij onrustig. Zij vertoonden dan symptomen als ataxie (waggelen), kop laten hangen, oren naar achteren, convulsies (schokken), rechtop gaan staan, hevig springen, donkere ogen, benauwdheid, tremoren en vlak voor het overlijden het trekken met de achterpoten. De sterfte trad gemiddeld 5 minuten na toediening van de saxitoxine standaardoplossing op. De muizen die extract I van de zeeslakken intraperitoneaal kregen toegediend, vertoonden reeds na ongeveer één minuut sterke speekselvorming, verminderde activiteit, half dichtgeknepen oogjes en waggelen bij het lopen. Na 3-7 minuten vertoonden ze incidenteel schokken, en pas vlak voor de sterfte ging de staart omhoog, gingen de achterpoten trillen en werden deze gestrekt. In tegenstelling tot de muizen die saxitoxine kregen toegediend, verliep het sterfproces veel minder heftig. Convulsies traden veel minder op en tremoren ontbraken geheel.

Tabel 4: Vergelijking van toxiciteits-symptomen bij muizen na intraperitoneale toediening van resp. 1 ml saxitoxine standaardoplossing in HCl (0,31 µg/ml; ca. 15 µg/kg lichaamsgewicht) en 1 ml HCl-extract van zeeslakken (extract I).

Tijdstip na toediening (in minuten, bij benadering)	Saxitoxine Symptomen	Extract I Symptomen
1. ⁰⁰	- actief	- sloom, liggen, half dichtgeknepen oogjes <u>sterke speekselproductie</u>
2. ⁰⁰	- actief oren naar achter	- waggelen (ataxie), liggen, kop hangen, zakt weg
3. ⁰⁰	- plat liggen kop hangen	- schokken moeilijk ademen
4. ⁰⁰	- donkere ogen, <u>hevig springen</u> , waggelen (ataxie)	- inactief, schokken, beroerd
4. ³⁰	- convulsies, tremoren staart omhoog, trap- beweging achterpoten	- inactief
5. ⁰⁰	- zeer moeizame adem- haling gevolgd door sterfte	- inactief
5. ³⁰		- staart omhoog
6. ⁰⁰		- achterpoten trillen, achterpoten strekken
7. ⁰⁰ - 8. ⁰⁰		- langzaam inslapen
	<u>Sterftetijden</u> 4:59-5:07 minuten	<u>Sterftetijden</u> 3:49-8:06 minuten

4. DISCUSSIE

Op basis van de intoxicatieverschijnselen waargenomen bij drie personen die in het ziekenhuis moesten worden opgenomen na het eten van zeeslakken (als wulken verkocht), werd aanvankelijk vermoed dat er sprake was van vergiftiging met schelpdiertoxinen, behorend tot de PSP.

Uitgaande van de gegevens aangereikt door de HIGB, werden vijf extracten van de verdachte partij zeeslakken op acute toxiciteit c.q. lethaliteit onderzocht in een muizentest. De acute toxiciteit in een der extracten bedroeg 35-40 μg saxitoxine-equivalenten/100 g schelpdiervlees. Dit positieve analyse-resultaat werd niet ondersteund door de onderzoeksresultaten van het RIKILT, waar in geen der extracten saxitoxine en/of andere PSP konden worden aangetoond. Bovendien treden toxiciteitsverschijnselen bij de mens doorgaans pas op bij concentraties $\geq 160 \mu\text{g}/100 \text{ g}$. (Krogh, 1987), hoewel in de literatuur wordt gewaarschuwd voor onderschatting van het PSP-gehalte bij intraperitoneaal toedienen van onverdunde extracten in de muis (Park, 1986). De twijfel dat PSP de oorzaak van de intoxicaties zouden zijn geweest nam verder toe, toen daags na het inzetten van de muis-bioassay de verdachte partij schelpdieren ter determinatie bij het Rijksinstituut voor Visserij-onderzoek (RIVO) werd aangeboden.

Het RIVO determineerde ongeveer de helft van de zeeslakken als wulken, en de andere helft als noordhoorns (*Neptunea antiqua*) die op wulken lijken. Met name de speekselklieren van noordhoorns bevatten van nature het giftige tetramine (tetramethylammoniumion). Hoewel deze quaternaire ammoniumverbinding minder toxisch is dan PSP, kan door de relatief hoge concentratie in de speekselklieren (0,2-7,5 mg tetramine/g klier [Anthoni, 1989^c]), de consumptie van noordhoorns intoxicaties bij de mens veroorzaken, waarbij o.a. verschijnselen als dubbelzien, hoofdpijn, duizeligheid, fotofobie en waggelende gang worden beschreven (Anthoni 1989^a, 1989^b). Op basis van het verschil in symptomen voorafgaand aan de sterfte bij muizen na intraperitoneale toediening van het toxische extract en saxitoxine in het tweede (vergelijkende) toxiciteits-experiment en de constatering van de aanwezigheid van noordhoorns, is het onwaarschijnlijk dat er sprake was van een vergiftiging door PSP. Daarbij moet worden aangetekend, dat verschijnselen als dubbelzien, dat bij de vergiftigde personen optrad, bij de muis niet kunnen worden onderzocht. Wel werd een

sterke speekselvorming waargenomen bij de muizen, die het positieve extract kregen toegediend. Deze speekselvorming, die in de literatuur wordt beschreven bij intoxicaties in katten en muizen met tetramine, trad niet op bij toedienen van saxitoxine-standaardoplossing.

De beschikbare onderzoeksgegevens van RIKILT, RIVO en het hier gerapporteerde toxiciteitsonderzoek leiden tot de conclusie dat niet PSP, maar vermoedelijk tetramine de oorzaak is geweest van de vergiftigingsverschijnselen bij de patienten in Weert.

De acute toxiciteits-experimenten die, gezien het spoed-eisende karakter van het onderzoek, snel op het RIVM werden uitgevoerd, hadden mogelijk (gedeeltelijk) achterwege kunnen blijven als determinatie van de betreffende partij zeeslakken eerder had plaatsgevonden. Niettemin heeft het acute toxiciteits-onderzoek met muizen praktisch inzicht verschaft in de beperkingen van de muis-bioassay ter bepaling van PSP, en het ongerief dat bij de dieren wordt veroorzaakt. Het onderstreept ook de wenselijkheid om nationaal en internationaal hoge prioriteit te geven aan het verder ontwikkelen en valideren van analytisch-chemische methoden van onderzoek voor PSP, inclusief het ontwikkelen van analytische referentiepreparaten. Anderzijds leert deze "case-study" dat het specifieke karakter van een test op toxiciteit ook voordelen kan hebben bij een snelle screening, wanneer niet bekend is om welke toxische stof het gaat. Te overwegen is naar een alternatief voor de muizentest te zoeken, waarbij toch de toxische potentie van marine toxinen kan worden vastgesteld. In vitro test-systemen komen daarvoor mogelijk in aanmerking.

LITERATUUR

Anthoni U., L. Bohlin, C. Larsen, P. Nielsen, N.H. Nielsen, C. Christophersen (1989^a). "Tetramine: occurrence in marine organisms and pharmacology." *Toxicon* 27, 707-716.

Anthoni U., L. Bohlin, C. Larsen, P. Nielsen, N.H. Nielsen, C. Christophersen (1989^b). "The toxin tetramine from the "edible" whelk *Neptunea Antiqua*." *Toxicon* 27, 717-723.

Anthoni U., C. Christophersen, P.H. Nielsen (1989). "Simultaneous identification and determination of tetramine in marine snails by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy." *J. Agric. Food Chem.* 37, 705-707.

Association of Official Analytical Chemists (1984). "Paralytic Shellfish Poison, Biological Method, Final Action." In: Williams S. (Red.), *Official Methods of Analysis*. Arlington, Virginia; 18.086-18.092.

Caddy J.F., R.A. Chandler (1968). "Accumulation of paralytic shellfish poison by the rough whelk (*Buccinum undatum*)."
Proc. Nat. Shellfish Assoc. 58, 46-50

Krogh P. (1987). "Scientific Report on Paralytic Shellfish Poisons in Europe." Document VI/3964/87-EN rev. 1, Commission of the European Communities, Directorate General for Agriculture VI/B/II.2 Brussel.

Park L., W.N. Adams, S.L. Graham, R.C. Jackson (1986). "Variability of mouse bioassay for determination of paralytic shellfish poisoning toxins." *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69, 547-550.

Sullivan J.J., M.M. Wekel (1984). "Determination of Paralytic Shellfish Poisoning toxins by high pressure liquid chromatography." In: Rachelis E.P. (Red.). *Seafood Toxins*. ACS Symposium 262, Washington D.C., 197-204.

Warenwet (1987). "Uitvoeringsbesluit invoer mosselen. Besluit V6.Bo.afl. 39 van 15 oktober 1984. VVp 28, van de Voorzitter van het Produktschap voor Vis en Visprodukten." PBO-voorschriften (E-16x-1). Vermande N 1488-8-87.

Warenwet (1988). "Verordening zuiverheidseisen schelpdieren 1987. Verordening van 29 maart 1988. PBO-blad afl. 30 van 17 juni 1988, VVp 23 van het bestuur van het Produktschap voor Vis en Visprodukten." PBO-voorschriften (E-16r). Vermande N 904-10-88.

World Health Organisation (1984). "Aquatic (marine and fresh water) biotoxins." Environmental Health Criteria 37. WHO, Geneve.