

CN Cartridge를 이용한 남조류 독소, 마이크로시스틴의 새로운 분석법 연구

표동진 · 신현두

강원대학교 자연과학대학 화학과

A Study of New Analytical Method of Cyanobacterial Toxins, Microcystins Using CN Cartridge

Dong Jin Pyo and Hyun Du Shin

Department of Chemistry, Kangwon National University

Hyoja-2-dong 192-1, Chunchon, Kangwon-do 200-701, Korea

A new analytical method of cyanobacterial toxins, *i.e.* microcystins was developed using cyano-type prepacked cartridge while the conventional method was to utilize ODS cartridge. The CN cartridge was washed with water and acetonitrile, then microcystins RR and LR were eluted from the cartridge with 70% aqueous acetonitrile. (Methanol + acetonitrile) - 0.025M phosphate buffer (pH=3.0) was used as the mobile phase for HPLC. Better recoveries and chromatograms were observed than with a ODS cartridge.

Key words : Cyano Cartridge, Microcystins, Cyanobacterial Toxins

1. 서 론

여름철 부영양화된 호수나 하천에서는 남조류가 대량 증식하는 현상이 나타나 물색이 변하고 남조류 세포밀도가 높아지게 된다. 이런 현상을 물꽃 현상(water bloom) 혹은 수화 현상이라 부른다. 남조류의 물꽃 현상에 의한 피해에는 호수의 pH 상승, 용존 산소의 저하, 어류의 질식사, 악취 발생, 정수과정에서의 여과장해 등이 있다. 또한 남조류 중에 일부는 독소를 함유하고 있어 동물이 죽는 사고를 유발하는데, 호소나 연못 등의 표면에 부유된 남조류를 물과 함께 섭취한 동물이 사망했던 예가 많은 나라에서 보고되어 있으며,¹ 특히 포유류에 대해서는 대형동물부터 소형동물까지 광범위하게 피해가 나타났다.^{1,2} 인간에 대한 피해로는 1996년 브라질에서 신장 투석을 하던 환자 60여 명이 남조류 독소인 마이크로시스틴에 오염된 물로 인하여 집단으로 사망한 사례가 있었다.³

담수 남조류가 내는 독성물질은 크게 두 가지로

즉, 신경독성물질(neurotoxins)과 간장독성물질(hepatotoxins)로 분류되어진다. 독성물질을 발생시키는 남조류 중 세계적으로 가장 먼저 알려진 종은 *Microcystis aeruginosa*이었다. 이 종에 의한 동물의 피해는 이미 1940년대에 나타났고, 피해가 일어난 지역도 미국, 영국, 오스트레일리아 등 넓은 지역에 분포한다. 또 피해 동물도 소, 말, 코뿔소 등 대형 동물부터 소형 동물에 이르기까지 다양하다.¹ 미국에서 일어났던 예는 20두(頭)의 소(울스타인 종)가 식욕부진, 탈수, 횡와(橫臥) 등의 증상을 나타냈고, 9두가 죽었다는 보고도 있다.² 이러한 사고를 발생시키는 독성물질은 Microcystin이라고 불리는 고리형태의 펩타이드 구조⁴를 가진 간장독성물질임이 밝혀졌다. 이러한 Microcystins는 *Microcystis aeruginosa* 이외에도 *Microcystis viridis*,⁵ *Anabaena flos-aquae*,⁶ *Oscillatoria agardhii*⁷ 그리고 *Nostoc sp*⁸ 등에서도 발견되었다. *Anabaena*속 중에는 *Anabaena flos-aquae*에 의한 피해가 많고, 소, 돼지 등의 가축 외에 집오리나 거위, 꿩 등의

조류에 피해가 있는 것이 특징이다.

Ashworth와 Mason은 microcystin을 쥐에 투여했을 때, 간장에 피가 맺히는 울혈(鬱血, hepatocyte necrosis) 현상을 최초로 인식하였으며, 이것이 미치는 영향은 주로 간장에 출혈을 일으켜 죽게 된다는 것이 확인되었다.⁹ 남조류에서 발생하는 간장독성물질들 중에는 해수(brackish water)에서 식하는 *Nodularia spumigena*에서 나오는 nodularin이라는 물질도 그 구조가 밝혀졌다.¹⁰ 최근의 연구 결과에 의하면 Nodularin과 Microdystins는 protein phosphate의 활동을 억제함^{11,12}으로써 간암을 유발시키는 성질이 있음이 보고되었다.¹³

지금까지 알려진 20여 가지의 microcystins는 모두 공통된 구조적인 특징을 가지고 있다. 이러한 특징들로는 모두가 7개의 펩타이드가 고리를 이룬 형태를 취하고 있으며 그 기본적인 구조는 γ -linked D-glutamic acid(Glu), N-methyl-dehydroalanine (Mdha), 하나의 β -amino acid, 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,3,8,-trimethyldeca-4,6-di-enoic acid(Adda) 그리고 두 개의 L-amino acids로 구성되어 있다. Nodularin은 microcystins와 구조가 비슷하나 5개의 펩타이드가 고리를 이루고 있는 점이 다르다고 할 수 있다. Fig. 1은 대표적인 남조류 독성물질인 Microcystin RR과 LR의 구조를 보여준다.

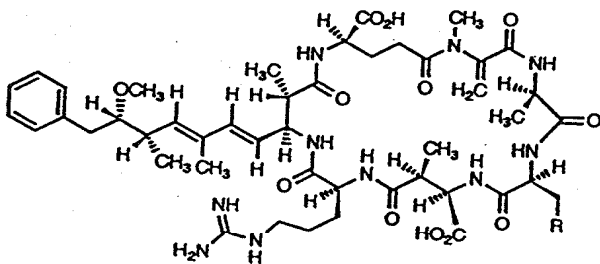


Fig. 1. Structure of microcystins RR and LR.

남조류에서 발생하는 신경독성물질로는 현재까지 세 개의 독성물질들이 보고되었다. 첫째는 *Aphanizomenon flos-aquae*로부터 발생하는 aphanizomenins (saxitoxins)¹⁴과 *Anabaena flos-aquae*로부터 나오는 anatoxin-a와 anatoxin-a(s)가 있다. Anatoxin-a는 alkaloid 같은 화학적 구조를 가지는 것으로 밝혀졌고¹⁵ anatoxin-a(s)는 cyclic N-hydroxyguanidine

의 phosphate ester 구조를 가짐이 알려지고 있으며,¹⁶ anticholinesterase¹⁷로 작용함이 알려졌다.

이러한 남조류의 독성물질들이 외국의 선진국에서는 많은 연구와 함께 화학적 구조까지 속속 밝혀지고 있지만 국내에서는 이에 대한 연구가 매우 미미한 실정이다. 우리나라의 대부분의 호수들도 부영양화가 되면서 유기물 함량이 증가하고 수중산소 고갈과 조류 현존량의 증가 및 식물 플랑크톤의 종조성 변화를 초래하며 남조류가 늦여름에 심한 번성을 형성하고 있다. 중영양호 수준이던 소양호에서도 1986년 남조류가 처음 출현한 이후 매년 증가추세에 있다.¹⁸ 이러한 호수들은 우리나라의 경우 국민의 상수원으로 사용되는 경우가 많기 때문에 위에서 언급한 많은 독성물질에 대한 연구가 시급히 이루어져야 하는 실정이다.

이러한 microcystins를 화학적으로 분석하기 위해서 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하는 방법^{19,20}과 얇은 판 크로마토그래피(TLC)를 이용하는 방법²¹ 등이 있다. 특히 Harada 등²⁰은 상품화된 ODS 카트리지를(cartridge)를 이용하는 HPLC 방법을 개발했으며 이 방법은 현재 microcystins의 화학적 분석을 위해 가장 많이 쓰이는 방법이 되었다.

CN 카트리지를 이용한 분석법은 본 실험실에서 처음으로 개발되었으며^{22,23} 이번 연구에서는 이러한 초기의 연구들을 바탕으로 CN 카트리지를 용액용액과 마이크로시스틴의 용리 용액들을 새로 최적화시킨 결과 기존의 비극성 ODS 카트리지를 이용하는 방법이나 본 실험실에서 개발된 이전의 방법들보다 더 좋은 실험결과를 보여주었다.

2. 실험

기존의 microcystins 분석방법은 비극성의 ODS (octadecylsilane, C₁₈) 카트리지를 이용했으며 불순물을 제거하기 위해 methanol과 H₂O의 혼합 극성을 변화시키면서 용리하는 방법이었다. 그러나 본 연구에서 시도한 새로운 분석방법은 microcystins라는 분석물질이 극성 guanidine기를 갖고 있는 점을 착안하여 극성을 가지는 CN(cyano) 카트리지를 이용하여 microcystins와 불순물을 동시에 흡착시

킨 후 적당한 용매를 사용하여 불순물을 먼저 용리시키고 나중에 microcystins만 선택적으로 용리시키는 방법을 사용하였다. 이 방법의 특징은 마이크로리터(microliter)단위에서 리터(liter)단위까지 다양한 시료의 부피를 적용할 수 있고 정지상이 분석물질을 붙잡고 있는 능력이 뛰어나며 마이크로리터 단위로 용리, 선택적인 추출, 선택적인 불순물 제거와 용리, 다양한 정지상의 종류와 정지상의 크기를 선택할 수 있는 장점을 가지고 있다.

보고된 기존의 ODS 카트리지를 사용하는 방법²⁰을 살펴보면 크게 3단계를 거쳐 분석하게 된다. 먼저 호수로부터 채집한 남조류를 동결 건조시킨 다음 적당량을 취하여 5% acetic acid 수용액 10 ml로 30분 동안 교반 시킨 다음 4000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리해 낸다. 분리해 내고 남은 침전물은 2회 반복하여 다시 추출해 낸다. 그 다음 단계는 분리해낸 상층액을 methanol로 활성화된 ODS 카트리지에 주입한 후 H₂O 10 ml, 20% methanol 수용액 15 ml 순으로 씻는 과정을 거친다. 그런 다음 100% methanol 15 ml로 용리시킨 후 회전증발기로 완전히 말리고 methanol 1 ml로 다시 녹여 고성능액체크로마토그래피(HPLC)에 주입시킨다.

본 연구에서 새로 개발한 분석 방법은 다음과 같다(Fig. 2). 기존의 비극성 카트리지에서 벗어나 극성을 갖는 CN 카트리지를 사용하여 분석을 시도하였으며 먼저 CN 카트리지를 70% acetonitrile 수용액 5 ml와 H₂O 5 ml로 활성화시킨다. 그런 후 동결 건조시킨 남조류 시료를 5% acetic acid 10 ml로 30분 동안 교반시킨 다음 9000 rpm에서 5분간 원심분리한다. 분리해 내고 남은 침전물은 2회 반복하여 다시 추출해 내고 추출액을 CN 카트리지에 통과시킨다. 이 때 상층액의 pH는 진한 NaOH 수용액을 이용하여 3.0으로 조절한다. 그 다음 100% H₂O 5 ml와 100% acetonitrile 5 ml로 씻은 후 70% acetonitrile 수용액 15 ml로 용리해 내고 회전 증발기에서 완전히 말린 후 methanol 1 ml로 녹여 HPLC로 분석한다.

본 실험에 사용한 HPLC는 주입기와 다용매 운반 체계(multisolvent delivery system)를 갖춘 Beckman 사 제품으로 Beckman 116 펌프(SYSTEM GOLD

Program-mable Solvent Module 126, Beckman Instruments, Inc., San Ramon, U.S.A.)와 Beckman 126 Detector (SYSTEM GOLD Programmable Detector Module 166, Beckman Instruments, Inc., San Ramon, U.S.A.)를 갖추고 있으며 컬럼(column)은 분석용으로 Ultrasphere 5 μm Spherical 80 Å Pore(C₁₈, 4.6 × 150mm)을 사용했으며 이동상은 (methanol : acetonitrile = 50 : 50) : 0.025M phosphate buffer(pH=3.0) = 52 : 48을 2 ml/min의 유속으로 흘려주었고 주입량은 10 μl이고 238 nm에서 측정하였으며 봉우리 면적(peak area)법에 의하여 정량하였다. Microcystins RR과 LR 표준물은 일본의 Meijo University의 Ken-ichi Harada 교수로부터 공급받아 사용하였다.

동결 건조 시료

- 0.1g 동결 건조 남조류
- 5% acetic acid 10 ml로 30분간 추출(3회)
- 9000 rpm으로 5분간 원심 분리

상층액

- 3 ml CN 카트리지
- 1) water 5 ml, 70% aqueous acetonitrile 수용액 5ml로 활성화
- 2) 상층액(pH를 3.0으로 조정)을 카트리지에 통과
- 3) 100% H₂O 5 ml, 100% acetonitrile 5 ml로 세척
- 4) 70% acetonitrile 수용액 15 ml로 용출시킴
- 5) 회전 증발기로 건조

나머지 부분

- a) methanol 1 ml로 녹임
- b) HPLC
- [methanol : acetonitrile = 50 : 50]
- : [0.025 M phosphate buffer(pH=3.0)] = 52 : 48
- 2 ml/min, 238nm

Fig. 2. Extraction and purification process for obtaining peptide toxins from cyanobacteria.

3. 결과 및 고찰

3.1. Microcystin RR과 LR의 HPLC 크로마토그램

Fig. 3은 microcystin RR과 LR의 표준물질 크로마토그램을 보여주고 있다. Microcystin RR의 머

무름 시간(retention time)은 8.2분대에서 8.5분대의 범위에서 나타났고 LR의 경우 머무름 시간은 13.8분대에서 14.3분대에 걸쳐 나타났다.

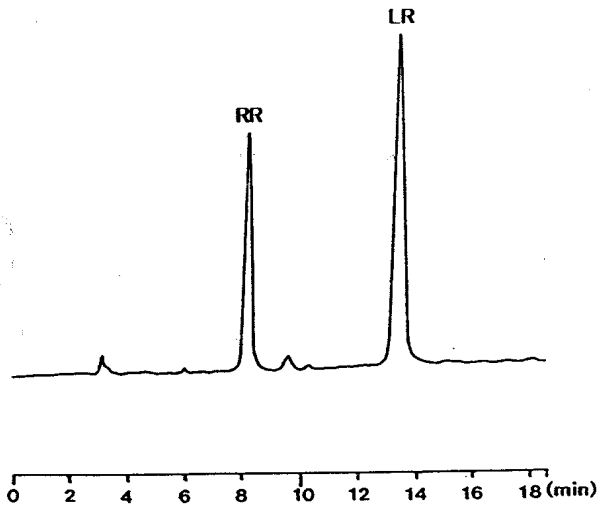


Fig. 3. HPLC chromatogram of the standard microcystins RR and LR.

3.2. 기존의 분석방법과의 차이점

비극성의 ODS 카트리지를 이용한 기존의 시료 처리 방법은 메탄올과 물의 극성 변화를 가지고 독성물질을 용리해 내었다. 이 ODS 카트리지를 이용한 분석방법은 면밀히 검토한 결과 microcystin RR과 LR이 ODS 카트리지에 전부 다 흡착되지 않거나 세척 단계에서 손실된다는 사실을 알게 되었다. 즉 이것은 시료 속의 microcystin의 양을 정확하게 정량할 수 없다는 것을 의미한다. Fig. 1의 구조에서 보듯이 이 물질이 어느 정도 극성을 가지기 때문에 비극성인 ODS 카트리지에 모두 흡착되지 않는 것으로 추측되어 극성을 가진 CN 카트리지로 실험을 하게 되었다. 극성의 CN 카트리지를 사용한 결과 Fig. 4의 크로마토그램에 나타난 것처럼 비극성의 ODS 카트리지를 이용했을 때와 봉우리 면적의 크기를 비교해 보면 현저한 차이가 났음을 알 수 있었다. 이때 선택한 시료는 micro-cystin RR과 LR이 모두 포함되어 있는 의암호에서 채집(97. 9)된 시료를 사용하였다. 실험의 재현성을 알아보기 위해 3회의 실험결과를 Table 1에 나타내었다.

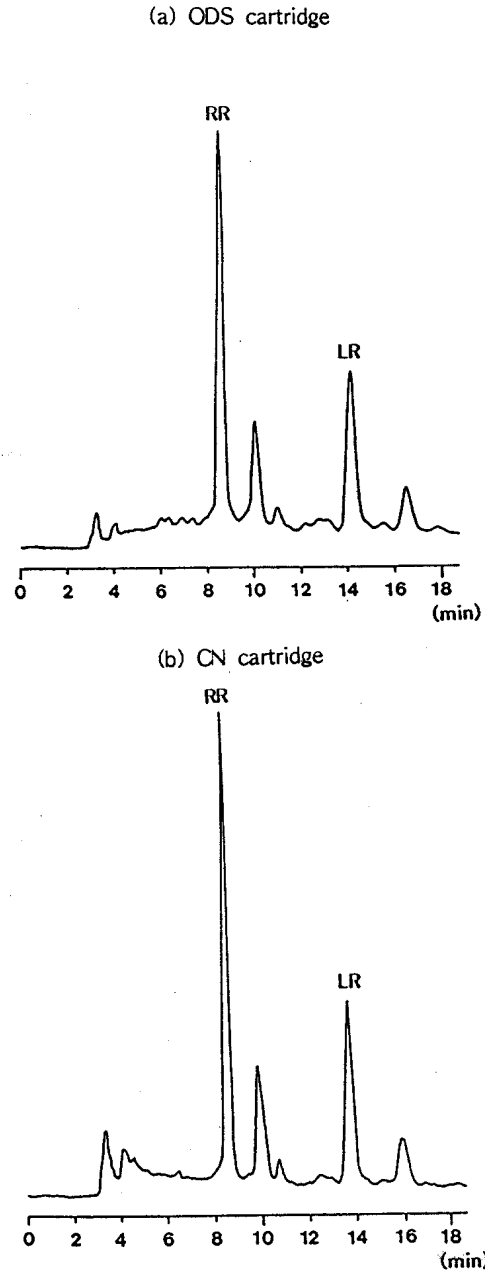


Fig. 4. HPLC chromatograms after extraction using (a) ODS cartridge and (b) CN cartridge.

3.3. CN 카트리지를 사용하는 분석법의 최적조건 설정

기존의 ODS 카트리지를 사용하는 방법과는 달리 CN 카트리지를 사용함에 있어 분석법의 최적

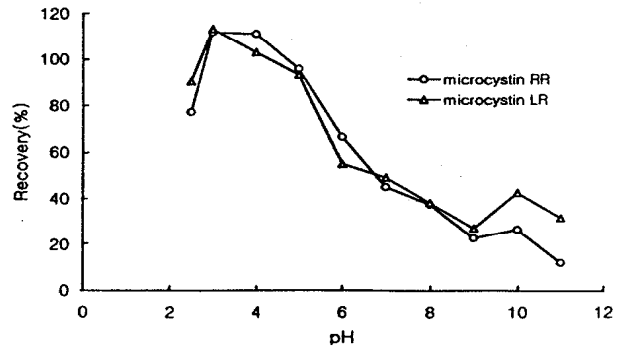
Table 1. Comparisons of peak areas after extraction by ODS and CN cartridge.

	ODS cartridge		CN cartridge	
	RR	LR	RR	LR
sample 1	8.4830	4.9089	9.8497	5.5592
sample 2	8.6523	4.7990	9.9018	5.3695
sample 3	8.3317	4.9856	9.8625	5.3371
average	8.4890	4.8978	9.8713	5.4219
S.D.	0.1604	0.0938	0.0272	0.1120

조건을 설정하기 위하여 용리액, 추출 후 상층액의 pH 그리고 불순물 제거 용액을 변화시켜보았다. 우선 의암호 시료를 5% acetic acid로 추출한 상층액을 활성화된 CN 카트리지에 통과시킨 후 카트리지 안에 붙잡혀있는 microcystins들을 ODS 카트리지를 이용한 분석 결과 이상으로 회수하기 위하여 용리액으로 H₂O, methanol, acetonitrile, 5% acetic acid의 조성을 변화시켜 사용한 결과, Table 2에서 알 수 있듯이 위의 용액으로는 ODS 카트리지를 이용한 분석 결과 이상으로 회수할 수 없었다. 그 이유는 추출액으로 사용한 5% acetic acid의 pH는 20°C에서 2.49로 상당한 산성을 나타내었다. 즉 이 pH에서는 CN 카트리지의 cyano 기와 microcystins의 guanidine 사이의 상당한 안정성을 유발하여 어떠한 용액으로도 ODS 카트리지를 이용한 분석 결과 이상으로 용리시킬 수 없었다. ODS 카트리지를 이용한 분석 결과 이상으로 microcystins를 용리시키기 위해서는 CN 카트리지의 cyano와 microcystins의 guanidine 사이의 상호 작용을 완화시키면 되리라고 추측, 상층액의 pH를 조절하여 실험을 하였다(Fig. 5). 추출 후 상층액의 pH를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0으로 바뀌가면서 실험한 결과 pH 3, 4에서 ODS 카트리지를 이용한 분석 결과 이상으로 회수할 수 있었다(Table 3). 이러한 결과로 미루어볼 때 pH 3이상에서 CN 카트리지의 cyano와 microcystins의 guanidine 사이의 상호 작용이 완화됨을 알 수 있었고, pH 6이상에서는 상호 작용이 현저히 떨어짐을 알 수 있었다. 이 때 pH 조절은 진한 NaOH 수용액을 사용하였고, 사용한 용리액의 조성은 70% aqueous acetonitrile 15 ml였다.

Table 2. Recoveries of microcystin RR and LR using various eluting solutions.

Eluting solution	Recovery	
	RR	LR
90% aqueous methanol	none	44.7
70% aqueous methanol	none	77.8
50% aqueous methanol	none	70.1
30% aqueous methanol	none	58.6
90% aqueous acetonitrile	55.4	61.2
70% aqueous acetonitrile	77.3	90.4
50% aqueous acetonitrile	46.5	49.3
30% aqueous acetonitrile	20.9	25.9
acetonitrile : 5% aqueous acetic acid (9:1)	none	none
acetonitrile : 5% aqueous acetic acid (7:3)	none	none
acetonitrile : 5% aqueous acetic acid (5:5)	none	none

**Fig. 5.** Graphs of recoveries of microcystins RR and LR at different pH.

불순물을 씻어 내는 용액으로는 단일 성분의 용액으로 간단하고 신속하게 씻는 과정을 거치기 위하여 100% H₂O와 100% acetonitrile을 이용하였다. 각각의 부피를 3~7 ml로 변화시켰을 때 H₂O의 경우는 microcystins의 용출이 일어나지 않았으나, acetonitrile의 경우는 6 ml 이상을 사용하였을 경우 microcystins의 용출이 있었다. 따라서 씻어내는 용액으로는 100% H₂O 5 ml와 100% acetonitrile 5 ml를 이용하였다. 결국 추출 후 상층액의 pH를 3.0으로, 씻어 주는 용액을 100% H₂O 5 ml와 100% acetonitrile 5 ml로, 용리액을 70% acetonitrile 수용

Table 3. Recoveries of microcystins RR and LR using CN cartridge.

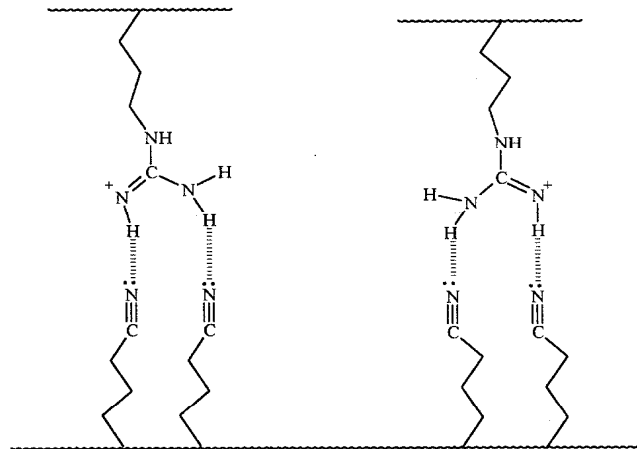
pH of supernate	Recovery(%)	
	RR	LR
2.5	77.3	90.4
3.0	111.9	113.3
4.0	111.2	103.1
5.0	95.9	93.4
6.0	66.8	55.1
7.0	45.3	49.3
8.0	37.6	38.3
9.0	23.0	27.3
10.0	26.7	42.7
11.0	21.1	31.7

액 15 ml로 하였을 때 좋은 크로마토그램을 얻을 수 있었다.

3.4. Microcystin과 Cyano 기와의 흡착 메커니즘

ODS 카트리지를 이용한 분석 방법에서 microcystins가 비극성의 ODS 카트리지에 모두 붙잡히지 않는다는 사실을 설명하기 위하여 microcystin RR과 LR의 구조를 살펴보았다. 실험 조건에서 시료로부터 microcystins를 추출하기 위해 5% acetic acid를 사용하였는데 이 5% acetic acid의 pH는 20°C에서 2.49로 상당한 산성을 나타내었다. 아래에 있는 그림은 microcystin RR과 LR은 화학적 구조를 볼 때 arginine중 guanidine 부분이 산성인 조건에서 공명 구조를 가질 수 있으며 이러한 공명 구조로 말미암아 산성인 조건에서 상당히 안정된 형태를 취하고 있다.

아래에 있는 그림은 CN 카트리지의 cyano 기의 질소 원자에 있는 비공유 전자쌍과 guanidine 부분의 아미노 기에 있는 수소 원자와의 수소결합을 보여주고 있다. Guanidine이 산성인 조건에서 갖는 공명 구조들은 전기적으로 양전하를 띤 양이온으로 존재하므로 전기적으로 음전하를 가진 CN cartridge의 카트리지 cyano 기와 쌍극자-쌍극자 상호작용에 의하여 CN 카트리지에 microcystins가 ODS 카트리지보다 훨씬 더 잘 달라붙는다고 예측할 수 있다.



결국 산의 조건(pH=2.5) 하에서는 어떠한 용액을 쓰더라도 microcystins의 guanidine 부분과 CN 카트리지의 cyano 기 사이의 높은 안정도로 인하여 microcystins를 효과적으로 용리시킬 수 없다. 그래서 추출 후 상층액의 pH를 3.0 정도로 조절하여 안정도를 어느 정도 떨어뜨려야만 용리가 가능하리라고 실험 결과(Fig. 5)로부터 추측할 수 있다. 또한 pH 6 이상에서는 회수율이 현저히 떨어지는 것을 알 수 있는데 이는 microcystins의 guanidine부분과 CN 카트리지의 cyano 기 사이의 안정도가 pH의 증가에 따라 감소한 결과로 추출 후 상층액을 CN 카트리지에 통과시 microcystins가 잘 달라붙지 않았음을 의미한다.

3.5. 용리액에 따른 microcystin LR의 회수

극성 CN 카트리지를 이용한 microcystins의 분석 과정에서 microcystin LR을 선택적으로 분리할 수 있었다(Fig. 6). 이러한 결과는 상층액의 pH를 3으로, 씻는 용액을 100% H₂O 5 ml와 100% acetonitrile 5 ml로, 용리액을 methanol 수용액으로 사용하였을 경우 일어났다. 물론 microcystin LR 주위에 있는 다른 방해 물질도 같이 용출되는 것을 알 수 있으나 주목할 것은 microcystin RR의 용출이 없었다는 것이다. Microcystin RR과 microcystin LR을 비교해 보면 각각 guanidine 부분을 2개와 1 개씩 포함한다. 즉 microcystin RR이 microcystin LR보다 CN 카트리지의 cyano 기에 더 세

게 불잡혀 있을 것이라 추측할 수 있다. 결국 CN 카트리지의 cyano 기와 guanidine 사이의 상호 작용이 상대적으로 많은 microcystin RR은 여러 가지 용리액에서 용출되지 않았고, 반면 상호 작용이 상대적으로 적은 microcystin LR은 선택적으로 용출되었다(Table 2).

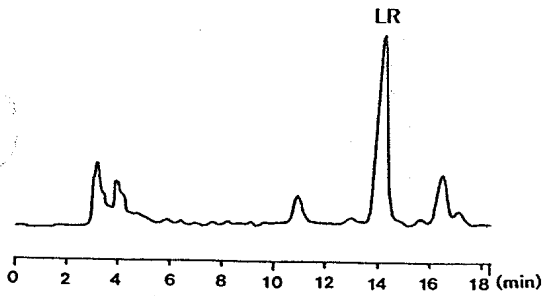


Fig. 6. HPLC chromatogram of microcystin LR after using 70% aqueous methanol as eluting solution.

4. 결 론

본 연구의 가장 큰 의의는 CN 카트리지를 이용한 분석 방법이 기존의 ODS 카트리지를 이용한 방법보다 훨씬 더 정확한 정량을 할 수 있다는 것이다. 즉 미량의 남조류 독소를 검출하는 데 있어 CN 카트리지가 ODS 카트리지보다 훨씬 유리하다는 것이다. 또한 CN 카트리지 내에서 일어나는 guanidine 부분과 cyano 기 사이의 상호 작용을 pH에 따라 예측함으로써 특정 용리액(70% methanol 수용액)을 사용해 microcystin RR의 용출 없이 microcystin LR을 회수할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. W. W. Carmichael and R. S. Saffermann, **1992**, *A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue-Green Algae) and Their Toxins*. EPA/600/R 92/079.
2. F. D. Galey, V. R. Beasley, W. W. Carmichael, G. Kleppe, S. B. Hooser and W. M. Haschek, *Am. J. Vet. Res.*, **1987**, 48, 1415.
3. S. Pouria, A de Andrade, J. Barbosa, R. L. Cavalcanti, V. T. S. Barreto, C. J. Ward, W. Prieser, G. K. Poon, G. H. Neild and G. A. Codd, *THE LANCET*, **1998**, 352, 21.
4. D. P. Botes, A. A. Tainman, P. L. Wessel, C. C. Viljeon, M. Kruger, D. H. Williams, S. Santikarn, R. J. Smith and S. J. Hammond, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1984**, 1, 2311.
5. T. Kusumi, T. Ooi, M. M. Watanabe, H. Takahashi and H. Kakisawa, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 26, 4695.
6. T. Krishnamurthy, W. W. Carmichael and E. W. Sasrver, *Toxicon*, **1986**, 24, 865.
7. J. A. O. Meriluoto, A. Sandstrm, J. E. Remand, G. A. Craog and J. Chattopadhyaya, *J. Toxicon*, **1989**, 27, 1021.
8. K. Sivonen, W. W. Carnichael, M. Namikoshi, M. L. Rinehart, A. M. Dahoim and S. I. Niemela, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1990**, 56, 2650.
9. A. Sandstrm, C. Glemarec, J. A. OMeriluoto, J. E. Eriksson and J. Chattopadhyaya, *Toxicon*, **1990**, 28, 535.
10. S. Yoshizawa, R. Matsushima, M. F. Watanabe, K.-I. Harada, A. Ichihara, W. W. Carmichael and H. J. Fujiki, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1990**, 116, 609.
11. R. Matsushima, S. Yoshizawa, M. F. Watanabe, K.-I. Harada, M. Furusawa, W. W. Carmichael and H. Fujiki, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **1990**, 171, 867.
12. C. MacKintosh, K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen and G. A. Codd, *FEBS Lett.*, **1990**, 264, 187.
13. R. Matsushima, T. Ohta, S. Nishwaki, M. Sukanumaa, K. Kohyama, T. ishikawa, W. W. Carmichael and H. Fujiki, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1992**, 118, 420.
14. J. J. Sansner, M. Ikawa and T. L. Foxall, **1984**, *In Studies on Aphanizomenon and Microcystic TYoxins, Seafood Toxins*, American

- chemical Society Symposium Series 262, Washington, DC., pp 391~406.
15. J. P. Devlin, O. E. Edwards, P. R. Gorham, N. R. Hunter, P. K. Pike and B. Stavric, *Can J. Chem.*, **1977**, 55, 1367.
 16. S. Matsunaga, R. E. Moore, W. P. Niemozura and W. W. Carmichael, *J. Am. Soc.*, **1989**, 111, 8021.
 17. N. A. Mahmood and W. W. Carmichael, *Toxicol.*, **1986**, 25, 1221.
 18. K. S. Cho, B. C. Kim, W. M. Heo and S. J. Cho, *Korean Journal of Limnology*, **1989**, 22(3), 179.
 19. K. Berg, W. W. Carmichael, O. M. Skulberg, C. Benestad and B. Underdal, *Hydrobiol.*, **1987**, 144, 97.
 20. K.-I. Harada, K. Matura, M. Suzake, H. Oka, M. F. Watanabe, S. Oishi, A. M. Dahlim, V. R. Beasley and W. W. Carmichael, *J. Chromatogr.*, **1988**, 448, 275.
 21. G. K. Poon, I. M. Priestley, S. M. Hunt, J. K. Fawell and G. A. Codd, *J. Chromatogr.* **1987**, 387, 551.
 22. D. J. Pyo, K. S. Song, S. C. Yoon, B. C. Kim and D. W. Lee, *Journal of the Korean Chemical Society*, **1994**, 38(10), 741.
 23. D. Pyo and M. Lee. *Chromatographia*, **1994**, 39(7/8), 427.