

호수에서의 남조류 독성물질의 새로운 분석법 개발

裴東震·宋起鏞·尹錫昌·金凡徹[†]·李大云[‡]

강원대학교 자연과학대학 화학과

[†]강원대학교 자연과학대학 환경학과

[‡]연세대학교 이과대학 화학과

(1994. 7. 19 접수)

Development of New Analysis Method of Cyanobacterial Toxins in Reservoirs

Dongjin Pyo, Kiseob Song, Sukchang Yoon, Bomchul Kim[†], and Dai Woon Lee[‡]

Department of Chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

[†]Department of Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

[‡]Department of Chemistry, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

(Received July 19, 1994)

요 약. 남조류의 독성물질인 microcystin을 HPLC로 분석하기 위해 지금까지는 ODS cartridge를 사용하였으나 본 연구에서는 CN cartridge를 사용하는 새로운 분석 방법을 시도하였다. CN cartridge는 0.5M 초산 용액으로 처리되었으며 Microcystin RR과 LR을 용리시키기 위해 30% Acetonitrile 용액이 사용되었다. CN cartridge를 이용하는 분석 방법이 기존의 ODS cartridge를 이용하는 방법보다 훨씬 더 정확한 정량을 할 수 있었다. 특히 Microcystin LR의 경우 피크 면적에서 현저한 차이를 보였다.

ABSTRACT. A new HPLC method for the analysis of cyanobacterial toxins, *i.e.* microcystin was developed using cyano-type prepacked cartridge while the conventional method was to utilize ODS cartridge. The cartridge was washed with 0.5M acetic acid, then microcystins RR and LR were eluted from the cartridge with 30% acetonitrile. A better degree of quantitation was observed than with a ODS cartridge. Especially, in the case of microcystin LR a great difference in peak area was observed.

서 론

담수 남조류의 번성은 여러나라에서 많은 문제를 일으키고 있다. 특히 이것이 상수원과 연결되어 있는 경우는 더욱 심각하다. 여름철에 이러한 남조류 번성은 음용수에서 불쾌한 맛과 냄새를 유발시키며 더욱 심각한 것은 물고기와 가축 그리고 인간에게 강한 독성을 나타내는 독특한 독성물질을 발생시킨다는 사실이다.

유독한 남조류의 출현은 1870년대에 오스트레일리아에서 일어났던 *Nodularia*에 의한 동물의 죽음에서 최초로 보고되었¹ 이 후 미국, 캐나다, 영국 등 많은 나라에서도 동물에 대한 피해가 보고된 바

있다².

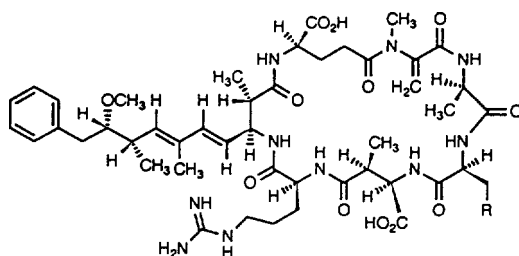
담수 남조류가 내는 독성물질은 크게 두 가지로 즉, 신경독성물질(neurotoxins)과 간장독성물질(hepatotoxins)로 분류되어진다. 독성물질을 발생시키는 남조류중 세계적으로 가장 먼저 알려진 종은 *Microcystis aeruginosa*이었다. 이 종에 의한 동물의 피해는 이미 1940년대에 나타났고, 피해가 일어난 지역도 미국, 영국, 오스트레일리아 등 넓은 지역에 분포한다. 또 피해 동물도 소, 말, 코뿔소 등 대형동물부터 소형동물에 이르기까지 다양하다³. 미국에서 일어났던 최근의 예에서 20두(頭)의 소(울스타인 종)가 식욕부진, 탈수, 횡파(橫臥) 등의 증상을 나타냈고, 9

두가 죽었다는 보고도 있다⁴. 이것은 발생시키는 독성물질은 Microcystin이라고 불리는 고리 형태의 펩타이드 구조^{5,6}를 가진 간장독성물질임이 밝혀졌다. 이러한 Microcystins는 *Microcystis aeruginosa* 이외에도 *Microcystis viridis*⁷, *Anabaena flos-aquae*⁸, *Oscillatoria agardhii*⁹, 그리고 *Nostoc* sp.¹⁰ 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 Mason(1946)은 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 확인되었다¹¹. 남조류에서 발생하는 간장독성물질들 중에는 해수(brackish water)에 서식하는 *Nodularia spumigena*에서 나오는 nodularin이라는 물질도 그 구조가 밝혀졌다¹². 최근의 연구결과에 의하면 Nodularin과 Microcystins는 protein phosphate의 활동을 억제함^{13,14}으로써 간암을 유발시키는 성질이 있음이 보고되었다¹⁵.

지금까지 알려진 20여 가지의 microcystins는 모두 공통된 구조적인 특징을 가지고 있다. 이러한 특징들로는 모두가 7개의 펩타이드(peptide)가 고리를 이루는 형태를 취하고 있으며 그 기본적인 구조는 γ -linked D-glutamic acid(Glu), N-methyldehydroalanine(Mdha), 하나의 β -amino acid, 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,3,8-trimethyldeca-4,6-dienoic 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.

남조류에서 발생하는 신경독성물질로는 현재까지 세 개의 독성물질들이 보고되었다. 첫째는 *Aphanizomenon flos-aquae*로부터 발생하는 aphanotoxins(saxitoxins)¹⁶과 *Anabaena flos-aquae*로부터 나오는 anatoxin-a와 anatoxin-a(s)가 있다. anatoxin-a는 alkaloid 같은 화학적 구조를 가지는 것으로 밝혀졌고¹⁷ anatoxin-a(s)는 cyclic N-hydroxyguanidine의 phosphate ester 구조를 가짐이 알려지고 있으며¹⁸,



Microcystin LR R = CH(CH₃)₂

Microcystin RR R = CH₂CH₂NHC(NH₂)NH

Fig. 1. Structures of microcystin RR and LR.

anticholinesterase¹⁹로 작용함이 알려졌다.

이러한 남조류의 독성물질들이 외국의 선진국에서는 많은 연구와 함께 화학적 구조까지 속속 밝혀지고 있지만 국내에서는 이에 대한 연구가 거의 전무한 상태이다. 우리나라의 대부분의 호수들도 부영양화가 되면서 유기물 함량이 증가하고 수중산소고갈과 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 있다²⁰. 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^{21,22}과 얇은 판 크로마토그래피(TLC)를 이용하는 방법²³ 등이 있다. 특히 Harada 등²²은 상품화된 ODS cartridge를 이용하는 HPLC 방법을 개발했으며 이 방법은 현재 microcystins의 화학적 분석을 위해 가장 많이 쓰이는 방법이 되었다. 본 연구는 이러한 배경하에서 국내 여러 곳의 호수에서 채취한 남조류 sample로부터 독성물질인 microcystin RR과 LR이 포함되어 있는지를 확인하기 위해 극성을 가지는 CN cartridge를 이용하여 기존에 보고된 비극성 ODS cartridge를 이용하는 방법보다 더 좋은 결과를 얻음으로써 남조류에 포함된 독성물질의 양을 더 정확히 정량할 수 있었다.

실 험

기존의 microcystins 분석방법은 비극성의 ODS (octadecylsilane, C_{18}) cartridge를 이용했으며 불순물을 제거하기 위해 methanol과 H_2O 의 혼합 극성을 변화시키면서 용리하는 방법이었다. 그러나 본 연구에서 시도한 새로운 분석방법은 Microcystins라는 분석물질이 극성 guanidine기를 갖고 있는 점을 착안하여 극성을 가지는 CN(cyano) cartridge를 이용하여 microcystins와 불순물을 동시에 흡착시킨 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 cartridge를 사용하는 방법²⁾을 살펴보면 크게 3단계를 거쳐 분석하게 된다. 먼저 호수로부터 채집한 남조류를 동결건조시킨 다음 적당량을 취하여 5% acetic acid 수용액 10 ml로 30분 동안 교반시킨 다음 3500 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리해 낸다. 분리해 내고 남은 침전물은 2회 반복하여 다시 추출해 낸다. 그 다음 단계는 분리해 낸 상층액을 methanol로 활성화된 ODS cartridge에 주입한 후 H_2O 10 ml, 20% methanol 수용액 15 ml 순으로 씻는 과정을 거친다. 그 후 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 cartridge에서 벗어나 극성을 갖는 CN cartridge를 사용하여 분석을 시도하였으며 먼저 CN cartridge를 100% acetonitrile 10 ml로 활성화시킨다. 그런 후 동결건조시킨 남조류 시료를 5% acetic acid 10 ml로 30분 동안 교반시킨 다음 4000 rpm에서 15분간 원심분리한다. 분리해 내고 남은 침전물은 2회 반복하여 다시 추출해 내고 추출액을 CN cartridge에 통과시킨다. 그 다음 0.5 M acetic acid 6 ml로 씻은 후 30% acetonitrile 5 ml로

동결건조 시료

- 5% acetic acid 10ml로 30분간 추출 (3회 실시)
- 4000 rpm으로 원심 분리

상층액

- CN cartridge
- 1) 0.5M acetic acid 6ml로 불순물 제거
- 2) 30% acetonitrile 5ml로 용리
- 3) 회전 증발기로 농축

나머지 성분

- a) Methanol 1ml로 녹임
- b) HPLC
MeOH: phosphate buffer (pH=2.5) (58:42)
1ml/min, 238nm

정제된 독소 성분

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

용리해 내고 회전증발기에서 완전히 말린 후 methanol 1 ml로 녹여 이동상의 pH를 기존의 ODS cartridge를 사용할 때와 다르게 2.5로 맞추어 HPLC에 주입시켰다.

본 실험에 사용한 HPLC는 injector와 multisolvent delivery system을 갖춘 Beckman사 제품으로 Beckman 116 Pump (SYSTEM GOLD Programmable 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 μ m Spherical 80 \AA Pore (C_{18} , 4.6 \times 150 mm)을 사용했으며 이동상(methanol : 0.05 M phosphate buffer (pH=2.5), 58 : 42)을 1 ml/min의 유속으로 흘려주었고 주입량은 10 μ l이고 238 nm에서 측정하였으며 피크면적(peak area)법에 의하여 정량하였다. Microcystins RR과 LR standard는 일본의 Meijo University의 Ken-ichi Harada 교수님으로부터 공급받아 사용하였다.

결과 및 고찰

HPLC 크로마토그램(Chromatogram). Fig. 3은 Microcystin RR과 LR의 표준용액 크로마토그램을

보여주고 있다. Microcystin RR의 머무른 시간(Retention Time)은 5.1분에서 5.4분대의 범위에서 나타났고 LR의 경우 머무른 시간은 8.9분대에서 9.2분대에 걸쳐 나타났다.

기존의 분석방법과의 차이점. 비극성의 ODS cartridge를 이용한 기존의 시료처리 방법은 메탄올과 물의 극성변화를 가지고 독성물질을 용리해 내었다. 이 ODS cartridge를 이용한 분석방법은 면밀히 검토한 결과 Microcystin RR과 LR이 ODS cartridge에 전부 다 흡착되지 않는다는 사실을 알게 되었다. 즉 이것은 시료속의 Microcystin의 양을 정확하게 정량할 수 없다는 것을 의미한다. Fig. 1의 구조에서 보듯이 이 물질이 어느 정도 극성을 가지기 때문에 비극성인 ODS cartridge에 모두 흡착되지 않는 것

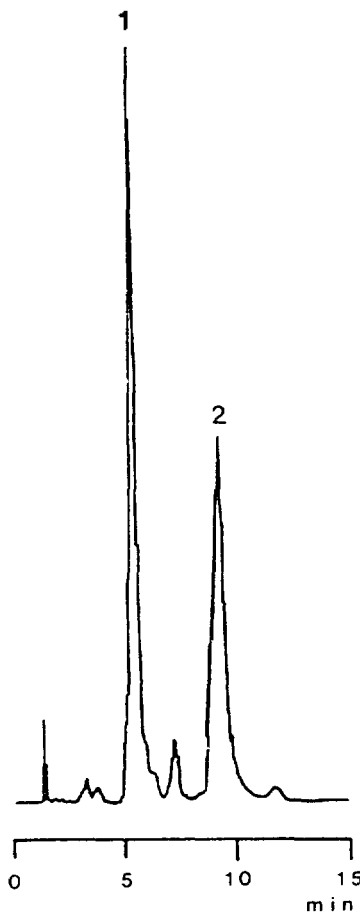


Fig. 3. Chromatogram of the standard microcystin RR and LR (1: Microcystin RR, 2: Microcystin LR).

으로 추측되어 극성을 가진 CN cartridge로 실험을 하게 되었다. 극성의 CN cartridge를 사용한 결과 Fig. 4의 크로마토그램에 나타난 것처럼 비극성의 ODS cartridge를 이용했을 때와 피크면적의 크기를 비교해 보면 많은 차이가 났음을 알 수 있었다. 이때 선택한 시료는 Microcystin RR과 LR이 모두 포함되어 있는 합천호에서 채집된 시료를 사용하였다.

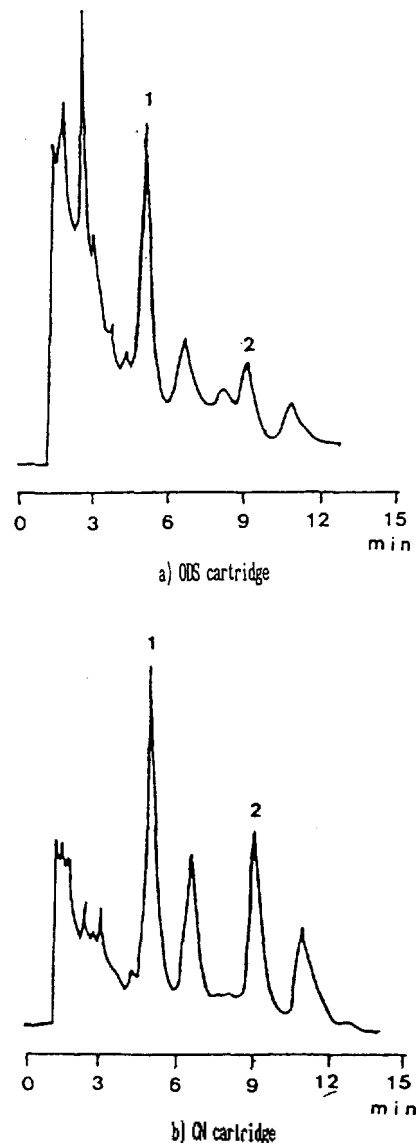


Fig. 4. Comparison chromatogram of ODS cartridge and CN cartridge (1: Microcystin RR, 2: Microcystin LR).

Table 1. Comparison peak area of ODS cartridge and CN cartridge

	ODS cartridge		CN cartridge	
	RR	LR	RR	LR
Sample 1	6.547	1.508	7.842	4.827
Sample 2	6.623	1.491	7.948	4.804
Sample 3	6.508	1.482	7.865	4.742
Sample 4	6.328	1.324	7.692	4.423
Sample 5	6.762	1.728	8.032	4.998
Average	6.553	1.506	7.876	4.759
S.D.	0.744	0.489	0.536	0.153

실험의 재현성을 알아보기 위해 5회의 실험결과를 Table 1에 나타내었다. 피크 면적으로 나타낸 이 실험 결과는 Microcystin LR에서 현저한 차이를 보였으며 Microcystin RR도 다소 높은 수치를 나타냈다.

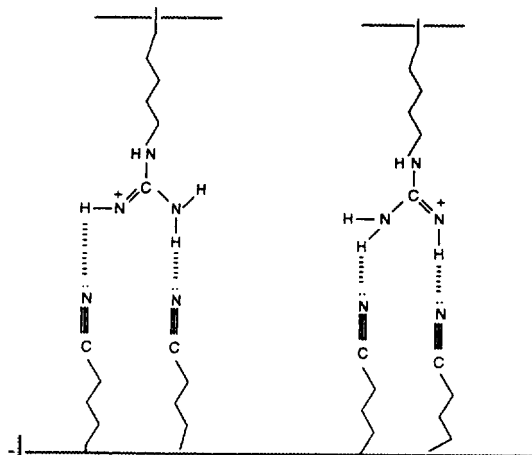
CN cartridge를 사용하는 분석법의 최적조건 설정. 기존의 ODS cartridge를 사용하는 방법과는 달리 CN cartridge를 사용함에 있어 분석법의 최적 조건을 설정하기 위하여 불순물을 씻은 용액인 acetic acid의 양과 농도, 용리액인 acetonitrile의 양과 농도를 변화시켜 보았다. 또 이동상으로 사용하는 phosphate buffer의 pH를 변화시켜 보았다. 불순물을 씻은 용액인 acetic acid의 양은 4, 6, 8, 10 ml로 바꾸어 가면서 될 수 있는 대로 Microcystin 이외의 간섭물질들은 제거하려고 하였다. 4 ml에서는 간섭물질들이 있어 표준물질의 80% 정도를 관찰할 수 있었고 6 ml에서는 90% 정도를 관찰할 수 있었다. 8 ml, 10 ml의 경우도 6 ml의 경우와 거의 같게 90% 정도가 관찰되었다. 따라서 6 ml를 선택하였다. 농도 변화는 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 M 정도를 실시하였다. 0.3 M의 경우는 간섭물질들이 겹쳐서 나타났고, 0.5 M의 경우는 5.2분대와 9.0분대의 RR과 LR의 피크가 주변의 피크와 완전히 분리되는 것을 볼 수 있었다. 0.7 M와 0.9 M의 경우에는 RR과 LR의 피크가 주변의 피크와 겹쳐서 나타났다. 용리액인 acetonitrile의 양은 3, 5, 7, 9 ml로 변화시키며 실험하였다. 용리액을 3 ml로 하였을 때는 60%, 5 ml일 때는 95%, 7 ml일 때와 9 ml일 때도 95%의 회수율을 보였다. 따라서 용리액의 양은 5 ml로 하였다. Acetonitrile의 농도 변화는 30, 40, 50%를 실험했으나 30%에서는

피크가 잘 분리되었으나 40%, 50%에서는 LR의 피크가 주변의 피크와 겹쳐 넓게 퍼진 모양으로 나타났다. 따라서 acetonitrile의 농도는 30%로 하였다. 마지막으로 이동상인 Phosphate buffer의 pH 변화는 2.0, 2.5, 3.0을 실시한 결과 조그마한 pH 변화에도 크로마토그램상의 큰 변화를 관찰할 수 있었다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 pH 2.5일 때 Microcystin RR과 LR이 완전히 분리되며 가장 좋은 분리능을 보여주었다.

Microcystin과 Cyano기와의 흡착 메커니즘.

ODS cartridge를 이용한 분석 방법에서 Microcystins가 비극성의 ODS cartridge에 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 arginine종 guanidine 부분이 산성인 조건에서 공명 구조를 가질 수 있으며 이러한 공명 구조로 말미암아 산성인 조건에서 상당히 안정된 형태를 취하고 있다.

아래에 있는 그림은 CN cartridge의 시아노(cyano)기의 질소 원자에 있는 비공유 전자쌍과 guanidine 부분의 아미노기에 있는 수소 원자와의 수소 결합을 보여주고 있다. Guanidine이 산성인 조건에서 갖는 공명 구조들은 전기적으로 양전하를 띤 양이온으로 존재하므로 전기적으로 음전하를 가진 CN cartridge의 dyano기와 쌍극자-쌍극자 상호작용에



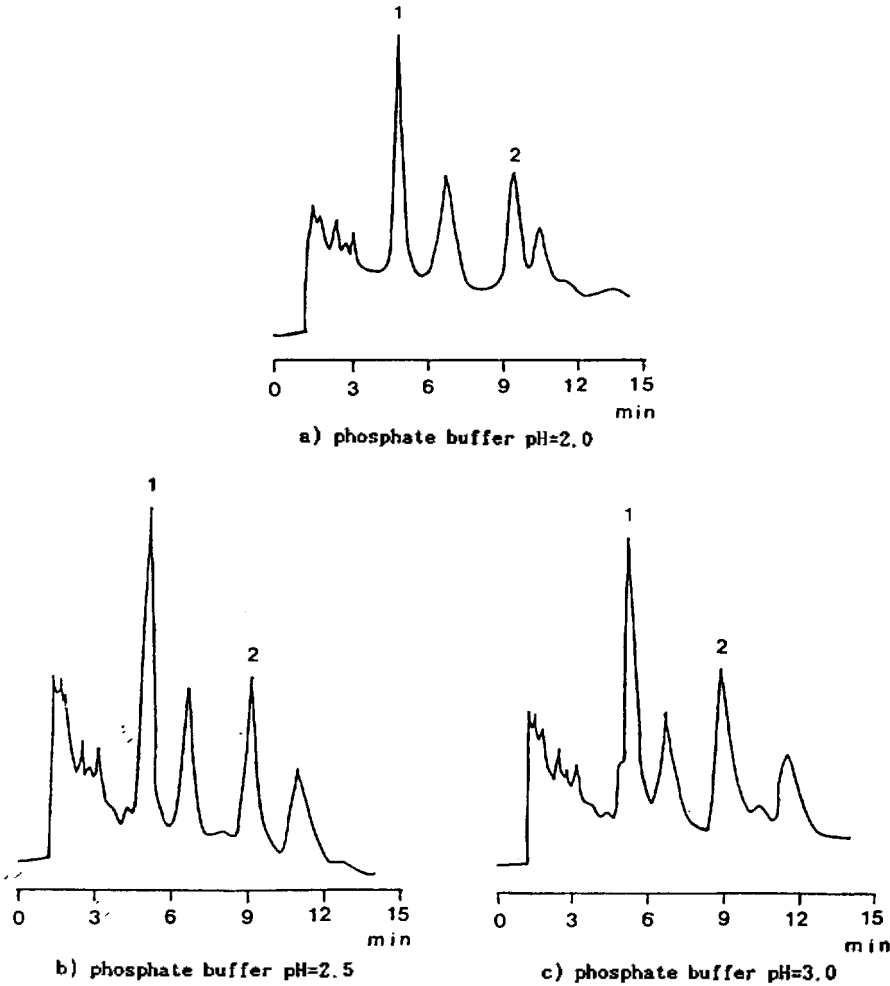


Fig. 5. Comparison phosphate buffer pH of Microcystin RR and LR (1: Microcystin RR, 2: Microcystin LR).

의하여 CN cartridge에 Microcystins가 ODS cartridge보다 훨씬 더 잘 달라붙는다고 예측할 수 있다.

또한 Microcystins 중 RR의 구조를 보면 7개의 아미노산 중 2개가 arginine이고 LR은 1개의 arginine을 가지고 있다. Fig. 4와 Table 1에서 보듯이 2개의 arginine을 갖고 있는 Microcystin RR이 1개의 arginine을 갖고 있는 LR보다 정지상에 흡착되는 정도가 훨씬 컸음을 알 수 있다. 그리하여 CN cartridge를 이용한 방법보다 같은 양의 시료에서 훨씬 정확한 정량을 할 수 있었다.

Microcystin RR과 LR의 검량선 검사 및 정량. Microcystin RR과 LR을 정량하기 위해서는 먼저 농도별로 표준 용액의 변적을 조사하여 검량곡선을

결정하여야 한다. Fig. 6은 농도별 5개의 데이터를 가지고 검량곡선을 Plot한 그래프이다. 통계적인 처리를 위해서 5개의 흡광도 데이터로 최소자승법(method of least squares)을 이용하였다. 검량곡선이 얼마나 좋은 직선적인 관계를 갖는지 알아보기 위하여 Perason의 상관계수를 계산해 본 결과 모두 $r=0.999$ 로 좋은 직선관계를 갖는 것을 볼 수 있다. Fig. 6으로부터 Microcystin RR의 경우 기울기($m=476.67$)와 절편($b=-3.21$)을 계산하여 Microcystin RR 1mg이 용액 1ml에 녹아 있을 때 473.46의 흡광도를 가짐을 볼 수 있었고 Microcystin LR의 경우 기울기($m=314.55$)와 절편($b=-2.21$)으로부터 정확한 정량을 할 수 있었다. 검량곡선으로부터 얻은 식은

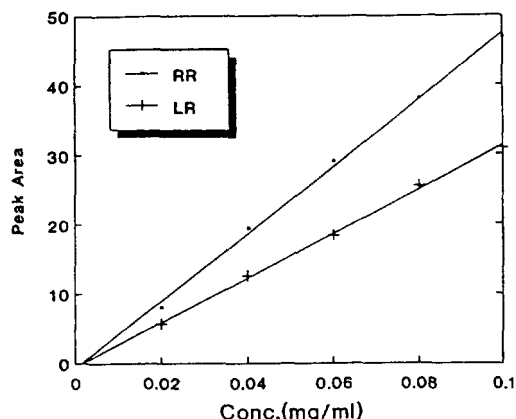


Fig. 6. Microcystin RR and LR standard calibration curve.

다음과 같다.

Microcystin RR의 경우: $[(\text{피크면적} + 3.21)/476.67]$
 \times 메탄올로 녹인 부피(ml)/시료의 양(g)

Microcystin LR의 경우: $[(\text{피크면적} + 2.21)/314.55]$
 \times 메탄올로 녹인 부피(ml)/시료의 양(g)

결론

본 연구의 가장 큰 의의는 CN cartridge를 이용한 분석 방법이 기존의 ODS cartridge를 이용한 방법보다 훨씬 더 정확한 정량을 할 수 있었고 국내에서는 처음으로 Microcystin의 화학적 분석을 시도하였다는 데 있다고 할 수 있다. 특히 Microcystin LR의 경우 피크 면적에 있어서 현저한 차이를 보였으며 또한 우점종의 영향에 따라 독성물질의 양이 크게 좌우된다는 것을 알 수 있었다.

본 연구는 학술진흥재단 연구비의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Francis, G. *Nature* (London) 1878, 18, 11.
- Schwimmer, M.; Schwimmer, D. In *Medical Aspects of Phycology*; Jackson, D. F., Ed.; Algae, Man and the Environment, Syracuse Univ. Press: 1968; p 279, 358.
- Carmichael, W. W.; Saffermann, R. S.; A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue-Green

- Algae) and Their Toxins. EPA/600/R 92/079, 19 92.
- Galey, F. D.; Beasley, V. R.; Carmichael, W. W.; Kleppe, G.; Hooser, S. B.; Haschek, W. M. *Am. J. Vet. Res.* 1987, 48, 1415.
- Botes, D. P.; Viljoen, C. C.; Kruger, M.; Wessels, P. L.; Williams, D. H. *Toxicon* 1982, 20, 1037.
- Botes, D. P.; Tainman, A. A.; Wessels, P. L.; Viljoen, C. C.; Kruger, M.; Williams, D. H.; Santikarn, S.; Smith, R. J.; Hammond, S. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans* 1984, 1, 2311.
- Kusumi, T.; Ooi, T.; Watanabe, M. M.; Takahashi, H.; Kakisawa, H. *Tetrahedron Lett.* 1987, 26, 4695.
- Krishnamurthy, T.; Carmichael, W. W.; Sarver, E. W. *Toxicon* 1986, 24, 865.
- Meriluoto, J. A. O.; Sandström, A.; Eriksson, J. E.; Remand, G.; Grey-Craig, A.; Chattopadhyaya, J. *Toxicon* 1989, 27, 1021.
- Sivonen, K.; Carmichael, W. W.; Namikoshi, M.; Rinehart, M. L.; Dahlem, A. M.; Niemela, S. I. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56, 2650.
- Sandström, A.; Glemarec, C.; Meriluoto, J. A. O.; Eriksson, J. E.; Chattopadhyaya, J. *Toxicon* 1990, 28, 535.
- Yoshizawa, S.; Matsushima, R.; Watanabe, M. F.; Harada, K.-I.; Ichihara, A.; Carmichael, W. W.; Fujiki, H. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1990, 116, 609.
- Matsushima, R.; Yoshizawa, S.; Watanabe, M. F.; Harada, K.-I.; Furusawa, M.; Carmichael, W. W.; Fujiki, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990, 171, 867.
- MacKintosh, C.; Beattie, K. A.; Klumpp, S.; Cohen, P.; Codd, G. A. *FEBS Lett.* 1990, 264, 187.
- Matsushima, R.; Ohta, T.; Nishiwaki, S.; Suganuma, M.; Kohyama, K.; Ishikawa, T.; Carmichael, W. W.; Fujiki, H. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1992, 118, 420.
- Sansner, J. J., Jr.; Ikawa, M.; Foxall, T. L. In *Studies on Aphanizomenon and Microcystic Toxins, Seafood Toxins*; Ragelis, E. P., Ed.; American Chemical Society Symposium Series 262, Washington, DC., 1984; pp 391-406.
- Devlin, J. P.; Edwards, O. E.; Gorham, P. R.; Hunter, N. R.; Pike, P. K.; Stavric, B. *Can. J. Chem.* 1977, 55, 1367.
- Matsunaga, S.; Moore, R. E.; Niemozura, W. P.; Carmichael, W. W. *J. Am. Soc.* 1989, 111, 8021.

19. Mahmood, N. A.; Carmichael, W. W. *Toxicon* **1986**, 25, 1221.
20. Cho, K. S.; Kim, B. C.; Heo, W. M.; Cho, S. J. *Korean Journal of Limnology* **1989**, 22(3), 179.
21. Berg, K.; Carmichael, W. W.; Skulberg, O. M.; Benestad, C.; Underdal, B. *Hydrobiol.* **1987**, 144, 97.
22. Harada, K.-I.; Matsura, K.; Suzaki, M.; Oka, H.; Watanabe, M. F.; Oishi, S.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R.; Carmichael, W. W. *J. Chromatogr.* **1988**, 448, 275.
23. Poon, G. K.; Priestley, I. M.; Hunt, S. M.; Fawell, J. K.; Codd, G. A. *J. Chromatogr.* **1987**, 387, 551.