

## 남조류 독성물질의 대량분리 및 정제

尹錫昌 · 朴權瑛 · 裴東震\*

강원대학교 자연과학대학 화학과

(1997. 10. 8 접수)

## A Large Scale Separation & Purification of Cyanobacterial Toxins

Sukchang Yoon, Keunyoung Park, and Dongjin Pyo\*

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

(Received October 8, 1997)

**요 약.** 남조류 독성물질인 Microcystins은 자연계에 매우 미량 존재하기 때문에 이를 분리 및 정제하기가 쉽지 않다. 본 연구에서는 자연계에 존재하는 남조류 동결건조시료로부터 Microcystin RR과 LR을 분리 및 정제하는 새로운 방법을 개발하였다. 약 7.5 g의 실리카겔을 정지상으로 사용하고 혼합용액인 ethyl acetate: isopropanol: water(30:45:25)를 이동상으로 사용하는 open column system으로 시료를 전개한후 용액을 3 mL 간격으로 받아냈다. 받아낸 용액중의 Microcystin RR과 LR은 TLC와 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 확인한 후 농축, 정제하였다.

**ABSTRACT.** It is very difficult to separate and purify the microcystins, cyanobacterial toxins since it exist in a trace level in natural lakes. In this paper, we developed a new analytical method to separate and purify the microcystin RR and LR from the freeze-dried cyanobacterial cells in natural lakes. We used 7.5 g silica gel as a stationary phase and ethyl acetate: isopropanol: water (30:45:25) as a mobile phase and microcystins were eluted using an open column. The eluting solvent was collected in a small bottle at the intervals of 3 mL and the fractions were chromatographed with HPLC to confirm the microcystin RR and LR.

### 서 론

최근에 국내 여러호수의 부영양화가 가속화 되어 가고 그에 따라 남조류가 대량 증식하는 현상이 나타나고 있다. 남조류의 발생은 호수 부영양화나 오염상태를 나타내기 때문에 오래전부터 이에 대한 생리·생태학적 연구가 진행되어 왔다. 여름철에 이러한 남조류의 번성은 음용수의 불쾌한 냄새와 맛을 내는 원인이 되기도 하고 더욱 심각한 것은 물고기와 가축 그리고 인간에게 강한 독성을 나타내는 독성물질을 발생시킨다는 사실이다. 독성이 있는 남조류의 출현은 1870년대에 오스트레일리아에서 일어났던 Nodularia에 의한 동물의 죽음에서 최초로 보고되었고<sup>1</sup> 이후 미국, 캐나다, 영국등 많은 나라에서 동물에 대한 피해가 보고된바 있다.<sup>2</sup>

독성을 일으키는 주요한 담수의 남조류는 Anabaena, Aphanizomeno, Microcystis 등이 있고, 독성물질

은 크게 신경독성물질(neurotoxins)과 간장독성물질(hepatotoxins)로 나눌 수 있다. Anabaena와 Aphanizomeno는 신경독성물질을, Anabaena의 일부와 Microcystis는 간장독성물질을 함유하고 있다.

독성물질을 발생시키는 남조류중에서 세계적으로 가장 먼저 알려지고 대표적인 종이 Microcystis aeruginosa로 국내의 대부분 부영양호에서 하계에 우점종으로 나타나고 있다. 이 종에 의한 가축의 피해는 이미 1940년대에 보고되었고, 이것이 발생시키는 독성물질은 Microcystin이라고 불리우는 고리형태의 펩타이드 구조<sup>3,4</sup>를 가진 간장독성물질임이 밝혀졌다. 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 일으켜서 죽게된다는 것이 확인되었다.<sup>5</sup> 남조류에서 발생되는 간장

독성물질중에 해수(brackish water)에 서식하는 *Nodularia spumigena*에서 나오는 nodularin이라는 물질도 그 구조가 밝혀졌다.<sup>6</sup> 최근 연구결과에 의하면 Nodularin과 Microcystin은 인산화단백질의 활동을 억제함<sup>7,8</sup>으로써 간암을 유발시키는 성질이 있음이 보고되었다.<sup>9</sup> 지금까지 알려진 20여가지의 Microcystins은 모두 공통된 구조적인 특징을 가지고 있다. 즉 모두 7개의 펩타이드(peptide)가 고리를 이룬 형태를 취하고 있으며 기본적인 구조는  $\gamma$ -linked D-glutamic acid(Glu), N-methyldehydro-alanine(Mdha), 하나의  $\beta$ -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 Microcystins과 구조가 비슷하나 5개의 펩타이드 고리를 이루고 있는 것이 다르다고 할 수 있다. Fig. 1은 대표적인 남조류 독성물질인 Microcystin RR과 LR의 구조를 보여준다.

이러한 남조류의 독성물질들에 대한 연구가 호주, 일본, 미국등의 선진국에서는 분석방법에 대한 많은 연구와 함께 인체 및 어패류에 미치는 영향, 효과적인 제거방법등이 활발히 연구되고 있으나 국내에서는 이에 대한 연구가 미미한 실정이다. 우리나라 대부분의 호수들도 부영양화가 되면서 유기물 함량이 증가하고 수중산소고갈과 조류 현존량의 증가 및 식물플랑크톤의 종조성 변화를 초래하며 남조류가 늘어남에 심한 번성을 형성하고 있다. 중영양호 수준이던 소양호에서도 1986년 남조류가 처음 출현한 이후 매년 증가추세에 있다.<sup>10</sup> 이러한 호수들은 우리나라의 경우 국민의 상수원으로 사용되는 경우가 많기 때문에 위에서 언급한 조류 독성물질에 대한 연구가

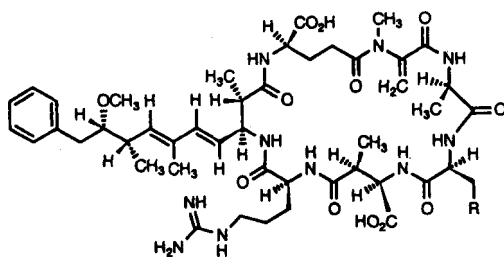
시급히 이루어져야 하는 실정이다.

이러한 연구들을 하기 위해서는 순수한 형태의 Microcystins을 대량으로 분리, 정제하는 방법이 우선적으로 개발되어야 하므로 본 연구에서는 Open Column과 TLC, HPLC를 이용하여 Microcystin RR과 LR을 효과적으로 분리 정제하는 방법을 개발하였다.

## 실 험

자연계에서 얻은 남조류시료로부터 여러 불순물을 제거하기위해서 ODS(octadecylsilane, C<sub>18</sub>, J. T. Baker) Cartridge를 사용하였다. ODS Cartridge에 주입할 추출용액을 얻기 위해서 호수에서 채집한 남조류를 동결 건조시킨후 1g을 취하여 5% acetic acid 수용액 20 mL로 30분동안 교반시키고 9000 rpm에서 5분동안 원심분리하여 상층액을 분리해낸다. 남은 침전물을 다시 2회 반복 추출하여 60 mL를 얻는다. 사용할 cartridge는 3 mL ODS cartridge를 두개 합쳐서 만든다. 고체상 추출법에 의한 추출은 먼저 methanol 10 mL와 H<sub>2</sub>O 10 mL로 씻어주어 cartridge를 활성화시키고, 남조류 추출용액을 cartridge에 주입한후 methanol:0.05 M phosphate buffer(pH2.4) (4:6) 7 mL와 H<sub>2</sub>O 10 mL순으로 씻어준다. 그런다음 methanol 15 mL로 용리시키고 40°C에서 진공회전 증발기로 농축하여 methanol 1 mL에 녹인다(Fig. 2참조).

그런후 Microcystin RR과 LR을 분리·정제하기 위해 open column 전개를 실시한다. 7.5 g의 실리카겔을 3시간정도 이동상에 넣어서 불리고 그것을 내경이 10 mm인 gravity column에 165 mm 높이로 충전시킨다. 전개용매가 실리카겔 표면에 다다르면 gravity column의 밸브를 잠그고, 추출한 독소혼합물을 0.4 mL로 농축하여 컬럼에 주입하고 밸브를 열어 독소혼합물을 실리카겔 표면까지 내려가게 한다. 다시 이동상 0.4 mL를 넣어 전개시키고 이 과정을 두 번 반복한다. 독소혼합물이 잘 주입되었으면 충전된 실리카겔이 움직이지 않도록 주의하여 이동상을 가하고, 시험관에 3 mL간격으로 용출되는 용매를 받아낸다. 이때 독소혼합물은 노란색의 불순물과 함께 전개되고, 불순물은 이동상과 비슷한 속도로 용리되기 때문에 노란색의 불순물이 용출되는 순간부터 용매를 받기 시작한다. 이렇게 얻어진 용출용액을 각각 1



Microcystin LR      R = CH<sub>3</sub>

Microcystin RR      R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(NH<sub>2</sub>)NH<sub>2</sub>

Fig. 1. Structures of microcystin RR and LR.

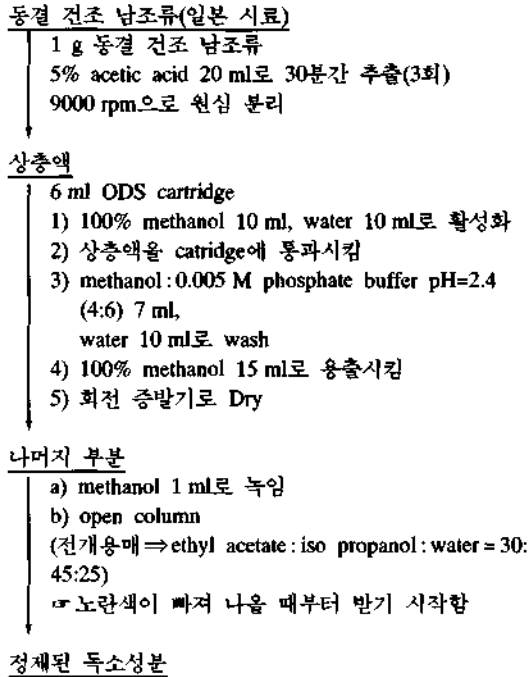


Fig. 2. Extraction and purification procedure for peptide toxins obtained from cyanobacteria.

mL로 농축하고 여과하여 TLC 및 HPLC로 확인한다. 본 실험에 사용한 HPLC는 injector와 multisolvent delivery system을 갖춘 Beckman사 제품으로 116 pump(SYSTEM GOLD Programmable Solvent Module 126)와 126 Detector(SYSTEM GOLD Programmable Detector Module 166)를 포함하고 컬럼(column)은 분석용으로 C<sub>18</sub> 10×150 mm(UltraspHERE 5 μm Spherical 80 Å Pore)을 사용했다. HPLC의 이동상은 [Methanol:Acetonitrile(50:50)]:0.025 M phosphate buffer pH=2.9(52:48)이며 유속은 2 mL/min., 주입량은 10 μL이고 검출과장은 UV 238 nm에서 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**효과적인 추출과 표준물질의 HPLC chromatogram**

Microcystin RR과 LR을 정제하기 위해서는 먼저 남조류 cell로부터 여러 가지의 독소혼합물을 추출해 내야 한다. 독소혼합물을 추출해내는 방법으로 Harada교수에 의해 개발된 ODS Cartridge를 이용한 고체상 추출법(Solid-Phase Extraction)이 있다.<sup>11</sup> 이 고체

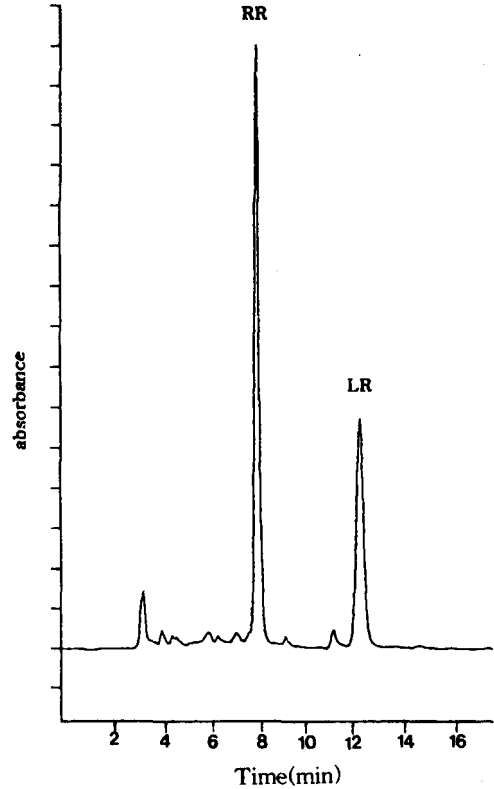


Fig. 3. HPLC chromatogram of the standard Microcystin RR & LR.

상 추출법은 마이크로리터(microliter)에서 리터(liter) 단위까지 다양한 부피의 시료에 적용할 수 있고, 정지상이 분석물질을 붙잡고 있는 능력이 뛰어나며 마이크로리터 단위의 용리, 선택적인 추출, 불순물의 선택적인 제거, 다양한 정지상의 크기를 선택할 수 있는 장점들이 있다.

본 연구에서는 앞의 실험부분에서 기술한 방법에 따라 ODS Cartridge를 이용한 고체상 추출법으로 노란색을 띠는 독소혼합물을 효과적으로 추출할 수 있었다. 또한 Fig. 3은 Microcystin RR과 LR의 표준용액을 사용하여 얻어진 크로마토그램이다. 대체로 Microcystin RR의 머무름시간(retention time)은 7.5분에서 8.2분의 범위에서 Microcystin LR은 12.2분에서 13.0분의 범위에서 나타내고 있음을 보여준다.

**TLC 실험을 통한 이동상 선정**

정지상이 실리카겔인 TLC 실험을 통해서 Microcystin RR과 LR의 분리에 적당한 이동상을 선정하

고자 했다. 이를 위해 많은 시간과 노력을 들였으며 최종적으로 얻은 가장 효과적인 이동상은 ethyl acetate : isopropanol : water(30:45:25)였다. 이것을 찾아 내게된 과정은 다음과 같다. 우선 Microcystins은 극성이 상당히 있는 용매들 예를들면 ethyl acetate, isopropanol, chloroform, ethyl ether, dichlorometane 등 어느것에 의해서도 TLC plate상에서 전혀 전개되지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 그중에서도 극성이 비교적 높은 ethyl acetate와 isopropanol의 혼합 용액에서도 역시 전개되지 않았다. 그래서 ethyl acetate와 isopropanol 혼합용액에 극성이 아주높은 H<sub>2</sub>O를 첨가하였다. 그때야 비로소 Microcystin RR과 LR이 전개되기 시작하였다. 이때 methanol을 첨가하여도 전개가 이루어지지만 H<sub>2</sub>O가 첨가되지 않으면 spot가 길게 끌리고 잘 분리되지 않는 현상을 관찰할 수 있었다. Ethyl acetate와 H<sub>2</sub>O는 섞이지 않기 때문에 isopropanol과 H<sub>2</sub>O의 혼합용매로 전개시켰다. 그러나 여전히 spot가 길게 끌리고 마이크로시스틴 RR과 LR이 불순물과 분리되지 않았다. 그래서 여기에 층분리가 생기지 않는 범위내에서 ethyl acetate를 첨가시켰다.

Table 1은 ethyl acetate, isopropanol, H<sub>2</sub>O 세가지 용매를 변화시켜 실험한 용매의 비율을 간추린 것이다. 대체적인 Rf값은 ethyl acetate의 비율이 높아질수록 낮아졌으며 isopropanol, H<sub>2</sub>O의 비율이 높아질수록 커졌다. 또한 H<sub>2</sub>O 비율의 변화는 Rf값의 큰 변

Table 1. Ratio of solvent used at TLC's development

번호	ethyl acetate (%)	isopropanol (%)	water(%)	비 고
1	50	30	20	
2	45	25	20	
3	43	37	20	
4	40	40	20	*
5	35	45	20	
6	30	50	20	
7	25	55	20	
8	20	60	20	
9	35	40	25	
10	30	45	25	**
11	25	50	25	
12	45	25	30	
13	40	30	30	*
14	40	25	35	층분리
15	45	25	30	층분리

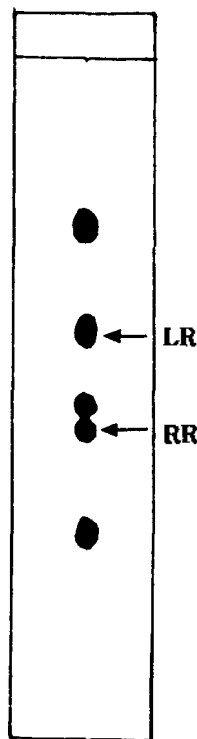


Fig. 4. Thin layer chromatograms of Microcystin RR and LR. Elution solvent ⇒ ethyl acetate : isopropanol : water (30:45:25), Detector ⇒ UV detector

화를 가져왔고 isopropanol의 비율의 변화는 작은 변화만을 가져왔다. \*\*표시는 가장 분리가 잘 일어나는 용매조건이며 \*는 TLC분리에 사용가능한 용매 조건이다. Fig. 4는 TLC 전개결과 분리된 독소혼합물중의 Microcystin RR과 LR spot들이 어느 위치에 나타나는지를 보여준다.

#### Microcystin RR과 LR의 정제

Microcystin RR과 LR을 효과적으로 정제하기 위해서 7.5 g 정도의 실리카겔로 충전된 open column을 사용하였으며 앞서 기술한 바와 같이 본 연구에서 찾아낸 최적의 이동상인 ethyl acetate : isopropanol : water(30:45:25)를 2 mL/min.의 유속으로 흘려주었다. Open Column을 통해서 분리가 이루어진후 용출되어 나오는 용액을 일련의 번호가 매겨져 있는 10 mL 부피의 시험관 60개에 순서대로 받았다. 이때 한 시험관당 3 mL정도의 양을 받았다. 이렇게 얻은 시험관속의 용액에 Microcystin RR과 LR이 얼마만큼 포함되어 있는지 확인하기 위해서 각각을 TLC와

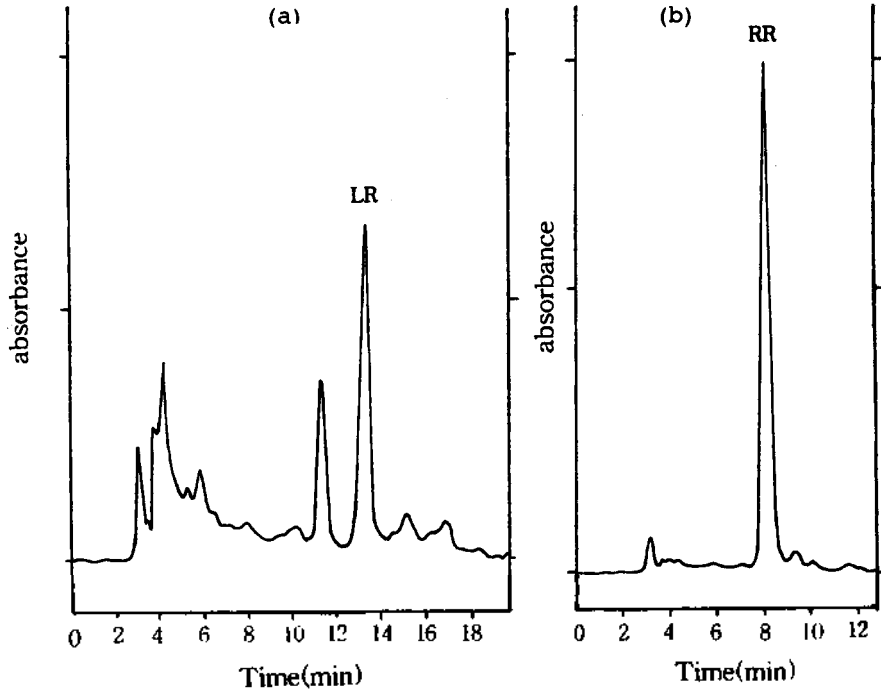


Fig. 5. HPLC chromatogram of Microcystin RR & LR after clean up with Silica gel. (a) Microcystin LR (b) Microcystin RR

HPLC를 이용하여 확인하였다. Microcystin RR은 TLC만으로 쉽게 확인되었지만 양이 적은 Microcystin LR은 TLC와 함께 HPLC의 확인이 꼭 필요했다. 이러한 방법으로 각 시험관 용액의 Microcystin RR과 LR을 확인한 후 각각을 모아서 농축한후 methanol 1 mL에 녹였다. 3 mL씩 받은 시험관의 6~7번에서 Microcystin LR이 나왔고 27~45번 사이 시험관에서 Microcystin RR이 나왔다(아래도표참조).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60

Fig. 5(a)는 6~7번의 시험관에서 얻은 Microcystin LR의 크로마토그램이고, Fig. 5(b)는 27~45번의 시험관에서 얻은 Microcystin RR의 크로마토그램이다. 이 크로마토그램에서 보여주는 것과 같이 Microcystin RR은 깨끗하게 정제가 되었으나 Microcystin LR은 상당량의 불순물이 섞여 있는 것을 볼 수 있

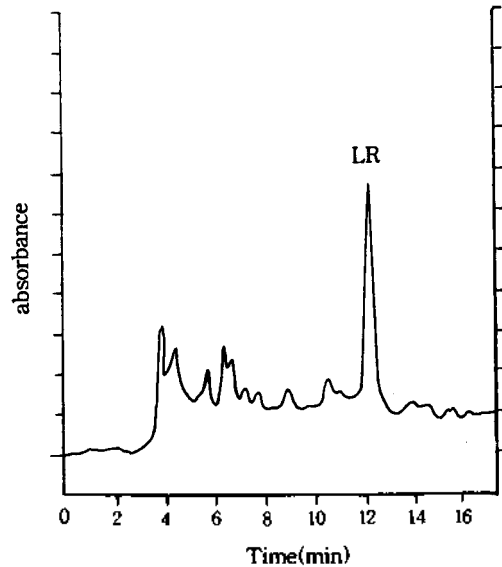


Fig. 6. HPLC chromatogram of Microcystin LR after selective collection.

다. Fig. 5(a)에서 Microcystin LR은 12.90분에 나타나며 그앞의 11.70분의 peak는 불순물로서 이를 제거하기 위해서 12분에서 14.0분사이의 용리액만 따

로 분리하여 2차 정제를 시도한 결과 Fig. 6과 같이 비교적 잘 정제된 Microcystin LR을 얻을 수 있었다. 최종 정제된 Microcystin의 양은 실험할때마다 조금씩 달랐으나 5회 실험한 결과 Microcystin RR이 약 1350  $\mu\text{g}$ ( $\pm 60 \mu\text{g}$ ), Microcystin LR이 약 410  $\mu\text{g}$ ( $\pm 20 \mu\text{g}$ )이었다.

## 결 론

남조류 독소인 Microcystins 연구를 위한 기틀을 마련하는데 있어서 순수한 독성물질의 정제는 필수적이다. 이를 위하여 open column을 이용하여 정제하고 분석한 결과, 전개용매로 ethyl acetate : isopropanol : H<sub>2</sub>O(30:45:25)이 가장 효과적이었으며 이를 사용하여 남조류 동결건조시료 1g으로부터 깨끗한 Microcystin RR과 LR을 얻을 수 있었다. Microcystin LR은 다른 물질과 섞여서 두개의 peak로 나타났으나 2차정제를 통하여 Microcystin LR만을 분리할 수 있었다. 따라서 우리는 Microcystin RR과 LR을 자연계 시료로부터 순수하게 분리할 수 있게 되었으며, 이를 통하여 앞으로 계속되는 Microcystins 연구에 많은 도움을 받을 수 있게 되었다.

이 연구를 수행할 수 있도록 재정적인 도움을 주신 보건복지부에 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

1. Francis, G. Nature (London), 1878, 18, 11.
2. Schwimmer, M.; Schwimmer, D., In *medical as-*

- pects of phycology*; Jackson, D. F., Ed.; Algae, Man and Environment, Syracuse Univ. Press: 1968; Vol. 358, p 279.
3. Botes, D. P.; Viljoen, C. C.; Kruger, M.; Wessels, P. L.; Williams, D. H. *Toxicol.* 1982, 20, 1037.
  4. Botes, D. P.; Tainman, A. A.; Wessels, P. L.; Viljoen, C. C.; Kruger, M.; Will-iams, D. H.; Santikarn, S.; Smith, R. J.; Hammond, S. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1984, 1, 2311.
  5. Sandstrm, A.; Glemarec, C.; Meriluoto, J. A. O.; Eriksson, J. E.; Chattopadhyaya, J. *Toxicol.* 1990, 28, 535.
  6. 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.
  7. Matsushima, R.; Yoshizawa, S.; Watanabe, M. F.; Harada, K. I.; Furusawa, M.; Carmichael, W. W.; Fujiki, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990, 171, 867.
  8. Mackintosh, C.; Beattie, K. A.; Klumpp, S.; Cohen, P.; Codd, G. A. *FEBS Lett.* 1990, 264, 187.
  9. Matsushima, R.; Ohta, T.; Nishwaki, S.; Suganuma, M.; Kohyama, K.; Ishikawa, T.; Carmichael, W. W.; Fujiki, H. *J. Center Res. Clin. Oncol.* 1992, 118, 420.
  10. Cho, K. S.; Kim, B. C.; Heo, W. M.; Cho, S. J. *Korean Journal of Limnology* 1989, 22(3), 179.
  11. Harada, K. I.; Matura, K.; Suzuki, M.; Oka, H.; Watanabe, M. F.; Oishi, S.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R.; Carmichael, W. W. *J. Chromatogr.* 1988, 448, 275.