

식물성 산성당으로부터 헤파리노이드의 제조

김영식# · 노지은* · 안형수* · 박호균**

서울대학교 천연물과학연구소

동덕여자대학교 약학대학*

한국과학기술연구원**

(Received July 8, 1992)

Preparation of Heparinoids from Acidic Plant Polysaccharides

Yeong Shik Kim*, Ji Eun Roh*, Hyung Soo Ann* and Ho Koon Park**

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

*College of Pharmacy, Dongduck Women's University, Seoul 136-714, Korea

**Korea Institute Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

Abstract—Anticoagulant activities were tested for the fifteen kinds of medicinal plants by measuring activated partial thromboplastin time (aPTT). Of them five kinds of species (*Artemisia princeps*, *Sanguisorba officinalis*, *Artemisia apiacea*, *Eclipta alba*, *Schizonepeta tenuifolia*) were selected and fractionated for the preparation of acidic polysaccharides. They were extracted with water by refluxing and the extracts were precipitated with ethanol. The precipitates were separated based on charge using a DEAE-Sephadex. The low salt and high salt fractions were sulfated with anhydrous pyridine and chlorosulfonic acid complex. *In vitro* anticoagulant activities of sulfated polysaccharides were tested by measuring aPTT, prothrombin time (PT), and factor Xa clotting time using normal human plasma. No relationship was found between the amount of uronic acids and anticoagulant activities, but the sulfated ones show the increase of activities. *In vivo* anticoagulant properties of the sulfated polysaccharide from *Artemisia apiacea* were also tested by the intravenous administration of three different doses (3, 5 and 10 mg/kg) to rats. APTT and PT were increased significantly and the action of factor Xa and thrombin mediated through antithrombin III were inhibited slightly.

Keywords □ Heparinoids, acidic plant polysaccharides, sulfation, anticoagulant activity.

다당류의 헤파린은 혈액응고계에서 중요한 기능을 지닌 thrombin과 factor X_a의 작용을 억제함으로써 항응고제의 역할을 하는 물질로 알려져 있다.¹⁾ 헤파린에 의한 thrombin 활성의 억제는 antithrombin III (ATIII)라는 프로티아제 저해제의 존재하에서 가속화된다.²⁾ 임상적인 측면에서 헤파린의 응용은 출산후나, 개복 수술시 나타나는 대퇴부 정맥의 혈전증, 관상동맥의 혈전증에 주로 사용되어지고 있으며³⁾ 기타,

신장투석,⁴⁾ 혈중 지방질 저하⁵⁾ 등의 목적으로 사용되어 지고 있다. 이러한 광범위한 응용에도 불구하고 장기적인 사용시 혈소판 감소 효과,⁶⁾ 출혈, 골다공증의 부작용이 나타나고 있다.⁷⁾ 또한, 약물 동력학적인 측면에서 반감기가 짧은 단점이 있고 분자량이 크기 때문에 정맥이나 피하 주사를 해야하는 단점이 있다.⁸⁾

이러한 부작용을 줄이기 위하여 저분자량의 헤파린이나 새로운 헤파린 유도체를 만들기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. 저분자량의 헤파린은 헤파린을 화학적 또는 생화학적인 방법으로 분해시켜 만들어진

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

것이고 평균 분자량은 5,000 정도이다.⁹⁾(헤파린의 평균 분자량은 13,000) 이러한 방법으로 만들어지기 때문에 수율 면에서 낮은 것이 단점이다.

이에 반해 전통 의학적으로 유래된 식물성 생약은 우선 값싼 원료에서 출발하고 수용성 성분의 주가 다당류라는 사실을 무시할 수가 없다. 실제적으로 한 등은 애엽에서 uronic acid와 rhamnase가 주성분인 산성당을 분리하여 항응고 작용이 있음을 확인하였다.¹⁰⁾ 헤파린의 항응고작용에 필수적인 구조적 특징은 sulfate기와 헤파린 다당류의 크기에 달려있다.¹¹⁾ 따라서 반합성의 sulfated 다당류에 대한 항응고작용이 보고되었는데¹²⁻¹⁶⁾ 대부분이 중성당을 sulfation시켰고, 산성당에 대해서는 보고가 거의 없는 편이다.

본 연구는 생약으로부터 항응고 작용을 검색한 보고^{10,17-18)}를 참고로하여 본 연구실에서 수용성 추출물로부터 얻어진 것을 재 검색하여 다섯 종류의 유용한 생약을 선정하였다. 이 들 생약으로부터 수용성 다당류를 분획하여 산성당을 분리하고 또한 이것을 화학적으로 sulfation시켜 헤파린과 유사한 기능을 지닌 헤파리노이드를 제조하여 *in vitro*와 *in vivo*에서의 항응고활성을 측정하였다.

실험방법

시약 및 생약—혈액 응고계에 두드러지는 효과를 보여주는 15종류의 생약(당귀, 애엽, 백미, 한련초, 오미자, 형개, 청호, 천련자, 치자, 시호, 대황, 지유, 관중, 오매, 오배자)을 경동시장에서 구입하였다.

또한 DEAE-Sephadex, Sephacryl HR-200, carbazole, rhodizonate, activated partial thromboplastin time (aPTT) 측정 kit, factor X_a clotting time 측정 kit, prothrombin time 측정 kit, thrombin (T 9135), N-*p*-Tosyl-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilide, glucurono-lactone을 미국 Sigma 회사에서 구입하였다. 혈장은 서울대학병원 혈액은행에서 구입하였고 항응고작용 측정시 대조물질은 돼지의 내장에서 추출한 헤파린(10 USP units/ml)으로서 Sigma 제품을 사용하였다. Antithrombin III는 사람의 혈장으로부터 정제하였다.¹⁹⁾

생약으로부터 당의 분리—15종의 생약 5g을 70 ml의 증류수로 4시간 환류 추출하고 나일론 천으로 걸러서 원심분리하였다. 상등액에 2배의 ethanol을 가해서 4°C 에서 하룻밤 방치하였다. 침전을 원심분리

(8,000 rpm, 20 min)하고 물에 용해시켜 분자량 3,500 cut-off membrane으로 투석하여 불용성물질을 제거하고 동결건조시켰다.

당의 분획—항응고작용을 보여주는 5종류의 식물(애엽 : *Artemisia princeps*, 지유 : *Sanguisorba officinalis*, 청호 : *Artemisia apiacea*, 한련초 : *Eclipta alba*, 형개 : *Schizonepeta tenuifolia*) 100g으로부터 위와 같은 방법으로 얻어진 다당류 1g을 DEAE-Sephadex A-50(2.6 cm×40 cm)을 이용하여 20 mM 인산완충액 (pH 7.0)으로 elution하여 결합된 분획(high salt fraction)과 결합되지 않은 분획(low salt fraction)으로 나누었다. DEAE-Sephadex에 결합된 것은 같은 완충액의 0~1.0 M NaCl gradient로 유리시키고 투석을 하여 염을 제거한 다음 동결 건조하였다. 다음에는 Sephacryl HR-200을 이용해서 0.1 M NaCl 용액으로 elution시켜 당의 분획을 모았고 uronic acid 측정에 의해서 당을 정량하였다.

다당류의 Sulfation—다당류의 유도체는 무수 피리딘 용매하에 클로로설폰산과 환류(110°C) 시켜서 만들었다.^{12,14)} 반응 후에 상등액을 제거하고 잔사를 물에 현탁시킨 다음 2 M NaOH로 pH를 9.0으로 맞추고 3배의 ethanol을 가하고 침전을 모아 물에 녹여 투석시킨 다음 동결 건조 시켰다.

중성당의 분석—글루코오스를 표준품으로 하여 페놀-황산 방법에 의해서 중성당을 정량하였다.²⁰⁾

Uronic acid의 분석—Glucurono-lactone을 표준품으로 하여 carbazole을 이용하여 uronic acid를 정량하였다.²¹⁾

Sulfate의 분석—Na₂SO₄를 표준품으로 하여 Silvestri 방법으로 결정하였다.²²⁾ 간단히 서술하면 적당량의 시료(0~100 nmole)를 5 ml의 도가니에 넣고 회화로(Dong Nam Co.)에서 15분간 600°C 에서 열분해 시켰다. 0.25 ml의 증류수에 녹이고 이 중 0.1 ml의 시료를 채취하여 Eppendorf tube에 분액하였다. Barium 완충액(0.6 ml)과 rhodizonate 시약(0.3 ml)을 가해 잘 섞은 후 실온에서 10분간 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 오차를 줄이기 위하여 도가니를 3차 증류수로 씻고 한 시료에 대해서 적어도 3번 이상 실시하였다.

단백질의 분석—DEAE-Sephadex로부터 분리된 당에 대해서 Bradford법에 의해서 함유된 단백질의 양을 정량하였다.²³⁾

Polyacrylamide gel-electrophoresis (PAGE)에 의한 sulfated polysaccharides의 분석—5~12% gradient로 만든 polyacrylamide gel에 sulfation시킴 전의 high salt fraction과 low salt fraction, sulfation시킨 후의 high salt fraction, 또 이와 비교하기 위해 헤파린을 100 µg씩을 loading하고 200 volt 전압에서 4시간 시행하였다. 0.5%의 Alcian Blue용액을 이용하여 염색을 하고 5%의 빙초산으로 탈색을 하였다. Marker로서는 phenol red와 methylene blue를 사용하였다.²³⁾

In vitro에서 항응고작용의 측정

1). Activated partial thromboplastin time(aPTT)—0.02 M CaCl₂용액과 100 µl의 aPTT시약을 미리 37°C에서 각각 1분간 배양하였다. 100 µl의 혈장(시료 포함)을 위의 aPTT시약에 넣고 정확히 3분간 배양한 다음 100 µl의 CaCl₂ 용액을 재빨리 가하지마자 loop로 긁기 시작하여 응고 될 때 까지의 시간을 기록하였다.

2). Factor X_a clotting time—정상의 혈장 0.1 ml와 시료가 포함된 혈장 0.1 ml, 완충액 0.7 ml를 섞어서 1분간 37°C에서 배양하였다. 여기에 정확히 100 µl의 factor X_a 시약을 넣고 90초 후에 이 중 100 µl를 제 2의 시험관에 넣어 37°C에서 20초간 배양시킨다. 다음 100 µl의 CaCl₂를 가하고 10초 후에 200 µl의 cephalin시약을 넣은 다음 정확히 응고 시간을 측정하였다.

3). Prothrombin time(PT)—Thromboplastin과 CaCl₂혼합액 200 µl를 37°C에서 적어도 1분간 배양하였다. 여기에 시료를 넣은 혈장 100 µl를 가하고 응고 시간을 기록하였다.

4). Thrombin 활성 측정—먼저 7.5 mM EDTA를 포함한 0.05 M Tris-HCl 완충액(pH=7.8) 400 µl, 약 물을 투여한 흰쥐의 혈장 100 µl, antithrombin III 20 µl(5.0~5.2 µM, ε=0.57 M⁻¹cm⁻¹)를 37°C에서 3분간 배양하고 thrombin 50 µl를 가한 다음 30초 후에 기질 200 µl를 가하고 2분 후에 50%(v/v) 빙초산을 넣어 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.^{24,25)}

In vivo에서 항응고작용 측정—실험동물은 200~230g Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐를 사용했고 실험 기간 중 사료와 물은 충분히 공급했다.

위의 생약중 청호로부터 얻어진 low salt 분획을 sulfation화한 것을 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg의

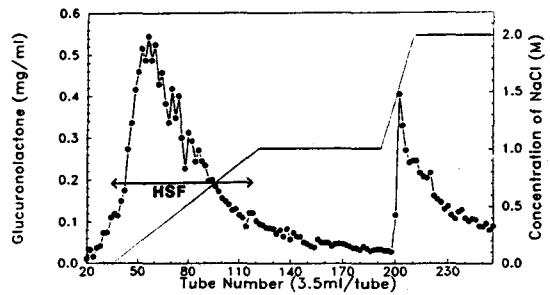


Fig. 1—Separation of one kind of polysaccharide on a DEAE-Sephadex A-50 chromatography. Ethanol precipitate (1g) was applied on a 2.6×40 cm DEAE-Sephadex column and the column was washed with sodium phosphate buffer (pH 7.0) intensively (Low Salt Fraction). Then a bound fraction was released by the gradient elution of sodium chloride from 0M to 1.0M (High Salt Fraction), then 1.0M and 2.0M of NaCl were eluted continuously.

농도로, sulfation화하지 않은 것 5 mg/kg를 대퇴정맥으로 투여하였고, 대조약물로 헤파린도 비교하기 위해 1 mg/kg의 농도로 투여하였다. 청호는 약물투여 후 1시간 30분 후에, 헤파린은 30분 후에 심장에서 채혈하였다. 채혈한 혈액과 3.8% sod. citrate 용액이 정확히 9:1이 되게 하고 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 platelet poor plasma를 얻었다. 이것을 가지고 aPTT, PT, factor X_a clotting time, thrombin 활성을 측정하였다.

결 과

당의 분획—각 1g씩을 달아서 0.02 M 인산완충액(pH 7.0)에 녹인 다음 DEAE-Sephadex(2.6 cm×40 cm)에 loading하여 DEAE-Sephadex에 결합되지 않은 것(low salt라 명명), 0~1.0 M NaCl의 gradient(high salt라 명명)에서 용출된 것을 모았다(Fig. 1).

Uronic acid의 양과 항응고작용—다섯 종류의 생약에서 얻은 당과 DEAE-Sephadex를 이용해서 얻은 당, 그리고 high salt 분획을 Sephacryl를 사용하여 분리한 것에 대해서 uronic acid와 항응고작용(aPTT)을 측정하였다(Table I).

Low salt fraction과 high salt fraction의 sulfation과 항응고작용—DEAE-Sephadex에 의해서 분리

Table I—Amount of uronic acid (mg)¹ and anticoagulant activity²

	EtOH ppt	Low salt	High salt	Gel-filtration
<i>S. officinalis</i>	0.31(0.03)	0.05(0.7)	0.39(0.3)	0.57(1.08)
<i>A. apiacea</i>	0.19(0.2)	0.18(0.4)	0.32(0.2)	0.38(0.032)
<i>S. tenuifolia</i>	0.21(0.5)	0.04(2.0)	0.27(0.3)	0.24(0.062)
<i>A. princeps</i>	0.16(0.4)	0.11(0.3)	ND ³ (0.4)	ND
<i>E. alba</i>	0.21(0.8)	0.07(1.9)	0.37(0.4)	0.35(0.074)

¹The amount of uronic acid is correspondent to 1 mg of polysaccharide.

²Anticoagulant activity was expressed as units/mg in parenthesis based on standard heparin (10 USP units/ml).

³ND: not determined.

Table II—Anticoagulant activity of sulfated polysaccharides

	Low salt fractions		High salt fractions		
	aPTT ¹	PT ¹	aPTT	PT	Xa clotting ¹
<i>S. officinalis</i>	34	36	22	16	3.0
<i>A. apiacea</i>	29	27	18	11	12.2
<i>S. tenuifolia</i>	ND	ND	16	ND	2.1
<i>E. alba</i>	ND	ND	30	10	4.0

¹Anticoagulant activity was expressed as units/mg based on standard heparin (10 USP units/ml)

된 분획에 대해서 sulfation을 한 후에 항응고 작용을 시험하여 Table II에 그 결과를 나타냈다. *Artemisia princeps* (애엽)은 양이 적어서 sulfation을 시키지 않았고 factor X_a clotting 활성은 sulfation을 시킨 high salt fraction에 대해서만 실시하였다. Sulfation을 하기 전(Table I)에 비해서 항응고작용이 상당히 증가됨을 알 수 있었다. 다당류의 sulfation은 적외선 분광기를 이용하여 확인하였다. 새로운 peak가 1240 cm⁻¹(S=O stretching), 820 cm⁻¹(C-O-S stretching)에서 확인되었다. Sulfation이 일어난 곳은 당의 6번 탄소에 있는 -CH₂OH기 이다. 또 polyacrylamide gel electrophoresis로도 sulfation전과 후가 다름을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 특히 저분자량의 다당류에서 sulfation이 일어났음이 Alcian Blue 염색에 의해서 확인되었다. 헤파린과 비교하였을 때 크기가 서로 다른 다당류들이 넓게 분포하였다.

청호의 경우 단백질의 양은 중량비로 환산하였을 때 7.5% 이내에서 확인되었다. 그러나 당이 단백질과의 복합체(proteoglycan)인 지는 앞으로 계통적인

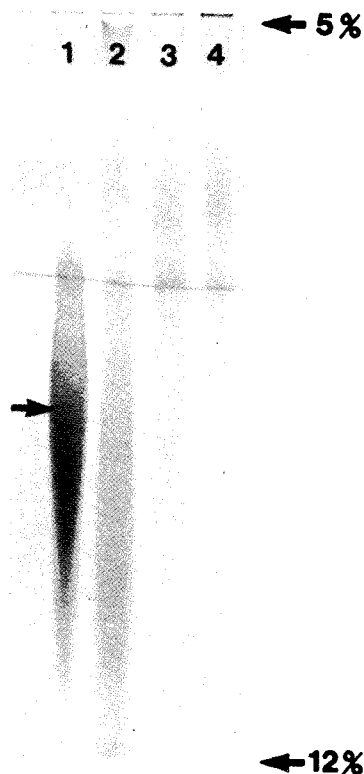


Fig. 2—Stained gradient polyacrylamide gel (1.5 mm) containing 100 µg of polysaccharides. Lane 1: Heparin, Lane 2: Sulfated polysacchride of high salt from *Artemisia apiacea*, Lane 3: Unsulfated polysaccharide of high salt fraction, Lane 4: Unsulfated polysaccharide of low salt fraction. The arrow indicates an average molecular weight (Mr) of heparin (13,000).

분획과 분석을 통하여 규명되어야 할 것이다.

In vivo에서의 항응고작용—Table II의 결과로부터 *Artemisia apiacea*의 low salt 분획의 sulfated 다당을 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg 용량으로, 같은 분획의 unsulfated 다당을 5 mg/kg의 용량으로, 헤파린은 1 mg/kg 정맥주사한 후에 채혈하여 aPTT, PT, factor X_a clotting 시간, thrombin 활성을 측정한 결과를 Table III에 나타내었다. 이때 결과는 aPTT, PT, factor X_a clotting 시간은 clot이 형성될 때까지의 시간으로 나타내었고, thrombin활성은 thrombin억제율(%)로 나타내었다. Sulfated 다당은 3가지 농도 모두 대조군에 비해 유의성있게 응고 시간을 지연시켰다. 그

Table III—*In vivo* anticoagulant activity of polysaccharides from *Artemisia apiacea* in rats

Samples injected	Dosage (mg/kg)	Number of rats	aPTT ¹ (sec)	PT ¹ (sec)	Xa clotting (sec)	Inhibition of thrombin activity(%) ⁴
Control (saline)	—	3	31± 0.3	18± 0	54	0
Sulfated polysaccharides	3	5	52± 5.1**	24± 1.7*	70	3.8
	5	3	81± 10.5*	22± 0.6*	69	-2.5
	10	2	294± 4.0*	23± 0**	82	6.7
Unsulfated polysaccharides	5	3	18± 0.4**	17± 1.2	ND ³	-36.3
Heparin	1	2	119± 1.0**	18± 0	86	48.3

¹The results are expressed as mean± S.E.

²Significant difference from the control *p<0.05, **p<0.01

³ND: not determined.

⁴Inhibition percentage = $\frac{A_{405} \text{ of Control} - A_{405} \text{ of Sample}}{A_{405} \text{ of Control}} \times 100$

Table IV—Sulfate analysis of modified polysaccharides from *Artemisia apiacea*

	percentage
Unsulfated Low salt Fr	0.34
Sulfated Low salt Fr	26.9
Sulfated High salt Fr	30.2
Heparin	31.5*

*Data from ref. (13)

러나, unsulfated 다당은 오히려 대조군(생리식염수 투여)보다도 응고시간이 짧게 나타났다. Thrombin활성에 대해 sulfated 다당은 약간의 thrombin 억제효과가 있었으나(10% 이내) 헤파린보다는 억제율(48%)이 적게 나타났다. 반면에 unsulfated 다당은 대조군보다도 thrombin 활성을 촉진시켰다.

Sulfate 양의 분석—Na₂SO₄를 표준품으로하여 *Artemisia apiacea*(청호)의 sulfate 분석을 하였다(Table IV). Unsulfated low salt 다당 0.34%(w/w)에 비해 sulfated 다당류는(low salt와 high salt) 약 30%(w/w)의 sulfate기를 가지고 있었다. 헤파린은 문헌에 보고된 것을 인용하였다.¹⁶⁾

고찰 및 결론

혈전증질환에 사용되어지고 있는 약물은 혈소판 응집억제제, 항응고제, 혈전용해제로 나눌 수 있다. 항응고제는 주로 coumarin계통 약물과 헤파린이 사용되고 있다. 혈액응고계 내에서 주로 coumarin류는 extrinsic pathway에 관여되고 헤파린은 intrinsic pa-

thway에 관여된다. Extrinsic pathway에 관계되는 약물이나 또는 혈액응고 인자의 결핍 등을 시험하는 방법으로 PT를 측정하고 intrinsic pathway의 변화는 aPTT를 측정하여 알 수 있다. 본 실험에서는 헤파린과 유사한 기능을 지닌 다당류의 제조에 목표를 두었기 때문에 aPTT를 주로 측정하였고 필요에 따라 PT를 측정하였다. 그리고 특이적 방법으로 factor X_a clotting 시간을 측정하였고 peptide 기질을 이용해서 ATIII의 매개에 의한 thrombin 억제효과를 시험하였다.

혈액응고계에 관여되는 식물생약 15종을 대상으로 aPTT clotting 시간을 측정함으로써 헤파린과 유사한 기능을 지닌 헤파리노이드를 일차적으로 검색하였다. 항응고작용의 활성은 높지 않았지만 *in vitro*에서 응고시간의 증가를 확인할 수 있는 다섯 종류(지유, 형개, 한련초, 청호, 애엽)의 생약을 선택할 수 있었다. Uronic acid는 low salt fraction일 때 5~10%이었고 high salt fraction은 30% 이상이었다. 헤파린의 구조적 특징은 uronic acid와 glucosamine이 결합된 이당류가 반복되어 있으며 sulfate기가 이당류에 3개 치환되어 졌다. 위의 결과에서 생약으로부터 얻어진 당의 항응고작용과 uronic acid의 양과의 사이에서는 어떠한 상관관계를 보여주지 않았다. 산성당에는 sulfate분석에서도 알 수 있는 것처럼 sulfate기는 거의 없는 것처럼 보인다. 청호를 이온교환 크로마토그래피에 의해서 분리한 당의 sulfate양과 헤파린의 sulfate양과 비교하였을 때 30%(w/w) 이상 차이가 난다. 그러나, high salt fraction을 무수 pyridine과 chlorosulfonic

산과 반응시켜 얻은 sulfated 다당류의 경우는 헤파린의 sulfate양과 거의 동일하다. 또한 *in vitro* 및 *in vivo*의 항응고 작용도 헤파린과 유사하다. 이러한 보고는 중성당을 sulfation 하였을 때도 항응고활성이 증가하는 것으로 보아 sulfation의 정도와 항응고 활성간에 전하에 의한 상호작용이 있는 것 처럼 보인다.^{27,28)} 청호의 경우는 factor Xa clotting 시간 역시 증가되는 점으로 볼 때 화학적으로 수식시켰을 때 가능성이 있는 것처럼 보인다. 청호로부터 얻어진 unsulfated 다당류의 PAGE를 보면 분자량이 다른 당들이 넓게 흩어져 분포하고 있다(Fig. 2). 그러나, sulfation 후에는 저분자량의 당들이 Alcian Blue 염색 후에 많이 나타나는 것으로 보아 sulfation과 당의 크기와의 관계가 있다고 보인다. 헤파린의 작용 기전은 ATIII와 결합하여 factor X_a 및 thrombin의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ *In vivo* 결과에서 청호의 sulfated 다당이 factor X_a를 억제하고, 헤파린보다 약하지만 ATIII존재하에 thrombin작용을 억제하므로 헤파린과 유사한 기전에 의해서 작용한다고 추정된다. 헤파린은 PT에서 대조군에 비해 전혀 증가가 없는데 비해 sulfated 다당은 약간 증가되었다. 이러한 결과로 이들 sulfated 다당류 등이 헤파린과 유사하지만 헤파린보다 넓게 다른 혈액응고 인자들에 대해 작용하는 것으로 보인다. 근래에 혈액 응고계에서 ATIII 이외에 Heparin cofactor II(HCII)라는 저해제가 발견되었다. Fucoidan, SP40 등 전하를 띠고 있는 다당류와 polyamino acids 등이 HCII를 매개로 thrombin의 활성을 억제하는 보고가 최근에 잇달아 발표되었다.²⁶⁾ 따라서, 위의 산성당의 sulfation을 시켰을 때 HCII에 의한 thrombin 억제작용도 고려할 수 있다. 이러한 점은 앞으로 계속 확인되어야 할 것이다. 흥미롭게도 쥐에게 unsulfated 다당을 5 mg/kg의 농도로 투여시 aPTT는 대조군에 비해서 짧았고 PT는 차이가 없었다. 또 thrombin 활성 측정에서는 대조군보다 thrombin 활성을 증가시켰다.

또한 위의 결과(Table II)에서 주목할 것은 사람의 혈장을 이용한 *in vitro* 활성의 검색과 동물에 투여한 후의 혈장을 이용한 *in vivo* 활성의 검색에는 상당한 상관관계가 입증되었다. 따라서, 많은 종류의 헤파리노이드를 검색할 때 위에서 사용된 *in vitro* 방법을 이용하는 경우에 많은 시간을 절약할 수 있다.

결론적으로, 화학적으로 sulfation시킨 후의 *in vitro*,

*in vivo*의 항응고 작용은 하기전 보다 약 40배에서 50배 이상 증가하였다. Sulfated sugar의 항응고작용은 헤파린과 유사하지만 혈장내의 다른 인자들과 헤파린보다 광범위하게, 특이적 또는 비특이적인 기전에 의해서 작용하는 것처럼 보인다. 앞으로 더욱 연구되어야 할 것이다.

문 헌

- 1) Casu, B.: Structure and biological activity of heparin. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **43**, 51 (1985).
- 2) Rosenberg, R.D.: Chemistry of the hemostatic mechanism and its relationship to the action of heparin. *Fed. Proc.*, **36**, 10 (1977).
- 3) Kakar, V.V. and Hedges, A.R.: *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications* (ed by D.A. Lane and Ulf Lindahl), p. 455, CRC Press, FL (1989).
- 4) Ireland, H., Rylance, P.B. and Kesteven, P.: *ibid*, p. 549 (1989).
- 5) Casu, B., Diamantini, G., Fedali, G., Mantovani, M., Oreste, P., Prescador, R., Porta, R., Prino, G., Torri, G. and Zoppeti, G.: Retention of antilipaemic activity by periodate-oxidized non-anticoagulant heparins. *Arzenimittel-Forschung* **6**, 637 (1986).
- 6) Godal, H.C.: *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications* (ed by D.A. Lane and Ulf Lindahl), p. 533, CRC Press, Inc Boca Ration, FL (1989).
- 7) Levine, Hirsh, J. and Kelton, J.G.: *ibid*, p. 517, CRC Press, Inc Boca Ration, FL (1989).
- 8) De Swart, C.A.M., Nijmeijer, B., Roelofs, J.M.M. and Sixma, J.J.: Kinetics of intravenously administered heparin in normal humans. *Blood*, **60**, 1251 (1982).
- 9) Holmer, E.: *Heparin : Chemical and Biological Properties, Clinical Applications* (ed by D.A. Lane and Ulf Lindahl). p. 576, CRC Press, Inc Boca Ration, FL (1989).
- 10) Han, Y.N., Yang, H.O. and Han, B.H.: Studies on the anticoagulant component of *Artemisiae herba*. *Yakhak Hoeji* **28**, 69 (1984).
- 11) Lindahl, U., Thunberg, L., Backstrom, G., Riesenfeld, J., Nordling, K. and Bjorkk, I.: Extension and

- structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 12368 (1984).
- 12) Ricketts, C.R.: Dextran sulphate-A synthetic analogue of heparin. *Biochem. J.*, **51**, 129 (1952).
 - 13) Bode, V. and Franz, G.: Physiological activity of new heparinoids derived from plant polysaccharides. *Arch. Pharm.*, **324**, 363 (1991).
 - 14) Nishimura, S.I., Nishi, N. and Tokura, S., Inhibition of the hydrolytic activity of thrombin by chitin heparinoids. *Carbohydr. Res.*, **156**, 286 (1986).
 - 15) Doctor, V.M. and Sauls, V.: Isolation and anticoagulant properties of a new sulfated xylan: Comparison with heparin and a sodium pentosan polysulfate (SP-54). *Thromb. Res.*, **30**, 573-578 (1983).
 - 16) Doctor, V.M., Lewis, D., Coleman, M., Kemp, M.T., Marbley, E. and V. Sauls: Anticoagulant properties of semisynthetic polysaccharide sulfates. *Thromb. Res.*, **64**, 413-425 (1991).
 - 17) Okuyama, T., Narui, T.: Kurata, H., Wang, J.D. and Ohno, S.: Effects of oriental plant drugs on blood coagulation system. *J. Med. Pharm. Soc., Wakan-Yaku* **5**, 167-178 (1988).
 - 18) Chang, Hson-Mou: *Pharmacology and Applications of Chinese Material Medicines*, World Scientific Publishing Co. Pte Let, Singapore, 9128 (1986).
 - 19) Griffith, M.J., Tydall, J.A., Noyes, C.M. and Church, F.C.: Reactive site peptide structural similiarity between heparin cofactor II and antithrombin III. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2218 (1985).
 - 20) Pazur, J.H.: *Carbohydrate Analysis* (ed. by Chaplin, M and Kennedy, J) IRL press Oxford, p. 55 (1986).
 - 21) Bitter, T. and Muir, H.M.: *Anal. Biochem.* **4**, 330 (1962).
 - 22) Silvestri, Loui J., Hurst, Robert E., Simpson, L. and Settime, Juanta M.: Analysis of sulfate in complex carbohydrates. *Anal. Biochem.*, **123**, 303-309 (1982).
 - 23) Al-Hakim, A. and Linhardt, Robert J.: Isolation and recovery of acidic oligosaccharides from polyacrylamide gels by semi-dry electrotransfer. *Electrophoresis* **11**, 23-28 (1990).
 - 24) Larsen, Merre L., Abildgaard U., Teien, A.N. and Jesdarl, K.: Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238). *Thromb. Res.*, **13**, 285-288 (1987).
 - 25) Kim, Y.S.: *Proc. Symp. Biochem. Methods Res. Develop. Bioactive Substances*, Biochem. Society of Korea, p. 887 (1990).
 - 26) Nisino, T., Aizu, Y. and Nigumo, T.: The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. *Thromb. Res.*, **64**, 723-731 (1991).
 - 27) Church, F.C., Meade, James B., Treanor, Rita E., and Whinna, Herbert C.: Antithrombin activity of fucoidan. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3618-3623 (1989).
 - 28) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).