

식물로 부터 혈액 항응고 활성 다당류의 검색

권미향¹ · 박미경 · 나경수² · 성하진³ · 양한철*

¹고려대학교 생물공학연구소, ²대구공업전문대학 식품영양과,

³고려대학교 유전공학과, 고려대학교 식품공학과

초록 : 혈액 항응고 활성물질을 검색하기 위하여 73종의 한약재, 41종의 산채류 및 일반 채소류, 5종의 해조류들의 열수추출물들에 대해 혈액응고 지연시간(Tr)을 시험하였다. 1차검색에서 비교적 활성이 높았던 택사, 삼칠근, 현호색, 운지, 마늘, 청각의 산성 수추출물에서 가장 높은 항응고 활성(대조군에 비해 4.3배)을 보였다. 청각(1.2 Kg) 을 0.8% 염산 수용액(24 l)으로 추출한 후 메탄을 환류, 에탄올 침전 및 투석하여 활성이 약 2 배 증가된 조다당 CF-1을 얻었다. CF-1은 80.8%의 다당과, 8.7%의 단백질 및 13.3%의 황산기로 구성되어 있었으며, 다당류는 arabinose, galactose, 및 glucose가 주구성당으로 확인되었다. 이 조다당 CF-1의 항응고 활성 본체를 확인하기 위해 pronase처리와 periodate 산화를 행한 결과 pronase 처리시에는 활성의 변화가 없었으나 periodate 산화시에는 약 70%로 활성이 감소한다는 사실로부터 CF-1의 항응고 활성은 다당에 의해 기인됨을 알 수 있었다(1996년 1월 30일 접수, 1996년 3월 12일 수리).

서 론

혈액에는 응고반응을 일으키는 항응고 요소(procoagulant factor)와 이에 길항하는 항응고 요소(anticoagulant factor)가 있어 혈액응고 과정은 균형적으로 조절되나 혈관내에서의 혈액응고는 혈액의 순환을 방해하여 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화증과 같은 성인병을 유발할 수 있다.¹⁾ 생체에서의 혈액응고 반응은 응고계의 어느 한 요소에 의해 억제 또는 방해작용을 가지는 외래성 항응고제에 의해서도 효과적으로 저해될 수 있다.²⁾ 따라서 혈액의 항응고제는 성인병의 중요 치료제로서 사용될 수 있어 이에 대한 활발한 연구가 진행되어 왔으며, 현재까지 알려진 외래성 항응고제로는 coumarin, heparin, hirudin 외에 polysine과 protamine 등이 있다.³⁾ 이 중 임상적으로 가장 많이 사용되고 있는 heparin은 sulfated glucosamine과 glucuronic acid로 중합되어진 sulfated mucopolysaccharide로서 분자량은 평균 15,000이며 정맥주사시 내인성 경로의 prothrombin activator의 형성을 억제하거나 이미 형성된 thrombin의 저해제인 antithrombin II와 III의 활성을 증강시킴으로써 매우 강력한 항응고 활성을 나타낸다고 보고되고 있다.⁴⁾ 그러나 heparin의 경우 장기적인 사용시 혈소판의 감소, 출혈, 골다공증의 부작용을 초래하고 체내 반감기가 매우 짧을 뿐 아니라 분자량이 크고 극성이어서 세포벽 통과가 용이하지 않아 경구투여가 불가능하여 정맥주사나 피하주사로서만 효력을 발휘하는 것으로 알려져 있어 문제시 되고 있다.⁵⁻⁸⁾

따라서 이런 단점을 보완할 수 있는 새로운 항응고제에 대한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. 특히

해조류의 한 종류인 갈조류에 대한 연구가 많이 진행되었는데 예를 들어, *Sargassum linifolium*,⁹⁾ *Colpomenia sinuosa*,¹⁰⁾ *Padina pavonia*,¹¹⁾ *Dictyota dichomia*,¹²⁾ *Ecklonia kurome*,¹³⁾ *Fucus vesiculosus*¹⁴⁻¹⁵⁾ 등의 갈조류에서 분리한 다당인 fucoidan들의 항응고 활성을 검토하였으며 그 외에도 dextran, alginic acid, cellulose, xylan, chitosan, locust bean, guar gum 등의 다당류에서도 항응고 활성에 대한 다수의 연구가 행해지기도 하였다.¹⁶⁻¹⁷⁾

본 연구에서는 heparin의 결점을 보완할 수 있는 새로운 항응고성 다당을 임상적으로 무해한 식물의 식물체들로부터 얻고자 국내산 한약재, 버섯류, 해조류 및 산채류 등을 대상으로 항응고 활성을 검색하였다. 검색 과정에서 높은 활성을 보였던 수종의 시료들에서 추출 용매를 달리하여 활성을 비교하였으며 청각이 가장 우수한 활성을 보였다. 따라서 국내에서 김치의 부재료로서만 주로 이용되어 왔던 청각에서 항응고 활성성분을 분리하고 이의 활성본체를 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 한약재(73종), 산채류(43종), 버섯류(6종), 해조류(5종)는 1993년 봄 서울 경동시장에서 구입하였다.

일반성분 분석 및 구성당 분석

당의 총함량은 galactose와 arabinose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법²⁵⁾으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl 법²⁶⁾

찾는말: 항응고활성, 청각, 항응고 활성 본체

*연락처자

으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry법²⁷⁾으로 정량하였다. 황산기 함량은 Dodgson의 방법¹⁸⁾을 변형하여 2 M TFA로 121°C에서 1시간 동안 가수분해한 시료 0.2 ml에 4% TCA 용액 3.8 ml 및 BaCl₂-젤라틴 시약 1 ml를 첨가하여 20분간 방치한 후 360 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 K₂SO₄를 이용하여 작성하였다. 다당류의 구성당 분석은 Jones 등의 방법¹⁹⁾에 따라 시료(1~3 mg)를 2 M TFA로 121°C에서 1.5시간 동안 가수분해한 후 각각 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas chromatography법으로 구성당을 분석하였다.

항응고 활성의 측정

혈장응고 지연시간 (Plasma recalcification time; Tr) 측정을 위하여 혈장(plasma)의 조제는 성인남자 혈액을 3.13%의 sodium oxalate와 혼합(10:1)하여 12,000 rpm에서 25분간 원심분리하여 얻었다. 시료를 녹인 검액 50 μ l 또는 생리 식염수 50 μ l를 시험관에 취하고 oxalated plasma 100 μ l를 가한 후, 37°C에서 3분간 반응시킨 후 37°C에서 50 mM CaCl₂ 100 μ l를 가해 진탕하였다. CaCl₂를 가한 때부터 혈장중 fibrin 생성이 관찰될 때 까지의 시간을 측정하여 생리 식염수를 가한 대조군에 대한 시료군의 지연시간 비율(Tr)을 구하였다.²⁰⁾

활성트롬보 플라스틴 시간 (Activated partial thromboplastin time; APTT), 프로트롬빈 시간 (Prothrombin time; PT) 및 트롬빈 시간 (Thrombin time; TT)은 시료를 함유한 100 μ l의 혈장(유기용매 추출물의 경우 10초간격의 초음파 처리를 수회 반복하여 용해시켰음), PT 진단시약 100 μ l와 혼합한 후 37°C의 진탕 항온수조에서 정확히 3분간 반응시킨 후 37°C에서 미리 정지된 0.025 M CaCl₂ 용액을 응고가 될 때 까지의 시간을 각각 APTT, PT로 하였으며, TT는 시료를 함유한 100 μ l의 혈장을 37°C의 진탕 항온수조에서 정확히 3분간 반응시킨 후 37°C에서 미리 정지된 TT 진단시약 100 μ l를 가한 후 blood coagulation analyzer를 사용하여 응고가 될 때 까지의 시간으로 하였다.²¹⁾

항응고 활성성분의 추출

항응고 활성의 검색을 위한 추출은 각종의 시료 10 g에 250 ml의 물을 가해 1.5시간 동안 환류추출한 후 원심분리(6,500 rpm, 20분)하여 그 상등액을 농축, 동결 건조하였다. 추출물들의 검색에서 활성이 높았던 6종의 시료(택사, 운지, 마늘, 삼칠근, 청각, 현호색) 각 5g을 취해 5% urea를 함유한 10% NaOH 용액과 0.8% 염산을 함유하는 용액(pH 2)을 각각 150 ml 가해 2시간 환류추출한 후 1 N NaOH로 중화, 원심분리(6,500 rpm, 20분)하여 이의 상등액을 증류수에 대해 투석한 후 농축, 동결건조하였다. 유기용매 추출은 분쇄시료 4g을 취해 butanol, ethylacetate, methanol, chloroform, acetone, ethanol을 각각 150 ml 가해 2시간 환류추출하여 감압 건조 후 동결건조하였다.

청각으로 부터 항응고성 조다당의 조제

청각 1.2 Kg에 0.8% 염산을 함유한 용액 (pH 2)을 1.6 l를 가한 후 70~75°C 진탕 항온수조에서 2시간 동안 추출한 후 중화, 원심분리(6,500 rpm, 20분), 투석, 동결 건조하여 얻은 시료(CF-0, 27.54 g)를 methanol로 5회 환류추출하여 methanol 가용성분(CF-M, 4.941 g)을 제거하였다. Methanol 비가용 성분(17.94 g)을 소량의 증류수로 용해시키고 5배의 ethanol을 가해 4°C에서 24시간 방치하여 ethanol 가용성분(CF-E, 4.797 g)과 침전성분을 분리하였다. Ethanol 침전성분은 증류수에 재용해하여 3일간 증류수에서 투석한 후 농축, 동결건조하여 조다당(CF-1)을 얻었다.

항응고 활성 본체 검토

청각에서 분리한 조다당 CF-1(20 mg)을 10 mM CaCl₂ 가 함유된 Tris-HCl buffer(pH 7.9) 20 ml에 용해시킨 후, pronase(20 mg)를 가하여 37°C에서 48시간 반응시켰다. 이 반응액을 5분간 끓여 정지시킨 후, 원심분리하여 얻은 상등액을 2일 동안 투석하고, 비투석획분을 동결 건조하여 CF-1의 pronase 분해물을 얻었으며, CF-1의 periodate 산화물을 제조하기 위해 조다당 CF-1(20 mg)을 50 mM acetate buffer(pH 4.5) 10 ml에 용해시킨 후, 50 mM NaIO₄를 5 ml 가하여 4°C의 암실에서 48시간 동안 반응시켰다. 과량의 NaIO₄를 분해하기 위하여 반응액에 ethylene glycol을 5 ml 가해 1시간 동안 실온에 방치한 후, 2일간 투석한 다음 비투석획분을 20 ml로 농축하였다. 이 농축액에 NaBH₄ 20 mg을 가하여 실온에서 1시간 교반시키고 0.1 M acetic acid로 중화, 투석, 동결건조하여 조다당 CF-1의 periodate 산화물을 조제하였다.

결과 및 고찰

1차 항응고 활성의 검색 73종의 한약재, 37종의 산채류 및 채소류, 5종의 버섯류, 5종의 해조류의 항응고 활성을 조사하기 위하여 이들의 열수추출물들을 대상으로 혈액응고지연시간(plasma recalcification time)법으로 사용하여 검색하였다. 삼칠근, 조각자, 쑥, 택사, 천화분, 고삼, 산초, 행인, 용담초, 상백피, 봉출, 현호색등이 Tr값이 1 이상의 비교적 높은 항응고 활성을 보였다. 토란, 고추, 부추, 고구마순, 도라지, 마늘, 연근, 고비등이 높은 항응고 활성을 나타내었고, 버섯류에서는 운지버섯이 높은 Tr값(2.2)을 보였다(Table 1). 해조류에서는 특히 다시마, 미역, 청각 등이 강력한 항응고 활성을 나타내었다(Table 2). 따라서 1차 검색재료 중 비교적 활성이 높았던 택사, 삼칠근, 현호색, 운지, 마늘, 청각을 선정하여 재검색을 행하였다. 다시마, 미역의 활성이 청각보다 높았으며 이들에서 분리된 항응고성 fucoidan²²⁾에 대한 연구는 상당히 진행된 바 있으므로 2차 검색 시료에서 제외시켰다.

열수추출물에서 활성이 높았던 6가지 시료들을 대상으로 함황성다당 및 아미노 다당들의 효율적인 추출²⁴⁾을

Table 1. Anticoagulant activities of hot water extracts from edible plants

Korean name	Scientific name	Tr (=Ts/Tc)*	Korean name	Scientific name	Tr (=Ts/Tc)*
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	0.82	마황	<i>Ephedra sinica</i>	0.54
뽕잎	<i>Morus alba</i>	0.87	반하	<i>Pinellia ternata</i>	0.65
삼칠근	<i>Panax notoginseng</i>	1.13	천궁	<i>Ligusticum wallichii</i>	0.67
대추	<i>Zizyphus jujuba</i>	0.78	황정	<i>Polygonatum japonicum</i>	0.66
원지	<i>Polygala tenuifolia</i>	0.84	향유	<i>Elsholtzia ciliata</i>	0.50
천문동	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	0.91	도코로마	<i>Discorea tokoro</i>	0.57
백출	<i>Atractylodes japonica</i>	0.85	삼능	<i>Scirpus maritimus</i>	0.87
오수유	<i>Evodia officinalis</i>	0.91	고삼	<i>Sophora flavescens</i>	1.04
맥문동	<i>Matricaria chamomilla</i>	0.90	산초	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	1.00
목향	<i>Saussurea lappa</i>	0.90	행인	<i>Prunus armeniaca</i>	1.26
백지	<i>Angelica dahurica</i>	0.97	용담초	<i>Gentiana scabra</i>	1.11
조각자	<i>Gleditsiac spina</i>	1.00	상백피	<i>Morus alba</i>	1.16
가시나무	<i>Quercus myrsinaefolia</i>	0.91	봉출	<i>Curcuma zedoaria</i>	1.07
계지	<i>Cinnamomum cassia</i>	0.76	현호색	<i>Corydalis ternata</i>	3.07
계피	<i>Cinnamomum cassia</i>	0.91	썸바귀	<i>Ixeris dentata</i>	0.57
인동	<i>Lonicia japonica</i>	0.89	피망	<i>Capsicum angulosum</i>	0.60
쑥	<i>Artemisia princeps</i>	1.16	양파	<i>Allium cepa</i>	0.60
약모밀	<i>Houttuynia cordata</i>	0.82	가지	<i>Solanum melongena</i>	0.56
민들레	<i>Taraxacum platycarpum</i>	0.80	취	<i>Pueraria thunbergiana</i>	0.64
황백	<i>Phellodendron amurense</i>	0.51	근대	<i>Beta vulgaris</i>	0.68
백급	<i>Bletilla striata</i>	0.59	들깨잎	<i>Perilla frutescens</i>	0.69
세신	<i>Asarum sieboldii</i>	0.60	토란대	<i>Colocasia anliquorum</i>	0.68
속새	<i>Equisetum hyemare</i>	0.60	고추잎	<i>Capsicum annuum</i>	0.70
연교	<i>Forsythia viridissima</i>	0.92	돈나물	<i>Pittosporum tobira</i>	0.69
목단피	<i>Paeonia suffruticosa</i>	0.90	호박	<i>Cucurbita moschata</i>	0.68
대황	<i>Rheum undulatum</i>	0.59	달래	<i>Allium monanthum</i>	0.74
뱀딸기	<i>Rubus coreanus</i>	0.83	쑥갓	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	0.67
굴피나무	<i>Platycarya strobilacea</i>	0.85	토란	<i>Colocasia antiquorum</i>	0.94
회향	<i>Foeniculum vulgare</i>	0.76	냉이	<i>Capsella bursapastoris</i>	0.75
적작약	<i>Paeonia lactiflora</i>	0.79	고추	<i>Capsicum annuum</i>	0.90
택사	<i>Alisma calnaliculatum</i>	1.10	생강	<i>Zingiber officinale</i>	0.61
유채	<i>Brassica campestris</i>	0.76	도토리	<i>Quercus dentata</i>	0.86
은행잎	<i>Ginkgo biloba</i>	0.82	고사리	<i>Pteridium aquilinum</i>	0.79
쑥	<i>Artemisia asiatica</i>	0.66	고구마순	<i>Ipomoea batatas</i>	0.99
지유	<i>Sanguisorba officinalis</i>	0.91	부추	<i>Allium tuberosum</i>	1.15
방풍	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	1.01	두충잎	<i>Eucommiae ulmoides</i>	0.95
천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	1.09	도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	0.88
지령	<i>Grifola umbellata</i>	0.51	마늘	<i>Allium sativum</i>	1.09
익모초	<i>Leonulus japonicus</i>	0.54	참취	<i>Aster scaber</i>	0.69
털진득찰	<i>Siegesbeckia pubescens</i>	0.52	연근	<i>Nelumbo nucifera</i>	1.32
진피	<i>Citrus nobilis</i>	0.57	통후추	<i>Piper nigrum</i>	0.79
절경이	<i>Plantago asiatica</i>	0.48	두릅	<i>Aralia elata</i>	0.81
오약	<i>Lindeara strychnifolia</i>	0.58	고비	<i>Osmunda japonica</i>	0.97
일황련	<i>Coptis japonica</i>	0.52	갓	<i>Brassica juncea</i>	0.76
파고지	<i>Psaralea corylifolia</i>	0.59	곰취	<i>Ligularia fischeri</i>	0.70
용안육	<i>Euphoria longana</i>	0.64	잔대	<i>Adenophora triphylla</i>	0.77
곽향	<i>Agastache rugosa</i>	0.53	미나리	<i>Oenanthe javanica</i>	0.73
소목	<i>Caesalpinia sappan</i>	0.72	냉초	<i>Veronicastrum sibiricum</i>	0.76
금은화	<i>Lonicera japonica</i>	0.59	양송이	<i>Agaricus bisporus</i>	0.95
지모	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	0.71	표고	<i>Lentinus edodes</i>	0.79
음양곽	<i>Epimedium koreanum</i>	0.56	느타리	<i>Pleurotus ostreatus</i>	0.70
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	0.59	영지	<i>Ganoderma lucidum</i>	0.71
담쟁이덩굴	<i>Partheniocissus tricuspidata</i>	0.69	운지	<i>Coriolus versicolor</i>	2.20
화살나무	<i>Euonymus alata</i>	0.69	결명자	<i>Cassia tora</i>	0.83
우랄감초	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	0.81	구기자	<i>Lycium chinense</i>	0.95
홍화	<i>Carthami tinctorius</i>	0.57	오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	0.62
카모밀라	<i>Matricaria chamomilla</i>	0.58			

*Clotting time ratio of sample (Ts) to saline (Tc). The concentration of each water extract was 1 mg/ml.

Table 2. Anticoagulant activities of hot water extracts from sea weeds

Korean name	Scientific name	Tr (=Ts/Tc)*
김	<i>Porphyra tenera</i>	0.97
파래	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0.97
다시마	<i>Laminaria japonica</i>	3.57
미역	<i>Undaria pinnatifida</i>	3.52
청각	<i>Codium fragile</i>	2.17

*Clotting time ratio of sample (Ts) to saline (Tc). The concentration of each water extract was 1 mg/ml.

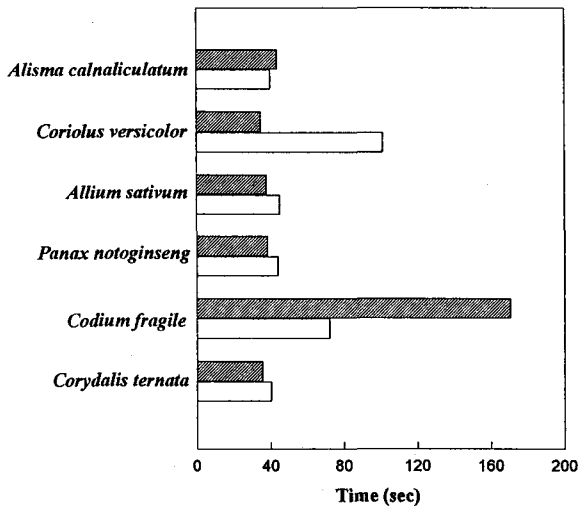


Fig. 1. Comparison of anticoagulant activities between alkalic and acidic extracts from several plants.

The control time of APTT was 40 sec. The concentration of each extracts was 1,000 μ g/ml. □, extracted with 10% NaOH containing 5% urea; ▨, extracted with 0.8% hydrochloride solution.

위하여 산, 알칼리성 수추출을 행하고 이들 시료에 대하여 APTT법으로 항응고 활성을 측정된 결과 Fig. 1에서와 같이 운지의 알칼리성 수추출물이 대조군에 비해 2.5배, 청각 산성 수추출물이 4.3배 높은 활성을 나타내었다. 이는 일반적으로 해조류를 묽은산으로 추출시 함황성 다당의 추출이 용이한 점²⁴⁾에서 청각중의 항응고성 활성 성분이 함황성 다당류의 가능성을 시사하는 것이었다.

추출용매에 따른 청각의 항응고 활성 검토

녹조류인 청각중의 항응고 활성 성분에 관한 연구는 아직 보고된 바 없으므로 청각(*Codium fragile*)을 추출용매에 따른 항응고 활성을 비교하기 위하여 용매를 달리하여 추출물을 제조하고, 1 mg/ml의 농도에서 각각의 항응고 활성과 수율을 Table 2에 나타내었다. 수율은 메탄올, 에탄올, 부탄올 추출물에서 각각 7.9%, 6.0%, 5.5% 순으로 비교적 높았으나 항응고 활성은 APTT, PT, TT 모두에서 높게 나타나지 않았다. 그러나 클로로포름 추출시에도 APTT의 경우 약 3배 응고시간이 지연되어

Table 3. Comparison of anticoagulant activities of extracts by different solvents from *Codium fragile*

Solvent	Yield (%)	APTT (sec)	PT (sec)	TT (sec)
Butanol	5.5	46.5	19.5	11.6
Ethylacetate	0.3	40.0	18.0	14.1
Methanol	7.9	44.0	19.5	14.1
Chloroform	1.9	116.0	20.0	15.0
Acetone	0.3	41.6	18.0	15.0
Ethanol	6.0	39.2	17.0	13.9
0.8% HCl/H ₂ O	2.7	170.6	18.9	28.4

*The controls of APTT, PT and TT were 40, 18 and 15 sec, respectively. The concentration of each sample was 1 mg/ml.

이 획분에서 다당체의 저분자성 항응고 활성 물질이 함유되어 있는것으로 사료되었으며, 그 외 유기용매에서는 별 뚜렷한 효과가 없었다. 산성 수추출물의 경우 대조군과 비교하여 APTT 4.3배, TT는 1.9배 응고시간이 지연되었다. 이와 같이 산성 수추출물이 APTT, TT법에서 높은 활성을 나타내는 것은 Church 등²³⁾이 이미 보고한 것처럼 해조다당인 fucoidan이 외인성 경로보다는 내인성 경로에 영향을 주어 응고시간을 지연시킨다는 결과와 일치하며 그 결과 불용성의 fibrin 형성이 지연됨을 알 수 있었다.

청각의 항응고 활성성분과 활성본체

청각 1.2 Kg을 0.8%의 염산을 함유한 수용액에서 추출하여 CF-0(27.54 g)을 얻었으며 이를 메탄올, 에탄올로 환류하여 가용성분인 CF-M(4.941 g), CF-E(4.797 g)와 불용성분인 CF-1(12.94 g)을 얻었다. 각 획분의 항응고 활성은 Fig. 2에, 구성당 분석과 황산기 함량은 Table 4에 나타내었다. CF-M의 경우 PT, TT에서는 활성이 거의 없었으며 APTT는 1,000 μ g/ml 농도에서 60.3초로 응고시간이 다소 지연되었고 그 외 농도에서는 별 뚜렷한 효과가 없었다. CF-E의 경우는 대조군과 거의 유사하였다. CF-0는 APTT에서는 172.5초, TT에서는 147.5초로 지연되었고 CF-1은 341초, 190초로 각각 활성이 증가하였다. CF-0와 CF-1는 모두 PT에서는 활성이 없었으며 헤파린을 대조군으로 실험한 결과와 유사하게 APTT, TT는 농도에 따라 그 활성이 급격히 증가하였다. 또한 CF-1이 CF-0보다 그 활성이 약 2배 증가하였는데, 이는 메탄올, 에탄올 환류시 시료에 존재하던 저분자 색소 물질들, polyphenol계통의 물질들이 제거됨으로써 고분자 다당의 농도가 증가하였기 때문이라고 볼 수 있다. 총당 및 산성당 함량은 64.3% 및 7.55%에서 각각 80.8%, 8.50%로 증가하였으며 단백질 함량은 약간 감소하였다. 두 획분의 구성당 분석 결과 주구성당은 arabinose, galactose, glucose이었으며, 이 결과는 fucose를 주구성당으로 하는 fucoidan²²⁾과, glucuronic acid, glucosamine이 주구성당인 heparin⁵⁾과는 차이를 보였다. 또한 이들 기존의 항응고성 다당과 마찬가지로 유허이 함유되어 있었는데, 황산기의 함량은 약 13%이었다. CF-1의 주성

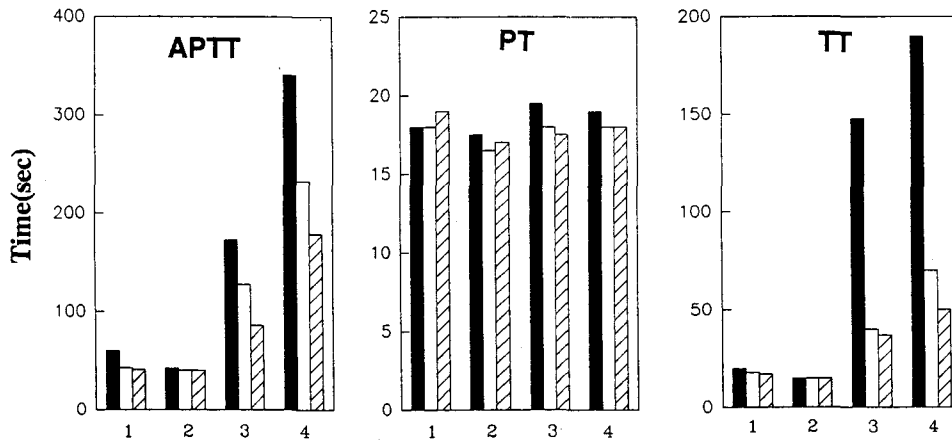


Fig. 2. Anticoagulant activities of crude extracts from *Codium fragile*. ■, 1,000 µg/ml; □, 500 µg/ml; ▨, 250 µg/ml. 1. CF-M (Methanol soluble component) 2. CF-E (Ethanol soluble component) 3. CF-0 (Acid extracts of *Codium fragile*) 4. CF-1 (Ethanol precipitate)

Table 4. Chemical compositions and yields of anticoagulant materials from *Codium fragile*

	CF-0 ^a	CF-1 ^b
	(%)	
Total sugar	64.3	80.8
Uronic acid	7.5	8.5
Protein	10.1	8.7
Sulfate	13.1	13.3
Yield	2.7	1.1
	Component sugar (Molar ratio)	
Rhamnose	1.0	1.0
Fucose	0.1	0.2
Arabinose	18.2	19.3
Xylose	Trace	1.2
Mannose	1.3	1.6
Galactose	10.0	12.4
Glucose	8.1	10.3

^aCF-0 was obtained from 0.8% hydrochloride solution of *Codium fragile*.

^bCF-1 was obtained from ethanol precipitate of CF-0.

분은 당이었지만 소량의 단백질이 함유되어 있어 항응고 활성에 당과 단백질의 영향을 확인하기 위해 pronase 처리와 periodate 산화를 행한 후 항응고 활성을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 pronase로 CF-1의 단백질을 소화시에는 CF-1에 비해 활성의 변화가 거의 없는 반면, periodate로 다당 부위만을 산화시에는 APTT의 경우 70%, PT의 경우 65% 항응고활성이 감소하였다. 그러므로 청각으로부터 추출한 물질의 항응고 활성분체는 다당에 기인함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Walsh, P. N. (1981) In Hemostasis and Thrombosis, Lippincott Co., Philadelphia, pp. 404-420.
 2. Jackson, C. M. and Y. Nemerson (1980) In Blood Coagulation,

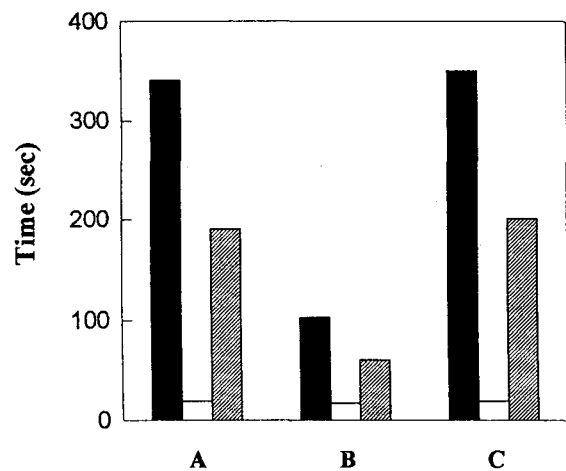


Fig. 3. Anticoagulant activities of pronase digested and periodate oxidated CF-1.

■, APTT; □, PT; ▨, TT. A: CF-1 B: NaIO₄ oxidated CF-1 C: Pronase digested CF-1.

tion, *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 765-771.

3. 이상화 (1994) *Streptomyces* 균주가 생성하는 *Rhabdophis tigrinus* 맹독의 prothrombin 활성화 효소의 작용과 thrombin의 작용을 억제하는 물질. 경북대학교 박사학위논문.
 4. Kumada, T. and Y. Abiko (1981) Comparative study on heparin and a synthetic thrombin inhibitor No. 805(MD-805) in experimental antithrombin deficient animals. *Thromb. Res.* **24**, 285-289.
 5. 김영식 (1992) 식물성 산성당으로부터 헤파리노이드의 제조, *약학회지.* **36**, 350.
 6. 김영식, 노지은, 안형수 (1993) 지유로부터 분리한 다당류의 분석과 항응고 작용, *생약학회지.* **24**, 124.
 7. Joffe, S (1976) Drug prevention of postoperative deep vein thrombosis, *Arch. Surg.* **111**, 27.
 8. De Swart, C. A. M., B. Nijimeyer, J. M. M. Roelofs, and J. J. Sixma (1982) Kinetics of intravenously administered heparin in normal humans, *Blood* **60**, 1251.
 9. Abel-Fattah, A. F., M. M. D. Hussein, and H. M. Salem

- (1974) Some structural feature of saggasan, a sulphated heteropolysaccharides from *Sagassum linifolium*, *Carbohydr. Res.* **33**, 19.
10. Hussein, M. M (1975) Two new polysaccharides from *Columbinia sinuosa*, *Phytochemistry* **14**, 1866.
 11. Hussein, M. M., A., Abdel-Aziz, and H. M. Salem (1980) Sulfated heteropolysaccharides from *Padina pavonia*, *Phytochemistry* **19**, 2131.
 12. Abdel-Fattah, A. F., and S. T. Fouad (1978) Carbohydrates of the brown seaweed *Dictyota dichotoma*, *Phytochemistry* **17**, 741.
 13. Nishino, T., H. Kiyohara, H. Yamada, and T. Nagumo (1991) An anticoagulant fucoidan from brown seaweed *Ecklonia kurome*, *Phytochemistry* **30**, 535.
 14. Springer, G. F., H. A. Wurzel, G. M. McNeal, N. J. Ansell, and M. F. Doughty (1957) Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidan, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**, 404.
 15. Church, F. C., and H. C. Whinna (1986) Rapid sulfopropyl-disk chromatographic purification of bovine and human thrombin, *Anal. Biochem.* **157**, 77.
 16. Ricketts, C. R (1952) Dextran sulphate-A synthetic analogue of heparin, *Biochem.* **51**, 129.
 17. Doctor, V. M., D. Lewis, M. T. Coleman, M. T. Kemp, E. Marbley, and V. Sauls (1991) Anticoagulant properties of semisynthetic polysaccharide sulfate, *Thromb. Res.* **64**, 413.
 18. Dodgson, K. S., and R. G. Price (1962) A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides, *Biochem. J.* **84**, 106.
 19. Jones, T. M., and P. O. Albersheim (1972) A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides, *Plant. Physiol.* **49**, 926.
 20. Frank, C. C., J. B. Meade, R. E. Treanor, and H. C. Whinna (1989) Antithrombin activity of fuoidan, *J. Biol. Chem.* **264** (6), 3618.
 21. Markwadt, F., G. Nowak, and J. Hoffmann (1983) Comparative studies on thrombin inhibitors in experimental microthrombosis. *Thromb. Haemostas.* **49**, 235-237.
 22. 구재근 (1994) 한국산 갈조류 중의 fucoidan 추출, 정제 및 그 특성에 관한 연구. 고려대학교 박사학위논문.
 23. Church, F. C., R. E. Treanor, G. B. Sherrill, and H. C. Whinna (1987) Carboxylate polyanions accelerate inhibition of thrombin by heparin cofactor II, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **148**, 362.
 24. Aspinall, G. O. (1983) In *The Polysaccharides*, vol. 1., Academic Press, New York, pp.19-32.
 25. Dubios, M., K. A. Hamilton, J. K. Rebers, and F. Sonisth. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances, *Anal. Chem.* **28**, 350-352.
 26. Blumenkronz, N. and G. Asboe-Hansen (1973) New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.* **54**, 484-487.
 27. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. Farr, and R. J. Rindall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 256-259.

Screening of Anticoagulant Polysaccharides from Edible Plants

Mee-Hyang Kweon¹, Mee-Kyung Park, Kyung-Soo Ra², Ha-Chin Sung³ and Han-Chul Yang* (¹Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul, Korea; ²Department of Food Nutrition, Taegu Technical Junior College, Taegu, Korea; ³Department of Genetic Engineering, Korea University, Seoul, Korea; Department of Food Technology, Korea University, Seoul, Korea)

Abstract: Screening of anticoagulant activity was conducted for the hot water extracts of 73 kinds of medicinal herbs, 41 kinds of Korean edible plants, and 5 kinds of sea weeds using plasma recalcification test(Tr). In the first screening several extracts of the plants, *Alisma calnaliculatum*, *Corydalis ternata*, *Panax notoginseng*, *Allium sativum*, *Ganoderma lucidum*, *Codium fragile*, showed high activities. When the plants were reextracted with various solvent conditions, acidic water extracts of *Codium fragile* showed the highest activity in APTT. A crude polysaccharide fraction(CF-1) was prepared by methanol reflux, ethanol precipitation, dialysis and lyophilization of the acid extracts. CF-1 comprised 80.8% total sugar consisting of arabinose, galactose and glucose as the main monomers, 8.7% protein, and 13.3% sulfate. The anticoagulant activity of CF-1 was not changed by pronase digestion, but decreased by periodate oxidation, and this indicated that the anticoagulant activity was attributed to the polysaccharide portion.

*Corresponding author