

효소분해와 HPLC를 이용한 황산콘드로이틴나트륨의 정량

강성호[†] · 신 훈 · 장순기 · 윤형중
한일약품(주) 중앙연구소
(1994. 4. 15. 접수)

Determination of Sodium Chondroitin Sulfate by Enzymatic Digestion and HPLC

Seong-Ho Kang[†], Hoon Shin, Sun-Ki Chang and Hyung-Jung Yoon

Research & Development Center of Hanil Pharmaceutical Ind. Co., LTD, Seoul 133-112, Korea

(Received Apr. 15, 1994)

요약 : 혼합물 중에서 미량 존재하는 황산콘드로이틴나트륨을 정량하기 위하여, Chondroitinase ABC를 사용하여 효소반응을 시킨 후 얻어지는 Δ Di-6S(2-acetamido-2-deoxy-3-0-(β -D-gluco-4-enepyranosyluronic acid)-6-0-sulf-D-galactose)를 지표성분을 설정하여 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하는 방법을 확립하였다. 230nm에서 흡광도를 측정하였고, 검출한계는 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. 본 분석법을 제제에 적용하였을 때 캡셀제는 $100.01 \pm 1.58\%$, 점안제는 $99.89 \pm 1.80\%$ 로 재현성 있는 결과를 나타내었다.

Abstract : In order to determine sodium chondroitin sulfate in the mixture, chondroitinase ABC was used for enzymatic reaction. The procedure was rapid, simple, quantitative and the HPLC analysis of Δ Di-6S(2-acetamido-2-deoxy-3-0-(β -D-gluco-4-enepyranosyluronic acid)-6-0-sulfo-D-galactose) in the sodium chondroitin sulfate was obtained. The absorbance was measured at 230nm and detection limit was $1\mu\text{g}/\text{ml}$. When we applied this method to the drugs(capsule, ophthalmic solution), it gave the mean contents of $100.01 \pm 1.58\%$ and $99.89 \pm 1.80\%$ respectively.

Key words : Sodium chondroitin sulfate, chondroitinase ABC, HPLC, enzymatic reaction

1. 서 론

관절통, 요통, 견비통, 신경통, 만성신장염, 안구의 기능 유지, 난청 등에 유용하게 쓰이는 황산콘드로이틴 나트륨은 척추동물의 연골을 비롯하여 각종 결합조직의 구성성분이며, 골 등의 지지조직에 넓게 분포하고 있고, 특히 대동맥, 심장판막, 힘줄, 피부, 각막 등에 함유되어 있으며 생체기능의 조절에 중요한 역할을 한

다. 본 성분은 mucopolysaccharide로 sulfate기가 기본 골격인 disaccharide의 어떤 위치에 결합되어 있는가에 따라 크게 chondroitin 4-sulfate(chondroitin sulfate A), chondroitin 6-sulfate(chondroitin sulfate C), dermatan sulfate(chondroitin sulfate B) 등 세 종류로 구분이 되며¹, 시판되고 있는 황산콘드로이틴나트륨은 이들이 함께 혼합되어 있는 상태로 알려져 있으며, 정량하기 위한 방법으로는 시료를 전처리한

뒤 acriflavine으로 발색시키거나, column을 통과하여 시료를 적지리한 후 p-nitrobenzenediazonium fluoroborate 등으로 발색시켜 흡광도를 측정하는 방법이^{2,3} 주로 사용된다. 또한 원료 자체에 대한 효소반응 후 구성성분에 대한 분석방법은^{4~9} 많이 알려져 있다. 하지만 점안제나 캡셀제 등의 제제와 같은 혼합물 중에서 황산콘드로이틴나트륨을 간단하고 정확하게 미량분석하여 실제로 응용할 수 있는 확립된 분석법은 아직 발표되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 혼합물 중에서 황산콘드로이틴나트륨과 선택적으로 반응하는 chondroitinase ABC를 사용하여 효소반응을 시킨 후 얻어지는 chondroitin disaccharide Δ Di-6S를 지표성분으로 설정하여, HPLC를 이용하여 황산콘드로이틴나트륨을 정량하는 방법을 검토하게 되었다.

2. 실험

2. 1. 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약으로는 chondroitinase ABC, chondroitin disaccharide Δ Di-6S(2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-glucopyranosyl)uronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose)와 Tris 완충액으로 사용한 Trizma는 Sigma사제, sodium chondroitin sulfate는 Danimex사제(독일), KH_2PO_4 는 Aldrich사제 특급시약을 사용하였고, HPLC 용리액으로 사용한 모든 용매는 HPLC급의 Merck사제를 사용하였다.

사용한 기기로는 HP8452A diode array spectrophotometer(Hewlett-Packard Co. LTD), 액체 크로마토그래피는 Shimadzu사의 LC-6A pump, SPD-6A uv spectrophotometric detector, C-R6A chromatopac integrator, 컬럼은 Tosoh사(일본)의 TSK-Gel NH₂-60(4.6mm i. d. \times 25cm, 5 μ m)을 사용하였고, sonicator는 Elma사의 Transsonic T460을 사용하였다.

2. 2. 최적의 효소분해반응

최적의 효소분해반응의 조건을 구하기 위해 chondroitinase ABC로 Tatsuya Yamagata 등의 방법¹⁰을 응용하여 다음과 같은 여러 조건에 변화를 주어 효소반응을 시켰다.

2. 2. 1. 효소량

황산콘드로이틴나트륨 표준품 50mg을 물에 녹여

100ml로 한 뒤 40 μ l를 취해 0.1M Tris·HCl 완충액(pH:8.0) 50 μ l와 chondroitinase ABC를 0.5~100 ($\times 10^{-3}$ unit/10 μ l)까지 변화시켜 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 효소반응을 시킨 후 효소량의 변화에 따른 황산콘드로이틴나트륨의 효소분해반응 정도를 조사하였다.

2. 2. 2. pH 영향

효소와 기질의 최적반응 pH를 구하기 위해 chondroitinase ABC를 0.02 unit로 고정시킨 후 상기 실험에서 pH를 6.0~9.5로 변화시켜 실험하였다.

2. 2. 3. 기질의 양

Chondroitinase ABC를 0.02 unit/10 μ l로 고정시키고 상기 조건하에서 황산콘드로이틴나트륨의 양을 1~100 μ g/100 μ l까지 변화시켜 보았다.

2. 2. 4. 반응온도, 반응시간

황산콘드로이틴나트륨과 chondroitinase ABC의 양을 고정시킨 후 반응온도를 5~60 $^{\circ}$ C, 반응시간을 2~120분까지 변화시키면서 각각에 대한 영향을 조사하였다.

2. 3. HPLC 최적 조건

혼합물 중에서 황산콘드로이틴나트륨을 정량할 수 있는 HPLC 최적 조건을 구하기 위해 실험한 결과 Table 1과 같은 조건을 얻을 수 있었고, 본 조건 하에서 HPLC를 이용하여 정량하였다.

Table 1. Analytical conditions of HPLC

Detection : UV 230nm
Column : TSK-Gel NH ₂ -60(250mm \times 4.6mm, 5 μ m) (at 40 $^{\circ}$ C)
Mobile phase : Methanol : 0.1M KH_2PO_4 (pH:4.0) = 1:4(v/v)
Flow rate : 0.8ml/min.
Injection volume : 10 μ l

2. 4. Δ Di-6S의 분리 및 검출

HPLC에서 지표성분으로 설정한 Δ Di-6S의 검출을 위해 물을 대조액으로 하여 UV-VIS spectrum을 조사하였다.

2. 5. 검량곡선의 작성

황산콘드로이틴나트륨의 양을 10~1000(μ g/ml)까

지 변화시키면서 효소반응을 시킨 후 HPLC 분석조건에서 실험을 하여 검량곡선을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. 효소의 양에 따른 변화

효소의 양에 따른 기질의 반응성을 Fig. 1에 나타내었다. Chondroitinase ABC의 양이 증가함에 따라 반응하는 황산콘드로이틴나트륨의 양도 증가하나 0.02 unit/10 μ l 이상에서는 반응하는 양이 거의 일정하게 유지되고 있다. 따라서 효소반응에 있어 chondroitinase ABC의 양은 20($\times 10^{-3}$ unit/10 μ l)으로 결정하였다.

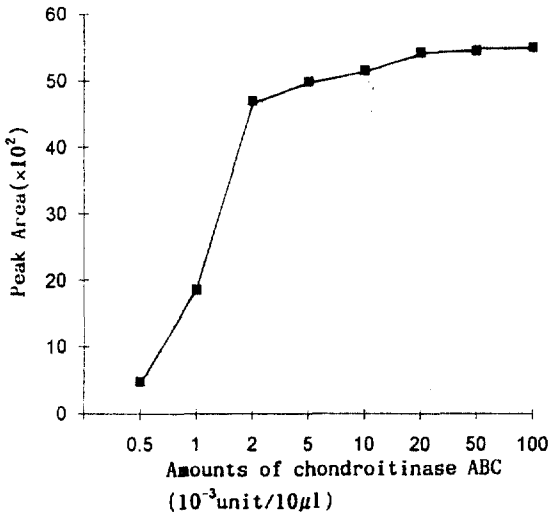


Fig. 1. Effect of the amounts of chondroitinase ABC on the enzymatic digestion.

3. 2. pH 변화에 따른 효소반응

pH를 6.0에서 9.5까지 변화시키면서 그에 따른 효소반응의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2의 (a)에서 볼 수 있듯이 pH 6.0~8.5에서는 pH의 변화에 크게 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 따라서 사용되는 효소의 양을 0.1배의 농도로 줄여 사용한 뒤 다시 실험을 하여 Fig. 2의 (b)에 나타내었다. 그림 (b)에서 볼 수 있듯이 pH 8.0에서 가장 큰 반응성을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 효소반응의 최적 pH는 8.0으로 결정하였다.

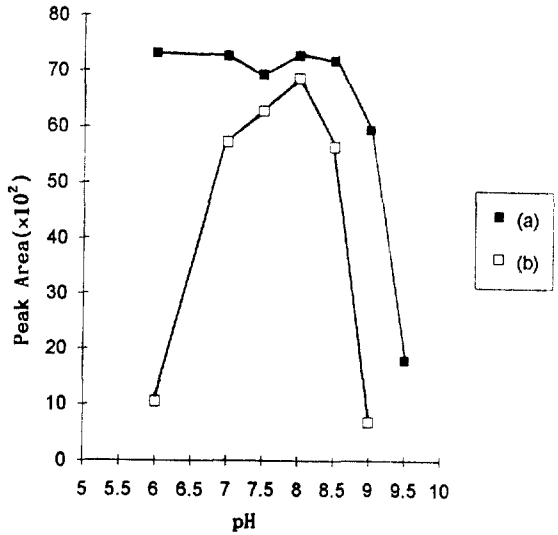


Fig. 2. Effect of pH on the enzymatic digestion. (a) at amount of chondroitinase ABC: 0.02unit/10 μ l (b) at amount of chondroitinase ABC: 0.002unit/10 μ l

3. 3. 반응온도 및 시간에 따른 효소반응

반응온도 및 시간의 변화에 따른 효소반응의 결과를 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 3과 Fig. 4에서 알 수 있듯이 37 $^{\circ}$ C에서 가장 큰 반응성을 나타내며, 37 $^{\circ}$ C에서 반응시간이 증가함에 따라 반응성은 증가하나, 20분 후부터는 증가율이 감소하며 30분 후부터는 거의 변화가 없음을 알 수 있었다. 따라서 효소반응에 있어

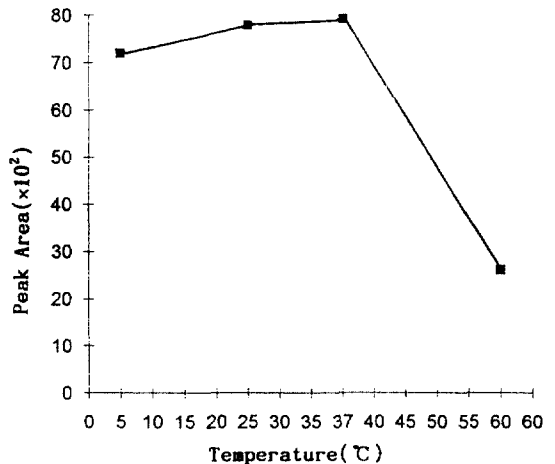


Fig. 3. Effect of temperature on the enzymatic digestion.

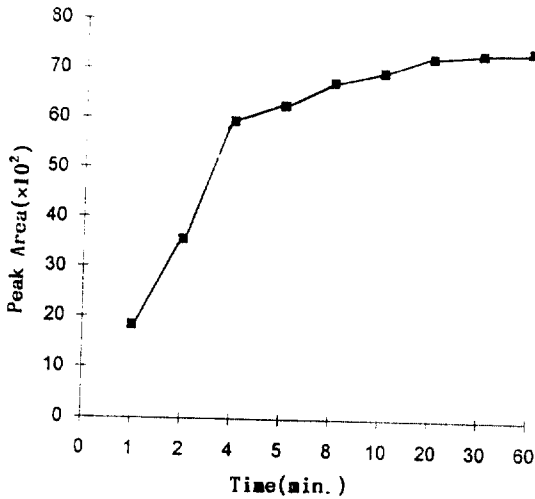


Fig. 4. Effect of reaction time on enzymatic digestion. (at 37°C)

Table 2. Optimal conditions of enzymatic Digestion.

Concentration of enzyme : 0.002 unit / μ l
pH of reaction : 8.0
Time of reaction : 30min.
Temperature of reaction : 37°C

최적 반응온도 및 시간은 37°C와 30분으로 결정하였다.

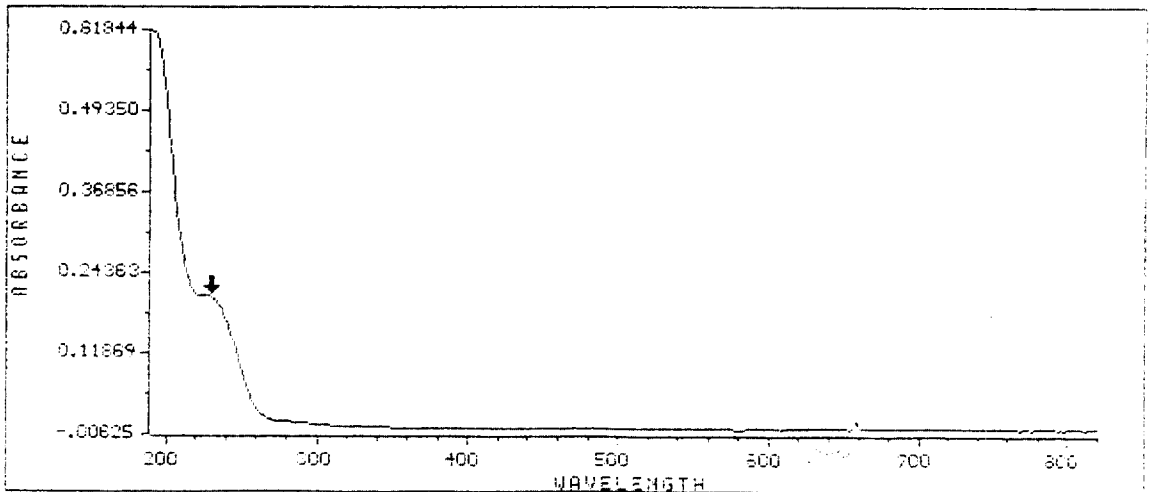
이상과 같은 결과를 종합하여 황산콘드로이틴나트륨을 효소반응시킬 때의 최적 효소반응 조건을 Table 2에 나타내었다.

3. 4. Δ Di-6S의 분리 및 검출

황산콘드로이틴나트륨을 효소반응시킨 뒤 HPLC로 정량하기 위하여 지표성분으로 설정한 Δ Di-6S의 검출을 하기 위해 최대 흡수파장을 조사하고자 uv-vis spectrum을 작성하여 Fig. 5에 수록하였다. 그림에서 볼 수 있듯이 230nm에서 최대 흡수파장을 나타내고 있음을 알 수 있고, HPLC 분석조건하에서 Δ Di-6S를 확인하기 위하여 Δ Di-6S와 표준품 황산콘드로이틴나트륨을 효소반응시킨 후 작성한 chromatogram을 Fig. 6에 수록하였다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 11~12분의 동일한 시간에서 표준품 Δ Di-6S 및 효소반응을 시킨 황산콘드로이틴나트륨에서 Δ Di-6S의 피크(↓)가 잘 나타나고 있음을 알 수 있었다.

3. 5. 검량곡선 작성 및 응용

황산콘드로이틴나트륨의 양을 10~1000 μ g/ml까지 변화시키면서 최적 효소반응조건에서 효소반응을 시



Annotated Wavelengths:

↓ : Wavelength = 230 Result = 0.205215

Fig. 5. UV-VIS spectrum of standard Δ Di-6S.

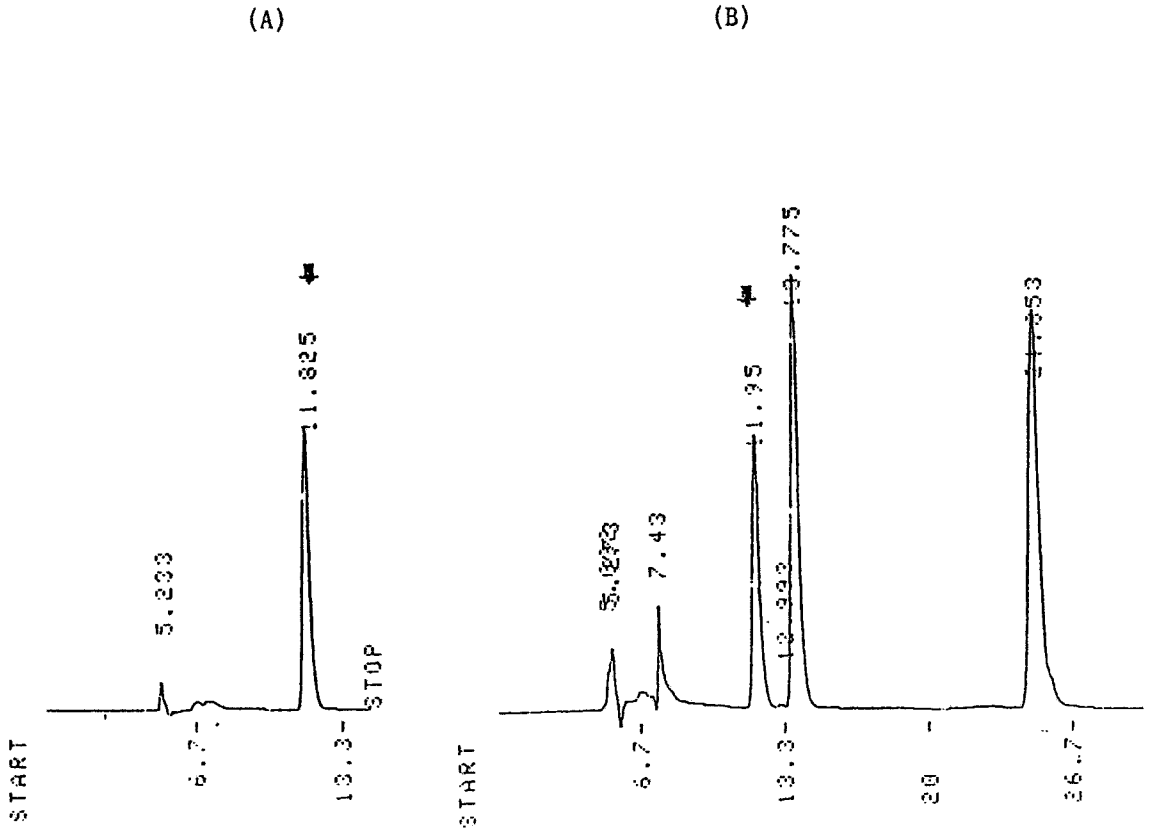


Fig. 6. HPLC chromatograms of standard Δ Di-6S(A) and Δ Di-6S produced by chondroitinase ABC digestion from sodium chondroitin sulfate(B).

Column : TSK Gel-NH₂ 60(4.6mm i. d.×25cm, TOSOH, Japan)

Flow rate : 0.8ml/min.

Detection : 230nm

↓ : Δ Di-6S

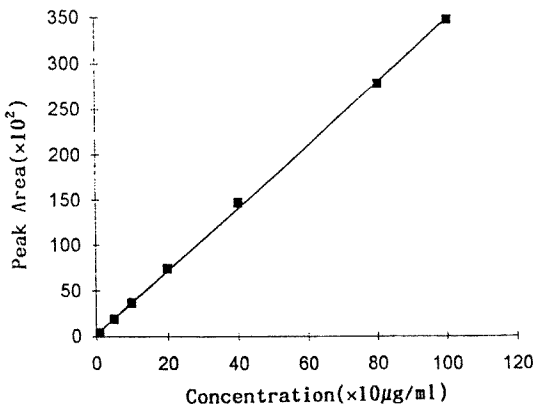


Fig. 7. Standard calibration curve of sodium chondroitin sulfate.

킨 후, HPLC 분석조건에서 실험하여 작성한 검량곡선을 Fig. 7에 수록하였다. 그림에서 알 수 있듯이 1000 μg/ml까지 원점을 지나는 좋은 직선성을 보여 줌을 알 수 있다. 또한 시판되고 있는 캡셀제와 점안제를 시료로 하여 실험한 결과 11~12분에서 Δ Di-6S(↓)의 분리가 가능하였으며, 표준품 황산콘드로이틴나트륨에 비교하여 계산해본 결과, 각각의 평균 함량은 100.01±1.58%, 99.89±1.80%였다. 이 때의 chromatogram을 Fig. 8에 수록하였다. 또한 검출한계는 1 μg/ml였다.

4. 결론

이상과 같은 실험결과를 종합해 볼 때 황산콘드로이

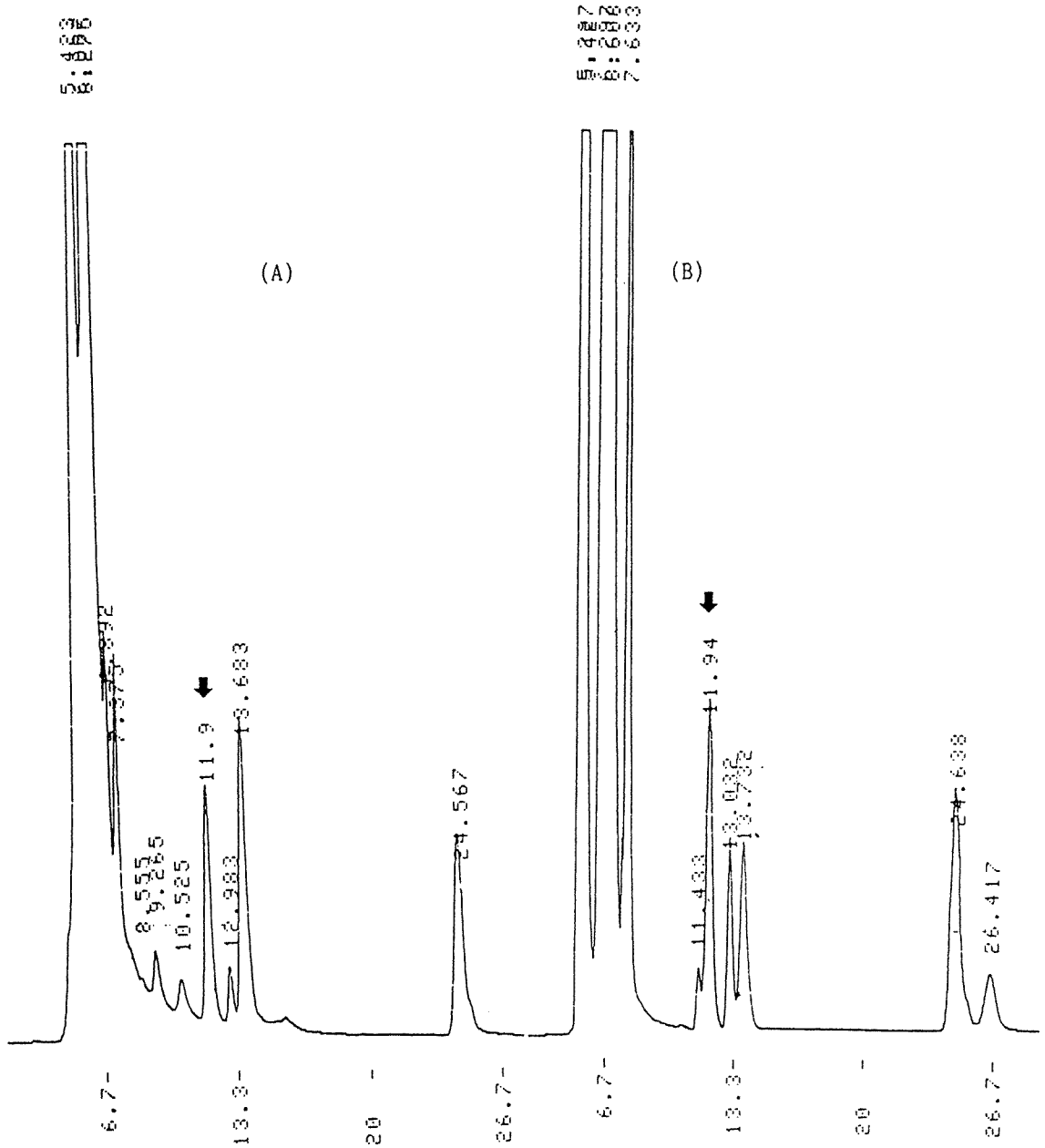


Fig. 8. HPLC chromatograms of Δ Di-6S(↓) in sample Capsule(A) and Ophthalmic solution(B) produced by chondroitinase ABC digestion.

Column : TSK Gel-NH₂ 60(4.6mm i. d.×25cm, TOSOH, Japan)

Flow rate : 0.8ml/min.

Detection : 230nm

틴나트륨을 혼합물 중에서 정량할 수 있는 효소분해반응의 최적 조건은 Table 2와 같으며, 이 때의 HPLC 분석조건은 Table 1에 나타낸 조건에서 가능하였다. 또한

본 실험법을 제제에 적용하였을 때도 응용성이 뛰어나며, 실제로 품질관리에 본 분석법을 사용할 수 있으리라 본다.

참고문헌

1. S. Budavari, M. J. Oneil, A. Smith, and P. E. Hecklman: *The Merck Index* (11th edition) 344.
2. 국립보건원, 의약품 기준 및 시험방법 개정편찬위원회. 의약품 기준 및 시험방법[제1개정] 15491~552 (1985).
3. 국립보건원, 의약품 기준 및 시험방법 개정편찬위원회. 의약품 기준 및 시험방법(1)[추보7] 94~98 (1992).
4. I. Koshiishi, S. Hyayshii and T. Imanari, *Biol. Pharm., Bull.*, **16**(3), 307~308(1993).
5. H. Akiyama, S. Shidawara, A. Mada, H. Toida, T. Toida, and T. Imanari, *J. Chromatogr.*, **579**, 203~207(1992).
6. K. Yoshida, S. Miyauchi, H. Kikuchi, A. Tawada, and K. Tokuyasu, *Anal. Biochem.*, **177**, 327~332 (1989).
7. Katsumi Murata and Y. Yokoyama, *Anal. Biochem.*, **146**, 327~335(1985).
8. David C. Seldin, Nobuko Seno, K. Frank Austen, and Richard L. Stevens, *Anal. Biochem.*, **141**, 291~300(1984).
9. Stephen R. Delaney, H. Edward Conrad, and Janet H. Glaser, *Anal. Biochem.*, **108**, 25~34(1980).
10. T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi and S. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, **243**(7), 1523~1535(1968).