

## 글리코사미노글칸 분해 효소와 핵자기공명을 이용한 오염된 헤파린 시료의 분석

임아랑 · 박유미 · 홍정희<sup>1</sup> · 이수정<sup>1</sup> · 이선희<sup>1</sup> · 김영식\*

서울대학교 약학대학/천연물과학연구소, <sup>1</sup>식품의약품안전청

## Analysis of Contaminated Heparins by the Combination of Glycosaminoglycan Degrading Enzymes and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

A-Rang Im, Youmie Park, Chong Hui Hong<sup>1</sup>, Sujung Lee<sup>1</sup>, Sun Hee Lee<sup>1</sup> and Yeong Shik Kim\*

Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>1</sup>Korea Food Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

**Abstract** – We examined the purity of six heparin samples by using heparinase, chondroitinase, <sup>1</sup>H-NMR, and polyacrylamide gel electrophoresis. To obtain high molecular weight contaminants from heparin samples, heparinase I - digested samples were subjected to the exhaustive microcon filtration. The filtration process removed heparin-derived di- and oligosaccharides effectively. By combining chondroitinase ABC treatment and strong anion exchange - high performance liquid chromatography, the result showed all six samples contained chondroitin sulfate as a contaminant ranging from 1.3 to 14.9%. Among them, sample S3 showed the highest content of 14.9%, which was further analyzed by chondroitinase AC treatment to confirm chondroitin sulfate B (dermatan sulfate). <sup>1</sup>H-NMR chemical shifts of *N*-acetyl groups clearly suggested the existence of chondroitin sulfate B (sample S3) and oversulfated chondroitin sulfate (samples S2 and S4) as contaminants. In addition, polyacrylamide gel electrophoresis was useful for qualitative detection on the sample's purity. These results suggest that the tools of heparinase I and chondroitinase ABC in combination with NMR spectroscopy would give very useful information for investigation of heparin contaminants such as oversulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate in heparin samples.

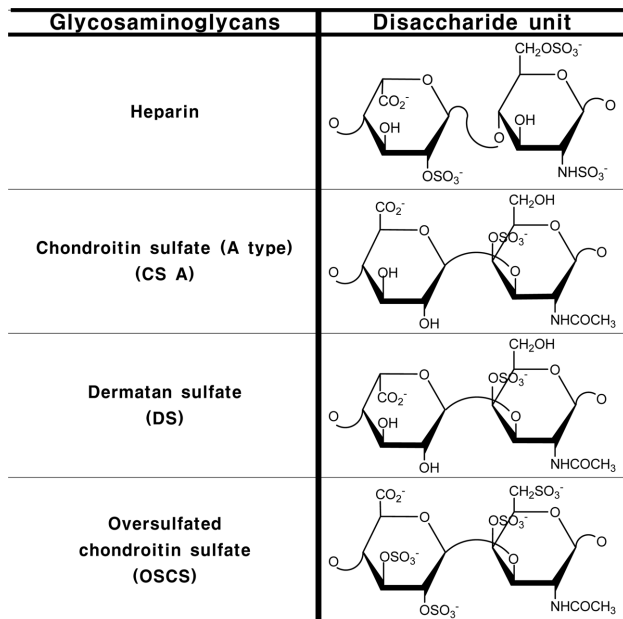
**Key words** – Heparin, Oversulfated chondroitin sulfate, Heparinase, Chondroitinase, Analysis, Dermatan sulfate.

헤파린 (heparin)은 복합다당체 (glycosaminoglycan)의 일종으로서 약 반세기 전부터 임상에서 수술시 항응고제로, 또한 심장 및 다리의 정맥 혈전증 치료제로서 널리 사용하고 있는 천연물유래 의약품이다. 특히 동물의 내장에서 추출한 것을 사용하기 때문에 구조적으로 일정함을 유지하기가 어려운 점이 있다. 현재 의약품으로 사용하고 있는 헤파린은 돼지의 내장에서 정제한 것이다. 헤파린의 일반적 구조는 glucosamine과 iduronic 산이  $\alpha$ -1,4 결합으로 이루어져 있지만 생합성의 과정에서 황산화 (*O*-sulfonation)의 정도에 따라 구조가 단일성을 유지하지 못하고 있다. 황산화는 2번, 6번의 glucosamine과 iduronic산의 2번에 이루어져 있다. 그리고, 일부 glucosamine이 황산기 대신 아세틸기가 결합하여 있는 매우 복잡한 형태를 이루고 있다. 이에 반해 콘

드로이틴황산 (chondroitin sulfate, CS)은 육상동물의 기관지와 어류의 연골조직에서 분리하고 있으며 구조는 *N*-acetylgalactosamine과 glucuronic 산이  $\beta$ -1,3와  $\beta$ -1,4의 결합으로 반복구조의 형태를 유지하고 있다. 황산기는 주로 galactosime의 4번과 6번에 치환되어 있다. 평균분자량은 헤파린은 13,000 Da이며 콘드로이틴황산은 20,000 Da이상이다. 또한 콘드로이틴황산 B 또는 더마탄황산 (dermatan sulfate, DS)이 *N*-acetylgalactosamine과 iduronic acid이 역시  $\beta$ -1,3와  $\beta$ -1,4의 결합으로 반복구조의 형태를 유지하고 있다. 황산기가 glucosamine의 4번 위치에 주로 치환되어 있다.

최근에 미국과 독일에서 정맥주사로 헤파린을 투여 받은 환자가 사망함으로써 헤파린의 이물질에 관하여 커다란 사회적 관심을 일으켰다. 최근에 보고된 논문에 의하면 헤파린 내에 과황산화 시킨 콘드로이틴황산 (oversulfated chondroitin sulfate, OSCS)이 이물질로 섞여 있는 것으로 알려졌다.<sup>1)</sup> Fig. 1은 헤파린, 콘드로이틴황산, 더마탄황산, 과

\*교신저자 (E-mail): kims@snu.ac.kr  
(Tel): 02-880-2479



**Fig. 1.** Structure of heparin, chondroitin sulfate A, dermatan sulfate (chondroitin sulfate B) and oversulfated chondroitin sulfate. The structure of OSCS was taken from the reference 2.

황산화 시킨 콘드로이틴황산<sup>2)</sup>의 구조적 특징을 보여주고 있다. OSCS는 콘드로이틴황산을 화학적으로 황산화(chemical sulfonation) 시킨 것으로 anti-factor Xa 활성이 있으며<sup>3)</sup> 이것이 인체 내에서 심각한 과민성 쇼크(anaphylactic shock)에 관련이 있는 것으로 알려졌다.<sup>4,5)</sup> 화학적으로만 합성이 가능한 OSCS가 어떤 경로로 동물조직으로부터 정제되는 헤파린에 혼입되었는지에 대해서는 알려져 있지 않다. 그렇지만, 상대적으로 가격이 저렴한 OSCS(헤파린 가격의 10% 미만)가 헤파린과 비슷한 분자량(18 kDa)과 전하밀도(charge density)를 가지므로<sup>6)</sup> 인위적으로 혼입되었을 가능성을 배제할 수는 없다. OSCS는 chondroitinase ABC에 의해 분해가 되지 않으며<sup>3)</sup> 이점을 착안하여 6종의 헤파린 시료에 대해서 분석하였다. 헤파린 분해효소(heparinase)와 콘드로이틴황산 분해효소(chondroitinase) 처리 후 생성되는 이당과 올리고당을 제거하면, 이 효소에 의해 분해되지 않는 OSCS가 남게되고, 이를 <sup>1</sup>H-NMR의 chemical shift 값을 이용하여 헤파린의 순도를 규명하고자 하였다. 이 연구에서는 glycosaminoglycan 분해효소 및 <sup>1</sup>H-NMR 이외에도 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 이용하여 헤파린의 순도를 확인하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 실험용 헤파린 시료 6가지는 모두 식품의약품안정청에서 제공을 받았고 (S1, S2, S3, S4, S5, S6) 양성대

조균으로 사용한 헤파린 (189 IU/mg)과 콘드로이틴황산은 뉴질랜드제약회사 제품 (New Zealand Pharmaceuticals, Palmerston North, New Zealand)을 사용하였다. 이것은 미국의 USP와 영국의 BP의 규격에 따라 제조한 제품들이다. Chondroitinase ABC (*Proteus vulgaris*)와 콘드로이틴황산 B (porcine intestinal mucosa)는 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였으며, chondroitinase AC (*Flavobacterium heparinum*), chondroitinase B (*Flavobacterium heparinum*), 콘드로이틴황산 C (shark cartilage), 콘드로이틴황산 이당 표준품 ( $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc),  $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc6S),  $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc4S)은 Seikagaku (Tokyo, Japan)에서 구입해서 사용하였다. 콘드로이틴황산 A (bovine trachea)는 Calbiochem (San Diego, CA)에서 구입하였다. 유전자재조합 heparinase I (*Bacteroids thetaiotaomicron*)은 Genbank로부터 유전자를 클로닝하여 발현시켜서 정제한 것을 사용하였다<sup>7)</sup>. 효소의 활성은 1분간 헤파린 이당류의 생성을 1 unit로 정의할 때 8.0 U/mg이었다. Tris-acetate buffer (50 mM Trizma<sup>®</sup> base, 60 mM sodium acetate, pH 8.0), phosphate buffer (250 mM NaCl in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0)가 효소 반응을 위해서 사용되었다.

기기 - UV spectrophotometer (V-550, JASCO, Tokyo, Japan), ÄKTA purifier system (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden), UNICORN software 5.01 (Amersham Pharmacia), SAX column (4.6 $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m, Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA) 제품이였다. NMR은 500 MHz Bruker (Billeveica, MA)를 이용하였고, 모든 시료는 D<sub>2</sub>O에 녹여 실시하였다. HOD 피크를 4.70 ppm으로 정한 후 상대적인 chemical shift 값을 얻었다.

**Agarose Gel Electrophoresis** - 1.0% agarose gel powder (Cambrex Bio Science, Rockland, ME) 를 1 $\times$  TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)에 녹이고 틀에 부어 agarose gel을 만들었다. sample은 10 mg/ml 로 멸균한 증류수에 녹였고 최종농도가 100  $\mu$ g 되게 60% sucrose 와 1:1 비율로 섞었다. 전기영동 장치에 agarose gel을 넣었고 gel이 잠기게 1 TBE buffer를 부어주었다. 시료를 각각 well에 20  $\mu$ l 씩 loading하고 power supply에 연결하여 100 V에서 40분간 전기영동을 하였다. gel을 빼서 0.5% Azure A (in 0.1% acetic acid)에 담귀 10분간 염색했고 distilled water : methanol : acetic acid = 6 : 3 : 1 용액에 담귀 탈색하였다.

**글리코사미노글리칸 분해효소에 의한 헤파린 시료의 분해** - 헤파린의 함유량을 알아보기 위해 NZP 헤파린을 표준품으로 사용하여 표준품과 시료를 50 mg/ml 되도록 멸균한 증류수에 녹여 250 mM NaCl in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)와 섞어 최종농도 1 mg이 되게 넣고 유전자재조합 *Bacteroids*에서 유래한 heparinase I을 10  $\mu$ l씩 넣어서 37°C에서 완전분해 시키기 위해 232 nm에서 흡광도 증가가 없

을 때까지 12시간 이상 반응시켰다. 콘드로이틴황산의 함유량을 알아보기 위해 chondroitinase ABC를 50 mM Tris-HCl 60 mM sodium acetate buffer (pH 8.0) 에 녹여서 1 U/ml 되게 했다. NZP 콘드로이틴황산을 표준품으로 사용하여 표준품과 시료를 50 mg/ml로 녹여서 buffer와 섞어 효소를 30 mU 넣어 37.5°C에서 생성되는 이당류의 비환원당의 이중 결합을 이용하여 232 nm에서 흡광도 증가가 없을 때까지 12시간 이상 분해시켜 콘드로이틴황산의 함유량을 분석하였다. 반응확인용 초기 반응을 알아보기 위하여 UV 분광기를 사용하여 232 nm에서 5분간 흡광도를 측정하였고 최종 완전 분해된 생성물을 분석하기 위하여 SAX-HPLC에서 NaCl 0M~2M (pH 3.5) 기울기 용리로 AKTA Purifier (Amersham Pharmacia)에 연결하여 유속은 1 ml/min로 유지하면서 UV 232 nm에서 검출하였다.

**헤파린을 제외한 콘드로이틴황산 및 기타 물질 분석** - 위의 결과를 바탕으로 S2, S3, S4와 대조군으로 S5를 실험에 사용하였다. 헤파린 외에 어떤 성분이 함유되어있는지 확인하기 위하여 1차 실험에서는 heparinase I 으로 시료를 완전 분해한 후 일차적으로 12~14 K 투석막을 이용하여 3일간 12시간 마다 증류수를 바꿔주며 투석하여 동결건조 하였다. 얻어진 시료를 cellulose 10 K molecular weight cut-off (MWCO) microcon filter에 넣은 후 13,000 rpm 으로 10분간 원심분리 한 후 남아있는 상등액에 증류수를 첨가하여 원심분리를 반복하여 헤파린의 이당 (dimer)과 올리고당 (oligomer)을 제거했다. 실험 중간에 시료 내에 이당과 올리고당이 어느 정도 제거 되었는지 확인하기 위하여 SAX-HPLC로 분석하였다. SAX-HPLC는 각 시료를 100 µg 되도록 기계에 주입하여 232 nm에서 distilled water (pH 3.5) 와 2.0 M NaCl (pH 3.5)를 step gradient로 하여 분석하였다. 최종 시료를 동결건조 한 후 500 MHz NMR로 분석하여 헤파린 이외에 어떤 물질이 포함되어 있는지 확인하였다.

**더마탄황산의 분석** - 일부 시료의 더마탄황산 (콘드로이틴황산 B)의 존재 유무를 위와 같은 방법으로 chondroitinase ABC, chondroitinase AC로 처리하여 더마탄황산을 확인하였다.

**Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)를 이용한 시료의 분석** - PAGE는 논문에 발표된 방법을 참조<sup>8)</sup>하여 15% running gel (0.1 M boric acid, 0.1 M Tris, 0.01 M EDTA2Na, pH 8.3,)과 5%의 stacking gel (1 M HCl로 보정하여 pH 6.3으로 만들) 조성비로 만든 polyacrylamide gel을 이용하여, 시료 10 µl를 60 % sucrose in resolving buffer (pH 8.3) 10 µl 와 섞어 최종 20 µl loading 하였고 100 V로 3 시간 전기영동 하였다. 전기영동후 0.5% Azure A (in 0.1% acetic acid)에 담귀 30분간 염색했고 distilled water : methanol : acetic acid = 6 : 3 : 1 용액에 담구어 탈색하였다.

## 결과 및 고찰

**Agarose Gel Electrophoresis** - 각 시료에 대하여 함량에 대한 정성적인 결과를 얻기 위하여 agarose gel을 이용한 전기영동을 수행하였다. 시료 동량 (100 µg)에 대한 결과로서 시료 S3가 헤파린 함량이 낮은 것으로 나타났다 (결과 미제시). 이 점은 시료 S3는 헤파린 이외에 다른 물질이 들어 있음을 제시하고 있다.

**Heparinase I 처리 후 UV 분광기를 이용한 생성물 모니터링** - Fig. 2에서 보는 바와 같이 여섯 종류의 시료와 NZP 헤파린을 heparinase I 으로 분해시킨 결과 효소와 기질의 초기 반응이 빠르게 일어나 흡광도가 올라가는 것을 확인할 수 있었다. 측정된 시료를 모아서 완전 분해시키기 위해 37°C에서 반응 시킨 후 초기 반응 속도가 빠르기 때문에 흡광도를 희석하여 완전분해가 일어나도록 반응시간을 연장하여 더 이상의 흡광도 증가가 없음을 확인하였다

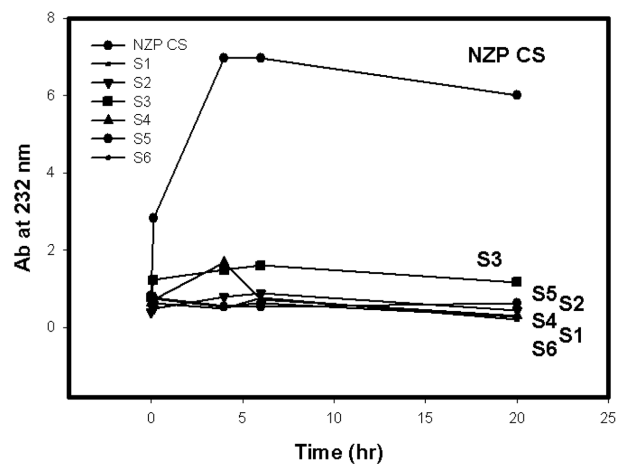


Fig. 2. Overnight incubations of heparin samples with heparinase I.

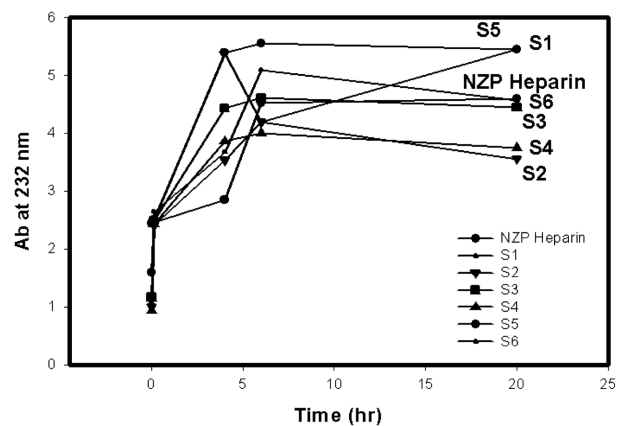
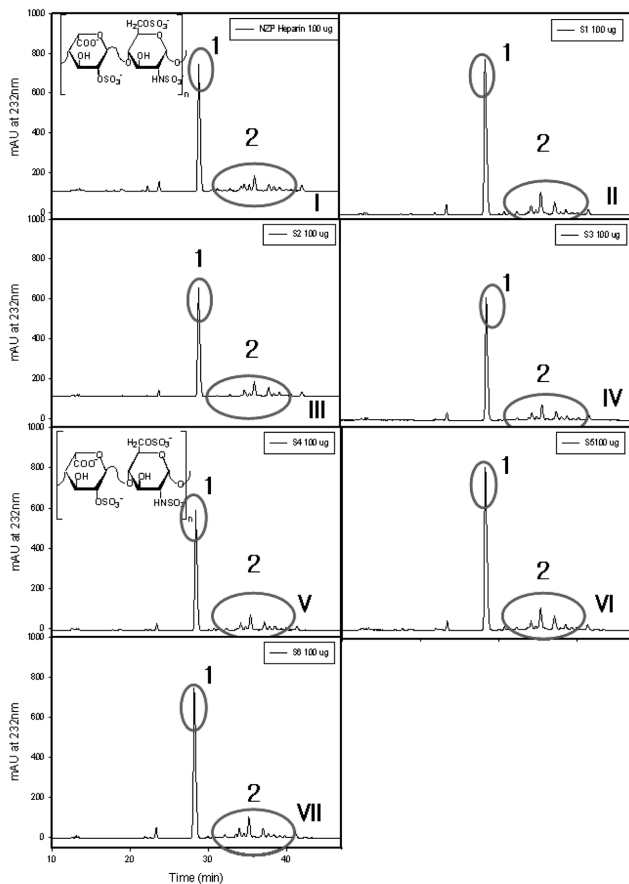


Fig. 3. Overnight incubations of heparin samples and NZP chondroitin sulfate with chondroitinase ABC.

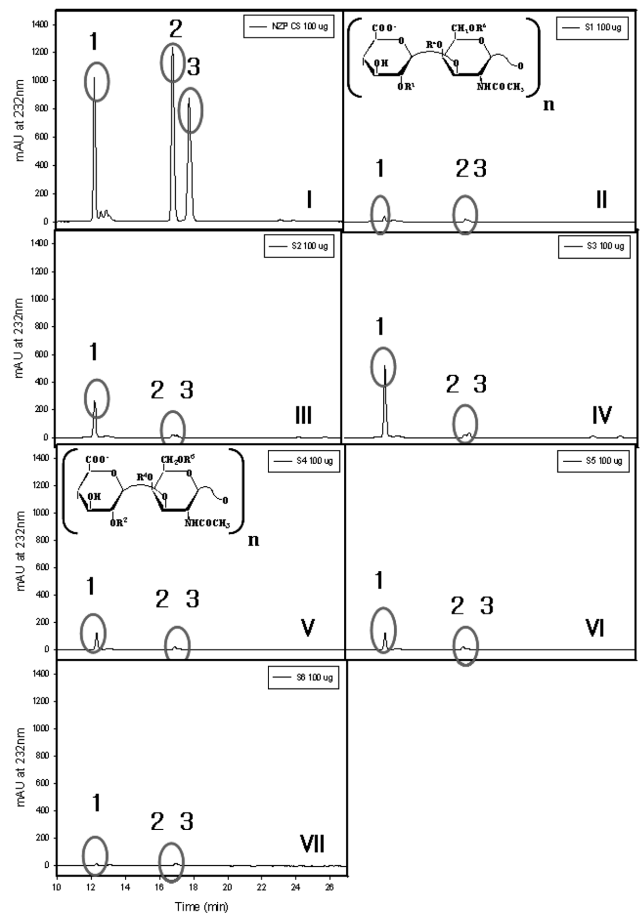
(결과 미세시). 반응시료에 대하여 SAX-HPLC로 분석하였다 (Fig. 4). Chondroitinase ABC로 여섯 종류의 시료와 NZP 콘드로이틴황산을 분해시켰을 때 NZP 콘드로이틴황산과 달리 여섯 종류 시료에서 흡광도가 급격하게 증가하지 않는 것으로 보아 시료 내의 콘드로이틴황산의 함유량은 높지 않음을 알 수 있었다. 여섯 종류의 시료를 비교해 볼 때, 시료 S3가 다른 시료들에 비해 같은 시간 내 (300 초)에 흡광도 증가가 더 큰 것을 관찰할 수 있었으며, 다른 시료에 비해 S3에 콘드로이틴황산의 함유량이 많음을 알 수 있었다. 측정된 시료를 모아서 완전 분해시키기 위해 37.5°C에서 반응 시킨 후 SAX-HPLC로 분석하였다 (Fig. 5).

**Heparinase I과 Chondroitinase ABC에 의한 분해후 시간 별 흡광도 측정** - 표준품과 시료에 대해 heparinase I를 처리하여 37°C에서 반응시키면서 시간을 정하여 흡광도 값을 측정하였다 (Fig. 2) 20시간 반응 시킨 후 흡광도가 더 이상 올라가지 않는 것을 확인한 후 완전 반응이 일어난 것



**Fig. 4.** SAX-HPLC analysis of heparin samples treated with heparinase I shown in Fig 1. (I, NZP heparin; II, S1; III, S2; IV, S3; V, S4; VI, S5; VII, S6). Numbers 1 and 2 represent heparin dimer ( $\Delta U2S-[1\rightarrow4]-GlcN2S6S$ ) and heparin oligomer, respectively.

으로 판단하고 SAX-HPLC로 분석하였다 (Fig. 3). 결과적으로 효소와의 반응이 5시간 후에는 더 이상 흡광도 증가가 없어 효소와의 반응이 끝난 것으로 판단하였다. 특히, S2와 S4의 흡광도가 S1 및 S5, 대조군 헤파린에 비해 두드러지게 낮은 것은 일부 헤파린 시료들이 다른 종류의 glycosaminoglycan 류와 섞여 있음을 강하게 제시하고 있다. 또한 표준품과 시료에 대해 chondroitinase ABC를 처리하여 37.5°C에서 반응시키면서 시간을 정하여 흡광도 값을 측정하였다 (Fig. 4) 20 시간 반응 시킨 후 흡광도가 더 이상 올라가지 않는 것을 확인한 후 완전 반응 되었다고 판단하여 SAX-HPLC로 분석하였다. 시료 S3의 경우 chondroitinase ABC를 처리하였을 때 흡광도가 증가하는 점은 헤파린 시료 내에 콘드로이틴황산이 존재하고 있음을 제시하고 있다. 그러나 콘드로이틴황산 A, B, C의 구별은 확실하지 않았다 (Fig. 5-VI).

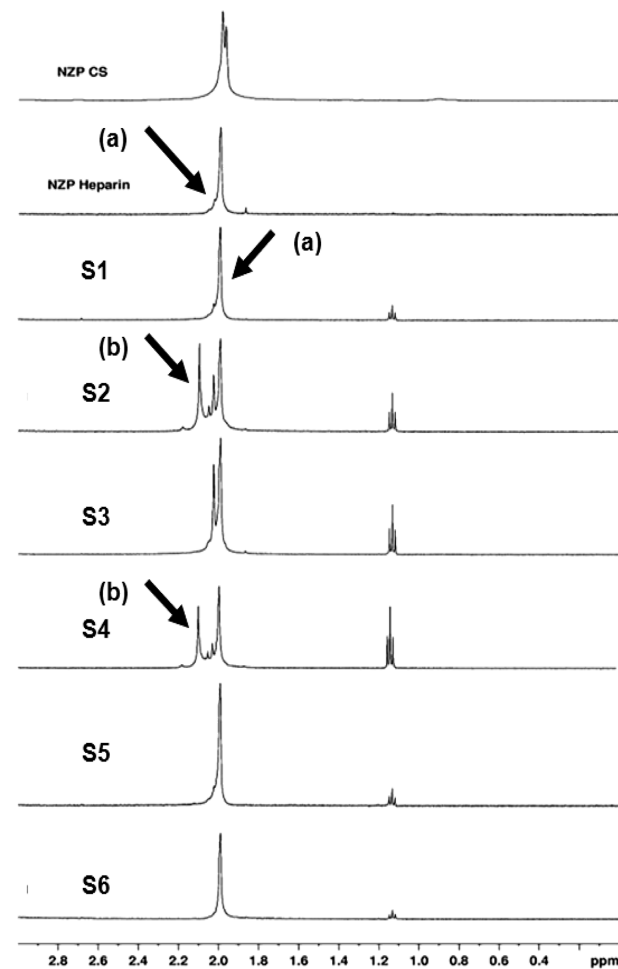


**Fig. 5.** SAX-HPLC analysis of heparin samples and NZP chondroitin sulfate treated with chondroitinase ABC I shown in Fig 1. (I, NZP CS; II, S1; III, S2; IV, S3; V, S4; VI, S5; VII, S6). Numbers 1, 2, and 3 represent  $\Delta$  Di-0S ( $\Delta UA-[1\rightarrow3]-GalNAc$ ),  $\Delta$  Di-6S ( $\Delta UA-[1\rightarrow3]-GalNAc6S$ ), and  $\Delta$  Di-4S ( $\Delta UA-[1\rightarrow3]-GalNAc4S$ ).

**Table I.** Percentage of chondroitin sulfate in each sample

Samples	Percentage of chondroitin sulfate (%)
Standard : NZP CS	100
1. S1	1.9
2. S2	8.3
3. S3	14.9
4. S4	3.9
5. S5	1.3
6. S6	1.4

**Heparinase I 처리 후 SAX-HPLC 분석** - NZP 헤파린과 시료를 heparinase I 로 분해시킨 결과, 이당과 올리고당으로 분해되었다. 각 시료를 100 µg 되도록 SAX-HPLC에 주입하였고 232 nm에서 47분간 분석 하였다. 헤파린을 구

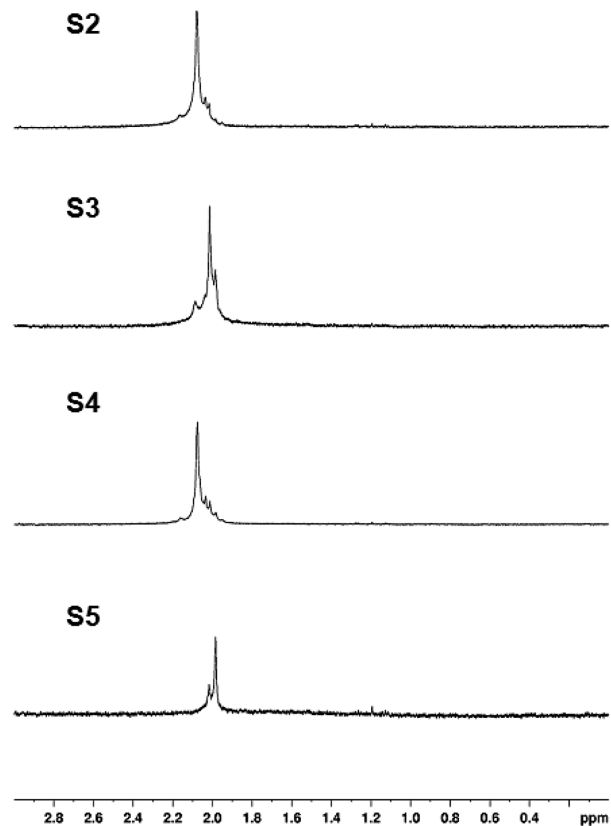


**Fig. 6.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (0 - 3.0 ppm) of intact samples. (a) The arrows at 2.05 ppm indicate the presence of N-acetyl peak from heparin; (b) the arrows at 2.15 ppm (S2 and S4) suggest the contaminant of OSCS in heparin samples.

성하는 주요 이당인 ΔUA2S-[1→4]-GlcN2S6S가 주 피크로 나타났으며, 올리고당도 섞여있었다 (Fig. 4). 결과로는 모두 유사하기 때문에 첨가된 불순물을 판단하기가 어려웠다.

**Chondroitinase ABC 처리 후 SAX-HPLC 분석** - Chondroitinase ABC로 분석 한 결과 NZP 콘드로이틴황산의 함유량을 100%로 보았을 때, Table I와 같은 %로 콘드로이틴황산이 시료에 포함되어 있음을 확인하였다. NZP 콘드로이틴황산과 시료를 100 µg 되도록 SAX-HPLC에 주입하였고 27분간 분석하였다 (Fig. 5). 특히 시료 S3에는 15%의 콘드로이틴황산이 함유되어 있음을 확인하였고, 여섯 시료 중 콘드로이틴황산의 함량이 제일 높았다. 이는 앞의 결과에서 S3의 흡광도 증가가 다른 시료에 비해 조금 더 많은 것과 일치한다.

**헤파린 시료내의 혼합물 분리** - 3일 동안 투석한 후 SAX-HPLC로 확인한 결과 헤파린 이당과 올리고당이 많이 제거되지 않아 시료를 동결건조 하여 10 K MWCO microcon으로 여과 후 증류수를 가하여 투석을 반복하였고 최종적으로 SAX-HPLC로 확인한 결과 이당과 올리고당이 대부분 제거된 것으로 보고 시료를 동결 건조하여 NMR로 분석하였다. NMR로 분석 한 결과 헤파린의 이당과 올리고당이 완



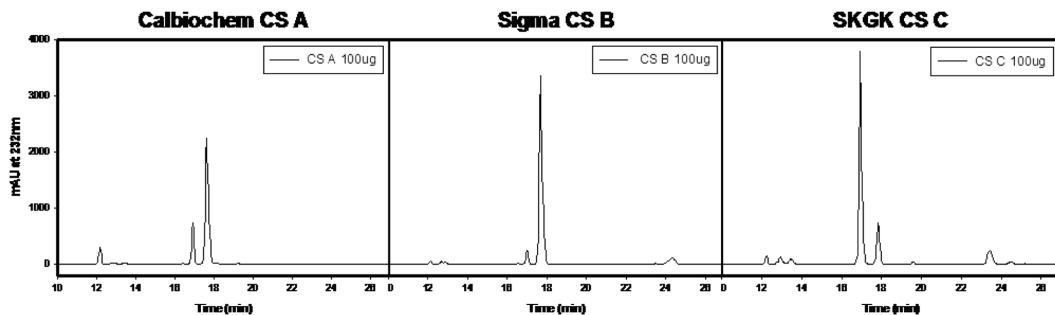
**Fig. 7.** NMR spectrum of heparinase-treated samples after the exhaustive removal of heparin oligomers. S2 and S3 samples show the 2.15 ppm chemical shift from OSCS N-acetyl group.

전히 제거되지 않아서 microcon의 MWCO 크기가 더 큰 것을 사용하여 추가실험을 했다. 시료는 1차 실험과 같은 것을 사용하였고 헤파린 외에 어떤 성분이 함유되어 있는지 확인하기 위하여 2차 실험에서는 heparinase I 으로 시료를 완전 분해한 후 일차적으로 12~14 K 투석 막으로 3일간 투석하여 동결건조 했다. 얻어진 시료 cellulose 50 K MWCO microcon filter에 넣은 후 13,000 rpm 으로 10분 간 원심분리한 후 남아 있는 상등액에 증류수를 추가하여 반복실험

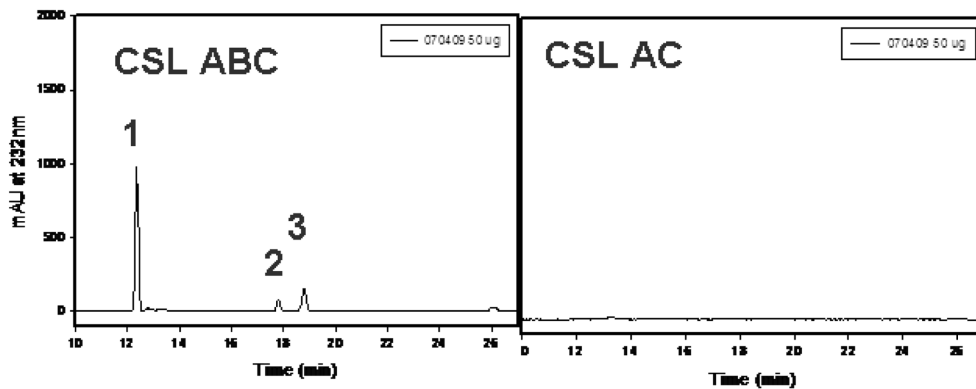
해서 헤파린의 이당과 올리고당을 제거했다. 실험 중간에 시료 내에 이당과 올리고당이 어느 정도 제거 되었는지 확인하기 위하여 SAX-HPLC로 분석하였고 최종 시료를 동결건조 한 후 NMR로 분석하여 헤파린 이외에 어떤 물질이 포함되어 있는지 알아보았다. 이 때 처리한 시료는 혼합물이 섞였다고 판단한 I: S2, II: S3, III: S4, IV: S5 4종류이었다.

NMR 분석 - Fig. 6의 NMR 결과에서 2.0 ppm을 중심으

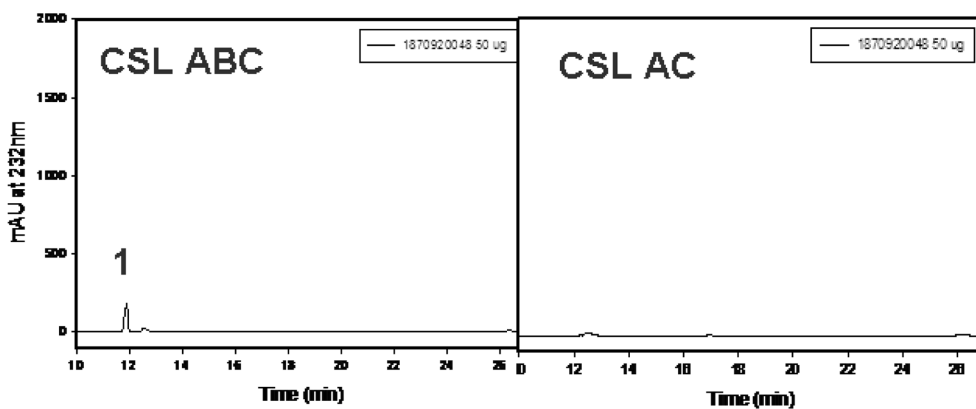
### (A) Standards



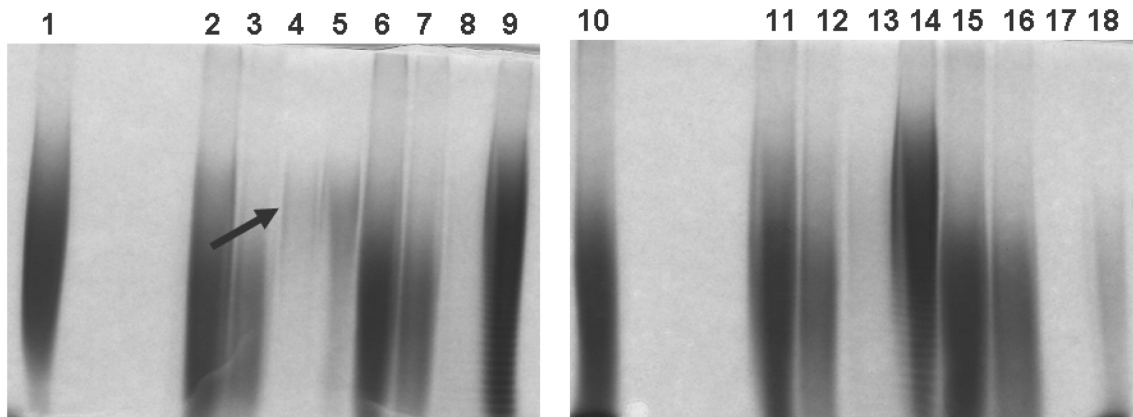
### (B) S3



### (C) S5



**Fig. 8.** SAX-HPLC analysis of contaminants after chondroitinase ABC and AC treatment. (A) standard chondroitin sulfate A (Calbiochem), B (Sigma), and C (Sekagaku) were digested by chondroitinase ABC, (B) Sample S3 was treated. Numbers 1, 2, and 3 represent  $\Delta$ Di-0S ( $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc),  $\Delta$ Di-6S ( $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc6S), and  $\Delta$ Di-4S ( $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc4S). (C) Sample S5 was treated. Number 1 represents  $\Delta$ Di-0S ( $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc).



**Fig. 9.** Analysis by polyacrylamide gel electrophoresis (lane 1, NZP CS; lane 2, intact S3; lane 3, S3 - chondroitinase ABC treated; lane 4, S3 - heparinase I treated; lane 5, S3 - 50K microcon; lane 6, intact S4; lane 7, S4 - chondroitinase ABC treated; lane 8, S4 - heparinase I treated; lane 9, S4 - 50K microcon; lane 10, NZP heparin; lane 11, intact S2; lane 12, S2 - chondroitinase ABC treated; lane 13, S2 - heparinase I-treated; lane 14, S2 - 50K microcon; lane 15, intact S5; lane 16, S5 - chondroitinase ABC-treated; lane 17, S52 - heparinase I- treated; lane 18, S5 - 50K microcon). The gel was stained with 0.5% azure A solution.

로 N-acetyl peak의 methyl기의 chemical shift임을 알 수 있다. 또한 NZP 헤파린에서 2.05 ppm에서 작은 methyl peak는 더마탄황산에서 기인하는 것으로 보이고 (화살표로 표시), S2의 경우 두 개의 methyl기가 보이는데 저자장 (2.15 ppm) 위치에서 나타나는 것이 이물질이며 고자장 (2.05 ppm)의 위치에서 나타나는 것이 헤파린에서 기인된 것이다. 이물질의 제거의 확인을 위해 NMR로 완전히 헤파린이 제거가 안 되었음을 확인한 후 재차 분자량에 따른 여과 후 헤파린 올리고당의 제거를 하였다 (결과 미제시). 다시 NMR을 이용하여 분석 시 거의 이물질만 남아 있음 (2.15 ppm)을 알 수 있었다 (Fig. 7). 특히 S2와 S3는 chemical shift의 비교로 전혀 다른 물질임을 알 수 있었다. S2와 S4는 같은 종류의 이물질이 섞여 있음을 재차 확인을 할 수 있었다. 최근에 발표된 연구논문에서<sup>1,2,9)</sup> OSCS의 N-acetyl의 methyl 피크가 2.15 ppm에 나타남을 확인하였고, 이는 본 연구의 결과와 일치하였다. 또한 최근에 헤파린 이물질의 NMR 분석이 다른 문헌에도 보고되었으며<sup>10)</sup> 본 결과가 매우 유사함을 알 수 있었다.

Heparinase I 으로 헤파린을 분해하여 제거한 후 Chondroitinase를 사용하여 성분분석 - NMR을 통하여 헤파린의 이당과 올리고당이 거의 제거된 것을 확인한 시료를 동결 건조하여 chondroitinase로 분해시킨 후 콘드로이틴 황산의 함유 여부를 SAX-HPLC로 확인 하였다 (Fig. 8). 효소는 3가지를 사용하였는데 chondroitinase ABC, chondroitinase AC, chondroitinase B를 사용하여 분해시킨 후 어떤 종류의 콘드로이틴황산이 함유되어 있는지 확인하였다.

Chondroitinase ABC는 위의 실험방법과 동일하게 반응시켰고 chondroitinase AC는 50 mM Tris-HCl 60 mM sodium acetate buffer (pH 8.0) 에 녹여서 1 U/ml 되게 해서

chondroitinase ABC와 마찬가지로 같은 조건에서 반응시켰다. 콘드로이틴황산 이당 표준품으로는 Seikagaku 제품을 사용하였고 SAX-HPLC로 위와 같은 조건에서 분석하였다. Fig. 7에서 표준품 콘드로이틴황산 A, 콘드로이틴황산 B, 콘드로이틴황산 C를 chondroitinase ABC로 처리하였을 경우, 콘드로이틴황산 이당류 3개가 종류에 따라서 그에 맞게 나타났다 (Fig. 8-A). 콘드로이틴황산 분해효소 ABC는 콘드로이틴황산 A, B, C를 차별 없이 분해시키지만 콘드로이틴 황산 AC 분해효소는 A와 C만 분해시킨다. 결과에서 시료 S3에 대하여 콘드로이틴황산 분해효소 ABC는 혼합물을 분해시켜  $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc,  $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc4S,  $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc6S를 생성하지만 콘드로이틴황산 분해효소 AC는 시료를 전혀 분해시키지 않았다 (Fig. 8-B). 이것은 S3가 콘드로이틴황산 B, 즉 더마탄황산이 들어 있음을 제시하고 있다. 더마탄황산은 돼지의 내장으로부터 헤파린을 정제 시 더마탄황산 일부가 포함될 수 있다. 유사한 결과가 최근에 보고되었다<sup>10)</sup>. 특히 S3 시료에 15%의 더마탄황산이 함유되어 있음을 알 수 있었다. HPLC 분석에서 특이한 점은 황산기가 없는 이당 (unsulfated disaccharide,  $\Delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 3]-GalNAc)가 특히 많이 나타났는데 앞으로 더 검토할 필요가 있다.

PAGE에 의한 시료 분석 - PAGE는 시료에 대한 순도 정도를 확인할 수 있으며 효소 처리 후의 시료 내에 들어 있는 혼합물에 대한 정성적인 결과를 확인할 수 있는 매우 유용한 방법이다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 1)의 NZP콘드로이틴황산이 10)의 NZP 헤파린보다 분자량이 크다는 것을 알 수 있다. 2)가 콘드로이틴황산을 포함하는 경우 chondroitinase ABC로 처리 시 콘드로이틴황산은 제거되고 헤파린만 남는다. 3)의 결과는 2)에 비해 화살표 부분이 없어짐

을 알 수 있다. 이러한 결과는 시료 S3에는 콘드로이틴황산이 들어 있음을 알 수 있었다. 4)의 경우 heparinase I로 처리 시 화살표 부분 이외에는 염색이 안 되었음을 확인하였다. 즉 헤파린은 모두 분해하여 겔 밖으로 빠져 나갔음을 알 수 있다. 7)의 경우 chondroitinase ABC에 거의 색이 변하지 않음을 알 수 있으며 heparinase I 효소로 처리 시 시료가 다 분해하였음을 확인하였다. 9)는 heparinase I 처리 후 남아 있는 시료에 대하여 50 K MWCO막을 통과 후의 결과이다. 시료가 농축된 관계로 진하게 색깔이 나타났다. 이러한 점은 시료 내에 헤파린 이외에 황산기를 가지고 있는 다른 종류의 다당체가 존재함을 제시하고 있다. 15)와 16)에서 차이점은 미량이지만 시료 S5내에 소량의 콘드로이틴황산이 있음을 보여주고 있다. 이러한 점은 SAX-HPLC에서 미량이나마 검출이 된 앞의 결과와 일치한다 (Fig. 9-C 참조).

## 결 론

본 실험에 사용한 chondroitinase ABC는 콘드로이틴황산에 매우 특이적이기 때문에 Table I에 제시한 것은 전적으로 정상적인 콘드로이틴황산의 양으로 볼 수 있다. 특히 콘드로이틴황산의 함량이 많은 것으로 S2, S3, S4으로서 철야 반응에서도 지속적으로 흡광도의 증가를 관찰할 수 있었다. 여섯 종류의 시료에서 NMR, 헤파린 분해효소, 콘드로이틴황산 분해효소, PAGE의 결과 S2와 S4에는 부분적으로 OSCS이 들어 있으며, S3는 더마탄황산이 함유되어 있음을 확인하였다. 최근에 같은 곳에서 제조된 헤파린의 분석에 관한 결과가 보고되었다. 본 연구와 방법론적으로는 다르지만 결과는 매우 유사하였다<sup>1)</sup>. 더마탄황산은 헤파린과 달리 혈장내의 헤파린 cofactor II와 결합하여 혈액응고계의 thrombin을 억제하는 것으로 알려졌다<sup>11)</sup>. 응고의 활성도는 헤파린에 비해 10배 이상 약하기 때문에<sup>12-13)</sup> 주사 시 나타날 수 있는 헤파린의 부작용인 출혈은 약한 것으로 알려졌다<sup>14)</sup>. 그러나 S3처럼 10%이상의 더마탄황산이 포함된 경우 사람에게 근육 또는 정맥주사 시 어떠한 반응을 보일 지는 더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., Naggi, A., Viswanathan, K., Bisio, A., Capila, I., Lansing, J. C., Guglieri, S., Fraser, B., Al-Hakim, A., Gunay, N. S., Zhang, Z., Robinson, L., Buhse, L., Nasr, M., Woodcock, J., Langer, R., Venkataraman, G., Linhardt, R. J., Casu, B., Torri, G and Sasisekharan, R. (2008) Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat. Biotechnol.* **26**: 669-675.
- Li, B., Suwan, J., Martin, J. G., Zhang, F., Zhang, Z., Hoppensteadt, D., Clark, M., Fareed, J. and Linhardt, R. J. (2009) Oversulfated chondroitin sulfate interaction with heparin-binding proteins: New insights into adverse reactions from contaminated heparins. *Biochem. Pharmacol.* **78**: 292-300.
- Maruyama, T., Toida, T., Imanari, T., Yu, G and Linhardt, R. J. (1998) Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation. *Carbohydr. Res.* **306**: 35-43.
- Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., Elankumar, S., Smith, S., Pelzer, K., Lansing, J. C., Sriranganathan, N., Zhao, G., Galcheva-Gargova, Z., Al-Hakim, A., Bailey, G. S., Fraser, B., Roy, S., Rogers-Cotrone, T., Buhse, L., Whary, M., Fox, J., Nasr, M., Dal Pan, G. J., Shriver, Z., Langer, R. S., Venkataraman, G., Austen, K. F., Woodcock, J. and Sasisekharan, R. (2008) Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N. Engl. J. Med.* **308**: 2457-2467.
- Blossom, D. B., Kallen, A. J., Patel, P. R., Elward, A., Robinson, L., Gao, G., Langer, R., Perkins, K. M., Jaeger, J. L., Kurkjian, K. M., Jones, M., Schillie, S. F., Shehab, N., Ketterer, D., Venkataraman, G., Kishimoto, T. K., Shriver, Z., McMahon, A. W., Austen, K. F., Kozlowski, S., Srinivasan, A., Turabelidze, G., Gould, C. V., Arduino, M. J. and Sasisekharan, R. (2008) Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin. *ibid* **359**: 2674-2684.
- Liu, H., Zhang, Z. and Linhardt, R. J. (2009) Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat. Prod. Rep.* **26**: 313-321.
- Han, Y. H., Garron, H. L., Kim, H. Y., Kim, W., Zhang, Z., Ryu, K. S., Shaya, D., Xiao, Z., Cheong, C., Kim, Y. S., Linhardt, R. J., Jeon, Y. H. and Cygler, M. *J. Biol. Chem.* submitted (under revision)
- Rice, K. G., Rottink M. K. and Linhardt, R. J. (1987) Fractionation of heparin-derived oligosaccharides by gradient polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.* **244**: 515-522.
- Zhang, Z., Weiwer, M., Li, Boyangzi., Kemp, M. M., Daman, T. H. and Linhardt, R. J. (2008) Oversulfated Chondroitin sulfate: Impact of a heparin impurity, associated with adverse clinical events, on low-molecular-weight heparin preparation. *J. Med. Chem* **51**: 5498-5501.
- Beyer, T., Diehl, B., Randel, G., Humpfer, E., Schafer, H., Spraul, M., Schollmayer, C. and Holzgrabe, U. (2008) Quality assessment of unfractionated heparin using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**: 13-19.
- Tollefsen, D. M., Majerus, D. W. and Blank, M. K. (1982) Heparin cofactor II, Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J. Biol. Chem.* **257**: 2162-2169.



12. Tollefsen, D. M., Pestka, C. A. and Monafó, W. J. (1983) Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. *ibid*, **258**: 6713-6716.
13. Kyogashinma, M., Onaya, J., Miyauchi, S., Arai, M., Shibata, Y., Suda, A., Sakai, T., Takada, Y. and Takada, A. (1999) Antithrombotic activity of avian crown dermatan sulfate. *Thromb. Res.* **96**: 459-465.
14. Fernandez, F., Van Ryn, J., Ofosu, F. A., Hirsh, J. and Buchanan, M. R. (1986) The hemorrhagic and antithrombotic effects of dermatan sulphate. *Brit. J. Haematol.* **64**: 309-317.

(2009년 4월 28일 접수)