

지유로부터 분리한 다당류의 분석과 항응고작용

김 영 식 · 노 지 은* · 안 형 수*

서울대학교 천연물과학연구소 · *동덕여자대학교 약학대학*

Compositional Analysis of Polysaccharide from *Sanguisorba officinalis* and Its Anticoagulant Activity

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

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

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

Abstract—Polysaccharide from *Sanguisorba officinalis* was separated and fractionated using DEAE-Sephadex ion-exchange chromatography and Sephacry HR-200 gel filtration chromatography. One of the fraction (Fr. II) was sulfated and its anticoagulant activity was tested *in vitro*. Sulfation could increase the clotting time 50 times compared to unsulfated one. Fr. II was hydrolyzed and its composition was analyzed by conjugation with 7-amino-1,3-naphthalene disulfonic acid using HPLC and electrophoresis. Arabinose and galactose were mainly composed at the ratio of 4:1. In addition, xylose and rhamnose were also found.

Keywords—*Sanguisorba officinalis* · polysaccharide · sulfation · anticoagulant activity · sugar analysis

근래에 들어와 다당류의 응용이 활발해지면서 의학적으로 많은 관심을 지니게 되었다. 이러한 응용은 다당류의 고유성질이거나 생물학적 상호작용에 의해서 기인된다고 볼 수 있으며 또한 생물학적 활성은 화학적 변형에 의해서 이루어질 수 있다.

헤파린 및 헤파리노이드는 다당류중에서 임상적 활용이 가장 높은 것중의 하나이다. 헤파린은 혈액응고계에서 중요한 기능을 지닌 thrombin과 factor Xa의 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, 심장의 혈전증에 주로 사용되어

지고 있으며³⁾ 기타, 신장 투석,⁴⁾ 혈중 지방질 저하⁵⁾ 등의 목적으로 사용되어지고 있다. 이러한 광범위한 응용에도 불구하고 장기적인 사용시 혈소판 감소 효과,⁶⁾ 출혈, 골다공증의 부작용이 나타나고⁷⁾ 또한, 약물 동력학적인 측면에서 반감기가 짧은 단점이 있고 분자량이 크기 때문에 정맥이나 피하주사를 해야 하는 단점이 있다.⁸⁾ 이러한 부작용을 줄이기 위하여 저분자량의 헤파린이나 새로운 헤파린 유도체를 만들기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. 저분자량의 헤파린은 헤파린을 화학적 또는 생화학적 방법으로 분해시켜 만들어진 것이고 평균 분자량은 5,000 정도이다(헤파린의 평균 분자량은 13,000).⁹⁾ 이러한 연구와 병행하여 반합성의 sulfate다당류가 항응고작용을 연장시킬 수 있다는 보고들이 발표되었다.¹⁰⁻¹⁴⁾ 최근에 저자는 혈

액 순환에 관계되는 생약에서 응고시간을 연장시키는 다섯 종류의 생약을 선정하여 수용성 다당류를 분획하여 산성당을 분리하고 또한 이것을 화학적으로 sulfation시켜 헤파린과 유사한 기능을 지닌 헤파리노이드를 제조하여 *in vitro*와 *ex vivo*에서의 항응고활성을 조사하였다.¹⁵⁾

본 연구는 지혈제로 사용되고 있는 지유(*Sanguisorba officinalis*)로 부터 다당류를 추출하여 겔여과 및 이온교환크로마토그래피 방법을 이용하여 당을 분획하고 항응고작용 및 당의 조성을 분석하였다. 특히 형광기를 결합시켜 전기영동과 HPLC에 의해 동시에 추적이 가능한 물질을 결합시켜서 분석을 용이하게 한 방법을 이용하여 역상칼럼크로마토그래피에 의해서 분리하였다.

실 험 방 법

실험재료—사용된 지유(*Sanguisorba officinalis*)는 경동시장에서 구입을 하여 감정을 받아 사용하였다. DEAE-Sephadex, Sephacryl HR-200, carbazole, rhodizonate, activated partial thromboplastin time (aPTT) 측정 kit, factor Xa clotting time 측정 kit, prothrombin time 측정 kit, glucuronolactone, Alcian blue, phenol red, methylene blue, dextran (MW: 162,000, MW: 66,700, MW: 38,900, MW: 9,400), 7-amino-1,3-naphthalene disulfonic acid (7-AGA), 표준품으로 사용한 헤파린(10 USP units/ml) 등을 미국 Sigma회사에서 구입하였고 7-AGA는 물에서 정제하여 사용하였다. 혈장은 서울대학병원 혈액은행에서 구입하였고 항응고작용 측정시 대조물질은 돼지의 내장에서 추출한 헤파린(10 USP units/ml)으로서 Sigma 제품을 사용하였다. Antithrombin III는 사람의 혈장으로부터 정제하였고¹⁶⁾ 단백질 정량은 BIO-RAD Protein Assay Dye Kit를 이용하여 실시하였다.

실험기기—전기영동기기는 Hoefer SE 600 모델이고 Power supply는 비전과학 KMC 101을 사용하였다. Electrotransfer unit는 미국의 Hoefer사 TE 70이었다. HPLC는 Spectra Physics사의 SP 8860의 펌프와 Rheodyne 제품의 #7125

injector 및 Spectra 1000 검출기를 사용하였다. 결과의 처리는 Spectra Physics사의 SP 4270 적분계로 하였다.

당의 추출—지유 200 g을 분쇄하여 1,300 ml의 methanol을 가하여 6시간 동안 환류 추출한 후 공기중에서 건조시켰다. 다음, 동량의 증류수로 18시간 환류 추출하고 나일론 천으로 걸러서 원심분리하였다. 상등액(750 ml)에 3배의 ethanol을 가해서 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 침전을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 물에 용해시켜 분자량 1,000 cut-off 막으로 투석하여 불용성 물질을 제거하고 동결건조 시켰다.

당의 분획—20 g의 DEAE-Sephadex를 0.02 M 인산완충액(pH 7.0)에 완전히 팽창시킨 후 분리한 당 1 g과 2시간 교반하여 결합시켰다. 겔을 여과하여 완충액으로 200 ml씩 3회 씻은 후 0.5 M NaCl이 함유된 인산완충액에 담긴 다음 여과하여 유리시켰다. 1 M NaCl, 2 M NaCl로 순차적으로 씻어 여액을 모아 흐르는 물에 투석하여 염을 제거하고 동결건조 시켜 시료로 사용하였다. 겔에 결합이 안된 중성당 분획을 low salt fraction이라 하고 후자를 high salt fraction이라 명명하였다. 특히, 0.5 M NaCl 분획에서 유리된 당 100 mg을 0.1 M NaCl 수용액에 녹여서 Sephacryl HR-200(2.5 cm×90 cm)으로 분자량에 따라 3가지의 분획으로 나눈 다음(이하 분획 I, 분획 II, 분획 III라 함) 항응고작용을 측정하였고 분자량은 dextran을 사용하여 결정하였다. 특히, 분획 II를 pyridine과 chlorosulfonic acid와 반응을 시켜서 화학적으로 sulfation하여 헤파리노이드로서 사용하였다.¹⁰⁻¹²⁾ Sulfation시킨 분획 II(62 mg)를 DEAE-Sephadex(1.5×20 cm)에서 NaCl염으로 재 분리하였을 때 거의 2 M NaCl에서 유리되는 것으로 보아 sulfation이 이루어진 것을 알 수 있었으며 2 M NaCl에서 유리된 것을 모아 항응고활성을 측정하였다.

Polyacrylamide gel-electrophoresis (PAGE)에 의한 sulfated polysaccharides의 분석—5~12% 농도기울기로 만든 폴리아크릴아미드 겔에 sulfation시키기 전의 high salt fraction과 low salt fraction, sulfation시킨 후의 high salt fraction, 또 이와 비교하기 위해 헤파린을

100 μg 씩을 50% 자당용액에 녹여 300 volt 전압(비전과학)에서 4시간 시행하였다. 0.5%의 Alcian blue 용액을 이용하여 1시간 동안 염색을 하고 5%의 빙초산으로 탈색을 하였다. Marker로서는 phenol red와 methylene blue를 사용하였다.

화학적 분석—Uronic acid의 분석은 glucuronolactone을 표준품으로 carbazole을 이용하여 실시하였고¹⁷⁾ 중성당은 phenol- H_2SO_4 을 이용하여 측정하였다.¹⁸⁾ 단백질의 분석은 BSA를 표준품으로 Bradford법에 의해서 함유된 단백질의 양을 정량하였다.

항응고활성의 측정—항응고작용은 aPTT(activated partial thromboplastin time), PT(prothrombin time), TT(thrombin time) 및 필요에 따라서 factor X_a clotting time을 측정하였다.¹⁵⁾

당의 조성 분석

1) 환원성 amine화 반응에 의한 형광기가 결합된 당의 제조

Sephacryl HR-200으로부터 분리된 분획 II(1 mg)를 trifluoroacetic acid 40 μl 와 혼합하여 질소를 불어 넣어준 다음 3시간동안 100°C에서 가온하여 가수분해를 하였다. 다음 물을 가하여 동결건조 시킨 후 methanol-pyridine-water (35 : 15 : 10) 55 μl 와 2 μl 의 acetic anhydride을 가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 중 30 μl 를 채취하여 30 μl 의 1 M NaCNBH₃, 0.2 M 7-AGA 15 μl (AcOH : H₂O)를 37°C에서 15시간 반응시켜 반응의 정도를 전기영동에 의해서 확인하였고 미반응의 7-AGA는 전기영동 후 나일론 막에 전이시킨 후 제거하였고 단당류 역시 나일론 막에 전이시켜서 정제를 하였다^{19,20)}. 나일론 막을 잘게 찢은 후 1 M NaCl 용액에 의해 추출하여서 LC를 이용해 분리하여 표준품과 비교하였다.

2) 전기영동

폴리아크릴아미드(20~30% gradient gel) 전기영동을 이용하여 당의 분리를 시도하였고 stacking gel은 6% gel을 사용하였다. Spacer의 두께는 분석용일 때는 0.75 cm이고 많은 양을 필요로 할 경우에는 1.5 cm의 것을 사용하였다. 위, 아래 챔버의 완충액은 0.1 M 붕산, 0.1 M

Tris, 0.01 M EDTA · 2 Na(pH 8.3)의 조성이고 시료는 보통 10 μl 내에서 50%의 sucrose에 섞어 적용시켰고 300 V에서 3시간 정도 실시하였다.^{19,20)} 확인은 UV 장파장(360 nm)에서 형광을 띄므로 쉽사리 가능하였고 초점을 맞추어 암실에서 사진을 찍었다. 이 때 조리개는 완전히 열어놓았고 셋터는 차동으로 고정시켰다.

3) Semi-dry electrotransfer

반응이 완전히 진행되지 않았을 때 AGA를 제거해야 할 필요가 있다. Desalting column(Bio-Gel P-2)을 이용하여 할 수도 있지만 분자량이 작은 화합물은 어려운 점이 있다. 위의 방법대로 전기영동을 한 후에 주 밴드를 칼로 잘라내어 전기적인 방법으로 나일론 막에 전이를 시켜 나일론 막으로부터 1 M NaCl에 의하여 유리시켜 AGA를 제거하였다.

4) HPLC에 의한 당의 분리

전기영동상에서는 단당류 사이에서의 분리가 어렵고 정량적인 목적을 위해서 HPLC(Spectra Physics)를 이용하여 분리를 시도하였다.²¹⁾ 전기영동에 사용한 시료를 희석하여 C₁₈ 역상칼럼(4.6×220 mm, Applied Biosystem)을 이용하여 분리를 시도하였다. 사용한 eluant는 0.1 M triethylamine(pH 4.0, 빙초산)이었고 유속의 속도는 1.0 ml/min이고 파장은 250 nm에서 고정되었다.

결과 및 고찰

당의 분획—Methanol과 증류수를 각각 처리하여 동결건조시켜 얻은 조당 1 g을 0.02 M 인산완충액(pH 7.0)에 녹인 후 DEAE-Sephadex (2.6 cm×40 cm)에 loading하여 DEAE-Sephadex에 결합되지 않는 것파(low salt라 명명), 0.5 M NaCl, 1.0 M NaCl, 2.0 M NaCl 농도에서 용출된 것을 모았다. 0.5 M NaCl 농도에서 유리된 당을 투석시켜 100 mg을 0.1 M NaCl 용액에 녹여서 Sephacryl HR-200(2.6 cm×90 cm)으로 분자량의 크기에 따라서 세 종류의 분획으로 나누었고 항응고활성으로 aPTT와 PT를 측정하였다(Fig. 1, Table I). 이것을 sulfation 시켜서 항응고활성을 측정하여 비교하였다(Table I).

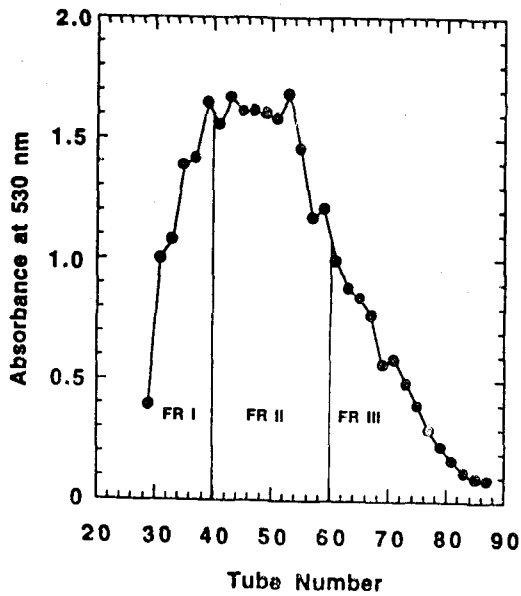


Fig. 1. A bound fraction to DEAE-Sephadex was loaded on a Sephacryl HR-200 equilibrated with 0.02 M phosphate buffer containing 0.1 M NaCl

It was divided into three fractions depending on the molecular weight. Uronic acid was determined for the measurement of sugar at 530 nm. The molecular weight was determined using a series of dextran, which are standard markers.

분획 II의 평균분자량은 45,000~60,000으로 계산되었고 분자량이 큰 분획일수록 항응고 작용이 크게 나타났다. Sulfation시켰을 때 aPTT는 30 U/mg이고 PT는 54 U/mg로 증가되어 sulfation 전에 비해서 두드러지게 증가함을 알 수 있다. 흔히 항응고제로 사용되는 다당류는 황의 양이 15% 이상이며 평균분자량이 10,000 정도이므로 생물활성은 당의 크기와 치환정도에 달려 있다고 볼 수 있다.²²⁾

당의 Sulfation—다당류의 sulfation은 적외선 분광기를 이용하여 확인하였다. 새로운 peak가 1240 cm⁻¹(S=O stretching), 820 cm⁻¹(C-O-S stretching)에서 확인되었다. 주로 sulfation이 일어난 곳은 당의 6번 탄소에 있는 1급 알코올인 -CH₂OH기로 추정되고 2급 알코올기에도 전체적으로 들어갔으리라고 생각된다. 또 전기영동으로도 sulfation전과 후가 다름을 확인할 수 있

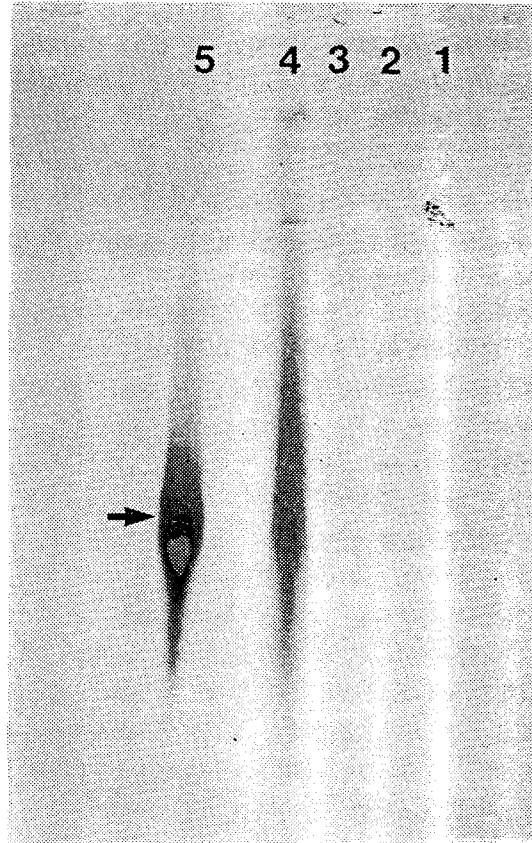


Fig. 2. Stained gradient polyacrylamide gel(0.75 mm) containing 100 μg of polysaccharides
Lane 1: Unbound fraction to DEAE-Sephadex, Lane 2: 0.5M NaCl washing fraction, Lane 3: Fraction II from Sephacryl
Lane 4: Sulfated polysaccharide of fraction II from Sephacryl HR-200, Lane 5: Heparin.

Table I. Molecular weight and anticoagulant activity of polysaccharides fractionated from *Sanguisorba officinalis*

Fraction	MW ¹⁾	aPTT ²⁾	PT ²⁾
Fraction I	97,000	0.6	2.9
Fraction II	60,000	0.3	5
Fraction III	15,000	0.1	2.9
Sulfated Fr. II	nd ³⁾	23	54.3

¹⁾ Molecular weight was determined using Sephacryl HR-200 with standard dextran.

²⁾ Anticoagulant activity was expressed as units/mg based on standard heparin.

³⁾ nd : not determined.

었다(Fig. 2). Fig. 2상에서 1번은 low salt 분획, 2번은 high salt분획, 3번은 분획 II, 4번은 분획 II를 sulfation시킨 것이고 5번은 헤파린의 분포를 나타낸다. 헤파린의 경우 가운데 진하게 보이는 것이 평균분자량 13,000에 해당한다. 1번의 low salt 분획의 band(띠)는 Alcian blue와 거의 결합을 하지 않는 것으로 보아 전하를 거의 띄고 있지 않다는 것을 알 수 있다. 이에 반해 high salt 분획은 분자량이 큰 쪽에서 염색된 점으로 보아 산성당이라는 것을 알 수 있다. 분획 II를 sulfation시켰을 때 특히 저분자량의 다당류에서 sulfation이 일어났음이 Alcian blue염색에 의해서 확인되었다 (Lane 4). 헤파린과 비교하였을 때 크기가 서로 다른 다당류들이 넓게 분포하였다.

Sulfation과 항응고활성—헤파린이 sulfate기를 가지고 있으며 sulfate기가 생리활성에 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다. 크기에 의해서 분리된 분획 II를 sulfation시켰을 때 aPTT, PT에 의해서 측정된 응고시간이 분획 I보다 2배 이상 연장되고 헤파린과 비교하였을 때 23 U/mg과 54 U/mg으로 환산되었다(Table I). aPTT는 혈액응고계에서 내인성 인자의 영향을 측정하며 PT는 외인성 인자의 영향을 측정하는데 일반적으로 사용된다. Sulfation된 분

획 II의 활성이 위의 두 계에 동시에 작용하는 것으로 보아 헤파린의 내인성 인자에 대해 작용하는 것에 비해서 비 특이적으로 작용하는 것처럼 보인다. Sulfation시킨 분획 II를 DEAE-Sephadex에서 재크로마토그래피를 하였을 때 1.0 M NaCl이 함유된 완충용액에서 소량 유리되고 대부분이 2.0 M NaCl 농도에서 유리되었다(Fig. 3). aPTT 측정에 의한 응고시간도 2.0 M의 분획에서 제일 증가되는 것으로 보아 sulfation과 활성은 밀접한 관계를 가지고 있음을 알 수 있다. 다른 중성당, ^{13,15)} 산성당^{10,14)}에 대해서도 유사한 결과가 보고되었다.

분획 II의 단당류분석—분획 II의 당분석은 가수분해 시킨 후 당의 환원성 말단을 reductive amination에 의해 형광기(7-amino-1,3-naphthalene disulfonic acid)를 결합시켜 당의 검출을 C₁₈ column을 이용하여 시도하였다. 이러한 방법에서 반응이 완전히 진행되지 않았을 때 7-AGA를 제거해야 할 필요가 있다. Desalting column(Bio-Gel P-2)을 이용하여 할 수도 있고 전기영동을 한 후에 주가수분해물인 단당류를 칼로 도려내어 전기적인 방법으로 나일론 막에 전이를 시켜 나일론 막으로부터 1M NaCl에 의

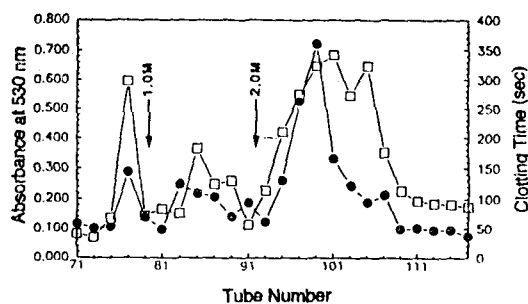


Fig. 3. Sulfated polysaccharide (fraction II) from *Sanguisorba officinalis* was loaded on a DEAE-Sephadex column equilibrated with 0.02 M phosphate buffer containing 0.5 M NaCl

Highly sulfated fraction was eluted at a concentration of 2.0 M NaCl and its anti-coagulant activity was highest. Uronic acid (○-○), Anticoagulant activity (●-●).

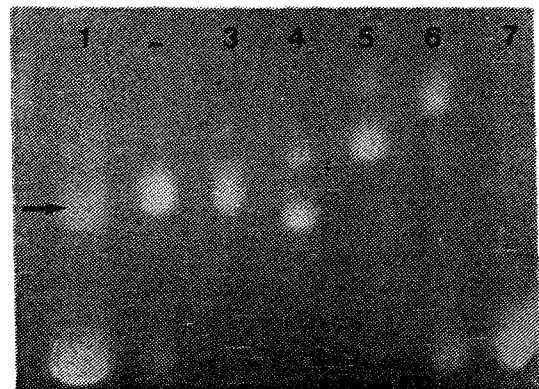


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of hydrolyzate-AGA conjugate of fraction II from Sephacryl

The band indicated by arrow was cut and purified. Lane 1: Hydrolyzate-AGA, Lane 2: Glucose-AGA, Lane 3: Galactose-AGA, Lane 3: N-Acetylglucosamine-AGA, Lane 4: Chitobiose-AGA, Lane 5: Chitotriose-AGA.

해서 유리시켜 당을 정제하였다(Fig. 4). 일반적으로 단당류 사이에서는 이동에 있어서 거의 차이가 안났지만 오탄당(arabinose, xylose)과 육탄당사이는 거의 분리가 안되어 단당류 전체에 포함되었다고 볼 수 있다. 이러한 점에서 전기영동은 분리 정제에 아주 유용하였고 정량적인 목적을 위해서 HPLC를 이용하여 분리를 시도하였다. 전기영동에 사용한 시료를 희석하여 C_{18} 칼럼을 이용하여 분리를 하였다.

Fig. 5의 내부에 단당류들의 분리가 HPLC상에서 보여주고 있다. 거의 분리가 baseline에서 되고 있는데 glucose와 mannose가 거의 동시에 겹치는 점이 발견되고 있다. 그러나, 같은 종류의 phenyl 역상 칼럼을 사용시 분리가 가능하였다(결과 미발표).

지유의 경우 두번째 분획의 단당류의 조성은 예측되는 당을 같이 injection시켰을 때 확인될 수 있었는데 중성당인 경우 galactose와 arabinose가 1:4의 비율로 구성되었고(LC상에서 면적비) 그 이외에 xylose, rhamnose가 있었다(Fig. 4). 그 이외에 8분대에서 보여지는 peak는 반응시 부산물로 보이고 뒤에서 나오는 peak는 확인을 하기가 어려웠다. 특히, 위의 방법의 장점은 UV 검출기를 이용하여 500 pmole에서 2 nmole 범위 내에서 분석이 가능하였고(형광검출기를 이용하는 경우는 100배 정도 감도가 증가될 수

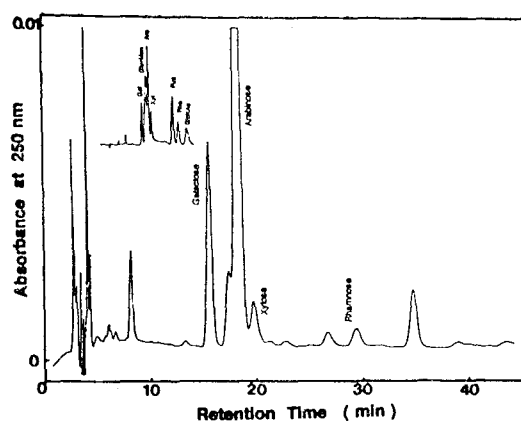


Fig. 5. HPLC analysis of polysaccharide fraction II from *Sanguisorba officinalis*

The inset indicates the chromatogram of monosaccharide-AGA conjugate analysis.

있다) 환원당의 α, β 형태 구별이 없기 때문에 정확히 당을 확인할 수 있었다. 따라서, 지유의 당은 arabinose가 주이고 galactose와 galacturonic 산이 가지로 연결된 것처럼 보인다. 실제적으로 지유의 주성분으로서 glycoside나 tannin 이외에 arabinose가 주성분으로 알려져 있다.²³⁾

또한, 분획 II의 경우 단백질은 검출되지 않았고 uronic산은 carbazole 시험에 의해 30% 이상으로 계산되었다. 어떠한 종류의 uronic 산인지는 명확히 규명이 안되었는데 가수분해시 HPLC에 의해서 검출이 안된 것은 lactone으로 전환이 되어 환원당기가 없어졌던 것으로 풀이된다.

분획 II의 sulfation은 항응고활성을 증가시키는 결과를 가져왔다. *In vitro* 활성이지만 유사한 종류의 sulfated 다당류들이 *ex vivo*에서도 응고시간의 증가를 야기시키기 때문에¹⁵⁾ 헤파리노이드로 가능성이 있다. 앞으로의 과제는 분자량을 작게하여 화학적 변형을 시켰을 때 활성의 증가를 피하는 일이다.

결 론

지유(*Sanguisorba officinalis* L.)로부터 당을 추출하여 DEAE-Sephadex에 결합되는 것과 결합되지 않는 것으로 나눈 후 결합된 분획을 0.5 M 염에서 유리된 분획을 분자량 크기로 다시 분획하여 평균분자량이 45,000~60,000인 분획 II를 모아서 화학적인 방법으로 sulfation시켰다. Sulfation시킨 다당은 항응고활성이 sulfation 전에 비해 월등히 증가됨을 확인하였다. 분획 II의 당은 가수분해시킨 후 환원당 말단에 형광화합물(7-amino-1,3-naphthalene disulfonic산)를 결합시켜 HPLC에 의해서 표준품과 비교를 하여 조성을 결정하였다. 중성당의 경우 주로 arabinose와 galactose가 주로 4:1의 비율로 구성되었고 uronic acid도 30% 이상이였다. 결론적으로 식물로부터 얻어진 당을 화학적으로 sulfation시켜 유용한 헤파리노이드를 제조할 수 있었고 감도가 500 pmole에서 2 nmole 범위내에서 당을 분석할 수 있었다.

감사의 말씀—본 연구에서 소요된 경비의 일

부는 1992년도 보사부 신약개발지원 연구비로
충당되었으며 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.
(1993년 4월 13일 접수 : 4월 16일 수리)

참 고 문 헌

1. Casu, B.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 43, 51 (1985).
2. Rosenberg, R.D.: *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), CRC Press, FL, p.455 (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., Orta, R., Prino, G., Torri, G. and Zoppeti, G.: *Arzneimittelforschung* 6, 637 (1986).
6. Godal, H.C.: *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications* (ed. by D.A. Lane and Ulf Lindahl), CRC Press, Inc Boca Ration, FL, p.533 (1989).
7. Levine, M.N., Hirsh, J. and Kelton, J.G.: *ibid.*, CRC Press, Inc Boca Ration, FL, p.517 (1989).
8. De Swart, C.A.M., Nijmeijer, B., Roelofs, J.M. M. and Sixma, J.J.: *Blood* 60, 1251 (1982).
9. Holmer, E.: *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications* (ed. by D.A. Lane and Ulf Lindahl), CRC Press, Inc Boca Ration, FL, p.576 (1989).
10. Ricketts, C.R.: *Biochem. J.* 51, 129 (1952).
11. Eode, V. and Franz, G.: *Arch. Pharm.* 32, 363 (1991).
12. Nishimura, S.I., Nishi, N. and Tokura, S.: *Carbohydr. Res.* 156, 286 (1986).
13. Doctor, V.M. and Sauls, V.: *Thromb. Res.* 30, 573 (1983).
14. Doctor, V.M., Lewis, D., Coleman, M., Kemp, M.T., Marbley, E. and Sauls, V.: *Thromb. Res.* 64, 413 (1991).
15. Kim, Y.S., Roh, J.E., Ann, H.S. and Park, H.K.: *Yakhak Hoeji* 36, 350 (1992).
16. Griffith, M.J., Tydall, J.A., Noyes, C.M. and Church, F.C.: *J. Biol. Chem.* 260, 2218 (1985).
17. Bitter, T. and Muir, H.M.: *Anal. Biochem.* 4, 330 (1962).
18. Pazur, J.H.: *Carbohydrate Analysis* (ed. by Chaplin, M. and Kennedy, J.), IRL Press, Oxford, p.55 (1986).
19. Al-Hakim, A. and Linhardt, Robert, J.: *Electrophoresis* 11, 23 (1990).
20. Kim, Yeong S., Lee, Kyung B. and Linhardt, Robert, J.: *Korean Biochem. J.* 24, 466 (1991).
21. Park, Kyung S. and Kim, Yeong S.: *The 41st Annual Convention of Pharmaceutical Society of Korea*, p.143 (1992).
22. Berquist, D. and Nilson, I.: *Thromb. Res.* 23, 304 (1983).
23. Bensky, D. and Gamble, A.: *Chinese Herbal Medicine*, Eastland Press, Seattle, p.384 (1986).