

G1099-0663

615,36

L 293E

v.1

제 1 차년도
최종 보고서

19603277

屠畜場 副産物로부터 醫療用
有用成分 抽出에 관한 研究

Studies on the Extraction of Useful Medicinal
Component from Slaughterhouse By-Products

의료용 성분

헤파린

研究機關

韓國食品開發研究院

農林水産部

제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “屠畜場 副産物로부터 醫療用 有用成分 抽出에 관한 研究” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1995. 12. 19

주 관 연 구 기 관 : 한국식품개발연구원
총괄연구책임자 : 韓 讚 奎
연 구 원 : 李 南 珩
 尹 七 石
 李 福 熙
 成 耆 承
 慶 炫 旻
 裴 貴 石
 尹 美 京
협동연구기관 : 중 앙 대 학 교
협동연구책임자 : 張 文 伯
협동연구기관 : 일심 산업 도축장
협동연구책임자 : 김 순 희

要 約 文

I. 제 목

屠畜場 副産物로부터 醫療用 有用成分 抽出에 관한 研究

II. 연구개발의 목적 및 중요성

도축부산물 중 内分泌腺이나 内分泌器官 등은 酵素, 호르몬 또는 기타 다른 물질의 추출을 위한 중요한 원료원이 된다. 이들은 生化學劑와 의약품 제품의 합성에 직간접적으로 이용할 수 있다. 실험실적인 이용을 위해서 여러가지 생화학제가 動物體 器官에서 추출되고 있으나 그 양이 매우 적기 때문에 축산업의 경영측면에서 그다지 큰 관심을 얻지 못하고 있다.

'93년 말 전국의 소와 돼지의 도축두수는 각각 686천두, 9,678천두로서 소와 돼지의 도체에서 器官, 腹腔 및 腸内容物の 비율을 각각 32%, 13%로 봤을때 상기 도축실적에 따른 부산물의 발생량은 소와 돼지에서 각각 87,800M/T, 243,800M/T으로 추정된다. 따라서 소와 돼지의 도체부산물 중 헤파린 추출에 이용되는 내장의 발생량은 각각 15%, 13%로 봤을 때 대략 13,000M/T, 32,000M/T 총 45,000M/T으로 추정된다.

도축시 발생하는 혈액, 내장, 뼈 등의 부산물은 대부분 放血 또는 폐기되므로 자원의 효율적인 활용도가 낮고 심각한 公害問題를 야기시키고 있다.

도축부산물 중 내장을 비롯하여 내분비선이나 각종 장기등은 효소 또는 호르몬 및 기타 유용성분의 추출에 중요한 원료원으로서 이들은 생화학제와 의약품제제의 합성에 직간접적으로 이용되고 있다. 현재 국내의 헤파린등 의료용 생화학제제는 원료합성이 어렵고 수요에 비해 施設投資費가 막대하여 원료를 수입하여 가공하거나 완제품을 수입하는 실정이다.

원료의약품 생산 분야는 완제 의약품 분야에 비해 대규모의 자본과 높은 기술 수준이 요구되므로 아직까지 우리나라의 원료 의약품 생산 분야는 취약하다고 할 수 있다. 특히 원료자급도는 50%를 상회하는 수준에 머물고 있으며 그것도 고도의 정밀 화학 제품이라기보다 일반 제품이 생산의 주종을 차지하고 있는 실정이다.

원료의약품 부문의 성장은 1970년대 전반에 매우 활발하였는데 이 시기에는 정부의 原料工業育成政策과 함께 원료의 국산화가 활발히 이루어져 매년 50% 이상의 성장율을 보인 반면 1970년대 후반부터는 생산 증가율이 매년 20% 내의 수준으로 둔화되었다. 이는 원료 의약품 부문 자체의 기술 수준이 향상되지 못하고 있는 것도 중요한 요인의 하나이다. 즉 원료 자급도가 50% 미만까지는 기술 도입이나 자체 개발이 비교적 손쉬운 품목이 주 대상이었으나 50%를 넘으면 기술적인 장벽이 높은 尖端製品을 개발 하여야 한다.

국내의 도축부산물과 관련한 기술은 단순히 사료가공이나 전통음식등에 국한되고 있고 실험실적으로 단순히 몇가지 생화학제가 동물체의 기관에서 추출되고 있으나 그 양이 매우 적기 때문에 부가가치를 높은 재활용기술 측면에서는 큰 관심이 되지 못하고 있다. 그러나 국내의 저 분자 호르몬 합성기술은 遺傳工學技法을 이용한 insulin의 대량 生産體系가 이미 확립되었기 때문에 향후 동물체 유래의 몇 가지 의료용 제제가 이 같은 방법으로 생산될 전망이다.

도축부산물로 부터 유용물질의 추출기술은 이미 선진외국에서는 實用化 技術로서 정착되었으나 우리나라에서는 의료용제제의 추출기술 개발욕구가 미약하고 國內需要가 많지 않다는 이유로 전량 수입에 의존하고 있다. 장기적으로 의약품 생산 기술과 관련된 기반기술의 확립이라는 차원에서 기술도입보다는 자체적인 연구개발로 실험실적인 추출·분리 기술의 확립과 실용화 기술로 정착시키는 것이 바람직하다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

도축장 부산물로부터 의료용 유용성분의 抽出, 分離, 精製 등 일련의 기술은 매우 정밀하여 단순 생산 기술 뿐아니라 기초과학을 바탕으로 原料의 中間體合成, 分離, 抽出기술과 前臨床 및 臨床試驗 단계에서 藥效 또는 毒性 檢索 技術, 藥劑 및 劑型 관련기술 및 生産工學 관련기술 등이 복합적이고 유기적으로 결합되어야 만 완전한 기술로 평가될 수 있다. 현재 국내의 의료용 유용성분의 개발현황은 원료의 수입 의존도가 높고 시설투자비의 부담등으로 基盤 技術 개발이 미약한 실정이다.

- 부산물 발생 현황 및 이용 실태 조사
- 헤파린 함유 수성 용액의 제조 및 추출 기술 연구
- 장기 추출물로부터 정제 방법 연구

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 1차 연구개발에서는 헤파린의 실험실적인 추출 분리 조건의 탐색으로서 헤파린 함유 水性 溶液의 제조 기술 확립이 주요 연구 내용이다.

연간 돼지 도축규모로 볼 때 이론적인 헤파린 원료물질의 확보율은 '93년 헤파린염 수입량의 300-400배 수준으로 추정된다. 따라서 폐기 자원의 활용성 제고를 통한 附加價値를 높일 수 있도록 抽出 收率 향상등의 방안 마련이 시급하다. 그러나 본 과제의 경우 1차년도만 실시한 과제로서 향후 이와 관련된 과제가 수행될 경우를 위해 몇 가지 지적하고자 한다. 실용화 기술로서 정착되기 위해서는 도축장에서 대량 분리, 추출 기술 정립을 위한 작업장의 표준 모델 정립과 대규모 도축장과 연계하여 부산물 수거의 일원화 및 단순화를 통한 장기등 내용물의 분류수집 시스템의 구축이 필요하다. 원료물질로서 돼지내장 점막을 온전하게 분리, 수거하기 위한 시설은 혈액이나 모발 등 이물질의 혼입(混入)을 예방하는 장치로서 도축부산물로부터 부가가치가 높은 의료용 생화학제의 추출, 정제를 통한 재활용의 제고 측면에서 본 과제와 관련해서 시험 도축장을 대상으로 시설 보수 및 개선이 선행되어야 한다. 산·학·연 공동

으로 도축부산물의 再活用과 관련된 유기적인 실용화 연구의 확대심화가 필요하다. 또한 추출, 정제된 헤파린 원료 물질의 인체 사용 적합성 내지 안전성 검정을 위해서는 국립보건원, 약학 대학, 수의과 대학 및 관련 제약회사등과 공동 연구 체제의 확립이 필요하다. 따라서 폐기자원의 재활용, 의료용 제제의 추출 기술 개발 및 이에 따른 환경오염의 완화 측면에서 농림수산부와 보건복지부 및 환경부 등의 종합적이고 구체적인 활용방안에 대한 정책적인 협의 및 연구지원이 필요할 것으로 판단된다.

의약품 제제의 원료를 거의 전량 수입, 가공하거나 제제를 완전 수입에 의존하는 현실정에서 본 연구 사업을 통한 의료용 유용성분의 추출에 관련된 기초 기술의 개발은 앞으로 이와 유사한 과제로서 도축 부산물로부터 유용한 생화학제의 기술 개발을 자극할 것으로 기대된다.

SUMMARY

In Korea, most of medical materials extracted from meat by-products have imported due to weak developmental needs and few domestic demands, although the extraction technology of useful medical components from the slaughterhouse by-products already had been established practically in developed countries.

However, it would be much desirable to develop and establish the basic technology applicable to the production of medicinal component in pilot scale rather importing the technology from the foreign countries. Therefore, this study was performed to develop laboratory production technology consisting of extraction, isolation and purification of heparin (anticoagulant) prepared from pig intestines.

Samples of pig intestines for heparin extraction were collected from Il-Sim slaughterhouse (cooperative research counterpart) located in Chun-An, Chung-Nam province.

For extraction of heparin, only small intestines among pig whole intestines were used and cut in two sides and intestinal contents were removed with running tap water at first and washed with physiological saline water a second time. Whenever doing sample preparations the cautions are given not to touch or lose mucosa from intestinal lumen.

After washing intestines, small intestines were cut by proper length to work with and mucosa were collected with slide glass. Prepared mucosa were placed in freeze-drying bottle.

The scope of the 1st year study was only to find optimal conditions of extraction and isolation in lab scale and major part of the study was to establish the production technology of the heparin containing water-type solution. Considering annual slaughtering size of pig, heparin extractable raw materials in Korea were estimated to amount 300-400 times the imported amount of heparin sodium. Thus research programs for improving the recovery rate of extractions are urgently needed.

Nevertheless, this study was performed only one-year so that not much significant outcomes had been obtained, so several things should be pointed out for the development technology of heparin preparation from meat by-products in current situation of Korea.

- 1) Standard work environment of slaughterhouse should be modeled for efficient sample collection and preparation.
- 2) To collect wholesome the by-products, layout, equipment and work facilities should be properly designed and constructed not to contaminate or incorporate undesirable foreign materials.
- 3) Research should be conducted in collaboration with industries and universities for concrete and practical results. Especially, since heparin is medical components, the safety of extracted heparin should be testified and proved medically before use by several different government institutions responsible for safety regulation or enforcement.

In conclusion, rather strategic and long-range research programs designed to develop processing technology of medical component from the by-product which might cause environmental pollution should be required in the governmental level.

CONTENTS

I . Introduction	10
II . Materials and Methods	13
1. Expremental objective	13
2. Expremental methods	13
(1) Sample preparation and pretreatment for analysis	13
(2) Chemical analysis	17
① Chemical composition	17
② Sulphate content	17
③ Monosaccharide	17
④ Uronic acid	20
⑤ Electrophoretic separation	22
3. Production of aqueous heparin solution	22
4. Extraction and partial purification of heparin	24
5. Anticoagulant titre	26
① Activated partial thromboplastin time (APTT)	26
② Prothrombin time (PT)	26
III . Results and Discussions	27
1. Occurrence and utilization of slaughterhouse by-products	27
2. Domestic production status of heparin	29
3. Extraction and purification of heparin	35
4. Anticoagulant titre	39
Reference	43

목 차

제1장 서 론	10
제2장 재료 및 방법	13
제 1절 실험목적	13
제 2절 실험방법	13
1. 시료 준비 및 분석 전처리	13
2. 화학 분석	17
가. 일반성분 분석	17
나. 황산기 함량 분석	17
다. 구성당 조성 분석	17
라. Uronic acid 함량 및 조성 분석	20
마. 전기영동에 의한 헤파린의 균일성 확인	22
3. 헤파린 함유 수성용액의 제조 방법	22
4. 헤파린 추출 및 부분 정제	24
5. 항혈액 응고력 측정	26
가. 활성 트롬보 플라스틴 시간 측정	26
나. 프로트롬빈 시간 측정	26
제3장 결과 및 고찰	27
1. 부산물 발생 현황 및 이용 실태	27
2. 국내의 헤파린 생산 현황	29
3. 헤파린의 추출 및 부분 정제	35
4. 항혈액 응고력	39
인용문헌	43

제1장 緒 論

헤파린은 포유동물 체내의 구성성분의 하나이며 肺, 肝 및 小腸의 粘膜組織에 다량 함유된 高分子 多糖類의 일종으로 mucoitin polysulfuric ester에 속한다. 헤파린은 혈액 응고작용과 섬유소 용해 촉진 작용 및 脂血 淸淨化 作用을 갖는다.

輸血 및 기타 분석 목적을 위해서 clot(血餅)가 생기지 않은 혈액 시료를 획득하기 위하여 여러가지 항응고제가 이용된다. 복합 polysaccharide인 heparin은 천연의 항응고제로서 혈액중 basophils(백혈구의 일종)과 체내의 mast cells에 의해 產生된다. Mast cell은 폐와 다른 기관에서 毛細血管을 둘러싸는 결합조직의 부분이다. 이 조직으로부터 헤파린이 방출되어 모세혈관 속으로 들어간다. 항응고를 위해서 혈액 1ml 당 헤파린 0.2mg 농도가 사용된다. 그러나 헤파린 1mg은 0°C에서는 혈액 100-500 ml, 상온에서는 혈액 10-20ml의 응고를 방지할 수 있다(Swenson, 1984).

Heparin은 antiprothrombin과 antithrombin으로서 작용하기 때문에 특히 심장순환 계통의 질환과 thrombosis의 치료에 이용되고 있다. 또한 어떤 외과적 수술 후의 blood clots의 형성을 억제하는데 쓰이기도 한다.

헤파린 1 unit는 대략 heparin sodium 0.01mg(약 20IU)과 같다. 가축에서 수혈을 위해 흔히 쓰이는 항응고제는 sodium citrate이다. Citrate는 혈장의 calcium ions과 결합하여 insoluble calcium salt를 형성한다. 반드시 주의해야 할 것은 너무 많은 citrate를 첨가하지 않아야 한다. 왜냐하면 citrate가 충분한 양의 calcium ions과 결합할 수 있으므로 tetany를 유발하는 神經組織 및 心筋의 機能障礙를 일으킬 수 있는 hypocalcemia가 나타난다. Sodium citrate와 유사한 당은 0.2-0.4% 농도로서 혈액응고를 방지한다. Potassium salts는 수혈할 때 사용하지 않는데 이는 심장마비 가능성 때문이다.

다른 유용한 항응고제로는 oxalates와 fluorides의 sodium, potassium 및 ammonium salts가 있다. EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)와 같이 chelating 화합물 역시 항응고제로서 이용되고 있다. Heparin 유기 thrombocytopenia(血小板減少症)는 돼지에서 추출한 heparin보다 소에서 추출한 heparin을 사용했을 때 빈발하는 것으로 보고되

고 있다. 미국의 경우 소에서 추출한 heparin을 사용하고 유럽에서는 대체로 돼지에서 추출한 heparin을 사용하고 있다(Bottiger, 1987).

Heparin의 분자량은 평균 12,000-15,000 Dalton이며 헤파린 분자의 30-50%정도는 antithrombin III에 결합하므로써 항응고 작용을 나타낸다. 나머지 분자들은 inactive하다(Anderson등, 1976). 상업적으로 생산되고 있는 heparin은 돼지의 장으로부터 획득되고 소의 폐에서 얻어지는 것은 glycoasminoglycans으로 구성된다(Lasker, 1977). Heparin의 항응고기능은 antithrombin기능을 촉진시키는 능력에 좌우된다(Yurt등, 1977, Rosenberg; 1977).

일반적으로 제품의 國際競爭力을 나타내는 지표로서 가장 중요시 되는 것은 價格競爭力이다. 그러나 기술이 산업개발에 기여하는 비중이 큰 技術集約的인 산업에서는 가격요인보다는 기술적 우위성 여부가 國際競爭을 좌우하게 된다. 醫藥産業의 경우 연구개발 및 기술혁신이 企業成長에 미치는 효과는 거의 절대적이다. 이에 따라 歐美와 日本의 다국적 기업들은 집중적으로 연구·기술개발투자를 함으로써 技術의 比較優位에 입각한 經營戰略을 수립하고 있다. 이와 같이 醫藥産業은 他製造業에 비해 技術의 意味가 매우 중요한 뿐만 아니라 타제조업과는 다른 몇가지 技術的 特性을 지니고 있다. 이 중에서도 가장 중요한 것은 醫藥産業의 技術이 人間의 生命과 健康을 다루는 기술이라는 점이다. 이러한 特性은 政府의 엄격한 統制를 필요로 하게 하여 化學적으로 발견된 物質을 藥理 藥效實驗과 動物實驗 그리고 臨床實驗 등 여러 단계의 복잡한 과정을 거치게함으로써 막대한 研究開發費用과 時間을 요구하게 된다. 둘째로 醫藥産業의 技術은 단순한 生産技術이 아닌 複合技術이라는 特性을 갖고 있다. 즉 어떤 醫藥品이 製品化되기까지는 단순한 生産技術 뿐만 아니라 基礎科學을 바탕으로 原料 및 中間體의 合成·分離·抽出技術과 前臨床 및 臨床試驗段階에서의 藥效 및 毒性檢索技術, 製劑 및 劑型關聯技術 그리고 生物工學關聯技術 등이 복합적이고 유기적으로 結合되어야만 완전한 기술로 평가될 수 있다. 마지막으로 醫藥産業 技術이 精密化學工學과 관련된 技術的 特性으로서 精密한 技術이 요구된다는 점이다. 이는 化學 物質의 純度가 중요시되고 있으며 또 이를 위한 合成·分離·抽出에 관계되는 基礎科學知識이나 技術이 요구된다(홍문신과 김용기, 1986).

외국의 경우 도축장 부산물로부터 추출, 이용되고 있는 의료용 생화학제제를 보면 脾臟에서 insulin, trypsin, chymotrypsin, lipase, 腦下垂體에서 ACTH, TSH, 肺에서 heparin, 内腸에서 heparin, pepsin, rennet 등이다(APRIA, 1983).

국내의 도축부산물과 관련한 기술은 단순히 사료가공이나 전통음식등에 국한 되고 있고 실험실적으로 단순히 몇가지 생화학제가 동물체의 기관에서 추출되고 있으나 그 양이 매우 적기 때문에 부가가치를 높인 재활용기술 측면에서는 큰 관심이 되지 못하고 있다.

도축부산물로부터 유용물질의 추출기술은 이미 선진외국에서는 실용화 기술로서 정착되었으나 우리나라에서는 의료용제제의 추출기술 개발욕구가 미약하고 국내수요가 많지 않다는 이유로 전량 수입에 의존하고 있다. 장기적으로 의약품 생산 기술과 관련된 기반기술의 확립이라는 차원에서 기술도입보다는 자체적인 연구개발로 실험실적인 추출·분리 기술의 확립과 실용화 기술로 정착시키는 것이 바람직하다.

제2장 材料 및 方法

제1절 실험목적

도축부산물로 부터 유용물질의 추출기술은 이미 선진외국에서는 실용화 기술로서 정착되었으나 우리나라에서는 의료용제제의 추출기술 개발욕구가 미약하고 국내수요가 많지 않다는 이유로 전량 수입에 의존하고 있다. 장기적으로 의약품 생산 기술과 관련된 기반기술의 확립이라는 차원에서 자체적인 연구개발로 실험실적인 추출, 분리 기술의 확립과 상업적인 실용화 기술로 정착시키는 것이 바람직하다.

따라서 본 연구는 돼지 내장으로부터 항 응고제로 쓰이는 헤파린의 추출, 분리, 정제를 위한 실험실적인 기술을 확립하고자 수행하였다.

제 2절 실험방법

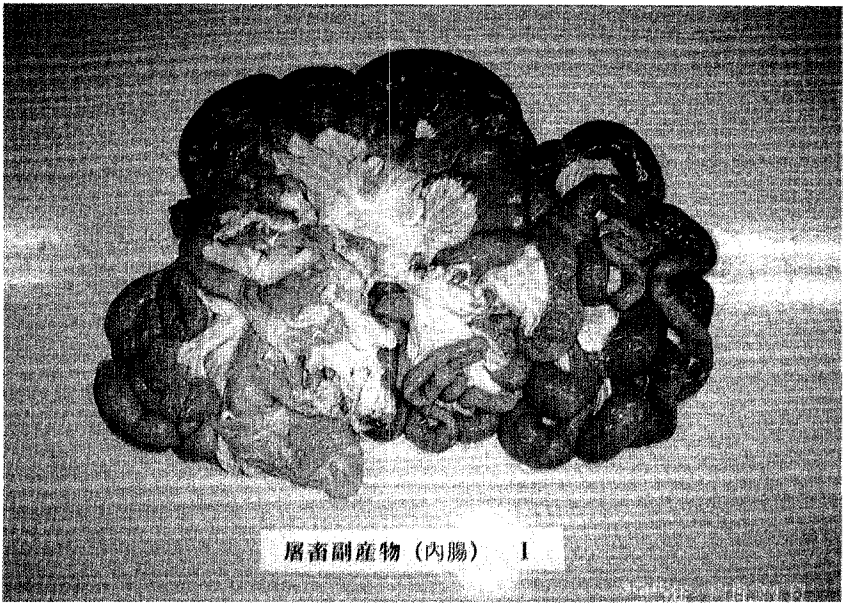
1. 시료 준비 및 분석 전처리

헤파린 추출을 위한 돼지 내장 시료는 본 연구사업의 협동 연구 기관인 일심산업 도축장(충남 천안군 소재)에서 획득하였다. 헤파린 추출을 위한 수성용액 제조를 위하여 돼지 내장은 소장 부위만 따로 절단하여 양쪽으로 절개한 다음 장 내용물의 제거를 위하여약하게 틀어 놓은 수돗물로 1차 세척하고 생리 식염수로 2차 세척하였다. 이때 소장 내벽에 붙어있는 점막이 유실되지 않도록 유의하였다. 세척이 끝난 다음 작업대 위에 소장을 점막 회수에 용이한 길이로 절단하여 현미경 검경용 슬라이드로 채취하여 동결건조용 bottle에 옮겼다. 헤파린 추출 수율을 비교하기 위해 소장 점막이 채취된 소장 시료 역시 별도의 트레이에 옮겨 보관하였다.

일반성분은 신선 내장 및 동결건조된 분말 시료를 사용하여 분석하였다. 황산기, 구성당, uronic acid 분석은 Nishino(1989)의 방법으로 가수분해한 시료를 사용하였다. 즉, teflon-lined cap이 있는 reaction vial에 일정량의 시료를 취한 후 90% formic acid

0.5ml를 넣고 이산화탄소로 치환한 뒤 100℃에서 2시간 2차 가수분해를 하였다. 가수분해된 시료는 중화시킨 후 황산기, 구성당 및 uronic acid의 분석용 시료로 하였다.

한편 추출 및 분석용 시료를 준비하기 위한 내장부산물의 사진(内腸 I, II, III)은 막 도출된 돼지 내장으로서는 内腸 I은 장간막(腸間膜)이 붙어있는 상태이고, 内腸 II는 장간막을 제거한 상태, 内腸 III은 腸内容物을 제거한 사진이다. 内腸 IV은 작업에 용이한 크기로 소장부분을 절단하여 절개한 모습이고 사진(I)는 현미경 검경용 슬라이드 그라스를 이용하여 小腸粘膜 만을 트레이에 받은 모습이고, 사진(内腸)은 추출 및 분석을 위해 동결건조된 소장점막이다.



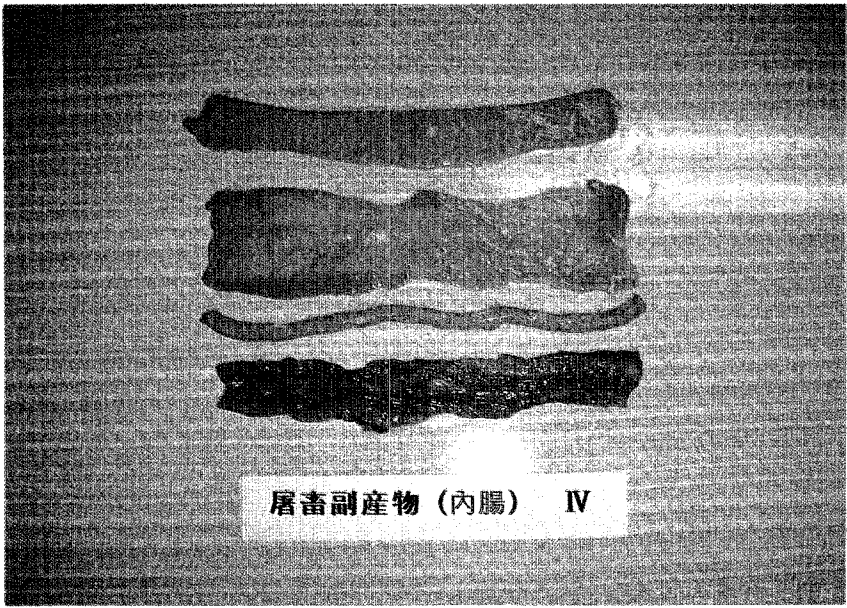
屠畜副産物（内腸） I



屠畜副産物（内腸） II



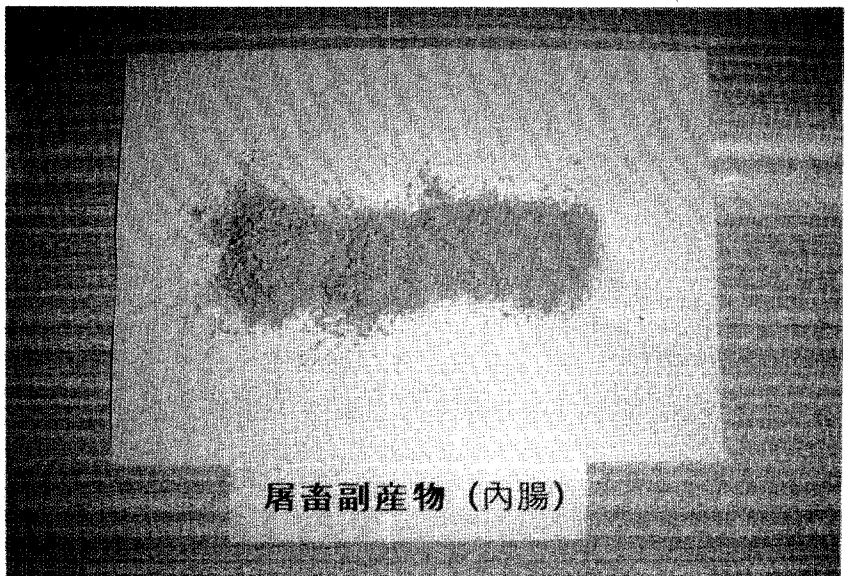
屠畜副産物（内腸） III



屠畜副産物（内腸） IV



小腸粘膜（I）



屠畜副産物（内腸）

2. 화학분석

가. 일반성분

수분은 105°C 상압건조법, 조지방은 Soxhlet 분석법, 조단백질은 Kjeldahl 정량법, 회분은 550°C 건식회화법에 따라 분석하였다(AOAC, 1990).

나. 황산기 함량

황산기의 함량은 Dodgson(1962)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 가수분해한 시료 0.2ml에 4% TCA용액 3.8ml 및 BaCl₂-젤라틴시약(증류수 400ml에 젤라틴 2g을 넣고 65°C에서 녹여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 이 액에 BaCl₂ 2g 넣어 녹인 후 2-3시간 방치 후 사용) 1ml를 첨가하여 교반 후 20분간 방치하여 360nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 K₂SO₄를 이용하여 작성하였다.

다. 구성당 조성 분석

구성당 조성 분석은 Blakeney등(1983)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 가수분해한 시료 0.2ml에 15M NH₄OH를 첨가하여 NH₄OH 농도가 1.0M가 되게 조정한 후 내부 표준물질로 myo-inositol을 첨가하였다. 시료용액에 sodium borohydride용액(NaBH₂ 2g을 dry-dimethyl sulfoxide 100ml에 100°C에서 녹여 조제)을 넣어 40°C에서 90분 환원시킨 후 과잉의 sodium borohydride는 acetic acid로 분해시켰다. 환원된 시료 용액에 acetic anhydride(2ml)와 1-methyl imidazole(0.2ml)을 넣고 교반한 후 실온에서 10분간 방치하여 acetylation시킨 후 과잉의 acetic anhydride는 증류수(5ml)를 첨가하여 분해하였다. 냉각시킨 후 dichloromethane(1ml)를 넣어 교반한 후 층 분리하여 dichloromethane층을 얻은 후 -20°C에 저장하여 두고 분석하였다. Gas chromatography (GC)의 분석 조건은 표 1과 같다.

Table 1. Operating conditions of the GC for alditol acetates

Instrument	Hewlett Packard GC Model 5890
Column	SP-2380(0.25mm i.d. × 30m; film thickness:0.2 μm)
Oven temp.	230°C (hold time, 10min.), 2.5°C/min., 265°C
Carrier gas	Helium, 11psi
Make up gas	Nitrogen(30ml/min)
Detector	Flame Ionization Detector
Injector temp.	265°C
Detector temp.	265°C

구성당의 확인은 표준시약의 크로마토그램과 retention time을 비교하여 확인하였다. 정량은 내부표준물질 (myo-inositol)과 표준시약(L-rhamnose, L-fucose, L-ribose, L-arabinose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-glucose)을 시료와 동일하게 acetylation하여 농도별 상대적 면적비를 구하여 환산하였다. 표준시약의 크로마토그램은 그림1과 같다.

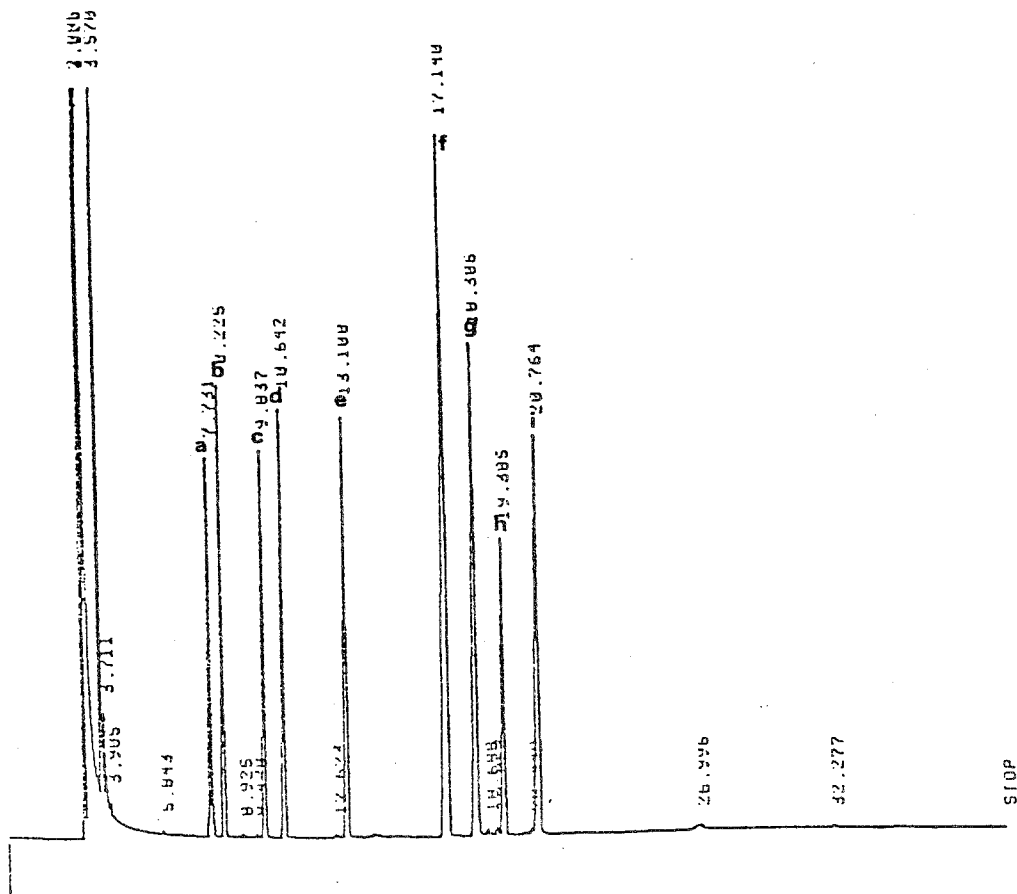


Fig.1. GC chromatogram of alditol acetates.

- a. Rhamnitol, b. Fucitol, c. Ribitol, d. Arabinitol,
- e. Xylitol, f. Mannitol, g. Galactiol, h. Glucitol,
- i. Myo-inositiol

라. Uronic acid의 함량 및 조성

Uronic acid의 함량은 Knutson과 Jeanes(1968)의 방법에 따라 분석하였다. 즉, H₂SO₄-borate 시약(H₃BO₃ 24.74g을 4M KOH용액 45ml에 녹인 후 증류수로 100ml로 정용한 뒤 25ml 취하여 진한 황산 용액으로 1L로 정용) 6ml에 가수분해한 시료 용액 0.7ml를 넣고 교반후 냉각하였다. 냉각된 용액에 carbazole용액(carbazole을 에탄올에 녹여 0.1% 용액을 조제) 0.2ml를 넣어 교반한 후 55°C 수욕조상에서 30분간 가열, 발색시켜 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량 곡선은 galacturonic acid를 이용하여 작성하였다.

Uronic acid의 조성은 Lehrfeld(1987)의 방법에 따라 분석하였다.

가수분해한 시료 용액 1ml에 내부표준물질로 myo-inositol을 첨가한 후 0.5M sodium carbonate(78 μl)를 넣고 30°C에서 45분간 방치한 후 4% sodium borohydride(0.5ml)를 가하여 실온에 90분간 방치하여 환원시켰다. 과인의 sodium borohydride는 acetic acid를 첨가하여 분해시킨 후 cation exchange column(2ml, AG 50W-X8, 200-400 mesh, H⁺ form)에 넣어 Na이온을 제거한 후 건조시켰다. 메탄올(3ml, 2회)을 첨가하여 borate를 trimethyl borate로 제거하고 진공하에서 85°C에서 2시간 건조하여 aldonic acid를 aldono lactone으로 전환시켰다. 잔사를 pyridine(1ml)과 1-propylamine(1ml)을 넣어 녹인 후 55°C에서 30분간 가열하였다. 냉각시킨 후 질소를 불어 넣어 건조시키고 다시 pyridine(0.5ml)과 acetic anhydride(0.5ml)에 녹인 후 95°C에서 1시간 가열하여 GC분석을 하였다. GC의 분석조건은 표 2와 같다.

Table 2. Operating conditions of GC for alduronic acids

Instrument	Hewlett Packard GC Model 5890
Column	SP-2380(0.25mm i.d. × 30m; film thickness:0.2 μm)
Oven temp.	265°C
Carrier gas	Helium, 11psi
Make up gas	Nitrogen(30ml/min)
Detector	Flame Ionization Detector
Injector temp.	265°C
Detector temp.	265°C

시료의 확인은 표준시약의 크로마토그램과 retention time을 비교하여 확인하였으며 함량은 내부표준물질 (myo-inositol)과 표준시약(D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, D-mannuronic acid lactone, L-gulonic acid lactone)을 시료와 동일하게 처리하여 상대면적비를 구하여 환산하였다. 표준시약의 크로마토그램은 그림 2와 같다.

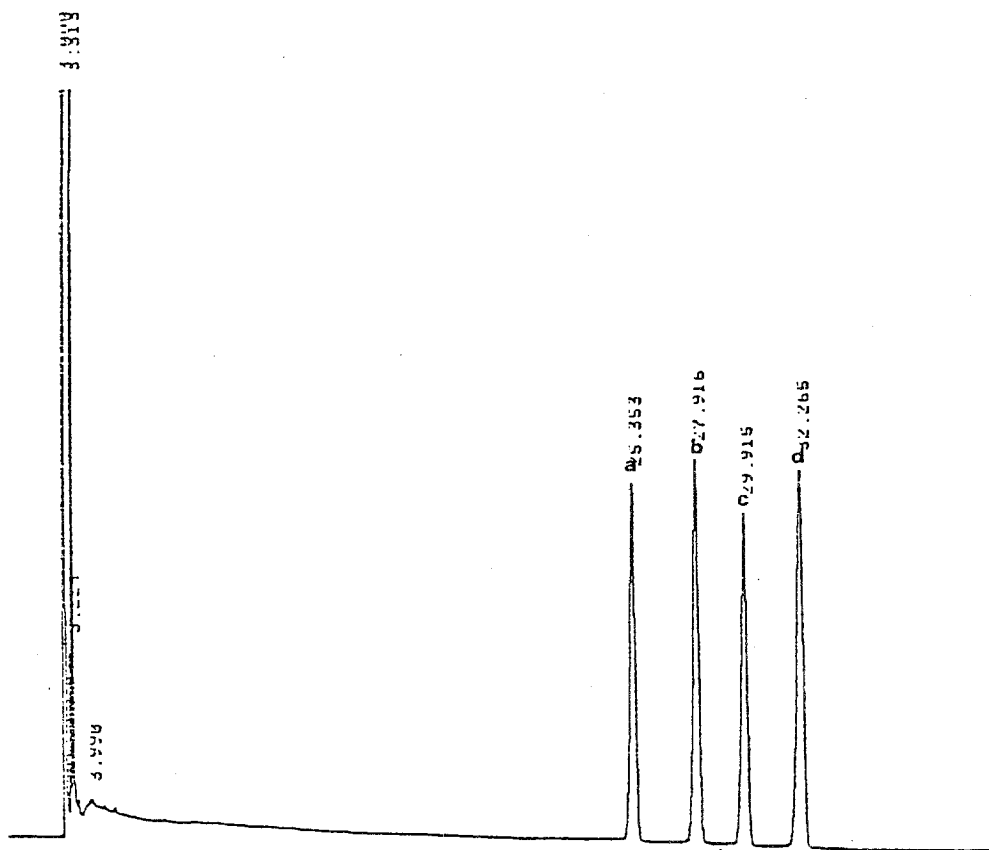


Fig.2. GC chromatogram of alduronic acids.

- a. Mannuronic acid, b. Glucuronic acid,
- c. Guluronic acid, d. Galacturonic acid

마. 전기영동에 의한 헤파린의 균일성 확인

전기영동은 Seno등(1970)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, cellulose acetate film을 미리 0.3M calcium acetate용액에 10분간 침지하여 활성화 시킨 후 여지로 과잉의 물기를 제거하고 5분간 평형화시켰다. 시료용액(0.1%)을 cellulose acetate film에 capillary pipet으로 3 μ l를 spotting한 후 즉시 0.3M calcium acetate 전개액 중에서 5mA 전류를 흘려 3시간 전개한 뒤 실온에서 건조한 후 0.5% toluidine blue로 발색시켰다.

3. 헤파린 함유 수성용액의 제조

헤파린을 함유하는 animal organ으로부터 헤파린 함량이 높은 수용성 용액을 제조하기 위한 공정은 그림 3과 같다. 먼저 이들 장기로부터 헤파린이 풍부한 과립 모양의 raw material의 형성과 다음으로는 20-80 $^{\circ}$ C 온도에서 1.5-12.0%의 염 농도를 가지는 염 용액 및 8-12.8의 pH 범위 (또는 알칼리 농도가 0.5 노르말 내지 1.8노르말 농도)에서 raw material의 추출로 이루어진다.

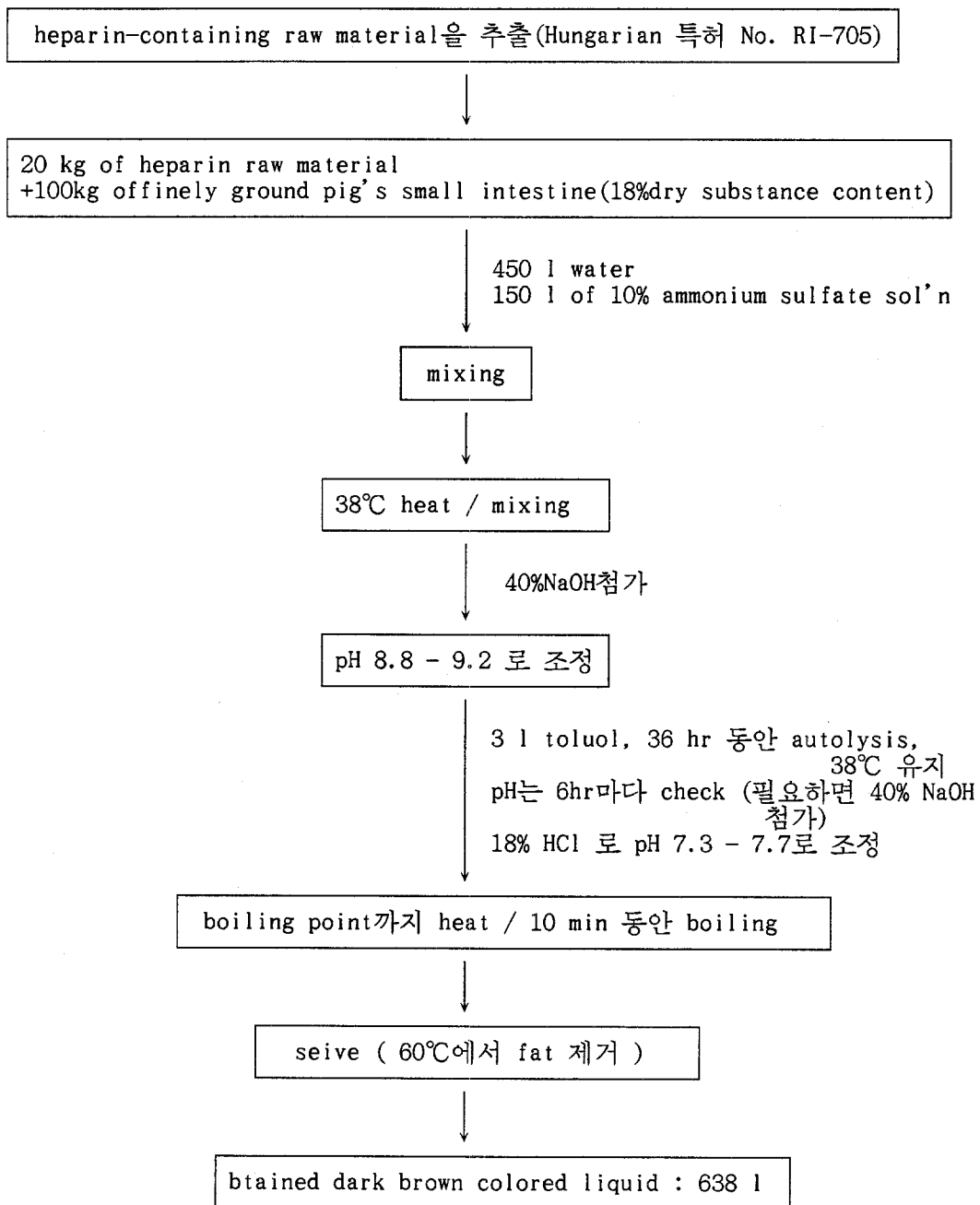


Fig. 3. Fractionation of partially purified heparins of small intestinal mucosa on DEAE-Sephadex A-25

4. 헤파린의 추출 및 부분 정제

Heparin의 추출은 Anno(1966)와 Iizima-Mizui(1985)의 방법에 준하여 그림 4와 같이 실시하였다. 건조시료 100g에 85%(V/V) 메탄올 용액 1L를 넣어 70°C에서 추출, 여과하여 메탄올 가용성 성분을 제거하였다. 이 메탄올 가용성 성분 추출을 3회 더 반복 실시하였다. 메탄올 추출한 잔사에 증류수 1.3L를 가한 후 묽은 염산 용액으로 pH 2.0으로 조절하여 65°C에서 1시간 추출하였다. 추출 조작을 2회 더 반복하여 추출액을 합친 후 10N NaOH용액으로 중화시켜 1L로 감압 농축을 하였다. 농축액에 CaCl₂를 침전이 생기지 않을 때까지 가한 후 원심분리(3,000g×10min)하여 알긴산을 제거하고 상등액을 투석막(M.W. cut off : 6,000-8,000)에 넣어 24시간 흐르는 수도물로 투석하였다. 투석액에 3배 용량의 에탄올을 첨가, 원심분리(10,000g×10min.)하여 다당을 분리한 후 진공동결 건조하여 crude heparin을 얻었다. 증류수에 녹인 1% crude heparin-용액에 5% cetylpyridinium chloride용액을 침전이 형성되지 않을 때까지 서서히 첨가하고 37°C에서 12시간 정치한 후 원심분리(3,000×10min)하였다. 분리한 cetylpyridinium-산성다당 복합체에 3M CaCl₂용액(500ml)에 가하여 37°C에서 48시간 교반하여 산성다당을 유리시킨 후 3배 용량의 에탄올을 첨가하여 원심분리(3,000×10min)하였다. 산성다당을 증류수에 다시 녹여 증류수액에 48시간 투석을 한 후 원심분리(10,000g×10min)하여 상등액을 동결 건조하여 부분 정제 heparin을 얻었다.

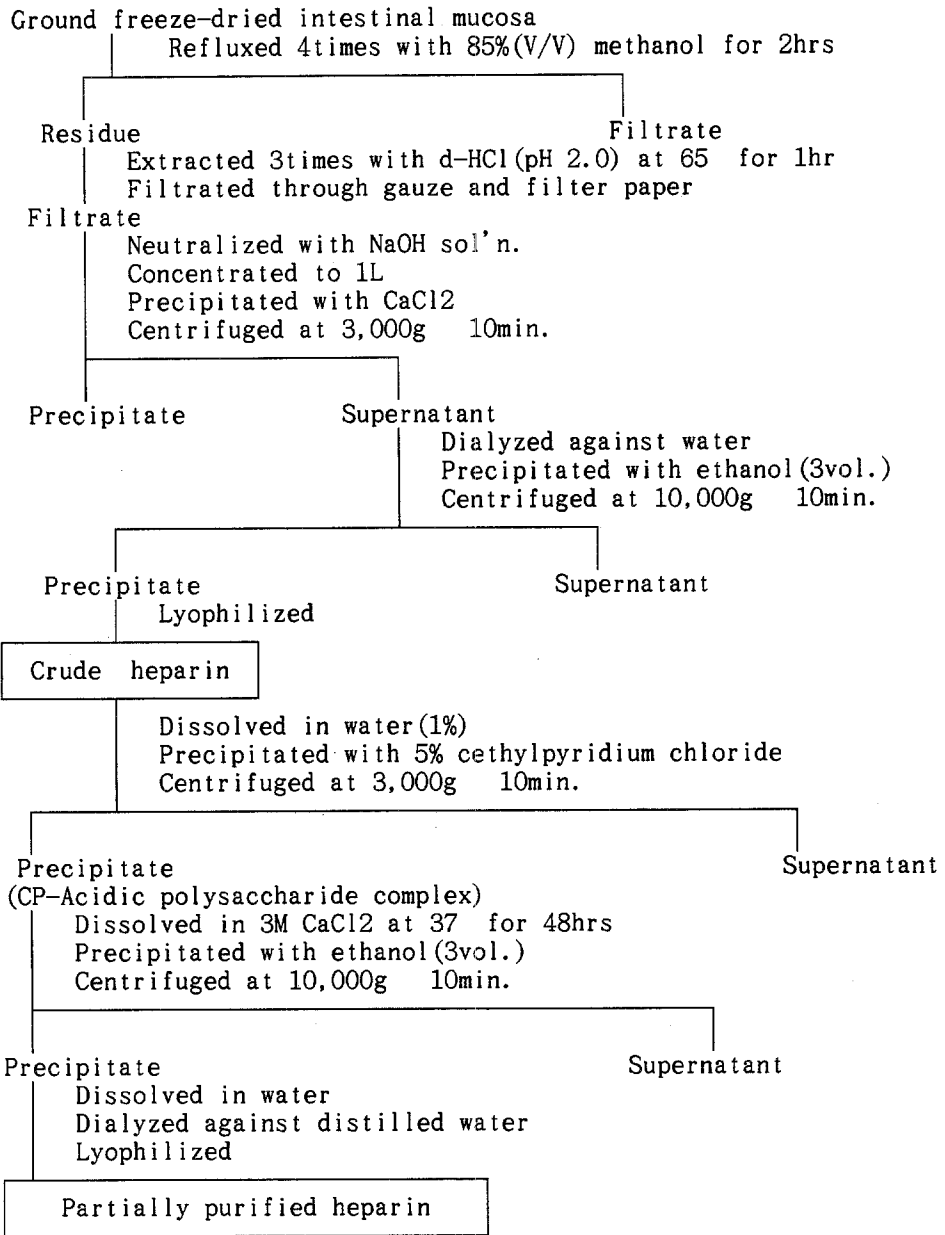


Fig. 4. Preparation procedure of partially purified heparin from freeze-dried mucosa of swine intestine

5. 항혈액 응고력 측정

내적응고기전 시험에 많이 이용되는 분석법은 activated partial thromboplastin time (APTT) 시험이다. APTT 시험을 위해서 celite/kaloin + 인지질을 혈소판이 거의 없는 혈장에 넣어 활성화를 개시시킨 후 트롬빈 형성을 위해 칼슘을 첨가한다. 이 시험에 의해 응고인자 V, IV, IX, VIII, X, 트롬빈, 피브리노젠 등의 이상을 밝혀낼 수 있다. OSPT (one-stage prothrombin time)은 외적 응고기전을 시험하는데 사용하는 방법으로서 프로트롬빈, 응고인자 V, VII, X의 이상을 검색해낸다. OSPT 시험에서는 조직의 트롬보플라스틴을 recalcification에 앞서 혈장에 첨가해야 한다. APTT와 같이 피브리노젠 값이 비정상적으로 낮거나 항응고제나 응고방지제가 검체중에 있을 경우 혈장 시료에서 OSPT는 지연될 수 있다. 가장 일반적으로 이용되는 시험 방법은 혈장 피브리노젠 농도 결정법이다.

본 시험에서는 Rat의 정맥혈 18ml를 채혈하여 2ml의 sodium citrate (3.8%) 용액과 혼합한 다음 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다.

가. 활성 트롬보 플라스틴 시간 (APTT) 측정

혈장 100 μ l에 시료 용액 10 μ l를 넣고 교반한 후 37°C 항온수조에서 1분간 가운하였다. 여기에 100 μ l Actin을 첨가한 후 다시 37°C 항온수조에서 2분간 가운하였다. 2분이 되는 순간 미리 37°C로 가열하여 둔 20mM CaCl₂ 100 μ l를 넣음과 동시에 스톱워치를 눌러 응고 시간을 측정하였다. 대조시료로는 heparin을 희석하여 항혈액 응고 시간을 동일하게 측정하였다.

나. 프로트롬빈 시간 (PT) 측정

37°C 항온수조에서 1분 이상 미리 가운하여 둔 Thromboplastin.C 200 μ l에 37°C에서 미리 1분 이상 가운하여 둔 혈장과 시료용액 혼합액(혈장:시료용액=10:1) 100 μ l를 가함과 동시에 스톱워치를 눌러 응고 시간을 측정하였다.

제3장 結果 및 考察

1. 부산물 발생 현황 및 이용 실태

가. 도축 부산물 발생 및 활용 방안

'93년 말 전국의 도축두수는 소 686천두, 돼지 9,678천두로서 소와 돼지의 도축에서 器官, 腹腔 및 腸内容物의 비율을 각각 32%, 13%로 봤을때 상기 도축실적에 따른 부산물의 발생량은 소와 돼지에서 각각 87,800M/T, 113,200M/T으로 추정된다. '91년 1월말 현재 전국의 도축장은 특급 65개소를 포함 총 168개소로 집계되고 있다. 도축시 발생하는 혈액, 내장, 뼈 등의 부산물은 일부 식용으로 이용되고 있으나 자원의 효율적인 활용도가 낮고 무단방혈 및 폐기로 인한 심각한 環境汚染을 일으키고 있다.

대략 생체중으로 볼 경우 소와 돼지의 가식 부분은 각각 55%, 63%이다. 부산물별 용도를 보면 간, 심장, 신장, 혀, 횡격막은 식용 또는 수출되고 있으며 위, 자궁은 pet 사료나 식용, 수출되고 장과 폐는 pet 사료, rendering, 지방정제에 이용되며 선(gland)은 의약품, 수출용으로 이용된다 (김정기, 1979).

腺은 수요가 크고 실질적인 이익을 가져다 주는 것으로 알려졌으나 소기의 목적을 달성하기 위해서는 몇가지 전제조건이 충족되어야 한다. 첫째, 수집을 보장할 수 있도록 그 생산량이 충분해야 하고 둘째, 충분한 마진과 이익을 가져다 줄 수 있을 만큼 시장성이 있어야 하며 셋째, 적절한 시설이 갖추어져야 한다. 이상의 조건이 충족되지 못하면 이것의 이용은 극히 제한을 받을 수 밖에 없다. 이것은 腺 그 자체를 이용하는 것이 아니고 선으로부터 나오는 抽出物을 이용하는 것으로서 대부분이 酵素系에 속하기 때문이다. 효소는 그 특성이 극미량으로도 작용을 나타내며, 열에 매우 약하여 常溫에서도 쉽게 파괴되는 성질을 지니고 있다. 그러므로 선의 보존을 위해서는 凍結이 반드시 이루어져야 하고 수집으로부터 1시간내에 동결상태로 제약공장에 운반되어야 한다.

나. 두축 부산물의 유통 및 이용실태

도축장에서 도살이 이루어지면 지육과 부산물로 분류되는데 부산물은 일반부산물, 원피, 머리, 혈액 등 4가지로 구성된다.

일반부산물은 食道, 胃, 창자, 肺, 肝, 足 등을 포함하는데, 원칙적으로 지육 1두당 1두분의 부산물이 지육구입자에 할당된다. 그러나 대부분이 소매업자인 정육점이 한마리분의 일반부산물을 처분하기란 매우 곤란하기 때문에 부산물만을 수집, 취급하는 전문업자가 단가계약을 하여 부산물 도매시장을 형성한다. 이렇게 형성된 도매시장을 통하여 필요로 하는 부위를 정육점 또는 부산물 소매업자가 구입하여 실수요자에게 판매하는 경로를 취하고 있으며, 지방의 경우는 정육업자가 도축장에서 도살하여 지육과 부산물을 함께 가져 가는 형태를 취하고 있다. 부산물은 그 용도에 따라 食用副産物과 非食用副産物로 분류된다. 이러한 분류는 한 사회의 구매력의 차, 취향 및 관습에 의하여 결정되는데 선진국은 간, 신장, 심장, 혀 등 이른바 赤肉(red offal)만을 소비하고, 개발도상국들은 부산물의 대부분을 식용으로 소비하는 경향이 있다.

우리의 경우에는 극히 제한된 부위를 제외하고 대부분 식용으로 이용하고 있다. 또한 가공처리를 거치지 않고 직접 식용함으로써 부산물이 조금만 변질되거나 일시적으로 공급이 조금만 과잉되면 그냥 폐기되므로 공중위생상 문제를 초래함은 물론 식중독 등 식품공해를 야기시키고 있다. 이러한 문제는 단지 축산 부산물의 이용부분에만 해당되는 것이 아니라, 어류가금류 등도 이와 비슷한 상태로 추정된다.

대표적인 일반부산물로는 내장, 간, 허파, 콩팥, 생식기, 족 등이다. 內腸은 胃와 腸이 주종을 이루는데, 특히 反芻動物(소와 양)은 4개의 위를 가지고 있어 그 이용 가치가 크며 각 위마다 식용으로서 특성을 가진다. 장은 식용으로 사용되지만 의약품합사, 악기의 줄 등을 제조하는데 사용되기도 한다.

내분비선, 담즙 및 쓸개, 췌장, 비장 등은 장기 그 자체를 이용하는 것이 아니라, 그 속에 함유되어 있는 分泌液 또는 組織을 이용하는 것이다. 이는 주로 製藥原料가 되지만, 현재 우리의 경우는 거의 이용이 이루어지지 않고 있는 실정이다.

다. 도축부산물의 재활용 의의

도축부산물 중 内分泌腺이나 内分泌器官 등은 酵素, 호르몬 또는 기타 다른 물질의 추출을 취한 중요한 원료원이 된다. 이들은 生化學劑와 의약품 제품의 합성에 직간접으로 이용할 수 있다. 실험실적인 이용을 위해서 많은 특별한 생화학제가 動物體器官에서 추출되고 있으나 그 양이 매우 적기 때문에 축산업의 경영측면에서 그다지 큰 관심을 얻지 못하고 있다.

저 분자 호르몬은 이제 상당한 정도로 합성 제조되고 있다. 遺傳工學技法을 이용하여 insulin의 大量生産體系가 이미 확립되고 있으므로 향후 동물체 유래의 몇가지 다른 물질 역시 이같은 방법으로 생산될 것으로 예상된다. 장차 도축 부산물은 유용한 원료원으로서 각광을 받게 될 것이다. 純粹精製 과정에서 hybridoma-technology가 적용될 것으로 보이고 향후 도축 부산물 산업은 관심있는 분야로 발전 가능성이 있다.

2. 국내의 헤파린 생산 현황

가. 인체용 헤파린의 약리 작용 및 효능

헤파린은 포유동물 체내의 구성성분의 하나이며 肺, 肝 및 小腸의 粘膜組織에 다량 함유된 高分子 多糖類의 일종으로 mucoitin polysulfuric ester에 속한다. 헤파린은 항혈액 응고작용과 섬유소 용해 촉진 작용 및 脂血 清淨化 作用을 갖는다.

輸血 및 기타 분석 목적을 위해서 clot(血餅)가 생기지 않은 혈액 시료를 획득하기 위하여 여러가지 항응고제가 이용된다. 복합 polysaccharide인 heparin은 천연의 항응고제로서 혈액중 basophils(백혈구의 일종)과 체내의 mast cells에 의해 產生된다. Mast cells은 폐와 다른 기관에서 毛細血管을 둘러싸는 결합조직의 부분이다. 이 조직으로부터 헤파린이 방출되어 모세혈관 속으로 들어간다. 항응고를 위해서 혈액 1 ml 당 헤파린 0.2mg 농도가 사용된다. 그러나 헤파린 1mg은 0°C에서는 혈액 100-500ml, 상온에서는 혈액 10-20ml의 응고를 방지할 수 있다.

헤파린 1 unit는 대략 heparin sodium 0.01mg(약 20IU)과 같다. 가축에서 수혈을 위해 흔히 쓰이는 항응고제는 sodium citrate이다. Citrate는 혈장의 calcium ions과 결합하여 insoluble calcium salt를 형성한다. 반드시 주의해야 할 것은 너무 많은 citrate를 첨가하지 않아야 한다. 왜냐하면 citrate가 충분한 양의 calcium ions과 결합할 수 있으므로 tetany를 유발하는 神經組織 및 心筋의 機能 障礙를 일으킬 수 있는 hypocalcemia가 나타난다. Sodium citrate와 유사한 당은 0.2-0.4% 농도로서 혈액응고를 방지한다. Potassium salts는 수혈할 때 사용하지 않는데 이는 심장마비 가능성 때문이다.

다른 유용한 항응고제로는 oxalates와 fluorides의 sodium, potassium 및 ammonium salts가 있다. EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)와 같이 chelating 화합물 역시 항응고제로서 이용되고 있다.

약리작용 (藥理作用)

- 항응고 작용 : 헤파린 나트륨 염은 plasma내의 albumin, lipoprotein등에 의해 활성화되어 thrombin을 불활성화함으로서 fibrinogen이 fibrin으로 되는 것을 막아 혈액응고를 억제한다. 혈액응고 시간의 연장은 혈액중의 헤파린 농도에 비례하며 혈액 1ml당 1 Unit의 헤파린 농도가 있으면 혈액은 응고되지 않는다.
- 투여후 신속하고 직접적인 항응고 작용을 나타내므로 수술 및 혈액 투석시 혈액 응고 방지에 유용하다.
- 경구적 항응고제에 비해 치료 효과가 강하다.
- 안정성 : 실온에서 5% Dextrose 또는 0.9% NaCl용액에 녹여 48시간 저장시 농도에 변화가 없다.

효능.효과 (效能.效果)

- 主效能 效果 : 혈전증의 응고 예방, 수술 후 혈전증 및 폐전색증의 예방 및 치료, 전색성 심방 세동의 예방 및 치료, 급성 및 만성 응고 이상증의 진단 및 치료, 혈관 및 심장 수술시 응고 예방, 뇌일혈로 인한 뇌혈전증의 예방
- 수혈, 체외 순환, 투석시 또는 실험실에서의 응고 방지, 관상 동맥 폐색증(급성

심근경색 수반시), 말초 혈관 전색증에도 사용가능

용법·용량 (用法·用量)

보통 정맥내에 주사하거나 혈액 체외 순환시의 관류 혈액에 첨가하여 사용한다. 투여 직후에 효과가 나타나지만 헤파린 감수성은 개체차가 크므로 투여 전에 헤파린 감수성 시험을 실시하고 투여 후에는 혈액 응고 시간을 측정하여 유지량으로 결정한다. 보통 사용후 혈액 응고 시간을 15-20분 또는 그 이상으로 유지되도록 하나 적용, 사용 목적에 따라 투여량을 결정한다.

나. 혈액응고 저지제의 생산실적

대한제약협회에서 발간하는 1993년도 의약품 생산실적에 따르면 표 3-1과 같이 혈액 및 체액용 약 생산실적은 약효종류별 전체 생산품목수는 177개로서 생산금액은 51,765백만원으로 집계되었다. 특히 혈액응고저지제는 11개 업체에서 26개 품목을 생산하고 있으며 생산금액은 9,803백만원으로 혈액 및 체액용 약 생산금액의 19%를 차지하는 것으로 나타났다. 표 3-2에는 완제 의약품으로서 혈액응고저지제(분류번호 3330)의 생산실적을 나타내었다. 우리나라 제약회사중 녹십자 의료공업(주)은 혈액응고저지제 생산금액의 약 78%를 점하는 7,626백만원의 생산실적을 나타냈고 그 외 중외제약(주), 제일약품(주), 한림제약(주) 등이 4~6%의 점유비율을 나타냈다.

Table 3-1. 血液 및 體液用 藥 생산 실적(1993년)

분류번호	약 효 종류	업체수	품목수	생산금액(천원)
331	血液代用劑	8	49	13,931,269
332	止血劑	34	55	6,481,036
333	血液凝固阻止劑	11	26	9,803,105
339	기타의 血液 및 體液用液	26	47	21,549,776
합 계			177	51,765,186

Table 3-2. 완제의약품으로서 혈액응고저지제의 생산실적 (1993년)

회 사 명	제 품 명	포장단위·규격	생 산 량	생산금액(천원)
녹십자	녹십자헤파린나트륨주사액	V	101,141	422,769
녹십자의료	수혈용구연산나트륨주사액 10%녹십	30ML	99,980	86,882
	씨. 피. 디. 에이. 항응고액 - 녹의공	44.8ML	621,624	806,867
		56ML	1,147,374	1,505,354
	씨피디에이녹의공	63ML	1,032,314	1,251,163
		70ML	119,946	290,029
	씨피디녹의공	35ML	25,053	19,916
		63ML	482,189	1,198,720
		70ML	582,742	1,816,405
	새그 - 엠	100ML	352,595	441,801
	팩그 - 엠	100ML	17,170	23,076
	팩스 - 에스	100ML	48,610	186,564
대광제약	대광헤파린나트륨주사액25,000단위	10V	1,324	46,728
	대광헤파린나트륨주사액1000단위	10V	2,374	90,485
대원제약	트라나민주사액	10A	13,004	31,548
	안트롬주사액	0.5ML*10A	493	19,488
대화제약	대화와르파린나트륨2밀리그램정	500T	874	26,569
	대화와르파린나트륨5밀리그램정	500T	468	35,568
명문제약	명문헤파린나트륨주20,000단위	10V	100	355
	명문헤파린나트륨주25,000단위	1V	100	2,487
	명문헤파린나트륨주20,000단위	1V	100	3,810
신풍제약	신풍헤파린나트륨주25000단위	5ML 1V	18,016	62,515
제일약품	제일쿠마딘정 (와파린정)	100T	25,856	406,714
	제일쿠마딘정 2MG (와파린나트륨)	100T	80	704
	제일쿠마딘정 10MG (와파린나트륨)	100T	60	1,415
중외제약	중외헤파린주	5MLX10V	10,831	379,529
		5MLX10V	325	3,537
	중외헤파린나트륨주1000아이유	10V	6,947	265,528
한국유나이	왈파정	100T	70	295
	왈파정 5밀리그램	100T	469	3,959
		500T	305	12,874
한림제약	한림헤파린나트륨주	10V	8,236	359,451
11업소	26품목			9,803,105

다. 헤파린의 합성기술수준

우리나라의 의약품수입은 '70년대의 고도성장에 따른 원료수입의 증가로 연평균 20%이상의 신장율을 기록하였고 '79년에는 수입실적이 최초로 \$1억을 초과하였다. 수입이 이처럼 증가하게 된 것은 그동안 국내에서 생산되지 않거나 공급상 수급 차질이 예상되는 품목의 수입만 허용되던 것이 수입 자유화 되었기 때문이다. 또한 국내 수요가 소량에 지나지 않기 때문에 이들 모두를 국산화하기는 어려운 측면이 있다.

의약 산업의 기술은 단순한 생산 기술 뿐 아니라 기초과학을 바탕으로 원료 및 중간물의 合成, 分離, 抽出技術과 前臨床 및 臨床試驗 단계에서의 약효 및 독성검색기술, 제제 및 제형 관련 기술 그리고 생물공학 관련 기술 등이 복합적이고 유기적으로 결합되어야만 완전한 기술로 평가될 수 있다.

국내의 경우 의약품 원료를 취급하는 (株)마성상사가 heparin 주사제 제조에 소요되는 원료 헤파린염을 덴마크 Leo社와 캐나다 Parker 社로 부터 수입하여 국내제약회사에 공급하고 있는 실정이다. 이들 제약회사에서는 대한약전(KP)에 의거 주사제 제조에 필요한 等張化劑, pH調整劑, stabilizer 및 保存劑 등을 첨가하여 주사액을 제조하고 있다.

Table 4. 혈액저지제 생산을 위한 원료헤파린 소요량(1993년)

생 산 자	품명(주사제)	포장단위	생산량(IU)	금액(천원)	원료소요량(MU)
유유산업	베노플란트겔*	10g	29,278	48,308	-
		20g	14,695	48,493	235
녹 십 자	헤파린나트륨주	25,000U	101,141	422,769	2,529
대광제약	헤파린나트륨주	25,000U	13,240	46,728	331
		1,000U	23,740	90,485	24
명문제약	헤파린나트륨주	20,000U	1,100	4,165	22
		25,000U	100	2,478	3
신평제약	헤파린나트륨주	25,000U	18,016	62,515	450
중외제약	헤파린주	25,000U	108,310	379,529	2,708
		1,000U	69,470	265,528	69
한림제약	헤파린나트륨주	25,000U	82,360	2359,451	2,059

*연고(ointment)

표 4에 의하면 '93년의 원료 소요량은 8,430MU로서 연고를 제외한 헤파린 주사제 생산량(단위)은 417,477IU 이었다. 국내 제약회사의 원료 헤파린염 생산기술과 관련 혈액응고저지제가 전체시장에서의 비중이 매우 낮고 전문의약품으로 일반 소비자의 인지가 낮기 때문에 시장 확대가 어렵고 특히 도축부산물로부터 추출정제기술개발에 소요되는 여러 가지 기반시설투자등과 관련하여 자체기술개발보다 수입에 의존하는 경향인 것으로 사료된다.

라. 헤파린 추출의 경제성

헤파린은 多糖類의 특성을 가진 복잡한 nitrogen과 sulphur 함유 抗凝固劑이다. 응고시간(clotting time)을 연장하는 특이한 성질 때문에 혈액의 응고력을 조절하는데 중요한 역할을 하고 있다. 독성이 낮기 때문에 intravascular clots를 형성하는 경향이 있는 사례에서 임상적으로 폭 넓게 사용되고 있다.

헤파린은 대체로 동물체의 腺組織으로부터 제조된다. 소의 胸腺, 脾臟, 肝 역시 다량의 heparin을 함유하고 있다. Heparin의 분획, 정제 및 염의 형성은 어려운 일은 아니다. 헤파린의 생산에 쓰이는 대부분의 화학 약품과 용매는 구입이 용이하다.

헤파린 유기 thrombocytopenia(血小板減少症)는 돼지에서 추출한 heparin에서보다 소에서 추출한 heparin을 사용했을때 빈발하는 것으로 보고되고 있다. 미국의 경우 소에서 추출한 heparin을 사용하고 유럽에서는 대체로 돼지에서 추출한 heparin을 사용하고 있다(Bottiger, 1987).

현재의 우리나라 도축장 시설 및 제반여건에서는 헤파린 추출을 위한 原料物質(raw material)의 원활한 분리수거가 어렵고 시설개선을 위한 초기단계의 투자비가 많이 소요될 것으로 예상된다. 또한 국내의 경우 도축 부산물은 대부분 식용으로 판매되거나 일부 공업용 원료로 사용되고 있는데 비해 외국에서는 대부분 불가식하고 단순 폐기물로서 원료물질의 확보가 용이하다. 따라서 전체적인 경제성에서 볼 때 외국과 우리의 경우가 매우 다르기 때문에 국내 기술 개발보다 헤파린 염의 원료를 수입하여 주사용 제제로 회석 사용하는 것이 경제성에서 더 유리한 측면이 있다.

3. 헤파린 추출 및 부분 정제

가. 내장추출물로부터 다당의 균일성 검증 및 분획 방법

헤파린의 정제시 우선 고려하여야 할 사항은 천연 고분자로서의 다당의 특성이다. 고분자로서의 다당의 가장 중요한 특성은 다분산계 (polydisperse)다. 이 다분산성은 분자량 분포 뿐만 아니라 화학적 구조에서도 나타난다. 즉, heteropolysaccharide의 구성 단당의 몰비에 있어 다분산성이 나타날 뿐만 아니라 homopolysaccharide에 있어서도 결합 양식의 비율에 다분산성이 나타난다. 이같은 다분산성은 다당의 보편적 특성이라고 할 수 있다. 이러한 특성으로 인해 다당은 단백질처럼 화학적 및 분자량이 균일한 분자를 얻는 것은 곤란할 뿐만 아니라 다당의 균일성 (homogeneity)을 직접 명확히 증명할 수 있는 방법도 없다. 따라서 추출, 정제한 다당의 균일성을 확인하기 위해서는 불순물이 없고 또한 분자량이나 구조상으로 더이상 분획이 안된다는 것을 증명하는 방법이외에는 없다. 통상 다당의 균일성을 검증할 때는 각종 정제 단계에서의 화학조성 및 물리적 특성의 조사, 전자현미경관찰, 초원심분리기를 이용한 침강 패턴조사, 분자량 균일성 조사를 위한 gel column chromatography법, 항원 항체 반응을 이용한 면역학적 방법 및 전기 영동 방법이 있다. 다당의 균일성을 검증하기 위해서는 위의 방법 중 단 1가지 방법으로도 결론을 내리는 것은 위험하고 적어도 2개 이상의 방법으로 균일성이 증명될때 시료가 균일하다고 판정할 수 있을 것이다(小林, 1987; Aspinal, 1982).

분획방법으로는 헤파린의 주요 특성인 황산기를 이용한 ion-exchange chromatography 및 분자량별 분획을 위한 gel column chromatography법 및 알콜 농도에 따른 분별 침전법도 등의 방법이 많이 이용되고 있다. 정제 헤파린의 균일성 검증을 위해서는 cellulose acetate film을 이용한 전기영동법과 분자량의 균일성 확인을 위한 gel column chromatography법이 많이 이용되고 있다.

나. 이온 크로마토그래피를 이용한 헤파린의 분획

0.01N HCl용액을 미리 충분히 흘려 평형화시켜둔 DEAE-Sephadex A-25 칼럼(20 mm×700mm)에 부분 정제 heparin을 소량의 0.01N HCl에 녹여 칼럼에 주입하였다. 시료의 용출은 0.01N HCl에 NaCl을 0.5M, 1.0M, 1.5M, 2.0M이 되게 각각 녹인 용출액으로 당이 검출되지 않을 때까지 단계적으로 용출시켰다. 용출액을 fraction collector로 10ml씩 모은 후 페놀-황산법(Dubois, 1965)으로 480nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 획분을 합쳐 증류수에 24시간 투석한 후 농축하여 동결 건조하였다.

부분정제 내장 헤파린 300mg을 DEAE-Sephadex A-25 칼럼(20mm×700mm)에 넣고 염농도를 0.5M에서 2.0M까지 단계적으로 0.5M씩을 증가시키면서 분획한 크로마토그램은 Fig.5와 같다. Fraction 1(Fr-1)은 0.5M NaCl에서, fraction 2(Fr-2)는 1.5M NaCl, fraction 3(Fr-3)은 2.0M NaCl에서 각각 용출되었다. 각 획분의 함량은 Fr-1이 31mg, Fr-2가 66mg, Fr-3이 77mg으로 Fr-3이 주획분이었다.

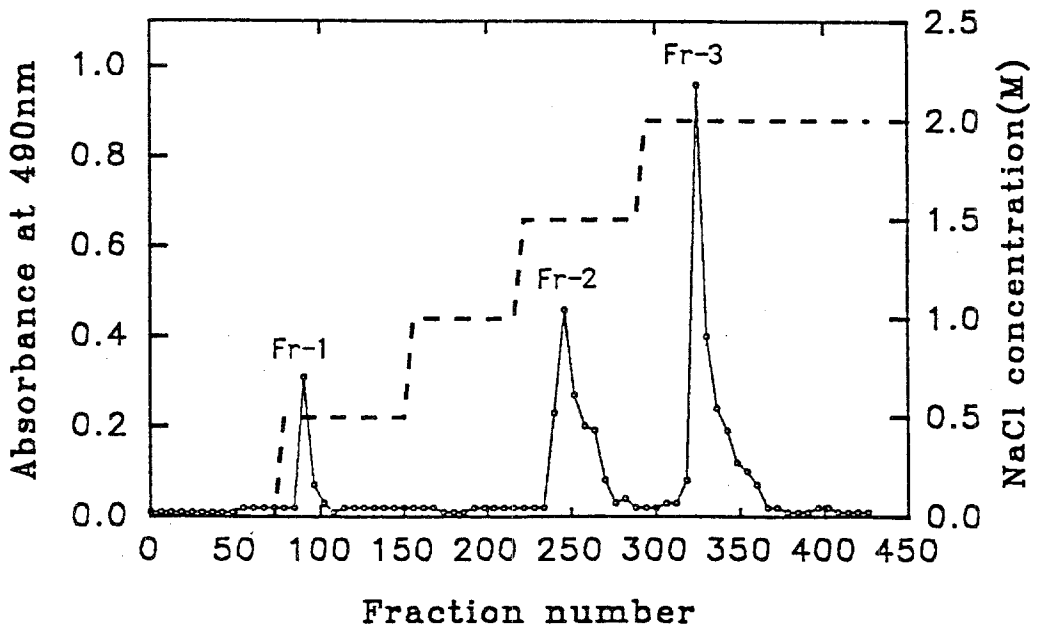


Fig.5. Fractionation of partially purified heparins of small intestinal mucosa on DEAE-Sephadex A-25

다. 부분정제 헤파린의 수율 및 조성

1) 시료의 일반성분

헤파린을 고농도로 함유한 장기 추출물(동결건조된 돼지 소장 점막)은 수분 91.0%, 단백질 65.2%, 지질 7.8%, 회분 7.9%, 탄수화물 함량은 19.1%로 나타났다(표5).

Table 5. Proximate composition of freeze-dried swine intestine (%)

Moisture	C. protein	E. E	C. ash	Total CHO
91.03±3.53	65.16±4.11	7.82±0.34	7.91±6.40	19.11±0.52

2) heparin의 수율 및 조성

돼지 소장 점막을 이용한 crude heparin 수율은 29.6%, 부분정제 헤파린 수율은 61.4%이었다(표6).

Table 6. Yields of crude heparin and partially purified heparins extracted from swine intestine

Sample	Crude heparin(%)	Partially purified heparin(%)
Mucosa	29.64 2.85	61.41 4.19

Ion-exchange chromatography로 분획한 각 획분의 조성은 표7과 같다. 즉 uronic acid의 함량은 Fr-1이 14.40%, Fr-2가 9.11%, Fr-3가 9.04%로 용출액의 염 농도가 증가할수록 감소한 반면 황산기의 함량은 Fr-1이 21.75%, Fr-2가 22.85%, Fr-3가 30.58%로서 용출액의 염농도가 증가할수록 증가하였다. 단백질도 용출액의 염농도가 증가할수록 함량이 감소하여 Fr-1이 4.00%, Fr-2가 3.17%, Fr-3가 2.98%이었다. 단당의 구성 비율은 Fr-1은 특이적으로 xylose의 함량이 높았고 Fr-2는 galactose, Fr-

3는 fucose의 함량이 높았다.

Table 7. Proximate composition of partially purified heparins extracted from swine intestinal mucosa¹

Fraction	Uronic Scids (%)	Sulfate (%)	Protein (%)	Proportion of monosaccharide(%) ²				
				Fuc	Gal	Glu	Man	Xyl
Fr-1	14.40	21.75	4.00	54.82	8.75	-	-	36.43
	±0.71	±0.89	±0.22	±1.30	±0.36			±0.18
Fr-2	9.11	22.85	3.17	36.01	41.17	9.43	0.88	12.5
	±0.49	±0.93	±0.18	±0.28	±0.87	±0.67	±0.06	±0.11
Fr-3	9.04	30.58	2.98	69.13	25.86	3.42	1.59	-
	±0.58	±1.24	±0.38	±0.43	±1.45	±0.57	±0.05	

1. Mean ± S. D.

2. Calculated from GC analysis, considering the total amounts under the five monosaccharides as 100%

4. 항혈액 응고력

가. 헤파린염 역가 측정 방법 (KP)

이 약은 건강한 식용동물의 간, 폐 또는 腸粘膜에서 얻은 것으로 혈액의 응고를 지연시키는 작용이 있고 간 또는 폐에서 만든 것은 1mg 중 110 헤파린 단위 이상, 장점막에서 만든 것은 1mg 중 130 헤파린 단위 이상을 함유한다.

이 약은 정량할 때 환산한 건조물에 대하여 표시단위 90-110%를 함유한다.

이 약은 원료로 쓴 기관명을 표시한다.

성상

이 약은 백색-회색을 띤 갈색의 가루 또는 알갱이로 냄새는 없다.

이 약은 물에 녹고 에탄올 또는 에틸에는 거의 녹지 않는다.

이 약은 흡습성이다.

pH 이 약 1.0g을 물 100ml에 녹인 액의 pH는 6.0-8.0이다.

순도시험

- 1) 용해상태 : 이 약 0.5g을 물 20ml에 녹일 때 무색-엷은 황색으로 맑다.
- 2) 바 룬 : 이 약 30mg을 물 3.0ml에 녹여 검액으로 한다. 검액 1.0ml에 묽은 황산 3방울을 넣고 10분간 방치할 때 액은 혼탁하지 않는다.
- 3) 총 질소 : 이 약을 60°C에서 3시간 감압건조하고 그 약 100mg을 정밀하게 달아 질소정량법에 따라 시험할 때 질소(N : 14.01)의 양은 3.0%이하이다.
- 4) 단백질 : 2)의 검액 1.0ml에 트리클로로초산용액(1 5) 5방울을 넣을 때 액은 침전 또는 혼탁이 생기지 않는다.
건조감량 10%이하(20mg, 감압, 60°C, 3시간).
강열잔분 40%이하(건조 후, 20mg)

발열성물질

토끼의 체중 1kg당 이 약의 표시단위에 따라 1ml중 1000단위를 함유하도록 생리 식염주사액을 넣어 만든 액을 가지고 2.0ml를 주사하여 시험할 때 여기에 적합하다.

정 량 법

- 1) 표준액 : 헤파린나트륨표준품 적당량을 정밀하게 달아 물에 녹여 그 1ml 중에 정확하게 2.00 단위 및 1.60단위를 함유하도록 만들고 각각 고용량표준액 SH 및 저용량표준액 SL로 한다.
- 2) 검액 : 이 약의 표시단위에 따라 그 적당량을 정밀하게 달아 물에 녹여 그 1ml중에 정확하게 2.00단위 및 1.60단위를 함유하도록 만들고 각각 고용량검액 TH 및 저용량검액 TL로 한다.
- 3) 황산염 전혈액 : 신선한 소의 혈액 250ml를 황산나트륨용액(9 50) 50ml를 넣은 마개가 달린 입이 큰 폴리에틸렌병에 넣고 1-4℃에서 보관한다. 쓸 때 응고물이 있으면 제거하여 쓴다.
- 4) 아세톤으로 건조한 소의 뇌 : 신선한 소의 뇌에서 혈관 및 결합조직 등을 제거하고 세절하여 10배 용량의 아세톤에 넣어 탈수한다. 다음 그 30g을 약절구에 취하여 갈면서 아세톤 75ml씩을 넣어 완전히 탈수하여 37℃에서 2시간 건조하여 아세톤을 제거한다.
- 5) 트롬보키나제 추출액 : 아세톤으로 건조한 소의 뇌 1.5g에 물 60ml를 넣어 50℃에서 10-15분간 추출하고 1500회전으로 2분간 원심분리한 다음 상징액을 취하고 여기에 보존제로 크레솔을 0.3%의 비율로 넣고 1-4℃에서 보관한다. 이액은 수일간 효력을 갖는다.
- 6) 조작법 : 안지름 13mm, 길이 150mm의 마개가 달린 깨끗한 시험관 4개에 SH, SL, TH 및 TL을 각각 1ml씩 넣고 다시 각각에 트롬보키나제추출액 0.20ml씩을 넣는다. 다만, 트롬보키나제추출액의 용량은 응고시간이 가장 긴 것으로

9-12분간이 되도록 선택한다. 다음 각 시험관에 황산염 전혈액 1ml씩을 넣어 마개를 한 다음 조용히 뒤집어 섞는다. 각 시험관을 15초마다 조용히 뒤집어서 관찰하고 시험관을 뒤집어도 관 밑바닥의 응고물이 떨어지지 않을 때까지의 시간을 응고시간으로 한다. 다만, 완전히 응고가 일어나지 않았을 때에 관을 뒤집었을 경우에는 시험을 되풀이 한다. 완전한 시험을 4회 이상 되풀이한다.

7) 계산법 : SH, SL, TH 및 TL에 의하여 생긴 응고시간의 대수를 y_1, y_2, y_3 및 y_4 로 하고 각 회 시험에서의 y_1, y_2, y_3 및 y_4 를 합하여 각각 Y_1, Y_2, Y_3 및 Y_4 로 한다.

이 약 1mg중의 단위수 = antilog M (고용량표준액 1ml중의 단위수) \times b/a

$$M = \frac{IY_a}{Y_b}$$

$$I = \log \frac{S_H}{S_L} = \log \frac{T_H}{T_L}$$

$$Y_a = -Y_1 - Y_2 + Y_3 + Y_4$$

$$Y_b = Y_1 - Y_2 + Y_3 - Y_4$$

a : 검체의 채취량(mg)

b : 검체에 물을 넣어 녹여 고용량검액을 만들었을 때의 전용량(ml)

다만, 다음 식에 따라 $L(P=0.95)$ 을 계산할 때 L 은 0.15 이하이다. 만일 이 값이 넘을 때는 이 값 이하가 될 때까지 시험횟수를 늘려 시험을 되풀이 한다.

$$L = 2\sqrt{(C-1)(CM^2+I^2)}$$

$$C = \frac{Y_b^2}{Y_a^2 - 4fs^2}$$

f : 시험횟수

$$s^2 = \frac{\sum y^2 - \frac{Y}{f} - \frac{Y'}{4} + \frac{Y''}{4f}}{n}$$

$\sum y^2$: 각 회 시험의 y_1, y_2, y_3 및 y_4 를 각각 제곱하여 합한 값

$$Y = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + Y_4^2$$

Y' : 1회의 시험의 y_1, y_2, y_3 및 y_4 의 합을 제곱하고 각 회 시험의 이 값을 합한 값

$$Y'' = (Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4)^2$$

$$n = 3(f - 1)$$

t^2 : s^2 을 계산할 때의 n 에 대한 인슬린주사액의 정량법의 표의 값

나. 항혈액 응고력 측정

부분정제 헤파린의 항혈액응고력을 비교하기 위하여 동일한 농도(125 g/ml)의 헤파린 용액으로 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(APTT)를 측정하였다(표8).

Table 8. Effect of partially purified heparin solutions on coagulation assay

	Clotting time(sec)	
	PT	APTT
Partially purified heparin	30	140

돼지 소장 점막을 이용한 부분정제 헤파린의 혈액 응고 저지 효과는 PT 30초, APTT가 140초로 나타났다. PT가 연장되는 경우는 혈액 응고의 외인성 경로(extrinsic pathway)에 관여하는 응고인자가 결핍되거나 억제 물질이 존재할 때 일어난다. 반면에 APTT는 내인성 경로(intrinsic pathway)의 단독 혹은 복합적 결핍이나 이들 인자의 억제 물질이 존재할 때 일어난다(김상인 등, 1992).

대조구로 사용한 시판 heparin sodium(중외제약)의 경우 20 g/ml에서 APTT 측정값이 140초였다. 따라서 동일한 APTT 연장 효과를 얻기 위해서 부분정제 소장 점막 헤파린은 시판 헤파린에 비해 약 6.25배의 많은 양이 필요하였다. 항혈액응고력은 황산기함량, 분자량 및 구조등에 따라 달라진다는 보고로 미루어 볼때 정제도가 높을수록 항응고력이 증가하는 것이 아님을 알 수 있다(Nishino, 1989; Nishino, 1994).

引用文獻

1. Anderson, L.O., Barrowcliffe, T.W., Holmer, E., Johnson, E.A. and Sims, G. E.C. 1976. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix bound antithrombin III and by gel filtration. *Thromb. Res.*, 9: 575-83.
2. Anno, K., Terahata, H., Hayashi, Y., and Seno, N. 1966. Isolation and Purification of Fucoidan from Brown Seaweed *Pelvetia wrightii*. *Agr. Biol. Chem.*, 30, 495.
3. AOAC. 1990. "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th Edition", Edited by Kenneth Helrich, Association of Official Analytical Chemists, Virginia, U.S.A.
4. APRIA. 1983. International Symposium for By-products (An economical chance for food industry).
5. Aspinall, G. O. 1982. Chapter 2. Isolation and Fractionation of Polysaccharides in "The Polysaccharides", Edited by Aspinall, G. O., Academic Press Inc., New York.
6. Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., and Stone, B.A. 1983. A simple and Rapid Preparation of Alditol Acetates for Monosaccharide Analysis. *Carbohydr. Res.*, 113, 291.
7. Böttiger, L. E. 1987. The heparin story (In search of the early history of heparin). *Acta Med. Scand.*, 222: 195-200.
8. Dodgson, K. S., and Price, R. G. 1962. A Note on the Determination of the Ester Sulphate Content of Sulphated Polysaccharides. *Biochem. J.*, 84, 106.
9. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1965. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analysis Chem.*, 28, 350.
10. Iizima-Mizui, N., Fujihara, M., Himeno, J., Komiyama, K., Umezawa, I., and Nagumo, T. 1985. Antitumor Activity of Polysaccharide Fractions. *Kitassato Arch.*

of *Exp. Med.*, 58 : 59.

11. Knutson, C. A. and Jeanes, A. 1968. A New Modification of the Carbazole Analysis. *Anal. Biochem.*, 24:470.
12. Lasker, S. E. 1977. The heterogeneity of heparins. *Fed. Proc.*, 36: 92-97.
13. Lehrfeld, J. 1987. Simultaneous Gas-Liquid Chromatographic Determination of Aldoses and Alduronic Acids. *Journal of Chromatography*, 408:245.
14. Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M., and Nagumo, T. 1989. Isolation, Purification, and Characterization of Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from the Brown Seaweed *Ecklonia Kurome* and their Blood-Anticoagulant activities., *Carbohydr. Res.*, 186:119.
15. Rosenberg, R. D. 1977. Biologic actions of heparin. *Semin. Haematol.*, 14: 427-440.
16. Seno, N., Anno, K., Kondo, K., Nagase, S., and Salto, S. 1970. Improved Method for Electrophoretic Separation and Rapid Quantitation of Isomeric Chondroitin Sulfates on Cellulose Acetate Strips. *Analytical. Biochem.*, 37:197.
17. Swenson, M. J. 1984. Dukes' Physiology of Domestic Animals. 10th ed. Cornell Univ. Press.
18. Yurt, R. W., R. W. Leid, Jr., K. F. Austen, and J. E. Silbert. 1977. Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.*, 252: 518-521.
- 19.金正璦. 1979. 家畜副産物の流通現況과利用提高方案. 農村經濟 Vol11 (3):136-146.
- 20.金正鎭. 1981. 生理學. 카톨릭 의대 생리학교실. 高文社
21. 대한제약협회. 1993년도 의약품 등 생산 실적.
22. 小林幹彦. 1987. 4章 抽出液の精製, "多糖の分離, 精製法", 松田和雄編, 學會出版 センタ日本, 東京.
23. 洪文信. 金鎔基. 1986. 醫藥産業의 構造와 政策. 産業研究院 연구보고서 98호 (RP 9603).