

# 소변 중 4-hydroxyproline 분석에 관한 연구

이규원, 이경중, 조영봉<sup>1)</sup>

아주대학교의료원 산업의학과, 연세대학교 환경공학과<sup>1)</sup>

## Determination of Free 4-hydroxyproline with Dansylchloride by HPLC in Human Urine

Keou Weon Lee, Kyung Jong Lee, Young Bong Cho<sup>1)</sup>

Department of Occupational and Environmental Medicine, Ajou University Medical Center;  
Department of Industrial Environment, College of Health Science, Yonsei University<sup>1)</sup>

**Objectives :** The level of 4-hydroxyproline (4-Hyp) in human urine was measured using high performance liquid chromatography (HPLC) with a fluorescence detector. This method is useful for medical examinations and investigating the radicals induced by physical, chemical, mental stresses. This method is superior to many published several methods in terms of its low cost and ability to analyze many samples.

**Methods :** The urine from workers in a tire manufacturing company (22 male pre- and post-shift workers) and 18 office-workers as controls were analyzed. Data concerning age, the cumulative drinking amount and the cumulative smoking amount was collected with a questionnaire. The optimum applied amount of dansyl-Cl, the optimum reaction temperature and time, the recoveries and the optimum pH of the eluent and buffer were determined. 4-Hyp from human urine was derivatized with dansyl-Cl (dimethylamino-naphthalene-1-sulfonyl chloride) after removing the  $\alpha$ -amino acid by a treatment with phthalic dicarboxaldehyde (OPA) and cleaned with Bond Elut C18 column. The 4-Hyp derivatives were separated on a reversed phase column by gradient elution with a phosphate buffer (5 mMol, pH 8.0) and acetonitrile, and detected by fluorescence measurements at 340 nm

(excitation) and 538 nm (emission).

**Results :** The detection limit for the urinary free 4-Hyp was 0.364  $\mu\text{mol/l}$ . The recovery rate of 4-Hyp was 99.7%, and the effective pH of the phosphate buffer and borate buffer were 3.0 and 8.0, respectively. From statistical analysis, age, drinking and smoking did not affect the urinary free 4-Hyp in both the controls and workers. The range of urinary 4-Hyp in the controls, pre-shift, and post-shift workers were 0.33-16.44, N.D-49.06, and 0.32-56.27  $\mu\text{mol/l}$ . From the paired-sample t-test, the urinary 4-Hyp levels in post-shift workers ( $11.82 \pm 16.73$  nmol/mg Cre) were 2-fold higher than in pre-shift workers ( $5.36 \pm 5.53$  nmol/mg Cre) and controls ( $4.91 \pm 4.89$  nmol/mg Cre).

**Conclusions :** This method was developed with high sensitivity, accuracy, and precision. The present method was effectively applied to analyze the urinary free 4-Hyp in both controls and workers.

Korean J Prev Med 2002;35(4):282-286

**Key Words:** Hydroxyproline, Dimethylamino naphthalene-1-sulfonyl chloride, Dansyl chloride, HPLC, Stress

## 서 론

질병의 90% 이상은 산화적 스트레스가 원인이며, 체내에서 발생한 잉여 활성산소가 생체의 구조나 기능을 담당하는 성분인 지방질, 단백질, 효소나 유전 정보를 담당하는 DNA를 공격해 생체의 구조나 기능을 방해하기 때문에 병이 되거나 노화가 빨리 진행된다고 알려져 있다. 암이나 동맥 경화, 고혈압, 심근경색, 당뇨병 등 생활 습관병이라고 알려진 병들은 활성산소에 의한 산화적 스트레스가 원인이라고 알려져 있다. 활성산소는 세포벽 지방의 산화를 촉진시켜서 malonaldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal

(4HNE)을 생성시키고, DNA의 구성성분인 deoxyguanosine(dG)의 산화물질인 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)을 생성시키며, 세포를 지지하고 있는 결합조직(collagen) 단백질의 성분인 hydroxyproline(Hyp)과 proline(Pro)의 소변 중 농도를 증가시킨다 [1-4].

결체조직은 아미노산 배열이 alpha chain을 형성하고 3개의 chain이 triple helix를 구성하여 막대 모양(1.4 nm 두께, 300 nm 길이)의 분자를 이룬다. 일반적인 형태의 결체조직은 약 1,000개의 아미노산으로 구성되어 있으며 (Gly-X-Y)n의 배열을 하고 있으며 X위치는 약 10% 정도가 Pro이며 Y위치의 약 10% 정도가

Hyp으로 구성되어 있다 [5].

체내에서 단백질을 구성하는 1급 아미노기를 갖는 아미노산( $\alpha$ -아미노산)은 20가지가 있으며 Pro를 제외하고는  $\alpha$ -탄소 원자에 1급 아민을 가지고 있다. 이들 기본적인 아미노산 외에 비교적 희귀한 6종의 아미노산이 있는데 이들은 원래의 아미노산이 polypeptide에 들어간 후 효소에 의해 Hyp이나 hydroxylysine과 같은 변형된 유도체가 합성되는 것으로 알려져 있다 [6].

Hyp과 관련된 연구결과는 뼈와 관련이 많은 것으로 알려지고 있는데 Liesegang 등 [7]은 결체조직의 대사산물인 Hyp과 deoxypyridinoline 및 type I collagen의 carboxyterminal telopeptide(CTP)를 사람과 몇 종의 동물

에서 뼈의 재흡수에 대한 지표물질로 적절하다고 하였다. Bishop 등 [8]은 전립선 암 환자 35명 중 21명이 bone scan에서 뼈의 변형이 있었으며, 소변 중 Hyp 농도도 증가하였으나 음성반응을 보인 9명의 소변 중 Hyp농도는 모두 정상수준이었다고 한다. 즉 기존에 전립선 암 환자의 뼈의 변형을 검사하기 위한 방법으로 plasma alkaline이나 acid phosphatase를 검사하는 것보다 소변 중 Hyp을 검사하는 것이 정확하다고 보고하였다. Inoue 등 [9]은 뼈 질환 및 암 환자에서 소변 중 총 Hyp과 Pro이 상관관계가 있다고 보고하였다. Niell 등 [10]은 뼈의 변형이 있는 여성 폐암환자(75명)를 실험군으로 선정하고, 뼈의 변형만 있는 환자를 대조군으로 선정하여 소변 검사를 실시한 결과, 대조군에 비해 실험군에서 소변 중 Hyp 농도가 3-4배 이상 높았으며, 뼈의 변형과 Hyp과는 90%이상의 상관성을 보였다. 이 결과로 폐암환자의 뼈의 변형을 검사하기 위한 방법으로 소변 중 Hyp을 분석하는 것이 간편하고 정확한 방법이라 하였다.

Hyp에 관한 분석은 장비의 종류에 따라 gas chromatography(GC)를 이용한 방법과 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 방법이 있으며, 연구목적에 따라 총 Hyp을 분석하는 방법과 유리형 Hyp을 분석하는 방법으로 나눌 수 있다. 유리형 Hyp을 분석할 경우 소변 중 존재하는 Hyp의 농도가 낮을 뿐 아니라 소변에 있는 모든 아미노산이 유도체시약과 같이 반응하기 때문에 반응효율이 떨어지며, 칼럼에서 분리가 어렵기 때문에 분석대상물질인 4-Hyp과 Pro를 제외한 다른 아미노산을 제거하고 분석하는 것이 매우 중요하다.

이에 본 연구는 질병진단, 노화, 스트레스의 연구에 유용하게 사용될 수 있는 소변 중 유리형 4-Hyp을 OPA와 dansyl chloride를 이용하여 유도체화시켜서 HPLC 형광검출기를 이용하여 분석할 수 있는 방법을 개발하고자 한다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 실험재료

모든 시약은 특급(HPLC grade)을 사용하였으며 증류수는 18 M $\Omega$ 이상의 전도도를 갖는 탈이온수 제조장치(Milipore, Milford, MA, U.S.A.)를 사용하여 증류수를 만들었다. 유도체 시약은 dimethyl-aminonaphthalene-1-sulfonyl chloride(dansyl-Cl, HPLC grade, Fluka)와 o-phthaldehyde(phthalic dicarboxaldehyde, aldrich)를 사용하였으며 표준물질은 trans-4-hydroxy-L-proline (Aldrich)을 사용하였다. 고체상흡착에 사용된 칼럼은 Bond Elut LC-18 (100 mg/cc, Supelcoclean, U.S.A.)을 사용하였다.

분석 기기는 자동시료주입기(Waters 717)와 두 개의 펌프(Waters 510)를 연결하여 gradient 조건을 갖추었으며 형광검출기(Waters 474)를 장착하여 분석하였다. 칼럼은 ODS hypersil column(200  $\times$  4.6 mm; Hewlett Packard)에 TSK Guardgel ODS-80Ts(15  $\times$  3.2 mm; Tosoh)를 연결하였으며 column oven을 장착하여 일정온도(25 $^{\circ}$ C)를 유지하였다.

### 2. 연구 대상 및 방법

노출군은 타이어생산 공장에서 근무하는 남성 근로자(22명)에 대해서 작업주기(4일) 중 4일째 되는 날 작업 전과 후의 소변을 채취하였고, 대조군은 병원에서 근무하는 일반 사무직 근로자(남성 8명, 여성 10명)의 소변 중 유리형 4-Hyp을 분석하였다. 그리고 대상자의 일반적 특성을 확인하기 위해 연령, 음주 및 흡연양에 대한 설문조사를 실시하였다.

소변 중 미량 존재하는 유리형 4-Hyp은 일반인에서 미량 존재하기 때문에 저농도(nmol)까지 분석이 가능해야 한다. 이를 위해서는 반응에 사용되는 dansyl-Cl의 양과 반응온도 및 시간이 중요한 변수로 작용하며, 반응에 불필요한 다른 아미노산을 제거하기 위한 C18 칼럼에서의 회수율도 검출한계에 영향을 미칠 수 있으며, 이동상의 종류와 반응에 사용되는

완충액(borate buffer)의 산도(pH)가 분석에 영향을 줄 수 있다. 따라서 열거한 변수들의 조건을 변화시켜가면서 최적의 분석조건을 선정하였다.

수집된 자료의 처리와 분석은 윈도우용 SPSS(version 10.0)을 이용하였으며, 일반적 특성과의 상관성을 관찰하기 위해 단순상관분석을 실시하였다.

## 연구 결과

### 1. Dansyl-Cl량의 변화에 따른 반응률

이동상(phosphate buffer, 5 mmol)의 pH를 3.0으로 고정하고, borate buffer (0.1 mol, pH 8.0) 1 ml을 첨가한 후 dansyl-Cl의 몰 비(4-Hyp/dansyl-Cl, W/W)를 변화(0~1,200배)시켜가면서 반응률을 관찰하였다. Hyp에 대한 dansyl-Cl의 몰 비(4-Hyp/dansyl-Cl, W/W)가 증가될수록 반응이 현저히 증가하였으며 몰 비가 120배에서 반응률이 가장 높았으며, 240배 이상부터는 몰 비가 증가함에 따라 조금씩 감소되었으나 큰 변화는 없었다 (Figure 1).

### 2. 검량선과 검출한계

표준물질의 농도 범위 10, 20, 50, 100, 200, 500  $\mu$ mol/l에서 선형추세 방정식은  $3.145x - 10.786$  ( $y=3.145x - 10.786$ ,  $r=0.9999$ )이었으며, blank sample을 10회 분석하여 mean값과 표준편차(2 SD)를 구하여 LLD(Lower Limit of Detection, 0.267  $\mu$ mol/l)를 구하고 spiked sample을 10회 분석하여 BLD (Biological Limit of Detection, LLD + 2Sspk)를 구한 결과 0.364  $\mu$ mol/l이었다 (Figure 2).

### 3. 회수율

4-Hyp(2 mmol, 200  $\mu$ l) 표준용액에 borate buffer(0.1 mol, pH 8.0) 500  $\mu$ l를 첨가한 후 OPA(4% o-phthaldehyde in acetonitrile : borate buffer(5 mmol, pH 8.0)=1:1, 300  $\mu$ l)로 일차 유도체반응을 시킨 후 이 용액을 전량 C18 칼럼에 흘

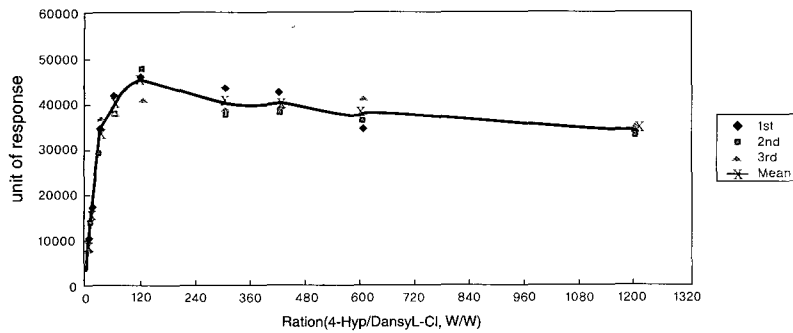


Figure 1. Differences of dansylation by rate of the amount of 4-Hyp and dansyl-Cl.

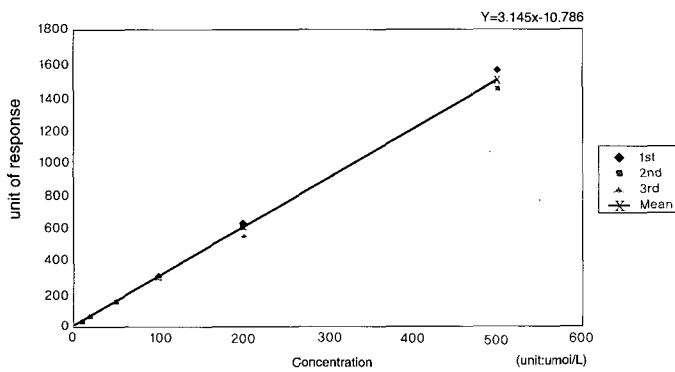


Figure 2. Calibration curve of 4-Hyp after dansylation by HPLC/Fluorescence detector.

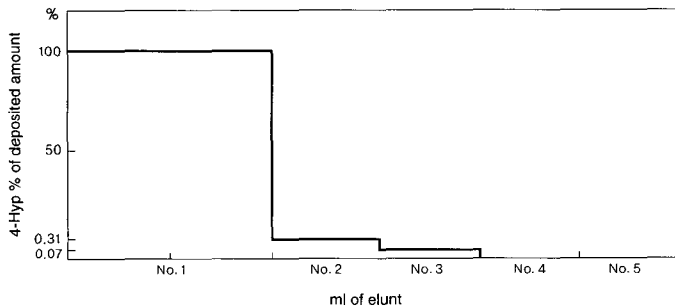


Figure 3. Recoveries of 4-Hyp on Bond Elut C18 column.

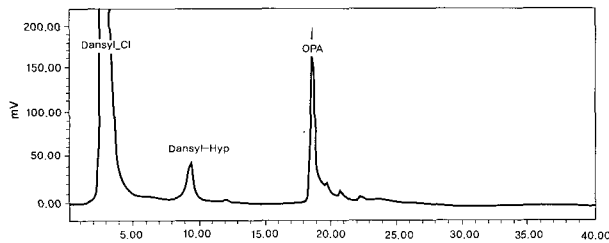


Figure 4. Chromatogram of dansyl-Hyp in a post-shift worker urine in a tire manufacturing company by HPLC/Fluorescence detector.

려주었다. 탈착에 사용된 용매는 borate buffer(0.1 mol/l, pH 8.0)를 분당 0.3 ml의 유속으로 용출하여 1 ml씩 5개의 시험관에 포집하였다. 포집된 용액 1 ml을 취

하여 dansyl-Cl로 유도체시킨 후 20 μl를 HPLC로 분석하여 회수율을 관찰하였다. OPA로 반응시킨 용액을 C18 칼럼에 분당 0.3 ml의 유속으로 흘려 여액을

받고, 이어서 borate buffer(0.1 mol/l, pH 8.0)로 용출하였다.

여액과 초기 용출액(1 ml)을 합한 용액(1차 용출액)을 분석한 결과 99% 이상의 회수율을 얻었으며, 2차 용출액(2 ml), 3차 용출액(3 ml)에서는 각각 0.31%, 0.07%이었으며 4차 용출액(4 ml)부터는 검출되지 않았다 (Figure 3).

#### 4. 최적분석조건

이상의 결과를 종합한 결과 다음과 같은 분석법을 얻을 수 있었다. 고체상 흡착에 사용된 Bond Elut C18 칼럼은 메탄올 2 ml과 증류수 2 ml을 흘려주고, 이어서 borate buffer 1 ml을 흘려서 conditioning시켰다. 10 ml 시험관에 소변 200 μl와 borate buffer(5 mmol, pH 8.0, 500 μl)를 넣은 후 OPA(4% in acetonitrile : borate buffer(0.1 mol, pH 8.0)=1:1, 300 μl)를 넣어 1차 유도체화하였다. 이 중 1 ml을 취하여 C18 칼럼에 흘려준 후 borate buffer(0.1 mol, pH 8.0) 1 ml을 흘려서 칼럼을 씻어주었다. 이렇게 받은 용액 1 ml을 취하여 10 ml screw cap vial에 담은 후 dansyl-Cl(1.5 mmol, 400 mg in 1 l acetone) 300 μl를 넣고 water bath에서 10분간(70℃) 반응시켰다. 반응이 끝나면 상온에서 약 30분간 식힌 후 dichloromethane 2 ml을 넣어서 용매를 추출하고 원심분리한 후 상층액 20 μl를 HPLC/형광검출기(Em: 340 nm, Ex: 538 nm)에 주입하여 분석하였다 (Figure 4). 칼럼은 ODS hypersil column(200×4.6 mm; Hewlett Packard)에 TSK Guardgel ODS-80Ts (15×3.2 mm; Tosoh)를 연결하였으며, 이동상은 (A) phosphate buffer(5 mmol/l, pH 3.0): (B) acetonitrile=70: 30%에서 10분간 지속하고 이후 (B)를 10분간 단계적으로 80%까지 증가시켜서 주었으며 5분간 30%까지 내린 후 5분간 지속시켰다. 칼럼의 유량은 1.0 ml/min이었다.

#### 5. 소변 중 유리형 4-Hyp 농도

소변 중 유리형 4-Hyp에 대한 작업 전과 작업 후에 대하여 대응표본 t-검정을

실시한 결과 작업 전( $5.36 \pm 5.53$  nmol/mg Cre)보다 작업 후( $11.82 \pm 16.73$  nmol/mg Cre) 소변에서 약 2배 높았으며 ( $p=0.132$ ), 대조군( $4.91 \pm 4.89$  nmol/mg Cre)은 작업 전과 비슷하였다. 크레아티닌을 보정하기 전의 결과에서는 대조군 ( $4.71 \pm 4.44$   $\mu\text{mol/l}$ )에 비해 작업 후 ( $12.77 \pm 14.41$   $\mu\text{mol/l}$ )가 약 2배 높았으며 ( $p=0.007$ ), 대조군과 작업 후 농도에서의 최저 값은 각각  $0.33$   $\mu\text{mol/l}$  와  $0.32$   $\mu\text{mol/l}$  이었다 (Table 1).

### 6. 대상자의 생활습관과 4-Hyp 과의 상관관계

타이어생산공장 근로자들의 소변 중 4-Hyp 농도에 영향을 미칠 수 있는 연령, 음주 및 흡연에 대한 t-검정결과 연령은 노출군이 비노출군에 비해 높았으며 (Table 2), 상관분석결과 연령, 음주 및 흡연은 작업 후 소변 중 유리형 4-Hyp에 영향을 미치지 못하였다 (Table 3).

### 고 찰

HPLC 분석 조건을 설정할 때 phosphate buffer의 pH를 조절하지 않거나 잘못 조절할 경우 검출되지 않는 것으로 오인될 수 있으므로 유의해야 될 것으로 생각된다. Borate buffer의 pH에 따라서

반응물에는 현저한 차이를 보였으며 pH가 9.0과 10.0에서부터는 거의 반응이 되지 않는 것으로 관찰되었는데, 그 원인은 pH가 높게 되면 과량의 수산화 이온이 반응에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 반응시간은 유도체와 실험에서 매우 중요한 요인 중 하나이며 저온에서도 높은 반응을 보이는 것이 좋다. 따라서 25°C에서 10분과 20분간, 70°C에서 10분, 20분, 60분간 반응시켜주었다. 실험결과 70°C에서 20분 이상 반응시킬 경우 반응물이 감소되는 것으로 보아 dansyl-Hyp은 고온에서 안정성이 떨어지는 것으로 생각된다. Dansyl-Cl의 양은 몰 비를 기준으로 4-Hyp의 120배에서 충분한 반응이 이루어졌으며 300배 이상에서는 오히려 반응률이 감소되었다. 이는 dansyl-Cl의 peak가 너무 커서 dansyl-Hyp의 peak가 중첩되어 과소 평가된 것으로 생각된다. 소변 양은 200  $\mu\text{l}$ 와 300  $\mu\text{l}$ 가 비슷한 반응율을 보였으며, 500  $\mu\text{l}$ 부터는 반응율이 매우 떨어져서 분석에 어려움이 있었다. 4-Hyp은 dansyl-Cl와 반응하여 Hyp의 N- 또는 O-위치와 결합하거나 N-과 O-위치에 동시에 결합하여 염화수소를 생성하게 되는데 반응이 한쪽 방향으로 흐르기 위해서는 이 염화수소를 효과적으로 제거해야 하는데 이를 위해서는 용액을 알칼리성으로 유지시켜야 한다.

Takahashi 등 [11]은 dansyl-Cl(375 mmol, 20  $\mu\text{l}$ )를 이용하여 유도체화하고 HPLC/형광검출기로 분석한 결과 0.1-10 nmol의 감도를 관찰하였다. 그러나 이 방법은 OPA를 이용하여 dansyl-Hyp 반응에서  $\alpha$ -아미노산을 제거하지 않고 분석하였기 때문에 반응효율이 떨어지며, HPLC 칼럼 상에서 분리가 어려운 단점을 가지고 있다. 반면  $\alpha$ -아미노산을 제거하여 분석한 방법들 중 Tsuruta 등 [12]은 DPS-Cl, DMS-Cl, NBD-Cl 및 dansyl-Cl의 유도체 시약들에 대한 감도를 비교한 실험에서 DMS-Cl이 dansyl-Cl보다 약 700배 높은 감도를 보였다고 발표하였으며, Inoue 등 [13]은 HPLC/형광검출기(Ex 300 nm, Em 400 nm)에서 DPS-Cl이 Phisyl-Cl에 비해 감도가 약 5-7배 높았고, 검출한계가 1 nmol/ml(signal-to-noise=3)이라 하였다 [14]. 그러나 DPS-Cl의 경우 표준시약 가격이 10 mg을 100달러에 판매되고 있기 때문에 많은 시료를 분석하는데 경제적인 어려움이 있다. 따라서 검출한계가 다소 높기는 하지만 일반인의 소변을 분석하는데 충분한 검출한계를 갖는 이번 연구결과는 위의 여러 분석법들의 단점을 보완한 개량된 분석법이라 할 수 있을 것이다.

타이어를 생산하는 공장에서는 물리적, 화학적 유해물질이 발생되고 있으며

**Table 1.** Concentration of free 4-Hyp in urines of controls, pre-shift workers, and post-shift workers in a tire manufacturing company

Class	n	Before Cr. corrected ( $\mu\text{mol/l}$ )			After Cr. corrected (nmol/mg Cre)		
		Mean SD	Range	P	Mean SD	Range	P
Controls	18	4.71 $\pm$ 4.44	0.33-16.44		4.91 $\pm$ 4.89	0.44-17.04	
Pre-shift workers	22	10.70 $\pm$ 12.58	N.D-49.06	0.570*	5.36 $\pm$ 5.53	N.D-22.17	0.132 <sup>†</sup>
Post-shift workers	22	11.65 $\pm$ 14.44	0.32-56.27	0.007**	11.82 $\pm$ 16.73	0.23-65.59	

SD; standard deviation Cre; creatinine

<sup>†</sup>; paired samples t-test between pre- and post-shift workers

\*; independent samples t-test between controls and pre-shift workers

\*\*; independent samples t-test between controls and post-shift workers

**Table 2.** Mean values of age, alcohol intake, and smoking (S.D.)

Variables	Control (n=18)	Exposed (n=22)	P
Age	30.9 ( $\pm$ 6.71)	43.0 ( $\pm$ 8.34)	0.000
Alcohol intake (ml)*	46.0 ( $\pm$ 37.3)	59.5 ( $\pm$ 45.9)	0.312
Smoking (number of cigarette) <sup>†</sup>	42.8 ( $\pm$ 64.1)	49.3 ( $\pm$ 57.8)	0.739

\* Alcohol intake (ml)=(ml of alcohol / week)

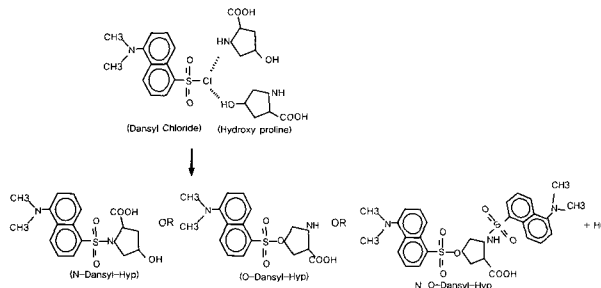
<sup>†</sup> Smoking(number of cigarette)=(smoking pack \* 20 \* 7 / week)

**Table 3.** Correlation between urinary free 4-Hyp and age, alcohol intake, and smoking in post-shift workers

Variables (n=22)	Pearson correlation	P
Age	0.299	0.177
Alcohol intake (ml)*	-0.168	0.454
Smoking (number of cigarette)†	-0.599	0.051

\* Alcohol intake(ml)=(ml of alcohol / week)

† Smoking (number of cigarette)=(smoking pack \* 20 \* 7 / week)

**Figure 5.** Derivatization reaction of Hyp with dansyl-Cl.

[15], 대상자들에게는 정신적 요인과 노동에 의한 생체 내에서 활성산소의 변화가 있을 수 있다. 따라서 유해물질과 소변 중 유리형 4-Hyp과의 상관관계에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각되며, 아울러 물리적, 화학적, 정신적 스트레스로 인한 활성산소 등 radical의 과다 발생이 질병과 노화에 미치는 영향을 규명하기 위해서는 소변 중 4-Hyp의 평가 이외에도 생물학적 지표인 malonaldehyde 및 4HNE과 dG의 산화물질인 8-OHdG을 통합 연계한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결론

OPA를 소변 중  $\alpha$ -아미노산에 반응시켜 Bond Elut C18 칼럼에서 흡착 제거한 후 dansyl-Cl를 유리형 4-Hyp에 유도체시켜서 HPLC/형광검출기(Em: 340 nm, Ex: 538 nm)로 분석하는 방법을 개발하였다. 개발된 분석방법을 이용하여 병원 근로자와 타이어생산 근로자들의 소변 중 유리형 4-Hyp의 분석가능 여부를 확인한 결과, 대조군(0.33-16.44  $\mu\text{mol/l}$ )과 노출군의 작업 전(N.D-49.06  $\mu\text{mol/l}$ ), 작업 후(0.32-56.27  $\mu\text{mol/l}$ ) 모두 분석이 가능하였다.

## 감사의 글

바쁜 시간을 나누어 많은 도움을 주신 연세대학교 환경공학과 대학원생들과 아주대병원 산업의학과 직원들에게 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Yin B, Whyatt RM, Perera FP, Randall MC, Cooper TB, Santella RM. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radic Biol Med* 1995; 18(6): 1023-1032
2. Shigenaga MK, Park JW, Cundy KC, Gimeno CJ, Ames BN. In vivo oxidative DNA damage: Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol* 1990; 186: 521-530
3. Dizdaroglu M. Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on  $\gamma$ -irradiation in aqueous solution. *Biochemistry* 1985; 24: 4476-4481
4. Ravanat JL, Gremaud E, Markovic J, Turesky RJ. Detection of 8-oxoguanine in cellular DNA using 2,6-diamino-8-oxopurine as an internal standard for high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Biochem* 1998; 260: 30-37

5. Robert K, Daryl K, Peter A, Victor W. Harper's biochemistry. 24th ed. Appleton & Lange, 1996
6. 김윤수. 생화학 제2판, 의학문화사, 1987
7. Liesegang A, Eicher R, Sassi ML, Risteli J, Riond JL, Wanner M. The course of selected bone resorption marker concentrations in response to short-term hypocalcemia experimentally induced with disodium EDTA infusions in dairy cows. *J Vet Med & Physiol Pathol Clin Med* 2000; 47(8): 477-87
8. Bishop MC, Fellows GJ. Urinary hydroxyproline excretion a marker of bone metastases in prostatic carcinoma. *Br J Urol* 1977; 49(7): 711-6
9. Inoue H, Iguchi H, Kono A, Tsuruta Y. Highly sensitive determination of N-terminal propyl peptides, proline and hydroxyproline in urine by high-performance liquid chromatography using a new fluorescent labelling reagent, 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidyl)-2-methoxyphenyl sulfonyl chloride. *J Chromatogr & Biomed Sci* 1999; 724(2): 221-30
10. Niell HB, Neely CL, Palmieri GM, McDonald MW. The post-absorptive hydroxyproline in the long-term elevation of patients with breast cancer. *Cancer* 1983; 52(8): 1442-7
11. Takahashi S, Lee MJ. Quantitative study of tissue collagen metabolism. *Anal Biochem* 1987; 162(2): 553-61
12. Tsuruta Y, Inoue H. 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidyl)-2-methoxyphenyl-sulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent for determination of amino acids in high-performance liquid chromatography and its application for determination of urinary free hydroxyproline. *Anal Biochem* 1998; 265: 15-21
13. Inoue H, Kohashi H, Tsuruta Y. Simultaneous determination of serum and urinary hydroxyproline and proline by liquid chromatography using two fluorescence labeling reagents. *Anal Chemica Acta* 1998; 365: 219-226
14. Inoue H, Date Y, Kohashi K, Yoshitomi H, Tsuruta Y. Determination of Total Hydroxyproline and proline in Human Serum and Urine by HPLC with Fluorescence Detection. *Biol Pharm Bull* 1996; 19(2): 163-166
15. National Institute for Occupational Safety and Health(NIOSH). Rubber products manufacturing industry. Special NIOSH Hazard Review. 1993