

## Novel Method for Urinary 1-Hydroxypyrene Measurement Using Molecular Imprinting

Dong-Hyuk Yim<sup>1</sup>, Sun-In Moon<sup>1</sup>, Young-Sook Choi<sup>1</sup>, Heejin Park<sup>1</sup>, Dae-Seon Kim<sup>2</sup>, Seung-Do Yu<sup>2</sup>, Chul-Ho Lee<sup>3</sup>, Yong-Dae Kim<sup>1\*</sup> and Heon Kim<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Preventive Medicine, College of Medicine and Medical Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea<sup>2</sup>Environmental Health Research Division, Environmental Health Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 404-170, Korea<sup>3</sup>Asbestos Damage Relief Center, Korea Environment Coporation, Incheon 404-708, Korea

Received January 11, 2011 / Accepted March 9, 2011

This study was performed to determine whether or not urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) levels can be accurately detected by our 1-OHP-detecting TiO<sub>2</sub>-Bead - HPLC assay that we developed based on the molecular imprinting method. Our method showed a variation coefficient of 4.97% and a between-day variation coefficient of 4.43%, suggesting that this may be a very stable method. In addition, the recovery rate of 1-OHP from a mixture of 1-OHP and similar substances using our TiO<sub>2</sub>-Bead-HPLC method was estimated to be 105.6%. The correlation coefficient between the conventional enzyme-HPLC method and this new method was 0.74 ( $p < 0.01$ ) when the urine samples were tested. Based on this result, it is conceivable that our method could be a useful technique for measuring urinary 1-OHP levels. Moreover, our method has some advantages of being easier and less expensive than the conventional method. The results of this study suggest that our method can facilitate the development of a urine 1-OHP sensor using TiO<sub>2</sub>-coating beads and that development of beads by molecular imprinting can be applied to analysis of chemicals other than 1-OHP.

**Key words** : TiO<sub>2</sub> bead, molecular imprinting, 1-hydroxypyrene

## 서 론

분자주형(Molecular imprinting)은 인공의 고분자 매트릭스 내에 분자인식 기능을 도입하는 기술로써 주형분자(template molecule)를 단량체 및 가교제의 존재 하에 중합시킨 후, 적절한 방법을 사용하여 주형분자를 제거하여 매트릭스 내에 주형분자를 인식할 수 있는 3차원 분자 인식 공간(molecular recognition cavities)을 만드는 기술이다[2,8,10,11]. 이러한 기술은 인공의 수용체(artificial receptor)를 만드는 기술로서 생체에서 일어나는 물질 이동, 신경계의 신호 전달, 효소의 촉매작용, 항원에 대한 항체의 면역기능, DNA의 유전정보 전달 등과 같은 생화학적 작용을 모방하는 기술이다. 이렇게 제작된 molecular imprinting 재료는 크로마토그래피 흡착제, 분리 막, 센서, 촉매 등 광범위하게 응용 되고 있다[1,5,6,9,12,14].

한편, 유기물질의 불완전연소에 의해 발생하는 다환족 방향족 탄화수소(Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAH)는 대기 오염 물질의 대표적인 것으로 거의 모든 사람들이 직업적 또는 비직업적으로 노출되고 있다[3,7]. 다양한 종류의 PAH 노

출을 모두 평가하는 것은 현실적으로 어렵기 때문에 일반적으로는 pyrene의 대사산물인 1-hydroxypyrene (1-pyrenol, 1-OHP)을 소변에서 측정하여 전반적인 PAH의 노출 정도를 평가하는 방법을 사용하고 있다.

체내로 흡수된 pyrene은 대사효소에 의해 1-OHP로 변환된 후 친수 작용기인 glucuronyl 기 또는 sulfur 기가 첨가되어 소변으로 배설된다. 따라서 소변으로 배설되는 1-OHP의 80% 이상은 특정 작용기와의 결합형(conjugated form)이며 20% 미만이 자유형(free form)인 것으로 알려져 있다. 요중 1-OHP의 측정은 액체크로마토그래피(HPLC)와 형광검출기를 이용하여 측정하는 방법이 Jongeneelene 등[4]에 의해 개발되어 현재까지 사용되고 있으나 직업적인 노출이 없는 일반인구 집단의 경우는 농도가 낮아 검출이 안 되는 경우가 있고 결합형 1-OHP를 자유형으로 바꾸어주기 위해서 사용하는 분해효소가 고가의 비용이 소요된다는 점, 그리고 전처리 과정에서 1-OHP의 손실 가능성이 크다는 단점이 있었다.

이에 본 연구자들은 선행연구에서 분자주형 기법을 이용하여 1-OHP를 특이적으로 인식하는 산화 티타늄(TiO<sub>2</sub>) 초박막 필름을 제조하여 보고한 바 있다[13]. 본 연구에서는 TiO<sub>2</sub> 초박막 필름과 기존의 크로마토그래피 방법을 결합하여 요중 1-OHP 농도를 보다 효율적으로 측정할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

**\*Corresponding author**

Tel : +82-43-261-2845, Fax : +82-43-274-2965

E-mail : ydkim@chungbuk.ac.kr

## 재료 및 방법

### 초미세 나노박막 코팅 bead 제작 방법

100 mM  $Ti(O-^nBu)_4$ 와 5 mM 1-hydroxypyrene을 에탄올:톨루엔(1:1, v/v) 혼합용액에 25°C에서 6시간 이상 교반하며 복합착체를 제조하였다. 상기 복합 착체 20 ml를 10 g의 고분자 bead와 혼합하여 25°C에서 3시간 교반 후, 2 ml/min의 유속으로 질소 가스를 5시간 흘려주어 용매를 모두 제거함으로써 폴리머비드의 표면을 복합착체로 코팅하였다. 이것을 25°C, 90% 습도의 항온, 항습기에서 12시간 이상 가수분해 시킨 후, 10% ethanol과 2% acetic acid가 함유된 acetonitrile 용액으로 밤새 교반하면서 주형분자를 제거하였다. 3-4 시간 간격으로 용액을 교환해주었고 HPLC의 방법으로 용액에서 1-OHP가 더 이상 검출되지 않을 때까지 제거하였다.

### 1-OHP-TiO<sub>2</sub> 전처리 과정

1-OHP-TiO<sub>2</sub>-Bead를 50 mg씩 2 ml tube에 넣은 후 50% methanol 1 ml로 conditioning하였다. 비직접적 노출이 없는 건강한 지원자 12명으로부터 일시뇨를 채취한 후 소변 600 µl을 취하고 여기에 메탄올 600 µl을 넣고 10분 동안 잘 섞어 주었다. 그런 후, 1-OHP-TiO<sub>2</sub>-Bead가 담긴 튜브에 넣고 하루 밤 동안 반응시켰다. 반응물은 50% methanol로 washing을 한 후 추출용액[acetic acid (5%) : acetone (80%) : ethanol (10%)]을 이용하여 2시간 추출한 후 HPLC로 측정하였다.

### HPLC 조건

1-OHP standard 10 ng/ml와 전처리가 끝난 소변 시료를 TOSOH TSKgel ODS-80TM (5 µm, 150×4.6 mm) 역상 column과 형광 검출기가 부착된 HPLC에 주입하여 1-OHP를 정량측정 하였다. 모든 시료의 측정은 2회 반복하여 그 평균값을 측정값으로 사용하였으며 두 측정값이 큰 차이를 보이는 경우는 재측정하여 유사한 두 값의 평균값을 이용하였다. HPLC는 Hitach (Tokyo, Japan) Model L-2300 column oven 이 부착된 L-2130 pump, L-7485 형광 검출기, 그리고 L-7200 지동시료주입기로 구성된 것을 사용하였다. 이동상은 80% methanol 용액을 사용하였으며, 분당 0.8 ml의 속도로 흘려 주었다. 형광 검출 파장은 excitation 242 nm, emission 388 nm를 사용하였다.

### 통계 분석

시행한 연구 결과를 SPSS 12.0 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 상관분석을 이용하여 Person 상관계수를 산출하였으며  $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구는 선행연구에서 molecular imprinting 방법을 이용

하여 개발한 1-OHP 특이적 TiO<sub>2</sub>-Bead [13]가 실제 소변 중의 1-OHP를 효율적으로 검출할 수 있는지 평가하기 위해서 시행되었다. TiO<sub>2</sub>-Bead를 이용한 전처리 과정을 거친 1-OHP 추출 용액은 기존의 HPLC-형광 검출기 시스템에서 매우 깨끗한 크로마토그램을 보여주었다. 기존의 측정방법에서 효소 전처리 과정을 거친 후의 HPLC 크로마토그램은 다양한 물질의 혼합으로 인해 1-OHP 피크를 분리하는데 다소 어려움이 있었으며 특히, 1-OHP 농도가 낮은 경우는 주변의 노이즈피크와 잘 구분되지 않는 경우도 있었다. 그런 면에서 TiO<sub>2</sub>-Bead를 이용한 전처리 방법은 피크분리가 상대적으로 우수함을 보여주었다(Fig. 1).

1-OHP-TiO<sub>2</sub>-Bead가 용액 상태의 1-OHP를 정확하게 검출하는지 알아보기 위해 10 ng/ml의 1-OHP를 bead에 가한 후 추출용액으로 추출하여 가해진 양에 대한 회수된 농도를 계산하였다. 회수율은 1-OHP 농도가 10 ng/ml가 되도록 표준용액을 첨가한 5개의 시료를 전처리과정을 거쳐 HPLC 형광검출기로 분석한 다음 그 평균값으로 정하였다. 그 결과, 평균 회수율은 103.3±5.87%인 것으로 조사되었다(Table 1). 회수율이 100%를 넘는 이유는 실험 오차에 의한 가능성으로 생각되며 이를 감안한다면 가해진 1-OHP의 거의 모든 양이 회수되는 것으로 판단된다.

본 연구에서 개발한 측정 방법의 재현성을 평가하기 위하여 3개의 시료를 3일간 반복하여 1-OHP 농도를 측정하고 1일 내(within-day)와 각 다른 날짜 별(between-day) 평균 및 표준편차를 각각 계산하여 변이계수(coefficient of variation)를 구하였다(Table 2). 그 결과, within-day 변이계수는 4.97%로 나타났고 between-day 변이계수는 4.43%로 나타나 TiO<sub>2</sub> 코팅 bead와 HPLC를 결합한 본 측정방법이 매우 안정적인 측정방법임을 확인할 수 있었다.

실제로 사람의 소변에서 1-OHP 농도를 측정하는 경우 소변에 존재하는 매우 다양한 이물질들에 의해 TiO<sub>2</sub> 코팅 bead가 1-OHP를 인식하는데 있어 방해받을 가능성이 있다. 본 연구자들은 제조한 TiO<sub>2</sub> 코팅 bead가 1-OHP와 구조적으로 유사한 다른 물질들과 혼합된 상태에서 1-OHP를 정확하게 인식하여 결합할 수 있는지 알아보기 위하여 1-OHP의 유사 물질인 1-nitropyrene, pyrene, 2-naphthol, 1-pyrene butyric acid, 1-pyrene carboxylic acid 등 총 6가지 물질의 혼합 용액을 모두 10 ng/ml의 농도로 TiO<sub>2</sub> 코팅 bead에 가한 후 동일한 방법으로 추출하여 1-OHP의 농도를 측정하고 그것의 회수율을 계산하였다(Table 3). 그 결과, 평균 105.6%의 회수율을 나타내어 제조한 TiO<sub>2</sub> 코팅 bead는 1-OHP와 유사 물질인 1-nitropyrene, pyrene, 2-naphthol, 1-pyrene butyric acid, 1-pyrene carboxylic acid가 혼합된 용액에서도 1-OHP를 성공적으로 인식하여 부착함을 확인할 수 있었다.

12명 대상자의 일시 뇨를 채취하여 TiO<sub>2</sub> 코팅 bead를 이용하여 요중 1-OHP의 농도를 측정하고 이를 기존의 측정방법인

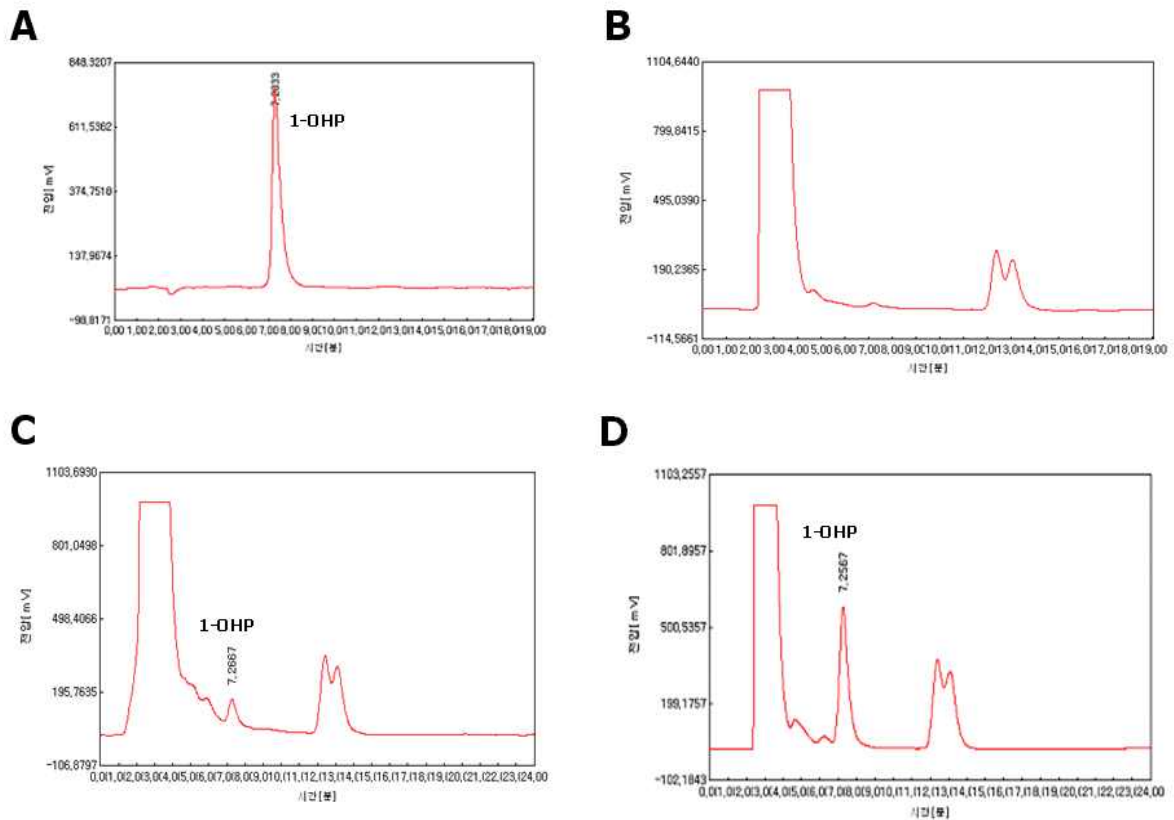


Fig. 1. Chromatogram of 1-OHP by HPLC fluorescence detector system. A, 10 ng/ml of 1-OHP standard solution, B, eluent of 1-OHP in TiO<sub>2</sub> coating bead (0 ng/ml), C, eluent of 1-OHP in TiO<sub>2</sub> coating bead (2 ng/ml), D, eluent of 1-OHP in TiO<sub>2</sub> coating bead (5 ng/ml)

Table 1. Recovery rate of 1-OHP in TiO<sub>2</sub> coating bead-HPLC method

Sample NO.	concentration (ng/ml)	Recovery rate (%)
1	11.13	111.3
2	10.33	103.3
3	10.64	106.4
4	9.63	96.3
5	9.94	99.4
Mean±SD	10.33±0.59	103.3±5.87

Table 2. Coefficient of variation in TiO<sub>2</sub> coating bead-HPLC method

	Range	Mean±SD	Coefficient of variation (%)
Within-day	10.15-11.95	10.94±0.54	4.97
Between-day	9.36-11.95	10.56±0.47	4.43

glucuronidase/sulfatase 전처리 방법과 비교하였다(Table 4). 그 결과 두 방법 간에는 0.74( $p < 0.01$ )의 상관계수를 보여 bead를 이용한 요중 1-OHP의 새로운 측정 방법의 유용성을 확인할 수 있었다. 새로운 방법을 통해 측정된 요중 1-OHP의 평균

Table 3. Recovery rate of 1-OHP in mixture solution by TiO<sub>2</sub> coating bead-HPLC method

Sample NO.	concentration (ng/ml)	Recovery rate (%)
Mixture_1	11.95	119.5
Mixture_2	10.21	102.1
Mixture_3	9.53	95.3
Mean±SD	10.56±1.25	105.6±12.5

농도는 0.48±0.26 ng/ml로 기존의 효소처리 방법 1.08±0.41 ng/ml에 비해 46% 정도로 낮게 측정되었다. 이는 기존의 효소처리 방법이 conjugate form과 free form을 모두 측정하는 반면, 새로운 방법은 free form만을 측정하기 때문인 것으로 생각할 수 있다. Free form의 농도가 conjugate form의 20% 정도인 것을 감안하면 bead를 이용한 새로운 측정 방법이 효소 처리를 이용한 기존의 방법에 비해 약 2배 정도의 높은 검출률을 보임을 알 수 있다. 그러나 향후, 보다 많은 시료를 대상으로 한 비교분석이 필요할 것으로 생각된다.

대기오염 물질인 PAH에의 노출은 발암작용 이외에도 각종 호흡기 질환을 유발하는 등 국민보건에 미치는 영향이 매우

Table 4. Urinary 1-OHP level measured by enzyme-HPLC method and TiO<sub>2</sub> coating bead-HPLC method

Sample NO.	1-OHP by TiO <sub>2</sub> coating bead-HPLC method (ng/ml)	1-OHP by enzyme-HPLC method (ng/ml)
#1	0.78	1.77
#2	0.54	1.71
#3	0.49	0.76
#4	0.58	0.81
#5	0.00	0.61
#6	0.00	0.52
#7	0.49	1.04
#8	0.55	0.88
#9	0.86	1.51
#10	0.63	1.28
#11	0.31	1.09
#12	0.56	1.01
mean±SD	0.48±0.26	1.08±0.41

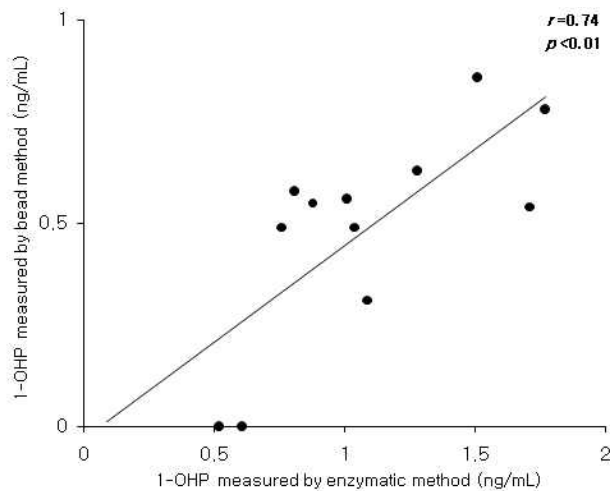


Fig. 2. Scatter gram of 1-OHP concentrations between enzymatic method and TiO<sub>2</sub> bead method.

심각하다. 따라서, 개개인의 PAH 노출을 정확히 평가하는 것은 이러한 질병을 사전에 예방할 수 있다는 점에서 매우 중요하다.

본 연구에서 개발한 새로운 측정방법은 기존의 측정방법에 비해 요중 1-OHP 농도를 보다 간편하고 저렴한 가격으로 측정할 수 있다는 장점이 있다. 기존의 여러 선행연구를 통하여 요중 1-OHP 농도가 PAH 노출에 대한 유용한 지표임이 입증되었으나, 본 측정 방법에서는 1-OHP의 free form만을 측정하는 것이므로 향후, PAH 노출에 대한 biomarker로서의 유용성 평가가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 본 TiO<sub>2</sub> 코팅 bead를 응용한 요중 1-OHP 센서의 개발도 가능할 것으로 생각되며, 분자추형을 이용한 bead의 개발은 1-OHP 이외의 다른 화학물질의 분석에도 다양하게 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

이 논문은 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음(This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2009).

### References

- Hansen, D. E. 2007. Recent developments in the molecular imprinting of proteins. *Biomaterials* **28**, 4178-4191.
- Haupt, K. and K. Mosbach. 2000. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem Rev.* **100**, 2495-2504.
- Hemminki, K. and T. Veidebaum. 1999. Environmental pollution and human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the east Baltic region. *Scand J. Work Environ. Health* **25**, 33-39.
- Jongeneelen, F. J., R. B. Anzion, and P. T. Henderson. 1987. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J. Chromatogr.* **413**, 227-232.
- Ju, M. J., D. H. Yang, S. W. Lee, T. Kunitake, K. Hayashi, and K. Toko. 2007. Fabrication of Regioselective imprinting of anthracenecarboxylic acids onto TiO<sub>2</sub> / γ-CD films for nitro aromatic compounds and its sensing application via cyclic surface-polarization impedance (cSPI) spectroscopy. *Sens. Actuators B* **123**, 359-367.
- Kim, H. and D. A. Spivak. 2003. New insight into modeling non-covalently imprinted polymer. *J. Am Chem Soc.* **125**, 11269-11275.
- Lijinsky, W. 1991. The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutat. Res.* **259**, 251-261.
- Lee, S. W., D. H. Yang, and T. Kunitake. 2005. Regioselective imprinting of anthracene carboxylic acids onto TiO<sub>2</sub> gel ultrathin films: an approach to thin film sensor. *Sens. Actuators B* **104**, 35-42.
- Schmidt, R. H., K. Mosbach, and K. Haupt. 2004. A Simple method for spin-coating molecularly imprinted polymer films of controlled thickness and porosity. *Adv. Mater.* **16**, 719-722.
- Vlatakis, G., R. Andersson, K. Muller, and K. Mosbach. 1993. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* **361**, 645-647.
- Wulff, G. 1995. Molecular imprinting in crosslinked materials with aid of molecular templates a way towards artificial antibodies. *Angew. Chem.* **34**, 1812-1832.
- Wulff, G. 2002. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymer. *Chem Rev.* **102**, 1-27.
- Yang, D. H., Y. R. Ham, M. H. Oh, Y. S. Yoon, J. S. Shin, Y. D. Kim, and H. Kim. 2009. Simple method for the fabrication of 1-hydroxypyrene-imprinted TiO<sub>2</sub> gel nanofilms. *Curr. Appl. Phys.* **9**, e136-e139.
- Ye, L., R. Weiss, and K. Mosbach. 2000. Synthesis and characterization of molecularly imprinted microspheres. *Macromolecules* **33**, 8239-8245.

**초록 : 분자주형을 이용한 요중 1-hydroxypyrene의 측정 방법 개발**임동혁<sup>1</sup> · 문선인<sup>1</sup> · 최영숙<sup>1</sup> · 박희진<sup>1</sup> · 김대선<sup>2</sup> · 유승도<sup>2</sup> · 이철호<sup>3</sup> · 김용대<sup>1\*</sup> · 김현<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>충북대학교 의과대학 예방의학교실 및 의학연구소, <sup>2</sup>국립환경과학원 환경건강위해성연구부 환경역학과, <sup>3</sup>한국환경공단 석면피해구제센터)

본 연구는 선행연구에서 molecular imprinting 방법을 이용하여 개발한 1-OHP 인식 TiO<sub>2</sub>-Bead가 실제 소변 중의 1-OHP를 효율적으로 검출할 수 있는지 평가하기 위해서 시행되었다. 본 연구에서 개발한 분석 방법은 within-day 변이계수가 4.97%, between-day 변이계수가 4.43%로 나타나 본 측정방법이 매우 안정적인 방법임을 확인할 수 있었다. 1-OHP와 유사한 물질들이 혼합된 용액으로부터 TiO<sub>2</sub>-Bead-HPLC 측정방법의 회수율을 평가한 결과, 평균 105.6%의 회수율을 나타내었다. 실제 소변시료를 대상으로 기존의 효소-HPLC 측정방법과 본 측정 방법 간의 상관성을 평가한 결과, 두 방법 간에는 높은 상관관계( $r=0.74$ ,  $p<0.01$ )를 보여 bead를 이용한 요중 1-OHP의 새로운 측정 방법의 유용성을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 개발한 새로운 측정방법은 기존의 측정방법에 비해 요중 1-OHP 농도를 보다 간편하고 저렴한 가격으로 측정할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구의 결과는 TiO<sub>2</sub> 코팅 bead를 응용한 요중 1-OHP 센서의 개발에 응용할 수 있을 것으로 생각되며, 분자주형을 이용한 bead의 개발은 1-OHP 이외의 다른 화학물질의 분석에도 다양하게 응용할 수 있을 것으로 기대된다.