

생체기능성 고분자를 이용한 Testosterone의 선택적 분리

정수환 · 서명교* · 박종곤**† · I. Karube

*동의공업전문대학 환경공학과

**경북대학교 공과대학 화학공학과

동경대학교 RCAST biosensor 연구실

(1997년 3월 31일 접수, 1997년 10월 15일 채택)

Selective Separation of Testosterone using Biofunctional Polymer

Soo Hwan Cheong, Myung Gyo Suh*, Joong Kon Park**† and Isao Karube

*Department of Environmental Engineering, Dongeui Technical Junior College

**Department of Chemical Engineering, Kyungpook National University, Taegu
Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, 4-6-1
Komaba, Meguro-Ku, Tokyo 153

(Received 31 March 1997; accepted 15 October 1997)

요 약

Molecular imprinting technique(MIT) 방법을 사용하여 steroid에 선택적 친화성을 가지는, 특히, testosterone에 대해 높은 친화성을 가지는 생기능성 고분자를 합성하였다. MIT 방법중 methacrylate ester를 이용한 공유결합과 수소결합 및 이온결합과 같은 비공유결합을 사용하여 고분자를 만들었다. 그리고 일련의 유사한 구조를 가진 steroids를 사용하여 imprinting 고분자 구조에 영향을 미치는 분자구조의 특징을 조사한 결과 C-17 위치의 OH-group과 carboxyl group 사이에 형성되는 수소결합이 지배적인 결합임을 알 수 있었다. Imprinting 고분자의 분리 능력은 HPLC 실험을 통하여 얻어진 용량인자(capacity factor) 및 분리인자(separation factor)를 사용하여 비교하였으며 estrone에 대해서는 9.6배의 높은 분리 능력을 나타내었다. 공유결합에 의해서 만들어진 imprinting 고분자의 경우 주형(template)을 제거하기 위해서 사용된 가수분해 정도에 대한 영향을 살펴보았으며 12시간 가수분해를 시킬 경우 용량인자(capacity factor)가 낮아짐을 알 수 있었다. 특히 비공유결합 imprinting에 의해 만들어진 고분자의 경우 testosterone에 대해 높은 결합능력(용량인자; 5.10)을 나타내었으며 그의 본 연구에 사용된 다른 steroids(estrone, progesterone, testosterone propionate and β -estradiol)는 정지상(void marker)과 비슷한 값(용량인자; 0.53-1.52)을 나타내고 있었다. Imprinting 고분자를 사용하여 testosterone과 steroids 혼합물의 분리 정도를 측정해 본 결과 바탕선(baseline) 분리가 이루어짐을 볼 수 있었다.

Abstract—The molecular imprinting technique(MIT) was used in synthesis of biofunctional polymers having affinity of steroid, especially high affinity for testosterone. This MIT method was developed based on the covalent bonding using the methacrylate ester and non covalent interaction such as hydrogen bonding and ionic interaction. Using a suite of similar steroids we were able to identify features of the molecules which affect their affinity for the polymer matrix. As a result, hydrogen bonding formed between OH group and carboxyl group was known as the dominant bonding. In case of the covalently imprinted polymer, it was investigated about the degree of the hydrolization used in order to remove the template being inside the polymer matrix. We were able to know a diminution of the capacity factor in case of doing hydrolization for 12 hrs. The polymer obtained(non-covalently imprinted) was found to interact specifically with testosterone(capacity factor; 5.10), while the other steroids under study(estrone, progesterone, testosterone propionate and β -estradiol) were eluted closely to the void volume in the HPLC experiments(capacity factor; 0.53-1.52). The mixture of testosterone and other steroids was shown to be separated by the imprinted polymer with near baseline resolution.

Key words: Molecular Imprinting Technique, Testosterone, Separation, Biofunctional Polymer

†E-mail: parkjk@bh.kyungpook.ac.kr

1. 서 론

최근 molecular imprinting은 아주 간단하게 가교 결합된 고분자 매트릭스(polymer matrix)내에 높은 친화력으로 주형(표적) 분자를 기억시킬 수 있는 자리를 만드는 수단으로서 많은 관심을 받고 있다[1-5]. 이 분자 인식은 수용체(receptors), 효소 그리고 항체와 같은 생물학적인 활성에 결정적인 역할을 하며, 좀더 선택적인 인식 시스템이 요구되어 지고 있다. 그 일환으로 항체 형성 기구(mechanism)로 구성되는 기술을 이용하여 주형 분자 주위에 가교중합체를 형성시켜 고 난 후 주형을 제거하므로써 주형 분자와 유사한 구조의 자리를 합성 고분자내에 형성할 수 있었다. 이 기술을 imprinting이라 하며 1972년 Wulff[1]에 의해서 처음으로 유기 고분자에 의한 imprinting이 보고되었다. 그 뒤 Mosbach[3], Shea[4] 등에 의해서 비공유결합 방법에 의한 효과적인 imprinting 기술이 개발되었다. 이 imprinting 기술의 응용은 크로마토그래피, 촉매 연구, 생감지기 기술 그리고 인공항체의 생산에 광범위하게 사용되어지고 있다.

Molecular Imprinting Polym(MIP)를 만드는 일반적인 방법은 다음과 같다. 1) Fig. 1의 a와 b에서 볼 수 있듯이 주형 분자 주위에 중합할 수 있는 기능성 단분자(functional monomer)를 찾아서 결합시킨다. 2) 그 다음 이 Fig. 1의 c에서처럼 고정된 배열을 이룬 가교 고분자를 형성하도록 중합시킨다. 3) 마지막으로 잘 형성된 공극을 가진 imprinting 고분자를 형성시키기 위해서 주형을 제거시킨다. 이렇게 만들어진 imprinting 고분자는 주형에 대한 모양과 화학적 기능이 상보적으로 이루어진 3차원 구조의 미세공극을 가진 다공성 매트릭스가 된다. 중합할 때 가교 결합의 정도는 주형을 제거한 후에도 그들의 모양을 유지할 수 있도록 하여 주며, 작용기(functional group)는 본래의 표적 물질을 재인식할 수 있도록 하는 기능을 부여하고 있다. 그리고 MIP 방법의 이점은 고분자 합성이 간단하며 물리적, 화학적 안정성이 높고 비용이 싸게 들어 넓은 온도 범위에서 사용이 가능하다는 것이다.

Imprinting 기술은 결합 형태에 따라 크게 두 가지로 나누어 볼 수가 있다. 첫째는 주형과 기능성 단분자 사이에 공유(covalent)결합을 형성하는 것으로, 이것은 중합(polymerization)에 따른 공간적 배열이 고정화되는 것이다. 결합기에 따라서 그 예를 찾아볼 수 있는데 4-vinylphenyl boronic acid esters[6]를 사용한 sugar 유도체의 imprinting 그리고 amide, ketal[7-9] 등의 작용단위체를 사용하여 결합시킨 경우이다. 두 번째는 수소결합 혹은 정전기적 상호작용과 같은 비공유(noncovalent)결합으로서 주형 주위에 작용단위체가 자동적으로 배열 형성되는 것이다. 이에 대한 최근의 연구서는 Mosbach 연구팀에서 주로 많이 이루어지고 있으며 이 예로서는 amino acid, peptides,

nucleotides 그리고 xathies와 diazepam의 유도체에 대한 imprinting 등이 있다[10-15]. 그리고 이들 방법을 혼합하여 사용한 예도 있다[16].

이와 같이 molecular imprinting은 크로마토그래피, 촉매, 수용체 작용 그리고 감지기 개발 등 넓은 범위에서 사용되고 있다. 특히 스포츠 분야에서 불법적인 신진대사 steroid의 사용이 급격히 증가함에 따라 빠르고 정확하게 값싼 수단에 의해서 이들 약품이나 대사물질을 측정할 필요성을 느끼게 되었다. Steroid는 구조적으로 유사한 유기 분자의 군으로 이루어져 있으며 간단하고 입체화학적으로 복잡한 탄화수소 구조로 되어 있다. 그리고 생물학적이거나 임상학적으로 중요함에도 불구하고 steroid가 imprinting의 물질로서 사용되어온 예가 그렇게 많지 않다[17-18].

따라서 본 연구에서는 기존의 특이성이나 민감성을 유지하고, 또한 간단하고 값싼 장치로 감지기를 개발하기 위한 연구의 기초적인 작업으로서 특정 steroid, 즉 testosterone를 선택적으로 인식할 수 있는 MIP를 제조하여 그 특성을 조사하였다. 이를 위해서 testosterone-methacrylate를 이용한 공유결합과 비공유결합 방법에 의해서 MIP를 제조하여 testosterone의 선택정도에 대해서 살펴보았다. 또한 Imprinting 정도를 알아보기 위해서 동일한 조건에서 주형(표적)을 포함하지 않은 고분자인 nonimprinting 고분자를 함께 제조하여 testosterone에 대한 선택성 정도를 비교 검토하였다. 아울러 testosterone의 선택적 분리를 알아보기 위해서 구조가 유사한 steroids에 대한 용량 인자를 조사해 보았다.

2. 실험

2-1. 시약

본 연구에서 사용된 시약은 다음과 같다. Methacrylic acid(MAA), ethylene glycol dimethacrylate(EGDMA) 그리고 2,2'-Azobis(2,4-dimethyl-valeronitrile)(ABDV)은 WAKO(Japan)로부터 구입하여 사용하였고, testosterone, β -estradiol, progesterone, testosterone propionate 그리고 estrone 등은 Tokyo KASEI(Japan)로부터 구입하여 사용하였다. 모든 용매는 분석용이나 HPLC 급을 구입, 정제[19]하여 사용하였다.

2-2. 기기

HPLC 분석은 Gilson system(France)으로 수행하였다 이 system은 805 manometric module, 305, 306 HPLC pump 그리고 118 uv/vis detector로 구성되어 있다. UV spectra는 DU 7400 Beckman spectrophotometer(USA)를 사용하였고, 광합성 고분자 합성을 위한 UV-light lamp(365 nm)는 EN-160 L/J Electronic Corp. Westburg(USA)를 사용하였다. NMR spectra는 JEOL JNM-A500 spectrometer를 사용하였다.

2-3. Testosterone methacrylate의 제조

Testosterone(3.16 g, 10.9 mmol), methacryloyl chloride(4.00 mL, 40.9 mmol) 그리고 triethylamine(10 mL, 82 mmol)을 dry(molecular sieves) CHCl_3 (100 mL)에 용해시킨 다음 질소공급하에 22 °에서 18시간 동안 교반시킨다. 그 다음 이 용액을 묶은 HCl (50 mL), 1 M NaHCO_3 (50 mL)로 씻고, NaCl (50 mL)용액으로 포화시킨 다음 무수 MgSO_4 에서 건조시킨다. 용매는 증발시키고 원하는 물질이 포함된 부분만 모은다. Ester는 물을 첨가함으로써 메탄올로부터 침전되고 재결정한 다음 차가운 메탄올로 씻어 내었다. 생산량은 1.37 g이고 수율은 35 %이다[20].

2-4. Imprinting 고분자의 제조

Imprinting 고분자들은 다음 방법에 의해서 준비하였다. 비공유결합 고분자는 주형 단위체로서 testosterone(1 mmol)을 사용하였고, 기능성 단분자와 가교제는 methacrylic acid(MAA) 8 mmol과 ethylene glycol

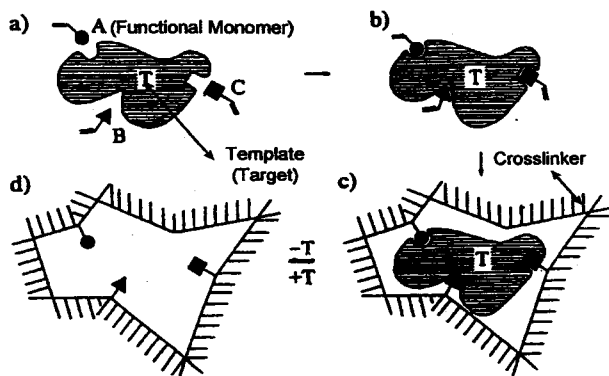


Fig. 1. Schematic representation of the imprinting of specific cavities in a cross-linked polymer by a template(T) with three different binding group[1].

dimethacrylate(EGDMA) 5 ml를 각각 사용하였다. 중합은 50 ml의 플라스크 속에 7.5 ml의 CHCl_3 혹은 THF 각각의 용매(porogen)에 1 mmol의 주형과 8 mmol의 기능성 단분자를 완전히 섞은 다음, 5 ml의 가교제(crosslinking agent)와 50 mg의 개시제(initiator) ABDV를 첨가한 후 이 혼합물에 10분 동안 질소를 불어 넣고 입구를 완전히 막은 후 40 °C와 60 °C의 oven에서 약 16시간 동안 반응시킴으로서 이루어졌다. 만들어진 고분자는 25-45 μm 크기로 작게 분쇄한 후 60 °C에서 24시간 동안 에탄올로 씻어 주형인 testosterone을 제거하였다. 이 과정은 testosterone이 에탄올 세척 용액으로부터 완전히 제거되어 더 이상 UV-spectrophotometer(파장 238 nm)에서 측정되지 않을 때까지 반복하였다. 최종적으로 이들 고분자는 37 °C vacuum oven에서 16시간 동안 건조하였다.

공유결합 고분자는 주형으로 testosterone methacrylate를 사용하여 위와 유사한 방법으로 준비하였다. 결합자리를 형성하기 위해서 testosterone methacrylate 가수분해는 methanolic 1 M NaOH(MeOH:H₂O, 1:1)로 순환시켜 수행하였고, acetic acid나 MeOH:HCl(10:1)로 고분자를 재양성자 첨가시켰다.

Imprinting 고분자의 인식정도를 비교하기 위해서 만들어진, imprinting 하지 않은 고분자인 기준 고분자(reference polymer)는 주형으로 사용된 testosterone을 고분자 중합시 첨가하지 않고 다른 성분은 모두 동일한 조건으로 하여 준비하였다.

2-5. HPLC 측정

25-45 μm 크기의 고분자 입자를 용매 메탄올 속에 넣고, LC 펌프를 사용하여 유속 3.0 ml/min의 속도로 stainless steel column(100×4.6 mm)속에서 슬러리 충전시켰다. 입자를 HPLC column에 충전시키기 전에 입자를 5분간 교반한 후 30분간 침전시켜 상등액의 미세입자를 제거시켰다. 그다음 고분자를 슬러리 충전시켜 준비한 column을 안정한 바탕선이 얻어질 때까지 acetonitrile로 씻어내었다. 샘플 주입량은 0.2 mmol 농도로 준비된 각 steroid 용액 10 μl 이었으며 측정 파장은 225 nm, 이동상은 acetonitrile를 사용하였고 속도는 2.0 ml/min 그리고 column의 정지상에 대한 머무름 시간을 측정하기 위한 공극 표시물(void marker)로서는 acetone를 사용하였다. 용질의 이동 속도와 관계되는 용량인자(k')는 $(t - t_0)/t_0$, 분리 정도를 나타내는 상대적 머무름비인 분리인자(α)는 $(t_2 - t_1)/(t_1 - t_0)$ 로 각각 계산하였다. 용량인자는 시료의 머무름 시간을 좌우하며 시료의 k' 값이 클 경우 정지상에 대한 분배가 크므로 늦게 용리된다. 그리고 분리인자는 관의 분리 능력과 관계가 되며, 이는 분리인자의 상대적 크기에 따라 달라진다. 여기서 t_1 , t_2 는 각 샘플 성분의 체류시간이고 t_0 는 공극 표시물의 체류시간이다. 실제적으로 혼합용액에 대한 고분자의 분리 능력 측정은 resolution으로 하였으며 이는 $2(t_2 - t_1)/(w_2 + w_1)$ 로 계산하였다[21]. 여기서 w 는 바탕선에서 peak 폭에 해당된다.

3. 결과 및 고찰

3-1. Covalent imprinting method에 의한 MIP 제조

Covalent imprinting 방법은 고분자화 할 수 있는 기(group)와 짝이 된 주형 분자와 기능성 분자를 중합함으로써 이루어진다. 중합하여 고분자를 만든 후 결합자리를 만들기 위해서 고분자로부터 주형을 분리시킨다. 이때 주형이 고분자의 다공성으로부터 적은 비율로 제거되어 있다는 단점이 있는 반면에 인식할 수 있는 자리수는 증가시킬 수 있는 장점이 있다[6].

본 연구에서는 testosterone을 인식할 수 있는 결합자리를 미리 확보하기 위해 제조한 testosterone methacrylate(TMA)와 MAA를 과량의 EGDMA 상태에서 중합하였다. TMA 1 mol 분자에 대해 3-keto group에 결합하는 MAA의 분자는 4 mol이 요구되어 지고 가수분해에 의해서 나타나는 carboxylate는 17-hydroxyl 기능에 대해 잘 배열된 결합기를 형성하게 된다. 이에 따라 형성된 고분자의 종류와 용량인자 그리고 분리인자에 대한 값을 Table 1에 나타내었다. Table 1에 나타난 고분자는 TMA와 MAA의 결합 비율을 1:4로 하였으며 합성된 고분자에서 주형을 제거하기 위해 사용된 세척용매(washing solvent)에 대한 영향을 살펴보았다. 그리고 imprinting 제조에 있어서 주형에 대한 선택성에 중요한 영향을 미치는 것으로 합성시 주형과 기능성 단분자를 녹이는 용매(porogen)가 있으며, 이 porogen는 주형과 기능성 단분자 그리고 가교제와의 결합을 용이하게 하는 역할도 한다. 따라서 Table 1에 용매(porogen)에 대한 영향을 나타내었으며 여기서 고분자 PCA는 고분자 합성시 사용된 용매(porogen)가 CHCl_3 이고 고분자 PCB는 THF 용매를 사용하였다.

합성된 고분자 PCA-1은 세척 용매로서 EtOH를 사용하여 주형을 제거하려고 시도하였다. 그러나 EtOH를 사용하여 얻어진 고분자를 이용하여 testosterone 및 샘플 steroid에 대한 용량 테스트를 실시해 본 결과 testosterone에 대해서 선택성이 나타나지 않았고, 체류시간도 짧았으며 분리인자도 낮게 나타났다. 특히 β -estradiol의 용량인자 값이 testosterone 보다 높게 나타난 것을 볼 수 있었다. 이는 고분자 내에 공유결합된 TMA 분자내의 C-17 위치를 EtOH를 사용하여 분리할 수 없어 고분자내의 주형이 제거되지 않았기 때문으로 사료된다. 고분자합성시 고분자에 imprinting 되지 않은 주형, 즉 testosterone은 EtOH 용매속으로 씻어져 나왔으며 이는 UV spectroscopy로 확인하여 알 수 있었다. 여기서 분리인자(α)는 testosterone의 용량인자(k'_{imp})값을 각 샘플 steroid(β -estradiol, progesterone, testosterone propionate and estrone)의 용량인자값으로 나눈 값이다. 따라서 testosterone에 대한 값은 항상 1의 값을 나타내고 있다.

그래서 고분자내에 imprinting 되어 있는 TMA분자를 가수분해시켜 주형인 testosterone을 제거하기 위해서 1 M NaOH 용액속에서 일정시간 환류시켜 주형을 제거시켜 보았다. 이에 대한 결과를 Table 1

Table 1. Selectivity data obtained using the testosterone-methacrylate imprinted polymer prepared by covalent bonding

Polymer	Washing solvent	K'_{imp} steroids					α_{imp} steroids				
		I	II	III	IV	V	II	III	IV	V	
PCA-1	Ethanol	0.795	0.994	0.398	0.464	0.464	0.800	2.00	1.71	1.71	
PCA-2	NaOH, 6 h	1.33	14.32	0.331	0.398	5.77	0.093	4.00	3.33	0.230	
PCA-3	Acetic-acid	1.26	1.26	0.398	0.597	0.530	1	3.17	2.11	2.38	
PCA-4	HCl	1.26	1.26	0.398	0.530	0.530	1	3.17	2.38	2.38	
PCB-2	NaOH, 6 h	1.26	16.84	0.331	0.398	7.16	0.075	3.81	3.17	0.176	
PCB-4	HCl	0.928	0.994	0.266	0.398	0.331	0.93	3.49	2.33	2.80	

PCA and PCB used CHCl_3 and THF as a porogen respectively.

PCA-1, 2, 3, 4 and PCB-1, 2 are a difference of washing solvent.

Steroid I; Testosterone, II; β -Estradiol, III; Testosterone-Propionate, IV; Progesterone, V; Estrone.

Table 2. Effect of hydrolyzed time on the capacity factor of the PCA polymer

Hydrolyzed time (hr)	K'_{imp} steroids					α_{imp} steroids				
	I	II	III	IV	V	II	III	IV	V	
1	1.13	1.19	0.398	0.530	0.464	0.945	2.834	2.13	2.43	
6	1.26	1.26	0.398	0.530	0.530	1	3.17	2.38	2.38	
12	1.06	1.06	0.398	0.530	0.464	1	2.67	2.00	2.29	

Steroid I; Testosterone, II; β -Estradiol, III; Testosterone-Propionate, IV; Progesterone, V; Esterone.

의 PCA-2에 나타내었다. 이 결과를 볼 때 testosterone의 용량인자 값에 대해 β -estradiol의 용량인자는 11배 estrone의 경우는 4배로 상당히 높게 나타남을 알 수 있었다. 이는 TMA분자를 1 M NaOH 용액으로 가수분해시키므로 TMA의 C-17 위치의 hydroxyl 부분이 deproton화되어 C-3위치에 OH 기를 가지고 있는 β -estradiol이나 estrone의 용량인자가 상당히 높게 나타남을 알 수 있었다.

따라서 이 PCA-2에 양성자를 재첨가시키기 위해서 약산인 acetic acid(PCA-3)와 강산인 HCl(PCA-4) 용액에 각각 처리하여 보았다. 그 결과 acetic acid와 HCl의 용량인자 값에 미치는 영향은 나타나지 않았다. 그렇지만 PCA-2의 용량인자 값에 비해서 PCA-3나 PCA-4의 용량인자값을 비교해 볼때 testosterone의 경우는 1배 정도의 차이로 비슷하게 나타나고 있으나 β -estradiol이나 estrone의 경우는 11배 정도 차이로 상당히 낮게 떨어졌으며 그외 testosterone-propionate나 progesterone의 값은 크게 변화하지 않았다. 궁극적으로 β -estradiol을 제외한 다른 성분들에 대한 testosterone의 선택성은 2.38배 내지는 3.17배까지 나타남을 알 수 있었다.

특히 여기서 상당한 반응성을 보이고 있는 β -estradiol을 testosterone과 동일한 방법으로 imprinting하려고 시도하였으나 CHCl_3 에는 β -estradiol이 용해되지 않아 imprinting을 할 수가 없었으며, 극성 용매에는 용해되었으나 고분자 제조후 β -estradiol에 대한 선택성이 전혀 나타나지 않았다. 따라서 β -estradiol을 분리할 수 있는 imprinting 고분자를 만들 수가 없었다. 그렇지만 testosterone-methacrylate를 imprinting하여 NaOH로 가수분해시킬 경우 β -estradiol에 상당히 높은 선택성이 나타남을 볼 수 있었다(Table 1의 PCA-2). 그리고 THF porogen을 사용했을 때도 CHCl_3 과 같은 결과가 나타남을 관찰할 수 있었다(Table 1의 PCB-2). 따라서 주형을 NaOH로 씻어내면 β -estradiol에 선택성 있는 고분자를 만들 수 있었다.

3-1-1. TMA 분자의 가수분해에 따른 영향

고분자내에 imprinting 되어 있는 TMA 분자를 제거시키기 위해 1 M NaOH로 가수분해하였다. 문헌[16, 17]에서 NaOH를 사용하여 가수분해시킬 경우 가교제로 사용된 EGDMA 분자가 분해되어 고분자가 팽윤될 수 있다고 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 TMA를 제거시키기 위한 가수분해 정도에 따른 영향이 있다고 보고 이의 제거 상태와 그에 따른 용량인자와 분리인자에 대한 영향을 Table 2에 나타내었다. 고분자 PCA-1을 각각 1 M NaOH로 시간에 따라 환류시킨후 HCl 용액속에서 2시간 동안 처리하여 HPLC column에 충

진하여 용량인자와 분리인자 값을 측정하였다. Table 2에서 볼 수 있듯이 가수분해 시간에 따라서 용량인자가 다르게 나타나는 것을 볼 수 있었다. 1시간 정도 NaOH용액에서 환류시켰을 때 β -estradiol의 용량인자 값이 testosterone 보다 높게 나타나고 있다. 이는 주형인 testosterone이 완전히 제거되지 않았기 때문으로 사료된다. 따라서 가수분해 시간을 증가시켜 용량인자를 관찰하여 보았다. 가수분해 정도를 증가시킴으로서 제거되어 나오는 주형의 양이 증가됨을 UV spectroscopy로 확인하여 알 수 있었다. 그리고 β -estradiol의 값이 testosterone 보다 높지 않고 같게 나타남을 알 수 있었다. 또한 너무 오랜시간(12시간) 가수분해시킬 경우 용량인자의 값이 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 이는 가수분해시 고분자의 가교제를 분해시켜 imprinting 정도를 떨어뜨린 것으로 사료된다[17].

3-1-2. HPLC의 이동상에 따른 영향

HPLC의 이동상(mobile phase) 용매는 측정하고자 하는 샘플 용액과의 결합정도와 column의 충전물 사이의 반응정도에 따라서 체류 시간에 영향을 미치므로[21] 이에 따른 영향을 살펴 보았다. Table 1의 PCA-4 고분자를 이용하여 HPLC의 분리상 용매를 바꾸어 보았다. Table 1의 PCA-4의 고분자는 분리상의 용매로 acetonitrile을 사용하여 용량인자와 분리인자 값을 얻었다. 본 연구에서 분리상으로는 극성이지만 testosterone에 대한 용해도가 뛰어난 에탄올을 사용하여 보았고, 기존의 acetonitrile에 수소결합이 뛰어난 H_2O 를 5%, 20%를 각각 첨가하여 사용하였다. 그 결과를 Table 3에 나타내었다. Table 3에서 볼 수 있듯이 분리상 용매로서 에탄올을 사용하는 경우 testosterone, β -estradiol 그리고 testosterone-progesterone의 용량인자 값은 같게 나타나며 progesterone과 esterone의 값이 같게 나타났다. Table 1의 PCA-4의 용량인자와 비교했을 때 전자의 steroid인 경우 선택성은 떨어지고 후자의 steroid경우가 증가한 것을 볼 수 있었다. 이는 에탄올이 극성이므로 imprinting 효과는 거의 없으며 각각의 steroid와 에탄올에 대한 친화력 정도가 충전물의 경우보다 높아서 샘플이 충전고분자에 반응하지 않고 column을 통해서 나오기 때문에 선택성이 떨어지는 것으로 사료된다. H_2O 에 대한 영향도 유사한 것으로 H_2O 를 증가할수록 용량인자는 떨어지며 궁극적으로 전혀 선택성이 없어 더 이상의 효과를 찾아볼 수 없었다.

3-2. Noncovalent imprinting method에 의한 MIP의 제조

3-2-1. 고분자의 준비

Table 3. Effect of mobile phase on the capacity factor of the PCA polymer

Mobile phase	K'_{imp} steroids					α_{imp} steroids				
	I	II	III	IV	V	II	III	IV	V	
Ethanol	0.076	0.076	0.076	0.763	0.763	1	1	0.093	0.093	
MeCN+5 % H_2O	0.382	0.763	0.076	0.152	0.382	0.501	5.03	2.51	1	
MeCN+20 % H_2O	0.152	0.305	0	0.076	0.152	0.498	0	2	1	

Steroid I; Testosterone, II; β -Estradiol, III; Testosterone-Propionate, IV; Progesterone, V; Esterone.

Table 4. Polymerization conditions for non-covalent imprinted polymers

Polymer	Imprint molecule	Porogen(ml)	Initiation temp.	Initiator, ABDV
P1	Testosterone	CHCl ₃ 7.5 ml	40 °C	50 mg
NP1	None	CHCl ₃ 7.5 ml	40 °C	50 mg
P2	Testosterone	THF 7.5 ml	40 °C	50 mg
NP2	None	THF 7.5 ml	40 °C	50 mg
P3	Estrone	THF 11.5 ml	40 °C	100 mg
P4	Estrone	THF 11.5 ml	60 °C	50 mg
NP4	None	THF 11.5 ml	60 °C	50 mg

본 연구에서는 생물학적 조직의 상호작용을 지배하는 수소결합 및 이온결합 등에 기초해서 bulk 상태에서 주형을 결합시키기 위한 방법인 noncovalent imprinting technique에 대해서 살펴보았다. Non-covalent imprinting의 경우는 covalent imprinting의 경우에 비해서 주형을 제거한 후 결합자리를 형성할 수 있는 비율이 적다는 단점이 있는 반면에 간단하게 imprinting을 할 수 있고 imprinting 후 주형을 쉽게 제거할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서 noncovalent method에 의해 준비된 고분자를 Table 4에 나타내었다.

Table 4의 고분자 P는 imprinting 고분자를 나타내고 NP은 주형없이 고분자를 합성시킨 nonimprinting 고분자이며 기준 고분자이기도 하다. P1 고분자와 P2 고분자의 경우는 용매(porogen)의 영향을 살펴보기 위해 다른 조건은 동일한 상태로 하고 용매만 다르게 하여 선택성을 살펴 보았다. P3 고분자는 주형인 estrone이 CHCl₃ 용매에 대한 용해도가 낮아 사용을 할 수가 없었다. 따라서 THF 용매에 녹여 고분자를 합성하여 사용한 경우이다. 이때 40 °C에서 개시제 (initiator) 50 mg을 사용할 경우 고분자가 형성되지 않아 용액상태로 존재하였다. 따라서 본 연구에서는 반응정도를 증가시키기 위해서 온도를 60 °C로 높이거나 개시제를 100 mg으로 증가시켜 보았으며 이 경우에 고분자가 형성됨을 관찰할 수 있었다.

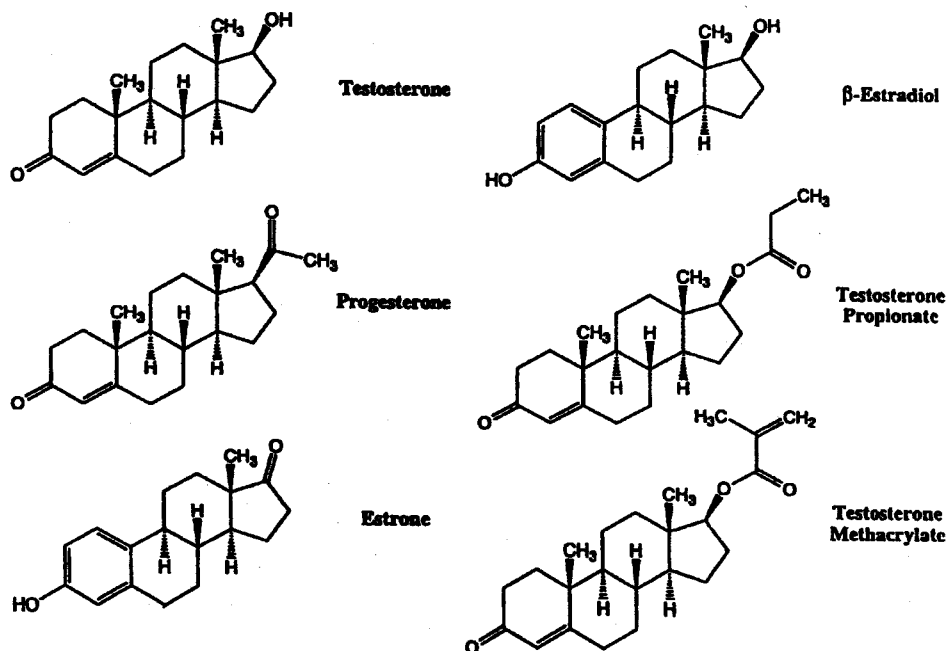
3-2-2. 고분자의 선택성

고분자의 선택성을 검토하기 위해서 covalent interaction과 같이 HPLC column에 고분자를 충전하고 샘플용액을 주입하여 그에 따른 용량인자와 분리인자를 구하여 Table 5에 나타내었다. 여기에서 P1과 P2는 고분자 합성시 사용되는 용매(porogen)만 다르고 다른 조건은 모두 동일한 상태이다. Porogen은 합성된 고분자의 특성을 결정하는데 중요한 역할을 하며 특히 극성 용매는 극성 분자를 용해하기 때문에 주형과 기능성 단분자 사이에 일어나는 수소 결합을 파괴시킬 수도 있다. CHCl₃를 사용한 P1 고분자와 THF를 사용한 P2 고

Table 5. Selectivity data obtained using the imprinted and nonimprinted polymer prepared by noncovalent bonding

Polymer	K' _{imp} steroids					α _{imp} steroids			
	I	II	III	IV	V	II	III	IV	V
P1	5.10	1.52	0.579	0.795	0.530	3.35	8.55	6.42	9.63
NP1	1.26	1.19	0.464	0.597	0.464	1.06	2.72	2.11	2.72
P2	1.99	1.06	0.530	0.729	0.331	1.87	3.75	2.73	6.01
NP2	1.46	0.994	0.464	0.663	0.331	1.47	3.14	2.20	4.41
P3	1.46	1.13	0.398	0.597	0.331	1.29	3.67	2.44	4.41
P4	1.06	0.795	0.398	0.530	0.331	1.34	2.67	2.00	3.21
NP4	1.06	0.795	0.398	0.530	0.331	1.34	2.67	2.00	3.21

Steroid I; Testosterone, II; β-Estradiol, III; Testosterone-Propionate, IV; Progesterone, V; Estrone.

**Fig. 2. Steroids used in these studies.**

분자 둘다 주형인 testosterone에 대한 선택성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 P1의 경우가 P2의 경우보다 용량인자가 testosterone에 대해서 약 2.56배 높게 나타나고 분리인자는 각 샘플에 대해서 1.6-2.4배 높게 나타났다. 이는 CHCl_3 과 THF의 물리적 특성을 살펴봄으로서 알 수 있다[12]. 두 용매의 polar term은 각각 3.1, 5.7이고 hydrogen bonding term은 5.7, 8.0 그리고 용해도 매개변수의 값은 19.0과 19.4로 비슷하다. 그러나 주개(donor)와 받개(acceptor) 사이의 수소결합 능력의 값이 CHCl_3 은 P(poor)이고 THF은 M(moderate)으로서 다소 차이가 나고 있으며 polar term도 다소 차이가 나고 있다. 따라서 porogen의 polar term과 수소결합능력이 약한 CHCl_3 의 경우가 THF보다 주형에 대한 imprinting 성능이 높게 나타남을 알 수 있었다.

주형만 첨가하지 않고 다른 조건은 모두 동일하게 하여 만든 고분자 NP1과 NP2를 비교해 볼 때 앞의 경우와는 다르게 testosterone의 경우 THF의 용량인자가 조금 높게 나타났고 나머지 steroids의 값은 비슷하게 나타났다. 이는 기존의 용매가 가지는 물리적 특성중 수소결합정도가 크기 때문으로 사료된다. 그리고 P1과 NP1의 imprinting 효과가 CHCl_3 의 경우 4.05이고 P2와 NP2인 THF의 경우 1.36으로 약 3배의 용량인자 차이가 남을 알 수 있었다.

P3와 P4의 경우 estrone을 주형으로 하여 고분자를 합성해 보았으나 nonimprinting 고분자인 NP2와 NP4의 경우와 용량인자가 동일하게 나타나 imprinting이 되지 않았음을 알 수 있다. 이 경우에는 기능성 단분자와 주형 사이의 결합이 잘 이루어지지 않은 것으로 사료된다. 온도가 40 °C에서 이루어진 P3와 60 °C에서 이루어진 P4의 경우

를 비교해 볼 때 P3의 고분자가 testosterone 샘플에 대해서 약 38% 높게 나타남을 볼 수 있다. 이는 imprinting이 되지 않은 경우에도 온도가 낮을수록 기능성 단분자와 주형의 결합이 안정하게 이루어져 선택성이 높아짐을 알 수 있었다[10].

3-2-3. Steroids구조에 따른 Imprinting의 영향

각 steroid의 구조를 조사해 봄으로써 이들이 imprinting 고분자에 어떻게 결합하고 있는지를 알 수가 있다. 이들의 분자 구조는 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 단지 testosterone과 β -estradiol만이 C-17위치에 OH-group을 가지고 있다. 이것이 steroid-고분자 상호작용에서 기능성분자와의 지배적인 역할을 이끌어 낼 수 있다. 다시 말해서 testosterone과 β -estradiol의 C-17위치에 있는 OH-group과 기능성 분자인 MAA의 carboxyl group 사이에 형성되는 수소결합으로 인해 C-17위치에 OH-group이 없는 다른 steroids 보다 retention time이 길어진다. 그 다음 영향으로는 A-ring의 차이에 기인한다고 볼 수 있다. Testosterone은 C-3 위치의 carboxyl group과 MAA의 분자 사이에 제2의 수소결합이 형성될 수 있다는 것이고 반면에 β -estradiol은 C-3의 OH와 MAA사이의 결합이 형성될 수 없었거나 혹은 상호 작용이 매우 약하다는 것이다. 따라서 이것은 two-point 결합과 one-point 결합의 차이라고 볼 수 있다. 또한 구조적인 면에서도 testosterone은 chair형이고 β -estradiol은 평면형으로 약간의 차이가 있는 것 때문으로 사료된다. Testosterone에 대한 각 샘플의 분리정도를 Fig. 3에 나타내었으며 여기에서 볼 수 있듯이 β -estradiol만 제외하고 testosterone에 대해서 완전 분리가 이루어 짐을 볼 수 있었다. 이는 유사한 기능성 분자를 가지더라도 imprinting 고분자와 기능성 분자 사이의 정확한 배열이 이루어지지 않으면 선택성이 높게 나타나지 않는다는 것을 입증해 주는 것이다.

4. 결 론

본 연구의 결론을 요약하면 다음과 같다. 우선 공유결합에 의해 이루어진 imprinting 고분자는 비공유결합에 의해 이루어진 고분자에 비해 선택성이 떨어짐을 확인할 수 있었다. 그리고 공유결합으로 이루어진 imprinting 고분자의 경우 가수분해 정도에 따라서 imprinting의 효과가 달라짐을 알 수 있었고, β -estradiol을 제외한 다른 샘플 성분들에 대해서 testosterone의 분리능력이 2.38배 내지는 3.17까지 나타남을 알 수 있었다. 특히 가수분해시 deproton화 되어 imprinting 고분자에 대한 β -estradiol의 결합이 강하게 이루어짐이 HPLC의 체류시간으로 확인할 수 있었다. 수소결합 등을 이용한 비공유결합으로 이루어진 testosterone imprinting 고분자는 nonimprinting 고분자에 비해 4.05배의 높은 선택성을 보이고 있으며 유사한 steroids 분자에 대한 분리능력도 3.3-9.6배이었고 testosterone과 다른 steroid 혼합물을 분리할 때 바탕선 분리가 이루어 짐을 볼 수가 있었다(Resolution; 0.8-1.3). 다른 porogen인 THF의 경우도 testosterone에 분리 가능하나 imprinting 정도가 떨어지는 것으로 나타났다. 낮은 온도 범위에서 이루어진 imprinting 고분자의 경우가 체류시간이 높게 나타남을 알 수 있었다. 이와같이 Molecular Imprinting Technique은 분리 및 인공 효소, 그리고 생감지기 등에 많이 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서 개발된 선택성이 높은 imprinting 고분자를 이용하면 기존의 specificity와 감도를 유지하면서도 더 안정하고 간단한 장치로 감지기를 만들 수 있을 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 일본 학술진흥재단의 연구비 지원으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

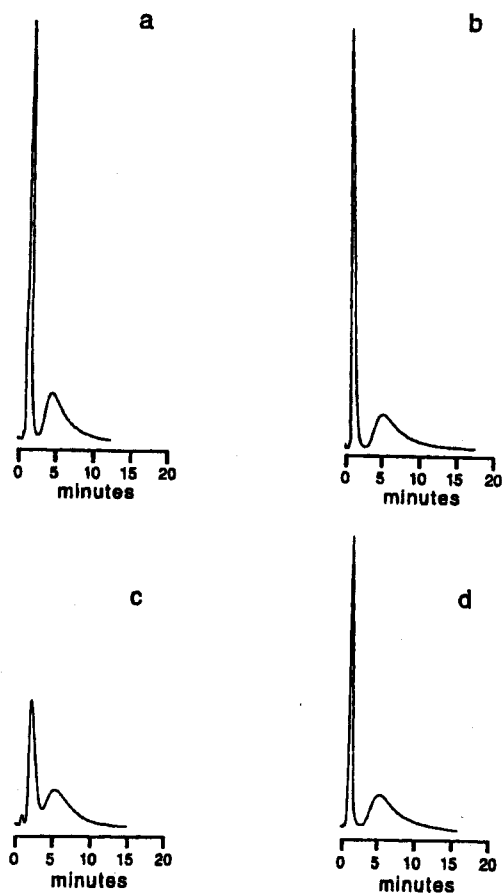


Fig. 3. Chromatograms obtained using non-covalent imprinting polymer P1. Mixtures of testosterone and (a) progesterone, $R_s=1.16$; (b) testosterone propionate, $R_s=1.26$; (c) β -estradiol, $R_s=0.80$ and (d) estrone, $R_s=1.30$.

참고문헌

1. Wulff G.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 1812(1995).
2. Wulf, G.: *Trends Biotech.*, **11**, 85(1993).
3. Mosbach, K.: *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 9(1994).
4. Shea, K.: *J. Trends Polym. Sci.*, **2**, 166(1994).
5. Nicholls, I. A., Andersson, L. I., Mosbach, K. and Ekberg, B.: *Trends Biotechnol.*, **13**, 47(1995).
6. Wulff, G. and Schauhoff, S.: *J. Org. Chem.*, **56**, 395(1991).
7. Shea, K. J., Sasaki, D. Y. and Stoddard, G. J.: *Macromolecules*, **22**, 1722(1989).
8. Shea, K. J. and Sasaki, D. Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3442(1989).
9. Shea, K. J. and Dougherty, T. K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 1091(1986).
10. Sellergren, B.: *Makromol. Chem.*, **190**, 2703(1989).
11. Matsui, J., Kato, T., Takeuchi, T., Suzuki, M., Yokoyama, K., Tamiya, E. and Karube, I.: *Anal. Chem.*, **65**, 2223(1993).
12. Sellergren, B. and Shea, K. J.: *J. Chromatogr. A*, **654**, 17(1993).
13. Kemp, M. and Mosbach, K.: *J. Chromatogr. A*, **664**, 276(1994).
14. Vlatakis, G., Andersson, L. I., Muller, R. and Mosbach K.: *Nature*, **361**, 645(1993).
15. Kemp, M. and Mosbach, K.: *J. Chromatogr. A*, **691**, 317(1995).
16. Sarhan, A. and Wulff, G.: *Makromol. Chem.*, **183**, 1603(1982).
17. Bystrom, S. E., Borje, A. and Akermark, B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2081(1993).
18. Whitcombe, M. J., Rodrigues, M. E., Villar, P. and Vulfson, E. N.: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7105(1995).
19. Sellergren, B. and Shea, K. J.: *J. Chromatogr.*, **635**, 31(1993).
20. Cheong, S. H., McNiven, S., Rachkov, A. E., Levi, R., Yano K. and Karube, I.: *Macromolecules*, (accepted, 1997).
21. Snyder, L. R. and Kirkland, J. J.: "Introduction to Modern Liquid Chromatography", Wiley Interscience, New York, 1974.