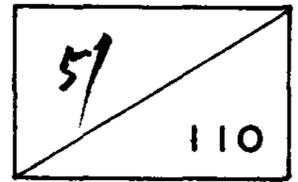


제 1 차 년 도
연 차 보 고 서



호르몬 분석을 이용한 질병의 진단에 관한 연구

A Study on the Hormonal Analysis as a Diagnostic Tool

연구기관
한국과학기술연구원

寄附
과 학 기 술 처
6

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 "호르몬분석을 이용한 질병의 진단에 관한 연구(1차)"
사업의 연차보고서로 제출합니다.

1990년 7월

연구 기관 : 한국과학기술연구원
연구책임자 : 박중세(책임연구원)
참여연구원 : 정봉철(선임연구원)
노동석(선임연구원)
김태욱(연구원)
엄기동(")
강혜경(")
장현경(")

여 백

요 약 문

I. 제 목

호르몬 분석을 이용한 질병의 진단에 관한 연구

II. 연구의 목표 및 중요성

새로운 질병진단법의 개발이 꾸준히 요구되는 현시점에서 초정밀 분석기기를 활용한 질병의 진단은 미흡한 점이 많다. 그러므로, 인체내에 실제 대사과정을 통해 생성되는 내인성 호르몬을 조사하는 것은 실제적인 질병의 원인과 그 예방을 치료등에 큰 역할을 할 것이다. 이 기술의 국내 조기정착을 꾀하고 이를 바탕으로 국내 기초의약의 조기발전과 국민보건 증진에 크게 기여하며, 생명공학의 발전에 이바지함을 목표로 함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

체내 내인성호르몬의 분석과 생물학적 시료에 의한 내인성 호르몬 대사과정 조사는 인체의 건강상태를 말해주는 척도가 될수 있어 1960년대말부터 서서히 화학분석기기등에 의해 연구되기 시작했는데 실제 검출하고자 할 물질의 인체내 농도는 극히 적은양이고, 또한 생체시료등에는 많은 간섭물질이 존재하고 있기 때문에 아주 높은

분리능을 맞는 기기에 의한 검출방법과 특별한 시료처리 방법이 필요한 관계로 연구하는데 어려움이 많다.

따라서 본 연구에서는 대사성 질환의 진단에 중요한 역할을 하는 내인성 스테로이드들을 동시에 측정하는 조건을 확립하고, 정상 성인들의 뇨를 사용하여 그 normal range를 설정하여 내분비성 질환 진단에 적용코자 시도하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

본 연구를 위한 기반확립 단계로서 필요 장비의 설치 및 기본기술 습득을 완료하였다. 주로 선천성 부신 질병의 진단에 중요한 역할을 하는 17가지의 내인성 스테로이드들을 질량분석기(GC/MSD)를 사용하여 그 검출한계 및 표준분석 조건을 확립하고, 다양한 화학적 유도체화방법을 이용하여 그 검출한계를 낮추고자 시도하였으며, 이는 한가지 스테로이드의 절대적 농도만을 가지고 판단함으로써 발생 되는 많은 오관의 여지를 감소시키기 위해 원인되는 내인성 전수물질과 그 생성물 및 그 대사산물을 동시에 측정, 비교하였다.

이와같은 호르몬분석을 이용한 구체적인 질병의 진단과정에 적용하는 기술의 확립은, 새로운 중증질환 진단방법을 개발하는데 있어서 중요한 역할을 담당하게 될것으로 사료된다.

Abstract

There are lots of endogenous substances which have critical functions at very low concentrations such as steroid hormones in body. Steroid hormones are synthesized from cholesterol precursor and play an important role to alter the activities of target organs or target cells. During the biosynthetic pathway of steroid hormones, 3β -hydroxydehydrogenase, 21-hydroxylase, 17α -hydroxylase, 17,20-lyase, 18-hydroxylase, cortisol oxidase, 5α -reductase and cortisone reductase enzymes are necessary to convert to the final products of steroid hormones. If body lacks any one of these enzymes, there will be a change of precursor and product steroids concentrations in body, and these physiological changes will lead to some diseases. Therefore, in order to diagnosis these diseases, we tried to attempt to quantitate the steroid hormones from urine.

The wet procedure of extracting steroids from urine consists of an initial isolation of lipophilic compounds on a column packed with XAD-2 resin, followed by enzyme hydrolysis with β -glucuronidase from *Escherichia coli*. After extraction, the hydrolyzed steroids are derivatized to the corresponding trimethylsilyl ethers. We used MSHFB/TMSIM/TMSCl mixture as the derivatizing reagent, and cholesteryl butyrate as an internal standard. The derivatized steroids are analyzed by gas chromatography/mass spectrometry with selected ion monitoring of their characteristic ions.

We set up three groups of sample from normal men, women and children to quantitate the concentrations of the endogenous steroids. The steroid hormones that we tried to quantitate are as follows; androsterone, ethiocholanolone, dehydroepiandrosterone, pregnanediol, pregnendiol, pregnantriol, 16-pregnenetriol, 11β -hydroxyandrosterone, 11β -hydroxyethiocholanolone, 11-keto androsterone, 11-keto ethiocholanolone, tetrahydrocortisol, 5α -tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone, tetrahydro-11-deoxycortisol, tetrahydrocorticosterone, 5α -tetrahydrocorticosterone.

We detected almost no difference of steroid concentrations between men and women. In the group of children, however, the concentrations of lots of steroid hormones were significantly low. Based on the range of the concentrations of each steroid hormones we tried to get the ratio of precursor and product concentrations of steroid hormones for the specific enzymes in the biosynthetic pathway of the steroid hormones.

Contents

Chapter 1. Introduction	11
Chapter 2. Theoretical Background	16
Section 1. Biosynthesis and Metabolism of the Endogeneous Steroids	16
Section 2. Analytical Methodology for the Endogeneous Steroids	25
Chapter 3. Experimentals	28
Section 1. Sample collection	28
Section 2. Apparatus and reagent	28
Section 3. Experimentals	32
Chapter 4. Results & Discussions	36
Section 1. Establishment of sample preparation procedure	36
Section 2. Establishment of derivatization method	37
Section 3. Establishment of calibration curve	61
Section 4. Determination of endogeneous steroids in normal blank urine	61
Section 5. Establishment of important ratio	69
References	92
Appendix	97

여 백

목 차

제1장	서론	11
제2장	이론적 배경	16
제1절	내인성 스테로이드의 생합성과 대사	16
제2절	분석방법	25
제3장	실험	28
제1절	시료	28
제2절	장치 및 시약	28
제3절	실험방법	32
제4장	결과 및 고찰	36
제1절	추출방법의 확립	36
제2절	유도체방법의 설정	37
제3절	검정곡선의 작성	61
제4절	Blank urine내의 내인성 steroid 농도결정	61
제5절	Important ratio의 설정	69
제5장	결론	90
참고문헌		92
부록		97

여 백

제장. 서론

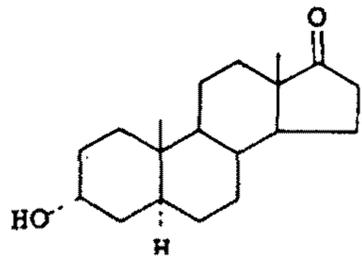
유기분석화학분야는 고성능 화학분석기기의 출현에 힘입어, 현재는 그 활용이 광범위한데 화학, 생물분야는 물론, 기초의학 분야에서도 극미량 분석이 크게 요구되어, 그의 응용범위는 확대되어 가고 있다. 특히 기초의학분야에의 유기분석 활용은, 어떤 화학물질이 인체내에서 어떻게 작용하는지의 여부를 그 대사과정을 통해 밝혀주고, 또한 신물질창출에서 반드시 요구되는 화학물질의 독성과 생리활성 연구에서도 큰 도움을 주고 있다. 최근에는 질병의 진단과정에서도 유기분석의 활용은 증대되어 가고 있다. 체내 내인성호르몬의 분석과 biological 시료에 의한 내인성 호르몬의 대사과정 조사는 인체의 건강상태를 말해주는 척도가 될 수 있어 1960년대 말부터 서서히 화학분석기기등에 의해 연구되기 시작했는데 실제 검출하고자 하는 물질의 인체내 농도는 극히 적은 양이고, 또한 biological sample 등에는 많은 interference가 존재하기 때문에 아주 높은 sensitivity를 갖는 기기에 의한 검출방법과 특별한 시료처리 방법이 필요한 관계로 어려움을 겪다가 최근에 몇몇 보고에 관련된 효소 결핍에 따른 내분비계 환자의 스테로이드 호르몬 level을 monitoring 하는 시도가 있었다. 그러나, 보고된 level은 서양인들의 경우를 기준으로 하여 설정되었고, 또한 기술적인 면에서도 미흡한 점이 있어 본 연구에서는 대사성 질환의 진단에 중요한 역할을 하는 내인성 스테로이드들을 동시에 측정하는 조건을 확립하고, 정상인의 urine들을 사용하여 그

normal range를 설정하여 내분비성질환의 진단에 적용하고자 시도하였다.

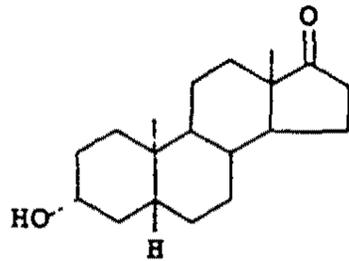
구체적으로 내분비계통의 진단에 중요한 역할을 하는 내인성 스테로이드들을 질량분석기(GC/MSD)를 사용하여 검출 및 표준분석 조건을 확립하고, 다양한 화학적 유도체화 방법을 이용하여 그 검출한계를 낮추고자 시도하였으며, 어느 한가지 스테로이드의 절대적 농도만을 가지고 판단함으로써 발생하는 많은 오판의 여지를 감소시키기 위해, 원인되는 내인성 전구물질과 그 생성물 및 그 대사산물등을 동시에 측정, 비교하였다.

Abbreviation

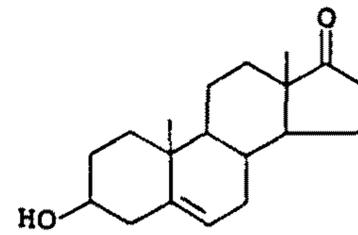
An	Androsterone
Et	Etiocholanolone
DHEA	Dehydroepiandrosterone
PAD	Pregnanediol
PED	Pregnenediol
PAT	Pregnanetriol
16-PET	16-Pregnenetriol
11 β -OH An	11 β -Hydroxyandrosterone
11 β -OH Et	11 β -Hydroxyetiocholanolone
11-K A	11-keto androsterone
11-K E	11-keto etiocholanolone
THF	Tetrahydrocortisol
5 α -THF	5 α -Tetrahydrocortisol
THE	Tetrahydrocortisone
THS	Tetrahydro-11-deoxycortisol
THB	Tetrahydrocorticosterone
5 α -THB	5 α -Tetrahydrocorticosterone



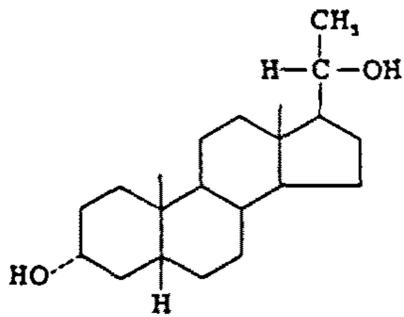
Androsterone



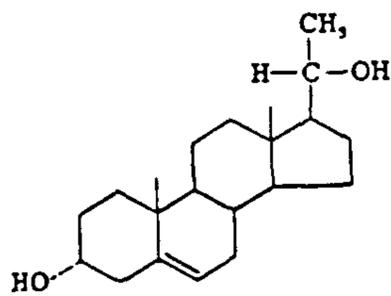
Etiocholanolone



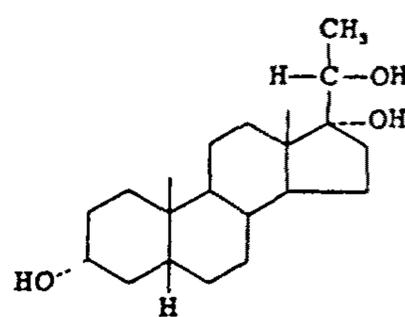
Dehydroepiandrosterone



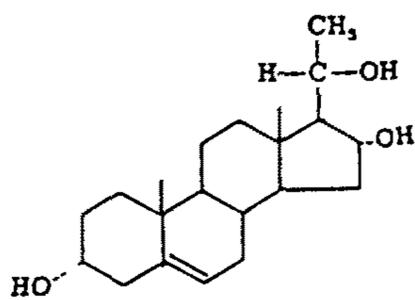
Pregnanediol



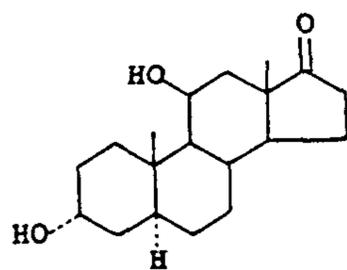
Pregnenediol



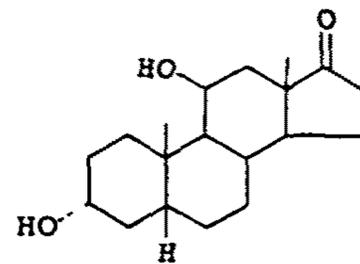
Pregnanetriol



16-Pregnenetriol

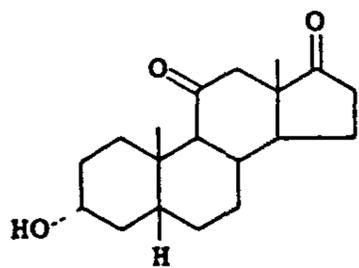


11 β -Hydroxyandrosterone

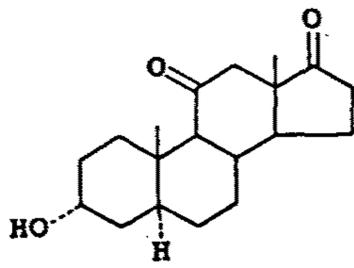


11 β -Hydroxyetiocholanolone

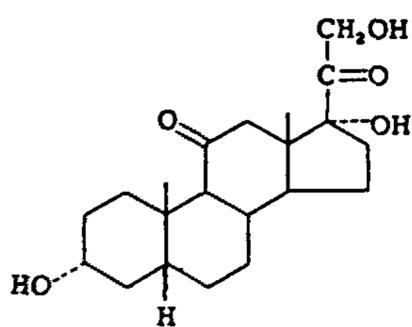
Chemical structure of Steroid hormone.



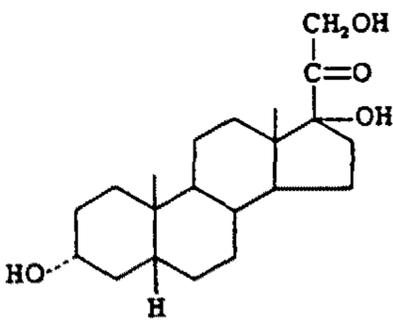
11-Keto-
etiocholanolone



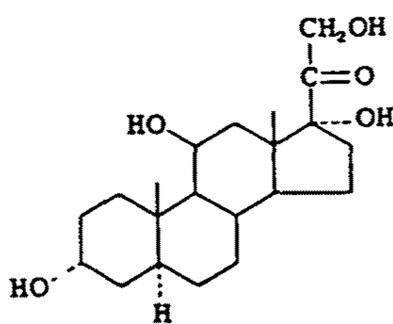
11-Keto-
androsterone



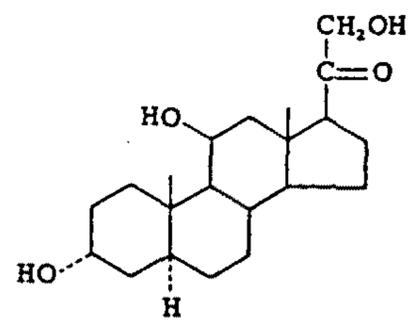
Tetrahydrocortisone



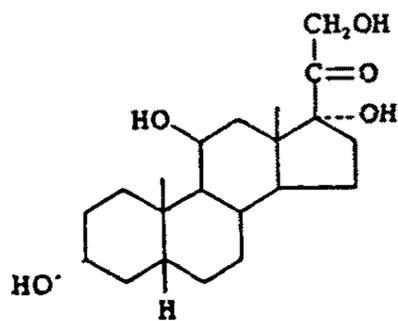
Tetrahydro-11-
deoxycortisol



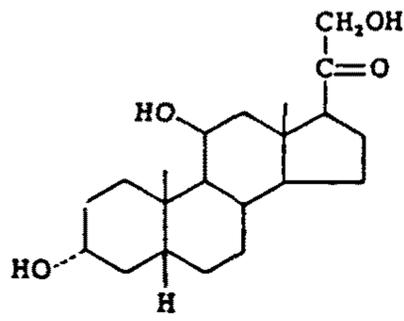
5 α -Tetrahydro-
cortisol



5 α -Tetrahydro-
corticosterone



Tetrahydro-
cortisol



Tetrahydro-
corticosterone

Chemical structure of Steroid hormone.

제2장. 이론적 배경

제1 절. 내인성 Steroid의 생합성과 대사

Hormone이란 특정한 장기 또는 조직에서 생성되는 물질로서 혈액중에 분비되며 생체에 극미량(10^{-7} - 10^{-8})으로 존재하여, 특정장기나 조직의 활동성을 조절하는 유기화합물이다. Hormone은 생성기관에 따라서 여러가지로 분류되고, 화학구조상으로 보면, renin, insulin, ACTH와 같은 단백질 peptide hormone, thyroxine, adrenaline 같은 아미노산 유도체 hormone, 그리고 corticoid나 androgen 같은 steroid hormone으로 나눌 수 있다.(1)

1929년에 Doisy 와 Butenandt(2)에 의해 분리되어진 steroid hormone의 하나인 estrogen을 선두로 하여 1950년에 Simpson이 aldosterone을 생체물질에서 분리한후, 검출하는 방법을 개발했다. 1930년대에 Zimmermann⁽³⁾은 비색법을 이용하여 ketosteroid를 정성분석하였으나, 이 방법은 생체내에서 극미량이 존재하는 hormone을 검출하는 데에는 검출한계도 높고, 정량하는데는 어려움이 많았다. Steroid hormone은 주로 부신으로부터 분비되고 생체에서의 작용에 따라 당질대사에 관여하여 기초대사를 유지하고, glycogen 생성을 촉진하고, 소염 및 항알리지작용을 하는 glucocorticoid, 무기염류의 대사에 관여하여 Na과 K의 양적평형을 유지시켜 주는 mineral corticoid, 단백질동화작용을 촉진하고 제2의 성장발현, 생식기능을 유지하는 androgen, estrogen으로 분류할 수가 있다.

Acetate로부터 시작되어 생합성된 cholesterol은 생물학적으로 중요한 내인성 steroid의 전구물질이다. 이 cholesterol은 desmolase라는 효소에 의해 탄소 21개를 갖는 pregnenolone이 되고, 이것은 3 β -hydroxy dehydrogenase의 작용을 받아 17 α -hydroxy pregnenolone과 progesterone으로 변화하여 점점 경로가 지날수록 17-hydroxylase, 21-hydroxylase, 11 β -hydroxylase, 18-hydroxylase, 17,20-lyase, 5 α -reductase, cortisone reductase 등 효소의 도움으로 최종적으로 glucocorticoid인 corticosteroid, mineral corticoid인 aldosterone, androgen 및 estrogen인 testosterone, estradiol을 생성하게 된다.

이렇듯 내분비계를 조절하는 여러가지 steroid hormone은 효소결핍(enzyme deficiency) 등에 의한 이상이 생기면 생체는 그 어긋남에 의해 질환이 오게 된다.

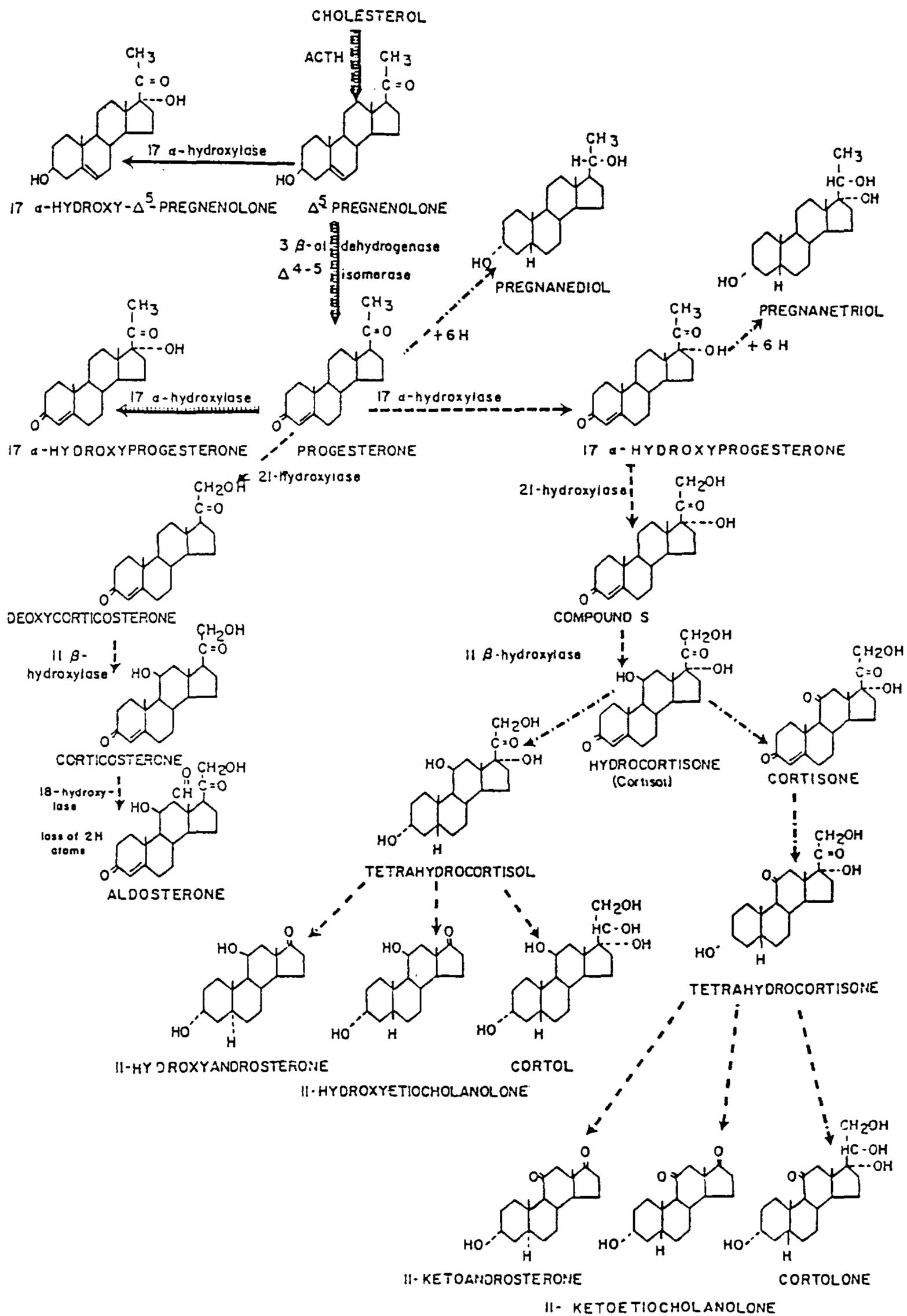
적절한 분비량을 유지해야 할 hormone이 효소의 도움을 받지 못하므로, 그 양이 과량이 되든지, 부족하게 되어 성장에 이상을 나타내거나 신장기능등에 이상이 생긴다.

Scheme 1에서 보듯이 11 β -hydroxylase 효소가 결핍되면 deoxycorticosterone(DOC) 이 그 다음 대사경로로 진행되지 못하기 때문에 DOC의 과량분비에 기인하여 3 β -hydroxy dehydrogenase는 progesterone을 경유하는 모든 glucocorticoid나 mineral corticoid 생합성의 기초대사에 관여하기 때문에, 이 효소가 부족한 경우에는 임상실 증상이 아주 높아 생후 곧 사망하게 된다.

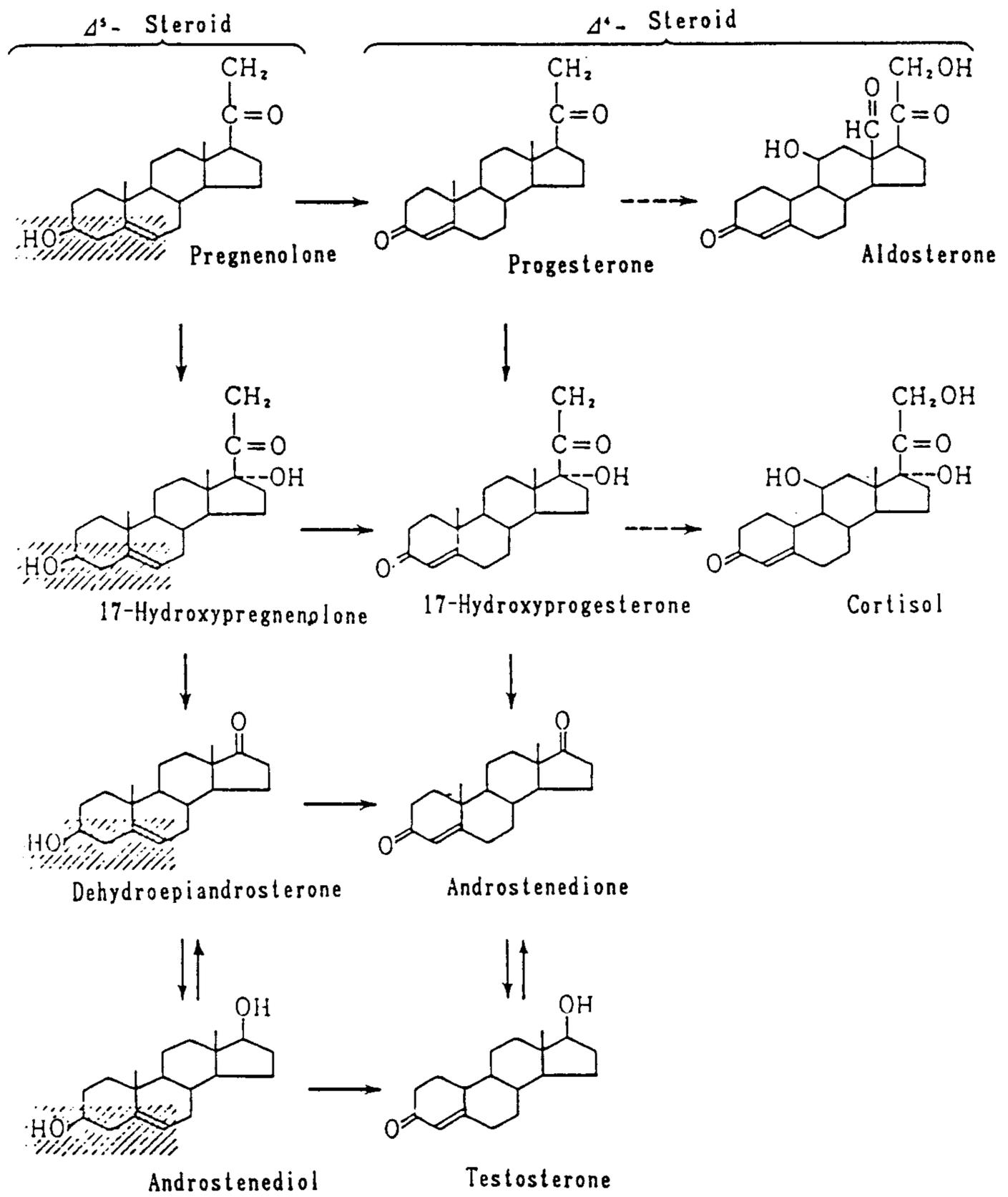
21-Hydroxylase는 $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADPH} \rightarrow \text{Cytochrome C 환원효소} \rightarrow \text{P}450(\text{OH 위치결정 효소}) \rightarrow \text{O}_2$ 의 경로로 활성화된 효소(C_{21} 위치에 OH를 첨가하는 mechanism을 가진 효소)가 결핍되면 progesterone에서 그 다음 경로인 DOC로 진행하지 못하고 17-OH progesterone을 거쳐 탄소 19개의 androgen(testosterone 포함)으로 가게되어 androgen 과량 분비로 인하여 남아의 경우 성조숙, 여아의 경우 외성기 남성화의 현상을 가져오게 되고, corticoid 분비 불완전으로 심한 염상실 증상이 오게 된다.

21-Hydroxylase 결핍증은 내분비이상 증상의 80% 정도를 차지하고, NaCl 결핍에 의해 생후 1-2개월후에 사망하게 된다. 또한 21-hydroxylase 결핍증과 11 β -hydroxylase 결핍증은 증상이 서로 비슷하기 때문에 1975년에 Curtius 등(4)은 증상으로는 두가지 결핍증을 구별할 수 없기 때문에 steroid profile을 통해서만이 구분할 수 있다고 보고하였다. 21-Hydroxylase 결핍인 경우는 androsterone, etiocholanolone, pregnanetriol이 현저하게 증가하고 11 β -hydroxylase의 경우는 normal level과 비교할때 11번 위치에 oxygenation된 steroid가 극히 적은양이던가 발견되지 않았고, 11-deoxytetrahydrocortisol(THS)의 양은 증가하고, tetrahydrocortisol(THF)의 level은 낮고, DOC와 aldosterone은 normal level과 비슷하다고 보고하였다.

1984년 Pike 등(5)은 정상인과 21-hydroxylase deficiency 환자의 urinary steroid profile을 비교하였다.



Scheme 1.b. Metabolic pathway of major corticoids.

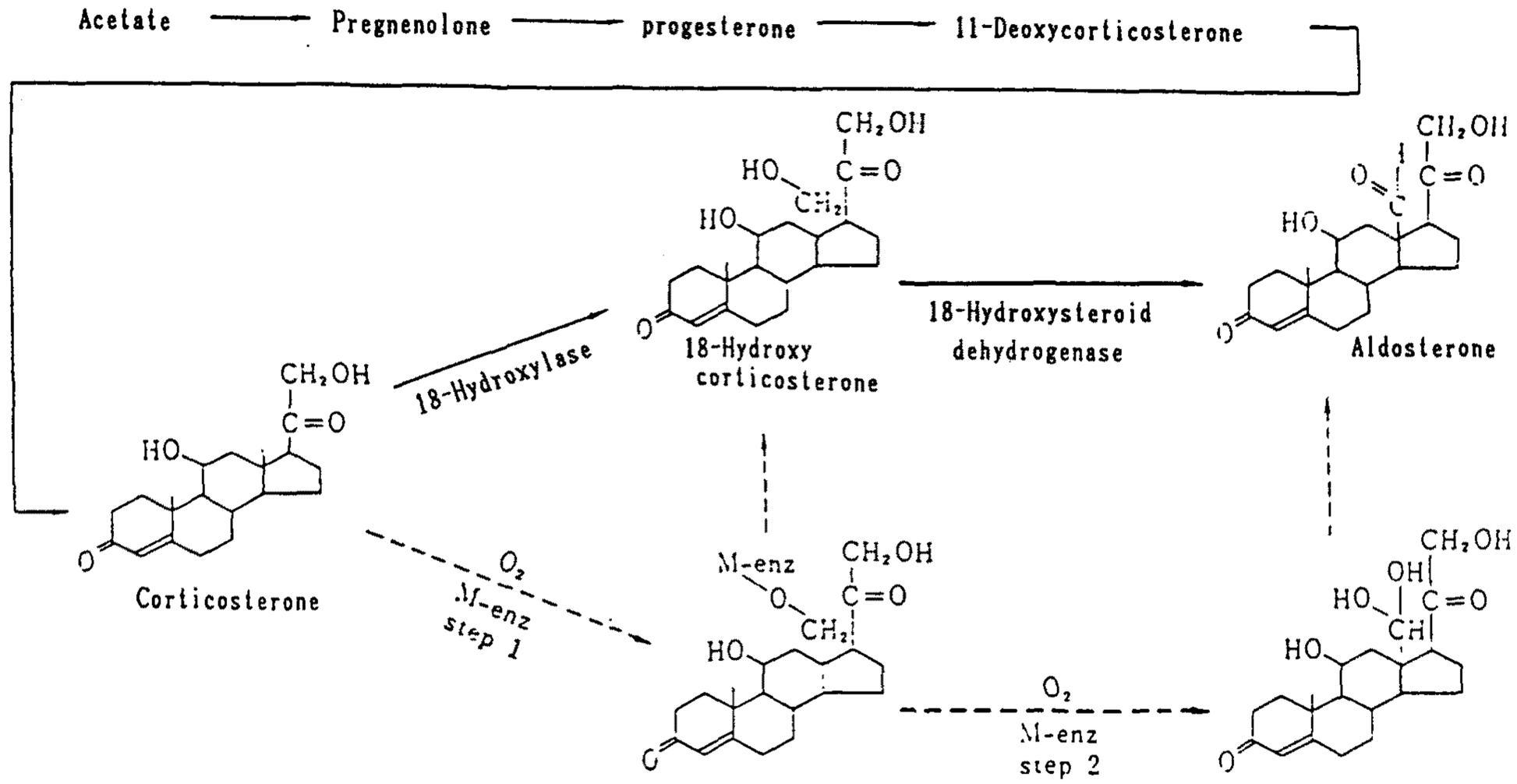


Scheme 1.C 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 가 관여하는 Δ^5 -3 β -Hydroxysteroid 에서 Δ^4 -steroid 가 생성되는 경로.

17 α -Hydroxylase의 경우는 pregnenolone에서 이 효소의 도움으로 17-OH pregnenolone이 되고, dehydroepiandrosterone으로 가서 androgen을 생합성하게 되는 경로에 필요한 효소이다. 이 효소가 결핍되면 androgen 생성이 불완전하여 남성의 경우 여성화 증상이 일어나고, DOC와 corticosterone의 분비량이 증가하게 된다. 그러나 그 다음 대사체인 aldosterone의 양은 증가하지 않는데 그 이유는 아직까지 분명치 않다.(6)

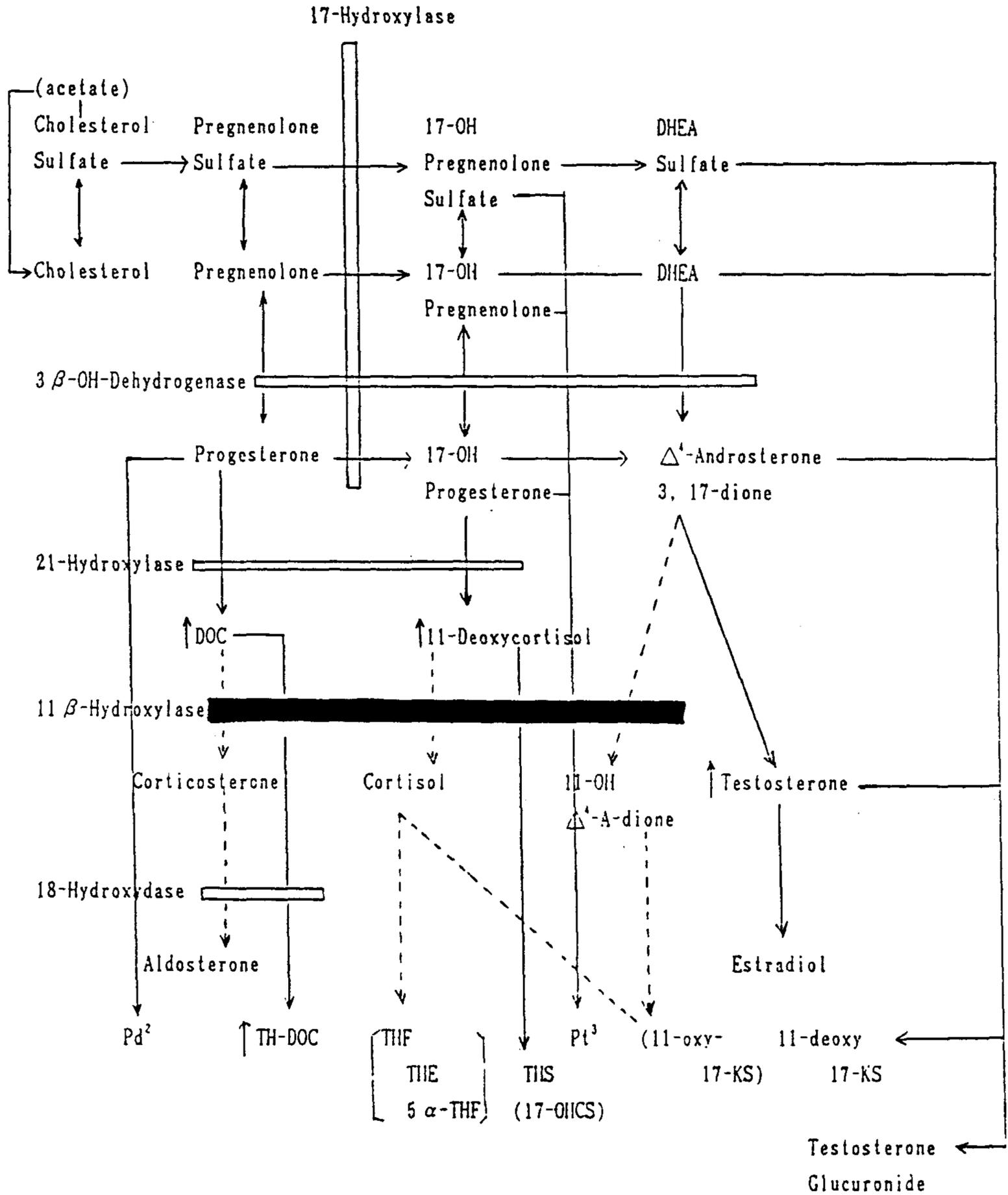
1977년에 Honour는 17 α -hydroxylase 결핍증 환자의 urinary profile을 비교한 결과, 17-ketosteroid나 cortisol metabolite가 현저하게 감소된다고 보고하였다.

18-Hydroxylase는 corticosterone에서 aldosterone으로 진행하는데 필요한 enzyme으로 이 효소의 결핍이 오면 저aldosterone 증상이 일어나고, Na 과 K를 조절하는 aldosterone이 제기능을 다하지 못하기 때문에 탈수증상이 일어나고, 뇨중 17-ketosteroid는 정상치를 나타내지만, tetrahydrocorticosterone(THB)과 5 α -tetrahydrocorticosterone(5 α -THB)은 낮은 값을 나타낸다. 5 α -Reductase가 결핍일 경우는 5 α -hydrogen의 배설량이 적어지기 때문에 5 α /5 β 의 ratio로 판단하게 되고 cortisone reductase가 모자랄 경우는 corticosteroid의 환원된 형태로 되는 것이 불완전하기 때문에 tetrahydrocortisone의 분비량이 높고 tetrahydrocortisol, 5 α -tetrahydrocortisol의 분비량이 urinary profile을 통해보면 현저히 낮다는 것이 보고되고 있다(7). 1978년 Horning(8)은 5 α -THF/THF, An/Et를 premenopausal,



Scheme 1.d Aldosterone 의 중요한 합성경로

Scheme 1. e 11 β -Hydroxylase deficiency에 있어서 부신피질 steroid 생합성계와 대사



postmenopausal 상태의 두 group으로 나누어 그 값을 비교, 검토하였다.

제2 절. 내인성 steroid의 분석방법

Urine으로부터 내인성 steroid들의 metabolite와 유사한 화합물들을 정량하는 많은 분석방법들이 있다. 이들은 일반생체분석에서도 이용이 많이 되는 분석방법들이다. 그 첫번째는 Radio-Immuno-Assay(RIA), 두번째는 HPLC/UV 그리고 세번째는 GC/MS 법이다.

Radio-immuno-assay

모든 RIA에 의한 정량법은 공통의 원리를 갖는다. 측정하려는 substance(예 hormone)은 이것의 알고 있는 radioactive isotope form 양으로 special protein의 결합 위치에서 서로 경쟁한다. 면역측정 정량인 경우 독특한 hormone에서 야기되는 antibody가 있다. Hormone의 protein 결합과의 분리후에는 양쪽 다 radioactivity가 없고 hormone의 농도를 검량곡선(calibration curve)과 비교하여 얻어낸다(9-12).

이러한 정량방법은 고도의 정밀성을 요하게 되는데 그 검출한계는 25 pg/ml이다. 그러나 측정하려는 hormone과 비슷한 구조를 가진 다른 hormone과의 생각지 않은 교차반응이 생기기 때문에 사용된 antigen의

specificity는 과량을 요구하게 된다. 이것을 통해서 정량시에는 불순물이 섞일수 있고 정성분석에서는 이러한 존재가 하나의 substance로 속을수 있기 때문에 잘못 판정(false positive)을 내릴수 있다

HPLC

HPLC 정량은 column chromatography와 비슷하고 단지 높은 압력(400 bar까지)을 이용한다는 것이다. Steroid 측정에서 column은 RP-column(reversed phase column)이며 길이는 10-25cm이다(16).

오늘날 UV-detector를 사용하는 이유는 국한된 압력하에서 steroid의 chromophor group(double bond의 conjugate system)을 측정할 수 있기 때문이다. 이것은 androgenic/anabolic steroid에서는 적합하나 주된 metabolite에서는 적합치 않다. HPLC의 유도체화(예, 한 분자내의 chromophor group을 선택하는 방법) 방법은 오늘날 크게 발전되지 않았다. UV-detector의 이용으로 검출 정밀도는 extinction coefficient가 injection 당 1ng까지 크게 높아졌다.

GC/MS

Urine으로 부터 정량방법은 다음과 같다(13-15).

- 1) 정제와 방해물질을 제거하는 목적으로 urine sample에서 추출. Steroid는 conjugate로 배설되기 때문에 enzymatic hydrolysis를 하거나 acidic hydrolysis를 하여 conjugate form을 분리시켜 extraction한다.
- 2) Chromatography 방법을 통해 정제.
- 3) Derivatization
- 4) 정량과 확실한 확인을 목적으로 GC/MS를 사용한다.

그 첫번째 방법은 정제과정에 있어서 hydrolysis 방법, extraction solution선택, derivatives의 선택과 그때 그때마다 분리관 선택등과 같은 약간의 차이가 있다.

GC/MS는 SIM mode로 steroid가 characteristic fragmentation을 갖기 때문에 사용한다. SIM method는 정밀도(sensitivity)가 높고 detection limit는 10-100pg까지 가능하다.

제3장. 실험

제1절. 시료

건강한 성인 남, 녀 그리고 어린이 각각 68명(25-40살), 34명(25-35살), 8명(3개월-11살)에게서 24시간동안 배설된 노를 수집하여 실험하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

제2절. 장치 및 시약

가) 분석기기 및 장치

본 실험에서 사용한 분석기기로는 Hewlett-Packard(HP) 5890A Gas Chromatograph(GC)에 direct interface로 연결된 5970B Series Mass Selective Detector(MSD)를 사용하였고, 모든 시료는 HP 7673A Autosampler를 사용하여 GC에 주입하였다. Data system으로는 HP 7946 disc drive가 연결된 HP 59970 MS Chemstation을 이용하였고 chromatogram과 mass spectrum은 HP 2934A Printer로부터 얻었다. 시료의 추출과정에서 사용한 장치로는 rotary vacuum evaporator(Buchi, 스위스), Buhler 7400 Tubingen 진탕기(Edmond, 독일), Varifuge-F 원심분리기 (Heraeus, 독일), heating block(Gebr. Liebig, 독일)등을 들수 있다.

나) GC/MSD 작동조건

본 실험에서 사용된 분석기기 작동조건은 다음과 같다.

주입기 온도 : 280 °C

주입 방법 : split mode(ratio 10:1)

운반기체 및 유속 : 1.4ml/min 수소

Transfer line 온도 : 300 °C

분리관 SE-30, 길이 17m., 내경 0.2mm, film thickness 0.11um였으며, 분리관의 온도는 유도체방법 A는 180 °C에서 4 °C/min으로 224 °C까지 하고, 224 °C에서 300 °C까지 15 °C/min으로 상승시키고, 2분간 머물렀다.

유도체방법 B는 180 °C에서 4 °C/min으로 250 °C까지 하고, 250 °C에서 2분간 머무르고, 15 °C/min으로 280 °C까지 올린다음, 곧바로 300 °C로 상승시켜 2분간 머물렀다.

유도체방법 C는 180 °C에서 4 °C/min으로 230 °C까지 하고, 230 °C에서 2분간 머무르고, 2 °C/min으로 240 °C까지 하고, 4 °C/min으로 280 °C까지 올리고, 곧바로 300 °C까지 상승시켜 2분간 머물렀다.

다) 시 약

본 실험에서 사용된 시약은 다음과 같다.

Androsterone (Sigma, 미국)
 Etiocholanolone (Sigma, 미국)
 D₂-Testosterone (Sigma, 미국)
 Dehydroepiandrosterone(Sigma, 미국)
 11 β -Hydroxy androsterone (Sigma, 미국)
 11 β -Hydroxyetiocholanolone (Sigma, 미국)
 Stigmasterol (Sigma, 미국)
 Cholesteryl Butyrate (Sigma, 미국)
 11-Keto androsterone (Sigma, 미국)
 11-Keto etiocholanolone (Sigma, 미국)
 Pregnanediol (Sigma, 미국)
 Pregnenediol (Sigma, 미국)
 Pregnanetriol (Sigma, 미국)
 16-Pregnenetriol (Sigma, 미국)
 Tetrahydro 11-deoxycortisol (Sigma, 미국)
 Tetrahydrocortisone (Sigma, 미국)
 Tetrahydrocortisol (Sigma, 미국)
 allo-Tetrahydrocorticosterone (Sigma, 미국)
 Amberlite XAD-2 resin(100-200 microns) : Serva(독일)
 로부터 구입하였으며, acetone(2 일),
 methanol(2 일), 증류수(3 일)로 환류시켜
 정제한 다음 증류수에 담아 보관하였다.

Phosphate buffer(pH=7) . 0.2M K_2HPO_4 와 0.2M KH_2PO_4 를 섞어서 pH 7로 맞추어 사용하였다.

Acetate buffer(pH=5.2) . 0.2M CH_3COOH 와 CH_3COONa 를 pH 5.2로 맞추어 사용 하였다.

β -Glucuronidase from E. Coli Boehringer(독일)로 부터 구입했으며, specific activity는 10U/mg (25℃)인 것을 25ul를 사용하였다.

β -Glucuronidase/Arylsulfatase from Helix Pomatia Boehringer(독일)로 부터 구입했으며, β -Glucuronidase activity는 5.5 U/ml (38℃)이고, Arylsulfatase activity는 2.6 U/ml(38℃)인 것을 50ul를 사용 하였다.

유도체화시약 : A) MSTFA(N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide)와 TMSI(Trimethyliodosilane)은 Sigma(미국)로부터 샀으며, MSTFA와 TMSI을 1000:1(v/v)로 섞은 혼합 용액을 사용하였다.

B) Methoxyamine hydrochloride을 pyridine에 녹여 사용한 다음, MSTFA TMSI을 100:2(v:v)의 비율로 섞은 혼합용액을 사용하였다.

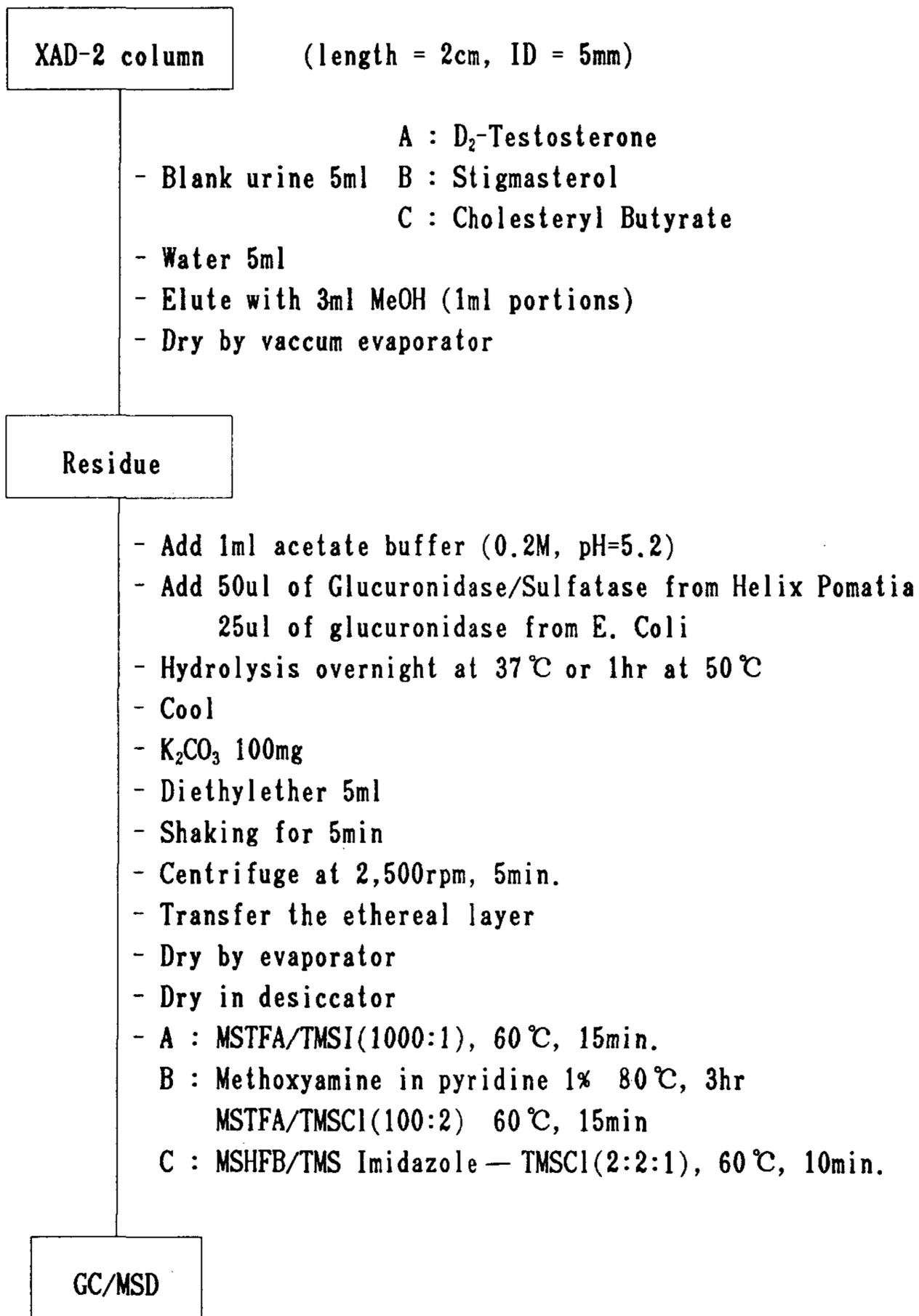
C) MSHFB(N-Methyl-N-trimethylsilyl heptafluorobutyramide) 는 Machery-Nagel (독일)로부터 구입했으며, Trimethylsilyl imidazole과 Trimethyl chlorosilane은 Sigma(미국)로 부터 구입하여, MSHFB TMSIM : TMSCl을 2:2:1(v:v:v)의 비율로 섞은 혼합용액을 사용하였다.

제3절. 실험방법

Analysis scheme에서 보여주는 것처럼 steroid의 추출과정을 간단히 요약하면 각 단계는 다음과 같다.

가) XAD-2 column의 준비

Disposable glass pasteur pipette(내경 0.5cm)에 glass bead를 넣어서 아래부분을 막은다음, 충분히 세척된 XAD-2 resin을 높이 2cm 정도로 채워서 만든다.



ANALYSIS SCHEME

나) 소변으로부터 steroid의 분리

5ml 소변을 원심분리하여 10ml plastic syringe로 뽑아서 준비된 XAD-2 column에 흘려주면서 내부표준 물질을 유도체 방법 A에는 D_2 -Testosterone을, 유도체방법 B에는 stigmasterol을, 유도체방법 C에는 cholesteryl Butyrate 을 넣어준다.

흘려준 소변은 동량의 증류수로 XAD-2 column을 씻어주고 free와 conjugated steroid들을 흡착하고 있는 XAD-2 column에 1ml씩 methanol을 3번 흘려서 stopper가 있는 원심분리 tube에 받는다. 그리고 methanol 용액은 vacuum rotary evaporator로 건조시킨다.

다) Free 및 conjugated steroid의 분리

Residue에 1ml phosphate buffer 또는 acetate buffer을 넣고, phosphate buffer 용액은 β -Glucuronidase(200ul/ml) 25ul를 넣고, 50℃에서 1시간동안 가수분해시키고, acetate buffer 용액에 β -glucuronidase/ Arylsulfatase 50ul를 넣고, 37℃에서 overnight 가수분해시킨다. 가수분해시킨후 추출하기에 알맞은 pH=9로 맞추기 위해 potassium carbonate 100mg을 넣고 diethylether 5ml를 사용하여 5분간 shaker에서

흔들어 추출한다. 혼합된 용액을 원심분리 (2,500rpm, 5분) 하고 freezer (-30 ℃)에 넣어 buffer 층을 얼린다음 ether 층은 다른 원심분리 tube에 옮긴다. 이 ether층은 evaporator에서 건조시키고 유도체화 반응을 시키기전에 수분을 제거하기 위해서 vacuum desiccator(P_2O_5/KOH)에 30분간 넣어 두었다.

라) 유도체화 반응

- A) MSTFA TMSI(1000:1) 혼합용액 100ul를 steroid를 추출한 원심분리 tube에 넣고 60 ℃에서 15분간 반응시킨다.
- B) Pyridine에 녹인 methyloxylamine hydrochloride 용액 100ul를 steroid를 추출한 원심분리 tube에 넣고 100 ℃에서 3시간 반응시킨 후, evaporator에서 건조시키고, 다시 MSTFA/TMSCl(100:2) 혼합용액 100ul를 넣어, 60 ℃에서 15분간 반응시킨다.
- C) MSHFB · TMS Imidazole TMSCl(2:2:1) 혼합용액 100ul를 steroid를 추출한 원심 분리 tube에 넣고 60 ℃에서 10분간 반응시킨다.

제4장. 결과 및 고찰

제1절. 추출방법의 확립

본 연구에 필요한 시료전처리과정을 위해서는 우선 urine내의 내인성 steroid 들에 대한 완전한 추출과정이 요구된다. 특히 내인성 steroid들의 대부분은 nonconjugated 형태가 아닌, conjugated 형태 즉 glucuronide형태나 sulfate 형태로 체내에서 변화되어 그 수용성이 높아져 urine으로 배설이 잘 되어진다. 실험부분에서 이미 언급된 시료전처리과정에서 특이한 점은 Amberlite XAD-2 resin을 사용한 점인데 보통 사용되어지는 XAD-2 resin보다도 상당히 mesh size가 적은 것을 사용하는 이유는 adsorption 되어지는 양을 증진시키기 위해서인데, 그외의 불필요한 물질(간섭물질)도 잘 제거된다. 그 다음 단계로는 일단 deconjugation시키는 단계를 필요로 하는데 이를 위해 E. Coli로부터 추출한 β -glucuronidase와 Helix pomatia로부터 추출한 arylsulfatase/ β -glucuronidase 를 각각 사용하였다. 이같이 enzyme 을 사용하여 hydrolysis를 하는 이유는 acid나 base에 의한 가수분해시에 steroid ring이 cleavage될 가능성이 크기 때문이다.

제2 절. 유도체화방법의 설정

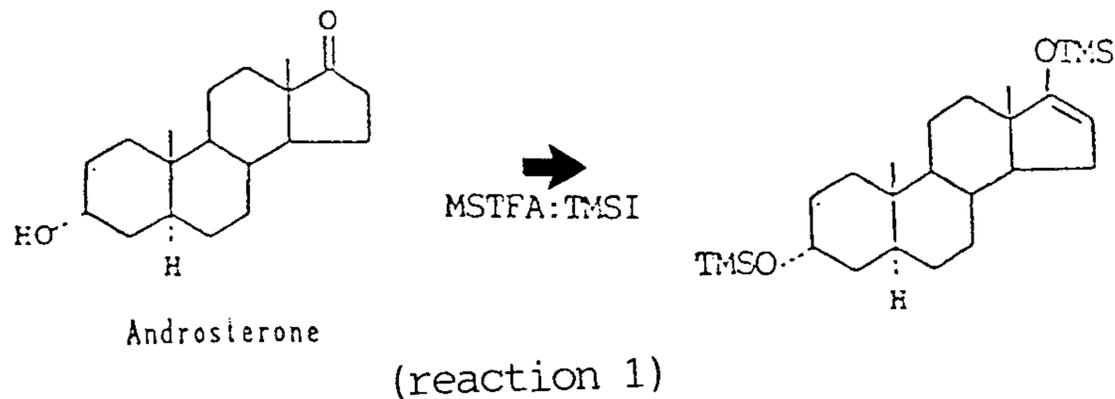
Urine에서 검출하고자 하는 16가지 steroid hormone의 표준물질을 MSTFA와 TMSI 혼합물로 유도체화하여 mass spectrum에서의 특성이온을 Table 1에 나타내었다.

공통적으로 steroid hormone은 perhydrocyclopentano-phenanthrene ring을 갖고 있고, 각 steroid가 다르기는 하지만 주로 ring의 3번위치의 탄소, 11번위치의 탄소, 16번위치 탄소, 17번 위치의 탄소, 20번위치 탄소 그리고 21번 위치 탄소에 hydroxy기나 ketone기를 가지고 있다. 이 hydroxy기나 ketone기는 polar하기 때문에 gas chromatograph에 적당하지 않기에, polar한 성질도 줄이고, 휘발성도 증가시킬 목적으로 유도체화 하는데, MSTFA와 TMSI의 혼합물을 사용하여 대상 steroid를 trimethylsilyl-enoether화시켜 각각의 steroid들이 GC상에서 잘 분리되어지도록 하였다.

TMS-enoether화한 steroid는 mass spectrum에서 $[M^+]$, $[M^+-15]$, $[M^+-18]$, $[M^+-90]$ 등이 특징적으로 잘 나타난다.

Androsterone과 etiocholanolone은 분자량이 290으로 A-ring의 3번위치 탄소의 hydroxy기와 D-ring 17번위치의 ketone기가 TMS-enoether화되어 M^+ 인 434가 특성이온이고(reaction 1), 11-keto androsterone은 ring의 3번위치, 11번 위치, 17번위치의 hydroxy기 TMS-enoether화되어 M^+ 인 520이 특성 이온이고, 11-keto etiocholanolone은 $[M^+-15]$ 인 505가 특성이온으로 나타난다.

Tetrahydro-11-deoxycortisol(THS)는 분자량이 350으로 3번위치, 17번위치, 21번위치탄소의 hydroxy기가 TMS-enoether화되어 $[M^+-18]$ 인 548이 특성이온이다.



$[M^+-90]$ 이 특성이온으로 나타나는 steroid는 16-pregnenetriol인데, 3개의 hydroxy기가 TMS-enoether화되어 460이 특성이온으로 나타난다.

또한, tetrahydrocortisone(THE)의 경우에는 하나의 compound임에도 gas chromatograph상에서 3개의 peak으로 나타난다.

분자량이 364인 THE는 ring 3번째위치 탄소, 17번위치 탄소, 21번위치 탄소에 hydroxy기, 11번위치 탄소, 20번위치에 ketone기가 있는데, polar 한것이 모두 TMS-enoether화 된것이 2개의 peak으로 나타나고, 다른 1개의 peak은 3개의 group만이 TMS-enoether화 된 것이 나타난다. MSTFA와 TMSI 혼합물 유도체는 방법이 간편하면서 GC상에서 분리능이 좋기 때문에 anabolic steroid를 검출하는데는 많이 사용되었다(16).

Table 1. TMS-enoether유도체화한 각각의 steroid들의 특성이온 및 상대머무름시간

Compounds	Relative Retention Time	Characteristic Ion
Androsterone	0.773	434 (2 TMS)
Etiocholanolone	0.789	434 (2 TMS)
DHEA	0.887	432 (2 TMS)
11-keto An.	0.889	520 (2 TMS)
11-keto Et.	0.899	505 (2 TMS-15)
D ₂ T = IS	1.000	434 (2 TMS)
11 β -OH An.	1.031	522 (2 TMS)
11 β -OH Et.	1.054	522 (2 TMS)
Pregnanediol	1.199	449 (2 TMS-15)
Pregnenediol	1.250	462 (2 TMS)
Pregnanetriol	1.294	552 (3 TMS)
16-Pregnenetriol	1.511	460 (3 TMS-90)
THS	1.522	548 (3 TMS-18)
THE	1.584	634 (4 TMS)
	1.594	634 (4 TMS)
	1.610	562 (3 TMS)
THF	1.635	636 (4 TMS-18)
5 α -THF	1.642	636 (4 TMS)
5 α -THB	1.649	638 (4 TMS-18)

그러나, endogeneous steroid를 정량하기 위해서는 androgen, corticosteroid등이 모두 좋은 분리능과 함께 각 compound마다 한개의 peak으로 나와야 정량을 할수 있게 된다. 그러므로, TMS-enoether 유도체화 방법으로 하게되면 corticosteroid의 metabolite중에서 important ratio의 설정에 많은 역할을 하게 되는 tetrahydrocortisone(THE)가 이 방법으로는 정량을 할수 없기 때문에, Table 2에 나타나 있는것은, ketone의 경우 methoxyamine hydrochloride를 pyridine에 용해한 1%용액으로 80℃에서 3시간 반응시켜서 methoxime(CH₃ON)^{24,25}으로 전환시키고, 그다음 hydroxy기는 MSTFA와 TMSCl 혼합물로 TMS유도체화하여, mass-spectrum에서의 특성이온을 나타내었다.

Methoxime과 TMS 유도체화한 steroid hormone은 ketone기와 hydroxy기가 있는 경우는 [M⁺-31], [M⁺-90-31-18], [M⁺-180-31], 그리고 [M⁺-180-31-18]이 특징적으로 잘 나타나고, hydroxy기만 있는 경우는 [M⁺], [M⁺-90-15] 그리고 [M⁺-90]이 mass spectrum상에서 큰 abundance를 나타낸다. Androsterone, etiocholanolne, dehydroepiandrosterone, 11-keto androsterone, 11-keto etiocholanolone과 같은 keton기와 hydroxy기가 하나씩 존재하는 경우는 mono methoxime, mone TMS화되어 [M⁺-31]인

Table 2. MO/TMS유도체화한 각각의 steroid들의 특성이온 및 상대머무름시간.

Compounds	Relative Retention Time	Characteristic Ion
Stigmasterol(IS)	1.000	484 (TMS)
Androsterone	0.445	360 (MO/TMS-31)
Etiocholanolone	0.462	360 (MO/TMS-31)
DHEA	0.503	358 (MO/TMS-31)
11 β -OH An.	0.605	376 (MO/TMS-31)
11 β -OH Et.	0.615	376 (MO/TMS-31)
11-keto An.	0.537	374 (MO/TMS-31)
11-keto Et.	0.546	405 (MO/TMS)
11 β -OH An.	0.623	448 (MO/2TMS-31)
11 β -OH Et.	0.640	448 (MO/2TMS-31)
Pregnanediol	0.689	449 (2 TMS-15)
Pregnenediol	0.744	462 (2 TMS)
Pregnanetriol	0.830	447 (3 TMS-90-15)
16-Pregnenetriol	0.878	460 (3 TMS-90)
5 α -THB	0.890	474 (MO/3TMS-31-90)
THS	0.916	384 (MO/2TMS-90-31-18)
THE	0.956	326 (MO/2TMS-180-31)
THF	0.980	310 (MO/2TMS-180-31-18)
5 α -THF	0.991	310 (MO/2TMS-180-31-18)

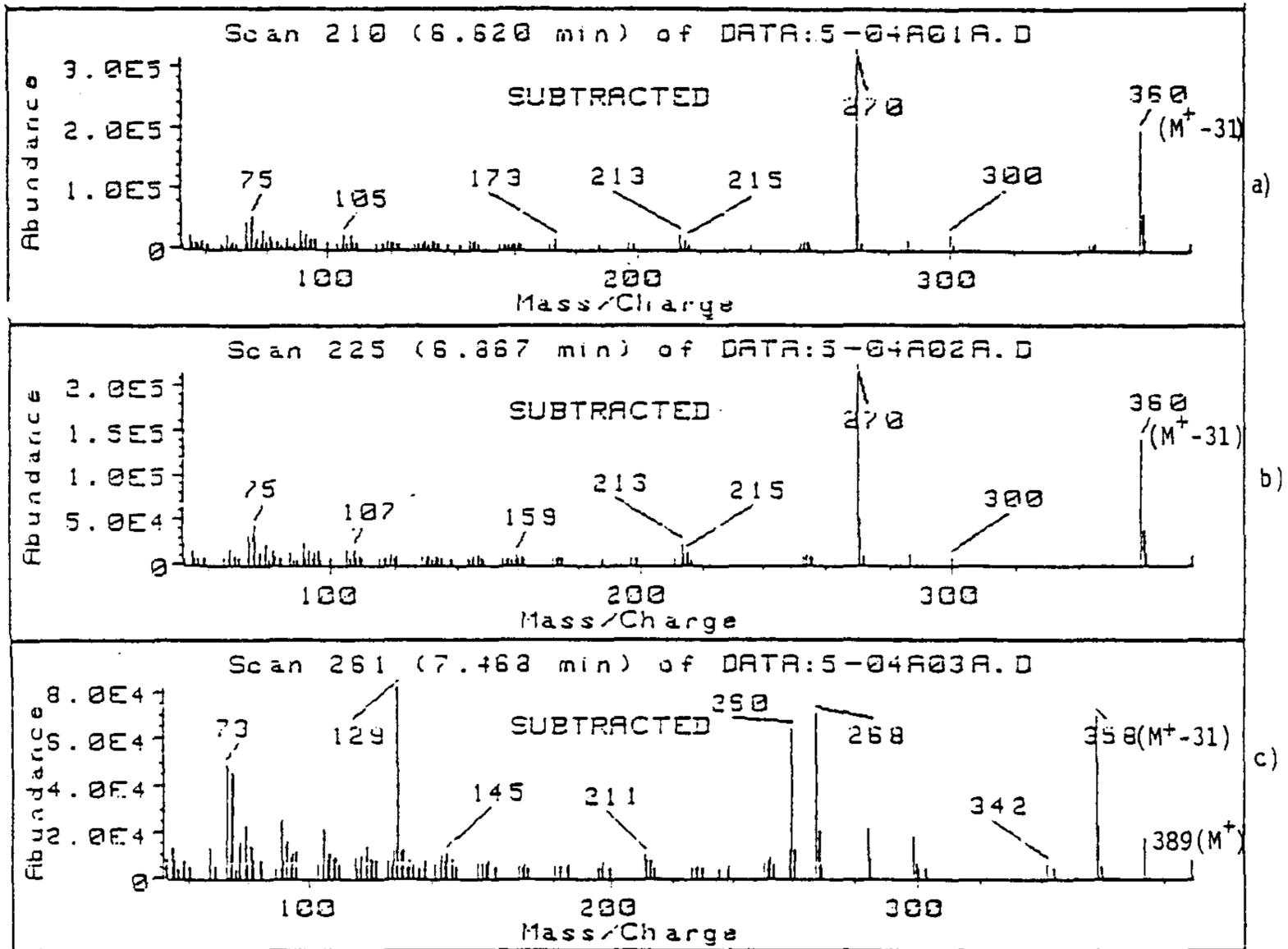


Fig. 1.1 Methoxime/TMS로 유도제와 한 steroid의 Mass spectrum.

a) Androsterone

b) Etiocholanolone

c) Dehydroepiandrosterone

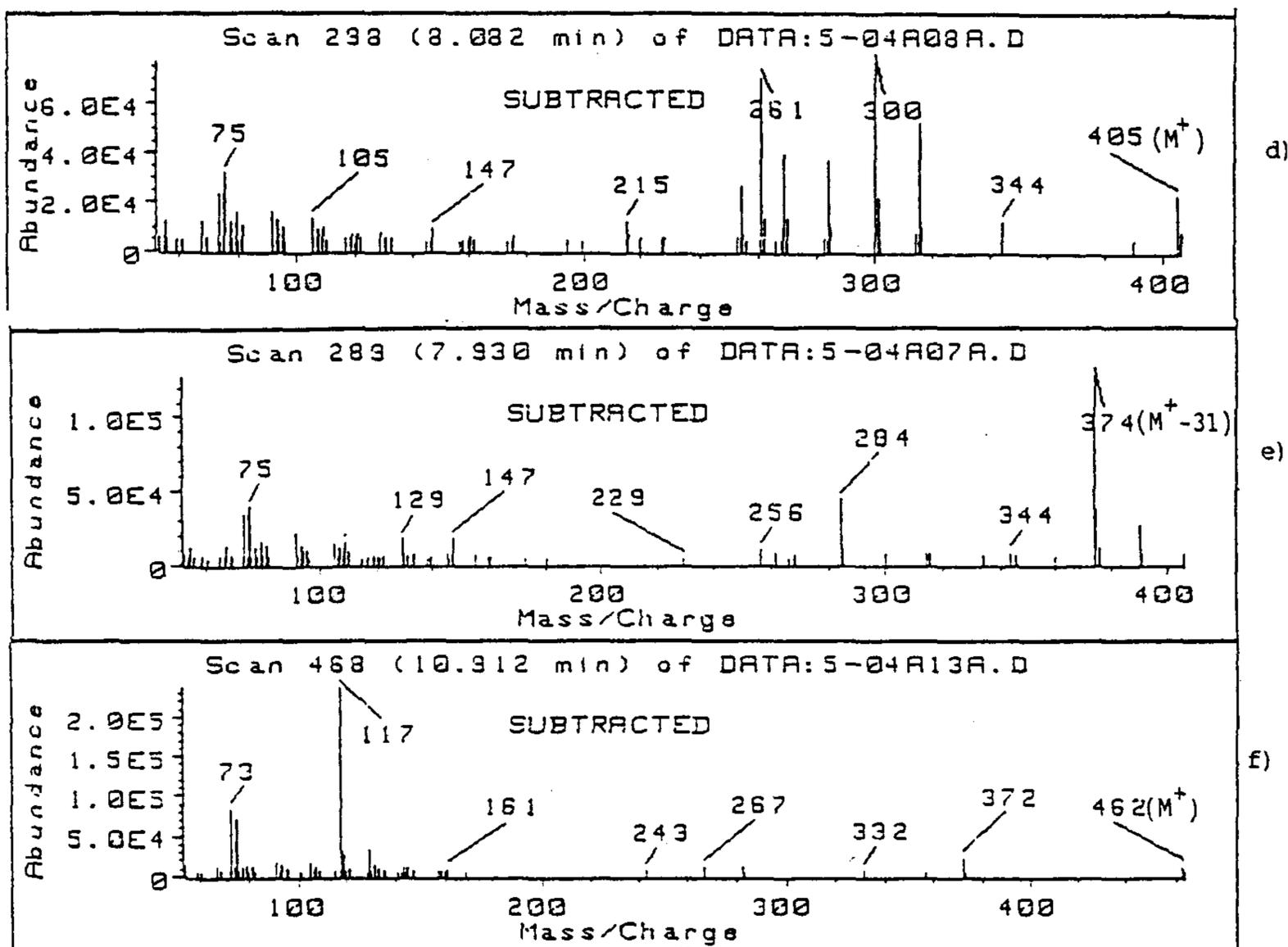


Fig. 1.2 Methoxime/TMS로 유도체와 만 steroid의 Mass spectrum.
 d) 11-Keto Etiocholanolone e) 11-Keto Androsterone
 f) Pregnenediol

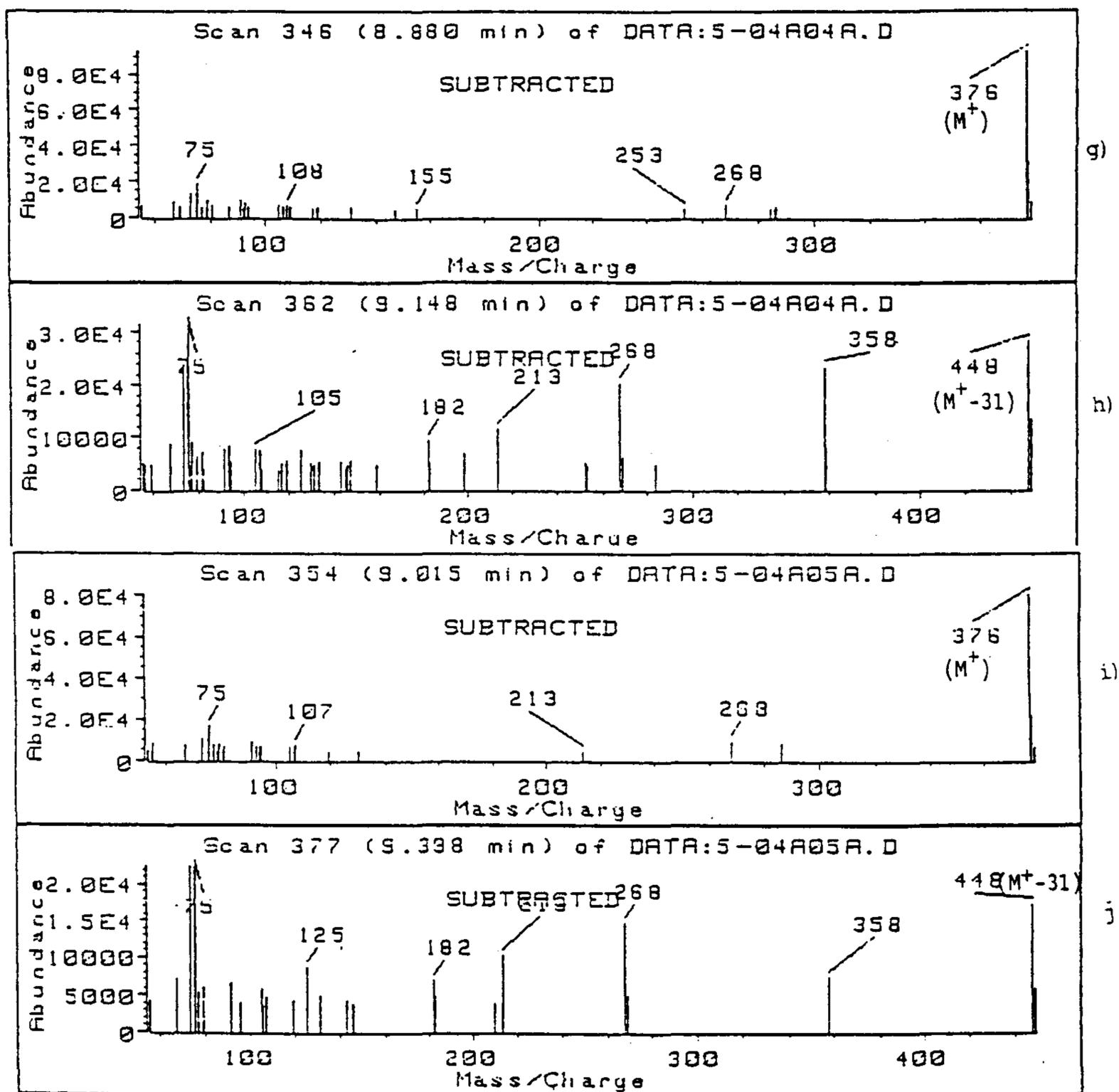


Fig. 1.3 Methoxime-TMS로 유도체와 한 Steroid의 Mass spectrum.

- g) 11 β -OH Androsterone(Methoxime + 1TMS)
- h) 11 β -OH Androsterone(Methoxime + 2TMS-31)
- i) 11 β -OH Etiocholanolone(Methoxime + 1TMS)
- j) 11 β -OH Etiocholanolone(Methoxime + 2TMS-31)

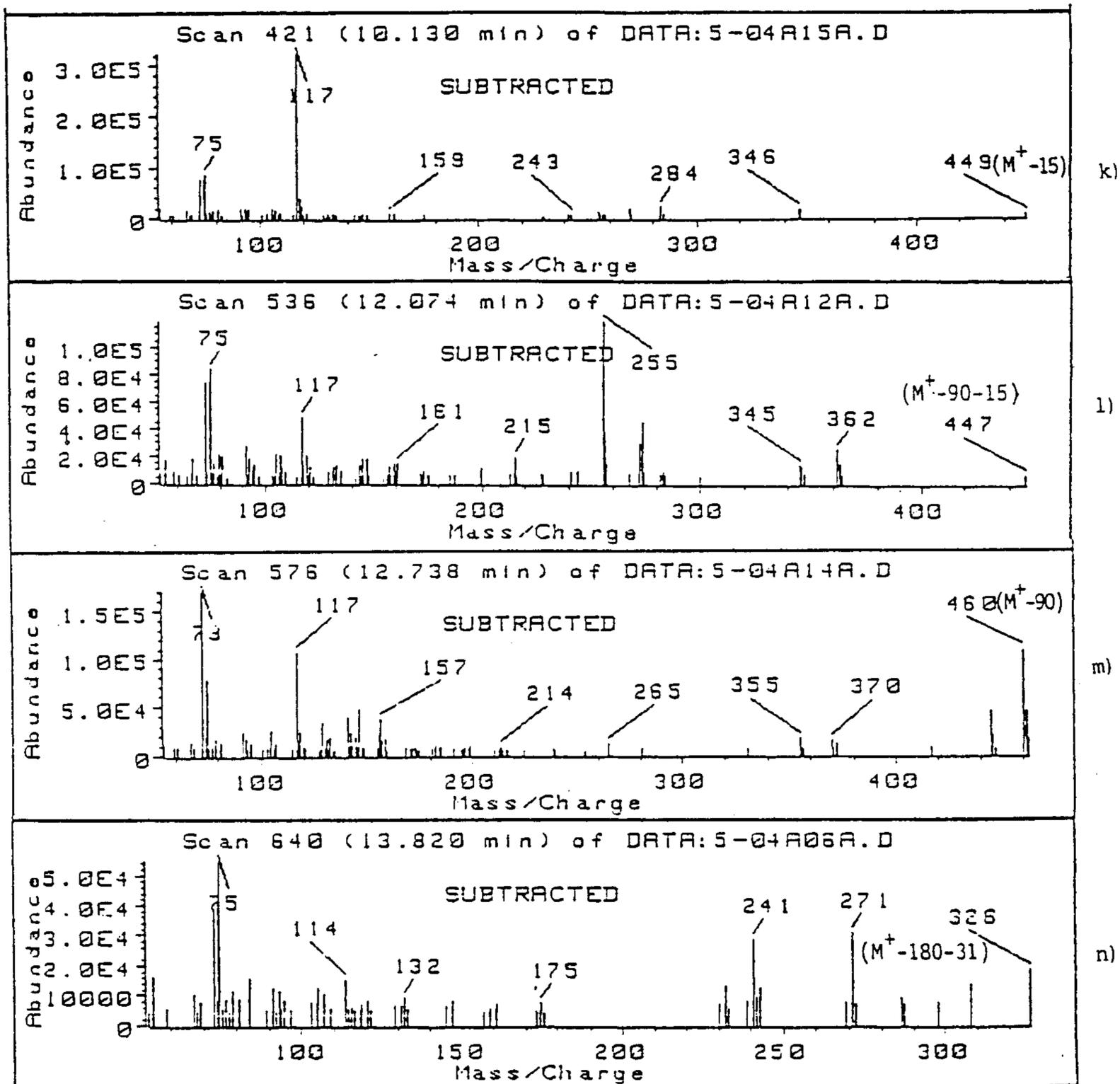


Fig. 1.4 Methoxime/TMS 로 유도체와 만 Steroid의 Mass spectrum.

- k) Pregnanediol
- l) Pregnanetriol
- m) 16-Pregnenetriol
- n) Tetrahydrocortisone

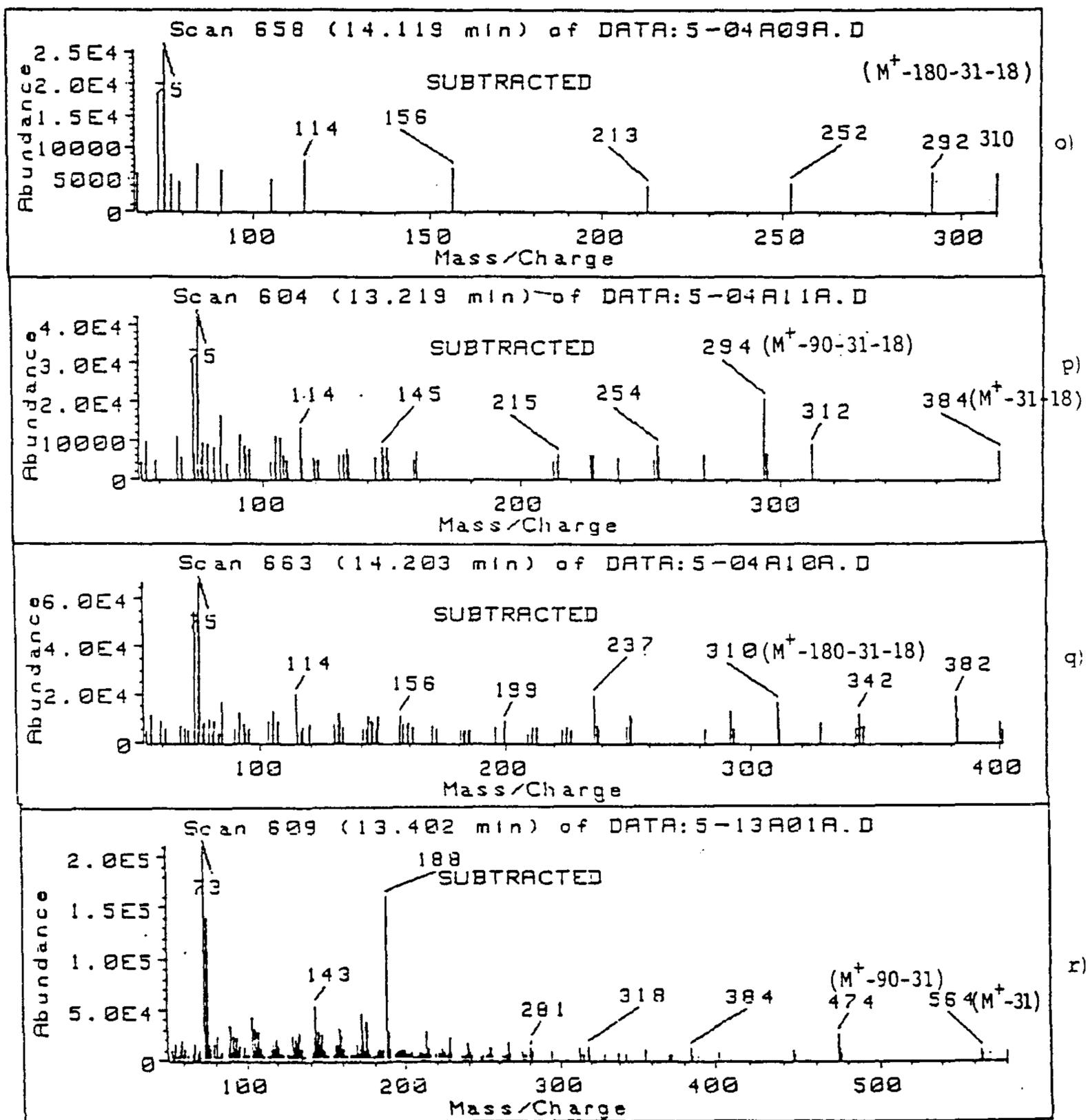
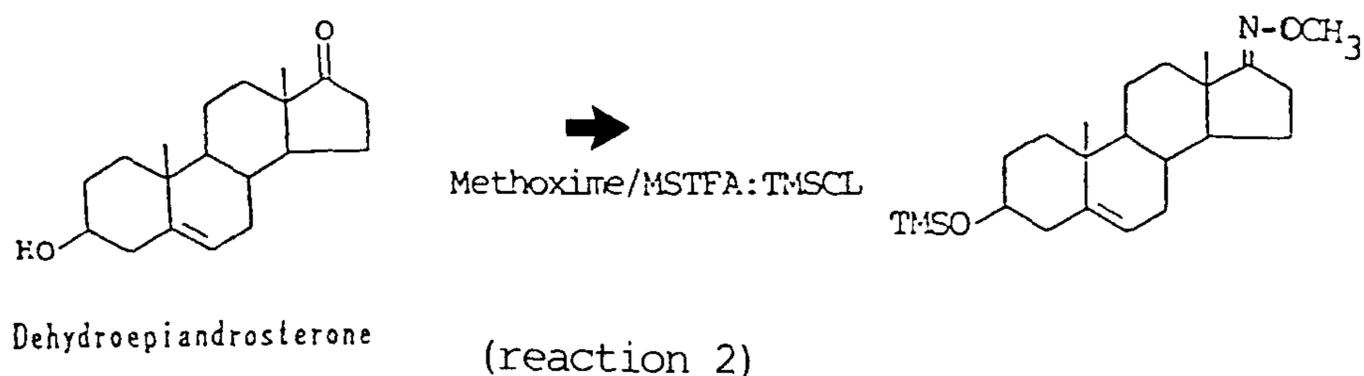


Fig. 1.5 Methoxime/TMS로 유도제와 한 Steroid의 Mass spectrum.

- o) Tetrahydrocortisol
- p) Tetrahydro-11-deoxycortisol
- q) 5 α -Tetrahydrocortisol
- r) 5 α -Tetrahydrocorticosterone

특성이온으로 나타나고(reaction 2) ketone기를 가지지 않은 pregnane 계통의 pregnanetriol은 3개의 hydroxy기가 TMS화되어 $[M^+ -90-15]$ 인 447이 특성이온이다. 11β -hydroxyandrosteron과 11β -hydroxy etiocholanolone의 경우는 3번위치 탄소와 11번위치 탄소에 hydroxy기, 10번위치 탄소에 ketone기를 가지고 있다.



11번위치는 steric hindrance를 받게되는 위치이기 때문에 언제나 TMS화가 이루어지지 않는다. 따라서 11β -hydroxyandrosterone 과 11β -hydroxyetiocholanolone은 11번위치에 TMS화가 된것과 되지 않은것이 각각 2개의 peak으로 나타나게 된다. 이같이 Methoxime 과 TMS 유도체화 방법으로는 16가지 steroid hormone을 모두 정량을 할수가 없기 때문에, 내분비이상증상을 진단하는데 중요한 역할을 하는 steroid hormone들이 gas chromatogram에서 single peak으로 잘 나타나게 하는 반응조건이 필요하다.

즉, steric hindrance를 받는 11번위치의 hydroxy기에도 TMS 유도체가 정량적으로 잘 생성되고, 반응조작도 간편한 유도체

방법을 시도한 결과, MSHFB/TMS-imidazole/TMS-Cl mixture에 의한 유도체방법이, 이 모든 조건을 만족시킬수 있었다.

Table 3에 나타난 MSHFB/TMS-imidazole/TMS-Cl에 의한 방법은 $[M^+-90]$, $[M^+-15]$, $[M^+-90-15]$ 의 특성 fragmentation pattern이 나타난다(reaction 3) 그러나, corticosteroid metabolite에서 Fig. 2에 나타난 mass spectrum을 보면 17번위치 탄소에 hydroxy기가 있는, tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone의 경우는 $[M^+-13]$, $[M^+-131-18]$, $[M^+-131-90]$ 이 특징적으로 나타나는데, 이는 20번위치 탄소에서 fragmentation이 일어나기 때문이다. 17번위치 탄소에 hydroxy기가 없는 tetrahydrocorticosterone의 경우는 $[M^+-103]$ 이 특성이온으로 나타나는데, 이는 21번위치 탄소에서 CH_2OTMS 의 fragmentation이 일어나기 때문이다.

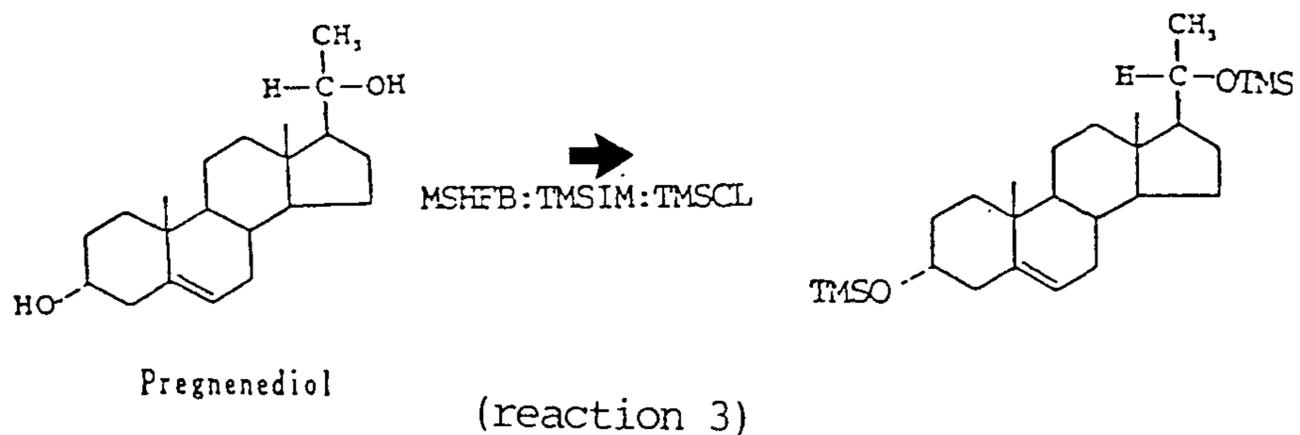


Fig. 3에 나타난 chromatogram을 보면 내부표준물질인 cholesteryl butyrate는, 검출하고자하는 steroid hormone과 머무름시간이 비교적 많은 차이를 보인다.

Table 3. TMS유도체화한 각각의 steroid들의 특성이온 및 상대머무름시간.

Compounds	Relative Retention Time	Characteristic Ion
Cholesterolbutyrate(IS)	1.000	368 (1 TMS)
Androsterone	0.286	272 (1 TMS-90)
Etiocholanolone	0.299	272 (1 TMS-90)
DHEA	0.329	360 (1 TMS)
11-keto An.	0.336	376 (1 TMS)
11-keto Et.	0.408	448 (2 TMS)
11 β -OH An.	0.426	450 (2 TMS)
11 β -OH Et.	0.444	450 (2 TMS)
Pregnanediol	0.509	449 (2 TMS-15)
Pregnenediol	0.546	462 (2 TMS)
Pregnanetriol	0.613	447 (3 TMS-90-15)
THS	0.524	435 (3 TMS-131)
16-Pregnenetriol	0.668	460 (3 TMS-90)
THE	0.770	449 (3 TMS-131)
THF	0.721	343 (4 TMS-131-180)
5 α -THF	0.744	343 (4 TMS-131-180)
5 α -THB	0.762	463 (3 TMS-103)
THB	0.778	463 (3 TMS-103)

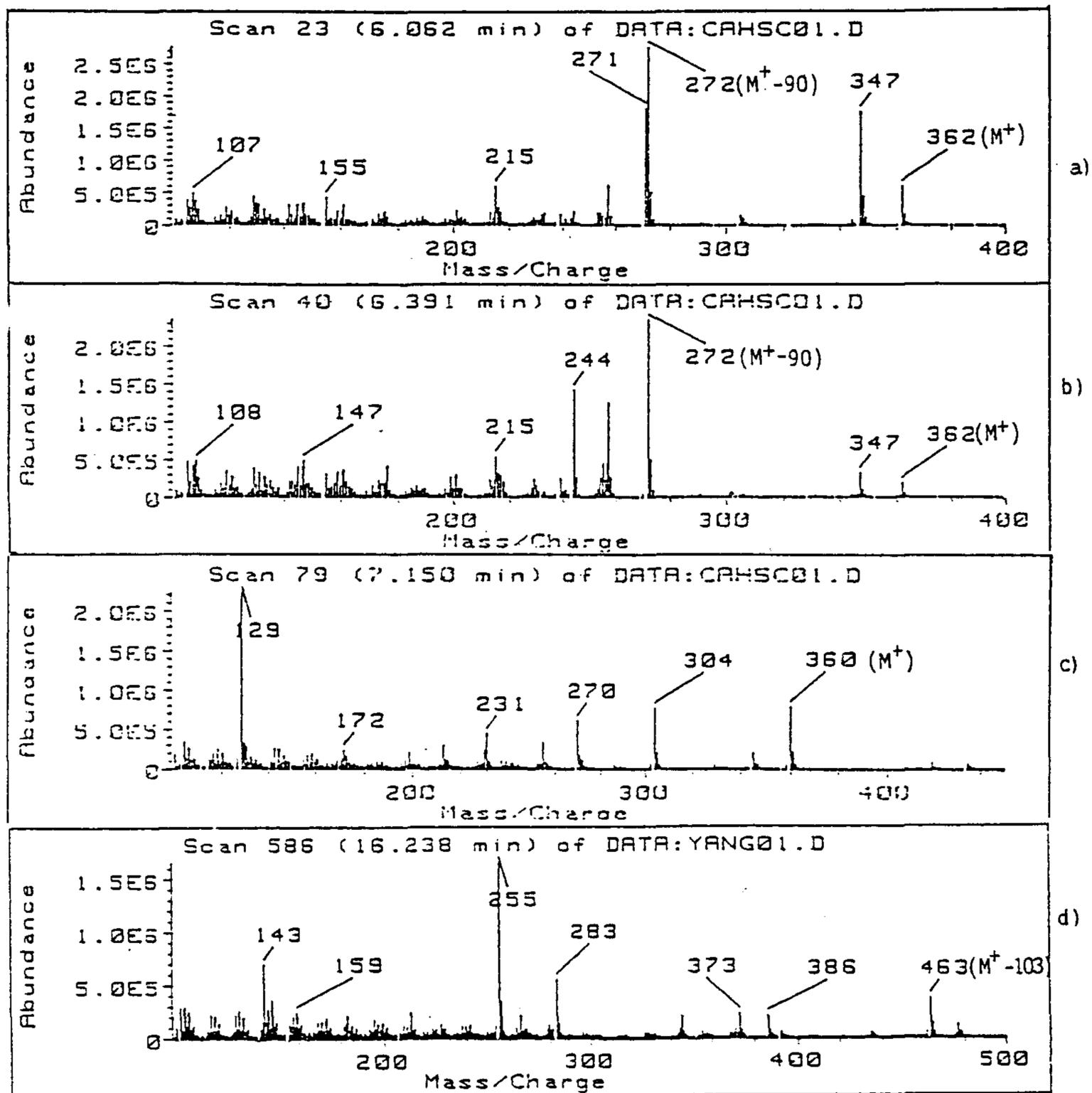


Fig. 2.1 TMS 유도제화 한 steroid 의 Mass spectrum

- a) Androsterone b) Etiocholanolone
 c) Dehydroepiandrosterone d) 5 α -Tetrahydrocorticosterone

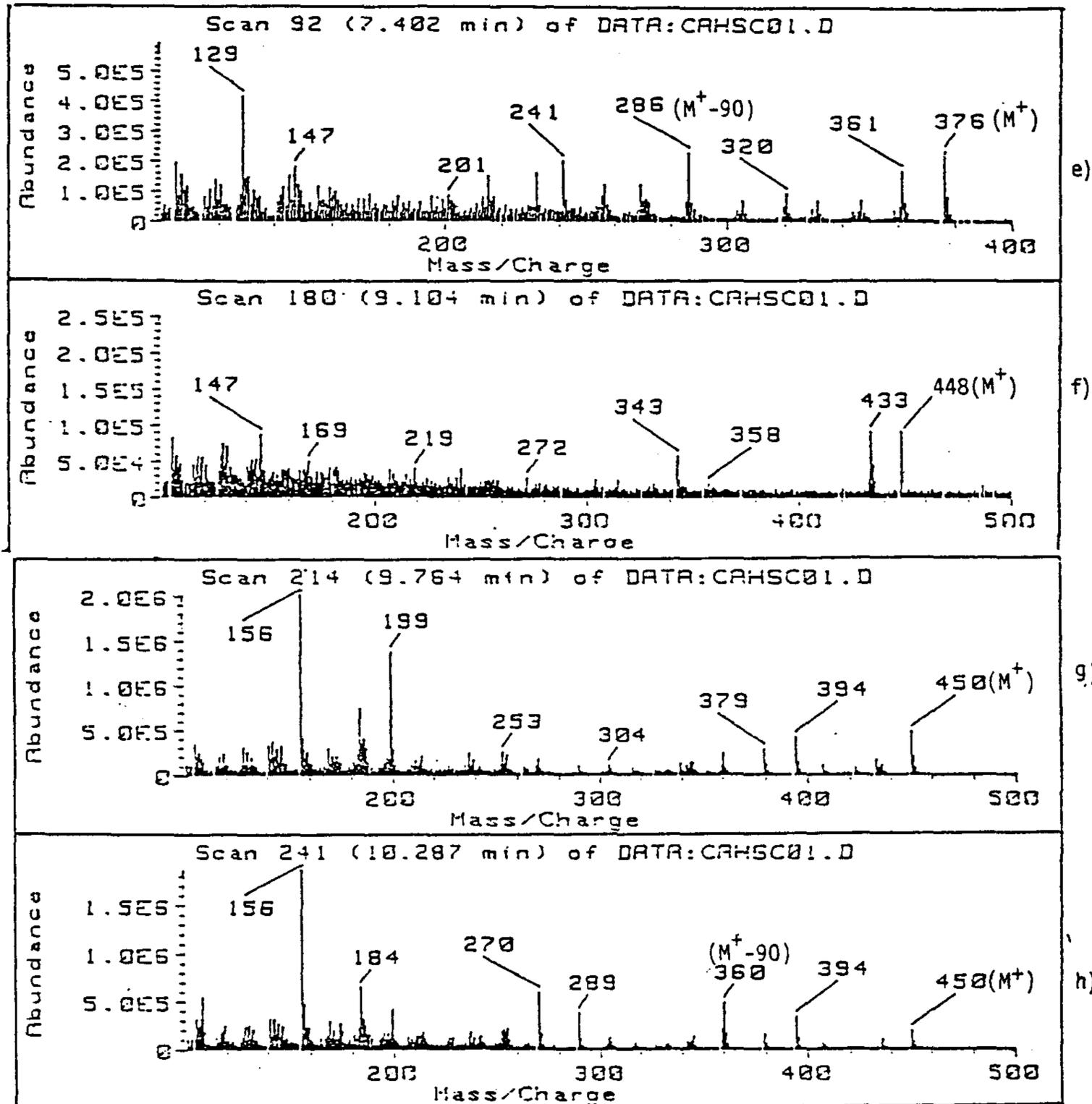


Fig. 2.2 TMS로 유도체와 한 Steroid 의 Mass spectrum.

- e) 11-keto Androsterone(1TMS)
- f) 11-keto Etiocholanolone(2TMS)
- g) 11 β -OH Androsterone(2TMS)
- h) 11 β -OH Etiocholanolone(2TMS)

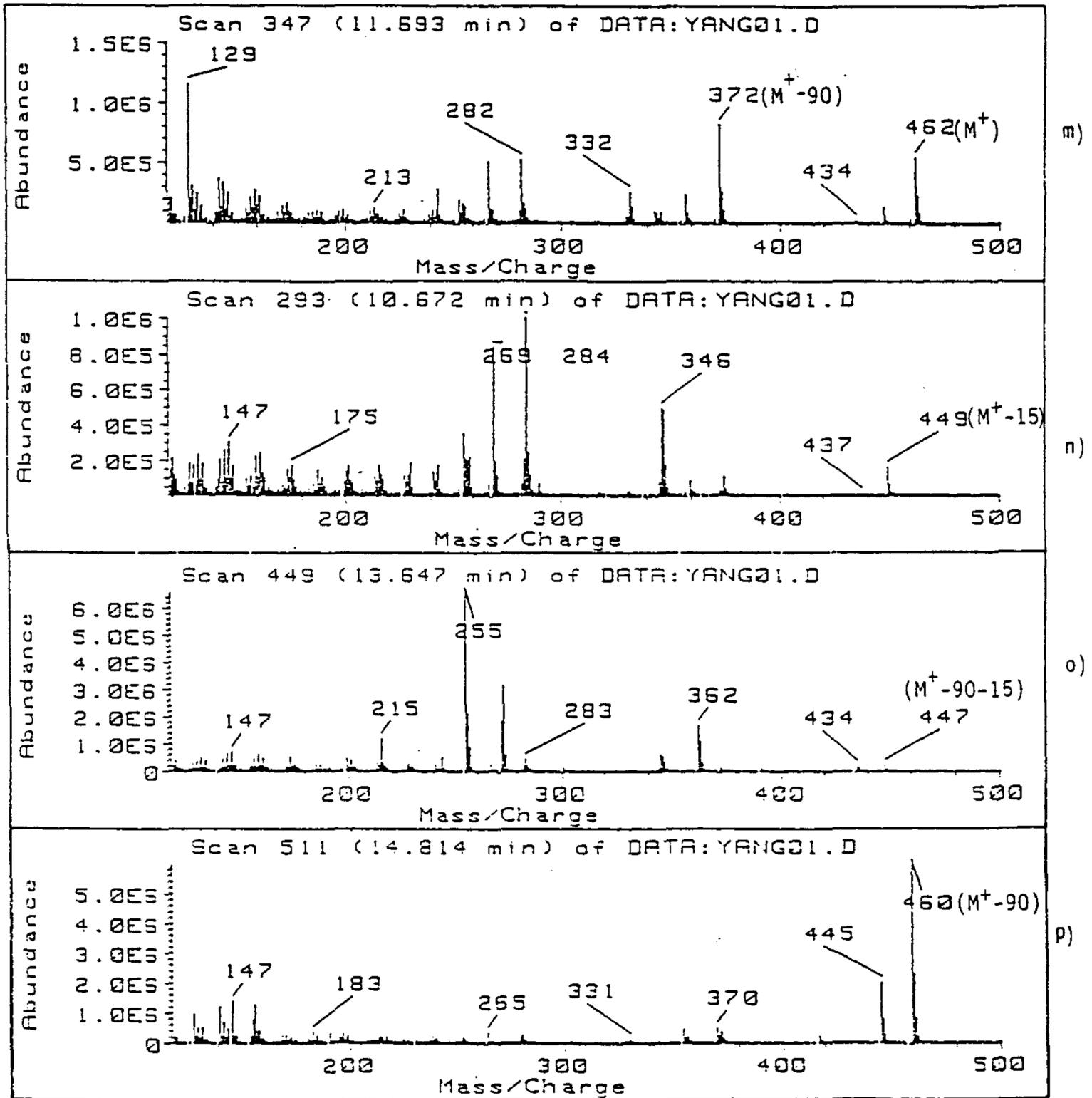


Fig.2.3 TMS로 유도체확한 Steroid의 Mass spectrum.

m) Pregnenediol

n) Pregnenediol

o) Pregnanetriol

p) 16-Pregnenetriol

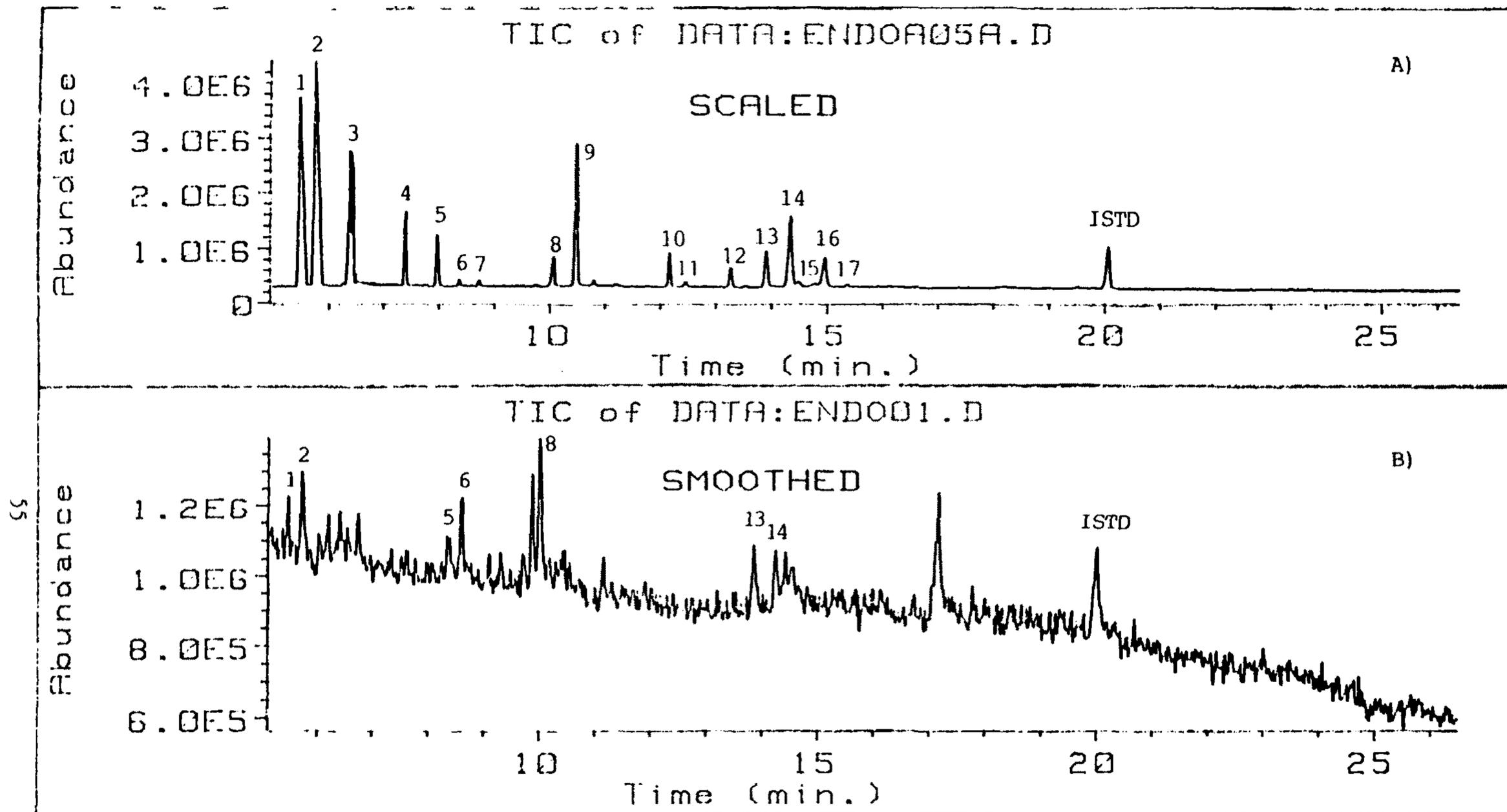


Fig.3

A) TMS 로 유도체화한 steroid 표준혼합물의 Total Ion Chromatogram

B) TMS 로 유도체화한 뇨추출물의 네인성 steroid 의 Total Ion Chromatogram.

1. Androsterone 2. Etiocholandone 3. DHEA 4. 11-keto An 5 11-keto Et 6. 11 β -OHAn 7. 11 β -OHET
 8. Pregnenediol 9. Pregnenediol 10. pregnanetriol 11. THIS 12. 16-Pregnenetriol 13. THE 14. THF
 15. 5 α -THF 16. THB 17. 5 α -THB.

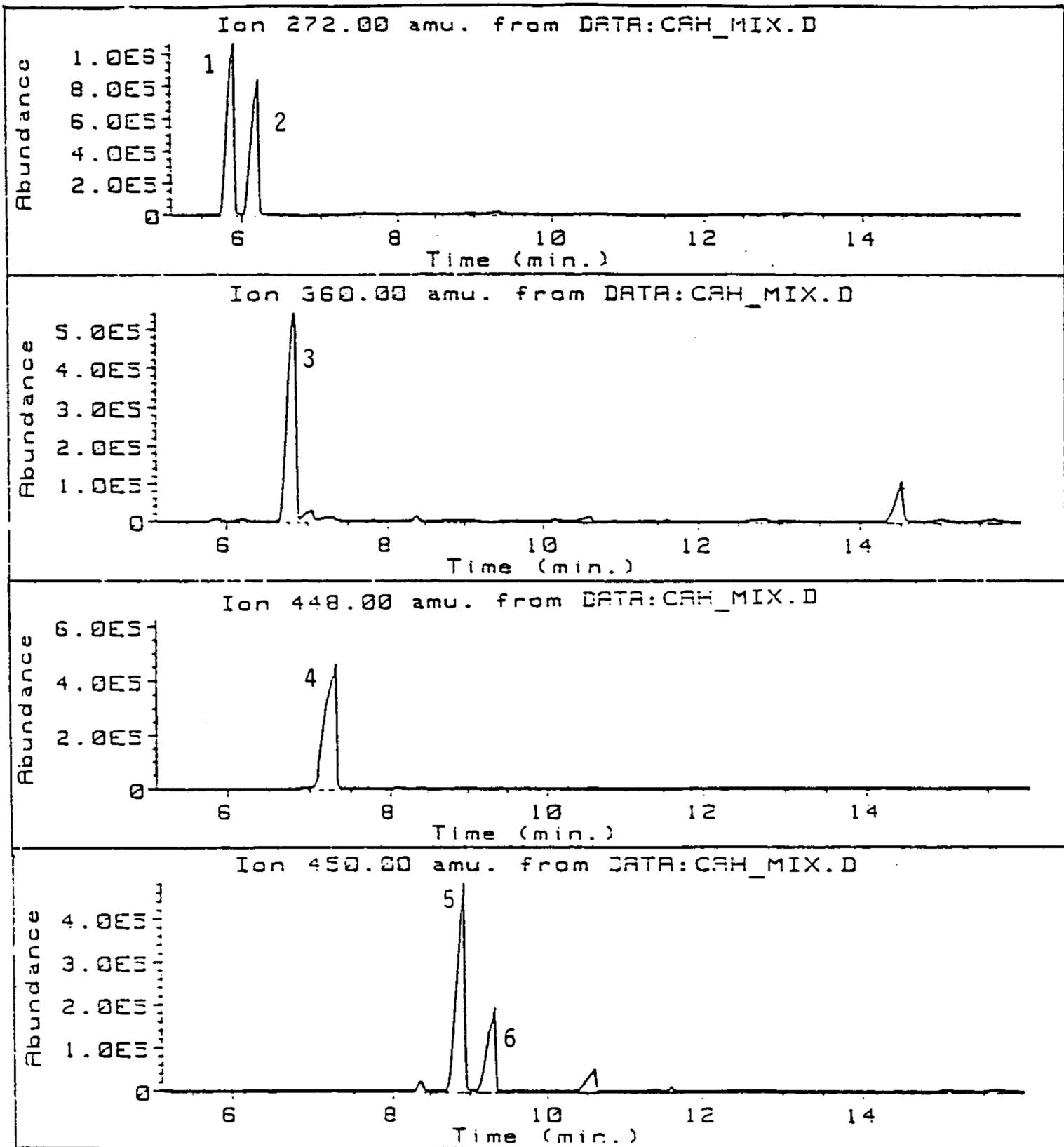


Fig.4.1 TMS로 유도체화 한 Steroid 의 표준혼합물에 대한 Ion chromatogram.

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Androsterone | 2. Etiocholanolone |
| 3. Dehydroepiandrosterone | 4. 11-Keto Etiocholanolone |
| 5. 11 β -OH Androsterone | 6. 11 β -OH Etiocholanolone |

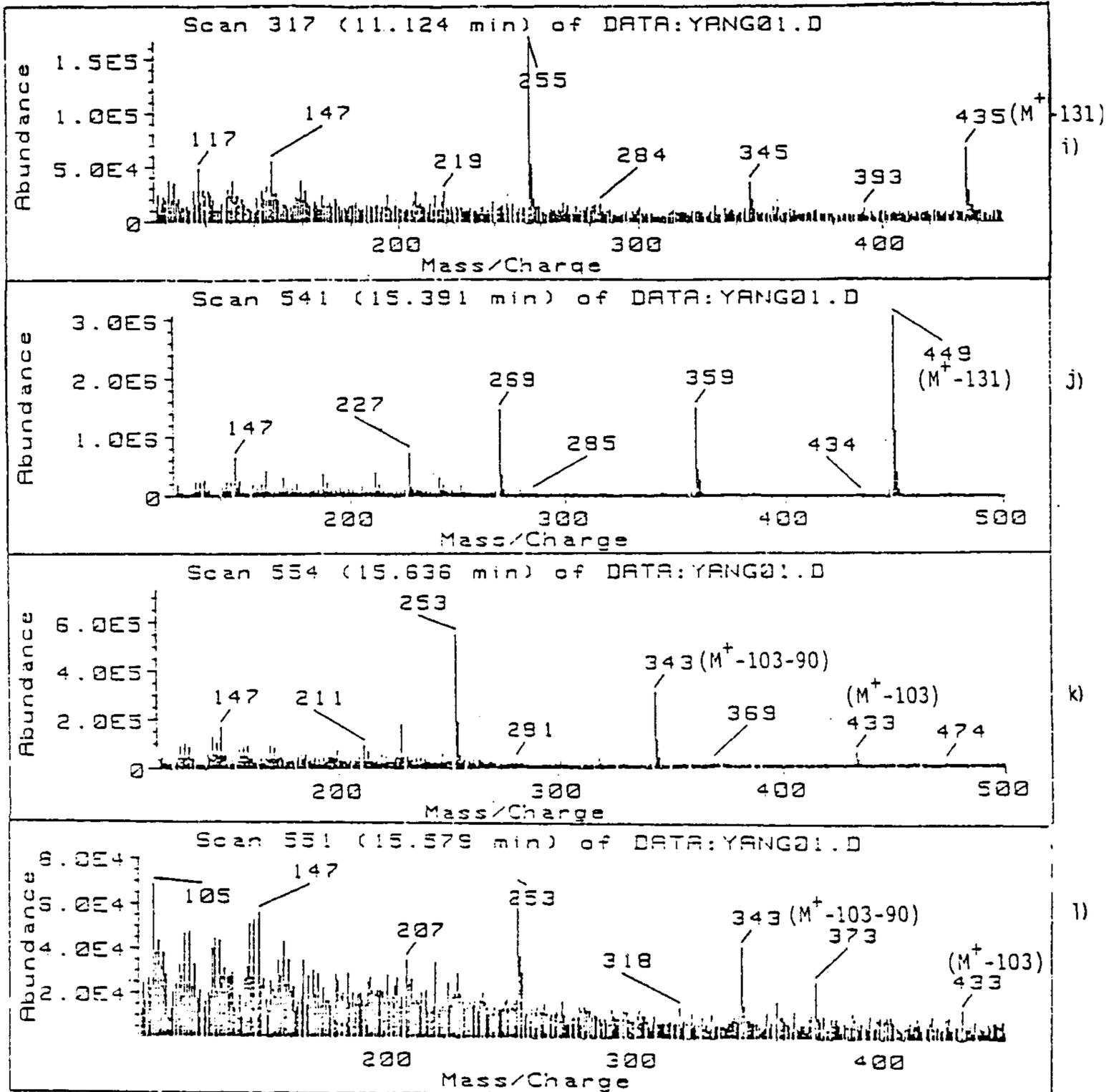


Fig. 2.4 TMS로 유도제와 한 steroid의 Mass spectrum.

- i) Tetrahydro-11-deoxycortisol
- j) Tetrahydrocortisone
- k) Tetrahydrocortisol
- l) 5 α -Tetrahydrocortisol

보통 내부표준물질은 run time의 중간정도 머무름시간을 갖는것을 사용하지만, urine내에는 알지 못하는 많은 steroid hormone이 존재하기 때문에 내부표준물질과 중첩이 될수 있다. 그리하여, 비교적 300℃ 부근에서 검출이 되고, 가능한 urine내 compound와 interference가 없는 cholesteryl butyrate를 내부표준물질로 사용하였다.

Fig.3의 B)는 뇨추출물을 scan mode로 하여 얻은 chromatogram이다. Scan mode는 검출한계가 높기 때문에 생체내에 극미량으로 존재하는 steroid hormone을 검출하기가 어렵다. 그러나, 앞에서 결정한 각 steroid hormone의 특성이온과 내부표준물질에 대한 상대적 머무름시간을 이용한 selected ion monitoring mode(Fig.4)는 scan mode보다 거의 1,000배정도 낮은 검출한계와 좋은 분리능을 가지고, 짧은 시간내에 내인성 steroid 상호간의 비를 알수 있도록 macro program을 이용해 이 검출형태를 만들었다.

여기서 언급한 macro program은 GC/MSD의 workstation의 하나인 chemstation의 언어로서 GC/MSD의 data 처리 및 autosampler를 이용하는데 도움을 주는 program이다.

Fig.5에는 macro program을 이용한 steroid 표준혼합물의 SIM chromatogram이다. THB와 5 α -THB는 상대적 머무름시간이 근소한 차이를 보이기 때문에 한개의 window에 두개의 compound를 동시에 나타내었다.

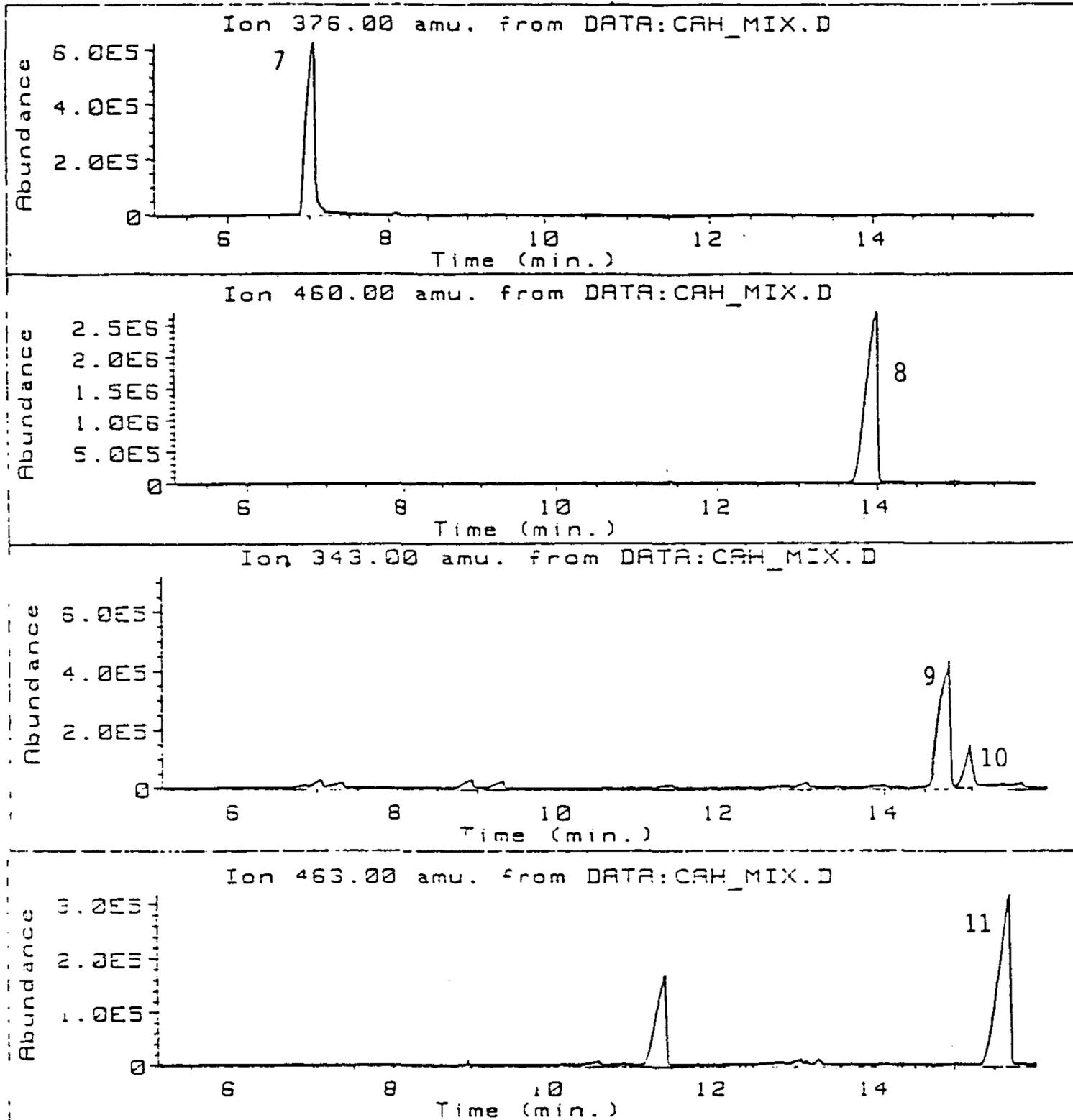


Fig.4.2 TMS로 유도체화 한 steroid의 표준혼합물에 대한 Ion chromatogram.

- | | |
|--|------------------------------------|
| 7. 11-Keto Androsterone | 8. 16-Pregnenetriol |
| 9. Tetrahydrocortisol | 10. 5 α -Tetrahydrocortisol |
| 11. 5 α -Tetrahydrocorticosterone | |

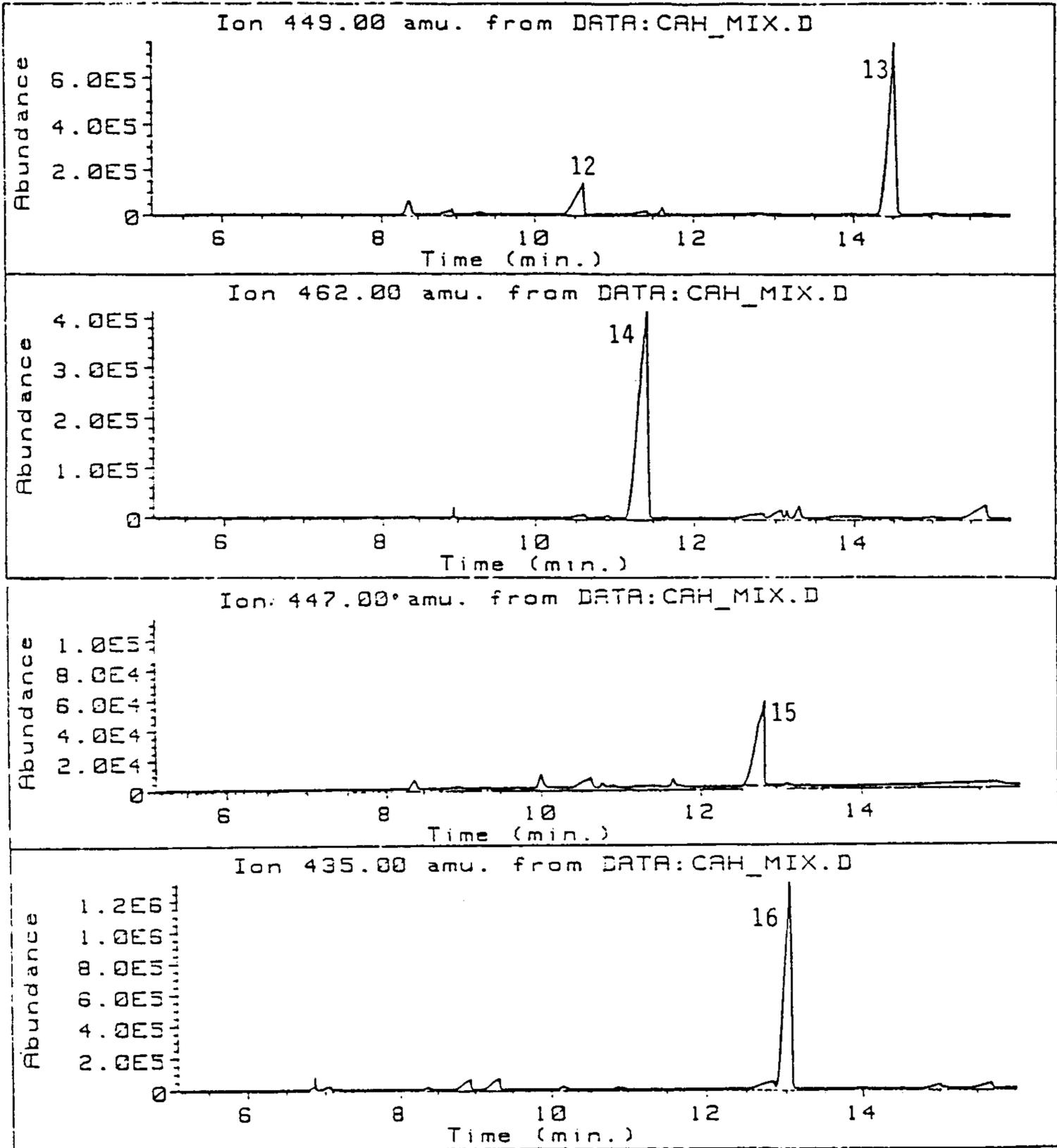


Fig.4.3 TMS 로 유도체화 한 steroid 의 표준혼합물에 대한 Ion chromatogram.

- | | |
|---------------------------------|-------------------------|
| 12. Pregnanediol | 13. Tetrahydrocortisone |
| 14. Pregnenediol | 15. Pregnanetriol |
| 16. Tetrahydro 11-deoxycortisol | |

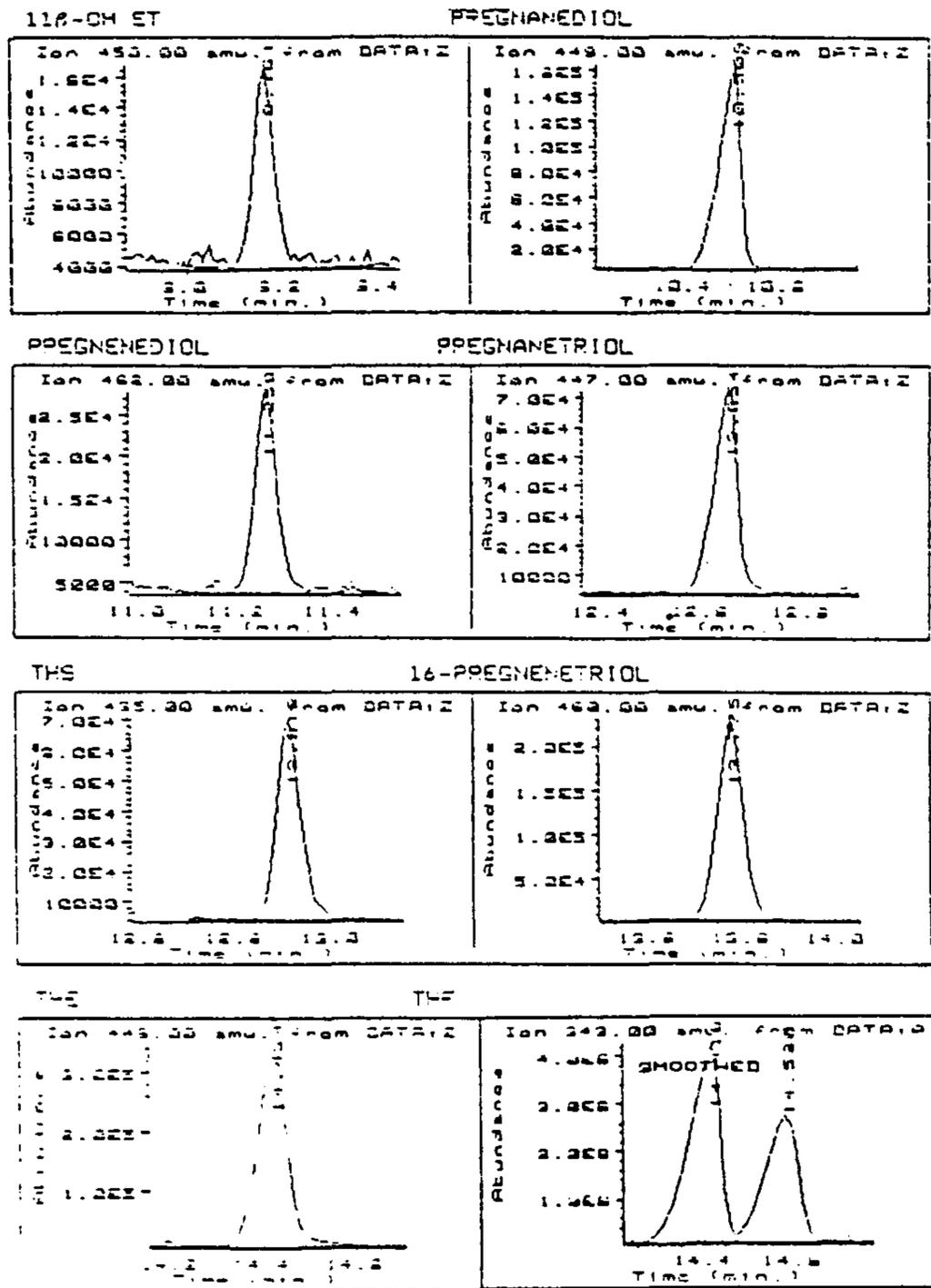


Fig.5.1. TMS 유도체화한 네인성 steroid 표준화합물의 SIM Chromatogram.

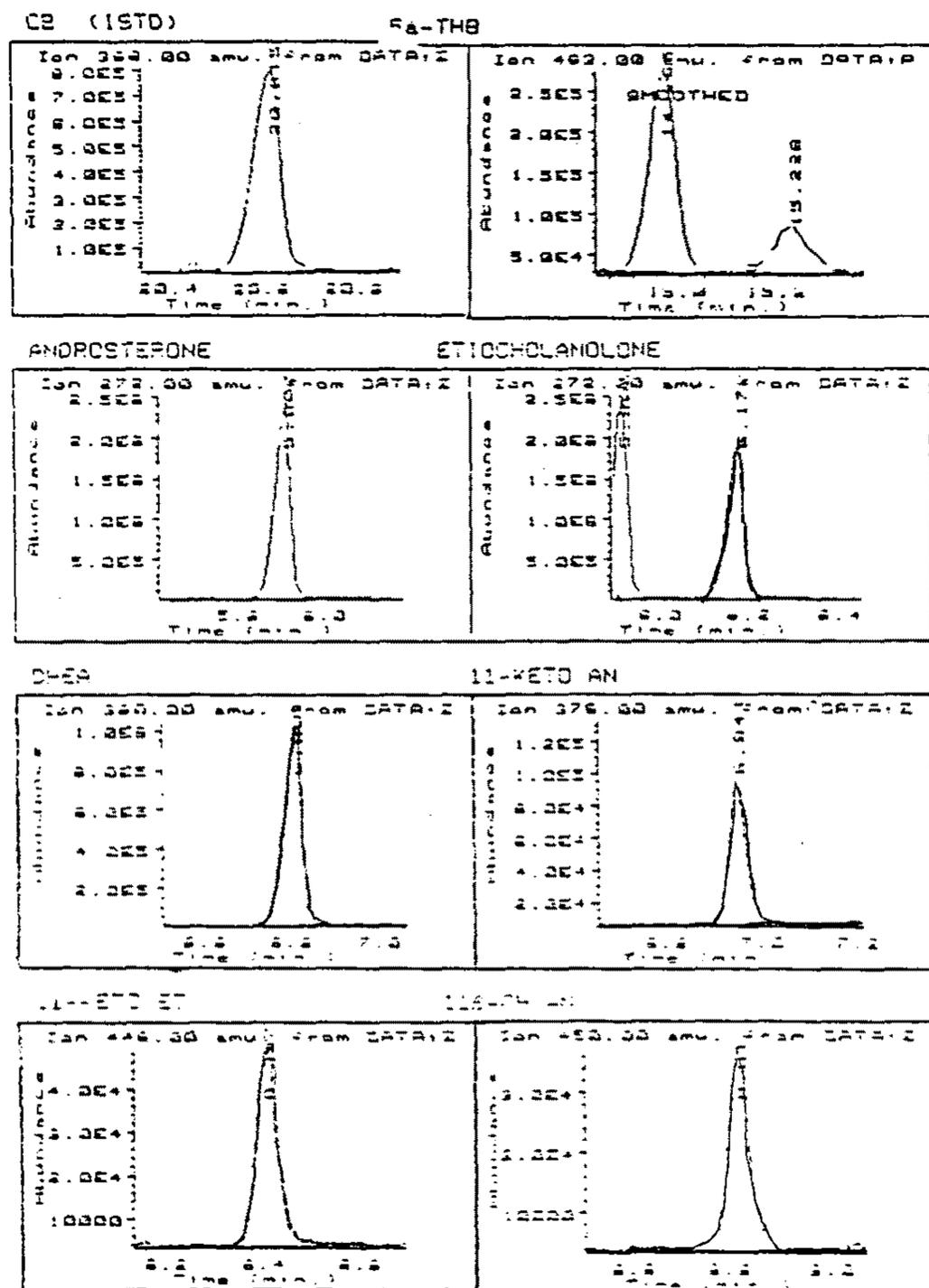


Fig.5.2. TMS 유도체확한 내인성 steroid 표준화합물의 SIM Chromatogram.

제3절. 검정곡선의 작성

측정하려는 내인성 스테로이드의 검정범위는 그 normal blank urine내에서 검출되는 steroid들의 농도에 의해 결정된다. 따라서, 본 연구에서는 소수의 개체들의 urine을 이용해 얻어진 각각의 steroid들에 대한 peak height 또는 peak의 평균값을 구해 그때의 대략적인 peak height를 기준으로 하여 검정농도 범위를 결정하고(Table 4), 각각의 표준 스테로이드를 혼합하여 5 종류의 검정용 표준혼합물을 만들었다. 이 검정용 표준 혼합물을 TMS 유도체화시켜 SIM mode로 측정하여 각각의 검정곡선을 만들었다.(Fig. 6)

제4절. Blank urine 내의 내인성 steroid 농도 결정

정상성인 남성 blank urine(n=58)으로부터 전처리과정을 통해 TMS유도체 (Fig.7)를 만들어 17종의 내인성 steroid들에 대한 urine내 농도를 결정하였다 (Table 5). Table 5에서 보듯이 17가지의 내인성 steroid 농도는 전체적으로 개체간에 어느 정도의 차이를 보였다. Androsterone과 etiocholanolone의 농도가 비교적 크게 나타났으며, DHEA의 경우도 비교적 큰 농도의 값을 보였다.

Table 4. 검정용 표준혼합물의 농도.

Compound	1	2	3	4	5
Cholesterylbutyrate	10	10	10	10	10
Androsterone	10	20	50	100	150
Etiocholanolone	10	20	50	100	150
DHEA	5	10	20	50	100
11-keto An.	1	5	10	20	50
11-keto Et.	1	5	10	20	50
11 β -OH An.	1	5	10	20	50
11 β -OH Et.	1	5	10	20	50
Pregnenediol	1	5	10	20	50
Pregnanediol	1	5	10	20	50
Pregnanetriol	1	5	10	20	50
16-Pregnenetriol	0.05	0.1	0.5	1	2
THS	0.5	1	2	5	10
THE	50	100	200	500	1000
THF	10	20	50	10	200
5 α -THF	10	20	50	10	200
5 α -THB	10	20	50	10	200
THB	10	20	50	10	200

($\mu\text{g/ml}$)

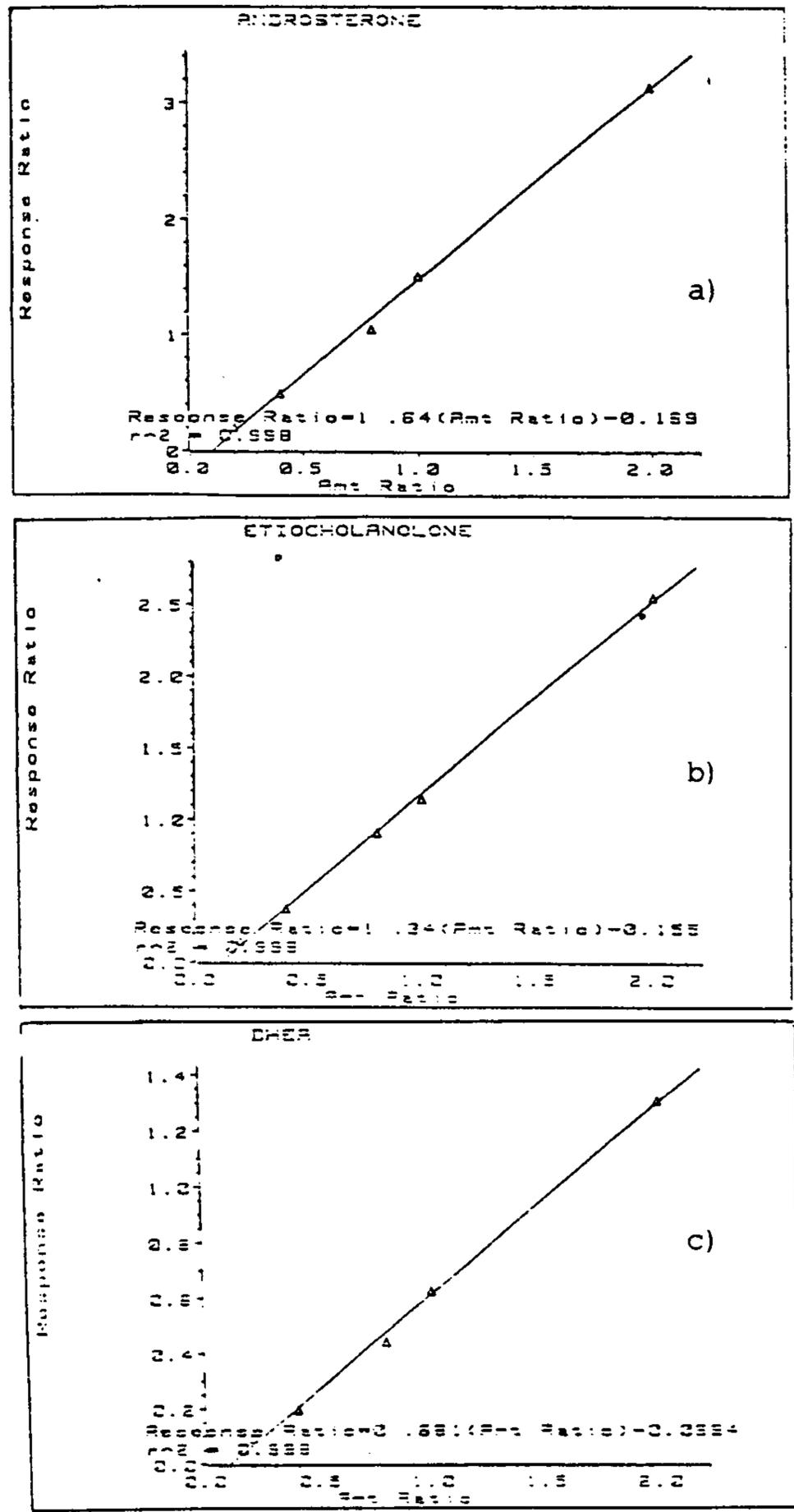


Fig. 6.1 . 내인성 steroid 를 정량하기 위한 각 steroid의 검량곡선
 a) Androsterone b) Etiocholanolone
 c) Dehydroepiandrosterone

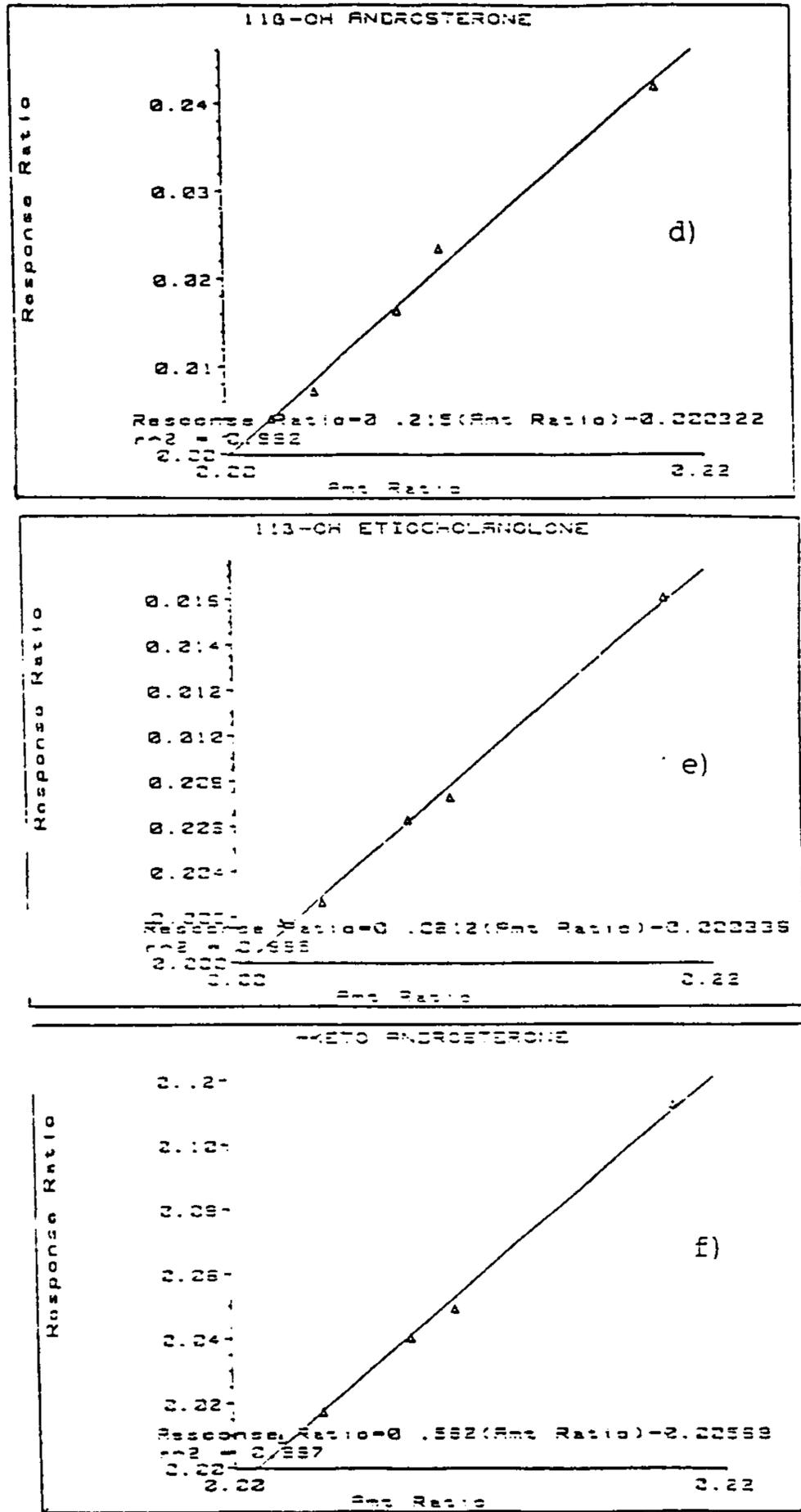


Fig.6.2. 내인성 steroid를 정량하기 위한 각 steroid의 검량곡선.

d) 11β-OH Androsterone

e) 11β-OH Etiocholanolone

f) 11-keto Androsterone

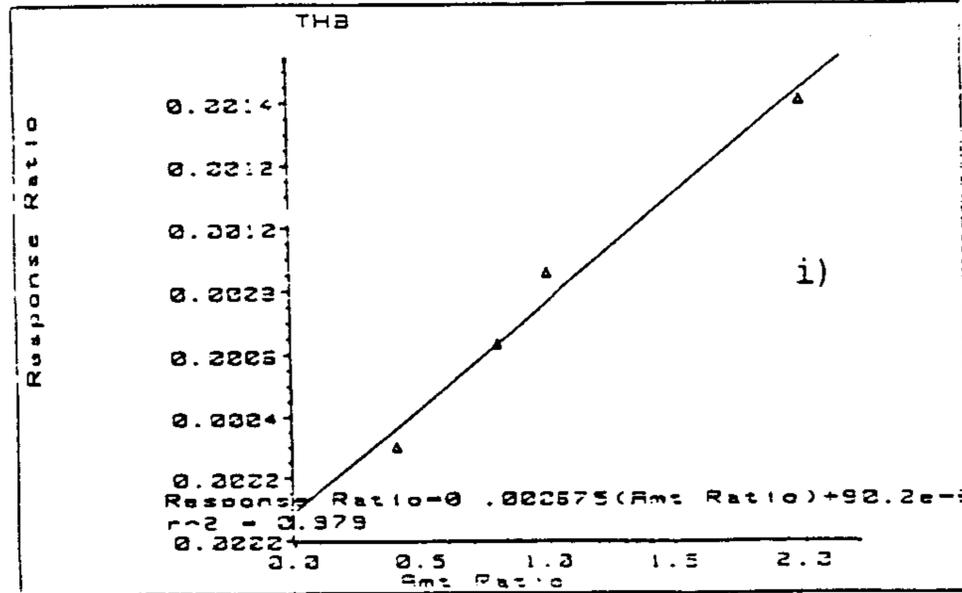
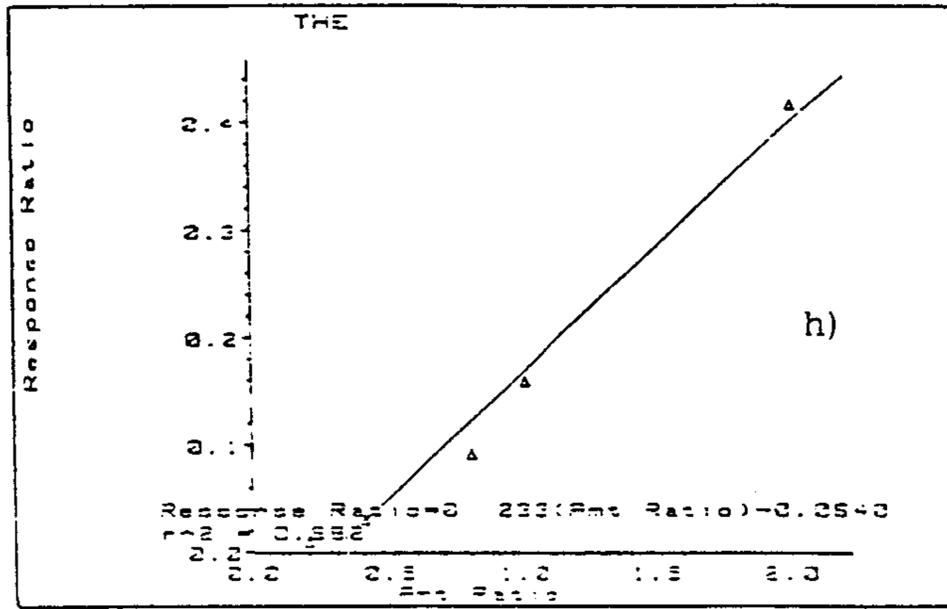
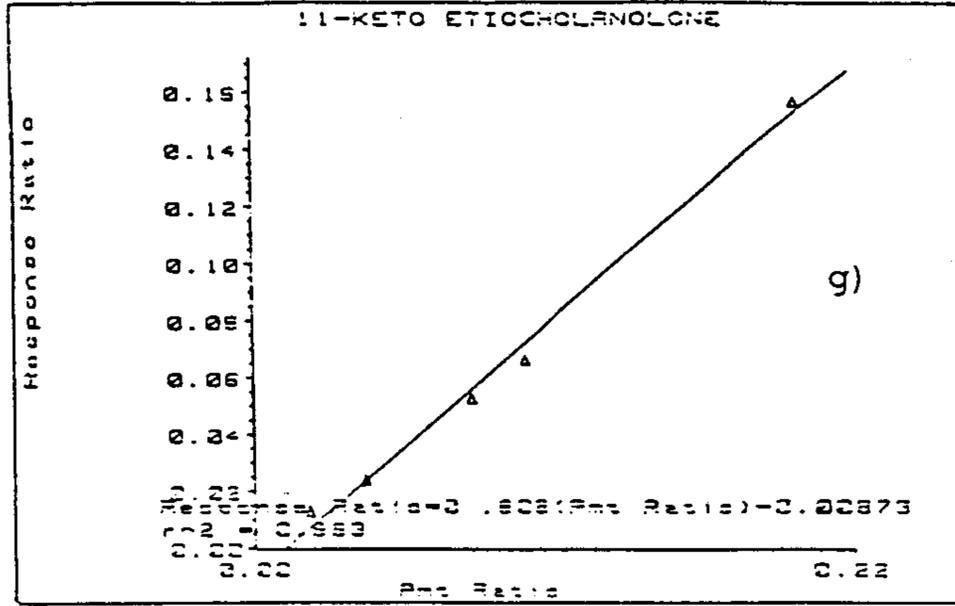


Fig.6.3. 내인성 steroid를 정량하기 위한 각 steroid의 검량곡선.

- g) 11-keto Etiocholanolone
- h) Tetrahydrocortisone
- i) Tetrahydrocorticosterone.

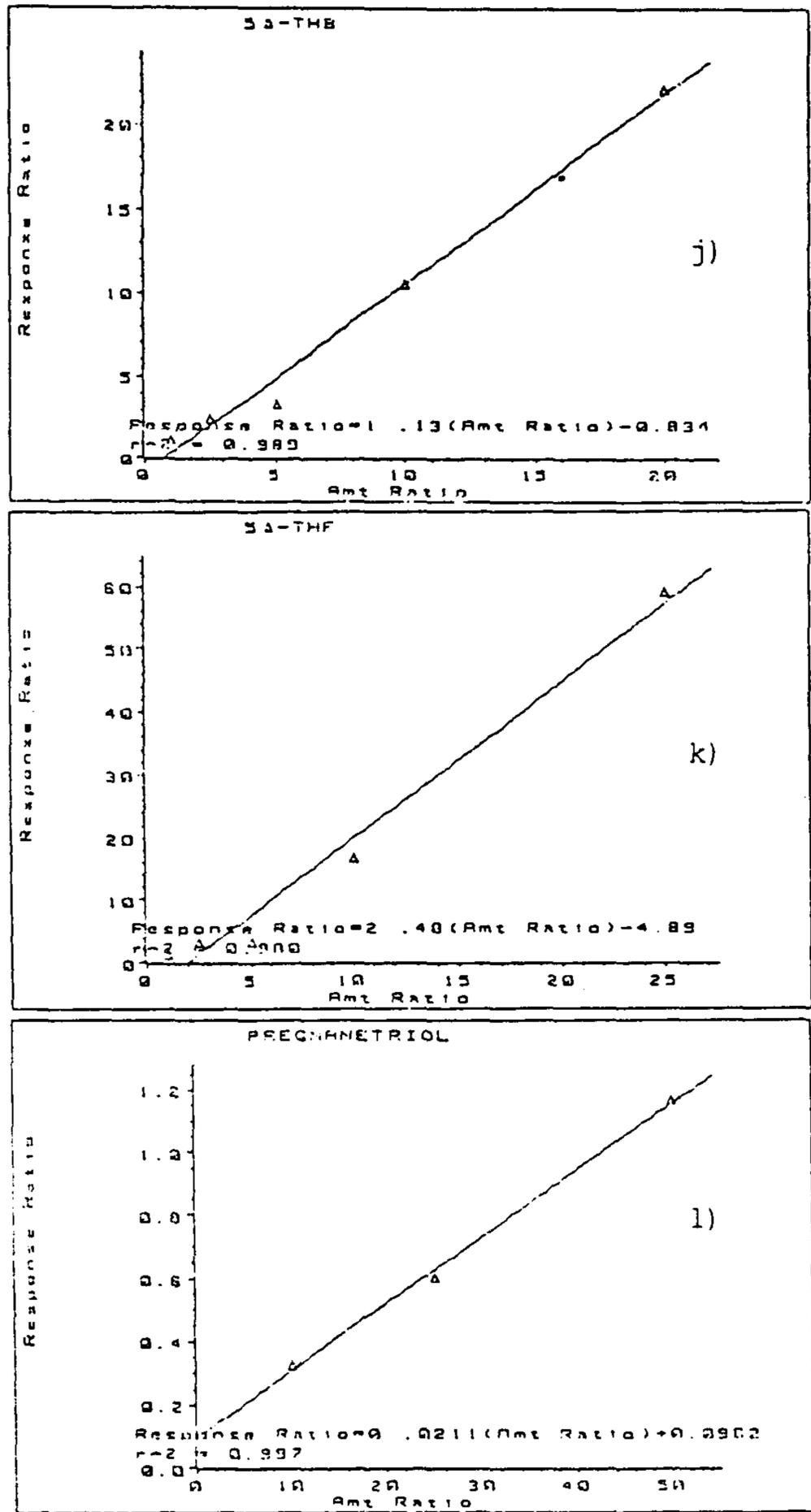


Fig.6.4. 내인성 steroid를 정량하기 위한 각 steroid의
경량곡선.

- j) 5α-Tetrahydrocorticosterone
- k) 5α-Tetrahydrocortisol
- l) Pregnanetriol

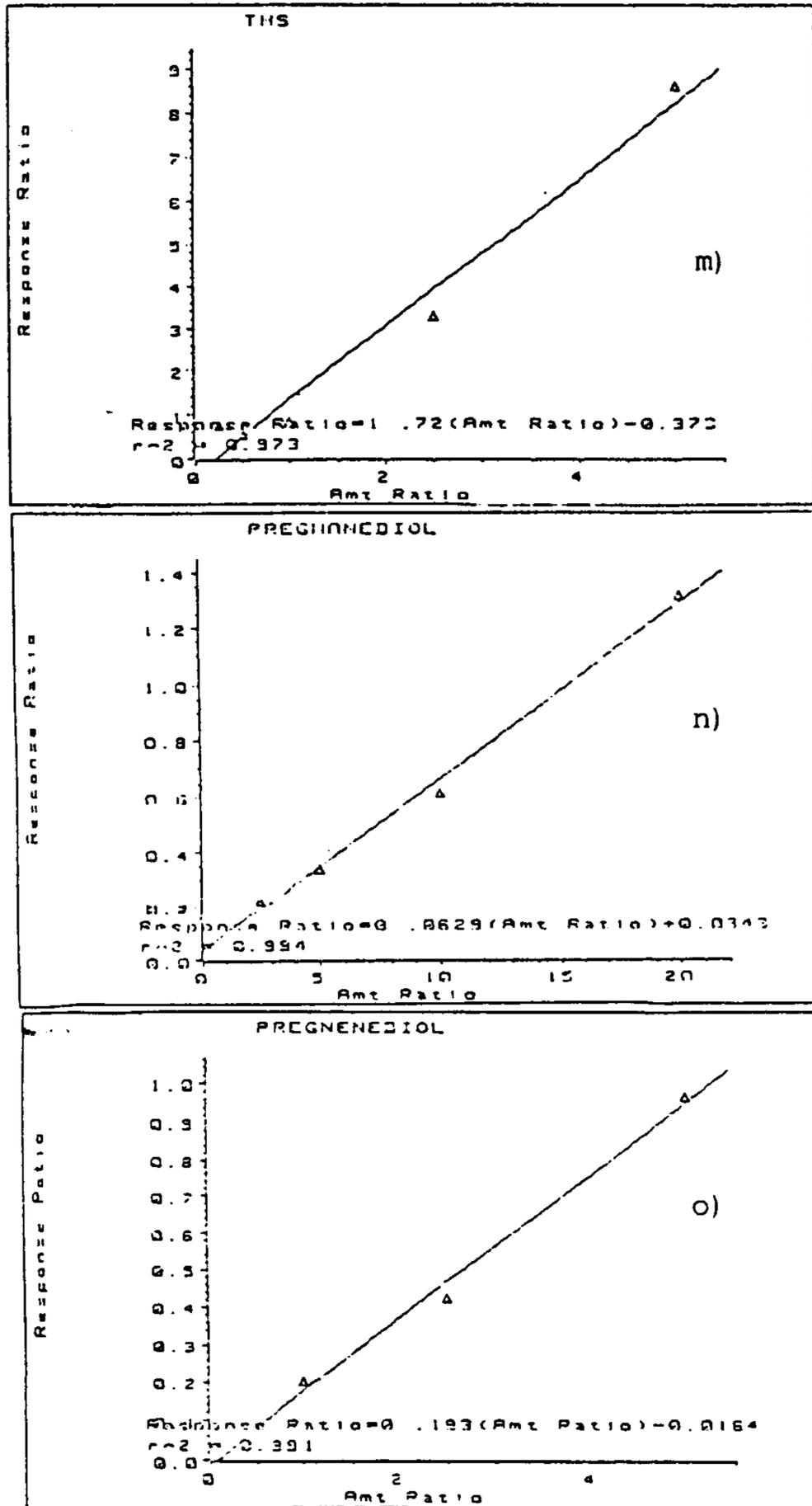


Fig.6.5. 내인성 steroid를 정량하기 위한 각 steroid의
경량곡선.

- m) Tetrahydro-11-deoxycortisol
n) Pregnanediol o) pregnenediol.

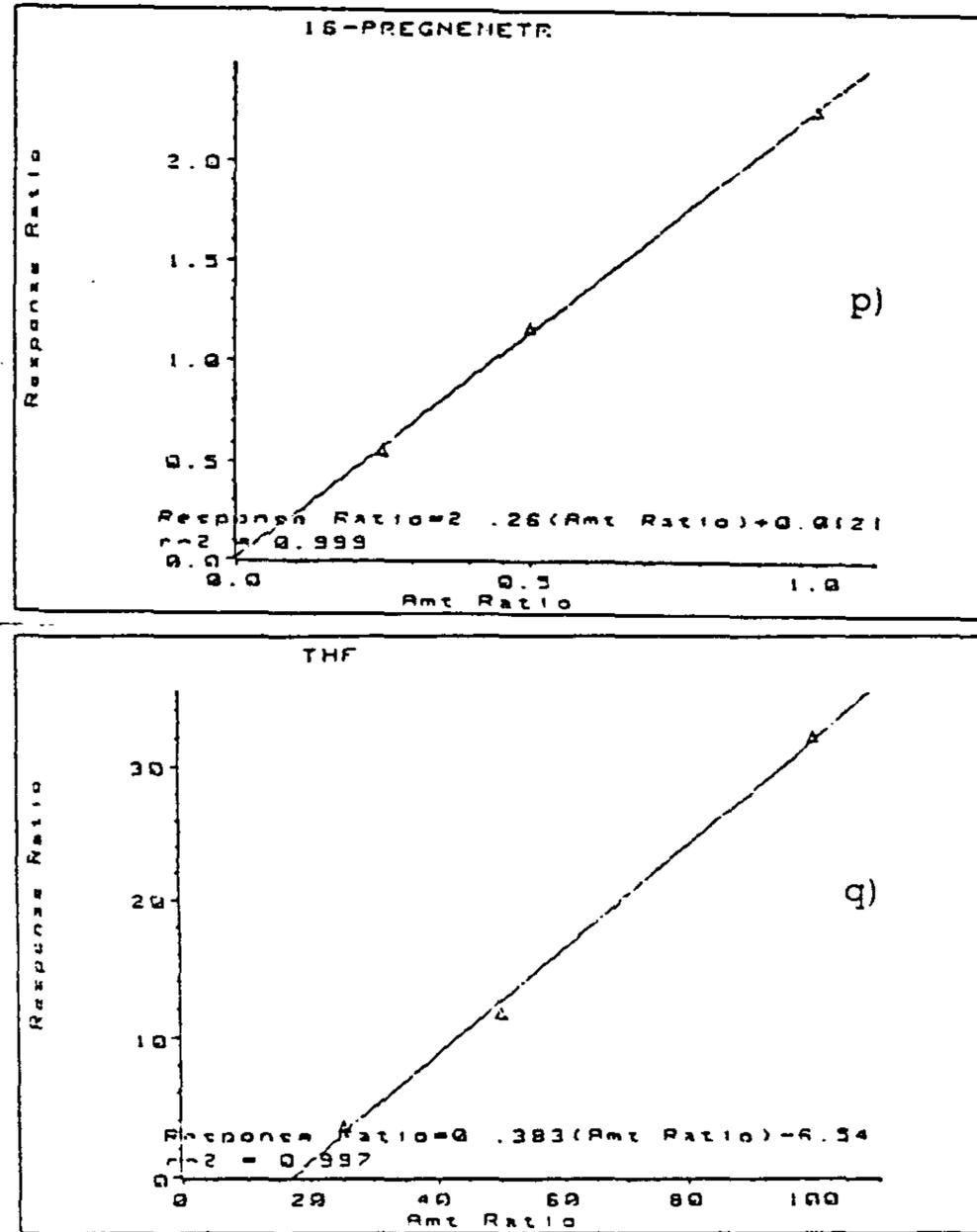


Fig.6.6. 내인성 steroid 를 정량하기 위한 각 steroid의
 검량곡선.
 p) 16-Pregnenetriol q) Tetrahydrocortisol

반면 11-keto steroid들은 적은 양으로 나타났으며 THS도 적은 양으로 나타났다. 남성의 경우와 같이, 정상성인 여성 urine으로부터의 내인성 steroid 농도를 결정하였다(Table 5, Fig.8.). 이 결과에서 보면, 각각의 내인성 steroid의 개략적인 농도범위를 얻을 수 있었는데, 개체간의 차이가 다소 나타난다는 점을 발견했고, 남성의 경우와는 큰 차이를 보이지 않았다.

어린이의 경우, 물론 개체수(n=8)가 적은 관계로 확실한 비교는 어렵지만, 대부분의 steroid들은 농도면에서 두드러지게 차이가 남을 한눈에 알 수 있다. THE의 경우, 성인의 경우에는 남.여 모두 그 평균값이 200ppm이상의 값을 보인 반면, 어린이의 경우는 2.62ppm 정도의 현저한 차이를 보임을 관찰했다. 11 β -OH Androsterone과 11 β -OH Etiocholanolone의 경우도 두드러지게 차이를 보이고, DHEA, androsterone, etiocholanolone의 경우도 비교적 큰 농도차를 나타낸다.(Fig. 9)

제5절. Important Ratio의 설정

서론에서의 Scheme 1에서 보듯이 endogeneous steroid의 precursor metabolite와 product metabolite 간에는 각각의 specific enzyme이 작용한다. 즉, 체내에서 생성되는 양은 enzyme에 의해 영향을 많이 받게 되므로 excretion되는

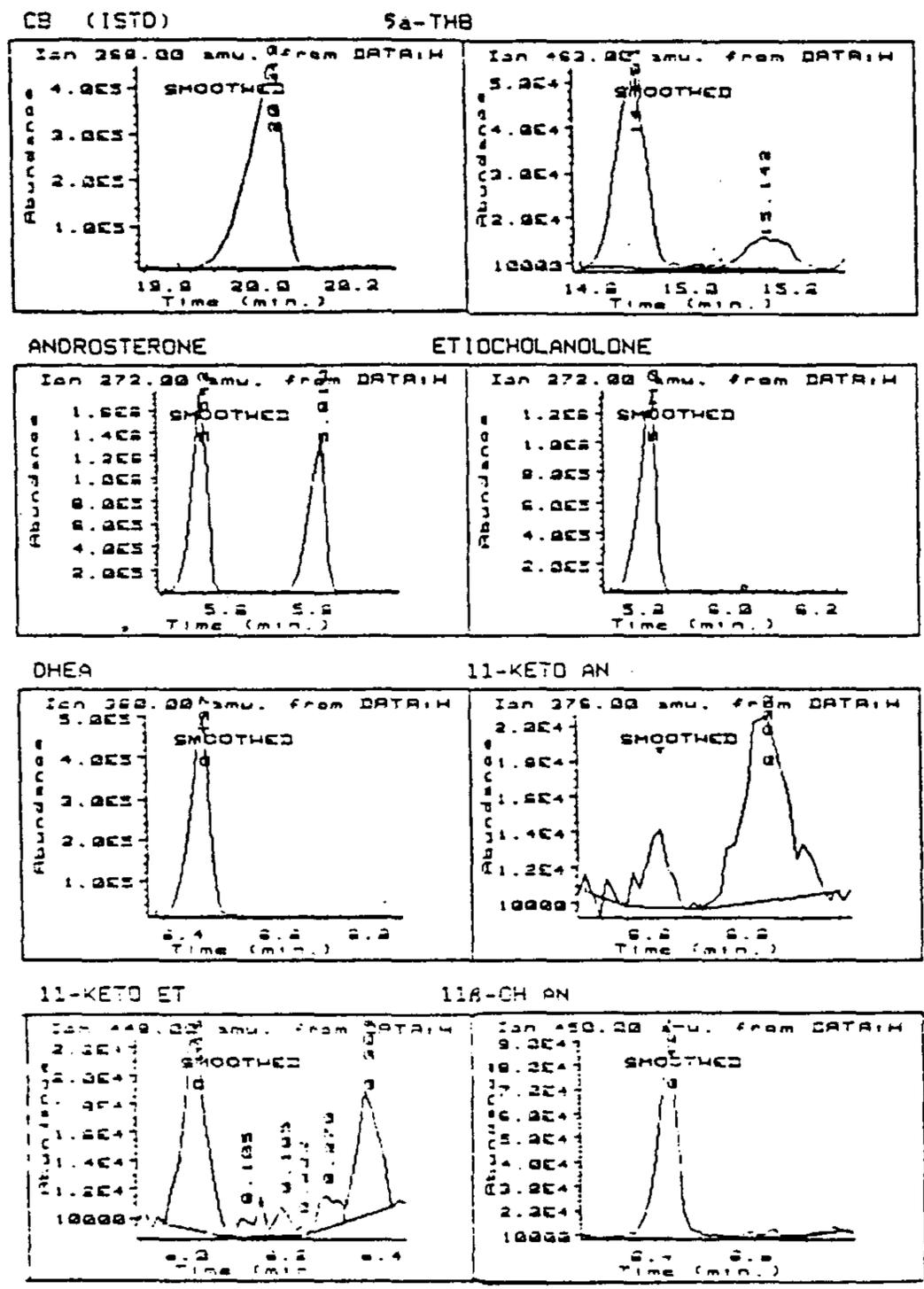


Fig. 7.1. TMS 유도체확한 정상 남성의 뇨추출물에 대한 SIM Chromatogram.

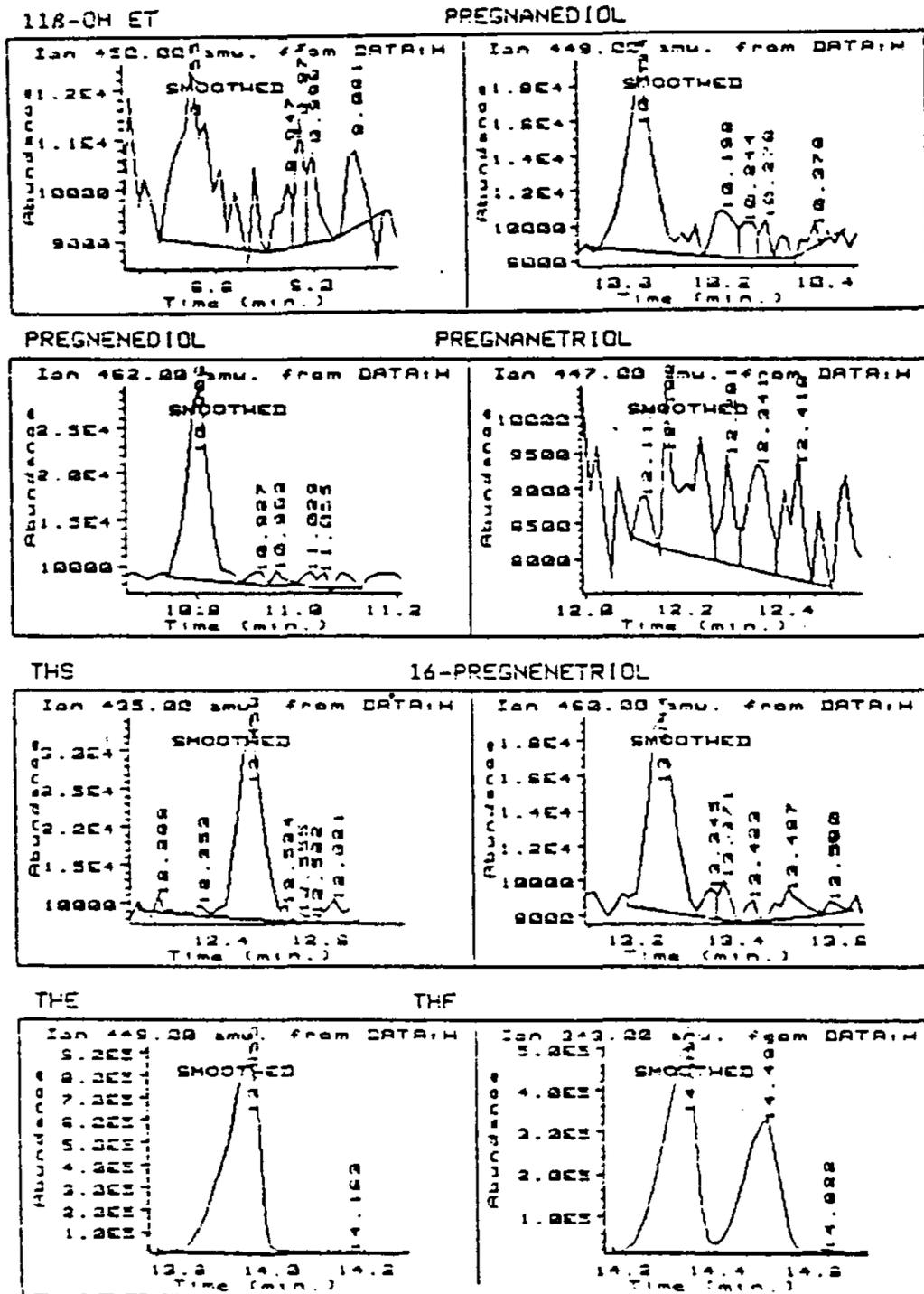


Fig.7.2. TMS유도체화한 정상 남성의 뇨추출물에 대한 SIM Chromatogram.

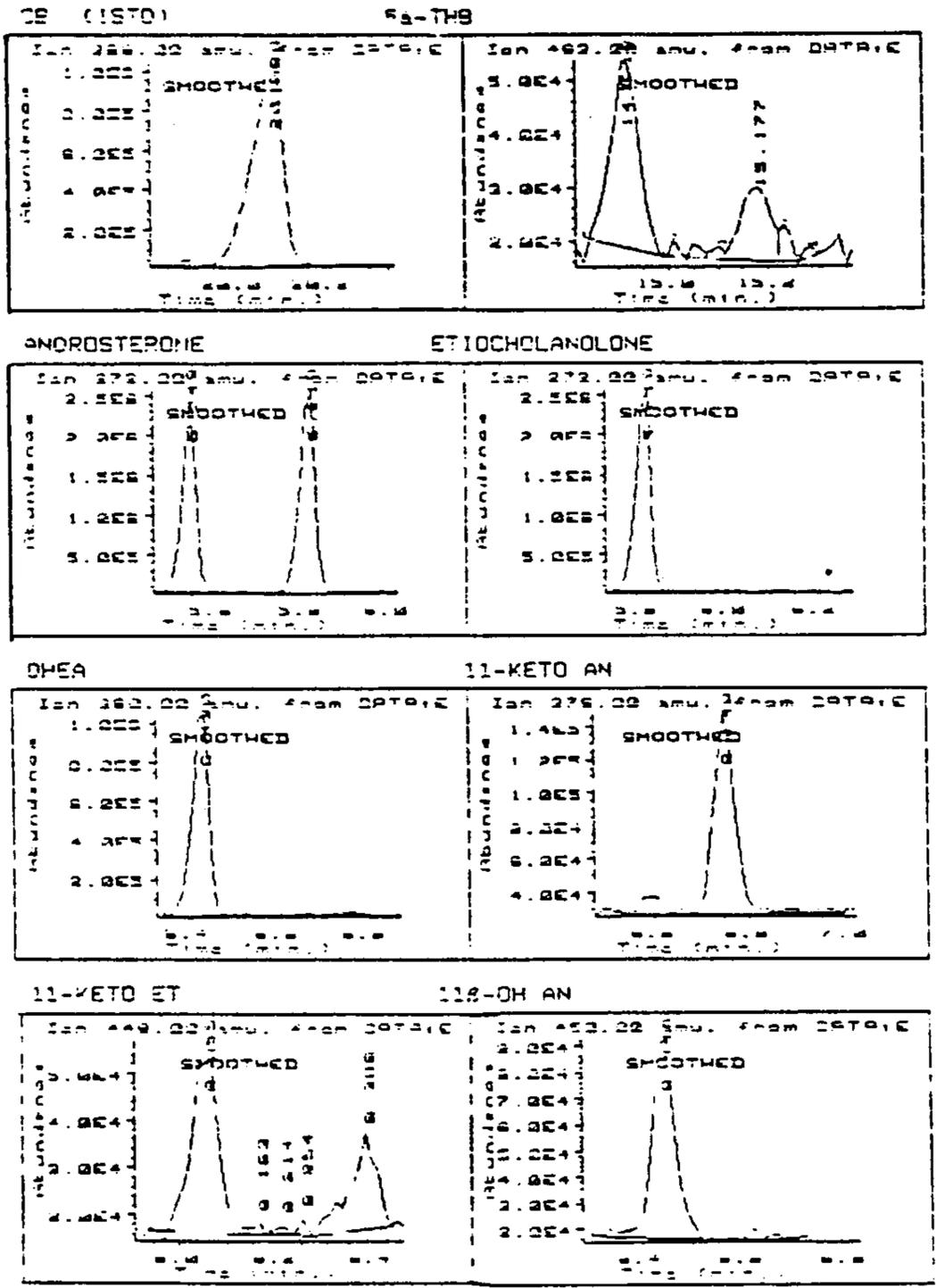


Fig.8.1. TMS 유도체화한 정상 여성의 뇨추출물에 대한 SIM Chromatogram.

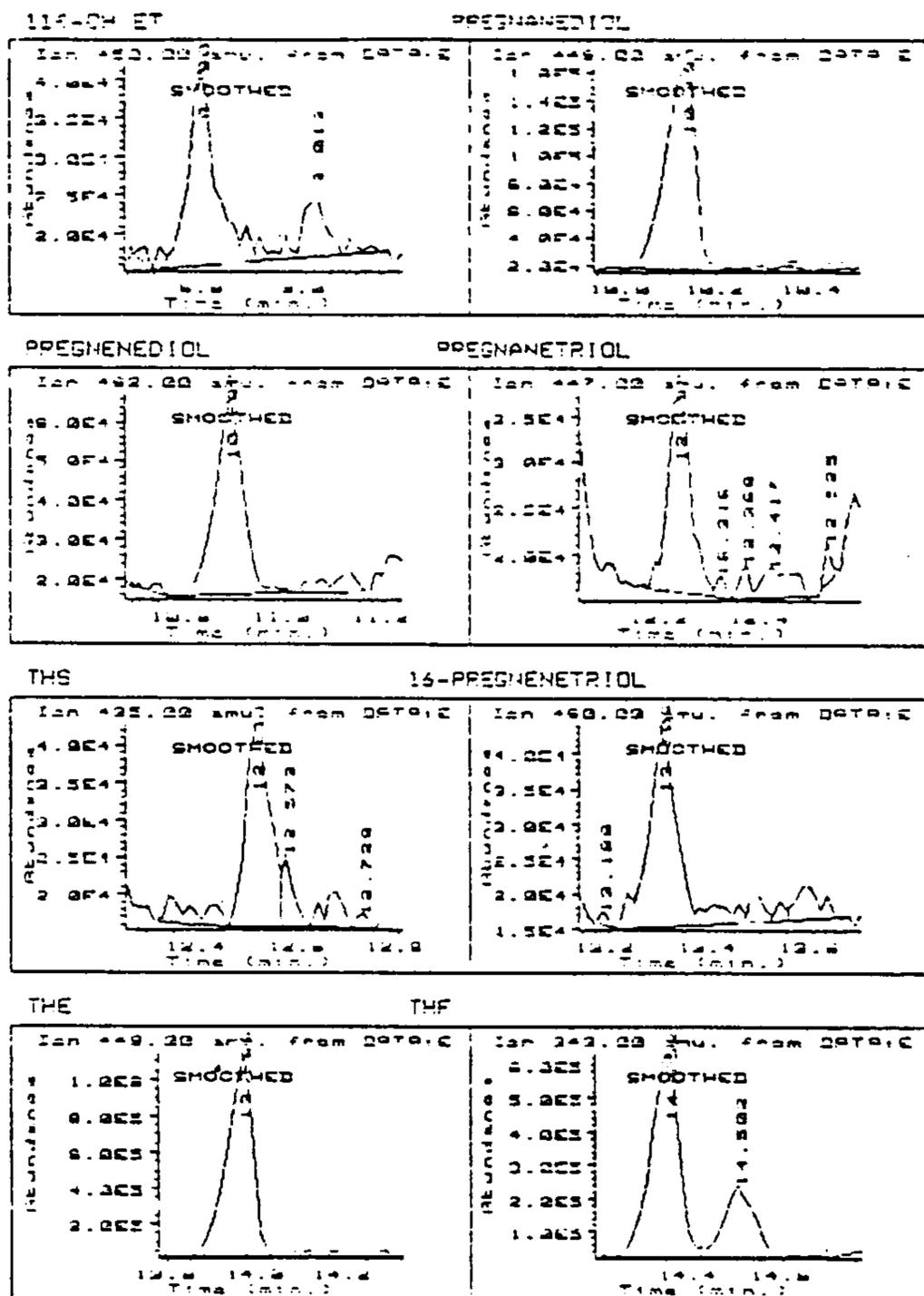


Fig.8.2. TMS 유도체화한 정상 여성의 뇨추출물에 대한 SIM Chromatogram.

Table 5. 개체군에 따른 내인성 steroid 농도의 평균값.

Compound	Children (n=8)	Female (n=34)	Male (n=68)
Androsterone	0.19	48.10	45.92
Etiocolanolone	0.19	46.23	35.07
DHEA	0.72	29.68	18.91
11 β -OH An.	0.11	23.87	25.08
11 β -OH Et.	0.46	10.13	6.48
THE	2.62	254.17	282.92
11-keto An.	0.10	1.39	0.49
11-keto Et.	0.12	3.39	0.64
THF	1.94	82.74	181.91
5 α -THF	6.69	51.14	118.22
THS	0.13	5.55	4.24
Pregnanetriol	68.75	18.75	6.61
Pregnenediol	5.79	4.92	2.65
16-Pregnenetriol	0.01	1.29	0.05
Pregnanediol	0.67	17.72	3.35
5 α -THB	0.33	11.43	20.82
THB	2.31	21.62	20.89

(ug/ml)

Table 7. Concentration range of Endogeneous steroids for male, female and children.

Compound	Children(n=8)	Female (n=34)	Male (n=68)
An	0.05 - 0.12	11.5 - 61.69	4.57 - 77.91
Et	0.05 - 0.12	2.04 - 66.09	4.26 - 68.53
DHEA	0.20 - 0.48	0.005-126.72	0.008- 59.23
11 β -OH An.	0.01 - 0.14	0.80 - 55.64	0.14 - 89.14
11 β -OH Et.	0.04 - 0.87	0.31 - 22.94	0.18 - 36.05
THE	0.15 - 2.00	0.35 -205.87	0.01 -278.58
11-keto An.	0.01 - 0.07	0.06 - 3.12	0.01 - 6.18
11-keto Et.	0.02 - 0.15	0.08 - 7.04	0.1 - 13.27
THF	0.21 - 1.40	8.26 - 38.83	1.98 - 5.62
5 α -THF	0.21 -10.74	1.23 - 38.46	0.60 - 8.03
THS	0.01 - 0.12	0.65 - 7.48	0.54 - 9.32
Pregnanetriol	0.02 - 0.15	0.08 - 7.04	0.1 - 13.27
Pregnenediol	0.004-17.19	0.005- 27.91	0.007- 28.30
16-Pregnenetriol	0.003- 0.007	0.004 - 11.40	0.007- 0.65
Pregnanediol	0.01 - 0.86	0.23 - 13.63	0.007- 15.96
5 α -THB	0.04 - 0.33	0.30 - 1.57	0.006- 26.38
THB	0.09 - 2.38	1.74 - 8.76	0.006- 22.88
Vol. L/24h	0.3 - 0.8	0.8 - 1.2	1.0 - 1.5

Table 6. 개체군에 따른 내인성 steroid 농도 범위.

Compound	Children (n=8)	Female (n=34)	Male (n=68)
Androsteron	0.13- 0.29	2.08-112.00	5.53-282.90
Etiocholanolone	0.13- 0.30	3.7 -120.20	7.73-165.90
DHEA	0.49- 1.16	0.01-228.50	0.01-427.20
11 β -OH An.	0.03- 0.35	1.54-106.60	0.36-273.20
11 β -OH Et.	0.09- 2.22	0.60- 43.94	0.35- 55.24
THE	0.45- 6.07	0.82-750.40	0.01-846.20
11-keto An.	0.03- 0.17	0.12- 5.93	0.01- 7.84
11-keto Et.	0.04- 0.39	0.15- 13.41	0.14- 16.84
THF	0.65- 4.27	18.93-237.20	3.03- 10.29
5 β -THF	0.65- 32.79	2.81-234.95	0.91- 14.72
THS	0.03- 0.35	1.43- 16.38	0.94- 16.33
Pregnanetriol	4.06-319.90	1.48- 51.27	1.52- 69.24
Pregnenediol	0.01- 45.63	0.01- 55.55	0.01- 45.00
16-Pregnenetriol	0.01- 0.02	0.01- 23.83	0.01- 1.36
Pregnenediol	0.03- 1.73	0.46- 72.77	0.01- 51.17
5 α -THB	0.11- 0.96	0.66- 3.45	0.01-154.10
THB	0.25- 6.96	3.82- 51.24	0.01-133.67

(ug/ml)

steroid들의 절대적인 양은 enzyme에 의해 결정되는데, 그 절대적인 농도는 개체간에 비교적 차이가 큰것으로 나타났다. 따라서, 원인되는 내인성 전구물질과 그 생성대사산물을 상대적으로 평가하는 것이 실제적인 진단을 위해서 필요하다. Fig. 12, 13은 각 steroid의 농도비율을 개체군에 따른 분포와 평균을 나타내었다. 이를 위해 다음과 같이 각각의 enzyme deficiency에 따라서 평가해야 하는 ratio들을 설정하였다.

1. 3β -Hydroxy steroid dehydrogenase deficiency²⁰⁻³⁰

3β -Hydroxysteroid dehydrogenase는 Δ^5 -steroid의 C₂₁에 있는 -CHOH에서 2개의 수소를 제거하고 3번탄소의 OH를 ketone으로 전환하게 하므로 Δ^5 -Isomerase에 의해서 C₅ 위치의 이중결합(Δ^5 -Steroid)이 C₄(Δ^4 -steroid)로 이동한다. 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency는 Δ^5 가 Δ^4 로 대사되지 않기 때문에 Δ^5 경로를 거쳐서 dehydroepiandrosterone 생합성 경로로 가게 된다. Glucocorticoid나 mineralcorticoid도 Δ^4 -steroid이므로 감소하게 된다. 또한, 이 증상은 3번위치에 ketone을 가지고 있는 testosterone의 양도 작기 때문에 남자의 경우 성장에 이상이 오게 된다.(Scheme 1.c)

그러므로, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency는 testosterone의 전구물질인 dehydroepiandrosterone, 이나 androsterone, etiocholanolone과 corticosteroid의 비율로 important ratio를 결정하게 된다. 1971년 O. Janne과 1979년 Y. Yamaguchi에 의하면 서양인의 경우 DHEA/THE + THF + 5α -THF가 남녀 각각 0.35, 0.10이고, An + Et/THE + THF + 5α -THF의 비율은 0.86과 0.66이다. 그리고 ratio의 값이 5가 넘으면 affected value라고 보고하였다.

서양인과 본실험의 data를 비교해 보면, DHEA/THE+ THF + 5α -THF의 값은 서양인 보다 적은값을 나타내고, An + Et/THE + THF + 5α -THF는 본 실험의 결과가 큰값을 보이고 있다.

Important Ratio	Normal		
	C	M	F
DHEA/THE + THF + 5α -THF	0.82	0.06	0.07
An + Et / THE + THF + 5α -THF	0.09	0.39	0.34

2. 21-Hydroxylase deficiency²⁴⁻²⁸

Cortisol의 생합성에 관여하는 21-hydroxylase는 21번 탄소에 OH를 첨가하는 기능을 가진다. 부신의 선천성 대사질환의 대표적인 것이 Congenital Adrenal Hyperplasia이고, 그중 가장 많은 병례가 발견되는 것이 21-hydroxylase deficiency이다. 이 증상은 mineralcorticoid인 aldosterone의 생합성이 불완전하고, 뇨중 17-ketosteroid, pregnanetriol이 증가하고, 혈중 cortisol이 감소한다. 따라서 21-Hydroxylase의 diagnosis에는 cortisol metabolite와 pregnanetriol의 ratio가 중요하다. 21-hydroxylase는 progesterone에서 deoxycorticosterone으로 전환하는데 도움을 주는 효소이므로 21-hydroxylase deficiency인 경우는 cortisol 생합성이 불완전하기 때문에 androgen인 testosterone이 과량분비되어 남아의 경우 성징조숙 현상이 일어나고, 여아의 경우 성징의 남성화 현상이 발견된다. 또한 본 증상은 ① Simple compensated form과 ② Salt-losing type 으로 나누어지는데 ①번의 경우는 내인성 ACTH의 과량분비에 의해 cortisol이 정상이든지 낮게 나타난다. 또한 ACTH와 같이 β -MSH도 증가하기 때문에 색소침착의 원인이 되기도 한다.

②의 경우는 aldosterone이 감소되고, 구토, 탈수, 체중감소의 증상과 더불어 환자는 생후 수일-보름후에 보유력이 부족하여 무기력 상태이고, 치료하지 않으면 1-2개월후에 사망한다. 다행히 그 위기를 넘기면 수개월후에 NaCl deficiency를 나타내고, 더우기 1-2년후에는 성조숙이라든가 남성화를 나타낸다.(Scheme 1.e) 따라서, 21-hydroxylase deficiency는 17-hydroxyprogesterone에서 corticosteroid로 진행하지 못하므로 pregnanetriol이 증가하므로, pregnanetriol과 corticosteroid의 ratio가 진단의 척도가 된다. 1981년 Joannou 와 De Peretti등이 PT/THE + THF + 5 α -THF의 값은 정상 여성일 경우 0.03-0.15라고 보고하였고, 본 실험결과는 어린이일 경우 그값이 23.50으로 현저히 높았고, 남성은 0.05 여성은 0.13을 나타내었다.

Important Ratio	Normal		
	C	M	F
PT/THE + THF + 5 α -THF	23.50	0.05	0.13

3. 17 α -Hydroxylase deficiency²⁹⁻³²

17 α -Hydroxylase는 pregnenolone 등 steroid의 17번 위치에 hydroxylation이 되는데 도움을 주는 효소이다. 이 효소가 deficiency되면, C₁₉ steroid와 cortisol metabolite가 거의 발견되지 않는다. 17번 위치가 hydroxylation 되어있는 testosterone, cortisol metabolite 등의 분비가 불완전하기 때문에 남성의 경우 여성화 또는 남성반성음양 현상을 나타낸다. 17번 탄소에 hydroxy기가 없는 corticosterone metabolite가 증가하고 최종 product인 aldosterone의 분비가 많아져 Na와 K의 양적평형을 유지하지 못하기 때문에 고혈압 증상도 나타난다. 이것도 21-hydroxylase deficiency와 마찬가지로 ACTH의 과량분비와 더불어 melanine stimulant hormone(MSH)의 과량분비 때문에 피부색소 침착의 경우도 발견된다. 17-hydroxylase deficiency는 17-keto steroid와 cortisol metabolite가 진단에 중요한 척도가 된다. 따라서 17번 탄소에 hydroxylation이 되어있는 cortisol metabolite와 corticosterone metabolite의 ratio, C₁₉ Steroid인 androsterone, etiocholanolone과 corticosterone metabolite의 ratio가 중요한 역할을 하리라 생각된다.(Scheme 1.e)

1982년 Petersen은 5 α -THB는 남성은 0.19, 여성은 0.33, THB/THF + 5 α -THB + THB/An + Et의 ratio는 남성, 여성 각각

0.11 과 0.28 이고, 각 ratio가 20이 넘으면 affected value 라고 보고하였다. 성인의 경우 서양인과 본 실험결과가 많은 차이를 보이지는 않지만 어린이의 경우 5α -THB + THB/An + Et의 ratio가 5.08을 나타내었다.

Important Ratio	Normal		
	C	M	F
5α -THB + THB / 5α -THF + THF	0.57	0.95	0.28
5α -THB + THB / An + Et	5.08	0.58	0.84

4. 17,20-Lyase deficiency²⁴⁻²⁶

17,20-Lyase deficiency는 17α -hydroxylase와 거의 비슷하고, C_{19} steroid의 분비량이 감소하고, corticosterone metabolite의 분비량이 증가한다. C_{19} steroid pregnanediol과 pregnanetriol의 분비가 (4) 많아지고, 17,20-Lyase deficiency를 진단하는데는 cortisol metabolite와 C_{19} steroid, C_{21} steroid의 ratio가 중요한 척도가 된다. (Scheme 1.e)

C_{21} Steroid가 C_{19} Steroid로 되는데 도움을 주는 enzyme
 이므로, 17,20-Lyase deficiency는 다음 4가지의 steroid
 ratio로 가늠하게 된다. 1982년 Roger와 Zachmann은 THB +
 5α - THB/THF + 5α -THF의 ratio가 정상남성은 0.19,
 정상여성은 0.33, 그리고, 1.5-2.5의 범위가 affected
 value이고, An + Et/THE + THF + 5α - THF는 남성은 1.0,
 여성은 0.8이라고 보고하였다.

Important Ratio	Normal		
	C	M	F
THB + 5α -THB / THF + 5α -THF	0.57	0.95	0.28
An + Et / THE + THF + 5α -THF	0.09	0.39	0.34
PD / PT	0.15	0.77	1.58
PT / THE + THF + 5α -THF	23.50	0.13	0.05

5. 5α -Reductase Deficiency³⁸⁻³⁹

Urine에서 steroid는 epimeric pair인 5β , 5α 로 존재한다.
 이 증상은 epimeric pair로 존재하는 steroid가 5α -hydrogen
 steroid의 분비량이 감소한다. 따라서 $5\alpha/5\beta$ 의 ratio로 이
 효소의 deficiency를 확인할 수 있다.

1984년 Corral과 Tvedegaard는 epimeric pair로 존재하는 steroid의 ratio에서 Et/An은 남성은 1.24, 여성은 1.73, 11 β -OH Et/11 β -OH An은 남성이 0.35, 여성이 0.51, THB/5 α -THB는 남성이 0.57, 여성이 0.48, THF/5 α -THF는 남성이 1.56, 여성이 2.00이라 보고하였다.

본 실험의 경우 어린이는 THB/5 α -THB의 값이 12.07을 나타내는데, 이는 시료의 개체수도 적고 어린이의 경우 성인과 다른 양상을 보이는 것으로 생각된다.

Important Ratio	Normal		
	C	M	F
Et / An	1.04	2.72	1.07
11 β -OHEt/11 β -OHAn	3.48	1.61	0.54
THB / 5 α -THB	12.07	2.16	5.16
THF / 5 α -THF	0.90	4.72	2.26

6. 18-Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency⁴²⁻⁴⁵

부신피질에 있는 aldosterone의 주요합성 과정인 18-hydroxy-corticosterone에서 aldosterone으로 전환하는데

관여하는 18-hydroxy-steroid dehydrogenase의 선천적 결함에 의한 저 aldosterone 증상이다. 그러나 최근 Ulick는 corticosterone에서 aldosterone으로 전환될때, 중간체인 18-hydroxycorticosterone이 아니고, (Scheme 1.d) corticosterone이 산화를 받아서 aldosterone으로 전환되는 것인가? 또는, 그림의 파선과 같은 경로에 의해서 side reaction이 일어나서 18-hydroxycorticosterone이 되는가를 추정했다. 그래서, 종래의 corticosterone에서 18-hydroxycorticosterone으로의 전환에 관여하는 18-hydroxylase의 선천성 결핍을 corticosterone methyl oxidase defect I형, 18-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency로 되는 선천성 저 aldosterone증을 corticosterone methyl oxidase defect II형이라 한다. 18-Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency는 생후 곧 발견되고, 생후 1-3개월후에 증상을 나타내고, 생후 5개월에서 34세에도 증상이 나타난다.

종래에 이 증상을 진단할때는 혈청 Na이 적고, K는 높은값을 나타내고, 혈청 CO₂ 함량은 적고, 혈중요소질소(BUN)은 높다. 또한 17-ketosteroid 및 pregnanetriol은 정상이고 tetrahydrocorticosterone, 5 α -tetrahydrocorticosterone은 높은값을 나타낸다. (Scheme 1.d)

따라서 corticosterone metabolite와 cortisol, cortisone metabolite와의 비율로 important ratio를 결정하게 된다.

G. Pillipou는 ratio의 값이 1이 넘으면 affected value라고 보고 하였고, 본 실험은 0.04-0.28의 범위를 나타내었다.

Important Ratio	Normal		
	C	M	F
THB / THE + THF + 5 α -THF	0.23	0.07	0.07
5 α -THB / THE + THF + 5 α -THF	0.28	0.07	0.04

7. Cortisol oxidase deficiency.⁴⁶⁻⁴⁸

Cortisone과 cortisol은 가역적이다. 이 반응에 관여하는 enzyme이 cortisol oxidase와 cortisone reductase이다. cortisol oxidase deficiency는 어린아이에게 흔히 볼수 있고, tetrahydrocortisone의 분비량이 감소하고, unconjugated cortisol metabolite의 분비량이 증가한다.

따라서 THF + 5 α -THF / THE와 5 α - THE / THF의 값으로 important ratio를 결정한다.

1982년 Fiselier는, THF + 5 α - THF/THE는 22.9, 5 α -THF/THF는 3.0이면 affected value라고 보고 하였다. 본 실험에서는 cortisol oxidase deficiency의 경우는 아래와 같이 important ratio의 값을 구하였다. 5 α -THF/THF는 3.0이며 affected value라고 보고하였다.

Important Ratio	Normal		
	C	M	F
THF + 5 α -THF/THE	2.76	1.05	4.74
5 α -THF / THF	2.15	0.58	0.79

8. Cortisone reductase deficiency.⁴⁹

Cortisone reductase deficiency는 cortisol이 cortisone으로 reduced metabolite에 disorder가 생기는 것이다.

Adrenal androgen의 증가로 인하여 female에서는 Hirsutism(다모증)이 나타나고, tetrahydrocortisone이 다량

분비되고, tetrahydrocortisol, 5 α -tetrahydrocortisol의 분비가 감소하므로, THE와 THF, 5 α -THF의 ratio가 diagnosis의 중요한 척도가 된다.

Taylor 등은 cortisone reductase deficiency의 important ratio로 THE/THF+5 α -THF로 결정하여 남성은 0.97, 여성은 1.43이고 20 이상이면 affected value라고 보고하였다.

본 실험결과는 어린이는 0.52, 남성은 1.65, 여성은 1.86을 나타내었다.

Important Ratio	Normal		
	C	M	F
THE / THF + 5 α -TMF	0.52	1.65	1.86

제5장. 결 론

여러가지 내인성 화합물을 포함하고 있는 뇨시료에서 steroid hormone만을 얻을 수 있도록, XAD-2 resin을 사용하였고, hydrolysis는 enzyme을 사용하여 재현성 및 회수율이 우수한 전처리과정을 확립하였다.

Gas Chromatography를 사용하므로, GC에 필수적인 유도체방법으로는 먼저, MSTFA/TMSI방법을 해 보았으나, 알맞지 않은 화합물이 있어서, 그 다음으로 Methoxime/MSTFA/TMSCI법을 써 보았으나 역시 알맞지 않은 steroid 때문에, 검출하고자 하는 모든 steroid에 적합한 MSHFB/TMS-Im/TMS-Cl혼합물 유도체방법을 구축하였다. 또한, 원하지 않는 내인성 화합물을 배제하고, 검출한계도 낮은 selected ion monitoring에 의한 정량법을 사용하여 뇨에서의 17가지 내인성 steroid의 농도를 정상 성인 남, 녀, 어린이 3개의 개체군으로 나누어 결정하였다. 3개의 개체군을 비교해 볼때 남성과 여성은 큰 차이를 보이지는 않았지만 어린이의 경우 개체수도 적었지만 대부분의 steroid의 농도면에서 두드러지게 차이가 남을 알수 있었다. 예를 들어 androsterone의 경우 남성과 여성은 45.92와 48.10ppm을 나타내는데 반해 어린이는 0.19ppm으로 적은 값을 나타내었다.

Enzyme결핍에 따른 내분비 질환의 유형은 어떤 enzyme의 결핍인지 원인을 알아보기 위해서, 그 enzyme이 작용하는 steroid의 precursor와 product의 농도비율을 결정하여 유형을 판단하게 된다. 따라서 본 실험에서는 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 21-hydroxylase, 17 α -hydroxylase, 17,20-lyase, 18-hydroxylase, cortisol oxidase, 5 α -reductase, cortisone reductase의 결핍에 따른 각 농도비율을 결정하였다.

앞으로는 내분비 질환을 가진 환자의 시료로부터 내인성 steroid profile의 변화를 알아보고자 한다.

참고문헌

1. G. Zubay, *Biochemistry*, Addison-Wesley, 1, 1103-1145(1983)
2. R.I. Dorfman and F. Ungar, *Metabolism of Steroid Hormone*, Academic Press, 1, 22-110(1965)
3. W. Zimmerman, *Z. Physiol Chem.* 233, 257-263(1965)
4. 山村雄一, *代謝*, 19, 670-692(1982)
5. H. CH. Curtius, J. Vollmin, M.J. Zagalak and M. Zachmann, *J. Steroid Biochem.* 6, 677-684(1975)
6. Adrian W. Pike, Celia Moynihan, Steven Kibler, Pl Grag Marsh and P.V. Fennessey, *J. Chromatogr.* 306, 39-50(1984)
7. J.W. Honour, J. Tourniaire, F.G. Biglieri and C.H.L. Shakleton., *J. Steroid Biochem.* 9, 495(1978)
8. C.D. Pfaffenberger, L.R. Malinak and E.C. Horning, *J. Chromatogr.* 158, 313-330(1978)
9. D.K. Mahajan, J.D. Wahlen, F.H. Tyler, and C.D. West, *Plasma Steroids*, 20, 609(1972)
10. J.Z. Scott, F.Z. Stanczyk, U. Goebelsmann, and D.R. Mishell Jr., *Steroids*, 31, 393(1978)
11. A.G. Antoshechkin, A.B. Golovkin, L.A. Maximova and V.A. Bakharev., *J. Chromatogr.* 489, 353-358(1989).

12. P. Pfeifer and Spiteller, *J. Chromatogr*, 223, 21-32(1981).
13. K. Ichimura et al., *Chromatogr.* 374, 5-16(1986).
14. C.H.L. Shackleton, *J. Chromatogr.*, 379, 91-156(1986)
15. C.H.L. Shackleton and W. Chai, *Endocr. Rev.*, 6(3), 441-486(1985)
16. R. Dugal, R. Masse, H. Bi, and C. Ayotte., *J. Chromatogr*, 497, 17-37(1989).
17. C.H.L. Shackleton and Joanne O. Whitney, *Clinica Chimica Acta*, 107, 231(1980).
18. Michael D. chu and Stanley Ulick, *J. biol. Chem.* 257, 2218(1982).
19. C.W. Weykamp, T.J. Penders, N.A. Schmidt, A.J. Borburgh, J.F. Van de Calseyde, and B.j. Wolthers, *Clinical Chem.* 35, 2281(1989).
20. O. Janne, *Acta Endocrinol.*, 67, 316(1971).
21. Y. Yamaguch, *J. Chromatogr.*, 163,253(1979).
22. S. Pang, L.S. Levine, E. Stoner, J.M. Opitz, M.S. Pollack, B. Dupont and M.I. New, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56(1983) 808.
23. R.L. Rosenfield, B.H. Rich, J.I. Wolfsdorf, F. Cassorla, J.S. Parks, A.M. Bongiovanni, CH. Wu and C.H.L. Shackleton, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51(1980) 345.
24. G.E. Joannou, *J. Steroid Biochem.*, 14, 901(1981).
25. E. DePeretti and M.G. Forest, *Horm. Res.*, 16, 10(1982).
26. C.H.L. Shackleton, *Clin. Chim. Acta*, 67(1976) 287.
27. Bongiovanni, A.M. & Rost, A.W. · *N. Engl. J. Med.*, 268, 1283(1963)

28. H. Wierhapper, P. Nowotony, W. Waldhausl and H. Frisch, J. Steroid Biochem., 22(1985) 363.
29. H.J. Dean, C.H.L. Shackleton and J.S.D. Winter, J. Clin. Endocrinol. Metab., 59(1984) 513.
30. M.D' Armiento, G. Reda, C. Kater, C.H.L. Shackleton and E.G. Biglieri, J. Clin. Endocrinol. Metab., 56(1983) 697.
31. M. Roger, R.E. Merceron, F. Girard, P. Canlorbe, L. Dehennin, P. Konopka, J. Seneze and J.E. Toublanc, Horm. Res., 16(1982) 23.
32. K.E. Peterson, A. Svejgaard, M.D. Nielson and Dissing, Horm. Res. 16, 151(1982).
33. E. Deperetti, M. Pradon and M.G. Forest, J. Steroid Biochem., 20 (1984) 455.
34. R.E. Peterson, J. Imperato-McGinley, T. Gautier and C. Shackleton, N. Engl. J. Med., 313(1985) 1182.
35. R.J.M. Corrall, K. Wakelin, J.P. O'Hare, I.A.D. O'Brien, A.A.A. Ishmail and J. Honour, Acta Endocrinol., 107(1984) 538.
36. M. Roger, R.E. Merceron, F. Girard, P. Canlorbe, L. Dehennin, P. Konopka, J. Seneze and J.E. Toublanc, Horm. Res., 16, 23(1982).
37. M. Zachmann, E.A. Werder and A. Proder, J. Clin. Endocrinol. Metab., 55, 487(1982).

38. R.J.M. Corall, K. Wakelin, J.P.O'Hare, I.A.D.O'Brien, A.A.A. Ishmail and J. Honour, *Acta. Endocrinol.*, 107, 538(1984).
39. E. Tvedegaard, V. Fredriksen, K. Ølgaard, M.d. Nielsen and J. Starup, *Acta Endocrinol.*, 98, 267(1981).
40. E. Tvedegaard, V. Fedriksen, K. Olgaard, M.D. Nielsen and J. Starup, *Acta Endocrinol.*, 98(1981) 267.
41. C.H.L. Shackleton, J.W. Honour, M. Dillon and P. Milla, *Acta, Endocrinol.*, 81(1976) 762.
42. S. Ulick and Ped. Adoles., *Endocrinol.*, 13(1984) 145.
43. Rosler, A., Rabinowitz D., Theodor R., Ramirez L.C. & Ulick S., .
J. Clin. Endocrinol. Metab., 44, 279(1977)
44. S. Ulick, L.S. Levine, P. Gunczler, G. Zanconato, L.C. Ramirez, W. Rauh, A. Rosler, H.L. Brodlow and M.I. New, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 49(1979) 757.
45. G. Pillipou and B.A. Higgins, *J. Seteroid Biochem.*, 22, 435(1985).
46. C.H.L. Shackleton, J.W. Honour, M.J. Dillon, C. Chantler and R.W.A. Jones, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50(1980) 786.
47. N.F. Tayler, W.A. Bartlett, D.J. Dawson and B.A. Enoch, *J. Endocrinol.*(1984)
48. T.J.W. Fiseliet, B.J. Otten. L.A.H. Monnens, J.W. Honour and P.J.J. van Munster, *Horm. Res.*, 16, 107(1982).
49. C.H.l. Shackleton, J.W. Honour, M. Dillon and P. Milla, *Acta Endocrinol.*, 81, 762(1976).

여 백

- 부 록 (Appendix) -

Fig. 10-1	개체군에 따른 Pregnenolol의 농도분포
Fig. 10-2	" THE 의 농도분포
Fig. 10-3	" Androsterone의 농도분포
Fig. 10-4	" THE 의 농도분포
Fig. 10-5	" 11-Keto Androsterone의 농도분포
Fig. 11	개체군에 따른 내인성 Steroid의 농도 평균
Fig. 12	개체군에 따른 내인성 Steroid의 농도 비율분포
Fig. 11	개체군에 따른 내인성 Steroid의 농도 비율평균

여 백

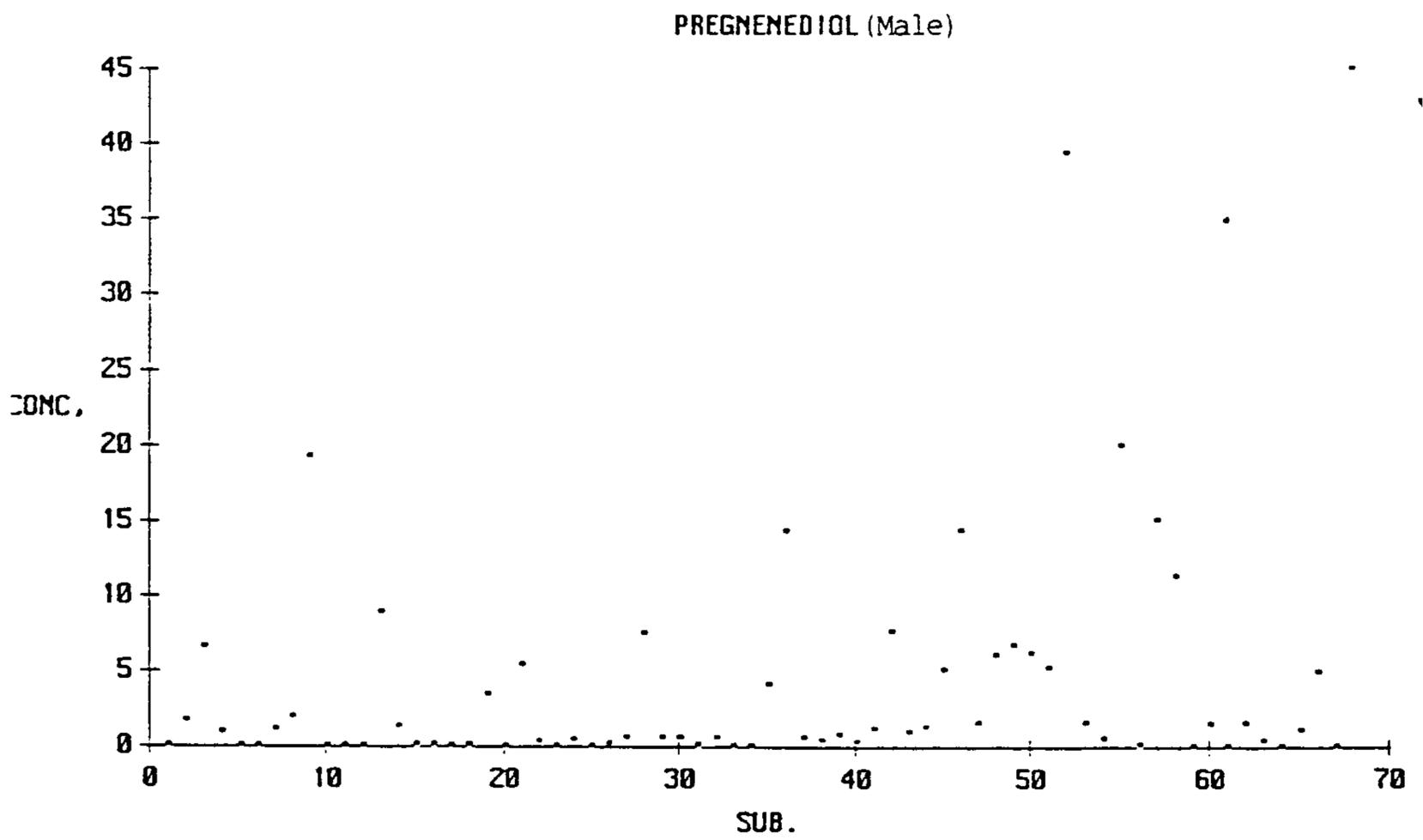
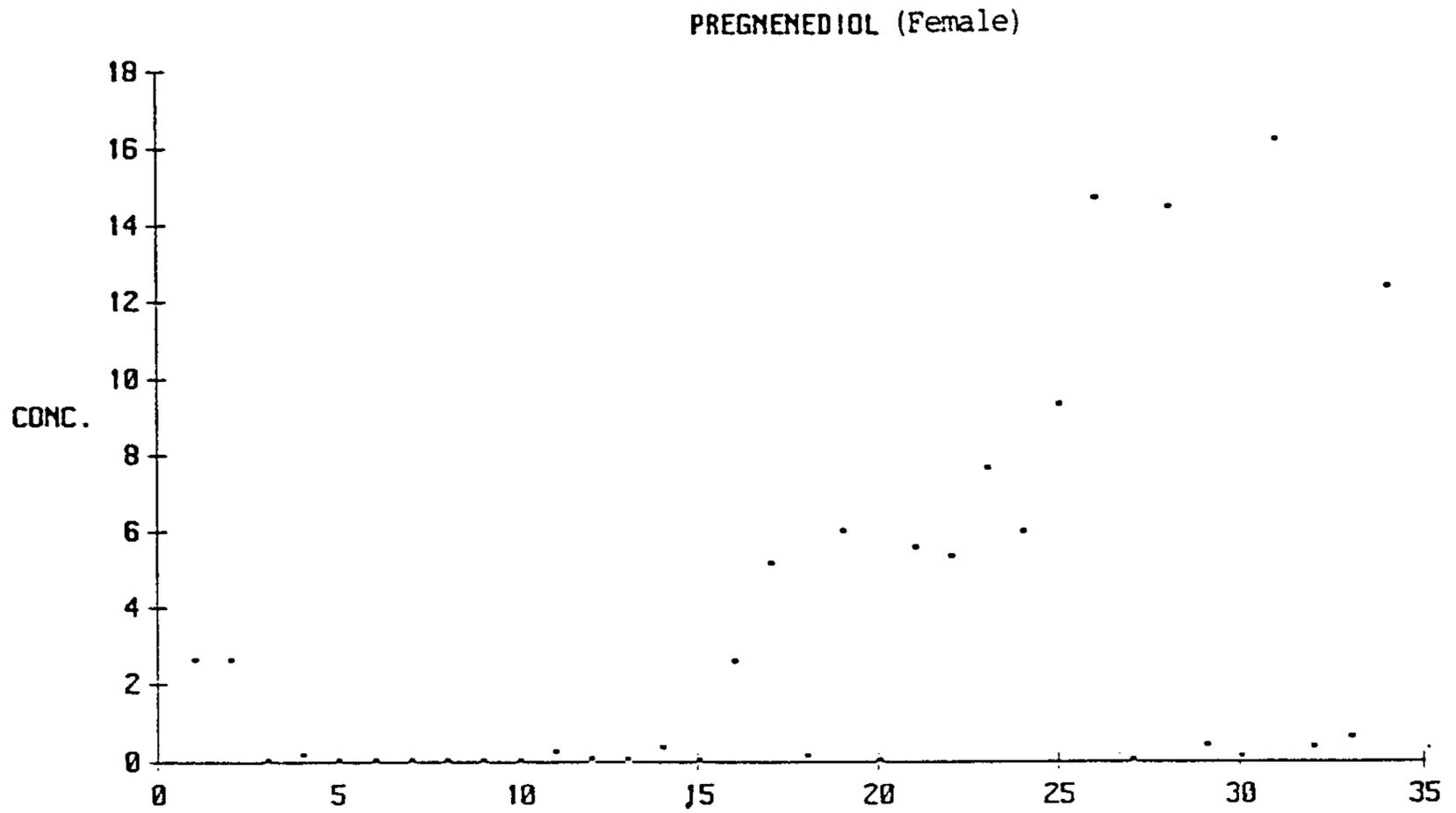


Fig 10-1 계제군에 따른 Pregnenediol 의 농도 분포(ug/ml)

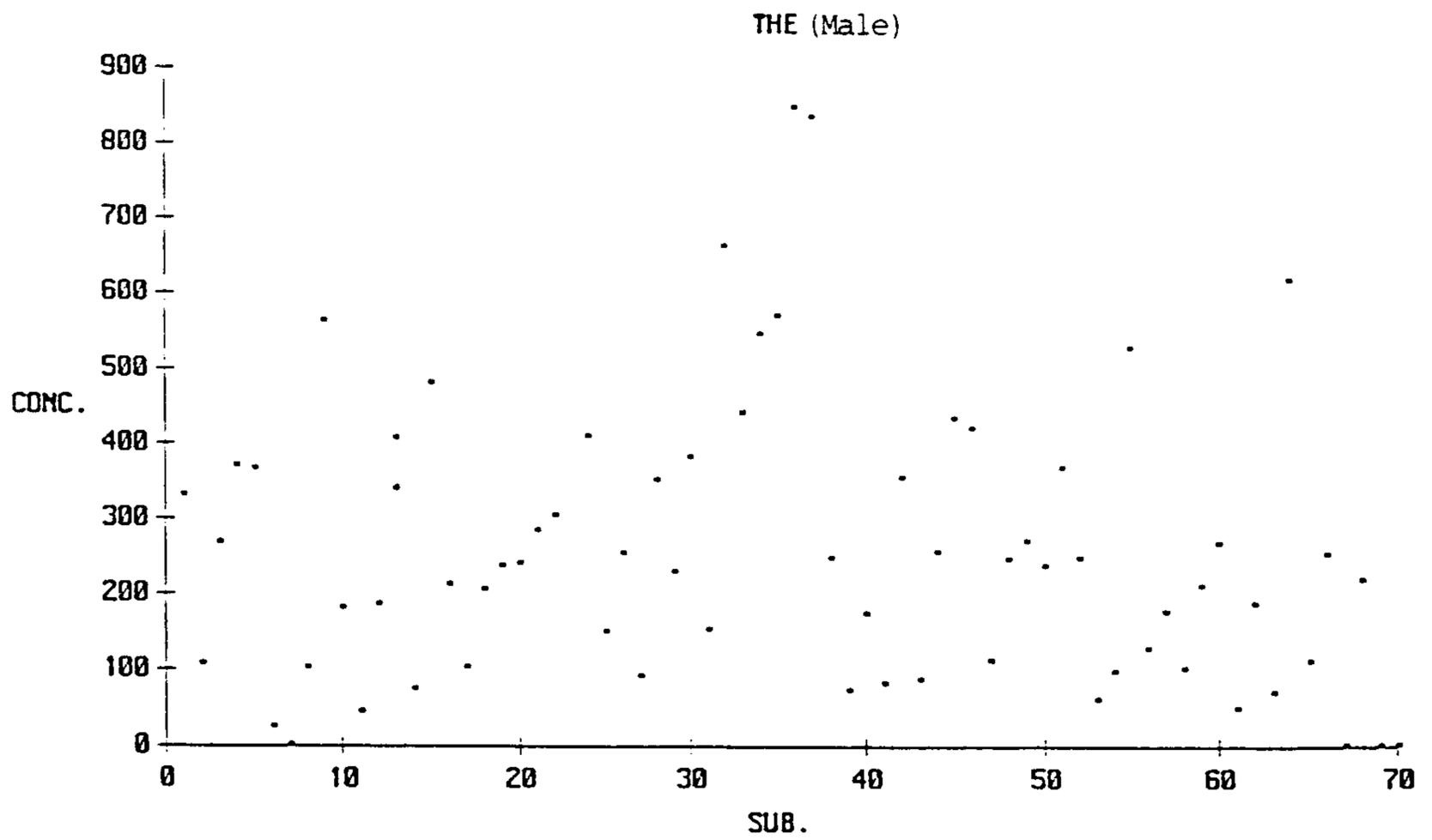
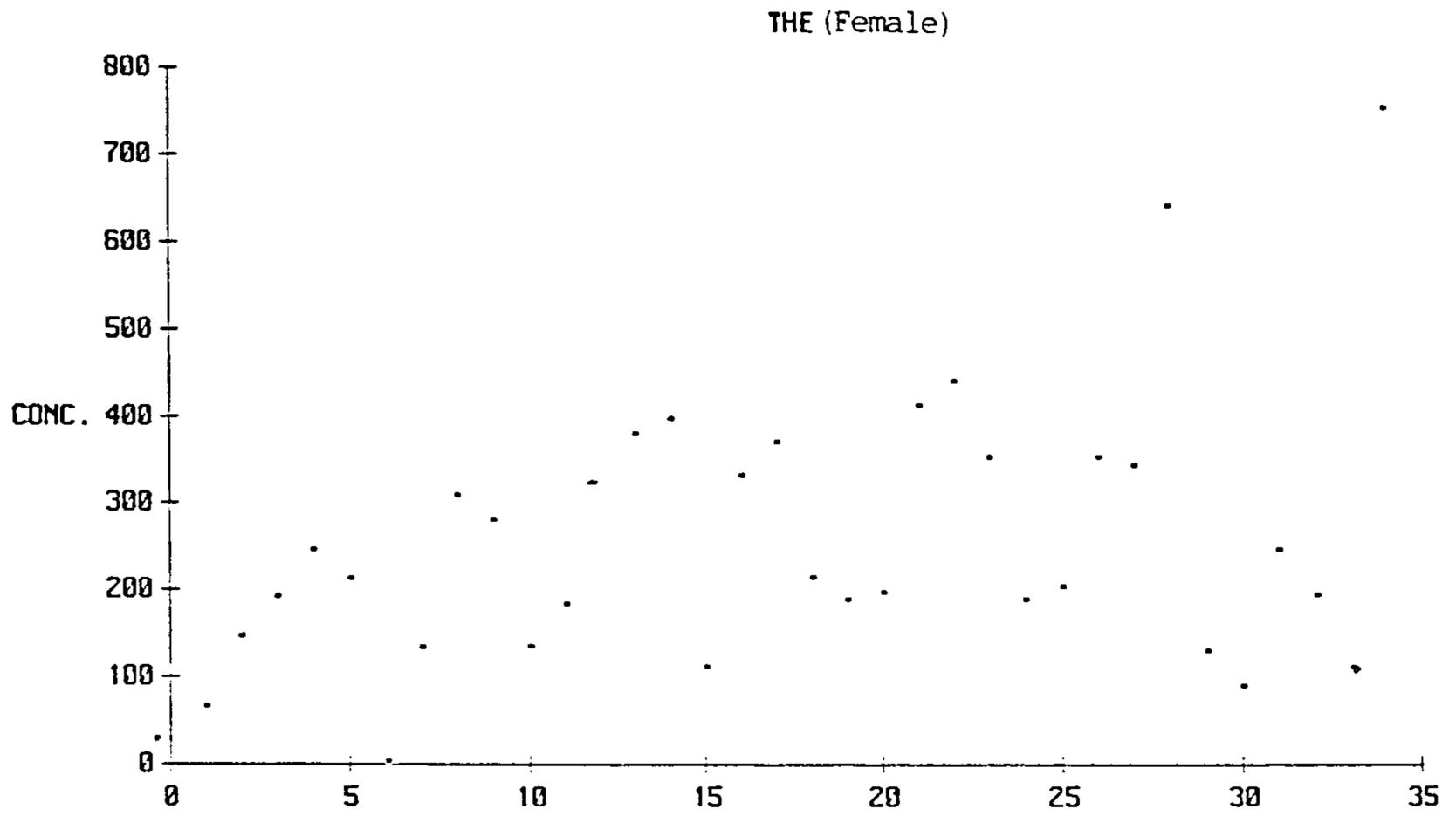


Fig 10-2 계체군에 따른 THE 의 농도 분포(ug/ml)

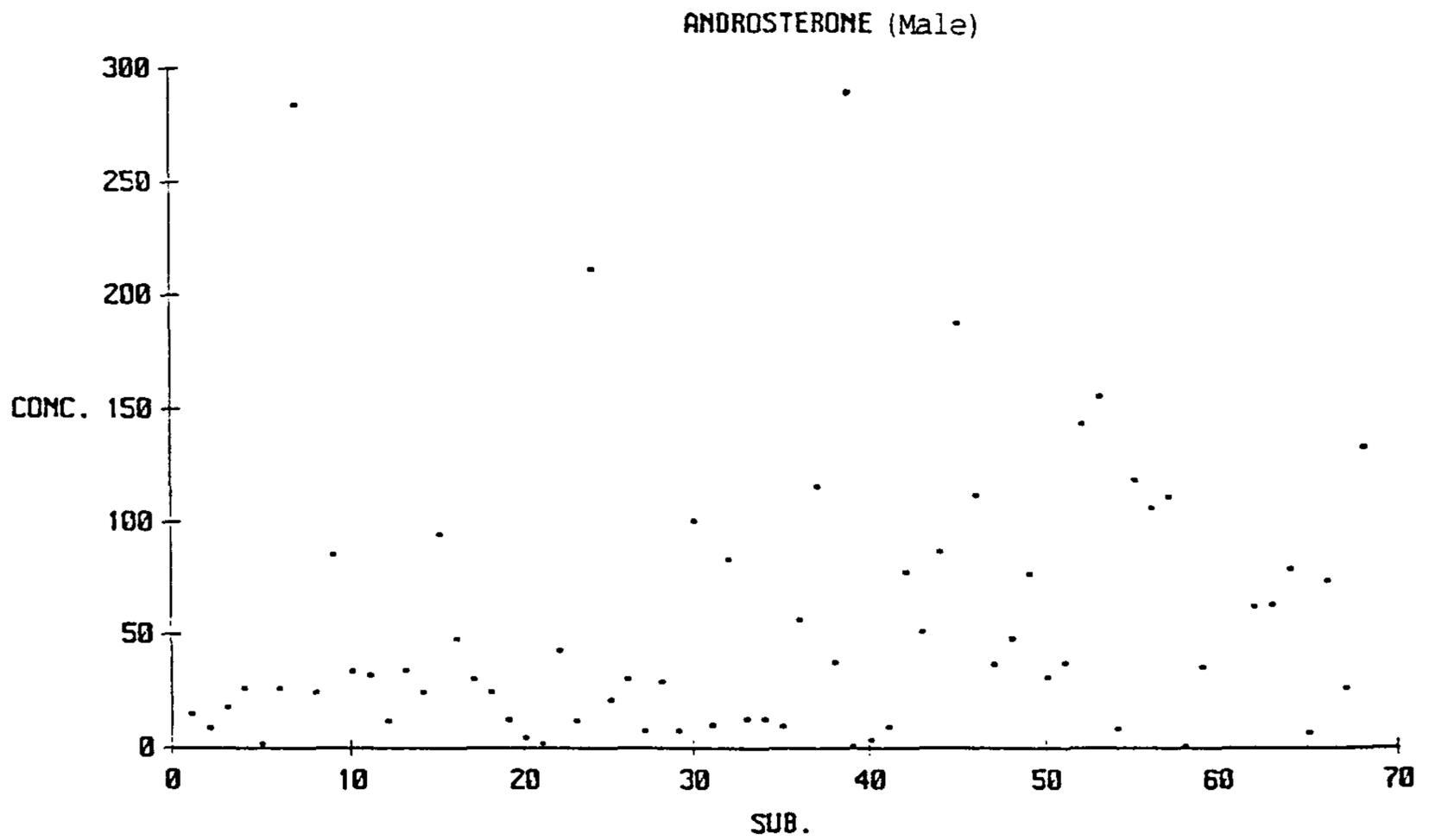
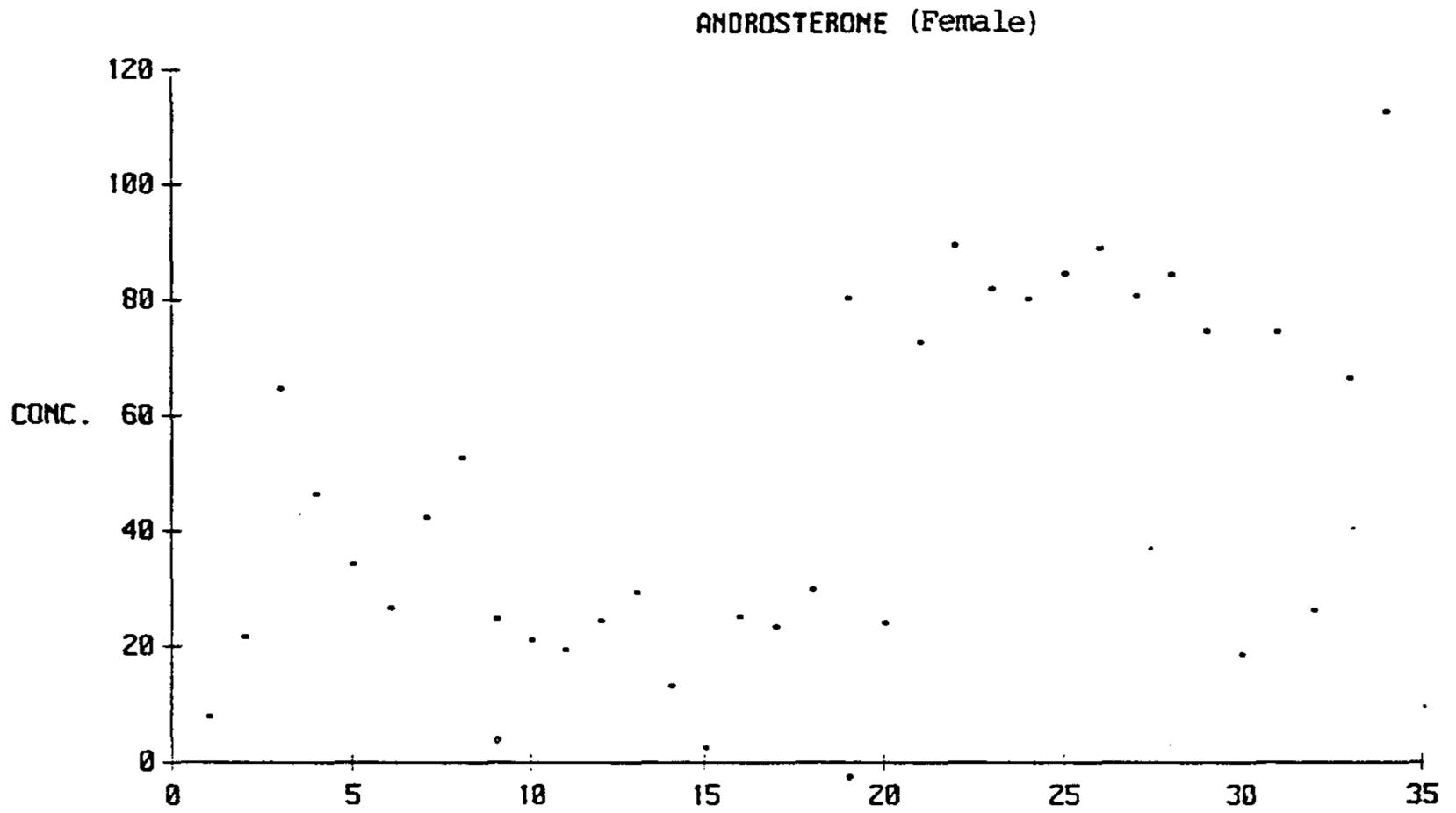


Fig 10-3 계층군에 따른 Androsterone 의 농도 분포(ug/ml)

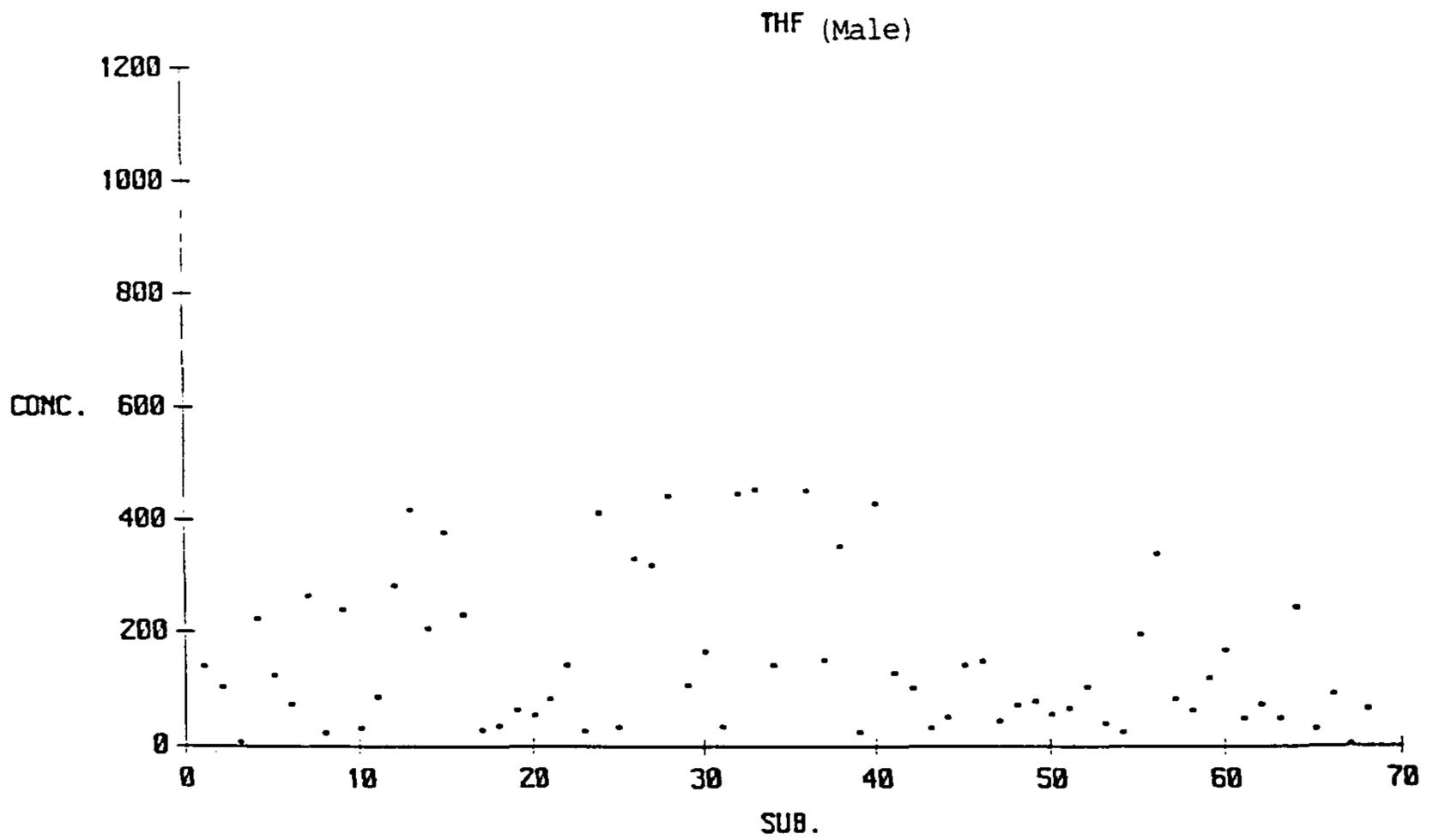
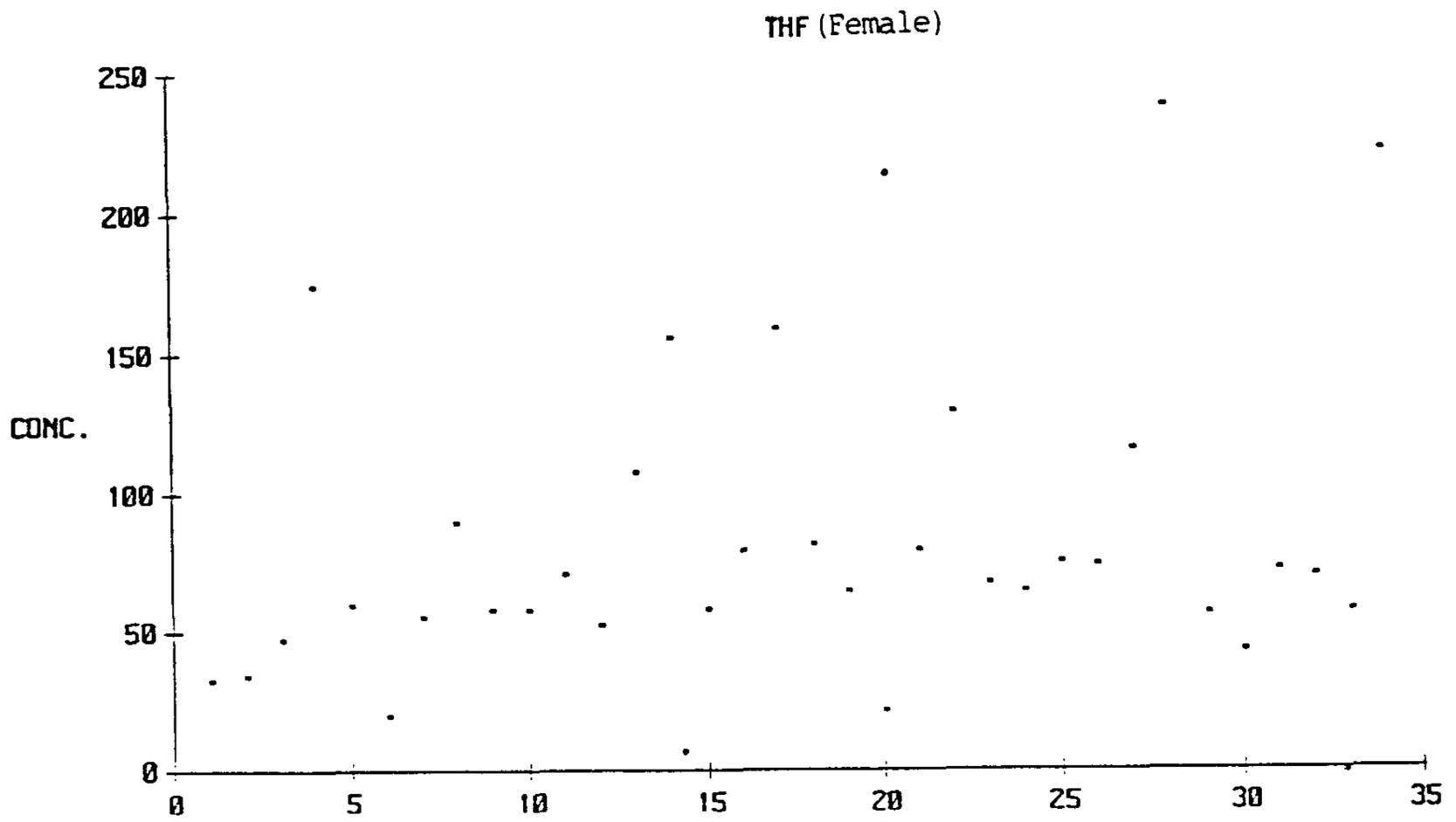


Fig 10-4 계제군에 따른 THF 의 농도 분포(ug/ml)

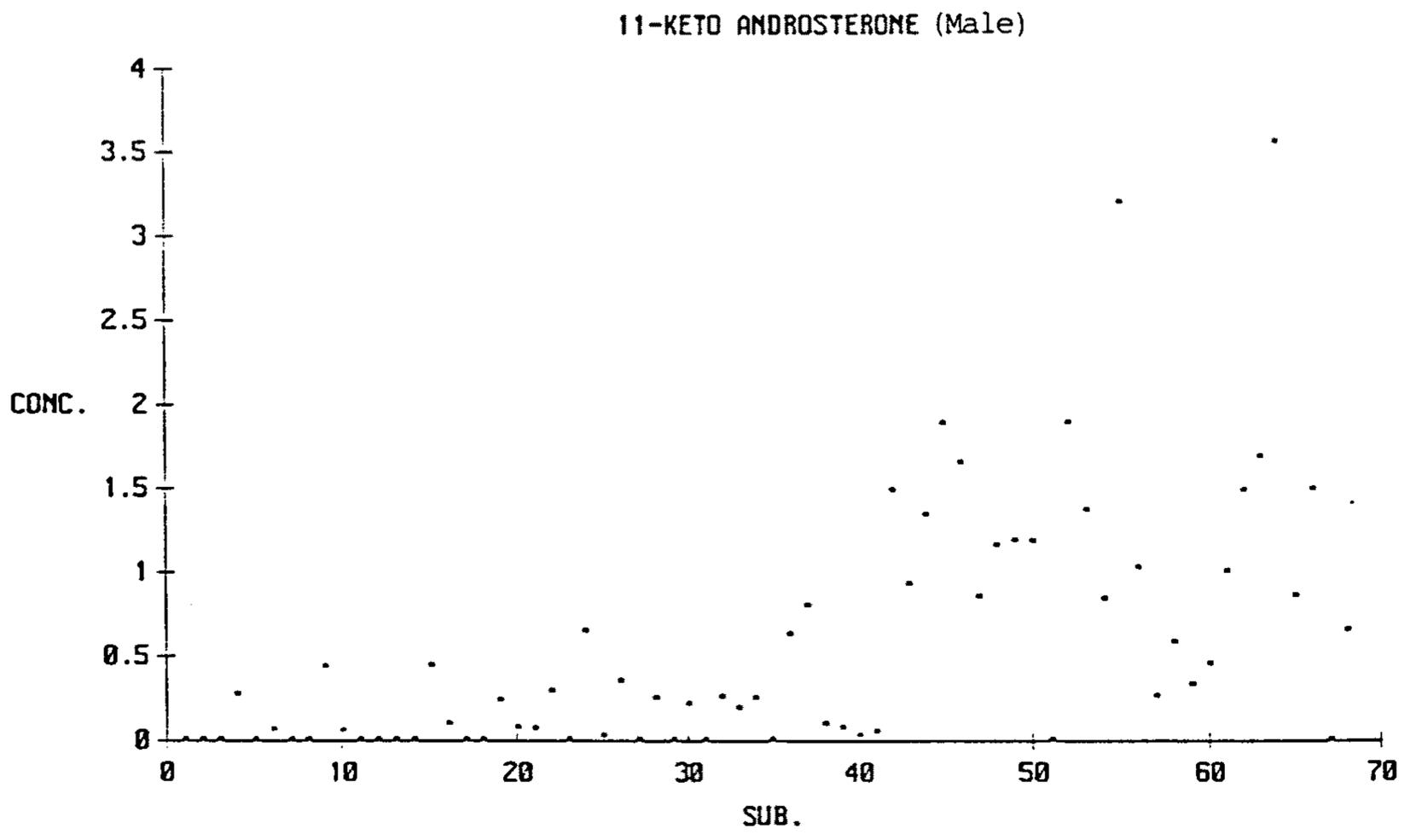
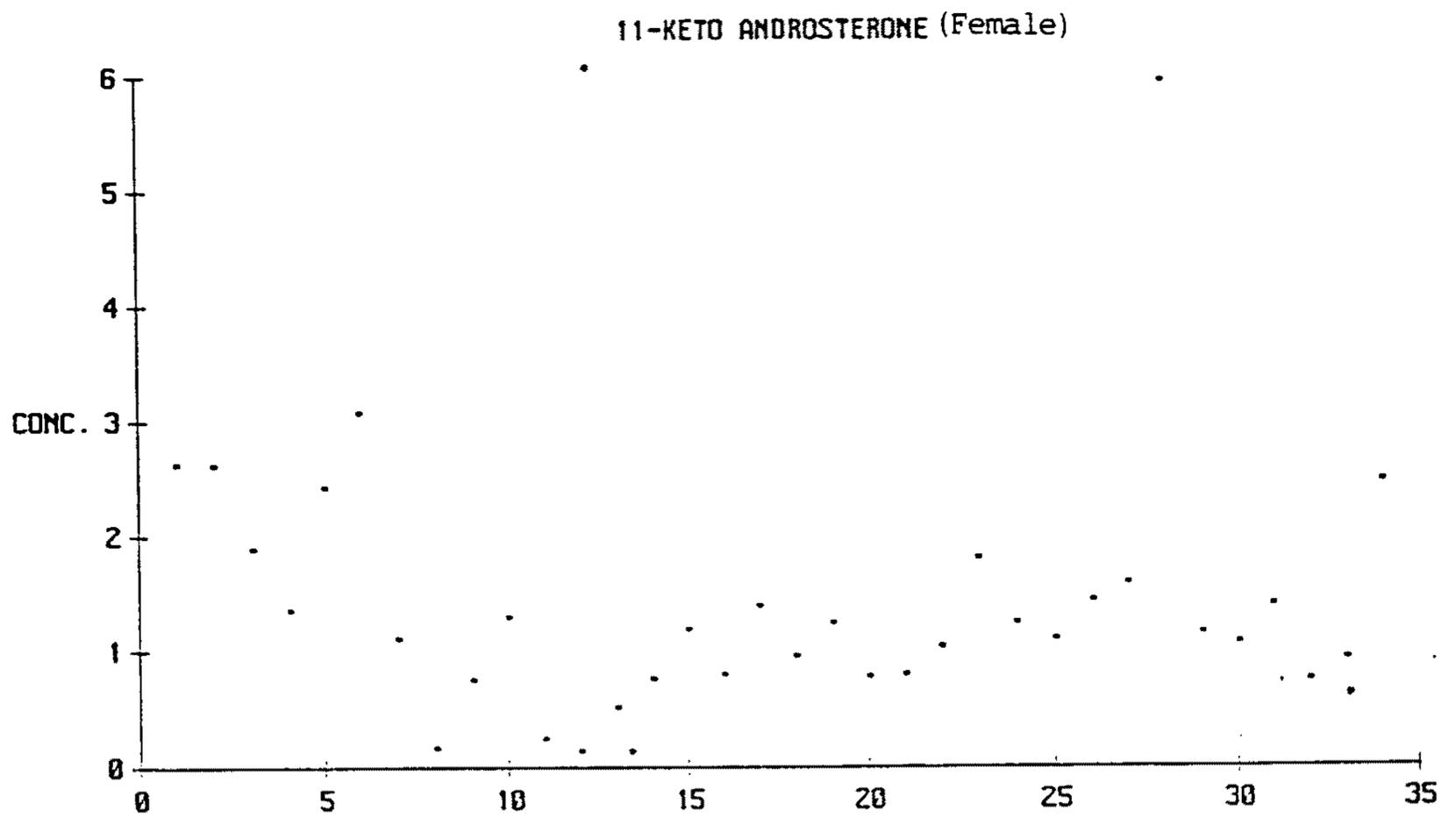


Fig 10-5 계체군에 따른 11-Keto Androsterone 의 농도 분포(ug/ml)

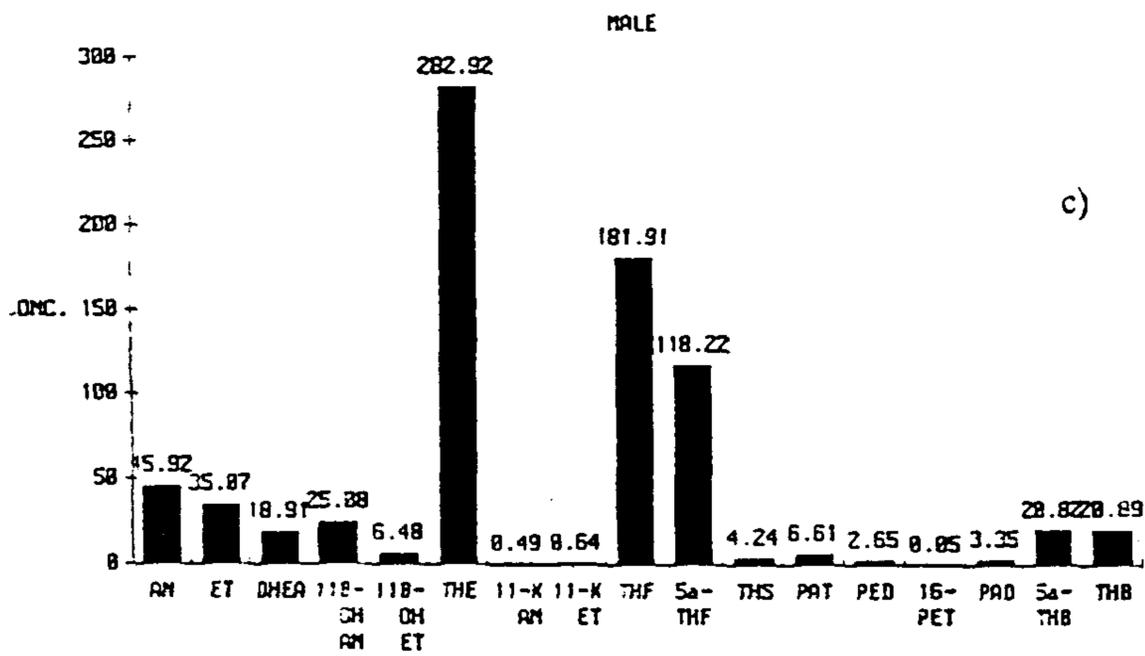
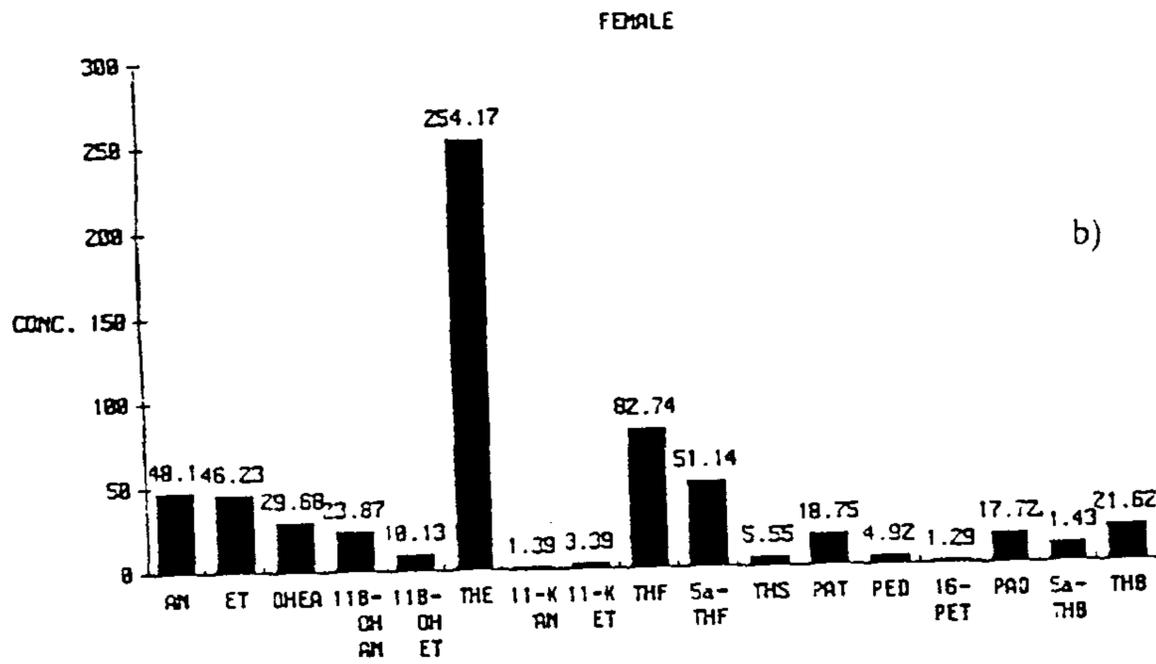
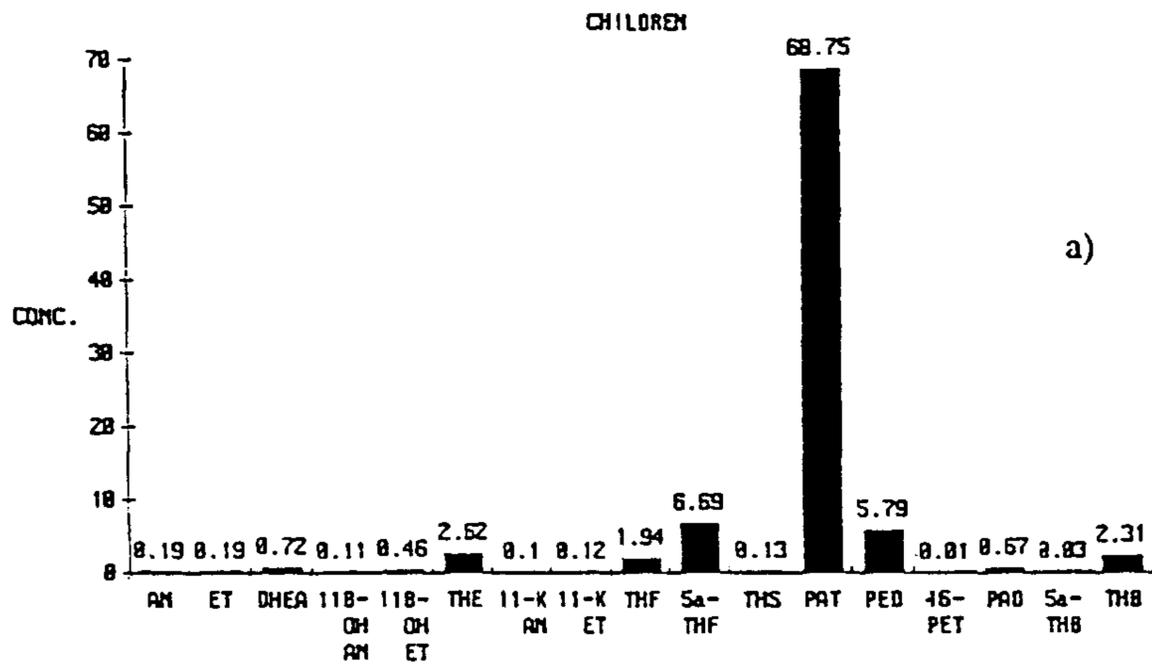


Fig. 11. 개체군에 따른 내인성 steroid의 농도 평균.
a) 어린이 b) 성인 여성 c) 성인 남성

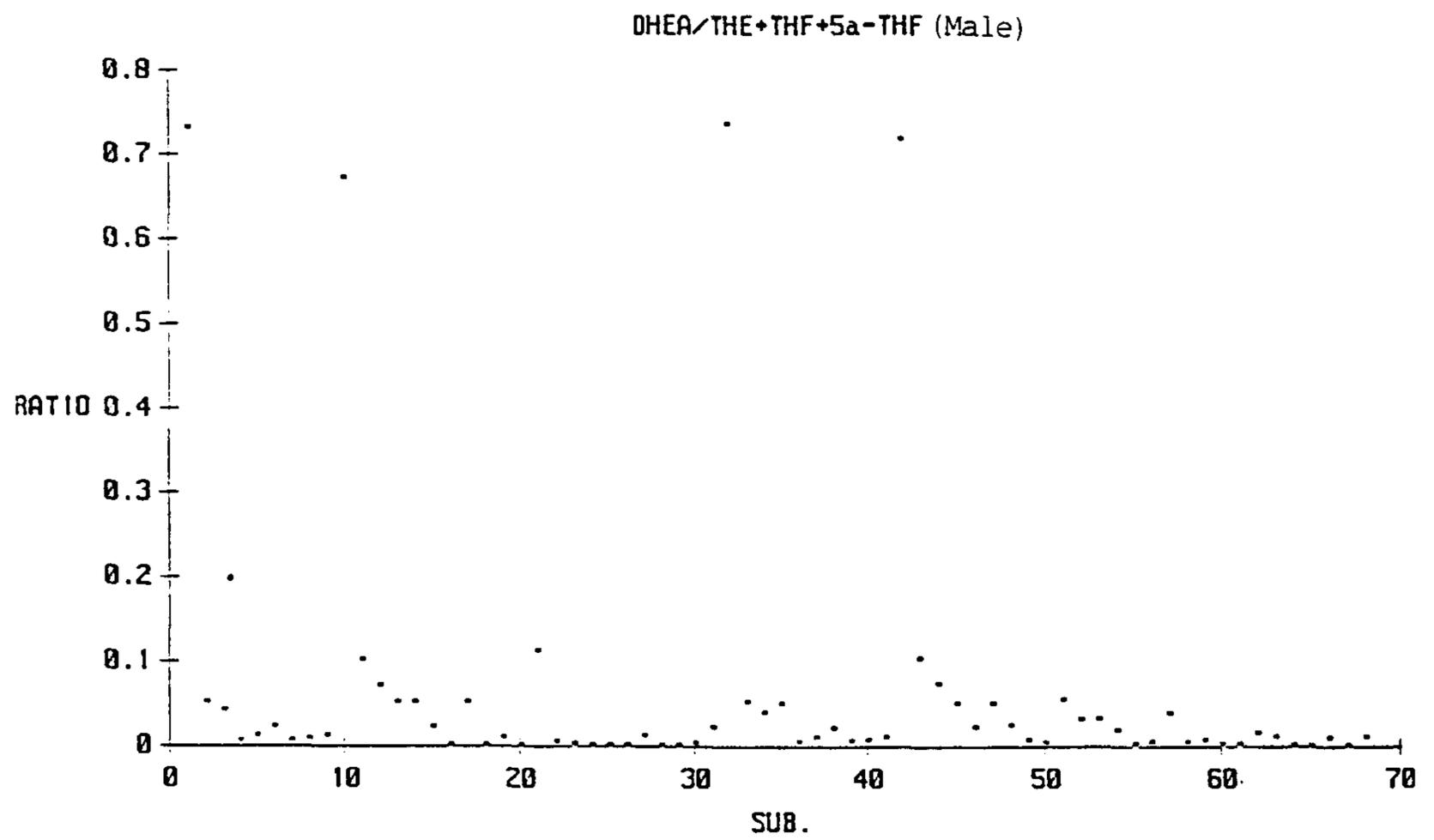
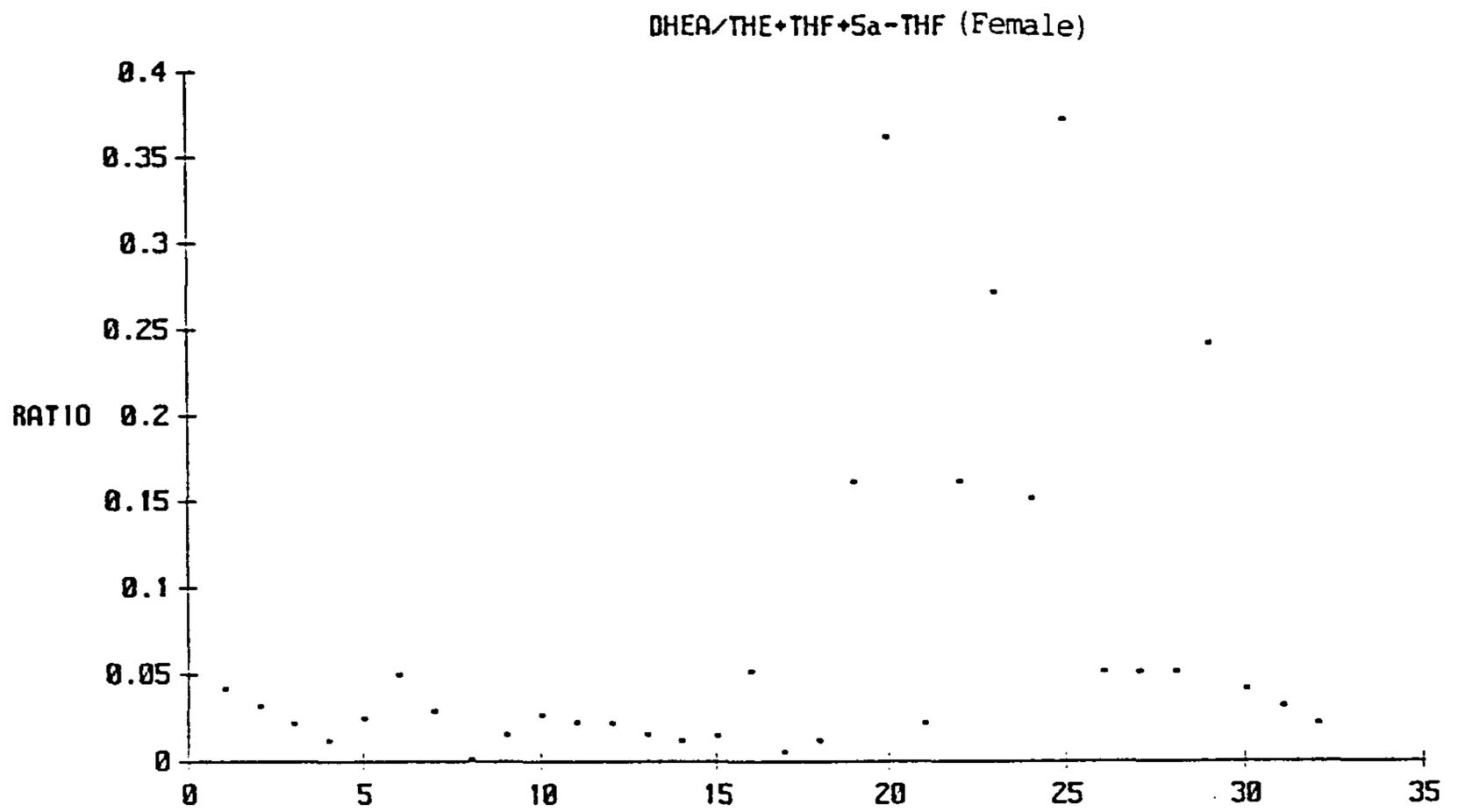


Fig 12-1 계층군에 따른 내인성 Steroid의 농도비율 분포.

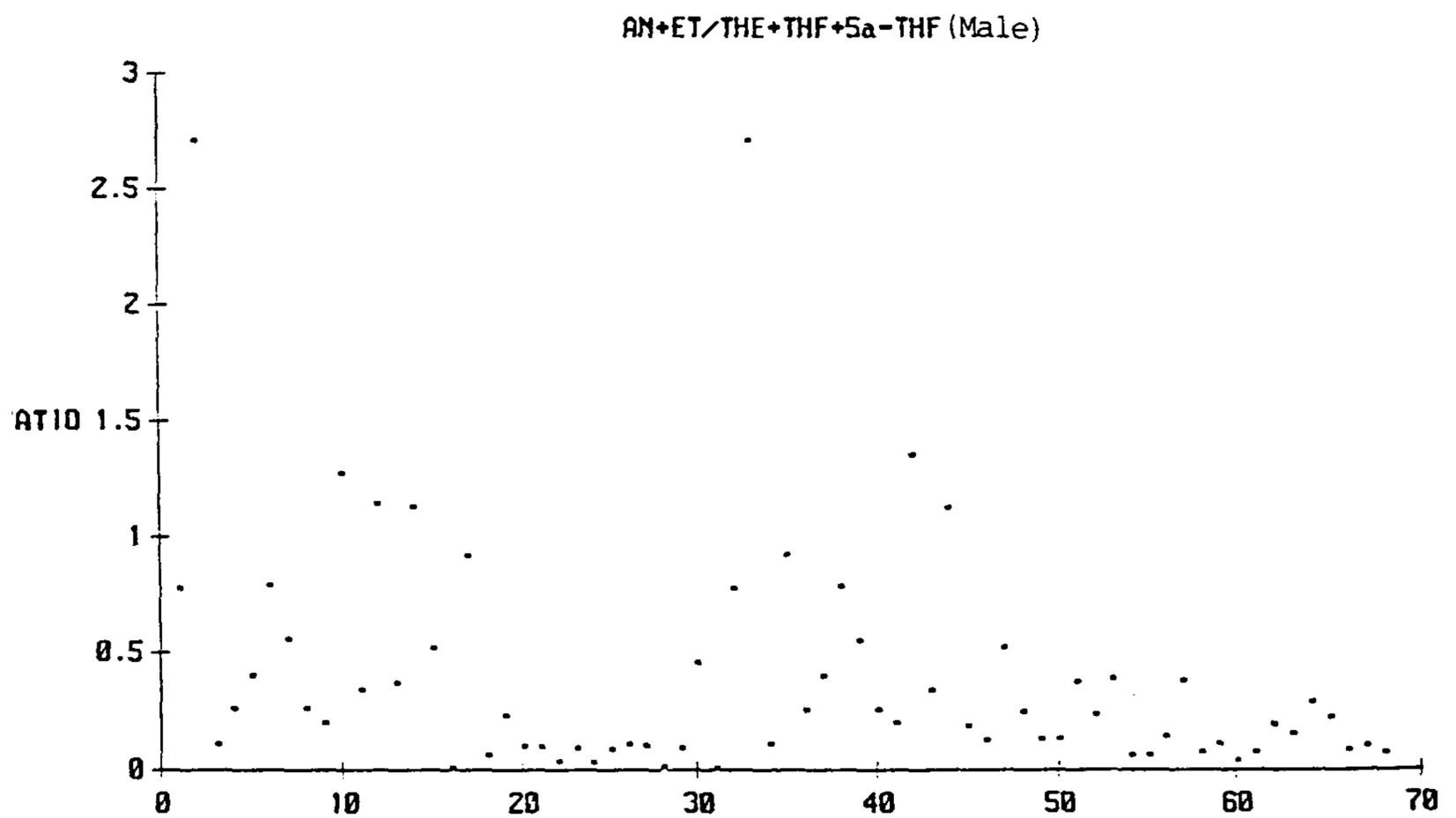
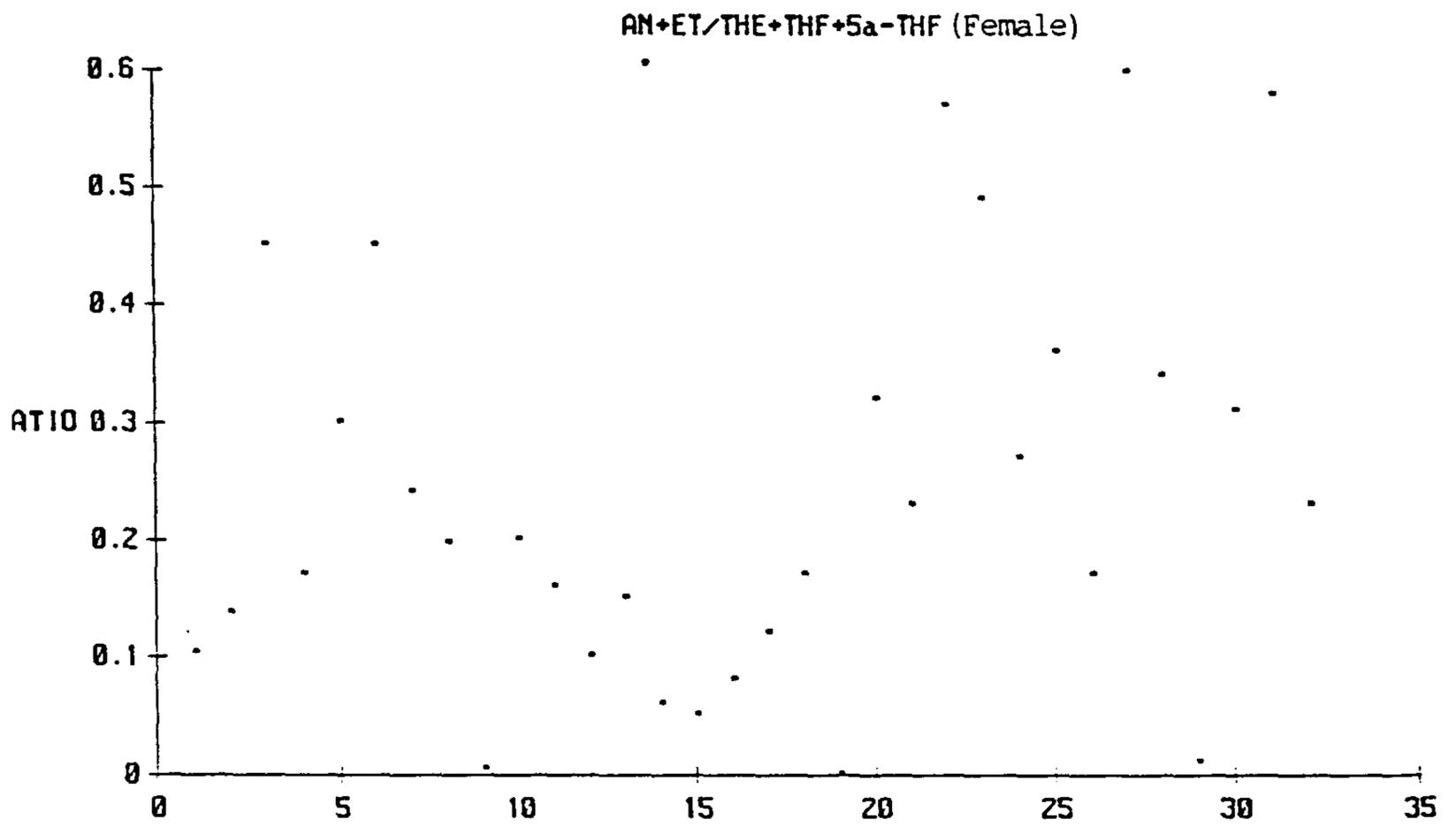


Fig 12-2 계측군에 따른 내인성 Steroid의 농도비율 분포.

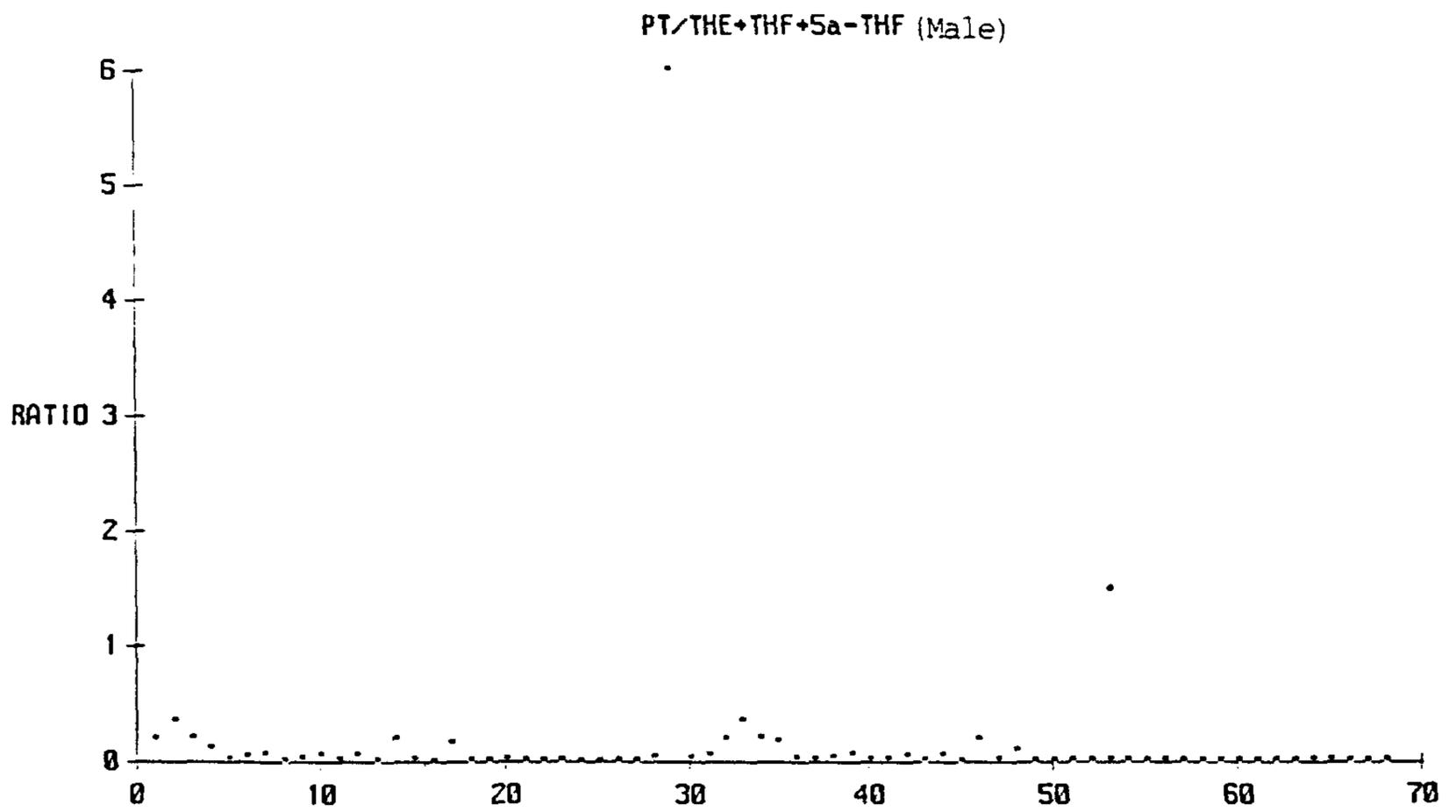
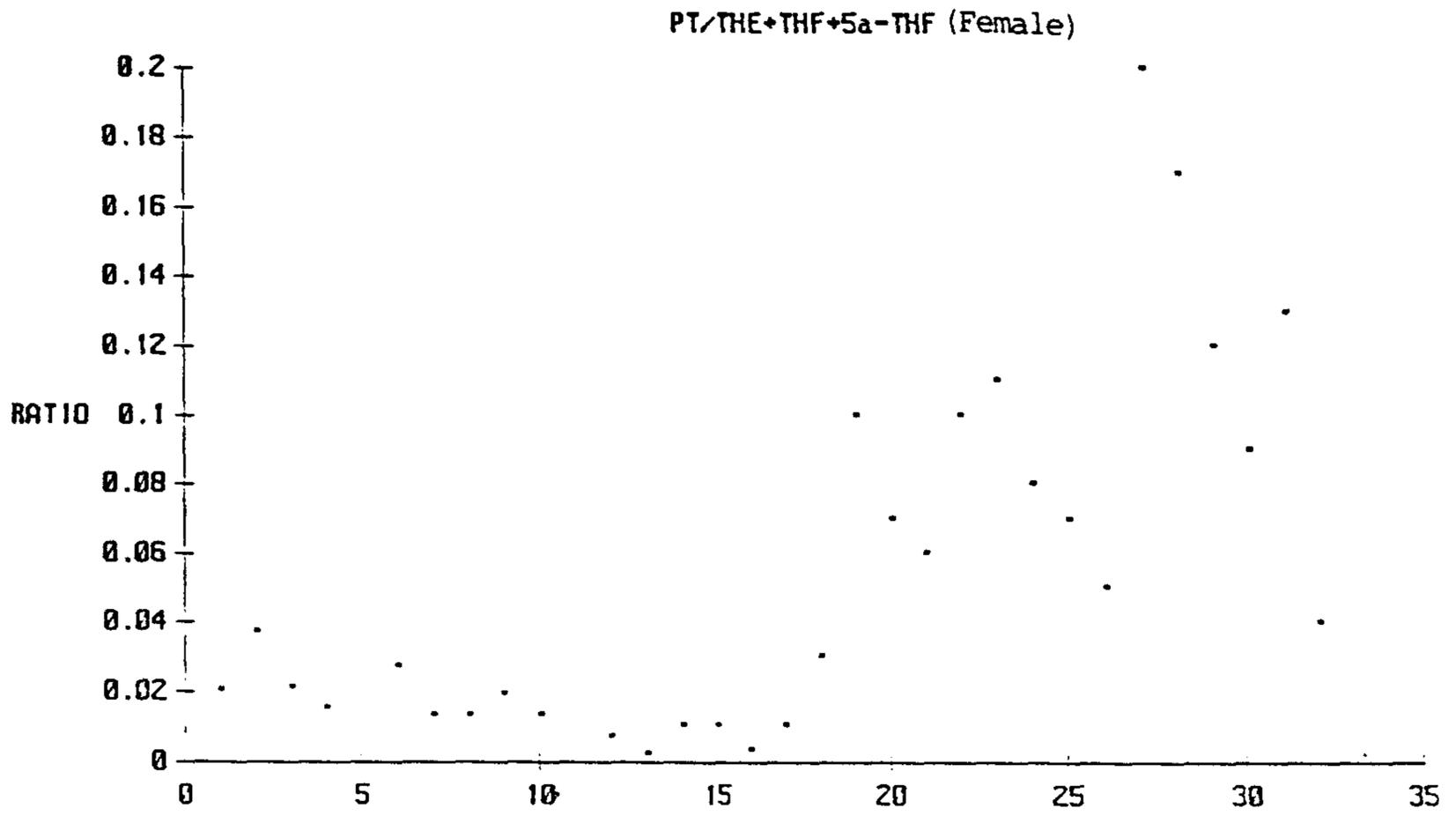


Fig 12-3 계제군에 따른 내인성 Steroid의 농도비율 분포.

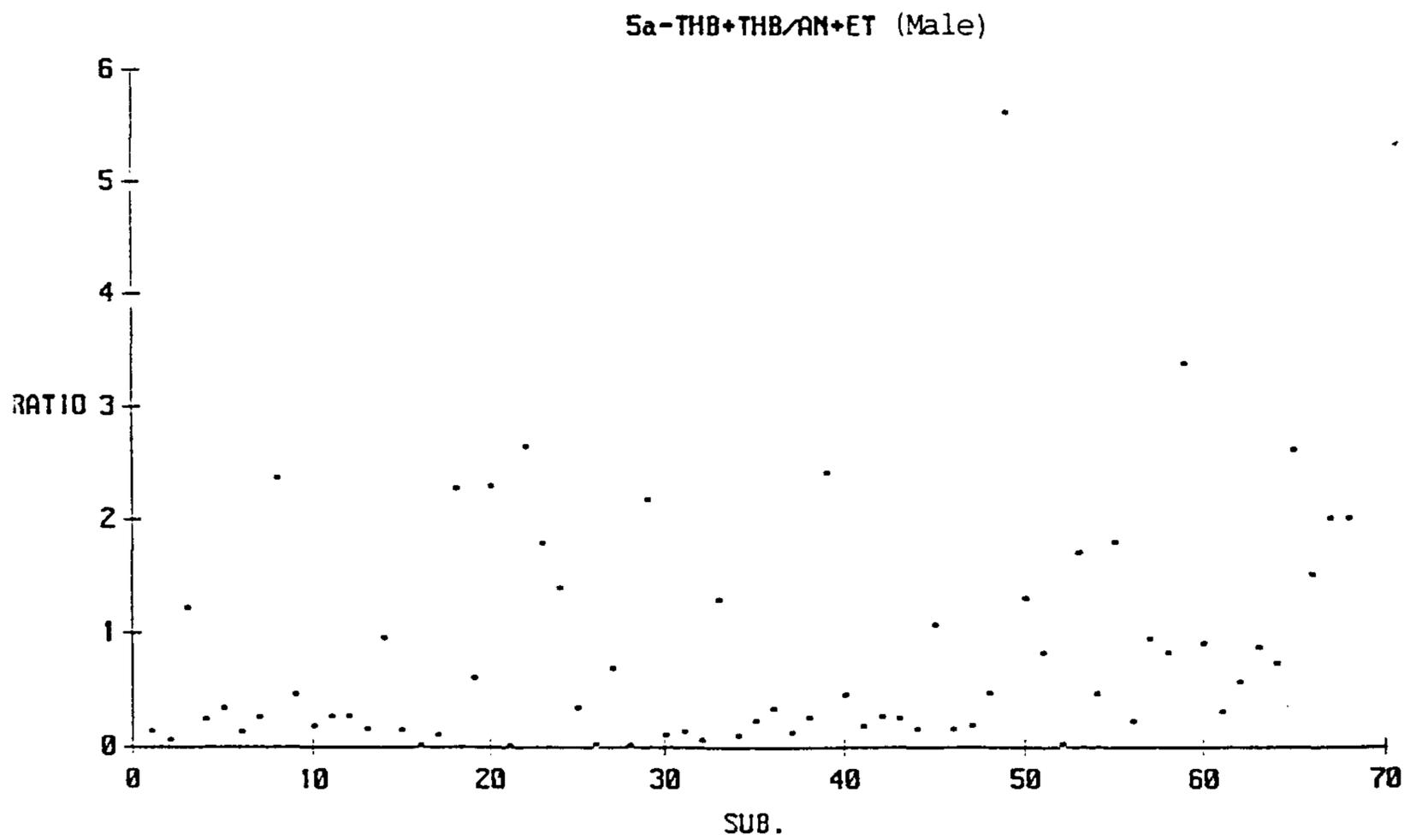
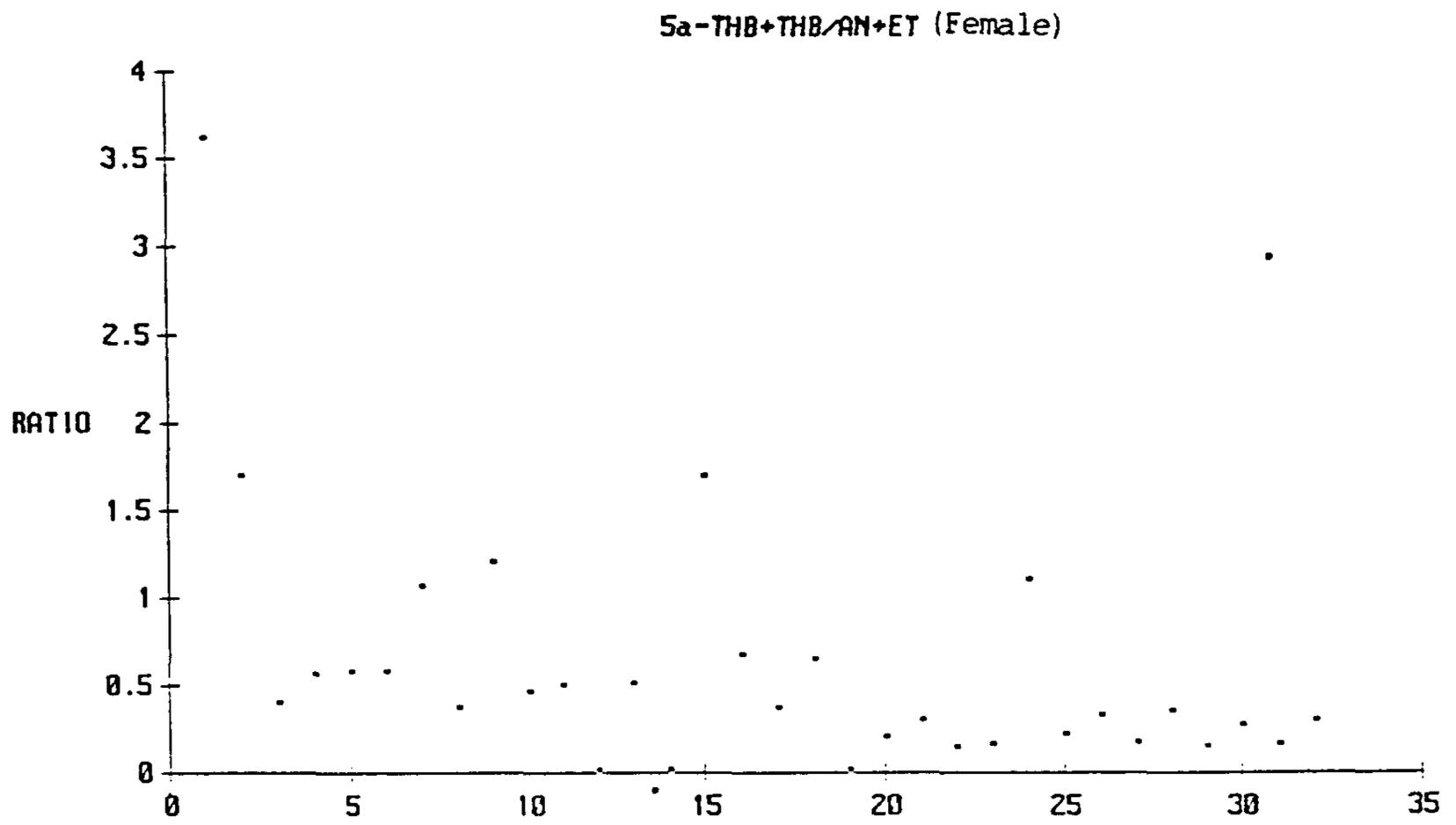


Fig 12-4 腎臟에 따른 내인성 Steroid의 농도비율 분포.

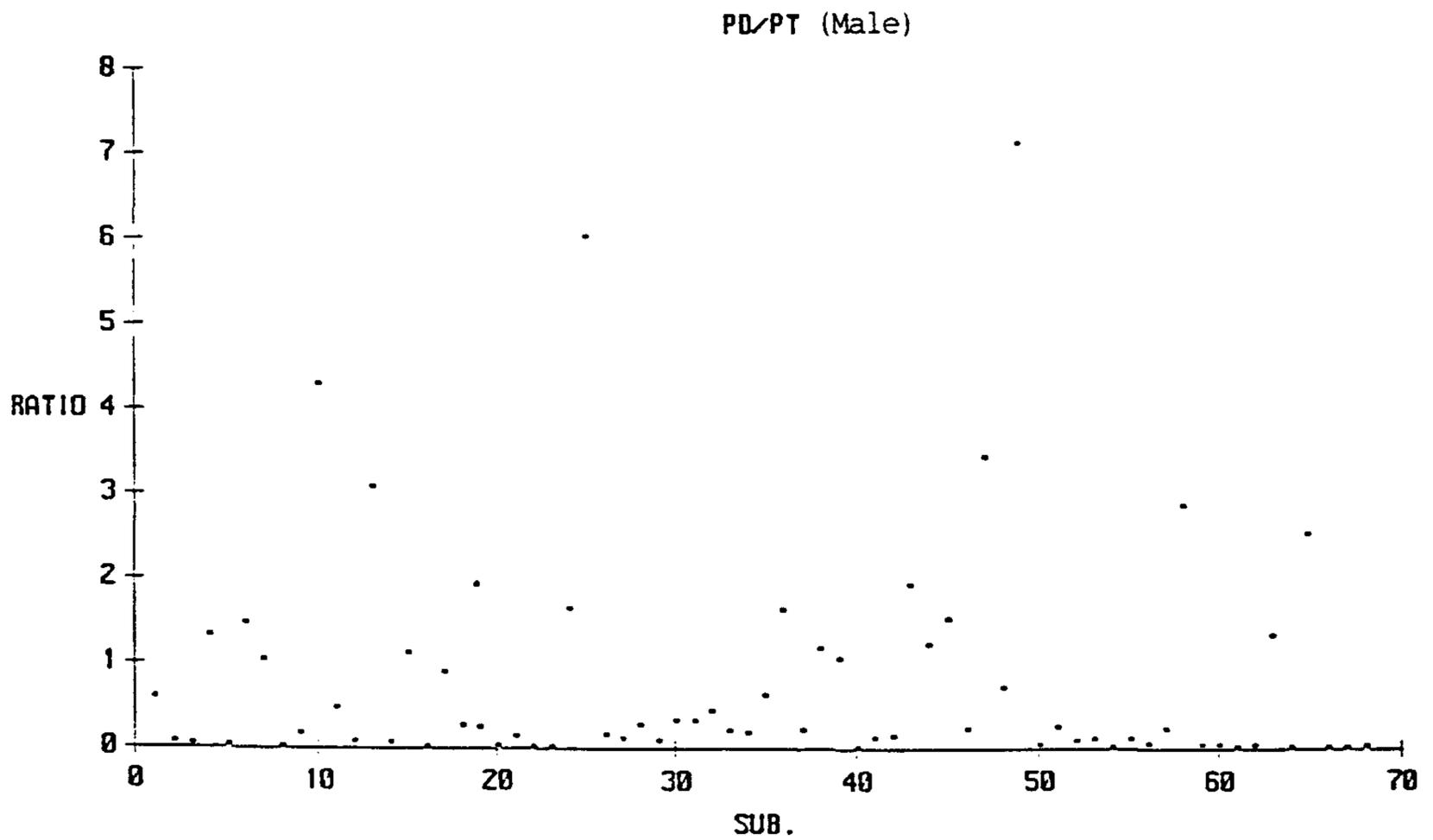
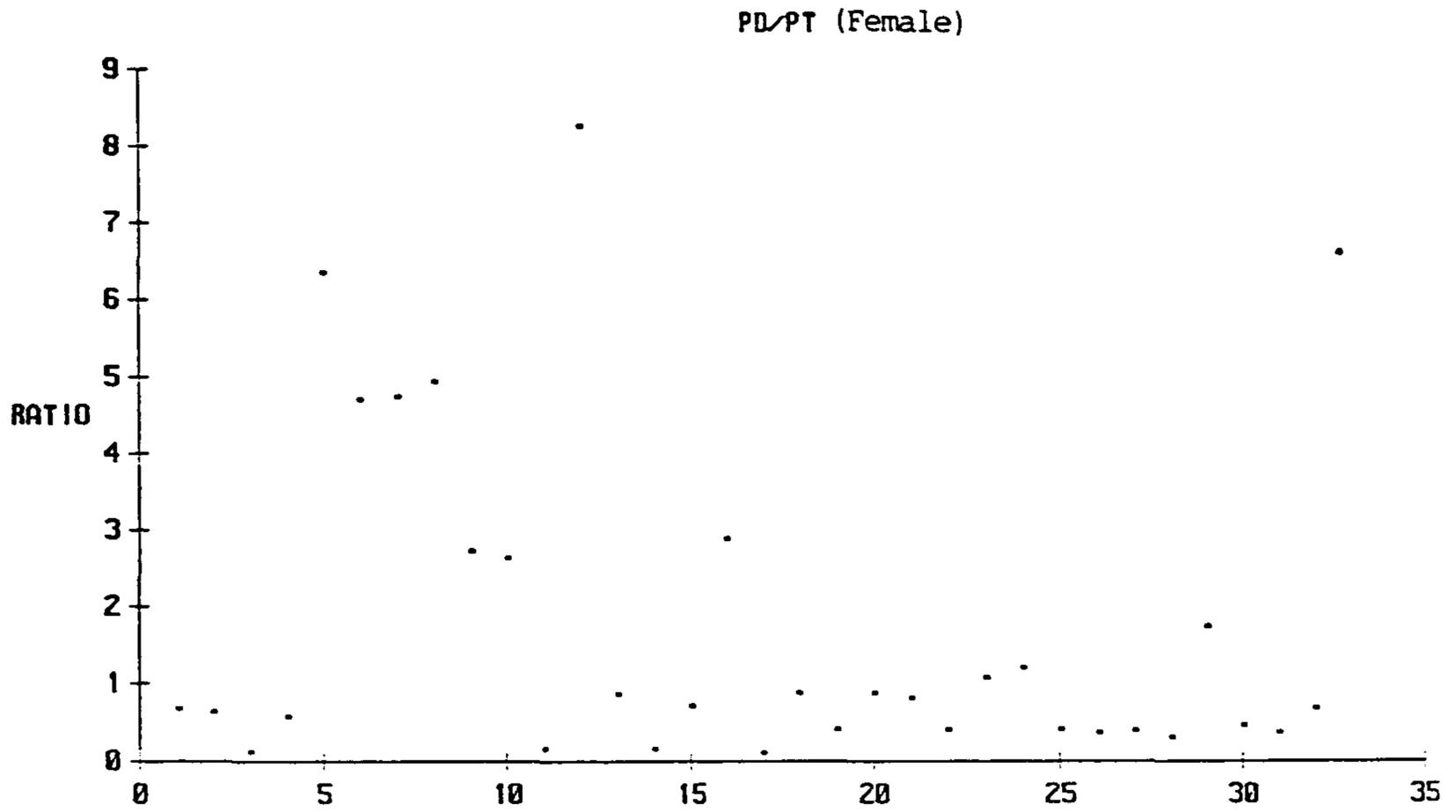


Fig 12-5 계측군에 따른 내인성 Steroid의 농도비율 분포.

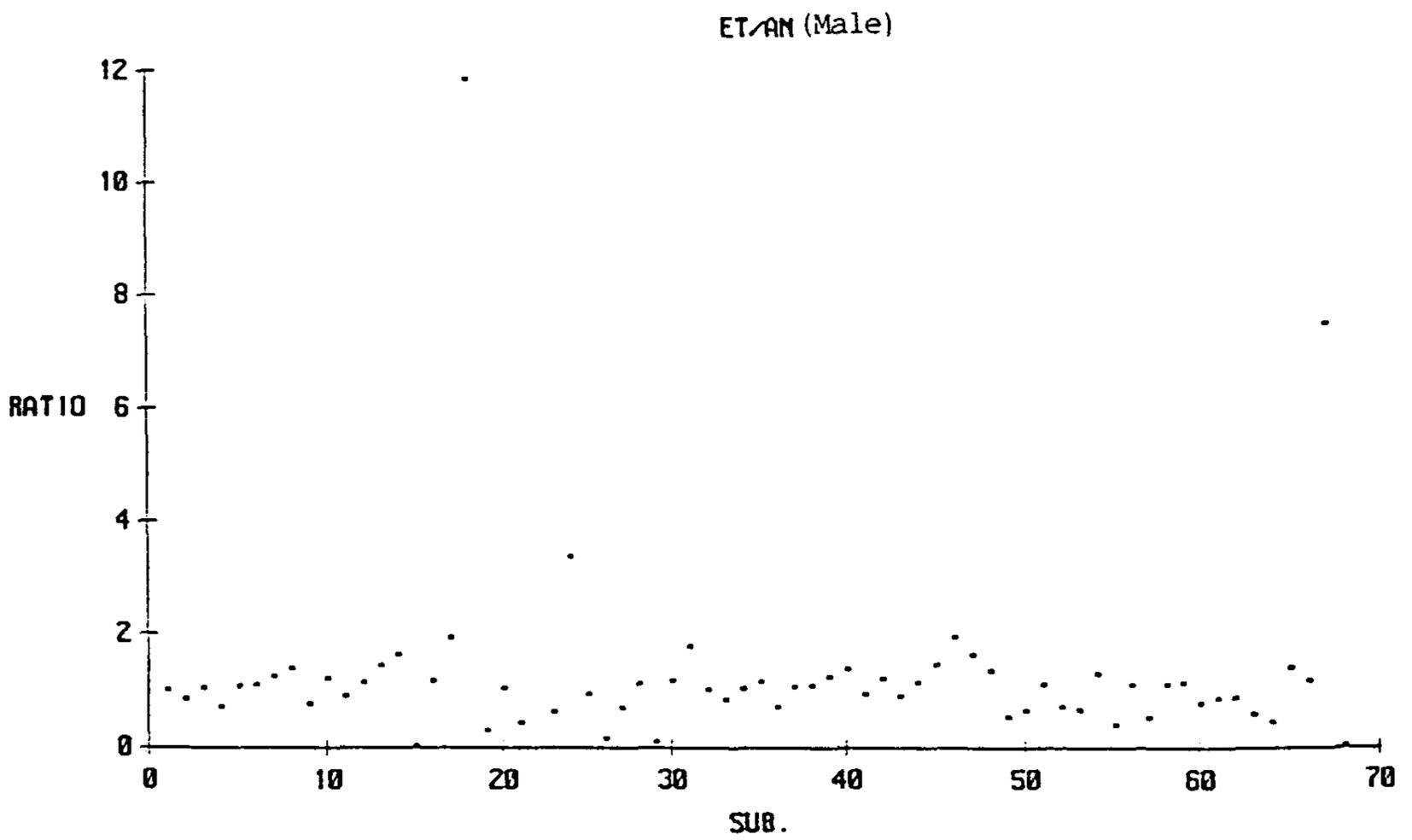
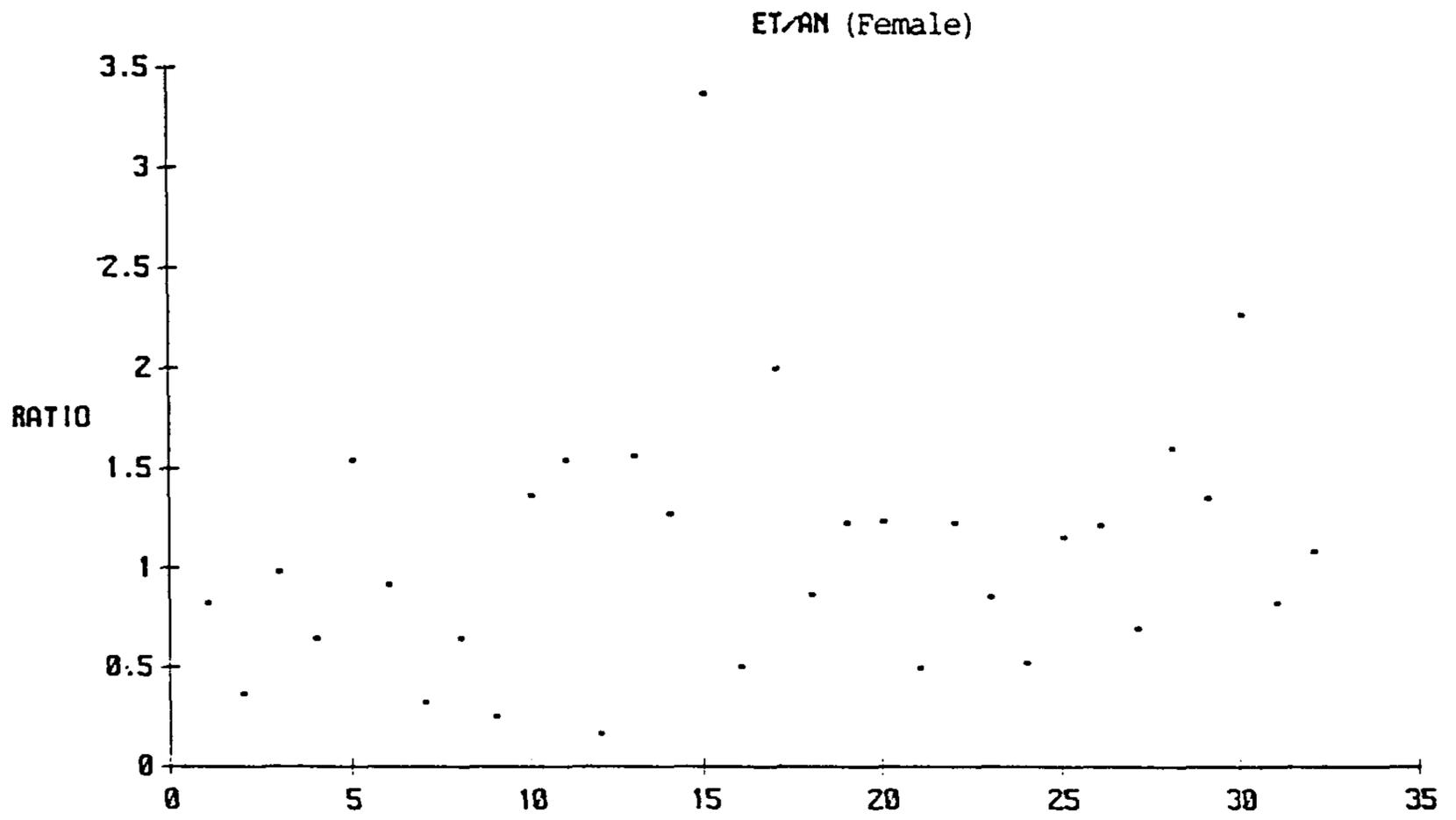


Fig 12-6 계제군에 따른 내인성 Steroid의 농도비율 분포.

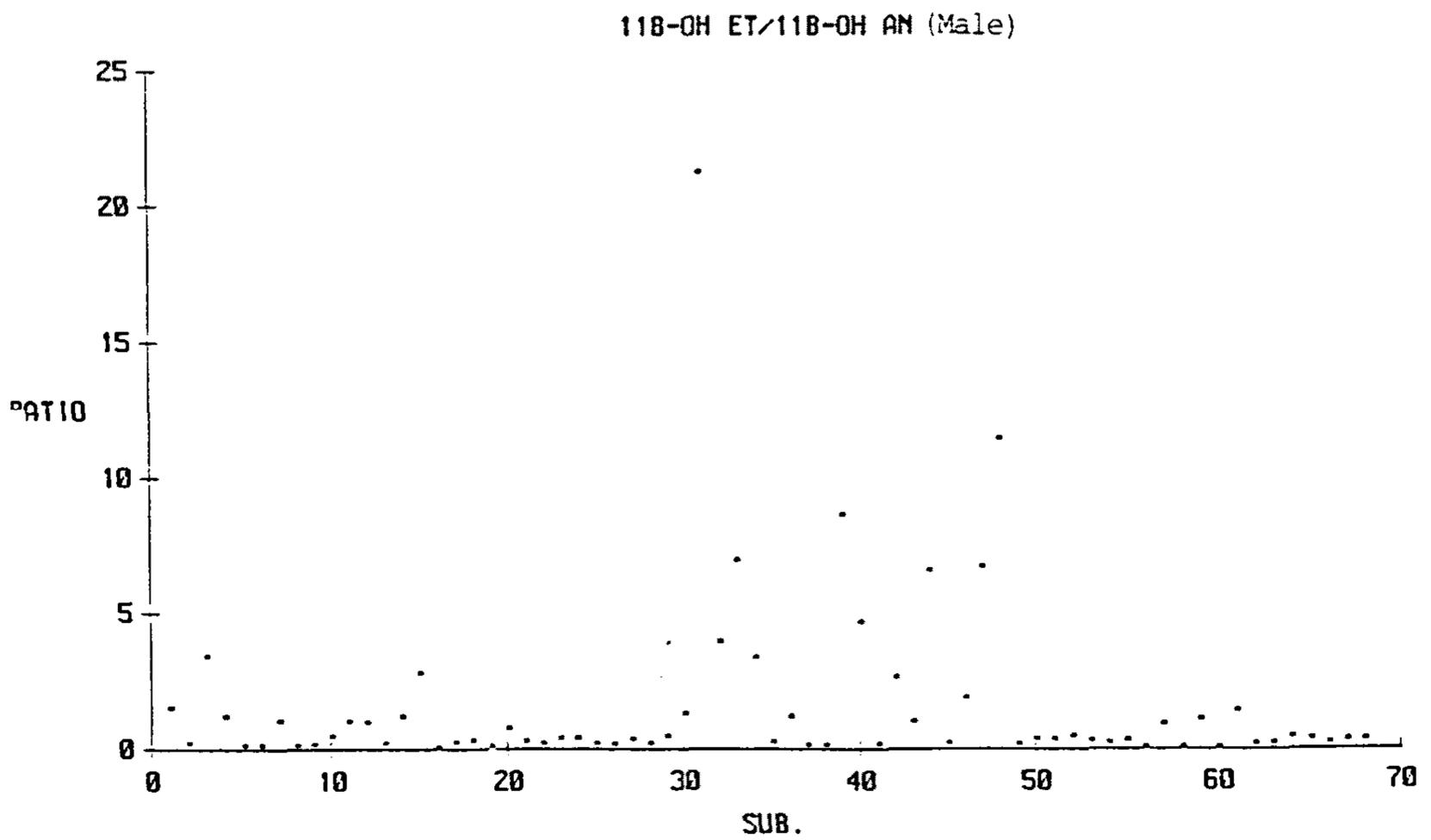
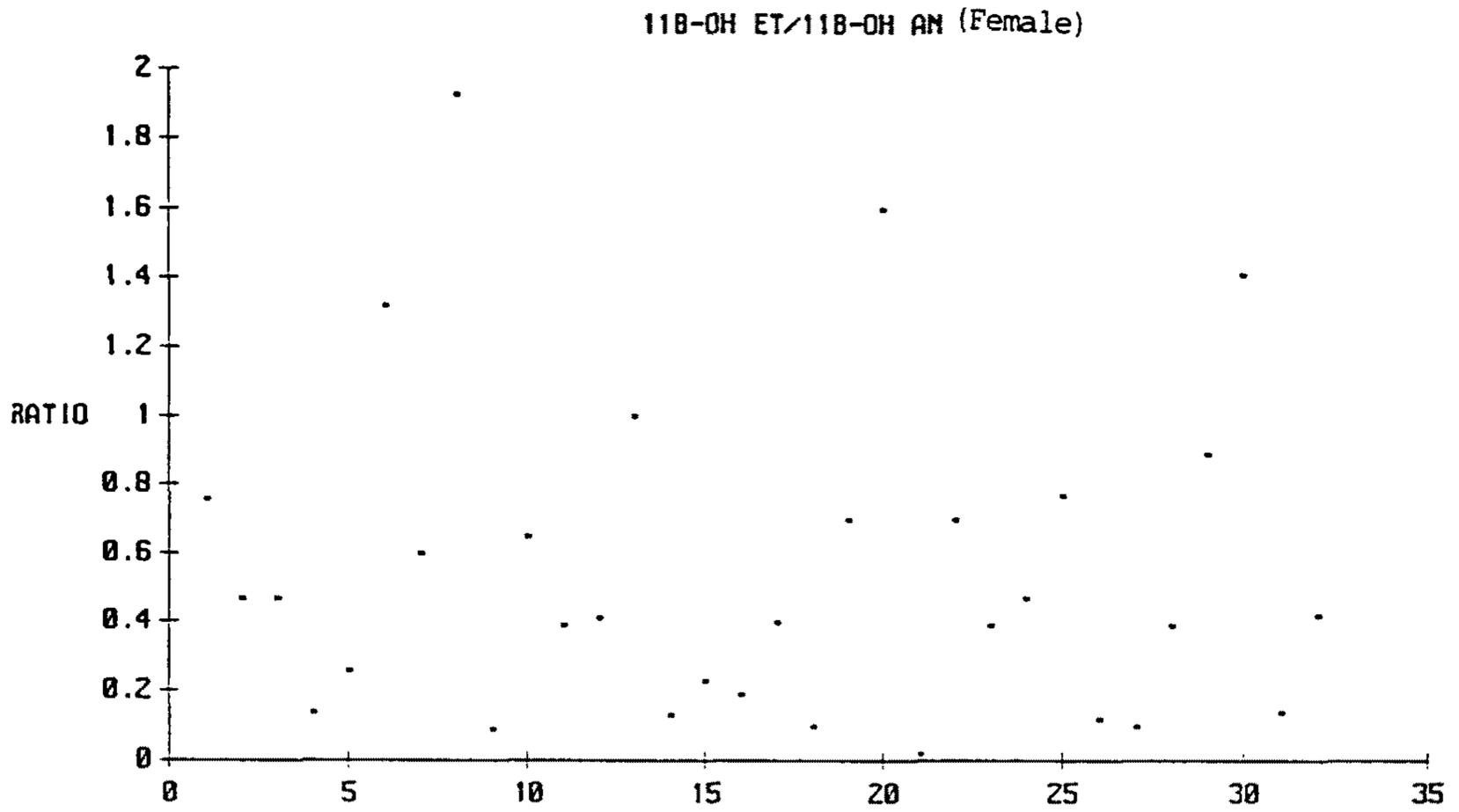


Fig 12-7 계제군에 따른 내인성 Steroid의 농도비율 분포.

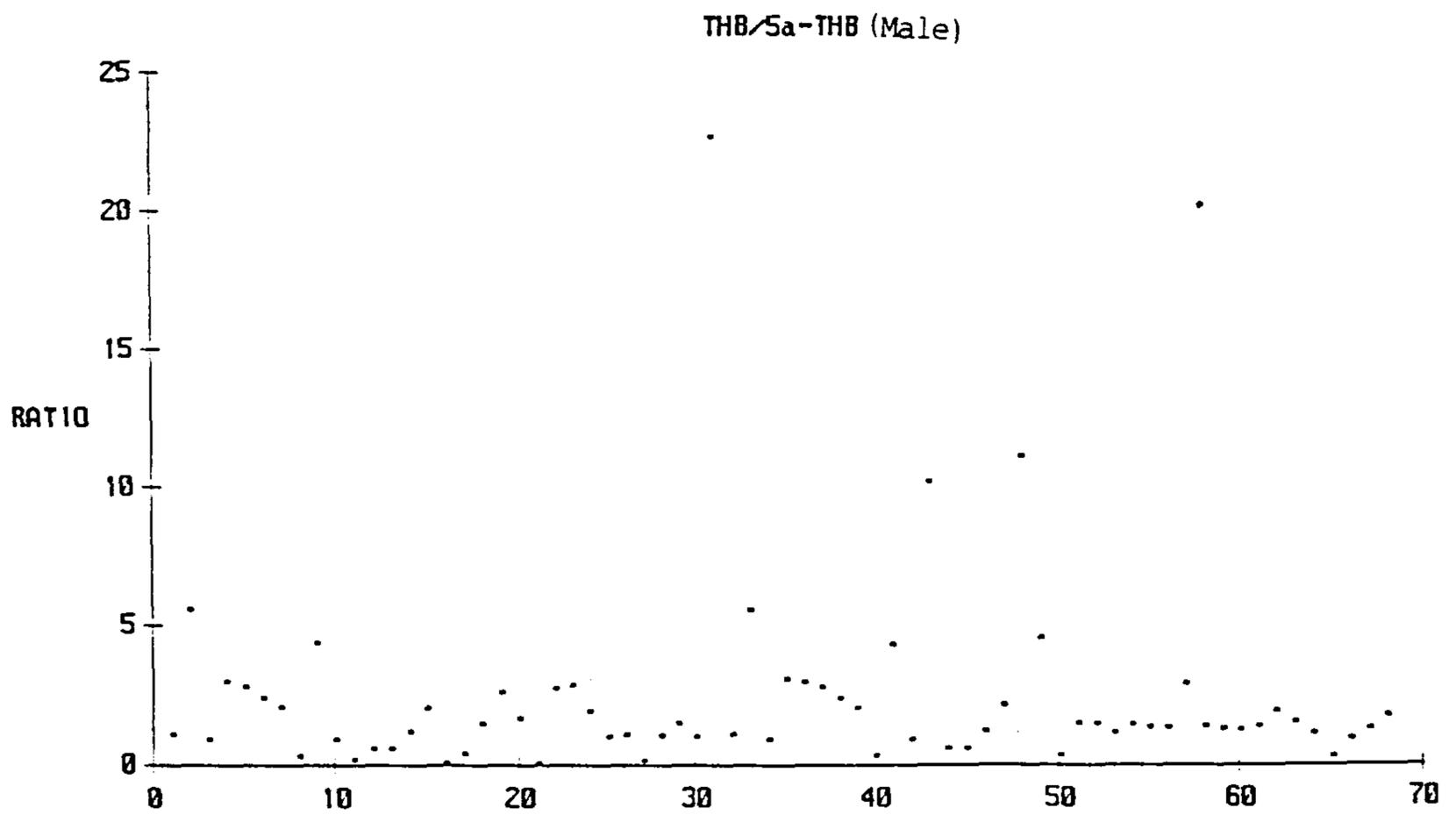
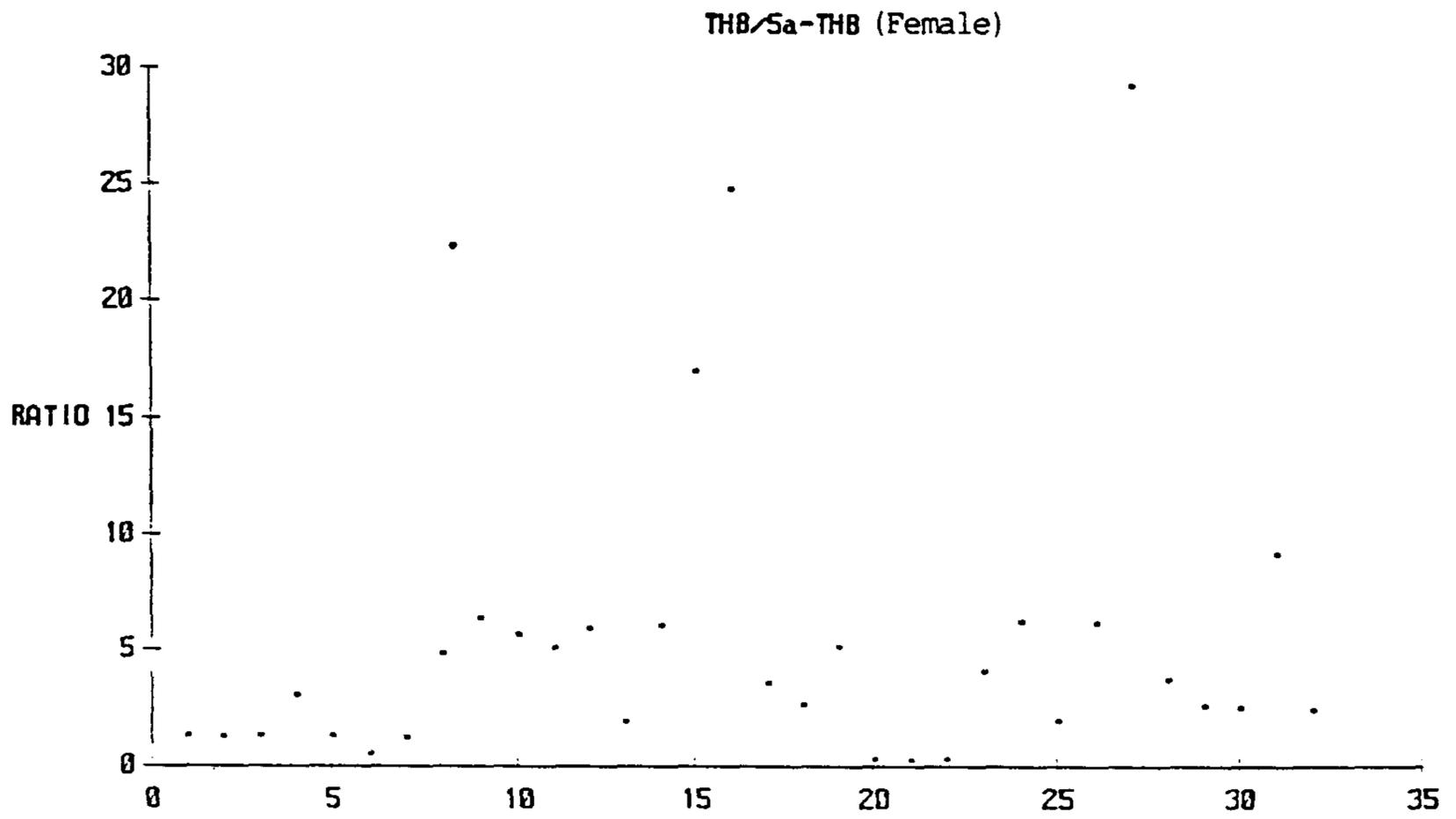


Fig 12-8 계측군에 따른 내인성 Steroid의 농도비율 분포.

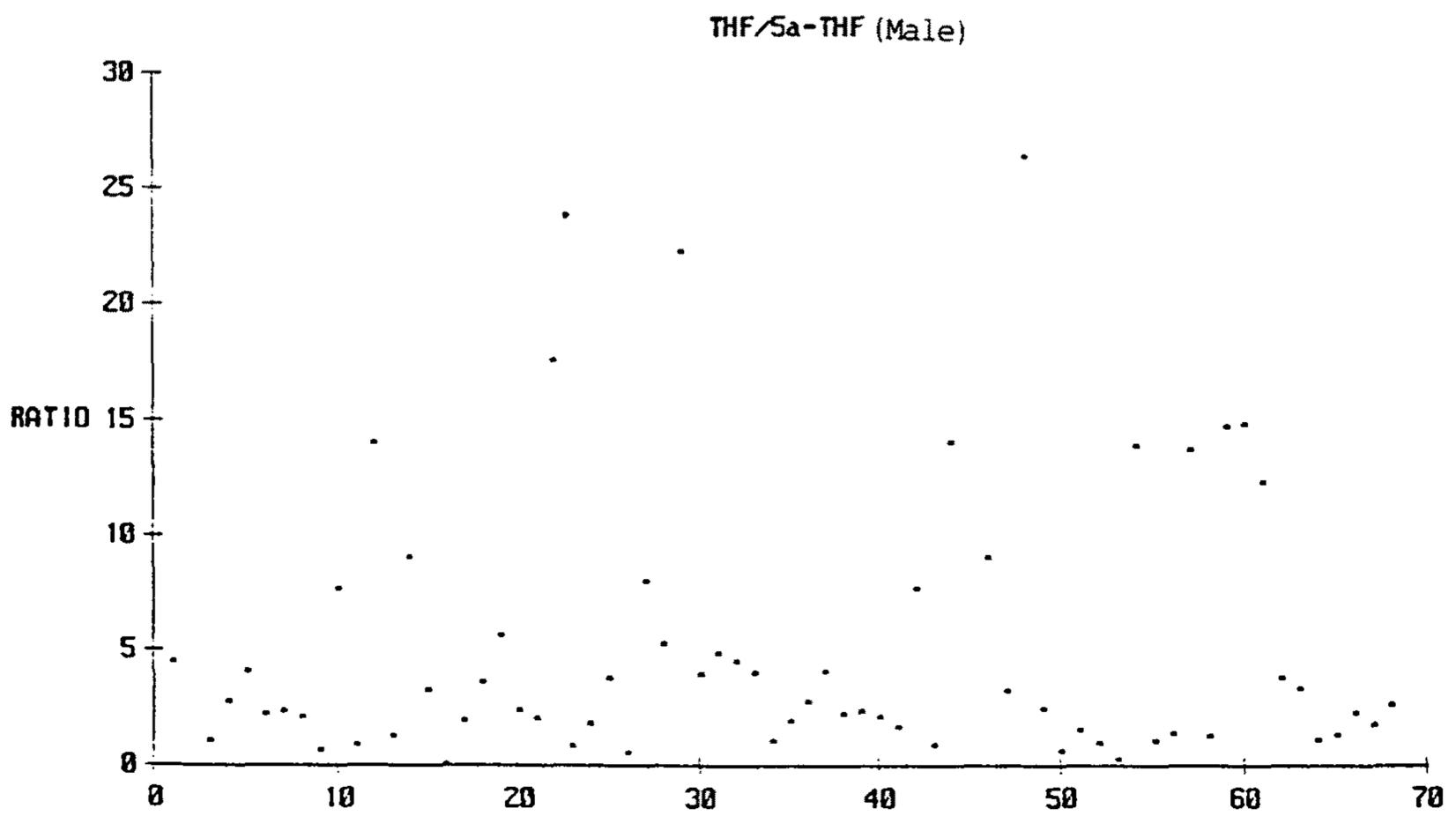
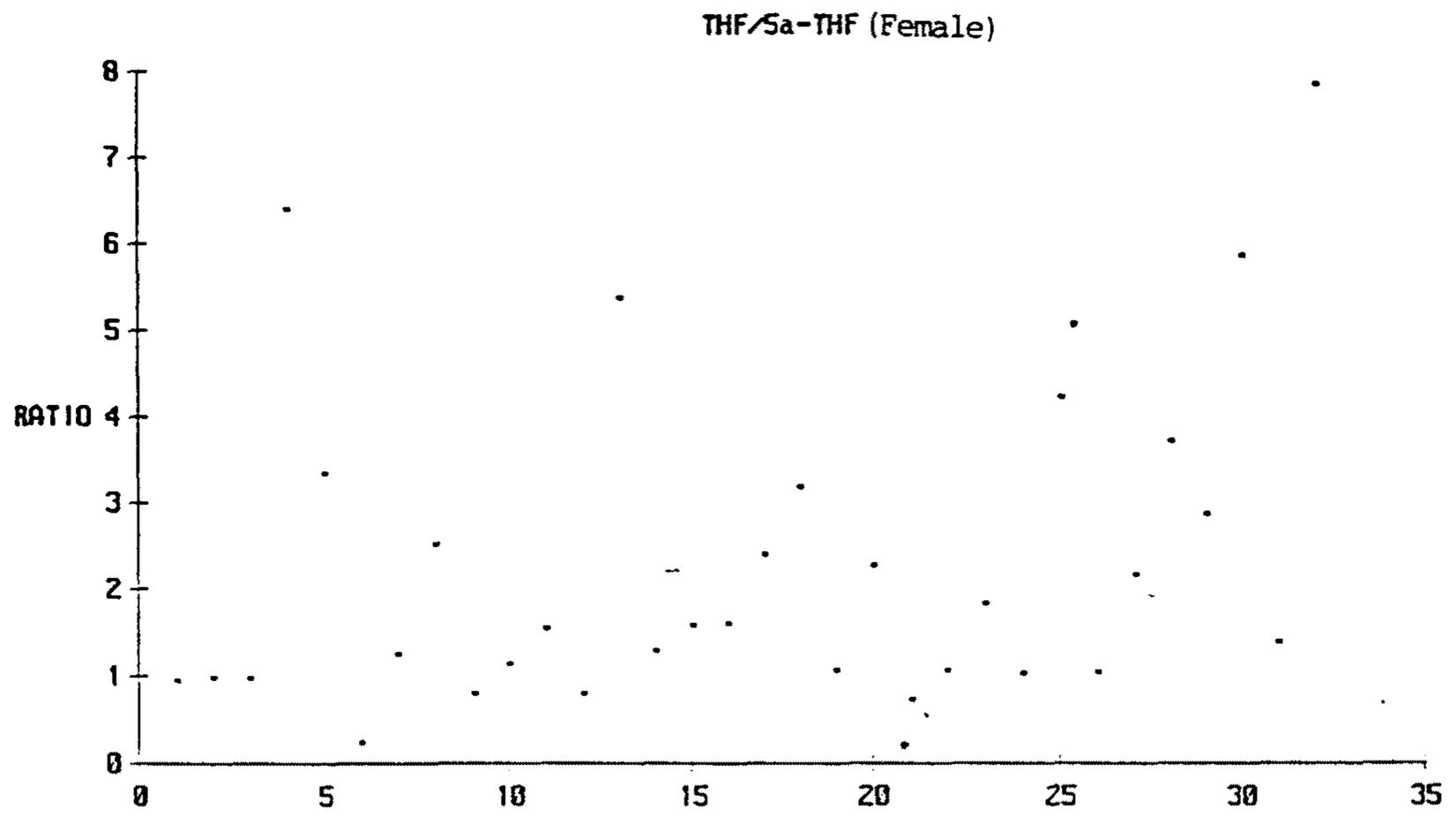


Fig 12-9 계제군에 따른 내인성 Steroid의 농도비율 분포.

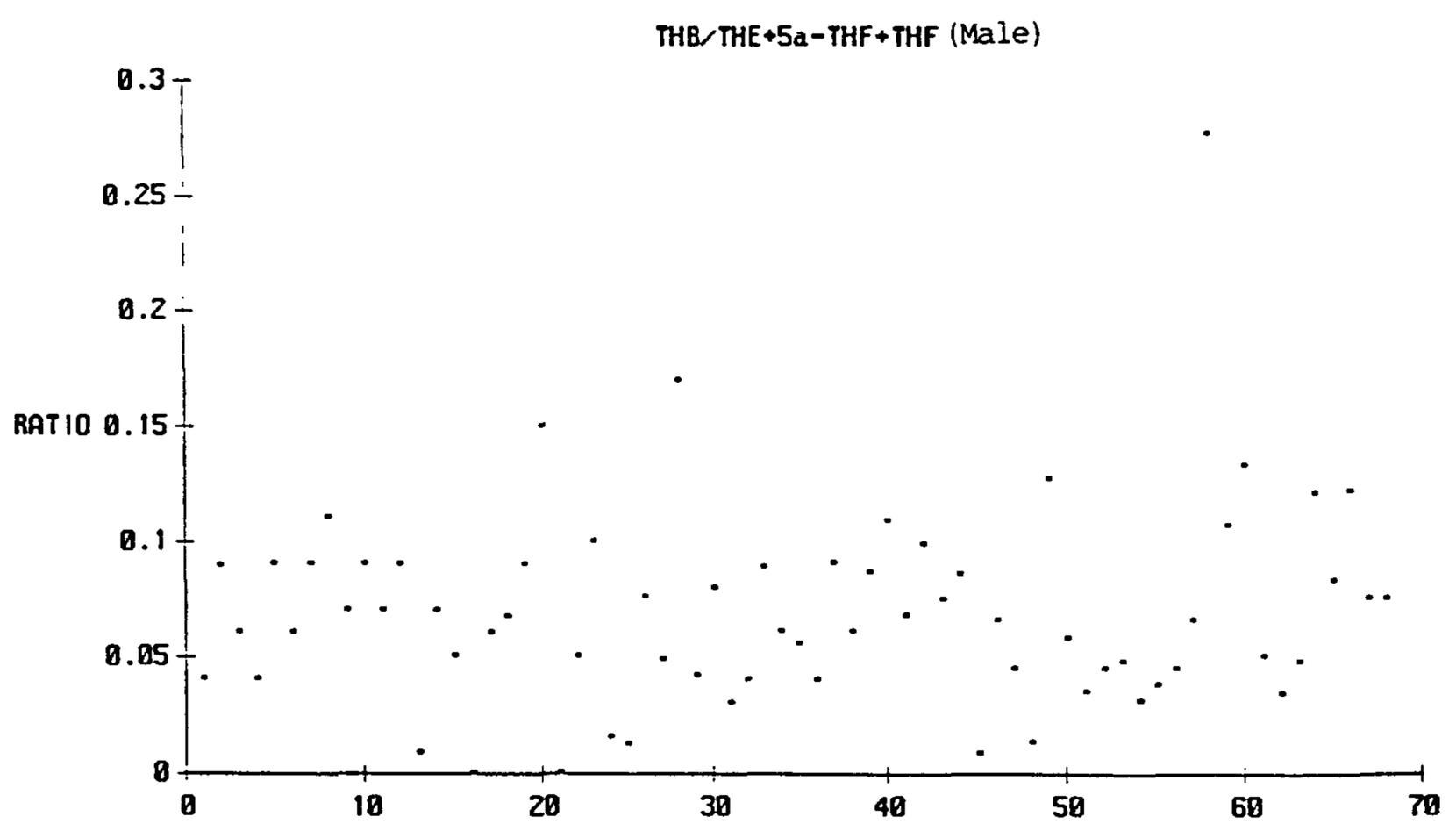
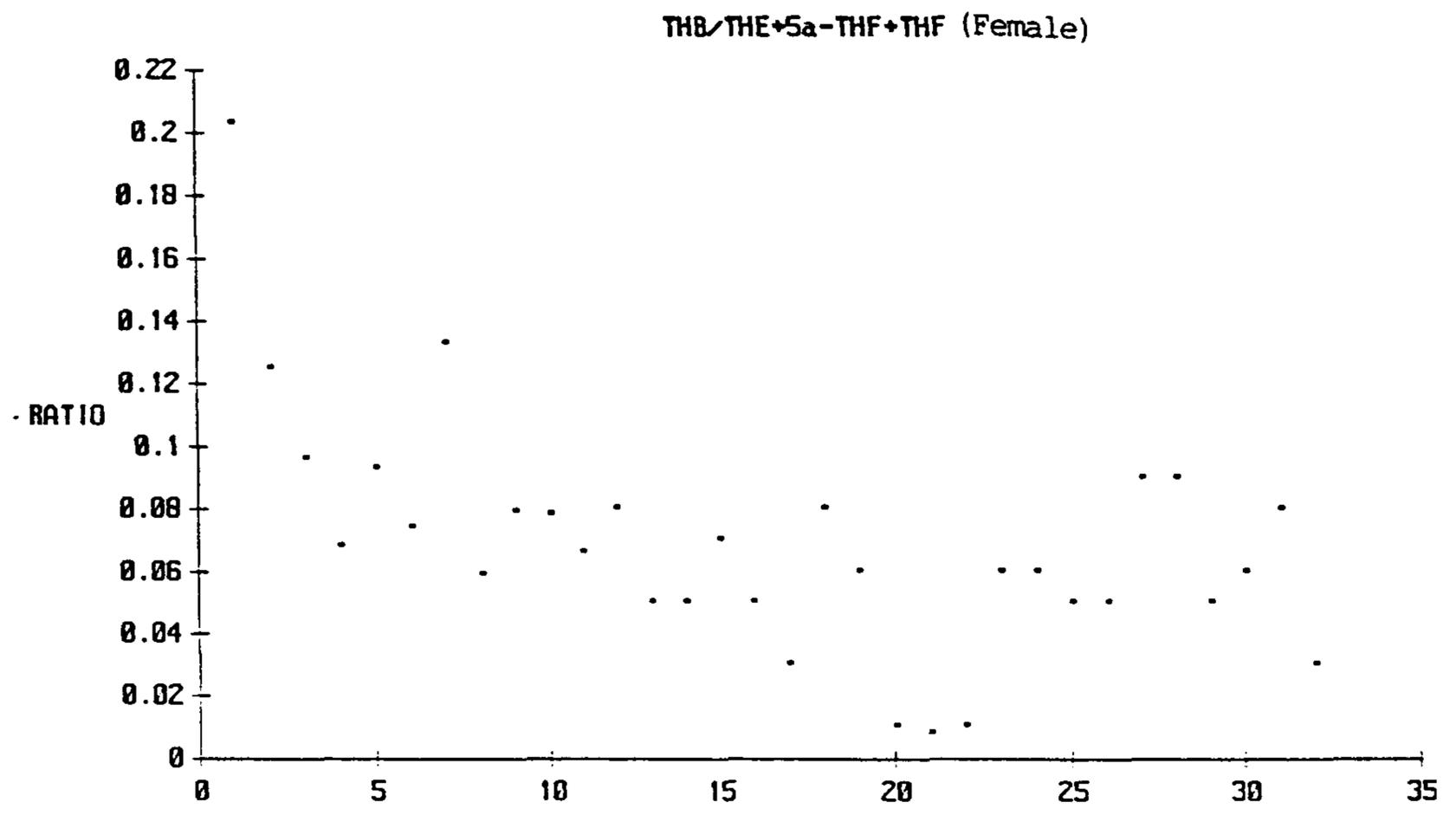
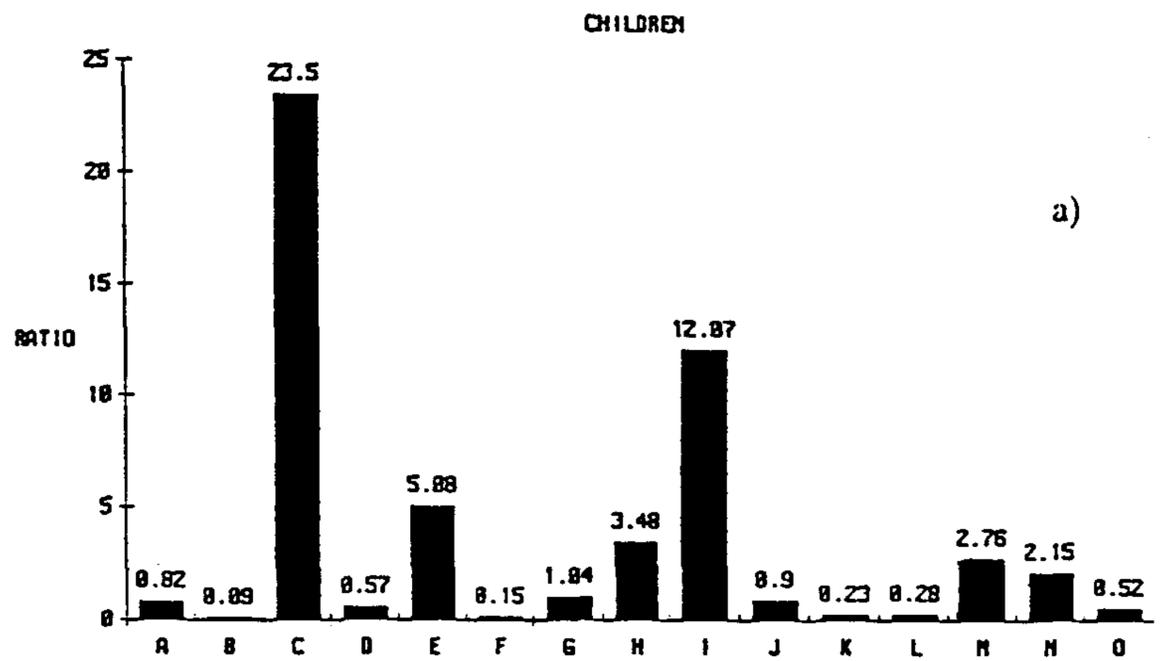


Fig 12-10 계제군에 따른 내인성 Steroid의 농도비율 분포.



- A= DHEA/THF+TEF+5a-THF
- B= AN+ET/THF+TEF+5a-THF
- C= PT/THF+TEF+5a-THF
- D= 5a-THB+THB/5a-THF+THF
- E= 5a-THB+THB/AN+ET
- F= PD/PT
- G= ET/AN
- H= 11B-OH AN/11B-OH ET
- I= THB/5a-THB
- J= TEF/5a-TEF
- K= THB/THB+5a-THF+TEF
- L= 5a-THB/THB+5a-THF+TEF
- M= 5a-TEF+TEF/THB
- N= 5a-TEF/TEF
- O= THB/5a-THF+THF

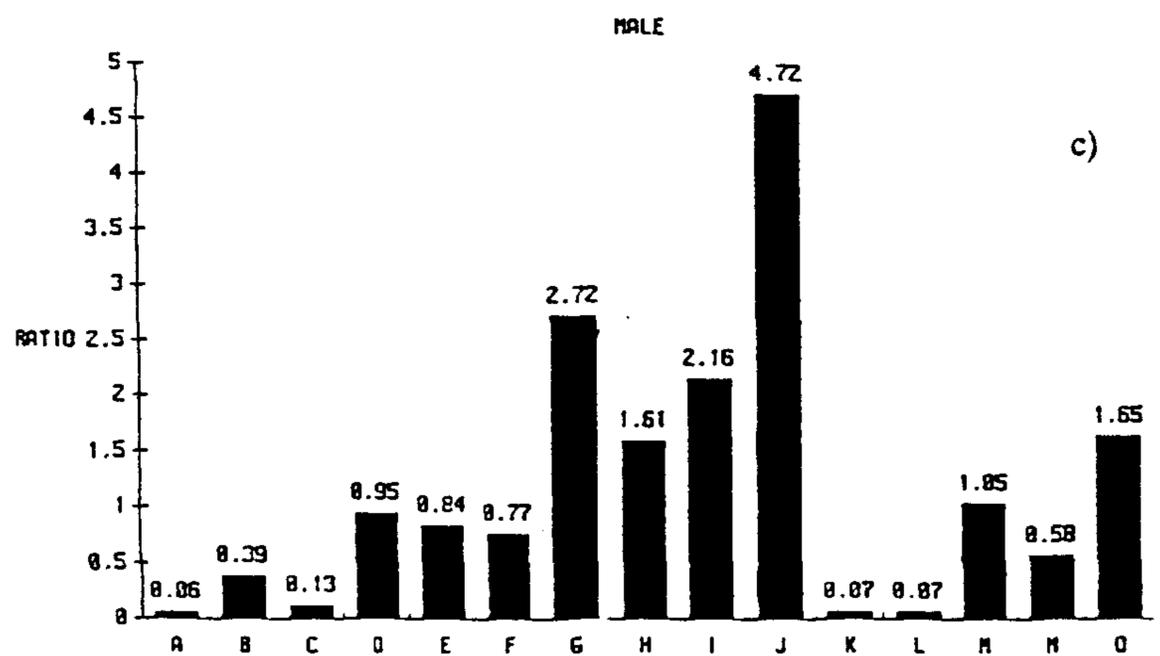
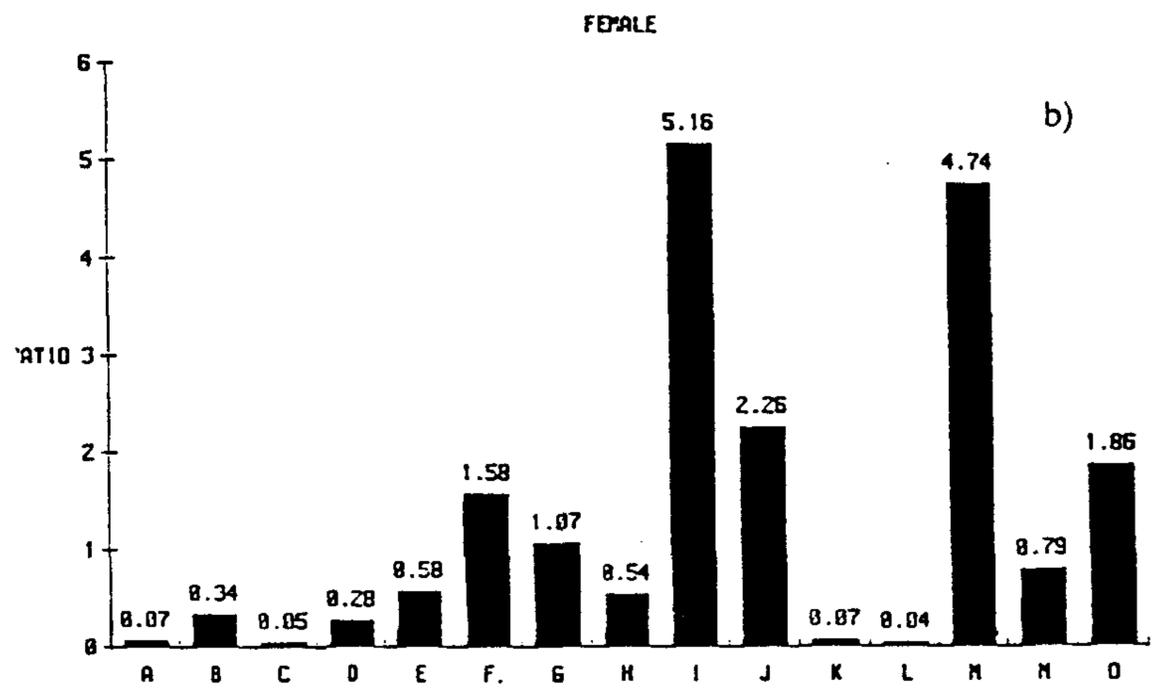


Fig. 13. 개체군에 따른 내인성 steroid의 농도비율 평균.
a) 어린이 b) 성인 여성 c) 성인 남성