

호르몬 분석을 이용한 질병의 진단에
관한 연구

A Study on the Hormonal Analysis as a Diagnostic Tool

연구기관
한국과학기술연구원

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀 하

본 보고서를 첨단요소사업 과제인 "호르몬분석을 이용한 질병의 진단에 관한 연구(3차)" 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1992년 7월

연구 기관 : 한국과학기술연구원
연구책임자 : 정봉철(선임연구원)
 유영숙(")
참여연구원 : 박종세(책임연구원)
 박송자(")
 최명자(")
 장현경(연구원)
 김태욱(")
 엄기동(")
 정병화(")
 김영숙(")
 표희수(")
 김연제(")
 송은영(")
 최정은(")
 박경수(")

여 백

요 약 문

I. 제 목

호르몬 분석을 이용한 질병의 진단에 관한 연구(3차)

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 원인을 밝히고, 그 예방 및 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 1960년대 말부터 서서히 화학분석기기등에 의해 연구되기 시작했는데 실제 검출하고자 하는 물질의 인체내 농도는 극히 적은양이고, 또한 생체시료등에는 많은 간섭물질이 존재하고 있기 때문에 아주 높은 분리능을 갖는 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 scope를 넓혀, 새로운 방법으로 확립하고, 정상 성인들의 뇨 및 혈장을 사용하여 그 normal range를 설정하고자 하였고, 실제 내분비계 질환이나 기타 질환환자의 urine을 사용하여 profiling 연구를 함으로써 질병의 진단에 적용하고자 시도를 하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

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

제 1차, 2차년도에서는 17가지의 내인성 스테로이드들의 동시분석법을 확립하였고 또한 한국인의 정상 성인, 남녀와 어린이들의 normal range를

설정하였고, 최종년도인 3차년도에서는 내인성 호르몬 4가지와 혈장 androgen의 중요한 marker인 6가지 스테로이드들을 추가하여 동시분석을 시도하였고, 선천성부신증생, 17 β -hydroxylase결핍증등 몇가지의 내분기계 질환환자들의 urine을 분석하여 질환 특유의 profile을 비교·검토하였다.

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

여 백

Summary

The twenty seven endogeneous steroid hormones from human urine were simultaneously analyzed by selected ion monitoring(SIM) method of Gas Chromatograph/ Mass Spectrometry(GC/MS). Urine samples were collected for twenty-four hours from sixty eight normal males, thirty four normal females and eight normal children. Urinary steroids were extracted by using XAD-2 resin, hydrolyzed with β -glucuronidase/aryl sulfatase from *Helix Pomatia* and quantitatively derivatized by N-methyl-N-trimethylsilylheptafluorobutyramide(MSHFB)/trimethylsilylimidazole/trimethylchlorosilane (2:2:1) mixture in order to be detected on the GC/MS. The observed concentrations of seventeen endogeneous steroids in human urine were in the range of 0.01-300 ug/ml.

A GC/MS method for profiling of six diagnostically significant plasma androgens, e.g., 4-androstendione, dehydroepiandrosterone, testosterone, epitestosterone, 5α -dihydrotestosterone, 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol have been developed successfully. The observed concentrations of six endogeneous steroids in human plasma were in the range of 0.01-5.6 ug/ml.

And we have done two case study for diagnostic purpose with this profiling already setted. One is Cushing's syndrome and the other is 17α -

The data obtained from this study can be used as reference values for the diagnosis of any kind of diseases in Korean, and this study will be extended further to determine normal reference value for other oriental people and applicable to routine clinical use. We believe that our sophisticated findings regarding the profiles of urinary and plasma steroid hormones of diverse sector of humanbeing establish a fundamental basis to the clinical research on diagnosis of various diseases related to the metabolism of steroid hormones.

Contents

Chapter 1. Introduction	23
Chapter 2. Theoretical Background	25
Section 1. Endocrinology	25
Section 2. Adrenal Steroid	31
Section 3. Endocrine Pathophysiology of the Steroid Hormone ...	36
Section 4. Analytical Methods of Steroid Hormone	43
Chapter 3. Experimentals	48
Section 1. Sample Collection	48
Section 2. Instruments and Apparatus	48
Section 3. Analytical Condition of GC/MSD	49
Section 4. Reagents	50
Section 5. Experimental Method	52
Chapter 4. Results and Discussions	58
Section 1. Establishment of New Steroid Profiling	58
Section 2. Cushing's Syndrome	70
Section 3. 17 α -hydroxylase deficiency	75
Section 4. Plasma Androgen Profiling	82
Chapter 5. Conclusion	96
References	99
Appendix	102

List of Tables

- Table 1. Endocrine Pathophysiology of the Adrenal Cortex.
- Table 2. Endocrine Glands and Their Hormone.
- Table 3-1. Characteristic Ions and Relative Retention Time of Steroids by TMS derivatization
- Table 3-2. Macro Program for Steroid Profile.
- Table 3-3. Concentration of Urinary Steroids and Prednisolone by Group of Age.
- Table 4. Steroid Quantitation of Cushing's Syndrome.(case 1)
- Table 5. Steroid Quantitation of Cushing's Syndrome.(case 2)
- Table 6. Concentration of Urinary Steroids in a Patient (pre-ACTH, post-ACTH) with 17 α -hydroxylase Deficiency.
- Table 7. Relative Retention Time and Characteristic Ions for Detection of Plasma Androgen.
- Table 8. Concentration of Plasma Androgens in Normal Male.
- Table 9. Macro Program of Plasma Androgen.

List of Figures.

- Figure 1. Gross Anatomy of the Human Adrenal Glands.
- Figure 2. Diagrammatic Representation of the Microanatomy of the Human Adrenal Cortex.
- Figure 3. Normal Regulation of Adrenal Steroid Hormone Secretion. Secretion of CRH is regulated by central nervous system afferents mediating the circadian rhythm and responses to stress.
- Figure 4. Mechanism of Steroid Hormone Action.
A complete understanding of the relationship between steroid receptor binding and the mechanism of hormone action depends on valid characterization and accurate measurement of steroid receptor
- Figure 5. Summary Scheme of the Etiology of Hypocortisolism and Hypercortisolism.
- Figure 6-1. Mass Spectra of TMS-Derivatized β -Cortolone and β -Cortol
- Figure 6-2. Mass Spectra of TMS-Derivatized Cortolone and THA
- Figure 6-2. Mass Spectra of TMS-Derivatized 5-AT and THDOC.
- Figure 7-1. Urinary Steroid Profile of a Patient with Cushing's Syndrome. (pre-medication)
- Figure 7-2. Urinary Steroid Profile of a Patient with Cushing's Syndrome. (post-medication)
- Figure 8-1. Total Ion Chromatogram of Standard Steroids.
- Figure 8-2. Urinary Steroid Profile of a Normal Female.(age 32 year)
- Figure 8-3. Urinary Steroid Profile of a Patient with 17α - Hydroxylase Deficiency(pre-ACTH)
- Figure 8-4. Urinary Steroid Profile of a Patient with 17α -Hydroxylase Deficiency(post-ACTH)

Figure 9-1 Mass Spectra of HFB-Derivatized DHEA and Epitestosterone.

Figure 9-2. Mass Spectra of HFB-Derivatized Testosterone and 5 α - androstane-3 α ,17 β -diol.

Figure 9-3. Mass Spectra of HFB-Derivatized Dihydrotestosterone and Androstenedione.

Figure 10. SIM Chromatograms of HFB-Derivatized Androgen by Macro Program.

Figure 11-1. Calibration Curves of Standard Androgen for Quantitation.

Figure 11-2. Calibration Curves of Standard Androgen for Quantitation.

Figure 11-3. Calibration Curves of Standard Androgen for Quantitation.

List of Schemes

Scheme 1. Metabolic Pathway of Steroid Hormone.

Scheme 2. Abnormal Metabolic Pathway of Steroid Hormone by 17α -Hydroxylase Deficiency.

Scheme 3. Genetic Defect in 17α -Hydroxylase Activity Leading to Hyperaldosteronism.

Scheme 4. Derivatization of Plasma Androgens with Heptafluorobutyric anhydride.

여 백

목 차

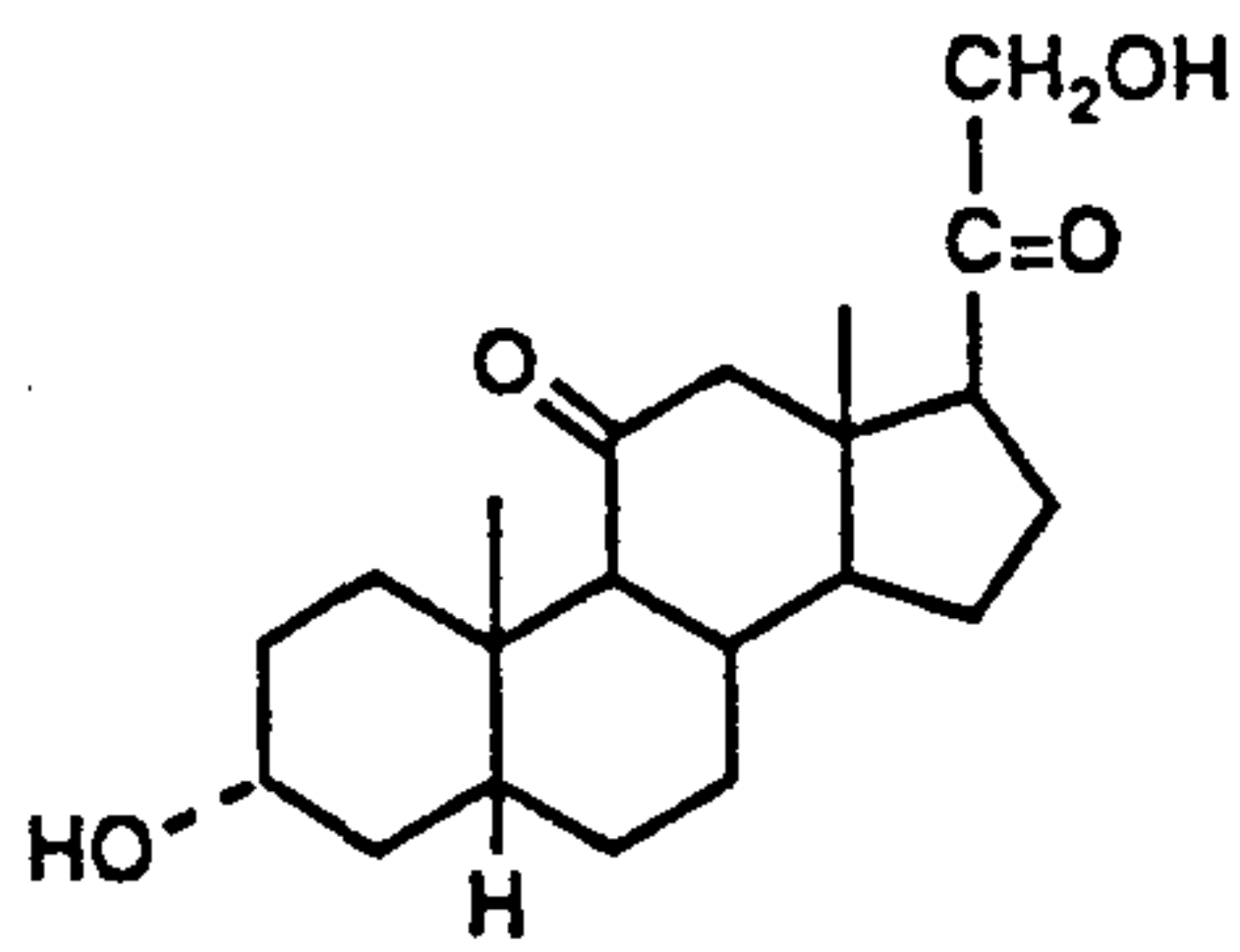
제 1장	서론	23
제 2장	이론적 배경	25
제 1절	내분비	25
제 2절	부신피질 호르몬	31
제 3절	스테로이드 호르몬계의 내분비질환	36
제 4절	생체시료에서의 내인성물질 분석방법	43
제 3장	실험	48
제 1절	시료	48
제 2절	분석기기 및 장치	48
제 3절	GC/MSD의 작동조건	49
제 4절	시약	50
제 5절	실험방법	52
제 4장	결과 및 고찰	58
제 1절	새로운 Steroid Profiling의 설정	58
제 2절	Cushing's Syndrome	70
제 3절	17 α -Hydroxylase Deficiency	75
제 4절	Plasma Androgen Profiling	82
제 5장	결론	96
참고문헌	99
부록	102

여 백

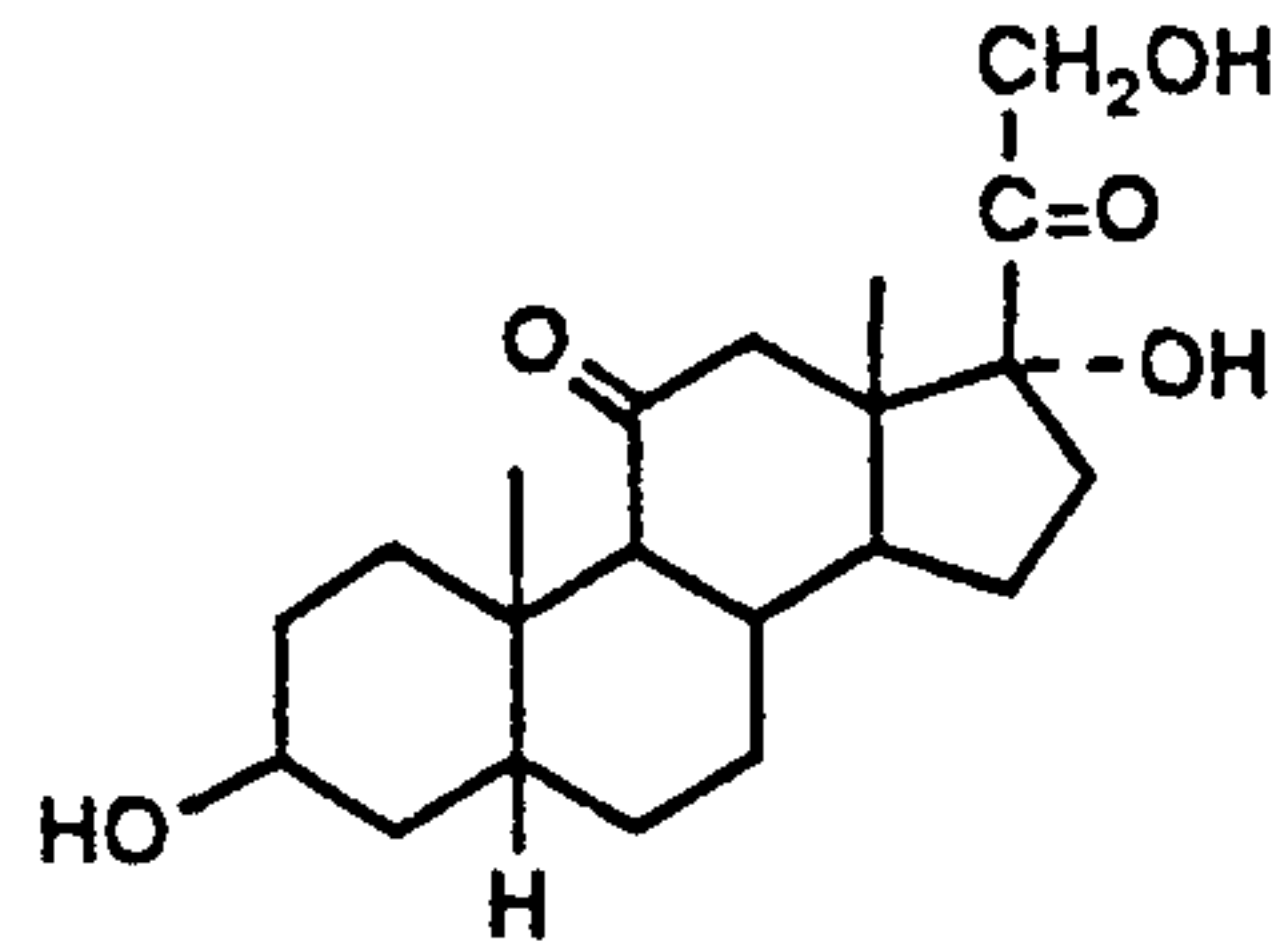
Nomenclature and Abbreviations

Androsterone	3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-one
Etiocholanolone	3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-one
DHEA	3 β -Hydroxy-5-androsten-17-one
11-Keto An	3 α -Hydroxy-5 α -androstan-11,17-dione
11-Keto Et	3 α -Hydroxy-5 β -androstan-11,17-dione
Androstenedione	4-Androstene-3,17-dione
11 β -OH An	3 α ,11 β -Dihydroxy-5 α -androstan-17-one
11 β -OH Et	3 α ,11 β -Dihydroxy-5 β -androstan-17-one
Pregnenolone	3 β -Hydroxy-5-pregnen-20-one
Progesterone	4-Pregnene-3,20-dione
Pregnanediol	5 β -Pregnane-3 α ,20 α -diol
Pregnenediol	5-Pregnene-3 β ,20 α -diol
Pregnanetriol	5 β -Pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol
16-Pregnenetriol	5-Pregnene-3 β ,16 α ,20 α -diol
THS(Tetrahydro-11-deoxycortisol)	5 β -Pregnane-3 α ,17 α ,21-trihydroxy-20-one
THE(Tetrahydrocortisone)	5 β -Pregnane-3 α ,17 α ,21-trihydroxy-11,20-one
THF(Tetrahydrocortisol)	5 β -Pregnane-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrahydroxy-20-one
5 α -THF(5 α -Tetrahydrocortisol)	5 α -Pregnane-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrahydroxy-20-one
5 α -THB(5 α -Tetrahydrocorticosterone)	5 α -Pregnane-3 α ,11 β ,21-trihydroxy-20-one
THA(Tetrahydro-11-dehydrocorticosterone)	5 β -Pregnane-3 α ,21-dihydroxy-11,20-dione
THDOC(Tetrahydrodeoxycorticosterone)	5 β -Pregnane-3 α ,21-dihydroxy-20-one
Cholesterol	5,(6)-Cholestene-3-ol
Prednisolone	11 β ,17,21-Trihydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione
Cortol	5 β -Pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,20 α ,21-pentol
β -Cortol	5 β -Pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,20 α ,21-pentol
Cortolone	5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 α ,21-tetrol-11-one
β -Cortolone	5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 β ,21-tetrol-11-one
5-AT	5-Androstene-3 β ,16 α ,17 β -triol

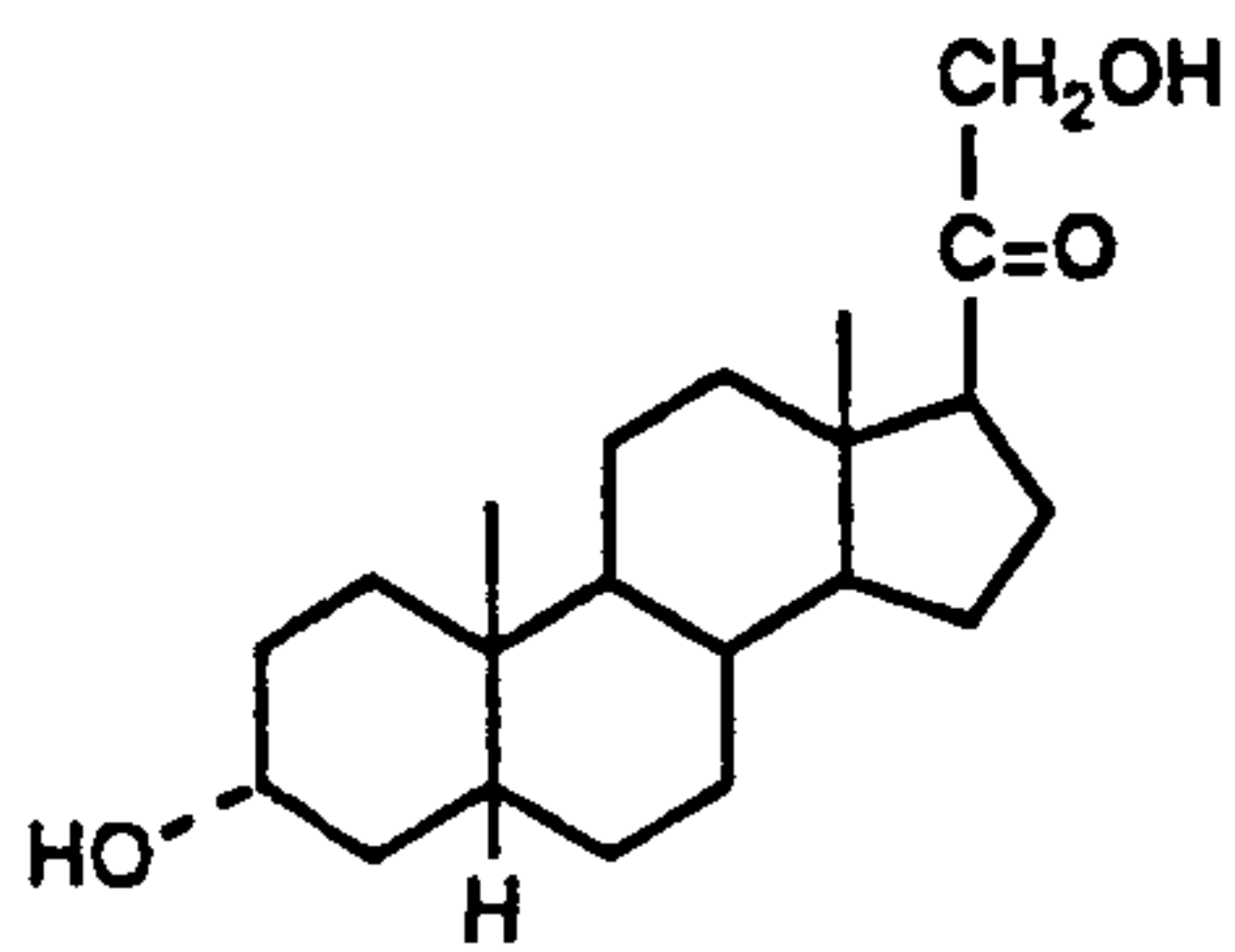
여 백



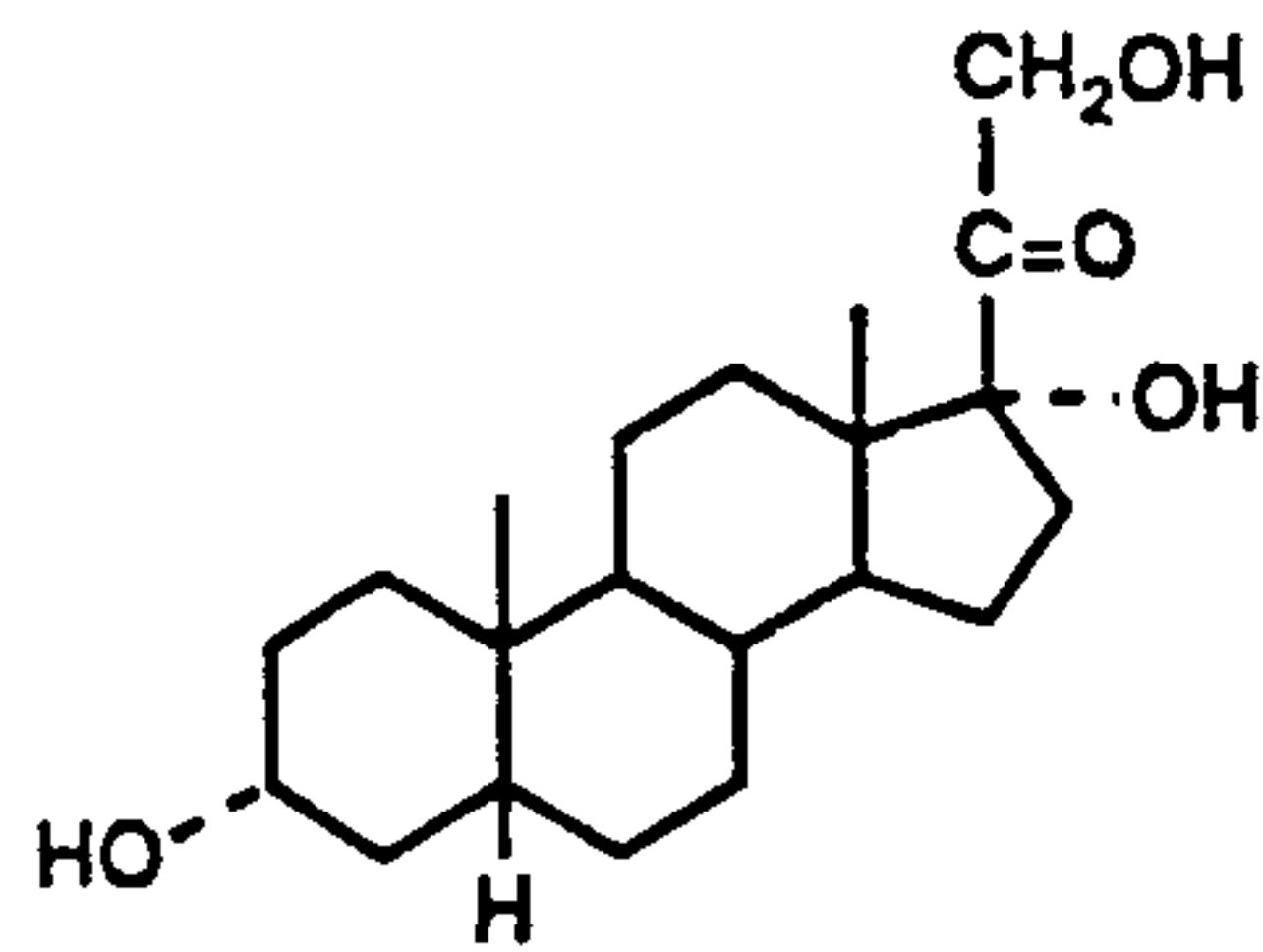
tetrahydro-11-dehydrocorticosterone
(THA)



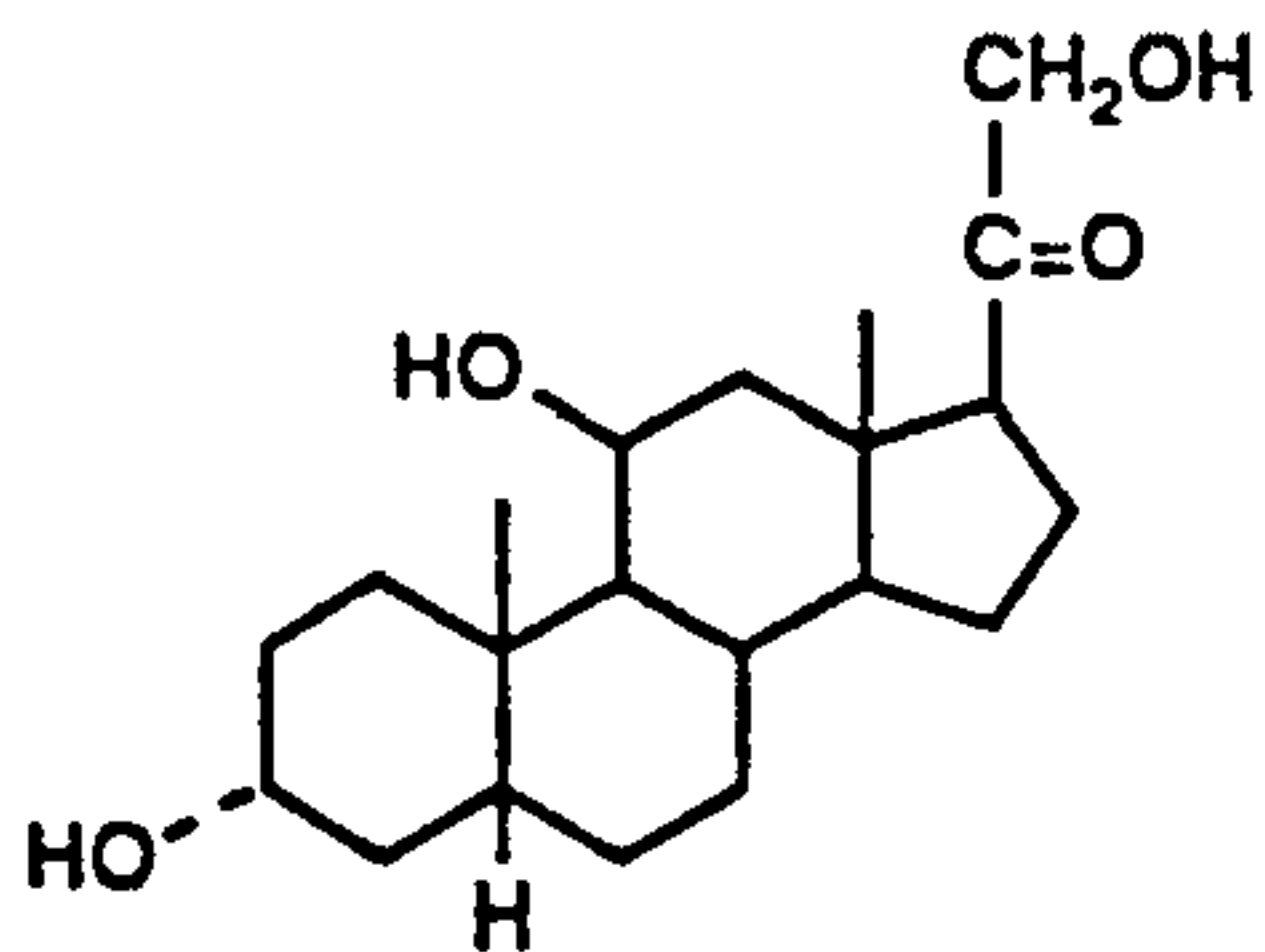
tetrahydrocortisone
(THE)



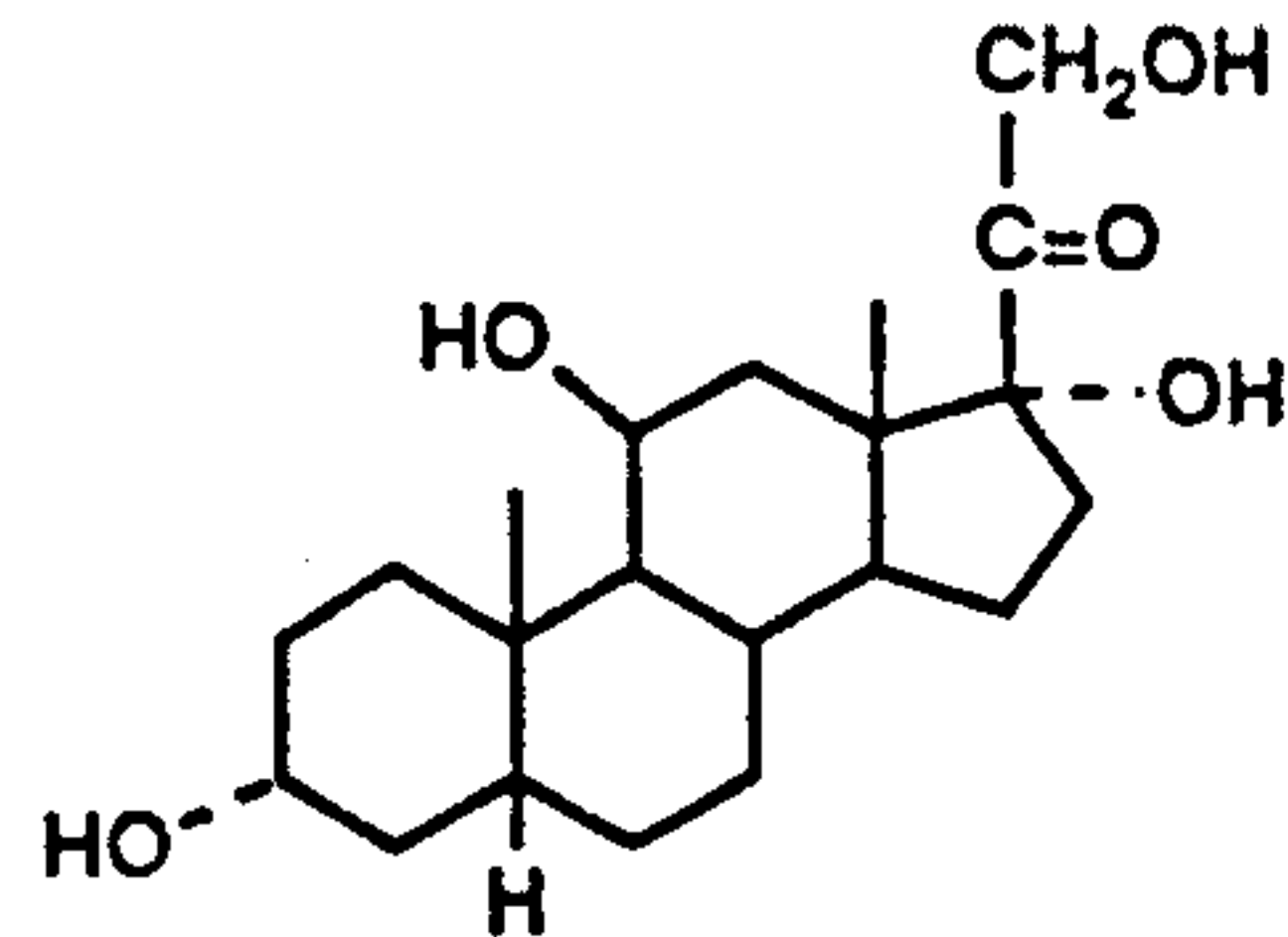
tetrahydrodeoxycorticosterone
(THDOC)



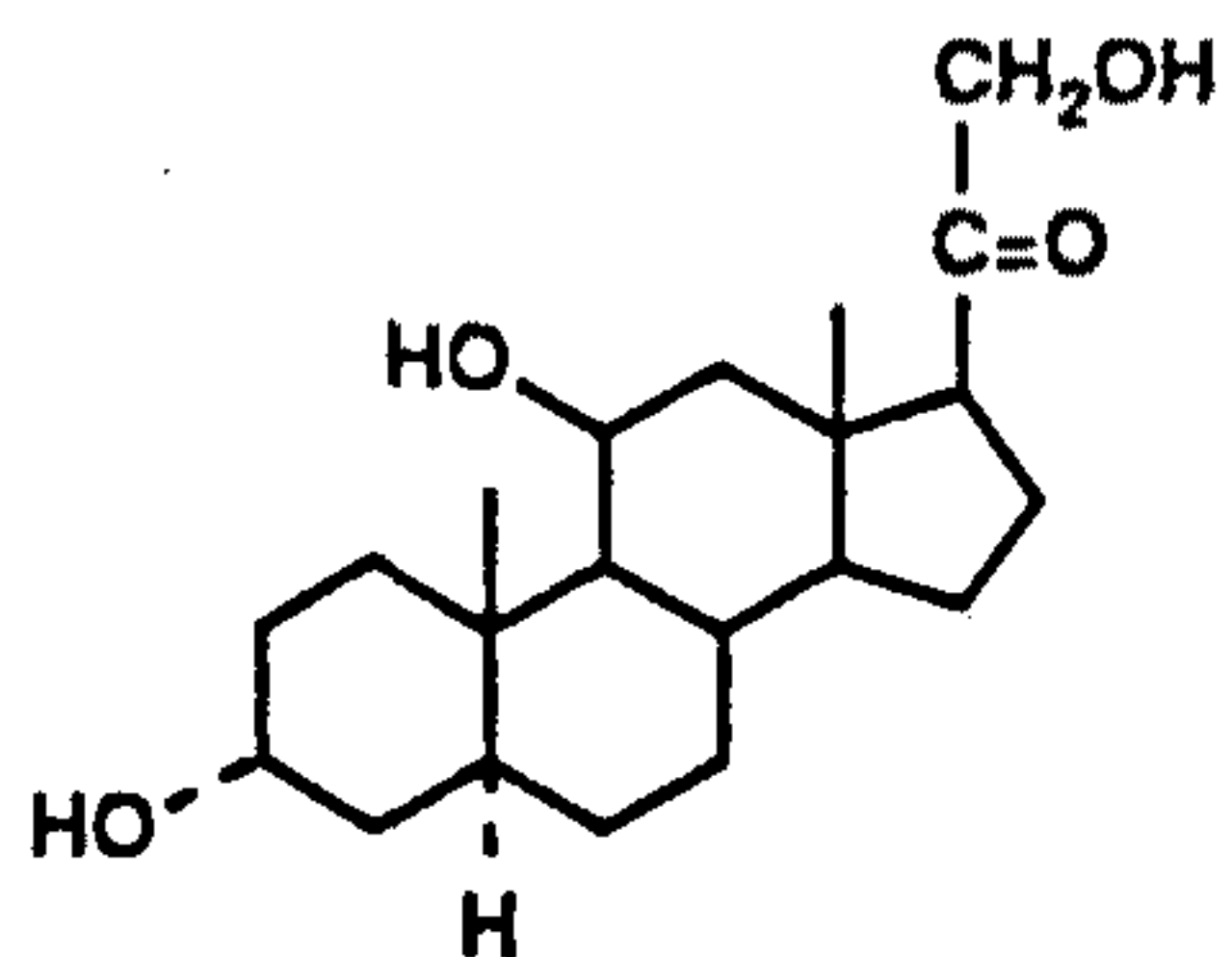
tetrahydro-11-deoxycortisol



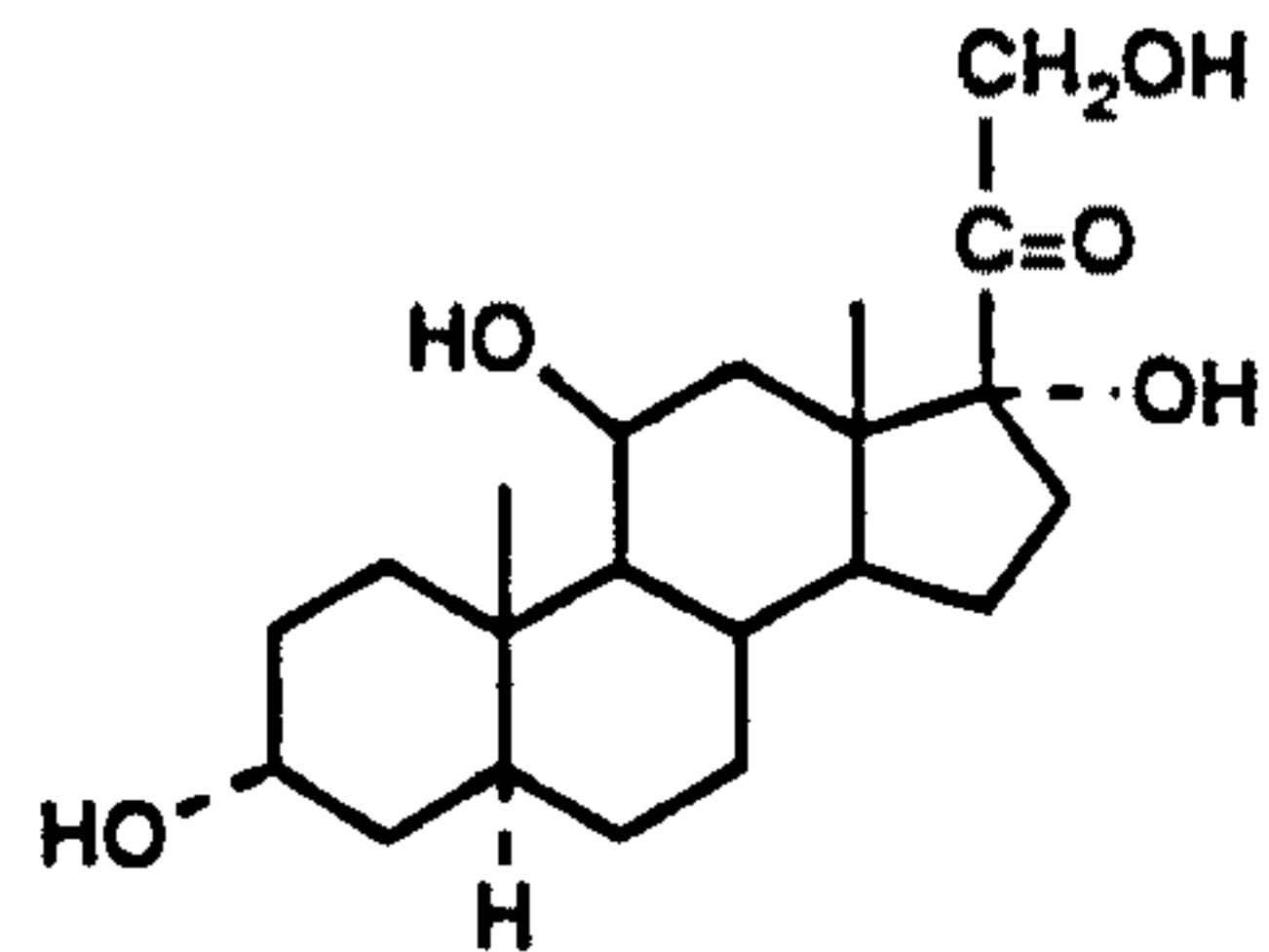
tetrahydrocorticosterone
(THB)



tetrahydrocortisol (THF)

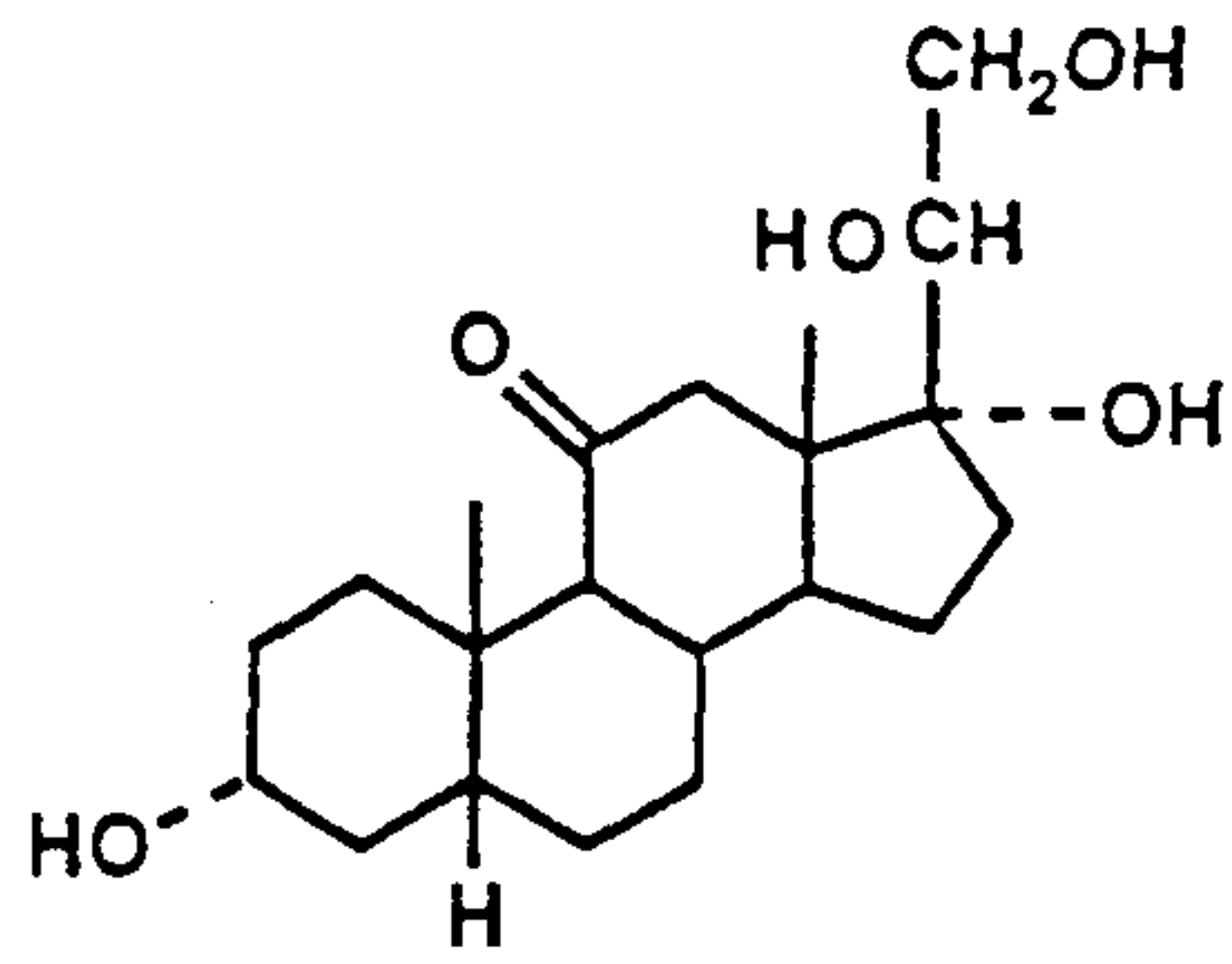


5 α -tetrahydrocorticosterone
(5 α -THB)

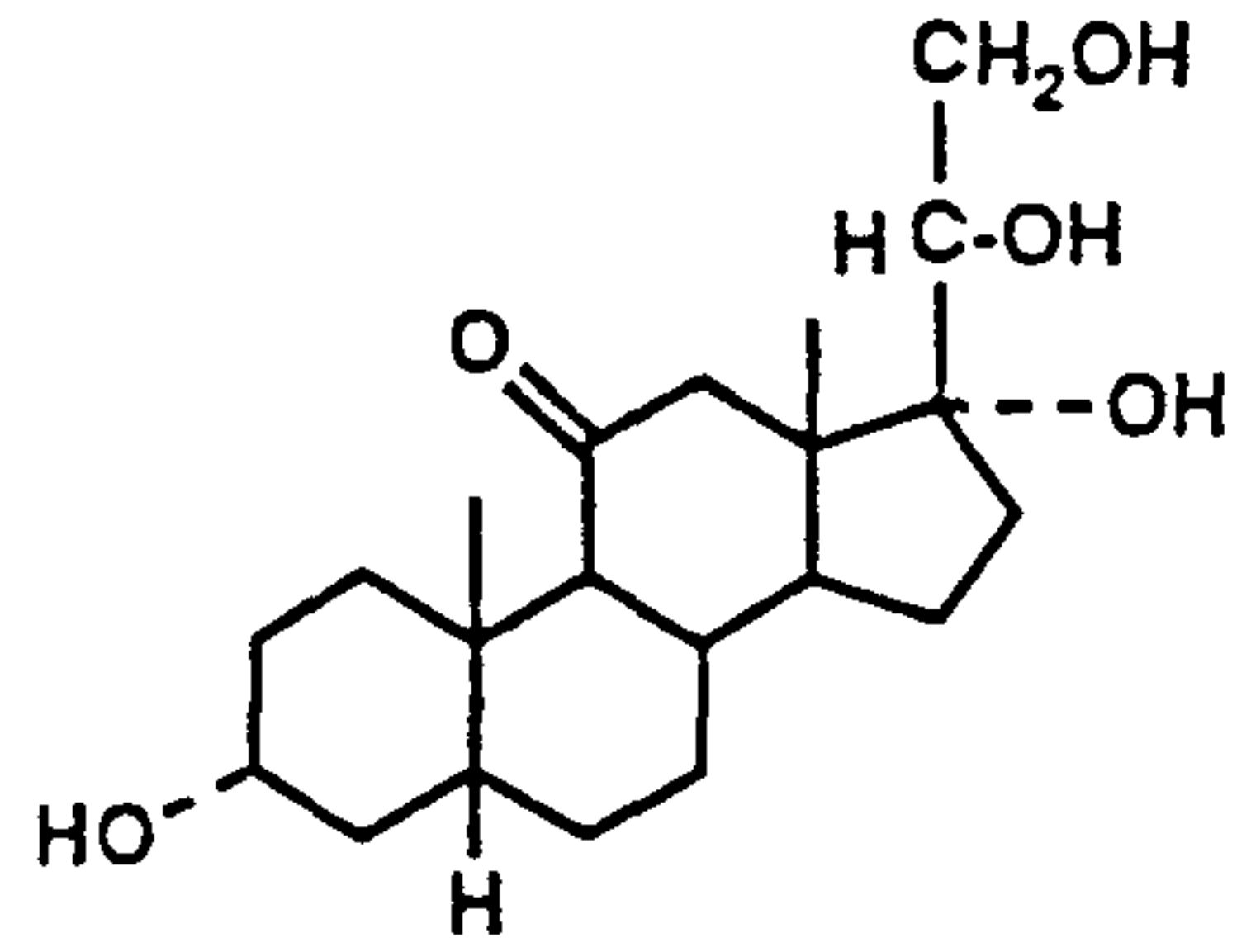


5 α -tetrahydrocortisol (5 α -THF)

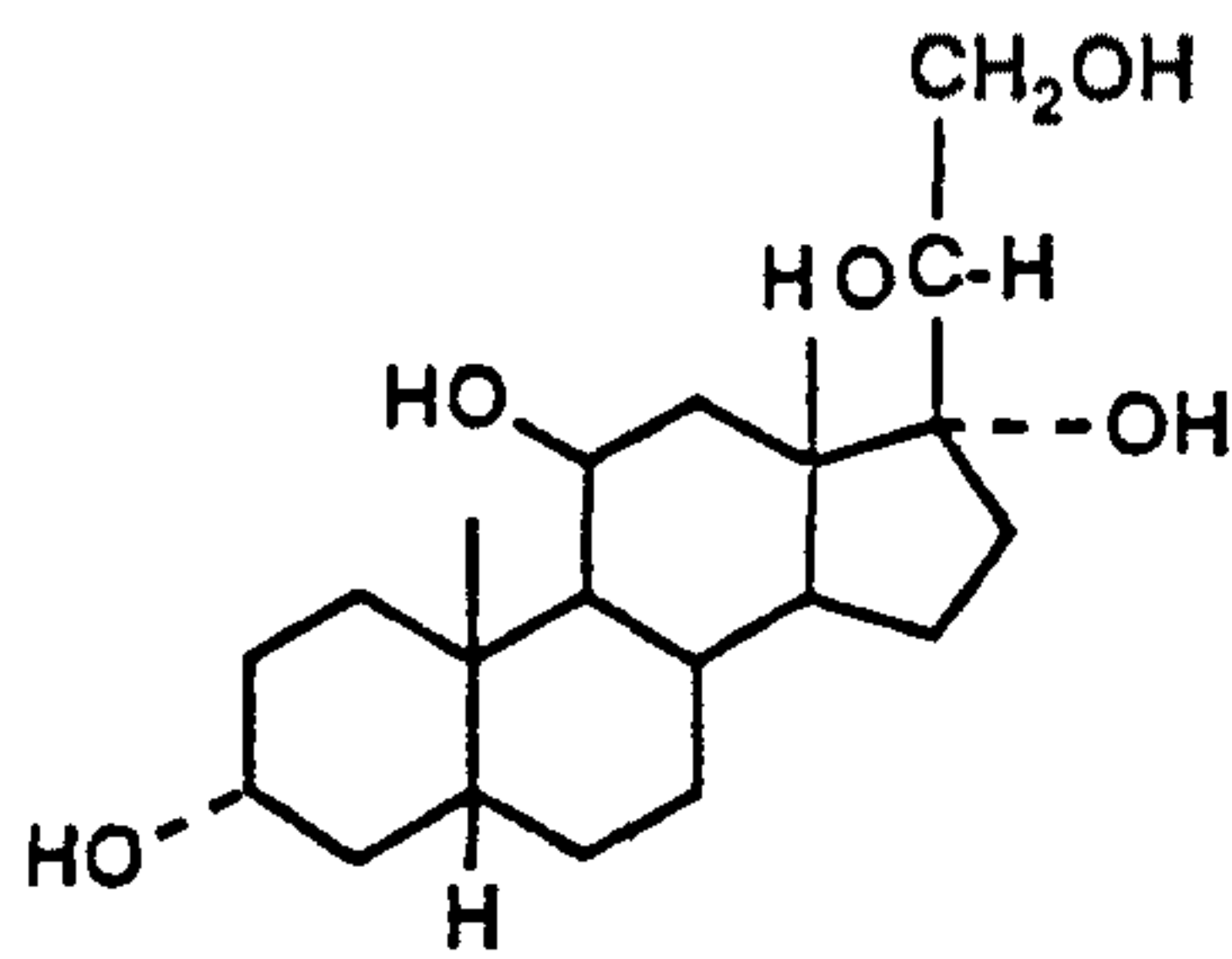
Chemical Structures of Steroid Hormone.



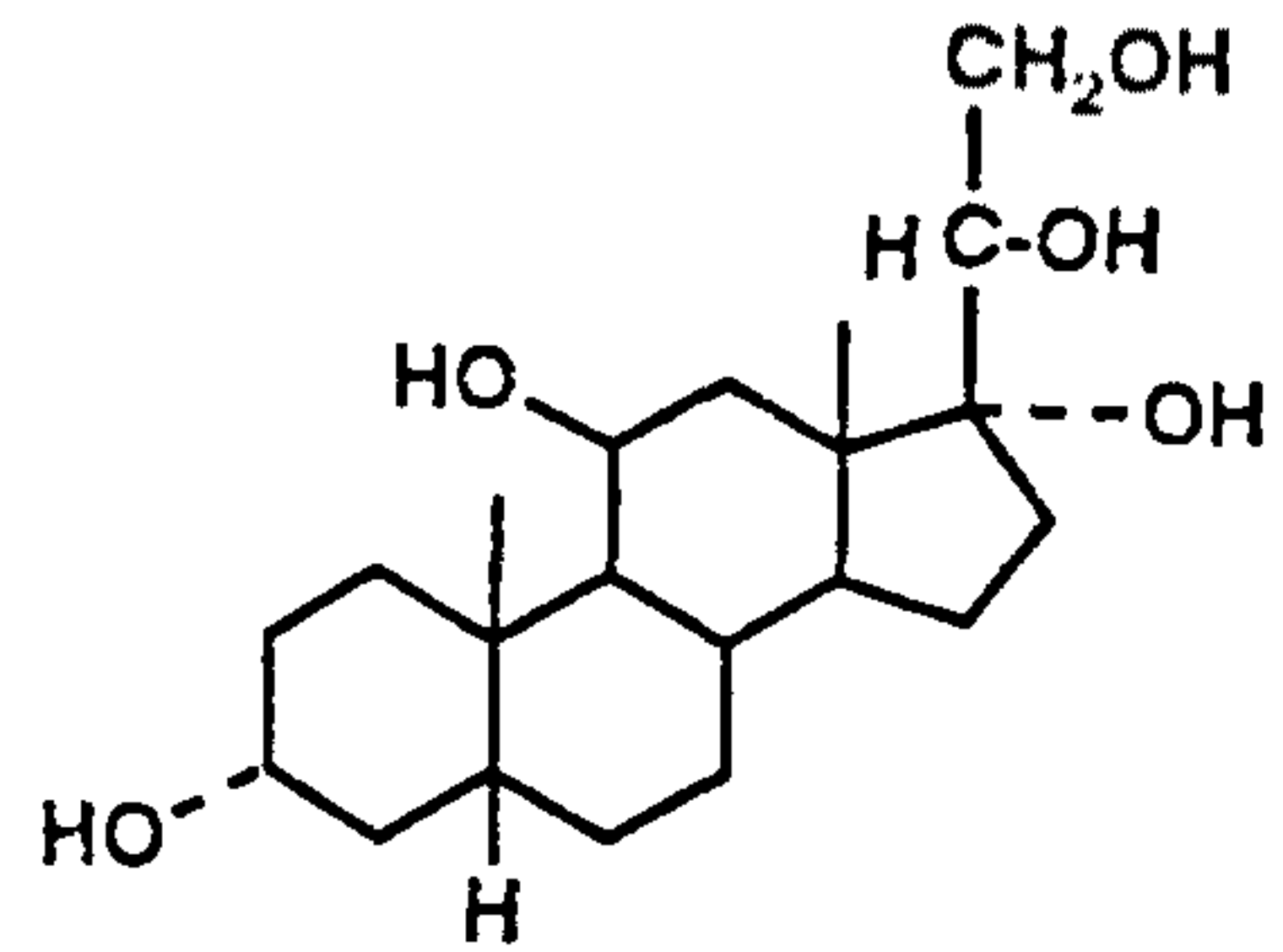
β -Cortolone



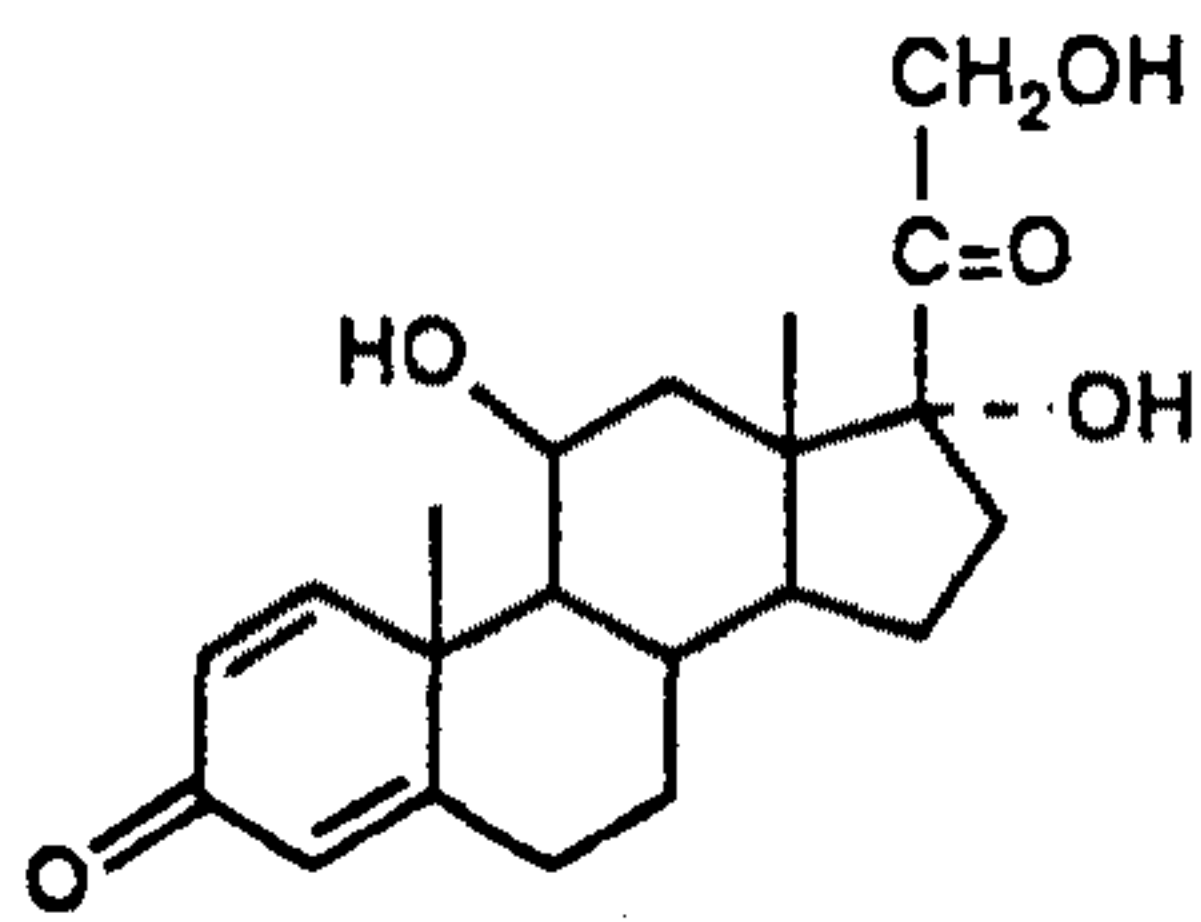
Cortolone



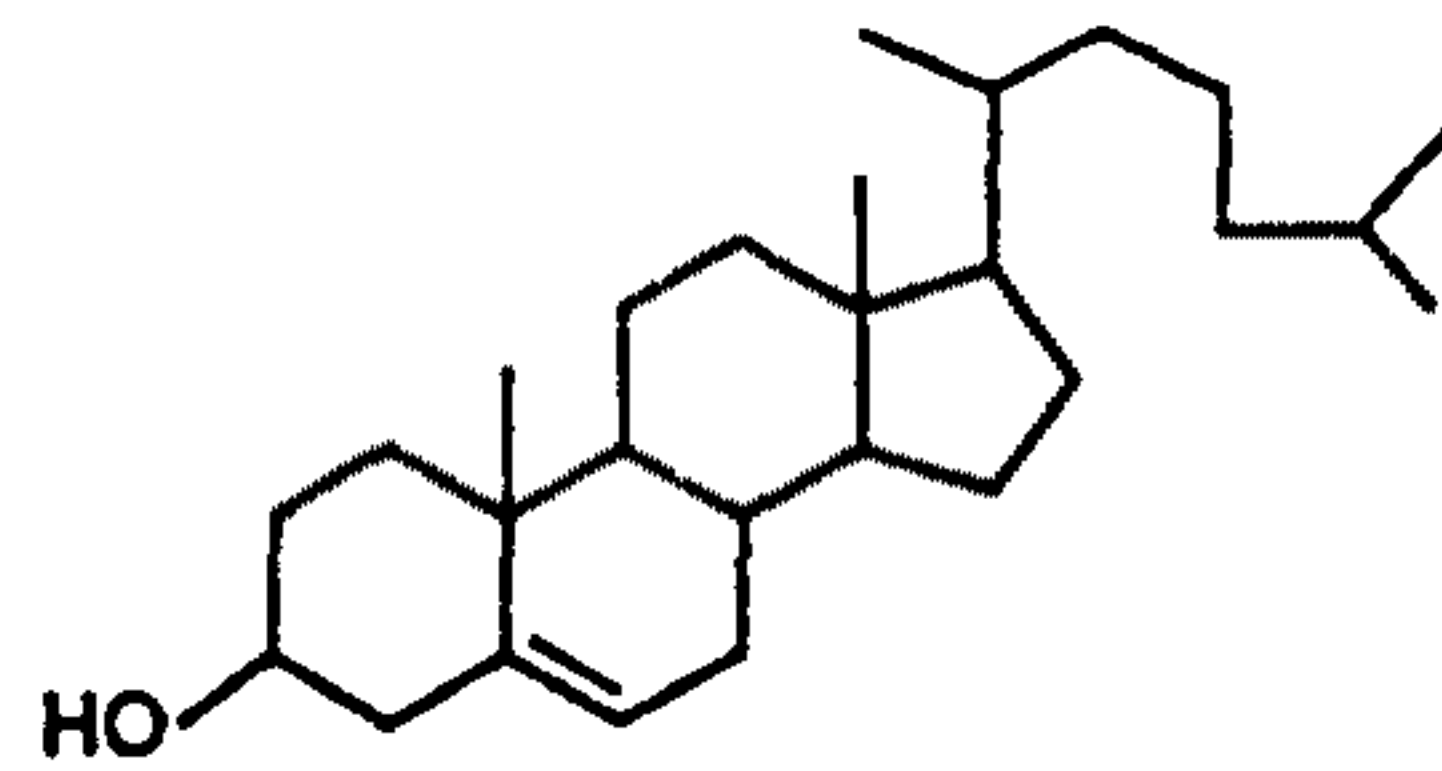
β -Cortol



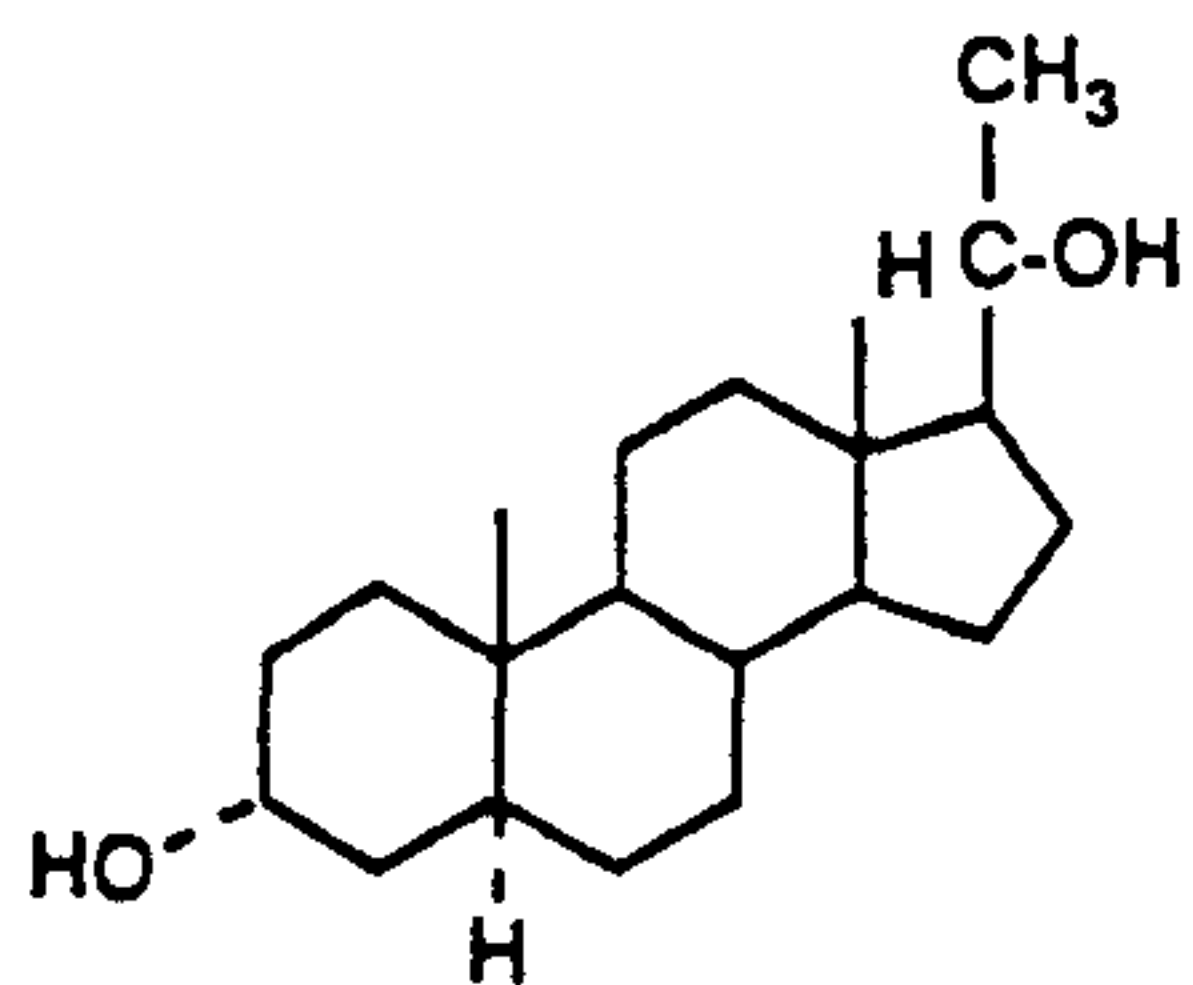
Cortol



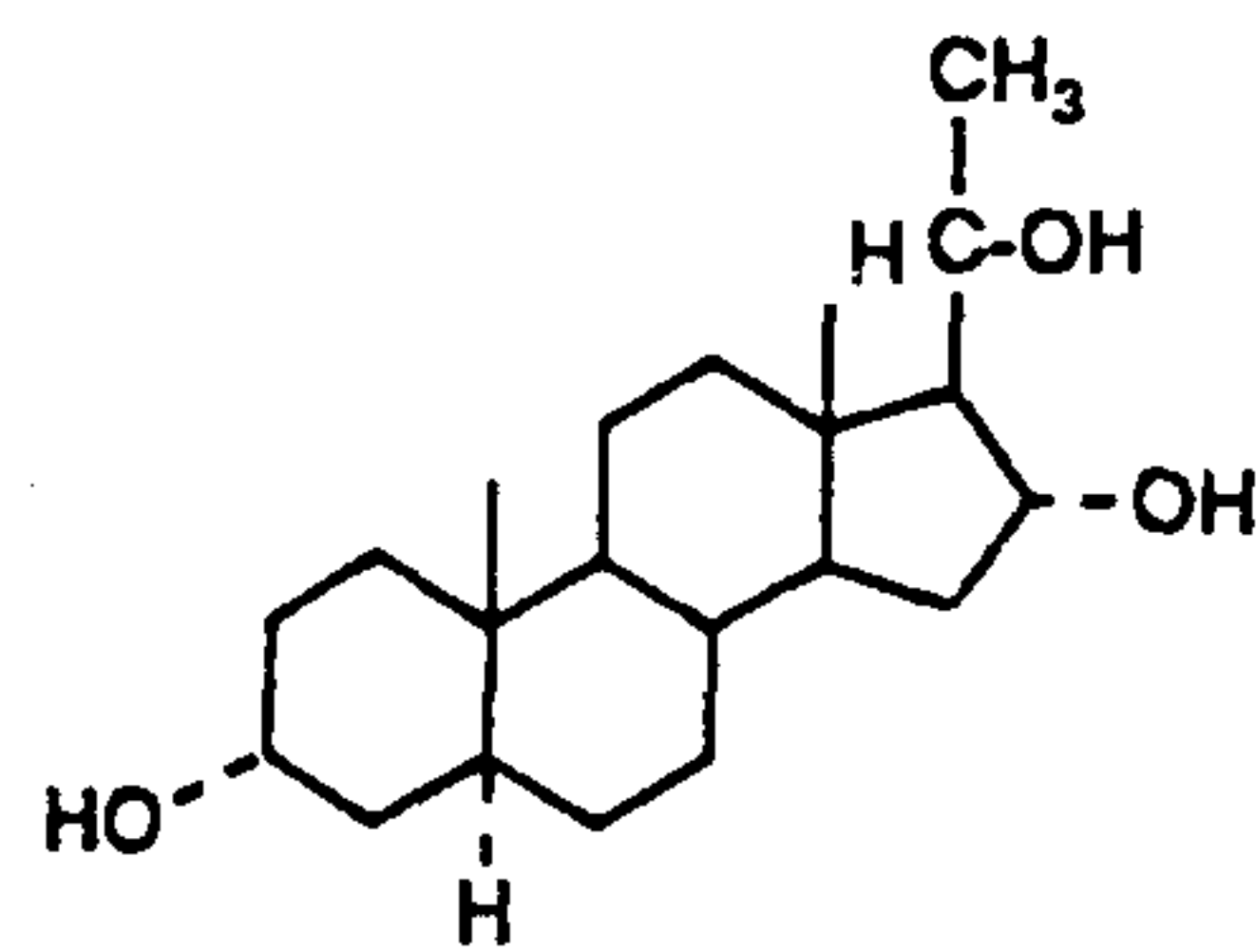
prednisolone



cholesterol

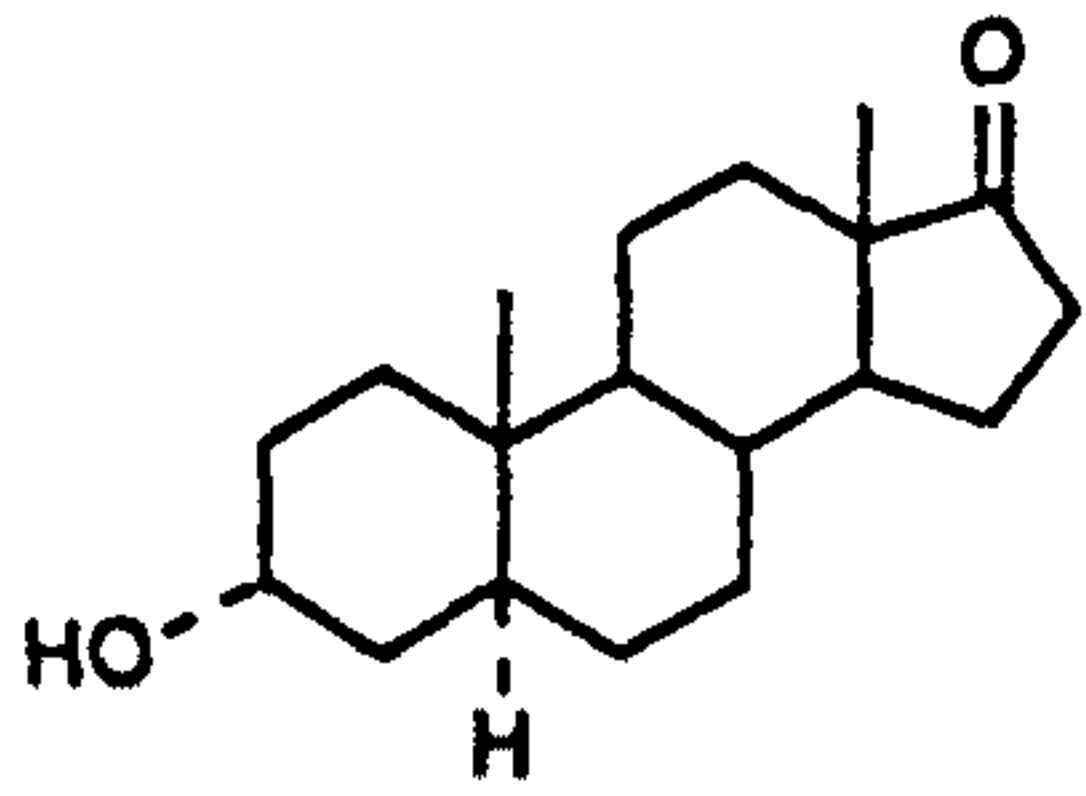


pregnanediol

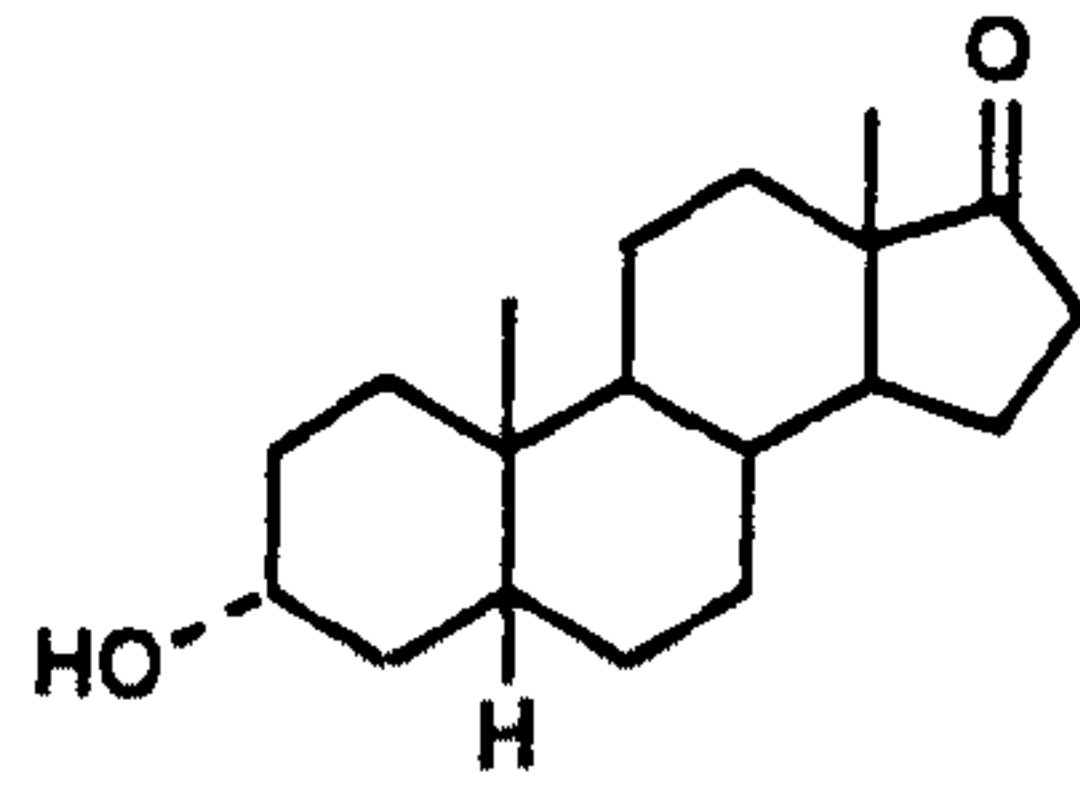


pregnanetriol

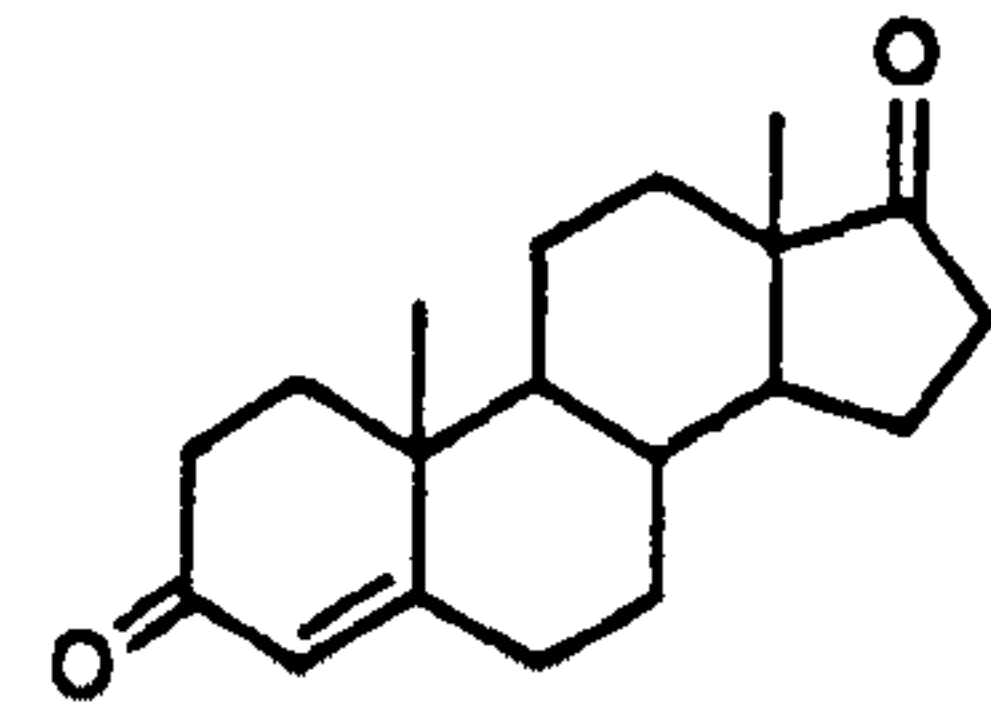
Chemical Structures of Steroid Hormone.



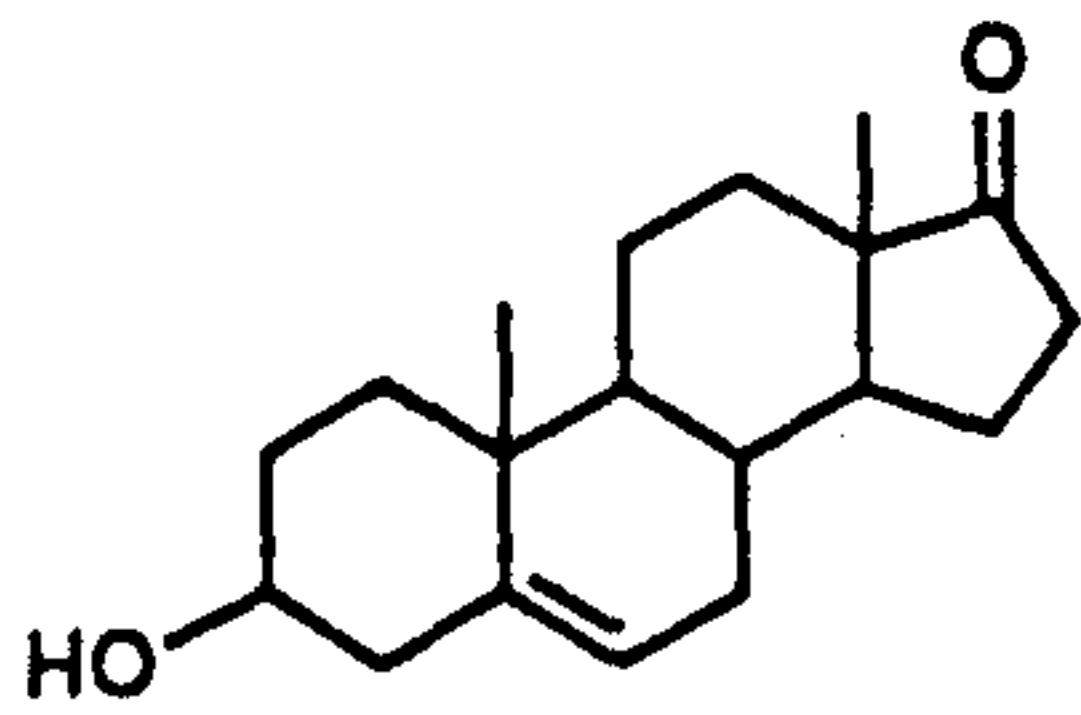
androsterone



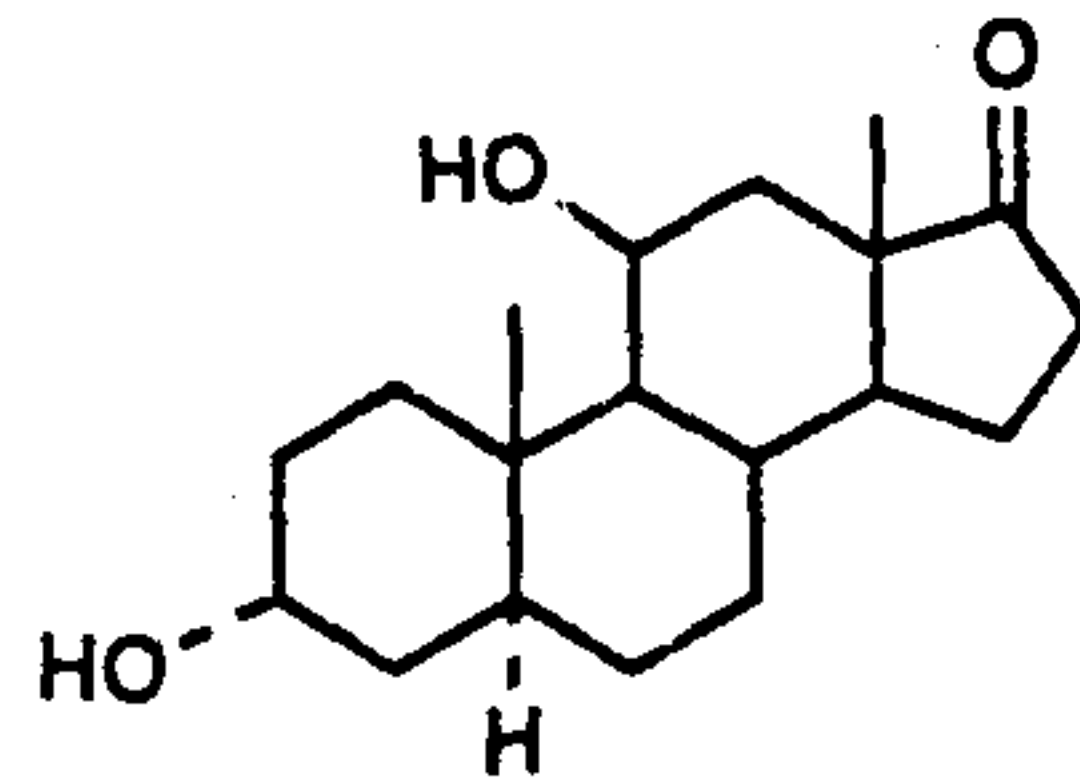
etiocholanolone



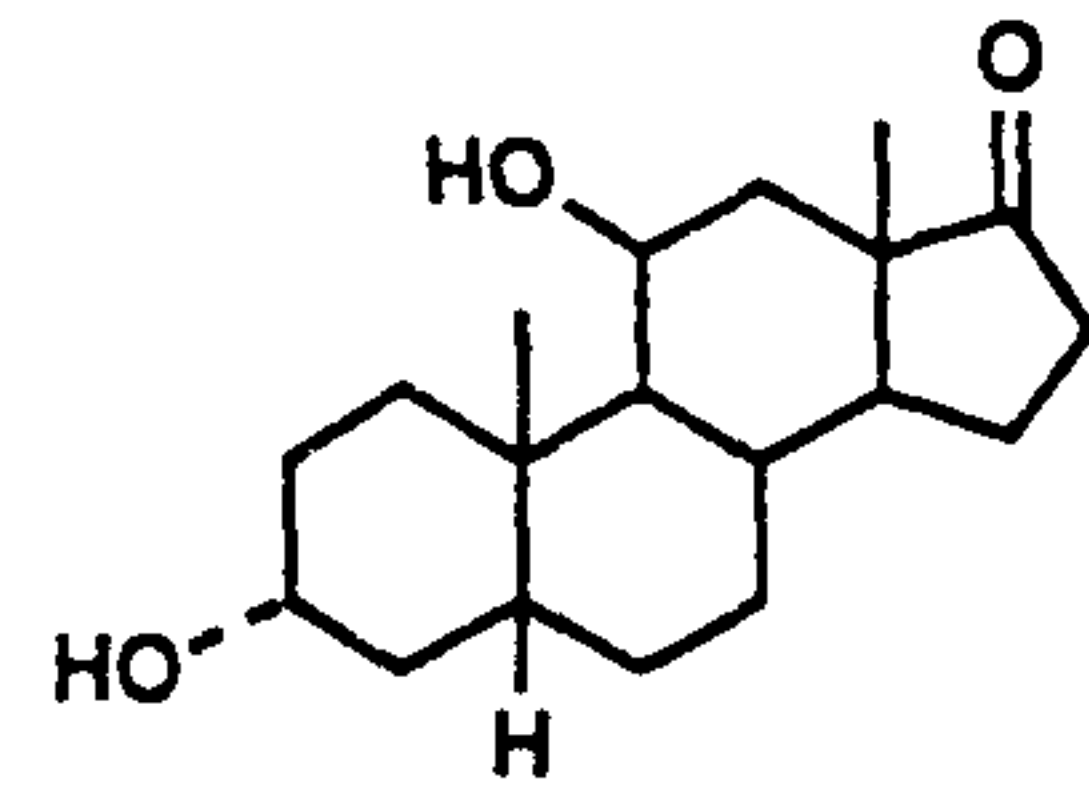
androstendione



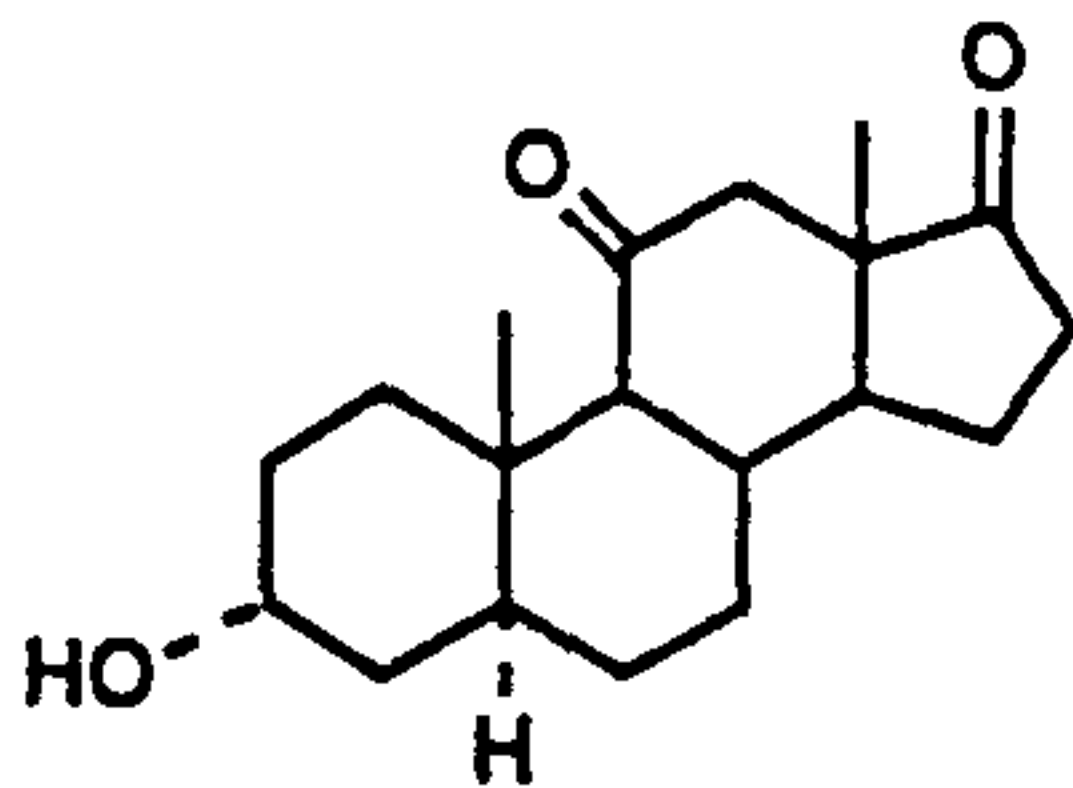
dehydroepiandrosterone



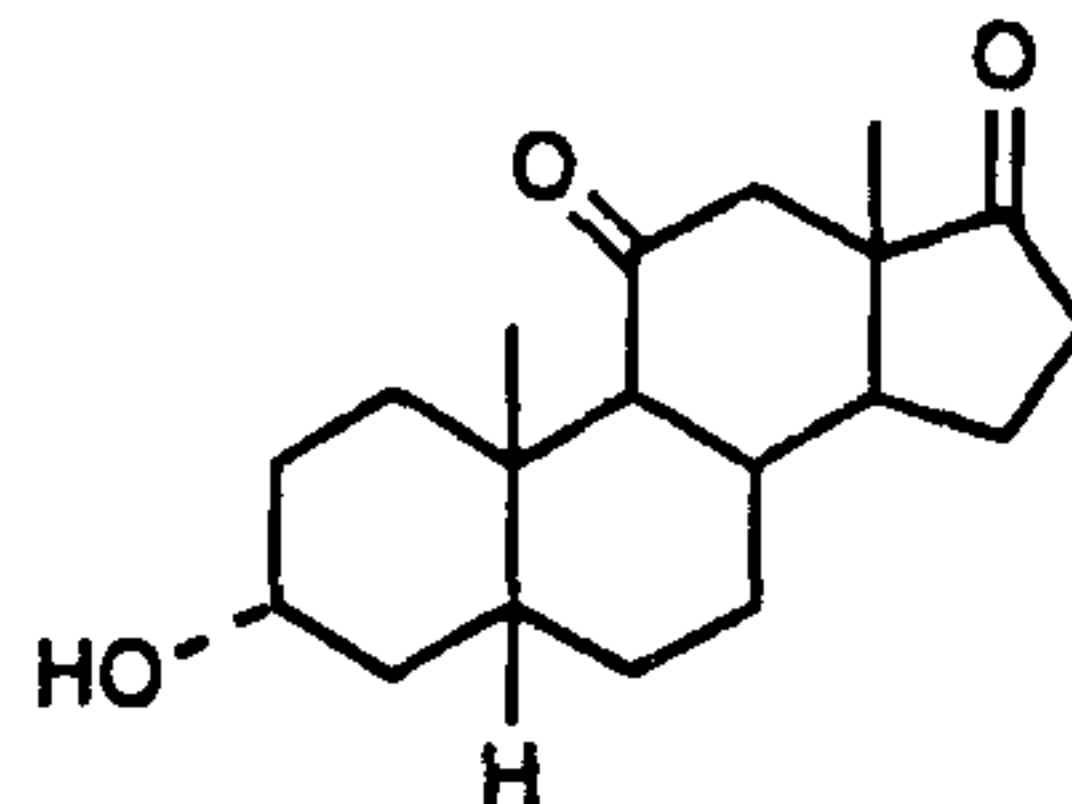
11-OH androsterone



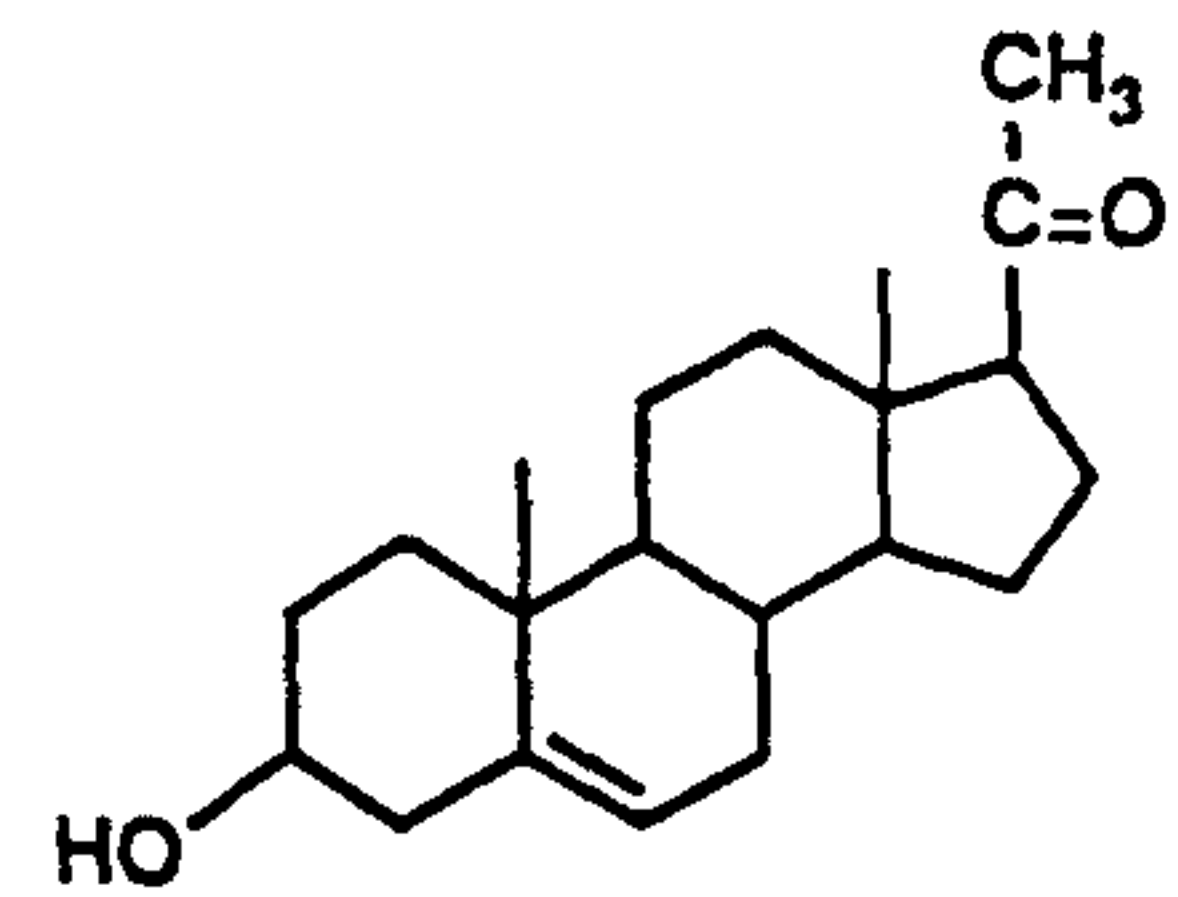
11-OH etiocholanolone



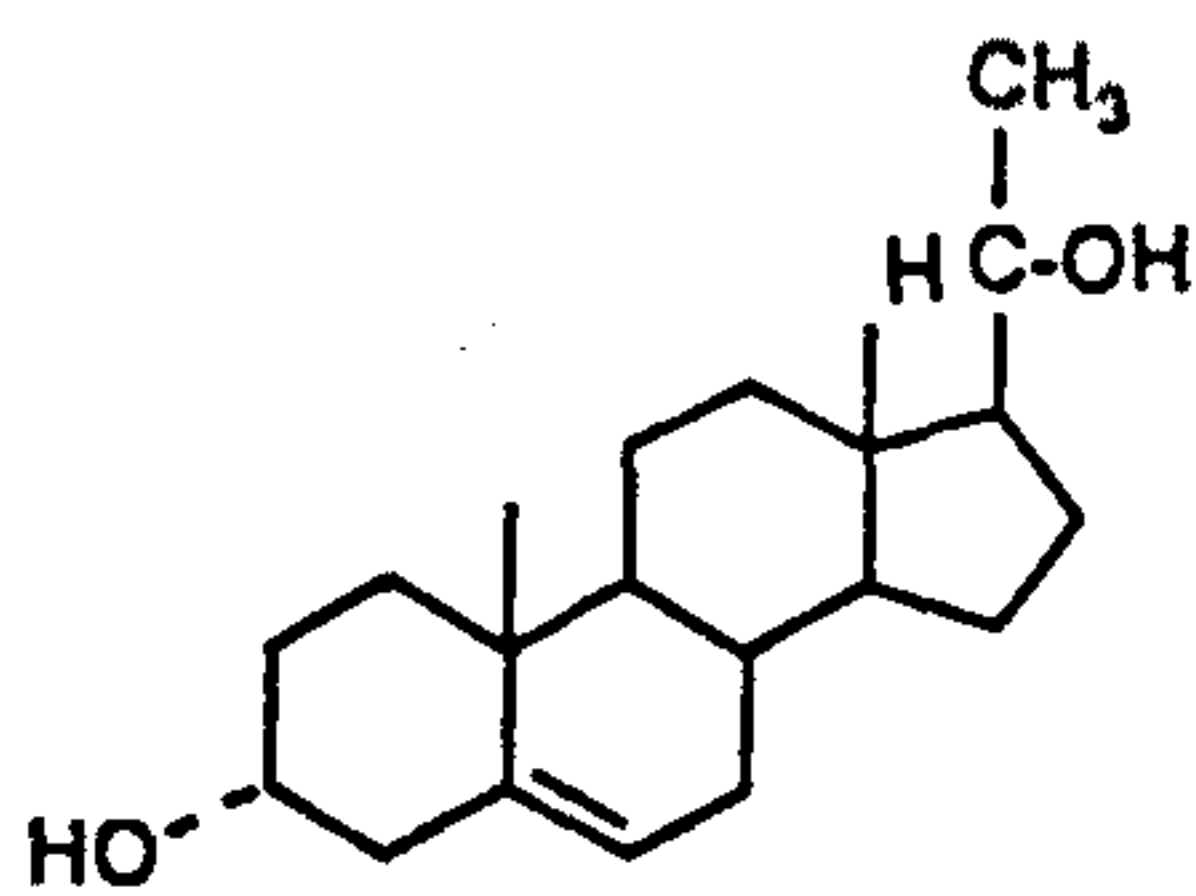
11-keto androsterone



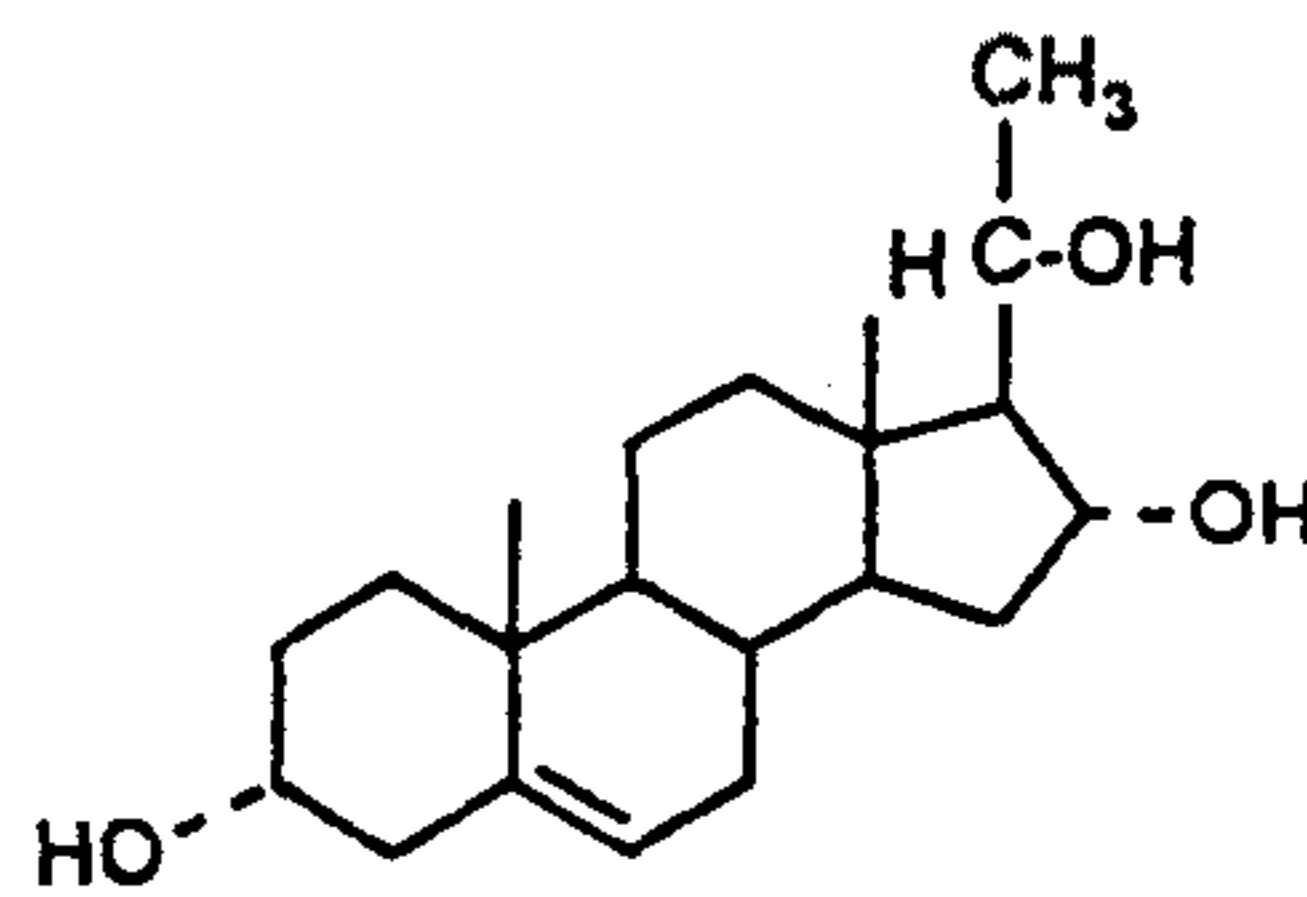
11-keto etiocholanolone



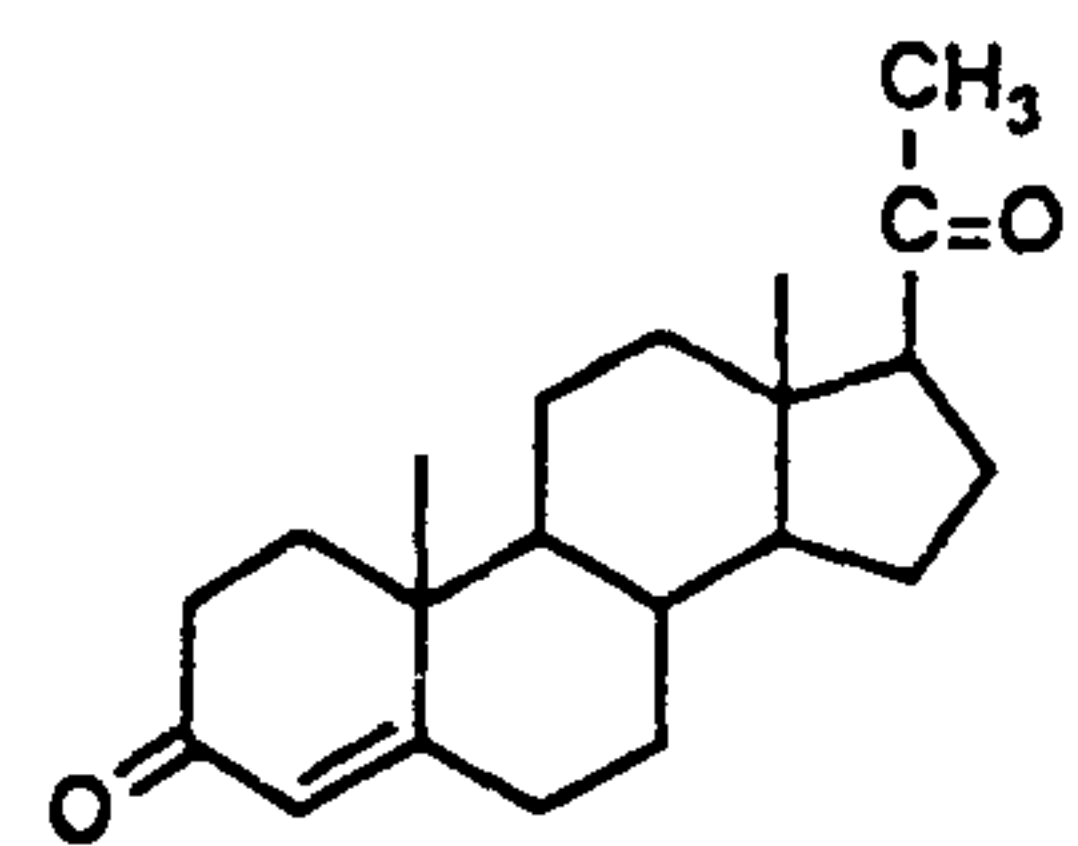
pregnenolone



pregnenediol



16-pregnenetriol



progesterone

Chemical Structures of Steroid Hormone.

여 백

제1장. 서론

과학의 발전과 더불어 많은 장기가 생체의 활동에 불가결한 즉, 그 자체의 역할이외에 생체의 다른 부분에 영향을 미치며 중요한 구실을 한다는 사실이 실험에 의해 증명되고 과학적으로 판명된 것은 극히 근대의 일이다. 생체내의 장기의 활동에 영향을 주는 호르몬의 연구도 1900년대 초부터 서서히 연구가 되어져 왔고 외국의 경우, 현재 여러 group에서 호르몬의 생체내 대사라든가 분석등이 활발하게 이루어지고 있다.

생체내의 내인성물질들은 극미량으로 존재하면서 그 역할을 수행하기 때문에, 이의 정량분석은 고성능 정밀분석기기의 발전과 더불어 함께 해왔다. 고성능 분석기기를 사용하여 연구함으로써 특정 내인성물질이 생체내에서 어떻게 작용하는지의 여부와 그 물질의 체내에서의 대사과정을 연구하는데 큰 기여를 하고, 또한 신약개발 및 생체내 새로운 내인성 물질을 개발함에 있어서도 필수적인 연구이며, 특정 화학물질의 체내 독성연구와 생리활성 연구에도 중추적인 역할을 담당하고 있다.

생체내의 내인성물질들을 생체시료중에서 분석하는 대사과정에 대한 연구는 인체의 건강상태를 나타내주는 척도가 되므로, 그 의의가 더욱 크다 할수 있다. 또한, 검출 및 정량하고자 하는 내인성물질들의 생체시료내 농도는 지극히 미량이고, 생체시료중에는 많은 간섭물질이 존재하므로, 높은 sensitivity를 갖는 기기에 의한 검출방법과 그 시료 및 물질에 적당한 특별한 시료처리 방법의 개발이 요구되어져 왔다.

이처럼 생체시료를 이용한 내인성물질의 연구는 특수 시료처리 방법이나 정밀분석기기의 사용 가능성 여부등의 어려움을 겪어 왔는데,

최근에 몇몇 연구에 의하면 내분비 계통의 환자 즉, 내분비대사과정중 특정효소가 결핍되어짐에 따라 변화되는 내인성물질의 level을 monitoring하여 정확한 진단을 위한 자료로 이용하는 예가 보고되어지고 있다. 이러한 자료를 토대로 하여 태아의 상태 및 선천성 대사장애의 진단을 위한 screening 방법에 응용되어지기도 한다. 제 1,2차 보고서에서는 한국인의 정상성인, 정상 소아들의 urine을 사용하여 연구함으로써 우리나라 사람들의 내인성 스테로이드 호르몬의 기준치를 설정하고자 하였다. 본 연구에서는 내분비계 질환에 사용될 수 있는 내인성물질을 추가하여 새로운 steroid profiling을 만들고, 뇨이외의 시료 즉, 혈액에서의 androgen profiling의 조건을 설립하기 위한 시료전처리 및 기기조건을 설정하여 내분비계 질환이나 기타 질환환자의 뇨시료와 혈액을 사용 체내대사 과정을 분석연구하므로써, 내분비성 질환의 진단에 적용하고자 시도 하였다. 또한, 원인을 알수없는 내분비계 질환이 의심되는 환자의 뇨시료의 steroid profiling을 알아 보았다.

제 2장. 이론적 배경

제 1 절. 내분비

특정세포에서 생성분비되어 혈액으로 유출된후, 먼곳에 있는 표적세포(target cell)에 생화학적 효과를 나타내는 물질인 호르몬은 신체의 성장(growth), 분화(differentiation) 및 대사(metabolism)에 작용한다.

호르몬은 여러 장기에서 형성되며, 여러 다른 장기에 영향을 주지만, 특정 장기뿐만 아니라 신체 전체적으로도 서로 협동 또는 길항적으로 작용한다. 따라서 그 작용을 구체적으로 알아보면 첫째로 신체의 대사에 관여하는 호르몬은 당질대사(Insulin), Ca^{++} (부갑상선 호르몬 및 thyrocalcitonin), 전해질(aldosterone) 및 수분대사(ADH), 그리고 열대사(갑상선 호르몬) 등이다.

둘째로, 신체 성장에는 성장호르몬(growth hormone)이 필요하며, 이것이 분비과다 또는 부족에 따라 거인(giantism) 또는 왜소한 사람(dwarfism)이 되며, 또, 소아기에 갑상선 호르몬이 결핍되면 성장이 안되어 cretinism이 된다.

셋째로 신경 또는 정신발육에도 작용하게 되는데 유아기에 갑상선 호르몬이 결핍되면 신체의 발육뿐만 아니라 정신발육에도 지장이 생겨 정신박약아가 된다.

넷째, 생식(reproduction)에 관계되는 FSH, LH 또는 다른 성호르몬(sex hormone) 등은 발육에 많은 영향을 주어 중요한 역할을 한다.

다섯째, 신체가 추운곳에 노출이 되면 갑상선 호르몬의 분비가 많아지며, stress를 받는 상태에서는 뇌하수체나 부신피질의 활동이

항진된다. 그러므로 이들 호르몬이 결핍될때는 생체는 주위환경에 잘 적응하지 못한다.

여섯째, secretin 또는 pancreozymin 등은 소화기능을 조절하는데 중요한 역할을 한다.

이와같은 호르몬의 작용들은 적은 양으로 기능을 하기 때문에 항상 일정한 혈중농도를 유지하게 하는 기전이 꼭 필요하게 되는 것이다. 그러므로, 일반적인 조절기능이란 호르몬의 이용 및 배설등으로 작용이 감소되면 곧 내분비기관이 자극을 받아 호르몬의 분비가 촉진되며, 이와 반대로 항진으로 호르몬이 과다하게 분비되면 내분비기관의 호르몬 분비가 억제되어 비교적 일정한 농도를 유지시키는 것이다. 이러한 작용과 기능을 가진 호르몬을 생산하는 내분비기관에 따른 분류는 Table 1에 나타내었다.

내분비 연구의 역사에서 살펴보면, 장기를 적출하여 결손증상이 일어나면, 그 기관은 내분비기관(endocrine organ)임을 알수 있으며, 그 결손증상을 일으킨 결과를 관찰하고 만약, 결손 증상이 일어나지 않았다고 해서 내분기관이 아니라고 단정지을수는 없다. 왜냐하면, 하나의 호르몬은 하나의 기관에서만 분비되는 것이 아니고 비슷한 생리작용을 가진 호르몬이 여러 곳에서 분비되는 수도 있기 때문이다. 따라서, 기관적출시 결손증상이 일어나면 다른 건강한 동물의 기관이나 그 적출물을 이식하여 결손증상의 회복여부를 관찰한다. 만일 회복되면 그 기관은 내분비기관임이 더욱 확실하다. 적출이 불가능한 기관이나 결손증상이 일어나지 않을때는 정상 동물에 주어서 호르몬의 과다증상을 관찰하기도 한다. 이러한 연구를 토대로 하여 밝혀진 호르몬의 작용

Table 1. Endocrine Glands and Their Hormone.

Source of hormone		Major physiological roles ^a	
Hypothalamus			
Gonadotropin releasing hormone	GnRH	↑	FSH and LH secretion
Thyrotropin releasing hormone	TRH	↑	TSH secretion
Corticotropin releasing hormone	CRH	↑	ACTH secretion
Prolactin inhibiting factor	PIF ^b	↓	Prolactin secretion
Melanocyte stimulating hormone (MSH) release inhibiting factor	MIF ^b	↓	MSH secretion
Somatostatin (somatotropin release inhibiting hormone)	SS	↓	STH secretion
Somatocrinin (somatotropin releasing factor)		↑	STH secretion
Pituitary Gland			
<i>Posterior Lobe^c</i>			
Oxytocin		↑	Milk secretion; uterine contraction
Vasopressin (arginine vasopressin) (antidiuretic hormone)	AVP ADH	↑	Renal water absorption; vasoconstriction
Melanin concentrating hormone	MCH	↑	Melanosome aggregation (teleost fishes)
<i>Pars Intermedia</i>			
Melanocyte stimulating hormone	MSH	↑	Integumental melanogenesis; melanosome dispersion
<i>Pars Distalis</i>			
Follicle stimulating hormone (folli-tropin)	FSH	↑	Female: ovarian follicle growth; estradiol synthesis ↑ Male: spermatogenesis
Luteinizing hormone (lutropin)	LH	↑	Female: ovulation; ovarian estradiol and progesterone synthesis ↑ Male: testicular androgen synthesis
Prolactin	PRL	↑	Milk synthesis; corpus luteum progesterone synthesis in some species
Thyrotropin (thyroid stimulating hormone)	TSH	↑	Thyroid hormone (T ₄ and T ₃) synthesis and secretion
Corticotropin (adrenal cortical stimulating hormone)	ACTH	↑	Adrenal steroidogenesis
Somatotropin (growth hormone, GH)	STH	↑	Hepatic somatomedin biosynthesis

^a The effect of each hormone on either an increased or stimulated (↑) or a decreased or inhibited (↓) physiological response is indicated.

^b There is some evidence for putative prolactin and MSH releasing factors (PRF and MRF, respectively).

Table 1.(Cont.)

Source of hormone		Major physiological roles ^a	
Thyroid			
Thyroxine	T ₄	↑	Growth; differentiation; calorigenesis (↑ metabolic rate and oxygen consumption)
Triiodothyronine	T ₃		Same as for thyroxine
Adrenal steroidogenic tissue			
Cortisol		↑	Carbohydrate metabolism; sympathetic function
Corticosterone		↑	Carbohydrate metabolism; sympathetic function
Aldosterone		↑	Sodium retention
Adrenal chromaffin tissue [9]			
Epinephrine	E		Multiple ↑ and ↓ effects on nerves, muscles, cellular secretions, and metabolism
Norepinephrine	NE		Generally same physiological roles as epinephrine
Ovary (preluteal follicle)			
Estradiol		↑	Female sexual development and behavior
Ovary (corpus luteum)			
Progesterone		↑	Uterine and mammary gland growth; maternal behavior
Relaxin		↑	Relaxation of pubic symphysis and dilation of uterine cervix
Placenta			
Chorionic gonadotropin (choriogonadotropin)	CG	↑	Corpus luteum progesterone synthesis
Placental lactogen		↑	Possibly fetal growth and development, mammary gland development in the mother
Testes (Leydig cells)			
Testosterone		↑	Male sexual development and behavior
Testes (Sertoli cells)			
Inhibin		↓	Pituitary FSH secretion
Müllerian regression factor	MRF		Müllerian duct regression (atrophy)
Pineal (epiphysis)			
Melatonin		↓	Gonadal development (antigonadotropic action)
Thymus gland			
Thymic hormones		↑	Proliferation and differentiation of lymphocytes
Pancreatic islets			
Insulin		↓	Blood glucose; ↑ protein, glycogen, and fat synthesis
Glucagon		↑	Blood glucose; gluconeogenesis; glycogenolysis
Somatostatin	SS	↓	Secretion of other pancreatic islet hormones
Pancreatic polypeptide	PP	↑↓	Secretion of other pancreatic islet hormones

Table 1.(Cont.)

Source of hormone		Major physiological roles ^a
Gastrointestinal tract		
Gastrin		↑ HCl secretion
Secretin		↑ Pancreatic acinar cell fluid (bicarbonate) secretion
Cholecystokinin	CCK	↑ Pancreatic acinar cell enzyme secretion; gall bladder contraction
Gastric inhibitory peptide	GIP	↓ Gastric acid (HCl) secretion
Vasoactive intestinal peptide	VIP	↑ Intestinal secretion of electrolytes
Chymodenin		↑ Chymotrypsinogen secretion from the exocrine pancreas
Motilin		↑ Gastric acid secretion; villous motility
Neurotensin	NT	Enteric neurotransmitter
Substance P	SP	Enteric neurotransmitter
Gastrin releasing peptide	GRP	Increased gastrin secretion; decreased gastric acid secretion
Parathyroid glands		
Parathormone	PTH	↑ Blood calcium; ↓ blood phosphate
Thyroid parafollicular cells (or ultimobranchial glands)		
Calcitonin		↓ Blood calcium
Skin, liver, kidney		
Vitamin D ₃		↑ Blood Ca ²⁺ ; bone formation, intestinal Ca ²⁺ and PO ₄ ⁻³ absorption
Plasma angiotensinogen		
Angiotensin II		↑ Vasoconstriction; aldosterone secretion; thirst (dipsogenic) behavior
Kidney		
Erythropoietin (erythrocyte stimulating factor, ESF)	EP	↑ Erythropoiesis
Most all tissues		
Prostaglandins	PGE ₂	↑ Cyclic nucleotide (cAMP) formation
	PGF _{2α}	↑ Cyclic nucleotide (cGMP) formation
Prostacyclins	PGI ₂	↑ Cyclic nucleotide (cAMP) formation
Thromboxanes	TXA ₂	↑ Cyclic nucleotide (cGMP ?) formation
Leukotrienes	LTE ₄	↑↓ Cyclic nucleotide formation
Various tissues		
Epidermal growth factor	EGF	↑ Epidermal cell proliferation
Fibroblast growth factor	FGF	↑ Fibroblast proliferation
Nerve growth factor	NGF	↑ Neurite development
Somatomedins		↑ Cellular growth and proliferation
Endorphins		Opiatelike activity
Epithelial tissue		
Epidermal chalone		↓ Epithelial proliferation
Heart		
Atrial natriuretic factor	ANF	↑ Renal salt and water diuresis

^a The major effect of each putative chemical messenger on either an increased or stimulated (↑) or a decreased or inhibited (↓) physiological response is indicated.

기작(Action Mechanism of Hormone)을 살펴보면, adrenaline과 같이 타기관의 중개없이 종말기관에 바로 작용하는 직접 작용이 있고, anterior pituitary gland의 TSH(Thyroid Stimulating Hormone)가 thyroid gland를 자극하고, 자극되어 분비가 높아진 thyroid hormone은 역으로 anterior pituitary gland에 작용하여 TSH의 분비를 제어하는 것과 같은 상호 복잡한 작용을 하는 상호작용이 있다. 또한, anterior pituitary gonadotropin인 ICSH(Interstitial cell stimulating hormone)는 uterus에 작용하나 이것은 직접 작용은 아니다. ovary를 적출하면 이 작용이 없어진다. ICSH는 uterus에 대한 직접작용은 아니고 Ovary를 자극하여 estrogen을 생성하여 이것이 uterus에 작용하는 것과 같이 타기관을 통하여 종말기관에 비로소 나타나는 간접작용이 있고, 마지막으로 조건작용이라는 것은 progesterone이 미량의 estrogen 존재하에서만 자궁내막의 임신기성변화를 일으키는 것과 같이 어느 조건하에서만 작용하는 것이다.

제2절. 부신피질 호르몬

부신은 신장과 후두 대정맥의 중간 또는 신장의 상단에 있는 좌우 한쌍의 내분비기관이다(Fig. 1). 특히, 포유동물의 부신은 태생학적인 기원이나 기능도 전혀 다른 수질(medulla)과 피질(cortex) 두 부분으로 되어 있고, 각각 생리작용이 다른 호르몬을 분비한다. 사람의 부신은 약 8g 정도이고, 수질(10%)과 피질(90%)은 육안으로도 구별이 되며, 자율신경의 일부를 이루고 있으며 중요한 약리작용을 가지는 Catecholamine 류를 분비하는 수질세포는 chrome 친화성 조직으로 chrome 산으로 염색하면 수질세포만이 갈색으로 되기 때문에 더욱 구별이 명확하다(Fig.2). 부신피질은 중배엽(mesoderm)에서 발생하며, 2개월된 태아에서도 확인할 수가 있다. 이때, 부신피질은 태아역(fetal zone)과 확정역(definitive zone)으로 구성되어 있는데, 임신중기가 되면서 크게 성장하여 신장의 크기보다 커지며, 성인과 비교하면 체내에서 차지하는 무게비가 훨씬 크며, 대부분이 태아역으로 되어 있다. 태아의 부신은 임신중기가 되면 부신피질 자극호르몬(adrenocorticotropic hormone, ACTH)의 조절을 받게 되지만, 태아역에는 확정역과는 다르게 steroid 생합성에 필요한 효소중 아직 생성되지 않는 효소때문에 태아역과 확정역은 분비되는 호르몬의 약간의 차이가 있다. 이러한, 태아역과 확정역의 관계는 출생시까지 지속되나, 그후 점차 태아역이 쇠퇴하여 출생 3개월까지 줄어들는다. 이후 부신피질의 바깥에서 나오는 세포들이 증식하여 3종류의 성인부신역(adrenal zones), 즉 사구체양대(zona glomerulosa), 성망대(zona fasciculata)와 망상대(zona reticularis)를 형성한다. 이들 세 영역은 기능적으로 다른 스테로이드 호르몬을 생산한다. 가장 바깥에 있는 사구체양대는 mineralocorticoid인

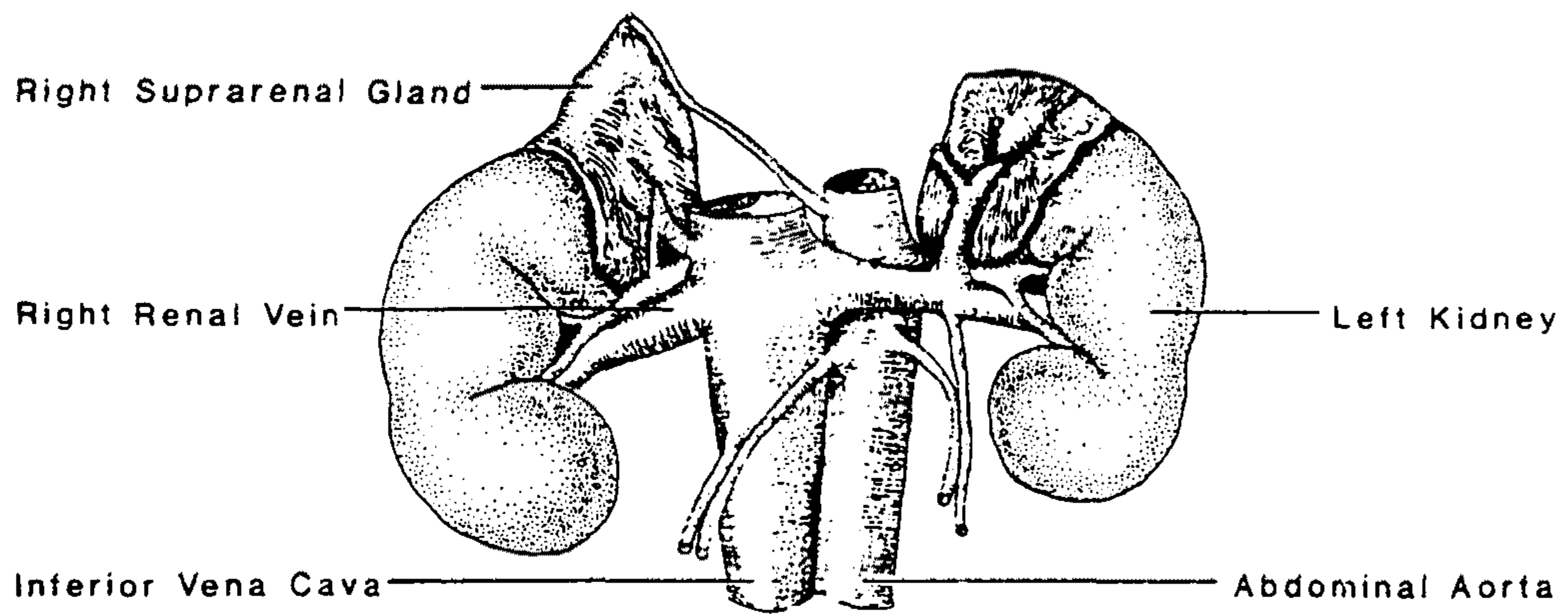


Figure 1. Gross Anatomy of the Human Adrenal Glands.

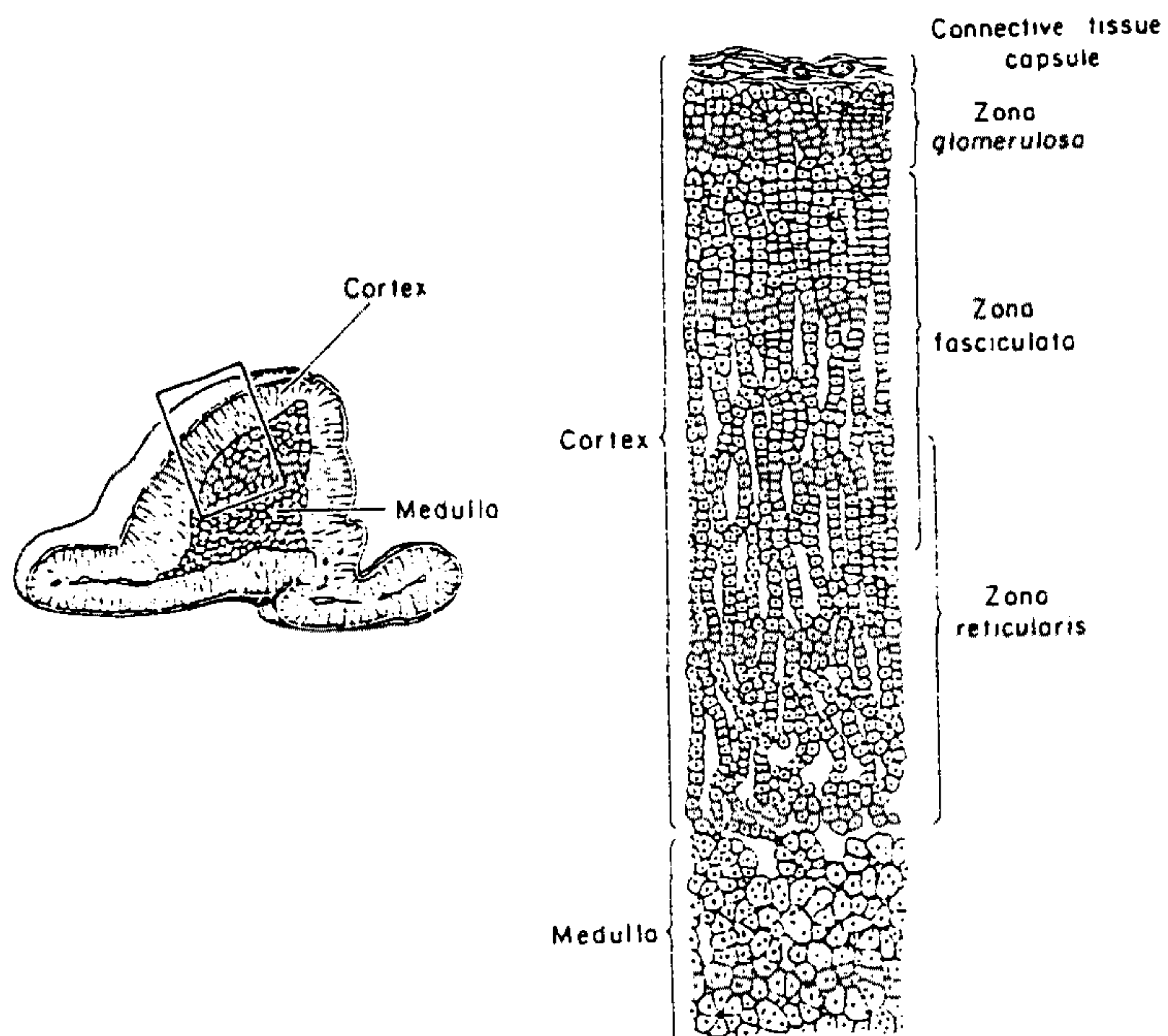


Figure 2. Diagrammatic Representation of the Microanatomy of the Human Adrenal Cortex.

aldosterone을 생산하는데 17 α -hydroxylase가 없기 때문에 cortisol이나 androgen은 만들지 못한다. 이 사구체양대는 뚜렷한 특성이 없으며 부신의 캡슐 아래에 지질 함량이 적은 세포들로 흩어져 있다. 가운데 위치한 섬망대는 가장 두꺼운 층으로 cortisol과 androgen을 분비한다. 이층의 세포는 크고 지질 함량이 많아 조직학적으로 염색하면, 지질이 빠져 투명한(clear) 세포로 나타난다. 이 세포들은 원주 모양을 이루며 아래 위로 뻗어 좁은 망상대로부터 사구체양대와 캡슐 아래까지 퍼져 있다.

망상대는 가장 안쪽에 있고, 수질을 싸고 있으며 섬망대와 같이 cortisol과 androgen을 생성한다. 이곳의 세포들은 치밀한 모습으로 배열되어 있으며, 지질 함량은 적으나 리포푸신(lipofuscin)이라는 과립을 가지고 있다. 이와같이 안쪽에 위치한 두영역(망상대, 섬망대)은 ACTH의 조절아래 있어서 자극이 강하면 증식을 일으키고 ACTH의 결핍때는 위축이 된다. 또, 오랫동안 ACTH로 자극하면 섬망대의 지질함량이 줄어들고, 망상대의 치밀한 세포모습을 띄게 되는데, 자극이 오래 지속되면 망상대의 영역이 섬망대의 영역을 대치하는 것으로 보인다. 따라서, 이런 사실은 섬망대가 ACTH의 급성 자극에 반응하고 망상대는 지속적 ACTH 자극에 반응하여, cortisol 분비를 담당하고 있음을 볼수 있다(Figure 3). 이와같이, 부신피질에서 분비되는 스테로이드 호르몬은 세포질내 수용체(cytosolic receptor)와 결합하는데, 이런 스테로이드 호르몬의 전체 분자량은 5만-30만 dalton에 달한다.

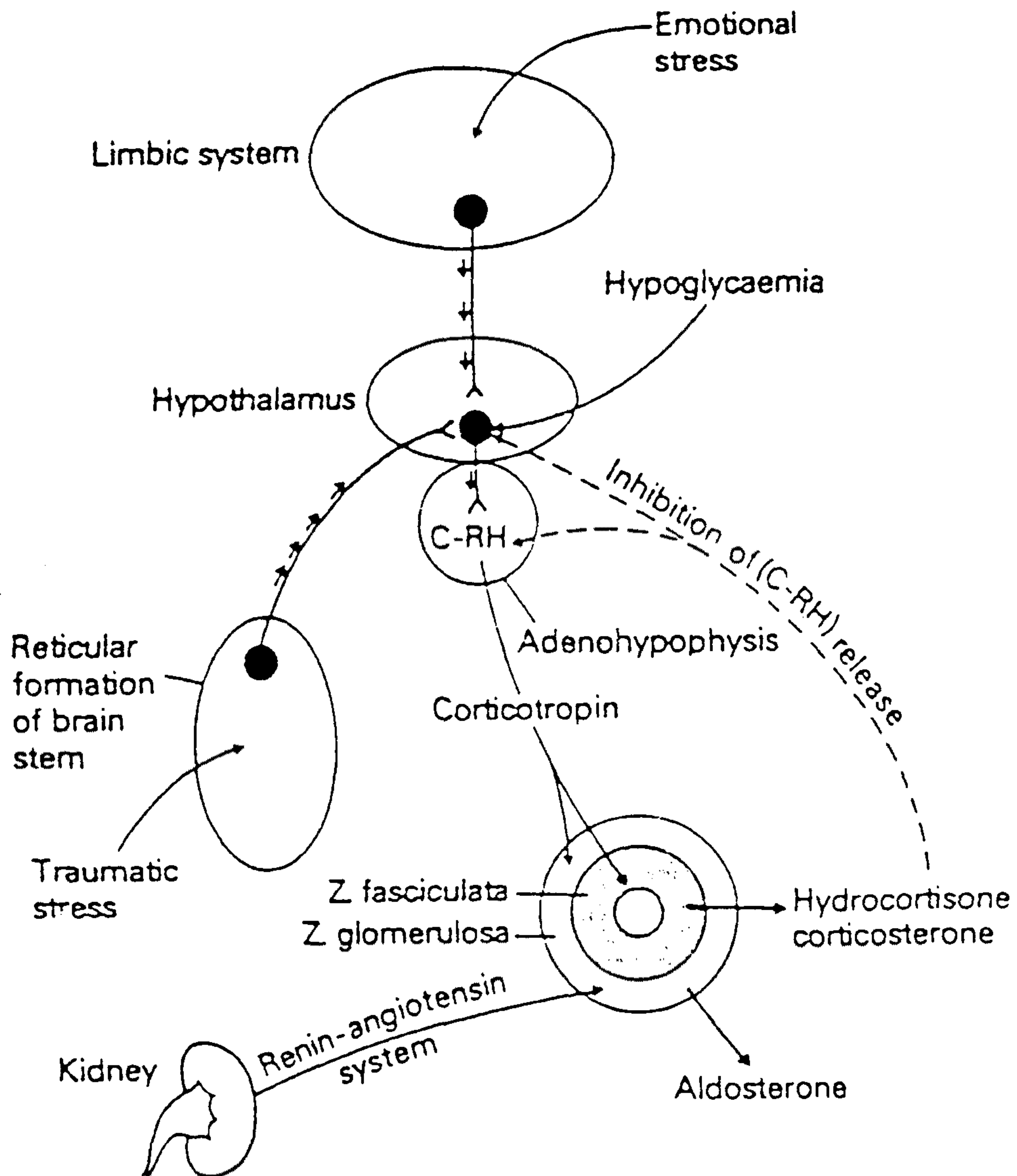


Figure 3. Normal Regulation of Adrenal Steroid Hormone Secretion. Secretion of CRH is regulated by central nervous system afferents mediating the circadian rhythm and responses to stress.

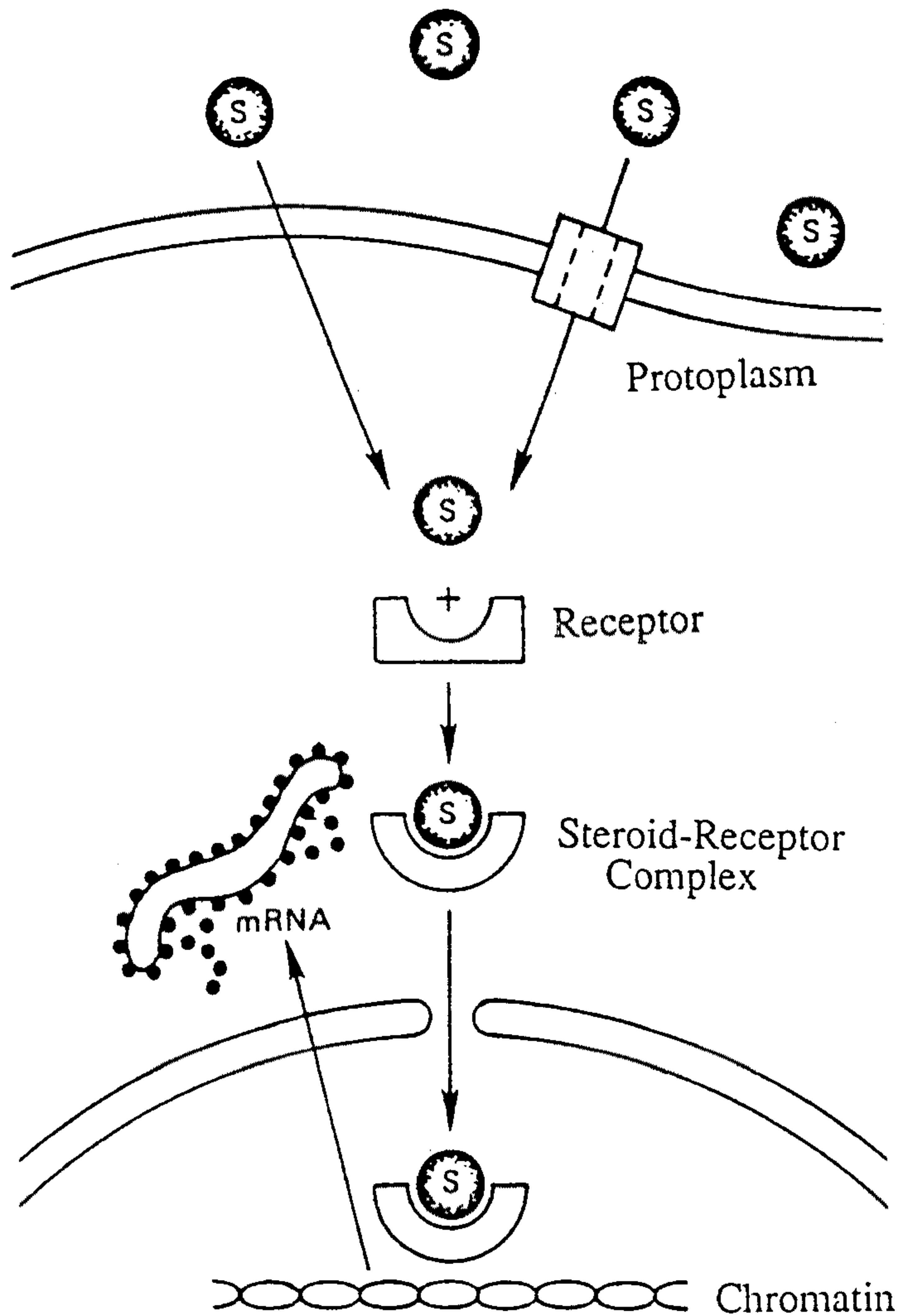


Figure 4. Mechanism of Steroid Hormone Action.

A complete understanding of the relationship between steroid receptor binding and the mechanism of hormone action depends on valid characterization and accurate measurement of steroid receptor

Figure 4와 같이 스테로이드 호르몬이 수용체와 결합한 후에는 세포질내 수용체의 수가 감소하고 핵내 수용체(nuclear receptor)가 증가한다. 스테로이드 수용체 복합체(steroid-receptor complex)는 핵내 물질과 결합하는데 반해, 유리 스테로이드나 수용체 자체는 이런 기능이 없다. 수용체가 해당되는 호르몬과 결합하게 되면 수용체의 3차 구조변화가 일어나 핵막을 통과할 수 있게 되는 것이다.

제3절. 부신피질 호르몬계의 내분비질환

대부분의 내분비질환들의 원인은 적정량을 유지해야 할 내인성물질이 외부적 또는 그 자체의 이상으로 말미암아 과잉 또는 부족상태일때 일어난다. 부신피질 호르몬계의 질환들은 Table 2와 같이 나타낼 수 있다. 내분비 연구의 시작이 질환의 원인을 찾고자 하는 것에서 부터 시작되었기 때문에 이 질환의 역사가 곧 내분비연구의 역사라고 말할수 있다. Congenital adrenal hyperplasia에서 몇가지 효소결핍에서 기인되는 질환은 scheme 1에서 알아보면 11β -hydroxylase의 결핍으로 인해 남성화현상이 일어나고 뇨중 pregnanetriol과 17-ketosteroid가 비정상적으로 증가한다. 그러나, 이질환인 경우 cortisol계는 많이 증가하지 않는데 그 원인은 ACTH의 feedback에 의해서 더이상 늘어나지는 않는다⁽⁵⁻⁷⁾.

따라서, 이 질환에서는 섬망대에서 생성되는 18-hydroxydeoxy corticosterone의 혈중농도가 감소하는 것으로 보아 11β -hydroxylase와

Table 2. Endocrine Pathophysiology of the Adrenal Cortex.

Adrenocortical Hypofunction

Addison's disease

Primary adrenocortical insufficiency

Secondary adrenocortical insufficiency

Pituitary origin (no ACTH secretion)

Hypothalamic origin (no CRH secretion?)

Hypoaldosteronism

Primary (adrenocortical insufficiency)

Secondary

Hyporeninemic hypoaldosteronism

Adrenocortical Hyperfunction

Syndromes of excess cortisol secretion (Cushing's disease)

Cushing's syndrome (primary origin)

Adrenal adenoma or adenocarcinoma

Cushing's syndrome (secondary origin)

Bilateral adrenal hyperplasia

Pituitary origin (microadenoma secreting ACTH)

Hypothalamic origin

Ectopic ACTH syndrome

Syndromes of excess aldosterone secretion

Primary hyperaldosteronism. Conn's syndrome (adrenal adenoma, aldosteronoma)

Secondary hyperaldosteronism

Barter's syndrome (hyperreninism)

Malignant hypertension

Renin-secreting tumor

Syndromes of excess adrenal androgen secretion (virilizing adrenal tumors)

Male (precocious pseudopuberty in the preadolescent boy)

Female (masculinization)

Syndromes of excess estrogen production (feminizing adrenal tumor)

Male (gynecomastia)

Female (precocious puberty in the preadolescent girl)

Adrenal Enzyme Deficiency Syndromes

Congenital (lipoid) adrenal hyperplasia (fatal)

Congenital virilizing adrenal hyperplasia

3 β -Dehydrogenase deficiency

11 β -Hydroxylase deficiency (hypertensive form)

21 β -Hydroxylase deficiency (salt-losing form)

Congenital 17 α -hydroxylase deficiency

Corticosterone methyl oxidase (type II) deficiency (hypoaldosteronism)

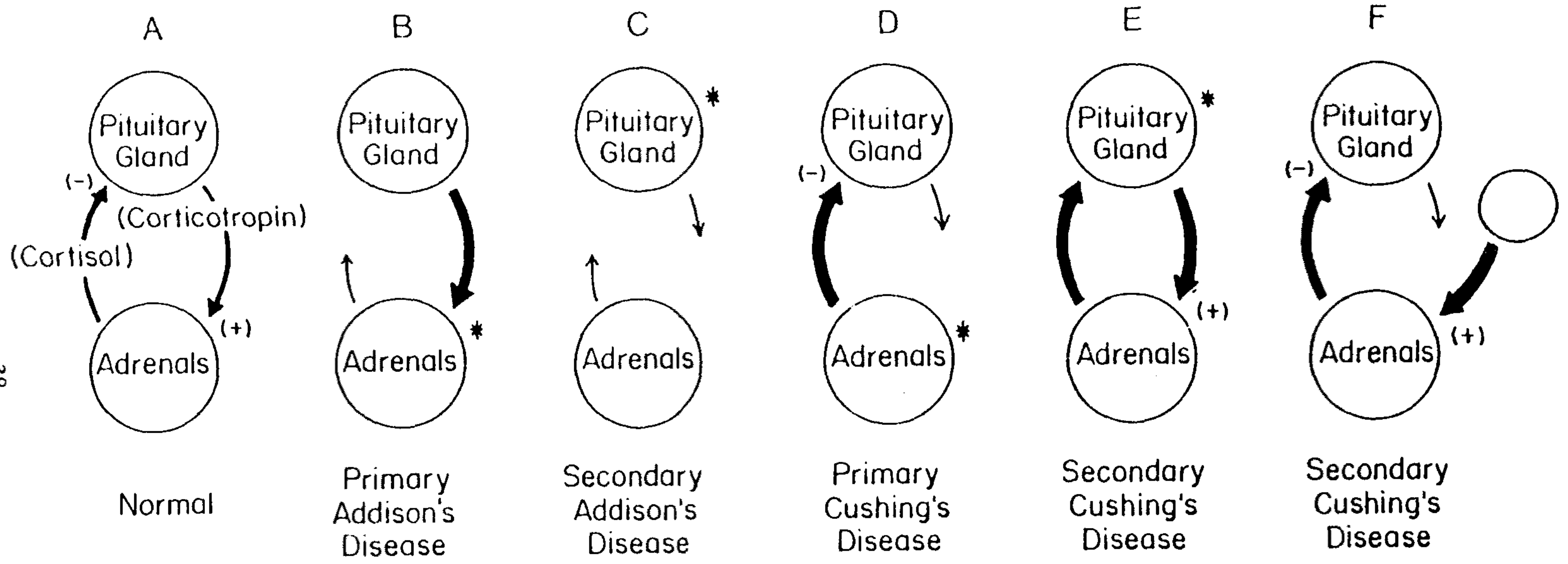
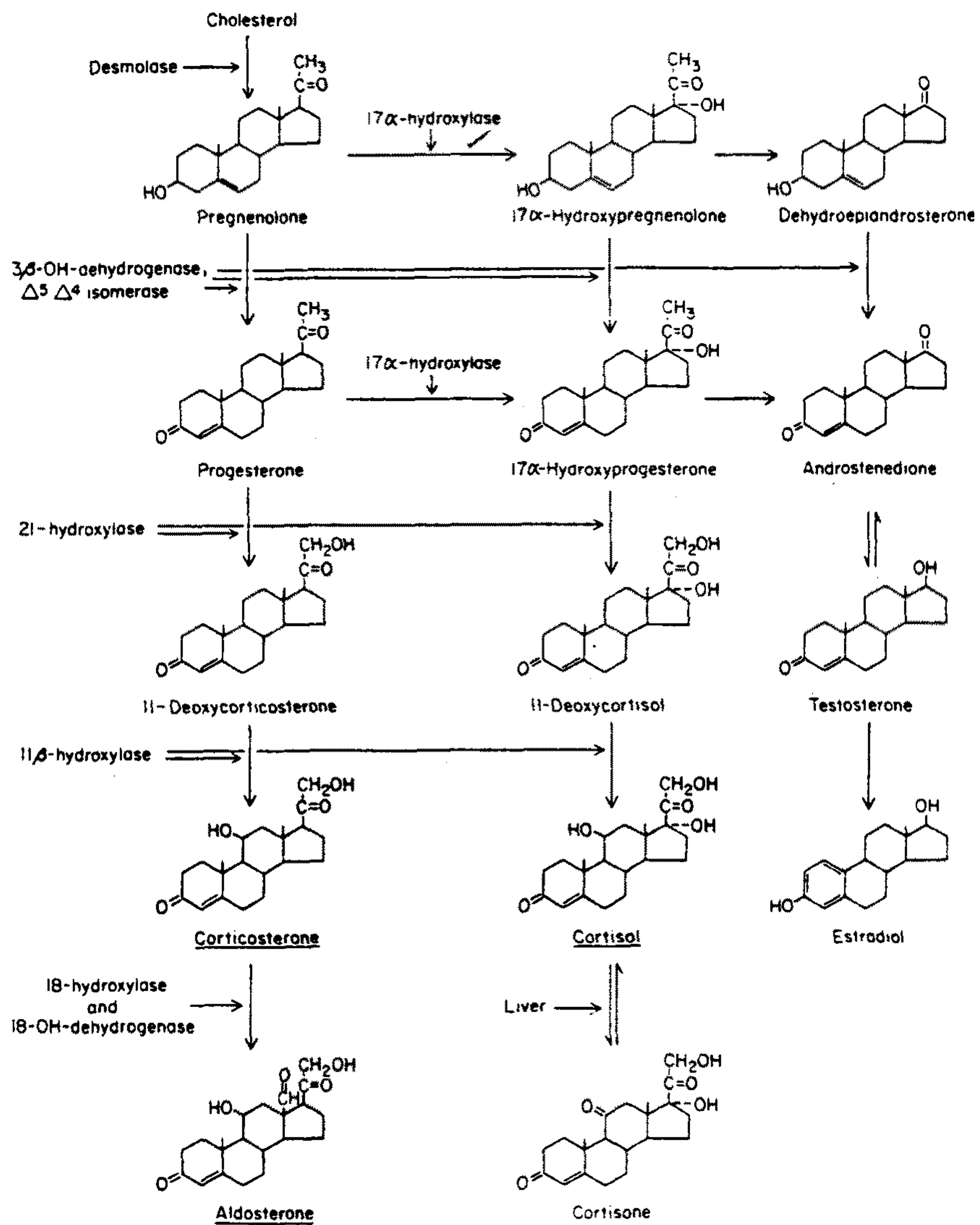


Figure 5. Summary Scheme of the Etiology of Hypocortisolism and Hypercortisolism.

* Ectopic Corticotropin Secretion

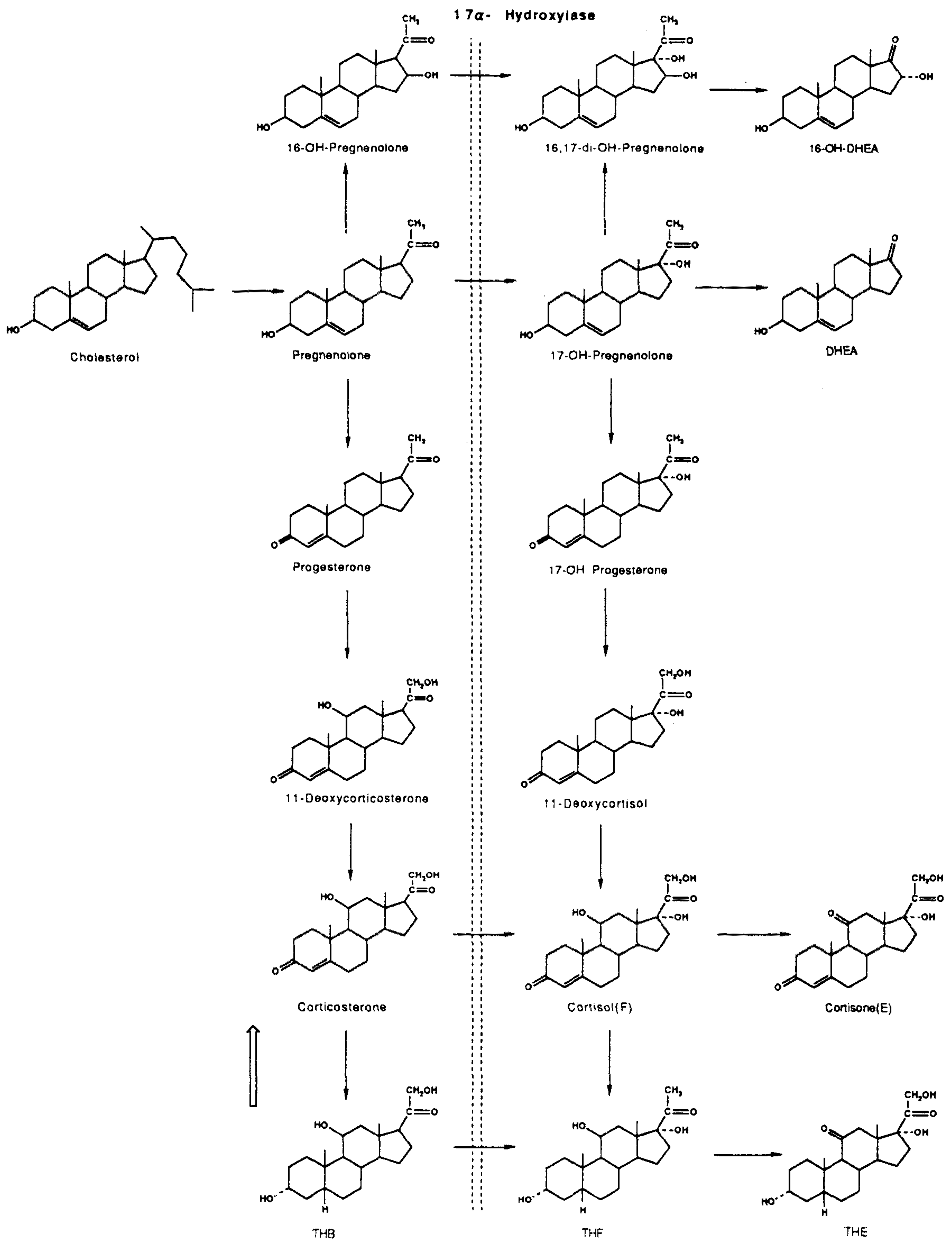


Scheme 1. Metabolic Pathway of Steroid Hormone.

18-hydroxylase는 상당히 유사한 효소일것으로 추측하고 있다.

17 α -hydroxylase deficiency의 경우, 증상으로는 사춘기에 고혈압, 저칼륨혈증, 남성에서는 가성반음양(pseudohermaphroditism) 등의 증상이 나타난다. 사춘기에 생식선 스테로이드 호르몬 생성이 증가하지 않아서 2차 성징이 나타나지 않기 때문에 이 시기에 병이 발견되는 것이며, 11 β -hydroxylase deficiency와는 다르게 남성화현상과 성장장애는 없다. 이 질환의 진단은 생체시료내에서 17-keto steroid등이 검출되지 않고, cortisol은 감소하고, 16 α -hydroxy계의 내인성물질이 많이 발견된다. 1983년에 Fennessey는 GC/FID로 본 질환의 진단시 androgen metabolite가 발견되지 않았고, 보통 뇨시료에서 많이 발견되는 THE나 THF보다 THB나 THA가 많이 발견되었다고 보고하였다. THE나 THF는 17 α -hydroxy계의 steroid이고 THB나 THA는 C-17의 hydroxy moiety를 갖지 않기 때문인것으로 생각된다⁽⁸⁻¹⁰⁾.

또한, 부신피질 호르몬계 질환의 하나인 Cushing 증후군은 1932년에 처음으로 발견된 부신피질기능항진증이다. 이 질환의 원인으로는 외부에서 장기적으로 glucocorticoid를 투여한 경우 즉 의인성(iatrogenic) 쿠싱증후군이며, 자연발생적인 원인으로는 뇌하수체 선종에서의 부신피질자극 호르몬 과다분비에 따른 부신피질증식증, 부신종양(선종 또는 암) 부신 및 뇌하수체 이외의 조직에서 기인한 종양에 의한 부신피질 자극호르몬의 과잉분비가 일어나는 이소성 부신피질자극호르몬증후군(Ectopic ACTH Syndrom)등이 있다. 또한, 이 증후군은 크게 부신피질자극 호르몬 의존성과 부신피질 자극 호르몬



Scheme 2. Abnormal Metabolic Pathway of Steroid Hormone by 17 α - Hydroxylase Deficiency.

비의존성으로 나눌 수 있는데, 의존성증후군에는 쿠싱병과 이소성 부신피질 자극호르몬 증후군이 포함되는데, 이 경우에는 부신피질 자극 호르몬의 만성적 과다분비에 따른 부신피질 망상대와 섬망대의 증식이 있고, 이에 따라 glucocorticoid와 adrenal androgen의 분비가 증가한다. 부신피질 자극호르몬 비의존성 쿠싱증후군은 자율적으로 glucocorticoid를 생산하는 부신선종(adenoma)이나 선암(adenocarcinoma)에 의하여 이 경우 뇌하수체 부신피질 자극 호르몬 분비는 억제되어 있다.

따라서, 이와같은 쿠싱증후군의 임상적 증상은 비만증이 가장 흔한 증상인데, 전형적인 중심성비만증으로 cortisol 과잉에 의한 표피와 결합조직의 위축도 가져 오므로 피부의 변화를 초래한다(Figure 5).

이와같은 변화를 가져오므로, 현재도 많은 연구자들에 의해 비만 (obesity)과 cortisol 및 스테로이드 호르몬의 관계에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이러한, 질환들의 진단시에는 현재 dexamethasone 억제검사, 비색법이나 radioimmunoassay를 이용하여 cortisol을 측정하는 방법으로 초기진단을 행한다. 그러나, steroid profiling을 적용할 경우 cortisol metabolite들 즉, THE, THF, THB, 5 α -THF등의 구조적으로 비슷한 내인성물질 각각을 확인하므로 좀더 정확한 진단이 될수 있으리라 생각된다.

제 4절. 생체시료에서 Steroid Hormone의 분석방법

생체시료로부터 내인성 steroid를 분석하기 위해서는 적당한 추출방법의 설정뿐만 아니라 적절한 분석기기의 선택도 중요하다. 1930년대 steroid hormone이 속속 발견되기 시작할때는 비색법이 주류를 이루어 왔고, 분석기기의 발달과 더불어 Radio Immuno Assay, HPLC/UV, 그리고 GC/MS등이 쓰이고 있다.

비색법

Steroid hormone이 처음 발견되었을때부터 사용한 방법으로 구조적으로 비슷한 화합물인 경우 구별이 불가능하고, 한번에 하나 또는 같은 계통의 화합물만 검출이 가능하다.

1. Kober reaction : Alcohol에 용해시켜 90% H₂SO₄와 반응시켜 황적색으로 나타난다.
2. Diazo coupling reaction : Diazo-*p*-nitroaniline과 sulfonilic acid로 반응하면 적색이 나타난다.
3. David reaction : H₂SO₄와 arsenic acid로 청색이 나타난다.
4. Bachman reaction : Na-*p*-phenolsulfonate의 85% H₃PO₄ 용액에서 안정한 적자색을 나타낸다(540nm에서 측정)
5. Phenylhydrazine reaction : acetic acid 존재하에 steroid hormone의 17 α -OH가 phenylhydrazine sulfate와 반응하여 황색의

최대 흡수띠가 410nm에서 나타난다. 이 반응은 많이 쓰이기는 하지만 당이나 bilirubin등으로 인해 방해가 생기기도 한다.

Radio-immuno-assay⁽¹⁹⁻²⁰⁾

Radio Immuno-assay 정량법은 측정하려는 substance(예 hormone)와 이것의 알고 있는 radioactive isotope form 양으로 special protein의 결합 위치에서 서로 경쟁한다. 면역측정 정량인 경우 특정 hormone에 대하여 생성된 antibody가 있다.

Radioactive form으로 label 되어진 antigen(예 hormone)과 label 되지 않은 hormone의 혼합물을 anti-hormone antibody와 결합시킨다. 이 antigen-antibody complex를 다시 staph A protein과 결합시켜서 침전시킴으로써 bound form의 antigen(hormone)을 unbound form으로 부터 분리시킨뒤, bound form의 hormone의 양을 측정하여 검량곡선을 작성하고, 측정하고자 하는 시료중의 hormone의 양을 검량곡선과 비교하여 정량한다.⁽²¹⁻²⁴⁾

이러한 정량방법은 고도의 정밀성을 요하게 되는데 그 검출한계는 25 pg/ml이다. 그러나 측정하려는 hormone과 비슷한 구조를 가진 다른 hormone과의 생각지 않은 교차반응이 생기기 때문에 사용되는 antigen과 antibody와의 immuno-specificity가 극히 높아야 하는 단점이 있다. 따라서 RIA법을 이용한 정량시에는 불순물이 섞일수

있고, 정성분석에서는 이러한 불순물의 존재가 하나의 substance로서 속을수 있기 때문에 잘못 판정(false positive)을 내릴수 있다

HPLC⁽²⁵⁻²⁶⁾

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.

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.

그러나, 열에 불안정하거나 고분자량의 물질인 경우 화합물의 분해없이 분석할 수 있는 장점이 있다. 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 높아졌으나, 화합물의 확인이 어렵기 때문에 미지의 물질인 경우 분석에 어려움이 있다.

GC/MS⁽²⁵⁻³⁴⁾

현재까지 steroid hormone을 정량분석하기 위한 최선의 방법인 GC/MS는 1960년대 GC의 발전과 1970년대 Mass의 급속한 발달에 힘입어 한번의 시료처리로서 여러개의 화합물을 동시에 검출할 수 있고 각 화합물의 분자량에 따른 특성이온과 머무름시간으로 판단하기 때문에 구조적으로 비슷한 화합물이라도 정확하게 정량할 수 있다.

Urine으로 부터 정량방법은 다음과 같다.⁽³⁵⁻³⁷⁾

- 1) 방해물질을 제거하고 steroid hormone만을 얻기 위한 목적으로 urine sample로부터 추출. Steroid는 conjugate로 배설되기 때문에 enzymatic hydrolysis를 하거나 acidic hydrolysis를 하여 conjugate form을 분리시켜 extraction.
- 2) Chromatography 방법을 통해 정제.
- 3) Derivatization
- 4) 정량과 정확한 확인을 목적으로 GC/MS를 사용한다.

정량을 하기 위하여 그 과정을 돌로 나누어 보자면 먼저, 정제과정에 있어서 hydrolysis 방법, extraction solvent선택, derivatization method의 선택과 상황에 따른 분리관 선택등과 같은 약간의 차이가 있다.

두번째의 과정으로는 기기를 이용한 분석의 단계를 들수 있는데, GC/MS의 selected ion monitoring mode는 각 steroid가 갖는 특성이온 fragmentaion에 의하여 사용되기 때문에, detection limit도 각 화합물마다 다르기는 하지만 10-100pg까지 가능하고 정밀도(sensitivity)도 높다.

제 3장. 실험

제 1절. 시료

1) 뇨

Y병원 내과에 내원한 내분비질환을 가진 3명의 환자의 이른 아침부터 24시간동안 배설된 뇨를 수집하여 뇨의 양을 측정하고 실험하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

2) 혈액

정상 성인 남자(20-30세)의 혈액을 10ml을 채혈하여, 즉시 원심분리한후 상등액을 tube에 옮긴후 실험하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

제2절. 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 Analyzing system으로는 HP 7946 disc drive가 연결된 HP 5970 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. Liebisch, 독일)등을 들수 있다.

제 3절. GC/MSD 작동조건

본 실험에서 사용된 분석기기 작동조건은 다음과 같다.

1) Urinary Steroid Profiling

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 thickness는 0.11um였으며, 분리관의 온도는 180 °C에서 2 °C/min으로 240 °C까지 올리고, 240 °C에서 2분간 머무른 다음, 곧바로 280 °C까지 올리고, 280 °C에서 300 °C로 상승시킨후 3분간 머물렀다.

2) Plasma Androgen Profiling

주입기 온도 : 200 °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 thickness는 0.11um였으며, 분리관의 온도는 100 °C에서 15 °C/min으로 210 °C까지 올리고, 210 °C에서 2분간 머무른 후, 곧바로 212 °C까지 올리고, 212 °C에서 2분간 머무른후 1 °C/min으로 216 °C까지 올리고,

216 °C에서 3분간 머무른 다음 곧바로 300 °C까지 올리고 4분간 머물렀다.

제 4절. 시 약

본 실험에서 사용된 시약은 다음과 같다.

- . Androstenedione (Sigma, 미국)
- . Progesterone (Sigma, 미국)
- . Pregnenolone (Sigma, 미국)
- . Cholesterol (Sigma, 미국)
- . Dihydrotestosterone (Sigma, 미국)
- . Methyltestosterone (Sigma, 미국)
- . Testosterone (Sigma, 미국)
- . Androsterone (Sigma, 미국)
- . Etiocholanolone (Sigma, 미국)
- . Dehydroepiandrosterone (Sigma, 미국)
- . 11 β -Hydroxy androsterone (Sigma, 미국)
- . 11 β -Hydroxy etiocholanolone (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)
 5-Androstenetriol
 α -Cortolone
 β -Cortolone
 α -Cortol
 β -Cortol
 Tetrahydrodeoxycorticosterone
 Tetrahydro-11-dehydrocorticosterone
 Amberlite XAD-2 resin(100-200 microns) : Serva(독일)
 로부터 구입하였으며, acetone(2일),
 methanol(2일), 증류수(3일)로 환류시켜
 정제한 다음 증류수에 담아 보관하였다.
 Acetate buffer(pH=5.2) : 0.2M CH₃COOH와 CH₃COONa를 pH
 5.2로 맞추어 사용 하였다.
 Sepadex LH-20 : Pharmacia(스웨덴)로부터 구입하였으며,
 cyclohexane과 ethanol을 9:1의 비율로
 혼합한 용액에 24시간 담군후 사용하였다.

. β -Glucuronidase/Arylsulfatase from Helix Pomatia :
Boehringer Mannheim(독일)로 부터 구입
했으며, β -Glucuronidase activity는 5.5
U/ml (38 °C) 이고, Arysulfatase activity는
2.6 U/ml(38 °C)인 것을 50ul를 사용 하였다.

. 유도체화 시약 :

1) MSHFB(N-Methyl-N-trimethylsilylheptafluorobutyra-
mide) 는 Machery-Nagel(독일)로 부터 구입했으며,
Trimethylsilylimidazole과 Trimethylchlorosilane은
Sigma(미국)로 부터 구입하여, MSHFB : TMSIM : TMSCI
을 2:2:1 (v:v:v)의 비율로 섞은 혼합용액을 사용
하였다.

2) Heptafluorobutyric anhydride는 Sigma(미국)로 부터
구입하여 acetonitrile과 5:2(v:v) 비율로 섞은
혼합용액을 사용하였다.

제 5절. 실험방법

1) Urinary Steroid Profiling

가) XAD-2 column의 준비

내경이 0.5cm인 disposable glass pasteur pipette에 glass bead를

5 ml urine + I.S. (Cholesteryl Butyrate, 2 ug)



Apply on XAD-2 column
Elute with 5 ml of METHANOL
Evaporate METHANOL to dryness



1 ml Acetate Buffer(0.2 M, pH=5.2)



**Enzymatic Hydrolysis
with *Helix Pomatia***



37 °C for overnight



**100 mg POTASSIUM CARBONATE
5 ml DIETHYL ETHER**



Shake 5 min. and centrifuge 5 min.
Evaporate organic layer to dryness
Dry in desiccator for 30 min.



**MSTFA/TMSimidazole/TMSCl
(2:2:1), 60 °C, 10 min.**



Inject to GC/MSD

**SAMPLE EXTRACTION PROCEDURE FOR MEASUREMENT
OF URINARY ANDROGENS, PROGETAGENS & CORTICOIDS.**

넣어서 아래부분을 막은다음, 충분히 세척하여 증류수에 보관되어진 XAD-2 resin을 높이 1cm 정도로 채워서 만든다.

나) 뇨로부터 steroid의 분리

5ml 뇨를 원심분리하여 10ml plastic syringe로 뽑아서, 준비된 XAD-2 column에 흘려주면서 내부표준 물질은 cholesteryl butyrate 을 넣어준다.

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

다) Free 및 conjugated steroid의 분리

Residue에 1ml acetate buffer를 넣고, acetate buffer 용액에 β -glucuronidase/ arylsulfatase 50ul를 넣고, 37°C에서 overnight 가수분해시킨다. β -glucuronidase/arylsulfatase로 가수분해시킨후 diethylether로 추출하기에 알맞은 pH=9로 맞추기 위해 potassium carbonate 100mg을 넣고 diethylether 5ml를 넣고 5분간 shaker에서 흔들어서 추출한다. 혼합된 용액을 2,500rpm에서 5분간 원심분리하고 -30°C의 freezer 에 넣어 buffer 층을 얼린다음, ether 층은 다른 원심분리 tube에 옮긴다. 이 ether 층은 evaporator에서 건조시키고 유도체화 반응을 시키기전에 수분을 제거하기 위해서 P₂O₅/KOH로 채워져 있는 vacuum desiccator에 30분간 넣어 두었다.

라) 유도체화 반응

Steroid를 추출한 원심 분리 tube에 MSHFB : TMS Imidazole : TMSCl(2:2:1) 혼합용액 100ul를 넣고 60℃에서 10분간 반응시킨후 auto sampler용 vial에 옮겨서, GC/MSD에 1 μ l을 injection 한다.

2) Plasma Androgen Profiling

가) Free 및 Conjugated Androgen의 분리

채혈한 혈액을 원심분리한후 상등액 1ml을 tube에 옮긴후, 내부표준 물질인 methyltestosterone 100ng을 넣고, 34℃에서 1시간 equilibration 한다. Equilibration한후, 0.1M acetate buffer 1ml을 넣고, acetate buffer 용액에 β -glucuronidase/arylsulfatase 50 μ l를 넣고 45℃에서 21시간 가수분해시킨다. β -glucuronidase/arylsulfatase 로 가수분해시킨후 ethylacetate 5ml을 넣고, 15분간 shaker에서 흔들어 추출한다. 혼합된 용액을 2,500rpm에서 5분간 원심분리하고, 유기용매층을 다른 tube에 옮긴다. 이와 같은 조작을 2번 반복한후 ethylacetate층은 evaporator에서 건조시킨다.

나) Sepadex LH-20 column의 준비

Sepadex LH-20 resin 20g을 cyclohexane과 ethanol 9:1의 비율로 섞은 혼합유기용매 100ml에 24시간 담구어 팽윤시킨다. 내경이 0.5cm인 disposable glass pasteur pipette에 glass wool을 넣어서 아래 부분을 막은 다음, 팽윤시킨 Sepadex LH-20 resin을 1cm 정도로 채워서 만든다.

1 ml of Plasma



Add I.S.(Methyltestosterone)
Equilibrate at 34 °C

**Enzyme Hydrolysis
with *Helix Pomatia***



0.1M Acetate buffer
Incubate at 45 °C for 21 hrs
Extract with EtOAc

LH-20 Treatment

(cyclohexane:EtOH=90:10)



Dry under nitrogen



Derivatization

(HFPA in AcCN)

Extraction Procedure for Plasma Androgens

다) Plasma androgen의 분리

Ethylacetate층을 건조시킨 tube에 500 μl 의 cyclohexane과 ethanol 혼합유기용매를 넣어 녹인후 Sepadex LH-20 column에 흘려준다. 혼합유기용매에 녹인 residue가 모두 흘러 내려간 후에 500 μl 의 cyclohexane과 ethanol 혼합유기용매로 씻어준다. 그리고, 다시 3ml의 cyclohexane과 ethanol 혼합유기용매로 elution을 하면서 tube에 받고, evaporator에서 건조시킨다.

라) Plasma Androgen의 유도체화 반응

건조된 tube에 acetonitrile 20 μl 와 heptafluorobutyric anhydride 50 μl 를 넣고, 75 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨후, 유도체화 시약을 nitrogen evaporator로 건조시키고, ethylacetate 50 μl 에 녹여 autosampler용 vial에 옮겨서, GC/MSD에 5 μl 를 injection한다.

제 4장 결과 및 고찰

제 1절. 새로운 Steroid profiling의 설정.

Androsterone, etiocholanolone, dehydroepiandrosterone, 11-keto an, 11-keto et, 11 β -OH an, pregnenolone, 11 β -OH et, progesterone, pregnanediol, pregnenediol, pregnanetriol, 16-pregnene-triol, THS, THE, 5 α -THB, THF, 5 α -THF, cholesterol, prednisolone 은 91년도(2차년도) 연차보고서에서 설정해 놓은 profiling에 포함되는 스테로이드들이다.

본 연구의 steroid profile에는 부신피질 호르몬계의 내분비질환을 진단하는데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 위의 열거한 것 이외에 7가지를 추가하여 그 조건을 설정하였다. 그 내용을 알아보면 다음과 같다.

Steroid acid의 일종으로 cortisol metabolite이면서 cortisol과 구조적으로도 유사한 cortol(5 β -pregnan-3 α , 11 β , 17 α , 20 α , 21-pentol), β -cortol(5 β -pregnan-3 α , 11 β , 17 α , 20 β , 21-pentol), cortolone(5 β -pregnan-3 α , 17 α , 20 α , 21-tetrol-11-one), β -cortolone(5 β -pregnan-3 α , 17 α , 20 β , 21-tetrol-11-one) 은 carboxylic acid의 산화된 형태로 21번 위치의 탄소에 hydroxy moiety를 가지고 있다. 이들의 일반적 명칭은 cortolic acid라고도 한다. 현재는 스테로이드 대사 및 생합성에 있어서 이들의 변화가 질환에 어떤 영향을 미치는지가 아직 많이 알려져 있지는 않다. 그러나, 1980년 Shackleton등에 의해서 6명의 암환자의 urinary profiling에서 cortolic acid 정량값을 보면 80-649 μ g/24hr의 값을

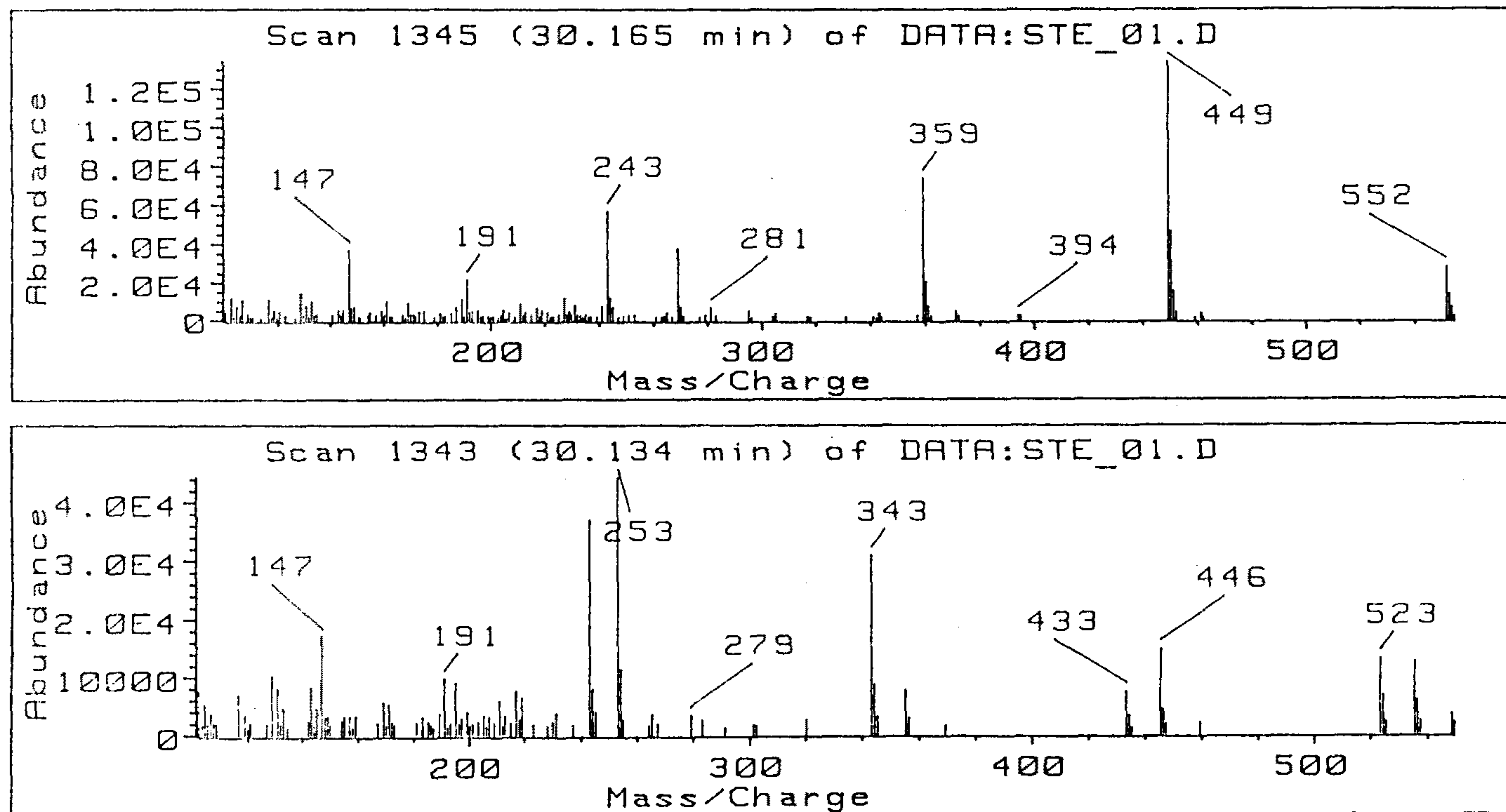


Figure 6-1. Mass Spectra of TMS-Derivatized β -Cortolone and β -Cortol.

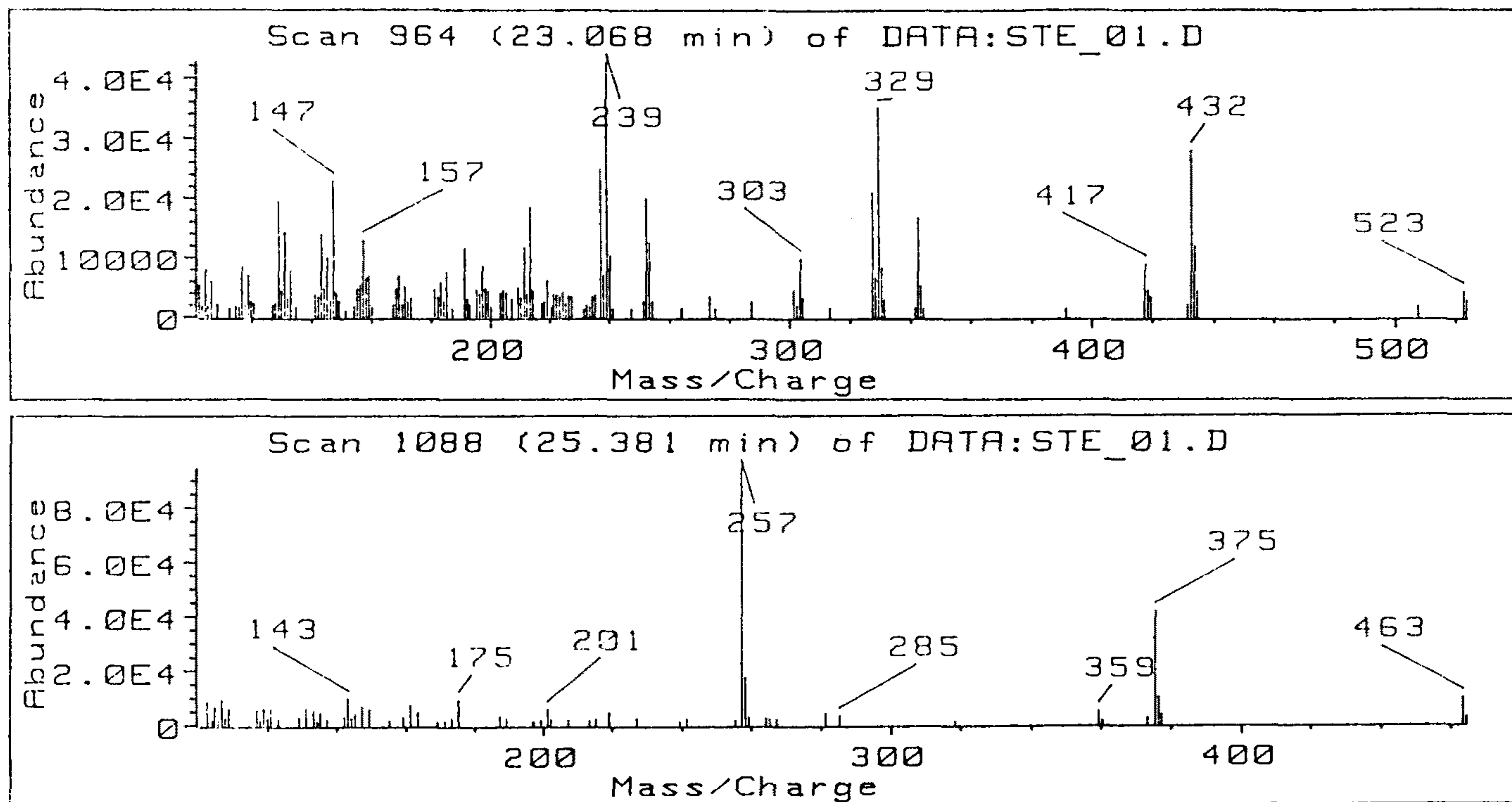


Figure 6-2. Mass Spectra of TMS-Derivatized 5-AT and THLOC.

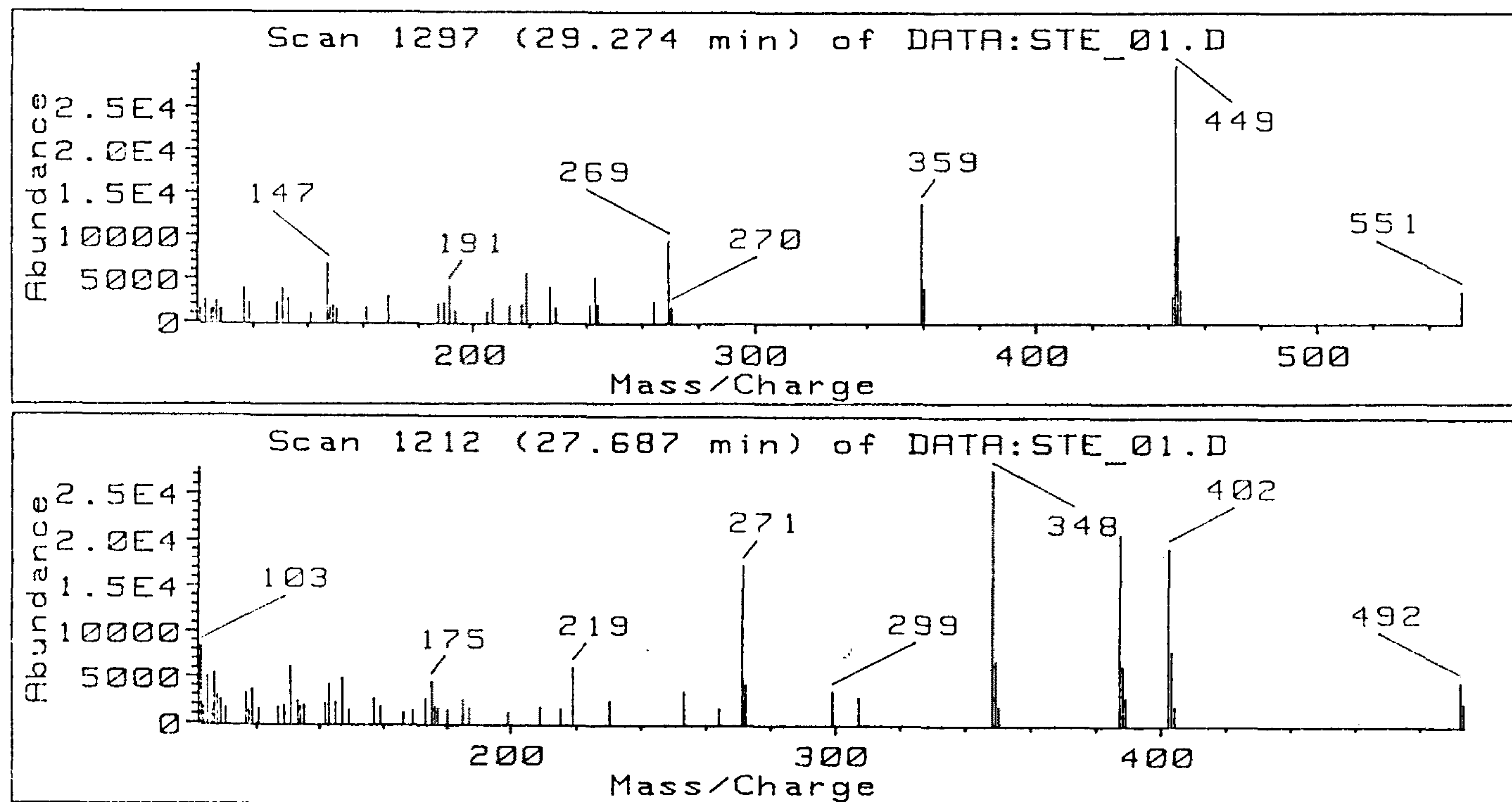


Figure 6-3. Mass Spectra of TMS-Derivatized Cortolone and THA

Table 3. Characteristic Ions and Relative Retention Time of Steroids by TMS derivatization.

Compounds	Relative Retention Time	Characteristic Ion
Cholesterylbutyrate(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)
Androstenedione	0.308	358 (1 TMS)
11-keto Et.	0.408	448 (2 TMS)
11 β -OH An.	0.426	450 (2 TMS)
Pregnenolone	0.400	298 (1 TMS-90)
11 β -OH Et.	0.444	450 (2 TMS)
Progesterone	0.452	386 (1 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)
Cholesterol	0.793	368 (1 TMS-180)
Prednisolone	0.977	265 (3 TMS-131-180)

```

NAME RTN
  N=1
  CH 28.00:29.50, 368
  SM
  ITH=14
  TH 1TH, 0
  INT
IF ACT=1 THEN
  WRITELN 701, #13#10 CB (ISTD)          PREDNISOLONE
  RT1=RTS*1.000
  RT2=RTS*0.958
  ITH=10
  I01=368
  I02=265
  DR2
  ENDIF
IF ACT=2 THEN
  WRITELN 701, #13#10 ANDROSTERONE      ETIOCHOLANOLONE
  RT1=RTS*0.231
  RT2=RTS*0.245
  ITH=10
  I01=272
  I02=272
  DR2
  ENDIF

```

Fig. 3-2. Macro Program for Steroid Profile.

```

IF ACT=3 THEN
    WRITELN 701, #13#10 DHEA                11-KETO AN
    RT1=RTS*0.276
    RT2=RTS*0.285
    ITH=10
    I01=360
    I02=376
    DR2
    ENDIF
IF ACT=4 THEN
    WRITELN 701, #13#10 11-KETO ET        11  $\beta$ -OH AN
    RT1=RTS*0.366
    RT2=RTS*0.389
    ITH=10
    I01=448
    I02=450
    DR2
    ENDIF
IF ACT=5 THEN
    WRITELN 701, #13#10 11  $\beta$ -OH ET      PREGNANEDIOL
    RT1=RTS*0.412
    RT2=RTS*0.489
    ITH=10
    I01=450
    I02=449
    DR2
    ENDIF

```

Fig. 3-2. Macro Program for Steroid Profile. Continued.

```

IF ACT=6 THEN
    WRITELN 701, #13#10 PREGNENEDIOL          PREGNANETRIOL
    RT1=RTS*0.535
    RT2=RTS*0.641
    ITH=10
    I01=462
    I02=255
    DR2
    ENDIF
IF ACT=7 THEN
    WRITELN 701, #13#10 THS                  16-PREGNENETRIOL
    RT1=RTS*0.643
    RT2=RTS*0.690
    ITH=10
    I01=435
    I02=460
    DR2
    ENDIF
IF ACT=8 THEN
    WRITELN 701, #13#10 THE                  THF
    RT1=RTS*0.724
    RT2=RTS*0.750
    ITH=10
    I01=449
    I02=343
    DR2
    ENDIF

```

Fig. 3-2. Macro Program for Steroid Profile. Cotinued.

```

IF ACT=9 THEN
    WRITELN 701, #13#10 5  $\alpha$ -THF           5  $\alpha$ -THB
    RT1=RTS*0.758
    RT2=RTS*0.776
    ITH=10
    I01=343
    I02=463
    DR2
    ENDIF

IF ACT=10 THEN
    WRITELN 701, #13#10 PREGNENOLONE         PROGESTERONE
    RT1=RTS*0.410
    RT2=RTS*0.452
    ITH=10
    I01=298
    I02=386
    DR2
    ENDIF

IF ACT=11 THEN
    WRITELN 701, #13#10 ANDROSTENEDIONE     CHOLESTEROL
    RT1=RTS*0.308
    RT2=RTS*0.793
    ITH=10
    I01=358
    I02=368
    DR2
    ENDIF

```

Fig. 3-2. Macro Program for Steroid Profile. Continued.

NAME DR2

TH 1TH, 0

WI 1, 0:0.5, 0.5:1

WI 2, 0.5:1, 0.5:1

SM

INT

DR 1, Y

DR 2, X

SCREENP 550, 320

ENDOPRO

NAME GO

Fig. 3-2. Macro Program for Steroid Profile. Continued.

Table 3-3. Concentration of Urinary Steroids and Prednisolone by Group of Age.

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

	0 - 1yr		1yr - 3yr		3yr - 6yr		6yr - 10yr		10yr - 17yr		30yr - 47yr	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Androsterone	3.51	2.10	4.24	2.53	3.97	5.39	6.47	7.34	19.47	20.54	52.40	49.54
Etiocolanolone	2.97	1.50	5.25	2.41	4.74	6.30	7.32	5.52	10.93	7.78	68.29	39.24
DHEA	-	-	-	-	0.07	-	0.05	0.02	2.87	1.54	39.47	42.14
11-keto An.	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19	-	0.47	0.92
11-keto Et.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.72	-
Androstenedione	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	0.91	0.87
11 β -OH An.	-	-	-	-	-	-	-	-	0.31	-	1.47	1.92
11 β -OH Et.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pregnenolone	-	-	-	-	-	-	-	-	0.21	-	0.91	1.07
Progesterone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.79
Pregnanediol	0.14	-	-	-	-	-	-	0.12	0.01	0.14	0.02	1.93
Pregnenediol	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	0.01	-	5.45
Pregnanetriol	1.21	0.80	0.24	0.17	0.52	0.59	0.17	1.73	4.53	9.42	0.01	30.47
THS	-	-	-	-	4.27	0.87	2.54	1.97	9.57	5.80	59.41	60.34
16-Pregnenetriol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
THE	60.23	6.12	5.25	10.53	9.35	4.54	49.71	35.97	34.53	59.47	64.94	72.47
THF	8.46	8.54	4.96	10.46	8.51	9.37	5.37	6.60	11.45	10.92	36.48	48.33
5 α -THF	18.50	7.75	16.43	9.98	7.37	10.58	4.92	10.72	15.47	9.18	49.14	35.29
5 α -THB	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	-	24.50	17.31
Cholesterol	18.8	7.83	10.59	8.17	14.97	9.74	10.78	15.14	10.47	19.41	21.41	29.75
Prednisolone	25.47	-	32.94	52.47	41.54	29.46	27.31	-	41.56	-	45.97	-
N=number of samples	2	2	2	3	11	3	10	3	11	2	5	4
Vol. (ml/24hr)	30- 400	30- 500	100- 450	50- 150	760- 1200	400- 950	1200- 2000	400- 1400	760- 1400	1150- 1400	1200- 1600	1300- 1500

나타내었다. 또한, anorexia nervosa인 경우에도 이들 corticoic acid의 배설량이 증가한다고 보고하였다⁽¹¹⁾.

따라서, 본 연구에서도 Figure 6에서와 같이 4가지의 cortol, β -cortol, cortolone 그리고 β -cortolone의 mass spectrum을 얻어서 steroid profiling에 조건을 설정하였다. Cortisol metabolite로서 17 α -hydroxy moiety를 갖는 것은 THE, THF 등이 있다. 이들은 17 α -hydroxylase deficiency를 진단하는 경우 17 α -hydroxy moiety를 갖고 있기 때문에 아주 미량으로 검출된다. 따라서, 17 α -hydroxy moiety를 갖고 있지 않은 화합물이 17 α -hydroxylase deficiency인 경우의 진단에 중요한 역할을 하기 때문에 THA(5 β -pregnan-3 α , 21-diol-11,20-dione), THDOC(5 β -pregnan-3 α , 21-diol-20-one)와 17 α -hydroxy moiety를 갖는 5-AT(5-androstene-3 β , 16 α , 17 β -triol)를 추가하였다.

제 2절. Cushing's Syndrome

만성적인 glucocorticoid 과잉상태인 cushing 증후군은 특이한 임상상태를 가져올 뿐만 아니라, 자연발생적인 원인일 경우 부신선종, 부신암, 미소성부신피질자극호르몬증후군등의 감별진단이 필요하다. 본 연구에서는 Y병원에 내원한 2명의 cushing 증후군 환자 뇨시료의 steroid profiling을 알아보았다. 1)의 환자인 경우 29세 남자로 cushing 증후군이 의심이 되면서, 체중이 100kg이 넘는 비정상적인 체격을 유지하고 있었다. 2)의 환자인 경우는 32세의 여자로 cushing 증후군이면서, 체중이 80kg정도였다. 두 질환환자는 모두 이소성 부신피질 자극호르몬증후군에 의한 Cushing's syndrome으로 양성 종양때문인 것으로 진단하였다. Figure 7과 같이 정상인과는 다르게 androgen류, progestagen류, corticosteroid류등이 고르게 나타나지는 않았다. Table 4-5에서 보면, 치료전, 후의 cortisol metabolite인 THE, THF, 5 α -THF, 5 α -THB의 양이 치료전의 농도가 훨씬 많이 배설됨을 알수 있다. 이소성 부신피질자극 호르몬(ectopic ACTH)의 자극에 의해 과량의 cortisol이 분비되므로, 이와같은 결과가 나타나는 것이다. 또한, prednisolone의 양도 측정하므로 therapeutic drug monitoring(TDM)도 할수 있다. 따라서, cushing's syndrome의 여러 종류 urinary profile을 알아보지는 않았지만 이번 자료를 토대로 하여, 앞으로 확실한 cushing's syndrome의 pattern을 알아보는데 많은 도움이 되리라 생각된다.

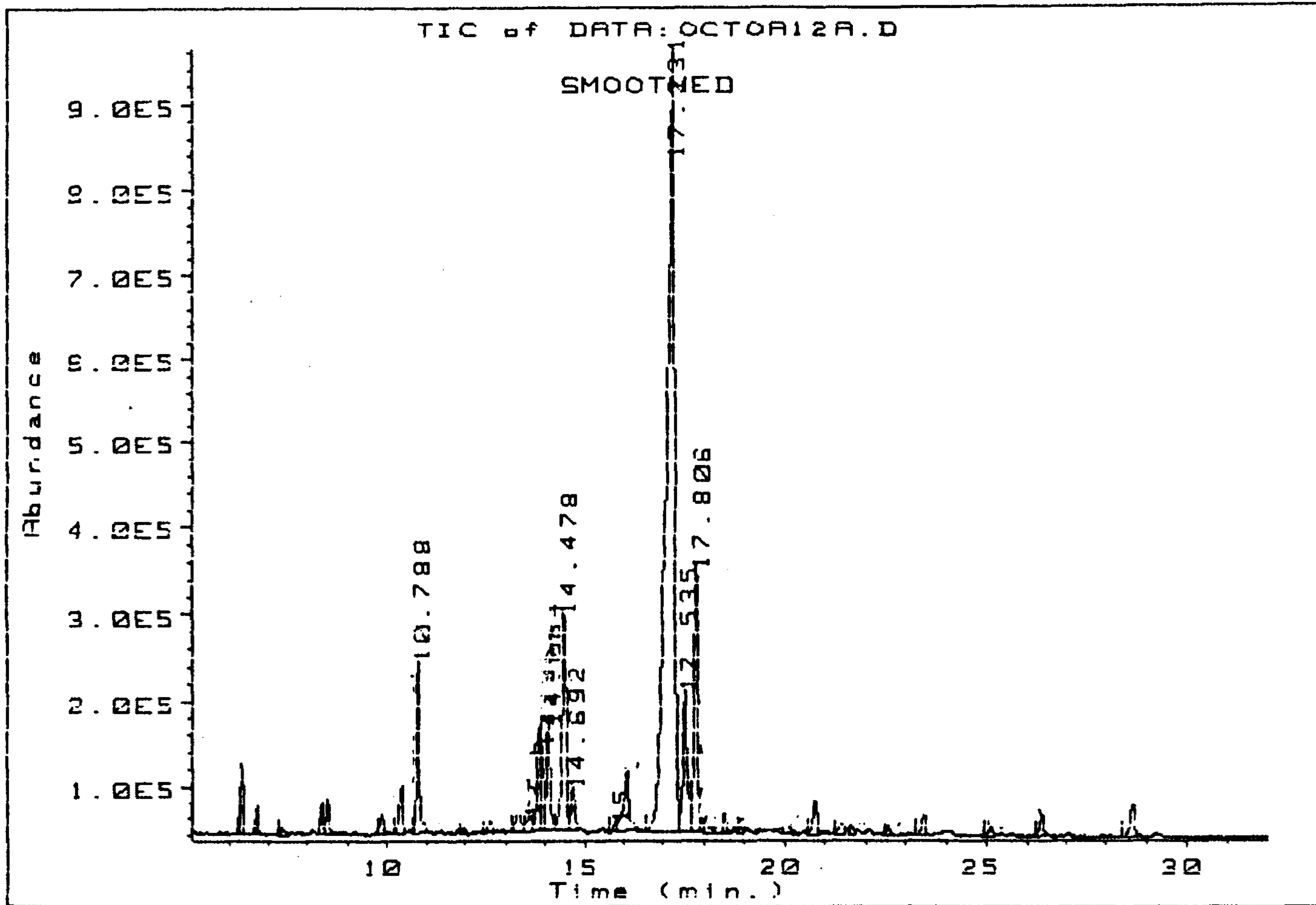


Figure 7-1. Urinary Steroid Profile of a Patient with Cushing's Syndrome. (pre-medication.)

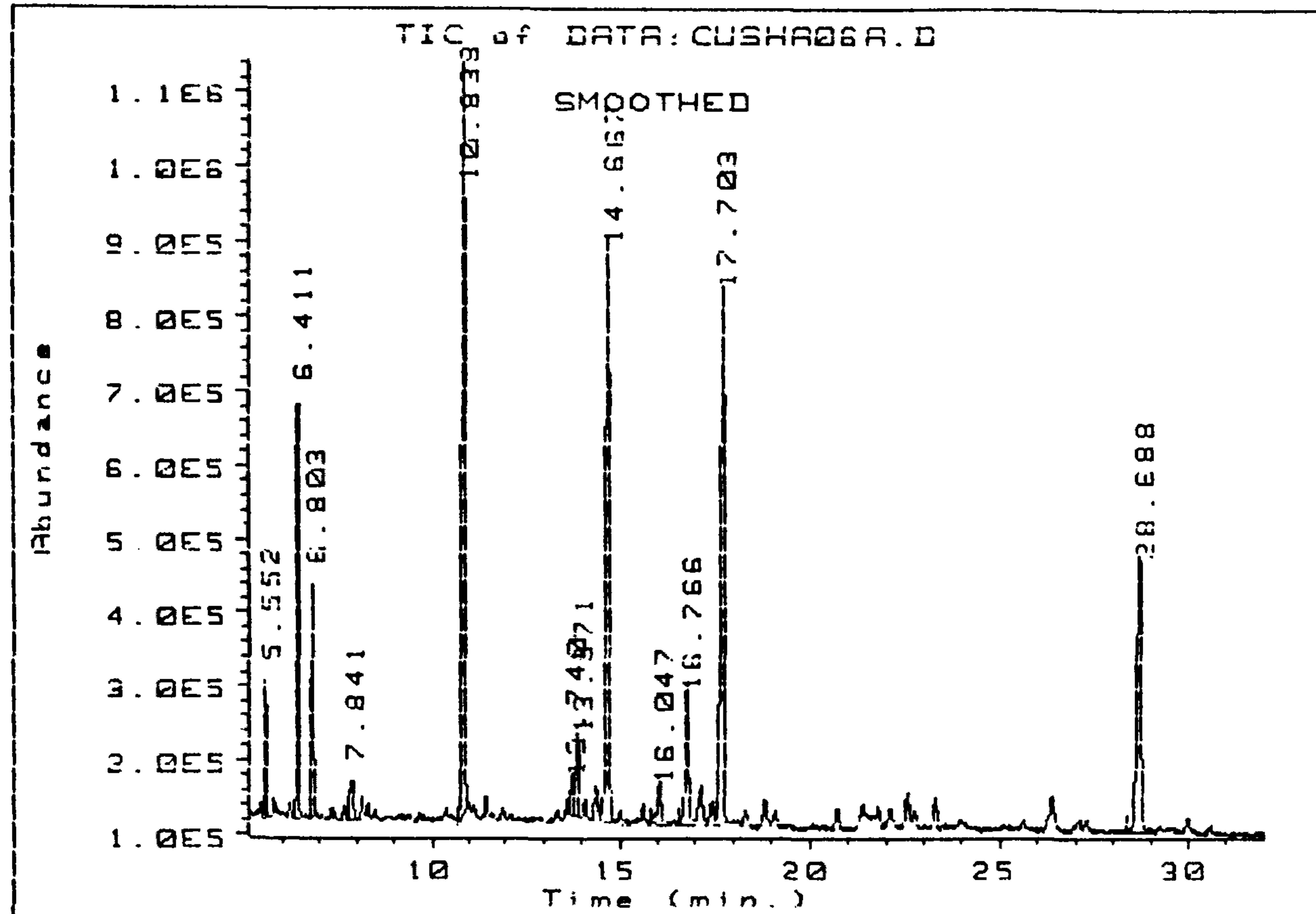


Figure 7-2. Urinary Steroid Profile of a Patient with Cushing's Syndrome.
(post-medication.)

Table 4. Steroid Quantitation of Cushing's Syndrome.(Case 1)

Steroid	FREE		Conjugated form	
	Post medi.	No Medi	Post Medi.	No Medi.
An	0.017	0.100	0.298	0.153
Et			0.138	0.414
DHEA				
11-Ke An				
Androstenedione				
11-Ke Et				0.130
11 β -OH An				0.378
Pregnenolone	0.015			
Pregnanediol				0.098
Pregnenediol				-
THS	0.003		1.406	0.041
Pregnanetriol			0.004	0.390
16-Pregnenetriol				-
THE			0.8	6.910
THF		0.158	0.061	7.290
5 α -THF				0.063
Cholesterol	0.355	0.250	0.506	0.603
Prednisolone	1.215	0.018	0.631	
5 α -THB				0.511
THE/THF			13.115	0.947

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

Table 5. Steroid Quantitation of Cushing's Syndrome(case 2)

	FREE		Conjugated form	
	Post Medi.	No Medi.	Post Medi.	No Medi.
An	54.40	32.00	95.36	48.96
Et			44.16	132.48
DHEA				
11-ke An				
Androstenedione				
11-ke Et				41.60
11 β -OH An				120.96
Pregnenolone	4.80			
Pregnanediol				31.36
Pregnenediol				
THS	0.96		449.92	13.12
Pregnanetriol			1.28	124.80
16-Pregnenetriol				-
THE			256.00	2211.20
THF		57.60	19.52	2332.80
5 α -THF				20.16
Cholesterol	113.60	80.00	161.92	192.96
Prednisolone	388.80	5.76	201.92	
5 α -THB				163.52 (μ g/day)
THE/THF			13.11	0.94

제 3절. 17 α -hydroxylase Deficiency

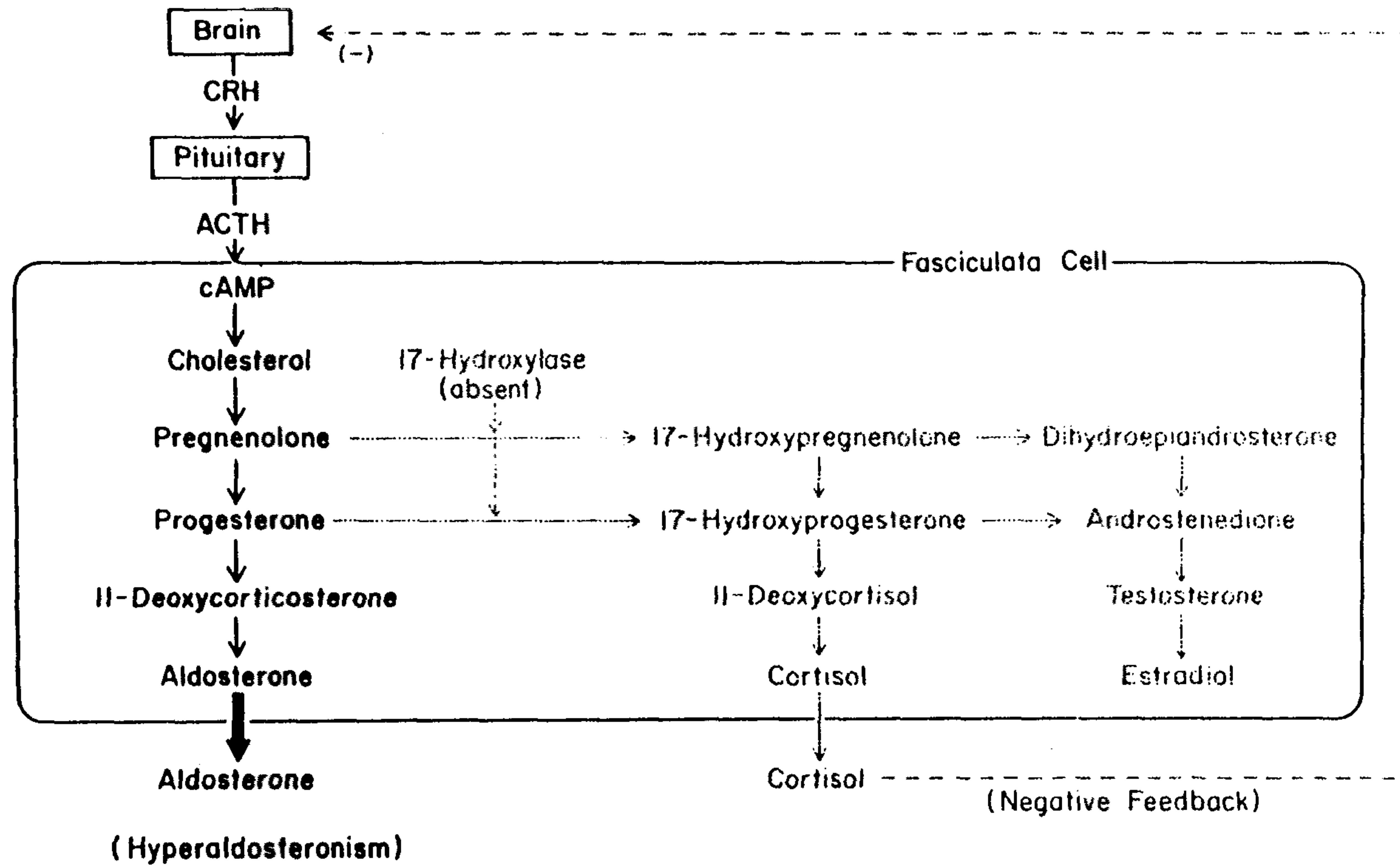
Y병원에 내원한 21세의 여자 환자인데 congenital adrenogenital syndrome에 의하여 46, XY의 남성 염색체임에도 불구하고 여성의 외양으로 출생하여 가임능력과 성숙한 여성의 신체구조를 갖지 못한 유아적 여성의 신체구조를 갖고 있었다. 이러한 경우 cholesterol로부터 시작되는 steroid metabolism에서 어느 효소의 결핍으로 부터 이러한 증상이 나타나게 되었나를 의심하게 된다. 비색법으로 17-hydroxy corticoid를 측정하게 되는 경우 cortisol의 약 90%이상이 17 α -hydroxy moiety를 갖고 있기 때문에 어느 부위의 효소인지 가늠이 불가능하게 된다.

따라서 본 연구에서 23가지 steroid profiling을 해본 결과, Table 6과 같이 정상성인 여자, ACTH 투여전, 후를 비교하여 나타내었다. 17-hydroxy moiety를 갖는 THE, THF, 5 α -THF 등은 정상인의 경우 16-1107 $\mu\text{g}/24\text{hr}$ 을 나타내었으나, 환자의 경우는 전혀 발견되지 않았고, 16-hydroxy moiety를 갖는 16-pregnenetriol은 정상인은 발견되지 않았으나, 환자의 경우 460-498 $\mu\text{g}/24\text{hr}$ 이나 배설되었다.

Figure 8-2에서 보는바와 같이, 정상여자일 경우 앞의 androgen을 비롯하여, 대개의 내인성물질이 고르게 나타난 반면, Figure 8-3의 환자는 androgen은 아주 작게 나타났다.(환자의 chromatogram인 경우 위의 그림을 확대한 것이 아래 그림임)

THDOC, 5 α -THB, THA도 정상인과 환자를 비교해볼때, 각각 0-16.0 $\mu\text{g}/24\text{hr}$ 과 99.6-3452.8 $\mu\text{g}/24\text{hr}$ 을 나타내는 것으로 보아

Pathophysiology



76

Scheme 3. Genetic Defect in 17 α -Hydroxylase Activity Leading to Hyperaldosteronism.

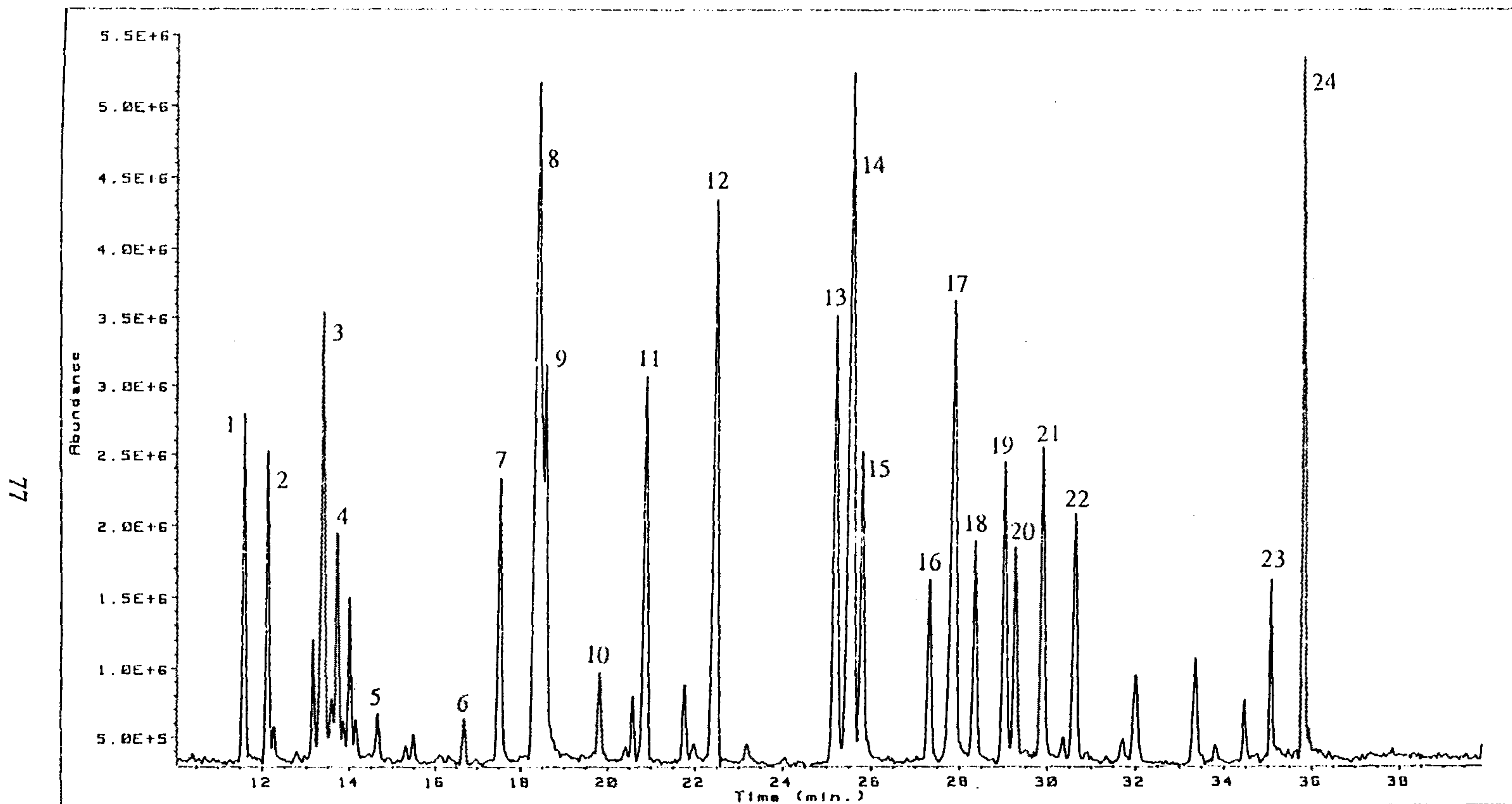


Figure 8-1. Total Ion Chromatogram of Standard Steroids.

1.Androsterone 2.Etiocholanolone 3.DHEA 4.11-Keto An 5.Androstenedione 6.11-Keto Et 7.11 β -OH An 8.11 β -OH Et 9.Pregnenolone
 10.Progesterone 11.Pregnanediol 12.Pregnenediol 13.Pregnatriol 14.THDOC 15.THS 16.16-Pregnatriol 17.THA 18.THE 19.THF
 20.5 α -THF 21.5 α -THB 22.Cholesterol 23.Prednisolone 24.Cholesteryl Butyrate(Internal Standard)

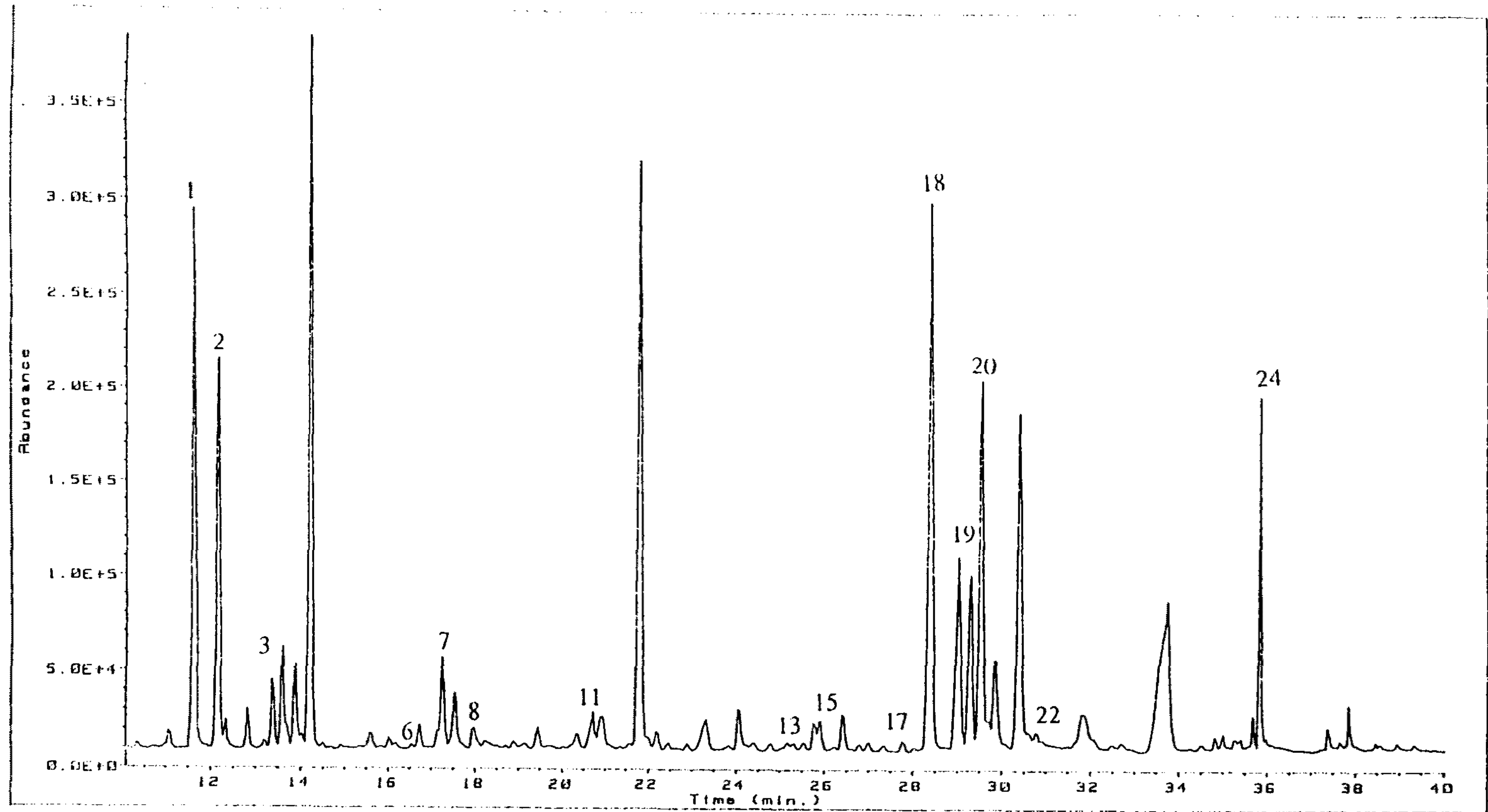


Figure 8-2. Urinary Steroid Profile of a Normal Female.(age 32 year)

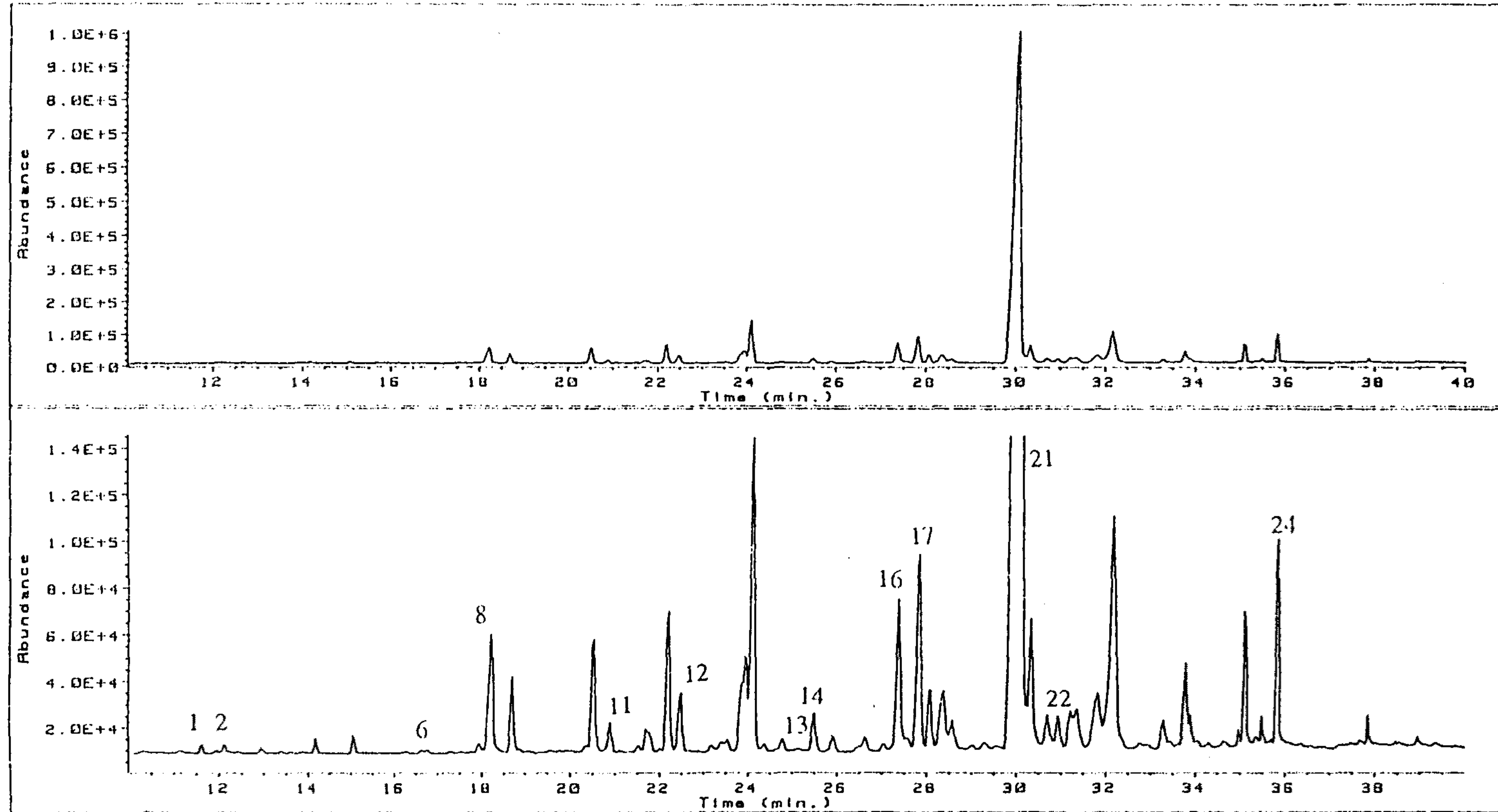


Figure 8-3. Urinary Steroid Profile of a Patient with 17α - Hydroxylase Deficiency(pre-ACTH)

Table 6. Concentration of Urinary Steroids in a Patient (pre-ACTH, post- ACTH) with 17 α -hydroxylase Deficiency.

Compounds	Normal Female (1,600ml/24hr)	Pre-ACTH (1,660ml/24hr)	Post-ACTH (2,600ml/24hr)
Androsterone	0.466(745.0)	0.017(28.2)	0.089(231.4)
Etiocolanolone	0.400(640.0)	0.016(26.5)	0.068(176.8)
DHEA	0.129(206.0)	N.D.	N.D.
11-Keto An	N.D.	N.D.	N.D.
Androstenedione	N.D.	N.D.	N.D.
11-Keto Et.	0.024(38.4)	0.143(237.3)	0.055(143.0)
11 β -OH An.	0.208(332.8)	N.D.	0.038(98.8)
11 β -OH Et.	0.010(16.0)	0.440(730.4)	0.163(423.8)
Pregnenolone	N.D.	N.D.	N.D.
Progesterone	N.D.	N.D.	N.D.
Pregnanediol	0.277(443.2)	0.259(429.9)	0.170(442.0)
Pregnenediol	N.D.	0.171(283.8)	0.256(665.6)
Pregnanetriol	0.106(169.6)	0.010(16.6)	0.021(54.6)
THDOC	N.D.	0.060(99.6)	0.047(122.2)
THS	0.014(22.4)	N.D.	N.D.
16-Pregnenetriol	N.D.	0.300(498.0)	0.177(460.2)
THA	0.01(16.0)	0.503(834.9)	0.261(678.6)
THE	0.692(1107.2)	N.D.	N.D.
THF	0.583(932.0)	N.D.	N.D.
5 α -THF	0.670(1072.0)	N.D.	N.D.
5 α -THB	0.006(9.6)	2.080(3452.8)	1.030(2678.0)
Cholesterol	0.024(38.4)	0.311(516.2)	0.015(39.0)
Prednisolone	N.D.	N.D.	N.D.

() : $\mu\text{g}/24\text{hr}$

N.D. : Not detected

All concentration values are in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

17 α -hydroxylase deficiency인것을 알수 있었다. 또한, 환자의 뇨시료를 Selected Ion Monitoring Mode로 injection 할때보다 더 농축하여서 scan mode로 injection하였다. 뇨시료에는 알려지지 않은 많은 steroid hormone계 화합물이 많이 포함되어 있기 때문에 scan data를 얻고자 하였다. 앞서, 예측한대로 각 뇨 스테로이드 호르몬의 scan data와 표준 스테로이드 호르몬과 비교분석한 결과 17 α -hydroxy moiety를 가진 것은 발견되지 않았고, 16, 21, 20번 위치에 hydroxy moiety를 가진 것이 정상인과 비교해 볼때 증가된 양으로 배설됨을 알수 있었다. 따라서, 본 시료의 환자는 pregnenolone에서 17-hydroxypregnenolone으로 진행되어야 하는 과정에서 17 α -hydroxylase의 결핍이 일어났기 때문에 progesterone으로 체내 대사가 진행되어, corticosterone계인 THB, THDOC를 다량 생성하게 되는 것이다. 만약, 비색법이라든지, RIA로 분석할 경우에는 profiling에 의한 정량이 가능하지 않음으로 효소결핍증을 판단하는데 오류를 범하게 된다. 이렇게 설정된 Profiling으로 여러개의 내인성물질을 정량하게 되면, 희귀하고, 흔하지 않은 질환이지만 정확한 효소결핍을 판단할수 있으므로, 진단을 하는데 좋은 자료로 이용될수 있으리라 생각된다.

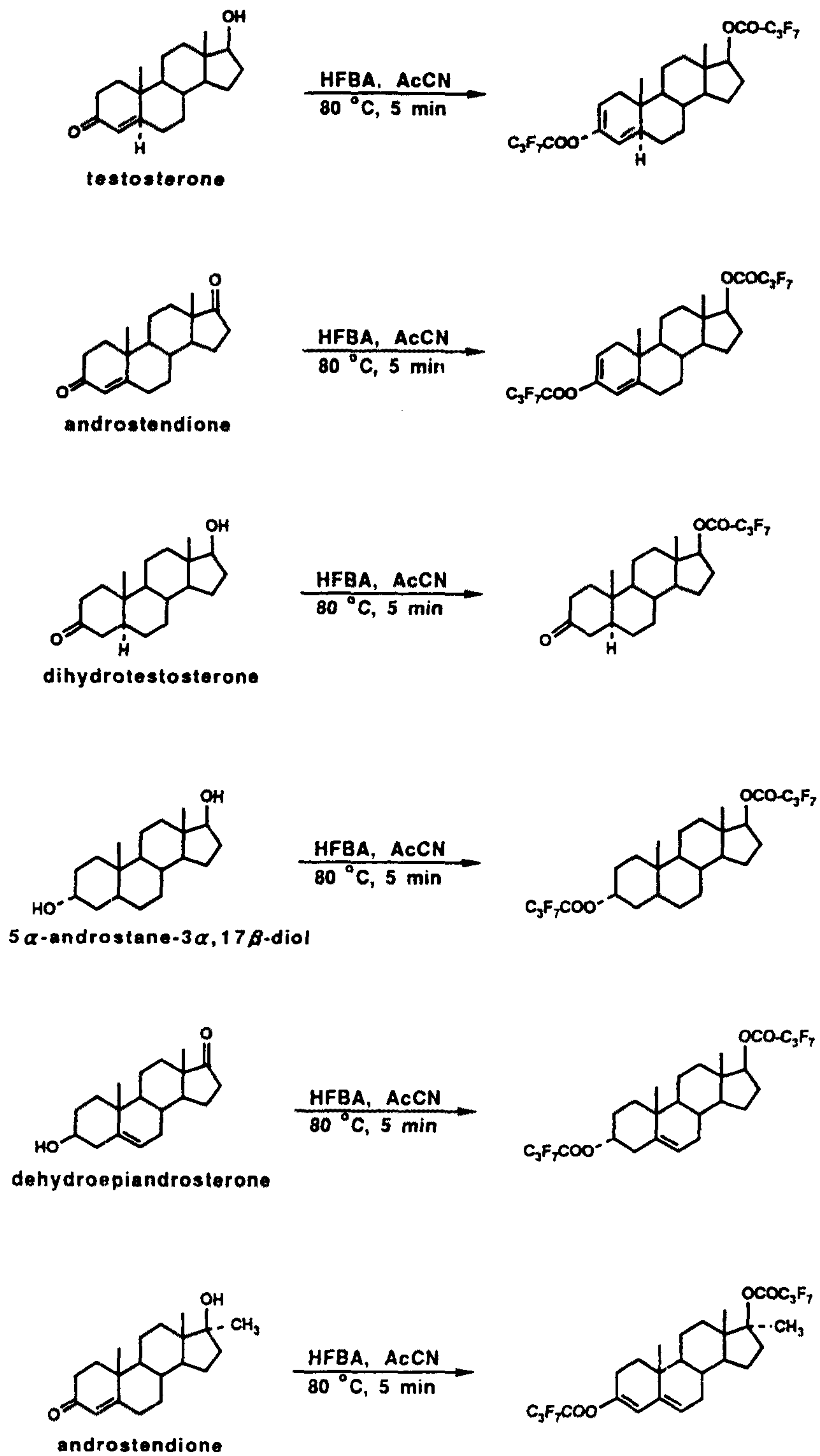
제 4절. Plasma Androgen의 정량

남성의 생식기능에 중요한 6가지 기초적 androgen은 5α -androstan- 3α , 17β -diol, epitestosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, dihydrotestosterone, testosterone이다. 양적인 면으로 볼때 가장 중요한 androgen은 testosterone을 들수 있다. Testosterone의 95% 이상은 testis의 레이다히 세포에 의해 분비되며, 그 나머지가 부신에서 나온다. Testosterone 이외에도 testis는 강력한 androgen인 dihydrotestosterone(DHT)와 약한 androgen인 dehydroepiandrosterone(DHEA) 및 androstenedione을 소량분비한다. 혈액중 androgen은 유리상태 또는 혈청단백질에 결합된 상태로 존재한다. 또한 대부분의 혈중 testosterone은 주로 간에서 androsterone 및 etiocholanolone와 같은 대사물로 전환되어 glucuronic acid 및 sulfuric acid에 의해 conjugation된후, 17-ketosteroid된 형태로 뇨로 배설된다. 대부분의 androgen target cell내에서 testosterone은 microsome 효소인 5α -reductase에 의해 좀더 강력한 남성 호르몬인 DHT로 전환된다.

따라서, 이들 androgen은 태아발생중 남성 내부 및 외부 생식기의 적절한 분화를 위해 필수적이며, 사춘기에는 음낭, 정낭, 전립선의 성장이 일어난다. 본 연구에서는 이러한 작용을 가진 6가지 androgen의 양을 혈액내에서 측정함으로써 남성 생식선기능 저하증, androgen 작용이상등의 판단자료로 이용하고자 한다. 이들 androgen은 혈액내에 미량으로 존재하기 때문에 적은양이라도 유도체화 반응이 잘 일어나는 heptafluorobutyric anhydride를 사용하였다(Table 7).

Androstenedione은 Figure 9에서 나타난 바와 같이 그 분자량이 286이고 2개의 ketone moiety에 2개의 C_3F_7CO 의 유도체가 형성되어 C_3F_7COO 기가 떨어져 얻어진 특성이온이 482 이온이다. Testosterone은 분자량이 288에 한개의 ketone과 한개의 hydroxy에 2개의 C_3F_7CO 가 유도체되어 $680(M^+)$ 가 특성이온으로 결정되었다. 위와같은 조건을 토대로 하여 정상 성인 남자 20명의 plasma에서 6가지 androgen을 정량하였다. 정량한 값은 Table 8과 같다.

이들 시료의 20-30세의 건강한 남자로서 가장 강력한 androgen인 DHEA의 경우 $0.02-5.60 \mu g/ml$ 을 나타내고 testosterone은 $0.26-4.01 \mu g/ml$ 을 나타내었다. 또한, plasma를 전처리한후, GC/MS에 injection하여 얻어진 data를 한눈에 알아볼수 있게 하기 위하여 Figure 10과 같이 macro program을 사용하여 나타내었다. 이 program은 내부 표준물질인 methyltestosterone의 retention time의 상대적인 시간을 기준으로 하여 window 설정을 하였으므로, 생체시료내의 다른 간섭물질을 최대한 피하고자 노력하였다.



Scheme 4. Derivatization of Plasma Androgens with Heptafluorobutyric anhydride.

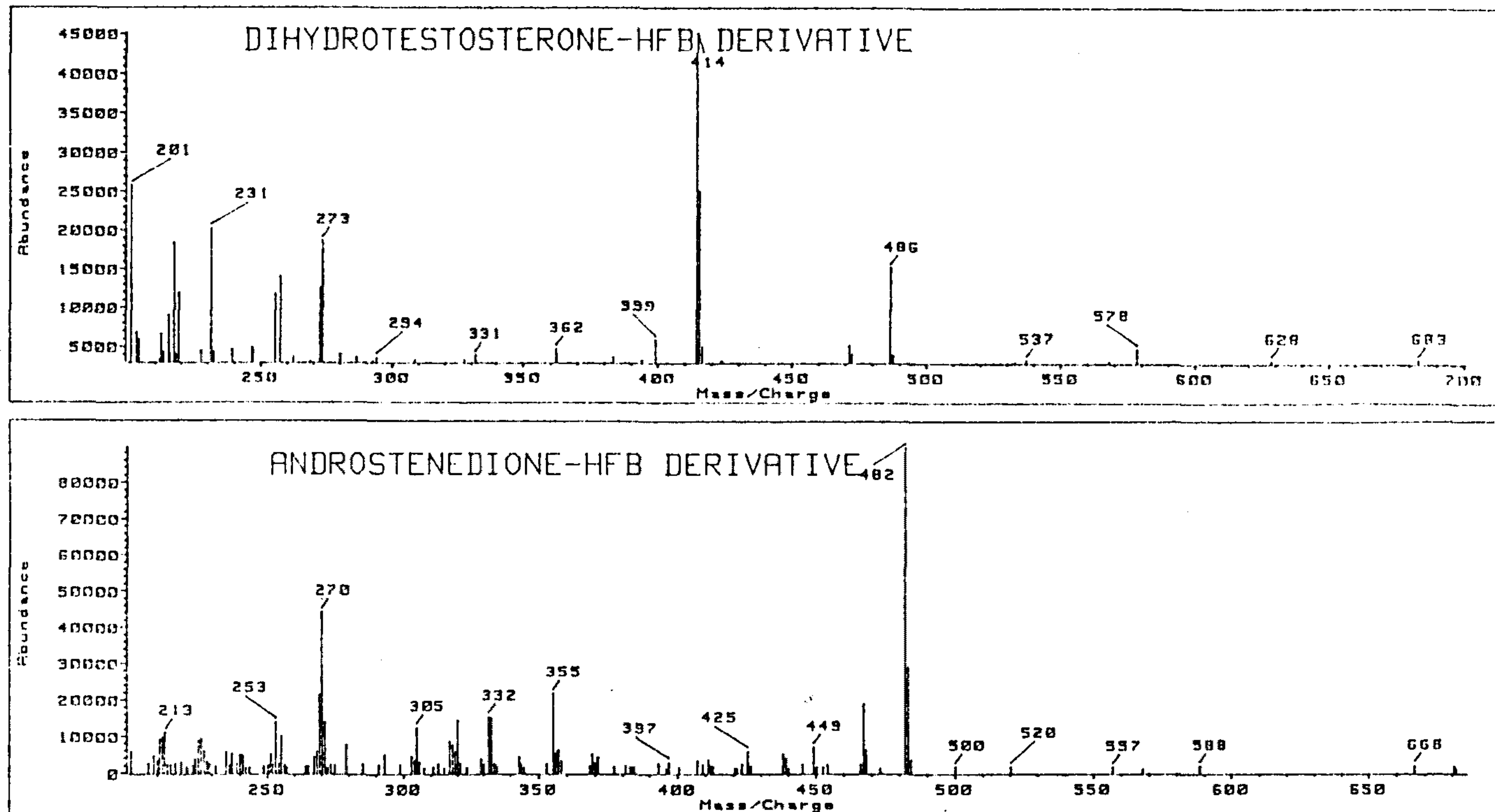


Figure 9-1 Mass Spectra of HFB-Derivatized Dihydrotestosterone and Androstenedione

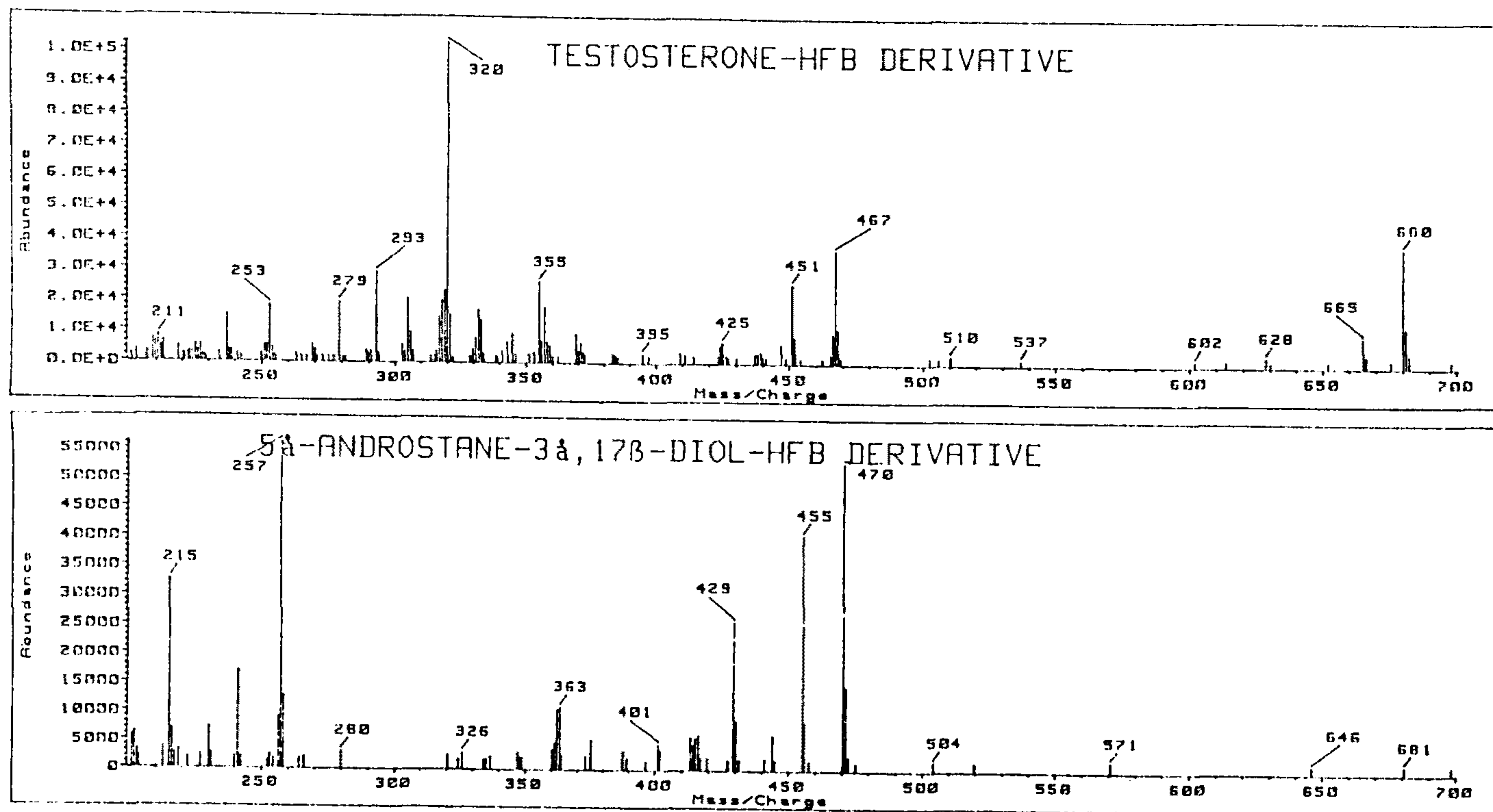


Figure 9-2. Mass Spectra of HFB-Derivatized Testosterone and 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol

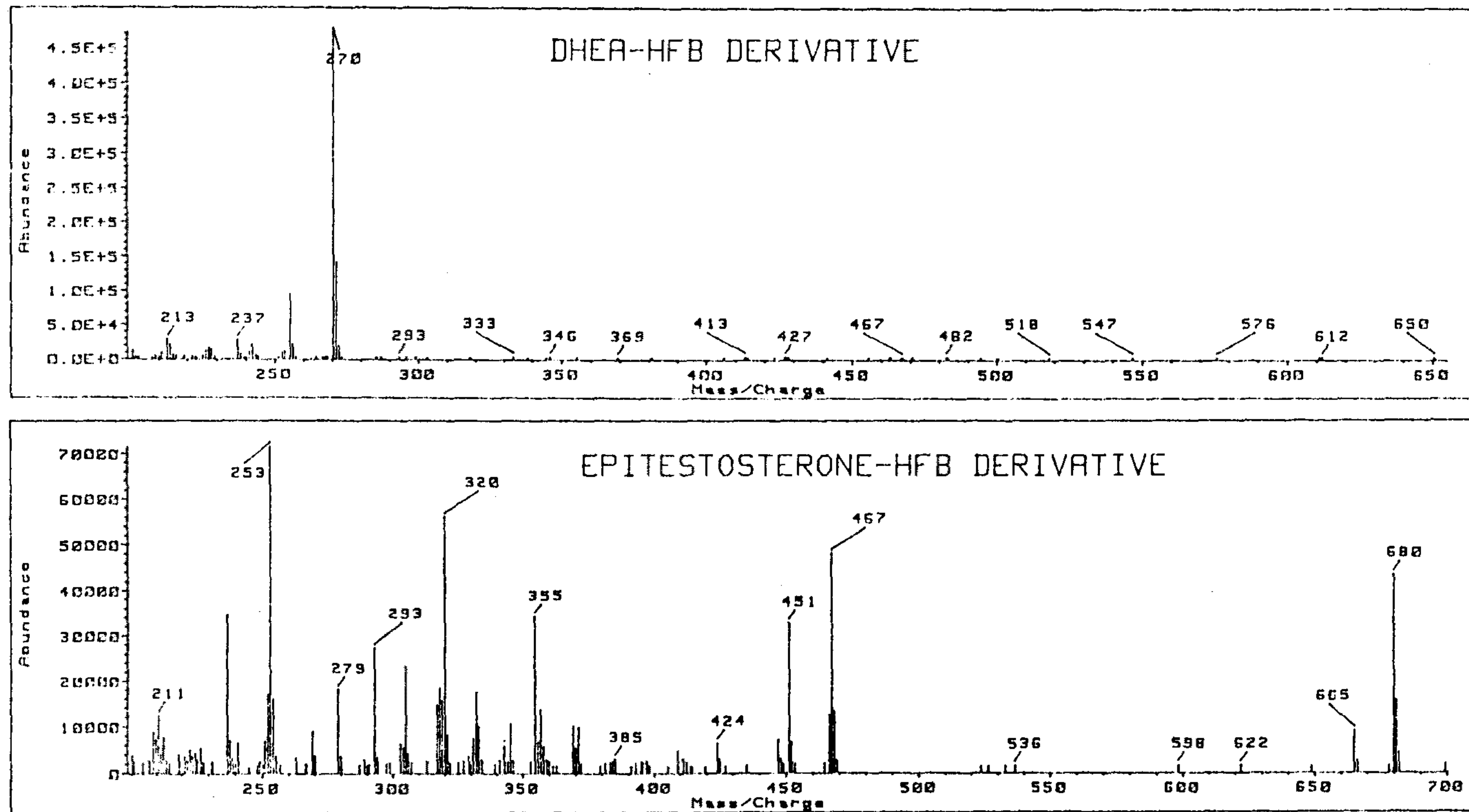


Figure 9-3. Mass Spectra of HFB-Derivatized DHEA and Epitestosterone.

Table 7. Relative Retention Time and Characteristic Ions for Detection of Plasma Androgens.

Compounds	M.W.	Selected Ion (HFB derivative)	Relative R.T.
Methyltestosterone (I.S.)	302	480	1.000
5 α -androstane-3 α , 17 β -diol	292	470	1.151
Epitestosterone	288	680	1.175
Androstendione	286	482	1.258
DHEA	288	270	1.264
Testosterone	288	680	1.175
DHT	290	414	1.335

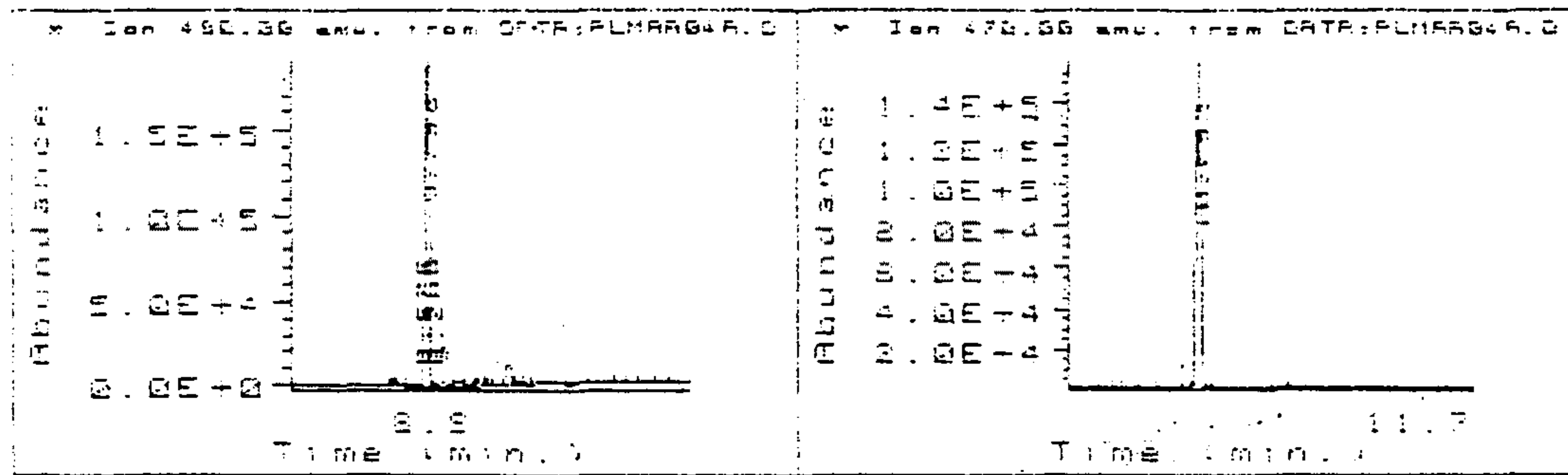
Table 8. Concentration of Plasma Androgens in Normal Male

Plasma Androgens	Range (n=20)
5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol	0.09 - 1.618
Epitestosterone	0.08 - 0.83
Dehydroepiandrosterone	0.02 - 5.60
Androstenedione	0.01 - 0.65
Testosterone	0.26 - 4.01
Dihydrotestosterone	0.04 - 4.97

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

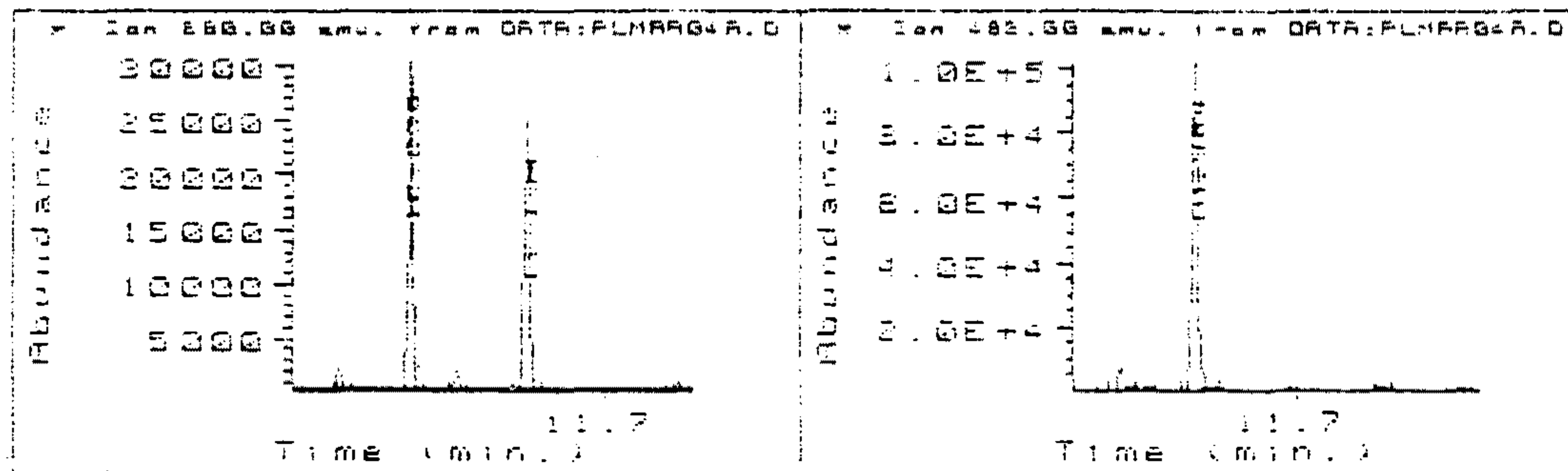
TESTOST 1970

5 α -ANDROSTANE-3 α ,17 β -DIOL



EPITESTOSTERONE TESTOSTERONE

ANDROSTENEDIONE



DIH

DIHYDROTESTOSTERONE

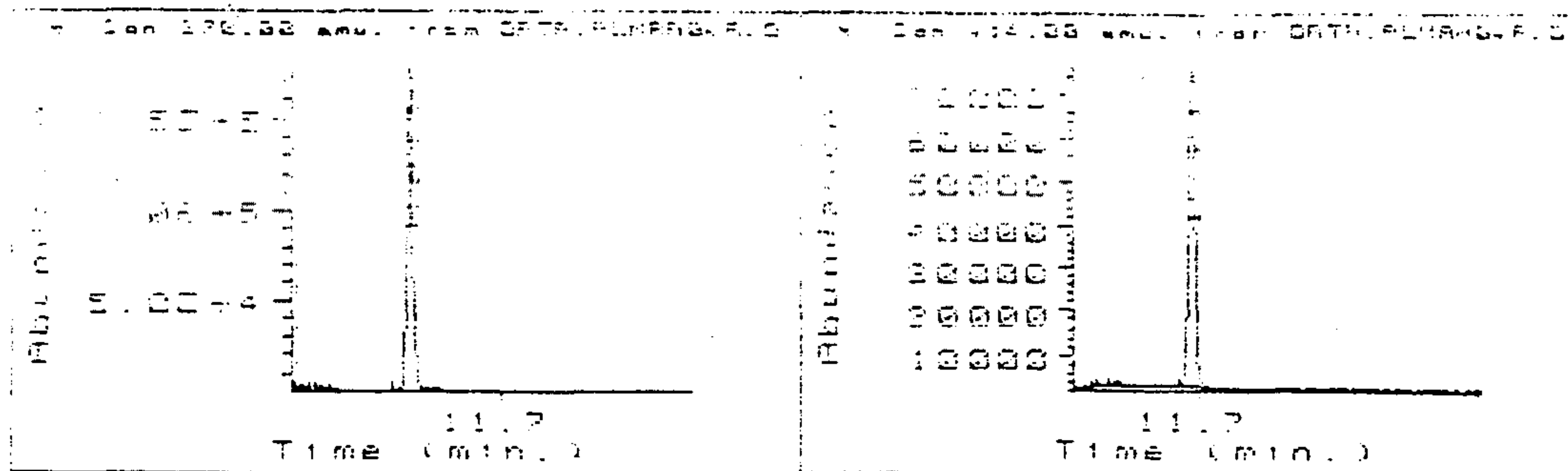


Figure 10. SIM Chromatograms of HFB-Derivatized Androgen by Macro Program.

```

NAME RTN
  N=1
  CHR 20.5:21.5, 394
  ITH=14
  SM
  INT
  WHILE NPEAKS<=0 DO
  ITH=1 TH-N
  SM
  TH ITH, 0
  INT
  N=N+1
  ENDWHILE
  GETS
  A=XHIGH
  STI=A
  RTS=STI
  STARTSET
  PLASMSIM
  NAME PLASMSIM
  ACT=ACT + 1
  RTW=1.5
  IF ACT=1 THEN
  PRINT
  WRITELN 701, STI(ISTD)           5  $\alpha$ -ANDRSTANE-3  $\alpha$ ,17  $\beta$ -DIOL
  RT1=RTS*1.000
  RT2=RTS*0.494
  ITH=10
  I01=394
  I02=470
  DRAW2
  ENDIF

```

Table 9-2. Macro Program for Plasma Androgen.

```

IF ACT=2 THEN
  PRINT
  WRITELN 701, EPITESTOSTERONE          ANDROSTENEDIONE
  RT1=RTS*0.505
  RT2=RTS*0.542
  ITH=10
  I01=680
  I02=482
  DRAW2
  ENDIF
IF ACT=3 THEN
  PRINT
  WRITELN 701, DHEA                     TESTOSTERONE
  RT1=RTS*0.545
  RT2=RTS*0.550
  ITH=10
  I01=270
  I02=680
  DRAW2
  ENDIF
IF ACT=4 THEN
  PRINT
  WRITELN 701, DIHYDROTESTOSTERONE
  RT1=RTS*0.575
  I01=414
  DRAW2
  ENDIF
  ENDSET
  QUIT
  NAME DRAW2
  TH ITH, 0

```

Table 9-2. Macro Program for Plasma Androgen. Continued.

```
WI 1, 0:0.5, 0.5:1
WI 2, 0.5:1, 0.5:1
CHR RT1-RTW:RT1+RTW, IO1
SM
INT
DRAW 1, Y
DRAW 2, X
SCREENP 550, 320
TAB RES, "#6:", Y
TAB RES, "#6:", X
PLASMSIM
NAME GO
TAB HE, "#6:"
ACT=0
RTN
```

Table 9-2. Macro Program for Plasma Androgen. Continued.

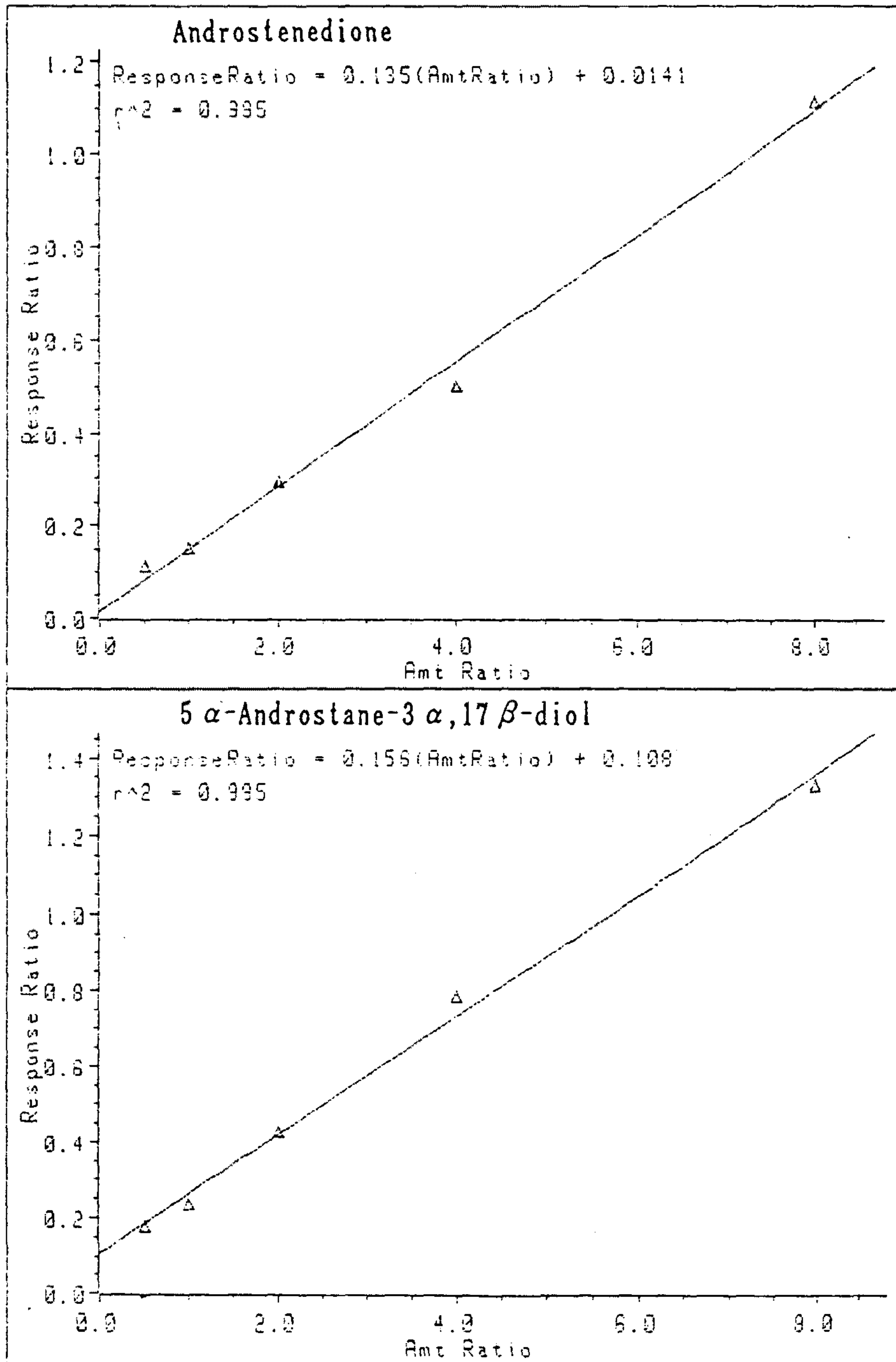


Figure 11-1. Calibration Curves of Standard Androgen for Quantitation

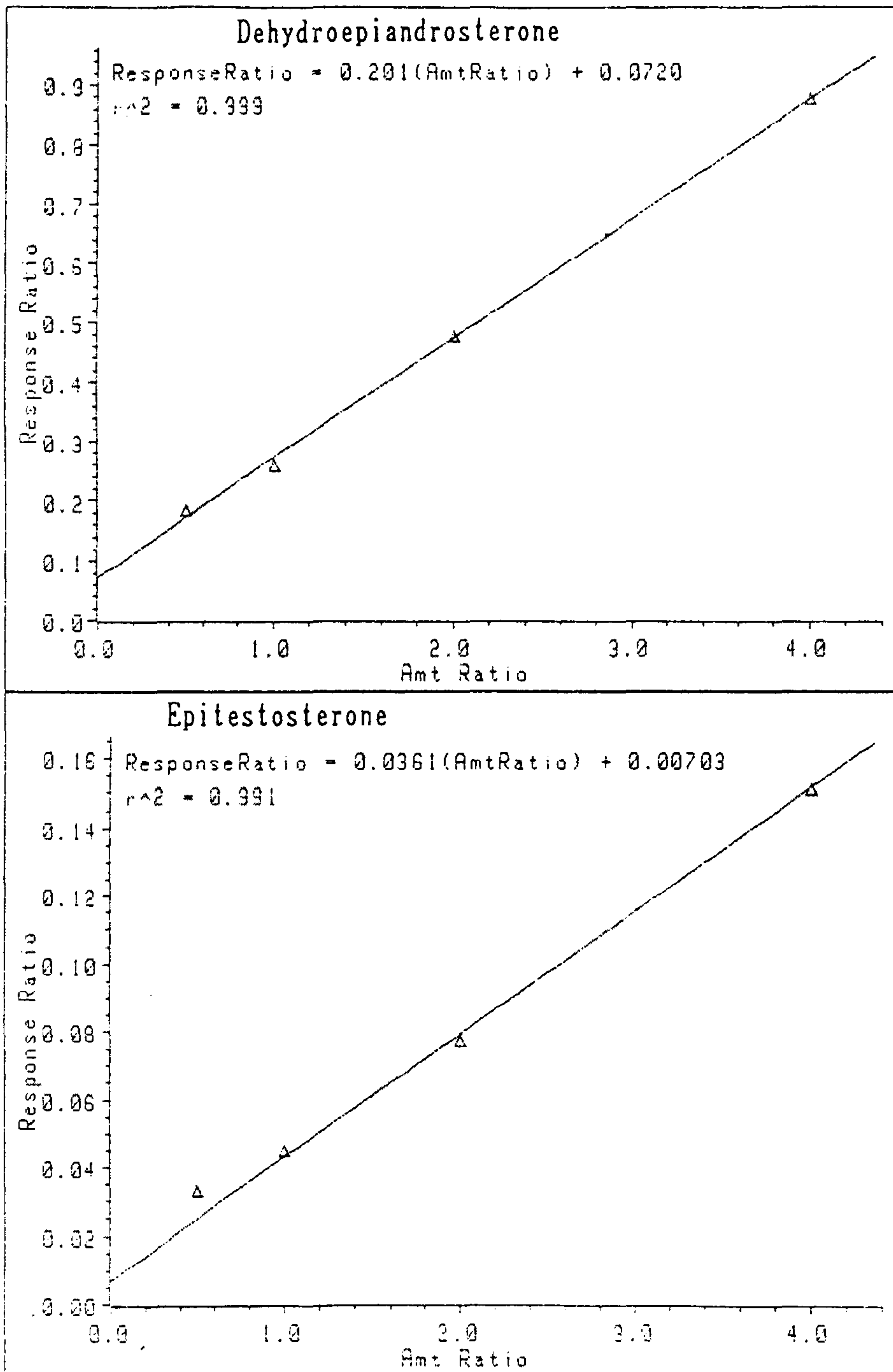


Figure 11-2. Calibration Curves of Standard Androgen for Quantitation

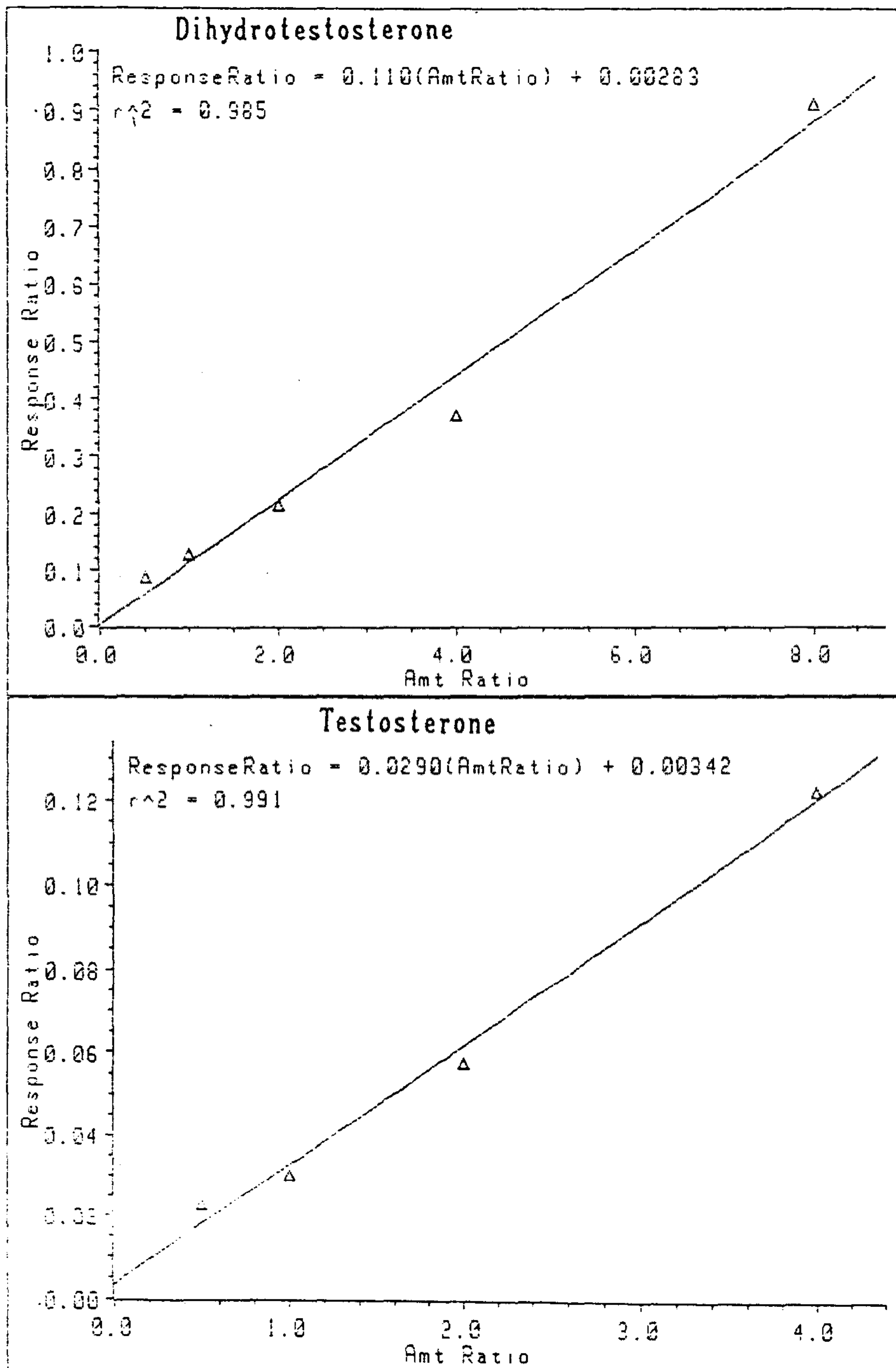


Figure 11-3. Calibration Curves of Standard Androgen for Quantitation

제 5장 결론

본 보고서에서는 androsterone, etiocholanolone, dehydroepiandrosterone, 11-keto an, 11-keto an, 11-keto et, 11 β -OH an, pregnenolone, 11 β -OH et, progesterone, pregnanediol, pregnenediol, pregnanetriol, 16-pregnenetriol, THS, THE, 5 α -THB, THF, 5 α -THF, cholesterol, prednisolone, cortol, β -cortol, cortolone, β -cortolone, THA, THDOC, 5-androstene-3 β ,16 α ,17 β -triol(5-AT)의 생체시료에서의 정량분석 조건을 설정하였다. 내인성 스테로이드 호르몬이외에도 내분비이상 및 신장기능이상등의 치료제로 쓰이는 prednisolone의 경우에도 함께 분석할수 있도록 온도조건 및 특성이온을 선정하여 분석조건을 설립하였다.

위에서 열거한 스테로이드 호르몬중에서 THA, THDOC, Cortol, β -cortol, cortolone, β -cortoloe, 5-AT는 추가된 화합물로서, 이들중 THA, THDOC는 17 α -hydroxy moiety를 갖지 않기 때문에 17 α -hydroxy deficiency인 경우 과량 배설된다. 따라서, 17 α -hydroxy deficiency를 진단할 경우 유용한 표지가 된다. 또한, cortolic acid의 일종인 cortol, β -cortol, cortolone, β -cortolone은 현재, 이들의 생체내 역할은 많이 알려져 있지는 않지만, 정량분석 조건을 설립해 놓음으로써 앞으로 이 자료로 응용할수 있는 생체내 이상상태를 찾아보고자 시도하였다.

부신피질자극 호르몬의 만성적인 자극에 의해 일어나는 질환의 일종인 Cushing's syndrome의 치료전, 치료후의 urinary steroid profiling을 비교해 봄으로 Cushing's syndrome의 여러 pattern을 조기에 판단할 수 있는 자료 및 치료중의 상태를 가늠할 수 있도록 하였다. 효소결핍으로 인한 스테로이드 호르몬 질환의 진단시 종래의 생화학적 검사는 비색법, RIA등의 방법으로 17-ketosteroid group, 17-hydroxycorticosteoid group등을 측정하게 되므로 개개의 스테로이드 호르몬의 정량 및 정성이 불가능하다. 따라서, 어느 효소의 결핍으로 인한 질환인지 판단이 불분명하다. 그러나, urinary steroid profiling을 이용할 경우, 각각의 물질을 정량분석함으로써 확실하게 판단할수 있다. 스테로이드 호르몬의 효소결핍으로 인한 질환이 의심되는 환자의 urinary steroid profiling을 알아본 결과 17 α -hydroxy moiety를 갖는 steroid는 거의 발견되지 않고, THA, THDOC, 5 α -THB, 16-pregnenetriol등 16 α -hydroxy moiety를 갖는 스테로이드들이 정상인보다 과량으로 발견됨으로 17 α -hydroxylase deficiency임을 판단할 수 있었다.

남성의 생식기능에 중요한 역할을 하는 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, epitestosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, dihydrotestosterone, testosterone을 plasma에서의 정량분석 조건을 설립 하였다. Plasma에는 이들 androgen이 극미량 존재하기 때문에 시료 전처리 및 GC/MS에 주입하기 위한 유도체 과정을 설립하는데 많은 어려움이 따른다. 따라서 본 연구에서는 정상성인 남자에서 6가지 plasma androgen을 정량함으로써, 남성, 생선선기능저하증, 또는 androgen 작용이상등의 판단자료로 이용하고자 하였다.

생체시료에서의 내인성물질을 분석하는 것이기 때문에 시료전처리 및 조건설립 과정에서 수많은 실패와 함께 어려움이 있다. 이러한, 과정을 통하여 각 생체시료의 형태(뇨, 혈액)에 따라서 조건을 설정해 놓음으로, 스테로이드 대사와 관련이 있는 내분비질환 및 개체별 건강상태 뿐만 아니라, 생체시료내의 새로운 내인성물질 발견등에도 지대한 공헌을 하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. 민헌기, 임상내분비학, 고려의학, (1990).
2. Mac E. Hardley, Endocrinology, Prentice-Hall, (1988).
3. J.D. Wilson and D.W. Foster, Textbook of Endocrinology(8th Ed.), Saunders College Publishing(1992).
4. A. Despopoulos and S. Silbernagl, Color Atlas of Physiology(3rd Ed.), Georg Thime Verleg.(1986).
5. J.W. Honour, J.M. Anderson and C.H.L. Shackleton, Acta Endocriol., 103(1983) 101.
6. M. Zachmann, D. Tassinari and A. Prader, J. Clin. Endocrinol. Metab. 56(1983) 222.
7. A. Glent ϕ j, M.D. Nielson and J. Starup, Acta Endocrinol., 93(1980) 94.
8. P.V. Fennessey, P.G. Marsh, E.R. Orr, P. Burnstein and G. Betz, Clin. Chim, Acta., 129(1983) 3.
9. H.J. Dean, C.H.L. Shackleton and J.S.D. Winter, J. Clin. Endocrinol. Metab., 59(1984) 513.
10. J.W. Honour, J. Tourniaire, E.G. Biglieri and C.H.L. Shackleton, J. Steroid Biochem., 9(1978) 495.
11. C.H.L. Shakleton, E. Roitman, C. Monder, and H.L. Bradlow, Steroids, 36(1980) 289.

12. R. Horton, D. Hawks and R. Lobo, *J. Clin. Invest.* 69(1982) 1203.
13. N. Greep, M. Hoopes and R. Horton *J. Clin. Endocri. Meta.* 62(1985) 22
14. A. Gompel, F. Wright, F. Kuttenn and P.M. Jarvis, *J. Clin. Endocri. Meta.* 62(1985) 441.
15. H. Ueshiba, M. Segawa, T. Hayashi Y. Miyachi, and M. Irie, *Clin. Chem.* 37(1991) 1329.
16. C.H.L. Shackleton, *J. Chromatogr.*, 379(1986) 91.
17. K. Shimizu, T. hara, N. Yamaga and H. Kohara, *J. Chromatogr.*, 432(1988) 21.
18. M. Fenske and H. Schonheiter, *J. Chromatogr.* 563(1991) 178.
19. M. Axelson, B.L. Sahlberg and J. Sjoval, *J. Chromagr.*, 224, 355(1981).
20. C.D. Pfaffenberger and E.C. Horning, *J. Chromagr.*, 112, 581(1975).
21. Giacarlo Severini, L. Malaguti and R. Giovannan, *J. Chromagr.*, 563, 147(1991).
22. M. Fenske and H. Schonheiter, *J. Chromagr.*, 563, 178(1991).
23. P. Pfeifer and G. Spiteller, *J. Chromagr.*, 223, 21(1981).
24. W.G. Sipell, P. Lehmann and G. Hollmann, *J. Chromagr.*, 108, 305(1975).
25. J.A. Luyten and G.A.F.M. Rutten, *J. Chromagr.*, 91, 393(1974).
26. H.C. Curtius, J. Vollmin, M.J. Zagalak and M. Zachmann, *J. Steroid Biochem.*, 6, 677(1975).
27. J. Reiner and G. Spiteller, *Monatsh. Chem.*, 106, 1415(1975).

28. C.H.L. Shackleton and J.W. Honour, *Clin. Chim. Acta*, 69, 267(1976).
29. V. Fant and C.H. Gray, *Clin. Chim. Acta*, 79, 237(1977).
30. W.J.J. Leunissen and J.H.H. Thijssen, *J. Chromagr.*, 146, 365(1978).
31. J.F. Van De Calseyde, R.J.H. Scholtis, N.A. Schmidt and C.J.J.A. leijton, *Clin. Chim. Acta*, 38, 103(1972).
32. George E. Joannou, *J. Steroid Biochem.*, 14, 901(1981).
33. James P. Gutai and A. Kowarski, *J. Pediatrics*, 90, 924(1979).
34. M.G. horning, *Clin. Acta*, 34, 261(1971).
35. C.H.L. Shackleton and J.O. Whitney, *Clin. Chim. Acta*, 107, 231(1980).
36. Alexander M. Lawson, *Clin. Chem.*, 21, 803(1975).
37. Noriko Hirota, Takashi Furuta and Yasuj Kasuya, *J. Chromagr.*, 425, 237(1988).

Appendix

Figure I. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program(Normal Male of age 26 years).

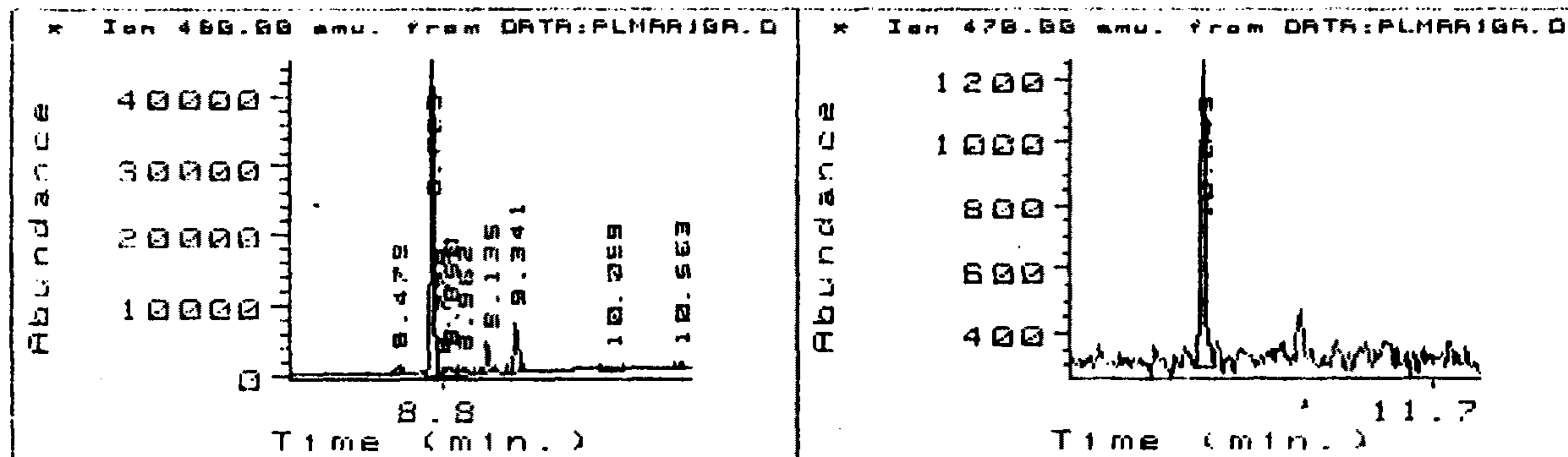
Figure II. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program(Normal Male of age 30 years).

Figure III. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program(Normal Male of age 25 years).

Figure IV. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program(Normal Male of age 22 years).

NETEST (ISTD)

5 α -ANDROSTANE-3 α ,17 β -DIOL



Ion 480.00 amu. from DATA:PLMARA10A.D 9 integration peaks found.

Page 1

103

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	8.479	PV	0.031	20926	8.444	8.510
2	8.729	PV	0.032	882104	8.689	8.766
3	8.779	PV	0.032	15795	8.766	8.810
4	8.850	VV	0.058	54917	8.810	8.922
5	8.962	VV	0.068	38897	8.922	9.045
6	9.135	PV	0.033	89802	9.093	9.182
7	9.341	BV	0.042	169157	9.265	9.399
8	10.059	VV	0.120	36077	9.963	10.128
9	10.563	VBA	0.041	22680	10.513	10.615

Ion 470.00 amu. from DATA:PLMARA10A.D 1 integration peaks found.

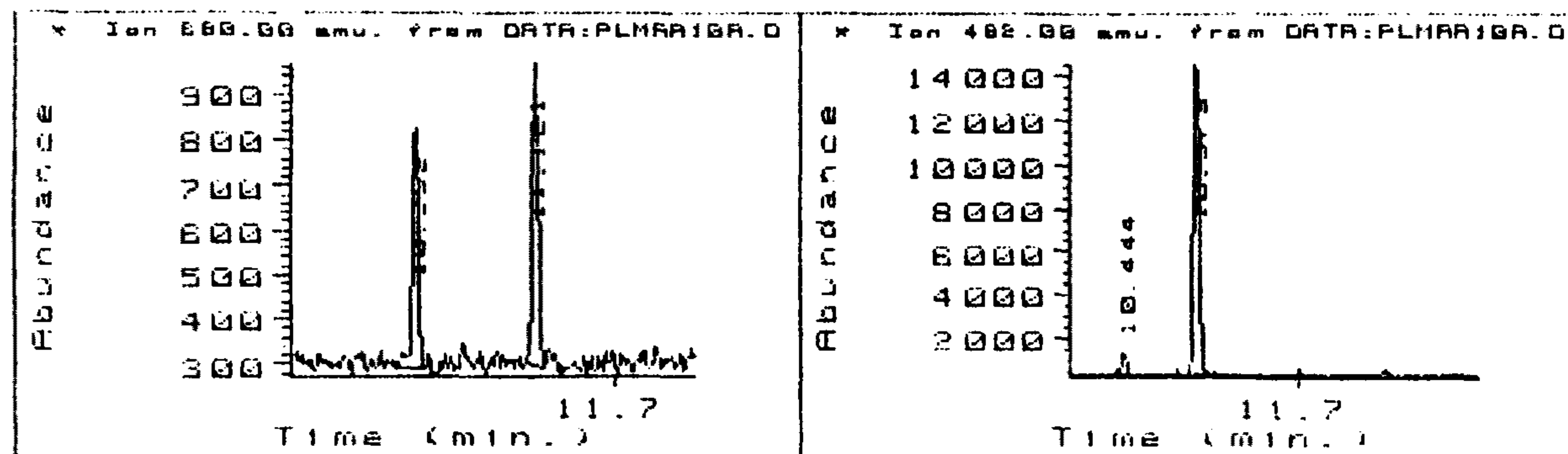
Page 1

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	10.045	BV	0.042	25514	9.983	10.122

Figure I-1. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 26 years).

EPITESTOSTERONE TESTOSTERONE

ANDROSTENEDIONE



Ion 680.00 amu. from DATA:PLMRA10A.D 2 integration peaks found.

Page 1

104

Peak#	Ret. Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	10.252	BV	0.041	15308	10.118	10.316
2	11.121	BV	0.044	18840	11.060	11.183

Ion 482.00 amu. from DATA:PLMRA10A.D 2 integration peaks found.

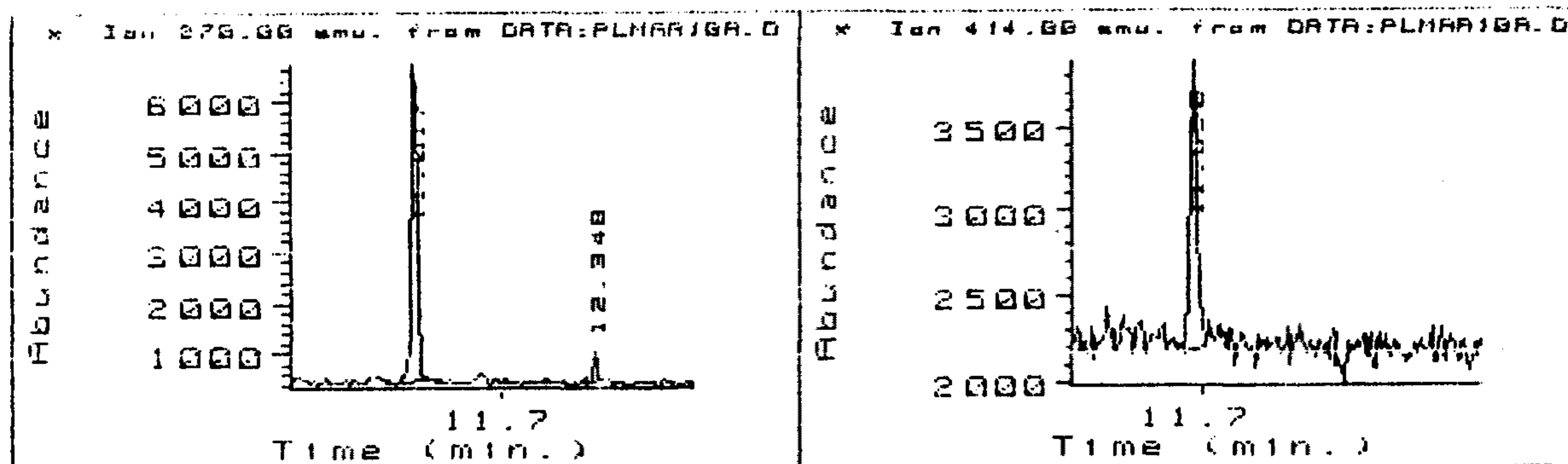
Page 1

Peak#	Ret. Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	10.444	PV	0.044	27324	10.384	10.527
2	10.973	PV	0.045	411253	10.823	11.066

Figure I-2. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 26 years).

DIHEA

DIHYDROTESTOSTERONE



105

Ion 270.00 amu. from DATA:PLMARA10A.D 2 integration peaks found.

Page 1

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	11.017	BV	0.047	185599	10.915	11.102
2	12.348	PV	0.041	14090	12.274	12.398

Ion 414.00 amu. from DATA:PLMARA10A.D 1 integration peaks found.

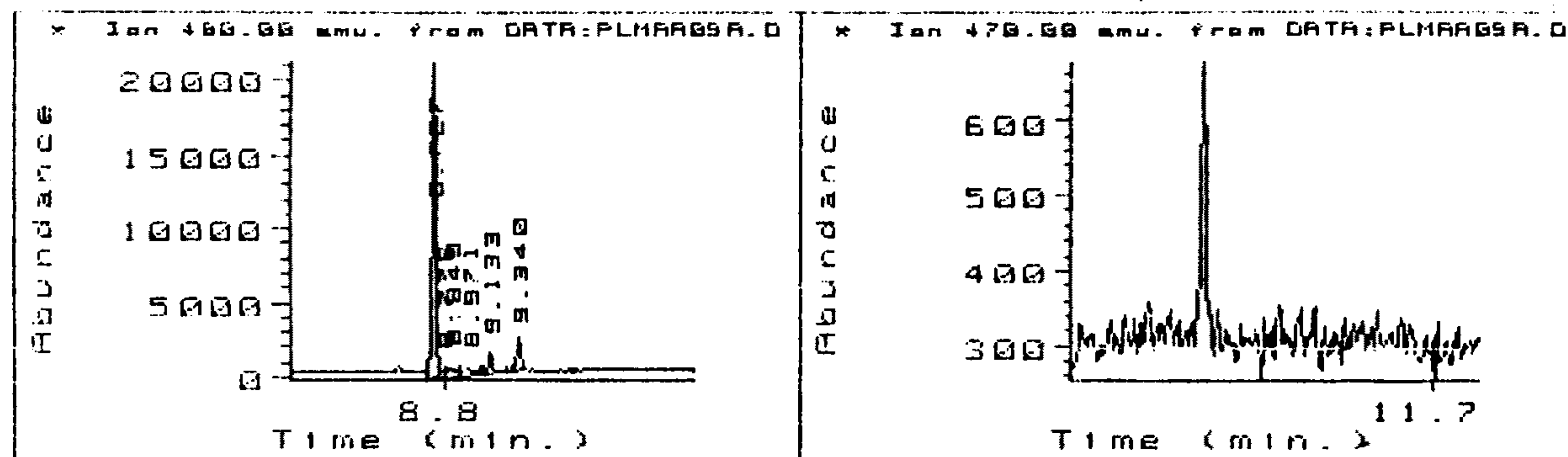
Page 1

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	11.650	PV	0.060	60981	11.576	11.737

Figure I-3. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 26 years).

METEST (1510)

5 α -ANDROSTANE-3 α ,17 β -DIOL



Ion 480.00 amu. from DATA:PLMAA09A.D 6 integration peaks found.

Page 1

901

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	8.727	PV	0.033	400550	8.688	8.766

Ion 480.00 amu. from DATA:PLMAA09A.D 6 integration peaks found.

Page 2

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
2	8.778	UU	0.033	9815	8.766	8.811
3	8.849	UU	0.066	26266	8.811	8.923
4	8.971	UU	0.072	21210	8.923	9.058
5	9.133	UB	0.038	33288	9.092	9.241
6	9.340	BU	0.037	51307	9.290	9.390

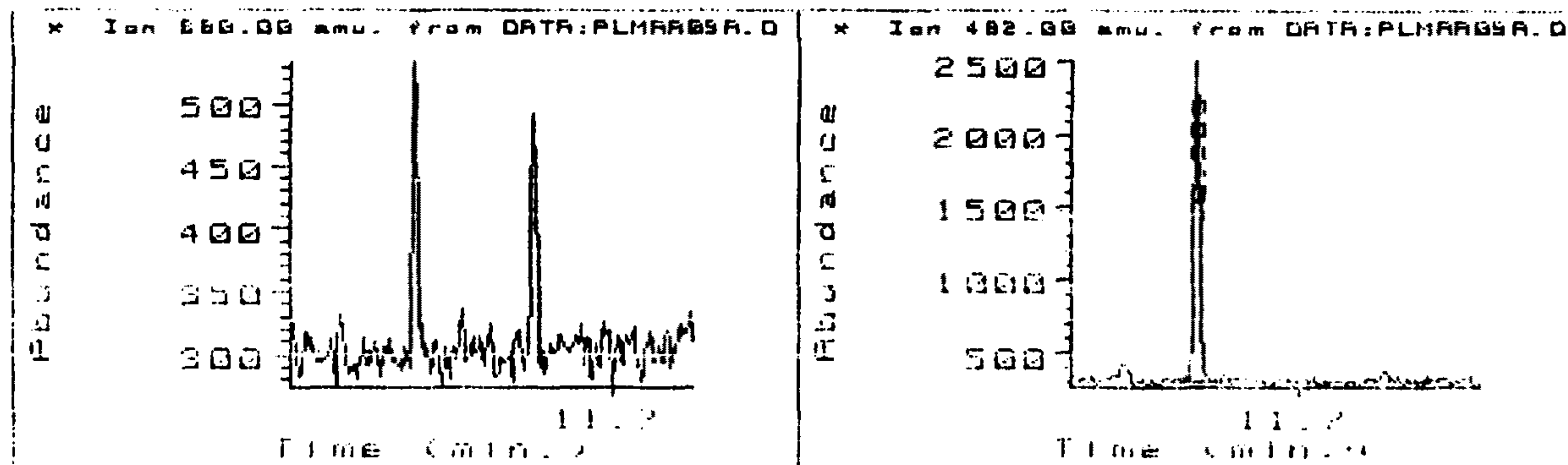
Ion 470.00 amu. from DATA:PLMAA09A.D 0 integration peaks found.

Page 1

Figure II-1. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 30 years).

EPITESTOSTERONE TESTOSTERONE

ANDROSTENEDIONE



Ion 280.00 amu. from DATA:PLMAB09A.D 0 integration peaks found.

Page 1

107

Ion 482.00 amu. from DATA:PLMAB09A.D 1 integration peaks found.

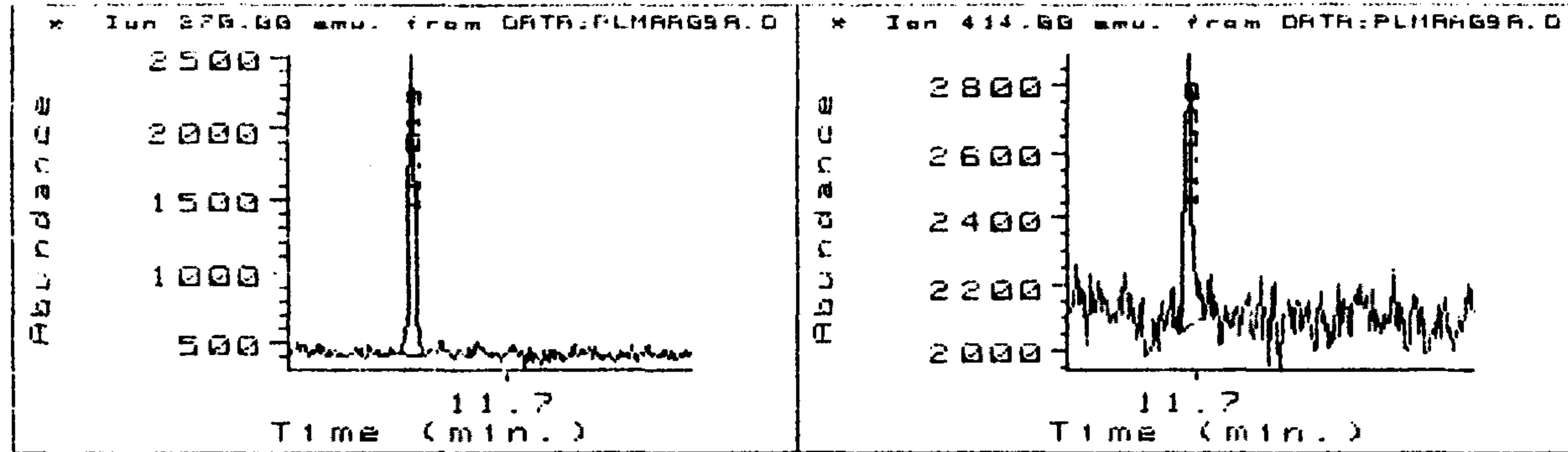
Page 1

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	10.966	BU	0.045	63420	10.873	11.090

Figure II-2. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 30 years).

LIHEA

DIHYDROTESTOSTERONE



Ion 270.00 amu. from DATA:PLMAA09A.D 1 integration peaks found.

Page 1

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	11.015	BV	0.046	61569	10.859	11.113

Ion 414.00 amu. from DATA:PLMAA09A.D 1 integration peaks found.

Page 1

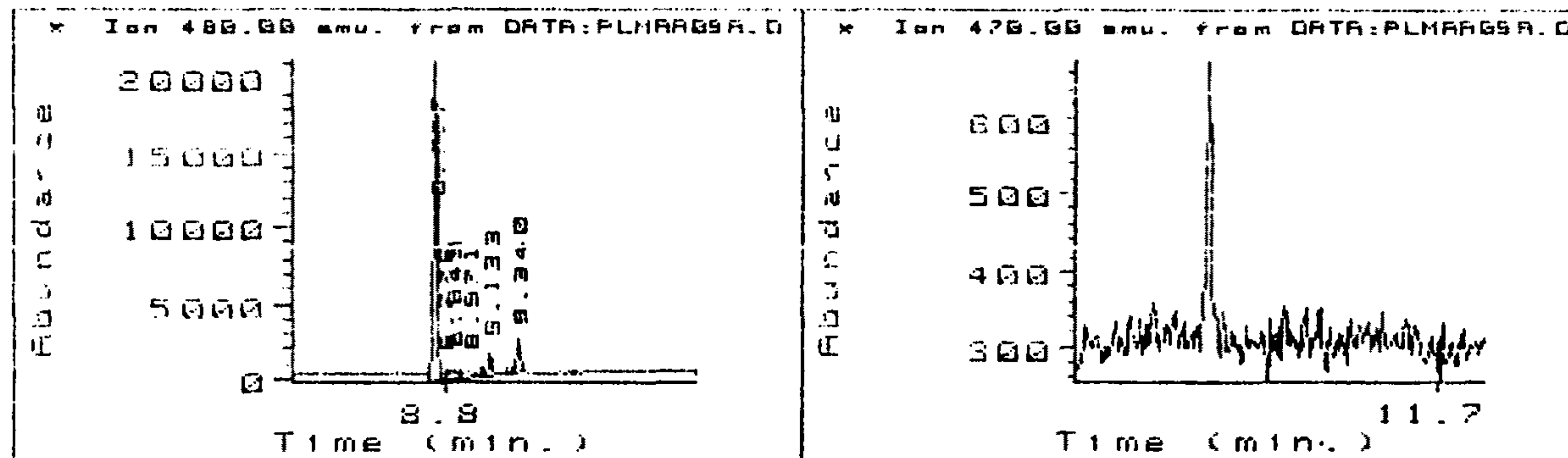
Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	11.650	PV	0.058	30524	11.593	11.725

Figure II-3. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 30 years).

108

METEST(1510)

5 α -ANDROSTANE-3 α ,17 β -DIOL



Ion 480.00 amu. from DATA:PLMAA09A.D 6 integration peaks found.

Page 1

109

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	8.727	PV	0.033	400550	8.688	8.766
2	8.778	UV	0.033	9815	8.766	8.811
3	8.849	UV	0.066	26266	8.811	8.923
4	8.971	UV	0.072	21210	8.923	9.058
5	9.133	UB	0.038	33288	9.092	9.241
6	9.340	BU	0.037	51307	9.290	9.390

Ion 470.00 amu. from DATA:PLMAA09A.D 0 integration peaks found.

Page 1

Figure III-1. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 25 years).

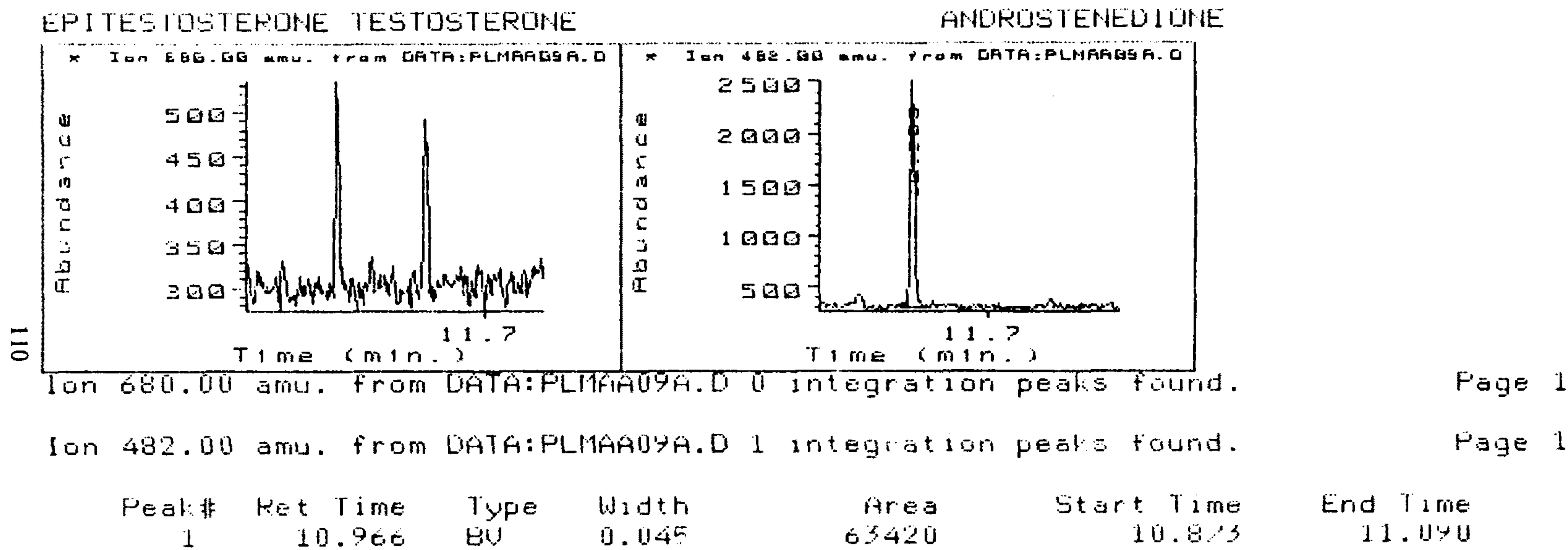


Figure III-2. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 25 years).

LINEA

DIHYDROTESTOSTERONE

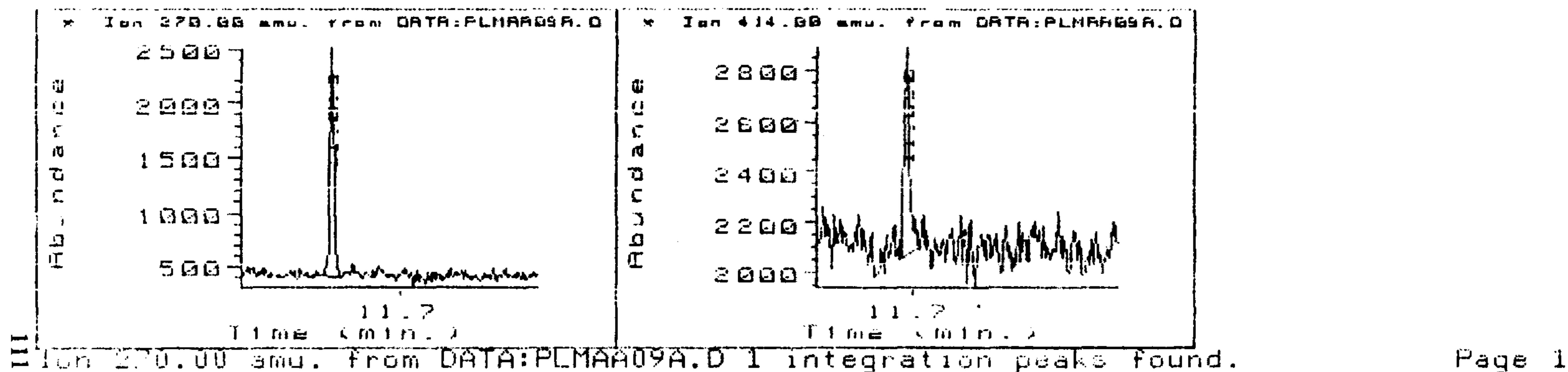
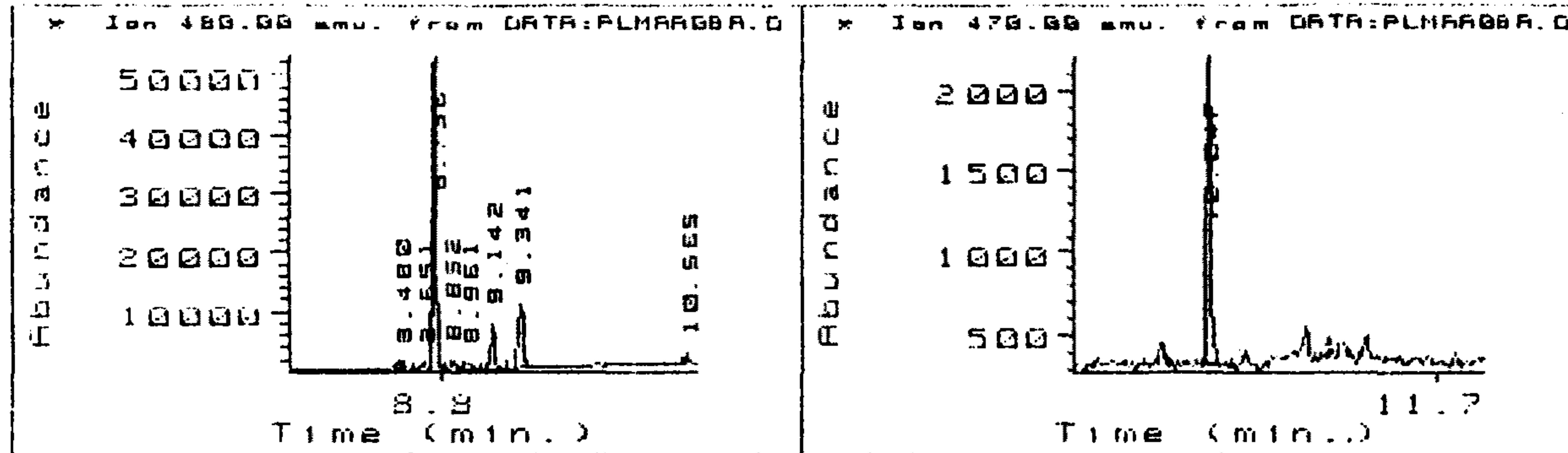


Figure III-3. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 25 years).

NETEST (1510)

5 α -ANDROSTANE-3 α ,17 β -DIOL



Ion 480.00 amu. from DATA:PLMAB08A.D 8 integration peaks found.

Page 1

112

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	8.480	UU	0.034	34159	8.444	8.509
2	8.651	UU	0.045	50471	8.571	8.690
3	8.736	FU	0.031	1087310	8.690	8.813
4	8.852	UU	0.054	65649	8.813	8.925
5	8.961	UU	0.055	45576	8.925	9.047
6	9.142	UU	0.037	177360	9.093	9.242
7	9.341	FU	0.038	268851	9.301	9.400
8	10.565	BBA	0.035	30462	10.514	10.594

Ion 470.00 amu. from DATA:PLMAB08A.D 1 integration peaks found.

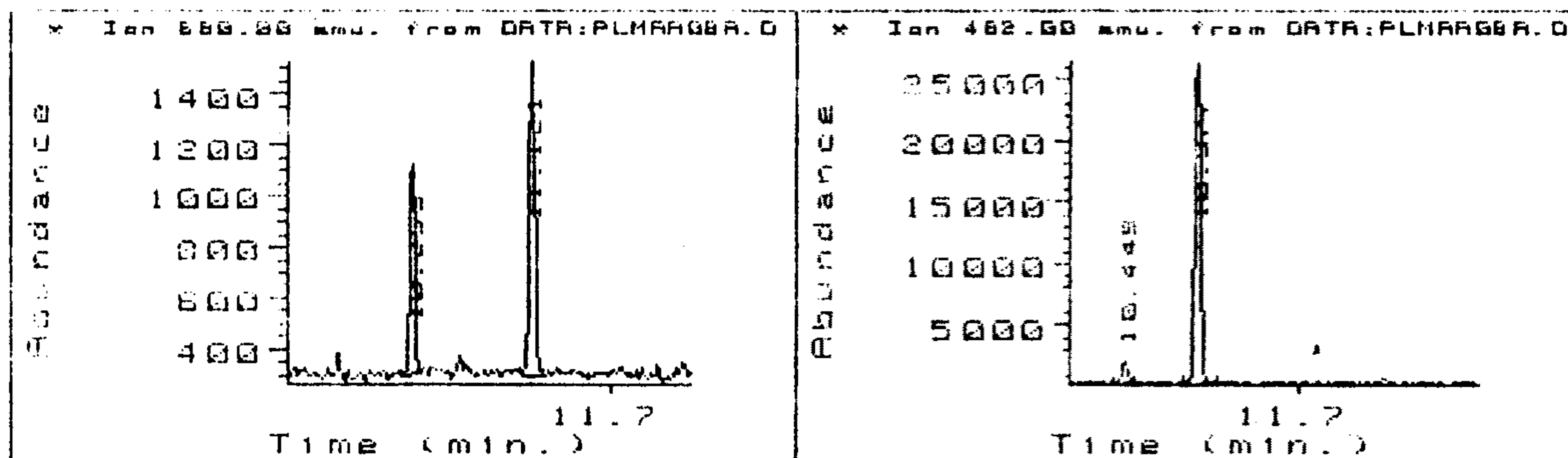
Page 1

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	10.047	BU	0.039	43462	9.995	10.124

Figure IV-1. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 22 years).

EPITESTOSTERONE TESTOSTERONE

ANDROSTENEDIONE



Ion 680.00 amu. from DATA:PLMAA08A.D 2 integration peaks found.

Page 1

113

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	10.253	PV	0.037	20101	10.171	10.307
2	11.121	PB	0.048	36609	11.055	11.228

Ion 482.00 amu. from DATA:PLMAA08A.D 2 integration peaks found.

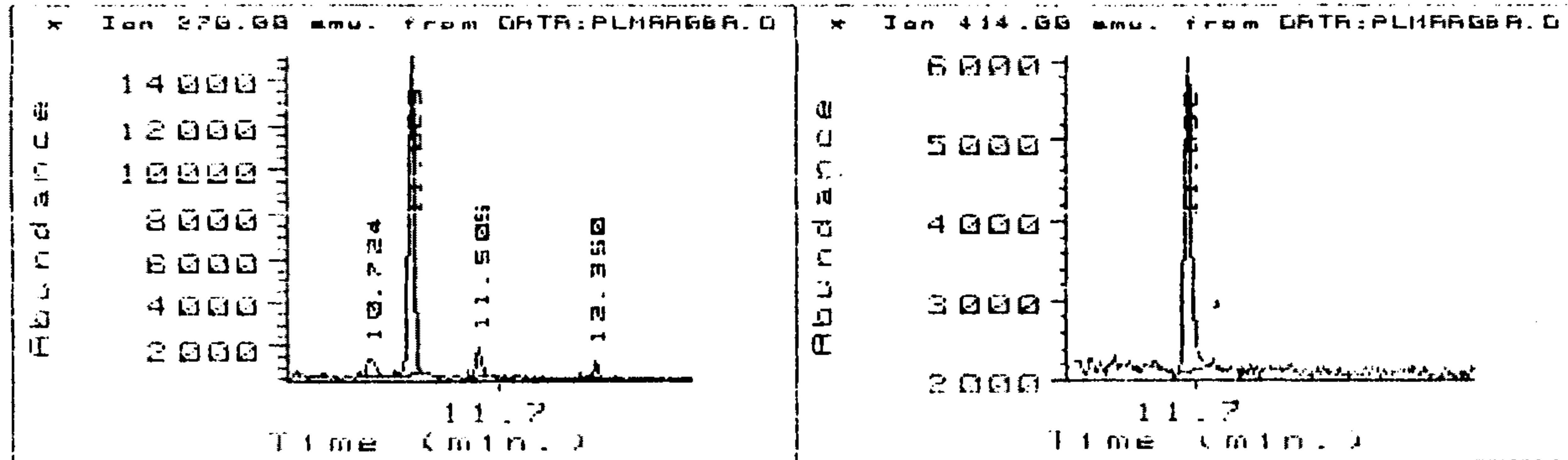
Page 1

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	10.449	PV	0.043	45668	10.329	10.527
2	10.977	UV	0.044	738736	10.879	11.127

Figure IV-2. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 22 years).

DHEA

DIHYDROTESTOSTERONE



Ion 270.00 amu. from DATA:PLM08A.D 4 integration peaks found.

Page 1

114

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	10.724	UV	0.083	46938	10.659	10.896
2	11.025	PV	0.045	420989	10.896	11.101
3	11.505	BV	0.048	44060	11.417	11.576
4	12.350	BV	0.052	17666	12.242	12.453

Ion 414.00, amu. from DATA:PLM08A.D 1 integration peaks found.

Page 1

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	11.652	BV	0.055	135526	11.547	11.817

Figure IV-3. SIM Chromatograms of HFB-derivatized Androgens in Plasma Extract by Macro Program (Normal Male of age 22 years).