

劉銀娥 教授指導

碩士學位 請求論文

가스크로마토그래피/질량분석법을 이용한
finasteride 복용 전후의 남성탈모환자의
혈장과 머리카락 내의 targeted 및 global
대사 프로파일링 연구

2006

誠信女子大學校 大學院

化學科

柳 惠 卿

가스크로마토그래피/질량분석법을 이용한
finasteride 복용 전후의 남성탈모환자의
혈장과 머리카락 내의 targeted 및 global
대사 프로파일링 연구

劉銀娥 教授指導

이 論文을 碩士學位 論文으로 提出함

2005년 11월

誠信女子大學校 大學院

化學科

柳 惠 卿

認 准 書

柳惠卿의 碩士學位 論文으로 認准함

審査委員 _____ 印

審査委員 _____ 印

審査委員 _____ 印

誠信女子大學校 大學院

논문 개요

탈모는 모발이 연모 (vellus hair)로 변하여 점진적으로 가늘어 지고 길이가 짧아지면서 미만성으로 소실되는 것을 특징으로 하는데, 남성탈모증 (male-pattern baldness, MPB)는 유전적이며 안드로겐에 의존적이라고 알려져 있다. 탈모 치료제로 널리 사용되고 있는 finasteride는 5 α -reductase II의 억제제로 안드로겐 수용체의 친화성을 약화시키고, DHT를 감소시킨다. 이러한 배경을 바탕으로 본 연구에서는 가스크로마토그래피/질량분석기를 이용하여 finasteride 복용 전후의 남성탈모환자의 targeted 및 global 대사 프로필을 살펴보고자 하였다. 혈장과 머리카락 시료 내에서 안드로겐, global metabolic profiling, 콜레스테롤을 분석하기 위한 방법으로 산성 용액이나 염기성 용액을 이용하여 가수분해 시키는 방법과, 액체-액체 추출법, 고체상 추출법을 이용한 전처리 방법을 확립하였으며, TMS-ether로 유도체화 한 후 GC/MS로 분석, 정량 할 수 있는 조건을 설정하였다. 그 결과 targeted 분석을 위한 방법론에 대한 정확도와 정밀도는 모두 10-20 % 내외로 나타내었고, 검량곡선에서의 상관계수(R^2)는 0.99 이상의 우수한 직선성을 나타내었다. 본 연구에서 설정된 분석방법을 이용하여 finasteride 복용 전후의 남성탈모환자의 머리카락과 혈장에서 안드로겐, global metabolic profiling, 콜레스테롤을 측정 비교하였다. Targeted 분석의 결과로, finasteride 복용 후 남성탈모환자의 두정부 머리카락과 혈장에서 5 α -reductase II의 활성이 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 또한 global metabolic profiling의 결과로, 주성분 분석법(PCA)과 판별 분석법 (DA)를 통하여 정상인과 finasteride 복용 전후의 탈모환자의 패턴이 다르다는 것을 확인 할 수 있었고, difference factor spectrum을 통하여 biomarker로써 가능성이 있는 미지의 대사체와 콜레스테롤을 찾을 수 있었다. 이러한 결과를

바탕으로 콜레스테롤을 검출한 결과 finasteride 복용 후 남성탈모환자의 두정부, 후두부의 머리카락에서 콜레스테롤이 증가하는 것을 확인할 수 있었고 이로써 남성탈모의 치료와 예방 진단에 필요한 기초적인 데이터를 제시하였다.

목 차

논문개요

List of Figures

List of Tables

I. 서론	1
II. 이론적 배경	4
1. Metabolomics	4
2. Targeted metabolic profiling	6
(1) 안드로겐의 대사프로필	6
1) 안드로겐의 대사	6
2) 안드로겐 대사 프로필 연구	8
(2) 콜레스테롤의 대사 프로필	9
1) 콜레스테롤의 대사	9
2) 콜레스테롤 대사 프로필 연구	10
3. Global metabolic profiling	11
(1) Global metabolic profiling 연구	11
III. 실험	11
1. 생체시료	11
2. 시약	12
(1) Targeted metabolic profiling을 위한 시약	13
1) 안드로겐 분석을 위한 시약	13
2) 콜레스테롤 분석을 위한 시약	13
(2) Global metabolic profiling을 위한 시약	14

3. 분석기기 및 작동 조건	15
(1) 분석기기 및 장치	15
(2) GC/MS 작동 조건	16
4. 실험방법	20
(1) 머리카락 세척 과정	20
(2) Targeted metabolic profiling을 위한 전처리 과정	20
1) 안드로겐 분석을 위한 전처리 과정	20
2) 콜레스테롤 분석을 위한 전처리 과정	22
(3) Global metabolic profiling을 위한 전처리 과정	24
5. 통계분석	27
(1) 주성분 분석	27
(2) 판별분석	27
IV. 결과 및 고찰	28
1. 안드로겐의 대사프로필 설정	28
(1) 전처리 방법과 유도체화 방법의 확립	28
(2) 안드로겐 분석을 위한 표준 검정 곡선	33
(3) 생체 시료 내의 농도 결정과 대사 프로필에 대한 고찰	33
2. Global metabolic profiling의 설정	40
(1) pH 조건별 크로마토그램	40
(2) 주성분 분석의 결과	43
(3) 판별분석의 결과	46
(4) Difference factor spectrum의 결과	49
3. 콜레스테롤 대사 프로필의 설정	52
(1) 전처리 방법의 확립	52
(2) TMS-ether 유도체화에 의한 질량 스펙트럼	53
(3) 콜레스테롤 분석을 위한 표준 검정곡선	56

(4) 분석의 회수율 및 정확도, 정밀도	56
(5) 생체 시료 내의 농도 결정	58
V. 결 론	60

참고문헌

Abstract in English

Appendix: Calibration Curves

List of Figures

- Figure 1.** The process of hair loss. In baldness, long, thick and pigmented hair becomes progressively short, fine, and unpigmented hair.
- Figure 2.** The Norwood's classification of androgenetic alopecia shows the varying degrees of baldness.
- Figure 3.** Biosynthesis and metabolism of androgen steroids.
- Figure 4.** Structure and mechanism of action for finasteride.
- Figure 5.** Metabolic profiling of androgen in different hair region.
- Figure 6.** The diagram of androgens pretreatment from human hair and plasma.
- Figure 7.** The diagram of cholesterol pretreatment from human hair.
- Figure 8.** The diagram of pretreatment from human hair for global metabolic profiling.
- Figure 9.** The diagram of pretreatment from human plasma for global metabolic profiling.
- Figure 10 .** Mass spectra of trimethylsilyl derivatives of androgen.
- Figure 11.** Total ion chromatogram of (A) standard mixture (B) androgen from human hair.
- Figure 12.** DHT/T ratio in (a) vertex and (b) occipital hair before- and after- finasteride administration.
- Figure 13.** DHT/T ratio in plasma before- and after- finasteride administration.
- Figure 14.** Total ion chromatograms of hair global metabolic profiling in acidic condition (pH=2-3).

- Figure 15.** Total ion chromatograms of plasma global metabolic profiling in weak acidic condition (pH=5-6).
- Figure 16.** Principal component analysis of hair global metabolic profiling.
- Figure 17.** Principal component analysis of plasma global metabolic profiling.
- Figure 18.** Discriminant analysis of hair global metabolic profiling.
- Figure 19.** Discriminant analysis of plasma global metabolic profiling.
- Figure 20.** Difference factor spectrum of hair global metabolic profiling.
- Figure 21.** Biomarker candidates from difference factor spectrum.
- Figure 22.** Mass spectra of trimethylsilyl derivatives of cholesterol.
- Figure 23.** GC/MS TIC profile from the hair of MPB patients.
- Figure 24.** Cholesterol level in (a) vertex and (b) occipital hair before and after finasteride administration.

List of Tables

- Table 1.** GC/MS operating conditions for TMS-ether derivatives of androgens.
- Table 2.** GC/MS operating conditions for TMS-ether derivatives of cholesterol.
- Table 3.** GC/MS operating conditions for TMS-ether derivatives of global metabolic profiling.
- Table 4.** Characteristic ions and relative retention times of TMS-ether derivatized steroids for detection by GC/MS.
- Table 5.** The levels (ng/g) and relative ratios of androgens in vertex scalp hair of MPB before- and after- finasteride administration.
- Table 6.** The levels (ng/g) and relative ratios of androgens in occipital scalp hair of MPB before- and after- finasteride administration.
- Table 7.** The levels (ng/g) and relative ratios of androgens in plasma of MPB before- and after- finasteride administration.
- Table 8.** Intra- and inter-day assay for cholesterol.

Abbreviation (약기 호표)

CV : Coefficient of variation

DA : Discriminant Analysis

DHEA: Dehydroepiandrosterone

DHT: Dihydrotestosterone

DTE: Dithioerythritol

EI : Electron impact

GC/MS: Gas chromatography/ mass spectrometry

MPB: Male-pattern baldness

MSTFA: *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide

NH₄I : Ammonium iodide

PCA : Principal Component Analysis

PREG: Pregnenolone

SD : Standard deviation

SIM : Selected-ion monitoring

T: Testosterone

TMCS : Trimethyl chlorosilane

TMSI : *N*-trimethylsilyl-idazole

I. 서 론

모발 성장은 크게 모발이 생성되는 성장기 (anagen), 성장이 다해 성장을 멈추는 퇴행기 (catagen), 다음의 모발 생성을 위해 휴식하는 휴지기 (telogen)로 나누어진다. 모발은 계속 자라기만 하는 것이 아니고 3단계를 거치면서 일정기간 지나면 빠지고 다시 새로운 모발이 난다.¹⁾ 정상인의 경우 하루에 보통 50~70개 정도의 머리카락이 빠지며 80~100 개 이상 빠지는 경우 '탈모증'이라고 하는데, 남성형 탈모는 사춘기 이후 두피의 중앙부 (전두부 및 두정부)의 모발이 연모 (vellus hair)로 변하여 점진적으로 가늘어지고 길이가 짧아지면서 미만성으로 소실되는 것을 특징으로 한다 (Figure 1).^{2,3)}

탈모의 원인으로는 유전적 요인, 연령 및 남성 호르몬이 관여 한다고 알려져 있으며, 특히 안드로젠 호르몬 중 DHT (dihydrotestosterone)이 남성 탈모에 결정적인 역할을 한다고 알려져 있다.⁴⁾ 질병이라기 보다는 흔한 현상으로 생각 되어지는 탈모증에 대하여 Hamilton은 처음으로 임상학적 단계에 따라 분류하였으며,⁵⁾ 이 후 Norwood는 Hamilton의 분류기준을 변형하여 안드로젠성 남성 탈모증을 재분류하여 현재 사용하고 있다 (Figure 2).⁶⁾ 탈모증 환자들은 대인 관계에 있어서 첫 대면시 매우 불리하며 사회적 활동에 지장을 줄 정도로 심한 스트레스까지 받을 수 있기 때문에,⁷⁾ 현대에는 탈모의 치료와 예방을 위한 연구들이 계속 진행되고 있다.

현재 남성 탈모 환자의 치료제로써 가장 널리 사용되고 있는 finasteride는 초기에는 전립선 비대증의 치료제로 사용되었으나,⁸⁾ 부작용으로 머리털이 새로 나는 것을 보고 이에 대한 연구를 실행하게 되었으며, 1997년 하반기에 미국 식품 의약국 (FDA)으로부터 남성형 탈모증 환자의 치료에 대한 약효와 안전성을 인정받게 되었다. Finasteride는 안드로젠 수용체의 친화성

을 약화시키고, 남성 탈모의 요인으로 알려져 있는 DHT를 감소시킨다고 알려져 있다.^{9,10)}

탈모 환자의 대사 프로파일링 연구로 주로 혈장과 같은 생체 시료가 사용되었는데, 모발은 과거의 건강상태와 같은 생리학적인 정보와 질병의 조기 진단에서 유용한 도구로 사용될 수 있다. 모발은 혈액과는 다르게 아프지 않고 쉽게 수집할 수 있을 뿐만 아니라 특별한 처리 없이 손쉽게 다룰 수 있고 보관하기 용이하다는 장점이 있다. 또한 장기간 동안 성장하고 계속 변화함으로써 과거와 현재의 건강 상태를 반영하기 때문에 소급해서 증명 할 때 정확성을 갖게 된다. 그러므로 모발 분석법은 혈액학적이거나 소변검사 방법의 보완적인 수단으로 주목할 만한 진단 도구가 되고 있다.¹¹⁻¹³⁾

본 연구에서는 생체 내 미량으로 존재하는 내인성 물질들의 확인과 정량에 뛰어난 감도를 나타내 신뢰성이 높은 분석 방법으로 활용되고 있는 가스 크로마토그래피/질량분석기 (gas chromatography/mass spectrometry)를 이용하여 finasteride 복용 전후의 남성탈모 환자의 혈장과 머리카락에서 안드로겐류의 targeted metabolic profiling 변화를 살펴보고자 한다. 또한 다양한 통계학적 기술을 사용하여 정상인과 finasteride 복용 전후의 남성탈모환자의 global metabolic profiling의 변화를 살펴보고 남성탈모환자의 biomarker로서 가능성이 있는 후보 대사체 들을 도출하여 남성 탈모의 치료와 예방에 유용하게 사용할 수 있는 기초적인 자료를 제시하고자 하였다.

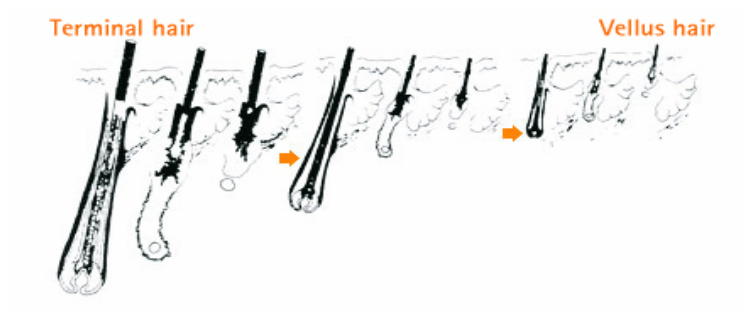


Figure 1. The process of hair loss. In baldness, long, thick and pigmented hair becomes progressively short, fine, and unpigmented hair.

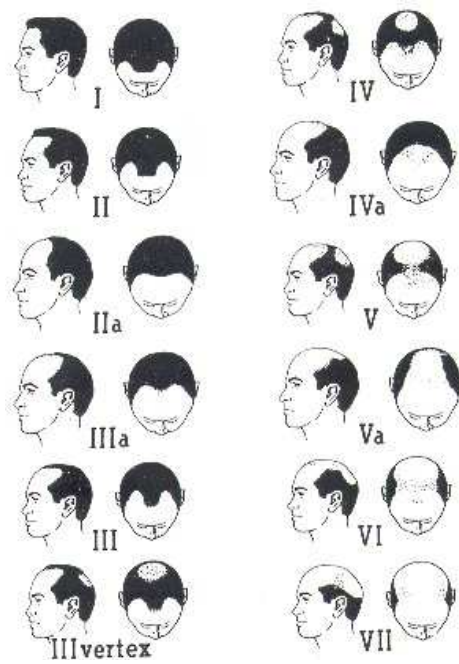


Figure 2. The Norwood's classification of androgenetic alopecia shows the varying degrees of baldness.

II. 이론적 배경

1. Metabolomics

Metabolomics는 다양한 유전적, 생리적 또는 환경적 조건에서 변화되어 나타나는 대사체군 (metabolome; 세포, 조직 또는 생체 내에 존재하는 저분자량의 전체 대사체의 집단)의 구성과 농도를 분석하고 해석함으로써 생명현상의 변화 원인을 규명해 나가는 총체적인 연구 분야이다.¹⁴⁻¹⁶⁾ Metabolic profiling은 metabolomics의 한 분야로 크게 targeted metabolic profiling과 global metabolic profiling으로 나뉜다. Targeted metabolic profiling의 경우, 이미 알려진 대사체를 분리하고 이들을 분석하여 이러한 알려진 대사체들이 어떠한 변화를 나타내는지에 대한 전반적인 자료를 제공한다. 반면에, global metabolic profiling은 알려지지 않은 미지의 대사체들이 어떠한 변화를 나타내는지에 대한 정보를 제공한다. Metabolic profiling은 1970년대 이와 비슷한 연구들이 진행되면서 시작하였고, 1971년 Horning과 Devaux는 GC/MS를 이용해서 스테로이드, 아미노산, 약물 대사체등에 대해 연구하였다.^{17,18)} Goodacre 와 Hall 등은 식물을 바탕으로 한 대사체 분석의 가장 인상적인 양상으로써 하루에 7000개의 샘플을 처리할 수 있는 분석 규모를 연구하였고,¹⁹⁾ maize(옥수수수과)의 동종 번식에 의한 기질을 대상으로 GC/MS 분석을 이용하여 fatty alcohols, aldehydes, fatty acids 등을 식물에서 분리한 예도 있다.²⁰⁾

대사체 분석은 주로 핵자기 공명 (NMR), 기체 크로마토그래피/질량분석기(GC/MS), 또는 액체 크로마토그래피/질량분석기(LC/MS)등을 이용하여 연구가 이루어지고 있다.²¹⁻²⁴⁾ NMR spectroscopy와 같은 기기를 이용하여 조직적으로부터 20-40개의 대사체들을 추출하여 검출 할 수 있으며, 뇨 샘플에서 100-200개의 대사체를 검출 할 수 있다. NMR spectroscopy보다 더

감도가 뛰어난 GC/MS를 이용하여 생물학적 샘플에서 1000개의 대사체들을 검출 할 수 있다. GC/MS는 경제적이며 재현성과 감도가 뛰어난 장점을 가지고 있으나, 샘플을 정제하는 전처리 과정이 필요하기 때문에 그 만큼의 시간이 소모되고 GC의 특징에 알맞지 않은 분석물질들은 분석하기 힘들다는 단점이 있다.²⁵⁻²⁷⁾

최근의 metabolomics의 양상은 모든 전체적인 대사체들을 동시에 측정하고자 하는 것이다. 이러한 전체적인 data sets에서 발견된 많은 정보들을 이용하여 정상적인 물리적 변화와 질환과정에서 발생하는 변화를 판독하려면 metabolomics의 분야에서 다변량의 pattern recognition 기술이 필요하다. 일반적으로 metabolomics에서 증가되는 많은 data sets에서 정의된 metabolic 차이에 대한 부분적인 구성요소는 같은 기초 위에서 높은 농도와 낮은 농도의 metabolites를 평가한다. 이러한 metabolites의 profiling을 수집하기 위해서 PCA(Principal Component Analysis), HCA(Hierarchical cluster analysis), K-means 등의 방법이 이용 된다.^{28,29)}

2. Targeted metabolic profiling

(1) 안드로젠 대사프로필

1) 안드로젠의 대사

안드로젠은 뇌하수체에서 분비되는 간질세포자극호르몬(ICSH, LH)의 자극을 받은 정소의 간질세포에서 분비되는 스테로이드 호르몬의 총칭을 말한다. 안드로젠은 콜레스테롤을 전구체로 하여 여러 단계의 합성 과정을 거치면서 생성되는데, pregnenolone에서 testosterone으로 가는 두개의 일반적인 대사경로($\Delta 5$ or $\Delta 4$ pathway)가 있다.³⁰⁾ $\Delta 5$ pathway에서 steroid중간산물은 3β -hydroxyl의 산화(3β -steroid dehydrogenase)로 ketone을 형성하여 C₅₋₆의 이중결합을 C₄₋₅로 위치변환($\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerase)시켜서 $\Delta 4$ pathway의 상응하는 steroid로 전환된다 (Figure 3). '17-ketosteroids'는 DHEA와 같이 안드로젠 수용체에 대한 친화력이 적은, 상대적으로 약한 안드로젠 (weak androgens) 그룹을 형성한다.^{1,31,32)} 이러한 약한 안드로젠들은 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD)와 같은 효소에 의해 testosterone 와 dihydrotestosterone 같이 안드로젠 수용체에 강하게 결합하는 강한 안드로젠 (potent androgens)으로 변환될 수 있다.³³⁾

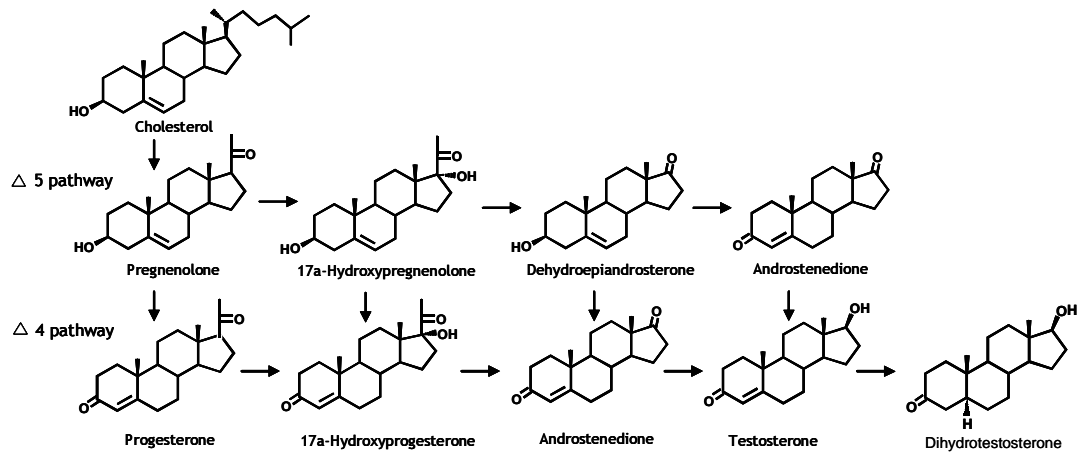


Figure 3. Biosynthesis and metabolism of androgen steroids.

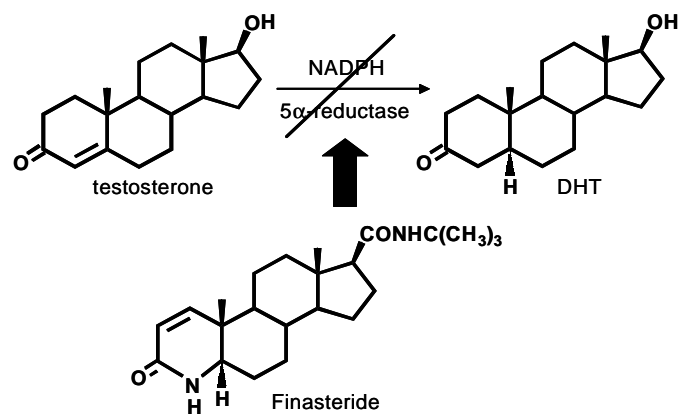


Figure 4. Structure and mechanism of action for finasteride.

2) 안드로겐대사 프로파일 연구

남성형 탈모증은 유전적이며 안드로겐에 의존적인 질병으로 알려져 있으며 안드로겐 호르몬 중에서 DHT는 탈모의 주요인으로 알려져 있다. 이 호르몬은 대부분의 조직에서 T가 5 α -reductase에 의해 변환된 것이다.^{4,34)} 5 α -reductase 효소는 사람에게 있어서 type I 과 type II 두 가지 형태의 동질 효소로 나누어지는데 5 α -reductase type I 은 피부와 간에 주로 존재하며, type II는 모낭, 전립선, 간에 존재하며 남성 탈모에 영향을 준다.^{35,36)} 일반적으로 탈모는 탈모환자의 두정부 모발의 안드로겐 분포에 의해 영향을 받는다고 알려져 있으며, 전두부의 모낭은 후두부의 모낭보다 안드로겐 수용체의 수치가 더 높고 5 α -reductase type II의 활성이 3배정도 높다.³⁷⁾ DHT는 T와 경쟁적인 안드로겐 수용체이지만, DHT는 T에 비해서 5배의 높은 친화력을 갖는다.⁹⁾ Finasteride는 가장 널리 사용되고 있는 탈모 치료제 중의 하나로, 5 α -reductase type II의 활성을 억제하여 안드로겐 수용체와의 친화력을 약화시키고, DHT를 감소시키는 약물이다 (Figure 4).^{38,39)} Finasteride의 효과에 대한 연구로, finasteride 치료 후의 남성 탈모 환자에서 모발의 성장기가 증가했다는 보고와 Macaque monkeys에서 모발의 무게와 모낭의 길이가 증가했다는 보고가 있었다.⁴⁰⁻⁴²⁾ 또한 finasteride 치료 후 사람에서 모발이 성장하고, 모발의 숫자가 증가했다.^{43,44)} 이러한 선행연구를 통하여, 두정부와 후두부의 머리카락에서 finasteride의 다른 효과를 예상할 수 있다. 본 연구에서는 targeted metabolic profiling을 살펴 보기 위하여 GC/MS를 이용하여 finasteride 복용 전후의 남성 탈모환자의 머리카락과 혈장에서 안드로겐 호르몬을 분석하는 방법을 설정하고, 이를 바탕으로 두정부 및 후두부 머리카락과 혈장에서 finasteride의 효과를 알아보고자 하였다.

(2) 콜레스테롤의 대사프로필

1) 콜레스테롤의 대사

기본적으로 세 개의 육탄소 고리 (A, B, C 고리)와 한 개의 오탄소 고리 (D 고리)로 구성된 융합 고리화합물이 스테로이드(steroid)로 분류되는데, 이 중에서 3번 위치에 OH group이 있는 것을 콜레스테롤이라고 한다. 콜레스테롤은 내인성으로 생체 자체에서 아세틸 조효소A(acetyl-CoA)로부터 생합성으로 이루어진다. 콜레스테롤은 사람의 담석에서 처음으로 발견되었는데, 식물에서는 발견되지 않으며, 동물에만 볼 수 있고 특히 뇌나 신경조직에 많이 함유되어 있다. 콜레스테롤은 인지질과 함께 세포의 막계(膜系)를 구성하는 주요 성분이며, 막 구조나 기능에 큰 역할을 한다고 생각되지만, 그 상세한 메커니즘은 거의 알려져 있지 않다. 포유동물에서 콜레스테롤 합성이 주로 행해지는 곳이 간인데 간에서 형성된 대부분의 콜레스테롤은 콜산과 글리코콜산과 같은 담즙산(bile acid)으로 전환된다. 지질 소화시 이런 혼합물들은 지질방울을 유화시켜 효소가 더 잘 공격할 수 있게 돕는다. 생체 내에서는 콜레스테롤을 전구체로 하여 비타민 D, 성호르몬(테스토스테론, 프로게스테론 등), 부신피질 호르몬 등이 합성된다.

2) 콜레스테롤 대사 프로파일 연구

콜레스테롤 수치는 심장병, Alzheimer 병과 같은 다양한 질병에 있어서 그 병의 발병률 증가의 중요한 요소로서 관련되어 있기 때문에,⁴⁵⁻⁴⁷⁾ 콜레스테롤은 지질 중에서도 가장 중요한 연구 대상이다. 대부분의 콜레스테롤은 뇌, 척수, 부신, 신경, 혈장, 머리카락, 간 및 다른 기타의 내부조직에 존재한다. 이 중에서 특히 머리카락은 건강상태와 병의 조기진단과 같은 생리학적 정보를 포함하는 유용한 도구로 콜레스테롤 분석에 많이 사용되고 있다. 지금까지 보고되어 있는 머리카락 내의 콜레스테롤 분석법은 GC나 GC/FID를 사용해 0.4 - 8.9 g의 머리카락을 이용하여 복잡한 세척과정과 전처리 과정을 통하여 콜레스테롤을 검출하였다.⁴⁸⁻⁵⁰⁾ 그러나 이와 같은 방법을 통해서 콜레스테롤을 검출 하는 것은 많은 양의 샘플이 필요하며, 이로 인해 머리카락 매트릭스에서의 방해물질의 영향을 많이 받게 된다는 한계가 있다. 따라서 적은 양의 머리카락 샘플에서 콜레스테롤의 분석 감도를 낮출 수 있는 분석방법이 요구된다. 본 연구에서는 소량의 머리카락을 세척하고 간단한 전처리 후, 콜레스테롤을 GC/MS로 분석하여 신속하고 간단하면서도 우수한 분석 감도를 얻을 수 있는 검출법을 개발하고, finasteride 복용 전후의 남성 탈모 환자의 머리카락과 혈장에서 콜레스테롤 프로파일 변화를 살펴보고자 하였다.

2. Global metabolic profiling

(1) Global metabolic profiling 연구

Global metabolic profiling은 알려지지 않은 미지의 대사체들이 어떠한 변화를 나타내는지에 대한 정보를 제공한다. 미지의 대사체들은 다양하게 발생할 수 있는 질환들과 얼마나 상관성이 있으며, 상관성이 있다면 어떠한 상관관계에 있는지, 얼마나 중요한 대사체 요인인지에 대한 정보가 거의 알려지지 않았으며 최근 들어 연구되어 지고 있는 실정이다. 본 연구에서는 정상인과 finasteride 복용 전후의 탈모환자의 머리카락에서 global metabolic profiling의 변화를 비교하였다. 다양한 실험 조건에서 검출되는 미지의 대사체들을 profiling하고, 이로부터 얻은 정성 데이터를 주성분 분석 (Principal component analysis, PCA) 및 K-nearest neighbor 판별 기법과 같은 통계학적인 기술을 사용하여 global metabolic profiling으로부터 정상인과 finasteride 복용 전후의 탈모환자를 판별하고 탈모의 biomarker가 되는 대사체를 도출하고자하였다.

III. 실험

1. 생체시료

Norwood의 분류에 따른 IIIa-V 단계의 남성 탈모 환자 21명 (연령 23-52세, 평균 31.36세)의 머리카락과 혈장 시료를 경희의료원으로부터 수집하였다. 머리카락 시료는 두정부와 후두부의 머리카락의 proximal 한 부분에서 100 mg 정도 수집하였다. 혈장은 혈액중 적혈구와 백혈구, 혈소판 등의 유형 성분을 제외하고 사용하였다. 모든 환자들은 5개월 동안 finasteride 1 mg을 매일 복용 하였다. 머리카락 과 혈장 시료는 finasteride 5개월 동안 치료 후 동일한 부위에서 다시 수집하였다. 정상인 대조군은 남성 탈모 환자와 나이가 거의 일치한 건강한 남성 20명의 머리카락을 수집하였다.

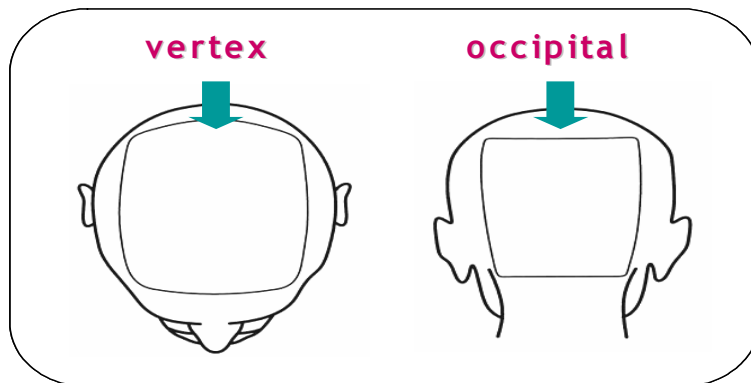


Figure 5. Metabolic profiling of androgen in different hair region.

2. 시약

(1) Targeted metabolic profiling을 위한 시약

1) 안드로겐 분석을 위한 시약

본 연구에서 대상으로 한 pregnenolone (PREG), dehydroepiandrosterone (DHEA), testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT)는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)사의 특급 시약을 사용하였다. 내부 표준물질 (internal standard, I.S.)로 사용된 d_2 -testosterone은 Cologne Laboratory (Institute of Biochemistry, German Sports University, Germany)에서 합성한 것을 이용하였다. 유도체화 시약은 Sigma-Aldrich사로부터 *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide(MSTFA), ammonium iodide (NH_4I)와 dithioerythritol (DTE)를 구입하여 1000:4:5 (v:w:w)로 혼합한 용액을 사용하였으며 머리카락 세척에 사용한 isopropyl alcohol과 추출용매로 사용한 *n*-pentane는 HPLC grade 로 JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다.

2) 콜레스테롤 분석을 위한 시약

본 연구에서 대상으로 한 콜레스테롤은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 내부표준물질 (internal standard, I.S.)로 사용된 d_6 -cholesterol은 Cambridge Isotope Lab. (Andover MA, USA)에서 합성한 것을 사용하였다. 전처리 과정의 고체상 추출에서 필요한 Oasis HLB cartridge (60mg, 3mL)는 Waters 사 (Milford, MA, U.S.A) 로부터 구입하여 사용하였다. 유도체화 시약은 Sigma-Aldrich사로부터

N-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide(MSTFA), ammonium iodide (NH₄I)와 dithioerythritol (DTE)를 구입하여 1000:4:5 (v:w:w)로 혼합한 용액을 사용하였다.

(2) Global metabolic profiling을 위한 시약

유도체화시약은 Sigma-Aldrich사로부터 *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA), *N*-trimethylsilyl-idazole (TMSI), trimethylchlorosilane (TMCS)를 구입하여 100:2:5 (v:v:v)로 혼합한 용액을 사용하였으며, 머리카락 세척에 사용한 isopropyl alcohol과 추출용매로 사용한 *n*-pentane과 ethyl ether는 HPLC grade 로 JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다.

3. 분석 기기 및 작동 조건

(1) 분석 기기 및 장치

Targeted metabolic profiling 실험에서 사용한 분석 기기는 Hewlett-Packard (HP) 6890 PLUS Gas Chromatograph (GC)에 direct interface로 연결된 5973 Mass Selective Detector (MSD)를 사용하였다. 모든 시료는 HP 6890 Series injector를 사용하여 GC에 주입하였다.

Global metabolic profiling 실험에서 사용한 분석 기기는 Thermo Finnigan사의 Trace 2000 GC에 direct interface로 연결된 Thermo Finnigan사의 Polaris Q를 사용하였고, data system으로 Xcalibur 1.3 version을 사용하였다. 또한, 모든 시료는 Thermo Finnigan사의 AS 2000 autosampler를 사용하여 GC에 주입하였다.

시료의 추출을 위하여 Rotary vacuum evaporator (Buchi, 스위스), Buhler 7400 Tubingen 진탕기 (Edmond, 독일), Varifuge-F 원심분리기 (Heraeus, 독일), Heating block (Gebr. Liebsch, 독일), RML6 LAUDA 냉각기 (Germany), Maxi Mix II Thermolyne (U.S.A.) 그리고 N₂ purge용 Reacti-ThermTM (Pierce, U.S.A)등을 사용하였다.

(2) GC-MS 작동 조건

Targeted metabolic profiling 분석을 위하여 각각의 표준물질을 methanol에 녹여 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 조제한 후, 필요에 따라 희석하여 사용하였다. 이온화 방법은 전자 충격법 (EI)이었으며 이온화에 사용한 전자 에너지는 70 eV이었다. 전처리된 시료들을 분석하기 위해 질량 스펙트럼상의 특성이온 (characteristic ion)만을 선택하여 검출하는 selected ion monitoring (SIM) 방법을 이용하였다.

Global metabolic profiling 분석을 위하여 전체적인 high concentration metabolites를 비교하기 위한 SCAN 방법을 이용하였다. 이온화 방법은 전자 충격 (EI)이었으며 이온화에 사용한 전자 에너지는 70 eV이었다.

Targeted metabolic profiling 및 global metabolic profiling 분석을 위한 GC/MS 작동조건은 Table 1, Table 2, Table 3에 각각 나타내었다.

Table 1. GC/MS operating conditions for TMS-ether derivatives of androgens.

Parameters		Conditions	
Column		Ultra-1 (100% methylpolysiloxane, 25 m x 0.2 mm I.D. x 0.33 μm film thickness)	
Carrier gas		He at 0.8 ml/min	
Inlet pressure		16 psi	
Split ratio		10:1	
Injection port temp.		280 $^{\circ}\text{C}$	
Detector temp.		300 $^{\circ}\text{C}$	
Oven temp. program			
#	Rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Time (min)
1		230	2
2	4	240	5
3	15	300	

Table 2. GC/MS operating conditions for TMS-ether derivatives of cholesterol.

Parameters		Conditions		
Column		Ultra-1 (100% methylpolysiloxane, 13 m x 0.2 mm I.D. x 0.33 μm film thickness)		
Carrier gas		He at 0.9 ml/min		
Inlet pressure		121 pka		
Split ratio		10:1		
Injection port temp.		260 $^{\circ}\text{C}$		
Detector temp.		280 $^{\circ}\text{C}$		
Oven temp. program				
	#	Rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Time (min)
	1		210	1.0
	2	4	230	1.0
	3	10	315	0.0

Table 3. GC/MS operating conditions for TMS-ether derivatives of global metabolic profiling.

Parameters		Conditions	
Column		Ultra-1 (100% methylpolysiloxane, 25 m x 0.2 mm I.D. x 0.33 μm film thickness)	
Carrier gas		He at 0.8 ml/min	
Inlet pressure		121 kPa	
Split ratio		50:1	
Injection port temp.		250 $^{\circ}\text{C}$	
Detector temp.		300 $^{\circ}\text{C}$	
Oven temp. program			
#	Rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Time (min)
1		80	2
2	10	300	3

4. 실험방법

(1) 머리카락 시료의 세척 과정

머리카락 외부에 있는 불순물과 지질을 제거하기 위하여 머리카락을 증류수로 세척 한 후 isopropyl alcohol 로 20 분간 세척한다. 세척 한 머리카락을 상온에서 1시간 정도 건조시킨 후 60 °C에서 1시간 동안 완전히 건조시킨다. 표면적을 넓히고 추출 효율을 높이기 위하여 핀셋과 수술용 가위로 1-2 mm 길이로 머리카락을 자른 후 무게를 재어 사용했다.

(2) Targeted metabolic profiling을 위한 전처리 과정

1) 안드로젠 분석을 위한 전처리 과정

머리카락에 내부 표준물질 (I.S)인 d_2 -testosterone (1 ppm) 10 μ l를 넣었다. 1 M NaOH 1 ml을 넣은 후 80 °C 조건에서 1시간 가수분해 시킨다. 혈장 시료의 경우, 혈장 1 ml에 내부표준물질을 넣고 β -glucuronidase 100 μ l를 넣은 후 55 °C조건에서 1시간동안 가수분해 시킨다. 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.0) 1 ml 첨가하고 pH 를 10-11로 맞춘 후 n-pentane 3 ml을 가하여 20분간 진탕기를 사용하여 추출한다. 이를 원심분리기 2,500 rpm에서 5분 동안 수행하여 층 분리를 한 후, 유기용매 층만 시험관에 담는다. 위 추출 과정을 두 번 반복하여 수행한다. 추출된 유기용매를 N₂ gas를 이용하여 증발 시키고, 데시케이터에서 30분 이상 충분히 건조시킨다. 분석물질을 GC/MS로 분석하기 위하여 시험관에 MSTFA/NH₄I/DTE (1000: 4: 5, v/w/w) 의 혼합용액 30 μ l을 첨가하여 60 °C에서 15분간 TMS-ether 유도체 시킨 후 이 중 2 μ l를 취하여 GC/MS로 주입하였다 (Figure 6).

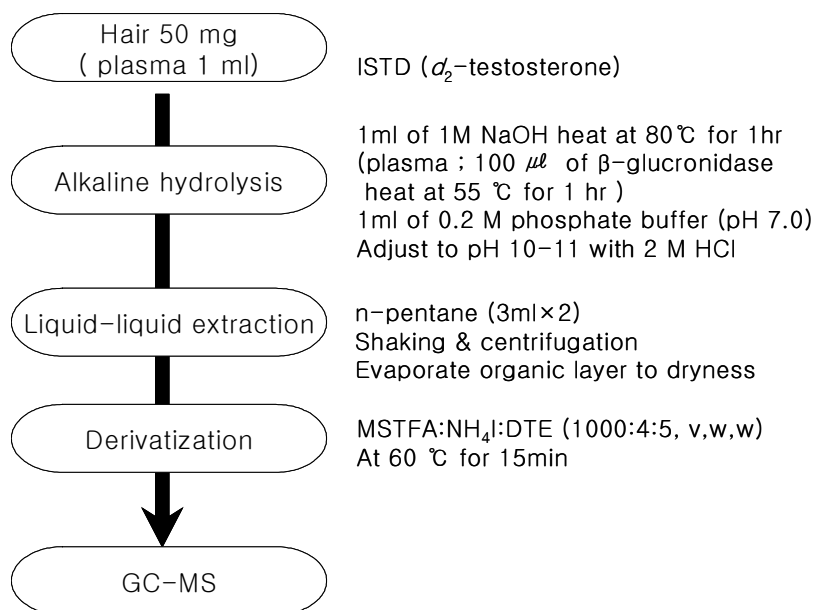


Figure 6. The diagram of androgens pretreatment from human hair and plasma.

2) 콜레스테롤 분석을 위한 전처리 과정

머리카락 1 mg에 내부 표준물질인 *d*₆-cholesterol (100 ppm)를 넣었다. 여기에 6 M KOH와 ethanol을 각각 1 ml 씩 첨가 한 후 60°C 조건에서 1시간동안 가수분해 시킨다. 고체상 추출을 위해 Oasis HLB cartridge를 준비한 후 활성화를 위해 메탄올 1 ml과 증류수 1 ml을 차례로 흘려준 후 로딩 (loading) 시킨다. 불순물제거를 위해 증류수 1 ml로 충분히 씻어 낸 후 메탄올 5 ml로 용출시켰다. 이 용출액을 감압증류기 (evaporator)를 이용하여 증발시키고 데시케이터에서 30분 이상 충분히 건조시킨다. 분석물질을 GC/MS로 분석하기 위하여 시험관에 MSTFA/NH₄I/DTE (1000: 4: 5, v/w/w) 의 혼합용액 50 μ l을 첨가하여 60 °C에서 20분간 TMS-ether 유도체 시킨 후 이 중 2 μ l를 취하여 GC/MS로 주입하였다 (Figure 7).

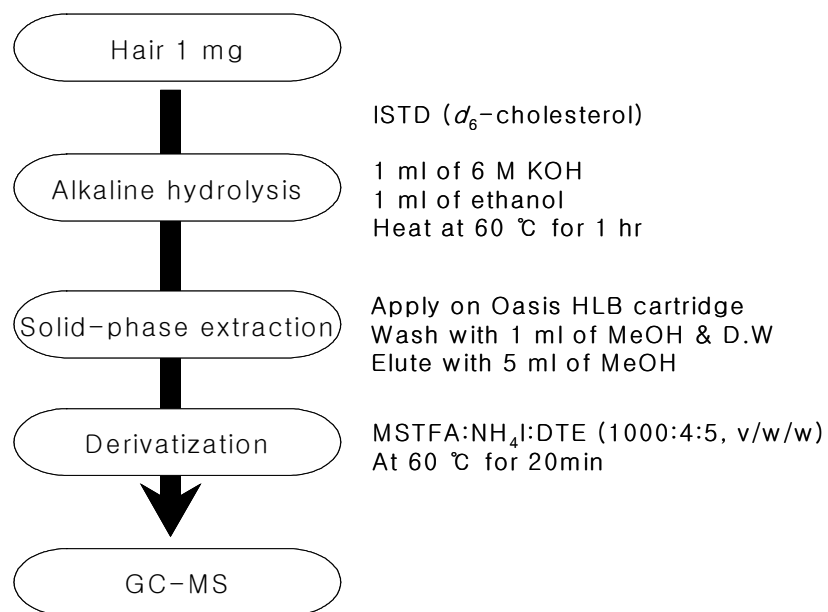


Figure 7. The diagram of cholesterol pretreatment from human hair.

(3) Global metabolic profiling을 위한 전처리 과정

머리카락 5 mg 에 1 M NaOH를 1 ml 넣은 후 80 °C 조건에서 1시간 가수분해 시킨다. 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.0) 1 ml 첨가하고 pH 를 10-11로 염기성 조건으로 맞춘 후 n-pentane 3 ml 을 가하여 20분간 진탕기를 사용하여 추출한다. 이를 원심분리기 2,500 rpm에서 5분 동안 수행하여 층분리를 한 후, 유기용매 층만 시험관에 담는다. 위 추출 과정을 두 번 반복하여 수행한다. HCl로 pH를 2-3으로 산성조건으로 맞춘 후 염기성 조건과 동일한 방법으로 추출과정을 수행하였다. 혈장의 경우, 시료 250 μ l에 0.6 N HCl 1 ml을 넣은 후 80 °C 조건에서 1시간 동안 가수분해 시킨다. 산성 (pH=2-3), 약산성 (pH=5-6), 염기성 (pH=9-10) 조건으로 맞춘 후 ethyl ether 5 ml로 추출 과정을 수행하였다. 추출된 유기용매를 N₂ gas를 이용하여 증발 시키고, 데시케이터에서 30분 이상 충분히 건조시킨다. 분석물질을 GC/MS로 분석하기 위하여 시험관에 MSTFA/TMCS/TMSI (100: 2: 5, v/v/v) 의 혼합용액 50 μ l을 첨가하여 60 °C에서 15분간 TMS-ether 유도체 시킨 후 이 중 2 μ l를 취하여 GC/MS로 주입하였다 (Figure 8, 9).

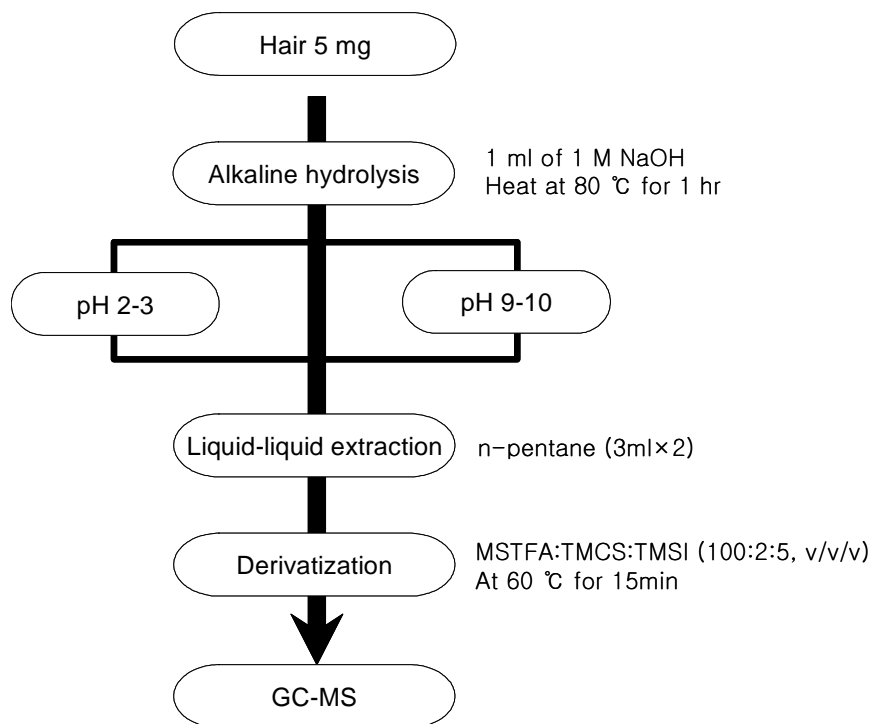


Figure 8. The diagram of pretreatment from human hair for global metabolic profiling.

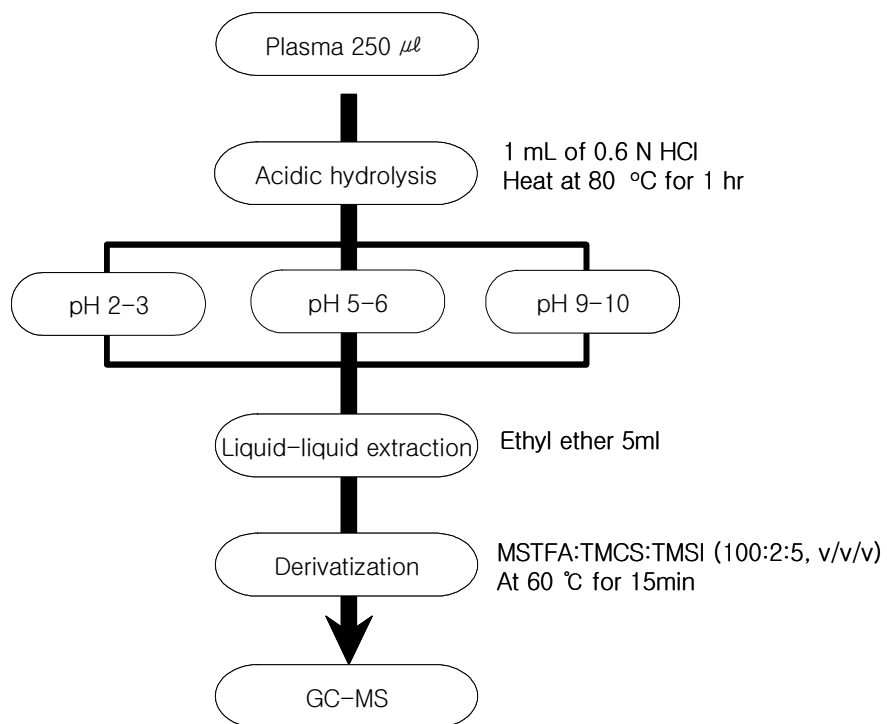


Figure 9. The diagram of pretreatment from human plasma for global metabolic profiling.

5. 통계분석

(1) 주성분 분석

다변량 자료에 존재하는 비정규성(abnormality)이나 이상치(outliers; 측정된 변수들 면에서 다른 개체들과 상이한 개체)를 발견하기 위하여 변수들의 상관관계(공분산 행렬 혹은 상관 행렬 이용) 상관관계가 존재하지 않는 새로운 변수(주성분; principal component)들을 구한다. PCA방법은 또한 주성분 점수를 이용하여 실험 개체들을 그룹으로 나누는데도 사용된다.

(2) 판별분석

판별분석(discriminant analysis)은 2개 이상의 모집단으로부터의 표본이 섞여 있을 때 각각의 케이스(case)에 대하여 그것이 어느 모집단에 속해 있는지를 판별(discriminate)하기 위해 함수를 만들어서 판별작업을 실시하는 분석방법이다. 판별분석에서는 소속그룹이 이미 알려진 케이스에 대하여 변수를 측정하고, 이 변수들의 선형함수를 작성하여 판별에 유용한 변수로 변환한다. 이들을 판별함수(discriminant function)라 한다. 판별함수가 정해지면 소속이 명확하지 못한 케이스에 대하여 독립변수의 값을 측정한 후에 이 케이스가 어느 그룹에 소속해 있는지를 판별할 수 있다.

IV. 결과 및 고찰

1. 안드로겐의 대사프로필 설정

(1) 전처리 방법과 유도체화 방법의 확립

안드로겐을 머리카락으로부터 추출하기 위하여 효과적인 전처리 과정을 정립하였다. 이를 위해 산성, 염기성 조건에서 가수분해 조건을 테스트한 결과 염기성 조건인 80℃에서 1시간동안 가수분해하는 조건이 가장 적합하였다. 안드로겐의 경우 비극성 용매인 n-pentane을 사용함으로써 높은 회수율과 함께 보다 선택적인 추출이 가능하였다. 안드로겐류는 수산화기 뿐만 아니라 케톤기를 가지고 있으며 이로 인해 GC로의 분석에 어려움이 있으므로 극성을 감소시키기 위하여 유도체화의 설정이 필요하다. 이를 위해 반응 조약이 간편한 MSTFA: NH₄I: DTE (1000: 4: 5) 혼합액을 이용하였고 이때 DHEA는 [M]⁺인 $m/z=432$, PREG는 [M-CH₃]⁺인 $m/z=445$, T와 DHT는 [M]⁺인 432, 434 이온이 각각 주 봉우리로 나타났으며 각각의 질량 스펙트럼 상에서의 특성 이온과 상대 머무름 시간을 Table 4에 정리하여 나타내었다. Figure 10에는 선정된 유도체화 방법과 최적화된 GC/MS를 적용하여 얻은 표준물질의 질량 스펙트럼을 나타내었고, Figure 11에는 표준물질과 앞서 서술한 전처리 과정을 적용하여 실제 머리카락 샘플에 적용한 크로마토그램을 나타내었다.

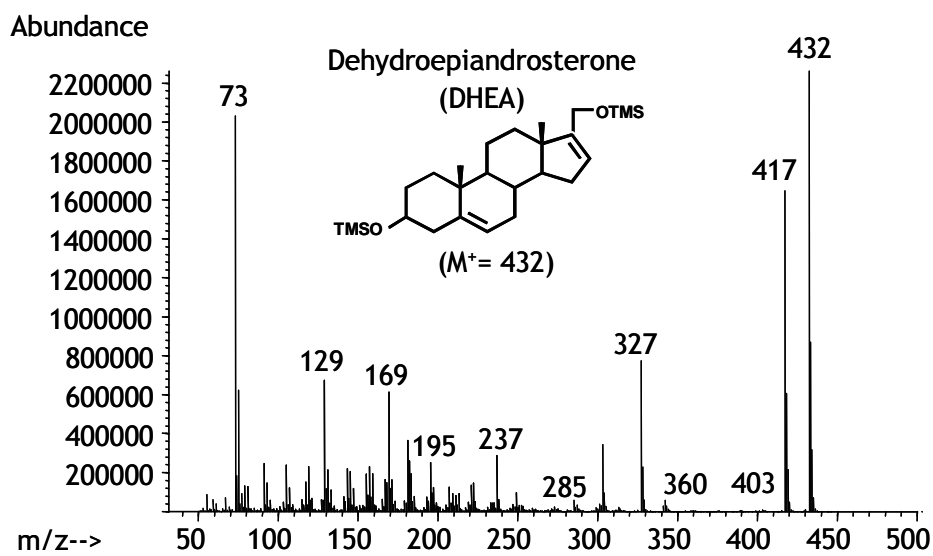
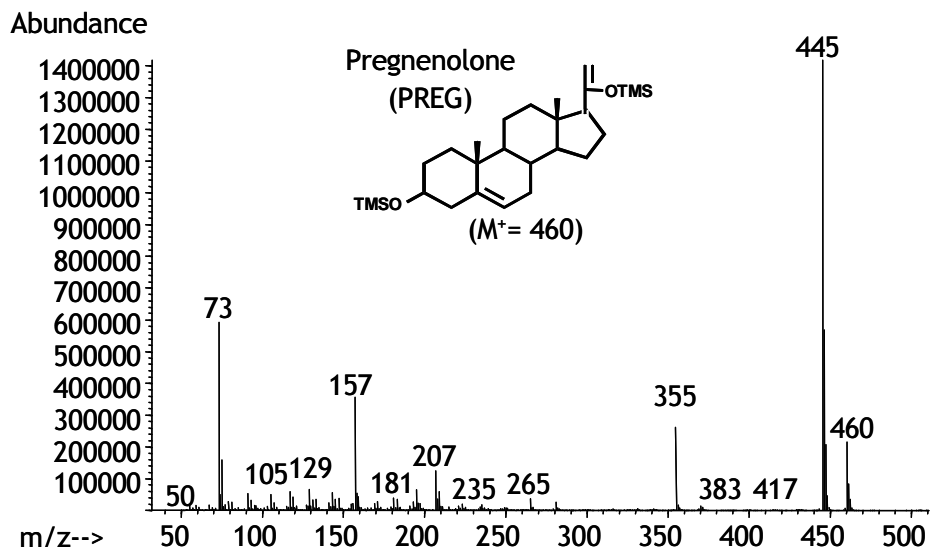


Figure 10 . Mass spectra of trimethylsilyl derivatives of androgen.

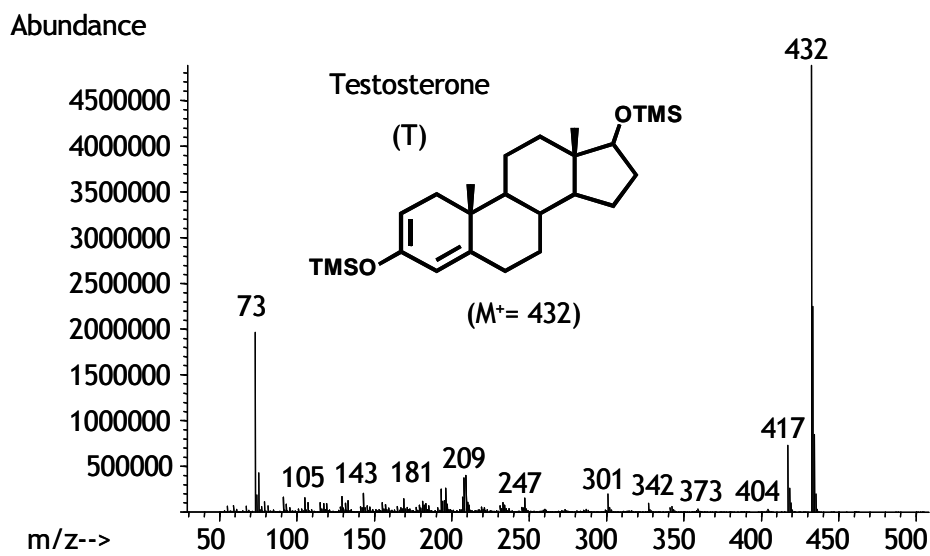
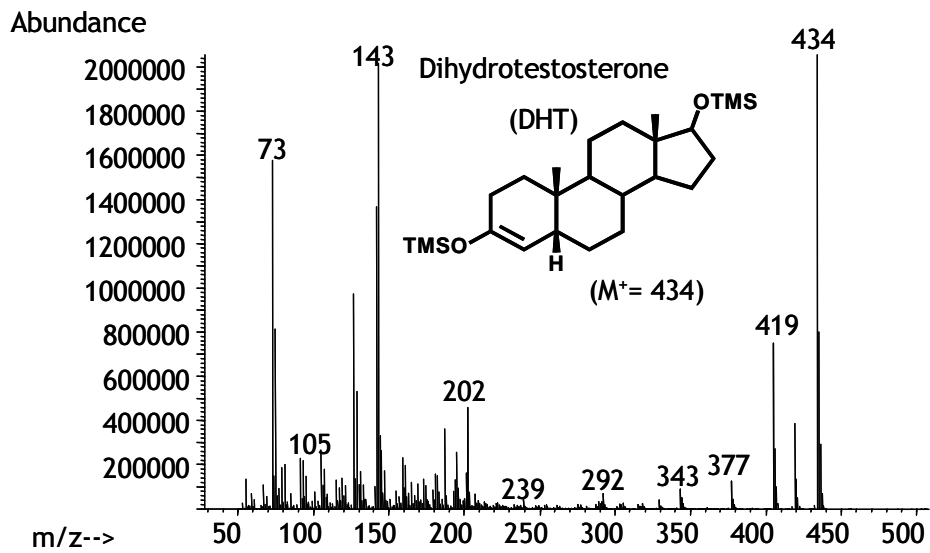


Figure 10. Continued.

Table 4. Characteristic ions and relative retention times of TMS-ether derivatized steroids for detection by GC/MS.

Steroids	Characteristic Ions (m/z) ^a	R.R.T.(min) ^b
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	<u>432</u> , 417, 327	0.895
Pregnenolone (PREG)	<u>445</u> , 460, 355	1.151
Testosterone (T)	<u>432</u> , 417, 360	0.996
Dihydrotestosterone (DHT)	<u>434</u> , 419, 405	0.956
d ₂ -Testosterone (I.S)	<u>434</u> , 417, 147	1.000

^a Quantitative ions are underlined.

^b Retention time relative to those of d₂-Testosterone as I.S.

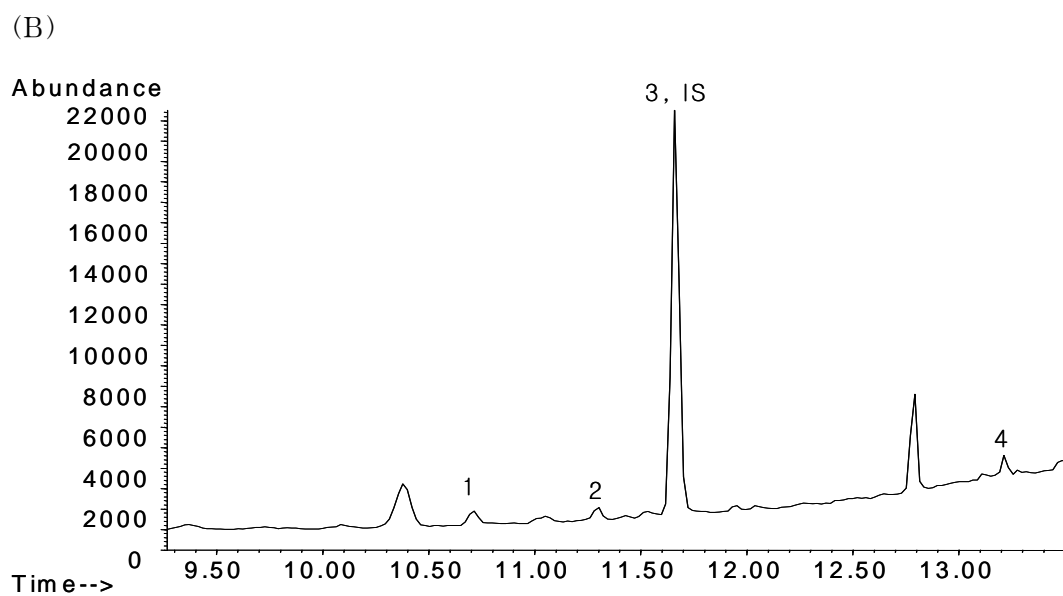
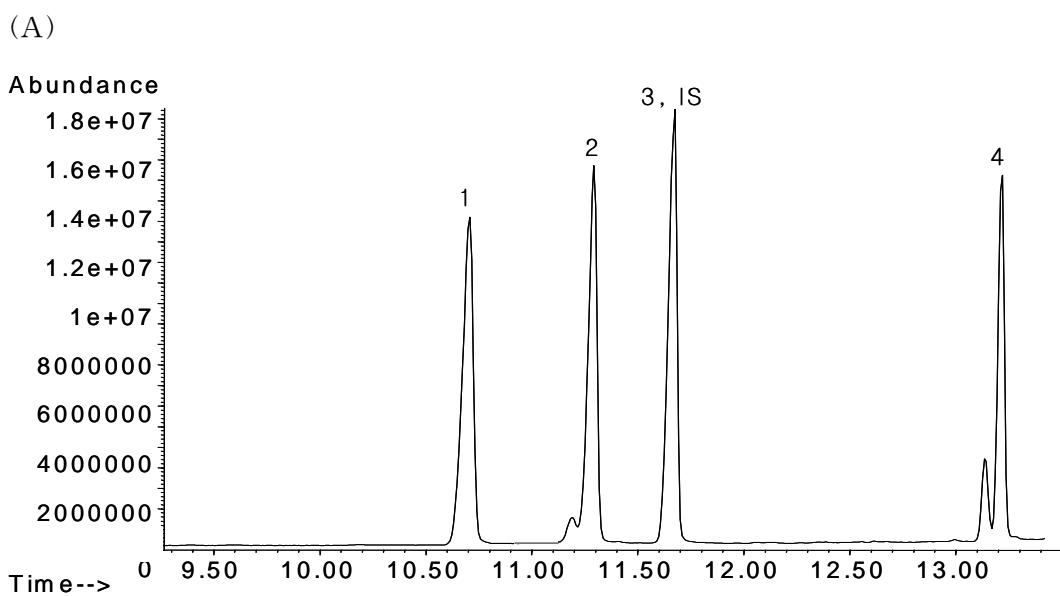


Figure 11. Total ion chromatogram of (A) standard mixture (B) androgen from human hair. 1; DHEA, 2; DHT, 3; T. 4; PREG, and d_2 -testosterone (I.S.).

(2) 안드로젠 분석을 위한 표준 검정 곡선

분석 대상 물질인 안드로젠의 검정범위는 머리카락 시료 내에서 검출되는 안드로젠의 농도를 기준으로 하여 검정 농도 범위를 0.05 - 50.00 ng/g으로 정하고, 대상 안드로젠들을 모두 혼합하여 농도별로 6개의 검정용 표준 혼합물을 만들었다. 이 검정용 표준혼합물을 본 실험 방법에 따라 추출한 후 TMS로 유도체화 하였으며, 이들을 GC/MS로 분석하여 검정곡선을 작성하였다. 검정곡선의 직선성은 안드로젠의 감응도와 내부표준물질의 감응도를 비교하여 회귀분석을 실행하여 얻었다. 그 결과 안드로젠의 R^2 값은 0.990 이상 이었다 (appendix).

(3) 생체 시료 내의 농도 결정과 대사 프로필에 대한 고찰

탈모 환자의 머리카락과 혈장에서 안드로젠 스테로이드를 정량한 결과는 Tabale 5-7 에 나타내었다. 본 연구에서의 결과를 살펴보면, finasteride 복용 전후의 남성 탈모 환자의 머리카락과 혈장에서의 안드로젠 중 DHEA, PREG, T의 경우 두 군에서 어떠한 차별성도 없었다. 두정부의 머리카락에서는 finasteride 복용 후 DHT 수치가 크게 감소하였으나, 후두부의 머리카락에서는 finasteride 복용 전후 정량값에 차이가 없었다. 5 α -reductase II의 활성도의 지표로 알려진 DHT/T는 finasteride 복용 후 두정부 머리카락에서 감소하여 5 α -reductase II의 활성이 감소한 것으로 예측할 수 있었다 ($p < 0.005$, Figure 12). 반면 후두부 머리카락에서는 DHT/T는 두 군 사이에서 어떠한 차별성도 없었다. 머리카락은 각각의 부위마다 다른 특성을 가지고 있다고 알려져 있다. 탈모가 일어나지 않는 후두부 보다는 탈모가 일어나는 남성탈모 환자의 전두부 및 두정부 모낭에서 5 α -reductase II의 활성과 안드로젠 수용체의 수치가 더 높다고 보고된 바가 있다.⁵¹⁾ 또한 남

성탈모 환자와 정상인의 머리카락에서 DHT, DHT/T 수치는 두정부에서 차별성이 있는 반면 후두부에는 어떠한 차이도 없다고 보고되었다.⁵²⁾ 따라서 남성 탈모는 두정부의 안드로겐 분포에 영향을 받는다고 예상할 수 있다.

혈장이나 혈청에서 DHT 수치는 탈모의 병리 생리학에 있어서 매우 중요하다. 6개월 동안 finasteride 치료를 받은 탈모 환자의 혈청에서 DHT 수치는 60-70% 감소했다는 보고가 있다.⁵³⁾ 본 실험결과 5개월 동안 finasteride 복용 한 탈모 환자의 혈장에서 DHT, DHT/T가 현저하게 감소하였다 ($p < 0.001$, $p < 0.001$, Figure 13). 결과적으로 finasteride는 5 α -reductase II의 활성을 억제하고 혈장과 두정부 머리카락의 DHT를 감소시킨다고 할 수 있다. 이러한 결과를 통하여 biological matrix 로써 머리카락 자체로 남성 탈모 환자에서 finasteride 약물 효과를 연구할 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

Table 5. The levels (ng/g) and relative ratios of androgens in vertex scalp hair of MPB before- and after- finasteride administration.

Steroids	Before- finasteride administration (n ^a =21)	After- finasteride administration (n=21)	t-test (p value)
	mean±SD	mean±SD	
DHEA	1.66±0.60	1.52±0.35	NS ^b
PREG	7.68±5.46	6.45±4.63	NS
T	10.96±2.66	12.24±4.19	NS
DHT	0.73±0.40	0.47±0.24	p < 0.05
DHT/T ratio	0.07±0.03	0.04±0.02	p < 0.005

^a n: number of subjects

^b NS: no significant; statistical significance was determined by the student t-test.

Table 6. The levels (ng/g) and relative ratios of androgens in occipital scalp hair of MPB before- and after- finasteride administration.

Steroids	Before- finasteride administration (n ^a =21)	After- finasteride administration (n=21)	t-test (p value)
	mean±SD	mean±SD	
DHEA	1.39±0.40	1.45±0.47	NS ^b
PREG	4.51±6.43	4.20±4.95	NS
T	9.62±2.94	11.42±3.68	NS
DHT	0.58±0.38	0.43±0.29	NS
DHT/T ratio	0.06±0.03	0.04±0.03	NS

^a n: number of subjects

^b NS: no significant; statistical significance was determined by the student t-test.

Table 7. The levels (ng/g) and relative ratios of androgens in plasma of MPB before- and after- finasteride administration.

Steroids	Before- finasteride	After- finasteride	t-test (p value)
	administration	administration	
	(n ^a =11)	(n=11)	
	mean±SD	mean±SD	
DHEA	15.57±6.45	12.09±4.98	NS ^b
PREG	3.25±2.15	1.93±1.58	NS
T	4.43±1.06	5.36±1.84	NS
DHT	1.24±0.39	0.56±0.33	p < 0.001
DHT/T ratio	0.28±0.06	0.11±0.06	p < 0.001

^a n: number of subjects

^b NS: no significant; statistical significance was determined by the student t-test.

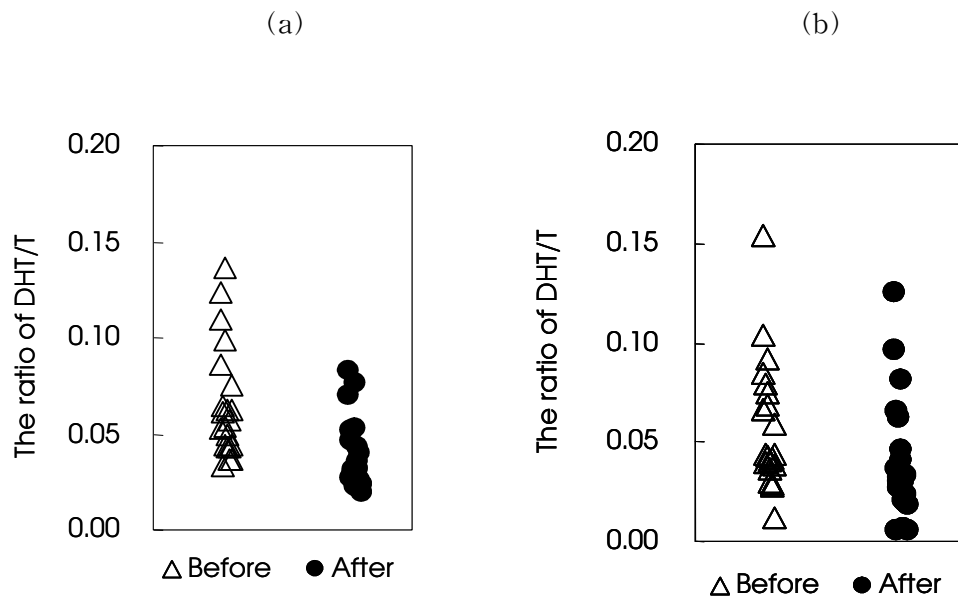


Figure 12. DHT/T ratio in (a) vertex and (b) occipital hair before- and after- finasteride administration. The DHT/T ratio indicates the activity of 5 α -reductase type II. The DHT/T ratio after- finasteride administration was lower than before- finasteride administration in vertex scalp hair with MPB ($p < 0.005$). There is no difference between before- and after- finasteride administration in occipital hair.

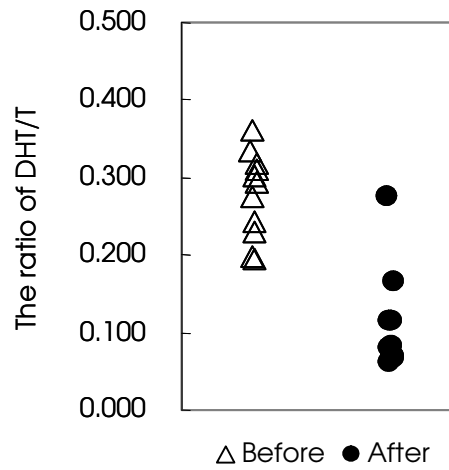


Figure 13. DHT/T ratio in plasma before- and after- finasteride administration. The DHT/T ratio after- finasteride administration was lower than before- finasteride administration in plasma with MPB ($p < 0.001$).

2. Global metabolic profiling의 설정

(1) pH 조건별 크로마토그램

산성 (pH=2-3)과 염기성 (pH=9-10) 조건에서의 가수분해시 추출되는 머리카락 내의 다양한 global metabolites들의 크로마토그램 형태를 비교하였다. 머리카락의 경우, 산 조건에서 정상인과 탈모환자를 비교해 보면 추출된 global metabolites들의 크로마토그램은 다소 다른 패턴을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 또한 크로마토그램상의 패턴을 통해 finasteride 복용 전후에 있어서 머리카락 내에서의 global metabolites들의 변화가 나타났음을 알 수 있었다. 게다가 finasteride 복용 후와 정상인에 있어서 크로마토그램의 패턴이 비슷한 경향을 나타내므로 이는 finasteride 복용 후에 머리카락 내에서의 global metabolites의 변화가 정상인과 비슷한 형태로 그 global metabolites들이 변화했다는 것을 의미한다(Figure 14). 그러나, 염기 조건에서의 가수분해 과정을 통해서 추출된 global metabolites들은 finasteride 복용 전후 및 정상인에 있어서 크게 차별화되지 않았다. 이러한 결과를 통해서, 산 조건의 가수분해 과정에서 추출된 global metabolites들이 finasteride 복용 후에 있어서 변화되었으며, finasteride 복용 후의 이러한 global metabolites들의 변화는 정상인에 가까운 형태로 변화된다는 것을 알 수 있었다. 혈장에서의 경우, finasteride 복용 전후의 탈모환자에서 산성 (pH=2-3), 약산성 (pH=5-6), 염기성 (pH=9-10) 조건에서 추출된 global metabolites들을 변화를 살펴보았다. 약산성 조건에서 finasteride 복용 전후에 있어서 global metabolites들의 변화가 나타났음을 알 수 있었다(Figure 15). 17.0-28.0 min 사이에 나타나는 미지의 대사체들이 finasteride 복용 후 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 산성, 염기성 조건에서의 가수분해 과정을 통해서 추출된 global metabolites 들은 크게 차별화되지 않았다.

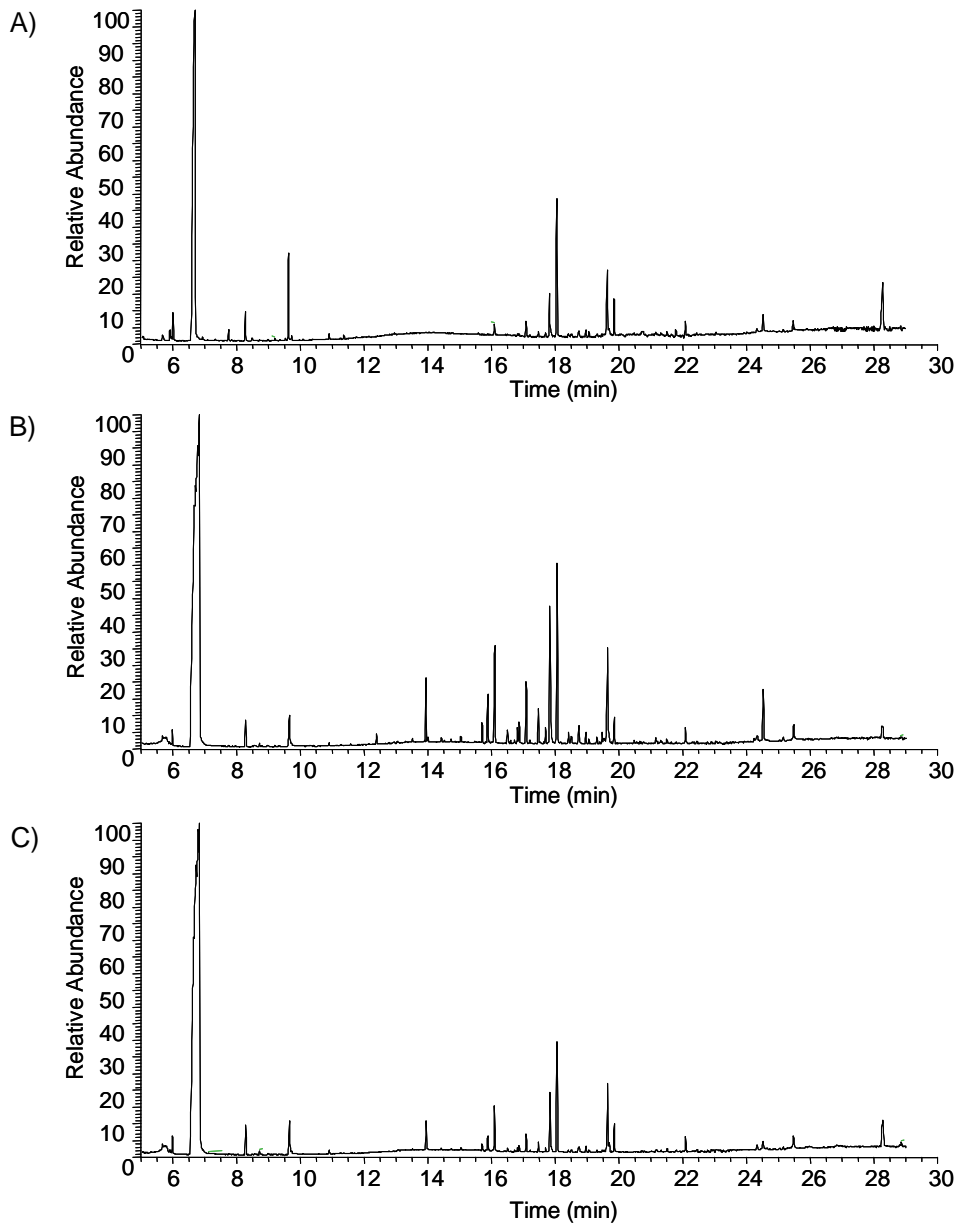


Figure 14. Total ion chromatograms of hair global metabolic profiling in acidic condition (pH=2-3). (a) normal (b) before- finasteride administration (c) after- finasteride administration.

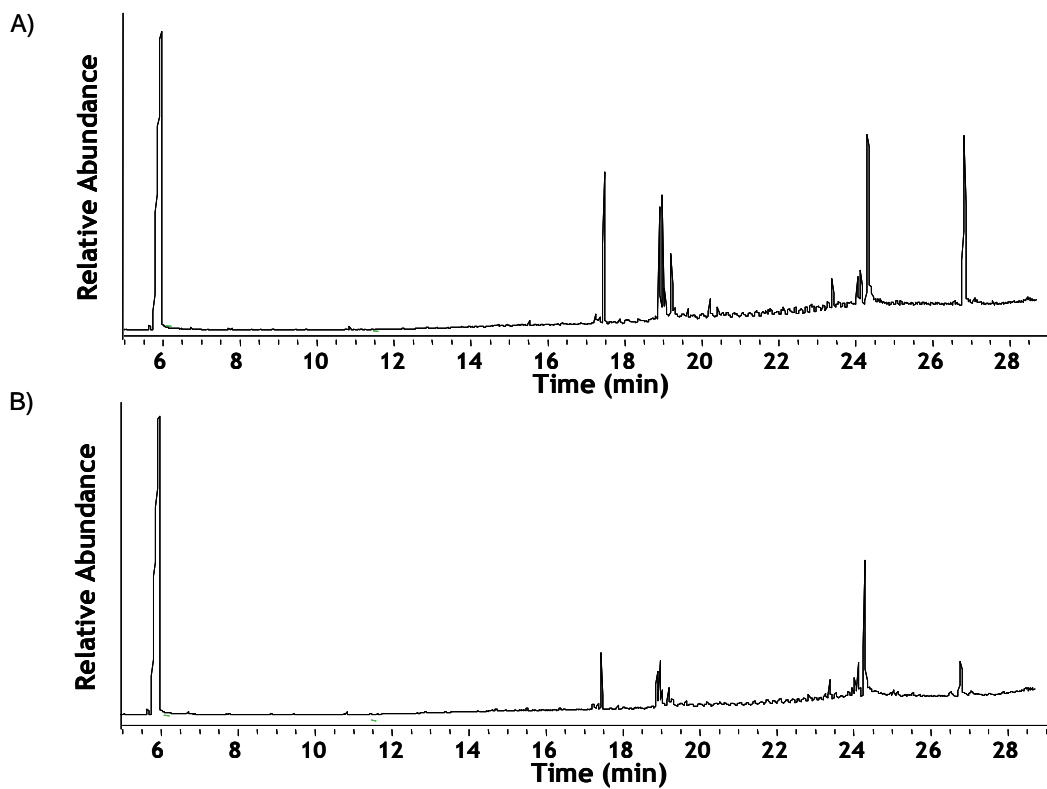


Figure 15. Total ion chromatograms of plasma global metabolic profiling in weak acidic condition (pH=5-6). (a) before- finasteride administration (b) after- finasteride administration. This chromatographic profile demonstrates that abundance of unknown peaks on the retention time range 17.0 - 28.0 min were decreased after- finasteride administration.

(2) 주성분 분석의 결과

Global metabolic profiling의 분석을 통하여 이때의 크로마토그램의 피크의 시간과 면적 데이터를 이용하여 주성분 분석을 실시하였다. 머리카락의 경우, 산성 (pH=2-3)과 염기성 (pH=9-10)의 두 가지 조건에서 추출된 global metabolites들을 분석하여 이들이 정상군과 finasteride 복용 전후의 탈모환자에 있어서 어떠한 경향으로 변화하는지에 대하여 연구하였다. 산 조건에서 추출한 경우에는 정상인과 탈모환자 군에서 주성분의 차이가 확연히 나타났고, finasteride 복용 전후에 있어서도 두 군에서 대체적으로 주성분이 분리되는 것을 볼 수 있었다. 염기성 조건에서 정상인과 탈모환자 군에서 주성분의 차이가 나타남을 확인할 수 있었지만, finasteride 복용 전후에 있어서는 주성분이 겹치는 경향이 나타나는 것을 알 수 있었다 (Figure 16).

혈장에서의 경우, finasteride 복용 전후의 탈모환자에서 산성 (pH=2-3), 약산성 (pH=5-6), 염기성 (pH=9-10)조건에서 추출된 global metabolites들을 변화를 살펴보았다. 약산성 조건에서 추출한 경우 finasteride 복용 전후 대체적으로 주성분이 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 산성과 염기성 조건에서는 주성분이 겹치는 경향이 나타나는 것을 알 수 있었다 (Figure 17).

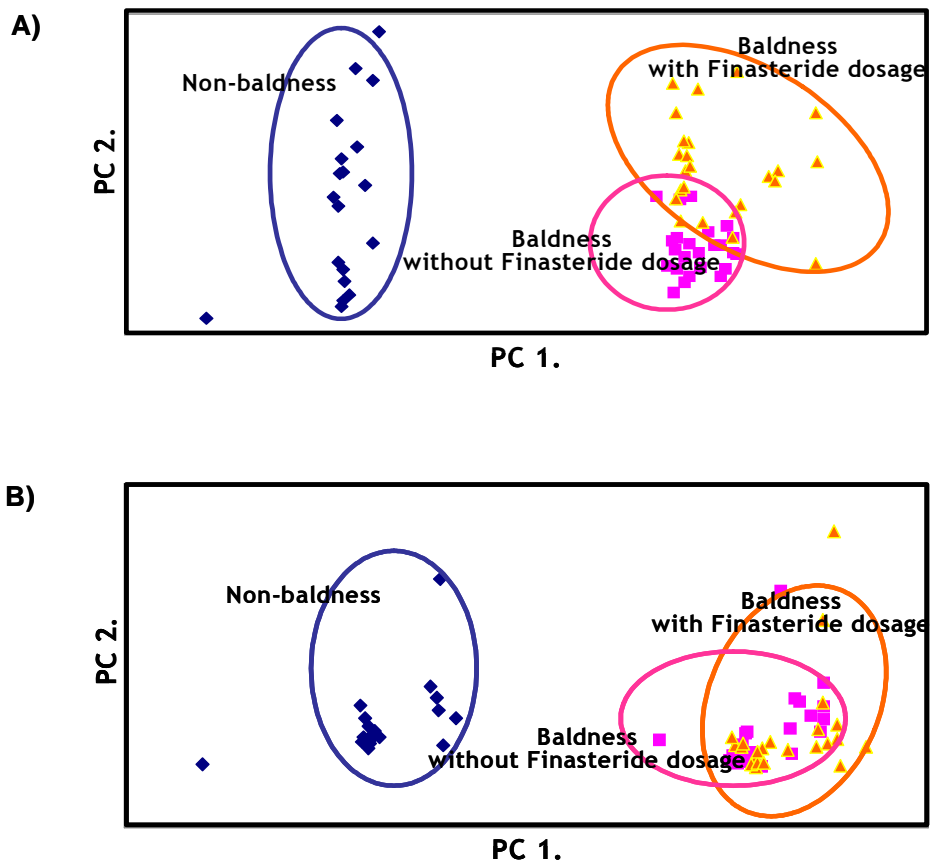


Figure 16. Principal component analysis of hair global metabolic profiling.
 (A) extraction with acidic condition (pH=2-3) (B) extraction with basic condition (pH=9-10).

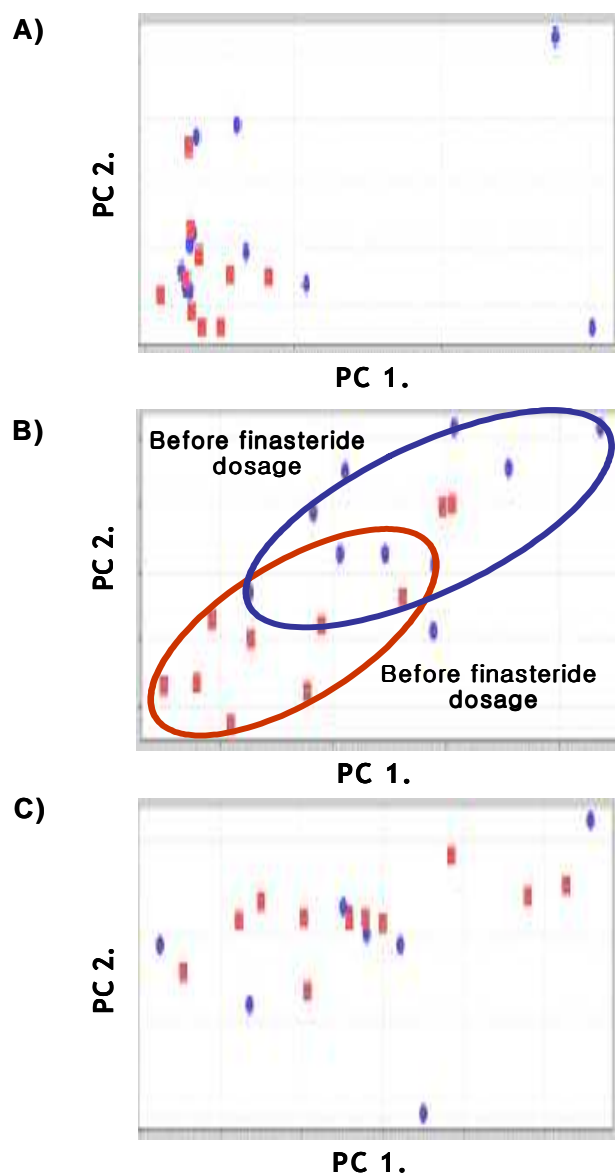


Figure 17. Principal component analysis of plasma global metabolic profiling. (A) extraction with acidic condition (pH=2-3) (B) extraction with weak acidic condition (pH=5-6) (C) extraction with basic condition (pH=9-10).

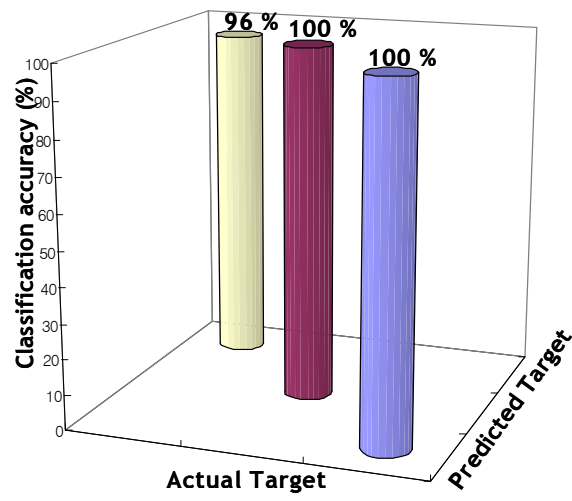
(3) 판별분석의 결과

본 연구에서는 K-nearest neighbor 판별 분석법을 이용하여 어느 정도의 분리도를 나타내는지 알아보았다. Training sample을 70 %로 지정하고, 소속이 명확하지 않은 케이스를 validation sample로 30 %를 정하여 판별 분석을 행하였다.

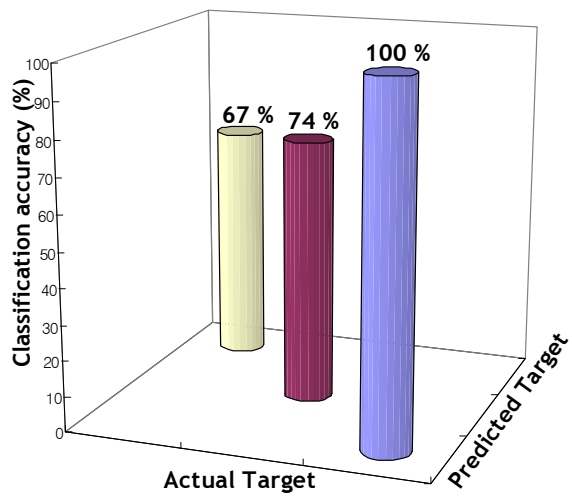
머리카락의 경우, 산성 조건에서 정상인과 finasteride 복용 전후의 탈모환자가 확연하게 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 산성 (pH=2-3)조건에서의 세균의 total classification accuracy는 90.01 %로 좋은 분리도를 나타내었다. 또한 염기성 (pH=9-10)조건에서의 세균의 total classification accuracy는 70.14 %로 좋은 분리도를 나타내었다. 이러한 판별 분석을 통해 미지의 대사체들이 정상인과 finasteride 복용 전후의 탈모환자 세균에서 다른 특성을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 18).

혈장의 경우, 약산성 (pH=5-6)조건에서 추출한 경우 finasteride 복용 전후의 탈모환자가 확연하게 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 약산성 조건에서의 세균의 total classification accuracy는 96.05 %로 좋은 분리도를 나타내었다. 반면, 산성 (pH=2-3)과 염기성 (pH=9-10)조건에서 추출한 경우 total classification accuracy가 70 %이하로 두 군이 분리되지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 19).

A)



B)



● Baldness without Finasteride dosage ● Baldness with Finasteride dosage ● Non-baldness

Figure 18. Discriminant analysis of hair global metabolic profiling.

(A) extraction with acidic condition (pH=2-3) (B) extraction with basic condition (pH=9-10).

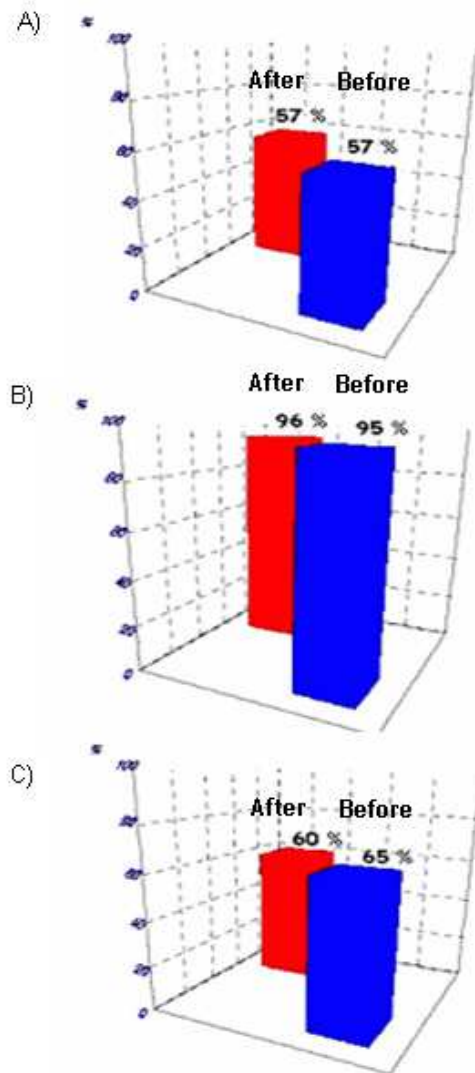


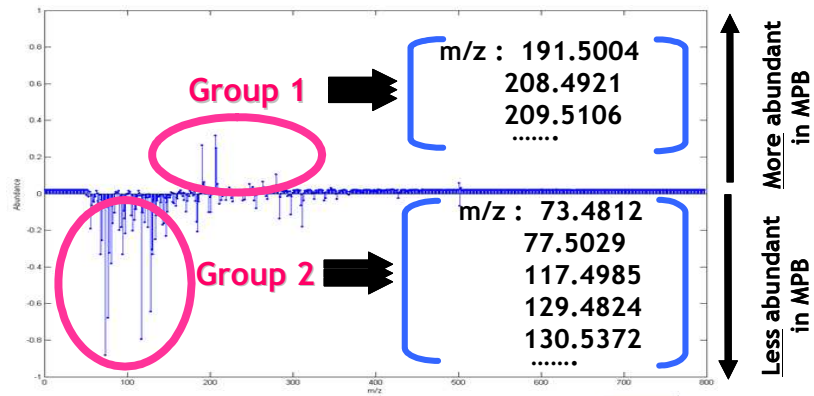
Figure 19. Discriminant analysis of plasma global metabolic profiling.

(A) extraction with acidic condition (pH=2-3) (B) extraction with weak acidic condition (pH=5-6.3) (C) extraction with basic condition (pH=9-10).

(4) Difference factor spectrum의 결과

GC/MS로부터 얻은 크로마토그램을 통하여 정상인을 기준으로 남성 탈모 환자의 mass spectrum에서 up, down regulation 정도를 나타내는 mass pattern을 찾았고, finasteride를 복용하기 전의 탈모환자를 기준으로 finasteride 복용 후의 남성 탈모환자의 mass spectrum에서 up, down regulation 정도를 나타내는 mass pattern을 찾았다 (Figure 20). Difference factor spectrum을 통하여 남성대머리에서 특이적인 변화를 보이며 biomarker 후보 물질로서 가치가 있는 몇 가지 mass spectrum 패턴을 찾았다. 이러한 패턴 중에서 콜레스테롤등 몇 가지 후보 대사체를 도출하였다 (Figure 21). 이를 바탕으로 콜레스테롤이 biomarker로써 가능성이 있는지 알아보기 위하여 finasteride 복용 전후의 남성 탈모환자의 머리카락에서 콜레스테롤의 분석 방법을 정립하고 콜레스테롤의 프로필 변화에 대하여 살펴 보고자 하였다.

A)



B)

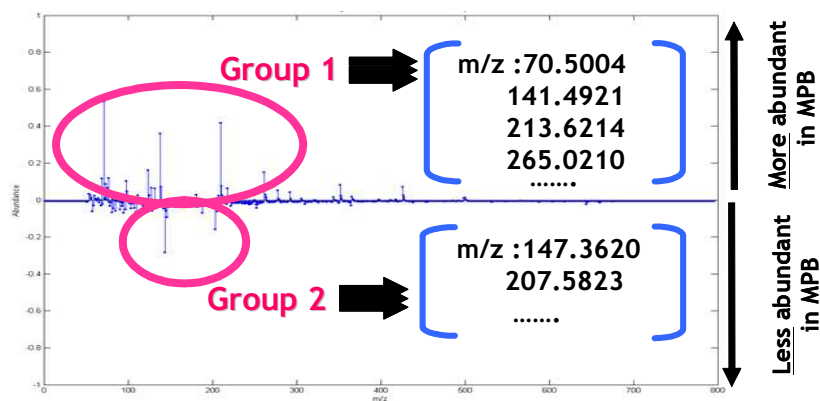


Figure 20. Difference factor spectrum of hair global metabolic profiling.

(A) MPB before- finasteride administration : MPB after- finasteride administration (B) Normal : MPB before- finasteride administration.

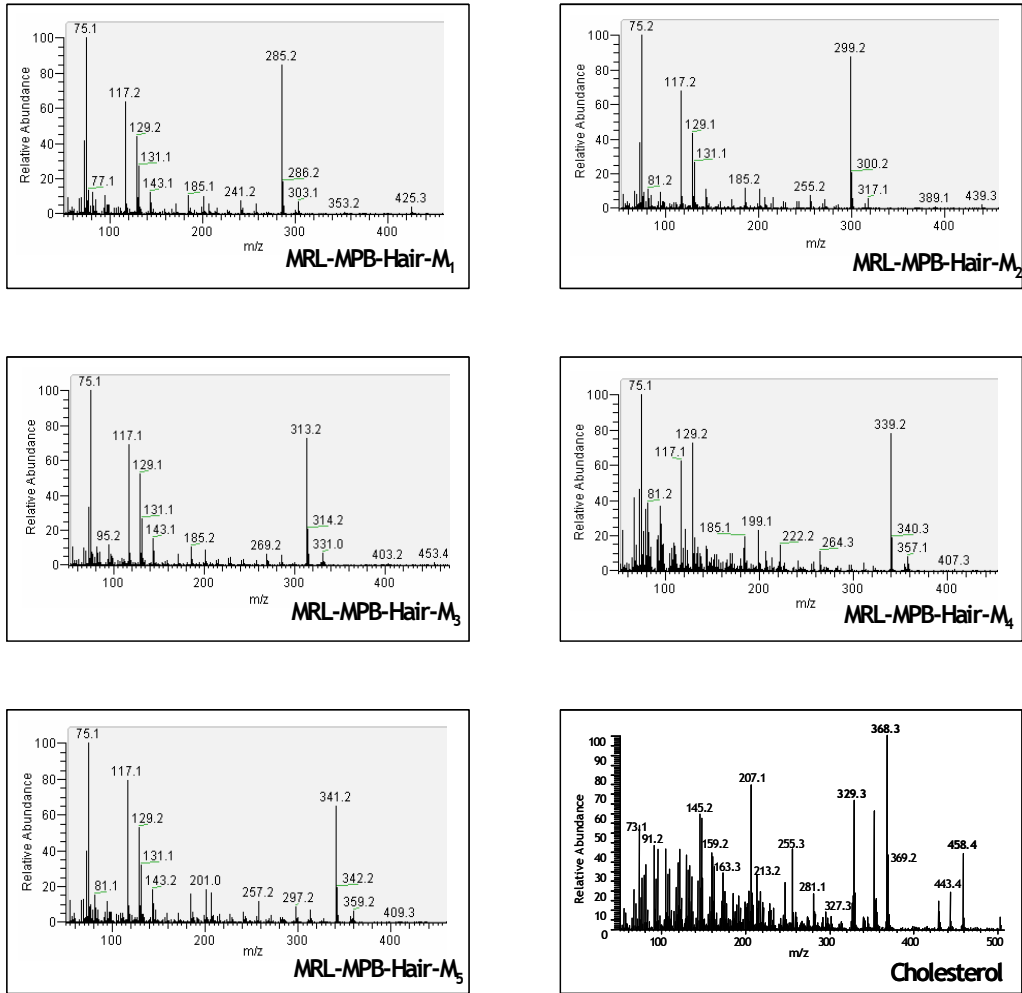


Figure 21. Biomarker candidates from difference factor spectrum.

3. 콜레스테롤 대사 프로파일 설정

(1) 전처리 방법의 확립

콜레스테롤을 머리카락으로부터 추출하기 위하여 효과적인 전처리 과정을 정립하였다. 이를 위해 산성, 염기성 조건에서 가수분해 조건을 테스트한 결과 염기 조건에서 회수율이 증가하였고 세포막의 지질을 용해시키는 효과가 있는 에탄올을 첨가하여 최적 추출 조건인 6 M KOH 1 ml 과 에탄올 1 ml 을 넣고 60°C에서 시간 가수분해를 시킴으로써 92 %이상의 회수율을 갖는 조건을 설정하였다. 방해물질의 효과적인 제거와 원하는 분석물질의 추출을 위해서 고체상 추출방법으로 Oasis HLB cartridge를 사용하였다. Oasis HLB cartridge는 친수성과 친유성 (hydrophilic & hydrophobic)의 균형을 갖춘 공중합체의 형태로 산성, 염기성, 중성 화합물에서 높은 회수율을 갖는다.⁵⁴⁾ 분석물질을 카트리지에 흡착 시킨 후 분석의 방해물질들을 제거하기 위하여 증류수를 흘려주었고 메탄올을 이용하여 용출시킨다. 콜레스테롤의 수산기의 극성을 완화시켜 GC를 이용한 분석에 적합하게 하고 휘발성을 증대시키기 위하여 TMS-ether로 유도체화 하였다.

(2) TMS-ether 유도체화에 의한 질량 스펙트럼

기본적으로 세 개의 육탄소 고리와 한 개의 오탄소 고리로 구성된 융합 고리화합물이 스테로이드(steroid)로 분류되는데 이중에서 3번 위치에 수산기가 있는 것을 콜레스테롤 이라고 한다. 수산기의 극성을 완화하여 GC로의 분석에 적합하게 하기 위하여 TMS-ether유도체화를 하였다. TMS-ether 로 유도체화한 콜레스테롤은 질량스펙트럼 상에서 $m/z=458$ $[M]^+$, $m/z=368$ $[M-TMS-H_2O]^+$, $m/z=329$ $[M-TMS-OC_3H_4]^+$ 등이 특징적으로 나타났다. $m/z=329$ 이온이 intensity는 높으나, 머리카락 시료로부터 background의 영향을 받기 때문에 정량이온을 유도체 분자이온 ($m/z=458$ $[M]^+$)을 선택하여 분석 및 정량하였다. 내부표준물질로 사용한 d_6 -cholesterol은 $m/z=464$ $[M]^+$, $m/z=374$ $[M-TMS-H_2O]^+$, $m/z=335$ $[M-TMS-OC_3H_4]^+$ 등이 특징적으로 나타났으며 이를 SIM 분석을 위한 특성이온(characteristic ion)으로 사용하였다. Figure 22에는 콜레스테롤의 질량 스펙트럼과 TMS-ether로 유도체화된 구조를 나타내었고, Figure 23에는 사람의 머리카락 추출물로부터 얻은 GC/MS 크로마토그램을 나타내었다.

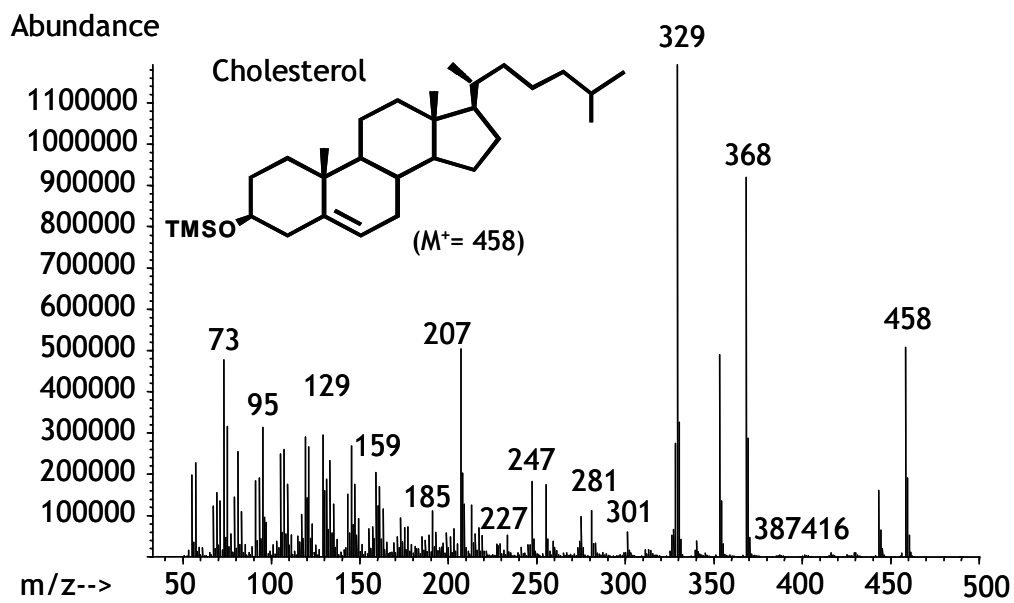


Figure 22. Mass spectra of trimethylsilyl derivatives of cholesterol.

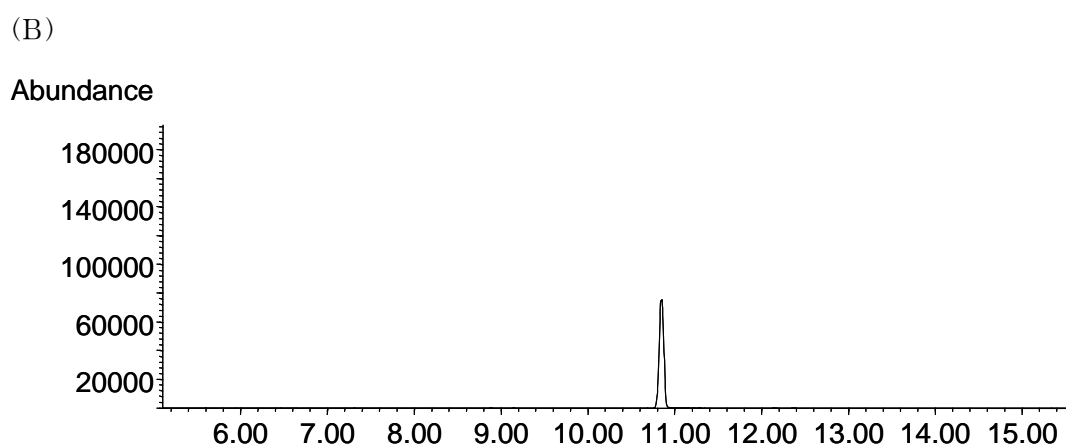
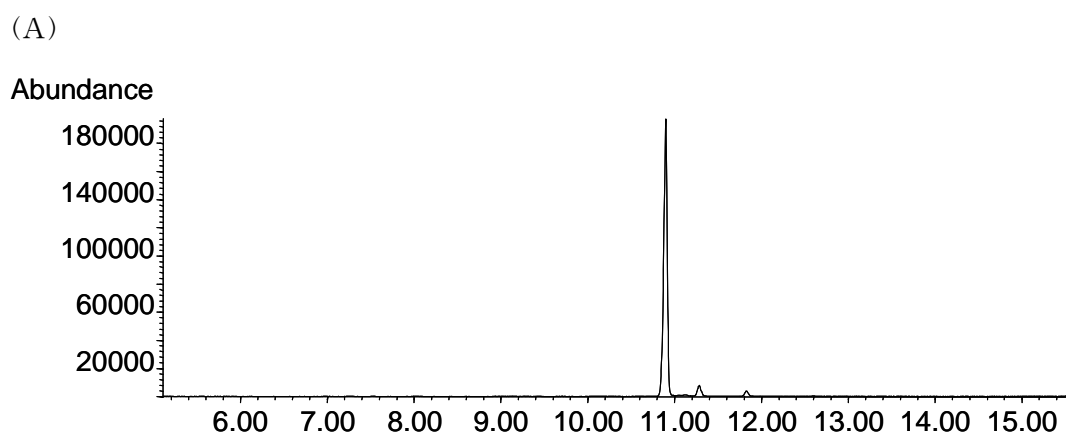


Figure 23. GC/MS TIC profile from the hair of MPB patients.

(A) Cholesterol, (B) d_6 -cholesterol (I.S)

(3) 콜레스테롤 분석을 위한 표준 검정곡선

임으로 정한 정상인들의 머리카락 시료를 분석하여 얻어진 콜레스테롤의 농도를 기준으로 한 농도범위에 따라 6개의 농도점 (100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 $\mu\text{g/g}$)을 선정하였다. 이 검정용 표준물을 본 실험 방법에 따라 추출한 후 TMS로 유도체화 하였으며, 이들을 GC/MS로 분석하여 검정곡선을 작성하였다. 검정곡선의 직선성은 콜레스테롤의 감응도와 내부표준물질의 감응도를 비교하여 회귀분석을 실행하여 얻었다. 그 결과 콜레스테롤의 R^2 값은 0.998 이상으로 좋은 직선성을 보였다 (appendix).

(4) 분석의 회수율 및 정확도, 정밀도

콜레스테롤의 회수율 및 정확도, 정밀도를 측정하기 위하여 매트릭스로 증류수를 사용하였다. 본 연구에서 설정한 분석 방법에 따라 처리하여 분석한 것과 전처리를 하지 않고 직접 유도체화하여 분석한 표준물질의 봉우리 면적을 비교하여 회수율(recovery)을 구하였으며, 그 결과 92 % 이상이었다. 정확도와 정밀도를 측정하기 위하여 증류수를 100, 1000, 2000 $\mu\text{g/ml}$ 씩 각각 가한 후, 실제 주입시킨 양과 정량한 값을 비교하여 정확도를 구하였으며, 정량값들 간의 표준편차 (standard deviation ; SD)와 상대 표준 편차 (relative standard deviation; RSD)로부터 정밀도를 측정하였다. Inter-day 와 intra-day 분석 결과 정확도는 1.30 - 5.51 %이었으며, 정밀도는 0.28 - 7.02 % (CV %)로 10 %이하의 결과를 나타내었다. 콜레스테롤의 구체적인 회수율과 정확도, 정밀도는 Table 8 과 같다.

Table 8. Intra- and inter-day assay for cholesterol.

Added Amount ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	Intra-day (n=9)			Inter-day (n=9)		
		Found (mean \pm SD ^a)	CV ^b (%)	accuracy (%)	Found (mean \pm SD)	CV (%)	accuracy (%)
	92.00						
100.00		96.69 \pm 3.31	3.44	3.34	97.09 \pm 6.76	7.02	1.56
1000.00		945.32 \pm 11.79	1.24	5.51	952.06 \pm 10.79	1.70	5.19
2000.00		2027.86 \pm 5.70	0.28	1.38	2023.80 \pm 5.65	0.38	1.30

^a Standard deviation

^b Coefficient of variation

(5) 생체 시료 내의 농도 결정

본 연구에서의 결과를 살펴보면, finasteride 복용 전(mean±SD, 1023±390 $\mu\text{g/g}$) 보다는 복용 후(mean±SD, 1913±327 $\mu\text{g/g}$)에 남성 탈모 환자의 두정부 머리카락 내에서 콜레스테롤이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$). 또한 후두부 머리카락 내에서도 finasteride 복용 전(mean±SD, 1371±453 $\mu\text{g/g}$) 보다는 복용 후(mean±SD, 2000±489 $\mu\text{g/g}$)에 콜레스테롤이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$, Figure 24).

본 연구 방법은 사람의 머리카락으로부터 콜레스테롤을 효과적으로 추출할 수 있도록 하며, 소량의 머리카락 시료로도 기체 크로마토그래피/질량분석기를 이용하여 선택적이고 우수한 감도를 가지는 최적의 분석 조건을 제공한다. 따라서 본 발명을 이용할 경우 분석 감도의 확보, 정확성, 재현성, 분석의 신속성 및 간편성 등을 만족시킬 수 있다. 이로 인해 머리카락 중에서 콜레스테롤의 함량을 정확하게 알 수 있고, 머리카락 한 올에서도 콜레스테롤 검출 가능성을 제시할 수 있으며, 콜레스테롤을 연구하기 위한 정량 및 정성분석에 널리 이용될 것이라 기대된다.

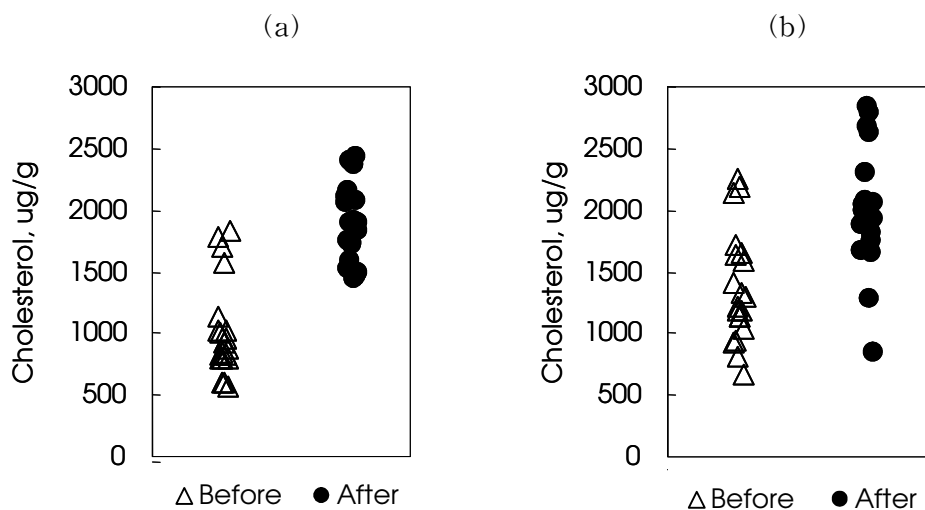


Figure 24. Cholesterol level in (a) vertex and (b) occipital hair before and after finasteride administration. The cholesterol level after finasteride administration was higher than before finasteride administration in vertex scalp hair with MPB ($p < 0.001$). Also, there is significantly difference between before and after finasteride administration in occipital hair ($P < 0.001$).

V. 결 론

본 연구에서는 생체 내 미량으로 존재하는 내인성 물질들의 확인과 정량에 뛰어난 감도를 나타내 신뢰성이 높은 분석 방법으로 활용되고 있는 가스 크로마토그래피/질량분석기 (gas chromatography/mass spectrometry)를 이용하여 finasteride 복용 전후의 남성탈모 환자의 혈장과 머리카락에서 targeted metabolic profiling 변화를 살펴보았다. 또한 다양한 통계적 기술을 사용하여 정상인과 finasteride 복용 전후의 남성탈모환자의 global metabolic profiling의 변화를 살펴보고 남성탈모환자의 biomarker로서 가능성이 있는 후보 대사체들을 도출하여 남성 탈모의 치료와 예방에 유용하게 사용할 수 있는 기초적인 자료를 제시하고자 하였다.

첫째, targeted metabolic profiling 변화를 살펴보기 위하여 머리카락과 혈장 시료 내에 미량으로 존재하는 안드로겐의 효과적인 분석법을 정립하였다. 염기성 가수분해 과정과 액체-액체 추출법으로 머리카락 내의 간섭물질들을 제거함으로써 정확도, 정밀도, 회수율이 우수한 전처리 과정을 확립하였으며, GC 상에서의 property를 향상시키고 질량분석기에서의 감도를 높이기 위하여 TMS-ether로 유도체화하여 GC/MS를 이용하여 안드로겐을 분석 및 정량하였다.

둘째, finasteride 복용 전후의 남성 탈모 환자의 머리카락과 혈장에서의 안드로겐 중 DHEA, PREG, T의 경우 두 군에서 어떠한 차별성도 없었다. 5 α -reductase II 의 활성도의 지표로 알려진 DHT/T는 finasteride 복용 후 두정부 머리카락과 혈장에서 감소하여 5 α -reductase II 의 활성이 감소한 것으로 예측할 수 있다. 이를 통해 biological matrix 로써 머리카락 자체로

남성 탈모 환자에서 finasteride 약물 효과를 연구할 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

셋째, 정상인과 finasteride 복용 전후의 알려지지 않은 미지의 대사체들이 어떠한 변화를 나타내는지에 대한 정보를 알아보기 위하여 global metabolic profiling을 위한 효과적인 전처리 방법을 설정하였다. 다양한 실험 조건에서 검출되는 미지의 대사체들을 profiling 하고, 이로부터 얻은 정성 데이터를 주성분 분석 (Principal Component Analysis, PCA) 및 K-nearest neighbor 판별 기법과 같은 통계적인 기술을 사용하여 global metabolic profiling 변화를 살펴보았다.

넷째, 1차적으로 각 조건에서 정상인과 finasteride 복용 전후의 탈모환자의 크로마토그램을 비교하여 차별성을 확인할 수 있었다. 또한, 주성분 분석을 통하여 70 % 이상의 주성분 차이를 확인할 수 있었고, 판별 분석을 통하여 각각의 군으로 나누어지는 것을 확인할 수 있었다. Difference factor spectrum을 통하여 남성대머리에서 특이적인 변화를 보이며 biomarker 후보 물질로서 가치가 있는 몇 가지 mass spectrum 패턴을 찾았다. 이러한 패턴 중에서 콜레스테롤 등 몇 가지 후보 대사체를 도출하였다.

다섯째, 머리카락 샘플 내에서의 방해물질의 영향을 적게 받을 수 있도록 소량의 머리카락 1 mg을 사용하여 콜레스테롤을 분석하는 방법을 설정하였다. 간단한 머리카락을 세척방법과 염기성 가수분해, Oasis HLB cartridge를 이용한 추출로 신속하면서도 간단한 전처리를 통하여 정확도, 정밀도, 회수율이 우수한 검출법을 개발하였다. GC 상에서의 property를 향상시키고 질량분석기에서의 감도를 높이기 위하여 TMS-ether로 유도체화하여 GC/MS를 이용하여 콜레스테롤을 분석 및 정량하였다

여섯째, global metabolic profiling을 통하여 도출된 후보 대사체로써 콜레스테롤의 가능성을 알아보고자 finasteride 복용 전후의 탈모환자의 머리카락 시료에서 콜레스테롤을 분석하였다. 그 결과, finasteride 복용 전 보다는 복용 후에 남성 탈모 환자의 두정부와 후두부 머리카락 내에서 콜레스테롤이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Ralph, M. T. *Exp. Gerontol*, **2002**, 37, 981-990.
2. Schweikert, H. U.; Wilson, J. D. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1974**, 113, 588-592.
3. Elis, A.; Olsen. *Disorders of hair growth diagnosis and treatment. 1st ed. McGraw-Hill.* **1994**, p 257-284.
4. Rittmaster, R. S. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1995**, 80, 2559-2563.
5. Hamilton, J. B. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1951**, 53, 708-728.
6. Norwood, O. T. *South Med. J.* **1975**, 68, 1359-1365.
7. Maffei, C.; Fossati, A.; Rinaldi, F.; Riva, E. *Arch. Dermatol.* **1994**, 130, 868-872.
8. Denti, L.; Pasolini, G.; Cortellini, P.; Sanfelici, L.; Benedetti, R.; Cecchetti, A.; Ferretti, S.; Banchini, A.; Ablondi, F.; Valenti, G. *J Endocrinol Invest.* **1999**, 22, 70-71.
9. Choi, M. H.; Yoo, Y. S.; Chung, B. C. *J Invest Dermatol.* **2001**, 116, 57-61.
10. Kaplan, S. A. *Urology.* **2001**, 58, 65-70.
11. Choi, M. H.; Kim, K. R.; Kim, Y. T.; Chung, B. C. *Clin. Chem.* **2001**, 47, 143-144.
12. Ferko, A. P.; Barbieri, E. J.; DiGregorio, G. T.; Ruch, E. K. *Life. Sci.* **1992**, 51, 1823-1832.
13. Skender, L.; Karačić, V.; Brčić, I.; Bagarić, A. *Forensic Sci. Int.* **2002**, 125, 120-126.
14. Nicholson, J. K.; Holmes, E & Lindon, J. *Metabonomics. Xenobiotica.*

- 1999**, *29*, 1181-1189.
15. Nicholson, J. K. & Wilson, I. *Nature Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 668-676.
 16. Fiehn, O. *Phytochemistry.* **2003**, *62*, 875-886.
 17. Devaux, P. G.; Horming, M. G. & Horning, E. C. *Analyt. Lett.* **1996**, *4*, 70-82.
 18. Horning, M. G. *J Chromatogr. Sci.* **1971**, *9*, 129-140.
 19. Goodacre, R.; Shann, B.; Gilbert, B. J.; Timmins, E. M.; McGovern, A. C., Aisberg, B. K.; Kell, D. B. & Logan, N. A. *Anal Chem.* **2000**, *72*, 119-127.
 20. Hall, R.; Veale, M.; Fiehn, O.; Hardy, N.; Summer, L.; Bino, R. *Plant Cell.* **2002**, *14*, 1437-1440.
 21. Fiehn, O.; Kopka, J.; Dormann, P.; Altmann, T.; Trethewey, R. N.; Willmitzer, L. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1157-1161.
 22. Fiehn, O.; Kopka, J.; Trethewey, R.N.; Willmitzer, L. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3573-3580.
 23. Roessner, U.; Wagner, C.; Kopka, J.; Trethewey, R. N.; Willmitzer, L. *Plant J.* **2000**, *32*, 131-142.
 24. Sauter, H.; Lauer, M.; Fritsch, H. *Acs Symp. Ser.* **1991**, *443*, 288-299.
 25. Saghatelian, A.; Cravatt, B. F. *Current opinion in chemical biology.* **2005**, *9*, 62-68.
 26. Julian, L.; Griffin, John P. Shockcor. *Nature Review.* **2004**, 551-561
 27. Alisdair, R.; Fernie, Richard N. Trethewey. Arno J. Krotzky. Lothar Willmitzer. Metabolite profiling; from diagnostics to systems biology.
 28. Hotellin, H. *J Educational Psychol.* **1933**, *24*, 417-441.

29. Kohonen, T. *Biol. Cybern.* **1982**, *43*, 59-69.
30. Miller, W. L. *Mol Cell Endocrinol.* **2002**, *198*, 7-14.
31. Shimada, K.; Mitamura, K.; Higashi, T. *J. Chromatogr. A.* **2001**, *935*, 141-172.
32. Hoffmann, R. *Clin Dermatol.* **2002**, *27*, 373-382.
33. Ralph, M. T.; *Exp. Gerontol.* **2002**, *37*, 981-990.
34. Randall, V. A.; Thornton, M. J.; Hamada, K. *Ann NY Acad Sci.* **1991**, *642*, 355-375.
35. Kaufman, K. D.; Olsen, E. A.; Whiting, D. *J Am Acad Dermatol.* **1998**, *39*, 578-589.
36. Bayne, E. K.; Flanagan, J.; Einstein, M.; Ayala, J.; Chang, B.; Azzolina, B.; Whiting, D. A.; Mumford, R. A.; Thiboutot, D.; Singer, I. I.; Harris, G. *Br J Dermatol.* **1999**, *141*, 481-491.
37. Sawaya, M. E.; Price, V. H. *J Invest Dermatol.* **1997**, *109*, 296-300.
38. Rhodes, L.; Harper, J.; Uno, H.; Gaito, G.; Audette-Arruda, J.; Kurata, S.; Berman, C.; Primka, R.; Pikounis, B. *J Clin Endocrinol Metab.* **1994**, *79*, 991-996.
39. Drake, L.; Hordinsky, M.; Fiedler, V. Swinehart, J.; Unger, W. P.; Cotterill, P. C.; Thiboutot, D. M.; Lowe, N.; Jacobson, C.; Whiting, D.; Stieglitz, S.; Kraus, S. J.; Griffin, E. I.; Weiss, D.; Carrington, P.; Gencheff, C.; Cole, G. W.; Pariser, D. M.; Epstein, E. S.; Tanaka, W.; Dallob, A.; Vandormael, K.; Geissler, L.; Waldstreicher, J. *J Am Acad Dermatol.* **1999**, *41*, 550-554.
40. Van Neste, D.; Fuh, V.; Sanchez-Pedreno, P.; Lopez-Bran, E.; Wolff, H.; Whiting, D.; Roberts, J.; Kopera, D.; Stene, J. J.; Calvieri, S.; Tosti, A.; Prens, E.; Guarrera, M.; Kanojia, P.; He, W.; Kaufman, K. D. *Br J*

- Dermatol.* **2000**, *143*, 804–810.
41. Stough, D. B.; Rao, N. A.; Kaufman, K. D.; Mitchell, C. *Eur J Dermatol.* **2002**, *12*, 32–37.
 42. Rhodes, L.; Harper, J.; Uno, H.; Gaito, G.; Audette–Arruda, J.; Kurata, S.; Berman, C.; Primka, R.; Pikounis, B. *J Clin Endocrinol Metab.* **1994**, *79*, 991–996.
 43. Price, V. H.; Menefee, E.; Sanchez, M.; Ruane, P.; Kaufman, K.D. *Am Acad Dermatol.* **2002**, *46*, 517–523.
 44. Shapiro, J.; Kaufman, K. D. *J Investig Dermatol Symp Proc.* **2003**, *8*, 20–23.
 45. Borroni, B.; Colciaghi, F.; Lenzi, G.L.; Caimi, L.; Cattabeni, F.; Di Luca, M.; Padovani, A. *Neurobiology of Aging.* **2003**, *24*, 631–636.
 46. Clarke, R.; Lewington, S.; Youngman, L.; Sherliker, P.; Peto, R.; Collins, R. *European Heart Journal.* **2002**, *23*, 286–293.
 47. Mogos, T.; Stanescu, J.; Tanase, I.; Georgescu, M.; Mincu, I. *Rom J Intern Med.* **1991**, *29*, 85–89.
 48. Brosche, T.; Dressler, S.; Platt, D. *Aging.* **2001**, *13*, 131–138.
 49. Wertz, P. W.; Downing, D. T. *Lipids.* **1988**, *23*, 878–881.
 50. Wertz, P.W. and Downing, D.T. *Comp. Biochem Physiol. B.* **1989**, *92*, 759–761.
 51. Randall, V. A.; Thornton, M. J.; Hamada, K.; Redfern, C. P.; Nutbrown, M.; Ebling, F.J.; Messenger, A.G. *Ann NY Acad Sci.* **1991**, *642*, 355–375.
 52. Bang, H. J.; Yang, Y. J.; Lho, D. S. Lee, W. Y.; Sim, W. Y.; Chung, B. C. *J Dermatol Sci.* **2004**, *34*, 11–16.
 53. DLerchl, A.; Nieschlag, E. *Gen Comp Endocrinol.* **1995**, *98*, 129–136.

54. Cheng, Y. F.; Neue, U. D.; Bean, L. *J Chromatogr A*. **1998**, *828*, 273-281.

ABSTRACT

Targeted and global metabolic profiling in plasma and scalp hair of patients with male-pattern baldness before- and after- finasteride dosage by gas chromatography/mass spectrometry

Hye Kyung Ryu

Department of Chemistry

Graduate school of

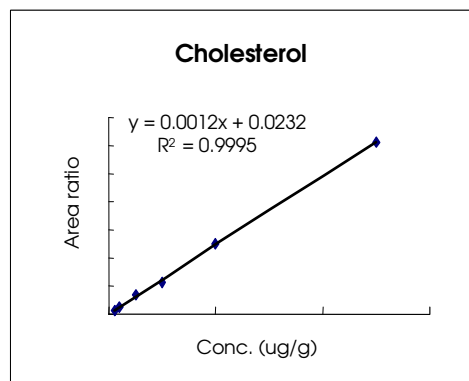
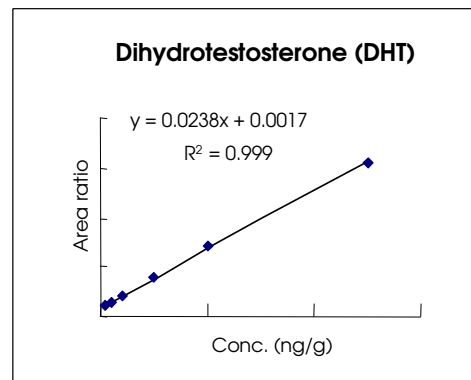
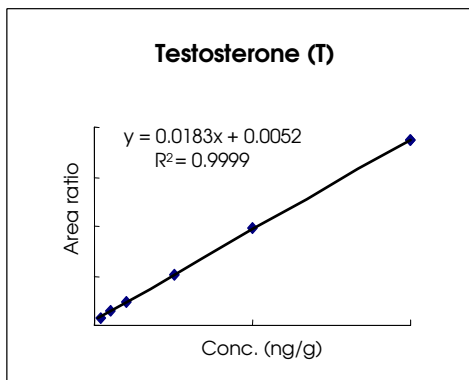
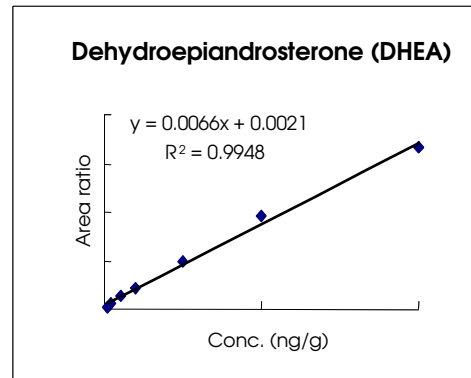
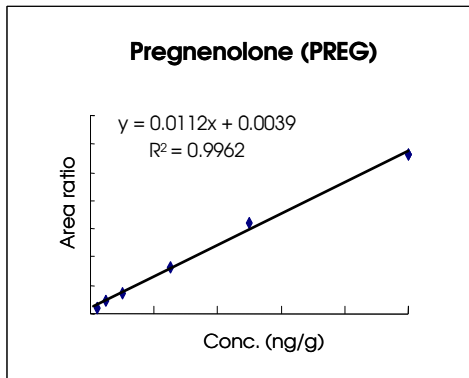
Sungshin Women's University

Male pattern baldness (MPB) is heritable and strongly androgen dependent. Finasteride, one of the most popular drugs for MPB treatment, works as competitive inhibitor of 5 α -reductase II. In this study, we tested before and after MPB patients was treated with finasteride. We also investigated the change of targeted and global metabolic profiling. For the sample preparation, plasma and hair were hydrolyzed and then extracted with liquid-liquid extraction or solid-phase extraction. The dried residues were derivatized with a mixture of MSTFA/NH₄I/DTE or MSTFA/TMCS/TMSI. As the results, the accuracy and CV % was showed 10-20 % or so. The correlation coefficient (R^2) on calibration curve was up to 0.99. Therefore

the linearity showed. We found the most proper condition and processed for androgens, global metabolic profiling and cholesterol. In targeted approach results, the ratio of DHT/T, as an indicator of the activity of 5 α -reductase II, was significantly decreased in vertex hair and plasma after finasteride treatment. Global metabolic profiling makes it possible to find unknown metabolites could establish a different non-targeted metabolic profiling between before and after finasteride treatment with MPB in hair and plasma from PCA and DA results. Also, we found an unknown metabolite "MPL-MPB-Hair-M₁..." and cholesterol from matching mass spectrum using identified mass to charge (m/z) in difference factor spectrum pattern. Based on these result, we detected cholesterol which was significantly decreased in vertex and occipital hair after the finasteride treatment.

Appendix

(Calibration curves)



Calibration curves of measurement of targeted metabolic profiling.