

개에서 thin layer chromatography 박층크로마토그래피 및 ELISA를 이용한 요중의 cortisol:creatinine비 측정

손대호 · 나기정* · 오태호 · 이혜숙** · 한홍율

서울대학교 수의과대학 · 충북대학교 수의과대학*
국립수의과학검역원**
(1999년 10월 15일 접수)

Determination of urinary cortisol : creatinine ratios by sequential thin layer chromatography and ELISA in dogs

Dae-ho Sohn, Ki-jeong Na* , Tae-ho Oh, Hye-sook Lee** , Hong-ryul Han

College of Veterinary Medicine, Seoul National University
*College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University**
*National Veterinary Research & Quarantine Service***

(Received Oct 15, 1999)

Abstract : This study was conducted to evaluate the ELISA kit for measuring the level of cortisol in the urine. The CV of within-run variation and day to day variation were 0.4~2.8 and 1.8~5.7, respectively. The minimum limitation of measurement was 1ng/ml. The cross reaction was high ($CR_{50}(\%) = 11.4\sim 43.2$) in prednisolone, 11-deoxycortisol, 21-deoxycortisol and prednisone. There was low and no cross reaction in other steroid. To develop the ELISA kit we measured the cortisol level in diluted urine with PBS (procedure I), extracted urine with methylene chloride (procedure II) and extracted methylene chloride-extracted urine from thin-layer chromatography (procedure III). The CV value of procedure I, II, III was 9.4~28.3%, 7.2~8.9% and 2.5~5.7%, respectively. There was significant difference between procedure I with II, and procedure I with III ($p < 0.01$), but no difference between procedure II with III significantly ($p < 0.01$). The mean UCCR of urine collected through am 8 to 10 was $9.5 \pm 7.6(0.14\sim 28.0)$ in 12-month-old dog ($n = 47$). In this study we can measure the cortisol level in extracted urine with methylene chloride and sequential thin-layer chromatography accurately using ELISA kit.

Key words : UCCR, cortisol, creatinine, thin layer chromatography, ELISA.

서 론

개에서 부신피질기능항진증은 내분비성 질환으로 부신피질에서 cortisol의 과량 분비에 기인한다. 1960년대에는 오줌에 분비되는 17-hydroxy corticosteroids를 측정하여 hyperadrenocorticoid 상태를 증명함으로써 부신피질기능항진증을 진단하려고 하였다¹². 24시간동안의 오줌을 완벽하게 채취하기 곤란함과 화학적 분석함에 있어서 복잡하고 시간소비가 많은 등의 단점들은 부신피질기능항진증의 진단을 위한 근거로 부신피질기능항진증의 다른 측면 즉, 뇌하수체-부신피질계의 조절장애에 관심을 갖게 하였다. 이후 연구들은 부신피질기능항진증에 대한 감별진단에 24시간 오줌 중의 cortisol 대사산물보다 24시간 urine free-cortisol(UFC)을 측정함이 더욱 감도가 좋다는 것을 증명하였다^{3,4}. 이어서 24시간동안 오줌채취를 아침 또는 저녁에 몇 시간동안의 시료로 대체하는 방법이 radio-immunoassay(RIA)로 진행되었다⁵.

부신피질기능항진증과 정상개체를 분별하는 screening test로 low-dose dexamethasone 억제검사는 뛰어나다고 평가되었다^{6,7}. 그러나 스트레스, 질병 또는 약물투여 등에 의해 위양성 및 위음성 결과가 발생한다는 것에 초점을 맞춘 연구 역시 사람⁸ 및 개 양측 모두에서 진행되었다.

한편 무작위로 시간의 연속성 없이 채취한 단일 오줌의 cortisol : creatinine 비율(UCCR)이 개의 부신피질기능항진증을 감별하는데 도움을 준다는 연구결과가 보고되었다^{9,10}. Rijnberk 등¹⁰과 Smiley 및 Peterson¹¹은 단일 오줌의 UCCR 측정으로 hyperadrenocorticism을 진단함에 있어서 진단감도와 특이성이 각각 0.99 및 0.77, 0.92 및 0.95로 보고한 반면, Feldman과 Mack¹²은 진단감도와 특이성이 각각 1.0 및 0.22라고 보고하였다. 그러나 Smiley와 Peterson¹¹은 중증도로 심한 부신피질기능항진증 이외의 질병으로 입원한 개에서 UCCR의 특이성이 매우 낮음(대략 0.21~0.24)을 보고하였으나 중증도로 심한 부신피질기능항진증 이외의 질병에 이환된 개에서 시료를 입원하지 않고 채취한 단순한 이유로 특이성이 0.85로 높게 나왔음을 보고하였다.

UFC를 정량하는 많은 방법이 고안되었지만 아직 RIA가 가장 널리 사용되고 있다. 십여년전 방사능 문제 및 임상실험실에서의 방사선 동위원소 취급과 관련된 문제

들을 극복하기 위해 RIA의 대안방법을 제안하였다. 이러한 방법들중 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)는 가장 널리 쓰이며 RIA와 비슷한 결과를 제시한다^{13,14}.

Immunoassay의 정확도는 항체의 특이성과 오줌 중의 대사산물의 존재에 좌우된다. UFC 정량의 초기연구는 7가지 다른 RIA system 모두 특이성이 낮으며, 7가지 RIA system의 결과는 chromatographic assay의 결과보다 UFC의 농도가 높게 측정되었음을 보여주었다¹⁵. 더욱 진행된 연구는 crude urine extracts에서 UFC를 측정하기 위해 개발된 RIA kits는 HPLC 방법에 비하여 높게 측정됨을 증명하였다^{16,17}. 한 연구는 enzyme-immunoassay (EIA)나 radio-immunoassay 모두 Sephadex LH-20 columns 등의 적절한 chromatographic step이 UFC 측정과정에 있어야 한다고 주장했다. 한편 chromatographic step으로 thin layer chromatography(TLC)를 이용하여 steroid를 분리하고 측정하는 연구도 진행되었으며¹⁸⁻²¹, Smiley 등¹¹은 상품으로 나온 cortisol kits로 오줌 중의 cortisol 측정에 사용할 수 있으나 결과가 동일하지 않은 까닭으로 실험실마다 정상치를 설정해야 할 것을 제안하였다.

따라서 본 연구의 목적은 UFC 정량을 위해 추출 및 thin layer chromatography를 실시하는 ELISA 측정법을 알아보고 이 측정법으로 정상 개에서 오줌의 UCCR을 측정하여 정상치를 마련하는 것이다.

재료 및 방법

공시동물 : Cortisol에 대한 항혈청을 생산하기 위하여 3~4개월령의 토끼(Newzealand white) 4마리를 사용하였으며 구입후 2주일간 기초사육하고 실험에 사용하였다. 기초사육기간에 콕시디움 제어를 위하여 sulfamethoxine을 투여하였다.

요중 cortisol과 creatinine 농도를 측정하기 위한 개들은 12개월령 이상으로 체중은 2.4~35.5kg이었다. 실험견들은 실내의 케이지에서 사료와 음수를 자유급식하도록 하여 사육하였다. 실험견들은 실험기간내에 어떠한 형태의 약물도 투여받지 않았으며 신체검사와 혈액학적 및 혈액화학적 검사 그리고 요검사에서 모두 정상이었다.

시료채취 및 보관 : 요도 catheter를 사용하여 오전 8시에서 9시 30분 사이의 오줌을 채취하였고 채뇨 즉시 20분간 원심분리하고 상층액을 -20℃ 이하에서 냉동보관하였다.

ELISA kit의 제작 및 검정 : 요중의 cortisol 농도를 측정하기 위한 ELISA kit는 hydrocortisone-3-(O-carboxymethyl) oxime-BSA(Sigma Chemical Co.)을 항원으로 하여 羅와李의 방법³²에 따라 제작하여 검정하고, cortisol과 구조가 비슷하고 오줌으로 배설되는 steroid들 및 합성 steroid들과의 교차반응을 조사하였다. 교차반응에 사용된 steroid는 cortisone, corticosterone, prednisone, 11-deoxycortisol, prednisolone, 17 α -estradiol, testosterone, 17 α -progesterone, progesterone, androsterone, tetrahydrocortisol, dexametasone, estradiol, estrone, β -estradiol, Fludrocortisone, 6 β -hydroxycortisol, 11-dehydro corticosterone, 21-deoxycortisol 등이었다(Sigma chemical Co).

Thin-layer chromatography(TLC) : 추출은 오줌 0.3 ml에 methylene chloride 1.2ml을 혼합하고 1분간 진탕한 후 1분간 원심분리하고 상층액을 피펫으로 분리하였다. Merck Silica Gel 60 F254 sheets(E. Merck, Darmstadt, W. Germany)는 acetone으로 1회 전개한 후 110 $^{\circ}$ C에서 30분간 건조하여 윗부분 1cm를 절단하고 1.5cm 넓이로 금을 그어 사용하였다. Chloroform-ethanol-water(188 : 12 : 1, v/v/v)를 용매로 하여 1시간 전개하였다. 표준 steroid는 ethanol에 10 μ g/50 μ l의 농도로 만들어 20 μ l를 점적하였고 시료는 50 μ l를 점적하였다. 전개가 끝난 뒤 자외선등 아래에서 기준 cortisol의 가운데를 표지하여 sheet의 cortisol 분획 1.0cm 넓이를 절단하였다. 절단된 cortisol 분획 조각을 마개가 있는 시험관에서 methylene chloride(90 : 10, v/v) 2.0ml로 1시간동안 용출시켰다. Cortisol 분획 조각을 시험관에서 건져낼 때 methylene chloride(90 : 10, v/v) 0.5ml로 cortisol 분획 조각을 시험관 안에서 씻었다.

요중의 cortisol 농도측정 : 오줌을 PBS로 희석하여 ELISA로 측정(과정 I)하거나 methylene chloride로 추출한 뒤 ELISA로 측정(과정 II)하며, methylene chloride로 추출한 뒤 TLC 추출을 실시하고 ELISA로 측정(과정 III)하였다. 과정 I은 오줌을 원심분리하고 PBS로 2배 희석한 오줌으로 ELISA를 실시하였다. 과정 II는 오줌을 원심분리하고 PBS로 2배 희석한 오줌 0.3ml와 methylene chloride 1.2ml를 혼합하고 1분간 vortexing한 뒤 30초 동안 원심분리하였다. 이후 상층액을 버리고 methylene chloride 층의 1.0ml(50%)를 취하여 질소가스로 건조시켰으며 PBS 0.5ml에 용해하여 ELISA를 실시하였다. 과정 III에서는 TLC를 실시하였다. 시료 0.3ml와 methylene chloride 1.2ml를 혼합하고 1분간 vortexing한 뒤 30초 동

안 원심분리하였다. 이후 상층액을 버리고 methylene chloride 층의 1.0ml를 취하여 질소가스로 건조시키고 ethanol 100 μ l에 용해하였다. 상기 용액 50 μ l를 TLC하고 cortisol 분획만 1.0cm 넓이로 절단하여 methylene chloride(90 : 10, v/v) 2.0ml이 든 시험관에 1시간동안 담근 뒤 cortisol 분획 조각을 꺼내고 질소가스로 건조시킨 다음 PBS 0.5ml에 용해하고 ELISA를 실시하였다.

Creatinine의 측정 : Creatinine은 Jaffé 반응을 이용한 크레아티닌 측정시약(영연화학, 한국)으로 측정하였다.

정상 개의 UCCR : 12개월령 이상의 정상 개(n=47)에서 오전 8시에서 10시 사이의 오줌을 채취하였다. Creatinine의 농도는 Jaffé 반응을 이용한 크레아티닌시약(영연화학, 한국)으로 측정하였으며 cortisol의 농도는 methylene chloride로 추출한 뒤 TLC 추출을 하고 ELISA로 측정하였다.

통계처리 : 통계분석은 Student's *t*-test, Turkey의 ANOVA/SAS 그리고 ANCOVA/SAS 등을 이용하였다.

결 과

ELISA kit의 검정 : 여러가지 농도의 cortisol 표준액에 대해 각각 12회 반복 측정하고 present binding(PB; %) 값을 구하여 최소측정한계를 계산한 결과 1ng/ml이었다. 표준 cortisol 용액의 농도가 5~500ng/ml일 때 동시재현성(within-run variation)의 변이계수(coefficient of variation; CV)는 0.4~2.8였으며 일차재현성(day to day variation)의 C.V. 값은 cortisol 표준액의 농도가 5~500ng/ml일 때 1.8~5.7이었다.

각종 steroid 19종에 대한 교차반응은 Table 1과 같이 나타났다. Prednisolone, 11-deoxycortisol, 21-deoxycortisol, prednisone 등은 높은 교차반응(crosse reaction; CR₅₀(%)=11.4~43.2)을 나타냈으나 17 α -estradiol, andorsterone, 6 β -hydroxycortisol, estrone, β -estradiol, testosterone, 17 α -progesterone, tetrahydrocortisol, dexametasone, estradiol, 11-dehydrocorticodterone 등은 매우 낮았으며(<0.01~3.1%), cortisone, corticosterone, fludrocortisone, progesterone 등은 6.1~8.0% 정도를 보였다.

Thin-layer chromatography : 요중에 출현할 수 있으며 cortisol과 구조적 유사성을 갖는 steroid에 대한 TLC 결과 이동율은 Table 2와 같이 나타났다. 용매는 1시간동안 12cm 전개하였으며 cortisol의 이동을 1로 잡고 이에

Table 1. Cross-reactivity(%) of the rabbit anti-cortisol-3-(α -carboxymethyl) oxime IgG with various steroids

Steroid	CR ₅₀ (%)
Cortisone	7.4
Corticosterone	6.1
Prednisone	11.4
11-Deoxycortisol	41.5
Prednisolone	43.2
17 α -Estradiol	< 0.01
Testosterone	2.2
17 α -Progesterone	2.4
Progesterone	8.0
Androsterone	< 0.01
Tetrahydrocortisol	3.1
Dexametason	1.7
Estradiol	1.0
Estrone	0.4
β -Estradiol	< 0.01
Fludrocortisone	7.6
6 β -Hydroxycortisol	< 0.01
11-Dehydrocorticosterone	10.7
21-Deoxycortisol	12.8

Table 2. R_f values of glucocorticosteroids and sex steroids chromatographed on Merck Silica Gel 60 F254 sheet

Steroids	R _f values steroids
Cortisol	1
Cortisone	1.7
Prednisolone	0.6
Hydroxyprogesterone	4.0
Corticosterone	1.9
17 α -Estradiol	5.1
11-Deoxycortisol	2.5
Prednisone	1.5
11-Dehydrocorticosterone	3.6

Fig 1. Result of thin layer chromatography with steroids. Chromatographed on Merck Silica Gel 60 F254 sheet.

1: Cortisol, 2: Cortisone, 3: Prednisolone, 4: Hydroxyprogesterone, 5: Corticosterone, 6: 17 α -Estradiol, 7: 11-Deoxycortisol, 8: Prednisone, 9: 11-Dehydrocorticosterone.

대한 상대적인 이동거리로 표시하였다. 이동율이 가장 높은 것은 17 α -Estradiol이었다.

오줌의 cortisol 측정방법의 비교 : 정상 개의 오줌과 텍사메타존을 투여하고 채취한 오줌 그리고 Chushing 증후군을 보이는 개의 오줌에 대한 동시재현성의 CV 값은 과정 I 이 9.4~28.3%, 과정 II 가 7.2~8.9%, 과정 III 이 2.5~5.7%이었다(Table 3).

Table 3. Coefficient of variation on the procedures of cortisol concentration measurement in urine

Procedure	Dilution rate	CV(%)		
		Normal	Chushing	Dexamethasone
I	2	16.4	28.3	18.5
II	2	7.5	8.9	7.2
III	2	5.7	2.5	3.1

오전 8시, 오후 4시, 밤 12시에 각각 dexamethasone(0.1 mg/kg)을 경구 투여하고 다음날 오전 8시에 cortisol 농도가 낮은 소변을 채취하였다. 여기에 cortisol을 0, 5, 50,

500, 1000ng/ml씩 첨가하여 과정 I, 과정 II 및 과정 III 등을 실시하여 구한 회수율은 Fig 2와 같이 나타났다.

Fig 2. Recovery of cortisol from cortisol administrated urine sample. Dogs were treated with dexamethasone for low level cortisol concentration in urine.

과정 I 과 과정 III, 과정 I 과 과정 II는 방법에 의한 회수율의 차이가 인정($p < 0.01$)되었지만 과정 II 과 과정 III은 방법에 의한 회수율의 차이는 인정되지 않았다($p < 0.01$).

정상 개의 UCCR값 : 12개월령 이상의 정상 개($n = 47$)에서 오전 8시에서 10시 사이에 채취한 오줌의 평균 UCCR(10^{-6})은 $9.5 \pm 7.6(0.14 \sim 28.0)$ 이었다. 이때의 오줌 중의 cortisol 농도는 평균 $17.5 \text{ng/ml}(0.2 \sim 54.2 \text{ng/ml})$ 이었다.

고 찰

본 실험에서 정상 개의 평균 UCCR(10^{-6})은 $9.5 \pm 7.6(0.14 \sim 28.0)$ 로써 $0.5 \sim 17.7^{12}$, $4 \sim 16^{10}$ 과 13.1 ± 7.0 등¹¹의 결과와 근소한 차이가 있어서 Chushing 증후군으로 진단을 받은 개의 UCCR(10^{-6})이 19.2로 본 실험과 Feldman¹²과 Rijnberk¹⁰의 정상치보다는 높고 Smiley¹¹의 정상치에서는 상한값에 해당된다. 이러한 결과는 cortisol을 측정하는 상용 kit로 오줌의 cortisol을 측정할 수 있으나 분석결과가 항상 일치하는 것은 아니기 때문에 각 실험실마다 정상치를 정립해야 한다^{9,11}는 견해를 뒷받침해주는 것이다. 건강한 개의 UCCR이 서로 다르게 보고되고 있는 것에 대하여 일간변이가 크기 때문일 것이라고 해석하기도 하였고 개에서 UCCR(10^{-6}) 수치가 다양하게 보고되는 것에 대하여 서로 다른 cortisol immunoassay가 사용되

고 각 분석법은 다양한 유리 및 중합 cortisol 뇨 대사산물에 대하여 고유한 profile을 가지고 있는 항체에 기초를 두고 있기 때문이라고 추정하고 산술적 UCCR 수치를 다양한 cortisol 측정기술간에 직접 비교하는 가치는 제한된다고 하였다.

개에서 cortisol의 일중변동의 존재여부는 확실하게 밝혀지지 않았으나 사람에서는 오전에 cortisol 농도가 높다고 하였으며 Rijnberk 등¹⁰은 오전에 받은 오줌으로 UCCR을 측정하였다. 본 연구에서도 이러한 원칙에 따라 UCCR은 오전중의 시료에서 측정하였다.

개의 부신피질기능항진증을 진단하기 위해 흔히 이용되는 screening test는 저용량 dexamethasone 억제시험과 ACTH 자극시험이다. 저용량 dexamethasone 억제시험은 진단감도가 0.85~0.94 정도이지만 8시간동안 3~5회의 혈액시료를 채취하여야 한다^{7,10,22}. ACTH 자극시험은 1~2 시간동안 2번의 혈액시료만 필요하지만 진단감도가 0.81~0.83 정도로 저용량 dexamethasone 억제시험보다 낮다⁶⁷. 오줌의 cortisol : creatinine 비의 진단감도는 0.92~0.99로 알려져 있으며 저용량 dexamethasone 억제시험이나 ACTH 자극시험에 비해 오줌의 cortisol : creatinine 비의 장점은 비용이 적게 들고 오줌을 채취함에 특별히 주의할 필요가 없어 매우 간편하다는 것이다¹¹. UCCR의 측정은 단순히 개의 주인집에서 주인이 채취한 오전에 배뇨된 오줌을 수집하고 분석하는 작업만 요구하여 병원방문은 오직 신체검사와 상담시에만 요구된다. 또한 UCCR 측정이 치료과정중에 치료반응을 관찰하는 목적으로 적합하다고 하였으며 부신피질기능항진증에 걸린 개에서 치료 유도단계중 ACTH 자극시험결과와 UCCR 측정은 상관관계가 좋았다고 하였다. 그러나 뇌하수체 의존성 부신피질기능항진증에 걸린 개에서 mitotane에 대한 치료반응을 관찰하기 위해서 UCCR 측정으로 ACTH 자극시험을 대체할 수도 없다는 견해도 있다.

본 연구에서 cortisol 농도를 측정하기 위하여 제작된 ELISA kit의 최소측정한계를 Kaiser와 Specker²³의 측정감도(0ng/ml 의 PB 값에서 2SD 값을 뺀 PB 값에 해당하는 cortisol 농도)로 계산하면 100pg/ml 이 되지만 본 실험의 표준곡선의 100pg/ml 수준의 SD 값은 2.99로 무척 크기 때문에 0ng/ml 의 PB 값과 특정 cortisol 농도의 PB 값과의 차이를 $p\text{-value} < 0.01$ 수준에서 Student's *t*-test로 유의성을 검정하여 1ng/ml 을 최소측정한계로 결정하였다.

오줌의 cortisol을 전처리없이 RIA로 측정하면 HPLC의

방법보다 cortisol의 농도가 높게 평가되는데^{17,24,25} 이것은 오줌의 추출물중 cortisol에 대한 면역활성(immuno-reactivity)이 전체 면역활성중 51%에 불과하기 때문이라고 하였다²⁶. 한편 Lantto¹⁶는 isotope dilution-mass spectrometry 방법에 비하여 HPLC 방법이 어떤 오줌에서는 cortisol 수준이 가성으로 높음을 관찰했고 Nakamura와 Yakata²⁷는 cortisol HPLC peak를 방해하는 물질이 있다고 보고하여 HPLC의 cortisol 측정치가 cortisol을 투여한 것에 비해 높다고 하였다.

오줌에는 비스테로이드성 물질 뿐만 아니라 많은 스테로이드성 물질이 있어서 이들을 제거하기 위해서 용매로 추출하거나 산 또는 염기로 처리하여도 완전하지 못하다고 하였다^{17,24,25,28}. Lewbart와 Elverson¹⁸은 Sephadex LH 20 column으로 전처리한 후 RIA로 얻은 결과가 TLC-HPLC의 결과보다 3배 높다고 하였으나 Sephadex LH 20 column으로 한 chromatography가 방해 화합물을 효과적으로 제거하고 이것을 RIA나 EIA로 최종분석한 결과 HPLC의 결과와 유사하다고 하였다¹⁴.

Silica precoated aluminium sheets의 유용함으로 스테로이드의 빠른 분리와 cut-out pieces로부터 스테로이드 용출이 보고된 바¹⁹ 있으며 Fenske와 Shönheiter²¹는 RIA 분석에 앞서 glucocorticoids와 sex steroids의 분리 및 용출을 위해 좋은 분해능과 높은 재생율을 보이고 용매가 적게 드는 TLC 기술을 소개하였다. Fenske와 Shönheiter²¹는 새로운 TLC 기술로 blank values를 증가시키고²⁹ 회수율을 감소시킨다³⁰라고 알려져 있으며 잘게 흩어진 silica 입자를 발생시키지 않았기 때문에 본 연구에서도 TLC를 사용하여 cortisol과 구조적 유사성을 갖는 많은 물질을 측정에서 배제시킬 수가 있었다.

극성을 많이 띄는 steroid 대사산물중 오줌에 cortisol 보다 매우 많은 6 β -hydrocortisol을 잘 추출하는³¹ ethyl acetate로 오줌을 추출하고 cortisol을 측정된 결과는 methylene chloride로 추출한 결과보다 cortisol 수준이 높았다¹⁴는 결과에 따라 methylene chloride를 추출용매로 사용하였다. 본 연구에서 서로 다른 방법에 따라 오줌 중의 cortisol을 측정하여 회수율과 이에 대한 CV 값을 검토하고 UCCR을 측정된 결과 보다 정확한 진단을 위해서는 methylene chloride를 이용한 추출 이후에 TLC를 실시하고 ELISA로 측정하는 것이 정확할 것으로 판단된다. 이러한 측정방법을 따른다면 UCCR을 측정함으로써 부신피질의 기능을 평가하기 위한 다른 복잡한 검사절차에

대하여 환측 및 측주들이 느끼는 부담을 최소화하고 효과적인 결과들을 얻을 수 있을 것이다.

결 론

개에서 부신피질의 기능을 평가하기 위하여 UCCR을 측정하였다. UCCR을 측정하기 위하여 요중의 cortisol 농도를 측정할 수 있는 ELISA kit를 제작하였으며 이것을 이용하여 다양한 방법으로 요중의 cortisol 농도를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 요중의 cortisol 농도를 측정하기 위하여 제작한 ELISA kit의 최소측정한계는 1ng/ml이었다.
2. 개의 오줌중에 존재하는 cortisol 농도를 측정하기 위해서 methylene chloride로 추출한 뒤 TLC를 한 다음 실시하는 것이 높은 회수율과 낮은 CV 값을 나타낸다.
3. 정상적인 개를 대상으로 UCCR(10⁻⁶)을 측정된 결과 9.5 \pm 7.6을 나타냈다.

참 고 문 헌

1. Rijnberk A, Der-Kinderen PJ, Thijssen JHH. Spontaneous hyperadrenocorticism in the dog. *J Endocrinology*, 41:397-406, 1968.
2. Siegel ET. Assessment of pituitary-adrenal gland function in the dog. *Am J Vet Res*, 29:173-180, 1968.
3. Burke CW, Beardwell CG. An evaluation of the clinical usefulness of urinary free cortisol and other steroid measurement. *Q J Med*, 42:175-204, 1973.
4. Crapo L. Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. *Metabolism*, 28:955-977, 1979.
5. Allin RE, McBride JH, Rodgerson DO. The elucidation of adrenal-cortical status by measuring two-hour urinary-free cortisol levels. *Clinica Chimica Acta*, 143:17-22, 1984.
6. Feldman EC. Comparison of ACTH response and dexamethasone suppression as screening test in canine hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc*, 182:506-510, 1983.
7. Peterson ME. Hyperadrenocorticism. *Vet Clin North Am (Small Anim Pract)*, 14:731-749, 1984.
8. Liebl R. Störfaktoren beim dexamethasone-hemmtest.

- Klin Wochenschr* , 64:535-539, 1986.
9. Stolp R, Rijnberk A, Meijer C, *et al.* Urinary corticoids in the diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *Res Vet Sci* , 34:141-144, 1983.
 10. Rijnberk A, von Wees A, Mol JA. Assessment of two tests for the diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *Vet Rec* , 122:178-180, 1988.
 11. Smiley LE, Peterson ME. Evaluation of a urine cortisol : creatinine ratio as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs. *J Vet Intern Med* , 7:163-168, 1993.
 12. Feldman EC, Mack RE. Urine cortisol : creatinine ratio as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs. *J Am Vet Med Assoc* , 200(11):1637-1641, 1992.
 13. Lewis JG, Manley L, Townsend JC, *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for urinary free cortisol. *Clinica Chimica Acta* , 159:205-209, 1986.
 14. Nahoul K, Patricot MC, Moatti JP, *et al.* Determination of urinary cortisol with three commercial immuno-assays. *J Steroid Biochem Molec Biol* , 43(6):573-580, 1992.
 15. Murphy BEP, Okouneff LM, Klein GP, *et al.* Lack of specificity of cortisol determinations in human urine. *J Clin Endocr Metab* , 53(1):91-99, 1981.
 16. Lanito O. Radioimmunoassay and liquid-chromatography analysis for free cortisol in urine compared with isotope dilution-mass spectrometry. *Clin Chem* , 28:1129-1132, 1982.
 17. Huang CM, Zweig M. Evaluation of a radioimmunoassay of urinary cortisol without extraction. *Clin Chem* , 35(1); 125-126, 1989.
 18. Lewbart MI, Elverson RA. Determination of urinary free cortisol and cortisone by sequential thin layer and HPLC. *J Steroid Biochem* . 17:185-190. 1982.
 19. Lee CY, James VHT. The determination of 18-hydroxycorticosterone in saliva and plasma : comparison with aldosterone and glucocorticoids. *J Steroid Biochem* , 29:511-517, 1988.
 20. Brind JL, Chervinsky K, Völgelman JH, *et al.* N. Radioimmunoassay of estrone sulfate in the serum of normal men after a non-chromatographic procedure that eliminates interference from dehydroepiandrosterone sulfate. *Steroids* , 55:32-35, 1990.
 21. Fenske M, Schönheiter H. Thin-layer chromatography on silica-coated aluminium sheet as an adjunct of radioimmunoassay of steroids. *J Chromatogr* . 563:178-183, 1991.
 22. Feldman EC. Evaluation of a combined dexamethasone suppression/SCTH stimulation test in dogs with hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* , 187:49, 1989.
 23. Kaiser H, Secker H. Vergleich von analysen verfahren. *Z Anal Chem* , 149:46, 1956.
 24. Murphy BEP. Clinical evaluation of urinary cortisol determination by competitive protein-binding radioassay. *J Clin Endocr Metab* , 28:343-348, 1968.
 25. Kitaro O, Makoto N, Toshinori K. *et al.* Liquid chromatography and Radioimmunoassay compared for determination of cortisol and corticosterone in plasma after a dexamethasone suppression test. *Clin Chem* , 33:1639-1642, 1987.
 26. Schöneschöfer M, Fenner A, Altinok G, *et al.* Specific and practicable assessment of urinary free cortisol by combination of automatic high-pressure liquid chromatography and radioimmunoassay. *Clin Chim Acta* , 106:63-73, 1980a.
 27. Nakamura J, Yakata M. Age and sex related differences in urinary cortisol level. *Clin Chim Acta* , 137: 77-80, 1984.
 28. Schöneschöfer M, Fenner A, Dulce HJ. Interferences in the radioimmunological determination of urinary free cortisol. *Clin Chim Acta* , 101:125-134, 1980b.
 29. Rudder HJ, Guy RL, Lipsett MB. A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. *J Clin Endocrinol Metab* , 35:219-224, 1972.
 30. Matthews JS, Prada AL, Aguilera A. *Steroids* , 8:865, 1966.
 31. Nahoul K, Adeline J, Paysant F, *et al.* Rioimmunoassay of plasma and urine 6 β -hydrocortisol : levels in healthy adults and in hypercortisolemic states. *J Steroid Biochem* , 17:343-350, 1982.
 32. 나기정, 이창우. ELISA를 이용한 cortisol 측정법의 정립 및 임상적 응용. 대한수의학회지, 36:731-741, 1996.