

< Original Article >

고속액체크로마토그래피를 이용한 가축용 호르몬제(고나도렐린, 프로게스테론, 옥시토신, 에스트라디올) 분석방법 개발

정경훈 · 정미영 · 박해철 · 아킬후세인 · 김대균 · 이광직 · 강정우*
농림축산검역본부 동물약품평가과

Development of new analytical methods using high performance liquid chromatography for animal hormones; gonadorelin, progesterone, oxytocin and estradiol

Kyung Hun Jeong, Mi Young Jeong, Hae-Chul Park, Md Akil Hossain,
Dae Gyun Kim, Kwang-Jick Lee, Jeong Woo Kang*

Veterinary Drugs & Biologics Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

(Received 25 August 2017; revised 10 October 2017; accepted 10 October 2017)

Abstract

The aim of this study is to develop an optimal analytical method for gonadorelin, progesterone, oxytocin and estradiol, the major components of hormones. A relatively simple and reproducible method using high performance liquid chromatography was developed and as a result of the measurement of specificity, linearity, repeatability, accuracy and intermediated precision, the validity of the developed method was verified with the result of meeting the verification criteria of analytical method validation. Using this newly developed method, 12 post-market veterinary products were tested and the ingredient content were 91.9~116.4%, which satisfied the 90~120% condition of the administrative measure standard. Therefore, if the newly developed method is used for the collection examination of hormone in veterinary medicine, it can be useful as an approved test method.

Key words : Gonadorelin, Progesterone, Oxytocin, Estradiol, HPLC

서 론

동물용의약품 중 생식과 비뇨기에 작용하는 호르몬제는 가축의 생식 기능과 성 역할에 많은 영향을 줄 뿐 아니라 골격 같은 신체의 성장 혹은 심리적 안정감에도 영향을 끼친다(Kloet 등, 2003). 또한, 배란 촉진과 발정동기화, 분만 촉진을 유도하며 산후 자궁 내 이물질을 제거함으로써 가축의 분만 향상에 도움을 주거나(Woods 등, 1974; Hooker 등, 1943) 분만 후 무유증을 예방하거나 유즙 부족 및 유선염의 보조치

료제로서 사용된다(Heo 등, 2008). 하지만 다량의 호르몬제 사용은 가축이나 축산물에 잔류하여 인간의 건강에 해로운 영향을 끼치거나 골다공증이나 골괴사증 등의 부작용을 일으켜 심각한 문제를 야기한다(Sharpe, 2001). 이와 같은 이유로 유럽 연합의 경우 잔류 독성으로 인해 가축에 내인성 혹은 합성호르몬의 사용을 금지하고 있다(McNeil, 1998).

생식·비뇨기계 호르몬제인 고나도렐린은 성선자극 호르몬의 방출을 도와 불임을 막아주고 프로게스테론은 임신유지, 옥시토신은 자궁을 수축시켜 분만을 유도하며 에스트라디올은 발정 작용을 일으킨다(Picard-Hagen 등, 2015; Young 등, 2010; Freeman, 1975;

*Corresponding author: Jeong Woo Kang, Tel. +82-54-912-0564,
Fax. +82-31-912-0584, E-mail. hijach@korea.kr

Somerville, 1972). 우리나라 정부에서는 동물약품취급 규칙에 의거하여 표준화된 방법을 사용하여 동물용 의약품 중 생식·비뇨기계 호르몬제를 관리하고 있다. 그러나 현재 농림축산검역본부에서 고시하는 동물약품공정서(APQA, 2016)에는 생식·비뇨기계 호르몬제 분석법이 미흡하거나 등재되어 있지 않아 품질 관리를 위한 동물용의약품 검사에 어려움을 겪고 있다. 따라서, 본 연구에서는 생식·비뇨기계 호르몬제에 대한 최신 분석법을 개발하여 검사 업무에 따른 품질 보증 확립과 동물용의약품의 오·남용 방지 및 안전성을 확보하고자 한다(APQA, 2016).

현재 동물용의약품 중 생식·비뇨기계 호르몬제 검사 방법에는 박층크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC), 가스크로마토그래피(Gas Chromatography), 액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography)가 있다. 하지만 TLC 검사법은 실험 방법이 번거로우며 결과를 얻기까지 상당한 시간이 걸리고, GC 검사법의 경우 주로 휘발성 물질을 분석하기에 분석 효율이 낮은 단점이 있다. 그러나 HPLC 검사법의 경우 분리 성능이 높고 정확도와 정밀성이 높은 장점을 가지고 있어 HPLC를 이용하여 생식·비뇨기계 호르몬제 분석법을 개발하면 가축용 동물 의약품 검사 업무의 경쟁력 향상 및 품질보증을 확립할 수 있다(Vandenheuveel 등, 1965; Abdel-Khalik 등, 2013).

따라서 본 논문은 HPLC를 이용하여 생식·비뇨기계 호르몬제 구성성분인 고나도렐린, 프로게스테론, 옥시토신 및 에스트라디올의 새로운 분석법을 개발하고 특이성(specificity), 직선성(linearity), 반복성(repeatability), 정확성(accuracy) 및 정밀성(intermediated precision) 등의 유효성을 평가하였다. 이를 바탕으로 국내에서 유통중인 인허가 제품 12종을 수거하여 개발된 검사법을 적용하여 검사하였다.

재료 및 방법

시약 및 장비

분석물질인 고나도렐린, 프로게스테론은 USP (MD, USA) 제품을 사용하였고 옥시토신, 에스트라디올은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입을 하여 사용하였다. 용매 중 인산, 아세트니트릴은 Merck (Darmstadt, Germany)의 시약을 사용하였으며 인산염은 Fluka (Seelze, Germany)에서, 메탄올은 J. T. Baker (NJ, USA)사의 HPLC 등급 시약을 사용하였다. 증류수는 EMD Millipore (Billerica, MA, USA)의 Milli-Q Integral Millipak membrane point-of-use cartridge (0.22 µm)를 이용하여 얻었다. 시약의 여과를 위해 여과지는 Pall (Port Washington, USA)사의 0.45 µm PVDF ACRODISC LC 13을 사용하였고, 시약의 균일한 혼합을 위해 BRANSON (Danbury, USA)의 8510E-DTH 초음파 추출기를 사용하였다.

표준용액 및 호르몬 시험물질 조제

표준용액 및 호르몬 시험물질 조제 조건은 Table 1에 나타내었다. 표준품인 고나도렐린, 프로게스테론, 옥시토신, 에스트라디올 4종과 유통중인 인허가 호르몬 시험물질 12종 1 mg을 각각의 희석용매에 녹이고 난 뒤, 제조된 용액은 4°C에 보관 후 사용하기 전에 희석하여 실험하였다. 각각의 표준 용액과 호르몬 시험물질 필요량을 볼륨플라스크에 넣어 교반기를 이용하여 각각의 용매에 녹이고 난 후 초음파 세척기를 이용하여 균일한 혼합을 해주었다. 필터를 이용하여 여과를 한 후 1.5 mL HPLC 바이알에 담아 실험에 이용하였다.

Table 1. HPLC Analytical method parameters for gonadorelin, progesterone, oxytocin and estradiol

| Analyte | Gonadorelin | Progesterone | Oxytocin | Estradiol |
|-------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| Instrument | Agilent 1100 | Agilent 1260 | Agilent 1260 | Agilent 1100 |
| Column | YMC TRIART C18 (4.6×100 mm, 5 µm) | Xterra RP18 (4.6×150 mm, 5 µm) | YMC C18 (4.6×150 mm, 5 µm) | Xterra RP18 (4.6×150 mm, 5 µm) |
| Mobile phase | 1% H ₃ PO ₄ :ACN=80:20 | 85% MEOH | 0.1M NAH ₂ PO ₄ :50% Acetonitrile=70:30 | Acetonitril:D.W=55:45 |
| Flow rate | 1 mL/min | 1 mL/min | 1 mL/min | 1 mL/min |
| Absorbance | 215 nm | 240 nm | 220 nm | 205 nm |
| Standard solution | Distilled water | Ethanol | Distilled water | Ethanol |
| Sample solution | Mobile phase | Ethanol | Mobile phase | Ethanol |

기기분석 조건

분석에 사용된 HPLC는 Agilent Technologies사의 1100, 1260 (Santa Clara, CA 95051, USA) 모델을 이용하였다. 고나도렐린, 프로게스테론, 옥시토신, 에스트라디올 4종 모두 이동상 유속을 1 mL/min으로 하였고 시료 주입량은 10 µL를 사용하였다. 각각의 물질 분석을 위해 길이와 직경이 다른 YMC triart C18 컬럼과 Xterra RP18 컬럼을 사용하였고 이동상으로는 물과 아세트니트릴, 메탄올을 이용하였다. 최적의 분리 조건을 찾기 위해 각 용매의 농도 및 조성을 달리 하였고 인산과 인산염을 첨가하여 분리 능력을 향상 시켰다. 검출을 위해서 Diode array detector (DAD) 방식을 선택하여 205~240 nm 사이의 파장에서 측정하였으며 HPLC 분석조건은 Table 1과 같다.

특이성, 직선성, 정확성, 반복성 및 정밀성 검증방법

분석 방법 검증을 위해 국제적 표준절차(WHO TRS 937-analytical method validation)를 따랐으며 특이성, 직선성, 반복성, 정확성 및 정밀성을 측정하여 유효성을 판단하였다. 특이성은 각각의 표준용액과 시험물질을 HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램의 머무름 시간과 UV스펙트럼을 비교하여 다른 물질에 의한 간섭이 없이 성분이 분리되는 것을 확인하였다. 직선성은 각각의 표준물질을 0~500 µg/mL 사이의 농도별로 5개를 제조 후 HPLC를 이용하여 3회 반복 측정하여 표준용액의 면적과 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하여 상관계수를 측정하였다. 정확성은 표준물질 3개 농도를 각각 3회 측정하여 얻은 값을 검량선에 대입하여 얻은 결과와 참값의 오차를 회수율로 측정하였다. 반복성을 측정하기 위해서 표준물질을 조제하여 하루 3반복 실험을 하였고 상대표준편차(relative standard deviation, RSD, %)를 이용하여 확인하였다. 정밀성은 시험 날짜를 달리하여 1일째, 3일째, 5일째에 각각의 표준물질을 5회 반복 측정하여 상대표준편차로 측정하였다.

분석법 적용

농림축산검역본부령 제 2015-165상에서 동물용 호르몬제의 유효성분 행정처분 함량 기준은 90~120% 이내의 값을 나타내어야 한다. 실험을 통해 개발된 HPLC 검사방법이 이를 충족시키는지 평가하기 위해

동물약품 도매상에서 판매되는 인허가 제품 12품목(고나도렐린 4품목, 프로게스테론 2품목, 옥시토신 4품목, 에스트라디올 2품목)을 구입하여 분석법 적용 검사를 하였다.

결 과

호르몬제 HPLC 분석

본 실험에서 4종의 호르몬제를 효과적으로 분석하기 위해 HPLC를 사용하였다. 각 호르몬마다 용매의 구성 및 함량, 검출 파장을 다르게 구성하여 최적의 분석 조건을 확립하였다. 고나도렐린은 YMC TRIART C18 (4.6×100 mm, 5 µm) 컬럼을 사용하여 1% 인산이 포함된 물(80)과 아세트니트릴(20)의 이동상 용매로 분석하였다. 표준액과 시험물질의 경우 각각 물과 이동상에 녹여 유속 1 mL/min으로 215 nm 파장에서 분석한 결과 1.40분에 피크가 관찰되었다. 프로게스테론은 Xterra RP18 (4.6×150 mm, 5 µm) 컬럼을 사용하여 85% 메탄올 용매로 분석하였다. 표준액과 시험물질 모두 에탄올에 녹여 유속 1 mL/min으로 240 nm 파장에서 분석한 결과 2.50분에 피크가 나타났다. 옥시토신은 YMC C18 (4.6×150 mm, 5 µm) 컬럼을 사용하였다. 이동상으로는 0.1몰 인산염이 포함된 물(70)과 50% 아세트니트릴(30)을 사용하였고 표준액의 경우 물에, 시험물질의 경우 이동상 용매에 녹였다. 유속은 1 mL/min으로 220 nm 파장에서 분석하여 18.10분에 피크를 관찰할 수 있었다. 에스트라디올의 경우 Xterra RP18 (4.6×150 mm, 5 µm) 컬럼을 사용하여 아세트니트릴(55)과 물(45)로 분석하였다. 표준액과 시험물질 모두 에탄올에 녹였고 유속 1 mL/min으로 205 nm 파장에서 분석한 결과 11.80분에 피크가 나타났다(Fig. 1).

분석법 검증

호르몬 4종의 분석법 검증을 위해 국제적으로 권고된 ICH (International Conference on Harmonization) 가이드라인을 따라 HPLC 유효성 검증 지표인 특이성, 직선성, 반복성, 정확성 및 정밀성을 측정하였다. 특이성은 다양한 성분이 혼합되어 있는 상태에서 원하고자 하는 분석대상물질을 정확하게 측정할 수 있는 검증 방법으로 HPLC 피크 순도를 이용해 확인하

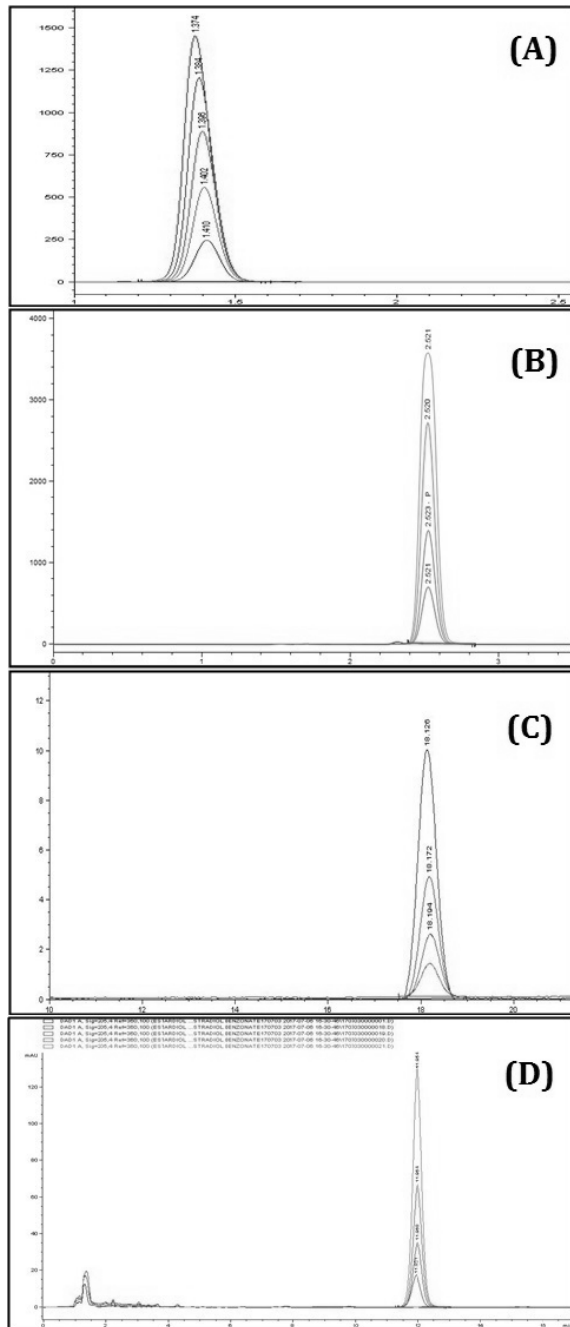


Fig. 1. HPLC chromatograms at 5 different doses: (A) gonadorelin, (B) progesterone, (C) oxytocin, (D) estradiol.

였다. 확립된 HPLC 조건으로 실험한 결과 표준용액과 시험물질 피크에 영향을 줄 수 있는 성분이 각각의 희석 용매와 이동상에 존재하지 않아 다른 물질과의 간섭이 없음을 확인할 수 있었다.

직선성은 고나도렐린의 경우 농도 0 $\mu\text{g/mL}$ (blank), 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ 를 제조하여 확립된 HPLC 조건으로 실험을 하

였다. 분석으로 얻은 Y축을 피크 면적으로, X축을 농도로 하여 검량선을 산출한 결과 상관계수(R^2)가 0.99914로 나타났고 프로게스테론은 농도 0 $\mu\text{g/mL}$ (blank), 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 제조하여 상관계수(R^2)가 0.99993으로 나타나 기준인 0.99를 만족하여 직선성을 확인하였다. 옥시토신은 농도 0 iu/mL , 1.25 iu/mL , 2.5 iu/mL , 5 iu/mL , 10 iu/mL 를 제조하여 상관계수(R^2)가 0.9992로 나타났고 에스트라디올은 농도 0 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 제조하여 상관계수(R^2) 0.9998로 직선성을 나타냈다.

반복성은 표준용액 피크 면적비의 표준편차를 피크 면적비의 평균값으로 나누어 백분율 값을 구하였다. 고나도렐린, 프로게스테론, 옥시토신, 에스트라디올이 각각 0.7%, 0.5%, 0.6%, 1.8%의 값을 나타내어 반복성 국제규격인 2% 이하를 만족하였다. 정확성은 표준용액을 3가지 농도로 제조 후 3번 반복하여 실험하여 평가하였고 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하여 값을 구하였다. 고나도렐린, 프로게스테론, 옥시토신, 에스트라디올 각각 99.8%, 99.5%, 100.5%, 100.2%의 값을 나타내어 국제 표준규격을 만족하였다. 정밀성 역시 3가지 농도의 표준용액을 만들어 5회 측정하였고 피크 면적비의 상대표준편차를 이용해 구하였다. 고나도렐린, 프로게스테론, 옥시토신, 에스트라디올 각각 5.2%, 3.1%, 2.4%, 6.4%로 기준치인 10% 이하를 만족하여 분석법의 정밀성을 확보하였다(Table 2).

호르몬제 인허가 제품 분석법 적용검사

호르몬제 검정을 위해 새롭게 개발된 분석법은 유효성 검증을 통해 특이성, 직선성, 반복성, 정확성 및 정밀성을 확인할 수 있었다. 개발된 분석법을 이용하여 현재 판매되고 있는 인허가 제품 12품목을 실험한 결과는 Table 3과 같다. 고나도렐린을 함유하는 호르몬제 4제품의 경우 기준 함량이 각각 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 mcg/mL , 100 mcg/mL 이었고 검사 결과 53.76 $\mu\text{g/mL}$ (107.5%), 108.73 $\mu\text{g/mL}$ (108.7%), 58.23 mcg/mL (116.46%), 107.73 mcg/mL (107.7%)의 함량을 나타냈고, 프로게스테론을 함유하는 호르몬제 2제품의 기준 함량은 모두 50 mg/mL 이었고 검사 결과 45.98 mg/mL (91.9%), 52.61 mg/mL (105.2%)의 함량을 나타냈다. 옥시토신을 함유하는 호르몬제 4제품의 경우 기준 함량이 모두 10 iu/mL 이고 검사 결과 10.58 iu/mL

Table 2. Validation result parameters of gonadorelin, progesterone, oxytocin and estradiol

| Analyte | RT (min) | Calibration curve (r^2) (5 pts) | Average Accuracy (%) (n=5) | Relative standard deviations (RSD, %) (n=5) | Intermediated precision (%) (3 day) |
|--------------|----------|--|-------------------------------|--|--|
| Gonadorelin | 1.4 | 0.99 | 99.8 | 0.7 | 5.2 |
| Progesterone | 2.5 | 0.99 | 99.5 | 0.5 | 3.1 |
| Oxytocin | 18.1 | 0.99 | 100.5 | 0.6 | 2.4 |
| Estradiol | 11.8 | 0.99 | 100 | 1.8 | 6.4 |

Table 3. Development analytical method inspections of collected product

| Ingredient | Licensing product | Reference content (unit) | Test content (unit) | Result |
|--------------|-------------------|--------------------------|---------------------|-----------|
| Gonadorelin | A | 50 µg/mL | 53.76 µg/mL | Compliant |
| | B | 100 µg/mL | 108.73 µg/mL | Compliant |
| | C | 50 mcg/mL | 58.23 mcg/mL | Compliant |
| | D | 100 mcg/mL | 107.73 mcg/mL | Compliant |
| Progesterone | E | 50 mg/mL | 45.98 mg/mL | Compliant |
| | F | 50 mg/mL | 52.61 mg/mL | Compliant |
| Oxytocin | G | 10 iu/mL | 10.58 iu/mL | Compliant |
| | H | 10 iu/mL | 10.43 iu/mL | Compliant |
| | I | 10 iu/mL | 10.84 iu/mL | Compliant |
| | J | 10 iu/mL | 11.3 iu/mL | Compliant |
| Estradiol | K | 2 mg/mL | 1.918 mg/mL | Compliant |
| | L | 1 mg/mL | 0.987 mg/mL | Compliant |

(105.8%), 10.43 iu/mL (104.3%), 10.84 iu/mL (108.4%), 11.3 iu/mL (113.0%)이었으며 에스트라디올을 함유하는 호르몬제 2제품의 기준 함량은 각각 2 mg/mL, 1 mg/mL이었고 검사 결과 1.918 mg/mL (95.9%), 0.987 mg/mL (98.7%)로 새로운 개발 분석법으로 적합함을 나타내었다.

고 찰

현재 국내 동물용의약품 품질관리는 동물약품 약사감시요령(MAFRA, 2017)에 따라 약사감시 수거검사를 통해 이루어지고 있으며 그 동안 약사감시 수거검사는 사용량 및 부적합율이 높은 품목을 선정하여 주로 검사 관리되고 있다. 그러나 최근 검역본부에서 용역연구사업으로 수행된 ‘바이오사이드 등 주요 동물용의약품 품질조사’ 연구결과로 호르몬제, 항원충제 및 외용제 등 판매량이 적은 동물약품에 대한 품질감시 또한 강화가 필요함이 대두되었다. 본 연구는 동물용의약품 수거검사 시 상대적으로 적게 감시된 다양한 제품 중에서 가축에 사용되는 호르몬제를 선정하여 지속적으로 제품에 대한 감시강화를 위한 검사가 이루어지도록 새로운 분석법을 개발하고자

하였다. 특히 호르몬제의 경우 항생제와 같은 치료 약제에 비해 사용량이 적으나 소량의 용량으로도 가축과 사람에게 영향을 미칠 수 있는 약제이다. 그 중에서도 고나도렐린, 프로게스테론, 옥시토신 및 에스트라디올의 경우 대·소동물에 주로 이용되는 생식·비뇨기 호르몬 제제로 동물용의약품 공정서(APQA, 2016)에 분석법이 등재되어 있지 않거나 분석법이 검증되어 있지 않아 검사법 제·개정이 시급한 약제이다. 따라서 본 연구에서는 HPLC를 이용하여 간편하고 정확한 공인검사법으로서 호르몬제의 분석법을 개발하였다. 개발된 분석법의 유효성을 입증하기 위해 HPLC 검증기준 항목인 특이성, 직선성, 반복성, 정확성 및 정밀성을 측정하였고, 유효성 입증 후 국내 유통 중인 인허가 제품 12개를 선정하여 검사한 결과 분석법의 표준화 및 실용성을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에 의해 개발된 분석법은 우수한 동물용의약품 생산 및 수출 지원, 품질관리 지원을 위해 농림축산검역본부에서 고시하는 동물용의약품 공정서에 고시할 예정이다.

결 론

본 연구는 호르몬제의 대표 성분인 고나도렐린, 프 로게스테론, 옥시토신 및 에스트라디올에 대하여 최 적의 분석 방법을 개발하고자 하였다. 그 결과 HPLC 를 이용해 비교적 과정이 간단하고 재현성이 높은 분 석법을 개발하였고 특이성, 직선성, 반복성, 정확성 및 정밀성을 측정한 결과 WHO TRS 937의 analytical method validation HPLC 검증 기준에 부합하는 결과 를 얻어 개발된 분석법의 유효성을 입증할 수 있었 다. 이렇게 새롭게 개발된 분석법을 이용하여 국내 인허가 제품 12품목에 적용한 결과 유효 성분 함량이 91.9~116.4%로 행정 처분 기준인 90~120% 조건을 만족해 효과적인 분석을 입증할 수 있었다. 따라서 이번 연구를 통해 새롭게 개발된 분석법을 동물용 호 르몬제 검사강화에 적용할 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 수의과학기술개발연구사업 연구개발과 제(F-1542058-2016-17-01)의 지원으로 수행 되었으며, 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Abdel-Khalik J, Bjorklund E, Hansen M. 2013. Simultaneous determination of endogenous steroid hormones in human and animal plasma and serum by liquid or gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 928: 58-77.
- APQA. 2016. Korean pharmacopoeia of veterinary medicinal products. QIA notification No. 2016-16.
- Freeman RK. 1975. The use of the oxytocin challenge test for antepartum clinical evaluation of uteroplacental respiratory function. *Am J Obstet Gynecol* 121: 481-489.
- Heo S, Yang YX, Jin Z, Park MS, Yang BK, Chae BJ. 2008. Effects of dietary energy and lysine intake during late gestation and lactation on blood metabolites, hormones, milk compositions and reproductive performance in primiparous sows. *Can J Anim Sci* 88: 247-255.
- Hooker CW, Pfeiffer CA. 1943. Effects of sex hormones upon body growth, skin, hair and sebaceous glands in the rat. *Endocrinol* 32: 69-76.
- Kloet DE, Ronald D. 2003. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul* 37: 51-68.
- MAFRA. 2017. Tip for inspecting a veterinary pharmaceutical affair. Directive No.78. <http://www.law.go.kr/admRulLsInfoP.do?admRulSeq=2000000025687>
- McNeil DE. 1998. The first case under the WTO's sanitary and phytosanitary agreement: the European union's hormone ban. *Va J Int'L* 39: 89.
- Picard-Hagen N, Lhermie G, Florentin S, Merle D, Frein P, Gayraud V. 2015. Effect of ganadorelin, lecorelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. *Theriogenology* 84: 177-183.
- Sharpe RM. 2001. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett* 120: 221-232.
- Somerville BW. 1972. The role of estradiol withdrawal in the etiology of menstrual migraine. *Neurology* 22: 355.
- Vandenheuve FA, Hinderks GJ, Nixon JC. 1965. Precise ultra-micro determination of steroid hormones by combined TLC and GLC analysis. *J Am Oil Chem Soc* 42: 283-290.
- Woods, Stephen C, Elisabeth D, Joseph R. 1974. Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol Rev* 81: 26.
- Young SL, Lessey BA. 2010. Progesterone function in human endometrium: clinical perspectives. In *semin Reprod Med* 28: 005-016.