

Hexokinase 방법을 이용한 Heparin 혈장과 NaF 혈장 시료의 혈당 분석치 비교

제주한라대학 임상병리과

문 인 경

Comparison of Li-heparinized Versus Na-fluorinated Plasma for Routine Blood Glucose Determination Using Hexokinase Procedure

In-Kyung Moon

Department of Clinical Pathology, CheJu Halla College, JeJu 690-708, Korea

In this study, the two sampling methods for blood glucose measurement were evaluated in order to reduce pre-analytical error. For this purpose, glucose levels of Li-heparinized plasma (LHP) and Na-fluorinated plasma (NFP) in blood collected from healthy volunteers were determined by using routine hexokinase procedures. The percentage range of pre-analytical error was quantitated by comparing LHP glucose values with NFP glucose values according to delaying analytical time (0, 60, and 120 min). LHP glucose values were decreased by 6.6% in 60 min., 17.7% in 120 min, whereas NFP glucose values decreased by 1.1% in 60 min, 2.0% in 120 min. Therefore it may be recommended that the NFP sampling method should be used for routine blood glucose determination in diabetes mellitus diagnosis.

Key Words : Blood glucose, Li-heparinized plasma, Na-fluorinated plasma, Hexokinase method

I. 서 론

혈액의 포도당은 인체의 주요 에너지원으로써 식이성 탄수화물, 저장 glycogen, 중성지방의 분해산물인 glycerol, 단백질 등으로부터 포도당을 공급하고 있다. 탄수화물로부터 단당류는 소장에서 농도 차에 의한 단순 확산이나 능동수송으로 흡수되며, 그 종류는 glucose, galactose, fructose 등의 hexose와 pentose가 있다. Hexose는 문맥을

통하여 간으로 이동하고, 신체에서 탄수화물은 대사가 진행이 되어 간에 glycogen으로 저장되며 또는 CO₂와 물로 완전히 대사되어 에너지를 생성한다. 그리고 케톤산과 아미노산 그리고 단백질로 전환되기도 하며, 중성지방으로 전환된 것은 지방조직에 저장된다. 식이성 공급이 감소하여 혈당이 낮은 경우에는 아미노산, 젖산, pyruvate, glycerol 등으로부터 gluconeogenesis를 통해 당을 공급하고 있다(Lehninger, 1982).

이와 같이 탄수화물 대사는 hexose만 관련된 대사가 아니고, 아미노산, 중성지방, 케톤체, TCA cycle, glycogen, pentose 등의 대사가 복합적으로 이루어지는 복잡한 대사 경로이며, 이 경로에서 특정한 효소가 결핍 되

교신저자 : 문인경, (우)690-708 제주도 제주시 노형동1534,
제주한라대학 임상병리과
Tel : 017-691-2628
E-mail : mik@hc.ac.kr

면 대사성 질환이 발생하며 또한 혈당은 여러 종류의 hormone에 의해 조절되고 있다. 혈액 중의 포도당 농도는 주로 내분비계에 의해 조절되는데 그 인자로는 insulin hormone은 혈당을 낮추고, 다른 한편으로는 역 조절 hormone인 glucagon, cortisol, 11-oxysteroid, epinephrine, growth hormone 등은 혈당을 높이는 작용을 한다. 혈당은 포도당이 흡수된 후 30분에서 60분 사이에 혈당농도는 약 150 mg/dL 정도 상승하였다가 2시간 내외에 공복상태의 정상 혈당농도 70~105 mg/dL범위 내로 유지된다(문 등, 2006). 당뇨병 환자는 공복 시에도 혈당치가 140 mg/dL 이상으로 정상수준보다 높으며, 포도당 경구투여 후 2~3시간 또는 그보다 더 늦게 최고수준에 도달하여 (200 mg/dL 이상) 이 수준은 좀처럼 저하되지 않는 것이 특징이다.

우리 나라의 1970년대 당뇨병 환자는 전 국민의 1% 수준에 불과하였으나, 최근에 보고된 대한당뇨병학회 역학 소위원회와 건강보험심사평가원의 공동조사 결과에 의하면 2003년 현재 우리나라 당뇨병 환자자수는 전 인구의 14.4%인 720만 여명으로 추산되고 있다(유, 2006). 또한 2007년 사망통계연보에 따르면 2005년 현재 12,430명이 당뇨병으로 사망하여 당뇨병에 의한 사망률은 인구 10만 명당 25.5명으로 나타났다(통계청, 2007). 당뇨병은 외혈관질환, 폐암, 심장질환 다음으로 4위의 사망원인으로 차지하고 있으며 그 합병증을 통합하면 국내 사망률 1위의 질환이라 할 수 있다.

임상에서 혈당측정은 당뇨병의 진단은 물론 당뇨환자 및 응급환자의 혈당관리에 매우 중요하다. 당뇨병 진단은 전술한 시간적 혈당반응 곡선을 이용하며, 무엇보다 환자의 정확한 혈당측정이 이루어져야 한다. 일례로 당뇨병 환자의 수술 과정에서 혈당치의 상승은 환자에게 유해한 상태로 작용할 수 있으며(이 등, 2004), 당뇨망막병증 환자에 유리체절제술 후에도 부적절한 혈당관리로 인하여 합병증이 발병할 수 있다고 한다(박 등, 2000). 이러한 사례는 당뇨병 질환에서 혈당관리의 중요성을 반증하는 것이며, 또한 임상에서 당뇨병 환자의 합병증과 관련 질환 치료를 위해 혈당분석은 대단히 중요한 과정이라고 하겠다. 일반적으로 환자의 검체는 요와 혈액을 이용하여 공복, 식후 2시간, 포도당 내성시험 등을 당뇨병 진단에 이용하고 있다. 그런데 혈당 분석치는 시료의 채취방법

(Colagiuri 등, 2003; Boyd 등, 2005), 시료의 저장기간(Weissman과 Klein, 1958), 분석방법(Putz 등 1976; Bradley와 Moses, 1986), 분석시약 키트의 종류(Tang 등, 2001), 분석기기(Sampson 등, 1976) 등에 따라서 달라질 수 있음은 잘 알려진 사실이다.

따라서 본 연구에서는 당뇨병 진단 시 이용되는 검체의 채취방법에 따라 분석전오차(pre-analytical error)가 얼마나 발생하는지 알아보기 위하여, 임상에서는 흔히 혈청을 사용하고 있지만 heparin 혈장과 NaF 혈장을 이용하여 건강한 성인남녀의 혈액을 채취하고 기존 GTT 권장 분석시간인 2시간 이내에 혈당값이 어떻게 변하는지 이들 검체처리 방법을 비교 평가하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 연구대상

제주도내 H대학에 C과에 재학하는 학생 중 남학생 26명(22±1.2세), 여학생 24명(20±0.9세) 등 50명을 무작위로 선택한 다음, 2006년 7월 25일에 lithium heparin 진공채혈 시험관 그룹과 sodium fluoride 진공채혈시험관 그룹으로 각각 25명씩 나누어 정맥혈 3 mL를 채취하여 실온에서 보관하여 분석하였다. 채혈 조건은 식전, 식후를 구분하지 않았다.

2. 분석기기 및 시약

채혈에 사용한 시험관은 B 회사 제품의 lithium heparin 진공채혈 시험관과 sodium fluoride 진공채혈시험관을 이용하였으며, 포도당 정량 분석 시약으로는 NaF의 영향이 없고 포도당분석의 표준법인 Hexokinase법을 이용한 DiaSys 제품을 사용하였고, 분석에는 임상화학 자동화분석기 Selectra-E(Vital Scientific, Dieren, Netherlands)를 사용하였다.

3. 실험방법

각 채혈 시험관을 3,000 rpm으로 10분간 전혈을 원심

Table 1. Change in glucose level of Li-heparinized plasma according to delaying time

Sample No.	delaying time		
	0 hr (mg/dL)	60 min (mg/dL)	120 min (mg/dL)
01	85.8	80.6	72.9
02	89.3	80.4	70.1
03	107.7	106.0	87.9
04	90.4	86.8	70.0
05	91.5	83.4	72.2
06	82.9	81.3	69.5
07	91.8	84.9	75.3
08	81.3	76.2	65.3
09	96.2	91.0	83.4
10	108.5	104.7	95.2
11	102.8	95.3	84.5
12	90.3	86.0	75.8
13	119.1	111.2	101.7
14	84.7	79.9	66.7
15	93.0	85.0	77.9
16	105.7	96.8	82.0
17	96.5	89.3	82.2
18	96.6	88.0	76.4
19	100.3	89.4	77.1
20	115.7	106.9	97.3
21	109.7	101.6	91.1
22	99.2	91.3	82.2
23	88.5	.2	75.5
24	119.1	113.4	103.6
25	91.2	84.1	71.1
Mean ± SD	97.5±10.99	91.03±10.63	80.28±10.73

분리하여 첫 번째로 혈장의 포도당 정량 분석한 것을 0 시간, 분석 후 혈구와 혈장을 잘 혼합하여 1 시간 방치하고 원심 분리하여 두 번째로 혈장의 포도당 정량 분석한 것을 60분, 다시 혈구와 혈장을 잘 혼합하여 1 시간 방치하고 원심 분리하여 세 번째로 혈장의 포도당 정량 분석한 것을 120분 포도당 정량 값으로 하였다. 이때 혈액의 포도당은 Hexokinase법(Neese 등, 1976)을 사용하였다. 임상화학 자동화분석기 Selectra-E의 분석 조건은 분석기기에 내장된 hexokinase parameter를 적용하였다.

III. 결 과

1. Heparin 진공채혈 시험관 혈장의 혈당 분석결과

25명의 heparin 혈장을 이용하여 hexokinase법으로 혈당분석의 기술 통계치는 Table 1과 같다. 본 정량분석에 사용한 이 시약의 혈당 참고치는 75~115 mg/dL이었다. 분석 대상자의 혈당치는 0분, 60분, 120분의 시간대에 따라 각각 97.5±10.99 mg/dL(최저 81.3 mg/dL, 최고 119.1 mg/dL), 91.03±10.63 mg/dL(최저 76.2 mg/dL, 최고 113.4 mg/dL), 80.28±10.73 mg/dL(최고 65.3 mg/dL, 최저 103.6 mg/dL)이었다. 25명 검체의 개별적인 감소를 보면 농도와 시간차에 따라 비례적으로 감소하지 않은 원인은 각 검체의 혈구 대사가 다른 것에 기인할 것으로 추정되어지며, 60분 경과 후의 평균 농도 차이는 6.48 mg/dL이었고, 120분 경과 후의 농도 차이는 17.23 mg/dL로 나타났다(Fig. 1).

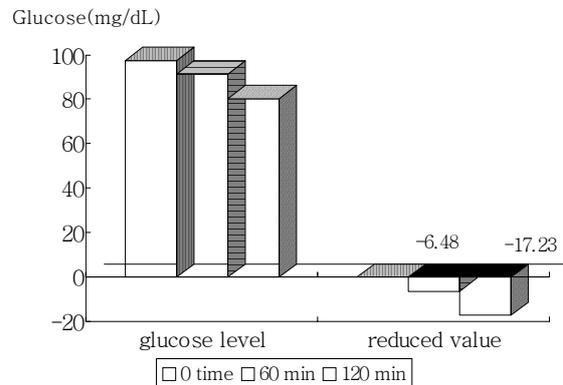


Fig. 1. Reduction in glucose value of Li-heparinized plasma according to delaying time.

2. NaF 진공채혈 시험관 혈장의 혈당 분석결과

25명의 NaF 혈장을 이용하여 hexokinase법으로 혈당 분석 결과는 Table 2와 같다. 분석 대상에서 0분, 60분, 120분의 시간대에 따라 각각 93.42±9.06 mg/dL(최저 78.7 mg/dL, 최고 109.6 mg/dL), 92.36±9.09 mg/dL(최저 76.9 mg/dL, 최고 108.5 mg/dL), 91.55±8.99 mg/dL(최고 76.6 mg/dL, 최저 106.8 mg/dL)이었다. 60분 경과 후의 평균

농도 차이는 1.06 mg/dL이고, 120분 경과 후의 농도 차이는 1.87 mg/dL로 나타났다(Fig. 2).

Table 2. Change in glucose level of Na-fluorinated plasma according to delaying time

Sample No.	Delaying time		
	0 hr (mg/dL)	60 min (mg/dL)	120min (mg/dL)
1	82.0	81.8	81.4
2	90.4	88.4	87.1
3	108.1	105.7	104.6
4	86.7	86.2	85.4
5	89.2	88.5	87.2
6	81.3	81.1	80.7
7	90.3	90.3	89.5
8	78.7	76.9	76.6
9	95.4	95.4	94.8
10	105.1	104.8	104.4
11	98.5	98.2	97.7
12	87.1	84.5	83.6
13	107.0	106.5	105.3
14	91.7	91.0	90.2
15	104.6	102.3	102.0
16	80.3	78.2	76.9
17	88.9	87.9	87.5
18	100.0	99.2	97.1
19	93.2	92.3	91.1
20	89.7	88.7	87.8
21	94.0	92.2	91.5
22	109.6	108.5	106.8
23	104.0	102.9	102.7
24	92.1	91.5	91.1
25	87.6	86.0	85.8
Mean ± SD	93.42±9.06	92.36±9.09	91.55±8.99

3. Heparin과 NaF 진공채혈 시험관 혈장의 혈당 분석결과 비교

25명의 heparin 혈장과 NaF 혈장을 이용하여 Hexokinase법으로 혈당 분석 결과를 비교한 결과는 Table

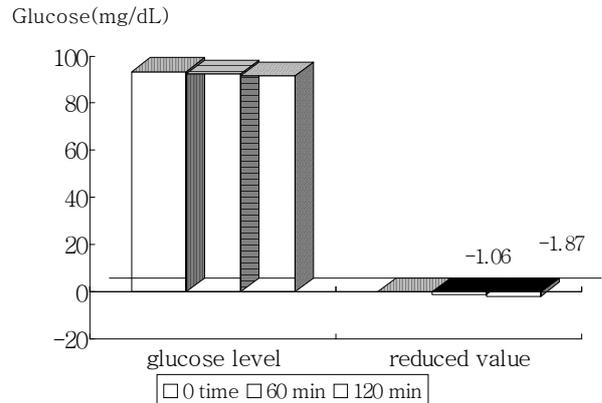


Fig. 2. Reduction in glucose value of Na-fluorinated plasma according to delaying time.

3과 같다. Table 1, 2에서 분석한 결과는 시간이 경과함에 따라 전체적으로 감소하는 경향을 보이고 있는데, Table 3에서 heparin 혈장을 이용한 검체에서는 1시간 경과에서 혈당이 평균 6.48 mg/dL이 감소되어 6.6%의 감소율을 나타내었고, 2시간 경과에서 혈당이 평균 17.23 mg/dL이 감소되어 17.7%의 감소율을 나타내고 있다. 그러나 NaF 혈장을 이용한 검체에서는 1시간 경과에서 혈당이 평균 1.06 mg/dL이 감소되어 1.1%의 감소율을 나타내었고, 2시간 경과에서 혈당이 평균 1.87 mg/dL이 감소되어 2.0%의 감소율을 나타내고 있다. heparin 혈장의 혈당 감소율은 NaF 혈장에 비해 1시간에 5.5%, 2시간에 15.7%의 감소율로 1시간 경과에 따라 무려 3배의 감소율을 나타내는 반면, NaF 혈장 검체는 1시간과 2시간의 감소율이 비교적 적은 2% 이내로 나타나고 있다.

Table 3. Comparison of two sampling method: Li-heparinized versus Na-fluorinated plasma sampling method

		0 hr	60min	120min
Heparin plasma	Mean (mg/dL)	97.51	91.03	80.28
	Reduced quantity (%)	-	6.48 (6.6%)	17.23 (17.7%)
	Mean (mg/dL)	93.42	92.36	91.55
NaF plasma	Reduced quantity (%)	0	1.06 (1.1%)	1.87 (2.0%)

IV. 고 찰

당뇨병과 관련 질환을 진단하기 위해서 일반적으로 사용하는 분석법은 과거부터 환원법, 축합법, 효소법 등으로 발전하였고, 현재는 효소법에서 Glucose Oxidase법과 Hexokinase법을 사용하여 공복과 식후 2시간 혈당검사법, 진성 당뇨병에 대한 포도당 내성시험 등의 혈당 분석에 적용하고 있으며, 당뇨병의 진행과 과거 병력에 대한 판단을 위해 2~3달 전의 평균 혈당 농도를 반영하여 당뇨병 관리에 보조적인 역할을 하는 당화혈색소와 관련된 HbA1c, 2주 정도의 최근 혈당을 반영하는 Fructosamine 검사법, 현재와 직전의 혈당조절 상황을 반영하는 1,5-Anhydroglucitol 검사법 등을 이용하고 있다(김 등, 2005).

임상에서 일상적으로 진단에 이용하는 종목에서 검체로 혈청을 사용하는 GOD법과 Hexokinase법, 혈구를 이용하는 HbA1c로 구분해 볼 수 있는데, 채혈하여 방치 시간이 길어지면 문제가 발생하는 것은 혈청의 포도당 농도라 할 수 있다. 임상화학적 검사는 특정한 1~2개의 종목을 검사하는 경우도 있지만 간 기능, 신장 기능, 지질대사 등의 일상적인 검사로서 이용되고 있고 여기에 혈당 분석 종목도 포함 되는 경향도 많다. 이와 같은 분석을 위해 진단검사의학에서 환자 접수 또는 병실에서 임상화학적 분석을 위해 채혈할 때 4부 시험관 또는 마개 색이 “빨강색”인 진공 시험관, 마개 색이 “노랑색”인 SST 진공채혈 시험관을 일상적으로 사용하고 있고, 4부 시험관과 마개 색이 “빨강색” 진공 시험관은 혈액 응고 시간이 1시간 정도 소요되고, “노랑색” 색의 SST 시험관은 혈액 응고 시간이 30분이 경과하여야 혈청 분리가 가능하고, 원심분리시간, 분석 준비시간 등을 고려한다면 시험관의 종류에 따라 약 1시간 또는 그이상도 될 수 있게 된다(문, 2005).

이 과정에서 혈당의 농도는 포도당을 에너지로 사용하는 적혈구의 대사과정에서 감소하게 되는데, 본 연구 결과의 Table 1과 3에서 나타난 것처럼 60분에 6.6%, 120분에 17.7%로 감소를 나타내고 있다. 이 결과는 Weissman과 Klein 등(1958)이 1시간에 7%가 감소한다는 보고와 거의 일치하는 결과를 나타내었다. 여기에서 이 실험에

사용한 분석법의 참고치가 75~115 mg/dL인 것을 고려하여 Tonk의 허용오차를 적용하면 10.5%의 값이므로 허용오차 10.5%와 1시간 경과 또는 2시간 경과 6.6%, 17.7%를 가산하면 실제적인 오차는 대단히 큰 오차가 발생할 것으로 생각된다.

이와 같은 해당을 방지하기 위해서 근래에는 sodium fluoride가 첨가된 마개 색이 “회색”인 진공채혈 시험관을 이용하여 혈당분석용 검체 채혈에 사용하고 있는데, NaF 혈장의 혈당 결과는 Table 2, 3에서 60분에 1.1%, 120분에 2.0%의 감소를 나타내고 있어, heparin 혈장 검체의 혈당 감소율보다 매우 적은 차이를 나타내고 있다. 이 sodium fluoride는 적혈구내의 포도당 대사과정에서 Mg(II)을 필요로 하는 효소인 enolase를 저해하고 있고, enolase는 적혈구내의 포도당 대사 과정의 2-phosphoglyceride와 phosphoenolpyruvate 사이에 평형 작용을 하고 있다(William et al, 1983). 그러나 일부 제품에서 며칠 간 혈당의 변화가 없다고 하지만 이에 대한 것은 좀 더 검토해야 하겠지만 일반적으로 공복 및 식후 2시간 혈당, GTT 시험에 대한 시간을 고려한다면 60분에 1.1%, 120분에 2.0%의 감소는 Tonk의 허용오차를 적용하더라도 변동의 폭은 적으며, 표준 편차에서 이 정도의 감소는 $\pm 2SD$ 범위에 들어가므로 혈당 분석에서 크게 문제가 되지 않을 것으로 보며, 비록 NaF 검체라 할지라도 채혈한 검체를 몇 일간 방치하는 것은 분석에 적절하지 않은 것 같다.

임상에서 환자의 검사 종목에 따라 별도의 검체를 채혈하는 경우도 있지만, 일상적인 화학분석에서 4부 시험관 또는 SST 시험관의 혈청으로 다른 분석과 함께 혈당 분석도 시행하는 경우에 병실에서 채혈 후의 임상병리과로 운송 지연, 임상병리과에서의 분석 지연 등으로 발생하는 혈당의 감소는 폭 넓은 변화가 예상 되므로, 혈당 분석 대상 환자인 경우는 SST 시험관 이외에 별도의 NaF 진공 채혈시험관에 채혈하고, 임상화학 자동화 분석기에서도 포도당 정량에 대한 batch 방식을 다른 분석과 독립적으로 적용하여 분석하는 것이 임상병리과에서 당뇨병 질환자들에 대한 환자 개별 정도관리 측면에서 적합할 것으로 생각되어 진다.

참 고 문 헌

1. Albert L. Lehninger. *Principle of biochemistry* p561-577, Worth Publishers, New York, 1982.
2. Boyd R, Leigh B, Stuart P. Capillary versus venous bedside blood glucose estimations. *Emerg Med J* 22(3):177-9, 2005.
3. Bradley C, Moses JL. Evaluation of blood glucose measurement techniques: locating sources of error. *Diabetes Res.* Jan;3(1):53-58, 1986.
4. Colagiuri S, Sandbaek A, Carstensen B, Christensen J, Glumer C, Lauritzen T, Borch-Johnsen K. Comparability of venous and capillary glucose measurements in blood. *Diabet Med* 20(11):953-956, 2003.
5. Neese J W, Duncan P, Bayse D. Development and evaluation of a hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase procedure for use as a national glucose reference method. HEW Publication No.(CDC)77-8330. Atlanta, *Center for Disease Control*, 1976.
6. Putz GR, Barrett DA 2nd, Witte DL. Evaluation of a glucose oxidase procedure. *Am J Med Technol* Oct 42(10):351-356, 1976.
7. Sampson EJ, Derck DD, Demers LM. Comparison of results for 13 clinical laboratory determinations with three automated analytical systems. *Clin Chem* 22(3):346-349, 1976.
8. Tang Z, Louie RF, Lee JH, Lee DM, Miller EE, Kost GJ. Oxygen effects on glucose meter measurements with glucose dehydrogenase- and oxidase-based test strips for point-of-care testing. *Crit Care Med* 29(5):1062-1070, 2001.
9. Weissman M, Klein B. Evaluation of glucose determinations in untreated serum samples. *Clin Chem* 4(5):420-2, 1958.
10. William J, Ernest B, Allen J, Marshall A. *Hematology* p332-336, Mcgraw-Hill Book, New York, 1983.
11. 김재영, 김진규, 김태영, 나영악, 류재두, 민복기, 박인국, 박정오, 박화진, 여영규, 이미화, 이화재, 정하승, 정현근, 최완수. 최신 임상화학. 제1판, p209-224, 청구문화사, 서울, 2005.
12. 문인경. 임상화학총론. 제1판, p329-330, 신광출판사, 서울, 2005.
13. 문인경, 강영태, 최명재. 임상화학각론. 제1판, p210-218, 신광출판사, 서울, 2006.
14. 박용규, 유진성, 김민호. 당뇨병망막병증의 유리체 절제술 후 임상성적분석. *대한안과학회지* 41(3):129-134, 2000
15. 사망원인통계. 일반사망요약분류. 통계청, 2007.
16. 유형준. 당뇨병소식, Diabeste News Letter, 대한당뇨병학회 40:2-3, 2006.
17. 이경민, 이규창, 이승윤, 우남식, 이예철. 혈당과 동맥혈 가스분석 및 폐포-동맥혈 산소분압차에 의한 당뇨병이 수술전후 환자 상태에 미치는 영향의 평가. *대한마취과학회지* 47:488-492, 2004.