

Original Article

용혈이 Vitamin B₁₂ / Folic acid 검사 결과에 미치는 영향

의료법인 삼광의료재단 핵의학실
김미숙 · 조윤교 · 임도화 · 서소연

The Effect of *in vitro* Hemolysis on Vitamin B₁₂ / Folic Acid Results

Mi Sook Kim, Youn Kyo Cho, Do Hw Im, So Yeon Seo
Samkwang Medical Laboratories

Purpose: Vitamin B₁₂ and folic acid are type of water-soluble vitamin and those work as a secondary vital enzyme, but especially those are involved in the nuclear DNA synthesis. Those are mainly measured in order to diagnose megaloblastic anemia and to assess the storage of folic acid during pregnancy. It is generally known that the hemolyzed serum is useless for folic acid and vitamin B₁₂, but it is not easy to abide by this information because our lab (Samkwang Medical Laboratories) is reference laboratory. We tested how much the extent of hemolyzed serum had influence on the results. **Materials and Method:** We performed the tests of vitamin B₁₂, folic acid. For the hemolysis effect study, we used 40 cases. According to the level of A, B and C groups, each group had 10 samples which were mechanically hemolyzed serum. **Results:** Hemolysis did not affect the vitamin B₁₂ results. However in case of folic acid, the value increased according to the degree of hemolysis. And severe hemolyzed cases had the highest value (greater than 20 ng/ml). **Conclusions:** Preventing the hemolysis, it has to be informed that blood-collecting, separation and storage are performed more carefully. As you see from the above results, hemolyzed serum is not proper for folic acid test, and hemolysis does not affect the results of vitamin B₁₂. However, for the more accurate results, it is necessary to avoid hemolysis. (*Korean J Nucl Med Technol* 2008;12(1):62-65)

Key Words : Vitamin B₁₂, Folic acid, Hemolysis

서 론

Vitamin B₁₂는 비타민 복합체의 하나로 코발트를 함유하고 있다. 그래서 Cobalamin이라고도 불린다. 주요기능은 적혈구 형성과, 건강한 신경계를 유지하는데 있다. Vitamin B₁₂는 세포분열을 하는 동안 빠른 DNA합성을 위해 꼭 필요하다. 이것은 특히 세포분열이 빨리 일어나는 곳, 특히 골수조직에 무엇보다 중요하다. Vitamin B₁₂ 결핍 시 DNA생성이

중단되고 Megaloblastic라는 비정상 세포가 생긴다. 이것이 Megaloblastic Anemia이다.

Vitamin B₁₂는 신경계 유지를 위해서도 중요하다. 신경은 myelin이라는 복합단백질로 구성되어 있고 절연체 역할을 하는 지방질의 시스(수초)에 의해 둘러 싸여 있다.

Vitamin B₁₂는 myelin의 유지를 위해 꼭 필요한 지방산의 대사에서 아주 중요한 역할을 한다. Vitamin B₁₂ 결핍은 신경의 퇴행과 비가역적인 신경손상을 일으킬 수 있다.

Folic acid는 화학식 C₁₉H₁₅N₇O₆. 프테린과 p-아미노벤조산 및 글루탐산으로 이루어지는 프테로일-L-글루탐산이다. 항빈혈 인자에 관한 연구 중에 분리한 것으로 작은 잎 식물(foliolate)에 많이 함유되어 있어 붙여진 이름이다. 담즙으로 배설되며, 장에서 흡수되어 간을 포함한 각종 조직에 운반된

• Received: October 8, 2007. Accepted: October 27, 2007.
• Corresponding author: Mi Sook Kim
Samkwang Medical Laboratories, 9-60 Yang Jae-dong, Seocho-gu, Seoul, 137-130, Korea
Tel: +82-2-3497-5173, Fax: +82-2-3497-5179
E-mail: kimm5777@smlab.co.kr

다. Folic acid는 섭취 후 소장 점막에 존재하는 효소의 작용을 받아 흡수되고, 소장 점막 또는 간에서 저장된다. 이와 같이 저장된 엽산은 여러 유도체로 변환하여 핵산 합성 등 중요한 작용을 한다. 엽산 유도체는 핵산합성에 기질이 되는 대단히 중요한 vitamin인데 특히 purine, pyrimidine 합성에 관여한다. 엽산 결핍은 혈액세포, 장관점막세포 등의 분열증식이 활발한 세포계에 큰 영향을 주기 때문에 엽산이 결핍되면 만성 설사, 설염, 구각염 외에 자극성 등의 신경 증상을 보인다.

이러한 의의를 갖는 Vitamin B₁₂, Folic acid 검사는 혈청이 용혈 되면 혈구중의 엽산과 비타민 B₁₂가 용출하기 때문에 검사 결과에 많은 영향을 미친다고 알려져 있다. 이에 수탁 검사기관인 본원의 특성상 이 내용을 충실히 따르기에는 어려움이 있어 용혈의 정도가 검사 결과 치에 어느 정도 영향을 미치는가를 알아보고자 실험을 실시 해 보았다.

방법 및 재료

1. 재료

건강 성인을 10명을 대상으로 Vacutainer로 한 사람당 4개씩 채혈 실시 용혈되지 않은 검체(n=10)를 대조군으로 하고 용혈 단계를 나누어 실험(Hemoglobin (Hb) 0, 0.1, 0.2, 3.8~4.2 g/dl)

1) 혈청의 완전분리

채혈 후 15~20분간 방치 후 2,500~3,000 rpm 5분간 원심 분리

대조군⇒ (Hemoglobin (Hb): 0 g/dl)

2) 단계별 분류

A그룹 : 혈액을 흔들거나 면봉으로 cell을 부수어 기계적으로 용혈시킴.

B그룹 : 혈액을 면봉으로 cell을 부순 후 Vortex mixer로 10회 mix함

C그룹 : 혈액을 동결, 해동을 2회 반복함

*실험군을 단계별로 분류하여 육안으로 색을 구분

⇒ Hemoglobin 수치 측정

A그룹 ⇒ (Hemoglobin (Hb): 0.1 g/dl)

B그룹 ⇒ (Hemoglobin (Hb): 0.2 g/dl)

C그룹 ⇒ (Hemoglobin (Hb): 3.8~4.2 g/dl)

3단계로 분류하여 실험 실시 하였다.

2. 방법

1) 측정원리(Principle of Test)

: 방사면역측정법(RIA: RadioImmunoAssay)

2) 검사시약

: M사의 Vitamin B₁₂ [⁵⁷Co]/Folate [¹²⁵I] 검사시행

3) 검사 실시 과정

① Tube에 Standard, sample를 200 µl씩 분주한다.

② Working Tracer solution 200 µl씩 모든 tube에 분주한 후 Vortex한다.

③ 실온에서 15분 동안 Incubate한다.

④ Extracting Reagent을 각각 100 µl씩 분주한 후 Vortex한다.

⑤ 실온에서 10분 동안 Incubate한다.

⑥ Blank Reagent는 Standard 처음 A에 1 ml를, 나머지 tube에 Binder 1 ml씩 분주 후 Vortex Mixer한다.

⑦ 실온에서 60분간 Incubate한다.

⑧ 냉동원심분리기에서 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 free form을 제거하고 bound form을 1470 wizard γ-counter에서 1분간 계측한다.

⑨ 표준 그래프에서 농도 값을 구한다.

결 과

◎ Reference Value

· Vitamin B₁₂: 160-970 pg/ml

· Folic acid: 1.5-16.9 ng/ml

Vitamin B₁₂ 대조군의 Mean±SD (pg/ml)는 611.43±254.52 (pg/ml), hemoglobin이 0.1 g/dl인 A그룹은 633.66±244.86 (pg/ml), hemoglobin이 0.2 g/dl인 B그룹은 647.28±264.17 (pg/ml), hemoglobin이 3.8~4.2 g/dl인 C그룹은 659.06±268.06 (pg/ml)로 용혈 정도에 따라 유의한 차이는 보이지 않았다. Folic acid 대조군의 Mean±SD (ng/ml)는 7.49±2.56 (ng/ml), hemoglobin이 0.1 g/dl인 A그룹은 9.68±3.10 (ng/ml), hemo-

Table 1. Effects Comparison of Hemolysis on Vitamin B₁₂ and Folic Acid

	Hemolysis	Control (Group) (Hb: 0 g/dl)	A (Group) (Hb: 0.1 g/dl)	B (Group) (Hb: 0.2 g/dl)	C (Group) (Hb: 3.8~4.2 g/dl)
Vitamin B ₁₂	Mean±SD (pg/ml)	611.43±254.52	633.66±244.86	647.28±264.17	659.06±268.06
Folic acid	Mean±SD (ng/ml)	7.49 ±2.56	9.68±3.10	12.65±2.91	20 ≥

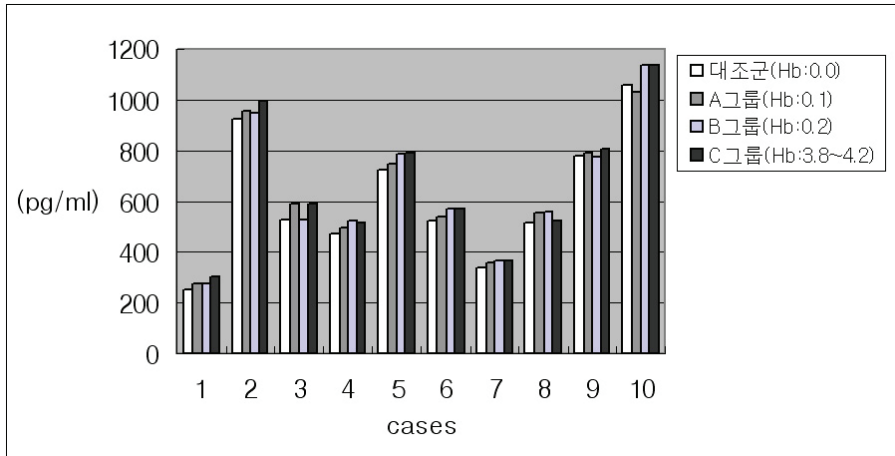


Fig. 1. Effects Comparison of Hemolysis on Vitamin B₁₂.

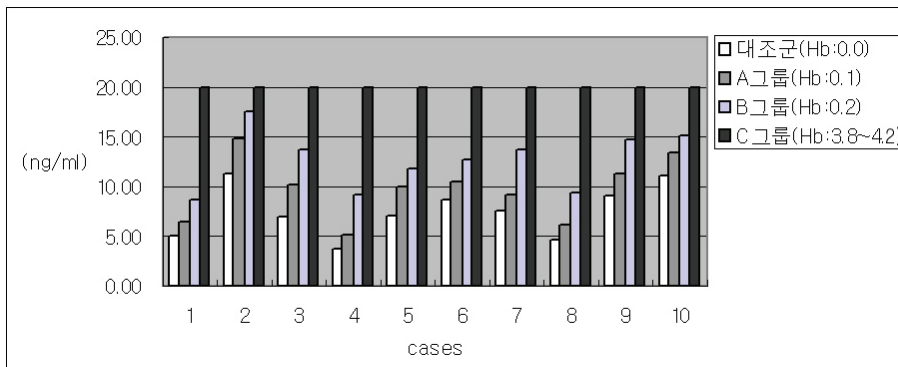


Fig. 2. Effects Comparison of Hemolysis on Folic Acid.

globin이 0.2 g/dl인 B그룹은 12.65±2.91 (ng/ml), hemoglobin 이 3.8~4.2 g/dl인 C그룹은 모두 20 (ng/ml) 이상 결과가 나왔다. 위의 결과에서 보여 지듯이 Folic acid 검사결과는 용혈의 정도에 따라 유의한 차이가 있었다(Table 1, Fig. 1,2).

고 찰

Vitamin B₁₂ 및 Folic acid는 모두 수용성 비타민의 일종으로 생체 내에서 보조 효소로서의 작용을 가지고 있다. 특히 세포핵의 DNA 합성에 관여하고 있다. 이러한 주요 기능을 하는 Vitamin B₁₂ 및 Folic acid 검사가 용혈 혈청은 혈구중의 엽산과 비타민 B₁₂가 용출하기 때문에 사용할 수 없다고 알

려져 있어, 이에 용혈의 정도가 검사 결과치에 어느 정도 영향을 미치는가에 대해 알아보려고 검사를 시행해 보았다. 위의 결과에서 보여주듯이 용혈 검체로 Vitamin B₁₂와 Folic acid를 검사할 경우 Vitamin B₁₂는 검체의 용혈이 결과 값에 큰 영향을 미치지 않았다. 하지만 Folic acid의 경우에는 용혈의 정도에 따라 값이 배 이상 증가하며, 심하게 용혈인 경우 모두 표준곡선의 최고치의 값(20 ng/ml 이상) 을 확인할 수 있었다. 환자의 정확한 진단과 치료를 위해서는 Vitamin B₁₂ 및 Folic acid 검사가 용혈 시 검사 결과에 미치는 영향을 정확하게 인지해야 한다. 수탁기관인 본원의 특성상, 최대한 용혈이 일어나지 않도록 검사 의뢰 병원에 적극적으로 홍보해야 한다. 또한 육안적으로 용혈을 인식할 수 없어도 혈구 막

의 투과성의 변화로 세포 내 성분이 흘러나올 수 있다는 점을 인지하여 채혈, 분리, 보관 시 세심한 주의를 기울여야 할 것이다. 위의 결과에서 보여주듯이 용혈 된 검체로 Folic acid 검사를 해서는 안 되며 Vitamin B₁₂ 또한 결과 값에는 큰 영향을 미치지 않지만 정확한 결과 값을 위해 용혈 검체는 피해야 할 것으로 생각된다.

요 약

배경 : Vitamin B₁₂ 및 Folic acid는 모두 수용성 비타민의 일종으로 생체 내에서 보조 효소로서의 작용을 가지고 있지만 특히 세포핵의 DNA 합성에 관여하고 있다. 주로 거대 적아구성 빈혈의 감별 진단과 임신 중 엽산의 저장을 평가하기 위해 측정한다. 용혈 혈청은 혈구 중의 엽산과 비타민 B₁₂가 용출하기 때문에 사용할 수 없다고 알려져 있으나 수탁 검사 기관인 본원의 특성상 이 내용을 충실히 따르기에는 어려운 경우가 있다. 이에 용혈의 정도가 검사 결과치에 어느 정도 영향을 미치는가에 대해 알아보하고자 검사를 시행해 보았다.

방법 : 용혈되지 않은 검체를 대조군으로 하고 기계적으로 용혈을 일으켜 용혈 정도에 따라 A, B, C그룹으로 분리하여 용혈 검체를 그룹별 각각 10개씩 준비한다. 경쟁반응 원리인 M사의 Vitamin B₁₂ [⁵⁷Co]/Folate [¹²⁵I] 시약으로 검사를 실시한다.

결과 : Vitamin B₁₂는 검체의 용혈이 결과 값에 큰 영향을 미치지 않았다. 하지만 Folic acid의 경우에는 용혈의 정도에 따라 값이 증가 하였으며, 심하게 용혈 된 경우 모두 표준곡선의 최고치의 값(20 ng/ml 이상)을 확인할 수 있었다.

고찰 : 수탁기관인 본원에서는 Vitamin B₁₂ 및 Folic acid 검사 의뢰 병원에 검체의 용혈이 검사 결과에 미치는 영향과 검체의 용혈을 막기 위해 채혈 시 주의할 점들을 홍보하고, 분리, 보관 시 세심한 주의를 기울여야 할 것이다. 위의 결과에서 보았듯이 용혈된 검체로 Folic acid검사를 해서는 안 되며 Vitamin B₁₂ 또한 결과 값에는 큰 영향을 미치지 않지만 용혈에 주의할 필요가 있다.

참고문헌

1. Herbert V, Introduction to the "Nutritional Anemias". *Sem Hemat.* 1970;7:2-5.
2. Herbert V. Folic Acid and vitamin B₁₂. "Modern Nutrition in Health and Disease", 5th ed., edited by R. S. Goodhart and M. E. Shils, Lea & Febiger, Philadelphia, pp.221-224, 1973.
3. Chanarin I. The assay and concentration of folate in blood and other tissues. "The Megaloblastic Anemias", Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.306-336, 1969.
4. Herbert V. Drugs effective in megaloblastic anemias. "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 4th ed., edited by L.S. Goodman and A. Gilman, MacMillan Co., New York, pp. 1414-1444, 1970.
5. Tishman G, Herbert V. B₁₂ dependence of cell uptake of serum folate: an explanation for high serum folate and cell folate depletion in B₁₂ deficiency. *Blood.* 1973;41:465-469.
6. Herbert V. B₁₂ and folate deficiency. "Nuclear Medicine", edited by B. Rothfield, Lippincott, Philadelphia, pp.69-84, 1974.
7. Chanarin I. The assay and concentration of Vitamin B₁₂ in serum, liver and cerebrospinal fluid. "The Megaloblastic Anemias". Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp.192-229, 1969.
8. Sullivan LW. The megaloblastic Anaemias. "Hematology: Principles and Practice". edited by E.C Mengel, E.frei III and R. Nacham, Yearbook Medical Publishers, Chicago, pp.95-131, 1972.
9. Kolhouse JF, Kondo H, Allen NC, Podell E, Allen RH. Cobalamin analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamin. *New Eng J Med.* 1978;299:785-792.
10. Cooper BA, Whitehead VM. Evidence that some patients with pernicious anemia are not recognized by radiodilution assay for cobalamin in serum. *New Eng J Med.* 1978;299:816-818.