

총콜레스테롤 및 중성지방 검사에서 비타민 C에 의한 음성간섭영향

The negative role of Vitamin C in total cholesterol and triglycerides tests

고유근^{1*} · 이현승^{1,2*} · 이경훈³ · 송정환³ · 박형두¹

You-Keun Ko, M.D.^{1*}, Hyun-Seung Lee, M.D.^{1,2*}, Kyunghoon Lee, M.D.³, Junghan Song, M.D.³, Hyung-Doo Park, M.D.¹

성균관의대 삼성서울병원 진단검사의학과¹, 원광의대 원광대학교병원 진단검사의학과², 서울의대 분당서울대학교병원 진단검사의학과³
Department of Laboratory Medicine and Genetics¹, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine², Wonkwang University Hospital, Iksan; Department of Laboratory Medicine³, Seoul National University, Bundang Hospital, Seongnam, Korea

Background: This study aimed to determine the cause of low total cholesterol and triglyceride levels based on the Trinder reaction by reviewing cases of negative interference.

Methods: We analyzed the results of total cholesterol and triglyceride tests performed over 19 months. Sixty-three test results from 48 patients showing abnormally low total cholesterol or triglyceride levels were included. Lipid profile (total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol) was evaluated with Roche Diagnostics (Germany) and Sekisui Medical (Japan) reagents by using Cobas c702 analyzer (Roche). In vitro lipid profile tests were also determined using both above reagents for serum spiked with nine different concentrations of vitamin C.

Results: Total cholesterol and triglyceride levels measured using Roche reagents (without ascorbate oxidase) were significantly lower than those using Sekisui reagents containing ascorbate oxidase respectively. HDL-cholesterol and LDL-cholesterol levels showed no significant difference between the two company reagents. Malignancy was diagnosed in 83% of the patients, and the patients have the possibility of receiving high-dose vitamin C therapy. In addition, 27% of the patients were diagnosed with chronic kidney disease. At the level of 25.0 mg/dL vitamin C to the serum, total cholesterol and triglyceride levels, measured using Roche reagents, reduced by 27% and 95%, respectively, but were rarely reduced when using Sekisui reagents.

Conclusions: When negative interference is suspected in the total cholesterol or triglyceride of patients, the specimens need to be retested with the reagent containing ascorbate oxidase, and the patient's medical record should be reviewed thoroughly.

Key Words: Ascorbic acid, Ascorbate oxidase, Analytic interference, Cholesterol, Enzymatic assays, Triglycerides

서론

총콜레스테롤, 중성지방, 고밀도 지단백 콜레스테롤(high den-

sity lipoprotein cholesterol, HDLC) 및 저밀도 지단백 콜레스테롤 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 4종으로 구성된 지질 프로파일 검사는 이상지질혈증의 진단과 치료 계획의 수립에 중요한 역할을 한다. 검사의 임상적 중요성이 높은 만큼 당화혈색소, 크레아티닌 검사와 더불어 국가진단의학표준검사실에서 운영하는 표준화관리사업의 대상이 되는 6개 검사 항목의 일부이며 해외의 이상지질혈증 지침에서도 정확하게 측정된 지질 프로파일 검사 결과에 근거하여 진료할 것을 강조하고 있다[1, 2].

임상 검사실에서 지질 프로파일 검사에 흔히 사용되는 방법은 Trinder 반응 기반의, 자동화 장비를 이용하는 효소비색정량법으로서, 자동화가 어려운 표준검사법을 대신한다. 지질 프로파일 각 항목의 세부적인 측정 과정은 차이가 있지만 공통적으로 Cholesterol oxidase 혹은 Glycerol phosphate를 통해 분석 물질의 산화가 이루어지며 그 과정에서 과산화수소(H_2O_2)가 발생한다. 과산화수소는 분석 물질의 양에 비례하여 발생하므로 과산화수소의 양

Corresponding author: Hyung-Doo Park, M.D., Ph.D.

<https://orcid.org/0000-0003-1798-773X>

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 06351, Korea

Tel: +82-2-3410-0290, Fax: +82-2-3410-2719, E-mail: nayadoo@hanmail.net

*These authors contributed equally and share co-first authorship.

Received: June 20, 2022

Revision received: September 26, 2022

Accepted: October 5, 2022

This article is available from <https://www.labmedonline.org>

© 2023, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에 비례한 발색 반응을 통해 분석 물질을 정량적으로 측정하는 것이 가능하다. 발색 반응 중에, 과산화효소(peroxidase)의 존재 하에 가시광선을 흡수하지 않는 4-aminophenazone과 같은 물질을 가시광선을 흡수하는 물질(chromophore)로 전환시키는 과정이 일어난다. Trinder 반응은 이러한 산화 및 발색을 이용하여 분석 물질의 농도를 측정하는 방법이며, 1969년 Trinder가 혈중 포도당 농도 측정을 위해 처음 사용하였다[3].

Trinder 반응 기반의 효소비색정량법은 혈청 내 다양한 원인물질로 인해 간섭현상이 발생할 수 있는데, 비타민 C (vitamin C, ascorbic acid), N-acetyl cysteine, acetaminophen, homogentisic acid, gentisic acid, etamsylate, calcium dobesilate 및 bilirubin 등에 의한 음성 간섭현상이 보고된 바 있다[4-7]. 특히 비타민 C로 인한 간섭 현상은 일반화학검사에서 발생할 수 있는 전형적인 간섭 반응 중 하나이다. 이때 총콜레스테롤과 중성지방 검사에서 음성 간섭 현상이 발생하는 것은 검사 단계 중 발색 반응에 필요한 과산화효소가 비타민 C로 인해 소진되는 것이 원인이다[6]. 검사 반응의 기질보다 비타민 C가 효소와 먼저 반응함으로써 발색 반응이 감소하고, 이는 분석물질의 농도가 낮게 측정되는 결과로 이어진다. 총콜레스테롤에 대한 국내 연구에서도 이러한 문제를 해결하기 위해 ascorbate oxidase가 포함된 시약의 사용이 권고된 바 있다[8]. 현재 국내에서 총콜레스테롤 검사에 많이 사용되는 시약들 중에서는 Pureauto S CHO-N (Sekisui Medical, Tokyo, Japan), L Type CHO M (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)이 ascorbate oxidase를 포함하는 시약에 해당하며, CHOL2 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)와 OSR6516 Cholesterol (Beckman Coulter, CA, USA) 시약에는 ascorbate oxidase가 포함되어 있지 않다. 중성지방 검사의 경우 Pureauto S TG-N (Sekisui Medical), L-Type Triglyceride M (Wako Pure Chemical Industries), OSR66118 Triglyceride (Beckman Coulter) 시약이 ascorbate oxidase를 포함하는 시약이며, TRIGL (Roche Diagnostics)에는 포함되어 있지 않다.

일반적으로 총콜레스테롤 및 중성지방 농도가 낮은 연령대인 10-20대에서도 총콜레스테롤과 중성지방은 각각 평균 140 mg/dL (1.58 mmol/L; $1 \text{ mg/dL} \times 0.0113 = 1 \text{ mmol/L}$), 60 mg/dL 이상의 값을 보이며, 총콜레스테롤이 40 mg/dL 미만으로 감소하거나 중성지방이 20 mg/dL 미만으로 감소하는 경우는 매우 드물다[9]. 그러나, 본원에서 시행된 지질 프로파일 검사에서 40 mg/dL 미만의 총콜레스테롤 또는 20 mg/dL 미만의 중성지방 농도를 보이는 경우가 반복적으로 발생하였다. 특히 총콜레스테롤과 중성지방이 최저량 한계(Lower limit of quantitation, LLOQ) 미만으로 측정되는 경우가 일부 발생하였다. 이에 저자들은 단일 기관에서 19개월간 발생한 총콜레스테롤 및 중성지방 이상 결과 발생 사례를 조사하고 원인을 분석하였다. 반복적으로 발생하였던 총콜레스테롤과 중성지방

의 비정상적인 측정 결과의 원인을 비타민 C에 의한 Trinder 반응의 음성 간섭현상으로 추정하고, 간섭현상을 교정한 경험을 공유하고자 한다.

재료 및 방법

1. 총콜레스테롤 및 중성지방 이상 결과 발생 검체 분석

2020년 9월부터 2022년 3월까지 19개월 동안 삼성서울병원 진단검사의학과에 의뢰된 1,196,743건의 총콜레스테롤 검사 및 495,176건의 중성지방 검사 중 총콜레스테롤 40 mg/dL 미만(38건, 0.003%), 중성지방 20 mg/dL 미만(65건, 0.013%)의 결과를 보인 경우를 비정상적으로 낮은 측정값으로 정의하여 분석하였다. 총콜레스테롤에서 40 mg/dL 미만의 측정값을 보인 검체는 모두 중성지방에서도 20 mg/dL 미만의 측정값을 보여 총 65건의 검체가 분석대상이 되었는데, 이중 생후 20일의 영아에서 시행된 1건과 잔여 혈청 보존 상태 불량으로 추가 검사가 불가능했던 1건을 제외하고 총 63건의 대해 추가 조사를 수행하였다. 63건 중에서 동일 환자에서 5회의 비정상적인 측정값들이 보고된 경우가 1건, 4회 보고된 경우가 1건, 2회 보고된 경우가 6건, 1회 보고된 경우가 40건으로 연구에 등록된 환자의 수는 48명이었다.

조사 대상 63건의 잔여 혈청을 이용하여 추가검사를 시행하였으며, 지질 프로파일 4종을 모두 확인하였고 타 제조사(Sekisui Medical) 시약으로 지질 프로파일 검사 4개 항목 결과를 측정하여 두 종류 시약의 측정값을 비교하였다. 잔여 혈청을 이용한 검사는 첫 측정이 이루어지고 난 후 적어도 24시간 이내에 이루어졌으며, 검체는 추가 검사가 시행되기 전까지 밀폐 용기 내 상온 보관되었다. 지질 프로파일 검사는 Cobas c702 analyzer (Roche Diagnostics)에서 측정하였으며, 정규검사에서 수행된 시약은 Roche사의 총콜레스테롤 시약 CHOL2 (Roche Diagnostics), 중성지방 시약 TRIGL (Roche Diagnostics), HDLC 시약 HDL3 (Roche Diagnostics), 및 LDLC 시약 LDL3 (Roche Diagnostics) 등이었다. 또한, 간섭현상을 배제하기 위하여 사용한 다른 회사 시약은 Sekisui Medical사의 Pureauto S CHO-N (Sekisui Medical), Pureauto S TG-N (Sekisui Medical), Cholestest N HDL (Sekisui Medical), Cholestest N LDL (Sekisui Medical) 등이었다(Table 1). 간섭 현상의 원인으로 널리 알려진 검체의 용혈, 고빌리루빈혈증, 고지질혈증의 배제를 위해 검체의 색과 혼탁도를 확인하였다. 10 mg/dL 미만의 결과값은 통계 분석의 편의성 및 정량 한계를 고려하여 10 mg/dL로 변환하였다.

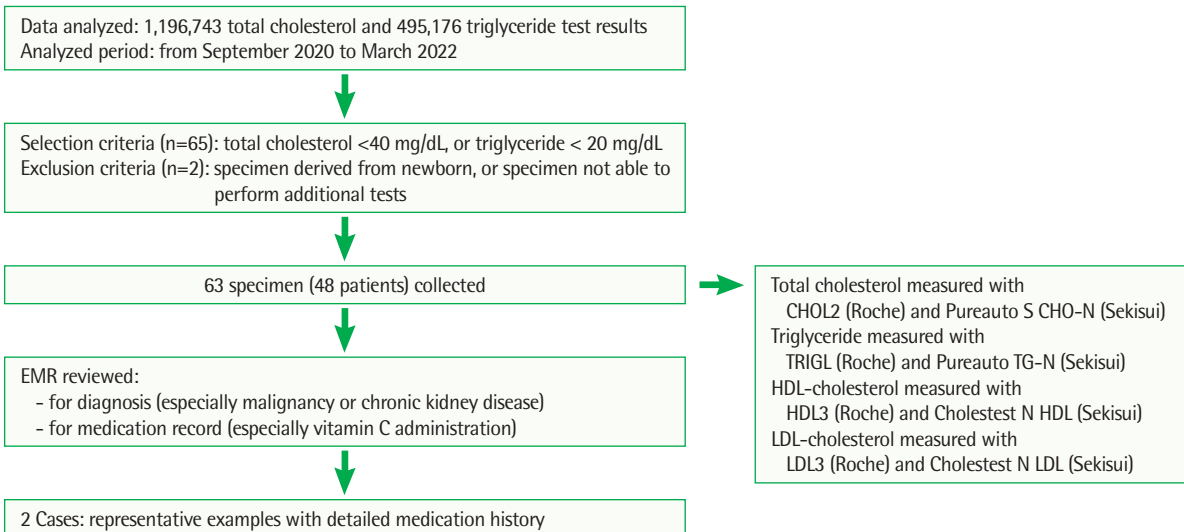
총콜레스테롤과 중성지방에서 비정상적인 측정값을 보인 48명의 환자들에 대해, 본원에서 작성된 의무기록 및 본원에 내원 시 타원에서 가져온 의무기록을 조사하여 병력을 확인하였다. 병력 확인 결과, 악성종양 및 만성신장병증(chronic kidney disease, CKD)

Table 1. Reagents used for the measurement of total cholesterol and triglyceride levels in the collected specimens

Test item	Reagents	Manufacturer	Ascorbate oxidase	Measuring range*	Vit C interference information mentioned*
Total cholesterol	CHOL2	Roche Diagnostics	Not included	3.86-800 mg/dL	Not mentioned
	Pureauto S CHO-N	Sekisui Medical	Included (amount not specified)	4-1,300 mg/dL	No interference up to 50 mg/dL
Triglyceride	TRIGL	Roche Diagnostics	Not included	8.85-885 mg/dL	Possible interference, level not specified
	Pureauto S TG-N	Sekisui Medical	Included (amount not specified)	3-2,000 mg/dL	No interference up to 50 mg/dL
HDL-cholesterol	HDL3	Roche Diagnostics	≥ 50 µkat/L	3.09-150 mg/dL	No interference up to 50 mg/dL
	Cholestest N HDL	Sekisui Medical	Not included	2-150 mg/dL	No interference up to 50 mg/dL
LDL-cholesterol	LDL3	Roche Diagnostics	≥ 66.7 µkat/L	3.87-549 mg/dL	No interference up to 500 mg/dL
	Cholestest N LDL	Sekisui Medical	Not included	1-450 mg/dL	No interference up to 50 mg/dL

*According to package insert information.

1. Additional test and EMR review on cases with abnormal test results



2. Dose-response testing

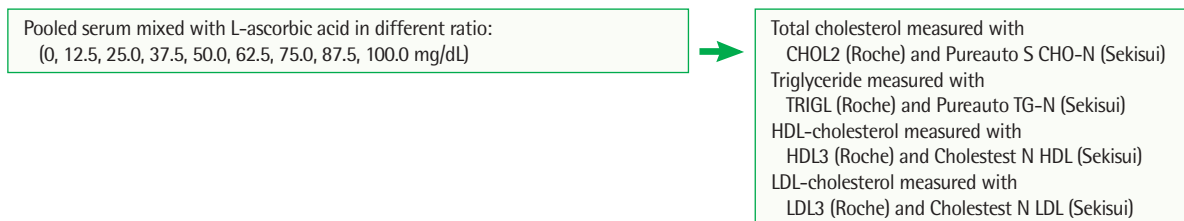


Fig. 1. Flow-chart of the study outline.

환자의 빈도가 매우 높았기에 두 질환으로 진단받은 적이 있는지 여부를 조사하였다. 또한 Trinder 반응의 음성 간섭을 유발한다고 알려진 비타민 C, N-acetyl cysteine, acetaminophen, methimazole, homogentisic acid, gentisic acid, etamsylate, calcium dobesilate 등의 복용 여부에 대해 조사하였다. 또한 비타민 C가 포함된 약제의 투약 여부 및 투약 이력을 확인하였는데, 비타민 C가 주성분인 약제의 투약 기록이 있거나, 경장영양제와 정맥영양제를 제외하되 비타민 C 포함 복합 약제를 투여한 기록이 확인되는 경우는 용량 및 제형에 관계없이 투약력이 확인된 것으로 판단하였다. 또한

구체적인 처방이 없더라도 진료기록에 비타민 C 투여와 관련된 언급이 있는 경우에도 투약력이 확인된 것으로 판단하였다.

2. 비타민 C 첨가 후 취합 혈청 지질 프로파일 측정 실험

체외 환경에서 비타민 C의 농도에 따른 두 제조사 시약에 대한 간섭 정도를 평가하기 위해, CLSI EP07 (제3판) 지침에 따라 간섭 영향 특성화를 위해 용량-반응 간섭 시험을 수행하였다[10]. 실험용 검체는 20명의 건강검진자 잔여 혈청을 취합하여 제조하였다. 취합 혈청 5 mL에 99% L-Ascorbic acid (Sigma Aldrich, St. Louis,

MO, USA) 5 mL를 혼합하여 제조한 고농도 검체와 취합 혈청 5 mL로만 구성된 저농도 검체를 다양한 비율로 혼합하여 총 9개 농도 (L-Ascorbic acid 0 mg/dL, 12.5 mg/dL, 25.0 mg/dL, 37.5 mg/dL, 50.0 mg/dL, 62.5 mg/dL, 75.0 mg/dL, 87.5 mg/dL, 100.0 mg/dL)의 검체를 제조하였다. 두 회사 시약을 사용한 지질프로필 4종 검사를 상기 9개 농도 검체에서 연속으로 2회 측정하여 평균값을 얻었으며, ascorbic acid가 포함되어 있지 않은 저농도 검체의 측정값을 기준으로 백분율 차이를 구하였다.

시약 간 측정결과는 짝을 이룬 *t*-검정 및 피어슨 상관분석으로 확인하였다. 통계 분석과 도표 제작을 위해 SPSS Statistics version 27 (SPSS Inc., Chicago, IL, United States)를 이용하였다. *P*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 본 연구는 삼성서울병원 윤리심의위원회의 승인(IRB File No. 2022-08-034)을 받았다. 전체적인 연구 설계는 Fig. 1과 같다.

결 과

1. 총콜레스테롤 및 중성지방 이상 결과 분석

총콜레스테롤과 중성지방에서 비정상적인 측정값을 보인 48명의 환자들의 특성을 조사한 결과를 Table 2에 기술하였다. 환자들의 평균 연령은 59세 \pm 16세(평균 \pm 표준편차)였으며 남성이 56%

(27/48)였다. 주로 외래나 응급실에서 검사가 의뢰되었으며, 두 명만 입원 중 검사로 시행되었는데 한 명은 입원 이틀째에, 다른 한 명은 입원 당일 시행한 검사에서 비정상 측정값이 관찰되었기에 48명의 대상환자 대부분 지질 프로필 검사 전에 의료진에 의한 투약 관리가 철저히 이루어진 경우는 거의 없었다고 판단되었다.

Table 2. Patient characteristics in cases of abnormally low total cholesterol or triglyceride levels

Characteristics	N	Proportion (%)
Total No. of patients	48	
Patients with 1 collected specimen	40	83
Patients with 2 collected specimens	6	13
Patients with 3 collected specimens	0	0
Patients with 4 collected specimens	1	2
Patients with 5 collected specimens	1	2
Age (yr, mean \pm SD)	59.0 \pm 15.6	
Male	27	56
Test route		
Inpatient	2	4
Outpatient or emergency center	46	96
Diagnosis		
Malignancy	40	83
Chronic kidney disease	13	27
Either malignancy or chronic disease	43	90
Preceding vitamin C administration	9	19

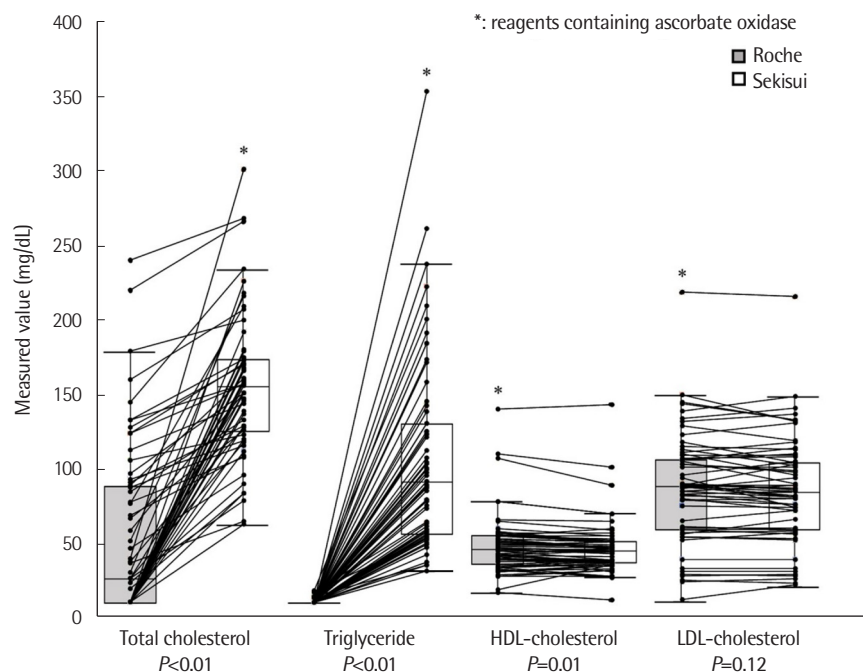


Fig. 2. Summary of lipid profile measurements between the two reagents. Box plots show the 25th percentile, median (horizontal lines inside the boxes), and the 75th percentile of the data values of total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol measured with Roche reagents (gray-colored box plot) and Sekisui reagents (uncolored box plot). Crossbar lines on box plot whiskers show the 5th and 95th percentile of data values. The "*" mark above the box plot indicates the reagents containing ascorbate oxidase.

전체 환자 중에서 악성종양을 진단받은 환자는 83%, 만성신장병을 진단받은 환자는 27%이었으며 악성종양 혹은 만성신장병증을 진단받은 환자는 90%였다. 오직 10%의 환자들만 악성종양이나 만성신장병증을 진단받지 않았다.

투약력 확인 결과 간섭요인으로 알려진 약물 중 비타민 C를 제외한 약물의 처방은 없거나 매우 드물었으며, 비타민 C 투약력이 확인되는 경우는 18%였다. 이 중 실제로 처방전까지 확인할 수 있었던 경우는 10%였는데, 비타민 C 10 g/mL를 정맥주사 투약한 1예, 60 mg 비타민 C 제제를 경구로 매일 투약한 2예, 618.6 mg 비타민 C 제제를 경구로 매일 투약한 1예, 60 mg 비타민 C 제제를 경구로 매일 복용하다 618.56 mg 제제를 추가한 1예가 각각 확인되었다.

비타민 C 투약 가능성이 있는 상병력(악성종양, 만성신장병증)이 있지만 투약력을 확인할 수 없는 경우는 60%였으며, 비타민 C의 투약력이 처방전으로 확인되거나 의무기록에 기재되었던 18% 중에서는 1예를 제외하고는 악성종양 혹은 만성신장병의 상병력

이 있었다. 비타민 C 투약에 대한 근거가 전혀 없는 경우는 오직 10% (5/48)였다.

63개 검체에 대해 두 회사의 시약으로 측정된 지질 프로필 4종 검사결과를 Fig. 2에 제시하였다. 각각의 시약으로 측정된 총콜레스테롤의 평균(\pm 표준편차)은 각각 52.76 mg/dL (\pm 56.80 mg/dL, Roche), 154.19 mg/dL (\pm 46.78 mg/dL, Sekisui Medical)이었으며 중성지방의 평균(\pm 표준편차)은 10.46 mg/dL (\pm 1.67 mg/dL, Roche), 106.16 mg/dL (\pm 63.27 mg/dL, Sekisui Medical)이었고 총콜레스테롤과 중성지방 모두 두 시약 평균값 간에 유의미한 차이가 있었다(작을 이룬 t -검정 유의수준 <0.01). Roche와 Sekisui Medical 시약을 사용한 HDLC 측정결과를 작을 이룬 t -검정으로 비교하였을 때 차이가 있었지만(유의수준 0.01) 평균농도는 각각 48.70 mg/dL과 46.92 mg/dL로 크게 차이가 나진 않았다. LDLC의 경우 유의수준 0.12, 평균농도 각각 85.98 mg/dL, 84.56 mg/dL로 두 시약 간에 유의미한 차이가 없었다(Fig. 3). 두 종류 시약 측정결과 중 HDLC와

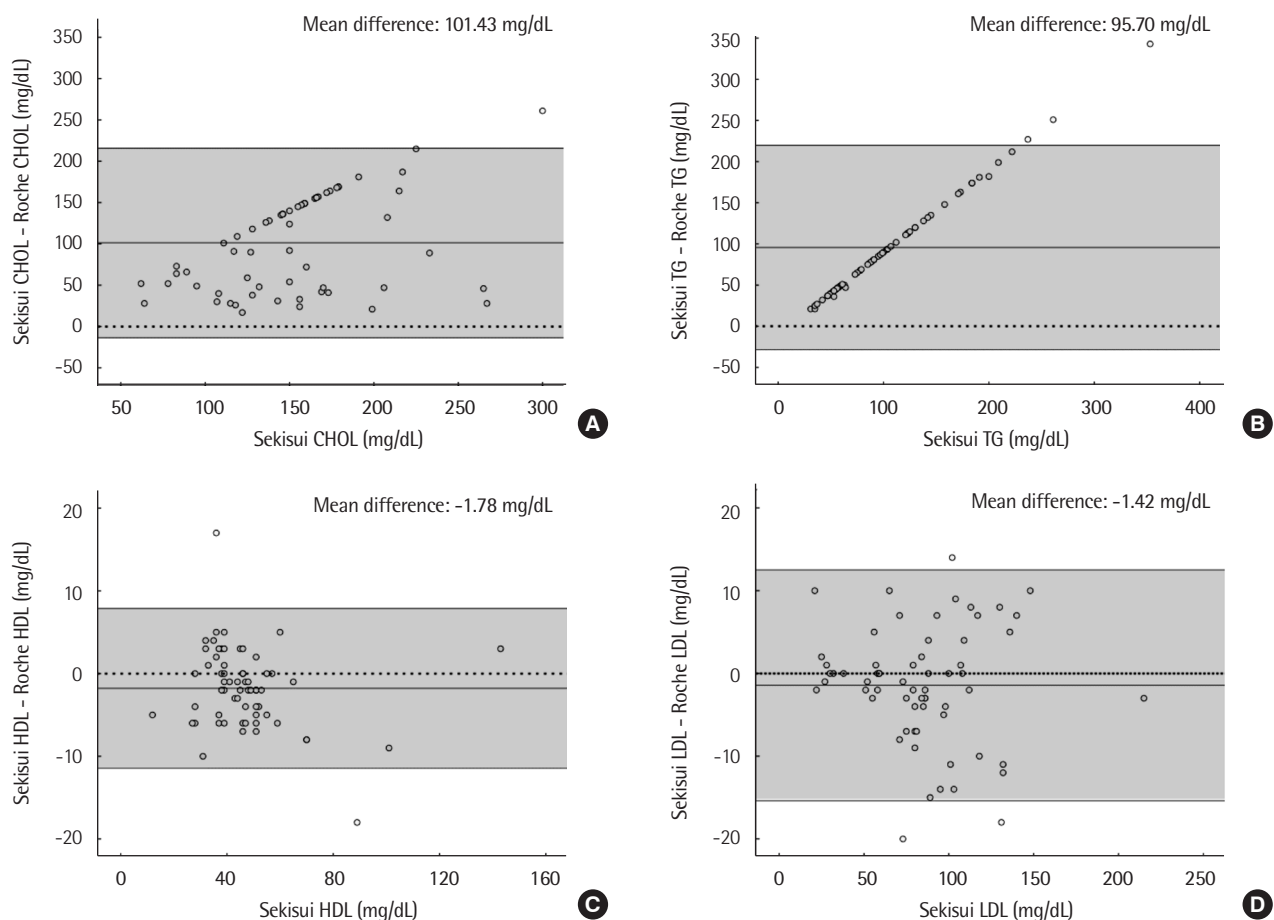


Fig. 3. Difference between plotted results obtained from Roche and Sekisui reagents. (A) Total cholesterol (CHOL); (B) Triglyceride (TG); (C) HDL-cholesterol (HDL); (D) LDL-cholesterol (LDL). The solid line and gray boxed area represent the absolute mean difference and its 95% CI, respectively. The dotted line represents the absolute mean difference of 0. The total cholesterol and triglyceride results using Roche and Sekisui reagents showed a large difference. The HDL-cholesterol and LDL-cholesterol results of Roche and Sekisui reagents showed no significant differences.

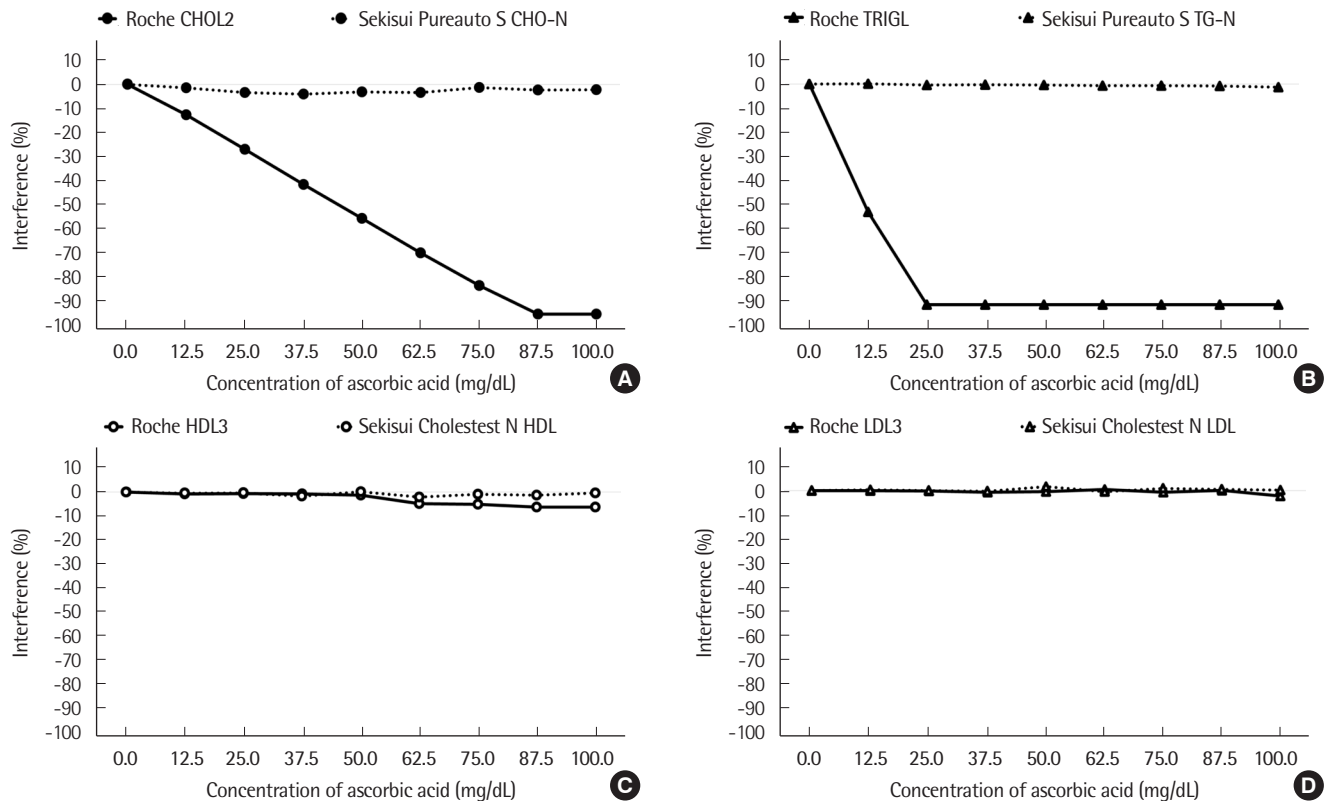


Fig. 4. Effect of concentration of ascorbic acid on interference in lipid profile testing between the two reagents. Measurement of pooled serum values of (A) total cholesterol (Roche: filled circle with solid line, Sekisui: filled circle with dotted line), (B) triglyceride (Roche: filled triangle with solid line, Sekisui: filled triangle with dotted line), (C) HDL-cholesterol (Roche: empty circle with solid line, Sekisui: empty circle with dotted line), and (D) LDL-cholesterol (Roche: empty triangle with solid line, Sekisui: empty triangle with dotted line) are converted to the percentage of reduction. Concentrations of triglyceride with Roche TRIGL and total cholesterol with Roche CHOL2 were reduced by more than 90% after adding 25 mg/dL and 87.5 mg/dL of ascorbic acid, respectively. (Reagents with ascorbate oxidase: Pureauto S CHO-N, Pureauto S TG-N, HDL3, LDL3. Reagents without ascorbate oxidase: CHOL2, TRIGL, Cholestest N HDL, Cholestest N LDL).

LDLC는 매우 강한 상관관계를 보였으나(HDLC, 피어슨 상관관계수 0.971, $P < 0.01$; LDLC, 피어슨 상관관계수 0.981, $P < 0.01$), 총콜레스테롤은 약한 상관관계를 보였다(피어슨 상관관계수 0.379, $P < 0.01$). 중성지방은 두 회사의 시약 간 측정결과에서 유의한 상관관계를 보이지 않았다(피어슨 상관관계수 -0.050, $P = 0.72$).

2. 비타민 C 첨가 후 취합혈청 지질프로필 측정 실험

비타민 C 첨가량에 따라 9가지 농도로 제조한 혈청에 대해 두 회사 시약으로 측정한 지질 프로파일 4종 검사의 결과를 Fig. 4에 제시하였다. 비타민 C를 첨가하지 않은 혈청에 비해 12.5 mg/dL 농도의 비타민 C를 첨가하였을 때 ascorbate oxidase 불포함시약으로 측정한 총콜레스테롤과 중성지방 농도는 각각 13%와 53% 감소하였으며, 25.0 mg/dL의 비타민 C를 첨가한 후엔 각각 27%와 95% 이상 감소되었다. 그러나, Roche 시약으로 측정한 HDLC와 LDLC, 그리고 Sekisui 시약으로 측정한 지질 프로파일 4종 검사 결과는 최고 농도인 100.0 mg/dL 농도의 비타민 C를 첨가했을 때에도 최대 6%

(구간, 0-6%)만의 감소 소견을 보였다.

고 찰

Trinder 반응을 이용한 검사 과정에 비타민 C가 간섭현상을 유발한다는 사실은 예전부터 잘 알려졌으며, 지질 프로파일 검사 외에도 포도당, 빌리루빈, 요산 등 다양한 항목들에 대한 보고들이 있었다[11-14]. 비타민 C로 인한 간섭을 교정하기 위해 ascorbate oxidase가 첨가된 시약을 사용한 검사에서 뚜렷하게 증가된 총콜레스테롤(52.76 mg/dL vs. 154.19 mg/dL, $P < 0.01$) 중성지방(10.46 mg/dL vs. 106.16 mg/dL, $P < 0.01$) 측정값은 총콜레스테롤과 중성지방에서 비정상적인 측정 결과가 비타민 C에 의한 Trinder 반응의 음성 간섭현상이 원인일 것으로 추정하게 하였다.

게다가, 비타민 C가 첨가된 혈청으로 실험한 지질 프로파일 검사의 간섭 현상은 HDLC와 LDLC에 비해 총콜레스테롤과 중성지방에서 뚜렷하였으며, 특히 중성지방은 ascorbate oxidase가 포함되

지 않은 시약에서 비타민 C에 매우 민감한 음성 간섭이 발생함을 확인하였다. 연구대상이 되었던 환자 검체 중에서는, 총콜레스테롤 40 mg/dL 미만, 중성지방 20 mg/dL 미만의 비정상적인 측정 결과가 총콜레스테롤 38예, 중성지방 63예였다. 총콜레스테롤과 중성지방 모두 비정상적인 측정 결과를 보인 38예 모두에서 중성지방의 음성 간섭이 선행하는 것을 관찰하였다. 이는 Martinello 등 [15]이 보고한 비타민 C의 간섭실험 결과와 일치하는 것으로서, 간섭현상이 측정물질의 종류에 관계없이 검사반응 중 발생하는 과산화수소의 몰 수에 따라 달리 나타난 것으로 해석할 수 있다. Fig. 4에서 관찰되듯이 간섭현상이 발생한 ascorbate oxidase 불포함시약으로 측정한 총콜레스테롤과 중성지방 결과는 첨가한 비타민 C 농도 증가에 따라 직선성을 보이며 감소하는데, 이것은 측정물질에서 발생하는 과산화수소와 비타민 C 간의 반응이 화학량론적 (Stoichiometric) 관계를 보이기 때문으로 설명할 수 있다.

저자들은 검사실에서 발생한 총콜레스테롤과 중성지방의 비정상적인 측정 결과에 대해 비타민 C를 음성 간섭현상의 원인물질로 의심하고 이를 확인하고자 하였으나, 비타민 C 제제는 처방전 없이 구매가 가능하며, 고용량 비타민 C의 정맥주사요법은 문서화된 투약력의 확인이 어렵다. 이러한 이유로, 본 연구에서 총콜레스테롤과 중성지방에서 비정상적인 측정 결과를 보인 환자들 중 82% (39/48)에서는 비타민 C 투약력이 직접적으로 확인되지 않았다. 게다가, 잔여 검체에서 비타민 C의 직접 측정은 임상검사실에서 일상적인 방법으로는 어려우며, 이는 본 연구의 한계이기도 하다.

다만 비타민 C 투약이 직접적으로 확인된 환자들 중, 투약력과 비정상 결과가 시간적 관련성을 보인 사례를 후향적 조사 중 발견하여 이를 소개하였다. 해당 환자는 2주 간격으로 3회 실시한 총콜레스테롤 검사에서 최저정상한계 미만, 30 mg/dL, 51 mg/dL의 결과가 각각 보고되었고, ascorbate oxidase가 포함된 Sekisui Medical 사 시약으로 재검사한 결과는 교정된 결과를 보였다. 그리고 그로부터 2주 이후에 측정한 결과에서는 비정상적인 결과가 보고되지 않았다. 후향적으로 환자의 투약력을 재확인하였을 때, 간섭현상이 발생한 기간과 정확히 일치하는 시점에 연고지의 요양병원에서 비타민 C 정맥주사 요법을 받았음이 확인되었다(Supplementary Fig. 1).

상기 결과는 폐암 재발의 병력이 있는 환자의 것으로서, 본 연구에서 이상 결과를 보인 환자들 중 높은 비율(83%)로 확인되어 비타민 C 투약력과 연관성이 있는 것으로 생각되는 악성종양 병력을 가진 사례이기도 하다. 일반적으로 섭취되는 비타민 C의 용량은 하루에 60-100 mg이지만 이보다 100배 이상 많은 용량의 비타민 C 투약의 유용성, 특히 악성 종양에 효과가 있다는 주장이 Cameron과 Pauling [16]에 의해 1970년대부터 제기되었다. 고용량 비타민 C 투약이 신체의 저항력을 높이는 효과가 있으며 암에 대한 치

료제로 사용될 수 있다는 주장에 대한 명확한 치료 지침이나 합의는 없지만, 현재까지도 비타민 C가 암 예방 및 치료에 유용할 수 있다는 연구결과가 이어지고 있다[17-20]. 비록 공식적으로 악성종양에 대한 국내 및 해외 임상진료지침에 고용량 비타민 C 치료에 대한 내용이 포함되어 있지 않지만, 상기 환자와 같이 악성종양 환자들 중 일부는 보조적인 효과를 기대하며 정기적으로 고용량 비타민 C 치료를 받고 있을 것으로 추측해 볼 수 있다.

한편 만성신장병증의 경우, 특히 투석을 시행하는 환자에서 결핍이 발생하는 비타민 C를 보충할 필요성이 있기에, 만성신장병증 환자에게 비타민 C 제제의 처방이 일반적으로 행해지고 있다[21, 22]. 정맥주사가 아닌 경구 투여를 통해 비타민 C가 투약되는 경우, 정상 신기능을 갖는 건강 대조군이라면 2,000 mg의 고용량 비타민 C 투여가 총콜레스테롤 혹은 중성지방의 혈중 농도에 뚜렷한 영향을 미치지 않음이 보고된 바 있다[15]. 하지만 환자의 신기능이 저하되어 있는 경우에는 경구로 복용한 비타민 C 제제에 의해서도 간섭현상이 발생할 가능성 또한 이전 연구에서 제기된 바 있는데, 기전이 명확하지 않아 추가적인 연구 및 실험으로 입증 필요할 것으로 생각된다[8].

후향적 조사 중 발견한 다음 증례는 신기능 저하 환자에서 경구로 복용한 비타민 C 제제에 의한 간섭현상이 가능함을 보여준다. 해당 환자는 만성신장병에 대해 본원에서 정기적으로 투석을 시행하는 환자로서 총콜레스테롤이 132 mg/dL, 중성지방이 정량한계 미만으로 보고되었는데, Sekisui Medical 사 시약으로 재측정한 결과 총콜레스테롤은 156 mg/dL로 증가하였고, 중성지방은 37 mg/dL로 교정되었다. 이러한 음성 간섭현상은 62 mg/day로 장기간 지속하던 비타민 C 제제 경구 투약을 680 mg/day로 증량한 시점에 갑자기 발생한 것으로 확인되었다(Supplementary Fig. 2).

상기 악성종양 및 만성신장병 사례들은 간섭현상이 발생한 환자에게서 고용량 비타민 C 투약력 혹은 신기능 저하와 병합된 비타민 C 투약력을 직접적으로 확인한 예시이다. 다만 대부분의 경우 비타민 C의 구체적인 투약기록 조사와 추적이 어려운 만큼, 실제 간섭현상이 발생하는 경우에는 본 연구에서 높은 비율로 확인되었던 악성종양, 혹은 만성신장병의 병력(90%)이 있는지 확인함으로써 비타민 C의 투약 가능성을 가늠할 수 있을 것이다.

또한, 본 연구대상 검체들 중 극히 일부만이 입원 중에 의뢰된 검체였으며, 그마저도 입원 1일째 혹은 2일째에 의뢰된 검체였다는 점도 의미가 있다. 환자의 체내로 투입되는 모든 것이 통제되고 모든 약물의 투약관리가 의료진에 의해 엄격히 이루어지는 입원환자의 경우 비정상적인 측정값이 거의 발생하지 않는다는 것은, 외부에서의 간섭 원인물질 투약으로 인한 간섭현상의 가능성을 시사하는 단서라고 할 수 있겠다.

흥미롭게도, HDLC와 LDLC 또한 비타민 C에 의해 간섭현상이

발생할 수 있다고 알려졌으나, 본 연구에서는 누적된 임상보고 결과나 HDLC와 LDLC의 체외 비타민 C 간섭 실험에서, 두 회사 시약 모두 비정상적인 측정 결과가 관찰되지 않았다. HDLC와 LDLC의 경우, 총콜레스테롤과 중성지방과는 반대로 Roche사의 시약에 ascorbate oxidase가 포함되고 Sekisui Medical 사의 시약에는 ascorbate oxidase가 포함되지 않았음에도, Sekisui Medical 사 시약으로 측정된 결과에서 이상 결과가 관찰된 바 없었다. 이는 HDLC와 LDLC를 측정하는 두 회사 시약 모두 계면활성제를 사용하여 목표 분획만을 선택적으로 산화시키거나(HDLC), 또는 목표 분획 이외의 콜레스테롤 분획을 먼저 산화시키는(LDL) 이중 산화 시스템을 사용하고 있기 때문으로 생각된다[23, 24].

또한 본 연구에서는 명백히 낮은 측정값을 가진 검체들만을 연구대상으로 선정하였으므로, 비정상적으로 낮지는 않더라도 비타민 C 간섭으로 인해 실제보다 낮게 측정되는 경우가 존재할 것임을 강조하고자 한다. 본 연구에서 비교적 참고구간(reference interval)에 가까운 측정값들은 애초에 연구대상에서 제외된 것처럼, 일선 검사 현장에서 비타민 C에 의한 간섭현상의 발생여부는 측정값을 확인하는 것만으로는 알 수 없다는 사실을 기억할 필요가 있다. 비타민 C에 의한 간섭현상의 해결법으로서 ascorbate oxidase가 포함된 시약을 사용하여 측정하는 방법 외에, 과량의 비타민 C를 먼저 산화시키는 이중 산화 시스템을 사용하거나 파장이 다른 chromophore를 사용하는 방법 등이 가능하다. 또한, 비타민 C의 자연 산화 특성을 이용하여 검체를 일정시간 공기 중에 노출하는 방법도 제안된 바 있다[25]. 그러나 비타민 C의 음성간섭현상을 해결하기 위해 임상 검사실 현장에서 측정 시스템 전체를 변경하는 것은 쉽지 않으므로, ascorbate oxidase가 포함되지 않은 시약을 지질 검사에 사용하는 검사실에서는 고용량 비타민 C 정맥주사 요법 혹은 환자의 신기능 저하 등의 요인으로 인해 총콜레스테롤과 중성지방에서 음성 간섭현상이 발생할 수 있음을 주지하여야 한다. 임상검사실에서는 텔타 검증 및 패닉 검증을 통해 비정상적인 측정값이 보고되지 않도록 주의하고, 만약 간섭현상이 의심된다면 지질 프로파일 4종의 검사결과를 검토하여 약제 유발 저지질혈증과 감별하고 악성 종양과 만성신장병증 등의 병력 여부를 확인하는게 도움이 된다. 또한, ascorbate oxidase가 포함된 시약으로 재검하고 비타민 C를 포함한 간섭 유발 약제의 복용력에 대해 조사할 필요가 있다.

요 약

배경: 저자들은 Trinder 반응에 기반한 총콜레스테롤 및 중성지방 측정 중에 음성간섭현상이 발생한 사례를 검토하여 그 원인을 규명하고자 하였다.

방법: 19개월간 총콜레스테롤이나 중성지방 검사결과가 비정상적으로 낮았던 63건의 검사를 특정하였으며, 한 명의 환자에서 여러 건의 비정상 결과가 발생한 경우가 있었기에 연구대상 환자는 48명이었다. 해당 검체들에 대해 지질 프로파일(총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤) 검사가 이루어졌으며, 두 종류의 시약-Roche Diagnostics (독일) 및 Sekisui Medical (일본)-을 사용하여 Cobas c702 (Roche) 장비에서 측정하였다. 비타민 C 첨가량에 따라 9가지 농도로 제조한 혈청에 대해 두 회사 시약으로 지질 프로파일 4종을 측정하였다.

결과: Ascorbate oxidase를 포함하지 않는 Roche의 총콜레스테롤 및 중성지방 시약 측정값(평균 ± 표준편차)은 52.76 ± 56.80 mg/dL, 10.46 ± 1.67 mg/dL이었으며, ascorbate oxidase를 포함하는 Sekisui의 총콜레스테롤 및 중성지방 시약을 이용한 측정값은 154.19 ± 46.78 mg/dL, 106.16 ± 63.27 mg/dL이었다. 반면 HDL-콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 측정값은 큰 차이를 보이지 않았다. 대상 환자의 83%는 악성종양을 진단받았는데 이들은 고용량 비타민 C 치료를 받았을 가능성이 있었고, 27%는 만성신장병을 진단받았는데 이는 비타민 C 투여를 지속하고 있을 가능성이 있는 병력으로 생각되었다. 25.0 mg/dL의 비타민 C를 첨가한 후 Roche 시약으로 측정된 혈청에서 총콜레스테롤과 중성지방은 각각 27%, >95%의 농도가 감소되었지만, Sekisui 시약에서는 거의 감소되지 않았다.

결론: 특정 질환 환자에서는 비정상적으로 낮은 총콜레스테롤 및 중성지방 측정값이 발생할 수 있다. 지질검사에서 음성간섭현상이 의심되면 ascorbate oxidase가 포함된 시약을 사용한 재검이 필요하며, 환자 병력을 확인하여 비타민 C가 원인일 가능성을 검토해야 한다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

REFERENCES

1. Bachorik PS and Ross JW. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. Clin Chem 1995;41:1414-20.
2. Committee of Clinical Practice Guideline of the Korean Society of Lipid and Atherosclerosis. Korean Guidelines for the Management of Dyslipidemia. 4th ed. Seoul, Korea: The Korean Society of Lipid & Athero-

- sclerosis, 2018.
3. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969;6:24-8.
4. Genzen JR, Hunsaker JJ, Nelson LS, Faine BA, Krasowski MD. N-acetylcysteine interference of Trinder-based assays. *Clin Biochem* 2016;49:100-4.
5. Guo X, Hou La, Cheng X, Zhang T, Yu S, Fang H, et al. Strong negative interference by calcium dobesilate in sarcosine oxidase assays for serum creatinine involving the trinder reaction. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e905.
6. Tarasek D, Gąsowska-Bajger B, Wojtasek H. Mechanisms of interference of p-diphenols with the Trinder reaction. *Bioorg Chem* 2020;97:103692.
7. Spain MA and Wu AH. Bilirubin interference with determination of uric acid, cholesterol, and triglycerides in commercial peroxidase-coupled assays, and the effect of ferrocyanide. *Clin Chem* 1986;32:518-21.
8. Nah H, Yim J, Lee SG, Lim JB, Kim JH. Ascorbate oxidase minimizes interference by high-concentration ascorbic acid in total cholesterol assays. *Ann Lab Med* 2016;36:188-90.
9. Ministry of Health and Welfare of Korea, Korea Centers for Disease Control and Prevention. 2019 Korea Health Statistics. Seoul, Korea: Ministry of Health and Welfare of Korea, 2020.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry. 3rd ed. CLSI guideline EP07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018
11. Yoo DW, Jun KR, Lee JH, Hwang WJ, Lee SM, Kim HH, et al. False decrease in serum triglyceride and cholesterol due to massive ascorbate in a bowel preparation solution. *Clin Chem Lab Med* 2020;59:e121-4.
12. Zoppi F and Fenili D. Drug interferences in reactions for detecting hydrogen peroxide by means of peroxidase. *Clin Chem* 1980;26:1229-30.
13. White-Stevens RH. Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury. *Clin Chem* 1982;28:578-88.
14. White-Stevens RH and Stover LR. Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. II. Redox-coupled indicator systems. *Clin Chem* 1982;28:589-95.
15. Martinello F and da Silva EL. Ascorbic acid interference in the measurement of serum biochemical parameters: in vivo and in vitro studies. *Clin Biochem* 2006;39:396-403.
16. Cameron E and Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3685-9.
17. Creagan ET, Moertel CG, O'Fallon JR, Schutt AJ, O'Connell MJ, Rubin J, et al. Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer: a controlled trial. *N Engl J Med* 1979;301:687-90.
18. Ngo B, Van Riper JM, Cantley LC, Yun J. Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C. *Nat Rev Cancer* 2019;19:271-82.
19. Böttger F, Vallés-Martí A, Cahn L, Jimenez CR. High-dose intravenous vitamin C, a promising multi-targeting agent in the treatment of cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2021;40:343.
20. Ladas EJ, Jacobson JS, Kennedy DD, Teel K, Fleischauer A, Kelly KM. Antioxidants and cancer therapy: a systematic review. *J Clin Oncol* 2004;22:517-28.
21. Hongsawong N, Chawprang N, Kittisakmontri K, Vittayananan P, Srisuwan K, Chartapisak W. Vitamin C deficiency and impact of vitamin C administration among pediatric patients with advanced chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2021;36:397-408.
22. Deicher R and Hörl WH. Vitamin C in chronic kidney disease and hemodialysis patients. *Kidney Blood Press Res* 2003;26:100-6.
23. Moshides JS. Comparison of ascorbic acid interference in HDL-cholesterol estimation by six precipitation methods, with use of a sensitive enzymic cholesterol reagent. *Clin Chem* 1987;33:1467-8.
24. Hubbard RS, Hirany SV, Devaraj S, Martin L, Parupia J, Jialal I. Evaluation of a rapid homogeneous method for direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Clin Pathol* 1998;110:495-502.
25. Yim J, Cho J, Ahn S, Lee SG, Kim JH. A practical way to overcome ascorbate interference in total cholesterol and triglyceride measurement by exploiting the autoxidation property of ascorbate. *Clin Biochem* 2017;50:350-1.