

HPLC법을 이용한 HbA1c 측정시 Abnormal Peak의 빈도와 원인

삼성서울병원 진단검사의학과

김선경 · 배애영 · 최대용 · 김명수 · 유광현 · 기창석

Factors Influencing Frequency of Abnormal Peak in the Measurement of HbA1c by HPLC

Sun-Kyung Kim, Ae-Young Bae, Dae-Yong Choi, Myung-Soo Kim, Kwang-Hyun Yoo, and Chang-Seok Ki

Department of Laboratory Medicine, Samsung Medical Center, Seoul 135-710, Korea

We experienced the specimen that contains a hemoglobin variant known as interference from HbAS in October 2003. It was the first case of Hb variants since Samsung Medical Center began conducting glycohemoglobin College of American Pathologists surveys in 1997. The purpose of this study is to share our experience with the specimen and promote the understanding of Hb variants & derivatives. We've performed cross checks to examine HbA1c by using two pieces of equipment; the TOSHOH G7 and BIO-RAD VARIANT-T(turbo), and Automatic High Performance Liquid Chromatography(HPLC) as an analytic measurement method. HPLC provides different fractional information of hemoglobin with a two-dimensional graph as well as numeric results. We have been performing a "Systematic Checking Process".

Three specimen suspicious of Hb variants & derivatives were found through this process. College of American Pathologists notified that it is important for users to be aware of the limitation of their glycohemoglobin method to avoid reporting incorrect results due to interference from hemoglobin variants or hemoglobin adducts. Therefore, laboratory findings of Hb variants & derivatives are very important. The experience of qualified technicians with professional knowledge in Hb variants is the most important aspect in finding Hb variants. Korea is homogeneous in race and is not in an area with a higher finding rate of Hb variants. While 1,024 cases of Hb variants have been found in Japan, we do not have specific data on how many cases of Hb variants have been found in Korea. Considering Hb variant cases in Japan, which is geographically close to us, it is presumed that there must be various Hb variant cases in Korea.

If domestic laboratories set a systemic protocol and build a network to share our experience in Hb variants, I expect the Korean Hb variants could also be listed on the world's Hb variant list.

Key Words : HbA1c, Hb variants & derivatives, Chromatogram, Protocol, Laboratory finding

I. 서 론

당화혈색소(이하, HbA1c)는 당뇨병의 장기적인 관리 지표로서 측정시부터 1-3개월간의 혈당조절상태를 반영하며(이 등, 2003) 임상에서의 그 선호도가 증가하고 있다. HbA1c는 측정방식 및 그 전반에 대한 세계적인 표준화가 발전하고 있음에도 불구하고 수 많은 Hb variants와 hemoglobinopathies의 현존 때문에 부정확한 HbA1c 결과의 산출이 발생될 수도 있다. Hb variants와 modified Hb 등이 존재하는 환자의 경우, HbA1c 및 glycohemoglobin (GHb) 측정시 검사 측정상 영향을 미칠 수 있으며 (Schnedl WJ 등, 2000), 부정확한 결과 값을 초래하기도 한다. 2003년 GHb에 관한 College of American Pathologists(CAP) Survey 결과 및 보고서에 따르면 Hb variant가 있는 검체의 측정상 한계점을 인식하고 검사실 내 실정에 맞는 프로토콜 마련을 제안하고 있다.

Hb variants와 부정확한 HbA1c 결과를 유도하는 원인에는 여러 인자가 있다. DNA 변형에 의한 원인으로 혈색소의 각 chain(α , β , γ , δ)의 point-mutation에 의해 Hb variants가 생성된다. 1949년 Pauling 등이 sickle cell anemia가 혈색소의 아미노산 서열에 기인하여 발병된다는 것을 처음 발견하였다. 현재까지 890여종 이상의 Hb variants가 보고되고 있고(Hardison 등, 2005) 비정상 혈색소의 20%는 임상적인 유병률이 있으며 나머지 80%는 임상적인 증상이 보여지지 않는다고 한다(Schnedl 등, 2000). 화학 물질에 의한 modified Hb들은 물성학적으로 GHb과 유사한 성향을 띄며 결과 측정 시 오류를 발생시킬 수 있다(Weykamp 등, 1999; Bry 등, 2001). 요독증 환자에서 증가되는 carbamylated Hb과 아스피린 복용에 의한 NH-terminus의 β -chain 변이로 발생하는 acetylated-Hb 이 1 g/day 이상 복용한 경우 영향이 있을 수 있다(Natan 등, 1983).

Sickle cell disease, homozygous HbC disease, HbSC disease, β -thalassemia (HbA2/F의 증가) 등의 질환은 GHb 측정방법에 영향을 주는 인자이며, 그 외에도 적혈구의 수명에 영향을 미치는 용혈성 질환, 과다출혈, 철 결핍성 빈혈, 적혈구 제제 수혈 또한 GHb 결과의 변동 인자이다 (Little 등, 1997; Bry 등, 2001). 본원의 systematic checking process를 통해 발견된 이상 혈색소 발견 사례와 CAP 보고서에서 제시한 Hb variants의 이해 및 정보를 공유하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 대상

본 실험은 2003년 10월부터 2004년 4월까지 7개월간 삼성서울병원을 내원한 환자를 대상으로 의뢰된 HbA1c 검체 35,000건을 대상으로 분석하였다. 정도관리 물질은 본원에서 1997년부터 시행한 GHb CAP survey 중 최초로 Hb variants(HbAS)가 포함된 CAP survey이었다.

2. 실험 장비

Tosoh G7(Tosoh, Tokyo, Japan)과 Bio-Rad Variant-T (Bio-Rad, Hercules, USA)의 두 장비로 결과를 상호비교하였다. 장비의 분석 원리는 automatic high performance liquid chromatography(HPLC)법 중 음이온교환 크로마토그래피(cation-exchange chromatography)법이다. 혈색소의 전하 차이를 이용하는 분리 방법으로, 이온 강도가 서로 다른 완충액을 column내로 통과시키면서 각기 다른 전하의 혈색소 분획이 분리되는 방식이다. 각 혈색소 분획에 따라 그 농도가 환산되며 공식은 다음과 같다.

$$\% \text{HbA1c} = 100 \times \frac{\text{area of HbA1c}}{\text{area of total Hb}}$$

3. 실험 방법

본원의 systematic checking process(Fig. 1)를 통한 HbA1c 측정과 연관 검사인 혈당의 과거 누적 결과와의 상관성을 검토하였다. 장비의 결과 중 크로마토그램에서 abnormal peak를 제외하고 보정값으로 환산하였으며 보정 전 결과 값과 비교하였다. 보정식은 다음과 같다.

$$\% \text{HbA1c} = 100 \times \frac{\text{Area of HbA1c}}{\text{Area of Total Hb} - \text{Abnormal Hb peak}}$$

일부 검체는 Hb 전기영동을 시행하여 나온 결과를 2차 스크리닝하였다. Systematic checking process는 delta & panic check와 장비에서 제공되는 10 종류의 flagging check system과 auto verification range check가 전산상으로 동시에 이뤄진다. 정상 결과는 자동 보고되고 비정상 결과는 전산에 남아있어 검사자가 확인 후 보고한다.

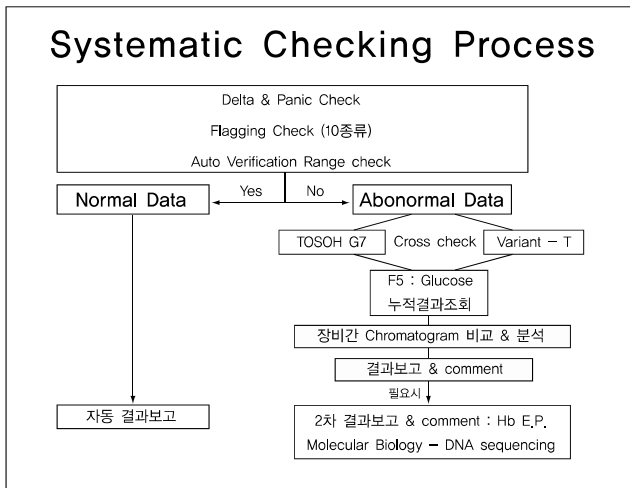


Fig. 1. Systematic checking process.

Table 1. HbA1c and approximate mean plasma glucose level

Ghb (%)	Approximate mean plasma glucose (mg/dL)	Interpretation
4.0	65	Non-diabetic range
5.0	100	
6.0	135	
7.0	170	ADA* target
8.0	205	Action suggested
9.0	240	
10.0	275	
11.0	310	
12.0	345	

*ADA : American diabetes association

전산상으로 환자의 누적된 HbA1c 결과를 조회하고 연관 검사인 혈당의 과거 누적결과와의 상관성을 검토한다 (Table 1). 장비간 비교검토 및 크로마토그램 비교분석 후 코멘트를 포함하여 결과 보고를 한다. 필요시 Hb 전기영

Table 2. Abnormal data of 3 cases

Cases	Fasting glucose level (mean, mg/dL)	HbA1c (%)				
		Pre-correction		Post-correction		
		TOSOH-G7	Variants	TOSOH-G7	Variants	
1	오 ○ 숙	157.6	4.7	4.6	6.0	5.5
2	최 ○ 호	104.6	3.6	5.7	6.7	5.6
3	박 ○ 철	156.4	4.9	8.6	5.0	9.3

동과 DNA sequencing을 통해 확인 후 코멘트를 포함하여 2차 결과 보고를 하고 있다.

Table 1은 혈당과 GHb의 비례 관계에 대한 DCCT (diabetes control and complications trial) 연구결과로 나온 것이며 이를 회귀 방정식으로 표현하면

$$\text{MPG estimate} = 35.6 (\% \text{HbA1c}) - 77.3$$

으로 나타낼 수 있다(Rohlfing 등, 2002).

이 때의 person correlation coefficient(r)은 0.82이었다. 평균 혈당값은 MPG보다 10-15% 낮은 값을 나타냈다.

III. 결 과

2003년 10월부터 2004년 4월까지 7개월간 본원을 내원한 환자 35,000명 중 이상 HbA1c 결과 및 이상 크로마토그램 양상을 보인 검체는 40검체(대략 0.1%)이었다. 이상 결과 검체 중 3건의 사례를 비교한 결과는 다음과 같다.

Fig. 1.에서 보는 것과 같이 Tosoh G7에서는 HbF이 15% 이상이였으며 less fraction flagging과 과거 평균 혈당이 157.6 mg/dL 인데 비해 HbA1c가 4.7%의 낮은 결과 값을 보였다. Bio-rad variant 장비 역시 5.5%의 결과 값을 보였다. 두 장비 모두에서 보정 전, 후의 결과 값이 공복 시 혈당과 상관성이 낮았다.

Case 2의 경우 HbX(abnormal Hb)가 HbA1c와 Co-elution된 경우이며 A1c % 계산 시 총면적 부분이 커 지므로 상대적으로 HbA1c가 underestimation된 경우이다. 두 장비 모두에서 이상 크로마토그램이 보였으며 G7장비는 more fraction으로 variant 장비에서는 S-window라는 명칭으로 나타난다. HbX로 추정되는 부분을 제외시키고 결과 값을 산출하면 보정 전 결과에 비해 공복 시 혈당과 상관성을 보였다.

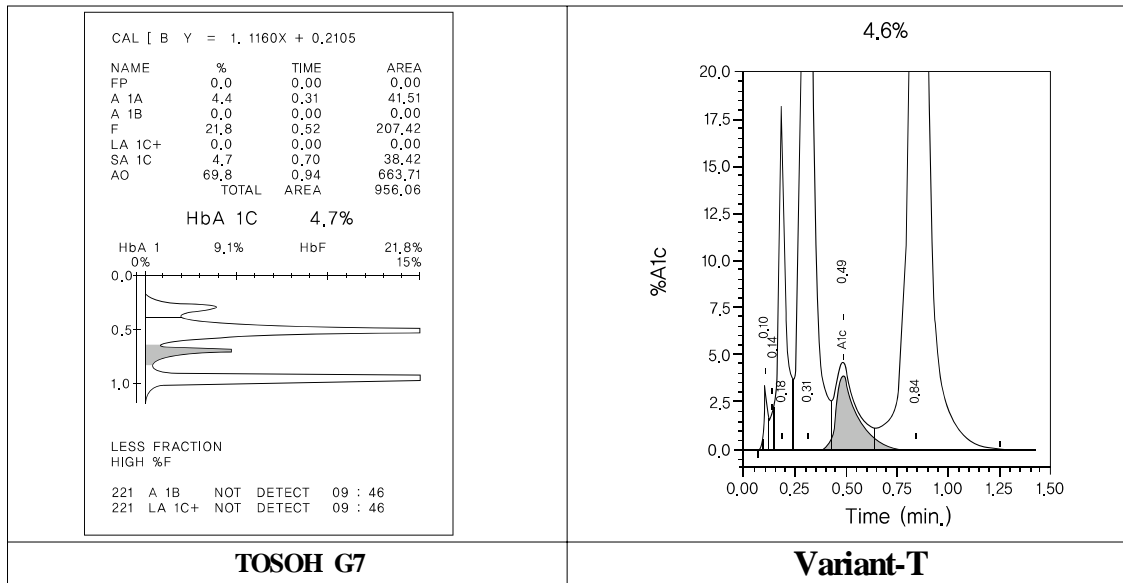


Fig. 2. Chromatogram of Tosoh-G7 and Variant-T in case 1.

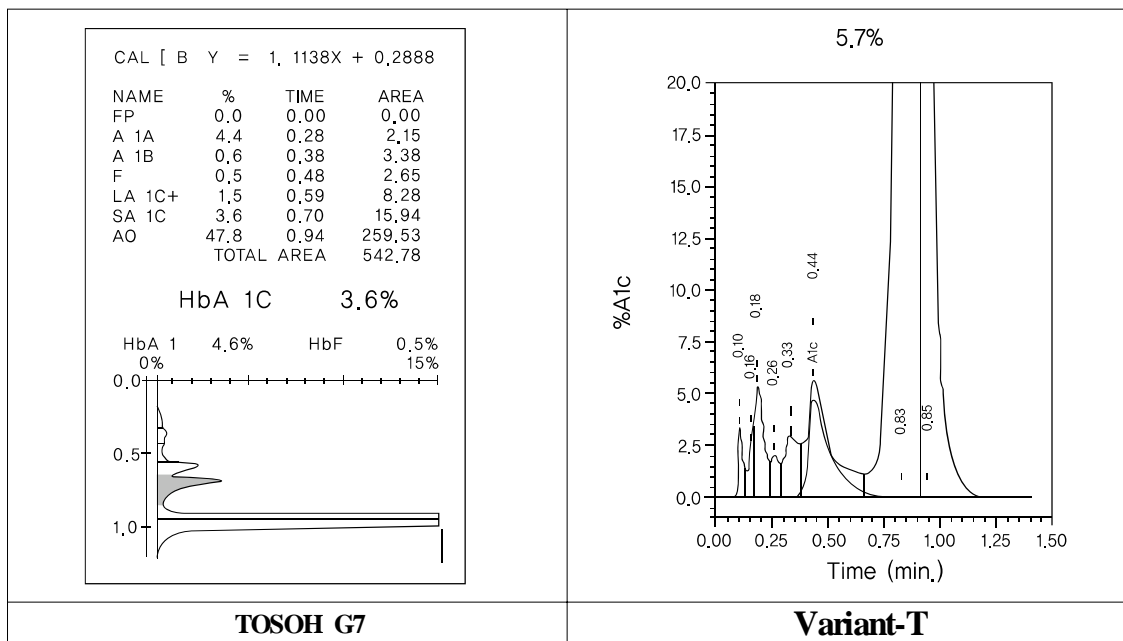


Fig. 3. Chromatogram of Tosoh-G7 and Variant-T in case 2.

IV. 고찰 및 결론

Case 3의 경우 누적된 혈당 평균값이 156.4 mg/dL로 G7장비와 variant 장비 모두에서 more fraction과 unknown peak(E.D window)가 보였다. 두 장비 결과 값이 매우 상이했으며 HbX로 추정되는 부분을 제외시킨 보정 값에서도 큰 차이를 보였다. 이는 Hb variants에 대한 특이도가 장비특성에 따라 차이가 있음을 보여주는 예이다.

Hb variants의 발생 건수는 다민족일수록, 적도 인근의 말라리아 저항성 돌연변이가 지역인 thalassemia belt' across the world에서 그 빈도가 높다(Modiano 등, 2001). 가까운 일본의 예를 들면, 우리나라와 같은 단일 민족 구성을 보이고 비슷한 위도 상에 있으며 thalassemia 다발지역에서

도 벗어나 있는 등 조건이 동일하다. 한국, 일본, 터키, 태국, 인디아, 알제리 등에서 공통으로 발견되는 Hb variants 중에는 Hb G-Taegu(동일 호칭으로 G-Coushatta, G-Saskatoon, G-Hsin Chu)가 있고 한국인과 일본인에게서 동일하게 Hb Ube4, Hb Yamagata 등이 보고되고 있다(Blackwell 등, 1969; Han 등, 1996; Hamaguchi 등, 1999). 변종 헤모글로빈의 희귀성을 고려한다 해도 일본의 경우 1996년 까지 30년간의 행정구역별 누적 통계자료가 있으며, 156종 1,024건의 Hb variants가 보고되어 있다(Harano와 Harano, 1996). 국내에서 보고된 Hb variants는 동아대병원 등에서 연구 명명한 Hb Pusan 등이 있다(Han 등, 1996). 위 내용으로 볼 때 우리나라의 Hb variants에 대한 통계 수치도 일본의 경우와 유사하게 나타날 것으로 생각된다.

2003년 GHb college of american pathologists(CAP) survey 결과 보고서에 따르면 Hb variants(HbAS)가 포함된 2003년 GHb CAP survey(GH-05) 검체는 2,001개 기관 중 96%가 참여했으며 GHb 분석 시 Hb variants를 측정하는가에 대한 질문에 31.5%가 “예”로 답하였고, 68.5%가 “아니오”로 응답하였다. 두 번째 질문은 “예”로 응답한 기관 중에서 “검출된 Hb variants에 대한 report protocol이 있는가?” 라는 질문에 41.8%가 “코멘트를 하

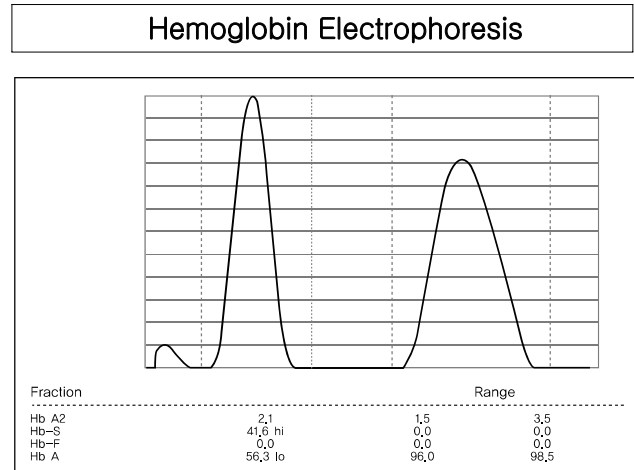


Fig. 4. Hemoglobin Electrophoresis in case 3 .

지 않는다”라고 응답하였고 코멘트하는 기관 중 45%가 유전적인 Hb 변종 가능성이 있음을 보고하고 있으며, 13.2%는 혈액소의 변종을 확인하기 위해 헤모글로빈 전기영동을 시행하는 등의 검증을 하였다고 발표하였다. 이는 평가 이래 최초의 변종 검체였으며 Hb variants 존재 시 부정확한 결과 값 유도 및 측정상의 한계점에 대해 주의 주는 보고서이었다.

본원의 HbA1c 검체 35,000건 중 40여건의 검체가 이

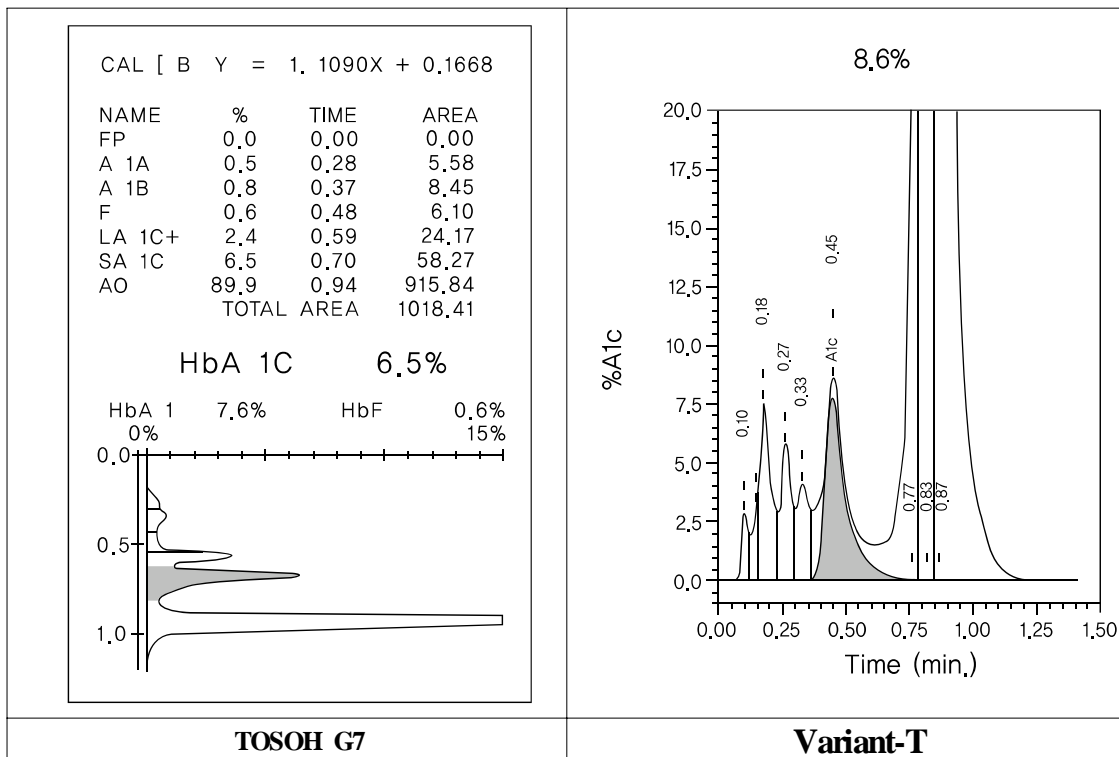


Fig. 5. Chromatogram of Tosoh-G7 and Variant-T in case 3.

상결과로 추정되며 이상 검체들 중에는 보정된 HbA1c 값을 혈당과의 상관관계를 볼 때 일치하지 않는 경우도 있었다(Table 1). 어떤 검체의 경우는 동일 장비에서도 재검한 결과 값이 매회 달라지기도 하고 크로마토그램에서도 unknown peak가 나타나지 않는 경우도 있었다. 장비별 특성에 따라 이상 검체의 변별력이 상이하기도 혹은 동일하기도 했다. 이는 Hb variants의 다양한 종류와 여러 인자들에 따른 장비별 특이성의 차이에 따라 결과 양상이 다름을 말하는 것으로, 위 과정으로 볼 때 Hb variants에 대해 어떤 장비가 더 우수하다고 단정지을 수 없음을 알 수 있고, 보정식 또한 한계가 있으며 모든 검체에 일률적인 보정값을 적용해서는 안 될 것으로 사료된다.

따라서 2차 스크리닝(전기영동법, DNA법 등) 및 자체 프로토콜에 따라 임상에 코멘트를 포함하여 결과를 보고해야 할 것으로 생각된다.

GHb 측정 시 hemoglobin variants 또는 기타 원인자에 의해 부정확한 GHb 결과가 보고될 수 있어 이로 인해 검사 결과 오류 및 부적절한 임상 진료를 야기시킬 수도 있다.

따라서 결과의 오류를 방지하기 위해서는 무엇보다도 Hb variants에 대한 “Laboratory finding” 즉, 검사자의 발견이 중요하다. 본원에서 시행하고 있는 systematic checking process는 월 5천여 건, 일일 200여 건 이상의 검체를 1시간 보고(turn around time) 및 이상결과를 관리하는 데 효율적이었다. 장비에서 환산된 수치상 결과 값 이외에도 크로마토그램을 통한 결과 해석이 정확한 HbA1c 결과 보고에 필수 사항이며 1차 스크리닝으로서 매우 중요한 의미를 갖는다고 할 수 있다. 또한 이러한 검체에 대해선 2차 검증이 요구되며 임상에 결과 보고 시 적절한 코멘트가 필요하다.

HbA1c 측정 시 다양한 변종 Hb들은 측정 방식에 따라 각각의 결과 양상이 상이하고 이에 따른 측정상 한계점이 있으며, 이를 보완하기 위해 Hb variants 검체의 GHb 결과 보고에 관한 각 의료 기관 및 검사실 실정에 맞는 프로토콜이 마련되어야 하며 Hb의 영향을 받지 않는 대체 검사법의 시행도 생각해 볼 필요가 있다. 본원에서 발견된 이상 검체는 현재 DNA Sequencing이 진행 중에 있으며 이 결과에 대한 내용은 차후 발표할 예정이다.

GHb 측정방식이 세계적으로 표준화되어 있음에도 불구하고 다양한 변종과 그 외 인자들로 인해 환자의 결과 보고에 오류를 보일 수 있음을 인지하고 이에 관한 지식

및 정보의 습득이 필요할 것으로 생각한다. 의료기관의 네트워크 형성으로 검체를 다른 검사실에 의뢰하는 등의 상호비교와 정보 공유로 새로운 Hb variants의 발견과 통계가 마련된다면 세계 Hb variants 연구에 있어서 국내의 정보 제공 및 의료 정보로서 효용 가치가 있는 일이라고 생각한다.

더 나아가 세계 변종 헤모글로빈 리스트에도 국내 이름으로 명명하여 올린다면 한국을 알리는 좋은 계기가 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Blackwell RQ, Ro IH, Liu CS, Yang HJ, Wang CC, Huang JT. Hemoglobin variant found in Koreans, Chinese, and North American Indians: alpha-2 beta-2 22 Glu Ala. *Am J Phys Anthropol* 30(3):389-391, 1969.
2. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for GHb. *Clin Chem* 47(2):153-163, 2001.
3. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New N Eng J Med* 329(14):977-986, 1993.
4. Han JY, Wee JH, Kim JM, Kim JY, Kim IH, Rodgers GP. A new observation of Hb Yamagata with a different nucleotide substitution: beta 132 AAA --> AAT. *Hemoglobin* 20(2):165-168, 1996.
5. Hamaguchi K, Harano K, Harano T, Abe N, Sakata T. Hb Ube-2 in a diabetic case with an abnormally low HbA1c value. *Intern Med* 38(10):800-803, 1999.
6. Harano T, Harano K. The higher structure and physiological significance of hemoglobin. *Nippon Rinsho* 54(9):7-12, 1996.
7. Hardison RC, Chu DH, Riemer C, Giardine G, Lehvaslaiho H, Wajcman H, Miller W. Databases of human hemoglobin variants and other resources at the globin gene server. <http://globin.cse.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>(28, June, 2005), 2005.
8. Little RR, Mathew AS, Tennill AL, Rohlfing CL,

- Goldstein DG, Measurement of GHb(GHB) in patients with chronic renal failure(CRF): Are ion-exchange HPLC results really invalid? *Clin Chem* 43(suppl.1):S136, 1997.
9. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simpoire J, Verra F, Konate A, *et al.* Haemoglobin C protects against clinical plasmodium falciparum malaria. *Nature* 414(6861):305-308, 2001.
 10. Natan DM, Francis TB, Palmer JL. Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 29(3):466-469, 1983.
 11. Pauling L, Itano HA, *et al.* Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* 110(2865):543-548, 1949.
 12. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c. *Diabetes Care* 25(2):275-278, 2002.
 13. Schnedl WJ, Krause R, Halwachs-Baumann G, Trinker M, Lipp RW, Krejs GJ. Evaluation of HbA1c determination methods in patients with hemoglobinopathies. *Diabetes Care* 23(3):339-344, 2000.
 14. Schnedl WJ, Lahousen T, Wallner SJ, Krause R, Lipp RW. Silent hemoglobin variants and determination of HbA(1c) with the high-resolution program of the HPLC A-8160 hemoglobin analyzer. *Clin Biochem* 38(1):88-91, 2005.
 15. Vella F, Isaacs WA, Lehmann H. Hemoglobin G Saskatoon: beta-22Glu-Ala. *Can J Biochem* 45(2): 351-353, 1967.
 16. Weykamp CW, Miedema K, de Haan T, Doelman CJ. Carbamylated hemoglobin interference in GHb assays. *Clin Chem* 45(3):438-440, 1999.
 17. 이귀녕, 권오현. 임상병리파일. 제3판, p246-249, 의학문화사, 서울, 2000.