

Original Article

Cortisol, 25OHD₃ 추출 후 원심 분리시 온도가 검사결과에 미치는 영향

서울아산병원 핵의학과

김외정 · 천준홍 · 유선희 · 조시만

Effect of the Centrifugation Temperature on Cortisol, 25OHD₃ Values After Extraction

Whe Jung Kim, Jun Hong Cheon, Seon Hee Yoo, Shee Man Cho

Department of Nuclear Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea

Purpose: We use the centrifugation of refrigeration state in separation of blood serum, Anti-ds-DNA, Vitamin B₁₂/Folate and GAD-Ab assay. However, Cortisol urine and 25-Hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) are conducted centrifuge at room temperature. This is troublesome that change centrifugation temperature into room temperature due to using of most assays at cold temperature. Therefore when using centrifuge after extraction of Cortisol urine and 25OHD₃, we conducted researches on effect of the centrifugation temperature in assay results.

Materials and Methods: In Cortisol urine, add dichloromethane 1.0 mL in urine 500 μ L, mix for 15 minutes, and then centrifuge for 8 minutes at 2600rpm. In 25OHD₃ add acetonitrile 0.5 mL in serum 200 μ L, and then centrifuge for 8 minutes at 2600rpm. Those experiments were conducted centrifuge at room temperature and 4°C. And experiments conducted immediately after centrifugation at 4°C and standing for 20 minutes after centrifugation 4°C. **Results:** In Cortisol urine, room temperature result in 1.93, 2.18, 2.43, 9.45, 14.2 (μ g/dL). Experiments of performing immediately after centrifuge at 4°C result in 1.8, 2.0, 2.3, 8.1, 13.7 (μ g/dL). Experiments of performing after 20 minutes result in 2.1, 2.1, 2.7, 9.95, 14.35 (μ g/dL). On the other hand, the 25OHD₃ tests conducted at room temperature result in 7.13, 26.6, 35.8, 48.2, 74.8 (ng/dL). Experiments were conducted immediately by pipetting after 4°C centrifugation result in 7.53, 30.9, 40.3, 61.5, 89.1 (ng/dL) as results are higher than experiments at room temperature. The experiments that conducted centrifuge at 4°C and then left at room temperature for 20 minutes result in 7.40, 32.4, 41.3, 51.6, 85.6 (ng/dL). **Conclusions:** Experiments were conducted by using centrifuge at 4°C are higher or lower than room temperature. The differences between results of standing for 20 minutes after centrifuge at 4°C and those of centrifuge at room temperature are less than conducting immediately. It is concerned that experiments conducted immediately after centrifuge at 4°C are incorrect, because tubes become dim due to temperature differences between 4°C and room temperature. Therefore, it is desirable to centrifuge at room temperature as manual and we should pipet promptly without stopping. (Korean J Nucl Med Technol 2009;13(3):143-146)

Key Words : Centrifugation temperature, Cortisol urine, Extraction, 25-Hydroxyvitamin D₃

서 론

Cortisol은 부신피질 속상대에서 생성되어 분비되는 대표적인

glucocorticoid이다. 화학식은 C₂₁H₃₀O₅고 분자량은 362로 혈중 반감기는 60분으로 glucuronic acid 또는 황산과 결합되어 요중으로 배설된다. Cortisol 분비는 CRF (corticotropin releasing factor) 및 ACTH를 통해서 시상하부-하수체-부신피질에 의해 조절되어 부신피질기능검사에 중요한 역할을 한다. 25 Hydroxyvitamin D₃는 Trivial names은 25-Hydroxyvitamin D₃; 25-Hydroxycholecalciferol; Calcidiol로 분자식은 C₂₇H₄₄O₂이다. 비타민 D결핍이나 중독 진단에 중요하다. 이 Cortisol urine과

- Received: August 7, 2009. Accepted: September 6, 2009.
- Corresponding author: **Whe Jung Kim**
Department of Nuclear Medicine, Asan Medical Center,
388-1 Pungnap-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea
Tel: +82-2-3010-4563, Fax: +82-2-3010-4588
E-mail: whejung@hanmail.net

Table 1. Procedure of Cortisol

	Standard	Control	Sample
검체분주 (μL)	25	25	25
시약분주(¹²⁵ I)		1 mL	
Mix	1분간 Vortex에서 MIX		
Incubation	37°C Water bath 45분간 반응		
Washing	Tube 1개씩 Aspiration		
Count	γ-counter 계측		

25-Hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃)의 경우 각각 Dichloromethane (methylene chloride)과 Acetonitrile 같은 유기용매를 사용하여 추출하고 실온에서 원심분리를 실시하도록 되어 있다. 그러나 본원 핵의학 검사실에서는 혈액의 혈청 분리 및 Anti-ds-DNA, Vitamin B₁₂/Folate, GAD-Ab 검사가 냉장 상태(4°C)로 원심분리를 실시하고 있다. 대부분의 원심분리가 냉장에서 행해지고 있으므로 Cortisol urine과 25OHD₃ 추출 후 분리 시 원심분리기의 온도를 매번 실온으로 바꾸어 실시해야 하는 번거로움이 발생한다. 이에 Cortisol urine과 25OHD₃를 추출하여 원심분리할 때 온도차이가 검사결과에 영향을 미치는 것을 알아보고 이를 해소하고자 한다.

검사 대상 및 방법

1. 검사대상: 본원에 검사 의뢰된 여러 농도의 Cortisol urine 5검체와 25OHD₃ Serum 5검체를 측정하였다.

Table 2. Procedure of 25OHD₃

	Total	Standard	Control	Sample
검체분주 (μL)		100	100	100
시약분주(buffer)		400 μL		
시약분주(¹²⁵ I)		50 μL		
Mix		약하게 혼합		
Incubation		실온 2시간 shaking		
Washing		washing solution 2 mL 2회		
Count		γ-counter 계측		

2. 검사 방법 Cortisol urine과 25OHD₃를 의뢰한 환자의 urine과 serum을 추출한 후 각각 실온과 4°C에서 원심 분리한 뒤 동시에 실험하였다. 4°C에서 실시한 실험 중 2회는 원심분리 후 바로 실험을 실시하였고, 2회는 원심분리 후 실온에 20분정도 방치 후 실험을 실시하였다. 총 4회 반복 실험하여 각 검사의 결과를 비교 평가하였다.

1) Cortisol urine 은 S사 kit를 사용하였다(Table 1).

Urine 추출 방법: Urine 500 μL에 dichloromethane 1 mL을 분주하고 15분 mix한 뒤, 2600rpm에서 8분 원심분리한다. 이 때 4회는 실온상태(20°C)에서 원심분리, 2회는 냉장상태(4°C) 원심분리 후 바로 pipetting, 2회는 냉장상태(4°C) 원심분리 후 실온상태 20분 방치 후 pipetting한다.

2) 25OHD₃는 B사kit를 사용하였다(Table 2).

Serum 추출 방법: serum 200 μL에 acetonitrile 0.5 mL를 분주하여 mix 후 2600rpm에서 8분 원심 분리한다. 이 때 4회는 실온

Table 3. Results of Cortisol

검체(μg/dL)	실온 원심분리 (20°C)						4°C 원심분리					
							바로 파이펫팅			실온화후 파이펫팅		
	1일	2일	3일	4일	mean	1일	2일	mean	3일	4일	mean	
1	1.3	2.1	2.5	1.8	1.93	1.7	1.9	1.80	2.4	1.8	2.10	
2	1.8	2.5	2.5	1.9	2.18	2.1	1.9	2.00	2.2	2	2.10	
3	1.6	2.8	2.9	2.4	2.43	2	2.6	2.30	2.9	2.5	2.70	
4	8.5	8.7	10.7	9.9	9.45	7.6	8.6	8.10	11.5	8.4	9.95	
5	11.8	15	15.9	14.1	14.20	12.2	15.2	13.70	14.9	13.8	14.35	

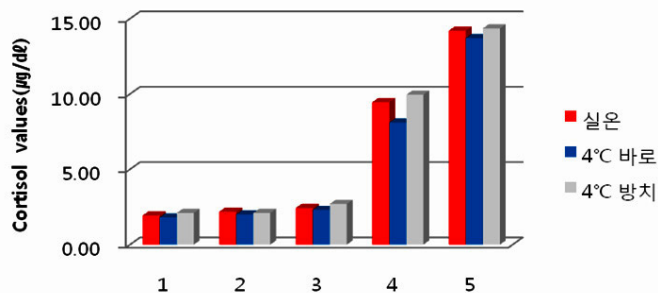


Fig. 1. Effect of the centrifugation temperature on Cortisol values (μg/dL) in urine samples.

Table 4. Result of 25OHD₃

검체(ng/mL)	실온원심분리 (20°C)					4°C 원심분리					
	1일	2일	3일	4일	mean	바로 파이펫팅			실온화후 파이펫팅		
						3일	4일	mean	1일	2일	mean
1	7.9		7.5	5.3	7.13	9.4	7.2	7.53	7.4		7.40
	8.2		7.9	6		7.3	6.2				
2	32.6	26.2	29.2	25.1	26.58	33.3	30.9	30.90	29.7	34.1	32.40
	25.6	23.7	23.6	26.6		32.4	27			31.1	
3	38.2	33.8	40.3	29.9	35.81	42.3	42.7	40.33	42.5	47.1	41.25
	36.4	36.2	39.9	31.8		38.5	37.8			40.8	
4	52.8	46.7	48.4	48.1	48.18	54.3	66.8	61.48	52.4	46.1	51.60
	52.2	46.4	44.8	46		59.3	65.5			54.3	
5	78.6	73.5	78.6	75.7	74.83	84	107	89.05	83.5	87.5	85.63
	78.7	70.9	75	67.6		75.3	89.9			87.7	

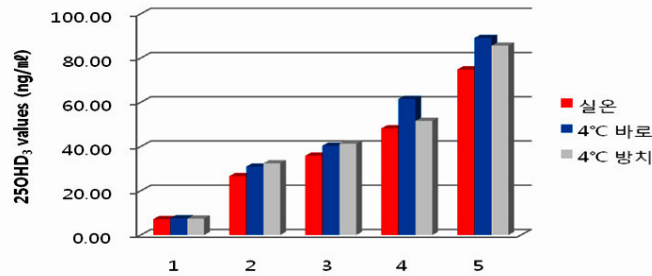


Fig. 2. Effect of the centrifugation temperature on 25OHD₃ values (ng/mL) in serum samples.

Table 5. Result of Cortisol by Freidman test

순위	Cortisol 검정통계량		
	평균순위	N	5
실 온	2.20	chi-square	8.4
4°C바로	1.00	자유도	2
4°C방치	2.80	P(근사유의확률)	0.015

Table 6. Result of 25OHD₃ by Freidman test

순위	25OHD ₃ 검정통계량		
	평균순위	N	5
실온	1.00	chi-square	7.6
4°C바로	2.60	자유도	2
4°C방치	2.40	P(근사유의확률)	0.022

상태(20°C)에서 원심분리, 2회는 냉장상태(4°C) 원심 분리 후 바로 pipetting, 2회는 냉장상태(4°C) 원심 분리 후 실온상태에 20분 방치 후 상층액 100 μL를 pipetting 한다.

비모수검정 중 Freidman 검정을 실시한 결과, 실온에서의 실험과 4°C 원심분리 후 바로 실험을 실시한 검사와 4°C 원심분리 후 실온에 방치한 뒤 실시한 실험 간의 근사유의확률이 0.015가 나옴에 따라 세 검사간의 차이가 있음을 나타내었다(Table 5).

결 과

1. Cortisol urine 결과

실온에서 실시한 검사결과가 1.93, 2.18, 2.43, 9.45, 14.2 (μg/dL)이고, 4°C에서 원심분리 후 바로 실시한 검사결과는 1.8, 2.0, 2.3, 8.1, 13.7 (μg/dL)로 실온 원심분리보다 낮아지는 경향이 있으며, 20분 실온 방치 후 실시한 실험의 검사결과는 2.1, 2.1, 2.7, 9.95, 14.35 (μg/dL)로 실온에서 실시한 검사결과와의 차이가 거의 없었다. 그리고 낮은 농도에서보다는 높은 농도에서 세 검사간의 결과차이가 크게 나타난다(Table 3, Fig. 1). 또한

2. 25OHD₃ 결과

실온에서 실시한 검사결과는 7.13, 26.6, 35.8, 48.2, 74.8 (ng/mL)이고, 4°C 원심분리 후 바로 pipetting을 실시한 실험은 7.53, 30.9, 40.3, 61.5, 89.1 (ng/mL)의 결과로 실온에서 실시한 결과보다 높게 나왔고, 4°C 원심분리 후 실온에서 20분 정도 방치 후 실시한 실험결과는 7.40, 32.4, 41.3, 51.6, 85.6 (ng/mL)를 나타내어 바로 실험한 결과 값보다 낮지만 여전히 실온 원심분리 후 실험한 결과 값보다 높게 나왔다. 그리고 검사 결과값이 낮은 농도에서보다는 높은 농도에서의 차이가 크게 나타난다(Table 4,

Fig. 2). 또한 Freidman 검정을 실시한 결과 근사유의확률이 0.022로 차이가 있음을 나타내었다(Table 6).

고찰

원심분리 시 온도에 따른 Homocysteine 농도를 연구한 다른 실험의 경우, 냉장상태인 4℃에서 원심분리한 실험의 결과값보다 실온상태인 20℃에서의 원심분리 실험결과값이 약간 높게 나와 두 온도에서 결과값의 차이가 있었다.¹⁾ 이번 연구에서도 두 온도차이가 실험결과값에 차이를 나타내었다. 이는 4℃ 원심분리 후 바로 실험을 실시할 경우, 실온과의 온도차이로 인한 일시적인 tube 표면의 흐릿해짐에 따른 상층액 제거의 부정확성이 우려된다. 만약 4℃에서 원심분리가 행해졌다면, 얼마 동안 실온에 방치하여 실온화를 시킨 후 실험을 실시하는 것이 검사 결과의 오차를 줄일 수 있는 방법이지만 유기용매 성분을 실온에 방치했을 때 증발이 발생하고 있으므로 이 또한 문제이다. 그러므로 Cortisol urine과 25OHD₃의 경우, 실온에서 원심분리 후 신속하게 실험하는 것이 검사의 정확성에 기여하며, 오차를 줄일 수 있는 방법으로 사료된다. 또한 본원 핵의학과 혈액 검사실에서 4℃에서 원심분리기가 행해지고 있는 실험인 Anti-ds-DNA, Vitamin B₁₂/Folate, GAD-Ab 검사의 경우, 검사원리 단계 중 bound form과 free form의 분리 단계에서 원심분리기가 이용되고 있다. 하지만 Cortisol urine과 25OHD₃의 경우, 검체 전처리단계에서 원심분리기가 이용되고 있다. 따라서 원심분리기를 이용하는 검사단계에 차이가 있음을 고려해야 한다. 또한 kit간의 차이도 본 연구에 고려해야 할 사항이다.

결론

유기용매로 추출하여 원심분리 후 실험을 실시하는 검사에서 4℃에서 원심 분리한 검체는 실온에서 원심분리한 검체보다 결과값이 높거나 낮게 나오는 경향이 있다. 그리고 낮은 농도에서 보다는 높은 농도에서 온도차이에 따른 검사결과와의 차이가 두드러지게 나타나고 있다. 4℃ 원심분리 하더라도 실온에서 일정 시간 동안 방치하여 실온화한 후 pipetting하는 것이 바로 실험을 실시하는 경우보다 실온에서 원심분리한 검사와의 결과값 차이가 작아진다. 그리고 표본수가 적어 비모수검정 중 Freidman 검정을 실시한 결과, 근사유의확률이 cortisol의 경우, 0.015가 나왔으며, 25OHD₃의 경우 0.022가 나왔으므로, 세 검사간의 결과는 차이가 있음을 의미한다. 따라서 매뉴얼의 방법대로 실온에서 원심분리하는 것이 가장 바람직하며 중단 없이 신속하게 pipetting을 해야 할 것이다.

REFERENCES

1. Angelika de Bree, et.al. Influence of Centrifugation Temperature on the Plasma Total Homocysteine Concentration. *Clin Chem* 2003;49:1026-1027.
2. Roder H, et.al. A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. *J Clin Endo Metab* 1972;35:219.
3. Mawer E.B. Clinical implication of measurements of circulating vitamin D metabolites. *Clin Endo Metab* 1980;9:63-79.
4. Angelo Mancinelli, et al. Effect of temperature on the stability of long-chain acylcarnitines in human blood prior to plasma separation. *Clinica Chimica Acta* 2007;375:169-170.
5. 한국임상화학연구회. 최신임상화학. *청구문화사* 2005;105-106.
6. 대한진단검사의학회편. 진단검사의학. *고려의학* 2001;135-137.