

소변 검체 분석물질의 냉/해동 과정 안정성 평가 연구

김민경^{1,2} · 김성욱² · 황유성¹ · 오은하^{1†}

¹(재)씨젠의료재단

²고려대학교 대학원 보건안전융합과학과 임상검사과학전공

(2021년 12월 28일 접수: 2022년 2월 17일 수정: 2022년 2월 22일 채택)

A Study on Stability evaluation in the freezing/thawing process of urine specimen analytes

Min Kyung Kim¹ · Sung Wook Kim² · You Seong Hwang¹ · Eunha Oh^{1†}

¹Seegene Medical Foundation, Life & Environment Science center, Seoul 04805, Korea

²Department of Health and Safety Convergence Science, Korea University Seoul 02841, Korea

(Received December 28, 2021; Revised February 17, 2022; Accepted February 22, 2022)

요약 : 소변검사 전 냉/해동 반복과 해동 과정에 따라 대표적인 임상 화학검사 측정값의 변화를 확인함으로써 소변검사의 안정성과 품질 개선방안을 모색하고자 하였다.

조사 대상자는 모두 건강한 남성 10명이었으며 이들의 소변 검체를 이용하여 냉/해동 안정성(freeze and thaw stability) 실험을 진행하였다. Micro-albumin과 Amylase의 경우 시간이 경과 됨에 따라 37°C에서는 통계적 유의성은 없었으나, 42°C와 60°C에서는 시간의 경과에 따른 결과가 통계적으로 유의한 변동이 있었고, BUN, Creatinine, Uric acid와 Glucose에서는 통계적으로 유의한 변동이 있었다.

Long term의 안정성 결과, 7일이 지난 후에는 Glucose의 변이는 증가하였고, 60°C에서는 Amylase가 감소하는 양상을 보였다. Glucose와 Amylase의 경우 시간의 경과에 따른 결과가 통계적으로 유의한 변동이 있었다. 신뢰성 있는 검사결과를 얻기 위해서는 소변 시료의 채취, 보관 및 저장 등을 비롯한 요검사의 정확한 표준화가 필요하며 생체 물질별 안정성 확보를 위한 조건들의 체계적 연구가 필요하다.

주제어 : 검증, 안정성, 임상 화학, 검체 수집 및 보관

Abstract : The purpose of this study was to find a way to improve the stability and quality of urinalysis by checking the changes in the measurement values of representative clinical chemistry test items according to the repeated freezing and thawing before the urine test and the thawing process. All subjects were 10 healthy males, and the freeze and thaw stability test was performed using their urine samples. In the case of micro-albumin and amylase, there was no statistical significance at 37°C with time, but at 42°C and 60°C, there was a statistically significant change in the results with time. There were statistically significant changes in BUN, creatinine, uric acid, and glucose.

[†]Corresponding author

(E-mail: waoeh@mf.seegene.com)

As a result of long-term stability, after 7 days, glucose mutation increased and amylase decreased at 60°C. In the case of glucose and amylase, there was a statistically significant change in the results over time. To obtain accurate test results, accurate standardization of urinalysis including appropriate collection, storage, and storage methods of urine samples is required and systematic study of conditions for securing stability for each biomaterial is required.

Keywords : Validation, Stability, Clinical Chemistry, specimen collection and storage

1. 서론

소변, 혈액 및 변 등과 같은 생체시료는 재충전이 되지 않는 소비성 자원이므로 분석 결과의 신뢰성을 확보하기 위해 생체시료 내 분석 대상 물질의 신뢰성 및 안정성 확보를 위한 물질별 조건들의 체계적 연구가 필요하다. 이와 같은 생체 모니터링은 질병 또는 유해 물질의 노출 정도를 측정하는데 효율적이며 효과적인 수단을 제공한다는 면에 있어서 비침습적으로도 유용하게 사용되고 있고, 인체에 미치는 건강 영향을 생태학, 독성학 또는 약물 동역학 모델을 통해서 측정, 평가를 위해 사용되며 생체모니터링 자료는 위해성, 독성 평가 목적뿐만 아니라 기초자료수집 목적으로 사용되고 있다[1]. 국내외에서 생체시료 내 분석 물질 안정성 평가 관련 연구 결과는 임상적 검사항목이 주를 이루고 있으며, 특히 생체시료의 보관 등의 안정성에 관련된 연구는 매우 미흡한 실정으로 표준화를 정립하기 위하여 생체시료의 검사와 보관 등의 연구가 필요하다.

영국의 Biobank pilot 연구에서도 혈액학적 및 임상 분석물질 42개 및 4개 소변 분석 물질에 대한 검사결과 안정성은 36시간 이내라고 알려져 있다[2]. 생체시료 분석 물질의 안정성은 시료 종류, 저장 및 보관 시스템, 물질의 화학적 특성 등에 의해 결정된다.

안정성 시험은 시료 보관 및 처리시간, 보관장소, 냉동조건, 냉/해동 주기 등이 시료에 미치는 영향을 확인하고 시료를 채취하고 취급하는 동안의 분석 물질의 안정성과 시료를 분석하는 동안 발생하는 변수에 대한 연구를 진행해 왔다[3]. Ercan 과 Akbulut 등은 소변 시료 안정성에 미치는 영향을 조사하여 첨가제가 없는 냉장 폴리스티렌 튜브의 결과를 비교하고, 방부제 튜브의 성

능과 온도의 영향을 조사하여 방부제 튜브는 대부분 매개변수에 대해 4~8 시간 동안 냉장고에 보관된 시료와 유사한 결과를 나타내었고 얼음은 백혈구 등에 부정적인 영향을 미치기 때문에 방부제 튜브를 사용할 때 시료를 실온에 보관해야 한다고 보고하였다[4]. 2017년 Rotter 등은 여러 저장조건에서 소변 시료 표적 대물질 프로파일의 안정성 연구에서 일부 아미노산 농도는 실온에서 장기간 보관한 후 변화에 민감했으며 소변 시료를 시원한 팩이나 실온에서 보관하고 여러 번의 동결 및 해동 주기를 피해야 한다고 보고하였다[5].

다양한 생체시료 중 소변검사는 간편하며 저비용이므로 병원에서 흔히 시행되는 비침습적 검사 중의 하나이며 채뇨 방법과 보존 방법은 분석의 결과와 해석에 중대한 영향을 미친다. 시료 채취 후 즉시 검사할 수 없다면 소변 시료의 보존 기간은 검사항목에 따라 약간 차이가 있지만, 일반적으로 4°C 이하 냉장 보관하고, 분석 시간이 5일 이상의 경우에는 -20°C 이하 냉동 보관하도록 권고하고 있다.

생체시료들에 대한 정확한 검사 결과를 얻기 위해서는 정확한 검체 채취법을 비롯한 검사 및 보관 방법의 표준화가 필요하며 생체시료 내 분석 물질별 신뢰성 및 안정성 확보를 위한 조건들에 대한 조직적이며 체계적인 연구가 필요하다.

본 연구에서는 소변검사 전 냉/해동 반복과 해동 과정에 따라 대표적인 임상 화학 검사항목의 측정값 변화를 확인하여 소변 자원 수집, 관리 정책 및 활용 방안을 마련하여 검사의 안정성과 품질 개선방안을 모색하고자 하였다.

2. 실험 및 통계처리

2.1 실험방법

2.1.1 대상자 선정

본 실험을 위한 선정기준으로 연구대상자는 신체 건강한 20~30 대의 남성으로, 유해물질을 취급하지 않는 직업군과 비흡연자를 선정하여 혈액 검사결과와 적합자만을 선정하였다. 사전 예비검사 항목으로 시료제작에 앞서 자원자를 대상으로 채뇨하여 간 기능, 신장, 염증 검사 등의 임상검사를 실시하여 이상소견을 보이는 자는 제외하였으며 최종적으로 검사 수치가 정상인 남자 10 명의 소변 100.0 ml를 채취하여 연구에 이용하였다.

Control 소변은 혼합한(pooling) 소변을 원심분리하여(3,000rpm, 10 분, 4°C) 그 상등액을 혼합하고 pH 조절 및 방부처리 없이 냉장 상태에서 1 시간 동안 충분히 교반하여 분석용 시료로 사용하였다.

본 연구의 모든 절차는 재)씨젠의료재단 IRB (Institutional Review Board, IRB)의 승인(IRB No. IRB-2010-3)하에 진행하였다.

2.1.2. 분석항목 및 연구방법

분석대상물로는 Micro-Albumin, Creatinine, BUN, Uric acid, Glucose, Amylase 을 선정하였

고 냉/해동 방법 표준화 설정으로 냉동 보관 시간은 해당 보관온도 설비에 넣는 순간부터의 시간을 적용하였다. 해동은 상온(냉동상태에서 바로 37°C 배양기로 이동)에서 일정 시간 방치되면서 동결 부분이 사라지는 시간을 측정하여 동일한 시간 동안을 해동함을 원칙으로 하며, 부트를 해동 후 방치 시간으로 하였다. 37°C에서 급속 해동이 바람직하나 대부분 현장에서는 상온에 방치하면서 해동하는 경우가 많으므로 본 연구에서는 현장조건에 부합되도록 상온 해동 방법에 따라 진행하였다. 해동 후 방치 시간은 상온(25°C)에서 해동을 시작하여 동결 부분이 사라진 후부터의 경과 시간을 적용하였다.

단기 및 온도 안정성 측정 방법으로 냉/해동 방법에 대한 조건 확립을 위해서 혼합된 소변(대조군 10명)을 이용하여 단기(4, 12, 24, 48, 72 시간), 장기(7 일) 동안 진행하였다. 검사항목별로 냉/해동 방법 기간은 1 일 간격으로 실시하였으며 냉/해동 횟수는 3 회 실시(1, 3, 5 회 냉/해동 후 측정)하여 CV %(오차율)을 제시하였다.

해동 방법으로는 4°C, RT 해동 조건(37°C incubation, 25°C voltex, 25°C water-bath)으로 하였고, Long-term(Accelerated decay) - pooling 시료로서 측정방법은 각각 3 가지 온도에 보관(37°C, 42°C, 60°C)하여 시간별(4, 24, 48, 72 시간, 7 일) 방치 후 측정하였으며 15.0 ml tube 에 5.0 ml 소변을 보관하였다.



Fig. 1. Control sample urine specimen preparation and storage process.

2.2. 통계처리 실험재료 및 방법

통계처리는 IBM SPSS Statistics version 25.0 프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였으며 결과값은 산술평균과 표준편차로 나타내었고, 두 그룹 간의 몸무게, 복용량 등의 평균을 비교 평가하기 위해 독립 표본 T 검정(Student's t-test)을 이용하였다.

시간에 따른 측정치의 변화는 반복측정 분산분석(repeated measurement ANOVA)으로 분석하여 p 값이 < 0.05 혹은 < 0.001 이하일 경우 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 대상자 특성

조사 대상자는 모두 남성으로 10명이었으며 평균 연령은 32.8 ± 5.1 세, 키 174.04 ± 4.6 cm, 몸무게 71.9 ± 9.9 kg 였다. Control 대상군의 요 중 임상 화학 검사 결과는 Micro-albumin 의 농도는 $5.9 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$, BUN $517.2 \pm 4.9 \text{ mg/dL}$, Creatinine $66.9 \pm 0.4 \text{ mg/dL}$, Uric acid $26.5 \pm 0.1 \text{ mg/dL}$, Glucose $5.2 \pm 0.1 \text{ mg/dL}$ 그리고 Amylase $151.4 \pm 2.0 \text{ U/L}$ 였다.

3.2. 냉/해동 시간 결과

냉/해동 안정성(freeze and thaw stability) 시험에서 냉/해동 반복 횟수는 시료 분석 시 냉/해동횟수와 동일하거나 더 많아야 한다. 품질관리 시료를 설정된 온도에서 냉동 저장하고 실온 또는 전처리 온도에서 해동하며, 완전히 해동한 다음 다시 동일 조건으로 최소 12시간 동안 동결하였다.

Fig. 2 에서 검체 동결과정 확인(-70°C) 확인을 위하여 분별 시간을 점검한 결과 20 분이면 완전하게 동결되었다. 4°C 검체 해동 시간은 120 분(약 2 시간), 25°C (실온) 검체 해동 시간은 30 분, 37°C (배양기) 검체 해동 시간은 11 분이면 완전해동되었다.

25°C 에서 voltexing 시간에 따라 검체 해동 시간을 확인하기 위해 5 분, 10 분, 15 분 해동한 결과 각각 10~15 분이면 완전 해동되었으며 25°C water-bath 도 6 분 이내에 완전 해동되었다

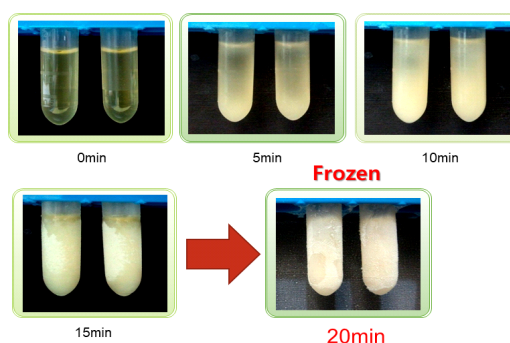


Fig. 2. Freezing process of urine specimen.

3.3. 대조군 냉/해동 반복실험 결과

Table 2는 pooling 시료 4°C 냉·해동 반복 실험 결과로서 검체 냉/해동을 5일에 걸쳐 5회 반복 실험 3회 측정된 결과 6개 항목 모두 변화가 없었고 CV %도 5% 내외였다.

같은 방법으로 검체 37°C incubation, 25°C voltex, 25°C water-bath 해동 방법을 달리하여 측정된 결과, 반복 실험에 의한 값의 차이는 크게 나지 않음을 확인할 수 있었다.

Table 1. Immediate analysis result of control urine sample

	Micro-albumin (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Uric acid (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Amylase (U/L)
reference	Not established	9.3~16.0 g/day	Not established	Not established	Random ≤ 15	Male: 16~491
Mean \pm SD	5.9 ± 0.2	517.2 ± 4.9	66.9 ± 0.4	26.5 ± 0.1	5.2 ± 0.1	151.4 ± 2.0
CV(%)	3.3	1.0	0.6	0.2	1.1	1.0

All data represent the mean \pm SD, CV%

Table 2. Control urine sample 4°C freeze/thaw repeated test results

Time	Analyte	Micro-albumin (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Uric acid (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Amylase (U/L)
	reference	Not established	9.3~16.0 g/day	Not established	Not established	Random ≤ 15	Male: 16~491
1	Mean ± SD	6.6 ± 0.2	601.9 ± 1.2	89.7 ± 0.1	37.4 ± 0.2	5.1 ± 0.1	194.0 ± 0.0
	CV(%)	2.3	0.2	0.1	0.6	2.0	0.0
3	Mean ± SD	7.6 ± 0.1	604.3 ± 12.9	90.0 ± 0.2	37.4 ± 0.1	5.1 ± 0.2	194.3 ± 0.6
	CV(%)	1.3	2.1	0.2	0.2	4.1	0.3
5	Mean ± SD	7.7 ± 0.2	598.3 ± 1.2	89.8 ± 0.5	37.2 ± 0.1	5.2 ± 0.2	193.7 ± 1.5
	CV(%)	2.7	0.2	0.6	0.3	4.0	0.8

Table 3. Analysis result of 37°C, 42°C and 60°C after 7 days of the pooled control sample

°C	Analyte	Micro-albumin (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Uric acid (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Amylase (U/L)
	reference	Not established	9.3~16.0 g/day	Not established	Not established	Random ≤ 15	Male: 16~491
37	Mean ± SD	6.2 ± 0.8	589.0 ± 8.4	90.5 ± 0.4	37.2 ± 0.0	0.6 ± 0.3	185.3 ± 2.5
	CV(%)	12.8	1.4	0.4	0.0	44.4	1.4
42	Mean ± SD	6.9 ± 0.1	583.4 ± 5.3	84.7 ± 0.6	37.1 ± 0.3	0.7 ± 0.0	181.3 ± 0.6
	CV(%)	1.7	0.9	0.7	0.7	0.0	0.3
60	Mean ± SD	7.2 ± 0.1	579.8 ± 7.1	65.2 ± 0.7	36.6 ± 0.8	0.4 ± 0.1	< 1
	CV(%)	1.6	1.2	1.1	2.1	13.3	-

대조군 시료 4시간 해동 분석 결과로서 pooling 한 소변을 37°C, 42°C, 60°C에서 4시간 보관 후 분석하였으며 각 항목의 큰 변화가 없었지만, Amylase의 경우는 60°C에서 값이 감소 되는 것을 확인하였다.

Table 3은 대조군 시료 7일 해동 분석 결과로 pooling 소변을 37°C, 42°C, 60°C에서 7일 보관 후 분석하였다. 37°C에서 Micro-albumin은 CV%가 각각 12.8%로 확인되었고, Glucose의 경우 CV% 값이 44.4%로 급격히 변화되었다. 60°C의 경우에

도 비슷한 양상을 보였고, Glucose는 값이 0.4 mg/dL로 떨어졌고, CV %도 13.3였다. Amylase는 60°C에서 거의 측정되지 않았다.

Fig. 3은 대조군 시료 시간대별 해동 분석결과로 Pooling 한 소변을 37°C, 42°C, 60°C에서 즉시, 4시간, 24시간, 48시간, 72시간 그리고 7일 보관 후 분석하였으며 Glucose의 경우 CV% 값이 4시간 후부터 급격히 변화되었고 Amylase의 경우에는 60°C에서 변화가 심하였다.

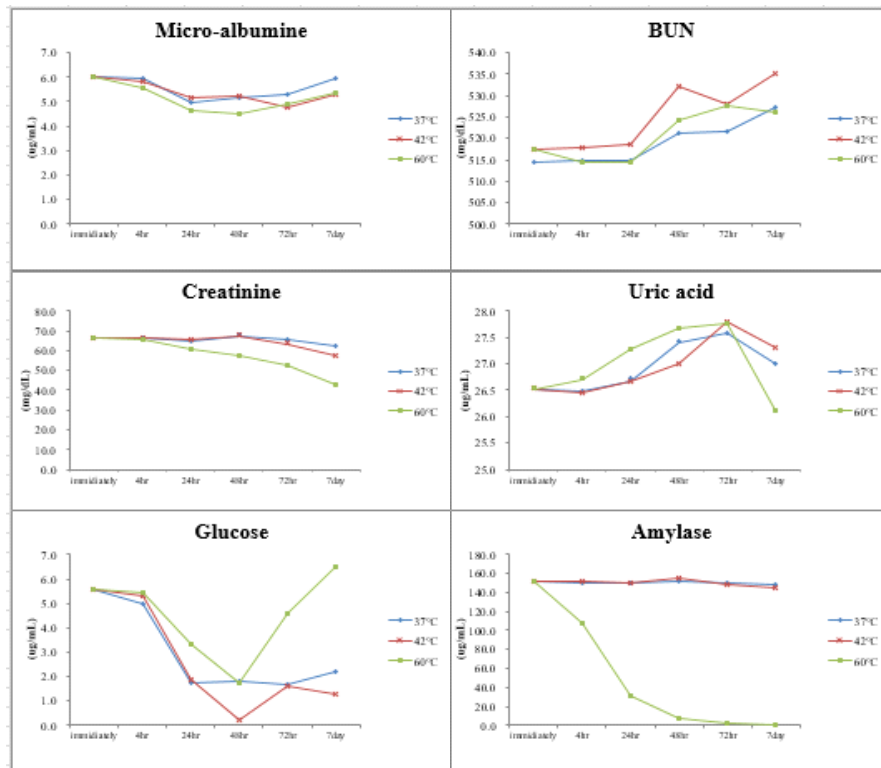


Fig. 3. Results by temperature and time of urine sample.

Table 4. Repeated measures ANOVA model of the effects of immediately, 4hr, 24hr, 48hr, 72hr and 7 days their interactive effect in micro-albumin

Temp	Time	Micro-albumin (ug/dL)						p-value
		immediate	4hr	24hr	48hr	72hr	7days	
37°C	Mean	6.0	5.9	5.0	5.1	5.3	6.0	0.240
	SD	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	
	CV	1.7%	3.5%	1.2%	6.3%	1.1%	1.0%	
42°C	Mean	6.0	5.8	5.1	5.2	4.8	5.3	0.014*
	SD	0.1	0.2	0.1	0.4	0.2	0.0	
	CV	1.7%	2.6%	2.2%	6.9%	4.4%	0.0%	
60°C	Mean	6.0	5.6	4.7	4.5	4.9	5.4	0.005*
	SD	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	
	CV	1.7%	1.0%	2.5%	4.6%	4.3%	2.8%	

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

3.3 시간대별 RM ANOVA 분석결과

소변을 37°C, 42°C, 60°C에서 즉시, 4시간, 24시간, 48시간, 72시간 그리고 7일 보관 후 분석하였다. Micro-albumin의 경우 시간이 경과 됨에 따

라 37°C에서는 통계적 유의성은 없었으나, 42°C와 60°C에서는 시간의 경과에 따른 결과가 Table 4에서 같이 통계적으로 유의한 변동이 있었다.

BUN의 경우 시간이 경과 됨에 따라 37°C, 4

Table 5. Repeated measures ANOVA model of the effects of immediately, 4hr, 24hr, 48hr, 72hr and 7 days their interactive effect in BUN

Temp	Time	BUN (mg/dL)						<i>p</i> -value
		immediate	4hr	24hr	48hr	72hr	7days	
37°C	Mean	514.4	514.7	514.6	521.1	521.5	527.1	0.002*
	SD	3.1	2.8	2.5	3.7	3.0	4.6	
	CV	0.6%	0.6%	0.5%	0.7%	0.6%	0.9%	
42°C	Mean	517.6	517.8	518.7	532.1	528.1	535.0	0.006*
	SD	2.4	3.4	3.8	1.6	3.2	1.6	
	CV	0.5%	0.7%	0.7%	0.3%	0.6%	0.3%	
60°C	Mean	517.6	514.4	514.3	524.2	527.7	526.0	0.044*
	SD	2.4	4.6	1.7	1.7	3.5	2.2	
	CV	0.5%	0.9%	0.3%	0.3%	0.7%	0.4%	

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Table 6. Repeated measures ANOVA model of the effects of immediately, 4hr, 24hr, 48hr, 72hr and 7 days their interactive effect in creatinine

Temp	Time	Creatinine (RU)						<i>p</i> -value
		immediate	4hr	24hr	48hr	72hr	7days	
37°C	Mean	66.7	66.8	65.2	67.3	65.8	62.3	0.005*
	SD	0.4	0.4	0.2	0.4	0.5	0.5	
	CV	0.5%	0.7%	0.4%	0.6%	0.8%	0.9%	
42°C	Mean	66.7	66.3	65.8	67.6	63.2	57.6	0.0001**
	SD	0.4	0.3	0.5	0.5	0.0	0.1	
	CV	0.5%	0.4%	0.8%	0.7%	0.0%	0.2%	
60°C	Mean	66.7	65.7	60.4	57.5	52.5	42.8	0.0001**
	SD	0.4	0.3	0.3	0.2	0.1	0.3	
	CV	0.5%	0.4%	0.4%	0.3%	0.2%	0.8%	

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

2°C와 60°C에서 시간의 경과에 따른 결과가 Table 5에서 같이 통계적으로 유의한 변동이 있었다.

Creatinine의 경우 시간이 경과 됨에 따라 37°C, 42°C와 60°C에서 시간의 경과에 따른 결과가 Table 6에서 같이 통계적으로 유의한 변동이 있었다.

Uric acid의 경우 시간이 경과 됨에 따라 37°C, 42°C와 60°C에서 시간의 경과에 따른 결과가 Table 7과 같이 통계적으로 유의한 변동이 있

었다.

Glucose의 경우 시간이 경과 됨에 따라 37°C, 42°C와 60°C에서 시간의 경과에 따른 결과가 Table 8과 같이 통계적으로 유의한 변동이 있었다.

Table 9와 같이 Amylase의 경우 시간이 경과 됨에 따라 37°C에서는 통계적 유의성은 없었으나, 42°C와 60°C에서는 시간의 경과에 따른 결과가 통계적으로 유의한 변동이 있었다.

Table 7. Repeated measures ANOVA model of the effects of immediately, 4hr, 24hr, 48hr, 72hr and 7 days their interactive effect in Uric acid

Temp	Time	Uric acid (mg/dL)						<i>p</i> -value
		immediate	4hr	24hr	48hr	72hr	7days	
37°C	Mean	26.5	26.5	26.7	27.4	27.6	27.0	0.0001**
	SD	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	
	CV	0.1%	0.3%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	
42°C	Mean	26.5	26.5	26.7	27.0	27.8	27.3	0.0001**
	SD	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	
	CV	0.3%	0.0%	0.3%	0.2%	0.3%	0.2%	
60°C	Mean	26.5	26.7	27.3	27.7	27.8	26.1	0.0004**
	SD	0.1	0.0	0.1	0.1	0.2	0.0	
	CV	0.3%	0.1%	0.3%	0.3%	0.7%	0.1%	

p* < 0.05, *p* < 0.001

Table 8. Repeated measures ANOVA model of the effects of immediately, 4hr, 24hr, 48hr, 72hr and 7 days their interactive effect Glucose.

Temp	Time	Glucose (mg/dL)						<i>p</i> -value
		immediate	4hr	24hr	48hr	72hr	7days	
37°C	Mean	5.6	5.0	1.8	1.8	1.7	2.2	0.003*
	SD	0.1	0.8	0.3	0.4	0.1	1.1	
	CV	1.8%	16.4%	17.3%	20.0%	6.9%	48.3%	
42°C	Mean	5.6	5.3	1.9	0.2	1.6	1.3	0.0001**
	SD	0.1	0.4	0.8	0.3	0.3	0.8	
	CV	1.8%	7.8%	40.9%	107.9%	16.5%	66.2%	
60°C	Mean	5.6	5.5	3.3	1.8	4.6	6.5	0.008*
	SD	0.1	1.0	0.2	0.9	0.3	0.4	
	CV	1.8%	17.4%	4.6%	48.1%	6.5%	5.0%	

p* < 0.05, *p* < 0.001

결과적으로 Micro-albumin 과 Amylase 의 경우 시간이 경과 됨에 따라 37°C에서는 통계적 유의성은 없었으나, 42°C와 60°C에서는 시간의 경과에 따른 결과가 통계적으로 유의한 변동이 있었고, BUN, Creatinine, Uric acid 와 Glucose 에서는 통계적으로 유의한 변동이 있었다.

Pooling 한 소변의 7종의 검사를 확인한 결과 CV 가 5% 이내였고, 4°C, 37°C, 25°C 해동 방법 별로 반복해도 큰 변이가 없었다. 소변 시료의 경우 대부분 24 시간 이내에 분석을 진행하고, 소

변 중의 적혈구나 침전물에 의해 제한적으로 분석에 영향을 줄 수는 있지만 대부분 냉장 보관 후 분석을 수행하고, 지연되는 경우에는 소변검사용 화학적 방부제를 사용하기 때문에 온도나 시간에 따른 영향은 적다고 알려져 있다[6]. 또한, Long term 의 안정성 결과 4 시간 동안 방치 시에 60°C에서 Amylase 가 감소하였고, 7일이 지난 후에는 Glucose 의 변이는 증가하였고, 60°C에서는 Amylase 가 감소하는 양상을 보였다.

Table 9. Repeated measures ANOVA model of the effects of immediately, 4hr, 24hr, 48hr, 72hr and 7 days their interactive effect in Amylase

Temp	Time	Amylase (U/L)						<i>p</i> -value
		immediate	4hr	24hr	48hr	72hr	7days	
37°C	Mean	151.2	150.6	149.6	151.1	150.0	148.9	0.477
	SD	0.3	0.4	0.6	0.2	0.6	0.3	
	CV	0.2%	0.2%	0.4%	0.1%	0.4%	0.2%	
42°C	Mean	151.2	151.1	149.4	155.3	147.6	144.7	0.0001**
	SD	0.3	0.8	0.5	0.2	0.1	0.6	
	CV	0.2%	0.5%	0.3%	0.1%	0.1%	0.4%	
60°C	Mean	151.2	107.5	30.6	7.9	1.7	0.1	0.0001**
	SD	0.3	0.4	1.0	0.1	0.2	0.1	
	CV	0.2%	0.4%	3.2%	0.7%	8.8%	43.3%	

p* < 0.05, *p* < 0.001

Table 8 과 9 의 결과에서 보듯이 Glucose 와 Amylase 의 경우 시간의 경과에 따른 결과가 통계적으로 유의한 변동이 있었다. 특히, Amylase 와 Glucose 의 유의한 차이가 큰 이유로 Amylase 의 경우, 일반적으로 혈청과 소변 시료는 실온에서 1주일까지 안정적으로 보관할 수 있다고 알려져 있으며 Amylase 의 활성 온도는 실온과 체온으로 알려져 있으나 냉/해동의 온도 또는 열 충격(temperature shock)을 주면 효소의 활성을 잃어버리므로 냉/해동 안정성에도 영향을 주는 것으로 판단된다. 이는 Solovyev 와 Gisbert 의 도미(*Sparus aurata*)의 효소 활성에 대한 시간, 보관온도 및 동결/해동 주기의 영향 연구에서도 장내 brush 및 세포질 효소 활성에 영향을 미치지 않는 반면에 트립신, α -아밀라아제 및 담즙-염 활성화 리파아제의 활성은 동결 및 해동 주기의 수에 의해 유의한 영향을 받았다는 연구 보고[7]에서와 같이 본 연구에서도 Amylase 경우 냉/해동의 안정성 실험도 영향을 받은 것으로 생각된다.

Glucose 의 경우 방부제 없이 실온에 장시간 방치한 소변 변화에 대한 연구에서 glycolysis 와 박테리아의 영향에 의한 변화를 보고하고 있으며 [8] Rotter 와 Brandmaier 의 저장조건에서 소변 시료 표적 대사 산물 프로파일의 안정성 연구에서 조사된 63 개의 대사 산물의 농도는 -80°C에서 즉시 저장된 시료와 비교할 때 -20 및 4°C에서

최대 24 시간 동안 안정하였으나 노출 시간과 온도 사이의 상호 작용을 고려할 때 반복적인 냉/해동은 Glucose 농도 변화에 현저하게 영향을 주는 것으로 나타나므로 소변 시료를 시원한 팩이나 실온에서 8시간 이상 배송하거나 보관하고 여러 번의 동결 및 해동 주기를 피해야 한다고 보고하였다[9].

실온에서의 소변 안정성 평가는 검사 종류에 따라 다르지만, 실온에서는 2~6 시간으로 제한되고, 냉장 소변 검체는 화학방부제 없이는 24 시간, 보존제 첨가 시에는 3일 정도가 안정하다고 보고하고 있다[7]. 하지만 소변 시료를 장기간 보관해야 할 경우는 -80°C에서 보관해야 하고, 되도록 소변 시료를 알칼리화하여 보관하는 것이 소변의 결과에 영향을 주지 않는 것으로 보고하고 있다[12].

이러한 본 연구의 실험 결과들로부터 기존 문헌 보고와 노출 시간과 온도 사이의 상호 작용을 고려할 때 반복적인 냉/해동은 특히, Amylase 와 Glucose 농도 변화에 현저하게 영향을 미치는 것으로 생각된다. 생체시료들에 대한 정확한 검사 결과를 얻기 위해서는 정확한 검체 채취법을 비롯한 검사 및 보관 방법의 표준화와 안정성이 필요하며 생체시료 내 분석 물질별 신뢰성 및 안정성 확보를 위한 지속적인 재현성 실험을 바탕으로 한 체계적인 연구가 필요하다고 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서는 소변 검체의 냉/해동 조건에 따른 변화를 측정하여 소변에서의 임상 화학 검사항목 측정값의 변화를 확인하고자 하였다. 조사 대상자는 모두 남성으로 10명이었으며 이들의 소변 검체를 이용하여 냉/해동 안정성(freeze and thaw stability) 실험을 진행하였다.

Micro-albumin 과 Amylase 의 경우 시간이 경과 됨에 따라 37°C에서는 통계적 유의성은 없었으나, 42°C와 60°C에서는 시간의 경과에 따른 결과가 통계적으로 유의한 변동이 있었고, BUN, Creatinine, Uric acid와 Glucose 에서는 통계적으로 유의한 변동이 있었다. Long term 의 안정성 결과 4 시간 동안 방치 시에 60°C에서 Amylase 가 감소하였고, 7 일이 지난 후에는 Glucose 변이는 증가하였고, 60°C에서는 Amylase 가 감소하는 양상을 보였다. 결과에서 보듯이 Glucose 와 Amylase 의 경우 시간의 경과에 따른 결과가 통계적으로 유의한 변동이 있었다. 이상과 같이 정확하고 신뢰성 있는 분석결과를 얻기 위해서는 소변 검체의 채취, 보관 및 저장 등을 비롯한 소변검사의 표준화가 필요하며 생체 물질별 안정성 확보를 위한 조건과 시스템 등의 체계적 연구가 필요하다.

References

1. R. Albertini, M. Bird, N. Doerrer, H. Zenick, "The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessments", *Environ. Health Perspect.*, vol. 114, no. 11, pp. 1755-1762 (2006).
2. C. Jackson, N. Best, P. Elliott, UK biobank pilot study, "Stability of haematological and clinical chemistry analytes.", *International Journal of Epidemiology.* vol. 37, pp. i16-i22, (2008).
3. L. Coppola, A. Cianfone, AM. Grimaldi, M. Incoronato, "Biobanking in health care: evolution and future directions", *Journal Transl. Med.*, (2019) vol. 17, no. 172, pp. 1-18, (2019).
4. M. Ercan, ED. Akbulut, A. Sedat Abuşoğlu, "Stability of urine specimens stored with and without preservatives at room temperature and on ice prior to urinalysis", *Clin. Biochem.*, vol. 48, no. (13-14), pp. 9-22, (2015).
5. M. Rotter, S. Brandmaier, C. Prehn, J. Adam, S. Rabstein, "Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions", *Metabolomics*, vol. 13, no 4, pp. 1-9, (2017).
6. J. Delanghe, M. Speeckaert, "Preanalytical requirements of urinalysis", *Biochemia Medica*, vol. 24, no. 1, pp. 89-104, (2014).
7. S. Mikhail, G. Enric, "Influence of time, storage temperature and freeze/thaw cycles on the activity of digestive enzymes from gilthead sea bream (*Sparus aurata*)", *Fish Physiol Biochem.*, vol. 42, no. 5, pp. 1383-1394,(2016).
8. RC. Pommerich, U. Karmann-Schulz, R. Conrad, B. Stoffel-Wagner, B. Zur, "Evaluation of the appropriate time period between sampling and analyzing for automated urinalysis", *Biochemia Medica.*, vol. 26, no. 1, pp. 82-89, (2016).
9. M. Rotter, S. Brandmaier, C. Prehn, J. Adam, "Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions", *Metabolomics*, vol. 13, no. 4, pp. 1776-1785, (2017).
10. S. Cuhadar, M. Koseoglu, A. Atay, A. Dirican, "The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples", *Biochemia Medica*, vol. 23, no. 1, pp. 70-77, (2013).
11. B. Surendra, D. Anthony, "Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules", *AAPS Journal*, vol. 9, no. 1, pp. 109-114, (2007).
12. AS. Christophersen, J. Mørland, "A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology", *Forensic Sci. Int.*, vol. 172, no (2-3) pp. 119-124, (2007).
13. W Herrington, N. Illingworth, N. Staplin, A. Kumar, B. Storey, "Effect of Processing Delay and Storage Conditions on Urine

- Albumin-to-Creatinine Ratio”, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, Vol. 11, no. 10, pp. 1794–1801, (2016).
14. R. Shah, WR. Lacourse, “An improved method to detect ethyl glucuronide in urine using reversed-phase liquid chromatography and pulsed electrochemical detection”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 576, no. 2, pp. 239–245, (2006).
15. Y. Zheng, A. Helander, “Solid-phase extraction procedure for ethyl glucuronide in urine”, *Journal Anal. Toxicol.*, vol. 32, no. 9, pp. 778–781, (2008).