

## 금속가공유 시료에서 일부 Optical Density 설정값에 따른 엔도톡신의 정량

박동욱<sup>a\*</sup> · 한인영<sup>a</sup> · 윤충식<sup>b</sup> · 박두용<sup>c</sup>

한국방송통신대학교<sup>a</sup>, 대구가톨릭대학교<sup>b</sup>, 한성대학교<sup>c</sup>  
(2002. 4. 26 접수)

### Analysis of Endotoxin Using Analytical Conditions of Optical Density in Metalworking Fluid Sample

Park Dong-Uk<sup>a\*</sup>, Han In-Young<sup>a</sup>, Yoon Chung-Sik<sup>b</sup>, Park Doo-Yong<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Korea National Open University, Department of Environmental  
Health, 169 Dongsung-Dong, Chongro-Ku, Seoul, Korea 110-791

<sup>b</sup>Catholic University of Daegu, Department of Occupational Health, Korea

<sup>c</sup>Hansung University, Dept. Mechanical Systems Engineering, Sungbuk-ku, Samsungdong 389, Seoul, Korea

(Received April. 26, 2002)

**요약** : 본 연구에서는 금속가공유 (metalworking fluids, MWF)를 취급하는 사업장에서 채취한 벌크시료와 공기중 시료를 대상으로 엔도톡신 (endotoxin)의 정확한 분석을 위한 Optical Density (OD)의 설정조건을 검토하였다. OD값을 설정하는 Onset time방법이 "time to V<sub>max</sub>"방법보다 재현성, 정확성이 높았다. 구체적인 OD설정값은 "0.03"이 가장 적절한 것으로 나타났다. 검량선의 상관계수 (직선성)가 0.998로서 가장 높았고 회수율도 88% - 105% (0.05 EU/mL과 5 EU/mL 범위)로서 다른 OD값 (OD "0.05", OD "0.1", "time to V<sub>max</sub>")보다도 적절하였다. Onset time방법에서 설정해야 할 OD값은 "0.03"과 "0.05"이 적절한 것으로 나타났다. OD "0.03"과 "0.05"에 의한 엔도톡신 분석결과간의 상관계수 (r)는 MWF시료에서는 0.97 그리고 공기 중 시료에서는 0.99로 유의하게 나타났다. 따라서 금속가공유를 대상으로 엔도톡신을 분석할 때는 Onset time 방법을 선택하고 구체적인 OD설정 값은 "0.03"과 "0.05"중에서 검량선의 상관성 (linearity)이 0.98 이상을 나타내는 OD값으로 분석하는 것이 적절한 것으로 판단된다.

**Abstract** : This study was performed to identify the proper analytical conditions of endotoxins regarding optical density in the workplace where metalworking fluids are used. This study found that "onset time method" was more accurate than "time to V<sub>max</sub> method". Reproducibility and accuracy analyzed by "onset time method" was greatly higher than the "time to V<sub>max</sub>". The optical density of "0.03" was the most appropriate analytical condition among "onset time method". In this analytical condition, linearity of 0.998 was obtained and recovery rate ranged from 88% to 105% at the endotoxin concentrations below 5 EU/mL. No significant difference of endotoxins was observed between the optical densities of "0.03" and "0.05". However, correlation coefficients were different with statistical significance (p<0.01).

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-3668-4707 Fax : +82+(0)2-3673-4274

E-mail : pdw545@mail.knou.ac.kr

This study confirmed that either the optical densities "0.03" or "0.05" should be used to analyze endotoxin. Of these optical density values, OD with correlation coefficient higher than 0.98 should be used to analyze endotoxin in environmental samples.

**Key words** : Metalworking fluids, endotoxin, optical density, Onset time method, time to  $V_{max}$

## 1. 서 론

그람음성박테리아는 양성박테리아와 달리 외벽(outer cell wall)을 가지고 있다. 그람음성박테리아는 죽을 때나 증식할 때 외벽의 LPS (lipopolysaccharide, LPS)를 방출하는데 이것을 엔도독신(endotoxin)이라고 한다.

거의 모든 환경에는 엔도독신이 존재한다. 공기 중의 엔도독신에 과다하게 노출되면 갑자기 열이 발생되고 가슴이 답답하고 기침이 나고 호흡곤란 등과 같은 폐 기능의 변화가 초래된다.<sup>1</sup> 엔도독신이 각종 호흡기 계질환의 원인인자로 작용하기 때문에 정확하게 양을 분석하는 것은 엔도독신의 노출에 따른 건강상의 영향을 규명하는데 매우 중요하다.

환경 중에서 엔도독신을 정량하는 분석방법에 대해서는 많은 논란이 있었다. 현재까지 엔도독신에 대한 분석방법은 미국시험재료협회(American Society for Testing and Materials, ASTM)에서 제안한 표준방법(standard method)이 유일하다.<sup>2</sup> 이 방법은 금속가공유(metalworking fluids, MWF)를 취급하는 공정에서 엔도독신을 분석하는 것으로 ASTM 위원회 E2144-01로 공포되었다.<sup>2</sup> 여기에는 공기 중 MWF의 채취와 전처리 방법에 대해서 자세히 설명되어 있다. 전처리 후에 엔도독신은 *Limulus ameobocyte lysate* (LAL) 방법으로 정량하도록 권고하였지만 구체적인 분석조건에 대한 자세한 설명은 없다. 이 방법은 LAL시약이 엔도독신 활성(kinetic)으로 겔화(coagulin gel)되는 탁도(turbidity)를 이용한 것이다. 탁도의 지표는 Optical Density (OD)로서 엔도독신이 많이 존재할 경우 LAL이 빨리 겔되고 탁도도 증가된다. 즉, LAL에 들어있는 조효소(겔화되지 않은 효소: proenzyme)가 엔도독신에 의해서 coagulase로 활성화된다. 이 효소가 LAL에 들어있는 응고성 단백질인 coagulin의 특정 결합을 가수분해시켜 coagulin이 되게 하고 이것이 겔형태의 응고물을 형성한다. 응고물이 탁도인 OD로 표현되며 이것을 측정하는 것이 Kinetic LAL 분석방법의 원리이다. 즉 시

료 중 엔도독신이 많을수록 생성되는 coagulin이 많아진다. 분석시간에 따라 coagulin에 의해서 형성되는 OD농도는 달라진다. 엔도독신의 분석시간의 변화에 따른 OD의 농도변화를 이용한 것이다.<sup>3</sup> 처음에는 OD가 서서히 증가하다가 일정 시점에서 OD가 급격히 증가되고 일정 시간이 지나면 더 이상의 활성은 일어나지 않는다. Kinetic 방법을 이용한 엔도독신의 정량은 설정된 OD에 도달하는(반응하는) 시간(reaction time)을 측정하는 것이다. OD조건에 따라 엔도독신의 양은 달라질 수 있다. "엔도독신의 농도"와 "설정된 OD에 도달하는데 걸리는 시간"과의 관계는 모두 대수(log-log)로 변환해서 엔도독신을 정량한다.

ASTM 분석방법에는 OD설정값에 대한 내용이 없다. Biowhittaker는 OD설정값으로 "0.03"을<sup>3</sup> Endosafe 회사는 "0.05"를 권고하였다.<sup>4</sup> Walters 등(1994)은 OD가 최대가 되는 시간( $V_{max}$ )을 이용하여 엔도독신을 측정하였다.<sup>5</sup> " $V_{max}$ "는 엔도독신의 활성이 최대가 되는데 걸린 시간을 말한다. 이처럼 엔도독신을 정량하는데 OD의 설정조건이 연구마다 다르다. OD값의 차이로 인해 엔도독신의 정량에 유의한 차이가 있는지 고찰하는 것은 대단히 중요하다. 또한 이러한 고찰을 통해 LAL 분석방법을 표준화하는 것은 환경 중에서 엔도독신을 정확하게 분석하는데 필요하다. 본 연구에서는 그 동안 연구에서 사용한 Kinetic LAL분석방법의 OD 설정값에 따라 엔도독신 정량농도에 차이가 있는지 알아보는 한편 타당한 설정값을 제안하고자 한다. 이 연구의 결과는 다른 환경시료에서 엔도독신의 표준화 방법을 설정하는데 도움을 줄 것으로 판단된다.

## 2. 연구재료 및 방법

### 2.1 재료

연구재료로는 MWF를 이용하였다. 즉 MWF 벌크시료와 MWF가 사용되는 공정에서 채취한 공기 중 시료였다. 시료를 벌크와 공기 중으로 구분한 이유는 시료의 특성에 따른 차이도 검토하고자 하였기 때문이다.

**2.2 방법**

**2.2.1 시료 채취**

2.0 (L/분)으로 측정전과 후에 보정된 펌프에 유리섬유필터(Glass fiber, 직경 37 mm, SKC)를 연결하여 공기 중 엔도톡신을 채취하였다. 채취후에는 4 ℃이하로 냉장된 아이스박스에 포장하여 실험실로 운반하였고 분석전까지 냉장고에 보관하였다. 한편 MWF 벌크시료는 MWF가 사용되는 공정에 연결된 탱크에서 채취하였다.

**2.2.2 시료 전처리**

카셋트에서 필터를 멸균된 원심분리용 튜브 (50 mL, polypropylene 재질)로 옮겨 전처리를 시작하였다. 각각의 튜브에 LAL water 15 mL를 넣고 48 KHz sonicator bath (Branson 8510)에서 1시간 동안 추출하였다. 다시 튜브를 원심분리기 (Hanil Union 55R)로 넣어 1,000 RPM에서 15분 동안 원심분리한 후 상등액을 엔도톡신 분석용 시료로 하였다. 벌크시료는 sonication 과정을 거치지 않고 원심분리를 하였고 이후 분석과정은 공기 중 시료와 동일하게 취급하였다.

**2.2.3 표준시료 및 buffer의 제조**

표준시료의 제조는 Endosafe사에서 제조한 10 ng/vial의 표준품과 LAL water (Control Standard Endotoxin, E.coli 055:B5, Lot# EX 14032)를 이용하였다. 10 ng이 들어있는 병 (vial)에 3.6 mL LAL water를 첨가하여 2.7778 ng/mL 분석용 표준원액 (stock solution)을 만들었다. 표준원액의 농도를 엔도톡신 단위 (Endotoxin Unit, EU)로 환산하면 50 EU/mL가 된다 (1 ng = 18 EU). 표준원액을 10배씩 단계별로 희석하여 표준시료 (standard solution)로 하였다. 표준시료의 농도범위는 0.05 EU/mL에서 50 EU/mL였다. 한편 모든 시료에 첨가되는 buffer용액은 2개의 LAL (KTA2 No. 1197 50-test, Endosafe)에 각각 5.2 mL의 specific buffer (Endotoxin specific buffer Lot# DML 2599, Endosafe)를 첨가하여 제조하였다.

공시료, 표준용액, 전처리된 시료의 100  $\mu$ L를 각각 96 well (Costar 3599)에 마이크로피펫으로 옮겼다. 모든 시료에 대한 희석이나 다른 용기로 옮길 때는 교반기로 30초 동안 격렬하게 혼합하였다. 시료용 초차기구와 플라스틱용기는 멸균하거나 멸균용 재질을 사용하였다.

**2.2.4 분석**

엔도톡신은 Kinetic microplate reader ( $V_{max}$ ; Molecular Devices Corp., Menlo Park, Calif.)를 이용하여 분석하였다. 100  $\mu$ L의 표준시료와 시료들이 들어있는 96 well을 분석기기 내에 있는 incubator에서 37 ℃에서 엔도톡신을 미리 활성화시켰다. 15분 후에 96 well을 다시 꺼낸 다음 8개의 마이크로팁이 달려있는 마이크로피펫 (Biowhittaker)으로 100  $\mu$ L의 buffer를 활성화된 모든 시료에 첨가하였다. 96 well 각각을 340 nm에서 75분 동안 3초마다 설정된 OD에 도달하는데 걸리는 시간을 읽도록 명령하였다. 본 연구에서 OD 설정값은 “0.03”, “0.05”, “0.1”, “최대 (time to  $V_{max}$ )”로 각각 구분하여 아래와 검량선의 상관계수(직선성, linearity), 동일한 MWF 벌크 및 공기 중 시료에서 엔도톡신 농도의 재현성, 알고 있는 농도(표준용액)에 대한 회수율 (정확성) 그리고 OD설정조건에 따른 엔도톡신 분석결과에 대한 상관 매트릭스를 비교, 고찰하였다. OD 값으로 선정된 특정한 값들 (“0.03”, “0.05”, “0.1”, time to  $V_{max}$ )은 기존에 보고된 연구들에서 활용한 분석값들이다

**3. 결 과**

**3.1 OD 설정값에 따른 엔도톡신 정량의 재현성**

Table 1은 동일한 시료를 OD설정조건에 따라 분석한 엔도톡신 농도의 재현성을 나타낸 것이다. 재현성을 평가하는 지표는 변이계수 (Coefficient of Variation, CV)를 이용하였다. “엔도톡신농도”와 “설정된 OD에 도달하는데 걸리는 시간”과의 상관은 OD값이 “0.03”과 “0.05”일 때 각각 0.993과 0.992로서 다른 설정조건에 비해 높았다. “time to  $V_{max}$ ”와 “엔도톡신농도와 상관은 0.816으로서 검량선으로서 유의하지 않은 값이었다. 또한 “time to  $V_{max}$ ”방법은 동일시료에 대한 재현성도 벌크시료에서 20.5% 그리고 공기중 시료에서 30.9%로서 변이가 매우 심하게 나타났다. 따라서 “time to  $V_{max}$ ” 분석조건에 의한 엔도톡신 정량은 정확하지 않은 것으로 판단된다. OD “0.1”일 때의 재현성은 벌크시료에서 46.4% 그리고 공기중 시료에서 7.9%로써 OD “0.03”과 “0.05”에 의한 변이계수보다 훨씬 높았다. 엔도톡신과 가장 상관성있게 정량적인 반응을 한 OD 설정값은 “0.03”이었다. 즉, 엔도톡신농도와 OD “0.03”에 도달하는데 걸리는 시간과의 상관계수가 0.993으로서 가장 높았고 동일한 시료에 대한 변이계

수도 가장 낮아 재현성도 다른 조건에 비해 높았다.

Table 1. Comparison of analytical results of the "time to V<sub>max</sub> method" with the "onset time method" with three OD values

	Time to V <sub>max</sub> method	Onset time method		
		Optical Density (OD)		
		0.03	0.05	0.10
Correlation coefficient, $\gamma$	0.816	0.993	0.992	0.989
MWF bulk sample(n=15), CV, %	30.9	16.7	25.0	46.4
Airborne MWF sample(n=18) CV, %	205	5.7	8.3	7.9

3.2 OD 설정값에 따른 회수율 (정확도)

Table 2는 표준용액 50 EU/mL, 5 EU/mL, 0.5 EU/mL, 0.05 EU/mL을 96 Well에 넣고 OD 설정값에 따라 회수되는 율 (검출된 엔도톡신 농도x100/주입된 엔도톡신 농도)을 나타낸 것이다. 즉 이론적으로 알고 있는 농도에 대한 정확도 (accuracy)를 OD 설정값에 따라 비교한 것이다. OD를 "0.03"으로 설정했을 때 회수율은 다른 조건에 비해서 양호하였다. 즉 0.05 EU/mL에서는 88%, 0.5 EU/mL에서는 99.8%, 5 EU/mL은 104.6 EU/mL, 50 EU/mL에서는 73.2%로 나타났다. OD 값을 "0.05"으로 설정하고 분석했을 때 회수율은 OD "0.03"보다는 낮았지만 다른 조건들 (OD "0.1", "time to V<sub>max</sub>")에 비해서는 양호하였다. OD "0.1"과 "time to V<sub>max</sub>"에 의해 회수되는 정도는 너무 낮거나 높아서 엔도톡신의 분석을 위한 설정조건으로 적합하지 않은 것으로 판단된다.

Table 2. Comparison of recovery of the "time to V<sub>max</sub> method" with the "onset time method" with three OD values

Concentration, EU/mL	Time to V <sub>max</sub> method	Onset time method		
		Optical Density (OD)		
		0.03	0.05	0.10
0.05(n=5)	78	88	86	80
0.5(n=5)	89	99.8	105	116
5.0(n=5)	160	104.6	114	133
50(n=5)	70.2	73.2	74.2	72.3

이 연구를 통해서 분석에 적절한 표준용액의 농도 범위도 결정할 수 있었다. OD값을 "0.03"이나 "0.05"

로 설정하였을 때 검량선에서 가장 높은 농도인 50 EU/mL에 대한 회수율은 73.2%와 74.2%로 낮았지만 이 보다 낮은 표준용액의 범위(5 EU/mL - 0.05 EU/mL)에서는 84%에서 114% 범위였다. 따라서 환경 시료에서 엔도톡신을 분석할 때는 표준용액의 범위는 5 EU/mL - 0.05 EU/mL으로 설정하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

3.3 OD "0.03"과 "0.05"설정에 의한 엔도톡신 분석 농도의 상관

Fig. 1은 MWF 벌크와 공기 중 시료에서 OD "0.03"과 "0.05"으로 분석한 엔도톡신 결과의 상관관을 나타낸 것이다. MWF를 취급한 사업장에서 직접 채취한 MWF 벌크시료와 공기중 시료를 OD "0.03"과 "0.05"로 각각 별도로 분석하여 엔도톡신의 상관관을 분석한 것이다.

OD "0.03"과 "0.05"에 의한 엔도톡신 분석결과의 상관관이 MWF 벌크시료에서는 0.97이었고 공기중 시료에서는 0.99로서 매우 유의한 상관이었다 (p<0.01). OD "0.03", "0.05", "0.1" 그리고 "time to V<sub>max</sub>"간의 상관매트릭스 (correlation matrix)를 작성한 결과 OD "0.03"과 "0.05"이외에는 유의한 상관관이 관찰되지 않았다. 그러나 OD "0.03"과 "0.05"간의 엔도톡신 분석은 통계적으로 차이는 없었다.

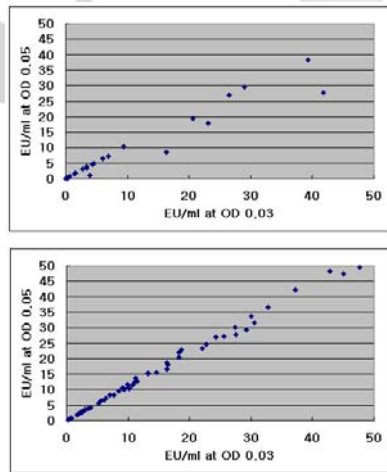


Fig. 1. Correlation of endotoxin concentrations analyzed at the optical density (OD) of "0.03" and "0.05" (Top: metalworking fluid bulk sample,  $\gamma=0.97$ , Bottom : airborne metalworking fluid samples ( $\gamma=0.99$ )).

Table 3. Correlation matrix among endotoxin concentrations analyzed by each optical density value (sample no=59)

Optical density	0.03	0.05	0.10	time to $V_{max}$
0.03	1	0.995	0.961	0.07
0.05	0.995	1	0.902	0.09
0.1	0.961	0.902	1	0.116
time to $V_{max}$	0.07	0.09	0.116	1

#### 4. 고찰 및 제안

미국 ASTM에서 1994년에 MWF를 사용하는 작업환경에서 엔도톡신의 개인시료 채취와 분석에 관한 잠정적인 방법 (provisional practice)을 제안하였으며, 2001년에 수정된 “E2144-01”c이 공포되었다.<sup>2</sup> 아직까지 국내는 물론이고 선진외국의 환경 및 산업보건분야에서도 표준화된 엔도톡신 분석방법이 없다. 이것은 환경중에서 엔도톡신을 정확하게 채취하고 분석하는데 영향을 미치는 요인이 많을 뿐만 아니라 이들을 제어 (control)할 수 있는 방법이 마련되어 있지 않았기 때문이다.

그 동안 공기 중에서 엔도톡신을 정확하게 채취하고 분석하는데 영향을 미치는 요인들은 많이 논의되었다. 공기를 채취하는 필터의 종류<sup>6,7</sup>, 필터에서 엔도톡신을 추출하는 방법<sup>1,8</sup>, 추출용기, 추출버퍼, 추출시간, 실험조자기구<sup>1,9,10</sup>, 시료의 pH<sup>9</sup> 등이 엔도톡신의 정확한 채취와 전처리에 영향을 미치는 주요 요인들로 보고되었다.

전처리된 시료에서 엔도톡신을 정량화하는데 가장 일반적으로 이용하고 있는 방법은 LAL을 이용한 4가지이다. 엔도톡신에 의해 형성된 탁도 (OD로 표현)의 최종점 측정 (endpoint detection of turbidity), Chromogenic 기질로부터 chromophore의 유리, Kinetic turbidimetric 그리고 Chromogenic 분석방법이다. 이 중에서 최근에 개발되었고 가장 많이 이용되는 방법은 엔도톡신의 활성을 측정하는 Kinetic LAL검사이다. 즉 분광광도계로 엔도톡신의 활성지표인 OD를 설정하고 설정된 OD에 걸리는 시간을 측정하여 엔도톡신을 정량하는 것이다.<sup>11-13</sup> 즉 “설정된 OD에 도달하는데 걸리는 시간”과 “알고 있는 엔도톡신의 농도”와의 관계를 이용하는 것이다. OD값은 임의적으로 정하거나 (OD “0.03”, “0.05”, “0.1” 등) OD 최고값 (time to  $V_{max}$ )을 설정할 수 있다. OD가 엔도톡신의 활성지표이므로 OD 값에 따라 분석의 정확성이 영향을 받는다. 본 연구에서는 OD의 설정값에 따

라 엔도톡신 분석에 차이가 있는지를 보고 가장 적절한 OD 설정값을 찾는 것이다.

OD 설정에 따라 분석된 엔도톡신의 농도가 달라지는 것을 연구결과와 확인하였다 (Table 1,2,3 참조). Fig. 2는 최대의 OD가 형성되는데 걸리는 시간 (“time to  $V_{max}$ ”)과 OD “0.03”이 형성되는데 걸리는 시간을 곡선 그래프로 나타낸 것이다. 즉 X축은 OD, Y축은 X축에 설정된 OD에 걸리는 시간을 나타낸다. 본 연구에서는 OD 설정조건에 따라 분석된 엔도톡신의 농도를 비교하고 적절한 설정조건을 제공하고자 하는 것이다.

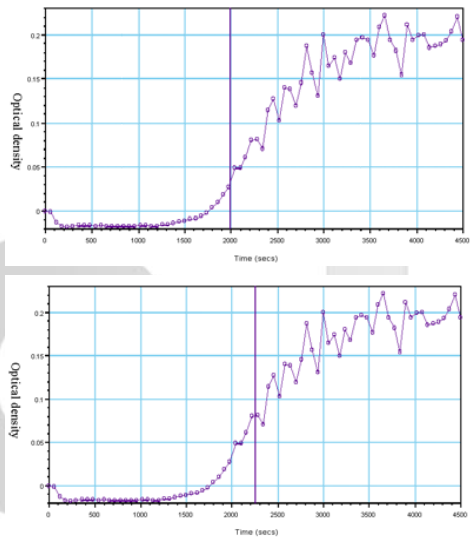


Fig. 2. An example of change in Optical Density(OD, Y axis) with OD “0.03” and “time to  $V_{max}$ ” method over time(top: graph of optical density over time in OD “0.03”, bottom, : graph of optical density over time in “time to  $V_{max}$ ” of OD).

ASTM 방법에서도 OD 설정에 대한 조건은 없다.<sup>2</sup> 환경 중에서 엔도톡신을 정량한 대부분의 연구들은 OD 설정조건에 연구마다 차이가 있다. Biowhittaker는 분석 카탈로그 No. N 383, N 384에서 OD “0.03”을 권고하였다.<sup>3</sup> Reynolds 등 (1993)은 OD값을 “0.02”와 “ $V_{max}$ ”에 의한 엔도톡신농도를 비교하였고, OD값의 설정에 따라 유의한 차이가 없는 것으로 보고하였다.

반면 Walters 등 (1994)은 OD값을 설정하는 “Onset time” 방법을 사용하지 않고 “ $V_{max}$ ”로 설정하여 측정하

였다.<sup>5</sup> 그들은 “ $V_{max}$ ” 설정에 의한 분석이 낮은 엔도톡신 농도에서도 민감도 (sensitivity)가 향상될 뿐만 아니라 Onset time방법에서 방해인자로 작용하던 인자들의 영향을 받지 않는다고 주장하였다. 또한 그들은 Kinetic LAL분석에서 OD를 최대로 하여 ( $V_{max}$ ) 분석한 것과 질량분석기 (GC-MS)로 3-hydroxy fatty acids (OHFAs, LPS의 일종)를 분석한 값에 유의한 차이를 발견하지 못했다. OHFAs를 GC-MA로 측정하는 것은 엔도톡신의 지표로 인식되기 때문이다.<sup>8</sup>

이러한 연구결과들은 본 연구결과와 차이가 있었다. 본 연구에서는 OD “0.03”과 “0.05”에 의한 엔도톡신 농도는 서로 큰 차이가 없었으나 “0.1”이나 “time to  $V_{max}$ ”와는 큰 차이가 있었다 (Table 1, 2, 3 참조). 또한 Onset time 방법이나 “time to  $V_{max}$ ”방법에서 높은 엔도톡신 (50 EU/mL)보다는 낮은 농도 (5 EU/mL)이하에서 민감도가 높았다 (Table 2 참조). 따라서 본 연구를 통해서 엔도톡신을 정량하기 위한 조건을 제안하면 다음과 같다.

첫째, OD값을 설정하는 Onset time방법이 “time to  $V_{max}$ ” 방법보다 재현성, 정확성이 높았다. 구체적인 OD 설정값은 “0.03”이나 “0.05”이 적절한 것으로 나타났다. 이러한 제안은 Biowhittaker와 Endosafe사의 분석지침성에서 제안한 조건과 동일하다.<sup>3,4</sup> 이렇게 제안하는 이유는 OD “0.03”, “0.05”, “0.1”이 “time to  $V_{max}$ ” 방법보다 검량선 (설정된 OD에 걸리는 시간과 엔도톡신과의 관계)의 상관성이 훨씬 높았고 (Table 1과 3 참조), 재현성 (Table 1과 2 참조), 정확성 (Table 2 참조)도 양호하였기 때문이다.

둘째, Onset time방법에서 설정해야 할 OD 값은 “0.03”과 “0.05”이 적절하다. 따라서 금속가공용 시료에서 엔도톡신을 분석할 때는 OD 값들에 따른 검량선의 상관계수를 보고 그 직선성 (linearity)이 큰 OD를 설정하고 분석하는 것이 적절하다 (Fig. 1 참조). 또한 다른 환경에서 엔도톡신을 분석할 때 OD설정에도 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

셋째, 엔도톡신에 대한 민감도는 5 EU/mL이하에서 높은 것으로 나타나 (Table 2 참조), 검량선을 작성할 때는 5 EU/mL를 가장 높은 농도로 선정하는 것이 보다 정확한 분석이 될 것으로 판단된다.

## 5. 결 론

엔도톡신농도와 설정된 OD값에 도달하는데 걸리는

시간과의 상관은 OD값이 “0.03”과 “0.05”일 때 각각 0.993과 0.992로서 다른 조건에 비해 높았다. 그러나 OD“0.1”과 “time to  $V_{max}$ ”에서의 상관 ( $\gamma$ )은 검량선으로서는 유의하지 않았다. OD를 “0.03”으로 설정했을 때 표준용액에 대한 회수율은 0.5 EU/mL에서 88%, 0.5 EU/mL에서는 99.8%, 5 EU/mL은 104.6 EU/mL, 50 EU/mL에서는 73. 2%로 나타났다. OD값을 “0.05”로 설정하고 분석했을 때 회수율은 OD “0.03”보다는 낮지만 다른 조건들 (OD “0.1”, “time to  $V_{max}$ ”)에 비해서는 양호하였다. OD “0.1”과 “time to  $V_{max}$ ”에 의해 회수되는 정도는 정확도가 낮아 엔도톡신의 분석에는 적절하지 않은 조건으로 판단된다. OD “0.03”과 “0.05”에 의한 엔도톡신 분석결과의 상관인 MWF 벌크시료에서는 0.97이었고 공기중 시료에서는 0.99로서 매우 유의한 상관이었다 ( $p < 0.01$ ). OD “0.03”, “0.05”, “0.1” 그리고 “time to  $V_{max}$ ”간의 상관매트릭스를 작성한 결과 OD “0.03”과 “0.05”이외에는 유의한 상관성이 관찰되지 않았다. 따라서 “Onset time방법”에서 설정해야 할 OD값은 “0.03”과 “0.05”이 적절한 것으로 판단된다. 환경 중의 엔도톡신을 분석할 때는 “0.03”과 “0.05” OD값에 따른 검량선의 상관계수를 보고 그 직선성이 큰 OD를 설정하고 분석하는 것이 적절하다고 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2001년 한국방송통신대학교 학술연구조성비의 지원을 받아 진행되었으며 이에 감사 드립니다.

## 참고 문헌

1. J. Douwes, P. Versloot, A. Hollander, *Appl. Environ. Micro.* **61**(5), 1763-1769(1995).
2. American Society for Testing and Materials (ASTM) : Standard Practice for Personal Sampling and Analysis of Endotoxin in Metal Removal Fluid Aerosols in Workplace Atmospheres. Designation: E2144-01, American Society for Testing and Materials (ASTM) 100 Barr Harr Dr., West Conshohocken, PA 19428 Reprinted form Annual Book of ASTM Standards. Copyright ASTM(2001).
3. BIOWHITTAKER, Limulus Amebocyte Lysate, Pyrogen<sup>R</sup>-5000, A Cambrex Company, Catalog No.

- N383, N384 License No. 709(1998).
4. Endosafe, Charles River ENDOSAFE, LAL Technology Seminar(2001).
  5. M. Walters, D. Milton, L. Larsson, and T. Ford., *Appl. and Environ. Micro.* **60(3)**, 996-1005(1994).
  6. D. K. Milton, J. A. Feldman, D. S. Neuberg, *Environ. Res.* **57**, 212-230(1992).
  7. T. Gordon, K. Galdanes and L. Brosseau, *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **7(7)**, 472-477 (1992).
  8. A. Sonesson, L. Larsson, A. Schutz, L. Hagmar and T. Hallberg, *Appl. Environ. Micro.* **56(5)**, 1271-1278 (1990).
  9. T. J. Novitsky, J. Schmidt-Gegenbach, and J. F. Remillard, *J. Parent. Env. Sci. Technol.* **40**, 284-286(1986).
  10. S. A. Olenchock, D. M. Lewis, and J. C. Mull, *Appl. Environ. Microbiol.* **15**, 430-435(1989).
  11. R. E. Wachtel, and K. Tsuji, *Appl. Environ. Microbiol.* **33(6)**, 1265-1269 (1977).
  12. D. K. Milton, R. J. Gere, H.A. Feldman, and I.A. Greaves, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **51**, 331-337 (1990).
  13. S. J. Reynolds and D. K. Milton, *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **8(9)**, 761-767 (1993).

