

碩 士 學 位 論 文

指導教授 朴杜用

비탁법에 의한 환경 중 엔도톡신의
정량분석방법에서 반응액 주입시간의 차이에
의한 영향 및 보정방법에 관한 연구

Study on the effects of quantitative analysis for
endotoxin by injection time interval of reaction reagent
to samples in the kinetic-turbidimetric method and on
development of a correction method

2005年 12月

漢城大學校 安全保健經營大學院

産業保健工學科

産業衛生工學專攻

韓 仁 英

碩 士 學 位 論 文

指導教授 朴杜用

비탁법에 의한 환경 중 엔도톡신의
정량분석방법에서 반응액 주입시간의 차이에
의한 영향 및 보정방법에 관한 연구

Study on the effects of quantitative analysis for
endotoxin by injection time interval of reaction reagent
to samples in the kinetic-turbidimetric method and on
development of a correction method

위 論文을 産業衛生工學 碩士學位論文으로 提出함

2005年 12月

漢城大學校 安全保健經營大學院

産業保健工學科

産業衛生工學專攻

韓 仁 英

韓仁英의 産業衛生工學碩士學位論文을 認准함

2005年 12月

심사위원장

김 수근



심사위원

김치년



심사위원

박두용



목 차

표 목차	iii
그림 목차	iv
I. 서론	1
1. 연구의 배경 및 필요성	1
2. 연구의 목적	6
II. 실험대상 및 방법	7
1. 실험대상	7
2. 재료 및 실험방법	7
2.1 시료 및 시약	7
2.2 분석기기	8
2.3 실험방법	8
2.3.1 표준액 제조	8
2.3.2 분석기기 설정	9
2.3.3 incubation	10
2.3.4 반응액 제조	10
2.4 분석	10
3. 통계처리	12
III. 연구 결과 및 고찰	13
1. 반응액 분배에 걸리는 시간에 따른 농도변화	13
1.1 시간별 전체 수준에서 농도변화	13
2.2 1 EU/ml 수준에서 시간별 농도변화	15
2.3 2 EU/ml 수준에서 시간별 농도변화	18
2.4 10 EU/ml 수준에서 시간별 농도변화	21

2. 시료의 농도수준에 따른 농도변화 비교	25
3. 보정방정식 계산	27
 IV. 결 론	 33
참고문헌	35
부록(결과값)	37
ABSTRACT	44

표 목차

<표 1> 표준액 희석 단계	8
<표 2> 반응액 분배에 걸린 시간적 차이에 의한 동일시료 결과값	13
<표 3> 분배에 걸리는 시간에 따른 1 EU/ml 수준의 분석치	15
<표 4> 동일시료의 칼럼 간 차이에 대한 사후 검증 결과	16
<표 5> 분배시간과 평균 농도값 변화관계의 사후검증 결과	17
<표 6> 1 EU/ml수준에서 총 분배에 걸린 시간에 따른 분석값의 상관식의 계수	18
<표 7> 반응액 분배 시점에 따른 2 EU/ml 수준의 분석치	19
<표 8> 동일시료의 칼럼 간 차이에 대한 사후 검증 결과	20
<표 9> 분배에 걸리는 시간에 따른 10 EU/ml 수준의 분석치	22
<표 10> 반응액 분배시간이 90초일 때 칼럼 간 사후 검증 결과	22
<표 11> 반응액 분배시간이 190초일때 칼럼 간 사후 검증 결과	23
<표 12> 10 EU/ml수준에서 총 분배에 걸린 시간에 따른 분석값의 상 관식의 계수	23
<표 13> 분배시간이 90초로 동일할 때 농도별 결과값의 변이	25
<표 14> 분배시간에 따른 상관식	27
<표 15> OD 0.03에 도달했을 때 반응시간으로 기기 실측값	29
<표 16> 반응시간 보정값	30
<표 17> 실측값과 보정값의 비교	31

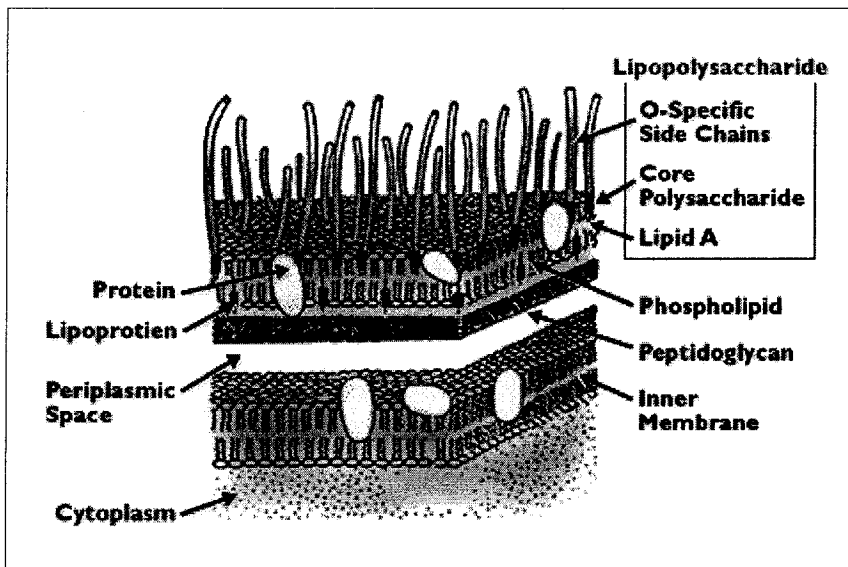
그림 목차

<그림 1> 그람음성균 세포막 구조	1
<그림 2> 엔도톡신과의 반응시간에 따른 OD값의 변화 모식도	3
<그림 3> 8 channel multipipettor 와 96 well microplate	5
<그림 5> 96well microplate의 모식도	9
<그림 5> 실험절차 흐름도	11
<그림 6> 컬럼에 분배된 시점에서의 농도 변화	14
<그림 7> 1 EU/ml수준의 시료의 반응액 분배시간별 농도변화	17
<그림 8> 2 EU/ml 수준의 시료의 분배시간별 농도변화	20
<그림 9> 10 EU/ml 수준에서 반응액 분배시간별 농도변화	24
<그림 10> 반응액 분배시간이 동일할 때 농도수준별 결과값 변화	26
<그림 11> 1 EU/ml 수준의 분배시간과 기울기값의 관계	28
<그림 12> 10 EU/ml 실측값과 보정값	31
<그림 13> 1 EU/ml 실측값과 보정값	32

I. 서론

1. 연구의 배경 및 필요성

엔도톡신(endotoxin)이란 ‘균체내 독소’라는 뜻을 가진 말로 그람음성균(Gram-negative bacteria, GNB)의 세포외벽에 존재하며, 지질(lipid), 탄수화물(polysaccharide), 단백질(protein)로 구성되어 있던 것이 세포가 죽거나, 증식할 때 세포의 벽이 깨지면서 단백질만 제외된 lipopolysaccharide(LPS)이 방출되는데 이것을 엔도톡신이라고 한다.⁴⁾



<그림 1> 그람음성균 세포막 구조.

그람음성균은 살아있는 동안에는 엔도톡신이 발현되지 않으며, 대단히 안정적이고, 열에 강하며 음전하를 띄고, 큰 분자량(1,000,000 dalton 이상)을 가진다. 이러한 성질 때문에 세포가 사멸, 증식하여 엔도

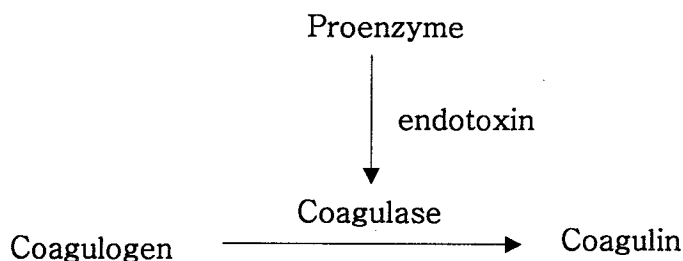
독신에 한번 노출되면 제거하기가 힘들며, 노출 시 인체에도 많은 영향을 끼친다.⁸⁾

엔도독신은 고독성 물질로 노출 시 발열이나 오한, 백혈구 수 변화 및 호흡기 질환을 일으키고, 쇼크나 천식, 기도와 폐포 염증 및 폐기능 장애, 심지어 사망을 초래하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾

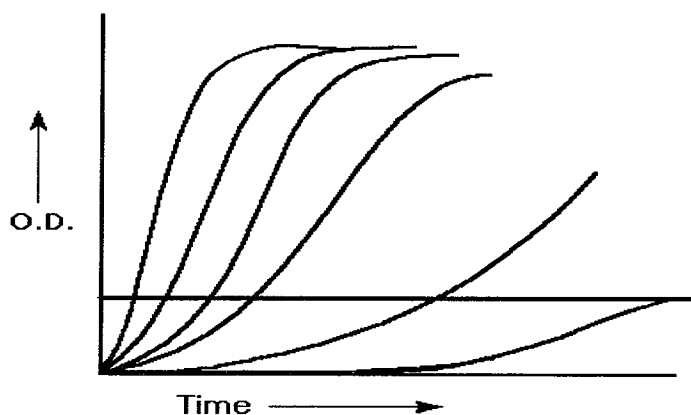
산업보건에서 엔도독신 노출 작업으로는 면방직업, 농업, 축산업, 곡물저장과 가공업, 목재 가공업, 폐기물 처리업, 절삭유 취급업, 등으로 생물학적 인자가 주 위험인자로 알려져 있는 작업장이다. 특히 농축산업과 곡물저장업 등은 동물의 분변, 습기 영양분 등으로 미생물 오염이 매우 심하고, 가축사육업종에서 알러지와 호흡기계질환의 발생률과 미생물의 농도는 매우 유의한 상관성이 있다. 또한 곡물관리 업종에서도 만성기관지염, 천식, 알러지성 비염 등의 발생이 높은 것으로 알려져 있다.³⁾ 기계가공업 및 자동차 부품업 등의 절삭유 취급을 하는 작업장의 경우 오염된 절삭유가 미스트나 에어로졸 상태로 호흡기로 들어와 천식 등 호흡기 질환이 촉진된다고 알려져 있다.

엔도독신 분석법은 각 분야별로 제시하는 방법이 있지만 산업보건분야에서는 국제적으로 미국시험재료협회(American Society for Testing and Materials, ASTM)가 제안하는 방법이 일관적으로 사용되고 있다.⁹⁾ 이 방법은 kinetic turbidimetric LAL Assay로 엔도독신을 정량을 하도록 권고하고 있다.¹⁾ LAL Assay에 사용되는 LAL(Limulus Amebocyte Lysate)은 아메리카 대륙의 대서양 연안에 분포하는 투구게(Limulus polyphemus)의 순환혈액세포의 추출물로 엔도독신과 반응하게 되면 겔의 형성을 일으킨다.²⁾ LAL에 들어있는 조효소인 Proenzyme이 엔도독신에 의해 coagulase의 응고효소로 활성화된다. 이 효소가 LAL에 응고성 단백질인 Coagulagen의 특정결합을 가수분해

시켜 Coagulin이라는 겔(gel)형태의 응고물을 형성시키는 것이다.²⁾



이런 활성도는 탁도(turbidity)의 지표인 OD(Optical Density)로 표현되며, 일정 OD에 도달하는 데 걸리는 시간을 측정하는 것이 kinetic turbidimetric LAL Assay의 원리이다.²⁾



<그림 2> 엔도톡신과의 반응시간에 따른 OD값의 변화 모식도.

<그림 2>와 같이 OD는 서서히 증가하다가 일정 시점에서 급격히 증가되며, 반응의 최고점에 달한 후엔 더 이상 증가되지 않는다. 엔도톡신의 농도가 높을수록 coagulin(gel)이 빨리 형성되므로 일정 OD에 도달하는 시간이 빨라진다. 그러므로 “일정 OD에 도달하는 시간”과 “엔도톡신의 농도”간에는 역비례 관계에 있다. Kinetic 방법은 일정 OD에 도달하는(반응하는) 시간을 측정하는 것으로써 실제 엔도톡신의 정량은 알고 있는 표준액의 “엔도톡신의 농도”와 “설정된 OD

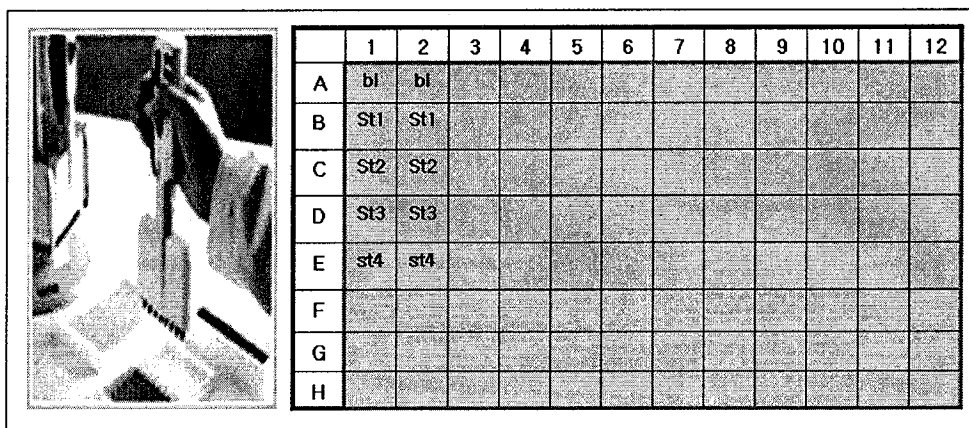
에 도달하는데 걸리는 시간”과의 관계를 대수(log-log)로 변환한 검량선을 이용한다.⁹⁾

환경 시료의 엔도톡신을 정확하게 분석하는데 여러 가지 요인들이 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 주로 채취하는 필터의 종류, 추출하는 방법⁵⁾, 추출용기, 추출버퍼, 추출시간, 실험초자기구, 시료의 pH, OD 설정값⁹⁾, 피펫 볼륨 에러⁷⁾ 등이 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 그러나 아직까지 반응액을 분배하는데 걸리는 시간이 분석값에 영향을 미친다는 연구는 거의 없다. 엔도톡신 실험방법으로 널리 인용되고 있는 국내 약전의 엔도톡신시험법^{6,10)}에도 반응액의 분배시간을 별도로 설정해 두지 않고 있다.

비탁분석법에서는 “일정 OD에 도달하는데 걸리는 시간(반응시간)”을 측정함으로써 반응시간은 정확히 측정되어야 한다. 반응시간이 달라지면 엔도톡신의 농도계산이 달라지기 때문이다. 그렇지만, 이 분석법에서 반응시간은 모든 시료에 반응액을 동시에 분배할 수 없으므로 분배시간에 따라 각 시료의 반응시간이 차이가 있다. 왜냐하면 현재 위의 분석방법은 다음과 같이 수행되기 때문이다.

분석을 하기 위해 전처리 과정이 끝난 시료를 <그림 3>과 같은 96well microplate에 시료를 각각 100 μ l를 주입하고, 8개의 마이크로 팁이 달려있는 8 channel multipipettor로 반응액(LAL)을 100 μ l씩 분배하게 된다. 한번에 8개의 well(A1-H1)은 동시에 분배가 되며, 이 직선상의 8개의 well을 칼럼(column)이라 한다. 칼럼은 총 12개가 구성되어 microplate는 96개의 well이 존재하는 것이다. 총 12회를 순차적으로 분배하게 되고, 이 때 걸리는 시간은 실험자의 숙련도에 따라 대략 1분에서 3분 정도 소요된다. 반응액이 분배된 96 well microplate

를 분석기기에 넣고, 분석시작시간부터 일정 OD에 도달에 걸리는 시간을 측정하여 엔도톡신 농도를 산출한다. 그러나 엔도톡신 시료의 반응은 측정기기에 microplate를 삽입하기 전에 이미 수작업으로 반응액을 넣은 이후부터 반응이 시작되므로 반응액이 분배된 시간의 차이만큼 오차가 발생할 수 있다. 반응액이 들어가는 시간은 12개의 칼럼별로 다르므로 반응시작 시간도 다른 것이다. 그러므로 실제로 동일한 농도일 지라도 “일정 OD에 도달하는 데 걸리는 시간”은 그만큼 다르게 기록된다. 따라서 이러한 시차로 인해 발생하는 오차를 고려할 필요가 있다. 본 연구에서는 이와 같은 시차에서 발생하는 오차의 크기를 정량적으로 분석하고, 이러한 오차를 보정할 수 있는 방법을 모색하고자 하였다.



<그림 3> 8 channel multipipettor와 96well microplate.

2. 연구의 목적

본 연구에서는 다음과 같은 가정으로 실험을 통한 검증을 해 보기로 한다. 첫째, 각 시료에 반응액을 분배하는 시간적 차이는 분석 농도에 영향을 미친다. 둘째, 이 차이는 시료의 농도수준에 따라 미치는 영향의 정도가 다르다. 이에 농도수준별로 반응액 분배의 시간적 차이에 따라 농도측정에 미치는 영향을 정량적으로 파악하고 이를 보정할 수 있는 수학적 모델을 개발하고자 한다.

밝혀진 영향인자에 대한 많은 연구들도 필요하지만, 이와 함께 새로운 요인을 찾아내어 분석값에 대한 오차를 줄이는 실험방법을 제안함으로써 보다 정확한 분석값을 산출하여, 값의 신뢰도 향상에 기여하고자 한다.

II. 실험대상 및 방법

1. 실험 대상

본 실험에 쓰인 시료는 “정제된 엔도톡신 표준액(Control Standard Endotoxin)”으로 1 EU/ml수준과, 10 EU/ml수준을 제조하여 사용하였고, 현장 시료로는 실제 대형건물에서 냉각탑의 냉각수를 채취하여 시료로 사용하였다.

2. 실험재료 및 실험 방법

2.1 시료 및 시약

엔도톡신 정량분석에 사용된 시약은 Limulus Amebocyte Lysate pyrogen 5000, 200 test kit 이다. 이 Kit(Biowhittaker CAT NO. N384)에는 반응물질 LAL Reagent(분말상태)와 이를 녹이는 Reconstitution Buffer 및 Standard 물질로 정제된 엔도톡신 표준품(Control Standard Endotoxin, C.S.E)이 들어있다.

실험에 쓰인 시료는 Standard 제조에 사용한 엔도톡신 표준액과 건물의 냉각탑에서 채취한 냉각탑수를 사용하였다. 엔도톡신 표준액을 이용하여 결과값의 변화를 관찰해 본 후 실제 채취된 현장시료(냉각탑수)에서도 동일한 변화가 일어나는지 관찰하였다.

2.2 분석기기

분석기기는 micromicroplate reader(Versa max , Molecular Devices Corp., U.S.A)를 사용하였다. 기기를 사용하기에 앞서 기기적 오류를 점검하기 위해 Validation test로 온도의 균일성과 파장의 균일성, 소프트웨어와의 호환성 등을 점검하였으며, 그 결과 기기적 결함이 없는 것을 확인하였다.

2.3 실험방법

2.3.1 표준액 제조 (Standard Solution)

Limulus Amebocyte Lysate pyrogen 5000, 200 test kit에 들어 있는 C.S.E(Control Standard Endotoxin : C.S.E) Vial(Lot#2L0300)을 개봉하여 LAL Water(Biowhittaker Lot#017085) 4.9ml 넣어 표준원액(stock solution) 100 EU/ml 로 제조하였다. 마개를 막고 밀봉한 후 교반기(vortex mixer)로 1000rpm이상에서 15분간 섞었다. 그 후 이 원액을 이용하여 LAL water 0.9ml에 원액 1ml를 넣고 1분 이상 교반기로 잘 섞어준 후 <표 1>과 같이 10배씩 단계별로 희석을 하였다. 표준액(standards)단계는 모두 4단계를 제조하였으며 농도 범위는 0.01 EU/ml~10 EU/ml 사이였다.

<표 1> 표준액 희석 단계

단계	Endotoxin 농도 (EU/ml)	LAL Reagent Water	Endotoxin Solution
*ST1	10	0.9ml	원액 0.1ml
ST2	1	0.9ml	ST1 0.1ml
ST3	0.1	0.9ml	ST2 0.1ml
ST4	0.01	0.9ml	ST3 0.1ml

*ST: Standard

이때 사용된 유리 시험관은 180℃에서 2시간 이상 건열 멸균하여 endotoxin free한 상태였고, 이때 사용된 pipette tip(labcon, made in U.S.A)또한 멸균(sterile)된 제품을 사용하였다. 제조된 standards를 96well microplate(endotoxin -free)에 100 μ l 씩 옮겨 담고, sample로 지정한 well에는 시료를 동일하게 100 μ l 씩 옮겨 담아 놓았다. 이때 standard NO. 1, 2번을 실험에 사용될 시료로 사용하였다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	BL										
B	ST1	ST1										
C	ST2	ST2										
D	ST3	ST3										
E	ST4	ST4										
F												
G												
H												

<그림 4> 96well microplate의 모식도.

(BL : Blank(공시료) - LAL water , ST(N) : Standard - 회색단계별 엔도톡신 표준액,  : 시료주입)

2.3.2 분석기기 설정

분석법은 비탁법(Kinetic Method)이었으며, 파장은 340nm로 단일 파장을 사용하였고, Reduction은 Onset Time법을 사용하여 OD 값은 0.03으로 설정하였다.⁴⁾ 시료를 읽어내는 간격(Interval)은 1분이었으며, 총 1시간15분 동안 76번을 읽어내도록 설정하였다. 분석 전 기기 내 microplate주입구의 온도를 설정하기 위해 incubation chamber에 Temperature Set Point 는 37℃로 맞추어 놓았다.²⁾

2.3.3 incubation

시료 및 표준액이 담긴 96well microplate는 37℃로 설정된 분석기기 내에 있는 incubation chamber에 10분 이상 넣어 두어 시료를 활성화 시켰다.²⁾

2.3.4 반응액 제조(LYSATE)

Pyrogen-5000 Reagent vial (Lot#2L168Y)을 조심스레 개봉한 후 Pyrogen-5000 Reconstitution Buffer 10.4ml를 넣고 마개를 막은 후 거품이 생기지 않도록 잘 저어 주었다. 충분히 녹인 Reagent는 8 channel multipipettor로 분배할 수 있도록 적정용기(reagent reservoir)에 조심스레 부었다. 이 모든 실험에 대한 절차는 그림 5와 같이 나타낼 수 있다.

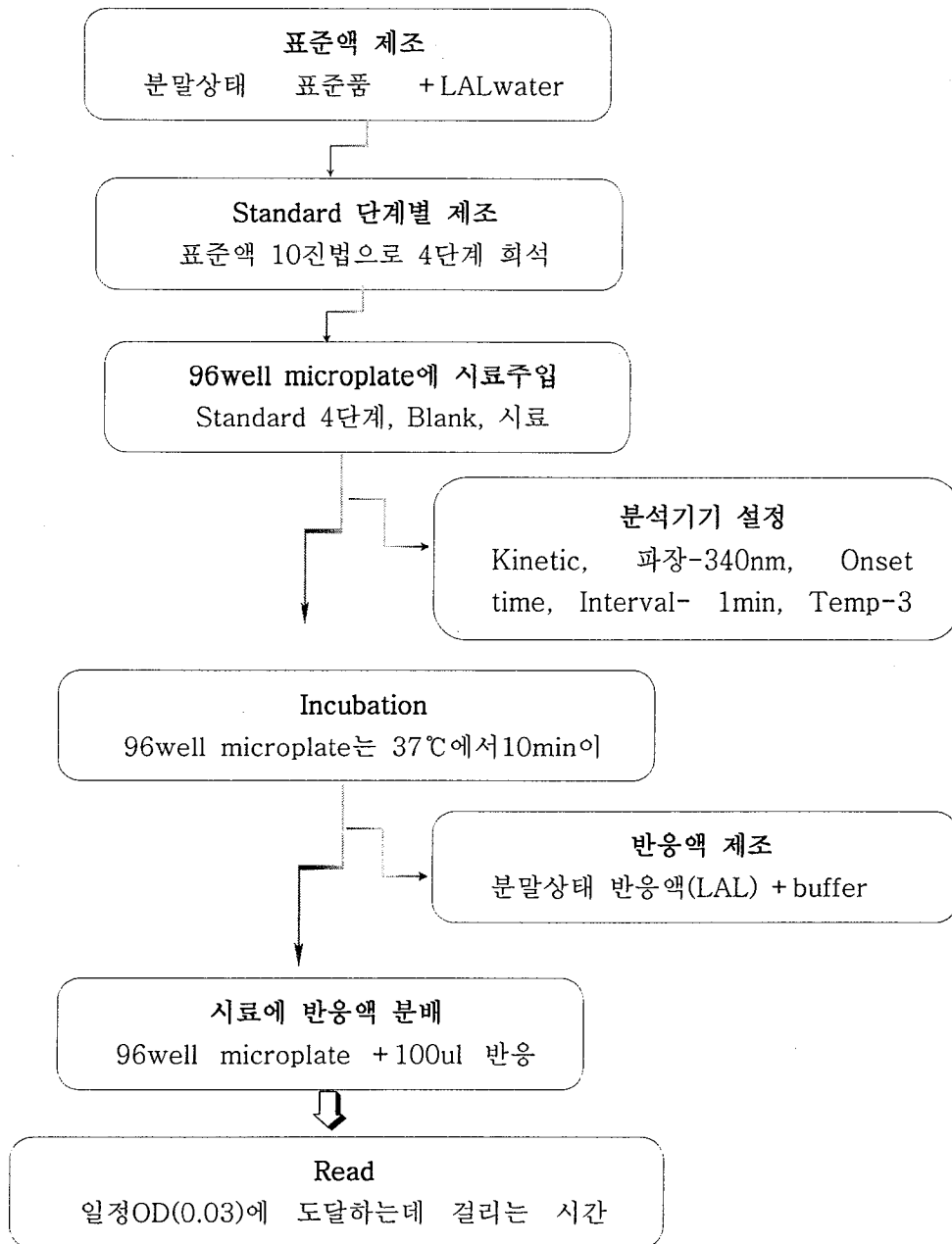
2.4 분석

분석기기내 10여 분간 Incubation 시킨 후 micromicroplate를 꺼내어 8 channel multipipettor(Biowhittaker CO., U.S.A)을 이용하여 reagent reservoir에 담긴 반응액(LAL)을 100 μ l씩 첫번째 컬럼부터 순차적으로 주입을 하였다. 주입 후 micromicroplate는 곧바로 분석기기에 넣어 일정 OD에 도달하는 시간을 측정하는 분석을 실시하였다.

반응액을 분배에 걸리는 시간은 90초, 107초, 125초, 147초, 190초로 각각 1회씩 실험하였으며, 결과값은 샘플간의 변이계수를 통해 값의 변화 정도를 비교 분석해 볼 수 있었다.

또한 현장시료인 냉각탑수(엔도톡신이 검출되었던 냉각탑수)시료도 비슷한 농도로 희석을 한 후(2 EU/ml 수준) 동일한 방법으로 실험하였다. 이때 반응액 분배에 걸리는 시간은 67초였다.

지금까지 기술한 실험방법을 요약하면 다음 그림 5와 같다.



<그림 5> 실험절차 흐름도.

3. 통계처리

자료처리는 Excel을 사용하였고, 시간별 비교분석은 SPSS 10.0 version을 사용하여 분산분석(ANOVA) 및 사후분석(Post hoc test)을 실시하였다.

III. 연구결과 및 고찰

1. 반응액(LAL) 분배에 걸리는 시간에 따른 농도변화

1.1 시간별 전체수준에서 농도변화

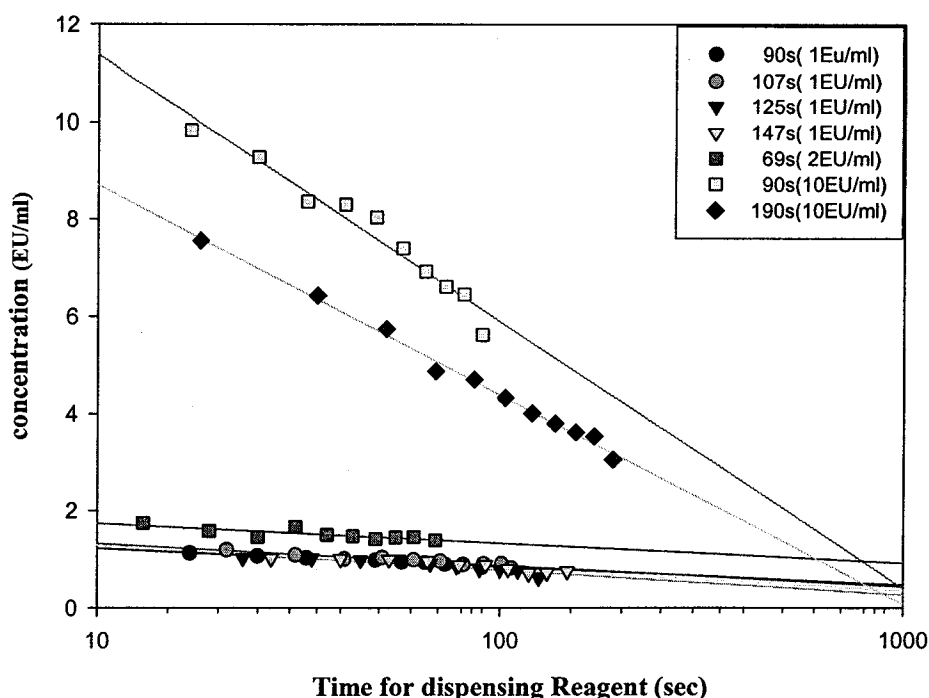
<표 2>는 표준액 1 EU/ml, 10 EU/ml와 현장시료(냉각탑수) 2 EU/ml 수준을 각각의 96Well microplate 시료부에 넣고, 전체 well에 반응액 분배 시 걸리는 시간을 각각 다르게 하여 분석한 엔도톡신 농도값이다. 동일한 시료의 농도값은 분배된 시간에 따라 다르게 나타났다고, 총 분배에 걸리는 시간이 길어질수록 농도차이가 커져 변이계수(Coefficient of Variation, C.V)가 증가하였다. 또한 농도수준에서는 1 EU/ml(저농도)수준보다 10 EU/ml(고농도)수준에서 변이가 더 컸다.

<표 2> 반응액 분배에 걸린 시간적 차이에 의한 동일시료 결과값

(단위 : EU/ml)

분배시간 (N)	1EU/ml				2EU/ml	10EU/ml	
	90s (n=86)	107s (n=85)	125s (n=83)	147s (n=86)	69s (n=86)	90s (n=82)	190s (n=86)
최대값	1.07	1.21	1.05	1.23	1.89	9.76	11.9
최소값	0.83	0.82	0.62	0.76	1.38	5.62	3.06
차이값	0.24	0.39	0.43	0.47	0.51	4.14	8.84
평균	0.98	0.99	0.89	0.90	1.53	7.94	4.46
S.D	0.10	0.13	0.15	0.16	0.17	1.39	1.40
CV(%)	10.17	12.94	17.02	17.64	10.87	17.52	31.48

<그림 6>은 반응액이 분배되는 시간에 따른 농도값 변화율을 그래프로 나타낸 것이다. 각각 농도 수준에 따라 단계별로 다르게 설정된 총 분배시간을 Column(n=12)수로 나누어 Column별 분배된 시점을 산정하여 총 12개의 “Column에 분배된 시점의 평균 농도값”을 나타내었다. 이때 1,2번 Column은 8개의 Well로 구성된 일반 Column과는 달리 3개의 well로만 구성이 되어 변이를 고려하여 그래프에서는 생략하였다. (이하 모든 그래프 동일하게 생략)



<그림 6> 컬럼에 분배된 시점에서의 농도 변화.

“엔도톡신 농도 결과값”과 “반응액 분배에 걸리는 시간”의 관계를 볼 때 분배시점이 증가함에 따라 엔도톡신 농도 결과값은 감소하는 경향을 보였다. 각각의 농도수준에 대한 결과 값은 다음과 같다.

2.2. 1 EU/ml 수준에서 시간별 농도변화

<표 3>는 동일한 시료(표준액 1 EU/ml)를 “반응액 분배에 걸리는시간”에 따라 분석한 엔도톡신 농도값으로, 컬럼에 분배된 시점에서의 농도값을 나타내었고, 이 값들 간의 유의한 차이가 있는 지를 검증하기 위해 일원변량 분석(One-way ANOVA)를 실시하여 보았다.

<표 3> 분배에 걸리는 시간에 따른 1 EU/ml 수준의 분석치

(단위 : EU/ml)

Column	90s	107s	125s	147s	평균(S.D)
1	1.073	1.210	1.050	1.225	1.139 (0.12)
2	0.987	1.136	1.043	1.126	1.067 (0.10)
3	1.126	1.195	1.024	1.017	1.091 (0.11)
4	1.069	1.085	1.019	1.003	1.045 (0.09)
5	1.029	1.007	0.981	0.994	1.002 (0.08)
6	0.998	1.036	0.993	0.968	0.999 (0.07)
7	0.985	0.987	0.901	0.880	0.939 (0.08)
8	0.945	0.960	0.855	0.886	0.936 (0.11)
9	0.934	0.887	0.799	0.797	0.854 (0.10)
10	0.897	0.909	0.785	0.714	0.826 (0.09)
11	0.901	0.915	0.773	0.724	0.829 (0.10)
12	0.828	0.824	0.622	0.755	0.758 (0.10)
평균 (S.D)	0.976 (0.10)	0.992 (0.13)	0.895 (0.15)	0.895 (0.16)	0.940 (0.14)
N	(n=86)	(n=85)	(n=83)	(n=86)	(n=340)
F값	16.452	18.897	20.107	18.551	12.237

전체적으로 컬럼 1, 2, 3번의 평균값이 높게 나타났고, 점점 감소하여 컬럼10, 11, 12번이 낮은 평균값을 보였으며, 컬럼간의 농도 변화 값은 모두 $P < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

또한, 분배시간이 다른 4번의 실험에 대해 차이를 보기 위해 분산분석을 실시한 결과 F-값이 12.237이고 유의확률 P-값이 0.000으로 유의수준 5%에서 통계적으로 유의한 차이가 있어 “분배시간”이 “농도값 변화”에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

구체적으로 각 칼럼간의 차이(분배시점 간에 따른 차이)를 살펴보기 위해 Tukey HSD 사후검증(Post hoc test)을 실시한 결과 <표 4>와 같이 나타났다. 1,3번, 2,3,4번, 2,4,5,6번, 5,6,7,8번, 9,10,11번, 10,12번이 집단군으로 유의한 차이를 보였다.($p < 0.05$)

또한 <표 5>는 분배시간에 따른 농도값의 차이에 대하여 Tukey's HSD를 이용한 사후분석 결과로 총 분배시간이 90초와 107초의 평균 농도값은 125초와 147초보다 유의미하게 컸으며, 90초와 107초 사이 및 125초와 147초 사이에는 유의미한 차이가 없었다. ($p < 0.05$)

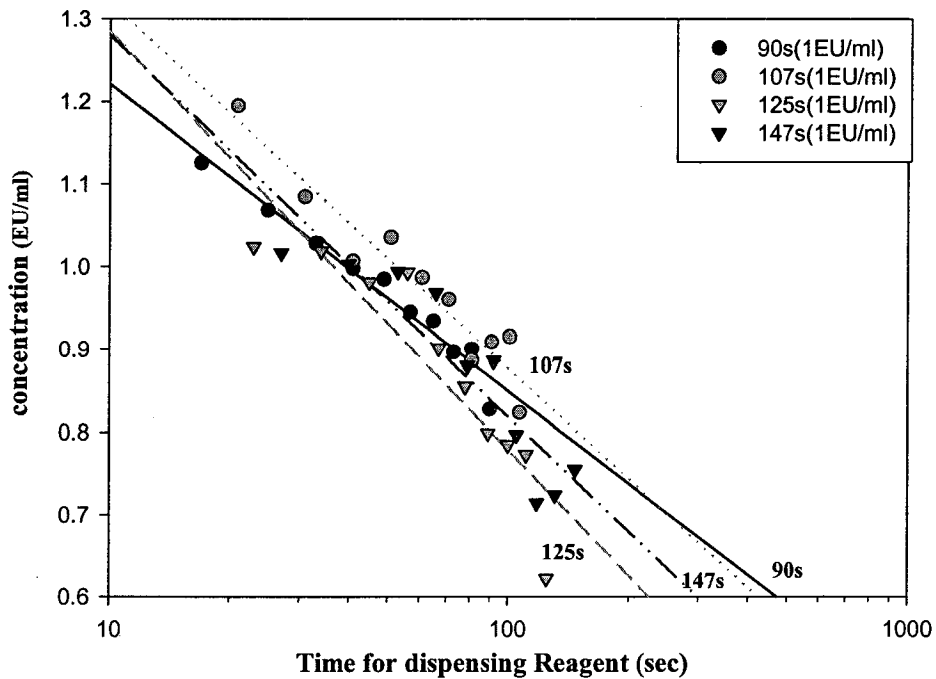
<표 4> 동일시료의 칼럼 간 차이에 대한 사후 검증 결과

칼럼	N	유의수준 = 0.05에 대한 집단군					
		1	2	3	4	5	6
1	12	1.139					
2	11		1.067	1.067			
3	32	1.091	1.091				
4	32		1.045	1.045			
5	32			1.002	1.002		
6	32			0.999	0.999		
7	32				0.939		
8	29				0.936		
9	32					0.854	
10	32					0.826	0.826
11	32					0.829	
12	32						0.758
평균		1.12	1.07	1.03	0.97	0.84	0.79

<표 5> 분배시간과 평균 농도값 변화관계의 사후검증 결과

분배시간(sec)	N	집단군	
		1	2
90	86	0.976	
107	85	0.992	
125	83		0.895
147	86		0.895
유의확률	p<0.05	0.467	1.000

다음의 <표 6>는 분배시간과 농도값의 변화의 상관관계를 확인하기 위해 회귀분석을 한 것이다. 분석 결과 주입시간과 농도값 간에는 음의 상관관계가 있음을 확인할 수 있었다.<그림 7>



<그림 7> 1 EU/ml수준의 시료의 반응액 분배시간별 농도변화.

또한 이 관계식의 평균을 산출한 결과 아래와 같은 기울기와 Y절편 값을 얻을 수 있었다. 이 식에 의하면 분배시간이 1초 증가할수록 농도값은 0.1932 EU/ml 만큼 감소한다는 것을 알 수 있었다.

<표 6> 1 EU/ml수준에서 총 분배에 걸린 시간에 따른 분석값의 상관식의 계수 ($Y=-a \times \ln(X)+b$)

분배시간(X)	a	b	R
90	-0.1611	1.5921	0.964
107	-0.1919	1.7613	0.923
125	-0.2195	1.7902	0.823
147	-0.2001	1.7405	0.840
mean	-0.1932	1.7210	0.8873
S.D	-0.0243	0.0883	0.067

2.3. 2 EU/ml 수준에서 시간별 농도변화

2 EU/ml수준의 현장시료인 냉각탑수를 가지고 반응액이 분배되는 시간에 따라 농도값의 유의한 차이가 있는 지를 검증하기 위해 일원변량 분석(One-way ANOVA)를 실시해 본 결과 <표 7>와 같이 나타났다. 이 실험의 경우도 전체 well의 분석치 중 칼럼 1, 2, 3번의 평균값이 높게 나타났고, 점점 감소하여 칼럼10, 11, 12번이 낮은 평균값을 보였으며, 칼럼간의 농도값은 $P<0.05$ 수준에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

또한 집단(칼럼) 내에는 유의한 차이를 보이지 않아 동일한 시점에 들어간 well 간에는 농도에 유의한 차이가 없어 반응액의 분배시점이 농도값 차이에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. ($p<0.05$)

<표 7> 반응액 분배 시점에 따른 2 EU/ml 수준의 분석치

(단위 : EU/ml)

Column	N	평균	표준편차
1	3	1.890	0.110
2	3	1.700	0.082
3	8	1.741	0.125
4	8	1.578	0.108
5	8	1.454	0.112
6	8	1.666	0.143
7	8	1.498	0.091
8	8	1.471	0.109
9	8	1.415	0.085
10	8	1.446	0.092
11	8	1.449	0.075
12	8	1.383	0.140
평균	86	1.530	0.167
F값			11.131*

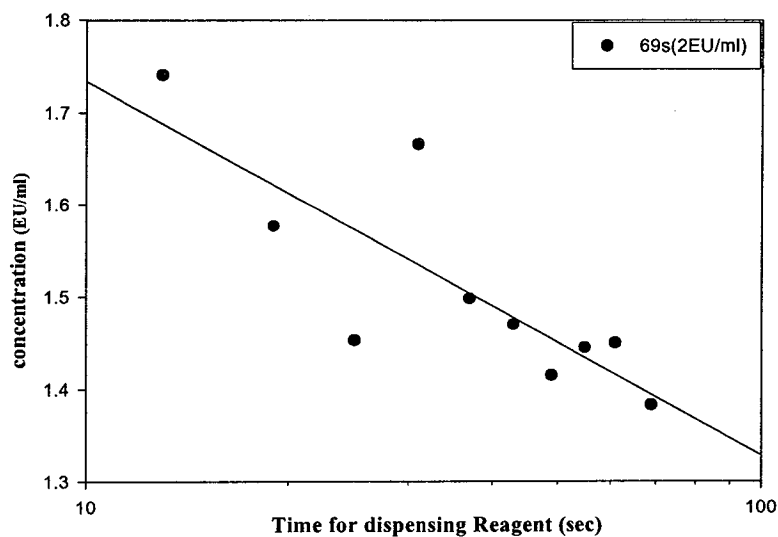
*p<0.05

구체적으로 각 칼럼간의 차이(반응액 분배시점 간의 차이)를 살펴보기 위해 Tukey HSD 사후검증(Post hoc test)를 실시한 결과 <표 8>과 같이 나타났다. 1, 3번(평균 : 1.816), 2, 3, 4, 6번(평균 : 1.671), 4,6,7번(평균 : 1.580) 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12번 칼럼(평균 : 1.462)이 집단군으로 유의한 차이를 보였다.(p<0.05)

분배시간과 농도값의 변화가 상관관계성은 R=0.6726으로 음의 상관성을 가지고 있었으며 관계식은 $Y = -0.176 \ln(X) + 2.1395$ 로 산출되었다.

<표 8> 동일시료의 칼럼 간 차이에 대한 사후 검증 결과

칼럼	N	유의수준 = 0.05에 대한 집단군			
		1	2	3	4
1	3	1.890			
2	3		1.700		
3	8	1.741	1.741		
4	8		1.578	1.578	1.578
5	8				1.454
6	8		1.666	1.666	
7	8			1.498	1.498
8	8				1.471
9	8				1.415
10	8				1.446
11	8				1.449
12	8				1.383
평균	86	1.816	1.671	1.580	1.462



<그림 8> 2 EU/ml 수준의 시료의 분배시간별 농도변화.

2.4 10 EU/ml 수준에서 시간별 농도변화

10 EU/ml수준의 표준액을 가지고 반응액이 분배되는 시간에 따라 농도값의 유의한 차이가 있는 지를 검증하기 위해 일원변량 분석(One-way ANOVA)를 실시해 본 결과 <표 9>와 같이 나타났다. 두 실험 모두 전체적으로 칼럼 1, 2, 3번의 평균값이 높게 나타났고, 점점 감소하여 칼럼10, 11, 12번이 낮은 평균값을 보였으며, 칼럼간의 농도값은 $P < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다.($p < 0.05$)

평균 농도값은 반응액 분배시간이 90초일 때 7.939로 190초일 때의 4.786보다 높았다. 두 집단간 차이를 검증하기 위해 t-검정을 한 결과 대응표본 검정 통계량의 t-값이 19.336이고, 유의확률 p-값이 0.000으로 유의수준 0.95보다 작게 나타나 반응액 분배시간을 다르게 한 경우에 두 집단간 차이가 있다고 판단되었다.

구체적으로 각 칼럼간의 차이와 반응액 분배시간 간의 차이를 살펴보기 위해 Tukey HSD 사후검증(Post hoc test)를 실시한 결과 <표 10, 11>과 같이 나타났다.($p < 0.05$)

반응액 분배시간과 농도값 변화의 상관관계를 확인하기 위해 회귀분석을 실시하여 <표 12>와 같은 결과를 얻었다. 분석 결과 주입 시간과 농도값 간에는 음의 상관관계로 위 실험과 동일한 결과를 얻었다(<그림 9> 참조).

<표 9> 분배에 걸리는 시간에 따른 10 EU/ml 수준의 분석치

(단위 : EU/ml)						
column	90sec			190sec		
	N	평균	표준편차	N	평균	표준편차
1	3	9.757	0.306	2	9.450	0.000
2	3	9.913	0.248	3	7.560	0.862
3	8	9.833	0.927	8	6.433	0.524
4	8	9.274	0.898	8	5.744	0.467
5	8	8.359	0.818	8	4.881	0.407
6	8	8.296	0.333	8	4.715	0.388
7	8	8.029	0.400	8	4.336	0.349
8	8	7.403	0.282	8	4.019	0.350
9	8	6.925	0.722	8	3.808	0.294
10	8	6.620	0.366	8	3.621	0.226
11	8	6.453	0.583	8	3.536	0.237
12	4	5.625	0.122	8	3.056	0.128
평균	82	7.939	1.391	85	4.786	1.915
F값			31.821			38.507

<표 10> 반응액 분배시간이 90초일 때 칼럼 간 사후 검증 결과

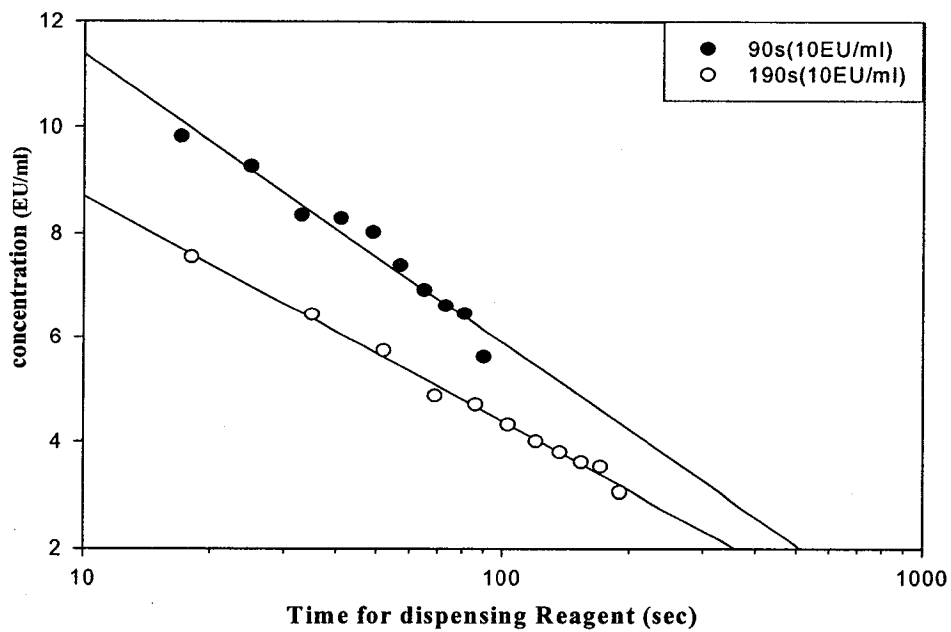
칼럼	N	유의수준 = 0.05에 대한 집단군				
		1	2	3	4	5
1	3	9.757				
2	3	9.913				
3	8	9.833				
4	8	9.274	9.274			
5	8		8.359	8.3588		
6	8		8.296	8.2963		
7	8			8.0288		
8	8			7.403	7.403	
9	8				6.925	
10	8				6.62	6.62
11	8				6.453	6.453
12	4					5.625
평균	82	9.694	8.643	8.022	6.850	6.233

<표 11> 반응액 분배시간이 190초일때 칼럼 간 사후 검증 결과

칼럼	N	유의수준 = 0.05에 대한 집단군					
		1	2	3	4	5	6
1	3	11.9					
2	3		7.560				
3	8		6.433	6.433			
4	8			5.744	5.744		
5	8				4.881	4.881	
6	8				4.715	4.715	
7	8					4.336	4.336
8	8					4.019	4.019
9	8					3.808	3.808
10	8					3.621	3.621
11	8					3.536	3.536
12	8						3.056
평균	86	11.9	6.996	6.088	5.113	4.131	3.729

<표 12> 10 EU/ml수준에서 총 분배에 걸린 시간에 따른 분석값의
상관식의 계수 ($Y = -a \times \ln(X) + b$)

분배시간(X)	a	b	R
90	-2.383	16.870	0.956
190	-1.873	13.021	0.994
mean	-2.128	14.946	0.975
S.D	-0.360	2.722	0.027



<그림 9> 10 EU/ml 수준에서 반응액 분배시간별 농도변화.

2. 시료의 농도수준에 따른 농도변화 비교

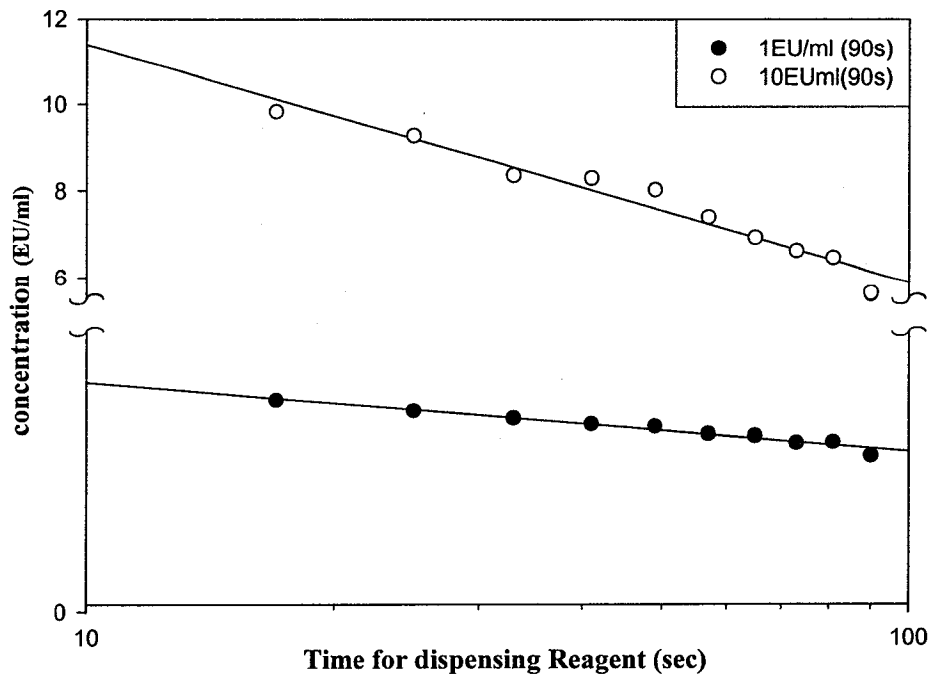
실험을 통해 반응액(LAL) 분배시간이 분석되는 농도값에 변화를 주어 재현성에 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 그러나 영향인자인 반응액 분배시간이 동일하다 하더라도 시료의 농도수준에 따라 변이정도가 달랐다. <표 13>은 반응액이 분배되는 시간이 90초로 동일했던 두 실험을 비교한 것이다.

시료 1 EU/ml의 평균 반응시간은 830초 이었고, 시료 10 EU/ml의 평균 반응시간은 435초로 농도가 10배 증가할 때, 반응시간은 대략 2배 감소하였다. 이때 시료 간 변이계수는 1 EU/ml에서는 10.17%, 10 EU/ml에서는 17.5%로 약 1.9배(86%) 증가하였다. <표 11>

반응액 분배에 걸린시간 90초는 1 EU/ml시료의 반응시간의 10.8%에 해당하며, 10 EU/ml 시료의 반응시간의 20.7%로 분배시간과 반응시간의 비율이 큰 쪽이 그 비율정도로 변이가 커 분배시간에 더 민감하게 반응함을 알 수 있었다<그림 10>. 즉, 농도가 높을수록 반응시간은 적고, 반응액 분배시간이 반응시간(OD 0.03에 도달할 때 시간)에 대한 비율이 커지기 때문에 변이가 커지게 됨을 알 수 있었다.

<표 13> 분배시간이 90초로 동일할 때 농도별 결과값의 변이

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	C.V (%)
(sec)	808	826	797	809	817	824	827	836	839	847	846	865	830	22.43	
1EU/ml															10.17
(EU/ml)	1.07	0.99	1.13	1.07	1.03	1.00	0.98	0.94	0.93	0.90	0.90	0.83	0.98	0.10	
(sec)	413	411	412	418	429	429	432	441	448	452	456	470	435	18.26	
10 EU/ml															17.50
(EU/ml)	9.76	9.91	9.83	9.27	8.36	8.30	8.03	7.40	6.93	6.62	6.45	5.62	7.94	1.39	



<그림 10> 반응액 분배시간이 동일할 때 농도수준별 결과값 변화.

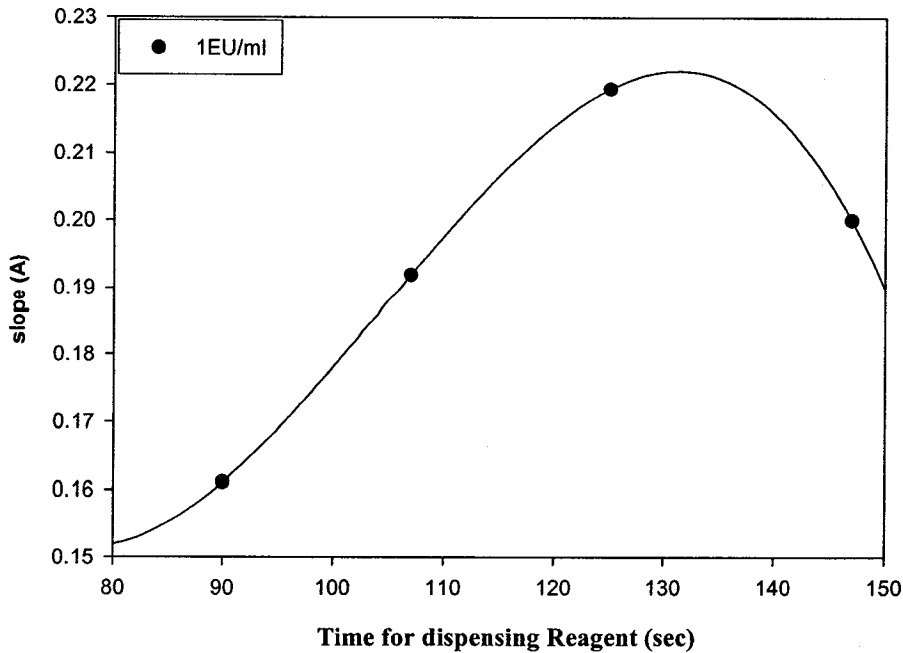
3. 보정방정식 계산

반응액 분배시간과 농도변화에 대한 회귀방정식을 통해 각각에 대한 기울기 값을 구해본 결과 아래와 같이 정리 할 수 있었다.

1) 반응액 분배시간과 기울기 값에 대한 상관성을 보게 되면 <그림 11>과 같이 기울기 값은 점점 증가하다가 일정시점에서 다시 감소하게 된다. 이것은 1 EU/ml수준의 기울기 값 변화이며, 10 EU/ml수준의 기울기 값은 2개 뿐이라 그래프까지는 그릴 수 없었다. 하지만 여기서도 기울기 값을 보면 분배시간이 90초 일 때 기울기 값 보다 190초일 때 기울기 값이 더 작아 졌음을 확인 할 수 있었다.

<표 14> 분배시간에 따른 상관식

농도수준(EU/ml)	분배시간(sec)	상관식
1	90	$0.161 \cdot \ln(X) + 1.592$
1	107	$0.192 \cdot \ln(X) + 1.761$
1	125	$0.220 \cdot \ln(X) + 1.790$
1	147	$0.200 \cdot \ln(X) + 1.741$
10	90	$2.383 \cdot \ln(X) + 16.870$
10	190	$1.873 \cdot \ln(X) + 13.021$



<그림 11> 1 EU/ml 수준의 분배시간과 기울기값의 관계.

2) 또한 기울기 값은 반응액 분배시간의 변수와 함께 농도수준과도 상관성이 있었다. 분배시간이 동일하게 설정되었던 90초의 기울기 값은 1 EU/ml의 0.1611보다 10 EU/ml의 2.3832이 더 컸다. 분배시간이 동일한 비교점이 90초뿐인 관계로 이 연구에서는 기울기 값과 농도와의 관계를 나타내는 식을 유도 해내는 데는 제한이 있었다.

3) 종합적으로 볼 때 기울기 값(농도변화량)은 분배시간이 늘어남에 따라 일정수준 증가하다 감소하며, 농도수준이 클수록 기울기 값은 커 농도수준에 따라서도 기울기 값은 변화하였다. 본 연구에서는 이러한 관계에 대한 유도식을 제시하기는 농도수준에 따른 실험 횟수가 제한되어 유도할 수는 없었다. 이에 아래와 같은 방법을 제안하고자 한다.

<표 15>는 분석기기가 읽어낸 실측값으로 칼럼별 평균반응시간 값이다.

<표 15> OD 0.03에 도달했을 때 반응시간으로 기기 실측값

	1 EU/ml				10 EU/ml	
	90s	107s	125s	147s	90s	190s
1	808	668	841	721	413	360
2	826	681	842	737	411	386
3	797	670	846	759	412	405
4	809	689	847	761	418	419
5	817	704	855	764	429	440
6	824	698	853	768	429	444
7	827	708	874	788	432	455
8	836	714	865	787	441	466
9	839	731	901	811	448	473
10	847	725	906	835	452	480
11	846	724	909	832	456	484
12	865	746	961	823	470	505
차이값*	57	78	120	102	57	145
보정치**	5	7	11	9	5	13

* 차이값 = (1번칼럼 반응시간)-(12번칼럼 반응시간)

**보정치 = (차이값)/(n-1)

여기서 가장 먼저 반응액이 들어간 시료(1번)와 마지막에 들어간 시료(12)의 값의 차이를 구한 “차이값”은 “분배에 걸린 시간”과 차이가 나는 것을 볼 수 있다. 이 차이에 대한 해석은 더 연구해 볼 필요가 있겠지만 여기서 말할 수 있는 것은 반응액 분배에 걸리는 시간에 따라 기기의 반응시간 값의 차이이다. 즉 처음값과 마지막 값을 직선으로 연결했을 때 값차이의 높이 즉 기울기 값이다. 이 차이의 정도를 칼럼 수(n-1=11)로 나누어 나온 값만큼 실측 반응시간 값을 보정해 준다면 농도값의 변이를 줄일 수 있다.

$$Y = TRi - Ti(Ci - 1)$$

Y: 보정된 반응시간 (설정된 OD값에 도달한 시간)

TRi: i번째 칼럼 반응시간

Ci: 칼럼순번(번호)

$$Ti = \frac{12\text{번째 칼럼 반응시간} - 1\text{번째 칼럼 반응시간}}{12(\text{총칼럼수}) - 1}$$

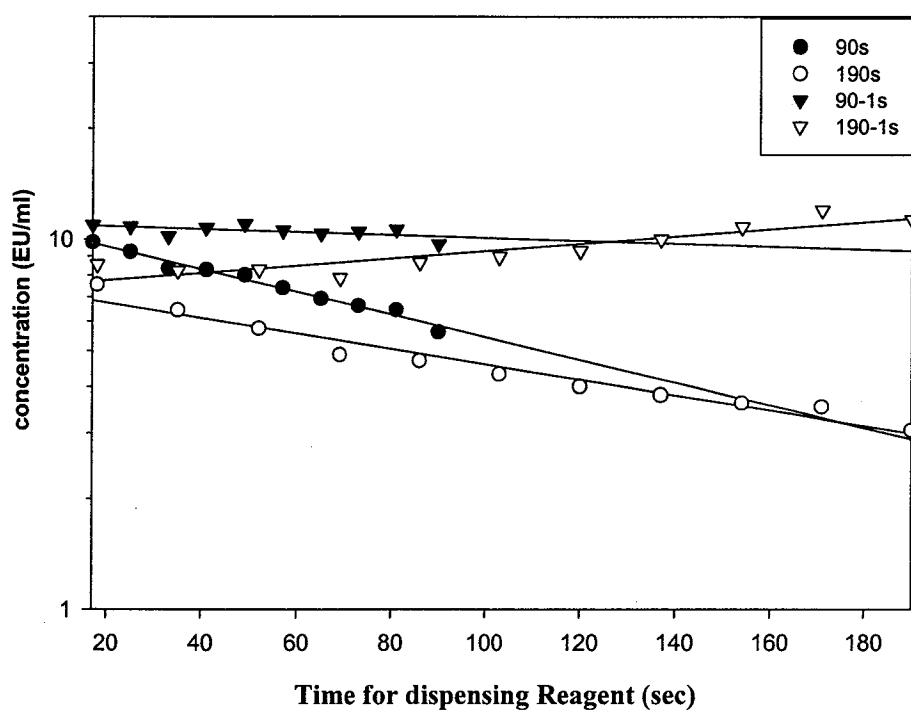
칼럼별 평균반응시간의 보정값은 <표 16>와 같으며, 이 값을 가지고 검량선에서 산출된 회귀방정식에 대입하여 농도를 산출해 낸 농도값은 <표 17>와 같이 실제 분석된 값과 비교해 볼 수 있다. 그 결과 전반적으로 평균값은 증가하였고, 표준편차도 감소하여 변이계수가 10% 이내로 값에 대한 재현성이 크게 향상되었다. <그림 12. 13>

<표 16> 반응시간 보정값

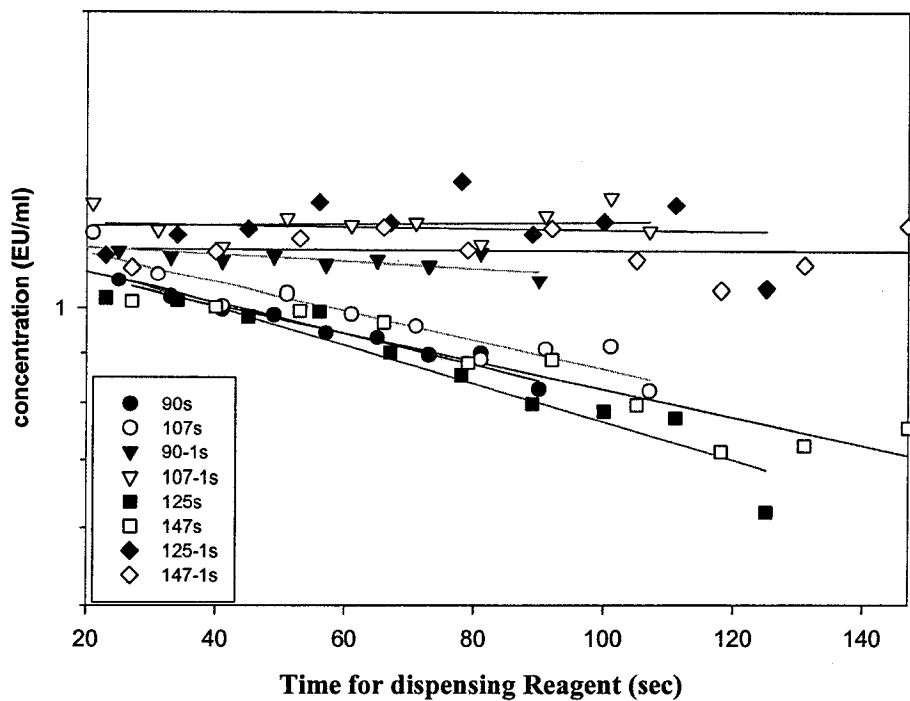
	1 EU/ml				10 EU/ml	
	90s	107s	125s	147s	90s	190s
1	808	668	841	721	413	360
2	821	674	831	728	406	373
3	787	656	824	740	402	379
4	793	668	814	733	402	377
5	796	676	811	727	408	387
6	798	663	798	722	403	378
7	796	665	809	732	401	376
8	800	664	789	722	405	374
9	798	674	814	737	407	368
10	800	661	808	752	405	361
11	794	653	800	739	404	352
12	808	668	841	721	413	360
평균	800	666	815	731	406	370

<표 17> 실측값과 보정값의 비교

시간	전체	실측값			보정값		
		평균	표준편차	C.V(%)	평균	표준편차	C.V(%)
1	90s	0.98	0.10	10.17	1.11	0.05	4.07
	107s	0.99	0.13	12.94	1.22	0.04	3.64
	125s	0.89	0.15	17.02	1.19	0.09	7.82
	147s	0.90	0.16	17.64	1.16	0.05	4.72
10	90s	7.94	1.39	17.52	10.48	0.43	4.06
	190s	4.46	1.40	31.48	8.63	0.82	9.47



<그림 12> 10 EU/ml 실측값과 보정값.



<그림 13> 1 EU/ml 실측값과 보정값.

IV. 결론

본 연구에서는 반응액을 분배하는데 걸리는 시간이 분석값에 미치는 영향의 정도를 파악하고자 반응액 주입시간을 달리하여 그 영향정도를 살펴보고, 반응액 주입시간에 시간별 농도값에 미치는 정도로부터 반응액 주입시간 차이를 고려하여 분석결과를 보정하는 방안을 모색하였다. 주요 연구결과는 다음과 같다.

1. 비탁법을 이용한 엔도톡신의 분석방법에서 반응액을 분배하는데 걸리는 시간 차이가 엔도톡신의 농도분석 결과에 통계적으로 유의한 정도의 영향을 미쳤다. 분배에 걸린 시간이 길수록 분석결과와 농도차이는 큰 것으로 나타났다..

2. 반응액은 8 channel multipipettor로 분배를 하였고, 96well microplate는 8개의 well이 한 컬럼으로 12개의 컬럼으로 구성되어 있어 12개의 컬럼은 반응액이 분배되는 시점이 달라지므로 12개의 컬럼에 대한 차이를 확인해 본 결과, 반응액이 분배된 시점이 앞인 1, 2, 3의 컬럼의 농도가 반응액이 분배되는 시점이 뒤인 10, 11, 12컬럼의 농도보다 높았고, 농도값은 순차적으로 감소하는 경향을 나타냈다.

3. 반응액 주입시간의 차이가 미치는 영향은 저농도인 1 EU/ml 수준보다 고농도인 10 EU/ml 수준에서 더 큰 것으로 나타났다. 96 well microplate에 반응액을 분배하는 걸리는 시간은 90초로 하였을 경우 고농도 수준(10 EU/ml)에서는 변이계수가 17.5%였으며, 저농도 수준((1 EU/ml)에서는 10.2%로 나타났다.

4. 반응액 분배시간에 따른 분석결과의 오차를 보정하는 보정식을 유도하여 적용한 결과, 오차가 크게 감소되어 정확도를 높일 수 있었다(CV <10%).

참고문헌

- 1) American Society for Testing and Materials(ASTM). "Standard Practice for Personal Sampling and Analysis of Endotoxin in Metal Removal Fluid Aerosols in Workplace Atmospheres". Standards method, ASTM : E2144-01. 2001
- 2) BOWHITTAKER, Limulus Amebocyte Lysate, Pyrogen R-5000, A Cambrex Company, Catalog No. N383, N384 License No. 709
- 3) Geoffrey A. Clark "Assessment and Sampling Approaches for Indoor Microbiological Assessments", AIHA Technical Exchange, The Synergist November, P21-22. 2001
- 4) Janet Macher, Sc.D., M.P.H. "Enotoxin and Ohter Bacterial Cell-Wall Components", Bioaerosols :Assessment and Control, ACGIH :22-1
- 5) Peter s. Thorne, Karen H, Bartlett, John Phipps, et.al., "Evaluation of Five Extraction Protocols for Quantification of Endotixin in MetalWorking Fluid Aerosol", Ann. occup. Hyg., Vol 47, No 1, p31-36. 2003
- 6) U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, "Guideline on validation of the limulus amebocyte lysate test as an end-product endotoxin test

for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices". FDA Guideline. 1987

7) Yuji Haishima, Chie Hasegawa, et. al., "Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxins", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 32, p495-503. 2003

8) <http://www.endosafe.co.kr/lal.html> : What's LAL - Bacterial Endotoxin

9) 박동욱, 한인영, 윤충식, 박두용. "금속가공유 시료에서 일부 Optical Density 설정값에 따른 엔도톡신의 정량", 분석과학학회지, 15-5. 2002

10) 식품안전청, 대한 약전 27항 "엔도톡신 시험법"

부 록

1. 1 EU/ml (90sec)

1) 반응시간 결과

sec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	796	798	802	810	814	823	806	840	849	859	820	22.33	2.72
b	st1	st1	807	809	817	824	835	846	842	847	845	880	835	21.97	2.63
c	st2	st2	786	793	796	808	818	827	843	839	833	854	820	23.27	2.84
d	st3	st3	791	808	818	827	824	837	848	852	855	865	833	23.19	2.79
e	st4	st4	793	802	820	826	815	824	803	836	840	856	822	19.29	2.35
f	807	838	791	805	823	825	825	832	848	859	849	863	830	22.27	2.68
g	799	811	810	817	823	831	832	838	849	844	836	868	830	19.18	2.31
h	818	830	805	840	838	837	850	859	875	860	862	875	846	21.78	2.58
mean	808	826	797	809	817	824	827	836	839	847	846	865	total mean		830
S.D	9.54	13.87	8.80	14.48	13.03	9.87	12.09	12.21	23.81	9.11	9.72	9.07	total S.D		22.43
c.v(%)	1.18	1.68	1.10	1.79	1.59	1.20	1.46	1.46	2.84	1.08	1.15	1.05	total C.V		2.70

2) 농도계산 결과

EU/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	1.13	1.12	1.10	1.06	1.04	1.00	1.08	0.93	0.89	0.85	1.02	0.10	9.87
b	st1	st1	1.08	1.07	1.03	1.00	0.95	0.90	0.92	0.90	0.90	0.77	0.95	0.09	9.75
c	st2	st2	1.19	1.15	1.13	1.07	1.02	0.98	0.91	0.93	0.96	0.87	1.02	0.11	10.81
d	st3	st3	1.16	1.07	1.02	0.98	1.00	0.94	0.89	0.88	0.87	0.83	0.96	0.10	10.64
e	st4	st4	1.15	1.10	1.01	0.99	1.04	1.00	1.10	0.94	0.93	0.86	1.01	0.09	8.74
f	1.08	0.93	1.16	1.09	1.00	0.99	0.99	0.96	0.89	0.85	0.89	0.83	0.97	0.10	10.33
g	1.12	1.06	1.06	1.03	1.00	0.96	0.96	0.93	0.89	0.91	0.94	0.82	0.97	0.08	8.61
h	1.02	0.97	1.09	0.93	0.93	0.94	0.88	0.85	0.79	0.85	0.84	0.79	0.91	0.09	9.98
mean	1.07	0.99	1.13	1.07	1.03	1.00	0.98	0.94	0.93	0.90	0.90	0.83	total mean		0.98
S.D	0.05	0.06	0.05	0.07	0.06	0.05	0.05	0.05	0.10	0.04	0.04	0.03	total S.D		0.10
c.v(%)	4.35	6.46	4.10	6.36	6.01	4.62	5.42	5.36	10.92	3.98	4.37	3.90	total C.V		10.17

2. 1 EU/ml (107sec)

1) 반응시간 결과

sec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	656	666	680	671	685	689	704	707	716	729	691	23.28	3.37
b	st1	st1	657	695	700	691	712	718	727	723	724	757	710	26.58	3.74
c	st2	st2	654	675	690	686	686	708	722	715	709	743	699	25.49	3.65
d	st3	st3	680	680	703	711	708	717	737	731	730	752	715	23.70	3.32
e	st4	st4	668	686	705	699	710	706	732	720	724	748	710	22.89	3.23
f	683	703	674	700	715	711	716	722	740	737	731	751	715	22.99	3.21
g	677	659	689	692	722	713	716	727	737	734	724	750	712	27.04	3.80
h	644	F	680	719	719	706	735	724	746	736	733	740	716	30.22	4.22
mean	668	681	670	689	704	698	708	714	731	725	724	746	total mean		709
S.D	20.66	31.61	13.05	16.28	14.29	14.76	16.45	12.32	13.10	10.88	8.14	8.57	total S.D		25.79
c.v(%)	3.09	4.64	1.95	2.36	2.03	2.11	2.32	1.73	1.79	1.50	1.12	1.15	total C.V		3.64

*F : fault

2) 농도계산 결과

EU/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	1.28	1.21	1.13	1.18	1.10	1.08	1.00	0.99	0.95	0.89	1.08	0.12	11.40
b	st1	st1	1.27	1.05	1.02	1.07	0.97	0.94	0.90	0.92	0.92	0.79	0.98	0.13	13.29
c	st2	st2	1.29	1.16	1.08	1.10	1.10	0.99	0.92	0.95	0.98	0.84	1.04	0.13	12.61
d	st3	st3	1.13	1.13	1.01	0.97	0.99	0.94	0.86	0.88	0.89	0.80	0.96	0.11	11.51
e	st4	st4	1.20	1.10	1.00	1.03	0.98	0.99	0.88	0.93	0.92	0.82	0.99	0.11	11.22
f	1.12	1.01	1.17	1.03	0.95	0.97	0.95	0.92	0.85	0.86	0.88	0.81	0.96	0.11	11.25
g	1.15	1.26	1.08	1.06	0.92	0.96	0.95	0.90	0.86	0.87	0.91	0.81	0.98	0.13	13.68
h	1.36	F	1.13	0.94	0.94	0.99	0.87	0.92	0.83	0.87	0.88	0.85	0.96	0.16	16.52
mean	1.21	1.14	1.19	1.08	1.01	1.04	0.99	0.96	0.89	0.91	0.92	0.82	total mean		0.99
S.D	0.13	0.18	0.08	0.09	0.07	0.08	0.08	0.06	0.06	0.05	0.04	0.03	total S.D		0.13
c.v(%)	10.95	15.81	6.64	7.91	7.06	7.47	8.01	6.11	6.37	5.19	3.90	4.02	total C.V		12.94

3. 1 EU/ml (125sec)

1) 반응시간 결과

sec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	848	840	839	841	855	785	891	897	913	946	866	46.13	5.33
b	st1	st1	845	844	859	851	872	880	904	911	897	970	883	38.90	4.40
c	st2	st2	832	838	836	835	857	F	895	894	889	954	870	41.28	4.74
d	st3	st3	850	845	864	885	874	885	932	902	913	983	893	41.50	4.65
e	st4	st4	829	839	853	854	874	881	894	901	905	961	879	38.86	4.42
f	840	850	852	878	860	863	876	F	898	901	905	966	881	35.95	4.08
g	857	830	851	829	855	819	892	F	897	893	899	965	871	42.61	4.89
h	825	845	859	863	876	878	891	896	901	946	954	943	890	41.08	4.62
mean	841	842	846	847	855	853	874	865	901	906	909	961	total mean		879
S.D	16.03	10.38	10.27	15.86	13.04	21.90	13.30	45.22	12.90	17.46	19.67	12.92	total S.D		40.10
c.v(%)	1.91	1.23	1.21	1.87	1.52	2.57	1.52	5.23	1.43	1.93	2.16	1.34	total C.V		4.56

*F : fault

2) 농도계산 결과

EU/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	1.01	1.05	1.06	1.05	0.98	1.37	0.84	0.81	0.76	0.66	0.96	0.20	20.87
b	st1	st1	1.03	1.03	0.96	1.00	0.91	0.88	0.79	0.76	0.81	0.60	0.88	0.14	15.70
c	st2	st2	1.09	1.06	1.07	1.07	0.97	Limit	0.82	0.82	0.84	0.64	0.93	0.16	16.99
d	st3	st3	1.00	1.03	0.94	0.86	0.90	0.86	0.70	0.79	0.76	0.57	0.84	0.14	16.69
e	st4	st4	1.11	1.06	0.99	0.99	0.90	0.87	0.82	0.80	0.79	0.62	0.89	0.15	16.26
f	1.05	1.00	1.00	0.88	0.96	0.95	0.89	Limit	0.81	0.80	0.78	0.61	0.88	0.13	14.47
g	0.97	1.10	1.00	1.11	0.98	1.16	0.83	Limit	0.81	0.83	0.80	0.61	0.93	0.16	17.78
h	1.13	1.03	0.96	0.95	0.89	0.88	0.84	0.82	0.80	0.66	0.64	0.67	0.85	0.15	17.66
mean	1.05	1.04	1.02	1.02	0.98	0.99	0.90	0.96	0.80	0.79	0.77	0.62	total mean		0.89
S.D	0.08	0.05	0.05	0.07	0.06	0.10	0.05	0.23	0.04	0.05	0.06	0.03	total S.D		0.15
c.v(%)	7.43	4.89	4.83	7.01	5.98	10.02	5.94	23.98	5.26	6.97	7.88	5.26	total C.V		17.02

4.1 EU/ml (147sec)

1) 반응시간 결과

sec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	744	734	748	752	793	774	778	813	823	782	774	29.84	3.85
b	st1	st1	771	757	788	781	814	821	812	847	819	857	807	32.22	3.99
c	st2	st2	713	730	747	763	764	773	791	841	804	826	775	40.63	5.24
d	st3	st3	753	774	754	761	790	790	850	856	863	844	803	44.94	5.59
e	st4	st4	786	784	725	768	776	774	795	847	809	823	789	33.21	4.21
f	716	744	780	784	792	774	783	789	856	810	826	811	789	36.51	4.63
g	743	724	739	774	772	771	794	775	812	843	862	828	786	42.70	5.43
h	704	743	787	754	782	772	793	800	797	822	851	810	785	38.63	4.92
mean	721	737	759	761	764	768	788	787	811	835	832	823	total mean	788	
S.D	19.94	11.06	26.40	21.19	23.53	9.03	14.68	16.99	28.15	17.41	23.22	22.56	total S.D	37.73	
c.v(%)	2.77	1.50	3.48	2.78	3.08	1.18	1.86	2.16	3.47	2.09	2.79	2.74	total C.V	4.79	

2) 농도계산 결과

EU/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	1.09	1.14	1.06	1.04	0.86	0.94	0.92	0.79	0.75	0.90	0.95	0.13	13.81
b	st1	st1	0.95	1.02	0.88	0.91	0.78	0.76	0.79	0.68	0.76	0.65	0.82	0.12	14.67
c	st2	st2	1.27	1.16	1.07	0.99	0.98	0.94	0.87	0.69	0.82	0.74	0.95	0.18	19.04
d	st3	st3	1.04	0.94	1.04	1.00	0.87	0.87	0.67	0.65	0.63	0.69	0.84	0.17	19.87
e	st4	st4	0.89	0.90	1.19	0.97	0.93	0.94	0.85	0.67	0.80	0.75	0.89	0.14	15.80
f	1.25	1.09	0.91	0.90	0.86	0.94	0.90	0.88	0.65	0.79	0.74	0.79	0.89	0.16	17.68
g	1.09	1.20	1.11	0.94	0.95	0.95	0.86	0.93	0.79	0.69	0.63	0.73	0.91	0.18	19.32
h	1.33	1.09	0.88	1.04	0.90	0.95	0.86	0.83	0.84	0.75	0.66	0.80	0.91	0.18	19.33
mean	1.23	1.13	1.02	1.00	0.99	0.97	0.88	0.89	0.80	0.71	0.72	0.76	total mean	0.90	
S.D	0.12	0.06	0.13	0.10	0.11	0.04	0.06	0.07	0.10	0.06	0.07	0.08	total S.D	0.16	
c.v(%)	9.89	5.62	13.23	10.44	11.51	4.35	6.81	7.57	12.11	7.78	10.07	10.27	total C.V	17.64	

5. 10 EU/ml (90sec)

1) 반응시간 결과

sec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	409	424	413	425	429	435	429	452	459	F	431	16.35	3.80
b	st1	st1	406	414	437	428	432	443	456	453	451	F	436	17.19	3.95
c	st2	st2	400	402	423	424	428	436	441	453	451	F	429	18.86	4.40
d	st3	st3	407	427	424	436	429	443	461	452	454	F	437	17.21	3.94
e	st4	st4	408	410	424	427	429	439	441	447	449	470	434	18.79	4.33
f	412	408	417	431	429	428	431	440	447	453	454	474	435	19.05	4.38
g	416	412	423	414	434	430	437	440	453	445	446	469	435	17.10	3.93
h	410	412	428	422	445	434	443	448	458	466	480	468	443	22.53	5.09
mean	413	411	412	418	429	429	432	441	448	452	456	470	total mean		435
S.D	3.11	2.44	9.51	9.44	10.01	4.13	5.30	4.00	10.72	6.11	10.73	2.42	total S.D		18.26
c.v(%)	0.75	0.59	2.31	2.26	2.34	0.96	1.23	0.91	2.39	1.35	2.35	0.52	total C.V		4.19

*F : fault

2) 농도계산 결과

EU/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	10.14	8.67	9.70	8.64	8.27	7.78	8.28	6.65	6.22	F	8.26	1.27	15.38
b	st1	st1	10.40	9.60	7.66	8.33	8.06	7.26	6.40	6.60	6.71	F	7.89	1.38	17.46
c	st2	st2	11.08	10.85	8.83	8.70	8.39	7.71	7.36	6.59	6.70	F	8.47	1.63	19.20
d	st3	st3	10.35	8.46	8.73	7.75	8.24	7.24	6.13	6.64	6.49	F	7.78	1.33	17.11
e	st4	st4	10.25	9.98	8.72	8.46	8.30	7.51	7.37	6.94	6.84	5.64	8.00	1.43	17.92
f	9.78	10.20	9.31	8.13	8.27	8.40	8.10	7.42	6.99	6.56	6.54	5.45	7.93	1.41	17.83
g	9.44	9.77	8.80	9.58	7.90	8.17	7.66	7.41	6.57	7.12	6.99	5.68	7.92	1.28	16.15
h	10.05	9.77	8.33	8.92	7.06	7.92	7.21	6.89	6.30	5.86	5.13	5.73	7.43	1.60	21.47
mean	9.76	9.91	9.83	9.27	8.36	8.29	8.03	7.40	6.92	6.62	6.45	5.62	total mean		7.94
S.D	0.31	0.25	0.93	0.90	0.82	0.33	0.40	0.28	0.72	0.37	0.58	0.12	total S.D		1.39
c.v(%)	3.17	2.53	9.45	9.69	9.77	4.02	4.99	3.80	10.44	5.52	9.04	2.16	total C.V		17.52

6. 10 EU/ml(190sec)

1) 반응시간 결과

sec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	393	405	422	428	438	447	456	465	470	495	442	31.14	7.05
b	st1	st1	402	417	439	442	453	462	471	477	480	501	454	30.20	6.65
c	st2	st2	405	425	443	447	463	470	480	482	487	510	461	31.47	6.82
d	st3	st3	405	423	442	453	454	473	480	485	487	505	461	31.17	6.77
e	st4	st4	414	425	449	453	462	476	483	490	490	514	466	31.10	6.68
f	360	398	414	423	450	449	464	477	482	488	488	507	450	43.61	9.69
g	360	387	414	428	446	453	467	473	476	485	498	510	450	45.22	10.06
h	303	372	389	402	425	428	442	450	459	471	471	500	437	53.46	12.23
mean	341	386	405	419	440	444	455	466	473	480	484	505	total mean		451
S.D	32.91	13.05	9.64	9.80	10.54	10.64	10.69	11.76	10.53	8.72	9.61	6.27	total S.D		39.22
c.v(%)	9.65	3.38	2.38	2.34	2.40	2.40	2.35	2.52	2.22	1.81	1.99	1.24	total C.V		8.70

2) 농도계산 결과

EU/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	7.06	6.38	5.57	5.31	4.92	4.60	4.30	4.03	3.89	3.27	4.93	1.17	23.76
b	st1	st1	6.55	5.79	4.88	4.77	4.40	4.12	3.86	3.70	3.62	3.14	4.48	1.05	23.38
c	st2	st2	6.38	5.44	4.74	4.60	4.09	3.89	3.62	3.57	3.45	2.96	4.27	1.03	24.19
d	st3	st3	6.38	5.52	4.77	4.40	4.36	3.81	3.62	3.50	3.45	3.06	4.29	1.04	24.17
e	st4	st4	5.93	5.44	4.53	4.40	4.12	3.73	3.55	3.38	3.38	2.88	4.13	0.96	23.31
f	9.45	6.77	5.93	5.52	4.49	4.53	4.06	3.70	3.57	3.43	3.43	3.02	4.83	1.85	38.36
g	9.45	7.43	5.93	5.31	4.63	4.40	3.97	3.81	3.73	3.50	3.21	2.96	4.86	1.92	39.58
h	16.80	8.48	7.30	6.55	5.44	5.31	4.77	4.49	4.21	3.86	3.86	3.16	5.22	1.63	31.14
mean	11.90	7.56	6.43	5.74	4.88	4.71	4.33	4.02	3.81	3.62	3.54	3.06	total mean		4.46
S.D	4.24	0.862	0.52	0.47	0.41	0.39	0.35	0.35	0.29	0.22	0.24	0.13	total S.D		1.40
c.v(%)	35.61	11.40	8.12	8.13	8.31	8.29	8.05	8.74	7.68	6.21	6.71	4.17	total C.V		31.48

7. 2 EU/ml (69sec)

1) 반응시간 결과

sec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	711	721	719	703	728	729	735	739	744	745	727	14.06	1.93
b	st1	st1	724	729	748	713	737	744	751	748	741	756	739	13.50	1.83
c	st2	st2	707	720	736	708	727	734	739	739	746	754	731	15.52	2.12
d	st3	st3	720	731	747	739	742	747	756	753	756	769	746	13.88	1.86
e	st4	st4	709	731	753	726	736	730	745	728	741	758	736	14.17	1.93
f	711	721	696	745	754	723	752	756	749	756	750	771	740	22.17	2.99
g	702	711	726	725	757	729	748	745	757	747	731	720	733	17.73	2.42
h	693	726	730	754	751	742	754	766	768	763	758	764	748	21.82	2.92
mean	702	719	715	732	746	723	740	744	750	747	746	755	total mean		738
S.D	9.27	7.86	11.67	11.82	12.35	14.16	10.32	12.92	10.57	11.10	8.80	16.25	total S.D		17.82
c.v(%)	1.32	1.09	1.63	1.61	1.66	1.96	1.39	1.74	1.41	1.49	1.18	2.15	total C.V		2.42

2) 농도계산 결과

EU/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	S.D	c.v(%)
a	blank	blank	1.79	1.68	1.70	1.87	1.61	1.60	1.54	1.51	1.46	1.45	1.62	0.14	8.58
b	st1	st1	1.65	1.61	1.43	1.77	1.53	1.46	1.40	1.43	1.49	1.37	1.51	0.12	8.25
c	st2	st2	1.83	1.69	1.53	1.82	1.62	1.56	1.51	1.50	1.45	1.38	1.59	0.15	9.45
d	st3	st3	1.69	1.58	1.44	1.50	1.48	1.44	1.37	1.39	1.36	1.27	1.45	0.12	8.26
e	st4	st4	1.80	1.58	1.39	1.63	1.53	1.59	1.45	1.61	1.49	1.35	1.54	0.13	8.48
f	1.78	1.68	1.96	1.46	1.38	1.66	1.40	1.37	1.42	1.37	1.41	1.25	1.51	0.21	13.84
g	1.89	1.79	1.62	1.64	1.36	1.60	1.43	1.46	1.35	1.44	1.58	1.69	1.57	0.17	10.69
h	2.00	1.63	1.59	1.38	1.40	1.48	1.38	1.29	1.28	1.32	1.35	1.30	1.45	0.21	14.24
mean	1.89	1.70	1.74	1.58	1.45	1.67	1.50	1.47	1.42	1.45	1.45	1.38	total mean		1.53
S.D	0.11	0.08	0.13	0.11	0.11	0.14	0.09	0.11	0.09	0.09	0.07	0.14	total S.D		0.17
c.v(%)	5.75	4.80	7.21	6.81	7.64	8.55	6.09	7.44	6.11	6.56	5.16	10.04	total C.V		10.87

ABSTRACT

Study on the effects of quantitative analysis for endotoxin by injection time interval of reaction reagent to samples in the kinetic-turbidimetric method and on development of a correction method

Han, In Young

Division of Industrial Hygiene Engineering
Graduate School of Occupational Safety and Health
Hansung University

Director

Park, Doo Yong, Dr.P.H., CIH

Workers can be exposed to endotoxins released by Gram-negative bacteria, which can cause a response in humans ranging from mild fever to shock or even death, from their work environments such as cotton processing, animal handling and farming, grain handling and use of metalworking fluids.

An analytical method has been developed for endotoxin based on the reaction of LAL with LPS, that is known to be easy, fast, and sensitive. Quantitative LAL methods based on turbidimetric assays are commonly used for workplace samples. It takes more than 90 seconds (up to 180 seconds upon the dexterity) to inject reaction reagents to all cells of samples in the 96 well micoplate during preparing samples for analysis based on turbidimetric assays. These injection time intervals between samples resulted in actual reaction duration before reading the optical

density by the instrument, and resulted in erroneous quantitative results. This study was conducted to estimate the effects of injection time interval to the quantitative results and to develop a correction method.

The results of this study were as in the follows.

1) Time delay due to injection time intervals between cells in the 96 well microplates resulted in decrease of endotoxin concentration significantly. It was found that the endotoxin concentration decreases as time delay increases.

2) It was shown that these effects were greater at a high concentration levels(10 EU/ml) compared to a relative low concentration levels (1 EU/ml).

3) It was able to demonstrate that these errors could be reasonably corrected by applying a correction equation derived from the experiments as shown on the below.

$$Y = TR_i - T_i(C_i - 1)$$

here, Y: corrected reaction time (for use to determine OD)

TR_i: reaction time of ith column read by the instrument to reach the predetermined OD

C_i: Number of ith column

$$T_i = \frac{(\text{Total elapsed time for injection to 12 column}) - T_1}{C_i - 1}$$

감사의 글

끝날 것 같지 않았던 논문이 제본되는 것에 홀가분함과 동시에 스스로 부족함으로 인해 부끄러움도 함께 느끼게 됩니다. 부족하지만 이렇게 논문이 완성되게끔 도와주셨던 분들에게 이 자리를 빌어 감사의 말을 전합니다.

우선 이 논문이 완성되기 까지 처음부터 끝까지 바쁘신 와중에도 지도를 아끼지 않으셨던 박두용 교수님께 감사드립니다. 부족했던 저를 2년 동안 한결같은 가르침으로 다시금 산업보건의 꿈을 키울 수 있도록 만들어 주신 은혜에 감사를 전하고 싶습니다. 그리고, 처음 제게 엔도톡신 분석법을 가르쳐 주셨고, 3년 동안 보살피 주시면서, 많은 가르침을 주셨으며, 분석법은 물론 실험에 필요한 장비 및 시약을 아낌없이 베풀어 주시고 배려해 주셨던 박동욱 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

떨어져 있지만 묵묵히 가슴으로 지켜봐 주시던 사랑하는 부모님을 비롯한 언니네와, 오빠네 모두에게도 감사의 말을 전합니다.

또한, 논문 쓰는 종종 격려와 간식까지 사주면서 응원해 주던 내 친구 순영이에게~고마움을 전하고 싶습니다. (순영아~ 고마워~~ ^^)

마지막으로, 함께 실험을 도와 줬던 방송대 선옥남 조교님과 2년 동안 같이 수업하며 동거 동락한 대학원 동기 분들 및 늦게 합류한 저를 따뜻하게 맞아준 공학관 4층 식구들(관호씨, 병년씨, 5층 식구들(병수씨, 원기씨) 마지막으로 6층 옥탑방 식구 철임언니 모두에게 감사드립니다.

논문을 끝으로 대학원은 졸업하지만 사회로 나가 산업보건을 시작하는 새내기로서 대학원에 들어올 때 첫 느낌, 처음 다짐으로 가슴으로 일을 하는 산업보건인이 되겠습니다.