

## 금속가공유 시료에서 Optical Density 설정조건에 따른 엔도톡신의 정량

박동욱<sup>a</sup>, 윤충식<sup>b</sup>, 박두용<sup>c</sup>,한인영<sup>a</sup>,

한국방송통신대학교<sup>a</sup>, 대구가톨릭대학교<sup>b</sup>, 한성대학교<sup>c</sup>

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

Park Dong-uk<sup>a</sup>, Han Inyoung<sup>a</sup> Yoon Chung-sik<sup>b</sup>, Park Dooyong<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

### ABSTRACT

This study was conducted to identify the proper analytical conditions regarding optical density for endotoxin analysis in the workplace using metalworking fluids. Our study found that "onset method" was more accurate than "time to Vmax". Reproducibility and accuracy analyzed by "onset method" was more greater than those by "time to Vmax". "0.03" of optical density was the most appropriate analytical condition among onset method. Through this analytical condition, 0.998 of linearity was obtained and recovery rate ranged from 88 % to 105 % at the endotoxin concentration below 5 EU/ml. No significant difference of endotoxins between "0.03" and "0.05" of optical density was observed from this study. Furthermore, correlation coefficients between them were statistically significant( $p < 0.01$ ). This study concluded that "0.03" or "0.05" of optical density is used to analyze endotoxin. Of these optical density value, value with higher linearity should be used to analyze endotoxin in environmental samples.

### I. 연구배경 및 목적

거의 모든 환경에는 엔도톡신(endotoxin)이 존재한다. 공기 중의 엔도톡신에 과다하게 노출되면 갑자기 열이 발생되고 가슴이 답답하고 기침이 나고 호흡이 곤란 등과 같은 폐 기능의 변화가 초래된다.<sup>1</sup> 엔도톡신이 각종 호흡기계질환의 원인인자로 작용하기 때문에 정확하게 정량하는 것은 엔도톡신의 노출에 따른 건강상의 영향을 밝히는데 매우 중요하다. 엔도톡신을 정량하는데 OD의 설정조건이 연구마다 다르다. 본 연구에서는 Kinetic LAL분석방법 중에서 OD 설정값에 따라 엔도톡신의 정량에서 차이가 있는지 알아보고 타당한 설정값을 제안하고자 한다.

## II. 연구방법

### 2.1 재료

연구재료로는 MWF벌크시료와 MWF가 사용되는 공정에서 채취한 공기 중 시료였다

### 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.

#### 2.2.2 시료 전처리

카셀트에서 필터를 멸균된 원심분리용 튜브(50 ml, polypropylene 재질)로 옮겨 전처리를 시작하였다. 각각의 튜브에 LAL water 15 ml를 넣고 4.8 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.

#### 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.

#### 2.2.4 분석

엔도톡신은 Kinetic microplate reader(Vmax; Molecular Devices Corp., Menlo Park, Calif.)를 이용하여 분석하였다. 100  $\mu$ l의 표준시료와 시료들이 들어있는 96 well을 분석기기 내에 있는 incubator에서 37 °C에서 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.

## III. 결과 및 고찰

1. “엔도톡신농도”와 “설정된 OD값에 도달하는데 걸리는 시간”과의 상관은 OD값이 0.03과 0.05일 때 각각 0.993과 0.992로서 다른 조건에 비해 높았다. 그러나 OD“0.1”과 “time to PVmax”에서의 상관은 검량곡선으로서 유의하지 않았다.
2. OD를 “0.03”으로 설정했을 때 표준용액에 대한 회수율은 0.5 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”로 설정하고 분석했을 때 회수율은 OD “0.03”보다는 낮지만 다른 조건들 (OD “0.1”, “time to Vmax”)에 비해서는 양호하였다. OD “0.1”과 “time to Vmax”에 의해 회수되는 정도는 너무 낮거나 높아서 엔도톡신의 분석에는 적정하지 않은 조건으로 판단된다.

3. OD “0.03”과 “0.05”에 의한 엔도톡신 분석결과의 상관성이 MWF벌크시료에서는 0.97이었고 공기중 시료에서는 0.99로서 매우 유의한 상관이었다( $p < 0.01$ ). OD “0.03”, “0.05”, “0.1” 그리고 “time to Vmax”간의 상관메트릭스(correlation matrix)를 작성한 결과 OD “0.03”과 “0.05”이외에는 유의한 상관성이 관찰되지 않았다.
4. Onset방법에서 설정해야 할 OD값은 “0.03”과 “0.05”이 적정하다. 따라서 환경중의 엔도톡신을 분석할 때는 OD값들에 따른 검량선의 상관계수를 보고 그 직선성(linearity)이 큰 OD를 설정하고 분석하는 것이 적정하다.