

# MRX Microplate Reader의 Endotoxin 모드를 활용한 Kinetic Turbidimetric 내독소 예비시험



## 개요

본 시험은 『대한민국약전』 별표 5 일반시험법 중 박테리아 내독소 시험(Bacteria Endotoxin Test, BET)에 따라, 광학적 분석법 중 하나인 비탁법(Turbidimetric Method)을 적용하여 예비시험을 수행하고자 하였다. 엔도톡신(Endotoxin)은 그람음성균(Gram-negative bacteria)의 세포 외막에 존재하는 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS) 중 Lipid A가 독성의 중심으로 작용하는 성분이며, 체내 유입 시 발열, 염증, 패혈성 쇼크 등의 반응을 유발할 수 있는 위험 요소이다.

본 실험에서는 Associate of Cape Cod, Inc.의 Pyrotell®-T 시약과 CSE(Control Standard Endotoxin)를 사용하였으며, 측정 장비로는 K LAB사의 마이크로플레이트 리더기를 활용하였다. 실험은 장비 내 내장된 Endotoxin 모드를 이용하여 진행되었으며, 37°C 조건에서 Kinetic turbidimetric 방식으로 측정되었다.

시험 설계는 『대한민국약전』 KP 44에 명시된 예비시험 항목들을 기반으로 하였으며, 검량선 작성, 정밀도 및 회수율 확인, 음성대조군의 반응 확인을 해당 기준에 따라 적합성을 평가하였다.

국내 분석장비 산업을 선도하는 케이랩 주식회사, 연구 및 제조까지 전 과정을 한 곳에서 책임지는 국내의 유일한 전문 연구·제조 기업입니다.

**주소**  
(34014) 대전광역시 유성구 테크노 2로 94-23

**홈페이지**  
[www.klab.im](http://www.klab.im)

**전화번호**  
042-932-7586

**문의**  
[info@klab.im](mailto:info@klab.im)



[그림 1]. MRX 마이크로플레이트 리더기 - MRX는 내장된 엔도톡신 모드를 통해  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  정밀도의  $37^{\circ}\text{C}$  인큐베이션 기능을 제공하며, 96-well plate를 8초 이내에 빠르게 판독할 수 있다. 실시간 데이터 확인과 자동 보고서 생성 기능을 갖추어 효율적이고 정밀한 내독소 분석이 가능하다.

## 재료 및 시험 방법

### 재료

#### (1) 시약

- ① CSE (Control Standard Endotoxin), Associates of Cape Cod, Inc., E0005-1
- ② Pyrotell®-T (Turbidimetric LAL Reagent), Associate of Cape Cod, Inc., T005-1
- ③ LRW (LAL Reagent Water), Associates of Cape Cod, Inc., WP100C

#### (2) 장비 및 소모품

- ① MRX Microplate Reader, K LAB, UNT0001
- ② MRX View 소프트웨어 Endotoxin모드, K LAB
- ③ Pyroplates® (96-well Microplate), Associates of Cape Cod, Inc., CA961-10
- ④ Precision Pipette Tips (Pyroclear®), Associates of Cape Cod, Inc., PPT10, PPT25
- ⑤ 일회용 멸균 Conical Tube (endotoxin free)

### 시험 방법

#### (1) 표준 물질 제조

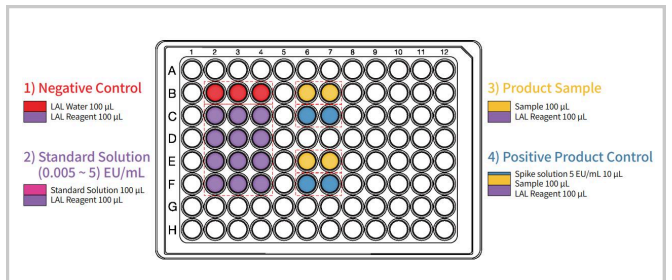
CSE (Control Standard Endotoxin) vial 1개에 LRW(LAL Reagent Water)를 넣어 최종 농도  $1,200\text{ EU/mL}$ 로 제조하였다. 이 원액을 1/10씩 순차 희석하여  $5, 0.5, 0.05, 0.005\text{ EU/mL}$ 의 검량선 시료(Standard Solution)를 제조하였으며, 모든 희석에는 LRW를 사용하였다.

#### (2) 시험 대상 시료 제조

시험 대상 시료는  $1,200\text{ EU/mL}$  CSE 원액으로부터  $1.0\text{ EU/mL}$ 로 희석하여 제조하였고, 이를 다시 1/10배 희석하여  $0.1\text{ EU/mL}$  시료도 함께 준비하였다. 이 두 시료는 제품 시료(Product Sample)로 사용되었다.

#### 샘플 배치 및 구성

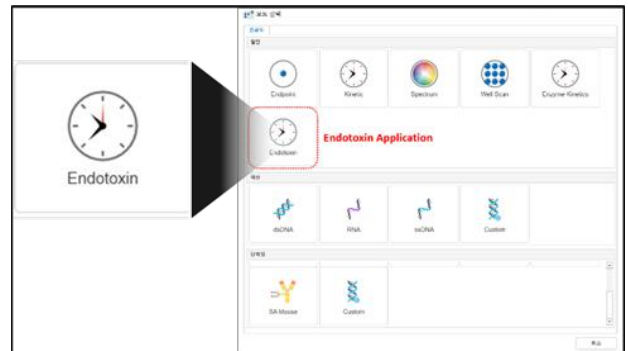
각 시료는 96-well 마이크로플레이트에  $100\ \mu\text{L}$ 씩 분주한 뒤, 동일한 부피의 Pyrotell®-T시약을 첨가하여 총  $200\ \mu\text{L}$ 로 구성하였다. 실험은 Negative Control, Standard Solution, Product Sample, Positive Control로 구성되었으며, 모든 조건은 정밀도 확보를 위해 2회 이상 반복 측정되도록 배치하였다. 전체 샘플 구성은 [그림 2]에 나타내었다.



[그림 2]. 내독소 분석용 마이크로플레이트 샘플 배치도 - 본 도식은 96-well plate 상에 Negative Control, Standard Solution, Product Sample, Positive Product Control을 배치한 구성을 나타낸다.

#### 측정 장비 운용 절차

MRX 마이크로플레이트 리더기의 Endotoxin 모드에 진입한 후, 측정 시간은 2시간, 측정 간격은 30초, Threshold값은 0.1로 설정하였다. 이후 [그림 2]와 동일하게 레이아웃을 설정하고, 측정 시작을 선택하여 분석을 진행하였다.



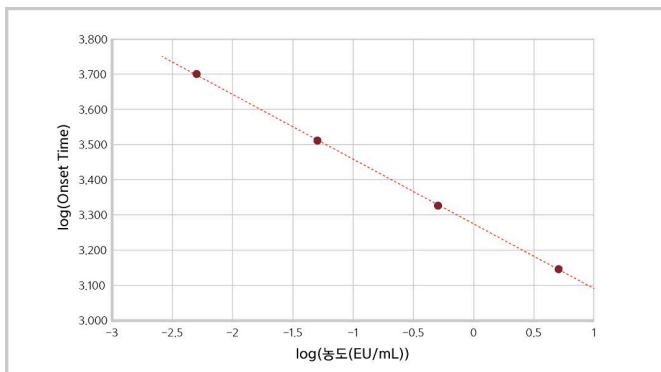
[그림 3]. MRX 소프트웨어 - 측정 모드 선택 화면에서 [Endotoxin]을 선택하여 내독소 분석을 수행할 수 있다.

### 실험 결과

본 시험에서는 『대한민국약전』 일반시험법 KP 44 ‘박테리아 내독소 시험(BET)’에서 제시하는 예비시험 항목에 따라, 표준 곡선의 직선성, 정밀도(%CV), 회수율(Recovery%), 음성 대조군 반응을 평가하였다.

#### 직선성(Linearity)

5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/mL의 4개 농도 구간에 대해 log-log 변환을 적용한 표준곡선을 작성한 결과, [그림 4]와 같이 직선성이 확보되었으며, 상관계수  $R = 1.0000$ 으로 약전 기준 ( $IRI \geq 0.98$ )을 만족하였다.



[그림 4]. MRX에서 작성된 표준곡선 - Onset Time(log)과 엔도톡신 농도 (log)간의 관계를 기반으로 작성된 표준곡선으로, 상관계수(R)가 1.0000으로 나타나 직선성 기준( $IRI \geq 0.98$ )을 만족함을 확인할 수 있다.

#### 정밀도(Precision)

Onset Time을 기준으로 각 농도별 반복 측정값의 표준편차 (SD) 및 변동계수(%CV)를 산출하였으며, 모든 %CV값은 10% 미만으로 정밀도 요건을 충족하였다.

[표 1]. Onset Time 기반 정밀도 결과(%CV)

Conc. (EU/mL)	Onset time(sec)					
	1st	2nd	3rd	Mean	SD	%CV
0.005	4,740	5,250	4,980	4,990	255	5.1%
0.05	3,240	3,240	3,240	3,240	0	0.0%
0.5	2,070	0.001	500	0.447	62	2.9%
5	1,350	1,440	1,410	1,400	46	3.3%

#### 회수율(Recovery%)

제품 시료(1.0 EU/mL 및 0.1 EU/mL)에 대해 Positive Product Control(PPC) 샘플을 구성하고 회수율(PPC Recovery%)을 확인하였다. 두 농도 모두 대한약전에서 제시하는 허용 기준(50-200%)을 만족하였다.

[표 2]. 제품 시료의 PPC Recovery% 결과

Conc. (EU/mL)	PPC Recovery%		
	1st	2nd	Mean
1.0	79.26	87.82	83.5
0.1	109.70	130.98	120.3

#### 음성 대조군(Negative Control) 결과

Negative Control은 LRW(LAL Reagent Water)를 사용하여 구성되었으며, Onset Time은 7,020, 6,960, 7,020초로 평균 7,000초를 기록하였다. 이는 0.005 EU/mL 샘플의 평균 Onset Time인 4,990초보다 늦게 반응하여, 음성 시료로서 검출 한계 미만임을 확인하였다. Separation%는 평균 28.71%로 안정적인 결과를 보였다.

## 결론

본 시험은 『대한민국약전』 일반시험법 KP 44 ‘박테리아 내독소 시험(BET)’에 따라 Kinetic Turbidimetric 방법으로 수행되었으며, 검량선의 직선성( $R= 1.0000$ ), 정밀도( $\%CV \leq 10\%$ ), 제품 시료의 회수율(50-200%), 음성 대조군의 안정성 등 주요 예비시험 항목 모두에서 적합한 결과를 확인하였다.

또한, K LAB사의 MRX 마이크로플레이트 리더기에 내장된 Endotoxin모드는 측정 데이터 기반의 표준곡선 생성, Onset Time 계산, %CV 자동 산출, Spike 회수율(PPC Recovery%) 계산, 음성 대조군 Separation% 평가 및 이에 대한 판정 등을 자동화된 알고리즘으로 처리하여 사용자의 해석 부담을 줄이고 실험의 효율성과 신뢰도를 높인다.

본 시험을 통해 MRX 장비와 내장 소프트웨어의 내독소 분석 기능이 약전 기준에 부합하는 결과를 안정적으로 제공할 수 있음을 확인하였다.

### \*참고문헌(자료출처):

- 『대한민국약전』 별표 5 일반시험법 중 ‘박테리아 내독소 시험 (Bacteria Endotoxin Test, BET)’

, 식품의약품안전처 고시 제 2025-18호