

Original Article

# 내독소 검사에서 자동합성장치에 따른 간섭요인 극복에 대한 연구

삼성서울병원 핵의학과  
김동일 · 김시할 · 지용기 · 석재동

## Study on Overcoming Interference Factor by Automatic Synthesizer in Endotoxin Test

Dong Il Kim, Si Hwal Kim, Yong Gi Chi, Jae Dong Seok  
Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Seoul, Korea

**Purpose** : Samsung medical center shall find a cause of the interference factor and suggest a solution for it. **Materials and Methods** : A sample of  $^{18}\text{F}$ -FDG, radioactive pharmaceuticals produced by TRACERlab MX and FASTlab synthesizer. Gel-clot method uses Positive control tube and single test tube. Kinetic chromogenic method uses ENDOSAFE-PTS produced by Charles River. **Results** : According to Gel clot method of Endotoxin Tests at FASTlab, both turbidity and viscosity increased at 40-fold dilution and Gel clot was detected. In case of TRACERlab MX, Gel clot was detected in most of samples but intermittently not in a few of them. When using ENDOSAFE-PTS, sample CV (Coefficient of Variation) of FASTlab is 0% at all dilution rates whereas spike CV is 0% at 1-fold dilution, 0~35% at 10-fold, 3.6~12.9% at 20-fold, 5.2~7.1% at 30-fold, 1.1~17.4% at 40-fold, spike recovery; 0% at one-fold, 25 ~ 58% at 10-fold, 50 ~ 86% at 20-fold, 70~92% at 30-fold, and 75~120% at 40-fold. Sample CV of TRACERlab MX, is 0% at all dilution rates whereas spike CV is 1.4~4.8% at one-fold dilution, 0.6~19.9% at 10-fold, spike recovery; 35~72% at one-fold dilution and 77~107% at 10-fold. **Conclusion** : Gel clot does not seem to occur probably to  $\text{H}_3\text{PO}_4$  which engages in bonding with  $\text{Mg}^{2+}$  ion contributing gelation inside PCT. Dilution which is identical to reducing the amount of  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , could remove interfering effects accordingly. Spike recovery was obtained within 70~150% - recommended values of supplier - at 40-fold dilution even in kinetic chromogenic method. (Korean J Nucl Med Technol 2012;16(2):3-6)

**Key Words** : Endotoxin Test, Gelation clot test, Kinetic chromogenic method, Interfering factor

## 서 론

PET 검사가 암 조기 발견에 유용해지면서 방사성의약품  $^{18}\text{F}$ -FDG를 이용한 검사건수가 급격하게 증가 하고 있다.<sup>1)</sup> 방사성의약품의 많은 생산과 사용으로 인해 많은 환자 검사에 이용되면서 그만큼 방사성의약품에 대해 철저한 품질관리가 중요하게 되었다. 그래서 제조된 방사성의약품은 여러 가지 품질관리를 수행하고 있으며, WHO에서도 품질관리에

대한 가이드라인을 제시하고 있고, 미국에서는 cGMP 기준의 엄격한 관리를 준비 중이며, 추후 우리나라에서도 같은 기준으로 관리가 될 것으로 본다.<sup>2)</sup> 대한약전 일반시험에는 의약품제조 후 수행하는 품질관리 항목에 물리적 성상, 수소이온농도, 방사화학적순도 측정, 핵종의 순도 측정, 화학적 순도측정, 내독소검사, 크립토펙스 잔류량 검사 등이 있다.<sup>3)</sup> 이 항목 중 내독소 검사(Endotoxin test)를 수행하는데, 엔도톡신은 일반적으로 그람 음성 박테리아의 세포 외벽에 존재하는 물질로 박테리아가 살아 있는 동안에 발현되지 않지만 박테리아가 증식하거나 사멸할 때 세포의 벽이 깨지면서 외부로 방출되는데, 발열성 물질 중에서 가장 강력한 발열물질이 그람음성간균의 세포벽 성분 중 리포다당질(Lipopolysaccharide)이다(Fig. 1).<sup>4)</sup> 혈류를 타고 체내에 유입되면 체내에서 단핵

• Received: July 21, 2012, Accepted: September 28, 2012.  
• Corresponding author : Dong Il Kim  
Department of Nuclear Medicine, Samsung Seoul Hospital, Irwon-dong, Kangnam-gu, Seoul, 135-170, Korea  
Tel: +82-2-3410-2669, Fax: +82-2-3410-2667  
E-mail: smileedi.kim@samsung.com

구나 대식세포에 의해 내인성 발열물질이 유리되며 이 내인성 발열물질은 직접 또는 임파구를 통하여 혈액으로 유리되어 시상하부의 체온 조절중추를 자극하여 발열반응을 유도한다. 이외에도 이차반응으로 쇼크, 저혈압, 패혈증, 체중감소, 혈중글루코스감소, macrophage 활성화, 장기부전 등을 일으키고 사망 할 수 있어 집중관리가 필요하다.<sup>4,5)</sup> 현재 개발되어 시판되고 있는 LAL (Limulus Amebocyte Lysate) 시약으로는 LAL의 겔 형성 여부에 따라 단지 내독소의 존재유무를 확인하는 정성시험 분석법인 겔화법(Gel clot test), 겔 형성의 탁도 변화를 측정하는 방법인 비탁법(Turbidimetric method)이 있으며 여기에는 일정 시간 내에 도달하는 최종 탁도를 측정하는 종말적 비탁법이 있다. 또한 응고효소에 의해 합성기질로부터 유리되는 발색기의 양을 측정하는 비색법(Chromagenic method)이 있으며 이 방법을 측정법에 따라 종말적 비색법(End-point chromagenic)과 키네틱 비색법(Kinetic chromagenic)으로 나뉘어 진다.<sup>6)</sup> 본원에서는 자동합성장치 모듈의 변경으로 겔화법과 비색법의 양성반응검사에 간섭인자가 발생하여 이에 간섭인자의 원인을 찾고 해결하기 위해 이 연구를 시작하였다.<sup>7)</sup>

## 실험재료 및 방법

### 1. 재료

Cyclotron은 PETtrace (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)를 이용하였고 FDG를 생산하기 위해 O-18 water를 사용하였다. <sup>18</sup>F-FDG 자동합성장치는 TRACERlab Mx, FASTlab module을 사용하였다. 엔도톡신시험에는 solvent를 정량하기 위한 파이펫, 검체를 희석하기 위한 LAL free water (Fig.

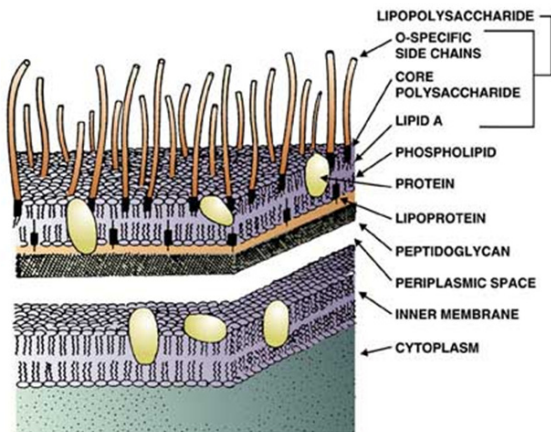


Fig. 1. Diagram of a gram-negative cell membrane.

2), 겔화법에 사용되는 Single test tube (STT)와 Positive control tube (PCT) (Fig 3), 37°C로 배양하기 위한 Incubator를 사용한다. 비색법에서는CHARLES RIVER사의 ENDOSAFE-PTS (Potable Test System)를 사용한다.

### 2. 방법

#### 1) 겔화법

모든 기구는 250°C에서 30분간 건열 처리한 것을 사용한다. FASTlab 과 TRACERlab MX에서 제조된 FDG 시료를 최소 200 µl 이상으로 측정한다. 200 µl를 튜브에 넣고 LAL free water를 1,800 µl를 넣는다. 희석을 할 때는 희석배수를 10배수를 넘지 않도록 한다. 희석배수 10배수의 2,000 µl에서 희석배수 20배, 30배, 40배를 만들기 위해 각각 200 µl를 뽑고 LAL free water를 각각 200 µl, 400 µl, 600 µl를 넣는다. 냉동고에 보관중인 STT와 PCT를 꺼내 각각 200 µl를 주입한다. 미리 37°C±1°C로 세팅되어 있는 Incubator에 넣고 1시간 동안 배양한 후 겔 형성정도를 확인한다(Fig. 4).

#### 2) 비색법

모든 기구는 250°C에서 30분간 건열 처리한 것을 사용한

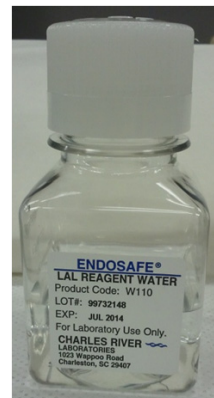


Fig. 2. LAL free water.



Fig. 3. Single test tube and positive control tube.

다. FASTlab 과 TRACERlab MX에서 제조된 FDG 시료를 최소 25  $\mu$ l 이상으로 측정한다. 25  $\mu$ l를 튜브에 넣고 LAL free water를 225  $\mu$ l를 넣는다. 희석을 할 때는 희석배수를 10 배수를 넘지 않도록 한다. 희석배수 10배수의 225  $\mu$ l에서 희석배수 20배, 30배, 40배를 만들기 위해 각각 50  $\mu$ l를 뽑아 LAL free water를 각각 50  $\mu$ l, 75  $\mu$ l, 600  $\mu$ l를 넣는다. ENDOSAFE-PTS에 샘플 당 하나의 카트리지를 넣은 후 희석배수를 설정한다. 카트리지 4곳의 주입부에 25  $\mu$ l씩 주입한 후 결과 데이터를 확인한다(Fig. 5).

## 결 과

### 1. 겔화법

내독소 검사 중 겔화법은 FASTlab의 경우 희석배수 1배, 10 배에서는 탁도와 점도 모두 변화가 없었고 20배와 30배에서는 탁도는 증가하였으나 점도는 샘플별로 차이가 있었다. 희석배수 40배에서는 점도와 탁도 모두 증가하였다. TRACERlab Mx에서는 샘플 거의 모두에서 겔이 형성 되었지만 간헐적으로



Fig. 4. incubator.



Fig. 5. ENDOSAFE-PTS (Portable test system).

로 그러지 못한 샘플도 발견되었다(Fig. 6).

### 2. 비색법

내독소 검사 중 비색법은 FASTlab의 경우 Sample Rxn time CV (coefficient of variation)는 모두 0%이었고 Spike Rxn time CV는 1배수 0%, 10배수 0~18%, 20배수 3.6~12.9%, 30 배수 5.2~71%, 40배수 1.1~17.4%이고, Spike recovery는 1배수 0%, 10배수 25~58%, 20배수 50~86%, 30배수 70~92%, 40배수 75~120%이다(Fig. 7).

TRACERlab Mx의 경우 Sample Rxn time CV는 모두 0%, Spike Rxn time CV는 1배수 1.4~4.8%, 10배수 0.6~19.9%, Spike recovery는 1배수 35~72%, 10배수 77~107%이다(Fig. 8).

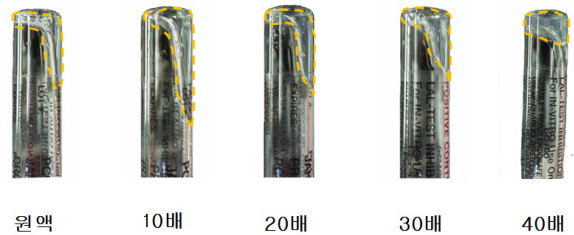


Fig. 6. Gel clot test of FDG.

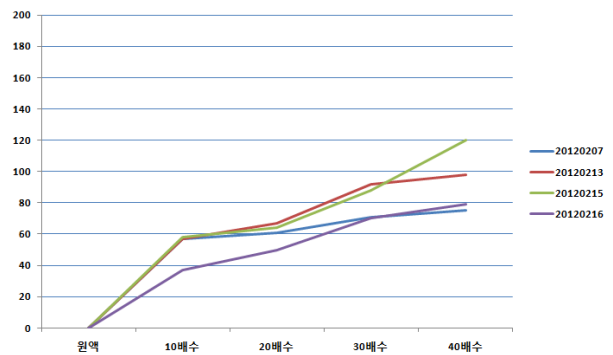


Fig. 7. Spike recovery of FASTlab.

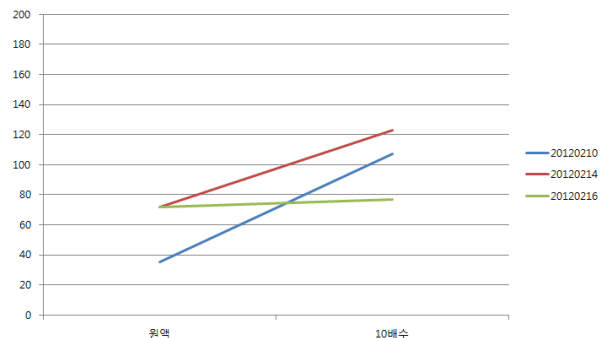


Fig. 8. Spike recovery of TRACERlab Mx.

## 결 론

FASTlab에서 합성된 방사성의약품의 경우 겔화법에서 간섭인자에 의해 40배 이상의 희석배수에서만 간섭을 극복할 수 있었다. 이러한 간섭요인 반응 저해 주된 원인으로는 적절한 범위 외의 수소이온농도, 이가 양이온의 감소, 효소의 변화, 탁도, 색깔, chelating compounds, 생물학적 detergents 등이고 반응촉진 원인으로는 Glucan이 있다. 이 경우에는 FASTlab 중화제로 사용되는  $H_3PO_4$  가 PCT내에 겔 형성에 관여하는  $Mg^{2+}$ 이온과 결합하여 겔 형성을 하지 못하는 것으로 추측된다. 이에 희석을 할 경우  $H_3PO_4$  양이 줄어들 간섭효과를 제거할 수 있었다.

비색법 결과에서 확인해야 될 항목은 첫 번째로 Sample Rxn time CV이다. 1,3채널의 CV(%)로서 두 반응 시간간의 차이를 의미한다. 두 번째로 Spike Rxn time CV이다. 2,4 채널의 CV(%)로서 두 반응 시간간의 차이를 의미한다. 여기에서 CV는 표준편차/평균으로서 반복 간에 얼마나 서로 멀리 떨어져 있는가를 보여주는 통계적 척도이다. 25% 이상의 CV는 두 반복 간에 뚜렷하게 서로 차이를 나타내고, 어떤 값이 참값인지 알 수 없으며 이 시험은 유효하지 않는 시험으로 간주 된다. 세 번째로 Spike recovery이다. spike recovery는 겔화법에서 PCT와 같은 역할로서 간섭을 일으키는 간섭인자가 있는지를 확인하는 부분이다. 50% 이하는 반응 저해 반응이고, 200% 이상은 반응 촉진반응이다. 이 실험에서 Sample Rxn time CV, Spike Rxn time CV는 모두 정상범위 안에 포함되었지만 Spike recovery는 40배의 희석배수에서만 업체 권고치인 70~150%에 포함되었다. 엔도톡신 검사에서 간섭인자들은 무수히 존재한다. 이 간섭인자들은 합성장치나 시약에 따라 달라질 수 있으므로 이와 같은 간섭인자들을 극복하기 위한 노력으로 품질검사의 정확성과 신뢰를 제공하도록 해야 할 것이다.

## 요 약

방사성의약품 제조 후 품질관리의 중요성이 점점 커지고 있다. 품질관리 항목에는 물리적 성상, PH, 핵종의 순도 측정, 화학적 순도 측정, 방사화학적 순도 측정, 내독소 검사, 크립토크스 잔류량 측정 등이 있다. 내독소 검사는 발열 및 쇼크등을 일으킬 수 있는 그람음성간균의 리포다당질이 포함된 검체가 인체에 주입되는 것을 방지하기 위한 검사법이다. FASTlab module을 이용하여 합성된  $^{18}F$ -FDG의 내독소

검사 시행 시 간섭요인이 발생하여 제대로 된 검사가 시행되지 못하여 희석하는 방법을 이용하였다. LAL free water를 이용하여 비색법은 25  $\mu$ l, 겔화법은 200  $\mu$ l를 최소단위로 하여 희석배수가 10배수를 초과하지 않는 범위내에서 희석배수를 10배수, 20배수, 30배수, 40배수로 하여 희석하였다. 희석된 시약을 겔화법은 STT와 PCT에 각각 200  $\mu$ l를 주입하고 Incubator에 37°C로 1시간동안 배양하여 겔형성 정도를 확인하고, 비색법은 25  $\mu$ l를 최소단위로 하여 위와 같이 희석한다. 희석된 시약은 ENDOSAFE-PTS의 Dilution factor를 입력하고 배수 당 하나의 카트리지를 4곳의 주입구에 25  $\mu$ l씩 주입하고 결과 데이터를 확인한다. 결과는 겔화법은 FASTlab의 경우 40배수에서만 겔이 형성되었고, TRACERlab Mx의 경우 거의 모든 배수에서 겔이 형성되었지만 간헐적으로 형성되지 않는 경우도 있었다. 비색법은 FASTlab의 경우 40배수에서만 Spike Rxn time CV, Sample Rxn time CV, Spike recovery 모두 정상범위 안에 포함되었다. TRACERlab Mx의 경우 10배수에서 Spike Rxn time CV, Sample Rxn time CV, Spike recovery 모두 정상범위 안에 포함되었다. FASTlab에서 생산된 방사성의약품은 중화제인  $H_3PO_4$  가 PCT내에 겔 형성에 관여하는  $Mg^{2+}$ 이온과 결합하여 겔 형성을 하지 못하는 것으로 추측된다. 이에 희석을 할 경우  $H_3PO_4$  양이 줄어들 간섭효과를 제거할 수 있었다. 엔도톡신 검사에서 간섭인자들은 무수히 존재한다. 이 간섭인자들은 합성장치나 시약에 따라 달라질 수 있으므로 이와 같은 간섭인자들을 극복하기 위한 노력으로 품질검사의 정확성과 신뢰를 제공하도록 해야 할 것이다.

## REFERENCES

1. Mine Silinder, A. Yekta ozar, recently developed radiopharmaceuticals for positron Emission tomography, FABAD J. Pharm.sci., 2008;33:153-162.
2. WHO Expert committee on specifications for pharmaceutical preparations-WHO technicae Report series, 2003;908(3ed): 57.
3. 대한약전
4. Lanisng, M.P., P.H. and Donald, A.K. Microbiology. 2nd ed. An.C.brown publishers, 1993;55.
5. Clas, F. and Loos, M. ikilling of the S and R forms of salmonella minnesota via the classical pathway complement activation in guinea pig and human sera. J Immunology. 1980;40:547.
6. 이유경, 강윤숙, 백선영, 김용관, 신광훈, 민홍기, 발열성 물질 시험과 내독소 시험의 비교연구, 약학회지 1999;43(5):606-613.
7. Gopal B. saha, Fundamentals of nuclear Pharmacy, 1992;8:164-165.