T-09-015-2021

광 흡수 측정을 통한 탄소나노물질의 세포 흡수량 정량화 방법

Method to estimate cellular uptake of carbon nanomaterials using optical absorption

KRISS 한국표준과학연구원
Korea Research Institute of Standards and Science

KRISS	시 험 절 차 서 광 흡수 측정을 통한 탄소나노물질의 세포 흡수량 정량화 방법	절차서 등록번호	T-09-015-2021
		제·개정번호	00
		제정일	2021. 06. 23.
		최종 개정확인일	2021. 06. 23.

☐ 절차서 담당부서 : 나노안전팀

☐ 절차서 작성자 : 허민범

☐ 제·개정 이력 내역

구분	제·개정번호	최종 개정·확인일자	제·개정 내용 요약
제정	00	2021. 06. 23.	광 흡수 방법을 이용한 탄소나노물질의 세포 내 흡수량 정량 방법 기술

☐ 절차서 목차

1. 적용범위 ····· 2
2. 인용표준 ····· 2
3. 용어의 정의 ····· 2
4. 시험내용 ····· 3
5. 준비사항 ····· 4
6. 소요장비 명세 ····· 6
7. 시험방법 ····· 6
8. 시험결과의 기록 ····· 9
9. 교정성적서 작성방법 ····· 15
10. 유효성 검증방법 ····· 15

1. 적용범위

본 절차서는 수용액 상에 분산되어 있는 탄소나노물질이 세포 내에 흡수된 정도를 근적외선 광 흡수 측정방법을 이용하여 정량화하는 일반적인 사항을 기술한다. 이 방법은 기존 사용되고 있는 형광 염색방법이나 방사성 동위원소 측정법에 비해 신속하고 간단하여 초기 검사에 사용할 수 있다.

2. 인용표준

ISO/PRF TS 23034, Method to estimate cellular uptake of carbon nanomaterials using optical absorption

3. 용어의 정의

3.1 A549 세포(A549 lung cancer cell line): 1972년 D.J. Giard에 의해 58세 백인 남성의 폐암 조직에서 분리한 폐포 기저막 상피세포이다.

3.2 세포 일반배양(routine culture): 생물체로부터 분리한 세포를 배양하는 과정으로 단백질분해효소 등의 처리로 단세포를 분산해서 배양하는 방법이다.

3.3 세포 컨플루언스(cell confluence): 세포 배양 시 배양플라스크의 공간 내에서 세포가 차지하는 비율을 의미한다.

3.4 패시지 번호(passage number): 세포의 population doubling에 의해 배양접시가 꽉 차게 되면 세포가 더 증식할 수 있도록 공간을 넓혀주기 위해 여러 개의 배양플라스크로 분주해 줄 때 붙여지는 번호이다.

3.5 혈청(serum): 혈액이 완전응고된 후 혈액으로부터 유리된 투명한 상층액으로 응고과정을 거치며 혈장에서 섬유소원이 제거된 상태로서 알부민, 글로불린 등의 단백질을 비롯하여 여러 가지 효소단백질 등 생체의 기능유지에 필요한 여러 가지 성분을 포함하고 있다.

3.6 세포 흡수(cellular uptake): 살아있는 세포에 의해 처리 물질이 세포 내부로 흡수되는 것을 말한다.

3.7 세포 용해(cell lysis): 세포막을 물리적, 화학적 방법으로 인해 파괴하여 세포 내용물을 세포 밖으로 방출시키는 방법이다.

3.8 흡광도(absorbance): 특정 파장에서 물질이 빛을 흡수하는 정도를 의미한다.

3.9 검량선(Calibration Curve): 검량선은 분석하고자 하는 물질의 '알고 있는 농도와 기기 반응간의 관계'에 대한 곡선이다. 미지 시료의 농도 정량을 위해 가장 많이 사용되는 방법 중 하나이다.

4. 시험내용

4.1 측정 항목

세포에 처리된 탄소나노물질의 세포 내 흡수량 정량적 평가

4.2 측정 원리

세포 용해에 의해 발생된 용해물은 단백질, 아미노산, 지방산, DNA와 같은 생체 구성요소를 포함할 수 있으며, 대부분 자외선 영역(200~400nm)과 일부 가시광선 영역(400~600nm)에서 빛을 흡수한다. 따라서 이외의 가시광선 영역(650~800nm)과 근적외선 영역(800~900nm)에서 생체 성분에 의한 광 흡수가 낮아지기 때문에 이 영역은 질병 진단 및 치료에 많이 이용되고 있다.

수용액 상에 분산된 탄소나노물질의 광 흡수 스펙트럼은 자외선 영역(200~300nm)에서 강한 흡수 피크를 나타낸다. 단일벽 탄소나노튜브(SWCNT), 다중벽 탄소나노튜브(MWCNT), 탄소나노혼(CNH), 카본블랙(carbon black), 그래핀(graphene)의 일반적인 흡수 스펙트럼은 그림 1과 같다.

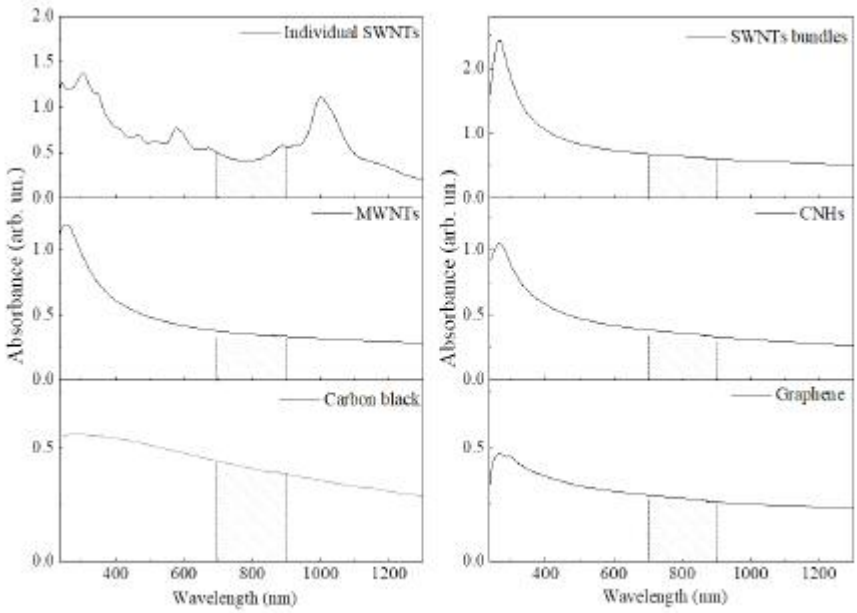


그림 1. 다양한 탄소나노물질의 광 흡수 스펙트럼

특정 파장의 빛을 조사하면 탄소나노물질에서 흡수되는 빛의 양은 수용액 상에 분산된 탄소나노물질의 농도와 정비례한다. 이러한 이유로 이미 알고 있는 탄소나노물질의 농도와 그의 흡광도로 얻은 검량선을 기반으로 미지 시료의 농도를 결정할 수 있다.

5. 준비사항

5.1 일반적 주의사항

5.1.1 세포 배양과 나노물질을 세포에 노출하는 절차는 무균상태의 무균작업대(clean bench)에서 진행되어야 한다.

5.1.2 실험자는 장갑과 실험복을 착용해야 한다.

5.1.3 세포 취급 시 무균 장비만 사용해야 한다.

5.1.4 사용한 모든 재료는 특수 생물실험 폐기물에 적합한 절차를 거쳐 폐기한다.

5.1.5 액체질소에 든 냉동 용기를 취급할 때는 안면보호 마스크와 적합한 장갑을 착용해야 한다.

5.1.6 세포 배양과 관련된 모든 시약은 사용 전 항온수조(37℃)에 넣어 예열 후 사용해야 한다.

5.2 시약 및 기구

5.2.1 A549 세포: 미국세포주은행 (ATCC, American Type Culture Collection, Sigma CCL-185)에 등록된 세포

5.2.2 기구

- CO_2 인큐베이터(37℃, 습도 95%, CO_2 5%)
- 무균작업대(clean bench)
- 항온수조(37℃)
- 역위상차현미경
- 원심분리기
- 세포계수기 또는 혈구계수기
- 볼텍스 믹서(Vortex Mixer)
- 초음파 분산기(Probe sonicator)
- 피페팅 보조기구, 피펫, 피페터, 멀티피펫
- 냉동용기
- 분석저울
- 진공펌프, 흡인장치
- 세포배양플라스크(Cell Culture Flask 75 cm^2, SPL Cat. 70075)
- 6웰 플레이트(6 well cell culture plate, SPL Cat. 30006)
- 96웰 플레이트(96 well black microplates, Corning® Cat. 3603)
- 코니칼 튜브(Conical Tube 50 and 15 mL, SPL Cat. 50015 and 50050)
- 마이크로 원심분리 튜브(Microcentrifuge Tube 1.5 mL, SPL Cat. 60015)
- 피펫 리저버(Reservoir, SPL Cat. 22050)
- 실린지 필터(Syringe Filter, 0.45 μm)

5.2.3 시약

- ·배양배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco® Cat. 11995-065)
- 혈청(Fetal Bovine Serum, Welgene Cat. 001-01)
- 페니실린/스트렙토마이신 수용액(Penicillin-Streptomycin Solutions(100X), 10,000 Unit/mL Pen.; 10,000 μg/mL Strep., Gibco® Cat. 15140-122)
- Ca^{2+}과 Mg^{2+}이 없는 인산완충식염수(DPBS, Sigma-Aldrich Cat. D8537)
- 0.05% 트립신-EDTA 페놀레드 용액 (Trypsin-Ethylene diamine tetra acetic acid 1×, Welgene Cat. LS015-01)
- 멸균증류수
- 세포 용해액(CelLytica M, Sigma-Aldrich Cat. C2978)
- 계면활성제(10X Tris/Glycine/SDS Buffer, BIO-RAD Cat. 1610732)
- 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich Cat. 9418)
- 다중벽 탄소나노튜브(MWCNT, JRC NM-402)

5.3 페니실린/스트렙토마이신· 혈청의 준비

5.3.1 페니실린/스트렙토마이신: 무균상태로 15 mL 코니칼 튜브에 5 mL를 소분한다.

5.3.2 혈청

① 37℃의 항온수조에서 혈청을 해동한다.

② 항온수조를 56℃까지 가열하여 혈청이 담긴 병을 30분간 수조에 담가둔다.

③ 50 mL 코니칼 튜브에 혈청 이름, 기원(예: Fetal Clone II U.S. origin), 혈청배치, 카탈로그 번호, 소분일자를 기록한다.

④ 30분 후 항온수조에서 병을 꺼내어, 무균상태에서 튜브별로 혈청 50 mL를 소분한다.

⑤ 코니칼 튜브를 닫고 뚜껑을 파라필름으로 감싼다.

⑥ 소분된 혈청은 -20℃에서 보관한다.

5.4 완전배지 및 무혈청배지 제조

5.4.1 일반배양(routine culture)용 완전배지는 무균상태에서 다음과 같은 조성으로 제조한다.

- 445 ml DMEM + 50 ml FBS(10% v/v) + 5 ml 페니실린/스트렙토마이신(1X, 10 μg/mL 페니실린, 10 μg/mL 스트렙토마이신)

5.5 세포 배양 절차

- 모든 세포 배양은 75 cm^2 세포배양플라스크에서 이루어지며, 2-3일 간격으로 70-80% 컨플루언스가 되도록 유지한다. A549 세포는 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 DMEM 완전배지를 첨가하여 배양한다.
- 세포 해동 후, 해동 프로세스로 인한 부작용을 보일 수 있으므로, 실험에 사용하기 전 3차례의 계대배양에 해당하는 적응시간이 주어져야 하며, 최대 3개월 이상 배양하지 않아야 한다.
- 세포는 수령 즉시 세포동결보존을 진행해야 한다. 수령 즉시 배지를 완전히 제

거하고, 새로 제조한 완전배지 10 mL를 넣고, 인큐베이터에서 배양한다. 서브컨플루언스 상태(컨플루언스 50-70%)에 도달하면 세포동결보존을 진행한다. 도착된 세포의 패시지 번호가 1이면, 동결 보존된 세포의 패시지 번호는 2가 된다.

- A549 세포는 약 22시간의 배가시간을 가진다.
- 페놀레드가 포함된 배지에서 생장하는 경우, 완전배지의 색이 붉은색에서 노란색으로 변화되면 과성장 되었음을 의미한다. 다시 말해, 영양소가 고갈되었다는 뜻이므로 색이 노란색으로 변할 때까지 방치하지 않는 것을 권장한다.
- 세포는 15 mL의 완전배지에 분산시켜 CO_2 인큐베이터(37℃, CO_2 5%)에서 배양한다.
- 세포는 다음과 같은 방법을 통해 계대배양을 진행한다.

① 무균상태에서 세포를 인산완충식염수 10 mL로 한차례 세척한다.
② 트립신-EDTA 용액 5 mL를 각 세포배양플라스크 (75 cm^2 culture flask)에 넣는다.
③ 플라스크를 3분간 인큐베이터에 둔다.
④ 현미경으로 세포가 분리되었는지 확인한 후, 완전배지 5 mL을 첨가하고 15 mL 튜브로 옮긴다.
⑤ 15 mL 튜브에 든 세포 현탁액을 원심분리기에 돌린다. (1500 rpm, 5분)
⑥ 상등액을 제거한 후, 1 mL의 배지를 넣고 침전물을 재현탁시킨다.
⑦ 1.5 mL 마이크로원심분리기 튜브에 세포 현탁액 10 μL와 0.4% 트리판블루 용액 10 μL를 넣고, 10 μL 피펫으로 피페팅하여 용액을 잘 섞어준다. (희석배수 = 2)
⑧ 혈구계수기 또는 세포계수기를 사용하여 세포 현탁액 표본(10 μL)을 계수한다.
⑨ 계수하여 얻어진 세포의 수를 토대로 원하는 수만큼 완전배지에 현탁하여 세포 분주에 사용한다.

6. 소요장비 명세

6.1 멀티웰플레이트리더 (Multiple well plate reader): 특정 파장의 빛이 분석대상 시료에 흡수되는 정도를 측정하는 기기

7. 시험방법

7.1 MWCNT 분산액 제조

7.1.1 분산보조제 BSA 용액 제조

① 200 mg의 BSA를 50 mL 코니칼 튜브에 넣고 40 mL의 완전배지를 넣어준다.
② 볼텍스 믹서를 이용하여 BSA를 완전배지에 충분히 녹인 후 4℃에 냉장 보관한다.

③ 다음 날, 실린지 필터를 이용하여 침전물을 제거한다.

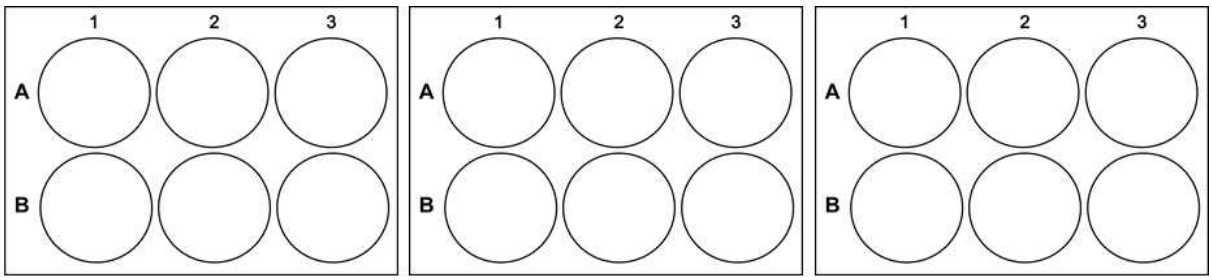
7.1.2 MWCNT 분산액 제조 (Stock 농도: 500 μg/mL)

① 20 mg의 MWCNT를 앞서 제조한 40 mL의 BSA 완전배지에 넣는다.

② 초음파 분산기(60% amplitute, 5s on / 10s off, 30 min)를 이용하여 고르게 분산한다.

③ 분산된 MWCNT 분산액을 4℃에 냉장 보관한다.

7.2 세포 분주



① 각 웰 당 3 × 10^5개의 세포를 배양시키기 위해 미리 세포를 계수하여 준비한다.

※ 총 18개의 웰을 사용하지만 여유있게 20개 분량의 세포를 준비한다.

② 60 mL의 완전배지에 6 × 10^6개의 세포를 현탁시킨다. (1 × 10^5 cells/mL)

③ 각 웰 당 세포 현탁액을 3 mL씩 분주한다.

④ 세포를 분주한 플레이트는 인큐베이터에서 24시간 동안 배양한다.

7.3 시료 처리

① 미리 준비한 MWCNT 분산액(Stock 농도 500 μg/mL)을 완전배지에 10배 희석하여 50 μg/mL의 농도로 총 20 mL (6웰 분량)을 준비한다.

② MWCNT test 플레이트에서 배양액을 제거하고 50 μg/mL 농도의 MWCNT 분산액을 각 웰당 3 mL씩 넣어준다.

③ 나머지 2개 Control 플레이트는 기존 배양액을 제거하고 새로운 완전배지를 각 웰당 3 mL씩 넣어준다.

④ 모든 플레이트는 인큐베이터에서 24시간 동안 배양한다.

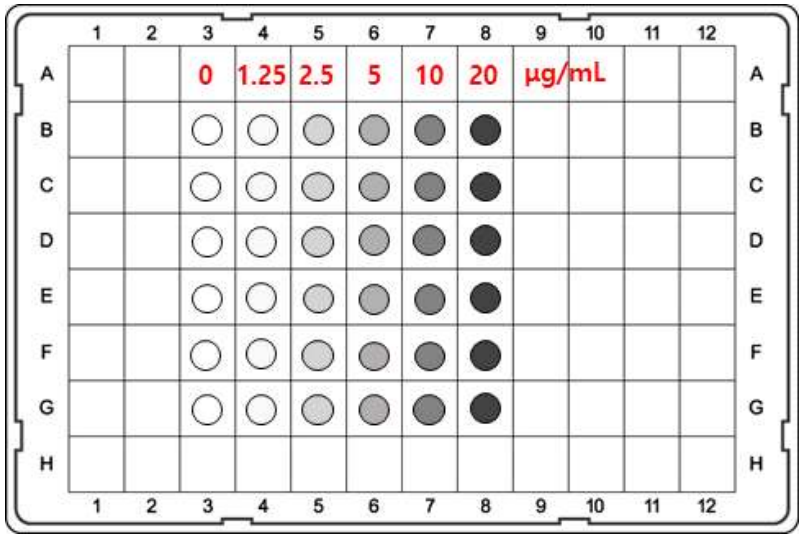
7.4 MWCNT의 검정곡선

① 계면활성제(50 mg/mL)와 세포 용해액을 각 2 mL씩 1:1로 혼합하여 총 4 mL을 제조한다.

② Stock 농도 500 μg/mL의 MWCNT 분산액을 ①의 혼합용액을 이용하여 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μg/mL 농도로 희석한다.

③ 희석된 시료는 96웰 플레이트에 농도당 각 6개의 웰에 100 μL씩 넣는다.

④ 멀티웰플레이트리더를 이용하여 750 nm 파장영역에서 흡광도를 측정한다.



7.5 MWCNT의 세포 흡수량 측정

7.5.1 시험에 사용된 세포 수 측정

① 우선 Control (for cell counting) 플레이트를 이용하여 각 웰에 배양된 세포의 수를 측정한다.

② MWCNT 처리 후 24시간 뒤, 인큐베이터에서 Control (for cell counting) 플레이트를 꺼내 6개 웰의 상층액을 모두 제거한다.

③ 인산완충식염수를 이용하여 각 웰당 2 mL씩 세척과정을 진행한다. (3회 반복)

④ 각 웰당 트립신-EDTA 용액 1 mL씩 넣고 인큐베이터에 1분간 넣어둔다.

⑤ 인큐베이터에서 꺼내어 완전배지 1 mL씩 추가한다.

⑥ 각 웰당 2 mL씩 15 mL 튜브에 옮긴 후 빈 웰에 완전배지 1 mL씩 다시 넣어 잔여 세포를 모두 15 mL 튜브에 모은다. 튜브당 총 3 mL이 되어야 한다.

⑦ 15 mL 튜브에 든 세포 현탁액을 원심분리기에 돌린다.(1500 rpm, 5분)

⑧ 상등액을 제거한 후, 1 mL의 완전배지를 넣고 침전물을 재현탁시킨다.

⑨ 1.5 mL 마이크로원심분리기 튜브에 세포 현탁액 10 μL와 0.4% 트리판블루 용액 10 μL를 넣고, 10 μL 피펫으로 피페팅하여 용액을 잘 섞어준다. (희석배수 = 2)

⑩ 혈구계수기 또는 세포계수기를 사용하여 세포 현탁액 표본(10 μL)을 계수한다.

⑪ 계수하여 얻어진 세포의 수를 기록하여 둔다.

7.5.2 MWCNT의 세포 흡수량 측정

① MWCNT 처리 후 24시간 뒤, 인큐베이터에서 Control (no treatment) 플레이트와 MWCNT가 처리된 플레이트를 꺼내 모든 웰의 상층액을 제거한다.

② 인산완충식염수를 이용하여 각 웰당 2 mL씩 세척과정을 진행한다. (3회 반복)

③ 각 웰에 0.5 mL의 세포 용해액을 넣고 30분간 실온에서 대기한다.

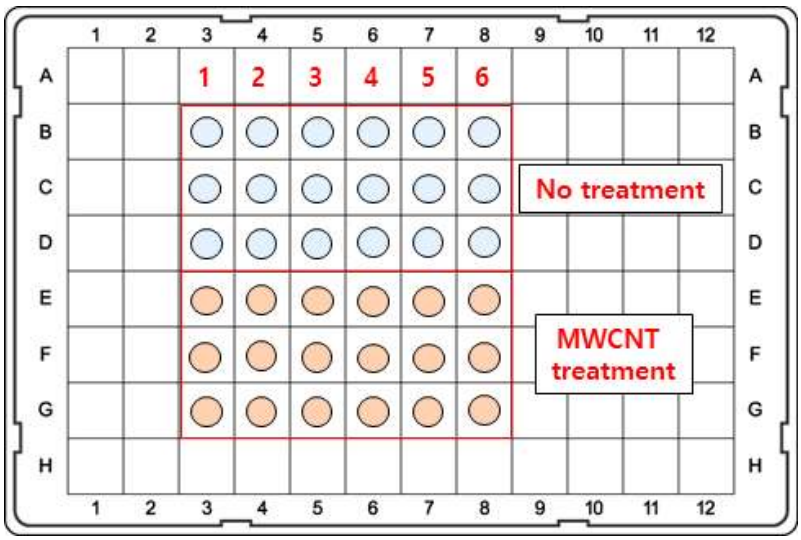
④ 1.5 mL 마이크로원심분리기 튜브에 세포 용해액을 옮긴다.

⑤ 빈 웰에 계면활성제를 0.5 mL씩 다시 넣어 잔여 세포 용해액을 모두 1.5 mL 마이크로원심분리기 튜브에 합친다. 튜브당 총 1 mL이 되어야 한다.

⑥ 초음파 분산기(10% amplitute, 2s on / 1s off, 10 sec)를 이용하여 잔여 세포를 물리적 초음파 용해 시킨다.

⑦ 96웰 플레이트에 각 시료당 3개 웰에 100 μL씩 넣는다.

⑧ 멀티웰플레이트리더를 이용하여 750 nm 파장영역에서 흡광도를 측정한다.



8. 시험결과의 기록

8.1 흡광도 분석을 위한 멀티웰플레이트리더의 성능 검증

- 멀티웰플레이트리더의 성능 검증을 위해 계면활성제와 세포 용해액의 혼합액을 이용하여 흡광도 분석을 진행하였다.
- 측정된 평균값과 표준편차를 바탕으로 CV(Coefficient of variation)% 값을 도출하여 데이터의 신뢰성을 분석하였다. 시험결과, CV*(%)≤10%임을 확인하여 멀티웰플레이트리더의 성능을 검증하였다.

$$*CV(Coefficient\ of\ Variation)\% = SD(Standard\ Deviation) \div Avg(Average) \times 100$$

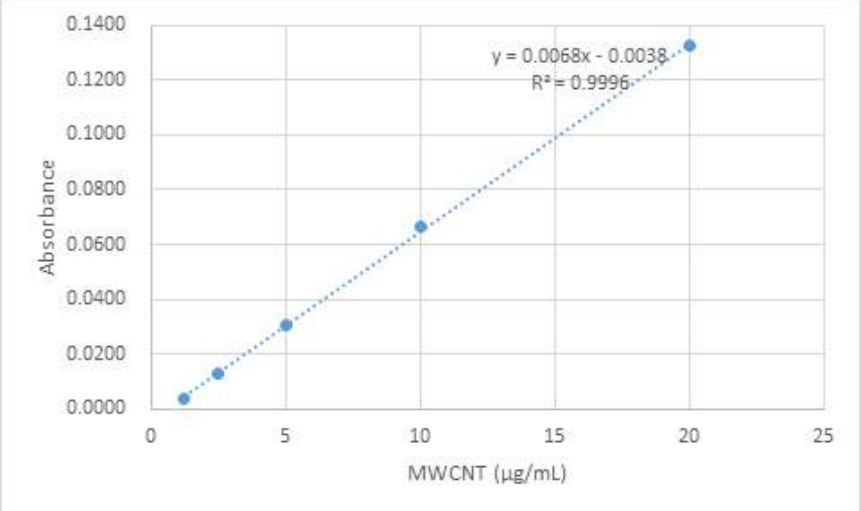
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0373	0.0367	0.037	0.0364	0.0367	0.0372	0.0374	0.0361	0.0377	0.0383	0.0382	0.0365
B	0.0367	0.0373	0.0381	0.0371	0.0369	0.0373	0.0377	0.0351	0.0354	0.0373	0.0383	0.036
C	0.0364	0.0379	0.0372	0.0357	0.0353	0.0367	0.0364	0.035	0.0364	0.0382	0.0383	0.0361
D	0.0375	0.0383	0.0381	0.0377	0.0377	0.0356	0.0347	0.0383	0.0383	0.0383	0.0382	0.0377
E	0.0377	0.0383	0.0381	0.0382	0.038	0.0367	0.0353	0.0381	0.0377	0.0379	0.038	0.0376
F	0.0361	0.038	0.0373	0.0354	0.0347	0.036	0.0369	0.0347	0.0355	0.0377	0.038	0.0359
G	0.0358	0.0379	0.037	0.0353	0.0359	0.0372	0.037	0.0367	0.0361	0.0371	0.0376	0.0361
F	0.0381	0.037	0.0368	0.0362	0.0365	0.0372	0.0365	0.0369	0.0356	0.0366	0.0371	0.0355

- standard deviation, SD = 0.001, Avg = 0.037
- coefficient of variation, CV = 0.001/0.037*100 = 2.749%

8.2 MWCNT의 검정곡선 계산

- 측정에 사용된 MWCNT의 농도는 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μg/mL이며, 각 농도당 6개의 웰을 사용하였다.

MWCNT (μg/mL)	0	1.25	2.5	5	10	20
Absorbance at 750 nm	-0.0004	0.0046	0.0118	0.0298	0.0644	0.1204
	-0.0004	0.0043	0.0118	0.0308	0.0681	0.1317
	0.0007	0.0016	0.0140	0.0316	0.0667	0.1387
	0.0012	0.0025	0.0146	0.0329	0.0662	0.1371
	-0.0005	0.0046	0.0130	0.0310	0.0662	0.1309
	-0.0009	0.0050	0.0141	0.0293	0.0661	0.1351
Mean	0.0000	0.0038	0.0132	0.0309	0.0662	0.1323
SD	0.0008	0.0014	0.0012	0.0013	0.0012	0.0066



8.3 MWCNT의 세포 흡수량 측정

- 모두 동일한 조건에서 3차례 반복시험을 진행하였다.
- Control (for cell counting) 플레이트의 각 웰에 배양된 세포의 수를 세포계수기를 사용하여 측정하였다.
- 세포에 의한 흡광도 영향을 배제하기 위해 MWCNT test 플레이트의 흡광도 측정 후, Control (no treatment) 플레이트의 측정값을 빼준다.
- 정확한 흡광도 측정을 위해 각 시료당 3개의 웰을 사용하였으며, 앞서 계산된 검정곡선의 데이터에 적용하여 최종 흡수량을 도출하였다.

8.3.1 1차 시험

A. Control (for cell counting) 플레이트의 세포 수 측정

Well-number	1	2	3	4	5	6	Avg
Cell number/well ($x10^6$)	1.33	1.12	0.99	1.4	1.05	1.2	**1.18**

B. Control (no treatment) 플레이트와 MWCNT test 플레이트의 흡광도

	1	2	3	4	5	6
Control	0.0399	0.0405	0.0402	0.0403	0.0404	0.0408
	0.0423	0.04	0.0387	0.0378	0.0402	0.0394
	0.0418	0.0405	0.0404	0.0403	0.0389	0.0381
MWCNT	0.1087	0.1143	0.1074	0.1143	0.1088	0.1016
	0.1083	0.1207	0.1048	0.1056	0.1082	0.1038
	0.1087	0.111	0.1046	0.1108	0.1082	0.1023

C. MWCNT의 세포 흡수량 계산

	1	2	3	4	5	6
Control 평균	0.0413	0.0403	0.0398	0.0395	0.0398	0.0394
MWCNT 평균	0.1086	0.1153	0.1056	0.1102	0.1084	0.1026
MWCNT - Control	0.0672	0.075	0.0658	0.0708	0.0686	0.0631
MWCNT (μg/well)*	10.4461	11.5882	10.2402	10.9657	10.6422	9.8431
MWCNT (pg/cell)**	8.8401	9.8067	8.6659	9.2798	9.0061	8.3299

* MWCNT (μg/well): 각 웰당 MWCNT의 농도

1: (0.0672 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 10.4461

2: (0.075 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 11.5882

3: (0.0658 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 10.2402

4: (0.0708 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 10.9657

5: (0.0686 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 10.6422

6: (0.0631 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 9.8431

** MWCNT (pg/cell): 각 세포당 MWCNT의 농도

1: 10.4461 ÷ 1.18 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 8.8401

2: 11.5882 ÷ 1.18 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 9.8067

3: 10.2402 ÷ 1.18 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 8.6659

4: 10.9657 ÷ 1.18 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 9.2798

5: 10.6422 ÷ 1.18 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 9.0061

6: 9.8431 ÷ 1.18 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 8.3299

8.3.2 2차 시험

A. Control (for cell counting) 플레이트의 세포 수 측정

Well-number	1	2	3	4	5	6	Avg
Cell number/well ($x10^6$)	1.07	0.9	0.7	1.14	1.21	1.1	**1.02**

B. Control (no treatment) 플레이트와 MWCNT test 플레이트의 흡광도

	1	2	3	4	5	6
Control	0.0405	0.042	0.0405	0.0409	0.0408	0.0413
	0.0424	0.042	0.039	0.0392	0.0406	0.0407
	0.0426	0.0422	0.0414	0.0411	0.0392	0.0384
MWCNT	0.1279	0.1249	0.1265	0.1324	0.1218	0.1188
	0.1227	0.1221	0.1189	0.1197	0.1168	0.115
	0.1261	0.1226	0.1212	0.123	0.1192	0.1152

C. MWCNT의 세포 흡수량 계산

	1	2	3	4	5	6
Control 평균	0.0418	0.0421	0.0403	0.0404	0.0402	0.0401
MWCNT 평균	0.1256	0.1232	0.1222	0.125	0.1193	0.1163
MWCNT - Control	0.0837	0.0811	0.0819	0.0846	0.0791	0.0762
MWCNT (μg/well)*	12.8725	12.4902	12.6029	13.0049	12.1863	11.7647
MWCNT (pg/cell)**	12.6201	12.2453	12.3558	12.7499	11.9473	11.534

* MWCNT (μg/well): 각 웰당 MWCNT의 농도

1: (0.0837 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 12.8725

2: (0.0811 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 12.4902
3: (0.0819 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 12.6029
4: (0.0846 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 13.0049
5: (0.0791 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 12.1863
6: (0.0762 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 11.7647

** MWCNT (pg/cell): 각 세포당 MWCNT의 농도
1: 12.8725 ÷ 1.02 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 12.6201
2: 12.4902 ÷ 1.02 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 12.2453
3: 12.6029 ÷ 1.02 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 12.3558
4: 13.0049 ÷ 1.02 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 12.7499
5: 12.1863 ÷ 1.02 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 11.9473
6: 11.7647 ÷ 1.02 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 11.534

8.3.3 3차 시험

A. Control (for cell counting) 플레이트의 세포 수 측정

Well-number	1	2	3	4	5	6	Avg
Cell number/well ($x10^6$)	0.67	0.7	0.82	0.65	0.77	0.83	**0.74**

B. Control (no treatment) 플레이트와 MWCNT test 플레이트의 흡광도

	1	2	3	4	5	6
Control	0.0404	0.0413	0.0404	0.0403	0.0407	0.041
	0.0426	0.0413	0.0417	0.0385	0.0404	0.0402
	0.0419	0.0414	0.0408	0.041	0.0384	0.0373
MWCNT	0.1065	0.1076	0.0987	0.0981	0.0931	0.0875
	0.0943	0.0978	0.0897	0.0888	0.0869	0.0787
	0.111	0.1104	0.1001	0.101	0.1019	0.089

C. MWCNT의 세포 흡수량 계산

	1	2	3	4	5	6
Control 평균	0.0416	0.0413	0.041	0.0399	0.0398	0.0395
MWCNT 평균	0.1039	0.1053	0.0962	0.096	0.094	0.0851
MWCNT - Control	0.0623	0.0639	0.0552	0.056	0.0541	0.0456
MWCNT (μg/well)*	9.7206	9.9608	8.6765	8.799	8.5196	7.2598
MWCNT (pg/cell)**	13.1537	13.4787	11.7408	11.9067	11.5286	9.8238

* MWCNT (㎍g/well): 각 웰당 MWCNT의 농도

1: (0.0623 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 9.7206

2: (0.0639 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 9.9608

3: (0.0552 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 8.6765

4: (0.056 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 8.799

5: (0.0541 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 8.5196

6: (0.0456 + 0.0038) ÷ 0.0068 = 7.2598

** MWCNT (pg/cell): 각 세포당 MWCNT의 농도

1: 9.7206 ÷ 0.74 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 13.1537

2: 9.9608 ÷ 0.74 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 13.4787

3: 8.6765 ÷ 0.74 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 11.7408

4: 8.799 ÷ 0.74 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 11.9067

5: 8.5196 ÷ 0.74 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 11.5286

6: 7.2598 ÷ 0.74 × 1,000,000 ÷ 1,000,000 = 9.8238

8.3.4 MWCNT의 각 세포당 최종 흡수량 계산 및 불확도 산출

- 1~3차 측정에서 얻어진 데이터를 바탕으로 MWCNT의 세포당 최종 흡수농도를 산출하면 아래와 같다.
- 모든 산출값은 소수점 셋째 자리에서 반올림하였다.

	각 웰에서 산출된 세포당 흡수량 (pg/cell)					
1차 시험	8.84	9.81	8.67	9.28	9.01	8.33
2차 시험	12.62	12.25	12.36	12.75	11.95	11.53
3차 시험	13.15	13.48	11.74	11.91	11.53	9.82
평균	**11.06**					
표준편차	**1.71**					

- A형 불확도 평가: 측정값이 유한하기 때문에 발생하는 오차로써 측정 결과의 표준편차 (standard deviation)를 총 개수의 제곱근으로 나눈 값 ($u(x_1)$)이다.

$$u(x_1) = \frac{s}{\sqrt{N}}$$ (s : 측정값의 표준편차, N : 측정한 횟수)

① 반복성(repeatability)에 대한 불확도: u_{repeat}(D)

같은 측정 조건에서 같은 시료를 연속적으로 측정하여 얻은 결과들 사이의 일치하는 정도에 대한 불확도로 1차 시험의 3번 반복 측정에 대한 표준편차와 측

정 횟수를 이용하여 구한다.

$$u_{repeat}(D) = \frac{0.51}{\sqrt{6}} = 0.21$$

② 재현성(reproducibility)에 대한 불확도: $u_{repro}(D)$

변경된 측정 조건에서 같은 시료를 측정하여 얻은 결과들 사이의 일치하는 정도에 대한 불확도로 3차 시험 및 3번 반복 측정에 대한 표준편차와 측정 횟수를 이용하여 구한다.

$$u_{repro}(D) = \frac{1.71}{\sqrt{18}} = 0.4$$

9. 교정성적서 작성방법

해당없음

10. 유효성 검증방법

☐ 교정용 표준기 또는 인증표준물질 이용

☐ 다른 교정·시험, 표준물질제조 인증방법으로 획득한 결과와의 비교

☐ 교정/시험기관 간 비교 및 숙련도 시험

☑ 결과에 영향을 미치는 요인에 대한 체계적인 검토

☑ 결과에 대한 측정불확도 평가

☐ 기타 유효화 방법 _____