

KOSHA GUIDE

T - 3 - 2015

제조나노물질의 건강유해성시험 시료의
적정용량 조제를 위한 해설지침

2015. 9

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 임 철 홍
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 임 철 홍

- 제정 경과
 - 2013년 6월 산업독성분야 제정위원회 심의
 - 2015년 5월 산업독성분야 제정위원회 심의(개정, 법규개정조항 반영)

- 관련규격 및 자료
 - 식품의약품안전청, 나노·신소재 의료기기의 안전성 평가 가이드라인
 - OECD Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials

- 관련법규, 규칙, 고시 등
 - 산업안전보건법 제39조(유해인자의 관리 등)
 - 산업안전보건법 시행규칙 제81조(유해인자의 분류·관리)
 - 고용노동부 고시 제2012-67호(화학물질의 유해성·위험성 시험 등에 관한 기준)

- 기술지침의 적용 및 문의
 - 이 기술지침에 대한 의견 또는 문의는 한국산업안전보건공단 홈페이지(www.kosha.or.kr)의 안전보건기술지침 소관분야별 문의처 안내를 참고하시기 바랍니다.
 - 동 지침 내에서 인용된 관련규격 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2015년 9월 3일

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

제조나노물질의 건강유해성시험 시료의 적정용량 조제를 위한 해설지침

1. 목적

이 지침은 「산업안전보건법」 제39조(유해인자의 관리 등), 고용노동부 고시 제2012-67호(화학물질의 유해성·위험성시험 등에 관한 기준)에 의거, 화학물질의 취급 및 노출에 의한 독성 및 건강장해 정보제공을 위한 독성시험의 수행에 있어 나노물질의 건강유해성시험 시료의 적정용량 조제를 위한 기술적 해설지침 제공을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 산업안전보건법 제39조(유해인자의 관리 등) 및 노동부 고시 제2012-67호(화학물질의 유해성·위험성 시험 등에 관한 기준)에 의거 시험동물을 이용한 독성시험의 수행에 있어 나노물질의 건강유해성시험 시료의 적정용량 조제 및 확인에 적용된다.

3. 용어의 정의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 정의는 다음 각 호에 의한다.

(가) “나노(Nano)”란 10^{-9} 을 가리키는 접두어를 말한다.

(나) “나노수준(Nanoscale)”이란 100 나노미터 이하의 평면 또는 입체구조를 말한다. 제조나노물질에 있어서 나노수준이란 1 나노미터에서 100 나노미터 범위를 말한다.

(다) “나노입자(Nanoparticle)”란 나노 수준의 크기를 가지는 입자를 말한다.

- (라) “나노물질(Nanomaterial)”이란 나노수준의 구조나 부피를 가지는 물질로 나노수준이 아닌 같은 물질에 비하여 새로운 특징을 가질 수 있다.
- (마) “응집체(Aggregate)”란 나노입자가 강하게 결합되거나 융합되어 외부의 표면적이 구성입자의 표면적보다 상당히 작게 뭉쳐진 것을 말한다. 응집체는 공유결합, 융합 또는 복잡한 물리적 그물과 같은 강한 힘에 의해만 들어진다. 응집체는 집괴체와 함께 2차 입자라 한다.
- (바) “집괴체(Agglomerate)”란 나노입자, 응집체 등이 모여 외부의 표면적이 구성입자의 표면적과 유사하게 뭉쳐진 것을 말한다. 집괴체를 반데르발스 힘, 물리적 그물과 같은 약한 힘에 의해 만들어진다. 집괴체는 응집체와 함께 2차 입자라 한다.
- (사) “1차 입자(Primary particle)”란 응집 또는 집괴되지 않은 나노입자 그 자체를 말한다.
- (아) “적정용량기준(Dosimetry)”이란 특정시점에서 특정 생체 표적에 입자의 총량(중량, 수, 표면적, 부피 등의 형태로)을 추정하거나 측정하는 것을 말한다.
- (자) “임시저장(Stock) 분산체”란 나노독성시험을 수회 반복하여 실시하기 위하여 단기간 사용하기 위하여 조제된 분산체를 말한다. 임시저장 분산체는 희석하거나 그 자체로 나노독성시험에 사용된다. 분산체의 안정성이 확보되지 않는 경우에는 임시저장 분산체를 사용하여서는 아니되며, 매 시험별로 새롭게 시료를 조제하여야 한다.

4. 시료 조제 지침

4.1 시료 안정성에 대한 고려

- (1) 많은 종류의 나노입자는 액상 분산체의 형태로 조제된다. 분산체에서 나노물질은 1차 입자, 응집체, 또는 집괴체로 존재한다. 일반적으로 분산은 ① 정전기 및 입체적 방해, ②반데르발스 힘, ③자력의 3종류 힘에 의해 유지

되며(흡입시험에서 나노물질의 에어로졸에서도 같은 힘이 적용된다), 분산체의 안정성은 위 3가지 힘의 상호작용에 의해 유지된다. 분산에 영향을 주는 이러한 힘은 주로 입자의 성질, 분산매질 및 입자의 표면성질에 따르며, 안정화제(예를 들면 계면활성제 또는 중합체), 표면개선제/코팅제, 또는 전기적 반발력에 의해 나노물질의 분산이 유지된다.

- (2) 계면활성제에 의해 안정된 분산체는 희석되면 계면활성제가 입자 표면으로부터 떨어져 나가 집괴가 일어나 수 있다. 표면전하에 의해 안정화된 입자는 희석용액의 pH 및 이온강도에 의해 집괴가 일어날 수 있다. 집괴체로 실시한 시험의 결과는 안정화된 분산체로 실시한 독성시험과 다르게 나타날 수 있다.
- (3) 교반과 초음파는 집괴체를 일시적으로 작게 만들 수 있다. 그러나 안정화제를 첨가하지 않은 분산체는 교반과 초음파를 멈추면 다시 큰 집괴체가 되어 침전될 수 있다.
- (4) 입자의 제타포텐셜과 등전점은 분산된 입자의 안정성을 예측할 수 있게 한다. 그러나 입체적으로 안정한 입자는 안정성과 제타포텐셜이 일치하지 않을 수 있다.

4.2 용량측정 단위에 대한 고려

- (1) 현재 건강유해성평가 등에서 가장 일반적으로 사용되는 용량측정 단위는 중량이다. 따라서 건강유해성평가 등의 시험은 일반적으로 중량농도(예를 들면 mg/ℓ)가 표시된다.
- (2) 그러나 중량이 항상 가장 적절하거나 적당한 측정기준은 아니다. 일부 나노물질의 경우에는 입자크기 또는 표면적이 독성에 중요한 역할을 하기 때문에 표면적이거나 개수가 더 적합한 용량측정 단위가 된다.
- (3) 현재 나노독성 연구에 가장 적합한 용량측정 단위에 대한 결론은 도출되지 않았다. 따라서 나노물질에 대한 독성시험이 수행될 경우에는 용량-반응이 다른 방법의 측정 단위로 해석되어 질 수 있도록 특성분석을 충분히 할 필요가 있다. 즉, 개수, 표면적, 중량 각각에 대하여 측정에 사용된 방법과 각

각의 용량측정 단위를 보고할 필요가 있다.

- (4) 입자의 크기 분포는 중량 농도에 대한 함수로 표현된다. 따라서 모든 크기 분포 또는 표면적 측정은 각 농도별로 수행되어야 한다.
- (5) 액상에서 표면적은 직접적으로 측정되지 않는다. 대부분의 입자 측정기는 집기체의 외부지름을 측정하여 표면적으로 환산한다. 따라서 입자 측정기를 사용하여 표면적을 측정할 경우에는 주의가 필요하다.

4.3 시료조제 및 용량측정 단위에 관한 일반 사항

- (1) 작은 불순물도 나노물질의 물리-화학적 성질에 영향을 줄 수 있다. 불순물이 다르면 주성분이 같더라도 다르게 거동할 수 있으므로 불순물의 존재에 주의하여야 한다.

4.4 시험물질의 보관 및 안정성

- (1) 나노물질은 제조업자가 권고한 방법에 따라 보관되어야 한다. 그러나 제조업자의 정보가 부족한 경우에는 일반적으로 고온, 직사광선 및 수분을 피한다. 마른 분말 또는 분산체로 공급된 나노물질은 각각 건조한 상태나 액상 분산체 형태로 보관되어야 한다.
- (2) 임시저장 분산체를 만들어 특성검사를 수행한 경우에는 보관기간 또는 제조업자가 제공한 정보를 확인하기 위하여 추가적인 검토가 필요하다. 임시저장 분산체를 다시 조제하고자 하는 경우에는 같은 배치(Batch) 번호의 다른 나노물질에 대해서도 특성검사를 실시하여야 한다.

4.5 시험액의 화학적 조성

- (1) 시험액의 화학적 조성은 나노입자의 응집/집괴에 영향을 줄 수 있다. 따라서 건강유해성시험이 실시되는 물질에 대해서는 아래의 항목에 대한 검토가 필요하다.
 - (가) 이온강도 : 많은 종류의 나노물질은 매우 희석된 염수, 또는 생리식염수

에서도 집괴가 일어날 수 있다. 따라서 이온강도를 계산할 수 있도록 비세포, 세포 또는 포유류 시험에서 사용된 분산액에 대한 조성이 제공되어야 한다.

- (나) 칼슘 농도 및 용액의 경도 : 2가 금속이온은 특히 낮은 염도에서 집괴에 영향을 줄 수 있다. 포유류 시험에서 음용수에 나노물질을 분산시킬 경우에는 칼슘, 마그네슘 및 용액의 경도가 측정되어야 한다.
- (다) pH : pH는 모든 시험에서 일상적으로 측정되어야 한다. pH는 전하를 가지는 나노물질의 집괴에 영향을 준다. 생리식염수는 때때로 pH 완충용액을 포함하며, 이 때 완충용액에 대한 정보는 정확히 기술되어야 한다.
- (라) 용해된 유기물질 : 특정 형태의 유기물질 및 그 리간드는 나노물질의 분산과 집괴에 영향을 준다.
- (마) 염기강도 : 집괴에 pH와 유사한 영향을 준다. pH를 조정하기 위하여 중탄산염을 처리한 경우에 특히 중요하다.
- (바) 분산 물질 : 분산체의 안정을 위하여 표면활성제를 첨가할 수 있다. 분산 물질이 액상과 입자 표면에서 분포할 수 있어 제공되는 분산체의 구조와 농도에 대한 정보가 필요하다.

4.6 임시저장 분산체의 특성 확인

(1) 임시저장 분산체에 대해 아래와 같은 특성 확인이 필요하다.

(가) 시험물질에 대한 제조업자가 제공한 모든 정보

(나) 측정된 평균 입자 크기(예를 들면 전자현미경으로 측정한 입자 크기)

(다) 입자 크기분포 및 다분산성 정보 또는 응집, 집괴 등 입자의 크기분포를 나타내는 다른 지표들

(라) 임시저장 분산체에서 측정된 중량 농도

(마) 1차 입자의 표면적 측정 결과

(바) 전하를 띤 입자에 대해서는 표면의 전하

(사) 특정한 입자의 형태(예를 들면 섬유에서 길이, 표면의 기능 등)

(2) 임시저장 분산체의 구성에 대한 분석은 가능한 불순물에 대하여 특별히 주의하여 수행되어야 한다. 불순물은 제조, 취급 및 분산의 모든 과정에서 나노물질에 포함될 수 있다.

(3) 입자 크기 및 입자 크기 분포 등 특성분석은 아래와 같이 실시한다.

(가) 제공된 나노물질(나노물질 분말)의 특성 확인에 사용되는 장비 또는 방법의 예는 아래와 같다.

크기, 크기분포, 형태	Scanning electron microscopy(SEM) Transmission electron microscopy(TEM) Atomic force microscopy(AFM) X-ray diffraction(XRD) Differential mobility analysis
결정도, 결정구조	X-ray diffraction(XRD) Electron diffraction in a transmission electron microscope(ED)
나노입자 집합체의 화학조성 및 순도(분말 시료) 또는 단일 나노입자의 화학성질	Inductively-coupled mass spectroscopy (ICPMS) Inductively-coupled plasma atomic emission spectroscopy(ICP-AES) Atom-absorption spectroscopy(AAS) X-ray fluorescence spectroscopy(XRF) X-ray photoemission spectroscopy(XPS) Time-of-flight secondary ion mass spectroscopy(TOF-SIMS) Ultraviolet-visible spectroscopy(UV-Vis) Fourier-transform infrared spectroscopy(FTIR) Energy-dispersive(wave-length) dispersive Xray spectroscopy in an electron microscope
표면 화학 및 표면 활성	X-ray photoemission spectroscopy(XPS) Electron spin resonance(ESR) Auger electron spectroscopy(AES)
응괴지표로서의 표면적	Isothermal gas adsorption/BET

(나) 액체 분산체에서의 나노물질 특성 확인에 사용되는 장비 또는 방법의 예는 아래와 같다.

크기 분포	Dynamic light scattering(DLS) Analytical ultracentrifugation(AUC) Cryo-transmission electron microscopy cryoTEM Field flow fractionation (FFF) combined with SAXS
표면 전하, 표면 포텐셜	Zeta potential by light-scattering electrophoresis
라디칼 종	Electron spin resonance(ESR)
용해도	Conductance Visual conformation over time
표면 활성	Photocatalytic degradation Vitamin C assay
단일 자가 형광 또는 분산액에서의 형광기능화된 나노입자	Fluorescence microscopy
나노입자의 침강	Computational dosimetry
단일 나노입자의 단백질 코팅	Fluorescence correlation spectroscopy(FCS)

(다) 세포 표면에서의 나노물질 특성 확인에 사용되는 장비 또는 방법의 예는 아래와 같다.

수 밀도, 크기 분포	Liquid atomic force microscopy(AFM) (Environmental) Scanning electron microscopy(ESEM)
화학조성 및 단일 나노입자의 순도	Energy dispersive X-ray analysis in a scanning electron microscope(EDXS)
나노입자의 응집	Fluorescence-activated cell sorting(FACS)

(라) 조직 및 세포에서의 나노물질 특성 확인에 사용되는 장비 또는 방법의 예는 아래와 같다.

수 밀도, 크기 분포 및 나노입자 위치	Fluorescence microscopy Confocal light microscopy X-ray fluorescence imaging(XFM) Liquid atomic force microscopy (AFM) (Environmental) Scanning electron microscopy(ESEM) Magnetic resonance imaging(MRI) of superparamagnetic nanoparticles
화학조성 및 순도, 총 나노입자 중량	Inductively-coupled mass spectroscopy(ICPMS)

(4) 집괴는 나노물질의 연구에서 매우 중요하다. 나노물질 연구에서 집괴의 역할을 고려하여 시험물질 준비 시 잘 조절되도록 주의한다.

4.7 투여 전 시료의 특성 확인 및 관리 조치

- (1) 보관용 분산액에서 언급한 일반적인 권고사항을 따른다.
- (2) 특성 확인의 주요 내용은 조제된 시료의 정확한 조성을 확인하는 것이다.
입자의 크기와 농도가 임시저장 분산액에서와 다를 수 있기 때문에 아래와 같은 추가 정보가 필요하다.
- (가) 조제 용량, 사용된 물 또는 용매 형태
- (나) pH 및 사용된 완충용액
- (다) 초음파 시간에 대한 시간/강도/도구/초음파 빈도로 표시되는 정확한 정보
(또는 J/L로 표시되는 에너지 양)
- (라) 시험 분산액이 시험계에 처리되기 전 초음파 또는 교반 후 얼마나 지났는지에 대한 정확한 정보
- (마) 시험계에 처리된 정확한 용량 및 시험계에 어떻게 혼합되었는지에 대한 정확한 방법
- (바) pH, 이온 강도, 용해된 유기물질
- (3) 시험 분산체 및 시험 중 매체의 관리조치에 대한 권고사항은 아래와 같다.
- (가) 일상적인 pH, 온도 등을 측정한다.
- (나) 시험 분산체의 노출농도를 측정한다. 현재의 기술로 가능하면 초기 노출 농도를 확인한다(예를 들면 용해된 금속 및 금속 산화물 농도).
- (다) 필요하다면 시험매질을 변경하여 일정한 노출농도를 유지한다. 시험 용매의 변경은 경험적으로 수행되어야 할 필요성이 있지만, 목표농도는 유지되어야 한다.
- (라) 입자의 개수, 크기분포, 집괴 등을 확인한다.

(마) 분산제 등 담체를 관리한다.

4.8 나노독성연구에서의 생리식염수 등과 같은 담체에 대한 특별고려 사항

- (1) 높은 이온강도를 가지는 완충용액은 시험물질을 집괴시켜 용량측정에 문제를 일으킬 수 있다. 나노물질이 물에 안정적으로 분산되면 초순수로 임시 저장 분산액을 조제하고, 이것을 다시 생리식염수 등의 완충용액으로 희석시켜 사용하는 것이 더 좋을 수 있다. 이와 같이 나노물질을 조제한 경우에는 생리식염수 등의 완충용액에서 나노물질의 특성분석이 추가적으로 수행될 필요가 있다.
- (2) 나노물질의 분산을 증가시키기 위하여 생리식염수에 분산안정제를 첨가할 수 있다. 그러나 분산안정제 없이는 나노물질을 분산시키는 것이 불가능한 경우 등 분산제 사용의 타당성이 인정되어야 한다. 흡입독성연구에서는 기관지폐포세척액 또는 이와 유사한 물질의 사용이 우선적으로 고려되어야 한다. Tween, Triton 등 기관지폐포세척액과 유사한 물질은 오염에 의한 거짓영향을 최소화하기 위하여 최고등급의 사용이 권장된다.
- (3) 조직배양 시험은 높은 농도의 산소, 이산화탄소(예를 들면 5% CO₂, 95% O₂)와 높은 온도(체온, 37℃)에서 실시된다. 이러한 조건은 나노물질의 화학적 성질을 변화시키지 않는 것으로 간주된다.
- (4) 시험과정에서 생리액과 배지에 특정 물질이 첨가될 수 있다. 이 경우 첨가되는 물질의 처리 전 또는 후에 입자의 특성변화와 이것들이 입자의 분산과 독성에 영향을 주지 않는다는 것을 확인할 필요가 있다.

4.9 투여 경로 및 포유동물 연구에서 나노물질 분산체의 거동

- (1) 포유동물을 이용한 시험은 흡입/기관지 주입, 경구 또는 경피 노출이 가능하다. 아래와 같이 각 경로에서의 시험물질의 물리적 거동에 대한 고려가 필요하다.
- (2) 흡입
 - (가) 에어로졸, 기체 또는 증기 흡입은 현탁된 입자의 무영향관찰농도를 확인

할 수 있는 유일한 노출 경로이다. 흡입시험에서는 독성뿐 아니라 나노물질의 물리화학적 성질과 관련된 생물학적 반응의 전반적인 특성을 평가하기 위하여 세포와 조직에서의 잠재적인 노출과 나노입자의 상호작용을 고려하는 것이 중요하다.

- (나) 일반적으로 입자와 특정 나노구조체의 독성은 초기 폐 침착과 제거에 영향을 받는다. 노출과 관련되어 많은 복잡한 변수가 있기 때문에 폐에서의 용량은 누적된 폐축적과 관련하여 입자동력학에 초점을 맞추어 실시할 필요가 있다.
- (다) 시험물질과 발생된 에어로졸의 표면적, 입도분포 등과 같은 중량 이외의 다른 단위에 대해서도 특성화하는 것이 중요하다. 시험결과가 유해성·위험성 평가에 활용되기 위하여 시험환경이 확인되고 나노물질의 특성(예를 들면 1차 입자의 지름, 입도분포, 질량농도, 개수농도, 표면적)에 대해서 주의 깊게 보고되어야 한다. 나노입자 에어로졸은 최대 흡착이 가능하게 되는 입도 분포(집괴를 포함하여 공기역학적질량중위직경(MMAD, Mass Median Aerodynamic Diameter) < 3 μm)로 생성되어야 한다. 반복 노출시험은 급성시험보다 낮은 농도에서 실시되기 때문에 하기도에 도달할 수 있는 입도분포를 고려하여야 한다.
- (라) 입자는 사람에서의 노출경험과 시나리오에 적합한 형태와 크기분포를 가져야 한다. 시험농도는 예상되는 최대내성용량을 포함해야 한다. 공기 중 입자의 수, 체류시간, 응집체/집괴체의 형성에는 명확한 상관성이 있다. 따라서 에어로졸은 시험동물의 호흡영역에 최대한 가까이 생성하는 것이 바람직하다. 집괴로 인하여 나노크기의 에어로졸 발생은 예측되지 않으며, 달성 가능한 공기역학적 입경분포는 일반적으로 0.3~3 μm 인 것으로 기대된다.
- (마) 나노물질의 거동에서 공기 역학적 직경과 기하학적 영향을 구분하는 것이 중요하다. 후자는 입자가 어디에 침착하는 지 추정하는 데 중요하며, 전자는 나노물질과 생물계의 상호 작용을 확인하기 위해 중요하다.
- (바) 나노 입자의 독성시험에서는 중량보다 입자의 개수 또는 총 표면적이 더 적합 할 수 있다. 응집/집괴되지 않은 나노입자가 존재한다고 예측되면

질량측정기기를 이용하여 농도와 입도분포를 측정하고 또한 SMPS 또는 ELPI 등의 장비를 사용하여 각각의 입자특성을 측정하여야 한다.

(사) 적절한 농도와 크기의 에어로졸을 발생시키기 위하여 물 또는 생리완충액 등을 사용할 필요성이 있는 경우에는 이것들에 의해 집괴가 일어나지 않는다는 것을 확인하여야 한다. 시험입자의 농도는 항상성과 균질성이 확보되어야 한다. 물 이외의 분산액을 사용하는 경우에는 적절한 방법(예를 들면 가스크로마토그래피)으로 정량하여야 한다.

(아) 흡입챔버 등에서 주의 깊고 지속적으로 공기의 흐름을 모니터링하고 제어하여야 한다. 공기흐름은 노출 중 최소한 시간단위로 기록되어야 한다.

(자) 흡입독성은 동물의 호흡영역에서 시료를 채취하여 농도를 측정하여야 한다. 비휘발성 단일성분의 나노입자 농도는 필터를 이용한 중량법으로 분석할 수 있다. 노출농도 범위는 최대내성용량이 포함되어야 한다. 그러나 최대내성용량은 나노물질에 적용되지 않을 수 있기 때문에 질량과 입자의 개수 중 최대노출시나리오의 2~3배 초과 농도에서 실시하는 것이 권고된다.

(차) 노출 환경은 최대한 일정하게 유지되어야 한다.

(카) 에어로졸의 입경분포는 각 농도별로 한번 이상 확인되어야 한다. 총 질량농도는 다른 방법으로 구한 질량농도와 합리적인 범위에 있어야 한다. 질량농도뿐만 아니라 응축입자계수기(10~1000 nm의 범위 측정)를 이용하여 개수 농도를 측정할 수 있다. 입경분포는 집괴체 또는 더 큰 나노입자 및 나노구조물질의 존재를 확인하기 위하여 광학입자계수기(300~20,000 nm의 범위 측정)를 이용하여 측정 할 수 있다.

(3) 기관

(가) 칼슘이온, 마그네슘 이온이 포함되지 않은 인산완충액 또는 기관지폐포세척액 등이 기관지 주입시험에서 나노물질의 현탁액으로 시도되었다. 그러나 기관지폐포세척액을 이용할 경우 추가적으로 동물의 희생이 요구되며, 동물의 취급방법, 마취정도, 기관지폐포세척액을 얻는 기술, 개체 차

등이 문제가 되어 칼슘, 마그네슘이 포함되지 않은 인산완충액에 폐 단백질의 한 종류인 DPPC를 넣은 유사 기관지폐포세척액 사용이 제안되었다. 기관지 주입액 조제에 사용되는 모든 분산안정제는 분산과 독성에 미치는 영향을 충분히 검토하여 선택하여야 한다. 화학계면활성제인 Pluronic-F68, Tween 등도 기관지주입액 제조시의 분산안정제로 시도되고 있다.

(나) 미세한 스프레이를 이용한 흡인은 분무장치의 차단과 분무되는 용량의 정확성 등 몇 가지 실질적인 문제를 가지고 있다.

(다) 점적주입 방법도 폐 표면의 면역체계에 영향을 줄 수 있으며, 흡입보다 고르게 침착되지 않는 단점이 있다. 따라서 투여시 집괴되지 않도록 주의하여야 한다. 흡인과 비교하여 점적주입의 장점은 정량적으로 주입할 수 있다는 것이다.

(4) 경구

(가) 규제를 위한 시험에서 소화관 주입 용량은 위를 팽창시키지 않고, 편하게 할 수 있도록 일반적으로 10~20 ml/kg으로 정해진다(흰쥐는 20 ml/kg~50 ml/kg, 마우스는 20 ml/kg~30 ml/kg). 만성시험은 사료에 나노입자를 혼합하여 실시한다. 나노물질은 불순물의 운반체로 작용할 수 있기 때문에 사료에 혼합한 나노물질의 독성시험은 사료의 성분에 의해 영향을 받을 수 있다.

(나) 때때로 시험물질이 사료에 분무되어 혼합되거나 코팅된다. 어떤 경우에도 사료에 고르게 분산시키기 위해 임시저장 분산액이 필요하다. 투여량은 가능하다면 사료의 일반적인 영양분석과 함께 계산되어야 한다. 나노입자는 흡착 또는 다른 효과로 사료의 생체 이용률과 소화를 감소시켜 이차적인 독성을 일으킬 수 있다. 위의 낮은 pH는 나노입자의 집괴에 영향을 줄 수 있기 때문에 위장관 및 장관 순환에서 나노물질의 화학적 성질을 고려할 필요가 있다.

(다) 음용수에 나노물질을 분산시켜 투여하는 방법은 일반적으로 OECD 시험 가이드라인 407 및 408에 따른다. 그러나 투여 시 침강을 방지하기 위해 주의하여야 한다. 또한, 칼슘, 마그네슘의 양과 물의 총 경도를 측정하여

야 한다. 난입자 분산액의 안정성은 시간에 따라 확인하여야 한다.

(5) 경피 노출

(가) 나노입자의 피부노출은 작업환경에서 일어날 수 있다. 나노입자의 피부흡수는 적을 것으로 예상되지만, 나노물질이 피부를 관통하는 것을 배제할 수 없다.

(나) 나노물질의 응집에 대한 고려는 없지만, 나노물질의 흡수는 OECD 시험 가이드라인 427과 428에 따른다. 과학적, 윤리적인 문제 등으로 인하여 OECD 시험가이드라인 428 시험관적 피부흡수 시험법을 사용하는 것이 바람직하다.

(다) 시험물질을 피부로 흡수시키는 것은 독성시험에서 중요한 고려사항이다. 일반적으로 시험물질을 피부에 균일하게 전달하기 위하여 담체에 분산한다. 담체에는 물, 에탄올, 톨루엔, 올리브오일, 바셀린, 프로필렌 글리콜, 아세톤/올리브 오일 등이 다양하게 사용되고 있다.

(6) 주사

(가) 순환계, 조직 또는 체강 내 주사는 일반적 체내동태연구의 투여경로로 사용된다. 보통 생리식염수에 분산되지만, 소수성이 큰 물질은 옥수수기름과 같은 지용성 담체에 분산되어 사용된다.

(나) 주사기 내에 발생한 미세거품은 나노물질을 침전시킬 수 있기 때문에, 거품이 발생하지 않는 분산기술이 필요하다. 마이크로 기포가 주사기의 내면에 형성되지 않도록 시험물질을 주사기에 채운 후 너무 오래 두지 않아야 한다. 주사바늘의 굵기는 주사기가 막하지 않도록 나노물질의 농도 또는 점도를 고려하여 충분한 것을 선택한다. 반응성이 큰 나노물질은 주사 시 매우 고통스러울 수 있다. 이 경우에는 동물 복지를 최우선으로 하여 바늘의 크기와 상관없이 예방 마취를 고려하여야 한다.

(다) 피부과민성시험에서는 낮은 피부침투성으로 인한 거짓 음성 결과에 주의하여야 한다.

4-10 배지에서 나노물질 분산

- (1) 시험관적 나노물질연구는 OECD 작업반 SG7의 준비문서에 자세히 설명되어 있다. 세포독성시험, 돌연변이시험, 세포/조직배양 스크리닝시험 및 면역독성 등을 포함한 많은 시험관적 시험법이 있다. 이들 중 전부는 아니지만 대부분에서 생리식염수 또는 보다 복잡한 배지를 사용한다. 일반적으로 사용되는 일부 배지에서 시험물질이 응집되어 배양세포와 직접적인 접촉이 증가할 수 있다. 배지에 분산안정제로 수용성 펩타이드 또는 다른 유기 리간드를 사용하는 것이 가능 수 있으나, 생물학적 관점에서는 문제가 발생할 수도 있다(즉, 생체 시스템이 이러한 물질을 “항원”으로 인식할 수 있다.). 배지는 종종 단백질을 포함하고 있어(예를 들면 우태아혈청 또는 우혈청알부민) 분산안정제의 추가가 필요하지 않을 수 있다.
- (2) 혈청 또는 우혈청알부민을 사용하는 경우의 문제는 혈청이나 우혈청알부민의 제품배치에 따라 다른 성분(펩타이드, 지방산, 설탕 등)이 포함될 수 있다는 것이다. 이것은 고순도의 우혈청알부민 또는 모든 성분이 알려진 비동물성의 화학적 첨가제를 사용하면 해결할 수 있다. 일반적 우혈청알부민 또는 폐 유래 계면활성제인 DPPC의 사용이 시도되고 있다.
- (3) 광활성 나노물질에 대해서는 세포배양실험에서 빛의 영향을 방지하기 위한 조치를 취하여야 한다. 임계입경값(유체 역학적 직경 > 40 nm)이상에서 침강이 확산보다 더 영향을 주기 때문이다.