

제조나노물질의 안전성 평가를 위한 시료준비 및 물리화학적 특성분석 기법

배은주 · 이정진 · 김영훈* · 최경희** · 이종협†

서울대학교 화학생물공학부, *광운대학교 화학공학과, **국립환경과학원 환경노출평가과

Sample Preparation and Analysis of Physico-Chemical Properties for Safety Assessment of Manufactured Nanomaterials

Eunjoo Bae, Jeongjin Lee, Younghun Kim*, Kyunghee Choi**, and Jongheop Yi†

School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea*

***Environmental Exposure Assessment Division, Chemicals Assessment Department,
National Institute of Environmental Research, Environmental Research Complex, Incheon 404-170, Korea*

Received February 2009, accepted June 2009

Manufactured nanomaterials have drawn attention due to their potential toxic effects on human and environment. The physico-chemical properties of nanomaterials can play an important role on the understanding of the toxicity mechanism, however, few physico-chemical properties have been reported. In this study, the physico-chemical properties, including size, agglomeration, solubility, crystalline structure, surface area, density, octanol-water partition coefficient, dustiness, surface composition, surface charge, surface energy, surface reactivity, photocatalytic activity, redox potential or the radical formation potential were recommended to be characterized during the sample preparation and toxicity evaluation. In addition, preparation methods of nanomaterials suspension, such as a bottom-up approach and a top-down approach, were explained. Recommendations regarding on the safety assessment of manufactured nanomaterials are i) sample preparation with minimize the chemical additives; ii) relevant selection of physico-chemical properties, which are related to nanotoxicity; iii) collaborations between toxicologists and engineers (or scientists), who designs and characterize manufactured nanomaterials.

Key words: Nanosafety, manufactured nanomaterial, sample preparation, physico-chemical properties

1. 서 론

제조나노물질은 상업적, 혹은 연구를 위한 목적으로 인위적인 설계를 통해 제조된 나노크기 이하의 물질을 의미한다. 나노물질은 특히 물질의 가로, 세로, 직경 등의 규격 중 하나가 100 nm 미만인 물질이다. 나노물질의 경우, 극히 작은 크기 때문에 기존 마이크로 입자들에 비해 동일 질량에 대하여 표면원소의 비율이 비약적으로 커진다. 이로 인해 활성이 우수한 표면특성을

가지며, 표면적의 크기가 극대화되는 것이 특징적이다. 이와 같은 나노물질의 독특한 특성은 여러 분야에서 기존 기술의 한계를 뛰어넘을 수 있는 가능성을 제공함에 따라, 그 응용분야가 확대되는 요인이 되고 있다. 특히, 나노크기에서의 양자효과는 물질의 특성과 효능을 결정하는데 중요한 역할을 하기도 한다. 이런 이유로 나노기술은 제2의 산업혁명으로 불릴 만큼 크게 각광을 받아왔을 뿐 아니라, 최근 10여 년 전부터 촉매, 전자, 의약 등 광범위한 분야에서 사용이 꾸준히 증가

†To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-(0)2-880-7438, Fax: 82-(0)2-885-6670, E-mail: jyi@snu.ac.kr

되고 있다.

나노기술의 발전과 함께 나노물질의 잠재적 위해성에 대한 논의가 있는 것 또한 사실이다. 나노물질의 잠재적 위해성에 대한 보고는 대기관련 연구그룹들이 수행한 초미립입자의 호흡기 질환에 대한 연구에서부터 시작된 것으로 추정된다¹⁾. 특히, Oberdöster는 어류를 대상으로 한 실험에서 제조나노물질들이 호흡기를 통해 체내로 침입하여 혈관을 통과할 뿐만 아니라 뇌에도 전달될 가능성이 있다고 보고하였다²⁾. 제조나노물질의 위해성 문제가 부각되면서 최근 국내 뿐만 아니라 국외에서도 나노물질의 잠재 위해성 관련 연구들이 급속히 증가하였다. 그러나 나노물질은 다른 위해성 화학물질들과 달리 크기, 표면적, 결정 구조 등의 물리화학적 특성이 주요 인자가 된다. 그러므로 나노물질의 고유 물리화학적 특성이 제대로 유지된 상태에서, 혹은 충분히 물리화학적 조건들을 파악한 후 독성해석이 되었는지가 매우 중요하다. 즉, 동일 성분으로 구성된 나노입자라고 하더라도 각각의 물리화학적 특성에 따라 독성 결과가 달라질 수 있음을 의미한다.

그러나 현재까지 나노물질의 독성을 보고한 연구 중에서 물리화학적 특성을 충분히 고려하여 수행한 경우는 많지 않으며, 특성 분석을 위한 체계적인 방법론조차 아직 정립되지 않은 상태이다. 이러한 상황에서 현재 국제표준화기구(ISO)나 경제협력개발기구(OECD)와 같은 국제기구들은 주로 선진국들로 구성된 다국적 작업반을 구성하여 제조나노물질의 위해 가능성 문제를 파악하고, 나노물질의 물리화학적 특성 분석방법에 대

한 가이드라인을 준비하고 있는 중이다.

제조나노물질의 안전성 문제에 있어서 가장 이슈가 되고 있는 것 중 하나는, 나노물질의 어떠한 물리화학적 특성에 의해 독성이 발현되는가 하는 것이다(Fig. 1). 이를 위하여 독성평가결과와 제조나노물질의 물리화학적 특성을 함께 고찰하는 연구가 진행되었다. 일례로 Wahrheit는 산화티탄 나노입자의 표면코팅제의 종류와 폐염증 발현과의 관련성을 연구하였다³⁾. 이 논문에서는 막대(rod) 혹은 점(dot)형태와 같은 산화티탄 입자의 모양에 따른 직접적인 상관성을 찾기는 어렵지만, 입자의 크기가 마이크로 단위에서 나노단위로 줄어듦으로써 폐염증 발병율이 증가하는 것을 관찰하였다고 보고하였다⁴⁾. 또한, 금속 나노입자가 용액 및 생체 내 존재할 때 나노입자로부터 누출되는 금속이온이 독성 영향을 미칠 수 있음을 지적하였다. 유사한 예로, 금속성 나노입자인 구리나노입자를 쥐에 먹였을 때 장기의 손상은 없었으나, 나노입자로부터 누출된 구리 이온과 체내의 알칼리성 물질(예를 들면 Na 등)이 장기 내에서 응집된 후 축적되어 결국 염증반응을 유발한다고 보고된 바 있다⁵⁾. 뿐만 아니라, 용액 상의 은나노입자로부터 빠르게 누출된 은이온이 나노입자의 크기와 더불어 *E. coli*에 미치는 독성영향의 주요인자 중 하나인 것으로 보고되었다⁶⁾. 한편, 탄소나노튜브는 비슷한 모양을 가지는 석면에 비해서 상대적으로 높은 독성을 나타내며 이는 탄소나노튜브의 크기가 현저히 작기 때문인 것으로 인식되고 있다. 이와 함께, 탄소나노튜브의 외세경, 길이의 크기분포, 혹은 잔류촉매여부에 따른

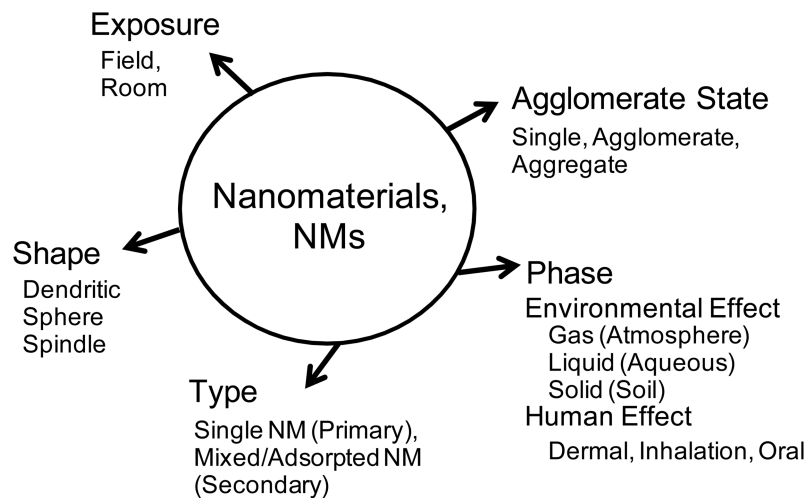


Fig. 1. A variety of parameters of manufactured nanomaterials for toxicity; The exposure scenarios should be considered to characterize the physico-chemical properties.

독성연구들이 진행되고 있다. 그 중의 한 연구에서는 탄소나노튜브의 길이가 짧을수록 독성이 증가할 수 있다는 것이다⁷⁾.

나노물질의 정량적인 투입을 위해 용액 상에 분산되어 있는 나노물질 시료의 준비는 독성평가의 기초적인 과정이지만 예상 외로 매우 중요하고 어려운 작업이다. 나노물질을 분산시키는 방법은 여러 가지가 있지만, 가장 중요한 점은 이러한 분산 과정에서 독성평가 결과에 미치는 영향을 최소화하여야 한다는 점이다. 가장 이상적인 독성평가용 나노물질 시료는 아무런 첨가제가 없는 상태에서 나노물질 고유의 특성을 그대로 유지한 채, 뭉침현상 없이 단일 물질로서 생체매질 상에 분산되어 있는 형태라고 할 수 있다. 하지만 이와 같은 이상적인 시료를 제조하는 것은 실제로는 쉬운 작업이 아니다. 예를 들어, 분산제와 같은 첨가제가 없는 나노물질 시료는 분산도가 높은, 고농도의 나노물질을 제조하기 힘들 뿐 아니라 분산을 유지하는 능력이 떨어질 가능성이 크게 된다. 분산제가 첨가되는 경우 분산도 측면에서 이익일 수 있으나, 분산제 자체가 독성 결과에 미치는 영향이 있을 수 있고 분산제가 나노물질 고유의 특성을 변화시킬 가능성이 크다. 따라서 여러 가지 과정을 통하여 나노물질 시료를 제조하고, 각각의 제조과정이 나노물질 고유의 성질에 미치는 영향을 고찰하여 가장 적합한 시료제조법을 찾아 연구하는 것이 중요하다. 즉, 나노물질 시료 제조방법, 물리화학적 특성 변화, 독성평가 결과를 모두 하나의 틀 내에서 고찰하여 연구 결과를 분석해야 한다. 또한 주변 환경에서 직접 채취를 통해 얻는 나노물질 시료에 대해서도 처리 과정이 필요하다. 환경이나 작업자에게서 직접 채취한 나노물질 시료를 대상으로 독성평가를 수행하는 경우의 시료는 나노물질의 순도가 높지 않은 여러 가지 환경 물질의 혼합물일 수 있으므로, 먼저 목적이 되는 나노물질의 추출이 선행되어야 할 것이다.

나노물질의 물리화학적 특성에 대한 연구는 나노물질의 독성발현을 이해하는 분야에서도 중요하지만, 인체와 환경 모두에 대한 나노물질의 위험성을 파악하기 위해 수행하는 다양한 경로에 대한 노출 평가 연구시 필수적인 요소이다. 나노물질은 환경에 노출되었을 때 여러 환경 매질에서 다양한 형태로 환경과 인체에 영향을 미칠 수 있는데, 예를 들어서 토양에서는 토양입자에 흡착하여 응집될 수 있고, 빛에 노출된 상황에서는 광화학적 반응을 유발할 수 있다(Fig. 1). 인체 및 환경 노출 가능성을 파악하기 위해서는 환경 내 제조

나노물질의 특성 및 거동에 대한 규명이 필요하고 이를 위해서 기존의 방법들의 적용 가능성을 평가하고 새로운 방법을 도출해야 한다.

좀 더 세부적인 관점에서 살펴보면 다음과 같은 노출평가에 필요한 연구들을 도출할 수 있다. 첫째, 제조 나노물질의 독특한 물리화학적 특성들이 물질의 종류(예를 들어 탄소기반인지 금속기반인지)에 따라 어떻게 다르며, 벌크상 혹은 단일입자상으로 존재하느냐에 따라서 특성의 차이를 파악을 해야 한다. 둘째, 연구실 혹은 산업체에서 비교적 순수한 상태의 나노물질이 환경에 노출되었을 때, 나노물질의 특성변화 연구가 진행되어야 한다. 즉, 제작, 가공, 최종제품으로의 제조과정 전반에 대한 이해와 함께 단계별 나노물질의 특성변화 연구가 필요하다. 셋째, 제조나노물질이 환경에서 이동하고 침착되는데 영향을 주는 물리화학적 특성을 파악해야 한다. 특히 토양콜로이드와 같은 서로 다른 매질을 통해 나노물질이 어떻게 이동하는지 연구가 필요하다. 넷째, 나노물질의 특성과 대기 조건들이 어떻게 나노물질의 대기 내 거동에 영향을 주는지 파악하는 것도 중요하다. 다섯 번째, 토양과 지하수에서 나노물질이 얼마나 이동하는지, 토양과 지표에 배출되었을 때 지하수와 대수층 내로 이동할 가능성과 지하수 섭취를 통한 노출 범위를 예측할 필요가 있다. 여섯 번째, 제조나노물질의 생체 내 축적, 나노물질의 생물학적, 비생물학적 공정을 통해 분해가 진행되는 정도, 분해가 될 경우 부산물은 어떤 것인지 파악할 필요가 있다. 일곱 번째, 제조나노물질의 물리화학적 특성들이 대기, 물, 토양 등의 환경을 어떻게 바꾸는지, 예를 들면 나노물질에 의한 산화환원 반응 혹은 광반응 등에 의한 환경영향을 평가하는 연구도 필요하다. 여덟 번째, 일반적인 하수처리법을 사용하여 음용수 내 나노물질을 효과적으로 제거할 수 있는지 여부 및 이의 처리 기작을 연구할 필요가 있다. 마지막으로, 나노물질의 독특한 특성을 반영하기 위해서는 현존하는 거동 및 이동 모델의 수정이 필요할 수도 있다.

이와 같이, 나노물질의 물리화학적 특성을 파악하는 것이 독성 및 노출 평가의 전반적인 위해성 평가분야에서 중요한 부분을 차지하고 있지만, 그 방법론에 대한 연구는 초기단계라고 할 수 있다. 현재까지 제시된 방법과 기술을 통해 대상 나노물질의 입자수, 크기, 모양, 표면특성(반응성, 전하, 표면적) 등을 측정하여 제조나노물질을 검출, 정량화 및 특성화할 수 있으며, 다른 물질에 흡착되었거나 응집된 정도를 판별할 수 있

다. 또한 시료준비를 위한 표준화된 방법과 독성평가에 있어서 물리화학적 특성 변화 및 노출특성을 파악하기 위한 방법론이 제시되고 있다. 그러나 이와 관련된 연구 분야는 모두 개발 중인 것으로써, 더 많은 연구결과와 축적과 고찰이 필요하다고 할 수 있다. 본 연구는 제조나노물질 독성을 평가하기 위해서 물리화학적 특성들의 파악이 선결이 되어야 한다는 전제하에서, 전 세계적으로 진행되고 있는 가이드라인 작업과 방법론적 제안들에 관련된 연구들을 정리하고자 한다. 추가적으로 기존의 방법과 다른 새로운 방법론 제시가 필요한 부분을 강조하고자 한다.

2. 제조나노물질 시료준비 방법

최근 OECD에서는 제조나노물질 중 독성 위해 가능성 관련 우선 연구대상 물질 14종을 선정하여 발표하였다⁸⁾. 발표된 우선연구 대상물질들과 주요 응용분야를

정리하면 Table 1과 같다. 제조나노물질의 종류에 따라 시료준비방법 즉, 액상에서의 분산방법은 달라지며 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

제조나노물질 독성평가를 위한 시료의 준비방법은 물리화학적 특성 변화를 최소화해야 한다는 것을 기본 전제로 한다. 예를 들면 물리적인 방법인 분쇄법으로 응집물을 분리하는 경우, 새로운 반응점이 생기는 등 물질의 특성 변화를 일으킬 수 있다. 액상에서 제조나노물질을 분산시키기 위해서 계면활성제, 환원제, 혹은 분산안정제를 사용하였을 경우 사용된 화학물질에 의해서 새로운 독성이 발생되거나 반응점을 코팅시켜 제조나노물질의 독성발현을 저해할 수 있다. 뿐만 아니라, 나노물질의 특성을 인위적으로 제어하기 위해서 사용된 화학 물질들은 정확한 독성평가의 수행을 어렵게 할 수 있다. 용매치환방법이나 초음파를 사용하여 입자의 응집 정도를 개선하는 경우 입자의 구조를 변화시킬 수 있을 뿐만 아니라 은나노입자의 경우 불안정한

Table 1. The representative manufactured nanomaterials and their applications

Nanomaterial	Application
1) Fullerene	
Fullerene (C60)	Drug delivery systems, fuel cells, cosmetics, sports industry (bowing ball, golf-club head), energy, or IT device
2) Carbon nanotubes	
SWCNTs	Selective gas sensor pertinent, high-strength/high-stiffness polymers, drug delivery, or electronics.
MWCNTs	
3) Nanoparticles of elements	
Silver nanoparticles	Clothes, washing machine, wound dressing, detergents, or antimicrobial coatings
Iron nanoparticles	Water treatment in contaminated groundwater, magnetic data storage, resonance imaging (MRI), certain alloy, or catalytic application
Carbon black	Pigment, reinforcing phase in automobile tires (for example, the tread and belt area), radar absorbent material, or printer toner
4) Nanoparticles of metal oxides	
Titanium dioxide	White pigment, sunscreen (sunblock), semiconductor, photocatalyst, or waste water treatment
Aluminum oxide	Refractory, ceramics, polishing, or abrasive application
Cerium oxide	Fuel cell electrolyte, or catalytic converters in automotive application
Zinc oxide	popular over-the counter cold remedy, biosensing, sunscreen (sunblock), breakfast cereals (as a source of zinc), pigment, or semiconductor
Silicon dioxide	Semiconductor, food additive to absorb water, electric insulator, medical anti-foaming agent, or hydrated silica in toothpaste
5) Polymers and other organics	
Polystyrene	Plastics, solid foam (insulation in building), or CFCs
6) Dendrimers	
Dendrimer	Drug delivery system, photonic excited molecules (insert porphyrin, absorb light, and photosynthesize artificially), or organic electroluminescent devices
7) Nanoplates	
Nanoclay	Automotive part, energy, packing, or adhesive

구조형성에 따른 이온발생을 유발시킬 수 있다. 확실한 것은 실험실에서 도출된 독성결과를 인체나 환경시스템에 외삽하기 위해서는 시료준비 방법에 환경적 배경을 충분히 모사해야 한다는 것이다. 또한 실제적으로 실험데이터의 신뢰성을 확보하기 위해서 재현성 및 제조나노물질의 정량적 주입이 중요하다.

제조나노물질 종류에 따라 차이가 있지만, 독성평가를 위한 시료준비 방법 중 가장 많이 사용되는 방법은 이미 제조된 입자를 분산시키는 하향식(top-down) 방법의 용매치환방법과 물교반방법, 그리고 상향식(bottom-up) 방법으로 크게 나누어질 수 있다. 각각의 시료 준비방법에 대해서 좀더 자세히 설명하면 다음과 같다. 주로 사용되는 용매치환방법은 주로 금속성 나노입자, 금속산화물 나노입자, 및 플러린과 같은 소수성 나노물질의 분산에 적용가능하며, 소수성 플러린을 분산시키기 위해서 Deguchi⁹⁾가 처음으로 제안하였다. 플러린은 물에 대한 용해성이 거의 없기 때문에 플러린에 대해 용해성이 있는 THF(Tetrahydrofuran)으로 용해시킨 뒤 THF를 서서히 휘발시키면서 물과 치환시킨다. 이때 플러린의 단일입자(직경 약 1 nm)들은 서로 자가조립(self-assembly)하여 새로운 형태의 결정구조를 형성하기도 하며, 표면은 수화(Hydrolysis) 반응으로 친수성 기능기가 형성되어 물에서의 분산 안전성을 도모하게 된다. 그러나 이 방법은 플러린의 구조 특이성 때문에 플러린 내부 빈공간에 THF 용매가 잔존하여 THF에 의한 독성이 추가될 가능성이 있으며, 플러린 내부 공간에 잔존하는 용매량은 10%로 계산된다는 보고가 있다¹⁰⁾. THF 잔존문제에도 불구하고 용매치환방법이 현재까지 선호되고 있는 이유는 구조 특이성을 가져 구조 내부에 THF 용매를 가두는 플러린 등의 물질을 제외하고, 구조 특이성이 없는 제조나노물질의 경우엔 THF가 물과 잘 섞여 치환이 용이하다는 점이다. 또한 휘발점이 낮아 쉽게 휘발시켜 제거할 수 있으며, 무엇보다 다른 방법들에 비해서 초기투입량에 대한 분산량 즉, 분산효율이 상대적으로 높기 때문이다. 용매로서 THF 외 톨루엔¹¹⁻¹²⁾, 에탄올¹³⁾ 등 휘발이 비교적 용이한 용매가 사용되고 있으며, 제조나노물질 용해도에 따라 용매를 선택할 수 있다. 여기서 중요한 점은, THF와 같이 휘발성 용매가 나노입자 내부 및 주변에 존재할 수 있으므로 반드시 용매잔존율을 모니터링하면서 충분히 낮추어질 때까지 용매를 휘발시켜야 한다.

두 번째 방법인 물교반방법은 용매를 사용하지 않고 제조나노물질을 3차 증류수에 넣고 일주일에서 한 달

정도 장시간 동안 교반을 시키는 방법이다¹⁴⁾. 물교반방법은 용매잔류에 대한 우려는 없으나, 대부분의 제조나노물질의 경우 소수성이기 때문에 물에 대한 분산성이 낮아 장시간 동안 교반을 하여도 용매치환방법에 비해서 분산 효율이 상대적으로 낮은 것으로 보고되고 있다. 분산효율을 높이기 위해서 초음파에 제조나노입자 분산액을 한시간 이상 노출시키는 과정이 추가되기도 한다. 그러나 초음파는 앞서 설명한 바와 같이 제조나노물질 구조의 불안정성을 유도하여 구조가 변형되거나, 금속성 나노입자의 경우 이온이 발생시킬 수 있기 때문에 이온제거를 위한 과정이 추가되어야 한다. 물교반방법은 금속산화물 나노입자에 주로 적용되고 있다.

위에서 언급한 용매치환방법이나 물교반방법과 같이 이미 만들어진 제조나노파우더를 분산시키는 하향식(Top-down) 방법이 있는 반면, 환원제, 고분자 분산안정제 혹은 계면활성제 등을 사용해서 나노입자를 액상에서 제조하는 상향식(Bottom-up) 방법도 있다. 제조방법은 주로 이온상태의 금속물질을 환원시키거나 단일입자들의 자가조립을 유도하는 분산안정제를 첨가하여 나노크기의 입자를 생성시키는 것이다. 대표적인 환원제는 포름알데히드(HCHO)¹⁵⁾, 보로수소화나트륨(NaBH₄)¹⁵⁻¹⁶⁾, 구연산염(citrate)¹⁷⁾ 등이 보고되고 있으며, 고분자계열의 분산안정제로 폴리아크릴아마이드(PA)¹⁸⁾, 폴리비닐알콜(PVA)¹⁹⁻²⁰⁾, 폴리비닐피롤리돈(PVP)²¹⁻²²⁾, 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)^{18, 23)}이 사용되고 있다. 또한 계면활성제로는 라우릴황산나트륨(SDS)²⁴⁾이 대표적인 물질이다. 최근에는 유해한 물질 대신 전분/글루코스, *Klebsiella pneumoniae* 추출물 등의 무해한 환원제를 사용하여 나노입자를 제조하는 방법들이 소개되고 있다²⁵⁻²⁶⁾. 그러나 이 방식은 입자의 크기, 모양, 구조를 조절하는 면에서는 유리하지만 사용된 화학물질에 의한 독성발현이 우려되고, 반대로 무해한 화학물질에 의해서 나노입자 표면 반응점이 코팅되어 독성발현을 지연, 혹은 억제시킬 가능성이 있다.

카본나노튜브(CNT)에 관한 시료준비는, 응집이 되어 있는 파우더 상태의 시료를 물리적으로 갈거나(grinding), 빻거나, 분쇄(milling)하기도 하고, 산처리와 같은 화학적인 방법을 사용하기도 한다²⁷⁻²⁹⁾. 또한 탄소나노튜브는 잔류 무결정 탄소물질(메탄, 메탄올, 아세틸렌, 벤젠 혹은 일산화탄소와 같은 카본원료), 촉매지지체(HiPco 공정이 아닌 경우 주로 SiO₂, MgO, 제올라이트 등), 금속촉매(철, 코발트, 니켈, 몰리브덴과 같은 전이금속)와 같은 불순물들을 포함하고 있어 정제과정

이 필요하다. 정제방법은 주로 염산, 질산과 같은 산을 사용하여 금속촉매를 용해시켜 제거하고, 세척과정을 거쳐 시료를 중화시키거나 진공, 혹은 알곤과 같은 무반응성 기체 조건에서 열처리하여 정제에 사용된 산이나 무결정성 탄소화합물을 휘발시켜 제거한다³⁰⁾.

지금까지 제조나노물질의 독성평가 및 물리화학적 특성 분석을 위한 시료준비 방법들에 대해서 설명하였다. 이와는 달리 환경에 노출된 제조나노물질을 채취하여 이의 특성분석을 수행하기 위한 시료준비 방법에 대해 설명하고자 한다. 제조나노물질의 시료채취는 기존의 표준화 방법을 적용해야 하지만, 취급방법은 다른 유해화학물질과 달라질 수 있다. 예를 들면, 토양이나 퇴적물에서 무기질 나노물질(금속, 산화금속 등)을 추출해 내는 경우 초음파 세척과 분산제를 사용할 수 있다. 유기질 나노물질 중 플러린은 토양입자에 흡착되어 있어도 톨루엔과 같은 용매를 사용하여 추출해 낼 수 있으나, 탄소나노튜브는 토양입자로부터 추출, 분리해 내는 방법이 개발되어 있지 않다.

채취된 시료를 정제하는 방법은 크게 두 단계로 나뉜다. 첫 번째 단계는 침전, 원심분리, 여과과정으로 구성된다. 침전은 입자의 크기에 따라 침전속도가 차이가 나는 원리로, 나노입자가 상대적으로 낮은 침전속도를 가지는 것을 이용한다. 상층액을 원심분리하고 다시, 마이크로필터(0.1 nm 이상 기공)를 이용하여 여과한다. 시료농도가 높은 경우, 전량여과(DEF)방법은 여과과정에서 필터막 내부에 나노입자 축적, 농도극화, 필터케이크 형성 등과 같은 문제점들이 어서는 우려되므로³¹⁾, 십자-흐름여과(CFF)가 추천된다³²⁾. 두 번째 정제 단계는 나노입자의 여과과정이다. 나노입자를 여과하는 방법으로 한외여과, 나노여과, 투석 등이 추천되며, 여과된 나노입자는 장-흐름 분획법(FFF), 크기배제 크로마토그래피(SEC), 수력학적 크로마토그래피(HC)³²⁾ 등으로 크기에 따라 분리할 수 있다. 마지막으로, 주의할 점은 시료준비과정에서 제조나노물질의 물리화학적 특성 변화여부 혹은 정도를 확인해야 한다는 점이다. 물리화학적 특성 분석 방법에 대해서는 다음 항에서 자세히 설명토록 하겠다.

3. 물리화학적 특성분석

제조나노입자의 물리화학적 특성분석을 위한 항목을 선정하는데 있어서 몇 가지의 의견들이 있다. 유해화학물질을 위한 물리화학적 특성분석방법들은 매우 다양

하고, 물질에 따라서도 세분화가 진행되어 있다. 따라서 기존의 유해화학물 분석법들을 검토하여 개선이 필요한지, 새로 개발해야 하는지 여부를 판단할 필요가 있다. OECD 제조나노물질작업반(WPMN)에서도 과제 초기부터 지금까지 몇 번의 번복을 거쳐서 나노물질의 물리화학적 특성분석 항목들을 수정해 오고 있다. 아직까지 어떠한 항목이 적절한지 선정되지 않았으므로, 본 연구에서는 지금까지 발표된 의견들을 검토하여 독성 발현요인으로 유력한 물리화학적 특성항목들을 선정하였다. 선정된 물리화학적 특성들은 크게 네 가지 분류로 나눌 수 있는데(Fig. 1), 각각은 1)입자 크기분포 및 응집에 대한 정보, 2)기본 입자정보, 3)표면화학, 4)반응성 정보이다. 각 항목들에 대해 장단점, 특성화시 유의점 등을 파악하고, 특성화하는 분석방법들(Table 2) 중 가장 신뢰성 있는 방법들 위주로 설명하고자 한다.

3.1 입자 크기분포 및 응집에 대한 정보

제조나노물질의 크기는 보건, 환경 위해 가능성을 평가하는데 있어서 기본적인 사항이다. 앞서 정의한 바와 같이 나노물질은 보통 100 nm 미만의 크기를 지니는 물질이다. 지금까지 사용되어 온 측정방식은 입자가 ‘구’ 형태라는 가정하에 측정을 수행하고 있으며 이와 같은 방식으로는 입자의 다양한 모양을 반영하지 못하는 한계점이 존재한다. 또한 나노입자 한 개의 크기인지 개개의 나노입자가 서로 응집된 형태의 크기를 나타내는 것인지 구분할 필요가 있다. 분산 혹은 응집 정도에 따라서 나노물질의 크기에 대한 측정방법이나 결과값을 표현하는 방법은 달라져야 한다.

3.1.1 입자크기, 모양

많은 학문분야에서 입자크기의 범위를 일반적 습성, 기본개념, 조성의 개념과 같이 정의해 왔다. 예를 들면 초미립자는 100 nm 미만의 입자상당 직경(혹은 공기동력학적 직경)으로 정의한다. 입자상당 직경은 시료의 모든 입자들이 구형이라고 가정하였을 때 입자침강속도를 측정하여 환산된 값이다. 그러나 나노입자가 초미립자와 크기범위는 겹치지만 나노입자의 크기를 측정하는 방법에 있어서 최근에는 전기적 이동도를 인위적으로 부여하여 스톡스-아인슈타인 식으로 알려진 브라운 확산속도를 측정하여 환산된 스톡스 직경이 나노입자를 표현하는데 더 적합하다고 여겨지고 있다³³⁾.

나노입자의 크기는 입자의 크기에 의존하는 물리적 현상을 해석하는 방법들을 활용하여 측정된다. 측정방

Table 2. Characterization methods of physico-chemical properties of nanomaterial

P. Chem. properties	Instrument and methods	Relation with agglomeration	Remarks
1) Information about size distribution and agglomeration			
Size	SMPS, DLS, SEM, TEM, BET, STM, AFM	●	
Shape	SEM, TEM, STM, AFM		
Agglomeration	DLS, AAN, Pd, Stability ratio, DLVO theory, CCC		
2) Particle information			
Solubility/purity	ICP, AAS, UV/VIS Spectroscopy, HPLC		
Crystallinity	XRD, Scherrer eq'n		
Surface area	BET, DC, Epiphaniometer	●	
Porosity	BET		
Density	ex, OECD TG109		
O/W partition coeff.	ex, OECD TG107, 117, 123		
Dustiness	single drop/ fluidization/ rotating drum+SMPS		
3) Surface chemistry			
Surface composition	FTIR, ESCA, XPS, SIMS, TGA, DSC	●	
Surface charge	Titration, ELS	●	
Surface energy	LIMC, contact angle	●	
Surface reactivity	MALDI-MS	●	exclusive methods ^{*)}
4) Reactivity			
Photocatalytic reactivity	UV/VIS+propanol degradation		exclusive methods ^{*)}
Redox potential	CV		
Radical formation potential	DMP/RNO/DCFH-DA, ESR		

Notes: ^{*)} The exclusive methods have been developing for applied purposes.

법들로 확산속도, 전기영동 이동도, 동력학적 광산란, 적분표면적 등이 있다. 호흡과 관련된 나노입자를 측정하는 방법은 확산속도와 적분표면적을 이용한 측정방법으로 각각 주사이동도 입자크기 측정기(SMPS)와 BET 방법이 대표적이다. 액상에서의 나노입자의 크기 측정방법으로는 동력학적 광산란(DLS) 방법이 있다. 또한, 주사전자현미경(SEM)과 투과전자현미경(TEM)은 시료가 액상이든 기상이든 상관없이 채용될 수 있는 분석방법이다.

SMPS는 분별이동도 측정기(DMA)를 통해서 나노크기의 입자를 분리하고, 응축핵 계수기(CPC)로 선택된 크기의 나노입자의 수를 세어 크기분포별 나노입자수를 표시하는 방식이다. SMPS는 대기중에 나노입자를 실시간 모니터링을 할 수 있다는 점에서 최근 나노입자 제조공정의 적용 가능성에 관심이 모아지고 있는 방법이다³³⁾. 액상 시료는 분무기와 수분제거필터를 SMPS 전단에 설치하여 입경분포분석이 가능하다. 그러나 아직까지 SMPS 방법은 휴대성이 떨어지고, ⁸⁵Kr과 같은 방사선 활성 동위원소를 사용할 뿐만 아니라 부탄올을 방출하는 안전상 취약점을 가지고 있어 개선이 필요하

다. 한편 휴대는 불가능 하지만, BET는 기상의 나노입자를 채취하거나 파우더 상태의 제조나노물질의 입경분포를 측정하는 방법으로 다른 측정법에 비해서 상대적으로 수월한 편이다. BET는 일정한 온도에서 고체 표면에 물리적으로 흡착한 기체 분자의 양이 기체의 부분압력의 함수로 표현되며, 흡착된 기체는 단일흡착층을 이룬다고 가정한 랑뮤어 이론을 보완한 BET 이론 계산식으로 입자의 표면적을 측정하고 입경분포를 계산하는 방법이다. BET는 또한 나노물질의 기공구조, 기공크기분포와 같은 정보를 제공해 준다.

DLS 방법은 액상에서 분산된 제조나노물질의 크기를 나타내는 방법으로 스톡스-아인슈타인 식을 이용해서 확산계수를 측정하고, 크기분포를 계산할 뿐만 아니라 입자들의 다분산성(P_d) 정보까지 제공한다. 최근에는 입자의 응집속도를 측정하는 데에도 적용된다고 보고되고 있다³⁴⁾. DLS는 빛을 산란시키는 산란원들의 움직임에 의한 산란광의 도플러 선폴증대현상을 이용하여 입자들의 확산계수나 이완시간을 측정하며, 산란광은 빛의 세기보다는 요동현상을 자기상관함수[G(t)]로 해석한다. 크기가 작은 입자가 큰입자보다 자기상관함

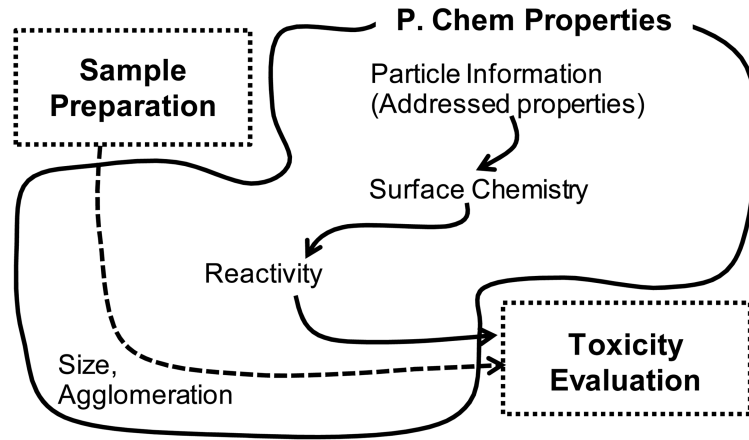


Fig. 2. The pathway of toxicity evaluation within the framework of physico-chemical properties of manufactured nanomaterials; The physico-chemical properties of manufactured nanomaterials should be characterized during the sample preparation to toxicity evaluation.

수가 빨리 감소하게 되며, 자기상관함수에서 산정된 확산계수는 스톡스-아인슈타인 식을 통해 수력학적 직경으로 환산된다. 입자의 크기가 균일한 경우 자기상관함수는 지수함수 형태로 감소하고, 균일하지 않을 경우 자기상관함수는 x 축 방향으로 좀 더 늘어져 감소하는 형태를 가진다. DLS는 측정이 비교적 용이하지만, 측정시료의 분산안정성이 떨어지고, 다분산도가 높고, 분산입자의 농도가 낮은 경우에는 측정이 어려울 뿐만 아니라 입자가 구형이라는 가정하에서 측정되기 때문에 탄소나노튜브와 같은 경우는 측정이 제한된다.

TEM, SEM과 같은 전자현미경은 나노입자의 정성분석, 즉, 형상(morphology; 크기, 모양, 표면상태)을 분석하는 가장 대표적인 방법으로 사용되어져 왔다. SEM의 공간해상도는 이론적으로는 5 nm 미만이고 확대배율은 전류와 최종 스팟 크기에 따라 달라지지만 최대 15만 배까지 확대가 가능하다. 반면, TEM의 해상도는 0.5-3 nm(HR-TEM은 1 nm 미만)까지 내려가며, 나노물질의 형태를 분석하는 가장 직접적(가시적) 방법이다. SEM과 TEM은 진공상태에서 분석이 진행되기 때문에 파우더상태의 입자에만 적용된다. 그리고 SEM은 전도성 물질에만 적용되므로 비전도성 물질을 분석하기 위해서는 금과 같은 전도성 원자를 시료에 수 나노 두께로 코팅해야 분석할 수 있다. TEM은 결정학적 구조에 대한 정보를 제공할 수 있으며, 또한 전자빔이 시편과 반응하여 발산하는 특성 X-ray를 해석하는 에너지분산분석기(EDS)가 설치된 경우 표면 원소조성까지 분석이 가능하다. 그러나 응집이 쉽게 일어나는 시료를 분석할 경우 응집과 분산상태를 구분하기 어렵고, 유기물로 표

면이 코팅된 물질이나 경도가 낮은 물질은 가전압시 쉽게 형상이 무너져 분석하기 어렵다.

그 외 나노입자의 크기분석방법으로 주사터널링현미경(STM), 원자간력현미경(AFM)과 같은 원자현미경이 있으며 STM은 시료와 탐침사이의 투과전류가 제어되고, AFM은 시료와 탐침사이의 접촉힘이 제어되는 차이점을 가지고 있으며, 시료가 고정된 시편의 표면굴곡을 형상화하여 입자의 크기를 표현한다. 전자현미경에 비해서 3차원적 분석이 가능하고 액상의 시료에 대해서도 분석이 가능하여 세포 분석도 가능하다는 장점을 가지고 있으나, 심하게 응집이 일어난 경우 표면굴곡이 왜곡되어 단일입자의 형상이 제대로 표현되지 못할 가능성이 있고, 표면조성을 조사하는 데에는 적당하지 않다.

3.1.2 분산도/응집도

제조나노물질의 유해가능성을 표현하는데 크기 항목이 가장 중요하게 다루어지고 있다면, 반대로 무해가능성의 증거로 거론되는 항목은 분산도/응집도 항목이다. 제조나노물질이 100 nm 미만으로 분산되어 나노물질 고유성질을 유지하고 있을 때 비로소 단위질량당 표면적은 기하급수적으로 늘어나 촉매, 전기전도체, 조영제, 혹은 의약품으로서 효능은 제대로 발휘될 수 있고, 또한 독성을 발현함에 있어서도 치명성이 증가할 것이다. 이름에서도 알 수 있듯이 제조나노물질이 마이크로 단위가 해내지 못한 성과를 얻을 수 있는 것은 나노크기로 조절이 되었다는데 있다. 그러나 나노입자는 흔히 대기모텔³³⁾에서 설명하듯 매우 불안정하여 서로 응집

하려는 성질이 매우 강하다. 나노기술을 발전시키려는 입장이나 유해가능성을 평가하려는 양쪽 모두 분산안정성에 대한 고민을 하고 있다. 덧붙여 말하면, 제조나 노입자의 응집현상은 나노물질의 성능발휘나 독성발현에 모두 마이너스 요인으로 알려져 있다.

응집현상은 영어로는 두 가지 개념으로 표현되고 있지만, 한글로 두 개념을 구분해서 번역할 단어가 아직까지 없다. 응집은 응집의 정도에 따라서 영어적으로 “agglomeration”과 “aggregation”으로 표현된다. 기존에는 agglomeration 개념 대신 aggregation으로 응집현상에 대해 표현해왔다. 하지만 최근 나노기술에 대한 집약적 발전으로 나노기술과 나노물질에 대한 개념정의의 필요성을 느낀 각국 정부에서는 agglomeration이라는 용어를 구분해서 사용할 것을 권고하고 있다. 특히 미국의 ASTM의 나노기술관련 용어집에 응집물(E2456-06)에 대한 두 개념은 다음과 같이 구분하여 설명되고 있다. 일반적으로 나노기술에서 사용되는 “agglomeration” 개념은 상대적으로 약한 힘(예를 들면, 반데르발스힘 혹은 모세관력)에 의해 뭉쳐진 입자들로 구성되어 있어, 단일입자나 더 작은 입자들로 쉽게 떨어져 나갈 수 있는 상태의 응집체이다. 나노기술에서 사용되는 “aggregation” 개념은 개개의 입자들이 쉽게 떨어지지 않은 상태로 뭉쳐진 집합체들로 녹아내림, 소결, 혹은 금속결합과 같은 강한 결합력으로 단일입자들이 서로 붙어있는 응집체를 말한다. 이런 개념에서 한국어로 “agglomeration”과 “aggregation”을 구분하여 해석한다면 각각 “응집”과 “응집”으로 표현할 것을 추천하고자 한다.

입자의 분산상태를 나타내는 지표로서 평균응집입자수(AAN)는 BET 방법으로 측정된 입자부피에 대한 평균입자직경으로 계산되며³⁵⁾, 다분산성(P_d)³⁶⁾은 DLS 방법에서 수역학적 입자크기 분포도에서 피크폭을 나타낸다. 안정성비 (Stability ratio, W)³⁷⁾는 입자상호간 전위값(V_T)들의 적분형태로 수식(1)과 같이 표현된다. 여기서, a 는 입자반경, D 는 두 입자중심점간의 거리, k_B 는 볼츠만 상수, T 는 절대온도를 나타낸다.

$$W = 2a \int_{2a}^{\infty} \exp\left(\frac{V_T}{k_B T}\right) \frac{dD}{D^2} \quad (1)$$

제조나노입자의 분산상태는 용액 내 pH, 이온강도, 혼합조성물질(휴믹산 혹은 펠빅산)의 농도 등 환경조건에 영향을 받는다. 또한 제조나노입자의 농도, 크기, 표면화학, 표면전하밀도, 이온농도 등 물리화학적 특성에

따라서 분산상태는 달라진다. 이를 통하여 나노물질과 나노물질 간의 상호작용에 의해서 서로 반응을 할 수 있는지 혹은 기능적 역할을 하는지 알 수 있다.

나노입자의 응집농도 측정은 임계응결농도(CCC)로 표현되며, CCC는 상기에서 언급된 응집을 유발시키는 환경 요소, 예를 들면 염 농도를 증가시키면서 입자의 제타 포텐셜(zeta potential)이나 초기 확산계수에 대한 확산계수비가 급작스럽게 0에 가깝게 감하는 농도영역을 의미한다³⁸⁾. 또한, DLVO 이론으로 수식 (2)과 같이 CCC (C_{∞})를 계산하기도 한다³⁹⁾. 이 경우 입자에 반데르발스 에너지와 전기적 반발력이 작용하며, 용매에 의한 구조적 상호작용은 배제되며, 입자주변의 전기이중층 두께는 입자의 크기에 비해 매우 작고, 입자반경간 거리에 대한 입자표면간 거리의 비는 매우 작아야 한다는 전제조건이 필요하다. 여기서 ϵ 는 유전율, e 는 기본전하, k_B 는 볼츠만 상수, T 는 절대온도, y_s 는 무차원의 전기적 표면전위, A_{132} 는 하마커 상수, Z 는 반대이온을 의미한다.

$$C_{\infty} = \frac{1152\epsilon^3 \kappa_B^5 T^5 \tanh^4(y_s/4)}{\pi \exp^2(1) e^6 A_{132}^2 Z^6} \quad (2)$$

제조나노물질의 응집속도를 산정하는 방법에 대한 연구는 아직까지 활발하게 진행되고 있지 않다. 그러나 DLS 방법을 이용하여 응집속도를 측정할 수 있으며, 수식(3)과 같이 정리될 수 있다⁴⁰⁾. 이 방법은 DLVO 이론처럼 어떠한 가정도 필요하지 않고, 측정도 비교적 간단한 장점을 가지고 있다. 여기서 r 은 수평균 입자반경, t 는 시간, q 는 산란벡터 등급, a 는 상대적인 수력학적 중첩반경, N_0 는 입자수 농도이며 k 가 입자응집 속도상수를 의미한다.

$$\frac{1}{r_h(q,0)} \left. \frac{dr_h(q,t)}{dt} \right|_{t \rightarrow 0} = \left[1 + \frac{\sin(2rq)}{2rq} \right] \left(1 - \frac{1}{\alpha} \right) k N_0 \quad (3)$$

입자응집 속도상수, k 는 Smoluchowski식으로 도출된 확산-한계 응집은 이중층형성 특성시간, τ 과 위 수식(1)에서 표현된 안정성비와의 관련식(4)으로 표현될 수 있다. 여기서, μ 는 동점도이고, n_0 는 초기입자농도를 의미한다⁴¹⁾.

$$\tau = \frac{2W}{k} = \frac{3\mu W}{4k_B T n_0} \quad (4)$$

응집물을 포함한 분산액은 잠재적 노출 상황을 충분히 반영할 수 있어야 한다. DLS 방법으로 측정된 제

조나노입자의 평균입자크기 및 크기분포는 환경매질에서 생체와 접촉 후 특성변화를 관찰하는데 사용될 수 있다. 응집의 정도(응집물 크기, 응집된 단일입자 개수)는 SEM, 정지광산란(SLS), 혹은 침전/분별법 등으로 관찰할 수 있다. 그러나 응집속도 및 응집강도 등 응집 특성을 표현하는 주요인자들을 측정하는 방법들은 아직까지 충분히 보고되고 있지 않다.

3.2 기본 물리화학적 정보

나노물질의 물리화학적 특성은 조성, 밀도, 결정구조, 화학반응성, 용해도, 전기전도도, 녹는점, 경도, 광학특성 등 매우 다양하지만 이러한 특성들을 모두 고려할 필요는 없다. 다양한 항목들 중에서 대상 나노물질의 독성발현 시 반드시 조절되어야 하는 항목, 기본정보로써 가치가 있는 항목, 물질별 특수항목으로 나눌 수 있다. 앞서 설명한 입자의 크기 및 응집특성은 제조나노물질의 물리화학적 특성분석에서 가장 중요한 항목들로 인식되고 있다. 그러나 두 항목 이외에 기본정보로 수집되어 평가되어야 할 항목으로 용해도, 결정구조, 표면적/기공구조 이라고 할 수 있다. 각각에 대한 특성분석 방법들에 대해서 설명하면 다음과 같다.

3.2.1 평형용해도/순도

용해도의 정의는 용질이 용매에 용해할 때 일정온도에서는 그 한계가 있는데 이 한계를 용질의 용매에 대한 용해도라고 표현한다. 또한, 사전에서 녹는다는 의미는 “결정체 따위가 액체 속에서 풀어져 섞이다”라고 정의하고 있다. 이와 같은 의미는 제조나노물질의 경우 불충분하며 제조나노물질이 증류수와 같은 용매에 녹는다는 개념 정의가 필요하다. 제조나노입자의 용해도는 콜로이드입자처럼 나노입자가 분산되어 용액에 존재하거나, 입자에서 분자형태 혹은 이온상태로 변하여 용액 속에 존재하는 질량 비율이라고 정의할 수 있다. 여기에서 분산과 용해 두 개념은 분산이 용해보다 하위개념으로 사용되고 있다. 또한 용해도를 정의하기 위해서는 순수 용매에 대한 온도 및 시간을 고려해야 한다. 무엇보다 시간에 따라서 분산된 나노입자가 응집, 침전되어 바닥에 가라앉을 가능성이 있으므로 평형용해도 개념이 사용되어야 한다. 즉, 평형용해도를 산정하기 위해서는 용해공정 후 일정시간 동안 정지시간을 거친 후 농도분석을 할 필요가 있다.

제조나노물질의 용해도는 용액 내 용해되어 있는 분산입자, 분자, 이온양의 합이라고 정리한다면, 특정 경

우 각각의 존재비율을 평가할 필요가 있을 수 있다. 예를 들면, 은나노입자의 경우 은나노입자를 물속에 용해시킬 때 다량의 이온이 발생하고, 또한 서서히 은이온이 용해되어 살균특성을 제공하기도 한다고 보고되고 있다⁴²⁾. 독성발현인자를 평가하기 위해서 은나노입자에 의한 것인지, 은이온에 의한 것인지, 아니면 상호 복합적인 것인지에 관한 상대적 평가를 할 필요가 있다. 그러나 1 nm 이상의 상대적으로 큰분자는 나노입자의 크기를 정의하는 범위(1~100 nm)에 포함되므로 유체 내에 이러한 큰분자가 섞여 있을 경우 분자인지 나노입자인지 구분하기 어려울 수도 있다.

용해된 나노물질을 정량화하는데 금속성 나노물질의 경우 플라즈마- 혹은 토치-분광분석법, 예를 들면 유도결합플라즈마(ICP) 혹은 원자흡광분석법(AAS) 방법들이 사용된다³⁸⁾. 탄소류의 정량화는 훨씬 까다롭고 복잡하여, 플러렌은 UV/VIS 분광법이나 액체크로마토그래피(HPLC)를 사용한다^{9,43)}. 탄소나노튜브에 대한 정량화 방법은 아직까지 개발되어 있지 않다.

순도 또한 평형용해도와 유사하지만 구분되어 정의되도록 하는 것이 좋다. 순도측정을 위해서는 시료의 제조나노물질 뿐만 아니라 이물질 등의 물질 조성 조사를 할 필요가 있다. 또한 나노입자의 표면화학구조도 연관이 있다. 표면화학조성을 측정하기 위한 방법은 다음 표면화학항에서 설명토록 하겠다.

3.2.2 결정상/미세결정크기

결정상(Crystalline phase)은 나노물질의 결정구조의 공간군을 정의할 것을 요청하는 항목이다. 예를 들면 실리카나 타이타니아 경우 다중 결정상을 가지므로 평가에 사용된 나노물질의 결정형태에 관한 정보가 충분한지 결정되어야 한다. 결정상의 공간군은 X선 회절법(XRD)에서 정보를 얻을 수 있다. 미세결정크기(Crystallite size)는 나노물질이 결정구조를 가진 경우, 동일한 결정구조와 배열을 가져도 여러 미세결정을 가진 다중결정상일 경우가 많다. 나노결정크기는 XRD의 피크와 Scherrer 식을 이용하여 미세결정크기를 산정할 수 있다⁴⁴⁾.

3.2.3 비표면적/다공성

제조나노입자의 표면적은 입자의 크기, 수, 모양에 따라 표현될 수 있으며, 생물체와의 사이에 독성반응은 나노물질의 표면에서 일차적으로 일어나므로 나노물질의 표면적을 명기하는 것은 기본적인 사항으로 인식되

고 있다. 일반적으로 입자가 작아질수록 단위부피당 비 표면적은 기하급수적으로 증가하고, 제조나노입자의 반응점 노출에도 훨씬 유리하게 된다. 비표면적은 활성산소(ROS), 이온, 구조불안정성 유도 등의 2차적 독성발현 인자의 증가와도 연관이 있다. 가장 일반적인 표면적 측정방법은 파우더상태의 제조나노입자에 대해 BET 법이며, 그 외 확산 충전입자 감지기(DC)로 활성 표면적을, Epiphaniometer로 푸치(Fuch) 표면적을 측정할 수 있다³³⁾. 액상에서 제조나노입자의 표면적을 측정하기 위한 방법은 아직 적당한 기술이 개발되어 있지 않다.

다공성(porosity)은 나노물질에 밀도 및 콜로이드 안정성의 변화로 인한 환경에서의 나노물질 소멸에 영향을 준다. 예를 들면, 벌크상태 용액상 혹은 기상에서 침전속도를 낮추어 나노물질이 자연환경에서 다공성 금속 오염물처럼 활동하도록 한다. 다공성을 측정하는 방법으로는 일반적으로 BET가 추천된다.

3.2.4 순밀도

순밀도는 제조나노물질 특정량을 침전없이 표준크기의 용기 내 용액에 넣었을 때 침전없이 생성된 물질층에 대한 겉보기밀도를 의미한다. 기존 표준화된 방법(예를 들면, OECD TG109)을 이용해서 측정할 수 있다.

3.2.5 옥탄올-물 분배계수

옥탄올-물 분배계수(1-Octanol/Water Partition Coefficient)는 섞이지 않는 두 용매인 물과 옥탄올에 제조나노물질을 용해시켰을 때 물과 옥탄올층에 녹아 있는 제조나노물질의 농도비를 분배계수로 나타낸 것이다. 이를 통하여 대상 제조나노물질의 친수성 혹은 소수성 정도를 파악할 수 있다. 또한, 제조나노물질이 환경에 노출되었을 때 수계에 용해되는 정도나, 지질이 풍부한 상, 예를 들면 세포벽이나 지방조직에 용해, 이동하는 정도를 예측하는데 적용될 수 있다. 옥탄올-물 분배계수는 기존 표준화된 방법(예를 들면, OECD TG107, 117, 123)을 이용해서 측정할 수 있다.

3.2.6 먼지발생능

먼지발생능(dustiness)은 제조나노물질을 취급시 먼지를 발생시키는 정도를 나타낸다³⁵⁾. 제조나노물질을 제조, 취급, 저장, 운송 등의 전과정 동안 호흡기 노출에 대한 잠재적 보건 위해도를 추정하는 기초자료로 활용될 수 있다. 일반적으로 먼지발생능은 먼지발생과 시료 채취의 두 과정으로 구성되어 있다. 먼지발생기는 주로

세 가지로, 밀폐된 공간 내 공기중에 제조나노입자를 낙하시키는 단적(single drop)법, 수직방향 튜브내에 제조나노입자를 넣고 아래에서 공기를 불어넣는 유동화법, 수평방향으로 설치된 드럼 내 제조나노물질을 넣고 회전시키는 회전드럼법 등이 사용되고 있다⁴⁵⁾. 발생된 먼지를 측정하는 방법은 SMPS 방법과 같은 대기중 나노입자 측정하는 방법들이 적용될 수 있다³³⁾.

3.3 표면화학

제조나노물질이 자연발생적 나노물질과 다른 점은 나노입자의 구조가 설계되었을 뿐만 아니라 표면화학이 변형되었다는 데 있다. 표면화학이란 평형용해도, 촉매 특성, 표면전하, 표면흡탈착 등의 특성을 포함하고 있으며, 이는 표면의 원자 혹은 분자조성과 물리적 표면구조의 함수이다. 표면화학은 다양한 요인에 의해서 변할 수 있으며, 대표적으로 코팅이나 흡착현상 때문인 경우가 많다. 입자의 표면이 단백질 혹은 다른 생물학적 물질로 코팅된 경우 코팅 두께, 연속성, 균일성, 지속성 등을 고려해야 하며, 이런 이유로 표면화학을 정량화하는데 어려움이 있다. 표면화학은 정량화되기 어렵지만, 최소한 나노입자의 표면조성/구조, 표면전하(제타포텐셜), 표면에너지(젖음성), 표면반응성 정도는 특성화 되어야 한다. 표면화학 특성들은 나노입자의 응집과도 매우 관련성이 높다(Table 2). 또한 생체와 직접적으로 접촉하는 표면특성은 독성발현에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

3.3.1 표면조성/구조

표면조성은 나노입자의 표면 기능성 향상을 위해 붙여진 티올기(-SH), 시안기(-CN), 수산화기(-OH), 카르복실기(-COOH), 아민기(-NH₂) 등의 조성이나 기타 오염물의 성분을 분석하고자 함이다. 환원제와 계면활성제 등과 같이 표면에 기능기를 인위적으로 첨가하거나, 일반적으로 앞서 설명한 시료준비방법을 통해 표면수화반응이 일어나 나노물질의 표면에 친수성기를 붙여 분산성을 향상시키는 방법들은 모두 표면화학 변화를 유도한 것이다. 이와 달리 탄소나노튜브는 표면잔존 촉매에 의한 표면화학이 문제가 된다. 표면개질을 통한 인위적 화학 반응점의 발달은 생체 내 세포표면에 흡착능을 향상시켜 생체에 대한 독성에 영향을 줄 가능성을 높여준다.

나노입자 표면의 분자구조 및 조성분석에서 오염에 의한 화학물 조성까지 확인할 수 있는 방법들로는 푸

리에 변환 적외선 분광기(FTIR), 전자분광 표면분석법(ESCA), X선 광전자 분광법(XPS), 2차이온질량분광법(SIMS), 열중량측정분석(TGA), 시차주사열량계(DSC) 등이 있다.

3.3.2 표면전하(제타포텐셜)

나노물질이 액상에서 분산될 때 나노입자는 표면에 전하를 가지고 있으며, 이때 표면전하는 입자의 고유특성 및 주변 매질의 종류에 따라 달라진다. 나노입자의 표면전하는 입자의 분산특성을 결정하는 중요한 요소일 뿐만 아니라, 이온이나 생물분자가 흡착하는데 영향을 주어 세포가 나노입자와 어떻게 반응할 것인지 예측하는데 사용될 수 있는 개념이다.

표면전하를 측정하는 방법은 적정법과 제타포텐셜을 측정하는 방법으로 크게 나뉘어진다. 나노입자들 사이에는 반데르발스와 같은 인력과 반발력이 동시에 작용하는데 이를 활용하여 표면전하를 측정한다. 나노입자는 전기적 이중층(Debye 두께)을 가지고 있으며, pH 조절용액이 첨가되면 전기적 이중층이 줄어들면 응집이 일어나거나, 반대로 전기적 이중층 외부에 이온층이 두꺼워지면 분산성이 향상된다. 적정법은 산과 염기 용액으로 나노입자 분산액에 pH를 조절해가면서 표면전하를 산정하는 방법이다⁴⁶⁾.

제타포텐셜은 매질과 나노입자의 전기이중층 계면에서의 전위차를 의미한다. Smoluchowski 이론은 나노입자의 모양이나 농도에 관계없이 전기적 이중층의 두께가 입자크기에 비해서 매우 작을 경우 실험값으로부터 제타포텐셜을 계산하는데 사용되어왔으며, 최근에는 전기영동산란법(ELS)으로 제타포텐셜을 간단히 측정할 수 있다. 제타포텐셜은 표면전하, 표면흡착물, 용액의 조성, 이온강도 및 pH의 함수이며, 나노입자의 분산성을 나타내는 지표로써 사용되어오고 있다. 콜로이드 입자의 경우 제타포텐셜이 ± 30 mV 이상일 때 안정성이 유지되고, $\pm 10 \sim \pm 30$ mV 사이에서 입자는 불안정 초기 단계이며 ± 5 mV 이하이면 응집, 혹은 응결이 발생한다고 보고하고 있다(ASTM Standard D4187-82). 그러나 분산안정제 첨가 없이 순수 나노입자가 분산되어 있는 경우 제타포텐셜은 콜로이드 입자보다 제타포텐셜이 낮다. 순수 나노입자 분산액의 제타포텐셜은 ± 10 mV 정도로 알려져 있고, 분산안정제를 첨가하였을 때 ± 30 mV 이상 향상되는 것을 알 수 있다. 특히, 제타포텐셜이 0이 되는 pH값을 등전점(IEP)이라고 표현하며, 응집이 일어나는 pH 농도로 분산 안정성 연구들에서 중

요하게 다루어지고 있다.

3.3.3 표면에너지(젓음성)

생물과의 친화력 정도를 표현하는데 사용되어 온 표면에너지는 나노입자의 응집, 용출, 생물 내 축적 등을 이해하는데 중요한 개념이다. 표면에너지는 액침마이크로칼로리법(LIMC) 혹은 접촉각으로 측정될 수 있다³⁵⁾.

3.3.4 표면반응성

표면반응성은 마이크로칼로리법으로 측정되는데, 산화상태 혹은 전기화학적 방법으로 탐침분자물이 분해되거나 변하는 것을 모니터링하는 방식이다. 나노물질이 단백질에 흡착되는 것은 나노물질 구조의 변화와 흡착단백질의 반응성 변화 때문이다. 단백질이나 생물의 분자에 흡착되는 것은 전통적으로 라디오 라벨링된 분자를 사용하여 측정하였으나, 특정 경우에는 사용이 불가능할 수도 있다. 최근에는 기질보조 레이저 탈착 이온화 질량 분광학(MALDI-MS) 방법으로 특성화하고 있다⁴⁷⁾.

3.4 반응성 정보

제조나노물질의 물리화학적 특성분석을 위한 항목들 중 제조나노물질의 종류에 따라서 분석이 필요한 항목들이 있다. 광촉매 활성, 산화환원 전위, 라디칼 형성 전위 등이다. 각각에 대해 설명을 하면 다음과 같다.

3.4.1 광촉매 활성

광촉매 활성(PCA)은 제조나노물질이 환경에 노출되어 생태적 순환고리상 이동이 진행되는 동안 혹은 전과정평가(LCA)에서 빛을 받으면 활성이 있는 물질에 대해 평가되는 하는 항목이다. 예를 들면, 타이타니아나 산화아연 등은 대표적인 광촉매 활성을 가진다고 알려져 있다. PCA는 UV 혹은 가시광선 노출로 전자-정공쌍(Electron-hole Pair)을 발생하는 정도를 나타낸다. PCA는 500 W 중앙 수은아크램프를 사용하여 광자 플럭스(Flux)하에서 프로판올이 프로페논으로 산화되는 0차 광산화 속도로 측정하여 나노물질의 그래프당 전이된 몰로 표현된다³⁵⁾.

3.4.2 산화환원 전위

산화환원 전위(Redox Potential)는 위에서 설명한 광촉매 활성처럼 제조나노물질이 환경 혹은 생체에 노출되었을 경우 산화환원 반응에 의한 유해성을 예측하는

데 유용하다. 산화환원 전위를 측정하는 방법은 순환전압전류(CV)가 추천된다.

3.4.3 라디칼형성 전위

제조나노입자에 의한 ROS의 생성은 입자의 독성효과에 대한 현재 인정되고 있는 가정 중 하나이다. ROS의 정량적 측정은 입자가 생체 내에서 초래할 것으로 예측되는 산화스트레스를 평가하는 지표로서 중요하게 다루어진다. ROS는 구리(I)-DMP(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)⁴⁸⁾, RNO(N,N-dimethyl-p-nitrosoaniline)⁴⁹⁾, DCFH-DA(dichlorofluorescein diacetate)⁵⁰⁾ 등 착화합물의 환원반응을 이용하거나 ROS 입시포집기(scavenger)와 함께 전자스핀공명분광기(ESR) 등으로 측정할 수 있다.

4. 토의 및 결론

현재 진행되고 있는 나노기술의 발전속도와 진행단계에 비해서 나노물질 안전성평가를 위한 평가가이드라인 개발이나 물리화학적 특성분석법들의 개발은 아직까지 초보적인 단계에 머물러 있다. 제조나노물질의 독성 가능성이 제기된 이후 초기 연구들은 독성을 발현시키기 위해서 방법론적인 신뢰성을 바탕으로 두지 않고, 발생된 독성해석 위주의 연구들이 진행 되었다. 그러나 현재의 연구방향은 단순히 제조나노물질의 독성발현 목록의 수를 늘리는 것보다, 나노물질의 어떠한 특성이 독성을 일으키는 요인이 되는가에 대한 연구가 증가하고 있다. 최근 제조나노물질의 독성이 있다고 말하기 위해서는 기본적으로 시료의 준비 단계부터 주요 물리화학적 특성들이 분석, 조절되었다는 전제조건을 충족하여야 되어야 한다. 그럼에도 불구하고, 전 세계적으로 나노물질의 위해 가능성 평가를 위한 시료의 준비와 물리화학적 특성분석을 위한 가이드라인을 발표한 예는 아직까지 없다. 이 분야에 대해 각국에서 기술 선점을 위한 노력들을 앞 다퉈서 진행하고 있는 만큼, 우리나라도 국제기구 활동에 참여할 뿐만 아니라 더욱 나아가 보다 적극적인 연구 및 기술 개발이 필요한 시점이다.

본문의 내용을 종합하여, 향후 제조나노물질 안전성 연구를 위해 다음과 같은 항목들을 고려할 것을 제안하고자 한다. 첫째, 제조나노물질만의 독성을 평가하기 위해서는 순도가 높은 시료를 사용해야 한다. 어떠한 화학물질, 예를 들면 분산제, 환원제, 분산안정제나 심지어 용매까지 사용을 자제하여야 한다. 사용된 경우에

도 잔존물을 최대한으로 낮추어야 하고, 사용된 화학물질에 대한 비교실험을 수행해야 한다. 둘째, 제조나노물질 시료의 준비 단계부터 생체 혹은 환경에 노출되는 과정까지 제조나노물질은 나노크기 등 물리화학적 특성들이 크게 변하지 않아야 한다. 그러나 앞서 설명한 바와 같이 나노물질의 불안정성으로 나노물질 특성들을 유지시키는 것은 거의 불가능해 보인다. 따라서 독성평가 과정 혹은 LCA 동안 나노물질의 특성변화를 관찰하는 것이 중요할 것으로 판단된다. 특히, 시료준비단계에서부터 독성평가과정을 수행하는 동안 나노입자의 크기를 유지하는 것은 매우 중요하지만 응집이나 영김으로 인해 입자크기가 커지기 쉽기 때문에 이를 만족시키기 어렵다. 독성에 평가된 시료의 초기 크기와 생체에 노출환경에 대한 응집속도, 응집의 정도 등을 파악해서 가능한 응집을 최소화시킬 수 있는 조건을 찾아야 한다.

인위적으로 설계된 제조나노물질의 물리화학적 특성을 파악하기 위해서 최소 십여 가지 항목들이 제안되고 있다. 하지만 모든 항목을 분석하기 보다는 대상 제조나노물질의 종류, 상태(기상, 액상 노출방법), 노출대상 생체에 따라 분석항목의 중요도는 변동되어야 한다. 평가자의 자의적인 해석이 필요하기 때문에 신뢰성을 얻기 위해서는 선택된 물리화학적 특성항목에 대한 신뢰성 있는 설명이 중요하며 물리화학적 특성들이 독성 평가에 어떻게 영향을 주는지 이해하는 것이 중요하다. 가장 잘 알려진 나노입자의 크기항목부터 독성에 직접적인 원인으로 추정되고 있는 광촉매활성, 라디칼형성 전위까지 가능한 다양한 항목들에 관한 평가는 독성결과에 대한 발현메카니즘 해석에 도움이 될 수 있다.

결론적으로, 제조나노물질의 안전성 평가는 나노기술 발전을 가로막는 방해물이 아닌 나노기술발전을 촉진시키고 인류와 환경에 기여하는 올바른 방향으로 진행되어야 한다. 그러기 위해서 제조나노물질의 안전성 평가법에 대한 신뢰성이 매우 중요하며, 이는 제조나노물질 시료를 준비에서부터 독성평가과정 동안 물리화학적 특성을 모니터링함으로써 확보될 수 있다. 아직까지 전 세계적으로 평가방법에 대한 가이드라인이 없는 실정이므로 국내에서도 향후 신뢰성 있는 제조나노물질의 평가법 개발을 위한 초기 연구가 필요하다. 위에서 언급된 제언들 외에 제조나노물질의 독성평가는 다른 유해물질에 비해 일반 독성연구자가 평가하기가 쉽지 않기 때문에 제조나노물질의 설계 및 응용분야의 연구자들과의 공동 연구가 필요하다고 덧붙여 제안하고자 한다.

Abbreviation

AAN, Average Agglomeration Number
 AFM, Atomic Force Microscopy
 AAS, Atomic Absorption Spectrometer
 BET, Brunauer, Emmett, Teller
 CCC, Critical Coagulation Concentration
 CFF, Cross-Flow Filtration
 CNT, Carbon Nanotube
 CPC, Condensation Particle Counter
 CV, Cyclic Voltammetry
 DC, Diffusion Charger
 DEF, Dead-End Filtration
 DLS, Dynamic Light Scattering
 DLVO, Derjaguin- Landau- Verwey- Overbeek
 DMA, Differential Mobility Analyzer
 DSC, Differential Scanning Calorimeter
 EDS, Energy Dispersive Spectrometry
 ELS, Electrophoretic Light Scattering
 ESCA, Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
 ESR, Electron Spin Resonance Spectrometer
 FFF, Field-Flow Fractionation
 FTIR, Fourier Transformation Infrared Spectrometer
 HC, Hydrodynamic Chromatography
 HiPco, The High Pressure Carbon Monoxide Process
 HPLC, High Performance Liquid Chromatography
 HR-TEM, High Resolution Transmission Electron Microscopy
 ICP, Inductively Coupled Plasma
 IEP, Isoelectric Point
 LCA, Life Cycle Assessment
 LIMC, Liquid Immersion MicroCalorimetry
 MALDI-MS, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry
 OECD, Organisation of Economic Cooperation and Development
 PA, Poly(acrylamide)
 PCA, Photocatalytic Activity
 Pd, Polydispersity
 PEG, Poly(ethylene glycol)
 PVA, Poly(vinyl alcohol)
 PVP, Poly(vinyl pyrrolidone)

ROS, Reactive Oxygen Species
 SDS, Sodium Dodecyl Sulfate
 SEC, Size Exclusion Chromatography
 SEM, Scanning Electron Microscopy
 SIMS, Secondary Ion Mass Spectrometry
 SLS, Static Light Scattering
 SMPS, Scanning Mobility Particle Sizer
 STM, Scanning Tunneling Microscopy
 TEM, Transmission Electron Microscopy
 TGA, Thermogravimetric Analysis
 WPMN, Working Party on Manufactured Nanomaterials
 XPS, X-Ray Photoelectron Spectroscopy
 XRD, X-Ray Diffraction

감사의 글

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia 21 project No. 0458-20080505)”으로 지원받은 과제입니다.

참고문헌

1. G. Oberdöster, V. Stone, and K. Donaldson, *Nanotoxicology*, **2007**, 1(1), 2-25.
2. E. Oberdöster, *Environ Health Persp*, **2004**, 112, 1058-1062.
3. D.B. Warheit, *Materials Today*, **2004**, 7(2), 32-35.
4. D.B. Warheit, T.R. Webb, C.M. Sayes, V.L. Colvin, K.L. Reed, *Tox. Sci.*, **2006**, 91(1), 227-236.
5. H. Meng, Z. Chen, G. Xing, H. Yuan, C. Chen, F. Zhao, C. Zhang, Y. Zhao, *Toxi. Lett.* **2007**, 175, 102-110.
6. J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramirez, M.J. Yacamán, *Nanotechnology*, **2005**, 16, 2346-2353.
7. Y. Sato, A. Yokoyama, K. Shibata, Y. Akimoto, S. Ogino, Y. Nodasaka, T. Kohgo, K. Tamura, T. Akasaka, M. Uo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, M. Ishiguro, R. Hatakeyama, F. Watari, K. Tohji, *Mol. Biosyst.*, **2005**, 1, 176-182.
8. OECD WPMN, “List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the OECD testing programme”, **2008**, Paris, France.
9. S. Deguchi, R.G. Alargova, K. Tsujii, *Langmuir*, **2001**, 17, 6013-6017.
10. G. Andrievsky, V. Klochkov, L. Derevyanchenko, *Nan-*

- otub. Carbon Nanostruct.* **2005**, 13, 363-376.
11. X. Zhou, J. Liu, Z. Jin, Z. Gu, Y. Wu, Y. Sun, *Fullerene Sci. Tech.* **1997**, 5(1), 285-290.
 12. F. Diederich, R. Ettl, Y. Rubin, R.L. Whetten, R. Beck, *Science*, **1991**, 252, 548-551.
 13. D. Heymann, *Fullerene Sci. Tech.*, **1996**, 4(3), 509-515.
 14. S. Zhu, E. Oberdorster, M.L. Haasch, *Marine Env. Res.* **2006**, 62(1), S5-S9.
 15. S.L. Hsu, R. Wu, *Mater. Lett.* **2007**, 61, 3719-3722.
 16. W. Wang, X. Chen, S. Efrima, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 7238-7246.
 17. A. Henglein, M. Giersig, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 9533-9539.
 18. D. Chen, Y. Huang, *J. Colloid Interf. Sci.* **2005**, 255, 299-302.
 19. P.K. Khanna, N. Singh, D. Kulkarni, S. Deshmukh, S. Charan, P.V. Adhyapak, *Mater. Letts*, 2007, 61, 3366-3370.
 20. Z.H. Mbhele, M.G. Salemane, C.G.C.E. van Stittert, J.M. Nedeljkovic, V. Djokovic, A.S. Luyt, *Chem. Mater.* **2003**, 15, 5019-5024.
 21. S.L. Hsu, R. Wu, *Mater. Lett.* **2007**, 61, 3719-3722.
 22. Z. Kai, F. Qiang, F. Jinghui, A. Dehui, *Mater. Lett.* **2005**, 59, 3682-3686.
 23. M. Popa, T. Pradell, D. Crespo, J.M. Calderon-Moreno, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2007**, 303, 184-190.
 24. V.R. Chaudhari, S.K. Haram, S.K. Kulshreshtha, J.R. Bellare, P.A. Hassan, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2007**, 301, 475-480.
 25. A.R. Shahverdi, A.F. Pharm, H.R. Shahverdi, S. Minaian, *Nanomedicine*, **2007**, 3, 168-171.
 26. W. Raveendran, J. Fu, S. Wallen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13940-13941.
 27. X. Pan, X. Bao, *Chem. Commun.*, **2008**, 6271-6281.
 28. J.M. Mangum, E.A. Turpin, A. Antao-Meneses, M.F. Cesta, E. Bermudez, J.C. Bonner, *Particle Fibre Toxicol.* **2006**, 3(15)
 29. Y. Zhu, T. Ran, Y. Li, J. Guo, W. Li, *Nanotechnology*, **2006**, 17, 4668-4674.
 30. F. Tian, D. Cui, H. Schwarz, G.G. Estrada, *Toxic. in Vitro*, **2006**, 20, 1202-1212.
 31. J. Buffle, J. Perret, J. Newman, "The use of filtration and ultrafiltration for size fractionation of aquatic particles, colloids and macromolecules", **1992**, Environmental Particles I. Lewis, Chesea.
 32. M. Hasselov, J.W. Readman, J.F. Ranville, K. Tiede, *Ecotoxi.* **2008**, 17, 344-361.
 33. E. Bae, B.K. Kwak, J. Yi, *J. Kor. Soc. Env. Anal.* **2008**, 11(3), 207-216.
 34. M. Kobayashi, F. Juillerat, P. Galletto, P. Bowen, M. Borkovec, *Langmuir*, **2005**, 21, 5761-5769.
 35. K.W. Powers, S.C. Brown, V.B. Krishna, S.C. Wasdo, B.M. Moudgil, S.M. Roberts, *Toxico. Sci.* **2006**, 90(2), 296-303.
 36. Malvern Instrument, "Zetasizer nano application note", Worcestershire, UK.
 37. J. Widegren, L. Bergstrom, *J. Am. Ceram. Soc.* **2002**, 85(3), 523-528.
 38. M.R. Wiesner, J. Bottero, "Environmental Nanotechnology", **2007**, McGrawHill, Newyork, USA.
 39. J. Hsu, B. Liu, *J. Colloid Interf. Sci.* **1998**, 198, 186-189.
 40. S.H. Behrens, D.I. Christl, R. Emmerzael, P. Schurtenberger, M. Borkovec, *Langmuir*, **2000**, 16, 2566-2575.
 41. L.K. Limbach, Y. Li, R.N. Grass, T.J. Brunner, M.A. Hintermann, M. Muller, D. Gunther, W.J. Stark, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 9370-9376.
 42. S.Y. Liau, D.C. Read, W.J. Pugh, J.R. Furr, A.D. Russell, *Lett. Appl. Microb.* **1997**, 25, 279-283.
 43. D. Heymann, L.P.F. Chibante, R.E. Smalley, *J. Chromatography A*, **1995**, 689, 157-163.
 44. A.J. Bard, L.R. Faulkner, "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications", **2001**, John Wiley & Sons, Denvers, USA.
 45. K. Hjemsted, T. Schneider, *Ann. Occup. Hyg.*, **1996**, 40(6), 627-643.
 46. Y. Kim, C. Kim, I. Choi, S. Rengaraj, J. Yi, *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 924-931
 47. P.R. Sudhir, H.F. Wu, Z.C. Zhou, *Pan*, **2006**, 77, 7380-7385.
 48. A.N. Baga, G.R.A. Johnson, N.B. Nazhat, R.A. Saadalla-nazhat, *Analytica. Chemica Acta.*, **1988**, 204, 349-353.
 49. C. Comninellis, *Electrochimica Acta.*, **1994**, 39, 1857-1862.
 50. H. Wang, J.A. Joseph, *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 5-6, 612-616.