

ChroZen HPLC를 활용한 벤잘코늄염화물(Benzalkonium chloride) 분석

• HPLC Application



Abstract

살생물제(Biocide)란 유해한 생물체를 제어 및 제거하기 위한 화학물질로 보존제, 살균제, 살충제, 방부제 등이 있다. 살생제는 병원체뿐만 아니라 비병원체도 죽일 수 있기 때문에 인체에 해로우며, 그 중 30% 이상이 내분비 장애를 유발하거나 수중 생물에 독성 또는 발암성이 있는 것으로 확인되고 있다. 2011년에는 가슴기 살균제로 인해 임신부와 영유아의 원인불명의 폐질환이 발생하여 살생물제에 대해 사회적으로 많은 문제가 야기 되었다.

살생물제 중 하나인 벤잘코늄염화물(Benzalkonium chloride, BKC)은 4급 암모늄 구조를 가진 양이온성 계면활성제로 농축산, 생활, 의료 환경에서 살균제 및 보존제로 광범위하게 사용되고 있다. 벤잘코늄염화물은 가슴기 살균제 원인물질 중 하나로 지속적으로 접촉 시 피부에 자극을 일으키고 흡입노출에 따른 호흡 곤란 등 급성독성을 일으킬 수 있다. 2019년부터는 환경부에서 ‘생활화학제품 및 살생물제의 안전관리에 관한 법률’과 ‘화학물질의 등록 및 평가 등에 관한 법률’로 살생제에 대한 관리를 강화하고 있다.

이번 연구에서는 벤잘코늄염화물을 대학약전 외 일반시험법과 환경부의 위해우려제품 안전기준 적합 여부 확인을 위한 표준시험절차 각각에 대해 ChroZen HPLC를 이용하여 분석을 진행하였다.

대한약전 외 일반시험법, 보존제시험

Instruments and Software

Item	Description	Part No.
Pump	ChroZen HPLC Quaternary Gradient Pump with Vacuum degasser	9421011020
Autosampler	ChroZen HPLC Autosampler	6421011020
Column Compartment	ChroZen HPLC Column Compartment for Analytical scale	3421011020
Detector	ChroZen HPLC UV/Vis Detector with dual wavelength	7411011020
Install. Option	HPLC Performance Kit (Without LC C18 Column)	1601011890
CDS	YL-Clarity software for single instrument of YL HPLC	5301011000
	Autosampler control of YL-Clarity	5301011040
Column	CN (4.6 mm x 150 mm, 5 μm)	-

Reagents and Standards

- Acetonitrile (CH₃OH), HPLC Grade
- Benzalkonium chloride, ≥ 50%
- Phosphoric acid, 85% purity
- Sodium phosphate dibasic, 99% purity
- Ultrapure water, 18.2 MΩ-cm resistivity

Preparation of Standard Solution

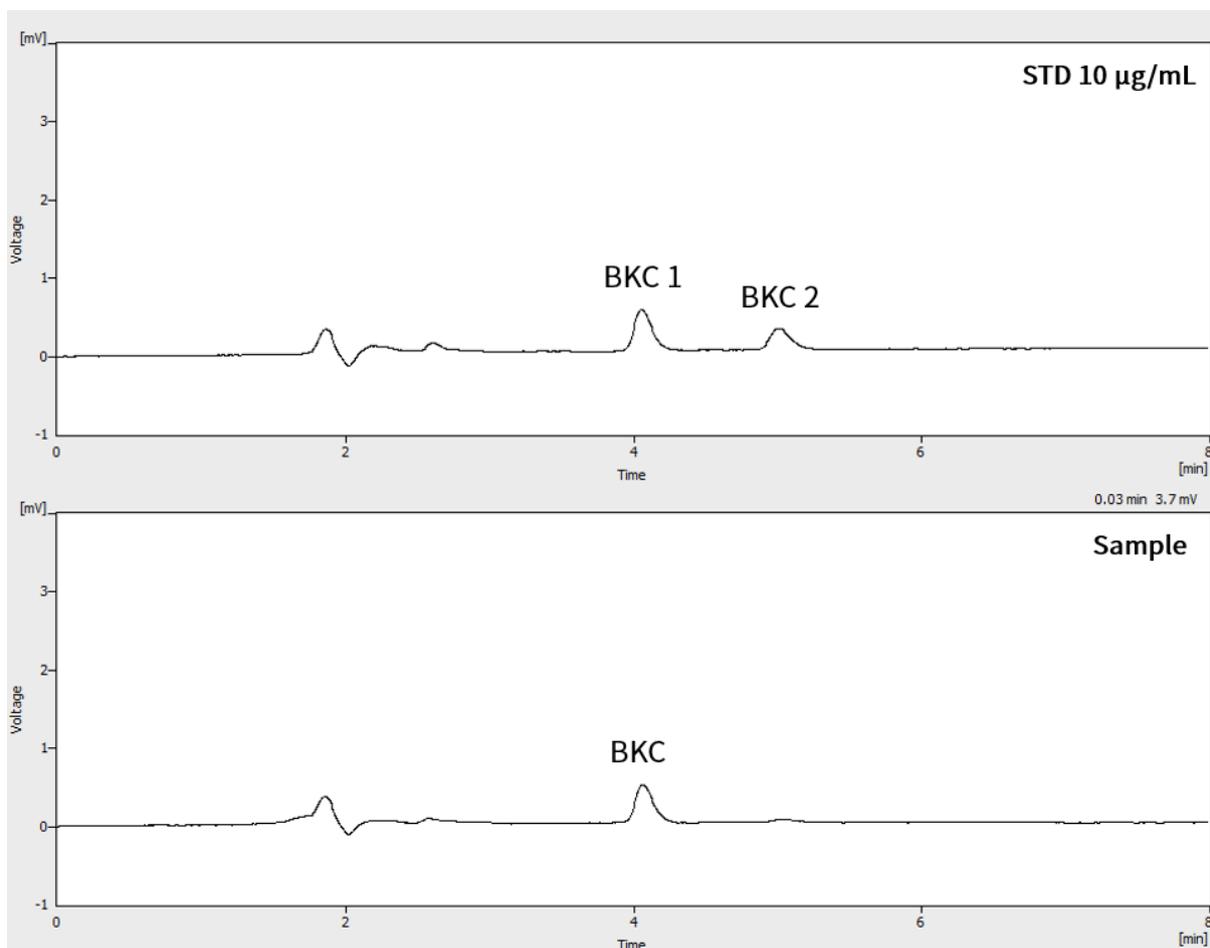
- ① 벤잘코늄염화물 1 g을 100 mL volumetric flask에 넣고 이동상을 넣어 100 mL가 되도록 채운다
- ② ①을 0.1 mL 취하여 100 mL volumetric flask에 넣고, 이동상을 넣어 100 mL가 되도록 채워 최종농도가 1 mL 중 10 μg이 되도록 만들어 표준액으로 한다

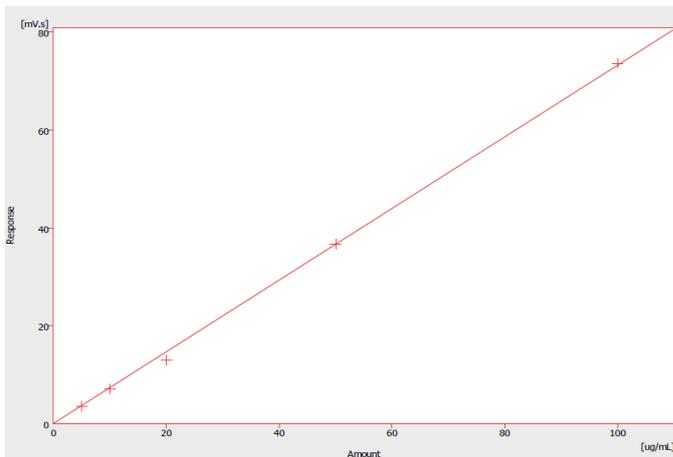
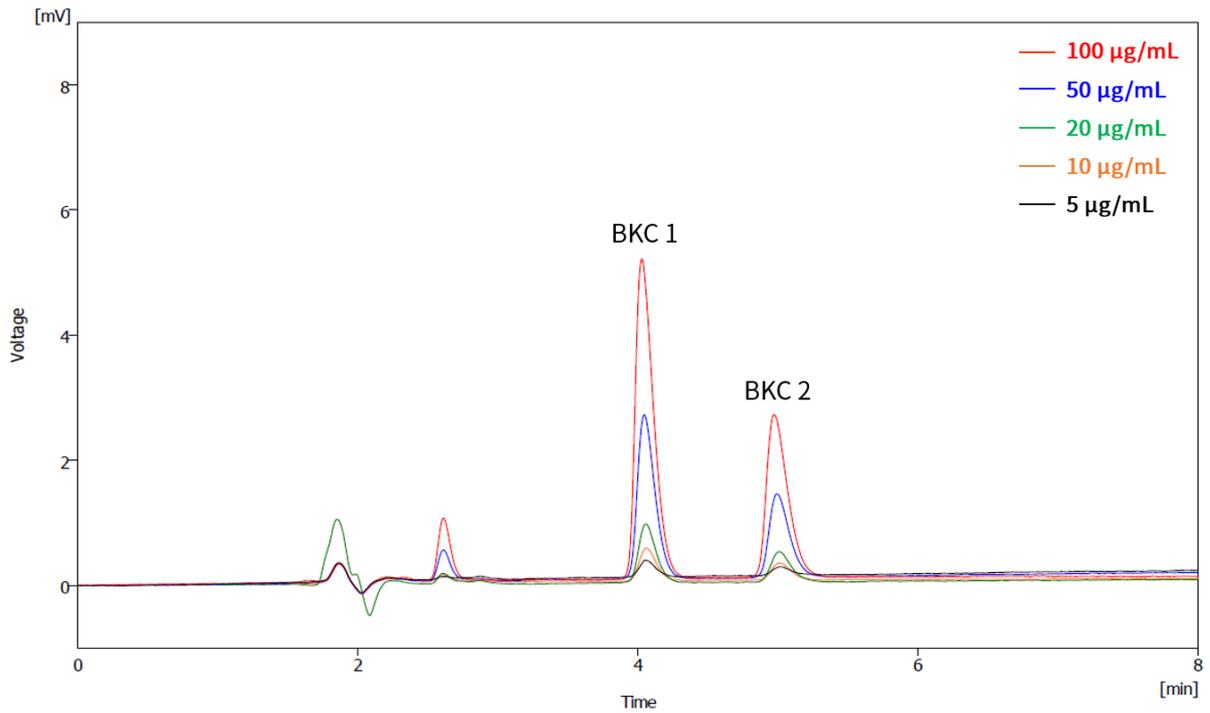
Preparation of Sample Solution

- ① 보존제의 표시량에 따라 적당량을 정확하게 취하여 최종농도가 1 mL 중 10 μg이 되도록 이동상으로 희석한다
- ② ①을 여과한 액을 검액으로 한다

Instrument conditions & Chromatogram

ChroZen HPLC system	
Mobile phase	ACN : 1% Na ₂ HPO ₄ = 50 : 50 (pH 5.2, phosphoric acid)
Column	CN (4.6 mm x 150 mm x 5 μm)
Flow rate	1.0 mL/min
Temperature	40°C
Injection volume	20 μL
Detection	UV/Vis detector 254 nm





STD	Standard Concentration (µg/mL)	Area (mV.s)
1	5	3.5105
2	10	7.0135
3	20	12.8988
4	50	36.6985
5	100	73.6270
Linearity		0.9997043

Calculation

$$\text{벤잘코늄염화물의 양(mg)} = \text{표준액의 농도(mg/mL)} \times \text{검액의 희석배수(mL)} \times \frac{A_T}{A_S}$$

A_T = 검액 내 벤잘코늄염화물의 peak area(BKC 1, BKC 2의 합)

A_S = 표준액 내 벤잘코늄염화물의 peak area(BKC 1, BKC 2의 합)

$$\text{Ex. } 0.01 \text{ mg/mL} \times 100 \times \frac{3.708}{7.060} = 0.525 \text{ mg}$$

환경부 위해우려제품 염화벤잘코늄 시험법

Instruments and Software

Item	Description	Part No.
Pump	ChroZen HPLC Quaternary Gradient Pump with Vacuum degasser	9421011020
Autosampler	ChroZen HPLC Autosampler	6421011020
Column Compartment	ChroZen HPLC Column Compartment for Analytical scale	3421011020
Detector	ChroZen HPLC UV/Vis Detector with dual wavelength	7411011020
Install. Option	HPLC Performance Kit (Without LC C18 Column)	1601011890
CDS	YL-Clarity software for single instrument of YL HPLC	5301011000
	Autosampler control of YL-Clarity	5301011040
Column	C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 μ m)	-

Reagents and Standards

- Benzalkonium chloride, $\geq 50\%$
- Sodium perchlorate, $\geq 98.0\%$
- Methanol, HPLC grade
- Ultrapure water, 18.2 M Ω -cm resistivity

Preparation of Standard Solution

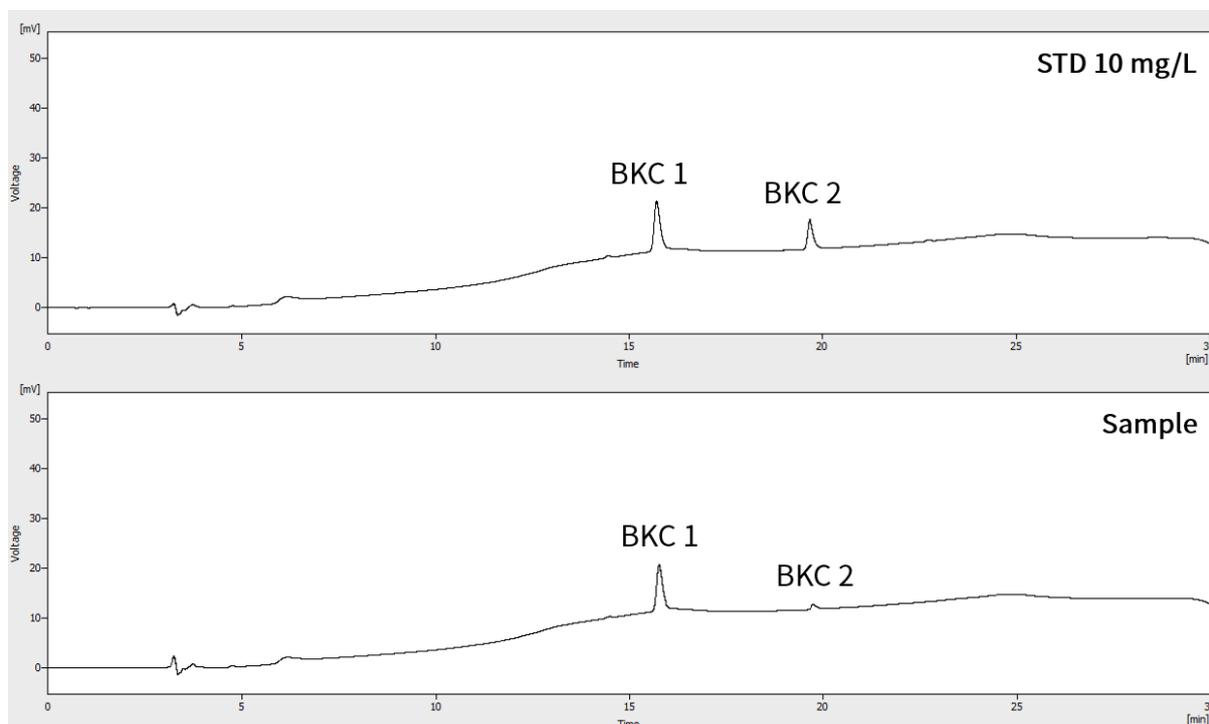
- ① 벤잘코늄염화물 0.1 g을 칭량하여 100 mL volumetric flask에 넣고 정제수를 넣어 표선까지 채워 표준원액(1,000 mg/L)으로 한다
- ② ① 0 ~ 5 mL를 단계별로 취하여 50 mL volumetric flask에 넣고 정제수로 표선까지 채운다.

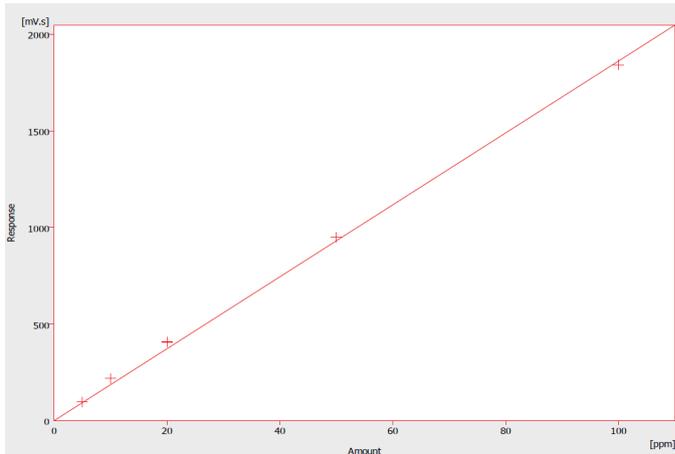
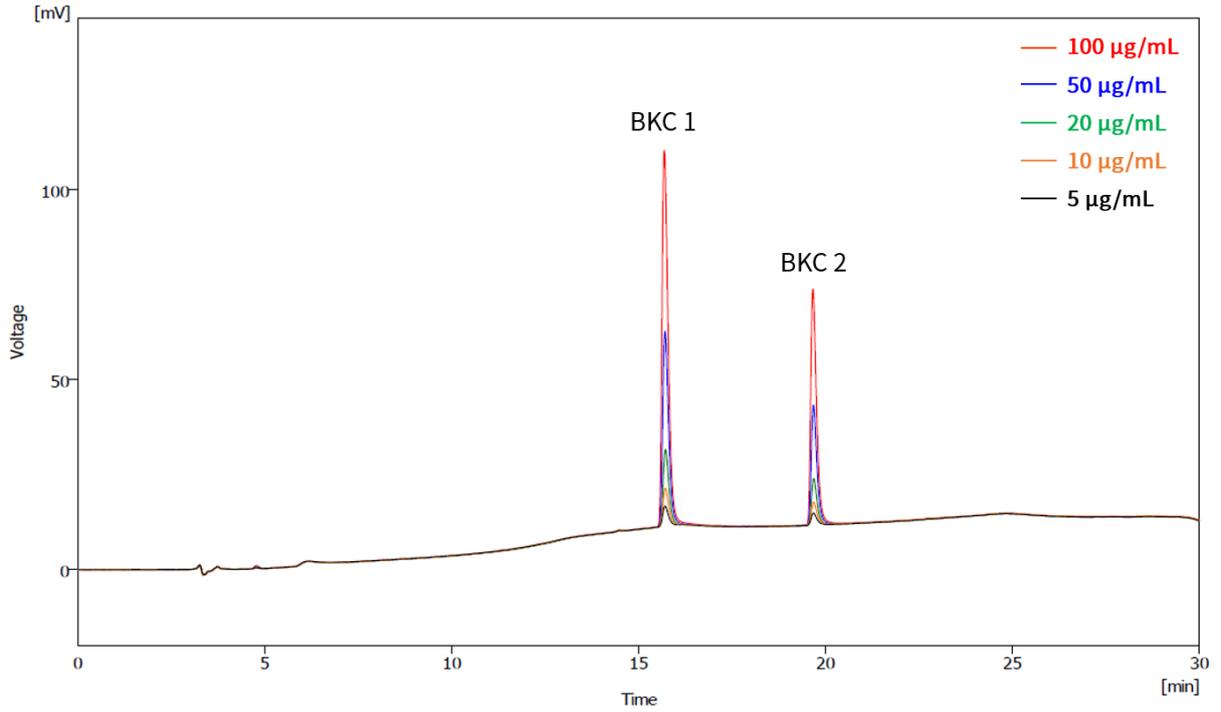
Preparation of Sample Solution

- ① 시료 약 1 ~ 4 g을 50 mL volumetric flask에 넣고 메탄올을 10 ~ 20 mL가한 후 초음파로 추출한다
- ② ①을 여과한 액을 시험용액으로 사용한다

Instrument conditions & Chromatogram

YL9100Plus HPLC system			
Mobile phase	A : 1% NaClO ₄ B : MeOH		
Column	C18 (4.6 mm x 250 mm x 5 μm)		
Flow rate	0.7 mL/min		
Temperature	30°C		
Injection volume	20 μL		
Detection	UV/Vis detector 220 nm		
Gradient programs	Time (min)	% A (1% NaClO ₄)	% B (MeOH)
	Initial	35	65
	20	5	95
	25	5	95
	30	35	65
	40	35	65





STD	Standard Concentration (µg/mL)	Area (mV.s)
1	5	97.1190
2	10	218.7178
3	20	407.1826
4	50	949.2359
5	100	1841.6945
Linearity		0.9996826

Table 1. Validity of Test Method

	MDL (mg/kg)	Linearity (R ²)	RSD (%)	Accuracy (%)
위해우려제품 지정 및 안전·표시기준	50	> 0.98	≤ 30	70 ~ 130
Result	0.13	0.99968	0.043	100.30
	Pass	Pass	Pass	Pass

Calculation

$$\text{제품 중 벤잘코늄염화물의 양(mg/kg)} = \frac{(C_1 - C_0)}{W_d} \times f \times V$$

C_1 = 시료의 벤잘코늄염화물의 농도(mg/L)

C_0 = 방법바탕시료의 벤잘코늄염화물의 농도(mg/L)

f = 희석배수(검정곡선의 범위를 벗어날 경우)

V = 시료 추출용액의 부피(mL)

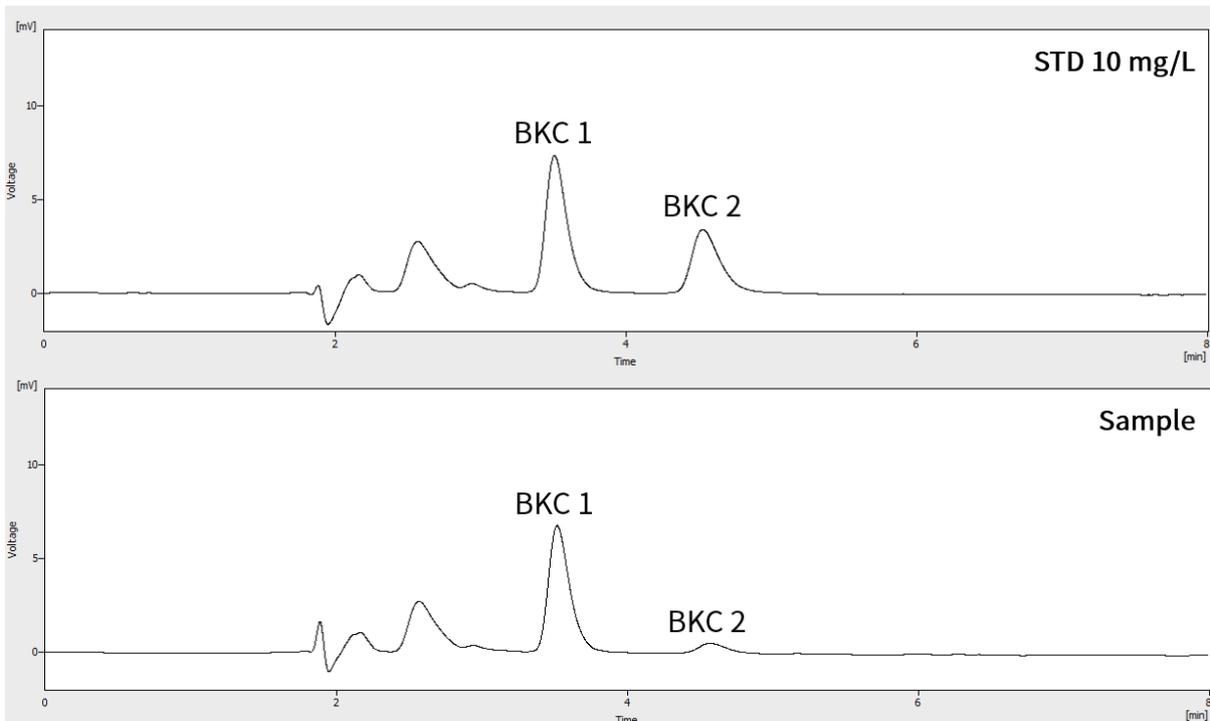
W_d = 제품시료의 무게(g)

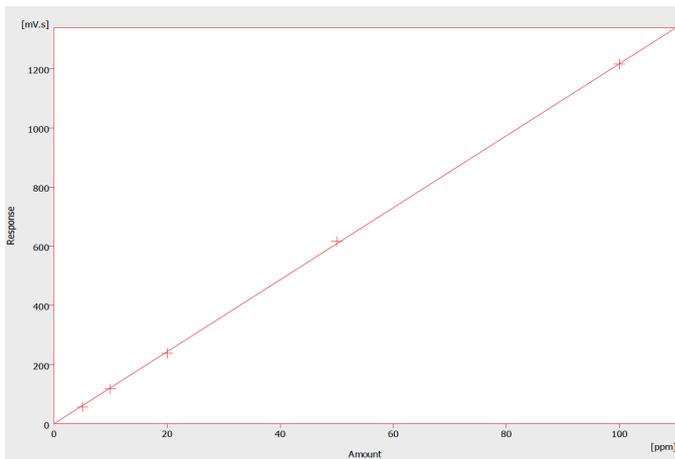
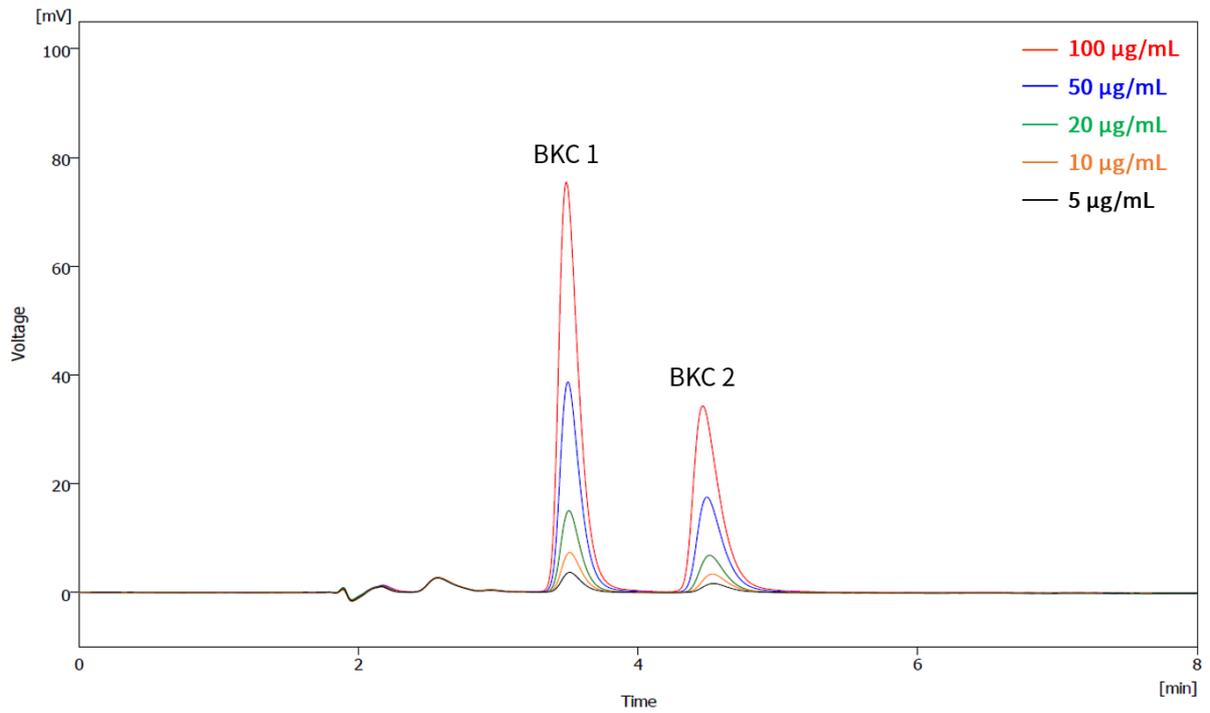
$$\text{Ex. } \frac{(6.242 - 0)}{1\text{g}} \times 1 \times 50 = 312.1 \text{ mg/kg}$$

환경부 위해우려제품 염화벤잘코늄 시험법 중 기기분석 조건 변경 시험법

Instrument conditions & Chromatogram

ChroZen HPLC system	
Mobile phase	1% NaClO ₄ : MeOH = 35 : 65
Column	CN (4.6 mm x 150 mm x 5 μm)
Flow rate	1.0 mL/min
Temperature	30°C
Injection volume	20 μL
Detection	UV/Vis detector 220 nm





STD	Standard Concentration (µg/mL)	Area (mV.s)
1	5	56.3969
2	10	117.2638
3	20	238.2750
4	50	616.2953
5	100	1215.1720
Linearity		0.9999506

Table 2. Validity of Test Method

	MDL (mg/kg)	Linearity (R ²)	RSD (%)	Accuracy (%)
위해우려제품 지정 및 안전·표시기준	50	> 0.98	≤ 30	70 ~ 130
Result	0.63	0.99995	0.346	95.98
	Pass	Pass	Pass	Pass

Conclusion

이번 연구에서는 대한약전 외 일반시험법, 환경부의 위해우려제품 내 염화벤잘코늄 시험법과 이 방법 중 기기조건을 변경한 시험법으로 ChroZen HPLC를 이용하여 벤잘코늄염화물을 분석하였다. 시험 결과의 유효성을 검토하기 위하여 직선성을 확인하였고, 정도관리가 제시되어 있는 시험법은 기준에 따라 방법검출한계(MDL)와 정밀도(RSD%)를 산출하였다.

3가지 시험법 모두 직선성에서는 0.999 이상으로 우수한 결과를 보였다. 환경부 염화벤잘코늄 시험법에 따라 진행한 결과는 [Fig 6], [Table 1]에서 확인할 수 있으며, 정밀도는 0.043%, 정확도는 100.30%로 정도관리 기준값과 비교하여 매우 만족하는 것으로 나타났다. 해당 시험법의 컬럼과 이동상 조건을 변경하여 기존의 긴 분석시간을 5배 단축시킨 시험법으로 진행한 결과는 [Fig 9], [Table 2]에서 확인할 수 있으며, 정밀도 0.346%, 정확도 95.98%로 환경부 시험법과 비교하여서는 정밀도가 약간 낮지만, 정도관리 기준값 비교에서는 역시 매우 우수한 결과를 보였다.

여러 가지 벤잘코늄염화물 시험법을 비교한 결과 분석결과의 정밀도는 모두 우수한 결과를 나타내었다. 따라서 분석 여건과 시료 종류에 따라 적절한 분석법을 선택하여 적용하면 될 것으로 여겨진다.

Reference

- 대한약전 외 일반시험법 보존제시험
- 위해우려제품 안전기준 적합 여부 확인을 위한 표준시험절차
- 코로나19 살균·소독제품의 안전한 사용을 위한 세부지침(환경부, 화학제품관리과)
- 가슴기 살균제(염화벤잘코늄)의 호흡기계 독성 연구(산업안전보건연구원)



14042, 경기도 안양시 동안구 안양천동로 60

TEL: 031-428-8700

FAX: 031-428-8787

E-mail: mkt@youngincm.com

Homepage: www.youngincm.com