

# 비이온성 계면활성제 용액에서 methyl paraben의 용해도와 대장균에 대한 최소억제농도의 변화

鄭 敎 民  
(太平洋化學技術研究所)

## Solubility of methyl paraben and MIC to *E.coli* in non-ionic solutions

CHUNG, Kiomin  
(Pacific Chem. Co.)

### ABSTRACT

Increasing the concentration of the nonionic surfactants the solubility of methyl paraben was increased.

This is called the solubilization phenomenon and caused inactivation of the preservatives used. The MICs (minimum inhibitory concentrations) on *E. coli* were increased at the same time. So the relation between the solubility and the mic could be expressed as  $S-S_0=R'/R''$  ( $M-M_0$ ) and in this case  $R'/R''$  was about 2.

### I. 序 論

비이온성 계면활성제는 향장류와 의약품공업에 유화제 또는 유화안정제로써 꼭 필요한 원료이지만, 음이온이나 양이온성계면활성제와는 달리 미생물의 성장을 억제하는 효과가 거의 없으며, 오히려 제품에 첨가되는 일부의 방부제, 특히 *p*-hydroxy benzoic acid ester(이하 paraben으로 略함)를 불활성화시킨다.

비이온성 계면활성제에 의한 paraben 불활성화 연구는 투석막(15, 17, 18.), pH 변화에 따른 적정법(10, 11), 용해도(6, 19), molecular sieve 법(2), 흡광도법(10, 15, 17, 18, 19)을 이용한 물리화학적 방법과 미생물의 성장량(4), 동위원소 측정법(3, 13), 성장에 따른 현탁도 측정(8), Coulter Counter를 이용한 방법(16)등의

미생물학적 방법등으로 진행되었다.

그러나 미생물을 이용한 연구는 방부제의 양을 고정시키거나 계면활성제의 양을 고정시켰으며(19, 21, 22), 물리화학적 방법과 미생물학적 방법의 혼합은 계면장력과 방부제의 용해도 및 최소억제농도와의 관계를 Tween 20<sup>®</sup>을 써서 실험한 Aoki 등(1)과, 계면활성제와 결합되지 않은 방부제의 양을 투석막으로 측정하고 최소억제농도와 비교한 Kostenbauder 등(17, 19)의 보고가 있을 뿐이다. Kostenbauder 등은 계에 첨가된 방부제의 총량/결합되지 않은 방부제의 양을 비교하여 분배율의 의미로 R 값을 구하였으나, R 값이 계면활성제의 농도에 따라 변하는 가변 상수이어서 실지 측정 및 실용성이 어렵다.

본 실험에서는 계면활성제 1% 이상에서 methyl paraben의 용해도와 *E.coli*의 성장을 억제시키는 최소억제농도와 상관관계를 고찰하였다.

II. 材料 및 方法

防腐劑로서 methyl paraben 은 단일화학제품을 경제하여 m.p. 128°C로 확인하였고, 비이온성계면활성제는 Tween 20°, Tween 60°, Tween 80°, Erij 58°, Brij 78°, Brij 98°은 미국 ICI社 제품을 사용하였고, 사용한 계면활성제의 상품명에 따른 화학명은 Table 1과 같다.

Table 1. 비이온성 계면활성제의 상품명 및 화학명

상품명	화학명
Tween 20	Sorbitan POE(20) monolaurate
60	" monostearate
80	" monooleate
Brij 58	POE (20) cetyl ether
78	" stearyl ether
68	" oleyl ether

POE=polyoxy ethylene의 준말, ( )=POE 부가 mole 수

실험에 사용한 균주는 *E. coli* ATCC 25922 로써, nutrient broth에서 37°C, 72시간 배양한뒤 일반적인 방법으로 조작하여 접종액으로 하였다.

① 溶解度 측정 : 1-10%의 농도별 계면활성제 수용액에 methyl paraben 을 과량 넣고 25°C에서 72시간 진탕하여 평형을 이루게 한 뒤, 잔존의 methyl paraben 을 여과하여 제거하고, 여액을 적당히 희석하여 methyl paraben 의 농도를 UV spectrophotometer 를 사용, 255m $\mu$ 에서의 흡광도로 결정했다(7).

② *E. coli*에 대한 최소억제농도의 결정 : 0.1-0.2%까지 증류수 100ml에 0.01g의 간격으로 methyl paraben 을 첨가하고 100°C, 15분 가열하여 살균시킨 다음 (열에 의한 methyl paraben 의 분해여부를 NaOH로 적정하여 확인하였음) 10<sup>6</sup> cell/ml 되도록 배양된 *E. coli* 균액을 접종하고, 25°C에서 진탕하면서 4, 8, 12, 24시간 경과후에 1ml씩 취하여 균수를 측정하였다.

24시간 경과뒤에 초기접종균수를 99.99% 감소시키는 농도가 0.17%로 나타났으므로, 24시간 배양후 99.99%를 감소시키는 농도를 최소억제농도로 하였다.

③ 계면활성제의 농도에 따른 methyl paraben 억제농도의 결정 : 2% 간격으로 계면활성제의 농도를 증가시킨 수용액에 0.02g 간격으로 methyl paraben 을 첨가하고 100°C, 15분간 가열하여 살균시킨 다음(열에 의한 계면활성제 분해여부를 0.01N NaOH로 유리지방산을 정량하였을 때 가열전과 동일하였음), 10<sup>6</sup>cell/ml 되도록 배양된 *E. coli* 균액을 접종하고 25°C에서 24시간 진탕배양한 후 1ml를 취하여 생균수를 측정하고 초기접종균수의 99.99%를 감소시킨 methyl paraben 의 농도를 구하였다.

III. 結果 및 考察

각 계면활성제의 농도에 따른 methyl paraben 의 용해도는 Table 2와 같다.

계면활성제의 농도가 증가하면 methyl paraben 의 용해도는 일정하게 증가하며, Tween의 경우 80=60>20으로, Brij의 경우 98>78=58로 나타났다. 따라서 Tween 계열이나 Brij 계열이거나 간에 계면활성제에 결합되어 있는 지방산의 탄소수가 lauryl 또는 cetyl, stearyl, oleyl 순으로 증가하면 methyl paraben 의 용해도를 증가시킬 수 있다.

Table 2. Solubility of methyl paraben in various nonionic solutions

conc.	Tween			Brij		
	20	60	80	58	78	98
2	0.43	0.43	0.46	0.35	0.48	0.46
4	0.66	0.68	0.68	0.76	0.52	0.72
6	0.84	0.98	0.97	0.90	0.73	1.00
8	1.10	1.03	1.14	0.98	0.87	1.18
10	1.33	1.52	1.42	1.22	1.38	1.63

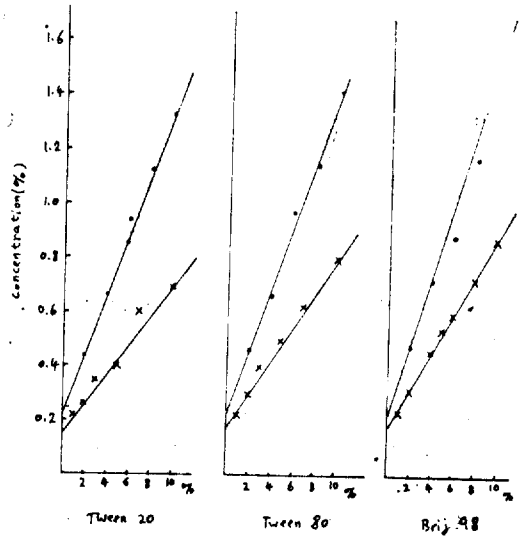
Sorbitan에 ester 결합을 한 Tween의 경우와 sorbitan이 없이 ether 결합을 한 Brij의 경우 용해도의 비교는 Brij 98>Tween 80, Tween 60> Brij 78로 나타났으며, 이러한 결과로써 ether 결합이나 ester 결합사이에 존재하는 일관성있는 결과를 얻지 못하였다.

지방산으로써 lauryl, oleyl을 갖고 ester 결합인 Tween 20과 Tween 80, 그리고 oleyl과

ether 결합하고 있는 Brij 98을 택하여 실험한 *E. coli*에 대한 최소억제농도는 Table 3과 같은 비계면활성제의 농도의 증가에 따라 최소억제농도를 일정하게 증가하였으며, 지방산의 탄소수 증가에 따른 Tween 20과 Tween 80의 경우 Tween 80이 높았고, oleyl을 갖고 있는 Brij 98이 같은 oleyl을 갖는 Tween 80보다 높았다. 따라서 최소억제농도 실험결과는 용해도 실험결과와 일치하였다.

**Table 3.** Minimum inhibitory concentrations of methyl paraben to *E. coli*

conc.	Tween 20	Tween 80	Brij 98
1	0.22	0.22	0.24
2	0.26	0.30	0.32
3	0.35	0.40	0.38
5	0.40	0.50	0.55
7	0.60	0.63	0.68
10	0.70	0.80	0.88



**Fig 1.** The solubility of methyl paraben and minimum inhibitory concentration to *E. coli* in various nonionic solutions

계면활성제의 농도 증가에 따른 methyl paraben의 용해도와 최소억제농도는 일정하게 증가하며, 이를 수식화할 수 있다.

용해도  $S = S_0 + R'C \dots ①$

최소억제농도  $M = M_0 + R''C \dots ②$

이때  $S_0, M_0$ 는 계면활성제가 없을 때의 용해도와 최소억제농도이며,  $S, M$ 은 계면활성제용액의 용해도와 최소억제농도,  $C$ 는 계면활성제의 농도(%)이다.  $R', R''$ 는 용해도와 최소억제농도 직선의 기울기 값이다.

①과 ②식에서  $C$ 가 공통항이므로 ②를 ①에 대입하면

$$S - S_0 = \frac{R'}{R''}(M - M_0) \text{가 된다.}$$

Table 2 및 Table 3의 결과를 도식화하면 Fig. 1과 같으며, 여기서 각 계면활성제에 대한 methyl paraben의 용해도 및 최소억제농도의 기울기는 Table 4와 같다.

Table 4에 의하면  $R'/R''$ 는 대략 2의 값을 나타내고 있으며, 이 결과로 계면활성제의 증가에 따라 용해되는 methyl paraben의 양이 약 절반이 미생물의 성장억제에 첨가되는 양임을 뜻한다.

Kostenbauder 등 (17, 19)은 투석막을 사용, 계

**Table 4.** comparison of solubility and minimum inhibitory concentration in nonionic solutions

nonionic	$R'$	$R''$	$R'/R''$
Tween 20	0.114	0.056	2.0357
Tween 80	0.119	0.063	1.8534
Brij 98	0.157	0.074	2.1216

면활성제와 결합하지 않은 methyl paraben을 분리정량하여 계에 투입된 양과 결합되지 않은 양의 비를 구하고  $T = R \times F$ 의 식으로 methyl paraben의 불활성화 양을 설명하였다( $T$ 는 methyl paraben의 용해총량,  $F$ 는 투석막을 통해 빠져나오는 계면활성제와 결합되지 않은 methyl paraben의 양,  $R$ 은 가변상수). 그러나 계면활성제의 농도에 따라  $R$  값이 변하므로 일일이 실험하여 결과를 얻어야 하는 불편한 점이 있었는데, 본 실험에서 얻은 결과는 이러한 불편을 보완할 수 있다.

## IV. 摘 要

1. 계면활성제의 농도가 증가하면 용해도와 최소억제농도는 일정하게 증가한다.
2. 계면활성제에 결합되어 있는 지방산의 탄소수가 증가하면 용해도와 최소억제농도는 증가한다.
3. 용해도와 최소억제농도와의 관계는  $S-S_0 = \frac{R'}{R''}(M-M_0)$ 로써, 본 실험에서  $\frac{R'}{R''}$ 는 대략 2가 되었다.

## V. 引用文獻

1. Aoki *et. al.* 1957. Application studies of surface active agents in pharmaceutical preparations, 2. The effect of Tween 20 upon antifungal activities of p-hydroxybenzoic acid esters in solubilized preparations. *J. Pharm. Soc. Japan*, 77, 4, 410.
2. Ashworth & Heard, 1966. The evaluation of a molecular sieve technique to determine the interaction a preservative and a surfactant. *J. Pharm. Pharmacol.* 81, 18, sup. 985.
3. Beckett & Robinson, 1958. The inactivation of preservatives by nonionic surface active agents. SPC 454.
4. Beckett *et.al.* 1959. The interaction of phenolic compounds with bacteria, 3. Evaluation of the antibacterial activity of hexylresorcinol against *E. coli*. *J. Pharm. Pharmacol.* 11, 6, 352.
5. Bennett, 1962. Factors involved in the preparation of metal cutting emulsions. *Dev. Ind. Microbiol.* 3, 273.
6. Blaug & Ahsan, 1961. Interaction of parabens with nonionic macromolecules. *J. Pharm. Sci.* 50, 441.
7. Bolle & Mirimanoff, 1950. Antagonism between nonionic detergents and antiseptics. *J. Pharm. Pharmacol.* 2, 685.
8. Brown, 1966. Turbidimetric method for the rapid evaluation of antimicrobial agents. Inactivation of preservatives by nonionic agents. *J. Soc. Cosm.Chem.* 17, 185.
9. deNavarre, Chemistry and Manufacture of Cosmetics.
10. Donbrow & Rhodes, 1966. Spectroscopic examination of the solubilization of benzoic acid by a nonionic surfactant. *J. Pharm. Pharmacol.* 18, 424.
11. Evans, 1964. The solubilization and inactivation of preservatives by nonionic detergents. *J. Pharm. Pharmacol.* 16, 323.
12. Higuchi & Lach, 1954. Studies of possible complex formation between macromolecules and certain pharmaceuticals, 3. Interaction of polyoxyethylene glycols with several organic acids. *J. Am. Pharm. Asso. Sci. Ed.* 43, 465.
13. Judis, 1962. Studies on the mechanism of action of phenolic disinfectant, 1. Release of radioactivity from carbon 14-labeled *E. coli*. *J. Pharm. Sci.* 51, 261.
14. Kostenbauder, 1962. Physical chemical aspects of preservative selection for pharmaceutical and cosmetic emulsions. *Dev. Ind. Microbiol.* 3, 286.
15. Miyawaki *et. al.* 1959. Interaction of preservatives with macromolecules, 3. Parahydroxybenzoate esters in the presence of some hydrophilic polymers. *J. Am. Pharm. Asso. Sci. Ed.* 48, 315.
16. Parker *et.al.* 1966. The use of the Coulter Counter to detect the inactivation of preservatives by a nonionic surface active agent. *J. Pharm. Pharmacol.* 18, sup. 103S.
17. Patel, 1967. Interaction of some pharmaceuticals with macromolecules, 3. Correlation of binding data with inhibitory concentrations of preservatives in the presence of cetomacrogol 1000 and polysorbate 80. *Can. J. Pharm. Sci.* 2, 7, 77.
18. Patel & Kostenbauder, 1958. Interaction of preservatives with macromolecules, 1. Binding of parahydroxybenzoic acid esters by polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (Tween80). *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 47, 280.
19. Pisano & Kostenbauder, 1959. Interaction of preservatives with macromolecules, 2. Corr-

- elation of binding data with required preservative concentrations of p-hydroxybenzoates in the presence of Tween 80. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* **48**, §10.
20. Rees & Collett, 1974. The dissolution of salicylic acid in micellar solutions of polysorbate 20. *J. Pharm. Pharmacol.* **26**, 956.
21. Wedderburn, 1958. Preservation of toilet preparations containing nonionics. *J. Soc. Cosm. Chem.* **9**, 210.
22. Wedderburn, 1964. Preservation of emulsions against microbial attack. *Adv. in Pharm Sci.* **1**, 195.