

## Isothiazoline 유도체의 합성 및 정제에 관한 연구

성기천 · 김기준

대전대학교 공과대학 화학공학과

### A Study on the Synthesis and Refining of Isothiazoline Derivatives

Sung, Ki-Chun · Kim, Ki-Jun

*Dept. of chemical engineering, Dae Jin University, Po-chun, Korea*

(Received Jun., 17, 1997)

#### ABSTRACT

Isothiazoline derivatives is widely used to food, medical drug and industrial goods, cosmetics etcs, and it makes to restrain and to sterilize a breeding of microbe as a preservative and a sterilizing agent.

It differs with the raw material of paraoxybenzoic acid derivatives or imidazolydinyl urea to be in use at present, on the efficacy and effect, and has various characteristics.

This synthesis makes 3,3'-dithiodipropionic chloride to add a thionyl chloride in 3,3'-dithiodipropionic acid, and 3,3'-dithiodipropionic methyl amide makes to synthesize in a reflux reaction the mono methyl amine to 3,3'-dithiodipropionic chloride.

And last synthesis becomes to make chlorination-cyclization molecule doing a reflux reaction in the temperature of 90~100°C to mix excessively thionyl chloride and ethylene dichloride to 3,3'-dithiodipropionic methyl amide. The last synthesis material has got in the mixture of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazoline-3-one and 2-methyl-4-isothiazoline-3-one, and it is so-called isothiazoline derivatives.

The purification of isothiazoline derivatives makes to fuse in ethyl acetate, and makes to decolorize and to deodorize in recrystallization. This experiment has been in synthesis and purification of isothiazoline derivatives, and has tried to measure on the antiseptis and sterilization function of microbe according to pH or content change.

#### I. 서 론

식품이나 의약품, 그리고 공산품이나 화장품 등에 널리 사용되고 있는 방부 및 살균제는 미생물인 박

테리아나 곰팡이균에 대한 번식을 막아주고 살균작용을 함으로서 제품의 유통 과정이나 장기 보관으로 인하여 변질을 막아주는 매우 중요한 재료이다.

제품에 본 재료를 사용하지 않을 경우 미생물에 오염되기 쉽고, 제조 및 생산시설에도 미생물에 오

염되기 쉽다.

따라서 이들 제품과, 제조 및 생산시설에는 방부 및 살균제의 첨가가 필요하며 특히 방부 및 살균효과가 우수한 Isothiazoline 유도체는 기존의 방부제인 파라 옥시안식향산 유도체나 이미나졸리디닐 우레아와는 달리 다양한 특성을 가지고 있으며, 파라 옥시안식향산 유도체의 항균효과는 Table 1과 같다.

Isothiazoline 유도체 ( $\begin{matrix} R_1 \\ | \\ \text{---} \\ | \\ R_2 \\ | \\ \text{---} \\ | \\ R_3 \end{matrix}$  )는 R<sub>1</sub>(CH<sub>3</sub>), R<sub>2</sub>(H), R<sub>3</sub>(Cl, H)의 라디칼을 갖는 5-chloro-2-methyl-4-isothiazoline-3-one과 2-methyl-4-isothiazoline-3-one의 합성물질로 R<sub>1</sub>과 R<sub>3</sub>의 위치에 따라 methyl과 chloro 라디칼을 선택적으로 치환, 반응시키면 Chlorination-Cyclization(염소-고리화)이 이루어지고, 이는 방부 및 살균작용에 탁월한 약리효과<sup>1)</sup>가 있는 것으로 보고되어 있으며, 미생물에 대한 염소의 살균효과는 Table 2와 같다.

Isothiazoline 유도체를 고리화하여 치환, 반응하는 방법은 여러 가지 합성방법<sup>2)</sup>이 있다. Adam과 slack<sup>3)</sup>는 mononuclear Isothiazole(단핵 이소치아졸)을 고리화 반응시켜 3-hydroxy Isothiazoline과 2-Substituted-4-isothiazoline-3-one을 최초로 합성하였다. Goerdeler와 Mitter<sup>4)</sup>는 thioacyl acetamide를 브롬화 반응시켜 2-methyl-5-phenyl-

4-isothiazoline-3-one과 5-methyl 및 5-phenyl-3-hydroxyisothiazoles을 고리합성하였다.

Hatchard<sup>5)</sup>는 di(sodiomercapto) methyl enenitrile을 산화반응시켜 과산화수소에 의하여 3-hydroxy-4-cyano-5-mercapto isothiazole의 disodium salt로 고리화 합성하였고 Goerdeler와 Keuser<sup>6)</sup>는 thiomalonamide 유도체를 브롬화 반응시켜 5-anilino-3-hydroxy isothiazole로 고리화 합성하였으며 Crow와 Leonald<sup>7)</sup>에 의해 cis-3-thiocyano와 thio-sulfatoacrylamide를 고리화 반응하여 2-methyl과 2-ethyl-4-isothiazoline을 각각 합성하였다. Isothiazoline 유도체는 낮은 수득률과 높은 순도로 효능 및 효과를 보다 높여주므로서 미량으로도 박테리아나 곰팡이균에 살균력이 있어 무좀이나 위궤양 치료제 등 의약품에 사용될 수도 있으나 임상시험에 대한 검토가 필요하다. 일반적으로 박테리아균<sup>8)</sup>에는 Gram(그램)양성균인 staphylococcus(포도상구균), streptococcus(연쇄구균) 등이 있고, 그리고 Gram(그램)음성균에는 pseudomonas(간균), E. coli(대장균) 등이 있으며 곰팡이균에는 Aspergillus(푸른곰팡이) 등이 있고 미생물의 발육에 영양을 미치는 인자는 습도<sup>9)</sup>(Humidity), 온도<sup>10)</sup>(Temperature) 그리고 산성도(Acidity)<sup>11)</sup> 등을 들 수 있다.

Table 1. 파라옥시 안식향산 유도체의 항균효과<sup>13)</sup>

합 량	항 균 농 도 (%)				비 고
	Methyl	Ethyl	Propyl	Butyl	
Staphylococcus	0.1 ~0.4	0.05~0.1	0.05~0.1	0.1	
Pseudomonas	0.2	0.1	0.05~0.1	0.05~0.4	
Aspergillus	0.1	0.05	0.05	0.05	

Table 2. 미생물에 대한 염소의 살균 효과<sup>13)</sup>

미 생 물	pH	온 도(℃)	살균 시간	유효염소농도		비 고
				(ppm)	살균효과(%)	
Staphylococcus	7.5	20~25	2분	0.5	100	
Streptococcus	6.0	21	0.25분	5.0	100	
Pseudomonas	7.2	25	0.5분	0.8	100	
E. coli	7.0	20~25	1분	0.055	100	
Aspergillus	5.0	25	30~60분	100.0	100	

대부분의 미생물은 수분에 의존하고 있으며 수분 없이 자체 발육과 성장을 지속할 수는 없다. 그러나 박테리아균 중에 그람음성균은 습도를 필요로 하지만 그람양성균이나 곰팡이균은 건조한 곳에서도 발육이 가능하다.

Larkin<sup>12)</sup> 등은 고온과 저온에서 미생물의 저항온도와 최적온도를 분리하였으며 이중 최적온도는 미생물의 발육과 성장에 중요한 요소가 되고 있으며 최적온도에 따라 자연계에는 많은 미생물이 존재함을 알 수 있다.

또한 미생물은 pH가 약 4.5 이하와 8.5 이상에서 증식이 불가능한 것으로 보고<sup>13)</sup> 되어 있다. 그러나 곰팡이 균인 진균류는 중성보다 산성쪽에 적합한 것으로 되어 있으며, 미생물에 대한 발육 및 최적 pH를 나타내면 Table 3과 같다.

Table 3. 미생물에 대한 발육 및 최적 pH<sup>13)</sup>

미 생 물	pH		비 고
	발 육	최 적	
Staphylococcus	5.0~9.6	6.5	
Streptococcus	5.7~9.2	7.6~8.0	
E. coli	4.8~9.6	7.0~8.0	

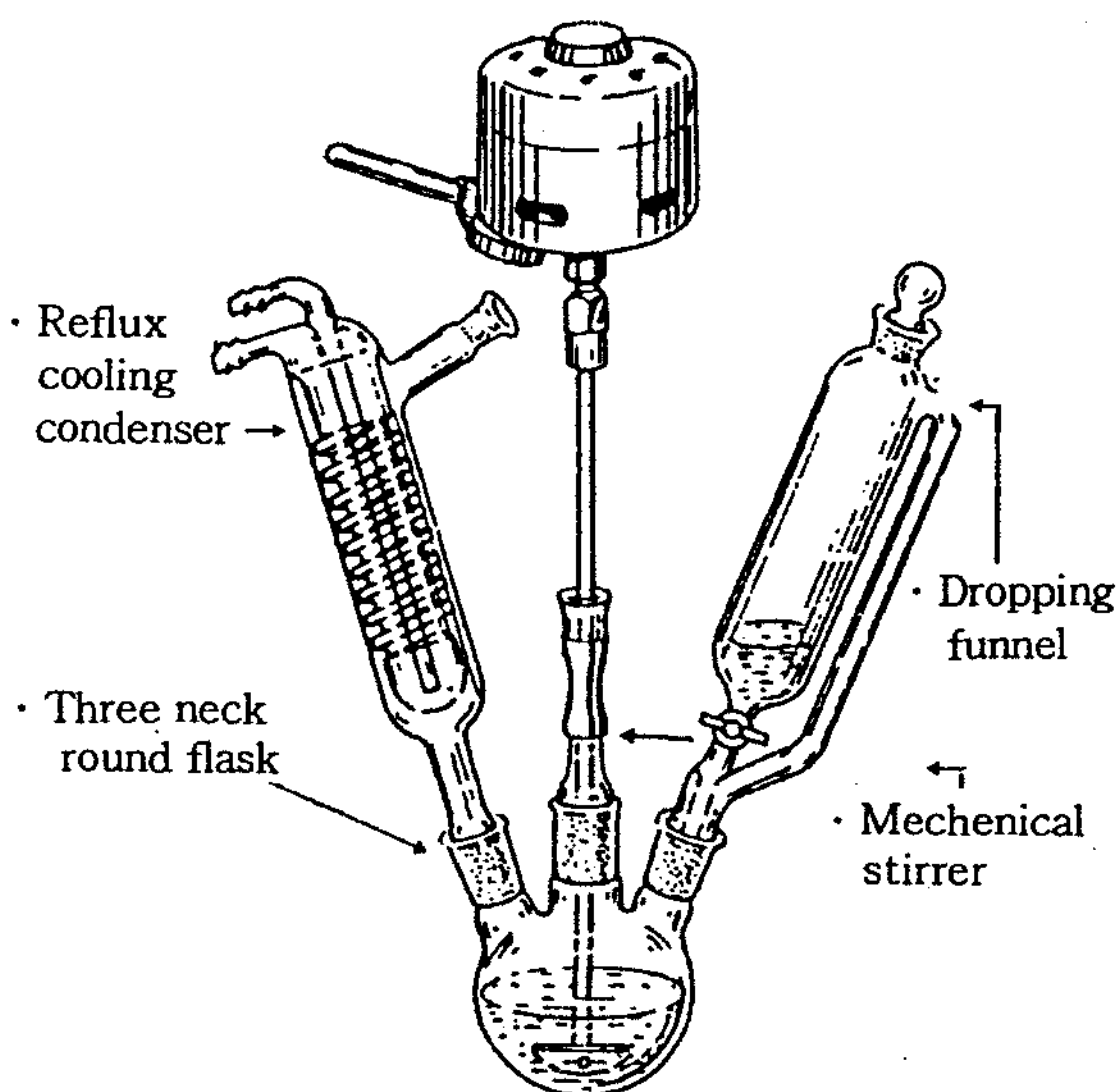


Fig. 1. 합성실험장치.

일반적으로 유기화합물을 정제하는 데는 흡착법과 증류법, 여과법과 재결정법 등이 있으며 isothiazoline 유도체의 정제에는 에틸 아세테이트를 용유시켜 재결정법으로 시험하였다.

본 연구는 합성, 정제한 Isothiazoline 유도체가 pH 및 함량 변화에 따라 미생물에 미치는 방부 및 살균기능에 관하여 효능 및 효과를 측정해 보고자 하였다.

## II. 실험

### 1. 시약 및 기기

본 합성에 사용된 시약은 3,3'-Dithiodipropionic acid로 Aldrich Chemical Co.의 특급시약을 사용하였고 Thionyl chloride와 Mono methyl amine (CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)은 D. S. P 국산 I급 시약을 사용하였다.

또한 용매로는 Ethylene dichloride와 Ethyl acetate를 사용하였고 pH 조정과 미생물 시험에는 Phosphoric acid(인산)과 Nutrient agar medium(한천영양배지)을 각각 사용하였다.

실험기기로는 Rotary reevaporator R-114(Swiss), Circulating aspirator A-3S(Japan), Three neck round flask(Germany)와 Reflux Cooling Condenser(국산) 등을 사용하였고 실험장치는 Fig. 1과 같다.

미생물시험에는 Microscope(Japan), Shaking Incubator(국산), Colony Counter(국산)와 Autoclave(국산)을 각각 사용하였고, UV-측정은 UV-Spectrophotometer(UVikon-920)와 IR-측정은 IR-Spectrophotometer(JASCO IR-100)와 HPLC 측정은 HPLC(Young In M-910)를 각각 사용하였다.

### 2. Isothiazoline 유도체의 합성 및 정제 시험

#### 1) 1차 합성시험

Three neck round flask(500mL)에 3,3'-Dithio-dipropionic acid(0.4mol)와 Thionyl Chloride(0.9mol)를 넣고 Oil bath상에서 온도가 90~100°C, 압력이 15~20mmHg, 시간이 약 4시간 Reflux(환류) 반응시켜 증발시키면 3,3'-Dithiodiprop-

ionic Chloride가 얻어진다.

#### 2) 2차 합성시험

Mono methyl amine(40% Sol), 200mL를 Three neck round flask(500mL)에 넣고 3,3'-Dithiodipionic chloride(1mol)를 Dropping Funnel에 넣어 서서히 교반하면서 주입한다. 이 때 Mono methyl amine은 발열반응을 하므로 Water Bath 상에 Ice와 NaCl을 넣어 온도를 15~20℃로 유지시키면서 약 15시간 Reflux(환류) 반응시키면 3,3'-Dithiodipropionic methyl amide가 얻어진다.

#### 3) 3차 합성시험

건조시킨 3,3'-Dithiodipropionic methyl amide(0.4mol)에 용매인 Ethylene dichloride 약 100 mL를 Three neck round flask에 넣어 상온에서 용해시키고 Surfuryl chloride(0.9mol)를 excess(과량) 혼합하여 Oil bath상에서 온도가 90~100℃, 시간이 약 12시간, Reflux(환류) 반응시키면 3,3'-Dithiodipropionic methyl amide가 Chlorination-Cyclization(염소-고리화)되어 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazoline-3-one과 2-methyl-4-isothiazoline-3-one의 합성물질이 얻어지며 본 Isothiazoline 유도체의 특성은 Fig. 2와 같다.

#### 4) 정제시험

합성한 Isothiazoline유도체를 Three neck round flask(500mL)에 넣고 용매인 Ethyl acetate 100 mL를 넣어 약 101.5℃까지 용융시킨 후 다시 냉각

하여 상온에서 분리시킨다. 분리시킨 Isothiazoline 유도체를 메탄올 20.0mL에 용해시키고 에틸아세테이트 100mL를 재혼합하여 약 101.5℃까지 용융시킨 후 감압하여 메탄올과 에틸아세테이트를 증발시키고 상온에서 감압여과(진공도 = -10 Torr)하여 재결정한 다음 진공건조기(50~80℃)로 건조시킨다.

### 3. pH시험 및 기기분석

1) 합성한 Isothiazoline 유도체를 1% Sol으로 용해시키고 Phosphoric acid을 10% Sol으로 만들어 적정식으로 pH를 2.4~7.0까지(2.4, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0) 각각 시험하였다.

2) 합성한 Isothiazoline 유도체(1% Sol)에 에틸알코올(10%)을 용매로 사용하여서 최대 흡수파장( $\lambda_{max}$ )을 UV-Spectrophotometer로 온도 25℃, 150~400nm범위에서 측정하였다.

3) 합성한 Isothiazoline 유도체를 KBr 정제법으로 미분쇄, 혼합하여 적외선 스펙트럼을 IR-Spectrophotometer의 범위( $4,000\sim 400\text{cm}^{-1}$ ,  $2.6\sim 16.6\mu$ )에서 측정하였다.

4) 합성한 Isothiazoline 유도체를 1% Sol으로 만들고 에틸알코올(10%)을 용매로 하여 합성물질의 최대 흡수파장  $\lambda_{max}$ 를 HPLC로 RT범위에서 최대농도 분포를 측정하였다.

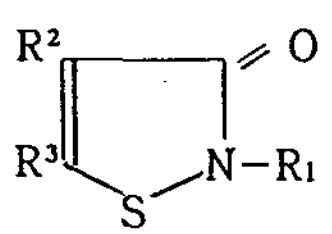
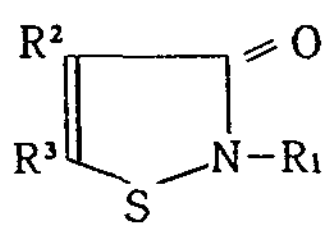
Component	Structural formula of Isothiazoline Derivatives	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Chemical formula	Molecule weight	Solubility (H <sub>2</sub> O)	M.P (°C)	Yield (%)
1		CH <sub>3</sub>	H	Cl	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> NOSCl	149.513	Soluble	54~55	59.36g (10%)
2		CH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NOS	115.060	Soluble	48~50	23.74g (4%)

Fig. 2. Properties of isothiazoline derivatives.

4. 미생물시험

1) 미생물시험에 사용된 물은 증류수를 사용하였으며 Petri dish 등은 이미 Auto clave(121℃, 15분)에서 멸균처리하여 사용하였다.

2) 미생물시험에 사용된 시료의 pH는 2.4, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0이었으며 투여농도는 5 ppm, 10ppm, 15ppm, 20ppm으로 조제하여 사용하였다.

3) 한천영양배지(Nutrient agar medium)은 Beef extract 3g, Pepton 5g, NaNO<sub>3</sub> 1g, Agar 15g/D-Water 1L로 하여 시료(1% Sol) 0.5mL를 Spread plate법으로 접종하였다.

4) 미생물은 이미 배양한 박테리아균(포도상구균)과 곰팡이균(푸른곰팡이균)을 각각 시험하였고 pH별로 한천영양배지에서 미생물 0.5mL(미생물 1,000CFUS/mL) 정도를 혼합하여 접종하였다.

5) 일반적으로 항온시험에서 박테리아균의 경우 항온조(37℃)에서 48시간(2일) 배양하였고 곰팡이균의 경우 항온(37℃)에서 168시간(7일) 배양한 후 시료의 투여 농도 및 pH에 따라 미생물의 변화(생육억제, 증식 또는 소멸상태)를 측정하였으며 측정 방법으로는 Colony Counter(집낙수)로 1개 집낙당 세균수는 1CFUS/mL로 하였고 미생물 시험기준은 1,000CFUS/mL을 대상으로 하였다(1CFUS/mL = 1Colony Forming Units/mL).

III. 결과 및 고찰

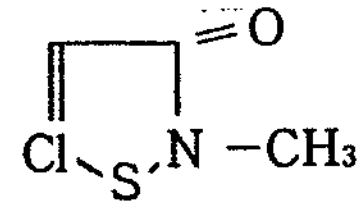
1. Isothiazoline 유도체의 합성

Isothiazoline 유도체 (R<sub>1</sub>-CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>-H, R<sub>3</sub>-Cl, H)를 합성하여 최종 생성물로 5-chloro-2-methyl-4-isothiazoline-3-one과 2-methyl-4-isothiazoline-3-one을 얻었으며, MP, UV, IR, HPLC 분석기기를 통하여 다음과 같이 확인하였다.

Fig. 3~6은 Isothiazoline 유도체를 IR-Spectrophometer로 IR-영역에서 측정된 분석자료로 R<sub>1</sub>-CH<sub>3</sub> radical은 1,400cm<sup>-1</sup>(7.25μ)에서 피이크가 나타났고 R<sub>2</sub>-H radical은 900~690cm<sup>-1</sup>(11.1~14.5μ)에서 나타났으며 R<sub>3</sub>-Cl radical은 800~600cm<sup>-1</sup>(12.5~16.5μ)에서 나타났다. 그리고 C=O는 1,725~1,705cm<sup>-1</sup>(5.8~5.87μ), C=C는 1,600~

1,475cm<sup>-1</sup>(6.25~6.78μ)에서 피이크가 나타났다.

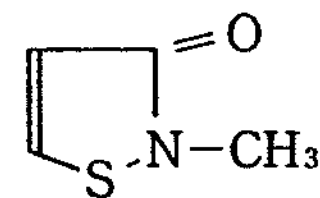
1) 5-chloro-2-methyl-4-isothiazoline-3-one



(C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>NOSCl : 149.513)

- mp = 54~55℃
- UV(Et-OH, λ<sub>max</sub>) = 270nm
- IR(KBr, cm<sup>-1</sup>) = 1,725, 1,705(C=O)  
1,600, 1,475(C=C)
- HPLC(Conc) = 10.0%

2) 2-methyl-4-isothiazoline-3-one



(C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NOS : 149.513)

- mp = 48~50℃
- UV(Et-OH, λ<sub>max</sub>) = 390nm
- IR(KBr, cm<sup>-1</sup>) = 1,725, 1,705(C=O)  
1,600, 1,475(C=C)
- HPLC(Conc) = 4.0%

Fig. 3. Analysis data of isothiazoline derivatives [1] & [2].

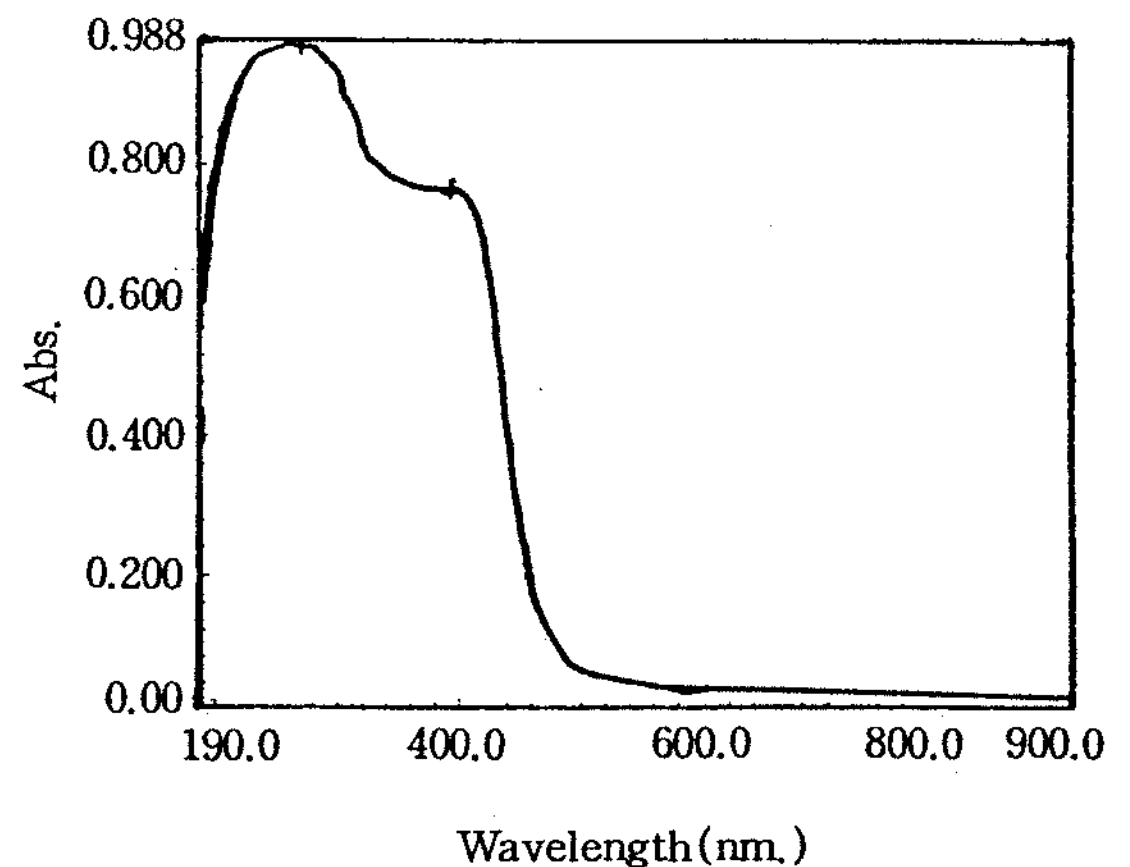


Fig. 4. Isothiazoline 유도체 1%Sol(pH : 3.6)을 UV Spectrophotometer로 측정 (Solvent : Et-OH 10%).

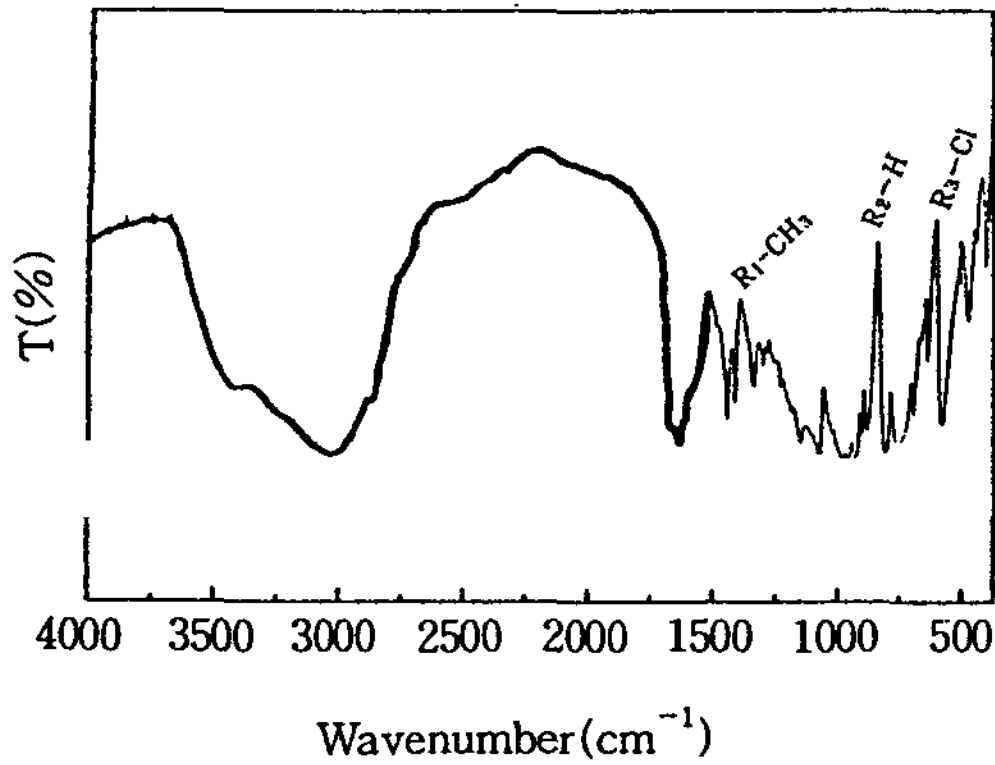


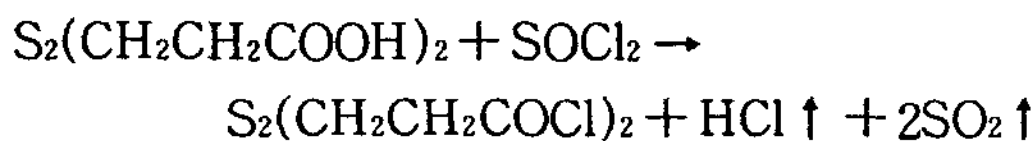
Fig. 5. Isothiazoline 유도체를 IR Spectrophotometer 로 측정(KBr 정제법).

NO.	NAME	RT	A	OR	H	MK	CONC
1		2.835	5538	M			10.0386
2		3.111	40917	M			74.1599
3		3.515	2158				3.9119
4		4.208	6560				11.8894
TOTAL			55174				100.0000

Fig. 6. Isothiazoline 유도체 1% Sol(pH: 3.5)를 HPLC 로 측정 (Solvent : Et-OH 10%).

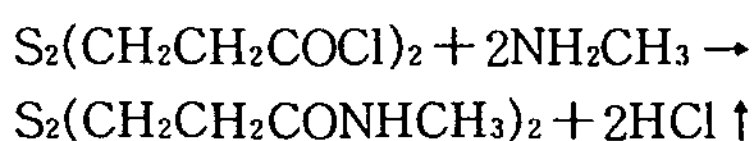
2. Isothiazoline 유도체의 반응

1) 1차 반응



1차반응은 Thionyl chloride의 치환반응으로 반응 조건은 온도가 90~100℃, 약 4시간, 압력이 15~20mmHg로 환류반응시켰다. 이 때 생성된 3, 3'-Dithiodipropionic chloride의 수득율(Yield)은 약 75mL(50%)이었다.

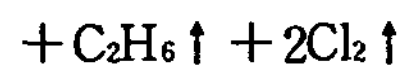
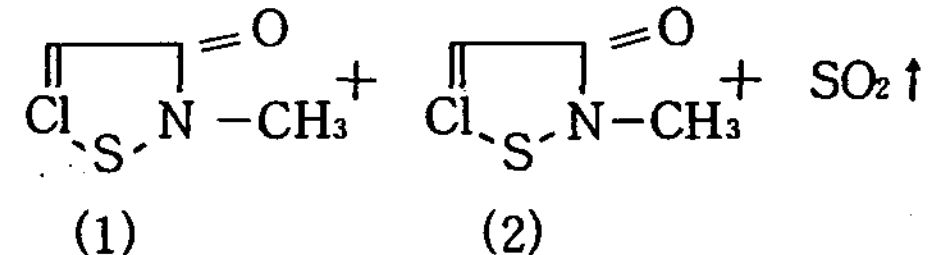
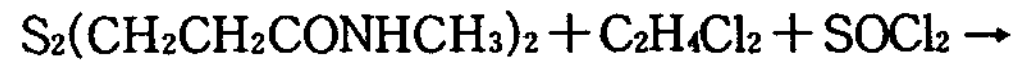
2) 2차 반응



2차반응은 Mono methyl amine의 치환반응으로 반응조건은 15~20℃의 저온에서 실시하였고 반응 시간은 약 15시간 환류반응시켰다.

Mono methyl amine은 60~65℃의 강한 발열반응으로 냉각상태에서 반응이 이루어졌으며 이 때 생성된 3,3'-Dithiodipropionic methyl amide의 수득율(Yield)은 약 95mL(40%)이었다.

3) 3차 반응



3차반응은 Ethylene dichloride과 Sulfuryl chloride의 치환반응으로 반응조건은 온도가 90~100℃, 압력이 15~20mmHg, 약 12시간, 환류반응시키면 Chlorination-Cyclization(염소-고리화)이 되어 (1)과 (2)가 얻어지며 이 때 수득율(Yield)은 약 83.1g(32%)로 HPLC 측정결과 (1)과 (2)의 혼합비율은 평균 10%와 4%로 나타났다.

3. Isothiazoline 유도체의 정제시험

유기화합물을 정제하는데는 흡착법과 증류법, 여과법과 재결정법이 있다.

활성백토나 활성탄을 이용한 흡착법은 흡착제의 선택이 중요하며 비극성인 유기물의 경우 탄소질의 흡착제가 있고 극성인 무기물의 경우 실리카, 알루미늄산화물 흡착제와 합성제올라이트가 있다.

Isothiazoline 유도체의 정제에는 천연의 색상과 냄새를 탈색 및 탈취하는 것이 중요하며 흡착법이나 증류법 및 여과법으로는 완전 탈색 및 탈취에 문제가 있다.

본 실험에서는 재결정법을 사용하였으며 재결정법에 사용되는 용매로는 Benzene, Heptan, Hexane, Toluene, Chloroform, Ligroin, Ethyl acetate 등이 있고 이 중에 대부분의 용매들은 낮은 온도에서 용융되므로 색상이나 냄새를 증발시켜 제거하기가 어렵다. 그러나 에틸아세테이트는 용융온도가 평균 101.5℃로 비교적 높고 냉각하면 상온에서 분리가 이루어진다. 분리시킨 하층액의 Isothiazoline 유도체에 메탄올을 용해시키고 에틸아세테이트를 재혼합시켜 용융, 감압처리하면 메탄올과 에틸아세테이트는 증발된다. 다시 상온에서 감압, 여과하여



재결정 한 다음 진공건조(50~80℃)시키면 색상이 백색으로 되고 냄새가 탈취됨을 알 수 있다.

4. Isothiazoline 유도체의 미생물시험

1) 함량 변화에 따른 미생물시험 결과

(1) 포도상구균

Fig. 7은 Isothiazoline 유도체가 함량변화에 따라 미생물의 수에 관한 시험결과이다. 먼저 박테리아균의 경우 포도상구균을 선택하여서 배지에 미생물 1,000CFUS/mL(미생물 1개 집낙:1CFUS/mL)를 기준으로 하였고 1,000개 집낙당 0.5mL 정도의 미생물을 배지에 접종·배양하였다. 시료의 pH는 3.5를 기준으로 하였으며 시료의 농도가 20ppm에서는

미생물의 수가 거의 나타나지 않았으며 이는 미생물의 생육이 불가능함을 알 수 있다.

15~5ppm에서는 미생물의 수가 100CFUS/mL 이하로 나타났으며 이는 미생물이 생육억제 또는 살균기능이 있음을 알 수 있다.

그러나 5ppm 이하에서는 미생물의 수가 점점 증가하여 0ppm에서는 Fig. 9(포도상구균-농도:10ppm, pH:3.5와 공시험)에서와 같이 시료가 투여하지 않은 공시험의 경우 미생물의 수가 현저하게 증가함을 알 수 있다.

또한 배양시간(24→168hrs)이 길어짐에 따라 동일 농도에서 미생물의 수가 약간 증가하며 이는 일정 시간이 지나면 미생물이 재번식함을 알 수 있다.

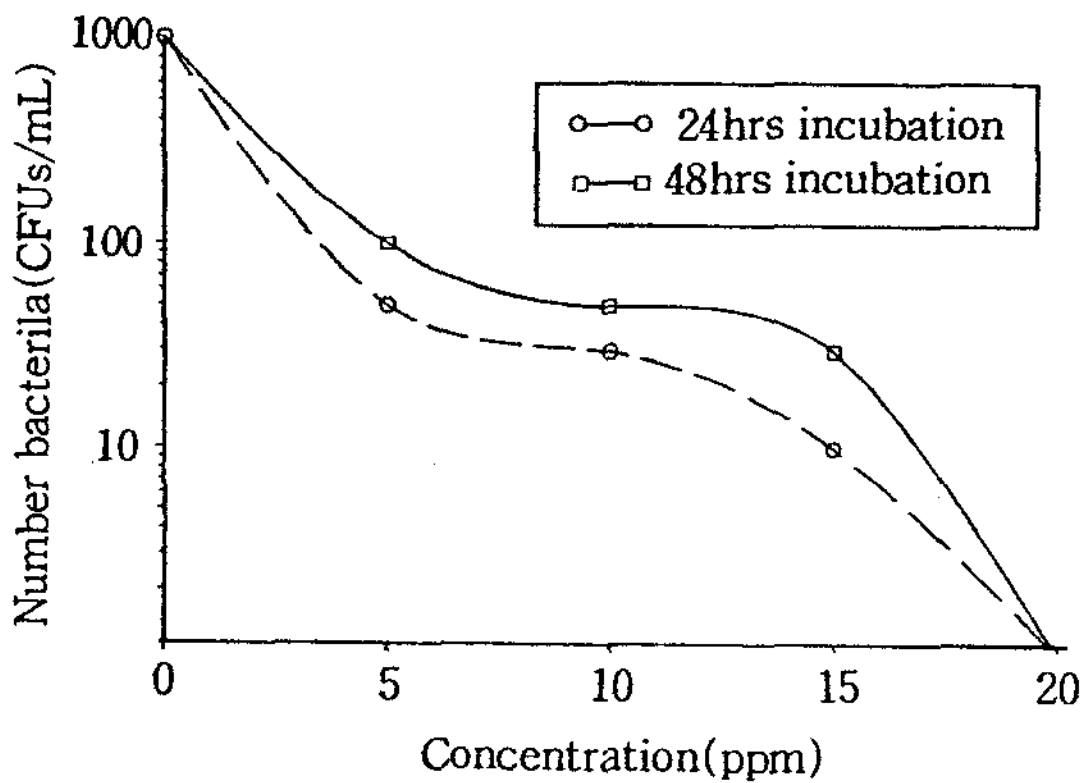


Fig. 7. Number of bacteria on the changes of concentration.

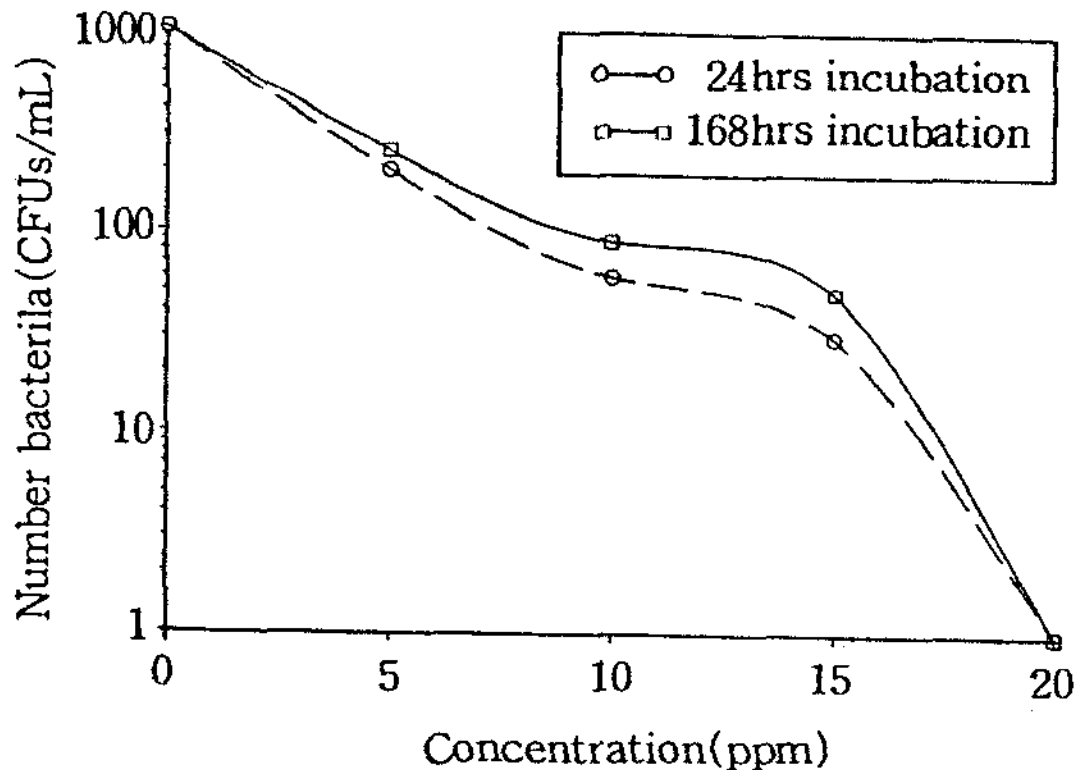


Fig. 8. Number of fungi on the changes of concentration.

1) 포도상구균: · 위 그림 (24hrs)  
· 아래 그림 (168hrs)

· 농도 10ppm(좌)	· 공시험(우)
· pH:3.5	· pH:7.0

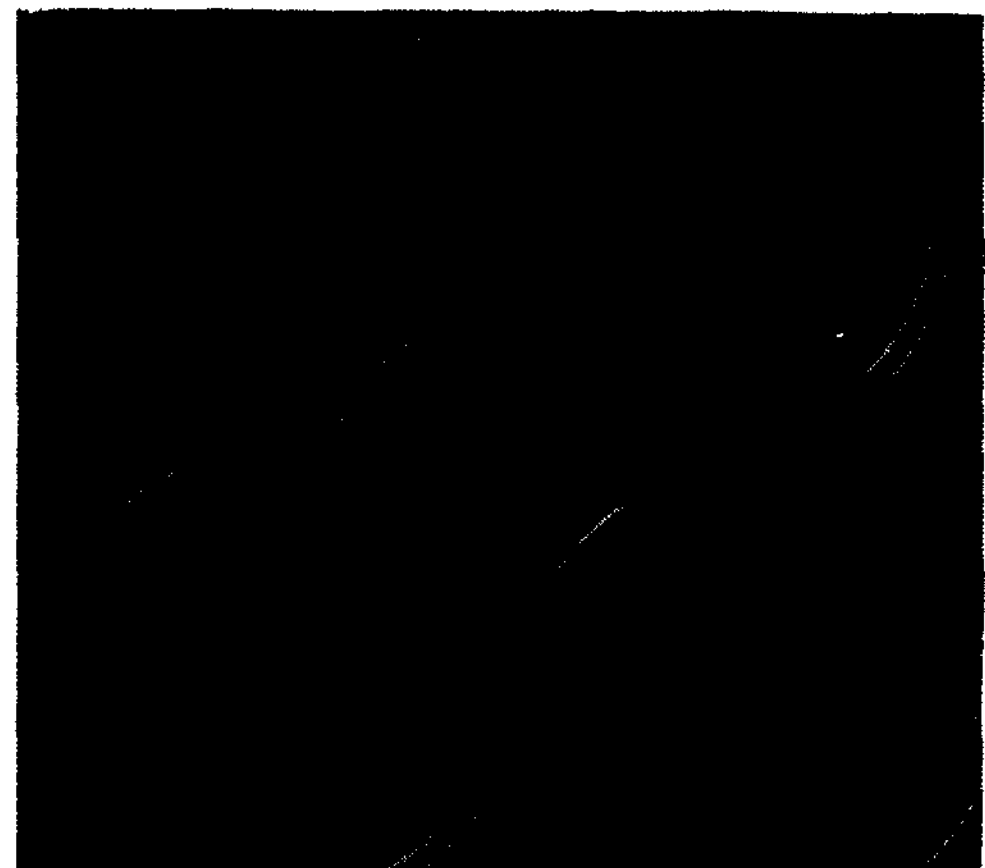


Fig. 9. Isothiazoline 유도체의 미생물 시험 비교.

(2) 푸른곰팡이

다음은 곰팡이균의 경우 푸른곰팡이균을 선택하여 상기 시험법에 따라 시험한 결과이다. 시료의 pH는 3.5를 기준으로 하였고 Fig. 8에서 보는 바와 같이 시료의 농도가 20ppm에서는 미생물의 수가 거의 나타나지 않는 것으로 보아 미생물의 생육이 불가능함을 알 수 있고 15~5ppm에서는 미생물의 수가 약

250~50CFUS/mL로 나타났으며 이는 곰팡이균이 박테리아균 보다 내성이 강함을 알 수 있다. 그러나 5ppm 이하에서는 미생물의 수가 점점 떨어져 0ppm에서는 Fig. 10(푸른곰팡이균-농도: 10ppm, pH: 3.5와 공시험)에서와 같이 시료가 투여하지 않은 공시험의 경우 미생물의 수가 현저하게 증가하였으나 시료가 10ppm 투여한 배지에는 미생물의 번식이 전혀 없음을 알 수 있다. 그리고 배양시간이 길어짐에 따라 박테리아와 마찬가지로 미생물의 수가 약간 증가함을 알 수 있다.

- 2) 포도곰팡이균 : · 위 그림 (24hrs)
- 아래 그림 (168hrs)

· 농도 10ppm(좌)	· 공시험(우)
· pH : 3.5	· pH : 7.0



Fig. 10. Isothiazoline 유도체의 미생물 시험 비교

2) pH변화에 따른 미생물시험 결과  
(1) 포도상구균

Fig. 11은 Isothiazoline 유도체가 pH 변화에 따라 미생물의 수에 관한 시험 결과이다. 먼저 시료를 10ppm씩 취하여 배지에 혼합하였고 pH가 2.4, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0인 시료를 각각 만들어 산성 범위내에서 실시하였으며 포도상구균을 선택하여 배지에 미생물 1,000CFUS/mL(미생물 1개 집낙 : 1CFUS/mL) 기준으로 하였고 1,000개의 집

낙당 0.5mL 정도의 미생물을 배지에 접종·배양하였다. 배양은 항온조 37℃에서 48시간(2일간) 실시하였다.

시료의 pH는 중성인 7을 기준으로 산성범위에서 실시하였고 pH가 7.0~5.0에서는 미생물의 수가 500CFUS/mL 이상으로 그 수가 점점 약해져 pH가 3.5 이하에서는 미생물 수가 100CFUS/mL 정도로 급격히 떨어져 미생물에 대한 생육억제 또는 살균기능이 있음을 알 수 있으며 pH가 3.5~2.4에서는 미생물의 수가 100CFUS/mL 이하로 사실상 생육이 불가능함을 알 수 있다. 따라서 산성으로 떨어질수록 미생물은 생육억제 기능이 증대되고 시료의 농도가 증가함에 따라 살균작용에도 상승효과가 있음을 알 수 있다. 또한 배양시간이 길면 동일 pH에서 미생물의 수가 약간 증가함을 알 수 있다.

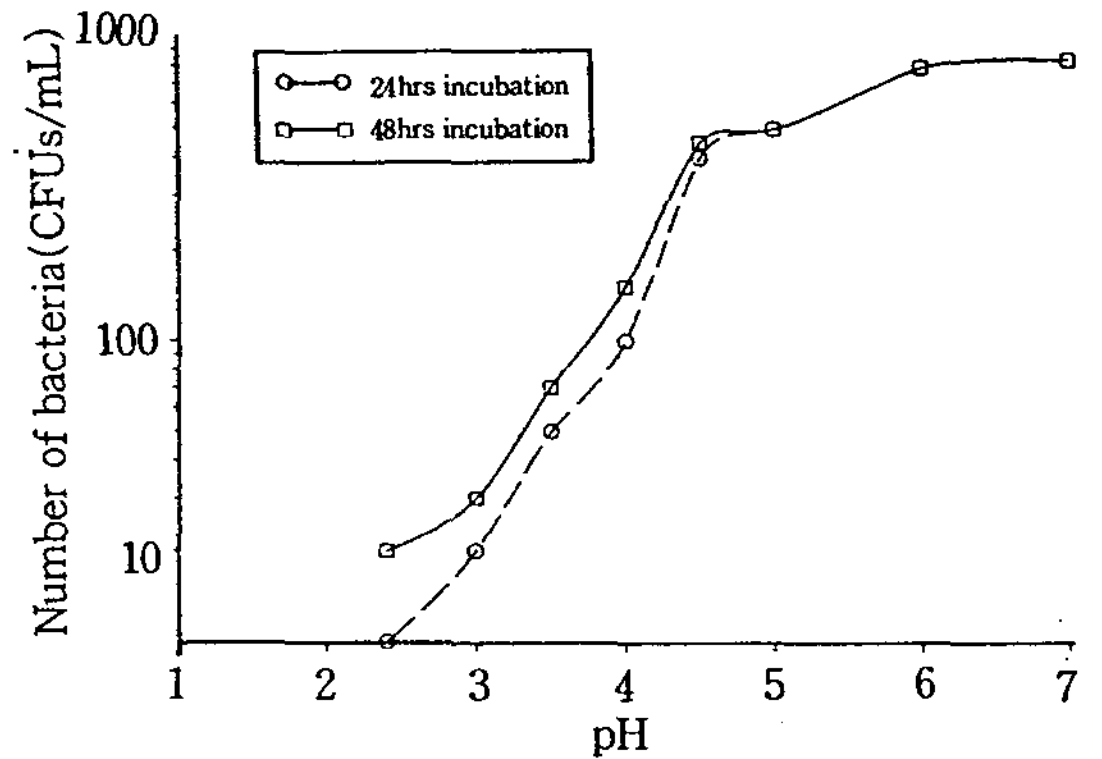


Fig. 11. Number of fungi on the changes of pH.

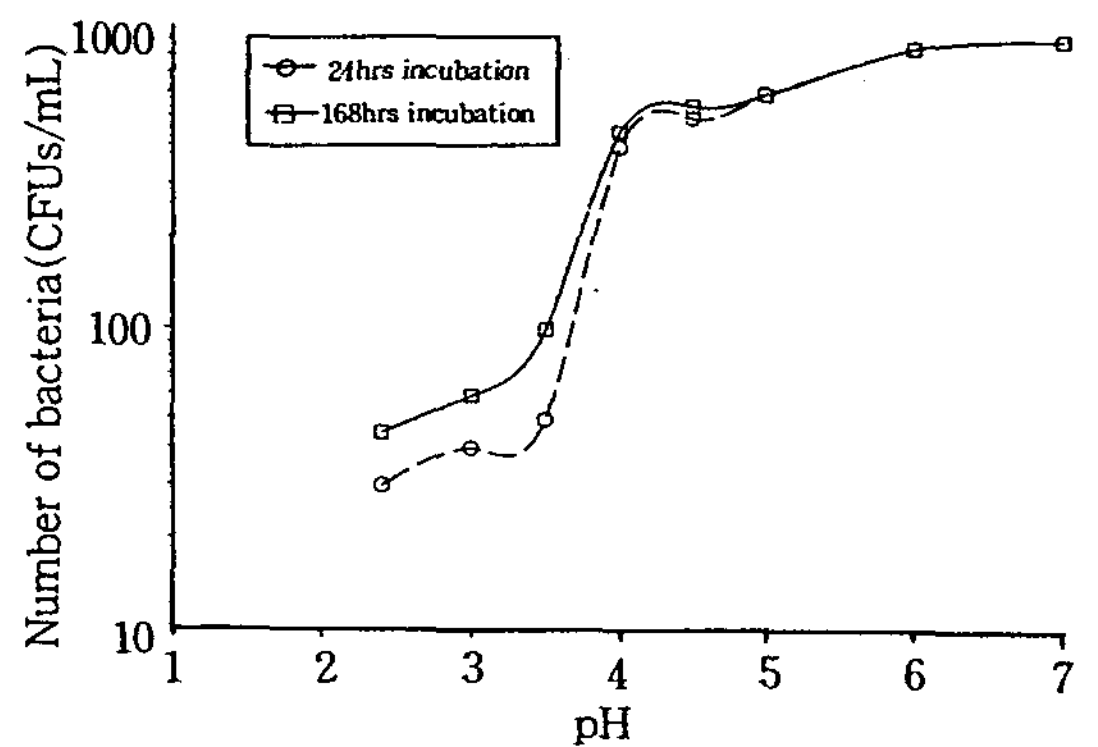


Fig. 12. Number of fungi on the changes of pH.



## 2) 푸른곰팡이균

다음은 곰팡이균의 경우 푸른곰팡이균을 선택하여 상기 시험법에 따라 시험한 결과이다. 먼저 시료를 10ppm씩 취하여 배지에 혼합하였고 pH가 2.4, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0까지 시료를 각각 만들어 산성 범위내에서 실시 하였으며 배지에 미생물 1,000CFUS/mL(미생물 1개 집낙:1CFUS/mL) 기준으로 100개의 집낙당 0.5mL 정도의 미생물을 배지에 접종·배양하였다. 배양시간은 168시간(7일간) 실시하였다.

Fig. 12에서와 같이 pH가 7.0~5.0에서 푸른곰팡이균의 수는 박테리아균 보다도 증가하였으며 pH가 3.5~2.4에서는 미생물이 100CFUS/mL 이하로 생육과 살균기능이 불가능함을 알 수 있다. 그러나 박테리아균보다는 내성이 강하고 배양시간이 증가할수록 동일 pH에서 미생물수도 증가함을 알 수 있다.

## IV. 결 론

본 연구는 Isothiazoline 유도체를 1차, 2차, 3차에 걸쳐 합성한 바 최종 생성물로 5-chloro-2-methyl-4-isothiazoline-3-one과 2-methyl-4-isothiazoline-3-one의 합성물질이 염소-고리화로 얻어졌으며 본 제제를 인산으로 pH를 시험한 후 에틸아세테이트로 재결정하여 미생물을 시험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Isothiazoline 유도체는 혼합물질로 HPLC 측정결과 그의 혼합 농도는 거의 10%와 4%로 나타났으며 유도체에서 살균제로 작용하는 라디칼은 염소(chloride)의 산화기능임을 알 수 있다.

2. Isothiazoline 유도체는 미생물 시험결과 pH가 3.5에서 미생물의 수가 현저하게 감소되었고 3.0 이하에서는 최저치를 나타냈는 바 이는 pH가 약산성(4.5~6.5)에서 강산성(3.0 이하)으로 변화할수록 미생물의 번식이나 생존이 낮으며 따라서 pH가 4.5 이하에는 pH에 의한 자체 방부기능이 있음을 알 수 있다.

3. Isothiazoline 유도체는 그의 투여함량이 10 ppm 이상에서 미생물인 박테리아 또는 곰팡이균에 대한 생존수가 현저하게 줄었으며 이는 Isothiazoline 유도체가 미생물에 방부 및 살균작용을 하며 미생

물 중에서 박테리아 보다 곰팡이균이 보다 내성이 강함을 알 수 있다.

4. Isothiazoline 유도체는 재결정법으로 용매인 에틸아세테이트를 사용하였으며, 용융하여 상온에서 분리시킨 Isothiazoline 유도체를 메탄올에 용해시키고 에틸아세테이트를 재혼합시켜 용융하면 메탄올과 에틸아세테이트가 증발된다. 다시 상온에서 재결정한 다음 진공으로 여과시키면 탈색과 탈취가 됨을 알 수 있다.

## 감 사

이 논문은 1996학년도 대전대학교 학술연구비 지원에 의해 수행된 연구결과입니다.

## 문 헌

1. Isothiazoles I ; 4-Isothiazoline-3-ones, A General Synthesis from 3,3'-Dithiodipropion-amides, Vol. 8, Aug, pp.571~580(1971).
2. A. R. Katritzky, Ed., "Advances in Heterocyclic chemistry", Vol. 4, III, Academic press, New York and London(1965).
3. A. Adams and R. Slack, Chem. Ind.(London), 1232(1956).
4. J. Goerdeler and W. Mittler, Chem. Ber., 96, 944(1963).
5. W. R. Hatchard, J. Org. chem., 28, 2163 (1963).
6. J. Goerdeler and U. Keuser, Chem. Ber., (II), 3106(1964).
7. W. D. Crow and N. F. Leonard, Tetrahedron Letters, 1477(1964); J. Org. Chem., 30, 2660(1965).
8. 미생물실험, 이규식 외 2인, 원광사, pp.71~107, pp.245~259(1992).
9. G. Sykes ; "Disinfection and Sterilization", p.243, E. F. N. Spon LTD., London(1958).
10. D. Smith, et al. ; "Zinsser Bacteriology", 11th, p. 97, Appleton century-crofts DNC., N. Y.(1957).

11. G. F. Reddish ; Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and chemical and physical Sterilization", 2nd Ed., p.147, p.422, Lea & Febiger, Philadelphia(1957).
12. J. M. Larkin, J. L. Stokes ; J. Bact., 91, 1667(1966).
13. 관근정기 의 7명, Hand Book ; Drug & Cosmetics material, Nikkol chemical Co., pp. 606~683(소화35).
14. 활성탄소(Acivitvated Carbon), KS허가, 제9448호, 제10149호, pp.7~16(1995).