山口道廣 浅賀良雄 田中宗男 光井武夫 太田三郎

Antimicrobial Activity of Butylparaben in
relation to its Solubilization Behaviors by
Nonionic SurfactantsMichihiro Yamaguchi, Yoshio Asaka, Muneo Tanaka,
Takeo Mitsui, and Saburo Ohta,

Butyl P-hydroxybenzoate (BP), widely used as a preservative for foods, drugs, and cosmetics, has been known to easily bind to surfactant micelles, and it has been also pointed out that its antimicrobial activity is reduced in nonionic surfactant solution.

Therefore, the antimicrobial activity of BP in the colloidal system was studied in relation to its solubilization behavior by nonionic surfactant. The equilibrium dialysis technique was used to determine both the concentration of BP solubilized (bound) within surfactant micelles and that the free (unbound) state.

We found that the antimicrobial activity of BP in combination with various nonionic surfactants differed according to the type of microorganisms. The concentration of free (unbound) BP contributed its antimicrobial activity against *Candida albicans*, while the total concentration of BP added to the system contributed its antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*.

These phenomena were well related to the lowering of the cloud point of surfactant due to the addition of BP; the more hydrophobic the added surfactant, the more the interaction between the polyoxyethylene chain of surfactant and BP.

The addition of glycols, inorganic salts, amino acids, or polar oils to this system, was found to change the antimicrobial activity of BP and the solubilized state. Owing to the salting-in effect, glycols were found to strengthen the antimicrobial activity of BP due to the increase of its free concentration and the raise of the cloud point of surfactant. However, inorganic salts or amino acids were found to decrease the antimicrobial activity of BP by reducing its free concentration and by lowering the cloud point of surfactant due to the salting-out effect.

On the other hand, the addition of some polar oils was found to decrease the antimicrobial activity of BP by reducing its free concentration, however raising the cloud point of surfactant. It is considered that the addition of polar oils contributes to move the solubilization locus of BP within surfactant micelles from the polyoxyethylene mantle to the hydrophobic core.

1. 緒 言

化粧品や医薬品、食品の二次汚染を防止する目的で配合される防腐剤は、或種の界面活性剤が共存すると、そ

の抗菌活性が低下してしまうと云われている。この原因として、界面活性剤のミセルに防腐剤が可溶化されたり、界面活性剤と防腐剤が疎水性のコンプレックスを作るためと考えられている。

界面活性剤水溶液中での防腐剤の抗菌活性は、界面活性剤のミセルに可溶化されていないフリーの防腐剤濃度に関与していると云われている^{1,2,3)}。

資生堂研究所：横浜市港北区新羽町 1050
Shiseido Laboratories : 1050 Nippacho
Kohoku-ku, Yokohama, ABSTRACT Japan 223

Donbrow^{4,5)}らは、非イオン性界面活性剤によるフェノール系防腐剤の可溶化は、その構造に支配され、また活性剤と疎水性のコンプレックスを形成して、活性剤の曇点を低下させてしまうと報告している。

Elworthy⁶⁾らによれば、この疎水性コンプレックスは、非イオン性界面活性剤分子のエチレンオキシド鎖に、防腐剤分子が結合 (binding) するために形成されると述べている。

著者らは、食品、医薬品や化粧品でよく用いられているブチルパラベンの非イオン性界面活性剤水溶液における可溶化挙動と、その抗菌特性について検討した。また、この可溶化挙動や抗菌特性に及ぼす、化粧品に汎用されている種々の水溶性物質、あるいは難水溶性物質の添加による影響についても検討した。

2. 実験

2-1 試料

防腐剤はブチルパラベン(東京化成試薬特級, 以下 BP と略す)を精製せずにそのまま用いた。用いた非イオン性界面活性剤や各種の添加物は、各々まとめて Table-1 に示す。特に水溶性添加物は試薬を用いたが、活性剤や

難水溶性の添加物は、化粧品に汎用されている市販品をそのまま用いた。

2-2 平衡透析

平衡透析実験は、Patel や Foss⁷⁾ らの手法に基づき、Fig.-1 に示すような、内容量 40ml の 2 つのパイレックス製チャンバーからなるセルを用いて行った。透析膜は 2 つのチャンバー (A) と (B) の間にはさみ、この膜は、活性剤のミセルは膜透過しないことをあらかじめ確認してあるナイロン-6 (東洋合成フィルム社製・膜厚 20 μ m) を用いた。また、この膜は、BP、活性剤およびここで用いた各種の添加物によって、変質しないことも確認してある。

活性剤で可溶化された BP 水溶液をチャンバー (A) に入れ、蒸留水または添加物だけを溶解した水溶液をチャンバー (B) に入れ、25°C の条件で 3 日間振盪すると、両チャンバー内の BP 濃度は平衡に達する。平衡に達してから、チャンバー (A) 内の BP 濃度を求めれば、これは活性剤のミセルに可溶化された BP と、可溶化されない Free の BP との Total の BP 濃度を示すことになる。一方、チャンバー (B) 内の BP 濃度は、活性剤のミセルが膜透過しないので、チャンバー (A) 内と平衡にあ

Table-1 Grade and Abbreviation of Nonionic Surfactant and Additive

Compound		*Grade	Abbreviation
Nonionic Surfactant	POE (10 moles) Oleyl Ether	C	OE-510
	POE (15 moles)	C	OE-515
	POE (20 moles)	C	OE-520
	POE (25 moles)	C	OE-525
	POE (8 moles) Dodecyl Ether	C	DE- 8
	POE (16 moles) 2-octyl Dodecyl Ether	C	ODE-16
	POE (20 moles)	C	ODE-20
	POE (25 moles)	C	ODE-25
Water-Soluble Additive	Polyethyleneglycol-6000	R	PEG-6000
	-4000	R	PEG-4000
	-1500	R	PEG-1500
	- 400	R	PEG- 400
	Di-propyleneglycol	R	Di-PG
	1,3-butanediol	R	1,3-BG
	Glycerin	R	—
	Lactic Acid	R	Lac. Acid
	Urea	R	—
	Sodium Pyrrolidone Carboxylate	R	PCA-Na
	Sodium Lactate	R	Lac-Na
	Glycine	R	—
Water-Insoluble Additive	Potassium Chloride	R	KCl
	Trimethylpropanol isostearate	C	RA.TM-318
	Pentaerythrytol Tetra 2-ethylhexanoate	C	RA.PE-408

* C; Commercially Available
R; Reagent

Fig.-1 Dialysis Cell.

る Free の BP 濃度を示すことになる。尚、BP 濃度は、257 nmの UV 吸収の変化量から定量した。

2-3 曇点測定

活性剤の曇点は、所期濃度に調製した BP の可溶化溶液 5 ml を試験管内に融封し、それを恒温水槽内で温度を上下に変化させ、観察される白濁温度から求めた。

2-4 抗菌力テスト

試料の抗菌力は、密栓付きのガラス容器に試料溶液を入れ、80°C で15 分間加熱・滅菌してから微生物を植え付け (*Can. albicans* については $10^4/\text{ml}$, *Ps. aeruginosa* については $10^5/\text{ml}$ になるように)、それぞれ 1~4 週間の微生物の死滅速度から判定した。

3. 結果と考察

3-1 活性剤の影響

BP の抗菌活性に及ぼす、種々の非イオン性界面活性剤の影響をまず調べてみた。

Fig.-2 は、BP 濃度が一定の時、活性剤 (OE-525) の濃度と、活性剤のミセルに可溶化されていない Free の BP 濃度との関係を示すが、活性剤濃度が増すにつれ、Free の BP 濃度が減少した。これは、活性剤濃度の増加に伴い、ミセル濃度が増え、可溶化される BP 濃度も増えるためである。この系の微生物に対する抗菌力を調べてみると、Fig.-3 の結果となり、*Can. albicans* に対しては、活性剤濃度の増加に伴い、抗菌力を示すのに必要な Total の BP 濃度もほぼ直線的に増えるが、*Ps. aeruginosa* に対しては、活性剤濃度に関係なく、必要な Total の BP 濃度は約 0.8 w/v% 以上であることが分った。即ち、この図で、濃度領域 A は *Can. albicans* および *Ps. aeruginosa* の双方に対して抗菌力の認められない領域であり、B は *Can. albicans* に対してのみ抗菌力を示し、C は双方の微生物に対して抗菌力の認められる領域をそれぞれ表わすことになる。

Fig.-2 Influence OE-525 concentration on free BP.

A ; ineffective region against *Can. albicans* and *Ps. aeruginosa*.
B ; effective region against *Can. albicans*.
C ; effective region against *Can. albicans* and *Ps. aeruginosa*.

Fig.-3 Relationship between concentration of OE-525 and antimicrobial activity of BP.

この結果を、Fig.-1 の活性剤濃度の増加に伴う Free の BP 濃度の減少と対応させてみると、*Ps. aeruginosa* に対しては、可溶化された BP も抗菌活性を示すことになるが、*Can. albicans* に対しては、抗菌活性を示さず、Free の BP のみが抗菌活性を示すことが分る。

これらの結果をまとめて Table-2 に示す。*Can. albicans* については、Free の濃度として 70~80 ppm 以上の BP が系の中に必要であり、*Ps. aeruginosa* については、Total 濃度として 0.8~0.9 w/v% 以上の BP が系の中に必要であることが分る。

活性剤水溶液における溶質の可溶化挙動は、次式に示す Langmuir 吸着の逆数式によって現わされること

Table-2 Influence of Total BP and Free BP on Antimicrobial Activity against Microorganisms at Various Concentration of OE-525

OE-525 (w/v%)	Total BP (w/v%)	Free BP (ppm)	*Antimicrobial Activity	
			Can.	Ps.
2	0.126	37.3	X	X
	0.202	71.2	△	X
	0.251	89.1	○	X
	0.388	146.2	○	X
	0.499	185.8	○	X
	0.618	201.6	○	X
3	0.182	36.2	X	X
	0.304	69.2	△	X
	0.387	97.0	○	X
	0.569	160.8	○	X
	0.757	192.2	○	△
	0.878	209.3	○	○
6	0.369	41.6	X	X
	0.489	62.3	X	X
	0.595	78.1	△	X
	0.762	100.8	○	△
	1.046	158.2	○	○
	1.429	199.1	○	○
9	0.479	38.3	X	X
	0.748	69.2	△	△
	0.949	96.0	○	○
	1.493	163.1	○	○
	2.128	209.0	○	○
	2.292	210.5	○	○

*○; none growth, △; weak growth, X; growth

が、知られている^{8,9)}。

$$\frac{1}{C_{bx}} = \frac{1}{K_2} + \frac{1}{K_1 K_2 C_f}$$

ここで、 C_{bx} は溶質の可溶化量 (g/g. micelle), C_f は可溶化されていない Free の溶質濃度 (w/v %), K_1 は

Fig.-4 Reciprocal Langmuir's plots for interaction of BP with seven nonionic surfactant at 3 w/v%.

可溶化定数, K_2 は活性剤ミセル内の最大可溶化サイト数をそれぞれ表わす。この式に基づき、溶質として BP を考え、種々の活性剤水溶液における BP の可溶化挙動を調べてみると、**Fig.-4** の結果が得られた。用いた活性剤の総ての系で、BP の広い濃度域で直線関係が得られた。

Dondrow ら⁴⁾によれば、直線の傾き ($1/K_1 K_2$) から得られる定数の積 $K_1 K_2$ 値は、ミセルと水相との間の溶質の分配係数に対応する値であると報告している。得られた $K_1 K_2$ 値を **Fig.-4** の中に示す。構造的に類似している場合、親油的な活性剤程 $K_1 K_2$ 値が大となり、また BP の可溶化量の増えることが分る。

それぞれの活性剤について得られた $K_1 K_2$ 値と、抗菌力との関係を **Fig.-5** に示す。この図は、 $K_1 K_2$ 値の異なる各活性剤の 3 w/v% 水溶液に於いて、微生物に対して抗菌力を示すのに必要な Total の BP 濃度をプロットしたものであり、この値より高い BP 濃度で抗菌力が認められることを表わす。

Can. albicans に対して抗菌力を示すに必要な Total

Fig.-5 Relationship between K_1K_2 value of surfactant (3w/v%) and antimicrobial activity of BP.

の BP 濃度は、活性剤の構造に関係なく K_1K_2 値に比例しているが、*Ps. aeruginosa* に対しては、 K_1K_2 値に関係なく、活性剤の構造に支配されるようである。即ち、直鎖の炭化水素鎖をもつ OE あるいは DE 型の活性剤系の方が、側鎖の炭化水素鎖をもつ ODE 型の活性剤系よりも、高濃度の BP を必要とするようである。

BP の抗菌活性に及ぼす、活性剤の影響をまとめてみると、*Can. albicans* に対しては、活性剤のミセルに可溶化されていない Free の BP のみが抗菌活性をもつと考えられる。即ち、Free の濃度として 70~80ppm の BP が系の中に存在すれば、活性剤の構造に関係なく、*Can. albicans* に対して抗菌力を示すようになる。一方、*Ps. aeruginosa* に対しては、Free の BP はもとより、ミセルに可溶化された BP、即ち系の中の Total の BP 濃度が抗菌力を左右するようである。特にこの場合は、活性剤の構造に影響され、OE あるいは DE 型の場合は、0.8~0.9 w/v% 以上の Total BP 濃度を必要とするのに比べ、ODE 型ではその濃度が 0.2 w/v% 以上であった。

3-2 添加物の影響

化粧品には、色々な物質がさまざまな目的から配合されるが、物質によっては防腐剤の抗菌活性を助長したり、低下させてしまう場合がある。ここでは、防腐剤の抗菌活性に及ぼす種々の添加物の影響を調べてみた。系は OE-515/BP/添加物/水の 4 成分系とし、活性剤の曇点変化、BP の可溶化挙動、*Can. albicans* に対する抗菌力、から検討した。

Fig.-6 (A), (B) は、0.4 w/v% の BP を可溶化し

た活性剤・OE-515 の 3w/v% 水溶液に色々の添加物が存在する場合の活性剤の曇点変化、およびミセルに可溶化されていない水相部の BP 濃度（ここでは添加物が存在する場合として、 C_w と表記する）の変化をそれぞれ示す。1・3-BG、PG や尿素などの添加の場合、添加濃度の増加に伴い曇点は上昇し、 C_w も増加する。KCl、乳酸ソーダやグリシンなどの塩やアミノ酸の場合は、逆に曇点は低下し、 C_w も著しく減少する。ポリエチレングリコール (PEG) の場合は、曇点は余り変化しないが、 C_w は著しく増加する。また、若干極性をもつトリグリセライドの様な油 (RA・TM-318, RA・PE-408) の添加では、曇点は上昇し、 C_w は、油の添加量が少ない (1.5~2.0w/v) にも拘わらず、かなり減少する。

Fig.-6 Influence of various additives on cloud points of OE-515 (A), and C_w of BP (B) in 3w/v% OE-515 aqueous phase containing 0.4w/v% total BP.

このような添加物の存在による、活性剤の曇点変化と、水相部の BP 濃度 C_w の変化を、*Can. albicans* に対する抗菌力と対応させてみると、Fig.-7 の結果となった。

この図は、添加物の無い場合の BP の可溶化溶液を基準に、各添加物を 0 から 2w/v% きざみに 10w/v% まで加えた時の、曇点、 C_w および抗菌力を示したものである。

図から理解される様に、曇点、 C_w および *Can. albicans* に対する抗菌力に及ぼす影響の違いから、添加物はそれぞれ次の 4 つに分類することが出来る。即ち、

グループ I は、1・3-BG、PG や尿素などの添加物の場合で、曇点が上昇し、 C_w も増加し抗菌力が高まる。

Fig.-7 Influence of various additives on cloud point of OE-515, C_w of BP, and antimicrobial activity of BP against *Can. albicans*.

グループIIは、PEGの添加の場合で、 C_w が著しく増加しても抗菌力は認められない。

グループIIIは、KCl、乳酸ソーダやグリシンなどの場合で、曇点が低下し、 C_w も減少するため抗菌力は低下する傾向にある。

グループIVは、RA・TM-318やRA・PE-408などの極性油の場合で、曇点は上昇するが、 C_w が減少するため抗菌は認められない。

これらの分類を、Fig.-8を用いて更に詳しく考察してみることにする。

添加物が無い場合、活性剤のミセルはBPの一部を可溶化し、同時に活性剤自身は若干疎水化してしまう。添加物が存在すると、グループIでは、添加物の大部分が水相部に溶解し、これらが塩化的作用を示す為、BPや活性剤単分子の溶解性を高めると考えられる。その結果、ミセルに可溶化し、活性剤を疎水化していたBP濃度が減少し、またミセルの会合数も減少してしまうため、曇点の上昇と共に、 C_w の増加が生ずると考えられる。この C_w の値が、添加物の濃度が増すにつれ、70~80ppm以上になると、*Can. albicans*に対して抗菌力を示す様になることは、前述のFree濃度の結果とよく対応している。

グループIIに属す巨大分子のPEGが、 C_w を著しく増加させているのは、BPの結合（可溶化）サイドが、活性剤のミセルから、水相部でコイル状に溶解すると云われているPEG分子^{6,7)}の中へと移動するためと考えられる。しかしながら、BPのPEG分子への結合は、 C_w

Fig.-8 Influence of various additives on solubilization behavior of BP.

の著しい増加をもたらすが、活性剤のミセルへの可溶化と同じように、BPを不活化してしまうと考えられる。

グループIIIでは、グループIの場合とは逆に、添加物の存在によりBPや活性剤単分子の溶解性を低下させてしまう塩析作用^{12,13)}が働くと考えられる。その結果、BPの可溶化量が増え、またミセルの会合数も増えるため、曇点の低下と共に、 C_w の減少をもたらすと考えられる。 C_w の減少は、当然ながら*Can. albicans*に対する抗菌力の低下をもたらすであろう。ところが、乳酸ソーダやKClの場合、その添加濃度が増えると、 C_w が減少するにも拘わらず、抗菌力が認められてくるという特異な挙動がみられた。恐らくこの作用は、添加濃度の増加に伴い、*Can. albicans*の生体膜に対する、膜浸透作用などの他の物理的作用に起因することが予想される。

グループIVにおける曇点の上昇は、BPの可溶化サイトが活性剤のEO鎖近傍から、極性油が可溶化されやすい炭化水素コアへと移動するためであろう。即ち、これはBPに対する極性油の溶解性が高いからである。また、 C_w の減少も同じ理由から、BPの可溶化が増加するためと考えられる。

4. 総括

BPの溶存状態や抗菌活性に及ぼす、非イオン性界面活性剤や種々の添加物の影響を検討してきたが、ここで得られた結果を簡単にまとめる。

1. BP は活性剤が共存すると、一部はミセルに可溶化されてしまう。可溶化されたBPは、*Can. albicans* に対しては不活化されてしまい、Free の BP のみが抗菌活性を示した。一方、*Ps. aeruginosa* に対しては、可溶化された BP も抗菌活性を有し、特に共存する活性剤の構造が、側鎖の場合の方が有効に作用する傾向がみられた。

2. 化粧品に汎用されている、種々の添加物の影響を調べた結果からは、水相部の BP 濃度や、抗菌力の違いだけでなく、活性剤の曇点に及ぼす影響も考慮することによって、用いた添加物を作用機構の違いから、4つに分類できた。即ち、それらの作用は、

1. 塩入的作用
2. PEG による BP の結合作用
3. 塩析的作用
4. 極性油による可溶化サイトの移動作用

である。

著者らの研究は、化粧品に使用されている物質の中の限られた系の結果であり、普遍的な結果であるとは断言できないが、実際の化粧品の製造に際して、効果的な防腐剤の配合法の一助となるのではないかと考えている。

特に、非イオン性界面活性剤との共存では、防腐剤の選択はもとより、活性剤の HLB や構造の違いを十分に考慮することも肝要と思われる。また、色々の目的から製品の中に配合される物質についても、前述の4つの分類を考慮することによって、もたらされる抗菌力が推察され、その選択に際して有効な指針を与えるであろう。

REFERECES

- 1) Garret, E. R., J. Pharm. Pharmacol. **18**, 589 (1966)
- 2) Bean, H. S., Konnig, G. H. and Malcolm, S. A., J. Pharm. Pharmacol. **21**, 1735 (1969)
- 3) Patel, N. K., and Ramanowsky, J. M., J. Pharm. Sci. **59**, 372 (1970)
- 4) Donbrow, M., and Azaz, E., J. Colloid Interfac. Sci. **57**, 11 (1976)
- 5) Donbrow, M., and Azaz, E., J. Colloid Interface Sci. **57**, 20 (1976)
- 6) Cobby, T. C., and Elworthy, P. H., J. Pharm. Pharmacol. **23**, Suppl. 39S (1971)
- 7) Patel, N. K., and Foss, N. E., J. Pharm. Sci. **53**, 94 (1964)
- 8) Donbrow M., Molyneux, P., and Rodes, C. T., J. Chem. Soc. (A) **561** (1967)
- 9) Donbrow, M. Azaz, E., and Hamburger, R., J. Pharm. Sci. **56**, 1427 (1970)
- 10) Luck, W., Ber. Bunsenges. Physik. Chem. **69**, 69 (1965)
- 11) Finer, E. G., Frank, F., and Tait, M. J., J. Am. Chem. Soc. **94**, 4424 (1972)
- 12) Elworthy, P. H., Florence, A. T., and Macf-alane, C. B., "Solubilization by Surface Active Agents and its Application in Chemistry and Biological Sciences", Capman and Hail, London, 1968
- 13) Wishnia, A., J. Phys. Chem. **67**, 2079 (1962)