EVALUATION OF PRESERVATIVES IN VARIOUS FORMS

OF

LIQUID PREPARATIONS

Miss Aurapin Rudichuen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science

in Pharmacy

Department of Microbiology

Chulalongkorn University

1974

1182 3174

การประเมินค่าของยากันบูด ในสิ่งเตรียมที่เป็นของเหลวชนิดต่าง ๆ

นางสาว อรพิน ฤดีชื่น

006394

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๑๗

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พิสวาท ทุติยะโพธิ

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การประเมินค่าของยากันบูด ในสิ่งเตรียมที่เป็นของเหลวชนิดต่าง ๆ

ชื่อ นางสาว อรพิน ฤดีชื่น แผนกวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา ๒๕๑๖

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษายากันบูดในกลุ่มต่าง ๆ ๑๓ ชนิด โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal Inhibitory Concentration) ในการฆ่าเชื้อ Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa และ Aspergillus niger และหาความเข้มข้นของยาแต่ละตัวที่สามารถฆ่าเชื้อได้ในเวลา ๑๐ นาที แต่ไม่ฆ่าที่ ๕ นาที (Bactericidal Activity Concentration) ใช้ทดลองกับเชื้อ Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa และ Aspergillus niger สำหรับค่า Oil-Water Partition Coefficient ได้ทำการทดลองหาโดยใช้น้ำมัน ๒ ชนิด คือ mineral oil ใช้ liquid paraffin และน้ำมันพืช ใช้ arachis oil นอกจากนั้นได้ทดลองหา absorption ของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ที่มีต่อยากันบูดทั้งใน aqueous solution และที่มี propylene glycol ผสมอยู่ด้วย 5% v/v equilibrium dialysis เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาหาค่าการรวมตัวของยากันบูดกับ nonionic surface active agent คือ Tween 80

จากผลการทดลองพบว่า ยากันบูดในสิ่งเตรียมที่เป็นของเหลว จะมีความเข้มข้นลดลงได้หลายทาง ในสิ่งเตรียมที่เป็นน้ำกับน้ำมัน ตัวยาบางส่วนละลายในน้ำมัน ทำให้

ความเข้มข้นของยาใน aqueous phase ไม่พอที่จะป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ค่า partition coefficient ของตัวยากันบูดในน้ำมันจะเป็นประโยชน์ในการคำนวณความเข้มข้นของยาที่อยู่ใน aqueous phase ได้ ในสิ่งเตรียมที่มีจุลินทรีย์ปนอยู่ด้วยมากจะทำให้ความเข้มข้นของยากันบูดลดลงด้วย จากการทดลองพบว่าเชื้อ Pseudomonas aeruginosa สามารถ absorb ยาได้มากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของยา และสำหรับ propylene glycol 5% v/v ทำให้การ absorb ยาของเชื้อลดลง ส่วน nonionic surface active agent เช่น Tween 80 สามารถจะรวมกับตัวยากันบูดทำให้ความเข้มข้นของตัวยากันบูดลดลงได้อีกทางหนึ่ง พบว่าการรวมตัวของยากันบูดกับ Tween 80 ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ Tween 80 แต่ไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวยากันบูด

Thesis Title Evaluation of Preservatives in Various Forms of Liquid Preparations

Name Miss Aurapin Rudichuen Department Microbiology

Academic Year 1973

ABSTRACT

Thirteen preservatives used in this study were determined for the lowest concentration (Minimal Inhibitory Concentration) which inhibit further growth of Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Aspergillus niger by using tube dilution method. The study of the highest dilution of preservative that permitted growth in 5 minutes but inhibited growth within 10 minutes (Bactericidal Activity Concentration) was made by using Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa and Aspergillus niger as the test organisms. Oil-Water Partition Coefficient of the preservatives was then determined using both mineral oil (liquid paraffin) and vegetable oil (arachis oil). Possible absorption of preservative by bacteria was determined in aqueous solution of preservative and in the presence of 5% v/v propylene glycol, the tested organism was Pseudomonas aeruginosa. Equilibrium dialysis method was used for the determination of the binding of preservatives and nonionic surface active agent (Tween 80).

Many factors which influenced the activities of preservatives have been found in this study. Preservatives in two-phase systems were partitioned between oil phase and aqueous phase, the concentration of preservatives in aqueous phase were found unable to inhibit the microbial growth. The preservatives in aqueous phase concentration were calculated from the partition coefficient value. Massive microbial contamination in the liquid preparation can decrease the preservative concentrations in aqueous phase. The abosrption of preservatives by Pseudomonas aeruginosa varied on types and concentrations of preservatives, and it was found that 5% v/v propylene glycol can also decrease the absorption of preservatives. The binding of preservatives and nonionic surface active agent (Tween 80) gave an inactivating effect of preservatives, Tween 80 was dependent on the nonionic concentration but independent on the preservative concentrations.

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my deep appreciation to my advisor, Assistant Professor Miss Pisawat Dutiyabodhi, Head of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her continuous interest, guidance and encouragement throughout the course of this work.

I would like to express my appreciation to Mr. Santi Thoongsuwan and the staff members of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their useful suggestions during the course of this study.

I also wish to express my gratitude to Professor M.L. Pranod Xumsaeng, Head of the Department of Food Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his kindness in supplying Unicam S.P. 1800 Ultraviolet Spectrophotometer.

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vi
ACKNOWLEDGEMENT	viii
TABLE OF CONTENTS	ix
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
CHAPTER	
1. INTRODUCTION	1
Literature survey	
Procedure emplyed	4
Microorganisms used	12
Preservatives used	20
2. MATERIALS, APPARATUS AND METHODS	31
Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC)	35
Determination of Bactericidal Activity Concentration	36
Determination of Oil-Water Partition Coefficient	37
Absorption of Preservatives by Bacteria	39
Interaction between Preservatives and Emulsifying agent	40

Page

3. RESULTS ---------- 43

4. DISCUSSION---------- 84

5. CONCLUSION---------- 88

REFFERENCES ---------- 90

VITA ---------- 100

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of preservatives in broth ----------	44
2.	Bactericidal Activity Concentration of preservatives ----------	46
3.	Total, aqueous and oil phase concentrations for preservatives partitioned between equal volumes of water and either liquid paraffin or arachis oil ----------	48
4.	Absorption of preservatives from aqueous solution by 5 x 10^8/ml Pseudomonas aeruginosa---	51
5.	Absorption of preservatives from aqueous solution by Pseudomonas aeruginosa in the presence of 5% v/v Porpylene glycol----------	53
6.	Relationship of total and free preservatives to concentration of Tween 80 at equilibrium----	69
7.	Slope of nonionic surface active agent concentration against R ratio regressions --------	83

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Absorption of Phenol from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa---	54
2.	Absorption of Chlorocresol from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa ----------	55
3.	Absorption of Sorbic acid from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa ----------	56
4.	Absorption of Methyl hydroxybenzoate from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa ----------	57
5.	Absorption of Propyl hydroxybenzoate from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa ----------	58
6.	Absorption of Benzyl alcohol from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa ----------	59
7.	Absorption of Phenylethyl alcohol from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa ----------	60

Figure		Page
8.	Absorption of Phenylmercuric nitrate from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa	61
9.	Absorption of Thiomersal from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa	62
10.	Absorption of Benzalkonium chloride from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa	63
11.	Absorption of Propylene glycol from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa	64
12.	Absorption of EDTA disodium from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa	65
13.	Absorption of Salicylamide from aqueous solution by 5 x 10^8 cells/ml Pseudomonas aeruginosa	66
14.	Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Phenol	71

Figure		Page
15.	Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Chlorocresol ----------	72
16.	Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Sorbic acid ----------	73
17.	Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Methyl hydroxybenzoate ----------	74
18.	Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Propyl hydroxybenzoate ----------	75
19.	Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Benzyl alcohol ----------	76
20.	Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Phenylethyl alcohol ----------	77
21.	Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Phenylmercuric nitrate ----------	78

Figure Page

22. Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Thiomersal ---------- 79

23. Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Benzalkonium chloride ---------- 80

24. Concentration of nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Propylene glycol ---------- 81

25. Concentration on nonionic surface active agent (Tween 80) against the R ratio of Salicylamide ---------- 82