アミノ酸系界面活性剤(第3報)*

N^α-長鎖アシル-L-アルギニンエステル塩の界面活性と抗菌性

吉田良之助・馬場啓子・斎藤忠臣・吉村一平

味の素株式会社中央研究所(川崎市川崎区鈴木町 1-1)

Surfactants Derived from Amino Acids. III.

Some Surface Active Properties and Antimicrobial Activities of
Salts of Long Chain N^α-Acyl-L-arginine Esters

Ryōnosuke YOSHIDA, Keiko BABA, Tadaomi SAITŌ, and Ippei YOSHIMURA

The Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.
(Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki-shi)

Long chain N^α-acyl-L-arginines obtained by the reactions of the C₁₀~C₁₆ fatty acid chlorides with L-arginine, were esterified by ethyl alcohol containing dry hydrogen chloride to yield salts of long chain N^α-acyl-L-arginine esters. To examine their surface active properties and antimicrobial activities, Krafft point, pH value, critical micelle concentration, surface tension, foaming power, wetting and emulsifying properties and minimum inhibition concentration (MIC) were measured and these data were compared with those of benzyldimethyl {2-[2(*p*-1,1,3,3-tetramethylbutylphenoxy) ethoxy] ethyl} ammonium chloride (benzethonium chloride). Among the salts of long chain N^α-acyl-L-arginine esters, the lauroyl derivatives showed best surface active properties and antimicrobial activities, and had almost the same properties as those of benzethonium chloride. The hydrolysis properties of the salts of N^α-acyl-L-arginine esters were also examined.

1 緒 言

著者らは、アミノ酸から誘導される界面活性剤の検討を行い、アニオン界面活性剤に属する N-長鎖アシルグルタミン酸塩の性質^{1)~4)}、光学活性およびラセミ N-アシルアミノ酸塩の臨界ミセル濃度⁵⁾ およびカチオン界面活性剤に属するアミノ酸エステル塩⁶⁾ について報告した。

一方、アミノ酸誘導体の抗菌作用に関しては、アミノ酸長鎖アルキルエステル塩⁷⁾、アシルアミノ酸塩⁸⁾ などについて調べられた。また、Vogler ら⁹⁾ はポリミキシンなどの抗菌性をもつ環状ペプチドの構造と抗菌力の関係の研究から、N-パルミトイル-L-リシール-L-リシンメチルエステル塩がすぐれた抗菌性を有することを、見いだした。

著者らは、容易に合成できるアミノ酸誘導体で、強い抗菌力をもつものの探索を行った結果、N^α-長鎖アシル-L-アルギニンエステル塩がすぐれていることを見いだした。本報では、アシル基の炭素数 10~16 の N^α-アシ

ル-L-アルギニンエステル塩を合成し、それらの界面活性と抗菌性を調べたので報告する。

2 実 験

2.1 試料の合成

2.1.1 N^α-ラウロイル-L-アルギニンの合成

L-アルギニン 34.8 g (0.2 mol) を 56% アセトン水溶液 450 ml に溶かし、かきまぜながら、20~30℃ で、8 N-水酸化ナトリウムを加えて pH 11~12 に保ちつつ、ラウリン酸クロリド 43.6 g (0.2 mol) を滴下した。滴下終了後、約 1 hr かきまぜた後、濃塩酸を加えて pH 5~6 にすると N^α-ラウロイル-L-アルギニンの結晶が析出した。ろ過、水洗後、乾燥してエチルエーテルで洗浄した。収量 60.6 g (収率 85%)、mp 235~238℃。

2.1.2 N^α-ラウロイル-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩の合成

メタノール 300 ml に塩酸ガス 14.6 g (0.4 mol) を吸収させた溶液に N^α-ラウロイル-L-アルギニン 71.3 g (0.2 mol) を加え室温で一晩放置した。反応液に 6 N の水酸化カリウムのメタノール溶液 30 ml を加えて中和

* 第一報：吉田，竹原，坂本，油化学，**24**，538 (1975)第二報：吉田，竹原，坂本，油化学，**25**，141 (1976)

し、析出した塩化カリウムをろ別した。ろ液を濃縮後、析出した結晶をろ別し、酢酸エチルで洗浄して、N^α-ラウロイル-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩 78.2 g (収率 96%) を得た。メタノールから再結晶, mp 64°C。

2・1・3 N^α-ラウロイル-L-アルギニンエチルエステル・DL-ピロリドンカルボン酸塩の合成

無水エタノール 250 ml に N^α-ラウロイル-L-アルギニン 71.3 g (0.2 mol) を加え、塩酸ガス 14.6 g (0.4 mol) を吹き込み、一夜放置した。水酸化カリウム 33.6 g をエタノール 100 ml に溶かした溶液で pH 7 に中和

後、DL-ピロリドンカルボン酸 25.8 g (0.2 mol) と水酸化カリウム 11.2 g (0.2 mol) を水-エタノール (1:2 体積比) 64 ml に溶かした溶液を 10°C 以下で滴下した。析出した塩化カリウムをろ別後、減圧下に濃縮し、アセトン 200 ml を加えて結晶を析出させた。エタノールから再結晶, 収量 82.2 g (収率 80%), mp 187~189°C

また、2・1・1、2・1・2 および 2・1・3 に準じて、その他の N^α-アシル-L-アルギニンエステル塩を合成し、その物性値を Table-2 に示した。

2・2 界面活性能の測定方法

クラフト点 (KP) は試料溶液の電気伝導度と温度との関係¹⁾ から、また臨界ミセル濃度 (cmc) は 45°C で試料溶液の電気伝導度を測定し、比電導度と濃度をプロットし、その屈折点から求めた¹⁾。表面張力は du Noüy の輪環法、あわ立ち力は Ross-Miles 法で測定した。浸透力は直径 1 in のフェルトディスク (ローラークロス、フェルト規格 20 オンス、ニッケ製) を用いて、セミマイクロジスク法でディスクの沈降し始めるまでの時間を測定した²⁾。また乳化力は 10 mmφ×390 mmh の測定管に試料溶液 10 ml とトルエン 10 ml を加えて倒立を繰り返して乳化させた後、分離してくる水の量から求めた¹⁰⁾。

2・3 N^α-アシル-L-アルギニンエステル塩の水溶液中における加水分解

2% の N^α-ココイル-L-アルギニンエチルエステル DL-ピロリドンカルボン酸塩水溶液 50 ml を 80°C の恒温水そう中で所定時間加水分解させた。これに、内部標準物質として 0.1% アセトン水溶液 10 ml を加え、純水

Table-1 Analysis of N-acyl-L-arginines.

Acyl radicals	Distribution of acyl radicals (C _n -%)	mp (°C)	Yield (%)	R _f ¹⁾
Decanoyl	C ₁₀ -100	165~168 ²⁾	87	0.36
Lauroyl	C ₁₂ -94.2, C ₁₄ -5.8	235~238 ³⁾	85	0.36
Myristoyl	C ₁₂ -1.6, C ₁₄ -97.3, C ₁₆ -1.1	240~250	90	0.36
Palmitoyl	C ₁₆ -100	240~250	87	0.36
Cocoyl	C ₈ -0.8, C ₁₀ -5.6, C ₁₂ -61.8, C ₁₄ -18.4, C ₁₆ -8.0, C ₁₈ -2.2, C ₁₈ ×F-3.2	240~245	80	

1) R_f: Developed on a silicagel-coated plate with mixed solvent (butanol : methylethylketone : 28% aqueous ammonia : water 5 : 3 : 1 : 1) and detected by Sakaguchi reaction.

2) Lit.¹¹⁾, mp 168~169

3) Lit.¹²⁾, mp 200~205

Table-2 Elementary analysis data and properties of salts of N^α-acyl-L-arginine esters.

Samples ¹⁾	Formula	Calc. N(%)	Found N(%)	mp (°C)	[α] _D ²⁾	R _f ³⁾
DAM ^{HCl}	C ₁₇ H ₃₅ N ₄ O ₃ Cl	14.83	14.33	Oil	-14.0	0.57
LAM ^{HCl}	C ₁₉ H ₃₉ N ₄ O ₃ Cl	13.77	13.25	64.0	-14.0	0.53
MAM ^{HCl}	C ₂₁ H ₄₃ N ₄ O ₃ Cl	12.89	12.63	87~87.5	-16.5	0.53
PAM ^{HCl}	C ₂₃ H ₄₇ N ₄ O ₃ Cl	12.10	11.51	91~93	-14.5	0.55
LAE ^{HCl}	C ₂₀ H ₄₁ N ₄ O ₃ Cl	13.31	12.57	Oil	-12.0	0.59
MAE ^{HCl}	C ₂₂ H ₄₅ N ₄ O ₃ Cl	12.48	12.43	63~65	-16.5	0.60
PAE ^{HCl}	C ₂₄ H ₄₉ N ₄ O ₃ Cl	11.74	11.69	90~92	-8.0	0.64
LAEP ^{CA}	C ₂₄ H ₄₅ N ₆ O ₆	13.63	13.49	187~189	-13.0	0.60
MAEP ^{CA}	C ₂₆ H ₄₉ N ₆ O ₆	12.93	12.70	190~191	-15.0	0.61
CAEP ^{CA}	C _{25.4} H _{48.7} N ₆ O ₆	13.32	13.01	180~185	-13.5	0.58

1) Salts of N^α-acyl-L-arginine esters are abbreviated as follows.

Acyl radicals : D, Decanoyl; L, Lauroyl; M, Myristoyl; P, Palmitoyl.

Ester radicals : M, Methyl; E, Ethyl.

N^α-Acyl-L-arginine esters: AM and AE meaning L-arginine methyl and ethyl ester respectively are suffixed to the abbreviation of acyl radicals, for example, LAM, lauroyl-L-arginine methyl ester.

Salts of N^α-acyl-L-arginine esters: Hydrochloric acid and DL-pyrrolidone carboxylic acid are abbreviated as HCl and PCA respectively and suffixed to AE or AM.

For example, MAE^{HCl}, myristoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride.

2) Measured in 1% methanol solution at 20°C.

3) Developed on a silicagel-coated plate with a mixed solvent (butanol : methylethylketone : 28% aqueous ammonia : water 5 : 3 : 1 : 1) and detected by Sakaguchi reaction.

で 100 ml とした。生成したエタノールをガスクロマトグラフィーにより、あらかじめ作成した検量線を用いて求めた。ガスクロマトグラフィーは Hewlett Packard 402 型 (水素炎イオン化検知器) を用い、分析条件は次のようである。カラムは長さ 1.8 m, 直径 3 mm のガラス製のものを用いた。充てん剤は Chromosorb 102, 60~80 mesh, キャリヤーガスはヘリウム, カラム温度は 100°C であった。

2.4 抗菌力の測定法

検定菌として *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 10798, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 の三種の菌を使用し, 比濁法簡便法で生育最少阻止濃度 (MIC) を求めた。培地としては肉エキス 3 g, ペプトン 10 g および塩化ナトリウム 5 g を水 1 l に溶かした普通ブイヨン (pH 7.0) を用いた。検定菌は標準寒天培地で 3 代継続培養し, 普通ブイヨン培地 2 ml に 1 白金耳を接種し, 30°C で 24 hr 前培養したものを用いた。普通ブイヨン培地を 2 ml ずつ分注した試験管に試料の濃度がそれぞれ 5 r, 10 r, 20 r, 50 r, 100 r, 250 r および 500 r/ml になるように試料の水溶液を添加し, オートクレープ中で 120°C, 20 min 殺菌し, 一夜放置した。各試験管に前培養した菌を 0.1 ml ずつ接種し, 30°C で 48 hr 培養後, 肉眼で菌の生育の有無を判定し, MIC を求めた。

3 結果と考察

3.1 合 成

N^α-長鎖アシル-L-アルギニンエステル塩の合成経路はアルギニンをエステル化した後アシル化する方法とアルギニンをアシル化した後エステル化する方法が考えられるが, 後者を採用した。アルギニンの長鎖脂肪酸によるアシル化は N^G-ニトロアルギニンメチルエステル塩酸

塩を出発物質とする方法¹¹⁾およびアルギニン塩酸塩に当量のラウリン酸クロリドと 2 当量の水酸化ナトリウムを反応させる方法¹²⁾が知られている。本報では L-アルギニンの α 位のアミノ基を選択的にアシル化するために, 水-アセトンの混合溶媒中で, 反応液の pH を 11~12 に制御して脂肪酸クロリドを反応させた。

アシル化に使用した脂肪酸クロリドの脂肪酸組成は, 酸クロリドをメタノールで処理し, 脂肪酸メチルエステルとした後, ガスクロマトグラフィーで分析した。N^α-アシル-L-アルギニンの合成収率および融点と, 酸クロリドの脂肪酸組成を Table-1 に示した。N^α-アシル-L-アルギニンは水およびアルコール, アセトン等有機溶媒に難溶性であるが, 酢酸, ギ酸に可溶であった。酢酸に溶かし, 薄層板にスポットし, 薄層クロマトグラムを得たがモノスポットを示し, ジアシル体は認められなかった。

N^α-アシル-L-アルギニンをアルコール-塩酸でエステル化する際にアシル基が切断されないように, 2 当量の塩酸を含むアルコールで室温処理という温和な条件でエステル化を行った。また反応終了後, 過剰の塩酸を中和し加水分解に注意して処理した。

3.2 界面活性能

N^α-アシル-L-アルギニンエステル塩の KP および cmc を Table-3 に示した。アシル基の炭素数の増加と共に KP が高くなり, 同じアシル基をもつ塩酸塩と DL-ピロリドンカルボン酸塩の KP を比較すると, 塩酸塩の方が低い。cmc はエステル基および塩の種類による影響をほとんど受けず, アシル基の炭素数と log cmc の間に直線関係があり, 一般式 log cmc = A - BN (A, B は定数, N はアシル基の炭素数) を満足した。

表面張力低下能はアシル基の炭素数 12 のものが大きく, 同じアシル基をもつ塩酸塩と DL-ピロリドンカルボン酸塩を比較すると塩酸塩の方が大きかった。アシル基の炭素数 12 の塩酸塩は対照の benzyldimethyl {2-[(p-1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxyl] ethoxy} ethyl ammonium chloride (塩化ベンゼトニウム) の表面張力低下能に近い値を示した。

浸透力は対照の塩化ベンゼトニウムに比し, やや劣っていた。

あわ立ち力はすぐれているが, あわの保持力が弱く, とくにアシル基の炭素数 12 のものの保持力が小さかった。炭素数の増加にしたがってあわの保持力が向上する。カチオン界面活性剤の塩化ベンゼトニウムのあわ立ち力および保持力も同じ傾向で

Table-3 Surface active properties of salts of N^α-acyl-L-arginine esters

Samples ¹⁾	pH	KP (°C)	cmc (mmol/l)	Surface tention (dyne/cm)	Wetting power (sec)
DAM ^{HCl}	4.1	5>	15.6	40.0	14.0
LAM ^{HCl}	4.1	17.6	6.3	32.1	4.4
MAM ^{HCl}	4.4	32.4	2.3	33.6	5.6
PAM ^{HCl}	4.0	43.2	1.0	35.0	12.3
LAE ^{HCl}	2.7	5>	6.2	30.2	5.0
MAE ^{HCl}	3.3	34.0	2.4	37.3	3.4
PAE ^{HCl}	3.2	44.5	1.0	36.4	9.4
LAE ^{PCA}	5.0	35.6	6.0	39.7	7.3
MAE ^{PCA}	5.1	49.6	2.4 ²⁾	39.2	7.8
CAE ^{PCA}	5.0	26.0	—	37.5	8.2
BZC ³⁾	5.8	5>	4.1	32.3	2.5

1) Measured in 10 mmol/l at 45°C.

2) Measured at 50°C.

3) BZC: Benzethonium chloride

Table-4 Intercept A and slope B of the equation $\log \text{cmc} = A - BN$ (N: Number of carbon atoms in the acyl radical)

	A (mmol/l)	B
N ^α -Acyl-L-arginine methyl ester hydrochloride	3.20	0.20
N ^α -Acyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride	3.16	0.20
N ^α -Acyl-L-arginine ethyl ester DL-pyrrolidone carboxylate	(3.16)	(0.20)

Fig.-1 Relation between $\log \text{cmc}$ and number of carbon atoms in the acyl radical.

あった。

トルエンに対する乳化力は塩化ベンゼトニウムに比し

Fig.-2 Foam stability of salts of N-acyl-L-arginine esters (10 mmol/l aqueous solution) at 45°C. **Fig.-3** Stability of toluene/water emulsions stabilized with salts of N-acyl-L-arginine esters (10 mmol/l for water) at 45°C.

やや弱く、30 min で 60~90% の水が分離した。

3・3 N^α-アシル-L-アルギニンエステル塩の加水分解

N^α-アシル-L-アルギニンエステル塩が加水分解されると、水に難溶性で、抗菌力のない N^α-アシル-L-アルギニンになるので、N^α-コキシル-L-アルギニンエチルエ

ステル・DL-ピロリドンカルボン酸塩の 2% 水溶液 (pH 5.0) を 1 年 6 か月間室温に保存した後, 加水分解率を調べたところ, 9.6% であった。そこで溶液の pH が加水分解に及ぼす影響をみるために, pH をかえて, 80°C で加水分解率を調べた。Fig. 4 の結果から, 酸性より中性の方が加水分解されやすいことが明らかとなった。

Fig. 4 Stability of 2% aqueous cocoyl-L-arginine ethyl ester DL-pyrrolidone carboxylate solution at 80°C.

3.4 抗 菌 性

第四級アルキルアンモニウム塩のアルキル鎖長と抗菌性との関係はすでに報告されている。高麗ら¹³⁾はアルキルトリメチルアンモニウムブロミドの *candida albicans* など数種の菌に対して, MIC を測定し, アルキル基の炭素数と $\log(\text{MIC})$ との間に直線関係があることを見いだした。一方, Ross ら¹⁴⁾は, ベンジルジメチルアルキルアンモニウムクロリドの誘導体のアルキル基の長さとの $\log(\text{MIC})$ の関係を求め, アルキル基の炭素数 12~14 が最小の MIC をもつことを示した。N^ω-アシル-L-アルギニンエステル塩の場合, アシル基の炭素数と $\log(\text{MIC})$ との間に明確な関係は得られなかったが, 炭素数 12 付近に MIC の最小値がみられた。また同じアルキル基をもつ場合, メチルエステルよりエチルエステルの方がややすぐれていた。またココイル-L-アルギニンエチルエステル DL-ピロリドンカルボン酸塩の MIC はグリシンラウリルエステル・DL-ピロリドンカルボン酸塩のそれよりややすぐれ, 対照の塩化ベンゼトニウムとほぼ等しかった。

また合成中間体の N^ω-ラウロイル-L-アルギニンは両性界面活性物質の構造を有するが, ほとんど抗菌力はない。N^ω-パルミトイル-L-リシリンメチルエステルの場合も, 抗菌力を発現するには末端のカルボキシル基の保護が必要であり⁹⁾, これらのものはカチオン界面活性剤の形で抗菌力を発揮していると考えられる。

本研究に当たり, 加水分解率の測定は辻健司氏, 抗菌力の測定は味の素(株)中央研究所担当部門の協力を得た。協力さ

Table-5 Minimum inhibition concentrations (MIC) of salts of N^ω-acyl-L-arginine esters.

Samples	γ/ml		
	<i>Ps. aerug.</i> ¹⁾	<i>E. coli</i> ²⁾	<i>St. aure</i> ³⁾
DAM ^{HCl}	250	100	50
LAM ^{HCl}	500<	50	20
MAM ^{HCl}	500<	100	20
PAM ^{HCl}	500<	500<	100
LAE ^{HCl}	250	50	10
MAE ^{HCl}	500<	100	10
PAE ^{HCl}	500<	250	50
DAE ^{PCA}	250	100	20
LAE ^{PCA}	250	50	10
MAE ^{PCA}	500<	100	10
CAE ^{PCA}	250	50	10
LA ⁴⁾	1000<	1000<	1000<
Gly C ₁₂ ^{PCA5)}	500<	100	20
BZC	250	50	5>

1) *Ps. aerug.*: *Ps. aeruginosa* ATCC 10145

2) *E. coli*: *E. coli* ATCC 10798

3) *St. aure.*: *St. aureus* ATCC 6538-P

4) LA: Lauroyl-L-arginine

5) Gly C₁₂^{PCA}: DL-Pyrrolidone carboxylic acid salt of lauryl glycinate

れた方々に深謝します。

本研究の大部分は昭和 50 年 10 月, 第 14 回油化学討論会油化学研究発表会(名古屋)において報告した。

(昭和 51 年 2 月 10 日受理)

文 献

- 1) M. Takehara, H. Moriyuki, I. Yoshimura, R. Yoshida, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**, 143 (1972)
- 2) M. Takehara, H. Moriyuki, A. Arakawa, I. Yoshimura, R. Yoshida, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 227 (1973)
- 3) M. Takehara, I. Yoshimura, R. Yoshida, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 419 (1974)
- 4) 吉田良之助, 佐藤勝治, 滝沢宏一, 前田幸紀, 油化学, **24**, 595 (1975)
- 5) 吉田良之助, 竹原将博, 坂本一民, 油化学, **24**, 538 (1975)
- 6) 吉田良之助, 竹原将博, 坂本一民, 油化学, **25**, 141 (1976)
- 7) B.R. Harris *U. S. Pat.*, 2,317,378 (1941)
- 8) 清水 晃, 成井善久子, 日本化学会第 21 年会, 講演予稿集 p. 2228 (1968)
- 9) K. Vogler, P. Lanz, P. Quitt, R.O. Studer, W. Lergier, E. Böhm, B. Fust, *Helv. Chim. Acta*, **47**, 526 (1964)
- 10) T. Hikota, K. Meguro, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 579 (1969)
- 11) E.I. Vinogradova, Yu. B. Alakhov, V.M. Lipkin, N.A. Aldanova, M. Yu. Feigina, Yu. B. Shvetsov, L.A. Fonina, *Zh. Obshch. Khim.*, 1970, **40** (6), 1385 *Chem. Abstr.*, **74**, 54165 d
- 12) General Aniline & Film Corp. *Ger. Pat.*, 1,139, 738 *Chem. Abstr.*, **58**, 11377 g
- 13) 高麗寛紀, 武市一孝, 醸酵工学雑誌, **48**, 635 (1970)
- 14) Sydney Ross, C.E. Kwartler, John Has Bailey, *J. Coll. Sci.*, **8**, 385 (1953)