抗菌性を有する界面活性剤についての研究 (第 5 報)

界面活性を有する染料の合成と抗菌性

内 堀 毅*・渡 辺 昭 一 郎*・阿 部 芳 郎**

* 北里大学衛生学部 (神奈川県相模原市麻溝台 1)

** 慶応義塾大学工学部 (神奈川県横浜市港北区日吉町 3-14-1)

Study on Antimicrobial Surface Active Agent. V.

Preparation of Alkyl Derivatives of Malachite Green and Determination of Surface Tension of Their Aqueous Solutions and Antimicrobial Activity

Tsuyoshi UCHIBORI*, Shōichirō WATANABE*, and Yoshirō ABE**

* School of Hygienic Science, Kitasato University (1, Asamizodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa-ken)

** Faculty of Engineering, Keio University (3-14-1, Hiyoshi-machi, Kōhoku-ku, Yokohama)

Malachite Green derivatives bearing butyl, hexyl, octyl and decyl group were prepared by the condensation reaction of *N,N*-dimethylaniline with alkylbenzaldehydes which had been obtained from alkylbenzenes by chloromethylation followed by oxidation. Surface tension of aqueous solutions of these derivatives were determined by electro surface balance and it was found that the surface tension lowered with an increase of the carbon number of the alkyl group and surface tension of aqueous solution of the decyl derivative was about 27 dyn/cm.

Antimicrobial and antifungal activities were evaluated in terms of minimum inhibitory concentration by a dilution method. Their activities increased markedly with decrease in the number of carbon in the alkyl group. The butyl derivative showed the highest activity among these derivatives, and the activity was comparable to that of a commercial cationic surfactant.

Dyeing properties of these derivatives for some bacterial cells and textiles were also examined.

1 結 言

界面活性剤の微生物に対する作用に関しては数多くの研究が行われているが、その化学構造や物理化学的特性と抗菌性との間にはなお明確な関連性が発見されていない。今までに著者らは抗菌性を有する新しい非イオン型界面活性剤の合成を行い、それらの界面活性剤の抗菌性に影響を及ぼす構造上の要因の一つとして親油性と親水性とのバランスがあることを推察している^{1)~3)}。

また生育している微生物に種々の界面活性剤を作用させた場合の菌体の形態学的変化⁴⁾や界面活性剤の菌体細胞に対する吸着量などについて研究を行い、界面活性剤の菌体に対する吸着性とその抗菌性を左右する一つの因子となっていることも推察した⁵⁾。

微生物の染色に用いられるマラカイトグリーンに対応

するエチル誘導体の硫酸塩であるファストグリーンは強い抗菌性を有することが知られている。微生物の染色は菌体細胞に対する染料の吸着現象であり、従ってこの染色に用いられる染料は微生物に対して強い吸着性を有しているものと思われる。

そこで今回はマラカイトグリーンの 1 つのベンゼン核に炭素数が 4, 6, 8 及び 10 のアルキル基を導入して親油性を増し、界面活性を与え、それらの表面張力低下能、抗菌性及び細菌細胞に対する染色性などについて検討した。

2 実験及び結果

2.1 各誘導体の合成

マラカイトグリーンのアルキル誘導体の合成は次式にしたがって行った。

2・1・1 アルキルベンゼンの合成

原料の酪酸、ヘキサン酸、オクタン酸及びデカン酸はいずれも市販一級品をそのまま使用し、これらを常法⁶⁾にしたがって塩化チオニル(市販一級品)と反応させ相当する塩化アシルを合成した。次に塩化アルミニウム(無水物)を触媒として、塩化アシルと無水のベンゼンとからアルキルフェニルケトンを得た⁷⁾。ついでこのケトンを亜鉛アマルガムにより還元して4種のアルキルベンゼンを合成した⁸⁾。各生成物について赤外スペクトルなどを測定し、その結果から目的の化合物であることを確認した。

2・1・2 *p*-アルキルベンジルクロリドの合成

p-アルキルベンジルクロリドは Blanc らの合成法⁹⁾に準じアルキルベンゼンをホルマリンと塩化水素によってクロメチル化して合成した。次にヘキシルベンジルクロリドの合成例について述べる。

アリーコンデンサー、温度計、塩化水素導入管及び排気用としてアスピレーターに接続したL字管を取り付けた四つ口フラスコにヘキシルベンゼン 20.4 g (0.13 mol)、パラホルムアルデヒド(市販品, 80%) 4.7 g (0.16 mol) 及び塩化亜鉛(市販一級品を磁製ざらに取り、180~200°C に加熱して活性化し、乳ばちで細粉としたもの) 4.2 g (0.14 mol) を入れ、かくはんしながら 60°C 前後に加熱し、87.5 g (2.4 mol) の塩化水素を約 5 h にわたって吹き込んだ。次にフラスコ内容物をエーテルに溶かし、これを炭酸水素ナトリウムで洗浄し、さらに飽和食塩水で洗浄した。エーテル溶液を硫酸ナトリウム(無水物)で乾燥した後、エーテルを留去して粗 *p*-ヘキシルベンジルクロリドを淡かっ色液体として得た。収量は 22.6 g (収率 82.6%) であった。

2・1・3 *p*-アルキルベンズアルデヒドの合成

2・1・2 で得た粗 *p*-アルキルベンジルクロリドをそのまま使用し、文献¹⁰⁾にしたがって *p*-アルキルベンズアルデヒドを得た。例としてヘキシルベンズアルデヒドの合成を次に示す。滴下漏斗、温度計及びアリーコンデンサーを取り付けた三つ口フラスコに *p*-ヘキシルベンジルクロリド 22.6 g (0.11 mol)、ヘキサメチレンテ

ラミン(市販特級品) 30.8 g (0.22 mol)、氷酢酸 45 ml 及び水 45 ml を入れて油浴上でかくはんしながら 100°C 前後で約 3 h 加熱還流した。次に濃塩酸 100 ml を徐々に滴下し、さらに 15 min、加熱還流を続けた後、生成物をエーテルで抽出し、エーテルを留去した後、減圧蒸留を行って精製した。生成物は無色の液体で 126.6~134.0°C/mmHg で留出し、収量は 9.3 g (収率 44.3%) であった。Fig.-1 に IR スペクトルを示す。2950, 2920

Fig.-1 IR spectrum of *p*-hexylbenzaldehyde.

及び 2850 cm⁻¹ にアルキル基の CH 伸縮振動、2720 cm⁻¹ にホルミル基の CH 伸縮振動、1690 cm⁻¹ にカルボニル伸縮振動、1600 及び 1445 cm⁻¹ にベンゼン核の骨格振動、さらに 810 cm⁻¹ に 1,4-置換のベンゼン核を示す CH 面外変角振動による吸収が認められ、ヘキシルベンズアルデヒドであることを確認した。

2・1・4 4-アルキル-4',4''-ビス(ジメチルアミノ)トリフェニルメタンの合成

常法にしたがって 2・1・3 で得た *p*-アルキルベンズアルデヒドを塩化亜鉛の存在下に *N,N*-ジメチルアニリンと縮合させ、4-ヘキシル-4',4''-ビス(ジメチルアミノ)トリフェニルメタンを得た。ヘキシル誘導体の合成を例として次に示す。

ヘキシルベンズアルデヒド 9.3 g (0.05 mol)、*N,N*-ジメチルアニリン 12.1 g (0.10 mol) 及び活性化した塩化亜鉛 10.9 g (0.08 mol) を磁製ざらに入れ、ヘキシルベンズアルデヒドの臭気なくなるまで約 7 h、水浴上で加熱した。生じた緑色粘性物質に沸騰水を加えた後、水蒸気蒸留を行って未反応の *N,N*-ジメチルアニリンを留去した。水蒸気蒸留終了後、ベンゼン溶液としたのち希塩酸を加え、よく振りまぜて 4-ヘキシル-4',4''-ビス(ジメチルアミノ)トリフェニルメタンを塩酸塩とし、これを水層に移し、ベンゼンで未反応の *p*-ヘキシルベンズアルデヒドを抽出して除き、ついで水層に水酸化ナトリウム水溶液を加え、生じた油状物質をクロロホルムで抽出した。得られたクロロホルム溶液からクロロホルムを留去し、4-ヘキシル-4',4''-ビス(ジメチルアミノ)トリフェニルメタンを残留として得た。生成物はかっ色粘りゅう液体で、収量は 6.4 g (収率 30.9%) であった。その IR スペクトルを Fig.-2 に、NMR スペクト

Fig.-2 IR spectrum of 4-hexyl-4',4''-bis(dimethylamino) triphenylmethane.

Fig.-3 NMR spectrum of 4-hexyl-4',4''-bis(dimethylamino) triphenylmethane.

ルを Fig.-3 に示した。

IR スペクトルにおいて 2900 cm^{-1} 付近に一連のアルキル基の CH 伸縮振動、 1600 及び 1450 cm^{-1} にベンゼン核の骨格振動、 805 cm^{-1} に 1,4-置換のベンゼン核を示す CH 面外変角振動がみられる外、 1340 cm^{-1} に第三級アミンを示す CN 伸縮振動が認められた。また NMR スペクトルでは 0.83 ppm にアルキル基の末端メチルのプロトン及び 1.25 ppm にアルキル基のメチレンプロトンのシグナルが見られ、また N 原子に結合したメチル基のプロトン、さらに第三級の炭素原子に結合したプロトン及びベンゼン核のプロトンのシグナルがそれぞれ 2.82 、 5.25 及び $6.4\sim 7.2\text{ ppm}$ に認められた。また元素分析の結果はその同族体と共に Table-1 にまとめた。

Table-1 Elementary analysis of 4-alkyl-4',4''-bis(dimethylamino) triphenylmethane.

	C(%)		H(%)		N(%)	
	Found	Calcd.	Found	Calcd.	Found	Calcd.
M-C ₄ *	83.66	83.89	8.83	8.86	7.13	7.25
M-C ₆	83.65	84.00	9.21	9.24	6.67	6.76
M-C ₈	82.39	84.11	9.45	9.56	6.07	6.33
M-C ₁₀	84.13	84.20	9.99	9.85	5.66	5.95

M-C_n*; n shows the number of carbon atoms in the alkyl group.

2.1.5 アルキルマラカイトグリーンの合成

マラカイトグリーンの合成法¹¹⁾にしたがって 2.1.4 で得られた 4-アルキル-4',4''-ビス(ジメチルアミノ)ト

リフェニルメタンを二酸化鉛により酸化し、アルキルマラカイトグリーンを得た。次にヘキシルマラカイトグリーンの合成について述べる。

4-ヘキシル-4',4''-ビス(ジメチルアミノ)トリフェニルメタン 23.2 g (0.056 mol) を約 2 N の熱塩酸 240 ml に溶かし、この溶液に水 560 ml を加え、氷浴中で冷却し、かくはんしながら水 30 ml にあらかじめ調製済みのり状二酸化鉛 17.5 g (0.073 mol) を加えた懸濁液を少しずつ加えた。次に硫酸ナトリウム(無水物)を加え、鉛イオンを硫酸鉛として沈殿させた。一晚静置して硫酸鉛を完全に沈殿させた後、滲過して硫酸鉛を除き、滲液に炭酸ナトリウム水溶液を加え、生じた粘性物質をクロロホルムで抽出し3回水で洗浄したのちクロロホルムを留去した。残留物に 2 N 塩酸を、ロイコ塩基と等モル加えて溶かし、これをエーテルで洗浄した。次にエタノールを加え、共沸させて水を除き、緑色の結晶 19.6 g (収率 78%) を得た。IR スペクトルを測定したところ、 $2300\sim 2500\text{ cm}^{-1}$ 及び 3450 cm^{-1} に第四級アンモニウム塩特有の吸収が認められた。

2.2 表面張力の測定

2.1.5 で得られた4種のアシルマラカイトグリーンについて所定濃度の水溶液を作り、シャーレに入れ、約 30 min 放置して表面層を安定させてからウィルヘルミー型表面張力計(協和、直読式エレクトロ表面張力計)で水溶液の表面張力を測定した。各試料についての表面張力-濃度曲線を Fig.-4 に示す。

Fig.-4 Surface tension of aqueous solution of Malachite-Green derivatives.

オクチル及びデシル基をもつものは明らかに cmc を示す屈曲点を得られ、ミセル形成が行われていると思われる。またアルキル基の炭素鎖長が長くなるにつれて、cmc が低濃度側に移り、表面張力低下能も大きくなっている。特にデシル誘導体の場合は 26.8 dyne/cm とかなりの表面張力低下能を有することが認められた。

2.3 抗菌性試験

細菌類については普通寒天培地(栄研 KK 肉エキス 0.05 g , ペプトン 0.1 g , 塩化ナトリウム 0.05 g , 寒天

0.15 g), 真菌類については Sabouraud 培地 (ブドウ糖 0.3 g, ペプトン 0.1 g, 寒天 0.15 g) を試験用培地として用い, これに各試料の所定濃度の水溶液 10 ml を加えて希釈系列をつくった。これに試験菌を植え, 細菌類は 37°C, 48 h, 真菌類は 25°C で 7 d 培養し, 発育の有無を観察して, 最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。Table-2 に試験結果を示す。

Table-2 Antimicrobial activity of Malachite-Green derivatives.

	M-C ₄	M-C ₆	M-C ₈	M-C ₁₀
<i>S. aureus</i>	50	>100	>100	>100
<i>B. subtilis</i>	>100	>100	>100	>100
<i>S. lutea</i>	10	50	50	>100
<i>E. coli</i>	>100	>100	>100	>100
<i>S. typhi</i>	100	>100	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i>	>100	>100	>100	>100
<i>C. albicans</i>	10	10	100	>100
<i>S. cerevisiae</i>	100	>100	>100	>100
<i>T. interdigital</i>	10	25	25	50
<i>M. gypsum</i>	10	10	100	50
<i>P. chrysogenum</i>	10	>100	>100	>100
<i>A. niger</i>	>100	>100	>100	>100

マラカイトグリーンそのものにはほとんど抗菌性がないにもかかわらず, これらのアルキル置換体には抗菌性が認められた。アルキル鎖の影響を見るとその炭素数が多くなるにつれて細菌及び真菌類のいずれに対しても抗菌性が弱くなる傾向が認められ, なかでもブチル誘導体は *Sarcina lutea*, *Candida albicans*, *Trichophyton interdigital*, *Microsporium gypsum* 及び *Penicillium chrysogenum* に対して MIC 10 µg/ml と強い抗菌性を示した。また, いずれの誘導体も細菌に対するよりもむしろ真菌類に対して強い抗菌性を示した。

2.4 染色性

2.4.1 細菌細胞に対する染色性

グラム陽性菌である *Sarcina lutea* 及びグラム陰性菌である *Escherichia coli* を用いて染色性を調べた。

すなわちこれらの菌を常法により純培養し, さらに Davis 合成培地で約 8 h 振とう培養してから冷凍遠心 (0°C, 4000 rpm, 15 min) により菌体を集め, 滅菌生理食塩水で 3 回洗浄した後, 生理食塩水に浮遊させた。このように調製した菌浮遊液にブチル誘導体の 0.5% 水溶液を加え, かくはんして 5 min 放置してから顕微鏡で観察した。その結果, いずれの菌体細胞も緑色に染まった。また普通染色法により, ブチル誘導体の染色性を市販のマラカイトグリーンの場合と比較したところ, 全く同等な染色性のあることを示した。しかしグラム陰性菌に対しては市販のマラカイトグリーンはアルコールで完全に脱色されるのに対し, ブチル誘導体の場合は完全に

は脱色されず, 菌体に色が残った。

2.4.2 繊維に対する染色性及び染色した繊維の防菌, かび止め性

塩基性染料の染色法に準じてブチル誘導体で羊毛及び木綿を染色したところ, いずれに対しても良好な染色性を示し, 特に羊毛に対しては優れていることが認められた。

またブチル誘導体で染色したガーゼについて寒天スライド法¹²⁾で抗菌性を調べた。すなわち普通寒天培地 (栄研 KK 肉エキス 0.05 g, ペプトン 0.1 g, 塩化ナトリウム 0.05 g, 寒天 0.15 g, 水 10 ml) 上に, 菌浮遊液, 約 0.5 ml を流し込み, 寒天上に染色したガーゼ 50×50 mm を置き, 48 h 培養した後, 菌の未繁殖ゾーンを調べた。その結果 *Bacillus subtilis* 及び *Escherichia coli* に対して菌の未繁殖ゾーンが約 10 mm と, かなりの抗菌性が認められた。この結果を Fig.-5 に示す。

Fig.-5 Antimicrobial activity of textile dyed with butyl derivative on *E. coli*. (Right Petri dish; Reference)

さらにブチル誘導体で染色したガーゼについて日本工業規格のかび抵抗性試験¹³⁾を行った。すなわちブチル誘導体で染めた 50×50 mm のガーゼを試験片として, これをペトリ皿の中央に平らに置き, ガーゼの中央部分に試験菌 (*Penicillium chrysogenum*, *Trichopyton interdigital*) をのせ, さらに菌をのせたガーゼの上に乾熱殺菌したガラス板 50×50 mm をのせてからペトリ皿にふたをした。底部にリン酸アンモニウムの飽和溶液を入れて恒湿を保つようにしたデシケーター中に上記のペトリ皿を置き, 28±2°C に保って 4 週間放置した後, 試験片の表面に生じた菌糸の発育状態を肉眼で調べた。その結果, 試験片の菌を接種した部分に菌糸の発育が全く認められず, 日本工業規格かび抵抗性試験方法の表示法 1, 2 及び 3 のうちもっとも抗菌性の強い結果を示す 3 の結果が得られた。

3 考 察

α-アルキルペンズアルデヒドと, ジメチルアニリン

とを縮合させてトリフェニルメタン系色素であるマラカイトグリーンの 1 つのベンゼン核にアルキル鎖を持った誘導体を合成し、それらの表面張力低下能、抗菌性及び染色性について調べたが、ベンゼン核についたアルキル鎖長の違いによって表面張力低下能と抗菌性とに明らかな差があることが認められた。すなわちアルキル鎖長が長くなる程その水溶液の表面張力は低下し、cmc も低濃度側に移った。ブチル及びヘキシル誘導体では cmc を示す屈曲点は明りょうには認められなかったが曲線の傾向からはミセルの形成がある程度行われていると推察される。おそらくブチル誘導体の場合は親油性が不足のため余りその傾向が認められないものと思われる。一方、抗菌性はアルキル基の炭素数の少ない程強いことが認められた。また、マラカイトグリーンは抗菌性をほとんど有していないにもかかわらず 1 個のベンゼン核にアルキル基を導入することにより抗菌性が生じ、しかもその抗菌性がアルキル基の炭素数が 4 あるいはそれ以下の場合に最大となることが認められた。またブチル基をもつものについて細菌細胞に対する染色性を調べたところ、グラム陰性菌に対し、わずかではあるがマラカイトグリーンよりも吸着性が強いことが認められたが、これが抗菌性と直接結びつくか否かは今回の実験結果だけでは明

らかではない。次に染色したガーゼを用いて抗菌性及び抗かび性を調べた結果、*B. subtilis*, *E. coli*, *T. interdigital* 及び *P. chrysogenum* に対し、有効な抗菌、抗かび性を示した。染色した布地の細菌及び真菌類に対する抗菌性についてはなお今後、詳細な実験を行い、結論を得るつもりである。

(昭和 52 年 7 月 22 日受理)

文 献

- 1) 内堀 毅, 渡辺昭一郎, 阿部芳郎, 油化学, **20**, 874 (1971)
- 2) 内堀 毅, 渡辺昭一郎, 阿部芳郎, 油化学, **22**, 667 (1973)
- 3) 内堀 毅, 渡辺昭一郎, 阿部芳郎, 油化学, **25**, 399 (1975)
- 4) 内堀 毅, 高橋政寿, 山本一郎, 渡辺昭一郎, 油化学, **24**, 116 (1975)
- 5) 内堀 毅, 渡辺昭一郎, 阿部芳郎, 日本化学会 35 秋季年会, 講演予稿集 2 F 26, p. 559; 内堀 毅, 渡辺昭一郎, 日本防菌防黴学会第 4 回年次大会研究発表要旨集 p. 32
- 6) "Org. Syntheses", Coll. Vol. 1, p. 147
- 7) Whitmore, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 235 (1947)
- 8) "Org. Syntheses", Coll. Vol. 3, p. 444
- 9) "Org. Reaction" Vol. 1, p. 67
- 10) "Org. Syntheses", Coll. Vol. 30, p. 67
- 11) S.M. McElvain, E.J. Eisenbraun, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1599 (1955)
- 12) W. Hofmann, 日本ゴム協会誌, **36**, 751 (1963)
- 13) 日本工業規格, かび抵抗性試験方法, JIS Z-2911 (1960)