報 文

エーテル結合を有する *N*-置換アミノ酸型両性
界面活性剤の合成と抗菌性

小山内州一・湯原尚一郎・阿部 芳郎

慶應義塾大学理工学部 (横浜市港北区日吉 3-14-1)

Preparation and Antimicrobial Properties of *N*-Substituted
Amino Acid Type Amphoteric Containing Ether LinkageShuichi OSANAI, Shoichiro YUHARA, and Yoshiro ABE
Faculty of Science and Technology, Keio University (3-14-1,
Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama-shi)

Amphoteric surface active *N*-substituted amino acid derivatives containing long chain alkoxyl radicals and the methylmethylethylene, ethylene, and methylethylene radicals between amino and carboxyl groups were prepared, then their antimicrobial properties against *G.* positive, *G.* negative bacilli and fungi were determined. It was confirmed that *N*-substituted β -alanine derivatives showed higher antimicrobial properties than the corresponding α -alanine derivatives. The effect of side methyl group between an ammonium and a carboxylate radical was not clear.

The surface tension of the *N*-substituted β -alanine aqueous solution was about 30~35 dyn/cm in the pH range from 3 to 11.

1 結 言

著者らはこれまでに疎水基中にエーテル結合を含む *N*-置換アミノ酸型両性界面活性剤を合成し、それらが高い抗菌性を有することを報告した¹⁾。ひきつづき同系列の両性界面活性剤において、アミノ基とカルボキシル基の間に介在する炭素骨格構造の相違——すなわち α -アラニン型、 β -アラニン型及び側鎖メチル基の有無——による抗菌性及び界面活性に及ぼす影響について検討し、二、三の知見を得たので以下に報告する。

2 実 験

2.1 両性界面活性剤の合成

合成した両性界面活性剤は、長鎖のアルコキシル基を含む 2-アミノプロピオン酸型 (A)、3-アミノ酪酸型 (B)、3-アミノプロピオン酸型 (C)、の置換アミノ酸型で Fig.-1 の反応式に準じて合成した。

2.1.1 3-アルコキシプロピルアミンの合成

アルコキシル基は、オクチルオキシル、デシルオキシル及びドデシルオキシルを選び、相当するアルコールを水酸化ナトリウムを触媒としてアクリロニトリルによりシアノエチル化し、減圧蒸留をして 3-アルコキシプロ

Fig.-1 Preparation of amphoteric containing long chain alkoxyl radicals.

ピオニトリル²⁾を得、ついで常法に従い、これらニトリルを乾燥したエーテル中で水素化アルミニウムリチウムにより還元し減圧蒸留による精製を行って、3-アルコキシプロピルアミンとした。以上合成した分子内にエーテル結合を含むニトリル、アミンはいずれも元素分析値が計算値とほぼ一致し、また沸点、屈折率が文献値と一致することを確認した。IR、NMR スペクトルも目的の化合物の構造と一致した。

2.1.2 両性界面活性剤の合成

アルコキシル基としてドデシルオキシル基の場合を例にして示す。他のアルコキシ同族体も同様にして合成した。

i) 2-(3-ドデシルオキシプロピル) アミノプロピオ

ン酸 (A) の合成

50 ml のエタノールの反応溶媒中で、先に得た 3-ドデシルオキシプロピルアミン 12.2 g (0.05 mol) に、2-クロロプロピオン酸ナトリウム (0.06 mol) 水溶液 10 ml を 50~60°C で滴加し、その後 TLC で反応を追跡しながら 7 h 加熱かくはんし、反応終了後、内容物を熱時濾過し、生成する無機塩を濾別し、その濾液を冷却して得られた結晶をエタノール：水=2：1 (vol/vol) の混合溶媒で 2 回再結晶を行い相当する 2-(3-ドデシルオキシプロピル) アミノプロピオン酸を白色結晶として得た。

次に 2-(3-ドデシルオキシプロピル)アミノプロピオン酸 1.0 g を濃塩酸 (12 N) 10 ml で処理し、ヘキサン：アセトン=1：1 (vol/vol) の混合溶媒で 2 回再結晶を行い、2-(3-ドデシルオキシプロピル) アミノプロピオン酸塩酸塩を得た。同様に 2-(3-オクチルオキシプロピル)-、及び 2-(3-デシルオキシプロピル) アミノプロピオン酸塩酸塩を合成した。それらの定数を Table -1 に示す。

Table-1 Characteristics of amphoteries,
 $\text{ROC}_8\text{H}_{17}\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$.

R	mp (°C)	C% (calcd.)	H% (calcd.)	N% (calcd.)
$\text{C}_8\text{H}_{17}-$	225~227	64.99 (64.83)	11.11 (11.27)	5.30 (5.40)
$\text{C}_{10}\text{H}_{21}-$	215~217	66.90 (66.86)	11.31 (11.57)	4.85 (4.87)
$\text{C}_{12}\text{H}_{25}-$	215~217	68.63 (68.53)	11.59 (11.82)	4.51 (4.44)
$\text{C}_8\text{H}_{17}-^*$	78~81	57.16 (56.84)	9.95 (10.22)	4.65 (4.73)
$\text{C}_{10}\text{H}_{21}-^*$	77~79	59.42 (59.33)	10.30 (10.58)	4.19 (4.32)
$\text{C}_{12}\text{H}_{25}-^*$	84~85	61.66 (61.43)	10.68 (10.88)	4.06 (3.98)

* : HCl salts

2-(3-ドデシルオキシプロピル)アミノプロピオン酸及び 3-(3-ドデシルオキシプロピル)アミノ酪酸の IR スペクトルは次のとおりである。1,120 cm^{-1} : $-\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2-$; 1,580, 1,400 cm^{-1} : $-\text{COO}-$; 2,250~2,700 cm^{-1} : $-\text{N}^+\text{H}_2-$

NMR スペクトルとして 2-(3-ドデシルオキシプロピル)アミノプロピオン酸を例として以下に示す (内部標準 TMS, 溶媒 CD_3OD)。

帰 属	a	b	h	e	f	c	d	g
$\delta(\text{ppm})$	0.92	1.35	1.50	2.00	3.20	3.57	3.67	3.45~3.80
多重度	t	m	d	qui	t	t	t	m
nH	3	20	3	2	2	2	2	1

ii) 3-(3-ドデシルオキシ) アミノ酪酸 (B) の合成

30 ml のエタノールの反応溶媒中で、先に得た 3-ドデシルオキシプロピルアミン 9.7 g (0.04 mol) に、3-クロロ酪酸ナトリウム (0.044 mol) 水溶液 10 ml を滴加し、オートクレープ中で 120°C, 20 h 加熱かくはんし、反応終了後、内容物を熱時濾過し、生成する無機塩を濾別し、その濾液を冷却して得られた結晶をアセトン：水=8：1 (vol/vol) の混合溶媒で 2 回再結晶を行い相当する 3-(3-ドデシルオキシプロピル)アミノ酪酸を白色結晶として得た。次に 3-(3-ドデシルオキシプロピル)アミノ酪酸 1.0 g を濃塩酸 (12 N) 10 ml で処理し、アセトンで 2 回再結晶を行い、3-(3-ドデシルオキシプロピル)アミノ酪酸塩酸塩を得た。同様に 3-(3-オクチルオキシプロピル)-、及び 3-(3-デシルオキシプロピル) アミノ酪酸塩酸塩を合成した。それらの定数を Table-2 に示す。

Table-2 Characteristics of amphoteries,
 $\text{ROC}_8\text{H}_{17}\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOH}$.

R	mp (°C)	C% (calcd.)	H% (calcd.)	N% (calcd.)
$\text{C}_8\text{H}_{17}-$	120~122	65.64 (65.90)	11.20 (11.43)	5.09 (5.12)
$\text{C}_{10}\text{H}_{21}-$	126~128	67.48 (67.73)	11.43 (11.70)	4.72 (4.65)
$\text{C}_{12}\text{H}_{25}-$	121~123	69.00 (69.25)	11.68 (11.93)	4.34 (4.25)
$\text{C}_8\text{H}_{17}-^*$	54~56	56.96 (58.14)	9.81 (10.41)	4.47 (4.52)
$\text{C}_{10}\text{H}_{21}-^*$	68~70	60.15 (60.42)	10.56 (10.74)	4.10 (4.14)
$\text{C}_{12}\text{H}_{25}-^*$	76~78	62.39 (62.35)	10.78 (11.02)	3.67 (3.83)

* : HCl salts

iii) 3-(3-ドデシルオキシプロピル) アミノプロピオン酸塩酸塩 (C) の合成

先に得た 3-ドデシルオキシプロピルアミン 14.6 g (0.060 mol) にアクリロニトリル 3.5 g (0.066 mol) を滴加し、その後 8 h, 60°C にてかくはんし、ついで減圧蒸留を行い相当するアミノニトリル (bp 128~136°C/0.4 mmHg; $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}-$, 128~130°C/0.5 mmHg) を得た。次にこのアミノニトリル 12.4 g (0.042 mol) の約 4 倍容 50 ml の濃塩酸 (10 N) で 4 h 還流することによって加水分解し、酢酸エチル：ヘキサン=3：1 (vol/vol) の混合溶媒で 2 回再結晶を行い相当する 3-(3-ドデシル

Table-3 Characteristics of amphoteries,
 $\text{ROC}_8\text{H}_{17}\text{NHC}_2\text{H}_4\text{COOH}\cdot\text{HCl}$.

R	mp (°C)	C% (cal cd.)	H% (cal cd.)	N% (cal cd.)
$\text{C}_{10}\text{H}_{21}-$	66~68	58.58 (59.33)	10.64 (10.58)	4.16 (4.32)
$\text{C}_{12}\text{H}_{25}-$	68~70	61.14 (61.43)	10.64 (10.88)	3.83 (3.98)

オキシプロピル) アミノプロピオン酸塩酸塩を得た。同様にして 3-(3-デシルオキシプロピル) アミノプロピオン酸塩酸塩を合成した。それらの定数を **Table-3** に示す。

2.2 表面張力及び cmc の測定

水溶液の比表面張力を滴数法により 25°C にて測定した。各濃度の対数と表面張力の関係をプロットし、その屈曲点から cmc を求めた。その結果を **Fig.-2** 及び **Fig.-3** に示す。表面張力の pH 依存性の測定は、cmc 以上の濃度で界面活性剤水溶液を調製し、これを等量に二分し、半分は酸側の表面張力測定に供し、他の半分はアルカリ側の表面張力測定に使用した。**Fig.-4** にそれらの結果を示す。各試料の pH 調製前の濃度は以下のとおりである。ROC₃H₆NHCH(CH₃)CH₂COOH (B) の試料においては R=C₁₀H₂₁ のものは 5 mM, R=C₁₂H₂₅ のものは 0.5 mM。ROC₃H₆NHC₂H₄COOH·HCl (C) の試料においては R=C₁₀H₂₁ のものは 10 mM, R=C₁₂H₂₅ のものは 1 mM である。酸側の表面張力測定は次のように行った。試料液の一部をとり、これに 0.1 N 及び 1 N 塩酸を適宜加え、得られた酸性溶液の pH を複合電極 pH メーター (東亜電波 (株) HM-5 A 型) で pH を測定後、表面張力を測定した。同様にアルカリ側の表面張力は試料の一部に 0.1 N 及び 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、得られたアルカリ性溶液の pH を測定し、ついで表面張力の測定を行った。なお pH 調製のた

Fig.-2 Surface tension-concentration curves of amphoteric, ROC₃H₆NHCH(CH₃)CH₂COOH.

Fig.-3 Surface tension-concentration curves of amphoteric, ROC₃H₆NHC₂H₄COOH·HCl.

Fig.-4 Influences of pH on surface tension of aq. solutions of amphoteric.

め加えた塩酸溶液及び水酸化ナトリウム水溶液は、試料溶液量に比較して極めて少量であるので試料溶液の濃度に及ぼす影響は無視しうるものと考えた。

2.3 抗菌性試験

先に合成した両性界面活性剤について細菌ならびに真菌に対する抗菌性試験を行った。培養条件は次のとおりである。細菌類: pH 7.0, 37°C, 48 h。真菌類: pH 6.5, 25°C, 5 d。なお 2-アミノプロピオン酸型 (A) の両性界面活性剤は水への溶解性が低いいため最小量のエタノール

Table-4 MIC of amphoteric containing long chain alkoxy radicals, (μg/ml)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	>100	100	>100	25	>100	25	>100
<i>Bacillus subtilis</i>	>100	>100	>100	25	>100	25	>100
<i>Sarcina lutea</i>	>100	>100	>100	100	>100	100	>100
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100	100	100	>100	>100	>100
<i>Salmonella typhi</i>	100	50	100	50	>100	25	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	100	100	>100	>100	>100	>100
(1) $\text{ROC}_3\text{H}_6\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{COOH}\cdot\text{HCl}$	R=C ₁₂ H ₂₅ -		(5) $\text{ROC}_3\text{H}_6\text{NHC}_2\text{H}_4\text{COOH}\cdot\text{HCl}$	R=C ₁₀ H ₂₁ -			
(2) "	R=C ₁₀ H ₂₁ -		(6) $\text{ROC}_3\text{H}_6\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOH}\cdot\text{HCl}$	R=C ₁₂ H ₂₅ -			
(3) "	R=C ₈ H ₁₇ -		(7) "	R=C ₁₀ H ₂₁ -			
(4) $\text{ROC}_3\text{H}_6\text{NHC}_2\text{H}_4\text{COOH}\cdot\text{HCl}$	R=C ₁₂ H ₂₅ -						

Table-5 MIC of amphoterics containing long chain alkoxy radicals, ($\mu\text{g/ml}$)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
<i>Candida albicans</i>	>100	>100	>100	100	>100	50	>100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100
<i>Trichophyton interdigital</i>	100	100	100	25	>100	25	>100
<i>Microsporium gypseum</i>	100	50	100	50	>100	50	>100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	100	>100	100	>100	>100	>100
<i>Aspergillus niger</i>	100	100	100	100	>100	100	>100
(1) $\text{ROC}_6\text{H}_6\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{COOH}\cdot\text{HCl}$	$\text{R}=\text{C}_{12}\text{H}_{25}-$		(5) $\text{ROC}_6\text{H}_6\text{NHC}_2\text{H}_5\text{COOH}\cdot\text{HCl}$		$\text{R}=\text{C}_{10}\text{H}_{21}-$		
(2) "	$\text{R}=\text{C}_{10}\text{H}_{21}-$		(6) $\text{ROC}_6\text{H}_6\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOH}\cdot\text{HCl}$		$\text{R}=\text{C}_{12}\text{H}_{25}-$		
(3) "	$\text{R}=\text{C}_8\text{H}_{17}-$		(7) "		$\text{R}=\text{C}_{10}\text{H}_{21}-$		
(4) $\text{ROC}_6\text{H}_6\text{NHC}_2\text{H}_5\text{COOH}\cdot\text{HCl}$	$\text{R}=\text{C}_{12}\text{H}_{25}-$						

ルに溶解し、寒天培地にて希釈して最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。Table-4, 5 に細菌、真菌に対する MIC 値をまとめて示した。

3 考 察

Fig.-2 の 3-(3-アルキルオキシプロピル)アミノ酪酸の水溶液 (pH 7.2) における比表面張力と界面活性剤の濃度の対数のグラフの屈曲点より cmc 値を求めると順に C_8 (20 mM), C_{10} (2.0 mM), C_{12} (0.23 mM) であった。また cmc 以上の濃度では 30~32 dyn/cm の表面張力を示した。

Fig.-3 の 3-(3-アルコキシプロピル)アミノ酪酸塩水溶液については, C_{10} (4.0 mM), C_{12} (0.35 mM) となり, C_{12} の方の cmc 値が, C_{10} の約 1/10 となった。また cmc 値以上の濃度では, 30~32 dyn/cm の表面張力を示した。なお合成した 3 種の両性界面活性剤中で, 2-アミノプロピオン酸型 (A) とその塩酸塩はきわめて水への溶解性が低いため比表面張力の測定は不可能であった。Fig.-4 は 3-アミノ酪酸型 (B) の界面活性剤溶液についての cmc の濃度以上での表面張力と pH との関係である。pH 3.5~11.5 において, C_{10} , C_{12} 共に 30~35 dyn/cm の表面張力を示した。また著しく酸性領域, またはアルカリ領域に近づくとも表面張力低下能が悪くなった。また 3-アミノプロピオン酸塩酸塩型 (C) 表面張力と pH との関係について注目すると pH 3.0~12.5 の広範囲において, C_{10} , C_{12} 共に 29~35 dyn/cm の表面張力を示した。これらも同様に強いアルカリ領域に近づくとも表面張力低下能が悪くなる。

Table-4 に細菌類に対する抗菌性試験の結果を示した。2-アミノプロピオン酸塩酸塩型はすべての菌に対して抗菌性が弱く, アルキル基鎖長間の影響はみられず, わずかに *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*

に抗菌性を示した。3-アミノプロピオン酸塩酸塩型, 3-アミノ酪酸塩酸塩型においては明らかに C_{12} の方が C_{10} よりも抗菌性が強く, かつ 2-アミノプロピオン酸塩酸塩型よりもすぐれた抗菌性を示し, 共に *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* に有効であった。

Table-5 に真菌類に対する抗菌性試験の結果を示した。細菌の場合と似た傾向を示した。すなわち 2-アミノプロピオン酸塩酸塩型は, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* を除き抗菌性を現すがアルキル基鎖長による違いはみられなかった。3-アミノプロピオン酸塩酸塩型, 3-アミノ酪酸塩酸塩型においては, *Trichophyton interdigital*, *Microsporium gypseum* に強い抗菌性を示した。また共にアルキル基鎖長が C_{12} の方が C_{10} よりも強い抗菌性を示した。抗菌性については, 2-アミノプロピオン酸型よりより 3-アミノ酪酸型の方が抗菌力が強く, また側鎖メチル基の影響は顕著ではなかった。

終わりに, 本研究を進めるにあたり御協力いただきました北里大学衛生学部渡辺研究室に感謝致します。なお本報は, 昭和 57 年, 第 30 回油化学討論会・研究発表会で発表したものである。

(昭和 58 年 2 月 16 日受理)

文 献

- a) 阿部芳郎, 小山内州一, 油化学, **25**, 102 (1976)
- b) Y. Abe, S. Osanai, S. Matsumura, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**, 357 (1972)
- c) Y. Abe, S. Osanai, T. Matsushita, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **51**, 385 (1974)
- 2) Y. Abe, *Lipid*, **1**, 141 (1966)
- 3) R.F. Nystrom, W.G. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3738 (1948)
- 4) DEHYDAG Deutsche Hydrierwerke G.m.b.H., *Brit. Pat.*, 869,405, (1961); *Chem. Abstr.*, **58**, 1349 f (1963)