ピロリジノン骨格を有するビニルモノマーの抗菌性

(1982年6月23日受理)

杉 山 一 男

薬理活性を示す高分子の合成を目的として, 3種の 1-アリール-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸〔2〕(アリール基はフェニル, トリルおよび *p*-クロロフェニル)と2種のメタクリラート〔3〕を合成した。さらに, 〔2〕および〔3〕を水溶性にするためアンモニウムあるいはトリエチルアミンによりアンモニウム塩〔4〕~〔7〕とした。ピロリジノン誘導体の抗菌性は *Bacillus polymyxa* Hino 株に対して, 改良 Winogradsky 培地中で試験した。その結果, 1-トリル-5-[3-メトキシ-4-(メタクリロイルオキシ)フェニル]-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸トリエチルアンモニウム塩〔6b〕がもっとも高い抗菌性を示した。

1 緒 言

薬理活性を示す高分子化合物の合成は機能性高分子に関する研究目的の一つに挙げられ, すでに数多くのデザインされた高分子があり, それらの有用性が検討されている¹⁾²⁾。薬理作用のうち抗菌性を有する高分子は, とくに活発な研究がなされているという²⁾。このような合目的な高分子合成には, あらかじめ薬効を示すビニルモノマーを合成し, それを高分子化する方法が有力な手段となっている。たとえば, キニン環³⁾⁴⁾, トロポロン環⁵⁾⁶⁾, スルホンアミド基⁷⁾, トリブチルスズ⁸⁾⁹⁾およびアダマンタン構造⁹⁾をもつアクリラートやメタクリラートが合成され, 抗菌性が調べられたりしている。また, ペンタクロロフェニル=メタクリラート¹⁰⁾や2-(アクリロイルオキシ)エチル=N-(2,3,6-トリクロロフェニルアセチル)カルバマート¹¹⁾が合成され, 害虫駆除剤としての有用性が検討されている。これらは薬効の安定化や持続性の向上を

目的としていることはいうまでもない。

著者らは, これらの範ちゅうに属する研究としてタバコ *Nicotina tabacum* の葉に存在するアルカロイドで, 駆虫作用を主作用とするニコチンの構造に注目した。すなわち, 1-アリール-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシ)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸〔2〕は, ケトン基の還元およびカルボキシル基の脱炭酸反応を経てニコチン類似化合物となりうることから, ニコチンとは異なるが, なんらかの薬効を示すことが期待できる。また〔2〕のヒドロキシル基やオキシおよびカルボキシル基は, さらに〔2〕を必要な誘導体へと導くのに有効である。

以上のことから, 薬理活性を示す新しい高分子を得るため, 〔2〕およびビニルモノマー〔3〕の合成を試みた。さらに, それらの薬理作用の有無を知るため〔2〕および〔3〕をそれぞれアンモニウム塩とし, 駆虫作用の試験にさき立って, *Bacillus polymyxa* Hino 株(以下 *B. polymyxa* と略記する)に対する抗菌性を検討した。

2 実 験

2.1 ピロリジノン誘導体の合成

〔2〕, 〔3〕およびそれらのアンモニウム塩は Castagnoli の反応により, つぎの図式にしたがって合成した¹²⁾¹³⁾。

12) N. Castagnoli, Jr., *J. Org. Chem.*, **34**, 3187(1969).

13) M. Cushman, N. Castagnoli, Jr., *ibid.*, **36**, 3404(1971).

近畿大学工学部工業化学科, 737-01 呉市広町

- 1) 大内辰郎, 化学, **33**, 94(1978).
- 2) 竹本喜一, 田伏岩夫著, “医薬高分子”, 講談社(1978)第3章.
- 3) K. Yamauchi, M. Kinoshita, M. Imoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **44**, 3186(1971).
- 4) K. Yamauchi, M. Kinoshita, M. Imoto, *J. Macromol. Sci., Chem.*, **A6**, 73(1972).
- 5) G. Manecke, M. Schöneschöfer, *Macromol. Chem.*, **112**, 293(1968).
- 6) R. J. Cornell, L. G. Donaruma, *J. Polym. Sci.*, **A3**, 827(1965).
- 7) V. Hofmann, M. Przybylski, H. Ringsdorf, H. Ritter, *Makromol. Chem.*, **177**, 1791(1976).
- 8) D. A. Kochkin, P. I. Zubov, Z. M. Rzaev, I. N. Azerbaev, V. I. Vashkov, N. I. Kovaleva, G. V. Shcheglova, *Vestn. Akad. Nauk. SSR*, **22**, 45(1966); *Chem. Abstr.*, **66**, 76330r(1967).
- 9) H. Ringsdorf, H. Ritter, H. Rolly, *Makromol. Chem.*, **177**, 741(1976).
- 10) 赤金華津男, 松浦和代, 色材, **45**, 70(1972).
- 11) W. A. Feld, D. W. Bombick, L. L. Friar, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **20**, 263(1982).

2.1.1 4-置換 *N*-(3-メトキシ-4-ヒドロキシベンジリデン)アニリン [1] の合成: 等モル (0.5 mol) のバニリンと置換アニリンを 500 ml のトルエン中, 約 10 時間, 加熱下還流し, 反応で生じる水 (0.5 mol) は Dean-Stark トラップに集める。溶媒を留去して得られる結晶をエタノールから再結晶した。収率はいずれも 90% 以上であった。

N-(3-メトキシ-4-ヒドロキシベンジリデン)アニリン [1a]: mp 157~158°C (文献値¹⁴) mp 152~153°C。

N-(3-メトキシ-4-ヒドロキシベンジリデン)-4-メチルアニリン [1b]: mp 119°C (文献値¹⁵) mp 115.5°C。

N-(3-メトキシ-4-ヒドロキシベンジリデン)-4-クロロアニリン [1c]: mp 130~131°C。

2.1.2 1-アリール-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸 [2] の合成: 等モル (0.1 mol) の [1] と無水コハク酸を乾燥キシレン 500 ml 中, 40 時間, 窒素気流中で加熱下還流する。反応終了後, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で抽出し, この抽出液を 2 mol/l の塩酸で pH 2 付近に調整すると [2] が析出する。エタノールまたはエタノール: 水 (=50:50) 系から再結晶する。

1-フェニル-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸 [2a]: mp 247~248°C, 収率 66.7%。

分析値 C 66.12%, H 5.29%, N 4.34%

$C_{18}H_{17}NO_5=327.337$ としての

計算値 C 66.05%, H 5.23%, N 4.28%

NMR(DMSO- d_6) δ (ppm): 2.87~3.53(m, C_3+C_4 , 3H), 3.75(s, OCH₃, 3H), 5.44(d, $J=6$ Hz, C_5 , 1H), 7.13~7.90(m, phenyl, 8H)

1-トリル-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸 [2b]: mp 198~202°C, 収率 52.3%。

分析値 C 66.97%, H 5.43%, N 4.10%

$C_{19}H_{19}NO_5=341.358$ としての

計算値 C 66.86%, H 5.61%, N 4.10%

NMR(DMSO- d_6) δ (ppm): 2.53(s, CH₃, 3H), 2.87~3.50(m, C_3+C_4 , 3H), 3.72(s, OCH₃, 3H), 5.45(d, $J=4.2$ Hz, C_5 , 1H), 7.10~7.80(m, phenyl, 7H)

1-(4-クロロフェニル)-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸 [2c]: mp 188~190°C, 収率

51.7%。

分析値 C 60.04%, H 4.53%, N 3.75%

$C_{18}N_2NO_5Cl=361.782$ としての

計算値 C 59.76%, H 4.46%, N 3.87%

NMR(DMSO- d_6) δ (ppm): 2.70~3.60(m, C_3+C_4 , 3H), 3.72(s, OCH₃, 3H), 5.50(d, $J=4.5$ Hz, C_5 , 1H), 6.80~7.60(m, phenyl, 7H)

なお, 3 種の [2] はそれぞれトランス体とシス体の両方が生成しうる。ここに NMR の 5.5~6.0 ppm の二重線は C_5 メチンプロトンに基づくもので Castagnoli^{12,13)} は, C_4 と C_5 の二つの H のなす角度 (トランス体: 120°, シス体: 0°) と Karplus の関係式¹⁶⁾ から, カップリング定数 J_{4-5} をトランス体およびシス体について, それぞれ 5, 9 Hz と算出している。[2] は J_{4-5} が 4.2~6.0 Hz であることからすべてトランス体である。

2.1.3 1-アリール-5-[3-メトキシ-4-(メタクリロイルオキシ)フェニル]-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸 [3] の合成: 0.03 mol の [2], 0.05 mol のトリエチルアミン, および少量の *p*-ベンゾキノンを 300 ml の乾燥テトラヒドロフランに加え, 氷冷下, かきまぜながら, 0.05 mol のメタクリル酸クロリド (Stempelらの方法に準じて合成した¹⁷⁾). bp 93~98°C, 文献値¹⁸⁾ bp 92~102°C) を 3 時間かけて滴々加える。滴下終了後, 室温にもどし, さらに約 10 時間かきまぜをつづける。ついで減圧下低温で溶媒類を留去し, 残留物はクロロホルムに溶かして希塩酸および水で数回洗浄する。クロロホルム層は無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去すると [3] が得られる。エタノール: 水 (=80:20) 系から再結晶する。

1-フェニル-5-[3-メトキシ-4-(メタクリロイルオキシ)フェニル]-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸 [3a]: mp 198~199°C,

16) M. Karplus, *J. Chem. Phys.*, 30, 11(1959).

17) G. H. Stempel, Jr., R. P. Cross, R. P. Mariella, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2299(1950).

18) S. Patai, *ibid.*, 74, 845(1952).

14) Beilsteins Handbuch d. Org. Chem. Hw. Eg. II, 12, 233(1933).

15) *ibid.*, 12, 790(1933).

収率 68.2%。

分析値 C 66.88%, H 5.52%, N 3.54%

$C_{22}H_{21}NO_6=395.411$ としての

計算値 C 66.83%, H 5.53%, N 3.54%

NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 2.00(s, CH_3 , 3H), 2.80~3.20(m, C_3+C_4 , 3H), 3.74(s, OCH_3 , 3H), 5.57(d, $J=4$ Hz, C_5 , 1H), 5.71(m, $-CH=$, 1H), 6.29(m, $-CH=$, 1H), 6.87~7.30(m, phenyl, 8H)

1-トリル-5-[3-メトキシ-4-(メタクリロイルオキシ)フェニル]-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸[3b]: mp 187~189°C, 収率 66.2%。

分析値 C 67.63%, H 5.59%, N 3.54%

$C_{23}H_{23}NO_6=409.439$ としての

計算値 C 67.47%, H 5.66%, N 3.42%

NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 1.89(s, CH_3 , 3H), 2.45(s, CH_3 , 3H), 2.85~3.80(m, C_3+C_4 , 3H), 3.70(s, OCH_3 , 3H), 5.62(d, $J=5.7$ Hz, C_5 , 1H), 5.50(m, $-CH=$, 1H), 6.10(m, $-CH=$, 1H), 6.80~7.50(m, phenyl, 7H)

2.1.4 1-アリアル-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸トリエチルアンモニウム塩[4]: 0.01 mol の[2]を 100 ml の乾燥テトラヒドロフランに溶かし, それに 0.02 mol の蒸留したこのトリエチルアミンをかきまぜながら加える。そののち, さらに 5 時間かきまぜをつづける。溶媒や残留トリエチルアミンを減圧下, 低温で留去して[4]を得る。収率はほぼ定量的であった。

1-フェニル-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸トリエチルアンモニウム塩[4a]: mp 245~250°C。

分析値 N 6.52%

$C_{24}H_{32}N_2O_5=428.525$ としての

計算値 N 6.54%

NMR($DMSO-d_6$) δ (ppm): 0.80~1.50(t, CH_3 , 9H), 2.86~3.50(m, C_3+C_4 , 3H), 3.73(s, OCH_3 , 3H), 4.05~4.30(q, CH_2 , 6H), 5.45(d, $J=6$ Hz, C_5 , 1H), 6.49~7.65(m, phenyl, 8H)

1-トリル-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸トリエチルアンモニウム塩[4b]: mp 250~251°C。

分析値 N 6.23%

$C_{25}H_{34}N_2O_5=442.555$ としての

計算値 N 6.33%

NMR($DMSO-d_6$) δ (ppm): 0.80~1.50(t, CH_3 , 9H), 2.18(s, CH_3 , 3H), 2.64~3.20(m, C_3+C_4 , 3H), 3.70(s, OCH_3 , 3H), 4.17(q, CH_2 , 6H), 5.40(d, $J=4$ Hz, C_5 , 1H), 6.25~7.30(m, phenyl, 7H)

1-(4-クロロフェニル)-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸トリエチルアンモニウム塩[4c]: mp 210~217°C。

分析値 N 6.10%

$C_{24}H_{31}ClN_2O_5=462.973$ としての

計算値 N 6.05%

NMR($DMSO-d_6$) δ (ppm): 0.70~1.80(t, CH_3 , 9H), 2.80

~3.20(m, C_3+C_4 , 3H), 3.72(s, OCH_3 , 3H), 4.10(q, CH_2 , 6H), 5.42(d, $J=4.2$ Hz, C_5 , 1H), 6.55~7.30(m, phenyl, 7H)

2.1.5 1-アリアル-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸アンモニウム塩[5]: 0.01 mol の[2]を 200 ml の乾燥ベンゼンに溶解し, 乾燥アンモニアガスを約 10 時間導入し, 析出する結晶を濾別して[5]を得た。収率は 80% 以上。

1-フェニル-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸アンモニウム塩[5a]: mp 250~253°C。

分析値 N 8.13%

$C_{18}H_{20}N_2O_5=344.367$ としての

計算値 N 8.39%

1-トリル-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸アンモニウム塩[5b]: mp 248~253°C。

分析値 N 7.73%

$C_{19}H_{22}N_2O_5=358.394$ としての

計算値 N 7.82%

1-(4-クロロフェニル)-5-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸アンモニウム塩[5c]: mp 260~261°C。

分析値 N 7.40%

$C_{18}H_{19}N_2O_5Cl=378.812$ としての

計算値 N 7.40%

2.1.6 1-アリアル-5-[3-メトキシ-4-(メタクリロイルオキシ)フェニル]-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸トリエチルアンモニウム塩[6]: [6]は[4]の合成法に準じて得た。収率は 80% 以上。

1-フェニル-5-[3-メトキシ-4-(メタクリロイルオキシ)フェニル]-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸トリエチルアンモニウム塩[6a]: mp 208~217°C。

分析値 N 5.54%

$C_{28}H_{38}N_2O_5=480.604$ としての

計算値 N 5.83%

1-トリル-5-[3-メトキシ-4-(メタクリロイルオキシ)フェニル]-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸トリエチルアンモニウム塩[6b]: mp 220~224°C。

分析値 N 5.52%

$C_{29}H_{38}N_2O_5=492.631$ としての

計算値 N 5.68%

2.1.7 1-アリアル-5-[3-メトキシ-4-(メタクリロイルオキシ)フェニル]-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸アンモニウム塩[7]: [7]は[5]の合成法に準じて得た。収率は 70% 以上。

1-フェニル-5-[3-メトキシ-4-(メタクリロイルオキシ)フェニル]-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸アンモニウム塩[7a]: mp 210~215°C。

分析値 N 6.74%

$C_{22}H_{24}N_2O_6=396.442$ としての

計算値 N 7.07%

1-トリル-5-[3-メトキシ-4-(メタクリロイルオキシ)フェニル]-2-オキソピロリジン-4-カルボン酸アンモニウム塩[7b]: mp 218~222°C。

分析値 N 6.54%

 $C_{23}H_{26}N_2O_6=410.470$ としての

計算値 N 6.82%

2.2 抗菌試験

抗菌試験には、近畿大学工学部新谷良雄研究室から提供された通性嫌気性菌である *B. polymyxa* を用いた。

2.2.1 培地の調製: *B. polymyxa* の培養は改良 Winogradsky 培地¹⁹⁾を用いた。すなわち、本培地はつぎに示すA液およびB液を *B. polymyxa* の植付直前に混合して調製した。

A 液: 蒸留水 2000 ml にショ糖 80 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 g, NaLi 40 mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 20 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 60 mg, $(NH_4)_2SO_4$ 1.98 g, および Biotin 40 μg を加える。

B 液: 蒸留水 2000 ml に K_2HPO_4 30.95 g, KH_2PO_4 2.85 g, p-アミノ安息香酸 40 μg を溶かす。

2.2.2 試験方法: 試料 2mg を加えた 10 ml の A 液および 10 ml の B 液, また, コントロールとして試料を含まない A 液および B 液を各試験管にとり, オートクレープ中, 121~123°C, 1.2 kg/cm² で 45 分間加圧滅菌する。ついで, これら A, B 両液を無菌箱内でふりまぜフラスコに入れ, 混合して培地とする。この培地に *B. polymyxa* を 1 ml 加え, 恒温ふりまぜ器中, 30°C で 24 時間, 48 時間培養し, 増殖におよぼす試料の影響を調べる。

2.2.3 抗菌試験の評価: 試料が *B. polymyxa* の発育を抑制するか否かの判定は, 分光計を用いて, 660 nm における吸収強度の増減を測定して行なった。すなわち, 菌が増殖すると培地の濁度は大きくなるが, 発育が抑制されると培地の濁度が低下することに基づいている。ここに, 濁度を吸光度 (A_s) で示し, T を透過度とすると

$$A_s = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I_1}$$

で表わされ, I_0 , I_1 はそれぞれ, 入射光と透過光の強度である。

2.3 機器分析

NRR は日本電子製 JNH-MH-60 型で, 元素分析は柳本製 CHN レコーダー MT 2 型で, 融点は柳本製微量融点測定装置で, また濁度は島津製 UV-200 S で測定した。

3 結果と考察

ピロリジノン骨格をもつ [2] およびそのメタクリレート [3] は, いずれも水に不溶のため, アンモニアやトリエチルアミンによってアンモニウム塩 [4]~[7] とし, *B. polymyxa* に対する抗菌試験を試みた。抗菌試験は嫌気的条件 (窒素雰囲気下) で行ない, [4]~[7] を培養液に加えたときの *B. polymyxa* の増殖の程度は, 分光計による濁度で決定したが, Thoma の血球板を用いても, 増殖率の評価にいちじるしい差異は認められなかった。結果を表 1 にまとめる。ここに, 試料濃度を 10 r/ml と 100

Table 1 Antibacterial test of [4]~[7] to *B. polymyxa* in Winogradsky's medium at 30°C

Sample	Concentration (r/ml)	$A_s-1^a)$	$A_s-2^a)$
[4 a] X=H	100	1.05	1.29
	10	1.05	1.34
[4 b] X=Me	100	0.63	1.29
	10	0.93	1.44
[4 c] X=Cl	100	0.94	1.32
	10	1.02	1.40
[5 a] X=H	100	1.06	1.26
	10	1.07	1.53
[5 b] X=Me	100	0.86	1.13
	10	0.86	1.52
[5 c] X=Cl	100	1.03	1.48
	10	1.08	1.53
[6 a] X=H	100	1.10	0.90
	10	1.17	1.40
[6 b] X=Me	100	0.92	0.85
	10	0.97	1.23
[7 a] X=H	100	0.89	1.08
	10	0.91	1.35
[7 b] X=Me	100	0.16	0.53
	10	0.91	1.28
Control	—	1.18	1.60

a) A_s-1 and A_s-2 represent the turbidity after cultivation for 24 and 48 h, respectively.

r/ml としたのは任意的であるが, この程度の濃度で 70~80% の菌の増殖が停止されれば抗菌剤として有効とみなせるであろう。また表中, A_s-1 , A_s-2 はそれぞれ 24 時間および 48 時間培養したときの濁度であり, コントロールは試料無添加のときの濁度である。

24 時間での結果, [4b] は 100 r/ml のとき, 明らかに *B. polymyxa* の増殖を阻害しているが [4a] は濁度に有意差は認められない。また, 48 時間ではすべての [4] に抗菌作用が明確には認められない。同様のことが [5] の 3 種についてもいえる。しかし, メタクリレート [6] および [7] は [4] や [5] より成績がよく, とくに [7b] を 100 r/ml 加えた場合により結果が得られ, 24 時間では 80% 以上の *B. polymyxa* の成長が阻害されている。

以上の結果から, ピロリジノン骨格にトリル基を導入し, メタクリレート化した誘導体が *B. polymyxa* の成長阻害に効果があることがわかる。しかし, ピロリジン誘導体が菌の成長における a) タンパク質合成の段階, b) 代謝物 (*B. polymyxa* では 2,3-ブタンジオール) 生成の段階, c) 呼吸系のいずれのステップに影響を与え, 抗菌性を示すのかは不明で目下検討中である。

なお, 抗菌試験について御指導いただいた近畿大学工学部新谷良雄氏に深謝する。

19) S. Hino, *J. Biochem.*, 47, 482(1960).

Antibacterial Activity of Vinyl Monomers Having a Pyrrolidinone Structure

Kazuo SUGIYAMA

*Faculty of Engineering, Kinki University ;
Hiro, Kure-shi 737-01 Japan*

In order to obtain a new pharmacologically active polymer, 1-aryl-5-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-2-oxopyrrolidine-4-carboxylic acid [2] and their methacrylates [3] were prepared. The ammonium salts of [2] and [3] were submitted to the antibacterial activity test to *Bacillus polymyxa* strain Hino using a modified Winogradsky's medium. Triethylammonium 5-[3-methoxy-4-(methacryloyloxy)phenyl]-1-tolyl-2-oxopyrrolidine-4-carboxylate [7 b] showed the highest antibacterial activity.

~~~~~