

2, 2'-methylene-bis-(3, 4, 6-trichloroacetoxy benzene)의 nitroaniline 계 mannich bases 에 관한 연구

1. 합성 및 항균성

유 주 현·김 유 삼·김 종 호*·양 용
연세대학교 식품공학과·*경희대학교 화학과

Studies on Nitroaniline derivative of 2, 2'-methylene-bis-(3, 4, 6-trichloroacetoxy benzene by Mannich reaction

Part I. Synthesis and Antimicrobial activity

by

Ju-hyun Yu, Yu-sam Kim, Jong-ho Kim* and Ryung Yang

Dept. of Food Engineering, Yon Sei University. *Dept. of Chemistry, Kyung Hee University

(Received September 25, 1973)

Abstract

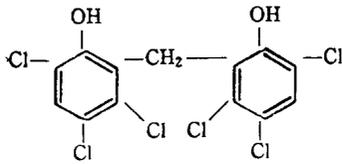
Four new compounds; 2, 2'-methylene-bis [3, 4, 6-trichloro (β -(*o*-nitroanilino) propionoxy) benzene]; m.p. 200~202°C, $C_{31}H_{22}O_8N_4Cl_6$ 2, 2'-methylene-bis [3, 4, 6-trichloro (β -(*p*-nitroanilino) propionoxy) benzene]; m.p. 168-170°C, $C_{31}H_{22}O_8N_4Cl_6$; 2, 2'-Methylene-bis [3, 4, 6-trichloro (β -(*o*-chloro-*p*-nitroanilino) propionoxy) benzene]; m.p. 170.5-172.5°C, $C_{31}H_{20}O_8N_4Cl_8$; 2, 2'-Methylene-bis [3, 4, 6-trichloro (β -(*c*-methyl-*p*-nitroanilino) propionoxy) benzene]; m.p. 163-164°C, $C_{33}H_{26}O_8N_4Cl_6$ -were synthesized by Mannich reaction from 2, 2'-Methylene-bis (3, 4, 6-trichloroacetoxy benzene) and their antimicrobial activities against the microorganisms -*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* Natto, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Pseudomonas ovalis*, *Aspergillus candidus* Link, *Aspergillus awamori* Nakazawa, *Aspergillus niger* var. Tieghem, *Aspergillus usami* Sakakuchi, *Penicillium notatum*-were tested.

2, 2'-methylene-bis [3, 4, 6-trichloro (β -(*o*-nitroanilino) propionoxy) benzene] showed a strong antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* Natto and *Brevibacterium ammoniagenes*.

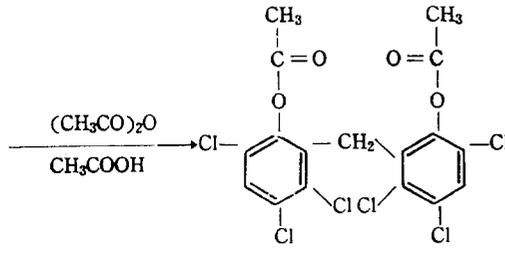
서 론

194년 Florey 가 Penicillin 을 재발견하고 1941년에는 Waksman 이 Actinomycin 을 발견한 이래 항균제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 그 용도 또한 다양하여 의약품은 물론 발육촉진제, 농약, 식품의 보존 등에 널리 사용되고 있다.⁽¹⁾ 그러나 Waksman 은 이전부터 Phenol 및 Cresol 계 화합물의 항균작용에 대하여 보고 하였다. 특히 그는 chlorophenol 계 화합물 및 그 금속 염등이 이상적인 살균제라고 지적하였다. 그에 의하여 Phenol 계 화합물로서 Pentachlorophenol,⁽²⁾ 2, 4, 5-trichloro phenol,⁽³⁾ *o*-phenylphenol, 2-chloro-4-phenyl phenol-Na,⁽⁴⁾ 2, 2'-dihydroxy-5, 5'-dichlorodiphenyl methane⁽⁵⁾ 등의 항균작용이 보고 되었던 것이다. 그 뒤에 1944년에는 Gamp 에 의해서 hexachlorophene 의 강력한 항균성이 보고 된 바 있다.⁽⁶⁾ 이와같이 多種의 우수한

항균제의 출현으로 이 항생물질에 대한 연구는 다소 위축된 감도 없지 않았으나 최근 Noone 은 항균제에 의해서 내성이 생긴 균주에 대하여 의용살균제로서 hexachlorophene 이 현저한 효과를 나타내었다고 보고 하였다.⁽⁷⁾ 그러나 hexachlorophene 에도 여전히 여러가지 단점을 수반하고 있어 보다 단점이 적으며, 보다 항균력이 강하고 보다 광범하게 사용 할 수 있는 것, 특히 식품보존등에 까지도 이용 될 수 있는 항균제의 합성이 가능하다고 보고 유등은 이미 2, 2'-methylene-bis(3, 4, 6-trichloroacetoxy benzene)의 hydroxyamine 유도체에 대하여 보고 하였다. 본 연구에서는 2, 2'-methylene-bis(3, 4, 6-trichloroacetoxy benzene)을 모체로하여 Mannich 반응⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾에 의하여 nitroaniline 계의 새로운 화합물을 합성하였고 이들의 항균성을 조사 하였기에 그 결과를 보고한다.



Hexachlorophene



2,2'-Methylene-bis(3,4,6-trichloroacetoxy benzene)

재료 및 실험방법

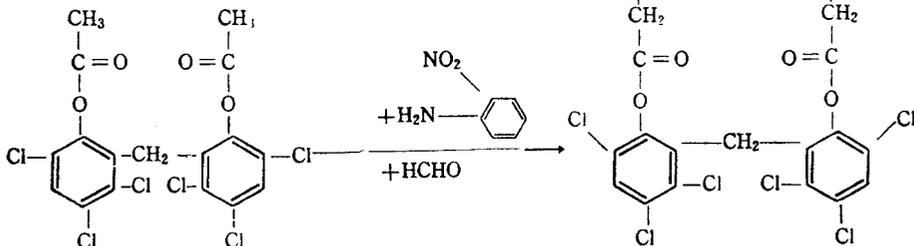
Mannich base 의 합성법

새로운 화합물의 합성을 위한 모체로서는 2,2'-methylene-bis(3,4,6-trichloroacetoxy benzene) [약호 MTAB]을 사용하였다 본 화합물은 이미 보고된 합성법⁽¹¹⁾에 따라서 hexachlorophene 을 acetic acid 에 용해시킨 후 acetic anhydride 존재하에서 수욕상에서 12시간 반응시켜 합성, 정제한 것을 사용 하였다.

합성된 2,2'-methylene-bis(3,4,6-trichloroacetoxy benzene)과 para formaldehyde 에 4종류의 nitro aniline 계 화합물을 각각 넣어서 Mannich 반응법⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾에 따라서 새로운 4종류의 화합물을 합성하였다.

항균성검정균주 : 항균성검정에 사용된 균주로는 *Staphylococcus aureus* Pfiger 0538-2090, *Escherichia coli* NCDC 0111B4, *Bacillus subtilis* Natto 11-6 IAM 136, *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6871, *Candida tropicalis* IAM4862, *Rhodotorula glutinis* IAM4642, *Pseudomonas ovalis* IAM1002, *Aspergillus candidus* Link IAM2174, *Aspergillus awamori* Nakazawa IAM 2299, *Aspergillus niger* Var. Tieghem IAM 2109, *Aspergillus usami* Sakakuchi IAM 2186, *Penicillium notatum* VAI-1 IAM7176을 사용했다.

항균성검정법 : 합성된 새로운 화합물에 대한 항균성



수율 : 68%, MP : 200~202°C, Kjeldahl 법에 의한 질소함량 : 3.75%(이론치 3.66%), 황색결정 : C₃₁H₂₂O₈N₄Cl₆, M.W : 791. λ_{Max} : 292, 380(mμ)

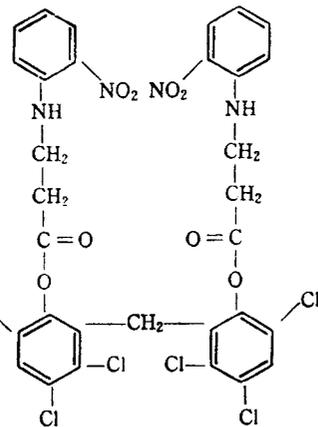
의 검정은 Paper disc 법⁽¹¹⁾을 사용하였으며, 즉 합성화합물이 흡착된 Paper disc 를 검정균이 산포된 한천평판 위에 놓고 Paper disc 주위에 형성되는 clear zone 의 직경을 측정하여 이것으로서 항균성을 표시하였다.

최소억제농도(Minimum inhibitory concentration)의 결정법 : 최소억제농도의 결정은 일반적으로 희석법을 사용하고 있으나 본 연구에서는 paper disc 에 농도가 다른 용액을 흡착시켜서 disc 주위에 clear zone 이 생기는 부분과 생기지 않는 부분을 구별하여 clear zone 이 생기는 최소 흡착액의 농도로서 표시하였다.

결과 및 고찰

2,2'-Methylene-bis(3,4,6-trichloro{β-(o-nitropropionoxy)benzene}(약호 MTNPB)의 합성

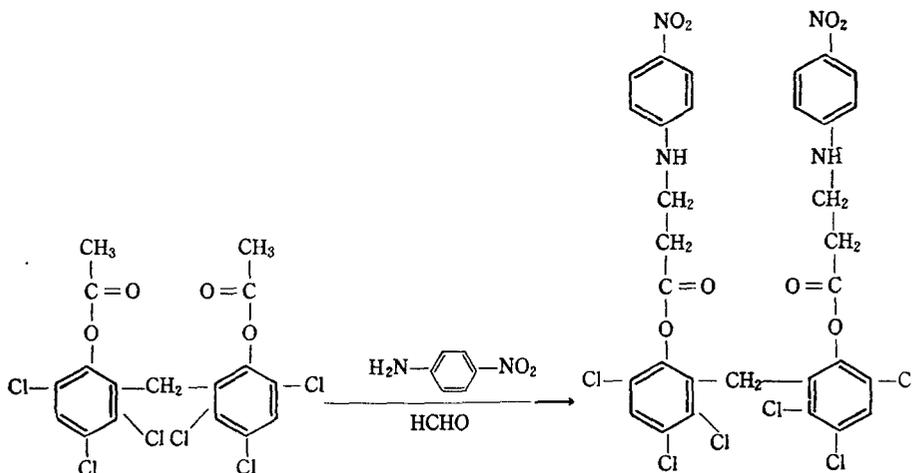
2,2'-Methylene-bis(3,4,6-trichloro acetoxy) 4.91g, para formaldehyde (0.6g 과 o-nitroaniline 2.37g 을 Ethanol 200ml 에 가온하여 녹인후 ethanolic-HCl 0.25ml 을 가한 다음 6시간 동안 환류 반응시키고 생성된 결정을 dimethyl formamide 와 물의 1 : 1 혼합용매로서 재결정시켜 정제하여 황색의 2,2'-methylene-bis[3,4,6-trichloro{β-(o-nitroanilino)-propionoxy}benzene] 결정을 얻었다.



2, 2'-Methylene-bis [3, 4, 6-trichloro{β-(p-nitroanilino) propiony} benzene]의 합성 : (약호 MTN²PB)

2, 2'-Methylene bis(3, 4, 6-trichloro acetoxy benzene)
4. 91g para-formaldehyde 0.6g 과 p-nitroaniline 2.37g
을 ethanol 200ml 에 가온 용해시킨후 ethanolic-HCl

0.25ml 을 가한다음 6시간동안 환류 반응 시키고 생성된 결정을 ethanol-H₂O(1 : 1)의 혼합용매로서 재결정하여 정제된 엷은 황색의 2, 2'-methylene-bis[3, 4, 6-trichloro{β-(p-nitroanilino) propiony} benzene] 결정을 얻었다.

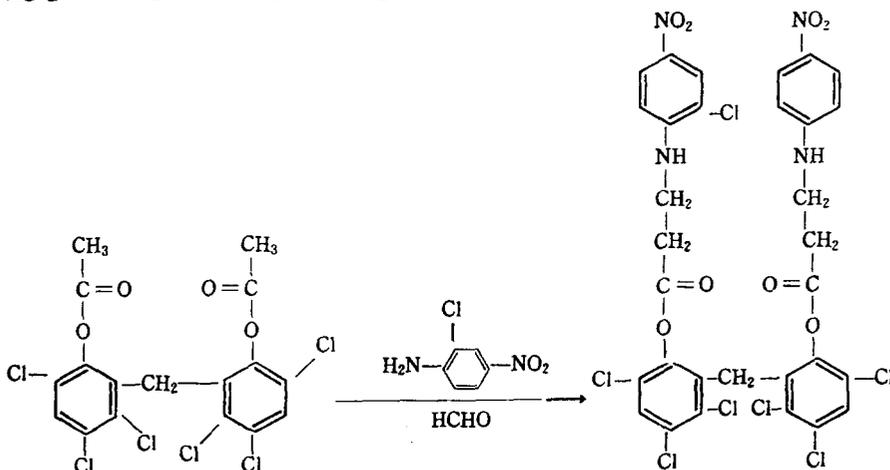


수율 : 54%, MP : 168~170°C kjeldahl 법에 의한 질소함량 : 3.52%(이론치 3.66%), 엷은황색결정 : C₃₁H₂₁O₈N₄Cl₆, M.W : 791, λ_{max} : 292, 410(mμ)

2, 2'-Methylene-bis[3, 4, 6-trichloro{β-(o-chloro-p-nitroanilino) propiony} benzene]의 합성(약호 MTCN PB)

2, 2'-Methylene-bis(3, 4, 6-trichloroacetoxy benzene)
4. 91g para formaldehyde 0.6g 과 o-chloro-p-nitroanilino 3.51g 을 ethanol 200ml 에 가온 용해 시킨후 etha-

nolic-HCl 0.25ml 을 가한다음 6시간동안 환류반응시키고 생성된 결정을 ethanol-H₂O(1 : 1)의 혼합 용매로서 재결정하여 백색의 2, 2'-Methylene-bis[3, 4, 6-trichloro{β-(o-chloro-p-nitroanilino) propiony} benzene]결정을 얻었다.

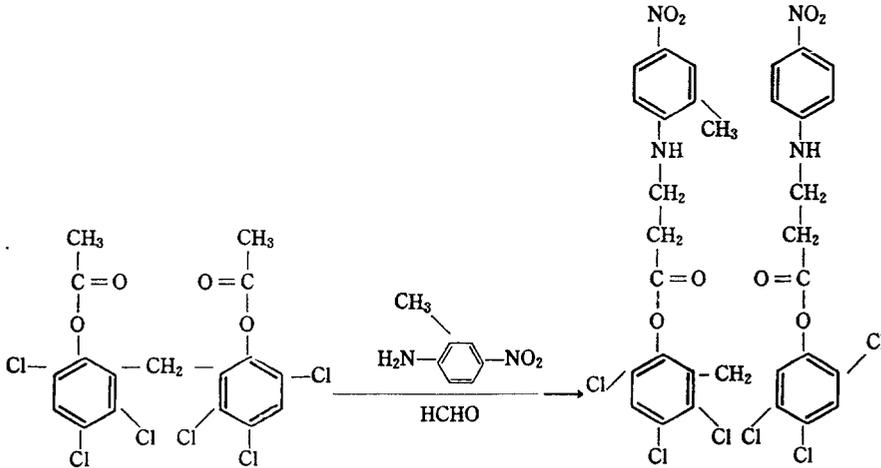


수율 : 52% MP : 170.5-172.5°C, kjeldahl 법에 의한 질소함량 : 3.2% 이론치(3.14%), 백색결정 : C₃₁H₂₁Cl₈N₄, M.W : 860, λ_{max} : 292, 370(mμ)

2,2'-Methylene-bis [3,4,6-trichloro{β-(o-methyl-p-nitroanilino) propionoxy}benzene]의 합성(약호 MTMN PB)

2,2'-Methylene-bis (3,4,6-trichloroacetoxy benzene) 4.91g 을 ethanol 200ml 에 가온용해시킨후 ethanol-HCl

0.25ml 을 가한다음 6시간동안 환류 반응시키고 생성된 결정을 ethanol-H₂O(1:1)의 혼합용매로서 재결정하여 정제된 주황색의 2,2'-Methylene-bis[3,4,6-trichloro{β-(o-methyl-p-nitroanilino) propionoxy}benzene] 결정을 얻었다.



수율 : 59%, MP: 163~164°C Kjeldahl 법에 의한 질소함량 : 3.1%(이론치 3.17%), 주황색 : C₃₂H₂₆O₈N₁₄Cl₆, M.W : 819, λ_{max} : 292, 440(mμ)

Table 1. Antimicrobial Spectrum of Mannich bases form 2,2'-Methylene bis(3,4,6-trichloroacetoxy benzene)

Microorganisms	Sample	Hexachlorophene	MTAB	MTN ^O PB	MTN ^P PB	MTCN PB	MTM NPB
<i>Staphylococcus aureus</i> Pfizer 0538-2090		10	7	8.5	7	7	7
<i>Escherichia coli</i> NCDC 011184		9	9	7	7	7	7
<i>Bacillus subtilis</i> Natto 11-6 TAM 1136		10	7	7.5	7	7	7
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> ATCC 6871		—	—	12	8	7	8
<i>Candida tropicalis</i> IAM 4862		7	7	7	7	7	7
<i>Rhodotorula glutinis</i> IAM 4642		7	7	7	7	7	7
<i>Pseudomonas ovalis</i> IAM 1002		10	8	10	7	7	7
<i>Aspergillus candidus</i> Link IAM 2174		—	—	7	7	7	7
<i>Aspergillus awamori</i> Nakazawa IAM 2299		—	—	7	7	7	7
<i>Aspergillus niger</i> var Tieghem IAM 2109		—	—	7	7	7	7
<i>Aspergillus usami</i> Sakakuchi IAM 2186		—	—	7	7	7	7
<i>Penicillium notatum</i> VAI-1 IAM 7176		—	—	7	7	7	7

Number: Diameter of clear zone (mm)

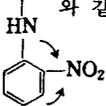
MTMNPB: 2,2'-Methylene-bis[3,4,6-trichloro{β-(o-methyl-p-nitroanilino) propionoxy}benzene]

MTAB: 2,2'-Methylene-bis (3,4,6-trichloroacetoxy) benzene

MTN^OPB: 2,2'-Methylene-bis[3,4,6-trichloro{β-10-nitroanilino) propionoxy} benzene]

MTN^PPB: 2,2'-Methylene-bis [3,4,6-trichloro{β-(p-nitroanilino) propionoxy} benzene]

MTCNPB: 2,2'-Methylene-bis [3,4,6-trichloro{β-(o-chloro-p-nitroanilino) propionoxy} benzene]

검정균주에 대한 Mannich bases 의 항균성
 항균성검정에 사용된 균들은 세균은 nutrient broth
 C pH 7.0150ml 에 접종 35°C 에서 12시간 전탕배양한 것
 을 점종균액으로 사용하였고 효모 및 곰팡이들은 Koji
 추출액(pH5.0) 50ml 에 접종하고 30°C 에서 24시간 전
 탕배양한 것을 검정균액으로하여 petri dish 에 만들어진
 nutrient agar(pH 7.0)와 koji agar(pH5.0)의 2mm
 두께 판상에 각각 검정균액을 부은 다음 여기에 7mm
 직경의 100µg/ml 의 시료가 흡수된 여과지의 disc 를 놓
 고 세균은 12시간 효모와 곰팡이는 24시간 배양시킬 때
 paper disc 주위에 생성된 clear zone 의 직경(paper
 disc 직경포함)은 Table 1과 같다. paper disc 에 시료를
 흡수시킬 때는 시료들이 물에 대한 용해도가 낮기 때문
 에 95% ethanol 에 가열용해시켜서 여기에 paper disc
 를 넣어 시료가 흡수되도록 하였다. Table 1에 나타난
 바와 같이 MTN^{OPB} 가 *Staphylococcus aureus* 와 *Baci-*
illus subtilis, *Brevibacterium ammoniagenes* 등의 세균
 에 대하여 또 *Pseudomonas ovalis* 에 대하여 비교적 높
 은 항균성을 나타냈다. 이것은 구조상으로 서로 비슷한
 4가지 화합물 중에서 ortho 위치에 존재하는 -NO₂라
 는 electron acceptor radical 이 항균성에 관계된다고
 본다. 즉  와 같이 전자를 끌어 주므로서 항균성

이 높아지는 것을 예측할 수 있다. ortho 와 para 사이
 의 항균성의 차이는 전자를 끌어주는 강도에 따라서 달
 라지는 것으로 추정된다.

특히 ortho 에 Cl 이라는 electron donor radical 이 있
 을때는 para 에 -NO₂ 가 있다하여도 검정된 모든 균주
 에 대하여 항균성이 전혀 없었고 -CH₃ group 는 -Cl
 보다도 전자를 밀어주는 힘이 큰데 이 때는 *Brevibac-*

terium ammoniagenes 에 대하여 디소 항균성이 있었을
 뿐이었다.

최소억제농도

합성된 새로운 4종의 화합물중 2,2'-Methylene-bis
 {β-(o-nitroailino) propionoxy} benzene 을 제외하고
 는 항균제로서의 가치가 없는 것으로 보고 이 물질에
 대한 최소억제 농도를 측정해 본 결과 table 2와 같았다
 table 2에서 보는 바와 같이 *Staphylococcus aureus*
Bacillus subtilis, *Brevibacterium ammoniagenes* 에 대하
 여는 MTN^{OPB} 가 최소한 1µg/ml 의 농도는 되어야만
 항균성을 나타낼 수 있다는 것을 알 수 있었다.

결 론

2,2'-Methylene-bis(3,4,6-trichloroacetoxy benzene)
 을 모체로 하여 Mannich 반응을 통하여 2,2'-Methylene-
 bis[3,4,6-trichloro{-(o-nitro anilino) propionoxy}
 benzene], 2,2'-Methylene-bis [3,4,6-trichloro{β-(p-
 nitroanilino) propionoxy} benzene], 2,2'-Methylene-bis
 [3,4,6-trichloro{β-(o-chloro-p-nitroanilino)propionoxy
 } benzene], 2,2'-Methylene-bis [3,4,6-trichloro{β-(o-
 -Methyl-p-nitroanilino) propionoxy} benzene] nitro-
 aniline 계 화합물을 합성하였고 그 물성을 측정 하였으
 며 이들 새로운 화합물을 paper disc 에 흡착시켜 paper
 disc 법에 의해서 측정한 항균성은 2,2'-Methylenebis
 [3,4,6-trichloro{β-(o-nitroanilino) propionoxy} ben-
 zene] 이 대체로 검정된 균주들에 대하여 높았었고 이
 물질의 최소억제농도는 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*
subtilis, *Brevibacterium ammoniagenes* 에 대하여 1µg
 /ml 이상이어야 항균성을 나타낼 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) 田中信男, 中村昭四郎: 抗生物質大要, 東京大學出版會 (1967).
- 2) Carswell, T.S. and Nason, H.K: *Ind, Eng, Chem*, **36** 622 (1938).
- 3) Pokorng: *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 1768 (1941).
- 4) Colbert, J.C. and Locy, R.M: *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 270 (1964).
- 5) Engel, R.A and Gum. W.S: *Am. Dyestuff Soc. Rptr.*, **30** 163 (1947).
- 6) Gump. W.S: *USP*, **2**, 353 725 (1944).
- 7) Noone,: *P. Pharm. J. (London)* **205**, 118 (1970).
- 8) 柳洲鉉, 金鍾浩, 李碩榮: 한국식품과학회지, **4**, 72 (1972).
- 9) Mannich, C. and Krosche, W.: *Arch. Pharm.*, **250**, 647 (1912).

table 2. 2,2'-Methylene-bis[3,4,6-trichloro{β-(O-nitroanitino) propionoxy}benzene]의 최소억제농도

MTN ^{OPB} 의 농도(µg/ml)	100	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²
* <i>Staphylococcus aureus</i> Pfizer 0.538-2090	8.5	+	+	+	-
* <i>Bacillus subtilis</i> Natto 11-6 IAM 1136	7.5	7.5	+	+	-
* <i>Brevibacterium ammo-</i> <i>niagenes</i> ATCC 6811	12	9	+	-	-

* 배양시간 24시간 * 배양온도 35°C nutrient agar 평판(두께 2mm),
 +: 직경은 측정 할 수 없으나 분명히 균의 생육이 억제됨을 보인 농도
 -: 전혀 항균력이 나타나지 않는농도

- 10) House. H.O and Trost. B.M: *J. Org. Chem.*, **29**,
B39 (1964). 51 (1973).
- 11) Yu.J. Kim.J.H. Sa.H. Yun.H.J. Yang.R. and
Kim.Y.S.: *Korean J. Appl. Microbiol Bioeng.*, **1**,
- 12) Kim. J. H. Bae. M. Lee. K. J. : *Korean J. Appl.
Microbiol Bioeng.*, **1**, 43 (1973).