

2, 2'-Methylene bis(3, 4, 6-trichloroacetoxy benzene)의 Hydroxyamine 유도체에 관한 연구

제 1 보 합성 및 항균성

柳洲炫 · 金鍾浩* · 李碩榮**

연세대학교 식품공학과 · *경희대학교 화학과 · **전북대학교 농화학과

(1972년 2월 29일 수리)

Studies on Hydroxyamine Derivatives of 2, 2'-Methylene bis(3, 4, 6-trichloroacetoxy benzene)

Part 1. Synthesis and Antimicrobial Sensitivity

Juhyun Yu, Jong Ho Kim* and Suk Young Lee**

Department of Food Engineering, Yonsei University, *Department of Chemistry, Kyung Hee University, and **Department of Agricultural Chemistry, Chunbuk National University

(Received February 29, 1972)

Abstract

Seven new hydroxyamine derivatives of 2, 2'-methylene bis(3, 4, 6-trichloroacetoxy benzene) were synthesized by the Mannich reactions. 13 strains of microorganisms were tested for sensitivity to these derivatives by both paper disk method and tube dilution method. Of these compounds, -NHOH compound displays the most effective antimicrobial activity in vitro against *Brevibacterium ammoniagenes*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. Its minimal inhibitory concentration is 1.6 µg/ml for *Brevibacterium ammoniagenes*, and 5 µg/ml for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.

緒 論

Phenol 및 cresol계 화합물이 고대로부터 강한 항균 작용이 있음이 보고된 이래 chlorophenol계 화합물 및 그 금속염 등이 이상적인 살균제로 보고되어 왔다.

Carswell 및 Nason(1938)⁽¹⁾ 등은 pentachlorophenol의 항균성, Porkorny(1941)⁽²⁾ 는 2, 4, 5-trichlorophenol Zn염의 항균성, Colbert (1946)⁽³⁾ 등은 o-phenylphenol 및 2-chloro-4-phenylphenol Na염의 항균성, R.A. Engel (1947)⁽⁴⁾ 및 Goldworthy (1949)⁽⁵⁾ 등은 2, 2'-dihydroxy-5, 5'-dichlorodiphenyl methane의 항균작용

등을 보고하였다. 그후 Gump (1944)^(6,7) 는 hexachlorophene의 강력한 항균성을 보고한 이래 Marsh^(8,9) (1946~9) 등은 hexachlorophene, bithionol 등을 포함한 bisphenol 유도체의 항균성을 화학구조적으로 비교 보고하였으며 Gregg 등 (1951)⁽¹⁰⁾, Grubb 등⁽¹¹⁾ (1952), Lawrence 등^(12,13) (1953) 은 hexachlorophene, 및 bithionol의 항균성을 용도별로 실험 보고하였다. 최근에 Noone⁽¹⁴⁾ (1970) 은 항생물질에 의한 내성(耐性)균주에 대하여 외용(外用) 살균제로서 hexachlorophene이 현저한 효과를 나타내었다고 보고하였다.

그러므로 저자들은 강력한 살균작용을 가진 hexachl-

orophene으로부터 그 유도체인 2,2'-methylene bis(3,4,6-trichloroacetoxy benzene)을 합성한 후 이것을 모체 화합물로 하여 Mannich반응으로⁽¹⁵⁾ 7가지 새로운 화합물을 합성하여 항균성을 조사하였다.

실 험 방 법

[I] 합성법

2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro-(*N*-*o*-hydroxy phenylaminopropionoxy) benzene]는 2,2'-methylene bis (3,4,6-trichloroacetoxy benzene) [이하 MTAB] 4.91 g (0.01 mol), *o*-aminophenol 2.18 g (0.02 mol), paraformaldehyde 0.6 g (0.02 mol)을 95% ethanol에 가온 용해시킨 후 ethanolic-HCl 0.25 ml를 가하고 magnetic stirrer 장치에서 45°C로 15시간 reflux하여 생긴 결정물을 ethanol로 재결정하여 백색 침상결정을 얻었다.

2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro-(*N*-*m*-hydroxy phenylaminopropionoxy) benzene], 2,2'-methylene bis [3,4,6-trichloro-(*N*-*p*-hydroxyphenylamino propionoxy) benzene], 및 2,2'-methylene bis [3,4,6-trichloro-(*N*-*p*-methoxyphenylaminopropionoxy) benzene]등도 동일한 방법으로 합성하였다.

2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro-(hydroxyl amino propionoxy) benzene]은 MTAB 4.91 g (0.01 mol), hydroxylamine hydrochloride 1.38 g (0.02 mol), paraformaldehyde 0.6 g (0.02 mol)을 methanol에 가온용해시킨 후 magnetic stirrer장치에서 50°C로 10시간 reflux하여 방냉(放冷)할 때 생성된 침전을 ethanol로 재결정하여 백색결정을 얻었다.

2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro (ethanolamino propionoxy) benzene], 2,2'-methylene bis [3,4,6-trichloro (diethanolaminopropionoxy) benzene] 등도 동일한 방법으로 합성하였다.

[II] 항균성 실험

a. 검정균주

Bacteria의 검정균주는 *Bacillus subtilis* Natto 11-6 IAM 1136, *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6871, *Pseudomonas ovalis* IAM 1002, *Staphylococcus aureus* Pfizer 0538~2090, *Staphylococcus aureus* Stf. 등을 사용하였고, 곰팡이의 균주로는 *Asp. awamori* Nakazawa IAM 2299, *Asp. candidus* Link IAM 2174, *Asp. nigar var. Tieghem* IAM 2109, *Asp. usami* Sakaguchi IAM 2186, *Asp. awamori* 14-1 KO 904를 사용하였다. 효모의 균주로는 *Candida tropicalis* IAM 4862, *Rhodotorula glutinis* IAM 4642를 사용하였다.

b. 배지

bacteria검정용 고체배지는 beef extract 3g과 peptone 5g 및 agar 15g을 물 1000 ml에 용해시켜 pH 7로 조절하여 사용하고, 곰팡이와 효모용 배지는 koji extract에 포도당 1%, 한천 2%가 되도록 첨가한 다음 pH 5로 조절하여 사용하였다. 액체배지는 nutrient broth 2.5%, 포도당 1% 용액을 pH 7로 조절하여 사용하였다. 이들의 모든 배지를 autoclave에 넣어서 1.5 kg/cm²에서 15분간 살균하였다.

c. 항균력 측정

1) Paper disk method^(16,18): 고체배지 5 ml를 멸균용해시켜서 petri dish에 부어서 평판배지를 만들고 균을 접종한 후, 그 배지위에 각 합성화합물의 acetone 용액 (1 mg/ml)을 흡착시켜서 말린 paper disk(지름: 7 mm)를 얹어 놓고 37°C에서 18시간 배양시킨 다음 disk 둘레에 나타난 clear zone의 크기를 측정하여 항균성을 검사하였다.

2) Tube dilution method^(17,19): 각 합성화합물의 acetone 용액과 0.05% Tween 60 수용액을 서로 같은 부피비로 섞어서 잘 혼든 다음 15분간 끓여서 acetone을 증발시켜 합성화합물의 현탁액을 만든다. 그 후 액체배지 2.7 ml를 시험관(1×10 cm)에 넣고 위에서 만든 여러 가지 농도의 현탁액 0.3 ml를 첨가하여 화합물의 최종 농도가 0.2~20 µg/ml 범위로 되게끔 조제하고, 균을 접종하여 37°C에서 배양하면서 Spectronic 20를 사용하여 1시간마다 측정한 660 mµ에서의 O.D. 값으로 균의 생육 억제 여부⁽²¹⁾를 검토하여 M.I.C. (minimum inhibitory concentration)를 결정하였다.

결 과 및 고 찰

2,2'-Methylene bis(3,4,6-trichloroacetoxy benzene)유도체의 물리화학적 성질: 이미 기지화합물인 2,2'-methylene bis(3,4,6-trichloroacetoxy benzene)을 모체 화합물로 하여 *o*-hydroxyphenylamine *m*-hydroxyphenylamine, *p*-hydroxyphenylamine, *p*-methoxyphenylamine, hydroxylamine, ethanolamine, diethanolamine을 paraformaldehyde와 같이 각각 Mannich반응시켜 된 합성화합물의 질소분석치와 질소계산치와의 차는 Table 1에 표시한 바와 같이 0.5%이하이므로 구조식의 R 위치에 각각 *o*-HOC₆H₄NH-, *m*-HOC₆H₄NH- *p*-HOC₆H₄NH-, *p*-CH₂OC₆H₄NH-, HONH-, HOCH₂CH₂NH-, (HOCH₂CH₂)₂N-가 결합되었다고 할수 있다.

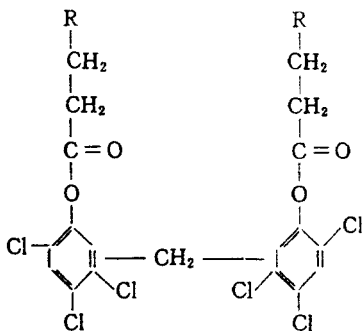
1962년 Kim⁽²⁰⁾ 등에 의하여 모체화합물인 2,2'-methylene bis(3,4,6-trichloroacetoxy benzene)에 대한 연구가 발표된 후 현재까지 이의 유도체에 대한 합성연

Table 1. Physical and chemical properties of synthesized compounds

Nomenclature	Radicals (R)※	Recryst. solvent	mp (°C)	Appearance	Yield (%)	Formula	Anal.N. (%)	
							Calcd.	Found
2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro-(N-o-hydroxy phenylaminopropiony) benylene]	o-HO·C ₆ H ₄ NH-	Ethanol	172~4	White needle	57	C ₃₁ H ₂₄ N ₂ O ₆ Cl ₆	3.81	3.73
2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro-(N-m-hydroxy phenylaminopropiony) benzene]	m-HOC ₆ H ₄ NH-	Ethanol	166~8	White crys. pd.	46	C ₃₁ H ₂₄ N ₂ O ₆ Cl ₆	3.81	3.88
2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro-(N-p-hydroxy phenylaminopropiony) benzene]	p-HOC ₆ H ₄ NH-	Ethanol	172~3	White crys. pd.	58	C ₃₁ H ₂₄ N ₂ O ₆ Cl ₆	3.90	8137
2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro-(N-p-methoxy phenylaminopropiony) benzene]	p-CH ₃ OC ₆ H ₄ NH-	Ethanol	166~8	White crys.	63	C ₃₃ H ₂₈ N ₂ O ₆ Cl ₆	3.68	3.71
2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro-(hydroxyl amino propiony) benzene]	HO-NH-	Ethanol	148~150	White crys.	64	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₆ Cl ₆	4.81	4.75
2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro-(ethanolamino propiony) benzene]	HOCH ₂ CH ₂ NH-	Ethanol	156~8	White crys.	71	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₆ Cl ₆	4.39	4.43
2,2'-Methylene bis [3,4,6-trichloro-(diethanol amino propiony) benzene]	(HOCH ₂ CH ₂) ₂ N-	Ethanol	165~7	White crys. pd.	68	C ₂₇ H ₃₂ N ₂ O ₈ Cl ₆	3.86	3.87

※ 구조식에서 R위치에 치환된 radical

구는 발표된 바 없으므로 이들 7가지 유도체는 새로운 화합물이라 생각된다. 이 유도체의 명칭은 각각 국제 명명법에 의하여 명명하고 이들의 명칭 및 물리적 성질은 Table 1에 표시하였다.



Antimicrobial spectrum: 새로 합성한 이들 화합물의 항균성을 검토하기 위하여 여러가지 미생물에 대한 antimicrobial sensitivity를 paper disk method로 조사하였다.

이들 화합물 중에서 -NH·OH기를 가진 화합물이 *Bacillus subtilis*와 *Brevibacterium ammoniagenes* 및 *Staphylococcus aureus*와 같은 세균에 강한 항균력을 나타내었다. Hydroxyaniline 화합물 중에서 -OH기가

ortho 위치에 있는 화합물은 *Bacillus subtilis*에만 항균성이 있고 para위치에 -OH기가 있는 화합물은 전연 어느 균에도 항균성이 없었다. para 위치에 -OCH₃가 있는 화합물은 *Asp. awamori*와 *Candida tropicalis*에 항균성을 나타내었다. -NH·OH, -NH·CH₂·CH₂·OH, 및 -N·(CH₂·CH₂·OH)₂ 화합물 중에서 -NH·OH 화합물은 세균에 대하여 강한 항균력을 나타냈으며 몇가지 곰팡이와 효모에도 항균성을 나타내는데 비하여 나머지 두 화합물은 몇 가지 균주에 대하여 약간의 항균성이 있을 뿐이었다.

M.I.C. 결정: 세균에 대하여 항균성이 강한 -NH·OH 화합물을 택하여 세가지 세균에 대한 농도별 항균성을 paper disk method를 이용하여 조사해본 결과는 Table 3과 같으며 1 mg/ml 이상에서만 항균성을 나타내었다. 이 화합물은 물에 불용성이므로 확산이 잘 되지 않으므로 paper disk method⁽²⁰⁾로는 정확한 M.I.C. 결정이 어려울 것으로 생각된다. 그러므로 tube dilution method에 의하여 이 화합물의 *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes* 및 *Staphylococcus aureus*에 대한 M.I.C.를 결정하기 위하여 액체배지에서 6시간 배양한 후 균의 생육을 측정한 결과(Fig.1) 화합물을 첨가하지 않았을 때는 660 mμ에서 O.D.가 1.9이상 증식

Table 2. Sensitivity of 13 organisms to hydroxyamine derivatives of 2,2'-methylene bis [3,4,6-trichloroacetoxy benzene] at 1 mg/ml when incubated at 37°C for 18 hrs

Test organism	OH		OH		OH		OCH ₃		-NH·OH		-NH·CH ₂ ·CH ₂ ·OH		-N(CN ₂ ·CH ₂ ·OH) ₂	
<i>Bacillus subtilis</i> Natto 11-6 IAM 1136	8	8	7	7	7	7	7	9	7	7	7	7	7	7
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> ATCC 6871	7	8	7	7	7	7	7	12	8	7	7	7	7	7
<i>Pseudomonas avalis</i> IAM 1002	7	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
<i>Staphylococcus aureus</i> Stf	7	8	7	7	7	7	7	10	8	7	7	7	7	7
<i>Staphylococcus aureus</i> Pfizer 0538-2090	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	10	8	7	7	7	7	7
<i>Asp. awamori</i> Nakazawa IAM 2299	7	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
<i>Asp. candidus</i> Link IAM 2174	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
<i>Asp. nigar</i> var. Tieghem IAM 2109	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
<i>Asp. usamii</i> Sakaguchi IAM 21860	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
<i>Asp. awamori</i> 14-1 KO 924	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8
<i>P. notatum</i> VA 1-1 IAM 7176	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	8	7	7	7	7	7	7
<i>Candida tropicalis</i> IAM 4862	7	8	7	7	7	7	8	8	7	7	7	7	7	7
<i>Rhodotorula glutinis</i> IAM 4642	7	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

1. Numbers indicate zone size (mm)
2. The discs measured 7 mm in diameter; therefore, readings of 7 mm indicate no zone of inhibition
3. NT, not tested

Table 3. Results of paper disc susceptibility test with 3 organisms of -NH·OH compound at 4 different concentrations when incubated at 37°C for 18 hrs

Test organisms	1 mg/ml	0.1 mg/ml	0.01 mg/ml	0.001mg/ml
<i>Bacillus subtilis</i> Natto 11-6 IAM 1136	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> Pfizer 0538-2090	+	-	-	-
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> ATCC 6871	+	-	-	-

+, positive; -, negative

되나 첨가화합물의 농도를 높여줌에 따라 생육이 억제되고 어느 일정한 농도 이상에서는 균의 생육을 볼수 없었다. 본 실험조건에서 -NH·OH 화합물의 *Brevibacterium ammoniagenes*에 대한 M.I.C.는 1.6 µg/ml이고, *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus subtilis*에 대한 M.I.C.는 5 µg/ml이었다. 이들 화합물이 동물에 미치는 영향, 식품의 방부제로서의 사용가능 여부, 항암성 및 이들 작용의 mechanism에 대한 연구는 현재 진행중이다.

요 약

2,2'-Methylene bis (3,4,6-trichloroacetoxy benzene)을 모체로 한 7가지 hydroxyamine 유도체의 13가지 균주에 대한 항균성을 paper disk method와 tube dilution method에 의하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1) Hydroxyaniline유도체 중에서 -OH 기가 meta위치

도와주신 한국과학기술연구소 이우성학사님께 깊이 감사할 드립니다.

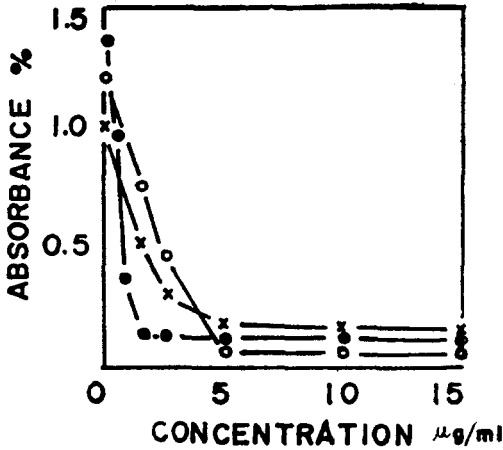


Fig. 1. Results of tube dilution susceptibility tests with 3 strains of bacteria to -NH·OH compound after 6 hrs culture at 37°C: *Brevibacterium ammoniagenes* (M.I.C: 16 μg/ml), *Staphylococcus aureus* (MIC: 5 μg/ml); *Bacillus subtilis* (M.I.C.: 5 μg/ml).

에 있는 유도체가 다른 유도체보다 항균력이 강하고, para위치에 -OH기가 있는 화합물은 전연 어느 군에도 항균력이 없으며, para위치에 있는 -OH기의 H대신에 CH₃-기가 치환된 유도체도 항균력이 별로 강하지가 않았다.

2) -NH·OH, -NH·CH₂·CH₂·OH 및 -N·(CH₂·CH₂·OH)₂화합물 중에서 -NH·OH화합물이 제일 강하고 나머지 두 화합물은 몇 가지 균주에 대하여 약간의 항균력을 나타내었다.

3) 모든 합성화합물 중에서 -NH·OH화합물의 항균력이 제일 강했으며 *Brevibacterium ammoniagenes*에 대한 M.I.C.는 1.6 μg/ml이며 *S. aureus*와 *Bacillus subtilis*에 대한 M.I.C.는 5 μg/ml이었다.



본 실험을 처음부터 끝까지 도와주신 연세대학교 식품공학과 김유삼선생님과 홍철숙양 그리고 합성실험을

인 용 문 헌

- 1) Carswell, T. S. and Nason, H. K.: *Ind. Eng. Chem.*, **30**, 622 (1938).
- 2) Pokorny: *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 1768 (1941).
- 3) Colbert, J. C. and Lacy, R. M.: *J. Am. Chem.*, **68**, 270 (1964).
- 4) Engel, R. A. and Gump, W. S.: *Am. Dyestuff Soc., Rept.*, **30**, 163 (1947).
- 5) Goldsworthy and Gertler: *Plant Disease Rept., Supplement*, **182**, 89 (1949).
- 6) Gump, W. S.: *U.S.P.* 2,353,725 (1944).
- 7) *Chem. Abstr.*: **38**, 2667 (1944).
- 8) Marsh, P. B. and Butler, M. L.: *Ind. Eng. Chem.*, **38**, 701 (1964).
- 9) Marsh, P. B., Butler, M. L. and Clark, B. S.: *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 2176 (1949).
- 10) Gregg, Zopf: *J. Am. Ph. A.*, **40**, 390 (1951).
- 11) Grubb, et al.: *J. Am. Ph. A.*, **41**, 59 (1952).
- 12) Lawrence, Erdlandson: *J. Am. Ph. A.*, **42**, 352 (1953).
- 13) Lawrence, Erdlandson: *Science*, **18**, 274 (1953).
- 14) Noone, P.: *Pharm. J.(London)*, **205**, 118 (1970).
- 15) Adams, R., Bachmann, W. E., Johnson J. R., Fieser, L. F. and Snyder, H. R. *Org. React.*, **6** (1), 303 (1957).
- 16) Pelczar and Reid: *Microbiology*, McGraw-Hill Book Co., New York, 348~350 (1965).
- 17) Buckley, D. and Thomas, J.: *Appl. Microbiol*, **21**, 565 (1971).
- 18) Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Turck, M.: *Am. J. Chem. Pathol.*, **45**, 493 (1966).
- 19) Traub, W. H.: *Appl. Microbiol.*, **29**, 89 (1970).
- 20) Kim, J. H.: *Report of 14th Annual Meeting, Kor. Pharmacol. Soc.*, (1962).