

# ベンザルアセトン型化合物の抗菌、 抗酸化性について

近畿職業能力開発大学校 登 成 健之介

Antibacterial Activity and Antioxidative Effect of Benzalacetone Homologs

Kennosuke TONARI

**要約** ベンザルアセトン型化合物の抗酸化性を過酸化物質価 (POV) の測定、分子軌道エネルギー (HOMO, LUMO) からの絶対的電気陰性度 ( $\chi$ )、絶対的ハードネス ( $\eta$ ) などより検討し、抗酸化性の強い化合物の POV (例えば40時間後の POV) はこれら化合物の  $\chi$  と相関することが判った。 ( $r=0.8696$ )

一方、抗菌性については各化合物の最小阻止濃度 (MIC) をペーパーディスク法による方法で測定した結果、 $\chi$  と強く相関していた。 ( $r=0.8865$ )

また、蛋白質、酵素と基質 (ここではベンザルアセトン型化合物) が作用することにより、抗菌性が発現するものと仮定して、蛋白質、酵素の代用として数種のアミノ酸を用い、これらとベンザルアセトン型化合物との反応を検討した。この時、反応性指標として、これら化合物の  $\chi$ 、 $\eta$  より導かれる電子移動数 ( $\Delta N$ ) および結合時の安定化エネルギー ( $\Delta E$ ) をとりあげた。この結果、抗菌性の強さである  $\log(\text{MIC})$  は  $\Delta N$ 、 $\Delta E$  と相関することが判った。システインにおける  $\log(\text{MIC})$  と  $\Delta N$  の相関係数は  $0.8892$  であり、 $\log(\text{MIC})$  と  $\Delta E$  とは  $0.7727$  であった。

## 緒言

前報ではフェノール類の抗酸化性について検討し、その抗酸化性は分子軌道エネルギー (HOMO、LUMO) から誘導されるパラメーター ( $\chi$ 、 $\eta$ ) と強く相関し、 $\chi$  (特に  $\eta$ ) の小さいものは抗酸化性が強い。<sup>(1)</sup> 今回、対象としたベンザルアセトン型化合物 (ベンザルアセトン、4-ヒドロキシベンザルアセトン、3-メトキシ-4-ヒドロキシベンザルアセトン (デヒドロジゲロン)、3,4-メチレンジオキシベンザルアセトンおよびクルクミン) の HOMO、LUMO および  $\chi$ 、 $\eta$  について調べてみると、 $\chi$  は既存抗酸化剤として知られる BHA よりいずれも大きい、 $\eta$  は小さく、抗酸化性が期待される。

5種類のベンザルアセトン型化合物の抗酸化性を過酸化物質価 (POV) の測定と、 $\chi$ 、 $\eta$  との対比より評価

した。また、抗菌性については各化合物の最小阻止濃度 (MIC) をペーパーディスクの阻止円の大きさから推定し<sup>(2)</sup>、これと  $\chi$ 、 $\eta$  と比較した。さらに酵素、蛋白質と基質 (ベンザルアセトン化合物) との結合性に関するパラメーター (電子移動数:  $\Delta N$ ) および基質との安定性に関するパラメーター (安定化エネルギー:  $\Delta E$ ) をそれぞれの  $\chi$ 、 $\eta$  より検討した。<sup>(3)</sup>

## 実験

### 2.1) 合成

ベンザルアセトン型化合物の合成法としては Fig. 1 に示すように、対応するベンズアルデヒドとアセトンを水酸化ナトリウム等のアルカリ下に縮合させる方法を用いた。即ち、0.15モルの各アルデヒド (4-ヒドロキシベンズアルデヒド、バニリン、ピペロナル)

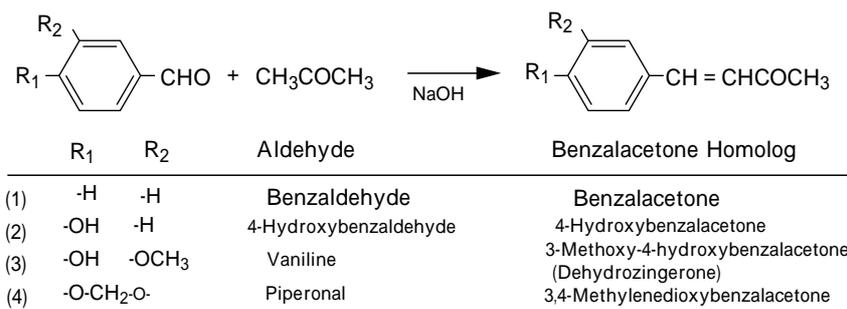


Fig. 1 Synthesis of Benzalacetone Homologs

を50mlのアセトンに溶解後、60mlの10%NaOHを25~30で滴下、室温下に3時間攪拌、一夜放置する。反応液に10%HCl 70mlを加え、酸性とした後、析出物を濾取し、メタノールより再結晶して目的物を得た。

GC-MSはHewlett Packard 5850 Q-Pole マスペクトロメーター (70eV, メチルシリコンガム10m, 80-150 /5 昇温, He 45ml/min.) NMRはJEOL JNM-MY60、IRは島津 IR400を同定のために用いた。

#### ベンザルアセトン ( 1 )

本物質は東京化成(株)特級を用いた。mp 39 - 40 MSm/z (rel. int.): 146 (M<sup>+</sup>27), 131(100), 103(80), 77(45) IR<sub>vmax</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1660, 1570, 1490, 1410, 1360, 1310, 1260, 1170

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.33 (CH<sub>3</sub>, s), 6.6 (CH=, d, J=17.6Hz), 7.37 (φ-H, bs), 7.8 (=CH, d, J=17.6 Hz)

#### 4 - ヒドロキシベンザルアセトン ( 2 )

赤褐色の結晶 mp .100 - 102 MSm/z (rel. int.): 162 (M<sup>+</sup>53), 147(100), 119(28), 91(15), 65(11)

IR<sub>vmax</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3300~3000, 1660, 1580, 1510, 1430, 1360, 1280, 1200, 1160

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.31 (CH<sub>3</sub>, s), 6.5 (CH=, d, J=15.9Hz), 6.8 (φ-H x 2, d, J=8.8Hz), 7.4 (-OH, s), 7.5 (φ-H x 2, d, J=8.8Hz), 7.65 (CH=, d, J=15.9Hz)

#### 3 - メトキシ - 4 - ヒドロキシベンザルアセトン ( デヒドロジンゲロン ) ( 3 )

黄褐色の結晶 mp .120 - 123 MSm/z (rel. int.): 192 (M<sup>+</sup>100), 177(88), 145(65), 117(22), 89(11)

IR<sub>vmax</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3350~3150, 1640, 1570, 1500, 1450, 1400, 1360, 1290, 1260, 1180, 1120

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.27 (CH<sub>3</sub>, s), 3.92 (CH<sub>3</sub>O-, s), 6.6 (CH=, d, J=15.9Hz), 6.9 (φ-H, d, J=9.5Hz), 7.3 (φ-H, d, J=9.5Hz), 7.3 (φ-H, s), 7.4 (-OH, bs), 7.6 (CH=, d, J=15.9Hz)

#### 3,4 - メチレンジオキシベンザルアセトン ( 4 )

黄褐色の結晶 mp .103 - 105 MSm/z (rel. int.): 192 (M<sup>+</sup>100), 187(95), 145(32), 117(22), 89(17)

IR<sub>vmax</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1660, 1610, 1590, 1500, 1440, 1350, 1240

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.24 (CH<sub>3</sub>, s), 6.0 (O-CH<sub>2</sub>-O, s), 6.5 (CH=, d, J=15.9Hz), 6.7 (φ-H, d, J=9.5Hz), 7.0 (φ-H, d, J=9.5Hz), 7.2 (φ-H, s), 7.5 (CH=, d, J=15.9Hz)

#### クルクミン ( 5 )

本物質は東京化成(株)特級を用いた。黄褐色粉末 mp .180 - 183

IR<sub>vmax</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3500~3300, 1620, 1580, 1500, 1270, 1200, 1150, 1020

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.9 (CH<sub>3</sub>O- x 2, s), 5.98 (-CH<sub>2</sub>-, s), 6.7 (CH= x 2, d, J=15.9Hz), 7.0 (φ-H x 2, s), 7.3 (φ-H x 2, s, J=10.5Hz), 7.3 (-OH x 2, bs), 7.4 (φ-H x 2, d, J=10.5Hz), 7.7 (CH= x 2, d, J=15.9Hz)

#### ブチレーテッドアニソール ( BHA ) ( 6 )

指標品としてキシダ化学(株)特級試薬を用いた。

#### 2 - 2 ) 過酸化物価 ( POV ) の測定

前報に準じた。<sup>(1)</sup>

#### 2 - 3 ) χ、η、ΔN、ΔE の計算

・χ、ηについては前報参照<sup>(1)</sup>

・ΔN、ΔEについては

$$\Delta N = 1/2 (\chi_B - \chi_A) / (\eta_A + \eta_B)$$

$$\Delta E = -1/4 (\chi_B - \chi_A)^2 / (\eta_A + \eta_B)^2 \text{ 与えられ、大文}$$

字 A, B はそれぞれ各種アミノ酸とベンザルアセトン型化合物をさす。(3)

2 - 4 ) 抗菌試験

*Escherichia coli* (IFO3301) に対するペーパーディスク法の阻止円の大きさから、回帰式 ( $\text{Log}(\text{MIC}) = -0.076X + 3.82$ , X : 阻止円の直径 (mm)) より計算値による MIC を求め、この周辺に100ppm ずつ濃度変化をつけた培地を作成、培養後、菌の生育を阻止する濃度を MIC とした。(2)

結果および考察

3 - 1 ) 抗酸化性

Fig 2 および Table 1 に示すように、30h、40h 後の POV を既存抗酸化剤 (BHA) と比べると、これ以上の効果のあるものは見出せなかったが、デヒドロジנגeron(3)、クルクミン(5)は遜色のないものであり、これに続くものとして、4 - ヒドロキシベンザルアセトン(2)、ベンザルアセトン(1)、3,4 - メチレンジオキシベンザルアセトン(4)がある。

抗酸化性の強さは Table 1 より30, 40h 後の POV

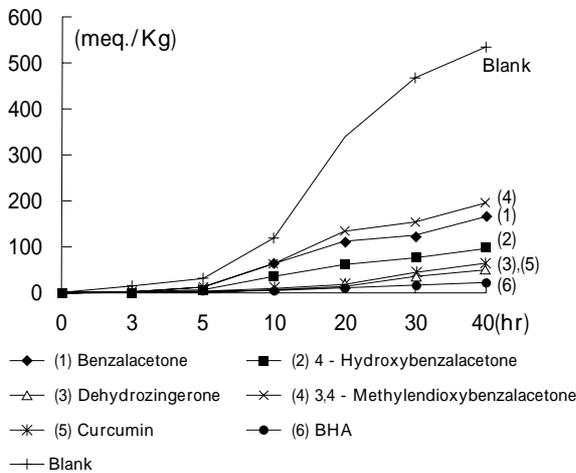


Fig 2 POV of Oleic acid added with Benzalacetone Homologs

Table1 . The Values of HOMO, LUMO,  $\chi$ ,  $\eta$  and Log( POV ) of Benzalacetone Homologs

	HOMO	LUMO	$\chi$	$\eta$	log( POV30 )	log( POV40 )
( 1 ) Benzalacetone	- 8.5115	0.3755	4.0680	4.4435	1.18	1.36
( 2 ) 4 Hydroxybenzalacetone	- 8.6168	0.5276	4.0446	4.5722	1.35	1.53
( 3 ) Dehydrozingerone	- 8.8950	0.3814	4.2568	4.6382	1.79	1.86
( 4 ) 3,4 Methylenedioxybenzalacetone	- 8.8925	0.3854	4.2536	4.6390	1.84	1.91
( 5 ) Curcumin	- 8.8815	0.4235	4.2290	4.6525	2.20	2.31
( 6 ) BHA	- 8.9962	0.3718	4.3122	4.6840	2.30	2.38

HOMO, LUMO was calculated at EF, AM 1 levels ( eV )  
POV30 and POV40 : POV after 30h and 40h, respectively

と  $\chi$ ,  $\eta$  を比べると明らかであり、Table 2 の相関表から  $\eta$  より  $\chi$  とよく相関していることが判る。ベンザルアセトン型化合物では電子密度変化の抵抗性 ( $\eta$ ) には関係なく、 $\chi$  が小さいもの即ちイオン化エネルギーが小さく、イオンになりやすいものが有効であることが判る。

Table 2 Correlation Coefficients between Log( POV ) and  $\chi$ ,  $\eta$  of Benzalacetone Homologs

	Log( POV30 )	Log( POV40 )
$\chi$	0.8497	0.8696
$\eta$	- 0.2225	- 0.2543

POV 30 and POV 40 : POV after 30h and 40h, respectively

3 - 2 ) 抗菌性について

ベンザルアセトン型化合物の *E.coli* に対する抗菌試験 (MIC の実測) については、実験の部 2 - 4 ) に示したように、ペーパーディスク法による阻止円の大きさから回帰式を用いて計算した。この計算値 MIC を参考にして、その近辺濃度の化合物を含む培地を作り、培養後、菌の生育を阻止する最小濃度を実測 MIC とした。

Table 4 にはベンザルアセトン型化合物の  $\chi$ ,  $\eta$  と Log ( MIC ) のデータを示すが、Log ( MIC ) と相関性のあるのはむしろ  $\chi$  ( $r=0.887$ ) で  $\eta$  ( $r= - 0.532$ ) ではなかった。従って、抗菌性は抗酸化性と同様、 $\eta$  よりむしろ  $\chi$  に影響されることが判った。

抗菌作用の説明の一つに、生体内の酵素、蛋白質等が基質と結びついて、不活性となり、代謝に異常をきたし、細胞死につながるとすることがある。この時、蛋白質、酵素等のアミノ酸残基と基質 (ここではベンザルアセトン型化合物) との結合が考えられ、アミノ酸残基とベンザルアセトン型化合物との結合性を調べることが有効である。アミノ酸残基としては残基によく見られるリジン、セリン、ヒスチジン、システイン

Table3 . Observed MIC, Calculated MIC (  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ) and Zone sizes ( mm ) by Paper Disks against *Escherichia coli* ( IFO3301 )

	Obsrd. MIC	Calcd. MIC	Zone sizes
( 1 ) Benzalacetone	1200	1258	9.5
( 2 ) 4-Hydroxybenzalacetone	900	1000	10.8
( 3 ) Dehydrozingerone	800	794	12.1
( 4 ) 3,4-Methylenedioxybenzalacetone	1400	1584	802
( 5 ) Curcumin	1100	1258	9.5
( 6 ) BHA	500	630	13.4

The calculated MIC was derived from the equation  $\log(\text{MIC}) = -0.076x + 3.82$  (  $x$  : zone sizes in diameter )<sup>2)</sup>

Table4 . The Values of  $\chi$ ,  $\eta$ ,  $\Delta N$ ,  $\Delta E$  and  $\log(\text{MIC})$  of Benzalacetone Homologs on *Escherichia coli* ( IFO3301 )

	$\chi$	$\eta$	$\Delta N^*$	$-\Delta E^*$	$\log(\text{MIC}_{30})$
( 1 ) Benzalacetone	5.0227	4.3128	0.06537	0.012262	3.08
( 2 ) 4-Hydroxybenzalacetone	4.8550	4.1418	0.027925	0.007029	2.95
( 3 ) Dehydrozingerone	4.7787	4.0247	0.024008	0.005128	2.90
( 4 ) 3,4-Methylenedioxybenzalacetone	4.8828	4.0744	0.029692	0.007888	3.15
( 5 ) Curcumin	4.7941	3.8850	0.025270	0.005592	3.04
( 6 ) BHA	4.0680	4.4435	-0.015216	0.002157	2.70
Cysteine	4.3515	4.8715			

Correlation Coefficients( $r$ ) :  $r = 0.887$  between  $\chi$  and  $\log(\text{MIC})$ ,  $r = -0.532$  between  $\eta$  and  $\log(\text{MIC})$

Table5 . Correlation Coefficients between  $\log(\text{MIC})$  and  $\Delta N$ ,  $-\Delta E$  of Benzalacetone Homologs at some amino acids

	$\Delta N$ and $\log(\text{MIC})$	$-\Delta E$ and $\log(\text{MIC})$
Cysteine	0.8892	0.7727
Lysine	0.8889	0.7158
Serine	0.8873	-0.8260
Histidine	0.8893	0.8109

のアミノ酸を用いた。これらアミノ酸のHOMO, LUMOから導かれる $\chi$ ,  $\eta$ およびベンザルアセトン型化合物の $\chi$ ,  $\eta$ より得られる $\Delta N$ ,  $\Delta E$ なるパラメーターを導入して検討した。<sup>(3)</sup> $\Delta N$ はこれらアミノ酸と基質が結合する時の電子移動数を示し、数値が高いほど結合性が強いことを示す。 $\Delta E$ は結合時の安定化エネルギーに対応し、大きいほど安定化が強く進行することを示す。システインとのこれら結合性指標値はTable 4に示した。各アミノ酸におけるベンザルアセトン型化合物の $\Delta N$ ,  $\Delta E$ と $\log(\text{MIC})$ との相関をTable 5に示す。ここでも $\chi$ 同様、各アミノ酸とベンザルアセトン型化合物の $\Delta N$ ,  $\Delta E$ は抗菌性の尺度である $\log(\text{MIC})$ と相関することが判った。

Fig 3には $\chi$ 、システインにおける $\Delta N$ ,  $\Delta E$ と $\log(\text{MIC})$ との相関を示す。

## 総 括

1. ベンザルアセトン型化合物の抗酸化性の強さを示すPOVはHOMO, LUMOより導かれる $\chi$ と強く相関する。
2. ベンザルアセトン型化合物の抗菌性の強さに関係するMICは $\chi$ およびアミノ酸との結合指標値である $\Delta N$ ,  $\Delta E$ と強く相関することが判った。

## 謝 辞

本研究にご協力を頂きました卒業生の戸高禎之君、中塚一也君に深謝いたします。

## [ 参考文献 ]

- (1) 登成健之介 フェノール類の抗酸化性 職業能力開発報文誌投稿中

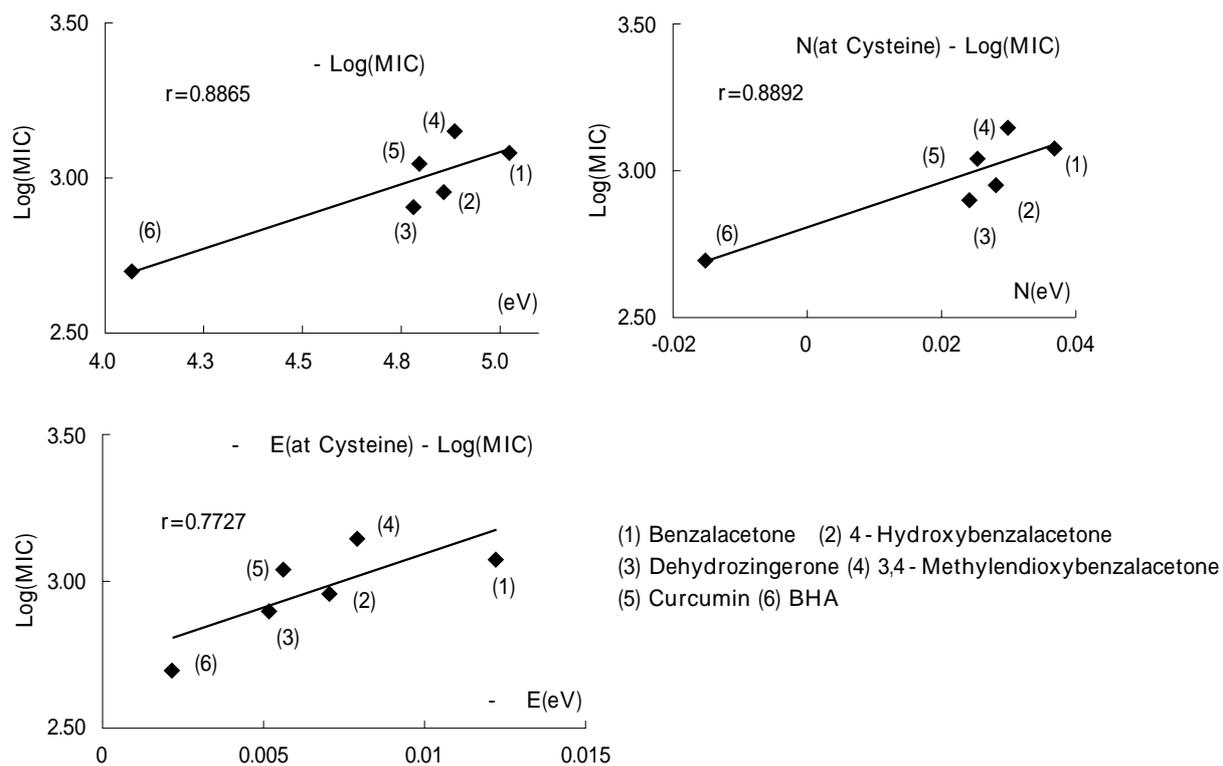


Fig 3 Relationship between  $\chi$ ,  $\Delta N$ ,  $\Delta E$  and  $\text{Log}(\text{MIC})$

(2) 登成健之介 最小阻止濃度 (MIC) 簡易測定法  
職業能力開発報文誌投稿中

(3) Kennosuke Tonari and Keiichiro Sameshima Antibacterial Activity of 3-Methylcyclopentanone Derivatives in Relation to Methylenomycins, *J. Jpn.Oil Chem.Soc.*, 49(6), 585 - 590 (2000)