

## 2,2'-Methylene bis(3,4,6-trichlorophenoxyacetic acid)의 Mannich Bases合成 및 抗菌作用에 關한 研究

金 鍾 浩\*

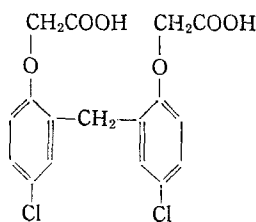
(Received April 20, 1972)

Jong Ho Kim: Studies on the Synthesis of Mannich Bases of 2,2'-Methylene bis(3,4,6-trichlorophenoxyacetic acid) and their Antimicrobial Activities.

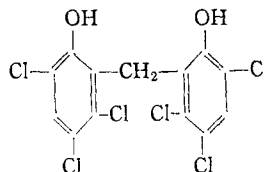
Thirty-three Mannich bases of 2,2'-methylene bis(3,4,6-trichlorophenoxyacetic acid) were synthesized as potential antimicrobial agents and tested against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* in vitro. It was found that: 1) Compounds 24 and 22 were active against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* at the concn. of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively; 2) Compounds 9 and 29 were active against *Trichophyton rubrum* at the concn. of 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively; 3) Compounds 9 and 30 were active against *Microsporium gypseum* at the concn. of 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively; 4) Compounds 6, 9, 13, 15, 21, 28, 29, 31, 33 and 34 were active against *Epidermophyton floccosum* at the concn. of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively; 5) Compounds 6, 9, 18 and 28 were active against *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* at the concn. of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively.

Chlorophenol系 化合物 및 그 金屬鹽 等이 현저한 抗菌作用이 있음이 報告된 以來 Gump<sup>1,2)</sup>는 hexachlorophene 金屬鹽의 抗菌性, Ter Horst等<sup>3)</sup>은 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone의 抗菌性, 또한 Gump等<sup>4)</sup>은 3,5,3',5'-tetrachloro-2,2'-dihydroxydiphenyl의 抗菌性, Turner等<sup>5)</sup> 및 Block<sup>6)</sup>는 pentachlorophenol 金屬鹽의 抗藻類性 및 抗菌性 等を 報告하였다. 또한 Pokorny<sup>7)</sup>가 chlorophenoxyacetic acid 系 化合物을 合成한 以來 Marsh等<sup>8,9)</sup>은 Chlorophenoxyacetic acid 誘導體인 2,2'-methylene bis(4-chlorophenoxyacetic acid), hexachlorophene 및 bithionol等을 포함한 여러 bisphenol 系 化合物의 抗菌性을 化學構造의 으로 比較하여 報告하였고, 더욱 Gregg等<sup>10)</sup>, Grubb等<sup>11)</sup> 및 Lawrence等<sup>12,13)</sup>은 hexachlorophene 및 bithionol의 抗菌性을 用途別로 報告하였다. 한便 橫川 等<sup>14,15)</sup>은 bithionol의 肺지스토마 驅蟲效果, 金 等<sup>16,17)</sup>은 hexachlorophene의 肝지스토마 驅蟲效果 等を 報告한 바 있고, 特히 最近에 Noone<sup>18)</sup>

은 抗生物質에 依한 耐性菌株에 대하여 外用 殺菌劑로서 hexachlorophene 이 매우 效果的 이었다고 報告하였다.



2,2'-Methylene bis(4-chlorophenoxyacetic acid)



Hexachlorophene

그러므로 著者는 현저한 抗菌作用을 가진 hexachlorophene 보다 強力한 殺菌性이 있는 것 을 얻으 爲의 目的으로 hexachlorophene에 monochloroacetic acid 를 反應<sup>7,19,20,21</sup>시켜 新化合物 인 2,2'-methylene bis(3,4,6-trichlorophenoxyacetic acid)를 合成하고 이것을 母體化合物 로하여 Wilkinson<sup>22</sup> 및 Furst<sup>23</sup> 등이 提唱한 chelate 化能에 依한 抗菌作用을 추구하기 爲하여 Mannich 反應<sup>24,25,26</sup>을 시켰다. 그 結果 chelate 化能和 hexachlorophene의 抗菌性을 化學構 造的으로 모두 含有하고 있는 Mannich base誘導體 33種을 合成하였다. Chelate化能의 化學 構造를 가진 化合物로서 強力한 抗菌性, 抗人結核性 및 抗癌性을 나타내는 例로 ethambutol, 2-pyridine carboxyaldehyde thiosemicarbazone 등이 알려져 있다.

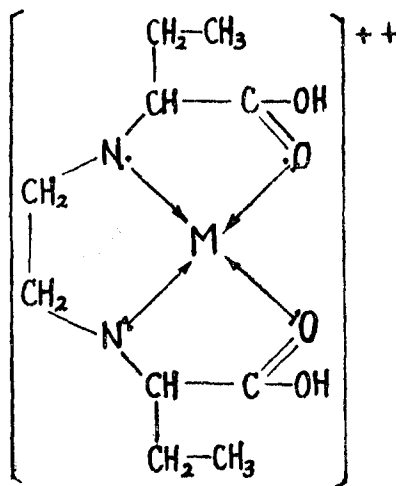


Fig. 1 Chelate of Ethambutol

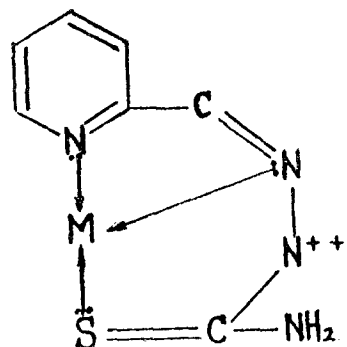


Fig. 2 Chelate of 2-Pyridine carboxyaldehyde thiosemicarbazone

本 Mannich base 誘導體의 chelate 化能式은 Fig. 3에 표시되는 바와 같이 생각된다.

이와 같이 chelating 할수 있는 Mannich base 誘導體 33種과 前述한 母體化合物에 對하여 hexachlorophene을 對照化合物로 하여 각각 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus niger* 및 *Aspergillus oryzae*에 對하여 抗菌作用을 比較하였다.

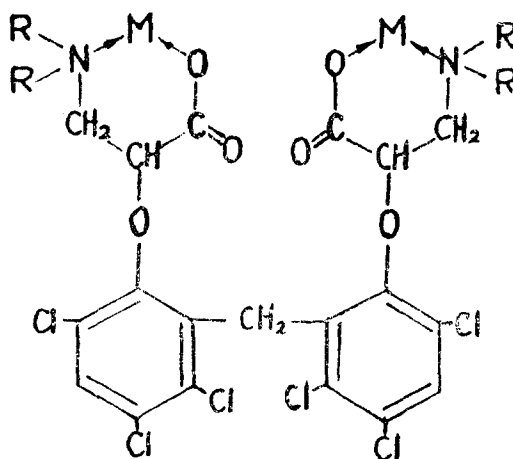


Fig. 3 Chelation form of hexachlorophene derivative

## 實 驗

## I. 合 成

**Method A**—2,2'-Methylene bis(3,4,6-trichlorophenoxyacetic acid) 0.01 mole, 8種의 amine 각각 0.02 mole 및 paraformaldehyde 0.02 mole을 95% EtOH 200ml에 加温溶解시킨 후 conc. HCl 1ml를 加하고 6時間 還流시킨다. 蒸發濃縮後 放置하여 얻은 沈澱을 EtOH-H<sub>2</sub>O로 再結晶한다.

**Method B**—Method A에서 最初로 얻은 沈澱을 10% NaOH에 溶解하여 濾過한 後 濾液에 dil. HCl을 加하여 pH 6.0으로 할때 얻은 沈澱을 EtOH-H<sub>2</sub>O 또는 D.M.F-H<sub>2</sub>O(22, 24, 29)로 再結晶한다.

2,2'-Methylene bis(3,4,6-trichlorophenoxyacetic acid) (1)

Hexachlorophene 4.07g(0.01 mole) 및 monochloroacetic acid 1.9g(0.02 mole)을 20% NaOH 10ml에 加温溶解시키고 100°C에서 6時間 反應시킨후 10% HCl을 pH 6.0이 될때까지 攪拌하면서 徐徐히 加한다. 이때 생긴 白色 沈澱을 H<sub>2</sub>O로 洗滌, EtOH-H<sub>2</sub>O로 再結晶하여 白色 結晶을 얻었다. yield 4.8g(92%), m.p. 149-150°

2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*o*-carboxyphenylamino)propionic acid] (2)

Method A로 合成하여 橙黃色 結晶을 얻었다. yield 4.3g(52%), m.p. 158-160°

2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*m*-carboxyphenylamino)propionic acid] (3)

Method A로 合成하여 褐色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 5.0g(61%), m.p. 135-136°

2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*p*-carboxyphenylamino)propionic acid] (4)

Method A로 合成하여 褐色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.6g(56%), m.p. 72-74°

2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*o*-hydroxyphenylamino)propionic acid] (5)

(5)

Method A로 合成하여 黃褐色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 3.9g(51%), m.p. 138—139°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*m*-hydroxyphenylamino)propionic acid] (6)

Method A로 合成하여 黃褐色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 3.6g(47%), m.p. 165—166°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*p*-hydroxyphenylamino)propionic acid] (7)

Method A로 合成하여 紅白色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 3.8g(50%), m.p. 134—135°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*p*-methoxyphenylamino)propionic acid] (8)

Method A로 合成하여 白色 針狀結晶을 얻었다. yield 3.8g(48%), m.p. 154—155°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*m*-hydroxy-*p*-carboxyphenylamino)propionic acid] (9)

Method A로 合成하여 褐色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 5.5g(64%), m.p. 148—149° (dec.)  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*o*-nitrophenylamino)propionic acid] (10)

Method B로 合成하여 黃色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 5.9g(72%), m.p. 141—142°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*m*-nitrophenylamino)propionic acid] (11)

Method B로 合成하여 褐色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 3.8g(46%), m.p. 152—153°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*p*-nitrophenylamino)propionic acid] (12)

Method B로 合成하여 黃色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 5.1g(62%), m.p. 141—142°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*o*-chlorophenylamino)propionic acid] (13)

Method B로 合成하여 黃色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 6.2g(77%), m.p. 129—130°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*p*-chlorophenylamino)propionic acid] (14)

Method B로 合成하여 白色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 3.8g(47%), m.p. 158—159°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*o*-chloro-*p*-nitrophenylamino)propionic acid] (15)

Method B로 合成하여 黃白色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.1g(50%), m.p. 138—139°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*o*-methyl-*p*-nitrophenylamino)propionic acid] (16)

Method B로 合成하여 白色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.4g(52%), m.p. 160—161°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*o*-methylphenylamino)propionic acid] (17)

Method B로 合成하여 灰白色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.8g(63%), m.p. 141—142°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*p*-methylphenylamino)propionic acid] (18)

Method B로 合成하여 類紅白色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.2g(55%), m.p. 139—140°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(phenylamino)propionic acid] (19)

Method B로 合成하여 白色 針狀結晶을 얻었다. yield 3.6g(49%), m.p. 161—162°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(phenylhydrazino)propionic acid] (20)

Method B로 合成하여 赤褐色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 5.4g(71%), m.p. 125—126°  
2,2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(methylamino)propionic acid] (21)

- Method B로 合成하여 白色 針狀結晶을 얻었다. yield 4.1g(67%), m.p. 96—97°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(N,N-dimethylamino)propionic acid] (22)
- Method B로 合成하여 黃白色 結晶을 얻었다. yield 3.1g (49%), m.p. 251—252° (dec.)
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(ethylamino)propionic acid] (23)
- Method B로 合成하여 黃白色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.0g(63%), m.p. 204—205°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(N,N-diethylamino)propionic acid] (24)
- Method B로 合成하여 黃白色 結晶을 얻었다. yield 4.4g(63%), m.p. 189—190°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*n*-butylamino) propionic acid] (25)
- Method B로 合成하여 白色 結晶을 얻었다. yield 4.7g(68%), m.p. 145—147°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(ethanolamino)propionic acid] (26)
- Method B로 合成하여 黃色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.7g(71%), m.p. 237—239°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(N,N-diethanolamino)propionic acid] (27)
- Method B로 合成하여 橙色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.3g(57%), m.p. 96—68°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(hydroxylamino)propionic acid] (28)
- Method B로 合成하여 白色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.1g(57%), m.p. 162—163°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(cyclohexylamino)propionic acid] (29)
- Method B로 合成하여 白色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 5.3g(71%), m.p. 218—219°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(piperidino)propionic acid] (30)
- Method B로 合成하여 灰赤色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.6g(64%), m.p. 133—134°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(morpholino)propionic acid] (31)
- Method B로 合成하여 白色 針狀結晶을 얻었다. yield 4.4g(61%), m.p. 226—228°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(2-pyridylamino)propionic acid] (32)
- Method B로 合成하여 褐色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 3.5g(48%), m.p. 96—97°
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*p*-sulfophenylamino)propionic acid] (33)
- 化合物 (1) 5.23g (0.01 mole), sulfanilic acid 3.46g(0.02mole)과 paraformaldehyde 0.6g(0.02 mole)을 50% EtOH 200ml에 加溫溶解시킨 후 conc. HCl 1ml을 加하고 6時間 還流시킨다. 反應終了後 그 反應液에 EtOH를 加하고 室溫에 放置하면 黃白色 沈澱이 生成된다. 이 沈澱을 EtOH-H<sub>2</sub>O로 再結晶하여 黃白色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.6g(52%), m.p. 243—244° (dec.)
- 2, 2'-Methylene bis[ $\alpha$ -(3, 4, 6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(4-sulfo-1-naphthylamino)propionic acid] (34)
- 化合物 (33)의 合成方法으로 合成하여 暗褐色 結晶性 粉末을 얻었다. yield 4.1g(41%), m.p. 123—124°

## II. 抗 菌 試 驗

### (1) 抗細菌試驗

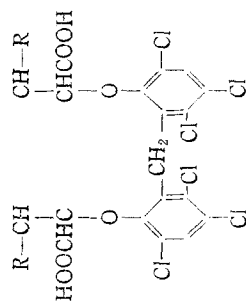
菌株—*Staphylococcus aureus* FDA 209 P\*

*Bacillus subtilis* ATCC 6633\*

*Escherichia coli* ATCC 14169\*

\* Strains were obtained from Applied Microbiology Laboratory, Korean Institute of Science and Technology

Table I Mannich Bases of 2,2'-Methylene bis(3,4,6-trichlorophenoxyacetic acid)



No.	R	Recryst. Solvent	m.p.	Yield (%)	Formula	Analysis					
						Calcd.			Found		
					C	H	N	C	H	N	
1	H	EtOH-H <sub>2</sub> O	149-150	92	C <sub>17</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	39.00	1.91		38.5	1.91	
2	<i>o</i> -HOCC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	158-160	52	C <sub>33</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> Cl <sub>6</sub>	48.23	2.92	3.41	47.9	2.55	3.27
3	<i>m</i> -HOCC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	135-6	61	C <sub>33</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> Cl <sub>6</sub>	48.23	2.92	3.41	48.7	3.29	3.54
4	<i>p</i> -HOCC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	72-4	56	C <sub>33</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> Cl <sub>6</sub>	48.23	2.92	3.41	48.5	3.40	3.37
5	<i>o</i> -HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	138-9	51	C <sub>31</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	48.62	3.14	3.66	48.9	2.84	3.52
6	<i>m</i> -HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	165-6	47	C <sub>31</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	48.62	3.14	3.66	47.9	2.74	3.61
7	<i>p</i> -HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	134-5	50	C <sub>31</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	48.62	3.14	3.66	48.1	3.54	3.69
8	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	154-5	48	C <sub>33</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> Cl <sub>6</sub>	49.81	3.53	3.53	50.2	3.72	3.66
9	<i>m</i> -HO- <i>p</i> -HOCC <sub>6</sub> H <sub>3</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	148-9 (dec.)	64	C <sub>33</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> Cl <sub>6</sub>	46.42	2.88	3.28	46.8	2.92	3.17
10	<i>o</i> -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	141-2	72	C <sub>31</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> Cl <sub>6</sub>	45.20	2.67	6.80	45.4	2.64	6.67
11	<i>m</i> -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	152-3	46	C <sub>31</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> Cl <sub>6</sub>	45.20	2.67	6.80	44.7	3.17	6.96
12	<i>p</i> -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	141-2	62	C <sub>31</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> Cl <sub>6</sub>	45.20	2.67	6.80	45.7	2.17	6.74
13	<i>o</i> -ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	129-130	77	C <sub>31</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>8</sub>	46.38	2.74	3.49	46.8	2.54	3.31

14	$p$ -ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	158-9	47	C <sub>31</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Cl <sub>8</sub>	46.38	2.74	3.49	45.9	3.14	3.58
15	$o$ -Cl- $p$ -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	138-9	50	C <sub>31</sub> N <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> Cl <sub>8</sub>	41.70	2.24	6.27	41.4	2.62	6.21
16	$o$ -CH <sub>3</sub> - $p$ -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	160-1	52	C <sub>33</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> Cl <sub>6</sub>	46.53	3.06	6.58	46.1	2.84	6.71
17	$o$ -CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	141-2	63	C <sub>33</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	52.03	3.67	3.68	51.9	3.24	3.51
18	$p$ -CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	139-140	55	C <sub>33</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	52.03	3.67	3.68	52.4	4.07	3.79
19	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	161-2	49	C <sub>31</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	50.75	3.27	3.83	50.2	3.04	3.99
20	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHNH	EtOH-H <sub>2</sub> O	125-6	71	C <sub>31</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>8</sub>	48.75	3.41	7.33	49.2	3.17	7.48
21	CH <sub>3</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	96-7	67	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	41.37	3.28	4.60	40.9	3.09	4.47
22	CH <sub>3</sub> >N CH <sub>3</sub>	D.M.F.-H <sub>2</sub> O	251-2 (dec.)	43	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	43.32	3.77	4.40	42.9	3.54	4.61
23	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	204-5	63	C <sub>33</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	43.32	3.77	4.40	43.8	3.27	4.32
24	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> >N C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	D.M.F.-H <sub>2</sub> O	189-190	63	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	46.75	4.61	4.04	47.3	4.47	4.12
25	$\pi$ -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	145-7	68	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	46.75	4.61	4.04	46.9	4.11	3.87
26	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	237-9	71	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>	41.26	3.58	4.19	40.7	3.49	3.98
27	(HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N	EtOH-H <sub>2</sub> O	96-8	57	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> Cl <sub>6</sub>	42.80	4.22	3.70	42.5	4.04	3.56
28	HONH	EtOH-H <sub>2</sub> O	162-3	57	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	37.19	2.61	4.57	36.9	2.43	4.73
29	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NH	D.M.F.-H <sub>2</sub> O	218-9	71	C <sub>31</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	49.93	4.83	3.77	50.5	5.04	3.58
30	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N	EtOH-H <sub>2</sub> O	133-4	64	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	48.54	4.46	3.90	49.1	4.22	4.07
31	O<CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> >N CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	EtOH-H <sub>2</sub> O	226-8	61	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	44.32	3.81	3.81	44.7	3.74	3.72
32	2-(C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N)NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	96-7	48	C <sub>29</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	47.35	3.03	7.62	47.9	3.04	7.75
33	$p$ -HO <sub>3</sub> SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	( ) ( ) ( )	243-4 (dec.)	52	C <sub>31</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> Cl <sub>6</sub>	41.65	2.68	3.14	41.6	2.95	3.02
34	$p$ -HO <sub>3</sub> SC <sub>10</sub> H <sub>6</sub> NH	EtOH-H <sub>2</sub> O	123-4	41	C <sub>33</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> Cl <sub>6</sub>	47.13	2.81	2.81	46.9	2.84	2.98

培 地—Dehydrated nutrient broth bacto 8g 을 1000ml 의 蒸溜水에 溶解시켜 pH 7.2 로 조절하고 121°C, 15 Lbs. 蒸氣壓下에서 15分間 滅菌하여 使用하였다.

試料調製—Table I의 新化合物 34種 및 hexachlorophene을 각각 5mg式 秤量한 후 EtOH에 溶解시키고 蒸溜水を 첨가하여 Hamada 等<sup>27)</sup>의 方法에 의하여 最終濃도가 20% EtOH 溶液中 1000 $\mu$ g/ml의 試液을 만들고 追加하여 20% EtOH로 稀釋시키므로써 500, 100, 20, 10 $\mu$ g/ml의 試料를 調製하였다.

檢定方法—各 細菌을 24時間 培養한 후 이 培養液을 無菌室에서 滅菌해둔 試驗管에 각각 0.9ml式을 注入하고 여기에 各 調製試料 0.1ml式을 加(이때 各 試料는 10倍로 稀釋함)한 後 가끔 振盪해주면서 1時間을 경과시킨 다음 이것을 滅菌한 liquid nutrient medium에 loop로 3回 接種하였다. *B. subtilis*는 30°C, *St. aureus*와 *E. coli*는 35°C의 incubator 內에서 24~48時間경과 후의 細菌發育有無로 檢定하였다.

## (2) 抗真菌試驗

真菌—*Trichophyton rubrum*<sup>a</sup>

*Microsporium gypsum*<sup>b</sup>

*Epidermophyton floccosum*<sup>b</sup>

*Aspergillus niger*

*Aspergillus oryzae*

培 地—Sabouraud glucose agar media<sup>28)</sup>를 pH 6.8로 조절하여 滅菌한 후 使用하였다.

試料調製—Table I의 新化合物 34種 및 hexachlorophene을 각각 50mg式 秤量한 후 EtOH에 溶解시키고 蒸溜水を 첨가하여 最終濃도가 20% EtOH 溶液中에서 49.5ml와 Tween 60 0.5ml에 懸濁溶解시켜 1000 $\mu$ g/ml의 試液을 만들고 追加하여 20% EtOH+0.1% Tween 60의 混合液으로 稀釋하여 500, 100, 20, 10 $\mu$ g/ml의 試料를 調製하였다.

檢定方法—Sabouraud 培地를 試驗管에 각각 4.5ml式을 無菌的으로 注入한 후 여기에 各 試料 0.5ml式을 加(이때 各 試料는 10倍로 稀釋함)한 다음 autoclave內에서 121°C, 15 Lbs. 蒸氣壓下에서 20分間 滅菌하여 15°경사의 斜面培地를 만든다. 여기에 각각 真菌을 이식시킨 후 *Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypsum*, *Epidermophyton floccosum*은 37°C, *Aspergillus niger*와 *Aspergillus oryzae*는 28°C에서 培養하므로써 *T. rubrum*은 37°C에서 10日後에, *M. gypsum*은 37°C에서 96時間後에, *E. floccosum*은 37°C에서 7日後에 *Asp. niger* 및 *Asp. oryzae*는 28°C에서 7日後의 發育抑制로 각각 檢定하였다.

## 考 察

2,2'-Methylene bis(3,4,6-trichlorophenoxyacetic acid)는 Mannich反應이 比較的 容易하게 이루어진다는 것이 確認되었으며 따라서 Mannich反應의 反應成立範圍를 넓혀 놓았다.

本 研究에서 化學構造의 由로 chelate化能이 있도록 合成된 Mannich base 들은 既知의 強力한 抗菌作用을 가진 hexachlorophene 보다도 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia*:

Strains were obtained from:

<sup>a</sup> Applied Microbiology Laboratory, Korean Institute of Science and Technology

<sup>b</sup> Dept. of Clinical Pathology, Seoul National University Hospital



**Table II** Minimum Inhibitory Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) of Mannich Bases of 2,2'-Methylene bis (3,4,6-trichlorophenoxyacetic acid)

Micro organism Compound	<i>St.</i> <i>aureus</i> <sup>a)</sup>	<i>B.</i> <i>subtilis</i> <sup>b)</sup>	<i>E.</i> <i>coli</i> <sup>a)</sup>	<i>T.</i> <i>rubrum</i> <sup>c)</sup>	<i>M.</i> <i>gypseum</i> <sup>d)</sup>	<i>E.</i> <i>floccosum</i> <sup>e)</sup>	<i>Asp.</i> <i>niger</i> <sup>f)</sup>	<i>Asp.</i> <i>oryzae</i> <sup>f)</sup>
1	10	10	i <sup>g)</sup>	100	i	10	10	10
2	10	10	i	50	100	10	10	10
3	50	10	i	50	100	10	10	10
4	10	2	i	50	50	2	2	2
5	50	10	i	100	100	2	2	2
6	50	10	i	100	100	1	1	1
7	50	10	i	50	50	2	2	2
8	100	100	i	100	100	10	50	50
9	10	2	i	2	2	1	1	1
10	10	10	i	100	100	2	2	2
11	10	10	i	100	100	2	2	2
12	10	10	i	50	50	10	2	2
13	10	50	i	50	100	1	2	2
14	10	50	i	50	50	10	2	2
15	50	2	i	100	i	1	10	10
16	10	100	i	10	50	10	2	2
17	10	10	i	10	50	10	2	2
18	2	10	i	10	10	2	1	1
19	50	100	i	10	50	50	2	2
20	50	2	i	50	100	10	10	10
21	10	2	100	50	50	1	2	2
22	2	1	100	50	50	10	10	10
23	10	2	100	50	50	2	2	2
24	1	2	100	50	50	10	10	10
25	10	2	100	50	50	10	10	10
26	50	10	i	100	100	10	50	50
27	50	10	i	100	100	10	50	50
28	50	10	i	100	i	1	1	1
29	10	10	i	2	100	1	2	2
30	50	10	i	50	2	10	10	10
31	50	2	i	50	50	1	10	10
32	50	2	i	100	i	50	100	100
33	50	10	i	50	100	1	50	50
34	50	2	i	10	10	1	10	10
Hexachloro- phene	10	10	i	100	i	10	10	10

a) Nutrient broth bacto medium (35°, 24-48hr.)

b) Nutrient broth bacto medium (30°, 24-48 hr.)

c) Sabouraud medium (37°C, 10days)

d) Sabouraud medium (37°, 96hr.)

e) Sabouraud medium (37°, 7 days)

f) Sabouraud medium (28°, 7days)

g) Not inhibited at the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$

*coli*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Aspergillus niger* 및 *Aspergillus oryzae*에 대하여 더욱 顯著하게 強한 抗菌作用을 나타내었음을 볼 수 있다.

本 研究에서 報告된 Mannich base 들은 有機溶媒인 ether, benzene, chloroform, acetone等에 難溶이었으므로 本 Mannich base로 부터 鹽酸鹽을 만드는 反應은 잘 이루어지지 않았다.

## 結 論

(1) 2,2'-Methylene bis(3,4,6-trichlorophenoxyacetic acid)와 이 化合物을 母體로 하여 Mannich base 誘導體 33種을 合成하였다.

(2) 上記한 新 化合物 34種을 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Aspergillus niger* 및 *Aspergillus oryzae*等에 對하여 抗菌試驗을 施行하였다.

(3) *Staphylococcus aureus*에 對해서는 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(N,N-diethylamino)propionic acid], *Bacillus subtilis*에 對해서는 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(N,N-dimethylamino)propionic acid]가 각각 1 $\mu$ g/ml에서 顯저한 抗菌作用을 나타내었다.

(4) *Trichophyton rubrum*에 對해서는 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*m*-hydroxy-*p*-carboxyphenylamino)propionic acid]와 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(cyclohexylamino)propionic acid], *Microsporium gypseum*에 對해서는 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,5-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*m*-hydroxy-*p*-carboxyphenylamino)propionic acid]와 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(piperidino)propionic acid]가 각각 2 $\mu$ g/ml에서 顯저한 抗菌作用을 나타내었다.

(5) *Epidermophyton floccosum*에 對해서는 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*m*-hydroxyphenylamino)propionic acid], 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*m*-hydroxy-*p*-carboxyphenylamino)propionic acid], 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*o*-chlorophenylamino)propionic acid], 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*o*-chloro-*p*-nitrophenylamino)propionic acid], 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(methylamino)propionic acid], 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(hydroxylamino)propionic acid], 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(cyclohexylamino)propionic acid], 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(morpholino)propionic acid], 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*p*-sulfophenylamino)propionic acid]와 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(4-sulfo-1-naphthylamino)propionic acid]等이 1 $\mu$ g/ml에서 顯저한 抗菌作用을 나타내었다.

(6) *Aspergillus niger* 및 *Aspergillus oryzae*에 對해서는 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*m*-hydroxyphenylamino)propionic acid], 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*m*-hydroxy-*p*-carboxyphenylamino)propionic acid], 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(*p*-methylphenylamino)propionic acid]와 2,2'-methylene bis[ $\alpha$ -(3,4,6-trichlorophenoxy)- $\beta$ -(hydroxylamino)propionic acid]가 1 $\mu$ g/ml에서 顯저한 抗菌作用을 나타내었다.

本 研究를 遂行하는데 있어서 指導해 주신 서울大學校 藥學大學 藥効學教室 趙允成博士에게 感謝를 드리며 아울러 元素分析을 擔當하여준 韓國科學技術研究所 文卓珍博士와 抗細菌試驗에 있어서 도와준 韓國科學技術研究所 裒武博士, 抗真菌試驗에 있어서 도와준 慶熙大學校 醫科大學 金燦洙博士에게 感謝하는 바이다. 또한 合成하는데 있어서 일을 돌보아준 助教 李宇省君에게 感謝하는 바이다.

### 文 獻

1. W.S. Gump, *U.S. Pat.*, 2, 272, 267, 2, 272, 268 (1942).
2. W.S. Gump. *U.S. Pat.*, 2, 253, 725(1944).
3. W.P. Ter Horst and E.L. Felix, *Ind. Eng. Chem.*, 35, 1255(1943).
4. W.S. Gump and M. Luthy, *U.S. Pat.*, 2, 353, 724(1944).
5. H.J. Turner, D.M. Reynolds and A.C. Redfield *Ind. Eng. Chem.*, 40, 450(1948).
6. S.S. Block, *Ind. Eng. Chem.*, 41, 1783(1949).
7. R. Pokorny, *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 1768(1941).
8. P.B. Marsh and M.L. Butler, *Ind. Eng. Chem.*, 38, 701(1946).
9. P.B. Marsh, M.L. Butler and B.S. Clark, *Ind. Eng. Chem.*, 41, 2176(1949).
10. R.M. Gregg and L.C. Zopf, *J. Am. Ph. A.*, 40, 390 (1951).
11. T.C. Grubb and H.A. Wands, *J. Am. Ph. A.*, 41, 59(1952).
12. C.A. Lawrence and A.L. Erdlandson, *J. Am. Ph. A.*, 42, 352 (1953).
13. C.A. Lawrence and A.L. Erdlandson, *Science*, 118, 274(1953).
14. M. Yokogawa et al, *J. Chiba Med. Soc.*, 37, 1, 16(1961).
15. M. Yokogawa et al, *J. Therap.*, 43, 5, 89 : 917(1961).
16. C.S. Kim, H.W. Kim and C.Y. Kim, *J. Kor. Med. Assoc.*, 7, 9, 847(1964).
17. C.S. Kim and C.Y. Kim, *ibid.*, 7, 9, 855(1964).
18. P. Noone, *Pharm. J. (London)*, 25, 118(1970).
19. L. Haskelberg, *J. Org. Chem.*, 12, 426(1947).
20. E. Ebel, J. Bell, A. Fries, C. Kasey and J.M. Berkebile, *J. Chem. Educ.*, 24, 449(1947).
21. R.E. Buckles and S. Wawzonek, *J. Chem. Educ.*, 25, 514(1948).
22. R.G. Wilkinson, R.G. Shepherd. J.P. Thomas and C. Baughn, *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 2212(1961)
23. A. Furst, "Chemistry of Chelation in Cancer", C.C. Thomas Publ. (1963).
24. R. Adams, L.F. Fieser, W.E. Bachmann, T.R. Johnson and H.R. Snyder, *Org. React.*, 6, 1, 303 (1957).
25. F.F. Blick and F.J. McCarty, *J. Org. Chem.*, 24, 8, 1061(1959).
26. S.V. Lieberman and E.C. Wagner, *J. Org. Chem.*, 14, 6, 1001(1949).
27. Y. Hamada, H. Matsuoka and H. Fukatsu, *J. Pharm. Soc. Jap.*, 91, 5, 565(1971).
28. Y. Hamada and F. Tomita, *J. Pharm. Soc. Jap.*, 88, 1361(1968).