

アリザリン関連物質の染色性、抗菌性 および抗酸化性について

近畿職業能力開発大学校 登 成 健之介

Dyeing, Antibacterial and Antioxidative Activity of Alizarin
Related Compounds

Kenosuke TONARI

要約 アリザリンの各種金属塩をつくり染色性、ペーパーディスクによる抗菌性を調べた。アリザリンとLi⁺, Na⁺, K⁺のアルカリ金属イオンによる金属塩の染色性は劣るが、2価および3価の金属イオン (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Ba⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Ni⁺⁺, Fe⁺⁺⁺およびAl⁺⁺⁺) による染色性は比較的良好であった。これら金属塩の抗菌性についてはこの逆で2価および3価イオンより1価イオンとの金属塩の方が効果が認められた。

また、アリザリン関連物質のユグロン、ケルセチン、カテキンの抗酸化性、抗菌性を分子軌道エネルギー(HOMO、LUMO)から導かれる絶対的電気陰性度 (χ)、絶対的ハードネス (η) および生体反応指標としてアミノ酸 (システイン) とアリザリン関連物質との反応性を示す電荷移動数 (ΔN) および結合時の安定化エネルギー (ΔE) を取り上げ検討した。

その結果、抗酸化性を示す指標である過酸化価値 (POV) および抗菌性の指標である最小阻止濃度 (MIC) とともに χ 、 η 、 ΔN 、 ΔE と強く相関し、フラボン系のカテキン、ケルセチンの方がキノン系のアリザリン、ユグロンより抗菌抗酸化性を有することが判明した。

I 緒言

アリザリン (1,2-Dihydroxyanthraquinone) は天然染料のアカネ (*Rubia cordifolia* L.) の根に配糖体として含まれる物質でアントラキノン骨格を有する2価のフェノール化合物である。本物質は金属塩を介する染料 (媒染染料) として知られており、特にアルミニウムとカルシウムを併用した染色法はトルコ赤として歴史的にも有名である。

本物質の各種金属塩の染色性および抗菌性について検討すると共に、構造の似たユグロン (クルミの産生

するファイトトキシンで下草の生育を阻害する)、ケルセチン (各種植物に広く存するフラボン化合物) およびカテキン (茶葉中のポリフェノール化合物) の抗菌、抗酸化作用について、前報^{(1),(2)}で述べた分子軌道エネルギー(HOMO,LUMO)より得られる絶対的電気陰性度 (χ) および絶対的ハードネス (η) より検討した。

II 実験

1) 試薬: アリザリン、ユグロン、ケルセチン、カテキンは市販特級試薬を用いた。

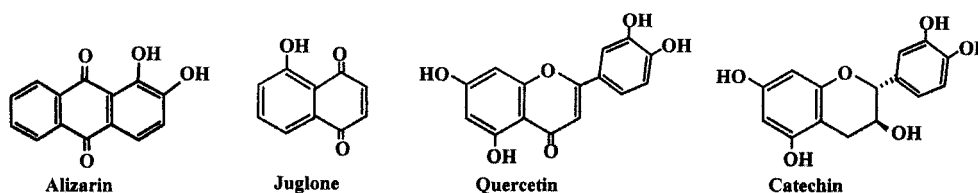


Fig. 1 Structures of Alizarin Related Compounds

2) アリザリン金属塩の染色液

アリザリン1mmol (240mg) に対して2ミリグラムイオンのアルカリ金属イオンおよびアルカリ土類金属イオン (Li⁺, Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺およびBa⁺⁺) を含むよう添加し (各水酸化物2mmol添加)、全量20mlの染色液とした。

また、その他の金属イオン (Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Ni⁺⁺, Fe⁺⁺⁺およびAl⁺⁺⁺) はアリザリン1mmol を5% NaOH2ml に分散後、4ミリグラムイオンの金属イオンを含むようCuSO₄・5H₂O (4mmol)、ZnCl₂ (4mmol)、NiSO₄ (4mmol)、FeCl₃ (2mmol)、AlCl₃・6H₂O (4mmol) を加え、全量20mlの染色液とした。

3) アリザリン金属塩の染色性比較

5cm角のガーゼ2枚用意し、各染色液に60分浸漬、軽く水洗いし、しばって乾燥 (100℃、10分) させる。一方は同液に一夜浸漬し、同条件で処理し、乾燥後、肉眼による対比を行った。

4) アリザリン金属塩のペーパーディスク法による抗菌性試験

試料としてはアリザリン0.2mmol (48mg) に対して0.4ミリグラムイオンになるよう各金属イオンを添加する。

即ち、2) で述べた各該当水酸化物、塩化物、硫酸塩を1.2mlの水に溶解あるいは分散させた後、1.2mlのDMSO (ジメチルスルホキサイド) を加えて加温溶解させる。(2%アリザリン含有液)

次にペーパーディスク (直径8mm) を各試験液に1分浸漬後、取り出し、反応板上で軽く風乾させる。試験菌 (*Bacillus subtilis* (IFO3009), *Escherichia coli* (IFO3301)) を塗布した標準寒天培地上に試験液を含んだペーパーディスクを置き、37℃、24時間培養後、形成した阻止円の大きさを測る。

5) 抗酸化性試験 (過酸化物質 (POV) の測定)

アリザリン、ユグロン、ケルセチンおよびカテキンは3%EtOH-DMSO(1:1)溶液とし、各0.1mlを10gのオレイン酸に添加、分散させ (300ppm)、25℃、10000Lux照射下、経時時間毎のPOVを測定する。ブランクは10gのオレイン酸にEtOH-DMSO溶液0.1mlを添加した。POVの測定方法は前報⁽¹⁾による。

6) 抗菌性試験 (最小阻止濃度 (MIC) の測定)

上記5) で調整した各3%EtOH-DMSO溶液30μlをペーパーディスクに吸着させ、反応板上で風乾後、試験菌を塗布した標準寒天培地で培養、形成した阻止円の大きさより、前報⁽³⁾に示す回帰式 (*B.subtilis*: log(MIC) = -0.0695X + 3.74, *E.coli*: log(MIC) = -0.076X + 3.82, X:阻止円の直径(mm)) を

参考に計算値によるMICを求めた。次にこの計算値MICを参考に100ppmずつ濃度変化をつけた試験物質含有培地を作成、植菌、培養後、菌の生育を阻止する最小濃度を観測MIC値とした。

7) HOMO、LUMOによるχ、ηおよびアミノ酸との反応指標ΔNおよびΔE 前報⁽²⁾の方法による。

III 結果および考察

(1) アリザリン金属塩の染色性

アリザリンと金属イオンによる錯塩構造は不明の部分があるが、おそらくFig.2に示すような構造を含むものと推定される。

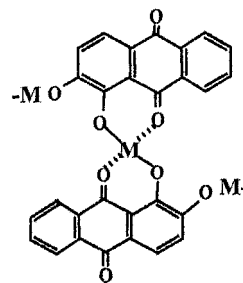


Fig. 2 Possible Structure for Alizarin Metal (M) Complex

アリザリンのアルカリ金属イオン (Li⁺, Na⁺, K⁺) による錯塩の染色性はTable 1にみるように水に溶けやすいためか洗着性に乏しく、60分染色と一夜浸漬染色では大差はなかった。

一方、アルカリ土類金属イオン (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Ba⁺⁺) およびCu⁺⁺, Zn⁺⁺, Ni⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Al⁺⁺⁺のような金属イオンでは60分染色より一夜浸漬染色の方が染着性は良好であった。

Table 1 Alizarin Metal Complexes for Dyeing Test

Metal Ions	Colors*	Fastness of Color**
Li ⁺	Red Purple	×
Na ⁺	"	×
K ⁺	"	×
Ca ⁺⁺	Violet	○
Mg ⁺⁺	"	○
Ba ⁺⁺	"	○
Cu ⁺⁺	Red Brown	◎
Zn ⁺⁺	Red Purple	◎
Ni ⁺⁺	Blue Violet	◎
Fe ⁺⁺⁺	Dark Violet	◎
Al ⁺⁺⁺	Red Brown	◎

*Dyeing solutions (1.2% Alizarin) was doubly diluted for the Comparison of Colors.

**Dyeing Test was conducted by Comparison of Guazes dyed for 1hr. with those of standing Overnight.

×: No Useful ○: Moderate ◎: Strong

(2) アリザリン金属塩のペーパーディスクによる抗菌性試験

アリザリンとアルカリ金属イオンの錯塩形成による抗菌性はTable2に示すように強いが、2~3価の金属イオンとの錯塩は水に対する溶解性が悪いいためか、アルカリ金属イオンのそれと比べて抗菌性が弱くなる。

Table 2 Inhibitory Zone Sizes* of Alizarin with Metal Complexes against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*

Alizarin Complex	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Alizarin	11(mm)	10(mm)
Complex with Li ⁺	11	11
" Na ⁺	11	15
" K ⁺	14	15
" Ca ⁺⁺	11	11
" Mg ⁺⁺	10	9
" Ba ⁺⁺	11	12
" Cu ⁺⁺	10	9
" Zn ⁺⁺	9	9
" Ni ⁺⁺	9	9
" Fe ⁺⁺⁺	8	8
" Al ⁺⁺⁺	10	8
salicylic acid	13	12
Sorbic acid	12	10

To a Sample of Alizarin(0.2mmol) was added Metal ions(0.4mgr ion) in water(1.2ml) and DMSO(1.2ml) and whole was heated to clear solution. After dipping paper disks in solution, the absorbed disks were briefly dried and placed in the quadrants of the plate and incubated (37°C,24hrs) for the measurement of Inhibitory zone sizes.

*Paper disk size : 8mm in diameter

(3) 抗酸化試験

アリザリン関連物質のPOVによる抗酸化試験の結果をFig.3に示す。カテキンの抗酸化効果は強く認められるが、ユグロンのそれは酸化を促進する傾向にあり、アリザリンもブランクと大差なく、抗酸化効果がほとんど認められなかった。ケルセチンについてはカテキンより劣るものの、抗酸化効果が若干認められた。

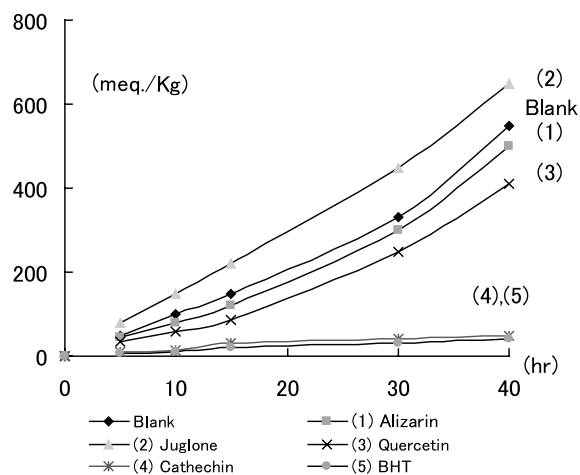


Fig. 3 POV of Oleic Acid added with Alizarin Related Compounds

Table3には χ 、 η とPOVの関係を示すが、 χ 、 η ともにPOVとの相関性が強いことが判った。

Table4より抗酸化性の強いものは χ の値が小さく、 η の値は大きいものが好ましいことが判り、 χ の降順(イオンになりやすい順)、 η の昇順(電子密度変化がしにくい順)に抗酸化性が強くなり、フラボン系のカテキン、ケルセチンの方がキノン系のアリザリン、ユグロンより抗酸化性が強いことが判明した。Fig.4にPOV40における χ 、 η の関係図を示した。

Table 4 Correlation Coefficients (r) between Log(POV) and χ , η of Alizarin Related Compounds

r	Log (POV30)	Log (POV40)
χ	0.9445	0.9335
η	-0.9352	-0.9498

(4) 抗菌性試験

アリザリン関連物質の抗菌性試験は前報^{(2),(3)}に示すように、ペーパーディスク法による阻止円の大きさから回帰式による計算MIC値を求め、この近辺濃度の試験物を含む培地を作成、植菌、培養後、菌の生育を阻止する最小濃度を観測MIC値とした。結果をTable5に示す。

Table 3 The Values of HOMO, LUMO, χ , η and Log(POV) of Alizarin Related Compounds

	HOMO	LUMO	χ	η	Log (POV30)	Log (POV40)
(1) Alizarin	-9.2751	-1.5611	5.418	3.857	2.48	2.70
(2) Juglone	-9.6254	-1.4835	5.554	4.071	2.65	2.81
(3) Quercetin	-8.8835	-0.7524	4.818	4.066	2.40	2.61
(4) Catechin	-8.9037	0.1114	4.396	4.508	1.60	1.70
(5) BHT	-8.6168	0.5276	4.045	4.572	1.48	1.60

HOMO, LUMO was calculated at EF and AM1 levels (eV).
POV30 and POV40: POV after 30h and 40h, respectively

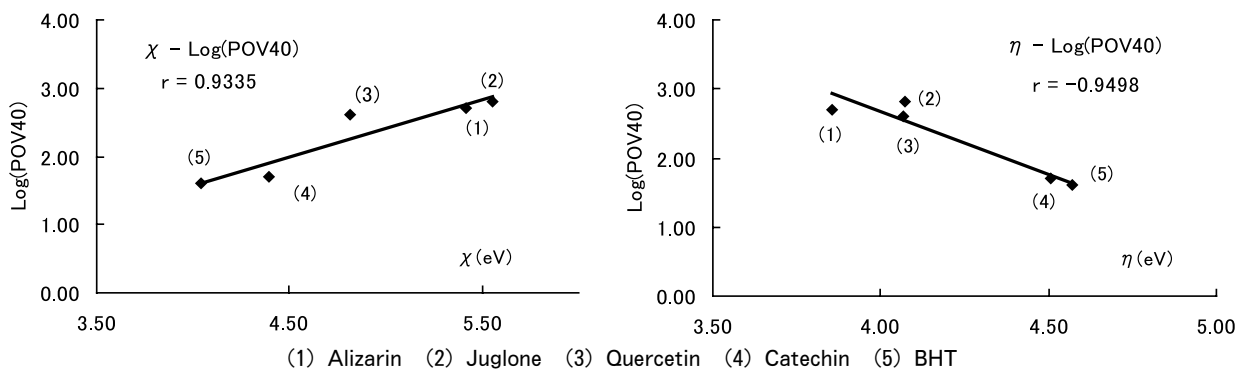


Fig. 4 Relationship between χ , η and Log(POV40) of Alizarin Related Compounds

Table 5 Observed MIC, Calculated MIC ($\mu\text{g/ml}$) and Inhibitory Zone Sizes (mm) against *B. subtilis* and *E. coli*

	Obsrd. MIC		Calcd. MIC		Zone Sizes	
	<i>B. sub.</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. sub.</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. sub.</i>	<i>E. coli</i>
Alizarin	1300	1500	1109	1368	10	9
Juglone	1500	1400	1302	1368	9	9
Quercetin	1000	1000	805	964	12	11
Catechin	800	900	686	809	13	12
BHA	700	600	585	570	14	14
Salicylic Acid	1000	900	805	964	12	11

The Calculated MIC was derived from the equation as follows⁽³⁾:
B. subtilis : $\text{Log}(\text{MIC}) = -0.0695X + 3.74$
E. coli : $\text{Log}(\text{MIC}) = -0.076X + 3.82$ (X: Zone Sizes in diameter)

Table6には χ 、 η とlog (MIC) の関係および生体内物質との反応性指標として酵素、蛋白質の活性基に見られるアミノ酸 (システインを代表アミノ酸として選択) との反応性を取り上げ、前報⁽²⁾と同様にlog (MIC) と対比した。

結果はTable7に示すように χ 、 η 、 ΔN 、 ΔE ともlog (MIC) と強く相関していることが判り、

アリザリン関連物質の内、抗菌性の強い物は χ 、 ΔN が小さく、 η 、 ΔE が大きいものが好ましいことが判った。

即ち、ここでもフラボン系のカテキン、ケルセチンの方がキノン系のアリザリン、ユグロンより抗菌性が強いことが示唆される。

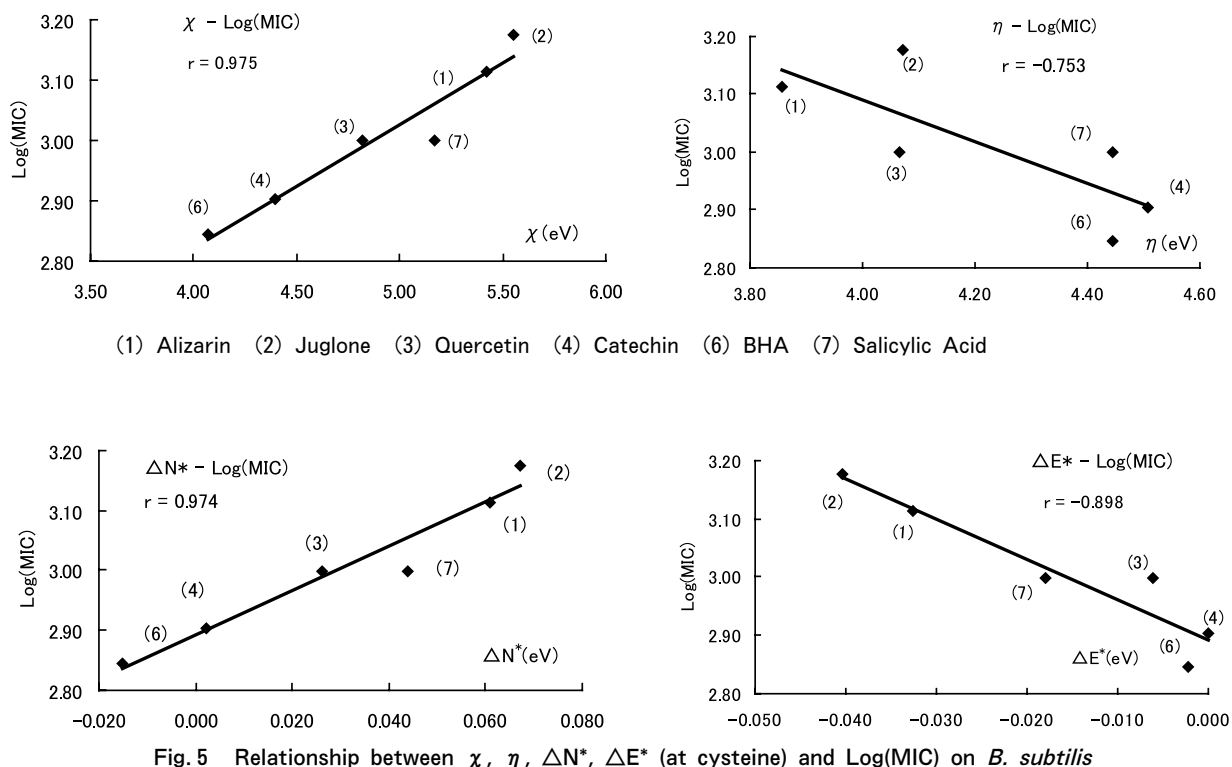
B.subtilis におけるこれらの関係をFig.5に示す。

Table 6 The Values of χ , η , ΔN^* , ΔE^* (eV) and Log(MIC) of Alizarin Related Compounds against *B. subtilis* and *E. coli* *at Cysteine

	χ	η	ΔN^*	ΔE^*	Log (MIC)	
					<i>B. sub</i>	<i>E. coli</i>
(1) Alizarin	5.418	3.857	0.0611	-0.0325	3.11	3.18
(2) Juglone	5.555	4.071	0.0672	-0.0404	3.18	3.15
(3) Quercetin	4.818	4.065	0.0261	-0.0061	3.00	3.00
(4) Catechin	4.396	4.507	0.0023	-0.0001	2.90	2.95
(6) BHA	4.068	4.444	-0.0152	-0.0022	2.85	2.78
(7) Salicylic Acid	5.172	4.446	0.0440	-0.0180	3.00	2.95
Cysteine	4.352	4.872				

Table 7 Correlation Coefficients (r) between χ , η , ΔN^* , ΔE^* and Log(MIC) of *B. subtilis* and *E. coli*

r	Log (MIC)		r	Log (MIC)	
	<i>B. sub</i>	<i>E. coli</i>		<i>B. sub</i>	<i>E. coli</i>
χ	0.9705	0.8948	ΔN^*	0.9737	0.905
η	-0.753	-0.8138	ΔE^*	-0.8977	-0.8319



IV 結論

- アリザリン金属塩の染色性は2,3価のイオンとの錯塩の方が1価（アルカリ金属）イオンのそれより強い。
- アリザリン金属塩の抗菌性は1価イオンの方が2,3価イオンより強い。
- アリザリン関連物質の抗酸化性はカテキンを除いてほとんど見出されなかった。中にはユグロンのように酸化を促進するものがあった。また、このことは各化合物の χ 、 η とPOVの相関性から支持され、 χ が小さく、 η が大きいものは抗酸化性が強く現れる。
- アリザリン関連物質の抗菌性を示すMICについては各化合物の χ 、 η およびアミノ酸（システイン）との反応性を示す ΔN 、 ΔE ともに相関性強く、 χ 、 ΔN が小さく、 η 、 ΔE が大きいものは抗菌性が強く現れる。

謝辞

本研究にご協力を得ました本校産業化学科卒業生の西川華さんに深謝いたします。

【参考文献】

- 登成健之介 フェノールおよびポリフェノールの抗酸化能について 職業能力開発報文誌15 (2) 65-68p (2003年)
- 登成健之介 ベンザルアセトン型化合物の抗菌、抗酸化性について 職業能力開発報文誌15 (2) 23-27p (2003年)
- 登成健之介 最小阻止濃度(MIC)の簡易測定について 職業能力開発報文誌15 (2) 61-64p (2003年)