

Beziehungen zwischen algistatischer Aktivität und physikalisch-chemischen Eigenschaften von 5-Amino-1-aryl-1*H*-tetrazolen

Thomas Schelenz*

Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Physikalische Chemie

Eingegangen am 15. Dezember 1999

Relationships Between Algistatic Activity and Physicochemical Properties of 5-Amino-1-aryl-1*H*-tetrazoles

Keywords: Heterocycles, Structure-activity relationships, Substituent effects, Algistatic activity, Tetrazoles

Abstract. A series of 20 5-amino-1-aryl-1*H*-tetrazoles was synthesized by diazotation of corresponding 1-amino-3-aryl-guanidines and tested for growth-inhibiting activity against autotrophic *Chlorella vulgaris* cultures. In the used tests the different algae growth was quantified by photometric measurements at 680 nm. From obtained dosage-effectivity relationships the reciprocal values of isoeffective concentrations c_{50} were derived and defined as activity parameters A in QSAR (quantitative structure-activity relationship) studies. It could be shown that the algistatic activity ($\log A$) of the tested

heterocycles strongly depends on hydrophobicity described by their octan-1-ol/water partition coefficients ($\log P$). The calculated linear relationships between $\log A$ and $\log P$ can be significantly improved by separate treatment of *meta*-/para- and *ortho*-substituted compounds or using an indicator variable to describe the lower activity of *ortho*-substituted 5-amino-1-aryl-1*H*-tetrazoles in common regression equations. The results are discussed and compared with analogous QSAR found for earlier tested series of N-heterocycles and compounds with urea structure.

5-Amino-1-aryl-1*H*-tetrazole verfügen mit muskelrelaxierenden und antiinflammatorischen [1, 2], antiarthritischen, analgetischen und ulcustherapeutischen [3, 4] sowie coccidiostatischen [5, 6] Eigenschaften über ein breites biologisches Wirkungsspektrum. Für isomere 5-Arylamino-1*H*-tetrazole und die unsubstituierte Leitstruktur 5-Amino-1*H*-tetrazol wurden darüber hinaus

antivirale [7], tuberculostatische [8] und wachstumsregulierende [9, 10] Wirkungen nachgewiesen. Dagegen stehen Untersuchungen zu algiziden oder algistatischen Effekten und Diskussionen quantitativer Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität für diese Wirkstoffgruppe bisher aus.

Zur effizienten Ermittlung algistatischer Aktivitäts-

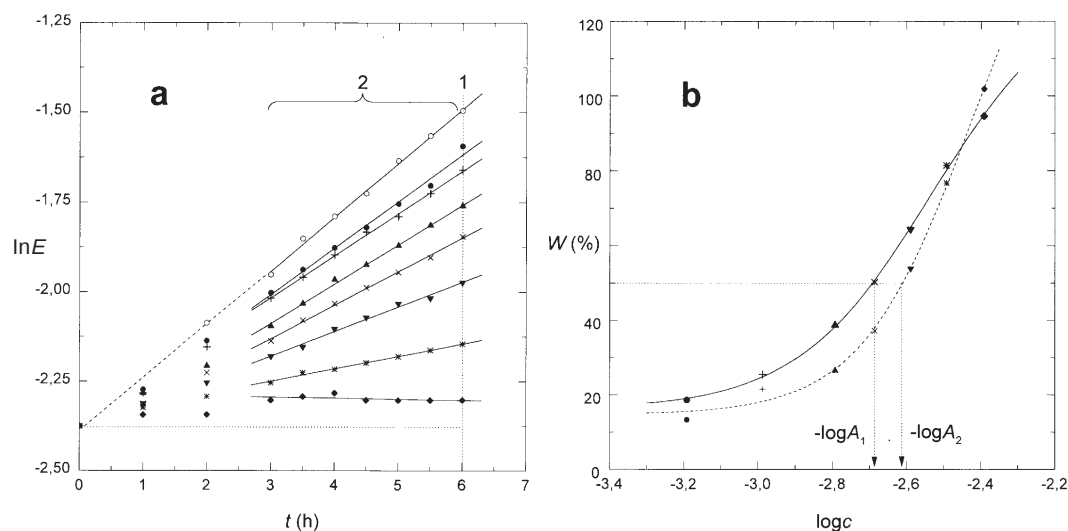


Abb. 1 Über Extinktionsmessungen (E) erhaltene Wachstumskurven (a) wirkstoff behandelter *Chlorella-vulgaris*-Kulturen ($\blacklozenge c = 4,05 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $\ast c = 3,22 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $\blacktriangledown c = 2,57 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $\times c = 2,06 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $\blacktriangle c = 1,61 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $+ c = 1,03 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $\bullet c = 6,43 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $\circ$ Kontrollkultur) und daraus resultierende Dosis-Wirkungs-Kurven (b) zur Ermittlung der Aktivitätsparameter $\log A_1$ und $\log A_2$ für die algistatische Wirksamkeit von 5-Amino-1-phenyl-1*H*-tetrazol (vgl. Text)

Tab. 1 Parameter zur Charakterisierung physikalisch-chemischer und biologischer Eigenschaften von 5-Amino-1-aryl-1H-tetrazolen

Verb.	R	log P^a)	pK _a ^{b)}	log A_1 (exp.) ^{c)}	log A_1 (ber.) ^{d)}	log A_2 (exp.) ^{e)}	log A_2 (ber.) ^{f)}
1	H	0,688	5,289	2,65	2,57	2,61	2,56
2	3-F	0,909	4,944	2,66	2,79	2,68	2,79
3	3-Cl	1,440	4,924	3,21	3,30	3,20	3,33
4	3-Me	1,236	5,300	3,09	3,10	3,13	3,12
5	3-NO ₂	0,669	4,540	2,79		2,64	
6	3-OMe	0,962	5,214	2,92	2,84	2,87	2,84
7	4-F	0,752	5,229	2,49	2,63	2,42	2,62
8	4-Me	1,198	5,444	3,15	3,07	3,23	3,08
9	4-NO ₂	0,770	4,109	3,01		2,92	
10	4-OH	0,326	5,724	2,19	2,22	2,26	2,19
11	4-OEt	1,315	5,510	3,31	3,18	3,29	3,20
12	3,4-Cl ₂	2,064	4,695*	3,84	3,91	3,90	3,97
13	3-Cl-4-Me	1,891	5,088*	3,76	3,74	3,89	3,79
14	3,4-(CH ₃) ₄	2,084	5,247*	4,01	3,93	4,00	3,99
15	2-Cl	0,870	4,890	2,40	2,37	2,40	2,38
16	2-Me	0,930	5,589	2,46	2,43	2,47	2,44
17	2-OMe	0,562	5,337	2,08	2,07	2,05	2,06
18	2,5-Cl ₂	1,606		3,11	3,09	3,19	3,13
19	2,5-Me ₂	1,455	5,586	2,98	2,94	2,99	2,98
20	2,3-(CH ₃) ₄	1,715		3,07	3,19	3,16	3,25

a) Dekadische Logarithmen der Octan-1-ol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (aus [23]). b) pK_a-Werte der isomeren NH-aciden 5-Arylamino-1H-tetrazole in Wasser bei 25 °C (aus [26]); die mit * gekennzeichneten Werte wurden über die in [26] angegebene Hammett-Beziehung berechnet. c) Aus Dosis-Wirkungs-Funktionen nach Methode 1 (vgl. Text) entnommene dekadische Logarithmen der reziproken molaren Effektkonzentrationen, die eine 50%ige Hemmung des autotrophen Wachstums synchroner *Chlorella-vulgaris*-Kulturen bewirken; den angegebenen Werten liegen mindestens zwei Bestimmungen zugrunde. d) Mit Gl. (7.1) berechnete log A_1 -Werte. e) Aus Dosis-Wirkungs-Funktionen nach Methode 2 (vgl. Text) experimentell ermittelte Aktivitätsparameter. f) Mit Gl. (7.2) berechnete log A_2 -Werte.

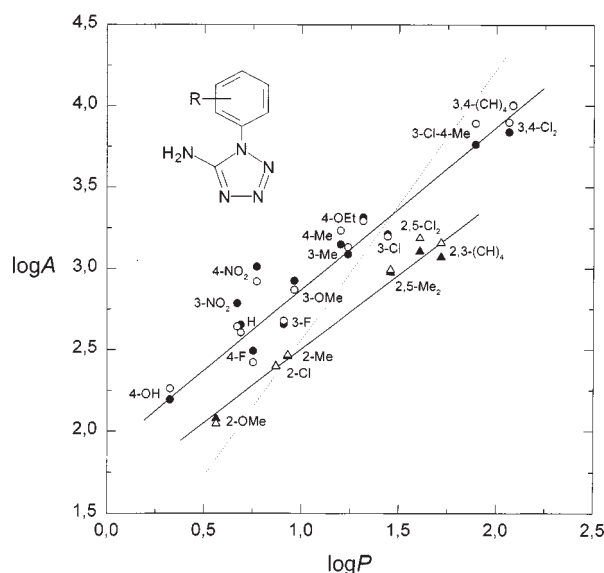


Abb. 2 Zusammenhänge zwischen den Logarithmen der algistatischen Wirkquantitäten log A_1 (●, ▲) bzw. log A_2 (○, △) und der durch die Logarithmen der Verteilungskoeffizienten log P beschriebenen Hydrophobizität von 5-Amino-1-aryl-1H-tetrazolen; eingezeichnet sind die Regressionsgeraden zu Gl. (6.1.1) und (6.2.1) für log A_1 meta- und para- (●) bzw. ortho-substituierter (▲) Verbindungen sowie zu der [25] entnommenen Beziehung (gestrichelt) zwischen Wasserlöslichkeit (-log S) und Hydrophobizität für 5-Amino-1-aryl-1H-tetrazole mit nicht wasserstoffbrückenbindenden Substituenten in meta- und para-Position

parameter für derartige QSAR-Analysen haben sich Synchronkulturen des chlorococcalen Einzellers *Chlorella vulgaris* mehrfach bewährt. So wurden im Arbeitskreis bisher isochemische Serien alkyl- und arylsubstituierter Hydrazin- und Harnstoffderivate [11–19], di-substituierter Benzole (vgl. Übersicht in [20]) und N-Heterocyclen [21, 22] erfolgreich auf ihre wachstumshemmende Wirkung an autotroph kultivierten *Chlorella-vulgaris*-Suspensionen getestet, wobei für Verbindungen mit "unspezifischen" Substituenten (Alkyl-, Alkoxygruppen, Halogene) gesicherte lineare Beziehungen zwischen algistatischer Aktivität und Hydrophobizität nachgewiesen werden konnten.

Als Beitrag zur weiteren Kenntnis quantitativer Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität werden in der vorliegenden Arbeit Ergebnisse entsprechender Untersuchungen zur Hemmung des autotrophen Wachstums synchroner *Chlorella-vulgaris*-Kulturen durch 5-Amino-1-aryl-1H-tetrazole vorgestellt und im Zusammenhang mit quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die algistatische Aktivität bereits beschriebener Wirkstoffgruppen diskutiert.

Ergebnisse und Diskussion

5-Amino-1-aryl-1H-tetrazole hemmen substituenten- und dosisabhängig das autotrophe Wachstum synchro-

ner *Chlorella-vulgaris*-Kulturen (Abb. 1). Die dabei beobachteten Wirkungen können relativ zu unbehandelten Kontrollkulturen als prozentuale Wachstumshemmungen W quantifiziert werden.

$$W = 100 \cdot \frac{Y_K - Y_W}{Y_K} \quad (1)$$

In Gl. (1) stellen Y_W und Y_K Funktionen dar, die das Wachstum wirkstoff behandelter Test- und unbehandelter Kontrollkulturen charakterisieren. Sie sind in dieser Arbeit wie folgt definiert (Abb. 1a):

1. In herkömmlicher Weise [11–22] über die zu den Zeiten $t = 0$ ($E_{W,0}$, $E_{K,0}$) und $t = 6$ h ($E_{W,6}$, $E_{K,6}$) bei $\lambda = 680$ nm gemessenen Extinktionen von Test- und Kontrollkulturen (Methode 1).

$$Y_W = E_{W,6} - E_{W,0} \quad (2.1)$$

$$Y_K = E_{K,6} - E_{K,0} \quad (2.2)$$

2. Alternativ aus den Steigungen (Wachstumsgeschwindigkeiten) der ab 3 Stunden Testdauer analysierten linearen Beziehungen zwischen $\ln E$ und t (Methode 2).

$$Y_W = \frac{d \ln E_W}{dt} \quad (3.1)$$

$$Y_K = \frac{d \ln E_K}{dt} \quad (3.2)$$

Dabei sind Wirkungen über 100% möglich, sofern die Organismen nicht nur in ihrem Wachstum beeinflusst, sondern darüber hinaus geschädigt werden ($Y_W < 0$).

Die grafische Darstellung der erhaltenen Wachstumshemmungen W als Funktion der eingesetzten Wirkstoffkonzentration ($\log c$) liefert sigmoidale Dosis-Wirkungskurven (Abb. 1b). Ihnen wurden numerisch die Reziprokwerte der molaren Effekorkonzentrationen entnommen, die eine 50%ige Hemmung des Algenwachstums bewirken (c_{50}), und als wirkstoffspezifische Aktivitätsparameter A definiert.

$$A = \frac{1}{c_{50}} \quad (4)$$

In Tab. 1 sind die nach beiden Methoden ermittelten dekadischen Logarithmen der Wirkquantitäten ($\log A_1$,

$\log A_2$) gegenübergestellt. Sie unterscheiden sich nicht wesentlich, was auf die unmittelbare und konstante Wirkungsausprägung während der Testdauer hinweist. Ihre deutliche Substituentenabhängigkeit kann zur Untersuchung quantitativer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR) herangezogen werden. Im eigentlichen Sinne sind dazu verschiedene Gruppen von Moleküldeskriptoren als direkte Strukturparameter erforderlich. Diese können in QSAR im weiteren Sinne durch tabellierte Substituentenkonstanten oder physikalisch-chemische Eigenschaften der Wirkstoffe ersetzt werden.

Eine entsprechende Hansch-Analyse liefert statistisch signifikante, jedoch nicht überzeugende Zusammenhänge zwischen den biologischen Aktivitäten ($\log A$) aller Verbindungen (1–20) und den Logarithmen ihrer Octan-1-ol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$ s. Tab. 1, Daten aus [23]).

$$\log A_1 = 0,913(\pm 0,222) \log P + 1,888(\pm 0,282) \quad (5.1) \\ n = 20, r = 0,898, s = 0,236, F = 74,9^1$$

$$\log A_2 = 0,985(\pm 0,205) \log P + 1,810(\pm 0,262) \quad (5.2) \\ n = 20, r = 0,922, s = 0,218, F = 101,4$$

Eine deutlich verbesserte Anpassung an die experimentellen Daten wird erzielt, wenn *meta*- und *para*- (1–14) sowie *ortho*-substituierte (15–20) Verbindungen zunächst getrennt behandelt werden (Abb. 2).

meta- und *para*-Substitution:

$$\log A_1 = 0,994(\pm 0,117) \log P + 1,876(\pm 0,158) \quad (6.1.1) \\ n = 12, r = 0,986, s = 0,097, F = 359,0$$

$$\log A_2 = 1,032(\pm 0,134) \log P + 1,845(\pm 0,181) \quad (6.1.2) \\ n = 12, r = 0,983, s = 0,112, F = 293,2$$

ortho-Substitution:

$$\log A_1 = 0,910(\pm 0,158) \log P + 1,598(\pm 0,200) \quad (6.2.1) \\ n = 6, r = 0,992, s = 0,059, F = 254,9$$

$$\log A_2 = 1,005(\pm 0,143) \log P + 1,511(\pm 0,181) \quad (6.2.2) \\ n = 6, r = 0,995, s = 0,054, F = 380,9$$

NO_2 -substituierte Verbindungen (5, 9) wurden als Ausreißer angesehen und bei den Berechnungen nicht berücksichtigt. Ihre überhöhte Wirksamkeit gegenüber *Chlorella vulgaris* konnte bereits mehrfach beobachtet [11, 20, 21] und für disubstituierte Benzole durch Aktivitätsinkremente quantifiziert werden [20].

¹) Für die Berechnungen wurden die erforderlichen Daten direkt aus Kalkulationsprogrammen übernommen und ungerundet der Regressionsanalyse unterzogen; in Klammern sind die Konfidenzintervalle zur Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ angegeben; n = Stichprobenumfang, r = Korrelationskoeffizient, s = Standardabweichung der Regression, F = Testgröße zur Prüfung der Regressionsgleichung auf Signifikanz.

Das im Sinne geringerer Aktivität abweichende Verhalten *ortho*-substituierter Verbindungen (15–20) entspricht ebenfalls den Ergebnissen früherer Untersuchungen [12, 13, 15, 16, 18, 21] und ist auf sterische und konformative Besonderheiten dieser Substitution zurückzuführen. Der über das gesonderte Verhalten bei der Verteilung [23] hinausgehende biologische *ortho*-Effekt kann in einer für alle Verbindungen gültigen QSAR berücksichtigt werden, indem *ortho*-substituierten Tetrazolen der Wert 1, allen übrigen Verbindungen der Wert 0 einer Indikatorvariablen X_o zugeordnet wird.

$$\log A_1 = 0,974(\pm 0,088) \log P - 0,378(\pm 0,093)X_o + 1,801(\pm 0,121) \quad (7.1)$$

$n = 18, r = 0,989, s = 0,087, F = 328,8$

$$\log A_2 = 1,025(\pm 0,096) \log P - 0,367(\pm 0,102)X_o + 1,853(\pm 0,132) \quad (7.2)$$

$n = 18, r = 0,988, s = 0,095, F = 298,6$

Da die Logarithmen der Octan-1-ol/Wasser-Verteilungskoeffizienten über einfache Beziehungen mit den Logarithmen der zugehörigen Transportgeschwindigkeiten ($\log k$ [24]) und Wasserlöslichkeiten ($\log S$ [25]) der 5-Amino-1-aryl-1*H*-tetrazole sowie mit hydrophoben Substituentenkonstanten (π^2 [23]) verschiedener Standardserien verknüpft sind, lassen sich die $\log P$ -Werte in den Beziehungen (5.1)–(7.2) prinzipiell durch $\log k$ -, $\log S$ - oder $\Sigma\pi$ -Werte ersetzen. Allerdings sind dann die in [23–25] angegebenen Korrekturen und Einschränkungen zu berücksichtigen.

Ein zusätzlicher elektronischer Einfluß auf die biologische Aktivität ist innerhalb des gegebenen Substituentenmusters nicht sicher nachweisbar. Aus multiplen linearen Regressionsanalysen mit verschiedenen Sätzen elektronischer Substituentenkonstanten oder experimentell ermittelten pK -Werten für Isomerie- und Dissoziationsgleichgewichte der untersuchten Tetrazole (Tab. 1, Daten aus [26]) resultieren lediglich für die zu den Gleichungen (6.1.1) und (6.1.2) gehörenden Stichproben statistisch signifikante Beziehungen. Diese könnten wegen der experimentellen Fehler bei den biologischen Tests zufällig sein.

$$\log A_1 = 1,072(\pm 0,107) \log P + 0,282(\pm 0,213) pK_a + 0,309(\pm 1,191) \quad (8.1)$$

$n = 12, r = 0,993, s = 0,072, F = 326,5$

$$\log A_2 = 1,126(\pm 0,117) \log P + 0,337(\pm 0,234) pK_a - 0,031(\pm 1,309) \quad (8.2)$$

$n = 12, r = 0,992, s = 0,080, F = 292,8$

Damit sind die in dieser Arbeit diskutierten quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen mit den für "unspezifisch" substituierte 2-Amino-5-aryl-1,3,4-oxadiazole [21] und 3-Ethyl-4-aryl-1,2,4-triazolin-5-one [22] an *Chlorella vulgaris* gefundenen QSAR vergleichbar und können mit ihnen zu einer für diese N-Heterocyclen gültigen gemeinsamen Struktur-Wirkungs-Beziehung zusammengefaßt werden ³⁾.

$$\log A_1 = 1,107(\pm 0,138) \log P - 0,243(\pm 0,196)X_o + 1,636(\pm 0,231) \quad (9)$$

$n = 49, r = 0,924, s = 0,293, F = 133,9$

Die Regressionskoeffizienten in (9) ändern sich nicht wesentlich, wenn in weitergehender Verallgemeinerung die publizierten Aktivitäts- und Hydrophobizitätsparameter für analog substituierte 1-Aryl-harnstoffe [13], 1-Aryl-thioharnstoffe [15], 1-Aryl-2-methyl-isothioharnstoffe [16], 1-Alkyl-thioharnstoffe [17], und 1-Amino-3-aryl-guanidine [18] in diese QSAR einbezogen werden ⁴⁾.

$$\log A_1 = 0,934(\pm 0,075) \log P - 0,301(\pm 0,124)X_o + 1,696(\pm 0,123) \quad (10)$$

$n = 131, r = 0,910, s = 0,305, F = 309,8$

Lineare Zusammenhänge zwischen biologischer Aktivität ($\log A$) und Hydrophobizität ($\log P$) folgen aus mehreren Struktur-Wirkungs-Theorien (zusammenfassende Darstellungen in [31] und [32]). Die an *Chlorella vulgaris* nachgewiesenen Beziehungen zur Beschreibung des Hydrophobizitätseinflusses auf die algistische Aktivität auch strukturell differenzierter Wirkstoffgruppen korrespondieren mit einem mathematisch fundierten Proteinbindungsmodell nach Franke [32, 33],

²⁾ Nach [27] ist die hydrophobe Substituentenkonstante π des Substituenten R (π_R) in einer Serie von Verbindungen RX definiert als die Differenz der Logarithmen der Verteilungskoeffizienten des Derivats RX ($\log P_{RX}$) und der unsubstituierten Stammverbindung HX ($\log P_{HX}$): $\pi_R = \log P_{RX} - \log P_{HX}$; eine umfangreiche Zusammenstellung von π -Konstanten für die Standardserie monosubstituierter Benzole enthält [28].

³⁾ Die $\log P$ -Werte der 2-Amino-5-aryl-1,3,4-oxadiazole wurden [29] entnommen oder nach Angaben in [29] und π -Konstanten aus [30] berechnet, die Hydrophobizitätsparameter der 3-Ethyl-4-aryl-1,2,4-triazolin-5-one waren aus $\log P$ -Werten in [22] zugänglich; die individuellen Regressionsgleichungen der Heterocyclengruppen sind im Ergebnis statistischer Tests zur Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ zwar als nicht identisch anzusehen, jedoch lassen die Konfidenzintervalle der Regressionskoeffizienten und sachliche Überlegungen einen Vergleich der Beziehungen durchaus zu.

⁴⁾ Die Logarithmen der Verteilungskoeffizienten der in [13] und [15–18] untersuchten Harnstoffderivate wurden über das π -System aus den publizierten $\log P$ -Werte der Stammverbindungen ohne Berücksichtigung möglicher *ortho*-Effekte berechnet (vgl. [17]).

das die biologische Aktivität in Serien biochemisch inverte Verbindungen auf relativ unspezifische ("physikalische") Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen zurückführt und lineare log *A*-log *P*-Beziehungen mit Steigungen von $1,0 \pm 0,2$ oder $0,5 \pm 0,2$ (mehr oder weniger vollständige Überführung des Wirkstoffs in das Innere der bindenden hydrophoben Region) bis zu einer komplex bestimmten kritischen Hydrophobizität begründet. Diese Hydrophobizität ist für die untersuchten 5-Amino-1-aryl-1*H*-tetrazole mit Substituenten in *meta*- und *para*-Position im Schnittpunkt der Regressionsgeraden für biologische Aktivität und Wasserlöslichkeit [25] bei $\log P \approx 1,5^5$ erreicht (Abb. 2). Für Wirkstoffe mit deutlich höherer Hydrophobizität sind die für den definierten Effekt (50%ige Wachstumshemmung) erforderlichen Konzentrationen praktisch nicht verfügbar. Auf die Synthese und Testung von 5-Amino-1-aryl-1*H*-tetrazolen mit $\log P \gg 1,5$ kann daher verzichtet werden.

Frau A. Sonntag und Herrn J. Vogel sei für die Mithilfe bei den experimentellen Untersuchungen, Herrn Prof. Dr. W. Schäfer für die Förderung der Arbeit herzlich gedankt.

Beschreibung der Versuche

Die in Tab. 1 aufgeführten Verbindungen wurden nach Angaben von Finnegan u.a. [34] durch Diazotierung entsprechender 1-Amino-3-aryl-guanidinium-nitrate und Cyclisierung der intermediären Guanylazide synthetisiert [1, 2]. Die dazu erforderlichen Aminoguanidine waren nach ebenfalls bekannten Verfahren [1, 2, 34–36] durch Hydrazinolyse der jeweiligen 1-Aryl-2-methyl-isothiuronium-iodide zugänglich, die nach S-Methylierung der korrespondierenden Thioharnstoffe erhalten wurden. Diese waren kommerziell verfügbar oder wurden nach Vorschriften in [37] und [38] aus den Arylaminen und Ammoniumthiocyanat bzw. Benzoylisothiocyanat hergestellt.

Zur physikalisch-chemischen Charakterisierung der 5-Amino-1-aryl-1*H*-tetrazole wurden Octan-1-ol/Wasser-Verteilungskoeffizienten, Transportgeschwindigkeiten, Wasserlöslichkeiten und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten experimentell bestimmt und als hydrophobe bzw. elektronische Molekülparameter bereitgestellt [23–26].

Die Beurteilung ihrer algistatischen Aktivität erfolgte in einem standardisierten autotrophen Wachstumstest aus dem *Chlorella*-Testsystem nach Böhm u.a. [39], welches über die Beeinflussung komplexer Wachstums- und Entwicklungsparameter der thermophilen chlorococcalen Alge *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 var. *vulgaris* Fott et Novakova 1969, Stamm Böhm/Borns 1972/1 eine effektive Charakterisierung algistatisch wirksamer Verbindungen ermöglicht.

Die Anzucht und Entwicklungssynchronisation der Orga-

nismen in einem auf Angaben in [40] basierenden Nährmedium erfolgte durch artspezifisch optimierte Kultivierung in einem Lichtthermostaten (37,5 °C, 10 l Luft mit 2 Vol.-% CO₂/h, gleichmäßige Belichtungsintensität von 28 W/m²) bei einem Licht-Dunkel-Wechsel von 8:16 Stunden.

In unmittelbarer Vorbereitung der Tests wurden zu je 80 ml einer mit Nährlösung verdünnten Algensuspension konstanter Zelldichte (etwa 7,5 Mio. Autosporen/ml, $E_0 \approx 0,1$) in handelsüblichen Reagenzgläsern (30/200 mm) Volumina zwischen 0,1 ... 1,0 ml einer Stammlösung des zu untersuchenden Tetrazols in Dimethylsulfoxid (DMSO) und das zu einem Gesamtvolumen von 1,0 ml DMSO gehörende Differenzvolumen des Lösungsmittels pipettiert. Anschließend wurden die Suspensionen parallel mit nur DMSO-haltigen Kontrollkulturen im Lichtthermostaten 6 Stunden belichtet und begast.

Den Kulturen wurden zu Beginn und weiter im Abstand von 30 min Proben entnommen und deren Extinktion im Absorptionsmaximum des Chlorophylls bei 680 nm gemessen. Obwohl diese Extinktionen nephelometrische Anteile enthalten, korrelieren sie mit typischen Wachstumsparametern wie Zellzahl, Zellvolumen oder Trockenmasse und können somit zur effektiven Beurteilung des Zellwachstums während der Testdauer herangezogen werden.

Literatur

- [1] C. D. Bossinger, T. Enkoji (Amour Pharm. Comp., USA), US-Pat. 3278381, 1966; Chem. Abstr. **1966**, 65, 20137. T. Enkoji, C. D. Bossinger (Amour Pharm. Comp., USA), US-Pat. 3374145, 1968; Chem. Abstr. **1968**, 69, 43917
- [2] Amour Pharm. Comp., USA, GB-Pat. 1208116, 1970; Chem. Abstr. **1971**, 74, 87995. GB-Pat. 1209880, 1970; Chem. Abstr. **1971**, 74, 141818
- [3] J. R. J. Sorenson, J. Med. Chem. **1976**, 19, 135
- [4] J. R. J. Sorenson, US-Pat. 4221785, 1980; Chem. Abstr. **1981**, 94, 25225. US-Pat. 4999347 A, 1991; Chem. Abstr. **1991**, 115, 174674
- [5] P. Kulsa, L. H. Peterson (Merck & Co., Inc., USA), DE-Pat. 2334821, 1974; Chem. Abstr. **1974**, 80, 108535
- [6] H. H. Mrozik (Merck & Co., Inc., USA), US-Pat. 3830928, 1974; Chem. Abstr. **1975**, 82, 64495
- [7] W. B. Scanlon, W. L. Garbrecht, ZA-Pat. 6804307, 1970; Chem. Abstr. **1970**, 73, 56100
- [8] E. Jeney, T. Zsolnai, Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I Orig. **1960**, 177, 215, 220
- [9] S. M. Mashtakov, Byull. Inst. Biol., Akad. Nauk B. SSR **1960**, 161; Chem. Abstr. **1963**, 58, 1876
- [10] E. E. Schweizer, B. J. Rogers, Weeds **1964**, 12, 7
- [11] C.-R. Kramer, E. Borns, H. Böhm, Biochem. Physiol. Pflanz. **1979**, 174, 223
- [12] C.-R. Kramer, L. Beck, H. Arndt, Biochem. Physiol. Pflanz. **1979**, 174, 672
- [13] C.-R. Kramer, E. Borns, L. Beck, A. Pfeffer, Biochem. Physiol. Pflanz. **1980**, 175, 664
- [14] C.-R. Kramer, L. Beck, H. Arndt, Biochem. Physiol. Pflanz. **1982**, 177, 192
- [15] C.-R. Kramer, Th. Schelenz, E. Borns, Biochem. Physiol.

⁵⁾ Im Experiment ist dieser kritische Wert durch die gegenüber den Löslichkeitsuntersuchungen [25] höhere Temperatur und den DMSO-Zusatz bei den biologischen Tests (vgl. Beschreibung der Versuche) geringfügig in Richtung zunehmender Hydrophobizität verschoben.

- Pflanz. **1982**, 177, 515
- [16] C.-R. Kramer, Th. Schelenz, E. Borns, Biochem. Physiol. Pflanz. **1984**, 179, 419
- [17] Th. Schelenz, C.-R. Kramer, Biochem. Physiol. Pflanz. **1985**, 180, 353
- [18] C.-R. Kramer, Th. Schelenz, H. Arndt, Biochem. Physiol. Pflanz. **1985**, 180, 565
- [19] Th. Schelenz, P. Bordes, Biochem. Physiol. Pflanz. **1986**, 181, 359
- [20] C.-R. Kramer, J. Klunker, Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz **1994**, 28, 545
- [21] D. Herbert, Dissertation (A), Päd. Hochsch. Köthen 1988
- [22] J. Stein, Dissertation (B), Päd. Hochsch. Potsdam 1989
- [23] Th. Schelenz, W. Schäfer, J. Prakt. Chem. **1999**, 341, 499
- [24] Th. Schelenz, J. Prakt. Chem. **2000**, 342, 87
- [25] Th. Schelenz, W. Schäfer, J. Prakt. Chem., **2000**, 342, 91
- [26] Th. Schelenz, W. Schäfer, J. Prakt. Chem. **2000**, 342, 205
- [27] T. Fujita, J. Iwasa, C. Hansch, J. Am. Chem. Soc. **1964**, 86, 5175
- [28] C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger, K. H. Kim, D. Nikaitani, E. J. Lien, J. Med. Chem. **1973**, 16, 1207
- [29] C.-R. Kramer, Wiss. Z. Päd. Hochsch. Erfurt-Mühlhausen **1978**, 14, 76
- [30] C. Hansch, K. H. Kim, R. H. Sarma, J. Am. Chem. Soc. **1973**, 95, 6447
- [31] J. K. Seydel, K.-J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen. Methoden der Quantitativen Struktur-Wirkungs-Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 1979
- [32] R. Franke, Optimierungsmethoden in der Wirkstoffforschung – Quantitative Struktur-Wirkungs-Analyse, in Beiträge zur Forschungstechnologie, Sonderbd. 2 (G. Lotz, G. Etzold, D. Döring, D. Schulze, T. Köster, Hrsg.), Akademie-Verlag, Berlin 1980
- [33] R. Franke, Acta Biol. Med. Ger. **1970**, 25, 789
- [34] W. G. Finnegan, R. A. Henry, E. Lieber, J. Org. Chem. **1953**, 18, 779
- [35] S. Birtwell (Imperial Chem. Ind. Ltd., UK), GB-Pat. 800869, 1958; Chem. Abstr. **1959**, 53, 7098
- [36] F. Kurzer, J. Chem. Soc. **1961**, II, 1617
- [37] F. Kurzer, Org. Synth. **1951**, 31, 21
- [38] L. Frank, P. V. Smith, Org. Synth. **1948**, 28, 89
- [39] H. Böhm, Wiss. Hefte Päd. Inst. Köthen **1973**, 2, 9
- [40] A. Kuhl, H. Lorenzen, Handling and Culturing of *Chlorella*, in Methods in Cell Physiology, Vol. 1 (D. Prescott, Ed.), Academic Press, New York 1964, pp. 159-187
- Korrespondenzanschrift:
Dr. Th. Schelenz
Institut für Physikalische Chemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Kurt-Mothes-Straße 2
D-06120 Halle (Saale)
Fax: Internat. code (0)345 5527028
e-Mail: schelenz@chemie.uni-halle.de