

VERSUCHE ZUR ENTDECKUNG NEUER FUNGISTATIKA—II NITRO-VERBINDUNGEN

TIBOR ZSOLNAI

Hygienisches Institut der Medizinischen Universität in Debrecen, Ungarn, Hungary
(Vorstand: Universitätsprofessor Dr. med. ENDRE JENEY)

(Received 22 August 1960)

Abstract—The fungical action of 184 nitrogen compounds has been studied, both in 10 % beef serum containing dissolved mash-agar-culture medium, and in 3 % agar containing solid mash-agar-culture medium. The reaction mechanism under these conditions has been studied for those compounds which proved to be most active. Attempts were made to relate chemical structure to fungical activity, and to reaction mechanism, for this group of compounds.

IN UNSERER früheren Mitteilung haben wir über die Ergebnisse berichtet, die wir bei der Untersuchung der *in vitro* ausgeübten fungistatischen Wirkung verschiedener substituierter Phenole und Phenol-äther, sowie beim Studieren ihres fungistatischen Wirkungsmechanismus erreicht hatten.¹

In dieser Mitteilung beschäftigen wir uns mit der fungistatischen Wirkung der ein oder zwei Nitro-Gruppen enthaltenden, aliphatischen, aromatischen und heterozyklischen Verbindungen und auch mit ihrem biochemischen Wirkungsmechanismus.

Vor uns haben auch schon andere Verfasser die fungistatische Wirkung einzelner Nitro-Verbindungen studiert und eine fungistatische Wirkung von bedeutendem Grade bei einer Reihe von Verbindungen festgestellt: wie bei dem Trijod-nitro-äthylen und symm. Dijod-dinitro-äthylen,² dem Trichlor-nitro-methan,³ den 4-Nitro-5-phenyl-cyklohexenen,⁴ dem ω -Nitro-styrol und dessen verschiedenen Derivaten,⁴⁻⁸ bei dem 1-*p*-Nitro-benzoyl-1-dichloracetyl-amino-2-hydroxy-äthan,⁹ dem *o*-Nitro-benzaldehyd,³ dem N-(*p*-Chlor-phenyl)-*o*-nitro-benzamid und dessen N-Methyl-Derivat,¹⁰ bei den Mono- und Polyhalogen-Derivaten des Nitro-benzols,^{11, 12} den substituierten und unsubstituierten Dinitro-benzolen,^{12, 13} bei zahlreichen Nitro- und Dinitro-phenol-Derivaten,^{3, 12, 14-20} Nitro-anilinen,¹² den 2-substituierten Derivaten des 5-Nitro-furans und 5-Nitro-thiophens²¹⁻²³ und endlich bei dem 2 : 5-Dichlor-3 : 4-dinitro-thiophen.²⁴

Die Untersuchungen dieser Verfasser haben sich jedoch im allgemeinen auf eine grössere Anzahl von Verbindungen dieser Gruppe nicht ausgedehnt, so kann man daraus in Bezug auf die Abhängigkeit der fungistatischen Wirkung von der chemischen Struktur im Reiche der Nitro-Verbindungen noch keine Schlüsse ziehen.

Als Zielsetzung unserer Forschungen galt diesmal: einerseits, die *in vitro* ausgeübte fungistatische Wirkung einer verhältnismässig grossen Anzahl von Nitro-Verbindungen sowohl auf flüssigem als auch auf festem Nährboden festzustellen, miteinander zu vergleichen, die etwa bestehenden Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur

und fungistatischer Wirkung in dieser Verbindungsreihe zu erkennen; andererseits aber: den Wirkungsmechanismus der im Laufe der Untersuchungen fungistatisch am intensivsten wirkenden Nitro-Verbindungen zu bestimmen und dadurch theoretische Anhaltspunkte zur Synthese weiterer wirksamer Verbindungen von ähnlichem Typus zu gewinnen.

Die Mehrheit der von uns untersuchten Nitro-Verbindungen haben wir gemäss den Methoden der chemischen Fachliteratur selbst hergestellt, der übrige, geringere Teil stand uns in der Form von Handelsprodukten in "pro analysi" Qualität zur Verfügung.

Die im Laufe der Untersuchung der fungistatischen Wirkung sowie des biochemischen Wirkungsmechanismus der Nitro-Verbindungen verfolgten Methoden waren mit denen, die in dem ersten Teil unserer Mitteilungsserie bereits beschrieben wurden.¹ ganz übereinstimmend, deshalb wollen wir hier auf diese nicht mehr eingehen. Es soll diesmal nur erwähnt werden, dass wir auch zu diesen Untersuchungen—wie auch für unsere früheren Forschungen bezüglich der fungistatischen Wirkung der Phenole-Derivate¹—flüssigen Maische-Nährboden mit 10% Rinderserum-Gehalt sowie serumfreien festen Maische-Agar-Nährboden verwendet haben.

Zur Untersuchung des Wirkungsmechanismus haben wir ausserdem auch noch verschiedene Zusätze enthaltende flüssige, bzw. feste Maische-Agar-Nährböden angewandt. Das pH der Kulturmedien betrug 6,0–6,2.

ERGEBNISSE

Die bei der Untersuchung der fungistatischen Wirkung der Nitro-Verbindungen erhaltenen Resultate sind in den Tabellen 1, 2 und 3 zusammengefasst.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN WIRKUNGSMECHANISMUS DER NITRO-VERBINDUNGEN

Beim Überblick der bei der Untersuchung der fungistatischen Wirkung der Nitro-Verbindungen erhaltenen Ergebnisse kann man feststellen, dass die am intensivsten wirkenden Verbindungen dieser Gruppe folgende strukturelle Eigenschaften aufweisen:

(1) Zu demselben Kohlenstoff-Atom, woran die Nitro-Gruppe gebunden ist, schliessen sich auch noch ein oder mehrere Halogenatome an (z.B. in den Verbindungen von Nr. F/267, 268, 273, 275, 283, 284).

(2) Die Nitro-Gruppe schliesst sich an irgendein Kohlenstoff-Atom doppelter Bindung eines ungesättigten araliphatischen Kohlenwasserstoffes an (z.B. in den Verbindungen von Nr. F/277, 281 und 282).

(3) In einem Benzol-Ring sind zwei Nitro-Gruppen in Verhältnis zueinander in Meta-Stellung anwesend (z.B. in den Verbindungen von Nr. F/290, 291, 292, 294, 315).

(4) Eine Nitro-Gruppe ist in den Benzyl-halogeniden in Verhältnis zur Gruppe $-\text{CH}_2-\text{X}$ in Ortho-Stellung anwesend (wie z.B. in den Verbindungen von Nr. F/316 und F/317).

(5) In Phenol-Derivaten sind in der im Verhältnis zu dem phenolischen Hydroxyl-Radikal gestellten *o*-, *m*- oder *p*-Stellung ein bzw. zwei Nitro-Gruppen und dabei vielleicht noch gelegentlich zugleich ein oder mehrere Alkyl-Substituenten oder Halogenatome anwesend (z.B. in den Verbindungen von Nr. F/325, 326, 328, 334, 335, 336, 337, 349, 351, 352, 356).

TABELLE I. DIE FUNGISTATISCHE WIRKUNG VON NITRO-VERBINDUNGEN AUF FLÜSSIGEM SERUM-MAISCHE NÄHRBODEN

Nr.	Verbindungen	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Achorium quinckeatum</i>	<i>Trichophyton gypsum</i>	<i>Eidernophyton Kaufman-Wolff</i>
<i>I. Aliphatische Nitro-Verbindungen</i>								
F/264	Trichlor-nitro-methan (=Chlorpikrin)	5000	(5000)	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/265	Tetranitro-methan	—	—	—	—	5000	5000	5000
F/266	2-Nitro-2-chlor-propan	10 000	5000	10 000	—	10 000	10 000	25 000
F/267	1-Nitro-1,1-dibrom-athan	50 000	25 000	50 000	25 000	50 000	50 000	50 000
F/268	1-Nitro-1,1-dibrom-propan	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
F/269	2-Nitro-2-brom- <i>n</i> -pentan	10 000	5000	25 000	10 000	25 000	25 000	25 000
F/270	3-Nitro-3-brom- <i>n</i> -pentan	10 000	5000	10 000	5000	25 000	25 000	25 000
F/271	2-Nitro-2-brom- <i>n</i> -heptan	5000	—	5000	5000	10 000	10 000	10 000
F/272	1-Nitro-1-brom-cyklohexan	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
F/273	1-Nitro-1-brom-cyklohexan	100 000	25 000	100 000	25 000	100 000	100 000	100 000
F/274	1-Nitro-1-brom-2- <i>i</i> -propyl-5-methyl-cyklohexan	5000	—	25 000	(5000)	10 000	10 000	10 000
F/275	1-Nitro-1-brom-2-methyl-2,5-(endo-dimethyl-methylen)-cyklohexan	50 000	10 000	50 000	25 000	50 000	100 000	100 000
<i>II. Aaraliphatische Nitro-verbindungen</i>								
F/277	1-Phenyl-2-nitro-aethylen (=ω-nitro-styrol)	10 000	10 000	10 000	10 000	25 000	25 000	25 000
F/278	1-(2-Hydroxy-phenyl)-2-nitro-aethylen	—	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/279	1-(3-Nitro-phenyl)-2-nitro-aethylen	—	—	5000	(5000)	5000	5000	5000
F/280	1-(4-Dimethylamino-phenyl)-2-nitro-aethylen sulphat	—	—	—	—	5000	5000	5000
F/281	1-(2-Furyl)-2-nitro-aethylen	5000	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/282	1-(2-Furyl)-2-methyl-2-nitro-aethylen	5000	—	5000	—	5000	5000	5000
F/283	1-Phenyl-1-nitro-1-brom-athan	10 000	10 000	25 000	10 000	25 000	25 000	25 000
F/284	1-Phenyl-2-nitro-1,2-dibrom-aethan	50 000	25 000	50 000	25 000	100 000	100 000	100 000
<i>III. Aromatische Nitro-Kohlenwasserstoffe</i>								
F/286	2-Nitro-toluol	(5000)	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/287	3-Nitro-toluol	(5000)	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/288	4-Nitro-toluol	5000	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/289	Nitro-xytol (Gemisch von Isomeren)	10 000	5000	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/290	1:3-Dinitro-benzol	25 000	25 000	10 000	(5000)	10 000	10 000	10 000
F/291	2:4-Dinitro-toluol	5000	5000	5000	(5000)	5000	5000	5000
F/292	3:5-Dinitro-toluol	5000	(5000)	5000	—	5000	5000	5000

TABELLE 1—fortges.

Nr.	Verbindungen	<i>Penicillium</i> <i>simplis-</i> <i>simum</i>	<i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	<i>Trichothecium</i> <i>roseum</i>	<i>Candida</i> <i>albicans</i>	<i>Achorion</i> <i>quinceanum</i>	<i>Trichophyton</i> <i>gypseum</i>	<i>Epider-</i> <i>mophyton</i> Kaufman- Wolff
F/293	Dinitro-xylo (Gemisch von Isomeren)	5000	5000	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/294	2:4:6-Trinitro-toluol	5000	—	10 000	(5000)	10 000	10 000	10 000
F/295	4-Nitro-diphenyl	—	—	5000	—	5000	5000	5000
F/297	1-Nitro-naphthalin	5000	5000	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/298	1-Nitro-2-methyl-naphthalin	—	—	—	—	10 000	10 000	10 000
F/299	1-Nitro-4-methyl-naphthalin	—	—	—	—	10 000	10 000	10 000
F/300	9-Nitro-phenanthren	—	—	10 000	—	10 000	10 000	10 000
F/306	1:5-Dinitro-naphthalin	—	—	—	—	10 000	10 000	10 000
<i>IV. Halogen-substituierte aromatische</i>								
<i>Nitro-Kohlenwasserstoffe</i>								
F/307	2-Nitro-chlor-benzol	5000	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/308	4-Nitro-chlor-benzol	5000	(5000)	10 000	—	10 000	10 000	10 000
F/309	3-Nitro-iod-benzol	5000	(5000)	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/310	4-Nitro-iod-benzol	5000	—	10 000	—	10 000	10 000	10 000
F/311	2-Nitro-4-chlor-toluol	5000	—	10 000	—	10 000	10 000	10 000
F/312	2:5-Dichlor-nitro-benzol	5000	5000	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/313	3:4-Dichlor-nitro-benzol	5000	(5000)	25 000	5000	25 000	25 000	25 000
F/314	3:5-Dibrom-nitro-benzol	25 000	(5000)	100 000	5000	100 000	100 000	100 000
F/315	2:4-Dinitro-chlor-benzol	100 000	50 000	100 000	25 000	50 000	50 000	50 000
F/316	2-Nitro-benzyl-chlorid	10 000	10 000	25 000	10 000	50 000	50 000	50 000
F/317	2-Nitro-benzyl-jodid	25 000	25 000	50 000	25 000	25 000	25 000	25 000
F/318	1-Nitro-4-chlor-naphthalin	10 000	5000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
F/319	4-Nitro-9-brom-phenanthren	—	—	—	—	—	—	—
<i>V. Mononitro-phenole</i>								
F/324	2-Nitro-phenol	5000	5000	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/325	3-Nitro-phenol	5000	—	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/326	4-Nitro-phenol	5000	(5000)	10 000	(5000)	10 000	10 000	10 000
F/327	2-Nitro-4-methyl-phenol	(5000)	(5000)	(5000)	—	(5000)	(5000)	(5000)
F/328	2-Nitro-4:6-dimethyl-phenol	(5000)	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/329	4-Nitro-2- <i>n</i> -propyl-5-methyl-phenol	—	—	5000	—	5000	5000	5000
F/330	3-Nitro-4-hydroxy-diphenyl	—	—	10 000	(5000)	25 000	25 000	25 000
F/331	2-Nitro-4-benzoyloxy-phenol	—	—	—	(5000)	5000	5000	5000
F/332	2-Nitro-4- <i>n</i> -hexyloxy-phenol	—	—	—	(5000)	10 000	10 000	10 000
F/333	2-Nitro-4- <i>n</i> -octyloxy-phenol	—	—	—	(5000)	(5000)	(5000)	(5000)
F/334	2-Nitro-4-propionyl-phenol	(5000)	—	5000	—	10 000	10 000	10 000

TABELLE I—fortges.

Nr.	Verbindungen	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Achorion quinquaneum</i>	<i>Trichophyton gypseum</i>	<i>Epidermophyton Kaufman-Wolff</i>
F/335	2-Nitro-4-chlor-phenol	10 000	10 000	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/336	2-Nitro-4-6-dibrom-phenol	10 000	5000	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/337	3-Nitro-4-6-dibrom-phenol	10 000	5000	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/338	4-Nitro-2-6-dibrom-phenol	5000	5000	5000	—	5000	5000	5000
F/339	2-Amino-4-nitro-phenol	—	—	—	—	5000	5000	5000
F/340	2-Amino-4-nitro-6-methyl-phenol	—	—	5000	—	5000	5000	5000
F/344	3-Nitro-4-hydroxy-benzoesäure- <i>n</i> -propyl-ester	—	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/345	3-Methyl-4-hydroxy-5-nitro-azobenzol	—	—	—	—	5000	5000	5000
F/346	3-Chlor-4-hydroxy-5-nitro-azobenzol	—	—	—	—	10 000	10 000	10 000
<i>VI. Dinitro-phenole</i>								
F/348	2:4-Dinitro-phenol	(5000)	(5000)	(5000)	—	5000	5000	5000
F/349	2:5-Dinitro-phenol	10 000	10 000	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/351	2:4-Dinitro-6-methyl-phenol	10 000	(5000)	5000	(5000)	5000	5000	10 000
F/352	2:4-Dinitro-5-methyl-phenol	5000	(5000)	5000	(5000)	10 000	10 000	10 000
F/353	2:6-Dinitro-4-methyl-phenol	(5000)	(5000)	(5000)	—	5000	5000	5000
F/354	2:6-Dinitro-3,4-dimethyl-phenol	(5000)	(5000)	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/355	3:5-Dinitro-4-hydroxy-diphenyl	—	—	—	—	10 000	5000	5000
F/356	2:4-Dinitro-6-chlor-phenol	5000	5000	5000	5000	10 000	5000	10 000
F/357	2:6-Dinitro-4-chlor-phenol	5000	5000	5000	—	5000	5000	5000
<i>VII. Nitro-naphthole</i>								
F/364	2-Amino-4-nitro-1-naphthol	—	—	—	—	(5000) ¹⁾	(5000)	5000
F/365	2,4-Dinitro-1-naphthol	—	—	(5000)	(5000)	5000	5000	5000
<i>VIII. Nitro-Derivate von Phenol-aethern</i>								
F/369	2-Nitro-4-methyl-1-aethoxy-benzol	(5000)	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/370	2-Nitro-4-methyl-1-allyloxy-benzol	(5000)	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/371	2-Nitro-4-methyl-1- <i>n</i> -hexyloxy-benzol	—	—	—	—	5000	5000	5000
F/372	2-Nitro-4-methyl-1-benzyloxy-benzol	—	—	—	—	10 000	10 000	10 000
F/373	4-Nitro-2- <i>i</i> -propyl-5-methyl-1-aethoxy-benzol	—	—	—	—	5000	5000	5000
F/377	3-Nitro-4-aethoxy-diphenyl	—	—	—	—	10 000	10 000	10 000
F/379	2-Nitro-4-chlor-1-aethoxy-benzol	5000	—	5000	—	5000	5000	5000
F/380	2-Nitro-4-chlor-1-allyloxy-benzol	(5000)	—	(5000)	—	5000	5000	5000

TABELLE 1—*fortiges.*

Nr.	Verbindungen	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Achorion quinckeum</i>	<i>Trichophyton gypseum</i>	<i>Epidermophyton Kaufman-Wolf</i>
F/381 F/387	2-Nitro-4-chlor-1- <i>n</i> -hexyloxy-benzol 1-Nitro-2-allyloxy-naphtalin	— —	— —	— —	— —	5000 10 000	5000 10 000	5000 10 000
<i>IX. Nitro-aniline und ihre Derivate</i>								
F/399	2-Nitro-anilin	—	—	5000	—	5000	5000	5000
F/400	3-Nitro-anilin	5000	5000	5000	—	5000	5000	5000
F/401	4-Nitro-anilin	—	—	(5000)	—	5000	(5000)	5000
F/402	2-Nitro-4-methyl-anilin	10 000	—	5000	5000	10 000	10 000	10 000
F/403	2-Nitro-4-ethoxy-anilin	10 000	—	5000	5000	10 000	5000	10 000
F/404	2-Nitro-4-chlor-anilin	10 000	(5000)	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/405	4-Nitro-2-methyl-anilin	—	—	(5000)	—	(5000)	(5000)	5000
F/406	4-Nitro-3-methyl-anilin	—	—	(5000)	—	(5000)	(5000)	5000
F/407	2 : 4-Dibrom-5-nitro-anilin	5000	5000	10 000	—	10 000	10 000	10 000
F/408	2 : 6-Dibrom-4-nitro-anilin	5000	5000	10 000	—	10 000	10 000	10 000
F/409	2 : 6-Dijod-4-nitro-anilin	5000	5000	10 000	—	25 000	25 000	25 000
F/420	1-Amino-4-nitro-naphtalin	(5000)	—	5000	—	10 000	10 000	10 000
F/422	2 : 4-Dinitro-anilin	—	—	—	—	5000	5000	5000
F/423	2 : 4-Dinitro-diaethylamin	—	—	—	—	5000	5000	5000
F/424	2 : 4-Dinitro-di-(<i>n</i> -butyl)-anilin	—	—	—	—	5000	(5000)	5000
F/425	2 : 4-Dinitro-cyklohexyl-anilin	—	—	—	—	5000	5000	5000
F/427	N-(2 : 4-Dinitro-phenyl)-piperidin	—	—	—	—	10 000	10 000	10 000
F/428	N : N'-Di-(2 : 4-dinitro-phenyl)-piperazin	—	—	5000	—	5000	5000	5000
F/429	1 : 6-Di-(2' : 4'-dinitro-phenyl-amino)-hexan	—	—	—	—	5000	5000	5000
<i>X. Heterozyklische Nitro-Verbindungen</i>								
F/400	6-Nitro-1 : 2 : 3 : 4-tetrahydro-carbazol	—	—	—	—	(5000)	(5000)	(5000)
F/441	5-Nitro-chinolin	—	—	—	—	5000	5000	5000
F/442	2-Methyl-6-nitro-chinolin	—	—	5000	—	5000	5000	5000
F/443	2-Methyl-8-nitro-chinolin	—	—	5000	—	5000	5000	10 000
F/444	2-Methyl-6-ethoxy-8-nitro-chinolin	(5000)	—	5000	—	5000	5000	5000

Die in der Tabelle stehenden Ziffern bezeichnen die Reziprokwerte jener Verdünnung der einzelnen Verbindungen, welche zur vollkommenen *Entwicklungshemmung* führen. — = Die untersuchte Verbindung übt auch in der angewandten niedrigsten Verdünnung—in 1 : 5000—keine fungistatische Wirkung aus. (5000) = Die untersuchte Verbindung kann auch in der angewandten niedrigsten Verdünnung—in 1 : 5000—nur eine teilweise Entwicklungshemmung des Pilzstammes herbeiführen.

TABELLE 2. NITRO-VERBINDUNGEN, WELCHE IN FLÜSSIGEM SERUM-MAISCHE NÄHRBODEN AUF JEDE UNTERSUCHTE PILZSTÄMME VOLLSTÄNDIG UNWIRKSAM SIND

F/261	Nitro-methan	F/375	4-Nitro-2- <i>i</i> -propyl-5-methyl-1- <i>n</i> -octyloxy-benzol	F/426	2 : 4-Dinitro-diphenylamin
F/262	Nitro-aethan	F/376	4-Nitro-2- <i>i</i> -propyl-5-methyl-1- <i>n</i> -benzyloxy-benzol	F/430	1-(4'-Nitro-phenyl-amino)-2 : 5-dimethyl-pyrrrol
F/263	1-Nitro-propan	F/378	3-Nitro-4-benzyloxy-diphenyl	F/431	1-(2 : 4'-Dinitro-phenyl-amino)-2 : 5-dimethyl-pyrrrol
F/276	Phenyl-nitro-methan	F/382	2-Nitro-4-chlor-1- <i>n</i> -octyloxy-benzol	F/432	N-(2 : 4-Dinitro-phenyl)-pyridinium-chlorid
F/285	Nitro-benzol	F/383	6-Nitro-2- <i>i</i> -propyl-5-methyl-4-brom-1-aethoxy-benzol	F/433	N-(2 : 4-Dinitro-phenyl)-chinolinium-chlorid
F/296	4 : 4'-Dinitro-diphenyl	F/384	2 : 4-Dinitro-4'-methyl-diphenyl-aether	F/434	N-(2-Nitro-benzyl)-pyridinium-chlorid
F/301	9-Nitro-anthrazen	F/385	2 : 4-Dinitro-2- <i>i</i> -propyl-5-methyl-diphenyl-aether	F/435	1-(2 : 4-Dinitro-phenyl)-3 : 5-dimethyl-pyrazol
F/302	2-Nitro-chrysen	F/386	1-Nitro-2-aethoxy-naphthalin	F/436	1-(4'-Nitro-phenyl)-3-methyl-4-nitro-pyrazolon-(5) (= Pikrolon-säure)
F/303	4-Nitro-acenaphthen	F/388	1-Nitro-2- <i>n</i> -octyloxy-naphthalin	F/437	2-Acetyl-amino-5-nitro-thiazol
F/304	4-Nitro-fluoranthren	F/389	1-Nitro-2- <i>n</i> -dodecyloxy-naphthalin	F/437	2-Acetyl-amino-4-methyl-5-nitro-thiazol
F/305	3-Nitro-pyren	F/390	1-Nitro-2-benzyloxy-naphthalin	F/439	2- <i>n</i> -Butyrylamino-4-methyl-5-nitro-thiazol
F/320	9-Nitro-10-brom-anthrazen	F/391	4-Nitro-1-aethoxy-naphthalin		
F/321	8-Nitro-2-brom-chrysen	F/392	4-Nitro-1- <i>n</i> -octyloxy-naphthalin		
F/322	12-Nitro-4-brom-fluoranthren	F/393	4-Nitro-1-benzyloxy-naphthalin		
F/323	10-Nitro-3-brom-pyren	F/394	3-Nitro-benzoesäure		
F/341	2-Amino-6-nitro-4-methyl-phenol	F/395	4-Nitro-benzoesäure		
F/342	2-Amino-6-nitro-4-chlor-phenol	F/396	3, 5-Dinitro-benzoesäure		
F/343	3-Nitro-4-hydroxy-benzoesäure	F/397	4-Nitro-phenyl-essigsäure		
F/347	2-Nitro-phenol-4-sulphosäure-Kalium	F/398	4-Nitro-1-naphthyl-essigsäure		
F/350	2 : 6-Dinitro-phenol	F/410	4-Nitro-acetanilid		
F/358	2 : 4-Dinitro-6-amino-phenol	F/411	2-Nitro-4-methyl-acetanilid		
F/359	2-Hydroxy-3 : 5-dinitro-benzoesäure	F/412	2-Nitro-4-aethoxy-acetanilid		
F/360	2 : 6-Dinitro-resorzin	F/413	2-Nitro-4-chlor-acetanilid		
F/361	2 : 4 : 6-Trinitro-phenol (= Picrin-säure)	F/414	4-Nitro-2-methyl-acetanilid		
F/362	Phenol-purpursäure-Natrium	F/415	4-Nitro-3-methyl-acetanilid		
F/363	Dinitro-phenolphthalein	F/416	4-Nitro-dimethylanilin		
F/366	2 : 4-Dinitro-1-naphthol-7-sulphosäure-Natrium	F/417	4-Nitro-diaethylanilin		
F/367	Naphthol-purpursäure-Natrium	F/418	2-Nitro-4 : 4'-diamino-diphenyl		
F/368	10-Nitro-9-anthron	F/419	4-Nitro-diphenylamin		
F/374	4-Nitro-2- <i>i</i> -propyl-5-methyl-1-allyloxy-benzol	F/421	1-Acetyl-amino-4-nitro-naphthalin		

TABELLE 3. DIE FUNGISTATISCHE WIRKUNG VON NITRO-VERBINDUNGEN AUF FESTEM MAISCHE-AGAR NÄHRBODEN

Nr.	Verbindungen	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F/267	1-Nitro-1 : 1-dibrom-aethan	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90
F/268	1-Nitro-1 : 1-dibrom-propan	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90
F/277	1-Phenyl-2-nitro-aethylen (= ω -Nitro-styrol)	22	36	50	> 90	63
F/281	1-(2-Furyl)-2-nitro-aethylen	25	35	50	50	43
F/282	1-(2-Furyl)-2-methyl-2-nitro-aethylen	35	50	20	12	12
F/283	1-Phenyl-1-nitro-1-brom-aethan	10	12	12	17	25
F/284	1-Phenyl-2-nitro-1 : 2-dibrom-aethan	27	25	57	60	57
F/290	1 : 3-Dinitro-benzol	55	30	30	20	12
F/291	2 : 4-Dinitro-toluol	20	27	25	10	10
F/292	3 : 5-Dinitro-toluol	20	30	25	17	15
F/293	Dinitro-xytol (Gemisch von Isomeren)	15	17	20	10	10
F/294	2 : 4 : 6-Trinitro-toluol	27	30	25	22	20
F/315	2 : 4-Dinitro-chlor-benzol	40	30	27	30	30
F/316	2-Nitro-benzyl-chlorid	15	15	15	12	17
F/317	2-Nitro-benzyl-jodid	30	27	37	40	37
F/325	3-Nitro-phenol	28	25	18	—	—
F/326	4-Nitro-phenol	28	26	17	—	—
F/328	2-Nitro-4 : 6-dimethyl-phenol	20	33	17	12	12
F/329	4-Nitro-2- <i>i</i> -propyl-5-methyl-phenol	10	15	10	10	12
F/330	3-Nitro-4-hydroxy-diphenyl	10	15	15	20	18
F/334	2-Nitro-4-propionyl-phenol	20	22	36	25	10
F/335	2-Nitro-4-chlor-phenol	40	32	40	10	40
F/336	2-Nitro-4 : 6-dibrom-phenol	24	35	40	28	17
F/337	3-Nitro-4 : 6-dibrom-phenol	30	30	42	30	32
F/338	4-Nitro-2 : 6-dibrom-phenol	16	20	20	10	10
F/339	2-Amino-4-nitro-phenol	10	10	20	12	15
F/340	2-Amino-4-nitro-6-methyl-phenol	30	35	25	15	15
F/344	3-Nitro-4-hydroxy-benzoesäure- <i>n</i> -propyl-ester	20	17	20	20	10
F/346	3-Chlor-4-hydroxy-5-nitro-azobenzol	10	10	20	12	10
F/348	2 : 4-Dinitro-phenol	17	30	20	10	10
F/349	2 : 5-Dinitro-phenol	45	40	42	22	25
F/351	2 : 4-Dinitro-6-methyl-phenol	20	30	20	20	22
F/352	2 : 4-Dinitro-5-methyl-phenol	26	42	50	18	17
F/354	2 : 6-Dinitro-3 : 4-dimethyl-phenol	15	18	25	—	—
F/356	2 : 4-Dinitro-6-chlor-phenol	40	40	38	17	18

TABELLE 3—*forgtes*.

Nr.	Verbindungen	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F/364	2-Amino-4-nitro-1-naphthol	13	15	15	—	—
F/365	2 : 4-Dinitro-1-naphthol	18	22	20	—	—
F/402	2-Nitro-4-methyl-anilin	35	18	28	10	10
F/403	2-Nitro-4-aethoxy-anilin	35	30	32	10	—
F/404	2-Nitro-4-chlor-anilin	18	15	30	—	—
F/420	1-Amino-4-nitro-naphthalin	10	15	15	10	10
F/422	2 : 4-Dinitro-anilin	40	44	50	35	30
F/443	2-Methyl-8-nitro-chinolin	14	18	15	10	10
F/444	2-Methyl-6-aethoxy-8-nitro-chinolin	12	20	15	10	12

Die in der Tabelle stehenden Ziffern bezeichnen die Durchmesser der durch die einzelnen Verbindungen herbeiführten wachstumsgehemmten Gebiete in mm ausgedrückt.

— = Die Verbindung übt auf den angewandte Pilzstamm keine fungistatische Wirkung aus.

Jene von den untersuchten Nitro-Verbindungen der Tabelle 1 und 2, welche in der Tabelle 3 nicht aufgeführt sind, üben auf festem Maische-Agar Nährboden keine fungistatische Wirkung auf die zu den Versuchen verwendeten fünf Pilzstämmen aus.

(6) In den *p*-substituierten Anilinen ist in der *o*-Stellung zum NH_2 -Radikal eine NO_2 -Gruppe enthalten (z.B. in den Verbindungen von Nr. F/402, 403 und 404).

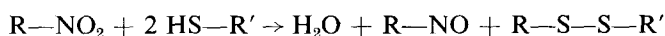
Diejenige Verbindungen, die über die in Punkten (1), (2) und (4), angeführten Strukturelemente verfügen, sind infolge der elektrophilen Eigenschaft der in ihrem Molekül anwesenden Nitro-Gruppe in bedeutendem Masse reaktionsfähig, deshalb können sie mit verschiedenen organischen Radikalen, wie z.B. auch mit HS-Gruppen, sehr leicht reagieren.

So scheint die Voraussetzung auf der Hand zu liegen, dass diese Verbindungen ihre fungistatische Wirkung durch die Hemmung der Sulfhydryl-Enzyme ausüben, welche zum intermediären Stoffwechsel und zur Vermehrung der Pilz-Zellen unerlässlich notwendig sind. Zur tatsächlichen Unterstützung dieser Annahme haben wir die auf das *Penicillium simplicissimum* und *Saccharomyces cerevisiae* ausgeübte fungistatische Wirkung der bei unseren auf flüssigem Nährboden ausgeführten Untersuchungen besonders wirksam erwiesenen Nitro-Verbindungen auch auf solchem Maische-Agar-Nährboden untersucht, welcher 0,3% Na-Thioglycolat oder 0,3% Cystein-hydrochlorid enthielt (pH=6,2). Die Methode, die wir bei diesen Untersuchungen auf festem Nährboden mit Cystein-hydrochlorid oder Na-Thioglycolat verfolgt haben, war dieselbe, wie diejenige, welche bei unseren Untersuchungen auf einfachem Maische-Agar ohne solche Zusätze angewandt wurde.

Indem die auf Cystein-hydrochlorid oder Na-Thioglycolat enthaltendem festem Nährboden ausgeübte fungistatische Wirkung der untersuchten Nitro-Verbindung *wesentlich* niedriger ist, als diese Wirkung ohne solchen Zusätze (d.h. auf normalem Maische-Agar) oder auf Cystein-hydrochlorid und Na-Thioglycolat enthaltendem festem Maische-Agar-Nährboden bleibt sie möglicherweise vollkommen wirkungslos, während sie zur gleichen Zeit auf normalem festem Nährboden fungistatisch wirksam sein kann, in dem Falle kann es für bestätigt gelten, dass die Nitro-Verbindung mit den Sulfhydryl-Gruppe enthaltenden Verbindungen unter den angewandten experimentellen Umständen auf irgendeine Weise reagieren kann. Dadurch wird unsere Voraussetzung *bedeutend unterstützt*—wenn auch nicht zweifellos bestätigt—dass die betreffende Verbindung mit einzelnen, zur Vermehrung der Pilz-Zellen unerlässlich notwendigen Sulfhydryl-Enzymen auch auf ähnliche Weise reagieren kann, wodurch sie jene inaktiviert; durch die Inaktivierung dieser Enzyme wird dann die Fungistase notwendigerweise herbeigeführt.

Diese Modell-Versuche können vielleicht zur Klärung der Frage beitragen, ob in dem fungistatischen Wirkungsmechanismus einer Verbindung die durch sie eventuell verursachte Inaktivierung der Sulfhydryl-Enzyme der Pilz-Zellen mitwirken kann oder nicht.

Die Verbindungen mit den unter (3), (5) und (6) angeführten Strukturelementen—mit Ausnahme des 2 : 4-Dinitro-chlor-benzols (F/315)—sind laut unserer heutigen Kenntnisse unfähig mit Sulfhydryl-Gruppen enthaltenden Verbindungen auf Grund eines Mechanismus von Substitutions- oder Additions-Charakter zu reagieren—in Gegensatz zu den angeführten Verbindungstypen unter 1, 2 und 3—es können höchstens einige unter diesen, abhängig von den Umständen in höherem oder geringerem Masse oxidierend auf sie einwirken, wobei ihre Sulfhydryl-Gruppe sich in eine Disulfid-Gruppe umwandelt:



Zur Erklärung der Frage, ob die auf die Sulfhydryl-Enzyme der Pilz-Zellen ausgeübte etwaige oxidierende Wirkung in dem Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen mitwirken kann, haben wir auch die Beeinflussung deren fungistatischen Wirkung infolge Cystein-hydrochlorid und Na-Thioglycolat untersucht.

Für die Verbindungen mit den unter (5) angeführten Strukturelementen ist die phenolische Hydroxyl-Gruppe mehr kennzeichnend als die Nitro-Gruppe. Infolge der elektrophilen Eigenschaft der in ihren Molekülen anwesenden Nitro-Gruppen vermag nämlich das H-Atom ihres phenolischen Hydroxyl-Radikals in demselben Masse als H^+ - Ion dissoziieren, wie das der Halogen-Phenole. Sie können also vielmehr als Phenol-Derivate von bedeutendem Dissoziationsgrad (d.h. von niedrigem pK_a) betrachtet werden, als für substituierte Derivate des Nitro-benzols oder Dinitro-benzols gelten.

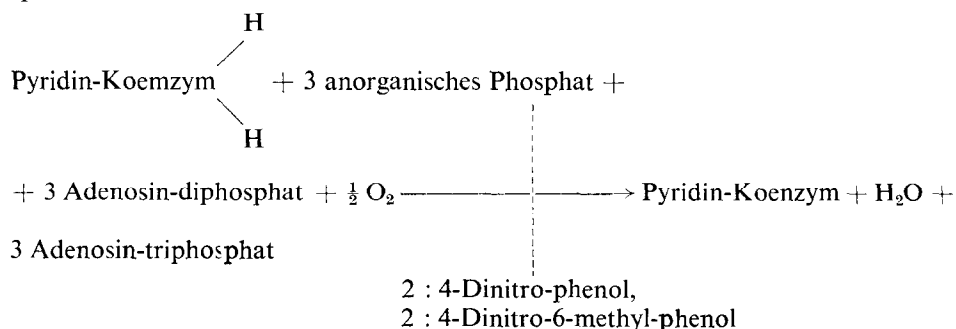
Es kann deshalb angenommen werden, dass sie ihre fungistatische Wirkung auf Grund desselben Mechanismus ausüben, wie die Nitro-Gruppen nicht enthaltenden Phenol-Derivate: d.h. durch ihre Bindung an die Eiweisse, Lipole und Lipoproteide der Zellwand, bzw. der Zelloberfläche und auf dem Wege der dadurch verursachten Desorganisation (Vgl. Teil I dieser Mitteilungsserie).¹

Zur Erklärung dieses Problems haben wir untersucht, ob die fungistatische Wirkung der wirksamsten gefundenen Nitro-phenol-Derivate so im festen wie auch im flüssigen Nährboden durch die Zugabe von 10% Rinderserum und im flüssigem Nährboden durch die Zugabe von 0,25% Lecithin, Lanolin und Sonnenblumenöl inwieweit beeinflusst wird.

Das im Laufe dieser Untersuchungen verfolgte Verfahren wurde schon im Teil I unserer Mitteilungsserie¹ beschrieben, so können wir hier davon absehen.

Nicht nur die Nitro-phenole, sondern auch andere Nitro-Verbindungen mit den Struktur-Eigenschaften (1), (2), (3), (4) und (6) haben wir mit Rücksicht darauf untersucht, inwiefern sie in ihrer fungistatischen Wirkung durch Rinderserum beeinflusst werden können; die letzteren wurden allerdings nur auf Maische-Agar-Nährboden geprüft. Es scheint nämlich nicht ausgeschlossen zu sein, dass einige unter diesen Verbindungen bei biologischen Umständen nicht nur mit Sulfhydryl-Gruppen, sondern ausserdem auch mit anderen Atom-Gruppen (z.B. mit $-NH_2$, $-NH$ -Radikalen, welche im Serum in bedeutender Menge anwesend sind) reagieren können; so mögen auch diese Reaktionen in ihrem fungistatischen Wirkungsmechanismus mitspielen.

Es ist aus der chemischen Fachliteratur bekannt, dass das 2 : 4-Dinitro-phenol (F/348) und das 2 : 4-Dinitro-6-methyl-phenol (F/351) die oxidative Phosphorylation spezifisch hemmen können.²⁵⁻²⁷



Insofern die Hemmung der oxidativen Phosphorylation im fungistatischen Wirkungsmechanismus des 2 : 4-Dinitro-phenols und des 2 : 4-Dinitro-6-methyl-phenols eine Rolle spielt, so muss ihre fungistatische Wirkung durch die Zugabe von Adenosin-triphosphat zum Nährboden wesentlich vermindert oder gänzlich abgewehrt werden.

Zur Entscheidung dessen, ob die Hemmung der oxidativen Phosphorylation im fungistatischen Wirkungsmechanismus dieser Nitro-Verbindungen wirklich mitspielt, haben wir deren fungistatische Wirkung auf das *Penicillium simplicissimum* und das *Saccharomyces cerevisiae* auf festem Maische-Agar-Nährboden auch mit 0,1% Adenosin-triphosphat (Tetra-natrium Salz)-Gehalt einer Prüfung unterzogen; diese Untersuchungen haben wir auch auf andere Nitro-phenole (und zugleich auf einige andere Nitro-Verbindungen von verwandter Struktur) ausgebreitet.

Die bei der Untersuchung des Wirkungsmechanismus der Nitro-Verbindungen erhaltenen Resultate stehen in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst.

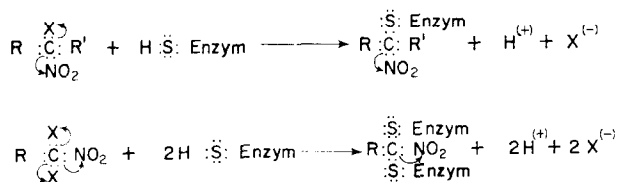
BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Durchschauend die Resultate unserer Untersuchungen kann man folgendes feststellen.

(1) Unter den aliphatischen und araliphatischen Nitro-Verbindungen sind nur jene fungistatisch wirksam, welche an demselben Kohlenstoffatom, wo sich ihre Nitro-Gruppe befindet, auch ein oder mehrere Halogen-Atome enthalten, oder aber diejenigen, die ihre Nitro-Gruppe an ein Kohlenstoffatom mit doppelter Bindung gebunden enthalten.

Jene aliphatischen und araliphatischen Nitro-Verbindungen, welche keine solche Struktur-Eigenschaften aufweisen können, bleiben wirkungslos.

Die Verbindungen mit Halogen-Atom-Gehalt unter den aliphatischen und araliphatischen Nitro-Verbindungen von der erwähnten Struktur sind fungistatisch deshalb wirksam, da die elektrophyle Eigenschaft der in ihren Molekülen anwesenden Nitro-Gruppe und des Halogen-Atoms (oder Atome) sich summiert, demzufolge wird jenes Kohlenstoffatom, woran die Nitro-Gruppe und das Halogen-Atom (Atome) gebunden wird, polarisiert; es wird nun dadurch fähig, auf Grund von kryptoionischen Mechanismus mit den Sulfhydryl-Gruppen von Elektron-Donor-Eigenschaft der Sulfhydryl-Enzyme der Pilz-Zellen in Reaktion zu treten, wobei Halogen- und Wasserstoff-Ione sich abtrennen. In anschaulicher Form:



R, R' = Alkyl-Gruppen

X = Halogen-Atome

(2) Jene Nitro-Verbindungen, bei denen die Nitro-Gruppe an ein Kohlenstoffatom von Doppelbindung angeschlossen ist, mögen ihre fungistatische Wirksamkeit wahrscheinlich ebenso durch ihre Reaktion mit den Sulfhydryl-Gruppen einzelner Sulfhydryl-Enzyme der Pilz-Zellen ausüben.

TABELLE 4. DIE DURCH VERSCHIEDENE STOFFE VERURSACHTE BEEINFLUSSUNG DER AUF FESTEM MAISCHE-AGAR-NÄHRBODEN AUSGEÜBTEN FUNGISTATISCHEN WIRKUNG VON NITRO-VERBINDUNGEN

Nr.	Verbindungen	<i>Penicillium simplicissimum</i>					<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
		(ohne Zugaben)	10 % Rinder- serum	0.3 % Cistein- hydro- chlorid	0.3 % Na-Thio- glycolat	0.1 % Adenosin- triphosphat (Tetra- Na-Salz)	(ohne Zugaben)	10 % Rinder- serum	0.3 % Cistein- hydro- chlorid	0.3 % Na-Thio- glycolat	0.1 % Adenosin- triphosphat (Tetra- Na-Salz)
F/267	1-Nitro-1 : 1-dibrom-aethan	>90	>90	—	—	—	>90	—	—	—	
F/268	1-Nitro-1 : 1-dibrom-propan	>90	>90	—	—	—	>90	—	—	—	
F/277	1-Phenyl-2-nitro-aethylen	22	20	—	—	—	63	59	—	—	
F/281	1-(2'-Furyl)-2-nitro-aethylen	25	21	—	—	—	43	43	—	—	
F/282	1-(2'-Furyl)-2-methyl-2-nitro- aethylen	35	35	—	—	—	12	10	—	—	
F/284	1-Phenyl-2-nitro-1 : 2-dibrom-aethan	27	27	—	—	—	57	56	—	—	
F/290	1 : 3-Dinitro-benzol	55	53	55	54	56	12	12	13	12	
F/291	2 : 4-Dinitro-toluol	20	17	20	19	20	10	10	10	10	
F/292	3 : 5-Dinitro-toluol	20	20	19	19	21	15	14	14	15	
F/294	2 : 4 : 6-Trinitro-toluol	27	10	20	18	25	20	17	15	15	
F/315	2 : 4-Dinitro-chlor-benzol	40	37	20	22	39	30	25	17	15	
F/316	2-Nitro-benzyl-chlorid	15	14	10	10	—	17	15	10	10	
F/317	2-Nitro-benzyl-jodid	30	28	11	12	—	37	32	12	12	
F/325	3-Nitro-phenol	28	15	16	—	25	—	—	—	—	
F/326	4-Nitro-phenol	28	16	16	—	26	—	—	—	—	
F/328	2-Nitro-4 : 6-dimethyl-phenol	20	13	15	15	21	12	10	—	14	
F/334	2-Nitro-4-propionyl-phenol	20	15	17	12	18	18	10	12	11	
F/335	2-Nitro-4-chlor-phenol	40	17	27	18	38	10	—	—	20	
F/336	2-Nitro-4 : 6-dibrom-phenol	24	12	19	12	22	17	12	13	18	
F/337	3-Nitro-4 : 6-dibrom-phenol	30	12	21	13	28	32	14	20	30	
F/344	3-Nitro-4-hydroxy-benzoesäure- n-propyl-ester	20	13	20	15	22	10	10	10	10	
F/348	2 : 4-Dinitro-phenol	17	10	16	11	16	10	10	10	10	
F/349	2 : 5-Dinitro-phenol	45	22	18	—	42	25	15	18	25	
F/351	2 : 4-Dinitro-6-methyl-phenol	20	16	15	—	21	22	16	20	20	
F/352	2 : 4-Dinitro-5-methyl-phenol	26	15	15	—	25	17	10	10	18	
F/356	2 : 4-Dinitro-6-chlor-phenol	40	22	19	10	38	18	12	10	18	
F/402	2-Nitro-4-methyl-anilin	35	33	32	34	—	10	10	10	—	
F/403	2-Nitro-4-aethoxy-anilin	35	35	32	33	—	—	—	—	—	
F/404	2-Nitro-4-chlor-anilin	18	16	18	16	—	—	—	—	—	
F/422	2 : 4-Dinitro-anilin	40	38	41	40	41	30	30	29	28	

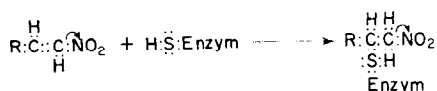
Siehe Zeichnerklärung der Tabelle 3.

TABELLE 5. DIE BEEINFLUSSUNG DER AUF DAS *Penicillium simplicissimum* AUSGEÜBTEN FUNGSTATISCHEN WIRKUNG DER NITRO-PHENOLE DURCH DIE ZUGABE VON VERSCHIEDENEN SUBSTANZEN ZUM FLÜSSIGEN MAISCH—NÄHRBODEN

Nr.	Verbindungen	—	10 % Rinder-serum	0.25 % Lecithin	0.25 % Lanolin	0.25 % Sonnen-blumenöl
F/324	2-Nitro-phenol	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/325	3-Nitro-phenol	5000	5000	5000	5000	5000
F/326	4-Nitro-phenol	5000	5000	5000	5000	5000
F/334	2-Nitro-4-propionyl-phenol	10 000	(5000)	10 000	10 000	10 000
F/335	2-Nitro-4-chlor-phenol	50 000	10 000	50 000	50 000	25 000
F/336	2-Nitro-4 : 6-dibrom-phenol	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
F/337	3-Nitro-4 : 6-dibrom-phenol	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
F/348	2 : 4-Dinitro-phenol	5000	(5000)	5000	5000	5000
F/349	2 : 5-Dinitro-phenol	50 000	10 000	50 000	25 000	50 000
F/351	2 : 4-Dinitro-6-methyl-phenol	10 000	10 000	10 000	5000	10 000
F/352	2 : 4-Dinitro-5-methyl-phenol	5000	5000	5000	5000	5000
F/353	2 : 6-Dinitro-4-methyl-phenol	5000	(5000)	5000	5000	5000
F/356	2 : 4-Dinitro-6-chlor-phenol	10 000	5000	10 000	10 000	10 000
F/357	2 : 6-Dinitro-4-chlor-phenol	5000	5000	5000	5000	5000

Siehe Zeichenerklärung der Tabelle 1.

Die Doppelbildung von Elektron-Donor-Eigenschaft dieser Verbindungen wird durch die elektrophyle Nitro-Gruppe recht stark polarisiert; infolgedessen werden diese Verbindungen geeignet, mit den SH-Gruppen der Sulfhydryl-Enzyme nach folgendem Schema in Reaktion zu treten:



Die Intensität der *in vitro* ausgeübten fungistatischen Wirksamkeit der Verbindungen dieses Typus wird nach aller Wahrscheinlichkeit durch den Grad ihrer Affinität gegen die Sulfhydryl-Gruppen bestimmt.

Der Grad ihrer Affinität zu den Sulfhydryl-Gruppen irgendwelches lebenswichtigen Sulfhydryl-Enzyms der Pilz-Zellen ist von der Natur des in ihren Molekülen anwesenden R-Radikals abhängig, ferner von dem Umstand, ob an die ungesättigten Kohlenstoffatome H-Atome oder irgendwelche anderen Atom-Gruppen sich anschließen.

(3) Die Richtigkeit unserer Voraussetzung über den fungistatischen Wirkungsmechanismus der Halogen-Atom (Atome) sowie ungesättigte Bindung enthaltenden aliphatischen und araliphatischen Nitro-Verbindungen scheint unsere Erfahrung zu rechtfertigen, dass einige stark fungistatisch wirkende Prototypen derselben (F/267, 268, 277, 281, 282, 284) auf einem Cystein-hydrochlorid oder Na-Thioglycolat enthaltenden festen Maische-Agar Nährboden ganz wirkungslos bleiben; sie erweisen sich aber fungistatisch bedeutend wirksam auf einem festen Nährboden der von diesen Sulfhydryl-Verbindungen frei ist.

Daraus kann man den Schluss ziehen, dass das Cystein-hydrochlorid, bzw. das Na-Thioglycolat im Nährboden mit ihnen extracellulär in Reaktion tritt und diese in für weitere ähnliche Reaktion unfähige Verbindungen unwandelt; dadurch werden die Pilz-Zellen gegen deren Einwirkung gleichwie in Schutz genommen.

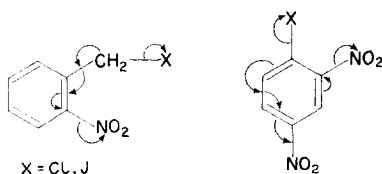
Die infolge der Einwirkung dieser Verbindungen *schon erfolgte* Hemmung der Vermehrung des *Penicillium simplicissimum* und *Saccharomyces cerevisiae* kann von vornherein weder das Cystein-hydrochlorid noch das Na-Thioglycolat aufheben, da die intercellulare Reaktion zwischen den Halogen-Atome oder ungesättigte Bindung enthaltenden aliphatischen und araliphatischen Nitro-Verbindungen sowie den SH-Gruppen der lebenswichtigen Sulfhydryl-Enzyme der Pilz-Zellen irreversibel ist. Da die Reversibilität der schon stattgefundenen intercellularen Reaktion durch das Cystein-hydrochlorid oder das Na-Thioglycolat *unter physiologischen Umständen für grundsätzlich ausgeschlossen gelten kann*, haben wir derartige Versuche auch nicht unternommen.

(4) Die Ergebnisse unserer Wirkungsmechanismus-Untersuchungen beweisen, dass die auf festem Nährboden ausgeübte fungistatische Wirkung des 2-Nitro-benzylchlorids und -jodids auf das *Penicillium simplicissimum* und *Saccharomyces cerevisiae* sowohl das Cystein-hydrochlorid als auch das Na-Thioglycolat weitgehend abwehren kann, die Wirkung des 2 : 4-Dinitro-chlor-benzols aber bedeutend vermindert.

Daraus folgt, dass das 2-Nitro-benzyl-chlorid, das 2-Nitro-benzyl-jodid und das 2 : 4-Dinitro-chlor-benzol ihre fungistatische Wirkung gleichfalls als "Sulfhydryl-Enzym-Inhibitors" ausüben.

Diese Ansicht wird prinzipiell durch die Tatsache begründet, dass die Nitro-Gruppen durch ihre starke elektrophyle Eigenschaft die Elektronen-Dichte um jenes Kohlenstoffatom des Moleküls vermindern, an welches Atom das gleichfalls elektrophyle Halogen-Atom gebunden ist; auf diese Weise wird es stark polarisiert und zur Teilnahme an kryptoionischen Reaktionen geeignet gemacht.

In anschaulicher Form lässt sich der Vorgang so darstellen:



(5) Das Cystein-hydrochlorid oder das Na-Thioglycolat beeinflussen die fungistatische Wirkung des 1 : 3-Dinitro-benzols, des 2 : 4- und 3 : 5-Dinitro-toluols nicht (sie vermindern diese Wirkung jedoch bei dem 2 : 4 : 6-Trinitro-toluol nur einigermassen); deshalb ist es wahrscheinlich zu halten, dass diese nicht durch die gelegentliche Lähmung der Funktion von Sulfhydryl-Enzymen in den Stoffwechsel der Pilz-Zellen eingreifen. Sowohl diese, als auch die anderen untersuchten fungistatisch wirkenden Nitro-Derivate des Benzols, Naphtalins, Diphenyls und Phenanthrens sollen ihre fungistatische Wirksamkeit vermutlich auf Grund eines ganz anderen Mechanismus ausüben.

Es ist allgemein bekannt, dass zahlreiche Nitro- und Polynitro-Verbindungen mit recht mannigfaltigen organischen Verbindungen Molekül-Assoziaten, Molekül-Verbindungen von verschiedener Struktur zu bilden vermögen.²⁸⁻³²

Wir müssen dabei annehmen, dass unter den bei unseren Versuchen fungistatisch erwiesenen aromatischen Nitro-Verbindungen diejenigen, die ausser der Nitro-Gruppe in ihren Molekülen keine anderen Reaktiven Gruppen enthalten, ihre fungistatische Wirkung dadurch entfalten, dass die mit lebenswichtigen Eiweissen, Lipoiden, Lipoproteiden, Nukleoproteiden der Pilz-Zellen, bzw. mit ihren gewissen Kettenteilen und Gruppen Molekül-Verbindungen, Assoziaten bilden, diese dadurch denaturieren und zur Ausübung ihrer normalen biochemischen Funktion unfähig machen. Zur Bestätigung dieser Voraussetzung werden wir im späteren eingehendere Untersuchungen vornehmen.

Die Nitro-Derivate einiger mehrkerniger aromatischer Kohlenwasserstoffe (z.B. das F/296, 301, 302, 303, 304, 305, 320, 321, 322, 323) können trotzdem, dass sie—wenigstens unter Laboratoriumsumständen—mit verschiedenen Verbindungen Molekül-Assoziaten zu bilden vermögen, doch keine fungistatische Wirkung ausüben. Die Ursache ihrer Wirkungslosigkeit ist unseres Erachtens darin zu suchen, dass sie infolge ihrer geringen Lösbarkeit im Wasser, sowie ihrer bedeutenden Disposition zur Aggregation nicht einmal in Kolloid-Zustand jenes Mindestmass der Konzentration im Nährboden erreichen können, das zur Herbeiführung der Fungistase notwendig ist.

(6) Die Nitro-Derivate der Benzoesäure, Phenyl-Essigsäure und der 1-Naphtyl-Essigsäure (F/394, 395, 396, 397, 398), und auch die Pikrinsäure, bleiben vermutlich deshalb wirkungslos, weil sie wegen ihres starken saurigen Charakters die Wand der Pilz-Zellen nicht durchdiffundieren und in deren Zwischenzellenraum nicht eindringen können.

(7) Serum kann auf festem Maische-Agar-Nährboden nur die fungistatische Wirkung der Nitro-phenole und des 2 : 4 : 6-Trinitro-toluols erheblich beeinflussen.

Auch das Cystein-hydrochlorid und das Na-Thioglycolat vermindern im allgemeinen in bedeutendem Masse die fungistatische Wirkung der Nitro-phenole. Diese Wirkungsabnahme infolge des Cystein-hydrochlorids und Na-Thioglycolats kann man aber nicht als Folge einer zwischen ihnen und den Nitro-phenolen zustande gekommenen spezifischen Reaktion betrachten, sondern sie ist wohl der Reduktion ihrer Nitro-Gruppe zuzuschreiben, die durch das Cystein-hydrochlorid, bzw. das Na-Thioglycolat verursacht wurde.

Im Wirkungsmechanismus der untersuchten und fungistatisch erwiesenen Nitro-phenole mag auch die Hemmung der Funktion der Sulfhydryl-Enzyme der Pilz-Zellen infolge ihrer aspezifisch oxidierenden Wirkung einen Anteil haben; es ist aber wahrscheinlich, dass es nicht die Hauptkomponente ihres Wirkungsmechanismus bildet.

Auf flüssigem Nährboden kann das Rinderserum nur die fungistatische Wirkung des 2-Nitro-4-chlor-phenols und des 2 : 5-Dinitro-phenols wesentlich vermindern, die des 2-Nitro-phenols, des 2-Nitro-4-propionyl-phenols und des 2 : 4-Dinitro-6-chlor-phenols nur in geringem Masse, die der übrigen Nitro-phenole aber durchaus nicht. Lecithin, Lanolin und Sonnenblumenöl können die fungistatische Wirkung deren Mehrheit überhaupt nicht, die der Minderheit auch nur wenig beeinflussen.

Die fungistatische Wirkung der Nitro-phenole auf festem Nährboden wird durch die Zugabe von Adenosin-triphosphat zum Nährboden nur unbedeutend vermindert (Ebensowenig die der Dinitro-benzol-Derivate und des 2 : 4-Dinitro-anilins). Daraus ergibt sich die Folge, dass diese Verbindungen ihre fungistatische Wirkung nicht durch die Hemmung der oxidativen Phosphorilation ausüben können.

Wenn wir all dies berücksichtigen, können wir zum Schluss kommen, dass der fungistatische Wirkungsmechanismus der Nitro-phenole viel komplizierter ist, als derjenige der einfachen Phenol-Derivate oder Halogen-phenole.¹ In ihrem Wirkungsmechanismus müssen verschiedene Faktoren mitwirken: die Denaturierung der Eiweisse der Pilz-Zellen, die oxidative Inaktivierung einzelner ihrer Sulfhydryl-Enzyme, ausserdem noch vermutlich auch die Bildung einer Molekül-Assoziation mit einzelnen Zellbestandteilen.

Die Frage, welcher biochemische Reaktionstypus in der Herbeiführung der Fungistase durch irgendein Nitro-phenol am entscheidendsten mitwirkt, hängt weitgehend von der speziellen chemischen Struktur des betreffenden Nitro-phenols ab, sowie von dessen Dissoziationskonstante, von der Elektronen—Dichte um einzelne Zentren des Moleküls, von der Qualität der polaren Gruppen des Moleküls und von der Stellung dieser Gruppen im Verhältnis zueinander und offenbar auch von anderen, bisher noch nicht bekannten Faktoren.

(8) Unter den Nitro-anilin-Derivaten sind nur die 4-Methyl-, 4-Äthoxy-, 4-Chlor- und 4-Nitro-Derivate des 2-Nitro-anilins fungistatisch wirksam. Es ist interessant, dass das 2-Nitro-anilin selbst keine bedeutende Wirkung ausüben kann, sondern nur

dessen 4-substituierte Derivate. Ihre fungistatische Wirkung wird durch Serum, Cystein-hydrochlorid und Na-Thioglycolat nicht beeinflusst. Ihr Wirkungsmechanismus ist uns nicht bekannt.

Zusammenfassung—Verfasser hat die fungistatische Wirkung von 184 Nitro-Verbindungen auf einem 10% Rinderserum enthaltenden flüssigen und 3% Agar enthaltenden festen Maische-Agar-Nährboden untersucht und unter diesen auch den Wirkungsmechanismus der am wirksamsten erwiesenen studiert. Er suchte in der Gruppe der Nitro-Verbindungen Zusammenhänge zu finden einerseits zwischen der chemischen Struktur und der fungistatischen Wirksamkeit, andererseits aber zwischen der chemischen Struktur und dem Wirkungsmechanismus.

LITERATUR

1. T. ZSOLNAI, im *Biochem. Pharmacol.* **5**, 1.
2. I. MUIRHEAD, *Ann. Appl. Biol.* **36**, 250 (1949); *Chem. Abstr.* **10**, 233/i (1950).
3. P. GAVANDAN, *Mém. services chim. état (Paris)*, **32**, 418 (1945); *Chem. Abstr.* 5601 (1948).
4. A. C. HUITRIC, R. PRATT, Y. OKAMO and W. D. KUMLER, *Antibiot. Chemother.* **6**, 290 (1956).
5. P. W. BRIAN, J. F. GROVE and J. C. MCGOVAN, *Nature, Lond.* **158** 876 (1946).
6. J. C. MCGOVAN, P. W. BRIAN and H. G. HEMMING, *Ann. Appl. Biol.* **35**, 25 (1948).
7. F. C. BOCOBO, A. C. CURTIS, W. D. BLOCK and E. R. HARRELL, *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.*, **85**, 220 (1954).
8. W. E. WOOLDRIDGE, *J. Invest. Derm.* **21**, 121 (1953).
9. LONG und TROUTMAN, *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 481 (1951).
10. *U.S. Pat.* 2643965 (1953); *Chem. Abstr.* 8962/b (1953).
11. *Chem. Abstr.* 8545/h (1955).
12. D. E. H. FREAR, *A Catalogue of Insecticides and Fungicides* Vol. I–II (1947–1948).
13. *Chem. Abstr.* 9212/e (1955).
14. G. J. WOODWARD, M. A. MILTON *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* **19**, 1216 (1934).
15. H. ENGELHARD, O. MÜLLER and K. BERTL, *Zbl. Bakt. (Orig.)* **153**, 326 (1948–1949).
16. *Chem. Abstr.* 4702/b (1948).
17. *U.S. Pat.* 2410281 (1946); *Chem. Abstr.* 1381/i (1947).
18. H. C. SPENCER *et al.*, *J. Industr. Hyg. Toxicol.* **30**, 10 (1948); *Chem. Abstr.* 1665/t (1948).
19. GARDNER und HOPKINS, *J. Invest. Derm.* **7**, 5 (1946).
20. J. L. MILLER, F. P. LOEWENFISCH und G. F. BEATTIE, *J. Amer. Med. Ass.* **132**, 67 (1946).
21. E. SCHRAÜFSTÄTTER, *Z. Naturf.* **5b**, 190 (1950).
22. K. A. LUDWIG *et al.*, *Antibiot. & Chemother.* **4**, 56 (1954).
23. *Chem. Abstr.* 6536/d (1955).
24. *U.S. Pat.* 2691616 (1954); *Chem. Abstr.* 2016/c (1955).
25. S. SPIEGELMANN und M. D. KAMEN, *Arch. Biochem.* **18**, 409 (1948).
26. W. F. LOOMIS and F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.* **179**, 503 (1949).
27. E. M. CASE und H. MCLWAIN, *Biochem. J.* **48**, 1 (1951).
28. A. WERNER, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **42**, 4324 (1909).
29. P. PFEIFFER, *Liebigs Ann.* **412**, 265 (1917).
30. J. SOUDBOROUGH, *J. Chem. Soc.* 1339 (1916).
31. D. L. HAMMICK *et al.*, *J. Chem. Soc.*, 1350 (1938).
32. J. WEISS, *J. Chem. Soc.*, 145 (1942).