

VERSUCHE ZUR ENTDECKUNG NEUER FUNGISTATIKA—VII

DIE ANTIMIKROBIELLE WIRKUNG VON ARYL-AZO-METHYLEN-GRUPPE ENTHALTENDEN VERBINDUNGEN

TIBOR ZSOLNAI

Hygiene-Institut* der Medizinischen Universität, Debrecen, Ungarn

(Received 16 August 1963; accepted 27 November 1963)

Abstract—Malononitrile, cyanoacetic-acid-methyl- and ethyl-ester, cyanoacetamide, cyanoacetic-acid-hydrazid, cyanoacetanilide and -4-chlor-anilide, acetylaceton, acetoacetic-ester, malonic-acid-diethylester were coupled with aryl-diazonium salts in the presence of sodium-acetate and their *in-vitro* bacteriostatic, fungistatic, tuberculostatic, trichomonastatic and ascarizid effects were measured as well as their acute toxicity in rats.

It was concluded that only the aryl-azo-malononitriles possess marked biological activity which seems to be related to the structure $R-N=N-CH(CN)_2$ or to its tautomeric form $R-NH-N=C(CN)_2$. The bacteriostatic and fungistatic effect of aryl-azo-malononitriles are considerably decreased by cysteine and thioglycolate (or even inhibited by some of them), but are not influenced by ascorbic acid.

The aryl-azo-malononitriles appear to exert their antimicrobial effect by reacting with the sulfhydryl-groups of certain sulfhydryl enzymes—which play an important part in the metabolism of micro-organisms—in a similar manner as with the cystein or thioglycolate. The aryl-azo-malononitriles are a new-type sulfhydryl-enzyme inhibitors of high biological activity and showing a high degree of structural specificity.

IM VERLAUFE unserer vorigen Arbeiten untersuchten wir die *in vitro* ausgeübte fungistatische Wirkung von 2200 Verbindungen, und wir beschäftigten uns mit dem Wirkungsmechanismus derjenigen, welche sich als die wirksamsten erwiesen haben.^{1–6} Unsere Forschungen weiterführend haben wir die verschiedenen Aryl-azo-Derivate von “aktive Methylen-Gruppe” enthaltenden Verbindungen dargestellt, und wir untersuchten ihre *in vitro* ausgeübte fungistatische Wirkung. Da einige der dargestellten

* Vorstand: Universitätsprofessor Dr. med. Endre Jeney.

Verbindungen schon im Verlaufe der informierenden Vorversuche sich dermassen als wirksam erwiesen, dass es anzunehmen war, dass ihre fungistatische Wirkung nicht spezifisch sei (d.h. dass sie die Vermehrung anderer Mikroorganismenarten vielleicht in ähnlichem Masse zu hindern vermögen, wie diejenige verschiedener Pilzstämmen), so haben wir unsere Versuche nicht nur auf ihre fungistatische Wirkung eingeschränkt, sondern wir haben die Untersuchung zugleich auch auf die *in vitro* ausgeübten bakteriostatischen, tuberkulostatischen, trichomonastatischen und ascariziden Wirkungen, wie auch auf die auf Ratten ausgeübte Toxizität dieser Verbindungen erstreckt.

Um unsere Ergebnisse entsprechend werten und vergleichen zu können, haben wir auch jene biologischen Wirkungen einiger Bakteriostatika und Fungistatika von bekannter Wirkung untersucht, welche sie unter den Versuchsumständen, die wir bei der Wirkungsuntersuchung unserer neuen Verbindungen angewendet haben, entfalten.

Die Identität der Struktur der dargestellten Verbindungen mit der vorausgesetzten Struktur haben wir durch Bestimmung ihres Nitrogen-Gehaltes kontrolliert, was wir—hinsichtlich der verhältnismässig einfachen chemischen Struktur dieser Verbindungen—*im gegebenen Falle* zu diesem Zweck für ausreichend gehalten haben. Das Nitrogengehalt unserer Verbindungen haben wir mit der Dumas'schen Halbmikromethode bestimmt: die zu ihrer Darstellung dienenden Ausgangsstoffe standen uns als Handelsprodukte von "Purissimum"—Reinheitsgrad zur Verfügung. Gleichfalls als Handelsprodukte von purissimum—Reinheitsgrad standen zu unserer Verfügung die "Kontroll-Verbindungen", welche wegen der Vergleichbarkeit der antimikrobiellen Wirkung unserer Produkte untersucht worden sind,—mit Ausnahme des 4-Nitro-chinolin-1-oxyd und dessen 6-Methyl-Derivats, welche Prof. E. Profft und G. Buchmann zum Zweck der Wirkungsuntersuchung uns zur Verfügung gestellt hatten, wofür wir ihnen auch an dieser Stelle unseren Dank zum Ausdruck bringen möchten.

DARSTELLUNG DER VERBINDUNGEN

Wir haben unsere Verbindungen mit den folgenden Methoden dargestellt:

Methode A

0,1 M Menge von einem aromatischen Amin lösen wir im Gemisch von 100 ml Wasser und 21 ml. konz. Salzsäure (= 0,25 M).

Wir kühlen es ab, dann geben wir 100–150 g Eisstücke dazu und wir geben langsam (ca in 20 Min), bei intensivem Rühren tropfenweise die in 50 ml Wasser bereitete eiskalte Lösung von 7,0 g Natrium-nitrit (= 0,1 M) dazu.

Nachdem das Natrium-nitrit hinzugegeben worden war, geben wir zum Gemisch neulich ca 100 g Eisstücke und wir rühren es weitere 20 Min lang. Während dieser Zeit beendet sich das Diazotieren vollständig—dies wird mit Kalium-jodid-Stärke-Papier kontrolliert.

Zu der gewonnenen Aryl-diazonium-salz-Lösung geben wir dann die in 30 ml. Alkohol bereitete Lösung einer Menge von 0,1 M der "aktive Methylen-Gruppe" enthaltenden Verbindung hinzu und wir waschen es mit 10 ml Alkohol ein. Nachher lassen wir zum Gemisch rasch, bei intensivem Rühren die eiskalte, in 100 ml Wasser

bereitete Lösung von 34 g Natrium-acetat (= 0,25 M; $\text{CH}_3\text{—COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) rinnten. Dann waschen wir es mit 50 ml Wasser ein.

Die gewonnenen Produkte scheiden als kristallinische Niederschläge in wenigen Minuten aus. Das Rühren wird noch 20 Min lang weiter fortgesetzt, danach lassen wir die Gemische eine Stunde lang bei Zimmertemperatur stehen. Die gewonnenen Stoffe werden nachher abgenutscht, mit Wasser dreimal gut gewaschen (im Ganzen mit ca. 500 ml Wasser) und dann in Vakuumexsiccator über Silika-Gel bei 35–40 °C getrocknet. Die Rohstoffe werden aus Alkohol umkristallisiert.

Methode B

0,1 M aromatisches Amin lösen wir bei mässigem Wärmen in 60 ml Essigsäure auf, dann geben wir 21 ml konz. Salzsäure (= 0,25 M) und 40 ml Wasser dazu. Wir kühlen das Gemisch auf +8–10 °C ab, nachher tröpfeln wir zu der gewonnenen Suspension bei intensivem Rühren, in langsamem Tempo (ca. in 20 Min) die in 50 ml Wasser bereitete eiskalte Lösung von 7,0 g Natriumnitrit (= 0,1 M). Das Rühren setzen wir weitere 20 Min fort.

Die Beendigung des Diazotierens kontrollieren wir mittels Kalium-jodid-Stärke-Papier, dann geben wir zum Gemisch 300 ml Wasser, die in 30 ml Alkohol bereitete Lösung von 0,1 M Menge der "aktive Methylen-Gruppe" enthaltenden Verbindung und wir waschen es mit 10 ml Alkohol ein.

Danach geben wir 100–150 g Eisstücke zum Gemisch, dann lassen wir schnell, bei intensivem Rühren die in 200 ml Wasser bereitete Lösung von 136 g Natriumacetat (= M) und 10 g Natrium-hydroxyd (= 0,25 M) hineinrinnen und waschen die mit 50 ml Wasser ein.

Die erwarteten Produkte scheiden in einigen Minuten als kristallinische Niederschläge aus. Das weitere Herausgewinnen bzw. die Reinigung der Produkte erfolgt in gleicher Weise, wie bei Anwendung der Methode A.

Methode C

Wir lösen 0,1 M Menge von Amino-benzol-karbonsäure, Amino-benzol-sulfonsäure oder ein Amino-benzol-sulfamid-Derivat in der in 100 ml Wasser bereiteten Lösung von 4 g Natriumhydroxyd (= 0,1 M) auf; dann lösen wir noch in dieser Lösung 7,0 g Natrium-nitrit auf (= 0,1 M). Wir geben zum Gemisch 100–150 g Eisstücke und nachher lassen wir es langsam (ca. in 20 Min) bei intensivem Rühren in das Gemisch von 30 ml konz. Salzsäure (= 0,35 M), 100 ml Wasser und 100 g Eisstücke hineinrinnen; danach waschen wir es mit wenig Wasser ein, nachher rühren wir die gewonnene Aryl-diazonium-Salzlösung weitere 20 Min langs. Die Durchführung der Azo-Reaktion und die Verarbeitung des gewonnenen Produktes erfolgt auf dieselbe Weise, wie bei der Methode A.

Methode D

Der Phenyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester und der 4-Tolyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester (F/2276 und 2277) sind undestillierbare orangengelbe Öle. Ihre Darstellung erfolgt nach Methode A.

Nach der Azo-Reaktion scheiden sie ölig aus. Ihre Reinigung wird dermassen vollzogen, dass wir sie in Chloroform durchschütteln, die Chloroformphase mit

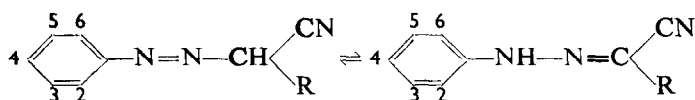
wasserfreiem Natriumsulfat entwässern, das Chloroform unter reduziertem Druck destillieren das zurückgebliebene Öl im Gemisch von 100 ml Alkohol, 100 ml Wasser und 10 ml 40%-igem Natrium-hydroxyd auflösen, es abklären und dann die Lösung bei Eiskühlung in das Gemisch von 9 ml konz. Salzsäure und 150 ml Wasser hineinrinnen lassen. Das ausgeschiedene Öl trennen wir in Scheidetrichter von der Wasserphase ab, danach filtrieren wir es durch ein Papierfilter.

Methode E

Wir führen die Azo-Reaktion von Cyan-essigsäure-hydrazid, Cyan-essigsäure-anilid und Cyan-essigsäure-4-chlor-anilid wesentlich nach Methode A durch, bloss mit dem Unterschied, dass das Cyanessigsäure-hydrazid anstatt Alkohol in 50 ml Wasser, das Cyanessigsäure-anilid und das Cyanessigsäure-*p*-chlor-anilid im Gemisch von 40 %-igem 10 ml (Gewicht/Volum) Natrium-hydroxyd, 40 ml Wasser und 100 ml Alkohol auflösen und ihre auf diese Weise bereiteten Lösungen zu den Aryldiazonium-salzlösungen hinzugeben.

Wir haben die Ausbeuten der dargestellten Verbindungen in Tabelle 1, ihre analytischen Angaben in Tabelle 2 zusammengefasst.

Ihre allgemeine Struktur ist die folgende:



R = —CN; Aryl-azo-malonitrile (Gruppen-Nr. 1.)

R = —COO.CH₃; Aryl-azo-cyanessigsäure-methyl-
ester (Gruppen-Nr. 2.)

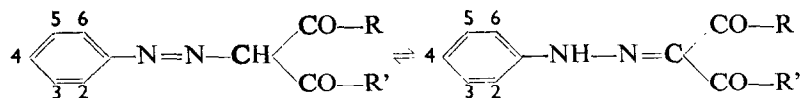
R = —COO.C₂H₅; Aryl-azo-cyanessigsäure-äthyl-
ester (Gruppen-Nr. 2.)

R = —CO—NH₂; Aryl-azo-cyanacetamide (Gruppen-Nr. 3.)

R = —CO—NH—C₆H₅; Aryl-azo-cyanessigsäure-
anilide (Gruppen-Nr. 3.)

R = —CO—NH—C₆H₄—Cl—*p*; Aryl-azo-cyanessig-
säure-4-chlor-anilide (Gruppen-Nr. 3.)

R = —CO—NH—NH₂; Aryl-azo-cyanessigsäure-
hydrazide (Gruppen-Nr. 3.)



R = —CH₃; R' = —CH₃; Aryl-azo-acetylacetone (Gruppen-Nr. 4.)

R = —CH₃; R' = —O—C₂H₅; Aryl-azo-acetessig-
ester (Gruppen-Nr. 4.)

R = —O—C₂H₅; R' = —O—C₂H₅; Aryl-azo-malon-
säure-diaethyl-ester (Gruppen-Nr. 4.)

TABELLE 1. DIE AUSBEUTEN DER DARGESTELLTEN VERBINDUNGEN

Nr	Verbindungen	Darstel- lungs- methode	Ausbeute (g)		Ausbeute des theoret- ischen Wertes (%)	
			Rohpro- dukt	Nach umkris- tallisation	Bezüglich auf Rohpro- dukt	Bezüglich auf umkristal- liertes Produkt
1. Aryl-azo-malonitrile						
F/2201	Phenyl-azo-malonitril	A	17,0	10,2	100	60
F/2202	2-Tolyl-azo-malonitril	A	16,5	13,9	89	75
F/2203	3-Tolyl-azo-malonitril	A	15,2	13,7	82	74
F/2204	4-Tolyl-azo-malonitril	A	17,5	16,0	95	87
F/2205	2-Chlor-phenyl-azo- malonitril	A	16,0	10,9	78	53
F/2206	3-Chlor-phenyl-azo-malonitril	A	18,0	15,9	88	77
F/2207	4-Chlor-phenyl-azo-malonitril	A	20,1	17,2	98	84
F/2208	4-Brom-phenyl-azo-malonitril	A	25,0	20,2	100	81
F/2209	4-Jod-phenyl-azo-malonitril	A	18,8	17,2	63	58
F/2210	4-Aethoxy-phenyl-azo- malonitril	A	16,1	14,1	75	66
F/2211	2-Methyl-4-brom-phenyl- azo-malonitril	A	23,8	21,4	90	81
F/2212	2-Methyl-4-jod-phenyl- azo-malonitril	A	19,5	15,3	63	49
F/2213	3-Methyl-4-brom-phenyl- azo-malonitril	B	23,2	17,2	88	65
F/2214	4-Methyl-2-brom-phenyl- azo-malonitril	B	24,0	16,3	91	62
F/2215	2-Brom-4-aethoxy-phenyl- azo-malonitril	B	25,8	20,5	88	70
F/2216	2,5-Dichlor-phenyl-azo- malonitril	B	14,5	12,4	60	52
F/2217	3,5-Dibrom-phenyl-azo- malonitril	B	26,6	24,8	81	75
F/2218	2-Chlor-4-brom-phenyl- azo-malonitril	B	24,0	20,6	84	72
F/2219	3-Chlor-4-brom-phenyl- azo-malonitril	B	25,2	22,4	89	79
F/2220	2-Methyl-4,6-dibrom- phenyl-azo-malonitril	B	19,0	12,5	55	36
F/2221	2-Chlor-4,6-dibrom-phenyl- azo-malonitril	B	29,0	22,0	80	60
F/2222	3-Chlor-4,6-dibrom-phenyl- azo-malonitril	B	17,3	14,1	47	39
F/2223	4-Chlor-2,6-dibrom-phenyl- azo-malonitril	B	31,6	24,2	87	67
F/2224	2,4,6-Tribrom-phenyl-azo- malonitril	B	36,6	32,0	90	78
F/2225	2-Nitro-phenyl-azo-malonitril	B	20,8	15,5	96	72
F/2226	3-Nitro-phenyl-azo-malonitril	B	19,6	17,2	91	80
F/2227	4-Nitro-phenyl-azo-malonitril	B	19,5	17,0	90	79
F/2228	2-Methyl-4-nitro-phenyl- azo-malonitril	B	15,7	12,1	68	53
F/2229	3-Methyl-4-nitro-phenyl- azo-malonitril	B	21,2	13,1	92	57
F/2230	4-Methyl-2-nitro-phenyl- azo-malonitril	B	20,0	17,8	87	77
F/2231	2-Nitro-4-aethoxy-phenyl- azo-malonitril	B	16,4	13,6	63	52
F/2232	2-Chlor-4-nitro-phenyl-azo- malonitril	B	16,4	11,2	65	45
F/2233	3-Chlor-4-nitro-phenyl-azo- malonitril	B	20,0	14,2	80	57

TABELLE 1—*fortges.*

Nr	Verbindungen	Darstel- lungs- methode	Ausbeute (g)		Ausbeute des theoret- ischen Wertes (%)	
			Rohpro- dukt	Nach umkris- tallisation	Bezüglich auf Rohpro- dukt	Bezüglich auf umkris- tallisiertes Produkt
F/2234	4-Chlor-2-nitro-phenyl-azo- malonitril	B	15,0	13,1	60	52
F/2235	4-Acetylamino-phenyl-azo- malonitril	A	22,3	17,5	98	77
F/2236	Phenyl-azo-malonitril-2- karbonsäure	C	12,6	9,2	58	43
F/2237	Phenyl-azo-malonitril-4- karbonsäure	C	20,0	18,6	93	87
F/2238	Phenyl-azo-malonitril-4- karbonsäure-aethyl-ester	A	20,1	16,0	83	66
F/2239	3-Hydroxy-phenyl-azo- malonitril-4-karbonsäure	C	12,2	11,4	53	50
F/2240	Phenyl-azo-malonitril-4- sulfonsäure	C	4,5	1,7	18	7
F/2241	Phenyl-azo-malonitril-4- sulfonamid	C	23,3	20,0	93	80
F/2242	Phenyl-azo-malonitril-4-N- 4',6'-dimethyl-2'- pyrimidyl-sulfonamid	C	34,4	30,3	97	85
F/2243	1-Naphthyl-azo-malonitril	A	17,1	12,8	78	58
F/2244	4-Brom-1-naphthyl-azo- malonitril	B	23,4	20,0	78	67
F/2245	Azobenzol-4-azo-malonitril	B	21,6	18,2	79	66
F/2246	Diphenylen-4,4'-bis-/azo- malonitril/	B	15,8	13,7	46	40
F/2247	3,3'-Dimethyl-diphenylen- 4,4'-bis-/azo-malonitril/	B	10,2	9,1	28	25
<i>2. Aryl-azo-cyanessigsäure-ester</i>						
F/2248	Phenyl-azo-cyanessigsäure- methyl-ester	A	17,0	16,3	83	80
F/2249	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure- methyl-ester	A	21,7	15,5	100	71
F/2250	4-Chlor-phenyl-azo-cyane- sigsäure-methyl-ester	A	23,8	19,6	100	82
F/2251	Phenyl-azo-cyanessigsäure- aethyl-ester	A	19,2	9,0	88	41
F/2252	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure- aethyl-ester	A	18,4	9,8	80	42
F/2253	4-Chlor-phenyl-azo-cyane- sigsäure-aethyl-ester	A	25,2	20,7	100	82
<i>3. Aryl-azo-cyanacetamide und ihre N-substituierte Derivate</i>						
F/2254	Phenyl-azo-cyanacetamid	A	14,6	13,6	77	72
F/2255	4-Tolyl-azo-cyanacetamid	A	11,4	10,6	56	52
F/2256	4-Chlor-phenyl-azo- cyanacetamid	A	16,2	15,4	72	69
F/2257	Phenyl-azo-cyanessigsäure- anilid	E	20,0	13,2	75	50
F/2258	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure- anilid	E	20,4	16,8	73	60
F/2259	4-Chlor-phenyl-azo-cyane- sigsäure-anilid	E	22,2	18,1	74	60

TABELLE 1—*fortges.*

Nr	Verbindungen	Darstel- lungs- methode	Ausbeute (g)		Ausbeute des theore- tischen Wertes (%)	
			Rohpro- dukt	Nach umkris- tallisation	Bezüglich auf Rohpro- dukt	Bezüglich auf umkris- tallisiertes Produkt
F/2260	Phenyl-azo-cyanessigsäure- /4'-chlor-anilid/	E	25,7	21,6	86	72
F/2261	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure- /4'-chlor-anilid/	E	24,0	20,3	76	65
F/2262	4-Chlor-phenyl-azo-cyane- sigsäure-/4'-chlor-anilid/	E	27,2	25,0	81	75
F/2263	Phenyl-azo-cyanessigsäure- hydrazid	E	16,2	14,4	80	71
F/2264	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure- hydrazid	E	16,0	14,0	73	64
F/2265	4-Chlor-phenyl-azo-cyane- sigsäure-hydrazid	E	18,3	16,1	77	67
4. Aryl-azo-Derivate des Acetylacetons, Acetessig-esters und Malonsäure- diaethyl-esters						
F/2266	Phenyl-azo-acetylaceton	A	19,9	17,2	97	84
F/2267	3-Tolyl-azo-acetylaceton	A	21,8	19,0	100	87
F/2268	4-Tolyl-azo-acetylaceton	A	21,8	18,6	100	85
F/2269	3-Chlor-phenyl-azo- acetyl-aceton	A	21,3	17,2	89	72
F/2270	4-Chlor-phenyl-azo- acetyl-aceton	A	21,5	16,6	90	70
F/2271	Phenyl-azo-acetessigester	A	20,3	17,7	86	75
F/2272	3-Tolyl-azo-acetessigester	A	21,7	12,1	87	48
F/2273	4-Tolyl-azo-acetessigester	A	20,5	17,3	82	70
F/2274	3-Chlor-phenyl-azo- acetessigester	A	23,7	20,5	88	76
F/2275	4-Chlor-phenyl-azo- acetessigester	A	24,6	21,6	91	80
F/2276	Phenyl-azo-malonsäure- diaethyl-ester	D	18,9	17,2	71	65
F/2277	4-Tolyl-azo-malonsäure- diaethyl-ester	D	20,0	17,0	72	61
F/2278	4-Chlor-phenyl-azo-malon- säure-diaethyl-ester	A	25,6	19,8	85	66

Wir versuchten die Reaktion von Acetonitril, Benzyl-cyanid, Akrylonitril, Akrylsäure-aethyl-ester, Acetessigester-*p*-chlor-anil und Acetyl-aceton-*p*-chlor-anil mit Aryl-diazonium-Salzen nach Methode A. Bei den angewandten Versuchsumständen reagierte keines von ihnen mit Aryl-diazonium-Salzen. Der Umstand, dass das Acetonitril und das Benzyl-cyanid nicht reagierten, können wir dadurch erklären, dass die CH_3 —bzw.— CH_2 —Gruppen in ihnen nicht genügend reaktionsfähig sind; die Unfähigkeit des Akrylonitrils und Akrylsäure-aethyl-esters zur Azo-Reaktion ist infolge ihrer strukturellen Gegebenheiten nicht überraschend. Durch jene Tatsache aber, dass das Acetessigester-*p*-chlor-anil und das Acetylaceton-*p*-chlor-anil mit Diazonium-Salzen nicht reagiert, wird diejenige, in der Fachliteratur ziemlich

TABELLE 2. DIE ANALYTISCHEN ANGABEN DER DARGESTELLTEN VERBINDUNGEN

Nr.	Verbindungen	Berechnete Summenformel	Berechnetes Molekular- Gewicht	Schmelzpunkt des umkristallisierten Produktes (°C)	Stickstoff-Gehalt (%)	
					Berechnet	Gefunden
1. Aryl-azo-malonitrile						
F/2201	Phenyl-azo-malonitril	C ₉ H ₇ N ₄	170,17	153 (u. Zers.)	32,93	32,81
F/2202	2-Tolyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₉ N ₄	184,19	108 (u. Zers.)	30,42	30,17
F/2203	3-Tolyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₉ N ₄	184,19	158 (u. Zers.)	30,42	30,38
F/2204	4-Tolyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₉ N ₄	184,19	174 (u. Zers.)	30,42	30,31
F/2205	2-Chlor-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₆ N ₄ Cl	204,62	103 (u. Zers.)	27,38	27,43
F/2206	3-Chlor-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₆ N ₄ Cl	204,62	179 (u. Zers.)	27,38	27,09
F/2207	4-Chlor-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₆ N ₄ Cl	204,62	196 (u. Zers.)	27,38	27,27
F/2208	4-Brom-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₅ N ₄ Br	249,07	203 (u. Zers.)	22,50	22,40
F/2209	4-Iod-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₅ N ₄ I	296,07	208 (u. Zers.)	18,92	18,73
F/2210	4-Aethoxy-phenyl-azo-malonitril	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O	214,22	175 (u. Zers.)	26,15	25,98
F/2211	2-Methyl-4-brom-phenyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₇ N ₄ Br	263,10	155 (u. Zers.)	21,30	21,05
F/2212	2-Methyl-4-jod-phenyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₇ N ₄ I	310,10	157 (u. Zers.)	18,07	18,17
F/2213	3-Methyl-4-brom-phenyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₇ N ₄ Br	263,10	183 (u. Zers.)	21,30	21,32
F/2214	4-Methyl-2-brom-phenyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₇ N ₄ Br	263,10	96 (u. Zers.)	21,30	21,11
F/2215	2-Brom-4-aethoxy-phenyl-azo-malonitril	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ BrO	293,13	177 (u. Zers.)	19,11	18,87
F/2216	2,5-Dichlor-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₄ N ₄ Cl ₂	239,06	161 (u. Zers.)	23,43	23,19
F/2217	3,5-Dibrom-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₄ N ₄ Br ₂	327,98	216 (u. Zers.)	17,08	17,25
F/2218	2-Chlor-4-brom-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₄ N ₄ ClBr	283,52	147 (u. Zers.)	19,76	19,08
F/2219	3-Chlor-4-brom-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₄ N ₄ ClBr	283,52	196 (u. Zers.)	19,76	19,47
F/2220	2-Methyl-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₆ N ₄ Br ₂	342,01	137 (u. Zers.)	16,38	16,10
F/2221	2-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₃ N ₄ ClBr ₂	362,43	129 (u. Zers.)	15,82	15,93
F/2222	3-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₃ N ₄ ClBr ₂	362,43	191 (u. Zers.)	15,82	15,60
F/2223	4-Chlor-2,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₃ N ₄ ClBr ₂	362,43	146 (u. Zers.)	15,82	15,87
F/2224	2,4,6-Tribrom-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₃ N ₄ Br ₃	406,89	160 (u. Zers.)	13,74	13,56
F/2225	2-Nitro-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₆ N ₅ O ₂	215,17	154 (u. Zers.)	32,55	32,37
F/2226	3-Nitro-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₆ N ₅ O ₂	215,17	169 (u. Zers.)	32,55	32,48
F/2227	4-Nitro-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₆ N ₅ O ₂	215,17	214 (u. Zers.)	32,55	32,70
F/2228	2-Methyl-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₈ N ₅ O ₂	229,20	140 (u. Zers.)	30,56	30,75
F/2229	3-Methyl-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₈ N ₅ O ₂	229,20	157 (u. Zers.)	30,56	30,68
F/2230	4-Methyl-2-nitro-phenyl-azo-malonitril	C ₁₀ H ₈ N ₅ O ₂	229,20	119 (u. Zers.)	30,56	30,41
F/2231	2-Nitro-4-aethoxy-phenyl-azo-malonitril	C ₁₁ H ₁₀ N ₅ O ₃	259,22	136 (u. Zers.)	27,02	27,15
F/2232	2-Chlor-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₄ N ₅ O ₂ Cl	249,62	115 (u. Zers.)	28,06	28,00
F/2233	3-Chlor-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₄ N ₅ O ₂ Cl	249,62	161 (u. Zers.)	28,06	28,31
F/2234	4-Chlor-2-nitro-phenyl-azo-malonitril	C ₈ H ₄ N ₅ O ₂ Cl	249,62	123 (u. Zers.)	28,06	27,86

TABELLE 2—fortges.

Nr.	Verbindungen	Berechnete Summenformel	Berechnetes Molekular- Gewicht	Schmelzpunkt des umkristallisierten Produktes (°C)	Stickstoff-Gehalt %	
					Berechnet	Gefunden
F/2235	4-Acetylamino-phenyl-azo-malonitril	$C_{11}H_{10}N_4O$	227,22	227 (u. Zers.)	30,82	31,07
F/2236	Phenyl-azo-malonitril-2-karbonsäure	$C_{10}H_8N_4O_2$	214,18	203 (u. Zers.)	26,16	26,09
F/2237	Phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure	$C_{10}H_8N_4O_2$	214,18	> 250	26,16	26,13
F/2238	Phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure-äthyl-ester	$C_{12}H_{10}N_4O_2$	242,23	194 (u. Zers.)	23,13	23,41
F/2239	3-Hydroxy-phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure	$C_{10}H_8N_4O_3$	230,18	> 250	24,34	24,00
F/2240	Phenyl-azo-malonitril-4-sulfonsäure	$C_8H_6N_4SO_3$	250,23	> 250	22,50	22,31
F/2241	Phenyl-azo-malonitril-4-sulfonamid	$C_9H_7N_5SO_2$	249,25	229 (u. Zers.)	28,10	28,22
F/2242	Phenyl-azo-malonitril-4-N-(4,6-dimethyl-2-pyrimidyl)-sulfonamid	$C_{13}H_{13}N_7SO_2$	355,37	230 (u. Zers.)	27,59	27,13
F/2243	1-Naphthyl-azo-malonitril	$C_{13}H_9N_3$	220,22	147 (u. Zers.)	25,44	25,03
F/2244	4-Brom-1-naphthyl-azo-malonitril	$C_{13}H_8N_3Br$	299,13	132 (u. Zers.)	18,73	19,01
F/2245	Azobenzol-4-azo-malonitril	$C_{15}H_{10}N_6$	274,28	218 (u. Zers.)	30,64	30,58
F/2246	Diphenyl-4,4'-bis-(azo-malonitril)	$C_{18}H_{10}N_8$	338,32	> 250	33,22	33,01
F/2247	3,3'-Dimethyl-diphenyl-4,4'-bis-(azo-malonitril)	$C_{20}H_{14}N_8$	366,37	212 (u. Zers.)	30,58	30,92
2. Aryl-azo-cyanessigsäure-ester						
F/2248	Phenyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	$C_{10}H_9N_3O_2$	203,19	173	20,68	20,70
F/2249	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	$C_{11}H_{11}N_3O_2$	217,22	137	19,34	19,21
F/2250	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	$C_9H_8N_3O_2Cl$	237,64	169	17,68	17,53
F/2251	Phenyl-azo-cyanessigsäure-äthyl-ester	$C_{11}H_{11}N_3O_2$	217,22	126	19,34	19,42
F/2252	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-äthyl-ester	$C_{12}H_{13}N_3O_2$	231,24	105	18,17	18,09
F/2253	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-äthyl-ester	$C_{11}H_9N_3O_2Cl$	251,67	164	16,70	16,74
3. Aryl-azo-cyanacetamide und ihre N-substituierte Derivate						
F/2254	Phenyl-azo-cyanacetamid	$C_9H_8N_4O$	188,18	> 250	29,77	29,68
F/2255	4-Tolyl-azo-cyanacetamid	$C_{10}H_{10}N_4O$	202,21	> 250	27,71	27,80
F/2256	4-Chlor-phenyl-azo-cyanacetamid	$C_8H_7N_4OCl$	222,63	> 250	25,16	25,22
F/2257	Phenyl-azo-cyanessigsäure-anilid	$C_{16}H_{12}N_4O$	264,28	169 (u. Zers.)	21,20	21,33
F/2258	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-anilid	$C_{17}H_{14}N_4O$	278,30	199 (u. Zers.)	20,13	20,00
F/2259	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-anilid	$C_{15}H_{10}N_4OCl$	298,73	191 (u. Zers.)	18,75	18,62
F/2260	Phenyl-azo-cyanessigsäure-(4'-chlor-anilid)	$C_{15}H_{11}N_4OCl$	298,73	196 (u. Zers.)	18,75	18,70
F/2261	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-(4'-chlor-anilid)	$C_{17}H_{13}N_4OCl$	312,74	203 (u. Zers.)	17,91	17,82

TABELLE 2—*fortges.*

Nr.	Verbindungen	Berechnete Summenformel	Berechnetes Molekular- Gewicht	Schmelzpunkt des umkristallisierten Produktes (°C)	Stickstoff-Gehalt (%)	
					Berechnet	Gefunden
F/2262	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-(4'-chlor-amilid)	$C_{15}H_{10}N_4OCl_2$	333,17	220 (u. Zers.)	16,82	16,74
F/2263	Phenyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid	$C_9H_8N_5O$	203,20	205 (u. Zers.)	34,47	34,86
F/2264	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid	$C_{10}H_{11}N_5O$	217,23	210 (u. Zers.)	32,24	32,41
F/2265	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid	$C_8H_8N_5OCl$	237,65	203 (u. Zers.)	29,47	30,28
4. Aryl-azo-Derivate des Acetylacetons, Acetessigesters und Malonsäure-diaethyl-esters						
F/2266	Phenyl-azo-acetylacetone	$C_{11}H_{10}N_2O_2$	204,23	91	13,72	13,49
F/2267	3-Tolyl-azo-acetylacetone	$C_{12}H_{14}N_2O_2$	218,25	85	12,84	12,58
F/2268	4-Tolyl-azo-acetylacetone	$C_{12}H_{14}N_2O_2$	218,25	100	12,84	12,67
F/2269	3-Chlor-phenyl-azo-acetylacetone	$C_{11}H_{11}N_2O_2Cl$	238,67	100	11,74	11,83
F/2270	4-Chlor-phenyl-azo-acetylacetone	$C_{11}H_{11}N_2O_2Cl$	238,67	140	11,74	11,71
F/2271	Phenyl-azo-acetessigester	$C_{12}H_{14}N_2O_3$	234,25	84	11,96	12,07
F/2272	3-Tolyl-azo-acetessigester	$C_{13}H_{16}N_2O_3$	248,28	62	11,28	11,20
F/2273	4-Tolyl-azo-acetessigester	$C_{13}H_{16}N_2O_3$	248,28	87	11,28	11,36
F/2274	3-Chlor-phenyl-azo-acetessigester	$C_{12}H_{13}N_2O_3Cl$	268,70	70	10,43	10,61
F/2275	4-Chlor-phenyl-azo-acetessigester	$C_{12}H_{13}N_2O_3Cl$	268,70	107	10,43	10,39
F/2276	Phenyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester	$C_{13}H_{16}N_2O_4$	264,28	Oel	10,60	10,50
F/2277	4-Tolyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester	$C_{14}H_{18}N_2O_4$	278,30	Oel	10,07	10,41
F/2278	4-Chlor-phenyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester	$C_{13}H_{15}N_2O_4Cl$	298,73	73	9,38	9,17

allgemein verbreitete Auffassung unterstützt, dass die *p*-chloranile des Acetessigesters und des Acetyl-acetons keine "aktive Methylen-Gruppe" enthalten, und dementsprechend sie als β -(*p*-Chlor-anilino)-crotonyl-methyl-ke-ton bzw. β -(*p*-Chlor-anilino)-crotonsäure-aethyl-ester betrachtet werden können.

UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Die Untersuchungsmethode der bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung

Wir haben die Untersuchung der bakteriostatischen Wirkung unserer Verbindungen auf einem 0,5 % Pepton, 0,3 % Natriumchlorid und 0,2 % Dinatriumhydrophosphat enthaltenden, mit 3,5 % Agar versteiften Bouillon-Agar-Nährboden (pH = 7,2), die Untersuchung ihrer fungistatischen Wirkung auf einem mit 3,5 % Agar versteiften Maischen-Agar-Nährboden (pH = 6,0–6,2) ausgeführt. Die Herstellung des Maischen-Nährbodens haben wir in einer unserer früheren Mitteilungen¹ eingehend besprochen, darum gehen wir darauf jetzt nicht ein. Aus den Verbindungen stellten wir Stammlösungen von M/20 Konz. her. Wir lösten sie in 70 %-igem Alkohol mit Hinzugabe von 40 %-igem, mit der abgemessenen Quantität der Verbindungen aequimolekularem Natriumhydroxyd auf. Die zur Vergleichung untersuchten Bakteriostatika bzw. Fungistatika (ausser dem Furoxon) wurden in 96 %-igem Alkohol aufgelöst. Einige Verbindungen (F/2244, 2246, 2247 und das Furoxon), welche so in Alkohol, wie auch in Laugen nur in geringem Masse lösbar waren, wurden als mit Tween 80 stabilisierte homogene Suspensionen verwandt.

Wir gewannen aus M/20 Konz. Stammlösungen durch Verdünnung mit 70 %-igem oder 96 %-igem Alkohol Verbindungslösungen von M/50, M/100, M/200, M/500, M/1000 Konz.

Nachher haben wir 49 ml geschmolzenen Bouillon-Agar,—bzw. Maischen-Agar-Nährboden in Petri-Schalen von 9 cm Durchmesser hineingemessen, und wir rührten die 1 ml Mengen der Verbindungslösungen von verschiedenen molaren Konz. dazu. Nach Erstarren inoculierten wir an die Oberfläche der Nährböden die Testorganismen, deren Vermehrung (oder das Verhindern ihrer Vermehrung durch die Verbindungen) wir im Falle von Bakterien in einer Incubationszeit von 24 Stunden ($T = 37^{\circ}\text{C}$), im Falle von Pilzstämmen aber von 5 Tagen ($T = 30^{\circ}\text{C}$) auswerteten.

Die Verbindungen waren in den Nährböden in den folgenden Konzentrationen zugegen: M/1000, M/2500, M/5000, M/10,000, M/25,000, M/50,000. Mit den Stoffen, die sich im Verlaufe der Vorversuche auch noch in M/50,000 Konz. bakteriostatisch, oder fungistatisch erwiesen haben, nahmen wir weitere Verdünnungen vor, indem wir auch ihre alkoholische (oder wässrige-alkoholische) Lösungen von M/2000 und M/5000 Konz. darstellten und diese bei den Versuchen anwendeten; diese letzteren Stammlösungsverdünnungen ergaben bei den angewandten Versuchsumständen in den Nährböden Verbindungskonzentrationen von M/100,000 bzw. M/250,000.

In jenen Fällen, wo einzelne Verbindungen in ihren bei den Versuchen angewandten höchsten molaren Konzentrationen—in M/1000—nicht totale, sondern nur teilweise Entwicklungshemmung der Testorganismen bewirkten, haben wir noch die hemmende Wirkung bezeichnet. Das Zeichen dafür in den Tabellen: (M/1000).

Die eventuell-konstatierbare *partielle* Entwicklungshemmung, die in einer niedrigeren Konzentration als M/1000 auftrat, berücksichtigten wir nicht, sondern nahmen es für totales Wachstum. Der zum Lösen der Verbindungen angewandte Alkohol

verhinderte in seinen bei den Versuchen angewandten Konzentrationen keinen der Testorganismen in seiner Vermehrung.

Wir untersuchten die Beeinflussbarkeit der bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung von Verbindungen durch Rinderserum, Cystein, Thioglycolat wesentlich nach der schon oben dargelegten Methode, bloss mit folgenden Abweichungen:

- (a) Anstatt 49 ml geschmolzenen Bouillon-Agars bzw. Maischen-Agars gaben wir in die einzelnen Petri-Schalen nur eine Menge von 44 ml, und unmittelbar vor ihrem Erstarren gaben wir noch 5 ml von *nativem* Rinderserum dazu. So war bei diesen Versuchen (da der Gesamtraumgehalt von Nährboden + Serum + VerbindungsstammLösung 50 ml ergibt) das native Rinderserum im Nährboden in 10 %-iger Konz. (Vol./Vol.) zugegen.
- (b) Wir stellten aus Cystein-hydrochlorid bzw. aus Thioglycolsäure wässrige Lösungen molarer Konz. dar, dann neutralisierten wir sie mit Hilfe von 20 %-iger Natronlaugenlösung und wir verdünnten sie mit Wasser auf Konz. M/2. Wir haben von diesen Lösungen in jede einzelne Petri-Schale eine Menge von 1 ml hineingemessen und anstatt 49 ml Nährbodens nur 48 ml. So blieb der Gesamtvolum des hineingemessenen Nährbodens, + der hineingemessenen VerbindungsstammLösung + der Cystein — bzw. der Thioglycolat—Lösung unverändert 50 ml, und infolge dessen war in jeder einzelnen Petri-Schale das Cystein bzw. das Thioglycolat gleichsam in M/100 Konz. zugegen,—ganz unabhängig von der Konzentration der untersuchten Verbindungen im Nährboden. Demzufolge fielen auf ein Molekül der untersuchten Verbindungen im Nährboden 10, 25, 50, 100, 250 usw. Moleküle Cystein bzw. Thioglycolat.

Das Serum, Cystein, Thioglycolat allein haben in ihren bei unseren Versuchen angewandten Konz. (10 % bzw. M/100 Konz.) die Vermehrung weder der Bakterienstämme, noch die der Pilzstämme verhindert. Wir haben den Grad der Beeinflussbarkeit der bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung der Verbindungen durch Serum, Cystein und Thioglycolat numerisch durch den "Serum-Faktor", "Cystein-Faktor" bzw. "Thioglycolat-Faktor" zum Ausdruck gebracht (s. Tabelle 6.). Diese Faktoren sind reziproke Zahlen; sie bezeichnen numerisch, auf den wievielten Teil der ursprünglichen Wirkung das Serum, Cystein bzw. Thioglycolat die bakteriostatische oder fungistatische Wirkung irgendeiner Verbindung—unter den verwendeten Versuchsumständen—zu vermindern vermögen. Wenn vor den Faktoren das Zeichen ">" steht, das bedeutet, dass die zum Nährboden hinzugegebene Zuzusatzung (Serum, Cystein, bzw. Thioglycolat) in solchem Masse die bakteriostatische bzw. fungistatische Wirkung der Verbindung zu vermindern vermag, dass die betreffende Verbindung in ihrer höchsten, bei den Versuchen angewandten molaren Konz., also auch bei M/1000 unwirksam sei.

Auf gleiche Weise, wie die Beeinflussbarkeit durch Cystein und Thioglycolat, haben wir auch die Beeinflussbarkeit der bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung dieser Verbindungen durch Ascorbinsäure untersucht. Wir gaben zum Nährboden anstatt Cysteins bzw. Thioglycolats je 1 ml der mit Natronlauge neutralisierten Lösung von M/2 Konz. der Ascorbinsäure. Da aber die Ascorbinsäure die bakteriostatische und fungistatische Wirkung keiner der Verbindungen zu vermindern vermochte, so kommt sie bei der Übersicht der Ergebnisse in den Tabellen nicht vor. Wir haben bei der Untersuchung der Beeinflussbarkeit der antimikrobiellen Wirkung unserer Verbindungen, wie auch der zur Vergleichung untersuchten Bakteriostatika

und Fungistatika durch Serum, Cystein, Thioglycolat und Ascorbinsäure die folgenden Bakterien- und Pilzstämme als Testorganismen angewandt:

Staphylococcen	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Staph. aureus Duncan} \\ \text{Staph. aureus pyogenes} \\ \text{Staph. albus} \end{array} \right.$
Gram-negative Bakterien	$\left\{ \begin{array}{l} \text{E. coli communis} \\ \text{Aerobacter aerogenes} \\ \text{Proteus vulgaris} \end{array} \right.$
Hefeartige Pilze	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Candida albicans} \\ \text{Saccharomyces cerevisiae} \end{array} \right.$
Faden-Dermatophytone	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Trichophyton gypseum} \\ \text{Epidermophyton Kaufman-Wolff} \\ \text{Achorion quinckeanum} \end{array} \right.$
Penicillium- und Aspergillus-Stämme	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Penicillium javanicum} \\ \text{Penicillium simplicissimum} \\ \text{Aspergillus niveus} \\ \text{Aspergillus niger} \end{array} \right.$

Im Laufe der Untersuchung der bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung unserer Verbindungen, wie auch der Untersuchung der Beeinflussbarkeit ihrer Wirkungen durch Rinderserum, Cystein, Thioglycolat, und Ascorbinsäure haben wir innerhalb jeder Versuchsserie von jeder Konzentration jeder einzelnen Verbindung zwei Parallelen angewandt, und wir haben jede Versuchsserie 3–4-mal reproduziert. Die einzelnen Parallelen, wie auch die Ergebnisse der bei den verschiedenen Gelegenheiten unternommenen identischen Versuchsserien stimmten praktisch—abgesehen von geringen Streuungen—überein.

Die Untersuchungsmethode der tuberkulostatischen Wirkung

Wir untersuchten die tuberkulostatische Wirkung unserer Verbindungen auf einem 10 % "inaktiviertes" Rinderserum enthaltenden flüssigen Kirchner-Nährboden. Wir füllten den Nährboden in sterile Prüfgläser ab,—in jedes einzelne Glas eine Menge von 5 ml—, nachher haben wir ihn an zwei aufeinander folgenden Tagen bei 56 °C Temperatur 2 Stunden lang inaktiviert.

Von einem Teil der in die Prüfgläser abgefüllten Nährböden haben wir 1 ml Menge mit einer Pipette steril herausgenommen, danach haben wir zu den 4 ml zurückgebliebenen Nährböden die Stammlösungen von M/20 Konz. der zu untersuchenden Verbindungen hinzugegeben. Auf diese Weise haben wir homogene Verbindungssuspensionen von M/100 Konz. gewonnen (in mehreren Fällen Lösungen), deren Homogenität innerhalb von 10–15 Min sich als dauerhaft erwies. Durch die 10-fache Verdünnung dieser Verbindungssuspensionen bzw. Lösungen von M/100 Konz. gewannen wir Stammlösungen von M/1000 Konz.

Wir gaben von diesen Stammlösungen von M/100 bzw. M/1000 Menge von 0,5, 0,2, 0,1, 0,05 ml zu den 5 ml Nährböden in den Prüfgläsern, nachdem wir aus diesen die entsprechenden Nährböden-Quantitäten mittels einer Pipette herausgenommen

hatten. So waren die Verbindungen in den einzelnen Prüfgläsern in der Konz. von M/1000, M/2500, M/5000, M/10,000 bzw. M/10,000, M/25,000, M/50,000, M/100,000 zugegen.

In jenen Fällen, wo im Laufe der Vorversuche irgendwelche Verbindung auch in M/100 000 Konz. sich als tuberkulostatisch wirksam erwies, haben wir auch die Vorverdünnung von M/10,000 Konz. dieser Verbindung hergestellt und daraus führten wir die Serien-Verdünnung aus; so wurde diese Verbindung auch in den Konz. von M/100,000, M/250,000, M/500,000, M1,000,000 (nötigenfalls sogar in noch niedrigeren molaren Konz.!) untersucht.

Danach haben wir mit je einem Tropfen der Suspension, die wir aus der 14-tägigen Kultur des auf flüssigem Kirchner-Nährboden gezüchteten *Myc. tbc. H₃₇R₆*-Stammes durch Homogenisieren mit Glasperlen gewonnen haben, mit Pasteur-Kapillare- bei strenger Beibehaltung der Sterilitätsregeln—ein jedes einzelnes Prüfglas der Versuchsserie inoculiert, nachher legten wir sie in ein Thermostat von 37 °C Temperatur.

Wir werteten die Ergebnisse nach einer 14-tägigen Incubationszeit aus. Der zum Auflösen der Verbindungen angewandte Alkohol hat—in bei den Versuchsumständen verwendeter Menge—die Vermehrung der Tuberkelbakterien nicht gestört.

Wir betrachteten als molare Grenzkonzentration von tuberkulostatischer Wirkung jene molare Konzentration der Verbindungen, in welcher noch die totale Hemmung der Vermehrung von Tuberkelbakterien festzustellen war, aber in ihren 2-2,5-fach niedrigeren molaren Konz. die Vermehrung der Tbc.-bakterien schon wahrzunehmen war.

Wir wendeten aus jeder Konzentration von jeder einzelnen Verbindung zwei Parallelen an, und reproduzierten jedes gewonnene Ergebnis am 3-4 verschiedenen Gelegenheiten. Sowohl die einzelnen Parallelen, wie auch die Ergebnisse der bei verschiedenen Gelegenheiten unternommenen identischen Versuchsserien stimmten praktisch—abgesehen von geringen Streuungen—überein.

Die Untersuchungsmethode der trichomonastatischen Wirkung

Wir haben die trichomonastatische Wirkung unserer Verbindungen in von uns etwas modifiziertem Johnson-Trussel Nährboden⁷ untersucht.

Die Zusammensetzung des Nährbodens, bzw. seine Darstellung geschieht folgendermassen:

- 6,0 g Natrium-chlorid
- 0,1 g Kalium-chlorid
- 0,1 g Calcium-chlorid
- 0,1 g Magnesium-sulfat
- 0,1 g Kalium-dihydrophosphat
- 1,6 g Maltose
- 1,0 g Agar
- 32,0 g Pepton sicc.
- 900 ml dest. Wasser
- 300 ml Leber-extract

(Herstellung: das Gemenge von 1 Teile in grosse Stücke geschnittener Leber + 2 Teile Brunnenwassers ist aufzukochen und abzufiltrieren.)

Wir kochten das erhaltene Gemisch auf, stellten es mit 10 %-iger Natronlauge auf $\text{pH} = 6,5$ ein, filterten es heiss ab; nach Abkühlen haben wir die in 60 ml dest. Wasser bereite und mit Natronlauge neutralisierte Lösung von 2,4 g Ascorbinsäure, 0,7 ml 0,5 %-ige Methylen-blau-Lösung, danach 320 ml, bei 56°C inaktiviertes Pferdeserum hinzugegeben. Den auf diese Weise dargestellten Nährboden füllten wir in Prüfgläser ab—in jedes einzelne Glas eine Menge von 5 ml—nachher inaktivierten es an zwei aufeinander folgenden Tagen bei 56°C 30 Min lang.

Die trichomonastatische Wirkung unserer Verbindungen haben wir auf diesem Nährboden durch Anwendung der Serienverdünnungs-Methode untersucht. Die Ausführungsweise der Serienverdünnung war völlig identisch mit derjenigen, welche wir bei der Untersuchung der tuberkulostatischen Wirkung der Verbindungen beschrieben haben, und so verzichteten wir auf die Wiederholung derselben.

Wir haben ein jedes einzelne Prüfglas der Versuchsserien mit 0,1 ml Menge der in 56–62 Stunden entwickelten bakterienfreien Kultur des *Trichomonas vaginalis* inoculiert, nachher setzten wir sie in ein Thermostat von Temperatur 37°C ; wir haben die Ergebnisse nach einer 56–62 stundenlanger Incubationszeit mikroskopisch abgelesen (Vergrößerung—1:200).

In den Kontrollprüfgläsern, die keine Verbindung enthielten, waren je nach Sichtfeld 10–15 sich lebhaft bewegende Trichomonaden wahrzunehmen. Wir betrachteten für trichomonastatisch wirksame molare Grenzkonzentration der Verbindungen jene niedrigste molare Verbindungskonzentration, bei der die vollständige Vermehrungshemmung des *Trichomonas vaginalis* festzustellen war (also bei welcher Verbindungskonzentration noch in keinem Sichtfeld Protozoon wahrzunehmen war), bei welcher aber die 2–2,5-mal niedrigere molare Verbindungskonzentration die Vermehrung der Trichomonaden ermöglichte. Von jeder Konzentration jeder einzelnen Verbindung haben wir drei Parallelen angewandt, und jedes Ergebnis 3–4-mal reproduziert. So die einzelnen Parallelen, wie auch die Ergebnisse der bei verschiedenen Gelegenheiten unternommenen identischen Versuchsserien stimmten—von geringen Streuungen abgesehen—praktisch überein.

Die Untersuchungsmethode der in vitro ausgeübten ascariziden Wirkung

Wir untersuchten die ascarizide Wirkung der dargestellten Verbindungen, sowie ihrer Ausgangsstoffe, und die der zur Vergleichung herangezogenen Stoffe an dem im Darmtrakt von Schweinen vorkommenden *Ascaris suum*. Nach dem Aufschneiden der Därme von am Schlachthof geschlachteten Schweinen haben wir die darin gefundenen Würmer in lauem Wasser gleich abgespült, dann haben wir sie in einer 37°C warme Ringer-Lösung enthaltenden Wärmeflasche in unser Institut gebracht; die Nematoden haben wir binnen einiger Stunden zu unseren Versuchen angewandt.

Wir haben je 200 ml Ringer-Lösung in Kolle-Schalen gegossen. Zu dieser Lösung gaben wir die Mengen von 4,0, 1,6, 0,8, 0,4, 0,16, 0,08 ml der Stammlösungen von M/20 Konzentration der untersuchten Verbindungen (Im Falle der Stammlösung-Einmessungen von den Mengen 4,0 und 1,6 ml haben wir vorher aus der Ringer-Lösungen den gleichen Umfang aus den Kolle-Schalen herausgenommen!). So waren die untersuchten Verbindungen in den Kolle-Schalen in Konz. von M/1000, M/2500, M/5000, M/10.000, M/25.000, M/50.000 zugegen, ihre Mehrzahl in der Form von Lösung, ihr kleinerer Teil in der Form von homogener Suspension. Die auf diese Weise dargestellten Versuchsserien setzten wir in ein Thermostat von 37°C , und

nachdem sie die Temperatur des Thermostats übernahmen, setzten wir in jede einzelne Kolle-Schale je ein *Ascaris suum* Individuum. Bei unseren Versuchen gebrauchten wir nur die sich stark bewegenden, sehr lebensfähigen, mittelmässig entwickelten Würmer-Individuen.

Die auf *Ascaris suum* *in vitro* ausgeübte ascarizide Wirkung der Verbindungen werteten wir nach 16 Stunden mit blossen Augen aus. Wenn nach diesem Zeitverlauf die Würmer in den Kolle-Schalen sich spontaner Weise nicht bewegten, trachteten wir durch Schlagimpulse auf ihre Kopfteile ihre Bewegung hervorzurufen. Wir betrachteten als ascarizid wirkende molare Grenzkonzentration jene molare Konzentration irgendeiner Verbindung, welche die totale *Bewegungslähmung* der *Ascaris suum*-Individuen (trotz der auf ihre Kopfteile ausgeübten Schlagimpulse) nach 16 stündiger Einwirkung hervorzurufen vermochte.

Es soll bemerkt werden, dass die in den verbindungs-freien Kolle-Schalen zur Kontrolle dienenden Ascaris-Individuen auch noch nach 72 Stunden eine bedeutende spontane Bewegung aufwiesen, und dass der zum Auflösen der Verbindungen gebrauchte Alkohol, wie auch die Natronlauge bei den gegebenen Versuchsumständen, —wie das unsere Kontroll-Versuche bezeugen—an sich die Bewegungsfähigkeit der Ascaris-Individuen überhaupt nicht beeinflussen.

Wir haben innerhalb jeder Untersuchungsserie 4 Parallelen aus jeder einzelnen Verbindungskonzentration angewandt, und wir haben jede Untersuchungsserie 3–4-mal (auch im Falle negativer Ergebnisse!) reproduziert. Die Parallelen innerhalb einer Versuchsserie, wie auch die bei Reproduktion identischer Versuchsserien gewonnenen Ergebnisse stimmten praktisch—abgesehen von geringen Streuungen—überein.

ERGEBNISSE

Wir haben die Ergebnisse, welche wir im Laufe der Versuche in Bezug auf die antimikrobielle und ascarizide Wirkung unserer Verbindungen, gleichwie auf die Beeinflussbarkeit ihrer bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung durch Rinder-serum, Cystein und Thioglycolat, ausserdem auf ihre auf Ratten ausgeübte akute Toxizität erhielten, in den Tabellen 3–10. zusammengefasst.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die in den Tabellen zusammengefassten Ergebnisse überblickend kann folgendes festgestellt werden:

1. Die Mehrheit der Aryl-azo-Derivate des Malonitrils ist im Allgemeinen von einer bedeutenden bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung. Es sind unter ihnen nur diejenigen unwirksam, welche in ihrer Aryl-azo-Gruppe hydrophyle —COOH, —SO₃H, —SO₂NH—R, —NH—CO—CH₃ Molekülanteile enthalten. Die Ursache ihrer Unwirksamkeit ist darin zu suchen, dass solche hydrophyle Molekülanteile enthaltenden Derivate annehmbar durch die Zellmembran bzw.

Die Zellwand der Mikroorganismen in den interzellularen Raum der Zellen nicht zu diffundieren vermögen—demzufolge vermögen sie nicht mit den einzelnen, den intermediaeren Stoffwechsel der Mikroorganismenzellen katalisierenden Enzymen chemisch zu reagieren. Dass die Ursache ihrer Unwirksamkeit wirklich in ihrem

TABELLE 3. DIE BAKTERIOSTATISCHE UND FUNGISTATISCHE WIRKUNG DER DARGESTELLTEN VERBINDUNGEN

Mikroorganismen- Stämme	Phenyl- azo-malo- nitril F/2201	2-Tolyl- azo-malo- nitril F/2202	3-Tolyl- azo-malo- nitril F/2203	4-Tolyl- azo-malo- nitril F/2204	2-Chlor- phenyl- azo-malo- nitril F/2205	3-Chlor- phenyl- azo-malo- nitril F/2206	4-Chlor- phenyl- azo-malo- nitril F/2207	4-Brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2208	4-Iod- phenyl- azo-malo- nitril F/2209	4-Aethoxy- phenyl- azo-malo- nitril F/2210	2-Methyl- 4-brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2211
<i>Bakterien:</i>											
<i>Staphylococcus aureus</i> Duncan	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/10,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000
<i>Staphylococcus aureus</i> pyogenes	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/10,000	M/25,000
<i>Staphylococcus albus</i>	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/10,000	M/25,000
<i>Shigella dysenteriae</i> Flexner	M/5,000	M/2,500	M/2,500	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/1,000	M/5,000
<i>Shigella dysenteriae</i> Sonne	M/5,000	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/1,000	M/5,000
<i>Salmonella typhi</i>	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000	M/2,500	M/10,000
<i>Salmonella paratyphi</i>	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/10,000	M/1,000	M/5,000
<i>Escherichia coli</i> communis	M/2,500	M/1,000	M/1,000	M/2,500	M/2,500	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/1,000	M/5,000
<i>Aerobacter aerogenes</i>	M/2,500	M/1,000	M/1,000	M/2,500	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/1,000	M/5,000
<i>Proteus vulgaris</i>	M/2,500	M/1,000	M/1,000	M/2,500	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	—	M/5,000
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	—	—	—	—	M/1,000	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/2,500	—	M/2,500
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	—	—	—	—	M/1,000	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/2,500	—	M/1,000
<i>Pilze:</i>											
<i>Candida albicans</i>	M/2,500	M/5,000	M/2,500	—	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/1,000	—	M/5,000
<i>Cryptococcus ruber</i>	M/5,000	M/5,000	M/5,000	M/5,000	M/5,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000	—	M/5,000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M/2,500	M/5,000	M/2,500	—	M/2,500	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/1,000	—	M/5,000
<i>Trichophyton gypseum</i>	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000
<i>Epidermophyton</i> Kaufman-Wolff	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000
<i>Achorion quinckeanum</i>	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000
<i>Trichothecium roseum</i>	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000
<i>Penicillium javanicum</i>	M/2,500	M/5,000	M/5,000	—	M/2,500	M/5,000	M/10,000	M/10,000	—	—	M/10,000
<i>Penicillium</i> simplicissimum	M/5,000	M/5,000	M/5,000	M/1,000	M/2,500	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/25,000	—	M/5,000
<i>Aspergillus niveus</i>	M/2,500	M/2,500	M/2,500	—	M/2,500	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/25,000	—	M/2,500
<i>Aspergillus elegans</i>	M/2,500	M/1,000	M/2,500	—	M/2,500	M/5,000	M/5,000	M/1,000	M/25,000	—	M/1,000
<i>Aspergillus niger</i>	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/10,000	M/25,000	M/25,000	M/5,000	M/5,000	M/5,000
<i>Actinomyces repens</i>	M/2,500	M/1,000	M/2,500	—	M/2,500	M/5,000	M/10,000	—	—	—	—
<i>Botrytis cinerea</i>	M/2,500	M/2,500	M/2,500	—	M/2,500	M/5,000	M/10,000	—	—	—	—
<i>Fusarium oxysporum</i>	M/2,500	M/2,500	M/2,500	—	M/2,500	M/5,000	M/10,000	—	—	—	—
<i>Fusarium solani</i>	M/2,500	M/2,500	M/2,500	—	M/2,500	M/5,000	M/5,000	—	—	—	—

TABELLE 3—fortges.

Mikroorganismen- Stämme	2-Methyl- 4-jod- phenyl- azo-malo- nitril F/2212	3-Methyl- 4-brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2213	4-Methyl- 2-brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2214	2-Brom- 4-äthoxy- phenyl- azo-malo- nitril F/2215	2,5-Di- chlor- phenyl- azo-malo- nitril F/2216	3,5-Di- brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2217	2-Chlor- 4-brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2218	3-Chlor- 4-brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2219	2-Methyl- 4,6-di- brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2220	2-Chlor- 4,6-di- brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2221	3-Chlor- 4,6-di- brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2222
<i>Bakterien:</i>											
<i>Staphylococcus aureus</i> Duncan	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000
<i>Staphylococcus aureus</i> pyogenes	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000
<i>Staphylococcus albus</i>	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000
<i>Shigella dysenteriae</i>	M/5,000	M/5,000	M/2,500	M/1,000	M/5,000	M/25,000	M/10,000	M/10,000	M/2,500	M/2,500	M/5,000
<i>Flexner</i>	M/5,000	M/5,000	M/2,500	M/1,000	M/5,000	M/10,000	M/5,000	M/5,000	M/2,500	M/1,000	M/2,500
<i>Shigella dysenteriae</i> Sonne	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/5,000	M/10,000	M/25,000	M/25,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000
<i>Salmonella typhi</i>	M/5,000	M/10,000	M/5,000	M/2,500	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/5,000	M/2,500	M/2,500
<i>Salmonella paratyphi</i>	M/5,000	M/10,000	M/5,000	M/2,500	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/5,000	M/2,500	M/2,500
<i>Escherichia coli communis</i>	M/5,000	M/10,000	M/5,000	M/1,000	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/2,500	M/1,000	M/1,000
<i>Aerobacter aerogenes</i>	M/5,000	M/10,000	M/5,000	M/1,000	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/2,500	M/1,000	M/2,500
<i>Proteus vulgaris</i>	M/5,000	M/10,000	M/5,000	M/1,000	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/2,500	M/1,000	M/2,500
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	M/2,500	M/2,500	M/1,000	—	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/1,000	M/1,000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M/2,500	M/2,500	M/1,000	—	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/2,500	M/1,000	M/1,000
<i>Pilze:</i>											
<i>Candida albicans</i>	M/2,500	M/2,500	M/5,000	—	M/5,000	—	M/10,000	M/5,000	M/2,500	M/2,500	M/5,000
<i>Cryptococcus ruber</i>	M/5,000	M/5,000	M/5,000	—	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/5,000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M/2,500	M/1,000	M/5,000	—	M/5,000	M/1,000	M/10,000	M/10,000	M/2,500	M/2,500	M/5,000
<i>Trichophyton gypsum</i>	M/10,000	M/50,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000
<i>Epidermophyton</i>	M/10,000	M/50,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000
<i>Kaufman-Wolff</i>	M/10,000	M/50,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000
<i>Achorion quinekeanum</i>	M/25,000	M/50,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000
<i>Trichothecium roseum</i>	M/25,000	M/50,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000
<i>Penicillium javanicum</i>	M/5,000	M/5,000	M/5,000	—	M/5,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/5,000	M/5,000	M/10,000
<i>Penicillium</i> simplicissimum	M/2,500	M/5,000	M/2,500	—	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/5,000	M/5,000	M/10,000
<i>Aspergillus niveus</i>	M/2,500	M/5,000	M/2,500	—	M/2,500	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/5,000	M/2,500	M/5,000
<i>Aspergillus elegans</i>	—	—	M/1,000	—	M/1,000	M/1,000	M/2,500	M/2,500	M/1,000	M/1,000	M/1,000
<i>Aspergillus niger</i>	M/2,500	M/5,000	M/2,500	—	M/10,000	M/5,000	M/5,000	M/10,000	M/5,000	M/5,000	M/5,000
<i>Actinomyces repens</i>	—	—	M/1,000	(M/1,000)	M/2,500	—	M/2,500	—	M/1,000	M/2,500	—
<i>Botrytis cinerea</i>	—	—	—	(M/1,000)	M/1,000	—	M/1,000	—	M/1,000	M/2,500	—
<i>Fusarium oxysporum</i>	—	—	—	(M/1,000)	M/1,000	—	M/1,000	—	M/1,000	M/2,500	—
<i>Fusarium solani</i>	—	—	(M/1,000)	—	M/2,500	—	M/1,000	—	M/1,000	M/5,000	—

TABELLE 3—fortges.

Mikroorganismen- Stämme	4-Chlor- 2,6-di- brom- phenyl- azo-malo- nitril F/2223	2,4,6- Tribrom- phenyl- azo-malo- nitril F/2224	2-Nitro- phenyl- azo-malo- nitril F/2225	3-Nitro- phenyl- azo-malo- nitril F/2226	4-Nitro- phenyl- azo-malo- nitril F/2227	2-Methyl- 4-nitro- phenyl- azo-malo- nitril F/2228	3-Methyl- 4-nitro- phenyl- azo-malo- nitril F/2229	4-Methyl- 2-nitro- phenyl- azo-malo- nitril F/2230	2-Nitro- 4-äthoxy- phenyl- azo-malo- nitril F/2231	2-Chlor- 4-nitro- phenyl- azo-malo- nitril F/2232	3-Chlor- 4-nitro- phenyl- azo-malo- nitril F/2233
Bakterien:											
<i>Staphylococcus aureus</i> Duncan	M/50,000	M/50,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/50,000
<i>Staphylococcus aureus</i> pyogenes	M/50,000	M/50,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/50,000
<i>Staphylococcus albus</i>	M/50,000	M/50,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/25,000
<i>Shigella dysenteriae</i> Flexner	M/2,500	M/2,500	M/5,000	M/5,000	M/5,000	—	M/1,000	M/2,500	M/1,000	M/2,500	M/5,000
<i>Shigella dysenteriae</i> Sonne	M/2,500	M/2,500	M/5,000	M/2,500	M/2,500	—	M/1,000	M/2,500	M/1,000	—	M/2,500
<i>Salmonella typhi</i>	M/5,000	M/5,000	M/25,000	M/10,000	M/10,000	M/5,000	M/5,000	M/5,000	M/2,500	M/2,500	M/10,000
<i>Salmonella paratyphi</i>	M/2,500	M/2,500	M/10,000	M/2,500	M/2,500	M/1,000	—	M/2,500	M/1,000	—	M/2,500
<i>Escherichia coli communis</i>	M/1,000	M/1,000	M/5,000	M/2,500	M/2,500	—	—	M/2,500	M/1,000	—	M/2,500
<i>Aerobacter aerogenes</i>	M/1,000	M/1,000	M/5,000	M/2,500	M/1,000	—	—	M/2,500	M/1,000	—	M/2,500
<i>Proteus vulgaris</i>	M/2,500	M/1,000	—	—	—	—	—	—	M/1,000	—	M/2,500
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	M/1,000	M/1,000	—	—	—	—	—	—	—	—	M/1,000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M/1,000	M/1,000	—	—	—	—	—	—	—	—	M/1,000
Pilze:											
<i>Candida albicans</i>	M/2,500	M/2,500	M/1,000	—	—	M/2,500	M/1,000	M/2,500	—	M/2,500	M/1,000
<i>Cryptococcus ruber</i>	M/5,000	M/10,000	M/5,000	—	—	M/2,500	M/1,000	M/5,000	—	M/2,500	M/2,500
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M/2,500	M/2,500	M/1,000	—	—	M/2,500	M/1,000	M/2,500	—	M/2,500	M/1,000
<i>Trichophyton gypseum</i>	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/10,000	M/5,000	M/25,000	M/25,000	M/50,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000
<i>Epidermophyton</i> Kaufman-Wolff	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000
<i>Achorion quinckeanum</i>	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/10,000	M/5,000	M/10,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000	M/50,000
<i>Trichothecium roseum</i>	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000	M/25,000
<i>Penicillium javanicum</i>	M/2,500	M/5,000	M/5,000	—	—	M/1,000	M/1,000	M/2,500	M/1,000	M/1,000	M/1,000
<i>Penicillium</i> simplicissimum	M/2,500	M/2,500	M/5,000	—	—	M/2,500	M/1,000	M/2,500	M/1,000	M/2,500	M/2,500
<i>Aspergillus niveus</i>	M/2,500	M/2,500	—	—	—	M/1,000	M/1,000	—	—	M/2,500	—
<i>Aspergillus elegans</i>	M/1,000	M/1,000	—	—	—	M/1,000	M/1,000	—	—	M/2,500	—
<i>Aspergillus niger</i>	M/5,000	M/5,000	—	M/1,000	—	M/1,000	M/1,000	M/2,500	—	M/2,500	M/1,000
<i>Actinomyces repens</i>	M/2,500	M/1,000	M/1,000	—	—	—	—	—	—	(M/1000)	—
<i>Botrytis cinerea</i>	M/1,000	M/1,000	M/2,500	—	—	M/1,000	(M/1000)	—	—	M/1,000	M/1,000
<i>Fusarium oxysporum</i>	M/1,000	M/1,000	M/2,500	—	—	M/2,500	—	—	—	M/1,000	M/1,000
<i>Fusarium solani</i>	M/1,000	M/1,000	M/2,500	—	—	M/2,500	(M/1000)	M/1,000	—	M/1,000	M/1,000

TABELLE 3—*fortges.*

Mikroorganismen-Stämme	Phenyl- azo-acet- essig-ester F/2271	3-Tolyl- azo-acet- essig-ester F/2272	4-Tolyl- azo-acet- essig-ester F/2273	3-Chlor- phenyl- azo-acet- essig-ester F/2274	4-Chlor- phenyl- azo-acet- essig-ester F/2275	Phenyl- azo-malon- säure- diäthyl- ester F/2276	4-Tolyl- azo-malon- säure- diäthyl- ester F/2277	4-Chlor- phenyl-azo- malonsäure- diäthyl- ester F/2278
<i>Bakterien:</i>								
Staphylococcus aureus Duncan	—	—	—	—	—	—	—	—
Staphylococcus aureus pyogenes	—	—	—	—	—	—	—	—
Staphylococcus albus	—	—	—	—	—	—	—	—
Shigella dysenteriae Flexner	—	—	—	—	—	—	—	—
Shigella dysenteriae Sonne	—	—	—	—	—	—	—	—
Salmonella typhi	—	—	—	—	—	—	—	—
Salmonella paratyphi	—	—	—	—	—	—	—	—
Escherichia coli communis	—	—	—	—	—	—	—	—
Aerobacter aerogenes	—	—	—	—	—	—	—	—
Proteus vulgaris	—	—	—	—	—	—	—	—
Pseudomonas pyocyanea	—	—	—	—	—	—	—	—
Pseudomonas fluorescens	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Pilze:</i>								
Candida albicans	—	—	—	—	—	—	—	M/ 1,000
Cryptococcus ruber	—	—	—	—	—	—	—	—
Sacharomyces cerevisiae	—	—	—	—	—	—	—	—
Trichophyton gypseum	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	(M/1000)	M/ 2,500	M/ 5,000
Epidermophyton Kaufman-Wolff	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/ 2,500	M/ 2,500	M/ 5,000
Achorion quinqueseptatum	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/ 1,000	M/ 1,000	M/ 2,500
Trichothecium roseum	M/ 5,000	M/ 5,000	M/10,000	M/10,000	M/1,000	—	—	—
Penicillium javanicum	—	—	M/1,000	(M/1000)	M/ 1,000	—	—	—
Penicillium simplicissimum	—	—	M/ 1,000	(M/1000)	—	—	—	—
Aspergillus niveus	—	—	—	—	—	—	—	—
Aspergillus elegans	—	—	—	—	—	—	—	—
Aspergillus niger	—	—	—	(M/1000)	(M/1000)	—	—	—
Actinomyces repens	M/ 1,000	—	—	—	M/ 1,000	—	—	—
Botrytis cinerea	(M/1000)	—	—	—	M/ 1,000	—	—	—
Fusarium oxysporum	(M/1000)	—	—	—	M/ 1,000	—	—	—
Fusarium solani	M/ 1,000	—	—	—	M/ 1,000	—	—	—

Zeichenerklärung = Die untersuchte Verbindung übt auf den angewandten Bakterien- bzw. Pilzstamm auch in der höchsten molaren Konzentration—d.h. in M/1000—keine bakterio- oder fungistatische Wirkung aus.

(M/1000) = Die untersuchte Verbindung übt auch in der angewandten höchsten molaren Konzentration—d.h. in M/1000—nur eine teilweise Entwicklungshemmung aus.

TABELLE 4. AUF DIE ANGEWANDTEN BAKTERIEN— UND PILZ—STÄMME UNWIRKSAM BEWIESENE VERBINDUNGEN

Nr	Verbindungen
	<i>A. Aryl-azo-methylen-Gruppe enthaltende Verbindungen</i>
F/2235	4-Acetylamino-phenyl-azo-malonitril
F/2236	Phenyl-azo-malonitril-2-karbonsäure
F/2237	Phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure
F/2239	3-Hydroxy-phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure
F/2240	Phenyl-azo-malonitril-4-sulfonsäure
F/2241	Phenyl-azo-malonitril-4-sulfonamid
F/2242	Phenyl-azo-malonitril-4-N-(4',6'-dimethyl-2'-pyrimidyl)-sulfamid
F/2246	Diphenylen-4,4'-bis-(azo-malonitril)
F/2254	Phenyl-azo-cyanacetamid
F/2255	4-Tolyl-azo-cyanacetamid
F/2256	4-Chlor-phenyl-azo-cyanacetamid
F/2258	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-anilid
F/2261	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-(4'-chlor-anilid)
F/2268	4-Tolyl-azo-acetylaceton
F/2269	3-Chlor-phenyl-azo-acetylaceton
F/2270	4-Chlor-phenyl-azo-acetylaceton
	<i>B. Ausgangsstoffe der Verbindungsklassen 1–4 und mit ihnen verwandte andere Verbindungen</i>
	Malonitril
	Cyanessigsäure-methyl-ester
	Cyanessigsäure-aethyl-ester
	Cyanacetamid
	Cyanessigsäure-anilid
	Cyanessigsäure-4-chlor-anilid
	Cyanessigsäure-hydrazid
	Acetyl-aceton
	Acetessigester
	Malonsäure-diaethyl-ester
	Acetonitril
	Benzyl-cyanid
	Kalium-cyanid

Mangel an Diffusionsvermögen in die Zellen zu suchen ist, wird auch durch jene Tatsache bewiesen, dass so lange die Phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure (F/2237) unwirksam ist, der Aethyl-ester desselben (F/2238), welcher anstatt der hydrophilen —COOH Gruppe, die lipophile —COO.C₂H₅ Gruppe enthält, bakteriostatisch und fungistatisch wirksam ist. Die bakteriostatische und fungistatische Wirkung ist bei denjenigen Aryl-azo-malonitrilen am intensivsten, welche in dem Benzolring ihrer Moleküle ein Halogen-Atom oder mehrere Halogen-Atome enthalten. Im Gegensatz zu den Halogen-Atomen steigert die Nitro- oder die Methyl-Gruppe in der Verbindungsfamilie der Aryl-azo-malonitrile die antimikrobielle Wirkung nicht in wesentlichem Masse.

2. Die Aryl-azo-Derivate der Cyanessigsäure-ester, des Malonsäure-diaethyl-esters und des Acetessigesters sind in wesentlichem Masse nur auf die Faden-Dermatophytone und auf das *Trichothecium roseum* fungistatisch wirksam. Auf andere Pilzstämmen, gleichwie auf die grampositiven und die gram-negativen Bakterien, sind sie völlig (oder fast völlig!) unwirksam.

Die Aryl-azo-Derivate des Cyanacetamids sind weder von bakteriostatischer noch von fungistatischer Wirkung. Die Phenyl-azo- und 4-Chlor-phenyl-azo-Derivate der Cyanacetanilide sind nur auf die Faden-Dermatophytone fungistatisch wirksam

TABELLE 5. DIE BAKTERIOSTATISCHE UND FUNGISTATISCHE WIRKUNG DER ZUM VERGLEICH UNTERSUCHTEN VERBINDUNGEN

Mikroorganismen-Stämme	d-Chlor- amphenicol	5-Nitro- furfural- semi- carbazon (= Furazin)	3-(5'-Nitro- furfural- amino)- oxazoli- don)-2 (= Furoxon)	1-Phenyl- 2-Nitro- propyl- (1,2)	1-(4'-Chlor- phenyl)-2- nitro- propyl- (1,2)	4-Nitro- chinolin-1- oxyd	4-Nitro- 6-methyl- chinolin- 1-oxyd	2-Methyl- 1,4-naphtho- chinon	4-Chlor- benzyl- thiocyanat	1-Phenyl- 3,5-di- methyl-4- nitroso- pyrazol
<i>Bakterien:</i>										
<i>Staphylococcus aureus</i> Duncan	M/ 50,000	M/ 50,000	M/100,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 5,000	M/ 2,500	M/ 5,000
<i>Staphylococcus aureus</i> pyogenes	M/ 25,000	M/ 25,000	M/ 50,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 5,000	M/ 2,500	M/ 2,500
<i>Staphylococcus albus</i>	M/ 25,000	M/ 50,000	M/ 50,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 2,500	M/ 2,500
<i>Shigella dysenteriae</i> Flexner	M/100,000	M/100,000	M/100,000	M/ 5,000	M/ 5,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 1,000	M/ 2,500	M/10,000
<i>Shigella dysenteriae</i> Sonne	M/100,000	M/ 50,000	M/ 50,000	M/ 2,500	M/ 2,500	M/ 25,000	M/ 10,000	M/ 1,000	M/ 1,000	M/10,000
<i>Salmonella typhi</i>	M/100,000	M/ 50,000	M/100,000	M/ 2,500	M/ 2,500	M/ 25,000	M/ 10,000	M/ 1,000	M/ 2,500	M/10,000
<i>Salmonella paratyphi</i>	M/100,000	M/ 50,000	M/100,000	M/ 2,500	M/ 2,500	M/ 25,000	M/ 10,000	M/ 1,000	M/ 2,500	M/10,000
<i>Escherichia coli</i> communis	M/ 25,000	M/ 10,000	M/ 25,000	M/ 1,000	M/ 1,000	M/ 10,000	M/ 5,000	—	M/ 1,000	M/ 2,500
<i>Aerobacter aerogenes</i>	M/10,000	M/ 2,500	M/ 5,000	M/ 2,500	M/ 2,500	M/ 10,000	M/ 5,000	—	M/ 1,000	M/ 2,500
<i>Proteus vulgaris</i>	M/ 25,000	M/10,000	M/10,000	M/ 2,500	M/ 2,500	M/ 10,000	M/ 5,000	—	M/ 1,000	M/ 2,500
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	M/10,000	M/10,000	M/10,000	M/ 2,500	M/ 2,500	M/ 10,000	M/ 5,000	—	M/ 1,000	M/ 2,500
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M/10,000	M/ 2,500	M/10,000	M/ 2,500	M/ 2,500	M/ 10,000	M/ 5,000	—	M/ 1,000	M/ 2,500
<i>Pilze:</i>										
<i>Candida albicans</i>	—	—	—	M/ 5,000	M/ 2,500	M/ 25,000	M/ 5,000	M/ 2,500	M/ 5,000	M/ 1,000
<i>Cryptococcus ruber</i>	—	—	—	M/ 5,000	M/ 2,500	M/ 25,000	M/ 10,000	M/ 2,500	M/ 5,000	M/ 2,500
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	—	—	M/ 5,000	M/ 2,500	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 2,500	M/ 5,000	M/ 1,000
<i>Trichophyton gypseum</i> Epidermophyton	—	M/ 2,500	M/ 1,000	M/100,000	M/100,000	M/ 25,000	M/ 50,000	M/25,000	M/10,000	M/10,000
<i>Kaufman-Wolff</i>	—	M/ 2,500	M/ 1,000	M/ 50,000	M/100,000	M/ 25,000	M/ 50,000	M/10,000	M/25,000	M/10,000
<i>Achorion quincanum</i>	—	M/ 2,500	M/ 1,000	M/ 50,000	M/100,000	M/100,000	M/250,000	M/25,000	M/10,000	M/10,000
<i>Trichothecium roseum</i>	—	M/ 2,500	M/ 1,000	M/ 25,000	M/ 25,000	M/100,000	M/ 50,000	M/ 2,500	M/10,000	M/10,000
<i>Penicillium javanicum</i>	—	—	—	M/ 5,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 50,000	M/ 1,000	M/ 5,000	M/10,000
<i>Penicillium</i> simplicissimum	—	—	—	M/ 5,000	M/ 5,000	M/ 50,000	M/ 50,000	M/ 2,500	M/ 5,000	M/10,000
<i>Aspergillus niveus</i>	—	—	—	M/ 5,000	M/ 5,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 2,500	M/ 5,000	M/10,000
<i>Aspergillus elegans</i>	—	—	—	M/ 5,000	M/ 5,000	M/ 25,000	M/ 25,000	M/ 2,500	M/10,000	M/10,000
<i>Aspergillus niger</i>	—	—	—	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 1,000	M/ 5,000	M/ 5,000
<i>Actinomyces repens</i>	—	—	—	M/ 5,000	M/ 5,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 1,000	M/ 2,500	M/ 5,000
<i>Botrytis cinerea</i>	—	—	—	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 5,000	M/ 5,000	M/10,000
<i>Fusarium oxysporum</i>	—	—	—	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 5,000	M/ 2,500	M/10,000
<i>Fusarium solani</i>	—	—	—	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 10,000	M/ 2,500	M/ 5,000	M/ 5,000

Zeichenerklärung: siehe die Tabelle 3.

TABELLE 6. DIE BEEINFLUSSBARKEIT DER BAKTERIOSTATISCHEN UND FUNGISTATISCHEN WIRKUNG DER ARYL-AZO-MALONITRILE UND DER ZUM VERGLEICH UNTERSUCHTEN VERBINDUNGEN DURCH RINDERSENUM, CYSTEIN UND THIOLYCOLAT.

Nr.	Verbindungen	Serum-Faktor				Cystein-Faktor				Thioglycolat-Faktor							
		Staphylococci	Gram-negative Bakterien	Hefartige Pilze	Fadenförmige Dermatophytone	Penicillium und Aspergillus Stämme	Staphylococci	Gram-negative Bakterien	Hefartige Pilze	Fadenförmige Dermatophytone	Penicillium und Aspergillus Stämme	Staphylococci	Gram-negative Bakterien	Hefartige Pilze	Fadenförmige Dermatophytone	Penicillium und Aspergillus Stämme	
<i>Aryl-azo-malonitrile</i>																	
F/2201	Phenyl-azo-malonitril	2	2,5	>2,5	2,5	2,5	>10	>2,5	>2,5	>25	>5	10	>2,5	>2,5	2,5	>5	
F/2202	2-Tolyl-azo-malonitril	10	>1	>5	10	>2,5-5	>10	>1	>5	>25	>5	4	>1	>5	—	>5	
F/2203	3-Tolyl-azo-malonitril	2	>1	2,5	—	2,5-5	>10	>1	>2,5	>25-50	>2,5-5	4	>1	>2,5	—	>2,5-5	
F/2204	4-Tolyl-azo-malonitril	2	2,5	>2,5-5	2,5-5	2,5-5	>10	>2,5	>2,5	>25-50	>2,5-5	4	>1	>2,5	—	>2,5-5	
F/2205	2-Chlor-phenyl-azo-malonitril	10	2	>2,5-5	5-10	10	>25	>2,5	>2,5	>25-50	>10	10	>2,5	>2,5-5	—	>10	
F/2206	3-Chlor-phenyl-azo-malonitril	5	2	10	2,5-5	2,5-5	>50	>10	>10	25-50	>25	10	>10	>10	—	>25	
F/2207	4-Chlor-phenyl-azo-malonitril	5	4-10	10	2,5-5	2,5-5	>50	>10	>10	25-50	>25	10	>10	>10	—	>25	
F/2208	4-Brom-phenyl-azo-malonitril	10	4	>1	5	25	>50	>10	>1	20	>25	4-10	>1	>1	—	>25	
F/2209	4-Iod-phenyl-azo-malonitril	2-5	>1	>5	—	—	>10-25	>1	>5	>25-50	>5	10	>1	>5	10	>2,5-5	
F/2210	4-Aethoxy-phenyl-azo-malonitril	10	5	>2,5	10	>2,5	>50	>5	>2,5	10	>5	10	>2,5	>2,5	4	>2,5-5	
F/2211	2-Methyl-4-brom-phenyl-azo-malonitril	20	5	>2,5	4	5	>50	>5	>2,5	10	>2,5	10	>2,5	>2,5	5	>2,5	
F/2212	2-Methyl-4-jod-phenyl-azo-malonitril	10	5	>2,5	5	5	>50	>5	>2,5	10	>2,5	10	>2,5	>2,5	5	>2,5	
F/2213	3-Methyl-4-brom-phenyl-azo-malonitril	5	2,5	>5	2,5	>2,5	>25	>2,5	>2,5	50	>2,5	10	>2,5	>2,5	5	>2,5	
F/2214	4-Methyl-2-brom-phenyl-azo-malonitril	10	>1	>2,5	2,5	>2,5	>25	>1	>2,5	50	>2,5	10	>2,5	>2,5	5	>2,5	
F/2215	2-Brom-4-aethoxy-phenyl-azo-malonitril	5	>1	>5	50	10-20	>50	>5	>5	20	>2,5-10	10	>5	>5	2	>2,5-10	
F/2216	2,5-Dichlor-phenyl-azo-malonitril	10	5	>5	20	>10	>50	>5	>5	20	>2,5-10	10	>5	>5	2	>2,5-10	
F/2217	3,5-Dibrom-phenyl-azo-malonitril	20	5	10	10	10	>50	>5	>10	10	>10	10	>5	>10	2	>10	
F/2218	2-Chlor-4-brom-phenyl-azo-malonitril	10	5-10	10	10	10	>50	>5	>5-10	10	>10	10	>5	>5-10	2	>10	
F/2219	3-Chlor-4-brom-phenyl-azo-malonitril	10	5	>2,5	10	5	>50	>2,5	>2,5	10	>5	10	>2,5	>2,5	2	10	
F/2220	2-Methyl-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	10	2,5	>2,5	10	2,5	>50	>2,5	>2,5	10	>2,5	10	>2,5	>2,5	—	5	
F/2221	2-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	10	>1	>5	20	>2,5-5	>50	>1-2,5	>5	20	>2,5	10	>2,5	>2,5	—	2,5-5	
F/2222	3-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	10	>1-2,5	>5	20	>5-10	>50	>1-2,5	>5	20	>2,5	10	>2,5	>2,5	2	>5-10	
F/2223	4-Chlor-2,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	10	>1-2,5	>5	25	>2,5	>50	>1-2,5	>2,5	25	>2,5	10	>2,5	>2,5	2,5	>2,5	
F/2224	2,4,6-Tribrom-phenyl-azo-malonitril	20	>1	>2,5	10	>5	>50	>1	>2,5	10	>2,5	10	>2,5	>2,5	—	>2,5	
F/2225	2-Nitro-phenyl-azo-malonitril	2	5	>2,5	10	>5	>10	>2,5	>2,5	10	>5	10	>2,5	>2,5	2,5	>5	
F/2226	3-Nitro-phenyl-azo-malonitril	10	>2,5	>1	5-10	>1	>10	>2,5	>2,5	>10	>1	10	>2,5	>2,5	10	>1	
F/2227	4-Nitro-phenyl-azo-malonitril	10	>1	>2,5	25	>2,5	>10	>1	>2,5	>25	>2,5	10	>2,5	>2,5	2-2,5	>1	
F/2228	2-Methyl-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	4	2,5	>1	10-20	>1	>10	>1	>2,5	>25-50	>2,5	4	>2,5	>2,5	5	>2,5	
F/2229	3-Methyl-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	4	2,5	>2,5	20	2,5	>10	2,5	>2,5	>50	>2,5	>10	>2,5	>2,5	5	>2,5	
F/2230	4-Methyl-2-nitro-phenyl-azo-malonitril	4	2,5	>2,5	10-20	2,5	>10	>1	>2,5	>50	>2,5	>10	>2,5	>2,5	5	>2,5	
F/2231	2-Nitro-4-aethoxy-phenyl-azo-malonitril	20	>1	>2,5	10-20	2,5	>50	>1	>2,5	>25-50	>2,5	50	>1	>2,5	5-10	>2,5	
F/2232	2-Chlor-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	4	2,5	>1	50	>2,5	10	>2,5	>2,5	10	>2,5	4	>2,5	>2,5	5	>2,5	
F/2233	3-Chlor-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	5-10	2,5	>1	20	>2,5	>25-50	>2,5	>1	20	>2,5	10-20	>2,5	>2,5	5	>2,5	
F/2234	2-Nitro-4-chlor-phenyl-azo-malonitril	10	2,5-5	>2,5	20	>1-5	>50	>2,5-5	>2,5	50	>1-5	20	2,5-5	>2,5	2	>1-5	
F/2238	Phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure-äthylester	5	2,5	>1	5	>1-5	>50	>2,5	>1	10-25	>1-5	10	2,5	>1	2-5	>1-5	
F/2243	1-Naphthyl-azo-malonitril	10	>2,5	>1	4-10	>2,5-5	>50	>2,5	>1	4-10	>2,5-5	10	2,5	>1	2-5	>2,5-5	
F/2244	4-Brom-1-naphthyl-azo-malonitril	10	>2,5	>1	4-10	>2,5-5	50	>2,5	>1	4-10	>2,5-5	5	2,5	>1	—	>2,5-5	
F/2245	Azobenzol-4-azo-malonitril	10	>2,5	>1	2,5-5	>2,5-5	50	>2,5	>1	>2,5-5	>2,5-5	5	2,5	>1	—	>2,5-5	
<i>Zum Vergleich untersuchte Verbindungen</i>																	
<i>D-Chloranphenicol</i>																	
F/2246	Furazone	2,5-5	2-2,5	2,5	2,5	2,5	5-10	2-2,5	2,5	2,5	2,5	10-20	4	2,5	2,5	>5	
F/2247	Furoxan	2-5	2,5	2,5	2-4	2-5	10-20	2,5	>2,5	5-10	5	>10	>2,5	>2,5	10-20	>5	
F/2248	1-Phenyl-2-nitro-propylen-(1,2)	2	2,5	5	10	2-5	2	2,5	>2,5	20	2,5	>10	>2,5	>2,5	40	>5	
F/2249	1-(4'-Chlor-phenyl)-2-nitro-propylen-(1,2)	2	2,5	2,5	—	—	>10	>5	>2,5	2,5	2-5	>10	>2,5	>2,5	2,5	>5	
F/2250	4-Nitro-chinolin-1-oxyl	2	2	—	—	—	>10	>5	2-5	10	2-10	>10	>2,5	>2,5	5	>5	
F/2251	4-Nitro-6-methyl-chinolin-1-oxyl	4	2	—	5	2-5	>10	>5	2	10	2-10	>10	>2,5	>2,5	10-25	>2,5	
F/2252	2-Methyl-1,4-naphthochinon	2-4	2	2,5	4-10	—	5-10	>2,5	>2,5	10-25	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	4-10	>5	
F/2253	4-Chlor-benzyl-thiocyanat	2,5	—	2	—	—	>2,5	>1	>2,5	10-25	>5	>2,5	>1	>2,5	4-10	5	
F/2254	1-Phenyl-3,5-dimethyl-4-nitroso-pyrazol	>2,5-5	>2,5	—	—	2	>2,5-5	>2,5	>1	>10	>10	>2,5-5	>2,5	>1	4	10	

Zeichenerklärung: — = Die bakteriostatische oder fungistatische Wirkung der untersuchten Verbindung konnte durch Rinder Serum bzw. Cystein, bzw. Thioglycolat nicht vermindern werden.

> = Dieses Zeichen bedeutet in allen Fällen, dass die bakteriostatische oder fungistatische Wirkung der untersuchten Verbindung durch Rinder Serum, bzw. Cystein, bzw. Thioglycolat so hochgradig vermindert wurde, dass die Verbindung in Gegenwart dieser Zugaben auch in der höchsten molaren Konzentration—d.h. in M/1000—keine bakteriostatische bzw. fungistatische Wirkung ausüben konnte.

~ = ungefähr.

Bemerkung: = Die antimikrobielle Wirkung der Verbindungen von der Tabelle 6. kann durch die zum Nährboden in einer Konz. von M/100 hinzugefügte Ascorbinsäure nicht vermindert werden.

TABELLE 7. DIE BEEINFLUSSBARKEIT DER AUF DERMATOPHYTONE AUSGEÜBTEN FUNGISTATISCHEN WIRKUNG EINIGER MÄSSIG WIRKSAM BEWIESENEN VERBINDUNGEN DURCH RINDERSERUM

Nr.	Verbindungen	Serum-Faktor
F/2248	Phenyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	4-5
F/2249	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	4
F/2250	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	5
F/2251	Phenyl-azo-cyanessigsäure-aethyl-ester	2
F/2252	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-aethyl-ester	2
F/2253	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-aethyl-ester	5
F/2265	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid	2
F/2266	Phenyl-azo-acetylaceton	2,5
F/2267	3-Tolyl-azo-acetylaceton	5
F/2271	Phenyl-azo-acetessigester	10
F/2272	3-Tolyl-azo-acetessigester	10
F/2273	4-Tolyl-azo-acetessigester	10
F/2274	3-Chlor-phenyl-azo-acetessigester	10
F/2275	4-Chlor-phenyl-azo-acetessigester	10
F/2278	4-Chlor-phenyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester	2

Bemerkung: 1. Die in der Tabelle 7. zusammengefassten Verbindungen sind nur gegen die fadenförmigen Dermatophytone in nennenswertem Grade aktiv, also bei Untersuchung der durch Rinderserum, Cystein, Thioglycolat, Ascorbinsäure erreichbare Beeinflussbarkeit ihrer antimikrobieller Wirkung sind als Testorganismen nur Dermatophytone anwendbar.

2. Cystein, Thioglycolat, Ascorbinsäure kann die auf Dermatophytone ausgeübte fungistatische Wirkung der Verbindungen von Tabelle 7. nicht beeinflussen.

(aber auch auf diese nur in den Konz. von M/1000–M/2500!), auf die anderen Pilzstämmen, gleichwie auf die Bakterien sind sie völlig unwirksam; ihre 4-Tolyl-azo-Derivate sind nicht einmal noch auf die Dermatophytone wirksam.

Das 4-chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid (F/2265) ist auf die gram-positiven Bakterien und auf die Faden-Dermatophytone in der Konz. M/5000 von bakterio-statischer bzw. fungistatischer Wirkung. Auf die gram-negativen Bakterien ist es völlig unwirksam, auf die Mehrheit der bei den Untersuchungen als Testorganismen angewandten übrigen Pilzstämmen ist es völlig oder beinahe völlig unwirksam. Die entsprechenden Phenyl-azo- und 4-Tolyl-azo-Derivate sind nur auf die Faden-Dermatophytone fungistatisch wirksam, aber auch auf diese nur in Konz. M/1000; sie weisen keine bakterio-statische Wirkung auf.

Von den Aryl-azo-Derivaten des Acetyl-acetons sind nur das Phenyl-azo- und 3-Tolyl-azo-acetyl-aceton (F/2266 und 2267) fungistatisch wirksam,—aber nur auf die Faden-Dermatophytone; auf andere Pilzstämmen wirken sie nicht entwicklungshemmend. Sie weisen keine bakterio-statische Wirkung auf.

Die 4-Tolyl-azo-, 3- und 4-Chlor-phenyl-azo-Derivate des Acetyl-acetons üben weder eine bakterio-statische, noch eine fungistatische Wirkung aus.

3. Von den die Ausgangsstoffen der von uns dargestellten "Aryl-azo-methylen-Verbindungen", gleichwie von ihren verwandten Stoffen gibt es keine, welche auf die Bakterien oder die Pilze eine antimikrobielle Wirkung aufgewiesen hätte.

4. Einige halogen-substituierte Aryl-azo-malonitrile (z.B. F/2206, 2207, 2208, 2218, 2219), welche in Hinsicht auf ihre bakterio-statische und fungistatische Wirkung von den dargestellten Aryl-azo-malonitrilen als diejenigen von intensivstem Wirkungsgrad betrachtet werden können, sind hinsichtlich ihrer auf gram-positive Bakterien

TABELLE 8. DIE TUBERKULOSTATISCHE UND TRICHOMONASTATISCHE WIRKUNG DER VERBINDUNGEN VON NR. 2201–2278, WEITERHIN DIE VON AUSGANGSTOFFEN UND ZUM VERGLEICH UNTERSUCHTEN VERSCHIEDENEN BAKTERIOSTATIKA UND FUNGISTATIKA

Nr.	Verbindungen	Tuberkulo- statisch wirkende molare Grenzkonzentration	Trichomo- nastatisch wirkende molare Grenzkonzentration
<i>1. Aryl-azo-malonitrile</i>			
F/2201	Phenyl-azo-malonitril	M/10,000	M/10,000
F/2202	2-Tolyl-azo-malonitril	M/ 5,000	M/ 5,000
F/2203	3-Tolyl-azo-malonitril	M/25,000	M/25,000
F/2204	4-Tolyl-azo-malonitril	M/25,000	M/25,000
F/2205	2-Chlor-phenyl-azo-malonitril	M/ 5,000	M/ 5,000
F/2206	3-Chlor-phenyl-azo-malonitril	M/50,000	M/25,000
F/2207	4-Chlor-phenyl-azo-malonitril	M/50,000	M/25,000
F/2208	4-Brom-phenyl-azo-malonitril	M/50,000	M/25,000
F/2209	4-Jod-phenyl-azo-malonitril	M/50,000	M/25,000
F/2210	4-Aethoxy-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/50,000
F/2211	2-Methyl-4-brom-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/10,000
F/2212	2-Methyl-4-jod-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/10,000
F/2213	3-Methyl-4-brom-phenyl-azo-malonitril	M/50,000	M/50,000
F/2214	4-Methyl-2-brom-phenyl-azo-malonitril	M/10,000	M/25,000
F/2215	2-Brom-4-aethoxy-phenyl-azo-malonitril	M/50,000	M/50,000
F/2216	2,5-Dichlor-phenyl-azo-malonitril	M/50,000	M/10,000
F/2217	3,5-Dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/50,000	M/10,000
F/2218	2-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/ 5,000
F/2219	3-Chlor-4-brom-phenyl-azo-malonitril	M/50,000	M/10,000
F/2220	2-Methyl-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/25,000
F/2221	2-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/25,000
F/2222	3-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/10,000
F/2223	4-Chlor-2,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/ 5,000
F/2224	2,4,6-Tribrom-phenyl-azo-malonitril	M/10,000	M/ 5,000
F/2225	2-Nitro-phenyl-azo-malonitril	M/10,000	M/10,000
F/2226	3-Nitro-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/ 5,000
F/2227	4-Nitro-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/50,000
F/2228	2-Methyl-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/10,000	M/10,000
F/2229	3-Methyl-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/25,000
F/2230	4-Methyl-2-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/10,000	M/25,000
F/2231	2-Nitro-4-aethoxy-phenyl-azo-malonitril	M/10,000	M/50,000
F/2232	2-Chlor-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/25,000
F/2233	3-Chlor-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/25,000
F/2234	4-Chlor-2-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/25,000	M/25,000
F/2235	4-Acetylamino-phenyl-azo-malonitril	M/10,000	M/25,000
F/2236	Phenyl-azo-malonitril-2-karbonsäure	—	—
F/2237	Phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure	—	—
F/2238	Phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure-aethyl-ester	M/25,000	M/ 5,000
F/2239	3-Hydroxy-phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure	M/ 2,500	—
F/2240	Phenyl-azo-malonitril-4-sulfonsäure	—	—
F/2241	Phenyl-azo-malonitril-4-sulfonamid	—	—
F/2242	Phenyl-azo-malonitril-4-N-(4',6'-dimethyl-2-pyrimidyl)-sulfonamid	—	—
F/2243	1-Naphtyl-azo-malonitril	M/25,000	M/50,000
F/2244	4-Brom-1-naphtyl-azo-malonitril	M/50,000	M/50,000
F/2245	Azobenzol-4-azo-malonitril	M/50,000	M/25,000
F/2246	Diphenylen-4,4'-bis(azo-malonitril)	M/ 5,000	M/25,000
F/2247	3,3'-Dimethyl-diphenylen-4,4'-bis-(azo-malonitril)	M/ 5,000	M/25,000
<i>2. Aryl-azo-cyanessigsäure-ester</i>			
F/2248	Phenyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	M/ 2,500	—
F/2249	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	M/ 2,500	—
F/2250	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	M/ 2,500	—
F/2251	Phenyl-azo-cyanessigsäure-aethyl-ester	M/ 5,000	—
F/2252	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-aethyl-ester	M/ 5,000	—
F/2253	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-aethyl-ester	M/ 5,000	—

TABELLE 8—fortges.

Nr.	Verbindungen	Tuberkulo- statisch wirkende molare Grenzkonzentration	Trichomo- nastatisch wirkende molare Grenzkonzentration
<i>3. Aryl-azo-cyanacetamide und ihre N-substituierte Derivate</i>			
F/2254	Phenyl-azo-cyanacetamid	—	—
F/2255	4-Tolyl-azo-cyanacetamid	—	—
F/2256	4-Chlor-phenyl-azo-cyanacetamid	—	—
F/2257	Phenyl-azo-cyanessigsäure-anilid	M/ 1,000	—
F/2258	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-anilid	M/ 1,000	—
F/2259	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-anilid	M/ 1,000	—
F/2260	Phenyl-azo-cyanessigsäure-(4'-chlor-anilid)	M/ 2,500	—
F/2261	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-(4'-chlor-anilid)	M/ 5,000	—
F/2262	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-(4'-chlor-anilid)	M/ 5,000	M/ 1,000
F/2263	Phenyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid	M/10,000	M/ 1,000
F/2264	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid	M/10,000	—
F/2265	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid	M/10,000	M/ 1,000
<i>4. Aryl-azo-Derivate des Acetylacetons, Acetessigesters und Malonsäure-diaethyl-esters</i>			
F/2266	Phenyl-azo-acetylaceton	M/ 2,500	—
F/2267	3-Tolyl-azo-acetylaceton	M/ 2,500	—
F/2268	4-Tolyl-azo-acetylaceton	M/ 2,500	—
F/2269	3-Chlor-phenyl-azo-acetylaceton	M/ 2,500	—
F/2270	4-Chlor-phenyl-azo-acetylaceton	M/ 2,500	—
F/2271	Phenyl-azo-acetessigester	M/10,000	M/ 2,500
F/2272	3-Tolyl-azo-acetessigester	M/10,000	M/ 1,000
F/2273	4-Tolyl-azo-acetessigester	M/10,000	M/ 2,500
F/2274	3-Chlor-phenyl-azo-acetessigester	M/10,000	M/ 2,500
F/2275	4-Chlor-phenyl-azo-acetessigester	M/10,000	M/ 1,000
F/2276	Phenyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester	M/ 5,000	M/ 1,000
F/2277	4-Tolyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester	M/ 5,000	M/ 1,000
F/2278	4-Chlor-phenyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester	M/ 2,500	M/ 1,000
<i>Ausgangstoffe der Verbindungsklassen.—4. und mit ihnen verwandte andere Verbindungen</i>			
	Malonitril	M/ 1,000	—
	Cyanessigsäure-methyl-ester	—	—
	Cyanessigsäure-äthyl-ester	—	—
	Cyanacetamid	—	—
	Cyanessigsäure-anilid	M/ 2,500	—
	Cyanessigsäure-4-chlor-anilid	M/ 1,000	—
	Cyanessigsäure-hydrazid	M/10,000	—
	Acetyl-aceton	—	—
	Acetessigester	M/ 1,000	—
	Malonsäure-diaethyl-ester	M/ 2,500	—
	Acetonitril	—	—
	Benzyl-cyanid	—	—
	Kalium-cyanid	—	—
<i>Zum Vergleich untersuchte Verbindungen</i>			
<i>D-Chloramphenicol</i>		M/50,000	—
	5-Nitro-furfuro-1-semicarbazol (=Furazin)	M/10,000	M/ 5,000
	3-(5'-Nitro-furfural-amino)-oxazolidon-(2) = Furoxon)	M/10,000	M/500,000
	1-Phenyl-2-nitro-propylen-(1,2)	M/10,000	M/10,000
	1-(4'-Chlor-phenyl)-2-nitro-propylen-(1,2)	M/10,000	M/10,000
	4-Nitro-chinolin-1-oxyd	M/500,000	M/2,500,000
	4-Nitro-6-methyl-chinolin-1-oxyd	M/500,000	M/2,500,000
	2-Methyl-1,4-naphthochinon	M/50,000	M/ 2,500
	4-Chlor-benzyl-thiocyanat	M/10,000	M/ 5,000
	1-Phenyl-3,5-dimethyl-4-nitroso-pyrazol	M/500,000	M/10,000

Zeichenerklärung: Die untersuchte Verbindung übt such in der angewandten höchsten molaren Konzentration—d.h. in M/1000—keine tuberkulostatische bzw. trichomonastatische Wirkung aus.

TABELLE 9. DIE *in vitro* AUSGEÜBTE ASCARIZIDE WIRKUNG DER ARYL-AZO-MALONITRILE UND DER ZUM VERGLEICH UNTERSUCHTEN BAKTERIOSTATIKA BZW. FUNGISTATIKA

Nr.	Verbindungen	Ascarizid wirkende molare Grenzkonzentration
F/2201	Phenyl-azo-malonitril	M/ 1,000
F/2202	2-Tolyl-azo-malonitril	M/ 2,500
F/2203	3-Tolyl-azo-malonitril	M/ 2,500
F/2204	4-Tolyl-azo-malonitril	M/ 2,500
F/2205	2-Chlor-phenyl-azo-malonitril	M/ 1,000
F/2206	3-Chlor-phenyl-azo-malonitril	M/ 5,000
F/2207	4-Chlor-phenyl-azo-malonitril	M/ 5,000
F/2208	4-Brom-phenyl-azo-malonitril	M/ 5,000
F/2209	4-Jod-phenyl-azo-malonitril	M/ 5,000
F/2210	4-Aethoxy-phenyl-azo-malonitril	M/ 1,000
F/2211	2-Methyl-4-brom-phenyl-azo-malonitril	M/ 5,000
F/2212	2-Methyl-4-jod-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2213	3-Methyl-4-brom-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2214	4-Methyl-2-brom-phenyl-azo-malonitril	M/ 1,000
F/2215	2-Brom-4-aethoxy-phenyl-azo-malonitril	M/ 1,000
F/2216	2,5-Dichlor-phenyl-azo-malonitril	M/ 2,500
F/2217	3,5-Dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2218	2-Chlor-4-brom-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2219	3-Chlor-4-brom-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2220	2-Methyl-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/ 2,500
F/2221	2-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2222	3-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/ 5,000
F/2223	4-Chlor-2,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	M/ 2,500
F/2224	2,4,6-Tribrom-phenyl-azo-malonitril	M/ 5,000
F/2225	2-Nitro-phenyl-azo-malonitril	M/ 1,000
F/2226	3-Nitro-phenyl-azo-malonitril	M/ 5,000
F/2227	4-Nitro-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2228	2-Methyl-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2229	3-Methyl-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2230	4-Methyl-2-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2231	2-Nitro-4-aethoxy-phenyl-azo-malonitril	M/ 1,000
F/2232	2-Chlor-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2233	3-Chlor-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2234	4-Chlor-2-nitro-phenyl-azo-malonitril	M/10,000
F/2238	Phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure-aethyl-ester	M/ 2,500
F/2243	1-Naphtyl-azo-malonitril	M/ 2,500
F/2244	4-Brom-1-naphtyl-azo-malonitril	M/10,000
<i>Zum Vergleich untersuchte Verbindungen:</i>		
	1-Phenyl-2-nitro-propylen-(1,2)	M/10,000
	1-(4'-Chlor-phenyl)-2-nitro-propylen-(1,2)	M/10,000
	2-Methyl-1,4-naphtochinon	M/ 2,500
	4-Chlor-benzyl-thiocyanat	M/ 5,000
	1-Phenyl-3,5-dimethyl-4-nitroso-pyrazol	M/ 1,000

Jene Verbindungen der Tabelle 8. (eingeschlossen auch die *Ausgangstoffe* und auch die zum Vergleich untersuchten Bakteriostatika und Fungistatika), welche in dieser Tabelle 9. nicht angeführt sind, übten auch in der angewandten höchsten molaren Konzentration—d.h. in M/1000—keine ascarizide Wirkung aus.

ausgeübten bakteriostatischen Wirkung auf molarer Grundlage im grossen und ganzen von demselben Wirkungsgrad, wie das D-Chloramphenicol, Furazin, Furoxon, und sind 2,5–5-mal wirksamer, als die 4-Nitro-chinolin-1-oxyde und die ω -Nitro- ω -methyl-styrole; hinsichtlich ihrer auf gram-negative Bakterien ausgeübten bakteriostatischen Wirkung sind sie von einem 4–10-fach minderen Wirkungsgrad, als das

TABELLE 10. DIE AUF RATTEN AUSGEÜBTE AKUTE TOXICITÄT DER UNTERSUCHTEN VERBINDUNGEN

(Anwendungsweise: intraperitoneal in ölicher Lösung oder Suspension)

Nr.	Verbindungen	Kleinste sicher tödliche Dose; Dosis minima certa (LD ₁₀₀) mg/kg (experimentell gefunden)	Verträgliche höchste Einzeldose; Dosis tolerata maxima (LD ₀) mg/kg (experimentell gefunden)
1. Aryl-azo-malonitrile			
F/2201	Phenyl-azo-malonitril	15	5
F/2202	2-Tolyl-azo-malonitril	15	5
F/2203	3-Tolyl-azo-malonitril	20	5
F/2204	4-Tolyl-azo-malonitril	30	5
F/2205	2-Chlor-phenyl-azo-malonitril	15	5
F/2206	3-Chlor-phenyl-azo-malonitril	10	5
F/2207	4-Chlor-phenyl-azo-malonitril	10	5
F/2208	4-Brom-phenyl-azo-malonitril	10	5
F/2209	4-Jod-phenyl-azo-malonitril	10	5
F/2210	4-Aethoxy-phenyl-azo-malonitril	70	40
F/2211	2-Methyl-4-brom-phenyl-azo-malonitril	15	5
F/2212	2-Methyl-4-jod-phenyl-azo-malonitril	20	5
F/2213	3-Methyl-4-brom-phenyl-azo-malonitril	15	5
F/2214	4-Methyl-2-brom-phenyl-azo-malonitril	30	20
F/2215	2-Brom-4-aethoxy-phenyl-azo-malonitril	60	40
F/2216	2,5-Dichlor-phenyl-azo-malonitril	15	5
F/2217	3,5-Dibrom-phenyl-azo-malonitril	15	5
F/2218	2-Chlor-4-brom-phenyl-azo-malonitril	20	10
F/2219	3-Chlor-4-brom-phenyl-azo-malonitril	20	10
F/2220	2-Methyl-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	20	10
F/2221	2-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	60	20
F/2222	3-Chlor-4,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	20	5
F/2223	4-Chlor-2,6-dibrom-phenyl-azo-malonitril	40	20
F/2224	2,4,6-Tribrom-phenyl-azo-malonitril	60	30
F/2225	2-Nitro-phenyl-azo-malonitril	10	5
F/2226	3-Nitro-phenyl-azo-malonitril	30	20
F/2227	4-Nitro-phenyl-azo-malonitril	20	10
F/2228	2-Methyl-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	10	5
F/2229	3-Methyl-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	20	10
F/2230	4-Methyl-2-nitro-phenyl-azo-malonitril	20	10
F/2231	2-Nitro-4-aethoxy-phenyl-azo-malonitril	20	10
F/2232	2-Chlor-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	10	5
F/2233	3-Chlor-4-nitro-phenyl-azo-malonitril	20	10
F/2234	4-Chlor-2-nitro-phenyl-azo-malonitril	10	5
F/2235	4-Acetylamino-phenyl-azo-malonitril	400	100
F/2236	Phenyl-azo-malonitril-2-karbonsäure	150	100
F/2237	Phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure	300	100
F/2238	Phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure-aethyl-ester	30	20
F/2239	3-Hydroxy-phenyl-azo-malonitril-4-karbonsäure	500	200
F/2240	Phenyl-azo-malonitril-4-sulfonsäure	800	300
F/2241	Phenyl-azo-malonitril-4-sulfonamid	500	200
F/2242	Phenyl-azo-malonitril-4-N-(4',6'-dimethyl-2'-pyrimidyl)-sulfonamid	600	400
F/2243	1-Naphtyl-azo-malonitril	20	10
F/2244	4-Brom-1-naphtyl-azo-malonitril	50	20
F/2245	Azobenzol-4-azo-malonitril	20	10
F/2246	Diphenylen-4,4'-bis-(azo-malonitril)	800	500
F/2247	3,3'-Dimethyl-diphenylen-4,4'-bis-(azo-malonitril)	50	30
2. Aryl-azo-cyanessigsäure-ester			
F/2248	Phenyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	> 800	600
F/2249	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester		> 800
F/2250	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-methyl-ester	600	200
F/2251	Phenyl-azo-cyanessigsäure-aethyl-ester	800	400
F/2252	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-aethyl-ester		> 800
F/2253	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-aethyl-ester	600	200

TABELLE 10—*fortges.*

Nr.	Verbindungen	Kleinste sicher tödliche Dose; Dosis lethalis minima certa (LD ₁₀₀) mg/kg (experimentell gefunden)	Verträgliche höchste Einzeldose; Dosis tolerata maxima (LD ₀) mg/kg (experimentell gefunden)
<i>3. Aryl-azo-cyanacetamide und ihre N-substituierte Derivate</i>			
F/2254	Phenyl-azo-cyanacetamid		> 800
F/2255	4-Tolyl-azo-cyanacetamid		> 800
F/2256	4-Chlor-phenyl-azo-cyanacetamid		> 800
F/2257	Phenyl-azo-cyanessigsäure-anilid		> 800
F/2258	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-anilid		> 800
F/2259	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-anilid		> 800
F/2260	Phenyl-azo-cyanessigsäure-(4'-chlor-anilid)		> 800
F/2261	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-(4'-chlor-anilid)		> 800
F/2262	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-(4'-chlor-anilid)		> 800
F/2263	Phenyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid		> 800
F/2264	4-Tolyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid		> 800
F/2265	4-Chlor-phenyl-azo-cyanessigsäure-hydrazid		> 800
<i>4. Aryl-azo-Derivate des Acetylacetons, Acetessig- esters und Malonsäure-diaethyl esters</i>			
F/2266	Phenyl-azo-acetylaceton	800	600
F/2267	3-Tolyl-azo-acetylaceton	800	400
F/2268	4-Tolyl-azo-acetylaceton	200	100
F/2269	3-Chlor-phenyl-azo-acetylaceton		> 800
F/2270	4-Chlor-phenyl-azo-acetylaceton		> 800
F/2271	Phenyl-azo-acetessigester	300	100
F/2272	3-Tolyl-azo-acetessigester	600	400
F/2273	4-Tolyl-azo-acetessigester	600	400
F/2274	3-Chlor-phenyl-azo-acetessigester	600	400
F/2275	4-Chlor-phenyl-azo-acetessigester	300	200
F/2276	Phenyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester		> 800
F/2277	4-Tolyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester		> 800
F/2278	4-Chlor-phenyl-azo-malonsäure-diaethyl-ester		> 800
<i>Ausgangsstoffe der Verbindungsklassen 1–4 und mit ihnen verwandte andere Verbindungen</i>			
	Malonitril	10	5
	Cyanessigsäure-methyl-ester		> 800
	Cyanessigsäure-äthyl-ester		> 800
	Cyanacetamid		> 800
	Cyanessigsäure-anilid		> 800
	Cyanessigsäure-4-chlor-anilid		> 800
	Cyanessigsäure-hydrazid		> 400
	Acetyl-aceton	400	300
	Acetessigester		> 800
	Malonsäure-diaethyl-ester		> 800
	Acetonitril		> 800
	Benzyl-cyanid	60	40
	Kalium-cyanid (in wässriger Lösung inisiert)	5	2
<i>Zum Vergleich untersuchte Verbindungen D-Chloramphenicol</i>			
	5-Nitro-furfurol-semicarbazon (= Furazin)	150	60
	3-(5'-Nitro-furfural-amino)-oxazolidon-(2) (= Furoxon)		> 400
	1-Phenyl-2-nitro-propylen-(1,2)	200	100
	1-(4'-Chlor-phenyl)-2-nitro-propylen-(1,2)	200	80
	4-Nitro-chinolin-1-oxyd	40	20
	4-Nitro-6-methyl-chinolin-1-oxyd	60	30
	2-Methyl-1,4-naphthochinon	80	40
	4-Chlor-benzyl-thiocyanat	40	20
	1-Phenyl-3,5-dimethyl-4-nitroso-pyrazol	150	80

Bemerkung: Die höchste angewandte Dose der Verbindungen war 800 mg/kg; Das Zeichen > 800 bedeutet, dass die untersuchte Verbindung auch in der angewandten höchsten Dose—in 800 mg/kg—auf die Versuchstiere unten den angewandten Versuchsbedingungen nicht toxisch wirkt.

D-Chloramphenicol, Furazin und Furoxon, im Allgemeinen von einem 2-4-fach minderen Wirkungsgrad, als die 4-Nitro-chinolin-1-oxyde, dagegen aber ist die Intensität ihrer bakteriostatischen Wirkung auf gramnegative Bakterien nicht niedriger, als die der ω -Nitro- ω -methyl-styrole. Ihre fungistatische Wirkung, abgesehen von einigen Abweichungen, ist im grossen und ganzen ungefähr von einem ähnlichen Grade, wie die der ω -Nitro- ω -methyl-styrol-Derivate und der 4-Nitro-chinolin-1-oxyde; sie ist von einem höheren Grade, als die des 1-Phenyl-3,5-dimethyl-4-nitroso-pyrazols, 2-Methyl-1,4-naphtochinons und des 4-Chlorbenzyl-thiocyanats.

5. Die Mehrzahl der Aryl-azo-malonitrile—mit Ausnahme der hydrophyle Substituenten enthaltenden Derivate—verfügt auch über eine bedeutende tuberkulostatische und trichomonastatische Wirkung. Von einer niedrigeren tuberkulostatischen Wirkung sind die Aryl-azo-Derivate der Cyanessigsäure-ester, des Acetyl-acetons, des Malonsäure-diethyl-ester und der Cyanessigsäure-anilide, gleichwie das Malonitril, und das Cyanessigsäure-methyl-ester; unwirksam sind die Aryl-azo-cyanacetamide.

6. In Hinsicht auf die trichomonastatische Wirkung—ausser den Aryl-azo-malonitrilen—sind nur die 4-Nitro-chinolin-1-oxyde und das Furoxon hervorragend.

7. Die Mehrzahl der Aryl-azo-malonitrile ist *in vitro* in geringerem oder höherem Masse auch von ascarizider Wirkung. Die übrigen Aryl-azo-methylen-Verbindungen sind in dieser Hinsicht völlig wirkungslos. Von den zum Vergleich untersuchten Bakteriostatika und Fungistatika wiesen eine ascarizide Wirkung mittleren Grades die ω -Nitro-styrol-Derivate, das 2-Methyl-1,4-naphtochinon und das 4-Chlor-benzyl-thiocyanat auf.

8. Die bakteriostatische und fungistatische Wirkung der Aryl-azo-malonitrile wird durch zu dem Nährboden in M/100 Konz. hinzugefügtes Cystein-hydrochlorid, gleichwie durch Natrium-thioglycolat völlig abgewehrt—oder mindestens in bedeutendem Masse vermindert, durch die Ascorbinsäure aber nicht beeinflusst. Ihre bakteriostatische, wie auch ihre fungistatische Wirkung wird auch durch zu dem Nährboden hinzugefügtes 10 % Rinderserum in geringerem oder höherem Grade vermindert. Unter den zum Vergleich untersuchten Verbindungen wird die bakteriostatische Wirkung des D-Chloramphenicols weder durch das Serum, noch durch das Cystein oder durch das Thioglycolat beeinflusst (auch durch die Ascorbinsäure nicht), hingegen wird die des Furazins und Furoxons durch das Serum in geringerem, durch das Cystein und Thioglycolat aber in bedeutendem Masse vermindert. Die Ascorbinsäure beeinflusst ihre Wirkung nicht. Das Serum vermindert mittelmässig die bakteriostatische und fungistatische Wirkung der übrigen zum Vergleich untersuchten Bakteriostatika und Fungistatika, in bedeutendem Masse wird aber ihre Wirkung durch das Cystein und Thioglycolat vermindert; durch die Ascorbinsäure wird sie nicht beeinflusst. Die auf Faden-Dermatophytone ausgeübte fungistatische Wirkung der Aryl-azo-Derivate der Cyanessigsäure-ester, des Cyanessigsäure-hydrazids, des Acetyl-acetons, des Acetessigesters und des Malonsäure-diaethyl-esters wird durch Rinderserum auf das 1/2-1/10-ste ihrer ursprünglichen Wirkung vermindert; durch Cystein, Thioglycolat und Ascorbinsäure wird sie aber nicht beeinflusst.

9. Die Aryl-azo-malonitrile—mit Ausnahme der Hydrophyle $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}-\text{R}$, $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ Substituenten enthaltenden Derivate—sind im Allgemeinen von bedeutender Toxicität auf weisse Ratten: ihre LD_{100} -Werte bewegen sich zwischen 10–60 mg/kg.

Die Aryl-azo-Derivate der Cyanessigsäure-ester, der Cyanacetanilide, des Cyanacetamids, des Cyanessigsäure-hydrazids, des Acetyl-acetons, des Acetessigesters und des Malonsäure-diaethyl-esters können in Vergleich mit den Aryl-azo-malonitrilen kaum, oder überhaupt nicht als toxisch betrachtet werden.

Dem Toxigitätsgrad der Aryl-azo-malonitrile kommen nahe bzw. erreichen der des Malonitrils, Benzyl-cyanids und des Kalium-cyanids, von den zum Vergleich untersuchten Bakteriostatika und Fungistatika der des 4-Nitro-chinolin-1-oxyds und dessen 6-Methyl-Derivate, weiterhin des 4-Chlor-benzyl-thiocyanats.

Auf Grund der in l.-g. zusammengefassten Feststellungen können wir jene Folgerung ziehen, dass unter den Aryl-azo-Derivaten der "aktive Methylen-Gruppe" enthaltenden Verbindungen bloss die Aryl-azo-malonitrile über eine bedeutende antimikrobielle, gleichwie über eine wesentliche ascarizide Wirkung wie auch über eine hochgradige Ratten-Toxizität verfügen. Die erwähnten biologischen Wirkungen sind also im Kreise der Aryl-azo-methylen-Verbindungen höchst-spezifisch an die $R-N=N-CH(CN)_2$ Struktur (oder ihre tautomere Form $R-NH-N=C(CN)_2$) gebunden und die in diesem strukturellen Teil vorgenommenen Veränderungen, namentlich das Vertauschen der einen oder beiden Cyan-Gruppen auf andere Gruppen, eine bedeutende Verminderung, sogar den vollständigen Verlust der biologischen Wirkungen zur Folge haben. Da das Cystein und Thioglycolat die bakteriostatische und fungistatische Wirkung der Aryl-azo-malonitrile in bedeutendem Masse vermindern (die Wirkungen von einzelnen derselben sogar vollständig aufheben), so müssen wir annehmen, dass diese Verbindungen ihre antimikrobielle Wirkung dadurch ausüben, dass sie mit den Sulfhydryl-Gruppen gewisser lebensnotwendiger Sulfhydryl-Enzyme der Mikroorganismen in ähnlicher Weise reagieren, wie mit dem Cystein oder dem Thioglycolat; in folge dessen wird das Funktionieren der Sulfhydryl-Enzyme—was aber das Intaktsein ihrer Sulfhydryl-Gruppe voraussetzt—gelähmt.

Die Aryl-azo-malonitrile können also als neue Typen von "*Sulfhydryl-Enzym-Inhibitoren*" betrachtet werden. Die Möglichkeit der Abwehrung bzw. Verminderung ihrer bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung durch Cystein bzw. durch Thioglycolat ist streng strukturspezifisch, d.h. sie beschränkt sich nur auf die Aryl-azo-malonitrile. Dies wird durch die Erfahrung unterstützt, dass nämlich diejenigen übrigen Aryl-azo-methylen-Verbindungen, welche ja auch von antimikrobieller Wirkung minderen oder höheren Grades sind (welche Wirkung sich aber hauptsächlich nur auf die Faden-Dermatophytone erstreckt!), in dieser Wirkung durch Cystein oder Thioglycolat nicht zu beeinflussen sind.

Der Gedanke scheint auf der Hand zu liegen, dass das Cystein und Thioglycolat die antimikrobiellen Wirkungen der Aryl-azo-malonitrile dadurch abwehren, dass sie ihre Azo-Gruppe reduzieren. Um diese Frage entscheiden zu können, haben wir die durch Ascorbinsäure erreichbare Beeinflussbarkeit der antimikrobiellen Wirkung sowohl der Aryl-azo-malonitrile, wie auch der übrigen, für bakteriostatisch und fungistatisch wirksam gefundenen Aryl-azo-methylen-Verbindungen und ihre Derivate untersucht. Die Ascorbinsäure ist nämlich von einer Reduktionsfähigkeit ähnlichen Grades, wie das Cystein oder das Thioglycolat.

Da aber die Ergebnisse unserer Versuche bewiesen, dass die Ascorbinsäure die antimikrobielle Wirkung weder der Aryl-azo-malonitrile, noch der untersuchten übrigen Aryl-azo-methylen-Verbindungen aufzuheben oder zu vermindern vermag,

so muss jene Voraussetzung aufgegeben werden, dass nämlich die Verminderung oder Aufhebung der antimikrobiellen Wirkung der Aryl-azo-malonitrile durch Cystein und Thioglycolat auf die durch sie eventuelle verursachte Reduktion zurückzuführen seien; umso mehr, da die auf Dermatophytone ausgeübte fungistatische Wirkung der gleichfalls Azo-Gruppe enthaltenden Aryl-azo-cyanessigsäure-ester, der Aryl-azo-cyanessigsäure-hydrazide, der Aryl-azo-acetessig-ester usw. nicht nur die Ascorbinsäure, sondern auch das Cystein, und das Thioglycolat weder aufzuheben, noch zu vermindern vermögen. Alldies lässt uns darauf schliessen, dass die Möglichkeit der Aufhebung bzw. Verminderung der bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung der Aryl-azo-malonitrile durch Cystein und Thioglycolat *die Folge irgendwelcher spezifischen Reaktion mit den Sulfhydryl-Gruppen* sei, zu welcher Reaktion keine von den solchen Aryl-azo-methylen-Verbindungen fähig seien, welche nicht das $R-N=N-CH(CN)_2$ bzw. $R-NH-N=C(CN)_2$ Strukturelement enthalten.

Auf Grund unserer Untersuchungen können die zum Vergleich untersuchten Bakteriostatika und/oder Fungistatika—mit Ausnahme des D-Chloramphenicols—auch unter die Sulfhydryl-Enzym-Inhibitoren eingereiht werden; auch sie üben also ihre antimikrobielle Wirkung mittels irgendeiner spezifischen Reaktion mit den HS-Gruppen der Sulfhydryl-Enzyme der Mikroorganismen aus.

Die neben den Aryl-azo-malonitrilen untersuchten übrigen Aryl-azo-methylen-Verbindungen, welche eine antimikrobielle Wirkung aufwiesen (obwohl sie nur auf Dermatophytone wirkten, und auf diese auch in einem viel geringerem Masse, als die Aryl-azo-malonitrile!), üben diese Wirkung nicht durch die Hemmung der Sulfhydryl-Enzyme der Mikroorganismen-Zellen aus, sondern annehmbar durch ganz andere Reaktionen, welche in viel geringerem Masse strukturspezifisch sind, als dies bei den Aryl-azo-malonitrilen der Fall ist.

Die Aryl-azo-malonitrile üben ihre Toxizität auf Ratten vielleicht auf Grund eines Mechanismus aus, der in minderem oder grösserem Masse dem bei ihrer auf Bakterien und Pilze ausgeübten antimikrobiellen Wirkung auftretenden Mechanismus ähnlich ist. Es ist aber auffallend, dass das Malonitril, welches an sich von keiner antimikrobiellen Wirkung ist, auf Ratten eine Toxizität desselben Grades aufweist, wie die höchst-toxischen Vertreter der Aryl-azo-malonitrile. Diese Tatsache lässt uns darauf schliessen, dass der Mechanismus der auf Warmblüter ausgeübten Toxizität der Aryl-azo-malonitrile—gegenüber dem Mechanismus ihrer antimikrobiellen Wirkung—eventuell doch nicht auf Sulfhydryl-Enzymen-Lähmung gründet, oder dass der Tiertoxizitätsmechanismus des Malonitrils eine ganz andere Art von Mechanismus ist, wie die der Aryl-azo-malonitrile.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass wir in den Aryl-azo-malonitrilen solche neuere Typen von Sulfhydryl-Enzym-Inhibitoren erkannt haben, welche ein weites biologisches Wirkungsspektrum und eine Strukturspezifität hohen Grades aufweisen; ihre Reaktionen mit Sulfhydryl-Gruppen enthaltenden Verbindungen und der Mechanismus ihrer auf warmblütige Tiere ausgeübten Toxizität, gleichwie ihre Wirkungen auf Enzym-Systeme machen ihre weitere Untersuchung erforderlich.

ZUSAMMENFASSUNG

Verfasser hat das Malonitril, Cyanessigsäure-methyl- und aethyl-ester, Cyanacetamid, Cyanessigsäure-hydrazid, Cyanessigsäure-anilid, und-4-chlor-anilid,

Acetyl-aceton, Acetessigester und Malonsäure-diaethyl-ester mit Aryl-diazonium-Salzen in Gegenwart von Natrium-acetat gekuppelt.

Er untersuchte die *in vitro* ausgeübte bakteriostatische, fungistatische, tuberkulostatische, trichomonastatische, ascarizide Wirkungen und die auf Ratten ausgeübte akute Toxizität sowohl der von ihm dargestellten Verbindungen, wie auch ihrer Ausgangsstoffe und einiger bekannten Bakteriostatika und Fungastatika. Er untersuchte die durch Cystein, Thioglycolat und Ascorbinsäure verursachte Beeinflussbarkeit der bakteriostatische und fungistatische Wirkung derjenigen Verbindungen, welche im Laufe der Versuche bakteriostatisch und/oder fungistatisch wirksam gewesen waren. Er stellte fest, dass von den untersuchten Verbindungen bloss die Aryl-azo-malonitrile eine breite biologische Wirkung aufwiesen und dass diese Wirkungen höchst spezifisch an die $R-N=N-CH(CN)_2$ Struktur (oder an die $R-NH-N=C(CN)_2$ tautomeren Form derselben) gebunden sind. Er machte die Erfahrung, dass die bakteriostatische und fungistatische Wirkung der Aryl-azo-malonitrile sowohl durch das Cystein, wie auch durch das Thioglycolat in bedeutendem Masse vermindert werden (dieselben bei einigen Aryl-azo-malonitrilen sogar völlig aufgehoben werden); daraus zog er die Folgerung, dass die Aryl-azo malonitrile ihre antimikrobielle Wirkung dadurch ausüben, dass sie mit den Sulfhydryl-Gruppen gewisser Sulfhydryl-Enzyme, welche beim Stoffwechsel der Mikroorganismen eine bedeutende Rolle spielen, ähnlicher Weise reagieren, wie mit dem Cystein oder mit dem Thioglycolat, und dass das Funktionieren der Sulfhydryl-Enzyme—welches Funktionieren das Intaktsein ihrer Sulfhydryl-Gruppen unerlässlich voraussetzt—in Folge der Reaktion mit ihnen gehemmt wird. Auf Grund dieser Ergebnisse erkannte der Verfasser in den Aryl-azo-malonitrilen solche Sulfhydryl-Enzym-Inhibitoren von neuerem Typ, welche ein breites biologisches Wirkungsspektrum und eine Struktur-spezifität hohen Grades aufweisen.

LITERATUR

1. T. ZSOLNAI, *Biochem. Pharmacol.* **5**, 1 (1960).
2. T. ZSOLNAI, *Biochem. Pharmacol.* **5**, 287 (1961).
3. T. ZSOLNAI, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 195 (1961).
4. T. ZSOLNAI, *Biochem. Pharmacol.* **11**, 271 (1962).
5. T. ZSOLNAI, *Biochem. Pharmacol.* **11**, 515 (1962).
6. T. ZSOLNAI, *Biochem. Pharmacol.* **11**, 995 (1962).
7. G. JOHNSON and R. E. TRUSSEL, *Proc. Soc. exp. Biol.* **54**, 245 (1943).