

Arch. Pharm. (Weinheim) 314, 817-823 (1981)

Quantitatives Struktur-Wirkungsverhalten von S,S'-Dialkyldithiomethylenmalodinitrilen bezüglich der antimikrobiellen Wirkung im Agardiffusionstest

Dieter Rehn*, Helmut Nolte, Wolfgang Zerling

Forschung und Entwicklung der Schülke & Mayr GmbH, Theodor-Storm-Str. 38, 2000 Norderstedt 1

und Hendrik Rehn

Gymnasium Neubiberg

Eingegangen am 20. November 1980

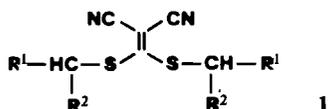
S,S'-Dialkyldithiomethylenmalodinitrile **1** wurden durch Umsetzung von Schwefelkohlenstoff mit Malonsäuredinitril und nachfolgende Alkylierung synthetisiert und im Plattendiffusionstest bezüglich ihrer antimikrobiellen Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* und *Trichophyton mentagrophytes* beurteilt. Die experimentell gefundene Wirksamkeit läßt sich quantitativ mit dem aus den Hydrophobie-Konstanten berechneten Verteilungskoeffizienten korrelieren.

Quantitative Structure Activity Relationships of S,S'-Dialkyldithiomethylenmalonodinitriles with Regard to Antimicrobial Activity

S,S'-Dialkyldithiomethylenmalonodinitriles **1** were synthesized by reaction of carbon disulfide with malonodinitrile followed by alkylation. The antimicrobial activity of the products against *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes* was tested using the disk method. The observed activities correlate quantitatively with the calculated partition coefficients.

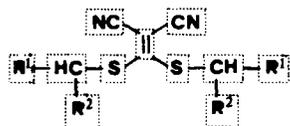
Chemie

Vom Schwefelkohlenstoff abgeleitete Derivate und auch Aryliden-malodinitrile besitzen biologische Bedeutung¹⁾. Wir haben daher eine Reihe von S,S'-Dialkyldithiomethylenmalodinitrilen **1**, welche beide Strukturmerkmale enthalten, synthetisiert und auf ihre keimhemmende Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton mentagrophytes* und *Candida albicans* untersucht.



Die Grundstruktur **1** läßt sich gemäß Schema 2 in geeignete Kompartimente zerlegen, deren Hydrophobie-Fragment-Konstanten f der Literatur entnommen werden können. Die resultierenden Verteilungskoeffizienten ($\log P^f$) sind in Tab. 2 aufgeführt.

Schema 2: Strukturelle Kompartimente der S,S'-Dialkyldithiomethylenmalodinitrile **1a-g**



Tab. 2: Berechnung der Verteilungskoeffizienten $\log P^f$

1	CN ^a	b	-S ^c	CH ^d	CH ₂ ^e	CH ₃ ^f	$\log P^f$
a	-2.312	0.41	-1.02	-	-	1.404	-1.518
b	-2.312	0.41	-1.02	-	1.06	1.404	-0.458
c	-2.312	0.41	-1.02	-	1.06	1.87 ^g	0.008
d	-2.312	0.41	-1.02	-	2.12	1.404	0.602
e	-2.312	0.41	-1.02	-	3.18	1.404	1.662
f	-2.312	0.41	-1.02	0.47	2.12	2.808	2.476
g	-2.312	0.41	-1.02	-	4.24	1.404	2.722

a) $f_{\text{CN}} = -1.066$; b) $f_{\text{C}=\text{C}} = 0.41$ ber. aus $f_{\text{H}-\text{C}=\text{C}-\text{H}} - 3 f_{\text{H}}$; c) $f_{\text{S}} = -0.51$; d) $f_{\text{CH}} = 0.235$; e) $f_{\text{CH}_2} = 0.53$; f) $f_{\text{CH}_3} = 0.702$; g) $f_{\text{CH}=\text{CH}_2} = 0.935$.

Mikrobiologie

Die Testung der Verbindungen **1a-g** auf ihre antimikrobielle Wirkung erfolgte im Agardiffusionstest⁴⁾ in Form des Disk-Testes. Als Lösungsmittel diente Dimethylformamid, welches gutes Lösevermögen für die Testsubstanzen aufweist und aufgrund seiner Wasserlöslichkeit lösungsvermittelnd und diffusionsunterstützend wirkt. Unter den gewählten Bedingungen besitzt Dimethylformamid keine eigene antimikrobielle Wirkung gegenüber den Testkeimen. Die Einsatzmenge, bezogen auf Wirkstoff, betrug jeweils $1,25 \cdot 10^{-4}$ mol. Das Maß für die Beurteilung der antimikrobiellen Wirksamkeit war der Durchmesser des Hemmhofes. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Tests sind in Tab. 3 zusammen mit den entsprechenden $\log P^f$ -Werten aufgeführt. Abb. 1 zeigt die Hemmhofdurchmesser d gegen $\log P^f$ in graphischer Darstellung.

Diskussion

Aus der graphischen Darstellung des Hemmhofes d als Maß für die Wirksamkeit der S,S'-Dialkyldithiomethylenmalodinitrile gegen die Verteilungskoeffizienten wird die Abhängigkeit der Wirkung von der Lipophilie der Testsubstanzen ersichtlich. Es zeigt sich, daß in Abhängigkeit vom Teststamm Wirkungsmaxima bei unterschiedlichen $\log P^f$ -Werten gefunden werden. Die größten Hemmwerte wurden gegen Staphylococcus

Tab. 3: Antimikrobielle Wirkung von **1a-g** im Agardiffusionstest (d in mm)

I	log P ^f	Staphylococcus aureus		Candida albicans		Trichophyton mentagrophytes	
		d	log d	d	log d	d	log d
a	-1.518	20	1.3	34	1.53	76	1.88
b	-0.458	23	1.34	45	1.65	55	1.74
c	0.008	27	1.43	32	1.61	41	1.621
d	0.602	15	1.18	23	1.36	32	1.51
e	1.662	11	1.04	11	1.04	17	1.23
f	2.476	≤9	≤0.95	≤9	≤0.95	≤9	≤0.95
g	2.722	≤9	≤0.95	≤9	≤0.95	10	1.0

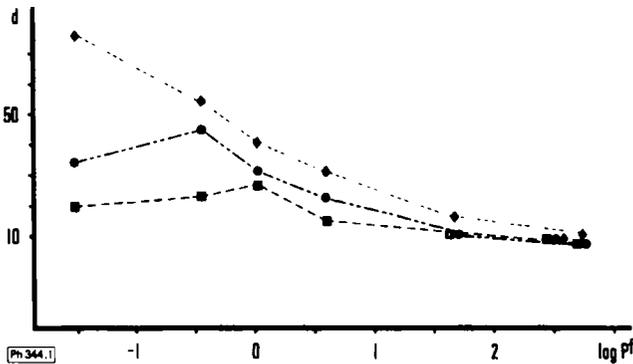


Abb. 1: Darstellung des Hemmhofdurchmessers d gegen den Lipophilieparameter log P^f.
 ■ - - ■ Staphylococcus aureus; ● - - ● Candida albicans und ◆ - - ◆ Trichophyton mentagrophytes.

aureus beim allyl- (**1c**), gegen *Candida albicans* beim ethyl- (**1b**) und gegen *Trichophyton mentagrophytes* beim methylsubstituierten Derivat (**1a**) gefunden. Die Abhängigkeit der Wirksamkeiten von den lipophilen Eigenschaften verschiedener Verbindungen läßt sich häufig quantitativ erfassen³⁾. Die Anwendung regressionsanalytischer Methoden auf die berechneten Verteilungskoeffizienten und die gemessenen Hemmhöfe zeigt, daß auch die Wirksamkeit der *S,S'*-Dialkyldithiomethylenmalodinitrile in Form der Gleichungen

$$\log d = a \cdot \log P^f + b$$

$$\log d = a \cdot \log P^f + b \cdot (\log P^f)^2 + c$$

Strukturparametern zugeordnet werden kann. Die mittels Regressionsanalyse berechneten Wirkungparameter log d_{ber} sind im Vergleich mit den experimentellen log d_{exp} in Tab. 4 zusammengefaßt und in Abb. 2 graphisch dargestellt. Die mathematisch einfachere

Tab. 4: Experimentelle und berechnete $\log P^f$ - und $\log d$ -Wertepaare

I	Staphylococcus aureus			Candida albicans			Trichophyton mentagrophytes			
	$\log P^f$	$\log d^a$	$\log d^b$	$\log d^c$	$\log d^a$	$\log d^b$	$\log d^c$	$\log d^a$	$\log d^b$	$\log d^c$
a	-1.518	1.3	1.29	1.31	1.53	—	1.55	1.88	1.93	1.88
b	-0.458	1.36	1.38	1.36	1.65	1.65	1.58	1.74	1.7	1.72
c	0.008	1.43	1.42 1.38	1.34	1.51	1.52	1.53	1.61	1.6	1.63
d	0.602	1.18	1.25	1.27	1.36	1.35	1.40	1.51	1.47	1.5
e	1.662	1.04	1.01	1.02	1.04	1.05	1.02	1.23	1.25	1.23
f	2.476	(≤ 0.95)	0.83	0.72	(≤ 0.95)	0.81	0.59	(≤ 0.95)	1.14	0.96
g	2.722	(≤ 0.95)	0.77	0.62	(≤ 0.95)	0.74	0.43	1.0	1.02	0.87

a) experimentell gef. Werte; b) linear ber. Werte (Gleichungen s. Tab. 5); c) nicht linear ber. Werte (Gleichungen s. Tab. 5).

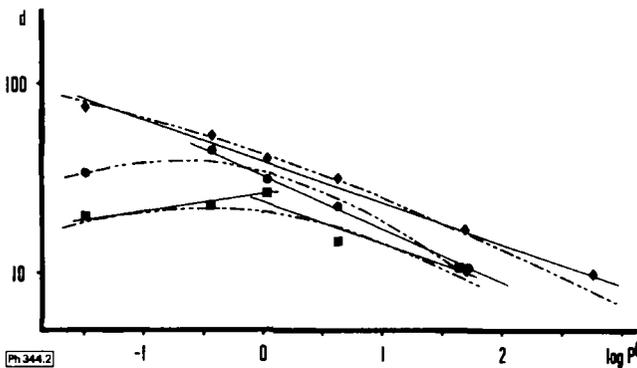


Abb. 2: Log. Darstellung des Hemmhofdurchmessers d gegen den Lipophilieparameter $\log P^f$. Exp. gef. Werte für ■ *Staphylococcus aureus*, ● *Candida albicans* und ◆ *Trichophyton mentagrophytes*; — lineare und - - - nicht-lineare Regressionskurven.

lineare Regressionsanalyse ist nur möglich, wenn die ansteigenden und abfallenden Äste der Kurven getrennt betrachtet werden. Für *Candida albicans* wurde auf die Berechnung des ansteigenden Astes verzichtet, da nur zwei Datenpaare zur Verfügung stehen. Zur Berechnung der Regressionsgeraden wurden $\log d$ -Werte $\leq 0,95$ nicht berücksichtigt, da diese aufgrund der gewählten experimentellen Bedingungen zu wenig bestimmt sind. Die antimikrobielle Wirksamkeit der S,S'-Dialkyldithiomethylenmalodinitrile georcht den in Tab. 5 aufgeführten Reaktionsgleichungen. Die Korrelation der experimentell gefundenen Werte mit den theoretisch berechneten wird mittels des t-Tests nach *Student* bestätigt und zeigt insbesondere für die gegen *Candida albicans* und *Trichophyton mentagrophytes* beobachtete antimikrobielle Wirkung eine hohe statistische Signifikanz.

Tab. 5: Lineare und nichtlineare Regressionsgleichungen**Staphylococcus aureus:**

$$\log d = 0.08 \quad \log P^f + 1.42 \quad n = 3 \quad r = 0.97 \quad t = 4.0 \quad 0.9 < F(t) < 0.95$$

$$\log d = -0.224 \quad \log P^f + 1.39 \quad n = 3 \quad r = -0.95 \quad t = 3.0 \quad F(t) \leq 0.9$$

$$\log d = -0.082 \quad \log P^f - 0.069 \quad (\log P^f)^2 + 1.344 \quad n = 5 \quad r^2 = 0.83 \quad t = 3.8 \quad 0.975 < F(t) < 0.99$$

Candida albicans:

$$\log d = -0.286 \quad \log P^f + 1.52 \quad n = 4 \quad r = -0.999 \quad t = 42 \quad 0.999 < F(t) < 1.0$$

$$\log d = -0.157 \quad \log P^f - 0.092 \quad (\log P^f)^2 + 1.53 \quad n = 5 \quad r^2 = 0.96 \quad t = 9.0 \quad 0.995 < F(t) < 0.999$$

Trichophyton mentagrophytes:

$$\log d = -0.215 \quad \log P^f + 1.6 \quad n = 6 \quad r = -0.995 \quad t = 19 \quad 0.999 < F(t) < 1.0$$

$$\log d = -0.211 \quad \log P^f - 0.025 \quad (\log P^f)^2 + 1.63 \quad n = 5 \quad r^2 = 0.996 \quad t = 27.3 \quad 0.999 < F(t) < 1.0$$

Experimenteller Teil**a) 1,1-Dicyanoethylen-2,2-dinatriumdithiolat (4)**

66 g (1 mol) Malonsäuredinitril werden in 200 ml Ethanol gelöst und unter starkem Rühren und Eiskühlung mit der doppeltäquimolaren Menge feinzermahlenden Ätznatrons versetzt. Diese Mischung wird unter Kühlung 30 min gerührt. Danach werden 74 g (1 mol) Schwefelkohlenstoff zu der Suspension zugegeben, wobei die Innentemperatur +10° nicht überschreiten sollte. Die Mischung wird noch 90 min bei Raumtemp. gerührt, danach das Salz **4** abgesaugt und i. Vak. getrocknet.

b) S,S'-Dialkyldithiomethylenmalodinitrile 1a-g

18,6 g (100 mmol) **4** werden in einem protisch polaren Lösungsmittel (z.B. Isopropanol) suspendiert und mit der doppeltäquimolaren Menge Alkylhalogenid unter Rückfluß erhitzt. Der Fortgang der Reaktion wird dc überwacht. Anorganische Salze und monosubstituiertes Nebenprodukt werden abgesaugt und das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen. Der Rückstand wird mit Methylenchlorid aufgenommen, mehrmals mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und wieder eingeeengt. Das Rohprodukt wird durch Kristallisation oder Destillation unter vermindertem Druck gereinigt.

c) Plattendiffusionstest

1 Tropfen (0,05 ml) einer 16-stündigen Bouillonkultur des entsprechenden Testkeimes wird auf die Oberfläche des Agar-Nährmediums (für Bakterien Oxoid Fleischextrakt-Pepton-Agar CM 55 und für Pilze Oxoid Sabouraud-Dextrose-Agar CM 41) aufgebracht und gleichmäßig ausgespatelt. Auf Antibiotika-Testblättchen (Fa. Schleicher & Schüll, Nr. 2668, Durchmesser 9 mm) werden 50 µl der Testlösung aufgebracht. Die Testlösung besteht aus 2,5 mmol der Substanzen **1a-g** in 10 ml DMF. Die Testblättchen werden zentrisch auf den Agar aufgelegt und 16 h bei 37° (Bakterien) resp. 5 d bei 28° (Pilze) bebrütet und dann durch Ausmessen des Durchmessers ausgewertet.

Literatur

- 1 a) Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, 3. Aufl., Band 15, S. 159 ff, Urban und Schwarzenberg, München 1964.
- 1 b) dito, 4. Auflage, Band 16, S. 422, Verlag Chemie, Weinheim 1978.
- 2 W.R. Hatchard, J. Org. Chem. 29, 660 (1964).
- 3 J.K. Seydel und K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim 1979.
- 4 R. Reiner, Antibiotika und ausgewählte Chemotherapeutika, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

[Ph 344]

Arch. Pharm. (Weinheim) 314, 823–831 (1981)

Einfluß sterischer Hinderung auf den Abbau von Ciclacillin und Ampicillin

Friedrich Moll* und Lutz von der Mark

Fachbereich Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Saarstraße 21, 6500 Mainz
Eingegangen am 16. Dezember 1980

Kinetische Untersuchungen der Reaktivität von Aminopenicillinen belegen bei Ciclacillin eine sterische Hinderung der α -Aminogruppe der Phenylacetamido-Seitenkette. Vergleichende Haltbarkeitsuntersuchungen an Arzneizubereitungen von Ciclacillin und Ampicillin ergaben, daß die aus der sterischen Hinderung resultierende höhere Stabilität von Ciclacillin auch bei Injektions-Lösungen, Suspensionen sowie eingeschränkt bei Pulvern und Tabletten nachweisbar ist.

Influence of Steric Hindrance on the Degradation of Ciclacillin and Ampicillin

Kinetic measurements of the reactivity of aminopenicillins demonstrated steric hindrance of the side chain amino group of ciclacillin. Comparative stability measurements of formulations of ciclacillin and ampicillin, showed that increased stability resulting from steric hindrance is also present in injectable solutions, suspensions and to a certain degree in powders and tablets.

Die beiden semisynthetischen Penicilline Ciclacillin und Ampicillin besitzen in der Seitenkette eine primäre Aminogruppe, jedoch befindet sich beim Ciclacillin (1) ein Cyclohexylrest und beim Ampicillin (2) ein Benzylrest in Nachbarschaft zur Aminogruppe.

