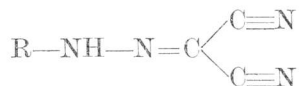


Deriváty karbonylkyanidfenylhydrazónu a ich vplyv na rast a metabolismus mikrobiálnych buniek

J. ŠUBÍK, O. GREKSÁKOVÁ, M. GREKSÁK, G. TAKÁCSOVÁ

Karbonylkyanidarylhydrazóny predstavujú skupinu organických zlúčenín všeobecného vzorca



v ktorom R je substituovaný alebo nesubstituovaný arylový radikál, napríklad fenyl alebo naftyl. Skupina týchto biologicky aktívnych zlúčenín, z ktorých niektoré sa používajú v základnom výskume [1, 2], je známa svojou lipofilitou [3], ionofórnymi vlastnosťami [4], ako aj schopnosťou blokovať spojenie medzi oxidačno redukčnými reakciami elektrónového prenosu a syntézou ATP v membránových systémoch [5, 6].

V snahe prakticky využiť vlastnosti týchto zlúčenín v boji proti poľnohospodárskym a potravinárskym škodcom sme študovali v závislosti od chemickej štruktúry antimikróbnu aktivitu série laboratórne syntetizovaných derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu, pri ktorých sme stanovili základné fyzikálnochemické veličiny. Zistili sme, že v závislosti od povahy substituenta benzénového jadra už pri pomerne nízkych koncentráciách týchto zlúčenín dochádza k výraznej inhibícii rastu baktérií, kvasiniek a vláknitých húb. Za týchto podmienok najefektívnejšie boli deriváty karbonylkyanidfenylhydrazónu s optimálnymi pK_a hodnotami v rozmedzí 5,9—6,1 a s maximálnou lipofilitou.

Materiál a metódy

Príprava derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu. Deriváty karbonylkyanidfenylhydrazónu sa pripravili z príslušných diazóniových solí a malononitrilu v mierne alkalickej prostredí [7—9] takto: 0,04 mólu substituovaného anilínu sa rozpustilo v 8,5 ml 37% HCl (0,1 mólu) a v 25 ml vody. Reakčná zmes sa ochladila v ľadovom kúpeli na 0 °C a za intenzívneho miešania sa diazotovala roztokom 3 g NaNO₂ (0,044 mólu) v 25 ml vody až do pozitívnej reakcie na jódovo-

-škrobový reagenčný papierik. Roztok NaNO_2 sa pridával tak rýchlo (asi 20 minút), aby teplota reakčnej zmesi neprevýšila 5°C . Po skončení diazotácie sa zmes intenzívne miešala ešte ďalších 10 minút a potom sa prefiltrovala.

K číremu roztoku diazóniovej soli sa pridalo 50 g ľadu a roztok obsahujúci 2,64 g malononitrilu (0,044 mólu) v 10 ml etylalkoholu. K tejto zmesi sa potom v malých dávkach za intenzívneho miešania pridával roztok obsahujúci 13,6 g octanu sodného (0,1 mólu) v 25 ml vody. Po skončení reakcie sa reakčná zmes miešala pri teplote miestnosti ďalších 20 minút a farebná zrazenina sa odfiltrovala na Büchnerovom lieviku a trojnásobne sa premyla 50 ml vody. Surový produkt sa vysušil pod infralampou a kryštalizoval do čo možno najostrejšieho bodu topenia z organických rozpúšťadiel a ich zmesí. Pre jednotlivé deriváty sa najlepšie osvedčila zmes benzén—petroléter a etanol—voda v rozličných pomeroch. Na dokonalé vyčistenie jednotlivých produktov bola potrebná šesťnásobná až osemnásobná rekryštalizácia. Body topenia (nekorigované) sa stanovili na Kofflerovom bloku pod mikroskopom. Všetky pripravené deriváty karbonylkyanidfenylhydrazónu sa pri svojom bode topenia zároveň rozkladali.

Určenie ionizačných konštánt. Hodnoty pK_a sa stanovili spektrofotometricky [10] a vypočítali z rovnice

$$pK_a = \text{pH} + \log \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon}{\varepsilon - \varepsilon_m} + \log \gamma^\pm,$$

kde ε_1 a ε_m sú molárne absorpčné koeficienty ionizovanej a neionizovanej formy a ε je formálny absorpčný koeficient pri danom pH. Hodnota stredného aktivitného koeficienta γ^\pm sa vypočítala zo vzťahu

$$\log \gamma^\pm = -\frac{A\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} + BI,$$

kde pre parametre A a B sa použili Robinsonove a Stokesove hodnoty [11]. I označuje iónovú silu roztoku.

Fotometrické meranie sa uskutočnilo na prístroji Spektronom 202 (MOM Budapest); pH roztokov sa meralo laboratórnym pH-metrom PHM 4d (Radiometer Copenhagen). Absorpčné spektrá neionizovaných foriem sa merali v prostredí 0,01 M-HCl, spektrá zmesí a ionizovaných foriem v tlmivých roztokoch v rozmedzí pH 4,0—9,8. Iónová sila tlmivých roztokov sa upravila s KCl na hodnotu 0,05. Teplota pri spektrofotometrických a potenciometrických meraniach bola $20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Určenie rozdeľovacích koeficientov. Rozdeľovacie koeficienty sa stanovili pri teplote 20°C pre systém oktanol—voda podľa vzťahu

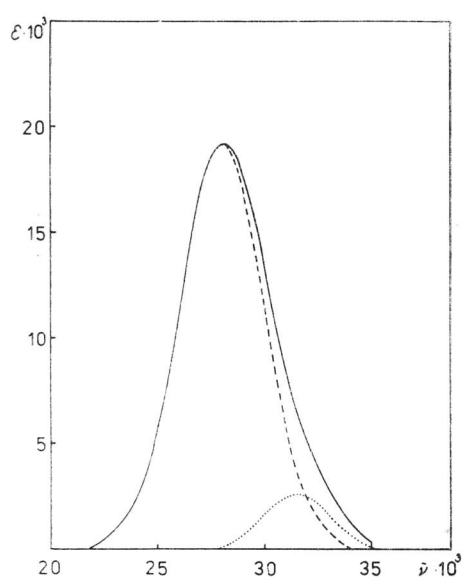
$$P = \frac{1000 \text{ g} - V_w c M}{V_o c M},$$

kde g je váha príslušného derivátu v gramoch, V_w a V_o sú objemy vodnej a oktanolovej fázy v ml a M je molekulová hmotnosť príslušného derivátu. Objem lipofilnej fázy oktanolu V_o sa vykorigoval na objem v oktanole rozpustnej časti substancie.

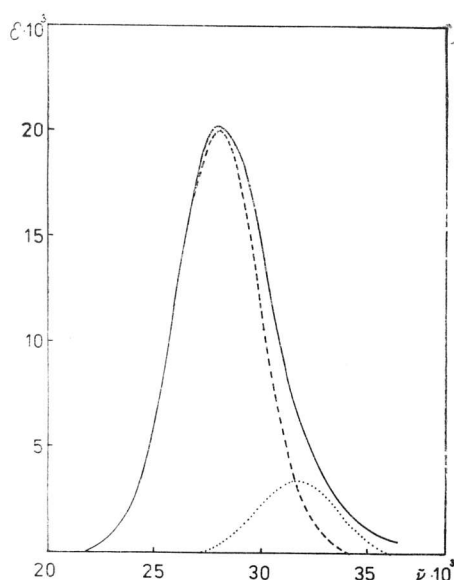
Navážené množstvo látky s presnosťou na štyri platné miesta sa pridalo

k 25 až 50 ml vody a 0,25 až 0,5 ml oktanolu. Po dvoch hodinách intenzívneho pretrepávania a centrifugácii sa stanovila koncentrácia látky vo vodnej fáze spektrofotometricky. Ako kontrolný roztok sa použil roztok, ktorý sa pripravil tak isto, ale bez účinnej látky. Rozdeľovací koeficient uvedený v tabuľke je hodnota z troch návažkov, pri ktorých sa koncentrácia merala pri štyroch rozličných vlnových dĺžkach.

Elektrónové spektrá. Spektrálne krivky pri všetkých látkach sa stanovili na spektrofotometri MOM 202 v kremenných 1,00 cm kyvetách. Zo spektrálnych kriviek sa separovali jednotlivé pásy empirickým geometrickým rozkladom spojeným s numerickou metódou Gaussových kriviek tak, ako predpokladá Kuhn a Brown [12] a ako neskôršie zdôvodnil Jörgensen [13]. Separáciu spektrálnych pásov pre karbonylkyanidfenylhydrazón ilustruje obr. 1 a pre karbonylkyanid-3-chlórfenylhydrazón obr. 2. Pre izolovaný pás v oblasti 357 nm sa vypočítali niektoré spektrálne parametre f_a a Dif .



Obr. 1. Separácia jednotlivých pásov spektrálnej krivky karbonylkyanidfenylhydrazónu empirickým geometrickým rozkladom a numerickou metódou Gaussových kriviek.



Obr. 2. Separácia jednotlivých pásov spektrálnej krivky karbonylkyanid-3-chlórfenylhydrazónu empirickým geometrickým rozkladom a numerickou metódou Gaussových kriviek.

Oscilátorová mohutnosť (f_a) patrí medzi geometricko-fyzikálne veličiny a vypočítala sa z experimentálnych údajov absorpčného pásu [14] podľa rovnice

$$f_a = 0,102 \frac{mc^2}{N\pi e^2} \int_{\tilde{\nu}_2}^{\tilde{\nu}_1} \epsilon \tilde{\nu} d\tilde{\nu},$$

kde m je pokojová hmotnosť elektrónu, c — rýchlosť svetla vo vákuu, e — náboj elektrónu, N — Avogadrovo číslo, $\bar{\nu}$ — vlnčnosť, ϵ — molárna absorptivita.

Pri hodnotení reaktivity sa môže použiť i ďalší parameter spektrálneho pásu — tranzitný moment (D_{if}), ktorý sa dá vypočítať podľa vzťahu [14]

$$D_{if} = 0,03825 \frac{hc}{\pi^3 N e^2 \bar{\nu}_{\max}} \int_{\bar{\nu}_1}^{\bar{\nu}_2} \epsilon d\bar{\nu},$$

kde h je Planckova konštanta.

Pri experimentálnom stanovení spektrálnych pásov sa roztoky pripravili rádovo v 10^{-5} M koncentráciách a absorpcie sa vždy merali v intervaloch po 5 nm, v oblasti maxima po 1 nm. Každá látka sa merala trikrát.

Hammettove konštanty (σ) zahŕňajú rezonančné polárne a indukčné polárne efekty substituentov v m polohe a p polohe aromatického jadra oproti sledovanému substituentu a ich hodnoty sa prevzali z literatúry [15, 16].

Použitá mikroorganizmy. V práci sa použil kmeň baktérií *Bacillus cereus* NCIB 8122, diploidný laboratórny kmeň kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* Hansen DTXII, ako aj plesne *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium italicum*, *Penicillium cyclopium*, *Botrytis cinerea*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus nigricans* a *Mucor mucedo*.

Rastové podmienky. Kvasinky *S. cerevisiae* rástli za trepania pri 30 °C v Erlenmayerových bankách naplnených do 1/10 ich objemu semisyntetickým médiom obsahujúcim v 1 litri 3 g glukózy, 5 g peptónu, 5 g kvasničného extraktu, 1 g KH_2PO_4 , 0,7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KCl, 0,5 g NaNO_3 , 1,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 5 mg FeCl_3 ; konečné pH 5,5. Začiatočná koncentrácia buniek v kultivačnom médiu bola 10^6 buniek/ml. Rast buniek sa sledoval ich počítaním v Bürkerovej komôrke pod mikroskopom.

Tvorba spór vláknitých húb. Kvôli tvorbe spór sa Petriho misky obsahujúce Sabouraudov agar inokulovali malým kúskom mycélia alebo spórmi zo zásobnej kultúry. Po 7 dňoch rastu pri 30 °C sa do Petriho misky pridalo dostatočné množstvo sterilnej vody potrebnej na ponorenie mycélia, povrch mycélia sa premiešal sklenou tyčinkou a suspenzia sa prečistila cez vatú. Za sterilných podmienok sa spóry premyli destilovanou vodou, stanovila sa ich koncentrácia počítaním v Bürkerovej komôrke pod mikroskopom a použili sa na inokuláciu.

Stanovenie priemeru inhibičných zón. Tekutá agarová semisyntetická pôda sa inokulovala tepelne aktivovanými (65 °C/15 min.) spórmi kmeňa *Bacillus cereus* na konečnú koncentráciu 10^6 spór/Petriho misku. Po stuhnutí pôdy sa na jej povrch pridal inhibítor (20 μg) vo forme etanolickeho roztoku. Priemer zóny inhibície sa meral po troch dňoch rastu pri 30 °C.

V prípade plesní sa stekutená agarová Sabouraudova pôda inokulovala spórmi na konečnú koncentráciu 10^6 spór/ml. Po stuhnutí pôdy sa na povrch agaru pridal inhibítor (20 μg) vo forme etanolickeho roztoku a priemer zóny inhibície sa meral po 14 dňoch inkubácie pri 30 °C.

Germinačný test sa robil pri 30 °C v 100 ml Erlenmayerových bankách s 10 ml semisyntetického média obsahujúceho 2% glukózu, spóry plesní (10^6 /ml) a inhibítor v udanej koncentrácii. Klíčivosť spór sa sledovala mikroskopicky.

Stanovenie životaschopnosti buniek. Bunky kvasiniek a spór plesní po interakcii s inhibítorom v čase uvedenom vo výsledkoch sa premyli a vysiali na pevné

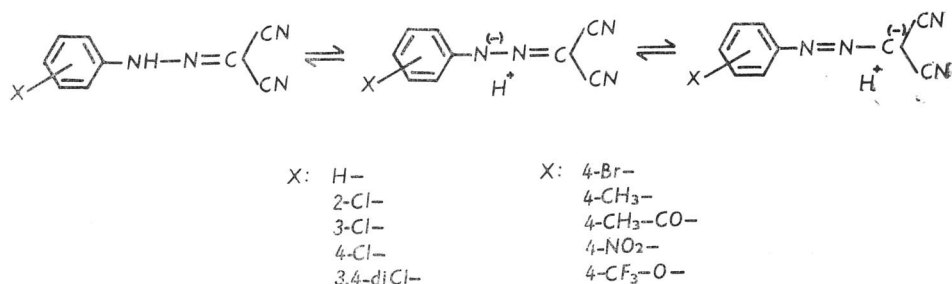
semisyntetické médium s 2% glukózou. Po inkubácii pri 30 °C sa v porovnaní s kontrolou stanovil počet vyrastených kvasiniek a vyklíčených konidií. Rast a klíčivosť sa sledovali 6, resp. 12 dní.

Stanovenie respiračnej rýchlosti. Spotreba kyslíka premytých buniek sa stanovila polarograficky vibračnou zlatou elektródou v reakčnej zmesi obsahujúcej v objeme 2 ml: 50 mM glutarátu draselného, 10 mM KH_2PO_4 , 100 mM KCl, 11 mM glukózy, $8,16 \times 10^7$ buniek kvasiniek (pred meraním 8 hodín hladovaných); konečné pH 4,3.

Výsledky

Príprava a fyzikálnochemické vlastnosti derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu

Deriváty karbonylkyanidfenylhydrazónu (CCP) štruktúry uvedenej na obr. 3 sa pripravili diazotáciou príslušného substituovaného arylamínu s dusitanom za vzniku diazóniovej soli, ktorá sa potom v mierne alkalickom prostre-

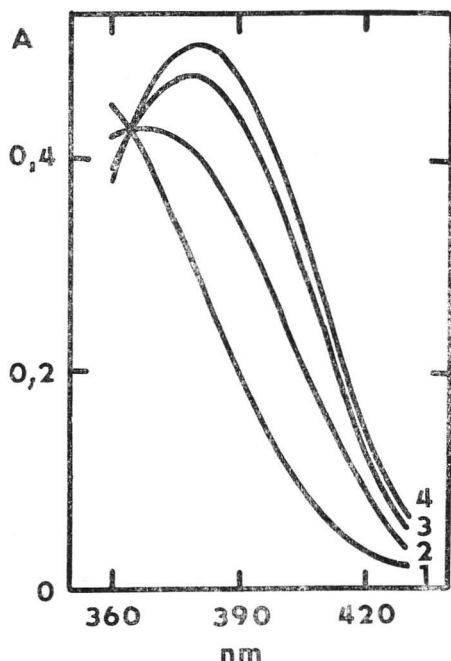


Obr. 3. Neionizovaná štruktúra a ionizované štruktúry karbonylkyanidfenylhydrazónov

dí podrobila kopulácii s dinitrilom kyseliny malonovej. Pripravili sa zlúčeniny predstavujúce deriváty, ktoré obsahujú voľný alebo substituovaný fenyl, a to v jednej alebo viacerých polohách s halogénom, alkylskupinou, nitroskupinou, acylskupinou alebo halogénalkoxy skupinou. Uvedené deriváty, vyčistené niekoľkonásobnou kryštalizáciou z organických rozpúšťadiel, identifikovali sa ako pevné kryštalické látky s neostrým bodom topenia za rozkladu. Sú žlté až žltlooranžové, slabo rozpustné v neutrálnych a kyslých vodných roztokoch. Lepšie sa rozpúšťajú v alkalických vodných roztokoch za vzniku solí.

Vo viditeľnej oblasti svetla v rozsahu vlnových dĺžok 340 až 470 nm vykazujú charakteristické absorpčné spektrum. Ich absorpčné maximum závisí od stupňa ionizácie príslušnej zlúčeniny a prehĺbuje sa s rastúcim pH okolitého média (obr. 4).

Niektoré základné fyzikálnochemické vlastnosti študovaných derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu, ako molekulová hmotnosť (M. h.), bod topenia (B. t.), disociačná konštanta (vyjadrená ako pK_a), rozdeľovací koeficient pre systém oktanol—voda (vyjadrený ako $\log P$), vlnочet maximálnej absorpcie (ν_{max}), mólový absorpčný koeficient pri vlnочte maximálnej absorpcie (ε_{max}), oscilátorová mohutnosť (f_a), tranzitný moment (D_{if}) a sigma konštanta pre



Obr. 4. Absorpčné spektrá 0,02 mM karbonylkyanid-3-chlórfenylhydrazónu pri rozličnom pH. 1—50 mM ftalan draselný, pH 4,0; 2—50 mM tris-malean, pH 6,2; 3—50 mM tris-malean, pH 7,2; 4—50 mM tris-HCl, pH 9,3.

substituenty (σ) uvádza tab. 1. Z údajov v tabuľke vyplýva, že kvalita a poloha substituenta na benzénovom jadre významne ovplyvňuje aciditu i lipofilitu základnej štruktúry karbonylkyanidfenylhydrazónu. Najkyslejšie sú 4-nitroderiváty, 2-chlóderiváty a 4-trifluórmetoxyderiváty. Z testovanej série derivátov maximum lipofility vykazovali 3,4-dichlór-CCP, 4-bróm-CCP a 4-trifluórmetoxy-CCP.

Antimikróbna aktivita derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu

Vplyv derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu na rast a metabolizmus mikroorganizmov sme testovali s prokaryotickými baktériami i s eukaryotickými kvasinkami a plesňami. Ako modelové organizmy sa použili *Bacillus cereus*, kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a rozličné druhy vláknitých húb, ktoré kontaminujú a často úplne znehodnocujú poľnohospodárske a potravinárske výrobky [17—19].

Antibakteriálnu aktivitu študovaných derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu uvádza tab. 2. Zistilo sa, že za týchto podmienok všetky deriváty boli schopné inhibovať rast baktérií *B. cereus* zo spórového inokula na pevných semisyntetických médiách. Ako najaktívnejšie sa ukázali 4-trifluórmetoxyderiváty a chlórované deriváty karbonylkyanidfenylhydrazónu. Najmenej aktívne boli nesubstituovaný karbonylkyanidfenylhydrazón a jeho 4-acetylderivát a 4-metylderivát.

Antimikróbna aktivita derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu sa detail-

0,02 mM kar-
azónu pri roz-
draselný, pH
H 6,2 : 3—50
0 mM tris-HCl,

alita a poloha
u i lipofilitu
e sú 4-nitro-
ei série deri-
CCP a 4-tri-

azónu

metabolizmus
s eukaryotie-
nžili *Bacillus*
nitych húb,
ské a potra-
kvanidfenyl-
tký deriváty
na perných
rmetoxyderi-
nej aktívne
ceylderivát
nu sa detail-

Tabuľka 1. Základné fyzikálnochemické veličiny derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu

Zlúčenina	M. h.	B. t.	δ	pK_a	$\log P$	$\bar{\nu}_{\max}$	$\epsilon_{\max} \cdot 10^3$	f_a	$D_{if} \cdot 10^{17}$
CCP	170,17	146—7	—	6,78	2,4880	28 100	18,2	0,4057	1,322
2-chlór-CCP	204,60	171—2	0,20	5,82	2,6532	28 200	15,5	0,3702	1,198
3-chlór-CCP	204,60	169—70	0,37	6,00	3,1274	28 000	20,0	0,4226	1,377
4-chlór-CCP	204,60	182—4	0,23	6,11	3,0759	27 500	20,2	0,4454	1,478
3,4-dichlór-CCP	239,06	180—4	0,52	5,99	3,4193	27 500	21,0	0,5016	1,664
4-bróm-CCP	249,07	196—8	0,23	6,53	3,3802	27 250	22,4	0,4630	1,550
4-metyl-CCP	184,20	168—71	—0,17	7,04	3,0228	27 450	19,6	0,4322	1,439
4-acetyl-CCP	212,21	177—80	0,50	6,12	2,1708	27 300	29,8	0,5439	1,818
4-nitro-CCP	215,17	198—202	0,78	5,76	2,3440	26 850	26,9	0,4869	1,655
4-trifluórmetoxy-CCP	259,18	173	0,35	5,94	3,3597	28 000	18,6	0,3759	1,225

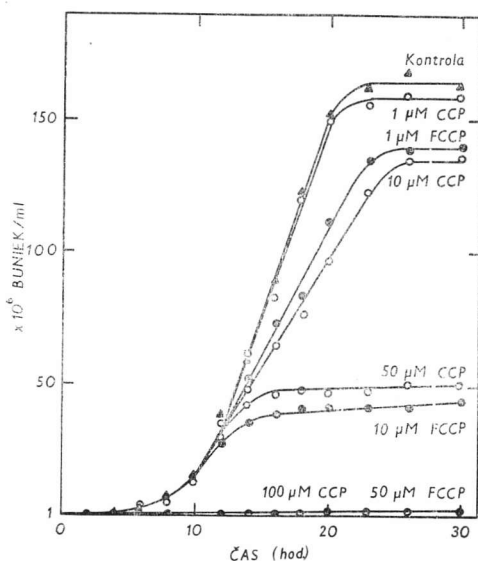
Tabuľka 2. Inhibícia rastu baktérií *Bacillus cereus* derivátmi karbonylkyanidfenylhydrazónu (20 μg) po 72 hodinách rastu pri 30 °C

Zlúčenina	Priemer zóny inhibície (mm)
4-trifluórmetoxy-CCP	55
4-chlór-CCP	47
2-chlór-CCP	46
3-chlór-CCP	45
3,4-dichlór-CCP	45
4-bróm-CCP	42
4-nitro-CCP	40
4-metyl-CCP	36
CCP	35
4-acetyl-CCP	33

nejšie študovala s kvasinkami *S. cerevisiae*. Bunky týchto kvasiniek sú schopné rásť za aeróbných i anaeróbných podmienok a nepotrebujú tvorbu ATP oxidatívnou fosforyláciou pri raste na skvasiteľných substrátoch [20].

Obr. 5 demonštruje vplyv karbonylkyanid 4-trifluórmetoxyfenylhydrazónu (FCCP) a karbonylkyanidfenylhydrazónu (CCP) na rast kvasiniek v tekutom semisyntetickom médiu. V závislosti od testovanej koncentrácie uvedené deriváty alebo rast neovplyvňovali (1 μM CCP), mierne znížili rastovú rýchlosť a rastový výťažok (1 μM FCCP a 10 μM CCP), znížili rastový výťažok na úroveň anaeróbného rastu (10 μM FCCP a 50 μM CCP), alebo celkom inhibovali rast na glukóze ako substráte (50 μM FCCP a 100 μM CCP).

Študované deriváty karbonylkyanidfenylhydrazónu v koncentrácii 1 μM buď rastovú rýchlosť neovplyvňovali, buď rast iba mierne spomaľovali (4-



Obr. 5. Vplyv rozličných koncentrácií karbonylkyanidfenylhydrazónu (CCP) a karbonylkyanid 4-trifluórmetoxyfenylhydrazónu (FCCP) na rast kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* v tekutom semisyntetickom médiu.

-trifluórmetoxy-CCP a 3,4-dichlór-CCP). 4-nitro-CCP a nesubstituovaný CCP neovplyvnili rastový výťažok. 4-chlór-CCP znížil rastový výťažok o 32% a 3,4-dichlór-CCP až o 62%. Ostatné deriváty znížili rastový výťažok buniek o 14 až 16%.

V koncentrácii 10 μM s výnimkou 4-nitro-CCP, ktorý bol bez účinku, všetky ostatné deriváty znížovali rastovú rýchlosť i rastový výťažok buniek. Percento inhibície rastového výťažku sa zvyšovalo v poradí CCP (18,2%), 4-metyl-CCP (26,1%), 4-acetyl-CCP (36,5%), 2-chlór-CCP (55,8%). Zostávajúcich päť derivátov inhibovalo rastový výťažok o 72 až 80%.

Pri 50 μM koncentrácii derivátov CCP v rastovom médiu došlo s výnimkou 4-nitro-CCP, CCP a 4-acetyl-CCP k úplnému zastaveniu rastu buniek. Uvedené tri deriváty neinhibovali rast úplne ani pri koncentrácii 100 μM , hoci percento inhibície bolo vysoké, v rozmedzí 75 až 97%.

Inhibičné účinky derivátov CCP na rast buniek kvasiniek súhrnne uvádza tab. 3.

Tabuľka 3. Inhibícia rastového výťažku kvasiniek *S. cerevisiae* rozličnými koncentráciami derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu po 30 hodinách rastu pri 30 °C.

Zlúčenina	Inhibícia rastového výťažku (%)			
	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM
3,4-dichlór-CCP	62,0	74,5	100	100
4-chlór-CCP	32,7	80,0	100	100
4-trifluórmetoxy-CCP	15,2	72,8	100	100
3-chlór-CCP	16,3	72,4	100	100
2-chlór-CCP	19,7	55,8	100	100
4-bróm-CCP	13,0	74,6	100	100
4-metyl-CCP	19,7	26,1	100	100
4-acetyl-CCP	14,4	36,5	77	83
CCP	3,6	18,2	74	97
4-nitro-CCP	0	0	68,9	75

Vplyv karbonylkyanidfenylhydrazónov na životaschopnosť buniek *S. cerevisiae* sme testovali dvoma derivátmi: 3-chlór-CCP (CCCP) a 4-trifluórmetoxy-CCP (FCCP). Zistili sme, že pri koncentráciách znižujúcich aeróbny rastový výťažok buniek rastúcich na 0,5% glukóze ako substráte na anaeróbnú úroveň sa životaschopnosť buniek kvasiniek nezmenila. Na druhej strane pri vyšších koncentráciách inhibítorov (100—200 μM) bunky kvasiniek neboli schopné nielen rásť na glukóze, ale po 24 hod. interakcie s CCCP a FCCP sa ich životaschopnosť úplne stratila (tab. 4).

Rast baktérií a kvasiniek i rast vláknitých húb bol efektívne inhibovaný takmer všetkými derivátmi karbonylkyanidfenylhydrazónu. Priemery inhibičných zón testovaných derivátov CCP, pridaných na povrch pevného Sabouraudovho média obsahujúceho spóry rozličných druhov plesní, sú v tab. 5. Najaktívnejšie z testovaných derivátov boli 3,4-dichlór-CCP, 4-trifluórmetoxy-CCP a 3-chlór-CCP. Najmenej aktívne boli 4-nitro-CCP, 4-metyl-CCP a 4-acetyl-CCP.

Vplyv 3-chlór-CCP (CCCP) a 4-trifluórmetoxy-CCP (FCCP) na klíčenie spór

Tabuľka 4. Vplyv karbonylkyanid 3-chlórfenylhydrazónu (CCCP) a karbonylkyanid 4-trifluórmetoxyfenylhydrazónu (FCCP) na životaschopnosť kvasiniek *S. cerevisiae*. Začiatočná koncentrácia buniek v semisyntetickom médiu s 0,5 % glukózou bola 1×10^6 buniek/ml

Inhibítor	Rastový výťažok po 24 hod. rastu (počet buniek $\cdot 10^6$ /ml)	Percento prežitia po 24 hod. interakcie
—	200	100
10 μ M CCCP	46	100
100 μ M CCCP	1	3,3
200 μ M CCCP	1	5,0
10 μ M FCCP	46	100
100 μ M FCCP	1	0,7
200 μ M FCCP	1	0,0

Tabuľka 5. Inhibícia rastu vlákнитých húb derivátmi karbonylkyanidfenylhydrazónu (20 μ g) po dvoch týždňoch rastu pri 30 °C

Zlúčenina	Priemer zóny inhibície (mm)							
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Penicillium italicum</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>	<i>Mucor mucedo</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>
3,4-dichlór-CCP	20	16	14	17	30	20	14	18
4-trifluórmetoxy-CCP	19	14	17	13	30	24	12	20
3-chlór-CCP	18	14	16	13	20	22	16	16
2-chlór-CCP	18	14	16	15	23	10	13	24
4-bróm-CCP	18	16	13	15	18	18	12	16
4-chlór-CCP	17	13	16	15	20	13	17	24
CCP	15	15	13	10	22	10	10	20
4-acetyl-CCP	10	8	12	10	10	15	15	11
4-metyl-CCP	8	12	13	10	20	8	12	18
4-nitro-CCP	0	0	0	0	0	10	0	0

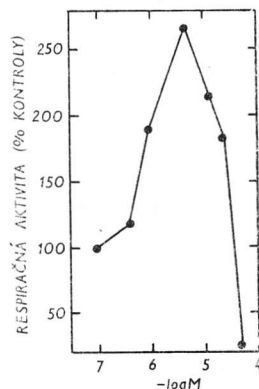
a ich prežitie v tekutom semisyntetickom médiu sa testoval plesňami *Aspergillus niger* a *Penicillium italicum*. V prítomnosti týchto derivátov spóry ani po 24 hodinách inkubácie nevyklíčili, zostali v stave dormantnom, kým v kontrolnej pôde bez inhibítora už v 8. hodine sa pozorovali jasné prejavy klíčenia. Za týchto podmienok účinok testovaných derivátov bol fungistatický (tab. 6).

Vzhľadom na nešpecifický efekt vyšších koncentrácií derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu, inhibujúcich úplne rast kvasiniek na glukóze ako

Tabuľka 6. Vplyv karbonylkyanid 3-chlórphenylhydrazónu (CCCP) a karbonylkyanid 4-trifluormetoxylphenylhydrazónu (FCCP) na germináciu a prežitie konídií *Aspergillus niger* a *Penicillium italicum*. Germinačné médium s 2 % glukózou obsahovalo 10^6 spór/ml. Percento vyklíčených a prežitých spór sa stanovilo po 8 hodinách interakcie konídií s inhibítorom

Pleseň	Inhibitor	Percento	Percento
		vyklíčených spór	prežitých spór
<i>Aspergillus niger</i>	—	90	100
	40 μ g CCCP/ml	0	98
	40 μ g FCCP/ml	0	95
	—	92	100
<i>Penicillium italicum</i>	40 μ g CCCP/ml	0	97
	40 μ g FCCP/ml	0	94
	—	92	100

substráte, sledovali sme aj vplyv týchto derivátov na respiračnú aktivitu celých buniek kvasiniek, kde schopnosť jej stimulácie reprezentuje mieru špecifického odpojujúceho účinku testovanej skupiny látok. Vplyv na dýchanie kvasiniek *S. cerevisiae* v prítomnosti 11 mM glukózy bol pri všetkých testovaných derivátoch stanovený pre koncentrácie 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 12,5, 25,0 a 50 μ M. Z aritmetických priemerov dvoch identických meraní sa zostrojila závislosť respiračnej aktivity od koncentrácie príslušného derivátu a z tejto krivky sa odčítala tá koncentrácia derivátu CCP, ktorá je potrebná na dosiahnutie 50% z maximálnej stimulácie respirácie. Priemerná maximálna hodnota bola 270,8% kontrolnej respiračnej aktivity buniek, ktorá sa stanovila za neprítomnosti derivátu CCP. Obr. 6 ilustruje takúto závislosť pre 3-chlór-CCP, s ktorým sa



Obr. 6. Vplyv rozličných koncentrácií karbonylkyanid 3-chlórphenylhydrazónu (CCCP) na respiračnú aktivitu buniek *Saccharomyces cerevisiae* (kontrola 100 %).

dosiahla maximálna stimulácia respirácie pri koncentrácii 5 μ M (268,1%). Vyššie koncentrácie stimuláciu znižovali a pri koncentrácii 50 μ M sa zistila 73,8% inhibícia kontrolnej respiračnej aktivity buniek. Obdobný charakter mali aj koncentračné závislosti pre ostatné deriváty CCP. Koncentrácie derivátov CCP, ktoré sú potrebné na dosiahnutie 50% z maximálnej hodnoty stimulácie ($\Phi_{1/2}$) a pokladajú sa za mieru rozprahajúceho potenciálu príslušnej

Tabuľka 7. Koncentrácie derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu potrebné na dosiahnutie polovice z maximálnej stimulácie respiračnej aktivity ($\Phi_{1/2}$) buniek kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*

Zlúčenina	$\Phi_{1/2}$ (μM)
4-trifluórmetoxy-CCP	0,562
4-chlór-CCP	0,631
3,4-dichlór-CCP	0,785
3-chlór-CCP	0,933
2-chlór-CCP	1,413
4-bróm-CCP	1,788
4-metyl-CCP	4,467
CCP	7,080
4-acetyl-CCP	8,913
4-nitro-CCP	8,961

zlúčeniny uvádza tab. 7. Tieto hodnoty vyjadrujú zároveň relatívnu účinnosť jednotlivých derivátov CCP v indukcii stimulácie respiračnej aktivity buniek kvasiniek. V tomto prípade sa maximálna účinnosť zistila pre 4-trifluórmetoxy-CCP, 4-chlór-CCP a 3,4-dichlór-CCP a najnižšia pre 4-nitro-CCP a 4-acetyl-CCP.

Diskusia

Výsledky práce demonštrujú biologickú aktivitu derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu a riešia niektoré otázky vzájomného vzťahu antimikróbnej aktivity a chemickej štruktúry týchto derivátov. Zistili sme, že účinnosť jednotlivých derivátov prejavujúca sa v antibakteriálnej a antifungálnej aktivite na jednej strane a v schopnosti špecificky stimulovať respiračnú aktivitu buniek kvasiniek na strane druhej, významne závisí od kvality a polohy substituenta na benzénovom jadre karbonylkyanidfenylhydrazónu. Najaktívnejšími boli deriváty s optimálnymi pK_a hodnotami v rozmedzí 5,9 až 6,1 a maximálnou lipofilitou.

Vplyv derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu na rast kvasiniek ukázal, že ich účinok v závislosti od použitej koncentrácie je alebo špecifický — vyplývajúci z ionofórovej povahy týchto látok [4], ktorej dôsledok je schopnosť blokovat spojenie medzi oxidačno-redukčnými reakciami transportu elektrónov a syntézou ATP v membránových systémoch [5, 6], alebo nešpecifický — pravdepodobne zapríčinený interakciou s tiolovými skupinami rozličných enzýmových systémov [8, 9, 21]. V prvom prípade dochádza k zníženiu rastových výťažkov na úroveň nedýchajúcich buniek, v druhom prípade k úplnej inhibícii rastu. Podobný vplyv ako pri kvasinkách možno očakávať aj v prípade baktérií a vláknitých húb, kde zachovanie membránového potenciálu a pri hubách naviac aj dostupnosť intramitochondriálne tvoreného ATP, sú pravdepodobne esenciálne faktory pre rast [5, 22, 23].

V prípade inhibície rastu kvasiniek, ako aj baktérií a vláknitých húb, najvyššiu účinnosť vykazovali 4-trifluórmetoxy-CCP a chlоровané deriváty

karbonylkyanidfenylhydrazónu, pri ktorých substituenty na benzénovom jadre svojim vysokým $-I$ efektom zapríčiňujú zvýšenie acidity základnej štruktúry a pritom ešte priaznivo ovplyvňujú lipofilné vlastnosti molekuly. Naopak, vo všetkých prípadoch najnižšiu účinnosť vykazovali 4-nitro-CCP, 4-acetyl-CCP, 4-metyl-CCP a nesubstituovaný karbonylkyanidfenylhydrazón. V podstate rovnaké poradie relatívnych účinností derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu sa zistilo aj pri sledovaní schopnosti stimulovať respiračnú aktivitu buniek kvasiniek, ktorá reprezentuje mieru špecifického odpojujúceho účinku testovanej skupiny látok.

Účinnosť biologicky aktívnych látok veľmi úzko súvisí s ich fyzikálnochemickými vlastnosťami, z ktorých sú najdôležitejšie acido-bázický charakter a lipofilita. Tento vzťah však nie je jednoduchý a jednotlivé fyzikálnochemické parametre vždy nekorelujú s biologickou ozvou [24]. Pre sériu študovaných derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu, kde základná štruktúra je rovnaká a acido-bázické vlastnosti (pK_a 5,76—7,04) a lipofilita molekuly ($\log P$ 2,1708—3,4193) sú dané iba kvalitou a polohou substituenta na benzénovom jadre, nenašla sa jednoduchá závislosť medzi účinnosťou na jednej strane a lipofilitou, resp. aciditou na strane druhej. Napriek tomu je evidentné, že najúčinnnejšie sú tie deriváty, pri ktorých substituent na benzénovom jadre (4-trifluórmetoxy-, 4-chlór-, 3-chlór- a 3,4-dichlór-) zapríčiňuje súčasne zvýšenie acidity (pK_a 5,94—6,11) a lipofility ($\log P$ 3,0759—3,597) základnej štruktúry. Optimálna pK_a hodnota, priaznivá pre vysokú účinnosť, a nízky rozdeľovací koeficient (napr. 4-nitro-CCP: pK_a 5,76 a $\log P$ 2,3440) alebo naopak, optimálny rozdeľovací koeficient a súčasne nízka acidita (napr. 4-bróm-CCP: pK_a 6,53 a $\log P$ 3,3802) nie sú dostačujúce na dosiahnutie vysokej biologickej aktivity. Preto je relatívna účinnosť 4-nitro-CCP v porovnaní s najúčinnnejším 4-trifluórmetoxy-CCP asi 250-krát nižšia a 4-bróm-CCP asi 34-krát nižšia.

Ako sme uviedli, jednoduchá závislosť medzi účinnosťou a elektrónovými vlastnosťami či lipofilitou karbonylkyanidfenylhydrazónov sa nenašla. Bude preto potrebné uskutočniť určenie kvalitatívneho vzťahu medzi účinnosťou testovaných derivátov a ich fyzikálnochemickými veličinami viacparametrovou regresnou analýzou, čo je predmetom ďalšieho výskumu. Bez ohľadu na túto skutočnosť, široké spektrum antimikróbného efektu, vysoká biologická aktivita, známy spôsob účinku, ako aj pomerne jednoduchá príprava karbonylkyanidfenylhydrazónov dávajú predpoklad na perspektívne využitie týchto derivátov pri príprave nových účinných dezinfekčných prostriedkov použiteľných v prevencii i likvidácii nežiadúcich poľnohospodárskych a potravinárskych škodcov.

Súhrn

Pripravilo sa desať štruktúrnych derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu a určili sa ich základné fyzikálnochemické vlastnosti. Stanovil sa vplyv týchto derivátov na rast baktérií, kvasiniek a rozličných druhov vláknitých húb. Pri kvasinkách sa stanovil aj vplyv týchto derivátov na respiračnú aktivitu celých buniek. Zo získaných výsledkov sa určili relatívne účinnosti jednotlivých derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu. Ukázalo sa, že maximum biologickej aktivity vykazujú tie deriváty, pri ktorých substituent na benzé-

novom jadre zapríčiňuje súčasne zvýšenie acidity a lipofility derivátu v porovnaní s nesubstituovaným karbonylkyanidfenylhydrazónom. Túto podmienku splňajú najmä 4-trifluórmetoxyderiváty, 3-chlóderiváty, 4-chlóderiváty a 3,4-dichlóderiváty.

Literatúra

1. ESTABROOK, R. W. — PULLMAN, M. E.: *Methods in Enzymology. Oxidation and Phosphorylation. Vol. X.* New York—London, Academic Press 1967.
2. HANSTEIN, W. G.: *Biochim. biophys. Acta*, **456**, 1976, s. 129.
3. LeBLANC, O. H.: *J. membrane Biol.*, **4**, 1971, s. 227.
4. KESSLER, R. J. — TYSON, C. S. — GREEN, D. E.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1976, s. 3141.
5. HAROLD, F. M.: *Bact. Rev.*, **36**, 1972, s. 172.
6. MITCHELL, P.: *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 1976, s. 399.
7. HEYTLER, P. G. — PRITCHARD, W. W.: *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **7**, 1962, s. 272.
8. SZOLNAY, T.: *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 1964, s. 285.
9. GREKSÁK, M.: *Biológia*, **28**, 1973, s. 445.
10. ALBERT, A. — SERJEANT, E.: *Konstanty ionizacii kyslot i osnovanij*. Moskva, Izd. Chimija 1964.
11. ROBINSON, R. A. — STOKES, R. H.: *Electrolyte Solutions*. Moskva, Izd. Inostrannoj literatury 1963.
12. KUHN, W. — BROWN, E.: *Z. Phys. Chem.*, **8**, 1930, s. 281.
13. JÖRGENSEN, C. K.: *Acta chem. scand.*, **8**, 1954, s. 1495.
14. MULLIKEN, R. S.: *J. Chem. Phys.*, **7**, 1939, s. 14.
15. HAMMET, L. P.: *J. Amer. chem. Soc.*, **59**, 1937, s. 96.
16. HAMMET, L. P.: *Chem. Rev.*, **17**, 1935, s. 125.
17. LEŠKOVÁ, Z. — ŠUBÍK, J. — BEHŮN, M.: *Bull. VÚP*, **13**, 1974, s. 141.
18. BEHŮN, M. — ŠUBÍK, J. — DUDÍKOVÁ, E.: *Bull. VÚP*, **14**, 1975, č. 1—2, s. 182.
19. WEISER, H. H. — MOUNTNEY, G. J. — GOULD, W. A.: *Practical Food Microbiology and Technology*. Westport, AVI Publ. Co. 1971.
20. ŠUBÍK, J.: *Vývoj a funkcia bunkových organel*. Bratislava, ÚV SAK SSR a Biol. spol. SAV 1975, 115 s.
21. KOVÁČ, L. — HRUŠOVSKÁ, E.: *Folia microbiol.*, **12**, 1967, s. 56.
22. ŠUBÍKOVÁ, V. — ŠUBÍK, J.: *Folia microbiol.*, **19**, 1974, s. 367.
23. SLAYMAN, C. W. — REES, D. C. — ORCHARD, P. P. — SLAYMAN, C. L.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 1975, s. 396.
24. HANSCH, C.: *Quantitative structure-activity relationship in drug design*. V.: Ariens, E. J. (Ed.), *Drug Design. Vol. 1.* New York, Academic Press 1971, s. 271.

Производные карбонилцианид фенилгидразона и их влияние на рост и обмен веществ микробных клеток

Выводы

Были подготовлены десять структурных производных карбонилцианид фенилгидразона и определены их основные физико-химические свойства. Определялось влияние этих производных на рост бактерий, дрожжей и разных видов волокнистых грибов. У дрожжей определялось также влияние этих производных на дыхательную активность целых клеток. Из полученных результатов были определены относительные действия отдельных производных карбонилцианид фенилгидразона.

Оказалось, что максимум биологической активности достигают те производные, у которых заместитель на бензольном ядре вызывает одновременное повышение кислотности и липофильности производного по сравнению с незамещенным карбонил-

цианид фенилгидразоном. Этим условиям удовлетворяют главным образом 4-трифторметокси-, 3-хлор-, 4-хлор- и 3,4-дихлор-производные.

The derivatives of carbonylcyanide phenylhydrazone and their influence on growth and metabolism of microbial cells

Summary

Ten structural derivatives of carbonylcyanide phenylhydrazone were prepared and their basic physico-chemical properties were determined. The influence of these derivatives on the growth of bacteria, yeast and different species of filamentous fungi was stated.

In the yeast the influence of these derivatives on whole cells respiration activity also was stated. From the results obtained the relative efficiencies of individual carbonylcyanide phenylhydrazone derivatives were determined. It was demonstrated that maximum of biologic activity possess the derivatives, in which the substituent on benzene nucleus causes simultaneously increase of derivative acidity and lipophilicity in comparison with nonsubstituted carbonylcyanide phenylhydrazone. This condition fulfil especially 4-trifluoromethoxy-, 3-chlor-, 4-chlor- and 3,4-dichlor-derivatives.