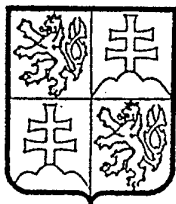


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 184

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 2338-90.P

(22) Přihlášeno : 14 05 90

(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 15 04 92

(47) Uděleno : 21 02 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 15 04 92

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

A 01 N 47/20

A 01 N 43/36

(73) Majitel patentu : UNIVERZITA KOMENSKÉHO, BRATISLAVA

(72) Původce vynálezu : KRÁLOVÁ KATARÍNA RNDr. CSc.,
ŠERŠEN FRANTIŠEK ing. CSc.,
CSÖLLEI JOZEF RNDr. CSc., BRATISLAVA

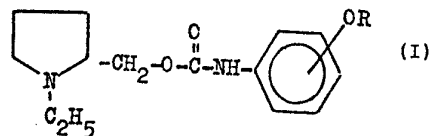
(54) Název vynálezu : Algicidny prostriedok typu N-etyl-2-
-pyrolidinylmetylesterov alkoxykarbani-
lových kyselín

(57) Anotace :

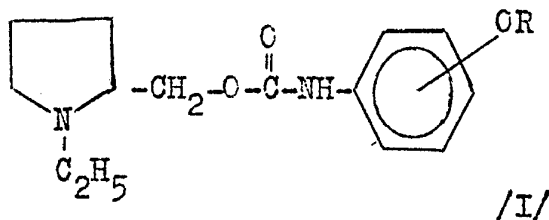
Algicidny prostriedok, ktorý ako účinnú látku obsahuje zlúčeninu obecného vzorca I, kde OR znamená alkoxyl so 4 až 7 atómami uhlíka v orto- alebo meta-polohe benzénového jadra.

Syntéza týchto zlúčenín je predmetom čs. autorského osvedčenia č. 211247 autorov: Csöllei J., Beneš L., Borovanský A., Švec P. (1985).

Zlúčeniny podľa vynálezu pôsobia algicidne pri koncentráciách $1 \cdot 10^{-5}$ mól.dm⁻³ a vyšších (tj. pri koncentráciách 3,9 mg.dm⁻³ a vyšších).



Vynález sa týka algicídneho prostriedku, ktorý ako účinnú látku obsahuje zlúčeninu obecného vzorca I



kde OR znamená alkoxy so 4 až 7 atómami uhlíka v orto- alebo meta- polohe benzénového jadra.

Syntéza zlúčenín obecného vzorca I je predmetom čs. autorského osvedčenia č. 211247 autorov: Csöllei J., Beneš L., Borovanský A., Švec P. (1985). Tieto zlúčeniny vykazujú lokálne anestetickú účinnosť (Csöllei J.: Farm. obzor 50, 407, 1981).

Pri ďalšom štúdiu biologickej účinnosti zlúčenín obecného vzorca I sme zistili, že tieto výrazne inhibujú rast a syntézu chlorofylu rias.

Inhibičná účinnosť zlúčenín obecného vzorca I na riasy sa testovala stacionárnou kultiváciou synchronnej kultúry rias *Chlorella vulgaris*. Hodnotil sa nárast buniek rias, ako aj obsah syntetizovaného chlorofylu. Podrobný popis metódy hodnotenia je uvedený v príklade 1. Miera antialgálnej účinnosti zlúčenín obecného vzorca I je vyjadrená údajmi v tab. 1. Inhibičný vplyv na riasy sa sledoval u nasledujúcich zlúčenín obecného vzorca I:

1. N-etyl-2-pyrrolidinylmetylester 2-butoxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (pracovné označenie KAK 2224)
2. N-etyl-2-pyrrolidinylmetylester 2-pentyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (KAK 2225)
3. N-etyl-2-pyrrolidinylmetylester 2-hexyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (KAK 2226)
4. N-etyl-2-pyrrolidinylmetylester 2-heptyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (KAK 2227)
5. N-etyl-2-pyrrolidinylmetylester 3-butoxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (KAK 2234)
6. N-etyl-2-pyrrolidinylmetylester 3-pentyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (KAK 2235)
7. N-etyl-2-pyrrolidinylmetylester 3-hexyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (KAK 2236)
8. N-etyl-2-pyrrolidinylmetylester 3-heptyloxykarbanilovej kyseliny (KAK 2237).

TABULKA 1

Inhibičná účinnosť látok obecného vzorca I na riasy
Chlorella vulgaris

Látka	IC ₅₀ syntézy chlorofylu	MIC syntézy chlorofylu	IC ₅₀ rastu rias	10 ⁻⁶ mól.dm ⁻³
KAK 2224	39,4	66,1	53,7	
KAK 2225	23,4	60,3	30,2	
KAK 2226	14,5	50,1	20,9	
KAK 2227	8,0	15,8	12,0	
KAK 2234	13,2	39,8	20,9	
KAK 2235	12,3	25,1	15,0	
KAK 2236	6,8	10,0	8,7	
KAK 2237	6,9	11,0	8,3	

IC_{50} značí koncentráciu študovanej látky, pri ktorej dochádza k 50 %nej inhibícii hodnoteného parametra rias vzhľadom na kontrolné vzorky;

MIC značí minimálnu koncentráciu študovanej látky, pri ktorej dochádza k úplnej inhibícii hodnoteného parametra rias.

Nasledujúci príklad bližšie osvetľuje inhibičnú účinnosť zlúčenín podľa vynálezu na zelene riasy.

Príklad 1

Účinok zlúčenín podľa vynálezu na rast rias *Chlorella vulgaris* a obsah syntetizovaného chlorofylu

Riasy *Chlorella vulgaris* sa pestovali stacionárnou kultiváciou pri teplote 25 ± 1 °C, pri svetelnom režime 16 hodín svetlo - 8 hodín tma, v kultivačnom médiu podľa Šetlíka (Šetlík I.: Annual Report of Algolog Lab. for 1967, 71-140, Třeboň, 1968). K živnému médiu sa pridával roztok študovanej zlúčeniny v destilovanej vode takej koncentrácie, aby sa získala séria kultivačných baniek s odstupňovanou koncentráciou látky a odstupňovaným biologickým účinkom. Banky sa inokulovali presným objemom homogénnej suspenzie rias. Po 7-dennej kultivácii sa objem kultivačného média doplnil destilovanou vodou na pôvodný objem (vyrovnanie odparu vody) a v suspenzii buniek sa merala absorbancia pri 660 nm (úmeraná množstvu buniek rias) a obsah chlorofylu po jeho extrakcii dimetylformamidom z odcentrifugovaných buniek rias. Celkový obsah chlorofylu rias v kultivačnom médiu sa vyhodnotil podľa rovnice: $Chl / mg \cdot dm^{-3} = 17,9 A_{647} + 8,08 A_{664,5}$, kde A je absorbancia vzorky pri 647, resp. 664,5 nm v 1 cm kyvete (Inskeep W. P., Bloom P.R.: Plant Physiol. 77(2), 483-5, 1985).

Získané hodnoty týchto parametrov sa porovnávali s hodnotami parametrov kontrolných vzoriek (vyhodnotené ako % kontroly). Na základe týchto hodnôt sa extrapoláciou vyčíslili koncentrácie študovaných zlúčenín, pri ktorých sa dosiahla 50 %ná inhibícia (IC_{50}) a v prípade hodnôt chlorofylu aj úplná inhibícia (MIC). Z hodnôt absorbancie sa MIC nevyhodnocovala, nakoľko touto metódou sa stanovujú tiež odfarbené mŕtve bunky rias, a teda aj pri úplnej inhibícii sa namerajú určité hodnoty absorbancie.

Napríklad v prípade testovania účinku zlúčeniny KAK 2237 sa k 12 ml kultivačného média s inokulom rias pridalo 0,12 ml vodného roztoku zlúčeniny KAK 2237 nasledovných koncentrácií: $2,5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $7,5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$ a $1 \cdot 10^{-4}$ $m \cdot l \cdot dm^{-3}$. Skutočné koncentrácie zlúčeniny KAK 2237 v kultivačnom médiu a príslušné hodnoty inhibície rastu rias a syntézy chlorofylu, vyjadrené v % kontrolných vzoriek sú uvedené v tab. 2.

Hodnoty koncentrácie študovanej zlúčeniny, pri ktorej dochádza k 50 %nej, resp. úplnej inhibícii študovaného parametra rias sa zisťuje extrapoláciou zo závislosti vyššie uvedených hodnôt % zistenej inhibície sledovaného parametra od logaritmu aplikovanej koncentrácie študovanej zlúčeniny.

TABULKA 2

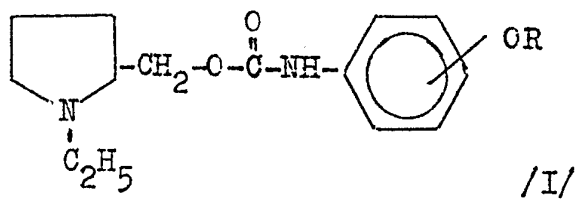
Inhibícia rastu rias a syntézy chlorofylu v prítomnosti zlúčeniny KAK 2237

σ = smerodajná odchýlka

Konc. zlúč. KAK 2237 $10^{-6} \text{ m} \cdot \text{l} \cdot \text{dm}^{-3}$	% kontroly $\pm \sigma$	
	Chlorofyl	Absorbancia
25	0	$12,5 \pm 0$
10	$9,3 \pm 0,7$	$18,5 \pm 2,0$
7,5	$47,5 \pm 7,7$	$63,3 \pm 1,1$
5,0	$85,4 \pm 3,6$	$86,0 \pm 3,0$
1,0	$110,6 \pm 3,0$	$106,2 \pm 4,4$

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Algicídny prostriedok, vyznačený tým, že ako účinnú látku obsahuje zlúčeninu obecného vzorca I



kde OR znamená alkoxyl so 4 až 7 atómami uhlíka v orto- alebo meta- polohe benzénového jadra.