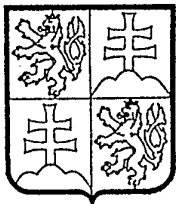


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 178

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 3478-90. K

(22) Přihlášeno : 13 07 90

(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 15 01 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 43/40

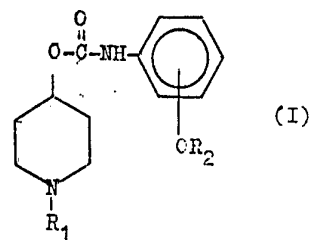
(73) Majitel patentu : UNIVERZITA KOMENSKÉHO, BRATISLAVA

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

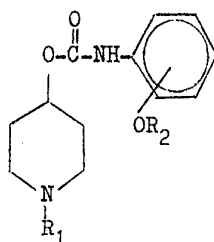
(54) Název vynálezu : Algicidny prostriedok typu N-alkyl-4-piperidylesterov
alkoxykarbanilových kyselín

(57) Anotace :

Algicidny prostriedok, ktorý ako účinnú látku obsahuje zlúčeninu obecného vzorca I, kde R₁ je priamy alkyl s 2 až 4 atómami uhlíka a OR₂ je alkoxyl so 4 až 7 atómami uhlíka v orto- alebo meta- polohe benzenového jadra. Syntéza týchto novosyntetizovaných zlúčenín je uvedená v práci autorov Csöllei J., Beneš L., Borovanský A., Švec P., Béderová E., Kozlovský J.: Českoslov. farm. XXXV. 229 (1986). Zlúčeniny pôsobia algicidne pri koncentráciách $6 \cdot 10^{-8}$ mol.dm⁻³ a vyšších (t. j. pri koncentráciách 2,3 mg.dm⁻³ (a vyšších).



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



(I),

kde R_1 je priamy alkyl s 2 až 4 atómami uhlíka a OR_2 je alkoxy so 4 až 7 atómami v orto- alebo meta-polohe benzénového jadra.

Syntéza novosyntetizovaných doposiaľ nepopísaných zlúčenín obecného vzorca I je uvedená v práci autorov Csöllei J., Beneš L., Borovanský A., Švec P., Béderová E., Kozlovský J.: Českoslov. farm. XXXV, 299 (1986). Zlúčeniny vykazujú lokálne anestetickú účinnosť.

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 tabuľke 1. Inhibičný vplyv na riasy sa sledoval u nasledujúcich zlúčenín obecného vzorca I:

1. N-etyl-N-piperidylester 2-butoxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (pracovné označenie 4224)
2. N-etyl-4-piperidylester 2-pentyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4225)
3. N-etyl-4-piperidylester 2-hexyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4226)
4. N-etyl-4-piperidylester 2-heptyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4227)
5. N-etyl-4-piperidylester 3-butoxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4234)
6. N-etyl-4-piperidylester 3-pentyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4235)
7. N-etyl-4-piperidylester 3-hexyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4236)
8. N-etyl-4-piperidylester 3-heptyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4237)
9. N-propyl-4-piperidylester 2-butoxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4324)
10. N-propyl-4-piperidylester 2-pentyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4325)
11. N-propyl-4-piperidylester 2-hexyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4326)
12. N-propyl-4-piperidylester 2-heptyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4327)
13. N-propyl-4-piperidylester 3-butoxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4334)
14. N-propyl-4-piperidylester 3-pentyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4335)
15. N-propyl-4-piperidylester 3-hexyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4336)
16. N-propyl-4-piperidylester 3-heptyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4337)
17. N-butyl-4-piperidylester 2-butoxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4424)
18. N-butyl-4-piperidylester 2-pentyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4425)
19. N-butyl-4-piperidylester 2-hexyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4426)
20. N-butyl-4-piperidylester 2-heptyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4427)
21. N-butyl-4-piperidylester 3-butoxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4434)
22. N-butyl-4-piperidylester 3-hexyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4436)
23. N-butyl-4-piperidylester 3-heptyloxykarbanilovej kyseliny, hydrochlorid (PAK 4437)

Tabuľka 1

Inhibičná účinnosť látok obecného vzorca I na riasy *Chlorella vulgaris*

Látka	IC ₅₀ syntézy chlorofylu	MIC syntézy chlorofylu	IC ₅₀ 10 ⁻⁶ mól.dm ⁻³ rastu rias
PAK 4224	50,0	20,4	27,5
PAK 4225	50,0	30,2	34,7
PAK 4226	33,1	10,7	13,8
PAK 4227	10,2	8,7	8,9
PAK 4234	11,0	8,7	8,7
PAK 4235	9,1	7,9	7,9
PAK 4236	6,0	3,8	4,6
PAK 4237	11,5	7,4	8,4
PAK 4324	60,3	17,4	28,8
PAK 4325	25,1	11,8	15,1
PAK 4326	25,1	11,8	11,5
PAK 4327	25,1	13,5	12,9
PAK 4334	16,2	5,4	7,4
PAK 4335	10,0	5,5	6,1
PAK 4336	8,7	4,2	4,6
PAK 4337	10,0	5,8	7,6
PAK 4424	19,9	8,3	12,6
PAK 4425	20,0	10,5	10,5
PAK 4426	39,8	12,0	20,9
PAK 4427	35,5	13,8	16,6
PAK 4434	15,8	9,6	9,1
PAK 4436	10,0	7,1	8,3
PAK 4437	15,1	9,8	11,5

IC₅₀ 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 zelené 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 s 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 (úmerná 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: $\text{Chl (mg.dm}^{-3}\text{)} = 17,9 A_{647} + 8,08 A_{664,5}$, kde A je absorbancia vzorky pri 647, resp. 664,5 nm v 1 cm kvete (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 (IC₅₀) a v prípade hodnôt chlorofylu aj úplná inhibícia (MIC). Z hodnôt absorbancie sa MIC nevyhodnocova-

la, 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 PAK 4324 sa k 12 ml kultivačného média s inokulem rias pridalo 0,12 ml vodného roztoku zlúčeniny PAK 4324 nasledovných koncentrácií $6,0 \cdot 10^{-3}$, $3,5 \cdot 10^{-3}$, $2,5 \cdot 10^{-3}$, $1,0 \cdot 10^{-3}$ a $7,5 \cdot 10^{-4}$ $\text{mól} \cdot \text{dm}^{-3}$. Skutočné koncentrácie zlúčeniny PAK 4324 v kultivačnom médiu a príslušné hodnoty inhibície rastu rias a syntézy chlorofylu, vyjadrené v % kontrolných vzoriek sú uvedené v tabuľke 2.

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

Tabuľka 2

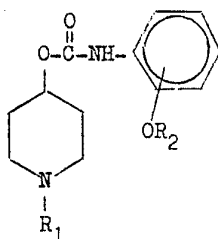
Inhibícia rastu rias a syntézy chlorofylu v prítomnosti zlúčeniny PAK 4324

Konc. zlúčenina PAK 4324 $10^{-6} \text{ mól} \cdot \text{dm}^{-3}$	% kontroly $\pm \delta$	
	Chlorofyl	Absorbancia
60	0	$18,7 \pm 0,2$
35	$25,6 \pm 6,5$	$45,7 \pm 1,3$
25	$38,1 \pm 3,7$	$58,0 \pm 2,0$
10	$68,9 \pm 10,8$	$87,5 \pm 2,8$
7,5	$82,8 \pm 3,0$	$94,8 \pm 1,9$

δ - smerodajná odchýlka

PATENTOVÉ NÁROKY

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



(I),

kde R_1 je priamy alkyl s 2 až 4 atómami uhlíka a OR_2 je alkoxyl so 4 až 7 atómami uhlíka v orto- alebo meta- polohe benzénového jadra.