

(19)



(10) **LT 5802 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5802**

(51) Int. Cl. (2011.01): **A61L 2/00**
A61K 33/00

(21) Paraiškos numeris: **2011 048**

(22) Paraiškos padavimo data: **2011 05 20**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2011 11 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2012 01 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Joana BENDORAITIENĖ, LT
Rima KLIMAVIČIŪTĖ, LT
Ramunė RUTKAITĖ, LT
Paulius Pavelas DANILOVAS, LT

(73) Patent savininkas:

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS, K. Donelaičio g. 73, 44249
Kaunas, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Aurelija ŠIDLAUSKIENĖ, Dr. V. Šidlauskas ir partneriai, UAB, K. Būgos g. 29,
LT-44326 Kaunas, LT

(54) Pavadinimas:

Katijoninio krakmolo-trijodido baktericidas

(57) Referatas:

Išradimas priklauso chemijos sričiai ir gali būti naudojamas vandens ir biologinių skysčių dezinfekavimui skirtos medžiagos – polimerinio baktericido gamyboje. Polimerinių baktericidų, kuriuose molekulinis jodas yra prijungtas prie polimero makromolekulių nekovalentiniais ryšiais, antibakterinį veiksmingumą nulemia iš polimero atsipalaiduojantis į aplinką molekulinis jodas.

Baktericidas gaunamas tinklinant mikrogranulių pavidalo gamtinį bulvių krakmolą epichlorhidrinu ($Y = 0,05$), po to eterinant glicidiltrimetilamonio chloridu ir jodinant vienvalenčio jodo darinių anijonų vandeniniame tirpale. Padidinto efektyvumo baktericido žaliava yra tinklintas N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo chloridas, kurio pakeitimo laipsnis $0,14 \leq x \leq 0,3$.

Išradimas priklauso chemijos sričiai ir gali būti naudojamas vandens ir biologinių skysčių dezinfekavimui skirtos medžiagos – polimerinio baktericido gamyboje.

Polimerinių baktericidų, kuriuose molekulinis jodas yra prijungtas prie polimero makromolekulių nekovalentiniais ryšiais, žaliava gali būti sintetiniai ir gamtiniai polimerai. Juose jodas įjungiamas į polimerinę matricą ją apdorojant jodo garais, tirpalais organiniuose tirpikliuose arba vienvalenčio jodo darinių anijonų (trijodido, pentajodido) vandeniniais tirpalais. Jų antibakterinį veiksmingumą nulemia iš polimero atsipalaiduojantis į aplinką molekulinis jodas.

Tarp efektyviausių ir plačiausiai naudojamų jodoforų yra stiren-divinilbenzeninių anijonitų kompleksai su vienvalenčio jodo darinių jonais [J. Mills. JAV patentas 3462363, 210/62, 1969; J. Lamber, L.Fina JAV patentas 3923665, 424/79, 1975; P-J. Messier. JAV patentas 5639452, 424/78.1, 1997], polivinilpirolidono-jodo krūvio pernašos kompleksai [E. Shanbrom, JAV patentas 5360605, 424/78.08, 1994; E. Shanbrom ir kiti, JAV patentas 5370869, 424/78.22, 1994], polidialildimetilamonio jodidas [J. Barkauskaitė ir kiti. LT patentas 4497B, C08F126/02, 1999]. Paminėtų jodoforų žaliava yra angliagrandžiai bioneskaidūs polimerai. Ši savybė riboja paminėtų polimerinių jodoforų naudojimą šiuolaikinėse vandens ir biologinių skysčių nukenksminimo technologijose.

Ekologiška ir bioskaidi jodoforų žaliava yra gamtiniai polisacharidai ir jų jonogeniniai dariniai (chitozanas, krakmolas). Iš praturtinto amiloze krakmolo, kuris išskirtas iš genetiškai modifikuotų kviečių grūdų, gauti medicinos paskirties amilozės-jodo preparatai, kuriuose yra 30 mg/g krakmolui jodo [W.R. Ghent, B.A.Eskin, JAV patentas 5955101, 424/451, 1999].

Tirpūs joniniai chitozano-jodo kompleksai gauti reaguojant polimerui su vienvalenčio jodo darinių anijonais parūgštintame, turinčiame daugiahidroksilinių junginių, tirpale. Pasiūlytas antiseptinis hidrogelis, kurio veikli medžiaga yra chitozano-

jodo darinys, pagreitina žaizdų gijimą [E.M. Hassan. JAV patentas 6521243, 424/404, 2003]. Jodas gali būti imobilizuotas į disperguojamus vandenyje bioskaidžius tinklintus dekstrinus, dekstraną, sorbitolį, poliviniloalkoholį arba jų darinius, turinčius dietilaminoetil-, karboksigrupių [J.A.O. Johansson. JAV patentas 4010259, 424/150, 1977]. Šie, priskiriami „cadoxemero“ šeimai baktericidai, naudojami naikinant bakterijas ir patogenus iš proteinų tirpalų [E. Shanbrom, JAV patentas 5814225, 210/656, 1998; E. Shanbrom ir kiti, JAV patentas 6096216, 210/638, 2000], arba kraujo [S. J. Miekka ir kiti, JAV patentas 6106773, 422/28, 2000], gydant infekcines ligas, nes atpalaiduoja molekulinį jodą kitaip negu iš polivinilpirolidono-jodo komplekso.

Šio išradimo prototipas yra joninis trijodido ir tinklinto N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo, kurio pakeitimo laipsnis pagal katijonines grupes yra 0,32, kompleksas [J. Bendoraitienė, R. Kavaliauskaitė, N. Plačenyte, V. Valikonytė, A. Žemaitaitis, Katijoninio krakmolo ir jo jodo kompleksų antimikrobinis veiksmingumas // Cheminė technologija. ISSN 1392 – 1231, 2007. Nr. 2 (44), p. 61-69].

Išradimo tikslas – gauti tinklinto N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo-trijodido kompleksus pasižyminčius didesniu baktericidinio veikimo efektyvumu.

Išradimo objektas yra netirpaus tinklinto N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo-trijodido žaliava – tinklinto N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo chloridas, kurio pakeitimo laipsnis $0,14 \leq x \leq 0,3$ pagal N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio grupes vienai anhidrogliukozinei grandžiai (AGL).

Tiksliai tokioje žaliavoje molekulinis jodas įjungtas į keletą molekulinio jodo kompleksų: joninį katijoninio krakmolo-trijodido (TKK-trijodido) ir įterpimo amilozės-jodo (TK-jodo) kompleksus. Tai patvirtina įvairaus pakeitimo laipsnio katijoninio krakmolo suspensijos dalelių spalva jodo tirpale. Tinklintas krakmolas įgauna mėlyną amilozės-jodo komplekso spalvą, katijoninis krakmolas su $PL \geq 0,32$ yra geltonai rudos spalvos. Tinklinto N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo chlorido, kurio pakeitimo laipsnis $0,14 \leq x \leq 0,3$ pagal N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio grupes, dalelių spalvą nulemia abu kompleksai. 1 lentelėje nurodyti medžiagų sutrumpinti žymėjimai.

1 lentelė. Katijoninis krakmolas ir jo kompleksai su jodu

Krakmolo darinys	Žymėjimas
	TKK _{PL=x} chloridas
	čia: x – katijoninio krakmolo pakeitimo (PL) laipsnis pagal N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio grupės
	TKK _{PL=x} trijodido kompleksas

Baktericidas gaunamas tinklinant mikrogranulių pavidalo gamtinį bulvių krakmolą epichlorhidrinu (EPH), po to katijonizuojant glicidiltrimetilamonio chloridu (GTAC) ir jodinant vienvalenčio jodo darinių (I_2)⁻ anijonų vandeniniame tirpale taip:

Į krakmolo–vandens 50 % suspensiją, pašarminatą NaOH tirpalu iki pH=11 maišant pilamas vandenyje gerai suspenduotas epichlorohidrinas (0,05 mol/anhidrogliukozidiniams likučiams (AGL)). Toks reakcijos mišinys išlaikomas 45 °C temperatūroje 24 h. Pasibaigus reakcijai, tinklintas krakmolas (TK) plautas dideliu kiekiu vandens ir džiovintas kambario temperatūroje;

N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo chloridas (TKK) gautas tinklintą krakmolą eterinant glicidiltrimetilamonio chloridu (GTAC) šarminėje terpėje. Katijonizavimo mišinys ruošiamas sumaišant NaOH ir GTAC tirpalus, į tokį mišinį pridedant TK ir viską kruopščiai išmaišant. Reagentų molekulių santykis reakcijos mišinyje buvo AGL : GTAC : NaOH : H₂O = 1 : z : 0,04 : w. Čia z ir w, atitinkamai, yra pridėtų į reakcijos mišinį GTAC ir vandens molekulių skaičius. Reakcija vykdyta heterogeninėmis sąlygomis 45 °C temperatūroje 24 h. Po reakcijos tinklintas N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo (TKK) chloridas plaunamas vandeniu ir filtruojamas.

Jodinimui naudojamas jodo tirpalas, kuriame molinis I₂ / KI santykis yra 3. Katijoninio krakmolo-trijodido baktericidas gaminamas 10 g TKK užpylus 550 ml 0,05 M jodo tirpalo. Suspensija 20–25 °C temperatūroje laikoma 30 min periodiškai ją

išmaišant. TKK–trijodido kompleksas ir likęs tirpalas atskiriami nufiltruojant, baktericidas gerai praplaunamas vandeniu ir džiovinamas 40 °C temperatūroje.

Katijoninių grupių nustatymas TKK.

Prieš analizę katijoninio krakmolo bandiniai buvo 24 h ekstrahuojami metanoliu Soksleto aparate. Nustačius azoto kiekį (N , %) bandinyje Kjeldalio metodu, 2-hidroksipropiltrimetilamonio kiekis modifikuotame krakmole apskaičiuotas kaip pakeitimo laipsnis (PL) iš formulės:

$$PL = \frac{162 \cdot N}{1400 - 151,5 \cdot N};$$

čia: N , % yra azoto kiekis bandinyje, 162 – AGL masė

Jodo kiekio nustatymas TKK-jodo komplekse.

Prijungtas jodo kiekis jodofore nustatomas pagal standartinę metodiką naudojant natrio tiosulfatą [K. Daukšas. Kiekybinė analizė. Vilnius, 1961.]

TKK-jodo komplekso antibakterinio aktyvumo nustatymas

Antibakteriniam aktyvumui įvertinti vartotos bakterijų, tarp jų ir patogeninių, kultūros. Pasirinktos testavimo kultūros: *Listeria monocytogenes*, ATCC 19117, *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (sporos ir vegetatyvinės ląstelės) ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Naudotas koliforminių ir heterotrofinių bakterijų turintis paviršinis vanduo.

Antibakterinį aktyvumą vertinant difuzijos į agarą metodu pagal LST EN ISO 20645:2005 reikalavimus, bakterijų kultūros 18 h augintos 37 °C ant nuožulnaus agaro. Nuplauta bakterijų suspensija praskiesta pagal Mc Farlando standartą Nr. 0,5, gerai sumaišyta mini purtykle ir įpilta į ištirpintą ir atvėsintą iki 47 °C temperatūros agarizuotą terpę bendram bakterijų skaičiui nustatyti. Dar kartą gerai sumaišyta, iki tolygaus ląstelių pasiskirstymo. Tokiu būdu paruošta bakterijų ląstelių ir terpės mišinio suspensija išpilstyta po 10 ml į 90 mm skersmens stiklines Petri lėkštes. Terpei sustingus, joje padarytos įdubos (8 mm skersmens), į kurias įdėti tiriamos medžiagos mėginiai ir 50 µl sterilaus distiliuoto vandens. Antimikrobinis poveikis bakterijų kultūroms įvertintas po inkubavimo 37 °C temperatūroje praėjus 24 arba 48 h, pagal

aplink įdubas susidariusių skaidrių zonų skersmenį, milimetrais. Slopavimo zonos plotis (H) išmatuojamas milimetrine liniuote. Tais atvejais, kai slopavimo zona yra ne skritulys, o ovalas, matuojamas didžiausias ir mažiausias zonos plotis ir apskaičiuojamas jų aritmetinis vidurkis [LST EN ISO 20645:2005 en]. Pamatavus visą skersmenį bei žinant duobutės skersmenį, slopavimo zonos plotis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$H = \frac{D - d}{2};$$

čia: H – slopavimo zonos plotis, mm; D – bendras sterilios zonos ir duobutės skersmuo, mm; d – duobutės skersmuo, mm

Katijoninio krakmolo-trijodido baktericidų antimikrobinio veiksmingumo duomenys pateikti 2 ir 3 lentelėse. Iš jų seka, kad gaminant iš tinklinto N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo chlorido žaliavos, kurio pakeitimo laipsnis $0,14 \leq x \leq 0,3$ pagal N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio grupes, gaunami baktericidai pasižymi didesniu baktericidinio veikimo efektyvumu negu prototipo medžiaga.

2 lentelė. Katijoninio krakmolo-trijodido baktericidų poveikis koliforminių ir heterotrofinių bakterijų augimui vertinant difuzijos į agarą metodu pagal LST EN ISO 20645:2005

Katijoninio krakmolo ir trijodido kompleksas	Koliforminių bakterijų augimo slopinimo zonos dydis, mm		Heterotrofinių bakterijų augimo slopinimo zonos dydis, mm	
	po 24 h	po 48 h	po 24 h	po 48 h
TKK _{PL=0,3} , 2 pavyzdys	43	45	36	40
TKK _{PL=0,32} , prototipas	40	42	30	30

Pastaba: baktericidų poveikio įvertinimui imta po 5 mg. tiriamos medžiagos mėginius

Išradimas iliustruojamas pateiktais pavyzdžiais

1 pavyzdys (prototipas).

Į 50 % krakmolo (SP AB „Stumbras“ Antanavo gamyklos, Lietuva) – vandens suspensiją, kuri pašarminta NaOH tirpalu iki pH=11, maišant pilamas 99 % epichlorohidrinas (Sigma-Aldrich, Vokietija). Epichlorohidрино kiekis buvo 0,05 mol/anhidroglukozidiniui likučiu (AGL). Toks reakcijos mišinys išlaikomas 45 °C temperatūroje 24 h. Pasibaigus reakcijai, tinklintas krakmolas (TK) plautas dideliu

kiekiu vandens ir džiovintas kambario temperatūroje. N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo (TKK) chloridas gautas eterinant tinklintą krakmolą 70 % glicidiltrimetilamonio chlorido (GTAC) tirpale (Fluka, Vokietija) šarminėje terpėje. Katijonizavimo mišinys ruošiamas sumaišant NaOH ir glicidiltrimetilaminio chlorido (GTAC) tirpalus ir į tokį mišinį pridedant TK ir kruopščiai išmaišant komponentus. Reagentų molių santykis katijonizavimo mišinyje buvo $AGL : GTAC : NaOH : H_2O = 1 : 0,33 : 0,04 : 8$. Čia 0,33 yra pridėtų į reakcijos mišinį GTAC molių skaičius. Reakcija vykdyta heterogeninėmis sąlygomis 45 °C temperatūroje 24 h. Po reakcijos tinklintas N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo (TKK) chloridas plaunamas vandeniu ir nufiltruojamas. Gauta TKK chlorido pakeitimo laipsnis 0,32 ($TKK_{SL=0,32}$).

Katijoninio krakmolo-jodo kompleksas gaminamas 10 g TKK užpylus 550 ml 0,05 M jodo tirpalo. Suspensija 20–25 °C temperatūroje laikoma 30 min periodiškai ją išmaišant. TKK–trijodido polikompleksas ir likęs tirpalas atskiriami nufiltruojant. TKK–trijodido polikomplekso mikrogranulės gerai praplaunamos vandeniu ir džiovinamos 40 °C temperatūroje. Jodo kiekis katijoninio krakmolo baktericide yra 28 %. Preparato baktericidinio poveikio duomenys pateikti 2 lentelėje.

2 pavyzdys.

Jodintas katijoninis krakmolas gaminamas kaip pirmame pavyzdyje, tik tai reagentų molių santykis katijonizavimo mišinyje buvo $AGL : GTAC : NaOH : H_2O = 1 : 0,34 : 0,04 : 3$. Gauta TKK chlorido pakeitimo laipsnis 0,30 ($TKK_{SL=0,30}$). Jodo kiekis katijoninio krakmolo jodofore yra 27 %. Preparato baktericidinio poveikio duomenys pateikti 2 ir 3 lentelėje.

3 pavyzdys.

Jodintas katijoninis krakmolas gaminamas kaip pirmame pavyzdyje, tik tai reagentų molių santykis krakmolo katijonizavimo mišinyje buvo $AGL : GTAC : NaOH : H_2O = 1 : 0,71 : 0,04 : 3$. Gauta TKK chlorido pakeitimo laipsnis 0,62 ($TKK_{SL=0,62}$). Jodo kiekis katijoninio krakmolo baktericide yra 38 %. Preparato baktericidinio poveikio duomenys pateikti 3 lentelėje.

4 pavyzdys.

Jodintas katijoninis krakmolas gaminamas kaip pirmame pavyzdyje, tik tai reagentų molių santykis krakmolo katijonizavimo mišinyje buvo $AGL : GTAC : NaOH :$

$H_2O = 1 : 0,24 : 0,04 : 3$. Gauta TTK chlorido pakeitimo laipsnis 0,21 ($TKK_{SL=0,21}$). Jodo kiekis katijoninio krakmolo baktericide yra 21 %. Preparato baktericidinio poveikio duomenys pateikti 3 lentelėje.

5 pavyzdys.

Jodintas katijoninis krakmolas gaminamas kaip pirmame pavyzdyje, tikrai reagentų molių santykis krakmolo katijonizavimo mišinyje buvo $AGL : GTAC : NaOH : H_2O = 1 : 0,16 : 0,04 : 5$. Gauta TTK chlorido pakeitimo laipsnis 0,14 ($TKK_{SL=0,14}$). Jodo kiekis katijoninio krakmolo baktericide yra 20 %. Preparato baktericidinio poveikio duomenys pateikti 3 lentelėje.

6 pavyzdys.

Jodintas katijoninis krakmolas gaminamas kaip pirmame pavyzdyje, tikrai reagentų molių santykis krakmolo katijonizavimo mišinyje buvo $AGL : GTAC : NaOH : H_2O = 1 : 0,05 : 0,04 : 8$. Gauta TTK chlorido pakeitimo laipsnis 0,04 ($TKK_{SL=0,04}$). Jodo kiekis katijoninio krakmolo baktericide yra 10 %. Preparato baktericidinio poveikio duomenys pateikti 3 lentelėje.

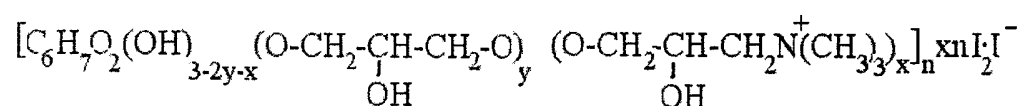
3 lentelė. Katijonio krakmolo ir jodo kompleksų antimikrobinis veiksmingumas pagal bakterijų augimui vertinant difuzijos į agarą metodu pagal LST EN ISO 20645:2005

Išradimo aprašymo pavyzdžio Nr.	Katijonio krakmolo ir jodo kompleksas	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (veg. last.)	<i>Bacillus subtilis</i> (sporos)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
3	TKK _{PI=0,62} jodas	30,0±0,47	26,00±1,63	26,00±1,63	18,33±0,47	27,33±2,05	35,00±0,00	42,00±0,00	12,00±0,00
2	TKKI _{PI=0,3} jodas	35,00±0,0	35,00±0,00	30,00±0,00	33,66±2,49	32,00±0,00	40,00±0,00	42,66±2,05	29,00±0,81
4	TKKI _{PI=0,21} jodas	34,00±0,00	48,47±2,49	36,33±2,87	19,00±0,81	25,00±4,08	40,00±0,00	25,00±0,00	28,00±0,81
5	TKKI _{PI=0,14} jodas	0	35,33±3,39	23,00±0,81	9,0±0,00	17,00±0,00	40,00±0,00	23,66±4,10	14,00±0,00
6	TKKI _{PI=0,04} jodas	0	23,66±1,69	17,00±0,00	0	0	40,00±0,00	13,33±1,39	14,00±0,00

Pastaba: Jodo kiekis mėginyje 1,1 mg. Augimo slopinimo zona (mm) po 24 h inkubavimo.

Išradimo apibrėžtis

Netirpus tinklinto epichlorohidrinu ($y=0,05$) katijoninio krakmolo-trijodido baktericidas, kuriame trijų anijonai sujungti į kompleksus su modifikuoto polisacharido makromolekulėmis



b e s i s k i r a n t i s tuo, kad padidinto efektyvumo baktericido žaliava yra tinklintas N-(2-hidroksil)propil-3-trimetilamonio krakmolo chloridas, kurio pakeitimo laipsnis $0,14 \leq x \leq 0,3$.