



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 32 002 T2 2007.04.12

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 221 934 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 32 002.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/IB00/01389

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 960 928.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/024769

(86) PCT-Anmeldetag: 28.09.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 12.04.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 17.07.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 22.11.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 12.04.2007

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A01N 31/02 (2006.01)

A01N 31/06 (2006.01)

A01N 35/04 (2006.01)

A01N 43/08 (2006.01)

A01N 49/00 (2006.01)

A01N 61/00 (2006.01)

A61Q 13/00 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

PCT/IB99/01618 04.10.1999 WO

PCT/IB99/01660 11.10.1999 WO

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Firmenich S.A., Genf/Genève, CH

(72) Erfinder:

BRETLER, Gil, CH-1012 Lausanne, CH

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ANTIMIKROBIELLEN PARFÜMIERENDEN ZUSAMMENSETZUNGEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****TECHNISCHES GEBIET UND STAND DER TECHNIK**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet parfümierender Bestandteile und Zusammensetzungen, die eine antimikrobielle Wirkung besitzen. Die Anmeldung beschreibt auch einen neuen Test, der für das Bestimmen der antimikrobiellen Aktivität von parfümierenden Bestandteilen besonders geeignet ist, wodurch er die Herstellung parfümierender Zusammensetzungen erlaubt, die eine antimikrobielle Aktivität aufweisen.

**[0002]** In der Parfümindustrie sowie in den Industrien, in denen Parfüme und parfümierende Zusammensetzungen verwendet werden (wie beispielsweise in Unternehmen, die Geschirrspülflüssigkeiten, Allzweckreiniger, Shampoos oder sogar kosmetische Produkte herstellen), besteht eine starke Tendenz, parfümierende Zusammensetzung, die eine antimikrobielle Wirkung aufweisen, zu schaffen und zu verwenden. Das ist der Tat- sache zuzuschreiben, dass eine steigende Nachfrage der Verbraucher nach Produkten besteht, die sowohl eine Aktivität gegen Bakterien und andere Mikroorganismen aufweisen, als auch die Erwartungen der Verbraucher bezüglich des Fehlens eines Gehalts an zur Zeit verwendeter Biozide, wie Triclocarban und Triclosan, erfüllen.

**[0003]** Es ist bekannt, dass gewisse parfümierende Bestandteile synthetischen oder natürlichen Ursprungs nicht nur einen angenehmen Geruch aufweisen, sondern auch eine mehr oder weniger ausgeprägte Aktivität gegen Mikroorganismen aufweisen. Jedoch ist diese potentielle Anwendung der parfümierenden Bestandteile bisher nicht ausgenutzt worden. Der Grund dafür ist größtenteils die Tatsache, dass es unseres Wissens nach keinen Test gibt, der eine Beurteilung der wirklichen antimikrobiellen Eigenschaften von parfümierenden Bestandteilen auf quantitative, sichere und reproduzierbare Weise erlaubt.

**[0004]** Die Anmeldung EP-A-451 889 von Unilever bietet einen allgemeinen Überblick über die verschiedenen Tests, die zum Bestimmen einer gewissen antimikrobiellen Aktivität bekannter parfümierender Verbindungen bekannt sind. Die Schlussfolgerung der obigen Anmeldung besteht darin, dass die offensichtlichen Methoden nicht verlässlich genug sind, weil beispielsweise sich widersprechende Ergebnisse für einen vorgegebenen Bestandteil gegen einen und denselben Organismus erhalten worden sind oder weil die für einen gewissen Organismus erhaltenen Ergebnisse nicht auf andere Organismen übertragen werden können. Als Lösung dieses Problems beschreibt dieses Dokument des Stands der Technik einen Test, der Einzelchallengetest genannt worden ist, von dem gesagt wird, dass er verlässliche Daten über die antimikrobielle Aktivität einer Verbindung ergibt.

**[0005]** Jedoch bietet dieser bekannte Test keine Quantitativen Ergebnisse, die eine wirkliche Beurteilung der Aktivität der einen Verbindung gestatten. Des Weiteren lösen die Tenside, die in den angegebenen Konzentrationen verwendet werden (Isooctylphenoxyethoxyethanol und Natriumdodecylsulfat) die hydrophoben parfümierenden Bestandteile in der wässrigen Lösung nicht. Der parfümierende Bestandteil liegt größtenteils als Suspension von Mizellen vor. Aus diesem Grund bilden sie keinen richtigen Kontakt mit den eingeimpften Bakterien, die in der wässrigen Phase vorliegen. Dies führt zu einem inhärenten Fehler beim Messen und macht den Vorgang unverlässlich.

**BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG**

**[0006]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren für die Zubereitung einer parfümierenden Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie das Mischen mit parfümierenden Bestandteilen, Lösungsmitteln oder Hilfsmitteln, die zur Zeit in der Parfümindustrie in Gebrauch sind, von mindestens 30 Gew.-% eines oder mehrerer aktiver Bestandteile umfasst, die eine antimikrobielle Aktivität von 100% gegen mindestens 2 verschiedene Arten von Bakterien aufweisen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus hirae*, wie durch eine Methode beurteilt, die Folgendes umfasst:

Löslichmachen des zu prüfenden Bestandteils in einem wässrigen Medium in einer Konzentration zwischen 250 und 1000 µg/ml, mit Bezug auf das Medium, in Gegenwart einer wirksamen Menge Lösungsmittel, das im Wesentlichen gegen daraufhin zugesetzte Bakterien nichttoxisch ist und das das vollständige Löslichmachen des parfümierenden Bestandteils erlaubt;

Zusetzen eines Inokulums der erwünschten Bakterien, derart, dass die Endkonzentration in dem Medium mindestens  $10^7$  koloniebildende Einheiten/ml Medium beträgt;

Verdünnen des Mediums derart, dass die Bakterienkonzentration auf  $10^3$  koloniebildende Einheiten/ml Medium reduziert wird;

Ausbreiten von  $10^2$  koloniebildenden Einheiten/ml der Bakterien auf einem geeigneten Kulturmedium; Zählen der überlebenden Kolonien nach der Inkubation; und Vergleichen des erhaltenen Werts mit einer Kontrolle, die kein Parfüm enthält.

**[0007]** Wir haben nun einen Test entwickelt, der eine quantitative und verlässliche Beurteilung der antimikrobiellen Aktivität parfümierender Bestandteile gegen eine Reihe verschiedener Bakterienstämme erlaubt. Dieser Test ist "mikrobieller Reduktionstest" genannt und der Test ist für parfümierende Bestandteile besonders geeignet.

**[0008]** Bei diesem spezifischen "mikrobiellen Reduktionstest" wird der zu beurteilende parfümierende Bestandteil in eine wässrige Testlösung in einer bestimmten Konzentration (vergleiche unten) eingewogen und mit einem geeigneten Lösungsmittel löslich gemacht, das die Bakterien in dem Inokulum (das in einer späteren Stufe zugegeben werden soll) nicht negativ beeinflusst. Die geeigneten Lösungsmittel können aus einer umfangreichen Reihe verschiedener Alkohole, wie beispielsweise Isopropanol, Amylalkoholen und Fuselölen bestehen. Der bevorzugte Alkohol ist jedoch Ethanol. Erstaunlicherweise haben wir entdeckt, dass der Zusatz von Alkoholen, und insbesondere Ethanol, es ermöglicht, verlässliche und signifikante Ergebnisse über die antimikrobielle Aktivität eines parfümierenden Bestandteils zu erhalten, obwohl es bekannt ist, dass Ethanol selbst eine gewisse bakteriostatische Wirkung besitzt. Jedoch haben wir erstaunlicherweise gefunden, dass die Verwendung der richtigen Menge Ethanol bei dem erfindungsgemäßen Test eine derart geringe Wirkung auf die Bakterien ausübt, dass signifikante Daten über die antimikrobielle Aktivität der parfümierenden Testbestandteile erhalten werden können. Gleichzeitig stellt das Ethanol eine gute Löslichmachung des hydrophoben parfümierenden Bestandteils in der wässrigen Phase sicher, die als Testmedium verwendet wird.

**[0009]** Die zu verwendende Menge Ethanol hängt von der Menge an parfümierendem Bestandteil ab, der in der Lösung vorliegt. Die Konzentration des Letzteren beträgt 250 bis 1000 µg/ml, bevorzugt 300 bis 800 µg/ml, wobei die bevorzugteste Konzentration im Bereich von 400 bis 600 µg/ml liegt. Für letztere wurde gefunden, dass Ethanolkonzentrationen in der Testlösung zwischen 5 und 20 Gew.-% gute Ergebnisse ergab, wobei die bevorzugte Konzentration ungefähr 15 Gew.-%, auf das Gesamtgewicht der Testlösung bezogen, beträgt. Diese Werte sind bezüglich der wässrigen Endlösung angegeben, die das Parfüm, das Ethanol und das Inokulum enthält.

**[0010]** Wenn der parfümierende Bestandteil dann in der Testlösung in den oben identifizierten Konzentrationen löslich gemacht wird, wird die Lösung mit dem entsprechenden Testbakterium beimpft, um eine Endkonzentration von Bakterien von  $10^7$  koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml bereitzustellen.

**[0011]** Die verwendeten Bakterien waren wir folgt:

- Escherichia coli, ATCC 10536 (Ursprung: American Type Culture Collection, Rockville, Md.)
- Pseudomonas aeruginosa, CNCN A22 (Ursprung: Institut Pasteur, Paris)
- Staphylococcus aureus, ATCC 9144 (Ursprung: Oxford Assay)
- Enterococcus hirae, ATCC 10541 (Ursprung: FDA, USA).

**[0012]** Nach einer Kontaktzeit zwischen 2 und 10 min, bevorzugt etwa 2 min bei etwas 20°C, wird die wässrige Testlösung dann mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Konzentration von etwa  $10^3$  KBE/ml verdünnt. In dieser hohen Verdünnung ist die Wirkung des parfümierenden Bestandteils auf die Bakterien vernachlässigbar gering. Ein dem theoretischen Maximalwert von  $10^2$  KBE entsprechendes Volumen wird dann entfernt, auf einem Kulturmedium ausgebreitet, inkubiert, und die Anzahl von Kolonien wird gezählt. In der Praxis wird der Test im Allgemeinen durch Zugeben von 0,1 ml Testprobe (enthaltend  $10^7$  KBE) zu 9,9 ml physiologischer Kochsalzlösung und Wiederholen der Verdünnung mit der erhaltenen Lösung durchgeführt, bis die erwünschte Konzentration von etwa  $10^3$  KBE/ml erreicht wurde. Aus dieser Lösung wurde eine Probe von 0,1 ml auf einer Caserin-Pepton-Dextrose-Hefeagarplatte ausgebreitet. Die Bakterien wurden dann unter geeigneten Bedingungen gezüchtet. Wir haben gefunden, dass gute Ergebnisse dann erhalten wurden, wenn die Bakterien über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C und einer Feuchte von etwa 60–90% gezüchtet wurden. Die Anzahl von Kolonien wurde dann beispielsweise mit einem Standardkoloniezähler beurteilt.

**[0013]** Die antimikrobielle Aktivitätsrate für das entsprechende getestete Produkt wird dann durch Teilen der Anzahl von koloniebildenden Einheiten für die Bakterien, die dem Testprodukt ausgesetzt sind, durch die Anzahl von koloniebildenden Einheiten, die in einem Bezugs- oder Kontrolltest gezählt werden, bestimmt, bei dem das gleiche Bakterium der gleichen Testsequenz unterworfen worden ist wie oben, jedoch ohne Zusatz eines parfümierenden Bestandteils.

**[0014]** Man sagt, dass der parfümierende Bestandteil den Test erfolgreich bestanden hat, d.h. man sagt, dass er eine antimikrobielle Aktivität aufweist, wenn 100% der jeweiligen Bakterien eliminiert worden sind.

**[0015]** Erfindungsgemäß werden die aktiven Moleküle, die zum Herstellen der parfümierend Zusammensetzung verwendet werden, als Verbindungen definiert, die gegen 100% der Bakterien von zwei oder drei der oben erwähnten Stämme aktiv sind. Eine nichteinschränkende Liste der Verbindungen, die den Verfahrensbedingungen der vorliegenden Erfindung entsprechen ist wie folgt:

Decanal	Isoeugenal
10-Undecen-1-al	Nerol
Nonanal	Tetrahydrolinalool
4-Isopropylbenzaldehyd	Zestover <sup>3)</sup>
4-Undecanolid	Intrelevenaldehyd <sup>4)</sup>
Citronellal	(2E,6Z)-2,6-nonadien-1-ol
Citronellol	γ-Dodecalacton
Cyclamenaldehyde	Floralozon <sup>5)</sup>
Delphon <sup>1)</sup>	Isobutylchinolein
Dihydroeugenol	Lilial <sup>®6)</sup>
8-p-Menthanol	Mayol <sup>®7)</sup>
Dimetol <sup>2)</sup>	Phenylhexanol
Geraniol	9-Decen-1-ol
3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-methylpropanal	

<sup>1)</sup> 2-Pentyl-1-cyclopantanone; Ursprung: Firmenich SA, Genf, Schweiz

<sup>2)</sup> 2,6-Dimethyl-2-heptanol; Ursprung: Givaudan-Roure SA, Vernier, Schweiz

<sup>3)</sup> 2,4-Dimethyl-1-carbaldehyd; Ursprung: Firmenich SA, Genf, Schweiz

<sup>4)</sup> Ursprung: International Flavors & Fragrances, USA

<sup>5)</sup> Mischung von 3-(4-Ethylphenyl)-2,2-dimethylpropanal + 3-(2-Ethylphenyl)-2,2-dimethylpropanal; Ursprung: International Flavors & Fragrances, USA

<sup>6)</sup> Ursprung: Givaudan-Roure SA, Vernier, Schweiz

<sup>7)</sup> cis-7-p-Menthanol; Ursprung: Firmenich SA, Genf, Schweiz

**[0016]** Aus diesem Grund wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein aktives Molekül als Verbindung definiert, die eine antimikrobielle Aktivität aufweist, wie durch den mikrobiellen Reduktionstest getestet, wenn sie es in der oben angegebenen List eingeschlossen ist.

**[0017]** Erfindungsgemäß werden Zusammensetzungen hergestellt, die eine antimikrobielle Aktivität aufweisen und eine wirksame Menge von aktiven Molekülen, wie oben definiert, enthalten. Wir haben gefunden, dass derartige Zusammensetzungen, um wirksam zu sein, mindestens 30 Gew.-% der oben definierten aktiven Moleküle, auf das Gesamtgewicht der Zusammensetzung bezogen, enthalten sollten. Die bevorzugten Zusammensetzungen sind diejenigen, die etwa 50 Gew.-% aktive Moleküle, auf das Gesamtgewicht der Zusammensetzung bezogen, enthalten.

**[0018]** Es ist daher möglich, Parfüme und Kölnisch Wasser herzustellen, die eine antimikrobielle Aktivität aufweisen, durch Verwenden einer Zusammensetzung umfassend aktive Moleküle, wie erfindungsgemäß definiert, um so antimikrobielle parfümierende Zusammensetzungen bereitzustellen. Die erfindungsgemäße Methode erlaubt auf vorteilhafte Weise das Herstellen von antimikrobiellen parfümierenden Zusammensetzungen, die zum Parfümieren gewisser Produkte, insbesondere Verbrauchsgüter auf dem Gebiet des Haushalts und der Körperpflege, verwendet werden.

**[0019]** Die Aktivität der Endprodukte hängt natürlich von der Menge der vorliegenden parfümierenden Zusammensetzung ab. Die erfindungsgemäße Methode erlaubt deshalb die Herstellung parfümierender Zusammensetzungen, die für eine Reihe verschiedener Anwendungen nützlich sind, die Seifen, Bad- und Duschgele, Shampoos, Deodorante und Antiperspirante, kosmetische Zusammensetzungen, Luftherfrischer, flüssige und feste Detergentien für die Behandlung von Textilien, Weichspülmittel und Allzweckreiniger für den Hauhalt und auch für die Verwendung in der Industrie umfassen.

**[0020]** Diese Methode für die Zubereitung antimikrobieller parfümierender Zusammensetzungen umfasst das Vermischen der aktiven Bestandteile mit den parfümierenden Bestandteilen, Lösungsmitteln und Hilfsmitteln, die zur Zeit beim Parfümieren verwendet werden. Die Art und die Verschiedenheit dieser gleichzeitig verwendeten Bestandteile erfordern hier keine nähere Beschreibung, die außerdem nicht erschöpfend wäre, und der

mit dem Stand der Technik vertraute Fachmann wird in der Lage sein, letztere durch sein Allgemeinwissen und in Abhängigkeit von der Natur der parfümierenden Zusammensetzung, die zubereitet werden soll, zu wählen. Diese parfümierenden Bestandteile gehören zu chemischen Klassen, die sehr unterschiedlich sind, wie Alkohole, Aldehyde, Ketone, Ester, Ether, Acetate, Nitrile, Terpenkohlenwasserstoffe, schwefel- und stickstoffhaltige heterocyclische Verbindungen sowie ätherische Öle natürlichen oder synthetischen Ursprungs. Eine große Anzahl dieser Bestandteil ist außerdem in Nachschlagelehrbüchern wie dem Buch S. Arctander, Perfume and Flavor Chemicals (Parfüm- und Aromachemikalien), 1969, Montclair, New Jersey, USA, oder den neueren Ausgaben oder in anderen Werken ähnlicher Natur aufgeführt.

**[0021]** Die Erfindung wird nun in weiteren Einzelheiten in den folgenden Beispielen veranschaulicht.

#### AUSFÜHRUNGSFORMEN DER ERFINDUNG

##### BEISPIEL 1

**[0022]** Es wurde eine antimikrobielle Zusammensetzung mit den folgenden Bestandteilen zubereitet:

Bestandteile	Gewichtsteile
Benzylacetat	500
Hexylzimtaldehyd	1000
*(2E,6Z)-2,6-Nonadien-1-ol*	5
*Citronellol	500
Cumarin	300
*γ-Dodecalacton	50
Lorysia® <sup>1)</sup>	1000
Heliotropin	200
*Isobutylchinolein	50
*Lilial®	2500
*Mayol®	1000
Phenethylol	400
*Phenylhexanol	1500
Polysantol®	500
Insgesamt	<u>9505</u>

\* in Dipropylenglykol

<sup>1)</sup> 4-(1,1-Dimethylethyl)-1-cyclohexylacetate; Ursprung: Firmenich SA, Genf, Schweiz

x = erfindungsgemäße aktive Verbindung

**[0023]** Die so zubereitete Zusammensetzung wies eine antimikrobielle Aktivität von 100% gegen Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa und Staphylococcus aureus, wie durch den erfindungsgemäßen Test gemessen, auf.

##### BEISPIEL 2

**[0024]** Eine parfümierende Zusammensetzung wurde unter Anwendung folgender Bestandteile zubereitet:

Bestandteile	Gewichtsteile
Benzylacetat	500
Linalylacetat	500
*Citronellol	300
*Cyclamenaldehyd	100
* $\gamma$ -Dodecalacton	20
*Geraniol	200
Habanolide <sup>®1)</sup>	500
*Lilial <sup>®</sup>	1000
*Mayol <sup>®</sup>	300
Phenethylol	800
*Phenylhexanol	500
Benzylsalicylat	800
Terpineol	1000
Insgesamt	<u>6520</u>

<sup>1)</sup> Mischung von Pentadec-11-en-15-olid und Pentadec-12-en-15-olid; Ursprung: Firmenich SA, Genf, Schweiz

x = erfindungsgemäße aktive Verbindung

**[0025]** Die so zubereitete Zusammensetzung wies eine antimikrobielle Aktivität von 100% gegen Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus, wie durch den erfindungsgemäßen Test gemessen, auf.

#### BEISPIEL 3

**[0026]** Es wurde eine parfümierende Zusammensetzung unter Anwendung folgender Bestandteile zubereitet:

Bestandteile	Gewichtsteile
*Nonanal	10
Hexylzimtaldehyd	800
*Intrelevenaldehyd	10
*4-Undecanolid	10
*Citronellol	1500
*Geraniol	1000
Habanolide <sup>®1)</sup>	800
Iralia <sup>®</sup> Insgesamt <sup>2)</sup>	200
Isopentylrat <sup>3)</sup>	400
Dorisyl <sup>1)</sup>	800
Lyral <sup>®4)</sup>	500
*Phenylhexanol	1000
*Tetrahydrolinalool	1500
Insgesamt	<u>8530</u>

<sup>1)</sup> siehe Beispiel 2

<sup>2)</sup> Methyliononmischung; Ursprung: Firmenich SA, Genf, Schweiz

<sup>3)</sup> 1,3-Dimethyl-3-butenylisobutyrat; Ursprung: Firmenich SA, Genf, Schweiz

<sup>4)</sup> Mischung von 4- und 3-(4-Hydroxy-4-methylpentyl)-3-cyclohexen-1-carbaldehyd; Ursprung: International Flavors & Fragrances, USA

x = erfindungsgemäße aktive Verbindung

**[0027]** Die so zubereitete Zusammensetzung wies eine antimikrobielle Aktivität von 100% gegen Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus, wie durch den erfindungsgemäßen Test gemessen, auf.

#### BEISPIEL 4

Aktivität antimikrobieller parfümierender erfindungsgemäß in einem Weichspülmittel zubereiteter Zusammensetzungen

**[0028]** Der Test der Bakterienkontaktzeit in vitro (BKZ) bietet ein Maß der Wirksamkeit, mit der eine Produkt-

lösung bei einer gewissen Konzentration einen vorgegebenen Typ Bakterien in der Lösung tötet.

**[0029]** Dieser Test ist in der internationalen Patentanmeldung WO 98/16194 beschrieben, deren Inhalt hier summarisch eingefügt wird.

Allgemeine Methode.

**[0030]** Es werden drei verschiedene antimikrobielle Zusammensetzungen, die erfindungsgemäß zubereitet wurden und verschieden Prozentsätze aktiver Verbindungen enthielten und in einer Konzentration von 1% formuliert wurden, in einem Weichspülmittel getestet, das aus den folgenden Bestandteilen zubereitet wurde;

Bestandteile	Gewichtsteile
Stepantex® VS90 <sup>1)</sup>	16,5
CaCl <sub>2</sub> (10% wässrige Lösung)	0,2
Farbstoff (1% wässrige Lösung)	0,3
Wasser	<u>82,0</u>
Insgesamt	99,0

<sup>1)</sup> Ursprung: Stepan, France

**[0031]** Die bei dieser Studie verwendeten Bakterien waren Escherichia coli ATCC 10536 (gram –) (Ursprung: American Type Culture Collection, Rockville, Md).

**[0032]** Die Testorganismen wurden in Tryptonsojabouillon (TSB) bei 37°C ( $OD_{600} = 1,0$ ) gezüchtet. Nach 5maliger Verdünnung des ursprünglichen Inokulums ( $OD_{600} = 0,2$ ) wurden 100 µl der Bakterien mit 100 µl des Probenweichspülmittels gemischt. Die Bakterienabtötung wurde durch Probenahme von der Bakterien/Weichspülmittelmischung in kurzen Zeitabständen (jeweils 30, 60, 90, 120, 180, 155 and 300 s) und darauffolgendem Abbrechen der Abtötungsreaktion durch Verdünnung in TSB gemessen. Bei Erreichen der Reaktionszeit wurden 5 µl der Zubereitung in 500 µl verdünnt und 5 µl dieser letzten Zubereitung wieder in 50 Volumen TSB verdünnt. 50 µl letzterer Verdünnung wurden dann auf einer Tryptonsojamittel(TSA-)Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die durchschnittliche Koloniezahl wurde mit einem Countermat Flash (IUL Instruments) schätzungsweise bestimmt.

**[0033]** In Tabelle 1 unten ist die Zeit (in s) aufgeführt, die zum Erreichen einer Abtötung von mindestens 99% bei unparfümierter Weichspülmittelbase und der gleichen Base, die in einer Konzentration von 1% parfümiert worden war, bei 3 verschiedenen antimikrobiellen erfindungsgemäßen Zusammensetzung erforderlich war, nämlich

- der antimikrobiellen Zusammensetzung 1 (AC1), bei der es sich um die in Beispiel 2 beschriebene Zusammensetzung handelt und die 37% erfindungsgemäße aktive Verbindung enthält;
- der antimikrobiellen Zusammensetzung 2 (AC2), bei der es sich um die in Beispiel 3 beschriebene Zusammensetzung handelt und die 59% erfindungsgemäße aktive Verbindung enthält; und
- der antimikrobiellen Zusammensetzung 3 (AC3), die 100% der erfindungsgemäßen aktiven Verbindungen enthält und die unter Anwendung folgender Bestandteile zubereitet wurde:

Bestandteile	Gewichtsteile
Nonanal	10
Intrelevenaldehyd	10
4-Undecanolid	10
Citronellol	1500
Geraniol	1000
Phenylhexanol	1000
Tetrahydrolinalool	<u>1500</u>
Insgesamt	5030

TABELLE 1:

Bakterienkontakttest, der auf einer unparfümierten Weichspülmittelbase und auf der gleichen Base durchgeführt wurde, die mit 3 verschiedenen Zusammensetzungen parfümiert worden war

Geprüfte Zusammensetzung	Prozentsatz aktiver Bestandteile	Abtötungszeit [s] 99%
Weichspülmittel-base (SB) unparfümiert	0	300
SB parfümiert mit AC 1	37	255
SB parfümiert mit AC 2	59	90
SB parfümiert mit AC 3	100	30

**[0034]** Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Weichspülmittelbase, die die antimikrobiellen Zusammensetzungen umfasst, die erfindungsgemäß zubereitet worden waren, besser wirkte als die Base als solche, bei der mindestens 300 s für eine 99%ige Abtötung erforderlich waren. Die Weichspülmittelzusammensetzung und AC3 (das 100% aktive Bestandteile enthielt) erreichten ebenfalls eine 99,9%ige Abtötung nach einer Kontaktzeit von 90 s. Die Wahrscheinlichkeitswerte für Abtötungen von 99 und 99,9% waren 0,1 bzw. 0,01.

#### Patentansprüche

1. Verfahren für die Zubereitung einer parfümierenden Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie das Mischen mit parfümierenden Bestandteilen, Lösungsmitteln oder Hilfsmitteln, die zur Zeit in der Parfümindustrie in Gebrauch sind, von mindestens 30 Gew.-% eines oder mehrerer aktiver Bestandteile umfasst, die eine antimikrobielle Aktivität von 100% gegen mindestens 2 verschiedene Arten von Bakterien aufweisen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus und Enterococcus hirae, wie durch eine Methode beurteilt, die Folgendes umfasst:

Löslichmachen des zu prüfenden Bestandteils in einem wässrigen Medium in einer Konzentration zwischen 250 und 1000 µg/ml, mit Bezug auf das Medium, in Gegenwart einer wirksamen Menge Lösungsmittel, das im Wesentlichen gegen daraufhin zugesetzte Bakterien nichttoxisch ist und das das vollständige Löslichmachen des parfümierenden Bestandteils erlaubt;

Zusetzen eines Inokulums der erwünschten Bakterien, derart, dass die Endkonzentration in dem Medium mindestens  $10^7$  koloniebildende Einheiten/ml Medium beträgt;

Verdünnen des Mediums derart, dass die Bakterienkonzentration auf  $10^3$  koloniebildende Einheiten/ml Medium reduziert wird; Ausbreiten von  $10^2$  koloniebildenden Einheiten/ml der Bakterien auf einem geeigneten Kulturmöedium;

Zählen der überlebenden Kolonien nach der Inkubation; und Vergleichen des erhaltenen Werts mit einer Kontrolle, die kein Parfüm enthält.

2. Methode nach Anspruch 1, wobei das Lösungsmittel ein Alkohol ist.

3. Methode nach Anspruch 2, wobei der Alkohol Ethanol ist.

4. Methode nach Anspruch 3, wobei das Ethanol in einer Konzentration im wässrigen Medium zwischen 5 und 20 Gew.-%, auf das Gesamtgewicht des Mediums bezogen, vorliegt.

5. Methode nach Anspruch 1, wobei die Bakterien das Kulturmöedium für eine Zeit von ca. 5 Minuten kontaktieren.

6. Methode nach Anspruch 1, wobei der parfümierende Bestandteil in dem wässrigen Medium in einer Konzentration zwischen 400 und 600 µm/ml vorliegt.

7. Methode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie das Mischen mit parfümierenden Bestandteilen, Lösungsmitteln oder Hilfsmitteln, die zur Zeit in der Parfümindustrie in Gebrauch sind, von mindestens

tens 50 Gew.-% eines oder mehrerer aktiver Bestandteile umfasst

8. Methode nach einem der vorhergehenden Ansprüche, die das Mischen von mindestens 30 Gew.-% eines oder mehrerer Bestandteile umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Decanal, 10-Undecen-1-al, Nonanal, 4-Isopropylbenzaldehyd, 4-Undecanolid, Citronellal, Citronellol, Cyclamenaldehyd, Delphon, Didydroeugenol, 8-p-Menthanol, Dimetol, Geraniol, 3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-methylpropanal, Isoeugenol, Nerol, Tetrahydrolinalool, Zestover, Intrelevenaldehyd, (2E,6Z)-2,6-Nonadien-1-ol, γ-Dodecalacton, Floralozon, Isobutylchinolin, Lilial, Mayol, Phenylhexanol, 9-Decen-1-ol.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen