RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **236158**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **416855**

(22) Data zgłoszenia: **18.04.2016**

(51) Int.Cl.
C07C 211/63 (2006.01)
C07C 209/68 (2006.01)

(54) **Substancje o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym oraz sposób wytwarzania substancji o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.10.2017 BUP 22/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
14.12.2020 WUP 20/20

(73) Uprawniony z patentu:
ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE, Szczecin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
EWA JANUS, Goleniów, PL
PAULA OSSOWICZ, Szczecin, PL
MAGDALENA BŁASZAK, Szczecin, PL
KINGA ZATOŚ, Świdwin, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Monika Wielecka

PL 236158 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są substancje o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym w postaci soli benzalkoniowych i sposób ich wytwarzania. Substancje te mogą być stosowane jako składniki kosmetyków.

Znane są właściwości bakteriobójcze soli benzalkoniowych, w postaci chlorku, bromku i sacharynianu benzalkoniowego. Wymienione związki są dopuszczone do stosowania w produktach kosmetycznych jako konserwanty, w stężeniu maksymalnym 0,1%. Chlorek benzalkoniowy stosuje się także do dezynfekcji pomieszczeń, szkła i narzędzi chirurgicznych. W lecznictwie stosowany jest do odkażania błon śluzowych i skóry (roztwory 0,01–0,05%), przepłukiwania pęcherza, cewki moczowej i pochwy (roztwory 0,005%), odkażania narzędzi chirurgicznych (roztwory 0,1%), odkażania rąk (roztwory 1%), a także jako środek antyseptyczny i konserwujący dodawany jest do wielu preparatów i leków, w tym leków okulistycznych (przede wszystkim kropli do oczu). Wchodzi również w skład preparatów złożonych działających dezynfekująco w obrębie jamy ustnej i gardła. Wraz ze zwiększeniem stężenia chlorku benzalkoniowego rośnie siła jego działania bakteriobójczego. Niskie stężenie (0,1%) wykazuje słabsze działanie na bakterie niż 70% roztwór alkoholu etylowego. Chlorek benzalkoniowy hamuje działanie bakterii Gram dodatnich, w większych stężeniach działa bakteriobójczo również na bakterie Gram ujemne, wirusy oraz bakterie kwasoodporne. Niszczy także niektóre gatunki grzybów w tym *Candida species* i *Saccharomyces cerevisiae* (działanie grzybobójcze), *Aspergillus ochraceus* (działanie fungicystyczne) i pierwotniaków, nie działa jednak na formy przetrwalnikowe. Jego działanie polega na dezintegracji procesów metabolicznych komórki bakteryjnej, które w końcowym efekcie powodują jej śmierć. Oprócz wykorzystania jako konserwanty chlorek, bromek i sacharynian benzalkoniowy są dopuszczone do stosowania w kosmetykach spłukiwalnych do włosów jako składniki o działaniu kondycjonującym i antystatycznym w maksymalnym stężeniu 3%.

Z polskiego opisu patentowego PL207844 znana jest aktywność biobójcza L-mleczanu, D-mleczanu i D,L-mleczanu benzalkoniowego wobec następujących szczepów bakterii: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Moraxella catarhalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i grzybów *Candidia albicans*, *Rhodotorula rubra*. Z publikacji (J. Pernak, M. Śmiglak, S. T. Griffin, W. L. Hough, T. B. Wilson, A. Pernak, J. Zabielska-Matejuk, A. Fojutowski, K. Kita, R. D. Rogers, *Green Chem.*, 8 (2006) 798–806) znane jest działanie biobójcze soli zawierających kation benzalkoniowy połączony z takimi anionami jak azotanowy(III), azotanowy(V), tetrafluoroboranowy wobec szczepów bakterii *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* i grzyba *Candidia albicans*. Znane jest hamowanie wzrostu i aktywność biobójcza sacharynianu oraz acesulfamu benzalkoniowego (W. L. Hough-Troutman, M. Śmiglak, S. Griffin, W. M. Reichert, I. Mirska, J. Jodynis-Liebert, T. Adamska, J. Nawrot, M. Stasiewicz, R. D. Rogers, J. Pernak, *New J. Chem.*, 33 (2009) 26–33) wobec bakterii *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (*MRSA*), *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mutans* i grzybów *Candidia albicans*, *Rhodotorula rubra*.

Z europejskiego zgłoszenia EP0818207 A2 znane jest działanie antybakteryjne wobec *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus epidermidis* mieszaniny chlorku benzalkoniowego i L-argininy. Wykazano, że oba te związki wykazują synergizm działania przeciwbakteryjnego i takie połączenie wykazuje silniejszy efekt w porównaniu do zastosowania tych związków osobno. Z opisu wynalazku JPH07133492 znana jest trójskładnikowa kompozycja myjąca o właściwościach bakteriobójczych, zawierająca m.in. sól benzalkoniową, w której preferowanym anionem jest chlorowiec lub reszta estru alkilowego kwasu fosforowego, np. heksadecylofosforan benzalkoniowy. Ponadto anion może stanowić reszta estru alkilowego kwasu fosfonowego, reszta estru alkilowego kwasu sulfonowego, estru alkilowego kwasu siarkowego. Znany jest z JP2000191521A materiał bakteriobójczy w postaci tkaniny bazowej – włókniny, zwilżonej płynem o działaniu bakteriobójczym. Płyn użyty do zwilżenia tkaniny składał się z czwartorzędowej soli amoniowej, w tym chlorku benzalkoniowego i surfaktantu typu aminokwasowego – 5-okso-DL-prolinianu estru etylowego N-kokoilo-L-argininy. Ponadto z opisu wynalazku JP2004002229A znana jest metoda sterylizacji, w której przetrwalniki bakteryjne poddaje się działaniu substancji stymulującej rozwój, a następnie poddaje się działaniu substancji bakteriobójczej. Jako substancję stymulującą rozwój stosuje się aminokwas (L-alaninę, L-asparaginę, L-tyrozynę, L-prolinę lub L-lizynę), cukry, jony metali alkalicznych lub adenozynę, natomiast jako środek bakteriobójczy stosuje się chlorek benzalkoniowy, chlorowodorek heksametylenobiguanidyny, podchloryn sodu, alkohol itp.

Substancje o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym, według wynalazku, w postaci soli benzalkoniowych aminokwasów, charakteryzują się tym, że mają postać soli o Wzorze 1, gdzie anion $RCOO^-$ pochodzi od L-aminokwasu, który stanowi L-walina, L-leucyna, L-izoleucyna, L-treonina, L-histydyna, L-metionina, L-tryptofan, L-tyrozyna lub L-prolina, a kation jest kationem benzalkoniowym, w którym n wynosi od 8 do 18. Korzystnie, gdy n wynosi 12 i 14, wtedy kation benzalkoniowy jest mieszaniną w proporcji 40:60 (%) kationu benzylododecylodimetyloamoniowego i benzylotetradecylodimetyloamoniowego.

Sposób wytwarzania substancji o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym, według wynalazku, w postaci soli benzalkoniowych aminokwasu, charakteryzuje się tym, że prowadzi się reakcję aminokwasu z wodorotlenkiem benzalkoniowym w środowisku wodnym przy ich równomolowym stosunku, w temperaturze 25°C–60°C, w czasie od 6 do 24 godzin. Jako L-aminokwas stosuje się L-walinę, L-leucynę, L-izoleucynę, L-treoninę, L-histydynę, L-metioninę, L-tryptofan, L-tyrozynę lub L-prolinę. Korzystnie stosuje się wodorotlenek benzalkoniowy otrzymywany z chlorku benzalkoniowego na drodze wymiany jonowej z użyciem żywicy jonowymiennej. Korzystnie po zakończeniu reakcji usuwa się wodę, następnie produkt suszy się w suszarce próżniowej.

Benzalkoniowe sole L-aminokwasów, zawierające kation benzalkoniowy oraz anion L-aminokwasowy, wykazują właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne. Cechę tą sprawdzono określając aktywność biologiczną roztworów wodnych, którymi działano na wybrane szczepy bakterii, które w naturalnych warunkach zasiedlają skórę i/lub przewód pokarmowy człowieka. Benzalkoniowe sole L-aminokwasów hamują wzrost i zabijają testowane izolaty bakterii, jednak ich skuteczność zależy przede wszystkim od użytego stężenia związku i od odporności poszczególnych szczepów bakterii. Sole benzalkoniowe L-aminokwasów, będące przedmiotem wynalazku mogą być zastosowane jako konserwanty w kosmetykach oraz środki o działaniu bakteriobójczym w dezodorantach. W zależności od aminokwasowego anionu związki te mogą wykazywać w kosmetykach także działanie antystatyczne i kondycjonujące na włosy i skórę oraz maskujące.

Wynalazek jest przedstawiony bliżej w poniższych przykładach wykonania, przy czym Przykłady I–IX pokazują wytwarzanie soli, natomiast Przykład X ilustruje właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne soli. Sole benzalkoniowe L-aminokwasów oznaczone skrótem [BA] [AA], gdzie [BA] oznacza kation benzalkoniowy, natomiast [AA] odpowiedni anion aminokwasowy, wykazujące właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne. Anion aminokwasowy [AA] wskazany na Wzorze 2 jest anionem optycznie czystego izomeru L-aminokwasu i stanowi go anion L-waliny [Val], L-leucyny [Leu], L-izoleucyny [Ile], L-treoniny [Thr], L-histydyny [His], L-metioniny [Met], L-tryptofanu [Trp] lub L-tyrozyny [Tyr] lub L-proliny [Pro].

P r z y k ł a d I

W kolbie o pojemności 250 ml, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne, umieszczono 17,2 mmola (2,02 g) L-waliny. Następnie dodano 156,36 ml wodorotlenku benzalkoniowego o stężeniu 0,11 mol/dm^3. Całość mieszano w temperaturze 25°C przez 12 h. Po tym czasie roztwór zatężono na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie produkt suszono pod próżnią w podwyższonej temperaturze (60°C/4 hPa). Otrzymano L-walinian benzalkoniowy z wydajnością 95% (7,62 g) w postaci bezbarwnej cieczy.

L-walinian benzalkoniowy ([BA][Val]):

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ, ppm: 0,64 (d, 3H, J = 6,8 Hz, CH_3-Val); 0,75 (d, 3H, J = 6,9 Hz, CH_3-Val); 0,92 (t, 3H, CH_3-kation); 1,32-1,37 (m, 20H, -CH_2-kation); 1,81 (br, 2H, -CH_2- kation); 1,84-1,90 (m, 1H, -CH-Val); 3,10 (s, 6H, CH_3-kation); 3,02-3,05 (m, 2H, -CH_2-kation); 4,51 (s, 2H, -CH_2-kation); 7,53 (t, 5H, C_6H_5-kation); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ, ppm: 14,43 (CH_3-kation); 17,51 (CH_3-Val); 21,07 (CH_3-Val); 22,28 (-CH_2-kation); 22,58 (-CH_2-kation); 26,34 (-CH_2-kation); 29,01 (-CH_2-kation); 29,19 (-CH_2-kation); 29,28 (-CH_2-kation); 29,41 (-CH_2-kation); 29,49 (-CH_2-kation); 28,41 (-CH_2-kation); 29,49 (-CH_2-kation); 31,77 (-CH-Val); 31,95 (-CH_2-kation); 49,48 (CH_3-kation); 61,86 (-CH_2-kation); 63,86 (-CH-Val); 66,55 (-CH_2-kation); 128,24 (-CH(Ar)-kation); 128,78 (-CH(Ar)-kation); 129,32 (-CH(Ar)-kation); 130,65 (-C(Ar)-kation); 133,46 (-CH(Ar)-kation); 176,33 (-COO^- Val);

FT-IR: ν_{max} (cienki film): 3000–3600 (szeroki), 2924, 2854, 1583, 1508, 1457, 1396, 1329, 728, 703 cm^{-1};

UV-VIS (w H_2O): widoczne maksimum absorpcji przy 288 nm;

Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{20}$ = +2,69.

Przykład II

Do naczynia reakcyjnego wprowadzono 15,6 mmola (2,05 g) L-leucyny i 141,82 ml wodorotlenku benzalkoniowego o stężeniu 0,11 mol/dm^3. Całość mieszano w temperaturze 25°C przez 24 h. Po tym czasie roztwór zatężano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie produkt suszono pod próżnią w podwyższonej temperaturze (60°C/4 hPa). Otrzymano L-leucynian benzalkoniowy z wydajnością 93% (6,97 g) w postaci bezbarwnej cieczy.

L-leucynian benzalkoniowy ([BA][Leu]):

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ, ppm: 0,87 (d, 1H, CH_3-Leu); 0,92 (t, 3H, CH_3-kation); 1,32-1,37 (m, 20H, -CH_2-kation); 1,34-1,40 (m, 1H, -CH(H) Leu); 1,45-1,53 (m, 1H, -CH(H) Leu); 1,81 (br, 2H, -CH_2-kation); 3,10 (s, 6H, CH_3-kation); 3,028-3,058 (m, 2H, -CH_2-kation); 3,02-3,05 (m, 2H, -CH_2-kation); 3,26-3,29 (dd, H, -CH-Leu); 4,51 (s, 2H, -CH_2-kation); 7,53 (t, 5H, C_6H_5-kation); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ, ppm: 14,43 (CH_3-kation); 22,28 (-CH_2-kation); 22,37 (CH_3-Leu); 22,57 (-CH_2-kation); 24,21 (CH_3-Leu); 25,13 (-CH-Leu); 26,34 (-CH_2-kation); 29,01 (-CH_2-kation); 29,19 (-CH_2-kation); 29,28 (-CH_2-kation); 29,41 (-CH_2-kation); 29,49 (-CH_2-kation); 31,77 (-CH_2-kation); 45,67 (-CH_2-Leu); 46,35 (CH_3-kation); 49,50 (CH_3-kation); 55,02 (-CH-Leu); 63,86 (-CH_2-kation); 66,57 (-CH_2-kation); 128,30 (-CH(Ar)-kation); 128,76 (-CH(Ar)-kation); 129,32 (-CH(Ar)-kation); 130,66 (-C(Ar)-kation); 133,46 (-CH(Ar)-kation); 178,08 (COO^- Leu);

FT-IR: ν_{max} (cienki film) 3000–3600 (szeroki), 2924, 2854, 1578, 1467, 1396, 728, 704 cm^{-1};

UV-VIS (w H_2O): widoczne maksimum absorpcji przy 290 nm;

Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{20}$ = +1,47.

Przykład III

Do kolby reakcyjnej zaopatrzonej w mieszadło wprowadzono 15,4 mmola (2,02 g) L-izoleucyny i 194,57 ml wodorotlenku benzalkoniowego o stężeniu około 0,079 mol/dm^3. Całość mieszano i ogrzewano w temperaturze 25°C przez 24 godziny. Roztwór zatężono na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie produkt suszono pod próżnią w podwyższonej temperaturze (60°C/4 hPa). Otrzymano L-izoleucynian benzalkoniowy z wydajnością 94% (6,94 g), w postaci bezbarwnej cieczy.

L-izoleucynian benzalkoniowy ([BA][Ile]):

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ, ppm: 0,74-0,80 (t, ov, 6H, CH_3-Ile); 0,85 (t, 3H, CH_3-kation); 1,01-1,05 (m, 1H, -CH_2-Ile); 1,21-1,31 (m, 20H, -CH_2-kation); 1,33-1,41 (m, ov, 1H, -CH_2-Ile); 1,72-1,80 (m, 1H, -CH-Ile); 2,07 (br, 2H, -CH_2-kation); 2,69 (d, 1H, -CH-Ile); 2,98 (s, 6H, CH_3-kation); 3,26-3,31 (m, 2H, -CH_2-kation); 4,62 (s, 2H, -CH_2-kation); 7,51 (t, 3H, C_6H_5-kation); 7,58 (d, 2H, C_6H_5-kation); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ, ppm: 12,64 (CH_3-Ile); 14,42 (CH_3-kation); 17,24 (-CH_2-Ile); 22,30 (-CH_2-kation); 22,58 (-CH_2-kation); 24,32 (-CH_2-kation); 25,46 (-CH_2-kation); 26,36 (-CH_2-kation); 29,03 (-CH_2-kation); 29,20 (-CH_2-kation); 29,30 (-CH_2-kation); 29,42 (-CH_2-kation); 29,50 (-CH_2-kation); 31,78 (-CH_2-kation); 45,67 (-CH-Ile); 49,42 (CH_3-kation); 61,56 (-CH_2-kation); 66,46 (-CH_2-kation); 128,28 (-CH(Ar)-kation); 128,88 (-CH(Ar)-kation); 129,26 (-CH(Ar)-kation); 130,59 (-C(Ar)-kation); 133,50 (-CH(Ar)-kation); 176,62 (-COO^- Ile);

FT-IR: ν_{max} (cienki film) 3000–3600 (szeroki), 2957, 2924, 2854, 1572, 1458, 1396, 728, 704 cm^{-1};

UV-VIS: widoczne maksimum absorpcji przy 290 nm;

Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{20}$ = +2,54.

Przykład IV

Do szklanego reaktora umieszczonego w łaźni olejowej ogrzanej do temperatury 25°C, zaopatrzonego w mieszadło magnetyczne wprowadzono 17,6 mmola (2,10 g) L-treoniny i 222,76 ml wodorotlenku benzalkoniowego o stężeniu około 0,079 mol/dm^3. Roztwór mieszano w temperaturze 60°C przez 6 godzin, następnie zatężano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono pod próżnią w temperaturze 60°C (4 hPa), Otrzymano sól L-treoninian benzalkoniowy z wydajnością 98% (8,08 g), w postaci bezbarwnej cieczy. L-treoninian benzalkoniowy ([BA][Thr]):

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ, ppm: 0,97 (t, 3H, CH_3-kation); 1,26 (d, 3H, CH_3-Thr); 1,32-1,37 (m, 20H, -CH_2-kation); 1,81 (m, 2H, -CH_2-kation); 3,02-3,06 (m, 2H, -CH_2-kation); 3,09 (s, 6H, CH_3-kation); 3,15 (d, H, -CH-Thr); 4,50 (s, 2H, -CH_2-kation); 7,49 (t, 5H, C_6H_5-kation); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ, ppm: 14,44 (CH_3-kation); 19,27 (CH_3-Thr); 22,26 (-CH_2-kation); 22,57 (-CH_2-kation); 26,32 (-CH_2-kation); 28,99 (-CH_2-kation); 29,19 (-CH_2-kation); 29,26 (-CH_2-kation); 29,41 (-CH_2-kation); 29,49 (-CH_2-kation); 31,17 (-CH_2-kation); 49,57 (CH_3-kation); 59,05 (-CH_2-kation); 63,91 (-CH-Thr); 66,60 (-CH_2-kation); 68,60 (-CH-Thr); 128,69 (-CH(Ar)-kation); 129,36 (-CH(Ar)-kation); 130,70 (-C(Ar)-kation); 133,41 (-CH(Ar)-kation); 175,76 (-COO^- Thr);

FT-IR: ν_{max} (cienki film) 3100–3600 (szeroki), 2924, 2854, 1575, 1457, 1414, 704 cm^{-1};

UV-VIS (w H_2O): widoczne maksimum absorpcji przy 290 nm;

Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{20}$ = -2,57.

P r z y k ł a d V

Do naczynia reakcyjnego wprowadzono 21,8 mmola (3,38 g) L-histydyny i 275,27 ml wodorotlenku benzalkoniowego o stężeniu około 0,079 mol/dm^3. Reakcję prowadzono w temperaturze 40°C przez 12 godzin od momentu dodania wodorotlenku benzalkoniowego. Po tym czasie roztwór zatężano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia wody. Następnie otrzymany produkt suszono pod próżnią w podwyższonej temperaturze (60°C/4 hPa). Otrzymano sól benzalkoniową L-histydyny z wydajnością 92% (10,09 g). Miała ona postać żółtej cieczy.

L-histydynian benzalkoniowy ([BA][His]):

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ, ppm: 0,97 (t, 3H, CH_3-kation); 1,32-1,37 (m, 20H, -CH_2-kation); 1,81 (m, 2H, -CH_2-kation); 2,85 (dd, 1H, CH(H)-His); 3,00 (dd, 1H, CH(H)-His); 3,02-3,08 (m, 2H, -CH_2-kation); 3,55 (t, 1H, -CH-His); 4,49 (s, 2H, -CH_2-kation); 6,96 (s, 1H, CH(Ar)-His); 7,50 (t, 5H, C_6H_5-kation); 7,70 (s, 1H, -CH(Ar)-His); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ, ppm: 15,97 (CH_3-kation); 18,84 (CH_2-kation); 24,11 (-CH_2-kation); 24,68 (-CH_2-kation); 27,90 (-CH_2-kation); 30,77 (-CH_2-kation); 31,45 (-CH_2-kation); 31,51 (-CH_2-kation); 31,73 (-CH_2-kation); 31,94 (-CH_2-kation); 33,91 (-CH_2-kation); 33,97 (-CH_2-His); 52,50 (CH_3-kation); 58,10 (-CH-His); 59,44 (-CH_2-kation); 64,29 (-CH-His); 68,93 (-CH_2-kation); 120,13 (-CH(Ar)-His); 129,64 (-CH(Ar)-kation); 131,07 (-CH(Ar)-kation); 132,45 (-C(Ar)-kation); 134,76 (-CH(Ar)-His); 135,29 (-CH(Ar)-kation); 137,76 (-CH(Ar)-His); 183,86 (-COO^- His);

FT-IR: ν_{max} (cienki film) 3000–3600 (szeroki), 2925, 2854, 1574, 1464, 1407, 1342, 624 cm^{-1};

UV-VIS (w H_2O): widoczne maksimum absorpcji przy 293 nm; $[\alpha]_D^{20}$ = -3,89.

P r z y k ł a d VI

W kolbie o pojemności 250 ml umieszczono 17,2 mmola (2,56 g) L-metioniny i 156,36 ml wodorotlenku benzalkoniowego o stężeniu 0,11 mol/dm^3. Całość mieszano i ogrzewano do temperatury 25°C na łaźni olejowej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne. Reakcję prowadzono 24 godziny od momentu dodania wodorotlenku benzalkoniowego. Po tym czasie roztwór zatężano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono pod próżnią w podwyższonej temperaturze (60°C/4 hPa). Otrzymano sól benzalkoniową L-metioniny z wydajnością 96% (8,20 g). Miała ona postać bezbarwnej cieczy.

L-metioninian benzalkoniowy ([BA][Met]):

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ, ppm: 1,04 (t, 3H, CH_3-kation); 1,32-1,37 (m, 20H, -CH_2-kation); 1,39-1,52 (m, 1H, -CH(H)-Met); 1,64-1,73 (m, 1H, -CH(H)-Met); 1,94-2,03 (br, 2H, -CH_2-kation); 2,18 (s, 3H, CH_3-Met); 2,65 (t, ov, 2H, -CH_2-Met); 3,06 (dt, 1H, -CH-Met); 3,15 (s, 6H, CH_3-kation); 3,43-3,47 (m, 2H, -CH_2-kation); 4,76 (s, 2H, -CH_2-kation); 7,71 (t, 3H, C_6H_5-kation); 7,76 (d, 2H, C_6H_5-kation);

FT-IR: V_{max} (cienki film) 3100–3600 (szeroki), 2924, 2853, 1574, 1406, 1456, 728, 703 cm^{-1};

UV-VIS (w H_2O): widoczne maksimum absorpcji przy 290 nm; $[\alpha]_D^{20}$ = +2,01.

P r z y k ł a d VII

Do szklanego reaktora umieszczonego w łaźni ogrzanej do temperatury 35°C, zaopatrzonego w mieszadło magnetyczne, wprowadzono 9,8 mmola (2,00 g) L-tryptofanu i 89,09 ml wodnego roztworu wodorotlenku benzalkoniowego (0,11 mol/dm^3). Reakcję prowadzono 24 godziny. Po tym czasie z roztworu usunięto wodę na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt suszono pod próżnią w podwyższonej temperaturze (60°C/4 hPa). Otrzymano sól benzalkoniową L-tryptofanu z wydajnością 91% (4,93 g). Miała ona postać brązowego wosku.

L-tryptofanian benzalkoniowy ([BA][Trp]):

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ, ppm: 0,69 (t, 3H, CH_3-kation); 1,04-1,07 (m, 20H, -CH_2-kation); 1,15-1,26 (br, 2H, -CH_2-kation); 1,04 (d, 1H, -CH(H)-Trp); 2,05 (d, 1H, CH(H)-Trp); 2,36 (s, 6H, CH_3-kation); 2,55-2,59 (m, 2H, -CH_2-kation); 2,57-2,59 (m, 2H, -CH_2-kation); 3,56 (s, 2H, -CH_2-kation); 6,70 (t, 1H, -CH(Ar)-Trp); 6,76 (t, 1H, -CH(Ar)-Trp); 6,85 (d, 2H, -CH(Ar)-Trp); 7,03 (s, 1H, -CH(Ar)-Trp); 7,06 (t, 3H, C_6H_5-kation); 7,25 (d, 2H, C_6H_5-kation); 11,08 (s, 1H, NH(Ar)-Trp) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ, ppm: 14,13 (CH_3-kation); 21,68 (-CH_2-kation); 22,91 (-CH_2-kation); 25,62 (-CH_2-Trp); 28,77 (-CH_2-kation); 29,54 (-CH_2-kation); 29,70 (-CH_2-kation); 29,97 (-CH_2-kation); 30,06 (-CH_2-kation); 30,15 (-CH_2-kation); 30,23 (-CH_2-kation); 30,75 (-CH_2-kation); 32,22 (-CH_2-kation); 50,05 (CH_3-kation); 56,45 (-CH-Trp); 61,46 (-CH_2-kation); 65,70 (-CH_2-kation); 111,15 (-CH(Ar)-Trp); 111,44 (-CH(Ar)-Trp); 118,44 (-CH(Ar)-Trp); 120,51 (-CH(Ar)-Trp); 124,24 (-CH(Ar)-Trp); 127,04 (-CH(Ar)-Trp); 127,83 (-C(Ar)-Trp); 128,75 (-CH(Ar)-kation); 130,18 (-CH(Ar)-kation); 132,27 (-CH(Ar)-kation); 135,96 (-C(Ar)-Trp); 181,20 (-COO^- Trp);

FT-IR: ν_{max} (cienki film) 3100–3600 (szeroki), 2924, 2854,1575, 1457, 1404, 1355, 741, 703 cm^{-1};

UV-VIS (w H_2O): widoczne maksimum absorpcji przy 303 nm; $[\alpha]_D^{20}$ = -2,54.

Przykład VIII

Do naczynia reakcyjnego wprowadzono 11,1 mmola (2,01 g) L-tyrozyny i 100,91 ml wodnego roztworu wodorotlenku benzalkoniowego o stężeniu 0,11 mol/dm^3. Całość mieszano w temperaturze 50°C przez 24 godziny. Po tym czasie roztwór zatężono na wyparce rotacyjnej, pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie produkt suszono pod próżnią w podwyższonej temperaturze (60°C/4 hPa). Otrzymano sól benzalkoniową L-tyrozyny z wydajnością 95% (5,58 g). Miała ona postać brązowego wosku.

L-tyrozynian benzalkoniowy ([BA][Tyr]):

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ, ppm: 0,95 (t, 3H, CH_3-kation); 1,14-1,21 (m, 8H, -CH_2-kation); 1,32-1,35 (m, 12H, -CH_2-kation); 1,60 (2H, -CH_2-kation); 2,61-2,67 (dd, 2H, -CH_2-Tyr); 2,83 (2H, -CH_2-kation); 2,89 (s, 6H, CH_3-kation); 3,45 (t, 1H, -CH-Tyr); 4,28 (s, 2H, -CH_2-kation); 6,71 (d, 2H, -CH(Ar)-Tyr); 6,99 (d, 2H, -CH(Ar)-Tyr); 7,37 (5H, C_6H_5-kation); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ, ppm: 14,43 (CH_3-kation); 22,28 (-CH_2-kation); 22,57 (-CH_2-kation); 26,34 (-CH_2-kation); 29,01 (-CH_2-kation); 29,19 (-CH_2-kation); 29,28 (-CH_2-kation); 29,41 (-CH_2-kation); 29,49 (-CH_2-kation); 31,77 (-CH_2-kation); 42,52 (-CH_2-Tyr); 46,35 (CH_3-kation); 49,50 (CH_3-kation); 58,79 (-CH-Tyr), 63,86 (-CH_2-kation); 66,57 (-CH_2-kation); 115,96 (-CH(Ar)-Tyr); 128,30 (-CH(Ar)-kation); 128,76 (-CH(Ar)-kation); 129,32 (-CH(Ar)-kation); 130,12 (-CH(Ar)-Tyr); 130,66 (-C(Ar)-kation); 133,46 (-CH(Ar)-kation); 176,77 (-COO^- Tyr);

FT-IR: ν_{max} (cienki film) 3100–3600 (szeroki), 2925, 2854, 1579, 1514, 1458, 1378, 1251, 729, 704 cm^{-1};

UV-VIS (w H_2O): widoczne maksimum absorpcji przy 293 nm; $[\alpha]_D^{20}$ = -8,44.

Przykład IX

Do reaktora szklanego wyposażonego w dipol magnetyczny wprowadzono 17,4 mmola (2,0 g) L-proliny i 220,25 ml wodorotlenku benzalkoniowego o stężeniu ok. 0,079 mol/dm^3. Reakcję prowadzono w temperaturze 25°C przez 24 godziny. Po tym czasie roztwór zatężono na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie produkt suszono pod próżnią w podwyższonej temperaturze (60°C/4 hPa). Otrzymano sól benzalkoniową L-proliny w wydajnością 93% (7,43 g). Miała ona postać bezbarwnej cieczy.

L-prolinian benzalkoniowy ([BA][Pro]):

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ, ppm: 0,92 (t, 3H, CH_3-kation); 1,20-1,38 (m, 20H, -CH_2-kation); 1,75 (2H, -CH_2-kation); 2,03-2,08 (m, 2H, -CH(H)-Pro); 2,08-2,15 (m, 1H, -CH(H)-Pro); 2,80-2,86 (m, 1H, -CH(H)-Pro); 3,35-3,37 (m, 1H, -CH(H)-Pro); 2,96 (2H, -CH_2-kation); 3,03 (s, 6H, CH_3-kation); 3,28-3,30 (m, 1H, -CH(H)-Pro); 3,58 (t, 1H, -CH(H)-Pro); 4,05 (t, 1H, -CH-Pro); 4,44 (s, 2H, -CH_2-kation); 7,44 (5H, C_6H_5-kation); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ, ppm: 14,43 (CH_3-kation); 22,28 (-CH_2-kation); 22,58 (-CH_2-kation); 25,12 (-CH_2-Pro); 26,34 (-CH_2-kation); 29,01 (-CH_2-kation); 29,19 (-CH_2-kation); 29,28 (-CH_2-kation); 29,41 (-CH_2-kation); 29,49 (-CH_2-kation); 28,41 (-CH_2-kation); 29,49 (-CH_2-kation); 30,04 (-CH_2-Pro); 31,95 (-CH_2-kation); 45,97 (-CH_2-Pro); 49,48 (CH_3-kation); 61,49 (-CH-Pro); 61,86 (-CH_2-kation); 66,55 (-CH_2-kation); 128,24 (-CH(Ar)-kation); 128,78 (-CH(Ar)-kation); 129,32 (-CH(Ar)-kation); 130,65 (-C(Ar)-kation); 133,46 (-CH(Ar)-kation); 182,26 (-COO^- Pro);

FT-IR: ν_{max} (cienki film) 3100–3600 (szeroki), 2924, 2854, 1582, 1455, 1417, 728, 704 cm-1;

UV-VIS: widoczne maksimum absorpcji przy 266 nm; $[\alpha]_D^{20}$ = -15,12.

Przykład X

Działanie przeciwdrobnoustrojowe soli benzalkoniowych L-aminokwasów potwierdzono w badaniach mikrobiologicznych wykonanych metodą określania najmniejszego stężenia hamującego wzrost bakterii na podłożu mikrobiologicznym (MIC – *minimum inhibitory concentration*, minimalne stężenie hamujące wzrost (mg · dm^{-3})) oraz metodą określania najmniejszego stężenia bakteriobójczego dla bakterii (MBC – *minimal bactericidal concentration*, minimalne stężenie bakteriobójcze (mg · dm^{-3})) po 24 godzinach inkubacji na specjalistycznych dobranych podłożach mikrobiologicznych. Skuteczność soli benzalkoniowych aminokwasów porównano do handlowego chlorku benzalkoniowego. Aktywność soli benzalkoniowych aminokwasów oceniano w stosunku do następujących szczepów bakterii: *Staphylococus aureus* szczep LN854556.1; *Staphylococus epidermidis* PCM2118 (symbol numeru kolekcji w PCM); *Pseudomonas aeruginosa* szczep KT737494.1; *Escherichia coli* PCM2560 (symbol numeru kolekcji w PCM); *Raoultella ornithinolytica* AB364958.1. Wartości MIC i MBC oznaczono metodą kolejnych rozcieńczeń. Wykorzystano następujące stężenia: 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80; 85; 90; 95; 100 mg · dm^{-3}. W przypadku MIC, ustalano najmniejsze stężenie, które hamowało wzrost bakterii – w takim przypadku nie obserwowano wzrostu tj. zmętnienia

podłoża lub/i pierścienia z biomasy na powierzchni hodowli okresowej płynnej (co nie jest równoznaczne z nieobecnością żywych komórek w takiej hodowli). Ustalone wartości MIC zestawiono w tabeli 1. W przypadku wartości MBC, ustalano najmniejsze stężenie związków, przy którym bakterie giną – brak kolonii bakteryjnych lub pojedyncze na specjalistycznych podłożach stałych. Ustalone wartości MBC zestawiono w tabeli 2. Wartości MIC i MBC mogą, ale nie muszą być takie same, w przypadku tej samej wartości MIC i MBC należy wynik interpretować tak, że bakterie są odporne na związek do czasu przekroczenia granicznej dawki, przy której mechanizmy obronne już nie działają – np. uszkodzony kluczowy enzym. Jednak na ogół wartości MIC i MBC różnią się, ponieważ mikroorganizmy wykazują zróżnicowaną odporność na ksenobiotyki nawet wewnątrz własnej populacji, dodatkowo działają mechanizmy szybkiej naprawy uszkodzonych struktur komórkowych (spowolnienie wzrostu) i zdolność do anabiozy – okresu przeżycia niekorzystnych warunków i uaktywnienia po ich ustąpieniu, dlatego zahamowanie wzrostu bakterii nie jest równoznaczne z ich całkowitą eliminacją.

Tabela 1

Rodzaj związku	Szczep testowy				
	Staphylococus aureus LN854556.1	*Staphylococus epidermidis* PCM2118	*Pseudomonas aeruginosa* KT737494.1	*Escherichia coli* PCM2560	*Raoultella ornithinolytica* AB364958.1
[BA][Val]	1	1	2,5	20	15
[BA][Leu]	1	1	2,5	15	10
[BA][Ile]	0,5	1	5	20	15
[BA][Thr]	1	1	5	25	15
[BA][His]	1	1	5	25	15
[BA][Met]	1	1	0,5	20	15
[BA][Trp]	1	1	5	25	15
[BA][Tyr]	0,5	2,5	0,5	25	15
[BA][Pro]	0,5	2,5	5	25	15
[BA][Cl]*	0,5	0,5	0,5	15	7,5

* wzorzec, handlowy chlorek benzalkoniowy

Tabela 2

Rodzaj związku	Szczep testowy				
	Staphylococus aureus LN854556.1	*Staphylococus epidermidis* PCM2118	*Pseudomonas aeruginosa* KT737494.1	*Escherichia coli* PCM2560	*Raoultella ornithinolytica* AB364958.1
[BA][Val]	7,5	7,5	5	20	20
[BA][Leu]	7,5	5	5	20	30
[BA][Ile]	5	10	15	25	20
[BA][Thr]	7,5	10	10	30	35
[BA][His]	10	10	10	25	80
[BA][Met]	10	7,5	2,5	30	40
[BA][Trp]	7,5	7,5	7,5	30	75
[BA][Tyr]	5	10	2,5	30	40
[BA][Pro]	5	10	10	30	20
[BA][Cl]*	5	2,5	1	15	10

* wzorzec, handlowy chlorek benzalkoniowy

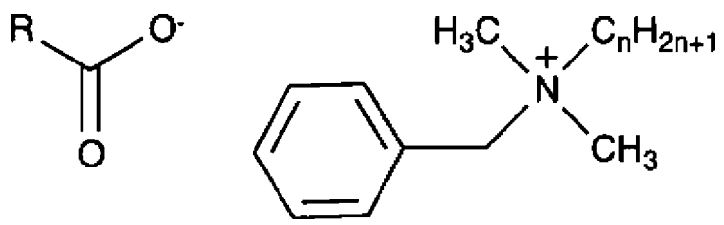
Związki będące przedmiotem wynalazku skutecznie zahamowały wzrost bakterii Gram – dodatnich z rodzaju *Staphylococus*, w mniejszym stopniu bakterii Gram – ujemnych, reprezentowanych przez bakterie z rodzaju *Escherichia* i *Raoultella*. Można stwierdzić, że chlorek benzalkoniowy silniej oddziałuje na bakterie, niż eksperymentalne sole L-aminokwasów, chociaż w pojedynczych przypadkach zanotowano takie samo działanie hamujące i bakteriobójcze zarówno chlorku, jak i soli. Przykładowo, sole [BA][Tyr], [BA][Pro] i [BA][Ile] w stosunku do *Staphylococus aureus* oddziaływały tak samo silnie jak chlorek. Jednak w większości przypadków oddziaływanie soli L-aminokwasów było od 2 do 10 razy

słabsze w porównaniu do chlorku benzalkoniowego. Nie można wskazać, który testowany związek oddziaływał najsilniej na wszystkie bakterie, efekt oddziaływania poszczególnych związków był zróżnicowany w zależności od badanego szczepu. Na bakterie z gatunku *S. aureus* najsilniej oddziaływały [BA][Tyr], [BA][Pro], [BA][Ile], ale z kolei na *S. epidermidis* te same sole wpływały najsłabiej. Szczep KT737494.1 należący do gatunku *Pseudomonas aeruginosa* był bardziej odporny na testowane związki, niż bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, a mniej odporny niż *Escherichia coli* i *Raoultella ornithinolytica*. Jedynie dwie sole L-aminokwasów, tj. [BA][Met] i [BA][Tyr] wpływały podobnie hamująco (MIC) na wzrost *P. aeruginosa*, jak modelowy chlorek, pozostałe związki oddziaływały słabiej od 5 do 10 razy. *Escherichia coli* okazała się szczepem najbardziej odpornym na testowane związki, jedynie [BA][Leu] podobnie silnie jak chlorek oddziaływał na te bakterie (MIC = 15 mg · dm^{-3}), pozostałe związki hamowały wzrost bakterii po zastosowaniu 20–25 mg · dm^{-3} soli. Jednak z drugiej strony należy zwrócić uwagę, że hamowanie wzrostu *E. coli* (wyrażone jako minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii MIC) i zabicie tej bakterii (wyrażone jako minimalne stężenie zabójcze dla bakterii MBC) następowało po użyciu zbliżonych lub takich samych dawek testowanych związków. W przypadku innych bakterii zawsze zabicie bakterii (MBC) następowało dopiero po użyciu stężenia związków kilka razy większego, niż, w przypadku hamowania ich wzrostu (MIC).

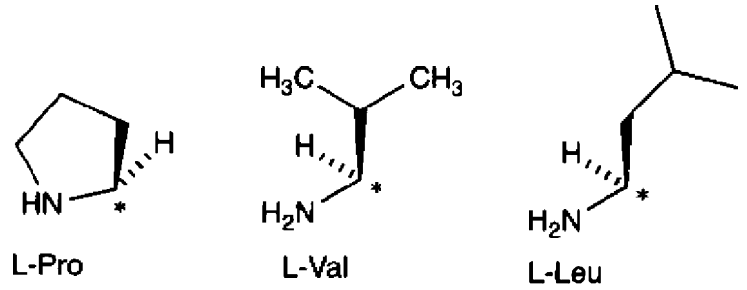
Zastrzeżenia patentowe

1. Substancje o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym w postaci soli benzalkoniowych aminokwasów, **znamienne tym**, że mają postać soli o Wzorze 1, gdzie anion $RCOO^-$ pochodzi od L-aminokwasu, który stanowi L-walina, L-leucyna, L-izoleucyna, L-treonina, L-histydyna, L-metionina, L-tryptofan, L-tyrozyna lub L-prolina, a kation jest kationem benzalkoniowym, w którym n wynosi od 8 do 18.
2. Substancje o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym według zastrz. 1, **znamienne tym**, że n wynosi 12 i 14.
3. Sposób wytwarzania substancji o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym w postaci soli benzalkoniowych aminokwasów, **znamienny tym**, że prowadzi się reakcję L-aminokwasu z wodorotlenkiem benzalkoniowym w środowisku wodnym przy ich równomolowym stosunku, w temperaturze 25°C–60°C, w czasie od 6 do 24 godzin, przy czym jako L-aminokwas stosuje się L-waliny, L-leucynę, L-izoleucynę, L-treoninę, L-histydynę, L-metioninę, L-tryptofan, L-tyrozynę lub L-prolina.
4. Sposób wytwarzania substancji o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym według zastrz. 3, **znamienny tym**, że stosuje się wodorotlenek benzalkoniowy będący produktem reakcji chlorku benzalkoniowego na drodze wymiany jonowej z użyciem żywicy jonowymiennej.
5. Sposób wytwarzania substancji o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym według zastrz. 3, **znamienny tym**, że po zakończeniu reakcji usuwa się wodę, następnie produkt suszy się w suszarce próżniowej.

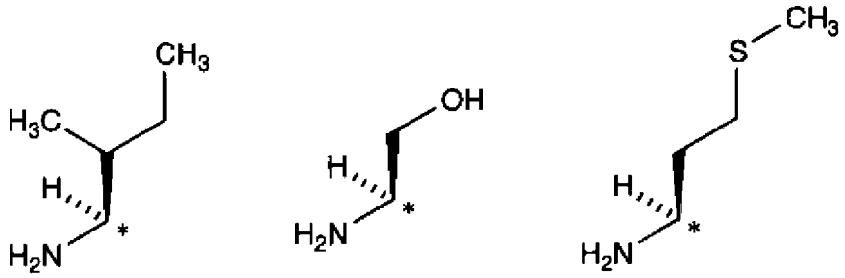
Rysunki



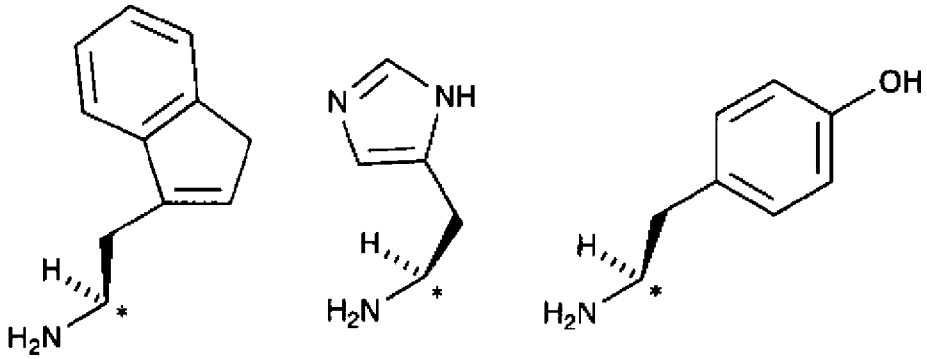
Wzór 1



L-Pro L-Val L-Leu



L-Ile L-Thr L-Met



L-Trp L-His L-Tyr

n=8-18

Wzór 2