



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 12.06.75 (P.181159)

Pierwszeństwo: 12.06.74 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 17.07.1976

Opis patentowy opublikowano: 31.10.1978

MKP A61k 7/00
A61l 23/00

Int. Cl.²
A61K 7/32
A61K 7/40

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Personal Products Company, Milltown, New Jersey (Stany Zjednoczone Ameryki)

Środek do hamowania procesu wytwarzania przez drobnoustroje niepożądanych kwasów tłuszczowych przeznaczony do stosowania na tkankę skórną

1

Przedmiotem wynalazku jest środek do hamowania procesu wytwarzania przez drobnoustroje niepożądanych kwasów tłuszczowych, przeznaczony do stosowania na tkankę skórną.

Jednym z problemów, od dłuższego czasu czekających na rozwiązanie, jest nieprzyjemny zapach wydzielin miesiączkowej. Wydzielin miesiączkowa zawiera różne substancje, takie jak białka i tłuszcze. Zwykle w wydzielinie miesiączkowej występuje wiele drobnoustrojów gram-ujemnych i gram-dodatnich, które mogą rozwijać się na wymienionych substancjach naturalnych. Działanie drobnoustrojów na białka powoduje wydzielanie cuchnących amin, zaś działanie na tłuszcze daje cuchnące kwasy tłuszczowe. Poważny problem stanowi także przykry zapach potu pachowego. Pot pachowy składa się z wydzielin zarówno potowych gruczołów ekrynowych jak i gruczołów potowych apokrynowych. Gruczoły te rozmieszczone są w okolicy pach. Podczas gdy pot ekrynowy składa się głównie z wody i soli, to pot apokrynowy składa się z różnych substancji, takich jak białko, węglowodany i tłuszcze. Na powierzchni skóry w okolicy pach występują liczne drobnoustroje, a wśród nich także drobnoustroje ze szczepów gronkowców i maczugowców. Rozkład tłuszczów w pocie apokrynowym wywołany przez drobnoustroje doprowadza do tworzenia się niższych kwasów tłuszczowych, więc stanowi główny powód nieprzyjemnego zapachu w okolicy pachy, (Borick

2

i współpracownicy, Antimicrobial Agents Annual — 1960, str. 647—651, Plenum Press, Inc., Nowy York).

Innym problemem, pozornie nie związanym z poprzednimi, jest problem zapalenia skóry, takiego jak trądzik. Łój jest mieszaniną tłuszczów, wydzielaną przez gruczoły łojowe i zawierającą związki pochodne różnych kwasów tłuszczowych (Baughton i współpracownicy, J. Invest. Dermat. 33, 49—55, 1959). Wolne kwasy tłuszczowe, mające swe źródło w tłuszczach odpowiadają w pierwszym rzędzie za wywołane zapalenia skóry, znanego jako trądzik pospolity (Freinkel i współpracownicy New Eng. J. Med. 273, 850—854, 1965). Drobnoustroje, zwłaszcza maczugowiec trądzika, drobnoustroj obecny zarówno w normalnym, jak i chorym gruczole, odpowiadają za wytwarzanie kwasów tłuszczowych (Scheimann i współpracownicy J. Invest. Dermat. 34, 171—174, 1960).

Środki bakteriobójcze i antybiotyki stosuje się w celu zahamowania nieprzyjemnych zapachów takich wydzielin ciała, jak pot i wydzielin miesiączkowa, oraz w celu zmniejszenia przykrych zaburzeń, takich jak trądzik. Dotąd stosowano 2,2'-metylenodwu/3,4,6-trójchlorofenol/ jako popularny składnik środków do ograniczenia zapachu potu oraz antybiotyki, takie jak tetracykliny do zwalczania trądzika. Obydwa środki stosuje się równocześnie. Jednak w obydwu przypadkach występuje pewna komplikacja, ponieważ środki bakte-

riobójcze i antybiotyki zabijają drobnoustroje i tym samym zakłócają równowagę mikrobiologiczną na powierzchni skóry. Dobrze znany jest fakt, że zniszczenie drobnoustrojów niechorobotwórczych wywołuje atak opornych organizmów, takich jak bakterie chorobotwórcze, drożdże i grzyby, które wywołują gorączkę, stan zapalny, zapalenie skóry i inne niepożądane objawy chorobowe. Tak więc, byłoby pożądane, aby można było ograniczać nieprzyjemny zapach ciała lub występowanie zaburzeń, takich jak trądzik, wywołanych działaniem drobnoustrojów na tłuszcze, bez znacznego wyniszczenia niechorobotwórczej flory bakteryjnej. Pożądane jest także, aby wyniki można było osiągać bez niepomyślnych skutków dla pacjentów.

Inne, znane środki, stosowane w celu ograniczenia niepożądanych zjawisk, zawierają substancje działające na czynniki wywołujące rozkład tłuszczów. W tym przypadku osiąga się jednak zwykle niezadowalające wyniki, które skłaniają do stosowania dość dużych ilości środka i/lub wydłużania okresu jego działania. Ponadto, nie zawsze uzyskuje się zadowalający efekt, zarówno pod względem kompleksowości hamowania niepożądanych zjawisk, jak i pod względem zapobiegania efektom ubocznym. Dlatego byłoby bardzo wskazane ograniczenie niepożądanych zjawisk przez zapobieganie powstawaniu czynników przyczynowych, wywołujących te zjawiska.

Stwierdzono, że wymienione powyżej zjawiska, jak również liczne inne niepożądane skutki, które można przypisać działaniu drobnoustrojów, można ograniczyć w podobny sposób, a ponadto, że ograniczenie to można uzyskać przy zupełnie nieznacznym wyniszczeniu flory bakteryjnej.

Tak więc wiele niepożądanych zjawisk, takich jak przykry zapach wydzieliny miesiączkowej, potu i przypadki zapalenia skóry, takie jak trądzik, wywołane tworzeniem się niepożądanych substancji na powierzchni ciała lub w jej okolicy w wyniku działania drobnoustrojów na substancje tłuszczowe, występujące w wydzielinach ciała, można zmniejszyć przez zahamowanie tych procesów, które następuje podczas stosowania w miejscu tworzenia się tych substancji pochodnych odpowiedniej ilości aminokwasów.

Określenie „substancje tłuszczowe, występujące w wydzielinach ciała”, oznacza tłuszcze, określone tak, jak rozumie się je w nazewnictwie chemicznym, obecne w płynach, które są wydzielane lub wydalane z ciała. Określenie „wydzieliny” oznacza płyny, wydalone przez organizm. Typowymi przykładami takich wydzielin są łój, pot, wydzielina miesiączkowa i tym podobne.

Stosowane w opisie określenie tłuszczów oznacza nie tylko trójglicerydy, lecz także fosfolipidy. Trójglicerydy przedstawia wzór 1, w którym R oznacza takie same lub różne grupy węglowodorowe, pochodzące z kwasów tłuszczowych. Określenie „fosfolipidy” w pierwszym rzędzie oznacza fosfotrójglicerydy, które można przedstawić wzorem 2, w którym R ma wyżej podane znaczenie, zaś B oznacza resztę związku hydroksyaminowego, takiego jak aminoalkohol, czwartorzędowa zasada hydroksyamonowa lub kwas hydroksyaminowy.

Produkty, które tworzą się lub mogą się tworzyć w wyniku działania drobnoustrojów na substancje tłuszczowe, są produktami podobnymi do tych, które mogą powstać w wyniku hydrolizy chemicznej. Tym sposobem z trójglicerydu o wzorze 1 powstaje gliceryna o wzorze 3 i kwasy tłuszczowe, jak przedstawiono na schemacie 1.

Ponieważ każdy z podstawników R może posiadać inne znaczenie, otrzymuje się różne kwasy tłuszczowe. Wśród tych kwasów mogą występować niższe kwasy tłuszczowe o przykrym zapachu, takie jak masłowy, izomasłowy, izowalerianowy i inne. Kwasy te wywołują przykry zapach potu i wydzieliny miesiączkowej. Te i inne kwasy tłuszczowe, zaś wśród nich także wyższe kwasy tłuszczowe aż do kwasów o 18 atomach węgla w cząsteczce mogą, jak wspomniano, wywołują inne niepożądane zjawiska, takie jak przypadki zapalenia skóry.

Kwasy tłuszczowe mogą także powstawać w wyniku rozkładu fosfolipidów o wzorze 2, co przedstawiono na schemacie 2. We wstępnych doświadczeniach, opisanych poniżej stwierdzono, że fosfolipidy są źródłem kwasów tłuszczowych o przykrym zapachu.

Stwierdzono, że niepożądane kwasy tłuszczowe mogą powstawać także w inny sposób, w wyniku działania drobnoustrojów, przy czym problem ich pochodzenia czeka na wyjaśnienie.

Jednak większość kwasów tłuszczowych pochodzi z opisanych poprzednio źródeł.

Określenie „miejsce tworzenia” oznacza miejsce, w którym wydzieliny tłuszczowe zatrzymują się lub są odbierane i gdzie stanowią one przedmiot działania drobnoustrojów.

Zwykle określenie „miejsce tworzenia” w pierwszym przybliżeniu oznacza ciało lub powierzchnię skóry oraz jej okolicę. Oznacza to skórę, pochwę oraz materiały stykające się bezpośrednio z powierzchnią ciała, takie jak przybory miesiączkowe, odzież, pościel i tym podobne wyroby; przeznaczone do zatrzymywania lub odbierania wydzielin ciała.

Środek według wynalazku, przeznaczony do stosowania na tkankę skórną, zawiera nośnik nadający się do stosowania zewnętrznego i, jako jedyny składnik soli kwasu animowielokarboksylogowego, takiego jak kwas etylenodwuaminoczwerooctowy, i dwuetylotrójaminopięciooctowy i N-hydroksyetyloetylenodwuaminotrójocowy, w ilości co najmniej 2% wagowych w odniesieniu do całkowitego ciężaru środka.

Korzystną substancją czynną środka jest sól alkanoloaminowa kwasu etylenodwuaminoczwerooctowego, a korzystnym nośnikiem jest roztwór oczaru.

W cząsteczce substancji czynnej występuje zawsze więcej niż jedna grupa kwasowa, przy czym grupa, zawierająca grupę kwasową, może być przyłączona do atomu azotu grupy aminowej.

Dla pewnych celów jako substancję czynną środka korzystnie stosuje się sole kationów jednowartościowych, takie jak sól sodowa lub potasowa. Dla pewnych innych zastosowań korzystne są sole aminoalkoholi, zwłaszcza aminodwu- i trójalkoholi, takich jak trójetynoloamina, dwuetanoloamina,

trójizopropanoloamina i tym podobne. Dla ułatwienia w dalszej części opisu będą stosowane skrócone nazwy kwasów: kwasu etylenodwuaminocetooctowego (EDTA), kwasu dwuetylenotrójaminopięciooctowego (DTPA) oraz kwasu N-hydroksyetyloetylenodwuaminotrójooctowego (HEDTA). Związki te są łatwo dostępne w handlu pod handlowymi nazwami, takimi jak versene, versenex, versenol, sequestrone i tym podobnymi.

Wymienione substancje czynne środka są łatwo dostępne w postaci wolnych kwasów, kwaśnych soli lub soli. Korzystnie sól aminokwasu lub mieszaninę soli aminokwasu stosuje się w takiej postaci, aby wartość pH mieszaniny w miejscu stosowania była bliska obojętnego, to znaczy, żeby wynosiła 6,2—8,5. Jednakże dobre wyniki stosowania środka można także uzyskać przy wartości pH przynajmniej 4,0. Sole i kwaśne sole wymienionych powyżej aminokwasów otrzymuje się łatwo przez zmieszanie kwasu i zasady.

Środek według wynalazku stosuje się w takich ilościach, aby końcowe stężenie substancji czynnej w stosunku do wagi wydzieliny ciała była przynajmniej rzędu 0,01%. Granica ta podyktowana jest przede wszystkim względami praktycznymi. Ogólnie mówiąc, nie jest zbyt korzystne zwiększenie stężenia powyżej 0,5% w stosunku do wagi wydzieliny ciała. Korzystna ilość stosowanego środka w przeliczeniu na substancję czynną zależy od celu, miejsca i sposobu stosowania oraz od rodzaju zawartej w nim substancji czynnej. Jeśli przewiduje się znaczny rozwój populacji drobnoustrojów, na przykład w wydzielinie miesiączkowej, to korzystnie stosuje się środek o zawartości większej ilości substancji czynnej. Tak więc, dla ograniczenia przykrego zapachu wydzieliny miesiączkowej pożądaną jest stężenie przynajmniej około 0,04% w stosunku do wagi wydzieliny miesiączkowej, zaś korzystnie stosuje się stężenie 0,10% lub większe. Poniżej określono korzystne ilości substancji czynnej w odniesieniu do poszczególnych celów oraz sposobów stosowania.

Środek według wynalazku stosuje się różnymi sposobami w miejscu wytwarzania przez drobnoustroje niepożądanych substancji. Stosowanie środka w celu zahamowania tworzenia się w wydzielinie miesiączkowej substancji o przykrym zapachu polega na tym, że środek wprowadza się do materiałów absorpcyjnych, zatrzymujących wydzielinę, takich jak przybory miesiączkowe lub do takich wyrobów, które mogą zbierać wydzielinę, na przykład do pościeli, odzieży i tym podobnych. Określenie „przybory miesiączkowe” oznacza serwetki sanitarne, tampony oraz podściółki międzywargowe, które zwykle składają się z jednej lub większej ilości warstw dobrego absorbenta, odpowiednio gęstego materiału, który charakteryzuje się przepuszczalnością cieczy, miękkością i zwiększoną, w tkany lub nietkanym opakowaniu. Wypełnianie wyżej wymienionych „przyborów miesiączkowych” wykonuje się zwykle z warstw lub włókien, takich jak zwiłki zgrempowanej bawełny, odkładane zwiłki włókien celulozowych, podściółki z rozdrobnionej miazgi drewnianej, miazga bibułkowa i tym podobne materiały, lecz także

z bardziej nowoczesnych substancji syntetycznych, takich jak piany i włókna z syntetycznego polimeru. Jakkolwiek środek według wynalazku można rozprowadzać jednolicie w całym przyborze miesiączkowym, to bardziej użyteczne jest stosowanie substancji czynnej w miejscu pierwszego kontaktu z wydzieliną ciała. Tak więc, środek według wynalazku korzystnie stosuje się na powierzchnię wypełnienia absorbującego przyboru lub na powierzchnię opakowania, lub też na obu powierzchniach jednocześnie, w taki sposób, żeby jego stężenie w przeliczeniu na substancję czynną zawierało się w zakresie 0,00016—0,016 g/cm². Ilość taka zapewnia utrzymanie odpowiedniego stężenia substancji czynnej w stosunku do całkowitej ilości wydzieliny. Korzystnym stężeniem substancji czynnej na powierzchni przyboru miesiączkowego jest stężenie rzędu 0,0006—0,009 g/cm².

Środek według wynalazku można wprowadzać do przyborów miesiączkowych w czasie wytwarzania lub w czasie używania. Jeśli środek wprowadza się w czasie wytwarzania przyborów miesiączkowych, to stosuje się metodę spryskiwania zarówno roztworem wodnym do spryskiwania, jak i roztworem w aerozolu, a poza tym można stosować nasycenie, moczenie lub ewentualnie inne znane sposoby wprowadzania. Roztwór do spryskiwania w aerozolu wytwarza się, stosując jako środek napędowy dwuchlorodwufluorometan lub trójchlorofluorometan. Jako rozpuszczalnik roztworu do spryskiwania stosuje się rozpuszczalnik obojętny, taki jak izopropanol.

Użycie środka napędowego lub obojętnego rozpuszczalnika wykazuje wyższość nad stosowaniem wodnego roztworu lub zawiesiny, ponieważ nie ma potrzeby suszenia przyborów miesiączkowych po wprowadzeniu środka. Poza tym, środek można stosować w postaci suchego pudru do użycia na przybory miesiączkowe przed zastosowaniem.

Środek według wynalazku stosuje się w zwykły sposób, typowy dla środków, wprowadzanych na powierzchnię skóry, przy czym korzystnie środek zawiera odpowiedni nośnik, zapewniający wprowadzenie na powierzchnię ciała skutecznej ilości substancji czynnej, a więc w stężeniu wynoszącym przynajmniej 0,0015% w stosunku do ciężaru wydzieliny, co opisano dokładnie powyżej. Zastosowanie środka w okresie, poprzedzającym wydzielanie płynu z ciała, jest korzystne, ponieważ całkowicie zapobiega tworzeniu się niepożądanych substancji. Jednak środek można także zastosować po wydzieleniu płynów, zmniejszając tym samym działanie drobnoustrojów na wydzieliny.

Zastosowanie na powierzchni skóry jest korzystne zarówno w celu zahamowania szybkości powstawania warunków wywołujących zapalenie skóry, jak i w celu zahamowania procesu powstawania nieprzyjemnego zapachu. Jeśli środek stosuje się w zwykły sposób, to jako nośnik substancji czynnej można stosować substancję stałą, ciekłą, półstałą lub używaną do rozpylania, stosowaną w kosmetyce lub farmacji i przeznaczoną do stosowania w zwykły sposób. Związek aminokwasu można stosować w płynach do przemywania, masełkach, aerozolach, roztworach wodnych, kremach,

sproszkowanych mieszaninach, że'owych laskach i tym podobnych. W skład środka mogą wchodzić także różne dodatki i rozcieńczalniki, między innymi dodatki do maści, takie jak polisorbát 80, trójolejan polioksyetylenosorbitanu, substancje powierzchniowo-czynne i emulgatory, takie jak siarczany laurylu, sodowy siarczan cetylu, jednostearynian gliceryny, dwuetyloaminoetylowo-alkilowy amid kwasu fosforowego, mirystynian izopropylu, alkohol oktylowy, glicerynowy i glikolowy ester kwasu stearynowego, glikole, takie jak glikol propylenowy i inne związki wielohydroksylowe, takie jak gliceryna i sorbitol, alkohole, takie jak etanol i izopropanól, oczar, czyli wywar z Hamamelisa, środki zapachowe, olejki eteryczne, środki napędowe, takie jak ch'orowcowane węglowodory, na przykład dwuchlorodwufluorometan, trójchlorofluoroetan i tym podobne, dwutlenek węgla i azot, stałe rozcieńczalniki, takie jak węglan wapniowy, skrobia, bentonit, talk oraz płyny silikonowe, takie jak płyn polisiloksanowy. Wybór poszczególnych nośników zależy od zamierzonego sposobu użycia środka. W celu przygotowania preparatu do hamowania rozwoju warunków, wywołujących zapalenie skóry, korzystnie stosuje się mieszaniny wodne. Korzystnymi preparatami stosowanymi do tych celów są substancje, zawierające oczar jako nośnik.

Zgodnie z typowym sposobem postępowania, substancję czynną, czyli związki aminokwasów, korzystnie stosuje się w postaci soli z alkanoloaminami. Jeśli jako nośnik stosuje się wodę, to sól tę można otrzymać przez zmieszanie kwasu i alkanoloaminy w wodnym nośniku.

W celu otrzymania preparatu, przeznaczonego do hamowania rozwoju warunków, wywołujących zapalenie skóry, związki aminokwasów stosuje się korzystnie w postaci soli z kationami jednowartościowymi rozpuszczalnymi w wodzie lub ich mieszaniny w wodzie, w ilości 2—15% wagowych w stosunku do ciężaru środka.

Jeśli środek jest w postaci roztworu do przeemywania, kremu lub aerozolu, to substancję czynną można dodać w rozpuszczalniku, dającym się połączyć z substancjami, zawartymi już w wytwarzanej kompozycji, takimi jak woda, gliceryna, glikol, propylenowy, glikol trójpropylenowy, eter metylowy, etanol i tym podobne. Alternatywnie, substancję czynną dodaje się do mieszaniny, zawierającej nośnik i dodatki, i gruntownie się z nią miesza. Sposób taki jest korzystny przy wytwarzaniu pudrów, jak również wodnych roztworów, takich jak roztwory w oczarze.

Opisane postaci środka stosuje się w miejscach, w których powstają niepożądane substancje na skutek działania różnych drobnoustrojów. Drobnoustrojami, które wytwarzają substancje, powodujące nieprzyjemny zapach wydzieliny miesiączkowej, są drobnoustroje gram-ujemne, takie jak *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i tym podobne, drobnoustroje gram-dodatnie, takie jak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* i tym podobne oraz drożdże, takie jak *Candida albicans* i tym podobne. Drobnoustroje,

wytwarzające substancje, powodujące nieprzyjemny zapach potu, są to drobnoustroje zwykle obecne na powierzchni skóry. Spośród nich najważniejszymi są drobnoustroje rodzaju *Corynebacterium* i rodzaju *Staphylococcus*. Drobnoustroje *Corynebacterium* uczestniczą również w procesie wytwarzania kwasów, wywołujących warunki, powodujące zapalenie skóry. Stosowanie środka według wynalazku hamuje działanie drobnoustrojów, które wytwarzają niepożądane kwasy lub stopniowo przywracają zdrowie. Uważa się, że działanie substancji czynnej środka polega na usuwaniu składnika metalicznego, niezbędnego dla przebiegu procesu enzymatycznego wytwarzania kwasów tłuszczowych. Jednak wynalazek nie ogranicza się do jakiegokolwiek szczegółowej teorii, a polega na stwierdzeniu, że stosując środek według wynalazku zapobiegawczo ogranicza się wytwarzanie kwasów tłuszczowych bez wywołania szkodliwych skutków we florze bakteryjnej.

Skuteczność środka według wynalazku w hamowaniu procesu wytwarzania niepożądanych kwasów tłuszczowych z tłuszczów, określa się metodami chromatografii gazowej, zaś skuteczność hamowania wydzielania przykrego zapachu określa się metodami organoleptycznymi.

Analizę metodą chromatografii gazowej przeprowadza się przez porównanie ze znanymi kwasami. Oznaczenie prowadzi się następującym sposobem: kwasy tłuszczowe ekstrahuje się eterem dwuetylowym z zakwaszonej badanej próbki i oznacza metodą chromatografii gazowej przy użyciu aparatu Hewlett-Packard 7620 A i Porapak QS 80/100 mesh w kolumnie do chromatografii gazowej o wymiarach 183 cm × 2 mm. I.D. Aparat programuje się przy temperaturze 135—235°C z szybkością 40°C na minutę, utrzymując wyższy zakres temperatury w czasie sześciu minut. Jako nośnik gazowy stosuje się hel pod ciśnieniem 3120 mm Hg, oraz szybkość przepływu, wynoszącą 40 ml/minutę.

W celu określenia skuteczności środka w hamowaniu wydzielania nieprzyjemnego zapachu przez opatrunki miesiączkowe stosuje się ilościową organoleptyczną metodę oznaczania, określoną w opisie jako zmodyfikowana metoda skali proporcjonalnej do oznaczania organoleptycznego. Metoda ta pomyślana została w taki sposób, że wynik uzyskany za pomocą organoleptycznego oszacowania przez grupę osób, może stanowić wartość próbki, określoną jako absolutna wartość intensywności zapachu. Tak więc, można określić nie tylko różnice pomiędzy dwoma próbkami o nieprzyjemnym zapachu, umieszczonymi w różnych środowiskach, na przykład na podściółce z użyciem odwaniacza lub bez niego, lecz również można ilościowo określić intensywność ich zapachu. Na przykład, jedna próbka może zawierać odwaniacz wielokrotnie bardziej skuteczny niż odwaniacz występujący w innej próbce. Jednak obydwie odwaniacze mogą zmniejszyć intensywność zapachu tylko w nieznanym stopniu, takim który można wykryć omawianą metodą oznaczania.

W pierwszym etapie tej metody określa się stężenie progowe substancji o nieprzyjemnym zapachu. Stosuje się sposób, opisany przez Freda

H. Steigera w *Chemical Technology*, tom 1, strona 225, kwiecień 1971, według którego określa się progowe stężenia zapachu dla etyloaminy przy użyciu dystrybuantu Weibulla. Zwykle, metoda ta wymaga zgromadzenia wyników badania organoleptycznego, przeprowadzonego przez grupę osób, którym przedstawiono serię próbek, zawierających substancję o nieprzyjemnym zapachu o wzrastającym stężeniu, celem wykrycia tego stężenia, przy którym można stwierdzić zapach. W celu badania środka według wynalazku stężenie progowe wybiera się jako stężenie skumulowane na poziomie 50%. Jak określono, progowe stężenie substancji o nieprzyjemnym zapachu zależy od rodzaju tej substancji oraz warunków, w których znajduje się ta substancja.

W czasie oznaczania, prowadzonego przez grupę osób, każdej osobie przedstawia się serię próbek w takim samym aparacie, składającym się z nieprzezroczystego słoja Masona o pojemności 568 ml, wykonanego z polietylenu i zaopatrzonego w śrubową nakrętkę, wmontowaną w szyjkę słoja. Słój wyścielony jest wewnątrz torebką polietylenową, zaś w okolicy nakrętki ma wmontowany lejek Büchnera, w taki sposób, że wąską część ujścia lejka, poniżej miejsca, w którym umieszczony jest sączek, przeciągnięty jest przez nakrętkę i wprowadzony do wyścielonego słoja. Próbkę umieszcza się w słoju i słój zamyka się lejkiem Büchnera, na którego szerokiej części wlotowej umieszcza się szkiełko zegarkowe. Następnie próbkę pozostawia się w czasie jednej godziny w celu doprowadzenia jej do stanu równowagi. W celu określenia stężenia progowego w słoju umieszcza się próbki, każda o całkowitej objętości 3 ml, zawierające substancje o nieprzyjemnym zapachu. Każda z próbek zawiera tę substancję w roztworze wodnym o ściśle określonym stężeniu.

Grupie około 30 kobiet przedstawia się serię próbek, doprowadzonych do stanu równowagi według wzrastającego stężenia, rozpoczynając od próbki o stężeniu zerowym (zawierającej jedynie wodę). Następnie każda z osób podaje numer próbki, której zapach wyczuła jako pierwszy. Każda z osób wacha każdą próbkę po kolei, pozostawiając 30-sekundowe przerwy pomiędzy poszczególnymi próbkami. Uzyskane wyniki wykorzystuje się do ustalenia skumulowanej procentowości dla grupy osób, określających zapach i dla każdego poziomu stężenia, odpowiadającego każdej próbce. Uzyskane w ten sposób wartości nanosi się na wykres prawdopodobieństwa według Weibulla metodą, opisaną w wymienionym powyżej artykule Steigera. Na osi odciętych nanosi się wartości stężenia, zaś na osi rzędnych skumulowane wartości procentowości dla danej grupy. Jako stężenie progowe przyjmuje się stężenie dla wartości 50%.

Po ustaleniu stężenia progowego zmodyfikowaną metodą skali proporcjonalnej opracowuje się krzywą wzorcową. Używa się identycznego aparatu badawczego, przygotowuje się serię próbek, po czym przedstawia się je do oceny grupie osób. Przygotowuje się próbki, których stężenie stanowi wielokrotność stężenia progowego, to znaczy wielokrotność jednostki zapachowej. Jedną z tych pró-

bek charakteryzuje się stężeniem 20-krotnie większym od stężenia progowego (20 jednostek zapachowych).

Zgodnie ze standardową metodą skali proporcjonalnej, każda osoba z grupy określa wartość intensywności zapachu postawionych przed nią próbek i określa intensywność zapachu każdej próbki w odniesieniu do intensywności zapachu innych próbek. Każda z osób może wybierać skalę według własnego uznania. Na przykład, może oznaczyć liczbą 10 próbkę o najsilniejszym zapachu. Próbka wykazująca intensywność zapachu, równą połowie tej intensywności i zapachu, zgodnie ze sposobem wartościowania, przyjętym przez tę osobę, będzie określona wartością 5. Zebrane od każdej osoby dane tworzą serie wartości, podane przez każdą z osób, przy czym każda seria opiera się na skali, przyjętej indywidualnie przez każdą osobę. Następnie próbce o stężeniu 20 razy wyższym od stężenia progowego przypisuje się wartość 100. Następnie każdej wartości, podanej przez każdą osobę, przypisuje się liczbę, proporcjonalną do liczby w indywidualnie przyjętej skali, stosując jako podstawę wartość 100 dla stężenia 20 razy większego od stężenia progowego. Na przykład, wartości, podane przez osobę, określającą wartość próbki 20-krotnie bardziej stężonej od próbki o stężeniu progowym jako 10, po proporcjonalnym ich przeliczeniu będą wynosiły dla próbki pierwszej 100, zaś dla drugiej próbki 50. Dane, uzyskane tym sposobem, że każdej próbce odpowiada jej właściwa wielokrotność stężenia progowego, tworzą serię wartości proporcjonalnych, posiadają wszystkie tę samą skalę (stężenie 20-krotnie większe od stężenia progowego = 100) i są odpowiednie w stosunku do wartości, podanych przez każdą osobę dla każdej próbki. Oblicza się średnią geometryczną wartości, proporcjonalnych dla każdej próbki i uzyskaną wartość przyjmuje się jako wartość proporcjonalną dla tej wielokrotności stężenia progowego.

Jeśli wartość logarytmu wartości proporcjonalnej nanosi się na osi rzędnych, zaś wartość logarytmu wielokrotności stężenia progowego na osi odciętych, to uzyskuje się linię prostą, przebiegającą poprzez punkty wartości od 3 do 20-krotnego stężenia progowego, dającą doskonałą korelację.

Stwierdzono, że niezależnie od rodzaju badanego związku aminowego o nieprzyjemnym zapachu, jeśli stężenie progowe określa się dla tego właśnie związku i stosuje się opisaną powyżej metodę opracowania krzywej wzorcowej, to uzyskane krzywe wzorcowe nakładają się na siebie z niezwykłą dokładnością, pomiędzy wielokrotnościami stężenia progowego od około 3 do około 20.

Krzywe wzorcowe uzyskane identycznym sposobem dla kwasu izomasłowego, związku niepodobnego pod względem budowy chemicznej, także z niezwykłą dokładnością pokrywają się z krzywymi wzorcowymi dla amin. Tak więc zapachu, badanych składników lub składnika nie można przypisać substancjom o określonej budowie chemicznej.

Krzywą wzorcową można stosować do określania intensywności zapachu, gdy substancję o nieprzy-

jennym zapachu umieści się w takim otoczeniu, jak na przykład na podściółce z czystych włókien celulozowych lub na podściółce z włókien, nasyconych substancją odwanającą i uzyskuje się nie tylko porównawcze wartości zapachu badanych próbek, lecz także uzyskuje się absolutny pomiar intensywności zapachu każdej z badanych próbek. W tym celu grupie osób przedstawia się serię próbek, wśród których jedna z próbek jest próbką standardową o znanym stężeniu badanej substancji o nieprzyjemnym zapachu, w otoczeniu identycznym, jak używane przy wykreślaniu krzywej wzorcowej. Korzystnie, próbkę standardową dobiera się tak, aby jej stężenie było 20 razy większe od stężenia progowego, w wyniku czego wartość proporcjonalna przyjmuje wielkość 100 na krzywej wzorcowej.

Następnie członkowie grupy ponownie oznaczają wartość każdej próbki, stosując swoje własne skale. Na podstawie podanej przez każdą osobę wartości próbek, w odniesieniu do wartości intensywności zapachu próbki standardowej, oblicza się wartości proporcjonalne dla każdej próbki w odniesieniu do próbki standardowej. Na przykład, jeśli osoba z grupy oznaczającej, przypisze próbce standardowej wartość 50, zaś inne próbce o nieznanym intensywności zapachu przypisze wartość 5, to po proporcjonalnym przeliczeniu tych wartości uzyskuje się dla próbki standardowej wartość proporcjonalną, wynoszącą 100, zaś dla próbki o nieznanym stężeniu wartość proporcjonalną 10. Następnie, korzystając z krzywej wzorcowej, można odczytać, że wartość proporcjonalna 10 uzyskana po przeliczeniu proporcjonalnym dla drugiej próbki, odpowiada intensywności zapachu równej pewnej wielokrotności stężenia progowego. Dla wartości proporcjonalnej 10 próbki o nieznanym intensywności zapachu odczytuje się z krzywej wzorcowej liczbę 1,2, co oznacza, że w standardowych warunkach badania stężenia substancji o nieprzyjemnym zapachu jest 1,2 raza wyższe od stężenia progowego.

Wstępne oznaczenia przeprowadzono w odniesieniu do problemu nieprzyjemnego zapachu wydzieliny miesięczkowej, w celu ustalenia obecności fosfolipidów w wydzielinie oraz określenia intensywności procesu wytwarzania kwasów tłuszczowych o nieprzyjemnym zapachu przez florę mikrobiologiczną, obecną zwykle w wydzielinie miesięczkowej.

Obecność znacznych ilości fosfolipidów w wydzielinie miesięczkowej określa się sposobem, polegającym na ogrzewaniu fosfolipidów z kwasem nadchlorowym. Uzyskuje się wtedy utlenienie organicznej części cząsteczki, po czym fosfor przeprowadza się w fosfomolibdenian o barwie błękitnej i oznacza metodą kolorymetryczną, dokładnie opisaną przez Bauera i współpracowników w „Bray's Clinical Laboratory Methods” str. 375—376, wydanie 17, C. W. Mosby Co., 1969. Próbkę wydzieliny miesięczkowej zbiera się do miseczek i oznacza w nich zawartość fosfolipidów. Analiza wykazuje w nich obecność fosfolipidów w ilościach 2250—4140 części na milion, co stanowi 0,225—0,4% wydzieliny.

Ustalenie zdolności drobnoustrojów, zwykle występujących w wydzielinie miesięczkowej, do wytwarzania kwasów tłuszczowych o nieprzyjemnym zapachu, przeprowadza się w sposób następujący: wydzielone próbki krwi ludzkiej wyjąłwia się, po czym inokuluje się je różnymi drobnoustrojami, poprzednio wyizolowanymi z wydzieliny miesięczkowej. Następnie próbki inokuluje się i poddaje analizie za pomocą chromatografu gazowego sposobem, opisanym powyżej. W doświadczeniu używa się krwi zamiast wydzieliny miesięczkowej, ponieważ krew łatwiej uzyskuje się w postaci jałowej i łatwiej można spełnić warunek użycia jałowej substancji w celu identyfikacji kwasu tłuszczowego, wytworzonego przez organizm stosowany do inokulacji. Stosowność zamiany wydzieliny na krew w wymienionych powyżej próbach mikrobiologicznych opiera się na znanym fakcie obecności trójglicerydów zarówno w krwi, jak i w wydzielinie miesięczkowej, oraz na wstępie przeprowadzonych doświadczeniach, wykonanych na sześciu próbkach ludzkiej krwi i tylu w próbach wydzieliny miesięczkowej. Doświadczenia te wykazały, że średnia całkowita ilość fosfolipidów we krwi wynosi 2807 części na milion, zaś w wydzielinie 2771 części na milion. Poniżej przedstawiono stosowane metody i uzyskane wyniki.

2,5 mililitrowe próbki jałowej krwi ludzkiej oddzielnie inokuluje się 0,2 ml zawiesiny komórek bakteryjnych różnych badanych drobnoustrojów, uprzednio wyizolowanych za pomocą znanych metod z wydzieliny miesięczkowej. Próbkę badaną, jak również nieinokulowaną próbkę zerową inkubuje się w temperaturze 37°C w czasie 24 godzin w łaźni o stałej temperaturze, ze stałą szybkością mieszania równą 200 obrotów na minutę. Następnie wszystkie próbki poddaje się analizie przy użyciu chromatografu gazowego. Wyniki przedstawiono w tablicy 1.

Przykłady wyjaśniają bliżej zarówno skład, jak i działanie środka według wynalazku, przeznaczonego do stosowania w różnych formach użytkowych.

Przykład I. Zbiera się dwie próbki wydzieliny miesięczkowej i poddaje je analizie w celu określenia wyjściowego stężenia kwasów tłuszczowych: izomasłowego, masłowego lub izowalerianowego, metodą chromatografii gazowej, prowadzonej na próbkach niezmiennych, nieinkubowanych wydzielin miesięczkowych. Następnie przygotowuje się próbki z każdej wydzieliny miesięczkowej o objętości około 2 ml. Próbkę zestawia się w dwie grupy, z których każda zawiera dwie różne próbki wydzieliny miesięczkowej. Do próbek jednej grupy dodaje się sól dwusodową kwasu etylenodwuaminoczerooctowego, w takiej ilości, aby końcowe stężenie związku wynosiło 0,2% wagowego wydzieliny miesięczkowej, zaś próbki grupy drugiej pozostawia się w stanie niezmiennym. Zarówno próbki, poddane działaniu środka hamującego, jak i próbki, niepoddawane jego działaniu, inkubuje się w temperaturze 37°C w czasie 24 godzin, po czym oznacza w nich określone poprzednio kwasy tłuszczowe metodą chromatografii gazowej.

Uzyskane wyniki przedstawione są w tablicy 2.

Tablica 1

Próbka	Obecne kwasy tłuszczowe (części na milion)		
	Izomasłowy	Masłowy	Izowalerianowy
Próbka kontrolna nieinokulowana	0	0	3,5
Drobnoustroje gram-ujemne			
Proteus mirabilis	59,5	9	111,7
Klebsiella pneumoniae	0	0	11,3
Aerobacter aerogenes	0	8,7	15,0
Escherichia coli	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0
Drobnoustroje gram-dodatnie			
Staphylococcus aureus	13,7	0	50,5
Streptococcus faecalis	0	0	39,1
Drożdże			
Candida albicans	12	0	38,5

Tablica 2

Próbka	Kwasy tłuszczowe (części na milion)		
	Izomasłowy	Masłowy	Izowalerianowy
Próbka 1 Świeżo uzyskana, nieinokulowana, nie poddawana działaniu środka hamującego, kontrolna	0	36	0
Inkubowana, nie poddawana działaniu środka hamującego	685,7	1014,0	857,1
Inkubowana, poddana działaniu Na ₂ EDTA	0	16,6	14,3
Próbka 2 Świeżo uzyskana, nieinkubowana, nie poddawana działaniu środka hamującego, kontrolna	0	0	0
Inkubowana, niepoddawana działaniu środka hamującego	475,0	307,0	336,0
Inkubowana, poddana działaniu Na ₂ EDTA	4,0	13,0	9,0

Przykład II. Pięć próbek, o objętości 2,5 ml każda, jałowej krwi ludzkiej inokuluje się 0,2 ml zawiesiny drobnoustrojów *Proteus mirabilis*. Do czterech próbek dodaje się odpowiednie ilości soli dwusodowej kwasu etylenodwuaminoczworoowego w ilościach 0,04—0,2%. Jedną z próbek inokuluje się drobnoustrojem, lecz nie dodaje do niej EDTA. Poza tym przygotowuje się nieinokulowaną próbkę krwi o objętości 2,5 ml i dodaje do niej 0,2 ml jałowej wody destylowanej. Wszystkie przygotowane próbki inkubuje się w temperaturze 37°C, w łaźni wodnej o stałej temperaturze w czasie 24 godzin, jednocześnie wstrząsając nimi z szybkością 200 obrotów na minutę. Po zakończeniu inkubacji próbki bada się na zawartość kwasów metodą chromatografii gazowej. Uzyskane wyniki zamieszczone są w tablicy 3.

Przykład III. Jałową krew, inokulowaną szczepem *Proteus mirabilis* umieszcza się na podanych działaniu środka hamującego i niepoddawanych jego działaniu podściółkach tamponowych i serwetkach sanitarnych. Próbki, poddawane działaniu środka hamującego, przygotowuje się następującym sposobem: na próbki serwetek sanitarnych lub próbki podściółek tamponowych nanosi się przez namoczenie, spryskiwanie lub impregnowanie ich opakowań w różnych miejscach i w różnym stężeniu 14% wodny roztwór mieszaniny soli

dwusodowej i czterosodowej kwasu etylenodwuaminoczworoowego o wartości pH = 7. Następnie, próbki suszy się i wagowo określa się ilości zatrzymanych przez nie soli kwasu etylenodwuaminoczworoowego. Następnie krew, inokulowaną poprzednio szczepem *Proteus mirabilis*, dodaje się do próbek poddanych w różny sposób działaniu środka hamującego, jak również do próbki, niepoddawanej działaniu tego środka oraz do próbki dwumetyloaminy, będącej odnośnikiem zapachowym. Trzy mililitry stosuje się dla podściółek tamponowych oraz pięć mililitrów dla serwetek sanitarnych. Następnie próbki inkubuje się w temperaturze 37°C w czasie 24 godzin po czym podaje się je badaniu organoleptycznemu, sposobem poprzednio opisanym. Wyniki, wskazujące na znaczne ograniczenie zapachu, umieszczone są w tablicy 4.

Przykład IV. Doświadczenie przeprowadza się w czasie 6 miesięcy. Grupa składająca się z siedmiu kobiet nosi miesięczkowe serwetki sanitarne w czasie, wynoszącym przynajmniej 4 godziny lub do chwili, aż ilość wydzieliny miesięcznej będzie taka, że zmiana serwetki stanie się niezbędna. W czasie 30 minut po usunięciu, serwetki poddaje się oględzinom i notuje się dane fizyczne, takie jak waga, wygląd fizyczny i obszar plamy. Następnie serwetki inkubuje się w temperaturze

Tablica 3

Działanie	Kwasy tłuszczowe (części na milion)	
	Izoma- słowy	Izowale- rianowy
Proteus + 0,0% Na ₂ EDTA	102,7	98,2
Proteus + 0,04% Na ₂ EDTA	28,4	52,3
Proteus + 0,1% Na ₂ EDTA	6,6	17,5
Proteus + 0,2% Na ₂ EDTA	7,9	17,6
Jałowa krew + 0,0% Na ₂ EDTA	0	0

30°C w czasie jednej godziny, po czym poddaje się je badaniom na zapach.

Ten tok postępowania powtarza się z każdą kobietą dla serwetek, poddawanych działaniu środka hamującego, jak i dla niepoddawanych działaniu (kontrolnych), lecz w naprzemiennych miesiącach. W niektórych przypadkach, zbierano dane z całego sześciomiesięcznego okresu, podczas gdy w innych przypadkach zbierano dane jedynie

z dwu miesięcy lub z czterech miesięcy. Wybór materiału doświadczalnego, uzyskanego od kobiet był przypadkowy, więc takie czynniki, jak klimat i zmiany aktywności miały niewielki wpływ na wyniki doświadczenia.

Serwetki, poddane działaniu środka hamującego, wytwarza się sposobem następującym: usuwa się karbowane, fabryczne opakowanie serwetek sanitarnych modess (nazwa handlowa produktu firmy Johnson & Johnson) i przepuszcza się wewnętrzną tkaninę absorbującą przez impregnujący roztwór mieszaniny soli dwusodowej i czterosodowej kwasu etylenodwuaminoczworoocowego (przygotowany sposobem, opisanym w przykładzie III), a następnie tkaninę wewnętrzną suszy się i umieszcza ponownie w opakowaniu, przepuszczającym plyn. Stężenie soli po wysuszeniu wynosi 0,00062 grama/cm².

Próbki, pobrane w danym okresie od wszystkich osób, gromadzi się i określa intensywność ich zapachu w porównaniu z intensywnością zapachu próbek kontrolnej. Wyniki badania zapachu 25 próbek, poddanych działaniu środka hamującego i 2 próbek, niepoddawanych jego działaniu, wyraża się w jednostkach zapachu od zera do 21 (największa). Serwetki, niepoddawane działaniu środka hamującego, wykazują intensywność zapachu w zakresie 3–21 jednostek, wśród nich 5 serwetek wy-

Tablica 4
Procentowe ograniczenie¹ zapachu za pomocą EDTA, umieszczonego różnymi sposobami⁴

Stężenie EDTA ⁵ w gramach na gram badanego inokulum	I umieszczenie w całym tamponie	II tkanka papierowa jako sączek nad podściółkę tamponową	III karbowane opakowanie serwetki sanitarnej	IV fabryczna bawełna jako sączek nad podściółkę tamponową	V zewnętrzna powierzchnia tamponu	VI wypukła część serwetki sanitarnej
0,0005 ²	-- ³	46	—	—	—	—
0,0016	—	—	48	—	—	—
0,0050	—	—	—	52	—	24
0,0060	—	—	—	—	46	—
0,0084	—	—	—	—	50	42
0,0100	—	—	—	—	—	40
0,0140	68	—	—	—	—	—
0,0200	—	—	—	—	—	58
0,0330	—	—	—	—	—	—

¹ w porównaniu z próbką, niepoddawaną działaniu środka hamującego (kontrolną), w przeliczeniu na rozpoznany zapach

² obliczona na podstawie stężenia roztworu EDTA, stosowanego do spryskiwania w czasie przygotowywania tkanki papierowej

³ linia przerywana (--) oznacza brak badania

⁴ metody stosowane do nanoszenia EDTA: I — namaczanie w wodnym roztworze o stężeniu 14%, II — spryskiwanie wodnym roztworem, III — impregnowanie (umieszcza się w roztworze, po czym suszy wyżymaczką wałkową), IV — impregnowanie, V — spryskiwanie wodnym roztworem, VI — spryskiwanie wodnym roztworem

⁵ obojętny roztwór (wartość pH = 7) etylenodwuaminoczworoocowy przygotowuje się sposobem następującym: 10,0 gramów soli czterosodowej kwasu etylenodwuaminoczworoocowego i 11,4 gramów soli dwusodowej kwasu etylenodwuaminoczworoocowego rozpuszcza się w 125 mililitrach wody destylowanej. Uzyskuje się roztwór o stężeniu, wynoszącym około 14% wagowych.

kazuje intensywność zapachu około 15 jednostek. Dziesięć serwetek, poddanych działaniu środka hamującego, wykazuje zapach o intensywności niższej niż 3 jednostki, a żadna nie wykazuje intensywności powyżej 11 jednostek.

Przykład V. Próbki rozcieńczonego osocza krwi ludzkiej o objętości 2 mililitry (1 część osocza i 2 części jałowej wody destylowanej) inokuluje się szczepem *Corynebacterium*. Do trzech próbek, przygotowanych sposobem opisanym powyżej, dodaje się sól dwusodową kwasu etylenodwuaminoczworoocowego w takiej ilości, aby uzyskać stężenie 0,1%, 0,2% oraz 0,5%. Jedna próbka nie zawiera soli sodowej kwasu etylenodwuaminoczworoocowego i stanowi próbkę kontrolną, niepoddawaną działaniu środka hamującego. Poza tym, przygotowuje się nieinokulowaną próbkę kontrolną z niezmienionego rozcieńczonego osocza krwi

ludzkiej. Próbkę badaną i kontrolną inkubuje się w temperaturze 37°C, w czasie 24 godzin, stosując wstrząsanie z szybkością 200 obrotów na minutę. Po zakończeniu inkubowania próbkę poddaje się analizie metodą chromatografii gazowej na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych. Uzyskuje się wyniki, przedstawiono w tablicy 5.

Tablica 5

Działanie	Kwasy tłuszczowe (części na milion)	
	Izomasłowy	Izowaleryanowy
Jałowe osocze nie poddane działaniu środka hamującego	0	0
Corynebacterium bez Na ₂ EDTA	155	564
Corynebacterium + 0,5% Na ₂ EDTA	12	22
Corynebacterium + 0,2% Na ₂ EDTA	25	49
Corynebacterium + 0,1% Na ₂ EDTA	22	41

Przykład VI. Do próbki brzezki o objętości 2 ml, zawierającej wyciąg mózgowo-sercowy (BHI) oraz naturalną florę bakteryjną, występującą w okolicy pach i składającą się głównie ze szczepów Corynebacterium i Staphylococcus, dodaje się sól dwusodową kwasu etylenodwuamino-czterooctowego w takiej ilości, że końcowe stężenie wynosi 0,5% wagowego. Przygotowuje się drugą próbkę o objętości 2 ml z inokulowanej brzezki, nie zawierającej soli dwusodowej kwasu etylenodwuamino-czterooctowego. Poza tym przygotowuje się także próbkę jałowej brzezki BHI o objętości 2 ml, jako nieinokulowaną próbkę kontrolną. Próbkę badaną i kontrolną inkubuje się w temperaturze 37°C w czasie 24 godzin, wstrząsając z szybkością 200 obrotów na minutę. Po zakończeniu inkubowania wykonuje się analizę przy użyciu chromatografu gazowego i oznacza się wolne kwasy tłuszczowe. Wyniki przedstawione są w tablicy 6.

Przykład VII. Jałową podściółkę z gazy zwilża się wodnym roztworem, zawierającym 0,45% wagowych mieszaniny soli Na₂EDTA i Na₄EDTA, który wytwarza się sposobem, opisanym w przykładzie III, po czym umieszcza ją pod jedną pachą badanej osoby. Pod drugą pachą tej osoby identycznym sposobem umieszcza się podściółkę z destylowaną jałową wodą i traktuje ją jako próbę kontrolną, nie poddaną działaniu środka hamującego. Obydwie podściółki bada się węchem dwa razy dziennie i określa porównawczo wzrost intensywności zapachu. Podściółka, zawierająca środek hamujący, wykazuje właściwości odnawiające.

Tablica 6

Działanie	Kwasy tłuszczowe (części na milion)	
	Izomasłowy	Izowaleryanowy
Jałowy BHI	0	0
BHI inokulowany kulturą z okolicy pach	32	57
BHI inokulowany kulturą z okolicy pach + 0,5% Na ₂ EDTA	0	0

Przykład VIII. Krem do stosowania w celu zwalczania zapalnych zaburzeń skóry wytwarza się sposobem następującym: (1) część A ogrzewa się do temperatury 70°C, (2) część B ogrzewa się do temperatury 75°C, (3) łączy się mieszając część B z częścią A oraz (4) doprowadza się wartość pH mieszaniny do 5,5, rozcieńczonym roztworem wodorotlenku sodowego.

Część A

% wagowy

Alkohol cetylowy	2,5
Alkohol stearylowy	5,0
Mirystynian izopropylu	2,0
Lekki olej silikonowy	1,0
„Emplex” ¹	1,5
Methyl paraben ²	0,15
Propyl paraben ³	0,05

Część B

Woda odjonizowana	78,8
Sól dwusodowa EDTA	4,0
Glikol propylenowy	5,0

¹ Sól sodowa produktu reakcji kwasu mlekowego i stearynowego (Pacto Products, Kansas City, Missouri)

² Hydroksybenzoesan metylu

³ Hydroksybenzoesan propylu.

Przykład IX. Roztwór do przemywania skóry wytwarza się sposobem następującym: (1) część A ogrzewa się do temperatury 72°C, (2) część B ogrzewa się do temperatury 75°C, (3) część A łączy się mieszając z częścią B oraz (4) doprowadza się pH do wartości 5,3 rozcieńczonym roztworem wodorotlenku sodowego.

Część A

% wagowy

Alkohol cetylowy	1,0
Alkohol stearylowy	3,0
Mirystynian izopropylu	1,3
Lekki olej silikonowy	0,8
„Emplex”	1,1
Methyl paraben	0,15
Propyl paraben	0,05

Część B

Woda dejonizowana	81,7
Glikol propylenowy	3,0
Sól dwusodowa EDTA	7,0

Krem i roztwór o składzie podanym powyżej można stosować na powierzchnię skóry w celu ograniczenia tworzenia się kwasów tłuszczowych, przez działanie szczepów *Corynebacterium* na wydzielony pot, wywołujących zapalenie skóry.

Przykład X. Płyn do przemywania dłoni i ciała do ograniczenia nieprzyjemnego zapachu wytwarza się następującym sposobem: (1) część A ogrzewa się do temperatury 82°C, (2) część B ogrzewa się do temperatury 78°C, (3) część A łączy się mieszając z częścią B oraz (4) całość oziębia się do temperatury 46°C, oraz dodaje do nich część C.

Część A	% wagowy
Olej mineralny	3,00
Jednostearynian gliceryny	5,00
Palmitynian izopropylu	5,00
Amerchol-H-9 ¹	1,00
Kwas stearynowy	1,50
Propyl paraben	0,05
Część B	
Methyl paraben	0,15
Onyxide 500 ²	0,20
Glikol propylenowy — USP	4,00
Gliceryna 96% — USP	3,00
Standapol SHO-01 ³	2,50
Sól dwusodowa EDTA	5,00
Woda dejonizowana	71,35

Część C	% wagowy
Składnik zapachowy	0,25

¹ Sterolatum (Amerchol Products, Inc.)

² 2-Bromo-2-nitropropaniol-1,3 (Onyx Co.)

³ Pólester kwasu sulfobursztynowego (Henkel Co.).

Przykład XI. Puder do typowego stosowania na powierzchnię ciała wytwarza się przez zmieszanie następujących składników: sól trójsodowa etylenodwuaminocteroocetowego 10 g, talk 787 g, środek zapachowy 3 g.

Puder ten można stosować na powierzchnię skóry w celu zahamowania wydzielania się kwasów tłuszczowych o nieprzyjemnym zapachu, tworzących się w wyniku działania szczepów *Corynebacterium* na wydzielony łój.

Przykład XII. Serwetki sanitarne wykonuje się z absorbującego wypełnienia, które stanowi miazga drzewna i karbowanego, porowatego opakowania. Na powierzchnię górną wypełnienia z miazgi drewnianej, jak i na opakowanie, przepuszczające piny, nanosi się sól sodową kwasu N-hydroksyetyloetylenodwuaminotrójocetowego, w takiej ilości aby uzyskać stężenie 0,25 mg na cm² powierzchni.

Przykład XIII. Tampon miesięczkowy wytwarza się z następujących surowców: sprasowany absorbent, cylindryczne wypełnienie ze zmiażdżonej miazgi drzewnej i krótkich włókien ze sztucznego jedwabiu. Na połowie powierzchni wypełnienia nanosi się obojętną mieszaninę soli dwu i czterosodowej kwasu etylenodwuaminocteroocetowego, w takiej ilości, aby uzyskać jej stężenie 0,23 mg/cm² powierzchni. Sole do nanoszenia na powierzchnię stosuje się w postaci suchej, wprowadzając je w aerozolu, w którym środek napędowy

stanowi dwuchlorodwuflourometan. Następnie wypełnienie opakuje się w karbowane opakowanie i zaszywa.

Przykład XIV. Tampon miesięczkowy przygotowuje się sposobem identycznym, jaki opisano w przykładzie XIII, z tą różnicą, że dwie lub trzy powierzchnie, zarówno wypełnienia, jak i opakowania, przepuszczającego piny, pokrywa się solą trójsodową kwasu etylenodwuaminocteroocetowego, w takiej ilości, aby uzyskać stężenie 0,16 mg/cm².

Przykład XV. Krem w laskach wytwarza się przez zmieszanie następujących składników, w poniżej podanych ilościach, w temperaturze około 60°C.

Składnik	Ciężar w gramach
Wosk ziemny	48,0
Wosk karnauba	32,0
Wosk kandellila	64,0
Emcol 249-3K ¹	42,0
Tenox 4 ²	0,8
Benton M-20 ³	80,0
Talk	120,0
Propyl paraben	0,8
Obojętna mieszanina Na ₂ EDTA oraz Na ₄ EDTA	40,0

¹ Alkoksylowany alkohol (Witco Chemical Company)

² Mieszanina, składająca się z 20% butylowanego hydroksytoluenu, 60% oleju kukurydzianego (Eastman Chemical Products Inc.).

³ Ulepszony bentonit (National Lead Company)

⁴ Opisany sposobem, podanym w komentarzu do tablicy 4.

Następnie mieszaninę wylewa się do chłodzonych form, w celu uzyskania końcowego produktu w postaci zestalonej laski.

Osoby, przeprowadzające badanie, otrzymują po dwie laski kremu do stosowania jako odwaniacze pachowe. Jedna laska składa się z kompozycji, opisanej powyżej, zaś druga z kompozycji podobnej, lecz nie zawierającej mieszaniny dwu soli kwasu etylenodwuaminocteroocetowego, przy czym badających nie informuje się, do której próbki dodano sole EDTA.

Osoby, wykonujące badanie, stosują jedną laskę do jednej pachy, zaś drugą do drugiej pachy. Po każdym zastosowaniu osoby te przeprowadzają jakościowe badania intensywności nieprzyjemnego zapachu. Wyniki przedstawione są w tablicy 7.

Przykład XVI. Kompozycję do podawania w aerozolu wytwarza się mieszając następujące substancje w podanych ilościach:

	Części wagowe
Mikroskopijnie rozdrobniony talk	2,50
Mikroskopijnie rozdrobniona Na ₂ EDTA	2,50
Środki zapachowe	0,16
Bezwodny etanol	0,20
Mirystynian izopropylu	0,60

Mieszaninę umieszcza się w naczyniach, odpowiednich do stosowania pod zwiększonym ciśnieniem (puszki), po czym dodaje się środki napędowe w podanych ilościach:

Freon 11¹ 47,02
 Freon 12² 47,20

¹ Trójchlorojednofluorometan (E.I. du Pont de Nemours & Co.)
² Dwuchlorodwufuorometan (E.I. du Pont de Nemours & Co.).

Tablica 7

Osoba przeprowadzająca badania	Określenie intensywności nieprzyjemnego zapachu za pomocą badań własnych	
	pacha kontrolna	pacha badana
A	silny	brak zapachu
B	bardzo silny	brak zapachu
C	bardzo silny	brak zapachu
D	silny	brak zapachu
E	silny	brak zapachu
F	bardzo silny	słaby
G	bardzo silny	słaby
H	silny	słaby
I	bardzo silny	słaby
J	bardzo silny	słaby
K	silny	słaby
L	silny	słaby
M	bardzo silny	słaby

Tablica 8

Próbka	Wytworzone kwasy tłuszczowe (części na milion)	
	Izomasy	Izowale-rianowy
Jałowe osocze krwi, nie poddane działaniu środka	0	0
Corynebacterium bez związku kwasu aminowielokarboksylowego	105	187
Corynebacterium + 0,1% Na ₂ EDTA	0	0
Corynebacterium + 0,1% HEDTA	0	0
Corynebacterium + 0,1% DTPA	0	0
Corynebacterium + 0,1% EGTA	0	0
Corynebacterium + 0,1% TEDTA	0	0

Przykład XVII. Sposobem, przedstawionym w przykładzie V, przygotowuje się jałowe próbki osocza krwi, inokuluje je szczepem Corynebacterium i dodaje do nich jeden z następujących związków aminowielokarboksylowych: sól dwusodowa 5 kwasu etylenodwuaminoczwerooctowego (Na₂EDTA), kwas N-hydroksyetyloetylenodwuaminotrójcoctowy (HEDTA), kwas dwuetylotrójaminopięciooctowy (DTPA), oraz sól trójetynoloaminy z kwasem etylenodwuaminoczwerooctowym (TEDTA), otrzymaną 10 w wyniku dodawania trójetynoloaminy do wodnego roztworu kwasu etylenodwuaminoczwerooctowego, aż do uzyskania wartości pH = 6,3. Związek 15 kwasu aminowielokarboksylowego dodaje się do próbki w takiej ilości, aby w badanym środowisku jego stężenie wynosiło 0,2% wagowych w przeliczeniu na wolny kwas. Poza tym przygotowuje się 20 dwie próbki kontrolne. Jedna próbka kontrolna składa się z niezmienionego, jałowego osocza krwi nieinokulowanego i nie zawierającego związku 25 kwasu aminowielokarboksylowego, zaś druga próbka kontrolna zawiera inokulowane osocze krwi, ale nie zawiera kwasu aminowielokarboksylowego i jest przedstawiona jako próbka kontrolna, nie 30 poddana działaniu środka hamującego. Wszystkie próbki inkubuje się i oznacza w nich wolne kwasy tłuszczowe sposobem, poprzednio opisanym. Uzyskane wyniki przedstawione są w tablicy 8.

Przykład XVIII. Krem w laskach wytwarza się sposobem, opisanym w przykładzie XV, przez 35 zmieszanie następujących substancji w podanych niżej ilościach:

Składnik	w gramach
Wosk ziemny	48,0
35 Wosk karnauba	32,0
Wosk kandellila	64,0
Emcol 249-3K	42,0
Tertox 4	0,8
Benton M-20	80,0
40 Talk	120,0
Propyl paraben	0,8
Sól trójetynoloaminy z kwasem etylenodwuaminoczwerooctowym	50,0

Laski kremu, uzyskanego sposobem opisanym 45 powyżej, można stosować na powierzchni skóry pod pachą, w celu zahamowania wydzielania kwasów tłuszczowych o nieprzyjemnym zapachu przez działanie szczepów Corynebacterium na substancje 50 tłuszczowe.

Przykład XIX. Kompozycję do typowego stosowania w celu zahamowania wydzielania kwasów 55 tłuszczowych przez działanie szczepów Corynebacterium na substancje tłuszczowe otrzymuje się przez dokładne zmieszanie następujących składników w poniżej podanych ilościach:

Kompozycja A	
Kwas N-hydroksyetylo-etylenodwuamino- czteroctowy	10 części wagowych
Trójetynoloamina	10 części wagowych
Oczar	80 części wagowych
Kompozycja B	
Kwas etylenodwu/amino- etoksy/-czteroctowy	13,8 części wagowych
Oczar	73,2 części wagowych

Kompozycja C

Kwas etylenodwuamino- czterooctowy	10 części wagowych
Trójizopropanoloamina	17,7 części wagowych
Oczar	72,3 części wagowe

Przykład XX. Kompozycję do stosowania na tkankę skórną otrzymuje się przez dokładne zmieszanie następujących składników:

Kwas etylenodwuamino- czterooctowy	10 części wagowych
Trójetanoloamina	13,8 części wagowych
Oczar	76,2 części wagowe

Kompozycję tę stosuje się na tkankę skórną, w celu zahamowania rozwoju warunków, sprzyjających zapaleniu skóry, wywołanemu przez kwasy tłuszczowe, tworzące się podczas działania szczepów *Corynebacterium* na wydzielone z ciała substancje tłuszczowe. W takim przypadku, środek hamujący stosuje się przez rozcieranie na skórze, na powierzchni skóry poddawanej działaniu tego środka, a następnie postępowanie takie powtarza się dotąd, aż objawy ulegną złagodzeniu. Dalsze stosowanie kompozycji uzależnia się od widocznego rozwoju niepożądanych warunków, w celu zapobiegania ich dalszemu rozwojowi.

Kompozycję tę stosuje się w celu określenia skuteczności hamowania rozwoju niepożądanych warunków, wywołujących zapalenie skóry typu trądzika. Jako niepożądane objawy można wymienić występowanie rumienia oraz powstawanie grudek i krost.

Do doświadczenia wybiera się sześć osób, wykazujących podobny stopień zapalenia skóry na obydwu stronach twarzy. Określa się liczbę rumieniowych grudek i krost na każdej stronie twarzy, określając ją jako „obrażenie”. Następnie do jednej strony twarzy stosuje się wymienioną powyżej kompozycję, zaś drugą stronę pozostawia jako kontrolną. Stosowanie kompozycji powtarza się dwa razy dziennie na jednej stronie twarzy, po każdym zastosowaniu czyści się każdą stronę twarzy oddzielnie. Doświadczenie kontynuuje się w czasie trzech tygodni. Po zakończeniu doświadczenia określa się procentową zmianę liczby obrażeń na stronie, poddawanej działaniu środka hamującego i na stronie kontrolnej. Uzyskano następujące wyniki:

Tablica 9

Pacjentka	Procentowa zmiana	
	strona poddana działaniu	strona kontrolna
1	70% zmniejszenie	6% zmniejszenie
2	70% zmniejszenie	55% zwiększenie
3	52% zmniejszenie	7% zwiększenie
4	62% zmniejszenie	20% zwiększenie
5	62% zmniejszenie	3% zmniejszenie
6	59% zmniejszenie	5% zmniejszenie

Jakkolwiek poprzednio powstawanie niepożądanych produktów w wyniku działania drobnoustrojów na wydzieliny z ciała hamowano poprzez zabijanie tych drobnoustrojów, obecnie stwierdza się, że stosowanie środka według wynalazku pozwala uzyskać pożądane zahamowanie działania drobnoustrojów bez konieczności zabijania tych organizmów. W celu udowodnienia tego przygotowuje się próbki hodowli drobnoustrojów ze szczepu *Proteus mirabilis* na krwi wątrobowej po czym do jednej próbki dodaje się sól dwusodową kwasu etylenodwuaminoczworoctowego, zaś do drugiej nie dodaje się tej soli. Próbki inkubuje się w temperaturze 37°C w czasie 24 godzin. Po tym czasie nie stwierdza się znacznych różnic w hodowlach drobnoustrojów, co przedstawiono w tablicy 10.

Tablica 10

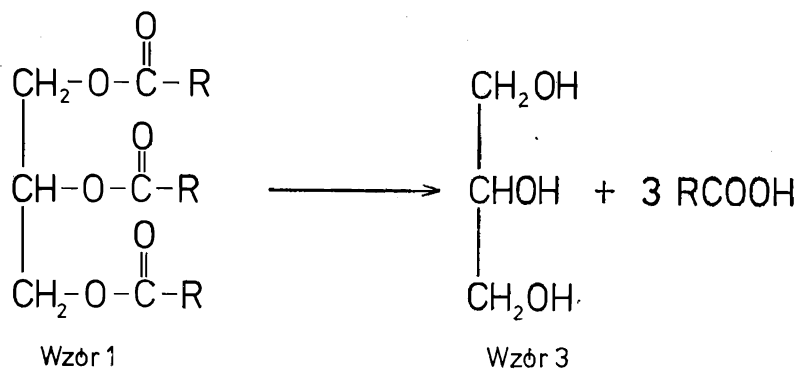
Krew inokulowana szczepem <i>Proteus mirabilis</i>	Liczba komórek bakteryjnych	
	0 godzin	24 godziny
bez Na ₂ EDTA	100×10 ⁴	182×10 ⁷
2% Na ₂ EDTA	100×10 ⁴	231×10 ⁷

Zastrzeżenia patentowe

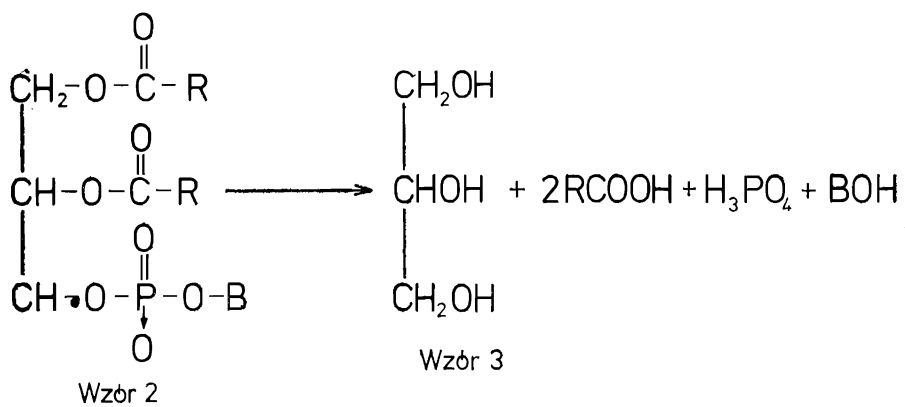
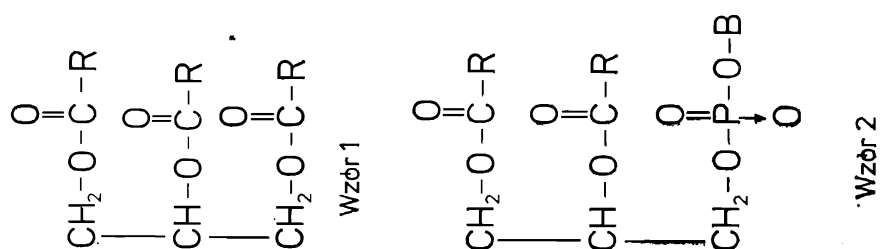
1. Środek do hamowania procesu wytwarzania przez drobnoustroje niepożądanych kwasów tłuszczowych, przeznaczony do stosowania na tkankę skórną, **znamienny tym**, że zawiera nośnik, nadający się do stosowania zewnętrznego i, jako jedyny składnik czynny, rozpuszczalną w wodzie sól lub mieszaninę soli kwasu aminowielokarboksyłowego, takiego jak kwas etylenodwuaminoczworoctowy, dwuetylenotrójaminopięciooctowy i N-hydroksyetyloetylenodwuaminotrójocowy, w ilości co najmniej 2% wagowych w odniesieniu do całkowitego ciężaru środka.

2. Środek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako substancję czynną zawiera sól alkaloaminową kwasu etylenodwuaminoczworoctowego.

3. Środek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako nośnik zawiera roztwór oczaru.



Schemat 1



Schemat 2