

Landeshygieneinstitut Mecklenburg-Vorpommern¹, Institut für Angewandte Chemie Berlin-Adlershof e.V.², Institut für Hygiene und Umweltmedizin³ und Institut für Pharmazie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität⁴, Greifswald, Germany

Synthese, antimikrobielle Wirksamkeit und Verträglichkeit neuer Strukturen von Harnstoff, Wasserstoffperoxid und Tensiden

W.-D. JÜLICH¹, R. OHME², N. ALHITARI³, V. ADRIAN³, TH. VON WOEDTKE⁴ und A. KRAMER³

Eine wesentliche Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten von Wasserstoffperoxid wird durch Einschlußverbindungen von anionischen, zwitterionischen, kationischen, nichtionischen oder polyfunktionellen Tensiden und Wasserstoffperoxid in Harnstoff erreicht. Mit dieser Zielsetzung wurden 3- und 4-Komponenten-Einschlußverbindungen mit naturnahen und mit antibakteriell wirksamen Tensiden synthetisiert und untersucht. Durch Herstellung im wasserfreien System können der Wirkstoffgehalt und das Mischungsverhältnis der Komponenten an die für den jeweiligen Verwendungszweck notwendigen Bedingungen angepaßt werden. Die Einschlußverbindungen zeichnen sich durch ein ausgeglichenes antimikrobielles Wirkungsspektrum aus und sind in Konzentrationen von 0,1 bis 0,4% zur Konservierung von pharmazeutischen Zubereitungen und technischen Produkten einsetzbar. Einige Verbindungen sind in Konzentrationen von 0,3 bis 0,6% sporizid wirksam und bei langer Einwirkungszeit (>24 h) auch gegen Polioviren mäßig wirksam. In der konventionellen Zellkultur und in der Perfusionszellkultur mit humanen Amnionzellen (FL-Zellen) sowie im Phytotoxizitätstest mit Kresssesamen ist die Verträglichkeit besser als die von Wasserstoffperoxid

Synthesis, antimicrobial efficacy, and tolerability of new structures of urea, hydrogen peroxide and tensides

A substantial extension of the applicability of hydrogen peroxide will be reached by using occlusion compounds of anionic, amphoteric (dipolar ionic), cationic, nonionic, or polyfunctional tensides with hydrogen peroxide in urea. Occlusion compounds with 3 as well as with 4 components containing natural equivalent and antimicrobial effective tensides were synthesized and tested. By synthesis in an anhydrous system the content of active substances as well as the mixture ratio of the components may be adapted to the conditions necessary according to the appropriate purpose. Occlusion compounds are characterized by a broad and well-balanced spectrum of antimicrobial effectivity. Concentrations in the range of 0.1 to 0.4% are practicable to preserve pharmaceutical preparations or technical products, respectively. Several compounds show a sporicidal activity in concentrations between 0.3 and 0.6% and, with an appropriate action time (>24 h) also a moderate effectivity against polioviruses. In the conventional cell culture, in the perfusion cell culture, and in the phytotoxicity test using cress seed, respectively, low biological activity of the occlusion compounds was found.

1. Einleitung

Prinzipiell ist es wünschenswert, über antimikrobielle Wirkstoffe zu verfügen, die nur aus naturidentischen oder naturnahen Komponenten bestehen. Kramer et al. [1] haben die Vorteile beschrieben, die durch Bildung supramolekularer Strukturen aus naturnahen Komponenten erreicht werden können. Einige dieser Einschlußverbindungen sind als Konservierungsmittel geeignet. Um die Verbindungen mit den besten Anwendungseigenschaften herauszufinden, haben wir weitere Einschlußverbindungen synthetisiert und ihre antimikrobielle Wirksamkeit und *In-vitro*-Verträglichkeit geprüft.

2. Untersuchungen und Ergebnisse

2.1. Synthesen und kristallographische Untersuchungen

Tensid-Harnstoff-Einschlußverbindungen und Tensid-Wasserstoffperoxid-Harnstoff-Einschlußverbindungen wurden in wäßriger Lösung [1] und in einem wasserfreien System [2, 3] hergestellt. Nach dem Baukastenprinzip ist eine Vielzahl von Variationen möglich (Tabelle 1).

Zur kristallographischen Untersuchung wurden Harnstoff, eine Harnstoffeinschlußverbindung mit 3% Laurinsäuresorbitanester, eine Harnstoff-Wasserstoffperoxid-Einschlußverbindung mit einem Wasserstoffperoxid-Gehalt von 34% und eine 3-Komponenten-Einschlußverbindung mit einem Gehalt von 3% Laurinsäuresorbitanester und 15% Wasserstoffperoxid (jeweils 30 mg Prüfsubstanz) auf einem Objektträger mit einem Tropfen Wasser versetzt. Unter Ver-

wendung eines Heitzischmikroskops wurde dieses Gemisch bei etwa 50–60 °C geschmolzen und durch langsames Abkühlen zur Kristallisation gebracht. Nach 24 h wurde die mikrophotographische Aufnahme bei 20facher Vergrößerung gemacht.

Harnstoff kristallisiert als Einzelsubstanz tetragonal (Abb. 1). In die wabenförmigen Hohlräume der Harnstoffkristalle können als „Gastmoleküle“ sowohl Tensidmoleküle (Abb. 2) als auch Wasserstoffperoxid (Abb. 3) eingelagert werden. Die Kristallform der 3-Komponenten-Einschlußverbindungen ist deutlich verschieden von den unter vergleichbaren Bedingungen erhaltenen Kristallen der entsprechenden 2-Komponenten-Einschlußverbindungen (Abb. 4).

2.2. Antimikrobielle Wirksamkeit

2.2.1. Bakteriostatische Wirkung

Zur Prüfung im Agarinkorporationstest wurde eine Verdünnungsreihe der Prüfsubstanzen auf der Basis 2 in Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CSA; Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) hergestellt. Nach 24 h Diffusionszeit bei Zimmertemperatur wurden die Agarplatten sektorenweise mit einer 16 h-Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Nährbouillonkultur der Testkeime beimpft und die minimale Hemmkonzentration (MHK) ermittelt. Wasserstoffperoxid ist als Monowirkstoff bis zur Verdünnung 0,012% bakteriostatisch wirksam, lediglich *P. aeruginosa* ist mit einer MHK von 0,05% resistenter (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammensetzung der Einschußverbindungen und bakteriostatische Wirksamkeit

Bezeichnung	Tensid-Komponente	Tensid-anteil (%)	WPO-Anteil (%)	weitere Wirkstoffe	Anteil (%)	Minimale Hemmkonzentration				
						<i>S. aureus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
WPO	—	—	100	—	—	0,012	0,012	0,012	0,012	0,05
3-Komponenten-Einschußverbindungen mit naturnahen Tensiden										
EO 210	Laurylsorbitanester	5	15	—	—	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4
E 185/4	Laurylsorbitanester	5	15	—	—	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4
EO 224	Laurylsorbitanester	5	18,7	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
E 185/6	Fettsäurepolyglycolester	5	17	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4
E 185/9	Tegin O	5	14	—	—	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2
3-Komponenten-Einschußverbindungen mit antimikrobiell wirksamen Tensiden										
EOI 216	Dodecylthiuroniumchlorid	4	16,5	—	—	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1
EO 497	Dodecylthiuroniumchlorid	2,5	15	—	—	0,05	0,012	0,1	0,05	0,1
EO 496	Sulfobetain	2,5	15	—	—	0,05	0,05	0,1	0,2	0,2
4-Komponenten-Einschußverbindungen										
EO 228/1	Laurylsorbitanester	5	15	Natriumfluorid	0,22	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2
EO 228/3	Laurylsorbitanester	5	15	Natriumazid	0,22	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
EO 606	Laurylsorbitanester	5	15	Natriumazid	50	0,1	0,1	0,025	0,05	0,05
E 185/8	Laurinsäuremonoglycerid	3	15	Laurinsäure-diethanolamid	2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4
EO 217	Dodecylthiuroniumchlorid	4,5	15	Polyhexa-methylenbiguanid	4,5	0,05	0,025	0,05	0,1	0,2
EO 1207	SPAN 20	4,8	15	Chlorhexidin	4,8					

WPO = Wasserstoffperoxid

Die MHK für 3-Komponenten-Einschußverbindungen mit naturnahen Tensiden liegt zwischen 0,1 und 0,4% (Tabelle 1). Zwischen dem durch Schmelzen (EO 210) und durch Umsetzung in der Kugelmühle erhaltenen Produkt (EO 185/4) bestehen keine Unterschiede. Bei den Harn-

stoffeinschußverbindungen, bei denen als oberflächenaktive Komponente Tenside mit antimikrobieller Eigenwirkung eingesetzt wurden, liegen die MHK zwischen 0,05 und 0,2%. Bei den 4-Komponenten-Einschußverbindungen wurde die höchste Wirksamkeit bei der Verbindung

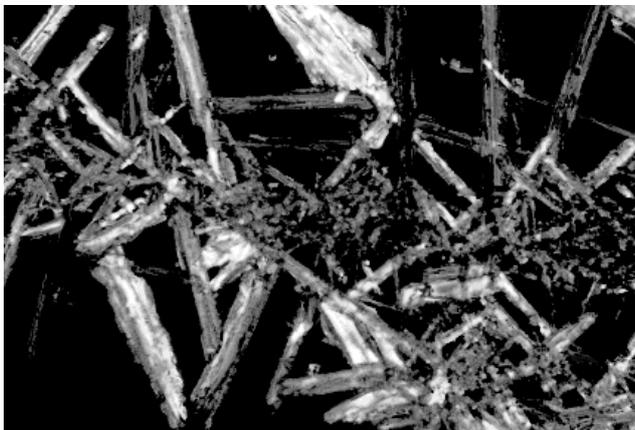


Abb. 1: Carbamid

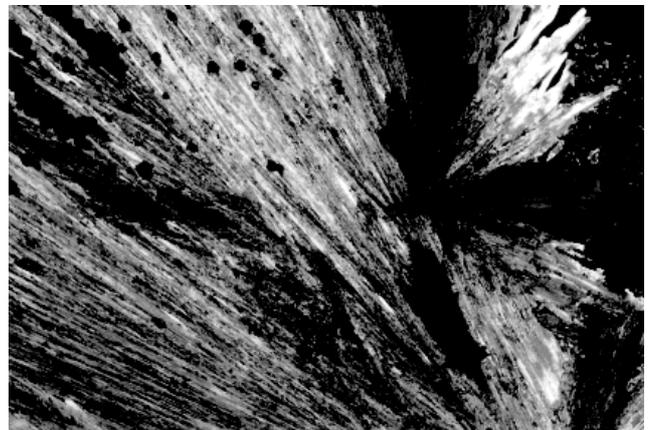
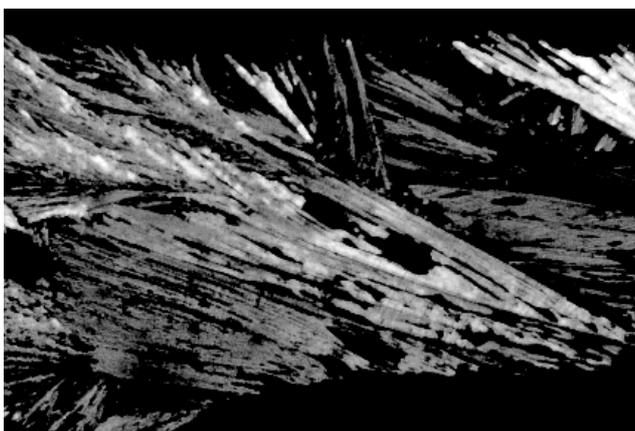
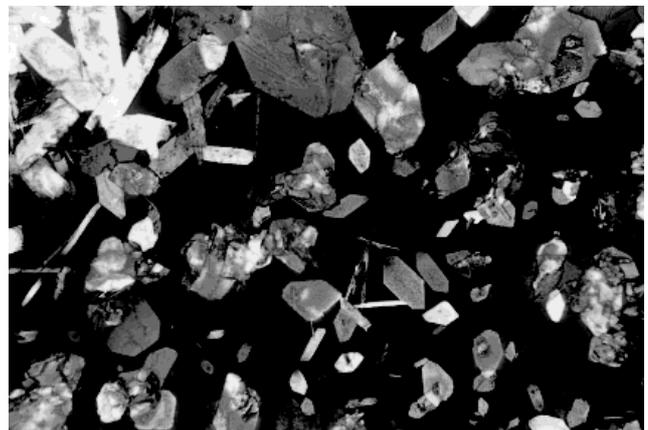
Abb. 3: Carbamid, eingeschlossen in 34% H₂O₂

Abb. 2: Carbamid, eingeschlossen in 3% Sorbitanmonolaurat

Abb. 4: Einschußverbindung: Carbamid mit 3% Sorbitanmonolaurat und 15% H₂O₂

EO 606 beobachtet, bei der durch einen hohen Anteil an Natriumazid eine gute Wirksamkeit gegen sonst schwer inaktivierbare gramnegative Keime erreicht wurde.

Bei den drei Einschlußverbindungen mit antimikrobiell wirksamen Tensidkomponenten wurde geprüft, ob Synergismus vorliegt. Dazu wurden die Ergebnisse gegen den resistensten Prüfkeim *P. aeruginosa* ausgewertet. Bei einem additiven Kombinationseffekt ist die Summe der Hemmkonzentrationen im Gemisch $q = 1$, wenn sie in Einheiten der Hemmkonzentration der Einzelsubstanzen (0,05% beim Wasserstoffperoxid, 0,1% beim Thiuroniumsalz und 0,05% beim Sulfobetain) gemessen werden [4]. Bei den Substanzen EO 216 und EO 496 wurde das Wachstum von *P. aeruginosa* durch 0,1% der Einschlußverbindung (entspricht einer Konzentration von 0,0025% Thiuroniumchlorid und 0,015% Wasserstoffperoxid), bei EO 497 durch 0,2% (entspricht 0,005% des Sulfobetains und 0,03% Wasserstoffperoxid) gehemmt. Es ist also

$$q_{EO\ 216} = (0,004/0,1) + (0,0165/0,05) = 0,37$$

$$q_{EO\ 497} = (0,0025/0,1) + (0,015/0,05) = 0,325$$

$$q_{EO\ 496} = (0,005/0,5) + (0,003/0,05) = 0,7$$

In allen drei Fällen ist q deutlich < 1 , so daß Synergismus vorliegt. Durch Einbindung von Thiuroniumsalzen bzw. Sulfobetain in supramolekulare Strukturen kann also eine Verbesserung der Wirksamkeit erreicht werden.

2.2.2. Sporizide Wirksamkeit

Die Versuche wurden mit *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 mittels Sporenteststreifen (BAG-BioStrips, Biologische Analysensystem GmbH Lich, Ch. Nr. Bsub. 112 10/97, deklarierte Kontamination $0,5-5 \cdot 10^6$ Sporen/Strip) durchgeführt. Die Indikatoren wurden in jeweils 5 ml der Prüflösungen für 1-3 d eingelegt. Danach erfolgte die Inaktivierung der Wasserstoffperoxid-Wirkung durch Zusatz von 25 µl Katalase (Katalase aus Rinderleber für technische Zwecke, Boehringer Mannheim GmbH). Anschließend wurden die Teststreifen in 5 ml Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung (CSL; Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) 7 d bei 36 °C bebrütet. Aus der Anzahl s von Prüfobjekten ohne vermehrungsfähige Keime bezogen auf die Gesamtzahl gleichbehandelter Prüfobjekte n wurde nach dem Verfahren von Spicher und Peters [5] die mittlere Anzahl überlebender Keime $m = -\ln s/n$ pro Prüfobjekt berechnet.

Nach Einwirkung von 0,6% Wasserstoffperoxid waren bei einer Einwirkungszeit von bis zu 3 d auf allen Prüfobjekten noch vermehrungsfähige Keime nachzuweisen. Bei Einwirkungszeiten von 4-14 d resultierte eine Abtötungskurve, bei der die mittlere Anzahl noch keimfähiger Sporen m nach der Gleichung

$$\lg m = 0,073 - 0,094 t \quad (n = 16, r = -0,7461; P = 0,1\%)$$

von der Einwirkungszeit t abhängig war. Nach dieser Gleichung können nach 3 d im Mittel 2 überlebende Keime pro Prüfobjekt erwartet werden. Da die Ausgangskontamination der Sporenteststreifen 10^6 Keime betrug, ist nach 3 d mit einer Keimzahlreduktion von 6 log-Stufen und erst nach 22 d mit einem Anteil von 99% Testobjekten ohne keimfähige Sporen, d. h. mit einer Keimzahlreduktion um 8 log-Stufen zu rechnen.

Aus der Gruppe der Einschlußverbindungen mit natürlichen Tensiden wurde EO 210, aus der Gruppe der Einschlußverbindungen mit antimikrobiell wirksamen Tensiden EO 216 ausgewählt. Bereits nach einer Einwirkungszeit von 3 d wurde bei beiden Verbindungen eine für eine

Auswertung gemäß Spicher und Peters [5] ausreichende Anzahl steriler Proben beobachtet (Abb. 5). Die Abhängigkeit von der Konzentration c ergibt sich aus den linearisierten Überlebenskurven für EO 210

$$\lg m = 0,487 - 0,754 c \quad (n = 5, r = 0,957, P = 0,05\%)$$

und für EO 216

$$\lg m = 0,106 - 0,33 c \quad (n = 5, r = 0,958, P = 0,05\%)$$

Nach Einwirkung der Einschlußverbindung EO 210 in einer Konzentration von 0,6% (entspricht einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 0,09%) wurde nach einer Einwirkungszeit von 3 d im Mittel ein überlebender Keim je Sporenteststreifen beobachtet, bei der Einschlußverbindung EO 216 waren hierfür nur 0,3% der Einschlußverbindung (entspricht 0,05% Wasserstoffperoxid) erforderlich. Die Einbindung in supramolekulare Strukturen führt also zu einer beträchtlichen Steigerung der sporiziden Wirkung.

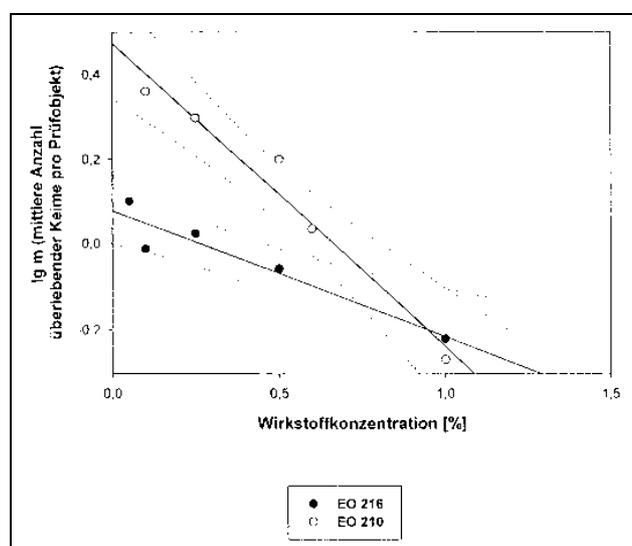


Abb. 5: Sporizide Wirksamkeit der Einschlußverbindungen

2.2.3. Inaktivierung von Polioviren

Die Wirksamkeit der Einschlußverbindungen in einer Konzentration von 0,5% gegen Polioviren Typ 1, Stamm Mahoney, wurde nach 4, 8 und 24 h gemäß gemeinsamer Richtlinie von Bundesgesundheitsamt und DVV im Suspensionstest geprüft [6].

Durch 0,6%iges Wasserstoffperoxid war eine vollständige Virusinaktivierung innerhalb 24 h erreichbar. Durch 0,1%iges Wasserstoffperoxid wurde der Virustiter um etwa 2 log-Stufen reduziert (Tabelle 2). Durch die Harnstoffeinschlußverbindungen wurde innerhalb 24 h eine maximale Titerreduktion um 3 log-Stufen erreicht und damit die antivirale Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid übertroffen. Die Wirkung trat allerdings nur langsam ein. Nach 4 h wurde ein Reduktionsfaktor von 0,34-0,67, nach 8 h von

Tabelle 2: Antivirale Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid sowie ausgewählter Einschlußverbindungen innerhalb von 24 h

Prüfsubstanz	Wasserstoffperoxid-Anteil (%)	Reduktionsfaktor (log ID ₅₀)
Wasserstoffperoxid	0,6	8
Wasserstoffperoxid	0,1	2,1 ± 0,3
EO 185/4	0,075	2,5 ± 0,22
EO 185/6	0,085	3,1 ± 0,00
EO 185/8	0,075	2,8 ± 0,17

1,00–1,17 beobachtet. Da die Tensid-Komponenten der Einschlußverbindungen EO 216 und EO 496 keine eigenständige antivirale Wirksamkeit haben [7], wurde auf die Prüfung dieser Einschlußverbindungen verzichtet.

2.3. In-vitro-Toxizitätsprüfung

2.3.1. Zytotoxizitätstest mit humanen Amnionepithelzellen (FL-Zellen)

Die als Monolayer vorliegenden Zellen wurden für 24 h mit der Prüfsubstanz exponiert, danach abgelöst und die Zellzahl in % zur Kontrolle mit dem Zellzähler Universal 87001 ermittelt [8].

In der konventionellen stationären Zellkultur kam es zu einer hochsignifikanten Hemmung des Zellwachstums durch Wasserstoffperoxid (Tabelle 3). Im Unterschied dazu wurde durch die Verbindung EO 210 in einer Konzentration von 0,01% (entsprechend einem Wasserstoffperoxid-Anteil von 0,0015%) die Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollen sogar leicht erhöht, obwohl das Verhältnis Prüfkonzentration/Hemmkonzentration vergleichbar war. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit den anderen Einschlußverbindungen mit naturnahen Tensiden erhalten.

Noch deutlicher waren diese Effekte in der Gruppe der Einschlußverbindungen mit antimikrobiell wirksamen Tensiden. Obwohl das eingesetzte Dodecylthiuroniumsalz (Zellwachstum in einer 0,0005%igen Lösung 82,9%) und Wasserstoffperoxid zytotoxisch wirken, beobachteten wir bei EO 497 in der Prüfkonzentration von 0,001% eine signifikante Förderung des Zellwachstums auf 129,7%. Bei der Einschlußverbindung mit einem Sulfobetain entsprach das Zellwachstum dem der Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse wurden bei 4-Komponenten-Einschlußverbindungen erhalten. EO 1207 enthält als weitere Komponente das zytotoxische Chlorhexidin ($IC_{50} = 0,002\%$). Trotzdem lag die Zellschädigung über der einer Wasserstoffperoxid-Lösung entsprechenden Konzentration.

2.3.2. Zytotoxizität in der Perfusionszellkultur bei kontinuierlicher biosensorischer Erfassung des Glucoseverbrauchs

Die Prüfsubstanzen wurden für 24 h und 96 h dem die Perfusionszellkultur durchströmenden Medium zugesetzt. Der Glucoseverbrauch der perfundierten Zellkultur wurde auf die in regelmäßigen Abständen gemessenen Referenz-

Tabelle 3: Zytotoxizität von Wasserstoffperoxid und ausgewählten Einschlußverbindungen an FL-Zellen

Prüfsubstanz	Prüfkonzentration (%)	n	Median der Zellzahl (%) der Kontrolle
WPO	0,0015	40	7,3*
	0,001	15	17,9**
	0,0005	40	53,3**
	0,00025	30	109,5
3-Komponenten-Einschlußverbindungen mit naturnahen Tensiden			
EO 210	0,01	10	103,7
E 185/4	0,01	20	105,1
	0,001	24	93,1
EO 224	0,001	6	104,2
E 185/6	0,01	20	109,0
	0,001	24	96,1
E 185/9	0,001	14	88,2*
3-Komponenten-Einschlußverbindungen mit antimikrobiell wirksamen Tensiden			
EO 497	0,01	10	66,3*
	0,005	20	117,5
	0,001	10	129,7*
EO 496	0,01	10	47,0**
	0,001	10	98,8
4-Komponenten-Einschlußverbindungen			
E 185/8	0,001	14	95,9
EO 1207	0,01	10	31,8**
	0,001	20	98,1

* signifikant im U-Test $P < 5\%$, ** signifikant im U-Test $P < 1\%$

werte der Glucosekonzentration im Medium vor der Zellpassage bezogen [9].

Unmittelbar nach Zugabe der Prüfsubstanz EO 210 kam es zu einer signifikanten ($p = 0,01$) Verminderung des Glucoseverbrauchs in Abhängigkeit von der Zeit nach der Zugabe. Nach 36 h stellte sich ein entsprechend erniedrigtes Niveau ein (Abb. 6). Der Effekt war reversibel. Unmittelbar nach Absetzen des Wirkstoffes setzte ein Anstieg des Glucoseverbrauchs ein, bis das Ausgangsniveau wieder erreicht war. Die Abhängigkeit des Glucoseverbrauchs von der Zeit nach dem Absetzen des Wirkstoffes war signifikant ($p = 0,01$). Eine antimikrobiell gleich wirksame Konzentration der Verbindung EO 216 beeinflusst den Glucosestoffwechsel nicht.

Bei ständiger Einwirkung der Einschlußverbindung EO 210 während des 96stündigen Versuchszeitraums waren die Einflüsse in den ersten 2 d gering (Abb. 7). Erst danach

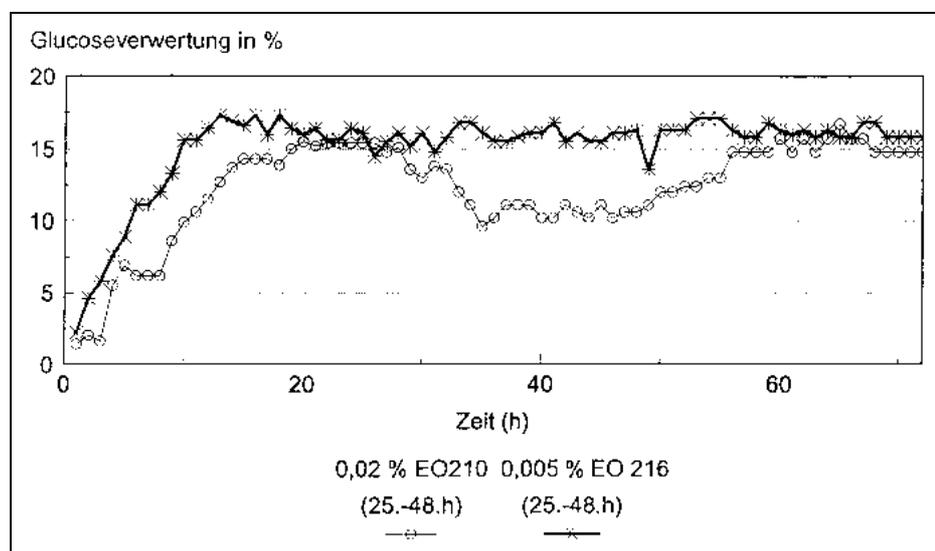


Abb. 6:
Glucoseverbrauch in einer Perfusionszellkultur bei zeitweiliger Einwirkung gleichwirksamer Konzentrationen der Versuchssubstanzen

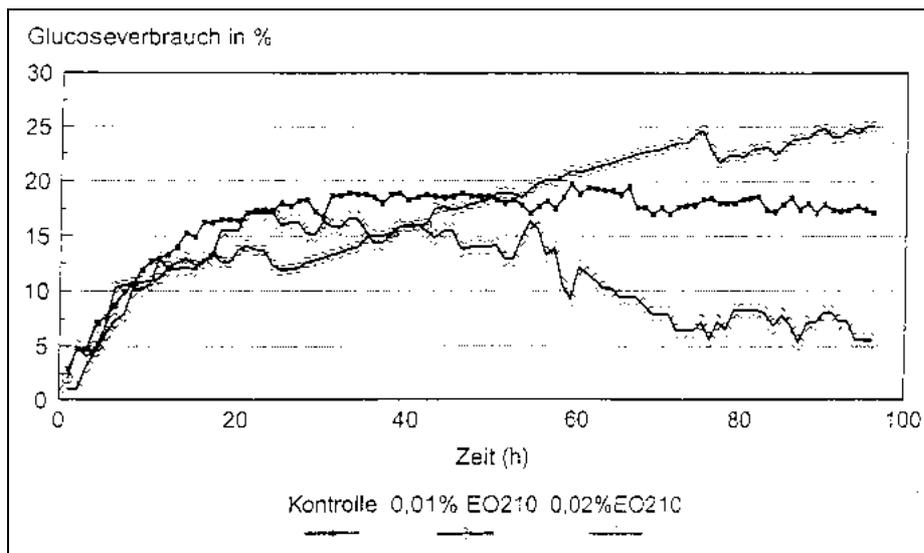


Abb. 7: Glucoseverbrauch in einer Perfusionszellkultur bei ständiger Einwirkung der Versuchssubstanzen

kam es bei einer Konzentration von 0,02% zu einer Verminderung des Glucoseverbrauchs, bei einer Konzentration von 0,01% EO 210 stieg der Glucoseverbrauch sogar leicht an.

2.3.3. Phytotoxizität

Es wurden 1%ige Lösungen der Einschlußverbindungen EO 210 und EO 185/4 an *Lepidium sativum* L. geprüft [10]. Unabhängig vom Herstellungsverfahren der Harnstoffeinschlußverbindungen wurde kein phytotoxischer Effekt beobachtet (Abb. 8). Dagegen verminderte 0,15% Wasserstoffperoxid als Monowirkstoff sowohl Hypokotyl- als auch Wurzelwachstum signifikant ($p = 0,01$) um 30%.

3. Diskussion

Die Entwicklung verlässlicher Verfahren zur Herstellung kompartimentierter Systeme gewinnt zunehmend an Bedeutung. Viele bis jetzt nur empirisch beschriebene Phänomene im Bereich der supramolekularen Chemie bilden die Basis für eine Reihe wichtiger Anwendungen, z. B. bei

der Farbdispersion, der Papierherstellung und der Klebetechnik [11]. Offenbar können auf diese Weise auch neue antimikrobielle Verbindungen mit im Vergleich zu den Einzelkomponenten verbesserten Anwendungseigenschaften erhalten werden.

Ein universell einsetzbares Verfahren zur Herstellung solcher antimikrobiell wirksamen Einschlußverbindungen ist die Umsetzung von Harnstoff mit Wasserstoffperoxid und Tensiden im nicht wäßrigen System bei 50–130 °C. Durch dieses Verfahren wird außerdem die Herstellung von Mehrkomponenten-Einschlußverbindungen mit zusätzlichen Wirkstoffen ermöglicht. Durch Variation der Komponenten und der Herstellungsbedingungen können die Einschlußverbindungen unterschiedlichen Aufgabenstellungen angepaßt werden (Tabelle 1).

So ist ein Einbau von Fluorverbindungen bei Einsatz der Einschlußverbindungen in Zahncremes möglich. Als oberflächenaktive Komponente können je nach Fragestellung naturnahe Tenside, die eine gute Verträglichkeit erwarten lassen, oder Tenside, deren antimikrobielle Wirkung bekannt ist, eingesetzt werden. Als Beispiele für antimikrobiell wirksame Tenside haben wir Dodecylthiuronium-

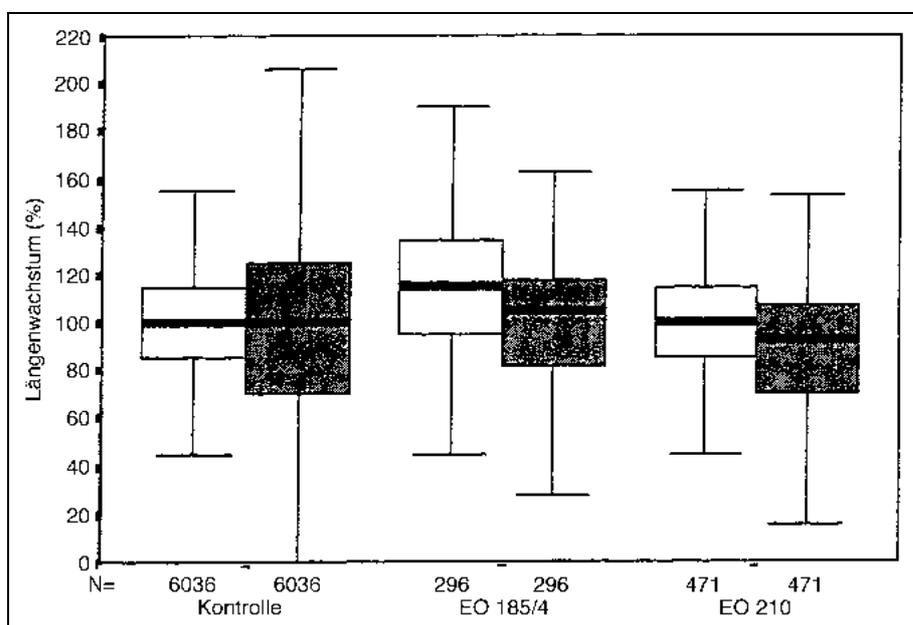


Abb. 8: Phytotoxische Wirkung der Laurylsorbitanester-WPO-Harnstoffeinschlußverbindung, hergestellt durch Vermahlen in der Kugelmühle (EO 185/4) und in der Schmelze (EO 210)

□ Hypokotyl ■ Wurzel

chlorid und ein Sulfobetain mit zwei langkettigen Alkylgruppen als Substituenten (Ro 623) eingesetzt. Beide Verbindungen sind Vertreter einer neuen Stoffgruppe, die Tensid- und Wirkstoffeigenschaften in einem Molekül vereint. Alkylthiuroniumtenside haben auch in anderen supramolekularen Strukturen, z. B. in Mikroemulsionen, ihre antimikrobiellen Eigenschaften unter Beweis gestellt [12]. Das Sulfobetaintensid ist insbesondere wegen seines ausgeglichenen Wirkungsspektrums interessant [13]. Beide Verbindungsgruppen zeichnen sich durch hohe Grenzflächenaktivität und gute antimikrobielle Wirksamkeit aus.

Insbesondere bei Einschlußverbindungen mit Haut- und Schleimhautkontakt bzw. bei bestimmungsgemäßer Anwendung auf diesen Biotopen ist es möglich, pflegende Komponenten zu integrieren. Hierfür ist beispielsweise Alantoin geeignet.

Durch den Einbau weiterer Wirkstoffe werden einerseits das Wirkungsspektrum und die Einsatzmöglichkeiten der Einschlußverbindungen erweitert, andererseits wird der Schmelzpunkt des Systems herabgesetzt, was verfahrenstechnische Vorteile bringt. Durch niedrigere Umwandlungstemperaturen und/oder kürzere Verweilzeiten wird der Einsatz empfindlicherer Komponenten möglich. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, Tenside einzusetzen, die nur als Paste, flüssig oder in einer schwer zu reinigenden Form zur Verfügung stehen. In diesen Fällen kann zunächst durch Vorfertigung einer Tensid-Harnstoff-Einschlußverbindung eine reinere, besser lagerfähige und besser dosierbare Form des Tensids gewonnen werden, die in einem zweiten Schritt durch einen Sinterungs- bzw. Schmelzprozeß mit Percarbamid in eine Drei- oder Mehrkomponenten-Einschlußverbindung umgesetzt wird.

Durch die Bildung von Wasserstoffperoxid-Tensid-Harnstoff-Einschlußverbindungen wird eine Verstärkung der sporiziden Wirksamkeit erreicht. Die antivirale Wirksamkeit der Einschlußverbindungen ist zwar größer als die von Wasserstoffperoxid, erfordert aber eine lange Einwirkungszeit und ist für eine Anwendung zur Desinfektion nicht ausreichend.

Die Monolayerkultur reagiert sehr empfindlich auf Wirkstoffeinflüsse. Wasserstoffperoxid entfaltet auf humane Amnionepithelzellen eine verhältnismäßig starke zytotoxische Wirkung [14]. Bei Einwirkung antimikrobiell gleichwirksamer Einschlußverbindungen wird überraschenderweise kein zytotoxischer Effekt beobachtet. Bei einigen Verbindungen ist in Abhängigkeit von den eingesetzten Tensiden die Zellzahl nach einer Einwirkungszeit von 24 h sogar erhöht.

Im Vergleich mit der konventionellen Zellkultur werden bei der Perfusionszellkultur deutlich höhere Wasserstoffperoxidkonzentrationen vertragen, ohne daß es zu morphologisch sichtbaren Veränderungen kommt. Das dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Zellen in der Perfusionszellkultur ständig optimal mit frischen Nährstoffen versorgt werden und sich schädigende Stoffwechselprodukte nicht ansammeln können.

Die vielfältigen Beziehungen einer Zelle mit ihrer Umwelt kommen in einer Reihe morphologischer Differenzierungen der Zelloberfläche zum Ausdruck, die bei rasterelektronenmikroskopischer Untersuchung erkennbar werden. Mikrovilli dienen dem Stoffaustausch mit dem umgebenden Medium und können die Oberfläche der Zellen um ein Mehrfaches vergrößern. Die Ausbildung der Mikrovilli ist ein aktiver Stoffwechselprozeß, der in einem ungünstigen Milieu bzw. bei Alterung der Zellkultur eingeschränkt wird. Auch ohne Wirkstoffeinfluß nimmt der Anteil der mikrovillireichen Fraktionen mit zunehmenden Alter der

Perusionszellkultur kontinuierlich ab. Bei diesen empfindlichen differenzierten Oberflächenstrukturen der Zelle und bei den mit dem Alterungsprozeß verbundenen Vorgängen zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der Einwirkung von Wasserstoffperoxid und der entsprechenden Einschlußverbindung. Im Gegensatz zu Wasserstoffperoxid wird die Ausbildung der mikrovillireichen Fraktion durch die Wasserstoffperoxid-Laurylsorbitanester-Harnstoffeinschlußverbindung während der gesamten Einwirkungszeit von 24 h im Vergleich zu den Kontrollen signifikant begünstigt [15].

Reversible Schädigungen können mit Hilfe der konventionellen Zellkultur nicht erfaßt werden, da nur Schädigungen bewertet werden, die zur Abtötung des Untersuchungsobjekts führen. Durch die Perfusionszellkultur mit kontinuierlicher biosensorischer Erfassung der Glucoseverwertung konnte gezeigt werden, daß die bei zeitweiliger Einwirkung der Einschlußverbindung beobachtete Verminderung des Glucosestoffwechsels reversibel ist. Da es sich um physiologische Wirkstoffe handelt, verfügt der Säugetierorganismus über Möglichkeiten zum raschen Abbau der Einschlußverbindung, so daß mit einer lang andauernden Schädigung eigentlich nicht zu rechnen ist. Trotzdem haben wir auch die Beeinflussung des Glucoseverbrauchs bei ständiger Einwirkung der Einschlußverbindungen untersucht. Diese ist allerdings schwieriger zu bewerten, da sich die physiologischen Bedingungen von Versuchsansatz zu Versuchsansatz unterscheiden können. Selbst bei einer Einwirkung von 0,003% Wasserstoffperoxid über 4 d bleibt der Stoffwechsel während der gesamten Beobachtungszeit auf leicht reduziertem Niveau erhalten. Bei der Einwirkung von 0,01–0,02% der Hexadecansäuresorbitanester-Wasserstoffperoxid-Harnstoffeinschlußverbindung über einen Zeitraum von 96 h kommt es nur zu geringen Einflüssen auf den Zellstoffwechsel, aber nicht zum Absterben der Zellen. Die sehr geringe toxische Wirkung der Einschlußverbindungen zeigt sich auch im Phytotoxizitätstest, bei dem selbst 1%ige Lösungen keinerlei Beeinflussung der Hypokotyllänge oder des Wurzelwachstums bewirken. Wasserstoffperoxid wirkt dagegen deutlich phytotoxisch. Nach unseren Erfahrungen gestattet die Bestimmung der Zytotoxizität an FL-Zellen und der Phytotoxizität an Kressesamen eine Prognose auf die zu erwartende Säugetiertoxizität [10].

Die kumulative Hautreizung bei mit Einschlußverbindungen konservierten Tensiden ist gleich oder sogar geringer als die der unkonservierten Tenside [1].

Bei vielen biologisch aktiven Implantaten kommt es nach Implantation zu Funktionsstörungen durch adhärierende Zellen. Bei enzymatischen Biosensoren führt eine Zytoadhärenz z. B. zur Verfälschung der Meßergebnisse [16]. Auf der anderen Seite sind zytotoxische Substanzen nicht zur Verminderung der Zytoadhärenz geeignet, da es zu Unverträglichkeitsreaktionen kommen kann. Physiologische Wirkstoffe sind aus toxikologischer Sicht zur Verminderung der Zytoadhärenz prinzipiell geeignet. Wenn nur einmal gespült wird, so daß Reste an der Membran verbleiben, wird die Zytoadhärenz an Polyurethanmembranen unter dem Einfluß einer Vorbehandlung mit den Wasserstoffperoxid-Einschlußverbindungen vermindert, nach einer Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid in einer entsprechenden Konzentration dagegen erhöht [17]. Werden die Wirkstoffe durch mehrmaliges Waschen weitgehend von der Sensoroberfläche entfernt, kommt es zu einem Anstieg der Zytoadhärenz, die aber bei der Einschlußverbindung geringer ausfällt als bei Wasserstoffperoxid als Monowirkstoff.

Antimikrobiell wirksame, gut verträgliche Einschlußverbindungen können für unterschiedliche Aufgabenstellungen eingesetzt werden. Erfahrungen liegen z. Z. für den Einsatz zur Konservierung und für die Anwendung als mikrobiozide Komponenten eines mehrstufigen Sterilisationsverfahrens für empfindliche Güter vor.

Bei einem Einsatz als Konservierungsmittel bieten sich folgende Vorteile:

- Die Forderungen einschlägiger Pharmakopöen an die Absterbekinetik werden mit hoher Sicherheitsspanne erfüllt [1], wobei die breite antibakterielle Wirkung die Inaktivierung von Bakteriosporen einschließt.
- Die im Vergleich zu den Einzelkomponenten geringere zytotoxische Wirkung der Harnstoffeinschlußverbindungen läßt in Verbindung mit der geringen kumulativen Hautreizung im Meerschweinchentest [1] eine gute Verträglichkeit unter Anwendungsbedingungen erwarten.
- Durch Einbindung von Wasserstoffperoxid in eine supra-molekulare Struktur wird ein physiologisches Prinzip für die Konservierung nutzbar gemacht, so daß eine Langzeitgefährdung, insbesondere eine Allergisierung, ausgeschlossen werden kann, sofern geeignete Tensidkomponenten ausgewählt werden.

Die Sterilisation biologisch aktiver Implantate, z. B. von enzymatischen Glucosesensoren ohne Störung der Funktionalität des empfindlichen Sterilguts und ohne Verminderung der Biokompatibilität, ist ein schwer zu lösendes Problem. Aussichtsreich sind Kombinationsverfahren von niedrig dosierter Gammastrahlung bzw. plasmagestützter Resonanz-UV-Strahlung [18, 19] und chemischer Inaktivierung [20]. Für letzteres können sowohl Wasserstoffperoxid als auch die hier beschriebenen Einschlußverbindungen des Wasserstoffperoxids eingesetzt werden. Folgende Gründe sprechen für den Einsatz von Harnstoffeinschlußverbindungen:

- Problemkeime bei der Strahlensterilisation sind Bakteriosporen und Viren [21]. Eine sporizide Wirkung wird bei den Einschlußverbindungen durch weitaus geringere Konzentrationen erreicht.
- Die *In-vitro*-Funktionalität dieser Biosensoren wird durch das vorgeschlagene Sterilisationsverfahren unter Einsatz der Einschlußverbindungen nicht beeinflusst [22]. Selbst eine längere Lagerung in einer Lösung der Einschlußverbindung ist möglich. Bei Anwendung von Wasserstoffperoxid als Monowirkstoff ist die Grenze zwischen erforderlicher antimikrobieller Wirksamkeit und bereits einsetzender Schädigung des Sensors schwer zu ziehen, d. h. eine längere Lagerung, als zur Erreichung des antimikrobiellen Effekts unbedingt erforderlich ist, ist nicht möglich [23].
- Die *In-vitro*-Biokompatibilität von mit Einschlußverbindungen behandelten Biosensoren ist günstiger als nach einer Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid [17].
- Antimikrobiell gleichwirksame Konzentrationen der Einschlußverbindungen sind weniger zytotoxisch [14].
- Der Säugetierorganismus verfügt über Möglichkeiten zum raschen Abbau von bei der Implantation mit dem Sensor evtl. übertragenen Resten des Wasserstoffperoxids. Wie mit der Perfusionzellkultur nachgewiesen wurde, sind die zellschädigenden Einflüsse sowohl bei Wasserstoffperoxid als auch bei der Einschlußverbindung vollständig reversibel. Deswegen können u. U. nach der Sterilisation auf der Sensormembran verbleibende Reste dieser physiologischen Wirkstoffe toleriert werden. Beim Einsatz der Einschlußverbindungen kann dadurch zumindest zeitweilig eine Verminderung der Zytoadhäsion auf der Sensormembran erreicht werden. Wasserstoffperoxid allein führt dagegen unter denselben

Versuchsbedingungen zu einer unerwünschten Erhöhung der Zytoadhäsion.

4. Experimenteller Teil

4.1. 2-Komponenten-Einschlußverbindungen naturnaher Tenside in Harnstoff (Zwischenprodukte)

2 g des Tensids bzw. der Tensidmischung werden unter Rühren mit 18 g Harnstoff bei 100–125 °C verschmolzen. Nach Entstehen eines homogenen Gemisches läßt man unter Rühren abkühlen und erhält eine feste Einschlußverbindung mit einem Tensidgehalt von 10%. Geeignet als Tenside sind Hexadecansäuresorbitanester, ein Tensidgemisch von 66% Tetradecansäuremonoglycerid mit 34% Hexadecansäurediethanolamid und die Emulgatoren TWEEN 40, Marlovet LVX, Marlox, Span 20, Marlamid D bzw. Tegin O.

4.2. 3-Komponenten-Einschlußverbindungen EO 210, EO 186/6 und EO 185/9

5 g des nach 4.1. hergestellten Produkts werden mit 5 g 30%igem Percarbamid unter ständigem Durchmischen erwärmt; zwischen 100–120 °C beginnt ein Sinterungs-Prozeß, der zur weitgehenden Verflüssigung und Homogenisierung des Produkts führt. Nach Kristallisation erhält man 10 g einer Harnstoff-Einschlußverbindung mit einem Wasserstoffperoxid-Gehalt von 15% und einem Tensid-Gehalt von 5%. Eine weitere Synthesemöglichkeit besteht in der Umsetzung der Laurinsäuresorbitanester-Harnstoff-Einschlußverbindung mit Percarbamid in der Kugelmühle (EO 185/4).

4.3. Einschlußverbindung EO 224

In eine gesättigte wäßrige Harnstofflösung wird Percarbamid gegeben und bei 80 °C Laurinsorbitanester eingeehrt. Nach dem Abkühlen werden die Kristalle abgesaugt.

4.4. Einschlußverbindung EO 185/4

1 g der 2-Komponentenverbindung nach Vorschrift 1 mit 10% Laurinsäuresorbitanester wird mit 1 g Percarbamid in der Kugelmühle umgesetzt. Man erhält eine Einschlußverbindung mit 15% Wasserstoffperoxid-Gehalt.

4.5. 4-Komponenten-Einschlußverbindung EO 185/8

50 g Harnstoff werden mit 50 g Percarbamid innig verrieben und im siedenden Wasserbad mit 5 g eines Tensidgemisches aus 60% Laurinsäuremonoglycerid und 40% Laurinsäurediethanolamid verschmolzen. Die Schmelze kristallisiert nach dem Abkühlen als Einschlußverbindung.

4.6. 4-Komponenten-Einschlußverbindung EO 217

Ein Gemisch von 10 g 30%igem Percarbamid mit 1 g Thiuroniumchlorid, 8 g Harnstoff und 1 g Polyhexamethylenbiguanid wird unter ständiger Durchmischung erwärmt. Man erhält nach dem Abkühlen 20 g einer 4-Komponenten-Einschlußverbindung mit einem Wasserstoffperoxid-Gehalt von 15%.

4.7. 4-Komponenten-Einschlußverbindung EO 1207

45 g Harnstoff und 5 g Chlorhexidin werden in der Schmelze gelöst und mit 2,5 g SPAN 20 und 52 g Percarbamid vermischt.

4.8. 4-Komponenten-Einschlußverbindung EO 228/1

Eine Lösung von 0,011 g Natriumfluorid in 0,5 ml Wasser wird mit 2,5 g Harnstoff gemischt. Das Gemisch wird im Wasserbad aufgeschmolzen und mit 2,5 g Percarbamid versetzt. Man erhält ein flüssiges Gemisch, das beim Abkühlen als Einschlußverbindung kristallisiert.

4.9. 4-Komponenten-Einschlußverbindung EO 228/2

Man verfährt wie bei 228/1, setzt aber anstelle von Natriumfluorid 0,011 g Natriumazid zu.

4.10. 4-Komponenten-Einschlußverbindung EO 606

1,5 g Percarbamid werden mit 1,5 g Harnstoff und 3 g Natriumazid vermorsert, bis das Gemisch homogen ist (50% Natriumazid-Gehalt).

Die Untersuchungen wurden gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft Projekt Jü 334/1-2.

Literatur

- 1 Kramer, A.; Jülich, W.-D.; Ohme, R.: Hyg. Med. **20**, 330 (1995)
- 2 Ohme, R.; Ballschuh, D.; Jülich, W.-D.; Kramer, A.: Deutsches Patent DE 4200 140 A1, I. 1. (1992)
- 3 Ohme, R.; Ballschuh, D.; Jülich, W.-D.; Kramer, A.: Europapaten 94112805.0, US-Patent 08327189, Japanisches Patent 273851/94 (1994)

- 4 Poser, H.; Weuffen, W.; Jülich, W.-D.: Z. Med. Labortechnik **5**, 293 (1964)
- 5 Spicher, G.; Peters, J.: Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A **231**, 541 (1975)
- 6 Bundesgesundheitsbl. **85**, 397 (1982)
- 7 BMBF-Vorhaben 03100237 A 5: Synthese und Verwendung neuer Sulfofetaine auf der Basis nachwachsender Rohstoffe. Abschlußbericht (1995)
- 8 Kramer, A.; Adrian, V.; Adam, C.: Hyg. Med. **18**, 9 (1993)
- 9 Jülich, W.-D.; von Woedtke, Th.; Abel, P.: Deutsches Patent DE 197 09 649 A1 (1997)
- 10 Kühl, H.; Kramer, A.; Moll, E.: Hyg. Med. **19**, 190 (1994)
- 11 Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (DECHEMA) im Auftrag des BMBF, Frankfurt/Main 1994
- 12 Jülich, W.-D.; Seibt, H.; Pietsch, H.; Knieler, R.; Ohme, R.; Ballschuh, D.; Kramer, A.: Deutsches Patent angemeldet am 4. 3. 1998
- 13 Ohme, R.; Ballschuh, D.; Seibt, H.; Jülich, W.-D.; Kramer, A.: Deutsches Patent, Patent-Nr. 1007 D 207/08, 2. 10. (1995)
- 14 Adrian, V.; Jülich, W.-D.; Kramer, A.; Alhitari, N.; von Woedtke, Th.; Abel, P.: Hyg. Med. **23** Suppl. 2, 94 (1998)
- 15 Jülich, W.-D.; Hanschke, R.; Alhitari, N.: Hyg. Med. **23**, 465 (1998)
- 16 Rebrin, K.; Fischer, U.; Hahn von Dorsche, H.; von Woedtke, Th.; Abel, P.; Brunstein, E.: J. Biomed. Eng. **14**, 33 (1992)
- 17 Urban, G.; Schlosser, M.; Jülich, W.-D.; von Woedtke, Th.; Krowas, D.; Lange, J.; Ziegler, B.: Hyg. Med. **23**, 459 (1998)
- 18 Jülich, W.-D.; Kindel, E.; von Woedtke, Th.; Conrads, J. P. F.: Deutsches Patent Reg.-Nr. 19748099.3 (1997)
- 19 Jülich, W.-D.; von Woedtke, Th.; Kindel, E.; Conrads, J. P. F.; Pfeiffer, M.: Hyg. Med. **23**, 338-344 (1998)
- 20 von Woedtke, Th.; Jülich, W.-D.; Kramer, A.; Nieber, D.; Pfeiffer, M.; Abel, P.; Fischer, U.: Hyg. Med. **19**, 646 (1994)
- 21 Jülich, W.-D.; von Woedtke, Th.: Zentr. Steril. **4**, 283 (1996)
- 22 von Woedtke, Th.; Jülich, W.-D.; Abel, P.; Kramer, A.: Hyg. Med. **23**, Suppl. 2, 91 (1998)
- 23 von Woedtke, Th.; Jülich, W.-D.; Abel, P.; Kindel, E.; Schröder, L.-W.: Hyg. Med. **23**, 346 (1998)

Eingegangen am 2. Juni 1998
 Angenommen am 8. Juli 1998

Dr. W.-D. Jülich
 Landeshygieneinstitut
 Mecklenburg-Vorpommern
 Lange Reihe 2
 D-17489 Greifswald

Chemistry Department, Faculty of Science, Girl's Branch, Al-Azhar University, Nasr City, Cairo, A. R. Egypt

Synthesis and reaction of cyanopyridone derivatives and their potential biological activities

A. S. S. SALMAN

4-Carboxy-3-cyano-6-biphenyl-pyrid-2-one (**1**) was prepared and then allowed to react with methyl iodide, benzenesulphonyl chloride, phenylisothiocyanate, acetic anhydride, *o*-phenylenediamine, phenylmagnesium bromide and phosphorus pentasulphide affording the corresponding N-substituted pyrid-2-one **2-5**, 4-(benzimidazol-2-yl)-pyrid-2-one **7**, 2-hydroxy-2-phenyl-1,2-dihydro-pyridine **8** and 2-thiopyridone **9** derivatives, respectively. Treatment of **1** with dimethyl sulphate and phosphorus oxychloride to give 2-methoxy pyridine **12** and 2-chloro pyridine **13** derivatives. Reaction of **13** with amines and hydrazine hydrate afforded **14** and **15**, respectively. The structural assignments of the new compounds were based on analytical, spectroscopic measurements and chemical reactions. Some of the obtained compounds showed interesting antibacterial and antifungal activities in vitro.

1. Introduction

In this work, the chemical activity of 4-carboxy-3-cyano-6-biphenyl-pyrid-2-one was studied to obtain several substituted pyridines for biological evaluation.

2. Investigations, results and discussion

2.1. Chemistry

Extensive studies [1, 2] described the reaction of active methylene compounds with α,β -unsaturated ketones in the presence of ammonium acetate to afford cyanopyridines

through a Michael type addition, followed by cyclization. The obtained cyanopyridines were found to possess a pronounced antimicrobial activity [3, 4].

In the present work, 4-carboxy-3-cyano-6-biphenyl-pyrid-2-one (**1**) was obtained by condensation of β -(*p*-phenyl)benzoylacrylic acid with cyanoacetamide in boiling ethanol in the presence of piperidine as a catalyst. The introduction of aromatic residues into the terminal positions of the conjugate system.

$\text{>C}=\overset{\text{I}}{\text{C}}-\text{C}=\text{O}$ appears to increase its polar character and therefore its tendency to undergo the Michael condensation as well as the effect of

Scheme 1

