



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0037050

(51)⁷ A01N 25/02; A01N 37/02; A01N 37/04; (13) B
C11D 3/48; C11D 1/62; C11D 11/00;
C11D 3/00; C11D 3/20; A01N 33/12;
A01N 37/36

(21) 1-2019-03158

(22) 21/11/2017

(86) PCT/EP2017/079945 21/11/2017

(87) WO2018/108466 A1 21/06/2018

(30) 16203653.7 13/12/2016 EP

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/12/2019 381A

(73) UNILEVER GLOBAL IP LIMITED (GB)

Port Sunlight, Wirral, Merseyside, CH62 4ZD, United Kingdom

(72) METCALFE Kenneth (GB); CARUS Mark Anthony (GB); SMITH Emily Grace (GB); STOTT Ian Peter (GB); O'KEEFFE Joanne Clare (GB); CORNMELL Robert Joseph (GB).

(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) PHƯƠNG PHÁP THÊM CHẾ PHẨM DIỆT KHUẨN VÀO QUY TRÌNH GIẶT

(57) Chế phẩm diệt khuẩn bao gồm một hoặc nhiều hợp chất amoni bậc bốn tan trong nước và một hoặc nhiều axit hydroxy hữu cơ tan trong nước; trong đó tỷ lệ trọng lượng của các axit hydroxy hữu cơ hòa tan trong nước với các hợp chất amoni bậc bốn nằm trong khoảng từ 95:5 đến 52:48.

Ngoài ra, phương pháp cho thêm chế phẩm diệt khuẩn vào quy trình giặt là bao gồm các bước thêm một liều từ 2 đến 100 ml chế phẩm dạng lỏng vào bộ cấp phối nước xả của máy giặt tự động, tùy ý kết hợp với một liều chất làm mềm vải dạng lỏng trong cùng một ngăn cấp phối.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này liên quan đến một chế phẩm diệt khuẩn để cho thêm vào quy trình giặt để xử lý đồ giặt, như quần áo, đặc biệt là trong máy giặt.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khi quy trình giặt trở nên tiết kiệm năng lượng và nước hơn; thì thời gian giặt, nhiệt độ giặt và lượng nước để giặt xả đều được giảm. Ngoài ra, các chế phẩm hóa học để sử dụng trong quá trình giặt cũng đang được thay đổi công thức để giảm tác động môi trường của chúng.

Một phần là do những thay đổi này, người tiêu dùng ngày càng lo ngại rằng đồ đã giặt sạch của họ vẫn có thể ẩn chứa những vi khuẩn gây bệnh không mong muốn, gây bệnh cơ hội mà quá trình giặt chưa loại bỏ hoặc tiêu diệt thỏa đáng. Họ có thể thấy rằng vết bẩn đã được loại bỏ. Họ có thể thấy rằng mùi hôi đã được khắc phục hoặc loại bỏ, nhưng họ cảm thấy khó có thể chắc chắn rằng bất kỳ mầm bệnh nào cũng đã được loại bỏ hoặc tiêu diệt. Họ muốn giặt ở nhiệt độ thấp hơn để tiết kiệm năng lượng và nước, muốn sử dụng ít hóa chất mạnh và ít hóa chất hơn trong quy trình giặt, nhưng họ lo ngại rằng điều đó có thể làm tăng nguy cơ mầm bệnh có trên đồ giặt. Cộng với nỗi lo rằng các chủng vi khuẩn kháng thuốc khó điều trị nếu không may bị nhiễm trùng, là nhu cầu đảm bảo vệ sinh đầy đủ cho người tiêu dùng cần chưa được đáp ứng; hoặc cho mỗi lần giặt, hoặc ít nhất là bất cứ khi nào người tiêu dùng muốn.

Sản phẩm ra đời nhằm mục đích làm sạch máy giặt. Sản phẩm được thiết kế và khuyến nghị sử dụng trong trường hợp không có đồ giặt và không nhất thiết phải cải thiện vệ sinh giặt giữ tại thời điểm lấy quần áo ra khỏi máy giặt. Ở một số nơi, nguồn nước sử dụng để giặt xả bị ô nhiễm nặng bởi vi khuẩn và vi rút. Trong trường hợp đó, có một máy giặt đã được khử trùng trước đó gần như không giúp ích cho vấn đề vệ sinh của mẻ đồ giặt sau khi đã được giặt. Hơn nữa, các sản

phẩm đã qua các thử nghiệm diệt khuẩn trong phòng thí nghiệm có thể không hiệu quả như thế trong điều kiện giặt là thực tiễn. Việc thỉnh thoảng vệ sinh máy giặt là không đủ để giữ lượng vi khuẩn có khả năng gây bệnh ở mức thấp. Bên cạnh đó, dữ liệu gần đây cho thấy mức độ vi khuẩn đo trên khăn của người tiêu dùng đã giảm từ 10^7 xuống 10^4 cfu/g khăn khi một chiếc máy giặt mới được thay cho một máy cũ và sử dụng thường xuyên. Dữ liệu tiếp theo sau đó cho thấy sự quay lại mức 10^7 cfu/g khăn sau nhiều tuần sử dụng máy

Nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra rằng *Pseudomonas spp.* là một chi thường được tìm thấy trên đồ giặt vải sợi bông ở cả các nước phát triển và đang phát triển. Nhiễm trùng da hoặc mô mềm do *Pseudomonas spp.* có xu hướng trở nên nghiêm trọng và phức tạp vì những vi khuẩn này vừa xâm lấn vừa gây độc. Những mầm bệnh cơ hội này có nhiều khả năng gây bệnh trong nhóm người bị suy giảm miễn dịch đang ngày càng gia tăng trên thế giới. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) là một loại vi khuẩn gram âm thường được thấy ở môi trường như đất, nước và các chỗ ẩm khác. *P. aeruginosa* là một mầm bệnh cơ hội. Nó lợi dụng lúc hệ miễn dịch của một cá nhân bị suy yếu để gây nhiễm trùng. Vi khuẩn này tạo ra độc tố gây tổn thương mô và có thể gây nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm trùng hệ hô hấp, viêm da, nhiễm trùng mô mềm, nhiễm khuẩn huyết, nhiễm trùng xương và khớp, nhiễm trùng đường tiêu hóa và nhiều bệnh nhiễm trùng hệ thống, đặc biệt ở những bệnh nhân bị bỏng nặng, bệnh nhân bị ung thư và AIDS thiếu sức đề kháng. Vi khuẩn này là mối lo đặc biệt đối với những người bị xơ nang, là những người rất dễ bị nhiễm trùng phổi pseudomonal. Tỷ lệ tử vong trong trường hợp những người bị nhiễm *P. aeruginosa* là 50%. Nó cũng còn có thể gây nhiễm trùng tai ở những người khỏe mạnh hơn.

Việc kiểm nghiệm mức độ hiệu quả của hệ thống diệt khuẩn đối với một nhóm các sinh vật là điều bình thường. Chế phẩm diệt khuẩn được cho thêm vào quy trình giặt ở nhiệt độ thấp thường sẽ được kiểm nghiệm theo tiêu chuẩn BS EN 1276: 1997 đối với cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương, sử dụng tất cả các sinh vật sau:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ATCC 6538

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) ATCC 15442

Enterococcus hirae (*E. hirae*) (ATCC 10541

Escherichia coli (*E. coli*) ATCC 10536

Dựa trên phân tích riêng của chúng tôi về vi khuẩn thường thấy trong đồ giặt, chúng tôi tin rằng tác động chống *Pseudomonas* spp. chẳng hạn như *P. aeruginosa* là rất quan trọng.

Các hệ số pha loãng cao diễn ra khi sử dụng các sản phẩm giặt là và thực tế là việc tái nhiễm vi khuẩn có thể xảy ra ở tất cả các giai đoạn, chẳng hạn thông qua việc cho nước bị ô nhiễm vào mỗi bước của quy trình giặt, có nghĩa là đưa thêm chất diệt khuẩn trong chu trình giặt xả cuối cùng có thể hữu ích. Tuy nhiên, để có hiệu quả, thời điểm cấp phối này cần một hệ thống kháng khuẩn tác động nhanh, hiệu quả về mặt trọng lượng (weight-efficient), hoạt động ở nhiệt độ bình thường, nồng độ nước xả vải bình thường và thang thời gian tương đương với mức thời gian giặt xả. Các thang thời gian này có thể chỉ là 5 phút trong máy giặt tự động hiện đại.

Sản phẩm vệ sinh giặt giữ có thể được phân thành hai nhóm chính. Những chất có chứa chất tẩy trắng và những chất có chứa chất diệt khuẩn khác. Nhược điểm chính với các sản phẩm tẩy trắng tốt là chúng cũng có thể tẩy trắng cả bất kỳ loại vải màu nào. Ngoài ra, chúng thường ở dạng bột và người tiêu dùng thích phụ gia dạng lỏng cho phù hợp với chất tẩy giặt dạng lỏng và / hoặc chất làm mềm vải dạng lỏng mà họ sử dụng.

Một sản phẩm lỏng trên thị trường có chứa chất diệt khuẩn không tẩy trắng được cho biết là chứa dimethyl didecyl ammonium clorua (DDAC) & alkyl dimethyl benzalkonium clorua (ADBAC). Liều khuyến nghị 120g được cấp phối qua ngăn kéo chứa chất xả làm mềm vải giai đoạn giặt xả có thể cấp phối 2,88g hệ thống diệt khuẩn muối amoni bậc bốn dạng hỗn hợp 60: 40 DDAC: ADBAC. Chúng tôi đã xác định rằng tác dụng diệt *P. aeruginosa* của nó trong thử nghiệm huyền phù với thời gian tiếp xúc 5 phút ở 20°C và trong điều kiện "bẩn" theo quy định của quy chuẩn EN1276 là không đủ để đạt yêu cầu vệ sinh như tự nhận và thậm chí trong điều kiện "sạch", đôi khi được tranh luận để miêu tả trạng thái của quần áo

bước vào lần giặt xả cuối cùng, nó không phải lúc nào cũng đạt mức giảm log 5 như trình bày. Trong một số máy, liều cao (2 nắp đầy X 60mL) có thể sử dụng toàn bộ ngăn chứa chất xả làm mềm vải không còn thừa chỗ để chứa thêm chất làm mềm vải.

WO2013 / 156371 (Unilever) bộc lộ một chế phẩm làm mềm vải dạng nước chứa từ 0,5 đến 35% trọng lượng một hoạt chất làm mềm vải, trong đó hoạt chất làm mềm vải chứa một hợp chất amoni bậc bốn trietanolamine liên kết este và từ 0,001% đến 2% trọng lượng một chất không ion, kháng khuẩn, và từ 0,01 đến 10% trọng lượng chất thơm. Chất kháng khuẩn không ion được chọn lọc mang lại cho chế phẩm lợi thế ổn định so với các loại thuốc chống vi trùng khác được thử nghiệm và cho thấy hoạt động khử trùng trong quần áo mang tính chất hiệp lực với hợp chất amoni bậc bốn trietanolamine liên kết este trong chất làm mềm vải. Tài liệu cũng tiết lộ rằng ngoài các chất chống vi trùng không ion, các chất chống vi trùng khác cũng có thể có mặt, với điều kiện là chúng không hiện diện ở mức độ gây mất ổn định trong công thức. Trong số các chất chống vi trùng hữu ích khác này là các chất tạo cang, đặc biệt hữu ích trong việc làm giảm sức đề kháng của vi khuẩn gram âm trong nước cứng. Chất diệt khuẩn axit cũng có thể có mặt.

Boomsma và cộng sự, Tạp chí SOFW (2015) Tập 141 (10) p2 đến 6 tiết lộ rằng khi không có chất hoạt động bề mặt, Axit Lactic đặc biệt hiệu quả chống lại vi khuẩn gram âm, và rằng vi khuẩn Gram dương có thể được xử lý bằng sự kết hợp của Axit Lactic và chất hoạt động bề mặt. Tính hiệp lực của sự kết hợp giữa chất hoạt động bề mặt và axit lactic tạo nên một hoạt động kháng khuẩn phổ rộng trong các sản phẩm làm sạch. Trong các sản phẩm có hàm lượng chất hoạt động bề mặt tương đối thấp, tính hiệp lực với Axit Lactic không chỉ là vấn đề chức năng, mà còn là vấn đề kinh tế. Các ví dụ điển hình về tính hiệp lực như vậy có thể kể đến các công thức làm sạch bề mặt cứng kháng khuẩn, trong đó hàm lượng chất hoạt động bề mặt anion và axit Lactic thấp có thể làm cho hiệu lực kháng khuẩn và kháng vi-rút rất hiệu quả về mặt kinh tế. Ấn phẩm cũng tiết lộ rằng đối với các công thức nhạy cảm hơn, các loại Axit L-Lactic siêu tinh khiết có sẵn cho phép các công thức dựa vào Axit Lactic để tuyên bố hoặc bảo quản kháng khuẩn,

đồng thời càng chứng tỏ một thực tế là chúng không có mùi thơm. Công trình cũng lưu ý rằng các thành phần thứ cấp khác như chất bảo quản, chất tạo cang và rượu, có thể làm tăng tác dụng diệt khuẩn của Axit Lactic.

Một ấn phẩm của Jungbunzlauer có tên "Khử trùng vi khuẩn an toàn và hiệu quả với Axit Lactic có nguồn gốc sinh học", đề cập đến khả năng sử dụng nó trong các chất tẩy giặt. Công trình ghi nhận rằng hỗn hợp Axit Lactic và SLES đã được thử nghiệm tính hiệp lực trong 5 phút (kết thúc bằng trung hòa pha loãng) ở 20°C diệt *P. aeruginosa* (DSM939), *S. aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (ATCC 10536) và *E. hirae* (ATCC 10541), với kỳ vọng một mức giảm 99,999% hoặc giảm log 5 theo quy chuẩn DIN EN 1040 được sửa đổi. Họ đã tìm thấy tính hiệp lực rõ rệt giữa hai thành phần trên một phạm vi nồng độ rộng. Họ nói rằng chất hoạt động bề mặt giúp Axit Lactic vượt qua và xâm nhập vào thành tế bào vi khuẩn. Kết quả là, Axit Lactic có thể thực thi toàn bộ tiềm năng diệt khuẩn của nó và tế bào sẽ bị diệt vong sau đó. Họ kết luận rằng trong khi các chất đơn lẻ (Axit Lactic, chất hoạt động bề mặt) chỉ cung cấp tác dụng chống vi khuẩn ở một mức độ hạn chế, sự kết hợp của cả hai dẫn đến việc tăng cường mạnh mẽ hiệu suất diệt khuẩn. Do tính hiệp lực thuận lợi này, yêu cầu khử trùng toàn diện (giảm 99,999% tất cả vi khuẩn - giảm log 5) được hỗ trợ ngay cả khi nồng độ Axit Lactic giảm xuống 1% và thấp hơn. Điều này, có nghĩa là các công thức cuối có thể được phát triển ít bó buộc hơn.

Các ấn phẩm được cấp bằng sáng chế sau đây cho thấy sự kết hợp của ít nhất một hợp chất amoni bậc bốn với Axit Lactic:

WO 2001/00777 (Colgate) bộc lộ các chế phẩm khử trùng bề mặt có chứa hỗn hợp các chất khử trùng, chất tăng cường cho các chất khử trùng một chất hoạt động bề mặt anion và một thành phần hydrocarbon, một chất đồng diện hoạt hòa tan trong nước và nước.

Chất khử trùng được sử dụng ở mức 0,05 đến 10% trọng lượng. Các tác nhân tăng cường được lựa chọn từ các chất tạo cang bao gồm các axit hữu cơ như axit Lactic hoặc axit citric và được sử dụng ở mức từ 0 đến 6% trọng lượng. Tất

cả các ví dụ đều sử dụng 2,5% trọng lượng Bardac 2170 (DDAC) và từ 0 đến 2% trọng lượng axit Lactic hoặc axit citric. Bardac 114 được chủ trương như là một hỗn hợp thay thế của các chất diệt khuẩn hợp chất amoni bậc bốn. Do đó, cả chủ trương chung và các ví dụ đều chỉ ra việc sử dụng dư thừa chất diệt khuẩn hợp chất amoni bậc bốn so với axit Lactic. Tác nhân tăng cường được chủ trương cải thiện hoạt động của vi khuẩn của chất khử trùng do đó làm tăng sự tiêu diệt vi khuẩn.

WO 2001/81519 (Colgate) tiết lộ chất tẩy rửa bồn cầu có chứa chất hoạt động bề mặt không ion, chất khử trùng, chất điều chỉnh độ nhớt polymer và nước. Các chất khử trùng hiện diện ở mức từ 0,05 đến 2,5% trọng lượng và được chọn từ các hợp chất amoni bậc bốn khác nhau bao gồm Bardac 114. Chế phẩm có thể theo tùy chọn gồm thêm từ 0 đến 2,5% trọng lượng một chất cho proton được chọn từ một danh sách dài các axit hữu cơ, bao gồm cả axit Lactic. Chúng không chỉ được sử dụng trong một ví dụ.

US 3932655 (Int. Pharmakon) bộc lộ một chất cô đặc khử trùng bao gồm hỗn hợp các halogenua benzalkonium n-alkyl hóa, tốt hơn là, các loại clorua amoni benzyl n-alkyl hóa hoặc clorua benzalkonium, mỗi loại có từ C8-18 trong các phần alkyl tương ứng, tốt hơn là C12-18, và hỗn hợp của chúng. Chất cô đặc còn bao gồm thêm một chất bảo quản và nước. Dùng các dung dịch được điều chế từ chất cô đặc chứa một lượng nhỏ chất cô đặc để có hiệu quả. Tốt hơn là, chất cô đặc bao gồm 99,5 đến 99,9% trọng lượng các thành phần tro và 0,1 đến 0,5% trọng lượng hoạt chất bao gồm một hỗn hợp của: chất tạo cang và một hỗn hợp gồm halogenua amoni alkyl benzyl n-alkyl hóa, hoặc halogenua amoni alkyl benzyl n-alkyl hóa, hoặc halogenua benzalkonium n-alkyl. Các chất tạo cang tốt hơn là axit tetraacetic etylenediamine hoặc muối kim loại kiềm của nó, chẳng hạn như axit tetraacetic disodium etylene diamine. Các hợp chất hữu ích khác bao gồm axit đường hoặc muối kim loại kiềm của chúng, chẳng hạn như axit gluconic, axit Lactic, axit citric, natri hoặc kali gluconate, lactate, citrate và tương tự.

Thành phần hoạt chất chứa từ khoảng 50 đến 75% trọng lượng hỗn hợp của clorua amoni bậc bốn và từ khoảng 25 đến 50% trọng lượng chất tạo cang. Tốt

hơn là, thành phần hoạt chất chứa từ khoảng 50 đến 60% trọng lượng hỗn hợp của clorua amoni bậc bốn và từ khoảng 40 đến 50% trọng lượng chất tạo cang. Có một ví dụ về chế phẩm khử trùng: nó đã sử dụng muối disodium của axit tetraacetic ethylene diamine được ưa thích làm chất tạo cang và sử dụng hai loại chủ yếu của chất khử trùng amoni bậc bốn (ADBAC và ADEBAC). Tỷ lệ trọng lượng của các hợp chất amoni bậc bốn này với chất tạo cang trong thành phần hoạt chất thể hiện sự dư thừa các hợp chất amoni bậc bốn so với chất tạo cang là 0,125: 0,090.

US 5861371 (Henkel-Ecolab) bộc lộ một chế phẩm dạng nước cho xử lý sau khi giặt đồ giặt chứa 0,1 đến 30% trọng lượng hợp chất amoni bậc bốn không tan trong nước, 0,1 đến 50% trọng lượng hợp chất amoni bậc bốn hòa tan trong nước, 0 đến 5% trọng lượng hợp chất terpene, 0,1 đến 20% trọng lượng axit tan trong nước và 0,1 đến 20% trọng lượng chất nhũ hóa. Các chế phẩm là để cải thiện vệ sinh và khử mùi vải. Việc bổ sung terpene mang lại lợi ích này mà không cần dùng đến các khối lượng bất ổn định chất diệt khuẩn hợp chất amoni bậc bốn hòa tan trong nước. Việc bổ sung axit hòa tan trong nước dường như nhằm mục đích điều chỉnh độ pH của chế phẩm nằm trong phạm vi từ 1 đến 5. Các chế phẩm có tính axit được cho là để trung hòa dư lượng chất tẩy kiềm trên vải. Các ví dụ đã sử dụng axit formic, mặc dù các axit hòa tan trong nước khác bao gồm Axit Lactic cũng được tiết lộ là lựa chọn thay thế phù hợp. Ngoại trừ các ví dụ được thực thi với pH 1, tất cả các ví dụ đã sử dụng hợp chất amoni bậc bốn vượt quá so với axit formic. Điểm 7 yêu cầu bảo hộ, có thể được coi là nhóm chế phẩm được ưa thích hơn, trừ tất cả các ví dụ với pH 1 khỏi phạm vi của nó. Các ví dụ đều sử dụng DDAC. Mặc dù các yêu cầu bảo hộ nói chung là bao gồm cả ADBAC nhưng nó không được sử dụng.

WO 2010/027863 (Stepan) bộc lộ một chế phẩm diệt khuẩn có chứa chất diệt khuẩn và hệ thống tăng tiềm lực, hỗn hợp có hoạt tính diệt khuẩn tổng hợp. Một chỉ số hiệp lực được xác định trong đoạn 048. Tác nhân diệt khuẩn bao gồm ít nhất một hợp chất amoni bậc bốn và hệ thống tăng tiềm lực bao gồm ít nhất một chất hoạt động bề mặt, dung môi, chất tạo cang và/hoặc chất đệm. Các chất tạo

càng được cho là đặc biệt phù hợp với các chế phẩm diệt khuẩn pha loãng trong đó chất pha loãng có thể có hàm lượng khoáng chất cao. Axit Lactic không được đề cập như một chất tạo càngh thích hợp. Nó được đề cập như một tác nhân đệm phù hợp. Tác nhân đệm được chỉ dẫn ở mức 0 đến 6 % trọng lượng, giảm xuống 0,3 đến 0,5 % trọng lượng, trong khi mức độ hoạt động của hợp chất amoni bậc bốn được chỉ dẫn là 6 đến 25 % trọng lượng xuống còn 10 đến 12 % trọng lượng. Do đó, sự dư thừa của hợp chất amoni bậc bốn so với chất đệm như Axit Lactic được tiết lộ. Điều này cũng được phản ánh trong các ví dụ.

EP 1454638 (Bode Chemie) bộc lộ các chế phẩm khử trùng đậm đặc dựa trên các hợp chất amoni bậc bốn và sử dụng chúng để chăm sóc nhiệt hóa học cho các dụng cụ. Ví dụ 1 và 3 sử dụng Axit Lactic và 2 loại QAC. Có quá nhiều QAC tổng số so với Axit Lactic.

WO 2013/067150 (Univ Columbia) mô tả các chế phẩm có hoạt tính kháng khuẩn ổn định bao gồm một hoặc nhiều chất chống vi trùng cation và một axit hữu cơ tùy chọn và muối kẽm là chất chống kích ứng. Lượng QAC dường như vượt quá lượng axit hữu cơ.

WO 2013/098547 (Byotrol) bộc lộ các chế phẩm kháng khuẩn bao gồm ít nhất một hợp chất amoni bậc bốn kháng khuẩn, một loại polymer ưa nước, dung môi phân cực, ít nhất một chất hoạt động bề mặt không ion và chất tạo càngh. Sáng chế tập trung vào loại polymer cụ thể được chọn. Các ví dụ đều có dư lượng lớn hợp chất amoni bậc bốn so với chất tạo càngh/Axit Lactic.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập một chế phẩm diệt khuẩn chứa một hoặc nhiều hợp chất amoni bậc bốn tan trong nước và một hoặc nhiều axit hydroxy hữu cơ tan trong nước; trong đó tỷ lệ trọng lượng của các axit hydroxy hữu cơ hòa tan trong nước với các hợp chất amoni bậc bốn nằm trong khoảng từ 95:5 đến 52:48.

Tốt hơn là chế phẩm bao gồm ít nhất hai hợp chất amoni bậc bốn hòa tan trong nước khác nhau.

Tỷ lệ trọng lượng của axit hydroxy hữu cơ tan trong nước với các hợp chất amoni bậc bốn tan trong nước tốt hơn là nằm trong khoảng 75:25 đến 54:46.

Các axit hydroxy hữu cơ hòa tan trong nước tốt nhất là Axit Lactic, hoặc hỗn hợp axit citric và axit malonic. Axit L-Lactic là đặc biệt phù hợp.

Theo một phương án có hai hợp chất amoni bậc bốn hòa tan trong nước, một là ADEBAC và hợp chất khác là ADBAC. Chế phẩm có thể chứa thêm cả DDAC.

Chế phẩm diệt khuẩn có thể chứa một chất mang dạng dung môi và một hỗn hợp gồm:

(i) ba hợp chất amoni bậc bốn bao gồm:

- a) (ADBAC) alkyl dimethyl benzalkonium clorua,
- b) (DDAC) didecyldimethyl amoni clorua và
- c) (ADEBAC) alkyl dimethyl etyl benzalkonium clorua,

và

(ii) Axit L-Lactic,

trong đó tỷ lệ trọng lượng của axit L-Lactic (ii) so với các hợp chất amoni bậc bốn (i) nằm trong khoảng từ 95:5 đến 52:48.

ADBAC bao gồm các chuỗi alkyl C8-18 với số lượng nguyên tử carbon chẵn được ưa thích hơn. Hàm lượng cao của C12-14 được ưa thích nhất vì các độ dài chuỗi này được cho là có tính diệt khuẩn cao nhất.

ADEBAC tốt hơn là chất lỏng với chuỗi alkyl C8-12. Tốt hơn là trên 90% chuỗi alkyl nên là chuỗi C10.

Ngoài ra, theo khía cạnh thứ hai của sáng chế đề cập một phương pháp để thêm một chế phẩm diệt khuẩn lỏng theo khía cạnh thứ nhất vào quy trình giặt bao gồm các bước thêm một liều từ 2 đến 100 ml chế phẩm lỏng vào bộ phận cấp phối hỗ trợ giặt xả của máy giặt tự động, có thể cùng với một liều chất làm mềm vải dạng lỏng trong cùng một ngăn cấp phối.

Liều tốt hơn là từ 4 đến 40 ml, tốt hơn nữa là từ 5 đến 25 ml.

Tốt hơn là chế phẩm được pha chế dưới dạng chất lỏng.

Việc sử dụng hỗn hợp này với lượng axit lactic dư thừa đi ngược lại với sự chỉ dẫn của tình trạng kỹ thuật trước đây, dường như cung cấp một mức độ hiệu quả tuyệt vời chống lại *P. aeruginosa*. Hiệu suất cao cho phép giảm đáng kể tổng khối lượng chất diệt khuẩn được sử dụng với sự gia tăng hiệp lực trong hoạt động diệt vi sinh. Ví dụ, một liều 10 g cô đặc có thể đủ để thêm vào đồ giặt trong điều kiện sạch (giặt xả) với mong muốn đáp ứng yêu cầu vệ sinh đối với vi khuẩn *P. aeruginosa* đã biết là có trong bối cảnh giặt. Việc giảm thể tích xuống mức thấp này cho phép tùy chọn thêm một hỗn hợp vào ngăn chứa chất làm mềm vải của máy giặt tự động cũng như thêm liều chất làm mềm vải thông thường. Thêm chất diệt khuẩn vào bước giặt xả theo cách này tốt hơn là thêm nó vào dung dịch giặt ban đầu vì (i) không tương thích với chất hoạt động bề mặt anion chứa các sản phẩm giặt chính và (ii) vi khuẩn mới có thể được đưa vào nước giặt xả và chúng cũng sẽ cần được xử lý bằng chất diệt khuẩn để đảm bảo vệ sinh các đồ giặt đã được giặt và giặt xả.

Cung cấp hệ thống diệt khuẩn hỗn hợp như là một chất cô đặc cho vào riêng biệt trong quá trình giặt, tốt nhất là trong giai đoạn giặt xả, cũng có thể tránh được vấn đề về chất diệt khuẩn hợp chất amoni bậc bốn gây bất ổn cho chất làm mềm vải nếu chúng được pha chế cùng với chất làm mềm vải và được chứa cùng trong một chai trong thời gian dài.

Sử dụng các chế phẩm theo sáng chế cung cấp quần áo sạch hợp vệ sinh với tải lượng vi khuẩn giảm đáng kể, đặc biệt là giảm tải *P. aeruginosa*. Việc sử dụng các chế phẩm có thể làm cho độ sạch sẽ của quần áo được cải thiện hơn và tỉ lệ mùi hôi còn sót lại trên quần áo và từ chính máy giặt ít hơn. Sử dụng các chế phẩm cũng có thể làm giảm tỷ lệ mốc đen thường thấy trong các ngăn kéo chứa chất làm mềm vải của máy giặt tự động.

Chế phẩm được pha chế phù hợp ở độ pH lớn hơn 2, tốt hơn là ở độ pH từ 2,2 trở lên. Điều này cải thiện sự an toàn của công thức cho người tiêu dùng. Trong sử dụng, các chế phẩm thường được pha loãng và độ pH sẽ tăng lên gần với mức trung tính. Nói chung, một chế phẩm axit hơn sẽ tiêu diệt nhiều vi khuẩn hơn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nhiều người tiêu dùng sử dụng chất làm mềm vải trong lần giặt cuối cùng của quy trình giặt để mang lại lợi ích, chẳng hạn như làm mềm vải và hương thơm lâu hơn. Sáng chế cho phép cấp phối hỗn hợp kháng khuẩn hiệu quả thông qua chế phẩm cô đặc có thể được cung cấp ở dạng đơn hoặc đa liều. Nó hiệu quả khi sử dụng một mình và nó cũng hiệu quả khi kết hợp với chất làm mềm vải. Điều này cho phép người tiêu dùng linh hoạt định lượng chế phẩm cùng với chất làm mềm vải thông qua ngăn xả của máy giặt tự động hoặc sử dụng nó như một cách xử lý giặt xả độc lập.

Ngoài ra, nhưng ít được ưa thích hơn do mối quan tâm về tính ổn định, công nghệ có thể được điều chế thành một chế phẩm làm mềm vải để mang lại lợi ích bổ sung từ sản phẩm kết hợp như vậy.

Các thiết bị phân phối trong giặt thông minh có thể được cấu hình để cho phép phát hành tuần tự các tác nhân lợi ích; các chế phẩm kháng khuẩn đậm đặc của sáng chế này có thể được giải phóng một cách thuận tiện, đặc biệt là vào nước giặt, từ một thiết bị như vậy.

Mặc dù các chế phẩm của sáng chế này chủ yếu nhằm mục đích cấp phối trong giai đoạn giặt xả; chúng cũng có thể được điều chỉnh để mang lại tác dụng kháng khuẩn cho bất kỳ bước nào của chu trình giặt bao gồm giặt sơ (pre-wash), giặt chính (main wash), ngâm, hấp, chiếu tia UV hoặc bất kỳ bước giặt xả (rinse) nào. Sáng chế không giới hạn ở việc giặt bằng máy và cũng sẽ mang lại lợi ích vệ sinh khi được sử dụng trong quy trình giặt tay.

Các chế phẩm được thiết kế đủ đậm đặc để đáp ứng mức độ vệ sinh cần thiết khi 2 đến 100 ml, tốt hơn là khoảng 4 đến 40 ml, tốt hơn nữa là 5 đến 25 ml chế phẩm được cấp phối vào chu trình giặt xả của máy giặt tự động. Chỉ một mình Axit L- Lactic là không đủ để tiêu diệt vi khuẩn theo tiêu chuẩn EN1276 khi được cung cấp dưới dạng liều 10 ml. Thực ra, ngay cả ở liều 100 ml, nó vẫn không diệt đủ khi sử dụng một mình.

Axit hydroxy hữu cơ

Axit L-Lactic là một axit hữu cơ và chia sẻ nhiều tính năng với các axit có kích thước tương tự. Sự kết hợp của hằng số phân ly axit thấp (pKa) và tính kỵ nước thấp làm cho nó dễ bị trộn lẫn với nước. Axit L-Lactic hiện hữu chủ yếu trong pha nước của nhũ tương. Điều này mang lại cho nó một lợi thế so với các axit hữu cơ kỵ nước hơn, bởi vì pha nước là nơi vi khuẩn cũng hiện hữu. Nó đặc biệt tốt trong việc "đưa qua đưa lại" các hạt proton, hay tính axit, trên màng tế bào. Khi ở trong tế bào, có bốn cơ chế hoạt động rộng có tác dụng ức chế tế bào vi khuẩn. Bốn cơ chế này đã được Desriac và đồng nghiệp xem xét vào năm 2013:

- Ứng xuất axit phá vỡ sự điều chỉnh tế bào ở mức độ chung.
- Vi khuẩn tiêu tốn năng lượng để duy trì pH, bằng cách bơm axit.
- Vi khuẩn thay đổi sự trao đổi chất của chúng để tạo ra các chất chuyển hóa kiềm.
- Ứng xuất axit tạo ra các gốc tự do gây tổn hại cho tất cả các cơ chế tế bào.

Trong thời gian phơi nhiễm ngắn trực tiếp dẫn đến việc vô hiệu hóa vi khuẩn, một số cơ chế này có liên quan nhiều hơn các cơ chế khác. Trong thử nghiệm tiêu chuẩn về chất lượng kháng khuẩn của các sản phẩm tẩy giặt, phơi nhiễm có thể chỉ trong 30 giây. Trong khung thời gian này, vi khuẩn không thể đối phó lại bằng cách điều chỉnh cấu trúc hoặc sự trao đổi chất của chúng để tồn tại. Ứng xuất axit nghiêm trọng đột ngột dẫn đến một cú sốc ứng xuất oxy hóa hoàn toàn, trong khi bất kỳ cơ chế sinh tồn nào đều bị ức chế bởi pH nội bào thấp. Về mặt này, axit lactic rất khác với một số loại thuốc chống vi trùng tổng hợp có thể dựa vào các cơ chế đơn lẻ để tiêu diệt vi khuẩn. Không có sự thích nghi nào có thể giúp vi khuẩn kháng cự. Sự phát sinh của ứng xuất oxy hóa xảy ra ở màng tế bào, do sự cố của chuỗi vận chuyển điện tử. Khi tiếp xúc với các sản phẩm làm sạch, màng vi khuẩn đã bị mất ổn định. Chúng bị tiết ra nhiều chất dịch hơn bởi sự có mặt của chất hoạt động bề mặt để dẫn đến việc bất hoạt hiệu quả hơn. Axit lactic có hiệu quả chống lại vi khuẩn gram âm trong trường hợp không có chất hoạt động bề mặt. Vi khuẩn gram dương thường ít nhạy cảm với axit lactic. Các thành phần thứ cấp như chất bảo quản, chất tạo cặn và rượu, có thể làm tăng tác

dụng diệt khuẩn của axit lactic. Những sự hiệp lực này thường được hiểu rõ nhất khi thêm sự phá hủy bổ sung vào các giai đoạn sống của vi khuẩn, khiến chúng dễ bị tổn thương hơn trước hoạt động khử trùng chính của công thức.

Lu và cộng sự, J. h Bảo vệ Thực phẩm (2011) Tập 74 (6) p893 đến 8 chỉ tiết lộ một sự khác biệt nhỏ trong việc giảm *E. coli* giữa Axit L- và D-Lactic trong điều kiện yếm khí, nhưng đề cập đến công việc trước đó trong môi trường hiếu khí trong đó Axit L-Lactic cho kết quả tốt hơn đáng kể. Vì hoạt động giặt được thực hiện dưới sự khuấy trộn trong máy giặt chủ yếu là quá trình hiếu khí, chúng tôi tin rằng Axit L-Lactic sẽ được ưu tiên sử dụng.

Các axit cacboxylic khác có thể được sử dụng, một mình hoặc trong hỗn hợp lẫn nhau hoặc với axit lactic. Một hỗn hợp hữu ích là hỗn hợp 50:50% trọng lượng axit citric và axit malonic. Các axit ở dạng lỏng (ví dụ Axit Lactic) và do đó có thể dễ dàng trộn lẫn với các hợp chất amoni bậc bốn cũng ở dạng lỏng được ưu tiên vì lý do điều chế. Axit L-Lactic được ưa thích hơn hỗn hợp chúng vì nó là chất diệt khuẩn đã được đăng ký và do đó có thể sẵn sàng sử dụng hơn để hỗ trợ yêu cầu của hoạt động diệt khuẩn.

Các chất diệt khuẩn hợp chất amoni bậc bốn

Các chất diệt khuẩn hợp chất amoni bậc bốn (QAC) và hỗn hợp diệt khuẩn phù hợp để sử dụng trong sáng chế được nêu trong Bảng 1:

Bảng 1

Tên vật liệu	Nhà cung cấp	Cấp độ hoạt động	Hoạt chất
Bardac 114	Lonza	0,48	ADEBAC: ADBAC: DDAC
BTC 2125 M80E	Stepan	0,81	ADEBAC: ADBAC
BTC 8353F	Stepan	0,81	ADBAC
BTC 1010-E	Stepan	0,5	DDAC

Sanilac 80 *	Corbion	0,8	Axit L-Lactic
Tinosan HP100	BASF	0,3	Diclosan
Axit xitric	Sigma Aldrich	1,0	Axit xitric
Axit malonic	Sigma Aldrich	1,0	Axit malonic

* Purac® Sanilac (Axit L-Lactic) đang được Corbion đăng ký làm chất diệt khuẩn.

ADEBAC = C12-14-alkyl [(etylphenyl) metyl] dimetyl clorua CAS số 85409-23-0

ADBAC = Benzyl C12-16 alkyl dimetyl clorua Số CAS 68424-85-1

DDAC = Didecyldimetylammonium clorua CAS số 7173-51-5

Axit L-Lactic = axit 2-hydroxypropanoic ($C_3H_6O_3$)

Một vật liệu được ưu tiên là Bardac 114 bao gồm ba hợp chất amoni bậc bốn kháng khuẩn (QACs) với số lượng bằng nhau (ADEBAC, ADBAC & DDAC) trong propan-2-ol (7%) và nước. Vật liệu được bán trên thị trường dưới dạng hỗn hợp hiệp đồng và được cho là hiệu quả gấp 3 lần so với ADBAC (nghĩa là BKC). Hàm lượng hoạt chất của Bardac 114 là:

ADBAC: QAC benzyl C12-16 alkyl dimetyl, clorua (16%)

DDAC: Didecyldimetylammonium clorua (16%)

ADEBAC: QAC C12-14-alkyl [(etylphenyl) metyl] dimetyl clorua (16%)

Hệ thống diệt khuẩn hỗn hợp

Chúng tôi đã phát hiện ra rằng việc kết hợp Axit L-Lactic với Bardac 114 mang lại hoạt tính diệt khuẩn tốt đối với *P. aeruginosa* ở nhiệt độ môi trường và thời gian tiếp xúc ngắn và cũng làm giảm lượng Bardac 114 cần thiết để đảm bảo EN1276 đi vào giặt xả từ máy giặt tự động cửa trước (Hệ số pha loãng x1400)); và cũng tránh ghi nhãn dễ cháy trên sản phẩm. Chúng tôi cũng đã thử nghiệm axit lactic triệt quang và thấy nó cho kết quả tương tự khi trộn với Bardac 114.

EN1276 thường yêu cầu xét nghiệm chống lại 4 loài vi khuẩn. Chúng là:

S. aureus: một loại vi khuẩn gram dương

E. hirae: một loại vi khuẩn gram dương thứ hai

E. coli: một loại vi khuẩn gram âm

P. aeruginosa: một loại vi khuẩn gram âm thứ hai.

Một trong những loài được sử dụng trong thử nghiệm EN1276 là *P. aeruginosa* và chế phẩm cô đặc rất hiệu quả để chống lại loài này. Chúng tôi đã xác minh rằng *Pseudomonas* spp. là thành phần chính của hệ vi sinh vật có trong quần áo được giặt ở nhiều thị trường. Đối với các hệ thống dựa trên QAC, người ta biết rằng *P. aeruginosa* là loài khó tiêu diệt nhất trong thử nghiệm EN 1276.

Chất diệt khuẩn bổ sung

Diclosan, một hợp chất bi-halogen; "4-4' dichloro-2-hydroxy diphenyl ether" có thể được thêm vào chế phẩm trong một số phương án để cung cấp hỗn hợp diệt khuẩn hiệu quả về mặt trọng lượng.

Độ nhớt, màu sắc, mùi và độ pH của các chế phẩm có thể được điều chỉnh bằng cách thêm chất làm đặc, chất tạo màu, nước hoa và chất điều chỉnh độ pH.

Các chất làm đặc thích hợp bao gồm: gồm gellan, gồm diôm, gồm xanthan, gồm guar, copolyme acryit/acrylic, copolyme acryit/aminoacryit, alginate, arabinogalactan, carrageenan, pectin, đất sét trương nở trong nước, silic được hun khói, các chất tương thích không mang điện tích và glycerol kết hợp với bất kỳ vật liệu nói trên.

Các chất điều chỉnh pH thích hợp phải rẻ tiền, không mùi, không độc hại và tạo ra các giải pháp rõ ràng khi điều chỉnh độ pH. Chúng bao gồm: Natri Hydroxide, Kali Hydroxide, Canxi Hydroxide và Lithium Hydroxide.

Khi chúng được cung cấp dưới dạng cô đặc, các chế phẩm có thể được đóng gói dưới dạng liều đơn hoặc nhiều liều trong một gói. Các gói phù hợp để đo liều thấp tới 10 ml là thông thường với người làm việc trong lĩnh vực.

Sáng chế sẽ được mô tả thêm với tham chiếu các ví dụ không giới hạn sau đây và tham chiếu bản vẽ; đó là một ý đồ lợi ích hiệp lực so với chế phẩm diệt khuẩn cho thấy nơi mà lợi ích cho hệ thống 3 thành phần lớn hơn 2,6.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tính hiệp lực

Công thức 1 tính toán tính hiệp lực của hỗn hợp ba thành phần của các thành phần kháng khuẩn (S_{abc})

$$S_{abc} = \frac{[a]_{MBCabc}}{MBC\ a} + \frac{[b]_{MBCabc}}{MBC\ b} + \frac{[c]_{MBCabc}}{MBC\ c} \quad \text{Phương trình 1}$$

Trong đó

MBC_a là nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của thành phần được xác định đối với một sinh vật được chỉ định. (Được xác định là nồng độ của thành phần làm giảm số lượng vi khuẩn Log 5 đối với quy chuẩn thử nghiệm huyền phù thích hợp và trong trường hợp này trong thời gian tiếp xúc 5 phút, điều kiện bản, nước có độ cứng tiêu chuẩn ở 20 ° C). Các ví dụ trong tài liệu này được tạo ra theo thử nghiệm huyền phù với tám phẳng có nhiều "giếng" là phiên bản thu nhỏ của EN1276.

$[a]_{MBCabc}$ là nồng độ của thành phần a trong hỗn hợp abc tại nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của hỗn hợp tức là tại MBC_{abc} .

Đối với mỗi loại vi khuẩn được thử nghiệm một mức độ hiệp lực riêng, (S_{abc}) được tính toán.

S_{abc} của một hỗn hợp chống lại vi khuẩn nào đó là hiệp lực khi <1 , là chất phụ gia khi $=1$ và là đối kháng khi >1 .

Hiệp lực có được của hỗn hợp được xác định là $\frac{1}{S_{abc}}$ và do đó là hiệp lực khi >1 .

Đối với hỗn hợp diệt khuẩn hai thành phần, phương trình trở thành:

$$S_{ab} = \frac{[a]_{MBCab}}{MBC\ a} + \frac{[b]_{MBCab}}{MBC\ b} \quad \text{Phương trình 2}$$

Ví dụ 1

Các chế phẩm được tạo ra bằng cách trộn nguyên liệu thô bằng máy trộn trên cao đơn giản để tạo thành các chế phẩm trong Bảng 2. Không có vấn đề về thứ tự cho các thành phần vào.

Bảng 2

Mã ví dụ		A	B	C	D	E	F	G	H
Thành phần	Hoạt động	% như là							
Bardac 114 (hỗn hợp QAC)	0,48	75,0		56,3	41,3	37,5			
Sanilac 80 (Axit L-Lactic)	0,8		46,9	11,7	21,1	23,4		11,8	23,5
BTC 1010-E	0,5						75,0	56,2	37,5
1 M HCl		Thêm đủ 1M HCl hoặc 1M NaOH khi thích hợp để điều chỉnh pH đến 2,2							
1M NaOH									
H ₂ O	1,0	cho đến 100%							

Bảng 2 (tiếp)

Mã ví dụ		J	K	L	M	1	2	3	4	5
Thành phần	Hoạt động	% như là								
Bardac 114 (hỗn hợp QAC)	0,48					35,0	18,8			37,5
Sanilac 80 (Axit L-Lactic)	0,8		11,8	23,5		25,0	35,2	35,2	35,2	
BTC 1010-E	0,5							19,0		
BTC 2125 M80E	0,81	46,0	37,4	23,2					11,6	
Axit citric: Axit malonic 1: 1	1,0				70					23,4

HCl 1 M		Thêm đủ HCl 1M hoặc NaOH 1 M khi thích hợp để điều chỉnh pH đến 2,2
NaOH 1 M		
H ₂ O	1,0	cho đến 100%

Chế phẩm phân đoạn của các hoạt chất, tức là QAC (ADBAC; ADEBAC; DDAC) và các axit hữu cơ có trong các hỗn hợp này được nêu trong Bảng 4 và 5.

Quy chuẩn thử nghiệm

Một thử nghiệm huyền phù định lượng thông lượng cao được thực hiện trong các tấm phẳng có nhiều "giếng" (MTP) và dựa trên phiên bản thu nhỏ của thử nghiệm huyền phù cổ điển được bao gồm trong tiêu chuẩn BS EN 1276: 1997 được sử dụng để đánh giá hoạt tính diệt khuẩn của các hệ thống diệt khuẩn hỗn hợp. Cách tiếp cận có thể được sử dụng với bất kỳ vi khuẩn nào, nhưng trong ví dụ này, chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* ATCC 15442 được sử dụng riêng.

Phiên bản thu nhỏ của xét nghiệm EN 1276 đầy đủ được thực hiện bằng hệ thống xử lý chất lỏng tự động của robot Hamilton với đầu 96 giếng. Sự khác biệt thực tế giữa hai quy chuẩn được tóm tắt trong Bảng 3.

Bảng 3: So sánh BS EN 1276 và phương pháp tấm phẳng có nhiều "giếng" thu nhỏ

Thử nghiệm huyền phù cổ điển BS EN 1276	Thử nghiệm huyền phù thu nhỏ theo EN 1276 với tấm phẳng 96 "giếng"
--	---

1 ml vi khuẩn thử nghiệm vào 1 ml chất gây nhiễu (0,3/0,03 g/L albumin huyết thanh bò) trong 30 ml sterilin.	100 µl vi khuẩn thử nghiệm vào 100 µl chất gây nhiễu (0,3 g/L albumin huyết thanh bò) trong tấm phẳng 96 "giếng".
Thời gian tiếp xúc 2 phút	Thời gian tiếp xúc 2 phút
8 ml sản phẩm thử nghiệm được thêm vào vi khuẩn/BSA	60 µl vi khuẩn/BSA được thêm vào 240 µl sản phẩm thử nghiệm trong tấm phẳng 96 "giếng". Giữa các cột của tấm phẳng này, nồng độ của sản phẩm thử nghiệm thay đổi. Theo đó, những vi khuẩn phải chịu thử thách khác nhau.
Thời gian tiếp xúc 5 phút	Thời gian tiếp xúc 5 phút
1 ml vào 9 ml dung dịch trung hòa	30 µl vào 270 µl dung dịch trung hòa
Thời gian trung hòa 5 phút	Thời gian trung hòa 5 phút
Pha loãng nối tiếp ở tỉ lệ 1:10 vào chất pha loãng tryptone	Từ tấm trung hòa 30µl từ mỗi giếng được chuyển vào tấm đầu tiên trong sáu tấm pha loãng từ đây pha loãng nối tiếp ở tỉ lệ 1:10 của 30 µl vào 270 µl môi trường vi sinh Tryptic Soy Broth (TSB) được tạo ra. Do đó, một mức giết chết 6 Log trong quần thể vi khuẩn được so sánh với các giếng kiểm soát sự tăng trưởng của vi khuẩn
1 ml vào tấm petri và phủ lớp thạch nóng chảy ~ 40 ° C	Độ đục ban đầu đọc ở 620nm trên tất cả các tấm pha loãng.

Xoay, đặt và ủ tằm lên đến 40 giờ kiểm tra tại 24.	Thời gian ủ 20 giờ ở 37 ° C được thực hiện.
Số lượng vi khuẩn còn sống được xác định thông qua số đếm tổng số vi sinh vật sống (TVC number).	mật độ quang (OD) điểm cuối đọc ở 620nm Một thay đổi 0,2 đơn vị OD liên quan đến đọc ban đầu được sử dụng để đặt ngưỡng tăng trưởng. Nồng độ trước ngưỡng mà tại đó ngưỡng này được thông qua cho thấy số lượng vi khuẩn có xác suất lớn nhất mà nồng độ cho trước của hỗn hợp diệt khuẩn có thể tiêu diệt ở mỗi độ pha loãng.

Trong thử nghiệm huyền phù với tấm phẳng có nhiều "giếng", các thuốc thử sau được sử dụng: -

Chất trung hòa: Tween 80, 60 g/L; lecithin, 6 g/L; L-histidine, 2 g/L; natri thiosulphate, 10 g/L; khử trùng bằng nồi hấp.

Môi trường phục hồi: Tryptone Soya Broth 30 g/L được khử trùng bằng nồi hấp.

Môi trường huyền phù vi khuẩn: Bột tryptone vi khuẩn, 1 g/L; natri clorua 8,5 g/L; Khử trùng bằng nồi hấp.

Chủng vi khuẩn được *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442

sử dụng:

Thời gian tiếp xúc: 5 phút ± 10 giây

Nhiệt độ thử nghiệm: 20 ° C ± 1 ° C

Chất gây nhiễu:

Điều kiện bản: 0,3% khối lượng/thể tích albumin huyết thanh bò trong thử nghiệm

Chất gây nhiễu được điều chế trong nước cất vô trùng ở mức 3% và được khử trùng bằng cách đi qua bộ lọc cellulose 0,2 μm .

Nhiệt độ và thời gian ủ bệnh: 37°C thời gian $\pm 1^\circ\text{C}$ trong 20 giờ

Nồng độ thường dùng của các công thức được đưa ra trong Bảng 1 được pha trong 60 ml tiệt trùng và sự pha loãng được thực hiện trong các tấm phẳng 96 "giếng", tất cả các chất dự trữ và pha loãng được chuẩn bị bằng nước cứng 24°FH. Thông thường, phương pháp thử nghiệm là tổng khoảng nồng độ của hỗn hợp thành phần thay đổi trong khoảng từ 1000 ppm đến 50 ppm. Các tấm thử nghiệm được thiết lập sao cho các tấm công thức có 11 độ pha loãng công thức kéo dài qua 11 cột của tấm. Đối với các hệ thống diệt khuẩn ít hơn như Ví dụ B và M về chế phẩm, cần phải tăng nồng độ và sử dụng các bước pha loãng lớn hơn để tìm kiếm và cuối cùng tìm thấy MBC.

Huyền phù vi khuẩn được điều chế từ nuôi cấy tấm tươi trên môi trường thạch tryptone và ủ trong 18 giờ ở 37°C. Định chỉ được thực hiện lên đến một mật độ 1,7 đơn vị McFarland (từ 1 đến $1,5 \times 10^8$ cfu / ml) trong tryptone chất pha loãng.

Các công thức được chuẩn bị như chi tiết ở trên và pha loãng trong một tấm phẳng có nhiều "giếng" sâu 2,2 ml sử dụng nước 24°FH cho tất cả các pha loãng. Nồng độ được thực hiện để cho phép pha loãng thử nghiệm 1,25. Các controls c dương tính và âm tính của dung dịch Virkon 1% và nước 24 ° FH đã được sử dụng.

Sau khi chuyển các công thức vào tấm thử, 100 μl bụi đất và 100 μl huyền phù vi khuẩn được chuyển vào một tấm phẳng 96 "giếng" rỗng và để trong thời gian tiếp xúc là 2 phút. Một khối đất 60 μl thể tích đất/vi khuẩn sau đó được chuyển vào tấm thử trộn và để trong thời gian tiếp xúc là 5 phút. Từ tấm thử nghiệm 30 μl được hút từ tất cả các giếng và phân phối vào tấm trung hòa để lại thời gian

tiếp xúc trong 5 phút. Từ tấm trung hòa 30 μ l từ tất cả các giếng đã được chuyển vào 6 tấm pha loãng đầu tiên từ đây pha loãng nối tiếp ở tỉ lệ 1:10 của 30 μ l trên tất cả các giếng đã được tạo thành 6 tấm pha loãng còn lại chứa 270 μ l môi trường vi sinh Tryptic Soy Broth (TSB)

Các tấm được đọc mật độ quang (OD) ở 620nm tại thời điểm 0, các tấm sau đó được ủ tĩnh ở 37 ° C trong 20 giờ trước khi lấy mật độ quang điểm cuối đọc ở 620nm. Các giá trị OD sau 0 và 20 giờ được sử dụng để tính giá trị Δ OD cho mỗi công thức và nồng độ. Giảm loga (log) được xác định bằng cách sử dụng hầu hết số có thể xảy ra (MPN) với ngưỡng mật độ quang (OD) là 0,2 đơn vị OD cho thấy sự tăng trưởng lại. Nồng độ trước ngưỡng mà ngưỡng này được thông qua cho thấy MPN của vi khuẩn có nồng độ nhất định của hỗn hợp biocidal và có thể tiêu diệt ở mỗi độ pha loãng Log.

Sau khi thiết lập đáp ứng liều của hỗn hợp biocidal, phương pháp phù hợp với đường cong được áp dụng để dự đoán MBC của hỗn hợp biocidal.

Đường cong phù hợp để có được ranh giới của khu vực này đã được tạo bằng cách khớp dữ liệu cho tỉ lệ giết chết vi khuẩn đo được so với *P. aeruginosa* so với nồng độ của chế phẩm với chức năng sigmoidal có dạng:

$$y = a1 + (a2 - a1) / \{1 + 10^{[a4 * (a3 - X)]}\}. \text{ [eq1]}$$

trong đó

y = tỉ lệ giết vi khuẩn được đo cho *P. aeruginosa*

x = nồng độ chế phẩm tính bằng ppm

a1 = tỉ lệ giết vi khuẩn tối thiểu,

a2 = tỉ lệ giết vi khuẩn tối đa

a3 = điểm uốn của đường cong sigmoidal, tính bằng ppm

a4 liên quan đến độ dốc của đường cong tại điểm uốn.

Đối với tất cả các chế phẩm được kiểm tra, phạm vi tiêu diệt nằm trong khoảng từ 0 đến 6 loga (log) do đó, a1 được đặt thành 0 và a2 được đặt thành 6. Dữ liệu thực nghiệm cho một chế phẩm được thử nghiệm được gắn vào hàm

sigmoid để thu được các tham số a_3 và a_4 . Điều này đã đạt được bằng cách giảm thiểu sai số thu được từ

$$\text{Sai số} = \text{tổng } ((y_{\text{measured}}(i) - y(i))^2) \quad [\text{eq2}]$$

Trong đó $y_{\text{được đo}}(i)$ là MBC đo được của điểm thử nghiệm thứ i cho một chế phẩm và $y(i)$ là MBC cho điểm thử nghiệm thứ i cho một chế phẩm, như được tính bởi hàm sigmoidal; eq1.

Sai số có được bằng cách tính tổng các bình phương của các sai số trên tất cả các điểm dữ liệu thử nghiệm cho một chế phẩm.

Việc giảm thiểu sai số bằng cách thay đổi các giá trị của a_3 và a_4 có thể thu được bằng bất kỳ chiến lược tối ưu hóa phù hợp nào, ví dụ như sử dụng bộ giải quyết sai số trong excel.

Khi các giá trị cho a_3 và a_4 thu được bằng cách giảm thiểu sai số từ eq2, MBC đã được tìm thấy bằng cách tìm nồng độ chế phẩm tạo ra dự đoán $\log \text{Kill} = 5$.

Ví dụ: MBC có thể được tìm thấy từ:

$$\text{MBC} = a_3 - (1 / a_4) * \text{LOG}_{10} ((a_2 - a_1) / (5 - a_1) - 1)$$

Trong đó $\text{LOG}_{10}(x)$ là logarit của x cơ số 10.

Kết quả MBC và lợi ích tổng hợp được tính toán cho mỗi kết hợp được đưa ra trong Bảng 4. Các ví dụ được biểu thị bằng một chữ cái là các ví dụ so sánh nằm ngoài phạm vi của yêu cầu bảo hộ. Các ví dụ được đánh số từ 1 đến 4 đều theo sáng chế.

Hình 1 là một biểu đồ của dữ liệu trong Bảng 4 cho thấy khu vực chế phẩm theo sáng chế, trong đó lợi ích hiệp lực lớn hơn hoặc bằng 2,7. 2,6 là mức tăng tính hiệp lực của hỗn hợp 50% axit L-Lactic, 25% trọng lượng ADEBAC và 25% ADBAC. 2. 6 là lợi ích hiệp lực thu được khi 67% ADEBAC: ADBAC được pha trộn với 33% DDAC để tạo ra hỗn hợp tương đương trong chế phẩm QAC với hỗn hợp Bardac 114 tổng hợp.

Bảng 4

Ví dụ	DDAC	ADEBAC: ADBAC *	Axit L- Lactic	Đất cao <i>P. aeruginosa</i> 5 phút, 20 ° C MBC (ppm)	Lợi ích hiệp lực (3 cách)
A	0,33	0,67	0,00	155	2,6
B	0,00	0,00	1,00	300 000	1,0
C	0,25	0,50	0,25	269	2,0
D	0,18	0,37	0,45	288	2,6
E	0,17	0,33	0,50	315	2,6
1	0,15	0,30	0,55	327	2,9
2	0,08	0,17	0,75	326	5,1
F	1,00	0,00	0,00	248	1,0
G	0,75	0,00	0,25	281	1,2
H	0,50	0,00	0,50	326	1,5
3	0,25	0,00	0,75	353	2,8
J	0,00	1,00	0,00	581	1,0
K	0,00	0,75	0,25	532	1,5
L	0,00	0,50	0,50	445	2,6
4	0,00	0,25	0,75	488	4. 7

* ADEBAC: ADBAC là hỗn hợp 50% trọng lượng của hai nguyên liệu bậc bốn.

Ví dụ 2

Các axit cacboxylic khác có thể được sử dụng, một mình hoặc trong hỗn hợp lẫn nhau hoặc với Axit Lactic. Một hỗn hợp hữu ích là hỗn hợp axit citric và malonic 50: 50% trọng lượng.

BẢNG 5

Ví dụ	DDAC	ADEBAC: ADBAC	Axit citric 1: 1: axit malonic	Đất cao <i>P. aeruginosa</i> 5 phút, 20 ° C MBC (ppm)	Tăng tính hiệp lực (3 cách)
A	0,3333	0,667	0,00	155	2,6
F	0,00	0,00	1,00	248	1,0
J	0,00	1,00	0,00	581	1,0
M	0,00	0,00	1,00	3000	1,0
5	0,25	0,50	0,25	230	3,1

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp thêm chế phẩm diệt khuẩn vào quy trình giặt bao gồm các bước thêm một liều từ 4 đến 40 ml chế phẩm lỏng vào bộ cấp phối nước xả của máy giặt tự động, có thể cùng với một liều chất làm mềm vải dạng lỏng vào trong cùng một ngăn cấp phối, chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều hợp chất amoni bậc bốn tan trong nước và một hoặc nhiều axit hydroxy hữu cơ tan trong nước; trong đó tỷ lệ trọng lượng của các axit hydroxy hữu cơ hòa tan trong nước với các hợp chất amoni bậc bốn nằm trong khoảng từ 95:5 đến 52:48; trong đó axit trong chế phẩm bao gồm axit L-lactic; và trong đó có hai hợp chất amoni bậc bốn tan trong nước, một là ADEBAC (C12-C14-alkyl [(etylphenyl) methyl] dimetyl amoni clorua) và một là ADBAC (benzyl C12-16 alkyl dimetyl amoni clorua).
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tỷ lệ trọng lượng của axit hydroxy hữu cơ hòa tan trong nước với các hợp chất amoni bậc bốn tan trong nước trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 75:25 đến 54:46.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó chế phẩm bao gồm thêm DDAC (didecyldimetyl amoni clorua).
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm chứa một chất mang dạng dung môi và một hỗn hợp gồm:
 - (i) ba hợp chất amoni bậc bốn bao gồm:
 - a) (ADBAC) benzyl C12-16 alkyl dimetyl amoni clorua,
 - b) (DDAC) didecyldimetyl amoni clorua và
 - c) (ADEBAC) C12-C14-alkyl [(etylphenyl) methyl] dimetyl amoni clorua,
 và
 - (ii) axit L-lactic,
 trong đó tỷ lệ trọng lượng của axit L-lactic (ii) so với các hợp chất amoni bậc bốn (i) nằm trong khoảng từ 95:5 đến 52:48.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó liều lượng là từ 5 đến 25 ml.