

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61L 2/16 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03821068.1

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100364615C

[22] 申请日 2003.9.2 [21] 申请号 03821068.1
[30] 优先权
[32] 2002.9.5 [33] SE [31] 0202625-0
[32] 2002.9.5 [33] US [31] 60/407,938
[86] 国际申请 PCT/SE2003/001356 2003.9.2
[87] 国际公布 WO2004/022111 英 2004.3.18
[85] 进入国家阶段日期 2005.3.4
[73] 专利权人 米特拉医疗股份公司
地址 瑞典隆德
[72] 发明人 B·E·B·桑德伯格 R·尼森
C·汝德巴克
[56] 参考文献
US4619935A 1986.10.28
CN1360467A 2002.7.24
US5079236A 1992.1.7

审查员 俞可嘉
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 唐伟杰

权利要求书 3 页 说明书 34 页

[54] 发明名称
组合物的应用及方法

[57] 摘要

本发明涉及在含水抗微生物防腐组合物中使用至少一种烷基对羟苯甲酸酯用于消除或减少微生物污染的分选基质中的微生物含量，其中分选基质在分选装置中使用，分选基质被微生物污染。此外，上述组合物用于生产微生物含量消除或减少的分选基质的方法中，所述方法包括提供所述的分选基质，其中分选基质装在所述装置或容器内且被微生物污染；将含有至少一种烷基对羟苯甲酸酯的含水抗微生物防腐组合物加入到在所述装置或容器内的上述分选基质中；让所述的含水抗微生物防腐组合物在所述装置或容器内发挥其作用直到每克防腐组合物中的菌落数 (CFU) 充分降低；从上述装置或容器中冲洗掉含水抗微生物防腐组合物。

1. 含水抗微生物防腐组合物用于消除或减少污染了微生物的分离基质中的微生物含量的应用，其中分离基质要装在分离装置中使用，其中所述组合物含有至少一种烷基对羟基苯甲酸酯。

2. 如权利要求 1 中的应用，其中所述至少一种烷基对羟基苯甲酸酯为对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯或对羟基苯甲酸丁酯。

3. 如权利要求 1 或 2 中的应用，其中所述的至少一种烷基对羟基苯甲酸酯的浓度随烷基数的增大而降低。

4. 如权利要求 2 的应用，其中对羟基苯甲酸甲酯的浓度在 0.5 和 $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 之间。

5. 如权利要求 2 的应用，其中对羟基苯甲酸乙酯的浓度在 0.01 和 $0.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 之间。

6. 如权利要求 2 的应用，其中对羟基苯甲酸丙酯的浓度在 0.12 和 $0.25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 之间。

7. 如权利要求 2 的应用，其中对羟基苯甲酸丁酯的浓度为 $0.002-0.04 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 。

8. 权利要求 1 的应用，其中所述含水抗微生物防腐组合物进一步含有增溶剂，其浓度足以维持所述至少一种烷基对羟基苯甲酸酯溶解。

9. 如权利要求 8 中的应用，其中所述增溶剂为丙二醇。

10. 如权利要求 9 中的应用, 其中所述丙二醇的浓度为不超过 $20\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 。

11. 一种生产具有消除的或减少的微生物含量的分离基质的方法, 所述方法包括以下步骤:

提供在装置或容器中的被微生物污染的所述分离基质;

向在所述装置或容器内的所述分离基质中加入含水抗微生物防腐组合物, 其中所述抗微生物防腐组合物含至少一种烷基对羟基苯甲酸酯;

让所述的含水抗微生物防腐组合物在所述装置或容器内发挥作用直到每克防腐组合物的菌落形成单位数充分减少; 和

从所述装置或容器中冲洗掉所述的含水抗微生物防腐组合物。

12. 如权利要求 11 中的所述方法, 其中所述至少一种烷基对羟基苯甲酸酯为对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯或对羟基苯甲酸丁酯。

13. 如权利要求 11 或 12 中的方法, 其中所述的至少一种烷基对羟基苯甲酸酯的浓度随烷基数的增大而降低。

14. 如权利要求 12 的方法, 其中对羟基苯甲酸甲酯的浓度在 0.5 和 $2\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 之间。

15. 如权利要求 12 的方法, 其中对羟基苯甲酸乙酯的浓度在 0.01 和 $0.5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 之间。

16. 如权利要求 12 的方法, 其中对羟基苯甲酸丙酯的浓度在 0.12 和 $0.25\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 之间。

17. 如权利要求 12 的方法，其中对羟基苯甲酸丁酯的浓度为 $0.002-0.04\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 。

18. 权利要求 11 所述的方法，其中所述的含水抗微生物防腐组合物进一步含有增溶剂，其浓度足以维持所述至少一种烷基对羟基苯甲酸酯溶解。

19. 如权利要求 18 中的方法，其中所述增溶剂为丙二醇。

20. 如权利要求 9 的方法，其中所述丙二醇的浓度为不超过 $20\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 。

21. 权利要求 11 所述的方法，其中在将含水抗微生物防腐组合物加入所述分离基质中之前对所述含水抗微生物防腐组合物灭菌。

22. 如权利要求 21 的方法，其中所述的含水抗微生物防腐组合物通过蒸汽或过滤灭菌的方式灭菌。

23. 权利要求 11 所述的方法，其中让所述含水抗微生物防腐组合物发挥其作用至少 6 小时。

24. 权利要求 11 所述的方法，其中让所述含水抗微生物防腐组合物发挥其作用直到满足美国药典和 / 或欧洲药典的试验规定。

组合物的应用及方法

本发明涉及含水抗微生物防腐组合物用于消除或减少微生物污染的分离基质中微生物含量的应用以及生产这种消除或减少了微生物含量的分离基质的方法。

如今许多实验室和生产过程中用到分离基质。这些系统可能对于所要吸附的组分或多或少有专一性。这样的组分可能构成所需要产品，或者可能构成杂质或其它不需要的物质，其中不需要的物质通过吸附到基质上与所需要的成分分离。许多分离系统的共同特点是以聚合物物质为基础的分离基质，其中聚合物物质与水相容并在与水溶液(干凝胶)接触时形成它们的活性结构。这类基质包括但不限于聚丙烯酰胺、纤维素、琼脂糖及其它多糖。

然而，在有水的情况下这些基质可能易感染微生物。当高压灭菌法、化学灭菌或放射不适用时，这些情况下微生物生长成为一个特别的问题。这可能归因于基质固有的敏感性或与基质共价键或非共价键连接的配体由于灭菌操作失活或变化。一个例子是当配体包括以蛋白或肽结构为基础的识别部分时。然而，已知许多其它非蛋白质的结构对通常的灭菌技术也是敏感的。

在防止微生物生长特别重要的领域有许多应用。一种这样的应用是以蛋白质为基质的药物或体内诊断产品的纯化。尤其是在分离基质和最终产品都不能按照任何一种用于杀菌的标准方法适当灭菌的情况下。一个这样的例子是在分离过程中使用固定在基质上的蛋白，如用于免疫球蛋白纯化的固定化蛋白质 A、或用于纯化各种与之相互作用的物质的固定化的免疫球蛋白。另一个例子是通过利用以抗生物素蛋白或抗生蛋白

链菌素包被的分离基质获取生物素酰化的物质。

即使在最终产品能够经受最后的成品灭菌的情况下，在制成品灭菌之前在加工和贮存过程中防止微生物不受控制的生长也是至关重要的。微生物污染的问题不局限于能生存的有机体的存在，而是包括这样的有机体释放的毒素、热原或其它有害的产物或代谢产物。这类物系的一个例子是各种内毒素。

要求防止微生物生长的分离基质的另一个应用是核酸类物质的纯化。这时，即使来源于污染微生物生长的微量 DNA 物质也可能干扰分析方法、基因剪接、或遗传设计物质的克隆，尤其是在后者用于药剂或医疗用具的生产时。因此，在许多应用中防止分离基质中微生物生长都至关重要。类似的问题也可能在蛋白、肽或特定的碳水化合物分子的分离时由于微生物释放类似性质的杂质而出现。

因此，需要一种用于大多数分离基质的有效和足够的处理，借此能够减少或完全消除污染的微生物。若分离基质打算装在体内、体旁或体外应用的装置中使用，而其中血液或其它体液通过所述装置时有害物质从中被除掉的情况下这是至关重要的。

用于处理人血浆的临床体外吸附系统可用于在自身免疫疾病的治疗中通过利用蛋白 A 除去免疫球蛋白 (Bygren 等, Lancet 1985, 1295-1296) 或防止移植器官的早期排斥 (Palmer 等, Lancet 1989, 10-12)、和用于在高胆固醇血症的治疗中通过利用固定化的抗低密度脂蛋白抗体除去低密度脂蛋白 (LDL) (duMoulin 等, 1990, Treatment of Severe Hypercholesterolemia in the Prevention of Coronary Heart Disease, 第 170-174 页)。

已记载有利用固定化抗物种抗体的体外装置、方法和这类装置用于

除去与肿瘤的免疫靶向有关的治疗或造影的应用(imaging)抗体(Henry CA, 1991, 第18卷, 第565页; Hofheinz D等, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1987 第28卷, 第391页; Lear JL, 等, Radiology 1991, 第179卷, 第509-512页; Johnson TK等, Antibody Immunoconj. Radiopharm. 1991, 第4卷, 第509页; Dienhart DG等, Antibody Immunoconj. Radiopharm. 1991, 第7卷, 第225页; DeNardo GL等, J. Nucl. Med. 1993, 第34卷, 第1020-1027页; DeNardo GL等, J. Nucl. Med. 1992b, 第33卷, 第863-864页; DeNardo S J等, J. Nucl. Med. 1992a, 第33卷, 第862-863页; US5,474,772; 澳大利亚专利号638061和欧洲专利申请90914303.4)。

为了使血液清除更有效和能够处理全血而不是血浆, 将医疗剂(例如, 运载细胞杀伤剂的肿瘤专一的单克隆抗体或用于肿瘤定位的放射性核素)生物素酰化并通过亲和(例如, 生物素结合的)柱纯化。许多出版物提供了证实该技术用于纯化生物素酰化的和放射性核素标记的肿瘤专一的抗体既有效又实用的数据(Norrgren K等, Antibody Immunoconj. Radiopharm. 1991, 第4卷, 第54页; Norrgren K等, J. Nucl. Med. 1993, 第34卷, 第448-454页; Garkavij M等, Acta Oncologica 1996, 第53卷, 第309-312页; Garkavij M等, J. Nucl. Med. 1997, 第38卷, 第895-901页)。欧洲专利申请92903 020.3描述了这类处理的应用。

当结合体外循环处理应用时, 必须保证分离基质和与之接触的装置内部完全无菌。也可在使用之前对体外装置的基质灭菌。此外, 还可在良好的制造实践条件下通过无菌处理制备装置。

此外, 为避免对所要处理的水溶液内容物的有害影响, 所选择的方法-要么湿热、放射, 要么化学处理-不可与基质和/或装置产生任何化学反应。这类化学反应包括体外装置中使用的材料的化学或结构变化、

断链、交联或机械性能的重大变化。

在用环氧乙烷或甲醛灭菌的情况下，由于灭菌剂对分离基质和周围的塑性材料的物理和化学吸附，这样的参数如溶解度、灭菌剂的吸附及解吸附是至关重要的。因为它们的高毒性，在灭菌之后通常要求一段精确的脱气时间。

如今，大多数现行的体外装置应用由琼脂糖、硅胶、聚丙烯酸酯或聚乙烯醇制成的载体，所述载体通过蒸汽或乙基汞硫代水杨酸钠(硫柳汞)灭菌。然而，迄今为止当配体是蛋白质和基质处于湿的状态或被水包围时不能对分离基质实施有效的灭菌。

EP 179420 说明了一种用于体外循环处理的基质的蒸汽灭菌方法，US 5,283,034 描述了一种方法和组合物，该方法允许通过电离辐射对与偶联生物活性基团的表面进行灭菌。

在体外系统中也曾使用过不同的防腐剂，如叠氮化物和硫柳汞。然而，使用这些物质曾引起争议，因为它们可能吸附于不同的使用材料，因而难以被冲洗掉。在这两个例子中剧烈和长期毒性构成另外的问题。就硫柳汞而论，过敏性危险对于患者和健康专家都是事实。

其它有用的防腐剂不溶于水，有些防腐剂长期与配体或装置内使用的塑性材料相互作用。例如，苯甲醇使塑料易碎。这类防腐剂也难以冲洗掉，这是与差溶解性相关的性质。

此外，防腐组合物必须既不与分离基质又不与装置反应形成无用产物，例如有毒物质。同样重要的是防腐组合物不能减少用于分离的配体的结合效率。

在最终的体外装置制成之前分离基质和装置往往在不同的场所生产以及贮藏和 / 或运输。这样的处理要求长期的抗微生物作用，同时防腐组合物既不影响分离基质也不影响用于贮存和运输的容器。而且，抗微生物防腐组合物应便于从与装填分离装置的分离基质中冲洗掉。这样分离基质能够保持无菌，直到它被无菌包装于最终的装置中。

有效的灭菌或防腐在处理可再利用的分离基质时同样重要。尤其是在这种情况下更是如此：当这类基质组成为处理血液、血浆或其它体液设计的可再利用的体外装置的一部分时。

用于体外装置中的载体或基质通常是小球状的聚合多孔材料，这种聚合多孔材料装入装置中，小球具有的大小足以提供当被装入装置中时必需的小球间距的大小。载体还可以是微孔过滤的中空纤维或平片膜以便使压降减到最小。

大多数分离系统应用含有易生长微生物的蛋白质或其它有机材料的将被处理的溶液以及分离基质。将要处理的溶液可以灭菌例如通过过滤灭菌，或者作为体液供给。然而，分离基质及其周围的液体因为如果处理不适当被微生物污染就会出现问題。

用于分离基质及其周围液体的防腐组合物必须对细菌和真菌都有抑制或杀灭作用。而且，必须有组合物组分的毒理学数据。优选地，它以前应已经在药物制剂中使用过，且对于这类防腐剂必须满足美国药典和欧洲药典的要求。

对羟苯甲酸酯属于杀生物剂，它通过改变膜电位或电子传递从而影响细胞膜。它们对酵母菌和霉菌最有效。对羟苯甲酸酯是对羟基苯甲酸的酯。两种最常见的酯是对羟苯甲酸甲酯和对羟苯甲酸丙酯，它们在美国 GRAS 分级中被批准用于食品中。对羟苯甲酸酯未作为抗微生物剂广

泛使用于其它应用中。应用主要包括食品工业和亲代 (parental) 医药产品。

Prickett 等 (J. Pharm. Sci., vol 50(4), 第 316 - 320 页, 1961) 已经研究过液体口服药物制剂中的对羟苯甲酸酯的作用能被低浓度的丙二醇增强。他们发现丙二醇的这种对对羟苯甲酸酯的抗微生物活力的增强作用可被用来增加难以在防止微生物腐败的制剂中的防腐作用和减轻对羟苯甲酸酯浓度, 借此改善液体口服制剂的味道和消费者的接受。

本发明的目的是消除如上所述的缺陷, 因而本发明具有权利要求 1 和 11 中分别表征的特点。

因此, 本发明描述了令人惊奇的发现: 一种含至少一种烷基对羟苯甲酸酯的含水组合物可被用来消除或减少基质中微生物的含量, 其中基质装在分离装置中使用。这样一种组合物可以例如用于分离医药产品的色谱和加工工业应用的分离基质中。它尤其适合于将用于体外循环处理装置中的分离基质的灭菌和 / 或贮藏。

在一种生产微生物含量消除或减少的分离基质的方法中, 该方法包括步骤:

提供装置或容器内微生物污染了的分离基质;

将含有至少一种烷基对羟苯甲酸酯的含水抗微生物防腐组合物加入到装置或容器内的分离基质中;

让该含水抗微生物防腐组合物在装置或容器内发挥其作用, 直到每克防腐组合物中的菌落形成单位 (CFU) 充分减少; 和

从装置或容器中冲洗掉含水抗微生物防腐组合物。

优选地, 让含水抗微生物防腐组合物发挥作用直到每克防腐组合物

中菌落形成单位满足美国药典和 / 或欧洲药典的试验规定 (test protocol) 。

含水抗微生物防腐组合物可以按照 GMP 和 ISO-9002/EN46002 生产。优选地, 在所述组合物加入到分离基质之前对其灭菌。例如适当的灭菌方法有蒸汽和过滤灭菌。

分离基质可以是任何通常用作固定基质的支持材料。优选地, 分离基质含多糖凝胶如琼脂糖。在优选的实施方案中固定化配体为蛋白质, 例如但不限于蛋白 A 或其它免疫球蛋白结合的蛋白或肽、或免疫球蛋白或半抗原结合的各种物质。在最优选的实施方案中固定化配体为生物素结合蛋白, 例如但不限于, 抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素及其衍生物。

合适的对羟基苯甲酸酯为对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯。

对羟基苯甲酸酯的总浓度及其相对分配对于抗微生物作用很重要。优选地, 组合物中各种烷基对羟基苯甲酸酯的浓度随着烷基数的增大(即碳原子数的增大)而降低。对羟基苯甲酸甲酯的合适浓度在 0.5 和 $2\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 之间, 对羟基苯甲酸乙酯的合适浓度在 0.01 和 $0.5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 之间, 对羟基苯甲酸丙酯的合适浓度在 0.12 和 $0.25\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 之间, 且对羟基苯甲酸丁酯的合适浓度为至少 $0.002\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 。

然而, 烷基对羟基苯甲酸酯由于它们易于沉淀, 难以维持溶解。因此, 若含水抗微生物防腐组合物进一步含增溶剂, 其浓度足以在长期的贮存期间和 / 或在环境温度 ($+4$ 至 $+25^{\circ}\text{C}$) 储藏条件下维持至少一种烷基对羟基苯甲酸酯溶解, 那将是有利的。

增溶剂可以是高级醇或多元醇, 例如甘油、聚乙二醇或丙二醇。优选地, 增溶剂为丙二醇。

当使用丙二醇时，其浓度为不超过 $20\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 就已足够了。

应当注意丙二醇将不仅助溶，有助于含水抗微生物防腐组合物的稳定，而且它还增强其中对羟苯甲酸酯的抗微生物活性并且产生最大防腐效应。不管是哪种具体的应用，应让抗微生物的防腐组合物发挥其作用至少 6 小时，由此分离基质中的微生物含量被消除或减少。

实施例

现在将通过以下的实施例进一步描述本发明。然而，应当指出这些实施例决不能理解为是限制本发明的。

实施例 1. 防腐剂研究。

以如下所示贮液配制抗菌防腐组合物。

贮液

柠檬酸 0.79 mM

柠檬酸三钠 49.21 mM

氯化钠 0.15 M

水 pH 7.0 ± 0.1

pH 7.0 对于生物相容性是理想的。

对下列防腐组合物进行了研究。所试验的实际市售产品从 Nipa Laboratories Lmt, UK 获得，并在括号内给出注册商标名称。

防腐剂 (1):

苯氧乙醇，

对羟基苯甲酸甲酯

对羟基苯甲酸丙酯，和

2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇

的混合物;

(0.3 % Nipaguard BPX®)

防腐剂 (2):

对羟基苯甲酸甲酯, $0.83 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,

对羟基苯甲酸乙酯, $0.17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和

对羟基苯甲酸丙酯, $0.12 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

的混合物;

(0.1 % Nipasept®)

防腐剂 (3):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,

对羟基苯甲酸乙酯, $0.25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和

对羟基苯甲酸丙酯, $0.18 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

的混合物;

(0.15% Nipasept®)

防腐剂 (4) : 苯氧乙醇, $5.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,

(0.5%Phenoxetol®)

防腐剂 (5):

对羟基苯甲酸甲酯, $0.83 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,

对羟基苯甲酸乙酯, $0.17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,

对羟基苯甲酸丙酯, $0.12 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和

苯氧乙醇, $5.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

的混合物;

(0.1 % Nipasept® + 0.5 % Phenoxetol®)

防腐剂 (6):

对羟基苯甲酸甲酯, 0.80 g.l^{-1} , 和
对羟基苯甲酸乙酯, 0.02 g.l^{-1}
的混合物;
($0.08 \% \text{ NipaginM}^{\text{®}}$ + $0.02 \% \text{ Nipagin A}^{\text{®}}$)

防腐剂 (7):

对羟基苯甲酸甲酯, 0.80 g.l^{-1} ,
对羟基苯甲酸乙酯, 0.02 g.l^{-1} , 和
对羟基苯甲酸丁酯, 0.005 g.l^{-1}
的混合物;
($0.08 \% \text{ Nipagin M}^{\text{®}}$ + $0.02 \% \text{ Nipagin A}^{\text{®}}$ + $0.005 \% \text{ Nipabutyl}^{\text{®}}$)

防腐剂 (8):

对羟基苯甲酸甲酯, 0.70 g.l^{-1} ,
对羟基苯甲酸乙酯, 0.02 g.l^{-1} , 和
对羟基苯甲酸丁酯, 0.005 g.l^{-1}
的混合物;
($0.07 \% \text{ Nipagin M}^{\text{®}}$ + $0.02 \% \text{ Nipagin A}^{\text{®}}$ + $0.005 \% \text{ Nipabutyl}^{\text{®}}$)

防腐剂 (9):

对羟基苯甲酸甲酯, 0.80 g.l^{-1} ,
对羟基苯甲酸乙酯, 0.15 g.l^{-1} , 和
对羟基苯甲酸丁酯, 0.005 g.l^{-1}
的混合物;
($0.08 \% \text{ Nipagin M}^{\text{®}}$ + $0.15 \% \text{ Nipagin A}^{\text{®}}$ + $0.005 \% \text{ Nipabutyl}^{\text{®}}$)

防腐剂 (10):

对羟基苯甲酸甲酯, 0.80 g.l^{-1} ,
对羟基苯甲酸乙酯, 0.02 g.l^{-1} , 和

对羟基苯甲酸丁酯, $0.04 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

的混合物;

(0.08% Nipagin M®+ 0.02% Nipagin A®+ 0.004% Nipabutyl®)

通过使用以高压灭菌法预先灭菌的贮液、灭过菌的工具和无菌操作来配制防腐剂(1)。其它防腐组合物以高压灭菌法进行灭菌。

微生物攻击试验

EP 1997 - 试验方案

将5份20g的各种防腐组合物转移到无菌容器中并分别接种0.2ml以下详述的试验生物体的培养物。将接种的样品部分通过涡旋搅拌机混合并在室温下储存。然后进行EP 1997的攻击试验方案。

USP 23 - 试验方案

5份20g的各种防腐组合物接种0.1ml以下详述的试验生物体的培养物,最初的柱水平以每g防腐组合物中菌落形成单位(CFU)表示。将接种的样品部分通过涡旋搅拌机混合并在室温下储存。然后进USP的攻击试验方案。

| 测试种类 | | 最初的接种水平 CFU 每克 | |
|---------|------------|-------------------|-------------------|
| | | EP 1997 | USP XXIII |
| 绿脓杆菌 | NCIMB 8626 | 1.1×10^6 | 5.6×10^6 |
| 大肠杆菌 | NCIB 8545 | 2.0×10^6 | 1.0×10^6 |
| 金黄色葡萄球菌 | NCTC 10788 | 4.3×10^6 | 2.2×10^6 |
| 白色念珠菌 | NCPF 3179 | 8.4×10^5 | 4.2×10^5 |
| 黑曲霉素 | IMI 149007 | 1.0×10^5 | 5.0×10^4 |

试验结果

给出每克防腐组合物中的菌落形成单位数(CFU)并与单独的贮液(未防腐的)相比较。

EP 1997

防腐剂 (1)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-----|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | 3.0×10^2 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 7.2×10^5 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | - | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | - | 4.0×10^2 | <10 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|------------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | <10 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 |

防腐剂 (2)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | 5.0×10^4 | 4.4×10^4 | 1.2×10^4 |
| 大肠杆菌 | 2.0×10^6 | 1.5×10^6 | 1.0×10^6 |
| 金黄色葡萄球菌 | 2.1×10^6 | 1.4×10^6 | 1.0×10^6 |
| 白色念珠菌 | - | 8.8×10^5 | 2.2×10^5 |
| 黑曲霉素 | - | 8.0×10^4 | 7.7×10^4 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | 3.2×10^5 | 3.0×10^5 | 1.0×10^5 |
| 大肠杆菌 | 7.3×10^5 | 3.0×10^3 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 1.4×10^4 | 2.0×10^3 | <10 |
| 白色念珠菌 | 7.1×10^4 | 2.2×10^3 | <10 |
| 黑曲霉素 | 3.0×10^4 | 1.1×10^3 | 9.0×10^2 |

防腐剂 (3)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | 1.8×10^5 | 8.0×10^3 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 1.5×10^6 | 8.0×10^2 | <10 |
| 白色念珠菌 | - | 1.6×10^4 | 5.2×10^3 |
| 黑曲霉素 | - | 2.0×10^4 | 1.0×10^4 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|------------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | <10 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 |

防腐剂 (4)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | 7.0×10^4 | 4.0×10^4 | 5.4×10^3 |
| 大肠杆菌 | 3.8×10^6 | 3.1×10^6 | 5.0×10^5 |
| 金黄色葡萄球菌 | 3.6×10^6 | 3.0×10^6 | 1.5×10^6 |
| 白色念珠菌 | - | 1.6×10^5 | 4.6×10^4 |
| 黑曲霉素 | - | 5.0×10^4 | 5.0×10^4 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | 1.5×10^6 | 5.4×10^5 | 3.0×10^3 |
| 金黄色葡萄球菌 | 6.5×10^5 | 2.6×10^5 | 6.0×10^3 |
| 白色念珠菌 | 3.8×10^4 | 3.2×10^5 | 1.0×10^5 |
| 黑曲霉素 | 2.0×10^4 | 1.0×10^4 | 3.0×10^3 |

防腐剂 (5)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 5.12×10^5 | 5.0×10^2 | <10 |
| 白色念珠菌 | - | 8.0×10^3 | 4.0×10^2 |
| 黑曲霉素 | - | 4.0×10^4 | 7.0×10^3 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|------------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | <10 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 |

防腐剂 (6)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | 1.0×10^6 | 1.1×10^4 | 9.0×10^3 |
| 大肠杆菌 | 2.4×10^6 | 2.4×10^6 | 9.6×10^5 |
| 金黄色葡萄球菌 | 3.6×10^6 | 3.0×10^6 | 1.9×10^6 |
| 白色念珠菌 | - | 2.4×10^5 | 1.8×10^5 |
| 黑曲霉素 | - | 5.0×10^4 | 4.0×10^4 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | 3.2×10^5 | 2.0×10^6 | 9.0×10^5 |
| 大肠杆菌 | 3.3×10^6 | 2.3×10^5 | 1.7×10^5 |
| 金黄色葡萄球菌 | 2.0×10^5 | 9.0×10^3 | 2.0×10^3 |
| 白色念珠菌 | 1.4×10^5 | 7.0×10^4 | 7.0×10^3 |
| 黑曲霉素 | 6.0×10^4 | 1.1×10^4 | 3.0×10^4 |

防腐剂 (7)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 2.1×10^4 | 4.8×10^2 | <10 |
| 白色念珠菌 | - | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | - | 2.1×10^5 | 3.0×10^3 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|------------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | <10 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 |

未防腐

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | 4.9×10^6 | 8.8×10^6 | 6.7×10^6 |
| 大肠杆菌 | 7.0×10^6 | 1.1×10^7 | 9.3×10^6 |
| 金黄色葡萄球菌 | 6.1×10^6 | 7.0×10^6 | 6.5×10^6 |
| 白色念珠菌 | - | 1.5×10^6 | 1.7×10^6 |
| 黑曲霉素 | - | 6.2×10^5 | 4.1×10^5 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | TNTC | TNTC | TNTC |
| 大肠杆菌 | TNTC | TNTC | TNTC |
| 金黄色葡萄球菌 | 7.6×10^6 | 4.5×10^6 | 5.2×10^6 |
| 白色念珠菌 | 1.0×10^6 | 2.8×10^6 | 2.6×10^6 |
| 黑曲霉素 | 2.0×10^5 | 4.8×10^5 | 3.1×10^5 |

USP 23

防腐剂 (1)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 : | | | |
|---------|--------------|------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 21 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 | <10 |

防腐剂 (2)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 : | | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 21 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | 9.1×10^3 | 5.2×10^3 | 7.1×10^3 | <10 |
| 大肠杆菌 | 5.0×10^5 | 9.2×10^3 | 2.1×10^3 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 7.1×10^3 | 4.0×10^2 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | 5.2×10^4 | 3.0×10^3 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | 1.0×10^3 | <10 | <10 | <10 |

防腐剂 (3)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 : | | | |
|---------|--------------|------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 21 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 | <10 |

防腐剂 (4)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 : | | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 7 天 | 14 天 | 21 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | 6.0×10^5 | 1.0×10^5 | 8.0×10^4 | 4.0×10^2 |
| 金黄色葡萄球菌 | 3.1×10^5 | 7.1×10^4 | 4.5×10^4 | 4.9×10^3 |
| 白色念珠菌 | 1.0×10^4 | 9.0×10^3 | 3.0×10^3 | <10 |
| 黑曲霉素 | 6.0×10^3 | 4.0×10^3 | 1.0×10^3 | <10 |

防腐剂 (5)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 : | | | |
|---------|--------------|------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 21 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 | <10 |

防腐剂 (6)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 : | | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 7 天 | 14 天 | 21 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | 8.2×10^4 | 6.0×10^4 | 3.0×10^4 | 7.0×10^3 |
| 大肠杆菌 | 5.1×10^4 | 3.3×10^4 | 6.0×10^4 | 1.2×10^4 |
| 金黄色葡萄球菌 | 9.0×10^4 | 5.0×10^4 | 4.1×10^4 | 9.1×10^3 |
| 白色念珠菌 | 8.3×10^4 | 6.3×10^4 | 6.0×10^4 | 2.9×10^3 |
| 黑曲霉素 | 4.0×10^4 | 1.0×10^4 | 7.0×10^3 | 4.0×10^3 |

防腐剂 (7)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 : | | | |
|---------|--------------|------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 21 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 | <10 |

未防腐

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 : | | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 7 天 | 14 天 | 21 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | 3.8×10^6 | 4.7×10^6 | 4.2×10^6 | 5.0×10^6 |
| 大肠杆菌 | 6.2×10^6 | 9.0×10^6 | 7.3×10^6 | TNTC |
| 金黄色葡萄球菌 | 3.7×10^6 | 4.3×10^6 | 5.1×10^6 | 8.2×10^6 |
| 白色念珠菌 | 8.0×10^5 | 1.2×10^6 | 2.0×10^6 | 3.7×10^6 |
| 黑曲霉素 | 8.0×10^4 | 9.0×10^4 | 1.0×10^5 | 2.1×10^5 |

结论

EP 1997, A 标准(目标), 要求细菌 6 小时减少至少 \log_2 、24 小时减少至少 \log_3 , 在 7 天以及此后没有生物体再生, 并且酵母菌/霉菌 7 天减少至少 \log_2 并在此后不再增殖。B 标准(最低标准), 要求细菌 24 小时减少了至少 \log_1 、7 天减少了至少 \log_3 , 14 天以及此后不再增加, 并且酵母菌/霉菌 14 天减少至少 \log_1 并在此后不再增加。

USP 23 要求 14 天细菌减少至少 \log_3 并在此后不再增加。14 天以及此后酵母菌/霉菌应显示出不再增加。

总结 - 应用上述标准

| 防腐系统 | EP 1997 | | USP |
|---------|--------------|--------------|-----|
| | 标准 A (目标) | 标准 B (最小) | |
| 防腐剂 (1) | 不通过 | 通过 | 通过 |
| 防腐剂 (2) | 不通过 | 不通过 | |
| 防腐剂 (3) | 不通过 | 通过 | 不通过 |
| 防腐剂 (4) | 不通过 | 不通过 | 不通过 |
| 防腐剂 (5) | 不通过 | 通过 | 通过 |
| 防腐剂 (6) | 不通过 | 不通过 | 不通过 |
| 防腐剂 (7) | 通过 | 通过 | 通过 |
| 未防腐 | 不通过 | 不通过 | 不通过 |

试验结果表明对羟基苯甲酸甲酯, $0.80 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 对羟基苯甲酸乙酯, $0.02 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和对羟基苯甲酸丁酯, $0.005 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 的混合剂(防腐剂(7))将有效地保存贮液达到 EP 1997 的标准(A 目标标准), 对于亲本制剂 (parental preparations), 并且满足 USP 23 标准。

EP 1997 (B 最低标准)较不严格, 这可由用防腐剂(3)和防腐剂(5)试验获得的结果显示。

同样, USP 23 的通过标准更不如 EP 1997(亲本)严格, 这反映在: 用防腐剂(1)、防腐剂(2), 防腐剂(3)、防腐剂(5)和防腐剂(7)试验能获得有效的结果。

实施例 2. 稳定性研究。

抗菌防腐组合物的贮液在 $2 - 8^\circ\text{C}$ 下储存, 贮存期限将高达 1.5 年。在微生物攻击试验中将防腐组合物在 4°C 和 -15°C 下储存以便测定

防腐剂的稳定性。

在储存和最后从-15℃解冻后目测其稳定性。

| 防腐系统 | 14 天后的稳定性 | |
|---------|-----------|------|
| | 4℃ | -15℃ |
| 防腐剂 (1) | 稳定 | 稳定 |
| 防腐剂 (2) | 稳定 | 稳定 |
| 防腐剂 (3) | 稳定 | 稳定 |
| 防腐剂 (4) | 稳定 | 稳定 |
| 防腐剂 (5) | 稳定 | 稳定 |
| 防腐剂 (6) | 稳定 | 稳定 |
| 防腐剂 (7) | 沉淀 | 沉淀 |

对羟基苯甲酸甲酯, $0.80 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 对羟基苯甲酸乙酯, $0.02 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和对羟基苯甲酸丁酯, $0.005 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 的混合剂 (防腐剂 (7)) 虽然在微生物攻击试验中是有效的, 但在 4°C 和 -15°C 下不稳定, 这可由白色沉淀/晶体的沉淀显示。

然后测定下列防腐剂系统的稳定性。

| 防腐系统 | 14 天后的稳定性 | |
|----------|-----------|------|
| | 4℃ | -15℃ |
| 防腐剂 (8) | 稳定 | 稳定 |
| 防腐剂 (9) | 稳定 | 稳定 |
| 防腐剂 (10) | 稳定 | 稳定 |

实施例 3. 增溶效果。

为了使微生物效果达到欧洲药典标准 A 的同时获得足够的溶解度, 将增溶剂加入到所选的对羧苯甲酸酯中。任何与水相容的物质都可使用, 条件是它被证实能药用。优选地, 使用丙二醇增加溶解度。

因此，用不同浓度的对羟基苯甲酸的甲酯、乙酯和丙酯以及 2 或 5 % 丙二醇的缓冲溶液进行低温稳定性评估。

在上述的贮液中配制下列抗菌防腐组合物，除用 pH 6.0 代替 pH 7.0 以外。由于选择 pH 6.0，就可能使用对羟苯甲酸酯的钠盐，其不能在酸性溶液中使用。

防腐剂 (11):

对羟基苯甲酸甲酯, $0.83 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
对羟基苯甲酸丙酯, $0.12 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.10 % Nipasept®)

防腐剂 (12):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
对羟基苯甲酸丙酯, $0.14 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物 ;
(0.12 Nipasept®)

防腐剂 (13):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.16 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.24 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
对羟基苯甲酸丙酯, $0.17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.14 % Nipasept®)

防腐剂 (14):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.33 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.27 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
对羟基苯甲酸丙酯, $0.19 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.16% Nipasept®)

防腐剂 (15):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.49 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.31 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
对羟基苯甲酸丙酯, $0.22 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物 ;
(0.18 % Nipasept®)

防腐剂 (16):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.66 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.34 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
对羟基苯甲酸丙酯, $0.24 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.20 % Nipasept®)

防腐剂 (17):

对羟基苯甲酸甲酯, $0.83 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丙酯, $0.12 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.10 % Nipasept® + 2%丙二醇)

防腐剂 (18):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丙酯, $0.14 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.12 % Nipasept® + 2%丙二醇)

防腐剂 (19):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.16 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.24 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丙酯, $0.17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.14% Nipasept®)

防腐剂 (20):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.33 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.27 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丙酯, $0.19 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.16 % Nipasept®+ 2%丙二醇)

防腐剂 (21):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.49 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.31 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丙酯, $0.22 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;

(0.18 % Nipasept®)

防腐剂 (22):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.66 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.34 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丙酯, $0.24 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.20 % Nipasept® + 2% 丙二醇)

防腐剂 (23):

对羟基苯甲酸甲酯, $0.83 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
对羟基苯甲酸丙酯, $0.12 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$;
丙二醇, $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.10 % Nipasept® + 5 % 丙二醇)

防腐剂 (24):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.00 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丙酯, $0.14 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.12 % Nipasept® + 5 % 丙二醇)

防腐剂 (25):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.16 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.24 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$,

对羟基苯甲酸丙酯, $0.17\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 和
的混合物
(0.14 % Nipasept®)

防腐剂 (26):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.33\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.27\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丙酯, $0.19\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.16 % Nipasept® + 5%丙二醇)

防腐剂 (27):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.49\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.31\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丙酯, $0.22\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.18 % Nipasept® + 5%丙二醇)

防腐剂 (28):

对羟基苯甲酸甲酯, $1.66\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.34\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丙酯, $0.24\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.20 % Nipasept® + 5 %丙二醇)

防腐剂 (29):

对羟基苯甲酸甲酯, $0.80\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.02\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 和
对羟基苯甲酸丁酯, $0.005\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.08% Nipagin M® + 0.02% Nipagin A®
+ 0.005% Nipabutyl®)

防腐剂 (30):

对羟基苯甲酸甲酯, $0.80\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.02\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丁酯, $0.005\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 和
丙二醇, $20\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
的混合物 ;
(0.08% Nipagin M® + 0.02% Nipagin A®
+ 0.005% Nipabutyl® + 2% 丙二醇)

防腐剂 (31):

对羟基苯甲酸甲酯, $0.80\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸乙酯, $0.02\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
对羟基苯甲酸丁酯, $0.005\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 和
丙二醇, $50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
的混合物;
(0.08% Nipagin M® + 0.02% Nipagin A®
+ 0.005% Nipabutyl® + 5% 丙二醇)

通过高压灭菌法对这些防腐组合物灭菌, 在 4°C 下储存 14 天, 然后评价可见的白色沉降晶体形式的沉淀。

试验结果

沉淀

| | |
|----------|-----|
| 防腐剂 (11) | (+) |
| 防腐剂 (12) | (+) |
| 防腐剂 (13) | + |
| 防腐剂 (14) | + |
| 防腐剂 (15) | + |
| 防腐剂 (16) | ++ |
| 防腐剂 (17) | - |
| 防腐剂 (18) | - |
| 防腐剂 (19) | - |
| 防腐剂 (20) | - |
| 防腐剂 (21) | (+) |
| 防腐剂 (22) | (+) |
| 防腐剂 (23) | - |
| 防腐剂 (24) | - |
| 防腐剂 (25) | - |
| 防腐剂 (26) | - |
| 防腐剂 (27) | (+) |
| 防腐剂 (28) | (+) |
| 防腐剂 (29) | - |
| 防腐剂 (30) | - |
| 防腐剂 (31) | - |

结果表明试验的防腐组合物防腐剂 (29) 似乎正好在低贮存温度下的溶解度的边缘, 因为其余的试验防腐组合物在没有加入增溶剂丙二醇时在低贮存温度下没有一个是稳定的。

当对羟苯甲酸酯的浓度增加到一定的程度, 进一步添加增溶剂不会提高溶解度 (cf. 防腐剂 (21) 和防腐剂 (27))。

微生物攻击试验

通过进一步研究防腐组合物防腐剂(18)、防腐剂(19)、防腐剂(20)和防腐剂(30)来估计最低的有效防腐剂浓度。

将5份20g的各种溶液转移到无菌容器中并分别接种0.2ml以下详述的试验生物的培养物。将接种的样品部分通过涡旋搅拌机混合并在室温下储存。然后进行EP 1997的攻击试验方案。

| 试验生物 | 最初的接种物含量 | 初始接种物水平 每克的菌落数 |
|---------|------------|-------------------|
| 绿脓杆菌 | NCIMB 8626 | 5.3×10^6 |
| 大肠杆菌 | NCIB 8545 | 1.2×10^7 |
| 金黄色葡萄球菌 | NCTC 10788 | 8.2×10^6 |
| 白色念珠菌 | NCPF 3179 | 1.3×10^6 |
| 黑曲霉 | IMI 149007 | 5.8×10^5 |

试验结果

EP 1997

防腐剂 (18)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | 1.0×10^3 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | 4.6×10^3 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 6.0×10^4 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | 2.1×10^6 | 4.21×10^5 | 8.0×10^4 |
| 黑曲霉素 | 2.0×10^5 | 5.0×10^4 | 1.0×10^4 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | 9.0×10^3 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 |

防腐剂 (19)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 5.0×10^4 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | 6.8×10^5 | 1.9×10^5 | 7.5×10^4 |
| 黑曲霉素 | 1.5×10^5 | 3.0×10^4 | 7.0×10^3 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | 2.1×10^3 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 |

防腐剂 (20)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 6.0×10^3 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | 8.4×10^5 | 2.8×10^5 | 5.1×10^4 |
| 黑曲霉素 | 1.0×10^5 | 1.3×10^4 | 6.2×10^3 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|------------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | <10 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | <10 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 |

防腐剂 (30)

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 6 小时 | 1 天 | 2 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | 8.0×10^4 | 5.0×10^2 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 3.0×10^4 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | 8.4×10^5 | 2.0×10^5 | 5.3×10^4 |
| 黑曲霉素 | 8.0×10^4 | 5.0×10^2 | <10 |

| 测试种类 | 之后的 CFU 每克 | | |
|---------|-------------------|------|------|
| | 7 天 | 14 天 | 28 天 |
| 绿脓杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 大肠杆菌 | <10 | <10 | <10 |
| 金黄色葡萄球菌 | 3.0×10^3 | <10 | <10 |
| 白色念珠菌 | <10 | <10 | <10 |
| 黑曲霉素 | <10 | <10 | <10 |

EP 1997, A 标准(目标), 要求细菌 6 小时减少至少 $\log 2$ 、24 小时减少至少 $\log 3$, 7 天以及此后没有生物再生, 并且酵母菌/霉菌 7 天减少至少 $\log 2$ 并在此后不再增加。B 标准(最低标准), 要求细菌 24 小时减少了至少 $\log 1$ 、7 天减少了至少 $\log 3$, 14 天以及此后不再增加, 并且酵母菌/霉菌 14 天减少至少 $\log 1$ 并在此后不再增加。

总结 - 应用上述标准

| 防腐系统 | EP1997 | |
|----------|-----------|-----------|
| | 标准 A (目标) | 标准 B (最低) |
| 防腐剂 (18) | 通过 | 通过 |
| 防腐剂 (19) | 通过 | 通过 |
| 防腐剂 (20) | 通过 | 通过 |
| 防腐剂 (30) | 通过 | 通过 |

试验结果表明这些抗菌防腐组合物能有效保存贮液达到 EP 1997 A (目标标准)的标准。

最低的对羧苯甲酸酯的总浓度是抗微生物组合物防腐剂 (21), 在此浓度下 4℃ 时出现沉淀。为了在 50% 的溶解度 4℃ 获得安全范围, 优选组合物防腐剂 (18)。

实施例 4. 安全性评价

毒理学数据

毒理学数据总结如下 (从科学文献摘要)。

对羟基苯甲酸甲酯

| 试验 | 结果 |
|-----------------------------|--|
| 急性的口服 LD ₅₀ (小鼠) | >8000 mg/kg |
| 腹腔内注射 LD ₅₀ (小鼠) | 960 mg/kg |
| 重复的口服剂量 (大鼠) - 96 周 | 900 - 1200 mg/kg/天没有观察到毒性的征候或主要器官的组织变化 |
| 重复的口服剂量 (人) | 在摄取 2000mg/天 30 天后没有明显的毒性作用 |
| 皮肤刺激 (人) | 在丙二醇中的 5% 溶液无刺激 (50 人志愿受试者 5 天覆盖接触) |
| 眼刺激 (人) | 含 0.1 - 0.3% 对羟基苯甲酸甲酯的溶液产生刺激和烧灼感的症状, 1 分钟内消失 |
| 皮肤过敏性 (人) | 在健康的受试者中没有证据表明皮肤过敏性 |
| 光敏作用 (人) | 没有证据表明光敏作用 |
| 致癌性 | 没有证据表明有致癌性 |
| Ames 试验 | 没有证据表明有致突变性 |

对羟基苯甲酸乙酯

| 试验 | 结果 |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| 急性的口服 LD ₅₀ (大鼠) | >4300 mg/kg |
| 重复的口服剂量 (大鼠) - 25 周 | 含 2% 对羟基苯甲酸乙酯的饮食没有观察到毒性的征候。观察到生长速度降低。 |
| 皮肤刺激 (人) | 在丙二醇中的 7% 溶液无刺激 (50 人志愿受试者 5 天覆盖接触) |
| 眼睛刺激 (兔) | 纯对羟基苯甲酸乙酯产生轻微的刺激 |
| 皮肤过敏性 (人) | 在健康的受试者中没有证据表明皮肤过敏性 |
| 光敏作用 (人) | 没有证据表明有光敏作用 |
| 致癌性 | 没有证据表明有致癌性 |
| Ames 试验 | 没有证据表明有致突变性 |

对羟基苯甲酸丙酯

| 试验 | 结果 |
|-----------------------------|--|
| 急性的口服 LD ₅₀ (小鼠) | >8000 mg/kg |
| 腹膜内注射 LD ₅₀ (小鼠) | 640 mg/kg |
| 重复的口服剂量 (大鼠) - 96周 | 900 - 1200 mg/kg/天没有观察到毒性的征候或主要器官的组织变化 |
| 重复的口服剂量 (人) | 在摄取 150mg/天 4 - 7天后在 28名患者中没有明显的毒性作用 |
| 皮肤刺激 (人) | 在丙二醇中的 12% 溶液无刺激 (50人志愿受试者 5天覆盖接触) |
| 眼刺激 (人) | 在 60名患者中含 0.01% 对羟基苯甲酸丙酯的溶液 15 分钟的接触时间没有产生刺激症状 |
| 皮肤过敏性 (人) | 在非健康的受试者中没有证据表明皮肤过敏性 |
| 光敏作用 (人) | 没有证据表明光敏作用 |
| 致癌性 | 没有证据表明有致癌性 |
| Ames 试验 | 没有证据表明有致突变性 |

丙二醇

根据 "chemical resistance chart, 1996 Nalgene Labware catalogue", 浓丙二醇在 20°C 下持续与聚碳酸酯接触 30 天后几乎不引起损害, 在 50°C 下持续接触 7 天后会有一些影响。根据同一耐化学性图表, 浓丙二醇在 20°C 和 50°C 下与聚乙烯 (过滤材料) 接触 30 后不产生有害影响。因此, 丙二醇的优选浓度 (2%) 对硬质塑料没有任何影响。

最低的对羟基苯甲酸酯的总浓度是抗微生物组合物防腐剂 (21), 在此浓度下 4°C 时出现沉淀。为了在 50% 的溶解度 4°C 下获得安全范围, 优选组合物防腐剂 (18)。

实施例 5. 洗去性质。

在安全性评价中假定按最坏的条件整个装置容积都充满含水抗微

生物防腐组合物。

约 180 ml 的装置被填充活性多糖凝胶的分离基质（蛋白质抗生物素蛋白已经固定于多糖凝胶上）和组合物防腐剂 (18)。

将该装置插入用于体外循环处理的装置内并在临床应用之前用 900 ml Ringer-醋酸溶液 (Pharmacia, Inc) 冲洗。然后分析冲洗之后防腐剂 (18) 的组分的残余浓度。存在的最高浓度低于检测限：

| | |
|----------|-----------------------------|
| 对羟基苯甲酸甲酯 | $< 0.010 \text{ g. l}^{-1}$ |
| 对羟基苯甲酸乙酯 | $< 0.010 \text{ g. l}^{-1}$ |
| 对羟基苯甲酸丙酯 | $< 0.010 \text{ g. l}^{-1}$ |
| 丙二醇 | 0.005 g. l^{-1} |

假定装置容积为 210 ml，残存成分将等于：

| | |
|----------|--------------------|
| 对羟基苯甲酸甲酯 | $< 2.1 \text{ mg}$ |
| 对羟基苯甲酸乙酯 | $< 2.1 \text{ mg}$ |
| 对羟基苯甲酸丙酯 | $< 2.1 \text{ mg}$ |
| 丙二醇 | $< 1.1 \text{ mg}$ |

这些量相当于下面的对 50 kg 人的最大静脉注射剂量：

| | |
|----------|-------------------------|
| 对羟基苯甲酸甲酯 | 0.042 mg/kg |
| 对羟基苯甲酸乙酯 | $< 0.042 \text{ mg/kg}$ |
| 对羟基苯甲酸丙酯 | $< 0.042 \text{ mg/kg}$ |
| 丙二醇 | $< 0.022 \text{ mg/kg}$ |

在对羟苯甲酸酯的急性中毒剂量和装置中的残余量之间的安全余量足够大而不致认为对患者有害。动物研究和长期应用和对药物的体验，表明关于慢性毒性作用没有明显的危险。

关于急性和慢性毒理，丙二醇的安全余量也都是足够大。源自装置的丙二醇的最大残余量比一些药物的给药剂量低得多。如此小剂量的丙二醇的给药临床经验表明给药不会有害。

在这些应用中使用本发明抗菌防腐组合物的其它优点有 256 nm 处的专一紫外线吸收 ($E_{256}^{1\%} = 9.5$)，这使得能够进行冲洗操作的连续监测。