



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0052297

(51)^{2020.01} A01N 47/44; A61K 31/155; A61P 31/12; (13) B
A61P 31/04; A61P 31/10; A23L 33/10;
A61K 47/10

(21) 1-2021-00031

(22) 12/07/2019

(86) PCT/JP2019/027803 12/07/2019

(87) WO 2020/017473 23/01/2020

(30) 2018-135190 18/07/2018 JP

(45) 27/10/2025 451

(43) 26/07/2021 400A

(73) OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC. (JP)

115, Aza Kuguhara, Tateiwa, Muya-cho, Naruto-shi, Tokushima 7728601, Japan

(72) IMAI, Kaoru (JP); NISHIOKA, Hisae (JP); HAGI, Akihumi (JP); ODA, Shinji (JP);
HASHIMOTO, Kazumasa (JP); KIKUCHI, Motoya (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

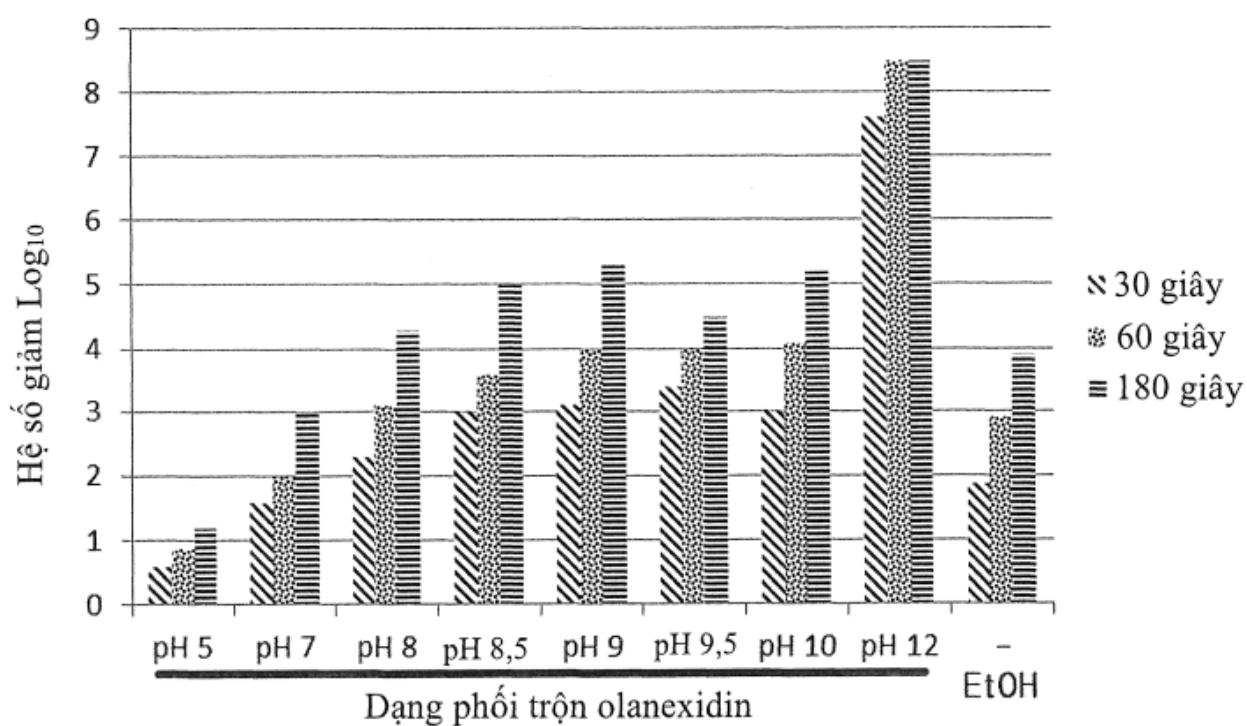
(54) CHẾ PHẨM KHỬ TRÙNG VÀ CHẾ PHẨM CỌ RỬA CHỨA CHẾ PHẨM KHỬ
TRÙNG NÀY

(21) 1-2021-00031

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm khử trùng có phạm vi ứng dụng rộng hơn bằng cách tăng cường hơn nữa hiệu quả của olanexidin gluconat, mà được sử dụng làm chất sát trùng diệt khuẩn da có độ an toàn cao, và bằng cách mở rộng phổ kháng khuẩn.

Việc sử dụng chế phẩm khử trùng chứa olanexidin gluconat và có tính kiềm có thể sản xuất ra chất sát trùng chứa olanexidin gluconat có phổ diệt khuẩn rộng hơn so với các chất sát trùng thông thường.

Fig.4



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm khử trùng (chế phẩm sát trùng) chứa olanexidin gluconat và có phổ diệt khuẩn rộng hơn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Olanexidin, tên hóa học 1-(3,4-diclobenzyl)-5-octylbiguanua, là hợp chất có hoạt tính diệt khuẩn cao. Olanexidin gluconat có độ hòa tan trong nước phù hợp, phổ diệt khuẩn rộng, cho thấy tác dụng diệt khuẩn trong thời gian ngắn, duy trì thêm tác dụng này trong một khoảng thời gian kéo dài, và an toàn ở mức cao, nhờ đó hữu ích để làm chất sát trùng y tế (Tài liệu sáng chế 1). Các chất sát trùng diệt khuẩn da chứa olanexidin gluconat có hiệu quả tốt đối với nhiều vi khuẩn khác nhau mà được coi là các vi khuẩn trên da thông thường và các virus có vỏ ngoài, trong khi gần như không có hiệu quả gì đối với calicivirus ở mèo mà không có vỏ (Tài liệu phi sáng chế 1). Vì lý do này, trong các lĩnh vực như y tế và điều dưỡng, và ngành công nghiệp thực phẩm và đồ uống, đang có nhu cầu về chất sát trùng chứa olanexidin gluconat có nhiều hiệu quả hơn với phổ diệt khuẩn rộng hơn.

Olanexidin thuộc hợp chất gốc monobiganit có cấu trúc 1 biganit. Các ví dụ về chất sát trùng có cùng cấu trúc biganit tiêu biểu bao gồm clorhexidin, là hợp chất gốc bisbiganit, và polyhexametylen biguanit, là hợp chất gốc polybiganit.

Clorhexidin là hợp chất gốc bisbiganit có cấu trúc 2 biganit trong một phân tử. Như với olanexidin, clorhexidin khó hòa tan trong nước và trở nên dễ tan khi ở dạng gluconat, vì lý do đó nó chủ yếu được sử dụng ở dạng clorhexidin gluconat làm sản phẩm được (Tài liệu phi sáng chế 2). Clorhexidin gluconat, như với olanexidin gluconat, cho thấy tác động diệt virus trên các virus có vỏ ngoài, trong khi đó không có hiệu quả gì trên các virus không có vỏ ngoài (Tài liệu phi sáng chế 3). Ngoài ra, clorhexidin gluconat ổn định ở độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 6,5 và được biết đến là gây kết tủa khi dung dịch nước loãng có tính kiềm ở độ pH bằng hoặc lớn hơn 8 và không gây ra khác biệt giữa các tác dụng diệt khuẩn ngay cả khi độ pH tăng lên (Tài liệu sáng chế 2, Tài liệu phi sáng chế 2, và Tài liệu phi sáng chế 4).

Mặt khác, polyhexametylen biganit, được phân loại là hợp chất gốc polybiganit,

là polyme của hexametylen biganit có cấu trúc 1 biganit trong một đơn vị. Polyhexametylen biganit cực kỳ dễ hòa tan trong nước và có phổ diệt khuẩn rộng, vì lý do đó mà dung dịch có tính axit nhẹ của nó thường hữu dụng để làm chất tiệt trùng độ độc thấp (Tài liệu phi sáng chế 5 và Tài liệu phi sáng chế 6). Ngoài ra, các chất sát trùng polyhexametylen biganit được báo cáo là có các hoạt tính diệt virus trên các virus không có vỏ ngoài (Tài liệu phi sáng chế 7) và được báo cáo thêm là làm gia tăng hiệu quả diệt khuẩn và hiệu quả diệt virus khi độ pH được tăng lên (Tài liệu phi sáng chế 4 và Tài liệu sáng chế 3 và Tài liệu sáng chế 4).

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

[Tài liệu sáng chế 1] Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2005-289959

[Tài liệu sáng chế 2] Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2007-217394

[Tài liệu sáng chế 3] Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2007-045732

[Tài liệu sáng chế 4] Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2017-171606

Tài liệu phi sáng chế

[Tài liệu phi sáng chế 1] Tài liệu đính kèm “Olanexidine solution 1.5% antiseptic applicator 10mL/25mL” (Tháng Tám, 2015 có sửa đổi)

[Tài liệu phi sáng chế 2] Mẫu phòng vắn sản phẩm dược “Clorhexidine gluconate solution” (Tháng Bảy, 2010 có sửa đổi)

[Tài liệu phi sáng chế 3] Clin Microbiol Rev.; 12(1): 147-179 (January, 1999)

[Tài liệu phi sáng chế 4] Skin Pharmacol Physiol.; 28(3): 147-158 (2015)

[Tài liệu phi sáng chế 5] Ủy ban khoa học về an toàn người tiêu dùng “Opinion on the safety of poly(hexamethylene) biguanide hydrochloride (PHMB)” (Tháng Bảy, 2015)

[Tài liệu phi sáng chế 6] Tài liệu thông tin kỹ thuật kháng khuẩn VANTOCIL IB

[Tài liệu phi sáng chế 7] Trang web “Arch Chemicals Reports that Studies Confirm that Vantocil (TM) Product Controls Norovirus, a Leading Cause of Acute Gastroenteritis”

(<https://www.businesswire.com/news/home/20060113005294/en/Arch-Chemicals-Reports-Studies-Confirm-Vantocil-TM>)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm khử trùng có phạm vi ứng dụng rộng hơn bằng cách tăng cường hơn nữa hiệu quả của olanexidin gluconat, mà đã được sử dụng làm chất sát trùng diệt khuẩn da có độ an toàn cao, và bằng cách mở rộng phổ diệt khuẩn.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiếp tục thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết vấn đề nêu trên. Các chất diệt khuẩn thông thường chứa olanexidin gluconat được phối trộn đến độ pH = 5 (Tài liệu phi sáng chế 1) vì các chế phẩm bôi lên da thường có tính axit nhẹ theo độ pH (độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 7) của da và olanexidin lắng xuống ở dạng hợp chất tự do khi được trung hòa bằng dung dịch nước có tính kiềm (Tài liệu sáng chế 1), tuy nhiên, các tác giả sáng chế chú ý điều chế ra dung dịch có tính kiềm chứa olanexidin gluconat để kiểm định các hoạt tính của các chất diệt khuẩn này và phát hiện ra rằng các hiệu quả diệt khuẩn không những được tăng cường ngoài mong đợi mà còn cho thấy cả hiệu quả đối với các virus không có vỏ ngoài mà chế phẩm có tính axit nhẹ của chúng gần như không có hiệu quả gì chống lại các virus không có vỏ ngoài đó. Ngoài ra, các tác giả sáng chế xác nhận rằng việc bổ sung thêm chất hoạt động bề mặt vào dung dịch có tính kiềm chứa olanexidin gluconat làm tăng cường độ ổn định. Sáng chế là dựa trên các phát hiện trên đây.

Cụ thể hơn, sáng chế là như sau.

- (1) Chế phẩm khử trùng chứa olanexidin gluconat, trong đó chế phẩm khử trùng này có tính kiềm.
- (2) Chế phẩm khử trùng theo mục (1), có độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 11.
- (3) Chế phẩm khử trùng theo mục (1) hoặc mục (2), trong đó nồng độ của olanexidin

gluconat nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20% (khối lượng/thể tích).

(4) Chế phẩm khử trùng theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), chứa nước và/hoặc rượu khử trùng.

(5) Chế phẩm khử trùng theo mục (4), trong đó nồng độ của rượu khử trùng nằm trong khoảng từ 10 đến 85% (thể tích/thể tích).

(6) Chế phẩm khử trùng theo mục (4) hoặc mục (5), trong đó rượu khử trùng được chọn từ etanol và rượu isopropylic.

(7) Chất cọ rửa chứa chế phẩm khử trùng theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (6).

Hiệu quả có thể đạt được của sáng chế

Theo chế phẩm theo sáng chế, có thể sản xuất ra chất sát trùng có thể sử dụng được trong các lĩnh vực như y tế và điều dưỡng, và ngành công nghiệp thực phẩm và đồ uống và có hiệu quả cao hơn với phổ diệt khuẩn rộng hơn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện sức mạnh diệt khuẩn của các chế phẩm chứa olanexidin gluconat (độ pH bằng 5, 8 đến 10) trong Ví dụ 1 kháng *Mycobacterium fortuitum* JCM 6387.

Fig.2 là biểu đồ thể hiện sức mạnh diệt khuẩn của các chế phẩm chứa olanexidin gluconat (độ pH bằng 5, 8 đến 10) trong Ví dụ 1 kháng *Mycobacterium chelonae* JCM 6388.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện sức mạnh diệt khuẩn của các chế phẩm chứa olanexidin gluconat (độ pH bằng 5, 8 đến 10) trong Ví dụ 1 kháng *Microsporum canis* NBRC 32464.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện hoạt tính diệt virus (thực khuẩn thể) của các chế phẩm chứa olanexidin gluconat (độ pH bằng 5, 7 đến 12) trong Ví dụ 2 trên thực khuẩn thể.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện hoạt tính diệt virus (thực khuẩn thể) của dạng phối trộn olanexidin chứa etanol trong Ví dụ 3 trên thực khuẩn thể.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm khử trùng chứa olanexidin gluconat và có tính

kiềm. Có tính kiềm được sử dụng ở đây có thể là chế phẩm bất kỳ có độ pH cao hơn 7 mà các ví dụ bao gồm, xét về độ độc và hoạt tính diệt khuẩn đối với da, độ pH cao hơn 7 đến 12, độ pH cao hơn 7 đến 11,5, độ pH cao hơn 7 đến 11, độ pH cao hơn 7 đến 10,5, và độ pH cao hơn 7 đến 10; tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 12, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 11,5, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 11, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 10,5, và độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 10; tốt hơn nữa là độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 11,5, độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 11, độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 10,5, độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 10; tốt hơn nữa là độ pH nằm trong khoảng từ 8,5 đến 11,5, độ pH nằm trong khoảng từ 8,5 đến 11, độ pH nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5, và độ pH nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10; và tốt hơn nữa là độ pH nằm trong khoảng từ 9 đến 12, độ pH nằm trong khoảng từ 9 đến 11,5, độ pH nằm trong khoảng từ 9 đến 11, độ pH nằm trong khoảng từ 9 đến 10,5, và độ pH nằm trong khoảng từ 9 đến 10. Lưu ý rằng chế phẩm theo sáng chế là dung dịch nước. Ngoài ra, trong phần mô tả này, cụm từ “sát trùng” và “diệt khuẩn” có nghĩa là tiêu diệt vi khuẩn, nấm và/hoặc virus.

Chất điều chỉnh độ pH đã biết bất kỳ có thể được sử dụng để điều chỉnh độ pH, mà các ví dụ bao gồm dung dịch có tính kiềm như natri hydroxit, kali hydroxit, canxi hydroxit, amoni carbonat, và kali carbonat, trong đó natri hydroxit được ưu tiên. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế tùy ý được điều chế bằng cách sử dụng chất đệm kiềm, và các ví dụ về chất đệm được sử dụng bao gồm chất đệm axit boric-natri carbonat, chất đệm CAPS-NaOH, chất đệm Bixin-NaOH, chất đệm Glyxin-NaOH, chất đệm Trixin-NaOH, chất đệm HEPPS-NaOH, chất đệm TAPS-NaOH, chất đệm Bixin-NaOH, và chất đệm HEPES-NaOH.

Nồng độ của olanexidin gluconat không bị giới hạn cụ thể miễn là hợp chất này có đủ hiệu quả diệt khuẩn, nhưng các ví dụ bao gồm nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20% (khối lượng/thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10% (khối lượng/thể tích), và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5% (khối lượng/thể tích). Khi rượu khử trùng mô tả sau được sử dụng đồng thời, thì các ví dụ về nồng độ này bao gồm nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10 % (khối lượng/thể tích), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 7% (khối lượng/thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5% (khối lượng/thể tích), và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 3% (khối lượng/thể tích).

Chế phẩm theo sáng chế có hoạt tính diệt khuẩn được tăng cường nhiều hơn trên nấm sợi và vi khuẩn chịu axit, đặc biệt là vi khuẩn thuộc chi *Microsporum* và vi khuẩn thuộc chi *Mycobacterium*. Ngoài ra, chế phẩm này cũng có hoạt tính diệt virus tốt thậm chí trên các virus không có vỏ ngoài, đặc biệt là các virus thuộc họ *Caliciviridae* (các virus thuộc chi *Norovirus*), mà dựa trên chúng các chất sát trùng chứa olanexidin gluconat thông thường không thể bất hoạt được.

Chế phẩm theo sáng chế còn tùy ý chứa rượu khử trùng để tạo ra hoạt tính diệt khuẩn và truyền khả năng khô nhanh. Các ví dụ về rượu khử trùng trong bản mô tả tốt hơn là bao gồm etanol và rượu isopropylic, và các ví dụ về nồng độ rượu khử trùng bao gồm nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 85% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 20 đến 85% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 30 đến 85% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 40 đến 85% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 50 đến 85% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 10 đến 80% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 20 đến 80% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 30 đến 80% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 40 đến 80% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 50 đến 80% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 10 đến 70% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 20 đến 70% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 30 đến 70% (thể tích/thể tích), nằm trong khoảng từ 40 đến 70% (thể tích/thể tích), và nằm trong khoảng từ 50 đến 70% (thể tích/thể tích). Chế phẩm theo sáng chế có thể về cơ bản không chứa rượu khử trùng. Việc chứa cả rượu khử trùng khiến cho có thể điều chế ra chất sát trùng khô nhanh có cả tác dụng tạo ra các hoạt tính diệt khuẩn nhờ rượu khử trùng và tác dụng duy trì hoạt tính diệt khuẩn nhờ olanexidin gluconat. Ngoài ra, khi các hoạt tính diệt khuẩn được tạo ra nhờ rượu khử trùng, thì nồng độ của olanexidin gluconat có thể được làm giảm. Các ví dụ về tỷ lệ nồng độ của olanexidin gluconat đối với rượu khử trùng bao gồm tỷ lệ nồng độ từ 1:400 đến 1:20, tốt hơn là từ 1:300 đến 1:30, và tốt hơn nữa là từ 1:200 đến 1:40.

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất diệt khuẩn đã biết. Các ví dụ về chất diệt khuẩn bao gồm muối benzalkoni như benzalkoni clorua và benzalkoni alkyl phosphat, benzethoni clorua, triclosan, isopropyl metylphenol, xetylpyridin clorua, resorxin, triclocarbanilit, clorhexidin hydroclorua, clorhexidin gluconat, polyhexametylen biganit, natri hypoclorit, hydrogen peroxit, povidon iot, và cồn iot. Các chất diệt khuẩn này tùy ý được sử dụng đơn lẻ hoặc 2 hoặc nhiều hơn hai chất diệt

khuẩn có thể được sử dụng kết hợp.

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất hòa tan đã biết. Các ví dụ về chất hòa tan bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion, chất hoạt động bề mặt ion, etylendiamin, natri benzoat, nicotinamit, xyclodextrin, etanol, rượu benzylic, và propylen glycol. Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt ion tốt hơn là bao gồm alkyl dimetylamin oxit như oleyl dimetylamin oxit, stearyl dimetylamin oxit, palmityl dimetylamin oxit, myristyl dimetylamin oxit, lauryl dimetylamin oxit, và alkyl dimetylamin oxit dầu dừa, trong số đó lauryl dimetylamin oxit được ưu tiên. Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt không ion bao gồm este của axit béo sorbitan, este của axit béo polyoxyetylen sorbitan, polyoxyetylen alkyl ete, polyoxyetylen polyoxypropylen alkyl ete, polyoxyetylen polyoxypropylen glycol, este của axit béo polyglyxeryl, dầu thầu dầu được hydro hóa polyoxyetylen, và este của axit béo sucroza, trong số đó polyoxyetylen polyoxypropylen glycol, polyoxyetylen alkyl ete, và polyoxyetylen polyoxypropylen alkyl ete được ưu tiên. Các ví dụ về polyoxyetylen polyoxypropylen glycol bao gồm polyoxyetylen(42) polyoxypropylen(67) glycol (Pluronic (R) P-123), polyoxyetylen(54) polyoxypropylen(39) glycol (Pluronic (R) P-85), polyoxyetylen(196) polyoxypropylen (67) glycol (Pluronic (R) F-127), polyoxyetylen(3) polyoxypropylen(17) glycol (Pluronic (R) L-31), polyoxyetylen(20) polyoxypropylen(20) glycol (Pluronic (R) L-44), polyoxyetylen(120) polyoxypropylen(40) glycol (Pluronic (R) F-87), và polyoxyetylen(160) polyoxypropylen(30) glycol (Pluronic (R) F-68), trong số đó polyoxyetylen(20) polyoxypropylen(20) glycol (Pluronic (R) L-44) được ưu tiên. Các ví dụ về polyoxyetylen alkyl ete bao gồm polyoxyetylen xetylete, polyoxyetylen oleyl ete, và polyoxyetylen lauryl ete (lauromacrogol), với polyoxyetylen lauryl ete (lauromacrogol) được đặc biệt ưu tiên. Ngoài ra, các ví dụ về polyoxyetylen polyoxypropylen alkyl ete bao gồm polyoxyetylen(20) polyoxypropylen(4) xetylete, polyoxyetylen(30) polyoxypropylen(6) dexyltetradexyl ete, polyoxyetylen(25) polyoxypropylen(25) lauryl ete, với polyoxyetylen(20) polyoxypropylen(4) xetylete được đặc biệt ưu tiên. Nồng độ của chất hòa tan có thể là nồng độ ngăn chặn được việc olanexidin gluconat kết tủa và không làm giảm hoạt tính diệt khuẩn và thường được xác định theo nồng độ của olanexidin gluconat nằm trong khoảng nồng độ từ 0,1 đến 30% (khối lượng/thể tích).

Chế phẩm theo sáng chế tùy ý chứa chất chống viêm, chất tạo ẩm, chất làm mềm,

chất cải thiện tiếp xúc, và chất làm đặc.

Các ví dụ về chất chống viêm bao gồm phần chiết cam thảo, axit glycyrrhêtinic, dikali glycyrrhizinat, stearyl glycyrrhêtinat, tocopherol axetat, alantoin, và phần chiết lô hội.

Ví dụ về chất tạo ẩm bao gồm axit amin, este của axit béo, axit pyrrolidon carboxylic, natri pyrrolidon carboxylat, natri lactat, axit hyaluronic, natri hyaluronat, N-cocoyl-L-arginin etyl este-DL-pyrrolidon carboxylat, ure, sorbitol, trehaloza, 1,3-butylen glycol, propylen glycol, poloxame (Pluronic (R) F-68, v.v.), và glyxerin.

Các ví dụ về chất làm mềm bao gồm este của axit béo như isopropyl myristat, isopropyl palmitat, isopropyl stearat, isobutyl oleat, và isobutyl maleat, và 1 este của axit béo đơn lẻ hoặc 2 hoặc nhiều hơn hai trong số đó có thể được bao gồm.

Các ví dụ về chất cải thiện tiếp xúc bao gồm hợp chất gốc silicon như dimethylpolysiloxan và silicon vòng.

Các ví dụ về chất làm đặc bao gồm dẫn xuất xenluloza như hydroxyetyl xenluloza, hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza kỵ nước, metyl xenluloza, và carboxymethyl xenluloza, axit (meth)acrylic bazơ copolyme, rượu polyvinyl, polyvinylpyrrolidon, metyl vinyl ete-maleic anhydrit copolyme, polyacrylamit, axit alginic, natri alginat, propylen glycol alginat, gelatin, gôm arabic, gôm tragacanth, gôm minh quyết (locust bean gum), gôm guar, gôm cây me, gôm xanthan, gôm gellan, và carrageenan.

Chế phẩm theo sáng chế có thể tốt hơn là được sử dụng nhằm mục đích sát trùng các bề mặt dụng cụ của các dụng cụ y tế, dụng cụ nấu nướng, và thiết bị điều dưỡng, và bề mặt da như tay và ngón tay. Chế phẩm theo sáng chế tùy ý được sử dụng dưới dạng ướt đầm trong giấy, vải, vải không dệt, gạc bông, hoặc bông thấm hút, hoặc như được làm đầy trong thiết bị chuyên dụng để bôi, hoặc ở dạng chất cọ rửa hoặc chất tẩy rửa, nhưng chế phẩm theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng làm chất cọ rửa. Chất cọ rửa ở đây có nghĩa là chế phẩm kiểu cọ rửa khô nhanh, và chất tẩy rửa có nghĩa là chế phẩm thu được bằng cách trộn chất diệt khuẩn/chất sát trùng và chất hoạt động bề mặt có tác dụng cọ rửa. Lưu ý rằng khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng để sát trùng các ngón tay của cả hai tay, lượng thường được sử dụng trong mỗi lần sát trùng nằm trong khoảng từ 1 đến 5mL, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,5 đến 4,5mL, tốt hơn nữa là nằm trong

khoảng từ 2 đến 4mL, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2,5 đến 3,5mL, và các ví dụ về số lần sử dụng trong mỗi ngày bao gồm, xét về độ độc với da, trong khoảng 100 lần, tốt hơn là trong khoảng 80 lần, tốt hơn nữa là trong khoảng 60 lần, và tốt hơn nữa là trong khoảng 40 lần.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn dựa trên các ví dụ, nhưng phạm vi kỹ thuật của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ 1

1. Sức mạnh diệt khuẩn chống nấm và mycobacteria không phải mycobacteria bệnh lao

Sức mạnh diệt khuẩn của chế phẩm chứa olanexidin gluconat (độ pH bằng 5, 8 đến 10) chống nấm sợi và mycobacteria không phải mycobacteria bệnh lao, mà đã biết là gây ra các bệnh lây nhiễm, được đánh giá bằng thử nghiệm tiêu diệt theo thời gian (Time-kill test).

1-1 Nguyên liệu thử nghiệm và phương pháp

1-1-1 Các chất thử nghiệm

(1) Chất cần được thử nghiệm 1

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 5

Hợp phần:	Olanexidin gluconat	1,5% (khối lượng/thể tích)
	Pluronic L-44	1,08% (khối lượng/thể tích)
	Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono-δ-lacton)	vừa đủ
	Nước tinh khiết	vừa đủ
	Độ pH = 5	

(2) Chất cần được thử nghiệm 2

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 8

Hợp phần:	Olanexidin gluconat	1,5% (khối lượng/thể tích)
	Pluronic L-44	1,08% (khối lượng/thể tích)

HEPES 0,1% (khối lượng/thể tích)

Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)

vừa đủ

Nước tinh khiết

vừa đủ

Độ pH = 8

(3) Chất cần được thử nghiệm 3

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 9

Hợp phần: Olanexidin gluconat 1,5% (khối lượng/thể tích)

Pluronic L-44 4,08% (khối lượng/thể tích)

Glyxin 0,1% (khối lượng/thể tích)

Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)

vừa đủ

Nước tinh khiết

vừa đủ

Độ pH = 9

(4) Chất cần được thử nghiệm 4

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 10

Hợp phần: Olanexidin gluconat 1,5% (khối lượng/thể tích)

Pluronic L-44 16,08% (khối lượng/thể tích)

Glyxin 0,1% (khối lượng/thể tích)

Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)

vừa đủ

Nước tinh khiết

vừa đủ

Độ pH = 10

(5) Chất đối chứng

Tên: Bazơ độ pH = 10

Hợp phần: Pluronic L-44 1,08% (khối lượng/thể tích)

Glyxin	0,1% (khối lượng/thể tích)
Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)	vừa đủ
Nước tinh khiết	vừa đủ
Độ pH = 10	

1-1-2 Môi trường

(1) Đĩa 7H10

19g thạch Difco Middlebrook 7H10 (số hiệu sản phẩm: 262710, được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company) được bổ sung 5mL glyxerol (số hiệu sản phẩm: 070-04941, được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và 900mL nước tinh khiết và được khuấy. Môi trường này được tiệt trùng bằng hơi nước trong điều kiện áp suất (121°C, 20 phút). Sau khi tiệt trùng, môi trường này được lấy ra từ máy tiệt trùng áp suất hơi nước, được làm mát xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 55°C kèm khuấy, và sau đó 100mL BBL Middlebrook OADC Enrichment (số hiệu sản phẩm: 212240, được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company) được bổ sung vào và được khuấy. Khoảng 20mL mỗi thạch, trước khi đặc lại, được phân tán trong các đĩa petri và được để cho hóa rắn.

(2) Đĩa SAB

65g môi trường thạch Sabouraud “Nissui” (số hiệu sản phẩm: 05701, được sản xuất bởi NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) được bổ sung 1000mL nước tinh khiết và được khuấy. Môi trường này được tiệt trùng bằng hơi nước trong điều kiện áp suất (121°C, 20 phút). Khoảng 20mL mỗi thạch, trước khi đặc lại, được phân tán trong các đĩa petri và được để cho hóa rắn.

(3) Đĩa SABL

73g môi trường thạch Sabouraud-Dextrose LP “DAIGO” (mã hiệu sản phẩm: 392-01875, được sản xuất bởi NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) được bổ sung 1000mL nước tinh khiết và được khuấy. Môi trường này được tiệt trùng bằng hơi nước trong điều kiện áp suất (121°C, 20 phút). Khoảng 20mL mỗi thạch, trước khi đặc lại, được phân tán trong các đĩa petri và được để cho hóa rắn.

1-1-3 Chất trung hòa

Khoảng 800mL nước cất được bổ sung 100g polysorbat 80, 5,0g natri thiosulfat hydrat, 0,4g kali dihydro phosphat, 1mL Triton X-100, 10,1g dinatri hydro phosphat khan, và 11,7g lexithin đậu nành và được khuấy. Ngoài ra, 10,0g Tamol (R) NN8906 được bổ sung vào, và được gia nhiệt và được khuấy cho đến khi hòa tan. Sau khi hòa tan, dung dịch natri hydroxit 1mol/L được bổ sung vào để điều chỉnh độ pH đến khoảng từ 7,8 đến 7,9. Nước cất được bổ sung vào cho đến khi tổng lượng bằng 1000mL, và sau đó bước tiệt trùng bằng hơi nước trong điều kiện áp suất được tiến hành.

1-1-4 Các vi sinh vật thử nghiệm

Đối với các vi sinh vật thử nghiệm, nấm sợi *Microsporium canis* NBRC 32464, vi khuẩn chịu axit *Mycobacterium chelonae* JCM 6388 và *Mycobacterium fortuitum* JCM 6387 được sử dụng. Mỗi vi sinh vật thử nghiệm này được nuôi cấy ở trên đĩa 7H10 (*Mycobacterium chelonae* và *Mycobacterium fortuitum*) hoặc đĩa SAB (*Microsporium canis*), và sau đó được tạo huyền phù trong nước cất để tạo ra dung dịch vi sinh vật thử nghiệm chứa McFarland No.1 (*Mycobacterium chelonae* và *Mycobacterium fortuitum*) hoặc chứa McFarland No.5 (*Microsporium canis*).

1-2 Thử nghiệm đánh giá sức mạnh diệt khuẩn

1-2-1 Đo số lượng tế bào sống sót ban đầu (*Mycobacterium chelonae* và *Mycobacterium fortuitum*)

(1) 3mL nước cất được bổ sung 150 μ L dung dịch vi sinh vật thử nghiệm và được trộn.

(2) Ngay lập tức, 50 μ L hỗn hợp vi khuẩn được bổ sung vào 4,95mL chất trung hòa và được trộn. Hỗn hợp này được điều chế thành phần pha loãng hệ số 10^2 lần.

(3) 0,3mL phần pha loãng hệ số 10^2 lần này được bổ sung vào 2,7mL chất trung hòa để pha loãng 10 lần. Bước pha loãng được lặp lại thêm bằng cùng một thao tác để sản xuất ra dãy pha loãng gấp 10 lần (tổng cộng 3 giai đoạn pha loãng hệ số từ 10^2 đến 10^4 lần).

(4) 100 μ L mỗi phần pha loãng hệ số 10^2 đến 10^4 lần được phân tán lên trên đĩa 7H10 và được phết lên kính. Các bước từ (2) đến (4) được thực hiện trong vòng 30 phút.

(5) Đĩa kính phết được lật ngược và các tế bào được nuôi cấy cho đến khi bước

đếm cụm khuẩn có thể được thực hiện.

(6) Các cụm khuẩn sinh trưởng trong đĩa kính phết được đếm bằng mắt thường và số lượng các cụm khuẩn được nhân với hệ số pha loãng để tính số lượng tế bào sống sót (CFU/mL). Tuy nhiên, các đĩa kính phết trong đó số lượng các cụm khuẩn là quá nhiều để phân biệt các cụm khuẩn với nhau được xác định là quá nhiều để đếm được TNTC (too numerous to count) và không được đếm.

1-2-2 Đo số lượng tế bào sống sót sau khi các chất thử nghiệm tác động (*Mycobacterium chelonae* và *Mycobacterium fortuitum*)

(1) 3mL chất thử nghiệm được bổ sung 150μL dung dịch vi sinh vật thử nghiệm và được trộn. Bằng cách sử dụng hỗn hợp này làm dung dịch phản ứng, thì phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ phòng.

(2) Sau khi để phản ứng tiếp diễn trong một khoảng thời gian định trước, thì 50μL dung dịch phản ứng được chiết, mà 4,95mL chất trung hòa được bổ sung vào đó và được trộn. Hỗn hợp này được điều chế thành phần pha loãng hệ số 10^2 lần.

(3) 0,3mL phần pha loãng hệ số 10^2 lần này được bổ sung vào 2,7mL chất trung hòa để pha loãng 10 lần. Bước pha loãng được lặp lại thêm bằng cùng một thao tác để sản xuất ra dãy pha loãng gấp 10 lần (3 giai đoạn trong tổng cộng các phần pha loãng hệ số từ 10^2 đến 10^4 lần).

(4) 100μL mỗi phần pha loãng hệ số 10^2 đến 10^4 lần được phân tán lên trên đĩa 7H10 và được phết lên kính.

(5) Đĩa kính phết được lật ngược và các tế bào được nuôi cấy cho đến khi bước đếm cụm khuẩn có thể được thực hiện.

(6) Các cụm khuẩn sinh trưởng trong đĩa kính phết được đếm bằng mắt thường và số lượng các cụm khuẩn được nhân với hệ số pha loãng để tính số lượng tế bào sống sót (CFU/mL).

1-2-3 Đo số lượng tế bào sống sót ban đầu (*Microsporium canis*)

(1) 3mL nước cất được bổ sung 150μL dung dịch vi sinh vật thử nghiệm và được trộn.

(2) Ngay lập tức, 500μL dung dịch hỗn hợp vi sinh vật được bổ sung vào 4,5mL

chất trung hòa và được trộn. Hỗn hợp này được điều chế thành phần pha loãng hệ số 10^1 lần.

(3) 0,3mL phần pha loãng hệ số 10^1 lần này được bổ sung vào 2,7mL chất trung hòa để pha loãng 10 lần. Bước pha loãng được lặp lại thêm bằng cùng một thao tác để sản xuất ra dãy pha loãng gấp 10 lần (tổng cộng 3 giai đoạn pha loãng hệ số từ 10^1 đến 10^3 lần).

(4) 100 μ L mỗi phần pha loãng hệ số 10^1 đến 10^3 lần được phân tán lên trên đĩa SABL P và được phết lên kính. Các bước từ (2) đến (4) được thực hiện trong vòng 30 phút.

(5) Đĩa kính phết được lật ngược và các tế bào được nuôi cấy cho đến khi bước đếm cụm khuẩn có thể được thực hiện.

(6) Các cụm khuẩn sinh trưởng trong đĩa kính phết được đếm bằng mắt thường và số lượng các cụm khuẩn được nhân với hệ số pha loãng để tính số lượng tế bào sống sót (CFU/mL). Tuy nhiên, các đĩa kính phết trong đó số lượng các cụm khuẩn quá nhiều để phân biệt các cụm khuẩn với nhau được xác định là TNTC và không được đếm.

1-2-4 Đo số lượng tế bào sống sót sau khi chất thử nghiệm tác động (*Microsporium canis*)

(1) 3mL chất thử nghiệm được bổ sung 150 μ L dung dịch vi sinh vật thử nghiệm và được trộn. Bằng cách sử dụng hỗn hợp này làm dung dịch phản ứng, thì phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ phòng.

(2) Sau khi để phản ứng tiếp diễn trong một khoảng thời gian định trước, thì 500 μ L dung dịch phản ứng được chiết, mà 4,5mL chất trung hòa được bổ sung vào đó và được trộn. Hỗn hợp này được điều chế thành phần pha loãng hệ số 10^1 lần.

(3) 0,3mL phần pha loãng hệ số 10^1 lần này được bổ sung vào 2,7mL chất trung hòa để pha loãng 10 lần. Bước pha loãng được lặp lại thêm bằng cùng một thao tác để sản xuất ra dãy pha loãng gấp 10 lần (tổng cộng 3 giai đoạn pha loãng hệ số từ 10^1 đến 10^3 lần).

(4) 100 μ L mỗi phần pha loãng hệ số 10^1 đến 10^3 lần được phân tán lên trên đĩa SABL P và được phết lên kính.

(5) Đĩa kính phết được lật ngược và các tế bào được nuôi cấy cho đến khi bước đếm cụm khuẩn có thể được thực hiện.

(6) Các cụm khuẩn sinh trưởng trong đĩa kính phết được đếm bằng mắt thường và số lượng các cụm khuẩn được nhân với hệ số pha loãng để tính số lượng tế bào sống sót (CFU/mL).

1-2-5 Công thức tính chỉ số giảm Log_{10} (LR)

$$\text{LR} = A - B$$

A: Giá trị trung bình của số lượng tế bào sống sót ban đầu (giá trị logarit thông thường)

B: Số lượng tế bào sống sót sau khi mỗi chất thử nghiệm tác động (giá trị logarit thông thường)

Đối với *Mycobacterium chelonae* và *Mycobacterium fortuitum*, thì tỷ lệ trộn của dung dịch phản ứng so với chất trung hòa là 1:99 và lượng phết lên kính là 100 μL , vì thế mà giới hạn phát hiện nhỏ nhất của số lượng tế bào sống sót là 1000 CFU/mL (3 trong giá trị logarit thông thường). Ngoài ra, đối với *Microsporum canis*, thì tỷ lệ trộn của dung dịch phản ứng so với chất trung hòa là 1:9 và lượng phết lên kính là 100 μL , vì thế mà giới hạn phát hiện nhỏ nhất của số lượng tế bào sống sót là 100 CFU/mL (2 trong giá trị logarit thông thường). Khi cụm khuẩn không được phát hiện ra, thì giới hạn phát hiện nhỏ nhất được chấp nhận và LR được biểu thị bằng dấu bất đẳng thức “>”.

1-3 Kết quả

Các kết quả được thể hiện trong các bảng từ Bảng 1 đến Bảng 3 và các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.3 dưới đây.

Bảng 1

Sức mạnh diệt khuẩn kháng vi khuẩn chịu axit *Mycobacterium fortuitum* JCM 6387

Chất thử nghiệm	Hệ số giảm Log ₁₀ (giá trị trung bình $\pm$ SD)		
	5 phút (n = 3)	10 phút (n = 6)	15 phút (n = 3)
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 5	0,83 $\pm$ 0,24	1,28 $\pm$ 0,33	1,94 $\pm$ 0,26
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 8	2,08 $\pm$ 0,38	3,18 $\pm$ 0,25	3,40 $\pm$ 0,00
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 9	2,18 $\pm$ 0,28	2,51 $\pm$ 0,16	3,06 $\pm$ 0,60
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 10	1,67 $\pm$ 0,24	2,13 $\pm$ 0,30	2,51 $\pm$ 0,55
Bazơ độ pH = 10	0,00 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,15	0,06 $\pm$ 0,13

Bảng 2

Sức mạnh diệt khuẩn kháng vi khuẩn chịu axit *Mycobacterium chelonae* JCM 6388

Chất thử nghiệm	Hệ số giảm Log ₁₀ (giá trị trung bình $\pm$ SD, n = 3)		
	5 phút	10 phút	15 phút
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 5	0,12 $\pm$ 0,38	0,24 $\pm$ 0,32	0,62 $\pm$ 0,53
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 8	1,62 $\pm$ 0,65	2,02 $\pm$ 0,55	2,24 $\pm$ 0,17
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 9	0,68 $\pm$ 0,40	1,00 $\pm$ 0,24	2,24 $\pm$ 0,17
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 10	0,08 $\pm$ 0,10	0,53 $\pm$ 0,42	0,94 $\pm$ 0,22
Bazơ độ pH = 10	-0,37 $\pm$ 0,23	-0,09 $\pm$ 0,22	-0,17 $\pm$ 0,20

Bảng 3

Sức mạnh diệt khuẩn kháng nấm sợi *Microsporum canis* NBRC 32464

Chất thử nghiệm	Hệ số giảm Log ₁₀ (giá trị trung bình $\pm$ SD, n = 3)		
	15 giây	30 giây	60 giây
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 5	0,29 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,05
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 8	2,23 $\pm$ 0,35	> 2,57	> 2,57
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 9	2,47 $\pm$ 0,17	> 2,57	> 2,57
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 10	2,23 $\pm$ 0,35	2,37 $\pm$ 0,35	> 2,57
Bazơ độ pH = 10	-0,07 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,06	0,07 $\pm$ 0,03

Các kết quả ở trên cho thấy rằng, trong tất cả các vi sinh vật thử nghiệm, sức mạnh diệt khuẩn của các dạng phối trộn olanexidin ở độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 10 là mạnh hơn so với dạng phối trộn olanexidin ở độ pH = 5. Lưu ý rằng sức mạnh diệt khuẩn của dạng phối trộn olanexidin ở độ pH = 10 bị làm giảm nhiều hơn so với dạng phối trộn olanexidin ở độ pH = 8, mà điều này được cho rằng hoạt tính này bị ngăn chặn do Pluronic L-44 được bổ sung làm chất hòa tan.

Ví dụ 2

2. Tác động của dạng phối trộn olanexidin đến thể ăn vi khuẩn MS2

Thể ăn vi khuẩn MS2 được biết đến là có tính kháng các chất sát trùng và được sử dụng cho thử nghiệm thay thế như tác động diệt virus noro của các chất sát trùng. Vì

lý do này, các tác dụng diệt virus của dạng phối trộn olanexidin được điều chế bằng cách làm thay đổi độ pH và chất sát trùng bán trên thị trường đối với virus được đánh giá bằng thử nghiệm sử dụng thể ăn vi khuẩn MS2.

2-1 Nguyên liệu thử nghiệm và phương pháp

2-1-1 Các chất thử nghiệm

(1) Chất cần được thử nghiệm 1

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 5

Hợp phần: Olanexidin gluconat	1,5% (khối lượng/thể tích)
Pluronic L-44	1,08% (khối lượng/thể tích)
Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)	vừa đủ
Nước tinh khiết	vừa đủ
Độ pH = 5	

(2) Chất cần được thử nghiệm 2

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 7

Hợp phần: Olanexidin gluconat	1,5% (khối lượng/thể tích)
Pluronic L-44	1,08% (khối lượng/thể tích)
HEPES	0,1% (khối lượng/thể tích)
Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)	vừa đủ
Nước tinh khiết	vừa đủ
Độ pH = 7	

(3) Chất cần được thử nghiệm 3

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 8

Hợp phần: Olanexidin gluconat	1,5% (khối lượng/thể tích)
Pluronic L-44	1,08% (khối lượng/thể tích)

HEPES 0,1% (khối lượng/thể tích)

Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)

vừa đủ

Nước tinh khiết

vừa đủ

Độ pH = 8

(4) Chất cần được thử nghiệm 4

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 8,5

Hợp phần: Olanexidin gluconat 1,5% (khối lượng/thể tích)

Pluronic L-44 1,08% (khối lượng/thể tích)

L-Histidin 0,1% (khối lượng/thể tích)

Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)

vừa đủ

Nước tinh khiết

vừa đủ

Độ pH = 8,5

(5) Chất cần được thử nghiệm 5

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 9

Hợp phần: Olanexidin gluconat 1,5% (khối lượng/thể tích)

Pluronic L-44 4,08% (khối lượng/thể tích)

Glyxin 0,1% (khối lượng/thể tích)

Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)

vừa đủ

Nước tinh khiết

vừa đủ

Độ pH = 9

(6) Chất cần được thử nghiệm 6

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 9,5

Hợp phần: Olanexidin gluconat 1,5% (khối lượng/thể tích)

Pluronic L-44	10,08% (khối lượng/thể tích)
Glyxin	0,1% (khối lượng/thể tích)
Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)	vừa đủ
Nước tinh khiết	vừa đủ
Độ pH = 9,5	

(7) Chất cần được thử nghiệm 7

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 10

Hợp phần: Olanexidin gluconat	1,5% (khối lượng/thể tích)
Pluronic L-44	16,08% (khối lượng/thể tích)
Glyxin	0,1% (khối lượng/thể tích)
Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)	vừa đủ
Nước tinh khiết	vừa đủ
Độ pH = 10	

(8) Chất cần được thử nghiệm 8

Tên: Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 12

Hợp phần: Olanexidin gluconat	1,5% (khối lượng/thể tích)
Pluronic L-44	26,08% (khối lượng/thể tích)
L-arginin	0,1% (khối lượng/thể tích)
Chất điều chỉnh độ pH (natri hydroxit, glucono- δ -lacton)	vừa đủ
Nước tinh khiết	vừa đủ
Độ pH = 12	

(9) Chất đối chứng

Tên/tên viết tắt: Etanol khử trùng “Kenei”/EtOH 70%

Nhà sản xuất và nhà phân phối: KENEI Pharmaceutical Co., Ltd.

Hợp phần: Hàm lượng etanol (C_2H_6O) nằm trong khoảng từ 76,9 đến 81,4% (thể tích/thể tích).

2-1-2 Môi trường

(1) Môi trường lỏng 702

1L nước tinh khiết được bổ sung 10g Polypepton, 2g phần chiết nấm men, và 1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ và được tiệt trùng bằng hơi nước trong điều kiện áp suất ($121^\circ C$, 20 phút).

(2) Môi trường thạch mềm

0,5L nước tinh khiết được bổ sung 5g Polypepton, 1g phần chiết nấm men, 0,5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, và 3,5g thạch từ môi trường và được tiệt trùng bằng hơi nước trong điều kiện áp suất ($121^\circ C$, 20 phút).

(3) Đĩa thạch

64g môi trường thạch trypto-soya (môi trường thạch SCD) “Nissui” được bổ sung 1,6L nước tinh khiết và được khuấy. Môi trường này được tiệt trùng bằng hơi nước trong điều kiện áp suất ($121^\circ C$, 20 phút). Khoảng 20mL mỗi thạch, trước khi đặc lại, được phân tán trong các đĩa petri và được để cho hóa rắn.

2-1-3 Chất trung hòa

Khoảng 800mL nước cất được bổ sung 100g polysorbat 80, 5,0g natri thiosulfat hydrat, 0,4g kali dihydro phosphat, 1mL Triton X-100, 10,1g dinatri hydro phosphat khan, và 11,7g lexitin đậu nành và được khuấy. Ngoài ra, 10,0g Tamol (R) NN8906 được bổ sung vào, và được gia nhiệt và được khuấy cho đến khi hòa tan. Sau khi hòa tan, dung dịch natri hydroxit 1mol/L được bổ sung vào để điều chỉnh độ pH đến khoảng từ 7,8 đến 7,9. Nước cất được bổ sung vào cho đến khi tổng lượng bằng 1000mL, và sau đó bước tiệt trùng bằng hơi nước trong điều kiện áp suất được tiến hành.

2-1-4 Thẻ ăn vi khuẩn và vật chủ

(1) Thẻ ăn vi khuẩn

Tên/tên viết tắt: Thực khuẩn thể *Escherichia coli* Ms2/thực khuẩn thể MS2

Nguồn cung cấp: Viện Công nghệ và Đánh giá Công nghệ sinh học Quốc gia (National Institute of Technology and Evaluation Biotechnology Center - NBRC)

Số hiệu NBRC 102619

(2) Vật chủ

Tên/tên viết tắt: *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani và Chalmers 1919/*E.coli* NBRC13965

Nguồn cung cấp: NBRC

Số hiệu NBRC 13965

2-2 Phương pháp thử nghiệm

2-2-1 Vật chủ

E. coli NBRC 13965 bảo quản trong môi trường casiton được cấy truyền trong 5mL $\times$ 4 môi trường lỏng 702 và được nuôi cấy bằng cách lắc ở nhiệt độ 35°C qua đêm. Các tế bào được bổ sung vào 180mL môi trường lỏng 702 và được nuôi cấy thêm bằng cách lắc trong 3 giờ để sử dụng môi trường nuôi cấy thu được bằng cách lắc dưới dạng chất lỏng nuôi cấy vật chủ.

2-2-2 Dung dịch thực khuẩn thể

Dung dịch thực khuẩn thể được điều chế đến khoảng 6×10^{12} PFU/mL theo phương pháp thông thường được sử dụng.

2-2-3 Thử nghiệm diệt virus (thực khuẩn thể)

(1) 475 μ L chất thử nghiệm được bổ sung 25 μ L dung dịch thực khuẩn thể. Ngoài ra, 25 μ L dung dịch thực khuẩn thể này được bổ sung vào 475 μ L nước cất làm dung dịch tác động đối chứng.

(2) Tác động này được để tiếp diễn ở nhiệt độ phòng trong 30 giây, 1 phút và 3 phút. Dung dịch tác động đối chứng chỉ có thời gian tác động khoảng 3 phút.

(3) Sau khi tác động, thì 50 μ L dung dịch tác động được gom và sau đó 450 μ L chất trung hòa được bổ sung vào và được khuấy. Hỗn hợp này được điều chế thành phần pha loãng hệ số 10^1 lần.

(4) 20 μ L mỗi phần pha loãng hệ số 10^1 lần được bổ sung vào 180 μ L chất trung hòa và được khuấy. Hỗn hợp này được điều chế thành phần pha loãng hệ số 10^2 lần. Cùng một thao tác pha loãng được lặp lại để tạo ra dãy pha loãng hệ số 10 lần đến 10^9 lần.

(5) 100 μ L dãy pha loãng hệ số 10^2 đến 10^9 lần được bổ sung 0,2mL chất lỏng nuôi cấy vật chủ và được khuấy. Khoảng 5mL môi trường thạch mềm bảo quản ở nhiệt độ khoảng 47°C được bổ sung vào, được khuấy nhẹ, và sau đó phủ lên trên đĩa thạch.

(6) Môi trường thạch mềm, sau khi đã được hóa rắn, được nuôi cấy ở nhiệt độ 35°C qua đêm.

(7) Số lượng mảng xuất hiện được đếm.

(8) Độ chuẩn ($\log_{10}$ PFU/mL) được tính bằng cách sử dụng phương pháp trung bình có trọng số [Đẳng thức 1 dưới đây]. Ngoài ra, hệ số giảm Log_{10} được tính.

2-2-5 Phân tích số liệu

(1) Độ chuẩn thực khuẩn thể

Độ chuẩn thực khuẩn thể được tính bằng cách sử dụng Đẳng thức 1 dưới đây.

$$\text{PFU/t} = (\Sigma c_1 + c_2 + \dots + c_n) \div ((n_1 + n_2 \times v_2 + \dots + n_n \times v_n) \times d) \quad (\text{Đẳng thức 1})$$

t: Lượng pha loãng được bổ sung vào đĩa (0,1mL trong thử nghiệm theo sáng chế)

c_1 : Tổng số lượng mảng của tất cả các đĩa có hệ số pha loãng nhỏ nhất đếm được

c_2 : Tổng số lượng các mảng của tất cả các đĩa có hệ số pha loãng sau c_1

c_n : Tổng số lượng mảng của tất cả các đĩa có hệ số pha loãng lớn nhất

n_1 : Số lượng đĩa của c_1

n_2 : Số lượng đĩa của c_2

v_2 : Tỷ lệ của các hệ số pha loãng của c_1 so với c_2 (10^{-1} trong thử nghiệm theo sáng chế)

n_n : Số lượng đĩa của c_n

v_n : Tỷ lệ của các hệ số pha loãng của c_1 so với c_n

d: Hệ số pha loãng của c_1

Độ chuẩn (PFU/mL) được biến đổi sang logarit thông thường ($\log_{10}$ PFU/mL) và được lấy đến hàng thập phân thứ nhất bằng cách làm tròn. Khi độ chuẩn (PFU/mL) bằng hoặc nhỏ hơn 1, thì giá trị logarit thông thường của nó là 0.

(2) Hệ số giảm Log_{10} (LR)

Tác động diệt virus (thực khuẩn thể) được đánh giá bằng giá trị hệ số giảm Log_{10} .

$$LR = A - B$$

A: Giá trị trung bình của độ chuẩn thực khuẩn thể của dung dịch tác động đối chứng (giá trị logarit thông thường)

B: Độ chuẩn thực khuẩn thể của mỗi chất thử nghiệm sau khi tác động (giá trị logarit thông thường)

LR được lấy đến hàng thập phân thứ nhất bằng cách làm tròn. Lưu ý rằng khi độ chuẩn (giá trị logarit thông thường) của chất thử nghiệm sau khi tác động bằng 0, LR được biểu thị là “>(A-3)” do độ chuẩn thực khuẩn thể có giới hạn phát hiện nhỏ nhất là $3 \cdot \log_{10}$.

2-3 Các kết quả

Các kết quả đánh giá về tác động diệt virus của các chất thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 4 và Fig.4.

Bảng 4

Tác dụng diệt thực khuẩn thể của các chất thử nghiệm

Chất thử nghiệm	Hệ số giảm $\log_{10}$		
	30 giây	60 giây	180 giây
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 5	0,6	0,9	1,2
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 7	1,6	2	3
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 8	2,3	3,1	4,3
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 8,5	3	3,6	5
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 9	3,1	4	5,3
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 9,5	3,4	4	4,5
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 10	3	4,1	5,2
Dạng phối trộn olanexidin độ pH = 12	7,6	8,5	>8,5
EtOH 70%	1,9	2,9	3,9

Dạng phối trộn olanexidin ở độ pH = 5 gần như không cho thấy tác động diệt virus, và tác động diệt virus của dạng phối trộn olanexidin ở độ pH = 7 bằng với etanol 70% được sử dụng làm chất đối chứng, trong khi đó dạng phối trộn olanexidin có độ pH chuyển sang độ kiềm có xu hướng có LR lớn hơn khi độ pH tăng lên. Các dạng phối trộn ở độ pH bằng hoặc lớn hơn 8 có LR lớn hơn hoặc bằng 3 ở 60 giây và dạng phối trộn ở độ pH bằng hoặc lớn hơn 8,5 có LR lớn hơn hoặc bằng 3 ở 30 giây, nhờ đó đáp ứng yêu cầu về tác động diệt virus của chất sát trùng lý tưởng có LR bằng 3 hoặc cao hơn. Do đó, dung dịch có tính kiềm chứa olanexidin gluconat được chứng minh là có hoạt tính diệt virus thiết thực và hoạt tính diệt virus này được tăng cường khi độ pH tăng.

Ví dụ 3

3. Tác động của dạng phối trộn olanexidin có tính kiềm chứa etanol đối với thể ăn vi khuẩn MS2

Trong ví dụ này, etanol được bổ sung vào dạng phối trộn olanexidin có tính kiềm có độ pH = 9,5 để đánh giá tác dụng diệt virus bằng thử nghiệm sử dụng thể ăn vi khuẩn MS2 nhằm mục đích xác nhận tác dụng gây khô nhanh và tác dụng tạo ra hoạt tính diệt khuẩn bởi rượu khử trùng cho dạng phối trộn olanexidin có tính kiềm.

3-1 Chất thử nghiệm

Các chất cần được thử nghiệm từ 1 đến 3, Ví dụ so sánh 1, và Bazo (chất đối chứng) được điều chế bằng các hợp phần trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Thành phần	Lượng (tính theo g/100mL)				
	Chất cần được thử nghiệm 1	Chất cần được thử nghiệm 2	Chất cần được thử nghiệm 3	Ví dụ so sánh 1	Bazo
Olanexidin gluconat	1,5	1	0,5	1,5	-
Pluronic L-44	1,08	0,72	0,36	1,08	1,08
Rượu benzylic	3,5	3,5	3,5	-	3,5
Hexyldecanol	0,01	0,01	0,01	-	0,01
Pluronic F-68	1	1	1	-	1
Axit glycyrrhetic	0,1	0,1	0,1	-	0,1
Glyxin	0,1	0,1	0,1	-	0,1
Glucono-δ-lacton	vừa đủ	vừa đủ	vừa đủ	-	vừa đủ
Natri hydroxit	vừa đủ	vừa đủ	vừa đủ	-	vừa đủ
Etanol	70	77	83	70	70
Nước tinh khiết	vừa đủ	vừa đủ	vừa đủ	vừa đủ	vừa đủ
Độ pH	9,5	9,5	9,5	6,89	9,5

Ngoài ra, etanol khử trùng sau đây được sử dụng làm đối chứng.

Tên: Etanol khử trùng “Kenei”

Nhà sản xuất và nhà phân phối: KENEI Pharmaceutical Co., Ltd.

Hợp phần: Hàm lượng etanol (C₂H₆O) nằm trong khoảng từ 76,9 đến 81,4% (thể tích/thể tích).

3-2 Phương pháp thử nghiệm

Các tác dụng diệt virus được đánh giá bằng phương pháp sử dụng thể ăn vi khuẩn

MS2 được mô tả trong Ví dụ 2, 2-1 và 2-2 nêu trên. Lưu ý rằng dung dịch thực khuẩn thể được điều chế đến khoảng 4×10^{12} PFU/mL được sử dụng.

3-3 Kết quả

Các kết quả đánh giá về tác động diệt virus của các chất thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 6 và Fig.5.

Bảng 6

Chất thử nghiệm	Hệ số giảm Log ₁₀	
	30 giây	60 giây
Chất cần được thử nghiệm 1 (Olanexidin gluconat 1,5%)	6	6,7
Chất cần được thử nghiệm 2 (Olanexidin gluconat 1,0%)	5,2	5,8
Chất cần được thử nghiệm 3 (Olanexidin gluconat 0,5%)	4,4	5
Ví dụ so sánh 1 (Olanexidin gluconat 1,5%, độ pH = 6,89)	2,6	3,5
Bazơ	3,8	4,5
Etanol khử trùng	2,2	3,4

Các kết quả ở trên cho thấy rằng tác động diệt virus tăng lên theo hướng phụ thuộc vào nồng độ của olanexidin gluconat ngay cả ở dạng phối trộn olanexidin có tính kiềm chứa etanol, nhờ đó tác động diệt virus bởi olanexidin gluconat không bị cản trở ngay cả khi etanol được bổ sung để gây khô nhanh. Ngoài ra, dạng phối trộn olanexidin có tính kiềm chứa etanol có tác động diệt virus cao hơn so với dạng phối trộn olanexidin có tính kiềm mà không chứa etanol, vì lý do đó dạng phối trộn olanexidin có tính kiềm chứa etanol cho thấy là có tác động diệt virus thiết thực ngay cả khi nồng độ olanexidin gluconat được làm giảm đi. Ngoài ra, hoạt tính diệt virus thiết thực (LR bằng 3 hoặc cao hơn) không được tìm thấy ở dạng phối trộn olanexidin chứa etanol có độ pH thấp hơn 7 (Ví dụ so sánh 1), nhờ đó đưa ra giả thuyết rằng, ở dạng phối trộn olanexidin có tính kiềm chứa etanol, olanexidin gluconat, etanol, và tính kiềm đóng góp hiệp đồng vào tác động diệt virus. Lưu ý rằng, trong ví dụ này, Pluronic F-68 được bổ sung vào để làm giảm bớt da sần và cấp ẩm, và không tìm thấy sự khác biệt về tác dụng ngay cả khi Pluronic F-68 ở nồng độ 0,5g/100mL.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Chế phẩm theo sáng chế, khi được sử dụng, có thể sản xuất ra chất sát trùng chứa olanexidin gluconat có phổ diệt khuẩn cải thiện và tác dụng trên các virus không có vỏ ngoài và từ đó có tính hữu ích cao trong các lĩnh vực như y tế và điều dưỡng, và ngành công nghiệp thực phẩm và đồ uống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm khử trùng chứa olanexidin gluconat, trong đó chế phẩm khử trùng này có tính kiềm.
2. Chế phẩm khử trùng theo điểm 1, có độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 11.
3. Chế phẩm khử trùng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nồng độ của olanexidin gluconat nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20% (khối lượng/thể tích).
4. Chế phẩm khử trùng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, chứa nước và/hoặc rượu khử trùng.
5. Chế phẩm khử trùng theo điểm 4, trong đó nồng độ của rượu khử trùng nằm trong khoảng từ 10 đến 85% (thể tích/thể tích).
6. Chế phẩm khử trùng theo điểm 4 hoặc 5, trong đó rượu khử trùng được chọn từ etanol và rượu isopropylic.
7. Chất cọ rửa chứa chế phẩm khử trùng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.

1/3

Fig.1

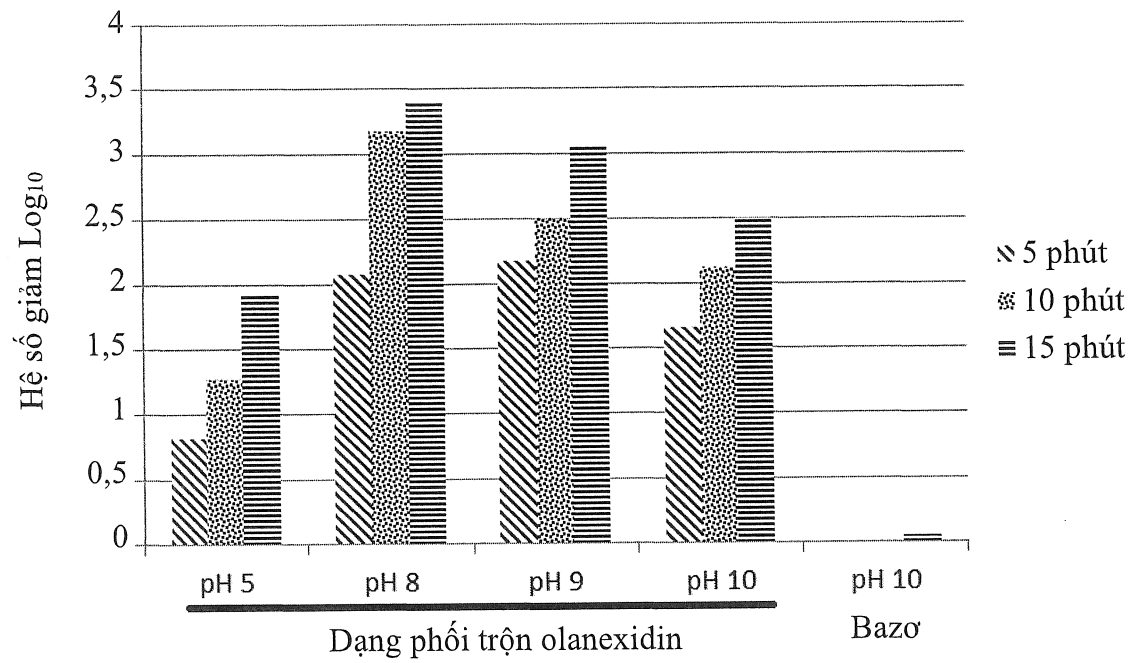
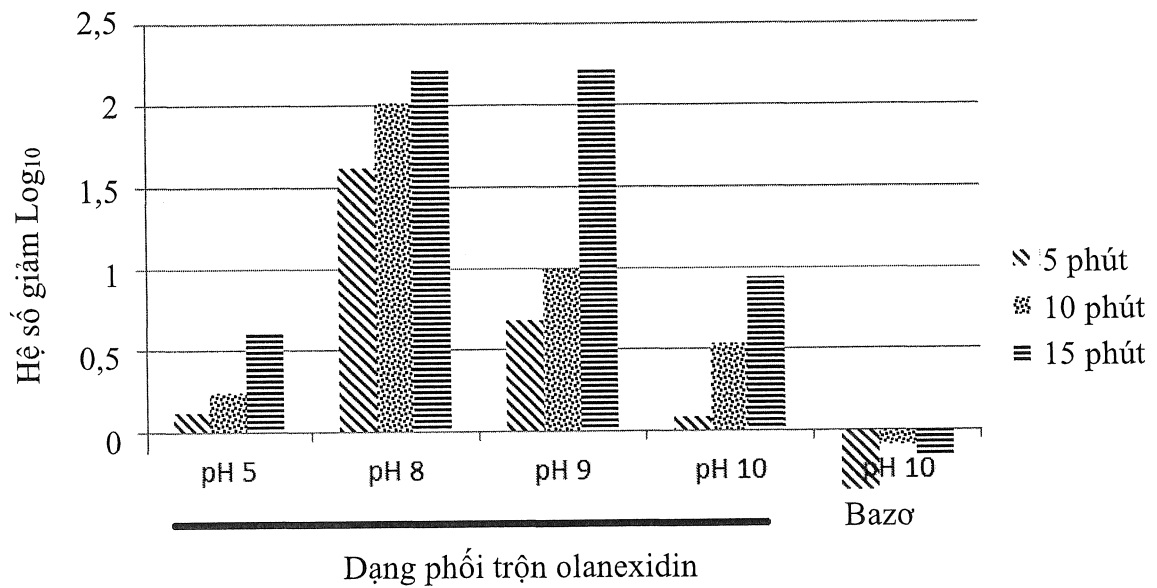


Fig.2



2/3

Fig.3

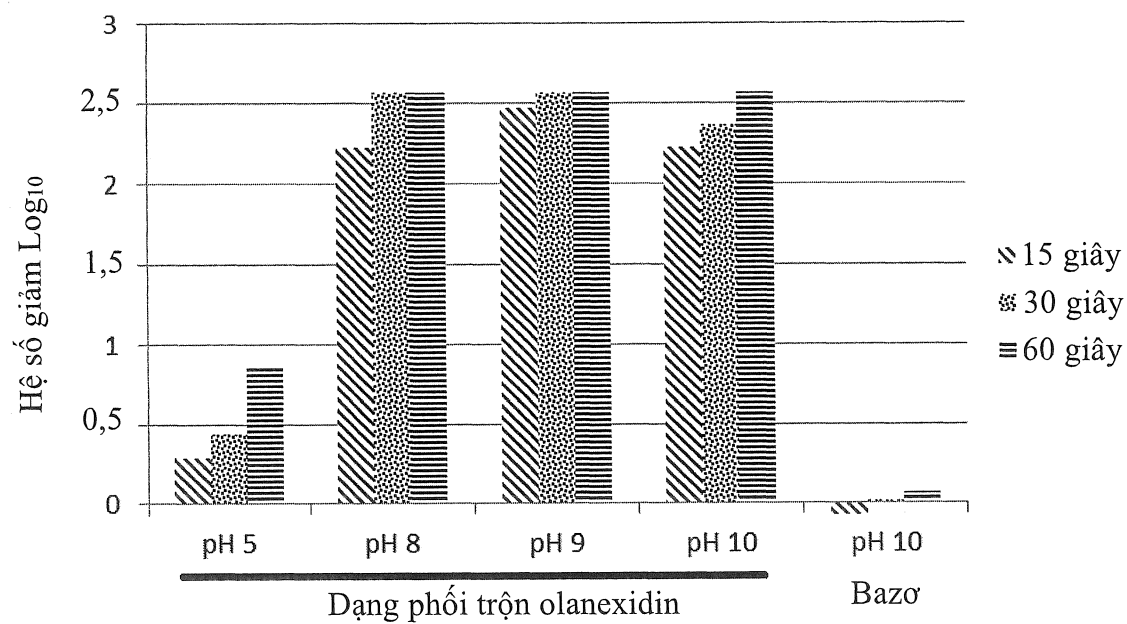
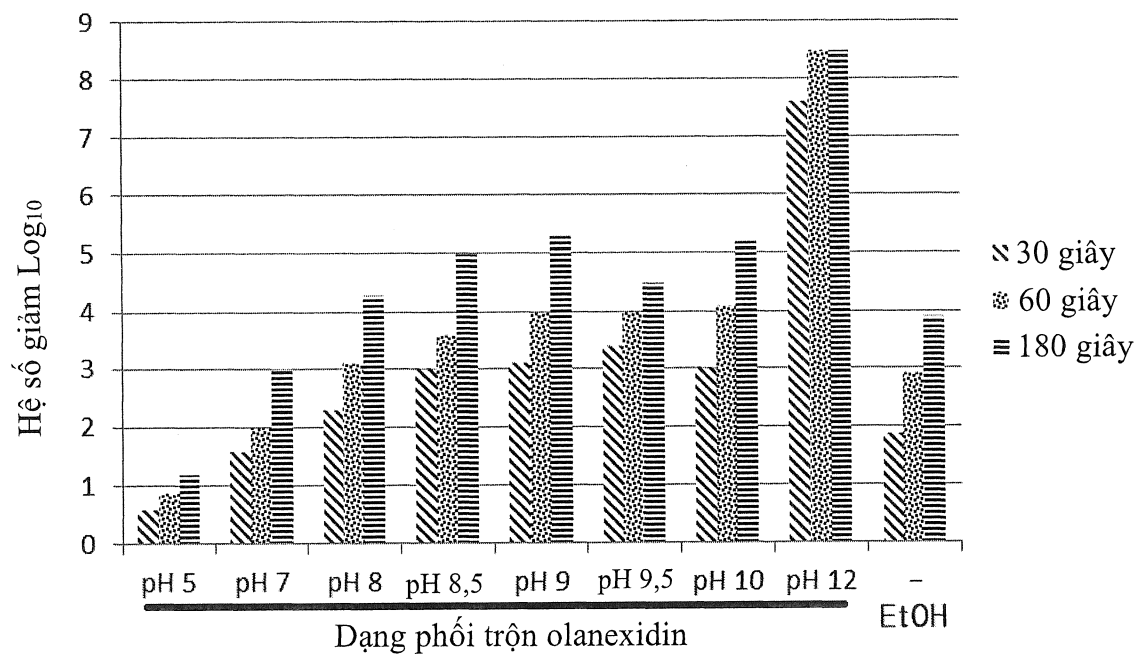


Fig.4



3/3

Fig.5

