

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780026275.0

[51] Int. Cl.

A61K 9/16 (2006.01)

A01N 31/16 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 7 月 22 日

[11] 公开号 CN 101489533A

[22] 申请日 2007.6.29

[21] 申请号 200780026275.0

[30] 优先权

[32] 2006.7.13 [33] GB [31] 0613925.7

[86] 国际申请 PCT/EP2007/056562 2007.6.29

[87] 国际公布 WO2008/006714 英 2008.1.17

[85] 进入国家阶段日期 2009.1.12

[71] 申请人 荷兰联合利华有限公司

地址 荷兰鹿特丹

[72] 发明人 D·J·邓卡尔夫 A·J·福斯特
J·隆 S·P·兰纳 王 东

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 万雪松 付 磊

权利要求书 2 页 说明书 27 页

[54] 发明名称

生物杀伤剂组合物的相关改进

[57] 摘要

本发明提供了具有改进的效力的无溶剂生物杀伤剂组合物,其包含至少一种水不溶性生物杀伤剂(优选除草剂)和水溶性载体材料,其中该水不溶性生物杀伤剂以纳米分散形式散布在该载体材料中,该纳米分散形式的峰值直径低于 1000 纳米。本发明还提供了包括将生物杀伤剂的溶液和水溶性载体的溶液喷雾干燥以获得生物杀伤剂在该载体中的无溶剂分散体的方法,该分散体在溶于水时产生纳米分散的生物杀伤剂。本发明还提供了通过该无溶剂组合物在水中的分散获得的水不溶性生物杀伤剂和水溶性载体的水分散体。

1. 具有改进的效力的无溶剂生物杀伤剂组合物，其包含至少一种水不溶性生物杀伤剂和水溶性载体材料，其中该水不溶性生物杀伤剂以纳米分散形式散布在该载体材料中，该纳米分散形式的峰值直径低于 1000 纳米。

2. 根据权利要求 1 的组合物，其中该水不溶性生物杀伤剂的峰值直径低于 800 纳米，优选低于 500 纳米，更优选低于 200 纳米，最优选低于 100 纳米。

3. 根据前述权利要求任一项的组合物，其中该水不溶性生物杀伤剂具有在环境温度下小于 5 克/升，优选小于 1 克/升，更优选小于 100 毫克/升，最优选小于 15 毫克/升的水溶解度。

4. 根据前述权利要求任一项的组合物，其中该无溶剂分散体包含最多 40%，优选最多 30 重量%，最优选最多 25 重量%的生物杀伤剂。

5. 根据前述权利要求任一项的组合物，其中该生物杀伤剂是除草剂。

6. 通过前述权利要求任一项的组合物在水中的分散获得的水不溶性生物杀伤剂和水溶性载体的水分散体。

7. 制备根据权利要求 1-6 任一项的组合物的方法，其包括将生物杀伤剂的溶液和水溶性载体的溶液喷雾干燥以获得生物杀伤剂在该载体中的无溶剂分散体，其在溶于水时产生纳米分散的生物杀伤剂。

8. 制备根据权利要求 1-6 任一项的组合物的方法，包括下列步骤：

a) 形成乳状液，其包含：

i) 生物杀伤剂在它的至少一种水不混溶性溶剂中的溶液，和

ii) 该载体的至少部分水溶液，和

b) 干燥该乳状液以除去水和该水不混溶性溶剂以获得该生物杀伤剂在该载体中的纳米分散体。

9. 制备根据权利要求 1-6 任一项的组合物的方法，包括下列步骤：

a) 提供一种混合物，其包含：

i) 至少一种非水性溶剂，

ii) 任选地，水，

iii) 在 (i) 和 (ii) 的混合物中可溶的水溶性载体材料，和

iv) 在 (i) 和 (ii) 的混合物中可溶的水不溶性生物杀伤剂，和

b) 干燥所述混合物以除去非水性溶剂和所存在的任何水以获得该生

物杀伤剂在该载体中的纳米分散体。

10. 预防或治疗感染或侵染用的生物杀伤剂组合物的制备方法，其包括制备根据权利要求 1-6 任一项的组合物的步骤。

11. 可通过权利要求 7-10 任一项的方法获得的组合物。

12. 医药治疗以外的底物处理法，其包括使该底物与根据权利要求 1-6 或 11 任一项的组合物接触的步骤。

13. 水不溶性生物杀伤剂的输递方法，包含下列步骤：

a) 将根据权利要求 1-6 或 11 任一项的水不溶性生物杀伤剂在水溶性载体材料中的纳米分散体溶解在水中，

b) 任选地，向该分散体中加入其它组分，和

c) 用该生物杀伤剂的该含水纳米分散体处理底物。

14. 根据权利要求 13 的方法，其中步骤 (c) 包括喷洒、浸渍或洗涤底物。

15. 根据权利要求 13 或 14 的方法，其中该底物选自植物、土壤、动物、动物草垫、草料或由植物或动物制成的制品。

16. 根据权利要求 1-6 或 11 任一项的组合物用于治疗侵染的用途。

17. 根据权利要求 8-10 的方法，其中干燥步骤包含喷雾干燥。

生物杀伤剂组合物的相关改进

发明领域

本发明涉及生物杀伤剂组合物的相关改进。

其特别涉及含有水不溶性生物杀伤物质的生物杀伤剂组合物及其前体。

发明背景

生物杀伤剂广泛用在农业、卫生和清洁、木材和纸防腐和各种其它人类、动物和植物健康和工业用途中。本发明被认为普遍适用于生物杀伤剂组合物，但特别参照抗微生物剂，即抗细菌和抗真菌剂，以及除草剂进行描述，但不是要排除本发明的其它和更宽方面。

许多有效的生物杀伤剂具有差的水溶性，并已经提出关于如何使这些材料更有效的各种建议。例如，许多农业制剂含有不溶或难溶生物杀伤剂的水溶性盐。这些盐，如烷基胺盐，通常不像它们的酸对等物那样活性。作为其实例，2,4-二氯苯氧基乙酸（2,4-D 酸）的除草活性已知高于 2,4-D 的相应二甲基胺盐。但是，2,4-D 酸不可溶于水。用于配制酸形式的 2,4-D 的溶剂已知对植物有毒并提高除草剂挥发性并随之迁移到非靶标区域中。

我们的共同待审国际专利申请 PCT/GB03/03226 描述了形成包含水溶性聚合材料的三维开孔晶格的固体多孔珠粒。这些通常是通过从含有溶解在水相中的聚合物的高内相乳状液（HIPE）中除去水和非水分散相而形成的“模板化”材料。通过将 HIPE 乳状液滴到低温流体如液氮中然后将形成的粒子冻干以除去大部分水相和分散相，形成该宏观珠粒。这留下“骨架”结构形式的聚合物。该珠粒迅速溶解在水中并具有显著性质，即在冷冻和干燥之前分散在该乳状液的分散相中的水不溶性组分在珠粒聚合物骨架溶解后也可以分散在水中。

WO 2005/011636 公开了用于形成药物在聚合物中的“固态非晶分散体”的非乳状液基喷雾干燥法。在这种方法中，将聚合物和低溶解度药物溶解在溶剂中并喷雾干燥形成分散体，其中药物主要以非晶形而非以晶形存在。

我们的共同待审申请 GB 0501835 (2005 年 1 月 28 日提交, 2006 年 8 月 3 日公开) 和 GB 0613925 (2006 年 7 月 13 日提交) 描述了可如何制备在水中形成纳米分散体的材料, 优选通过喷雾干燥法制备。在这两种情况下, 液体都在高于环境温度下 (高于 20℃) 干燥, 例如喷雾干燥, 以产生结构剂粒子作为载体, 水不溶性材料分散在其中。当这些粒子置于水中时, 它们溶解, 形成粒子通常小于 300 纳米的水不溶性材料的纳米分散体。这一尺寸级别类似于病毒粒子, 且该水不溶性材料表现得像其在溶液中一样。

在 GB 0501835 中所述的方法中, 将水不溶性材料溶解在该乳状液的溶剂相中。该早期在先公开申请指出, 该方法可用于抗微生物剂, 例如: Triclosan™、氯咪巴唑、octapyrox、酮康唑、phthalimo 过氧己酸 (PAP) 和季铵化合物, 或用于杀虫剂、农药和除草剂。我们的在先公开的 GB 0501835 申请也表明, 通过所公开的方法制成的荧光增白剂材料与通过已知冻干法制成的那些相比表现出更好的性能。

在 GB 0613925 中, 将水不溶性材料溶解在混合溶剂体系中并与水溶性结构剂共存于相同的相中。我们的 GB 0613925 申请清楚表示, Triclosan™ 纳米分散体具有额外益处, 即按重量计 (weight for weight), 其即使在极低浓度下也比通常对 Triclosan™ 预期的有效。

在本申请中, 除非另行指明, 术语“环境温度”是指 20℃ 且所有百分比都是重量百分比。

发明概述

我们现在已经确定, 乳状液基和单相法都可用于制造表现出改进的效力的生物杀伤剂物质的水溶性形式。

相应地, 本发明的第一方面提供了包含至少一种水不溶性生物杀伤剂和水溶性载体材料的具有改进效力的生物杀伤剂制品, 其中该水不溶性生物杀伤剂以纳米分散形式散布在该载体材料中, 该纳米分散形式的峰值直径低于 1000 纳米。

本发明进一步提供了改进水不溶性生物杀伤剂的效力的方法, 包含下列步骤: 将生物杀伤剂的溶液和水溶性载体的溶液喷雾干燥以获得生物杀伤剂在该载体中的无溶剂分散体, 其在溶于水时产生峰值粒径低于 1000 纳米的纳米分散的生物杀伤剂。

本发明的分散产物的粒度筛选的优选方法使用动态光散射仪(Nano S, Malvern Instruments UK 制造)。具体而言, Malvern Instruments Nano S 使用红色(633 纳米)4mW 氦-氖激光照射含有材料悬浮液的标准光学品质 UV 浮雕(curvette)。本申请中提到的粒度是用该装置使用标准规程获得的那些。

优选地, 水不溶性生物杀伤剂的峰值直径低于 800 纳米。更优选地, 水不溶性生物杀伤剂的峰值直径低于 500 纳米。在本发明的特别优选的实施方案中, 水不溶性生物杀伤剂的峰值直径低于 200 纳米, 最优选低于 100 纳米。

我们已经确定, 对于较小粒度, 特别是低于 40 纳米的粒度, 水不溶性生物杀伤剂的 MIC 进一步显著改进。这种效应尚未没有充分理解(作为比较, 革兰阴性细菌细胞壁的厚度为大约 10 纳米), 其可能涉及生物杀伤剂纳米粒子与细胞壁的一定的特异性相互作用。该粒度范围也接近微乳液(miscellar)水平, 且另一可能的解释在于, 某些生物杀伤剂只需要少数分子或在一些情况下单个分子就能发挥作用和因此输递水不溶性生物杀伤剂的极小包装极大提高了其效率。

在本发明中, 用于生物杀伤剂的“水不溶性”是指其在水中的溶解度小于 10 克/升。

优选地, 水不溶性生物杀伤剂具有在环境温度(20℃)下小于 5 克/升, 优选小于 1 克/升, 尤其优选小于 120 毫克/升, 再更优选小于 15 毫克/升, 最优选小于 5 毫克/升的水溶解度。该溶解度水平提供了水不溶性在本说明书中的含义的预期解读。

本发明适用于大范围的生物杀伤剂。优选在本发明中的水不溶性生物杀伤剂是抗菌剂(例如氯酚, 包括三氯生)、抗真菌剂(例如有机氯, 包括四氯二氧苯和咪唑, 如酮康唑和丙环唑)、杀虫剂(例如拟除虫菊酯类, 包括 λ -三氟氯氰菊酯)和/或除草剂(例如酚-脲类, 包括异丙隆)。本发明也预计适用于杀螨剂、杀藻剂、杀软体动物剂和杀线虫剂(nematacides)。

三氯生(5-氯-2-(2, 4-二氯苯氧基)-酚)是肥皂、除臭剂、牙膏、漱口水和清洁供应品中所用的氯酚抗菌剂, 并灌注到越来越多的消费产品中, 如厨房用具、玩具、床上用品、短袜和垃圾袋。其在水中具有~17 毫克/升的差溶解度, 且是本发明中适用的抗菌生物杀伤剂。

酮康唑（乙酰基-二氯苯基-咪唑）是以多种形式用于治疗真菌感染的广谱咪唑抗真菌剂。乳霜、洗剂和含药香波可用于局部感染，如头皮屑，而口服片剂用于治疗全身真菌感染。Janssen-Cilag Ltd 制造了以“Nizoral®”为商品名的多种酮康唑基制剂。其具有小于 0.1 毫克/升的溶解度。

丙环唑（1-(2-(2,4-二氯苯基)-4-丙基-1-1,3-二氧戊环-2-基甲基)-1H-1,2,4-三唑）是另一广谱抗真菌剂。丙环唑主要用在抗真菌的农用化学制剂中，如 Ciba 制造的“Tilt®”。其具有大约 100 毫克/升的溶解度。

啞菌酯（(E)-2-{2-[6-(2-氰基苯氧基)啞啉-4-基氧基]苯基}-3-甲氧基丙烯酸甲基酯）是全身的广谱 strobilurin 杀真菌剂，其对四种主要类属的植物致病真菌具有活性，包括 *Ascomycetes*（例如白粉病）、担子菌纲（*Basidiomycetes*）（例如锈病）、*Deuteromycetes*（例如稻瘟病）和卵菌纲（例如霜霉病）。另一些 strobilurins 是啞菌酯、醚菌酯、啞氧菌酯、氟啞菌酯、oryzastrobins、醚菌胺、啞菌胺酯和肟菌酯。啞菌酯在水中具有 ~6 毫克/升的极差溶解度。

四氯二氰苯（2,4,5,6-四氯间苯二腈）是用于控制威胁蔬菜、树木、小果树、草皮、装饰性植物和其它农作物的真菌的广谱有机氯杀真菌剂。其在水中具有 ~0.6 毫克/升的格外低的溶解度。

酮康唑、丙环唑、啞菌酯和四氯二氰苯各自是本发明中适用的抗真菌生物杀伤剂。

异丙隆（3-(4-异丙基苯基)-1,1-二甲基脲）是在水中具有低溶解度（~65 毫克/升）的常见除草剂并广泛用于控制在各种一年生草中生长的阔叶杂草。其是本发明中适用的除草剂。

λ-三氟氯氰菊酯是本发明中适用的杀虫剂并具有 0.005 毫克/升的水溶解度。

如上所示，据信，最终纳米分散体中粒度的降低在改进在其它方面不溶于水的材料的效力方面具有显著优点。在追求显著改进的生物利用率时或在要避免材料的高局部浓度的类似用途中，这被认为特别有利。此外，具有小粒度的纳米分散体被认为比具有较大粒度的那些更稳定。

优选的载体材料选自水溶性无机材料、表面活性剂、聚合物、糖及其混合物。

本发明的另一方面提供了水不溶性生物杀伤剂和水溶性载体材料的水分散体，其中该生物杀伤剂处于纳米分散形式，该纳米分散形式的峰值直径低于1000纳米，优选低于800纳米，更优选低于500纳米，再更优选低于200纳米，尤其低于100纳米。如上所示，当生物杀伤剂的粒度低于40纳米时，特别有利。

本发明的另一方面提供了制备包含水不溶性生物杀伤剂和水溶性载体的生物杀伤剂组合物的方法，包括下列步骤：

a) 形成乳状液，其包含：

- i) 生物杀伤剂在它的至少一种水不混溶性溶剂中的溶液，和
- ii) 该载体的水溶液，和

b) 干燥该乳状液以除去水和该水不混溶性溶剂以获得生物杀伤剂在该载体中的基本不含溶剂的纳米分散体。

为方便起见，这类方法在本文中被称作“乳状液”法。

本发明的另一方面提供了制备包含水不溶性生物杀伤剂和水溶性载体的生物杀伤剂组合物的方法，包括下列步骤：

a) 提供一种混合物，其包含：

- i) 至少一种非水性溶剂，
- ii) 任选地，水，
- iii) 在(i)和(ii)的混合物中可溶的水溶性载体材料，和
- iv) 在(i)和(ii)的混合物中可溶的水不溶性生物杀伤剂，和

b) 干燥所述混合物以除去非水性溶剂和所存在的任何水以获得生物杀伤剂在该载体中的基本不含溶剂的纳米分散体。

为方便起见，这类方法在本文中被称作“单相”法。

在本发明中，基本不含溶剂是指产物的游离溶剂含量小于15重量%，优选低于10重量%，更优选低于5重量%。

在本发明中，载体材料和生物杀伤剂必须都在干燥步骤之前基本完全溶解在其各自的溶剂中。在本说明书的范围内没有教导浆料的干燥。为避免任何疑问，因此事实是，该乳状液或该混合物的固含量使得所存在的可溶材料的超过90重量%，优选超过95%，更优选超过98%在干燥步骤之前是溶解的。

关于上述方法，优选的生物杀伤剂和优选的载体材料如上所述并且如下文进一步详述。类似地，材料的优选物理特性如上所述。

“单相”法是优选的，其中生物杀伤剂和载体材料都溶解在包含至少一种非水性溶剂（和任选水）的相中。这被认为获得纳米分散的生物杀伤剂的较小粒度。优选地，干燥同时除去几乎所有溶剂，更优选通过在高于环境温度下实现喷雾干燥。

本发明的另一方面提供了预防或治疗感染或侵染用的生物杀伤剂组合物的制备方法，其包括制备本发明的组合物的步骤。优选地，在该方法中，将水不溶性生物杀伤剂的粒度降至低于 100 纳米，更优选低于 40 纳米。这类组合物适用在医药治疗法中。

本发明的再一方面提供了医药治疗以外的底物处理，其包括使该底物与本发明的组合物接触的步骤。这种方法可能包括，例如，保存木材或其它天然来源材料的方法。

发明详述

下面进一步详细描述本发明的各种优选特征和实施方案。

生物杀伤剂：

如上所示，本发明适用于大范围的水不溶性生物杀伤剂。优选的生物杀伤剂是非动物生物杀伤剂，特别是杀真菌剂、杀细菌剂和除草剂。这些生物杀伤剂优选在水中具有小于 120 毫克/升，更优选小于 15 毫克/升的溶解度。

在本发明中，术语生物杀伤剂也包括生物稳定剂。例如丙环唑是“抑制真菌的”而非“杀真菌的”，因为其作用模式涉及细胞有丝分裂的抑制而非造成细胞死亡。

某些已知的水不溶性除草剂列在美国专利 US 6849577 中，并包括敌草隆、利谷隆、嘧黄隆、chlorsulphuron、甲磺隆、氯嘧磺隆、阿特拉津、西玛津、喹禾灵、丁氧环酮、烟嘧磺隆、primisulfuron、苄嘧磺隆、莠灭净、除芽通、异丙隆、绿麦隆、吡氟草胺、硝草酮、苯草醚、氟咯草酮、乙氧氟草醚、异噁唑草酮、甲氧咪草烟和噻磺隆。

另一些合适的除草剂包括氟乐灵、氟草烟、甜菜宁、精噁唑禾草灵、乙草胺、甲草胺、野麦畏和敌稗。

本发明在其最广义上不严格依赖于该水不溶性除草剂的性质。本发明适用于如上所述的那些除草剂的不溶形式，其目前以盐形式使用。这

些包括通常以其水溶性盐形式（如三甲基铈盐、异丙基胺、钠或铵盐）使用的草甘膦盐（N-膦酰基甲基甘氨酸）、通常以其水溶性钠盐形式使用的氟磺胺草醚、通常以其水溶性铵盐形式使用的草铵膦、百草枯和通常以其水溶性钠盐形式使用的灭草松。

某些已知的水不溶性杀真菌剂公开在例如美国专利 US 6355675 和 6113936 中，并包括苯并咪唑化合物，如苯菌灵、多菌灵、涕必灵和甲基托布津；苯基氨基甲酸酯，如乙霉威；二羧基酰亚胺化合物，如腐霉利、异菌脲和乙烯菌核利；唑化合物，如烯唑醇、epoxyconazole、戊唑醇、苯醚甲环唑、环唑醇、氟硅唑、粉唑醇和三唑酮；酰基丙氨酸化合物，如甲霜灵；羧基酰胺化合物，如呋吡菌胺、灭锈胺、氟酰胺和甲苯氟磺胺；有机磷酸酯化合物，如甲基立枯磷、乙磷铝和吡菌磷；苯胺基嘧啶化合物，如嘧霉胺、嘧菌胺和嘧菌环胺；氰基吡咯化合物，如咯菌腈和拌种咯；抗生素，如灭瘟素、春雷霉素、多抗霉素和井冈霉素；甲氧基丙烯酸酯化合物，如嘧菌酯、醚菌酯和苯氧菌胺；四氯二氰苯；代森锰锌；克菌丹；灭菌丹；；；三环唑；咯嗪酮；烯丙苯噻唑；苯酞；霜脍氰；烯酰吗啉；S-甲基苯并[1,2,3]噻二唑-7-硫代羧酸酯；恶唑酮菌；恶唑酸；氟啶胺；嘧菌脲；chlorobenthiazole；isovalerone；四氯间苯二甲腈；thiophthalimideoxybisphenoxyarsine；3-碘-2-丙基丁基氨基甲酸盐；；对羟基苯甲酸酯；。其它如芬普福（吗啉基）和福美双（二硫代氨基甲酸盐）也被认为是合适的。

优选的杀真菌剂包括多烯、咪唑和三唑类的那些。

特别优选的多烯包括两性霉素、制霉菌素及其混合物。

优选的咪唑包括：联苯苄唑、布康唑、克霉唑、益康唑、芬康唑、异康唑、酮康唑、甲硝唑、奥昔康唑、舍他康唑、硫康唑、噻康唑、咪康唑及其混合物。

优选的三唑类包括：氟康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、丙环唑、立福康唑、戊唑醇、特康唑、伏立康唑及其混合物。

另一些适用于本发明的抗真菌生物杀伤剂包括：阿莫罗芬、阿尼芬净、布替萘芬、萘替芬、卡泊芬净、环吡酮、氟胞嘧啶、灰黄霉素、卤普罗近、米卡芬净、对羟基苯甲酸酯类、水杨酸、特比萘芬、噻苯咪唑、发癣退、十一烯酸及其混合物。

水不溶性杀虫剂包括氯氟菊酯、 λ -三氟氯氟菊酯、顺式氯戊菊酯、

马拉硫磷和毒死蜱。

水可分散的形式：

本发明提供了获得在其它方面基本不溶于水的材料的可迅速分散形式的方法。这通过形成至少部分非水的中间乳状液或溶液（水溶性载体材料，和水不溶性生物杀伤剂都溶解在其中）来制备。在除去溶剂后，该不溶的生物杀伤剂散布在水溶性载体材料中。下面进一步详细描述合适的载体材料。

中间乳状液或溶液的最优选干燥方法是直接产生粉末的方法，如喷雾干燥。喷雾干燥特别有效地除去非水性挥发性组分和存在的任何水，从而以粉末形式留下载体和“有效荷载”材料。下面进一步详细描述干燥步骤。

尚未充分理解在干燥步骤后获得的材料的结构。据信，所得干粉材料不是囊状物(encapsulate)，因为在干燥产物中不存在水不溶性材料的离散的宏观体。干燥材料也不是“干乳状液”，因为在干燥步骤后几乎或完全没有留下构成乳状液“油”相的挥发性溶剂。在向干燥产物中加入水后，不重新形成乳状液，就像“干燥乳状液”那样。也相信，该组合物不是所谓的固溶体，因为在本发明中，可以在不损失益处的前提下改变所存在的组分的比率。也根据X射线和DSC研究，相信本发明的组合物不是固溶体，但包含纳米级的相分离混合物。

优选地，在干燥步骤后产生的组合物包含重量比为1:500至1:1(生物杀伤剂:载体)的生物杀伤剂和载体，1:100至1:1是优选的。通过喷雾干燥可以获得大约10-30重量%水不溶性生物杀伤剂和90-70%载体的典型含量。低于40%，更优选低于30重量%，最优选低于25重量%的生物杀伤剂含量是优选的，因为它们表现出如上所述的改进的MIC。

“乳状液”制备法：

在本发明的一个优选方法中，水不溶性生物杀伤剂的溶剂与水不混溶。在与水混合后，其因此可形成乳状液。

优选地，非水相占乳状液的大约10%至大约95% v/v，更优选大约20%至大约68% v/v。

该乳状液通常在本领域技术人员公知的条件下制备，例如，通过使

用磁搅拌棒、均化器或旋转机械搅拌器。该乳状液不需要特别稳定，只要它们在干燥前不会发生显著的相分离。

使用高剪切混合设备的均化是特别优选的制造乳状液（其中水相是连续相）的方式。据信，对粗乳状液的这种回避和乳状液分散相液滴尺寸的降低实现生物杀伤剂在干燥产物中的改进的分散。在本发明的优选方法中，以 500 纳米至 5000 纳米的平均分散相液滴尺寸（使用 Malvern 峰强度）制备水连续乳状液。我们已经发现，‘Ultra-Turrax’ T25 型实验室均化器（或同等物）在高于 10,000 rpm 下运行多于 1 分钟时产生合适的乳状液。

在乳状液液滴尺寸和生物杀伤剂粒度之间存在直接关系，这可以在本发明的材料分散在水溶液中后检测。我们已经确定，前体乳状液的均化速度的提高可以降低再溶解后的最终粒度。

据信，在均化速度从 13,500 rpm 提高至 21,500 rpm 时，再溶解粒度可降低大约一半。均化时间也被认为在再溶解粒度的控制中起到一定作用。粒度再随均化时间增加而降低，且粒度分布同时变宽。这种强混合不是本发明的方法中的基本步骤，但它是有利的。

声处理也是特别优选的降低乳状液体系液滴尺寸的方式。我们已经发现，在 10 级下运行 2 分钟的 Hert Systems Sonicator XL 是合适的。

“单相”制备法：

在本发明的一种备选方法中，载体和生物杀伤剂都可溶于非水性溶剂或水与非水性溶剂的混合物。在此处和说明书的其它地方，非水性溶剂都可以是非水性溶剂混合物。在这种情况下，干燥步骤的进料包含水溶性载体和水不溶性生物杀伤剂均溶解在其中的单相材料。这种进料也可以是乳状液，只要载体和生物杀伤剂均溶解在相同相中。

该“单相”法通常被认为与乳状液法相比产生具有更小粒度的更好纳米分散体。如上所示，较小粒度产生提高的生物杀伤作用。

据信，相对于溶剂和/或载体，降低生物杀伤剂相对浓度的组分比率产生较小粒度。

干燥：

喷雾干燥——最优选的乳状液或溶液干燥方法——是本领域技术

人员公知的。在本发明的情况下，由于被干燥的材料中存在挥发性非水性溶剂，必须小心。为了在使用可燃溶剂时降低爆炸危险，可以在所谓的封闭喷雾干燥系统中使用惰性气体，例如氮气作为干燥介质。溶剂可以回收和再使用。

我们已经发现，'Buchi' B-290 型实验室喷雾干燥装置适用于实施本发明。

干燥温度优选应该等于或高于 100°C，优选高于 120°C，最优选高于 140°C。升高的干燥温度已经被发现在再溶解的纳米分散材料中产生较小粒子。

也可以使用冻干。优选使用熔点高于 -120°C，优选高于 -80°C 的非水性溶剂。氯仿由于其物理特性，是特别优选的溶剂。其具有相对较高的熔点（大约 -63.5°C）。乳状液法和单相法都可以使用冻干。

载体材料：

载体材料是水溶性的，其包括形成结构化水相以及分子单分散物类的真实离子溶液。载体材料优选包含无机材料、表面活性剂、聚合物或可以是其中两种或更多种的混合物。

预计可以使用其它非聚合的、有机水溶性材料，如糖作为载体。但是，本文具体提到的载体材料是优选的。

合适的载体材料（本文称作“水溶性载体材料”）包括优选的水溶性聚合物、优选的水溶性表面活性剂和优选的水溶性无机材料。与在环境温度下的软固体或半固体相比，特别优选的材料是固体，从而在喷雾干燥产物中获得良好的粉末性质。

载体的具体选择取决于该组合物的预期最终用途，应该选择载体以使它们不会有害地与生物杀伤剂反应并与预期用途相容。载体也可以自身具有活性，或含有具有这种活性的水溶性材料。例如，在本发明的农业用途中，载体可以包含具有农用化学活性的材料。

优选的聚合物载体材料：

适宜的可溶于水的聚合物载体材料的实例包括：

(a) 天然聚合物（例如天然存在的胶如瓜尔胶、藻酸盐、刺槐豆胶）或多糖如葡聚糖；

(b)纤维素衍生物例如黄原胶、木葡聚糖、醋酸纤维素、甲基纤维素、甲基乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟乙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基丁基纤维素、乙基羟乙基纤维素、羧甲基纤维素及其盐(例如钠盐-SCMC),或者羧甲基羟乙基纤维素及其盐(例如钠盐);

(c)由选自下列的两种或多种单体制得的均聚物或共聚物: 乙烯醇、丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、丙烯酰胺甲基丙烷磺酸酯、丙烯酸氨基烷基酯、甲基丙烯酸氨基烷基酯、丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸羟乙酯、乙烯基吡咯烷酮、乙烯基咪唑、乙烯基胺、乙烯基吡啶、乙二醇和其它烷撑二醇、环氧乙烷和其它环氧烷烃、亚乙基亚胺(ethyleneimine)、苯乙烯磺酸酯、乙二醇丙烯酸酯和乙二醇甲基丙烯酸酯;

(d)环糊精, 例如 β -环糊精;

(e)其混合物。

当聚合物材料是共聚物时, 其可以是统计共聚物(下文中也公知为无规共聚物)、嵌段共聚物、接枝共聚物或超支化共聚物。除了上述所列的那些之外, 也可以包括上面所列那些之外的共聚单体, 如果它们的存在不会损坏所获聚合物材料的可溶于水或者可分散于水的本性。

适宜且优选的均聚物的实例包括聚乙烯醇、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚丙烯酰胺(如聚-N-异丙基丙烯酰胺)、聚甲基丙烯酰胺、聚丙烯胺、聚甲基丙烯胺(如聚二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯和聚-N-吗啉代乙基甲基丙烯酸酯)、聚乙烯基吡咯烷酮、聚苯乙烯磺酸酯、聚乙烯基咪唑、聚乙烯基吡啶、聚-2-乙基-咪唑啉、聚亚乙基亚胺及其乙氧基化衍生物。

聚乙二醇(PEG)、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、聚(2-乙基-2-咪唑啉)、聚乙醇(PVA)羟丙基纤维素和羟丙基-甲基纤维素(HPMC)和藻酸盐是优选的聚合载体材料。

优选的表面活性剂载体材料

载体材料为表面活性剂时, 该表面活性剂可以是非离子、阴离子、阳离子、两性或两性离子的。

适宜非离子表面活性剂的实例包括乙氧基化甘油三酯、脂肪醇乙氧基化物、烷基酚乙氧基化物、脂肪酸乙氧基化物、脂肪酰胺乙氧基化物、

脂肪胺乙氧基化物、山梨聚糖链烷酸酯、乙基化山梨聚糖链烷酸酯、烷基乙氧基化物、PluronicTM、烷基聚葡萄糖苷、硬脂醇(stearol)乙氧基化物、烷基聚糖苷。

适宜阴离子表面活性剂的实例包括烷基醚硫酸盐、烷基醚羧酸盐、烷基苯磺酸盐、烷基醚磷酸盐、磺基琥珀酸二烷基酯、肌氨酸盐、烷基磺酸盐、皂类、烷基硫酸盐、烷基羧酸盐、烷基磷酸酯、链烷烃磺酸盐、仲(secondary)正烷烃磺酸盐、 α -烯烃磺酸盐、羟乙基磺酸盐磺酸盐。

适宜阳离子表面活性剂的实例包括脂肪胺盐、脂肪二胺盐、季铵化合物、磷鎓表面活性剂、铊表面活性剂、sulfonxonium 表面活性剂。

适宜两性离子表面活性剂的实例包括氨基酸(如甘氨酸、甜菜碱、氨基丙酸)的 N-烷基衍生物、咪唑啉表面活性剂、胺氧化物、酰氨基甜菜碱。

可以使用表面活性剂的混合物。在该混合物中可以存在为液体的各种组分，前提是该载体材料整体上为固体。

烷氧基化非离子型表面活性剂(尤其是 PEG/PPG, 例如 PluronicTM 材料和/或 PEG/醇非离子型表面活性剂)、酚-乙氧基化物(尤其是 TRITONTM 材料)、烷基磺酸盐(尤其是 SDS)、醚-硫酸盐(包括 SLES)、酯表面活性剂(优选 SpanTM 和 TweenTM 型失水山梨糖醇酯)和阳离子型表面活性剂(尤其是十六烷基三甲基溴化铵 - CTAB)特别优选作为表面活性剂载体材料。

表面活性剂载体材料特别适用于其中在水中的再分散粒度低于 100 纳米，特别低于 40 纳米的本发明的实施方案。

优选的无机载体材料

载体材料也可以是既非表面活性剂也非聚合物的水溶性无机材料。简单有机盐也被发现合适，特别是在与上述聚合和/或表面活性剂载体材料的混合物中。合适的盐包括碳酸盐、碳酸氢盐、卤化物、硫酸盐、硝酸盐和乙酸盐，特别是钠、钾和镁的可溶盐。优选材料包括碳酸钠、碳酸氢钠和硫酸钠。这些材料的优点在于，它们是便宜和生理学可接受的。它们也相对惰性，以及与家居和药学产品中存在的许多材料相容。

载体材料的混合物是有利的。优选的混合物包括无机盐与表面活性剂，和表面活性剂与聚合物的组合。

特别优选的混合物包括表面活性剂和聚合物的组合，其包括 a) 中的至少一种和 b) 中的至少一种：

a) 聚乙二醇 (PEG)、聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP)、聚(2-乙基-2-噁唑啉)、聚乙烯醇 (PVA)、羟丙基纤维素和羟丙基-甲基纤维素 (HPMC) 和藻酸盐；

b) 烷氧基化非离子型表面活性剂(尤其是 PEG/PPG Pluronic™ 材料)、酚-乙氧基化物(尤其是 TRITON™ 材料)、烷基磺酸盐(尤其是 SDS)、醚-硫酸盐(包括 SLES)、酯表面活性剂(优选 Span™ 和 Tween™ 型失水山梨糖醇酯)和阳离子型表面活性剂(尤其是十六烷基三甲基溴化铵 - CTAB)。

载体材料也可以是既不是表面活性剂、聚合物又不是无机载体材料的水溶性小有机材料。简单的有机糖已经被发现是合适的，特别是在与上述聚合和/或表面活性剂载体材料的混合物中。合适的小有机材料包括甘露醇、聚右旋糖、木糖醇和菊粉等。

在本发明的优选形式中，表面活性剂载体含量使得总载体的至少 50% 是表面活性剂。主要含表面活性剂(多于其它载体存在)的混合物表现出更好的生物杀伤作用。

非水性溶剂：

本发明的组合物包含挥发性非水性溶剂。如上所示，这可以是溶剂混合物。这可以在干燥前与预混物可能存在的这类其它溶剂(包括水)混溶，或与那些溶剂一起可以构成乳状液。

在本发明的一种备选形式中，使用非水性溶剂，其中可以在生物杀伤剂和载体存在下与水形成单相。这些实施方案的优选溶剂是极性的质子或非质子溶剂。通常优选的溶剂具有大于 1 的偶极矩和大于 4.5 的介电常数。

特别优选的溶剂选自卤仿(优选二氯甲烷、氯仿)、低碳(C1-C10)醇(优选甲醇、乙醇、异丙醇、异丁醇)、有机酸(优选甲酸、乙酸)、酰胺(优选甲酰胺、N,N-二甲基甲酰胺)、腈(优选乙腈)、酯(优选乙酸乙酯)、醛和酮(优选甲乙酮、丙酮)、和包含具有适当大的偶极子的杂原子键的其它水混溶性物类(优选四氢呋喃、二烷基亚砷)。也可以使用前述材料的混合物。

在本发明的另一备选形式中，该非水性溶剂与水不混溶并形成乳状液。

该乳状液的非水相优选选自一种或多种下列挥发性有机溶剂：

链烷，优选庚烷、正己烷、异辛烷、十二烷、癸烷；

环烃，优选甲苯、二甲苯、环己烷；

卤代链烷，优选二氯甲烷、二氯乙烷、三氯甲烷（氯仿）、氟三氯甲烷和四氯乙烷；

酯，优选乙酸乙酯；

酮，优选 2-丁酮；

醚，优选二乙醚；

挥发性环硅氧烷，优选含有 4 至 6 个硅单元的线型或环状聚二甲基硅氧烷。合适的实例包括 DC245 和 DC345，两者均可获自 Dow Corning Inc。

优选溶剂包括二氯甲烷、氯仿、乙醇、丙酮和二甲亚砷。

优选的非水性溶剂，无论是否混溶，具有小于 150℃ 的沸点，更优选具有小于 100℃ 的沸点，以促进干燥，特别是在实际条件下和在不使用专用设备情况下的喷雾干燥。它们优选不可燃，或闪点高于本发明的方法中遇到的温度。

优选地，非水性溶剂构成所形成的任何乳状液的大约 10% 至大约 95% v/v，更优选大约 20% 至大约 80% v/v。在单相法中，溶剂含量优选为 20-100% v/v。

特别优选的溶剂是醇，特别是乙醇和卤代溶剂，更优选为含氯溶剂，最优选为选自二或三-氯甲烷的溶剂。

任选的助表面活性剂：

除了非水性溶剂外，还可以在干燥步骤之前在该组合物中使用任选助表面活性剂。我们已经确定，相对少量的挥发性助表面活性剂的添加降低了制成材料的粒径。这可对粒子体积具有显著影响。例如，从 297 纳米降至 252 纳米相当于粒度降低大约 40%。因此，少量助表面活性剂的添加提供了用于降低本发明的材料的粒度而不会改变最终产品配方的简单廉价方法。

优选的助表面活性剂是沸点 < 220℃ 的短链醇或胺。

优选的助表面活性剂是直链醇。优选的助表面活性剂是伯醇和胺。特别优选的助表面活性剂选自 3-6 碳醇。合适的醇助表面活性剂包括正丙醇、正丁醇、正戊醇、正己醇、己胺及其混合物。

该助表面活性剂优选以小于溶剂的量（按体积计）存在，溶剂与助表面活性剂的体积比优选为 100:40 至 100:2，更优选 100:30 至 100:5。

优选的喷雾干燥进料：

本发明中所用的干燥进料是优选不含固体物质，特别优选不含任何未溶解的生物杀伤剂的乳状液或溶液。

该组合物中生物杀伤剂的含量特别优选应使得干燥组合物中的载量低于 40 重量%，更优选低于 30 重量%。这类组合物具有如上所述的小粒度和高效力优点。

典型的喷雾干燥进料包含：

- a) 表面活性剂，
- b) 至少一种低碳醇，
- c) 溶解在进料中的多于 0.1% 的至少一种水不溶性生物杀伤剂，
- d) 聚合物，和
- e) 任选水。

优选的喷雾干燥进料包含：

a) 至少一种选自二氯甲烷、氯仿、乙醇、丙酮及其混合物的非水性溶剂，

b) 表面活性剂，选自烷氧基化非离子型表面活性剂（尤其是 PEG/PPG Pluronic™ 材料）、酚-乙氧基化物（尤其是 TRITON™ 材料）、烷基磺酸盐（尤其是 SDS）、醚-硫酸盐（包括 SLES）、酯表面活性剂（优选 Span™ 和 Tween™ 型失水山梨糖醇酯）和阳离子型表面活性剂（尤其是十六烷基三甲基溴化铵 - CTAB）及其混合物，

c) 多于 0.1% 的至少一种水不溶性生物杀伤剂，

d) 选自聚乙二醇（PEG）、聚乙烯醇（PVA）、聚乙基吡咯烷酮（PVP）、羟丙基纤维素和羟丙基-甲基纤维素（HPMC）、藻酸盐及其混合物的聚合物，和

e) 任选水。

水-分散形式:

本发明的固体组合物（优选通过喷雾干燥获得的那些）适用于治疗感染。它们可以以该固体形式“原样”使用，但优选将它们在使用前溶解在水中。

在水溶性载体材料与水混合后，载体溶解，且水不溶性生物杀伤剂以足够细的形式散布在水中以致其在许多方面表现得像可溶材料一样。干燥产物中水不溶性材料的粒度优选使得在水中溶解后，该水不溶性材料具有通过本文所述的 Malvern 法测得的小于 1 微米的粒度。测得的粒度优选小于 800 纳米，更优选小于 500 纳米。在本发明的典型实施方案中，粒度为 250-50 纳米，最优选为 200-75 纳米。为比较目的，该较宽范围类似于病毒粒子的尺寸（其通常为 450-20 纳米）。小于 200 纳米的直径最优选。据信，在该固体形式分散在水中后，该生物杀伤剂的粒度没有显著降低。

可以通过本发明的方法获得低至 4 纳米的极小粒度。在 4-40 纳米的尺寸范围内，本发明的组合物表现出效力的进一步改进。

通过应用本发明，可以使显著量的“水不溶性”材料达到在许多方面与真溶液相当的状态。在该干燥产物溶解在水中时，也可以获得包含多于 0.1%，优选多于 0.5%，更优选多于 1% 的水不溶性材料的视觉上清澈透明的“溶液”。对于半透明和不透明“溶液”，可以容许更高含量的纳米分散材料。

有利地，这些“溶液”可以用水配制且不需要含有其它溶剂。这意味着，“不溶的”生物杀伤剂可以通过水性喷洒、洗涤或灌注来输递，而不会使生物杀伤剂靶标暴露在溶剂中。

该溶液形式被认为是适合“原样”使用或在进一步稀释或其它组分混合后使用的形式。

本发明因此还涉及输递水不溶性生物杀伤剂的方法，包括下列步骤：

a) 将水不溶性生物杀伤剂在水溶性载体材料中的纳米分散体溶解在水中，其中该水不溶性生物杀伤剂分散在载体材料中，其粒子的平均粒度低于 1 微米，

b) 任选地，向该分散体中加入其它组分，和

c) 用该生物杀伤剂的该含水纳米分散体处理底物。

该底物可以用生物杀伤剂直接处理（例如植物，其中目标是根除例如真菌，或需要防腐处理的木制品），或可以与对象（如草垫或土壤）相结合。优选的底物选自植物（或其部分，包括种子、鳞茎、果实、根、叶）、土壤、动物、动物草垫、草料或由植物或动物制成的制品。优选处理法包括喷洒、浸渍和洗涤。

为了进一步理解和实施本发明，下面参照非限制性实例进一步描述本发明。

实施例：

下列实施例中所用的本发明的分散产物的粒度筛选法使用动态光散射仪（Nano S, Malvern Instruments UK 制造）。具体而言，Malvern Instruments Nano S 使用红色（633 纳米）4mW 氦-氖激光照射含有材料悬浮液的标准光学品质 UV 浮雕(curvette)。

实施例 1

由用 PVP 和 PEG-PPG-PEG 稳定化的单相氯仿溶液制成的四氯二氟苯（水不溶性杀真菌剂）的纳米分散体

制备下列材料的溶液：

组成

四氯二氟苯	0.2 克（10 重量%）
PEG-PPG-PEG	0.4 克（20 重量%）
PVP（90kDa）	1.4 克（70 重量%）
氯仿	40 毫升

在这些浓度下，固体组分在测得的室温（21.5℃）下易溶于氯仿。

使用在负压模式下运行的 Buchi B-290™ 工作台喷雾干燥器将该溶液喷雾干燥。使用从该实验室提取的空气作为干燥介质且操作条件如下：

泵速率	10%（3.6 毫升/分钟）
入口温度	105℃
抽吸	100%

N₂流（雾化） Max（大约 55 升/小时）

获得干燥白色粉末。将该材料以 10 毫克/毫升浓度再分散在软化水中（1.0 重量%，0.1 重量%四氯二氰苯）。这产生不透明白色分散体。在此浓度下，该材料相对缓慢分散（大约 5 分钟）。

所得溶液具有下列性质：

粘度	1.95cP
粒度	437 纳米（直径）
标准偏差	± 25.5nm
PdI	0.385

实施例 2:

由用 PVP 和 PEG-PPG-PEG 稳定化的单相氯仿溶液制成的四氯二氰苯（水不溶性杀真菌剂）的纳米分散体

组成

四氯二氰苯	0.2 克（10 重量%）
PEG-PPG-PEG	0.4 克（20 重量%）
PVP（55kDa）	1.4 克（70 重量%）
氯仿	40 毫升

在这些浓度下，固体组分在室温（21.5℃）下易溶于氯仿。

干燥

使用在负压模式下运行的 Buchi B-290 工作台喷雾干燥器将该溶液喷雾干燥。使用从该实验室提取的空气作为干燥介质。

泵速率	15%（5.4 毫升/分钟）
入口温度	90℃
抽吸	100%

N₂ 流（雾化） Max（大约 55 升/小时）

产物

获得干燥白色粉末。将该材料以 1 毫克/毫升浓度再分散在软化水中（0.1 重量%，0.01 重量%四氯二氟苯）。这产生不透明白色分散体。在此浓度下，该材料明显更快（与实施例 1 相比）分散（少于 30 秒）。

粘度	1.0cP
粒度	452 纳米（直径）
标准偏差	± 5.72nm
PdI	0.181

实施例 3:

由用 PVP 和 PEG-PPG-PEG 稳定化的单相氟仿溶液制成的四氯二氟苯（水不溶性杀真菌剂）的纳米分散体

组成

四氯二氟苯	0.05 克（10 重量%）
PEG-PPG-PEG	0.1 克（20 重量%）
PVP（55kDa）	0.35 克（70 重量%）
氟仿	30 毫升

在这些浓度下，固体组分在室温（21.5℃）下易溶于氟仿。

干燥

使用在负压模式下运行的 Buchi B-290 工作台喷雾干燥器将该溶液喷雾干燥。使用从该实验室提取的空气作为干燥介质。

泵速率	15%（5.4 毫升/分钟）
入口温度	90℃
抽吸	100%
N ₂ 流（雾化）	Max（大约 55 升/小时）

产物

获得干燥白色粉末。将该材料以 1 毫克/毫升浓度再分散在软化水中（0.1 重量%，0.01 重量%四氯二氰苯）。这产生不透明白色分散体。在此浓度下，该材料以与实施例 2 类似的速率分散（少于 30 秒）。

粘度	0.93cP
粒度	402 纳米（直径）
标准偏差	± 15.1 纳米
PdI	0.228

实施例 4-5

由用 PVA/PEG 稳定化的单相氯仿溶液制成的酮康唑（水不溶性杀真菌剂）的纳米分散体（单相法）

将 2 克（10%）酮康唑和 18 克（90%）聚（乙烯基醇）（10kDa, Aldrich）溶解在 500 毫升乙醇和 360 毫升水中。所得溶液在 150℃的入口温度和大约 3.6 毫升/分钟的泵速率下喷雾干燥。将回收的干燥白色粉末再分散在水中以产生平均粒度 24.2 纳米（Z-ave）的清澈悬浮液。

将 100 毫克（10%）酮康唑、500 毫克（50%）聚（乙二醇）（10kDa, Fluka）和 400 毫克（40%）十二烷基醚硫酸钠（SLES）溶解在 60 毫升乙醇和 60 毫升水中。所得溶液在 180℃的入口温度和大约 3.6 毫升/分钟的泵速率下喷雾干燥。将回收的干燥白色粉末再分散在水中以产生平均粒度 16.1 纳米（Z-ave）的清澈悬浮液。

实施例 6

由用 SLES/PEG 稳定化的单相氯仿溶液制成的丙环唑（水不溶性杀真菌剂）的纳米分散体（单相法）

通常将 20 毫克至 800 毫克（1%至 40%）丙环唑、600 毫克至 1100 毫克（32%至 55%）聚（乙二醇）（10kDa, Fluka）和 600 毫克至 880 毫克（28%至 44%）十二烷基醚硫酸钠（SLES）溶解在 30 毫升至 80 毫升乙醇和 30 毫升水中。所得溶液在 180℃的入口温度和大约 3.6 毫升/分钟的泵速率下喷雾干燥。以干燥白色粉末形式回收产物。

实施例 7-9**实施例 4-6 中制成的酮康唑和丙环唑的生物杀伤活性**

通过下列标准化最低抑菌浓度 (MIC) 试验检测根据实施例 4-6 制成的这些材料的生物杀伤效力。该试验由已知数量的白色念珠菌 (CA) 菌株在 YEME (酵母提取物, 麦芽提取物培养基) 中构成, 培养浓度的活性材料和试样装在 96 孔板中。该板在 37℃ 下培养过夜, 然后用 UV 板读数器在 550 纳米波长下检查。抑制细胞生长的生物杀伤剂浓度产生具有极低光学密度 (视觉上透明) 的孔, 而其中发生细胞生长的孔具有极高光学密度 (视觉上不透明)。MIC 是指在培养过夜时造成细胞生长的完全抑制的生物杀伤剂最低浓度。

也进行同等实验以测定溶解在水混溶性溶剂中的生物杀伤剂活性物质的 MIC。在这些情况下, “空白” 参照材料简单地是不含活性化合物的溶剂样品。

所有实验重复 4 次。结果显示在下表中。

实施例 7: 酮康唑:

材料	初始浓度	粒度 (Z-ave, nm)	MIC (毫克/升)
13/28/20 (SLES/PEG 空白基质)	相当于 0.15 毫克/ 毫升活性物	n/a	没有观察到 抑制
实施例 5	0.15 毫克/毫升活性 物	16.1	~ 14
实施例 4	0.15 毫克/毫升活性 物	24.2	~ 38
DMSO	25% v/v	n/a	~ 9.2% v/v
PVA (空白)	相当于 0.15 毫克/ 毫升活性物	n/a	没有观察到 抑制
酮康唑, 在 DMSO 中	0.15 毫克/毫升, 在 25% v/v 溶剂中	n/a	65

从这些结果可以看出，本发明的材料（表中以粗体显示）比该活性物在 DMSO 中的同等溶液更有效地抑制 YEME 中 CA 的生长。可以确定，在所涉浓度下，记录的 MIC 可归因于该活性物而非溶剂。也表明，具有较小粒度的制品比较大粒子的同等分散体更有活性。在这两种情况下，基质材料在这些浓度下都没有被发现表现出任何生物杀伤活性。

实施例 8： 丙环唑：

所有实验都在用于 CA 培养的 YEME 培养基中进行。

材料 Ref (14/22/...)	初始浓度 (毫 克/毫升活性 物)	活性物载量 (%)	粒度 (Z-ave, nm)	MIC (毫克/ 升)
16	0.25	1	6.45	4
17	0.25	3	4.97	11
11	0.25	5	6.08	14
04	0.25	10	4.84	23
12	0.25	15	6.90	27
13	0.25	20	4.66	32
14	0.25	25	6.85	31
15	0.25	30	16.4	38
18	0.25	35	40.8	46
19	0.25	40	245	46

为了比较，溶解在水/丙二醇助溶剂混合物中的丙环唑的 MIC 为 91.6 毫克/升。在所有情况下，据显示，本发明的制品的生物杀伤活性比活性物在水混溶性溶剂中的同等溶液高得多。

在同等浓度下，对空白基质材料没有观察到细胞生长抑制，含极低载量活性物的除外。在这些情况下，一定的抑制可归因于基质材料，但量级低于活性制剂。

对于材料 14/22/16，观察到最高效力，其比可溶活性物的同等制品有效超过 20 倍。

实施例 9:

基质中的 SLES/PEG 比率的影响（固定活性物载量）：

材料 Ref (14/22/..)	初始浓度 (毫克/ 毫升活性物)	PEG (重量%)	SLES (重量 %)	MIC (毫克/ 升)
34	0.25	0	90	16
28	0.25	10	80	14
29	0.25	20	70	16
30	0.25	30	60	16
31	0.25	40	50	23
04	0.25	50	40	23
32	0.25	60	30	27
33	0.25	70	20	31
35	0.25	80	10	46

也已经证实，本发明的材料的生物杀伤活性受其基质组成的影响。在这种情况下，当表面活性剂的比例从 10 重量%升至 80 重量%时，制剂活性（因此活性物效力）提高 3 倍。

实施例 10-12

由仅用 SDS 稳定化的助溶剂的单相混合物制成的三氯生（水不溶性抗菌剂）的纳米分散体

组成

三氯生 2.0 克（20 重量%）

SDS 8.0 克（80 重量%）

水混溶性溶剂 125 毫升（50/50% 混合物）

使用三种不同的水混溶性有机溶剂（乙醇、丙酮和异丙醇）。在这些浓度下，固体组分在室温（21.5℃）下易溶于该助溶剂混合物。

干燥

使用在负压模式下运行的 Buchi B-290 工作台喷雾干燥器将该溶液喷雾干燥。使用从该实验室提取的空气作为干燥介质。

泵速率 7% (2.5 毫升/分钟)
入口温度 120°C
抽吸 100%
N₂ 流 (雾化) Max (大约 55 升/小时)

产物

对于各个不同的助溶剂体系，获得干燥白色粉末。这些材料以 1 毫克/毫升 (0.1 重量%) 的浓度再分散在软化水中，迅速产生保持稳定多于 12 小时的晶体清澈分散体。所有分散体看起来产生具有类似尺寸和分布的粒子。

关于这些实验的细节及其结果列在下表中：

助溶剂	粘度	粒度	SD	多分散性指数	粒度	SD	多分散性指数	残留 TCN
	(cP)	峰 1 (d. nm)	峰 1 (d. nm)	峰 1	峰 2 (d. nm)	峰 2 (d. nm)	峰 2	重量% (UV)
乙醇	0.9	3.5	0.088	0.0674	187	28.2	0.1829	13.6
丙酮	0.9	3.01	0.061	0.0504	127	15.8	0.2605	14.8
IPA	0.9	3.06	0.045	0.0487	179	16.5	0.1957	17

实施例 13:

异丙隆的纳米分散体 (ISP - 水不溶性除草剂，乳状液法)

该制剂组成为：

相 1:

10% ISP (28) 500 毫克 在 10 毫升氯仿中

相 2:

60% PVA (10kDa) 3000 毫克

30% SDS 1500 毫克 在 75 毫升水中

将这两个相在乳化的同时使用水夹套的烧杯连续冷却。乳化通过在 50%功率下声处理 5 分钟,然后在 100%功率下进一步声处理 2 分钟来实现(使用 1kW 探针型声波仪)。

所得乳状液在 150℃入口温度和 5.6 毫升/分钟泵速率下喷雾干燥,抽吸和雾化气体设为最大。

将所得干燥白色粉末再分散以产生浓度为 1 毫克/毫升的微混浊悬浮液。粒度测得为 297 +/- 8.66 纳米。

实施例 14:

使用助表面活性剂的异丙隆 (ISP - 水不溶性除草剂) 的纳米分散体 (乳状液法)

配方与实施例 13 中相同,但含有少量的附加挥发性助表面活性剂(正丁醇)。

相 1:

10% ISP (28) 500 毫克 在 10 毫升氯仿和 2 毫升正丁醇中

相 2:

60% PVA (10kDa) 3000 毫克

30% SDS 1500mg 在 75 毫升水中

将这两个相在乳化的同时使用水夹套的烧杯连续冷却。乳化通过在 50%功率下声处理 5 分钟,然后在 100%功率下进一步声处理 2 分钟来实现(使用 1kW 探针型声波仪)。所得乳状液在 150℃入口温度和 5.6 毫升/分钟泵速率下喷雾干燥,抽吸和雾化气体设为最大。

将所得干燥白色粉末再分散以产生浓度为 1 毫克/毫升的微混浊悬浮液,尽管明显比实施例 13 的清澈。粒度测得为 252 +/- 14.0 纳米。

实施例 15-16**嘧菌酯（水不溶性杀真菌剂）的纳米分散体，单相法****实施例 15:**

将 1.10 克 Azoxystrobin™、2.00 克 Brij® 58 (Aldrich) 和 6.90 克聚乙基吡咯烷酮 (Mw 45,000, Aldrich) 都溶解到 200 毫升 DCM 中。然后将该溶液在 70℃ 下喷雾干燥。

然后将该干粉分散到蒸馏水中以产生分散的 1 重量% AzB 并用 Malvern Nano-S 测量纳米粒度。(SG-15)

实施例 16

将 5.00 克嘧菌酯、10.00 克聚(乙二醇)-嵌段-聚(丙二醇)-嵌段-聚(乙二醇) (Mw8,400, Aldrich) 和 35.00 克聚乙基吡咯烷酮 (Mw45,000, Aldrich) 都溶解到 1.0 升 DCM 中。然后将该溶液在 70℃ 下喷雾干燥。

然后将该干粉分散到蒸馏水中产生分散的 1 重量% AzB 并用 Malvern Nano-S 测量纳米粒度。(SG-16)

关于这些实验的细节及其结果列在下表中。

实 施 例	AzB, 毫 克/毫 升	表面活性剂, 毫 克/毫升	PVP, 毫克/ 毫升	溶剂, 毫升	喷雾干燥 温度, °C	PS, nm
15	5.5	Brij 58, 10.0	34.5	DCM, 200	70	532
16	5.0	Pluronic, 10.0	35.0	DCM, 1000	70	356
喷雾干燥条件: 抽吸速率: 100%; 泵速率: 1.80 毫升/分钟						

实施例 17A-L**λ-三氟氯氟菊酯（水不溶性杀虫剂）的纳米分散体，冻干，单相法**

在氯仿中制备杀虫剂 λ-三氟氯氟菊酯、PEG 和 PEG 基表面活性剂 Pluronic™ F68 和 Pluronic™ F127 的单相溶液。其使用 “Christ α 2-4 LSC” 冻干机以 5 毫升/样品（即各样品中 250 毫克固体）的规模单批冻

干。

样品和冻干搁架都在液氮中预冷至低于-140℃的最终温度（冻干机温度探针的工作极限）。一旦实现真空（~0.080mbar），样品由于样品自身的升华产生的自冷却效应而保持冷冻。结果和组成列在下表中：

实施 例 17	F68	F127	PEG	活性	粒度
A	0.9	0	0	0.1	66.19
B	0	0.9	0	0.1	44.24
C	0	0	0.9	0.1	168.2
D	0.7	0	0	0.3	102
E	0	0.7	0	0.3	80.99
F	0	0	0.7	0.3	240.5
G	0	0.4	0.4	0.2	94.59
H	0.4	0	0.4	0.2	127.5
I	0.3	0.3	0.3	0.1	51.87
J	0.26667	0.26667	0.2667	0.2	90.92
K	0.26667	0.26667	0.2667	0.2	93.54
L	0.26667	0.26667	0.2667	0.2	72.5