

陈兴江, 曹务栋, 王晶君, 等. 甲霜灵的纳米化包埋、控制释放及烟田应用[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 114–116.

甲霜灵的纳米化包埋、控制释放及烟田应用

陈兴江¹, 曹务栋², 王晶君¹, 商胜华¹, 曹毅¹

(1. 贵州省烟草科学研究院, 贵州贵阳 550081; 2. 贵州省烟草公司遵义市公司, 贵州遵义 563000)

摘要: 为提高甲霜灵的抗病效果与减少农药残留, 以壳聚糖包埋甲霜灵制备复合纳米粒子, 然后将纳米溶液制备成壳聚糖纳米粒子/海藻酸钙膜, 并对该膜的释放特征进行表征; 将甲霜灵包埋膜分别在烟草移栽及移栽后 10 d 置于烟草根部, 移栽后 90 d 防治黑胫病的效果仍达 77.8%, 但其防治效果要低于对照甲霜灵·锰锌的防治效果。

关键词: 甲霜灵; 壳聚糖; 海藻酸钠; 包埋; 黑胫病

中图分类号: S482.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)05–0114–03

烟草黑胫病 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*) 是世界烟草生产中危害严重的病害, 可在烟草生长的任何一个阶段发病^[1–2]。目前防治烟草黑胫病仍以化学防治为主, 甲霜灵 (metalaxyl) 是有效防治烟草黑胫病的主要药剂之一^[3]; 但甲霜灵只对病菌的单一代谢环节产生作用, 容易导致病菌产生抗药性。已有研究表明, 连续使用甲霜灵后, 可导致烟草黑胫病菌抗性水平不断上升^[4], 由此带来的是农药使用量的逐年加大及农药残留的逐年积累, 因此, 研究开发新型高效甲霜灵药剂, 对于克服病菌抗药性、有效地控制烟草黑胫病的危害、保障烟草稳产高产具有十分重要的应用意义。

微胶囊包埋技术就是将固体、液体或气体包埋、封存在一种微型胶囊内成为一种固体微粒产品的技术。该技术通过密闭的或半透性的壁膜将目的物与周围环境隔离开来, 从而达到保护和稳定药物、屏蔽气味或颜色、控制药物释放等目的。壳聚糖是甲壳质经脱乙酰基而得到的一种天然阳离子多糖。壳聚糖制成的纳米微胶囊具有可提高药物稳定性、增加药物吸收、提高药物的生物利用度、降低药物毒副作用等特点^[5–8]。海藻酸钠是天然亲水性胶态多聚糖, 具有低细胞毒性、可生物降解性及良好的生物相容性与成膜性等特点, 被广泛用于药物载体, 特别是缓、控释制剂的研究^[9–10]。本试验先利用壳聚糖与三聚磷酸钠的交联作用将甲霜灵包埋后形成微胶囊纳米溶液, 然后以海藻酸钠为包埋剂、氯化钙为辅材, 将甲霜灵–壳聚糖纳米溶液包埋后形成纳米粒子/海藻酸钙膜, 将包埋膜施于烟草根部, 防治黑胫病取得了较好的效果。

1 材料与方法

1.1 供试材料

壳聚糖 (chitosan, CS)、甲霜灵原药 (metalaxyl, Metl)、三聚磷酸钠 (sodium tripolyphosphate, TPP)、海藻酸钠 (sodium

alginate)、二氯甲烷、氯化钙均为分析纯。

1.2 试验方法

参照蒋新宇等^[11]、杨文静等^[12]的方法。

1.2.1 Metl 的溶解、最大吸收峰扫描及标准曲线制作 (1) 取 100 mg Metl, 溶于 50 mL 去离子水中, 吸取 3 mL 加入石英比色皿中, 在多孔板检测系统中进行全波长扫描 (200 ~ 800 nm), 寻找特征吸收峰 (Peak 1)。(2) 将 Metl 溶液稀释成不同浓度, 并在 Peak 1 波长处测定吸光度, 以吸光度为横坐标, 以 Metl 浓度为纵坐标制作标准曲线, 获得二元一次计算公式 $y_1 = a_1x_1 + b_1$ 。

1.2.2 CS 和 TPP 的溶解及 pH 值测定

1.2.2.1 CS 的溶解及 pH 值测定 称取 1 g CS, 加入到 1 000 mL 1% 醋酸溶液中, 磁力搅拌器上搅拌至充分溶解。滴加 10 mol/L NaOH 至 pH 值为 4.0, 取出 200 mL 标记清楚备用; 继续滴加 NaOH 至 pH 值为 4.5, 取出 200 mL 标记清楚备用; 继续滴加 NaOH 至 pH 值为 5.0, 取出 200 mL 标记清楚备用; 继续滴加 NaOH 至 pH 值为 5.5, 取出 200 mL 标记清楚备用; 继续滴加 NaOH 至 pH 值为 6.0, 取出 200 mL 标记清楚备用。

1.2.2.2 TPP 的溶解及 pH 值测定 称取 200 mg TPP, 加入到 200 mL ddH₂O 中, 磁力搅拌器上搅拌至充分溶解, pH 值约为 9.2。

1.2.3 不同 pH 值 CS 溶液的包封率试验

1.2.3.1 包埋 Metl 的 CS 纳米溶液制备 取 4 mL CS + 0.4 mL Metl 在磁力搅拌器上混匀, 边搅拌边加入 1 mL TPP, 继续搅拌 30 min, 此时, 溶液颜色由无色变为淡蓝白色, 即为纳米溶液。

1.2.3.2 对照的设定 阳性对照: 4 mL ddH₂O + 0.4 mL Metl + 1 mL TPP; 阴性对照: 4 mL CS + 0.4 mL ddH₂O + 1 mL TPP。

1.2.3.3 游离 Metl 浓度测定 (1) 吸取 1 mL “1.2.3.1” 和 “1.2.3.2” 节的溶液于 1.5 mL 离心管中, 50 000 g 离心 15 min, 取上清 3 mL, 加入 1 mL pH 值 6.2 的 PBS 缓冲液, 再加入 4 mL 二氯甲烷, 在磁力搅拌器上 300 r/min 搅拌 30 min, 于 8 000 g 离心 6 min。(2) 分别吸取有机相, 在 265 nm 处作吸光度试验, 测定阴性对照 Peak 1 波长下的吸光度、阳性对照吸光度及不同 pH 值条件下 CS 溶液所制备样品

收稿日期: 2013–01–22

基金项目: 中国烟草总公司贵州省公司科技项目“控制烟叶农残监测体系研究”(编号: 200908)。

作者简介: 陈兴江 (1977—), 男, 山东寿光人, 硕士, 助理研究员, 主要从事烟草植保、农药残留研究。E-mail: chenxingjiang1@163.com。

通信作者: 曹毅, 博士, 助理研究员, 从事微生物和植物保护研究。E-mail: caoyi1001@yahoo.cn。

吸光度。

1.2.3.4 包封率计算 包封率计算公式:

$$L = (A - B) / A \times 100\%$$

式中:A 为阳性对照吸光值 - 二氯甲烷吸光值,B 为样品吸光值 - 阴性对照吸光值。

1.2.4 相同 pH 值下不同分子量 CS 对甲霜灵包封率的影响

称取分子量分别为 50、400、1 880 ku 的 CS 0.6 g,溶解于 200 mL 1% 醋酸溶液中,调节 pH 值至步骤 2.3.3 中包封率最高的 pH 值。然后按照步骤 1.2.3.1 的方法同样制备纳米溶液,并测定包封率。

1.2.5 相同 pH 值、相同分子量但不同 CS 浓度对甲霜灵包封率的影响 称取步骤 1.2.4 中包封率最高的 CS 分子量,配制成浓度分别为 1、2、3 mg/mL 的溶液,pH 值与 1.2.4 同。同样制备纳米溶液,测定包封率。

1.2.6 载药 CS 纳米粒子/海藻酸钙膜的制备及缓释测定 载药 CS 纳米粒子/海藻酸钙膜的制备参照许加超等的方法并加以改进^[13]:(1)按照步骤 1.2.5 获得最佳制备条件制备 4.4 mL 纳米溶液,以及阴性对照,平行做 3 份。(2)称取 2 g 海藻酸钠溶于 200 mL 去离子水中,制成浓度为 10 mg/mL 的溶液。取 5 mL 海藻酸钠溶液于培养皿中,置于 60 ℃烘箱中烘干。取 8.8 mL 海藻酸钠溶液于 25 mL 小烧杯中,1 700 r/min 磁力搅拌速度下,逐滴加入 4.4 mL 制备好的纳米溶液,继续搅拌 1 min。(3)将混合液倒入烘干的培养皿中,均匀分布整个皿底,60 ℃烘干。(4)烘干后取出培养皿,每皿中再加入 5 mL 海藻酸钠,继续 60 ℃烘干。(5)烘干后取出培养皿,用刀片小心自边缘将制好的膜剥下,置于滤纸上,用蘸有 1 mol/L CaCl₂ 溶液的棉花接触膜的两面,之后于 60 ℃烘干。(6)将膜折叠成块,置于 6 支试管中,每管加入 4 mL ddH₂O 并测定 Metl 的释放。

1.2.7 载药 CS 纳米粒子/海藻酸钙胶囊防治烟草黑胥病的效果试验

1.2.7.1 试验设计 设 4 个处理。处理 1:72% 甲霜灵·锰锌可湿性粉剂,施用甲霜灵 0.015 g/株(有效成分)(CK₁),分别于移栽后 7、15、25 d 灌根;处理 2:甲霜灵包埋膜,施用甲霜灵 0.045 g/株(有效成分),于移栽时置于烟草根部;处理 3:甲霜灵包埋膜,施用有效甲霜灵 0.023 g/株,分别于移栽及移栽后 10 d 置于烟草根部;处理 4:清水(CK₂)。

1.2.7.2 大田期黑胥病药效调查 分别于栽后 30、60、90 d 进行调查,每小区于中间 4 行随机选择具代表性的 10 株烟草进行挂牌定株调查,分别记载烟株病级。按下列公式计算防治效果:防治效果 = [(对照区病指 - 处理区病指)/对照区病指] × 100。

2 试验结果

2.1 甲霜灵最大吸收峰及标准曲线

经全波长扫描(200 ~ 800 nm),甲霜灵最大吸收峰在 265 nm 处。图 1 为甲霜灵浓度 - 吸光度标准曲线。

2.2 不同 pH 值 CS 溶液的甲霜灵包封率

当 pH 值不同时,所得到甲霜灵的包封率的平均值也有较大差异。其中,当 pH 值为 4.5 时,甲霜灵的平均包封率最高,达到 39.20% (表 1)。

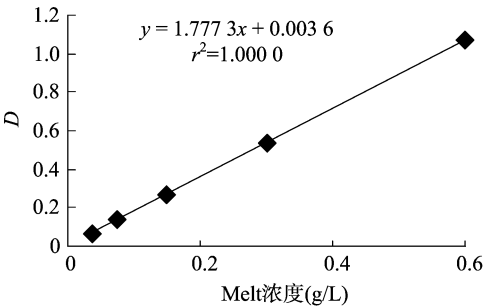


图1 甲霜灵标准曲线

表 1 不同 pH 值条件下甲霜灵的包封率

pH 值	包封率(%)			
	第 1 组	第 2 组	第 3 组	平均值
4.0	10.15	19.18	25.71	18.35
4.5	38.97	42.57	36.06	39.20
5.0	46.91	16.44	22.94	28.76
5.5	50.26	28.72	30.06	36.35
6.0	36.60	18.26	13.53	22.80

2.3 相同 pH 值下不同分子量 CS 对甲霜灵包封率的影响

在相同的 pH 值条件下,壳聚糖的分子量不同时,所得到的甲霜灵平均包封率也存在较大差异,当壳聚糖的分子量为 1 000 ku 时,甲霜灵的平均包封率最高,为 39.22% (表 2)。

表 2 相同 pH 值、不同分子量 CS 条件下甲霜灵的包封率

CS 分子量(ku)	包封率(%)				
	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	平均值
50	12.10	24.48	17.31	9.90	15.95
100	35.66	20.28	38.46	14.29	27.17
400	36.36	17.48	43.59	27.39	31.21
1 000	29.48	38.67	48.79	39.93	39.22
1 880	14.69	28.67	37.18	30.54	27.77

2.4 相同 pH 值下相同分子量、不同浓度 CS 对甲霜灵包封率试验结果的影响

当溶液的 pH 值条件相同且壳聚糖的分子量都是 1 000 ku 时,不同浓度的 CS 对甲霜灵的包封率同样有较大影响,其中当壳聚糖的浓度为 1 mg/mL 时,甲霜灵的包封率最高,为 43.16% (表 3)。

表 3 相同 pH 值、相同分子量但不同浓度 CS 条件下甲霜灵的包封率

CS 浓度(mg/mL)	包封率(%)			
	第 1 组	第 2 组	第 3 组	平均值
1	41.63	39.69	48.15	43.16
2	25.58	27.19	31.79	28.19
3	24.52	23.67	28.94	25.71

2.5 载药 CS 纳米粒子/海藻酸钙膜制备及释放试验结果

将 pH 值 4.5、壳聚糖分子量为 1 000 ku、浓度为 1 mg/mL 条件下得到的纳米溶液进一步包埋。采用海藻酸钠做包埋剂,氯化钙做辅材,将纳米溶液包埋后,不管是游离的甲霜灵还是纳米颗粒中的甲霜灵都完全被包埋,最终得到 CS 纳米粒子/海藻酸钙膜,然后将包埋膜放在试管中(图 2 左),每管加入 4 mL ddH₂O 并测定甲霜灵的释放,最终得到甲霜灵包埋

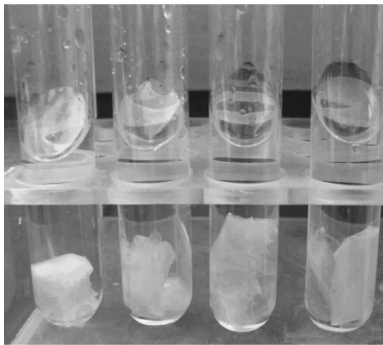
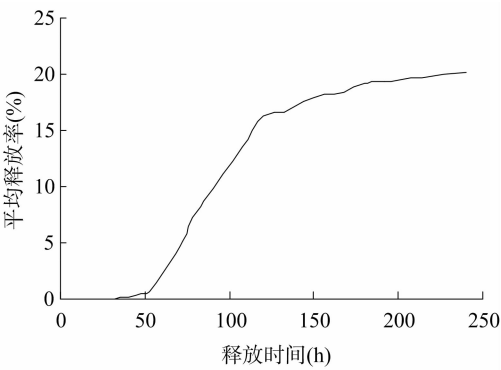


图2 甲霜灵在试管中的释放测定



膜的释放曲线(图 2 右)。从释放曲线可以看出,即使在水中,甲霜灵的释放速度也是非常缓慢的,前期基本没有释放,在 200 h 左右达到最高峰,之后进入平台期。

2.6 载药 CS 纳米粒子/海藻酸钙胶囊防治烟草黑胫病的效果

经过二次包埋后得到的甲霜灵包埋膜对烟草黑胫病有较好的防治效果。其中处理 2 的防治效果要好于处理 1,处理 2 在移栽后 90 d 时防效依然可以达到 77.8%,但是比对照甲霜灵·锰锌的防效要差(表 4)。

处理	栽后 30 d		栽后 60 d		栽后 90 d	
	病情指数	相对防效(%)	病情指数	相对防效(%)	病情指数	相对防效(%)
处理 1(CK ₁)	0	—	0	100	3.98	90.60
处理 2	0	—	4.1	71.09	14.86	62.14
处理 3	0	—	0	100	9.4	77.80
处理 4(CK ₂)	0	—	14.18	—	42.35	—

3 讨论

烟草黑胫病在我国西南烟区属于烟草流行病、常见病,目前最有效的防治药剂是甲霜灵,通常需要连续 3 次施药才能有较好的防治效果,多次施药易造成农残超标及黑胫病的抗药性,而且提高了生产成本。本试验先用壳聚糖包埋甲霜灵形成纳米溶液,因为该方法包埋率较低,纳米溶液中残留大量游离甲霜灵,所以,再将纳米溶液二次包埋,形成壳聚糖纳米粒子-海藻酸钙膜,从释放曲线可以看出,缓释效果良好。另外,在移栽时将包埋膜同肥料一起施到烟草根部,能起到减工降本的作用。

壳聚糖有较好的生物可降解性,毒性小,而且壳聚糖本身具生物学活性,有较好的抑菌效果^[14-15],用壳聚糖包埋甲霜灵可以增强其抗病效果,制作农药微胶囊是一种良好的壁材。本试验用壳聚糖包埋甲霜灵,得到的最佳包埋条件为:溶液 pH 值 4.5,壳聚糖分子量 1 000 ku,壳聚糖浓度 1 mg/mL。在此条件下获得的甲霜灵的平均包埋率为 43.16%。

将制作的甲霜灵包埋膜施到烟草根部防治烟草黑胫病,与对照甲霜灵·锰锌相比,1 次施药及 2 次施药的效果都不如甲霜灵·锰锌,可能是因为甲霜灵·锰锌是甲霜灵与代森锰锌的混合制剂,代森锰锌有明显的促壮、增产作用并能提高

植物的抗病能力,所以甲霜灵·锰锌比甲霜灵的抗病效果要明显好很多。在今后试验中,考虑将代森锰锌加入到包埋膜中,提高其抗病效果,并进一步优化条件,提高其实用价值。

参考文献:

[1] Dukes P D, Apple J L. Chemotaxis of zoospores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* by plant roots and certain chemical solutions [J]. *Phytopathology*, 1961, 51: 195-197.

[2] Stokes G W, Litton C C. Source of black shank resistance in tobacco and host reaction to races 0 and 1 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* [J]. *Phytopathology*, 1966, 56: 678-680.

[3] 汪汉成,李文红,李兴龙,等. 不同类型杀菌剂对烟草黑胫病菌生物活性的研究 [J]. *中国烟草学报*, 2012, 18(4): 46-50.

[4] 王文桥,刘国容. 卵菌对内吸性杀菌剂的抗药性及对策 [J]. *植物病理学报*, 1996, 26(4): 294-296.

[5] 梁菲菲. 壳聚糖的应用 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(11): 52-53.

[6] 李 沙,侯新朴. 海藻酸钠-壳聚糖微囊成型机理及其对大分子药物的载药、释药研究 [J]. *药学学报*, 2003, 38(5): 380-383.

[7] Aiedehe K, Ganasii E, Orienti I, et al. Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin [J]. *Microencapsulation*, 1997, 14(5): 567-576.

[8] Ehab T, Mansoor A. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(10): 1937-1945.

[9] 王孝华. 海藻酸钠的提取及应用 [J]. *重庆工学院学报: 自然科学版*, 2007, 21(5): 124-128.

[10] Strand B L, Morch Y A, Espevik T, et al. Visualization of alginate-poly-L-lysine-alginate microspheres by confocal laser scanning microscopy [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 82: 386-394.

[11] 蒋新宇,周春山,张俊山. 应用三聚磷酸钠为交联剂制备载药物纳米粒的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 13(22): 69-71.

[12] 杨文静,王 婷,何农跃. CS/TPP 纳米微胶囊的制备及其载药性能 [J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(3): 625-628.

[13] 许加超,卢伟丽,高 昕,等. 氯化钙体系制备的褐藻酸钙凝胶特性的研究 [J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 100-103.

[14] Helander I M, Nurmiaho - Lassila E L, Ahvenainen R, et al. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria [J]. *Food Microbiol*, 2001, 71(2/3): 235-244.

[15] 李浙江,王金信,连玉朱,等. 壳聚糖在农药领域中的应用和前景 [J]. *农药科学与管理*, 2005, 26(6): 28-32.