

嘧菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球的结构表征与释放性能

王 娅^{1,2}, 王 宁^{1,2}, 齐 麟^{1,2}, 李晓刚^{1,2*}

(1. 南方粮油作物协同创新中心/湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128;
2. 湖南省生物农药与制剂加工工程技术研究中心, 长沙 410128)

摘要 以 PBS/PLA 共混物为复合载体, 嘧菌酯和苯醚甲环唑为包埋有效成分, 聚乙烯醇(PVA-1788)为分散剂, 采用溶剂挥发法制备了嘧菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球。通过光学显微镜、扫描电子显微镜、Nicolet 6700 型傅立叶变换红外光谱仪、高效液相色谱(HPLC)等表征复配农药微球的性质, 采用透析袋法测定其缓释性能。结果表明, 所得的嘧菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球中嘧菌酯的载药量和包埋率分别为 14.30%、85.06%, 苯醚甲环唑的载药量和包埋率为 9.47%、90.18%, 且微球球形规整, 平均粒径为 7.20 μm 。嘧菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球具有良好的缓释性能, 并且 2 种活性成分的释放量之比与其最佳复配比接近, 可以达到增效目的。

关键词 嘧菌酯; 苯醚甲环唑; 微球; 溶剂挥发法; 聚丁二酸丁二醇酯

中图分类号: TQ 450.6 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.04.010

Structure characterization and release properties of azoxystrobin and difenoconazole compound pesticide microspheres

Wang Ya^{1,2}, Wang Ning^{1,2}, Qi Lin^{1,2}, Li Xiaogang^{1,2}

(1. Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops, College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Provincial Engineering, Technology Research Center for Biopesticides and Formulating Processing, Changsha 410128, China)

Abstract The microspheres containing azoxystrobin and difenoconazole were prepared by emulsion solvent evaporation method using PBS/PLA blends as microsphere delivery, azoxystrobin and difenoconazole as core materials and PVA-1788 as disperser. The compound pesticide microsphere was characterized by scanning electron microscope (SEM), optical microscope (OM), Nicolet 6700 FTIR spectroradiometer (FTIR Spectrometer) and high-performance liquid chromatography (HPLC), and the performance of its controlled release was studied by dialysis bag method. The results showed that the entrapment efficiency and drug loading of microsphere were 85.06%, 14.30% for azoxystrobin and 90.18%, 9.47% for difenoconazole. The microsphere dispersed as individual particles with a well-defined spherical shape and the average particle size of microsphere were 7.20 μm . The results also showed that the microsphere had a significant effect on controlled release; in addition, the concentration ratio of active ingredients was close to the optimum compound stoichiometry, which can achieve the purpose of improving the efficacy of the pesticides.

Key words azoxystrobin; difenoconazole; microsphere; solvent evaporation method; poly (butylene succinate)

农药缓释制剂具有提高农药稳定性、降低对非靶标生物毒性以及延长持效期等优点^[1], 目前农药缓释制剂主要聚焦于单一有效成分的包覆, 两种有效成

分的农药缓释制剂研究相对较少。制备双组分农药缓释制剂不仅可以实现二元复配增效, 扩大防治谱, 还可以降低生产成本, 受到研究者的关注。以聚碳酸

收稿日期: 2016-10-29

修订日期: 2017-01-04

基金项目: 化学肥料和农药减施增效综合技术研发专项(2016YFD0201200); 中国烟草总公司科技重点项目(110201302014); 湖南省高校重点实验室平台开放基金(15K064); 湖南省研究生科研创新项目(CX2016B304)

* 通信作者 E-mail: lxxgang@hunau.edu.cn

亚丙酯为载体的噻虫嗪·高效氯氰菊酯复配微胶囊不仅具有良好的缓释性能,活性成分的释放浓度比例与其最佳复配比 1:2 接近,可以实现增效的目的^[2]。

啞菌酯(azoxystrobin)属于甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂,具有高效、广谱以及内吸性的杀菌活性^[3]。苯醚甲环唑(difenoconazole)属于三唑类内吸性杀菌剂,具有良好的内吸性,同时兼具很强的预防、治疗兼保护作用^[4-5]。由于啞菌酯和苯醚甲环唑杀菌机制完全不同,两者合理混用可以提高防治效果、减少用药量和防治成本、降低杀菌剂抗药性风险^[6-7]。但是,两种杀菌剂对水生生物均表现较高的毒性,而且其目前的主要剂型为悬浮剂,其有效利用率低,持效期短^[8-10],因此将啞菌酯和苯醚甲环唑加工为微球复配缓释剂型,实现低毒化是很有必要的。聚丁二酸丁二醇酯(PBS)是一种环境友好型生物降解高分子材料,具有良好的生物可降解性和生物相容性^[11]。由于 PBS 在土壤、淡水等环境条件下的降解速度快,且成囊后微胶囊的表面会形成部分微孔,导致 PBS 单独用作药物微胶囊的壁材时释药速度过快,而采用与其他高分子材料共聚、共混的方法则可控制壁材的降解速率,实现对药物的控制释放^[12],如以聚丁二酸丁二醇酯(PBS)/聚碳酸亚丙酯(PPC)为载体的噻虫嗪微胶囊载药量和包封率比纯 PBS 载体微胶囊高,具有良好的成球性和缓释性能^[13]。聚乳酸(PLA)是性能优良的可降解材料,其降解速度相对缓慢,用 PLA 和 PBS 共混可以有效调节 PBS 的降解速率,从而进一步改善农药缓释剂的缓释性能。对于啞菌酯、苯醚甲环唑等用于瓜果、蔬菜等收获期短或直接食用的作物上的杀菌剂而言,其农药微球或微胶囊对有害生物的防治关键时期在 2 个月内最为适宜^[14-15],而且使用可降解的载药材料对环境更为友好。因此,PBS/PLA 共混材料可作为农药缓释剂良好的载体^[16]。

本文以 PBS/PLA 共混物为复合载体,采用乳化溶剂挥发法制备啞菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球。对所制备的微球进行表征,并以 32.5%苯醚甲环唑·啞菌酯悬浮剂作为参比,研究微球的缓释行为。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

聚丁二酸丁二醇酯(PBS),工业级,安庆和兴化工有限公司;聚乳酸(PLA),美国 Nature Works 公司;啞

菌酯(azoxystrobin)原药,纯度 96%,江苏苏滨生物农化有限公司;苯醚甲环唑(difenoconazole)原药,纯度 95%,江苏丰登作物保护股份有限公司;32.5%苯醚甲环唑·啞菌酯悬浮剂,先正达(苏州)作物保护有限公司;聚乙烯醇(PVA-1788),分析纯,成都西亚化工股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

Motic 光学显微镜(OM),麦克奥迪实业集团有限公司;C-MAG 可控加热磁力搅拌器;T25 - digital 高速剪切机,德国 IKA 公司;5804R 高速台式大容量离心机,德国 Eppendorf 公司;Rise-2006 型激光粒度分析仪,济南润之科技有限公司;JSM-6360 型扫描电子显微镜,日本 JEOL 公司;Nicolet 6700 型傅立叶变换红外光谱仪,美国 Thermo Nicolet 公司;Agilent1260 高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司。

1.2 微球的制备方法

采用乳化溶剂挥发法制备啞菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球^[17]。分别准确称取一定质量的啞菌酯原药、苯醚甲环唑原药和 PBS/PLA 共混物溶于一定体积的二氯甲烷中作为有机相,配制一定浓度和体积的 PVA-1788 作为水相。将有机相与水相混合后在高速剪切机下高速剪切乳化,形成稳定的水包油(O/W)混合乳液,在室温下以 600 r/min 搅拌 6~8 h,直至二氯甲烷完全挥发,使微球固化。将固化形成的微球悬浮液离心、洗涤、干燥,得到啞菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球。

1.3 微球的表征

1.3.1 微球外观形貌观察

采用光学显微镜和扫描电子显微镜分别观察微球的外观形貌特征,并选取有代表性的区域拍照。

1.3.2 微球粒径分布测定

采用激光粒度分布仪测定啞菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球的粒径大小及分布,并按照公式(1)计算跨距(Span)。

$$\text{Span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (1)$$

公式(1)中 D_{90} 表示微球累积的粒度分布百分数达到 90%时所对应的粒径; D_{50} 表示微球累积的粒度分布百分数达到 50%时所对应的粒径; D_{10} 表示微球累积的粒度分布百分数达到 10%时所对应的粒径。

1.3.3 微球红外光谱测定

采用 Nicolet 6700 型傅立叶变换红外光谱仪测试

微球的红外吸收光谱,定性分析有效成分的包埋情况。

1.3.4 微球载药量与包埋率测定

总有效成分的测定:准确称取一定质量的以 PBS/PLA 共混物为载体的 噻菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球试样,加入少量二氯甲烷中进行溶解,待二氯甲烷挥发完全后,加入适量的甲醇超声振荡溶解,将所得溶液用甲醇定容至 50 mL 容量瓶中,用于 HPLC 测定。

微球外有效成分的测定:准确称取一定质量的以 PBS/PLA 共混物为载体的 噻菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球试样用适量甲醇萃取,将所得的萃取液用甲醇定容至 50 mL 容量瓶中,用于 HPLC 测定。

噻菌酯色谱条件:色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 不锈钢色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为 V(甲醇):V(水)=65:35;流速 1.0 mL/min;检测波长 230 nm;进样量 10 μL;柱温 30℃。

苯醚甲环唑色谱条件:色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 不锈钢色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为 V(甲醇):V(水)=80:20;流速 0.9 mL/min;检测波长 254 nm;进样量 20 μL;柱温 30℃。

用标准溶液测定噻菌酯和苯醚甲环唑的标准曲线,分别为: $y = -38.46 + 26.606x$ ($R^2 = 0.9981$) 和 $y = -8.58 + 7.88x$ ($R^2 = 0.9997$),根据标准曲线计算总有效成分含量和球外有效成分含量。微球的载药量和包埋率分别按照公式(2)和公式(3)计算:

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{总有效成分含量} - \text{微球外有效成分含量}}{\text{称取微球质量}} \times 100 \tag{2}$$

$$\text{包埋率}(\%) = \frac{\text{总有效成分含量} - \text{微球外有效成分含量}}{\text{投入原药质量}} \times 100 \tag{3}$$

1.3.5 噻菌酯/苯醚甲环唑微球缓释性能评价

采用透析袋法^[18]对以 PBS/PLA 共混物为载体的 噻菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球的缓释性能进行测定。室温下,准确称取 300 mg 噻菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球于透析袋中,将其浸入盛有 500 mL 缓释介质(甲醇和水,体积比为 1:1)的烧杯中,每隔一段时间取 1 mL 上清液(每次取样后立即补充 1 mL 缓释介质),采用 HPLC 测定噻菌酯和苯醚甲环唑的含量,研究微球的缓释行为。同时,以

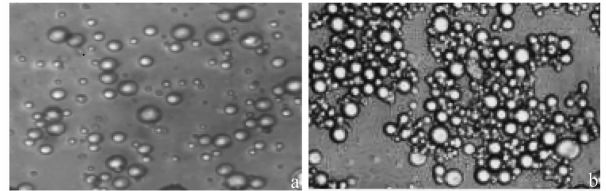
32.5% 苯醚甲环唑·噻菌酯 SC 在相同条件下进行对照试验。并按照公式(4)计算累积释放率。

$$\text{累积释放率}(\%) = \frac{\text{释放的药物量}}{\text{微球中理论药物量}} \times 100 \tag{4}$$

2 结果与讨论

2.1 噻菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球外观形貌及粒径分布

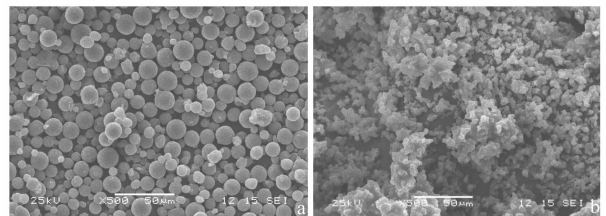
图 1、图 2 分别为 噻菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球的光学显微镜照片和扫描电子显微镜照片。光学显微镜和扫描电镜下观察结果显示,以 PBS/PLA 共混物为载体的微球粒径分布较均一、球形规整,而以脲醛树脂为载体的微胶囊存在明显的粘连现象,干燥后球形不规整。



a: PBS/PLA 微球(×400); b: 脲醛树脂微胶囊(×400)
a: PBS/PLA microsphere; b: Urea-formaldehyde microcapsule

图 1 光学显微镜下的微球

Fig. 1 Optical microscope photo of microsphere



a: PBS/PLA 微球; b: 脲醛树脂微胶囊
a: PBS/PLA microsphere; b: Urea-formaldehyde microcapsule

图 2 扫描电镜下的微球

Fig. 2 SEM photo of microsphere

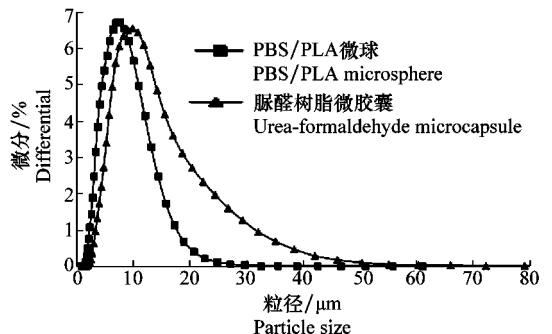


图 3 微球样品粒径分布

Fig. 3 Size distribution profile of microsphere samples

图 3 为咪菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球的粒径分布图。由图 3 可知,以 PBS/PLA 共混物为载体所制备微球粒径大小呈正态分布,分布范围较窄,平均粒径为 $7.20 \mu\text{m}$,跨距为 1.36。

2.2 咪菌酯·苯醚甲环唑微球载药量、包埋率

采用 HPLC 法测得以 PBS/PLA 为复合载体的咪菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球的载药量和包埋率,其中咪菌酯的载药量为 14.30%,包埋率为 85.06%;苯醚甲环唑的载药量为 9.47%,包埋率为 90.18%。

2.3 咪菌酯·苯醚甲环唑微球及 FTIR 测定结果

FTIR 测试结果见图 4 和图 5。包埋有咪菌酯和苯醚甲环唑的 PBS/PLA 微球的组成可以通过微球和微球载体的红外光谱得到。图 4 中,在微球的红外光谱中的 1446.35 cm^{-1} 处出现了 C-N 的特征峰, 748.24 cm^{-1} 处出现了 C-Cl 的特征峰(苯醚甲环唑的 C-N 和 C-Cl 特征峰),在 2231.23 cm^{-1} 处出现了 C≡N 的特征峰(咪菌酯的 C≡N 特征峰),同时微球载体在这 3 处均没有峰,证明了咪菌酯和苯醚甲环唑均被包埋到微球里。

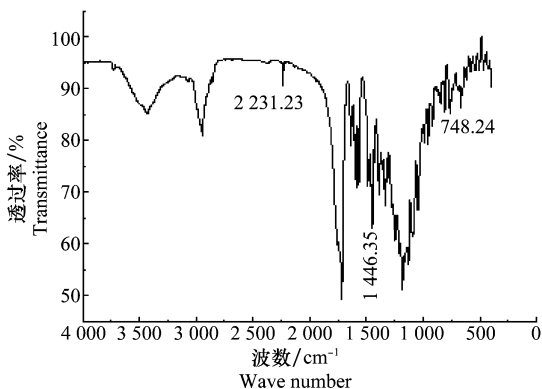


图 4 微球的红外光谱图

Fig. 4 FTIR spectra of microsphere

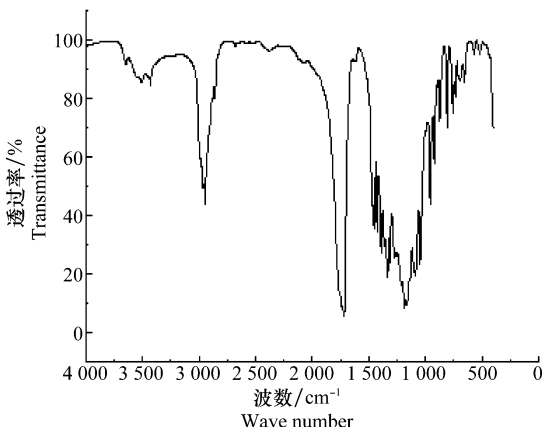


图 5 微球载体的红外光谱图

Fig. 5 FTIR spectra of microsphere delivery

2.4 咪菌酯·苯醚甲环唑微球的缓释性能

由以 PBS/PLA 共混物为复合载体的咪菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球的累积释放曲线(见图 6)可知:悬浮剂和微球中咪菌酯和苯醚甲环唑的释放量之比在 1.60~1.93:1 之间,与其最佳复配比(8:5)接近,但是悬浮剂中咪菌酯和苯醚甲环唑的累积释放率在第 7 天就都已经达到 80% 以上,而与其相比,微球则具有明显的缓释效果,并且释放分为突释和缓释 2 个阶段。微球表层及浅层附着部分活性成分导致在初期(0~5 d)释放较快,与文献报道的“突释效应”相符^[19]。在缓释阶段释放的活性成分主要是来自微球的内部,释放速度较慢,活性成分释放 25 d 后均达到 85% 以上。

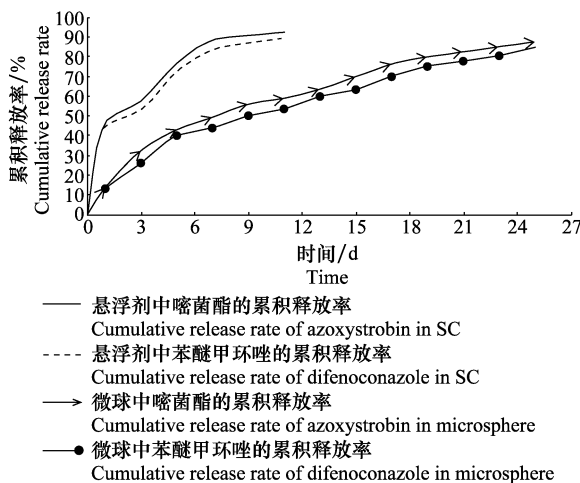


图 6 微球的累积释放曲线

Fig. 6 Cumulative release curves of microsphere

3 结论

以可降解高分子材料 PBS 为载体,通过 PLA 对其进行改性,采用乳化溶剂挥发法成功制备了咪菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球。所制备的微球粒径均一,球形规整,平均粒径为 $7.2 \mu\text{m}$,且咪菌酯载药量为 14.30%,包埋率为 85.06%,苯醚甲环唑的载药量为 9.47%,包埋率为 90.18%。FTIR-ATR 测试结果显示,咪菌酯和苯醚甲环唑均被充分包埋在微球中。

以 PBS/PLA 共混物为复合载体的咪菌酯·苯醚甲环唑 PBS/PLA 微球具有明显的缓释效应,且两种活性成分的释放量之比为 1.60~1.93:1。研究表明,咪菌酯和苯醚甲环唑按照有效成分质量比 8:5(1.6:1)混配时具有明显增效作用,防治效果最

佳^[20]。因此,所制备的复配农药微球两种活性成分释放量接近最佳复配剂量比,能够达到增效和持效的目的。

参考文献

[1] 朱欣妍,尹明明,陈福良. 甲维盐聚乳酸微球缓释性能及室内毒力的初步测定[J]. 农药, 2013, 52(9): 653 - 655.

[2] 宋思思,夏姣,王宁,等. 噻虫嗪-高效氯氰菊酯复配农药微胶囊的制备与性能[J]. 农药, 2016, 55(1): 22 - 25.

[3] 徐建强,杨改凤,田娟,等. 三类杀菌剂对牡丹腔胞叶斑病菌生长和发育的影响[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 86 - 91.

[4] 宋根苗,蒋家珍,邱立红,等. 噻霉酮和苯醚甲环唑混配对 4 种不同病原菌的增效作用[J]. 植物保护, 2012, 38(4): 171 - 174.

[5] 刘艳萍,王思威,刘丰茂,等. 四种常用三唑类杀菌剂在香蕉上残留行为及使用评价研究[J]. 植物保护, 2014, 40(5): 100 - 105.

[6] 侯颖,徐建强,宋宇州,等. 三种杀菌剂对牡丹黑斑病菌菌丝生长及分孢子萌发的影响[J]. 植物保护学报, 2014, 41(3): 367 - 372.

[7] 罗湘仁,李敏,马超,等. 28%苯甲·啉菌酯悬浮种衣剂的研制[J]. 农药, 2012, 51(4): 264 - 266.

[8] Gustafsson K, Blidberg E, Eifgren I K, et al. Direct and indirect effects of the fungicide azoxystrobin in outdoor brackish water microcosms [J]. Ecotoxicology, 2010, 19(2): 431 - 444.

[9] Mu Xiyan, Pang Sen, Sun Xingze, et al. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays [J]. Environmental Pollution, 2013, 175(4): 147 - 157.

[10] 张国福,李本杰,王金花,等. 不同剂型苯醚甲环唑和啉菌酯

及其原药对斑马鱼的急性毒性评价[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(11): 2125 - 2130.

[11] 梁宁宁,熊祖江,王锐,等. 聚左旋乳酸/聚丁二酸丁二醇酯共混物的结构与性能[J]. 高分子材料科学与工程, 2016, 32(3): 48 - 53.

[12] Babur R P, O'Connor K, Seeram R. Current progress on bio-based polymers and their future trends [J]. Progress in Biomaterials, 2013, 2(8): 1 - 16.

[13] 朱锐,杨琛,喻湘林,等. 基于改性 PBS 载体的噻虫嗪微胶囊的制备及性能测试[J]. 农药, 2013, 52(5): 334 - 336.

[14] 毕秋艳,杨晓津,马志强,等. 葡萄霜霉病有效药剂筛选及药效评价[J]. 植物保护, 2014, 40(3): 199 - 203.

[15] 李金堂,李保华,李宝笃,等. 几种杀菌剂防治梨黑星病的持效期的研究[J]. 莱阳农学院学报, 2004, 21(1): 37 - 39.

[16] Hong K, Nakayama K, Park S. Enhanced mechanical properties and degradability of poly (butylene succinate) and poly (lactic acid) blends [J]. European Polymer Journal, 2002, 38: 305 - 311.

[17] Lalit K T, Mohan L K. Development and *in-vitro* characterization of lornoxicam loaded ethyl cellulose microspheres prepared by emulsion solvent evaporation method [J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2014, 8(9): 277 - 285.

[18] 周训卿,曹立冬,刘亚静,等. 啉菌酯微囊的制备及其性能表征[J]. 农药学报, 2014, 16(2): 213 - 219.

[19] Jégat C, Taverdet L J. Stirring speed influence study on the microencapsulation process and on the drug release from microcapsules [J]. Polymer Bulletin, 2000, 44(3): 345 - 351.

[20] 范子耀,王文桥,孟润杰,等. 7 种杀菌剂对马铃薯早疫病病菌室内毒力及田间防效[J]. 农药, 2011, 50(7): 531 - 533.

(责任编辑:田 喆)

(上接 50 页)

[5] 孟慧,杨云,冯锦东. 降香黄檀引种栽培现状与发展[J]. 广东农业科学, 2010, 37(7): 79 - 80.

[6] 刘洪湾,李际,林秀莲. 海南降香黄檀病虫害调查与防治[J]. 农业灾害研究, 2011, 1(2): 32 - 33.

[7] 李青春. 降香黄檀的培育及栽育苗技术[J]. 吉林农业, 2012, (2): 163 - 164.

[8] 周洁尘,刘君昂,何苑俾,等. 13 种海南入侵植物提取物对降香黄檀炭疽病菌的抑制作用[J]. 植物保护, 2015, 41(5): 54 - 60.

[9] 孟昭礼,罗兰,尚坚,等. 人工模拟杀菌剂绿帝对 8 种植物病原菌的室内生测[J]. 莱阳农学院学报, 1998, 15(3): 159 - 162.

[10] Suárez M B, Sanz L, Chamorro M I, et al. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum* identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease [J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42 (8): 924 - 934.

[11] 何静. 苍耳提取物对有害生物抑制机理的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.

[12] 宋瑞清,冀瑞卿. 四种毒蘑菇菌株及其毒素对杨树烂皮病菌生长的抑制作用[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(2): 88 - 91.

[13] 王储炎. 鹿蹄草提取物的抑菌作用和应用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2007.

[14] 李丽萍. 紫茎泽兰提取物对细菌的抑制作用及抑菌机理的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.

[15] 蒋继宏,吴薇,曹小迎,等. 苦豆碱对杨小舟蛾体内保护酶系统活性的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2005, 29(5): 91 - 93.

[16] 李冲伟. 菌株 T-33 抑菌活性物质及其对杨树烂皮病菌的抑制机理[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.

[17] Suhaila M, Suzana S S, Ei S, et al. Antimycotic screening of 58 malaysian plants against plant pathogens [J]. Pesticide Science, 1997, 47: 259 - 264.

[18] 计红芳. 防治杨树叶枯病的毒蘑菇菌株筛选及其生防机理研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.

[19] 张国珍,樊瑛,丁万隆,等. 麻黄和细辛挥发油的抗真菌作用[J]. 植物保护学报, 1995, 22(4): 373 - 374.

[20] 杨帮. 中药植物美洲商陆抗菌活性及作用机理研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2005.

(责任编辑:田 喆)