

单凝聚与复凝聚法制备昆虫激素十二醇微胶囊及其释放行为*

朱晓丽 顾相伶 张志国 孔祥正**

(济南大学化学化工学院 济南 250022)

摘要 通过向明胶溶液中加入硫酸钠溶液的单凝聚方法以及将明胶溶液加入到阿拉伯胶溶液的复凝聚方法,制备了聚合物包覆昆虫激素十二醇的水分散体系微胶囊.通过对凝聚过程中 ζ 电位与透光率跟踪测试确定了单凝聚中加入硫酸钠的最佳用量以及复凝聚中明胶与阿拉伯胶的相对量.在壁材浓度大于或等于3%条件下制备的复凝聚胶囊的尺寸大于单凝聚微胶囊,但后者的大小分布更均一.除非在2%壁材浓度下,其他条件下复凝聚制备的胶囊的十二醇包覆率明显高于单凝聚胶囊.对胶囊中十二醇在恒温条件下释放研究表明,单凝聚胶囊中十二醇很快释放完毕,变化壁材浓度不明显改变其释放行为.相比之下复凝聚胶囊中十二醇的释放对壁材浓度有明显的依赖性.2%壁材浓度制备的胶囊其释放行为类似于单凝聚胶囊;但3%到5%壁材浓度制备的胶囊中十二醇的释放明显分为3个区间,即较快的初始释放、较长时间的恒速释放以及最后阶段释放速率的再次提高直至释放完毕.复凝聚胶囊中十二醇的释放表现出了明显的可控性.文中亦对该体系中昆虫激素十二醇的释放机理作了初步讨论.

关键词 明胶,单复凝聚,包覆率,昆虫激素,可控释放

对农林业病虫害的防治在中国和世界上一一直是一个十分重要的课题.迄今为止国内外的灾害方法基本上是使用毒性农药,由此所带来的问题也是众所周知的,农药的使用危害使用者的健康,农药中毒事件时有发生.农药在农作物中的残留是世界性的问题.农药对生物无选择性,常导致对以昆虫为食物的其他生物物种的毁灭性打击.农药对生态及环境的危害.此外尚有害虫的抗性进化,具抗杀虫剂性的昆虫种类呈指数上升,使防治日益困难.

国内外探索和研究病虫害防治的新途径和新技术主要集中在以下几个方面,一是新型、高效、低毒、低残留化学杀虫剂的研制.其合成一般较复杂,难度颇大,因而进展缓慢.二是病虫害天敌的利用.这种方法由于受昆虫天敌种类及区域的影响,不具有普遍性.三是昆虫激素或信息素的应用等.

昆虫激素有许多种,但大致可分为两大类,这其中最重要的是昆虫信息素中的性外激素,尤其是昆虫雌性外激素.雌成虫(雌蛾)释放到大气中的性外激素的作用在于引诱雄虫,是雄虫寻找雌虫的信号向导.昆虫是在雌性激素的导向下实现交配,从而完成产卵、孵化这一过程的.一只雌蛾

的雌性激素含量甚微,一般为0.005到1 μg 甚至更低^[1].尽管有关昆虫激素的鉴定及合成早有研究,但直到1970年才逐渐应用于农作物或者果园的灾害防治.即制备含有昆虫激素的装置安装于农田中使其中的昆虫激素释放到大气中,从而使雄性昆虫迷失寻找雌性的方向,从而阻止其发生交配,由此而达到无药灭虫的目的.这正是目前使用的干扰交配或者迷向法灭害的基本原理^[2~6].

世界上许多国家都开展了使用干扰交配或迷向法灭害的相关研究,如北美^[4~7]、欧洲^[8,9]、澳洲^[10,11]及中美洲国家^[12].美国在1970年即有商用昆虫激素迷向装置用于果树灭害^[13].据报道,在美国果园进行的试验使苹蠹蛾对苹果和梨小食心虫害对梨园的灾害损失从平常的39.5%降低到1%以下^[2,14].我国在交配干扰虫害农田试验方面亦取得了很大进展.孟宪佐等在1980年对梨小食心虫的试验使虫害比化防区下降了40%~75%^[15].李连昌等^[16]、李文谷等^[17]也开展了类似试验,在减少农药使用、虫害治防等方面都取得了明显效果.

迄今为止的相关研究及应用,涉及昆虫物种繁多,但都仅仅是涉及诱捕器昆虫激素迷向器的形状、颜色、设置、诱捕时环境(时间、气温、湿度)

* 2006-11-17 收稿,2006-12-11 修稿.国家自然科学基金(基金号 20574031)和山东省自然科学基金(基金号 Z2004B05)资助项目;

** 通讯联系人, E-mail: xzkong@ujn.edu.cn

或者所用合成激素的成份等对虫害控制效果的搜集、分析等^[6,18~22]。尽管多年来有许多关于高分子材料对小分子的包覆体系用于制备磁性材料^[23~25]、印染技术^[26]、尤其是近年发展迅速的药物可控缓释体系^[27,28]的报道,但国内外鲜见有关使用高分子材料制成微米或纳米昆虫激素包覆水分散体系的报道。而以高分子材料水分散体系制备的昆虫激素颗粒可使用喷雾施用、释放更均匀,尤其宜于森林虫害的作业。

昆虫雌激素的化学结构大多是从 C₁₂ 到 C₂₄ 之间(大部分是烯类)的醇、醛或其乙酸酯^[1,15,29~31]。十二醇(C₁₂OH)确实作为一个组分存在于多种昆虫激素中,亦有许多昆虫激素的烯类对应体也仅与之相差 2 到 4 个氢原子,它们的物理性能比较接近,使用饱和 C₁₂OH 获得的结果对进一步使用实际的昆虫激素进行包覆有可靠的借鉴性。本文选取 C₁₂OH 作为复合胶囊的芯材用高分子电解质的单凝聚和复凝聚对其进行包覆,探索其被高分子材料的包覆规律及其释放行为。

本实验选择研究广泛的凝聚法^[32],使用阿拉伯胶(AG)与明胶(GE)通过复凝聚或者明胶的单凝聚作为昆虫激素包覆技术,探讨了凝聚过程的规律,制备了十二醇微胶囊,研究了凝聚方法、交联度对微胶囊性能的影响,为进一步开展昆虫激素包覆奠定了基础。

1 实验部分

1.1 原料

阿拉伯胶(AG),Span 80,天津广成化学试剂有限公司产品。A 型明胶(GE,化学纯),国药集团化学试剂有限公司。1-十二醇(C₁₂OH),分析纯,天津博迪化工有限公司;Tween 20,化学纯,天津福晨化学试剂厂;甲醛(37%溶液),山东莱阳经济技术开发区精细化工厂;乙酸,分析纯,淄博天德精细化工研究所,使用前配置成 10% 的溶液;氢氧化钠,分析纯,山东省化工研究院,使用前配置成 1 mol/L 的溶液。

1.2 产物的表征

使用英国 Malvern 公司的 Nano-ZS 粒径仪和瑞士万通生产的 662 型光密度计测试 AG 和 GE 溶液凝聚过程中 ζ 电位与透光率变化;采用日本 Olympus 公司生产的 BX51 型光学显微镜和丹东市百特仪器有限公司的 BT-9300H 型激光粒度分布仪对微胶囊的形态和粒径进行观察;日本岛津

公司 GC-14C 型气相色谱仪用来测定微胶囊载药量和包覆率;药物释放实验在上海一恒公司的 LHS-100CL 型恒温恒湿箱中进行。

1.3 微胶囊制备

复凝聚法制备微胶囊是预先在两个容量瓶中分别制备 30 g/L AG 和 30 g/L GE 溶液,取 100 mL AG 溶液,加入设计量的十二醇、分散剂 Span 80 以及 Tween 20,800 r/min 下分散 30 min。将与 AG 等量的 GE 溶液加入 AG 分散液中,调 pH 至 4.2,然后在 50℃ 恒温水浴中于 400 r/min 连续搅拌 1 h。将反应体系用冰水浴降温至 5~10℃,调整 pH 约为 9.0,加入甲醛交联固化,制备成微胶囊。不同交联度的微胶囊,经抽滤、真空干燥至恒重。以水作溶剂,用索氏提取器抽提样品,计算交联度。微胶囊经抽滤、洗涤和干燥,利用甲苯萃取十二醇,使用气相色谱仪测定十二醇含量,进而确定载药量和包覆率。将经真空冷冻干燥过的微胶囊,置于恒温恒湿箱,在 35℃ 及 50% 相对湿度下测试微胶囊中十二醇的释放行为。使用明胶进行单凝聚时先制备 6% 的明胶溶液,在搅拌下向其中加入 20% 浓度的硫酸钠水溶液。

2 结果与讨论

2.1 凝聚法制备微胶囊

单凝聚法制备微胶囊时,随着硫酸钠溶液的加入,明胶从溶液中凝聚形成微胶囊,体系的透光率逐渐下降,至最大凝聚量时透光率最低。制备的 6% 的明胶溶液的 pH 在 5.0 左右,这低于其等电点 pH (IE pH) 9.2,此时明胶分子带正电荷,当加入硫酸钠溶液时,明胶中季铵盐上的部分质子逐渐被钠离子置换,并与硫酸根结合,使体系的电导率有所上升,当季铵盐中活性质子全部被置换时,电导率上升变缓,此时对应于明胶的最大凝聚点。无论从透光率抑或是电导率测试,都表明加入约 30 mL 20% 硫酸钠时,体系中明胶达到最高凝聚(图 1a)。在明胶与阿拉伯胶的复凝聚中,是将明胶溶液加入到后者中,体系的透光率从一开始即迅速下降,当加入到 25~30 mL 时,透光率达到最小值,此时对应的 ζ 电位为零。由此判定明胶与阿拉伯胶质量比为 1 时为最大凝聚点(图 1b)。

图 2 给出了单复凝聚两种条件下形成的微胶囊的粒径大小及其分布,单凝聚得到的胶囊的粒径分布明显窄于复凝聚时的胶囊。

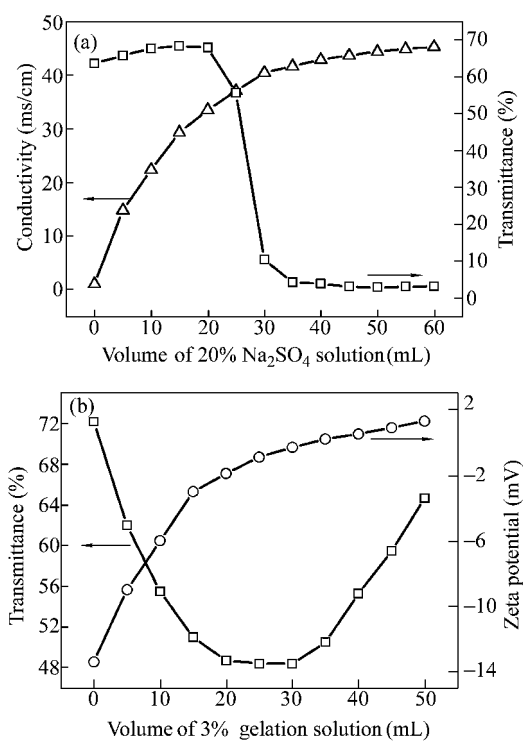


Fig. 1 Property evolution during coacervation
a) Simple coacervation by adding 20% Na_2SO_4 solution into 40 mL of 6% gelatin solution ; b) Complex coacervation by adding 3% gelatin solution into 30 mL of 3% arabic gum solution

2.2 单复凝聚胶囊对 C_{12}OH 的包覆及其释放

用以上方法在 C_{12}OH /聚合物比为 1/2 条件下制备了两类胶囊(表 1). 对于胶囊尺寸的观察,可以看出复凝聚中壁材浓度在 3% 以上时,粒径在 $1.9\ \mu\text{m}$ 和 $2.7\ \mu\text{m}$ 之间.壁材浓度低于 3% 时粒径明显变小.单凝聚中胶囊尺寸明显小于复凝聚胶囊.比较相同高分子壁材浓度下单凝聚(G5F1, 5%明胶溶液,1% 甲醛交联;G3F1,3% 明胶溶液,1% 甲醛交联)和复凝聚(GA5F1,GA3F1,明胶与阿拉伯胶的复凝聚,其它条件相同)胶囊对 C_{12}OH 的包覆率(C_{12}OH encapsulation%,即包覆到胶囊内部的 C_{12}OH 占投料量的比),可见复凝聚时包覆率是单凝聚时的近两倍,从而导致复凝聚胶囊中含 C_{12}OH 的量是单凝聚胶囊的约 1.6 倍或以上.正是由于单凝聚胶囊含 C_{12}OH 量低,在恒温恒湿条件下测定其释放时(图 3),两个明胶浓度下制备的单凝聚胶囊释放行为相似,7 天内即基本释放完毕.而复凝聚胶囊依制备过程不同,表现出了很大差别.5% 浓度壁材制备的胶囊(GA5F1)前 3 天释放速率稍快,经过一个 3 天左右的降速期后释放速率又有上升,此后基本上保持恒速至 18 天

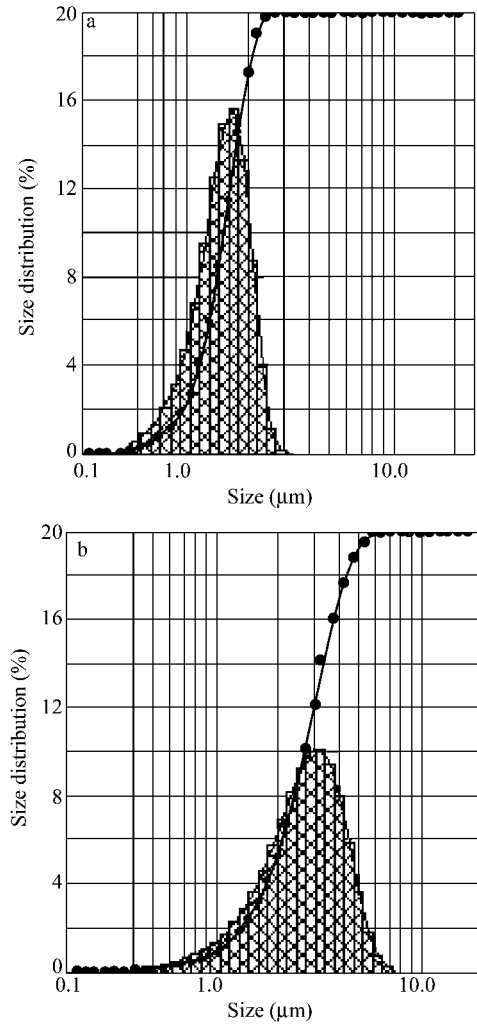


Fig. 2 Size and size distribution of capsules prepared *via* simple (a) and complex (b) coacervations
Simple coacervation by adding 20% Na_2SO_4 solution into 40 mL of 6% gelatin solution ; Complex coacervation by adding 3% gelatin solution into 30 mL of 3% arabic gum solution

Table 1 Dodecanol encapsulation rate and its loading in simple and complex coacervation capsules

Coacervation	Complex coacervation				Simple coacervation	
	Samples	GA5F1 *	GA4F1	GA3F1	GA2F1	G5F1 G3F1
Capsule size (μm)		1.94	2.06	2.70	1.05	1.10 1.50
C_{12}OH encapsulation (%)		80.2	85.20	78.60	30.70	41.88 42.85
C_{12}OH loading (%)		28.62	29.87	28.20	13.31	17.31 17.65

* In GA5F1, GA implies that gelatin and arabic gum were used for complex coacervation ; 5 means gelatin and arabic gum solutions were 5% ; F stands for gormaldehyde as crosslinking agent ; last number indicates 1% formaldehyde was used for crosslinking.

左右释放完全(约 28%) 而以 3% 壁材浓度制备

的胶囊(GA3F1)在释放的最初 3 天内稍快(但明显低于 5% 壁材的胶囊),此后至 25 天内释放速率恒定但比前段略有降低,此后释放速率略有上升直至 $C_{12}OH$ 完全释放.基于这些观察,可见单凝聚胶囊虽然粒径分布较均一,但 $C_{12}OH$ 的包覆率明显偏低, $C_{12}OH$ 的释放时间短且无可控性,而复凝聚制备的胶囊释放时间明显变长,不同条件制备的胶囊的释放形为有所变化,为改变实验条件达到 $C_{12}OH$ 的可控释放提供了空间.

2.3 不同壁材浓度复凝聚胶囊的制备及 $C_{12}OH$ 释放行为

壁材浓度从 2% 改变到 5%,仍然使用 1% 甲醛交联制备了 4 种微胶囊(表 1 前 4 列数据),3% 到 5% 壁材浓度时,包覆率都在 80% 左右,胶囊含 $C_{12}OH$ 量在 28% 左右;而 2% 壁材浓度时, $C_{12}OH$ 包覆率仅为 30%,胶囊含 $C_{12}OH$ 量仅为 13.3%.可见降低壁材浓度至 2%,严重降低了壁材对 $C_{12}OH$ 的包覆效率.

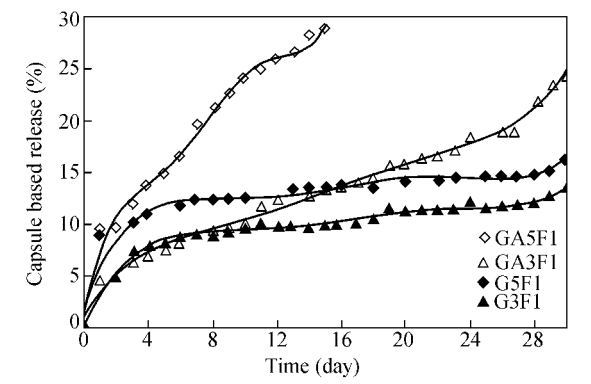


Fig. 3 Dodecanol release from capsules prepared through different processes at different wall concentrations

各试样的释放行为由图 4 给出.从该图可见,壁材的浓度对胶囊的释放行为有明显影响,壁材浓度为 2% 时,与单凝聚时非常相似.由于其 $C_{12}OH$ 含量低,经历 4~5 天的释放后,胶囊中尽管此时仍有 5%,但释放十分缓慢或基本无释放行为.5% 浓度的胶囊释放最快,3 天后释放速率有所降低,但 9 天后又迅速上升,2 周即释放完毕,且残留 $C_{12}OH$ 很少.相比之下,4% 和 3% 壁材制备的胶囊无论是释放速率还是释放行为都介于 5% 和 2% 壁材浓度制备的胶囊之间,释放初期都有一相

对快速期,而后紧随有一略低的恒速期,最后释放速率再次上升直至完全释放.制备胶囊时壁材浓度愈低,中间恒速期持续愈长. Lamprecht^[33] 等最近使用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)对阿拉伯胶-明胶复凝聚对二十碳五烯酸乙酯(EPAE)包覆体系作了研究,证实了芯材 EPAE 与胶囊壁材形成了核壳结构,EPAE 作为芯材被完全包覆在交联的阿拉伯胶-明胶微胶囊中.在本体系中,当会形成类似的核壳结构.但鉴于十二醇分子量小于 EPAE,不排除含有少量吸附在壁材的外层或杂混于壁材中,这部分应当比较容易释放出来,形成了释放初期的快速释放期.胶囊 $C_{12}OH$ 含量越高,壁材层含量越高,因而前期速率也越高.待该部分 $C_{12}OH$ 释放完全后,完全包覆在内部的芯材壁材界面里的 $C_{12}OH$ 才开始释放,形成 GA3F1 和 GA4F1 中的恒速释放期.随着 $C_{12}OH$ 的释放,壁材中空隙或内部 $C_{12}OH$ 的释放通道会变得畅通,因而后期有一释放加速期.依此构思,可完全解释图 4 中观察到的各种释放现象.

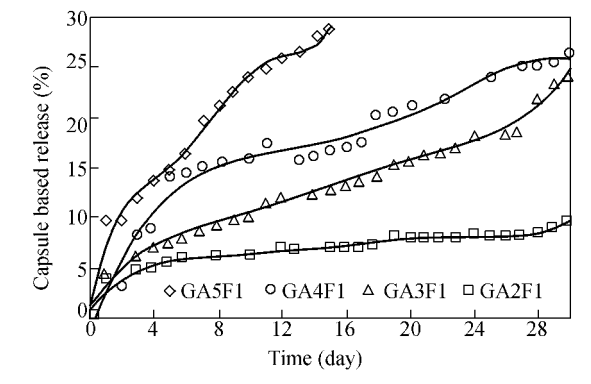


Fig. 4 Influence of polymer concentration at coacervation on $C_{12}OH$ release

综上所述,本工作表明通过明胶的单凝聚或者和阿拉伯胶的复凝聚可以实现对昆虫激素十二醇的包覆,但复凝聚对 $C_{12}OH$ 的包覆率明显高于单凝聚,单凝聚胶囊中 $C_{12}OH$ 的释放类似暴释行为,可控性较低.相比之下复凝聚过程制备的胶囊中 $C_{12}OH$ 的释放随本文中实验条件的改变有明显的规律性变化,表明完全可以通过控制壁材厚度、交联剂量、载药量等条件达到昆虫激素 $C_{12}OH$ 的可控释放.

REFERENCES

- 1 Du Jiawei(杜家纬). Insect Sex Pheromones and Their Applications(昆虫性信息激素及其应用). Beijing(北京): China Forestry Publisher(中国林业出版社), 1988. 24 ~ 104
- 2 Gordon D, Zahavi T, Anshelevich L. J Econ Entomol, 2005, 98(1): 135 ~ 142
- 3 Barnes M M, Millar J G, Kirsch P A. J Econ Entomol, 1992, 85(4): 1274 ~ 1277
- 4 Weissling T J, Knight A L. Entomol Exp Appl, 1995, 77: 271 ~ 275
- 5 Knight A L, Hilton R, Light D M. Environ Entomol, 2005, 34(3): 598 ~ 603
- 6 Ward C R. Cooperative Extension Service Guide, 1998, H-152(9): 1 ~ 4
- 7 Gries G J, Li J, Gries R M. Canadian patent, CA2041529. 1998-11-24
- 8 Chandler J. Pesticide News, 2003, 59: 10 ~ 11
- 9 Raty L, Drumont A, De Windt N. Forest Ecology and Management, 1995, 78: 191 ~ 205
- 10 Braby M F. The Complete Field Guide to Butterflies of Australia. Collingwood, Vic: CSIRO Publishing, 2004. 116 ~ 118, 240 ~ 241
- 11 Suckling M, Gibb A R, Burnip G M. J Chem Ecol, 2005, 31(2): 393 ~ 406
- 12 Ventura M U, Mello E P, Oliveira A R M. Neotropical Entomol, 2001, 30(3): 361 ~ 364
- 13 Flint H M, Doane C C. Radcliffe's IMP World Text Book. Twin Cities: University of Minnesota, 1996. 1 ~ 10
- 14 Pfeiffer D G, Kaakeh W, Killian J C. Entomol Exp Appl, 1993, 67: 57 ~ 64
- 15 Meng Xianzuo(孟宪佐). Entomological Knowledge(昆虫知识), 2000, 37(2): 75 ~ 84
- 16 Li Lianchang(李连昌), Han Guibiao(韩桂彪), Li Jie(李婕). Chem Ecol(化学生态学), 1998, (2): 59 ~ 62
- 17 Li Wengu(李文谷), Luo Zhiyi(罗志义), Jenkins J W. Collection of Entomology Research(昆虫学研究集刊), 1982-1983, (3): 1 ~ 8
- 18 Johansson B G, Anderbrant O, Simandl J, Avtzi D, Saalvadori C. J Chem Ecol, 2001, 27(4): 733 ~ 744
- 19 Byers J A. J Chem Ecol, 1988, 14: 199 ~ 212
- 20 Zada A, Dunkelblume, Harel M, Assael F, Gross S, Mendel Z. J Econ Entomol, 2004, 97(2): 361 ~ 368
- 21 Östrand F, Anderbrant O, Jönsson P. Entomol Exp Appl, 2000, 95(2): 119 ~ 128
- 22 Knight A L, Light D M. The Can Entomol, 2005, 137(6): 739 ~ 747
- 23 Liu Xueyong(刘学涌), Ding Xiaobin(丁小斌), Zheng Zhaohui(郑朝晖), Peng Yuxing(彭宇行), Long Xinping(龙新平), Shang Kun(尚昆), Wang Xiaochuan(王晓川), Chan Albert S C(陈新滋), Yip C W(李蓓). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2003, (1): 104 ~ 108
- 24 Zhou Chunhua(周春华), Liu Wei(刘威), Zhang Shuxiang(张书香), Li Hui(李辉), Chu Guohong(褚国红). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2005, (4): 606 ~ 609
- 25 Jiao Yuyan(焦玉彦), Lin Shiyin(林世寅), Zhang Xizeng(张熙曾), Guo Yi(国毅), Xu Jie(徐杰), Li Lu(李璐), Ge Xiangnan(葛向南). Chinese Pharm J(中国药理学杂志), 1996, 31(1): 27 ~ 30
- 26 Song Jian(宋健), Diao Dajie(刁大杰), Li Guangtian(李光天), Cheng Libai(程侣柏). Dyestuff Industry(染料工业), 1996, 33(1): 9 ~ 13
- 27 Wang Guangyuan(王广远), Luo Mingke(罗明科). Pesticides(农药), 1998, 37(11): 14 ~ 16
- 28 Langer R, Peppas N A. Bioengineering, Food and Natural Products, AIChE J, 2003, 49(12): 2990 ~ 3006
- 29 Leal A W S, Bento J M S, Murata Y, Ono M, Parra J R P, Vilela E F. J Chem Ecol, 2001, 27(10): 2041 ~ 2051
- 30 Backman A, Bengtsson M, Witzgall P. J Chem Ecol, 1997, 23(3): 807 ~ 815
- 31 Hung C C, Hwang J S, Hung M D, Yen Y P, Hou R F. J Chem Ecol, 2001, 27(9): 1855 ~ 1866
- 32 De Kruif C G, Weinbreck F, De Vries R. Curr Opin Colloid & Interf Sci, 2004, 9: 340 ~ 349
- 33 Lamprecht A, Schafer U F, Lehr C M. Eur J Pharm Biopharm, 2000, 49: 1 ~ 9

PREPARATION OF INSECT SEX PHEROMONE DODECANOL CONTAINING MICROCAPSULES BY SIMPLE AND COMPLEX COACERVATIONS AND THEIR RELEASE BEHAVIOR

ZHU Xiaoli, GU Xiangling, ZHANG Zhiguo, KONG Xiang Zheng

(College of Chemistry and Chemical Engineering, University of Jinan, Jinan 250022)

Abstract Microcapsules with dodecanol ($C_{12}OH$) encapsulated were prepared through complex coacervation by adding gelatin (GE) solution to an acacia gum (AG) solution and through GE simple coacervation by adding sodium sulfate solution to GE solution, both in presence of $C_{12}OH$. $C_{12}OH$ was chosen for the core material because it does constitute a real component in sex pheromones of numerous insects. In a first step, Zeta potential and light transmittance in the two coacervation processes were followed in order to determine the optimum ratio of AG and GE in complex coacervation and the best amount of sodium sulfate in simple coacervation. It was observed that maximum yield was achieved for complex coacervation with AG/GE weight ratio at unity, and for simple coacervation when 30 mL of 20% sodium sulfate was added to 40 mL of 6% GE solution. When the wall material concentration was equal to or higher than 3%, the size of the microcapsules from complex coacervation was larger than that prepared through simple coacervation. Nevertheless, simple coacervation led to capsules with much narrower size distribution. $C_{12}OH$ encapsulation rates in simple coacervation were significantly lower compared with those in complex coacervation at equal wall material concentration, leading therefore to a lower $C_{12}OH$ loading in simple coacervation. To investigate $C_{12}OH$ release from the capsules, samples were placed into an incubator with constant temperature (30°C) and relative humidity (50% RH), and taken out for $C_{12}OH$ examination by gas chromatography and by weighing the samples. It was found that all samples from simple coacervation reached their final release in less than one week, no difference was observed for samples prepared with different wall material concentration; whereas microcapsules from complex coacervation manifested a three-step-release profile, *i. e.* a quick start followed by a constant plateau region and terminated by a release increase till completion. Results also revealed that capsules prepared with higher wall material concentration had a higher release rates. The capsules prepared with 5% solutions of AG and GE lost their $C_{12}OH$ within 2 weeks; lowering wall material concentration effectively reduced $C_{12}OH$ release rate and extended $C_{12}OH$ constant release period. This work indicates that release of $C_{12}OH$ can be well controlled through capsule structure designing. This is of great importance for our on-going study on controlled release of authentic insect semiochemicals.

Key words Gelatin, Coacervation, Encapsulation, Insect pheromone, Controlled release