

文章编号: 1005-0523(2006)01-0164-05

鱼藤酮的环糊精包合物对松材线虫的杀虫作用

胡林^{1,2}, 夏坚², 詹素兰², 黄晓东², 徐汉虹¹

(1. 华南农业大学 教育部农药与化学生物学重点实验室, 广州 510642; 2. 华东交通大学 应用化学研究所, 江西 南昌 330013)

摘要:为研制防治松材线虫病的高效杀线剂, 制备了鱼藤酮的 β -环糊精包合物和HP- β -环糊精包合物, 运用紫外分光光度法测得鱼藤酮分子与环糊精分子的包合比为1:2. 在鱼藤酮与 β -环糊精的物理混合物中, 鱼藤酮的固-液相转变温度所对应的差热吸收峰为163.1 $^{\circ}\text{C}$, 而鱼藤酮的 β -环糊精包合物的相应差热吸收峰为165.1 $^{\circ}\text{C}$. 与鱼藤酮相比, 鱼藤酮的 β -环糊精包合物及HP- β -环糊精包合物的对紫外光照稳定性都明显增强, 溶解度分别增加了13.3倍和233.4倍. 形成包合物后, 鱼藤酮的 β -环糊精包合物及HP- β -环糊精包合物都保持了鱼藤酮对松材线虫的高效杀虫活性.

关键词:鱼藤酮; 环糊精; 环糊精包合物; 松材线虫

中图分类号: TP273

文献标识码: A

1 前言

目前, 我国松材线虫病发生形势异常严峻, 已对一些地区的生态环境、外贸出口和经济社会发展产生了严重影响, 直接威胁到我国0.33亿公顷松林和一批世界自然文化遗产、国家重点风景名胜及重点生态区的安全, 发现有效的松材线虫病防治方法是我国森林防护的迫切需要^[1]. 松材线虫主要分布在松树的导管内, 其生存环境很大程度上可以认为是水生环境, 松材线虫的呼吸作用主要依靠与水中溶解氧的相互交换. 一般而言, 对水中溶解氧高度依赖的水生生物对Complex I的抑制剂非常敏感. 我们曾选用了一种经典的Complex I抑制剂鱼藤酮, 测定其对松材线虫生物活性, 实验发现, 鱼藤酮对松材线虫的活性极高, 且随着作用于时间的延长其活性持续升高^[2], 鱼藤酮作为一种传统的有代表性的植物性杀虫剂在对松材线虫的杀灭能力方面的卓越表现, 值得深入研究.

尽管鱼藤酮对松材线虫出色的防治效果令人

惊奇, 但具体运用鱼藤酮防治松材线虫还存在一些困难, 主要表现在鱼藤酮的稳定性比较差, 特别是当与空气接触、光照或与碱性溶液接触后, 容易通过氧化、异构等方式失去活性^[3], 研究其降解途径、寻找防止其降解的有效手段依然是一项艰巨的任务. 另外, 鱼藤酮在水中溶解度仅有2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 当注射至松树体内后, 鱼藤酮难以随着导管内水分的蒸腾作用从注射的树干部位沿着导管扩散至树冠, 过低的溶解度使鱼藤酮难以在松树体内系统分布并达到作用剂量. 为解决鱼藤酮的稳定性和传导性问题, 有效防治松材线虫病, 本文通过对鱼藤酮的剂型改造, 首次采用让鱼藤酮形成鱼藤酮-环糊精包合物的方法改善其传导性和稳定性, 使鱼藤酮的包合物易于在松树体内传导并达到作用剂量, 从而达到长期、有效地控制松树体内松材线虫的目标.

2 材料与方法

2.1 供试线虫

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Nikle,

收稿日期: 2005-09-05

基金项目: 国家科技部科技成果转化资金(200344-0051163), 广东省科技厅星火计划项目(2003B21605), 广州市重大科技项目(2003Z1-E0101), 中国博士后基金(2005037586)

作者简介: 胡林(1964-), 男, 安徽宁国人, 副教授.

1970),取 250 ml 的烧瓶,加入玉米粒培养基,在用 110 度高温灭菌 2 小时后,用 150 克玉米粒培养基接种培养盘多毛孢菌(*Pestalotia* sp.)。在 24℃ 恒温光照培养箱内培养 10 天后,盘多毛孢菌的菌丝长满培养皿底部;将从广东省东莞市长安镇莲花山病区松树上的松材线虫分离出来,收集线虫,用无菌水冲洗几遍后,配成约 6 000 条/ml 混合虫龄的线虫液接种,让松材线虫在盘多毛孢菌的菌丝培养基内繁殖,二周后转入 15℃ 恒温光照培养箱内培养,试验前用改良的贝曼漏斗法分离收集线虫,配成约 600 条/ml 的松材线虫试样备用。

2.2 化学药品

鱼藤酮标准品,美国 Aldrich 公司;制备用鱼藤酮,含量 98%,广东丰顺农药厂;其它皆为市售分析纯药品。

2.3 主要仪器

LABOROTA4001 型旋转蒸发仪,德国 Heidolph 公司;HP 1100 型高效液相色谱仪,美国惠普公司;1601 紫外-可见分光光度仪,日本岛津公司;MAXI dry plus 冷冻离心真空干燥仪,丹麦 Heto-Holten 公司;CQ-1 电热鼓风干燥箱,重庆永生实验仪器厂;DCS 204 差热分析仪,德国 Netzsch 公司;紫外光源,30 W 低压汞灯,最大紫外发射波长 252 nm。

2.4 鱼藤酮的 β -环糊精包合物制备方法

将 30g 环糊精两次重结晶并在 110℃ 的烘箱中干燥至恒重,称量 2.270 g 的环糊精并将其置于 100 ml 的三颈瓶内,加 30 ml 蒸馏水并加热到 50℃ 以上形成水溶液;称量 98% 的鱼藤酮 0.4026 g,将鱼藤酮溶于乙醇溶剂中,在 N₂ 气体的保护下将鱼藤酮的溶液缓慢加入三颈瓶中,继续加热搅拌并回流 12 h,冷却静置后用滤纸过滤,用少量的无水乙醇冲洗滤渣,除去滤渣中未反应的鱼藤酮,再用少量的水洗涤滤渣以除去滤渣中未反应的环糊精,用真空冷冻干燥机将滤渣在 -40℃ 的环境下真空冷冻干燥,即获鱼藤酮的环糊精包合物。

2.5 鱼藤酮的羟丙基- β -环糊精(HP- β -环糊精)包合物制备方法

将 10 g 的 HP- β -环糊精在 110℃ 的电热干燥箱中干燥至恒重,称取 1.60 g 的 HP- β -环糊精并将其置于 100 ml 的三颈瓶内,加 20 ml 蒸馏水并加热到 50℃ 以上形成水溶液;称取 98% 的鱼藤酮 0.4026 g,用制备鱼藤酮的 β -环糊精包合物相同的条件及方法,即可获 HP- β -鱼藤酮的环糊精包合物。

2.6 差热分析确定包合物的形成

分别按 1:2 的摩尔比制成鱼藤酮与环糊精的物理混合物和鱼藤酮的摩尔比为 1:2 的包合物样品,取样品用 DCS 204 差热分析仪进行分析,将两样品从温度 20℃ 至 400℃ 之间进行差热分析扫描,扫描速度为 10℃/min。

2.7 鱼藤酮含量的高效液相色谱(HPLC)测定法

纯鱼藤酮标样以丙酮为溶剂,分别配制成 0, 2.5×10⁻³, 5×10⁻³, 7.5×10⁻³ 和 1×10⁻² mol/L 的溶液。用 HP1100 型高效液相色谱仪测定上述标准溶液的保留时间与峰面积,测定条件为:流动相为 MeOH:H₂O=78%:22%(v/v),检测波长为 297 nm,检测所用的色谱柱为 C₁₈反相柱(250×4 mm,大连依利特);流动相流速:1 ml/min;柱温:室温。每次进样 2.00 μ l,每个试样平行测定 3 次。

2.8 鱼藤酮及其环糊精包合物光照降解率的测定

为观察鱼藤酮在形成包合物后对鱼藤酮稳定性的影响,特设计了鱼藤酮及其环糊精包合物的紫外光照稳定性实验,采用紫外光照射法检验其稳定性既可以加快鱼藤酮的降解进程、便于用高效液相色谱分离鱼藤酮与其降解产物,又可为考查鱼藤酮的环糊精包合物在防治其它农业害虫时持效期的改变方面提供信息。实验方法如下:分别在 8 只小烧杯中放入 1 ml 的 40.0 μ M 的鱼藤酮的丙酮溶液,另外 16 只烧杯分别放入 1 ml 的 40 μ M 的 β -环糊精或 HP- β -环糊精包合物,干燥后置于 2 支平行的 30 W 的紫外灯下照射,紫外灯管中心位置距烧杯底部距离为 35 cm,在试验开始时及其后的每隔 12h 后,分别取装有鱼藤酮、鱼藤酮 β -环糊精包合物和装有鱼藤酮 HP- β -环糊精包合物的烧杯测定其中的鱼藤酮浓度,每次每种样品取 2 只烧杯,结果取 2 次的平均值。测定方法为以高效液相色谱仪分别测定各的成分的色谱峰面积,用标准工作曲线法计算其不同照射时间下残存的鱼藤酮的含量。

2.9 对松材线虫活性的生测方法

取 24 孔细胞板,在每一个孔内都加入 0.1 ml 的 600 头/ml 左右松材线虫悬浮液,在不同的孔中分别设对照组和处理组,其中对照组中加入 0.1 ml 的清水,处理组中加入 0.1 ml 的一定浓度的鱼藤酮丙酮溶液或鱼藤酮 β -环糊精包合物,或装有鱼藤酮 HP- β -环糊精包合物的水溶液,每组 2 次重复,在解剖镜下对处理前以及处理 48 h 后的松材线虫总数及存活的松材线虫进行计数,统计其死亡率并计算其校正死亡率,以此计算并比较鱼藤酮和鱼藤酮的环糊精包合物毒力回归方程。

3 结果与讨论

3.1 鱼藤酮的环糊精包合物的化学组成

分别取 8 只 100 ml 的容量瓶,用十万分之一的天平准确称量 8 份 1.60 mg 的鱼藤酮标样,每份加水 80 ml 左右,分别加入 0, 2.27, 4.54, 6.81, 9.08, 11.25, 13.62 和 15.8 mg 的经过重结晶干燥过的 β -环糊精,对混合物加热到 60℃ 持续 30 min 后,冷却,转移至容量瓶中,定容至 100 ml. 此时每只容量瓶中鱼藤酮的摩尔浓度为 40 μ M, 环糊精的浓度分别为 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 和 140 μ M, 环糊精与鱼藤酮的摩尔数之比分别为 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 对 8 个容量瓶内溶液用沙滤漏斗过滤,滤液用 1601 型紫外-可见分光光度仪在 190 nm 至 350 nm 的范围内扫描,确定鱼藤酮在 297 nm 处有最大吸收峰,测量其 297 nm 的吸光度值,以吸光度为纵坐标,以环糊精与鱼藤酮的摩尔比为横坐标,绘制曲线. 结果如图 1 所示:

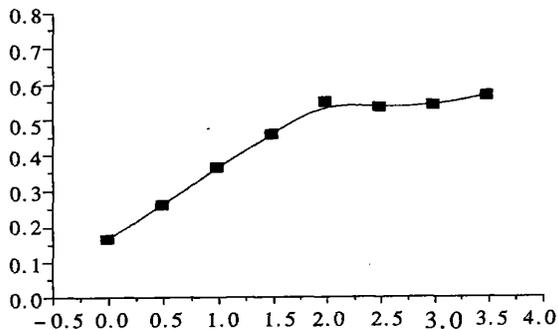


图 1 不同鱼藤酮与 β -环糊精摩尔比的水溶液紫外吸光度

由图可见,当环糊精与鱼藤酮的摩尔比为 2:1 时吸收达最大值,此后增加环糊精的量并不增加鱼藤酮在 297 nm 的吸光度,这意味着其溶解度不再增加;实验还发现,在不加或加入低浓度的环糊精时,将混合物加热到 60℃ 并持续 30 min 后冷却,因鱼藤酮本身的溶解度小,溶液浑浊,但当环糊精加入量达 80 μ M 以上时,含有 40 μ M 的鱼藤酮溶液不再浑浊,故推断鱼藤酮与环糊精的包合物摩尔比为 1:2,鱼藤酮与 β -环糊精包合物的分子式可以记为 $C_{23}H_{22}O_6 \cdot (C_{42}H_{70}O_{35})_2$

3.2 鱼藤酮的 β -环糊精包合物的差热分析

取鱼藤酮 39.4 mg 与 β -环糊精 227 mg 混合为一号样品,另取用前述方法制备的鱼藤酮与 β -环糊精的摩尔比为 1:2 的包合物为 2 号样品,将两样品从温度 20℃ 至 400℃ 之间进行差热分析扫描,结果见图 2 和图 3. 由图可见,一号样品物理混合物在 163.1℃ 时有一明显的吸热峰,这是鱼藤酮的融化吸热,但在包合物中此熔点峰上升到 165.1℃,同样,鱼藤酮混合物的另外两个吸热峰也分别从 220.9℃ 和 296.1℃ 上升至 223.3℃ 和 304.4℃,这都有力的证明了鱼藤酮被环糊精包合. 其吸热峰的改变是因为当鱼藤酮被 β -环糊精包合后,在鱼藤酮和 β -环糊精分子之间产生了较强的分子间作用力,使鱼藤酮及 β -环糊精的熔沸点等物理性质发生了较大的变化.

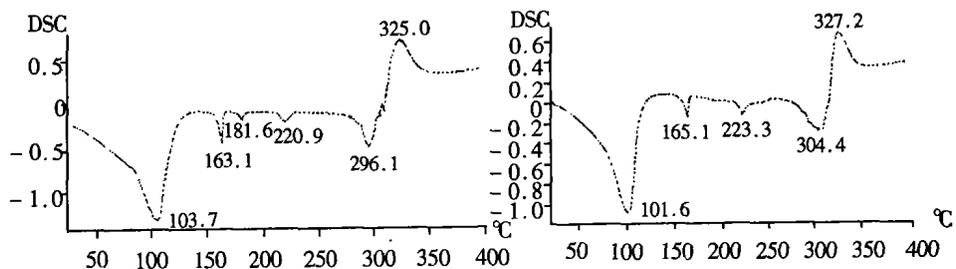


图 2 鱼藤酮与 β -环糊精的混合物的单位质量的差热分析图(左)及鱼藤酮与 β -环糊精的包合物的单位质量的差热分析图(右)

3.3 鱼藤酮的 β -环糊精和 $H\beta$ - β -环糊精包合物的稳定性

鱼藤酮的标准工作曲线:在本文所示的高效液相色谱测定条件下,鱼藤酮标样的色谱峰峰值所对

应的保留时间为 5.83 min, 获取各浓度标准溶液所对应的峰面积值, 平均平行实验结果, 按最小二乘法做出满足直线过原点的标准工作曲线 $Y=bX$. 根据最小二乘法计算出 $b=2.095.5 (mM^{-1})$, 标准工

作曲线方程为: $X=Y/2095.5$

本方程的 $R=0.99972$, $SD=206.45$, 在本工作曲线相同条件下可定量测定样品中的鱼藤酮含量。分别以 2 支平行的 30 W 的紫外灯照射 40.0 μM 的鱼藤酮及其包合物, 紫外灯管中心位置距溶液液面距离为 35 cm, 以高效液相色谱仪分别测定各色谱峰的峰面积并用标准工作曲线法计算其不同照射时间后残存的鱼藤酮的含量, 结果见表 1。

表 1 鱼藤酮及其 β -环糊精的包合物的溶液在不同时间的紫外光照射下的残余浓度(单位 μM)

| 杀虫剂及其包合物 | 残余浓度(μM) | | | | |
|-------------------------|-----------------------|------|------|------|------|
| | 0h | 12h | 24h | 36h | 48h |
| 鱼藤酮 | 40.0 | 24.2 | 15.7 | 9.7 | 7.3 |
| 鱼藤酮的 β -CD 包合物 | 40.0 | 36.4 | 32.9 | 29.0 | 26.8 |
| 鱼藤酮 Hp- β -CD 包合物 | 40.0 | 34.7 | 31.3 | 27.5 | 25.1 |

可见, 在形成环糊精或环糊精的衍生物后, 其光照稳定性大幅度增加。鱼藤酮的光照降解主要来自在光照条件下, 鱼藤酮与氧气、含氧自由基等氧化性的物质发生氧化还原反应, 使鱼藤酮变成 7-羟基鱼藤酮、去氢鱼藤酮等一系列氧化产物, 当鱼藤酮被环糊精包裹后, 鱼藤酮分子中易参与反应的化学键处于环糊精分子的内部, 特别是当鱼藤酮 C7 上的氢原子被包合在环糊精内部后, 氧气在向环糊精分子内扩散并与鱼藤酮相应化学键反应的进程中将要克服更高的能垒, 这种化学反应动力学上的障碍使得鱼藤酮的 β -环糊精的包合物和 Hp- β -环糊精的包合物比鱼藤酮更加稳定。

包合物水中溶解度的测定: 分别取 0.2 g 鱼藤酮、鱼藤酮的 β -环糊精包合物及 Hp- β -环糊精包合物, 加入 100 ml 的蒸馏水, 搅拌加热, 后将上述物质自然冷却到 20 $^{\circ}\text{C}$, 用离心机在 200 G 下离心 5 min, 取上清液进行高效液相色谱定量分析, 柱条件为: 流动相为 MeOH:H₂O=78%:22%(v/v), 检测波长为 297 nm, 检测所用的色谱柱为 C₁₈反相柱。每个试样平行测定 3 次, 根据峰面积和标准工作曲线求出各样品在水中的溶解度(表 2)。与鱼藤酮相比, 鱼藤酮的 β -环糊精包合物, 及鱼藤酮的 Hp- β -环糊精包合物的溶解度分别增加了 13.3 倍和 233.4 倍,

表 2 鱼藤酮及其包合物的 20 $^{\circ}\text{C}$ 时的溶解度

| 物质 | HPLC 峰面积 | 溶液浓度 μM | 溶解度 mg/L (鱼藤酮计) |
|--------------------------|----------|--------------------|--------------------------|
| 鱼藤酮 | 10.71 | 5.110 | 2.03 |
| 鱼藤酮的 β -环糊精包合物 | 142.6 | 68.05 | 27.04 |
| 鱼藤酮的 Hp- β -环糊精包合物 | 2582 | 1267 | 473.8 |

对松材线虫的毒力测定: 按前述方法分别测定鱼藤酮的丙酮溶液和鱼藤酮的 β -环糊精包合物及 Hp- β -环糊精包合物对松材线虫处理 48 h 后的 LC₅₀($\mu\text{g/ml}$), 结果如表 3:

表 3 鱼藤酮及其包合物对松材线虫的 48 h 的 LC₅₀($\mu\text{g/ml}$)

| | 方程 | LC ₅₀ | 95%置信区间 | 相关系数 |
|---------------------|--------------------|------------------|-----------|--------|
| 鱼藤酮丙酮溶液 | $Y=4.6257+1.2866X$ | 1.8613 | 1.52-2.28 | 0.9954 |
| β -环糊精包合物 | $Y=4.7445+1.8189X$ | 1.6234 | 1.27-1.92 | 0.9904 |
| Hp- β -环糊精包合物 | $Y=4.3809+1.6650X$ | 2.3543 | 1.99-2.78 | 0.9849 |

鱼藤酮及其包合物对松材线虫的 48 h 的 LC₅₀ 都在 2($\mu\text{g/ml}$)左右, 属于特别高效的松材线虫杀灭剂, 尽管三者对松材线虫的毒力差别不大, 但鱼藤酮的环糊精包合物有更好的稳定性与溶解性, 所以环糊精剂型的引入可以有效的弥补鱼藤酮的一些不足。

环糊精是一种由 D(+)-葡萄糖单元通过 1,4-糖苷键连接起来的环状寡糖, 可以形成一系列的环糊精的衍生物。在空穴内侧有两圈氢原子(H-3 和 H-5)及一圈处于 C-H 原子的屏蔽下的苷键, 即空腔内侧集中了氢原子和碳原子, 而在环糊精分子的外表面集中了众多的羟基, 环糊精这种特殊的分子结构使其拥有一个疏水性的内表面和亲水性的外表面, 鱼藤酮等疏水性的有机物在一定的条件下成为客体分子可以进入环糊精分子的空穴内, 形成环糊精的包合物^[4,5]。处于环糊精的外表面的亲水性羟基使得客体分子在形成包合物后溶解度有较大的提高。另外, 因客体分子被包裹在环糊精的分子内部, 在一定程度上增加了氧气等分子与客体分子接触的难度, 减缓了环糊精内客体分子被氧化的速度, 提高了客体分子的稳定性。

本文运用 Hp- β -环糊精与鱼藤酮结合生成的鱼藤酮 Hp- β -环糊精包合物在溶解度方面已达到获得高浓度的鱼藤酮水溶液的要求, Hp- β -环糊精等一系列具有各种特性的环糊精衍生物作为高效助溶稳定剂在农药中的应用将有良好的发展前景。目前环糊精作为一种剂型在农药中的应用还刚刚起步, 生物农药的环糊精剂型的研究也鲜有报道, 对于植物性农药等一些生物农药来说, 很多物质溶解性差, 光照下易降解, 在空气中的稳定性差, 有的易挥发, 因生物农药往往见效缓慢, 需较长时间才能发挥药效, 但因生物农药不稳定, 往往是在它们还没有起到杀虫、杀菌效果之前就被分解、氧化而失效, 故将环糊精包合物剂型引入生物农药特别是植物性农药具有重要的理论意义和实用价值。

在分析鱼藤酮的降解途径和探索提高其稳定性途径的基础上研制鱼藤酮的新剂型,充分发挥鱼藤酮的高效和毒性随时间延长而增加的特点,克服其低溶解性和稳定性差的局限,获得可救治和预防松材线虫病的高效防治剂,将为疫区内的松材线虫的综合治理提供可行方案,为保护我国生态环境和森林资源提供技术保障,也将对我国松材线虫病预防和根治产生深远的影响。

4 结论

鱼藤酮与环糊精可以形成分子比为 1:2 包合物,在差热分析中出现 165.1℃ 的特征差热吸收峰,当鱼藤酮形成包合物后其溶解度增加,抗紫外光照所致的氧化降解能力增强,且其包合物保持了鱼藤酮对松材线虫高效杀虫活性。

参考文献

- [1] 沈杰,陈浩,应松康.自然侵染的松材线虫在松树体内的分布与消长[J].浙江林业科技 2001 21(5):10—11
- [2] 胡林.鱼藤酮的稳定性研究及致细胞凋亡作用[C].华南农业大学博士学位论文,2003.
- [3] 徐汉虹,黄继光.鱼藤酮的研究进展.西南农业大学学报. 2001.23(2):140—143.
- [4] Yoichi Ikeda, Fumitoshi Hirayama, Hidetoshi Arima, Kaneto Uekama, Yasuyuki Yoshitake, Kazunobu Harano, NMR spectroscopic characterization of metoprolol/cyclodextrin complexes in aqueous solution: Cavity size dependency. Journal of Pharmaceutical Sciences .2004. 93(7) ;1659—1671.
- [5] Enrico Redenti, Lajos Szente, Josef Szejtli. Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs. Thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2001. 90(8) ; 979—986.
- [6] V.R. Sinha, Amita Nanda, and Rachna Kumria .Cyclodextrins as Sustained Release Carriers .Pharmaceutical Technology 2002 (10) ;36—46.

The Preparation and Characterizations of Rotenone Cyclodextrin Inclusion Complex the Bioactivity Against *Bursaphelenchus Xylophilus*

HU Lin^{1,2}, XIA Jian², ZHAN Su-lan², HUANG Xiao-dong², XU Han-hong¹,

(1. Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, South China Agricultural University, Guangzhou 5106421; 2. Institute of Applied Chemistry, East China Jiaotong University, Nanchang 330013, China)

Abstract: The purpose of these studies was to discover novel nematocides which can prevent *Bursaphelenchus xylophilus* effectively, the rotenone beta-cyclodextrin inclusion complex and HP-beta-cyclodextrin inclusion complexes were prepared in the first time. The characterizations about solution ability and stability against UV exposure were investigated. It was determined by UV-Vis spectrophotometry that rotenone and cyclodextrin formed inclusion complex in molar ratio of 1:2. Compared with rotenone, there was significant delay in the max absorb thermal point of solid-liquid Phases change from 163.1℃ to 165.1℃ that was detected by Differential Scanning Calorimetry, which indicated the formulation of inclusion complex. The solubility of rotenone-beta-cyclodextrin inclusion complex and rotenone HP-beta-cyclodextrin inclusion were 13.3 times and 233.4 times respectively than those of rotenone. The degradation by UV light exposure was decreased significantly after the formation of cyclodextrin inclusion complex. It was also found that the bioactivity of against *Bursaphelenchus xylophilus* did not change too much though the inclusion complexes were formed.

Key words: rotenone; Beta-cyclodextrin, hydroxypropyl Beta-cyclodextrin; cyclodextrin inclusion complexes; *Bursaphelenchus xylophilus*