

◆ 研究与开发 ◆

# 20%大蒜素·丁香酚水乳剂的制备及生物活性

邵晨,赵龙冬,孙立杰,孙杰,王苗苗,张保华\*

(青岛农业大学 新农药创制研究所 山东青岛 266109)

**摘要:**采用转相法制备20%大蒜素·丁香酚水乳剂,采用生长速率法测定其室内生物活性。20%大蒜素·丁香酚水乳剂的稳定配方为大蒜素5%、丁香酚15%、乳化剂WJ-630 4%、WJ-990 1%、聚乙二醇400 3%、乙二醇3%,去离子水补齐至100%。20%大蒜素·丁香酚水乳剂各项指标均符合水乳剂产品要求,对灰葡萄孢菌有较高的室内生物活性。

**关键词:**大蒜素;丁香酚;水乳剂;生物活性

中图分类号:TQ 450.6<sup>+</sup>7 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2019.05.004

## Formulation and Bioactivity of Allicin + Eugenol 20% EW

Shao Chen, Zhao Long-dong, Sun Li-jie, Sun Jie, Wang Miao-miao, Zhang Bao-hua\*

(Pesticide Research Institute, Qingdao Agricultural University, Shandong Qingdao 266109, China)

**Abstract:** Allicin + eugenol 20% EW was obtained through inverse phase method, and the bioactivity was determined with the mycelial growth rate method. The optimum formula was as follows: allicin 5%, eugenol 15%, WJ-630 4%, WJ-990 1%, polyethylene glycol 400 3%, glycol 3%, and deionized water added up to 100%. All the indexes of allicin eugenol 20% EW conformed to the requirements of EW, and this production had good bioactivity to *Botrytis cinerea*.

**Key words:** allicin; eugenol; EW; biological activity

随着社会对环境的日益重视,乳油、粉剂等传统农药剂型的环境污染问题备受关注,水乳剂(EW)作为一种不用或很少用有机溶剂的水性化制剂,具有绿色、环保、安全的优点,已经成为代替传统剂型产品尤其是乳油产品的主要环保剂型<sup>[1-3]</sup>。

植物源农药是目前一类重要的生物农药,主要是利用植物的次生代谢产物对农业病虫草害进行防治<sup>[4-5]</sup>。大蒜素是从大蒜的球形鳞茎中提取的一种具有挥发性的黄色油状物,主要成分是二烯丙基硫代亚磺酸酯。已有研究表明大蒜素对多种细菌、真菌和病毒有良好的抑制效果<sup>[6-8]</sup>。丁香酚是一种来源于丁香等植物的具有丁香香气的酚类化合物,具有抑菌、抗病毒、保鲜和增强植物抗冻性等作用<sup>[9-12]</sup>。目前,大蒜素和丁香酚均被广泛应用于医药、食品和农业领域。

基于大蒜素与丁香酚的环境友好性和广泛抑菌活性,本研究以大蒜素和丁香酚作为有效成分,结合水乳剂的配方优化,确定了20%大蒜素·丁香酚水乳剂的稳定配方,并以灰葡萄孢菌为供试菌株测定其室内生物活性,以期对20%大蒜素·丁香酚水乳剂的进一步开发应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

**原药与制剂:**大蒜素(98.5%),深圳市鼎诚植物香料有限公司;丁香酚(化学纯),国药集团化学试剂有限公司;250 g/L吡唑醚菌酯乳油,巴斯夫植物保护(江苏)有限公司。助剂:主要有苯乙基苯酚聚氧乙烯聚氧丙烯醚(乳化剂33#),邢台鑫蓝星科技有限公司;蓖麻油聚氧乙烯醚(By-125),上海忠诚

收稿日期:2019-03-14

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2014CM039),青岛农业大学生科技创新基金(2017548)

作者简介:邵晨(1997—)女,山东省临沂市人,硕士,主要从事农药制剂研究工作。E-mail:1611349200@qq.com

通信作者:张保华(1976—)男,山东省潍坊市人,博士,副教授,主要从事农药制剂研究工作。E-mail:zhangbaohua76@163.com

精细化工有限公司;聚醚磷酸酯类表面活性剂 WJ-630、WJ-990,上海万金助剂有限公司。结构调整剂:氯化钠、尿素、硅酸镁铝、聚乙二醇400、聚乙二醇600。防冻剂:乙二醇、丙三醇、1,2-丙二醇。供试病原菌:灰葡萄孢菌。

BME型密闭式实验室乳化剪切机,上海德雨机电设备有限公司;JA5003N型电子天平,上海精密科学仪器有限公司;BT-9300H型激光粒度分布仪,丹东百特仪器分析公司;三门电冰箱,青岛海尔股份有限公司;101型电热鼓风干燥箱,龙口市先科仪器有限公司;紫外分光光度检测仪,北京普析通用仪器有限责任公司;超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;恒温培养箱,宁波江南仪器厂。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 20%大蒜素·丁香酚水乳剂的制备

采用转相法制备20%大蒜素·丁香酚水乳剂。称取一定量的大蒜素与丁香酚,加入一定量乳化剂后,混合搅拌形成油相,将结构调整剂、防冻剂等助剂与蒸馏水混合形成水相。在高速剪切的过程中,将水相加入到油相中,充分混合,在3 500 r/min的剪切速度下剪切5 min,自发形成油包水型体系。

### 1.2.2 指标测定方法

按照《农药热贮稳定性测定方法》(GB/T 19136—2003)测定20%大蒜素·丁香酚水乳剂在(54±2)℃条件下贮存7 d的稳定性。按照《农药低温稳定性测定方法》(GB/T 19137—2003)测定冷贮稳定性。按照《农药乳液稳定性测定方法》(GB/T 1603—2001)测定乳液稳定性。

### 1.2.3 粒径测定方法

20%大蒜素·丁香酚水乳剂的粒径利用激光粒度分布仪测定,平行测定3次后取其平均值。

### 1.2.4 有效成分含量测定方法

参考文献[13]的方法,将20%大蒜素·丁香酚水乳剂、大蒜素标准品、丁香酚标准品分别用无水乙醇溶解稀释,用紫外分光光度计在200~400 nm对大蒜素、丁香酚的标准品进行光谱扫描,得到两种有效成分的最大吸收波长。在其最大吸收波长下,分别测定不同稀释浓度的大蒜素、丁香酚的吸光度,得到大蒜素、丁香酚的标准曲线  $y=0.1396x+0.364$  ( $R^2=0.9937$ )  $y=0.0197x+0.0263$  ( $R^2=0.9928$ )。分别在两个吸收波长下,测定20%大蒜素·丁香酚水乳剂的吸光度,计算制剂中有效成分大蒜素、丁香酚的含量。

### 1.2.5 生物活性测定方法

以灰葡萄孢菌为供试菌,采用生长速率法测定

20%大蒜素·丁香酚水乳剂对供试菌株的室内生物活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳化剂的筛选

#### 2.1.1 单一乳化剂的筛选结果

水乳剂中的乳化剂可使油水的界面张力和表面自由能降低,而且乳化剂具有空间位阻作用和静电作用,促使乳液体系更加稳定<sup>[14]</sup>。5种单一乳化剂对20%大蒜素·丁香酚水乳剂各项性能的影响见表1。乳化剂加入量为5%。

表 1 5种单一乳化剂对20%大蒜素·丁香酚水乳剂各项性能的影响

乳化剂	外观	乳液稳定性	热贮稳定性	冷贮稳定性
By-125	有油滴	分层	分层	分层
乳化剂33#	有油滴	不分层	分层	分层
WJ-630	均相	不分层	少量析水	不分层
WJ-990	均相	不分层	少量析水	不分层
Termul-5030	均相	不分层	少量油析出	不分层

结果显示,在5种备选乳化剂中,WJ-630、WJ-990各项性能相对较好,常温放置一段时间无油滴析出,热贮有少量析水分层。这两种乳化剂的 $D_{10}$ 值、 $D_{50}$ 值和 $D_{90}$ 值较小(图1)。因此,选择WJ-630、WJ-990两种乳化剂用于复配乳化剂的筛选优化。

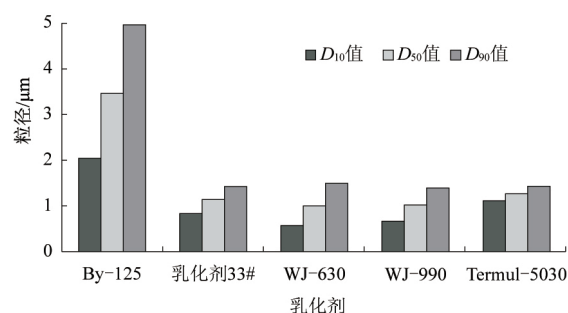


图 1 5种乳化剂对20%大蒜素·丁香酚水乳剂粒径的影响

#### 2.1.2 复配乳化剂的筛选结果

不同的乳化剂具有不同的亲水亲油特性,通过乳化剂复配可以实现乳化剂的协同作用,提高水乳剂的各项性能和制剂的稳定性。结合以上对单一乳化剂的筛选结果,将WJ-630、WJ-990两种乳化剂按不同质量比例复配,总用量为5%。结果见表2和图2。

结果显示,两种乳化剂复配后对水乳剂体系的稳定性均有影响。在不同复配比例中,当WJ-630和WJ-990的质量比为4:1时,水乳剂各项性能指标较好,具有较小的粒径和粒度范围。但此配方长时

间贮存后仍有微量水析出,需要加入结构调整剂改善水乳剂的稳定性。

表2 乳化剂质量比的筛选

$m_1:m_2$	外观	乳液稳定性	热贮稳定性	冷贮稳定性	综合评价
2:3	有油滴	分层	沉油	不合格	不合格
3:2	有油滴	分层	有分层	不合格	不合格
1:4	合格	合格	有分层	合格	不合格
4:1	合格	合格	微量析水	合格	合格

注  $m_1$ 为乳化剂WJ-630的质量,  $m_2$ 为乳化剂WJ-990的质量。

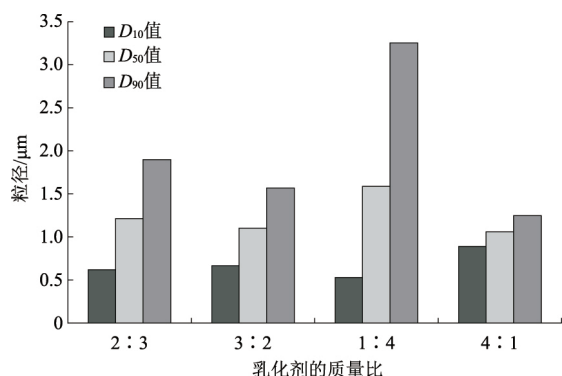


图2 乳化剂的不同质量比对水乳剂粒径的影响

## 2.2 结构调整剂的筛选

结构调整剂可以通过调节体系黏度、多相的密度差等方式,降低分散相微粒的沉降聚结速度,提高水乳剂体系的稳定性。在对乳化剂筛选的基础上,选择几种结构调整剂进一步改善水乳剂的各项性能,结果见表3和图3。结构调整剂加入量为3%。

表3 结构调整剂的筛选结果

结构调整剂	外观	乳液稳定性	热贮稳定性	冷贮稳定性
氯化钠	合格	分层	合格	分层
尿素	合格	良	合格	合格
硅酸镁铝	合格	少量析水	合格	合格
聚乙二醇400	合格	优	合格	合格
聚乙二醇600	合格	良	合格	合格

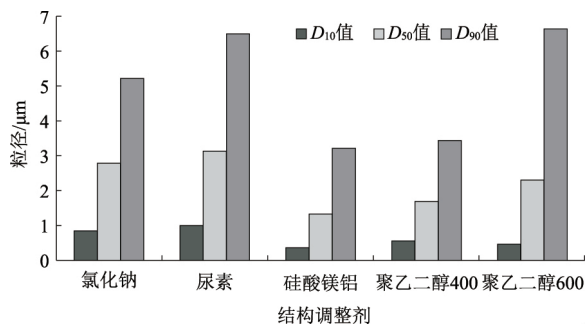


图3 结构调整剂对水乳剂粒径的影响

结果显示,不同结构调整剂对水乳剂的外观影响不大,均能达到合格,但乳液稳定性存在差异。综

合各项性能测定结果,加入聚乙二醇400的水乳剂体系具有良好的稳定性,且其能够使水乳剂体系保持较小的粒径和较窄的粒度范围。因此,选择聚乙二醇400作为水乳剂的结构调整剂。

## 2.3 防冻剂的筛选结果

水乳剂作为一种油水分散体系,在低温条件下易冻结结冰,防冻剂的加入可以保障其在低温下依然保持良好的流动性,使水乳剂在低温时保持良好稳定性。经过对4种防冻剂的筛选,发现加入3%乙二醇时,水乳剂乳液稳定性、分散性等性能表现良好。

## 2.4 配方的确定及性能测定

经过筛选,确定20%大蒜素·丁香酚水乳剂的优化配方为:大蒜素5%、丁香酚15%、WJ-630 4%、WJ-990 1%、聚乙二醇400 3%、乙二醇3%,用去离子水补足至100%。所制水乳剂产品指标检测结果见表4,均达到产品标准要求。

表4 20%大蒜素·丁香酚水乳剂指标检测结果

项目	指标	检测结果
外观		均一、稳定的乳白色液体
乳液稳定性	合格	合格
分散稳定性	合格	合格
冷贮稳定性	合格	合格
热贮分解率	<5%	合格
pH值	5.0~9.0	6.5
$D_{50}$ 值/ $\mu\text{m}$		1.22

## 2.5 生物活性测定结果

以灰葡萄孢菌作为供试菌,25%吡唑醚菌酯乳油作为对照药剂,测定20%大蒜素·丁香酚水乳剂的室内抑菌活性。通过表5可以看出,20%大蒜素·丁香酚水乳剂在所有稀释倍数下对灰葡萄孢菌均有较好的抑菌效果,其500倍稀释液与25%吡唑醚菌酯乳油1500倍稀释液的抑菌效果相当。

表5 20%大蒜素·丁香酚水乳剂对灰葡萄孢菌的抑菌率(72h)

药剂	稀释倍数	抑制率/%
20%大蒜素·丁香酚水乳剂	500	92.41
	1000	74.35
	1500	69.76
25%吡唑醚菌酯乳油	1500	95.59

## 3 结论和讨论

通过对乳化剂、结构调整剂、防冻剂及其配比的筛选和优化,确定了20%大蒜素·丁香酚水乳剂的最终配方为:大蒜素5%、丁香酚15%、复配乳化剂WJ-630 4%、WJ-990 1%、结构调整剂聚乙二醇400

3%、防冻剂乙二醇3%,去离子水补足至100%,所制备的水乳剂各项指标均达到产品标准。室内生物活性测定结果表明,20%大蒜素·丁香酚水乳剂在稀释500倍时,对灰葡萄孢菌的抑制率为92.41%,与25%吡唑醚菌酯乳油1500倍稀释液的抑菌效果相当。

丁香酚和大蒜素均是从植物中提取的天然活性成分,具有良好的环境相容性,将其作为原药制成水基化制剂水乳剂在病虫害绿色防控中具有环保优势。但由于二者存在易氧化、水解等不稳定性<sup>[15-16]</sup>,限制了其水基化制剂的开发和应用推广。本研究通过系统筛选水乳剂的助剂得到了稳定配方,能够为大蒜素和丁香酚相关制剂产品的研究提供参考。

#### 参考文献

- [1] 季庆祥,曲红杰,李晓花,等. 农药水乳剂的组成及发展优势[J]. 农业开发与装备, 2013, 5(11): 87-88.
- [2] 冯建军,张小军,赵哲伟,等. 农药水乳剂用乳化剂的应用研究现状[J]. 农药, 2012, 51(10): 706-709; 723.
- [3] 史雅丽,郁倩瑶,孙陈铨,等. 农药水乳剂物理稳定性的研究进展[J]. 日用化学工业, 2016, 46(3): 173-177.
- [4] 吴传万,杜小凤,徐建明,等. 植物源抑菌活性成分研究新进展[J]. 西北农业学报, 2004, 13(3): 81-88.
- [5] 刘敏艳,胡冠芳,余海涛,等. 绣球小冠花等35种植物提取物对粘虫的杀卵作用研究[J]. 草业学报, 2012, 21(4): 198-205.
- [6] Cloves A C, Melissa C, David M, et al. Antimalarial Activity of Al-

- licin, A Biologically Active Compound from Garlic [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(5): 1731-1737.
- [7] 潘兴寿,蓝景生,李天资,等. 大蒜素治疗病毒性心肌炎疗效分析[J]. 右江医学, 2010, 38(2): 120-122.
- [8] 时威,张岩,白阳,等. 大蒜素的抑菌作用及稳定性研究[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(3): 56-61.
- [9] Burt S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods: A Review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(3): 223-253.
- [10] 张猛. 植物源杀菌剂20%丁香酚水乳剂对草莓灰霉病的田间防治效果[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 132-133.
- [11] 李磊,易有金,夏波,等. 丁香酚改性产物对葡萄采后保鲜的作用[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(10): 180-185.
- [12] 黄琦辉,简凯丽,黄琦,等. 丁香酚熏蒸对青茄采后冷害和脯氨酸代谢的影响[J]. 核农学报, 2018, 32(5): 907-915.
- [13] 杜卓,刘芳,谭淑仪,等. 紫外分光光度法测定丁香油膜剂丁香酚含量的方法学研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 315-316.
- [14] Foudazi R, Qavi S, Masalova I, et al. Physical Chemistry of Highly Concentrated Emulsions [J]. Adv Colloid Interface Sci, 2015, 220: 78-91.
- [15] Woranuch S, Yoksan R. Eugenol-loaded Chitosan Nanoparticles: I. Thermal Stability Improvement of Eugenol Through Encapsulation [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96(2): 578-585.
- [16] Zhang H, Chingin K, Zhu L, et al. Molecular Characterization of Ongoing Enzymatic Reactions in Raw Garlic Cloves Using Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(5): 2878-2883.

(责任编辑:石凌波)

(上接第6页)

后,无公害农产品申报认证制度将更加完善,更符合市场需求,更有利于保障和提升农产品的质量安全。

## 7 建议和思考

“三品”大米和稻谷检测标准要适当增加检测覆盖面。建议在无公害和有机大米标准中增加感官检测要求。无公害大米和稻谷标准、有机稻谷标准农药残留检测品种较少,考虑适当增加。对于重金属污染物和真菌毒素残留限量值要求,有机大米和稻谷标准都低于绿色大米稻谷标准,可以适当提高标准,加快标准修订。

“三品”检测标准制定要与时俱进。目前使用的无公害大米和稻谷标准于2015年制定,绿色大米标准于2014年制定,绿色稻谷标准于2016年制定,有机大米和稻谷标准于2017年制定。人民生活水平日益提高,对食品安全提出新要求,“三品”标准

需要及时更新。

“三品”检测标准制定要与国际接轨。标准制定过程中要结合国际贸易市场的要求,借鉴国外优质农产品检测标准,完善我国标准。

#### 参考文献

- [1] 欧燕芳,李川山,王全永,等. 广西糙米米粉标准化现状和对策[J]. 大众科技, 2018, 20(225): 136-138.
- [2] 金连登,朱智伟,许立. 我国“三品”大米生产与认证的法规及技术标准要素研究[J]. 中国稻米, 2006(2): 1-6.
- [3] 覃世民. 科学认识并有效应对稻米质量安全问题[J]. 粮食科技与经济, 2014, 39(4): 14-17.
- [4] 胥直秀,张琼秀,何文斌,等. 针对有机水稻认证中部分重金属检测标准的探讨[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(32): 12711-12712; 12715.
- [5] 康月琼,柴勇,杨俊英,等. 绿色食品大米的准确评价及标准修改建议[J]. 南方农业, 2007, 1(5): 56-60.
- [6] 冯爱国. 新时期我国“三品一标”的发展形式和任务[J]. 农产品质量安全, 2015(2): 3-5.

(责任编辑:徐娟)