

双改性壳聚糖载药纳米胶束的制备及其性能研究

周 闯^{1,2}, 张 利², 李普旺¹, 何祖宇¹, 王 超¹, 刘运浩¹, 宋书会¹, 谢木标³, 杨子明^{1*}

(1. 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 海南省热带园艺产品采后生理与保鲜重点实验室, 湛江 524091; 2. 中国热带农业科学院农产品加工研究所, 湛江 524001; 3. 岭南师范学院 化学化工学院, 湛江 524048)

摘要: 纳米载体由于对药物的包封和释放作用, 可以有效地保护杀虫剂中药物分子免受外界条件的降解, 且对目标害虫具有缓慢释放作用, 在农业科学、生物科学等领域得到了大量的应用。本文通过酰基化反应将 α -亚麻酸(ALA) 疏水性脂肪长链和尿素(urea) 亲水性基团接枝到羧甲基壳聚糖上, 制备两亲性壳聚糖衍生物(U-CMCS-*g*-ALA), 并通过红外光谱、核磁氢谱对其结构进行表征。然后, 以 U-CMCS-*g*-ALA 为壁材, 噻虫胺(CTD) 为芯材, 采用超声波自组装的方法制备了载药纳米胶束 CTD@U-CMCS-*g*-ALA。扫描电镜显示纳米胶束呈球形, 粒径分布均匀, 平均粒径约为 465 nm, 在室温条件下具有缓释性能和 pH 响应性能, 在弱酸和中性环境中(pH=6.5, pH=7.4) 可以释放出更多的药物。最后通过人工饲料掺入法对甘蔗螟虫测试抗拒食活性, 结果显示载药纳米胶束能有效抑制甘蔗螟虫的生长发育, 具有一定的杀虫性能。

关键词: 羧甲基壳聚糖; 两亲性; 纳米胶束; 自组装; 杀虫

甘蔗螟虫是我国蔗区分布最广、为害最严重的一类害虫, 均以幼虫钻蛀为害蔗苗和蔗茎组织, 造成枯心苗和螟害节, 进而使甘蔗糖分和产量降低。近年来其发生呈现爆发性、常年发生等特征, 给甘蔗产业造成较大威胁。近几年, 纳米材料与技术农业领域中的应用取得了一定进展, 利用纳米科学与技术开发高效、安全的农药新剂型, 提高药效成分的生物活性及靶标利用率, 延长持效期, 减少有机溶剂与助剂的含量, 实现化学农药的提质增效、减量减排, 已经成为当前的研究热点。

羧甲基壳聚糖是壳聚糖的衍生物^[1~3], 具有生物相容性^[4]、可降解性^[5]、粘附性^[6]等特性, 可以溶解在具有较宽 pH 范围的水溶液中, 由于其同时含有 $-NH_2$ 和 $-COOH$ 基团, 这使得该类聚合物具有多功能性, 常被用作药物递送的载体骨架, 在医药、食品、化工、农业等方面有广泛的用途^[7~9]。近年来, 壳聚糖及其衍生物在农业中的应用研究引起了人们的广泛关注, 尤其在抑制病虫害方面逐渐成为研究的热点^[10,11]。科研工作者通过将各种化学基团通过接枝或离子反应来修饰壳聚糖骨架(C2 的氨基以及 C3 和 C6 的羟基), 调节其生物活性^[12] 和细胞相容性^[13]。Xu 等^[14] 通过化学交联制备了可生物降解的壳聚糖-丙交酯共聚物, 其可作为疏水性农药-啉菌胺酯载体。Zhang 等^[15] 利用壳聚糖与聚丙交酯和 1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺反应, 制备了负载亲脂性有机磷农药毒死蜱共聚物的纳米颗粒。Chen 等^[16] 通过壳聚糖接枝制备了一种新型聚(L-组氨酸)-壳聚糖/藻酸盐复合物微胶囊, 其表面光滑和具有较窄的尺寸分布范围, 可以作为一种药物载体材料。Fan 等^[17] 采用聚氨基乙基和二乙氧基磷酸基团接枝壳聚糖, 合成了新型水溶性功能性壳聚糖衍生物, 该衍生物具有比壳聚糖更好的抗真菌活性和水溶性, 以及良好的生物相容性, 这些壳聚糖衍生物可以作为抗真菌剂开发用于植物保护。Dong 等^[18] 以羧酸化聚乙二醇单甲醚为亲水基团、N-乙酰-L-异亮氨酸为疏水基团制备了两亲性壳聚糖, 并对多杀菌素进行包

10.14028/j.cnki.1003-3726.2022.10.011

收稿: 2021-10-25; 修回: 2022-04-26;

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金资助(2019A1515010714), 海南省自然科学基金资助(520MS094, 421MS078), 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630062022006, 1630062022023), 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项资金(2019KJ140), 海南省科技厅科技项目(ZDYF2021XDNY145);

作者简介: 周闯(1992-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为生物质高分子材料;

* 通讯联系人: 杨子明, E-mail: yangziming2004@163.com.

埋,发现其对尖孢镰刀菌具有较好的抑制能力。

本文通过化学偶联法将亚麻酸(ALA)和尿素(urea)分别接枝羧甲基壳聚糖(CMCS),制备两亲性壳聚糖衍生物(U-CMCS-*g*-ALA),并通过傅里叶红外光谱和核磁共振氢谱对其结构进行了表征。同时采用超声自组装法,制备了负载噻虫胺的壳聚糖纳米胶束,并对载药纳米胶束的理化特性和缓释性能进行了表征,并研究了其对甘蔗螟虫的杀虫性能。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

羧甲基壳聚糖(CMCS, $M_w = 1.0 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^4$, 脱乙酰度 $\geq 85\%$, 羧甲基化度 $\geq 80\%$)、 α -亚麻酸(ALA)购自上海麦克林生化有限公司。1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)购自上海阿拉丁试剂有限公司。乙醇、尿素由天津市富宇精细化工有限公司提供;噻虫胺购自上海源叶生物科技有限公司。

本实验使用的仪器有电热恒温鼓风干燥箱、分析天平、冷冻干燥机(Alpha 2-4 LSC, 德国 christ)、荧光分光光度计(F7000, 日本日立)、傅里叶红外光谱仪(Tensor 27, 德国 Bruker)、核磁共振仪(DPX300, 德国 Bruker)、马尔文动态光散射仪(Zetasizer Nano ZS, 英国),场发射扫描电镜(S4800, 日本日立),探针型超声波仪(JY92-II, 中国)等。

1.2 实验步骤

1.2.1 羧甲基壳聚糖-亚麻酸二元共聚物的制备(CMCS-*g*-ALA) 称取 0.278 g CMCS 溶解在 40 mL 去离子水中。将 0.278 g (0.001 mol) ALA 溶解在 40 mL 的乙醇中,加入 0.2876 g (0.0015 mol) 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 0.1725 g (0.0015 mol) *N*-羟基丁二酰亚胺(NHS),搅拌混合均匀。然后,将 CMCS 溶液转移至三口烧瓶中,加热至 80 °C,并在剧烈搅拌下将含有 EDC 和 NHS 的 ALA 溶液滴加到 CMCS 溶液中,在 80 °C 下反应 5 h。之后,将反应混合物冷却至室温并继续反应 12 h。接着,将反应混合物用蒸馏水透析(截留分子量 3000 Da)48 h,每隔一段时间更换新鲜蒸馏水。最后,将透析的悬浮液冻干,得到 CMCS-*g*-ALA 共聚物。

1.2.2 羧甲基壳聚糖-亚麻酸-尿素三元共聚物的制备(U-CMCS-*g*-ALA) 称取 0.2 g 上述实验制备的 CMCS-*g*-ALA 共聚物溶于 40 mL 去离子水中,随后加入 0.2 g EDC 和 0.1g NHS,搅拌混合均匀。然后,将含有 0.2 g 尿素的 20 mL 水溶液滴加到上述反应溶液中,在 80 °C 下反应 5 h。之后,将反应混合物冷却至室温并再继续反应 12 h。接着,将反应混合物用蒸馏水彻底透析(截留分子量 3000 Da) 48 h。最后,经过冷冻干燥得到 U-CMCS-*g*-ALA 三元共聚物。

1.2.3 两亲性壳聚糖纳米胶束的制备 称取 20 mg 的羧甲基壳聚糖-亚麻酸-尿素三元共聚物(U-CMCS-*g*-ALA),加入 100 mL 的去离子水,搅拌至体系均匀,然后在 0 °C 冰水浴的条件下,使用探针型超声波仪在 250 W 下持续 5 min,重复处理 3 次,获得光学透明的分散体,即得 U-CMCS-*g*-ALA 纳米胶束。

1.2.4 负载噻虫胺壳聚糖纳米胶束(CTD@U-CMCS-*g*-ALA)的制备 取 10 mL 不同浓度的噻虫胺(CTD)甲醇溶液(2~60 mg/L),加入 100 mL 浓度为 0.2 mg/mL 的空白纳米胶束水溶液,搅拌 3 h,用去离子水透析,以除去甲醇,然后使用探针型超声波仪在 250 W 下持续 5 min,重复处理 3 次,得到负载噻虫胺(CTD)壳聚糖纳米胶束(CTD@U-CMCS-*g*-ALA)。

噻虫胺标准溶液的标准曲线方程:配制浓度分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 $\mu\text{g/mL}$ 的噻虫胺的甲醇溶液,在 265 nm 处测定噻虫胺的吸光度值,根据紫外分光光度计测量结果绘制噻虫胺的标准曲线,并拟合方程($A = 0.13274C - 0.07868, R^2 = 0.9976$)。

包封率(EE)和载药率(LC)的测定:将 20 mL 上述 CTD@U-CMCS-*g*-ALA 溶液,在 10000 r/min 的转速下离心 10 min,取上清液,通过紫外分光光度计计算噻虫胺的含量。按以下公式计算包封率(EE)和

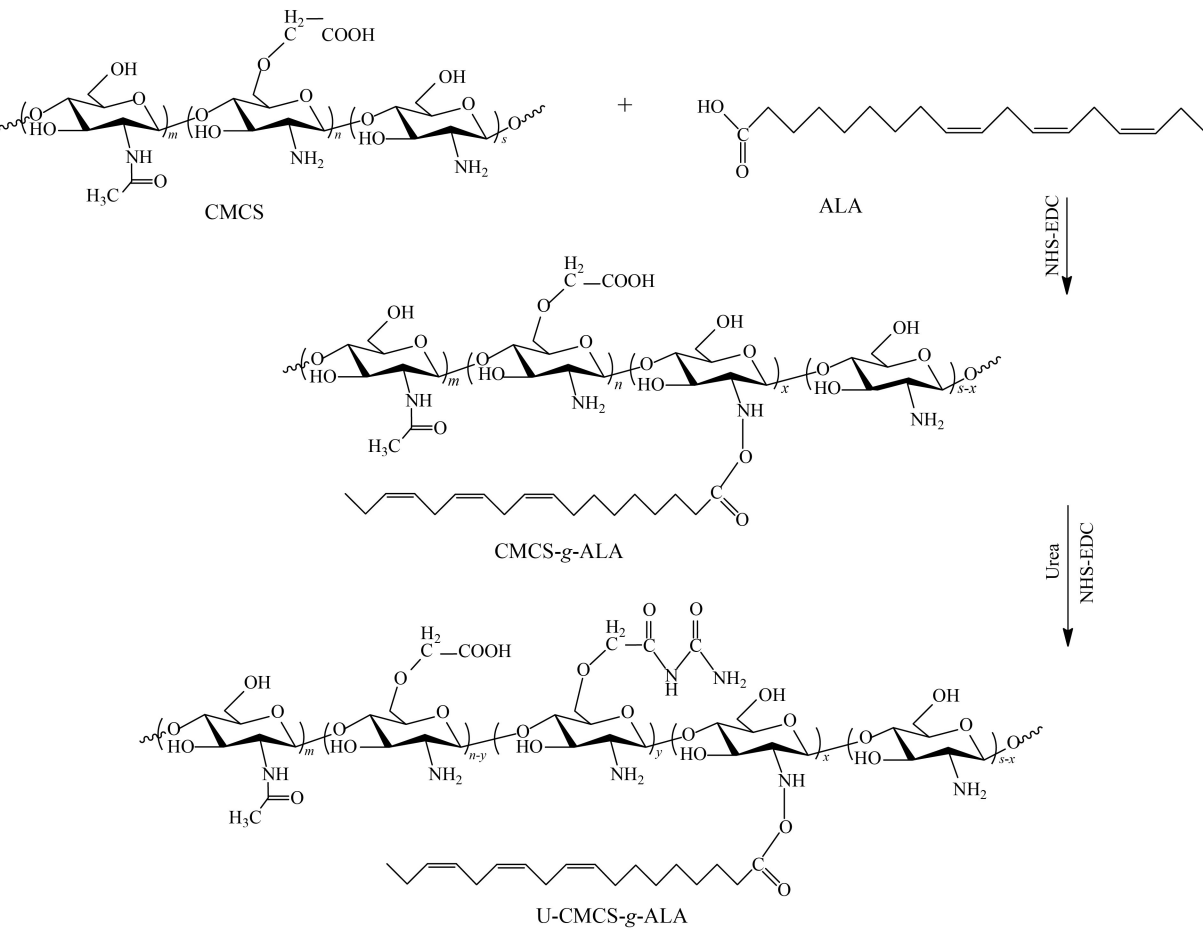


图 1 两亲性壳聚糖合成机理图

Figure 1 Synthesis and chemical structure of amphiphilic chitosan

载药量(LC)：

$$EE(\%) = \frac{m - m_e}{m} \times 100\%$$

$$LC(\%) = \frac{m - m_e}{W} \times 100\%$$

在上述方程式中， m 是加入噻虫胺的总量， m_e 是上清液中噻虫胺的量， W 是载药纳米胶束的总量。

1.3 测试与表征

(1)共聚物的结构表征：采用美国赛默飞公司 Nexus 670 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)对共聚物官能团进行表征，该光谱扫描范围为 $400\sim4000\text{ cm}^{-1}$ 。采用 Bruker 公司 AV600 核磁共振波谱仪对样品进行氢谱分析，利用四甲基硅烷(TMS)作为内标物，重水作为样品溶剂，鉴定共聚物的结构。

(2)载药胶束的性能表征：通过动态光散射仪(Zetasizer Nano ZS,英国)测定纳米胶束的平均粒度和粒度分布；采用扫描电子显微镜(S-4800,日本)观察产物的微观形貌。

1.4 缓释性能

取 20 mL 的 CTD@U-CMCS-g-ALA 载药纳米胶束溶液放置于透析袋中(截留分子量为 3500 Da)，在磷酸盐缓冲盐溶液(pH 分别为 6.5、7.4、8.0)中透析。分别取不同时间点的透析液，采用紫外分光光度计法测定药物释放量，并用等量的 PBS 缓冲溶液代替取出的透析液。

1.5 杀虫性能

通过人工饲料掺入法对甘蔗螟虫测试抗拒食活性，将 U-CMCS-g-ALA、CTD 和 CTD@U-CMCS-g-

ALA 分别掺入到人工饲料中,混合均匀,掺入药物的质量百分浓度为 0.1%、0.3% 和 0.5%,饲料重 1.0 g。将处理好的饲料与大小一致的三龄幼虫(饥饿 3 h)分别放置于 100 孔板的人工饲养格内,供其取食生长。经过 24 h 的处理后,分别称量空白和药物处理组的重量,每个浓度设置 3 个重复,每个重复设置 20 头幼虫,所有试验组均放置于人工气候箱中。饲养条件如下:温度 27 ± 1 °C;相对湿度 60%~70%;光周期 14 h:10 h(L:D)。试验 48 h 后,检查试虫死亡数计算死亡率。根据以下公式计算抗拒食活性:

$$\text{死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡幼虫数目}}{\text{总幼虫数目}} \times 100\% \quad (3)$$

2 结果与讨论

2.1 U-CMCS-g-ALA 的红外表征

图 2 为 ALA (a)、CMCS (b)、CMCS-g-ALA (c)、U-CMCS-g-ALA (d) 的红外光谱图。在 ALA (a) 的谱图中, 3013 cm^{-1} 为 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 伸缩振动吸收峰, 2926 、 2852 cm^{-1} 亚麻酸直链中亚甲基 CH_2 的不对称和对称伸缩振动吸收峰, 1741 cm^{-1} 为羰基 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动吸收峰, 1151 、 1097 cm^{-1} 为 $\text{Ar}-\text{COOR}$ 中酯基的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动吸收峰。在 CMCS (b) 的谱图中, 光谱特征峰如下: 3432 cm^{-1} 为 CMCS 结构中的 $\text{O}-\text{H}$ 和 $\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动吸收峰, 1602 cm^{-1} 为酰胺基的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰, 1415 cm^{-1} 为 $\text{N}-\text{H}$ 的平面弯曲振动吸收峰, 1310 cm^{-1} 为甲基和亚甲基的 $\text{C}-\text{H}$ 弯曲振动吸收峰, 1066 cm^{-1} 归因于 CMCS 中的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动吸收峰。而相较于 CMCS (b) 的红外谱图, 在 CMCS-g-ALA (c) 的红外谱图中, 在 3013 、 2926 、 2852 、 1741 cm^{-1} 出现了新的特征峰, 其为亚麻酸的双键、甲基、亚甲基以及羰基的特征吸收峰, 同时在 3432 cm^{-1} 的吸收峰强度 ($-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 的特征峰) 降低, 说明亚麻酸 (ALA) 接枝到 CMCS 上。而相较于 CMCS-g-ALA (c) 的红外谱图, 在 U-CMCS-g-ALA (d) 的红外谱图中, 出现了 1650 cm^{-1} 的吸收带, 该吸收带属于脲基的 $\text{C}=\text{O}$ 振动吸收峰, 因此, 可以证明尿素与 CMCS-g-ALA 结合, 得到了 U-CMCS-g-ALA 共聚物。

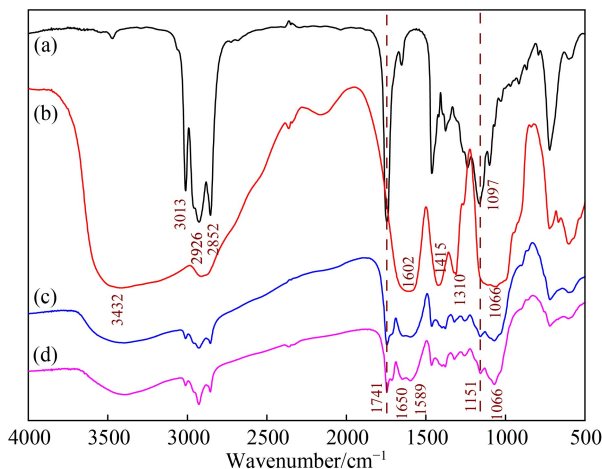


图 2 ALA(a)、CMCS (b)、CMCS-g-ALA (c)、U-CMCS-g-ALA (d) 的红外光谱图

Figure 2 FTIR spectra of ALA (a), CMCS (b), CMCS-g-ALA (c) and U-CMCS-g-ALA (d)

2.2 U-CMCS-g-ALA 的核磁氢谱表征

图 3 为 ALA、CMCS、CMCS-g-ALA 和 U-CMCS-g-ALA 的核磁氢谱图。在 CMCS 的 ^1H -NMR 谱图中, $\delta=4.7$ 处的化学位移值归因于氘化溶剂 (D_2O), $\delta=3.25\sim 4.25$ 处的化学位移值归属于环质子峰 (CMCS 的 H-3, 4, 5, 6, 6'), $\delta=2.0$ 处的峰归属于 N -乙酰氨基葡萄糖的甲基氢 ($\text{CH}_3-\text{C}=\text{O}$)。在 CMCS-g-ALA 的 ^1H -NMR 谱图中, $\delta=0.89$ 、 1.03 和 1.22 处的新质子峰归属于甲基和亚甲基的质子信号峰, $\delta=2.84$ 为 ALA 两个双键中间的亚甲基的质子信号峰, $\delta=5.28$ 不饱和双键 $\text{CH}=\text{CH}$ 的质子信

号峰, $\delta=4.11$ 处的新峰归因于酰胺基($\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2$)的质子氢特征吸收峰,可以证实 ALA 与 CMCS 发生了偶联接枝反应,共聚物 CMCS-*g*-ALA 制备成功。此外,在 U-CMCS-*g*-ALA 的 ^1H -NMR 谱图中, $\delta=4.11$ 处的酰胺基($\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2$)的质子氢特征吸收峰变宽,表明尿素的氨基与 CMCS-*g*-ALA 支链的羧基结合形成新的酰胺键,由此证明 U-CMCS-*g*-ALA 制备成功。

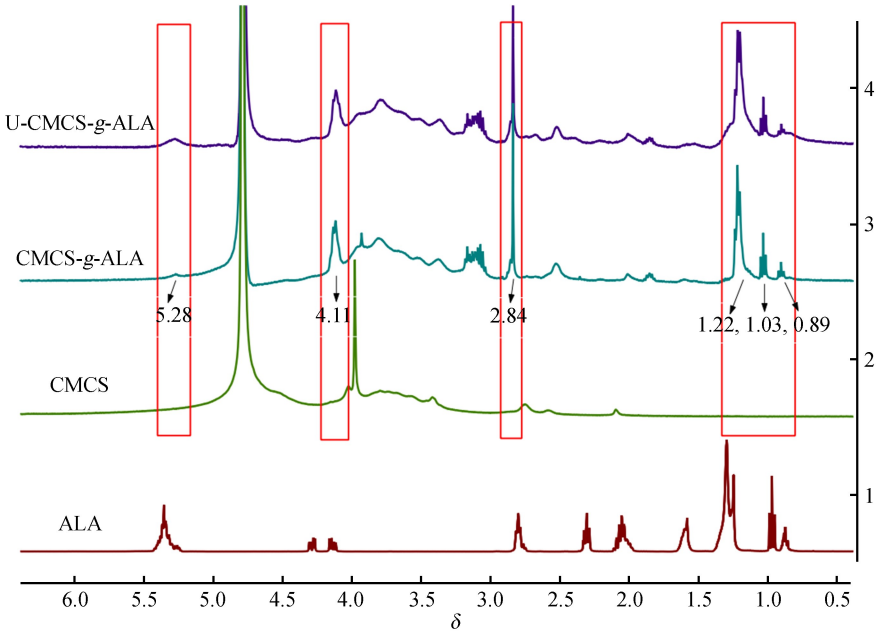


图 3 ALA,CMCS,CMCS-*g*-ALA 和 U-CMCS-*g*-ALA 的核磁氢谱图
Figure 3 ^1H -NMR spectra of ALA, CMCS, CMCS-*g*-ALA and U-CMCS-*g*-ALA

2.3 U-CMCS-*g*-ALA 的临界胶束浓度

两亲性壳聚糖在水中能自组装形成纳米胶束,其原理是两亲性壳聚糖水溶液高于一定浓度后,亲水基团与水充分接触,溶液界面自由能减少,疏水基团之间相互作用而聚集,形成“核壳”结构。两亲性壳聚糖在水中自组装构成“核壳”结构的最低浓度为临界胶束浓度(CMC)。在 U-CMCS-*g*-ALA 溶液中,由于芘具有疏水性,极易进入疏水内核。芘经包埋后,荧光强度稳定且发射光谱强度发生变化。浓度对数和 I_{381}/I_{393} 比值的直线相交点为临界胶束浓度点。如图 4 所示,通过芘荧光方法测得的 U-CMCS-*g*-ALA 的临界胶束浓度为 5.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4 CTD@U-CMCS-*g*-ALA 包封率和载药量

通过紫外分光光度计研究噻虫胺投料量对 CTD@U-CMCS-*g*-ALA 的包封率和载药量的影响,图 5 为不同噻虫胺含量下的 CTD@U-CMCS-*g*-ALA 的包封率(EE)和载药量(LC)数据图。从图中可以看出,噻虫胺的浓度从 2 mg/L 增加到 30 mg/L ,CTD@U-CMCS-*g*-ALA 的包封率 EE 值由最初的 85.14%急剧下降到 43.25%,之后随着噻虫胺浓度的增加,EE 值再由 43.25%缓慢降至 39.79%,而载药率 LC 值随着噻虫胺浓度的增加,缓慢地上升,当噻虫胺浓度为 30 mg/L 时,LC 值则为 17.18%,继续增加噻虫胺的浓度,LC 值变化不明显。因此,综合包封率(EE)和载药量(LC)的数据,噻虫胺最适宜的添加浓度为 30 mg/L 。

2.5 CTD@U-CMCS-*g*-ALA 载药纳米胶束的粒径和形貌表征

图 6 为 CTD@U-CMCS-*g*-ALA 粒径分布和扫描电镜图。从图 6(a)中可以看出,CTD@U-CMCS-*g*-ALA 粒径呈现正态分布,主要集中在 400~600 nm 之间,平均粒径约为 465 nm。从图 6(b)中可以看出 CTD@U-CMCS-*g*-ALA 为颗粒较为规整的近似球形,且分布较为均匀,未发生明显聚集的现象。

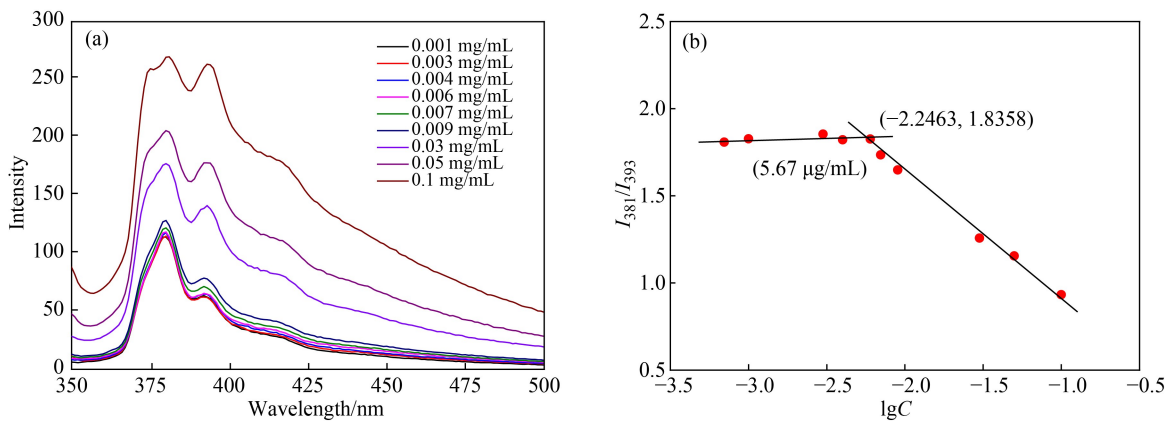


图 4 U-CMCS-*g*-ALA 的芘荧光光谱(a)和 I_{381}/I_{393} 作为 $\lg C$ 的函数关系图(b)

Figure 4 Fluorescence spectra of pyrene in U-CMCS-*g*-ALA aqueous solution with different concentrations (a); Plot of the intensity ratio I_{381}/I_{393} as a function of $\lg C$ (b)

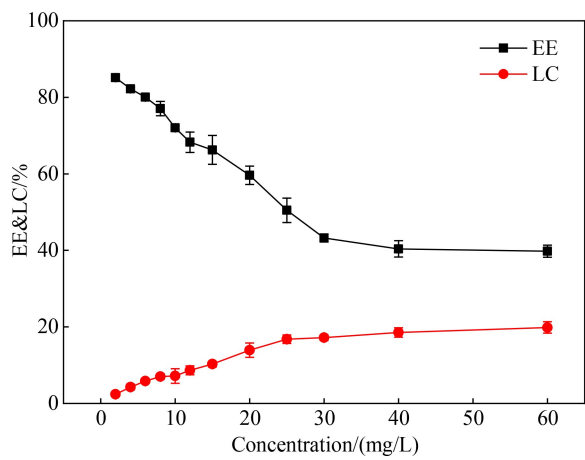


图 5 噻虫胺投料量对包封率和载药量的影响

Figure 5 EE and LC values of CTD@U-CMCS-*g*-ALA with different CTD concentrations

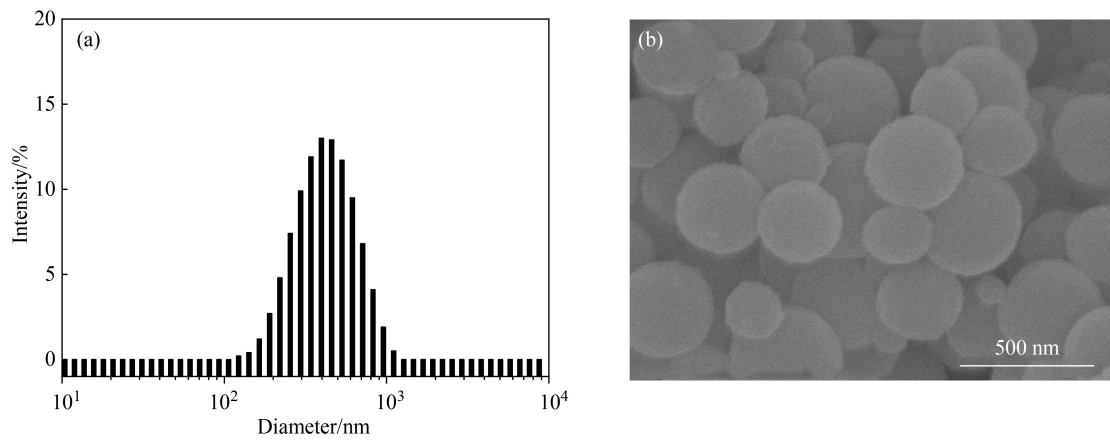


图 6 CTD@U-CMCS-*g*-ALA 粒径分布图(a)和扫描电镜图(b)

Figure 6 Particle size distribution (a) and SEM image (b) of SSD@CS-*g*-EA-NAC

2.6 CTD@U-CMCS-g-ALA 的缓释性能

通过紫外分光光度计测定噻虫胺载药纳米胶束在不同 pH 环境下的缓释性能,图 7 为 CTD@U-CMCS-g-ALA 在不同 pH 下缓释曲线图。从图中可以看出,载药纳米胶束表现出良好的缓释性和 pH 响应性能。并且,在不同 pH 值的磷酸盐缓冲液下,载药纳米胶束的体外释放均具有两个阶段:突释阶段和缓释阶段。突释是由于在酸性和弱碱性条件下,诱导变形效应改变了纳米胶束的外部结构,使纳米胶束变得更松散并从囊泡间释放出更多的药物;缓释性能是由于疏水性噻虫胺与胶束内核疏水基团的强相互作用阻止了药物的快速释放。此外,纳米胶束在 pH=6.5 和 7.4 的缓冲溶液中的累积释放量高于 pH=9.0,这是由纳米胶束的结构决定的。两亲性壳聚糖 U-CMCS-g-ALA 骨架上存在—NH₂ 和—COOH 基团,随着缓冲溶液 pH 值的降低,U-CMCS-g-ALA 共聚物的羧甲基和氨基被质子化,共聚物的净电荷下降,当 pH 接近偶联物的等电点时,这些纳米胶束的表面电荷逐渐降低至 0,促进了这些纳米胶束的聚集和沉淀,进而导致纳米胶束的结构被破坏,药物从纳米胶束内核中释放。这与不同 pH 下载药纳米胶束的 Zeta 电位变化曲线一致。图 8 为不同 pH 值下 CTD@U-CMCS-g-ALA 的 Zeta 电位曲线图,从图中可以看出 CTD@U-CMCS-g-ALA 的 Zeta 电位随着 pH 的减小而增大,当 pH=4.67 时,CTD@U-CMCS-g-ALA 的 Zeta 电位为 0,即 pH=4.67 为其等电点。

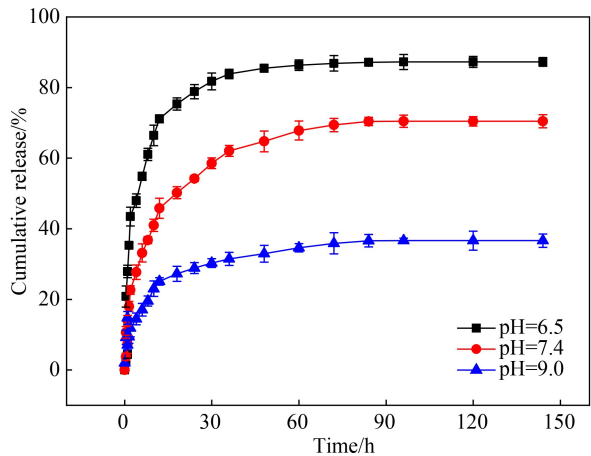


图 7 CTD@U-CMCS-g-ALA 在不同 pH 下
累积释放曲线图
Figure 7 *In vitro* release of CTD@U-CMCS-g-ALA
at different pH

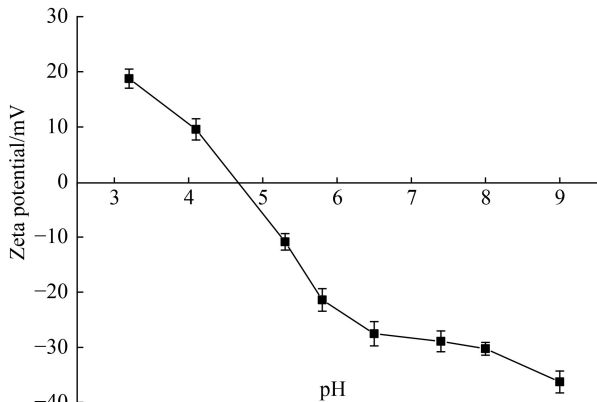


图 8 不同 pH 值下 CTD@U-CMCS-g-ALA 的
zeta 电位曲线图
Figure 8 The curve of zeta potential with different
pH for CTD@U-CMCS-g-ALA

2.7 CTD@U-CMCS-g-ALA 杀虫性能

通过人工饲料掺入法测定甘蔗螟虫幼虫的抗拒食活性。表 1 显示了甘蔗螟虫幼虫在不同浓度 U-CMCS-g-ALA、CTD 和 CTD@U-CMCS-g-ALA 下的抗拒食活性。从表中可以看出 U-CMCS-g-ALA 对甘蔗螟虫幼虫无拒食活性,载药载药纳米胶束 CTD@U-CMCS-g-ALA 在最低浓度时(0.1%)显示出为 62.6%的拒食率,在最高浓度(0.5%)时其拒食率为 85.7%,均小于同等浓度下 CTD 拒食率(76.3%和 100.0%)。可以看出,两亲性壳聚糖 U-CMCS-g-ALA 对噻虫胺 CTD 的包封使得 CTD@U-CMCS-g-ALA 的拒食率明显的降低,这主要是壁材 U-CMCS-g-ALA 对噻虫胺 CTD 的包封作用,使得其对幼虫的拒食性能降低,从而表现出更好的杀虫活性。

图 9 为不同处理甘蔗螟虫幼虫培养 48 h 后图像。从图中可以看出,对照组和 U-CMCS-g-ALA 组处理的幼虫晶莹剔透,用 CTD 处理的幼虫消瘦变黑,而 CTD@U-CMCS-g-ALA 组处理的幼虫发育不仅消瘦发黑,而且短小。这些结果表明 U-CMCS-g-ALA 包埋的 CTD 可以有效抑制甘蔗螟虫幼虫的生长并提高 CTD 的杀虫能力。

表 1 不同浓度的 U-CMCS-*g*-ALA、CTD 和 CTD@U-CMCS-*g*-ALA 对甘蔗螟虫幼虫拒食率的影响

药物组	质量百分浓度（%）		
	0.1	0.3	0.5
U-CMCS- <i>g</i> -ALA	0 ^a	0 ^a	0 ^a
CTD	76.3±5.2 ^b	89.2±5.6 ^b	100±0 ^b
CTD@U-CMCS- <i>g</i> -ALA	62.6±4.7 ^c	75.3±3.8 ^c	85.7±7.2 ^c

注:纵列内 a,b,c 表示经 LSD 检验相互间差异显著($n=3$; $P<0.05$)。

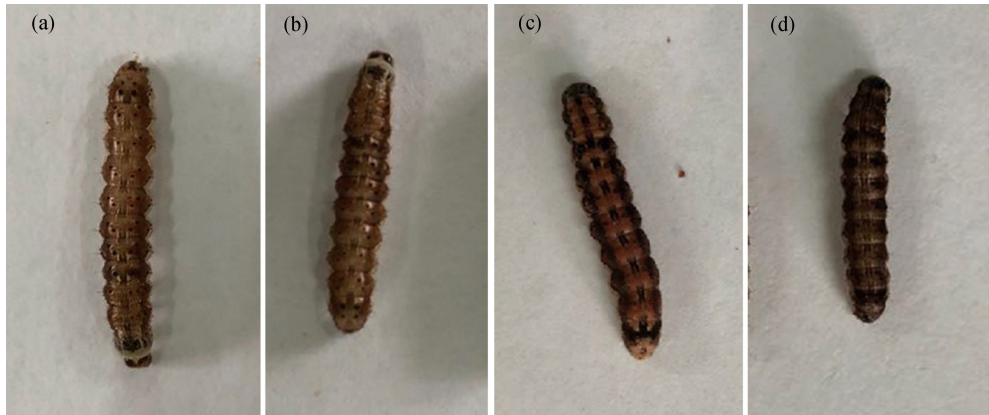


图 9 不同处理甘蔗螟虫幼虫培养 48 h 后图像

(a)空白组;(b) U-CMCS-*g*-ALA;(c) CTD;(d) CTD@U-CMCS-*g*-ALA

Figure 9 Images of sugarcane borers larvae cultured for 48 h with diffrent treatments:

(a) control;(b) U-CMCS-*g*-ALA;(c) CTD;(d) CTD@U-CMCS-*g*-ALA

3 结论

本文通过化学接枝法,在羧甲基壳聚糖结构上分别接枝了疏水性基团 α -亚麻酸(ALA)和亲水性基团尿素(urea),合成了两亲性壳聚糖衍生物,并以此为壁材,制备了包埋噻虫胺的载药纳米胶束 CTD@U-CMCS-*g*-ALA,研究了载药纳米胶束对甘蔗螟虫的毒力性能。得出结论如下:

(1)采用酰胺反应合成了两亲性壳聚糖衍生物 U-CMCS-*g*-ALA,采用红外光谱仪和核磁共振仪表征了 U-CMCS-*g*-ALA 的化学结构。

(2)通过超声自组装法制备了负载噻虫胺载药纳米胶束 CTD@U-CMCS-*g*-ALA,该载药纳米胶束平均粒径约为 450 nm,具有 pH 响应和持效缓释性能,在弱酸和中性环境中($pH=6.5$ 和 $pH=7.4$)可以释放出更多的药物。

(3)由于壁材 U-CMCS-*g*-ALA 对噻虫胺的包封作用,CTD@U-CMCS-*g*-ALA 对甘蔗螟虫幼虫拒食率明显降低,从而表现出更好的杀虫活性。

参考文献:

[1] Cheng X, Zeng X, Zheng Y, Wang X, Tang R. Carbohydr Polym, 2019, 208: 59~69.
[2] Wang X, Guo Y, Qiu L, Wang X, Li T, Han L, Ouyang H, Xu W, Chu K. Carbohydr Polym, 2019, 206: 121~131.
[3] Yu Y, Feng R, Yu S, Li J, Wang Y, Song Y, Yang X, Pan W, Li S. Int J Biol Macromol, 2018, 114: 462~469.
[4] Bonferoni M C, Sandri G, Dellera E, Rossi S, Ferrari F, Mori C, Caramella. Eur J Pharm Biopharm, 2014, 87(1):101~106.
[5] Moreno P M D, Santos J C, Gomes C P, Varela-Moreira A, Costa A, Leiro V, Mansur H, Pêgo A P. Mol Pharmaceut, 2016, 13

- (2); 344~356.
- [6] Martino A D, Kucharczyk P, Zednik J, Sedlarik V. *Int J Pharmaceut*, 2015, 496(2): 912~921.
- [7] Muley A B, Shingote P R, Patil A P, Dalvi S G, Suprasanna P. *Carbohydr Polym*, 2019, 210: 289~301.
- [8] Kumaraswamy R V, Kumari S, Choudhary R C, Sharma S S, Pal A, Raliya R, Biswas P, Saharana V. *Int J Biol Macromol*, 2019, 123: 59~69.
- [9] Kumaraswamy R V, Kumari S, Choudhary R C, Pal A, Raliya R, Biswas P, Saharan V. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113: 494~506.
- [10] Chun S C, Chandrasekaran M. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 948~954.
- [11] Sathiyabama M, Indhumathi M, Muthukumar S. *Carbohydr Polym*, 2019, 212: 169~177.
- [12] Chen Y, Li J, Li Q, Shen Y, Ge Z, Zhang W, Chen S. *Carbohydr Polym*, 2016, 143: 246~253.
- [13] Larsson M, Huang W C, Hsiao M H, Wang Y J, Nydén M, Chiou S H, Liu D M. *Prog Polym Sci*, 2013, 38(9): 1307~1328.
- [14] Xu L, Cao L, Li F, Wang X, Huang Q. *J Disper Sci Technol*, 2014, 35(4): 544~550.
- [15] Zhang J, Li M, Fan T, Xu Q, Wu Y. *J Polym Res*, 2013, 20(3):107.
- [16] Chen A, Chen M, Wang S, Huang X, Liu Y, Chen Z. *J Appl Polym Sci*, 2012, 124(5):3728~3736.
- [17] Fan Z, Qin Y, Liu S, Xing R, Yu H, Chen X, Li K, Li P. *Carbohydr Polym*, 2018,190: 1~11.
- [18] Dong E, Yang Z, Zhou C, Wang C, Li S, Ouyang Q, Kong L, He Z, Xie J, Li P, Yang P. *React Funct Polym*, 2019, 141: 123~132.

Preparation and Properties of Dual Modified Chitosan Based Drug-loaded Nano-micelles

ZHOU Chuang^{1, 2}, ZHANG Li², LI Pu-wang¹, HE Zu-yu¹, WANG Chao¹, LIU Yun-hao¹,
SONG Shu-hui¹, XIE Mu-biao³, YANG Zi-ming^{1*}

(1. *Key Laboratory of Hainan Province for Postharvest Physiology and Preservation of Tropical Horticultural Products, South Subtropical Crop Research Institute of China Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524091, China*; 2. *Agricultural Product Processing Research Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524001, China*; 3. *School of Chemistry and Chemical Engineering, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China*)

Abstract: In this paper, α -linolenic acid (ALA) as the hydrophobic fatty long chain and urea as the hydrophilic group were grafted onto carboxymethyl chitosan through acylation reaction to prepare amphiphilic chitosan derivatives (U-CMCS-g-ALA), and its structure was characterized by Fourier infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy. Then, the drug-loaded nano-micelles (CTD@U-CMCS-g-ALA) were prepared by the ultrasonic self-assembly method using U-CMCS-g-ALA as the wall material and clothianidin (CTD) as the core material. The scanning electron microscope (SEM) image of nano-micelles showed that the nano-micelles had a spherical shape with a uniform particle size distribution, with an average particle size of about 465 nm. *In vitro* release revealed that the CTD@U-CMCS-g-ALA nano-micelles exhibited a sustained and pH-responsive drug release property at room temperature. Finally, the antifeedant activity of CTD@U-CMCS-g-ALA nano-micelles on sugarcane borer was tested by the artificial feed incorporation method. The results showed that the drug-loaded nano-micelles could effectively inhibit the growth and development of the sugarcane borer and the antifeeding rate of CTD@U-CMCS-g-ALA on sugarcane borer went down by more than 14.3% compared with unembedded clothianidin, which was mainly due to the encapsulation effect of the wall material U-CMCS-g-ALA that could reduce the antifeeding performance against larvae and thus showed better insecticidal activity.

Key words: Carboxymethyl chitosan; Amphiphilic; Nano-micelles; Self-assembly; Insecticidal