

Preparation and Characterization on New Chitosan Graft Copolymer for Nanoparticle Drug Delivery System

Bo-hua Feng¹, Zi-yong Zhang², Xu-dong Yin², Hua-xin Rao², Liu-fen Peng¹

¹College of medical information engineering, Guangdong pharmaceutical university, Guangzhou, China ²College of science and engineering, Jinan University, Guangzhou, China *E-mail: tfengbh@163.com*

Abstract: A new chitosan derivate (CMC-g-RA) was prepared by grafting ricinolic acid anhydride (RA) on carboxymethy chitosan (CMC) molecules. Molecular mass, mole ratio of anhydride/amino, reaction temperature and solvent which had influence on grafting products were examined. Nanoparticles blent by botanical insecticide retenone (Rot) and CMC-g-RA as carrier was carried out. Nanoparticles were characterized by surface shape, particle size and dispersion, surface charge and loading efficiency which were influenced by CMC-g-RA and Rot concentration. The results showed that lower molecular mass was of advantage to higher degree of RA substitution. CMC-g-RA and Rot formed drug loading nanoparticles in their aqueous solution with the spherical shape and negative surface charge. The higher the concentration of Rot was, the higher the Zeta potential of Rot/CMC-g-RA nanoparticles was with narrower size dispersion. The loading efficiency of nanoparticles reached 68%.

Keywords: chitosan; rotenone; nanoparticles; drug carrier

新型壳聚糖接枝共聚物载药纳米粒子的制备与表征

冯博华¹,张子勇²,殷旭东²,饶华新²,彭柳芬¹

¹广东药学院医药信息工程学院,广州,中国,510006 ²暨南大学理工学院,广州,中国,510632 E-mail:tfengbh@163.com

摘 要:本文合成了新型羧甲基壳聚糖接技蓖麻油酸共聚物(CMC-g-RA),考查了原料分子量、酸 酐/氨基摩尔比、反应温度和溶剂因素对产物取代度的影响。制备了以 CMC-g-RA 为载体负载脂溶性 植物源药物鱼藤酮(Rot)的纳米粒子。表征了该纳米载药体系的粒径、粒径分布、表面电荷、表面形 态和负载率,探讨了载体和药物浓度因素对纳米粒子形态参数和性能的影响。结果表明: RA 的取代 度主要受原料分子量影响; CMC-g-RA 与 Rot 在中性水中形成分散性较好的纳米粒子,粒子呈密实光 滑球状,表面带负电荷; 随 Rot 浓度升高,纳米粒子 Zeta 电位增大,体系内的纳米粒子具有更窄的尺 寸分布, Rot 的负载率最高可达 68 %。

关键词: 壳聚糖; 鱼藤酮; 纳米粒子; 药物载体

1. 引言

壳聚糖 (Chitosan,以下简称 CS)是自然界唯 一带正电荷的天然碱性多糖高分子,全称(1,4)-2-氨基-2-脱氧-β-D-葡聚糖。作为世界第二大可再生资 源,CS 凭借其独特的物理、化学性能在生物功能材料 领域得到了广泛的应用^[1]。其中,农药领域的研究发现 CS 对农作物具有保鲜、杀菌、生长调节等有益作用^[2-5]; 而且,绿色环保的 CS 还可用作农药载体和农药制剂的 助剂^[6]。当前,水基型制剂——以水为介质代替乳油中 大量的芳香类有机溶剂的制剂——因其显著的绿色环 保优势,成为当今农药剂型的重要发展方向之一^[7,8]。 要形成以壳聚糖为载体材料的水基型制剂,要求壳聚糖 同时具有水溶性和脂溶性。然而,高分子量 CS 分子间 氢键强,一般不溶于中性水,只能溶解于酸性水溶液。 而酸性溶液可能对生物体造成危害,这极大限制了其在 医药领域中的应用。目前改善 CS 水溶性的研究较多, 主要方法有:分子量的控制^[9,10]和功能基团的接枝改性 等。通过在 CS 分子上进行定位或非定位接枝改性,引 入功能基团,改变 CS 大分子的聚集态结构主要是晶区 结构,是改善 CS 的水溶性等性能的有效方法。如 N、

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771419 和 30971915)

O上的烷基化^[11, 12]、羧烷/芳基化^[13]、N-季铵盐化^[14]、 烷/芳酰化^[15-17]、羧酰化^[18]、含氧无机酸酯化、醚化、 氧化、接枝共聚与交联等。

实际使用中农药一方面以液珠、乳胶粒或固体颗 粒等形态存在(如悬乳剂),尺寸基本处于微米级(> 10³ nm)以上;另一方面以分子分散状态(≤ 1 nm, 如水溶液制剂)直接分散于水溶液中,药效发挥快, 同时失效也快,无法实现缓释和长效的要求。负载农 药的粒子粒径若处于纳米尺寸范围,分布于表面的农 药分子数量以及与叶片、害虫接触的面积也将会有剧 增,这将有利于提高农药的有效利用率^[19]。目前对纳 米农药的体系研究主要包括:将农药制备成水分散的 农药纳米晶粒^[20],或在农药纳米晶粒的外部进行合成 高分子的涂覆保护^[21],以及将液体农药包裹成微胶囊 ^[22-24]等,但以壳聚糖及其衍生物为载体的纳米农药水 分散制剂的研究却鲜有报道。

我们在前期制备了季铵盐壳聚糖,磷酸化壳聚糖, 羧甲基壳聚糖等带有不同电荷的壳聚糖衍生物,将它 们与肝素、牛血清蛋白、阿霉素等通过静电作用形成 纳米粒子载药体系,研究结果表明^[14,25],纳米载药体 系中药物受到载体的有效保护,延长了药效,纳米级 药物易于进入细胞内部,制备的壳聚糖衍生物是一种 有效的药物载体。本研究以 CS 的衍生物羧甲基壳聚 糖(Carboxymethyl chitosan, CMC)为亲水部分,以天 然蓖麻油酸(Ricinleic acid, RA)的脂肪碳链作为疏水 部分进行接枝反应。考察反应条件对接枝率的影响并 进行优化,对接枝产物进行表征,制备新型两亲性 CMC 接枝 RA 的共聚物(CMC-g-RA)。选用脂溶性 天然植物源药物鱼藤酮(Rotenone、以下简记为 Rot), 以 CMC-g-RA 作为该脂溶性药物的载体, 制备载药纳 米粒子水分散液。探讨该水分散液中载药纳米粒子的 粒径、粒径分布、表面电荷、形态结构及 Rot 负载率 变化特点和影响因素,为发展新型纳米农药水基型制 剂开辟新的研究思路。

2. 实验部分

2.1 材料和仪器

粘均分子量 M_w为 1.20×10⁵, 0.960×10⁴, 5.78×10³ 的 3 种活化降解 CS 样品,分别记为 CS-0、CS-1 和 CS-2,实验室自制;甲醇(A.R.,天津化学试剂厂), 乙醇(A.R.,天津大茂化学试剂厂),氢氧化钠,盐 酸(38%),乙酸酐,氯乙酸,异丙醇均为分析纯, 广州化学试剂厂;蓖麻油酸酐(Ricinoleic anhydride, 简记为 RA,实验室自制);鱼藤酮(Rotenone,纯度 98%,广东丰顺县汤西嘉兴福利化工厂);鱼藤酮标 准品,色谱纯,Sigma。

扫描电子显微镜(SEM, XL-30ESEM, 荷兰, PHILIPS),付里叶变换红外吸收光谱仪(FTIR,德 国, Bruk EQUINOX55),酸度计(PHS-3C型,上海 盛磁仪器有限公司),X-射线衍射仪(D/MAX-1200,日 本理学),纳米粒度仪(BI-200SM,美国,Brookhaven), Zeta 电位分析仪(ZetaPALS,美国,Brookhaven), CHNS/O元素分析仪(EA2400II型,美国 PE),高 效液相色谱(HPLC, Agilent 1100型,美国,惠谱)。

2.2 羧甲基壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚物 (CMC-g-RA)的合成与表征

 分别称取 CS-0、CS-1 和 CS-2 样品 0.5 g,按 文献^[26]合成羧甲基壳聚糖(CMC),相应得到三种 CMC 产物,分别记为 CMC-0, CMC-1 和 CMC-2。电 位滴定法^[27]测定 CMC 的羧甲基的取代度(Degree of Substitution, DS),用 FTIR 表征合成产物。

②称取上述 CMC-0、CMC-1 和 CMC-2 样品, 分散于溶有一定量 NaI 的吡啶中, 按酸酐/氨基摩尔比 1:1、3:1 和 5:1, 将 RA 滴入上述混合溶液中并剧烈搅 拌。在 40~100 ℃温度范围内分别按 4 h、9 h 和 14 h 进行反应。反应结束后用 300 ml 无水乙醇浸泡洗涤反 应产物 3 次, 乙醚脱水, 丙酮洗涤后于 60℃真空干燥 箱中干燥 48 h, 产物用 FTIR 表征。CS、CMC 和 CMC-g-RA 中的 C, N 元素所占的百分含量用 CHNS / O 元素分析仪测定。

2.3 鱼藤酮/羧甲基壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚物 纳米粒子 (Rot/CMC-g-RA) 水分散液的制备

将 CMC-g-RA 溶解于去离子水中,制备浓度为 10 mg/ml 的 CMC-g-RA 水溶液。配制质量分数为 1.0 % 的 Rot 丙酮溶液备用。分别吸取 0.10~0.90 ml 的 CMC-g-RA 溶液加入锥形瓶中。搅拌条件下,分别吸 取 0.02~0.20 ml 1.0 %的 Rot 丙酮溶液,加入锥形瓶中,得到药浓度为 0.02~0.20 mg/ml 的鱼藤酮/羧甲基 壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚物 (Rot/CMC-g-RA) 纳米粒 子水分散液。

2.4 鱼藤酮/羧甲基壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚物 纳米粒子(Rot/CMC-g-RA)的表征

① 纳米粒子的粒径, 粒径分布及表面电荷测定:



将不同浓度的 Rot/CMC-g-RA 纳米粒子水分散液,纳米粒度仪和 Zeta 电位分析仪测定纳米粒子的粒径、粒径分布和表面电荷。

② 纳米粒子的形态结构:将制备的 Rot/ CMCg-RA 水分散液滴加到基片上,室温下蒸发溶剂,喷金 后,用扫描电子显微镜观察纳米粒子的形态结构。

③ 纳米粒子中 Rot 负载率测定: 1.5 ml Rot/CMC-g-RA 纳米粒子水分散液经超速离心后,用 高效液相色谱测定上清液中游离的药物 Rot 的量,进 而计算出纳米粒子中鱼藤酮的负载率。

3. 结果与讨论

3.1 反应条件对羧甲基壳聚糖接技蓖麻油酸共聚 物取代度的影响

运用酸酐能与羧甲基壳聚糖上未被羧甲基化的氨 基发生定位反应的原理,以吡啶为分散剂,将 RA 与 CMC 混合后,制备羧甲基壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚 物,反应过程按下式进行。



考虑到 CMC 上羧甲基的水解及某些不利接枝的 副反应,故采用无水吡啶-碘化钠反应体系。以 CMC 分子量,蓖麻油酸酸酐与 CMC 分子上氨基的摩尔比 (A/N),反应时间和温度为因素,设计 3 水平 4 因 素正交表 L₉(3⁴)进行试验。

根据元素分析数据, CMC-g-RA 中 RA 的取代度 按式(1)、(2)计算:

$$CMC取代度 = \frac{CMC的C/N元素摩尔比-CS的C/N元素摩尔比}{2}$$
 (1)

计算结果列于表1中。

根据表1中的极差值R将各影响因素进行排序: CS分子量>酸酐/氨基摩尔比>反应温度>吡啶量。从方 差分析(表2)中可知分子量对取代度的影响具有显 著性,表明极差R反映出的因素影响程度与方差分析 中反映的显著性差异一致。

Table 1. The analysis table of orthogonal test for CMC-g-RA 表 1. CMC-g-RA 制备试验直观分析表

实验号		南小南			
	CS 样品	A: N	吡啶量	温 度	取代度
1	1	1	1	1	0.0414
2	1	2	2	2	0.0398
3	1	3	3	3	0.0450
4	2	1	2	3	0.1163
5	2	2	3	1	0.1297
6	2	3	1	2	0.1418
7	3	1	3	2	0.1464
8	3	2	1	3	0.1207
9	3	3	2	1	0.2526
均值I	0.042	0.101	0.101	0.141	
均值II	0.129	0.097	0.136	0.109	
均值III	0.173	0.146	0.107	0.094	
R	0.131	0.049	0.035	0.047	

Table 2. The table of variance analysis of CMC-g-RA 表 2. CMC-g-RA 制备试验方差分析表

因素	总波动平方和 S _T	自由度 f	F 值	F临界值 (α=0.05)
分子量	0.027	2	10.80*	6.940
A : N	0.005	2	2.00	6.940
吡啶量	0.002	2	0.80	6.940
温度	0.003	2	1.20	6.940

注:表中"*"表示因素影响显著。

可见,高酸酐/氨基摩尔比(A/N)、低 CMC 分 子量、以及一定的温度和吡啶量是获得较高取代度的 主要因素,其中分子量因素的影响最为显著。另外, 一定反应体系中,吡啶的加入量具有最大值。吡啶作 为增进高分子的可溶性的溶剂,使酰化反应可以在粘 度很大的溶液体系中进行,并保持反应体系均相^[28]。 吡啶也是一个良好的亲核试剂,与酸酐生成更好的酰 化剂 N-酰基吡啶鎓盐,故提高吡啶含量有利于 N-酰 化反应。但随着吡啶加入量增加,势必降低反应物浓 度,反而不利于反应进行。

3.2 羧甲基壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚物的表征

分别由 CS-0、CS-1 和 CS-2 样品制备的 CMC-0、 CMC-1 和 CMC-2,经电位滴定法测定后,以 pH 值为 纵坐标,V_{NaOH}为横坐标,作 pH-V_{NaOH}滴定曲线。利 用二阶微商法确定曲线拐点处的碱用量。

再将此碱用量代入下面所示的羧甲基的取代度计



算公式:

$$DS = \frac{161A}{m - 58A} \tag{3}$$

$$A = V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}}$$
(4)

计算得到 CMC-0、CMC-1 和 CMC-2 的羧甲基取 代度分别为 0.38、0.64、0.84。当羧甲基取代度小于 1 时,羧甲基在壳聚糖上的取代位置为 C6-O,较少在 C2-N 上发生取代^[29]。故 CMC 上的-NH₂基团,可与 酸酐反应形成酰胺^[30],实现对 RA 对 CMC 的接枝。 接枝产物中-CH₂-等 RA 长链基团的特征吸收峰成 为判断合成产物结构的重要依据之一。



Figure 1. FTIR spectrums of CMC-g-RA(a) and CMC(b) 图 1. CMC-g-RA(a)和 CMC(b)的红外光谱图

接枝产物 CMC-g-RA 和 CMC 的红外光谱分别如 图 1 a 和 b 所示: 3427 cm⁻¹ 附近的 O-H 和 N-H 的 伸缩振动峰移明显减弱,说明-OH 和/或-NH₂基团 上有取代发生; 原 1597 cm⁻¹ 谱带向低波数移动,出现 1560 cm⁻¹ 的强吸收峰,表明-NH₂上发生了取代反应; 酰胺中羰基形成了 1735 cm⁻¹ 处的吸收峰。3018 cm⁻¹ 处为的 C=C 双键特征吸收峰; 2920 cm⁻¹ 和 2852 cm⁻¹ 的 C-H 伸缩振动峰变强且尖锐; 720 cm⁻¹ 的吸收峰 表明产物中存在大量-(CH₂)_n-基团,且 n ≥ 4。表明 RA 与 CMC 分子上-NH₂发生了 N-酰化反应,接枝 产物为羧甲基壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚物。

3.3 负载脂溶性药物鱼藤酮的载体材料

以往研究中,以 CS 衍生物为载体的载药纳米粒 子常分散于中性水^[31]和一定酸度的水^[25,32]中。酸度过 高,pH 值降到 5.6 以下时,将会改变生物生长、发育 和繁殖等生命活动所需要的正常酸碱度,产生生理危 害。酸性溶液也会破坏植物叶面的蜡质和角质层,损 害植物的表皮结构,造成叶片萎蔫、使病原体和其他 污染物更容易侵入。酸性溶液还会增加植物膜透性, 使养分外渗,造成植物光合、呼吸代谢、蛋白质代谢、 脂肪代谢、矿质营养代谢等发生紊乱^[33]。

从农药实际应用的角度考虑,用作 Rot 的载体应 在中性水中有较好的溶解性。制备 CMC-g-RA 的目的 就是改善壳聚糖的水溶性和脂溶性,使其既能溶于中 性水,又能在水中形成自组装大分子胶束,实现对脂 溶性药物 Rot 的增溶。溶解试验表明 CMC-g-RA 在 pH= 2.4~8.0 范围内均易溶于水。此外,壳聚糖及其 衍生物本身就有一定药效,具有诸多有益于农作物生 长发育的特性,如抗病诱导、杀菌杀虫、种子包衣、 农药增效等;而且 CMC-g-RA 作载体,RA 基团降解 形成的蓖麻油酸在农业上也有一定杀虫活性^[34]。总 之,CMC-g-RA 用于 Rot 的载体,符合绿色农药助剂 的要求。

3.4 鱼藤酮/羧甲基壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚物 纳米粒子的表征

3.4.1 纳米粒子的形态结构

载体 CMC-g-RA 与药物 Rot 按一定浓度比例在水分散介质中制备出 Rot/CMC-g-RA,其扫描电镜(SEM)照片如图 2 所示:粒子尺寸在 1000 nm 以内的纳米尺度范围,纳米粒子呈表面光滑的球状结构。



Figure 2. SEM photos of Rot/CMC-g-RA nanoparticles, [Rot]= 0.10 mg/ml 图 2. Rot / CMC-g-RA 纳米粒子 SEM 照片, [Rot] = 0.10 mg/ml

CMC-g-RA 纳米粒子的分子上亲水基团一 COOH-插入水相, RA 基团则聚集在一起形成疏水 相。根据相似相容原理,加入的 Rot 将进入疏水相中, 组成 CMC-g-RA 主链的葡聚糖环结构处于油水相界 面,构成纳米粒子外壳的主体。在水为连续相的条件 下,CMC-g-RA 分子自发卷曲以减小表面张力,这一 行为驱动了球状纳米粒子的成形,构成了以 Rot 穿插 进入 CMC-g-RA 疏水链间、CMC-g-RA 为外壳的球状 纳米粒子(图 2b)。 Scientific Research

3.4.2 鱼藤酮/羧甲基壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚物纳米 粒子的粒径、粒径分布和表面电荷

通过动态激光散射技术(DLS)对 Rot/CMC-g-RA 纳米粒子粒度、粒径分布进行测量,利用 Zeta 电位分 析技术测定溶液中纳米粒子的表面电荷,结果归结在 表 3 中。Rot 和 CMC-g-RA 的浓度配比对纳米粒子的 粒径、粒径分布和表面电荷的影响如下:

 Table 3
 Particles size, PDI and zeta potential under different concentration of CMC-g-RA and Rot

表 3	CMC-g-RA 和 Rot 浓度变化卜的纳米粒子粒径、粒径分布和
	表面电荷

CMC-g-RA 浓度 (mg/ml)	Rot 浓度 (mg/ml)	粒径 (nm)	粒径分布	Zeta 电位 (mV)
0.10	0.02	190.2 ± 12.3	0.433 ± 0.002	-58.50 ± 0.91
0.10	0.03	289.7 ± 20.5	0.344 ± 0.002	-55.62 ± 1.68
0.10	0.04	271.5 ± 19.9	0.284 ± 0.002	-40.73 ± 5.49
0.10	0.05	256.4 ± 20.0	0.157 ± 0.002	-50.50 ± 1.52
0.10	0.06	376.3 ± 27.3	0.185 ± 0.003	-45.55 ± 5.52
0.30	0.02	316.2 ± 17.5	0.206 ± 0.002	$\textbf{-36.98} \pm 0.95$
0.30	0.03	402.3 ± 31.0	0.171 ± 0.001	$\textbf{-63.27} \pm 0.68$
0.30	0.04	345.3 ± 27.1	0.153 ± 0.001	-68.30 ± 2.04
0.30	0.05	475.2 ± 37.2	0.138 ± 0.004	-60.33 ± 2.15
0.30	0.06	562.2 ± 28.2	0.154 ± 0.001	-58.47 ± 1.29
0.50	0.02	218.4 ± 18.1	0.075 ± 0.001	-28.00 ± 4.21
0.50	0.03	352.2 ± 24.8	0.081 ± 0.001	-60.14 ± 6.85
0.50	0.04	341.2 ± 18.6	0.112 ± 0.001	-56.81 ± 1.75
0.50	0.05	306.9 ± 17.5	0.140 ± 0.001	$\textbf{-69.64} \pm 2.91$
0.50	0.06	511.4 ± 26.7	0.137 ± 0.001	-52.28 ± 0.95
0.70	0.02	251.5 ± 20.0	0.104 ± 0.001	-45.84 ±13.66
0.70	0.03	253.6 ± 16.0	0.126 ± 0.001	-54.69 ± 5.28
0.70	0.04	309.6 ± 16.1	0.009 ± 0.000	-65.13 ± 0.91
0.70	0.05	348.9 ± 22.3	0.003 ± 0.001	-74.69 ± 2.21
0.70	0.06	355.8 ± 21.1	0.010 ± 0.001	-70.35 ± 6.62

Rot/CMC-g-RA 的粒径主要分布在 100~600 nm 范围内,当 Rot 和 CMC-g-RA 浓度均较小 (< 0.40 mg/ml)时, Rot/CMC-g-RA 纳米粒子粒径出现的最小 值 190.2 nm; CMC-g-RA 浓度一定,随着 Rot 浓度升 高,粒径呈增大趋势;当 Rot 浓度升高至 0.06 mg/ml 时,粒径也相应增大至 562.2 nm (此时 CMC-g-RA 浓 度为 0.30 mg/ml)。表 3 所示的纳米粒子分散指数 (polydispersity index, PDI)普遍小于 0.25,这意味 着纳米粒子的粒径分布较窄。多分散指数是由激光光 散射分析获得的表征纳米粒子尺寸分布的一个重要参数,是从自相关函数外推得到的无量纲数值,其变化 范围为:0.01(单分散)~0.5-0.7,多分散指数大于 0.7表明粒子尺寸分布较宽^[35]。

从表 3 中也可观察到 Rot/CMC-g-RA 纳米粒子的 Zeta 电位值均为负值,最大相差近 50 mV,表明该纳 米粒子表面均带负电荷。这是因为 CMC-g-RA 中含负 电荷的羧基-COOH-分布在纳米粒子的表面,与水 相接触。根据 DLVO 双电层理论^[36]:两粒子间的总位 能等于范德华引力位能和静电斥力位能的总和,粒子 间的相互吸引使粒子有聚集的趋势,但当两个粒子靠 近时,斥力开始起作用,总位能增加。达到最大值后, 总位能下降甚至变为负值。这表明粒子在最大值能垒 前可以保持一定稳定性而不发生凝聚。故较大的负电 性(一般认为 Zeta 电位的绝对值 > 30mV^[37])将使 Rot/CMC-g-RA 纳米粒子间的静电排斥力增大,有利 于纳米粒子分散稳定性。

通过比较表 3 中数据还发现, CMC-g-RA 和 Rot 浓度较高时,可获得较大的 Zeta 电位值。例如,当 CMC-g-RA 浓度为 0.70 mg/ml 和 Rot 浓度 0.05 mg/ml 时, Zeta 电位值高达-74.69 mV。出现这种现象的可能原因:一方面 CMC-g-RA 浓度增大将向体系中引入 更多的-COO-基团;另一方面,Rot 分子数量增多, 需要有相应数量的 CMC-g-RA 分子对 Rot 进行负载, 而且在分子间作用力下,Rot 使 CMC-g-RA 分子排列 更紧密(粒径变小),其上的亲水-COO-基团更明 确地伸向水相,使表面的负电荷密度增大,对 Zeta 电位的增大起到一定驱动作用^[38]。

3.4.3 鱼藤酮/羧甲基壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚物纳米 粒子的负载率

按文献方法^[39]制样,经 HPLC 检测 Rot 标准品的保 留时间为 5.718 min。测定各浓度的标准溶液所对应的 峰面积值,获得的标准工作曲线,如图 3 所示。可以看 出 Rot 浓度与峰面积呈现良好的线性关系,故该工作曲 线可用于定量测定浓度范围内样品中 Rot 含量。

Rot 的负载率可按下式计算出。

Rot 的负载率= [(A-B)/A]×100% (5)

式中,A为所加药物 Rot 的总量,B为留在上清 液中的游离 Rot 的含量。





Figure 3. The standard working curve of Rot by HPLC 图 3. Rot 的标准工作曲线

CMC-g-RA 溶液浓度对 Rot 负载率的影响如图 4 所示: 当 Rot 浓度为 0.05 mg/ml 时,随着 CMC-g-RA 溶液浓度的增大,纳米粒子对 Rot 的负载率由 68 %逐渐低至 22 %。



Figure 4. Rot loading efficiency of Rot/CMC-g-RA, [Rot] = 0.05 mg/ml (a) and [Rot] = 0.10 mg/ml (b) 图 4. [Rot] = 0.05 mg/ml (a) 和[Rot] = 0.10 mg/ml (b) 时 Rot/CMC-g-RA 的负载率

当 Rot 溶液浓度为 0.10 mg/ml 时,负载率则出现 了较大值。在 CMC-g-RA 溶液浓度 < 0.3 mg/ml 时, 负载率从 0.22 快速增长到 0.68; CMC-g-RA 溶液浓度 在 0.3~0.7 mg/ml 时,负载率相对平稳; CMC-g-RA 溶液浓度 > 0.7 mg/ml 后,负载率则下降至 0.28。这 种变化特点与表 3 中粒径随 CMC-g-RA 浓度的升高

(Rot 浓度一定时)出现峰值的情况类似,表明调控 载体与药物的浓度配比,在控制纳米粒子形态结构参 数的同时,也对 Rot 的负载率产生重要影响。

4. 结论

本研究用羧甲基壳聚糖与蓖麻油酸的进行接枝反

应,通过控制分子量、反应时间、温度和加料比和溶剂量,制备了溶解于中性水的两亲性羧甲基壳聚糖接枝蓖麻油酸共聚物(CMC-g-RA)。在温和条件下制备了新型 Rot/CMC-g-RA 纳米粒子水分散液。两亲性CMC-g-RA 分子,在水中通过自组装高分子胶束,负载难溶植物源药物 Rot 的载体,提高了植物源药物在水中的溶解度,为研究新型植物源农药纳米粒子水分散制剂和微乳制剂提供了良好的载体。

Rot/CMC-g-RA 的形态结构显示其具有较光滑、 密实的圆球状结构,粒子以外较少见到 Rot 晶体聚集, 表明 Rot 被载体 CMC-g-RA 的增溶胶束负载。对 Rot/CMC-g-RA 纳米粒子粒径、粒径分布和表面电荷 的研究表明:通过控制 Rot、CMC-g-RA 浓度关系, 可以有效调控 Rot/CMC-g-RA 纳米粒子的性能,获得 期望的粒径、粒径分布和表面电荷。载体 CMC-g-RA 对 Rot 的负载率研究表明:载体的最大负载率可达 68%,负载率变化与其粒径变化特点吻合。

采用新型壳聚糖接枝共聚物作载体材料,制备脂溶性植物源药物纳米粒子,为研制环境友好的绿色农药制剂提供了新的研究思路。植物源农药不同于单组分药物,其成分较为复杂,大多是多组分,未负载药物的定量检测有一定难度。在提高纳米粒子负载率的同时,如何更有效地控制纳米粒子尺寸;对Rot/CMC-g-RA 纳米粒子的载药量及其药物释放行为等方面均有待进一步研究。

References (参考文献)

- Tingda Jiang. Chitin [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003. 1-52 (Ch).
 蒋挺大编著. 甲壳素. 北京: 化学工业出版社, 2003. 1-52.
- [2] Zhonggao Jiao, Jie Liu, Zhengheng Chao. Research on Chitosan Preservation Mechanism for Fruits and Vegetables[J]. Food Research and Development, 2003, 24(5): 114-116 (Ch). 焦中高,刘杰,超郑恒. 壳聚糖对果蔬的保鲜作用及其机理 探讨[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(5): 114-116.
- [3] No H K, Park N Y, Lee S H, Hwang H. J., Meyers S. P.. Antibacterial Activity of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights[J]. Int J Food Microbiol, 2002, 74(1-2): 65-72.
- [4] Prapagdee Benjaphorn, Kotchadat Kanignun, Kumsopa Acharaporn, Visarathanonth Niphon. The Role of Chitosan in Protection of Soybean from Sudden Death Syndrome Caused by Fusarium solani f. sp. glycines[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(7): 1353-1358.
- [5] Meiyun Zhu, Xiaofang Zhao. Development Of Chitosan and Chitosan-derived on Fresh-Cut Fruit and Vegetable and Food Keeping Freshness[J]. Food Research and Development, 2007, 28(4): 153-155 (Ch). 祝美云,赵晓芳. 壳聚糖及其衍生物在鲜切果蔬和食品保鲜 中的应用进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(4): 153-155.
- [6] Marc A. Teixeira, William J. Paterson, Edward J. Dunn, Qiangliang Li, Brian K. Hunter, Mattheus F. A. Goosen. Assessment

of Chitosan Gels for the Controlled Release of Agrochemicals[J]. Ind Eng Chem Res, 1990, 29: 1205-1209.

- [7] Dai Quan. The Developing Idea of the Green Pesticide Form[J]. Journal of China Agrochemicals, 2006, 1: 15-17 (Ch). 戴权. 环保型农药制剂的发展思路[J]. 中国农药, 2006, 1: 15-17.
- [8] Xiangming Shen, Yi Song. Application of Domestic New Surfactants in water-based pesticide Form[J]. Journal of China Agrochemicals, 2009, 8: 29-34 (Ch). 沈向明, 宋煜. 国产新型表面活性剂在水基性农药制剂中的应用[J]. 中国农药, 2009, 8: 29-34.
- [9] Fengqi Lu, Zongshun Cao, Chunxiang Wang, Guangtai Mi, Xizhi Feng. Studies on Preparation of Low-Molecular-Weight Chitosan[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 1997, 20: 279 (Ch). 卢凤琦,曹宗顺, 王春香, 米广太, 封锡志. 低分子量壳聚糖

户风坷, 盲示顺, 工作官, 木/ 入, 封锡芯. 低/ J 重元, 的研制[J]. 中国生化药物杂志, 1997, 20: 279.

[10] Xuan Huang, Fuqiang Hu, Hong Yuan, Xiaoying Ying. Preparation and Quality Control of Low Molecular Weight Chitosan[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, 30(14): 1076-1079 (Ch). 黄孋, 胡富强, 袁弘, 应晓英. 低分子质量壳聚糖的制备及质

量控制[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(14): 1076-1079. [11] Xiaoli Sun, Meihua Xin, Mingchun Li, Sheng Shu. Preparation of N,N-Dilauryl Chitosan[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2006, 25(9): 1095-1097 (Ch). 孙晓丽, 辛梅华, 李明春, 苏盛. N, N-双十二烷基化壳聚糖的

が皖納, 羊樽半, 学明春, 办盈. N, N-双十二, 元基化元汞糖的 制备[J]. 化工进展, 2006, 25(9): 1095-1097.

[12] Zuowei Li, Liyan Zhang, Qingxiao Zeng, Hanming Rui. Study on Effects of Reaction Conditions on N-Acetylation of Chitosan[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(8): 63-65 (Ch).

李作为,张立彦,曾庆孝,芮汉明. 壳聚糖N-烷基化改性反应 影响因素的研究[J]. 食品工业科技,2006,27(8):63-65.

- [13] Changxia Liu, Guohua Chen, Jin Hou, Mingkun Sun. Study on Preparation of Carboxymethylchitosan by One-Pot Continuous Method[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2006, 22(6): 213-216 (Ch). 刘长霞,陈国华,侯进,孙明昆.一锅连续法制备羧甲基壳聚 糖工艺研究[J]. 高分子材料科学与工程, 2006, 22(6): 213-216.
- [14] Fanna Liu, Ziyong Zhang, Huaxin Rao. Preparation and Properties of Novel Drug-Loaded Nano Quaternary Amine Salt System[J]. Journal of Functional Polymers, 2007, 21(1): 50-75 (Ch).

刘璠娜, 张子勇, 饶华新. 一种新型季胺盐壳聚糖纳米载药 体系的制备与性能[J]. 功能高分子学报, 2007, 21(1): 50-75.

- [15] Chao Liu, MeiHua Xin, MingChun Li, Min Wang, Zhen Feng. Preparation of Fully Hydrophobic Acylated Chitosan and Effect of Reaction Conditions[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2005, 36(2): 76-78 (Ch). 刘超, 辛梅华, 李明春, 汪敏, 冯震. 完全疏水化酰化壳聚糖 的制备及反应条件的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(2): 76-78
- [16] Yu Chen, Yingquan Duo, Yunjun Luo, Huimin Tan. Cinnamyl Modification Research of Chitosan and Chitin[J]. *Polymeric Materials Science & Engineering*, 2005, 21(3): 286-289 (Ch). 陈煜, 多英全, 罗运军, 谭惠民. 壳聚糖和甲壳素的肉桂酰化 改性[J]. 高分子材料科学与工程, 2005, 21(3): 286-289.
- [17] Can Zhang, Ya Ding, Qineng Ping. Synthesis and Characterization of Water-soluble 6-O-Succinyl-N-galactosylated Chitosan Derivatives[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2005, 36(4):291-295 (Ch).
 张灿, 丁娅, 平其能. 水溶性 6-O-琥珀酰-N-半乳糖化壳聚糖 衍生物的制备与表征[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(4):291-295.
- [18] Zhenju Jiang, Zhouyu Wang, Xingqi Hu. The Effects of Reaction Conditions on the Properties of N-Maleyl Chitosan[J]. *Journal of Southwest Petroleum Institute*, 2006, 28(5): 73-76

(Ch).

蒋珍菊, 王周玉, 胡星琪. 反应条件对 N-酰化壳聚糖性能影响的研究[J]. 西南石油学院学报, 2006, 28(5): 73-76.

- [19] D.B. Shenoy, G.B. Sukhorukov. Engineered Microcrystals for Direct Surface Modification with Layer-by-layer Technique for Optimized Dissolution[J]. *Eur. J. Biopharm.*, 2004, 58: 521-527.
- [20] Ying Liu, Zhen Tong, Robert K Prud'homme. Stabilized Polymeric Nanoparticlesfor Controlled and Efficient Release of Bifenthrin[J]. *Pest Management Science*, 2008, 64: 808-812.
- [21] Huanan Guan, Defu Chi, Jia Yu, Xiaocan Li. A novel photodegradable insecticide: Preparation, characterization and properties evaluation of nano-Imidacloprid[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008, 92: 83-91.
- [22] Xianquan Xia, Xu Liu, Ge Yao, Taiping Hou, Baohong Gong, Yong Hou. Preventing Experiments by Nicotine Type Nano-pesticide—H₂SO₄-Nicotine Avermectin 18% AS[J]. Agrochemicals, 2007, 46(7): 500-502 (Ch). 夏先全,刘旭,姚革,候太平,龚葆红,候勇. 纳米烟碱类 生物农药-18 %烟•阿 AS 防治试验[J]. 农药, 2007, 46(7): 500-502
- [23] Jianhui Yan, Kelong Huang, Yuelong Wang, Suqin Liu. Application of Anti-pollution Nano-pesticide Preparation for Chlorfenapyr[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2006, 57(1): 91-96 (Ch).
 阎建辉,黄可龙,王跃龙,刘素琴.环保型溴虫腈纳米农药制剂的应用[J]. 化工学报, 2006, 57(1): 91-96.
- [24] Wenxiang Zhou, Lingqian Chen. Preparation and Photo Degradation Activity of Environmental Friendly Nano-pesticide for Chlorfenapyr[J]. Guangdong Chemical Industry, 2007, 34(6): 108-111 (Ch).
 周文祥,陈灵谦. 环境友好型溴虫腈纳米农药的制备及其光

周叉杆,际灭床. 坏鬼发好望误虽崩纳木衣约的制备及其无降解活性[J]. 广东化工, 2007, 34(6): 108-111.

- [25] Zonghua Liu, Yanpeng Jiao, Fanna Liu, Ziyong Zhang. Heparin/Chitosan Nanoparticle Carriers Prepared by Polyelectrolyte Complexation[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007: 806-812.
- [26] Youwen Lin, Chen Xu, Canhui Lu. Preparation of Carboxymethyl Chitosan by Ultrasonic Radiation[J]. Ion Exchange and Adsorption, 2000, 16(1): 54-59 (Ch). 林友文, 许晨, 卢灿辉. 超声波辐射制备羧甲基壳聚糖[J]. 离 子交换与吸附, 2000, 16(1): 54-59.
- [27] Huacai Ge, Dengke Luo. Preparation of Carboxymethyl Chitosan in Aqueous Solution under Microwave Irradiation[J]. Carbohydrate Research, 2005, 340: 1351-1356.
- [28] Yu Yi, Hao Yang, Guoqing Ying, Jianshu Chen, Hong Wang. Synthesis and Properties of N-Phthaloyl-Chitosan[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2005, 25(5): 542-545 (Ch). 易喻,杨好,应国清,陈建澍,王鸿. N-邻苯二甲酰化壳聚糖的合成与性能[J]. 化工进展, 2005, 25(5): 542-545.
- [29] Jie Chen, Wenshui Xia, Fangqi Yang, Fucheng Gao. Study on the Relationship between the Emulsification and the Structure of 6-O-CM-Chitosan[J]. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 1999, 6: 1-4 (Ch). 陈洁夏,文水杨,方琪,高福成. 6-O-羧甲基壳聚糖的乳化性 能与结构的关系. 日用化学工业, 1999, 6: 1-4.
- [30] Qiyi Xing, Weiwei Pei, Ruiqiu Xu, Jian Pei. Fundamentals of Organic Chemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005. 632 (Ch).
 邢其毅, 裴伟伟, 徐瑞秋, 裴坚编著. 基础有机化学 [M]. 北京:高等教育出版社, 2005. 632.
- [31] Can Zhang, Ya Ding, Qineng Ping, Liangli Yu. Novel Chitosan-Derived Nanomaterials and Their Mi-celle-Forming Properties[J]. J. Agric. Food Chem., 2006, 54: 8409-8416.
- [32] Ronny Martien, Brigitta Loretz, Marlene Thaler, Sayeh Majzoob, Andreas Bernkop-Schnurch. Chitosan-thioglycolic Acid Conjugate: An alternative carrier for oral nonviral gene delivery?[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007, 2: 1-9.
- [33] Cifu Meng, Peikuen Jiang, Zhihong Cao, Qiufang Xu, Guomo



Zhou. Progress on Mechanism of Acid Rain Harming Plants and its Controlling Countermeasure[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2008, 20(3): 208-212 (Ch). 孟赐福,姜培坤,曹志洪,徐秋芳,周国模.酸雨对植物的危 害机理及其防治对策研究进展[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(3): 208-212.

- [34] Lixiang Zhu. Multi-purpose Plants: Ricinus Communis[J]. Chinese Native Produce, 1999, 3: 34-35 (Ch).
 祝丽香. 多种用途的植物-蓖麻[J]. 中国土特产, 1999, 3: 34-35.
- [35] Donini C, Robinson D N, Colombo P, Giordano F, Peppas N A, Preparation of P(MAA-g-EG) Nano-spheres for Pharmaceutical. Applications[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 245: 83-91.
- [36] Humio Kitahara, Katsuyasu Tamai, Shigeo Hayano, Itirou Hara. Surfactant- Physical Properties, Applications and Chemical Ecology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1991. 1-126 (Ch).

北原文雄,玉井康勝,早野茂夫,原一郎著.孙绍曾,卫祥元 等译.表面活性剂一物性、应用、化学生态学[M].北京:化 学工业出版社,1991.1-126.

- [37] Li Ling, Xiangyang Xu, Jianping Zhou. Preparation and Characterization of N-octyl-N'-Succinyl Chitosan Micelles[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2007, 16(7): 543-547 (Ch). 李玲, 许向阳, 周建平. N-正辛基-N'-琥珀酰基壳聚糖胶束的 制备及特征研究[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(7): 543-547.
- [38] Yiding Shen. Polymer Surfactant [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002. 107 (Ch).
 沈一丁. 高分子表面活性剂 [M]. 北京:化学工业出版社, 2002 107
- [39] Yongkun Wu, Jun Lin, Min Ye. Determination of Rotenone by High Performance Liquid Chromatography[J]. *Yunnan Chemical Technology*, 2006, 32(4): 59-60 (Ch). 武永昆,林军,叶敏. 鱼藤酮的高效液相色谱分析方法研究 [J]. 云南化工, 2006, 32(4): 59-60.