

· 研究论文 ·

负载戊唑醇的壳聚糖纳米胶囊的制备与性能研究

贾进伟^a, 张绍勇^a, 张爽^a, 陈安良^{*a}, 孙芳利^{*b}

(浙江农林大学 a. 生物农药高效制备技术浙江省工程实验室,
b. 国家木质资源综合利用工程技术研究中心, 浙江 临安 311300)

摘要:以戊唑醇为囊芯,壳聚糖和甲基丙烯酸甲酯为囊壁,采用自组装的方法制备了壳聚糖戊唑醇纳米胶囊。采用动态光散射仪(DLS)和透射电镜(TEM)对其粒径和形貌进行了表征,纳米胶囊的平均粒径(D_{50})为220 nm,分布系数(PDI)为0.23;经高效液相色谱仪测定,纳米胶囊的载药量为21.8%,包覆率为85.7%,体外释放192 h的释药率为65.97%。用带毒培养基法测试了其对于3种木竹材霉菌的抑制性能。结果表明,与相同质量浓度(48.2 mg/L)的戊唑醇乙酸乙酯溶液相比,载戊唑醇纳米胶囊处理前20 d抑菌效果较低,但随着时间的延长仍能保持较高的抑菌活性,药剂处理40 d时对木霉、青霉、黑曲霉菌的抑菌率分别仍达70.6%、66.4%和89.1%。研究结果可为纳米胶囊木竹材防霉剂的开发奠定基础。

关键词:戊唑醇;壳聚糖;纳米胶囊;抑菌活性

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2013.05.16

中图分类号:TQ450.6 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2013)05-0582-05

Preparation and properties of chitosan nanocapsules loaded with tebuconazole

JIA Jinwei^a, ZHANG Shaoyong^a, ZHANG Shuang^a, CHEN Anliang^{*a}, SUN Fangli^{*b}

(a. Provincial Engineering Laboratory of Biopesticide Preparation,

b. National Engineering and Technology Research Center of Wood-Based Resources Comprehensive Utilization, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China)

Abstract: Tebuconazole-loaded nanocapsules were synthesized by self-assembly method, with cores of tebuconazole and walls of chitosan and polymethylmethacrylate. The mean particle diameter(D_{50}) and particle dispersion index(PDI) of the nanocapsules were 220 nm and 0.23, characterized by dynamic light scattering(DLS) and transmission electron microscope(TEM). The drug loading efficiency, encapsulation rate and release characteristics of the nanocapsules *in vitro* at 192 h were 21.8%, 85.7% and 65.97% respectively, measured by high performance liquid chromatography. The fungicidal activity of tebuconazole-loaded nanocapsules against three kinds of wood and bamboo fungus was tested by poisoned medium method. Compared with the same mass concentration(48.2 mg/L) of tebuconazole ethyl acetate solution, tebuconazole-loaded nanocapsules exhibited lower fungicidal activity within

收稿日期:2013-04-22;修回日期:2013-08-21.

作者简介:贾进伟,男,在读硕士,主要从事微胶囊剂的研究与开发, E-mail: jiajinwei1379@163.com; *陈安良,通信作者(Author for correspondence),男,教授,主要从事林木化学保护研究, E-mail: anchen@126.com; *孙芳利,共同通信作者(Co-author for correspondence),女,教授,主要从事木竹材保护与改性研究, E-mail: sun-fangli@163.com

基金项目:国家自然科学基金项目(30972304).

20 days, but maintained higher fungicidal activity as time prolonged. The inhibition rate of the tebuconazole-loaded nanocapsules against *Trichoderma viride*, *Penicillium citrinum* and *Aspergillus niger* were 70.6%, 66.4% and 89.1% respectively on the 40th day. The results of present study would provide useful information for the development of wood and bamboo nanocapsules preservative.

Key words: tebuconazole; chitosan; nanocapsules; fungicidal activity

随着人们生活水平的不断提高和对天然产品的追求,木质产品越来越广泛地应用于住宅及户外建筑,但其在加工和使用过程中常因霉菌寄生而发生霉变。常用的有效防霉剂虽然效果好,但对人体和环境有毒,抗流失性较差,已被多数国家限制或禁止使用^[1-2]。有机杀菌剂戊唑醇具有高效、低毒等优点,但在水中溶解度较低,在制成水基化制剂时需加入表面活性剂,从而导致使用此类保护剂处理过的木、竹材吸湿性较高,胶合强度下降^[3-4]。

借鉴医用高分子领域关于载药纳米粒子的缓释与控释方面的研究成果,可将有机杀菌剂进行纳米胶囊化。与传统杀菌剂乳油相比,纳米胶囊粒径小,不需添加任何表面活性剂即可将其均匀分散于水中形成透明的胶体溶液,同时,理论上还可以通过缓释延长杀菌剂的持效期,因而,纳米胶囊剂在木竹材防腐中已受到越来越多的关注^[5-6]。张旭等^[7]采用自组装技术,合成了以聚乙二醇-聚己内酯嵌段共聚物(PEG-*b*-PCL)为囊壁、以戊唑醇为囊芯的载药胶束,但其包覆率低,合成工艺复杂,产业化生产较为困难。

壳聚糖是一种来源丰富的聚阳离子天然氨基多糖,拥有优良的可生物降解性、生物粘附性及阳离子性,将其制成纳米微粒后又拥有很多令人瞩目的性能,因而被认为是一类极具应用前景的药物控释载体^[8]。杨文静等^[9]利用粒子凝胶法制备了壳聚糖/三聚磷酸钠纳米胶囊,李志诚等^[10]以壳聚糖和海藻酸钠为壁材,通过复凝聚方法制备了纳米香精胶囊。本研究沿用张旭等的研究思路,以提高包覆率和简化合成方法为目标,改用壳聚糖和甲基丙烯酸甲酯为囊壁,制备出了一种负载戊唑醇的壳聚糖纳米胶囊,采用动态光散射仪(DLS)和透射电镜(TEM)对其粒径和形貌进行了表征,并对其缓释行为和抑菌性能进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

药剂:95%戊唑醇(tebuconazole)原药,江苏七州绿色化工股份有限公司;壳聚糖(CS,相对分子质

量10万),浙江金壳生物化学有限公司;99%的甲基丙烯酸甲酯(MMA),百灵威科技有限公司;98%的过硫酸铵,百灵威科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

供试菌种:木霉 *Trichoderma viride*、青霉 *Penicillium citrinum* 和黑曲霉 *Aspergillus niger*,由浙江农林大学国家木质资源综合利用工程技术研究中心提供。

仪器:Waters 600 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; Brookhaven-90 型动态光散射仪,美国 Brookhaven 公司; JEM-1200 EX 透射电镜,日本 JEOL 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 戊唑醇纳米胶囊的制备 参考 Ding 等^[11]方法并加以改进。将壳聚糖改性并自组装成纳米胶囊。取1g CS溶解于150 mL质量分数为0.43%的乙酸溶液中,油浴中加热至50℃,通氮气0.5 h以脱除氧气后加入2g MMA。取900 mg戊唑醇溶解于5 mL丙酮中,搅拌下逐滴加入上述反应液中,搅拌10 min后升温至70℃。加入88 mg过硫酸铵,在70℃、400 r/min下反应24 h,用0.45 μm滤膜过滤,收集固体物质(囊壁材料)和滤液,滤液即为戊唑醇纳米胶囊溶液(M₁)。在不加戊唑醇的情况下,采用同样方法制备空白纳米胶囊(M₂)。

1.2.2 戊唑醇纳米胶囊的表征

1.2.2.1 粒径及形貌 采用透射电镜(TEM)观察纳米胶囊形貌:将1滴胶囊溶液滴加到镀有碳膜的铜网上,在空气中干燥后用TEM观察。于25℃下采用动态光散射(DLS)法在取光角度为90°下测定戊唑醇纳米胶囊和空白纳米胶囊的平均粒径(D_{50})和分布系数(PDI),每次测定时间为5 min。

1.2.2.2 包覆率及载药量测定 取1.2.1节中收集的固体物质(囊壁材料),用甲醇反复洗涤3次,50℃烘干称重,即为析出的囊壁材料的质量。

取1 mL戊唑醇纳米胶囊溶液(M₁),用9 mL甲醇溶解,超声10 min,离心取上清液,采用高效液相色谱(HPLC)法测定纳米胶囊中戊唑醇的质量浓度,按照式(1)和(2)分别计算包覆率和载药量^[12-13]。

液相色谱检测条件: Sunfire™ C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱; 紫外检测波长 200 nm; 柱温为室温; 流动相为 V(乙腈): V(甲醇): V(水) = 50: 10: 40; 流速 1 mL/min。

包覆率 / % =

$$\frac{\text{载药纳米胶囊中戊唑醇的质量}}{\text{投药量}} \times 100 \quad (1)$$

载药量 / % =

$$\frac{\text{载药纳米胶囊中戊唑醇的质量}}{\text{纳米胶囊的质量}} \times 100 \quad (2)$$

其中: 载药纳米胶囊中戊唑醇的质量 = 纳米胶囊中戊唑醇的质量浓度 × 纳米胶囊溶液的体积; 投药量 = 加入的戊唑醇的质量 (900 mg); 纳米胶囊的质量 = 载药纳米胶囊中戊唑醇的质量 + 投放的囊壁材料的质量 (3 g) - 析出的囊壁材料的质量。

1.2.2.3 体外释药实验 准确移取 5 mL 戊唑醇纳米胶囊溶液 (M₁) 和相同质量浓度的戊唑醇乙酸

乙酯溶液, 分别置于已处理好的透析袋中, 两端夹紧后分别放入装有 1 000 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, 0.2 mol/L) 释放介质的烧杯中, 37 °C 下磁力搅拌, 于 0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72、96、120、144、168 和 192 h 分别取磷酸盐缓冲溶液 5 mL, 同时补加相同体积的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4, 0.2 mol/L)^[14-15]。用 1.2.2.2 节的 HPLC 条件测定磷酸盐缓冲溶液中戊唑醇的含量, 计算出累积释放量, 绘制体外释放曲线。

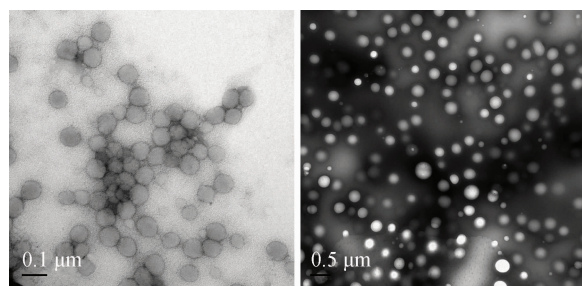
1.2.2.4 抑菌实验 采用带毒培养基法^[16]。处理组分别为相同质量浓度 (48.2 mg/L) 的戊唑醇纳米胶囊溶液和戊唑醇乙酸乙酯溶液, 对照组分别为空白纳米胶囊和乙酸乙酯。将直径为 6 mm 的木霉、青霉和黑曲霉菌菌饼分别接种到处理组 and 对照组 PDA 培养基中, 每皿接种菌饼 1 块, 每处理 3 次重复, 于 25 °C 的生化培养箱内培养, 定期测量菌落直径, 按照式 (3) 计算菌丝生长抑制率。

$$\text{抑菌率} / \% = \frac{\text{对照组菌落的平均直径} - \text{处理组菌落的平均直径}}{\text{对照组菌落的平均直径} - \text{菌饼直径}} \times 100 \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 戊唑醇纳米胶囊的粒径及形貌

图 1 为空白纳米胶囊 (图 1a) 和载戊唑醇纳米胶囊 (图 1b) 的透射电镜图。可以看出, 两者均为球形颗粒, 载药纳米胶囊的粒径明显偏大, 约为 200 nm, 而空白纳米胶囊约为 100 nm。



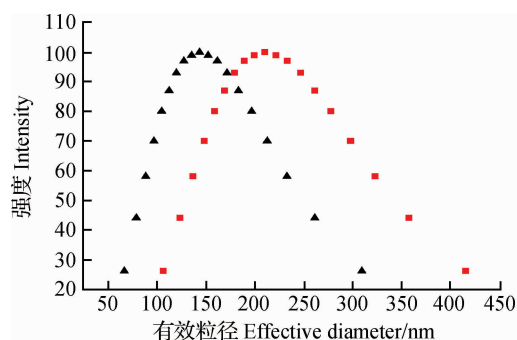
a. 空白纳米胶囊
Blank nanocapsules

b. 载戊唑醇纳米胶囊
Tebuconazole-loaded nanocapsules

图 1 空白纳米胶囊和载戊唑醇纳米胶囊的透射电镜图
Fig. 1 Transmission electron micrographs of blank nanocapsules and tebuconazole-loaded nanocapsules

DLS 法测得空白纳米胶囊和载戊唑醇纳米胶囊的 PDI 分别为 0.18 和 0.23, 均匀度良好, D₅₀ 分别为 143.4 和 220 nm (见图 2), 比透射电镜所测结果偏大, 其原因可能是透射电镜的样品是无水状态

下的, 而 DLS 测定的是纳米胶囊的水溶液, 其中的接枝共聚物发生了溶胀。戊唑醇胶囊化后, D₅₀ 大幅度增加的原因可能是戊唑醇的负载相当于使壁材壳聚糖-g-聚甲基丙烯酸甲酯 (CS-g-PMMA) 的疏水段变长, 从而使其亲水段相对较短, 需要聚集更多的分子以减少疏水链段与水溶液接触的表面积, 实现能量的最小化, 从而使得纳米胶囊的 D₅₀ 增大^[17]。



▲ 空白纳米胶囊 Blank nanocapsules
■ 载药纳米胶囊 Tebuconazole-loaded nanocapsules

图 2 空白纳米胶囊和载戊唑醇纳米胶囊的粒径分布
Fig. 2 Size distribution of blank nanocapsules and tebuconazole-loaded nanocapsules

2.2 载戊唑醇纳米胶囊的包覆率及载药量测定

1.2.1 节中收集的固体物质 (囊壁材料) 经甲醇洗涤后烘干称重, 为 236 mg, 用 HPLC 法测出载戊唑醇纳

米胶囊中戊唑醇的质量浓度为 4.82 mg/mL, 根据公式(1)和(2)得出包覆率为 85.7%, 载药量为 21.8%。

2.3 戊唑醇纳米胶囊的体外释药实验

结果见图 3。相同浓度(4.82 mg/mL)的戊唑醇乙酸乙酯溶液在磷酸缓冲溶液中很快释放, 50 h 左右即释放完全(图 3b); 而戊唑醇纳米胶囊在磷酸缓冲溶液中, 突释量与前者相当, 在 96 h 内, 释放累积量呈线性增加, 96 h 后, 释放速度明显减慢, 192 h 时仍未释放完全, 最终的平衡释药率为 65.97% (图 3a), 其原因可能是 CS-g-PMMA 负载药物导致药物扩散到溶液中的速度变慢, 释放周期加长^[18]。

2.4 戊唑醇纳米微胶囊的抑菌试验

载戊唑醇纳米胶囊及戊唑醇乙酸乙酯溶液对木霉、青霉及黑曲霉菌的抑制效果见图 4。相同质量浓度(48.2 mg/L)的载戊唑醇纳米胶囊与戊唑醇乙酸乙酯溶液相比, 处理前 20 d 抑菌效果较低, 但随着时间的延长仍能保持较高的抑菌活性, 施药 40 d 时对木霉、青霉、黑曲霉菌的抑菌率仍分别达 70.6%、

66.4% 和 89.1%, 说明壳聚糖戊唑醇纳米胶囊具有缓释、长效的抑菌性能。

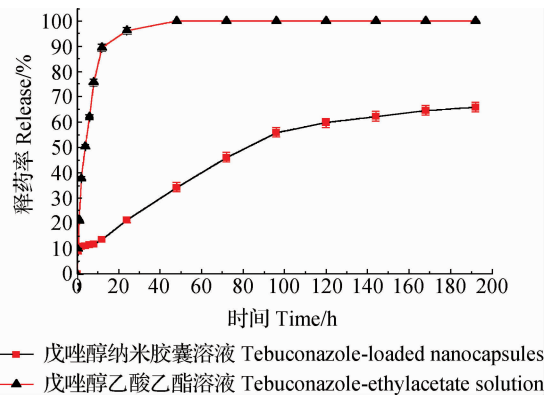


图 3 4.82 mg/mL 的载戊唑醇纳米胶囊及戊唑醇乙酸乙酯溶液的体外累积缓释曲线
Fig. 3 Cumulative releasing curves of tebuconazole-loaded nanocapsules and tebuconazole ethyl acetate solution *in vitro* (4.82 mg/mL)

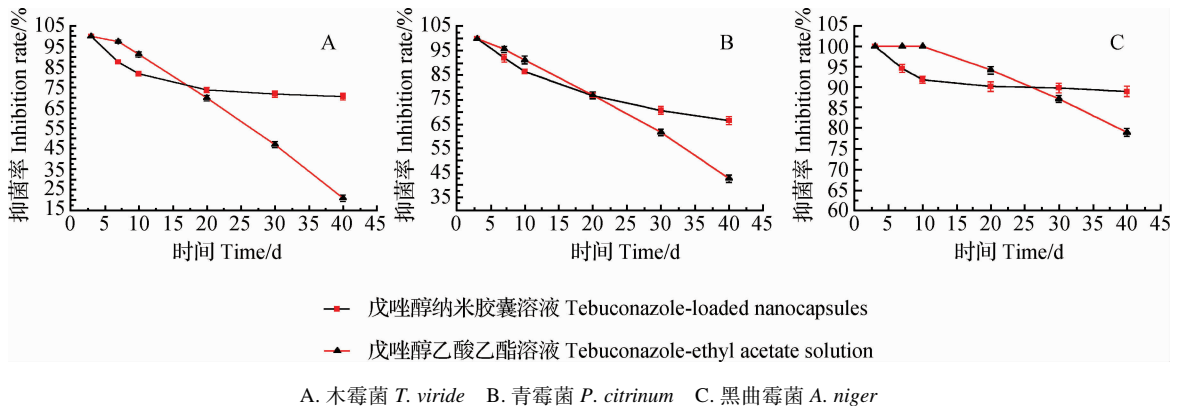


图 4 载戊唑醇纳米胶囊及戊唑醇乙酸乙酯溶液(48.2 mg/L)对木霉菌、青霉菌和黑曲霉菌的抑制效果
Fig. 4 Inhibition rate of tebuconazole-loaded nanocapsules and tebuconazole ethyl acetate solution (48.2 mg/L) against *Trichoderma viride*, *Penicillium citrinum* and *Aspergillus niger*

3 结论与讨论

本研究采用自组装的方法制得 D_{50} 为 220 nm、 PDI 为 0.23 的球形纳米胶囊, 载药量为 21.8%, 包覆率为 85.7%, 体外释放 192 h 的释药率为 65.97%, 质量浓度为 48.2 mg/L 的载戊唑醇纳米胶囊在施药 40 d 时对木霉、青霉、黑曲霉菌的抑菌率仍分别达 70.6%、66.4% 和 89.1%, 对 3 种腐朽菌均表现出长期高效的抑制效果。制得的壳聚糖戊唑醇纳米胶囊不借助任何表面活性剂, 可形成均匀稳定的悬浮液。

自组装过程中, 在壳聚糖上引入疏水性甲基丙烯酸甲酯支链, 会有效地促使壳聚糖基高分子在水

体系中自动聚集, 形成以疏水性链段为核, 亲水性壳聚糖为壳的核壳结构纳米粒子。这种核壳结构的壳聚糖纳米微粒可以有效地包覆难溶性的有机木材防腐剂, 形成较为稳定的球形纳米胶囊。与张旭等制备的负载戊唑醇的聚乙二醇-聚己内酯胶束相比, 本文报道的这种纳米胶囊不仅包覆率高, 缓释性能良好, 而且其囊壁材料廉价, 生产工艺简单, 更易投入产业化生产。

壳聚糖戊唑醇纳米胶囊悬浮液不含表面活性剂, 更适用于木竹材的防霉处理, 囊壁材料壳聚糖上有很多羟基和氨基, 可以和木材上的羟基形成氢键, 能够提高载药纳米胶囊在木材中的固着性, 这一点已经得到证实。如段新芳等^[19]将壳聚糖作为木材

和染料之间的桥梁用于木材染色,发现染料上染率比直接用染料染色的上染率高且均匀。眭亚萍等^[20]发现壳聚糖与铜盐反应形成的壳聚糖铜配合物在木材中的固着率远高于氯化铜。壳聚糖戊唑醇纳米胶囊在木竹材上的浸注、纳米胶囊与木竹材纤维的结合及抗流失等性能特点是进一步研究的主要问题。

参考文献 (Reference) :

- [1] 林宣益. 涂料用防腐剂和防霉防藻剂及发展[J]. 现代涂料与涂装, 2006, 9(1): 54-60.
LIN Xuanyi. Anti-corrosive agents, fungicides and algacides for coatings and their development[J]. *Modern Paint and Finishing*, 2006, 9(1): 54-60. (in Chinese)
- [2] 陈利芳, 何雪香, 马红霞, 等. 环保型防霉剂处理竹材的防霉效果[J]. 浙江农林大学学报, 2012, 29(1): 78-82.
CHEN Lifang, HE Xuexiang, MA Hongxia, et al. Performance of bamboo treated with environmentally sound anti-mould chemicals [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2012, 29(1): 78-82. (in Chinese)
- [3] FREEMAN M H, SHUPE T F, VLOSKY R P, et al. Past, present and future of the wood preservation industry; wood is a renewable natural resource that typically is preservative treated to ensure structural integrity in many exterior applications[J]. *Forest Prod J*, 2003, 53(10): 8-15.
- [4] OHYA Y, SHIRATANI M, KOBAYASHI H, et al. Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity[J]. *J Macromol Sci Pure Appl Chem*, 1994, 31(5): 629-642.
- [5] LIU Y, LAKS P, HEIDEN P. Controlled release of biocides in solid wood. III. Preparation and characterization of surfactant-free nanoparticles[J]. *J Appl Polymer Sci*, 2002, 86(3): 615-621.
- [6] LIU Y, LAKS P, HEIDEN P. Controlled release of biocides in solid wood. II. Efficacy Against *Trametes versicolor* and *Gloeophyllum trabeum* wood decay fungi [J]. *J Appl Polymer Sci*, 2002, 86(3): 608-614.
- [7] 张旭, 周月英, 陈安良, 等. 负载戊唑醇的聚乙二醇-聚己内酯胶束的制备与性能研究[J]. 农药学报, 2012, 14(3): 327-333.
ZHANG Xu, ZHOU Yueying, CHEN Anliang, et al. Preparation and performances of poly(ethylene glycol)-polycaprolactone micelles loaded with tebuconazole [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2012, 14(3): 327-333. (in Chinese)
- [8] MAJETI N V, RAVI K. A review of chitin and chitosan applications[J]. *React Funct Polym*, 2000, 46(1): 1-27.
- [9] 杨文静, 王婷, 何农跃. CS/TPP 纳米微胶囊的制备及其载药性能[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(3): 625-628.
YANG Wenjing, WANG Ting, HE Nongyue. Preparation and property of chitosan/sodium tripolyphosphate microcapsules as drug carrier[J]. *Chem J Chin Univ*, 2009, 30(3): 625-628. (in Chinese)
- [10] 李志诚, 石光, 黄杨, 等. 复凝聚法制备壳聚糖/海藻酸钠纳米香精胶囊[J]. 精细化工, 2012, 29(4): 376-382.
LI Zhicheng, SHI Guang, HUANG Yang, et al. Preparation of essence-loaded chitosan-alginate nanocapsules by complex coacervation[J]. *Fine Chemicals*, 2012, 29(4): 376-382. (in Chinese)
- [11] DING X C, RICHTER D L, MATUANA L M, et al. Efficient one-pot synthesis and loading of self-assembled amphiphilic

- chitosan nanoparticles for low-leaching wood preservation [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(1): 58-64.
- [12] 周嘉嘉, 陈汝福, 卢红伟, 等. 两亲多糖纳米胶束作为药物缓释载体的制备及释药研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(6): 667-671.
ZHOU Jiajia, CHEN Rufu, LU Hongwei, et al. Preparation and drug controlled-release of biodegradable amphiphilic polysaccharide nano-micelles as drug delivery systems [J]. *J Sun Yat-Sen Univ: Med Sci Ed*, 2006, 27(6): 667-671. (in Chinese)
- [13] 霍美蓉, 周建平, 魏彦, 等. 紫杉醇阴离子壳聚糖胶束的制备及其小鼠体内组织分布研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(24): 1876-1880.
HUO Meirong, ZHOU Jianping, WEI Yan, et al. Preparation of paclitaxel-loaded cationic chitosan polymeric micelles and its tissue biodistribution in mice [J]. *Chin Pharmaceut J*, 2006, 41(24): 1876-1880. (in Chinese)
- [14] 周怀胜, 蓝育青, 程良正, 等. 两亲性壳聚糖衍生物负载及缓释醋酸曲安奈德的性能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(29): 5371-5374.
ZHOU Huaisheng, LAN Yuqing, CHENG Liangzheng, et al. Bioloading of amphiphilic chitosan derivatives and their sustained-release of triamcinolone acetate [J]. *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2010, 14(29): 5371-5374. (in Chinese)
- [15] 刘占军, 张卫国, 于九皋, 等. 负载紫杉醇壳聚糖纳米粒的制备、表征与释药性能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(3): 493-495.
LIU Zhanjun, ZHANG Weiguo, YU Jiugao, et al. Preparation, characterization and drug release property of paclitaxel nanoparticles [J]. *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2009, 13(3): 493-495. (in Chinese)
- [16] 史怀, 朱育菁, 李芳, 等. 淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株的多糖及其对尖孢镰刀菌的抑制作用[J]. 中国植保导刊, 2006, 26(9): 5-7.
SHI Huai, ZHU Yujing, LI Fang, et al. Polysaccharides of *Paecilomyces lilacinus* strain NH-PL-03 and its inhibitory effects on *Fusarium oxysporum* [J]. *China Plant Protection*, 2006, 26(9): 5-7. (in Chinese)
- [17] 吴桐, 何勇, 韦嘉, 等. 聚乳酸-聚乙二醇嵌段共聚物结晶行为研究[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(11): 2193-2197.
WU Tong, HE Yong, WEI Jia, et al. Crystallization behavior of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol) diblock copolymers [J]. *Chem J Chin Univ*, 2006, 27(11): 2193-2197. (in Chinese)
- [18] YU B G, OKANO T, KATAOKA K, et al. Polymeric micelles for drug delivery: Solubilization and haemolytic activity of amphotericin B [J]. *J Control Rel*, 1998, 53(1-3): 131-136.
- [19] 段新芳, 孙芳利, 朱玮, 等. 壳聚糖处理对木材染色的助染效果及其机理的研究[J]. 林业科学, 2003, 39(6): 126-130.
DUAN Xinfang, SUN Fangli, ZHU Wei, et al. Effects of wood dyeing pretreated with chitosan and its mechanism for color improvement by chitosan [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2003, 39(6): 126-130. (in Chinese)
- [20] 眭亚萍, 鲍滨福, 孙芳利, 等. 壳聚糖铜化合物处理后马尾松的防白蚁效果[J]. 林业科学, 2008, 44(8): 152-154.
SUI Yaping, BAO Binfu, SUN Fangli, et al. Termite resistance of *Pinus massoniana* treated with chitosan-copper complexes [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2008, 44(8): 152-154. (in Chinese)