

黑木耳 β -葡聚糖/纳米硒复合物(DNT-Se)的制备工艺优化及活性评价

胡程, 宋浩颖, 常聪, 邱振鹏, 郑国华, 孟燕

Optimization of the Preparation Process and Evaluation of the Activity of β -Glucan/Nano-selenium Complex (DNT-Se) from Black Fungus

HU Cheng, SONG Haoying, CHANG Cong, QIU Zhenpeng, ZHENG Guohua, and MENG Yan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100004>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

纳米硒合成细菌Lxz-41的鉴定、培养条件优化及其在富硒猕猴桃栽培中的应用

Identification, Culture Conditions Optimization of Nano-selenium Synthetic Bacteria Lxz-41 and Its Application in Se-enriched Kiwifruit Cultivation

食品工业科技. 2019, 40(21): 110-117 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.21.018>

微生物合成纳米硒的研究进展

Research Progress in the Synthesis of Nano-Selenium by Microorganism

食品工业科技. 2020, 41(15): 339-344, 351 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.052>

蛹虫草基质多糖纳米硒复合物的制备研究

Study on the preparation of Cordyceps militaris polysaccharide/Nano-Selenium complex

食品工业科技. 2017(05): 49-53 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.05.001>

黑木耳多糖的酶法生物转化工艺优化及其体外降血糖性能

Optimization of Enzymatic Biotransformation Process of Polysaccharides from *Auricularia auricula* and Its Hypoglycemic Performance *in Vitro*

食品工业科技. 2019, 40(21): 203-209, 230 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.21.033>

纳米硒桔梗多糖复合物对CCl₄致小鼠肝损伤的保护作用

Protective effects of Nano-Selenium/*platycodon* polysaccharides complex on CCl₄-induced Liver Damage in Mice

食品工业科技. 2018, 39(1): 308-311, 317 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.01.056>

黑木耳多糖对胰脂肪酶活性的抑制作用

Inhibitory effect of *Auricularia auricula* polysaccharides on pancreatic lipase activity

食品工业科技. 2017(22): 56-60 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.22.012>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

胡程, 宋浩颖, 常聪, 等. 黑木耳 β -葡聚糖/纳米硒复合物(DNT-Se)的制备工艺优化及活性评价 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(21): 162–170. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100004

HU Cheng, SONG Haoying, CHANG Cong, et al. Optimization of the Preparation Process and Evaluation of the Activity of β -Glucan/Nano-selenium Complex (DNT-Se) from Black Fungus[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(21): 162–170. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100004

· 工艺技术 ·

黑木耳 β -葡聚糖/纳米硒复合物 (DNT-Se) 的 制备工艺优化及活性评价

胡程¹, 宋浩颖¹, 常聪¹, 邱振鹏¹, 郑国华^{1,2}, 孟燕^{1,*}

(1.湖北中医药大学药学院, 湖北武汉 432500;

2.湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 湖北武汉 432500)

摘要:探索黑木耳 β -葡聚糖/纳米硒复合物 (DNT-Se) 的最佳制备条件, 并探究其安全性。以多糖 (DNTs) 浓度、维生素 C (V_C) 与亚硒酸钠配比、亚硒酸钠浓度、反应时间、反应温度作为实验因素, 采用双波长比色法及马尔文粒径测定法表征 DNT-Se 中 Se NPs 的粒径变化, 以 Se NPs 的粒径大小为评价指标, 采用单因素及正交试验设计的方法考察 DNT-Se 的制备工艺, 并采用 CCK-8 法评价 DNT-Se 对 293T 人胚胎肾细胞和 AML-12 小鼠正常肝细胞的毒性。DNTs 浓度 1.0 mg/mL, 维生素 C 与亚硒酸钠配比为 6:1, 亚硒酸钠浓度为 1.0 mg/mL、反应时间 12 h、反应温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 为制备 DNT-Se 的最佳条件。该条件下制备的 DNT-Se 中 Se NPs 的粒径大小均值为 34.50 nm, 细胞增殖实验结果表明, DNT-Se 对 293T 人胚胎肾细胞和 AML-12 小鼠正常肝细胞在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率仍高于 82%, 同时 DNT-Se 能够抑制 HepG2 细胞的增殖, 在 72 h 时对 HepG2 细胞的 IC_{50} 值为 42.54 $\mu\text{g/mL}$ 。本研究成功确定了 DNT-Se 的最优制备工艺, 所得纳米硒粒径较小、分散均匀, 对肝癌细胞 HepG2 有抑制增殖的效果, 对正常细胞无毒性, 具有良好的生物安全性。

关键词: 纳米硒, 黑木耳, β -葡聚糖, 工艺考察

中图分类号: R943

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)21-0162-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100004

本文网刊:



Optimization of the Preparation Process and Evaluation of the Activity of β -Glucan/Nano-selenium Complex (DNT-Se) from Black Fungus

HU Cheng¹, SONG Haoying¹, CHANG Cong¹, QIU Zhenpeng¹, ZHENG Guohua^{1,2}, MENG Yan^{1,*}

(1.College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 432500, China;

2.Key Laboratory of Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 432500, China)

Abstract: This study aimed to explore the optimal conditions for the preparation of β -glucan/nanosized selenium (Se NPs) complexes (DNT-Se) and determining the safety of DNT-Se. The concentration of polysaccharides (DNTs), the ratio of vitamin C (V_C) to Na_2SeO_3 , the concentration of Na_2SeO_3 , the reaction time, and the reaction temperature were used as experimental factors. The dual-wavelength colorimetric method and the Malvern particle-size assay method were used to characterize changes in the particle size of Se NPs in DNT-Se, and the single-factors and orthogonal experimental design were used to investigate the preparation process of DNT-Se, and the toxicity of DNT-Se to 293T human embryonic kidney cells and normal liver cells of AML-12 mice was evaluated by using CCK-8. The results showed that the optimal conditions for DNT-Se preparation were list as follows: 1.0 mg/mL of DNTs, and 1.0 mg/mL of Na_2SeO_3 with the ratio of vitamin C to

收稿日期: 2022-10-08

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31900919); 国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点项目 (U21A20297); 湖北中医药大学校级杰出青年基金 (2022ZZXJ006)。

作者简介: 胡程 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药学, E-mail: hu19992021@163.com。

* 通信作者: 孟燕 (1991-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药新制剂, E-mail: yameng2016@126.com。

Na_2SeO_3 6:1. Moreover, the reaction time was 12 h, and the reaction temperature was 25 °C. The mean diameter of DNT-Se prepared under such conditions was around 34.50 nm. Cell proliferation experiment results showed that DNT-Se was non-toxic to 293T human embryonic kidney cells and normal liver cells of AML-12 mice, but it could inhibit the proliferation of HepG2 cells, and the IC_{50} value of DNT-Se for HepG2 cells at 72 h was 42.54 $\mu\text{g/mL}$. The synthesis process of DNT-Se was fixed in this work, and the obtained nanoparticles were with smaller size and uniform distribution. Moreover, the DNT-Se could significantly inhibit the proliferation of HepG2 hepatoma cells without toxicity to normal cells, which was of good biosafety.

Key words: Se NPs; black fungus; β -glucans; process investigation

近年来,随着纳米技术的发展,许多金属及非金属的无机纳米颗粒被用于各种疾病的治疗。其中,纳米硒(Se NPs)因其毒性低、生物利用度高、活性高成为硒类物质研究和发展的焦点。但纯的 Se NPs 不稳定,在水溶液中容易聚集,因此为保持其良好的水溶性和稳定性,在制备过程一般要添加分散剂或保护剂使其在水溶液中稳定分散^[1-4]。化学类表面活性剂虽然对纳米硒有较强的分散能力,但因其本身的毒性使纳米硒在生物活性方面的应用受限^[5]。核酸、蛋白质和多糖等天然生物大分子,由于其本身的生物相容性好,被更为广泛地用于构建生物医用材料。如 Meng 等^[6]利用多糖-亚硒酸钠螯合法制得一种新型的水溶性黄芪多糖纳米硒(Se-APS)。结果表明,Se-APS 含硒量高、水溶性好、副作用小,不仅能够促进 T 淋巴细胞的增殖,还能够抑制 HepG2 细胞的恶性增殖,减少细胞的迁移和侵袭。Zhu 等^[7]探讨了石笋多糖(ULP)稳定的 Se NPs 对 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎产生保护作用。因此,开发多糖-纳米硒复合物对临床疾病的治疗具有重要的意义。

黑木耳是生长在朽木上的一种腐生菌,具有补脾益气、止咳润肺、延缓衰老、辅助降血糖降血脂及抗癌等功效^[8]。黑木耳的主要活性成分为多糖,目前已有多篇研究报道了从黑木耳中提取得到的不同结构的多糖,并证明了他们具有多种生物活性,如抗肿瘤、抗氧化、降血脂及免疫调节等功效^[9-13]。在本课题组前期研究中,发现从黑木耳中提取的一种多糖,可在水中自组装成树枝状纳米管(DNTs)^[14-17],这种中空纳米管结构可以负载多种客体分子,如 DOX 药物、Pt(IV)前药、聚集诱导发光(AIE)染料以及金、银纳米粒子^[14,16-18]。并在治疗中展现出优良的疗效^[19]。然而,该复合物作为一种新型制剂,其制备工艺并未进行过系统研究,阻碍其作为药物的深入开发。

因此,本文拟通过系统的制备工艺考察来探索 DNT-Se 复合物的最优制备条件。有研究表明,在纳米硒的制备工艺中,多糖浓度、维生素 C 与亚硒酸钠的比例、反应温度等都是制备理想纳米颗粒的重要因素^[20]。因此,本文对黑木耳 β -葡聚糖/纳米硒复合物(DNT-Se)的制备工艺进行考察,主要研究黑木耳 β -葡聚糖溶液浓度、维生素 C 和亚硒酸钠配比、反应温度、反应时间、亚硒酸钠浓度等反应条件对 DNT-Se 复合物粒径的影响,采用单因素考察结合正交试验进行比例筛选,从而确定制备 DNT-Se 的最佳工

艺,并考察其对 HepG2 肝癌细胞增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑木耳 湖北房县;乙酸乙酯 天津市富宇精细化工有限公司;氯化钠 天津市大茂化学试剂厂;甲醇、无水乙醇、维生素 C、亚硒酸钠 国药集团化学试剂有限公司;氘代二甲基亚砷、溴化钾 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Cell Counting Kit-8 东仁化学科技(上海)有限公司;DMEM 培养基、双抗(青霉素-链霉素溶液)、胰酶(0.25%)、磷酸盐缓冲液 美国 HyClone 公司;胎牛血清(FBS) 美国 Gbico 公司;二甲亚砷(DMSO) 美国 Sigma 公司;人胚胎肾细胞株 293T、小鼠正常肝细胞株 AML-12 及人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

Implen N60 超微量紫外分光光度计 北京诺汇诚生物科技有限公司;Nicolet 6700 傅里叶红外光谱仪 赛默飞世尔科技有限公司;YP-2 压片机 上海山岳科学仪器有限公司;Mercury VX-300 核磁共振仪 Varian Mercury 公司;LC-10A 高效液相色谱仪、RI-10A 示差检测器 Shimadzu;色谱柱 BRT105-104-102 串联凝胶柱 BRT105-104-102 (8 mm×300 mm) BoRuiSaccharide;Nano-ZS90 粒径测定仪 马尔文仪器有限公司;JEM1400 透射电镜 日本 JEOL 有限公司;QUANTA200 扫描式电子显微镜 FEI 公司;XPertPro X 射线衍射仪 荷兰帕纳科公司;ESCALAB250Xi X 射线光电子能谱仪 Thermo Fisher Scientific。

1.2 实验方法

1.2.1 黑木耳 β -葡聚糖的提取、分离及表征 按照参考文献 [21] 的方法,黑木耳粉碎后,分别使用丙酮、乙酸乙酯回流 4 h 脱脂,将脱脂粉末烘干后使用 70% 乙醇溶胀 24 h 后用 0.9% NaCl 提取,收集上清,然后使用 Sevage 法脱蛋白、 H_2O_2 脱色,透析 7 d 后冻干即得黑木耳多糖。按照参考文献 [22] 的方法,采用苯酚-硫酸法对黑木耳 β -葡聚糖的总糖含量进行测定。将冻干的黑木耳多糖配制成多糖溶液,使用紫外分光光度计测定样品溶液在 490 nm 处的吸光度值,利用标准曲线计算样品的总糖含量。使用傅里叶红外光谱仪,采用溴化钾压片法采集黑木耳 β -葡聚糖的红外光谱,检测范围为 400~4000 cm^{-1} 。另

取 30 mg 黑木耳 β -葡聚糖冻干品溶于 1 mL 氘代二甲亚砜(DMSO- d_6)中,置于核磁仪上进行测定以得核磁共振(NMR)谱图,测定温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 黑木耳 β -葡聚糖/纳米硒复合物(DNT-Se)的制备 将 β -葡聚糖于 60 $^{\circ}\text{C}$ 溶于蒸馏水(1 mg/mL),冷却至室温,即可通过其在水中自组装得黑木耳 β -葡聚糖纳米管,命名为 DNTs。纯纳米硒对照组(Se NPs),采用 V_C 还原法制备。将 V_C 水溶液(1 mg/mL)以 4:1(n/n)的比例逐滴滴加到亚硒酸钠水溶液中,即可得到纳米硒粒子,命名为 Se NPs。DNT-Se 的制备方法类似,将黑木耳 β -葡聚糖配制成终浓度 1 mg/mL 的多糖溶液,待完全溶解后逐滴滴加 0.1 mol/L 的亚硒酸钠(Na_2SeO_3)水溶液,搅拌 30 min 后再按照维生素 C 与亚硒酸钠配比为 4:1(n/n)逐滴滴加维生素 C 水溶液(1 mg/mL),于 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 24 h。之后转入透析袋中(MWCO 3000)透析,冷冻干燥即得多糖/纳米硒复合物,命名为 DNT-Se。

1.2.3 β -葡聚糖/纳米硒复合物中纳米硒粒径的评价指标

1.2.3.1 双波长吸光度比值法 将浓度为 1 mg/mL DNTs、1 mg/mL 维生素 C 溶液以及 1 mg/mL 维生素 C+1 mg/mL DNTs(v/v=1:1)、1 mg/mL DNTs+1 mg/mL 维生素 C+1 mol/L 亚硒酸钠溶液(v/v/v=1:1:1),进行紫外全波长扫描(200~800 nm),确定波长 λ_1 (410 nm)、 λ_2 (490 nm)的吸光度 A_1 、 A_2 ,并计算 A_1/A_2 的值,以各因素为横坐标,以波长比(A_1/A_2)为纵坐标,绘制曲线图,以比值大小判断 DNT-Se 复合物中 Se NPs 的粒径大小,每个样品重复 3 次。

1.2.3.2 粒径仪测定法 将所得的 DNT-Se 置于马尔文激光粒度仪中,稳定 120 s,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定 DNT-Se 复合物中 Se NPs 的粒径,每个样品重复 3 次。

1.2.4 DNTs-Se 粒径的单因素考察 分别考察 DNTs 浓度、亚硒酸钠浓度、维生素 C 与亚硒酸钠配比、反应温度、反应时间对 DNT-Se 形成的影响。分别配制浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL 的 DNTs 溶液,其他条件保持不变,考察 DNTs 浓度对 DNT-Se 形成的影响;保持其他条件不变,考察 0.6、0.8、1.0、1.2 mol/L 的亚硒酸钠溶液对 DNT-Se 形成的影响;精密称取维生素 C 与亚硒酸钠,使二者终配比为 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1(n/n 物质的量之比),考察维生素 C 与亚硒酸钠配比对 DNT-Se 形成的影响;分别考察反应温度为 25、37、60、80 $^{\circ}\text{C}$ 时对 DNT-Se 形成的影响;在保持其他条件不变的条件下分别考察反应 3、6、12、24、36 h 对 DNT-Se 形成的影响。

1.2.5 正交试验优化 DNT-Se 的制备工艺 以 DNTs-Se 中 Se NPs 粒径大小的单因素考察实验结果为依据,选取三种因素作为实验对象,将最适宜的条件作为中间水平,以 $L_9(3^4)$ 设计正交因素水平表为模板,按照表 1 进行正交试验,以对 DNT-Se 的制备进行进一步的优化。

表 1 正交设计中的因素与水平

Table 1 Factors and levels in orthogonal design

因素	代号	水平		
		1	2	3
DNTs浓度(mg/mL)	A	0.5	1.0	1.5
$\text{V}_\text{C}:\text{Na}_2\text{SeO}_3$ (n/n)	B	4:1	5:1	6:1
Na_2SeO_3 浓度(mol/L)	C	0.6	0.8	1.0

1.2.6 黑木耳 β -葡聚糖/纳米硒复合物(DNT-Se)的形貌表征 DNT-Se 的形貌特征通过透射电子显微镜(TEM)来观察。取一滴新制备的 DNTs、Se NPs 及 DNT-Se 溶液分别小心滴于 100 目的铜网上,待样品被吸附 10 min 后,用滤纸吸走各剩余样品溶液,室温下晾干铜网,通过 TEM 观察依次各样品的微观形态。同时用能量色散光谱仪对其表面积断面进行观察,加速电压为 5 kV,测试前均进行喷金操作。

1.2.7 细胞增殖实验 采用 CCK8 法^[23]检测 DNT-Se 等样品对各种细胞增殖抑制的情况。首先采用该法检测 DNTs、Se NPs 及 DNT-Se 对 HepG2 肝癌细胞的增殖抑制情况。将处于对数生长期的 HepG2 细胞消化,加适量完全培养基轻吹散成细胞悬液,并用细胞计数器计数以便进行密度换算。将细胞混悬液稀释后以 1.0×10^4 个/孔的密度分别接种于 96 孔板内,于细胞培养箱中待其贴壁。贴壁后将含有一定浓度梯度的 DNTs、Se NPs、DNT-Se 培养基(6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)分别加入到各孔中,同时建立无药物、无细胞的空白组和无药物、有细胞的对照组,每组设置 4 个复孔,置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中继续分别培养 24、48、72 h。

接着采用该法检测 DNT-Se 对 293T 人胚胎肾细胞及 AML-12 小鼠正常肝细胞活性的影响,以进一步确定 DNT-Se 的生物安全性。将 293T 细胞和 AML-12 细胞以 1×10^5 的密度接种于 96 孔板,待其贴壁。之后加入含有一定浓度梯度的 DNT-Se 培养基(6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$),同时建立无药物、无细胞的空白组和无药物、有细胞的对照组,每组设置 4 个复孔,置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中继续培养 48 h。

以上三种细胞终止培养后,每孔加入无菌 PBS 清洗细胞 2 次以洗净培养基,再加入 100 μL 含 10% CCK8 培养基,于培养箱中继续孵育 20 min,最后用酶标仪在 450 nm 处检测每孔的吸光度 OD 值。用下式计算各细胞的存活率,用 Graphpad prism 7.0 计算药物的半数致死浓度(IC_{50}):

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100$$

1.3 数据处理

采用 Graph Pad Prism 7.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数采用 One-Way ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 黑木耳 β -葡聚糖的理化性质表征

所得多糖采用苯酚-硫酸法测得总糖含量为 94.1%, 因前期^[24-25]已通过色谱洗脱、甲基化分析等手段对黑木耳 β -葡聚糖的平均高度、长度、分子量、链构象等进行了详细的表征, 故本文仅对该多糖进行初步验证并与之对比, 从而确证二者的相似性。红外光谱图如图 1A 所示。由图 1A 可知, 黑木耳葡聚糖在 890 cm^{-1} 处有明显的吸收峰, 为 β 构型的特征峰^[26], 结合前期研究, 该黑木耳多糖为 β -葡聚糖。

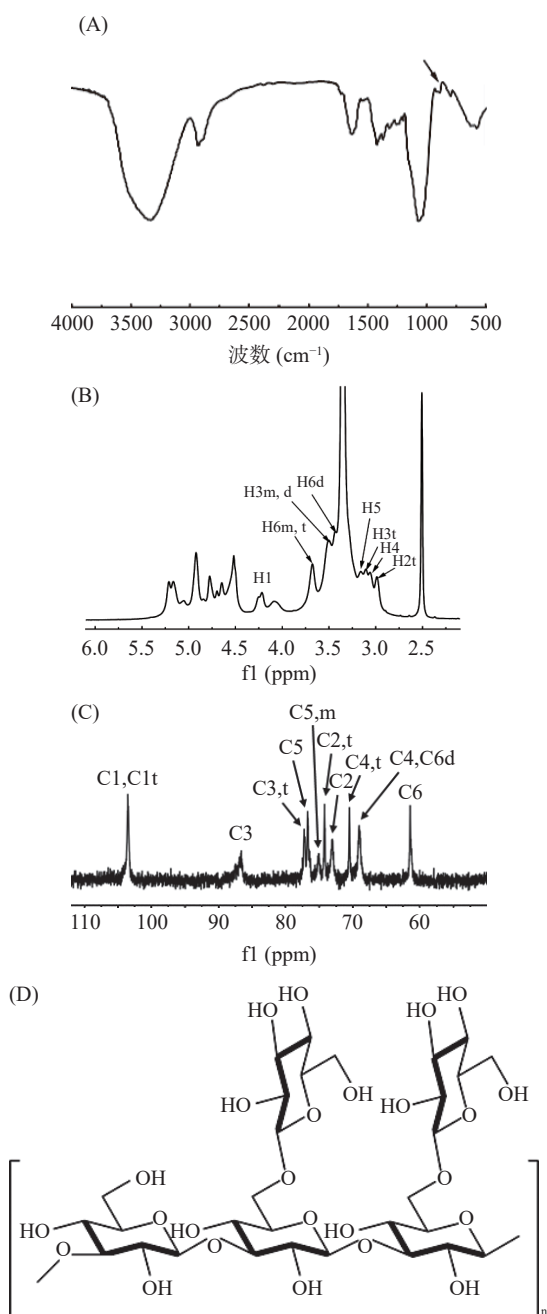


图 1 黑木耳 β -葡聚糖的近红外图谱(A)、核磁共振氢谱(B)、核磁共振碳谱(C)及其结构式(D)

Fig.1 FT-IR spectrum (A), ^1H NMR spectrum (B), ^{13}C NMR spectrum (C) and structural formula (D) of β -glucan from *Auricularia auricula*

采用核磁共振氢谱和碳谱分析黑木耳 β -葡聚糖的连接方式。如图 1B 和图 1C 所示, 在 ^{13}C 核磁共振谱中未发现典型的糖醛酸信号(176.5 ppm), 表明 β -葡聚糖是中性多糖。黑木耳 β -葡聚糖在 74.26 ppm 处 C2t 积分值(侧链)和在 72.99 ppm 处 C2(主链)积分值的比值为 1:1.4, DNTs 的所有化学位移如表 2 所示。与前期报道黑木耳多糖^[27-29] 的 NMR 特征峰等进行对比可确定其化学结构为主链上每三个 β -(1,3)-葡萄糖主链带有两个 β -(1,6)-葡聚糖的侧链, 具体结构式如图 1D 所示。

表 2 黑木耳 β -葡聚糖的 ^1H 和 ^{13}C NMR 化学位移
Table 2 ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts of β -glucan from *Auricularia auricula*

化学位移 (ppm)	1	2		3		4		5		6	
		2m,d	2t	3m,d	3t	4m,d	4t	5d,t	5m	6m,t	6d
^1H	4.24	—	2.93	3.20	3.10	3.16		3.28		3.67	3.43
^{13}C	103.5	73.0	74.2	86.6	77.2	69.0	70.6	76.7	75.2	61.4	69.0

注: m, d 和 t 分别代表 1,3-葡萄糖链、1,3,6-葡萄糖和末端葡萄糖。

2.2 黑木耳 β -葡聚糖/纳米硒复合物 (DNT-Se) 的制备工艺研究

2.2.1 不同溶液的全扫描吸收光谱 根据之前报道的胶体溶液双波长法^[30-31] 可知, 硒纳米颗粒的粒径参数 $\varepsilon = \lg(A_2/A_1) / \lg(\lambda_1/\lambda_2)$, 其中 A_1 、 A_2 分别表示样品在波长 λ_1 、 λ_2 下的吸收值。可用 A_1/A_2 的比值来表征纳米硒的粒径变化, 当比值不变时, 纳米硒的粒径不再发生变化; 比值越大, 纳米硒的粒径越小, 形貌越稳定。图 2 为不同溶液的 UV-Vis 全波长扫描吸收光谱。从图中可以看出, DNTs、 V_C 及二者的混合样品在 $200\sim 300\text{ nm}$ 范围内有明显的吸收峰, 但在 $300\sim 600\text{ nm}$ 范围内无明显吸收; 而 DNTs+ V_C + Na_2SeO_3 (总反应介质) 在 $200\sim 600\text{ nm}$ 处均有吸收, 且峰值较宽, 说明在加入 Na_2SeO_3 后生成了一定的纳米硒, 因此在 $300\sim 600\text{ nm}$ 范围内选取 410 和 490 nm 作为纳米硒的测定波长, 并以 A_{410}/A_{490} 作为表征纳米硒粒径随时间变化的依据及指标。

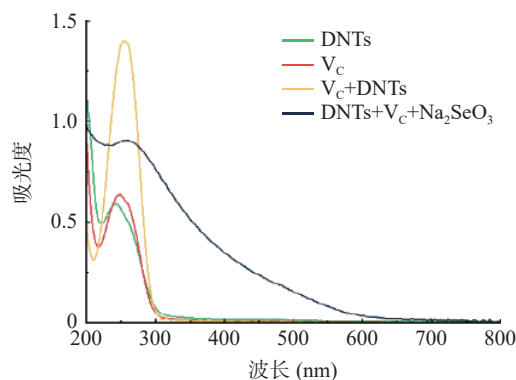


图 2 不同溶液的 UV-Vis 全扫描吸收光谱

Fig.2 Full-scanning UV-Vis absorption spectra of different solutions

2.2.2 单因素考察实验结果

2.2.2.1 DNTs 浓度对 DNT-Se 形成的影响 本试验

以黑木耳 β -葡聚糖溶液 DNTs 作为模板剂,研究了 DNTs 浓度对 DNT-Se 复合物中 Se NPs 粒径的影响。各浓度下的吸光度比值及 DNT-Se 复合物中 Se NPs 的粒径如表 3 所示。随着 DNTs 浓度的增加, A_{410}/A_{490} 的数值呈现先上升后下降的趋势,在 DNTs 浓度为 1.0 mg/mL 时 A_{410}/A_{490} 达到最大值 2.549 ± 0.025 。同时,马尔文粒径仪测得的结果表明, DNT-Se 复合物中 Se NPs 的粒径出现先减小后增大的趋势,在 1.0 mg/mL 时 Se NPs 的粒径最小。将各组溶液放置 7 d 后,均未发现聚沉等现象,可初步说明各组的稳定性良好。因此,选择 1.0 mg/mL DNTs 作为反应体系中 DNTs 的浓度。

表 3 不同 DNTs 浓度对纳米硒的粒径及 A_{410}/A_{490} 的影响
Table 3 Effect of different DNTs concentration on the size of Se NPs and A_{410}/A_{490}

DNTs 浓度(mg/mL)	A_{410}/A_{490} (双波长比色法)	纳米硒粒径(nm)
0.1	1.796 ± 0.008^a	49.37 ± 9.61^c
0.5	1.798 ± 0.002^a	36.86 ± 4.44^b
1.0	2.549 ± 0.025^b	32.30 ± 6.62^a
1.5	2.384 ± 0.030^{ab}	41.04 ± 3.73^b
2.0	2.313 ± 0.041^{ab}	39.71 ± 6.03^b

注:同列标有不同小写字母者表示组间差异显著($P < 0.05$);标有相同小写字母者表示组间差异不显著($P > 0.05$)。

2.2.2.2 维生素 C 与亚硒酸钠的配比对 DNT-Se 形成的影响 各配比下的吸光度比值及纳米硒的粒径如表 4 所示。固定反应体系中亚硒酸钠的终浓度为 0.1 mol/L, V_C 的量对反应的影响主要表现在体系中的亚硒酸钠是否得到完全反应,能否生成足够量的纳米硒。判断反应完全的程度的最直观的变化则是溶液颜色的深浅,越深表明纳米硒生成量越多,同时, A_{410} 、 A_{490} 也可能越大并且趋于稳定。从表 4 中可以看出,随着 V_C/Na_2SeO_3 的升高, A_{410}/A_{490} 逐渐增加,这说明溶液中越来越多的亚硒酸钠参与了反应;而当比值达到 5:1 之后, A_{410}/A_{490} 呈现下降的趋势,这说明当 V_C/Na_2SeO_3 达到 5:1 之后,反应体系中的亚硒酸钠得到了完全反应,由于纳米硒生成过多,产生聚集导致 A_{410}/A_{490} 开始减小。接着测定了各体系中纳米硒的粒径,发现其在 V_C/Na_2SeO_3 为 5:1 时的粒径最小,该结果与双波长比值结果一致。将各组溶液放置 7 d 后,均未发现聚沉等现象,可初

表 4 不同 V_C 与 Na_2SeO_3 的配比对纳米硒的粒径及 A_{410}/A_{490} 的影响

Table 4 Effect of different ratio of V_C and Na_2SeO_3 on the size of Se NPs and A_{410}/A_{490}

$n_{V_C} : n_{Na_2SeO_3}$	A_{410}/A_{490} (双波长比色法)	纳米硒粒径(nm)
2:1	1.646 ± 0.005^a	42.85 ± 3.42^a
3:1	1.797 ± 0.005^b	41.99 ± 5.62^a
4:1	2.153 ± 0.012^c	40.86 ± 1.79^a
5:1	2.183 ± 0.008^d	37.88 ± 7.32^a
6:1	2.158 ± 0.003^c	44.86 ± 1.12^a

步说明各组的稳定性良好。结合该实验结果,故选择 $V_C/Na_2SeO_3=5:1$ 作为反应体系中维生素 C 与亚硒酸钠的比例。

2.2.2.3 反应温度对 DNT-Se 形成的影响 反应温度不仅对纳米硒粒径的大小有影响,而且对作为稳定剂的多糖 DNTs 也有影响。因此,确定一定的反应温度是至关重要的一环。本试验研究了不同的反应温度对纳米硒形成的影响,实验结果如表 5 所示。从结果中可以得知,随着反应温度的升高, A_{410}/A_{490} 逐渐降低,纳米硒粒径逐渐增加,甚至在 80 °C 时出现了聚沉,因为温度过高会破坏多糖的链状结构,同时其自组装能力也会受到影响,导致整个反应体系不稳定,多糖稳定纳米硒的能力减弱^[32-33]。尽管在 25、37、60 °C 时均未发生聚沉,但 25 °C 时 DNT-Se 粒径最小,因此,选择 25 °C 作为制备 DNT-Se 的最佳反应温度。

表 5 不同反应温度对纳米硒的粒径及 A_{410}/A_{490} 的影响
Table 5 Effect of different reaction temperature on the size of Se NPs and A_{410}/A_{490}

反应温度(°C)	A_{410}/A_{490} (双波长比色法)	纳米硒粒径(nm)
25	2.085 ± 0.015^b	37.65 ± 2.64^a
37	2.047 ± 0.010^a	42.41 ± 3.10^{ab}
60	1.882 ± 0.008^a	49.06 ± 5.70^b
80	—	—

注:“—”表示样品为浑浊状态;表 7 同。

2.2.2.4 反应时间对 DNT-Se 形成的影响 与反应温度对纳米硒粒径大小的影响一样,反应时间对纳米硒的粒径也有着重要影响。因此,本试验也探究了反应时间对纳米硒形成的影响,实验结果如表 6 所示。从结果中可以看出,反应时间在 12 h 内,随着反应时间的增加, A_{410}/A_{490} 也逐渐增加,纳米硒粒径逐渐减小;当反应时间大于 12 h 时, A_{410}/A_{490} 开始降低,纳米硒粒径增加。在反应温度一定时,随着反应时间的延长,体系中生成的纳米硒逐渐增多,溶液的颜色会出现浅黄色→橙色→红色的变化, A_{410}/A_{490} 增加, DNT-Se 粒径减小^[34-35]。但反应时间过长,纳米硒会发生集聚,硒纳米粒子的粒径增大,溶液的颜色会由红色变为砖红色,甚至出现红色沉淀。因此,反应时间不宜过长,故选择 12 h 作为制备 DNT-Se 的反应时间。

表 6 不同反应时间对纳米硒的粒径及 A_{410}/A_{490} 的影响
Table 6 Effect of different reaction time on the size of Se NPs and A_{410}/A_{490}

反应时间(h)	A_{410}/A_{490} (双波长比色法)	纳米硒粒径(nm)
3	1.812 ± 0.007^a	49.25 ± 7.16^b
6	1.845 ± 0.005^b	41.25 ± 7.52^{ab}
12	2.092 ± 0.019^c	35.76 ± 7.45^a
24	2.039 ± 0.013^d	40.16 ± 4.38^{ab}
36	1.913 ± 0.007^c	44.93 ± 6.37^b

2.2.2.5 亚硒酸钠浓度对 DNT-Se 形成的影响 本

研究最主要的目的是在纳米硒分散且稳定的前提下,利用 DNTs 负载尽可能多的纳米硒。因此纳米硒的浓度至关重要。不同亚硒酸钠浓度对粒径的影响如表 7 所示。随着浓度的增加, A_{410}/A_{490} 逐渐减小, 纳米硒粒径也呈现增加的趋势; 在浓度为 1.2 mol/L 时, 样品出现了聚沉现象。实验数据表明, 0.6、0.8、1.0 mol/L 的 A_{410}/A_{490} 与粒径相差不大, 结合实验的目的, 选择 Na_2SeO_3 为 1.0 mol/L 作为反应体系中亚硒酸钠的浓度。

表 7 不同 Na_2SeO_3 浓度对纳米硒的粒径及 A_{410}/A_{490} 的影响

Table 7 Effect of different Na_2SeO_3 concentration on the size of Se NPs and A_{410}/A_{490}

Na_2SeO_3 浓度(mol/L)	A_{410}/A_{490} (双波长比色法)	纳米硒粒径(nm)
0.6	2.158 ± 0.043^b	37.93 ± 4.70^a
0.8	1.832 ± 0.003^b	41.79 ± 1.96^a
1	1.795 ± 0.016^a	43.40 ± 3.08^a
1.2	—	—

2.2.3 正交试验优化 DNT-Se 的制备工艺 基于前述单因素实验的结果及本研究的主要目的,选择 DNTs 浓度(A)、维生素 C 与亚硒酸钠的配比(B)和亚硒酸钠浓度(C)作为因素,选择最适宜的条件作为中间水平,各设三个水平,第四个因素为空白组,作为本实验的误差列,采用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 设计正交试验表,继续优化 DNT-Se 的制备工艺,优化指标为纳米硒粒径。实验使用的因素水平如表 1,实验结果如表 8 所示。

表 8 正交试验设计与结果

Table 8 Orthogonal experimental design and results

实验号	水平				纳米硒粒径(nm)
	A DNTs浓度	B $\text{V}_\text{C}:\text{Na}_2\text{SeO}_3$	C Na_2SeO_3 浓度	空白	
1	1	1	1	1	47.56
2	1	2	2	2	46.22
3	1	3	3	3	44.28
4	2	1	2	3	37.97
5	2	2	3	1	40.12
6	2	3	1	2	39.64
7	3	1	3	2	43.87
8	3	2	1	3	47.06
9	3	3	2	1	44.70
K_1	138.1	86.3	89.5	88.3	
K_2	78.5	88.9	85.9	86.5	
K_3	90.4	85.7	85.5	86.2	
$\bar{K}_1$	46.020	43.133	44.753	44.127	
$\bar{K}_2$	39.243	44.467	42.963	43.243	
$\bar{K}_3$	45.210	42.873	42.757	43.103	
R	6.8	1.6	2.0	1.0	

对正交试验的结果,以 DNTs-Se 中 Se NPs 粒径大小为指标,进行直观分析及方差分析,如表 8 和表 9 所示,以空白组作为误差项,因素 A、B、C 的 F 值与临界值比较后可知,因素 A 不同水平对纳米硒的影响有显著性差异,即 DNTs 浓度对纳米硒的

影响显著($P<0.05$)。各因素对纳米硒粒径的影响程度为 $A>C>B$ 。根据正交试验结果,得出最佳方案为 $A_2B_3C_3$ 。

表 9 正交试验结果方差分析

Table 9 Analysis of variance of orthogonal experiment results

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	82.180	2	44.494	19.000	*
B	4.384	2	2.374	19.000	
C	7.233	2	3.916	19.000	
误差	1.850	2			

“*”表示差异显著, $P<0.05$ 。

2.2.4 验证实验 运用正交试验所得的最优条件进行 5 组实验对其进行验证,即 DNTs 浓度 1.0 mg/mL,维生素 C 与亚硒酸钠配比 6:1,亚硒酸钠浓度为 1.0 mol/L。5 次验证试验的结果中纳米硒粒径分别为 33.59、35.10、34.48、35.32、34.01 nm,5 次验证实验中纳米硒粒径的均值为 34.50 ± 0.72 nm。故选择 $A_2B_3C_3$ 作为最佳制备条件。

2.3 黑木耳 β -葡聚糖/纳米硒复合物(DNT-Se)的形貌表征

DNTs 及 Se NPs 的透射电镜结果如图 3 所示。由图 3A 所示,DNTs 在水中可自组装成为平均直径约为 200 nm 的树枝状的中空纳米纤维。而没有分散剂的纯 Se NPs 则聚集成团且粒径较大,约为 220 nm (图 3B)。图 3C 和图 3D 是 DNT-Se 的透射电镜图、粒径分布图。显然,因 DNTs 的存在,Se NPs 不再聚集成团,而是均一、单一地分散于 DNTs 的中空纳米管中,与文献 [17] 报道相符。DNT-Se 形态良好,粒径较小,约为 30.9 nm(图 3C),而正交试验所得的粒径大小约为 34.50 nm,这是因为正交验证时

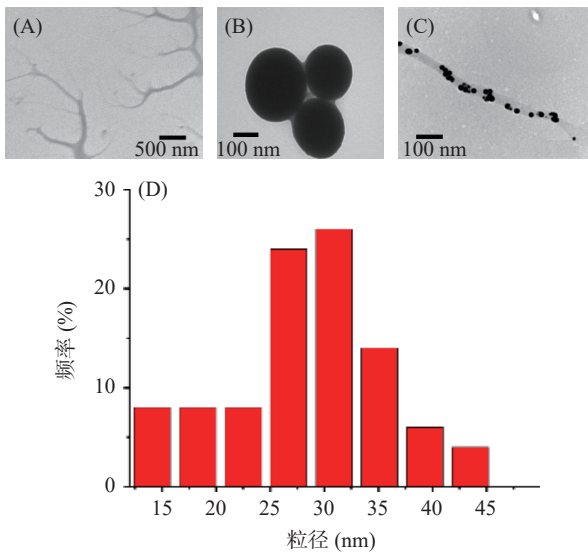


图 3 DNTs、Se NPs、DNT-Se 的 TEM 图像及 DNT-Se 中 Se NPs 的粒径分布图

Fig.3 TEM image of DNTs, Se NPs and DNT-Se, and particle size distribution of Se NPs in DNT-Se

注: A. DNTs; B. Se NPs; C. DNT-Se; D. DNT-Se 中 Se NPs 的粒径分布。

中测量粒径时 DNT-Se 是以一个液体的状态存在,多糖在溶液中会有一定的体积膨胀。而透射电镜中, DNT-Se 是处于干燥状态的。此时的粒径确实会与溶液状态下粒径大小具有一定的差异。

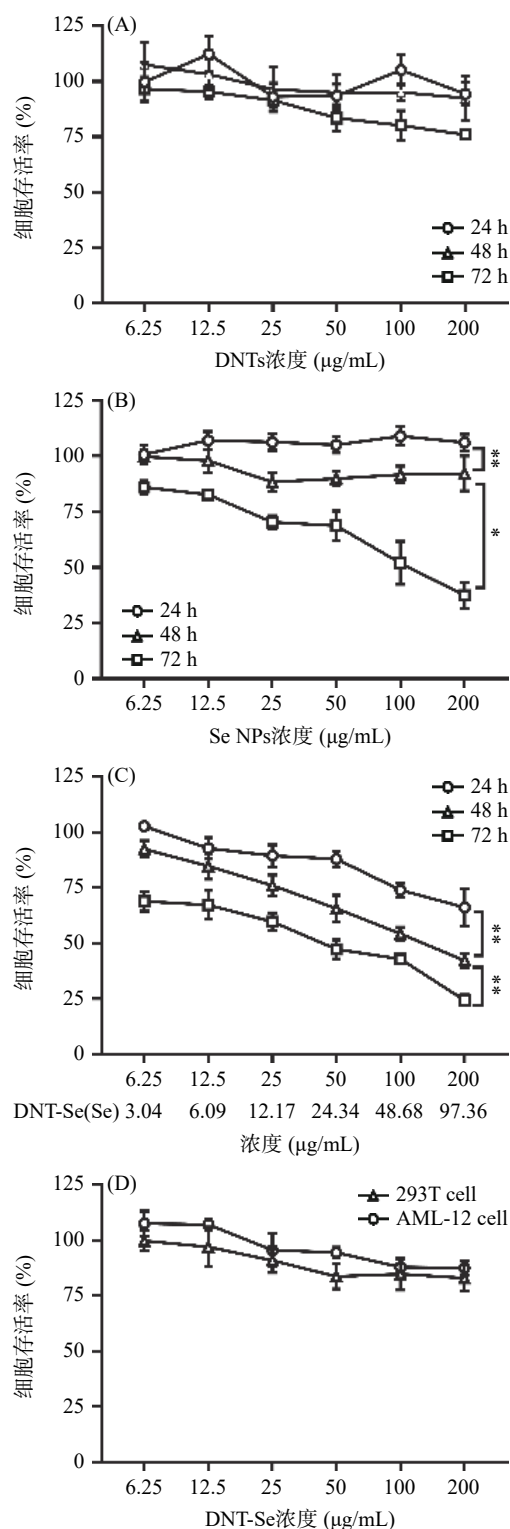


图4 DNTs、Se NPs、DNT-Se 与不同细胞在不同孵育时间的存活率

Fig.4 Survival rates of different cells at different incubation time of DNTs, Se NPs and DNT-Se

注: A~C 分别表示 HepG2 细胞分别与 DNTs、Se NPs、DNT-Se 在 24、48、72 h 后的细胞存活率; D 表示 DNT-Se 与不同细胞孵育 48 h 后的细胞存活率; * $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=4$ 。

2.4 细胞增殖实验

有研究表明,含硒的材料通过诱导细胞凋亡而发挥抗癌活性^[33]。故为考察各样品对肝癌细胞和正常细胞的作用,本研究采用 CCK8 法对 DNTs、Se NPs 及 DNT-Se 对 HepG2 细胞的作用进行了探讨。结果如图 4 所示,由图 4A 可知, DNTs 与细胞作用 72 h 后,在最高浓度下存活率仍高于 75%,说明 DNTs 基本不杀死细胞,也可推测其基本不引起细胞凋亡;由图 4B 可知,200 $\mu\text{g/mL}$ 的 Se NPs 与细胞作用 48 h 后,在最高浓度下存活率大于 92%,而当其作用时间达 72 h 时,其存活率显著下降且与 48 h 时存在显著性差异($P<0.05$);由图 4C 可知,随着 DNT-Se 与细胞共孵育的时间的增加,其存活率逐渐降低,对三个时间段的半数致死浓度进行计算, DNT-Se 在 24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为 412.81、125.64、42.54 $\mu\text{g/mL}$ 。可见, DNT-Se 对 HepG2 细胞的作用具有时间依赖性,且在各时间段内, DNT-Se 组的 IC_{50} 均低于 Se NPs 组,可说明经 DNTs 分散后的制剂(DNT-Se)能使更多的 Se NPs 进入肝癌细胞,从而更好地发挥抑制癌细胞增殖的作用。考虑到制剂在体内的代谢情况,后续实验拟采用 48 h 作为 DNT-Se 及各组样品与细胞的作用时间。

为了进一步考察 DNT-Se 对正常细胞的影响,本研究采用 293T 人胚胎肾细胞及 AML-12 小鼠正常肝细胞的 CCK8 实验以确证其安全性。如图 4D 所示, DNT-Se 分别与 293T 细胞和 AML-12 细胞作用 48 h 后,即使在最高浓度(200 $\mu\text{g/mL}$)时,其细胞存活率仍高于 82%,说明 DNT-Se 对正常细胞并无毒性作用,具有良好的生物安全性。

3 结论

本文采用原位还原法制备黑木耳 β -葡聚糖/纳米硒复合物(DNT-Se),考察了 DNTs 浓度、维生素 C 与亚硒酸钠配比、反应温度、反应时间、亚硒酸钠浓度对 DNT-Se 粒径大小的影响,最终确定 DNT-Se 的最佳制备工艺为 DNTs 浓度 1.0 mg/mL ,维生素 C 与亚硒酸钠配比 6:1,亚硒酸钠浓度为 1.0 mol/L ,反应温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,反应时间为 12 h,所得 DNT-Se 粒径平均值为 34.50 nm。细胞增殖实验结果表明, DNT-Se 对 293T 人胚胎肾细胞及 AML-12 小鼠正常肝细胞基本无毒性,但是对 HepG2 肝癌细胞的增殖具有显著的抑制作用,且其对 HepG2 肝癌细胞增殖的抑制作用明显优于 Se NPs。本研究为多糖/纳米硒复合物的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] DAVY T, CASTELLANO S. The genomics of selenium: Its past, present and future[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2018, 1862(11): 2427-2432.
- [2] LIU X, SUN J, GAO W. Site-selective protein modification with polymers for advanced biomedical applications[J]. *Biomaterials*, 2018, 178: 413-434.
- [3] XIE M, YANG M, SUN X, et al. WS 2 nanosheets functional-

- ized by biomimetic lipids with enhanced dispersibility for photothermal and chemo combination therapy[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(11): 2331–2342.
- [4] ZENG D, ZHAO J, LUK K H, et al. Potentiation of *in vivo* anticancer efficacy of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides surface decoration[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(10): 2865–2876.
- [5] 李泽甫, 钟国清. 纳米硒的制备与应用研究进展[J]. *当代化工*, 2011, 40(4): 396–399. [LI Z F, ZHONG G Q. Progress in preparation and application of selenium nanoparticles[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2011, 40(4): 396–399.]
- [6] MENG Y, ZHANG Y, JIA N, et al. Synthesis and evaluation of a novel water-soluble high Se-enriched *Astragalus* polysaccharide nanoparticles[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118: 1438–1448.
- [7] ZHU C, ZHANG S, SONG C, et al. Selenium nanoparticles decorated with *Ulva lactuca* polysaccharide potentially attenuate colitis by inhibiting NF- κ B mediated hyper inflammation[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2017, 15(1): 1–15.
- [8] 朱雪琼. 黑木耳多糖的提取、功能及单糖组成的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2014. [ZHU X Q. Study on the extraction, separation and functional activity of the *Auricularia auricula* polysaccharide[D]. Nanning: Guangxi University, 2014.]
- [9] CHEN G, LUO Y C, LI B P, et al. Effect of polysaccharide from *Auricularia auricula* on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of ICR mice fed a cholesterol - enriched diet[J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73(6): H103–H108.
- [10] KHASKHELI S G, ZHENG W, SHEIKH S A, et al. Characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its antioxidant properties in fresh and pickled product[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 81: 387–395.
- [11] MA Z, WANG J, ZHANG L, et al. Evaluation of water soluble β -D-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(3): 977–983.
- [12] YOON S J, YU M A, PYUN Y R, et al. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin[J]. *Thrombosis Research*, 2003, 112(3): 151–158.
- [13] 庄伟, 屈咪, 赵迪, 等. 黑木耳多糖的结构组成及其免疫活性研究[J]. *食品科技*, 2020, 45(2): 205–210. [ZHUANG W, QU M, ZHAO D, et al. Structural composition and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Auricularia auricula*[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(2): 205–210.]
- [14] CHEN K, CAI L, YANG S, et al. Pt (IV) prodrugs designed to embed in nanotubes of a polysaccharide for drug delivery[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2021, 4(6): 4841–4848.
- [15] MENG Y, ZHANG H, HU N, et al. Construction of silver nanoparticles by the triple helical polysaccharide from black fungus and the antibacterial activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 182: 1170–1178.
- [16] PING Z, LIU T, XU H, et al. Construction of highly stable selenium nanoparticles embedded in hollow nanofibers of polysaccharide and their antitumor activities[J]. *Nano Research*, 2017, 10: 3775–3789.
- [17] 孟燕. 黑木耳多糖的螺旋链构象及其生物医学应用[D]. 武汉: 武汉大学, 2018. [MENG Y. Helical chain conformation of a polysaccharide isolated from black fungus and its biomedical applications[D]. Wuhan: Wuhan University, 2018.]
- [18] SONG H, HU N, GAO Z, et al. Construction of gold nanoparticles by tubular polysaccharide from black fungus and their apoptosis-inducing activities in HepG2 cells[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2021, 138(48): 51537.
- [19] JIN Y, CAI L, YANG Q, et al. Anti-leukemia activities of selenium nanoparticles embedded in nanotube consisted of triple-helix β -D-glucan[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 240: 116329.
- [20] SHI X D, TIAN Y Q, WU J L, et al. Synthesis, characterization, and biological activity of selenium nanoparticles conjugated with polysaccharides[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(13): 2225–2236.
- [21] XU S, XU X, ZHANG L. Branching structure and chain conformation of water-soluble glucan extracted from *Auricularia auricular-judae*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(13): 3498–3506.
- [22] 王迎香, 唐子惟, 彭腾, 等. 苯酚-硫酸法测定酒蒸多花黄精多糖含量的优化[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(18): 308–316. [WANG Y X, TANG Z W, PENG T, et al. Optimization of phenol sulfuric acid method for the polysaccharide content of wine-steamed *Polygonatum cyrtonema* Hua[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(18): 308–316.]
- [23] 张聪, 胡娜, 李珊, 等. 马钱苷对肝癌细胞 HepG2 增殖与凋亡的影响及机制研究[J]. *中国药房*, 2020, 31(7): 782–788. [ZHANG C, HU N, LI S, et al. Study on the effects of loganin on the proliferation and apoptosis of liver cancer HepG2 cells and its mechanism[J]. *China Pharmacy*, 2020, 31(7): 782–788.]
- [24] 平兆华. 黑木耳刚性链 β -葡聚糖及其复合物的抗癌活性和构效关系[D]. 武汉: 武汉大学, 2016. [PING Z H. Antitumor activities and correlation of structure to bioactivity of stiff β -glucan from *Auricularia auricular-judae* and its composites[D]. Wuhan: Wuhan University, 2016.]
- [25] 许淑琴. 黑木耳刚性链葡聚糖结构、链构象转变及自组装行为[D]. 武汉: 武汉大学, 2013. [XU S Q. Chemical structure, chain conformational transition, and self-assembly behaviors of stiff glucan from *Auricularia auricular-judae*[D]. Wuhan: Wuhan University, 2013.]
- [26] TAJMIR-RIABI H A. Infrared spectra of crystalline β -D-glucuronic acid and its Na⁺, K⁺, and Rb⁺ salts[J]. *Carbohydrate Research*, 1984, 125(1): 13–20.
- [27] CHAUVEAU C, TALAGA P, WIERUSZESKI J M, et al. A water-soluble β -D-glucan from *Boletus erythropus*[J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(2): 413–415.
- [28] RINAUDO M, VINCENDON M. ¹³C NMR structural investigation of scleroglucan[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1982, 2(2): 135–144.
- [29] SANTOS-NEVES J C, PEREIRA M I, CARBONERO E R, et al. A gel-forming β -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*[J]. *Carbohydrate Research*, 2008, 343(9): 1456–1462.
- [30] SHIBATA S. Dual-wavelength spectrophotometry[J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1976, 15(11): 673–679.
- [31] 王红艳, 张胜义, 刘明珠, 等. 壳聚糖模板法制备纳米硒[J]. *应用化学*, 2004(8): 788–792. [WANG H Y, ZHANG S Y, LIU M Z, et al. Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of chitosan template[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2004(8):

788-792.]

[32] ZHANG J, TENG Z, YUAN Y, et al. Development, physico-chemical characterization and cytotoxicity of selenium nanoparticles stabilized by beta-lactoglobulin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107: 1406-1413.

[33] 赵胜男. 不同尺寸纳米硒的制备及其生物活性研究[D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2019. [ZHAO S N. Preparation and bioactivity of different sizes nano selenium[D]. Jiamusi: Jiamusi University, 2019.]

[34] 杨梦涛. 纳米硒—牡蛎多糖的制备及其抗氧化活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014. [YANG M T. Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of oyster polysaccharides and the antioxidant activity[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.]

[35] 郑晓凤, 侯丽然, 廉亚楠, 等. 桔梗多糖软模板法制备纳米硒及表征[J]. *广东化工*, 2016, 43(16): 25-26. [ZHENG X F, HOU L R, LIAN Y N, et al. Preparation and characterization of nano-selenium using *Platycodon grandiflorum* polysaccharides as soft template[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2016, 43(16): 25-26.]