

壳寡糖纳米硒的工艺优化研究

叶大天¹, 任祥雨¹, 夏磊², 林昌宇³, 肖云玉³, 闻正顺^{1*} (1. 浙江海洋大学食品与药学院, 浙江舟山 316022; 2. 舟山市农产品质量安全管理中心, 浙江舟山 316021; 3. 浙江金壳药业股份有限公司, 浙江台州 317602)

摘要 [目的] 优化壳寡糖纳米硒的合成工艺。[方法] 采用单因素探究壳寡糖与亚硒酸钠的比例、乙酸质量浓度和反应时间对纳米粒子粒径、PDI 和电位的影响, 并以 PDI 为主要判断依据, 电位为次要判断依据, 进行正交试验, 优化反应的条件。[结果] 最优工艺条件为壳寡糖与亚硒酸钠的比例为 16:1, 乙酸质量浓度为 3%, 反应时间为 2.5 d, 得到壳寡糖纳米硒的 PDI 为 0.238, 电位为 50.36 mV。通过方差分析可知, 反应条件对 PDI 影响由大到小依次为壳寡糖与亚硒酸钠的比例>反应时间>乙酸质量浓度, 反应条件对电位影响由大到小依次为反应时间>壳寡糖与亚硒酸钠的比例>乙酸质量浓度。[结论] 该研究优化了壳寡糖纳米硒的合成条件, 为壳寡糖纳米硒的进一步开发利用提供了支持。

关键词 壳寡糖; 纳米硒; 合成工艺; 优化; 正交试验

中图分类号 TB 383.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)08-0156-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.08.043



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Process Optimization of Chitooligosaccharides-Selenium Nanoparticles

YE Da-tian¹, REN Xiang-yu¹, XIA Lei² et al (1. School of Food Science and Pharmaceutics, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022; 2. Zhoushan Center of Agricultural Products Quality and Safety Supervision and Management, Zhoushan, Zhejiang 316021)

Abstract [Objective] To optimize the synthesis process of chitooligosaccharides-selenium nanoparticles. [Method] The single factor was used to explore the influence of the ratio of chitooligosaccharide to sodium selenite, the mass concentration of acetic acid and the reaction time on the particle size, PDI and potential of nanoparticles. Using PDI as the main judgment basis and potential as the secondary judgment basis, an orthogonal experiment was carried out to optimize the reaction conditions. [Result] The best process conditions for synthesizing chitooligosaccharides-selenium nanoparticles were the ratio of chitooligosaccharides to sodium selenite 16:1, 3% acetic acid mass concentration, and the reaction time 2.5 days. Under this condition, the PDI of the chitooligosaccharides-selenium nanoparticles was 0.238 and the potential was 50.36 mV. The variance analysis of the experimental factors showed that the effect of reaction conditions on PDI was in the order of the ratio of chitooligosaccharide to sodium selenite > reaction time > acetic acid mass concentration, and the effect of reaction conditions on potential is in the order of reaction time > the ratio of chitooligosaccharide to sodium selenite > acetic acid mass concentration. [Conclusion] The synthesis conditions of chitooligosaccharides-selenium nanoparticles are optimized, which provides support for the further development and utilization of chitooligosaccharides-selenium nanoparticles.

Key words Chitooligosaccharides; Nano-selenium; Synthesis process; Optimization; Orthogonal experiment

硒是人体和动物体内许多抗氧化酶如谷胱甘肽过氧化物酶和硒蛋白 P 的必需微量元素和组成部分。硒缺乏会导致各种临床后果, 包括癌症、心血管疾病、2 型糖尿病和肺部疾病^[1]。因此, 补充硒非常重要, 而膳食硒的有效剂量和毒性剂量之间的差距很小, 其生物利用度和生物活性受到很大限制^[2]。研究表明, 零氧化态的红色硒纳米粒子具有优异的生物利用度和低毒性^[3]。由于红色硒纳米粒子容易转化为热力学稳定的灰色类似物, 而这种类似物生物学上是惰性的, 因此为了稳定红色的纳米硒, 人们会用多糖、蛋白、多酚等作为稳定剂^[4-6]。壳寡糖又叫壳聚寡糖、低聚壳聚糖, 是将壳聚糖经特殊的生物酶技术(或化学降解、微波降解技术)降解得到的一种聚合度在 2~20 的寡糖。壳寡糖是带正电荷阳离子碱性氨基低聚糖, 其阳离子性质相当特殊, 因为大多数多糖在酸性环境中通常呈中性或带负电荷。这种特性使其能够与其他带负电荷的合成或天然聚合物形成静电复合物或多层结构^[7]。有研究表明, 使用壳聚糖可以作为还原剂和

稳定剂合成硒纳米粒子(SeNPs), 通过控制温度, 简单的一锅反应合成了 83~208 nm 的分散良好的 CS-Se 纳米复合材料^[8]。该试验采用单因素研究壳寡糖与亚硒酸钠的比例、乙酸质量浓度和反应时间对纳米粒子粒径、聚合物分散性指数(polydispersity index, PDI)和电位的影响, 并以 PDI 为主要判断依据, 电位为次要判断依据, 进行了正交试验, 对壳寡糖纳米硒的合成工艺进行优化, 以期对硒纳米粒子的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂 壳寡糖(浙江金壳药业股份有限公司); 亚硒酸钠(长沙哈林化工有限公司); 乙酸(分析纯 AR, 国药)。

1.2 试验仪器 LG10-2.4Axx 高速离心机(北京京立离心机有限公司); AREC.T 加热磁力搅拌器(意大利 VELP 公司); JM-B1003 电子天平(上海数宜电子衡器有限公司); Zetasizer_Nano_ZS_90 激光粒度仪(英国马尔文公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 壳寡糖纳米硒粒子的制备。 将一定量的壳寡糖放入锥形瓶中, 加入一定质量浓度的乙酸溶液 30 mL, 室温下搅拌 1 h 使壳寡糖充分溶解。另称量 100 mg 的亚硒酸钠溶于 10 mL 纯水中, 然后将亚硒酸钠加入壳寡糖溶液中, 并在 47 °C 的水浴中以 1 000 r/min 避光反应一定时间。将反应完

基金项目 国家自然科学基金项目(81903693); 舟山市科技计划项目(2020C21018, 2020C21014); 舟山市科技合作项目(2020C21047, 2021C13044)。

作者简介 叶大天(1996—), 男, 广东阳西人, 硕士研究生, 研究方向: 营养活性物质与消化道健康。* 通信作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事营养活性物质与消化道健康研究。

收稿日期 2021-11-26

成的溶液在 10 000 r/min 下离心取沉淀,并水洗沉淀 3 次,将残留的亚硒酸根除去,然后将沉淀溶于 10 mL 的水中备用。将 0.1 g 的壳寡糖放入锥形瓶中,加入 3% 的乙酸溶液 10 mL,搅拌使壳寡糖溶解,加入先前的沉淀水溶液,室温下避光搅拌 1 h 后,10 000 r/min 离心取沉淀,再 10 000 r/min 离心水洗沉淀 1 次,生成的橙红色溶液即为壳寡糖纳米硒待测样品。

1.3.2 粒子的粒径和 PDI 分析。取少量待测样品于石英皿中,加纯水稀释到一定的浓度后,放进 Zetasizer_Nano_ZS_90 激光粒度仪的槽中进行粒径和 PDI 分析。

1.3.3 粒子的电位分析。将待测样品吸入电解槽中,放进 Zetasizer_Nano_ZS_90 激光粒度仪的槽中进行电位分析。

1.3.4 单因素试验设计。固定乙酸质量浓度为 3%,反应时间为 2.5 d,探究不同的壳寡糖与亚硒酸钠的比例(8:1、10:1、12:1、14:1、16:1、18:1, g:g)对粒径、PDI 和电位的影响。固定壳寡糖与亚硒酸钠的比例为 10:1,反应时间为 2.5 d,探究不同的乙酸质量浓度(1%、2%、3%、4%、5%)对粒径、PDI 和电位的影响。固定壳寡糖与亚硒酸钠的比例为 10:1,乙酸质量浓度为 3%,探究不同的反应时间(1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 d)对粒径、PDI 和电位的影响。

1.3.5 正交试验设计。由单因素的试验结果来确定各因素适宜的合成条件,通过试验的因素个数和水平数来选取正确的正交试验表,该试验选取正交表 $L_9(3^4)$ 进行试验(表 1),确定最佳的工艺条件。

表 1 正交试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	A(壳寡糖与亚硒酸钠的比例 Ratio of chitooligosaccharide to sodium selenite)	B(乙酸质量浓度 Acetic acid mass concentration//%)	C(反应时间 Reaction time//d)
1	14:1	2	2.0
2	16:1	3	2.5
3	18:1	4	3.0

1.3.6 正交试验评判标准。选取 PDI 值和电位作为壳寡糖纳米硒粒子的评判依据。PDI 为主要的判断依据,电位为次要的判断依据。PDI 值代表粒子的分散程度,其值越小代表粒子分布越均匀。电位的大小与粒子的稳定性有关,电位越大粒子的稳定性越好,一般粒子的电位需要大于 30 mV 说明粒子有较好的稳定性。

1.4 数据分析 利用 Excel 2007 进行试验数据的整理,利用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 壳寡糖与亚硒酸钠的比例对粒径的影响。由图 1 可知,粒子的粒径随壳寡糖与亚硒酸钠的比例升高总体呈先平稳后增大的趋势,壳寡糖与亚硒酸钠的比例在 8:1~16:1 时,粒径在 167.6~187.5 nm。而当壳寡糖与亚硒酸钠的比例从 16:1 变化到 18:1 时,粒径由 167.6 nm 上升至 205.7 nm,可能是因为壳寡糖加入的量太多时,生成的纳米硒外层包裹着更

多的壳寡糖。

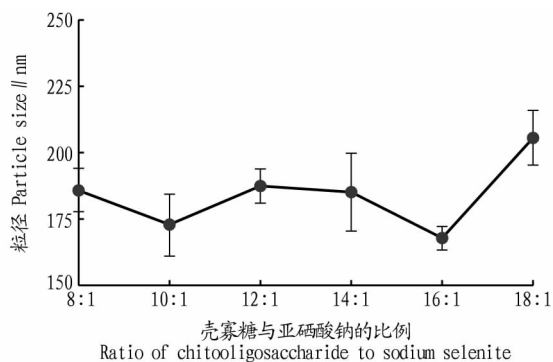


图 1 壳寡糖与亚硒酸钠的比例对粒径的影响

Fig.1 Effect of the ratio of chitooligosaccharides to sodium selenite on particle size

2.1.2 乙酸质量浓度对粒径的影响。由图 2 可知,粒子的粒径随乙酸质量浓度的上升总体呈先减小后增大的趋势,在 3% 的乙酸质量浓度下粒子的粒径最小,为 172.7 nm。当乙酸质量浓度由 2% 上升至 3% 时,粒子的粒径由 430.0 nm 下降至 172.7 nm,而乙酸质量浓度由 3% 上升至 5% 时,粒子的粒径由 172.7 nm 增加到 247.0 nm。这可能是由于随着乙酸质量浓度的增大,改变了反应体系的 pH,从而导致了粒径的变化。

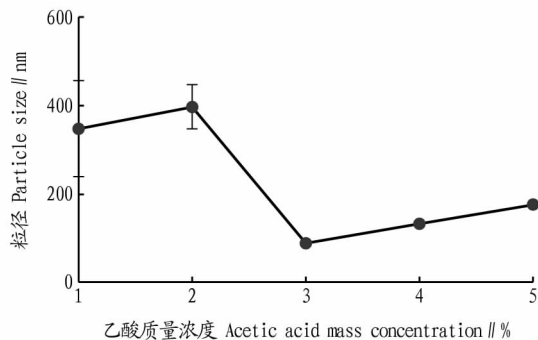


图 2 乙酸质量浓度对粒径的影响

Fig.2 Effect of acetic acid mass concentration on particle size

2.1.3 反应时间对粒径的影响。由图 3 可知,粒子的粒径随反应时间的延长总体呈下降的趋势。反应时间在 1.5~3.5 d,粒径的大小由 218.0 nm 下降至 157.2 nm。可能是因为反应时间会影响纳米粒子的产物的结晶程度,从而影响粒径的大小。

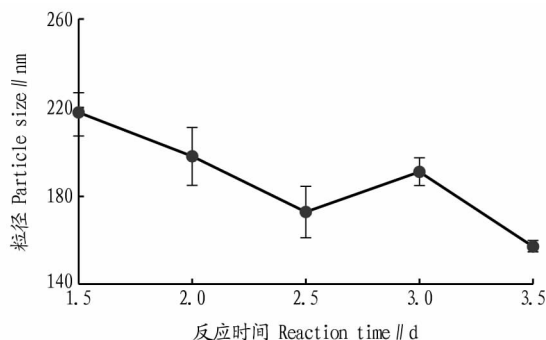


图 3 反应时间对粒径的影响

Fig.3 Effect of reaction time on particle size

2.1.4 壳寡糖与亚硒酸钠的比例对 PDI 和电位的影响。由图 4 可知,粒子的 PDI 随壳寡糖与亚硒酸钠的比例升高总体呈先减小后增大的趋势,而当壳寡糖与亚硒酸钠的比例为 16:1 时 PDI 最小,为 0.269;当壳寡糖与亚硒酸钠的比例为 8:1~16:1 时,PDI 缓慢减少,而壳寡糖与亚硒酸钠的比例为

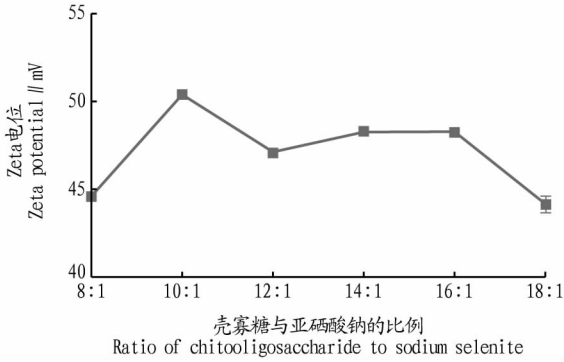


图 4 壳寡糖与亚硒酸钠的比例对 PDI 和电位的影响

Fig.4 Effect of the ratio of chitoooligosaccharides to sodium selenite on PDI and potential

2.1.5 乙酸质量浓度对 PDI 和电位的影响。由图 5 可知,粒子的 PDI 随乙酸质量浓度的升高总体呈先减小后趋向平稳的趋势,而在乙酸质量浓度为 3% 时 PDI 最小,为 0.286;当乙酸质量浓度在 1%~3% 时,PDI 由 0.628 减少至 0.286,而在 3%~5% 时,PDI 变化不大。粒子的电位随乙酸质量浓度的

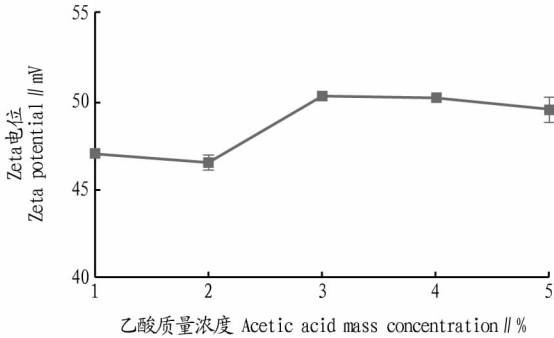


图 5 乙酸质量浓度对 PDI 和电位的影响

Fig.5 Effect of acetic acid mass concentration on PDI and potential

2.1.6 反应时间对 PDI 和电位的影响。由图 6 可知,粒子的 PDI 随反应时间的延长总体呈先减少后增大的趋势,而在反应时间为 2.5 d 时,PDI 最小,为 0.286;反应时间在 1.5~2.5 d 时,PDI 由 0.403 减少至 0.286,反应时间在 2.5~3.5 d 时,PDI

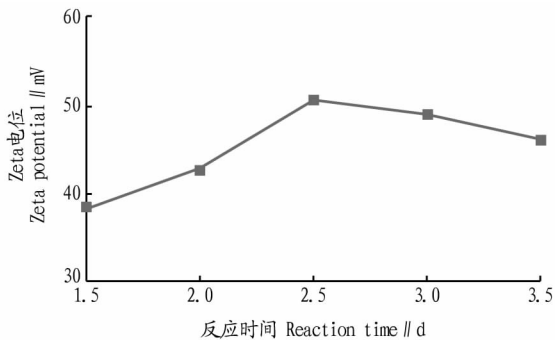
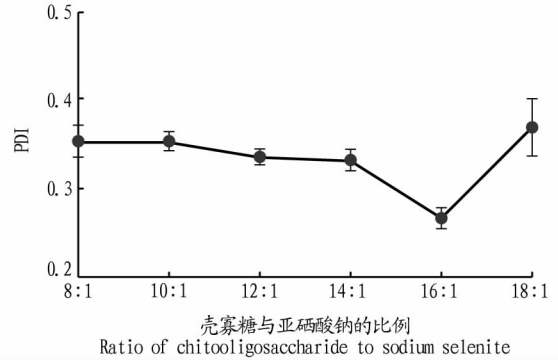


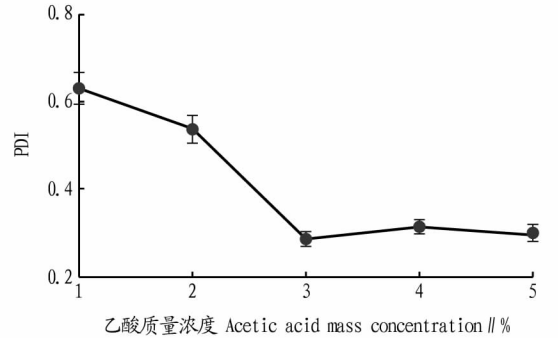
图 6 反应时间对 PDI 和电位的影响

Fig.6 Effect of reaction time on PDI and potential

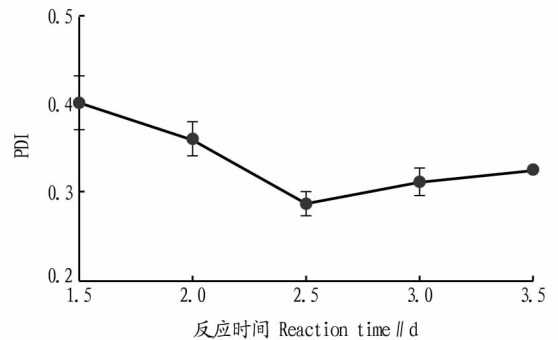
16:1~18:1 时 PDI 增加明显。粒子的电位随壳寡糖与亚硒酸钠的比例升高总体呈先增大后平稳减小的趋势,当壳寡糖与亚硒酸钠的比例为 10:1 时电位最大,为 50.33 mV。综上考虑 PDI 为主要判断依据,兼顾电位,选择壳寡糖与亚硒酸钠的比例为 14:1、16:1 和 18:1 进行正交试验。



升高总体呈先增大后平稳减小的趋势,当乙酸质量浓度为 3% 时电位最大,为 50.33 mV。综上考虑 PDI 为主要判断依据,兼顾电位,选择乙酸质量浓度为 2%、3% 和 4% 进行正交试验。



由 0.286 增加至 0.325。粒子的电位随反应时间的延长呈先增大后平稳减小的趋势,当反应时间为 2.5 d 时,电位最大。综上考虑 PDI 为主要判断依据,兼顾电位,选择 2.0、2.5 和 3.0 d 进行正交试验。



2.2 正交试验 由正交试验结果(表 2)可知,反应条件对 PDI 影响由大到小依次为壳寡糖与亚硒酸钠的比例(A)>反应时间(C)>乙酸质量浓度(B),PDI 的最佳反应条件为 $A_2B_2C_2$;反应条件对电位影响由大到小依次为反应时间(C)>壳寡糖与亚硒酸钠的比例(A)>乙酸质量浓度(B),电位的最佳反应条件为 $A_1B_1C_3$,采用综合平衡法进行分析得到最优组合。对于因素 A:由于 PDI 最佳反应条件为 A_2 ,电位最佳反应条件为 A_1 ,而 A_1 与 A_2 的电位相对相差不大,PDI 两者相差较大,所以选择 A_2 为最优条件。对于因素 B:PDI 和电位两者相差都不大,但是以 PDI 为主要的判断依据,因此选择 B_2 。对于因素 C:PDI 最佳反应条件为 C_2 ,电位最佳反应条件为 C_3 ,两者的相对差值差不多,但是以 PDI 为主要的判断依据,因此选择 C_2 。综上所述,最佳的反应条件为 $A_2B_2C_2$,即壳寡糖与亚硒酸钠的比例为 16:1,乙酸质量浓度为 3%,反应时间为 2.5 d。

表 2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal experimental results

序号 No.	A	B	C	PDI	电位 Potential//mV
1	1	1	1	0.385	48.60
2	1	2	2	0.309	45.97
3	1	3	3	0.352	48.93
4	2	1	2	0.250	44.73
5	2	2	3	0.262	47.10
6	2	3	1	0.294	46.43
7	3	1	3	0.315	49.90
8	3	2	1	0.377	48.57
9	3	3	2	0.308	44.90
PDI	k_1	0.349	0.317	0.352	
	k_2	0.269	0.316	0.289	
	k_3	0.333	0.318	0.310	
	R	0.080	0.002	0.063	
电位	k_1	47.83	47.74	47.87	
	k_2	46.09	47.21	45.20	
	k_3	47.79	46.75	48.64	
	R	1.74	0.99	3.44	

按照最佳反应条件即壳寡糖与亚硒酸钠的比例为 16:1,乙酸质量浓度为 3%,反应时间为 2.5 d,得到壳寡糖纳米硒的 PDI 为 0.238,电位为 50.36 mV,明显优于先前在正交试验中的结果,说明该条件可行。

3 结论与讨论

纳米硒的合成方法有化学合成和生物合成^[9],化学合成采用硒盐与还原剂的还原,通常通过稳定剂防止硒原子簇生长并在胶体悬浮液中获得稳定的纳米粒子。许多方法包括物理蒸发方法、水热方法、 γ -辐射还原和声化学方法被用作纳米硒合成的过程^[10-12]。水热法是常用的合成纳米硒的方法,有研究利用水热法以枸杞多糖为修饰剂和稳定剂制备枸杞多糖纳米硒^[13]。对于合成纳米硒的影响因素,pH 是影响纳米粒子形成的原因之一,其主要是通过改变纳米粒子的表面化学特性而改变粒子的稳定性,因此零电位点是关键。随

着 pH 偏离零电位点,纳米粒子的稳定性将会增大,而且 pH 的改变会导致纳米粒子的化学键的断裂或者合成,从而影响纳米粒子的稳定性^[14]。另外,反应时间会影响纳米粒子的结晶程度^[15]。因此,该研究采用单因素的方法研究了壳寡糖与亚硒酸钠的比例、乙酸质量浓度和反应时间对纳米粒子粒径、PDI 和电位的影响,并以 PDI 为主要判断依据,进行了正交试验,优化了反应的条件。结果表明,反应条件对 PDI 影响由大到小依次为壳寡糖与亚硒酸钠的比例>反应时间>乙酸质量浓度,反应条件对电位影响由大到小依次为反应时间>壳寡糖与亚硒酸钠的比例>乙酸质量浓度,而最优工艺条件为壳寡糖与亚硒酸钠的比例为 16:1,乙酸质量浓度为 3%,反应时间为 2.5 d,得到壳寡糖纳米硒的 PDI 为 0.238,电位为 50.36 mV。综上所述,该研究为壳寡糖纳米硒的制备提供了科学参考。

参考文献

- [1] SANTHOSH KUMAR B, PRIYADARSINI K I. Selenium nutrition: How important is it? [J]. Biomedicine & preventive nutrition, 2014, 4(2): 333-341.
- [2] WANG W F, MAI K S, ZHANG W B, et al. Dietary selenium requirement and its toxicity in juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino [J]. Aquaculture, 2012, 330/331/332/333: 42-46.
- [3] TORRES S K, CAMPOS V L, LEÓN C G, et al. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity [J]. Journal of nanoparticle research, 2012, 14(11): 1-9.
- [4] ZHANG X, YAN H H, MA L, et al. Preparation and characterization of selenium nanoparticles decorated by *Spirulina platensis* polysaccharide [J]. Journal of food biochemistry, 2020, 44(9): e13363.
- [5] XU C L, QIAO L, GUO Y, et al. Preparation, characteristics and antioxidant activity of polysaccharides and proteins-capped selenium nanoparticles synthesized by *Lactobacillus casei* ATCC 393 [J]. Carbohydrate polymers, 2018, 195: 576-585.
- [6] MITTAL A K, KUMAR S, BANERJEE U C. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential [J]. Journal of colloid and interface science, 2014, 431: 194-199.
- [7] VENKATESAN J, KIM S K. Chitosan composites for bone tissue engineering-An overview [J]. Marine drugs, 2010, 8(8): 2252-2266.
- [8] CHEN W W, YUE L, JIANG Q X, et al. Synthesis of varisized chitosan-selenium nanocomposites through heating treatment and evaluation of their antioxidant properties [J]. International journal of biological macromolecules, 2018, 114: 751-758.
- [9] MATES I, ANTONIAC I, VASILE L, et al. Selenium nanoparticles: Production, characterization and possible applications in biomedicine and food science [J]. UPB scientific bulletin, series B: Chemistry and materials science, 2019, 81(1): 205-216.
- [10] YU B, YOU P T, SONG M F, et al. A facile and fast synthetic approach to create selenium nanoparticles with diverse shapes and their antioxidant ability [J]. New journal of chemistry, 2016, 40(2): 1118-1123.
- [11] ZHANG S Y, ZHANG J, WANG H Y, et al. Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of polysaccharides [J]. Materials letters, 2004, 58(21): 2590-2594.
- [12] WANG H L, ZHANG J S, YU H Q. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice [J]. Free radical biology and medicine, 2007, 42(10): 1524-1533.
- [13] 杨雪. 枸杞多糖纳米硒体外消化吸收特性及抗疲劳活性研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021: 20-30.
- [14] 翟晓娜. 壳寡糖纳米硒体系的制备及其物化特性和生物活性的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2017: 43-58.
- [15] 胡万军, 李旭东, 郭银贵, 等. 水热法反应条件对纳米硒酸盐形貌的影响研究进展 [J]. 山东化工, 2021, 50(18): 68-69.