



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110876754 B

(45) 授权公告日 2022.04.15

(21) 申请号 201911215358.5

(22) 申请日 2019.12.02

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110876754 A

(43) 申请公布日 2020.03.13

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院  
地址 518052 广东省深圳市南山区粤海街  
道香港理工大学产雪妍大楼205室

(72) 发明人 黄家兴 董晓莉 陆家谦 张兆滔

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 郝传鑫 周全英

(51) Int. Cl.

A61K 9/06 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107412280 A, 2017.12.01

CN 101560268 A, 2009.10.21

CN 102895258 A, 2013.01.30

CN 105520953 A, 2016.04.27

Siming et al..Polysaccharide-protein complex-decorated selenium nanosystem as an efficient bone-formation therapeutic.《J Mater Chem B》.2018,第6卷(第32期),5215-5219.

审查员 汤明秀

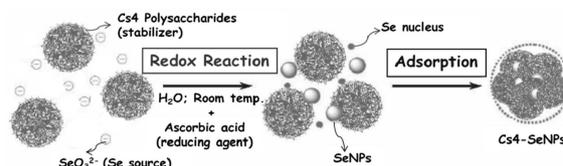
权利要求书2页 说明书9页 附图6页

(54) 发明名称

一种纳米硒水溶胶及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及新型纳米硒的快速制备,具体涉及一种功能化纳米硒水溶胶及其制备方法与应用。本发明所述的新型纳米硒水溶胶制备方法包括以下步骤:(i)向虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液中加入二氧化硒溶液或亚硒酸盐溶液,混合均匀,得到混合溶液A;所述的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液是通过水提虫草菌丝体Cs4得到;(ii)向混合溶液A中加入维生素C溶液,混匀,得到混合溶液B;(iii)待混合溶液B反应完全,经过透析得到纳米硒水溶胶。本发明以具有广泛生物活性的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白作为纳米硒功能化因子,获得一种具有促进骨骼生长功能且稳定性好的新型纳米硒水溶胶,可用于儿童青少年期促进骨发育以及中年期防治骨质疏松症、骨流失、骨折等疾病状态。



1. 一种纳米硒水溶胶在制备促进成骨细胞增殖、分化和/或钙化的药品中的用途,其特征在于,所述纳米硒水溶胶的制备方法包括以下步骤:

(i) 向虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液中加入二氧化硒溶液或亚硒酸盐溶液,混合均匀,得到混合溶液A;所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液是通过水提虫草菌丝体Cs4得到;

(ii) 向混合溶液A中加入维生素C溶液,混匀,得到混合溶液B;

(iii) 待混合溶液B反应完全,经过透析得到纳米硒水溶胶;

其中,所述的混合溶液B中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为 $60\sim 6000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,维生素C的浓度为 $0.8\sim 80\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,二氧化硒或亚硒酸盐的浓度为 $0.2\sim 20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述混合溶液B中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为 $300\sim 1200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,维生素C的浓度为 $8.0\sim 80\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,二氧化硒或亚硒酸盐的浓度为 $2.0\sim 20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3. 如权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述的混合溶液B中,维生素C与所述的二氧化硒或亚硒酸盐的摩尔比为4:1。

4. 如权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述亚硒酸盐溶液中的亚硒酸盐为亚硒酸钠,所述维生素C溶液中的维生素C为还原型维生素C。

5. 一种纳米硒水溶胶在制备促进骨骼生长或改善骨质疏松的药品中的用途,其特征在于,所述纳米硒水溶胶的制备方法包括以下步骤:

(i) 向虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液中加入二氧化硒溶液或亚硒酸盐溶液,混合均匀,得到混合溶液A;所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液是通过水提虫草菌丝体Cs4得到;

(ii) 向混合溶液A中加入维生素C溶液,混匀,得到混合溶液B;

(iii) 待混合溶液B反应完全,经过透析得到纳米硒水溶胶;

其中,所述的混合溶液B中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为 $60\sim 6000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,维生素C的浓度为 $0.8\sim 80\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,二氧化硒或亚硒酸盐的浓度为 $0.2\sim 20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

6. 如权利要求5所述的用途,其特征在于,所述混合溶液B中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为 $300\sim 1200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,维生素C的浓度为 $8.0\sim 80\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,二氧化硒或亚硒酸盐的浓度为 $2.0\sim 20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

7. 如权利要求5或6所述的用途,其特征在于,所述的混合溶液B中,维生素C与所述的二氧化硒或亚硒酸盐的摩尔比为4:1。

8. 如权利要求5或6所述的用途,其特征在于,所述亚硒酸盐溶液中的亚硒酸盐为亚硒酸钠,所述维生素C溶液中的维生素C为还原型维生素C。

9. 一种能促进骨骼生长或改善骨质疏松的药品,其特征在于,包括纳米硒水溶胶,所述纳米硒水溶胶的制备方法包括以下步骤:

(i) 向虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液中加入二氧化硒溶液或亚硒酸盐溶液,混合均匀,得到混合溶液A;所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液是通过水提虫草菌丝体Cs4得到;

(ii) 向混合溶液A中加入维生素C溶液,混匀,得到混合溶液B;

(iii) 待混合溶液B反应完全,经过透析得到纳米硒水溶胶;

其中,所述的混合溶液B中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为 $60\sim 6000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,维生素C的浓度为 $0.8\sim 80\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,二氧化硒或亚硒酸盐的浓度为 $0.2\sim 20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

10. 如权利要求9所述的药品,其特征在于,所述混合溶液B中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋

白的浓度为 $300\sim 1200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,维生素C的浓度为 $8.0\sim 80\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,二氧化硒或亚硒酸盐的浓度为 $2.0\sim 20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

11.如权利要求9或10所述的药品,其特征在于,所述的混合溶液B中,维生素C与所述的二氧化硒或亚硒酸盐的摩尔比为4:1。

12.如权利要求9或10所述的药品,其特征在于,所述亚硒酸盐溶液中的亚硒酸盐为亚硒酸钠,所述维生素C溶液中的维生素C为还原型维生素C。

## 一种纳米硒水溶胶及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及新型纳米硒的快速制备,具体涉及一种功能化纳米硒水溶胶及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 骨质疏松症是一种代谢性的骨骼疾病,其特征在于骨质密度减少、骨微结构退化,导致脆性增加以及骨折风险增高。随着全球老龄化,骨质疏松症已成为一个严重的公共卫生问题,影响全球超过两亿人,对社会造成巨大的经济及医疗负担。2010年,中国骨质疏松症引起的骨折个案超过2,300万宗,涉及的医疗费用高达100亿美元,预计2050年更将会大幅增加至254亿美元。因此,我们迫切需要开发一种防治骨质疏松症的新方法。

[0003] 骨质疏松症是由于体内成骨和破骨过程失衡,成骨减少,破骨增加导致骨量下降,骨质流失。因此,通过增加成骨细胞的生长、分化和矿化从而加强成骨过程将是预防或治疗骨质疏松症的重要手段。另外,人从出生后骨量随年龄增加而逐渐增加,到20岁左右时达到最高水平,即是峰值骨量(Peak Bone Mass)。研究发现,峰值骨量每增长10%,未来发生骨质疏松骨折的风险将减少50%,或可将骨质疏松症发病年龄推迟13年。中老年人的骨密度与其在年轻时所达到峰值骨量及其到中年期时的骨丢失速率正性相关。儿童和青少年时期,骨骼生长发育快速,以骨形成和骨构建为主。儿童和青少年时期是峰值骨量累积的关键时期,充分利用这一快速骨量累积期,促进机体达到更高的峰值骨量,对于预防中老年时期的骨质疏松症意义重大。

[0004] 硒是人体健康必需的微量元素之一,具有广泛的生理功能(e.g. 抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、提高机体免疫力、保护修复细胞等)。在过去几十年的大量研究表明,缺硒不但会破坏骨微结构,并且与大骨节病以及骨质疏松症有密切关系,揭示出硒在骨代谢中的重要角色。然而作为营养补充剂或骨质疏松防治,硒的有效剂量与有毒剂量之间的范围极其狭窄,容易造成硒中毒,严重限制了硒在疾病防治中的应用。近年,利用纳米技术获得的纳米硒,因其生物相容性高、毒性低和生物活性显著而成为新的研究热点。然而,迄今有关纳米硒与骨健康的研究仍鲜有报导。

[0005] 现有的纳米单质硒制备方法通常采用还原法,利用硒的含氧酸盐或氧化物通过各种还原剂获得单质硒,同时使用修饰剂或者调控剂对形貌进行修饰调控,获得理想粒径和形貌的产物,但所得产物并不是功能化纳米单质硒。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术之不足,提供一种具有促进骨骼生长功能且稳定性好的新型纳米硒水溶胶及其制备方法与应用。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:

[0008] 第一方面,本发明提供了虫草菌丝体Cs4多糖蛋白在制备纳米硒水溶胶中的应用,所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白是通过水提虫草菌丝体Cs4得到。

[0009] 本发明虫草菌丝体Cs4多糖蛋白可采用下述方法制备得到:按照虫草菌丝体Cs4与水的重量比为1:20的比例,向虫草菌丝体Cs4中加入水,加热至95~100℃,提取2小时后取滤液;按照前面的步骤将滤渣重复提取一次,重复提取的时间为2小时,合并两次提取所得滤液,透析24小时,截留分子量为8,000,得到所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白。

[0010] 第二方面,本发明提供了一种纳米硒水溶胶的制备方法,其包括以下步骤:

[0011] (i) 向虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液中加入二氧化硒溶液或亚硒酸盐溶液,混合均匀,得到混合溶液A;所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液是通过水提虫草菌丝体Cs4得到;

[0012] (ii) 向混合溶液A中加入维生素C溶液,混匀,得到混合溶液B;

[0013] (iii) 待混合溶液B反应完全,经过透析得到纳米硒水溶胶。

[0014] 上述步骤(i)中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白可采用下述方法制备得到:按照虫草菌丝体Cs4与水的重量比为1:20的比例,向虫草菌丝体Cs4中加入水,加热至95~100℃,提取2小时后取滤液;按照前面的步骤将滤渣重复提取一次,重复提取的时间为2小时,合并两次提取所得滤液,透析24小时,截留分子量为8,000,得到所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白。

[0015] 优选地,上述步骤(iii)中,透析的时间为24小时,截留分子量为8000。

[0016] 作为本发明所述的纳米硒水溶胶制备方法,所述的混合溶液B中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为60~6000mg·L<sup>-1</sup>,维生素C的浓度为0.8~80mmol·L<sup>-1</sup>,二氧化硒或亚硒酸盐的浓度为0.2~20mmol·L<sup>-1</sup>。

[0017] 作为本发明所述的纳米硒水溶胶制备方法,所述的混合溶液B中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为300~1200mg·L<sup>-1</sup>,维生素C的浓度为8.0~80mmol·L<sup>-1</sup>,二氧化硒或亚硒酸盐的浓度为2.0~20mmol·L<sup>-1</sup>。

[0018] 作为本发明所述的纳米硒水溶胶制备方法之优选实施方式,所述的混合溶液B中,维生素C与所述的二氧化硒或亚硒酸盐的摩尔比为4:1。

[0019] 作为本发明所述的纳米硒水溶胶制备方法之优选实施方式,所述亚硒酸盐溶液中的亚硒酸盐为亚硒酸钠,所述维生素C溶液中的维生素C为还原型维生素C。

[0020] 第三方面,本发明提供了采用上述方法制备得到的纳米硒水溶胶。

[0021] 第四方面,本发明提供了上述纳米硒水溶胶在制备促进成骨细胞增殖、分化和/或钙化的食品、保健品或药品中的用途。

[0022] 第五方面,本发明提供了上述纳米硒水溶胶在制备促进骨骼生长或改善骨质疏松的食品、保健品或药品中的用途。

[0023] 第六方面,本发明提供了一种能促进骨骼生长或改善骨质疏松的食品、保健品或药品,包括上述的纳米硒水溶胶。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0025] (1) 本发明以具有广泛生物活性的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白作为纳米硒的功能化因子,获得一种具有促进骨骼生长功能且稳定性好的新型纳米硒水溶胶,可用于儿童青少年期促进骨发育以及中年期防治骨质疏松症、骨流失、骨折等疾病状态;

[0026] (2) 本发明使用的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白在化学结构上具有特殊性,多糖部分具有多羟基结构,因而对纳米硒具有很强的物理吸附作用,避免纳米硒进一步聚集沉淀,有效的对纳米硒表面进行修饰,发挥良好的粒径调控和稳定作用。此外,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白富含亲水性的羟基(-OH)和氨基(-NH)基团,提高了纳米硒的水溶性,增强其与前成骨细

胞之间的亲和力,大大提高了成骨细胞对纳米硒的摄取量,达到减少用药剂量、提增疗效、减少毒副作用的整体治疗效果;

[0027] (3) 本发明在制备新型纳米硒的反应体系中只以维生素C为还原剂,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白为纳米硒功能化因子,不添加其他任何模板剂,避免了在实际应用中可能产生的不良效果;

[0028] (4) 本发明所得产物,一种具有促进骨骼生长功能且稳定性好的新型纳米硒水溶胶,其纳米硒的浓度可以根据应用上的需要通过适当改变虫草菌丝体Cs4多糖蛋白和还原剂维生素C的浓度进行调整,操作简单,简便快捷。

## 附图说明

[0029] 图1是采用本发明效果例1的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg · L<sup>-1</sup>;亚硒酸钠浓度:2.0mmol · L<sup>-1</sup>;维生素C浓度:8.0mmol · L<sup>-1</sup>)所得的新型纳米硒其粒径分布图[Nanosight NS300颗粒跟踪分析仪(Malvern)];

[0030] 图2是采用本发明效果例1的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg · L<sup>-1</sup>;亚硒酸钠浓度:2.0mmol · L<sup>-1</sup>;维生素C浓度:8.0mmol · L<sup>-1</sup>)所得的新型纳米硒其稳定性跟踪图[Nanosight NS300颗粒跟踪分析仪(Malvern)];

[0031] 图3是采用本发明效果例1的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg · L<sup>-1</sup>;亚硒酸钠浓度:2.0mmol · L<sup>-1</sup>;维生素C浓度:8.0mmol · L<sup>-1</sup>)所得的新型纳米硒其TEM图(图中标尺为50nm)[透射电子显微镜(Hitachi H-7650)];

[0032] 图4是采用本发明效果例1的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg · L<sup>-1</sup>;亚硒酸钠浓度:2.0mmol · L<sup>-1</sup>;维生素C浓度:8.0mmol · L<sup>-1</sup>)所得的新型纳米硒其HR-TEM图(图中标尺为10nm)[透射电子显微镜(JEM-2010,JEOL)];

[0033] 图5是采用本发明效果例1的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg · L<sup>-1</sup>;亚硒酸钠浓度:2.0mmol · L<sup>-1</sup>;维生素C浓度:8.0mmol · L<sup>-1</sup>)所得的新型纳米硒其SADE选区衍射图[透射电子显微镜(JEM-2010,JEOL)];

[0034] 图6是采用本发明效果例1的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg · L<sup>-1</sup>;亚硒酸钠浓度:2.0mmol · L<sup>-1</sup>;维生素C浓度:8.0mmol · L<sup>-1</sup>)所得的新型纳米硒其EDX元素分析图[透射电子显微镜(JEM-2010,JEOL)+能量色散X射线光谱仪(EX-250,Horiba)];

[0035] 图7是采用本发明效果例1的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg · L<sup>-1</sup>;亚硒酸钠浓度:2.0mmol · L<sup>-1</sup>;维生素C浓度:8.0mmol · L<sup>-1</sup>)所得的新型纳米硒其FT-IR图[傅立叶变换红外光谱仪(Equinox 55,Bruker)];

[0036] 图8是采用本发明效果例3的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg · L<sup>-1</sup>;亚硒酸钠浓度:2.0mmol · L<sup>-1</sup>;维生素C浓度:8.0mmol · L<sup>-1</sup>)所得的新型纳米硒其对小鼠前成骨细胞MC3T3-E1增殖之影响结果图(培养时间为24、48、72小时;MTS法检测);

[0037] 图9是采用本发明效果例3的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg · L<sup>-1</sup>;亚硒酸钠浓度:2.0mmol · L<sup>-1</sup>;维生素C浓度:8.0mmol · L<sup>-1</sup>)所得的新型纳米硒、虫草菌丝体Cs4多糖蛋白、虫草菌丝体Cs4粉末其对小鼠前成骨细胞MC3T3-E1增殖之影响结果图(培养时间为24、48、72小时;MTS法检测);

[0038] 图10是采用本发明效果例3的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg ·

$L^{-1}$ ;亚硒酸钠浓度: $2.0\text{mmol} \cdot L^{-1}$ ;维生素C浓度: $8.0\text{mmol} \cdot L^{-1}$ )所得的新型纳米硒其对小鼠前成骨细胞MC3T3-E1分化之影响结果图(碱性磷酸酶活性检测);

[0039] 图11是采用本发明效果例3的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度: $600.0\text{mg} \cdot L^{-1}$ ;亚硒酸钠浓度: $2.0\text{mmol} \cdot L^{-1}$ ;维生素C浓度: $8.0\text{mmol} \cdot L^{-1}$ )所得的新型纳米硒其对小鼠前成骨细胞MC3T3-E1骨矿化的影响结果图(茜红素染色和Von Kossa染色法检测);

[0040] 图12为本发明所述的新型纳米硒其制备原理图。

## 具体实施方式

[0041] 为更好地说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明。

[0042] 现有的各种纳米单质硒制备方法均是通过各种不同的调控剂或修饰剂对形貌进行调控或者修饰,得到理想粒径和形貌的产物,但所得产物并不是功能化纳米单质硒。为解决这问题,本发明以具有广泛生物活性的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白作为纳米硒的功能化因子,获得一种具有促进骨骼生长功能且稳定性好的新型纳米硒水溶胶,所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白是通过水提虫草菌丝体Cs4得到。

[0043] 冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)是一种珍贵的药用真菌,在中国作为滋补及治疗中药已有700多年的历史。由于野生冬虫夏草非常稀少且价格昂贵,因此中国科学院于第4次成功分离的一种虫草菌丝体(Cs4),对过去40年的商业生产和科学研究有非常巨大的贡献。药理学和临床研究表明,多糖蛋白是Cs4的主要生物活性成分之一,具有广泛的健康促进和治疗作用,如免疫调节、抗肿瘤以及骨保护等。虫草菌丝体Cs4水溶性多糖蛋白含有水溶性多糖、多糖蛋白及蛋白质中的至少一种物质,例如总糖含量约为41.5%,蛋白质含量约为23.6%的水溶性多糖蛋白,其中多糖部分以葡萄糖、甘露糖和半乳糖为主,含有少量甘露糖、阿拉伯糖和木糖。

[0044] 在本发明的一个实施例中,本发明提供了虫草菌丝体Cs4多糖蛋白在制备新型纳米硒水溶胶中的应用,所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白是通过水提取虫草菌丝体Cs4得到。例如:本发明虫草菌丝体Cs4多糖蛋白可采用下述方法制备得到:按照虫草菌丝体Cs4与水的重量比为1:20的比例,向虫草菌丝体Cs4中加入水,加热至 $95\sim 100^{\circ}\text{C}$ ,提取2小时后取滤液;按照前面的步骤将滤渣重复提取一次,重复提取的时间为2小时,合并两次提取所得滤液,透析24小时,截留分子量为8,000,得到所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白。本发明首创利用虫草菌丝体Cs4多糖蛋白将纳米硒功能化,即把具有广泛生物活性的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白引入液相纳米硒体系,提高其生物利用度和生物活性,降低细胞毒性,获得一种具有促进骨骼生长功能且稳定性好的新型纳米硒水溶胶。

[0045] 在本发明的一个实施例中,本发明提供了一种纳米硒水溶胶的制备方法,其包括以下步骤:

[0046] (i) 向虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液中加入二氧化硒溶液或亚硒酸盐溶液,混合均匀,得到混合溶液A;所述的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液是通过水提虫草菌丝体Cs4得到;

[0047] (ii) 向混合溶液A中加入维生素C溶液,混匀,得到混合溶液B;

[0048] (iii) 待混合溶液B反应完全,经过透析得到纳米硒水溶胶。

[0049] 上述步骤(i)中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白可采用下述方法制备得到:按照虫草菌

丝体Cs4与水的重量比为1:20的比例,向虫草菌丝体Cs4中加入水,加热至95~100℃,提取2小时后取滤液;按照前面的步骤将滤渣重复提取一次,重复提取的时间为2小时,合并两次提取所得滤液,透析24小时,截留分子量为8,000,得到所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白。

[0050] 优选地,上述步骤(iii)中,透析的时间为24小时,截留分子量为8000。

[0051] 本发明所述的纳米硒水溶胶制备方法是以前述维生素C为还原剂并采用虫草菌丝体Cs4多糖蛋白为纳米硒功能化因子,获得一种具有促进骨骼生长功能且稳定性好的新型纳米硒水溶胶。虫草菌丝体Cs4多糖蛋白在化学结构上具有特殊性,多糖部分具有多羟基结构,因而对纳米硒具有很强的物理吸附作用,避免纳米硒进一步聚集沉淀,有效的对纳米硒表面进行修饰,发挥良好的粒径调控和稳定作用。此外,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白富含亲水性的羟基(-OH)和氨基(-NH)基团,提高了纳米硒的水溶性,增强其与前成骨细胞之间的亲和力,大大提高了成骨细胞对纳米硒的摄取量,达到减少用药剂量、提增疗效、减少毒副作用的整体治疗效果,可用于儿童青少年期促进骨发育以及中年期防治骨质疏松症、骨流失、骨折等疾病状态。此外,采用本发明方法制得的新型纳米硒,可在液相中以水溶胶的形式长时间保存,分散性和稳定性好,可作注射、喷雾等多种剂型应用。

[0052] 需说明的是,本发明采用的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液、二氧化硒溶液或亚硒酸盐溶液以及维生素C溶液均是以水作为溶剂。上述步骤(3)中,混合溶液B是否反应完全可依据产物的颜色进行判断,例如,待产物中出现的红色不再加深即表明反应完全。另外,向混合溶液A中加入维生素C溶液时,可采用将维生素C溶液滴加到混合溶液A中的方式。同时,为了保证良好的还原性,所述维生素C优选为还原型维生素C。

[0053] 作为本发明所述的纳米硒水溶胶制备方法,所述的混合溶液B中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为60~6000mg·L<sup>-1</sup>,维生素C的浓度为0.8~80mmol·L<sup>-1</sup>,二氧化硒或亚硒酸盐的浓度为0.2~20mmol·L<sup>-1</sup>。因虫草菌丝体Cs4多糖蛋白、维生素C和二氧化硒或亚硒酸盐的投料比会影响所得的纳米硒粒径以及稳定性。可根据不同浓度需要的新型纳米硒水溶胶,计算出上述的原料所需采用的浓度体积。

[0054] 作为本发明所述的纳米硒水溶胶制备方法之优选实施方式,所述的混合溶液B中,维生素C与所述的二氧化硒或亚硒酸盐的摩尔比为4:1。研究表明,当维生素C与所述的二氧化硒或亚硒酸盐的摩尔比为4:1时,所得的新型纳米硒平均粒径较小和稳定性较高。

[0055] 作为本发明所述的纳米硒水溶胶制备方法之优选实施方式,所述的混合溶液B中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为300~1200mg·L<sup>-1</sup>,维生素C的浓度为8.0~80mmol·L<sup>-1</sup>,二氧化硒或亚硒酸盐的浓度为2.0~20mmol·L<sup>-1</sup>。在所述的浓度下,所得的纳米硒平均粒径显著较小和稳定性较高,尤其是当混合溶液B中虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为600mg·L<sup>-1</sup>时,其平均粒径最低稳定性最高。

[0056] 作为本发明所述的纳米硒水溶胶制备方法之优选实施方式,所述亚硒酸盐溶液中的亚硒酸盐为亚硒酸钠,所述维生素C溶液中的维生素C为还原型维生素C。在所述的浓度下,所得的纳米硒平均粒径较小和稳定性较高,尤其是当亚硒酸钠和维生素C浓度分别为2.0mmol·L<sup>-1</sup>及8.0mmol·L<sup>-1</sup>时,其平均粒径最低,稳定性最高。

[0057] 在本发明的一个实施例中,本发明提供了采用上述方法制备得到的纳米硒水溶胶。本发明采用虫草菌丝体Cs4多糖蛋白将纳米硒功能化,在调控剂作用下提高其生物利用度和生物活性,降低细胞毒性,获得一种具有促进骨骼生长功能且稳定性好的新型纳米硒

水溶胶,即把具有广泛生物活性的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白引入液相纳米硒体系,提高其稳定性及促进骨骼生长活性。

[0058] 本发明所述的新型纳米硒水溶胶可在2~10℃下以溶胶形态保存,保存期为30~60天。

[0059] 在本发明的一个实施例中,本发明提供了上述纳米硒水溶胶在制备促进成骨细胞MC3T3-E1增殖、分化和/或钙化的食品、保健品或药品中的用途。

[0060] 在本发明的一个实施例中,本发明提供了上述纳米硒水溶胶在制备促进骨骼生长或改善骨质疏松的食品、保健品或药品中的用途。

[0061] 在本发明的一个实施例中,本发明提供了一种能促进骨骼生长或改善骨质疏松的食品、保健品或药品,包括上述纳米硒水溶胶。

[0062] 本发明所述的新型纳米硒水溶胶可用于制备能促进骨骼生长的食品、药物或保健品,如用于儿童青少年期促进骨发育;用于中年期防治骨质疏松症、骨流失、骨折等疾病状态。

[0063] 实施例1~5

[0064] 纳米硒水溶胶其制备方法为:

[0065] (1) 常温常压下,向虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液中加入亚硒酸钠溶液,混合均匀,得到混合溶液A;所述的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液是通过热水提取虫草菌丝体Cs4得到;虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶的具体制备方法为:按照虫草菌丝体Cs4与水的重量比为1:20的比例,向虫草菌丝体Cs4中加入水,加热至95~100℃,提取2小时后取滤液;按照前面的步骤将滤渣重复提取一次,重复提取的时间为2小时,合并两次提取所得滤液,透析24小时,截留分子量为8,000,得到所述虫草菌丝体Cs4多糖蛋白。

[0066] (2) 向混合溶液A中滴加还原型维生素C溶液,在滴加时混匀,定容,得到混合溶液B;

[0067] (3) 待混合溶液B反应至产物中所出现的红色不再加深,表示反应完全,经过24小时透析(截留分子量8,000)得到新型纳米硒水溶胶;

[0068] 其中,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液、亚硒酸钠溶液和还原型维生素C溶液中的溶剂均为水;混合溶液B中虫草菌丝体Cs4多糖蛋白、还原型维生素C和亚硒酸钠的浓度如下表1所示。

[0069] 表1

	实施例 1	实施例 2	实施 例 3	实施 例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 7
[0070] 虫草菌丝体 Cs4 多糖蛋白/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	60	300	600	600	600	1200	6000
还原型维生素 C/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.8	8.0	8.0	40	80	80	80
亚硒酸钠/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.2	2.0	2.0	10	20	20	20

## [0071] 效果例1

[0072] 本效果例考察了虫草菌丝体Cs4多糖蛋白用量对本发明所述的新型纳米硒水溶胶之影响。考察的具体方法为：常温常压下(15~35℃,1标准大气压),取质量浓度为 $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液0、0.12、0.24、0.6、1.2、2.4、8mL分别加入7个50mL的容量瓶中,然后加入双蒸水至8mL,再分别加入浓度为 $0.02\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚硒酸钠溶液1.0mL,轻轻摇匀使之混合充分后,分别滴加浓度为 $0.08\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的维生素C溶液各1.0mL,边滴加边轻轻摇匀,滴加完毕,加水定容至10mL,待红色不再加深,即得到亚硒酸钠浓度均为 $2.0\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,维生素C浓度均为 $8.0\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度分别为0、60、120、300、600、1200、4000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的产物。产物经过24小时透析(截留分子量8,000)后经硝化ICP方法测定新型纳米硒中的硒含量。产物可在2~10℃下以水溶胶形态保存。

[0073] 采用不同浓度虫草菌丝体Cs4多糖蛋白所得的新型纳米硒其平均粒径通过Nanosight NS300颗粒跟踪分析仪(Malvern)测定如表2所示。结果显示,当不加虫草菌丝体Cs4多糖蛋白作为稳定剂时,反应生成的新型纳米硒极不稳定,最后沉淀,而采用不同浓度虫草菌丝体Cs4多糖蛋白所得的新型纳米硒其平均粒径约为88.67~124.7nm,说明虫草菌丝体Cs4多糖蛋白对纳米硒粒径具有很好的调控作用。随着Cs4多糖蛋白浓度增大,纳米硒平均粒径呈浓度效应减小然后增大。在虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为300~1200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下,所得的纳米硒平均粒径显著较小和稳定性较高,尤其是虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的浓度为600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其平均粒径最低,稳定性最高。此外,标准偏差(SD)值均较小,表示新型纳米硒分散性好,粒径分布很窄。综上所述试验结果,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白是理想的纳米硒粒径调控剂。

[0074] 表2:效果例1的新型纳米硒平均粒径和SD

Cs4 多糖蛋白 (mg/L)		0	60	120	300	600	1200	6000
[0075]	新型纳米硒							
	平均粒径 (nm)	沉淀	124.7	107.3	90.00	88.67	97.00	123.3
	SD	—	4.73	2.31	3.00	1.15	2.65	2.52

[0076] (注解:当不加虫草菌丝体Cs4多糖蛋白作为稳定剂时,反应生成的新型纳米硒极不稳定,最后沉淀。)

[0077] 采用本发明效果例1的制备条件(虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度:600.0mg·L<sup>-1</sup>;亚硒酸钠浓度:2.0mmol·L<sup>-1</sup>;维生素C浓度:8.0mmol·L<sup>-1</sup>)所得的新型纳米硒作全面形貌表征见图1至7。结果显示,所得的新型纳米硒其平均粒径约为88.67nm[图1;颗粒跟踪分析仪(Nanosight NS300,Malvern)]。于13周内,粒径范围变化不大,不会出现颗粒聚集而发生沉淀,说明新型纳米硒的稳定性很好[图2;Nanosight NS300颗粒跟踪分析仪(Malvern)]。此外,新型纳米硒的分散性好,获得的产物为球形纳米硒[图3;透射电子显微镜(Hitachi H-7650)]。进一步形貌表征可见,新型纳米硒具有高纯度的多晶结构,主要元素为硒(85.55%)[图4-6;透射电子显微镜(JEM-2010,JEOL)+能量色散X射线光谱仪(EX-250,Horiba)]。通过比较新型纳米硒与虫草菌丝体Cs4多糖蛋白的主要功能基团发现,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白富含亲水性的羟基(-OH)和氨基(-NH)基团,可有效对纳米硒表面进行修饰,调控纳米硒的粒径[图7;傅立叶变换红外光谱仪(Equinox 55,Bruker)]。

#### [0078] 效果例2

[0079] 本效果例考察了亚硒酸钠和维生素C用量对本发明所述的新型纳米硒水溶胶之影响。考察的具体方法为:常温常压下(15~35℃,1标准大气压),取浓度为2.5g·L<sup>-1</sup>的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液6mL分别加入4个装有10mL双蒸水的25mL容量瓶中,然后分别加入浓度为0.025mol·L<sup>-1</sup>的亚硒酸钠溶液0、0.5、1.0、2.0mL,轻轻摇匀使之混合充分,然后再分别向相对应的容量瓶滴加浓度为0.1mol·L<sup>-1</sup>的维生素C溶液各0、0.5、1.0、2.0mL,边滴加边轻轻摇匀,滴加完毕,加水定容至25mL,待红色不再加深,即得到虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度为600mg·L<sup>-1</sup>,亚硒酸钠浓度分别为0、0.5、1.0、2.0mmol·L<sup>-1</sup>,相对应维生素C浓度为0、2.0、4.0、8.0mmol·L<sup>-1</sup>的产物。产物经过24小时透析(截留分子量8,000)后经硝化ICP方法测定新型纳米硒中的硒含量。

[0080] 采用不同浓度亚硒酸钠和维生素C用量组合所得的新型纳米硒其平均粒径通过Nanosight NS300颗粒跟踪分析仪(Malvern)测定如表3所示。结果显示,采用不同浓度亚硒酸钠和维生素C用量组合所得的新型纳米硒其平均粒径约为77.67~137.3nm。随着亚硒酸钠和维生素C用量组合浓度增大,纳米硒平均粒径呈浓度效应减小然后增大。在亚硒酸钠和维生素C浓度分别为2.0~20mmol·L<sup>-1</sup>以及8.0~80mmol·L<sup>-1</sup>下,所得的纳米硒平均粒径显著较小和稳定性较高,尤其是亚硒酸钠和维生素C浓度分别为2.0mmol·L<sup>-1</sup>及8.0mmol·L<sup>-1</sup>时,其平均粒径最低,稳定性最高。

[0081] 表3:效果例2的新型纳米硒平均粒径和SD

[0082]	亚硒酸钠 (mmol·L <sup>-1</sup> )	0.2	2.0	10	20
	维生素 C (mmol·L <sup>-1</sup> )	0.8	8.0	40	80
[0083]	新型纳米硒 平均粒径 (nm)	137.3	77.67	84.33	89.00
	SD	2.08	2.31	0.58	2.00

[0084] 效果例3

[0085] 本效果例考察了本发明所述的新型纳米硒之促进骨骼生长功能,考察的具体方法为:常温常压下(15~35℃,1标准大气压),取质量浓度为 $2.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的虫草菌丝体Cs4多糖蛋白溶液6.0mL加入到已装有10mL双蒸水的25mL容量瓶中,然后加入浓度为 $0.025\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚硒酸钠溶液2.0mL,轻轻摇匀使之混合充分,然后再滴加浓度为 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的维生素C溶液2.0mL,边滴加边轻轻摇匀,滴加完毕,加水定容至25mL,待红色不再加深,即得到亚硒酸钠浓度为 $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,维生素C浓度为 $8\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,虫草菌丝体Cs4多糖蛋白浓度为 $600\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的产物。产物经过24小时透析(截留分子量8,000)后经硝化ICP方法测定新型纳米硒水溶胶中的硒含量。

[0086] 通过MTS检测法(BMG Labtech,Clariostar)探讨新型纳米硒其对小鼠前成骨细胞MC3T3-E1增殖之影响见图8至9。结果显示,新型纳米硒可促进小鼠前成骨细胞MC3T3-E1增殖,有效浓度为 $10\mu\text{M}$ (图8)。此外,新型纳米硒(Cs4-SeNPs)其促进小鼠前成骨细胞MC3T3-E1增殖的作用是虫草菌丝体Cs4多糖蛋白(Cs4-Polysaccharides)、虫草菌丝体Cs4粉末(Crude-CS4)和对照组[蒸馏去离子水(DDI)]的1.5~2.0倍(图9)。通过检测碱性磷酸酶(ALP)活性、Von Kossa和茜素红S染色进一步探讨新型纳米硒其对小鼠前成骨细胞MC3T3-E1分化及骨矿化之影响发现,新型纳米硒( $10\mu\text{M}$ )可显著地诱导小鼠前成骨细胞MC3T3-E1的分化[ALP活性显著增长;(图10)]以及骨矿化[骨结节形成显著增加;(图11)]。综上所述试验结果,新型纳米硒具有显著的促进骨骼生长功能(促进前成骨细胞MC3T3-E1的增殖、分化和骨钙化)。

[0087] 最后应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

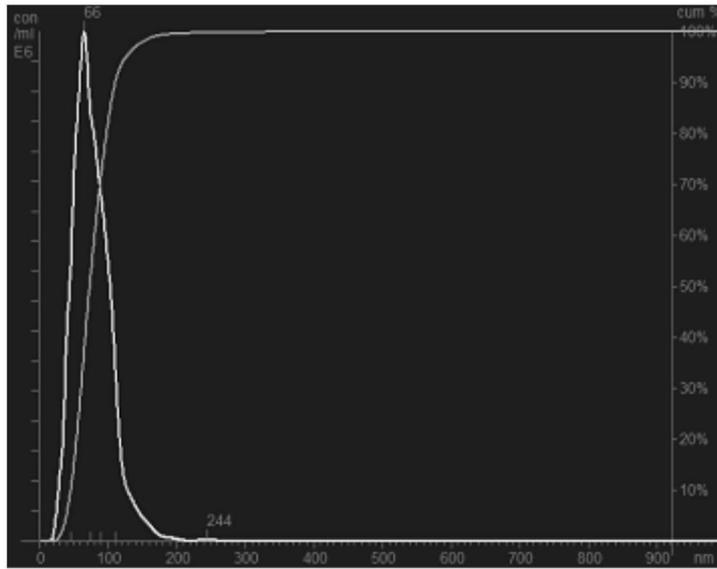


图1

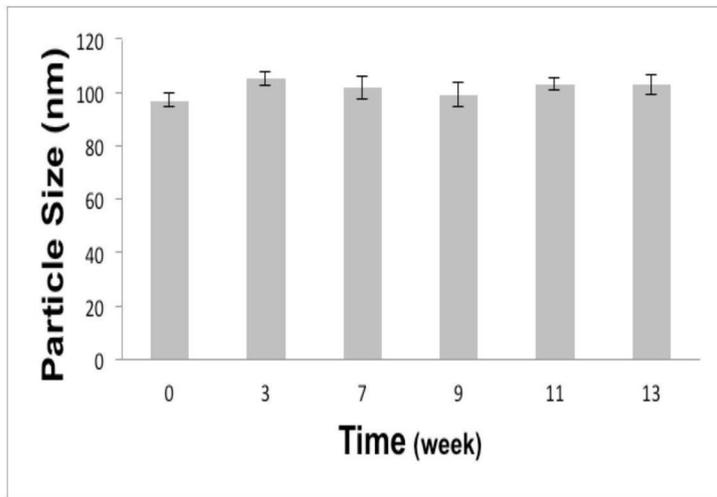


图2

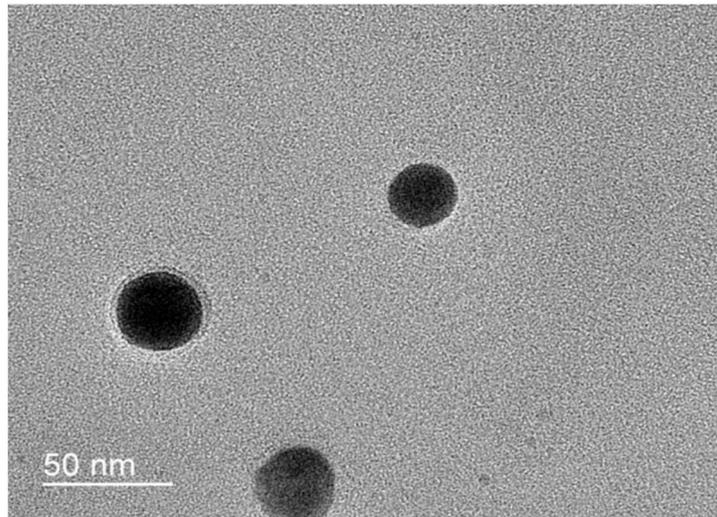


图3

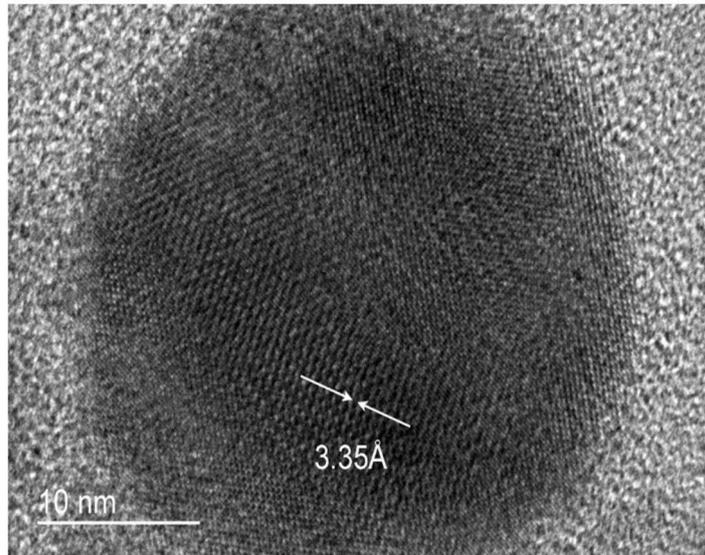


图4

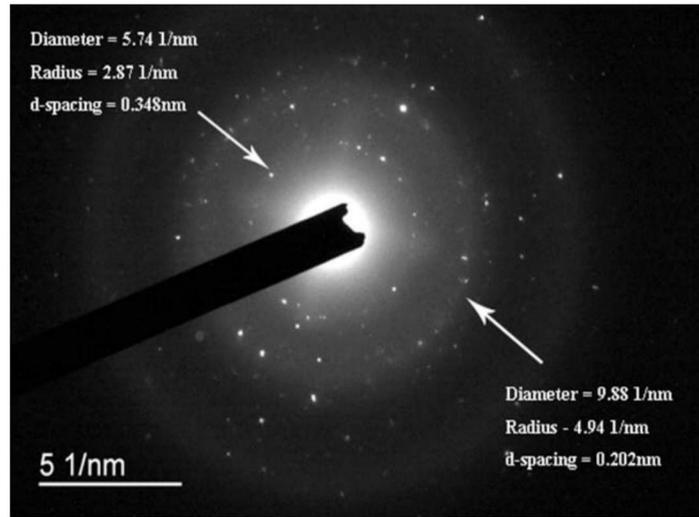


图5

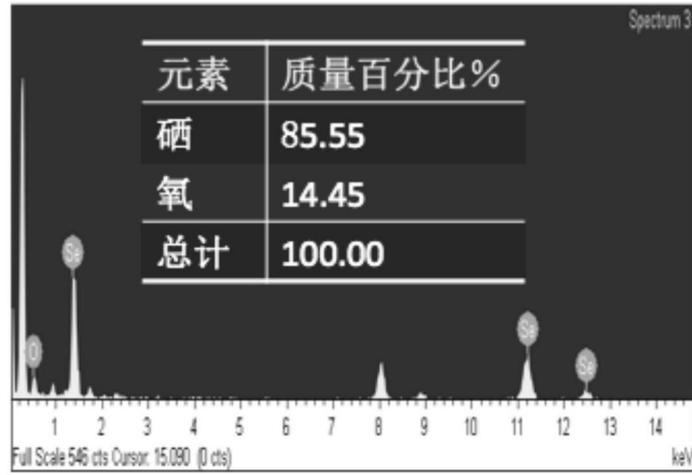


图6

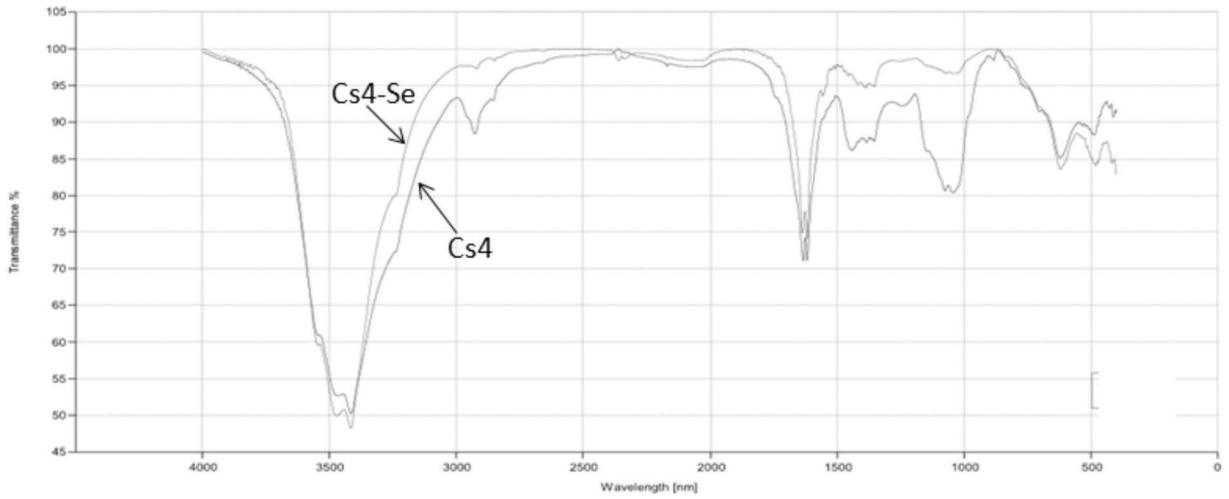


图7

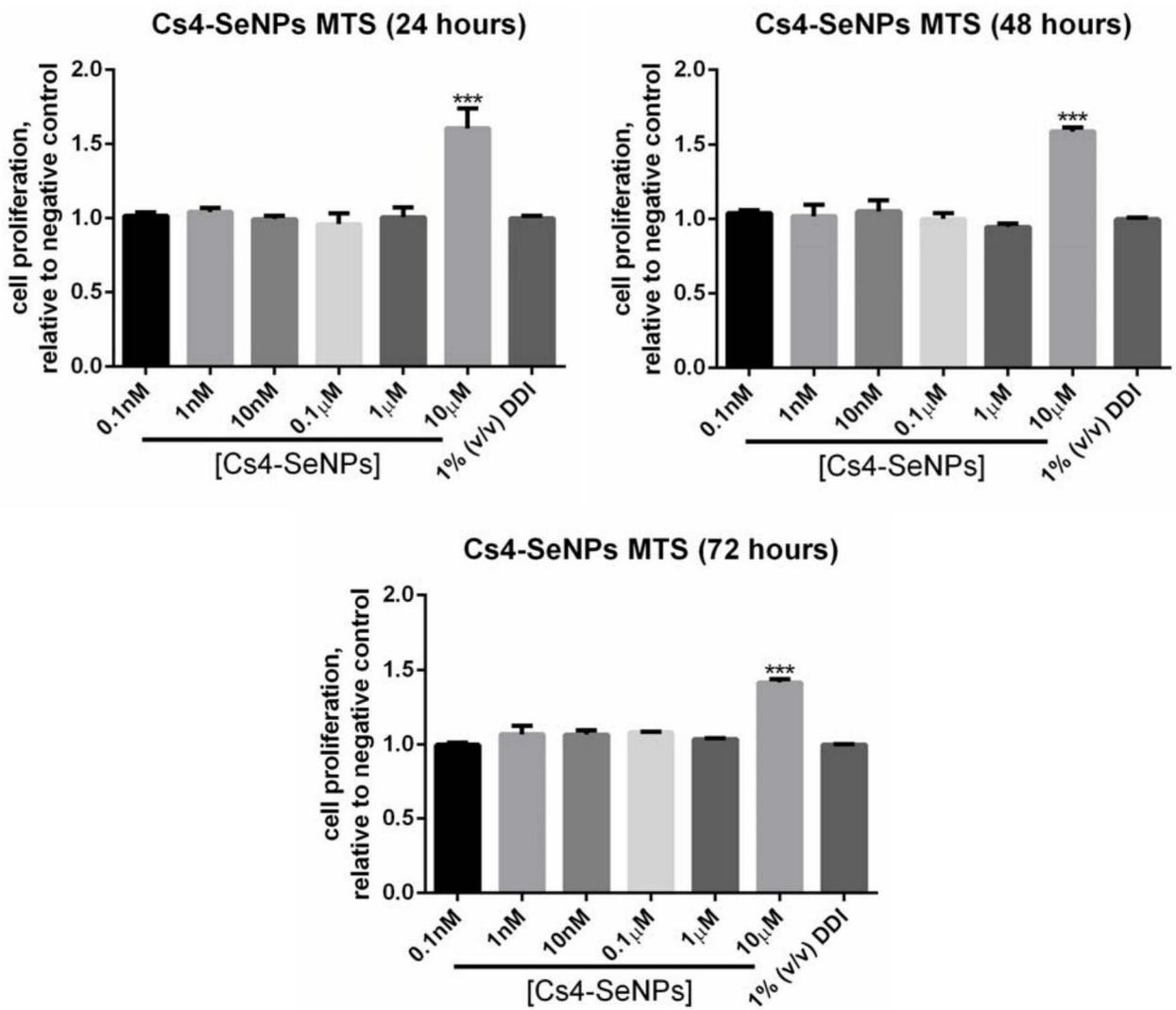


图8

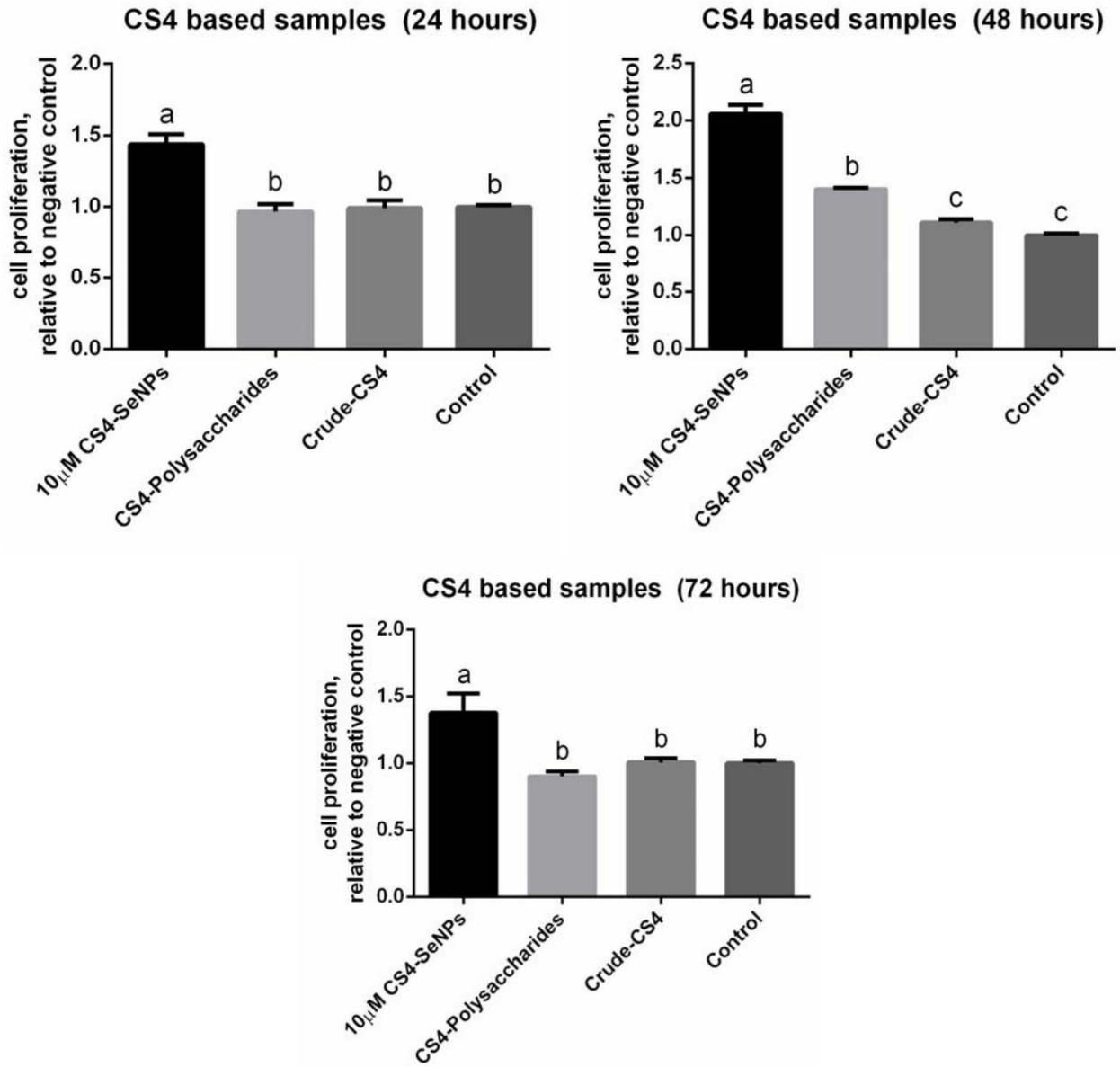


图9

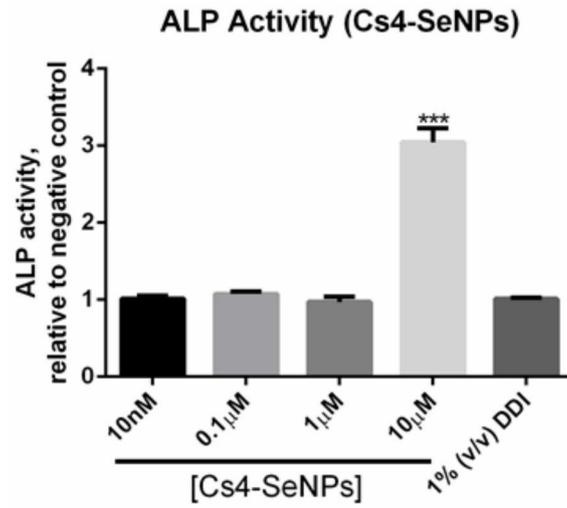


图10

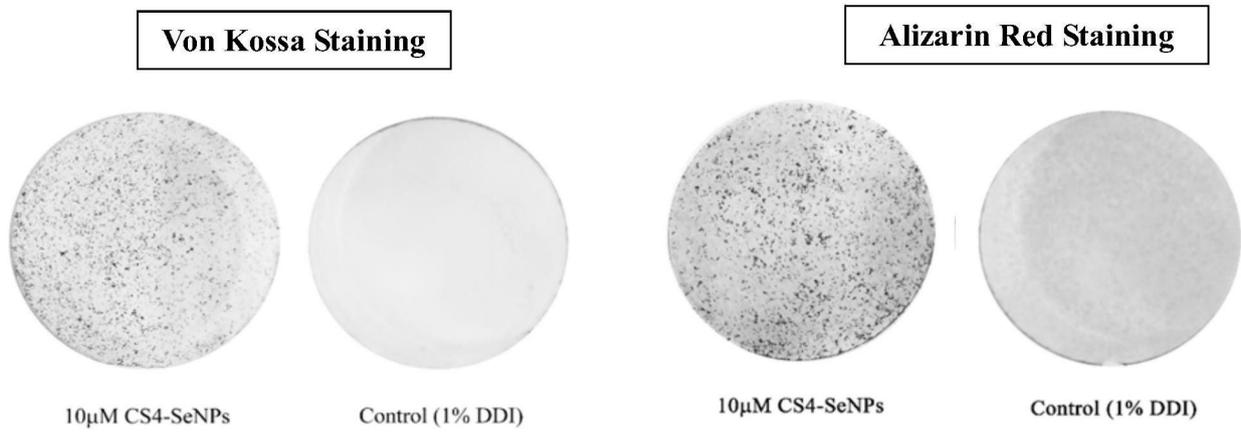


图11

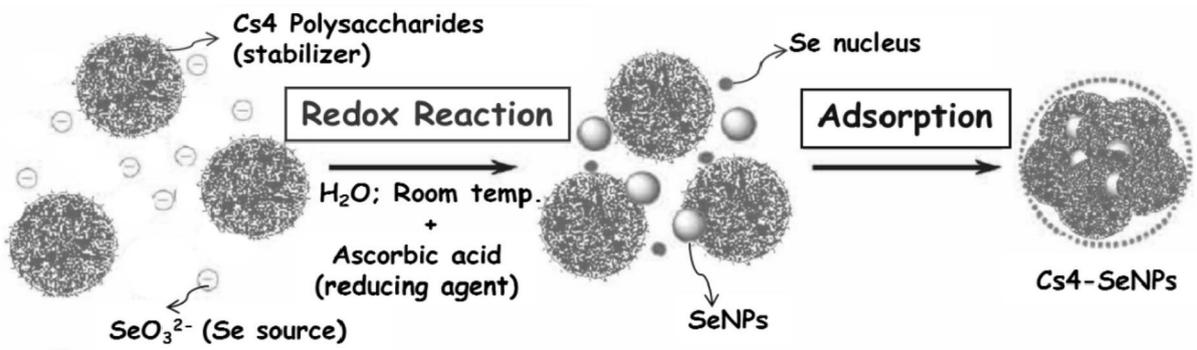


图12