



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114588112 B

(45) 授权公告日 2024.04.12

(21) 申请号 202210232289.4

(22) 申请日 2022.03.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114588112 A

(43) 申请公布日 2022.06.07

(73) 专利权人 湖北师范大学
地址 435000 湖北省黄石市磁湖路11号

(72) 发明人 夏险 涂俊铭 敖波 严镇钧
杜向阳 谭峥

(74) 专利代理机构 北京远智汇知识产权代理有限公司 11659
专利代理师 刘彦伟

(51) Int. Cl.

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 33/04 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2020142790 A1, 2020.07.09

CN 113174358 A, 2021.07.27

CN 103373713 A, 2013.10.30

CN 111186822 A, 2020.05.22

US 2020289600 A1, 2020.09.17

Venkatesan Alagesan等.Green Synthesis of Selenium Nanoparticle Using Leaves Extract of Withania somnifera and Its Biological Applications and Photocatalytic Activities.BioNanoScience .2018,第9卷105-116.

董雯雯等.辣木叶有效成分提取及在畜禽中的应用.《饲料研究》.2021,(第9期),第135-138页.

审查员 耿胜燕

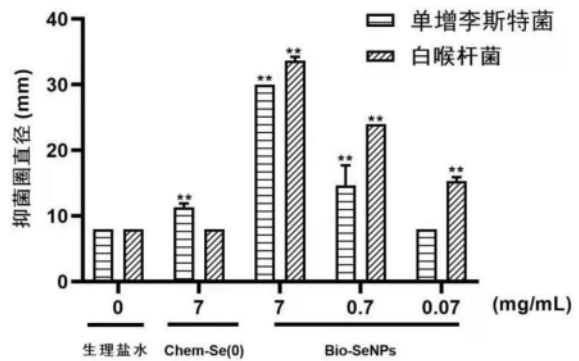
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

辣木秸秆介导合成生物硒纳米颗粒及其抗菌应用

(57) 摘要

本发明公开了一种辣木秸秆介导合成生物硒纳米颗粒,其通过包含如下步骤的方法制备:取辣木秸秆与水制备固液混合物、过滤收集滤液、与亚硒酸钠混合反应、离心取沉淀、用去离子水洗涤、重悬于去离子水中即得。本发明还公开了所述生物硒纳米颗粒在抗白喉杆菌或单增李斯特菌方面的应用。本发明填补了现有技术中辣木合成具有抗菌功能的纳米硒尚存在技术空白的缺陷,且产品具有抑菌活性高、生产成本低、合成工艺简单、条件温和、周期短、安全高效、产品保存方式简单、稳定性高、技术应用范围广、实用性强、绿色环保等优势。本发明具有广阔的市场前景。



1. 辣木秸秆介导合成生物硒纳米颗粒的方法,其特征在于是通过如下步骤制备:
 - 1) 取辣木秸秆与水按照1g:10mL的比例混合,240℃搅拌5min,得固液混合物;
 - 2) 将步骤1)得到的固液混合物用8层纱布过滤,粗提液进行2次抽滤,收集滤液,置于4℃,保存24h;
 - 3) 将步骤2)得到的滤液与亚硒酸钠按照50mL:0.3g的比例混合,50℃搅拌反应4h;
 - 4) 将步骤3)反应结束后的样品12000rpm室温离心5min,取沉淀;
 - 5) 将步骤4)得到的沉淀用去离子水洗涤,最终重悬于去离子水中,获得所述生物硒纳米颗粒。
2. 如权利要求1所述的方法制备得到的生物硒纳米颗粒在制备抗菌药物中的应用。
3. 如权利要求2所述的应用,所述菌为白喉杆菌和\或单增李斯特菌。

辣木秸秆介导合成生物硒纳米颗粒及其抗菌应用

【技术领域】

[0001] 本发明涉及生物纳米抗菌材料技术领域,具体涉及一种辣木秸秆介导合成生物硒纳米颗粒及其抗菌应用。

【背景技术】

[0002] 白喉棒状杆菌是一种感染人类呼吸道并引起皮肤白喉的细菌性病原体。常见的症状是发烧、喉咙痛,接着是虚弱、吞咽疼痛和头痛。它通过飞沫、分泌物或直接接触传播。一般用青霉素和红霉素治疗白喉梭菌感染。然而,国内外近年来各种分离的白喉梭菌被鉴定为多药耐药病原体。这给抗生素治疗带来了巨大的挑战。单增李斯特菌是引起食源性疾病的另一种致病菌,其致死率最高。单增李斯特菌的感染可导致头痛、颈僵、意识混乱、平衡丧失、惊厥、孕妇流产甚至死亡。目前世界各地仍不断有单增李斯特菌感染的报道。青霉素和氨苄青霉素常用于治疗这种细菌的侵袭。同样,单增李斯特菌的耐药性也引起了越来越多的关注。

[0003] 近年来报道了多种具有抗菌能力的纳米材料,这些材料可能是抗生素的替代品,硒纳米颗粒(SeNPs)是在抗菌方面表现出巨大潜力的纳米材料之一。硒是人体必需的微量元素之一,有文献报道Se(IV)可还原为Se(0),进而形成SeNPs。生物硒纳米颗粒(Bio-SeNPs)通常由植物、细菌、真菌和酵母合成,与微生物的Bio-SeNPs相比,植物产生的Bio-SeNPs可能在生物医学方面表现出更多的功能。如今,已经有多种植物被用于合成生物硒纳米颗粒(Bio-SeNPs),然而,辣木合成生物硒颗粒的研究还没有报道。辣木是一种原产于印度的药用植物。它在抗氧化、抗菌、抗癌、抗糖尿病和抗炎等方面有很好的应用价值。辣木也已经被用于合成多种抗菌纳米材料。然而,这些纳米颗粒对白喉杆菌和单增李斯特菌的抑菌活性尚未得到评价。此外,基于食用硒和可食用辣木制备的Bio-SeNPs,安全性和实用性更强,更有应用前景。为了评价辣木合成Bio-SeNPs的抑菌能力,本专利以辣木提取物为原料合成了Bio-SeNPs,并提供了其对白喉杆菌和单增李斯特菌的抗菌功能。

【发明内容】

[0004] 本发明的目的是解决现有技术中辣木合成具有抗菌功能的纳米硒尚存在技术空白的缺陷,提供一种生产成本低,合成工艺简单,抗菌效果好,实用性强,绿色环保的辣木秸秆介导合成生物硒纳米颗粒。

[0005] 为实现上述技术目的,本发明提供了一种辣木秸秆介导合成生物硒纳米颗粒,其特征在于是通过包含如下步骤的方法制备:

[0006] 1) 取辣木秸秆与水按照1g:10mL的比例混合,240℃搅拌5~10min,得固液混合物;

[0007] 2) 将步骤1)得到的固液混合物用8层纱布过滤,粗提液进行2~3次抽滤,收集滤液;

[0008] 3) 将步骤2)得到的滤液与亚硒酸钠按照50mL:0.1~0.3g的比例混合,30~60℃搅拌反应1~4h;

- [0009] 4) 将步骤3) 反应结束后的样品12000rpm室温离心5min,取沉淀;
- [0010] 5) 将步骤4) 得到的沉淀用去离子水洗涤,最终重悬于去离子水中,获得所述生物硒纳米颗粒(Biological Selenium Nanoparticles,Bio-SeNPs)。
- [0011] 优选地,上述步骤2) 中,对收集到的所述滤液还需置于2~6℃,保存16~48h。
- [0012] 优选地,上述生物硒纳米颗粒是通过包含如下步骤的方法制备:
- [0013] 1) 取辣木秸秆与水按照1g:10mL的比例混合,240℃搅拌5min,得固液混合物;
- [0014] 2) 将步骤1) 得到的固液混合物用8层纱布过滤,粗提液进行2次抽滤,收集滤液,置于4℃,保存24h;
- [0015] 3) 将步骤2) 得到的滤液与亚硒酸钠按照50mL:0.3g的比例混合,50℃搅拌反应4h;
- [0016] 4) 将步骤3) 反应结束后的样品12000rpm室温离心5min,取沉淀;
- [0017] 5) 将步骤4) 得到的沉淀用去离子水洗涤,最终重悬于去离子水中,获得所述生物硒纳米颗粒(Biological Selenium Nanoparticles,Bio-SeNPs)。
- [0018] 本发明还提供了上述生物硒纳米颗粒的抗菌应用。
- [0019] 优选地,所述菌为白喉杆菌和\或单增李斯特菌。
- [0020] 本发明的有益效果是:生产原料来源低廉,主要由辣木秸秆组成,为农作物副产品,植物提取物的获取安全高效,由水浸提有效成分,时间较短,反应条件温和,保存方式简单,稳定性较高,合成过程简单,应用范围较广,抑菌活性较高。

【附图说明】

- [0021] 图1A为实施例三合成的生物硒纳米颗粒实物图;
- [0022] 图1B为实施例三合成的生物硒纳米颗粒光谱扫描图;
- [0023] 图2为实施例三合成的生物硒纳米颗粒透射电镜、元素Mapping检测图;
- [0024] 图3A为实施例三合成的生物硒纳米颗粒扫描电镜图;
- [0025] 图3B为实施例三合成的生物硒纳米颗粒傅立叶红外光谱图;
- [0026] 图3C为实施例三合成的生物硒纳米颗粒X射线光电子谱图;
- [0027] 图3D为实施例三合成的生物硒纳米颗粒X射线光电子Se(0)元素谱图;
- [0028] 图4为实施例三合成的生物硒纳米颗粒的抗菌效果图;
- [0029] 图5为实施例六结果图。

【具体实施方式】

[0030] 现结合附图和实施例详细说明本发明的技术方案。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0031] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0032] 实施例一生物硒纳米颗粒的合成

[0033] 1) 取100g辣木秸秆(茎秆、叶)与1000mL水混合,使用2100W电磁炉加热到240℃,搅拌10min;

[0034] 2) 固液混合物使用8层纱布过滤,粗提液使用水循环式真空泵进行3次抽滤,最终收集600mL滤液,并将滤液分装在250mL锥形瓶中(100mL/瓶),置于6℃,保存16h;

[0035] 3) 在100mL的玻璃烧杯中,取滤液50mL与0.3g亚硒酸钠混合,在水浴加热60℃的条件下搅拌反应4h;

[0036] 4) 反应结束后,将样品分装于2mL离心管中,在12000rpm条件下,室温离心5min,弃上清,取沉淀;

[0037] 5) 将沉淀用2mL去离子水洗涤,重复洗涤2次,最终重悬于10mL去离子水,获得生物硒纳米颗粒(Biological Selenium Nanoparticles, Bio-SeNPs)。

[0038] 实施例二生物硒纳米颗粒的合成

[0039] 1) 取100g辣木秸秆(茎秆、叶)与1000mL水混合,使用2100W电磁炉加热到240℃,搅拌5min;

[0040] 2) 固液混合物使用8层纱布过滤,粗提液使用水循环式真空泵进行2次抽滤,最终收集600mL滤液,并将滤液分装在250mL锥形瓶中(100mL/瓶),置于2℃,保存48h;

[0041] 3) 在100mL的玻璃烧杯中,取滤液50mL与0.1g亚硒酸钠混合,在水浴加热30℃的条件下搅拌反应1h;

[0042] 4) 反应结束后,将样品分装于2mL离心管中,在12000rpm条件下,室温离心5min,弃上清,取沉淀;

[0043] 5) 将沉淀用2mL去离子水洗涤,重复洗涤3次,最终重悬于10mL去离子水,获得生物硒纳米颗粒(Biological Selenium Nanoparticles, Bio-SeNPs)。

[0044] 实施例三生物硒纳米颗粒的合成

[0045] 1) 取100g辣木秸秆(茎秆、叶)与1000mL水混合,使用2100W电磁炉加热到240℃,搅拌5min;

[0046] 2) 固液混合物使用8层纱布过滤,粗提液使用水循环式真空泵进行2次抽滤,最终收集600mL滤液,并将滤液分装在250mL锥形瓶中(100mL/瓶),置于4℃,保存24h;

[0047] 3) 在100mL的玻璃烧杯中,取滤液50mL与0.3g亚硒酸钠混合,在水浴加热50℃的条件下搅拌反应4h;

[0048] 4) 反应结束后,将样品分装于2mL离心管中,在12000rpm条件下,室温离心5min,弃上清,取沉淀;

[0049] 5) 将沉淀用2mL去离子水洗涤,重复洗涤2次,最终重悬于10mL去离子水,获得生物硒纳米颗粒(Biological Selenium Nanoparticles, Bio-SeNPs),4℃保存,过夜;

[0050] 6) 取步骤5)获得的生物硒纳米颗粒1mL,在80℃的条件下,干燥48h,按照所得固体重量与所取溶液体积,确定生物硒纳米颗粒的浓度;

[0051] 7) 取步骤5)获得的生物硒纳米颗粒200 μ L,使用酶标仪在200~800nm范围内进行光谱扫描。

[0052] 结果如图1A、图1B所示,辣木秸秆提取物与亚硒酸钠反应过程中,不断有生物硒纳米颗粒的合成,在反应过程中不断地发生颜色变化,生成红色目标产物(图1A),通过200~800nm的可见光光谱扫描,发现其在500~600nm处有最大吸收峰(图1B),结果表明在反应体系中有生物硒纳米颗粒的生成。

[0053] 实施例四生物硒纳米颗粒的表征分析

[0054] 1) 使用实施例三中合成的生物硒纳米颗粒,并使用去离子水洗涤2~3次,最后将收集的沉淀,重悬在2mL ddH₂O中;

[0055] 2) 收集目标样品, 放置 -80°C 超低温冰箱 $1\sim 2\text{h}$, 使用真空冷冻干燥机, 连续冻干 24h 后收集;

[0056] 3) 表征检测: 使用粉末状的样品, 进行红外光谱扫描、扫描电镜和X射线光电子能谱扫描, 使用实施例三中的步骤5) 获得的液体样品进行透射电镜和元素Mapping分析。

[0057] 结果如图2、图3A、3B、3C、3D所示, 通过透射电镜观察不同视野中的生物硒纳米颗粒, 确定其形状为圆形、大小为 $50\sim 100\text{nm}$ (图2A、B、C); 通过元素Mapping分析生物硒纳米颗粒, 确定了其表面均匀分布硒 (图2D)、碳 (图2E)、氧 (图2F)、氮 (图2G)、磷 (图2H) 和硫 (图2I) 元素, 确定其表面均匀分布着硒元素和多种有机物; 通过扫描电镜观察生物硒纳米颗粒, 确定其形貌为立体圆形, 大小约为 100nm (图3A); 通过红外光谱扫描分析生物硒纳米颗粒, 发现其在 3424.56 (羟基)、 1633.99 (烯基)、 1045.74 (亚甲基, 环己烷环)、 841.96 (芳香化合物, 1,4-取代基)、 775.53 (芳香化合物, 1,3-取代基)、 711.81 (芳基硫醚, C-S拉伸)、 602.55 (硫化物, 二硫键)、 454.64 (芳基硫化物, 二硫键) cm^{-1} 处有伸缩振动 (图3B), 表明其含有一些蛋白质、脂质等物质; 通过X射线光电子能谱分析生物硒纳米颗粒的分子结构和原子价态, 发现其在 $\text{Se}3d$ (55.5eV) 出现峰值 (图3C、3D), 表明Se的价态为0价, 说明 $\text{Se}(\text{IV})$ 被还原成 $\text{Se}(0)$ 。综合可得, 生物硒纳米颗粒的形状为立体圆形, 大小在 $50\sim 100\text{nm}$ 左右, 在其表面均匀分布着硒元素和蛋白质、脂质等有机物, 并在辣木提取物的作用下4价硒还原为0价硒, 进而生成了生物硒纳米颗粒。

[0058] 实施例五不同浓度生物硒纳米颗粒的抗菌应用

[0059] 本实施例所用的生物硒纳米颗粒是由实施例三合成。

[0060] 1) 取 $100\mu\text{L}$ 白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheria* CMCC 38107) 和单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes* ATCC 19112) 分别接种到MHA培养基 (Mueller Hinton Agar) (配方: 牛肉粉 6.0g/L , 可溶性淀粉 1.5g/L , 酸水解酪蛋白 17.5g/L , 琼脂 17.0g/L) 中, 25°C 过夜培养;

[0061] 2) 使用质量体积百分比为 0.85% 生理盐水清洗、重悬, 收集MHA培养皿中的细菌, 并使用比浊仪将其浊度调整为 0.5M ;

[0062] 3) 分别取 $50\mu\text{L}$ 菌悬液, 将白喉杆菌悬液涂于血MHA培养皿中 (所用血MHA是MHA含 5% 脱纤维羊血 (质量体积比) (配方: 牛肉粉 6.0g/L , 可溶性淀粉 1.5g/L , 酸水解酪蛋白 17.5g/L , 琼脂 17.0g/L , 5% 脱纤维羊血), 将单增李斯特菌悬液涂于MHA培养基中;

[0063] 4) 在每个培养皿中央放置一个灭菌的内环直径为 6mm 、外环直径为 8mm 的牛津杯;

[0064] 5) 由半胱氨酸与亚硒酸钠合成的化学硒 $\text{Chem-Se}(0)$, 用于实验对照组;

[0065] 6) 取 7mg/mL 的 $\text{Chem-Se}(0)$ 和 7mg/mL 、 0.7mg/mL 、 0.07mg/mL 的生物硒纳米颗粒 ($100\mu\text{L}$) 加入到灭菌的牛津杯中;

[0066] 7) 在 25°C 的条件下, 培养 15h ;

[0067] 8) 记录培养皿中抑菌圈的直径;

[0068] 结果见表1和图4, 使用琼脂糖凝扩散法测定生物硒纳米颗粒的抗菌效果, 根据抑菌圈大小判断其抑菌效价, 结果显示浓度为 7mg/mL 、 0.7mg/mL 、 0.07mg/mL 的生物硒纳米颗粒可以抑制 0.5 个麦氏单位的白喉杆菌和单增李斯特菌生长, 在 15 个小时内其抑菌圈直径分别可达到 $33.667\pm 0.333\text{mm}$ 、 $24.000\pm 0.000\text{mm}$ 、 $15.333\pm 0.333\text{mm}$ 和 $30.000\pm 0.000\text{mm}$ 、 $14.667\pm 1.764\text{mm}$ 、 $8.000\pm 0.000\text{mm}$, 表明生物硒纳米颗粒在高浓度和低浓度条件下均可以

抑制白喉杆菌和单增李斯特菌的生长,而对照组的生理盐水的抑菌圈大小为8mm(牛津杯外环直径为8mm)无抑菌效果。

[0069] 表1不同浓度生物硒纳米的抗菌效果(单位:mm)

[0070]		生理盐水	Chem-Se (0)		Bio-SeNPs	
			7 mg/mL	7 mg/mL	0.7 mg/mL	0.07 mg/mL
[0071]	单增李斯特菌	ND	11.333±0.333**	30.000±0.000**	14.667±1.764**	ND
	白喉杆菌	ND	ND	33.667±0.333**	24.000±0.000**	15.333±0.333**

[0072] 备注:ND表示无抗菌效果。

[0073] 实施例六生物硒纳米颗粒的抗菌应用

[0074] 本实施例所用的生物硒纳米颗粒是由实施例三合成。

[0075] 1) 取约 8.0×10^8 cfu/mL的白喉杆菌CMCC 3810750 μ L菌悬液,2次涂布,25 μ L/次,均匀涂布在2cm*2cm的载玻片上;

[0076] 2) 约10分钟,菌液在载玻片上干燥后,加入浓度为7mg/mL的生物硒纳米100 μ L覆盖菌液涂布的区域,同时以100 μ L的生理盐水的涂布作为对照;

[0077] 3) 在室温条件下,经过材料处理30分钟后,用无菌棉签将2cm*2cm区域内的微生物收集起来,然后将棉签头浸泡在1mL的0.85%的生理盐水中;

[0078] 4) 然后取50 μ L上述处理后的生理盐水和生物硒纳米颗粒,梯度稀释至 10^{-3} 后涂布MHA平板,计算菌落的数量。

[0079] 结果如图5,体积为50 μ L的 8.0×10^8 cfu/mL的白喉菌液,经过7mg/mL生物硒纳米颗粒和生理盐水(对照组)处理后的白喉杆菌存活率分别为19.48%和100%,结果表明生物硒纳米可以在30分钟内,将接触过载玻片的白喉杆菌灭活,灭活率可达到80.52%。



图1A

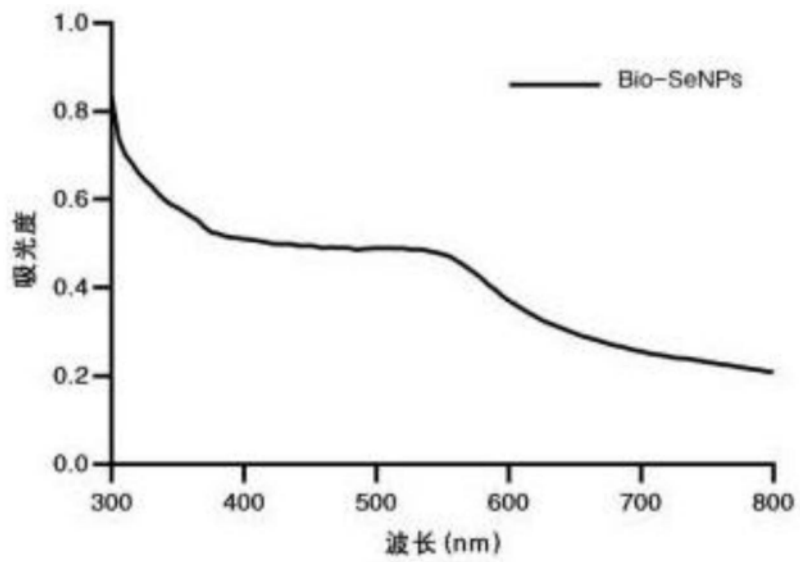


图1B

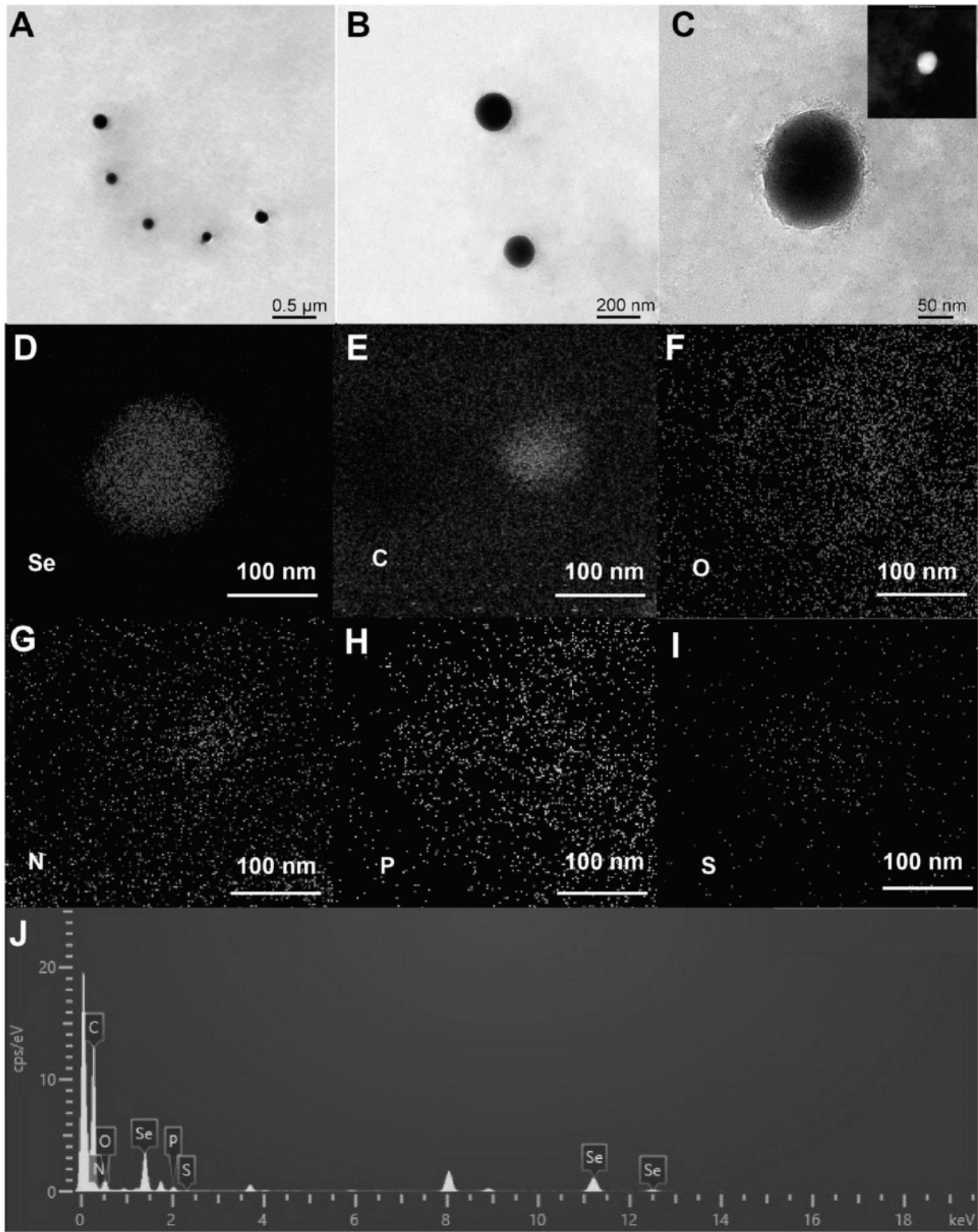


图2

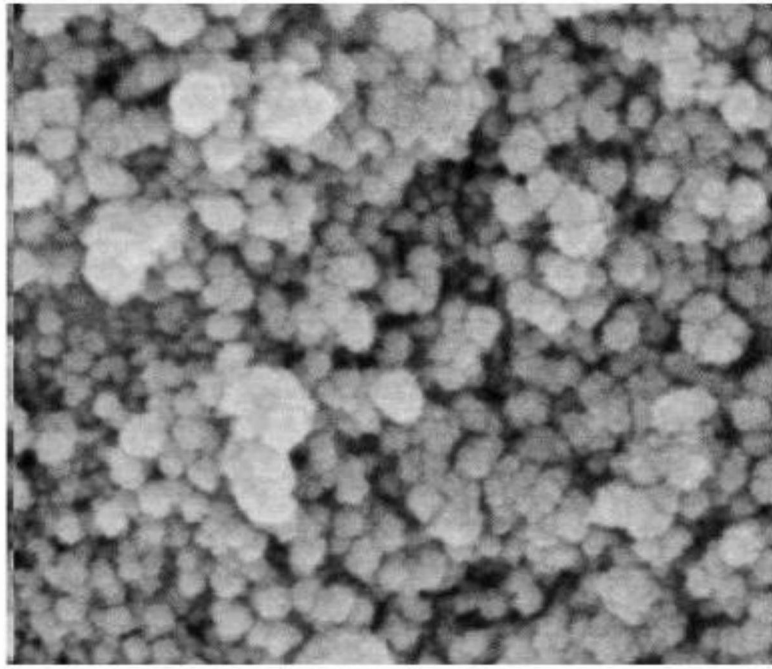


图3A

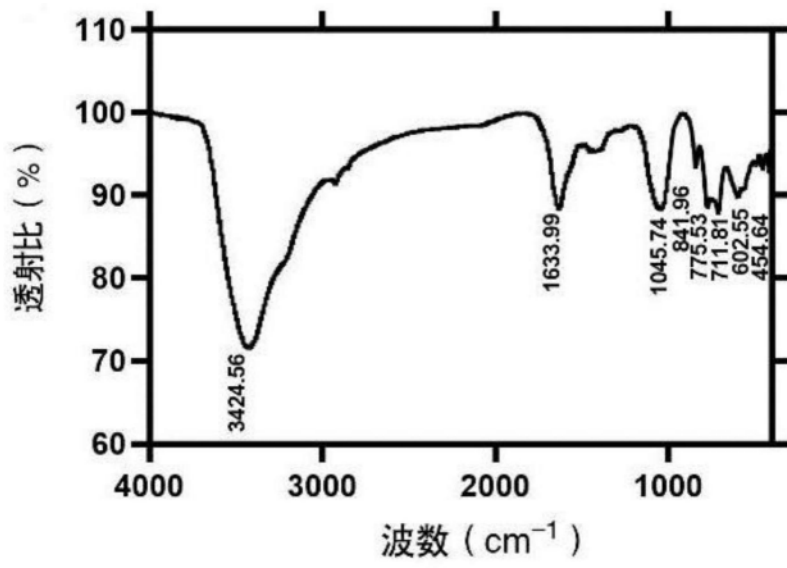


图3B

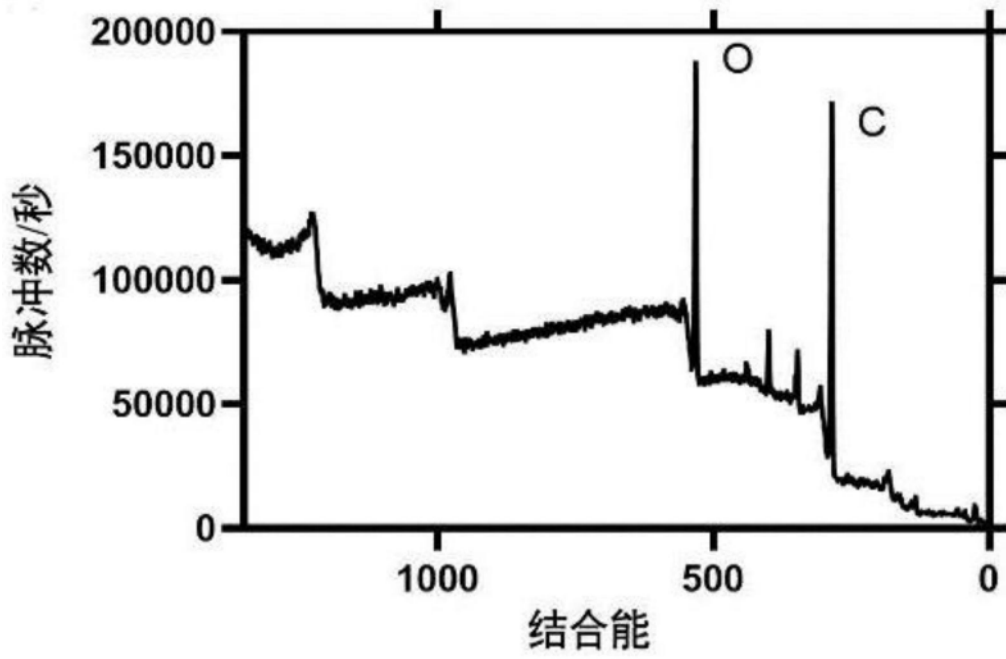


图3C

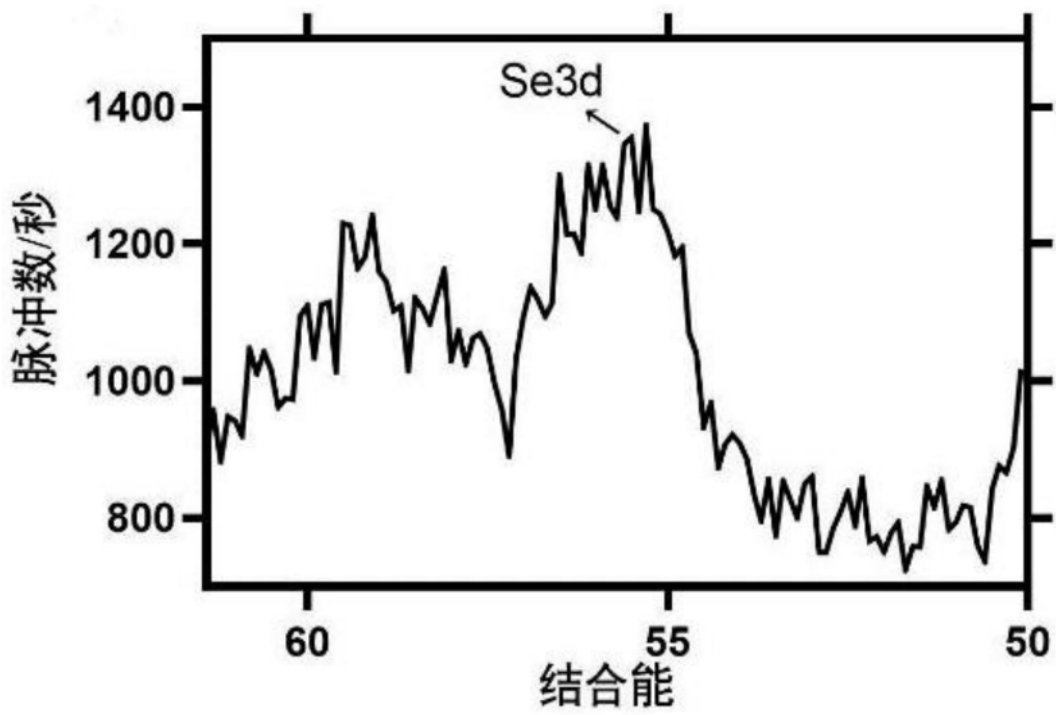


图3D

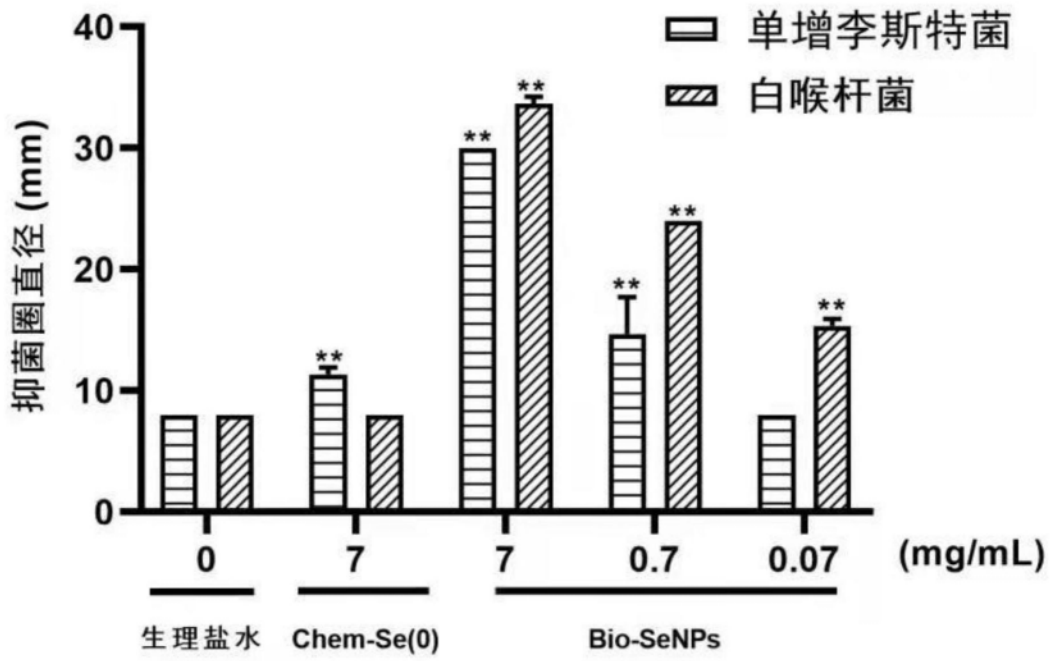


图4

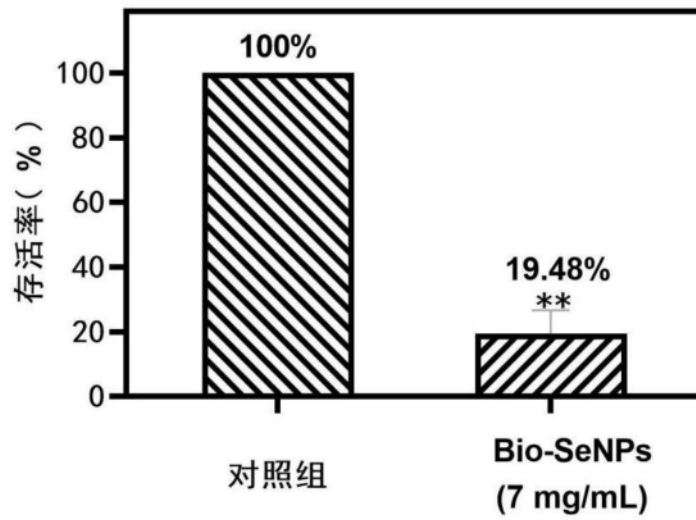


图5