



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113772683 A

(43) 申请公布日 2021.12.10

(21) 申请号 202111092100.8

(22) 申请日 2021.09.17

(71) 申请人 深圳大学

地址 518000 广东省深圳市南山区南海大道3688号

(72) 发明人 杨雪薇 罗艳青

(74) 专利代理机构 深圳尚业知识产权代理事务所(普通合伙) 44503

代理人 王利彬

(51) Int. Cl.

C01B 33/18 (2006.01)

A61L 24/00 (2006.01)

A61L 24/02 (2006.01)

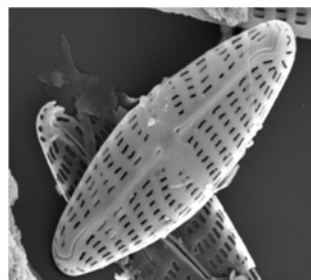
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

一种介孔二氧化硅的制备方法、介孔二氧化硅及其应用

(57) 摘要

本发明涉及二氧化硅领域,具体涉及一种介孔二氧化硅的制备方法、介孔二氧化硅及其应用。介孔二氧化硅的制备方法包括以下步骤:将去除胞外分泌物及培养液后的硅藻藻体冻干至凝固,再将其冻干至恒重,获得硅藻粉末;采用酸溶液对硅藻粉末进行清洗,去除硅藻粉末中的有机质,获得介孔二氧化硅材料。本发明提供的介孔二氧化硅的制备方法,通过采用冻干硅藻后再酸洗的方法获得介孔二氧化硅,建立起一种纯化硅藻壳制备介孔二氧化硅的方法,从而实现快速、定量、完整地获得介孔二氧化硅,且得到的二氧化硅材料介孔均一,为介孔二氧化硅的进一步研究提供了极大的方便。



1. 一种介孔二氧化硅的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将去除胞外分泌物及培养液后的硅藻藻体冻干至凝固,再将其冻干至恒重,获得硅藻粉末;

采用酸溶液对硅藻粉末进行清洗,去除硅藻粉末中的有机质,获得介孔二氧化硅材料。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述酸溶液包括硫酸以过氧化氢,所述硫酸及过氧化氢的体积比为7:3。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述采用酸溶液对硅藻粉末进行清洗包括以下步骤:

以1ml酸溶液:(20mg~50mg)硅藻粉末的比例将酸溶液与硅藻粉末混合,超声分散后在60℃水浴下消化至混合溶液呈现清亮颜色;

将消化后的混合溶液进行抽滤,获得滤饼;

将滤饼进行清洗、冷冻干燥,得介孔二氧化硅材料。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述抽滤步骤采用PTFE滤膜。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述清洗包括将滤饼加去离子水重悬、离心清洗3次的步骤。

6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述冷冻干燥包括将清洗后的滤饼置于-80℃下冷冻至无流动成分后再冻干12h的步骤。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述去除胞外分泌物及培养液后的硅藻藻体按照如下步骤获得:

离心收集已培养至完全的硅藻藻体,用去离子水重悬、离心清洗3次。

8. 一种介孔二氧化硅,其特征在于,按照如权利要求1-7中任一项所述的制备方法制备得到。

9. 一种如权利要求8所述的介孔二氧化硅在止血中的应用。

一种介孔二氧化硅的制备方法、介孔二氧化硅及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及二氧化硅领域，具体涉及一种介孔二氧化硅的制备方法、介孔二氧化硅及其应用。

背景技术

[0002] 介孔材料是一种孔径介于微孔与大孔之间的新型材料。介孔二氧化硅材料具有优异吸附材料的特性：孔道结构有序性、孔径分布单一性和可调控性、以及介孔形状多样性，使得其在吸附分离、工业催化、生物医学、环境保护等领域具有极为重要的作用。

[0003] 目前，介孔二氧化硅主要通过模板法进行制备，其通过使用不同类型的模板剂，如表面活性剂、嵌段共聚物等在酸性或碱性条件下自聚集形成胶束，而后加入硅源水解形成二氧化硅自组装在模板剂表面，最后通过萃取模板剂或煅烧的方式去除模板剂保留二氧化硅产物，该制备方法流程复杂，在制备过程中所涉及的条件及试剂众多，其中一个环节出现差错就容易导致形态、孔隙率的变化，因此，其需要确定一系列的参数和条件才能获得均一的介孔二氧化硅材料，过程繁琐，不利于介孔二氧化硅的进一步研究。

发明内容

[0004] 因此，本发明要解决的技术问题在于克服现有技术中的通过模板法制备介孔二氧化硅流程复杂的缺陷，从而提供一种介孔二氧化硅的制备方法、介孔二氧化硅及其应用。

[0005] 本发明提供一种介孔二氧化硅的制备方法，包括以下步骤：

[0006] 将去除胞外分泌物及培养液后的硅藻藻体冻干至凝固，再将其冻干至恒重，获得硅藻粉末；

[0007] 采用酸溶液对硅藻粉末进行清洗，去除硅藻粉末中的有机质，获得介孔二氧化硅材料。

[0008] 可选的，所述酸溶液包括硫酸以过氧化氢，所述硫酸及过氧化氢的体积比为7:3。

[0009] 可选的，所述硅藻藻体为*Navicula australoshetlandica* sp.。

[0010] 可选的，所述采用酸溶液对硅藻粉末进行清洗包括以下步骤：

[0011] 以1ml酸溶液：(20mg~50mg)硅藻粉末的比例将酸溶液与硅藻粉末混合，超声分散后在60℃水浴下消化至混合溶液呈现清亮颜色；

[0012] 将消化后的混合溶液进行抽滤，获得滤饼；

[0013] 将滤饼进行清洗、冷冻干燥，得介孔二氧化硅材料。

[0014] 可选的，所述抽滤步骤采用PTFE滤膜。

[0015] 可选的，所述清洗包括将滤饼加去离子水重悬、离心清洗3次的步骤。

[0016] 可选的，所述冷冻干燥包括将清洗后的滤饼置于-80℃下冷冻至无流动成分后再冻干12h的步骤。

[0017] 可选的，所述去除胞外分泌物及培养液后的硅藻藻体按照如下步骤获得：

[0018] 离心收集已培养至完全的硅藻藻体，用去离子水重悬、离心清洗3次。

[0019] 本发明还提供一种介孔二氧化硅,按照如上述所有方案中任一项所述的制备方法制备得到。

[0020] 本发明还提供一种如上述方案所述的介孔二氧化硅在止血中的应用。

[0021] 本发明技术方案,具有如下优点:

[0022] 1. 本发明提供的介孔二氧化硅的制备方法,通过采用冻干硅藻后再酸洗的方法获得介孔二氧化硅,建立起一种纯化硅藻壳制备介孔二氧化硅的方法,从而实现快速、定量、完整地获得介孔二氧化硅,且得到的二氧化硅材料介孔均一,为介孔二氧化硅的进一步研究提供了极大的方便。

[0023] 2. 本发明提供的介孔二氧化硅的制备方法,通过冻干的方式获得干燥硅粉,可以保证硅藻在干粉状态下仍能够保留其原始形态,从而可以避免如烘干时的硅藻个体之间产生挤压变形甚至开裂的现象发生。

[0024] 3. 本发明提供的介孔二氧化硅的制备方法,通过采用过氧化氢与硫酸两种试剂按特定配比配制成酸溶液对硅藻粉进行清洗,该酸溶液具有很强的氧化性,能够在充分消化硅藻有机质的同时,赋予硅藻壳表面更多的羟基,从而在增加材料的亲水性,且清洗过后的酸可回收,只需补充少量过氧化氢。

[0025] 4. 本发明提供的介孔二氧化硅的制备方法,在对滤饼进行清洗后,依旧采用冻干技术进行干燥,可以保证得到的介孔二氧化硅分散性良好,形态完整,减少黏附在离心管上的材料,减少损失。

[0026] 5. 本发明提供的介孔二氧化硅,通过采用特定的方法进行制备,得到的介孔二氧化硅介孔均一。

[0027] 6. 本发明提供的介孔二氧化硅在止血中的应用,凝血快,止血效果好。

附图说明

[0028] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0029] 图1是本发明实施例1中硅藻介孔二氧化硅的扫描电镜图片;

[0030] 图2是本发明实施例1中硅藻介孔二氧化硅的透射扫描电镜图片;

[0031] 图3是本发明实施例2中硅藻介孔二氧化硅的扫描电镜图片;

[0032] 图4是本发明实施例3中硅藻介孔二氧化硅的扫描电镜图片;

[0033] 图5是本发明对比例2中硅藻介孔二氧化硅的扫描电镜图片;

[0034] 图6是本发明对比例3中硅藻介孔二氧化硅的扫描电镜图片;

[0035] 图7是本发明介孔二氧化硅止血效果评价中不同浓度硅藻壳的溶血率;

[0036] 图8是本发明介孔二氧化硅止血效果评价中体外凝血时间结果;

[0037] 图9是本发明介孔二氧化硅止血效果评价中凝血实验结果。

具体实施方式

[0038] 提供下述实施例是为了更好地进一步理解本发明,并不局限于所述最佳实施方

式,不对本发明的内容和保护范围构成限制,任何人在本发明的启示下或是将本发明与其他现有技术的特征进行组合而得出的任何与本发明相同或相近似的产品,均落在本发明的保护范围之内。

[0039] 实施例中未注明具体实验步骤或条件者,按照本领域内的文献所描述的常规实验步骤的操作或条件即可进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规试剂产品。

[0040] 实施例1

[0041] 本实施例涉及一种介孔二氧化硅的制备方法,具体包括以下步骤:

[0042] S1、离心收集已培养至完全的硅藻藻体 (*Navicula australoshetlandica* sp.), 用去离子水重悬、离心清洗3次,去除培养液及其胞外分泌物;

[0043] S2、将S1得到的藻体放入-80℃,冷冻1h,再转移至冷冻真空干燥机中,冻干至恒重,获得硅藻粉末;

[0044] S3、以硫酸:过氧化氢=7:3的比例配制的酸溶液;

[0045] S4、以1mL酸溶液:50mg硅藻粉末的比例将酸溶液及硅藻粉末混合在三角瓶中,转移至超声机中分散5min,转移至60℃水浴锅中消化30min;

[0046] S5、消化完毕后,将混合溶液转移至抽滤装置上,使用PTFE滤膜抽滤,滤饼即为硅藻介孔二氧化硅材料,将滤饼刮下,转移至离心管中,加入去离子水重悬、离心清洗3次,获得硅藻介孔二氧化硅;

[0047] S6、将硅藻介孔二氧化硅,放入-80℃,冷冻1h,转移至冷冻真空干燥机中,冻干至粉末状(视藻粉质量时长会有所不同,最长不超过12h),最终获得均匀分散为粉末状的白色硅藻介孔二氧化硅粉末。

[0048] 本实施例只需不到18h就能够从硅藻粉末到介孔二氧化硅材料。通过扫描电镜及透射电镜对硅藻及其介孔二氧化硅硅藻壳进行拍摄,获得电镜照片,如图1-2所示,其中,图1为硅藻介孔二氧化硅的扫描电镜图片,图2为硅藻介孔二氧化硅的透射扫描电镜图片。从图1-2中可看到,硅藻介孔二氧化硅表面具有不同孔径的孔隙分布,孔径直径范围为165-350nm。而对100nm以上的孔进行放大,能清晰地看到内部呈现地整齐排列的直径6-8nm的孔。这表明本实施例中清洗硅藻壳的方法能够有效清除硅藻的有机质,保留硅藻的完整结构及精细结构,从而得到介孔均匀的介孔二氧化硅材料。这种网状亚结构可以大大增加 *Navicula australoshetlandica* sp. 的表面积,这在其作为介孔生物材料的方面是有益的。

[0049] 实施例2

[0050] 本实施例涉及一种介孔二氧化硅的制备方法,本实施例与实施例1的区别之处在于,在本实施例中,酸溶液中硫酸:过氧化氢=3:7。

[0051] 本实施例得到的介孔二氧化硅的透射扫描电镜图片如图3所示。从图3中可看出,有机质清除不够干净。

[0052] 实施例3

[0053] 本实施例涉及一种介孔二氧化硅的制备方法,本实施例与实施例1的区别之处在于,在本实施例中,酸溶液中硫酸:过氧化氢=5:5。

[0054] 本实施例得到的介孔二氧化硅的透射扫描电镜图片如图4所示。从图4可知,硅藻

已发生部分破损。

[0055] 对比例1

[0056] 本对比例涉及一种介孔二氧化硅材料的制备,包括以下步骤:

[0057] 一、无定形二氧化硅球体的制备

[0058] 在室温下,将160mL乙醇、异丙醇或丁醇与16mL氢氧化铵和7g正硅烷乙醇(TEOS)混合物在带塞的500mL圆底烧瓶中搅拌20h。通过离心和用乙醇洗涤多个循环回收和纯化二氧化硅微球,在70-80℃下干燥过夜。

[0059] 二、水热反应(制备介孔二氧化硅球体)

[0060] 使用假晶转化反应将无定形母体二氧化硅球体转化为介孔二氧化硅球体。将分散在乙醇(2.53mL)中的无定形二氧化硅球体(44mg)添加到CTAB(0.05g)、水(10mL)和NaOH(0.013g)的混合物中,并在室温下搅拌30分钟。所有组分的摩尔比为1 SiO₂:0.18 CTAB:0.44 NaOH:750 H₂O:75 EtOH。水热反应在聚四氟乙烯内衬高压釜中在100℃下进行24小时。通过离心和用乙醇洗涤的多个循环回收和纯化产物。通过在空气中在550℃下煅烧6小时(加热速率1℃/min)从介孔二氧化硅球体中去除表面活性剂。最终产物表示为HT-SiO₂-EtOH、HT-SiO₂-iPrOH和HT-SiO₂-BuOH,取决于母球Stöber合成中使用的溶剂。

[0061] 可见,模板法在制备介孔二氧化硅材料上更加的复杂、费时、污染更高。

[0062] 对比例2

[0063] 本对比例涉及一种介孔二氧化硅的制备方法,本对比例与实施例1的区别之处在于,在本对比例中,S4步骤中水浴温度为40℃。

[0064] 本对比例得到的介孔二氧化硅的透射扫描电镜图片如图5所示。从图5中可看出,有机质清除不够干净。

[0065] 对比例3

[0066] 本对比例涉及一种介孔二氧化硅的制备方法,本对比例与实施例1的区别之处在于,在本对比例中,S4步骤中水浴温度为90℃。

[0067] 本对比例得到的介孔二氧化硅的透射扫描电镜图片如图6所示。从图6中可看出,硅藻部分已发生破损。

[0068] 介孔二氧化硅止血效果评价

[0069] 1、体外溶血实验

[0070] 利用不同浓度的硅藻壳粉末的进行体外溶血率实验。硅藻壳溶于生理盐水中(10mg/ml、5mg/ml、2.5mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml),并提前在37℃水浴。60mL 10%血细胞比容的红细胞分散液加入到1mL硅藻壳分散溶液中,随即加入20mL的CaCl₂,37℃水浴1h。然后将溶液在2000rpm/min下离心5分钟。测量上清液在545nm处的吸光值。不加硅藻壳的蒸馏水和生理盐水分别作为阳性对照和阴性对照。

[0071] 溶血率hemolysis rate的计算公式:

[0072] $HR(\%) = (D_s \text{硅藻壳} - D_n \text{生理盐水}) / (D_p \text{蒸馏水} - D_n) \times 100$

[0073] 2、硅藻壳的体外促凝血活性

[0074] 取洁净试管,分别加入10mg的硅藻壳粉末,空白试管作阴性对照,壳聚糖作阳性对照,每样品每浓度设三支试管。将各管轻轻摇匀或使粉末尽量铺开于试管底部,预热至37℃。依次将0.25mL、0.5mL、0.75mL、1mL、1.25mL新鲜血液和抗凝血(血:3.8%枸橼酸钠=9:

1) 加入上述试管中,平稳地移入37℃水浴中,放入同时开始计时,每隔30s将第一支试管倾斜一次(角度小于30°),其余两支暂时不动,直到第一支试管缓慢倒置血液不流动为止,以同样方法观察第二、第三支试管,至第三管内的血全凝后,按停秒表,记下该组凝血时间。凝血时间以60min为上限,超过即判为不凝血。每样品重复试验6次。

[0075] 用磷酸缓冲溶液(PBS,pH 7.4)清洗各管内的样品三次,去除未附着于粉末上的血细胞。向清洗后的硅藻壳粉末及RBC复合物中加入2.5%戊二醛溶液,置于室温固定2h,使血细胞和硅藻壳粉末产生交联。固定后的粉末用酒精分散,滴于硅片上,喷金,拍摄电子扫描显微镜图片。

[0076] 3、活化部分凝血酶时间(aPTT)测定

[0077] 100L PPP在37℃下水浴3min,接着与同样在37℃下水浴3min的aPTT试剂和样品(多少克)混匀,然后移入全自动凝血分析仪中进行测量,每个样品测试6次,取平均值。

[0078] 4、凝血酶原时间(PT)测定

[0079] 100L贫血小板血浆(PPP)和PT试剂被混合在一起,在37℃下预热5min。将准备好的样品加入,然后移入全自动凝血分析仪中进行测量,每个样品测试6次,取平均值。

[0080] 5、实验结果:

[0081] (1)、体外溶血率

[0082] 溶血试验用于确认硅藻壳对于血液的相容性。该测试测量主要由分布在硅藻壳表面的硅烷醇基团与膜蛋白的带正电荷基团之间的静电相互作用引起的溶血现象。二氧化硅和细胞膜之间的强亲和力削弱了红细胞的完整性。随着硅藻壳浓度的增加,红细胞(RBCs)的溶血率基本变高,如图7所示。为了量化硅藻壳在SD大鼠红细胞中的溶血作用,计算了溶血率(根据等式1.)。

[0083]
$$\text{溶血率}(\%) = \frac{D_F - D_P}{D_N - D_P} \times 100$$

等式 1

[0084] D_F , D_N , 和 D_P 分别为545nm处,硅藻壳、蒸馏水(阴性对照)和生理盐水(阳性对照)的吸光值。

[0085] 从图7中,在1、2.5和5mg·mL⁻¹硅藻壳中发现低溶血率,不超过1.55±0.06%。在1mg·mL⁻¹硅藻壳中,最低溶血率为1.18±0.22%,这可以被认为是几乎透明的分辨率(图8)。虽然7.5mg·mL⁻¹的溶血率达到4.73±0.45%,但仍低于5%。当使用10mg·mL⁻¹硅藻壳加入至红细胞溶液内时,溶血率为5.64±0.39%,显著高于1、2.5和5mg·mL⁻¹的浓度(p<0.001)。然而,与Coscinodiscus sp的数据相比,数据仍然是有优势的。硅藻壳(17.76±1.16%,10mg mL⁻¹)和硅藻土(13.83±0.11%,5mg mL⁻¹)。所得结果表明Navicula australoshetlandica sp.硅藻壳具有良好的血液相容性。

[0086] (2)、体外凝血结果

[0087] 体外全血凝固时间来衡量硅藻壳的止血效果。本次评估中使用的抗凝血液加入1/50V 0.025mol/L CaCl₂重新钙化。这里的氯化钙是提供适当的钙离子(凝血因子IV)进入抗凝血剂,使凝血过程被激活发生反应。为了比较止血效率,对悬浮在不同体积血液中的硅藻壳和壳聚糖进行了凝血时间的评估。壳聚糖是一种天然多糖,因其有效的止血性能、生物降

解性和生物相容性而被广泛用作商业止血材料。在本研究中,我们使用壳聚糖作为阳性对照。根据图9,硅藻壳和壳聚糖的凝固时间明显短于空白对照($429.37 \pm 12.14s$)。硅藻壳组在止血材料/血液($mg/\mu L$)比为1:100时的凝血时间最短($134.99 \pm 7.00s$),比壳聚糖短1.83倍($112.32s$)和3.18倍($294.38s$),比对照组的时间短。当血容量从 $25\mu L$ 增加到 $125\mu L$ 时,壳聚糖的凝血时间从 181.06 ± 7.25 显著延长到 $282.52 \pm 3.48s$,而硅藻壳的凝血时间几乎保持不变,从 $167.37 \pm 13.33s$ 变为 $181.73 \pm 7.60s$ 。这表明血容量对硅藻壳的止血特性有轻微影响,显示出作为医用止血材料的巨大潜力。

[0088] (3)、活化部分凝血活酶时间(aPTT)和凝血酶原时间(PT)

[0089] 活化部分凝血活酶时间(aPTT)和凝血酶原时间(PT)的表征揭示了硅藻在止血途径中的作用。硅藻壳的aPTT比对照短 $44.53 \pm 7.78s$,而对PT没有显著变化($P < 0.5$,使用SPSS分析)(血液为 $8.73 \pm 0.12s$;硅藻壳为 $8.85 \pm 0.37s$),如图7所示。aPTT的缩短意味着硅藻壳可以诱导血液凝固的内在途径。先前的研究表明,二氧化硅的高度多孔、带负电荷的表面可以通过刺激凝血因子XI和XII来激活血液凝固的内在途径[28,29]。大量带负电荷的基团可归因于aPTT缩短,而几乎恒定的PT表明硅藻壳没有激活外在凝固途径。

[0090] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

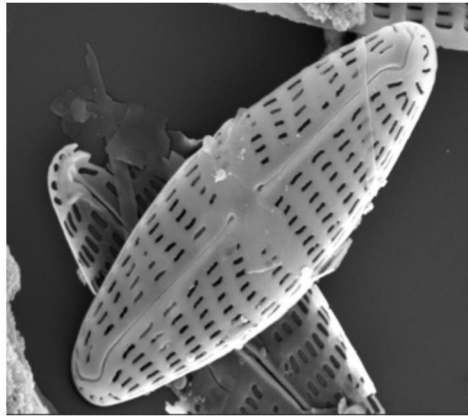


图1

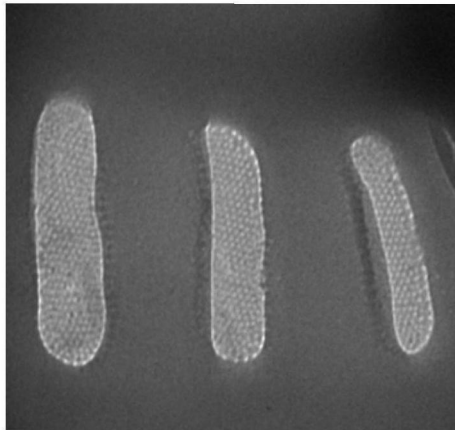


图2

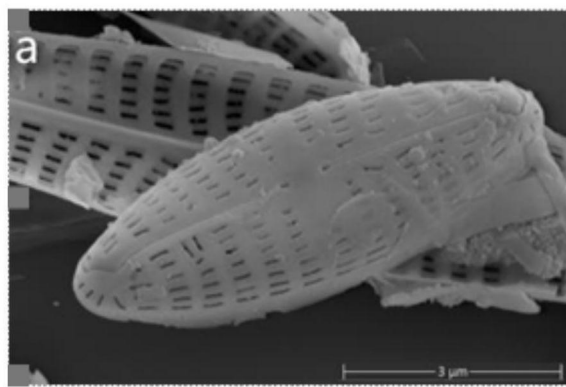


图3

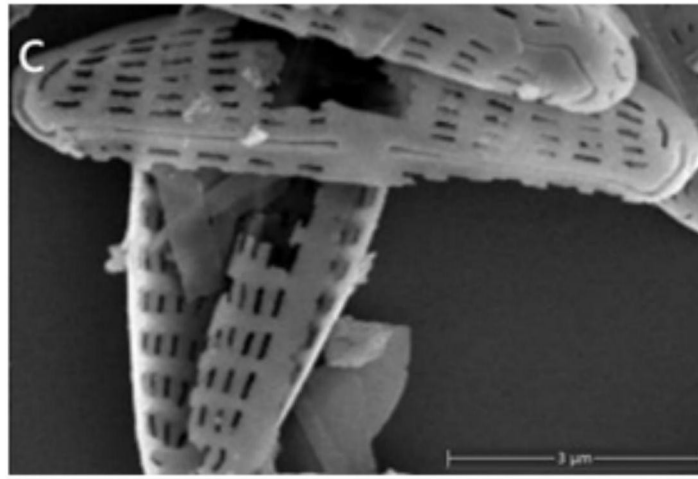


图4

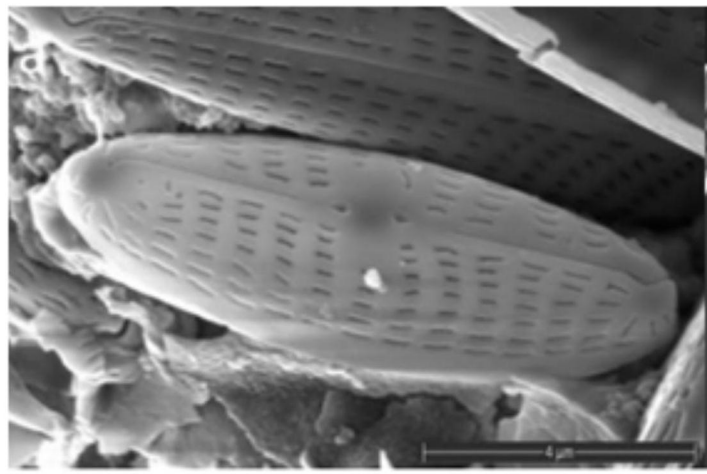


图5



图6

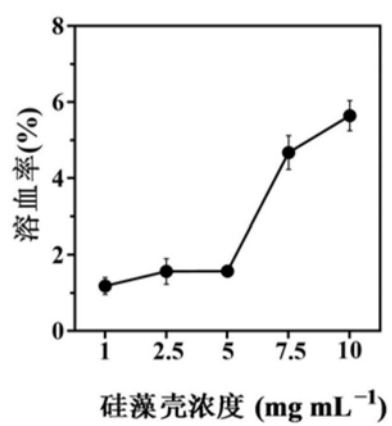


图7

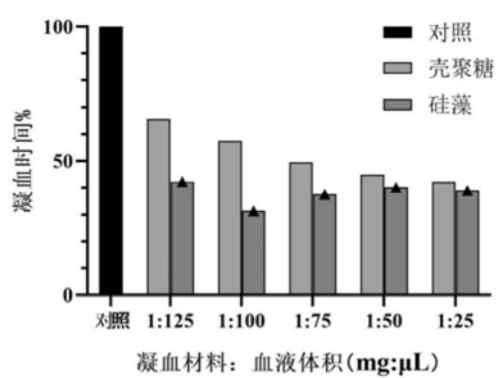


图8

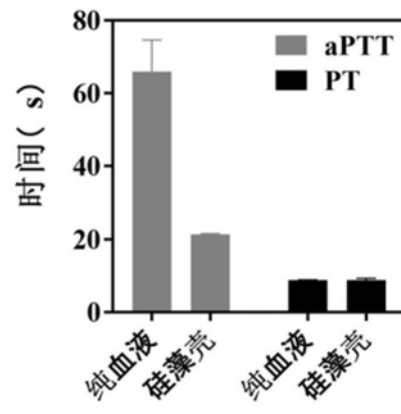


图9