



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104010970 B

(45)授权公告日 2016.12.21

(21)申请号 201280059128.4

P·迈尔斯 张海飞

(22)申请日 2012.11.22

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(65)同一申请的已公布的文献号

代理人 沙永生

申请公布号 CN 104010970 A

(43)申请公布日 2014.08.27

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C01B 33/18(2006.01)

1120665.3 2011.12.01 GB

B01J 20/286(2006.01)

C09C 1/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(56)对比文件

2014.05.30

Byunghwan Lee et al.. "synthesis of functionalized porous silicas via templating method as heavy metal ion adsorbents: the introduction of surface hydrophilicity onto the surface of adsorbents".《Microporous and Mesoporous Materials》.2001,第50卷(第1期),

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/073405 2012.11.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/079396 EN 2013.06.06

(73)专利权人 赛默电子制造有限公司

地址 英国剑桥

审查员 程可可

(72)发明人 H·里奇 A·阿罕默德

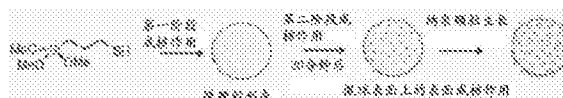
权利要求书1页 说明书14页 附图12页

(54)发明名称

用于液相色谱的多孔颗粒及其制备方法

(57)摘要

提供了表面多孔型二氧化硅颗粒以及一种用于制备这些表面多孔型颗粒的一锅法,该方法包括使一种包含官能团的二氧化硅前体水解并且缩合以形成表面多孔型颗粒,这些表面多孔型颗粒包括二氧化硅微颗粒,这些二氧化硅微颗粒具有结合到这些微颗粒表面上的二氧化硅纳米颗粒。这些纳米颗粒在微颗粒上提供了一个多孔外层。这些表面多孔型颗粒可用作液相色谱中的固定相并且允许样品的快速质量传递和分离。



1. 一种用于制备表面多孔型二氧化硅颗粒的一锅法,该方法包括在包括水和一种有机溶剂的碱性介质中,在表面活性剂和一种用作胶体稳定剂的亲水聚合物的存在下使一种巯基二氧化硅前体水解并且缩合以形成表面多孔型二氧化硅颗粒,这些表面多孔型二氧化硅颗粒包括实质上非多孔的二氧化硅微颗粒,这些二氧化硅微颗粒具有结合到这些微颗粒的表面上的二氧化硅纳米颗粒,且这些二氧化硅纳米颗粒完全覆盖这些微颗粒,任何其他二氧化硅前体不存在或以基于二氧化硅前体的总量的按重量计少于10%的量存在。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中该前体包括一种巯基硅烷。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中该巯基硅烷包括3-巯基丙基三甲氧基硅烷。

4. 根据以上任何一项权利要求所述的方法,其中使用该前体作为唯一的二氧化硅源。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述的碱性介质具有9至11范围内的起始pH。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中该有机溶剂包括甲醇。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中该表面活性剂包括一种季铵表面活性剂。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中该季铵表面活性剂包括溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)和/或氯化十六烷基三甲基铵(CTAC)。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中该亲水性聚合物包括聚乙烯醇(PVA)和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。

10. 根据权利要求1所述的方法,该方法进一步包括对这些表面多孔型二氧化硅颗粒进行煅烧。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中这些微颗粒具有在1 μ m至20 μ m范围内的通过激光衍射测得的平均颗粒尺寸。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中这些纳米颗粒具有不大于500nm的通过动态激光散射(DLS)测得的平均颗粒尺寸。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中由非局部密度泛函理论(DFT)计算出的表面多孔型颗粒的孔径小于2nm。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中结合到这些微颗粒表面上的纳米颗粒形成一个单层。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中这些微颗粒具有在1 μ m至10 μ m范围内的通过激光衍射测得的平均颗粒尺寸。

用于液相色谱的多孔颗粒以及其制备方法

发明领域

[0001] 本发明涉及液相色谱的领域。本发明进一步涉及在填充液相色谱柱中用作一种固定相的多孔颗粒,并且涉及用于制备这些多孔颗粒的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 液相色谱(LC)柱已经得到广泛发展,并且常规地用于分析型以及制备型色谱中。一种包括多种组分的混合物的样品(也称为分析物或溶质)在色谱柱中的分离是通过将该样品溶解于一种液体流动相中并且使该流动相通过一种典型地填充在一个管状柱中的固定相来实现的,从而使该样品由于不同组分在该流动相与固定相之间的不同分配(即,这些组分具有不同的分配系数)而分离成其多个组分。在液相色谱中,固定相典型地是以填充在柱内的颗粒床的形式。本发明涉及此类所谓的填充柱。

[0004] 通常使用二氧化硅颗粒作为固定相床。非多孔二氧化硅颗粒具有低的样品容量。因此,通常使用多孔二氧化硅颗粒,这些多孔二氧化硅颗粒含有孔网络以增大固定相的表面积并且因而改善分离能力。这些孔隙可以是小于2nm尺寸的微孔、2nm至50nm的介孔、或大于50nm的大孔。已存在减小这些多孔颗粒的尺寸来改善分离的动力学以及分辨率的趋势,但这以增大工作压力为代价。多孔颗粒还可以具有过大颗粒尺寸分布,这限制了峰分辨率。已经使用所谓的表面多孔型颗粒(即只在其表面为多孔的颗粒)来作为其中孔隙贯穿颗粒的本体而延伸的全多孔型二氧化硅颗粒的替代方案。这些使得能够使用合理的工作压力,但仍然具有高的分辨率。它们还提供了窄颗粒尺寸分布的可能性。表面多孔型颗粒包括一个具有多孔壳的非多孔核。该多孔壳导致短的质量传递距离并且因此导致快速的质量传递以及快速的样品分离。这对于大型生物分子(例如像蛋白质)的分离是重要的。在来自安捷伦(Agilent)的Poroshell™柱以及来自赛默飞世尔科技(Thermo Scientific)的Accucore™柱中用于HPLC的表面多孔型颗粒是可商购的。

[0005] 在US3,505,785所描述的一种已知方法中,表面多孔型二氧化硅颗粒是通过在充当实心核的非多孔二氧化硅微球的表面上的二氧化硅胶体多层包覆层制备的。描述了两层与三十层之间的胶体颗粒。这种排列是由表面相容性引起的,并且在某些情况下,必需进行二氧化硅颗粒的表面预处理或改性来引起相互作用。由于单独地制备实际的核以及壳颗粒,接着进行核包覆步骤,这种方法相当复杂。由于必须在分开的步骤中施加每一层,这种方法还是一个很长的过程,并且难以再现最终的表面多孔型颗粒尺寸以及尺寸分布。

[0006] 制备表面多孔型二氧化硅的另一种方法是在J.J.Kirkland,F.A.Truszkowski,以及C.H.Dilks Jr,G.S.Engel,色谱杂志A(Journal of Chromatography A),890(2000)3-13中描述的一种凝聚法,其中用一种聚合物和硅溶胶的凝聚层来包覆实心的(即非多孔的)二氧化硅微球,随后通过高温下加热来去除该聚合物。然而,这种多级工艺具有另外的缺点,这些缺点在于一些核颗粒可能没有被包覆而留下非多孔颗粒并且可能形成一些全多孔型颗粒。类似地,在本申请的优先权日之后公开的W02012/018598描述了由至少一种两步合成形成的表面多孔型颗粒,其中首先合成有种子的二氧化硅颗粒或其他颗粒,并且然后在其顶部生成多孔层。

[0007] 以上这些工艺采用在二氧化硅微颗粒表面上的多孔层作为表面多孔型颗粒的基底。US2010/0051877A中描述的另一种方法涉及二氧化硅微颗粒表面的假形貌(pseudomorphic)转换。在该过程期间,将核颗粒的外层溶解并且再沉淀以在表面上形成一个多孔层。然而,该工艺要求在第一反应中形成核颗粒并且然后将其回收以便在进一步的反应中对其进行处理来进行表面的假形貌转换从而形成表面多孔型颗粒。如此,该工艺就过长的制备时间以及再现性而言存在缺点。必须首先生长核,对其进行检验以便进行质量控制并且然后将其分级,这会花费几个星期。然后必须使壳逐渐形成在核上并且生长至给定厚度。这样做时,颗粒尺寸改变并且颗粒尺寸分布变宽,可能需要进一步分级,这又可能花费几个星期。

[0008] 常规地,二氧化硅微颗粒本身是用Stöber法(W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, 胶体与界面科学杂志(Journal of Colloid and Interface Science), 第26卷, 第1期, 1968, 第62-69页)的多种变体来制备的,其中向含有一种醇(诸如乙醇)以及氨的过量的水中加入原硅酸四乙基酯(TEOS)。TEOS的水解以及缩合产生二氧化硅颗粒。

[0009] 在Lee等人,朗缪尔(Langmuir), 2007, 23(22), 第10875-10878页; Lee等人,微孔与介孔材料(Microporous and Mesoporous Materials), 2001, 50, 第77-90页以及Lee等人,朗缪尔, 2011, 27(7), 第3372-3380页中早已描述了使用巯基硅烷类代替TEOS作为前体二氧化硅源来产生多孔、单分散的二氧化硅微颗粒。一般来说,发现增大巯基硅烷的浓度使颗粒尺寸增大。另一方面,增大碱浓度使颗粒尺寸减小。那些研究中报道的二氧化硅微颗粒是多孔的并且大多是光滑的,即没有报道任何表面多孔性。

[0010] 针对此背景作出本发明。

[0011] 发明概述

[0012] 根据本发明的一个方面,提供一种用于制备表面多孔型二氧化硅颗粒的一锅法,该方法包括使一种包含官能团的二氧化硅前体水解并且缩合以形成表面多孔型二氧化硅颗粒,这些表面多孔型二氧化硅颗粒包括实质上非多孔的二氧化硅微颗粒,这些二氧化硅微颗粒具有结合到这些微颗粒表面上的更小的二氧化硅纳米颗粒。

[0013] 根据本发明的另一个方面,提供由本发明的方法可得到的表面多孔型二氧化硅。

[0014] 根据本发明的再另一个方面,提供表面多孔型二氧化硅,该表面多孔型二氧化硅包括其上具有更小的二氧化硅纳米颗粒的二氧化硅微颗粒。在下文中描述该表面多孔型二氧化硅的进一步的特征。

[0015] 第一制备步骤后的微颗粒和纳米颗粒包含一个官能团,该官能团优选地选自巯基(SH)、氨基(NH₂)、羟基(OH)或环氧基,最优选巯基。然而,在600℃至1250℃下进行烧结之后,此官能团将与其他有机官能度一起实质性地被烧掉。

[0016] 根据本发明的又另一个方面,提供本发明的表面多孔型二氧化硅作为液相色谱中的固定相的用途。

[0017] 根据本发明的一个进一步的方面,提供一种由表面多孔型球上球(spheres-on-sphere)颗粒制成或包括这些表面多孔型球上球颗粒的固定相。有利的是,这些颗粒呈现在分离化学(诸如液体色谱,尤其是HPLC)中的改善的性能。该固定相适合于大型生物分子的分离。

[0018] 在权利要求书中详述了本发明的进一步的优选特征。

[0019] 所形成的颗粒是表面多孔型的,具有一个多孔壳。本发明所提供的每个表面多孔型颗粒均具有一个核球(即微颗粒)以及一个在该核球的表面上的更小球(即纳米颗粒)的包覆层的形式。因此这些表面多孔型颗粒具有一种球上球形貌。因此该表面多孔型颗粒在此多数被称为球上球颗粒,例如球上球二氧化硅。典型地,纳米颗粒是在微颗粒上实质性一层厚的,虽然在本发明的某些实施例中可能形成多层。如以下更详细地说明的,在本发明的方法中,典型地在一种一锅反应合成法中,已经发现首先形成微颗粒,接着是纳米颗粒在这些微颗粒的表面上的受控生长。微颗粒和纳米颗粒可以方便地由同一种前体形成。这样,相比现有技术的方法,本发明的方法快速并且过程简单。

[0020] 二氧化硅前体的水解和缩合形成了微颗粒以及在这些微颗粒表面上的纳米颗粒。已发现的是,使该前体水解并且缩合的方法可以方便地以一锅合成法来进行,以形成由表面结合的更小的纳米颗粒包围的微颗粒。能够在单个锅中进行该方法显然是有利的,因此优选该前体水解并且缩合的步骤是一种一锅合成法。因此,以此方式,通过将用于制备多孔壳颗粒的方法精简到单个步骤中,本发明减少了现有技术方法需要几个高劳动强度步骤的至少部分问题。本发明的方法不同于已报道的方法,因为它涉及简单的反应混合物以便获得所希望的球上球结构以及对表面孔隙率的控制。

[0021] 虽然本发明提供了如在此所描述的一种表面多孔型二氧化硅及其用途,以及用于制备该二氧化硅的方法,本发明还可适用于除二氧化硅外的其他半金属或金属氧化物。该金属氧化物可以是已知能够通过一种适当的前体的水解和缩合形成成为微颗粒的任何金属氧化物。实例包括而不限于,氧化锌(Zn)、氧化铜(Cu)、氧化铝(Al)、氧化钛(Ti)、氧化锆(Zr)、氧化镍(Ni)以及氧化铁(Fe)。在某些实施例中有可能使用二氧化硅颗粒作为模板来制备球上球型二氧化硅上金属氧化物(metal oxides-on-silica)颗粒(即,不是纯金属氧化物,其中该金属氧化物不同于二氧化硅)。

[0022] 表面多孔型颗粒的核处的微颗粒通常具有比其表面的纳米颗粒包覆层更小的孔隙率。微颗粒核是实质上非多孔的(即实质上实心的),即,具有很小的或没有孔隙率。

[0023] 核微颗粒优选具有在 $1\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 范围内的颗粒尺寸,进一步优选 $1\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$,更优选 $1\mu\text{m}$ 至 $20\mu\text{m}$,再更优选 $1\mu\text{m}$ 至 $15\mu\text{m}$ 并且最优选 $1\mu\text{m}$ 至 $10\mu\text{m}$,尤其是 $2\mu\text{m}$ 至 $5\mu\text{m}$ 。令人希望地,这些微颗粒的尺寸为至少 $1\mu\text{m}$ 。还令人希望地,这些微颗粒的尺寸小于 $10\mu\text{m}$ 。此微颗粒尺寸是由激光衍射技术测量的。在此处的实例中,使用马尔文(Malvern)Mastersizer 2000分析仪通过激光衍射技术测量微颗粒尺寸。产生了颗粒尺寸体积分布,其典型地是一条实质上钟形的曲线,其中在此所提到的平均尺寸是该分布中的峰值尺寸,即该曲线的最高点处的尺寸。

[0024] 纳米颗粒优选具有在 1nm 至 1000nm 范围内的颗粒尺寸。更优选地,纳米颗粒具有至少 10nm 的颗粒尺寸,再更优选至少 20nm ,甚至更优选 50nm ,又甚至更优选 100nm 并且最优选至少 200nm 。更优选地,纳米颗粒具有小于 1000nm 的颗粒尺寸,再更优选不大于 800nm ,甚至更优选不大于 500nm 并且最优选不大于 400nm 。令人希望地,纳米颗粒具有在 10nm 至 800nm 范围内的颗粒尺寸,更令人希望地在 50nm 至 500nm ,更令人希望地在 100nm 至 500nm ,并且最令人希望地在 150nm 至 400nm 以及 200nm 至 400nm ,例如约 200nm 。此纳米颗粒尺寸是由动态激光散射(DLS)技术测量的。在此处的实例中,纳米颗粒尺寸是用Viscotek 802 DLS分析仪测量的。在此所用的来自DLS的初步结果是来自强度分布的平均值(称为Z平均),并且可以用多

分散性指数(PDI)来描述分布宽度。在目前情况下,所产生的颗粒尺寸分布典型地是一条实质上钟形的曲线,并且平均尺寸是该分布中的峰值尺寸,即该曲线的最高点。

[0025] 表面多孔型(即球上球)颗粒优选具有在 $1\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 范围内的由激光衍射法测得的颗粒尺寸,进一步优选 $1\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$,更优选 $1\mu\text{m}$ 至 $20\mu\text{m}$,再更优选 $1\mu\text{m}$ 至 $15\mu\text{m}$ 并且最优选 $1\mu\text{m}$ 至 $10\mu\text{m}$,尤其是 $2\mu\text{m}$ 至 $5\mu\text{m}$ 。颗粒尺寸的范围也是相关的。优选地,表面多孔型颗粒具有的 D_{90}/D_{10} 不大于3.5,更优选不大于3.0,甚至更优选不大于2.0,再更优选不大于1.6并且最优选不大于1.4,其中 D_{90} 是在由激光衍射技术测得的体积分布中第90百分点的直径,并且 D_{10} 是在该体积分布中第10百分点的直径。此颗粒尺寸是由如上述的激光衍射技术测量的。在此处的实例中,表面多孔型颗粒的尺寸是用马尔文Mastersizer2000分析仪测量的。如下面更详细地描述的,通过改变方法条件,颗粒尺寸可以是可控的。

[0026] 更小的纳米颗粒被结合到微颗粒的表面上。由于纳米颗粒之间的间距或间隙提供了孔隙,这些纳米颗粒在微颗粒的表面上形成一个多孔层。也就是说,通过纳米颗粒堆积在表面上产生了表面孔隙。这些孔隙典型地小于5nm孔径,并且尤其为微孔,即小于2nm孔径。这些更小的纳米颗粒优选形成一个包围微颗粒的多孔壳。纳米颗粒优选完全覆盖微颗粒。纳米颗粒壳是小厚度的。该壳优选是实质上只有一层纳米颗粒厚的。可以进行制备这些颗粒的方法从而在微颗粒上提供纳米颗粒的一个单层(单层),并且该方法倾向于基于前体的首次加料来进行。有可能在一锅合成法中形成一个纳米颗粒壳,该纳米颗粒壳包括两个层,并且如果需要的话,或许包括甚至三个或更多个层。已经发现,如下面所说明的,在微颗粒生长阶段之后,即在纳米颗粒生长阶段期间,加入另外量的前体可以提供两个或更多个纳米颗粒层。通过对颗粒进行煅烧可以改善多孔纳米颗粒表面层的稳定性。然而,已经发现具有纳米颗粒单层的颗粒是最稳定的。已经发现甚至为单层的多孔层的小厚度对有效的色谱分离来说是足够合适的。多孔层的小厚度意味着短的质量传递距离,并且因此可能发生快速的质量传递以及快速的样品分离。

[0027] 由于小纳米颗粒堆积在表面上,表面多孔型颗粒典型地具有小的孔径。由非局部密度泛函理论(DFT)计算的表面多孔型颗粒的孔径优选小于5nm,更优选小于3nm并且再更优选小于2nm。

[0028] 表面多孔型颗粒的孔隙率优选在30%至70%的范围内。

[0029] 煅烧(即至少 550°C)后表面多孔型颗粒的表面积优选为,按优先递增的顺序,至少 $10\text{m}^2/\text{g}$ 、至少 $25\text{m}^2/\text{g}$ 、至少 $50\text{m}^2/\text{g}$ 、至少 $75\text{m}^2/\text{g}$ 、至少 $100\text{m}^2/\text{g}$ 、至少 $150\text{m}^2/\text{g}$ 、或至少 $175\text{m}^2/\text{g}$ 。最优选地,表面多孔型颗粒的表面积为至少 $200\text{m}^2/\text{g}$ 。已发现,实例典型地具有在10至 $250\text{m}^2/\text{g}$ 范围内的表面积。

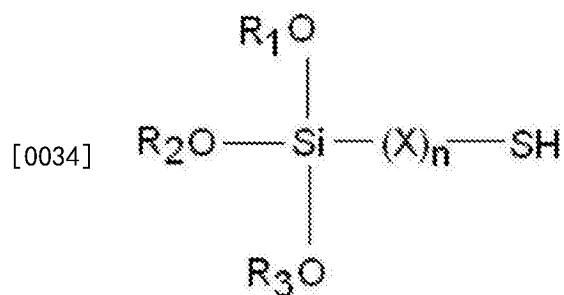
[0030] 可以对表面多孔型颗粒进行热处理(即煅烧)以给予改善的机械稳定性。本发明的另一个优点在于,球上球颗粒对于高温(例如,高达 1250°C)是稳健的,而没有对球上球形貌的任何显著变形。因此可以在没有对球上球形貌的显著损伤的情况下对这些颗粒进行煅烧。优选地,在用作色谱的固定相之前对表面多孔型颗粒进行煅烧。

[0031] 本发明提供了适合于用作液相色谱(LC)中的固定相床的表面多孔型颗粒。这些颗粒可以容易地被填充入LC柱中。该LC可以是正相(NP)或反相(RP)LC。在用作RP固定相之前,优选将表面多孔型颗粒功能化。该LC可以是在等度或梯度洗脱条件下。对于反相LC,优选使用梯度洗脱条件。该LC可以是高效液相色谱(HPLC)、超高效液相色谱(UHPLC)、快速蛋白质

液相色谱(FPLC)或另一种LC技术。该LC可以有用地为大型生物分子(例如像蛋白质类)的LC。多孔壳和非多孔核的存在可以提供优异的质量传递性质,导致快速的质量传递并且因此导致大型生物分子(诸如蛋白质类)的快速分离。因此,本发明减少了现有技术中对于诸如蛋白质类的大型生物分子的分离缓慢的问题。这些表面多孔型颗粒还可以减少与HPLC中高背压有关的问题。

[0032] 该方法优选使用一种含有巯基基团的二氧化硅前体(其中在此提及前体还包括使用前体混合物的情况)(在此称为巯基-二氧化硅前体)。然而,该方法可以使用一种含氨基基团的前体(在此称为例如氨基-二氧化硅前体)、和/或一种含羟基基团的前体(在此称为例如羟基-二氧化硅前体)、和/或一种含环氧基团的前体(在此称为例如环氧基-二氧化硅前体)。因此,前体的官能团优选选自巯基、氨基、羟基以及烷氧基,最优选巯基。为了方便起见,本说明书此后将主要指的是含有巯基基团的最优选前体的情况,并且更具体地一种巯基-二氧化硅前体的情况,但应理解的是,除非上下文另外要求,对巯基-二氧化硅前体的引用可以由相应的氨基-二氧化硅前体、羟基-二氧化硅前体、或环氧基-二氧化硅前体的引用所替代。在形成除二氧化硅以外的表面多孔型颗粒、例如另一种金属氧化物的情况下,此处巯基-二氧化硅前体等可以是一种含有这些官能团之一的金属氧化物前体。

[0033] 巯基-二氧化硅前体优选是一种巯基硅烷。更优选地,巯基-二氧化硅前体含有一个烷基-巯基基团,优选一个(C₁-C₄烷基)-巯基,例如3-巯基-丙基。该巯基硅烷优选具有以下通式:



[0035] 其中R₁、R₂、R₃独立地是H、未取代的或取代的烷基(优选甲基或乙基);X是未取代的或取代的烷基(优选C₁-C₄烷基,特别是丙基)。作为二氧化硅源的尤其优选的巯基-二氧化硅前体是3-巯基丙基三甲氧基硅烷(MPTMS)。其他适合的前体可以包括3-巯基丙基三乙氧基硅烷(MPTES)。如以上所描述的,二氧化硅前体可以是一种氨基-二氧化硅前体、羟基-二氧化硅前体、或一种环氧基-二氧化硅前体,其中在以上化学式中,-SH基团被一个-NH₂(氨基)基团、或-OH基团、或一个环氧基团所替代。此外,Si可以被M所替代,其中M是一种例如选自下组的金属,该组由Zn、Cu、Al、Ti、Zr、Ni以及Fe组成。

[0036] 巯基-二氧化硅前体的量可能影响最终表面多孔型颗粒的尺寸。表面多孔型颗粒典型地随着最初的、微颗粒生长阶段中的巯基-二氧化硅前体的量的增加而增大。已经发现,如下面所说明的,在微颗粒生长阶段之后,即在纳米颗粒生长阶段期间,加入另外量的巯基-二氧化硅前体可以增加纳米颗粒的形成,例如形成两个或更多个纳米颗粒层。

[0037] 巯基-二氧化硅前体的量(在使用多于一种巯基-二氧化硅前体时意指巯基-二氧化硅前体的总量)优选在0.05至3重量份(wt份)的范围内。起始混合物中巯基-二氧化硅前体的量优选为至少0.05重量份,更优选至少0.1重量份,再更优选至少0.3重量份,并且最优选至少0.5重量份。起始混合物中巯基-二氧化硅前体的量优选不大于3重量份。

[0038] 优选使用巯基-二氧化硅前体作为唯一的二氧化硅源。由于反应混合物的简单性并且因为已经发现具有巯基基团的二氧化硅前体提供了有效的球上球形貌,这是有利的。然而,例如为了产生二氧化硅颗粒形貌的变化,巯基-二氧化硅前体可以与定量的一种或多种其他二氧化硅源(即,不具有巯基基团或如在此指明的其他官能团)一起使用,尽管已经发现这典型地减低了球上球颗粒的形成效率。适合的额外的二氧化硅源的实例包括原硅酸四乙基酯(TEOS)和原硅酸四甲基酯(TMOS)以及已知通过水解和缩合形成二氧化硅的其他二氧化硅源。优选地,巯基-二氧化硅前体(也包括巯基-二氧化硅前体的混合物的情况)优选用作唯一的二氧化硅源,或者当存在时,任何其他二氧化硅前体以基于二氧化硅前体的总量的按重量计少于10%并且更优选少于5%的量存在。

[0039] 水解优选是碱催化的。因此,该方法优选包括:在反应介质或混合物中包含一定量的碱以提供碱性pH。初始为碱性的反应介质的pH随着反应进行逐渐增大,但起始pH可以由所存在的碱的量来控制。反应介质的起始pH(即,在水解和缩合反应开始时)优选为9或更高,并且更优选为9.5或更高。起始pH优选为11或更低,并且更优选为10.5或更低。优选的起始pH在从9.0至11.0的范围内,并且最优选的起始pH在从9.5至10.5的范围内,例如9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、或10.4。

[0040] 优选的碱是氢氧化铵,尽管可以使用其他碱,例如氢氧化钠。氢氧化铵的量优选相当于至少0.1重量份、更优选至少0.2重量份、再更优选至少0.3重量份、并且最优选至少0.4重量份的30%的 NH_3 标准级溶液。氢氧化铵的量优选相当于1重量份或更少的30%的 NH_3 标准级溶液。

[0041] 用于水解和缩合反应的介质包括水。水优选以至少3重量份、更优选至少5重量份、并且再更优选至少7重量份的量存在。优选使用不大于15重量份并且更优选不大于10重量份的水。因此,优选的范围包括3至15重量份以及5至10重量份的水。

[0042] 除了水之外,该方法优选在存在一种有机溶剂(在此也包括使用有机溶剂的混合物的情况)、优选一种醇(在此也包括醇类的混合物)、尤其包括一种小分子醇的情况下进行,最优选的醇为甲醇。已发现,醇的存在在表面多孔型最终颗粒中的表面结合的纳米颗粒的形成中是重要的。这与上述的用巯基硅烷形成二氧化硅的现有技术研究相反,这些研究在纯水性条件下水解该巯基硅烷(Lu等人,朗缪尔,2011,27(7),第3372-3380页)。在那种情况下,只观测到所形成的大的二氧化硅颗粒而没有任何二氧化硅纳米颗粒形成在其表面上(即,只形成了光滑的二氧化硅微颗粒)。

[0043] 醇(当使用多于一种醇时意指醇的总量)优选以至少3重量份、更优选至少5重量份、并且再更优选至少8重量份的量存在。优选使用不大于15重量份并且更优选不大于12重量份的醇。因此,优选的范围包括3至15重量份以及5至12重量份的醇。

[0044] 因此,用于巯基-二氧化硅前体的水解的介质优选是至少一种有机溶剂(优选甲醇)与水的混合物。反应中该溶剂与水的总重量份优选为至少6重量份,更优选至少8重量份,再更优选至少10重量份并且最优选至少12重量份。优选地,反应中该溶剂的总重量份不大于30重量份,更优选不大于25重量份并且再更优选不大于20重量份。溶剂混合物中有机溶剂(优选甲醇):水的比(按体积计)优选在3:1至1:3、更优选2:1至1:2的范围内。该混合物中有机溶剂(优选甲醇):水的比(按体积计)特别地是至少1:1,即,有机溶剂的量优选等于或大于水的量,其中甚至更优选的比为在3:1至1:1以及2:1至1:1的范围内。

[0045] 水解和缩合反应优选在一种表面活性剂(在此也包括表面活性剂混合物的情况)存在的情况下进行。该表面活性剂优选是水溶性的。该表面活性剂优选在该方法的水解和缩合条件下形成胶束。在本发明不受理论限制的情况下,该表面活性剂看来在微颗粒表面的纳米颗粒的形成中起稳定化的作用。该表面活性剂可以是离子型的(阳离子型的或阴离子型的或两性离子型的)或非离子型的,但优选是离子型的,并且更优选是阳离子型的。优选的表面活性剂是阳离子型的季铵表面活性剂,更优选带有溴或氯平衡离子,其中更优选的实例具有以下化学式: $(R_4)(R_5)(R_6)(R_7)(N)^+X^-$,其中 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 中的每一个独立地选自H、烷基、烯基、炔基、苄基以及芳基(特别是烷基),这些基中的每一个可以是未取代的或取代的(优选 R_4 、 R_5 、 R_6 各自独立地是一个烷基基团并且 R_7 是一个烷基或苄基基团(特别是一个烷基基团)),并且X是Br或Cl。特别地, R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 中的至少一者是一个 C_{8-20} 烷基基团(未取代的或取代的)。更特别地, R_4 、 R_5 、 R_6 各自独立地是一个 C_{1-2} 烷基基团(特别是甲基)并且 R_7 是一个 C_{8-20} 烷基基团。特别优选的实例是溴化或氯化烷基三甲基铵,更特别地是溴化或氯化(C_{8-20} 烷基)三甲基铵,其中最优选月桂基(C_{12})、肉豆蔻基(C_{14})、以及十六烷基(C_{16})和硬脂基(C_{18})和二癸基(C_{20})类似物,特别好的实例是溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)和/或氯化十六烷基三甲基铵(CTAC)。其他实例可以包括,例如,具有偶数烷基链长度(例如 C_8 至 C_{18})的氯化或溴化苄铵,也称为氯化或溴化烷基二甲基苄基铵的混合物。

[0046] 所存在的表面活性剂的量(当使用多于一种表面活性剂时意指表面活性剂的总量)优选在从0.01重量份至1重量份的范围内。表面活性剂的量优选为至少0.02重量份,更优选至少0.05重量份并且最优选至少0.1重量份。表面活性剂的量优选不大于3重量份,或更优选不大于2重量份。

[0047] 反应优选在一种胶体稳定剂(在此也包括胶体稳定剂的混合物的情况)、更优选一种聚合物型的胶体稳定剂、特别是一种亲水性聚合物存在的情况下进行,已经发现这有助于在二氧化硅颗粒的合成过程中使胶体稳定并且提供对颗粒尺寸和尺寸分布的一定程度的控制。亲水性聚合物的优选实例包括聚(乙烯醇)(PVA)和聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)、聚(乙二醇)(PEG)、以及羟丙基甲基纤维素(HPMC),其中更优选PVA和PVP。优选地,该聚合物的(重量平均)分子量 M_w 为约5000至15000,更优选为约8000至10000。

[0048] 诸如亲水性聚合物的胶体稳定剂的量(当使用多于一种时意指稳定剂的总量)优选在从0.05重量份至3重量份的范围内。诸如亲水性聚合物的稳定剂的量优选为至少0.1重量份,并且更优选为至少0.2重量份。稳定剂的量优选不大于3重量份,更优选不大于2重量份并且最优选不大于1重量份。

[0049] 鉴于以上情况,用于制备球上颗粒的优选体系或方案包括按所描述的方式使用以下组分:碱性条件、一种包括甲醇和水的溶剂、一种巯基二氧化硅前体(特别是MPTMS)、一种表面活性剂(特别是CTAB或CTAC)、以及一种亲水性聚合物(特别是PVA)。

[0050] 优选制备碱性pH介质,并且然后优选向该含有碱的介质中加入该前体。优选在加入该前体之前,将其他优选试剂,诸如该胶体稳定剂(例如亲水性聚合物)以及表面活性剂,包括在该碱性介质中并且与其混合。

[0051] 优选向其他成分中递增地加入该前体,即在一段时间内,例如从1秒至100秒范围内的一段时间。典型地可采用约30秒的时间。

[0052] 优选将反应成分一起搅拌以保证球上颗粒的有效形成。例如可以在约室温下方

便地进行水解和缩合。

[0053] 优选在第一次加入前体后使反应进行至少30分钟、更优选至少45分钟并且最优选至少60分钟的一段时间。已经发现,至少在某些实施例中,该方法按两个阶段进行。在第一阶段(在此称为微颗粒生长阶段)中,颗粒生长主要是微颗粒的生长。在该第一阶段之后的第二阶段(在此称为纳米颗粒生长阶段)中,颗粒生长主要是纳米颗粒的生长。典型地,该纳米颗粒生长阶段的持续时间比该微颗粒生长阶段更长。已经发现,该微颗粒生长阶段需要约20分钟的一段时间以形成核微颗粒,接着该纳米颗粒生长阶段需要一段更长的时间用于在这些微颗粒的表面上有效地形成纳米颗粒。

[0054] 优选从溶液中回收表面多孔型颗粒并且在例如用作色谱的固定相之前对其进行煅烧。优选的煅烧条件包括,优选在空气中加热到550℃至1250℃范围内的温度。一种实例条件为:例如在空气中加热到550℃至1250℃(例如在1℃/min下),在550℃至1250℃的温度范围内保持例如300min的一段时间,并且然后例如在5℃/min下冷却到室温。更优选地,通过在不超过约1000℃的温度下,例如在550℃至1000℃范围内的温度下进行加热来对表面多孔型颗粒进行煅烧。煅烧后的颗粒可以容易地被填充入LC柱中用作固定相。

附图说明

[0055] 图1A示出了根据本发明合成的球上球二氧化硅颗粒的SEM图像。

[0056] 图1B示出了图1A中显示的二氧化硅颗粒的N₂等温线。

[0057] 图1C示出了图1A中显示的二氧化硅颗粒的孔径分布。

[0058] 图2示出了球上球二氧化硅颗粒随时间(以分钟计)生长的SEM图像。

[0059] 图3示意地表示根据本发明的表观合成机理。

[0060] 图4示出了使用不同的NH₃浓度根据本发明合成的球上球二氧化硅颗粒的SEM图像。

[0061] 图5示出了根据本发明的球上球二氧化硅颗粒在超声处理后的SEM图像。

[0062] 图6示出了使用含有在庚烷:二氧六环(0.7%vv)中的1-100μg/ml的甲苯、邻硝基苯胺、对硝基苯胺以及间硝基苯胺的正相试验混合物在0.3mL/min的流速下由填充有根据本发明的球上球颗粒的柱得到的色谱图。

[0063] 图7示出了以与图6相似的方式但更高流速下得到的色谱图。

[0064] 图8示出了使用含有在水:乙腈(50%vv)中的1-100μg/ml的苯甲酰胺、苯乙酮、二苯甲酮以及联苯的反相试验混合物TM-2由填充有根据本发明的功能化的球上球颗粒的柱所得到的色谱图。

[0065] 图9示出了使用含有在0.1%vv的TFA-水中的2-10mg/ml的核糖核酸酶A、细胞色素C、溶菌酶、胰蛋白酶以及BSA的反相蛋白质混合物由填充有根据本发明的功能化的球上球颗粒的柱所得到的色谱图。

[0066] 图10A示出了一个额外的流动相梯度曲线(梯度法1)并且图10B示出了另一个额外的流动相梯度曲线(梯度法2),各自用于以该反相蛋白质混合物所得到的色谱图。

[0067] 图11示出了用梯度法1所得到的该反相蛋白质混合物的色谱图。

[0068] 图12示出了用不同的流速并且使用梯度法1所得到的该反相蛋白质混合物的色谱图。

[0069] 图13示出了用不同的流速并且使用梯度法2所得到的该反相蛋白质混合物的色谱图。

[0070] 图14示出了用于以该反相蛋白质混合物所得到的色谱图的进一步优化的梯度曲线(梯度法3)。

[0071] 图15示出了使用梯度法3所得到的色谱图(顶部迹线)与使用梯度法2所得到的色谱图(底部迹线)的比较。

[0072] 图16示出了在进行色谱分离之后卸下的根据本发明的球上球二氧化硅材料的SEM图像。

[0073] 发明详细说明

[0074] 为了进一步理解本发明,但不限制其范围,现在参照附图对各种实例进行说明。以下内容仅作为本发明的实例,然而,明显的是,从这些实例可以看出的许多特征是可以被一般化的,例如像试剂添加的优选顺序。

[0075] 材料表征

[0076] SEM

[0077] 二氧化硅微颗粒的形貌通过一个东芝(Hitachi)-S4800扫描电子显微镜(SEM)来观测。将一滴乙醇中的悬浮体沉积在一个SEM螺柱上并且使其干燥过夜。然后用一个溅射涂覆器(EMITECH K550X)在30mA下以金对这些样品进行涂覆3min以用于SEM成像。为了使用STEM检测器来观测这些颗粒,将一滴悬浮体沉积到TEM栅极上,并且然后在干燥过夜后直接进行观测。

[0078] 颗粒尺寸

[0079] 使用配备有分散单元的马尔文(马尔文,伍斯特郡,英国(Malvern, Worcestershire, UK))Mastersizer2000来测量二氧化硅微颗粒。使用He-Ne激光器结合蓝光源来进行分析以提供宽尺寸范围内的优异的灵敏度。通过用于增强尺寸确定性能的正向以及反向散射检测来检测散射光的角强度。由米氏(Mie)散射模型来准确预测颗粒的散射。测量六次以得到在2000rpm分散下的平均颗粒尺寸分布。通过动态激光散射(DLS)用Viscotek Model802DLS系统来表征作为水中悬浮体的二氧化硅纳米颗粒以得到水合的颗粒尺寸。室温下在石英池中进行这些测量并且在六次测量后得到平均颗粒尺寸分布。

[0080] pH

[0081] 在至少2小时的一段时间内以规则的间隔连续地测量该溶液混合物的pH。

[0082] 表面积和孔容积

[0083] 77K下N₂吸附的布鲁诺尔-埃米特-泰勒(Brunauer-Emmett-Teller(BET))表面积和孔容积是用麦克默瑞提克(Micromeritics)ASAP2020吸附分析仪来测量的。由巴雷特-乔伊纳-海蓝德(Barrett-Joyner-Halenda(BJH))脱附数据以及非局部密度泛函理论(DFT)数据计算孔径分布。分析前在120℃下对样品进行除气10h。

[0084] HPLC

[0085] 对于柱的HPLC表征,使用安捷伦1200系列高效液相色谱系统,该系统包括一个真空除气机、四元泵、ALS自动进样器、被加热的柱室以及紫外-可见光(UV-Vis)检测器。使用Agilent Chemstation软件,B.02.01版本(安捷伦科技,美国(Agilent Technologies, USA))来进行数据分析。

[0086] 实例1-球上球二氧化硅的制备

[0087] 使用以下的化学品和试剂:(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷(MPTMS)(95%),溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)($\geq 98\%$),氢氧化铵溶液(试剂级,28%-30% NH_3 基底),亲水性聚合物类:聚(乙烯醇)(PVA)($M_w 10K$)、聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)($M_w 8K$)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)($M_w 10K$)以及甲醇(分析级)。三氟乙酸(TFA)和二甲基辛基氯硅烷(C8)是从西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)购买的并且按来样使用。整个实验过程都使用蒸馏水。

[0088] 将亲水性聚合物(0.25g)和CTAB(0.1g)溶解于5g水中。在搅拌的同时向此溶液中加入8mL甲醇。通过与2mL水混合来稀释所购买的氢氧化铵溶液(0.5g),并且然后将2mL的稀释的氨溶液加入该反应混合物中。搅拌15min后,在30秒的一段时间内滴加0.5mL的MPTMS。这些实例中的聚合物和表面活性剂的浓度是参照水的体积。室温下搅拌反应24小时。通过对悬浮体进行离心来收集所产生的二氧化硅颗粒。在炉(卡博莱特(Carbolite),CWF1500)中对所收集的这些二氧化硅颗粒进行煅烧以去除该有机模板以及其他有机组分(诸如官能团)。煅烧条件:以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 在空气中加热至(550°C - 1250°C),保持300min,并且然后以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 冷却至室温。

[0089] 当加入MPTMS时,一锅合成法形成球上球颗粒。使用PVA作为亲水性聚合物时,球上球颗粒的颗粒尺寸分布在 $2.5\text{-}12.9\mu\text{m}$ 的范围内并且峰值在 $5.67\mu\text{m}$ 处。 $d_{0.1}$ 和 $d_{0.9}$ 的值分别为 $3.21\mu\text{m}$ 和 $9.89\mu\text{m}$ 。所得到的球上球颗粒的SEM图像显示于图1A中。看到大的二氧化硅微球包覆有尺寸在 $200\text{-}400\text{nm}$ 范围的二氧化硅纳米颗粒,这些二氧化硅纳米颗粒有序地排列在这些微球的表面上。煅烧后的BET表面积为 $204\text{m}^2/\text{g}$ 。 N_2 等温线展示出对于微孔二氧化硅正常得到的I型等温线(图1B中示出)。由于BJH模型的限制,不能计算小于 2nm 的孔隙。因此,对于微孔材料,应使用非局部密度泛函理论(DFT)方法。由DFT数据计算的孔径分布展示出 0.91nm 和 1.51nm 处的微孔峰(图1C)。

[0090] 实例2-生长研究

[0091] 进行时间研究以便观察在一锅合成法过程中球上球颗粒如何生长。这是通过以规则的时间间隔对样品进行检查来完成的。为了获得每个样品,在 13000rpm 下进行离心以保证从悬浮体中完全提取出二氧化硅颗粒,然后用水将这些二氧化硅颗粒充分洗涤以除去任何未反应的二氧化硅前体。由SEM对所得到的样品进行分析,并且图像在图2中示出(每个图像上的数字指示反应开始后到该样品被提取时的以分钟计的时间)。它表现出成核作用的发生存在两个阶段。第一阶段包括二氧化硅微颗粒的生长并且持续约20分钟的一段时间。然后,第二阶段的成核作用在所形成的微颗粒的表面上发生。在180分钟时,球上球颗粒表现为已经完全形成。对反应监测了24小时,但在此时间期间没有看到进一步显著的生长。在本发明的范围不受此理论的限制的情况下,图3中示出了表观合成的图示。

[0092] 实例3-pH研究

[0093] 该溶液的pH在水解开始前为约9.9,并且到方法完成的时候(150分钟)正好低于10.5。与常规方法中的TEOS相比,由于硅酸的形成本通常导致观测到pH降低,所呈现的随时间的pH图形相当不同。在不受任何理论限制的情况下,看来这种行为可能是由硫醇基引起的,因为该硫醇基在碱性条件下去质子化。

[0094] 上述的反应条件涉及在合成过程中使用2mL的按重量计25%的稀释的 NH_3 溶液,并且这导致在这些微颗粒的表面上形成 $200\text{-}400\text{nm}$ 尺寸的有序地密集地排列的纳米颗粒。使

用更加稀释的按重量计5%以及按重量计1%的 NH_3 溶液来进一步考察pH影响。在这些情况下,SEM图像(参见图4图像C和D)显示,随着 NH_3 浓度降低,纳米颗粒尺寸增大且堆积更密集。为了比较,将使用按重量计25%的 NH_3 溶液的上述实例的SEM示于图4的图像B中。这显示出,添加按重量计1%的 NH_3 时,二氧化硅纳米颗粒强烈融合或聚集在表面上。在更稀的情况下颗粒的沉淀进行得更慢,这导致形成更大的颗粒。这对颗粒尺寸分布产生影响并且形成更大的颗粒。煅烧后,使用更稀的 NH_3 溶液制备的样品同样具有更低的表面积($30\text{m}^2/\text{g}$ 和 $19\text{m}^2/\text{g}$)。使用未稀释(即,按重量计100%)的 NH_3 溶液产生降低的纳米颗粒覆盖率,如图4的图像A中所示。

[0095] 实例4-颗粒稳定性

[0096] 对球上球颗粒进行超声处理以观测在表面上的纳米颗粒的稳定性。在水中在140W下对颗粒进行超声处理8小时,并且观测到一些纳米颗粒已经从微球表面脱落,但并不是所有纳米颗粒,如由SEM所揭示的(参见图5)。由于即使在此类强烈的声处理后表面仍保持被相对密集地覆盖,这表明纳米颗粒稳固地附接到该表面上。

[0097] 实例5-双包覆层

[0098] 使用上述方法获得的颗粒在表面上产生纳米颗粒的单包覆层。然而,在不除去预形成的微球的情况下,通过在纳米颗粒生长阶段期间(即,20分钟之后)、在30分钟处加入另外的MPTMS,看到了更多的纳米颗粒生长在表面上。通过增加溶液中的MPTMS量,纳米颗粒之间的间距减小并且形成了密集得多的包覆层。这种方法使得当在30分钟处加入另外0.5ml的MPTMS时能够形成双包覆层,虽然观测到该双包覆层随洗涤脱落,因此显然不像单层一样稳定,但可以通过煅烧来改善稳定性。

[0099] 实例6-控制颗粒形成

[0100] 表面活性剂对于球上球形貌的影响是显著的。通过改变表面活性剂浓度,表面上的纳米颗粒的尺寸减小。与以上实例1中的CTAB量(基于5mL所加入的水体积的2%wv)相比,更高浓度的CTAB(10%wv)有助于在表面上形成约128nm的更小的纳米颗粒并且微球尺寸保持不变。通过用相同的表面活性剂阳离子但带有氯平衡离子(CTAC)替换该CTAB表面活性剂来考察表面活性剂平衡离子的性质。在反应过程中使用不同的表面活性剂平衡离子产生了相同的球上球结构。

[0101] 对于色谱应用来说,控制固定相颗粒的均匀性是非常重要的。以2倍增大PVA浓度使球上球颗粒的尺寸分布改善至 $d_{0.1}-d_{0.9}=2.68-6.81\mu\text{m}$ 。另一种亲水性聚合物、聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)(Mw8K)被引入反应中代替PVA,并且这也产生了球上球结构,另一种亲水性聚合物、羟丙基甲基纤维素(HPMC)(Mw10K)同样如此。对于用其他聚合物制备的样品保持相同的5%wv(基于5mL所加入的水)的聚合物浓度。使用PVP的颗粒尺寸分布好于用PVA聚合物的。使用PVP时,获得大约 $2.73\mu\text{m}$ 的更小并且更窄的颗粒尺寸分布,其中 $d_{0.1}-d_{0.9}=1.54-4.76\mu\text{m}$ (相比以上PVA(5%wv)时 $d_{0.1}-d_{0.9}=3.21-9.89\mu\text{m}$,PVA(10%wv)时 $d_{0.1}-d_{0.9}=2.68-6.81\mu\text{m}$ 的情况)。使用PVP时,表面纳米颗粒同样更小,为75nm。

[0102] HPLC

[0103] 实例7-柱填充以及表征

[0104] 使用同步柱填充法将煅烧的球上球颗粒填充入 $2.1\times 50\text{mm}$ 的不锈钢柱中。用0.3g的二氧化硅颗粒在15ml甲醇中制备成浆料。将该浆料倒入15ml容器中并且在60K巴下进行

填充。

[0105] 如上制备的柱用于正相(NP)试验条件。新制成的柱用异丙醇(1小时),然后用庚烷(1小时)进行洗涤。NP试验混合物含有在庚烷:二氧六环(0.7%vv)中的1-100 μ g/ml的甲苯、邻硝基苯胺、对硝基苯胺以及间硝基苯胺。

[0106] 对于反相(RP)色谱,通过用甲苯中的二甲基辛基氯硅烷进行冲洗来对柱进行功能化。100 $^{\circ}$ C下对柱进行加热24小时。重复两次精确的过程以保证良好的覆盖率。最后,用甲苯(1小时)、乙腈(1小时)以及乙腈:水(1小时)洗涤该柱。RP试验混合物TM-2含有在水:乙腈(50%vv)中的1-100 μ g/ml的苯甲酰胺、苯乙酮、二苯甲酮以及联苯。RP蛋白质混合物含有在0.1%vv的TFA-水中的2-10mg/ml的核糖核酸酶A、细胞色素C、溶菌酶、胰蛋白酶以及BSA。

[0107] 实例8-正相(NP)HPLC

[0108] 对如上所述的使用5%NH₃溶液制备的球上球颗粒在600 $^{\circ}$ C下进行煅烧,并且通过实例7的方法将煅烧后的颗粒填充入柱中,而除了用异丙醇(1小时)然后用庚烷(1小时)进行洗涤外,不进行进一步处理。

[0109] 使用在0.3mL流速下的该NP试验混合物以及254nm下的UV检测对该柱进行试验。图6示出了所得到的色谱图。该材料展现出对小分子良好的分离效率,在基于最优流速下的间硝基苯胺峰计板塔数在15000-21000块塔板/m(p/m)范围内。如果对颗粒进行分级以产生紧密得多的颗粒尺寸分布,则可能进一步增强该效率。球上球颗粒对于在具备良好的分离特性的情况下这些分析物的迅速扩散是有利的。如图7中所示,该固定相即使在更高的0.6和1.0mL/min的流速下也产生了良好地分辨的峰。分析物在少于两分钟内被分离,但存在效率的轻微下降,并且在1mL/min下基于间硝基苯胺峰存在约9000p/m的塔板数。

[0110] 实例9-反相(RP)HPLC

[0111] 由于优异的质量传递特性,球上球颗粒对于生物大分子的反相分离是合乎需要的。如上所述的用二甲基辛基氯硅烷对含有600 $^{\circ}$ C煅烧后材料的柱进行功能化并且在反相条件下进行试验。

[0112] 梯度洗脱

[0113] 在RP色谱分离过程中随着时间增大水:乙腈流动相强度以实现比在等度条件下更快的分离。使用乙腈在5%-70%vv范围内增大的线性溶剂梯度,在1mL/min以及254nm的UV检测下进行TM-2混合物的分析。5分钟后溶剂梯度回复到初始条件。如图8中所示,这些峰被良好地分辨,并且总分析时间为4分钟。可进一步完善该梯度法以便取得快得多的分离时间。

[0114] 蛋白质分离

[0115] 球上球颗粒形貌适合于生物大分子的分离。堆积在表面上的纳米颗粒提供颗粒间孔隙,这些孔隙允许大分子以更快的扩散距离进入孔结构。在25 $^{\circ}$ C、220nm的UV检测下,用核糖核酸酶A、细胞色素C、溶菌酶、胰蛋白酶以及BSA蛋白质的蛋白质混合物进行梯度洗脱研究。所用的流动相包括0.1%vv的TFA-水以及0.1%vv的TFA-乙腈。由于乙腈在220nm下吸收,可见到基线漂移。对多种梯度法进行试验以便取得这些蛋白质的最佳分离。首先将一种简单线性梯度法设定为:使用5%-70%vv的乙腈和0.1%vv的TFA流动相,在1mL/min下,以139巴的背压以及1 μ l的注入量。每次运行之间的再平衡时间对于保证可重复分离是重要的,因此在每次运行之前使柱平衡10分钟。使用此简单线性梯度的蛋白质分离在图9中用图

说明。作为大型的大分子的这些蛋白质在少于4分钟内被良好地分离,且具有优异的峰形和分辨率。这归功于球上球颗粒的优异的动力学性质。然而,在这些简单线性梯度条件下不能分辨溶菌酶和胰蛋白酶。因此,开发了另外的梯度法来改善所有五种蛋白质的分离。图10A和10B分别示出了在相同溶剂体系情况下所用的另外的梯度曲线(梯度法1和梯度法2)。

[0116] 这些梯度曲线(梯度法1和梯度法2)在1ml/min下展示出对该蛋白质混合物的良好分离(梯度法1参见图11)。所有五种蛋白质在4分钟(梯度法1)和3分钟(梯度法2)内被完全分辨。对于每个峰均维持了分辨率,且具有优异的峰形。然而,在梯度法2下存在由这些蛋白质的更快洗脱造成的溶菌酶与胰蛋白酶之间分辨率的某些损失。还在这些梯度条件下对更高流速进行了试验。由于球上球颗粒的优异的动力学性质,在更高的流动相速度(例如,诸如1.5和1.75ml/min的流速)下,此类化合物的甚至更快的分离是有可能的。在不同流速下的分离结果对于梯度法1显示在图12中,并且对于梯度法2显示在图13中。如图12和13所示,在1.75ml/min下的蛋白质的分离分别在约3.5分钟(梯度法1)和2.5分钟(梯度法2)内完成。再次,在良好峰形的情况下维持了分辨率。柱的背压在1.5ml/min下增大至189巴并且在1.75ml/min下增大至241巴,完全在该HPLC系统的工作范围内。

[0117] 图14示出了所用的一种进一步优化的梯度曲线(梯度法3)。由使用此流动相梯度的色谱图中,如图15(顶部迹线)中所示的,与梯度法2(底部迹线)相比,BSA峰尖锐得多并且轻微移位。梯度法3有效改善了溶菌酶与胰蛋白酶峰的分离。因此,取决于在分离过程中所应用的梯度,可以容易地使这些峰加速通过柱或者滞留在柱中。在任何情况下,球上球颗粒展现了快速分离诸如蛋白质类的更高分子质量的化合物的能力。

[0118] 在完成色谱试验之后,柱床并未发生变化并且在将柱拆卸之后没有观测到空隙,并且通过SEM来观测形貌。图16中的SEM图像显示,卸下的球上球二氧化硅-C8材料保留了球上球形貌。这暗示着纳米颗粒稳固地附接到微颗粒的表面上。

[0119] 如在此所用的,包括在权利要求书中,除非在上下文另外指明,此处术语的单数形式将被解释为包括复数形式,反之亦然。例如,除非在上下文另外指明,单数涵义,如“一个/一种(a)”或“一个/一种(an)”,意味着“一个或多个”。

[0120] 在本说明书的整个描述和权利要求书中,词语“包括(comprise)”、“包含(including)”、“具有(having)”和“含有(contain)”以及这些词语的多种变体(例如“包括(comprising)”和“包括(comprises)”等)意味着“包含但不限于”,并且并非旨在(并且并不)排除其他组分。

[0121] 将意识到的是,可以作出本发明的上述实施例的多种变体,而仍然落入本发明的范围内。除非另行说明,本说明书中所披露的任何特征都可能被服务于相同、等效或类似目的的替代性特征所代替。因此,除非另行说明,所披露的每一个特征只是等效或相似特征的属类系列中的一个实例。

[0122] 除非另外声明,任何以及所有实例的使用、或在此所提供的示例性语言(“例如(for instance)”、“诸如(such as)”、“例如(for example)”、“例如(e.g.)”以及类似语言),仅仅旨在更好地说明本发明而并非指示对本发明的范围的限制。本说明书中的语言不应被解释为指示对本发明的实践必需的任何未提出权利要求的要素。

[0123] 除非另行说明或上下文另外要求,本说明书中描述的任何步骤可以按任何顺序或同时进行。

[0124] 本说明书中披露的所有特征可以按任意组合进行组合,除了其中此类特征和/或步骤中的至少一些是互不相容的组合外。特别地,本发明的优选特征可适用于本发明的所有方面并且可以按任何组合来使用。同样,以非必需组合描述的特征可以单独地(不组合地)使用。

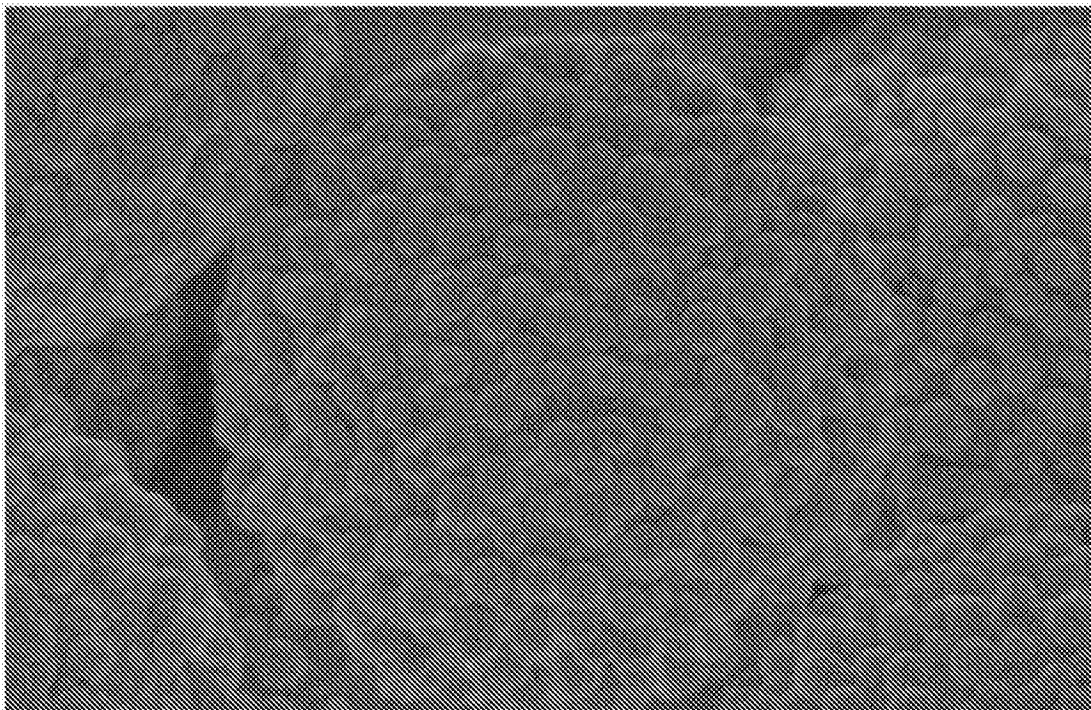


图1A

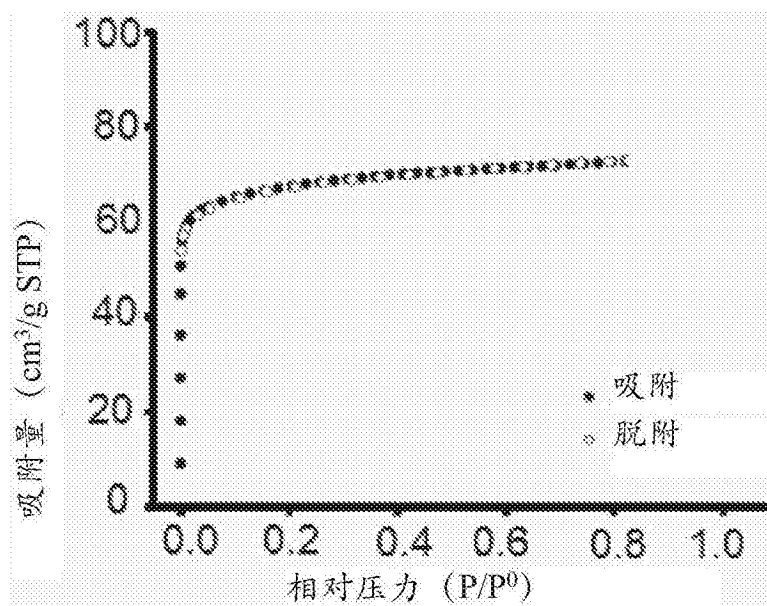


图1B

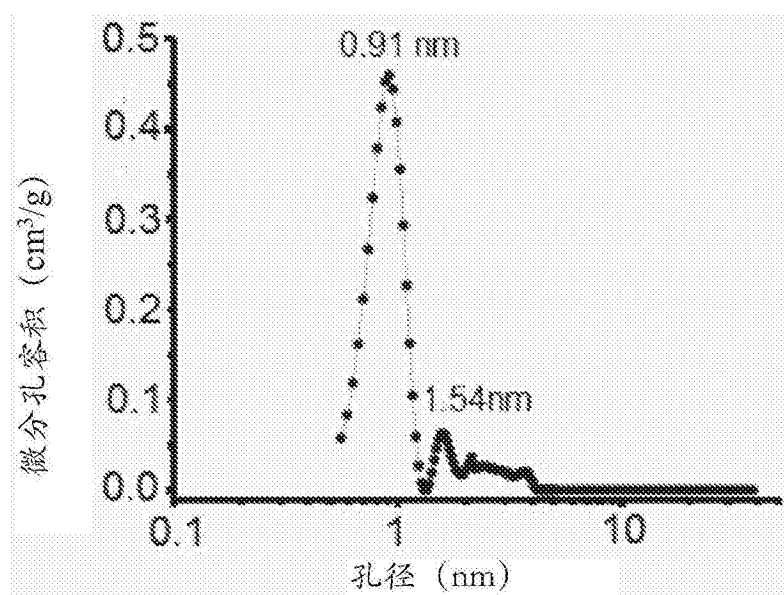


图1C

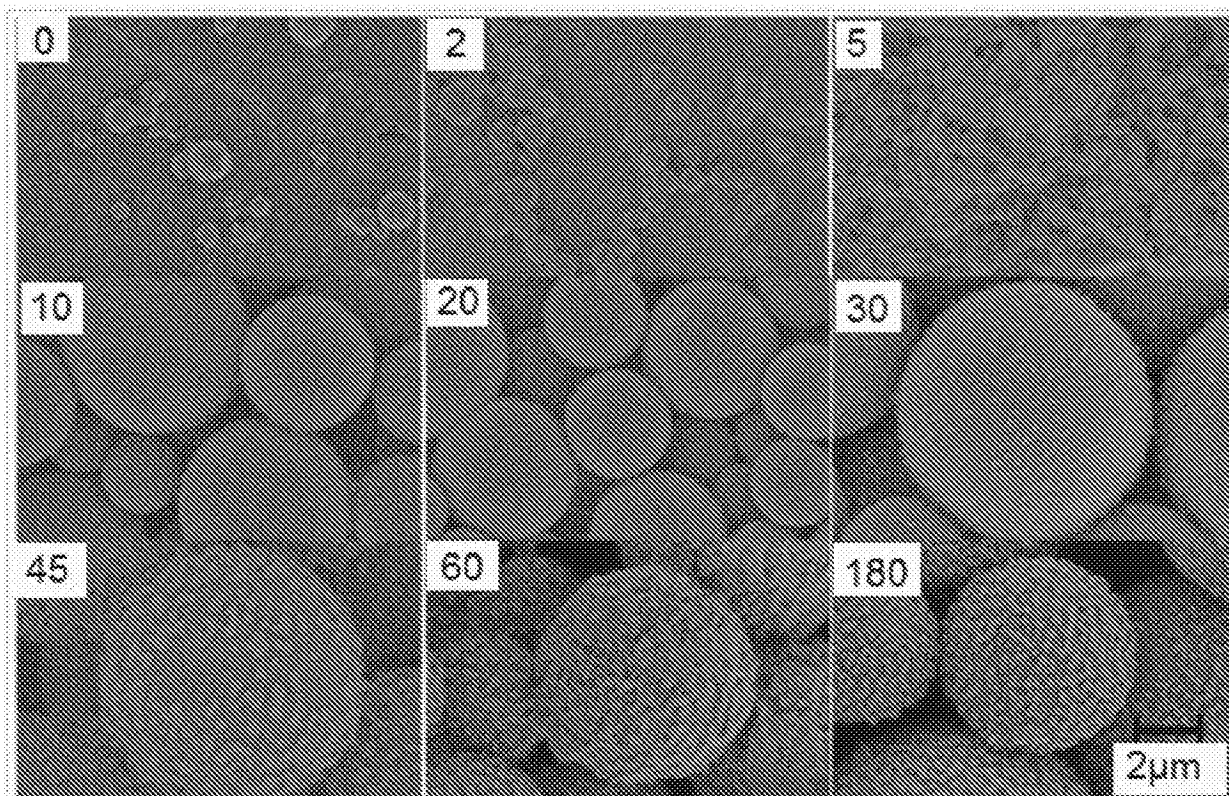


图2

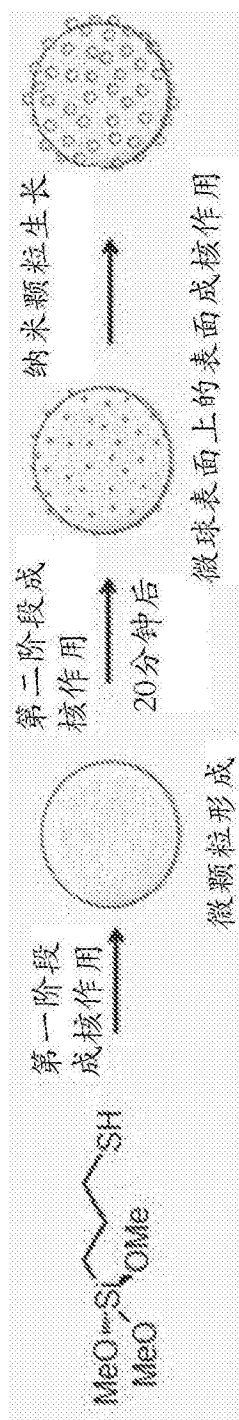


图3

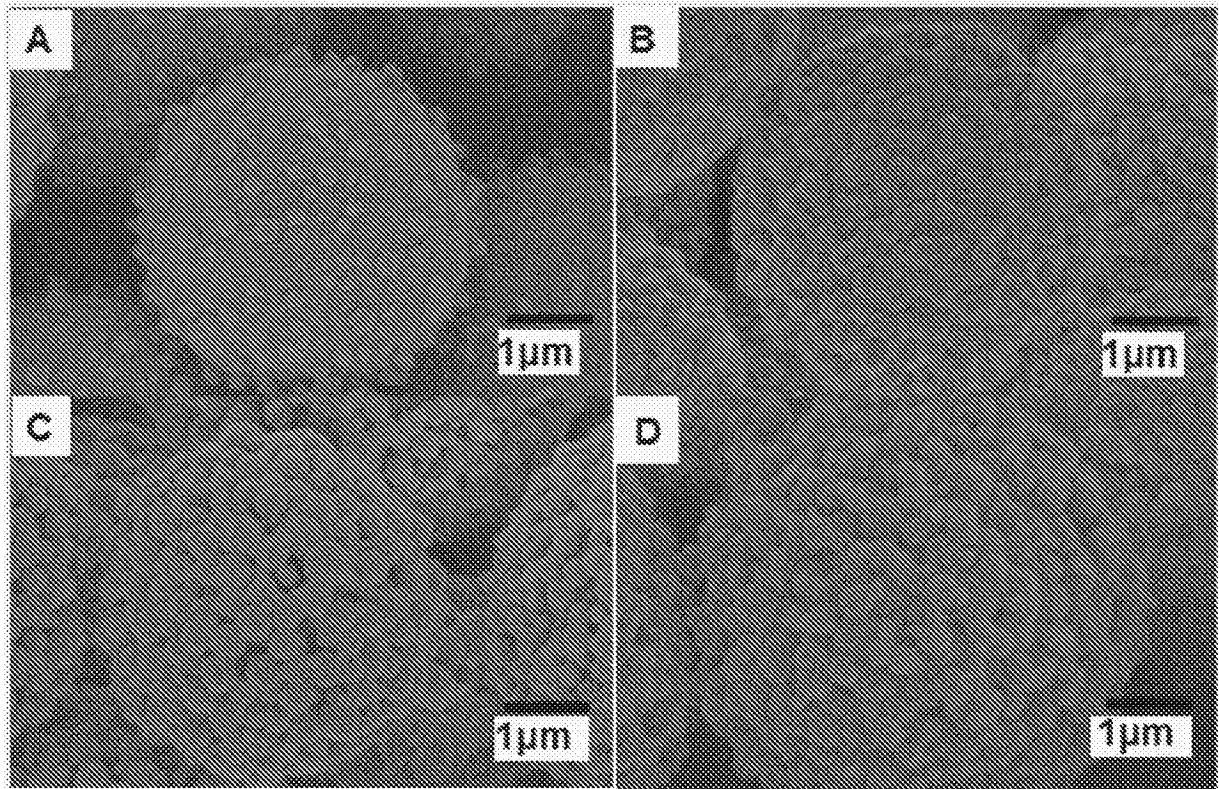


图4

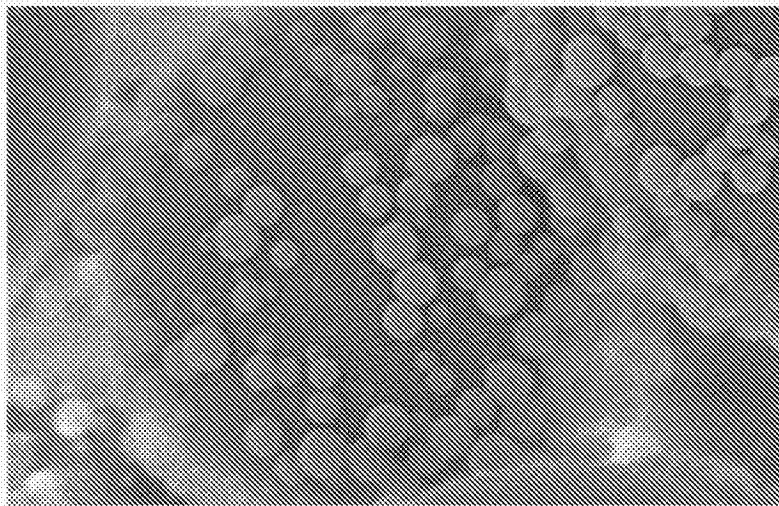


图5

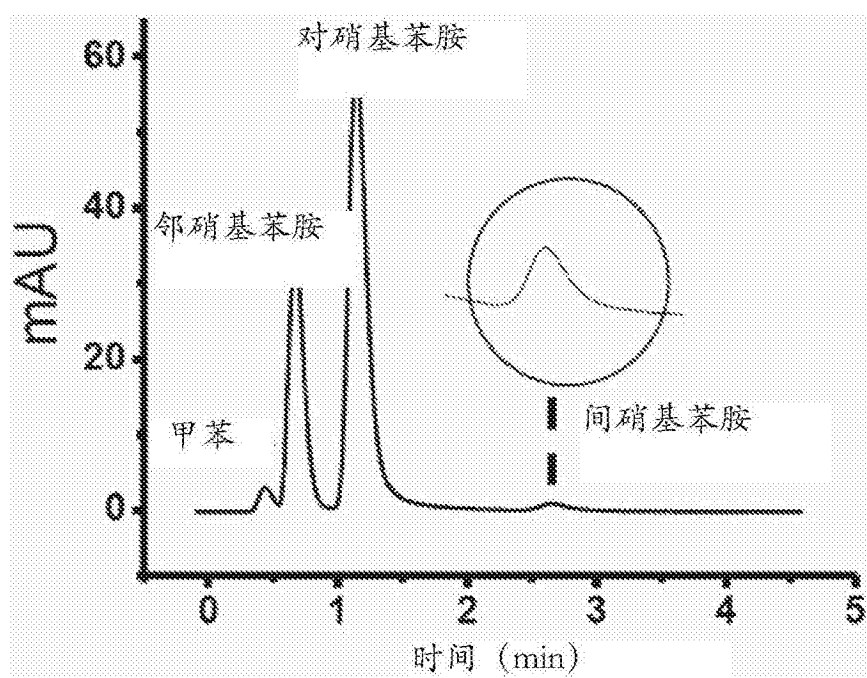


图6

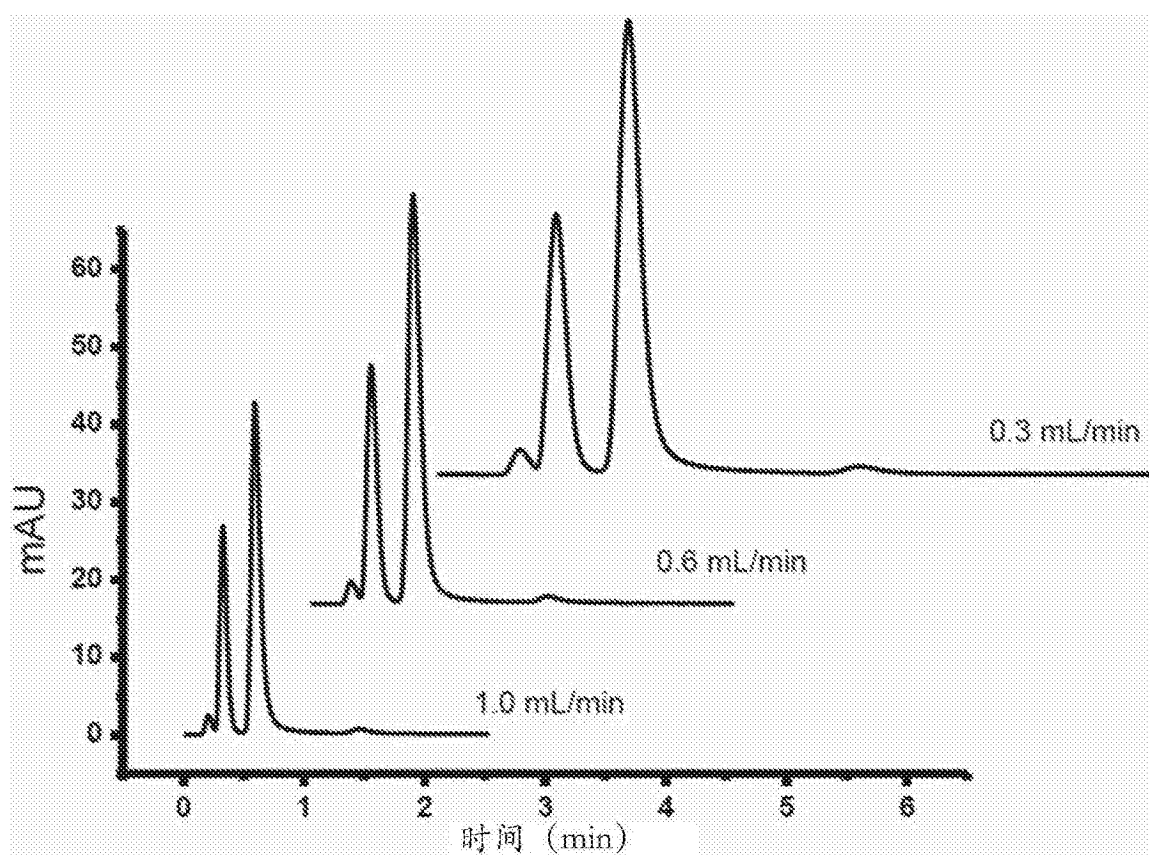


图7

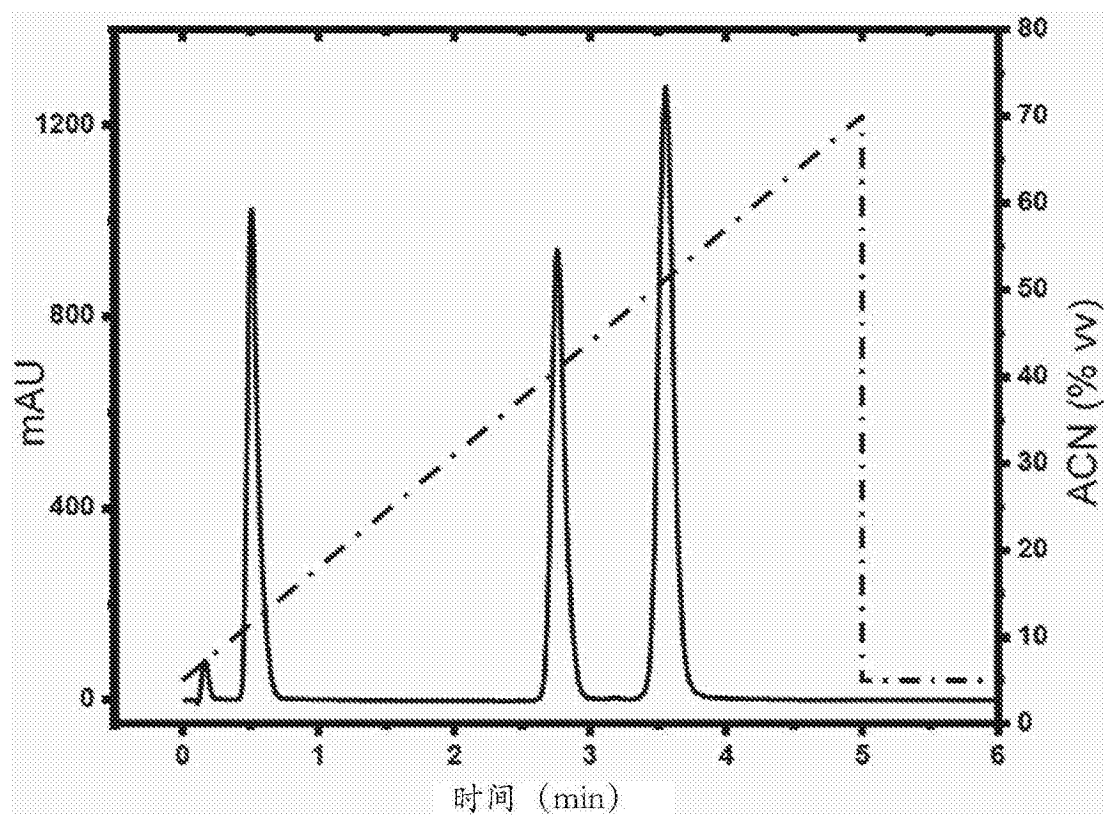


图8

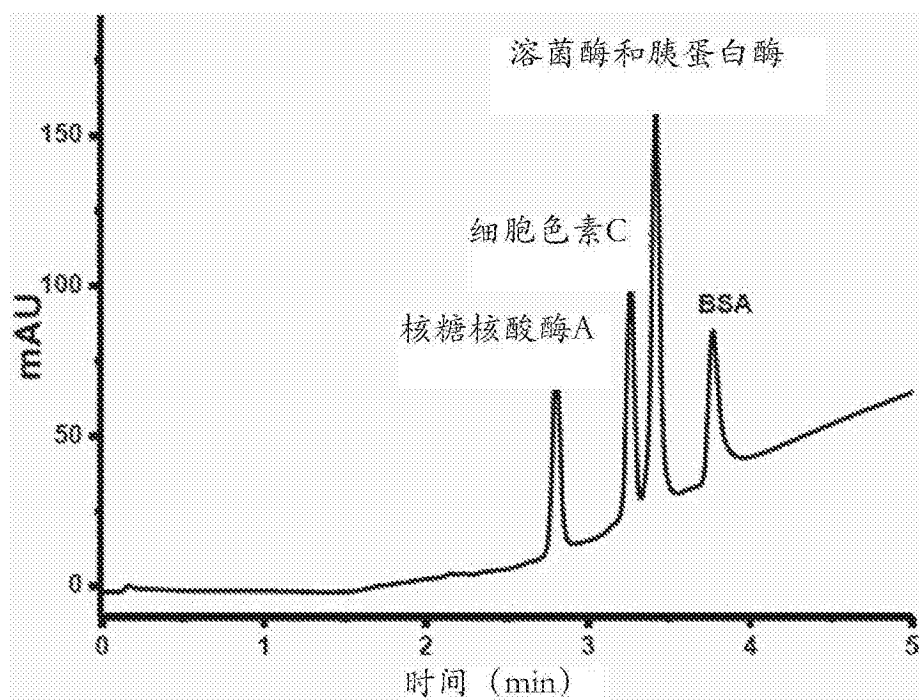


图9

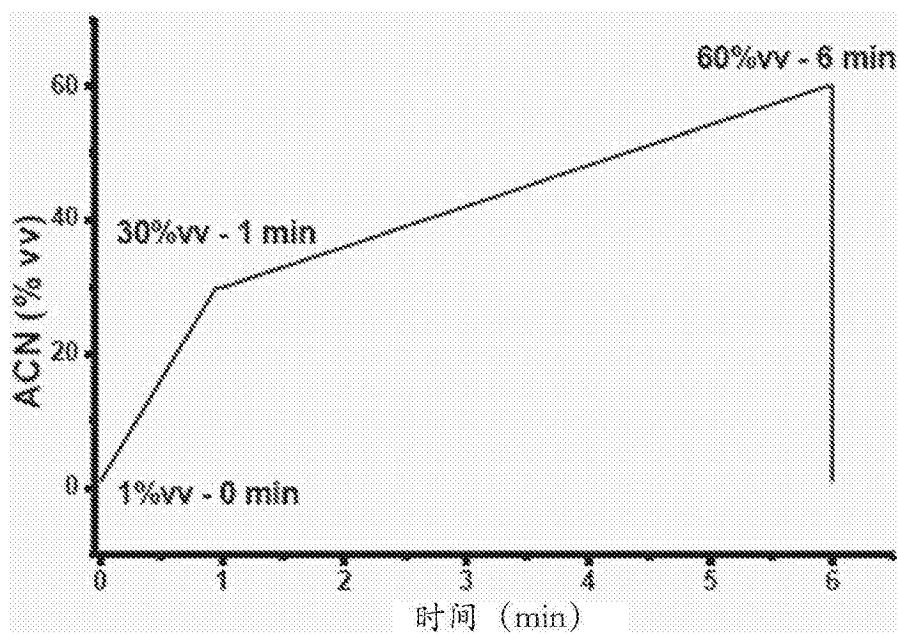


图10A

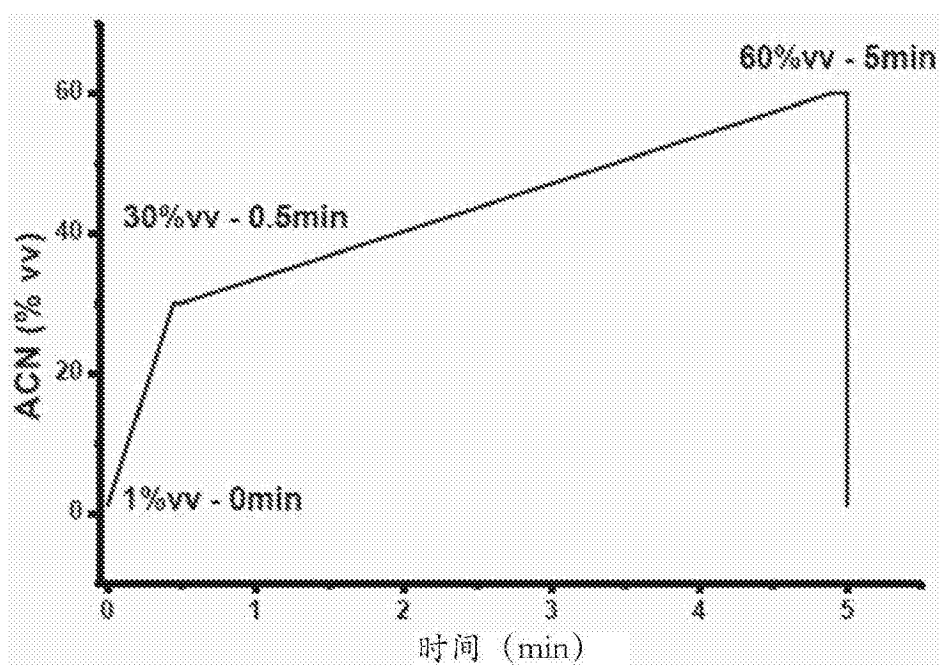


图10B

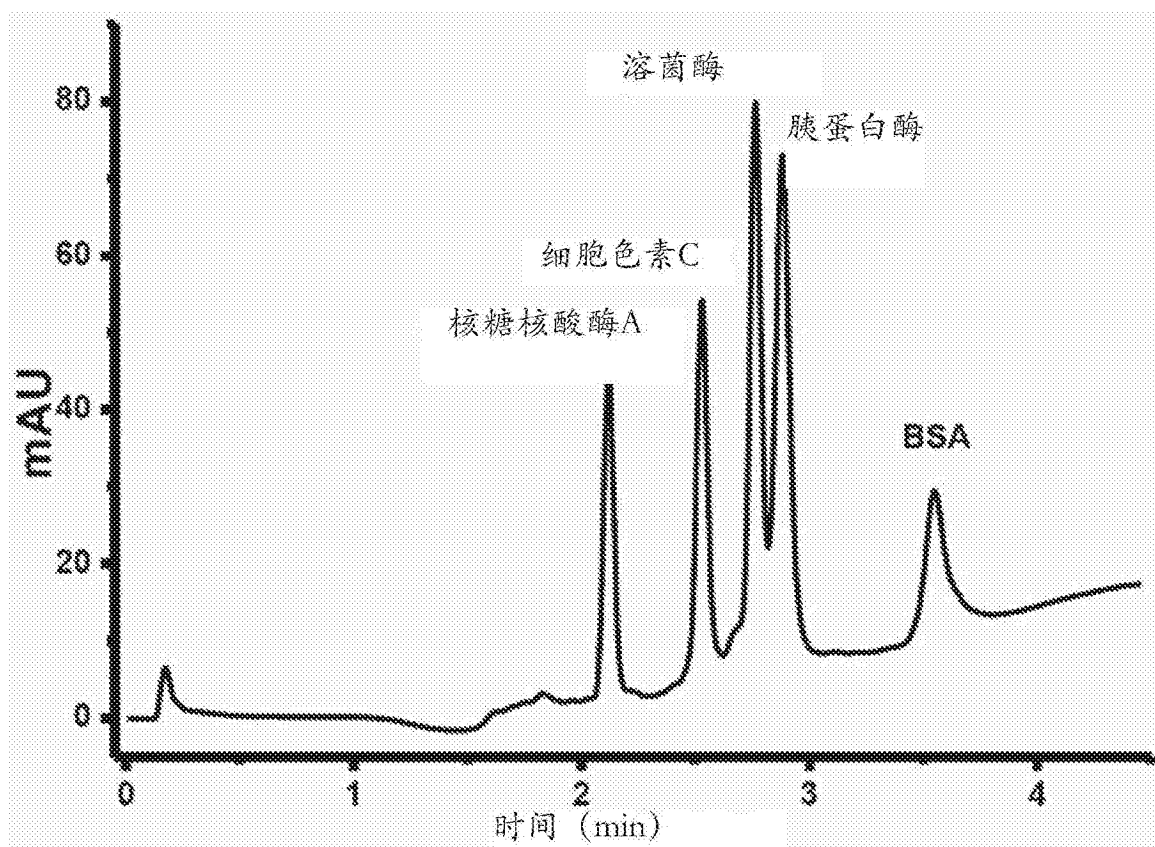


图11

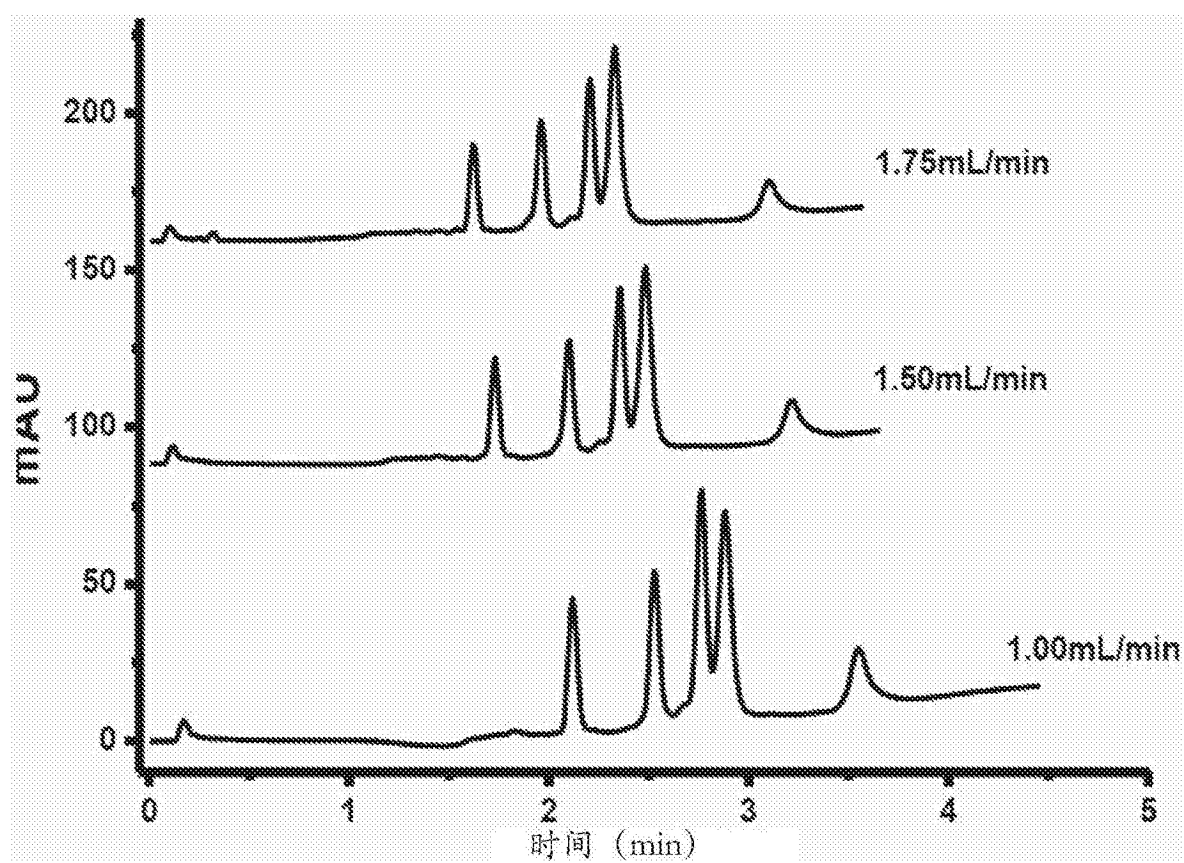


图12

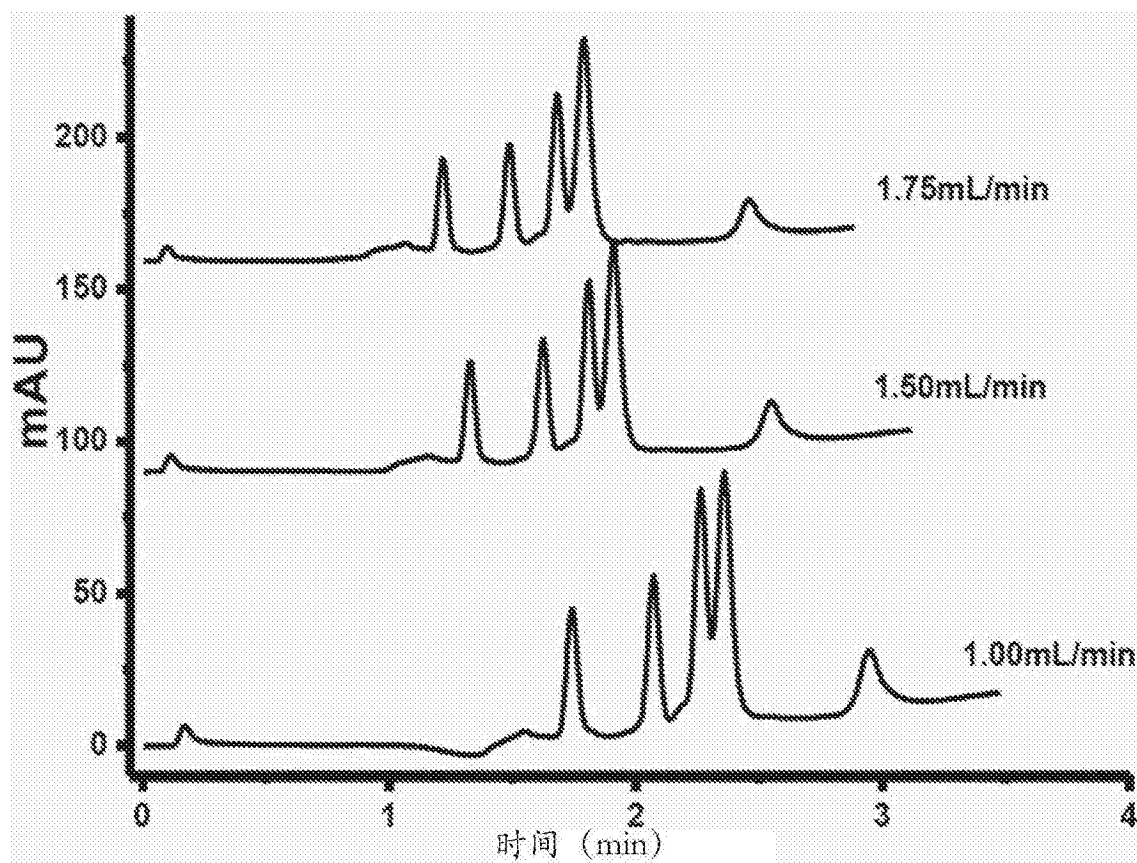


图13

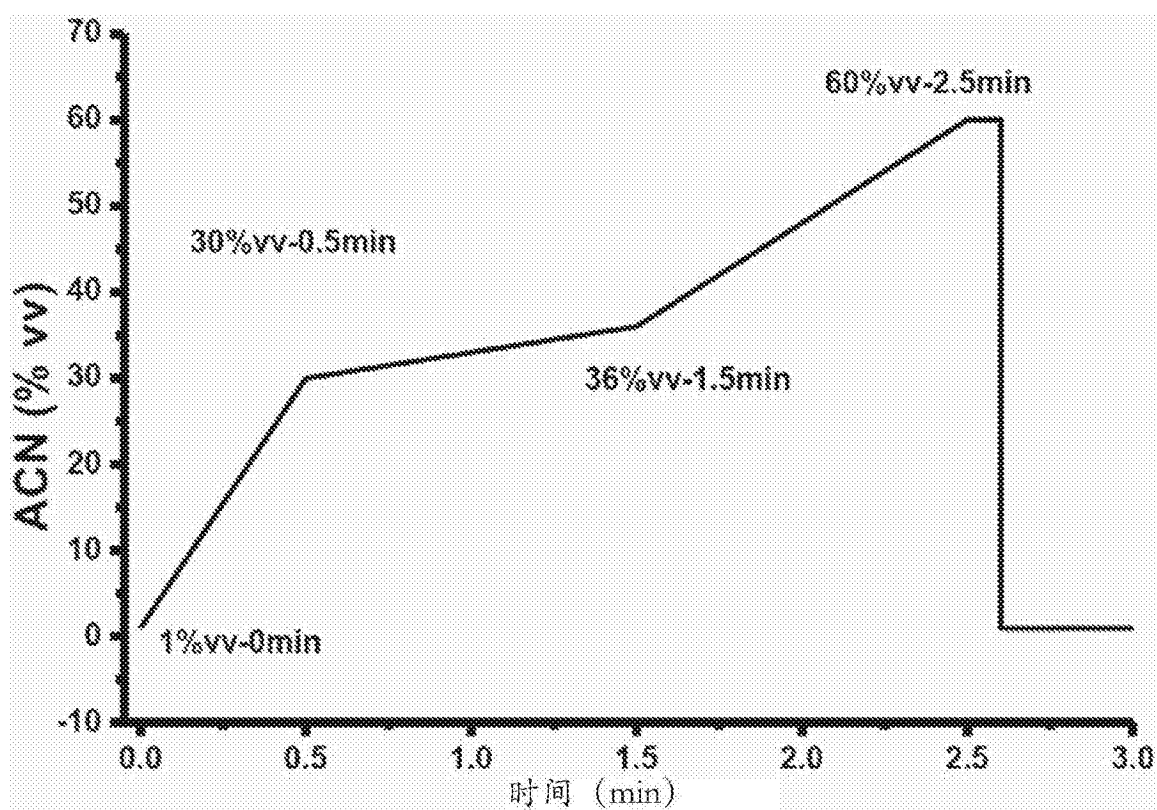


图14

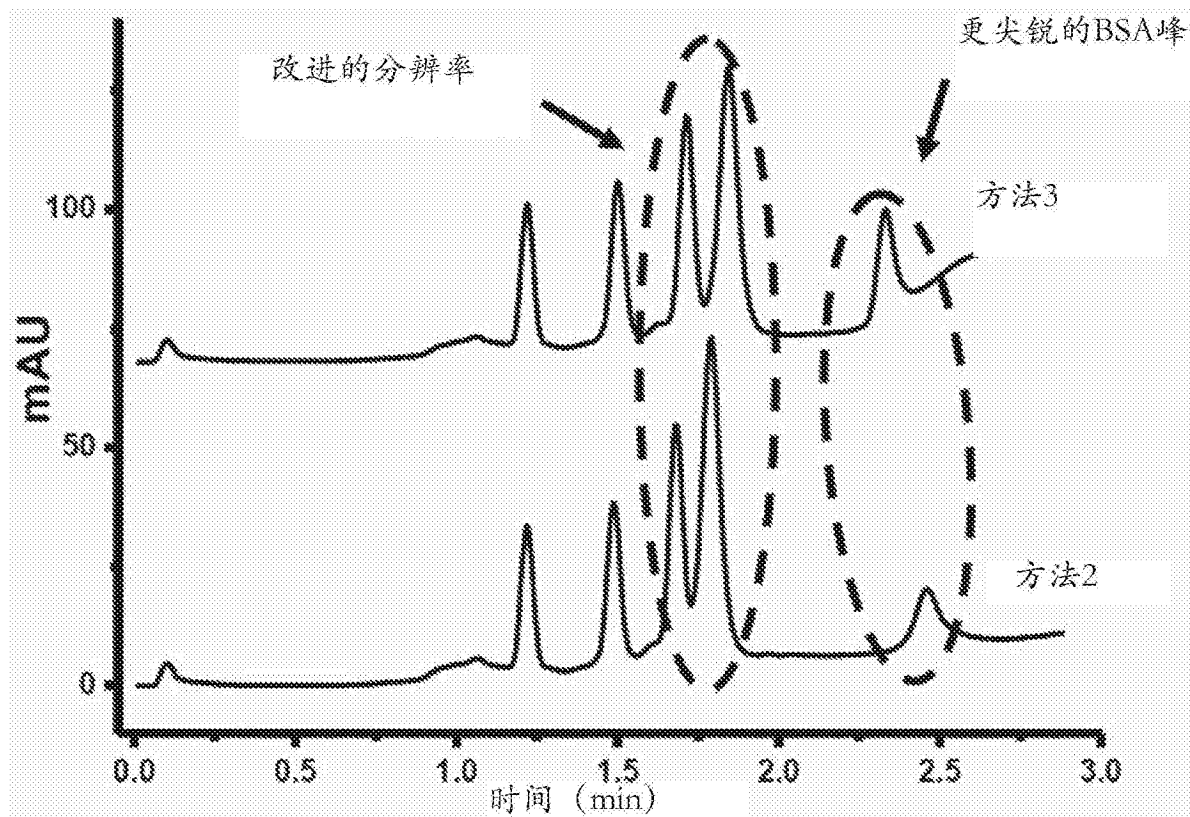


图15

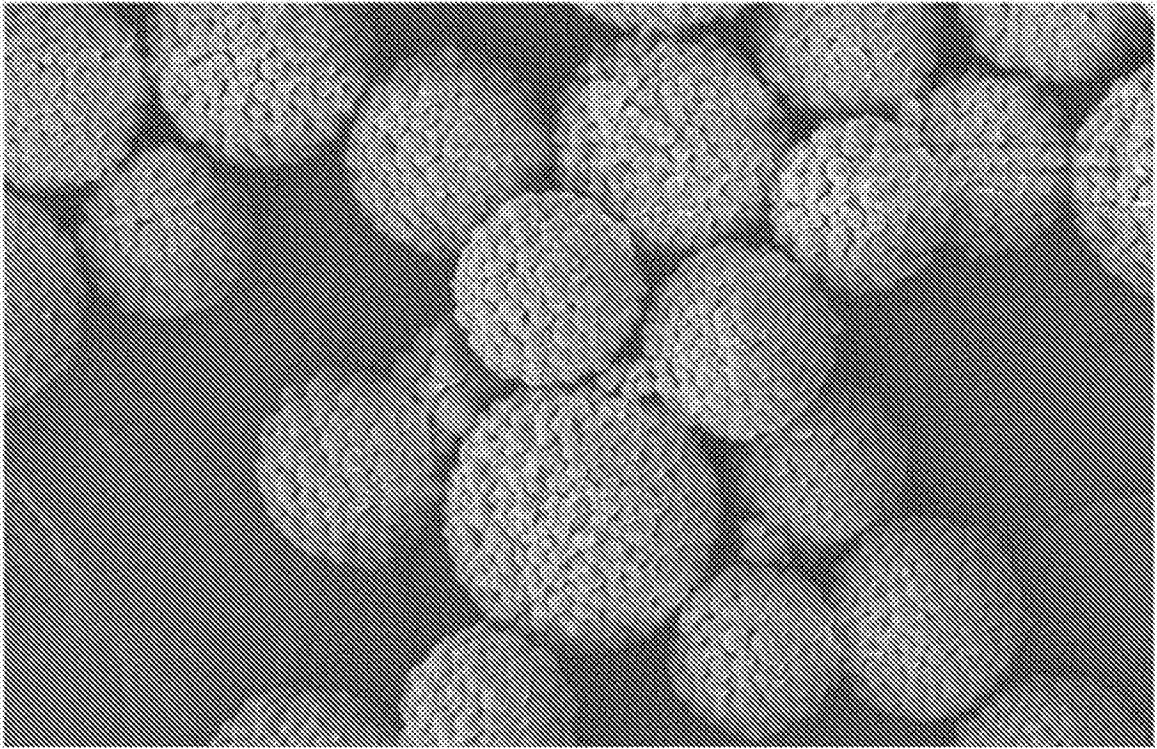


图16