

發明專利說明書

PD1084086A

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 97120826

※ 申請日期： 97.6.4

※IPC 分類： G01B 33/12 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

二氧化矽顆粒及其製造和使用方法

SILICA PARTICLES AND METHODS OF MAKING AND USING THE SAME

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)(簽章) ID：

亞泰克聯合公司

ALLTECH ASSOCIATES, INC.

代表人：(中文/英文)(簽章)

羅伯特 A.馬吉歐

Robert A. Maggio

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國馬里蘭州 21044 哥倫比亞市格瑞斯街 7500 號

7500 Grace Drive, Columbia, Maryland 21044, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國

United States of America

三、發明人：(共2人)

姓 名：(中文/英文) ID：

1.詹姆士尼爾普萊亞/PRYOR, JAMES NEIL

2.羅倫斯肯特/KINDT, LAWRENCE

國 籍：(中文/英文)

1.~2.美國

United States of America

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其

事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國 2007/6/4 60/933,069

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

三、發明人：(共2人)

姓 名：(中文/英文) ID：

1.詹姆士尼爾普萊亞/PRYOR, JAMES NEIL

2.羅倫斯肯特/KINDT, LAWRENCE

國 籍：(中文/英文)

1.~2.美國

United States of America

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其

事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國 2007/6/4 60/933,069

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於二氧化矽顆粒、含有二氧化矽顆粒之組成物、製造二氧化矽顆粒的方法及使用二氧化矽顆粒的方法。

【先前技術】

在高壓液相層析(HPLC)管柱中，填充介質會承受相當高的填充壓力，以提供緻密的分離介質。舉例來說，典型的填充壓力可高達或大於 1500 psi。在曝露於這種高填充壓力的環境下，一部分的填充介質，例如二氧化矽顆粒，可能會碎裂而形成微粒物質的細屑。在填充方法期間所產生細屑數量的增加可能會導致一些處理上的問題，包括（但非侷限於）流體流經管柱時的過大阻力、流體不均勻地流經管柱、和降低管柱效率。

在本技術領域上仍持續努力開發具有最適楊氏模數的顆粒，如二氧化矽顆粒，而使得這些顆粒在管柱填充期間只會適度的彈性降伏。如果顆粒的模數太低，過度的彈性顆粒變形可導致上述那些處理上的問題（例如，流體流動的阻力高）。然而，如果顆粒模數太高，顆粒管柱會缺乏足夠的穩定性。系統在使用並且承受機械衝擊的情況下，非常高模數的顆粒可能會偏移位置而導致降低流體流動的均勻性和降低管柱的效率。

在此技術領域需要具有最適彈性模數的二氧化矽顆粒，當其使用於填充管柱時，可在管柱內部產生一種「內部彈簧效果」，也就是說，當二氧化矽顆粒承受到填充壓力時

，會有某種程度的壓縮但可免於碎裂。

【發明內容】

本發明藉由發現新的二氧化矽顆粒而得以解決前面所討論的一些困難和問題。這種二氧化矽顆粒具有最適的楊氏模數，而可在以這種二氧化矽顆粒填充的管柱之中產生一種「內部彈簧效果」。這些二氧化矽顆粒相信是具有非常耐塑性變形的內部，和不太耐塑性變形的表面（亦即低彈性模數）。這種新的二氧化矽顆粒特別適合用於高壓液相層析（HPLC）管柱做為層析介質。這種新的二氧化矽顆粒通常為球形的、多孔的，特別是沒有大空隙的，非晶二氧化矽顆粒；並且同時可在沒有表面改質（亦即未鍵結或正相）或是有表面改質（亦即已鍵結或逆相、HIC等）的情況下用來做為層析介質。

在一個示範性的具體實施例中，本發明之二氧化矽顆粒包含多孔的二氧化矽顆粒，其包含(i)具有第一彈性模數的內側部分，和(ii)具有第二彈性模數的顆粒外表面部分，其中第一彈性模數大於第二彈性模數。在這種二氧化矽顆粒之中的彈性模數差異可能是改變二氧化矽顆粒區域內的孔隙密度所造成。例如，二氧化矽顆粒的內部區域與相同二氧化矽顆粒的外表面區域相比，其可具有較低的孔隙密度。

在另一個示範性的具體實施例中，本發明之二氧化矽顆粒包含一種多孔的二氧化矽顆粒，其中該顆粒擁有至少約 100 MPa 的塑性變形和小於約 4 GPa 的彈性變形。高的塑性變形和低的彈性變形可讓這種二氧化矽顆粒在被用來

做為層析介質時能夠有效率的填充在層析管柱中，而不會破壞顆粒。

本發明亦針對製造二氧化矽顆粒之方法。在一個示範性的方法中，這種製造二氧化矽顆粒的方法包括部分水解一種有機矽酸鹽，以形成部分水解物質；將部分水解物質予以蒸餾，以去除任何乙醇及形成蒸餾的部分水解物質；在極性的連續相中將蒸餾的部分水解物質予以乳化，而在極性的連續相中形成部分水解之矽酸鹽的小液滴；經由與氫氧化銨的縮合反應來膠凝小液滴，以形成球形多孔顆粒；沖洗球形多孔顆粒；將球形多孔顆粒予以水熱老化；以及將球形多孔顆粒加以乾燥，以形成乾燥的多孔顆粒。

本發明進一步針對使用二氧化矽顆粒之方法。在一個使用二氧化矽顆粒的示範性方法中，此方法包括一種製造層析管柱之方法，其包括將至少一種多孔的二氧化矽顆粒置入層析管柱中，而這種多孔的二氧化矽顆粒包含(i)具有第一彈性模數的內側部分，和(ii)具有第二彈性模數的顆粒外表面部分，其中第一彈性模數大於第二彈性模數。其它使用二氧化矽顆粒之示範性方法可包括使用上述層析管柱在一或多種物質通過層析管柱的同時使其彼此分離。

本發明甚至進一步針對層析管柱、製造層析管柱的方法和使用層析管柱的方法，其中層析管柱包含至少一種多孔二氧化矽顆粒，此種至少一種的多孔二氧化矽顆粒包含(i)具有第一彈性模數的內側部分，和(ii)具有第二彈性模數的顆粒外表面部分，其中第一彈性模數大於第二彈性模數。

在審閱以下所揭露之具體實施例和所附申請專利範圍的詳細描述之後，本發明的這些和其它特色及優點將會變的顯而易見。

【實施方式】

為促進對本發明原理的了解，接下來將針對本發明的特定具體實施例加以描述，並且使用特定的語言來描述這些特定的具體實施例。但仍應了解本發明的範圍並不會因為使用這種特定的語言而受到任何限縮。對於本技術相關領域具有通常知識者而言，更改、其它修改和本發明所討論之原理的其它應用皆是經常會遭遇到的考量。

本發明係針對多孔二氧化矽顆粒。本發明還針對製造多孔二氧化矽顆粒的方法，以及使用多孔二氧化矽顆粒的方法。以下所提供的是示範性多孔二氧化矽顆粒、製造多孔二氧化矽顆粒的方法、使用多孔二氧化矽顆粒的方法之描述。

I. 二氧化矽顆粒

本發明之二氧化矽顆粒所具有的物理結構和性質可使得這些二氧化矽顆粒與已知的二氧化矽相較之下能提供一或多項優點。

A. 二氧化矽顆粒的物理結構

本發明之二氧化矽顆粒具有平均最大粒徑(亦即最大直徑尺寸)之球形顆粒形狀。一般而言，本發明之二氧化矽顆粒具有的平均最大粒徑小於約 700 μm ，更典型的情況是小於約 100 μm 。在本發明的一個較佳具體實施例中，二氧化矽顆粒具有的平均最大粒徑為約 1.0 至約 100 μm ，更佳

的是約 3.0 至約 20 μm 。

在利用(例如)穿透式電子顯微鏡(TEM)技術量測本發明之多孔二氧化矽顆粒時，通常所得之縱橫比小於約 1.4。至於本文中所指的「縱橫比」乙詞係用來描述(i)二氧化矽顆粒的平均最大粒徑和(ii)二氧化矽顆粒的平均最大截面粒徑之間的比率，其中截面粒徑係實質上垂直於二氧化矽顆粒的最大粒徑。在本發明的一些具體實施例中，二氧化矽顆粒所具有的縱橫比小於約 1.3(或小於約 1.2，或小於約 1.1，或小於約 1.05)。一般來說，二氧化矽所具有的縱橫比為約 1.0 至約 1.2。

本發明之多孔二氧化矽顆粒所具有的孔隙體積可使得二氧化矽顆粒成為所需的層析介質。以氮氣測孔儀所量測而得之二氧化矽顆粒的典型孔隙體積至少為約 0.40 cc/g。在本發明的一個示範性具體實施例中，以氮氣測孔儀量測多孔二氧化矽顆粒所得之孔隙體積為約 0.40 cc/g 至約 1.4 cc/g。在本發明的另一個示範性具體實施例中，以氮氣測孔儀量測多孔二氧化矽顆粒所得之孔隙體積為約 0.75 cc/g 至約 1.1 cc/g。

本發明之多孔二氧化矽顆粒具有至少約 40 埃($\text{\AA}$)的平均孔隙直徑。在本發明的一個示範性具體實施例中，二氧化矽顆粒的平均孔隙直徑為約 40 $\text{\AA}$ 至 700 $\text{\AA}$ 。在本發明的另一個示範性具體實施例中，二氧化矽顆粒的平均孔隙直徑為約 90 $\text{\AA}$ 至 150 $\text{\AA}$ 。

以 BET 氮氣吸附法(亦即 Brunauer Emmet Teller 方法)來量測本發明之多孔二氧化矽顆粒時，其所得的表面積至少為約

150 m²/g。在本發明的一個示範性具體實施例中，二氧化矽顆粒所具有的 BET 表面積為約 200 m²/g 至約 450 m²/g。在本發明的另一個示範性具體實施例中，二氧化矽顆粒所具有的 BET 表面積為約 260 m²/g 至約 370 m²/g。

在第 1 圖中描繪了本發明之示範性二氧化矽顆粒的放大圖，其係以掃描式電子顯微鏡 (SEM) 放大 1000 倍所提供之影像。如第 1 圖中所示，示範性二氧化矽顆粒 10 為球形，並且具有相當窄的粒徑大小分布。此外，如第 2A 和 2B 圖中所示，示範性二氧化矽顆粒 10 在沿著顆粒的截面方向上應具有顆粒性質梯度。

如第 2A 圖中所示，在本發明的一個具體實施例中，示範性二氧化矽顆粒 10 被認為在示範性二氧化矽顆粒 10 的內部 12 和外表面 11 之間具有類步階性質梯度。例如，示範性二氧化矽顆粒 10 在內部區域 13 具有較高的楊氏模數，並且在表面區域 14 具有較低的楊氏模數。例如，示範性二氧化矽顆粒 10 在內部區域 13 具有較高的楊氏模數 (或較低的孔隙密度)，並且在表面區域 14 具有較低的楊氏模數 (或較高的孔隙密度)。值得注意的是，在這個具體實施例中，在示範性二氧化矽顆粒 10 的內部 12 和外表面 11 之間可以有兩個以上的區域具有不同的顆粒性質。

如第 2B 圖中所示，在本發明的另一個具體實施例中，示範性二氧化矽顆粒 10 被認為具有實質上連續的性質梯度，其由內部 12 的內部數值變化為沿著外表面 11 的表面數值。例如，示範性二氧化矽顆粒 10 在內部區域 12 具有最大楊氏模數 (或最小孔隙密度， $P_{\min}$)，並且沿著外表面 11

具有最小楊氏模數(或最大孔隙密度， $P_{\max}$)。值得注意的是，在這個具體實施例中，示範性二氧化矽顆粒 10 的內部 12 和外表面 11 之間的某個點可能會存在最大或最小的性質數值(例如，最小孔隙密度 $P_{\min}$)，而不是在第 2B 圖中所示的內部 12。

B. 二氧化矽顆粒的性質

如同前述本發明之二氧化矽顆粒之物理性質的結果，二氧化矽顆粒相當適合在 HPLC 應用上做為層析介質。幾近於球形的形狀可使得填充更為均勻，並且因而使得液體可以更均勻地流過 HPLC 管柱，因而得到更好的管柱效率。此外，由於二氧化矽顆粒的塑性變形性質，當本發明之二氧化矽顆粒曝露於填充壓力之下，其可以耐碎裂，因此避免了流體流動的過多阻力，而可維持流體均勻地流過 HPLC 管柱。

如同前面所討論，本發明之二氧化矽顆粒似乎具有最適的楊氏模數，其可使得顆粒在管柱填充期間得以適度地彈性降伏，但又不足以造成顆粒的碎裂。當本發明之二氧化矽顆粒用於 HPLC 管柱時，可提供「內部彈簧效應」，其可以類似於動態軸向壓縮所可達到的方式使管柱穩定。

此外，如同前面所討論，本發明之二氧化矽顆粒在彈性模數上應擁有軸向延伸性質梯度。更具體而言，本發明確信二氧化矽顆粒應該具有一種表面區域，其具有比二氧化矽顆粒內部區域為低的模數。這樣的顆粒結構可以解釋為何本發明確信二氧化矽顆粒能形成如此穩定化的填充床(亦即在管柱中低顆粒移動和孔洞形成)。本發明確信二氧

化矽顆粒的表面應該會具有較大的彈性變形，但是在朝顆粒內部區域的方向上則具有較高的模數，使得內部模數得以避免顯著的顆粒變形(亦即塑性變形)，而導致顆粒破裂和對流體流動造成高阻力。

除此之外，由於本發明確信二氧化矽顆粒的孔隙度梯度，當其用於填充管柱中時，這種二氧化矽顆粒提供了良好的質傳性質。由於在層析分離時，大多數的分子並未擴散至顆粒真正的中心，先前所述的軸向延伸孔隙度梯度可增加顆粒進出的質量傳遞，因而產生改善管柱效率的結果。

在一個具體實施例中，本發明之顆粒以原子力顯微鏡(AFM)所測得的硬度或塑性變形為至少約 100 MPa，典型的數值為至少約 200 MPa，更典型的數值為至少約 300 MPa，又更典型的數值為至少約 400 MPa。AFM 是利用 Veeco 儀器公司的 Nanoman II SPM 系統，在施力為 30 μ N 的情況下以鑽石頭探針來進行。硬度是由硬度 = 力 / 面積的公式來決定，其中面積是指探針所形成凹痕的大小的面積。AFM 的進行方式如「利用原子力顯微鏡以奈米尺度進行彈性模數量測之理論模式和實現」，*物理期刊 (Journal of Physics)：會議系列論文集 61*, 第 1303-07 頁, 2007，中所述。

在另一個具體實施例中，本發明之顆粒以 AFM 所測得之楊氏模數或彈性變形小於約 4 GPa，典型的數值係小於約 3 GPa，更典型的數值為小於約 2 GPa，又更具典型的數值為至小於約 1 GPa。AFM 是利用 Veeco 儀器公司的 Nanoman II SPM 系統，在施力為 3.297 μ N 的情況下以鑽石頭探針來進

行。楊氏模數是依照 Oliver 和 Pharr 在「利用負載和位移感測凹痕實驗來決定硬度和彈性模數之改良技術」，*材料研究期刊 (J. Mater. Res.)*，第 7 冊，第 1564-83 頁，1992，中所述之分析方法來決定。

在另一個示範性的具體實施例中，本發明之二氧化矽顆粒包括多孔二氧化矽顆粒，其中該顆粒所具有的塑性變形至少約 100 MPa 且彈性變形小於約 4 GPa，較佳的是塑性變形為至少約 100 MPa 且彈性變形小於約 3 GPa，更佳的是塑性變形為至少約 100 MPa 且彈性變形小於約 2 GPa。此外，本發明之二氧化矽顆粒可具有本文中所引述之塑性變形和彈性變形的任何組合，例如塑性變形為至少約 100 MPa (或 200 MPa、300 MPa 或 400 MPa 等) 且彈性變形小於約 4 GPa (或 3 GPa、或 2 GPa 或 1 GPa 等)。當使用此種二氧化矽顆粒做為層析介質時，這種高塑性變形和低彈性變形的性質可使其能夠有效率的填充於層析管柱中，而不會破壞顆粒。

所揭露二氧化矽顆粒的上述性質可以再詳細參照第 3-5 圖。第 3 圖描繪了本發明之示範性二氧化矽顆粒在填充於 HPLC 管柱之前和之後的粒徑大小分析。如第 3 圖中所示，本發明之二氧化矽顆粒在動態軸向壓縮填充期間展現出較少的顆粒破碎，這可由以下兩點看出：(1) 與商用二氧化矽顆粒（取自 Eka Nobel AB 公司的 Kromasil® 10 微米 C18）在「之前」和「之後」的數目(%)線條相比，本發明之二氧化矽顆粒在「之前」和「之後」的數目(%)線條相當接近；以及(2) 與商用二氧化矽顆粒之細屑增加的數量相比，本發明

之二氧化矽顆粒的細屑數量所增加的數量極少。在將本發明之顆粒填充於管柱之後，粒徑大小分布並沒有實質上的改變，然而商用介質的粒徑大小分布卻已明顯的不同。例如，本發明之顆粒產生了極少的細屑（例如，以 $<5\mu\text{m}$ 的所有細屑數目為基準，其少於約 50 數目%），然而商用顆粒則會產生比較多的細屑（例如，以 $<5\mu\text{m}$ 的所有細屑數目為基準，其大於約 50 數目%）。較佳的是，在填充本發明顆粒的期間，產生少於約 40 數目%的細屑，以少於約 30%為更佳，又以少於約 20%為更佳（亦即少於 15%、10%、5%、4%、3%、2%等）。

第 4 圖所描繪的是本發明之示範性二氧化矽顆粒在動態軸向壓縮填充於 HPLC 管柱之後的掃描式電子顯微鏡 (SEM) 影像 (放大 500 倍) (右邊影像) 與上述之商用二氧化矽顆粒在動態軸向壓縮填充於 HPLC 管柱之後的 SEM 影像 (放大 500 倍) (左邊影像)。左邊影像顯示出，上述之商用二氧化矽顆粒在動態軸向壓縮填充期間產生了細屑，而右邊影像則是呈現出，本發明之二氧化矽顆粒在動態軸向壓縮填充期間基本上並沒有產生細屑。

第 5 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒之管柱填充效率的比較。如第 5 圖中所示，本發明之二氧化矽顆粒與商用的二氧化矽顆粒（取自 EKa Nobel AB 公司的 Kromasil 10 微米 C18 和取自 Daiso 公司的 Daiso 10 微米 C18）相比，其展現出最高的板數／米。

II. 製造二氧化矽顆粒的方法

本發明亦針對製造二氧化矽顆粒的方法。用來形成本

發明之二氧化矽顆粒的原料，以及用來形成本發明之二氧化矽顆粒的方法步驟將討論如下。

A. 原料

製造本發明之二氧化矽顆粒的方法可以由多種含矽原料來形成。適合的含矽原料包括，但非侷限於，四乙基正矽酸鹽(TEOS)，可取自多種商品來源，包括 Sigma-Aldrich 公司(聖路易(St. Louis)，MO)；部分寡聚化的矽酸鹽，如來自 Dynasil 公司的 DYNASIL™ 40(西柏林(West Berlin)，NJ)；以及部分寡聚化的矽酸鹽，如來自 Wacker Chemie AG 的 TES 40 WN(慕尼黑，德國)。

在一個較佳的具體實施例中，SILBOND™ 40 被用來形成「小分子」產物。在本文中所指的「小分子」產物乙詞係用來描述本發明之二氧化矽顆粒，其在小分子層析應用上特別有用。本發明之「小分子」二氧化矽顆粒通常具有的 N₂ 孔隙體積係在約 0.75 至約 1.1 cc/g 的範圍內；N₂ 表面積在約 260 至約 370 m²/g 的範圍內；並且平均孔隙直徑在約 90 至約 150 埃(Å)的範圍內。

B. 方法步驟

本發明之二氧化矽顆粒通常係利用多步驟方法來製備，其中有機矽酸鹽(如前面所述)被部分水解、蒸餾，接著分散於極性較高的連續相，因為部分水解之矽酸鹽不溶於極性連續相中而導致小液滴的形成。接著這些小液滴因為受到氫氧化銨催化之縮合反應而導致膠凝。然後把所得的球形、多孔的顆粒予以沖洗、水熱老化和乾燥。目前已發現，在水熱老化和乾燥步驟期間的製程條件對於控制所

得顆粒之孔隙結構特別重要。接著可藉由傳統的方式(例如淘析或空氣分級)將所得之多孔二氧化矽顆粒分成適當地狹窄粒徑大小分布。以下將提供各種方法步驟的進一步描述。

1. 部分水解步驟

水解程度是獲得具有所需物理性質之二氧化矽顆粒(例如最適楊氏模數、粒徑大小等)的重要製程參數。舉例來說,過度水解將產生一種與顆粒形成步驟之連續相完全互溶的溶液,而水解不足則是導致材料在後續的縮合(亦即膠凝)步驟期間太沒有反應活性。

部分水解通常是使用 0.1 M HCl(水溶液)來進行,雖然也可以使用其它的酸類。將乙醇(EtOH)添加至這種混合物中(予以攪拌)以克服有機矽酸鹽和水相之間的不互溶性。反應在室溫下自發性的進行。反應物的典型組合包括 100.0 克的 SILBOND™ 40、21.5 克的 EtOH 和 4.6 克的 0.1 M HCl(水溶液)。

2. 蒸餾步驟

可以對部分水解物質(PHS)進行蒸餾,以去除 EtOH(亦即同時包括添加進去的物質和在水解步驟期間所形成的副產物)。蒸餾步驟可使不含大孔洞之顆粒形成最小化和/或去除。在本文所指的「不含大孔洞之顆粒」為具有實質上連續微孔之顆粒結構的二氧化矽顆粒。蒸餾通常是在大約 90℃ 於真空(亦即小於 100 托)狀態下進行一段時間,其為去除 EtOH 所必需的時間(通常小於約 1 小時)。

3. 顆粒形成(乳化)步驟

藉由將 PHS 在氨化的水相中乳化來完成顆粒形成。由於 PHS 氨催化縮合反應的關係，所得的小液滴會迅速膠凝（亦即固化）。

使用兩種方法來製造粒徑大小在 1 至 100 μm 範圍內的二氧化矽顆粒。第一種方法是一種在兩步驟中使用 Cowles 攪拌機的批次技術。在第一步驟（亦即，液滴形成步驟，蒸餾）中，PHS 在異丙醇 (IPA)/水溶液（例如 30 重量 % 的 IPA 水溶液）中乳化。接著，在第二步驟中加入 NH_4OH ，並連續攪拌，以驅動縮合反應，而使得多孔的球形顆粒固化。平均粒徑是藉由攪拌翼片尖端的速度（例如，速度愈高產生愈小的顆粒）和連續相的組成（例如，愈多的醇產生愈小的顆粒）來控制。

第二種製造二氧化矽顆粒的方法是利用管線內靜態攪拌器使 PHS 在 30 重量 % IPA / 1 重量 % NH_4OH 水溶液中乳化。在這個例子中，通過管線內攪拌器的速度愈高可生成愈小的粒徑。

4. 過濾／傾析步驟

在顆粒形成步驟之後，通常係使用過濾和傾析來去除多餘的醇，以及任何來自二氧化矽產物的氨。在典型的過濾／傾析步驟中，由上述顆粒形成步驟所得的濾餅被再次懸浮於去離子水中（例如 12 升的去離子水），並且接著使其沈降整晚（例如 12 小時）。在沈降之後，將含有顆粒的溶液予以傾析，以去除大多數的液體。

5. 水熱老化步驟

水熱老化步驟可用來降低多孔二氧化矽顆粒的內表面

積。以類似於矽凝膠製造的方式，愈嚴重的老化(亦即更長、更熱和／或更鹼)會導致在乾燥過程中有更多表面積減少以及顆粒孔隙度(孔隙體積)最佳的維持力。在老化步驟結束時，加入足夠的去離子水使之冷卻，因而使老化方法淬火。

在一個示範性具體實施例中，水熱老化步驟包括將上述傾析／過濾步驟中所形成沈降的二氧化矽餅塊再次懸浮於足量的去離子水中，以製成一種可攪拌的泥漿(例如約 1 公斤乾的二氧化矽餅塊在約 1 升的添加水中)。接著將攪拌的泥漿加熱至約 75℃ 達約 90 分鐘。添加約 12 升室溫去離子水(對每升的加熱水而言)來中止老化。接著不是將懸浮液予以過濾就是留置沈降並且予以傾析。

6. 乾燥步驟

乾燥速率對於最終二氧化矽顆粒的表面積和孔隙體積也有影響。在一個示範性的具體實施例中，乾燥步驟包括將二氧化矽產物的傾析體積或濾餅在托盤上抹開，以形成厚度約 1.25 公分的二氧化矽餅塊；將含有二氧化矽餅塊的托盤置放於重力式對流烘箱中約 20 小時，烘箱溫度約 140℃；將托盤和二氧化矽由烘箱中取出；並且收集二氧化矽。這種經乾燥的二氧化矽材料已可用於後續選用的篩選和黏合步驟。

III. 使用二氧化矽顆粒的方法

本發明還針對使用二氧化矽顆粒之方法。如同前面所討論，二氧化矽顆粒可用來做為層析介質。在第 6-11 圖中描繪了使用二氧化矽顆粒做為層析介質的多種方法。

第 6 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒(取自 Phenomenex Inc.的 Luna® 5 微米 C18)相比之胜肽選擇率的層析圖。

第 7 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒(取自 Akzo Nobel AB的 Kromasil 5 微米 C18)相比之純合成胜肽選擇率的層析圖。

第 8 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒(取自 Akzo Nobel AB的 Kromasil 5 微米 C18)相比之粗製合成胜肽選擇率的層析圖。

第 9 圖係描繪使用本發明之示範性二氧化矽顆粒和傳統的二氧化矽顆粒(取自 Phenomenex Inc.的 Jupiter® Proteo 5 微米 C18)所得之粗製 20-AA 合成胜肽之層析圖。

第 10 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒相比之血管活性腸胜肽(VIP)選擇率的層析圖。

第 11 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒(取自 Akzo Nobel AB的 Kromasil 5 微米 C8 和取自 YMC 有限公司的 Hydrosphere 5 微米 C8)相比之胰島素承載能力。

實施例

本發明將藉由以下實施例做進一步的說明，其不應視為對本發明之範疇在任何方面設下限制。相反地，其應被清楚的認知，在閱讀了本文的描述之後，在此領域具有一般技術能力者可在不偏離本發明的精神和所附申請專利範圍之範疇的情況下，聯想出各種其它的具體實施例、修改

和其等效的方式。

實施例 1

部分水解材料(PHS)的製備

在攪拌的同時將 230 克 0.1 M 的 HCl(水性)溶液添加至 5,000 克的 SILBOND™ 40 中。接著在攪拌的同時再將 1075 克的 EtOH 添加至混合物中，以克服 SILBOND™ 40 和水相之間的不互溶。反應是在室溫下自發性地進行。

將所得之部分水解材料(PHS)予以蒸餾，以去除任何添加至混合物或在水解步驟期間成為副產物的 EtOH。蒸餾是在 90℃ 於真空狀態(< 100 托)下操作。

實施例 2

利用批次攪拌來製備「小分子」二氧化矽顆粒

將 3,800 克實施例 1 中所形成之蒸餾 PHS 倒入 14,900 克 30 重量 %IPA/水中(預先製備好並且讓它靜置至少 16 小時以去除氣體)。啟動 Cowles 攪拌機，並且設定成 1160 rpm 運轉 5 分鐘，以使得完全乳化。接著在持續進行攪拌的同時一次添加 378 克 30 重量 %的 NH₄OH。在顆粒完全膠凝的期間，使溶液在 1160 rpm 再多攪拌 20 分鐘。將二氧化矽懸浮液留置沈降整晚。

第二天，將二氧化矽懸浮液予以過濾，並且以 12 升的去離子水將所得的二氧化矽餅塊再次懸浮，以去除任何多餘的醇和／或氨。將二氧化矽溶液留置沈降整晚，並且在隔天傾析。再次重覆此程序。

將來自傾析溶液的二氧化矽餅塊再次懸浮於大約 1 升的去離子水中，以製成一種可攪拌的泥漿。接著將攪拌的

泥漿加熱至約 75℃ 達 90 分鐘。添加約 12 升室溫去離子水來中止老化。接著將懸浮液予以過濾以去除多餘的流體。

將二氧化矽餅塊的產物在托盤上抹開，並且推平成約 1.25 公分的厚度。將含有二氧化矽餅塊的托盤置放於 140℃ 重力式對流烘箱中達 20 小時。接著將托盤和二氧化矽由烘箱中取出，並且將二氧化矽裝瓶。

實施例 3

利用管線內靜態攪拌器來製備「小分子」二氧化矽顆粒

將實施例 1 中所形成之蒸餾 PHS(950 毫升/分鐘)與 30% IPA/ 1% NH₄OH 水溶液(4,090 毫升/分鐘)通過直徑為 15.2 公分(6 英吋)的靜態攪拌器以進行混合。接著將所得的二氧化矽顆粒泥漿流入一個攪拌的容器中。將二氧化矽懸浮液留置沈降整晚。

第二天，將二氧化矽懸浮液予以過濾，並且以 12 升的去離子水將所得的二氧化矽餅塊再次懸浮，以去除任何多餘的醇和／或氨。將二氧化矽溶液留置沈降整晚，並且在隔天傾析。再次重覆此程序。

將來自傾析溶液的二氧化矽餅塊再次懸浮於大約 1 升的去離子水中，以製成一種可攪拌的泥漿。接著將攪拌的泥漿加熱至約 75℃ 達約 90 分鐘。添加約 12 升室溫去離子水來中止老化。接著將懸浮液予以過濾以去除多餘的流體。

將二氧化矽餅塊的產物在托盤上抹開，並且推平成約 1.25 公分的厚度。將含有二氧化矽餅塊的托盤置放於 140℃

重力式對流烘箱中達 20 小時。接著將托盤和二氧化矽由烘箱中取出，並且將二氧化矽裝瓶。

實施例 4

以 AFM 測試二氧化矽顆粒

在這個實施例中，包含 10 微米球形多孔顆粒之本發明二氧化矽顆粒係以 AFM 來測試，以決定彈性和塑性變形性質。此二氧化矽經過表面處理，可產生與二氧化矽表面共價結合的 C_{18} 矽烷層，其可使得顆粒疏水。其彈性和塑性變形性質將與商用的二氧化矽顆粒 (Daiso SP-120-ODS) 比較，商用的二氧化矽顆粒係具有與二氧化矽表面共價結合之 C_{18} 矽烷層的 10 微米球形多孔二氧化矽顆粒，其為來自 Daiso 有限公司的商品。每一種二氧化矽顆粒的彈性和塑性變形性質係依照「利用原子力顯微鏡以奈米尺度進行彈性模數量測之理論模式和實現」，*物理期刊：會議系列論文集* 61，第 1303-07 頁，2007 所述。對於塑性變形而言，AFM 是利用 Veeco 儀器公司的 Nanoman II SPM 系統，在施力為 $30\mu\text{N}$ 的情況下以鑽石頭探針來進行。硬度是由硬度 = 力 / 面積的公式來決定，其中面積是指探針所形成凹痕的大小的面積。對於彈性變形而言，AFM 是利用 Veeco 儀器公司的 Nanoman II SPM 系統，在施力為 $3.297\mu\text{N}$ 的情況下以鑽石頭探針來進行。楊氏模數是依照 Oliver 和 Pharr 在「利用負載和位移感測凹痕實驗來決定硬度和彈性模數之改良技術」，*材料研究期刊*，第 7 冊，第 1564-83 頁，1992 中所述之分析方法來決定。由表 1 中可看出，本發明之二氧化矽顆粒的塑性變形遠高於傳統或商用的二氧化矽，並且本發明之二氧化矽顆

粒的彈性變形遠低於傳統的二氧化矽。

表 1

變形	本發明之二氧化矽顆粒	Daiso 二氧化矽顆粒
塑性	420 MPa	78 MPa
彈性	0.539 GPa	4.7 GPa

實施例 5

二氧化矽顆粒填充於層析管柱

在這個實施例中，於層析管柱中測試包含 10 微米球形多孔顆粒之本發明二氧化矽顆粒，以決定介質的填充效率。此二氧化矽經過表面處理，可產生與二氧化矽表面共價結合的 C₁₈ 矽烷層，其可使得顆粒疏水。這種介質的胜肽解析度將與其它介質相比較，包括 Kromasil®，具有與二氧化矽表面共價結合之 C₁₈ 矽烷層的 10 微米球形多孔二氧化矽顆粒，其為來自 Akzo Nobel AB 的商品；以及 Daiso SP-120-ODS，具有與二氧化矽表面共價結合之 C₁₈ 矽烷層的 10 微米球形多孔二氧化矽顆粒，其為來自 Daiso 有限公司的商品。將介質填充至 Alltech Associates 公司所販售 25 mm x 400 mm 的 Spring™ 管柱中。每 60 克介質使用 150 毫升的異丙醇，在 1500 psi 的壓力下將介質填充至管柱中。最終的管柱床長度為 250 mm。由第 3 圖可看出，在填充之後所產生小顆粒(或細屑)的數目遠比傳統二氧化矽所產生的要少。例如，在填充之後，本發明具有的細屑(粒徑小於 5 μm)數量比 Kromasil 少一半。

以逆相層析法做為分離技術來評估每一個管柱的效率。使用由 70 體積 % 乙腈和 30 體積 % 水所構成的移動相，在

等位 (isocratic) 條件下將苯、萘和聯苯之混合物注入每一個管柱中。流速為 10 毫升／分鐘。管柱係在室溫 25℃ 下運作。使用超級預備流動槽和 Rainin 偵測器 (取自 Varian Inc.) 在 254 nm 下進行偵測。在進行分析時，還同時使用了 Varian SD-1 製備泵 (取自 Varian Inc.)、Valco 預備手動注射器 (取自 Valco 儀器公司) 和 EZ Chrom™ (取自 Scientific 軟體公司)。

結果顯示於第 5 圖中，其說明了使用本發明之二氧化矽顆粒可得到優於傳統介質之管柱效率。

實施例 6

以二氧化矽顆粒做為層析介質之用途

在這個實施例中，於層析管柱中測試包含 5 微米球形多孔顆粒之本發明二氧化矽顆粒，以決定其分離各種不同生物物質 (例如胜肽) 的能力。此二氧化矽經過表面處理，可產生與二氧化矽表面共價結合的 C₁₈ 矽烷層，其可使得顆粒疏水。這種介質的胜肽解析度將與其它介質相比較，其商品名稱為 Luna®，具有與二氧化矽表面共價結合之 C₁₈ 矽烷層的 5 微米球形多孔二氧化矽顆粒，其係取自 Phenomenex Inc. 的商品。

以逆相層析法做為每一個管柱的分離技術。將表 1 中所列的胜肽混合物 (GY (238 Da)、VYV (379 Da)、Met Enkephalin (YGGFM, 573 Da)、Angiotensin II (DRVYIHPF, 1045 Da) 和 Leu Enkephalin (YGGFL, 555 Da))，於下列條件下注入每一個管柱 (4.6 mm x 250 mm)：移動相包括由 0.1% v/v TFA 在水中所形成的溶劑 A；以及由 0.085% v/v TFA 在乙腈中所形成的溶劑 B。使用梯度方法，其中管柱在 10% 溶劑 B 和 90% 溶劑 A 的情況下平衡

30 分鐘；接著將溶劑 B 由 10% 提高至 40% (60% 的溶劑 A)；使溶劑 B 的流動維持在 40% 達 5 分鐘；接著將溶劑 B 由 40% 提高至 90% (10% 的溶劑 A)；並且使溶劑 B 的流動維持在 90% 達 5 分鐘。流速為 1.0 毫升 / 分鐘。管柱係在室溫 25℃ 下運作。使用 UVD 170S 偵測器 (取自 Dionex 公司, Sunnyvale, CA) 在 225 nm 下進行偵測。在進行分析時, 還同時使用了 Dionex HPLC 系統 (P580 HPG 高壓梯度, 取自 Dionex 公司的二元泵)、Rheodyne 手動注射器 (取自 IDEX 公司) 和 CHROMELEON® 資料系統 (取自 Dionex 公司)。結果顯示於第 6 圖和表 2 中, 其說明了使用本發明之二氧化矽顆粒可超越傳統介質, 對於每一個胜肽峰得到最佳的解析度。

表 2

胜肽峰	本發明介質 解析度*	Phenomenex Luna 介質 解析度*
1	42.0	35.7
2	32.2	28.3
3	6.0	2.3
4	7.4	11.3

* 解析度係以下一個鄰接的層析峰為基準。

實施例 7

以二氧化矽顆粒做為層析介質之用途

在這個實施例中, 於層析管柱中測試包含 5 微米球形多孔顆粒之本發明二氧化矽顆粒, 以決定其分離各種不同生物物質 (例如胜肽) 的能力。此二氧化矽經過表面處理, 可產生與二氧化矽表面共價結合的 C₁₈ 矽烷層, 其可使得

顆粒疏水。這種介質的胜肽解析度將與其它介質相比較，其商品名稱爲 Kromasil®，具有與二氧化矽表面共價結合之 C₁₈ 矽烷層的 5 微米球形多孔二氧化矽顆粒，其係取自 Akzo Nobel AB 公司的商品。

以逆相層析法做爲每一個管柱的分離技術。將胜肽混合物 (Ac-RGGGGLGLGK-醯胺 (911 Da)、RGAGGLGLGK-醯胺 (883 Da)、Ac-RGAGGLGLGK-醯胺 (926 Da)、Ac-RGVGGLGLGK-醯胺 (954 Da) 和 Ac-RGVVGLGLGK-醯胺 (996 Da))，於下列條件下注入每一個管柱 (4.6 mm x 250 mm)：移動相包括由 0.1% v/v TFA 在水中所形成的溶劑 A；以及由 0.085% v/v TFA 在乙腈中所形成的溶劑 B。使用梯度方法，其中管柱在 10% 溶劑 B 和 90% 溶劑 A 的情況下平衡 30 分鐘；接著將溶劑 B 由 10% 提高至 40% (60% 的溶劑 A)；使溶劑 B 的流動維持在 40% 達 5 分鐘；接著將溶劑 B 由 40% 提高至 90% (10% 的溶劑 A)；並且使溶劑 B 的流動維持在 90% 達 5 分鐘。流速爲 1.0 毫升／分鐘。管柱係在室溫 25℃ 下運作。使用 UVD 170S 偵測器 (取自 Dionex 公司，Sunnyvale, CA) 在 225 nm 下進行偵測。在進行分析時，還同時使用了 Dionex HPLC 系統 (P580 HPG 高壓梯度，取自 Dionex 公司的二元泵)、Rheodyne 手動注射器 (取自 IDEX 公司) 和 CHROMELEON® 資料系統 (取自 Dionex 公司)。結果顯示於第 7 圖中，其說明了使用本發明之二氧化矽顆粒可超越傳統介質，對於每一個胜肽峰得到更佳的解析度。

實施例 8

以二氧化矽顆粒做爲層析介質之用途

在這個實施例中，於層析管柱中測試包含 5 微米球形

多孔顆粒之本發明二氧化矽顆粒，以決定其由雜質中分離出標的生物物質(例如胜肽)的能力。此二氧化矽經過表面處理，可產生與二氧化矽表面共價結合的 C_{18} 矽烷層，其可使得顆粒疏水。這種介質的胜肽解析度將與其它介質相比較，其商品名稱爲 Kromasil®，具有與二氧化矽表面共價結合之 C_{18} 矽烷層的 5 微米球形多孔二氧化矽顆粒，其係取自 Akzo Nobel AB 公司的商品。

以逆相層析法做爲每一個管柱的分離技術。將取自 Bachem Inc. 的粗製合成胜肽和兩種雜質之混合物於下列條件下注入每一個管柱 (4.6 mm x 150 mm)：移動相包括由 0.1% v/v TFA 在水中所形成的溶劑 A；以及由 0.1% v/v TFA 在乙腈中所形成的溶劑 B。使用梯度方法，其中管柱在 15% 溶劑 B 和 85% 溶劑 A 的情況下平衡 30 分鐘；接著將溶劑 B 由 15% 提高至 50% (50% 的溶劑 A)；使溶劑 B 的流動維持在 50% 達 1 分鐘；接著將溶劑 B 由 50% 提高至 80% (20% 的溶劑 A)；並且使溶劑 B 的流動維持在 80% 達 5 分鐘。流速爲 0.8 毫升／分鐘。管柱係在室溫 22℃ 下運作。使用 UVD 170S 偵測器(取自 Dionex 公司，Sunnyvale, CA)在 220 nm 下進行偵測。在進行分析時，還同時使用了 Dionex HPLC 系統 (P580 HPG 高壓梯度，取自 Dionex 公司的二元泵)、Rheodyne 手動注射器(取自 IDEX 公司)和 CHROMELEON® 資料系統(取自 Dionex 公司)。結果顯示於第 8 圖和表 3 中，其說明了使用本發明之二氧化矽顆粒可超越傳統介質，可由緊密洗提之雜質得到最佳的胜肽峰解析度。

表 3

胜肽峰	本發明介質 解析度	Kromasil 介質 解析度
雜質 #1	0.84	0.73
雜質 #2	0.50	0.32

實施例 9以二氧化矽顆粒做為層析介質之用途

在這個實施例中，於層析管柱中測試包含 5 微米球形多孔顆粒之本發明二氧化矽顆粒，以決定其由雜質中分離出標的生物物質(例如胜肽)的能力。此二氧化矽經過表面處理，可產生與二氧化矽表面共價結合的 C₁₈ 矽烷層，其可使得顆粒疏水。這種介質的胜肽解析度將與其它介質相比較，其商品名稱爲 Jupiter®，具有與二氧化矽表面共價結合之 C₁₈ 矽烷層的 4 微米球形多孔二氧化矽顆粒，其係取自 Phenomenex Inc. 的商品。

以逆相層析法做為每一個管柱的分離技術。將取自 Biopeptide 有限公司的粗製合成胜肽混合物於下列條件下注入每一個管柱 (4.6 mm x 250 mm)：移動相包括由 0.1% v/v TFA 在水中所形成的溶劑 A；以及由 0.1% v/v TFA 在乙腈中所形成的溶劑 B。使用梯度方法，其中管柱在 20% 溶劑 B 和 80% 溶劑 A 的情況下平衡 20 分鐘；接著將溶劑 B 由 20% 提高至 40% (60% 的溶劑 A)。流速爲 1.0 毫升／分鐘。管柱係在室溫 25℃ 下運作。使用 UVD 170S 偵測器 (取自 Dionex 公司，Sunnyvale, CA) 在 220 nm 下進行偵測。在進行分析時，還同時使用了 Dionex HPLC 系統 (P580 HPG 高壓梯度，取自 Dionex 公司的二元泵)、Rheodyne 手動注射器 (取自 IDEX 公司) 和

CHROMELEON®資料系統(取自 Dionex 公司)。結果顯示於第 9 圖中，其說明了使用本發明之二氧化矽顆粒可超越傳統介質，可由緊密洗提之雜質得到更佳的胜肽峰解析度。

實施例 10

以二氧化矽顆粒做為層析介質之用途

在這個實施例中，於層析管柱中測試包含 5 微米球形多孔顆粒之本發明二氧化矽顆粒，以決定其由雜質中分離出標的生物物質(例如胜肽)的能力。此二氧化矽經過表面處理，可產生與二氧化矽表面共價結合的 C₁₈ 矽烷層，其可使得顆粒疏水。這種介質的胜肽解析度將與其它介質相比較，包括 Kromasil®，具有與二氧化矽表面共價結合之 C₁₈ 矽烷層的 5 微米球形多孔二氧化矽顆粒，其係取自 Akzo Nobel AB 公司的商品，和 Luna®，具有與二氧化矽表面共價結合之 C₁₈ 矽烷層的 5 微米球形多孔二氧化矽顆粒，其係取自 Phenomenex Inc. 的商品。

以逆相層析法做為每一個管柱的分離技術。將取自瑞典斯德哥爾摩 Karolinska 學院的血管活性腸胜肽(28-胺基酸胜肽，HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-醯胺，MW 3325.8)和兩種雜質之混合物於下列條件下注入每一個管柱(4.6 mm x 250 mm)：移動相包括由 0.1% v/v TFA 在水中所形成的溶劑 A；以及由 0.085% v/v TFA 在乙腈中所形成的溶劑 B。使用梯度方法，其中管柱在 20%溶劑 B 和 80%溶劑 A 的情況下平衡 30 分鐘；接著將溶劑 B 由 20%提高至 40%(60%的溶劑 A)；使溶劑 B 的流動維持在 40%達 5 分鐘；接著將溶劑 B 由 40%提高至 90%(10%的溶劑 A)；並且使溶劑 B 的流動維

持在 90% 達 5 分鐘。流速為 1.0 毫升 / 分鐘。管柱係在室溫 25℃ 下運作。使用 UVD 170S 偵測器 (取自 Dionex 公司, Sunnyvale, CA) 在 225 nm 下進行偵測。在進行分析時, 還同時使用了 Dionex HPLC 系統 (P580 HPG 高壓梯度, 取自 Dionex 公司的二元泵)、Rheodyne 手動注射器 (取自 IDEX 公司) 和 CHROMELEON® 資料系統 (取自 Dionex 公司)。結果顯示於第 10 圖和表 4 中, 其說明了使用本發明之二氧化矽顆粒可超越傳統介質, 可由緊密洗提之雜質得到更佳的胜肽峰解析度。

表 4

胜肽峰	本發明介質 解析度	Kromasil 介質 解析度	Phenomenex Luna 介 質 解析度
雜質 #1	1.71	1.59	1.48
雜質 #2	2.93	2.66	2.27

實施例 11

以二氧化矽顆粒做為層析介質之用途

在這個實施例中, 於層析管柱中測試包含 5 微米球形多孔顆粒之本發明二氧化矽顆粒, 以決定管柱胰島素的前期承載能力。此二氧化矽經過表面處理, 可產生與二氧化矽表面共價結合的 C₈ 矽烷層, 其可使得顆粒疏水。這種介質的胰島素承載能力將與其它介質相比較, 包括 Kromasil®, 具有與二氧化矽表面共價結合之 C₈ 矽烷層的 5 微米球形多孔二氧化矽顆粒, 其係取自 Akzo Nobel AB 公司的商品, 和 Hydrosphere, 具有與二氧化矽表面共價結合之 C₈ 矽烷層的 5 微米球形多孔二氧化矽顆粒, 其係取自 YMC 有限公司。

以逆相層析法做為每一個管柱 (2.1 mm x 50 mm) 的分離技術, 於下列條件下進行: 移動相包括由 0.1% v/v TFA

在水中所形成的溶劑 A；以及包含在 5 毫升乙腈中含有 250 毫克胰島素、2 毫升 50%冰醋酸和 43 毫升去離子水的溶劑 B。以含有 0.1% TFA 的去離子水將其以 1:5 的比例稀釋，而製成 1 毫克/毫升的胰島素溶液。使用梯度方法，其中管柱在 100%溶劑 A 的情況下平衡；接著將溶劑 B 由 0%提高至 100%達 1 分鐘；使溶劑 B 的流動維持在 100%達 200 分鐘；接著將溶劑 A 由 0%提高至 100%(0%的溶劑 B)達 1 分鐘。流速為 0.2 毫升/分鐘。管柱係在室溫 25℃ 下運作。使用 UVD 170S 偵測器(取自 Dionex公司，Sunnyvale, CA)在 276 nm 下進行偵測。在進行分析時，還同時使用了 Dionex HPLC系統(P580 HPG 高壓梯度，取自 Dionex公司的二元泵)、Rheodyne手動注射器(取自 IDEX公司)和 CHROMELEON®資料系統(取自 Dionex公司)。每一種材料的承載能力是以下列方程式來計算：

$$C_{\text{Capacity}} = \frac{[T_{(\text{at } 50\%)} - t_{0(\text{uracil})}] \times C_{\text{Insulin}} \times F}{V_{\text{Column}}}$$

$T_{(\text{at } 50\%)}$ = 在 50%峰高時所量得的前期貫穿時間減去 1 分鐘

C_{Insulin} = 1 毫克 / 毫升

V_{Column} = 0.173 毫升

$F(\text{流速})$ = 0.2 毫升 / 分鐘

$t_{0(\text{uracil})}$ 係來自尿嘧啶的注射，其中移動相 A 的速率為 0.2 毫升 / 分鐘。

結果顯示於第 11 圖，其說明了使用本發明之二氧化矽顆粒可超越傳統介質得到更佳的胰島素承載能力。舉例來說，使用本發明之二氧化矽的管柱之胰島素承載能力為 154

毫克／毫升，然而 Hydrosphere 和 Kromasil 介質所提供的胰島素承載能力分別為 133 毫克／毫升和 14 毫克／毫升，相當於回收率高了約 10 至約 1000%。

雖然本發明已藉由有限的數個具體實施例來加以描述，但這些特定的具體實施例並非用來限制本發明的範疇和本文的申請專利範圍。對於在此領域具有一般技術能力者而言，在審閱了本文的示範性具體實施例之後，當能清楚理解其它的修改和變動是可能的。除非特別提及，在實施例和本專利申請書的其它內容中所述的所有份數和百分比皆係以重量為基準。此外，在專利申請書和申請專利範圍中所列舉的任何數值範圍，例如代表性質、量測單位、條件、物理狀態或百分比的特別集合，係藉由參照而逐字明確納入本文，或者是在此範圍內的任何數值範圍，包括在任何列舉範圍內之數字子集。例如，每當揭露了一個數值範圍，其下限為 R_L 且上限為 R_U 時，任何在此範圍內的數字 R 也被特別揭露。尤其是，在範圍內的以下數字 R 被特別揭露： $R = R_L + k(R_U - R_L)$ ，其中 k 為在 1% 至 100% 範圍內的變數，其增加量為 1%，例如 k 為 1%，2%，3%，4%，5%，... 50%，51%，52%，... 95%，96%，97%，98%，99% 或 100%。此外，依上述計算方式而得之任何兩個 R 的數字所代表的數值範圍也被特別地揭露。除了本文中已顯示和描述的之外，在此領域具有一般技術能力者可由前面的敘述內容和所附圖示清楚了解本發明的任何修改。此類修改仍應視為在所附申請專利範圍的範疇內。

【圖式簡單說明】

第 1 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒的放大圖

；

第 2A 圖係描繪具有類步階 (step-like) 性質梯度之本發明示範性二氧化矽顆粒的截面圖；

第 2B 圖係描繪具有實質上連續性質梯度之本發明示範性二氧化矽顆粒的截面圖；

第 3 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒在填充於 HPLC 管柱之前和之後的粒徑大小分析；

第 4 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒在填充於 HPLC 管柱之後的掃描式電子顯微鏡 (SEM) 影像；

第 5 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒之管柱填充效率的比較；

第 6 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒相比之胜肽選擇率的層析圖；

第 7 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒相比之純合成胜肽選擇率的層析圖；

第 8 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒相比之粗製合成胜肽選擇率的層析圖；

第 9 圖係描繪使用本發明之示範性二氧化矽顆粒和傳統的二氧化矽顆粒所得之粗製 20-AA 合成胜肽之層析圖；

第 10 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的二氧化矽顆粒相比之血管活性腸胜肽 (VIP) 選擇率的層析圖；

第 11 圖係描繪本發明之示範性二氧化矽顆粒與傳統的

二氧化矽顆粒相比之胰島素承載能力。

【主要元件符號說明】

10	示範的二氧化矽顆粒
11	外表面
12	內部
13	內部區域
14	表面區域

五、中文發明摘要：

本發明係揭露二氧化矽顆粒和含有二氧化矽顆粒之組成物。同時也揭露二氧化矽顆粒的製造方法和二氧化矽顆粒的使用方法。

六、英文發明摘要：

Silica particles and compositions containing silica particles are disclosed. Methods of making silica particles and methods of using silica particles are also disclosed.

十、申請專利範圍：

1. 一種多孔二氧化矽顆粒，其包含(i)具有第一彈性模數的內側部分，和(ii)具有第二彈性模數的顆粒外表面部分，其中第一彈性模數大於第二彈性模數。
2. 如申請專利範圍第 1 項之多孔二氧化矽顆粒，其中顆粒具有彈性模數梯度，其最大彈性模數係在顆粒的內部並且最小彈性模數係鄰近顆粒的外表面或在顆粒的外表面上。
3. 如申請專利範圍第 1 項之多孔二氧化矽顆粒，其中顆粒在顆粒內部具有第一孔隙密度，並且在鄰近顆粒的外表面或在顆粒的外表面上具有第二孔隙密度，第二孔隙密度大於第一孔隙密度。
4. 如申請專利範圍第 1 項之多孔二氧化矽顆粒，其中顆粒實質上為球形。
5. 如申請專利範圍第 1 項之多孔二氧化矽顆粒，其中顆粒具有的平均最大粒徑小於約 $100\text{ }\mu\text{m}$ ，孔隙體積為約 0.40 cc/g 至約 1.4 cc/g ，平均孔隙直徑為約 $40\text{ }\text{\AA}$ 至約 $700\text{ }\text{\AA}$ ，並且表面積為約 $200\text{ m}^2/\text{g}$ 至約 $450\text{ m}^2/\text{g}$ 。
6. 如申請專利範圍第 1 項之多孔二氧化矽顆粒，其中顆粒具有的平均最大粒徑為約 3 至約 $20\text{ }\mu\text{m}$ ，孔隙體積為約 0.75 cc/g 至約 1.1 cc/g ，平均孔隙直徑為約 $90\text{ }\text{\AA}$ 至約 $150\text{ }\text{\AA}$ ，並且表面積為約 $260\text{ m}^2/\text{g}$ 至約 $370\text{ m}^2/\text{g}$ 。
7. 如申請專利範圍第 6 項之多孔二氧化矽顆粒，其中顆粒具有的孔隙體積為約 0.95 cc/g ，並且表面積為約 $320\text{ m}^2/\text{g}$ 。

- 8.如申請專利範圍第 1 項之多孔二氧化矽顆粒，其中顆粒具有的平均最大粒徑為約 3 至約 20 μm 。
- 9.一種複數二氧化矽顆粒，其包含至少一種如申請專利範圍第 1 項之多孔二氧化矽顆粒。
- 10.一種用於層析管柱之介質，其包含至少一種如申請專利範圍第 1 項之多孔二氧化矽顆粒。
- 11.一種結合至少一種如申請專利範圍第 1 項之多孔二氧化矽顆粒的層析管柱。
- 12.如申請專利範圍第 11 項之層析管柱，其中該至少一種多孔二氧化矽顆粒係置放於管柱之中。
- 13.一種使用層析管柱之方法，該方法包括步驟：
處理流過如申請專利範圍第 12 項之層析管柱的流體。
。
- 14.一種製造二氧化矽顆粒之方法，該方法包括步驟：
部分水解有機矽酸鹽，以形成部分水解物質；
將部分水解物質予以蒸餾，以去除任何乙醇及形成蒸餾的部分水解物質；
在極性的連續相中將蒸餾的部分水解物質予以乳化，而在極性的連續相中形成部分水解之矽酸鹽的小液滴；
經由與氫氧化銨的縮合反應來膠凝小液滴，以形成球形多孔顆粒；
沖洗球形多孔顆粒；
將球形多孔顆粒予以水熱老化；以及
將球形多孔顆粒加以乾燥，以形成乾燥的多孔顆粒

- 。
- 15.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中再進一步包括將具有第一粒徑的二氧化矽顆粒由不具有第一粒徑的二氧化矽顆粒中分離出來。
 - 16.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中第一粒徑大小介於約 3 μm 至約 20 μm 之範圍。
 - 17.一種製造層析管柱之方法，該方法包括步驟：
將至少一種以申請專利範圍第 14 項之方法所形成的二氧化矽顆粒置入層析管柱中。
 - 18.一種使用層析管柱之方法，該方法包括步驟：
處理流過含有至少一種以申請專利範圍第 14 項之方法所形成之二氧化矽顆粒的層析管柱的流體。
 - 19.如申請專利範圍第 18 項之方法，其中流體含有胜肽。
 - 20.一種依申請專利範圍第 14 項之方法所形成之二氧化矽顆粒。
 - 21.一種多孔二氧化矽顆粒，其包含至少約 100 MPa 的塑性變形。
 - 22.如申請專利範圍第 21 項之多孔二氧化矽顆粒，其中該塑性變形至少為約 200 MPa。
 - 23.如申請專利範圍第 21 項之多孔二氧化矽顆粒，其中該塑性變形至少為約 300 MPa。
 - 24.如申請專利範圍第 21 項之多孔二氧化矽顆粒，其中該塑性變形至少為約 400 MPa。
 - 25.一種多孔二氧化矽顆粒，其包含小於 4 GPa 的表面彈性變形。

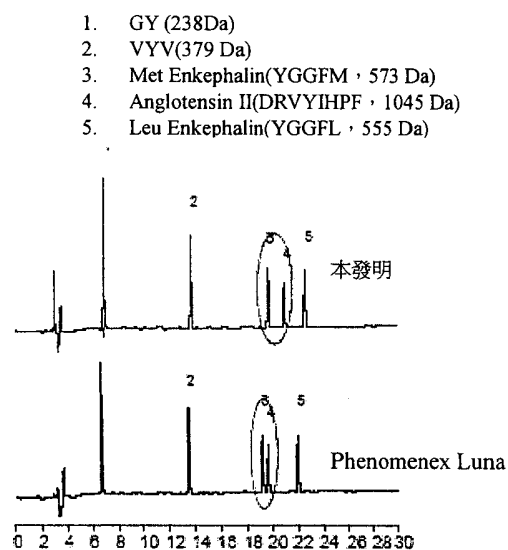
26.如申請專利範圍第 25 項之多孔二氧化矽顆粒，其中該彈性變形為小於約 3 GPa。

27.如申請專利範圍第 25 項之多孔二氧化矽顆粒，其中該彈性變形為小於約 2 GPa。

28.如申請專利範圍第 25 項之多孔二氧化矽顆粒，其中該彈性變形為小於約 1 GPa。

29.一種多孔二氧化矽顆粒，其包含至少約 100 MPa 的塑性變形和小於 4 GPa 的彈性變形。

胜肽選擇率 胜肽標準混合物



管柱: All C18 5 μ m 4.6x250mm
移動相 A: 在水中含 0.1%之 TFA
移動相 B: 在乙腈含 0.085%之 TFA
梯度(分鐘, %B): (0,10), (30,40), (35,90), (40,90)
流速: 1.0mL/min
偵測器: UV 在 225nm
管柱溫度: 25°C

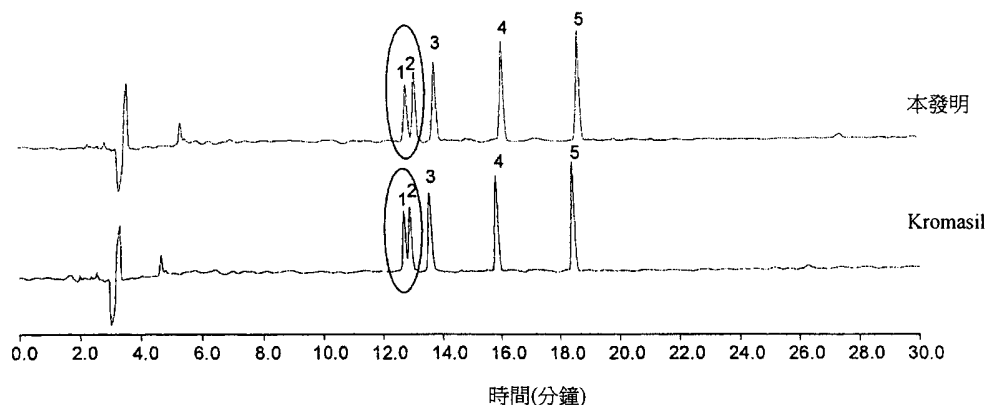
胜肽峰	解析度(USP)*	
	本發明	Luna
1	42.0	35.7
2	32.2	28.3
3	6.0	2.3
4	7.4	11.3

* 解析度係以下一個鄰接的層析峰為基準

第 6 圖

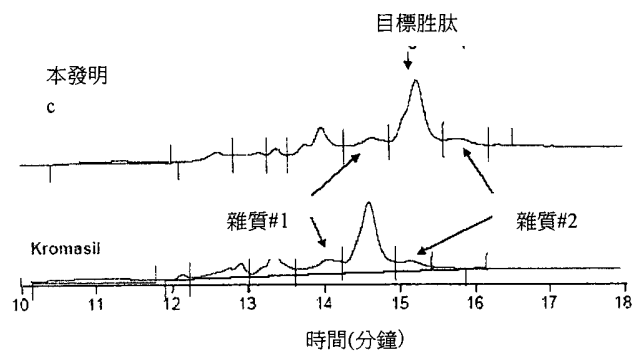
1. Ac-RGGGGLGLGK-醯胺(911 Da)
2. RGAGGLGLGK-醯胺(883 Da)
3. Ac-RGAGGLGLGK-醯胺 (926 Da)
4. Ac-RGVGGLGLGK-醯胺(954 Da)
5. Ac-RGVVGLGLGK-醯胺 (996 Da))

管柱: All C18 5 μ m 4.6x250mm
HPLC 系統: 低壓低度, 四元泵
移動相 A: 在水中含 0.1%之 TFA
移動相 B: 在乙腈含 0.085%之 TFA
梯度(分鐘, %B): (0,10), (30,40), (35,90), (40,90)
流速: 1.0mL/min
偵測器: UV 在 225nm
管柱溫度: 25°C



第 7 圖

粗製的合成胜肽

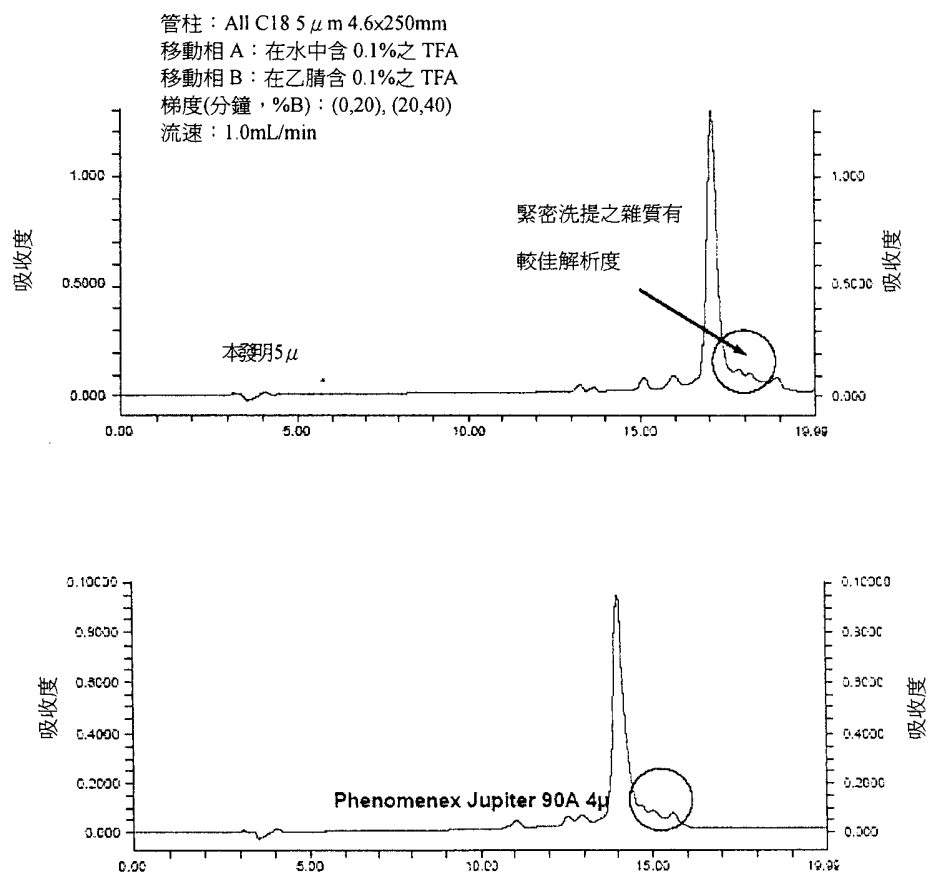


管柱：All C18 5 μ m 4.6×150mm
移動相 A：在水中含 0.1%之 TFA
移動相 B：在乙腈含 0.1%之 TFA
梯度(分鐘，%B)：(0,15), (30,50), (31,80), (36,80)
流速：0.8mL/min
偵測器：UV 在 220nm
管柱溫度：22°C

胜肽峰	解析度	
	本發明	Kromasil
雜 質 # 1	0.84	0.73
雜 質 # 2	0.50	0.32

第 8 圖

來自 Biopeptide 有限公司的粗製 20-AA 合成胜肽

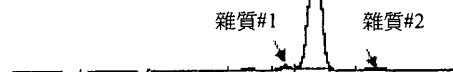


第 9 圖

血管活性腸胜肽

本發明

峰高=441.9 mAU
峰寬(50%)=0.16 min
峰面積=82.3 mAU *min



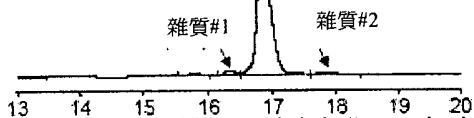
Phenomenex

峰高=309.9 mAU
峰寬(50%)=0.25min
峰面積=81.9 mAU *min



Kromasil

峰高=351.7 mAU
峰寬(50%)=0.22 min
峰面積=84.7 mAU *min



血管活性腸胜肽(VIP)

28-胺基酸胜肽

連續：HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNLSILN-醯

胺，MW 3325.8

pI=9.8(以胜肽為基質)

管柱：All C18 5 μ m 4.6x250mm

移動相 A：在水中含 0.1%之 TFA

移動相 B：在乙腈含 0.085%之 TFA

梯度(分鐘，%B)：(0,20), (30,40), (35,90), (40,90)

流速：1.0mL/min

偵測器：UV 在 225nm

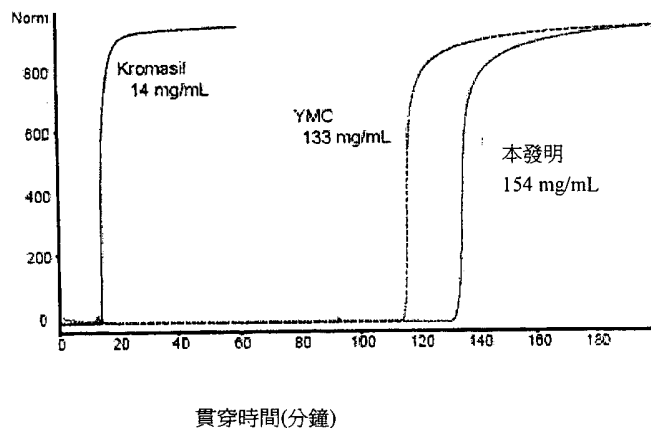
胜肽峰	解析度(USP)		
	本發明	Phenomenex Luna	Kromasil
雜質 # 1	1.71	1.48	1.59
雜質 # 2	2.93	2.27	2.66

樣品慣例上取自瑞典斯德哥爾摩
Karolinska 學院

在 GraceAlpha™ 管柱上，VIP 胜肽可由雜質得到較佳的解析

第 10 圖

具有 0.1% TFA 之 C8 管柱的胰島素前期承載能力



在本發明的 C8 管柱上，胰島
素承載能力提高了 16 至
1000%的回收率

第 11 圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：