

HPLC 级二氧化硅微球的制备及其功能化

包建民, 王惠柳, 李优鑫*

(天津大学 药物科学与技术学院, 天津市现代药物传递及功能高效化重点实验室, 天津化学化工协同创新中心, 天津 300072)

摘要: 采用酸-碱催化的溶胶-凝胶法制备二氧化硅微球, 系统探索了水用量、乙醇用量、旋蒸温度、搅拌速度和致孔剂种类对二氧化硅微球形态和粒径分布的影响。将制得的二氧化硅微球经简单沉降筛分及功能化后, 获得了 C18 键合硅胶、亲水 C18 键合硅胶、氨丙基键合硅胶、乙二胺-*N*-丙基键合硅胶 4 种键合硅胶。结果表明: 最佳的二氧化硅微球制备条件为, $n(\text{H}_2\text{O}) : n[\text{正硅酸四乙酯}(\text{TEOS})] = 6 : 4$, $V(\text{EtOH}) : V(\text{TEOS}) = 3 : 5$, 旋蒸温度为 57 °C, 搅拌速度为 2190 r/min, 致孔剂为 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)。所制二氧化硅微球球形度好、粒径分布为 3~10 μm 、比表面积为 464.11 m^2/g 、孔体积为 1.14 m^3/g 、平均孔径为 9.81 nm, 且孔径分布窄、硅羟基含量高达 0.5450 mmol/g。C18 键合硅胶和亲水 C18 键合硅胶的柱效分别为 53474/m 和 86984/m (以甲苯计), 且对分析物的分离良好。氨丙基键合硅胶和乙二胺-*N*-丙基键合硅胶的离子交换容量分别为 1.44 和 1.22 mmol/g, 对甲苯磺酸吸附量分别为 240.8 和 217.6 mg/g。

关键词: 溶胶-凝胶法; 二氧化硅微球; C18 键合硅胶; 亲水 C18 键合硅胶; 氨丙基键合硅胶; 乙二胺-*N*-丙基键合硅胶

中图分类号: TB34 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2018)09-1457-09

Preparation and Functionalization of HPLC Grade Silica Microspheres

BAO Jian-min, WANG Hui-liu, LI You-xin*

(Collaborative Innovation Center of Tianjin Chemical Engineering, Tianjin Key Laboratory for Modern Drug Delivery & High-Efficiency, School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Porous silica microspheres were prepared via an acid-basic catalytic sol-gel method. The effects of water amount, ethanol amount, rotary evaporation temperature, stirring speed and porogen species on the morphology and particle size distribution of silica microspheres were investigated. After simple sedimentation and sorting, the silica spheres were functionalized and four packings were obtained, including C18 bonded silica gel, hydrophilic C18 bonded silica gel, aminopropyl bonded silica gel and ethylenediamine-*N*-propyl bonded silica gel. Results showed that the optimal conditions for the preparation of silica microspheres were as follows: $n(\text{H}_2\text{O}) : n[\text{tetraethyl orthosilicate}(\text{TEOS})] = 6 : 4$, $V(\text{EtOH}) : V(\text{TEOS}) = 3 : 5$, rotary evaporation temperature of 57 °C, stirring speed of 2190 r/min, and *N,N*-dimethylformamide(DMF) as porogen. The obtained silica microspheres were mostly regular-ball and had a narrow pore size distribution with an average pore size of 9.81 nm, the specific surface area was 464.11 m^2/g , and the pore volume was 1.14 m^3/g . The concentration of Si-OH groups was up to 0.5450 mmol/g. The column efficiency of C18 bonded silica gel and hydrophilic C18 bonded silica gel were 53474/m and 86984/m (toluene), respectively. Moreover, these two microspheres had good separation effects for analytes. The ion exchange capacity of aminopropyl bonded silica gel and ethylenediamine-*N*-propyl bonded silica gel were 1.44 and 1.22 mmol/g, respectively. Their absorption capacity to *p*-toluenesulfonic acid was up to 240.8 and 217.6 mg/g.

收稿日期: 2017-06-24; 定用日期: 2017-11-13; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170514

基金项目: 国家自然科学基金(21375093, 21605112); 天津市应用基础与前沿技术研究计划青年项目(15JCQNJC43200)

作者简介: 包建民(1961—), 男, 教授, 博士生导师, 电话: 022-27892820, E-mail: bao@tju.edu.cn。联系人: 李优鑫(1981—), 女, 博士, 副教授, 电话: 022-27892820, E-mail: lyx@tju.edu.cn。

Key words: sol-gel method; silica microspheres; C18 bonded silica gel; hydrophilic C18 bonded silica gel; aminopropyl bonded silica gel; ethylenediamine-*N*-propyl bonded silica gel

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21375093,21605112); Youth Foundation of Application Base and Frontier Technology of Tianjin (15JCQNJC43200)

高效液相色谱 (HPLC) 被广泛用于生物、化工、制药、食品分析、环境保护等领域, 其分离分析的核心为色谱填料^[1-2]。目前, 常用的色谱填料基质包括聚合物微球^[3]和二氧化硅微球。聚合物微球 pH 使用范围广, 但其易溶胀和机械强度差等缺点制约了其应用发展。二氧化硅微球具有机械强度高、比表面积大和表面易于修饰等优点, 因此成为应用最广泛的色谱填料基质。

目前, 高性能的二氧化硅微球大多依赖进口, 价格昂贵, 且其制备技术多为商业机密。因此, 开发简单、经济的 HPLC 级二氧化硅微球成为研究热点^[4]。目前, 主要制备方法包括喷雾干燥法^[5]、聚合诱导胶体团聚法 (PICA)^[6]和溶胶-凝胶法^[7]。喷雾干燥法制备的二氧化硅微球机械强度和球形度均较差, 且需要昂贵的设备; PICA 法制备的二氧化硅微球含有较高的金属杂质, 且原料利用率低; 溶胶-凝胶法制备的二氧化硅微球具有机械强度高、球形度好和金属含量低等优点。

溶胶-凝胶法是制备二氧化硅微球的经典方法, 一般采用正硅酸乙酯为硅源^[8]。TEOS 水解制备二氧化硅微球起源于 1968 年的 Stöber 法^[9], 之后的研究者们纷纷对此方法进行改进。田超^[10]等采用滴加 TEOS 的方式制备了粒径为 2.5 μm 的二氧化硅微球; 夏红军^[11]等采用电解质增加粒径的方法制备了粒径为 1~5 μm 的二氧化硅微球; Anderson^[12]等采用逐渐发展的种子生产法制备了微米级二氧化硅微球。但这些方法制备的二氧化硅微球完全无孔, 只能用作特殊用途。

为了制备出多孔微米级二氧化硅微球, 本文对酸-碱催化的溶胶-凝胶法进行了工艺优化和改进, 制备了具有合适粒径和孔结构的二氧化硅微球, 经过简单的沉降筛分成功制备了 4 种色谱填料, 它们可用做 HPLC 基质填料。本文的制备方法解决了其他方法中存在的旋蒸时间长^[7]或需要额外的碱热扩孔等步骤^[13], 节约了成本, 简化了工艺, 为微米级多孔硅胶的制备提供了一种新方法。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

正硅酸乙酯 (TEOS), AR, 天津科密欧化学试

剂有限公司; 乙腈 (ACN), 色谱纯, 天津康巢生物医药有限公司; 十八烷基三氯硅烷, AR, 萨恩化学技术 (上海) 有限公司; 1-十八烷基硫醇、对羟基苯甲酸丙酯、 γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷 (γ -GPTMS)、三乙胺, AR, 摩贝 (上海) 生物科技有限公司; 氨丙基三乙氧基硅烷, AR, 武大有机硅新材料有限公司; 乙二胺-*N*-丙基三甲氧基硅烷, AR, 湖北德邦化工有限公司; 对羟基苯甲酸甲酯, AR, 凯玛特 (天津) 化工科技有限公司; 对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯, AR, 天津市博迪化工有限公司; 对羟基苯甲酸, AR, 上海笛柏化学品技术有限公司; *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、浓盐酸、无水乙醇、异丙醇、氨水、甲苯、甲醇、二氯甲烷、丙酮、乙醇、苯甲酸、聚乙二醇 200 (PEG200)、聚乙二醇 400 (PEG400)、对甲苯磺酸、氢氧化钠、邻苯二甲酸氢钾 (KHP) 和酚酞, AR, 天津江天化工有限公司; 不定型硅胶, 山东辛化硅胶。

TS2-60 保定兰格注射泵, 保定兰格恒流泵有限公司; SX2 系列箱式电阻炉, 宜兴市前锦炉业设备有限公司; JK-PAUC-900DE 超声波清洗器, 上海精学科学仪器有限公司; Eclipse 80i 生物显微镜, 日本 Nikon 公司; CSW-PH50U 生物显微镜, 深圳市科视威光学仪器有限公司; Agilent 1260 HPLC 仪, 美国 Agilent 科技有限公司; LC-3000 HPLC 仪, 北京创新通恒科技有限公司; Micromeritics Tristar II 3020 比表面积和孔径分析仪, 北京冠远科技有限公司; Bruker Tensor 27 型红外光谱仪, 德国 Bruker 公司。

1.2 二氧化硅微球的制备

向三口瓶中加入 25 mL TEOS (密度为 0.933 g/mL), 15 mL 无水乙醇, 搅拌均匀后, 采用注射泵以 0.5 mL/min 的速度滴加 0.1 mol/L 的 3 mL 盐酸水溶液, 滴加时间为 6 min, 滴加结束后反应 30 min 使 TEOS 发生部分水解缩聚成低聚物。停止搅拌, 将反应液倒入旋蒸瓶中, 在 57 °C 下, 旋蒸 30 min 得到黏稠液体聚硅酸乙酯 (PES)。

称取 1 g PES, 加入 63.29 μL DMF, 混匀后快速倒入含有 2.7 mL 蒸馏水和 1.5 mL 异丙醇的三口瓶中, 高速乳化 5 min 形成 O/W 型乳状液, 采用注射泵以 0.5 mL/min 的速度滴加 0.1 mL 氨水, 滴加结

束后, 在 2190 r/min 下, 搅拌 2 min 后停止反应。将反应产物静置, 老化, 洗涤和干燥, 600 °C 下煅烧 6.5 h, 得到二氧化硅微球。

1.3 二氧化硅微球的表征

用显微镜观察二氧化硅微球形态和粒径分布; 用比表面积和孔径分析仪表征二氧化硅微球的比表面积和孔结构; 用滴定法测定二氧化硅微球表面的硅羟基含量^[14]; 用红外光谱法 (IR) 表征二氧化硅微球的结构。

1.4 功能化色谱填料的制备及表征

1.4.1 C18 键合硅胶的制备

将 5.0007 g 自制二氧化硅微球加入三口瓶中, 倒入 25 mL 质量分数为 18% 的盐酸水溶液, 60 °C 下搅拌回流 6 h, 用蒸馏水洗至中性, 60 °C 下真空干燥过夜, 得到酸化二氧化硅微球。

准确称取酸化二氧化硅微球 4.0013 g 于三口瓶中, 于 130 °C 下真空活化 3 h, 降温, 待降至 50 °C 时, 加入 20 mL 重蒸甲苯。N₂ 保护下, 边加热边搅拌, 待回流后, 加入 2.7 mL 十八烷基三氯硅烷, 反应 2 min 后, 加入 1.4112 g 咪唑, 搅拌回流反应 3 h 后, 依次用甲苯、甲醇、二氯甲烷和丙酮各洗涤 2 次, 60 °C 下真空干燥过夜, 过 325 目筛, 得到 C18 键合硅胶, 备用。

1.4.2 亲水 C18 键合硅胶的制备

准确称取酸化二氧化硅微球 5.0004 g 于三口瓶中, 于 130 °C 下真空活化 3 h, 降温, 待降至 50 °C 时, 加入 83 mL 重蒸甲苯。N₂ 保护下, 边加热边搅拌, 待回流后, 加入 4.2 g 1-十八烷基硫醇、5 mL γ -GPTMS 和 12 mL 甲苯, 反应 2 min 后, 加入 1.2 g 三乙胺, 反应 4 h 后, 依次用甲苯和甲醇洗涤产物, 60 °C 下干燥过夜。将干燥产物置于 100 mL 三口瓶中, 加入 50 mL pH=3.00 的盐酸水溶液, 60 °C 下反应 10 h, 用去离子水洗至中性, 60 °C 下真空干燥过夜, 过筛, 得到亲水 C18 键合硅胶, 备用。

1.4.3 弱阴离子交换色谱填料 (WAX) 的制备

1.4.3.1 氨丙基键合硅胶的制备

精密称取酸化二氧化硅微球 3.0017 g 于三口瓶中, 于 130 °C 下真空活化 3 h, 降温, 待降至 50 °C 时, 加入 30 mL 重蒸环己烷。N₂ 保护下, 边加热边搅拌, 待回流后, 加入 4.2 mL 氨丙基三乙氧基硅烷, 反应 24 h 后, 用环己烷洗涤 4 次, 60 °C 下真空干燥过夜, 得到氨丙基键合硅胶, 备用。

1.4.3.2 乙二胺-N-丙基键合硅胶的制备

精密称取酸化二氧化硅微球 8.0021 g 于三口瓶中, 于 130 °C 下真空活化 3 h, 降温, 待降至 50 °C

时, 加入 40 mL 重蒸甲苯。N₂ 保护下, 边加热边搅拌, 待回流后, 加入 12.3 mL 乙二胺-N-丙基三甲氧基硅烷, 反应 24 h 后, 用甲苯和甲醇洗涤, 60 °C 下真空干燥过夜, 得到乙二胺-N-丙基键合硅胶, 备用。

1.4.4 色谱填料的表征

1.4.4.1 红外光谱分析

取少量填料以溴化钾压片法进行 IR 分析。

1.4.4.2 C18 键合硅胶表面性质测试

(1) 疏水性测试: 取约 0.5 g C18 键合硅胶于烧杯中, 一次性加入 100 mL 去离子水, 填料会完全漂浮于水面上, 将烧杯放入超声波清洗器中, 在不断搅拌下慢慢加入甲醇, 直至填料完全悬浮在溶液中, 记录甲醇的用量, 若甲醇的体积分数 > 50%, 则填料合格。

(2) 残余硅羟基含量测定: 同 1.3 节中硅羟基的测定方法, 加入 NaCl 溶液的同时需加入 3 mL 异丙醇。

(3) 填料吸附量测定: 准确称取 50 mg C18 键合硅胶于离心管中, 加入 25 mL 质量浓度为 1 g/L 的对羟基苯甲酸丙酯水溶液和 5 mL 甲醇, 充分混匀后于摇床中摇晃 12 h, 使其达到吸附平衡, 用 HPLC 法测定吸附前、后溶液中对羟基苯甲酸丙酯的浓度, 用标准曲线法定量, 计算填料的吸附量。制作标准曲线时选择 5 个质量浓度进行 HPLC 分析, 分别为 0.04、0.06、0.08、0.10 和 0.12 g/L, 记录不同质量浓度下的峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。标准曲线为 $y=910319x+845859$ ($R^2=0.9996$)。

1.4.4.3 反相色谱填料 C18 键合硅胶和亲水 C18 键合硅胶的 HPLC 测试

采用高压匀浆技术装柱。(1) 两种填料柱效测试的色谱条件如下。安捷伦 1260 液相色谱仪; 流动相: ACN/水 (60:40, V/V); 评价柱效的标准物为尿嘧啶、苯乙酮、苯和甲苯的混合溶液 (质量浓度均为 0.02 g/L)。(2) 对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸丙酯是食品和化妆品中常用的防腐剂, 本文采用梯度洗脱法对其进行快速分离。3 种混合物的色谱分离条件如下。LC-3000 液相色谱仪; 色谱柱: C18 键合硅胶 (3~8 μ m, 25 cm \times 4.6 mm I.D. I.D 为内直径); 梯度洗脱条件: 0.00~7.00 min, 体积分数 45% ACN; 7.01~15.00 min, 体积分数 60% ACN。(3) 对羟基苯甲酸和苯甲酸为两种模型物质, 其色谱分离条件如下。LC-3000 液相色谱仪; 色谱柱: 亲水 C18 键合硅胶 (3~7 μ m, 25 cm \times 4.6 mm I.D.); 流动相: ACN/pH 2.70 PBS 缓

冲液 (体积比分别为 40 : 60、50 : 50 或 60 : 40)。

所有测试流动相流速: 1 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量: 5 μ L。

1.4.4.4 WAX 离子交换容量的测定

返滴定法: 分别称取约 0.1 g 填料于锥形瓶中, 加入 60 mL 0.01 mol/L 的 HCl 水溶液, 超声 10 min, 静置 1~2 h, 使填料上的氨基和溶液中的 H^+ 充分反应, 用移液管移取上清液 15 mL 于锥形瓶中, 加入 1~2 滴酚酞指示剂, 用经过 KHP 标定过的 0.01 mol/L NaOH 标准溶液滴定剩余的 HCl, 滴定终点时, 记录消耗 NaOH 水溶液的体积, 同时做空白, 通过计算可以得到离子交换容量。平行 3 次取平均值。

1.4.4.5 WAX 对对甲苯磺酸吸附量的测定

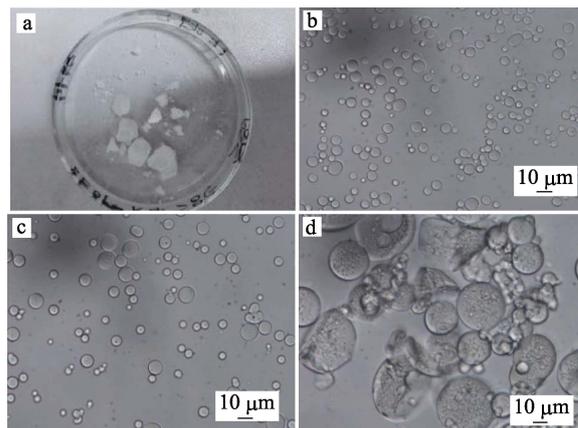
准确称取 15 mL 填料于 50 mL 离心管中, 准确加入 20 mL 质量浓度为 1 g/L 的对甲苯磺酸水溶液, 充分混匀后于摇床中摇晃 12 h, 使其达到吸附平衡。用 HPLC 法测定吸附前、后溶液中对甲苯磺酸的质量浓度, 用标准曲线法定量计算吸附量。绘制标准曲线时选择 5 个质量浓度进行 HPLC 分析, 分别为 0.04、0.06、0.08、0.10 和 0.12 g/L, 记录不同质量浓度下的峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 标准曲线为 $y=16246515x-78675.8$ ($R^2=0.9978$)

2 结果与讨论

2.1 二氧化硅微球的制备工艺优化

2.1.1 水用量对 SiO_2 微球粒径及粒径分布的影响

水用量对二氧化硅微球粒径及粒径分布的影响见图 1, 实验方法同 1.2 节。由图 1 可知, 随着水用量的增加, 二氧化硅微球粒径增大, 且粒径分布范围明显变宽。水用量不足时, 即 $n(H_2O) : n(TEOS)=5 : 4$ 时 (图 1a), 生成的产物呈凝胶状, 干燥后得到硬块状物。随着水用量的增加, TEOS 水解缩聚的程度增加, 生成的中间产物 PES 相对分子质量变大, 最终得到的二氧化硅微球粒径变大, 如图 1b 和 c 所示。当 $n(H_2O) : n(TEOS)=6 : 4$ 时, 硅球粒径为 3~10 μ m; 当 $n(H_2O) : n(TEOS)=7 : 4$ 时, 二氧化硅微球粒径为 3~15 μ m。但当水用量过大时 (图 1d), 即 $n(H_2O) : n(TEOS)=8 : 4$ 时, PES 黏稠度大, 所得的二氧化硅微球严重粘连, 硅球粒径为 5~40 μ m。通过控制 TEOS 的水解缩聚程度, 可以得到一定相对分子质量 PES, 从而控制二氧化硅微球的粒径大小, 这与 Brinker^[15] 等采用 ^{18}O 同位素示踪解释 TEOS 水解机理一致。所以, 本文选 $n(H_2O) : n(TEOS)=6 : 4$ 进行后续实验。

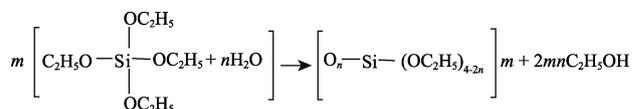


a— $n(H_2O) : n(TEOS)=5 : 4$; b— $n(H_2O) : n(TEOS)=6 : 4$; c— $n(H_2O) : n(TEOS)=7 : 4$; d— $n(H_2O) : n(TEOS)=8 : 4$

图 1 不同 $n(H_2O) : n(TEOS)$ 得到的二氧化硅微球显微图
Fig. 1 Microscope images of silica microspheres with different molar ratios of H_2O to TEOS

2.1.2 乙醇用量对二氧化硅微球粒径及粒径分布的影响

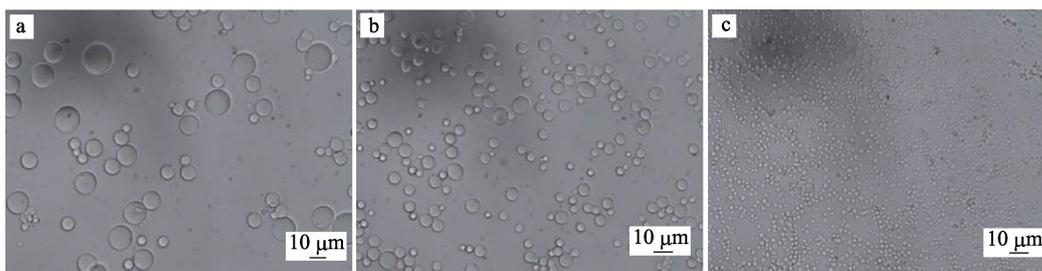
乙醇在酸催化过程中承担着多重角色: 一方面, 从反应平衡的角度看, 乙醇是此过程的产物, 可抑制反应进行 (反应式如下)。同时, 乙醇是反应中的溶剂, 可稀释硅源, 减慢水解缩聚的速度^[16]; 另一方面, 乙醇起到减小体系黏度的作用, 减小硅源水解缩聚的障碍, 促进反应进行。



乙醇的多重作用影响着酸催化过程。为此本文考察了乙醇用量对二氧化硅微球粒径及粒径分布的影响, 实验方法同 1.2 节, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 当 $V(EtOH) : V(TEOS)=2 : 5$ 时, 可以得到粒径在 5~20 μ m 的二氧化硅微球; 当 $V(EtOH) : V(TEOS)=3 : 5$ 时, 可以得到粒径在 3~10 μ m 的二氧化硅微球; 当 $V(EtOH) : V(TEOS)=4 : 5$ 时, 可以得到粒径在 2~4 μ m 的二氧化硅微球。推测原因可能为: 乙醇用量的增加导致硅源水解缩聚速度减慢, 进而中间产物 PES 相对分子质量减小, 所以二氧化硅微球粒径减小。因此, 本文选 $V(EtOH) : V(TEOS)=3 : 5$ 进行后续实验。

2.1.3 旋蒸温度对二氧化硅微球粒径及粒径分布的影响

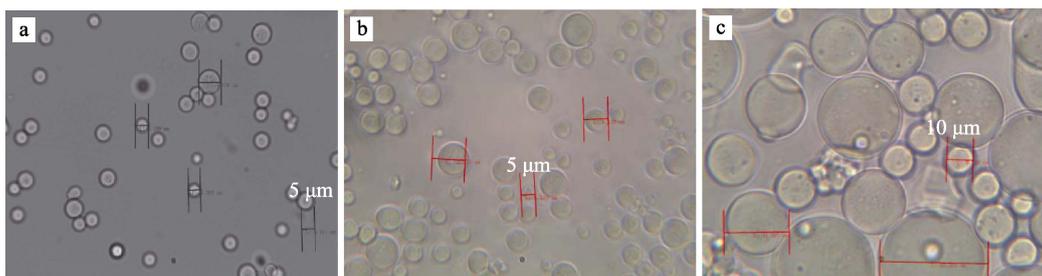
正硅酸乙酯的水解缩聚反应是热力学过程, 温度对该过程具有一定影响, 本文考察了旋蒸温度对二氧化硅微球粒径及粒径分布的影响, 实验方法同 1.2 节, 结果如图 3 所示。当旋蒸温度从 57 $^{\circ}C$ (图 3a) 分别提高到 64 $^{\circ}C$ (图 3c) 和 70 $^{\circ}C$ (图 3c) 时,



a— $V(\text{EtOH}) : V(\text{TEOS})=2 : 5$; b— $V(\text{EtOH}) : V(\text{TEOS})=3 : 5$; c— $V(\text{EtOH}) : V(\text{TEOS})=4 : 5$

图 2 不同 $V(\text{EtOH}) : V(\text{TEOS})$ 得到的二氧化硅微球显微图

Fig. 2 Microscope images of silica microspheres with different volume ratios of EtOH to TEOS



a— $57\text{ }^{\circ}\text{C}$; b— $64\text{ }^{\circ}\text{C}$; c— $70\text{ }^{\circ}\text{C}$

图 3 不同旋蒸温度得到的二氧化硅微球显微图

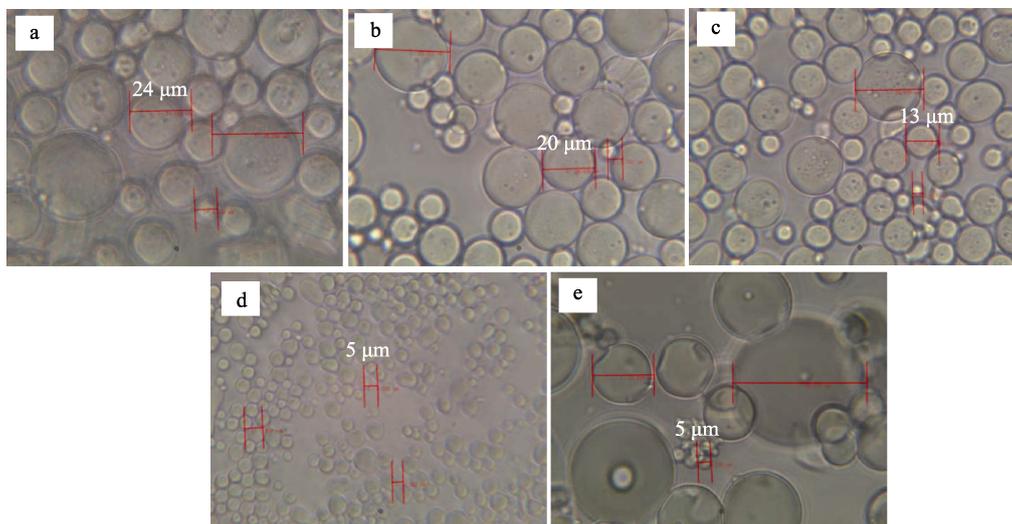
Fig. 3 Microscope images of silica microspheres with different rotary evaporation temperature

二氧化硅微球粒径增大, 从图 3a 的 $3\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 增大到图 3b 的 $5\sim 12\text{ }\mu\text{m}$ 和图 3c 的 $10\sim 40\text{ }\mu\text{m}$, 且粒径分布变宽。作者也尝试了在更低的旋蒸温度如 53 、 50 、 48 和 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下制备二氧化硅微球。结果显示, 当旋蒸温度为 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 得到透明的凝胶块状产物, 沉降数天后, 仍然漂浮于液体上层, 经离心干燥后, 得到白色块状物。分析原因可能是: 随着旋蒸温度的提高, TEOS 的水解缩聚程度增加, 即脱水脱乙醇程度增加, 生成的低聚物 PES 的质量减少, 最终导致生成的 PES 的相对分子量增大, 故得到的二氧化硅微球粒径较大, 且粒径分布较宽。反之, 温度

较低时, 小相对分子质量的 PES 不利于得到球形度好的二氧化硅微球, 而得到块状产物。所以, 本文选择旋蒸温度为 $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行后续反应。

2.1.4 搅拌速度对二氧化硅微球粒径及粒径分布的影响

搅拌速度对二氧化硅微球粒径及粒径分布有较大的影响^[17], 为此, 本文考察了不同机械搅拌速度 (分别为 570 、 980 、 1370 和 2190 r/min) 及磁力搅拌速度 (1000 r/min) 对制备二氧化硅微球粒径及粒径分布的影响, 实验方法同 1.2 节, 结果见图 4。当搅拌速度为 570 r/min 时 (图 4a), 得到的二氧化硅



机械搅拌: a— 570 r/min ; b— 980 r/min ; c— 1370 r/min ; d— 2190 r/min ; 磁力搅拌: e— 1000 r/min

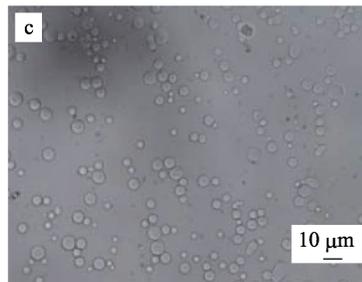
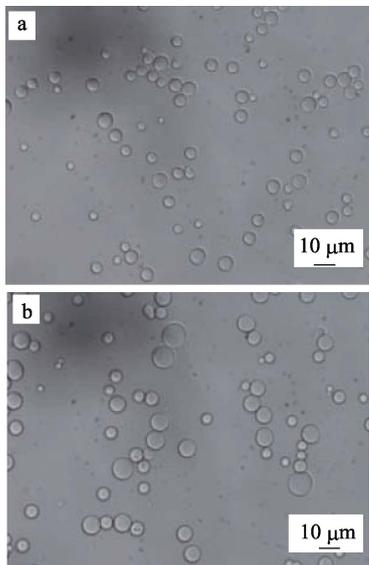
图 4 不同搅拌速度得到的二氧化硅微球显微图

Fig. 4 Microscope images of silica microspheres with different stirring speed

微球粒径分布范围为 8~35 μm , 可用作制备色谱填料。当搅拌速度分别为 980 r/min(图 4b)或 1370 r/min(图 4c)时, 得到的二氧化硅微球粒径分布分别为 6~29 μm 或 4~27 μm 。机械搅拌可以提供稳定的剪切力, 随着搅拌速度增大, 二氧化硅微球的粒径逐渐减小, 粒径分布变窄。磁力搅拌条件下制备的二氧化硅微球粒径和粒径分布很大(图 4e), 为 5~52 μm , 且小球难以分散开, 结块严重。这可能是由于, 磁力搅拌的力度较小, 尤其是滴加氨水催化剂后, 反应体系变得黏稠, 磁子的转动受到限制, 故最终制备的二氧化硅微球粒径偏大, 且出现结块现象, 故磁力搅拌不适合二氧化硅微球的制备。所以, 本文选择机械搅拌速度为 2190 r/min 进行后续反应, 此时得到的二氧化硅微球粒径分布为 3~10 μm 。

2.1.5 致孔剂种类对二氧化硅微球粒径及粒径分布的影响

致孔剂的种类是影响二氧化硅微球粒径、粒径分布及孔结构的关键因素^[7,17], 本文以 DMF、PEG200 和 PEG400 为致孔剂, 考察了致孔剂种类对二氧化硅微球粒径及粒径分布的影响, 实验方法同 1.2 节, 结果如图 5 所示。由图 5 可知, 以 DMF、PEG200 和 PEG400 为致孔剂均能得到球形度较好的二氧化硅微球, 粒径分布分别为 3~10 μm 、3~12 μm 和 3~10 μm 。范少华^[18]等的报道指出: 非质子型溶剂不能与亲核试剂形成氢键, 不能使亲核试剂溶剂化, 最终裸露的负离子作为亲核试剂, 具有较高的反应活性。在本文的实验中, DMF 是非质子型溶剂, 氨水是亲核试剂, 成球过程中, 氨水中的 OH^- 具有较高的反应活性, 促进 OH^- 与 PES 的亲核取代反应, 促进 PES 水解, 有利于硅球形成。PEG200 和 PEG400 不仅可以作为致孔剂, 还可作为 O/W 乳化剂和稳定剂, 只有采用合适的浓度才有利于得到球形度较好的二氧化硅微球。



a—PEG200; b—PEG400; c—DMF

图 5 不同致孔剂种类得到的二氧化硅微球显微图
Fig. 5 Microscope images of silica microspheres with different porogen species

2.2 BET 表征结果

采用不同致孔剂制备的二氧化硅微球的 BET 参数如表 1 和图 6 所示。采用 DMF 为致孔剂时, 二氧化硅微球的比表面积、平均孔径和孔体积均满足商业要求, 而且孔径分布窄, 近似呈正态分布, 故本文选 DMF 为致孔剂进行后续实验。制备硅球时, DMF 的用量较聚乙二醇大, 故得到的二氧化硅微球平均孔径也较大。采用 PEG 为致孔剂时, PEG 的相对分子质量越大, 得到二氧化硅微球的平均孔径越大, 故与 PEG200 相比, 以 PEG400 为致孔剂得到的二氧化硅微球的平均孔径更大。

表 1 不同致孔剂种类制备的二氧化硅微球的 BET 参数
Table 1 BET parameters of silica spheres with different porogen species

	致孔剂		
	DMF ^a	PEG200 ^b	PEG400 ^b
比表面积/(m^2/g)	464.11	459.42	432.70
平均孔径/nm	9.81	5.51	7.09
孔体积/(m^3/g)	1.14	0.63	0.77

注: ^a DMF 的体积分数为 1.2%; ^b PEG200 和 PEG400 的体积分数为 0.9%。

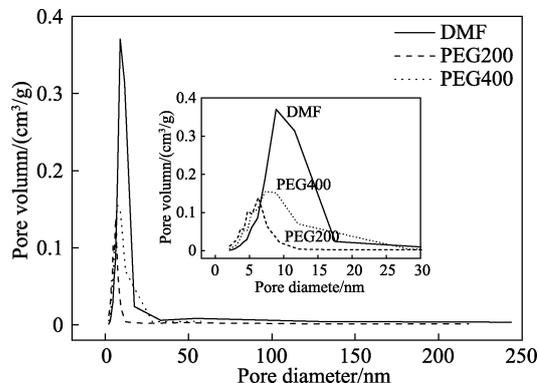


图 6 不同致孔剂种类制得二氧化硅微球的孔径分布图
Fig. 6 Pore size distribution of silica microspheres with different porogen species

2.3 硅羟基含量测定

本文对比了不同种类硅胶的表面硅羟基含量, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 自制二氧化硅微球

硅羟基含量 (0.5450 mmol/g, 比表面积 464.11 m²/g) 较商业的不定型硅胶 (0.3183 mmol/g, 比表面积 300 m²/g) 和 PICA 法制备的硅球 (0.2518 mmol/g, 比表面积 124 m²/g) 高, 这也进一步表明自制二氧化硅微球具有高的比表面积, 与 BET 的测试结果相吻合, 硅球表面丰富的硅羟基有利于制备高键含量的色谱填料。

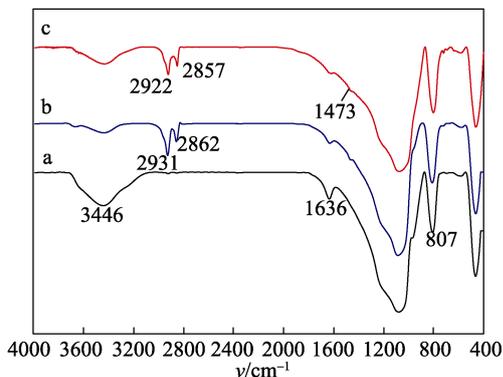
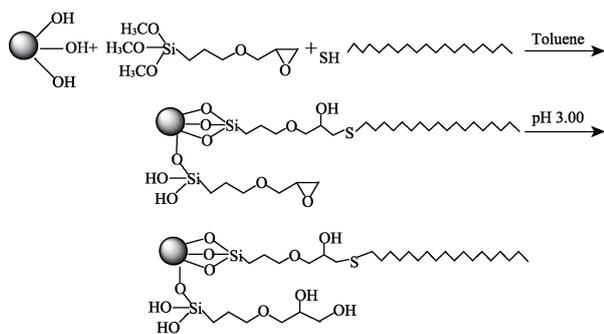
表 2 不同硅胶硅羟基含量的比较

硅羟基含量/ (mmol/g)	商业的不定型硅胶	硅球 (PICA)	自制二氧化硅微球
	0.3183	0.2518	0.5450

注: 硅球 (PICA) 参考文献[14]制备。

2.4 红外光谱分析

二氧化硅微球、C18 键合硅胶和亲水 C18 键合硅胶的 IR 图如图 7 所示。从图 7a 可以看出, 3446 cm⁻¹ 处是 Si—OH 或吸附水的不对称伸缩振动峰, 1636 cm⁻¹ 处是水的 H—O—H 弯曲振动峰, 1080 cm⁻¹ 处强而宽的吸收峰是 Si—O—Si 的反对称伸缩振动峰, 807 和 464 cm⁻¹ 处是 Si—O 的对称伸缩振动峰^[19]。经过十八烷基修饰后 (图 7b), 在 2931 和 2862 cm⁻¹ 附近出现了一CH₂—的伸缩振动吸收峰。图 7c 为亲水 C18 键合硅胶 (合成路线如下) 的红外光谱图, 2922 和 2857 cm⁻¹ 附近为一CH₂—的伸缩振动吸收峰, 且在 1473 cm⁻¹ 处为 C—S 的伸缩振动峰。IR 结果表明, 两种反相色谱填料被成功合成。



a—二氧化硅微球; b—C18 键合硅胶; c—亲水 C18 键合硅胶

图 7 3 种色谱填料的红外光谱图

Fig. 7 IR spectra of three kinds of packings

2.5 C18 键合硅胶表面性质测试

疏水性测试中甲醇用量为 466 mL, 甲醇的体积分数为 82.3%; 残余硅羟基含量为 0.08843 mmol/g, 占二氧化硅微球表面硅羟基的摩尔分数为 16.23%; 对羟基苯甲酸丙酯在 0.04~0.12 g/L 内线性很好。吸附平衡后, 平均峰面积为 4186918.33, 经计算吸附量为 31.95 mg/g。3 组测试结果均表明, 十八烷基键合相的键合密度较高。

2.6 HPLC 测试

将所制 3~10 μm 的填料分级, 得到 3~8 μm 的 C18 键合硅胶和 3~7 μm 亲水 C18 键合硅胶, 将其分别装柱并测试柱效。结果如图 8 和 9 所示, 可以看到, 4 种物质分离良好, 色谱峰型对称, 经过计算, 二者柱效分别可以达到 53474/m 和 86984/m (以甲苯计), 满足 HPLC 分析要求, 且 4 种化合物在两种填料上有相同的出峰顺序。C18 键合硅胶分离对羟基苯甲酸酯类的柱效见图 10。从图 10 可以看出, C18 键合硅胶对 3 种对羟基苯甲酸酯类物质分离良好, 峰型对称, 且分析时间较短。亲水 C18 键合硅胶分离对羟基苯甲酸和苯甲酸的色谱图见图 11。从图 11 可以看出, 最先出峰的对为羟基苯甲酸,

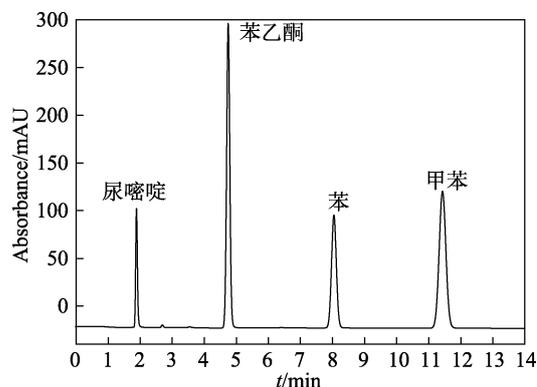


图 8 自制 C18 键合硅胶的柱效图

Fig. 8 Column efficiency of home-made C18 bonded silica gel

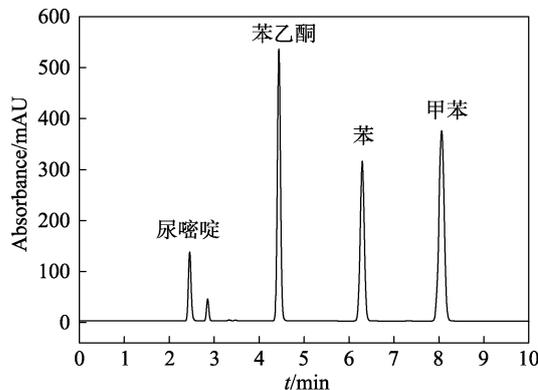


图 9 自制亲水 C18 键合硅胶的柱效图

Fig. 9 Column efficiency of home-made hydrophilic C18 bonded silica gel

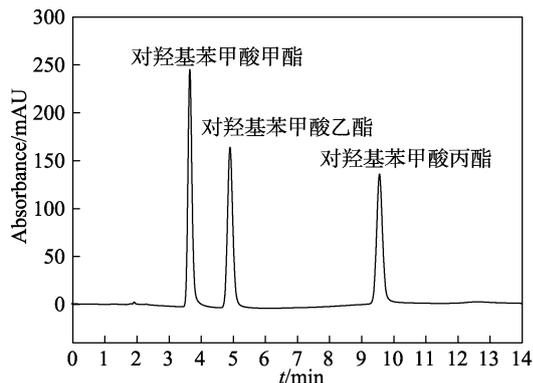
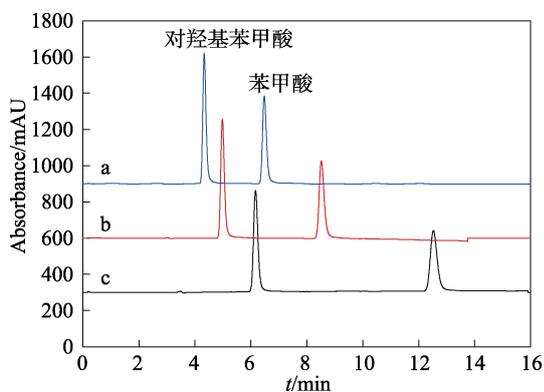


图 10 自制 C18 键合硅胶分离对羟基苯甲酸酯类的柱效图
Fig. 10 Separation result of parabens by home-made C18 bonded silica gel



a— $V(\text{ACN}) : V(\text{pH } 2.70 \text{ PBS 缓冲液}) = 60 : 40$; b— $V(\text{ACN}) : V(\text{pH } 2.70 \text{ PBS 缓冲液}) = 50 : 50$; c— $V(\text{ACN}) : V(\text{pH } 2.70 \text{ PBS 缓冲液}) = 40 : 60$

图 11 亲水 C18 键合硅胶的色谱分离图

Fig. 11 Separation result by home-made hydrophilic C18 bonded silica gel

最后出峰的为苯甲酸。流动相中水相的比例增加，两种物质的保留时间延长，表明亲水 C18 键合硅胶为反相保留的分离机理。

2.7 离子交换容量和吸附量测试

氨丙基键合硅胶和乙二胺-N-丙基键合硅胶两种 WAX 填料的离子交换容量分别为 1.44 和 1.22 mmol/g。HPLC 测定，对甲苯磺酸在 0.04~0.12 g/L 内线性良好，氨丙基键合硅胶和乙二胺-N-丙基键合硅胶吸附一定量的对甲苯磺酸后平均峰面积分别为 1252611.67 和 1277277.33，经计算可得，二者对对甲苯磺酸的吸附量分别为 240.8 和 217.6 mg/g。

表 3 离子交换容量和吸附量测试结果

Table 3 Results of ion exchange capacity and adsorption capacity

	离子交换容量 / (mmol/g)	对甲苯磺酸吸附量 / (mg/g)
氨基键合硅胶	1.44	240.8
乙二胺-N-丙基键合硅胶	1.22	217.6

3 结论

采用酸-碱催化的溶胶-凝胶法制备了多孔二氧化硅微球，并对影响二氧化硅微球形态和粒径分布的因素进行了考察，得到最佳制备条件为： $n(\text{H}_2\text{O}) : n(\text{TEOS}) = 6 : 4$ ， $V(\text{EtOH}) : V(\text{TEOS}) = 3 : 5$ ，旋蒸温度为 57 °C，搅拌速度为 2190 r/min，致孔剂为 DMF。在此条件下可以制备出粒径分布在 3~10 μm、比表面积 464.11 m²/g、孔体积 1.14 m³/g、平均孔径为 9.81 nm，且孔径分布范围窄的二氧化硅微球，其表面硅羟基含量高达 0.5450 mmol/g。以自制二氧化硅微球为基质，成功合成了 4 种色谱填料。装柱测试结果表明：C18 键合硅胶和亲水 C18 键合硅胶柱效较高，分别为 53474/m 和 86984/m（以甲苯计），且对分析物的分离效果良好。氨丙基键合硅胶和乙二胺-N-丙基键合硅胶两种阴离子填料的离子交换容量分别为 1.44 和 1.22 mmol/g，对甲苯磺酸吸附量分别为 240.8 和 217.6 mg/g。本文所制填料不经扩孔即具备良好的色谱性能，可直接用作分析型 HPLC 色谱填料。下一步研究重点是在本文制备方法基础上进行改进，放大规模制备二氧化硅微球。并将在此方法基础上探索采用双硅源或多硅源制得含有机官能团的有机-无机杂化硅球。

参考文献:

- [1] Zhao W J, Hu K, Hu C C, *et al.* Silica gel microspheres decorated with covalent triazine-based frameworks as an improved stationary phase for high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1487: 83-88.
- [2] Wei J X, Shi Z G, Chen F, *et al.* Synthesis of penetrable macroporous silica spheres for high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(44): 7388-7393.
- [3] Bao Jianmin (包建民), Xu Hui (许慧), Li Youxin (李优鑫). Preparation of methacrylate-based microspheres by seeded swelling polymerization[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2015, 32(6): 601-605.
- [4] Zhao Beibei (赵贝贝), Zhang Yan (张艳), Tang Tao (唐涛), *et al.* Silica based stationary phases for high performance liquid chromatography[J]. *Progress in Chemistry (化学进展)*, 2012, 24(1): 122-130.
- [5] Alonso B, Douy A, Véron E, *et al.* Morphological and textural control of spray-dried mesoporous silica-based sphere [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2004, 14(13): 2006-2016.
- [6] Zhao L, Yu J G, Guo R, *et al.* Preparation and formation mechanisms of monodispersed mesoporous SiO₂ microspheres by the PICA method [J]. *Key Engineering Materials*, 2007, 280/283: 1153-1156.
- [7] Hohenesche C F, Ehwald V, Unger K K. Development of standard operation procedures for the manufacture of *n*-octadecyl bonded silicas as packing material in certified reference columns for reversed-phase liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1025(2): 177-187.
- [8] Wu Y J, Ren X Q, Wang J. Facile synthesis and morphology control of zeolite MCM-22 *via* a two-step sol-gel route with tetraethyl orthosilicate as silica source[J]. *Materials Chemistry & Physics*, 2009, 113 (2/3): 773-779.

- [9] Stöber W, Fink A, Bohn Ernst. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968, 26(1): 62-69.
- [10] Tian Chao (田超). Preparation and chromatographic properties of novel high performance liquid chromatography stationary phases[D]. Qingdao (青岛): Qingdao University (青岛大学), 2016.
- [11] Xia Hongjun (夏红军). Preparation of core-shell silica microspheres and its application in fast separation and analysis by liquid chromatography[D]. Xi'an (西安): Northwest University (西北大学), 2016.
- [12] Anderson D J. Process for forming large silica spheres by low temperature nucleation: US5425930[P]. 1995-06-20.
- [13] Liu Shipeng (刘世鹏). Preparation of high purity porous silica microspheres by reverse phase suspension system[J]. *Bulletin of the Chinese Ceramic Society (硅酸盐通报)*, 2014, 33(9): 2370-2380.
- [14] Wang Yan (王艳), Li Youxin (李优鑫), Bao Jianmin (包建民). Preparation of silica microspheres and its functionalization[J]. *China Ceramics (中国陶瓷)*, 2013, 49(7): 19-23.
- [15] Brinker C J. Hydrolysis and condensation of silicates: effects on structure[J]. *Journal of Non-crystalline Solids*, 1988, 100 (1): 31-50.
- [16] Yu X Y, Wu X Y, Guo D Q, *et al.* Preparation of flexible, hydrophobic and oleophilic silica aerogels based on a methyltriethoxysilane precursor[J]. *Journal of Materials Science*, 2014, 49(22): 7715-7722.
- [17] Yang X, Wang J, Liu X. High purity micron-scale macroporous silica spheres for high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Separation Science*, 2002, 25(3): 179-182.
- [18] Fan Shaohua (范少华), Cui Yumin (崔玉民). The role of different solvents in nucleophilic substitution reactions[J]. *Chemical Education (化学教育)*, 2004, 25(2): 53-56.
- [19] Chen Hesheng (陈和生), Sun Zhenya (孙振亚), Shao Jingchang (邵景昌). Investigation of FTIR spectroscopy for eight different sources of SiO₂[J]. *Bulletin of the Chinese Ceramic Society (硅酸盐通报)*, 2011, 30(4): 934-937.

(上接第 1448 页)

- [31] Ding H Y, Chiang C M, Tzeng W M, *et al.* Identification of 3'-hydroxygenistein as a potent melanogenesis inhibitor from biotransformation of genistein by recombinant *Pichiapastoris*[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50: 1614-1617.
- [32] Chiang C M, Chang Y J, Wu J Y, *et al.* Production and anti-melanoma activity of methoxyisoflavones from the biotransformation of genistein by two recombinant *escherichia coli* strains[J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 87-95.
- [33] Jin Yongsheng (金永生), Liu Chaomei (刘超美), Wu Qiuye (吴秋业), *et al.* Synthesis and antitumor activity of a novel genistein derivative 5-hydroxy-4'-nitro-7-substituted acyl isoflavone[J]. *Journal of the Second Military University (第二军医大学学报)*, 2005, 26(2): 182-185.
- [34] Castro S B, Junior C O, Alves C C, *et al.* Immunomodulatory effects and improved prognosis of experimental autoimmune encephalomyelitis after *O*-tetradecanoyl-genisteintreatment[J]. *International Immunopharmacology*, 2012, 12(2): 465-470.
- [35] Hofstetter H H, Ibrahim S M, Koczan D, *et al.* Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Cellular Immunology*, 2005, 237(2): 123-130.
- [36] Kong W, Yen J H, Ganea D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation, inhibits antigen-specific Th1/Th17 differentiation and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Brain Behavior & Immunity*, 2011, 25(5): 872-882.
- [37] Huppert J, Closhen D, Croxford A, *et al.* Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption[J]. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2010, 24(4): 1023-1034.
- [38] Spach K M, Nashold F E, Dittel B N, *et al.* IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Journal of Immunology*, 2006, 177: 6030-6037.
- [39] Cua D J, Hutchins B, Lafae D M, *et al.* Central nervous system expression of IL-10 inhibits autoimmune encephalomyelitis[J]. *Journal of Immunology*, 2001, 166(1): 602-608.
- [40] Wing K, Onishi Y, Prietro-Martin P, *et al.* CTLA-4 control over Foxp³⁺ regulatory T cell function [J]. *Science*, 2008, 322: 271-275.
- [41] Serada S, Fujimoto M, Mihara M, *et al.* IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(26): 9041-9046.
- [42] Li R, Perez N, Karumthilmelethil S, *et al.* Enhanced engagement of CTLA-4 induces antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ and CD4⁺ CD25⁻ TGF- β 1⁺ adaptive regulatory T cells[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 179(8): 5191-5203.
- [43] Qiang Xiaoming (强晓明), Yuan Wen (袁文), Sang Zhipei (桑志培), *et al.* Synthesis and biological evaluation of genistein carbamate derivatives[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry (有机化学)*, 2013, 33(3): 621-629.
- [44] Citu C, Danciu C, Pinzaru I, *et al.* Genistein and its fatty acid esters as new *in vitro* antitumor compounds[J]. *Revista de Chimie-Bucharest-Original Edition*, 2015, 66(8): 1100-1104.
- [45] Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, 96(2): 147-152.
- [46] Chang Pengfei (常鹏飞), Xie Xian (谢宪), Yu Kaili (喻凯荔), *et al.* Synthesis of sulfonated derivatives of genistein and their effects on human serum albumin[J]. *Chemistry Bulletin (化学通报)*, 2015, 78(7): 613-620.
- [47] Li L D, Xue J H, Liu R Z, *et al.* Neuroprotective effects of genistein-3'-sodium sulfonate on focal cerebral ischemia in rats[J]. *Neuroscience Letters*, 2017, 646: 43-48.
- [48] Granville D J, Jiang H, An M T, *et al.* Bcl-2 overexpression blocks caspase activation and downstream apoptotic events instigated by photodynamic therapy[J]. *British Journal of Cancer*, 1999, 79(1): 95-100.
- [49] Andlauer W, Kolb J, F ü rst P. Isoflavones from tofu are absorbed and metabolized in the isolated rat small intestine[J]. *Journal of Nutrition*, 2000, 130(12):3021-3027.
- [50] Chen Xiaolan (陈晓岚), Yu Zhangqi (郁章琦), Qu Lingbo (屈凌波), *et al.* Modification of phosphorus structure of genistein and its weak interaction with lysozyme[J]. *Acta Pharmacologica Sinica (药理学学报)*, 2007, 42(4): 396-400.
- [51] Wang S T, Fang T F, Chen H, *et al.* Biotransformed product, genistein 7-O-phosphate, enhances the oral bioavailability of genistein[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 13: 323-335.
- [52] Zhou Quancheng (周泉城), Zhu Hailiang (朱海亮), Chen Xiangfei (陈相飞), *et al.* Process for preparing genistein derivative containing phenyl piperazine and its antibacterial activity: CN104262313A [P]. 2015-01-07.
- [53] Zhou Q C, Feng C X, Ruan Z. Inhibitory effect of a genistein derivative on pigmentation of guinea pig skin[J]. *RSC Advances*, 2017, 7: 7914-7919.
- [54] Liu Na (刘娜), Zhou Quancheng (周泉城). Synthesis and biological activity of genisteinderivatives[J]. *Food and Drug (食品与药品)*, 2016, 18(4): 235-238.