



钛胶整体柱的制备及钛胶在分离蛋白、肽方面的
应用

**Synthesis of Titania Monolithic Column and its
Application in Separation of Protein and Peptide**

专 业：食品科学

研 究 生：路冠茹

指导教师：姜子涛 教授

生物技术与食品科学学院

2011年5月

摘要

氧化钛由于其独特的化学特性,在催化领域、传感领域、电子领域、光学领域和分离科学领域中得到广泛研究与应用。最近,对于氧化钛整体材料的研究进一步发展起来。将钛胶(TiO_2)的优良化学特性与整体材料的高通透性等优点结合起来,即将钛胶应用于高效液相色谱的整体固定相,引起了色谱界的极大兴趣。同时, TiO_2 作为新型色谱固定相,在生物样品如磷脂、磷酸蛋白、肽、核酸及中间体的分离富集以及糖类物质分析等方面有着更为广阔的前景。本文研究了钛胶整体柱的制备和条件优化,以及钛胶基质填充色谱柱在分离蛋白、肽方面的应用。

本课题内容包括三部分:

(1)以钛酸丁酯(正丁基钛)为前驱物,醋酸为螯合剂,正丁醇为溶剂,盐酸为凝胶调节剂,通过溶胶-凝胶法制备钛胶整体材料。所得材料性能采用 N_2 吸附-脱附等温线、SRD、扫描电镜进行分析表征。从而,确定影响整体柱内部微观结构因素,包括:正丁基钛与水、正丁醇、醋酸、盐酸的比例及相互作用;凝胶化温度;凝胶干燥过程中升温程序的控制。并在正丁基钛:醋酸:正丁醇:盐酸:水(摩尔比)=1:5:4:0.45:6和1:4:2.8:0.5:5.5的原料比下,凝胶化温度为 21°C 时,控制凝胶干燥升温过程,制备出了具有较好外观和性能的钛胶整体柱。

(2)使用正相、反相钛胶填充色谱柱分离酪蛋白水解液中得到的多肽,确定流动相中有机相比例及梯度过程,使用缓冲盐的类型及浓度,找到最佳分离条件:正相色谱柱—流动相为85%ACN,磷酸钠缓冲盐pH5.0,磷酸钠盐浓度2.0mM;反相色谱柱—乙腈梯度:3.5-15.4%(8min);15.4-70%(32min);70-35%(15min);35%(5min);

(3)使用正相、反相钛胶填充色谱柱分离糖巨肽,确定流动相中有机相比例及梯度过程,使用缓冲盐类型及浓度,找到最佳分离条件:反相色谱柱—乙腈梯度为:7-42%(20min);跳到70%(保持5min), NH_4F 终浓度80mM。

关键词:二氧化钛;整体柱;HPLC;酪蛋白;肽;糖巨肽

ABSTRACT

Because of the unique properties of titania(TiO_2), it has been extensively exploited in diverse areas such as catalysis, sensing, electronics, optics, and separation science. Recently, researches on titania monolith have been further developed. Combining fine chemical properties of titania with high permeability of monoliths and applying to the stationary phase of high performance liquid chromatogram(HPLC), will cause the most interest in colour spectrum. Simultaneously, TiO_2 as a new type of chromatographic stationary phase, there will be more application prospects of TiO_2 in the biological materials, such as phospholipids, phosphoprotein, peptides, nucleic acid and intermediates as well as the analysis of carbohydrate. In this paper, synthesis of titania monolithic column and the optimization of conditions, as well as the application of titanium packing chromatographic column in the separation of phosphoprotein, peptides.

The researches in this thesis included three aspects:

(1) Using $\text{Ti}(\text{OnBu})_4$ as predecessor, acetic acid as chelating agent, n-butanol as solvent, hydrochloric acid as gel regulator, through sol-gel method, we synthesis of titania monolithic column. And we exosyndrome the material's performance we got. Accordingly, decide the factors that affect the microstructure of the material, including the ratio of water, n-butanol, hydrochloric acid and acetic acid, as well as their interaction. Gelatinization temperature and drying process are also be controled. At $\text{Ti}/\text{HAc}/\text{BuOH}/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O} = 1/5/4/0.45/6$ and $1/4/2.8/0.5/5.5$, gelatinization temperature 21°C , we got titania monolithic column of better shape and performance.

(2) Uesing NP(RP)-HPLC to separate zymohydrolysis products of casein. The best separating condition: NP-HPLC, ACN 85%, sodium phosphate buffer pH5.0, saltness 2.0mM; RP-HPLC, ACN gradient: 3.5-15.4%(8min); 15.4-70%(32min); 70-35%(15min); 35%(5min).

(3) Uesing NP(RP)-HPLC to separate macropeptides. The best separating condition: RP-HPLC, ACN gradient: 7-42%(20min); goto 70%(keep 5min), NH_4F final concentration 80mM.

Key words: Titania; Monolithic column; HPLC; Casein; Peptide

目录

第一章 前言.....	1
1.1 整体柱研究现状.....	1
1.1.1 整体柱研究概况.....	1
1.1.2 新型色谱材料概述.....	1
1.1.3 钛胶整体柱的制备方法.....	3
1.1.4 整体柱结构的评价.....	6
1.2 钛胶基质色谱性能研究现状.....	6
1.2.1 概述.....	6
1.2.2 二氧化钛的物理化学性质.....	7
1.2.3 二氧化钛在高效液相色谱(HPLC)中的应用.....	8
1.3 酪蛋白多肽的研究概况.....	11
1.3.1 酪蛋白的构成.....	11
1.3.2 酪蛋白酶解产物的研究概况.....	13
1.3.3 糖巨肽的研究概况.....	13
1.4 研究目的及意义.....	14
1.5 本课题所要研究的问题.....	15
第二章 钛胶基质整体材料的制备及表征.....	16
2.1 引言.....	16
2.2 实验仪器与材料.....	16
2.2.1 主要试剂.....	16
2.2.2 主要仪器.....	17
2.3 实验方法及结果讨论.....	17
2.3.1 钛胶基质整体材料的制备.....	17
2.3.2 钛胶基质整体材料的表征.....	25
2.4 实验小结.....	32
第三章 正相钛胶填充色谱柱对酪蛋白酶解液、肽的分离.....	34
3.1 引言.....	34
3.2 实验仪器与材料.....	35
3.2.1 主要试剂.....	35
3.2.2 主要仪器.....	35
3.3 实验方法及结果讨论.....	36
3.3.1 酪蛋白酶解产物的分离.....	36
3.3.2 糖巨肽混合样品的分离.....	42
第四章 反相钛胶填充色谱柱对酪蛋白酶解液、肽的分离.....	47
4.1 引言.....	47
4.2 实验仪器与材料.....	47
4.2.1 主要试剂.....	47
4.2.2 主要仪器.....	47
4.3 实验方法及结果讨论.....	48
4.3.1 酪蛋白酶解产物在单泵液相色谱上的分离.....	48

4.3.2 酪蛋白酶解产物在四元泵液相色谱上的分离.....	52
4.3.3 糖巨肽混合样品在单泵液相色谱上的分离	53
4.3.4 糖巨肽样品在四元泵液相色谱上的分离	59
第五章结论与展望.....	61
参考文献.....	62
论文、参加科研情况说明以及学位论文使用授权声明	69
致 谢.....	70

第一章 前言

1.1 整体柱研究现状

1.1.1 整体柱研究概况

色谱填料,从液相色谱技术创立之初到目前,经历了四代发展过程。第一代发展过程是:从形状不规则的填充颗粒到球形填充颗粒;第二代发展过程是:从较大的填充颗粒到较小的填充颗粒;第三代发展过程则是:从不纯的色谱填充材料到高纯的球形硅胶填料;第四代发展过程就是:从填充色谱柱到目前整体柱的产生。可以说,色谱填充材料一直在向着提高柱效和实现快速分离的方向发展,这也必将是今后色谱填料发展的趋势。

整体柱(monolithic column),又称整体固定相(monolithic stationary phase)、棒柱、连续床层(continuous bed)或无塞柱(fritless column)等,是一种利用有机或无机聚合方法在色谱柱内进行原位聚合而得到的连续床固定相^[1]。这种色谱柱的制备方法,省略了常规填充色谱柱的填充过程,只要在管子中直接通过反应即可制备得到整体色谱填料。整体柱中通常具有大孔结构,使整个固定相微观上具有孔穴相通的网络结构,从而具有了良好的渗透性;此外,可以经过一些后续处理,让材料同时具有中孔结构,增大柱容量,增大流动相与固定相的接触面积。由此可见整体色谱柱,对流动相的传质阻力小,有利于大幅度地提高流动相的流速,实现快速分离。HPLC 整体柱在试样分析时,流动相流速提高的同时并不会降低柱效,能够达到快速分离分析的目的。这主要是因为,试样中的各组分通过对流传质与色谱固定相之间发生相互作用,从而得到分离,对流传质速度越大,试样中各组分在流动相与固定相之间就越能够实现快速分配、分离。

目前,整体色谱柱可以分为无机整体色谱柱和有机整体色谱柱两大类:前者主要是通过硅氧化物等无机基质,直接在柱内烧结或者通过溶胶-凝胶(Sol-gel)法在柱容器中反应得到,后者则是通过有机聚合单体在柱管内的原位聚合反应得到的。世界上许多研究小组^[2-8]正在进行整体色谱柱的研究。Klodzinska^[9]、Tanaka^[10,11]、Ou^[12]分别综述了整体色谱固定相的研究进展。

1.1.2 新型色谱材料概述

使用高稳定性的色谱填充材料,可以使色谱柱使用寿命得到延长,分析成本降低。因

而能为分析工作提供较宽的 pH 和温度使用范围的色谱填料,能够较长时间忍耐极端环境,从而可以降低其中色谱流出液的速度,这就为 LC-MS 联用技术和光散射检测方法的进一步发展开辟了蹊径。同时,这使在较极端 pH 或高温的条件下,对色谱柱进行在位清洗成为了可能^[13]。近年来,色谱工作者一直在为寻找到具有高化学稳定性的新型色谱固定相做着不懈的努力,以此来解决硅胶基质固定相机械强度差和酸碱稳定性差等的缺点,以满足更多领域分析工作的要求。目前已开发出的新型色谱填料有铝胶、锆胶、钛胶、石墨化碳及聚合物刚性微球等^[14]。

金属氧化物如 TiO_2 、 ZrO_2 和 Al_2O_3 , 以及石墨化碳等,较硅胶显现出了更高的化学稳定性,如果将这些物质优化后作为色谱柱填充基质,得到的色谱柱将在机械强度和酸碱稳定性等方面大大提高。此类新型色谱固定相可以用来部分替代硅胶基质固定相,这必将使色谱分析方法得到进一步的拓展和发展。其中, TiO_2 微球作为色谱填料的制备方法主要有聚合诱导胶体凝聚法(polymerization-induced colloid aggregation, PICA)^[15-16]、油乳液法(oil emulsion methods, OEM)^[17-18]、溶胶-凝胶法(sol-gel)^[17]、醇热法(alcoholthermal route)^[19, 20]等。石墨化碳是除硅胶基质之外的另一种可供选择的色谱固定相材料。它的疏水特性与硅胶基质和聚合物基质有着明显地不同之处,此基质已经应用于生物学、药学、法医学和环境学等领域^[21]。

除此之外,对硅胶球表面进行修饰,也可得到不同表面性质的微球体。它们在机械强度和化学稳定性上,都随之发生了改变。Barde 和 DuBois 以及 Barkatt 和 Macedo 报道了通过金属醇盐,醋酸盐和乙酰丙酮盐等使金属氧化物覆盖到了硅胶表面上。Kirklan^[13]等人将钛胶涂覆在二氧化硅微粒的表面上,经过煅烧处理,可以得到孔结构各不同的凝胶粒子。将 TiO_2 、 ZrO_2 和 Al_2O_3 涂覆在硅胶微球表面上,以形成具有混合基质的色谱固定相,该粒子表面的酸性增强,并且具有了更广泛的应用范围。 ZrO_2 - SiO_2 微球由于表面酸性的增加,水解能力得到提高, Ohta 等人将这样的复合微球应用于离子交换色谱和离子排斥色谱中^[22-23]。用 ZrO_2 和 Al_2O_3 修饰后的硅胶微粒用于离子交换树脂,可以分离一价和二价阳离子^[24]。

锐钛矿和金红石型的 TiO_2 可以用作色谱固定相,它不溶于强酸强碱,具有良好的酸碱(pH 1-14)稳定性。 TiO_2 晶体的表面很均匀,上面的羟基使分子显示弱酸性(pH5.5-6.5),它既不同于氧化铝的不完全晶体结构,也不像硅胶的无定形结构,且表面具有很多特殊基团,所以 TiO_2 能提供不同于硅胶的表面物理化学性质和分离选择性^[25]。 TiO_2 表面显示弱酸性,所以在作为正相色谱填料时可以分离碱性化合物^[19],解决了碱性化合物在硅胶基质固定相

上分离时出现的“拖尾”现象。所以，近年来 TiO_2 作为 HPLC 固定相倍受关注。钛胶(TiO_2)是两性物质，即可以作为 Lewis 酸位点，也可以作为 Lewis 碱位点。在酸性条件下， TiO_2 表面带着正电荷，在碱性条件下表面带着负电荷，因此 TiO_2 对带电物质表现出了离子交换的性质^[14, 26]。此外，对于 Lewis 碱，钛胶表面还具有配位位点。而硅胶只能做为阳离子交换剂，不具备任何配位体交换性质^[27, 26]。

TiO_2 作为过渡金属配位化合物，不饱和的钛原子是很强的 Lewis 酸，它能与提供电子对的原子或基团之间形成很强的亲和力^[24]。因此，钛胶对磷酸酯、磷酸肽或磷酸蛋白、核酸及其中间体等都有着较强的选择吸附作用^[28]，对这类物质的分离分析与检测也是一项值得关注的课题。

1.1.3 钛胶整体柱的制备方法

无机整体柱的制备方法主要有溶胶-凝胶法(Sol-gel)、聚合诱导胶体凝聚法(PICA)两种。有机整体柱的制备方法比较简单，这里不做详细介绍。接下来重点介绍一下 Sol-gel 法。

1.1.3.1 溶胶-凝胶 (Sol-gel) 法

Sol-gel 法是制备材料的湿化学方法中一种崭新的方法。Sol-gel 技术是一种由金属有机化合物、金属无机化合物或上述两者的混合物经过水解缩聚过程，逐渐凝胶化及进行相应的后处理，而获得氧化物或其他化合物的新工艺。1846 年 J.J.Ebelmen 首先开展这方面的研究工作，20 世纪 30 年代 W.Geffcken 利用金属醇盐水解和凝胶化制备出了氧化物薄膜，从而证实了这种方法的可行性，但直到 1971 年联邦德国学者 H.Dislich 利用溶胶-凝胶法成功制备出多组分玻璃之后，溶胶-凝胶法才引起科学界的广泛关注，并得到迅速发展。

溶胶-凝胶法采用的原料一般分为五种：金属化合物、水、溶剂、催化剂和其他添加剂。金属化合物是金属元素的起始原料，一般为易水解的金属化合物，最常用的化合物包括金属醇盐、醋酸盐、乙酰丙酮盐、硝酸盐、氯化物等。金属醇盐是溶胶-凝胶法最合适的原料，金属醇盐具有容易用蒸馏、重结晶技术提纯，可溶于普通有机溶剂，易水解等特性^[2]。

溶胶凝胶法主要步骤：(1) 混合、浇铸、凝胶化：初始物的组成和浓度是这一步骤的关键。(2) 陈化：又包括三个过程：缩聚、脱水收缩及粗化。(3) 干燥和热处理：减少残余硅醇基的数目及强化骨架的刚性、力度。(4) 柱体的包覆。溶胶凝胶过程的主要反应：

(1) 前驱体溶液的水解反应 (2) 溶胶的缩聚反应 (3) 润湿凝胶体的干燥过程变化 (4) 凝胶体烧结过程的变化。

Sol-gel 法制备材料的过程对实验条件的要求非常苛刻，操作步骤也比较复杂，重复性

较差,制得的柱结构极易开裂、坍塌。目前,几乎所有的科研小组都沿用着类似的方法合成无机基质整体柱,得到的柱结构还不太理想。

1.1.3.2 溶胶-凝胶法制备钛胶整体材料:

以钛醇盐为前驱物通过溶胶-凝胶获得二氧化钛整体材料,在形成溶胶过程中存在着水解缩聚速度过快的问题,由此可以加入一些螯合剂,如乙酸、多元醇、乙酰丙酮等,或者以醇盐相应的醇作为溶剂,进行水解反应。张立德等^[29]以钛酸正丁酯为前驱体,以正丁醇为溶剂,通过乙酸进行改性。乙酸根起到二配位体作用,与钛形成稳定的六配位体,不容易被水取代,从而使醇盐的水解和缩聚过程得到控制。同时将水以冰块的形式加入到体系中,在温度上控制了系统的水解缩聚反应。将制得的钛胶在室温下干燥 30 天 40°C 下干燥 10 天,测得比表面积(SSA)332.8m²g⁻¹。将上述钛胶继续在 300°C 下煅烧,SSA 降为 123.7 m²g⁻¹,400°C 下煅烧时,SSA 降为 118.4 m²g⁻¹,500°C 时,SSA 降为 90.5m²g⁻¹,600°C 下,SSA 降为 25 m²g⁻¹,同时随着煅烧温度的升高,钛胶由锐钛矿型向金红石型转化。在不同温度下煅烧后,得到了平均孔直径在 4.5-10nm 的介孔钛胶整体材料。Amlouk 等^[30]设计以异丙氧基钛为前驱体,加入甲醇、乙酸跟盐酸,通过甲醇与乙酸在酸性条件下发生酯化反应慢慢释放出的水与前驱体发生水解反应,从而达到控制水解缩聚反应的目的。室温下干燥得到的钛胶 SSA 为 330 m²g⁻¹,550°C 下煅烧后 SSA 降为 62m²g⁻¹,平均孔直径在 2.2nm 左右,得到了微孔钛胶整体材料。

1.1.3.3 溶胶-凝胶法制备大孔-介孔双级孔结构钛胶整体材料:

上述方案中都存在着合成周期较长,且无大孔结构的缺点。最近,合成大孔-介孔双级孔结构氧化钛材料的综合策略也发展起来。例如,以表面活性剂和胶乳球为二元模版,生产具有双级孔结构的二氧化钛粉末^[31]。近来,有报道证实,在仅有一种表面活性剂^[32-34],甚至没有模版的条件下^[35],能够制备出具有大孔-介孔结构的材料。而双级孔整体材料更是引起了材料领域的广泛关注,因为它能够通过不同尺寸的孔径,在多方面提高材料的工作性能^[36]。例如,色谱领域,双级孔整体柱可以在不影响其它性能的情况下,通过大孔使液体流动相更快速更灵活地通过,提高分离速度,流动相流过主体所需的压强也大大减小,介孔可以增加固定相与液体流动相之间的接触面积,使溶质在两相之间更快达到分配平衡,利于混合分子的分离^[11]。因此,具有多尺寸多级孔结构的整体材料在高效液相色谱的分离媒介中有良好的应用前景,与使用了 100 多年的传统颗粒填充柱比较,有更快的分离速度,更适用于高效液相色谱^[4, 37]。但是,用于合成这种材料的技术还是很有限,溶胶-凝胶伴随相分离是制备具有双级孔结构整体材料的一种有效技术。

Chen 等^[38]设计以钛酸异丙酯为前驱体, 丙三醇为溶剂同时与前驱体发生酯交换反应, 生成第二前体, 另外, 引入聚氧乙烯(PEO)通过絮凝作用诱导相分离发生, 得到大孔-介孔钛胶整体材料。溶胶-凝胶合成氧化硅, 也是水解、缩聚和粒子聚集反应共同作用的复杂过程, 并通过加入一定浓度的丙三醇得以延缓^[39]。丙三醇在溶胶-凝胶过程中, 与前驱体发生酯交换反应, 生成对水敏感性较弱的二级前体物质, 从而降低了水解和凝缩的速度^[40]。另外, 丙三醇不像其他单元醇那样——在水溶液中与前驱体的反应基本上是不可逆的。多元醇能够参与分子内反应, 重新生成敏感性前驱体。因此, 多元醇的加入, 从起始上改变了水解、缩聚作用的平衡状态, 同时还增加了溶液基质的粘性, 缓和 TiO₂ 低聚物粒子之间的碰撞, 减缓了聚集作用。丙三醇的利用, 冲出了传统方法对于 pH 值的限制, 不再需要极其低的 pH 值来控制水解产生的二氧化钛, 取而代之的是更具有生物亲和性的 pH 操作条件。

在反应系统中加入 PEO, TiO₂ 低聚物的表面羟基与 PEO 的醚基氧之间能够形成氢键。增加了 TiO₂-PEO 联合体与混合溶剂之间的排斥力, 诱导产生相分离。通常, 大分子量、高粘性的 PEO 更利于小颗粒絮凝成大凝聚物, PEO 通过絮凝作用控制聚合颗粒的尺寸, 也就控制了介孔的尺寸, 而诱导相分离相对于凝胶的时间, 就控制了大孔的尺寸。丙三醇也是高粘性、氢键材料, 能够增强这种效应。因此, 在系统中增加丙三醇浓度同时减小 PEO 质量分数时, 可以得到具有相似结构的整体材料。

NAKANISHI 实验组在整体固定相的研究中做了诸多工作, 已经成功地制备出硅胶、锆胶基质固定相, 同时对钛胶整体材料的合成也进行了一些的研究。2006 年实验组^[41]报道了以比例 Ti(OⁿBu)₄/HCl/FA/H₂O=1:0.5:0.5:f, f=20.5, 20.75, 21.00, 21.25, 21.5, 合成不同孔径多级孔钛胶整体材料。盐酸营造的强酸性条件可以促进水解反应, 而抑制缩聚反应, 使得前驱体充分水解而不会快速缩聚、聚集产生沉淀。系统中引入的甲酰胺(FA), 可以在酸性条件下发生水解, 清除质子, 达到逐步提升系统 pH 值的目的是, 在 24h 之内就能将系统低于 0 的 pH 值提升到 5, 从而慢慢促进缩聚反应进行。同时作为强极性溶剂, 降低了氧化钛低聚物与溶剂的相容性, 诱导相分离。此方法得到的湿凝胶在 30°C 或者 60°C 下老化 7 天, 就可以在 300°C 或者 700°C 下煅烧。与实验组之前工作^[42], 以氧化钛水溶胶为钛源制备的钛胶整体材料相比较, 具有更大的平均介孔孔径, 更大的机械强度。2009 年实验组^[43]在之前工作的基础上, 调整了水相对于前驱体的摩尔比, 提高了前驱体在初始系统中的质量百分数, 由此可以进一步提高所得钛胶整体材料的机械强度。此外以氮甲基甲

酰胺(NFA)代替 FA, 因为 NFA 较 FA 有更慢的水解速度, 从而减慢系统 pH 值的升高速度, 减缓缩聚反应。同时还引入 PEO, 与 FA/NFA 共同诱导相分离, 控制大孔-介孔双

级孔结构特性。

Backlund 等^[44]报道了一种不使用任何氢键聚合物或者表面活性剂,只通过乙酸螯合剂和盐酸两种廉价试剂来控制相分离相对于凝胶发生的时间,从而得到大孔-介孔双级孔结构的钛胶整体材料。同样,乙酸起螯合钛,减缓水解反应的作用,盐酸可以抑制缩聚反应。而当乙酸与前驱体摩尔比大于 2 时,过量的乙酸回去水解产生的醇发生酯化反应,产生水,反而加剧了水解聚合作用,使得大孔孔径变大。由此可以通过调节乙酸的量来调节大孔孔径。报道还指出,缓慢干燥很重要,干燥过快,引起孔中巨大的毛细管张力,导致整体材料的断裂。

1.1.4 整体柱结构的评价

评价整体材料性能的参数主要包括:比表面积、孔径分布、孔隙率和机械强度。

多孔整体材料中孔径分布的评价可以采用压汞法测定,或者由扫描电镜(SEM)观察。SEM可以直观给出所需观察床层截截面的形貌及孔径的情况,但缺点是只能给出断面中的局部结构信息,还无法对整根柱子作出全面而综合的评价。另外,这两种方法均是在材料干燥状态下测定的,因此,并不能真实地反映出色谱运行当中的孔径大小。尽管如此,柱子“干”时和“湿”时的孔径还是存在着严格的对应关系的。整体柱在溶胀状态下的孔径分布可通过逆体积排阻色谱法(ISEC)测定,但是,ISEC的有效应用范围受制于标准样品的尺寸。比表面积可以采用氮气吸附-解吸法进行测定,同样是测定柱子“干”时的状态。柱子基质的化学结构可以用X-射线衍射来测定。

1.2 钛胶基质色谱性能研究现状

1.2.1 概述

从上个世纪 80 年代末期和 90 年代初期开始,Kawawara^[45]等学者开始了对二氧化钛基质在色谱方面应用的研究。1988 年日本的 Nakamura^[46,47]等学者研究了已经商业化的多孔 TiO₂ 微球的色谱性能,结果表明 TiO₂ 和 ZrO₂ 的色谱性能很相似。1994 年该实验组以 TiO₂ 与十八烷基三乙氧基硅烷的反应制备出了键合的反相二氧化钛色谱填料(ODT),并与 ODS 性能进行了比较。其研究表明在使用 ODT 固定相时,分离酸性化合物和碱性化合物时的容量因子随流动相 pH 值的变化趋势跟 ODS 固定相存在着明显的差异。他们认为,出现这

种现象的主要原因是 ODT 表面残留着的钛羟基所导致的。近年来,关于二氧化钛基质色谱性能和应用的研究越来越多^[21,27,48,49],但是关于二氧化钛基质的比表面积、孔体积、孔径表面化学性质和热力学稳定性等方面的研究还有待进一步深入。该固定相用于色谱分离并实现商业化还有很长一段路要走。

对于钛胶基质整体色谱柱(其双连续结构见图 1),目前已经成为了第四代色谱固定相中倍受关注的色谱柱材料。它不仅具备整体柱的所有优点,还具备了很高的分离选择性跟酸碱稳定性(pH: 1-14),从而有望解决硅胶基质色谱固定相对碱性化合物有不可逆吸附的问题,而且钛胶基质色谱固定相还对生物样品中某些带有磷酸基团的物质有特殊的吸附作用,因此,可用于磷脂^[50]、核酸^[51-53,27]及磷酸蛋白或磷酸肽^[54-56]的分离和富集。但 TiO₂整体柱的制备技术还不够完善,其主要的合成方法是模板法和溶胶-凝胶法。制备整体钛胶柱的过程中存在着两大难题:一是钛胶前驱物水解、缩聚反应过快而对其难以控制,二是得到的凝胶体在后续老化、干燥和煅烧过程中,极易发生断裂和变形。为此,经常通过在反应物体系中加入一些螯合剂,如乙酰丙酮、醋酸、丙三醇等螯合钛原子,减弱前驱物对水的敏感度,降低水解、缩聚反应速率;而控制凝胶老化、干燥条件也是一种解决柱子断裂和变形的办法。

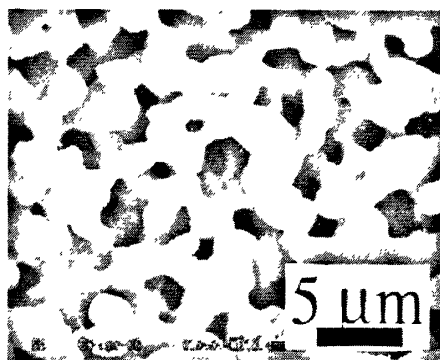


图 1-1 钛胶整体固定相的双连续结构示意图

为了便于了解该研究方面的工作,接下来介绍一下二氧化钛的物理化学性质及一些研究现状。

1.2.2 二氧化钛的物理化学性质

二氧化钛有 3 种晶型:板钛矿、锐钛矿和金红石型。但是,只有锐钛矿跟金红石型具有商业应用价值,比如生产油漆等染料、合成纤维,在整形外科中也有应用。金红石和锐钛矿型都具有四棱形的晶胞。它们的晶胞结构如图^[57]。

锐钛矿和金红石型氧化钛在每 nm² 表面积上大约有 10 个羟基基团^[58]。很多学者研究

指出^[17,47,45-46,59-60]，二氧化钛在酸性、碱性条件下都是不能溶解的，因此可以实现在极度酸性或碱性条件下，对分析物的分离。这种特性，还能实现在 1M 的 NaOH 溶液中进行满足 HPLC 条件的预处理过程。

锐钛矿和金红石型二氧化钛作为色谱柱基质，能过在酸或碱性条件下完全保持稳定，因此能够在传统吸附剂无法接近的分离条件下进行分离。作为晶体材料，氧化钛的比表面积要比无定形的氧化硅和部分结晶化的氧化铝低，但是，氧化钛的表面要更均匀。这种均一的表面具有更高的吸附选择性，更利于不同附着物的附着。氧化钛吸附剂的等电点在 5.5 到 6.5 之间，因此表面的羟基只有微弱酸性，这更利于氧化钛作为正相固定相分离碱性分子，如胺类，否则就要使用反相固定相分离这类物质。

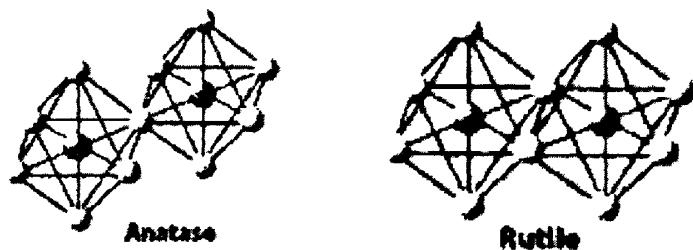


图 1-2 锐钛矿型（左）和金红石（右）二氧化钛的结构

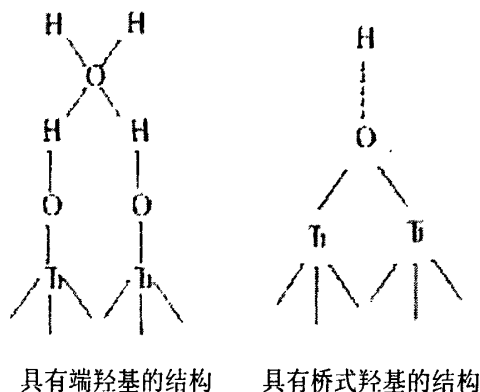


图 1-3 二氧化钛的表面结构

1.2.3 二氧化钛在高效液相色谱(HPLC)中的应用

1.2.3.1 二氧化钛的正相色谱性能

目前，关于二氧化钛的正相色谱性能的研究较多。早在 1990 年 Unger 等^[17,60]就采用溶胶-凝胶法制备出了多孔的 TiO₂ 微球，初步研究了多孔 TiO₂ 的正相色谱性能，并与 ZrO₂、

Al₂O₃ 进行了比较。

钛胶未饱和的 titania ions (IV) 是很强的路易斯酸位点, 能够吸引可供电子对的化合物^[61,13]。相比, 硅胶只能作为阳离子交换剂, 没有配位交换特性。

钛的配位交换行为可能与过渡金属的配位络合相似: $\text{Ti}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O}) + \text{L}^- \leftrightarrow \text{Ti}(\text{H}_2\text{O})\text{L} + \text{OH}^-$, 在 lig 和 L⁻ 作为路易斯碱时, 特别是 F 和聚氧阴离子, 如硼酸盐、羧化物和硫酸盐, 更利于反应发生。除了以上提到的路易斯碱, 钛对于具有强电负性的有机磷酸化合物的磷酸基团也有较强的吸附性^[53]。

在钛胶正相色谱上的分离机制同时还包含着亲水色谱(HILIC)机制。HILIC 概念由 Alpert 提出, 旨在强调极化色谱柱上的一种独特的保留行为。RPLC 是指使用一个极性固定相和一个弱极性流动相, 通常是一种高浓度有机修饰相的水溶液, 如乙腈水溶液。HILIC 的洗脱顺序是从弱极性到极性, 与 RPLC 中观察的结果相反。HILIC 可以看作是正相色谱法的一种变型——它使用“反相”洗脱, 其中水是更强的洗脱剂, 保留机理也是不同的。当高浓度有机修饰相如乙腈添加入洗脱液中时, 会在亲水固定相表面形成一个富水层, 被分析物在富水层中与大体积疏水洗脱液中分配。与 NPLC 或 RPLC 相比较, HILIC 在分离极性物质上, 具有很多优点。在 RPLC 中, 极性分析物的保留很弱, 因此不容易被分离。而极性分析物在 HILIC 上有很好的保留。在 NPLC 中, 水必须严格地从洗脱液中除掉。硅胶的高表面活性和酸性, 使它对痕量水很敏感。但是在 HILIC 模型中, 水作为拟固定相, 不必从 HILIC 洗脱液中排除掉。

1.2.3.2 二氧化钛的反相色谱性能

二氧化钛为金属氧化物, 表面具有可被修饰的羟基, 因此可以通过在其表面进行修饰和改性, 来制备出反相色谱固定相。Murayama^[47]、Kurganov^[17]、Tani^[62-63]等已经报导了以十八碳三乙氧基硅烷为硅烷化试剂的键合二氧化钛固定相(ODT)。Pesek^[48,64]等利用硅氢化法成功地合成了 ODT, 并将硅氢化法制备的 ODT 跟直接与十八碳三乙氧基硅烷键合制成的 ODT 进行了对比。2001 年姜子涛等^[65]采用 PICA 法制备出了多孔 TiO₂ 微球, 并对 ODT 微球进行了色谱评价。通过这些研究表明, ODT 固定相跟传统的 ODS 固定相一样, 也是一种很好的反相色谱固定相。

1.2.3.3 二氧化钛的离子色谱性能

二氧化钛表面呈两性, 所以它可以作为阳离子交换色谱柱的填料, 也可以作为阴离子交换色谱柱的填料。Tani 和 Murayama 等学者^[47,66]很早就报道了有关钛胶基质的离子交换色谱性能。2002 年, Tani^[61]等学者对 TiO₂ 在高效液相色谱中作为离子交换剂与配体交换剂

的色谱特性进行了评价。该研究发现：钛胶制备时的干燥和煅烧温度对它的色谱性能有着很大的影响。在 40℃ 下干燥的 TiO₂ 表现为具有阳离子交换剂的功能，TiO₂ 加热到 200℃ 时表现出两性的交换剂功能，当 TiO₂ 煅烧到 600℃ 时，在 pH4.1~6.5 范围内表现为阴离子交换剂功能。因此，可根据需要来控制钛胶制备的温度，实现不同的钛胶离子交换剂功能。

1.2.3.4 二氧化钛在分离蛋白、肽中的应用

磷酸蛋白质组学是蛋白质组学研究中的重要分支之一，研究涉及了磷酸蛋白(多肽)的分离与鉴定，磷酸化位点的定位和定量分析。蛋白质的磷酸化在所有细胞活动中起着关键性的作用，很多重要的生命过程，如：细胞周期、细胞生长、细胞分化和代谢，都受到可逆的调节蛋白质活性和稳定性的磷酸化过程的调节跟控制。由于细胞中磷酸化蛋白含量较低，磷酸化位点不定，而且磷酸肽的质谱信号经常会受到抑制，加上蛋白质的磷酸化又是一个动态的过程，所以对磷酸蛋白的分析存在着诸多困难。为了进一步了解蛋白质的磷酸化对细胞活动的调节过程和作用，首先研究蛋白的磷酸化位点和特异蛋白所处的磷酸化状态是十分必要的。

目前，磷酸蛋白的分析和鉴定大都采用分离技术结合单极或者多极质谱鉴定的方法，其中磷酸蛋白(肽)的分离和富集是分析鉴别的前提，也就成了磷酸蛋白分析工作中的关键步骤之一。磷酸蛋白的分离和富集方法主要有免疫沉淀法、金属氧化物亲和和吸附法及化学修饰磷酸基团法等^[67]。近年来，用 TiO₂ 分离和富集磷酸蛋白(肽)倍受关注，其过程为：在酸性条件下把含有磷酸肽的样品液与 TiO₂ 柱作用，样品流经钛胶表面的同时，磷酸肽会吸附在 TiO₂ 上，而非磷酸肽则不被保留，首先流出柱子，磷酸肽和非磷酸肽得到了分离；再经碱性溶液洗脱，磷酸肽被洗脱下来，通过色谱-质谱联用技术对流出液中的组分进行分析鉴别。分析前，要对蛋白进行酶解处理，通常采用的蛋白酶主要有胰蛋白酶，也可用其它一些酶，如胰凝乳蛋白酶^[55]、弹性蛋白酶，蛋白酶 K^[68] 等对磷酸蛋白进行水解，酶解作用位点不同，导致得到的多肽片段不同，采用不同酶水解，有利于得到更精确的蛋白质磷酸化信息。

Martijn 等学者^[55]应用一组包含 TiO₂ 柱的二维柱液相色谱串联双级质谱(2D-LC-MS/MS)装置，成功地从多肽混合液中分离出了磷酸肽 RKIpSASEF，回收率达到 90%；对环鸟苷酸依赖蛋白激酶 PKG 的三种不同磷酸化形态的酶解产物进行了分析，最后鉴定出了 8 个磷酸化位点，包括先前未已经被定性过的 Ser-26 和 Ser-44 两个磷酸化位点。Kuroda 等学者^[56,54]也报道了 TiO₂ 基质分离富集磷酸肽的方法，得到较好的分离效果。另外，对钛胶柱进行化学改性或者优化洗脱条件，可实现 TiO₂ 基质对磷酸蛋白(肽)富集的优

化。Liang 等学者^[69]用异丁烯酰基丙氧基三甲氧基硅烷(MPTMS)把纳米二氧化钛硅烷化,再将烷基化后的二氧化钛跟联丙烯酸酯进行聚合交联,通过对不同蛋白质进行分析表明,纳米级的二氧化钛分离蛋白质酶解产物中的磷酸肽和非磷酸肽的能力明显强于微米级的二氧化钛。Yu 等学者^[28]在 TiO₂ 吸附磷酸肽的过程中引入羧基间的竞争吸附机制,达到利用谷氨酸铵盐优化二氧化钛富集磷酸肽条件的目的,还通过将其与 RPLC-MS2-MS3 的联用技术,成功地鉴别出海拉细胞中磷酸肽的种类和磷酸化位点。由此可见,以二氧化钛为基质的 HPLC 在磷酸蛋白质组学研究中必将具有很大的应用前景。

1.3 酪蛋白多肽的研究概况

1.3.1 酪蛋白的构成

酪蛋白(casein)简称 CN,是指哺乳动物(人、牛、羊等)奶中的主要蛋白质。是一种含有大量磷和钙,大型、坚硬、致密和难消化分解的凝乳。大量研究表明,酪蛋白不是单一的蛋白质,它是由 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白和 γ -酪蛋白组成的混合体,其中 γ -酪蛋白实际上是 β -酪蛋白的酶解产物^[70]。这四种酪蛋白氨基酸组成、电荷分布、分子量分布、结合磷的量等方面各不同,可以通过电泳法将它们分离^[71]。常见的牛乳酪蛋白的分类及性质见表 1-1。

表1-1 酪蛋白组成

成分	分子量	等电点	氨基酸残基数
α_{s1} -酪蛋白	27000	4.1	199
α_{s2} -酪蛋白	24000	4.5	207
β -酪蛋白	14100	4.1	207
κ -酪蛋白	21000	5.8-6.0	169

四种酪蛋白的一级结构已经研究得很清楚了,氨基酸序列见图 1-3, 1-4, 1-5, 1-6。

¹
 H. Arg - Pro - Lys - His - Pro - Ile - Lys - His - Gln - Gly - Leu - Pro - Gln - Glu - Val - Leu - Asn - Glu - Asn - Leu ²⁰
 Leu - Arg - Phe - Phe - Val - Ala - Pro - Phe - Pro - Gln - Val - Phe - Gly - Lys - Glu - Lys - Val - Asn - Glu - Leu ⁴⁰
 Ser - Lys - Asp - Ile - Gly - Ser - Glu - Ser - Thr - Glu - Asp - Gln - Ala - Met - Glu - Asp - Ile - Lys - Gln - Met ⁶⁰
 Glu - Ala - Glu - Ser - Ile - Ser - Ser - Ser - Glu - Glu - Ile - Val - Pro - Asn - Ser - Val - Glu - Gln - Lys - His ⁸⁰
 Ile - Gln - Lys - Glu - Asp - Val - Pro - Ser - Glu - Arg - Tyr - Leu - Gly - Tyr - Leu - Glu - Gln - Leu - Leu - Arg ¹⁰⁰
 Leu - Lys - Lys - Tyr - Lys - Val - Pro - Gln - Leu - Glu - Ile - Val - Pro - Asn - Ser - Ala - Glu - Glu - Arg ¹²⁰
 His - Ser - Met - Lys - Glu - Gly - Ile - His - Ala - Gln - Gln - Lys - Glu - Pro - Met - Ile - Gly - Val - Asn - Gln ¹⁴⁰
 Glu - Leu - Ala - Tyr - Phe - Tyr - Pro - Glu - Leu - Phe - Arg - Gln - Phe - Tyr - Gln - Leu - Asp - Ala - Tyr - Pro ¹⁶⁰
 Ser - Gly - Ala - Trp - Tyr - Tyr - Val - Pro - Leu - Gly - Thr - Gln - Tyr - Thr - Asp - Ala - Pro - Ser - Phe - Ser ¹⁸⁰
 Asp - Ile - Pro - Asn - Pro - Ile - Gly - Ser - Glu - Asn - Ser - Glu - Lys - Thr - Thr - Met - Pro - Leu - Trp - OH ¹⁹⁹

图 1-4 α_1 -酪蛋白的一级结构

¹
 H. Lys - Asn - Thr - Met - Glu - His - Val - Ser - Ser - Ser - Glu - Glu - Ser - Ile - Ile - Ser - Gln - Glu - Thr - Tyr ²⁰
 Lys - Gln - Glu - Lys - Asn - Met - Ala - Ile - Asn - Pro - Ser - Lys - Glu - Asn - Leu - Cys - Ser - Thr - Phe - Cys - ⁴⁰
 Lys - Glu - Val - Val - Arg - Asn - Ala - Asn - Glu - Glu - Glu - Tyr - Ser - Ile - Gly - Ser - Ser - Ser - Glu - Glu ⁶⁰
 Ser - Ala - Glu - Val - Ala - Thr - Glu - Glu - Val - Lys - Ile - Thr - Val - Asp - Asp - Lys - His - Tyr - Gln - Lys ⁸⁰
 Ala - Leu - Asn - Glu - Ile - Asn - Glu - Phe - Tyr - Gln - Lys - Phe - Pro - Gln - Tyr - Leu - Gln - Tyr - Leu - Tyr ¹⁰⁰
 Gln - Gly - Pro - Ile - Val - Leu - Asn - Pro - Trp - Asp - Gln - Val - Lys - Arg - Asn - Ala - Val - Pro - Ile - Thr ¹²⁰
 Pro - Thr - Leu - Asn - Arg - Glu - Gln - Leu - Ser - Thr - Ser - Glu - Glu - Asn - Ser - Llys - Llys - Thr - Val - Asp ¹⁴⁰
 Met - Glu - Ser - Thr - Glu - Val - Phe - Thr - Lys - Lys - Thr - Lys - Leu - Thr - Glu - Glu - Glu - Lys - Asn - Arg ¹⁶⁰
 Leu - Asn - Phe - Leu - Lys - Lys - Ile - Ser - Gln - Arg - Tyr - Gln - Lys - Phe - Ala - Leu - Pro - Gln - Tyr - Leu ¹⁸⁰
 Lys - Thr - Val - Tyr - Gln - His - Gln - Lys - Ala - Met - Lys - Pro - Trp - Ile - Gln - Pro - Lys - Thr - Lys - Val ²⁰⁰
 Ile - Pro - Tyr - Val - Arg - Tyr - Leu - OH ²⁰⁷

图 1-5 α_2 -酪蛋白的一级结构

¹
 H. Arg - Glu - Leu - Glu - Glu - Leu - Asn - Val - Pro - Gly - Glu - Ile - Val - Glu - Ser - Leu - Ser - Ser - Ser - Glu ²⁰
 Glu - Ser - Ile - Thr - Arg - Ile - Asn - Lys - Lys - Ile - Glu - Lys - Phe - Gln - Ser - Glu - Glu - Gln - Gln - Gln ⁴⁰
 Thr - Glu - Asp - Glu - Leu - Gln - Asp - Lys - Ile - His - Pro - Phe - Ala - Gln - Thr - Gln - Ser - Leu - Val - Tyr ⁶⁰
 Pro - Phe - Pro - Gly - Pro - Ile - Pro - Asn - Ser - Leu - Pro - Gln - Asn - Ile - Pro - Pro - Leu - Thr - Gln - Thr ⁸⁰
 Pro - Val - Val - Val - Pro - Pro - Phe - Leu - Gln - Pro - Glu - Val - Met - Gly - Val - Ser - Lys - Val - Lys - Glu ¹⁰⁰
 Ala - Met - Ala - Pro - Lys - His - Lys - Glu - Met - Pro - Phe - Pro - Lys - Tyr - Pro - Val - Gln - Pro - Phe - Thr ¹²⁰
 Glu - Ser - Gln - Ser - Leu - Thr - Leu - Thr - Asp - Val - Glu - Asn - Leu - His - Leu - Pro - Pro - Leu - Leu - Leu ¹⁴⁰
 Gln - Ser - Trp - Met - His - Gln - Pro - His - Gln - Pro - Leu - Pro - Pro - Thr - Val - Met - Phe - Pro - Pro - Gln ¹⁶⁰
 Ser - Val - Leu - Ser - Leu - Ser - Gln - Ser - Lys - Val - Leu - Pro - Val - Pro - Glu - Lys - Ala - Val - Pro - Tyr ¹⁸⁰
 Pro - Gln - Arg - Asp - Met - Pro - Ile - Gln - Ala - Phe - Leu - Leu - Tyr - Gln - Gln - Pro - Val - Leu - Gly - Pro ²⁰⁰
 Val - Arg - Gly - Pro - Phe - Pro - Ile - Ile - Val - OH ²⁰⁹

图 1-6 β -酪蛋白的一级结构

1
 Pyro.Glu-Glu-Gln-Asn-Gln-Glu-Gln-Pro-Ile-Arg-Cys-Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser-Asp-20
 Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-40
 Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Leu-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-60
 Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ala-Gln-Ile-Leu-Gln-Trp-Gln-Val-Leu-Ser-80
 Asp-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser-Cys-Gln-Ala-Gln-Pro-Thr-Thr-Met-Ala-Arg-His-Pro-His-100
 Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys-Thr-Glu-Ile-Pro-120
 Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala-Ser-Gly-Glu-Pro-Thr-Ser-Thr-Pro-Thr-Ile-Glu-Ala-Val-Glu-140
 Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu-Ala-Ser-Pro-Glu-Val-Ile-Glu-Ser-Pro-Pro-Glu-Ile-Asn-160
 Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-ValOH-169

图 1-7 κ -酪蛋白的一级结构

1.3.2 酪蛋白酶解产物的研究概况

酪蛋白是乳蛋白中最主要的蛋白质，是一种全价蛋白质，含有全部人体所必需的8种氨基酸，因而，能够为生物体的生长发育提供必需的营养物质。与此同时，酪蛋白许多潜在的生理功能越来越引起了人们的重视^[72]，特别在酶解过程中酪蛋白产生的生物活性肽，受到了广泛关注。

另外，酪蛋白比其他多数蛋白质的疏水性强，分子中疏水性残基所占的比例高达60%以上，其中疏水性和亲水性残基分布很不均匀^[73-74]。酪蛋白中的亲水区域，也就是磷酸丝氨酸基集中的区域，主要是酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptides, CPPs)片断，而疏水区域就是酪蛋白非磷酸肽(casein non-phosphopeptides, CNPPs)集中的区域。CPPs 是研究和开发的最早，能够促进钙、铁等吸收的一种，也是酪蛋白生物活性肽中研究最多的一种。一般在工业化生产 CPPs 过程中，有近 80%的蛋白质副产物 CNPPs 未被合理利用，作为饲料或废弃物被弃去^[75]。而随着研究的深入，发现酪蛋白非磷酸肽也同样具有许多生理功能，如具有降血压活性的ACE抑制肽等。可见，对于酪蛋白酶解产物的利用和研究具有很大的经济效益和社会效益。

1.3.3 糖巨肽的研究概况

酪蛋白糖巨肽最早是在1953年引起科研工作者的注意的，Alais等发现经凝乳酶处理过的牛乳以及酪蛋白盐溶液中(12%三氯乙酸(TCA))可溶性氮含量明显增加^[76]。实质上，酪蛋

白糖巨肽(caseinglycomacropeptide, CGMP)是在干酪生产过程中,凝乳酶分解乳中 κ -酪蛋白后释放的一种C-末端亲水性的、含有唾液酸的活性糖肽^[77],是 κ -酪蛋白的经凝乳酶酶解后的多肽片段,含有64个氨基酸残基,单体相对分子量约为7000 μ ^[78]。

牛乳中的蛋白主要为酪蛋白、乳清蛋白、脂肪球膜蛋白等^[79]。乳清蛋白是酪蛋白沉淀分离时保留在上清液中的多种蛋白质组分的统称,其含量仅次于酪蛋白,占牛奶中蛋白质含量的18%~20%^[80]。干酪制作时,凝乳酶作用于 κ -酪蛋白,生成副 κ -酪蛋白(1~105片段)和糖巨肽(106~169片段),副 κ -酪蛋白存在于凝乳中,糖巨肽则随乳清一同被排出^[81-82],由凯氏定氮法测得糖巨肽约占乳清蛋白含量的15%~25%^[83]。酪蛋白糖巨肽具有多种生理活性功能和营养特性,在食品、日化、药品等领域有广阔的应用前景。其分离提取方法有热沉淀法、化学沉淀超滤法、等电点沉淀超滤法、亲和层析法^[84]、凝胶层析法^[85]等。

1.4 研究目的及意义

近年来,高效液相色谱特别是液相色谱串联多级质谱联用技术在生物大分子分离分析中显示出不可替代的作用。传统的填充色谱柱主要由颗粒状的硅胶或聚合物填料通过均浆的方式装填得到,紧密填充的填料会产生很大的传质阻力,大大地限制了色谱通量。整体色谱柱具有制备方便、柱容量大、通透性好等优点,适合于快速分离。

目前所报道的整体固定相主要为聚合物基质和硅胶基质,且绝大部分工作集中在毛细管柱,这主要是由于合成 HPLC 整体柱由更大的工作难度。聚合物整体固定相大内径柱难于制备,并且在有机溶剂中的溶胀可能导致孔结构的变化,影响柱效和分离效果。

另外,硅胶(SiO_2)基质色谱固定相只能在较窄的 pH 值范围(2.5-7.5)内保持稳定,硅胶整体固定相仍存在着“第二效应”的问题,流动相中磷酸盐缓冲液的使用会加剧对硅胶固定相的腐蚀。钛胶(TiO_2)是两性物质,既可以作为 Lewis 酸,也可以作为 Lewis 碱,在不同条件下可显示出阳离子交换树脂和阴离子交换树脂的性质。同时,它对磷酸蛋白、磷酸酯(盐)、谷氨酸、天冬氨酸等有较强的选择性吸附作用,有望应用于生物体系中不同丰度蛋白的分离。

与此同时,大量研究发现,蛋白水解中间产物肽在机体中有很多重要的生理功能,而且在营养和医疗等方面也有其他物质不可替代的作用。肽可以分为营养型肽和功能型肽^[86]。营养型肽作为蛋白合成的原料,有利于氨基酸吸收,这类肽能提高日粮中氨基酸的利用率和蛋白质在体内的沉积率,还能促进矿物质元素的吸收利用,提高动物的生长性能。功能肽中包括食品感官肽是指添加在食品中能调节食品品质、感观和口味的一类肽的总称。在饲料和食品加工过程中常使用的活性肽有抗氧化肽、表面活性肽、甜味肽、酸味肽、

咸味肽和苦味肽等。介于肽类化合物的种种特殊生理功能，对于肽类化合物的研究引起了人们的广泛关注。因此，开发钛胶基质整体色谱柱成为解决生物大分子快速分离分析的又一途径。据我们所知，目前硅胶整体柱已经有产品面市(Chromolith™，德国 Merck 公司)，而钛胶整体固定相方面的研究还很少(这里指的是：基质完全是由钛胶构成的，不包括钛胶包覆硅胶基质)，且整体固定相还存在着制备的重复性差，整体柱溶胀或收缩问题，硅胶整体柱不能在较大的 pH 范围内使用，梯度淋洗等问题。因此，进一步深入研究整体柱，开发出具有独立知识产权的二氧化钛基质整体固定相，并拓展其色谱应用领域是十分必要的。

本课题将进一步研究开发出钛胶基质整体固定相，并应用于蛋白、肽类样品的分离。此外，钛胶表面与硅胶的相比呈碱性，且能在强酸强碱性条件下稳定存在，因此可以解决碱性化合物在硅胶基质固定相上分离时“拖尾”的大问题，更适合于蛋白质、生物碱、胺类、碱性药物等化合物的分离分析与检验。钛胶基质固定相必将在食品安全与检测、医药卫生、生命科学等领域发挥出硅胶和聚合物固定相都无法替代的作用。发展此类新型固定相将具有重要的理论意义和应用前景，也为蛋白质组学研究提供了一个较有力的工具。

1.5 本课题所要研究的问题

- (1) 采用溶胶—凝胶法制备钛胶基质整体柱；
- (2) 钛胶基质整体材料孔结构和骨架结构的优化；
- (3) 钛胶基质整体材料性能的评价；
- (4) 用正相钛胶填充色谱柱对酪蛋白酶解液和糖巨肽样品进行分离；
- (5) 用反相钛胶填充柱对酪蛋白酶解液和糖巨肽样品进行分离。

第二章 钛胶基质整体材料的制备及表征

2.1 引言

氧化钛以其独特的性质, 在各个领域得到应用, 如光催化剂、传感装置、电极材料、光学装置和色谱技术等方面。如果双级孔二氧化钛整体材料能够可重现地可良好控制地生产出来, 应用于色谱领域, 必将会大大提高二氧化钛在这些领域中的工作性能, 对于生物大分子的分离、鉴别, 更将是一个很好的推动力。但是, 目前氧化钛整体材料应用与高效液相色谱, 还存在很多问题, 比如孔径不容易控制, 比表面积还比较低, 合成材料易断裂, 整个合成过程重现性差等等。因此, 氧化钛整体材料要应用于色谱固定相, 还有待进一步研究与优化。

目前所报道的色谱整体材料主要为聚合物基质和硅胶基质, 且绝大部分工作集中在毛细管柱, 这主要是由于合成 HPLC 整体柱有更大的工作难度。但硅胶整体固定相仍没有从根本上解决如硅胶的酸碱稳定性和“第二效应”的问题。为此, 色谱工作者在寻找新的固定相基质和硅胶基质改善等方面做了不懈的努力, 一是已经开发出可部分代替硅胶的锆胶和钛胶, 这些填料在某些方面的性能已超过硅胶; 二是在硅胶的表面涂覆锆胶或钛胶形成混合基质固定相。据我们所知, 目前硅胶整体 HPLC 柱已经有产品面市(Chromolith™, 德国 Merck 公司), 而钛胶整体 HPLC 固定相方面的研究尚未见详细报导(这里指的是: 基质完全是由钛胶构成的, 不包括钛胶包覆硅胶基质), 且整体固定相还存在着合成的重复性差、聚合物整体柱溶胀或收缩、硅胶整体柱离子色谱不能在大的 pH 范围内使用梯度淋洗等问题。因此, 本章内容旨在通过对钛胶基质整体材料合成条件的探讨, 进一步深入研究整体柱, 为开发具有独立知识产权的钛胶整体固定相提供必要的理论支持和基础数据。

2.2 实验仪器与材料

2.2.1 主要试剂

钛酸丁酯	天津市科密欧化学试剂有限公司
冰乙酸(分析纯)	天津化学试剂厂
盐酸(36.5%, 分析纯)	天津化学试剂厂
正丁醇(分析纯)	天津市科密欧化学试剂有限公司
蒸馏水	实验室制备

2.2.2 主要仪器

FA1104N 电子天平	上海精密仪器有限公司
WH8401-50型多功能电动搅拌器	天津市威华实验仪器厂
KQ5200E超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
送风型定温干燥箱	天津市华北实验仪器有限公司
气套式恒温培养箱	天津市华北实验仪器有限公司
可程序升温马弗炉	天津市华北实验仪器有限公司
光学显微镜 B203	重庆奥特光学仪器有限公司
F-Sorb 3400 型比表面积及孔径分析仪	北京金埃谱科技有限公司
SS-550 扫描电镜	日本岛津公司
D/max-2500 X-射线衍射仪	Rigaku Co. Ltd., Japan

2.3 实验方法及结果讨论

2.3.1 钛胶基质整体材料的制备

2.3.1.1 Sol-gel 法制备钛胶基质整体材料的原理

溶胶-凝胶法是制备材料的湿化学方法中一种崭新的方法。溶胶-凝胶技术是一种由金属有机化合物、金属无机化合物或上述两者的混合物经过水解缩聚过程，逐渐凝胶化及进行相应的后处理，而获得氧化物或其他化合物的新工艺。1846年 J.J.Ebelmen 首先开展这方面的研究工作，20世纪30年代 W.Geffcken 利用金属醇盐水解和凝胶化制备出了氧化物薄膜，从而证实了这种方法的可行性，但直到1971年联邦德国学者 H.Dislich 利用溶胶-凝胶法成功制备出多组分玻璃之后，溶胶-凝胶法才引起科学界的广泛关注，并得到迅速发展。

溶胶-凝胶法采用的原料一般分为五种：金属化合物、水、溶剂、催化剂和其他添加剂。金属化合物是金属元素的起始原料，一般为易水解的金属化合物，最常用的化合物包括金属醇盐、醋酸盐、乙酰丙酮盐、硝酸盐、氯化物等。金属醇盐是溶胶-凝胶法最合适的原料，金属醇盐具有容易用蒸馏、重结晶技术提纯，可溶于普通有机溶剂，易水解等特性^[87]。

溶胶凝胶法主要步骤：(1) 混合、浇铸、凝胶化：初始物的组成和浓度是这一步骤的关键。(2) 陈化：又包括三个过程：缩聚、脱水收缩及粗化。(3) 干燥和热处理：减少残

余钛醇基的数目及强化骨架的刚性、力度。(4) 柱体的包覆。

溶胶凝胶过程的主要反应：(1) 前驱体溶液的水解反应 (2) 溶胶的缩聚反应 (3) 润湿凝胶体的干燥过程变化 (4) 凝胶体烧结过程的变化。

2.3.1.2 钛胶基质整体材料的制备过程

本试验中以钛酸丁酯(正丁基钛)为前驱体, 通过加入冰醋酸螯合钛原子, 降低其对水的敏感度; 通过在反应体系中加入适量正丁醇, 一方面正丁醇是反应生成二氧化钛微粒的良好溶剂, 防止微粒过快聚合而沉淀, 另一方面正丁醇又是钛酸丁酯水解产物, 所以一定程度上抑制了水解反应过快、连续发生; 通过在体系中加入适量盐酸, 调节微粒带点性, 使形成二氧化钛微粒在静电排斥力的作用下, 减慢聚合反应, 但与此同时盐酸也能促进水解反应发生, 所以盐酸用量要控制; 最后在向系统中添加水的过程中, 要不断搅拌, 控制加水的速度, 以防止局部反应过快, 产生沉淀, 使溶胶不均匀。

实验操作过程: 以 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为 1:5:4:0.45:6(文中出现比例均为摩尔比)为例, 试验在室温 21°C 下完成。称取 $10\text{mmol Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4$ 于反应器中, 在电动搅拌器下以一定功率搅拌; 用移液管量取相应量 HAc 在搅拌下逐滴加入盛有钛的反应器中, 螯合 30min ; 之后, 向反应器中滴加相应量正丁醇和 HCl, 搅拌 10min ; 搅匀后, 加大搅拌器搅拌功率, 使用针管滴加相应量蒸馏水, 继续搅拌 30min ; 停止搅拌后, 将反应后的透明溶胶转入玻璃试管中静止于 21°C 下。观察其由溶胶由透明到不透明所需时间即相分离时间(t_{ps})和从溶胶到凝胶所需时间即凝胶化时间(t_{g})。通过对各条件的控制, 来改变他们的差值($t_{\text{g}} - t_{\text{ps}}$), 这个相对的差值是形成整体材料微观结构的关键因素。如果差值太小, 还没有形成连续的两相, 便凝胶了, 使整体材料形成了没有孔的结构; 如果差值太大, 连续的两相继续发生相分离, 使其中二氧化钛连续相断裂, 形成颗粒堆积结构, 同样得不到连续的珊瑚状结构。如图所示:

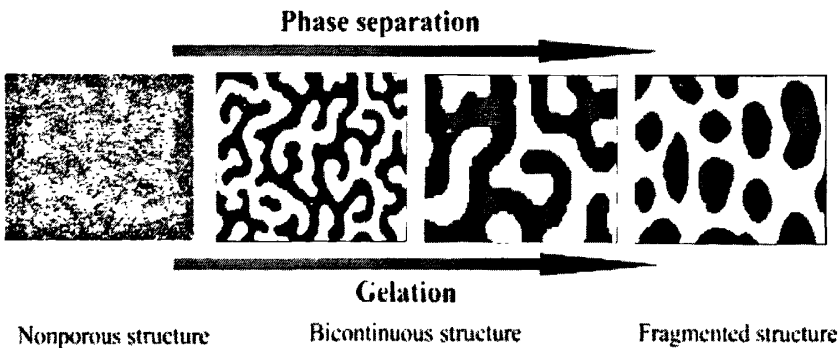


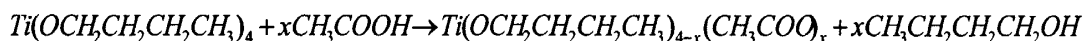
图2-1 凝胶过程中的相分离

得到凝胶之后, 将其在21℃下继续陈化3-4天, 期间凝胶内部仍在进行着复杂的缩聚、脱水收缩及粗化反应, 所以应保持反应温度稳定, 且保持静置状态。在此过程中, 可明显观察到凝胶收缩、出水, 即离浆现象。此后, 将凝胶连同母液一同转置30℃培养箱中, 继续陈化2天, 接着连同母液转置45℃培养箱中陈化2天。此时, 凝胶已经收缩到较稳定状态, 继续陈化则凝胶体积上无明显变化。之后将母液用针管抽出, 将凝胶转置60℃烘箱中, 进行干燥和热处理, 来减少残余钛醇基的数目及强化骨架的刚性、力度, 保持3-4天, 最后将彻底干燥的凝胶升温至80℃, 保持1天, 即可进入马弗炉煅烧。

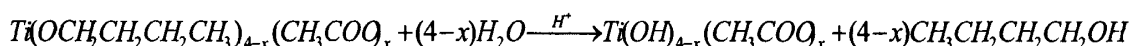
煅烧程序为: 30℃—100℃ (60min)—350℃ (500min)—350℃ (120min)—150℃ (220min)—30℃ (60min)—30℃ (60min)—室温(自然冷却)。

2.3.1.3 制备钛胶基质整体材料的主要反应

冰乙酸中的 CH_3COO^- 可作为配位基团取代正丁基钛中的丁基, 减弱丁基钛的水解和缩聚速度, 通常产生的为二配位体^[87], 即在下式中 $x=2$ 。

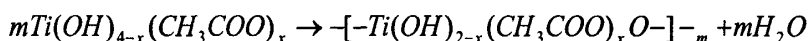


盐酸是水解反应的催化剂, 在 H^+ 作用下, 钛上残留的丁基会较快的被羟基替代。



H^+ 不仅能够促进水解, 也会使钛带上正电互相排斥, 从而抑制缩聚^[41]。

缩聚的反应通常被认为是:^[87]



冰乙酸与异丙氧基钛通常产生二配位体, 即 $x=2$, 此时可以缩合产生线形聚合物, 表现为搅拌过程中反应物粘度增大。随着盐酸催化水解发生, 配位在钛原子上的醋酸根会逐步地被羟基替代, 当 $x=1$ 或 0 时, 反应产物可以缩合生成具有体型聚合物, 随着聚合度的增加, 形成氧化钛颗粒, 聚集直至形成凝胶。

2.3.1.4 钛胶基质整体材料制备条件的探讨

钛酸丁酯的摩尔比例设为1, 初步设定影响钛胶基质整体材料制备的主要因素: 水的比例、醋酸的比例、正丁醇的比例、盐酸的比例、凝胶化温度、以及干燥和热处理条件和各因素之间的交互作用等, 本试验将通过单因素实验确定最佳实验方案。

(1) 通过研究不同醋酸比例对凝胶时间及凝胶后续老化成型的影响, 确定容易得到整体材料的醋酸比例。

固定 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4$: n-butanol:HCl:H₂O 的摩尔比为 1:4:0.5:6, 醋酸摩尔比例分别设定 3、4、5、6 四个点; 固定 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4$: n-butanol:HCl:H₂O 的摩尔比为 1:3:0.5:6, 醋酸摩尔比例分别设

定4、5、6三个点。将制备好的溶胶在同一温度下凝胶化，观察并记录凝胶化时间，同时记录凝胶老化、干燥过程中的外观变化。

(2) 经过醋酸摩尔比例的优化，分别在醋酸与钛酸丁酯摩尔比例为4和5的条件下，研究正丁醇与钛酸丁酯的摩尔比例对凝胶化时间和整体材料性能等的影响。

固定 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为1:4:0.5:6，正丁醇摩尔比例分别设定2.8、3.1、3.5三个点；固定 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为1:5:0.5:6，正丁醇摩尔比例分别设定3.1、3.5、4.0三个点。将制备好的溶胶在同一温度下凝胶化，观察并记录凝胶化时间，同时记录凝胶老化、干燥过程中的外观变化。

(3) 经过正丁醇摩尔比例的优化后，分别在醋酸摩尔比例4、正丁醇摩尔比例2.8和醋酸摩尔比例5、正丁醇摩尔比例4.0的条件下讨论盐酸与钛酸丁酯的摩尔比例对凝胶化时间和整体材料性能等的影响。

固定 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为1:4:2.8:6，盐酸摩尔比例分别设定0.45、0.5、0.55三个点；固定 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为1:5:4:6，盐酸摩尔比例分别设定0.45、0.5、0.55三个点。将制备好的溶胶在同一温度下凝胶化，观察并记录凝胶化时间，同时记录凝胶老化、干燥过程中的外观变化。

(4) 经过盐酸摩尔比例的优化后，分别在 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{HCl}$ 的摩尔比为1:4:2.8:0.5和 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为1:5:4:0.45的条件下讨论水与钛酸丁酯的摩尔比例对凝胶化时间和整体材料性能等的影响。

固定 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{HCl}$ 的摩尔比为1:4:2.8:0.5，水的摩尔比例分别设定为5.5、6.0、6.5；固定 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为1:5:4:0.45，水的摩尔比例分别设定为5.5、6.0、6.5。

(5) 凝胶化温度的影响

取同一比例原料制得的溶胶，在不同温度下凝胶化，讨论凝胶化温度对反应的影响，和对材料结构的影响。

(6) 老化、干燥程序的影响

老化、干燥程序应严格控制，影响湿凝胶的后续反应，如继续的相分离、离浆等，同时选择好的老化干燥程序，也较容易得到完整无裂痕的整体材料。

2.3.1.5 实验结果与讨论

凝胶化时间过长时，水解、缩聚反应已经形成了较大的凝胶颗粒，形成的钛胶连续相已经断裂，这样得到的凝胶，老化、干燥过程中容易断裂，即使形成整体，材料的机械强

度也很差；凝胶化时间过短时，水解缩聚反应不充分，即被凝胶作用固定下来，钛胶连续相没有形成，相分离不明显，甚至没发生，这样得到的凝胶，老化、干燥过程中同样容易断裂，很难形成整体柱。所以要控制凝胶化时间在适当范围内。

(1) 通过研究醋酸与钛酸丁酯的不同摩尔比例对凝胶时间及凝胶后续老化成型的影响，确定容易得到整体材料的醋酸摩尔比例。

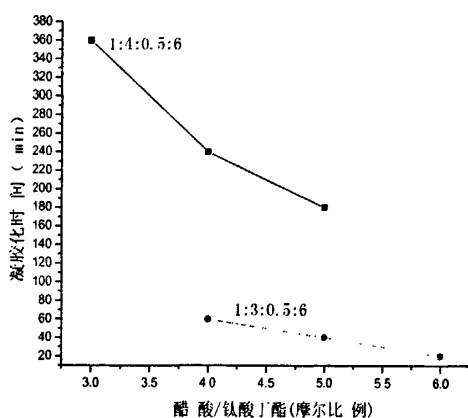


图2-2 醋酸/钛酸丁酯-凝胶化时间

结论：首先确定醋酸的摩尔比例是由于，钛酸正丁酯作为反应的前驱物，对水十分敏感，必须找到适合比例的螯合剂改变它对水的敏感程度。醋酸太少，螯合不够，反应在开始就难以控制；醋酸太多，又会使水解反应不充分，大量残余的醋酸根会对整体材料的结构、性能产生较大影响。在丁醇与钛酸丁酯摩尔比例为4和3时，随醋酸比例的增加凝胶化时间都在缩短，由此可见，较少量醋酸螯合钛原子之后，过量的醋酸同样会促进缩聚反应，缩短凝胶化时间。整体来讲，丁醇摩尔比例为4时凝胶化时间明显高于丁醇摩尔比例是3时的凝胶化时间。这是因为，正丁醇是二氧化钛微粒的良好溶剂，在一定程度上稳定了溶胶，延长了凝胶化时间，也使醋酸摩尔比例增加对凝胶化时间的缩短作用凸显出来。

丁醇摩尔比例为4，醋酸的摩尔比例较大时，凝胶化时间适中，但醋酸摩尔比例继续增大时，得到的湿凝胶在后续老化、干燥中离浆现象剧烈，导致材料内部结构破坏，失去了孔结构，不能用于色谱材料。由此在丁醇摩尔比例为4时，取醋酸摩尔比例5来讨论其它因素影响；丁醇摩尔比例为3，醋酸摩尔比例较小时，凝胶化时间适中，但醋酸摩尔比例继续减小时，得到的湿凝胶在后续的老化、干燥过程中很难继续相分离出现离浆现象，而导致凝胶交联度低易断裂。由此在丁醇摩尔比例为3时，取醋酸摩尔比例4讨论其它因素影响。

由上述两组实验得出：其他试剂摩尔比例一定，正丁醇摩尔比例取3左右时，醋酸摩尔比例是4易成型；正丁醇摩尔比例取4左右时，醋酸摩尔比例是5易成型。

(2) 经过醋酸摩尔比例的优化，在醋酸摩尔比例为4和5时，分别研究其它因素对整体材料性能的影响。

① 正丁醇/钛酸丁酯（摩尔比）对凝胶化时间和整体材料性能的影响

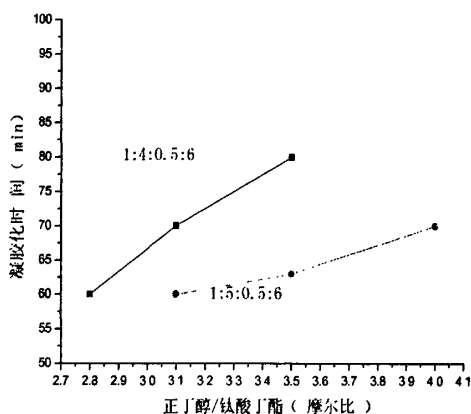


图2-3 正丁醇/钛酸丁酯-凝胶化时间

结论：在醋酸摩尔比例为4和5时，随正丁醇摩尔比例的增加，凝胶化时间都得到了延长。当醋酸摩尔比例为5时，丁醇的这种延长凝胶化时间的作用受到了抑制。这是由于醋酸摩尔比例的增加，有缩短凝胶化时间的作用。这种缩短与丁醇的延长作用相互竞争。

同样是根据找到合适的凝胶化时间，且容易得到完整整体柱的原则，在此次试验中，确定了丁醇与钛酸丁酯的摩尔比例：醋酸摩尔比例4时，取丁醇摩尔比例2.8；醋酸摩尔比例5时，取丁醇摩尔比例4。

② 盐酸/钛酸丁酯（摩尔比）对凝胶化时间和整体材料性能的影响

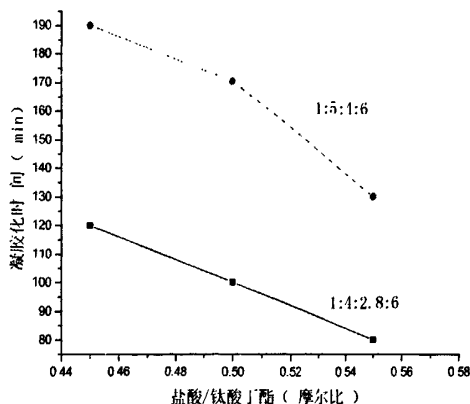


图2-4 盐酸/钛酸丁酯-凝胶化时间

结论：随盐酸摩尔比例的增加，凝胶化时间快速缩短，可见盐酸摩尔比例的微小变化对水解、缩聚反应的影响十分大。试验发现，醋酸跟盐酸对凝胶化时间有共同的缩短作用。

总结上述试验可得到：醋酸可以螯合钛原子，降低钛酸丁酯对水的敏感度，控制水解反应；盐酸能够促进水解反应，此作用与醋酸竞争，同时能够使二氧化钛微粒带上正电荷，减缓缩聚反应。但盐酸摩尔比例增加时，过快的水解反应发生，也诱导了缩聚反应，所以盐酸摩尔比例增加，凝胶化时间也是快速缩短，盐酸过少时，水解不完全，同样影响整体材料的制备；正丁醇是钛酸丁酯和二氧化钛的良好溶剂，可以稳定溶胶，延长凝胶化时间，使得到的凝胶内部结构更均匀。

③水/钛酸丁酯（摩尔比）对凝胶化时间和整体材料性能等的影响

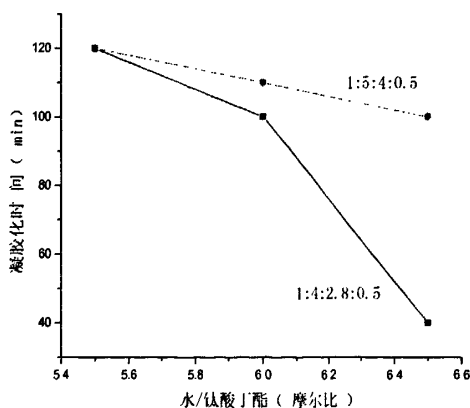


图2-5 水/钛酸丁酯-凝胶化时间

结论：水摩尔比例增加，凝胶化时间快速缩短，尤其在水摩尔比例增加到6后，对凝

胶化时间的影响显著增大。水的增加，直接增加了反应物，从根源上导致水解、缩聚反应的加快，对于整个材料的制备过程影响非常大，所以要严格控制水的量和加水的速度。水的比例也不能太小，否则可能导致水解反应不完全，使后续的缩聚反应不能顺利进行，也就得不到完整的整体材料。

综上所述：在醋酸摩尔比例为5时，选择较大摩尔比例的正丁醇缓解凝胶化过程，同时选择较低的盐酸比例，共同缓解凝胶作用，水则选择能够保证水解反应较完全的比例6；在醋酸摩尔比例为4时，可以选择较小的正丁醇比例和较大盐酸比例，共同促进凝胶化，水比例在保证水解反应较完全时，控制在略低处。从而，确定了两组最佳合成配比为 $Ti(O^iBu)_4:HAc:n\text{-butanol}:HCl:H_2O$ 的摩尔比为 1:5:4:0.45:6 和 1:4:2.8:0.5:5.5，这两种原料配比能控制一个适当的凝胶化时间，较容易得完整的干凝胶。以下在此配比下讨论凝胶化温度对整体柱性能的影响。

(2) 凝胶化温度对凝胶化时间和整体材料性能的影响

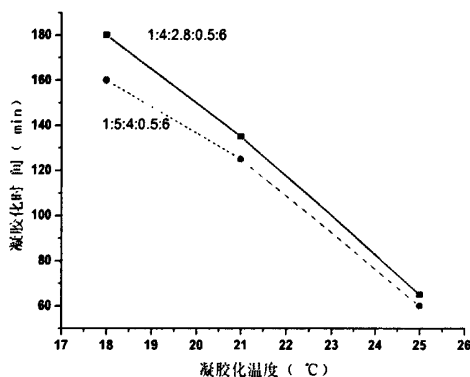


图2-6 凝胶化温度-凝胶化时间

结论：凝胶化温度对凝胶化时间影响较大，从而也影响了凝胶的微观结构，对于整体材料的成型至关重要。凝胶化温度过低，导致难以形成连续结构，微观上缺少孔结构；凝胶化温度过高，导致连续结构断裂，微观上形成较大颗粒堆积机构。这两种情况都不利于具有色谱性能的整体柱的制备。

(3) 老化干燥程序对整体材料性能的影响

老化过程升温不可太快，容易造成湿凝胶表面干燥过快，内部还残留大量液体，毛细管张力作用，使表面爆裂；也不宜过慢，升温的断层会导致后续反应不能连续进行，同样会导致整体材料的断裂。

2.3.2 钛胶基质整体材料的表征

2.3.2.1 二氧化钛凝胶粒子的生长过程

本实验通过生物显微镜,对凝胶化后钛胶整体材料中二氧化钛微粒的生长进行跟踪。观察不同因素对微粒生长的影响,及其对最后得到的钛胶整体材料结构、外观的影响。

2.3.2.2 钛胶基质整体材料的比表面积

本部分利用F-Sorb 3400比表面积及孔径分析仪,通过直接对比法对整体柱比表面积进行表征。

①样品研磨:将值得的整体柱经煅烧至350°C后冷却,在研钵中研磨,转置于锅中。

②样品的烘干:将盛有样品粉末的干锅在120°C下干燥2h,在室温下略冷却,将干锅转置干燥器中,待称量。

③样品的称量:利用分析天枰,准确称量样品管质量,装入样品后再称量,由此计算样品质量,并记录。

④样品比表面积测定:装好盛有样品的样品管,仪器通气、预热,输入标准品、样品质量,选定实验参数,测定比表面积。

2.3.2.3 钛胶基质整体材料的中孔表征—孔径分布

本部分利用F-Sorb 3400比表面积及孔径分析仪,对制备得到的钛胶整体材料进行孔径分析。样品处理同比表面积测定中的样品处理。

2.3.2.4 钛胶基质整体材料的大孔的表征

本部分通过扫描电镜对制备出的钛胶整体材料的大孔结构进行表征。

2.3.2.5 二氧化钛结晶类型的表征

有文献^[30,44]报道,在低温煅烧后,TiO₂形成不定型结构。而该方法合成的钛胶在100°C的煅烧温度下,锐钛矿晶型明显,并随着温度的升高该晶型变得更加突出。

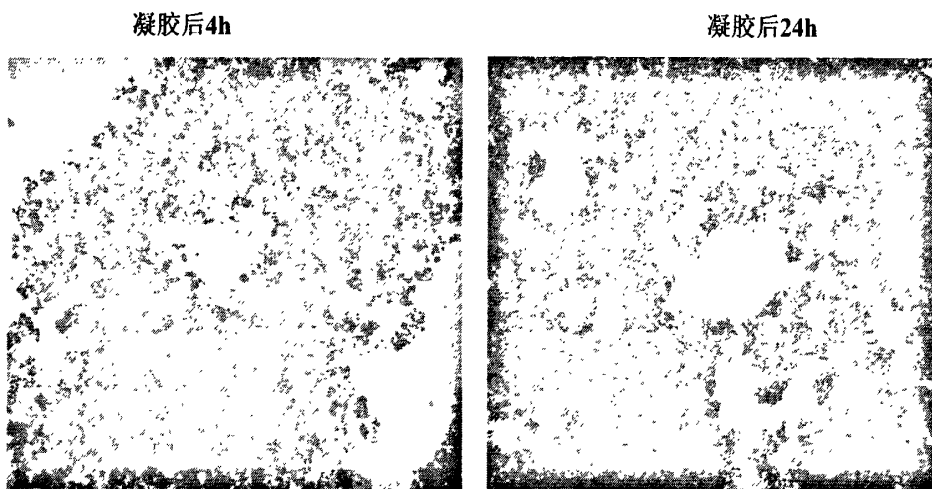
有文献报道^[41,29,88,30],在高温条件下,一般为600-700°C左右,晶型发生由锐钛矿向金红石的转变过程。

为研究该方法合成的钛胶整体材料的晶体结构,我们对反应比例为Ti/HAc/BuOH/HCl/H₂O=1/5/4/0.45/6的样品进行350°C温度的煅烧处理,然后对其进行X-射线衍射分析,判断其晶体结构。

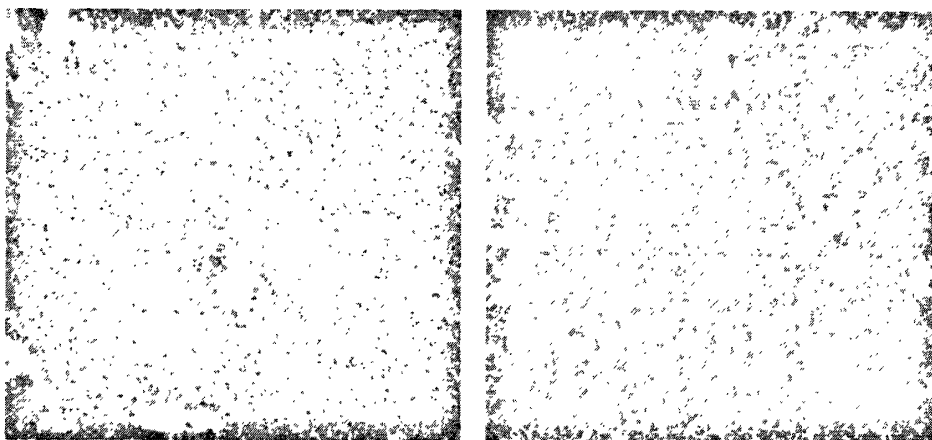
2.3.2.6 实验结果与讨论

(1) 生物显微镜观察凝胶过程中颗粒生长

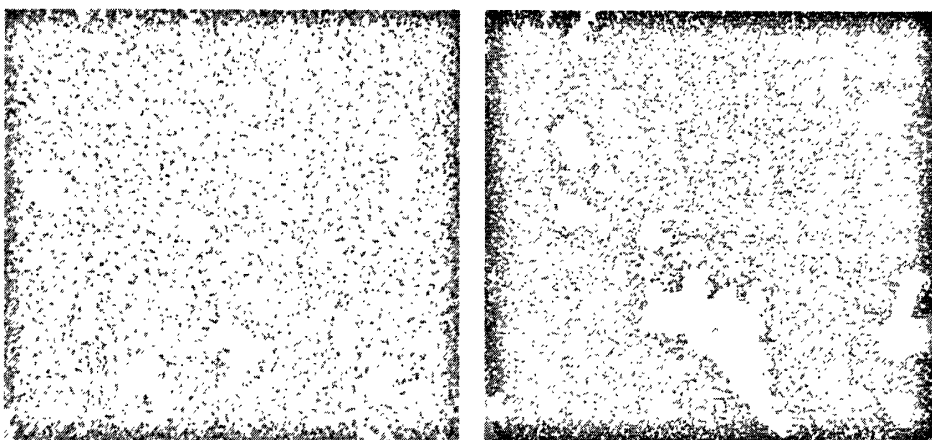
①醋酸摩尔比例4时，正丁醇摩尔比例对凝胶粒子生长的影响



A: 原料配比为1:4:2.8:0.5:6的显微镜照片



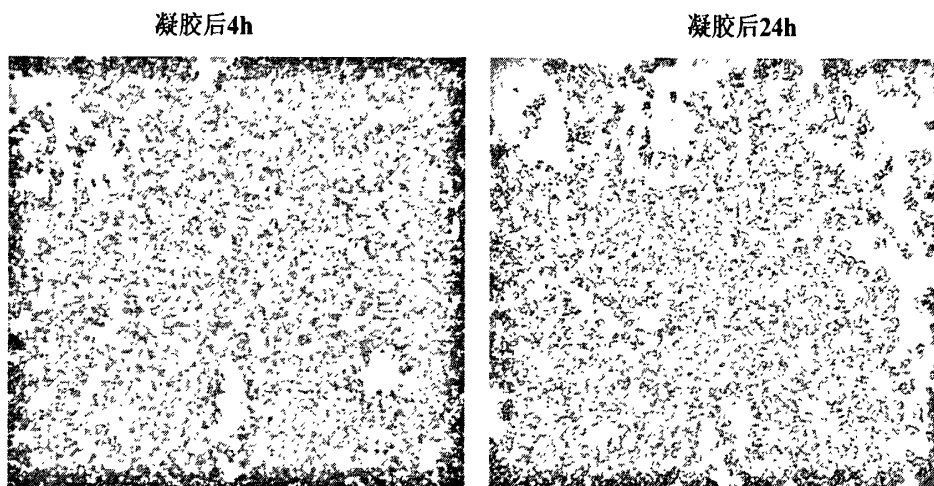
B: 原料配比为1:4:3.1:0.5:6的显微镜照片



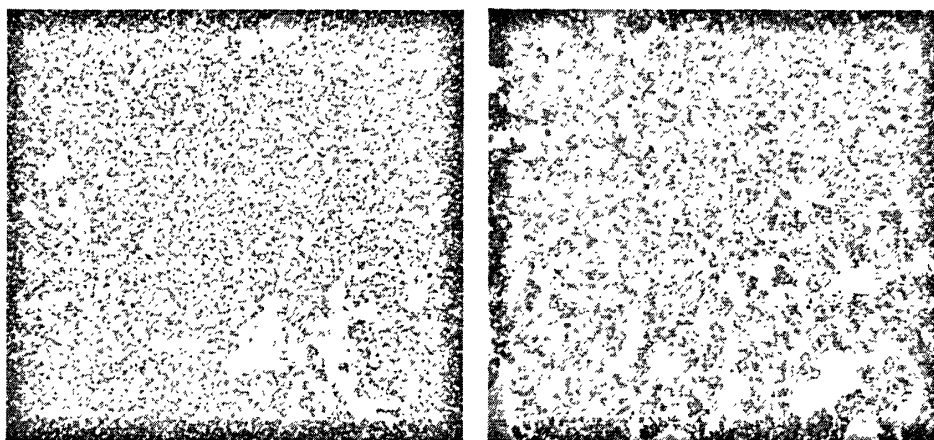
C: 原料配比为1:4:3.5:0.5:6的显微镜照片

图2-7 正丁醇/钛酸丁酯（摩尔比）对二氧化钛微粒生长的影响

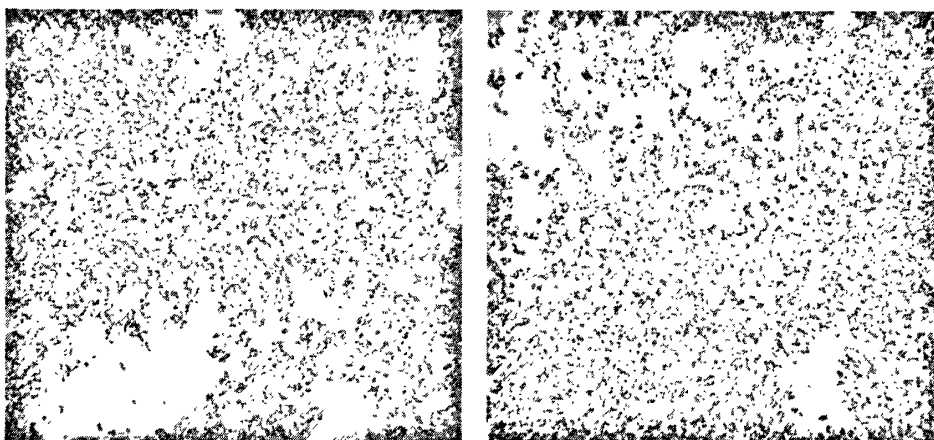
②醋酸摩尔比例5时，正丁醇摩尔比例对凝胶粒子生长的影响



A: 原料配比为1:5:3.1:0.5:6的显微镜照片



B: 原料配比为1:5:3.5:0.5:6的显微镜照片



C: 原料配比为1:5:4:0.5:6的显微镜照片

图2-8 醋酸/钛酸丁酯（摩尔比）对微粒生长的影响

结论：醋酸一定时，随着丁醇增加，颗粒变小且均匀。但是随着醋酸的增多，这种趋势变得不再明显。如醋酸摩尔比例是4时，随丁醇减少，凝胶颗粒明显变大；醋酸摩尔比

例是 5 时，随丁醇的减少，凝胶颗粒变大趋势减缓。

(2) 整体材料比表面积的测定

醋酸摩尔比例为 5 时，各因素对整体材料比表面积的影响：

① 正丁醇摩尔比例对整体材料比表面积的影响

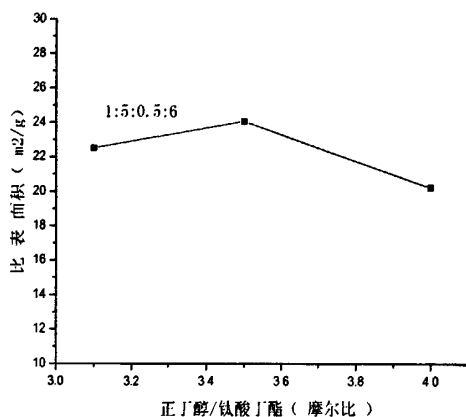


图2-9 正丁醇/钛酸丁酯-比表面积

结论：正丁醇摩尔比例对整体材料比表面积的影响较小。但在较高比例时，比表面积略有下降，这主要是由于，正丁醇是水解反应产物，比例大时水解可能不充分，后续的缩聚反应受到影响，使钛胶内部骨架受到影响，从而降低了比表面积。

② 盐酸摩尔比例对整体材料比表面积的影响

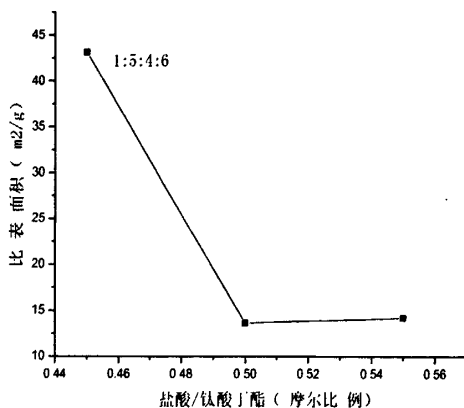


图2-10 盐酸/钛酸丁酯-比表面积

结论：盐酸摩尔比例对整体材料比表面积的影响较大。盐酸摩尔比例较大时，水解反

应快，诱导缩聚反应较快发生，导致钛胶颗粒较大，比表面积较小。

③水摩尔比例对整体材料比表面积的影响

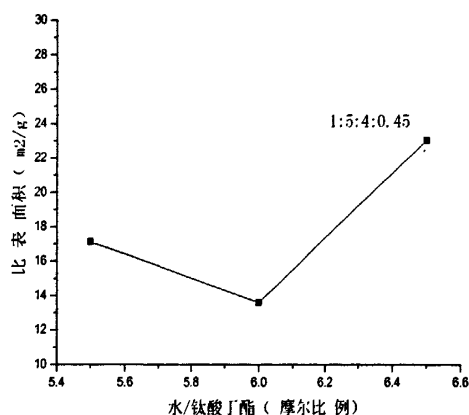


图2-11 水/钛酸丁酯-比表面积

结论：随水摩尔比例的增加，整体材料比表面积增大。水解反应较充分，整体材料交联度较好。但水比例过大时也会导致整体材料不易成型。

综上所述：确定两组最佳比例为 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为 1:4:2.8:0.5:5.5 和 1:5:4:0.45:6，此时两种比例较容易得完整的干凝胶，并且有较大的比表面积。以下在此配比下讨论凝胶化温度对整体柱性能的影响。

④凝胶化温度对整体材料性能的影响

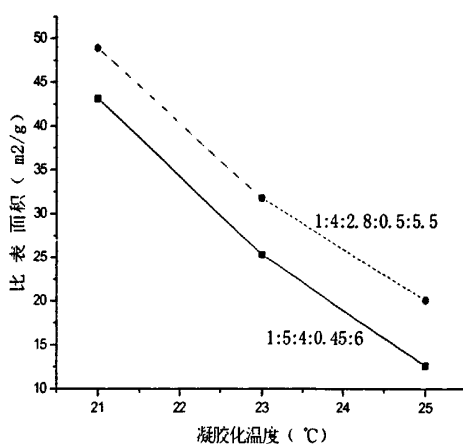


图2-12 凝胶化温度-比表面积

结论：凝胶化温度对整体材料的比表面积影响也较大。随凝胶化温度的升高，整体材料比表面积快速降低。温度能同时促进水解、缩聚反应，对凝胶过程很大。温度过高时，

导致凝胶化时间缩短, 凝胶离浆现象严重, 微观结构被破坏, 比表面积急剧降低。21°C 凝胶化时, 得到的整体材料比表面积分别是 $43 \text{ m}^2/\text{g}$ 和 $44 \text{ m}^2/\text{g}$ 。

(3) 孔径分布

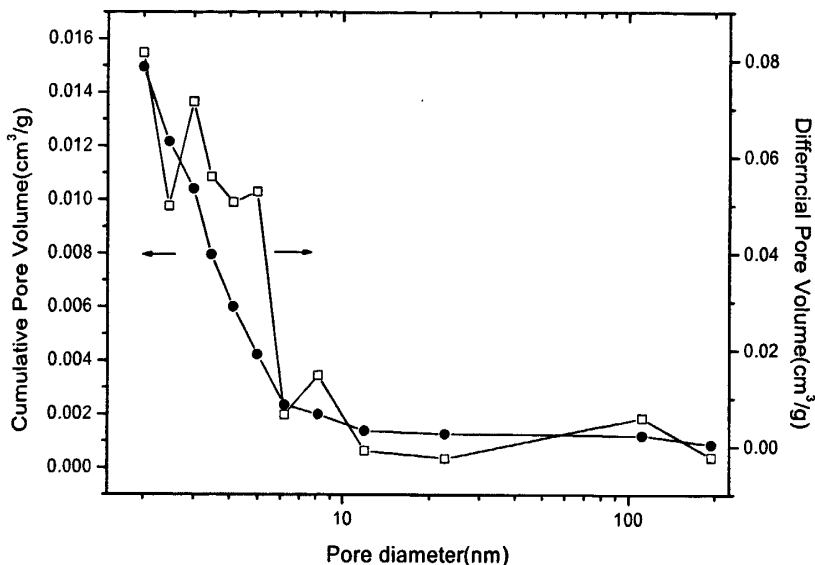


图 2-13 配比 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=1:4:2.8:0.5:5.5$ (摩尔比) 样品的孔径分布图

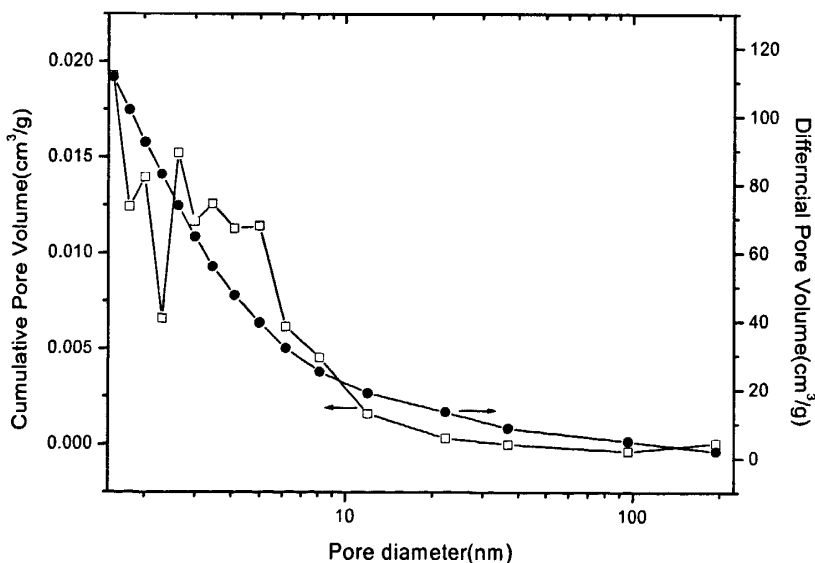


图 2-14 配比 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=1:5:4:0.45:6$ (摩尔比) 样品的孔径分布图

结论: 配比为 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=1:4:2.8:0.5:5.5$ 时, 孔径分布不及配比为 $\text{Ti}(\text{O}^n\text{Bu})_4:\text{HAc}:\text{n-butanol}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=1:5:4:0.45:6$ 时均匀, 这可能主要是因为正丁醇作

为 TiO_2 的良好溶剂，对形成的凝胶结构的均匀程度有很大影响。正丁醇相对比例较大时，得到的凝胶微观结构更加均匀，孔径分布也就更加均匀。

(4) 电镜照片

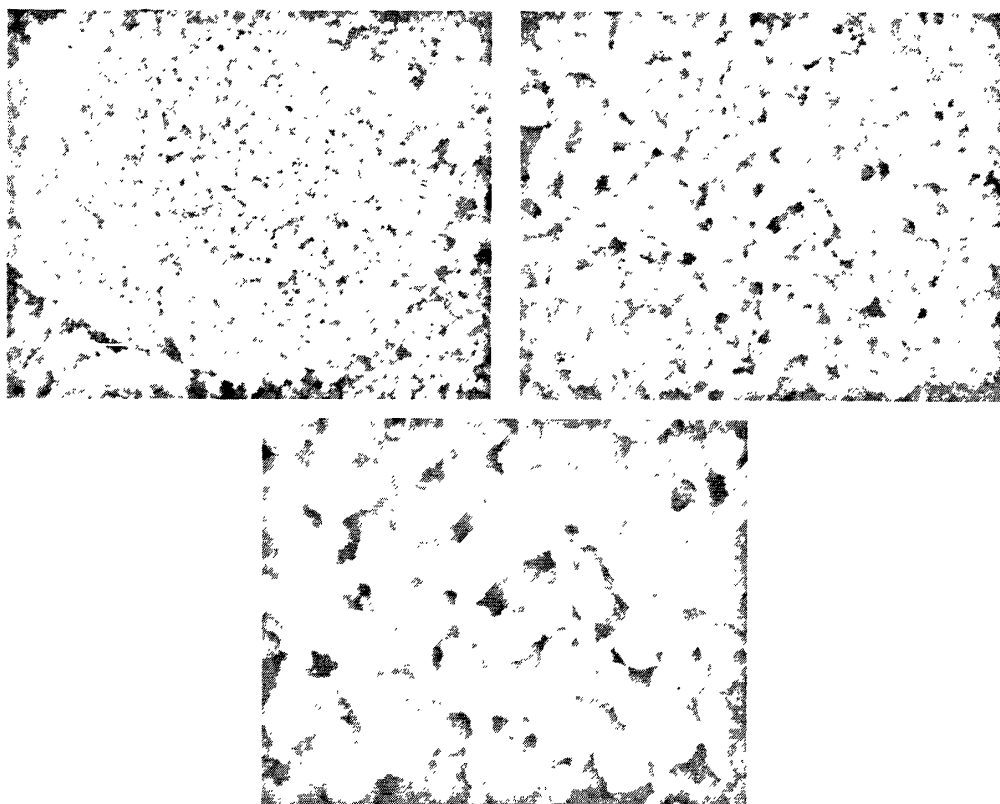


图2-15 配比为1:5:4:0.45:6样品的扫描电镜照片（上左：5 μm ；上右2 μm ；下中1 μm ）

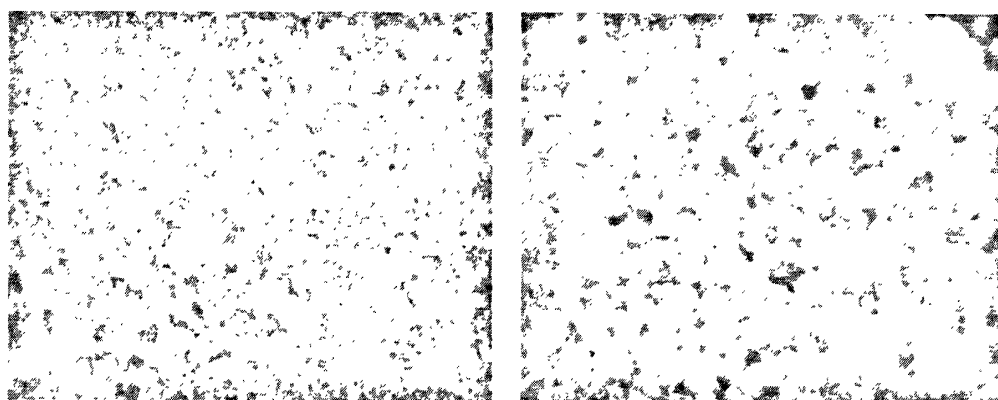


图 2-16 配比为 1:4:2.8:0.5:5.5 样品的扫描电镜照片（左：5 μm ；右 2 μm ）

结论：从图中可以看到，不同原料配比对得到凝胶的结构有很大的影响。原料配比为 $\text{Ti}/\text{HAc}/\text{BuOH}/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}=1/5/4/0.45/6$ 样品易于形成颗粒和珊瑚交联的结构；原料配比为 $\text{Ti}/\text{HAc}/\text{BuOH}/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}=1/4/2.8/0.5/5.5$ 样品形成了明显的小颗粒堆积结构，且结构致密。

结构致密可能是因为正丁醇是二氧化钛微粒的良好溶剂，相对于盐酸和 HAc 的含量，正丁醇含量较少时，水解缩聚反应加快，TiO₂ 微粒不能均匀分布而很快聚合起来，老化过程中也容易发生剧烈的离浆现象，易于形成致密少孔结构；而当正丁醇含量相对较大时，一方面抑制水解，另一方面将二氧化钛微粒良好的溶解，减缓缩聚反应，从而形成了具有一定交联度的珊瑚状结构。若将钛胶整体材料应用于色谱分析领域，就要进一步研究原料配比与凝胶结构之间的关系，以找到最适合的原料配比，合成完美的大孔—中孔双连续的钛胶整体柱。

(5) XRD

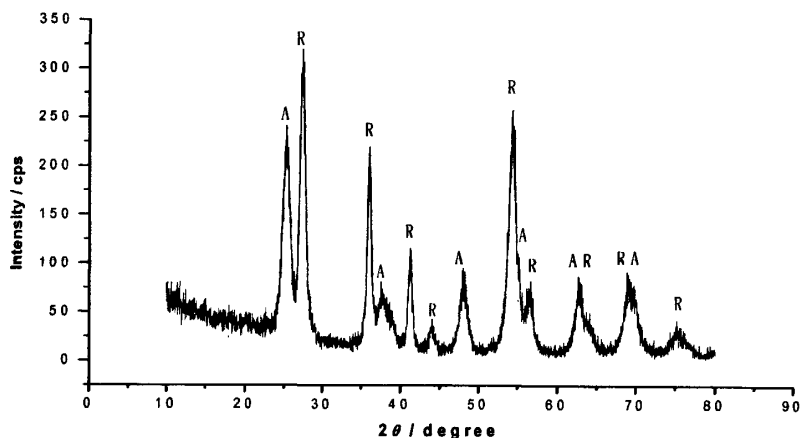


图 2-17 配比 Ti/HAc/BuOH/HCl/H₂O=1/5/4/0.45/6 样品经 350°C 煅烧后的 X-射线衍射图

结论：从图中可以看出，350°C 煅烧温度处理的样品其衍射峰都主要出现了 2 个晶型的系列衍射峰，一个是锐钛矿型 (A) 一个是金红石型 (R)。证明该方法合成的钛胶晶型主要为锐钛矿和金红石型。我们推断，TiO₂ 由不定型向更稳定的锐钛矿晶型转换的过程发生在干燥过程中，因为在酸性环境下，烷氧基钛的钛氧桥易发生断裂重组反应，能够促使更稳定的晶体结构形成^[41]。而金红石结构的出现可能由两方面原因造成的：一是样品结构不均一，出现了颗粒和珊瑚的混合结构^[89]；二是在酸性条件下(pH, ca. 0.15)，烷氧基钛易于形成锐钛矿-金红石的混合结构^[90]。由此可见，钛胶形成何种晶型是由温度和反应条件共同决定的。

2.4 实验小结

通过单因素实验对钛胶整体材料制备条件的研究，可以看出导致材料比表面积下降的

根源是，水解、缩聚反应过快，形成的凝胶在老化过程中出现剧烈离浆现象，使微观结构致密，孔结构遭到破坏。造成这种结果的原因可归结为：①醋酸或盐酸摩尔比例过大；②凝胶化温度过高；③正丁醇摩尔比例相对较小。导致材料机械强度降低的原因可归结为：①醋酸或盐酸摩尔比例过大；②凝胶化温度过高；③正丁醇摩尔比例相对较小；④水的摩尔比例过大。导致材料不易成型的原因可归结为：①正丁醇摩尔比例相对较大；②凝胶化温度过低；④水的摩尔比例较小；⑤醋酸或盐酸摩尔比例过小。

此外老化、干燥过程中，温度、湿度等条件的控制也同样影响到了整体材料的各方面性能。

第三章 正相钛胶填充色谱柱对酪蛋白酶解液、肽的分离

3.1 引言

钛胶未饱和的 titania ions (IV)是很强的路易斯酸位点,能够吸引可供电子对的化合物^[5,6]。相比,硅胶只能作为阳离子交换剂,没有配位交换特性。

钛的配位交换行为可能与过渡金属的配位络合相似: $\text{Ti}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})+\text{L}^- \leftrightarrow \text{Ti}(\text{H}_2\text{O})\text{L}+\text{OH}^-$, 在 lig^- 和 L^- 作为路易斯碱时,特别是 F 和聚氧阴离子,如硼酸盐、羧化物和硫酸盐,更利于反应发生。除了以上提到的路易斯碱,钛对于具有强电负性的有机磷酸化化合物的磷酸基团也有较强的吸附性^[53]。

与锆相似,钛也被广泛用来捕获有机磷酸盐^[91-93,55-56]。例如, Ikeguchi et al.^[92]通过在钛胶预前柱上捕获磷酸化氨基酸,通过阴离子交换分离,再通过后置柱反应检测,设计除了一个高选择性的有机磷酸化合物分析器。Pinkse et al.^[55]采用二氧化钛预前柱从蛋白水解液中分离富集磷酸肽,并用 2D-nanoLC-ESI-MS/MS 分离鉴定。Hata et al.^[94]设计了 2D-LC 系统,用钛胶色谱柱高通量捕获磷酸蛋白,再经硅胶色谱柱分离。

与这些捕获工作相比, Miyazaki et al.^[53]最近用钛作为分离媒介,分离了 4 种核苷酸。当流动相为 60%乙腈,磷酸缓冲溶液浓度为 50mM 时,得到了较好的柱效(~ 2600 plates/m)。尽管这个流动相是有效地,但是为什么这种特殊的条件是适合的,还不是很清楚。

Charles A. Lucy^[95]等,系统地研究了,有机磷酸化合物 AMP, ADP, ATP 在钛胶上的分离机制——路易斯酸位点的配位交换机制和亲水色谱机制的共同作用。包括流动相有机相组成、缓冲盐种类和浓度等对核苷酸保留机制和柱效的影响。并在钛胶柱上分离了 15 种核苷酸和他们的中间物,最小分离度达到 1.3。

在钛胶正相色谱上的分离机制同时还包含着亲水色谱(HILIC)机制。HILIC 概念由 Alpert 提出,旨在强调极化色谱柱上的一种独特的保留行为。RPLC 是指使用一个极性固定相和一个弱极性流动相,通常是一种高浓度有机修饰相的水溶液,如乙腈水溶液。HILIC 的洗脱顺序是从弱极性到极性,与 RPLC 中观察的结果相反。HILIC 可以看作是正相色谱法的一种变型——它使用“反相”洗脱,其中水是更强的洗脱剂,保留机理也是不同的。当高浓度有机修饰相如乙腈添加入洗脱液中时,会在亲水固定相表面形成一个富水层,被分析物在富水层中与大体积疏水洗脱液中分配。与 NPLC 或 RPLC 相比较, HILIC 在分离极性物质上,具有很多优点。在 RPLC 中,极性分析物的保留很弱,因此不容易被分离。

而极性分析物在 HILIC 上有很好的保留。在 NPLC 中, 水必须严格地从洗脱液中除掉。硅胶的高表面活性和酸性, 使它对痕量水很敏感。但是在 HILIC 模型中, 水作为拟固定相, 不必从 HILIC 洗脱液中排除掉。

此后 Charles A. Lucy^[96]等继续研究了羧酸化合物在钛胶正相色谱上的保留机制。通过对流动相乙腈浓度、缓冲液类型和浓度、pH 和温度的研究, 更好地了解了钛胶 HILIC 保留机制。建立了基本的钛胶 HILIC 机理指导方针, 并用于分离一些羧化物的混合物。

本章实验将酪蛋白经胰蛋白酶水解产物和糖巨肽样品, 通过以二氧化钛为色谱填料的正相高效液相色谱柱进行分离分析, 优化色谱条件, 找出能将酪蛋白胰蛋白酶解产物进行良好分离的色谱条件。

3.2 实验仪器与材料

3.2.1 主要试剂

酪蛋白	Sigma公司
胰蛋白酶(1:250)	Sigma公司
碳酸氢铵	天津市科密欧化学试剂有限公司
氢氧化钠	天津化学试剂三厂
乙腈(色谱纯)	天津市科密欧化学试剂有限公司
娃哈哈纯净水	杭州娃哈哈集团有限公司
磷酸二氢钠(色谱纯)	天津市科密欧化学试剂有限公司
磷酸氢二钠(色谱纯)	天津市科密欧化学试剂有限公司

3.2.2 主要仪器

HSS-1 (B) 型恒温浴槽	成都仪器厂
801-离心机	上海手术器械厂
FA1104N 电子天平	上海精密科学仪器有限公司
PH S-25 数显酸度计	上海虹益仪器仪表有限公司
Agilent 1200 系列高效液相色谱仪	安捷伦公司
20 μ L 微量注射器	安捷伦公司

0.45 μ m 针心过滤膜	上海密利欧
KQ5200E 超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
色谱柱(Sachtopore-NP, 5 μ m diameter, 300 \AA pore size, 250 \times 4.6mm id.)	Zirchrom 公司

3.3 实验方法及结果讨论

3.3.1 酪蛋白酶解产物的分离

3.3.1.1 酪蛋白酶解液的制备

取一定量的酪蛋白用50mM的碳酸氢铵(NH_4HCO_3)配制成一定底物浓度为5%的溶液,装入具塞三角瓶中,将其放入恒温水浴中置温度为55 $^\circ\text{C}$,用0.5mol/L的氢氧化钠(NaOH)溶液调节反应溶液pH至7.5,预热30min。然后在反应液中加入62.44 U/g的胰蛋白酶,开始酶解。在55 $^\circ\text{C}$ 水浴中水解180min,水解过程中NaOH溶液调节pH始终保持在7.5。反应结束后将具塞三角瓶放入沸水浴中5min灭酶活,将反应液冷却至室温后,离心5min(3000/min),取少量上清液过0.45 μ m的微孔滤膜备用,将剩余上清液冷冻保存。

3.3.1.2 样品准备

取酪蛋白酶解液,用流动相稀释30倍,过0.45 μ m有机微孔滤膜,待分离。

3.3.1.3 色谱条件的优化

1、固定相的选择

由于二氧化钛具有极好的化学稳定性,在pH为1-14的范围内都能稳定存在,同时,它对磷酸蛋白、磷酸酯(盐)、谷氨酸、天冬氨酸等有较强的特异性吸附作用,因此本实验中采用钛胶基质的色谱柱,通过在流动相中加入磷酸缓冲液对酪蛋白酶解产物进行洗脱分离的研究。

2、检测波长的选择

因为酪蛋白经过胰蛋白酶水解之后的产物是多肽与氨基酸的混合物,而多肽和氨基酸的紫外吸收波长大多在220nm左右,因此实验中将在220nm检测波长下对酪蛋白酶解产物的分离进行监测。

3、钛胶裸柱表面配位络合位点被磷酸盐不同程度饱和时对分离效果的影响

实验前分别用pH6.0的磷酸缓冲液终浓度为15、30、50、70mM的流动相对钛胶裸柱(正相柱)上的配位络合位点进行饱和修饰,使磷酸缓冲液中的磷酸基团结合在钛胶表面,不同程度改变钛胶表面性质,然后采用同一流动相,取乙腈(ACN)浓度85%,磷酸缓冲液pH6.0,

终浓度1.5mM，在不同修饰程度的柱子上分离酪蛋白酶解产物，讨论不同浓度磷酸缓冲盐修饰柱子后，对酪蛋白酶解产物分离情况的影响。

4、流动相比对分离效果的影响

实验中采用乙腈-水体系作为流动相，同时在流动相中加入一定浓度和pH值的磷酸氢二钠与磷酸一氢钠配合的缓冲液。固定流动相流速为1.0ml/min，进样量20 μ l 时，柱温40 $^{\circ}$ C，讨论以下因素，对于酪蛋白酶解产物分离的影响：

(1) 讨论 pH 值对分离的影响：乙腈浓度 80%，磷酸盐缓冲液终浓度 1.0mM，缓冲液 pH 分别为：5.0、6.0、7.0、8.0。

(2) 讨论乙腈浓度对分离的影响：选择 pH5.0 磷酸缓冲液终浓度 2mM，乙腈浓度分别为 75%、80%、85%。

(3) 讨论流动相中磷酸缓冲液终浓度对分离的影响：乙腈浓度 80%，pH5.0 磷酸缓冲液终浓度分别为：0、2、4、6mM。

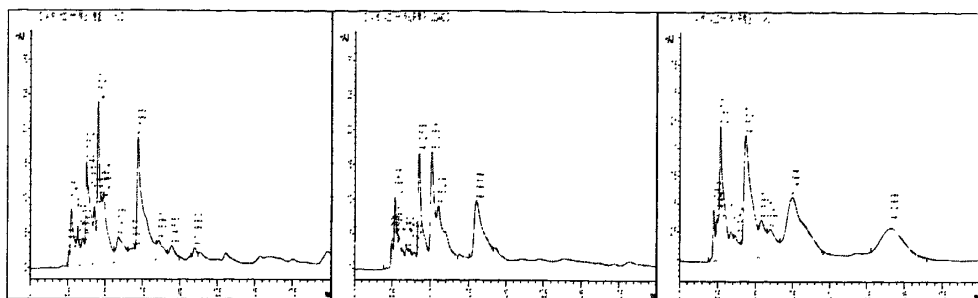
5、流速对分离效果的影响

固定流动相比比例，改变流速，考查不同流速时对酪蛋白酶解各产物分离效果的影响。

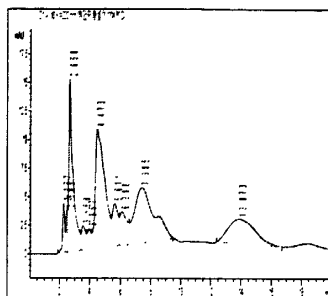
3.3.1.4 实验结果与讨论

(1) 钛胶裸柱修饰对分离效果的影响：

流动相流速为1.0ml/min，进样量20 μ l 时，柱温40 $^{\circ}$ C，检测波长220nm；流动相：乙腈浓度85%，磷酸缓冲液pH6.0，终浓度1.5mM。磷酸缓冲液终浓度为15、30、50、70mM。



a: 15mM 磷酸缓冲盐修饰裸柱 b: 30mM 磷酸缓冲盐修饰裸柱 c: 50mM 磷酸缓冲盐修饰裸柱



d: 70mM 磷酸缓冲盐修饰裸柱

图3-1 不同浓度磷酸钠缓冲盐修饰钛胶裸柱对分离效果的影响

该因素对跟踪峰保留值和柱效的影响:

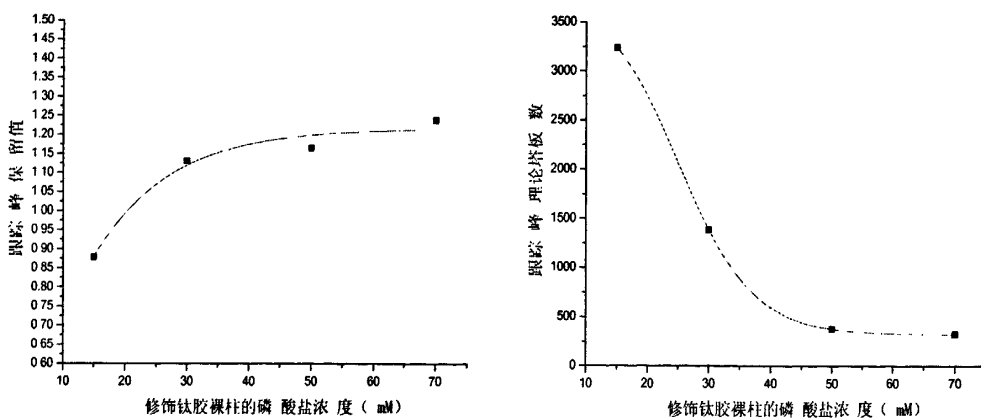


图 3-2 不同磷酸盐浓度修饰钛胶裸柱对跟踪峰保留值和理论塔板数的影响

结论: 随柱子修饰程度的增大, 跟踪峰保留值略有增加后变平稳; 跟踪峰理论塔板数随柱子修饰程度加大明显降低。综合考虑保留值与柱效, 选取 15mM 磷酸盐修饰色谱柱。

(2) 流动相中缓冲盐pH值对分离效果的影响:

流动相流速为 1.0ml/min, 进样量 20 μ l 时, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 检测波长 220nm; 流动相: 乙腈浓度 80%, 磷酸缓冲液终浓度 1.0 mM。磷酸缓冲液 pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0。

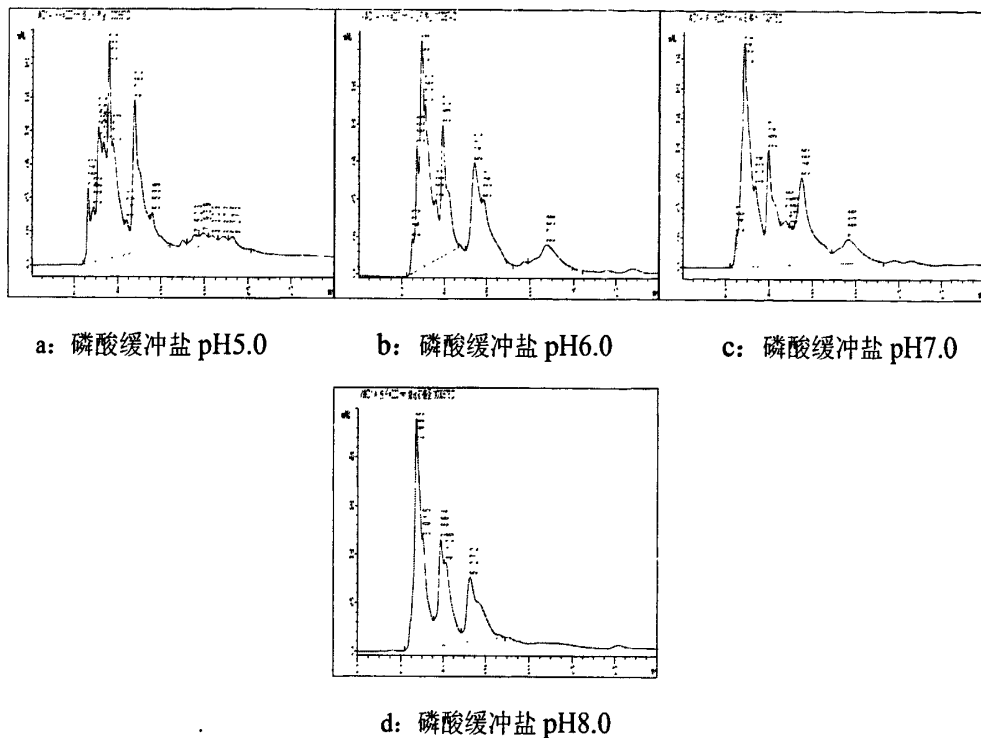


图 3-3 流动相中缓冲盐 pH 值对分离效果的影响

该因素对跟踪峰保留值和柱效的影响:

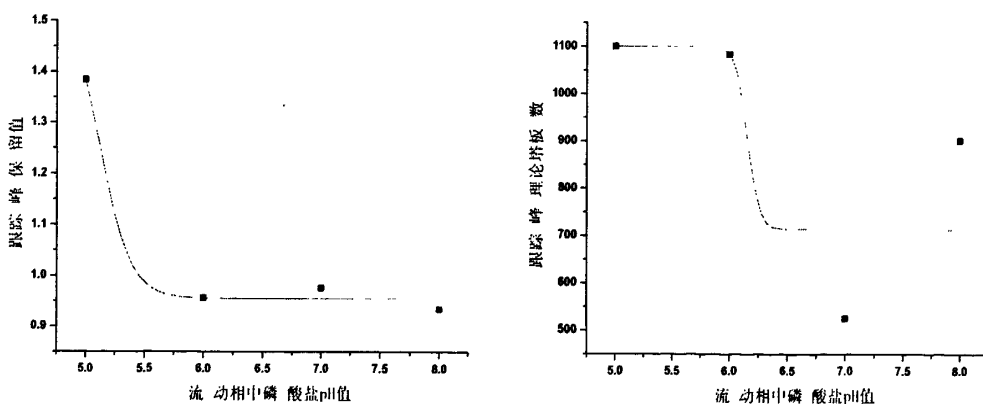


图 3-4 流动相中磷酸缓冲盐浓度跟踪峰保留值和理论塔板数的影响

结论: 当 pH 由 5.0 升到 6.0 时, 跟踪峰保留值明显降低, 随 pH 值继续升高至 8.0, 保

留值不变；当 pH 由 5.0 升到 6.0 时，跟踪峰理论塔板数在较高处保持不变，之后随 pH 值继续升高至 7.0，快速降低。综合考虑保留值与柱效，选定 pH5.0 为试验流动相缓冲盐 pH。

(3) 流动相中乙腈浓度 (%) 对分离效果的影响：

流动相流速为 1.0ml/min，进样量 20 μ l 时，柱温 40 $^{\circ}$ C，检测波长 220nm；流动相：磷酸缓冲液 pH5.0，终浓度 2.0 mM。乙腈浓度分别为：75%、80%、85%。

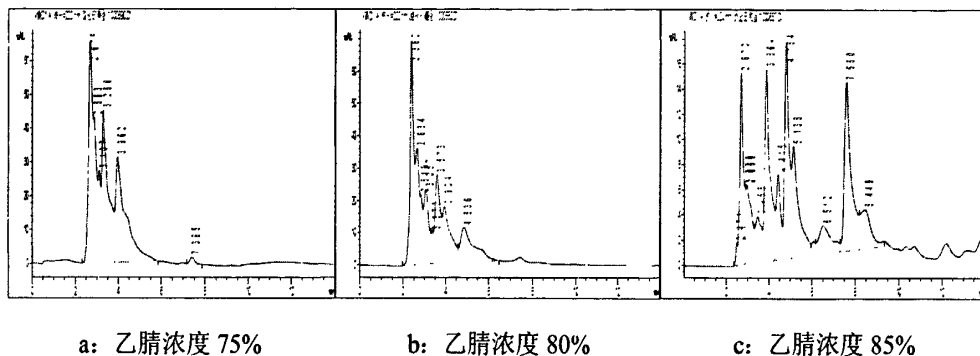


图 3-5 流动相中乙腈浓度对分离效果的影响

该因素对跟踪峰保留值和柱效的影响：

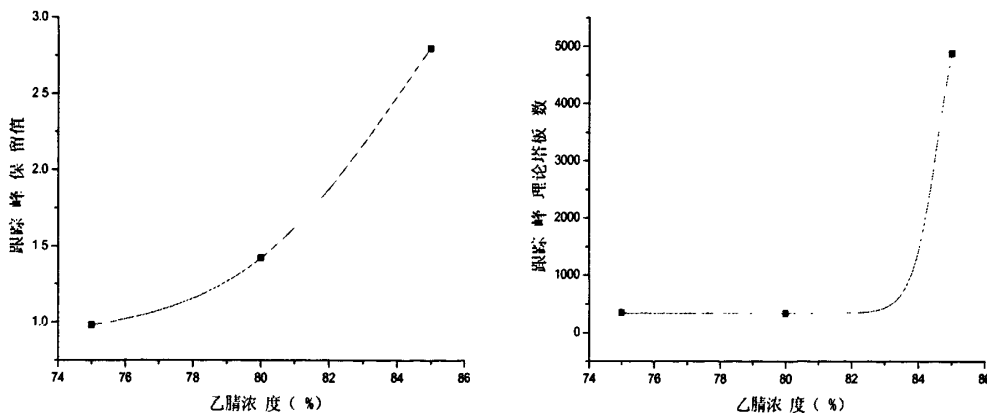


图 3-6 流动相中乙腈浓度对跟踪峰保留值和理论塔板数的影响

结论：随流动相中 ACN 浓度的增加，跟踪峰保留值逐渐增大；理论塔板数在低 ACN 浓度时保持平稳，随 ACN 浓度继续增大显著增加。可见，在高 ACN 浓度下能得到较好的峰保留值与较高的柱效。

(4) 流动相中缓冲盐终浓度 (mM) 分离效果的影响：

流动相流速为 1.0ml/min, 进样量 20 μ l 时, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 检测波长 220nm; 流动相: 乙腈浓度 75%, 磷酸缓冲液 pH5.0。缓冲盐浓度浓度分别为: 0、2、4、6mM。

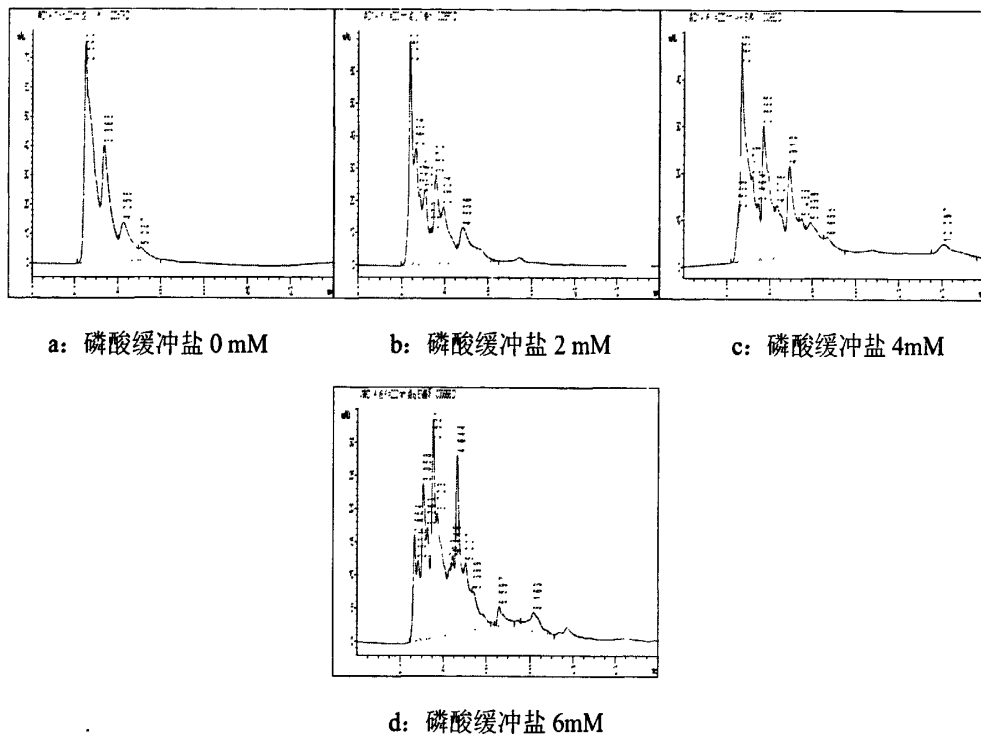


图 3-7 流动相中磷酸缓冲盐终浓度 (mmol/L 即 mM) 对分离效果的影响

该因素对跟踪峰保留值和柱效的影响:

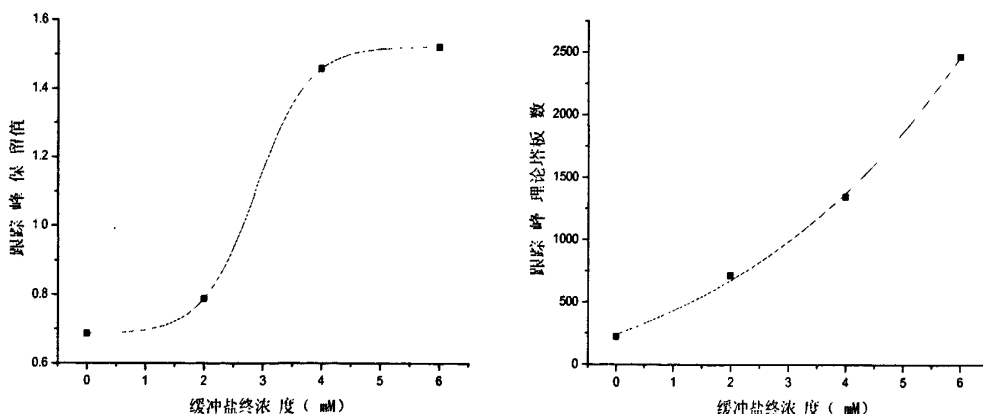


图 3-8 流动相中缓冲盐终浓度对跟踪峰保留值和理论塔板数的影响

结论: 在统一修饰柱子后, 按盐浓度从小到大顺序试验, 得到这样的结论, 随盐浓度

增加,跟踪峰保留值先较缓慢增加,随之快速增加,最后平稳。跟踪峰理论塔板数随盐浓度增加,单调增大。所以在选用流动相 ACN 浓度确定情况下,可以通过提高流动相盐浓度来得到较好的保留值和柱效。

综上结果考虑,选定流动相为 85%ACN,磷酸钠缓冲盐 pH5.0 磷酸钠盐的最大溶解度 2.0mM。色谱图如下:

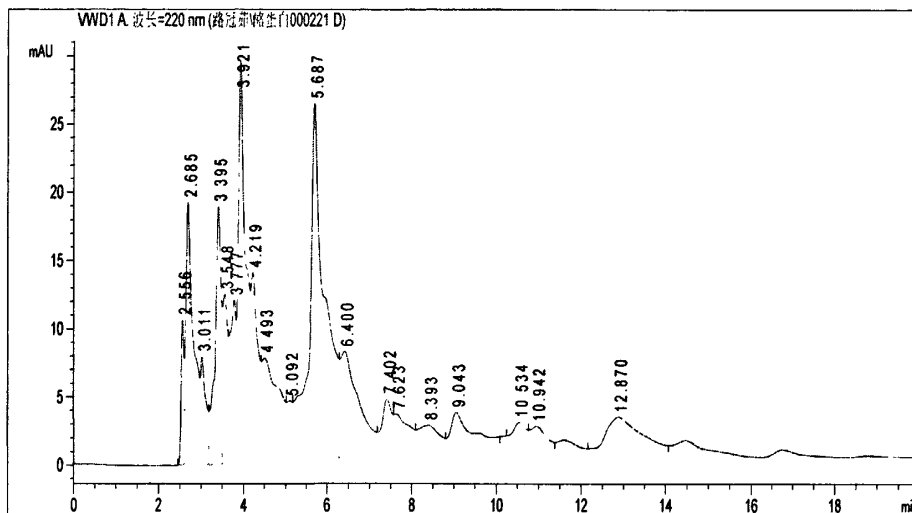


图 3-9 酪蛋白酶解液最佳分离条件色谱图

共分离出 19 个组分。

3.3.2 糖巨肽混合样品的分离

3.3.2.1 样品准备

用流动相配制糖巨肽样品,浓度为 1mg/mL,过 0.45 μ m 有机微孔滤膜,待分离。

3.3.2.2 色谱条件的优化

1、固定相的选择

由于二氧化钛具有极好的化学稳定性,在 pH 为 1-14 的范围内都能稳定存在,同时,它对磷酸蛋白、磷酸酯(盐)、谷氨酸、天冬氨酸等有较强的特异性吸附作用,因此本实验中采用钛胶基质的色谱柱,通过在流动相中加入磷酸缓冲盐对糖巨肽样品进行洗脱分离的研究。

2、检测波长的选择

实验中将在 226nm 检测波长下对糖巨肽的分离进行监测。

3、钛胶裸柱表面配位络合位点被磷酸盐不同程度饱和时对分离效果的影响

实验前分别用 pH6.0 的磷酸缓冲液终浓度为 15、30、50、70mM 的流动相对钛胶裸柱(正相柱)上的配位络合位点进行饱和修饰,使磷酸缓冲液中的磷酸基团结合在钛胶表面,不同程度改变钛胶表面性质,然后采用同一流动相,取乙腈(ACN)浓度 85%,磷酸缓冲液 pH6.0,终浓度 1.5mM,在不同修饰程度的柱子上分离糖巨肽,讨论不同浓度磷酸缓冲盐修饰柱子后,对糖巨肽分离情况的影响。

4、流动相比比例对分离效果的影响

实验中采用乙腈-水体系作为流动相,同时在流动相中加入一定浓度和pH值的磷酸氢二钠与磷酸一氢钠配合的缓冲液。固定流动相流速为1.0ml/min,进样量20 μ l 时,柱温40 $^{\circ}$ C,讨论以下因素,对于酪蛋白酶解产物分离的影响:

(1) 讨论 pH 值对分离效果的影响:乙腈浓度 80%,磷酸盐缓冲盐终浓度 1.0mM,缓冲液 pH 分别为: 5.0、6.0、7.0、8.0。

(2) 讨论乙腈浓度对分离效果的影响:选择 pH5.0 磷酸缓冲液终浓度 2mM,乙腈浓度分别为 75%、80%、85%。

(3) 讨论流动相中磷酸缓冲盐终浓度对分离效果的影响:乙腈浓度 80%,pH5.0 磷酸缓冲液终浓度分别为: 0、2、4、6mM。

3.3.2.3 实验结果与讨论

(1) 钛胶裸柱修饰对分离效果的影响:

流动相流速为 1.0ml/min,进样量 20 μ l 时,柱温 40 $^{\circ}$ C,检测波长 226nm;流动相:乙腈浓度 85%,磷酸缓冲液 pH6.0,终浓度 1.5mM。磷酸缓冲液终浓度为 30、50、70、100mM。

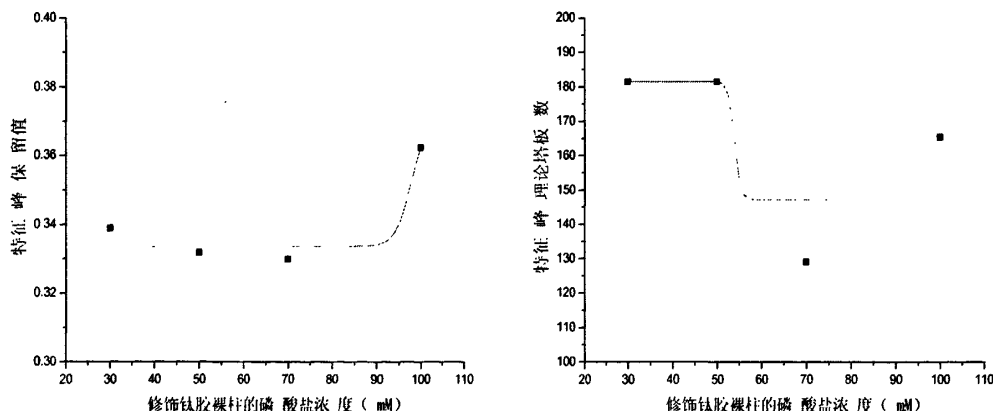


图 3-10 不同磷酸盐浓度修饰钛胶裸柱对样品特征峰保留值和理论塔板数的影响

结论:在不同柱子修饰程度下,糖巨肽保留值缓慢增加,但都处于减低水平;柱效随

修饰程度增加，略有减小，且都处于较低水平。保留值随柱子修饰程度增加，起初平稳，在较大浓度磷盐修饰下保留值有较小增加。理论塔板数随柱子修饰程度增加有减小趋势。

(2) 流动相中缓冲盐pH值对分离的影响:

流动相流速为 1.0ml/min，进样量 20 μ l 时，柱温 40 $^{\circ}$ C，检测波长 226nm；流动相：乙腈浓度 80%，磷酸缓冲液终浓度 1.0 mM。磷酸缓冲液 pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0。

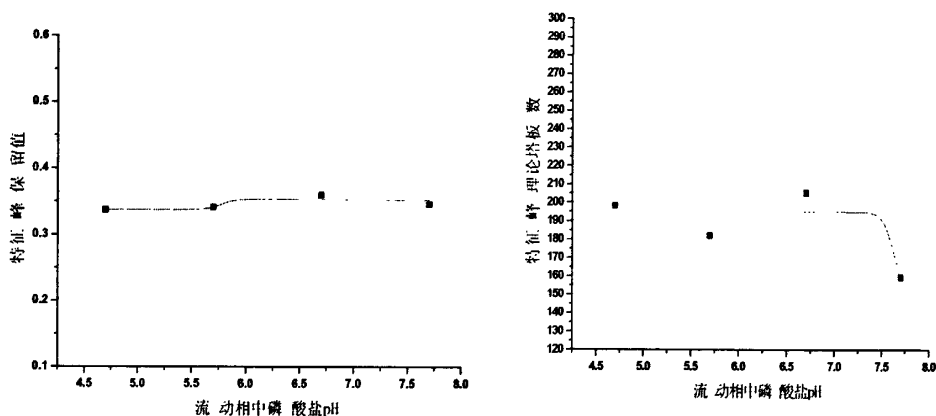


图 3-11 流动相中磷酸盐 pH 对跟踪峰保留值和理论塔板数的影响

总结：pH 值在 6.0 附近时，随 pH 值增加，保留值略有增大，之后在较低水平保持平稳；理论塔板数在较低 pH 值时平稳保持一个较小值，柱效不高，在高 pH 值下柱效降低。

(3) 流动相中乙腈浓度(%)对组分分离的影响:

流动相流速为 1.0ml/min，进样量 20 μ l 时，柱温 40 $^{\circ}$ C，检测波长 226nm；流动相：磷酸缓冲液 pH 5.0，终浓度 2.0 mM。乙腈浓度分别为：75%、80%、85%。

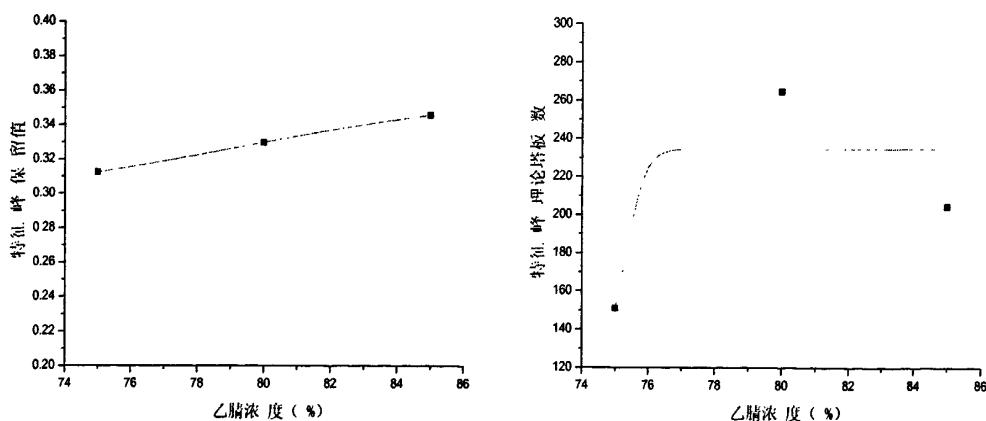


图 3-12 流动相中乙腈浓度对特征峰保留值和理论塔板数的影响

总结：随流动相中乙腈浓度的增加，糖巨肽保留值直线增加，但保留值水平仍较低；柱效显著增加后趋向平稳，整体水平不高。随ACN浓度增加，保留值有所增加，理论塔板数略有升高后，变平稳。

(4) 流动相中缓冲盐终浓度(mM)对组分分离的影响：

流动相流速为 1.0ml/min，进样量 20 μ l 时，柱温 40 $^{\circ}$ C，检测波长 226nm；流动相：乙腈浓度 75%，磷酸缓冲液 pH5.0。缓冲盐浓度浓度分别为：0、2、4、6mM。

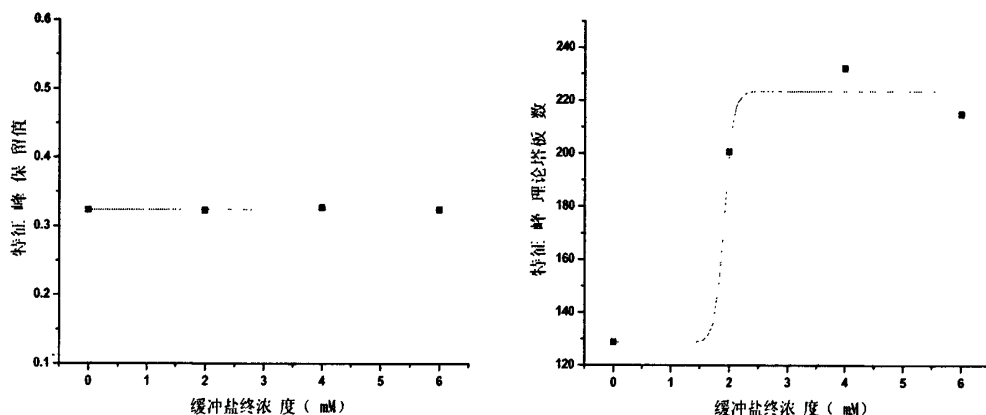


图 3-13 流动相中缓冲盐终浓度对特征峰保留值和理论塔板数的影响

总结：随流动相中缓冲盐终浓度的增加，糖巨肽样品保留值保持不变；柱效在高盐浓度时显著增加，但仍处于较低水平。保留值随盐浓度增大基本不变，理论塔板数在低盐浓度时，随盐增加而增大，后变平稳。

综上所述，在100mM缓冲盐修饰柱子后，选取乙腈浓度80%，磷酸缓冲盐pH5.0，终浓度2mM作为流动相，分离糖巨肽。但糖巨肽在钛胶正相色谱柱上的分离效果不理想，保留值太小，分离度不好，同时柱效也较低。

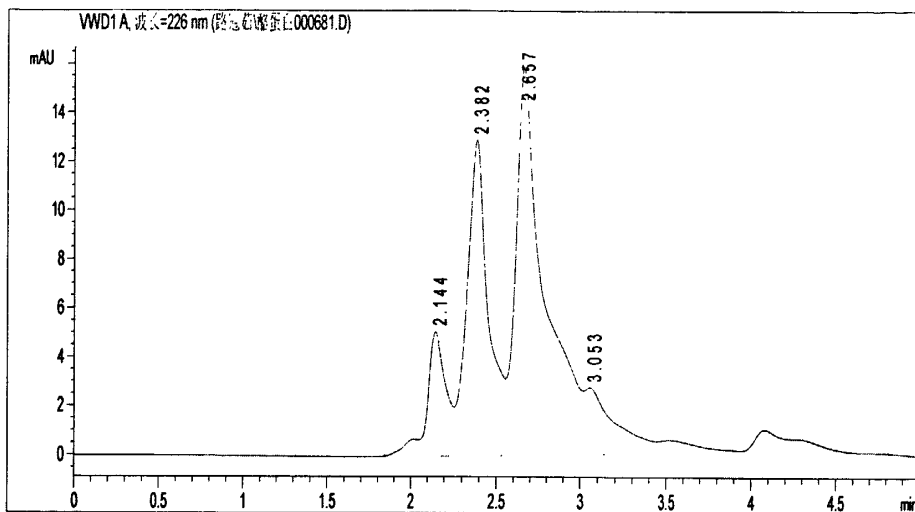


图 3-14 糖巨肽混合样品最佳分离条件色谱图

第四章 反相钛胶填充色谱柱对酪蛋白酶解液、肽的分离

4.1 引言

钛胶为金属氧化物,其表面有可以被利用的羟基,因此可以对其表面进行修饰和改性,制成反相色谱固定相,同时保留了钛胶基质优良的化学稳定性品质。

本实验将利用的钛胶反相色谱柱,是在钛胶裸柱表面键合一高聚物层,使其转化为非极性柱的色谱柱产品。通过钛胶反相色谱柱对酪蛋白酶解产物和糖巨肽样品进行分离分析,优化色谱条件,找出能将酪蛋白胰蛋白酶解产物及糖巨肽样品进行良好分离的色谱条件。

4.2 实验仪器与材料

4.2.1 主要试剂

酪蛋白	Sigma公司
胰蛋白酶(1:250)	Sigma公司
糖巨肽样品	天津商业大学生物实验室
碳酸氢铵	天津市科密欧化学试剂有限公司
氢氧化钠	天津化学试剂三厂
乙腈(色谱纯)	天津市科密欧化学试剂有限公司
娃哈哈纯净水	杭州娃哈哈集团有限公司
磷酸二氢铵(色谱纯)	天津市科密欧化学试剂有限公司
磷酸氢二铵(色谱纯)	天津市科密欧化学试剂有限公司
醋酸铵(色谱纯)	天津市科密欧化学试剂有限公司
氟化铵(色谱纯)	天津市科密欧化学试剂有限公司

4.2.2 主要仪器

HSS-1(B)型恒温浴槽	成都仪器厂
801-离心机	上海手术器械厂
FA1104N 电子天平	上海精密科学仪器有限公司

PH S-25 数显酸度计	上海虹益仪器仪表有限公司
Agilent 1200 系列高效液相色谱仪	安捷伦公司
20 μ L 微量注射器	安捷伦公司
0.45 μ m 针心过滤膜	上海密利欧
KQ5200E 超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
色谱柱(Sachtopore-RP, 5 μ m diameter, 300 \AA pore size, 250 \times 4.6mm id.)Zirchrom 公司	

4.3 实验方法及结果讨论

4.3.1 酪蛋白酶解产物在单泵液相色谱上的分离

4.3.1.1 酪蛋白酶解液的制备

取一定量的酪蛋白用50mM的碳酸氢铵(NH_4HCO_3)配制成一定底物浓度为5%的溶液,装入具塞三角瓶中,将其放入恒温水浴中置温度为55 $^\circ\text{C}$,用0.5mol/L的氢氧化钠(NaOH)溶液调节反应溶液pH至7.5,预热30min。然后在反应液中加入62.44 U/g的胰蛋白酶,开始酶解。在55 $^\circ\text{C}$ 水浴中水解180min,水解过程中NaOH溶液调节pH始终保持在7.5。反应结束后将具塞三角瓶放入沸水浴中5min灭酶活,将反应液冷却至室温后,离心5min(3000/min),取少量上清液过0.45 μ m的微孔滤膜备用,将剩余上清液冷冻保存。

4.3.1.2 样品准备

取酪蛋白酶解液,用流动相稀释30倍,过0.45 μ m有机微孔滤膜,待分离。

4.3.1.3 色谱条件的优化

1、固定相的选择

由于二氧化钛具有极好的化学稳定性,在pH为1-14的范围内都能稳定存在,同时,钛胶反相色谱柱,对蛋白质中氨基氮有特异性吸附作用,因此本实验中采用钛胶基质反相色谱柱,通过在流动相中加入氟化铵缓冲盐对酪蛋白酶解产物进行洗脱分离的研究。

2、检测波长的选择

因为酪蛋白经过胰蛋白酶水解之后的产物是多肽与氨基酸的混合物,而多肽和氨基酸的紫外吸收波长大多在220nm左右,因此实验中将在220nm检测波长下对酪蛋白酶解产物的分离进行监测。

3、钛胶反相柱的表面修饰作用

由于钛胶反相柱表面对氨基氮的特异性吸附作用力较钛胶正相柱对磷酸基团的特异

性吸附作用力弱很多，所以流动相中的氨基物质对于色谱柱表面性质的改变可以忽略。

4、流动相比对分离效果的影响

实验中采用乙腈-水体系作为流动相，同时在流动相中加入一定浓度氟化铵缓冲液。固定流动相流速为1.0ml/min，进样量20 μ l 时，柱温40 $^{\circ}$ C，讨论以下因素，对于酪蛋白酶解产物分离情况的影响：

(1) 讨论乙腈浓度对分离的影响：选择流动相中 NH_4F 终浓度为 80mM，乙腈浓度分别为 50%、60%、68%、75%。

(2) 讨论流动相中氟化铵缓冲盐终浓度对分离的影响：乙腈浓度 68%，氟化铵缓冲盐终浓度分别为：0、5、10、15、17、20、25、30、35、40、50、60、70、80mM。

4.3.1.4 实验结果与讨论

(1) 流动相中乙腈浓度(%)对组分分离的影响：

流动相流速为 1.0ml/min，进样量 20 μ l 时，柱温 40 $^{\circ}$ C，检测波长 220nm；流动相：氟化铵终浓度 80 mM。乙腈浓度分别为：50%、60%、68%、75%。

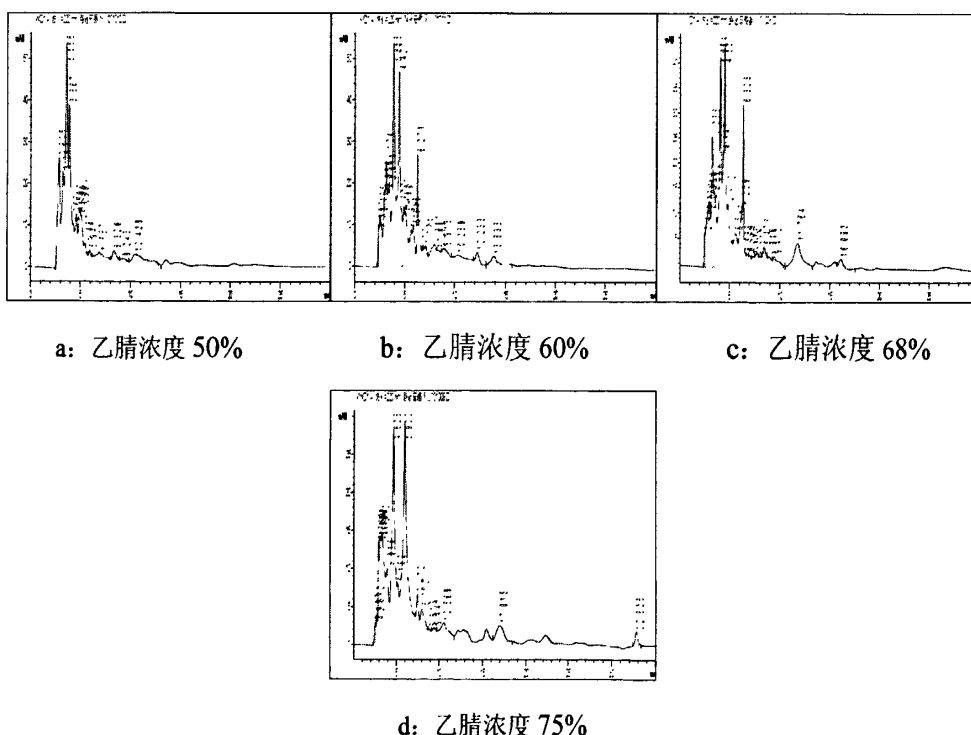


图 4-1 流动相中乙腈浓度对分离效果的影响

该因素对酪蛋白酶解产物保留值及柱效的影响：

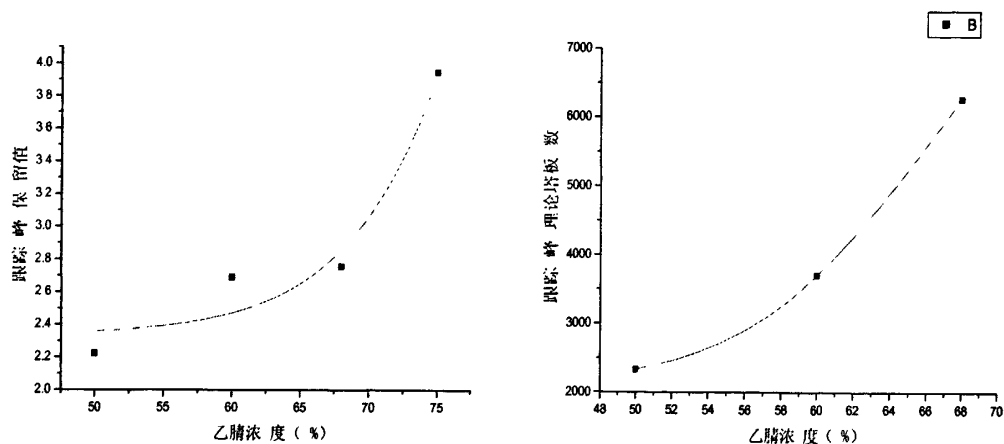
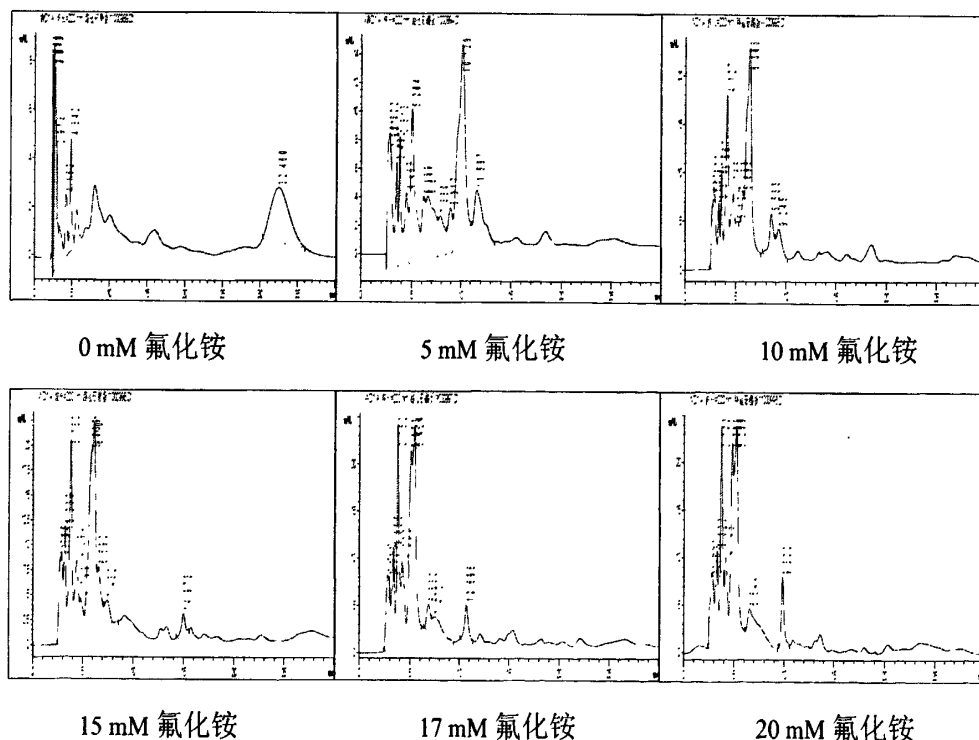


图 4-2 流动相中乙腈浓度对跟踪峰保留值和理论塔板数的影响

总结：随 ACN 浓度增加，跟踪峰的保留值与理论塔板数都随之增加。

(2) 流动相中缓冲盐终浓度(mM)对组分分离的影响：

流动相流速为1.0ml/min，进样量20μl 时，柱温40°C，检测波长220nm；流动相：乙腈浓度68%，氟化铵缓冲盐终浓度分别为：0、5、10、15、17、20、25、30、35、40、50、60、70、80mM。



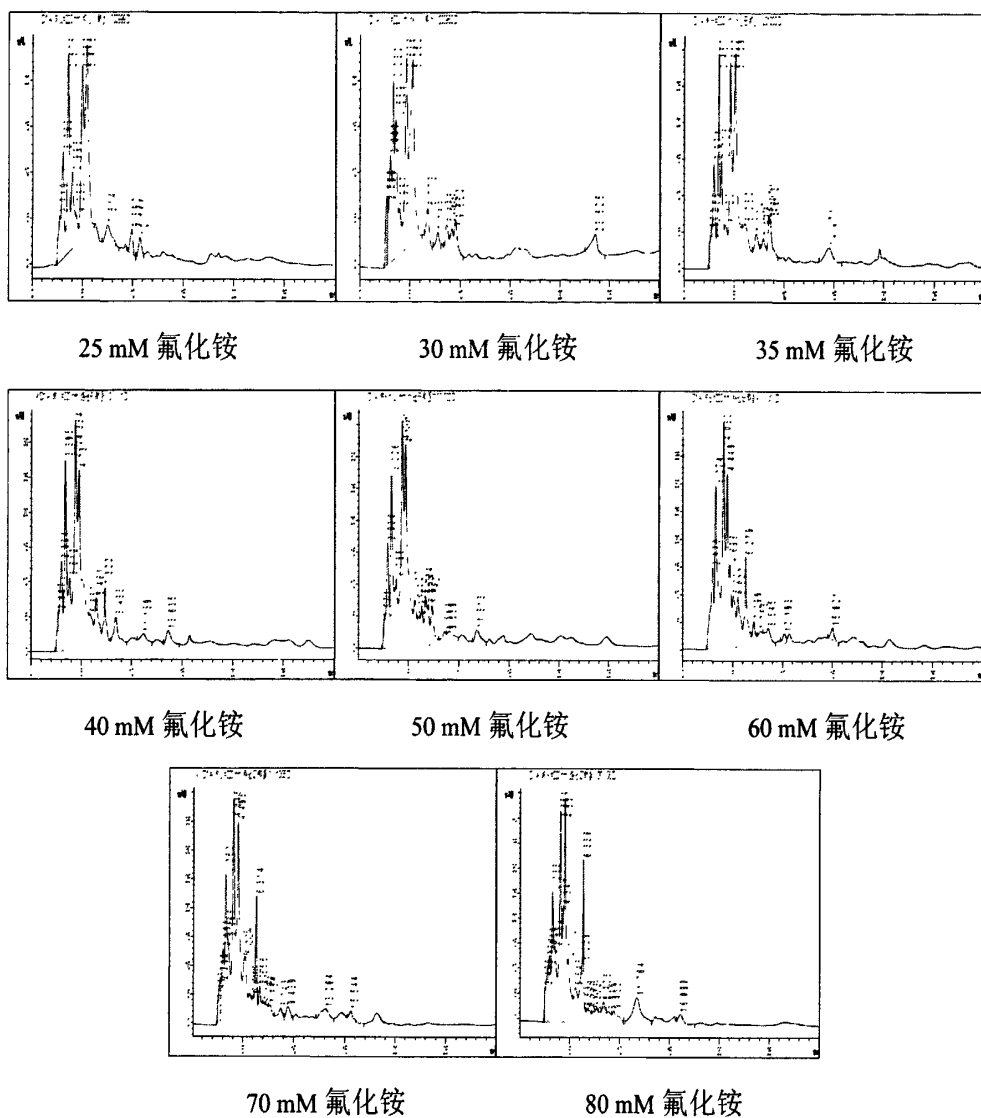


图 4-3 流动相中氟化铵终浓度对分离效果的影响

该因素对酪蛋白酶解产物保留值及柱效的影响：

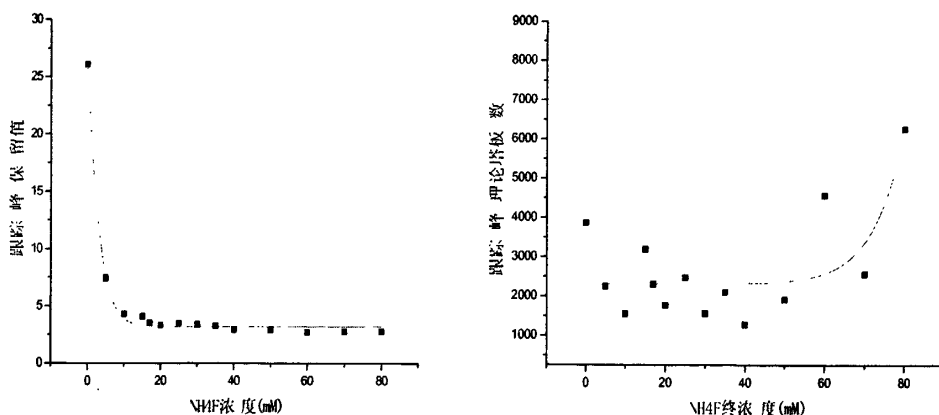


图 4-4 左：氟化铵终浓度-k；右：氟化铵终浓度-理论塔板数

结论：随盐浓度增加，跟踪峰保留值由较高值较快减小到适当值，随后趋于平稳，保持恒定。跟踪峰的理论塔板数大致随盐浓度增加略有增大。综上，可选择较大浓度 NH_4F 作为流动相。

4.3.2 酪蛋白酶解产物在四元泵液相色谱上的分离

4.3.2.1 样品准备

取酪蛋白酶解液，用流动相稀释30倍，过 $0.45\mu\text{m}$ 有机微孔滤膜，待分离。

4.3.2.2 色谱条件的优化

根据以上实验结果选择流动相中 NH_4F 终浓度为80mM，采取ACN梯度洗脱样品。

4.3.2.3 实验结果与讨论

以 NH_4F 终浓度 80mM，乙腈梯度：6.5-65% (30min)；65% (5min) 得到酪蛋白酶解液分离的色谱图如下：

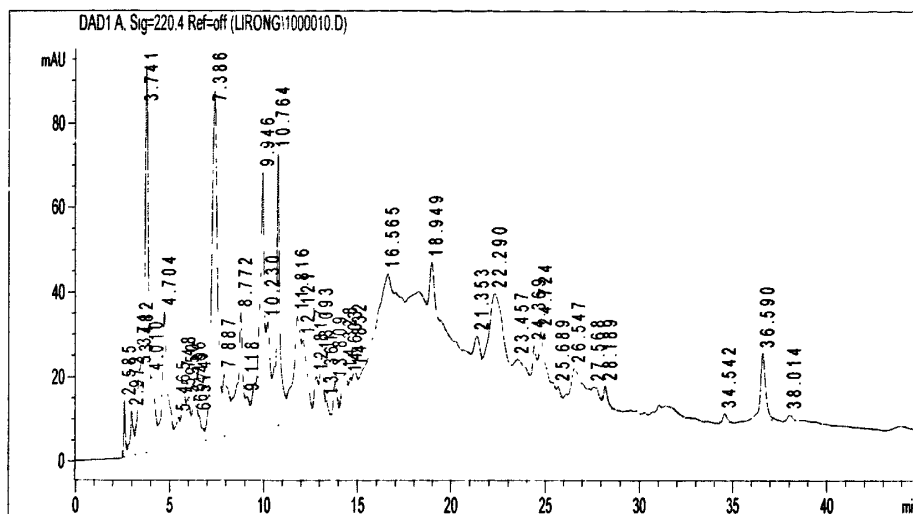


图 4-5 酪蛋白酶解液色谱分离图

以 NH_4F 终浓度 80mM, 乙腈梯度: 3.5-15.4%(8min); 15.4-70%(32min); 70-35%(15min); 35%(5min)得到酪蛋白酶解液分离的色谱图如下:

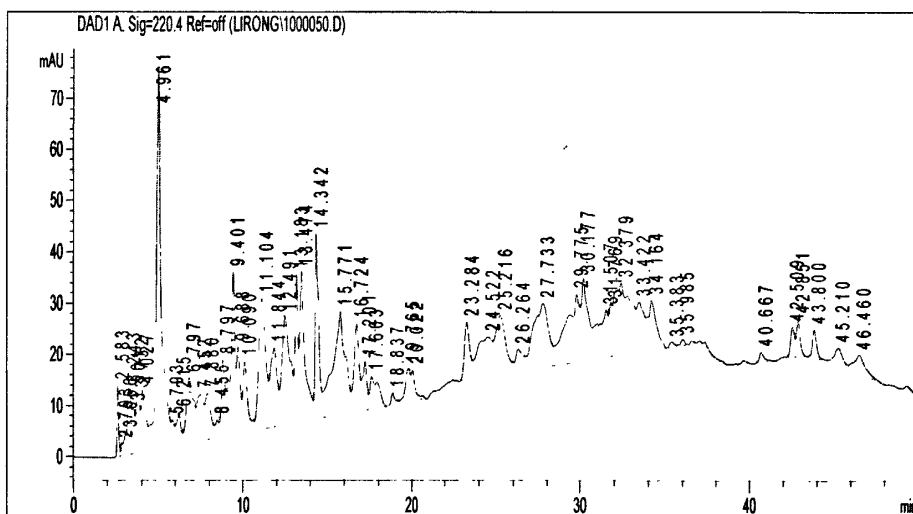


图 4-6 酪蛋白酶解液色谱分离图

结论: 乙腈梯度较缓慢时, 更利于组分的分离, 同时基线也较平稳。

4.3.3 糖巨肽混合样品在单泵液相色谱上的分离

4.3.3.1 样品准备

用流动相配制糖巨肽混合样品，浓度为 1mg/mL，过 0.45 μ m 有机微孔滤膜，待分离。

4.3.3.2 色谱条件的优化

1、固定相的选择

由于二氧化钛具有极好的化学稳定性，在pH为1-14的范围内都能稳定存在，同时，钛胶反相色谱柱，对蛋白多肽中氨基氮有特异性吸附作用，因此本实验中采用钛胶基质反相色谱柱，通过在流动相中加入磷铵、氟化铵、醋酸铵缓冲液对糖巨肽样品进行洗脱分离的研究。

2、检测波长的选择

实验中将在226nm波长下对糖巨肽的分离进行检测。

3、钛胶反相柱的表面修饰作用

由于钛胶反相柱表面对氨基的特异性吸附作用力较钛胶正相柱对磷酸基团的特异性吸附作用力弱很多，所以流动相中的氨基物质对于色谱柱表面性质的改变可以忽略。

4、流动相比比例对分离效果的影响

实验中采用乙腈-水体系作为流动相，同时在流动相中加入一定浓度铵盐缓冲液。固定流动相乙腈浓度为30%，流速为1.0ml/min，进样量20 μ l 时，柱温40 $^{\circ}$ C，讨论以下因素，对于糖巨肽样品分离情况的影响：

(1) 讨论磷铵缓冲盐浓度对分离的影响：乙腈浓度为30%，选择pH6.0磷铵缓冲液终浓度分别为：10、20、30、40、50、60mM。

(2) 讨论磷铵缓冲液pH值对分离的影响：乙腈浓度为30%，选择流动相中磷铵缓冲液终浓度为30mM，pH值分别为4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。

(3) 讨论氟化铵缓冲盐终浓度对分离的影响：乙腈浓度为 30%，pH6.0 磷铵缓冲液 30mM，氟化铵缓冲盐终浓度分别为：0、1、5、10、15mM。

(4) 讨论醋酸铵缓冲盐终浓度对分离的影响：乙腈浓度为 30%，pH6.0 磷铵缓冲液 30mM，醋酸铵缓冲盐的终浓度分别为：0、1、5、10、15mM。

4.3.3.3 实验结果与讨论

(1) 流动相中磷铵缓冲盐终浓度对分离效果的影响：

流动相流速为1.0ml/min，进样量20 μ l 时，柱温40 $^{\circ}$ C，检测波长226nm；流动相：乙腈浓度30%，磷铵缓冲液pH6.0，磷铵缓冲盐终浓度分别为：10、20、30、40、50、60mM。

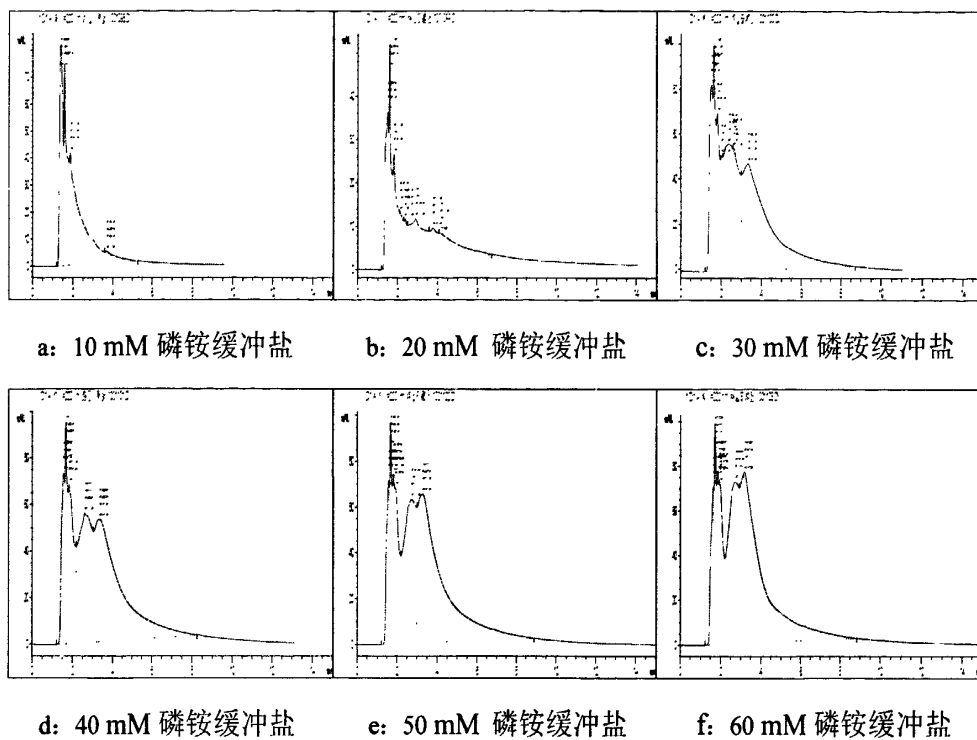


图 4-7 流动相中磷酸终浓度对分离的影响

该因素对样品保留值和柱效的影响:

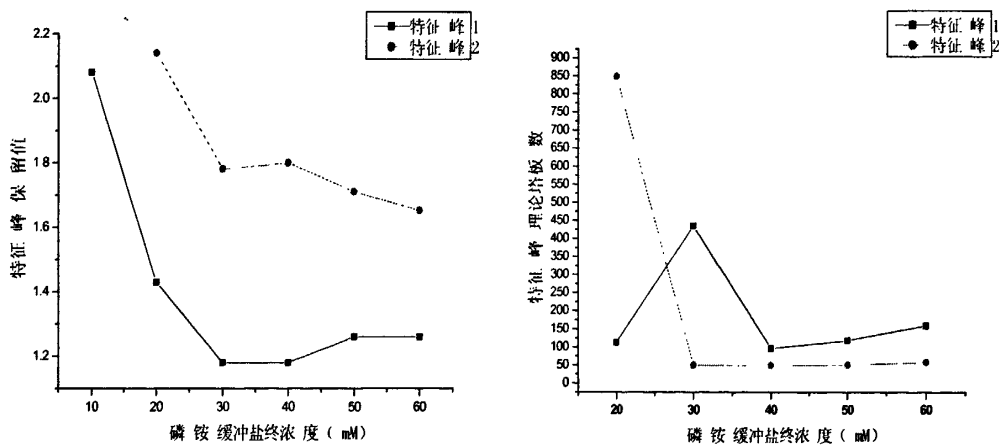


图 4-8 流动相中磷酸终浓度对特征峰保留值和理论塔板数的影响

总结: 从糖巨肽混合样品的两个特征峰的保留值看, 当缓冲盐浓度在 30-40 mM 之间时, 两个特征峰有最好的分离度。特征峰 2 的理论塔板数随缓冲盐浓度增加先快速降低后, 保持恒定; 特征峰 1 理论塔板数较波动。综上, 选定磷酸缓冲液浓度为 30mM。

(2) 流动相中磷酸缓冲液 pH 对分离的影响:

流动相流速为 1.0ml/min, 进样量 20 μ l 时, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 检测波长 226nm; 流动相: 乙腈浓度 30%, 磷酸缓冲液 30mM, 磷酸缓冲液 pH 分别为: 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。

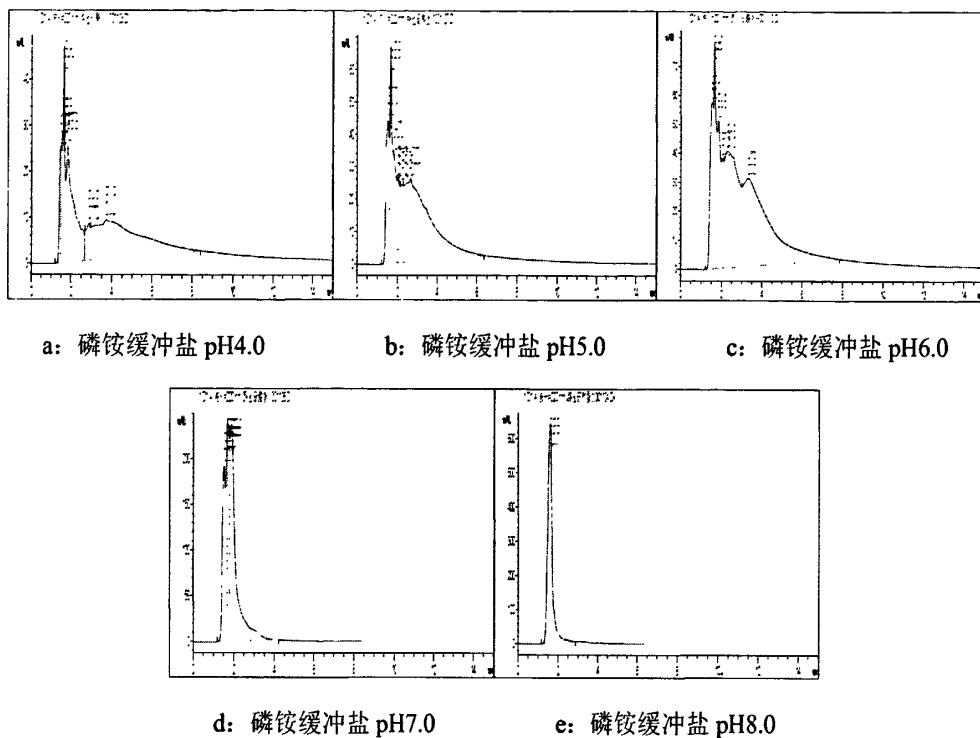


图 4-9 流动相中磷酸缓冲盐 pH 对分离效果的影响

该因素对样品保留值和柱效的影响:

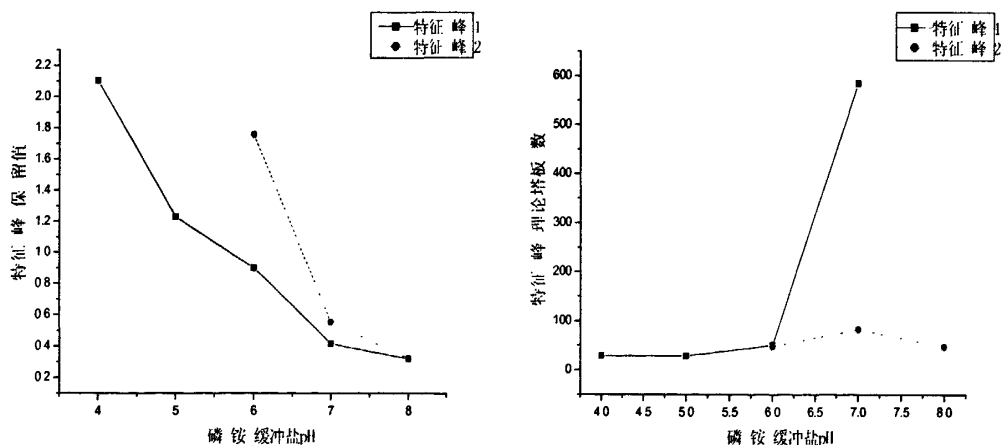


图 4-10 磷酸缓冲盐 pH 对特征峰保留值和理论塔板数的影响

总结：随 pH 增加，两个特征峰保留值均减小，在 pH8.0 时，两个峰不能分离。由此，在较低 pH 值时两峰能得到较好的分离。在 pH 大于 6.0 时，特征峰 1 理论塔板数随 pH 继续增大，显著增加，特征峰 2 在此条件下，基本恒定。考虑两峰的分高度，选择 pH6.0 为试验 pH。

(3) 讨论在流动相中添加氟化铵缓冲盐终浓度对分离效果的影响：

流动相流速为 1.0ml/min，进样量 20 μ l 时，柱温 40 $^{\circ}$ C，检测波长 226nm；流动相：乙腈浓度为 30%，pH6.0 磷铵缓冲液 30mM，氟化铵缓冲盐终浓度分别为：0、1、5、10、15mM。

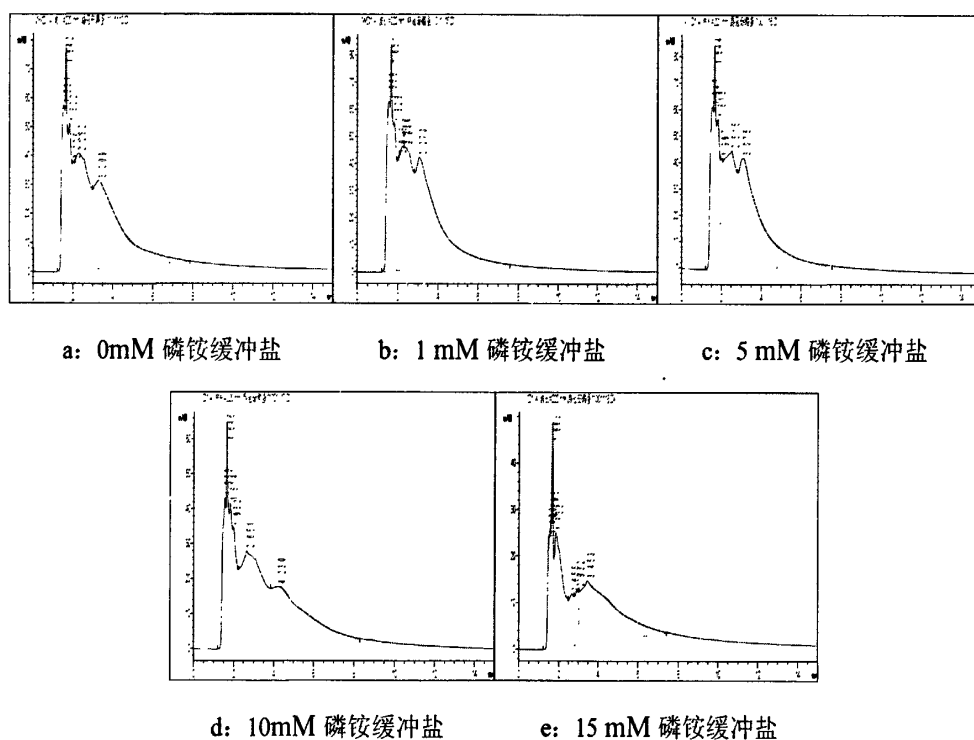


图 4-11 流动相中氟化铵缓冲盐终浓度对分离效果的影响

该因素对样品保留值和柱效的影响：

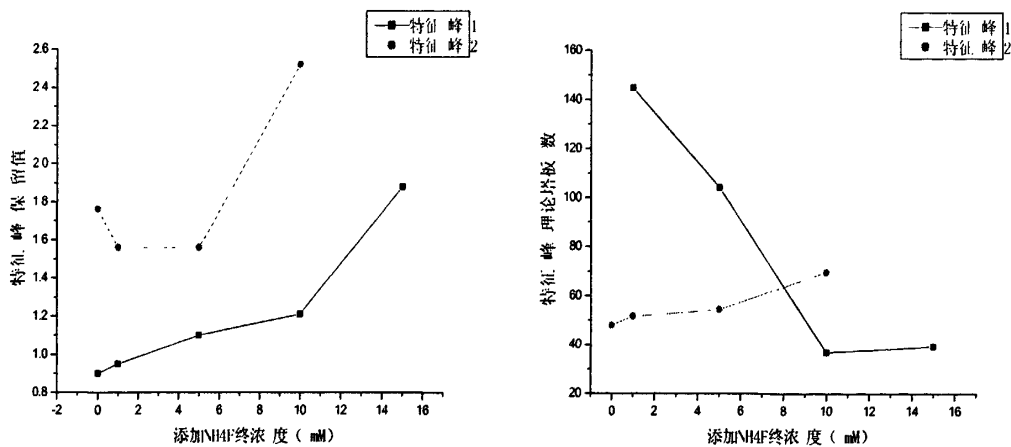


图 4-12 流动相中添加 NH₄F 终浓度对分离效果的影响

总结：两个特征峰的保留值大致随 NH₄F 浓度增加而增加，在很低的 NH₄F 浓度时，分离度较大。特征峰 1 理论塔板数随 NH₄F 浓度增加略有增大；特征峰 2 理论塔板数随 NH₄F 浓度增加快速降低后保持恒定。

(4) 讨论在流动相中添加醋酸铵缓冲盐终浓度对分离效果的影响：

流动相流速为 1.0ml/min，进样量 20 μ l 时，柱温 40 $^{\circ}$ C，检测波长 226nm；流动相：乙腈浓度为 30%，pH6.0 磷铵缓冲液 30mM，醋酸铵缓冲盐终浓度分别为：0、1、5、10、15mM。

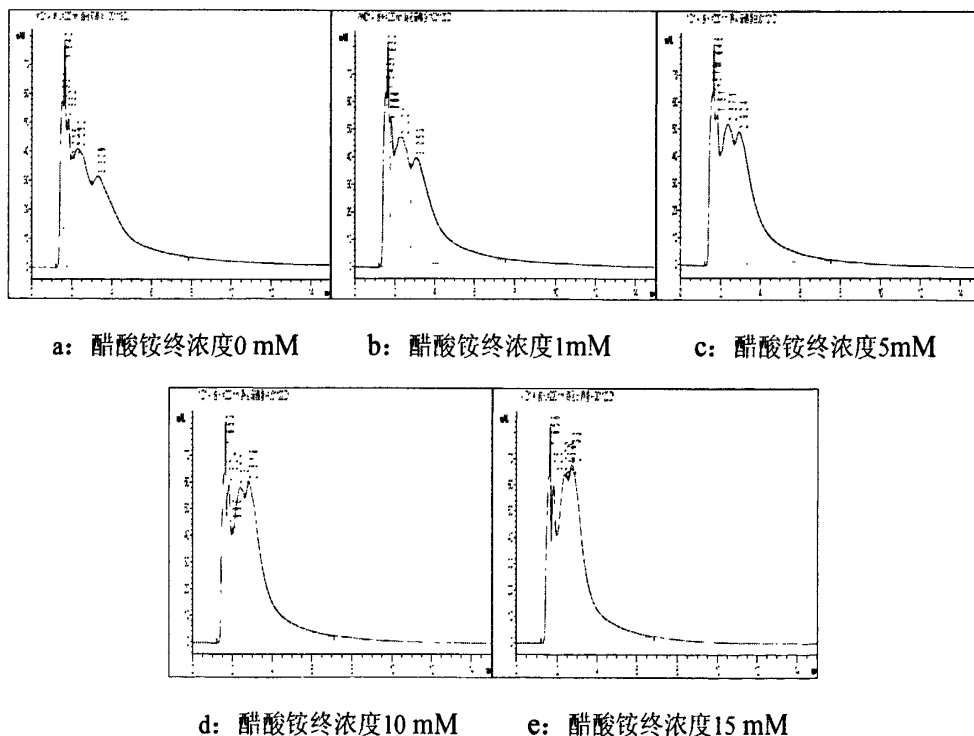


图 4-13 流动相中添加 NH₄Ac 终浓度对分离的影响

该因素对样品保留值和柱效的影响:

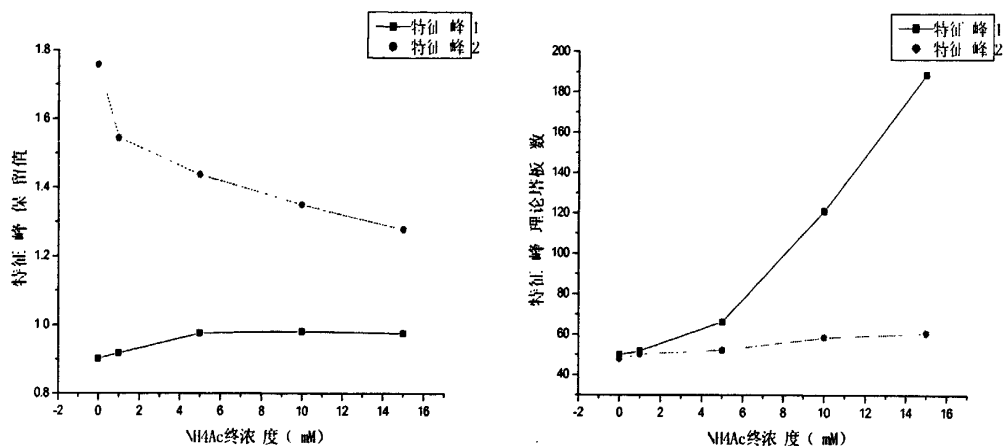


图 4-14 流动相中添加 NH₄Ac 终浓度对特征峰保留值和理论塔板数的影响

总结: 特征峰 1 随 NH₄Ac 浓度增加, 保留值略有增加, 随后保持恒定; 特征峰 2 随 NH₄Ac 浓度增加, 保留值减小。由此, 随 NH₄Ac 浓度增加, 两个特征峰的分度减小。两个特征峰理论塔板数随 NH₄Ac 浓度增加都逐渐增大, 特征峰 1 的增加速度大于特征峰 2。

4.3.4 糖巨肽样品在四元泵液相色谱上的分离

4.3.4.1 样品准备

用流动相配制糖巨肽样品, 浓度为 1mg/mL, 过 0.45 μ m 有机微孔滤膜, 待分离。

4.3.4.2 色谱条件的优化

根据以上实验结果, 选择磷酸缓冲液 pH6.0, 终浓度为 30mM, 选择流动相中乙腈梯度为: 7-42%(20min); 跳到 70%(保持 5min), 采取 ACN 梯度洗脱样品。乙腈梯度为: 7-42%(20min); 跳到 70%(保持 5min)

4.3.4.3 实验结果与讨论

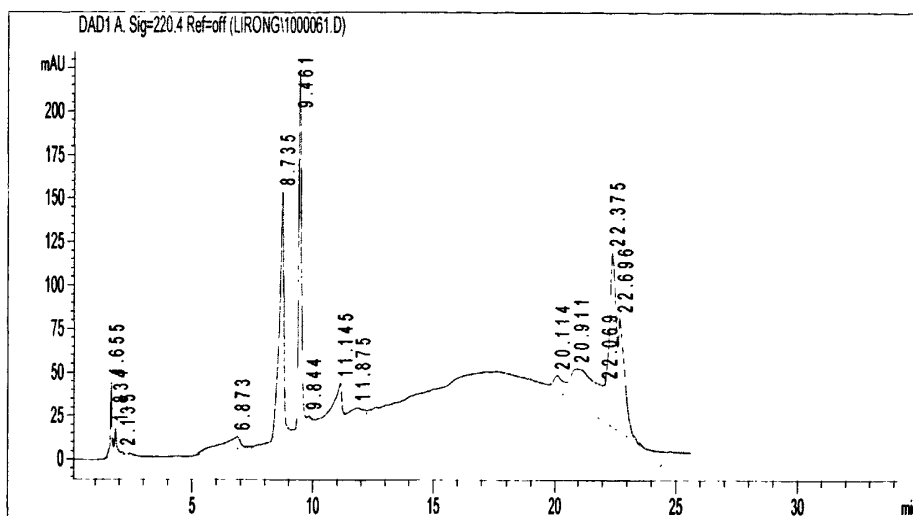


图 4-15 糖巨肽混合样品最佳分离条件色谱图

通过乙腈的梯度洗脱，是的糖巨肽两个特征峰完全分离开来，得到了较好的分离度和柱效。

第五章结论与展望

本文研究了通过溶胶-凝胶法制备钛胶整体柱,并研究了钛胶基质正、反相色谱法在酪蛋白-胰蛋白酶水解产物和糖巨肽样品分离鉴定中的应用,得到以下结论:

(1) 采用溶胶-凝胶法制备钛胶整体材料的研究结果为:在正丁基钛:醋酸:正丁醇:盐酸:水(摩尔比)=1:5:4:0.45:6和1:4:2.8:0.5:5.5的原料比下,凝胶化温度为21°C时,控制凝胶干燥升温过程,制备出了具有较好外观和性能的钛胶整体柱,比表面积都在40m²/g以上。

(2) 通过单因素实验对钛胶整体材料制备条件的研究,可以看出导致材料比表面积下降的根源是,水解、缩聚反应过快,形成的凝胶在老化过程中出现剧烈离浆现象,使微观结构致密,孔结构遭到破坏。造成这种结果的原因可归结为:①醋酸或盐酸比例过大;②凝胶化温度过高;③正丁醇比例相对较小。导致材料机械强度降低的原因可归结为:①醋酸或盐酸比例过大;②凝胶化温度过高;③正丁醇比例相对较小;④水的比例过大。导致材料不易成型的原因可归结为:①正丁醇比例相对较大;②凝胶化温度过低;④水的比例较小;⑤醋酸或盐酸比例过小。此外,老化、干燥过程中,温度、湿度等条件的控制也同样影响到了整体材料的各方面性能。

(3) 酪蛋白酶解液在钛胶正相色谱柱上最佳的分离条件是:流动相为85%ACN,磷酸钠缓冲盐pH5.0,磷酸钠盐浓度2.0mM;酪蛋白酶解液在钛胶反相色谱柱上最佳的分离条件是:乙腈梯度:3.5-15.4%(8min);15.4-70%(32min);70-35%(15min);35%(5min);NH₄F终浓度80mM。

(4) 糖巨肽样品在钛胶反相色谱柱上的最佳分离条件:乙腈梯度为:7-42%(20min);跳到70%(保持5min)。

由于时间有限,本人知识水平和实验条件的限制,本课题尚有许多未完成的工作,以下是我的进一步的工作设想:

(1) 钛胶整体材料的制备难度较大,得到的整体材料较易碎易裂,虽然我们得到了具有较好外观和性能的整体材料,但其结果难以重复,还不能很好地大批量开发钛胶整体材料。因此,只有找到一种具有良好重现性的钛胶整体材料的制备方法才能使钛胶整体柱的研制取得更大发展。

(2) 对钛胶整体材料进行进一步的修饰和改性,使其能够用于更复杂的化合物的分离。

(3) 将钛胶柱应用于更多蛋白质水解产物的分离和分析。

这些问题有非常高的实用价值,更需深入研究,希望能在今后的工作中努力完成!

参考文献

- [1]杨更亮, 高文惠, 杨静. 硅胶整体柱的研究进展[J]. 色谱, 2003, 21(4): 332-335.
- [2]Svec.F, Peters.EC, Sykra.D, et al., Monolithic stationary phases for capillary electrochromatography based on synthetic polymers: designs and applications[J]. Journal of High Resolution Chromatography, 2000, 23(1): 3-18.
- [3]Svec.F, Peters.EC, Sykra.D, Fréchet.JM. Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 887(1-2): 3-29.
- [4]Tanaka.N, Kobayashi.H, Nakanishi.K, et al., Peer Reviewed: Monolithic LC columns[J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(15): 420A-429A.
- [5]Zou.HF, Huang.XD, Ye.ML, Luo.Q. Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 954(1-2): 5-32.
- [6]Siouffi.AM. Silica gel-based monoliths prepared by the sol-gel method: facts and figures[J]. Journal of Chromatography A, 2003(1-2), 1000: 801-818.
- [7] Legido-Quigley.C, Marlin.ND, Melin.V, et al., Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science[J]. Electrophoresis, 2003, 24(6): 917-944.
- [8]Tanaka.N, Kimura.H, Tokuda.D, et al., Simple and comprehensive two-dimensional reversed-phase HPLC using monolithic silica columns[J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(5): 1273-1281.
- [9]Klodzinska.E, Moravcova.D, Jandera.P, et al., Monolithic continuous beds as a new generation of stationary phase for chromatographic and electro-driven separations[J]. Journal of Chromatography A, 2006(1), 1109: 51-59.
- [10]Tanaka.N, Kobayashi.H. Monolithic columns for liquid chromatography[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 376(2):298-301.
- [11]Tanka.N, Kobayashi.H, Ishizuka.N, et al., Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations[J]. Journal of Chromatography A, 2002(1-2), 965: 35-49.
- [12]Ou.JJ, Dong.J, Dong.XL, et al., Recent progress in polar stationary phases for CEC[J]. Electrophoresis, 2007, 28(1): 148-163.
- [13]J.Nawrocki,C.Dunlap,A.McCormick,etal.Part I. Chromatography using ultra-stable metal

- oxide-based stationary phases for HPLC[J].*Chromatography A*,2004,1028:1-30.
- [14]K. Tani, Y. Suzuki.Investigation of the on-Exchange Behaviour of Titania:Application as a Packing Material for Ion Chromatography [J].*Chromatographia*,1997,46(11/12):623-627.
- [15] Zi-TaoJiang,Yu-Min Zuo.Synthesis of Porous Titania Microspheres for HPLC Packings by Polymerization-Induced Colloid Aggregation (PICA), 2001,73(3):686-688.
- [16]怀其勇,马庆林,左育民.利用聚合诱导胶体凝聚法制备中孔钛胶的研究[J].*分析测试学报*,2008,27(15):453-457.
- [17] TrüdingerU,Müller G,Unger K.Porous zirconia and titania as packing materials for high2performance liquid chromatography[J].*J Chrm atogr*,1990,535:111-125.
- [18]薛振东,贺飞,冯钰琦.油乳法制备高效液相色谱氧化钛和钛锆氧化物复合填料[J].*武汉大学学报(理学版)*,2002,48:142-146.
- [19]李艳廷,李静 ,魏永巨等.醇热法制备钛胶色谱固定相及其性质研究化学研究与应用 [J].2007,19
- [20]Li Y T, Song C H, Hu Y Z, etal. Facile temp late-free alcohothermal route to synthesize hollow TiO₂ micro-spheres with nanocrystal structure [J].*Chem Lett*,2006,35(12):1344-1345.
- [21]Vaclav,Zizkovsky,RadimKucera,etal.Titania-based stationary phase in separation of ondansetron and its related compounds[J].*Chromatography A*, 2008,1189:83-91.
- [22]K. Ohta, H. Morikawa, K. Tanaka,[M]. Furukawa, M.Sando, J. *Chromatogr.A* 2001,920:109.
- [23]K. Ohta, Application of zirconium-modified silica gel as a stationary phase in the ion-exclusion chromatography of carboxylic acids[J].*Chromatography A*, 2001,920: 69-77.
- [24]K. Ohta, K. Tanaka, P.R. Haddad,.Simultaneous separation of common mono- and divalent cations on silica gels modifed with aluminium and zirconium[J]. *trends in analytical chemistry*1, 2001,20(6-7):330-335
- [25]Jochen Winkler,Stefan Marme.Titania as a sorbent in normal-phase liquid chromatography[J].*Chromatography A*, 2000,888:51-62.
- [26]K. Tani, M. Kitada, M. Tachibana ,etal. Retention Behavior of Monosaccharides and Disaccharides on Titania[J].*chromatographia*, 2003, 57:409-412.
- [27]Ting Zhou, Charles A. Lucy.Hydrophilic interaction chromatography of nucleotidesand their pathway intermediates on titania[J].*Chromatography A*, 2008,1187:87-93.
- [28]L.R.Yu,K.C.Chan,H.J.Issaq,etal. Improved Titanium Dioxide Enrichment of

- Phosphopeptides from HeLa Cells and High Confident Phosphopeptide Identification by Cross-Validation of MS/MS and MS/MS/MS Spectra[J]. *Proteome Res*, 2007, 6: 4150-4162.
- [29] Yao BD, Zhang LD. Preparation and characterization of mesoporous titania gel-monolith [J]. *J. Mater. Sci.*, 1999, 34: 5983-5987.
- [30] Amlouka A, Elaloui E. Preparation and optical characterization of transparent, microporous TiO₂ xerogel monoliths [J]. *Mater. Sci. Engn. B*, 2008, 146: 69-73.
- [31] Holland, B. T.; Blanford, C. F.; Do T.; Stein, A. Synthesis of Highly Ordered, Three-Dimensional, Macroporous Structures of Amorphous or Crystalline Inorganic Oxides, Phosphates, and Hybrid Composites. *Chem. Mater.* 1999, 11, 795.
- [32] Deng, W.; Toepke, M. W.; Shanks, B. H. Surfactant-Assisted Synthesis of Alumina with Hierarchical Nanopores. *Adv. Funct. Mater.* 2003, 13, 61.
- [33] Yuan, Z.-Y.; Vantomme, A.; Leonard, A.; Su, B.-Li. Surfactant-assisted synthesis of unprecedented hierarchical meso-macrostructured zirconia. *Chem. Commun.* 2003, 13, 1558.
- [34] Antonelli, D. M. Synthesis of macro-mesoporous niobium oxide molecular sieves by a ligand-assisted vesicle templating strategy. *Microporous Mesoporous Mater.* 1999, 33, 209.
- [35] Collins, A.; Carriazo, D.; Davis, S. A.; Mann, S. Spontaneous template-free assembly of ordered macroporous titania. *Chem. Commun.* 2004, 5, 568.
- [36] Kosmulski, M.; Gustafsson, J.; Rosenholm, B. J. J. Correlation between the Zeta Potential and Rheological Properties of Anatase Dispersions. *Colloid Interface Sci.* 1999, 209, 200.
- [37] Kazuki Nakanishi; Yuki Kobayashi; Tomohiko Amatani; Kazuyuki Hirao; Tetsuya Kodaira. Spontaneous Formation of Hierarchical Macro-Mesoporous Ethane-Silica Monolith. *Chem. Mater.* 2004, 16(19): 3652-3658.
- [38] Yang Chen; Yunyu Yi; John D. Brennan; Michael A. Brook. Development of Macroporous Titania Monoliths Using a Biocompatible Method. Part 1: Material Fabrication and Characterization. *Chem. Mater.* 2006, 18, 5326-5335.
- [39] Brook, M. A.; Chen, Y.; Guo, K.; Zhang, Z.; Brennan, J. D. J. Sugar-modified silanes: precursors for silica monoliths. *Mater. Chem.* 2004, 14, 1469-1479.
- [40] Sanchez, C.; Livage, J.; Henry, M.; Babonneau, J. Chemical modification of alkoxide precursors. *Non-Cryst. Solids.* 1988, 100, 65.
- [41] Konishi J, Fujita K, Nakanishi K, et al. Monolithic TiO₂ with controlled multiscale porosity

via a template-free sol-gel process accompanied by phase separation[J]. *Chem. Mater.*, 2006, 18: 6069-6074.

[42]Junko Konishi; Koji Fujita; Kazuki Nakanishi; Kazuyuki Hirao. Phase-Separation-Induced Titania Monoliths with Well-Defined Macropores and Mesoporous Framework from Colloid-Derived Sol-Gel Systems. *Chem. Mater.* 2006, 18(4): 864-866.

[43]Konishia J, Fujita K, Nakanishi K, et al. Sol-gel synthesis of macro-mesoporous titania monoliths and their applications to chromatographic separation media for organophosphate compounds[J]. *J. Chromatogr. A*, 2009, doi:10.1016/j.chroma.2009.06.016.

[44] Smått JH, Jarl B. Rosenholm, et al. Template-free sol-gel synthesis of hierarchically macro- and mesoporous monolithic TiO₂[J]. *J. Disp. Sci. Technol.*, 2007, 28: 115-119.

[45]Kawahara.M, Nakamura.H, Nakajima.T. Titania and zirconia as new ceramic column packing materials for high performance liquid chromatography[J]. *Analytical Sciences*, 1989, 5(4): 485-486.

[46]Kawahara.M, Nakamura.H, Nakajima.T. Titania and zirconia: possible new ceramic microparticulates for high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1990, 515(1): 149-158.

[47]Murayama.K, Nakamura.H, Nakajima.T, et al., Preparation and evaluation of octadecyl titania as column-packing material for high-performance liquid chromatography[J]. *Microchemical Journal*, 1994, 49(2-3): 362-367.

[48]Ellwanger.A, Matyska.MT, Albert.K, Pesek.J. Comparison of octadecyl bonded titania phases[J]. *Chromatographia*, 1999, 49(7-8): 424-430.

[49]Kim.TY, Alhooshani.K, Kabir.A,et al., High pH-resistant, surface-bonded sol-gel titania hybrid organic-inorganic coating for effective on-line hyphenation of capillary microextraction (in-tube solid-phase microextraction) with high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1047(2): 165-174.

[50]Ikeguchi Y, Nakamura H. *Analytical sciences*, 2000, 16: 541-543.

[51]Randon J, Guerrin J F, Rocca J L. *Chromatography A*, 2008, 1214: 183-186.

[52]Kimura Y, Shibasaki S, Morisato K, et al. *Anal. Biochem.*, 2004, 326: 262.-266.

[53]Miyazaki S, Miah M Y, Morisato K. *Sep. Sci.*, 2005, 28(1): 39-44.

[54]Larsen M R, Thingholm T E, Jensen O N, et al. *Mol. Cell Proteomics*, 2005, 4(7): 873-886.

- [55]Martijn H P, Pauliina M U, Martijn J H. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 3935-3943.
- [56]Kuroda I, Shintani Y, Motokawa M, et al. *Analytical Sciences*, 2004, 20(9): 1313-1319.
- [57]R. Strunz, in: *Klockmann's Lehrbuch der Mineralogie*, 16th ed., Enke, Stuttgart, 1978, p. 138.
- [58]T. Rentschler, *Eur. Coatings J.* 10 (1997) 939.
- [59]M. Grün, A.A. Kurganov, S. Schacht, F. Schüth, K.K. Unger, *J. Chromatogr. A* 740 (1996) 1.
- [60]A.A. Kurganov, U. Trüdinger, T. Isaeva, K.K. Unger, *Chromatographia* 42 (1996) 217.
- [61]K. Tani, T. Sumizawa, M. Watanabe, M. Tachibana, H. Koizumi, T. Kiba, *Chromatographia* 55 (2002) 33.
- [62]Tani.K, Suzuki.Y. Influence of titania matrix on retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 722(1-2): 129-134.
- [63]Tani.K, Suzuki.Y. Effect of octadecyl-modification on retention when using titania as a support[J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1996, 19(17): 3037-3408.
- [64]Pesek.JJ, Matyska.MT, Ramakrishnan.J. Synthesis and characterization of titania based stationary phases using the silanization/hydrosilation method[J]. *Chromatographia*, 1997, 44(9-10): 538-554.
- [65]Jiang.ZT, Zuo.YM. Synthesis of porous titania microspheres for HPLC packings by polymerization-induced colloid aggregation (PICA)[J]. *Journal Analytical Chemistry*, 2001, 73(3): 686-688.
- [66]Tani.K, Suzuki.Y. Syntheses of spherical silica and titania from alkoxides on a laboratory scale[J]. *Chromatographia*, 1994, 38(5-6): 291-294.
- [67] Paradela A, Albar J P. Advances in the analysis of protein phosphorylation [J]. *J. Proteome Res*, 2008, 7(5): 1809-1818
- [68]Schlosser A, Vanselow J T, Kramer A. Mapping of phosphorylation sites by a multi-protease approach with specific phosphopeptide enrichment and nano LC-MS/MS analysis[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(16): 5243-5250
- [69]Liang S S, Makamba H, Huang S Y, et al. Nano-titanium dioxide composites for the enrichment of phosphopeptides [J]. *J. Chromatogra A*, 2006, 1116(1-2): 38-45
- [70]张源淑, 邹思湘. 酪蛋白源生物活性肽[J]. *国外畜牧科技*, 1998, 25(4): 33-36.

- [71]李晓辉. 牛乳中酪蛋白的结构特性及其应用[J]. 食品工业, 2002(1): 29-31.
- [72]Yu.VY. The role of dietary nucleotides in neonatal and infant nutrition [J]. Singapore Med J. 1998, 39(4): 145-150.
- [73]金世琳.乳品生物化学(下)[M].北京:中国轻工业出版社,1988:30- 38
- [74]Gobbettim, Stepaniak M, De Angelis M, et al. Latent bioactive peptides in milk protein: Proteolytic activation and significance in dairy processing[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,2002,42(3):223- 239
- [75]赵利,王璋,许时婴.牛乳酪蛋白活性肽的研究进展[J].江苏农业科学,2002,(6):71- 75
- [76]Alais,et al. Helv Chem Acta,1953,36:1955-1968
- [77]TALBO G H, SUCKAU D, MALKOSKIA M, et al. MALDI-PSD-MS analysis of the phosphorylation sites of caseinomacropeptide[J]. Peptides, 2001, 22: 1093-1098.
- [78]PRATA-VIDAL M, BOUHALLAB S, HENRY G, et al. An experimental study of caseinomacropeptide hydrolysis by trypsin in a continuous membrane reactor[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001(8): 195-202.
- [79]Aldrich J M, Muller L D, Varga G A, et al. Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen fermentation, nutrient flow, and performance of dairy cows. Journal of dairy science, 1993, (3):1091-1105
- [80]Mercier A, Gauthier S F, Fliss I. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic. International Dairy Journal, 2004, 14:175-183
- [81]Jolles J, FIAT A M, ALAIS C, et al. Comparative study of cow and sheep k-caseino-glycopeptides: determination of the N-terminal sequence with a sequencer and location of the sugars [J]. FEBS Letters, 1973, 30: 173-176
- [82]Kanamori M, Kawaguchi N, Ibuki F, et al. Attachment: sites of carbohydrate moieties to peptide chain of bovine, casein from normal milk [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1980, 44: 1844-1861
- [83]Smithers G W, et al. Food Aust., 1991, 43: 252-254
- [84]Shammet K M, Brown R J, McMahon D J. Proteolytic activity of proteinases on macropeptide isolated from Casein[J]. J Dairy Sci., 1992, 75: 1380-1388
- [85]Nakano T, Ozimek L. Purification of glycomacropeptide from caseinate hydrolysate by gel chromatography and treatment with acidic solution[J]. J Food Sci., 2002,65(4):588-590

- [86]陈文雅; 王碧莲; 周围等. 肽营养的研究进展[J]. 饲料研究. 2008(11): 25-28.
- [87]Huang JF. Sol-gel principle and technology. Beijing: Chemical Industry Press, 2005 P41-61.
- [88]Konishi J, Fujita K, Nakanishi K, et al. Sol-gel synthesis of macro-mesoporous titania monoliths and their applications to chromatographic separation media for organophosphate compounds[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(44): 7375-7383
- [89]Huang D, Luo GS, Yang LM, Wang YJ (2005) Synthesis of masoporous TiO₂ materials with high specific area using inorganic acids as catalysts. China particuology 3: 176-180
- [90]Yang H, Shen QH, Gao JW (2008) Preparation of TiO₂ sol containing anatase-rutile mischcrystal grains and its photocatalytic activity. Rare Metal
- [91]K. Hata, H. Morisaka, K. Hara, J. Mima, N. Yumoto, Y. Tatsu, M. Furuno, N. Ishizuka, M. Ueda, Anal. Biochem. 350 (2006) 292.
- [92]Y. Ikeguchi, H. Nakamura, Anal. Sci. 13 (1997) 479.
- [93]Y. Sekiguchi, N. Mitsuhashi, Y. Inoue, H. Yagisawa, T. Mimura, J. Chromatogr. A 1039 (2004) 71.
- [94]K. Hata, H. Morisaka, K. Hara, J. Mima, N. Yumoto, Y. Tatsu, M. Furuno, N. Ishizuka, M. Ueda, Anal. Biochem. 350 (2006) 292.(2004) 1.
- [95]Ting Zhou, Charles A. Lucy, Hydrophilic interaction chromatography of nucleotides and their pathway intermediates on titania[J]. Journal of Chromatography A, 1187 (2008) 87-93.
- [96]Ting Zhou, Charles A. Lucy, Separation of carboxylates by hydrophilic interaction liquid chromatography on titania[J]. Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 82-88.

论文、参加科研情况说明以及学位论文使用授权声明

一、 发表论文

- 1、路冠茹, 姜子涛, 李荣. 钛胶整体柱的制备及其应用, *食品研究与开发*, 2010, 31(12): 255-258.
- 2、李荣, 路冠茹, 姜子涛. 肉桂精油抗氧化性能及清除自由基能力的研究, *食品科技*, 2010, 35(2): 166-171.
- 3、J. Zhao, Z. T. Jiang, **G. R. Lu**, J. Tan and R. Li, Determination of phosphatidylcholine in soybean lecithin samples by high performance liquid chromatography on titania, **Analytical Methods**, 2010, 2: 1779-1783. (SCI: 690RX)

二、 学位论文使用授权声明

本人同意授权 天津商业大学 将论文的全部内容或部分内容提供给有关方面, 编入《中国学位论文全文数据库》、《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》、《天津商业大学博硕士学位论文全文数据库》等有关数据库进行检索, 并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅或借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。

致 谢

本论文是在姜子涛教授的悉心指导下完成的。在整个研究生期间姜老师不仅在实验研究上给我进行认真细致的指导，而且他的言传身教教给了我许多做人的道理，让我终身受益，在此对姜老师表示深深的敬意及诚挚的感谢！

我还要衷心感谢李荣教授，在学业上给予我的关怀和鼓励，在我实验和论文的完成过程中给予的帮助！在此，表示我诚挚的谢意！感谢我的父母家人对我学业和生活的大力支持，感谢我所有的同学和朋友给予我的帮助，衷心感谢在学习和生活中所有给予我帮助和关怀的老师、同学和朋友！

路冠茹

2011年5月

独创性声明及使用授权声明

一、学位论文独创性声明

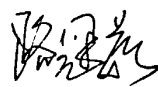
本人所撰写的学位论文是在指导教师的指导下独立完成的研究成果。除已明确标注或得到许可外,所撰写的学位论文中不包含他人已申请学位或其他用途所使用过的成果,不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果,本人的指导教师对此进行了审定。对本文的研究做出重要贡献的个人或集体,本人已在文中做出明确的说明并表示谢意。如有不实,本人承担相应责任。

二、学位论文及研究成果使用授权声明

本人同意授权天津商业大学以非赢利方式保存、使用本人的学位论文的电子版及纸质版。授权天津商业大学将本论文的全部内容或部分内容提供给有关方面编入数据库进行检索、出版及提供信息服务。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。本人在校期间取得的研究数据、相关成果等知识产权归天津商业大学所有。

注:涉及保密的学位论文在解密后适用本授权。

学位论文作者签字:



指导教师签字:



日

期: 2011年5月24日