

SiO₂@TiO₂复合材料分离富集酪蛋白磷酸肽

刘真真¹, 李荣^{1,*}, 汤书华¹, 黄贤勇¹, 张万晶¹, 李勇杰¹, 姜子涛^{1,2,*}

(1.天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134;

2.天津天狮学院食品工程学院, 天津 301700)

摘要: TiO₂具有选择性吸附磷酸肽的特点。为了得到高比表面积的TiO₂, 提高磷酸肽的分离富集效果, 本研究采用层层自组合法, 制备出了比表面积为116.26 m²/g、平均孔直径为8.42 nm的SiO₂@TiO₂核壳型复合材料, 并将该材料用于酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptides, CPPs)的分离富集。利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定出该材料对CPPs的吸附率为93.0%, 解吸率达到81.5%。通过液相色谱-四极杆-飞行时间质谱鉴定出CPPs样品经富集后, 洗脱液中的5种磷酸肽成分的序列分别为PS*H、PS*PR、S*SRS*E、PHS*和PS*SRS*EP; 并以茶碱为内标的HPLC法测定了CPPs样品、氨糖软骨素钙片、婴儿配方奶粉中CPPs的含量, 测定结果的平均添加回收率介于92.5%~95.1%之间。因此, 本实验所制备的SiO₂@TiO₂核壳型复合材料性能优异, 对CPPs分离富集效果明显, 用于实际样品测定的结果准确可靠。

关键词: SiO₂@TiO₂复合材料; 固相萃取; 分离富集; 酪蛋白磷酸肽

Separation and Enrichment of Casein Phosphopeptides Using SiO₂@TiO₂ Composite

LIU Zhenzhen¹, LI Rong^{1,*}, TANG Shuhua¹, HUANG Xianyong¹, ZHANG Wanjing¹, LI Yongjie¹, JIANG Zitao^{1,2,*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China; 2. School of Food Engineering, Tianjin Tianshi College, Tianjin 301700, China)

Abstract: Titania can selectively adsorb phosphopeptides. In order to obtain TiO₂ with high specific surface area and improve the separation and enrichment of phosphopeptide, a SiO₂@TiO₂ composite was prepared by layer-by-layer self-assembly method. The specific surface area and average pore diameter of SiO₂@TiO₂ are 116.26 m²/g and 8.42 nm, respectively. The core-shell composite was used in the separation and enrichment of casein phosphopeptides (CPPs). The adsorption rate of CPPs was determined to be 93.0% by high performance liquid chromatography (HPLC), and the desorption rate was 81.5%. The sequence of the five phosphopeptides present in the eluent was identified as PS*H, PS*PR, S*SRS*E, PHS* and PS*SRS*EP by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOF-MS), respectively. The contents of CPPs in commercial CPPs product, calcium tablets and infant formula were determined by HPLC with theophylline as the internal standard, and the results showed that average recoveries of CPPs were 92.5%–95.1%. It can be concluded that the core-shell SiO₂@TiO₂ composite had excellent properties and allowed efficient separation and enrichment of CPPs, and the proposed method was accurate and reliable to determine CPPs in real samples.

Keywords: SiO₂@TiO₂ composite; solid phase extraction; separation and enrichment; casein phosphate peptides

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180606-063

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 11-0075-07

引文格式:

刘真真, 李荣, 汤书华, 等. SiO₂@TiO₂复合材料分离富集酪蛋白磷酸肽[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 75-81. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180606-063. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-06-06

基金项目: 天津市自然科学基金项目 (13JCYBJC18700; 16JCYBJC43300; 17JCQNJC02400)

第一作者简介: 刘真真 (1993—) (ORCID: 0000-0001-8866-8029), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品添加剂。

E-mail: 373193942@qq.com

*通信作者简介: 李荣 (1962—) (ORCID: 0000-0001-8115-5124), 女, 教授, 学士, 研究方向为食品分析。

E-mail: lirong@tjcu.edu.cn

姜子涛 (1956—) (ORCID: 0000-0003-2756-1898), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品添加剂。

E-mail: ztjiang@tjcu.edu.cn

LIU Zhenzhen, LI Rong, TANG Shuhua, et al. Separation and enrichment of casein phosphopeptides using $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ composite[J]. Food Science, 2019, 40(11): 75-81. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20180606-063. <http://www.spkx.net.cn>

TiO_2 作为一种新型的分离分析材料,具有机械强度高、酸碱稳定性好等优点^[1],对碱性化合物没有不可逆吸附^[2-3],且对磷酸肽等具有较好的选择吸附作用^[4],在分离分析中具有良好的应用前景,但是比表面积小、孔径分布不均和孔径小等方面的缺点大大限制了作为介孔材料的 TiO_2 在色谱填料以及固相萃取(solid phase extraction, SPE)方面的应用^[5]。将 TiO_2 与具有大比表面积的材料复合是改善其比表面积的有效途径,层层自组装法(layer-by-layer, LBL)便是其中的方法之一^[6-7]。LBL是利用静电作用力将电负性不同的带电粒子进行结合。研究结果表明,通过LBL合成的核壳型复合材料在生物工程学^[8]、电磁信息转化^[9]以及表面工程^[10]等方面应用广泛,在SPE方面的应用还有待拓展。

酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptides, CPPs)是一种经单一或复合蛋白酶水解牛乳酪蛋白得到的含有磷酸丝氨酸基团的生物活性多肽^[11-12]。在碱性条件下, CPPs可防止钙、铁等离子的沉淀,从而促进其吸收,因此CPPs被称为“矿物质载体”^[13-16]。现今已有报道的关于CPPs富集的方法主要包括:免疫沉淀法、固定金属离子亲和色谱法、金属氧化物亲和色谱法^[17]及强阴离子交换色谱法^[18]。免疫沉淀法由于成本高,对于分子质量低的磷酸化丝氨酸和苏氨酸并不适用,目前多应用于从小规模的细胞提取物中进行酪氨酸磷酸蛋白的富集^[19]。固定金属离子亲和色谱法是通过带正电的金属离子与带负电的磷酸基团产生静电交互作用而结合来富集磷酸肽,但这种结合能力在高pH值或磷酸盐存在的缓冲液中会被破坏,磷酸化肽会被释放出来^[20]。强阴离子交换色谱法因其对样品需求量大、工作量大而应用受限^[21]。金属氧化物亲和色谱法不仅可以快速、高效地富集磷酸肽,而且其金属氧化物(如 TiO_2)大多具有很好的化学稳定性,故而广泛应用于磷酸肽富集研究,发展迅速^[22]。

本研究利用LBL技术,合成了具有高比表面积、多孔结构的 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 核壳型复合材料,并用于样品中CPPs的分离富集。通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry, LC-Q-TOF-MS)等手段对CPPs进行结构鉴定,采用内标法对CPPs进行定量分析。本研究旨在为食品、药品中CPPs(特别是低丰度)成分的分离分析提供一个行之有效的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氢糖软骨素钙片和婴儿配方奶粉样品,购自于天津市大型购物超市。

CPPs样品 天津百奥泰科技发展有限公司;甲醇、乙腈(色谱纯) 美国Sigma-Aldrich公司; SiO_2 填料(Davisil硅胶,粒径16~24 μm ,孔径15 nm,比表面积289 m^2/g) 美国格雷斯公司;异丙氧基钛($\text{Ti}(\text{OPr})_4$) 安徽省泰昌化工试剂有限公司;十二烷基硫酸钠(sodium lauryl sulfate, SDS)、氨水、氢氧化钠、盐酸 天津市科密欧化学试剂有限公司;氟化铵 天津市光复精细化工研究所。

1.2 仪器与设备

6520 Q-TOF-MS、1200系列HPLC仪 美国Agilent公司;JEOL场发射扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(配有电子能谱(energy dispersive spectrometry, EDS)附件) 日本电子株式会社;HGC数控SPE仪 上海禾工科学仪器有限公司;F-Sorb 3400全自动比表面积及孔径测试仪 北京金埃谱科技有限公司;TSX1200紫外分光光度计 西尼特(北京)有限公司;H2050R-1医用离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料的制备及表征

$\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料参照文献[23-26]的方法制备并适当改进,具体制备流程如下:

1) SiO_2 的活化:称取2 g的 SiO_2 填料放于100 mL三角瓶中,按照10 mL/g的比例向其中加入1 mol/L HCl溶液,45 $^{\circ}\text{C}$ 超声30 min后转移至恒温振荡器中,45 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡12 h,然后进行抽滤,沉淀用去离子水洗至中性,80 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥4 h,冷至室温,即得到活化后的 SiO_2 ;
2) 有机分子膜组装:将活化后的 SiO_2 浸入到100 mL浓度为0.05 mol/L的SDS溶液中,超声30 min,抽滤、蒸馏水洗涤,除去未吸附的SDS,80 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥5 h后冷至室温,得到 $\text{SiO}_2@\text{SDS}$;
3) TiO_2 的组装:将 $\text{SiO}_2@\text{SDS}$ 浸入 TiO_2 溶胶中(该溶胶按照文献[2]的方法制得),在温度为15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,恒温磁力搅拌3 h,静置陈化12 h,离心去除上清液,用无水乙醇洗涤3次,80 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥5 h后冷至室温,得到 $\text{SiO}_2@\text{SDS}@\text{TiO}_2$ 复合材料;
4) 多层复合材料组装:将步骤3)中得到的 $\text{SiO}_2@\text{SDS}@\text{TiO}_2$ 复合

材料浸入到100 mL 0.05 mol/L SDS溶液中,之后重复步骤2)、3)的操作,即可制备包覆多层的SiO₂/SDS/TiO₂复合材料;5) SiO₂@SDS@TiO₂复合材料煅烧:将所制备SiO₂@SDS@TiO₂复合材料置于马弗炉中煅烧,以0.5 °C/min升温速率升温至350 °C并维持3 h,除去复合材料中的有机物,即可制备出SiO₂@TiO₂复合材料。

通过改变TiO₂溶胶与SiO₂的比例、陈化时间、包覆层数和煅烧温度等的单因素试验,确定采用LBL法制备SiO₂@TiO₂核壳型复合材料的最佳条件。对所制备的SiO₂@TiO₂复合材料,采用SEM、EDS进行表征,并利用氮吸附-脱附法(Brunauer-Emmett-Teller, BET)测定所制备的SiO₂@TiO₂复合材料的比表面积及孔径。

1.3.2 SiO₂@TiO₂复合材料SPE柱的制备与对CPPs的富集

1.3.2.1 配制1.0 mg/mL的CPPs样品液

称取0.100 0 g CPPs样品粉末置于烧杯中,加1.5 mL 0.1 mol/L NaOH溶液,在超声条件下使之溶解,然后将溶液转入100 mL容量瓶中,超纯水定容至刻度。

1.3.2.2 SPE柱填装及预处理

首先在SPE柱底端装入聚丙烯筛板,再称取2.0 g的SiO₂@TiO₂复合材料填装于3 mL SPE柱内,之后在SPE柱顶部装入聚丙烯筛板。接着将SPE柱安装在数控SPE仪上,对SiO₂@TiO₂复合材料进行预处理,预处理的具体方法为:先用0.1 mol/L的NaOH溶液对SPE柱进行淋洗,并用超纯水洗涤至中性;然后用0.1 mol/L HCl溶液对SPE柱进行淋洗,再用超纯水洗涤至中性;最后用甲醇淋洗。以上活化过程均在0.5 mL/min流速下进行。

1.3.2.3 CPPs的富集

将SPE仪的流速设定为0.2 mL/min。向SPE柱中加入1.0 mg/mL的CPPs溶液,收集24 min(约2倍柱床体积)流出液并标记;然后用超纯水淋洗SPE柱,收集淋洗液并标记,再用0.3 mol/L的氨水进行洗脱,收集24 min洗脱液并标记,并将流出液、淋洗液及洗脱液于冰箱中4 °C保存,在进行HPLC和LC-Q-TOF-MS分析之前,需经0.22 μm滤膜过滤。

1.3.3 CPPs吸附率及解吸率的测定

将1.3.2.3节得到CPPs样品液原液、流出液及洗脱液进行HPLC分析,HPLC条件参考文献[27]并加以改进,流动相为甲醇、20 mmol/L氟化铵体积比7:93;柱温为45 °C;等度洗脱,流速为0.8 mL/min;检测波长为280 nm;色谱柱为Vydac 218TP C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

利用原液中CPPs的峰面积与质量浓度之比等于洗脱液中CPPs的峰面积与质量浓度之比,求出洗脱液中CPPs的质量浓度,以此类推可分别计算出流出液、洗脱液中CPPs的质量浓度,再按公式(1)、(2)求出SPE柱对CPPs的吸附率与解吸率。

$$E/\% = \frac{\rho_1 V_1 - \rho_2 V_2}{\rho_1 V_1} \times 100 \quad (1)$$

$$D/\% = \frac{\rho_3 V_3}{\rho_1 V_1 - \rho_2 V_2} \times 100 \quad (2)$$

式中: E 表示吸附率; ρ_1 、 ρ_2 、 ρ_3 分别表示样品液、流出液、洗脱液中的CPPs质量浓度/(mg/mL); V_1 、 V_2 、 V_3 分别表示样品液、流出液、洗脱液的上样体积/mL; D 表示解吸率。

1.3.4 LC-Q-TOF-MS对富集后的CPPs结构的分析鉴定

LC条件: Vydac 218TP C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为体积分数15%乙腈水溶液,采用等度洗脱的方式进行;柱温45 °C;流速0.3 mL/min;进样量5 μL。MS条件:电喷雾离子源;正离子模式;离子源温度:350 °C;雾化气流速:10 L/min;喷雾器压力:30 psig;电压:175 V;透镜:65 V;离子喷雾电压:4 000 V;一级MS质荷比范围: m/z 60~3 200;二级MS碰撞能量数据设置见表1;检测范围: m/z 50~3 000;母离子优选价态:2、3、大于3。所得信息利用Mascot软件进行检索,鉴定匹配肽链中的氨基酸链接顺序。

表1 二级MS碰撞能量设置
Table 1 Collision energy setting of tandem mass spectrometry

m/z	$z:1$	$z:2$	$z:3$
100	12	12	12
200	25	25	25
300	30	30	30
400	35	35	35
500	45	45	45
600	50	50	50
700	55	55	55
800	60	60	60

1.3.5 内标法测定样品中CPPs的含量

1.3.5.1 内标工作曲线的制作

采用内标法测定CPPs的含量,选择茶碱作为内标物。配制1.0 mg/mL茶碱标准液,经天津市食品生物技术重点实验室自制SiO₂@TiO₂复合材料填装的SPE柱富集后得到茶碱的洗脱液,将洗脱液分别稀释50、100、200、300、400、500倍体积,得到一系列质量浓度的茶碱标准液。再取1.0 mg/mL CPPs样品洗脱液分别加入到1.0 mL一系列质量浓度的茶碱标准液中,混合,过0.45 μm的滤膜,然后进行HPLC分析。据公式(3)计算出不同稀释倍数的茶碱洗脱液中茶碱的质量,以茶碱质量为横坐标,以茶碱与CPPs的峰面积之比为纵坐标,得到内标工作曲线。

$$m = \frac{\rho \times V \times E \times D}{n} \quad (3)$$

式中: m 表示茶碱的质量/μg; ρ 表示茶碱的质量浓度/(mg/mL); V 表示加入的茶碱的体积/mL; E 表示

SPE柱的吸附率/%; D 表示SPE柱的解吸率/%; n 表示稀释倍数。

1.3.5.2 样品前处理

对于CPPs样品, 依照1.3.2.1节的方法制成1.0 mg/mL的样品溶液。对于钙片和奶粉样品, 前者需用研钵研磨成约40目的粉末, 后者可直接使用。分别称取0.500 0 g粉碎后的钙片或奶粉样品, 加适量0.1 mol/L NaOH超声溶解, 然后加入超纯水后继续超声10 min, 抽滤后取滤液进行离心, 将上清液转入100 mL容量瓶, 超纯水定容并摇匀, 得到5.0 mg/mL钙片及奶粉的样品溶液。依照1.3.2.3节的方法将配制好的样品液上样, 富集其中的CPPs, 再按1.3.3节的HPLC条件将样品富集前的原液及富集后的洗脱液分别进样。

1.3.5.3 CPPs成分含量的测定

采用文献[28]的方法, 并据公式(4)计算CPPs的质量, 据公式(5)计算出样品中CPPs的含量。

$$m_s = \frac{m_i \times f_s \times A_s}{f_i \times A_i} \quad (4)$$

$$\omega = \frac{m_s}{\rho_{\text{样}} \times V_{\text{样}} \times E \times D} \quad (5)$$

式中: m_s 表示洗脱液中CPPs成分的质量/ μg ; m_i 表示茶碱的质量/ μg ; f_s 表示洗脱液中CPPs的绝对校正因子; A_s 表示洗脱液中CPPs的峰面积; f_i 表示茶碱的绝对校正因子; A_i 表示茶碱的峰面积; ω 表示样品中CPPs的含量/($\mu\text{g}/\text{mg}$); $\rho_{\text{样}}$ 表示上样液的质量浓度/(mg/mL); $V_{\text{样}}$ 表示上样液的体积/ mL ; E 表示SPE柱的吸附率/%; D 表示SPE柱的解吸率/%。

1.4 数据处理与分析

采用SPSS 16.0软件对实验数据进行单因素方差分析, 用Origin 8.5软件对实验数据作图。

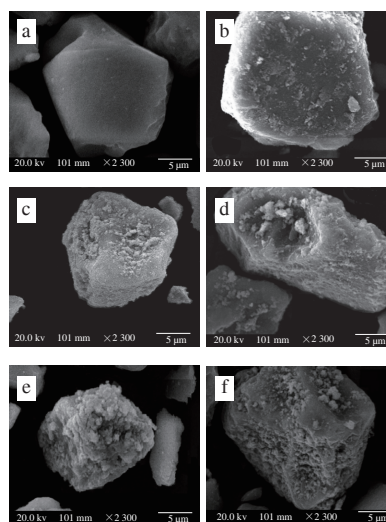
2 结果与分析

2.1 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料的表征

2.1.1 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料的SEM和EDS表征

从图1可以看出, 内核材料 SiO_2 在包覆前表面是光滑的, 当 TiO_2 纳米粒子沉积在其表面即被包覆后, SiO_2 表面变得粗糙, 且随着包覆层数的增加, SiO_2 表面沉积的 TiO_2 粒子逐渐增多, 表面的粗糙程度也越大; 当包覆层数达到8层时, SiO_2 表面基本全部覆盖了 TiO_2 粒子, 之后再增加包覆层, 表面变化不明显。

由图2可知, 包覆层数由0层增加到8层时, 硅元素的原子百分比从34.55%降至11.99%, 钛元素的原子百分比从0%升至19.25%; 当包覆层数由8层增加到9层时, 硅元素的原子百分比从11.99%降至10.12%, 钛元素的原子百分比从19.25%升至20.88%, 变化趋于平稳。结合图1、2的结果可以证明包覆层数为8层时包覆达到饱和。



a. SiO_2 ; b~f 包覆层数分别为2、4、6、8、9; 图2同。

图1 不同包覆层数的 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料的SEM图

Fig. 1 Scanning electron microscope images of $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ composite with different layers of TiO_2 coating

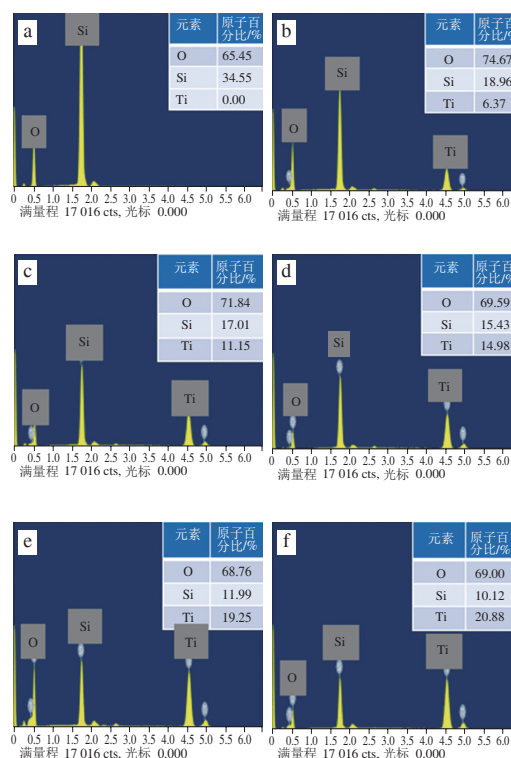


图2 不同包覆层数的 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料的EDS分析结果

Fig. 2 EDS images of $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ composite with different layers of TiO_2 coating

2.1.2 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料的比表面积及孔径分析

用BET法对包覆8层合成的 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料的比表面积及孔径进行测定, 结果见图3。运用BET法测得的 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料比表面积为116.26 m^2/g 。根据 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料的BET等温线(图3A), 结合BDT

吸附等温线理论可知, 该材料的吸附特征及出现的毛细管凝结的现象均符合中孔结构的特点, 从而说明了 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料具有多孔结构。从孔径分布(图3B)可以看出, $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料的孔径主要分布在2~13 nm范围内, 平均孔直径为8.42 nm, 分布较窄并且均匀。

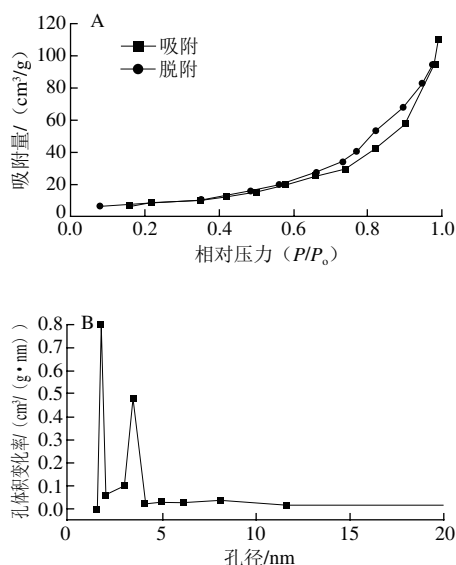


图3 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料的BET等温线(A)和孔径分布(B)

Fig. 3 Nitrogen adsorption/desorption isotherms (A) and pore size distribution (B) of $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ composite

2.2 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料对CPPs的富集

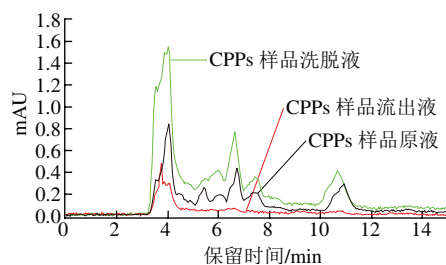


图4 CPPs样品富集前后的分析

Fig. 4 Comparative elution profiles of original and enriched CPPs

由图4可知, 流出液保留时间大于5 min时, 没有明显的色谱峰出现, 表明富集之后, 样品中的CPPs基本被 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料吸附; 而洗脱液保留时间在5 min之后的色谱峰响应值较原液增大了1~2倍, SPE柱对CPPs的吸附率为93.0%, 解吸率为81.5%, 说明 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料对CPPs有较好的富集效果。

2.3 利用LC-Q-TOF-MS法鉴定CPPs的结构

从图5可以看出, 所测定的CPPs样品液有5个信号较高的色谱峰, 此说明CPPs样品主要是由这5种化合物构成的。

利用LC-Q-TOF-MS法对CPPs的结构进行了鉴定。在MS分析过程中, 磷酸肽的稳定性比较差, 由于碰撞诱导裂解, 磷酸肽中性磷酸(如 H_3PO_4 、 HPO_3)易丢失^[29-30]。其中, 磷酸化的Ser和Thr易发生 β 消除, 即丢失 H_3PO_4 分子, 分子质量减小98 Da^[31]。结合得到的离子碎片图和Mascot检索的结果, 分析确定了洗脱液中的5种CPPs, 据总离子流图提取出每种CPPs对应的质核比以及每个质核比对应的二级MS碎片等具体参数(表2), 各CPPs对应的断裂结构解析如图6所示, 说明洗脱液中的5个峰均为磷酸肽, 可见 $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 复合材料对CPPs具有非常好的富集作用。

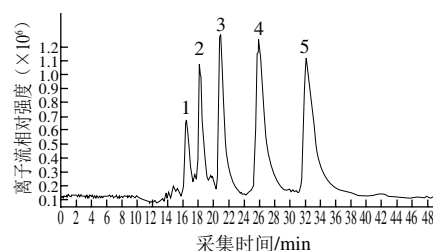


图5 洗脱液总离子流图

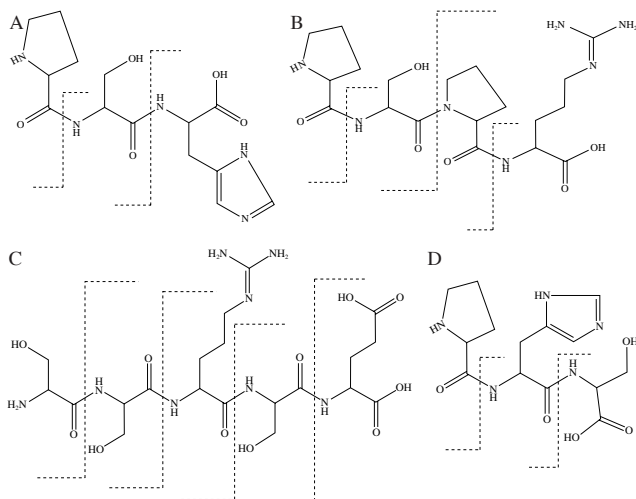
Fig. 5 Total ion current chromatogram of the eluent

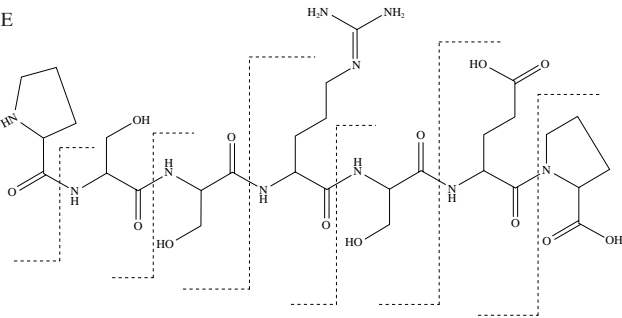
表2 主要的CPPs

Table 2 Major components of CPPs

色谱峰	MS保留时间/min	母离子(m/z)	碎片离子(m/z)	氨基酸序列	对应HPLC图保留时间/min
1	16.139	340.3	209、114	PS*H	5.4
2	17.857	453.4	322、209、114	PS*PR	6.0
3	21.821	566.5	435、322、209、114	S*SRS*E	6.7
4	27.915	340.3	209、114	PHS*	7.4
5	39.413	792.7	661、548、565、435、322、209、114	PS*SRS*EP	10.8

注: P、S、H、R、E分别表示脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、谷氨酸(Glu); *.其左侧的氨基酸为磷酸化的氨基酸。





A. PS*H; B. PS*PR; C. S*SRS*E; D. PHS*; E. PS*SRS*EP。图7同。

图6 CPPs的断裂结构解析

Fig. 6 Fragmentation of CPPs

2.4 SiO₂@TiO₂复合材料富集CPPs的应用

2.4.1 工作曲线的制作

茶碱与5种CPPs的工作曲线如图7所示, 据工作曲线可以得出茶碱与每种CPPs对应的线性方程、决定系数 R^2 以及相对校正因子(即组分与标准物质的绝对校正因子之比), 如表3所示。

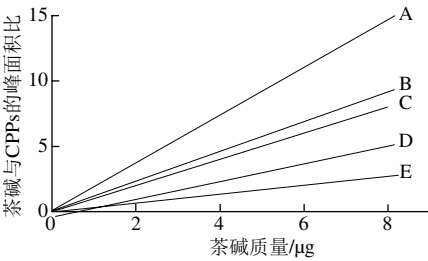


图7 内标工作曲线

Fig. 7 Internal standard working curves

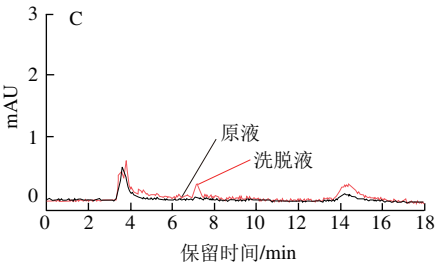
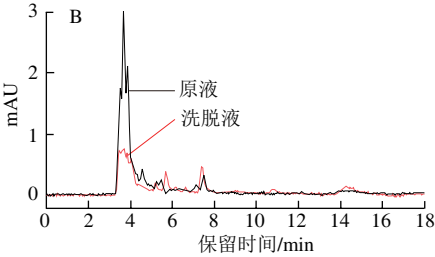
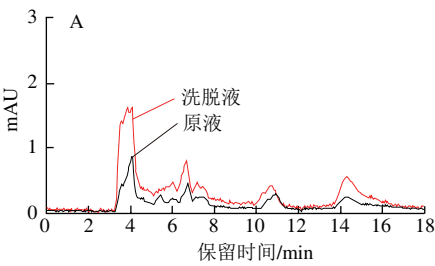
表3 内标工作曲线线性方程及相关参数

Table 3 Linear equations with correlation coefficients and relative correction factors from internal standard working curves

内标工作曲线	线性方程	R^2	相对校正因子
茶碱/PS*H	$y=0.305\ 83+3.630\ 85x$	0.999 60	3.630 85
茶碱/PS*PR	$y=0.191\ 14+2.269\ 28x$	0.999 60	2.269 28
茶碱/S*SRS*E	$y=0.047\ 79+0.567\ 32x$	0.999 60	0.567 32
茶碱/PHS*	$y=0.096\ 23+1.135\ 01x$	0.999 59	1.135 00
茶碱/PS*SRS*EP	$y=0.029\ 39+0.335\ 82x$	0.999 58	0.335 80

2.4.2 样品的测定及加标回收率

由图8A可以看出, CPPs样品洗脱液在5 min后出现5个响应值明显大于CPPs原液的峰, 结合LC-Q-TOF-MS的结果可知, 图8A中这5个峰均为CPPs。由图8B可知, 钙片样品洗脱液在保留时间分别为7.4 min和10.8 min时色谱峰响应值均明显大于钙片样品原液的色谱峰, 这两个时间分别对应PHS*、PS*SRS*EP的保留时间, 可以得出保留时间在7.4 min和10.8 min的成分均是钙片中的CPPs。由图8C可知, 奶粉样品洗脱液在保留时间为7.4 min时色谱峰响应值大于奶粉样品原液, 且与PHS*的保留时间一致, 可以得出保留时间在7.4 min的成分是奶粉中的CPPs成分。图8中14.3 min处均为茶碱富集前后的色谱峰。



A. CPPs样品; B. 钙片; C. 婴幼儿配方奶粉。

图8 样品富集前后的分析

Fig. 8 Chromatograms of original and enriched CPPs from real samples

加标回收实验的结果如表4所示。CPPs样品、氨糖软骨素钙片和婴儿配方奶粉中CPPs的含量分别为2 676.3、174.6、38.7 mg/100 g, 平均加标回收率分别为95.1%、94.4%和92.5%。加标回收实验结果说明, 用茶碱作内标测定样品中CPPs含量的方法有良好的精密度和准确度。

表4 样品中茶碱加标回收实验结果

Table 4 Recoveries of CPPs from real samples spiked at different levels with the internal standard theophylline

样品	CPPs含量/(mg/100 g)	添加茶碱质量/μg	加标回收率/%
CPPs样品	2 676.3	3.79	95.4
		1.90	96.4
		1.26	93.6
氨糖软骨素钙片	174.6	1.26	96.2
		0.95	94.7
		0.76	92.3
婴儿配方奶粉	38.7	7.58	93.1
		3.79	91.2
		1.90	93.2

3 结论

本研究采用LBL法制备出了性能优良的SiO₂@TiO₂核壳型复合材料, 在利用SiO₂@TiO₂复合材料填充的SPE柱

富集磷酸肽的基础上,通过HPLC分析得到其对CPPs的吸附率为93.0%,解吸率为81.5%;又通过二级MS确定了CPPs样品洗脱液中的5种磷酸肽成分,分别为PS*H、PS*PR、S*SRS*E、PHS*、PS*SRS*EP;同时建立了以茶碱为内标测定样品中CPPs含量的方法,结果表明制备的SiO₂@TiO₂复合材料对CPPs具有较理想的富集效果,内标法测定样品中CPPs的含量方法可靠。

参考文献:

- [1] JIANG Z T, ZUO Y M. Synthesis of porous titania microspheres for HPLC packings by polymerization induced colloid aggregation (PICA)[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(3): 686-688. DOI:10.1021/ac001008u.
- [2] ZHAO J, JIANG Z T, TAN J, et al. Sol-gel synthesis and characterization of titania monolith with bimodal porosity[J]. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2011, 58(2): 436-441. DOI:10.1007/s10971-011-2410-2.
- [3] TAN J, LI M, LI R, et al. Functional monomer free synthesis of molecularly imprinted titania for solid-phase extraction of nicotinic acid[J]. *Analytical Methods*, 2013, 5(5): 1245-1252. DOI:10.1039/c2ay26414e.
- [4] 林威, 王京兰, 应万涛, 等. 二氧化钛富集磷酸肽方法优化及在脉冲热厌氧菌磷酸化蛋白质组分析中的应用[J]. *色谱*, 2012, 30(8): 763-769.
- [5] 孟庆磊, 刘百军. 高比表面积二氧化钛制备研究新进展[J]. *无机盐工业*, 2009, 41(8): 1-5.
- [6] 王天雷, 刘梅堂, 马鸿文. 层层自组装技术制备类水滑石基新型薄膜材料的研究进展[J]. *化工进展*, 2013, 32(7): 1584-1590; 1603.
- [7] 黄怡, 李梅. 用层层自组装法制备PS/SnO₂核壳微球[J]. *材料导报*, 2006, 20(10): 143-146.
- [8] 薛瑞, 康天放, 鲁理平. 层层自组装纳米金与乙酰胆碱酯酶电化学学生物传感器检测有机磷农药[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(8): 940-944.
- [9] 孙军, 朱正意, 赖健平, 等. 层层自组装法制备石墨烯/聚苯胺复合薄膜及在传感器中的应用[J]. *高等学校化学学报*, 2015, 36(3): 581-588.
- [10] 胡燕, 蔡开勇. 层层自组装技术在基因活化生物材料表面工程的应用[J]. *生物医学工程学杂志*, 2008, 25(3): 738-741.
- [11] 李如兰, 王立克, 戴四发. 酪蛋白磷酸肽功能研究进展[J]. *家禽科学*, 2012(2): 43-45.
- [12] 徐曼, 何东平, 卫娜, 等. 酪蛋白磷酸肽持钙能力的研究[J]. *现代食品科技*, 2012, 28(3): 278-281. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2012.03.003.
- [13] YAN Y H, ZHENG Z F, DENG C H, et al. Selective enrichment of phosphopeptides by titania nanoparticles coated magnetic carbon nanotubes[J]. *Talanta*, 2014, 118: 14-20. DOI:10.1016/j.talanta.2013.09.036.
- [14] DONIDA B M, MRAK E, GRAVAGHI C, et al. Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells[J]. *Peptides*, 2009, 30(12): 2233-2241. DOI:10.1016/j.peptides.2009.08.003.
- [15] ZHAO W, XU G M, YANG R J, et al. Preparation of casein phosphopeptides using a novel continuous process of combining an enzymatic membrane reactor with anion-exchange chromatography[J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 117(1): 105-112. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2013.02.015.
- [16] PEREGO S, ZABEO A, MARASCO E, et al. Casein phosphopeptides modulate calcium uptake and apoptosis in Caco2 cells through their interaction with the TRPV6 calcium channel[J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(2): 847-857. DOI:10.1016/j.jff.2013.01.032.
- [17] TAN Y J, SUI D, WANG W H, et al. Phosphopeptide enrichment with TiO₂-modified membranes and investigation of tau protein phosphorylation[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(12): 5699-5706. DOI:10.1021/ac400198n.
- [18] 李鹏章, 王粤博. 蛋白质组学中磷酸化肽的常用富集方法[J]. *化学进展*, 2012, 24(9): 1785-1793.
- [19] ZHANG Y, WOLF-YADLIN A, ROSS P L, et al. Time-resolved mass spectrometry of tyrosine phosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor signaling network reveals dynamic modules[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2005, 4(9): 1240-1250. DOI:10.1074/mcp.M500089-MCP200.
- [20] MOSER K, WHITE F M. Phosphoproteomic analysis of rat liver by high capacity IMAC and LC-MS/MS[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(1): 98-104. DOI:10.1021/pr0503073.
- [21] MOHAMMED S, HECK A J R. Strong cation exchange (SCX) based analytical methods for the targeted analysis of protein post-translational modifications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(1): 9-16. DOI:10.1016/j.copbio.2010.09.005.
- [22] ZAREI M, SPRENGER A, METZGER F, et al. Comparison of ERLIC-TiO₂, HILIC-TiO₂, and SCX-TiO₂ for global phosphoproteomics approaches[J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(8): 3474-3483. DOI:10.1021/pr200092z.
- [23] 宋秀芹, 张雪红, 王新, 等. 纳米结构TiO₂/SiO₂的逐层自组装[J]. *化学学报*, 2003, 61(5): 780-784; 644.
- [24] 葛晋, 翟宗德, 明永飞, 等. 分子自组装氧化钛包覆硅球色谱柱载体的制备及正相色谱性能研究[J]. *分析化学*, 2006, 34(1): 73-76.
- [25] 郝晏, 李巧玲, 李建强, 等. 逐层自组装法制备纳米二氧化钛空心微球[J]. *天津化工*, 2011, 25(1): 13-14.
- [26] 李媛媛, 陈桐, 马玉龙, 等. 静电层层自组装法制备纳米ZrO₂/活性炭复合材料及其吸附性能研究[J]. *化工新型材料*, 2014, 42(10): 60-62.
- [27] 包荣. 基于钛胶柱对几种物质的高效液相色谱分析[D]. 天津: 天津商业大学, 2012: 41-43.
- [28] 丁靖, 惠伯棣. 番茄及其制品中全反式番茄红素和β-胡萝卜素含量的C₃₀-HPLC内标法定量分析[J]. *食品科学*, 2010, 31(24): 348-354.
- [29] PARADELA A, ALBAR J P. Advances in the analysis of protein phosphorylation[J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(5): 1809-1818. DOI:10.1021/pr7006544.
- [30] CHONG P K, LEE H, KONG J W, et al. Phosphoproteomics, oncogenic signaling and cancer research[J]. *Proteomics*, 2008, 8(21): 4370-4382. DOI:10.1002/pmic.200800051.
- [31] RUOTOLO B T, GILLIG K J, WOODS A S, et al. Analysis of phosphorylated peptides by ion mobility-mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(22): 6727-6733. DOI:10.1021/ac0498009.