

# pH响应的包覆超顺磁性纳米颗粒的 $\gamma$ -聚谷氨酸二级结构研究

张菊花<sup>1,2</sup>, 邢建民<sup>1\*</sup>, 江洋洋<sup>1,2</sup>, 高红帅<sup>1,2</sup>, 刘会洲<sup>1</sup>

1. 中国科学院过程工程研究所, 中国科学院绿色过程与工程重点实验室, 北京 100190

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

**摘要** 用傅里叶红外光谱法(FTIR)定量研究了pH对包覆超顺磁性纳米颗粒的 $\gamma$ -聚谷氨酸( $\gamma$ -PGA)二级结构变化的影响。结合傅里叶去卷积技术和二阶导数法对原始谱带(酰胺I带)进行高斯拟合, 计算了二级结构的相对百分含量。红外结果显示: pH变化影响 $\gamma$ -PGA的二级结构。 $\gamma$ -聚谷氨酸磁性纳米微球中 $\gamma$ -PGA的 $\beta$ -折叠和 $\beta$ -转角的总含量很大, 达65%以上, 而 $\alpha$ -螺旋和无规卷曲的含量则比较少。随着pH值的增大,  $\beta$ -折叠的含量逐渐减少相反 $\beta$ -转角的含量逐渐增大。 $\gamma$ -PGA二级结构变化与 $\gamma$ -聚谷氨酸磁性纳米微球在水溶液的稳定性有关。考察了 $\gamma$ -聚谷氨酸纳米微球的zeta电位随pH的变化。结果表明, pH为10.2时zeta电位出现极小值, 其绝对值最大, 颗粒稳定性最好。

**关键词** 傅里叶红外光谱法;  $\gamma$ -聚谷氨酸; 磁性纳米微球; pH; zeta电位

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)08-2148-04

## 引言

红外光谱法是最早用于研究多肽和蛋白质二级结构的手段之一<sup>[1,2]</sup>, 它具有准确及实用性强等特点。

$\gamma$ -聚谷氨酸(polyglutamic acid,  $\gamma$ -PGA)是由谷氨酸经肽键结合形成的生物可降解大分子多肽, 能被机体吸收, 代谢和排泄, 不易产生积蓄和毒副作用, 是理想的药用载体材料。了解 $\gamma$ -PGA二级结构的信息, 对研究药物负载和释放有重要的意义<sup>[3,4]</sup>。 $\gamma$ -PGA二级结构对pH非常敏感。据研究报告,  $\gamma$ -PGA的二级结构与侧链羧基的电离度有关, 未电离的侧链羧基对二级结构的分子内氢键有稳定作用, 当羧基电离时会破坏其氢键稳定从而发生结构转变<sup>[5,6]</sup>。所以, 改变pH值可以调控 $\gamma$ -PGA的二级结构。 $\gamma$ -PGA包覆超顺磁性纳米颗粒可得到 $\gamma$ -PGA磁性纳米微球。这种新型的生物材料在生物医药和生物医学工程领域中具有广泛的应用前景。近年来, 聚合物固体颗粒在溶液中的结构变化以及稳定性研究成为热点之一<sup>[7-9]</sup>。

本文主要研究目的是, 结合傅里叶去卷积技术、二阶导数法以及高斯曲线拟合<sup>[10]</sup>定量研究在不同pH值溶液里经冷冻干燥得到的固体 $\gamma$ -聚谷氨酸以及 $\gamma$ -聚谷氨酸磁性纳米

微球二级结构的信息, 并分析二级结构变化对磁性微球在水溶液中分散稳定性的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

氯化亚铁( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 三氯化铁( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 北京化学试剂公司, 分析纯; 聚乙二醇(PEG Mw 400), 北京化学试剂公司, 分析纯;  $\gamma$ -聚谷氨酸( $\gamma$ -PGA), 珠海优茂生物科技有限公司, 纯度90%, Mw 50 000~80 000。

### 1.2 $\gamma$ -聚谷氨酸磁性纳米微球制备

用化学共沉淀法<sup>[11]</sup>制备超顺磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 颗粒,  $\text{Fe}^{3+}$ 与 $\text{Fe}^{2+}$ 摩尔比为2:1。在制备过程中加入PEG得到了 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁流体。将0.5 g磁流体超声分散在 $\gamma$ -PGA溶液里(1.5 g  $\gamma$ -PGA溶于100 mL去离子水)在氮气保护下升温至80 °C, pH值调至3(1 mol·L<sup>-1</sup> HCl溶液), 搅拌4 h合成了 $\gamma$ -PGA包覆的磁性纳米微球(粒径在200~300 nm之间)。

### 1.3 样品制备

配置0.5 mg·mL<sup>-1</sup>, pH值分别为2, 7, 10, 13的 $\gamma$ -PGA溶液和 $\gamma$ -PGA磁性纳米微球分散液。pH值用0.5 mol·L<sup>-1</sup>磷酸溶液, 0.5 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液, 0.5 mol·

收稿日期: 2008-05-10, 修订日期: 2008-08-20

基金项目: 国家“973”重点基础研究发展规划项目(2007CB714301), 国家“863”高技术研究发展计划项目(2006AA02Z215)和国家自然科学基金重大基金项目(20490200)资助

作者简介: 张菊花, 女, 1982年生, 中国科学院过程工程研究所硕士研究生 e-mail: zhangjuhua05@yahoo.com.cn

\* 通讯联系人 e-mail: hzliu@home.ipe.ac.cn

$L^{-1}$  磷酸氢二钠溶液进行调节。配好的样品放置 2 h, 再置于冰箱冷冻 2 h。然后, 放入冷冻干燥机 (Vir Tis, SP 公司), 在  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻干燥 24 h。

#### 1.4 傅里叶变换红外光谱及数据处理

干燥好的样品用 KBr 压片, 在 Bruker 公司生产的 VECTOR 22 傅里叶变换红外光谱仪上进行检测, 扫描次数 256 次, 分辨率为  $2\text{ cm}^{-1}$ 。根据文献 [12, 13] 所用的图谱处理方法可以得到二阶导数谱和去卷积谱。用 Microsoft Origin 数学软件对原始谱带进行高斯曲线拟合, 得到子峰数目 10~12 之间,  $R^2$  大于 0.999。

## 2 结果与分析

### 2.1 pH 对 $\gamma$ -聚谷氨酸二级结构的影响

图 1 是不同 pH 条件下的  $\gamma$ -PGA 溶液经过冷冻干燥以后测得的红外吸收。从图 1(a) 中可以看出,  $1714\text{ cm}^{-1}$  是  $\gamma$ -COOH 的 C=O 伸缩振动吸收峰。 $1650\text{ cm}^{-1}$  属于酰胺 I 带为  $\alpha$ -螺旋<sup>[14,16]</sup>,  $1556\text{ cm}^{-1}$  是  $\alpha$ -螺旋酰胺 II 带吸收<sup>[14]</sup>。当 pH 为 7 时,  $1650$  和  $1556\text{ cm}^{-1}$  处仍有吸收。 $1775\text{ cm}^{-1}$  是侧链 ( $\gamma$ -位) 电离羧基的 C=O 伸缩振动。 $1622\text{ cm}^{-1}$  是  $\beta$ -折叠的吸收<sup>[14]</sup>。在  $1670\text{ cm}^{-1}$  左右出现了宽的强吸收, 推测为  $\beta$ -转角<sup>[17]</sup>。当 pH 为 10 时在  $1655\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 I)<sup>[14]</sup> 有无规卷曲结构的吸收, 在  $1597\text{ cm}^{-1}$  处出现了电离的  $-\text{COO}$  基团的不对称伸缩振动也证明了无规卷曲结构的存在<sup>[18]</sup>。当 pH 为 13 时  $\beta$ -结构显著。分别在  $1670$  和  $1622\text{ cm}^{-1}$  出现了

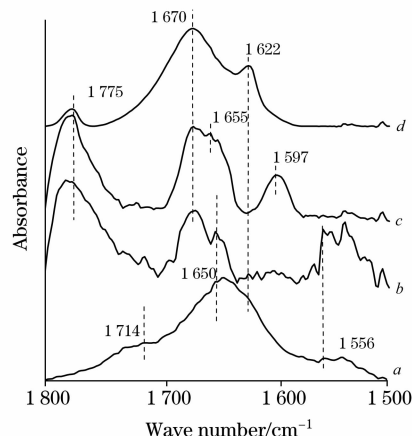


Fig. 1 FTIR spectra of  $\gamma$ -PGA

a: pH 2; b: pH 7; c: pH 10; d: pH 13

$\beta$ -转角和  $\beta$ -折叠的吸收。

Sawa 等<sup>[18]</sup> 用粘度法、红外光谱法和旋光色散仪研究了微生物法合成得到的  $\gamma$ -PGA 二级结构。认为在酸性条件下  $\gamma$ -PGA 呈平行的  $\beta$ -结构 (Parallel  $\beta$ -form), 在中性条件下呈无规卷曲 (Random coil), 而在碱性条件下是更为收缩的无规卷曲形式 (Contracted random coil)。但是根据图 1 的分析, 每个 pH 值下可能至少存在两种二级结构。酸性条件下可能有  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠<sup>[16]</sup>, 而中性及碱性条件下可能有无规卷曲,  $\beta$ -折叠和  $\beta$ -转角。有研究报道, 大分子量的多肽容易形成  $\beta$ -

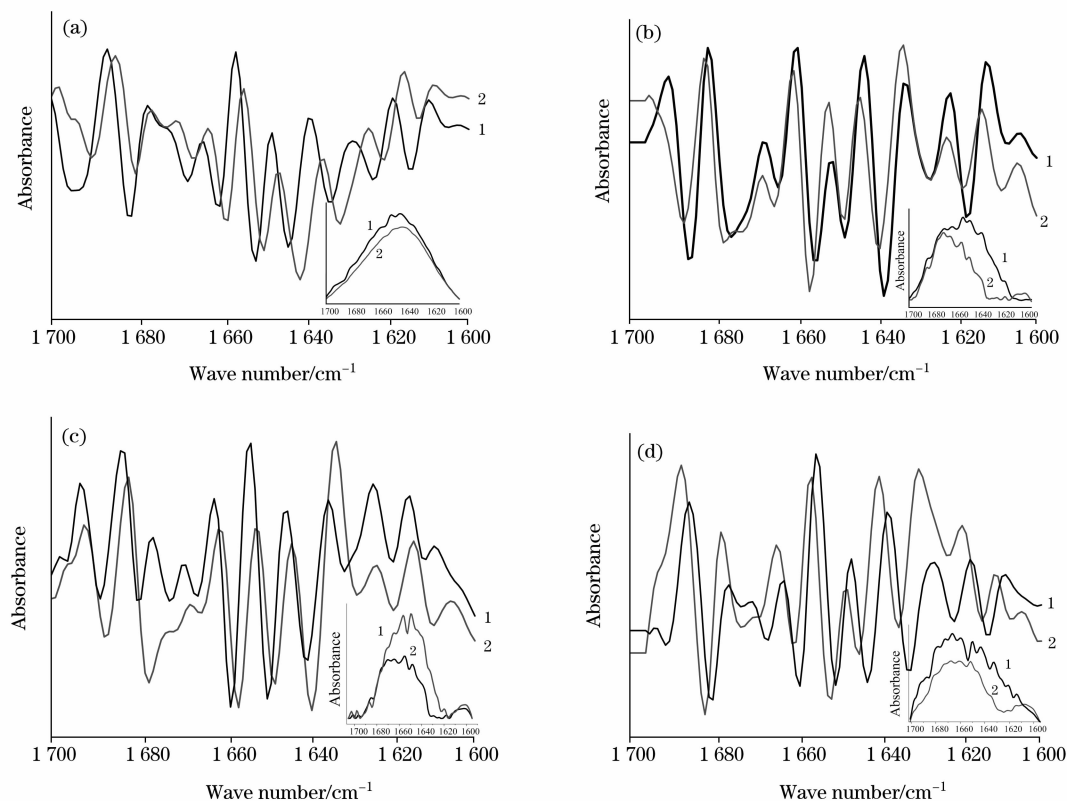


Fig. 2 Second derivative spectra and original spectra (inset)

1:  $\gamma$ -PGA; 2: magnetic  $\gamma$ -PGA nanospheres; (a): pH 2; (b): pH 7; (c): pH 10; (d): pH 13

结构<sup>[14]</sup>。 $\gamma$ -PGA 的分子量很大,所以图 1 中的每个 pH 值下都可能存在  $\beta$ -折叠和  $\beta$ -转角。

## 2.2 $\gamma$ -PGA 以及 $\gamma$ -PGA 磁性纳米微球二级结构的定量分析

为确定各二级结构百分含量,选定酰胺 I 带(1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$ )对  $\gamma$ -PGA 和  $\gamma$ -PGA 磁性纳米微球经冷冻干燥后得到的红外谱图进行二阶导数处理,原始谱图和二阶导数谱图示于图 2。

根据文献的报道本文对所得谱带进行了峰的归属(主要的 9 个峰)(见表 1)。1 619~1 632  $\text{cm}^{-1}$  反平行链  $\beta$ -折叠,1 636~1 639  $\text{cm}^{-1}$  是平行链  $\beta$ -折叠<sup>[14, 19]</sup>。一般认为酰胺 I 带的 1 660~1 695  $\text{cm}^{-1}$  是  $\beta$ -转角吸收峰<sup>[2, 17]</sup>。本实验中  $\gamma$ -PGA 的  $\beta$ -转角出现在 1 660~1 681  $\text{cm}^{-1}$ ,反平行链  $\beta$ -折叠在 1 685~1 695  $\text{cm}^{-1}$ <sup>[14, 18, 19]</sup>。1 651  $\text{cm}^{-1}$  是  $\alpha$ -螺旋,无规卷曲的吸收在 1 655  $\text{cm}^{-1}$ 。表中 1 641~1 648  $\text{cm}^{-1}$  是难以归属的峰。Byler 和 Susi<sup>[2]</sup> 研究重水溶液里的酰胺 I 带蛋白质二级结构时认为 1 644  $\text{cm}^{-1}$  (1 640~1 648  $\text{cm}^{-1}$ ) 附近的吸收属于无序片段(Aperiodic segments),可能是由多种吸收峰叠加而形成的。Hollósi 等<sup>[20]</sup> 研究了线型多肽的  $\beta$ -转角结构,发现  $\beta$ -转角和  $3_{10}$ -螺旋的吸收在 1 640  $\text{cm}^{-1}$  附近。Haris 等<sup>[10]</sup> 对多肽构象进行了报道,认为  $\beta$ -转角和  $3_{10}$ -螺旋出现在 (1 646 $\pm$ 3)  $\text{cm}^{-1}$ 。另外, Miyazawa 等<sup>[14]</sup> 在研究平行链  $\beta$ -折叠结构时提出平行的酰胺 I 带(Parallel amide I band)吸收在 1 645  $\text{cm}^{-1}$ 。因而本文将 1 641~1 648  $\text{cm}^{-1}$  归属于“未知结构”(Undefined),特别是 (1 642 $\pm$ 1)  $\text{cm}^{-1}$  和 (1 647 $\pm$ 1)  $\text{cm}^{-1}$  两处出现未知结构峰。由 Krimm 等<sup>[17]</sup> 对多肽和蛋白质  $\beta$ -转角研究发现  $\beta$ -转角有多种类型,在酰胺 I 带  $\beta$ -转角经常与  $\alpha$ -螺旋及  $\beta$ -折叠的吸收叠加在一起出现并影响它们的吸收。根据以上结论推测 (1 642 $\pm$ 1)  $\text{cm}^{-1}$  可能是  $\beta$ -折叠与  $\beta$ -转角的叠加在一起的组合峰,而 (1 647 $\pm$ 1)  $\text{cm}^{-1}$  可能是  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角的组合峰,可能也有少量的  $\beta$ -折叠的贡献。

根据上述归属的子峰,对二阶导数拟合峰进行统计,计算了峰面积的百分含量。分析表 1 的二级结构信息,发现相同 pH 条件下得到的  $\gamma$ -PGA 和  $\gamma$ -PGA 磁性纳米微球二级结构含量不同。这可能是部分的  $\gamma$ -PGA 分子链与磁性颗粒连接形成微球而影响了其构象转变。比较  $\gamma$ -PGA 在不同 pH 下的二级结构,每个 pH 下都存在  $\beta$ -折叠和  $\beta$ -转角,且它们所占的百分含量很高,达 65%~70%(见表 2),而  $\alpha$ -螺旋与无规卷曲的含量比较低。同样  $\gamma$ -PGA 磁性纳米微球的  $\beta$ -折叠和  $\beta$ -转角所占百分含量也非常高,为 66%~74%(见表 2)。这可能是由于  $\gamma$ -PGA 是一个大分子量的多肽容易形成  $\beta$ -构象,而且冷冻干燥过程也有可能导致  $\beta$ -构象的增加<sup>[21]</sup>。同时发现  $\gamma$ -PGA 和  $\gamma$ -PGA 磁性纳米微球  $\beta$ -折叠的含量随着 pH 值的增加而降低,相反  $\beta$ -转角则逐渐增加。 $\gamma$ -PGA 侧链羧基的电离程度是影响二级结构变化的主要原因。随着 pH 值的增加侧链羧基电离程度随之增大,电离的  $\text{COO}^-$  基团破坏  $\beta$ -折叠肽链之间的氢键作用,导致  $\beta$ -折叠的含量减少,相反使  $\beta$ -转角的含量增加。

据研究报道,在冷冻干燥过程会使  $\beta$ -折叠的含量增加,但其变化不大,因而一般研究中可以用冷冻干燥后的样品来表征二级结构,同时固体状态样品的红外谱图不需要差减水

**Table 1 Secondary structure of  $\gamma$ -PGA (1) and of magnetic  $\gamma$ -PGA nanospheres (2) from amide I band analysis**

pH	Band position/ $\text{cm}^{-1}$		Band area/%		Assignment
	1	2	1	2	
2	1 623	1 620	13.7	6.9	$\beta$ -sheet
	1 633	1 631	15.4	22.5	$\beta$ -sheet
	1 643	1 640	19.1	18.8	Undefined
	1 651	1 650	7.9	10.6	$\alpha$ -helix
	1 660	1 658	13.3	7.1	$\beta$ -turn
	1 667	1 666	11.9	16.9	$\beta$ -turn
	1 674	1 673	2	0.91	$\beta$ -turn
	1 681	1 680	7.9	7.6	$\beta$ -turn
	1 694	1 690	4.4	4.4	$\beta$ -sheet
	7	1 626	1 626	12.1	1.8
1 637		1 638	11.7	7.2	$\beta$ -sheet
1 647		1 648	16.7	13.3	Undefined
1 655		1 655	11.5	11.7	Random coil
1 663		1 664	16.5	25	$\beta$ -turn
1 671		1 672	13.4	15.3	$\beta$ -turn
1 677		1 677	4.2	9.3	$\beta$ -turn
1 685		1 686	10.2	11.8	$\beta$ -sheet
1 695			1.4		$\beta$ -sheet
10		1 619	1 620	0.25	0.78
	1 628	1 631	0.32	7.6	$\beta$ -sheet
	1 638	1 639	0.67	20.6	$\beta$ -sheet
	1 647	1 648	23.8	17.2	Undefined
	1 656	1 657	6.5	13	Random coil
	1 664	1 666	36.8	22.7	$\beta$ -turn
	1 671	1 672	5.5	7.2	$\beta$ -turn
	1 677	1 679	12.7	5.2	$\beta$ -turn
	1 687	1 688	5	2	$\beta$ -sheet
	13	1 623	1 621	0.28	6.5
1 635		1 632	4	11.9	$\beta$ -sheet
1 644		1 642	18	10.3	Undefined
1 651		1 650	10.6	12.3	$\alpha$ -helix
1 660		1 659	18.8	10.6	$\beta$ -turn
1 668		1 666	18.71	6.2	$\beta$ -turn
1 674		1 673	6.3	2.7	$\beta$ -turn
1 681		1 680	15.5	19	$\beta$ -turn
1 693		1 691	1.5	7.4	$\beta$ -sheet

**Table 2 Secondary structure constitution of  $\gamma$ -PGA and of magnetic  $\gamma$ -PGA nanospheres, lyophilized at different pH, from amide I analysis**

pH	$\gamma$ -PGA		Magnetic $\gamma$ -PGA nanospheres	
	$\beta$ -sheet/%	$\beta$ -turn/%	$\beta$ -sheet/%	$\beta$ -turn/%
2	33.6	35	33.7	32.5
7	35.4	34.1	20.8	49.6
10	12.4	54.9	31.13	5.1
13	5.8	59.2	25.8	48.4

或溶剂峰,因而显示出其优点<sup>[22, 23]</sup>。根据冷冻干燥后的样品红外信息可以认为溶液里  $\gamma$ -PGA 的二级结构也会有相同趋势的变化。实验测定了不同 pH 值溶液(2.2~11)里的  $\gamma$ -PGA 磁性纳米微球的 zeta 电位,结果发现,当 pH 为 10.2

时 zeta 电势出现极小值, 为  $-35.4$  mV。说明,  $\gamma$ -PGA 二级结构变化与聚合物磁性微球在水溶液里的分散稳定性的关系。随着 pH 值增大,  $\gamma$ -PGA 电离子度增大, 使磁性颗粒之间的排斥力增加, 颗粒分散性越好。另外, 颗粒的 zeta 电位与

表面电荷密度有关,  $\gamma$ -PGA 二级结构的变化可能改变了  $\gamma$ -聚谷氨酸磁性微球表面电荷密度, 当 pH 为 10.2 时形成的二级结构使颗粒表面电荷密度最大, zeta 电位绝对值出现极大值, 使颗粒在水溶液中的稳定性最好。

### 参 考 文 献

- [1] Krimm S, Bandekar J. *Advances in Protein Chemistry*, 1986, 38: 181.
- [2] Byler D M, Susi H. *Biopolymers*, 1986, 25: 469.
- [3] Higashi N, Koga T, Niwa M. *ChemBioChem*, 2002, 3: 448.
- [4] Inoue K, Baden N, Terazima M. *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109: 22623.
- [5] Palivec L, Urbanová M, Volka K. *J. Peptide Sci.*, 2005, 11(9): 536.
- [6] Zanuy D, Alemán C, Muñoz-Guerra S. *Macromolecular Theory Simulations*, 2000, 9(8): 543.
- [7] Higashi N, Shosu T, Koga T, et al. *J. Colloid Interf. Sci.*, 2006, 298: 118.
- [8] Shim J Y, Gupta V K. *J. Colloid Interf. Sci.*, 2007, 316: 977.
- [9] Mandal H S, Kraatz H B. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129: 6356.
- [10] Haris P I, Chapman D. *Biopolymers*, 1995, 37: 251.
- [11] Liu X, Kaminski M D, Guan Y, et al. *J. Magnetism and Magnetic Materials*, 2006, 306: 248.
- [12] Liu H Z, Yang W J, Chen J W. *Biochem. Eng. J.*, 1998, 2: 187.
- [13] WANG Jing, GUO Chen, LIANG Xiang-feng, et al(王靖, 郭晨, 梁向峰, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(9): 1598.
- [14] Miyazawa T, Blout E R. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83: 712.
- [15] He L M, Neu M P, Vanderberg L A. *Environ. Sci. Technol.*, 2000, 34: 1694.
- [16] Pivcová H, Saudek V, Schmidt P, et al. *Polymer*, 1987, 28: 991.
- [17] Krimm S, Bandekar J. *Biopolymers*, 1980, 19: 1.
- [18] Sawa S, Murakawa T, Watanabe T, et al. *J. Agric. Chem. Soc. Japan.*, 1973, 47: 167.
- [19] Lee N H, Frank C W. *Langmuir*, 2003, 19: 1295.
- [20] Hollosi M, Majer Z S, Réónal A Z, et al. *Biopolymers*, 1994, 34: 177.
- [21] Griebenow K, Klibanov A M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, 92: 10969.
- [22] LIU Ming, MIN Si-jia, ZHU Liang-jun(刘明, 闵思佳, 朱良均). *Science of Sericulture(蚕业科学)*, 2007, 33: 246.
- [23] Forato L A, Bernardes-Filho R, Colnago L A. *Anal. Biochem.*, 1998, 259: 136.

## Study on the pH-Sensitive Secondary Structure of $\gamma$ -PGA Embedded with Magnetite Nanoparticles

ZHANG Ju-hua<sup>1, 2</sup>, XING Jian-min<sup>1\*</sup>, JIANG Yang-yang<sup>1, 2</sup>, GAO Hong-shuai<sup>1, 2</sup>, LIU Hui-zhou<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Green Process and Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China
2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract** The conformational transition of poly  $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA) embedded with magnetite nanoparticles under various pH conditions was investigated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The secondary structure content was determined through the analysis of amide I bands of Fourier deconvolution spectra, secondary derivative spectra and the Gaussian curve fitting of the original infrared spectra. The results showed that the conformation of the  $\gamma$ -PGA was affected by solution pH. The total contents of  $\beta$ -sheet and  $\beta$ -turn were higher than 65%, while  $\alpha$ -helix and random coil were low. The content of  $\beta$ -turn increased with increasing pH, while the  $\beta$ -sheet decreased. Additionally, the zeta potential results showed that the pH-sensitive secondary structure of  $\gamma$ -PGA had influence on the stability of suspension of magnetic  $\gamma$ -PGA nanospheres. The minimum value of zeta potential ( $-35.4$  mV) was obtained at pH 10.2.

**Keywords** FTIR; Poly  $\gamma$ -glutamic acid; Magnetic nanospheres; pH; Zeta potential

\* Corresponding author

(Received May 10, 2008; accepted Aug. 20, 2008)