

原子吸收光谱法间接研究碱式胱氨酸锌的配合反应

刘文涵¹, 吴小琼¹, 陈丹¹, 肖珊美²

1 浙江工业大学化材学院、绿色化学合成技术国家重点实验室分析测试中心, 浙江 杭州 310032
2 金华职业技术学院材化学院, 浙江 金华 321017

摘要 在研究原子吸收间接测定胱氨酸(Cystine, Cys-Cys)时,发现胱氨酸与锌离子在碱性条件下能形成可溶性碱式胱氨酸锌配合物,并在pH 9.4左右时达到最大浓度,经编程计算不同pH下的胱氨酸和锌离子的各种存在形式和分析了拟合分布图,指出在pH 9.4左右时,所形成的可溶性碱式胱氨酸锌配合物是由显电中性的Cys-Cys⁺⁻, -1价的Cys-Cys⁻和-2价的Cys-Cys²⁻,这三种胱氨酸基同时均可以与Zn(OH)₂配位形成三种可溶性碱式胱氨酸锌配合物,其分子式为[(COO⁻)CH(NH₃⁺)CH₂S-SCH₂CH(NH₃⁺)COO⁻]Zn(OH)₂, [(COO⁻)CH(NH₃⁺)CH₂S-SCH₂CH(NH₂)COO⁻]Zn(OH)₂, [(COO⁻)CH(NH₂)CH₂S-SCH₂CH(NH₂)COO⁻]Zn(OH)₂。理论计算分析的结果与实验数据得到了很好的吻合,并确定了硫化锌法原子吸收间接测定胱氨酸时的配合物反应机理。

关键词 火焰原子吸收光谱法; 胱氨酸; 间接测定; 配合反应; 机理研究

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)01-0209-05

引言

氨基酸与锌离子在一定的条件下可以形成配合化合物。在研究原子吸收光谱间接测定胱氨酸时,发现利用新生成的硫化锌悬浮液与胱氨酸(Cystine, Cys-Cys)反应产生可溶性的配合物,再用塞曼火焰原子吸收光谱测定溶液中的总锌浓度,即可间接测定胱氨酸的含量,从而建了硫化锌法原子吸收光谱间接测定氨基酸的方法^[1-3]。实验表明,胱氨酸锌可溶性配合物有一个浓度分布,在pH 9.4左右时有一个最大峰值,表明在不同pH条件下,溶液中的各种离子或分子,随着pH的变化有着不同的配合存在状态。在最大浓度时,各种离子组合状态和配合形式是什么?整个测定又是利用哪一种物质?研究其配合反应的机理,有助于整个测定及其性能的提高和改善,也有利于类似的原子吸收间接测定研究工作的开展和深入,对氨基酸与金属离子的配合反应研究亦有一定的帮助。

本文在前文^[1-6]的基础上,进一步利用计算机对胱氨酸和金属锌离子,在不同pH条件下的离子状态及分布作数值计算分析和拟合作图,研究探讨在pH 9.4左右条件下的各种离子组合状态,以便确定胱氨酸与金属锌离子配合反应的机理及配合物的组成结构。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

日立180-80型塞曼火焰原子吸收分光光度计;日立牌锌空心阴极灯;HI 9321 Microprocessor pH计(HANNA Instruments)。

胱氨酸标准溶液(500 mg·L⁻¹):精确称取0.1250 g L-胱氨酸(生化试剂BR,上海康捷生物科技发展有限公司)溶于2.0 mL 0.5 mol·L⁻¹的NaOH(AR)溶液,转移至250 mL容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度。用时临时配制,不宜放置过长时间。

5%氯化锌溶液;3%硫化钠溶液;其他试剂均为AR级,水为离子交换水。

2.2 实验步骤

硫化锌悬浮液的制备:取2 mL 5%氯化锌溶液,边搅拌边加入3 mL 3%硫化钠溶液,摇匀后离心分离,倾去上层清液,用6 mL 2%硼砂水溶液将沉淀洗涤两次,加0.3 g固体NaCl,用2%的Na₂B₄O₇溶液将沉淀稀释至100 mL。

精确移取1.0 mL胱氨酸标准溶液于10 mL离心管中,加入4.0 mL ZnS悬浮液,用力振荡均匀,放置20 min,用离子交换水稀释至6.00 mL摇匀,离心分离后,以试剂空白作

收稿日期: 2006-10-28, 修订日期: 2007-01-09

基金项目: 浙江省分析测试基金项目和浙江省重中之重学科开放基金项目(20050505)资助

作者简介: 刘文涵, 1956年生, 浙江工业大学化材学院教授, e-mail: liuwh@mail.hz.zj.cn

参比, 用塞曼火焰原子吸收光谱法测定上层清液中锌的 FAAS 吸光度值。

3 结果与讨论

3.1 原子吸收间接测定胱氨酸原理及不同 pH 的影响

胱氨酸根在一定条件下与新生成的硫化锌中的锌发生配合反应, 定量形成可溶性配合物, 再将溶液中的多余的硫化锌沉淀分离, 测定上层清液中的锌含量, 即可间接的测定胱氨酸的含量^[1]。

利用塞曼火焰原子吸收光谱仪, 测定在同一缓冲体系不同 pH 条件下, 胱氨酸与硫化锌悬浮液反应后溶液中锌的总量, 得到溶液 pH 对原子吸收响应的关系曲线, 如图 1 所示。由于 ZnS 在 pH < 7 时会发生溶解, 因而考察仅在碱性溶液中进行。随着 pH 的增大吸光度响应随之增大, 在 pH 9.4 左右时达到最大值。

在 pH > 9.4 以后, 随着 pH 的增大, 响应反而下降, 表明溶液中的可溶性配合锌离子含量, 随着 pH 的增大而降低, 存在着另一种副反应的发生, 降低了可溶性的锌配合物的存量。为考察测定反应进行的方式, 以下从胱氨酸和锌离子两个方面分别探讨在不同 pH 时的存在形式, 以确定不同 pH 阶段的配合反应形式。

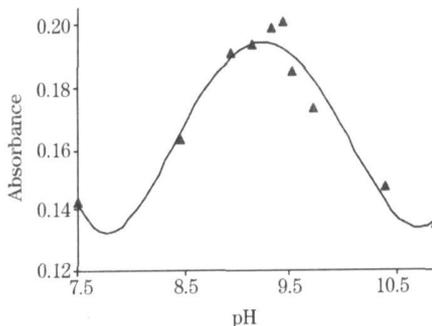


Fig 1 Concentration of zinc cystine at different pH

3.2 胱氨酸的存在形式及在不同 pH 条件下的分布

胱氨酸在水溶液中有 5 种不同的电离状态, 如图 2 中的 (1) Cys-Cys²⁺, (2) Cys-Cys⁺, (3) Cys-Cys⁰, (4) Cys-Cys⁻, (5) Cys-Cys²⁻ 分子式, 相应的带电荷分别为 +2, +1, 0, -1 和 -2 价。其中分子式 (3) 为显电中性分子, 当主要为分子式 (3) 时, 胱氨酸呈电中性, 为等电点, 此时的 pH 为 5.04^[7-9]。当改变溶液的 pH 值, 胱氨酸的带电情况会随着溶液 H⁺ 的浓度变化而发生改变。

图 3 是根据胱氨酸在水溶液中的各级酸碱解离常数^[7-9], 通过自己编制的计算机程序计算和绘制在不同 pH 条件下不同形态的胱氨酸的分布情况。

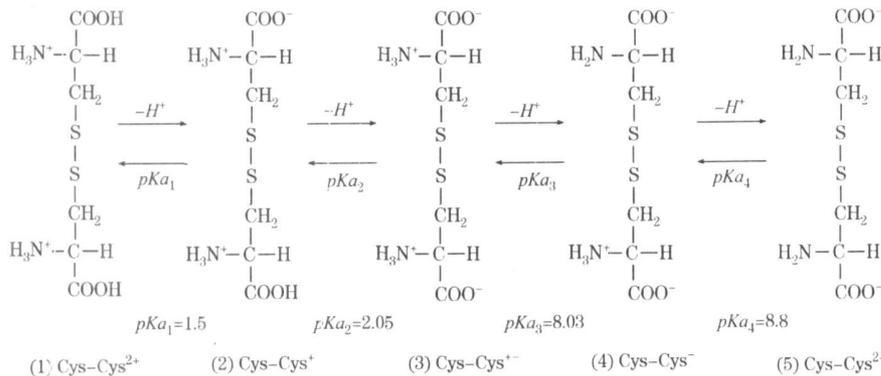


Fig 2 Molecular ionization status of cystine at different pH

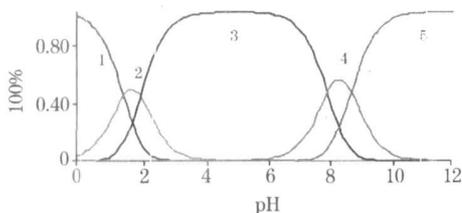


Fig 3 Distribution graph of different status of cystine at different pH

从图 3 中可以看出, 胱氨酸的第 1 种形态 Cys-Cys²⁺ 基本在 pH 2.0 以下; 第 2 种形态 Cys-Cys⁺ 在 pH 0~3.5 之间, 分布范围较小, 相对最大浓度在 pH 1.78 为 48.50%; 第 3 种形态 Cys-Cys⁰ 分布在 pH 1~9 之间, 分布范围较

大, 计算出的最大浓度出现在 pH 5.04, 这与等电点 5.04 完全吻合^[7-9], 此时中性分子的比例为 99.80%, 分子式 2 和 4 均为 0.01%, 此时分子 2 和 4 的浓度相等, 对中性分子的等电点几乎没有影响; 第 4 种形态 Cys-Cys⁻ 在 pH 6.5~10.5 之间, 分布范围较小, 相对最大浓度在 pH 8.42 为 54.82%; 第 5 种形态 Cys-Cys²⁻ 在 pH 8 以后逐渐上升, 到 pH 10 以后基本全转化为带 -2 价电荷的胱氨酸基 Cys-Cys²⁻。从图 1 的峰值 pH 9.4 左右结合图 3 可知, 此时胱氨酸的存在反应形式主要有呈 0 价, -1 价和 -2 价的分子式 (3) Cys-Cys⁰, (4) Cys-Cys⁻ 或 (5) Cys-Cys²⁻ 都能参与反应, 从以下的分析可以得知胱氨酸主要是这三种形式同时参与与锌进行配合反应的。

3.3 锌离子在不同 pH 条件下的存在形式及分布

金属锌离子同样在水溶液中, 在不同 pH 条件下会有不

同的存在形式，在酸性时主要以 Zn^{2+} 形式存在，由于 $Zn(OH)_2$ 是两性化合物能够在强碱性溶液中溶解，形成 OH^- 的配合物。其形成的各级分子式和累积形成常数^[7-9]，列于方程式(6)，(7)，(8)，(9)中。

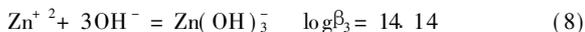
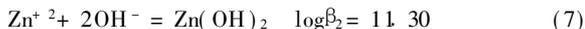
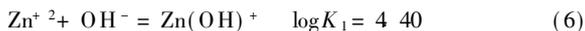


图 4 是根据锌离子的各级反应和累积形成常数，通过微机编程和数值计算绘制的锌离子在不同 pH 条件下的状态分布图。从图 4 中可以看出 pH 7.6 以下的中性和酸性溶液中主要以 Zn^{2+} 的简单形式存在，含量比例在 96% 以上。分子式为 $Zn(OH)^+$ 和 $Zn(OH)_3^-$ 是两种中间过渡形态，其最大含量分别在 pH 8.4 时的 2.71% 和 pH 10.8 时的 18.6%。分子形式 $Zn(OH)_2$ 的最大含量在 pH 9.4 为 96.9%，在 pH 9.4 以前时急速下降，在 pH 8.0 时为 16.3%，在 pH 7.6 时为 3.0%，在 pH 9.4 以上时， $Zn(OH)_2$ 逐步少量的转化为过渡态 $Zn(OH)_3^-$ ，大多数转化为 $Zn(OH)_4^{2-}$ ，并最终全部转化为 $Zn(OH)_4^{2-}$ 而溶解。在 pH 11 之后 $Zn(OH)_4^{2-}$ 会明显增加而干扰了氨基酸锌配合物的测定。

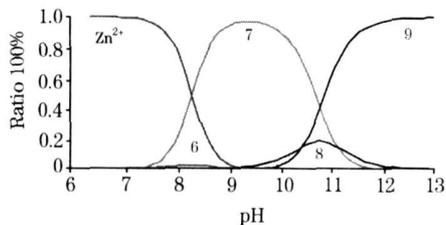


Fig 4 Distribution graph of status of zinc ion at different pH

3.4 不同 pH 条件下的离子组合形式

图 5 是在 pH 7~12 区域时不同形态的胱氨酸基 $Cys-Cys^{+}$ ， $Cys-Cys^-$ ， $Cys-Cys^{2-}$ 与锌离子的共存区域图，在这一区域内存在着多种分子形态的交叉组合。可以看出，在图 1 中的峰值 pH 9.4 左右时，浓度较大的主要有两种胱氨酸形式-1 价的 $Cys-Cys^-$ 和-2 价的 $Cys-Cys^{2-}$ ，而金属锌离子主要以 $Zn(OH)_2$ 形式存在，不难看出此时与 $Zn(OH)_2$ 所形成的可溶性配合物，其胱氨酸的 $Cys-Cys^-$ 和 $Cys-Cys^{2-}$ 都有可能，考察 $Cys-Cys^-$ 和 $Cys-Cys^{2-}$ 都有相同的 2 个羧基作为配体，可以与 $Zn(OH)_2$ 配位形成可溶性配位化合物；若从图 1 峰形的分布范围考察，显电中性的 $Cys-Cys^{+}$ 也有 2 个 $-COO^-$ 的配体，也可以参与配位反应。若在这区域内这三种胱氨酸基 $Cys-Cys^{+}$ ， $Cys-Cys^-$ ， $Cys-Cys^{2-}$ 均与 $Zn(OH)_2$ 配合，则所形成的配合物浓度分布应由 $Zn(OH)_2$ 分布决定，其 pH 应为 9.50，与图 1 最大峰值处 pH 9.4 基本一致，这种情况与图 1 中的峰值、峰形比较吻合。

若只有显电中性的分子参加配合，则配合物最大浓度应在 $Cys-Cys^{+}$ 与 $Zn(OH)_2$ 交点处，其 pH 为 8.21。若只有-1 价的 $Cys-Cys^-$ 与 $Zn(OH)_2$ 配位，最大浓度应在 $Cys-Cys^-$ 与 $Zn(OH)_2$ 的交点处，其 pH 应为 8.41。若只有-2 价的 $Cys-Cys^{2-}$ 与 $Zn(OH)_2$ 配位，最大浓度应在 $Cys-Cys^{2-}$

与 $Zn(OH)_2$ 的交点处，其 pH 应为 9.93。显然这三种以胱氨酸基单独配合的方式其浓度分布和峰值位置与图 1 的匹配的可能性较小。

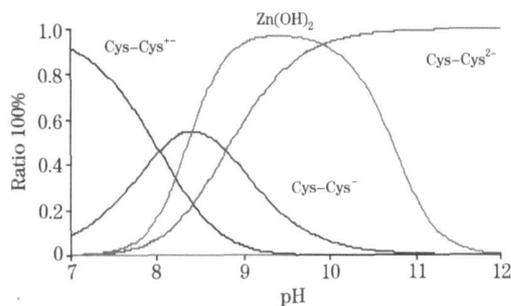
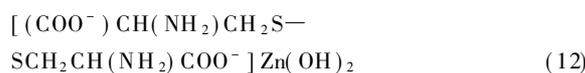
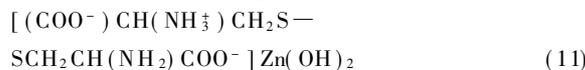
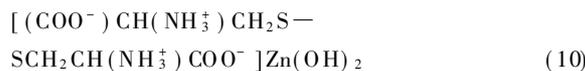


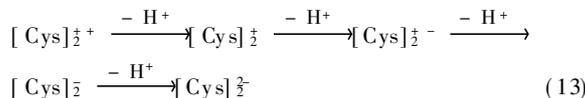
Fig 5 Area graph of coexistence of cystine and $Zn(OH)_2$

因而从图 1 的峰形位置、分布和以上的分析，可以推断所形成的可溶性胱氨酸锌配合物是由显电中性的 $Cys-Cys^{+}$ ，-1 价的 $Cys-Cys^-$ 和-2 价的 $Cys-Cys^{2-}$ ，这三种胱氨酸基同时与 $Zn(OH)_2$ 配位形成的，其配合离子的主要形式为

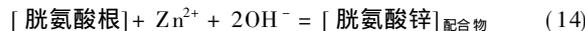


3.5 反应机理探讨

由于原子吸收光谱测定是在最大峰值 pH 9.4 时进行，此时硫化锌在水溶液中存在着平衡： $ZnS = Zn^{2+} + S^{2-}$ ， $Zn^{2+} + 2OH^- = Zn(OH)_2$ ，而胱氨酸在一定的碱性溶液中存在以下平衡



生成的显电中性的 $Cys-Cys^{+}$ ，-1 价的 $Cys-Cys^-$ 和-2 价的 $Cys-Cys^{2-}$ 与 ZnS 中解离出的 Zn^{2+} 在碱性条件下反应生成更加稳定的碱式胱氨酸锌可溶性配合物



碱式胱氨酸锌配合物的分子式为： $Zn(OH)_2 \cdot [C_6H_{12}N_2O_2S_2]$ ， $Zn(OH)_2 \cdot [C_6H_{11}N_2O_2S_2]^-$ ， $Zn(OH)_2 \cdot [C_6H_{10}N_2O_2S_2]^{2-}$ 如 10，11，12 式所示；结构式见图 6 所示。

4 结论

通过计算机对胱氨酸和锌离子在不同 pH 条件下的数值拟合和图示分布研究，并对硫化锌原子吸收光谱法间接测定胱氨酸时的不同 pH 对响应值的影响曲线的分析，指出在峰值 pH 9.4 条件下，溶液中所生成的是由显电中性的 $Cys-Cys^{+}$ ，-1 价的 $Cys-Cys^-$ 和-2 价的 $Cys-Cys^{2-}$ ，这三种胱氨酸基与 $Zn(OH)_2$ 配位形成的可溶性碱式胱氨酸锌配合物。

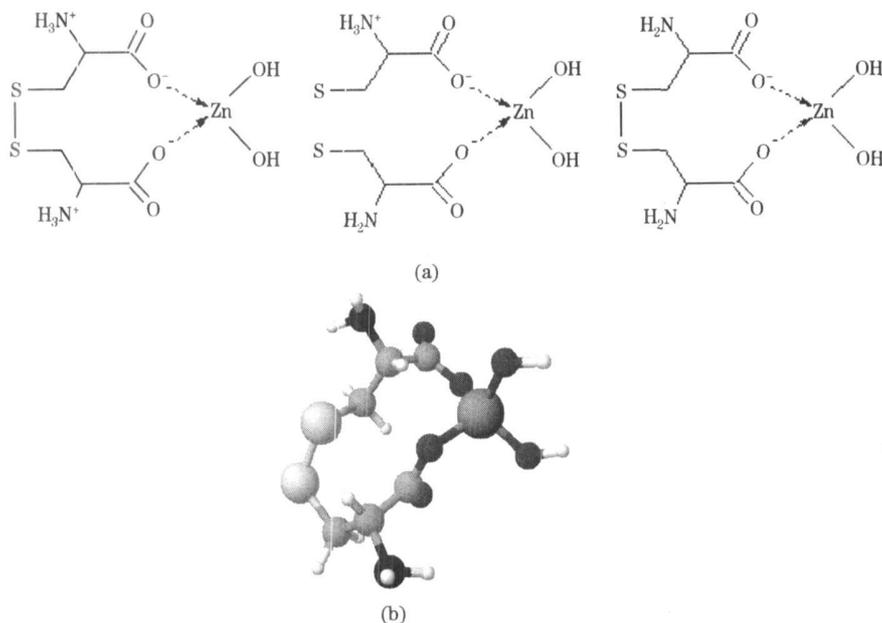


Fig 6 Configuration graph of soluble zinc cystine complex

(a): Configuration graph; (b): Optimization 3D viewer

参 考 文 献

- [1] LIU Wei han, ZHANG Qing xin, ZHANG Qing yi, et al(刘文涵, 章庆新, 张清义, 等). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报), 2003, 22(4): 58.
- [2] LIU Wei han, SHAN Wei guang, GAO Yur fang, et al(刘文涵, 单伟光, 高云芳, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(6): 1191.
- [3] LIU Wei han, ZHANG Dan, LI Zir guang, et al(刘文涵, 张丹, 李祖光, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(6): 968.
- [4] LIU Wei han, ZHANG Dan, ZHENG Jiarr zhen, et al(刘文涵, 张丹, 郑建珍, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(1): 147.
- [5] LIU Wei han, SHAN Sheng yan, ZHANG Dan, et al(刘文涵, 单胜艳, 张丹, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(10): 1717.
- [6] LIU Wei han, WU Xia o qiong, ZHENG Jiarr zhen, et al(刘文涵, 吴小琼, 郑建珍, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(1): 180.
- [7] Dean Ed J A. Lange's Handbook of Chemistry, Thirteenth Edition, McGraw-Hill Book Company, 1985. 5.
- [8] David R Lide, ed., CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005, < <http://www.hbcpnetbase.com> >, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005: 8-14 "Dissociation Constants of Organic Acids and Bases".
- [9] Group of Analysis Chemistry of University of Hangzhou(杭州大学化学系分析化学教研室编). Handbook of Analysis Chemistry(Chemistry)(分析化学手册·第一分册化学分册), the Second Edition(第2版). Chemistry Industry Publishing House(化学工业出版社), 1997. 148.

Indirect Study of Zinc Cystine Complex Reaction by FAAS

LIU Wei han¹, WU Xia o qiong¹, CHEN Dan¹, XIAO Sha n mei²

1. College of Chemical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China

2. Jinhua College of Profession & Technology, Jinhua 321017, China

Abstract Each state of cystine and zinc ion in aqueous solution under different pH conditions was calculated by computer, and the scatter diagram was given. Under the influence of solution pH, the mechanism of complex reaction in indirectly determining cystine by flame atomic absorption spectrometry with ZnS was studied. The soluble complex ion is composed of 0 valence cystine Cys-Cys^- , -1 valence cystine Cys-Cys^{+} and -2 valence cystine Cys-Cys^{2-} with $\text{Zn}(\text{OH})_2$. The theoretical analysis from computing and scatter diagram dovetail very well with the data determined from the experiments. The structure of soluble zinc cystine complex ion is, $[(\text{COO}^-)\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{S}-\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-]\text{Zn}(\text{OH})_2$, $[(\text{COO}^-)\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{S}-$

$\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-]\text{Zn}(\text{OH})_2$ and $[(\text{COO}^-)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{S}-\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-]\text{Zn}(\text{OH})_2$.

Keywords Flame atomic absorption spectrometry; Cystine; Indirect determination; Complex reaction; Mechanism

(Received Oct. 28, 2006; accepted Jan. 9, 2007)

《光谱学与光谱分析》投稿简则

《光谱学与光谱分析》是由中国科协主管,中国光学学会主办,钢铁研究总院、中国科学院物理研究所、北京大学、清华大学共同承办的专业学术期刊。国内外公开发行,从2004年起为月刊,大16开本,2008年仍为月刊,每期240页。《光谱学与光谱分析》主要报道我国光谱学与光谱分析领域内具有创新性科研成果,及时反映国内外光谱学与光谱分析的进展和动态;发现并培育人才;推动和促进光谱学与光谱分析的发展。为科教兴国服务。读者对象为从事光谱学与光谱分析的科研人员、教学人员、分析测试人员和科研管理干部。

栏目设置和要求

1 研究报告 要求具有创新性的研究成果,一般文章以8000字(包括图表、参考文献、作者姓名、单位和中文、英文摘要,下同)为宜。

2 研究简报 要求在前人研究的基础上有重大改进或阶段性研究成果,一般不超过5000字。

3 评述与进展 要求评述国内外本专业的发展前沿和进展动态,一般不超过10000字。

4 新仪器装置 要求介绍新型光谱仪器的研制、开发、使用性能和应用,一般不超过5000字。

5 来稿摘登 要求测试手段及方法有改进并有应用交流价值,一般以3000~4000字为宜。

稿件要求

1 投稿者请经本刊编委(或历届编委)一人或本专业知名专家推荐,并附单位保密审查意见及作者署名顺序,主要作者介绍。文章有重大经济效益或有创新者,请说明,同时注明受国家级基金或国家自然科学基金资助情况。

2 来稿要观点明确、数据真实可靠、层次分明、言简意明、重点突出。来稿必须是网上在线投稿(含各种符号和外文字母大写、小写、正体、斜体;希腊字母、拉丁字母;上角、下角标位置应标清楚)。中文摘要以300字为宜,英文摘要以2000字符(相当于300个英文单词)为宜;另附关键词。要求来稿应达到“齐、清、定”,中文、英文文字通顺,方可接受送审。

3 为了进一步统一和完善投稿方式、缩短论文发表周期,本刊在2007年7月1日以后,不再接收以邮寄方式或e-mail方式的投稿,只收网上在线投稿。严禁“一稿两投”、“一稿多投”,一经发现,取消三年投稿资格。

4 文中插图要求完整,图中坐标、线条、单位、符号、图注等应标注准确、完整。图幅大小:单栏图7.5cm(宽)×6cm(高);双栏图:14cm(宽)×6cm(高);图中数字、图题、表题全部用中文、英文对照,图中数字、中文、英文全用6号字(另准备一份合格的图附在文章的后边)。

5 文中出现的单位必须按“中华人民共和国计量标准”及有关GB标准规定缮写。物理量符号一律用斜体,单位符号和词头用正体字母。

6 名词术语,请参照全国科学技术名词规定缮写。

7 参考文献,采用顺序编码制,只列主要文献;以15~20条为宜。内部资料、私人通讯、未经公开发表的一律不能引用。日文、俄文等非英文文献,请用英文表述;中文文献和中文图书采用中、英文对照表述,文献缮写格式请参照本刊。

8 请在投稿第一页左下角写明投稿联系人的电话和两个e-mail,以便及时联系。

稿件处理

1 自收到稿件之日起,一个月内作者会收到编辑部的稿件处理意见。请根据录用通知中所提出的要求认真修改,希望修改稿在30天内寄回编辑部,并作为作者最终定稿(当作者接到校样时,以此修改稿为准进行校对,请勿再作大的改动),若二个月内编辑部没收到修改稿,将视为自行撤稿处理。

2 有重大创新并有基金资助者可优先发表;不录用的稿件,编辑部将尽快通知作者,底稿一律不退,请自留底稿。

3 来稿一经发表将酌致稿酬并送样书两本,本人文章两份抽页。

4 遵照“中华人民共和国著作权法”,投稿作者须明确表示,该版权(含各种媒体的版权)授权给光谱学与光谱分析期刊社。国内外各大文献检索系统摘录本刊刊出的论文;凡不同意被检索刊物无稿酬摘引者,请在投稿时事先声明,否则,本刊一律认为已获作者授权认可。

5 修改稿请寄:100081北京市海淀区魏公村学院南路76号,光谱学与光谱分析期刊社

电话:010-62182998或62181070 传真:010-62181070

e-mail: chngpxygpfx@vip.sina.com; 修改稿专用邮箱: mengzh1018@vip.sina.com

网址: http://www.gpxygpfx.com