

Cu²⁺和Fe³⁺与明胶的相互作用*

唐世华 黄建滨

(北京大学物理化学研究所, 北京 100871)

摘要 利用荧光猝灭法, 研究了不同温度、酸度下, Cu²⁺和Fe³⁺与明胶的相互作用。计算了猝灭常数和结合常数。紫外光谱和显微红外光谱的测定结果表明, Cu²⁺、Fe³⁺与明胶分子中的酰胺键发生了作用。探讨了猝灭机理。计算出的热力学函数表明, 在Cu²⁺、Fe³⁺与明胶的相互作用过程中熵变起主要的作用。

关键词: 明胶, 金属离子影响, 荧光猝灭, 明胶鳌合物

金属离子在生命过程中有重要的作用。金属离子引入生物体中不仅可以作为生物探针剖析大分子结构, 而且可用于诊断和作为治疗的药物^[1]。明胶是一类多分散性的蛋白质生物大分子, 由十八种氨基酸以多肽链结构组成; 其分子结构中侧链基团, 如羧基、苯酚基、肽链上的羰基等均可与一些金属离子发生鳌合作用, 从而对明胶的各种性能产生影响。目前, 关于金属离子与明胶相互作用的研究主要集中在明胶中金属离子含量的测定, 以及金属离子的掺杂和调变对乳剂照相性能的影响等方面^[2~7]。对于金属离子与明胶相互作用的结合位点、鳌合物的空间结构、环境因素的影响、作用机理等方面的研究比较少^[8~10], 特别是金属离子与明胶在水溶液中作用机理及热力学性质方面, 则更少见诸文献报导。本文利用荧光猝灭法对Cu²⁺、Fe³⁺与明胶间的相互作用进行了研究, 发现Cu²⁺、Fe³⁺对明胶的内源荧光有明显的猝灭效应。根据荧光猝灭曲线, 求出了猝灭常数, Cu²⁺、Fe³⁺与明胶的结合常数; 确定了不同pH值下的猝灭机理; 根据样品的紫外和显微红外光谱, 推测了鳌合物的可能结构。对探索蛋白质与金属离子作用的本质, 进行金属蛋白设计, 了解金属离子对光敏卤化银乳剂微晶感光性能影响的机理奠定基础。

1 实验部分

RF-5310PC 荧光光度计(Shimadzu); UV-160A 紫外可见分光光度计(Shimadzu); 750 IR-microscopy (美国 Nicolet); pH-S-P1型酸度计(上海)。Fe₂(SO₄)₃ (AR, 天津化学试剂厂); CuSO₄(AR)、H₂SO₄(AR)、NaOH(AR)、明胶(CP)均为北京化工厂产品。

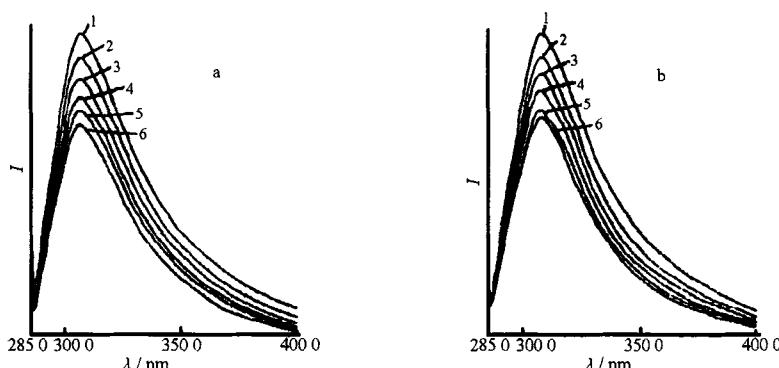
固定明胶浓度, 加入不同量的金属离子, 用稀NaOH或H₂SO₄调节pH值, 测定其荧光光谱。荧光发射和狭缝宽度为5 nm, 激发与发射波长分别为278 nm和305 nm。扫描得到230~290 nm的激发光谱和285~400 nm的发射光谱。紫外可见光谱为室温下(~24℃)200~800 nm扫描结果。显微红外光谱(样品固化后)的测定亦在室温下进行。

2 结果与讨论

2.1 金属离子与明胶的荧光光谱

在组成蛋白质的20种氨基酸中, 只有色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸有天然荧光, 其相对荧光强度比为100:9:0.5^[11]。在构成明胶分子的18种氨基酸中, 由于色氨酸不存在, 故认为明胶所显示的荧光主要来自酪氨酸的贡献^[12], 明胶的荧光及其变化直接反映了明胶中酪氨酸残基本身和周围环境的变化。在激发波长λ_{ex}=278 nm、发射波长λ_{em}=305 nm下的荧光光谱表明, Cu²⁺、Fe³⁺在pH值4.0、7.3和10.0时, 对明胶的荧光均有明显猝灭作用。图1给出了pH值为7.3时, Cu²⁺、Fe³⁺对明胶的荧光猝灭

2001-02-21 收到初稿, 2001-05-09 收到修改稿。联系人: 黄建滨 (E-mail: JBHuang@chem.pku.edu.cn)。 *国家自然科学基金(29992590-4, 29733110)、国家教委骨干教师和河南省教委重点科研(97150022)资助项目

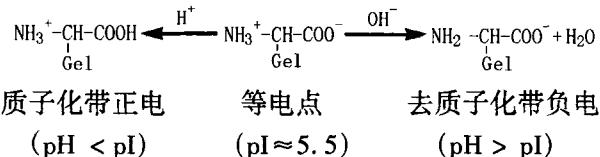
图 1 Cu^{2+} (a)、 Fe^{3+} (b) 对明胶荧光光谱的影响Fig. 1 Fluorescence quenching spectra of gelatin with Cu^{2+} (a) and Fe^{3+} (b) $10^5 c(\text{Cu}^{2+})/\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$: 1) 0.0, 2) 0.63, 3) 1.26, 4) 1.89, 5) 2.52, 6) 3.15; $10^5 c(\text{Fe}^{3+})/\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$: 1) 0.0, 2) 0.72, 3) 1.43, 4) 2.15, 5) 2.86, 6) 3.58. $\text{pH} = 7.3, 24^\circ\text{C}$. $[\text{gelatin}] = 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}, \lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$

光谱。其它 pH 值时与此类似。

从图 1 可见, Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 加入未明显改变明胶的最大荧光峰位置, 荧光强度却随 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 的增加而降低, 表明 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 与明胶间存在相互作用, 发生了能量转移。

2.2 金属离子与明胶的紫外-可见光谱

室温下, 测定了 pH 为 4.0、7.3 和 10.0 时, 纯明胶、 Cu^{2+} /明胶和 Fe^{3+} /明胶的吸收光谱, 扫描范围为 200~800 nm。结果发现, 在这三个 pH 值下, 纯明胶只在 227.4 nm 处有吸收峰; Cu^{2+} /明胶和 Fe^{3+} /明胶在 pH = 4.0 时, 只在 227.4 nm 处出现吸收峰; 而在 pH = 7.3 和 10.0 时, 不仅 227.4 nm 处的吸收峰仍然存在, 且在 259 nm 处出现了新的吸收峰, 说明在这两个 pH 值下, Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 和明胶发生了反应, 形成基态配合物^[13]。pH = 7.3 和 10.0 时, Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 能与明胶形成基态配合物是因为明胶是两性蛋白质大分子, 在不同 pH 值的电荷现象如下所示^[12]:



其中 Gel 代表明胶大分子。当溶液 pH 值大于等电点 pI 时, 明胶大分子去质子化带负电, 使明胶大分子侧链上暴露出来的 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{COO}^-$ 增多, 从而可与金属离子螯合形成基态配合物; 而且随 pH 值增大, 金属离子/明胶的结合常数增大(见表 3)。

2.3 金属离子与明胶的显微红外光谱

室温和 pH = 7.3 时, 纯明胶、 Cu^{2+} /明胶和 Fe^{3+} /明胶固体样品的显微红外光谱数据见表 1。纯明胶表现出仲酰胺键 ($-\text{CONHR}$) 的特征吸收, Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 的加入, 明胶的吸收峰发生了不同程度的偏移, 说明 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 与明胶中的酰胺键发生了键合作用。相对于明胶而言, Cu^{2+} /明胶的改变值大于 Fe^{3+} /明胶, 显示出 Cu^{2+} 与明胶的相互作用更

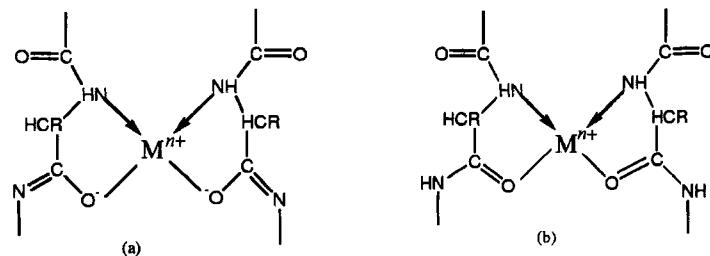


图 2 明胶鳌合物的简单结构示意图

Fig. 2 The proposed structures of Cu^{2+} /gelatin and Fe^{3+} /gelatin

(a) enolization structure; (b) no enolization structure

表 1 纯明胶、Cu²⁺/明胶和 Fe³⁺/明胶固样的显微红外光谱数据Table 1 Micro-IR data of gelatin, Cu²⁺/gelatin and Fe³⁺/gelatin (pH = 7.3)

System	Position (σ/cm^{-1}) and intensity of absorption peak			
Gelatin	1650, s	1540,	3302, m	3082, w
Cu ²⁺ / gelatin	1648, s	1527,	3295, m	3079, w
Fe ³⁺ / gelatin	-	-	3304, m	-

表 2 荧光猝灭常数 K_{sv} 和双分子猝灭速率常数 k_q Table 2 Stern-Volmer quenching constant (K_{sv}) and bimolecular quenching constant (k_q) at different pH and temperatures

pH	T/K	$10^{-4} K_{sv}/\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$	$10^{-12} k_q/\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	R
Cu^{2+}	297	0.182	0.569	0.983
	4.0	305	0.255	0.936
	7.3	297	1.177	0.999
	305	1.088	3.400	0.999
	10.0	297	1.111	0.994
	305	1.227	3.834	0.997
Fe^{3+}	297	1.360	4.250	0.997
	4.0	305	1.844	5.763
	7.3	297	0.971	3.034
	305	0.958	2.994	0.992
	10.0	297	0.779	2.434
	305	0.899	2.809	0.998

强些。计算所得 Cu²⁺ 对明胶的猝灭常数(见表 2)和结合常数(见表 3)均大于 Fe³⁺ 与明胶的这些常数,也可证明这一点。

2.4 鳌合物的可能结构

紫外和显微红外光谱显示 Cu²⁺、Fe³⁺ 与明胶发生了键合作用, 考虑到形成鳌合物时, 五员环和六员环的张力最小, 结构更稳定的特点, 以及酰胺键可能发生烯醇化的共振作用^[9], 我们认为 Cu²⁺/明胶、Fe³⁺/明胶鳌合物的简单结构式可用图 2 表示(Mⁿ⁺代表 Cu²⁺ 或 Fe³⁺).

2.5 猝灭常数和猝灭机理的确定

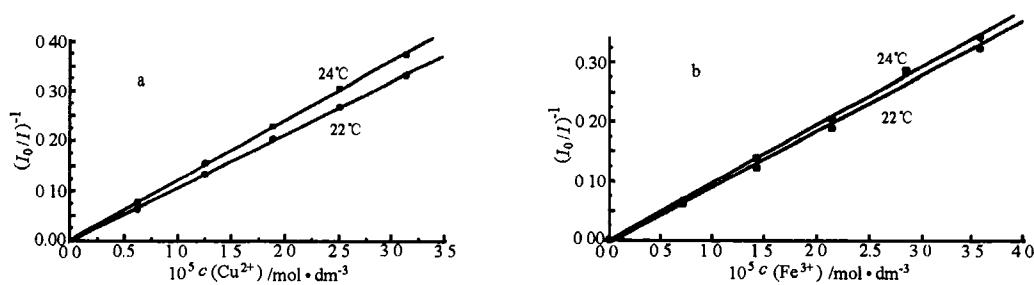
2.5.1 Cu²⁺/明胶和 Fe³⁺/明胶的荧光猝灭曲线

荧光猝灭过程通常可分为动态猝灭和静态猝灭^[13]。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间所发生的与扩散有关的相互作用过程。温度升高将增大扩散系数, 从而增大双分子猝灭常数; 由于碰撞猝灭只影响荧光分子的激发态, 因而并不改变荧光物质的吸收光谱。静态猝灭是猝灭剂与荧光物质分子在基态时生成不发光的配合物, 从而导致荧光强度降低的过程。温度升高可能引起配合物的稳定性下降, 从而减小静态猝灭的程度; 由于静态猝灭是生成基态配合物而引起, 因此, 荧光物质吸收光谱往往产生变化。

不论是动态或静态猝灭, 其荧光强度和猝灭剂

表 3 Cu²⁺/明胶、Fe³⁺/明胶的结合常数Table 3 Binding constant (K) of gelatin with Fe³⁺ and Cu²⁺ at different pH and temperatures

pH	T/K	$10^{-4} K(\text{Cu})/\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$	R	$10^{-4} K(\text{Fe})/\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$	R
7.3	297	1.231	0.9999	0.516	0.9991
	305	2.010	1.0000	0.941	0.9997
10.0	297	3.698	0.9980	1.243	0.9992
	305	4.666	0.9950	1.779	0.9940

图 3 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 对明胶荧光猝灭的 Stern-Volmer 图Fig. 3 Stern-Volmer relationship between concentration of quencher Cu^{2+} (a), Fe^{3+} (b)
and relative intensity of gelatin fluorescence $\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 305 \text{ nm}; \text{pH} = 7.3; [\text{gelatin}] = 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

浓度之间均存在线性关系。对于动态猝灭，则符合 Stern-Volmer 方程

$$I_0/I = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

I_0 和 I 分别为未加猝灭剂和加入给定浓度猝灭剂时的荧光强度； k_q 为双分子猝灭速率常数； τ_0 为无猝灭剂存在下荧光分子的平均寿命； $K_{sv} = k_q \cdot \tau_0$ ，称为 Stern-Volmer 猛灭常数； $[Q]$ 为猝灭剂 Q 的浓度。

根据实验数据，在 pH = 7.3，温度 24 °C 和 32 °C 时， Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 对明胶的 Stern-Volmer 荧光猝灭关系见图 3，其它 pH 值时与此类似。

2.5.2 猛灭常数的确定

各类猝灭剂对生物大分子的 K_{sv} 一般约为 $10^2 \sim 10^3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ，最大扩散碰撞猝灭常数 k_q 约为 $2.0 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ （大分子的 τ_0 一般约为 10^{-8} s ）^[13-16]。根据式(1)，由各猝灭曲线的斜率求出 K_{sv} ，结果列于表 2。从表 2 可见，所得 K_{sv} 在 $10^3 \sim 10^4$ 、 k_q 值在 $10^{11} \sim 10^{12}$ 数量级（酪氨酸的 τ_0 为 $3.2 \times 10^{-9} \text{ s}$ ）^[17]。

2.5.3 猛灭机制的推测

从表 2 中数据来看， k_q 的数值均大于 10^{10} ，似乎猝灭机理应为静态猝灭，但除 k_q 外应综合考虑：(1) 同一 pH 值下， K_{sv} 随温度变化的影响；(2) 猛灭剂与荧光物质是否形成基态配合物，即荧光物质的吸收光谱是否发生改变等因素。pH = 4.0 时， K_{sv} 均随温度升高而增大，且吸收光谱未发生改变，故 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 对明胶的荧光猝灭应为动态猝灭过程。pH = 7.3 时， Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 对明胶的荧光猝灭常数 K_{sv} ($k_q \approx 10^{12}$) 均随温度的升高而降低；吸收光谱发生了改变。显微红外光谱表明 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 与明胶分子中的酰胺键发生作用，说明有基态配合物生成。因此，pH = 7.3 时， Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 对明胶荧光的猝灭为典型的静态猝灭机制。杨斌盛等^[18] 研究金属离子与人血清白蛋白的相互作用 (pH = 7.4) 时，发现 Cu^{2+} 的 k_q 为 $9.67 \times 10^{11} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ，与本实验结果基本一致。pH = 10.0 时，虽然荧光猝灭常数 K_{sv} ($k_q \approx 10^{12}$) 随温度升高稍有增大，但吸收光谱发生改变，且显微红外光谱表明 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 与明胶发生了键合作用，仍应为静态猝灭过程。出现 K_{sv} 随温度升高

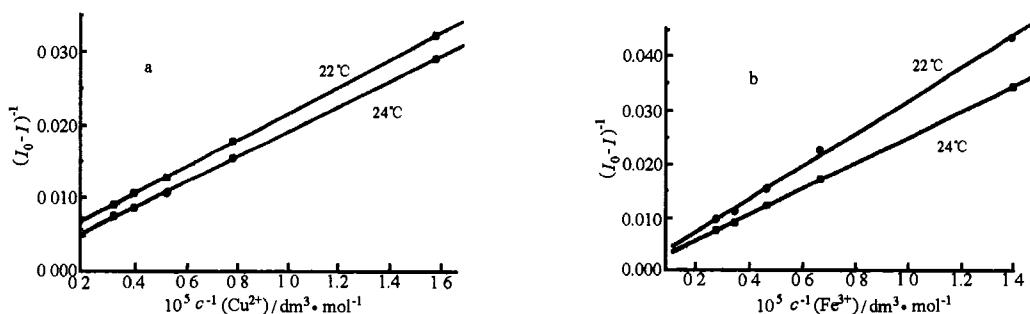
图 4 明胶的荧光强度与 Cu^{2+} (a)、 Fe^{3+} (b) 浓度的双倒数图Fig. 4 Lineweave-Burk relationship between fluorescence intensity of gelatin and concentration of quencher
pH: 7.3. (a) Cu^{2+} , (b) Fe^{3+}

表 4 Cu²⁺/明胶、Fe³⁺/明胶的热力学函数Table 4 Thermodynamic functions of gelatin with Fe³⁺ and Cu²⁺ at different pH and temperatures

System	pH	T/K	$\Delta H_m^\ominus / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta G_m^\ominus / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S_m^\ominus / \text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
$\text{Cu}^{2+}/\text{gelatin}$	7.3	297	41.16	-23.26	233.74
		305		-25.13	233.74
	10.0	297	21.89	-25.97	161.14
		305		-27.26	261.15
$\text{Fe}^{3+}/\text{gelatin}$	7.3	297	56.56	-21.11	261.52
		305		-23.20	261.51
	10.0	297	33.75	-23.28	192.02
		305		-24.82	192.03

稍微增大的原因可能是：在所研究的反应体系中，主要发生的是金属离子与明胶的螯合反应以及金属离子与 OH⁻ 的沉淀反应，温度升高，虽然结合常数增大（见表 3），但沉淀反应左移，溶液中游离金属离子增多，简单碰撞猝灭亦可能发生，导致 K_{sv} 稍增大。

2.6 Fe³⁺/明胶、Cu²⁺/明胶的结合常数和热力学函数

2.6.1 Fe³⁺/明胶、Cu²⁺/明胶的结合常数

杨频等^[19] 提出了猝灭剂与生物大分子之间的结合常数关系式为

$$(I_0 - I)^{-1} = I_0^{-1} + K^{-1} I_0^{-1} [Q]^{-1} \quad (2)$$

式中，I₀ 为无猝灭剂时的荧光强度，I 为加入猝灭剂后的荧光强度，K 为结合常数，[Q] 为猝灭剂 Q 的浓度。

由式(2)作双倒数 Lineweaver-Burk 图，见图 4。由斜率和截矩求得 Fe³⁺/明胶、Cu²⁺/明胶的结合常数 K 分别见表 3。梁宏等^[20] 利用荧光猝灭法研究 Cu²⁺、Fe³⁺ 与人血清白蛋白的相互作用时，得到结合常数 K(pH=7.43, 20 °C) 分别为 $7.29 \times 10^3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $5.74 \times 10^3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ 。与本实验结果相近。

2.6.2 Cu²⁺/明胶、Fe³⁺/明胶反应的热力学函数

对于单齿或多齿配位体与中心离子的形成反应，它们的结合常数和热力学函数 ΔG_m^\ominus 、 ΔH_m^\ominus 和 ΔS_m^\ominus 之间有如下关系

$$\ln [K(T_2)/K(T_1)] = \Delta H_m^\ominus (T_2 - T_1) / RT_1 T_2 \quad (3)$$

$$\Delta G_m^\ominus = \Delta H_m^\ominus - T \Delta S_m^\ominus \quad (4)$$

$$\Delta G_m^\ominus = -RT \ln K \quad (5)$$

这说明螯合物的稳定性来自于螯合反应的 ΔH_m^\ominus 和

ΔS_m^\ominus 的贡献。当温度变化不大时， ΔH_m^\ominus 可视为常数。由表 2 中的数据和式(3)、(4) 和 (5) 可求出 Fe³⁺、Cu²⁺ 与明胶螯合反应的 ΔG_m^\ominus 、 ΔH_m^\ominus 和 ΔS_m^\ominus （结果见表 4）。

从表 4 数据可知，反应焓变为正值，且熵变值较大亦为正值，因而 ΔG_m^\ominus 主要来自熵变的贡献，说明熵效应在 Cu²⁺/明胶、Fe³⁺/明胶螯合物的稳定性中占主导地位，这与一些金属离子与小分子多元配体之间的螯合效应类似^[21]。熵增加原因可能是螯合反应后分子数目增多，由于金属离子是水化的，明胶与金属离子发生螯合反应时，将水合金属离子的水分子取代，结果导致体系总分子数的增加。由于 Cu²⁺、Fe³⁺ 对明胶荧光的猝灭是生成基态螯合物而引起，故可认为熵在 Cu²⁺、Fe³⁺ 对明胶荧光的猝灭过程中起到重要的作用。

References

- Lippard S T, Berg J M. Principle of Bioinorganic Chemistry, Trans. Xi ZF, Yao GQ, Xiang SF, Ren HW. Beijing: Peking University Press, 2000: 1-6 [生物无机化学原理. 席振峰, 姚光庆, 项斯芬, 任宏伟译. 北京: 北京大学出版社, 2000: 1-6]
- Liu XY. J. Photog. Sci., 1983, 30(1): 66
- Tani T, Staito M. Photog. Sci. Eng., 1973, 17(5): 434
- Pearlman D, Reithel R F, Eastman D R, Urbach F. Photog. Sci. Eng., 1980, 24(3): 149
- Huang BX, Zhou T, Chang L, Yue J. Imaging Sci. J., 1998, 46(2): 87
- Zhang YH, Yan TT, Yu SQ, Zhuang SY. J. Electrochem. Soc., 1999, 146(4): 1270
- Wang RQ, Peng BX. Photographic Science and Photochemistry, 1988, 6(1): 33; 1988, 6(2): 35 [王荣琴, 彭必先. 感光科学与光化学 (Ganguangkexue Yu Guanghuaxue), 1988, 6(1):

- 33; 1988, 6(2): 35]
- 8 Tang SH, Zeng XR, Zheng Z. *Photographic Science and Photochemistry*, 1999, 17(2): 145 [唐世华, 曾锡瑞, 郑忠. 感光科学与光化学(*Ganguangxue Yu Guanghuaxue*), 1999, 17(2): 145]
- 9 Strickland R D, Freeman M L, Gurule F T. *Anal. Chem.*, 1961, 13(4): 545
- 10 Tang SH. *Photographic Science and Photochemistry*, 2000, 18(4): 323 [唐世华. 感光科学与光化学(*Ganguangxue Yu Guanghuaxue*), 2000, 18(4): 323]
- 11 Guo XJ. *The Application of Experimental Technology of Fluorescence in the Molecularbiology*. Beijing: Science Press, 1979: 123 [郭晓君. 荧光实验技术及其在生物学中的应用, 北京: 科学出版社, 1979: 123]
- 12 Tang SH, Zhang N. *The Science and Technology of Gelatin*, 2000, 20(2): 69 [唐世华, 张宁. 明胶科学与技术(*Mingjiao Kexue Yu Jishu*), 2000, 20(2): 69]
- 13 Chen GZ, Huang XZ, Xu JG, Zheng ZZ, Wang ZB. *Fluorescence Analytical Method*(2nd Ed.). Beijing: Science Press, 1990: 112-119 [陈国珍, 黄贤智, 许金钩, 郑朱梓, 王尊本. 荧光分析法(第二版). 北京: 科学出版社, 1990: 112-119]
- 14 Lakowicz J R, Weber G. *Biochemistry*, 1973, 12(21): 4171
- 15 Zhu K, Tong SY. *Acta Chimica Sinica*, 1997, 55: 405 [朱铿, 唐沈阳. 化学学报(*Huaxue Xuebao*), 1997, 55: 405]
- 16 Zhang XW, Zhao FL, Li KA. *Chem. J. Chinese Universities*, 1999, 20(7): 1063 [张晓威, 赵凤林, 李克安. 高等学校化学学报(*Gaojing Xuexiao Huaxue Xuebao*), 1999, 20(7): 1063]
- 17 Lakowicz J R, Weber G. *Biochemistry*, 1973, 12(21): 4161
- 18 Yang BS, Yang P. *Progress in Biochem. & Biophys.*, 1992, 19(2): 110 [杨斌盛, 杨频. 生物化学与生物物理进展(*Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan*), 1992, 19(2): 110]
- 19 Yang P, Yang MM, Zhang LW. *Chinese Science Bulletin*, 1994, 39(1): 31 [杨频, 杨曼曼, 张立伟. 科学通报(*Kexue Tongbao*), 1994, 39(1): 31]
- 20 Liang H, Xing BG, Wu QX, Luo JW, Zhou YQ, Shen PW. *Acta Chimica Sinica*, 1999, 57: 161 [梁宏, 邢本刚, 吴庆轩, 罗济文, 周永治, 申泮文. 化学学报(*Huaxue Xuebao*), 1999, 57: 161]
- 21 Xu ZG. *Modern Coordination Chemistry*. Beijing: Chemical Industry Press, 1987: 176-177 [徐志固. 现代配位化学. 北京: 化学工业出版社, 1987: 176-177]

Study on Interactions of Gelatin with Cu²⁺ and Fe³⁺

Tang Shi-Hua Huang Jian-Bin
(Institute of Physical Chemistry, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Interaction of the gelatin with Cu²⁺ and Fe³⁺ are investigated at different pH and temperatures by fluorescence quenching method. The mechanisms of fluorescence quenching of Cu²⁺ and Fe³⁺ to gelatin are studied at different pH. The quenching constants, binding constants, and the thermodynamic functions are calculated. The results of micro-IR and UV show that Cu²⁺ and Fe³⁺ interact with the amido bond in the gelatin molecule. The entropy change is a main factor in the interaction process of the gelatin with Cu²⁺ and Fe³⁺.

Keywords: Gelatin, Influence of metal ions, Fluorescence quenching, Chelates gelatin with Cu²⁺ and Fe³⁺