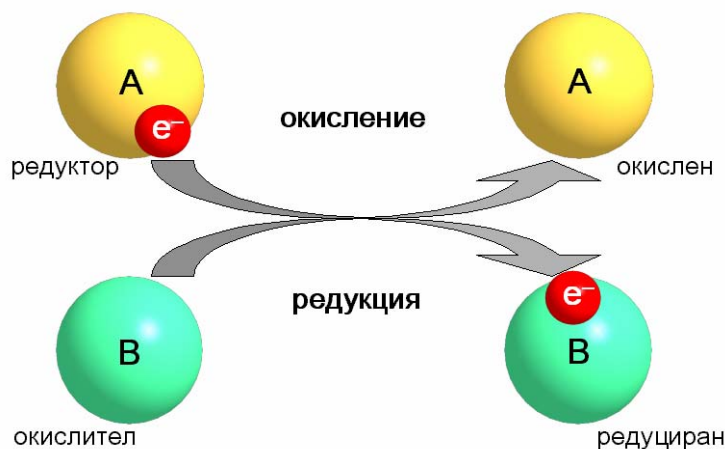


Използване на редокс титруването при анализа на биологически важни електрохимично активни молекулни форми

Л.Владиминова, В.Кочев

1.Увод

Под *електрохимично активен* вид, най-общо се разбира такава химична форма в разтвора (било то обикновен йон, просто съединение, комплекс, или сложна макромолекула) която е в състояние да участва в окислително-възстановителна (накратко *редокс*) реакция. Това са реакциите с пренос на електрони, при които единият реагент отдава електрони и се окислява, докато другият приема и се възстановява (редуцира) [Bard&Faulkner].



Фиг.1. Редокс реакции. Хомогенен електронен пренос.

Не е трудно да си представим огромното значение което имат този тип реакции не само за абиотичната, но и за живата материя [Nelson&Cox]. Вече бе дискутирана тяхната роля в метаболизма на клетката, по-конкретно в механизмите осигуряващи я с енергия (вж. PowerPoint - представянето “Биоелектрохимия и Биоенергетика”). С това естествено не се приключва широкото им присъствие в биохимията на всички организми от едноклетъчните до човека. Освен в енергетичните, те са ангажирани пряко или косвено в много други метаболитни превръщания, имащи за цел синтеза на биомолекули със специфични функции (ензими, транспортери и т.н.) или разграждането и обезвреждането на ненужни и опасни продукти (“прочистващи” системи). Значително е участието им в разпространението на химичните сигнали в организма. С други думи, редокс реакциите съществено са намесени и в трите основни направления от дейността на живите системи – обработката на информация, на енергия и на вещество.

От казаното до тук е ясно, че най-малко установяването на наличие на биологично значими електроактивни форми в дадена течна среда е от голям интерес за редица фундаментални и приложни аналитични задачи. В последните десетилетия много усилия бяха посветени на разработването на ефективни методи за тяхната регистрация. Като най-перспективни в това отношение се очертават електрохимичните [Bard&Faulkner] (вж. също останалите РРТ представяния).

Настоящото разглеждане се занимава с възможностите които предлага *редокс титруването* за дефиниране на електроактивни видове в разтвор. По-специално е описана процедурата за определяне на желязото в състояние Fe(II). Като пример е представен един опит за количествена оценка на общото съдържание на Fe²⁺ отделено от феритин при редуцията му *in vitro* от екзогенна аскорбинова киселина (Витамин С).

2. Принципи и техника на редокс титруването

Титруването изобщо, е аналитична процедура при която се определя неизвестното количество на някакво вещество от разтвора – аналит, с помощта на реакцията му с друго вещество – титрант, чиято концентрация е известна. Това става като към разтвора се добавят последователно аликвотни порции от титранта докато количеството му се изравни с това на аналита. Така, познавайки стехиометрията на реакцията, можем да определим количеството на интересувания ни аналит. В химията за аналитично титруване се използват главно четири типа реакции: *киселинно-основни* – в които реагират киселини и основи; *окислително-редукционни* (редокс) – в които реагентите са окислител и редутор; *комплексометрични* – свързани с образуването на комплекси с координационни връзки (най-често между метал и лиганди) и *преципитатни* – при които се образуват неразтворими утайки. Ясно е, че с тях не се изчерпват всички варианти на метода. Титруване може да се извършва например и с реакциите антиген-антитяло.

За да се използва успешно една реакция за титруване са необходими няколко условия: 1) Да се познава добре стехиометрията на реакцията; 2) Реакцията да протича бързо в сравнение с останалите реакции в разтвора (напр. такива които се използват за индикаторни); 3) Да се определи прецизно точката в която титранта и аналита са отреагирали напълно, т.нар. *точка на еквивалентност*.

В частност, всяко *редокс титруване* се основава, както казахме, на някаква окислително-възстановителна реакция между аналита (чиято концентрация се търси) и титранта, който е с известна концентрация [Harvey]. Тъй-като редуторите по принцип са нестабилни (особено в присъствието на кислород в разтвора), по-често се използва титруването на аналит в редуцираната му форма A_R с титрант-окислител T_O (т.е. със степен на окисление поне с единица по-висока от тази на аналита), така че реакцията (в най-простия случай на едно-електронно взаимодействие) има вида:



където индексите R и O се отнасят съответно до редуцираната и окислената форма на реагентите. Добавяйки последователно към разтвора малки аликвотни порции от титранта T_O, благодарение на горната реакция, A_R постепенно се изчерпва и когато

количеството на титранта стехиометрично се изравни с първоначално присъстващото (неизвестно) количество на анализа, се достига до точката на еквивалентност. При това положение (както е и с другите видове титрувания: рН-метрично, комплексометрично, и т.н.), познавайки концентрацията на титранта $[T_O]_o$ в аликвотните порции, ще бъдем в състояние да намерим търсената концентрация на анализа $[A_R]_o$. Наистина, ако V_o е началният обем, n са броят порции на титранта, ΔV е обемът на една порция, $N_t = [T_O]_o \Delta V$ е количеството (в молове) на титранта в една порция, а $N_a = [A_R]_o V_o$ е началното количество на търсената (в случая редуцираната) форма на анализа, то в точката на еквивалентност ще имаме:

$$n_{eq} N_t = n_{eq} [T_O]_o \Delta V = N_a = [A_R]_o V_o \quad (2)$$

където неизвестна е само $[A_R]_o$.

Очевидно, дефинирането на точката на еквивалентност е от особена важност за титруването. От нейното точно определяне в най-голяма степен зависи прецизността на метода. За целта се използват различни средства, като например т.нар. визуални индикатори – вещества променящи цвета си (по-общо поглъщането във видимата област) в зависимост от степента си на окисленост, или с образуването на комплекс при взаимодействие с някоя от редокс формите на реагентите. В някои случаи самият титрант може да играе ролята и на индикатор – такъв е перманганатният йон MnO_4^- (т.е. T_O), който дава наситена вишнево-червена окраска на разтвора, докато редуцираната му форма $Mn^{2+}(aq)$ е безцветна.

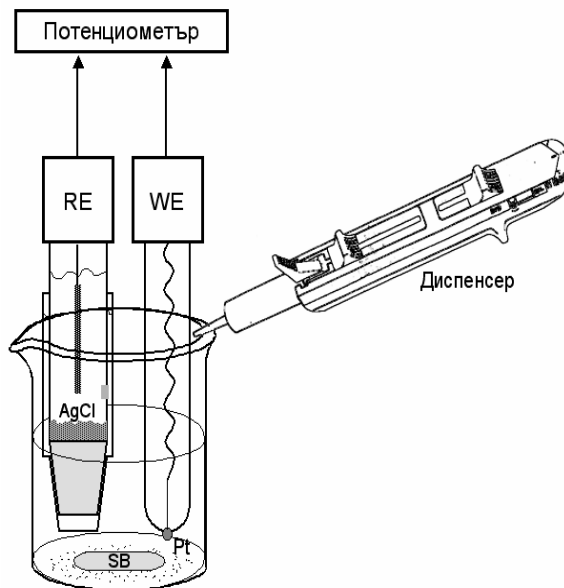
Естествено, за редокс титруването най-удачна е електрохимичната регистрация. Тя се базира на изменението на потенциала на работния електрод WE (спрямо сравнителния RE) в зависимост от съотношението на концентрациите на редокс формите. Връзката се задава с уравнението на Нернст (W.H.Nernst, 1889) [Bard&Faulkner]. Понеже до точката на еквивалентност преобладаващо е количеството на анализа, то в тази област уравнението (при $25^\circ C = 298^\circ K$ и едно-електронна реакция) ще има вида (3):

$$E = E_a^\circ + \frac{RT}{F} \ln \frac{[A_O]}{[A_R]} = E_a^\circ + 0.05916 \log \frac{[A_O]}{[A_R]} \quad (3)$$

и измереното напрежение на клетката ще бъде:

$$E_{cell} = E - E_{RE}$$

където E_a° е стандартният потенциал на анализа спрямо водородния електрод NHE (във V), $R = k_B N_A = 8.315 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ е газовата константа, $k_B = 1.381 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$ е константата на Болцман, $N_A = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ е числото на Авогадро, T е абсолютната температура в келвинови градуси (K), $F = N_A \cdot e = 96.48455 \text{ J/V}\cdot\text{mol} = 96484.55 \text{ C/mol}$ е константата на Фарадей, $e = 1.602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ е зарядът на електрона, а E_{RE} е потенциалът на сравнителния електрод (спрямо NHE). Уравнението (3) може да бъде използвано само до точката на еквивалентност, тъй-като в нея $[A_R] = 0$ и както се вижда $E \rightarrow \infty$. Една примерна схема на установка с която се провежда потенциометрично титруване е показана на Фиг.2.



Фиг.2. Експериментална установка за потенциометрично титруване. WE – работен платинов Pt електрод, RE – Ag/AgCl сравнителен електрод, SB – магнитна бъркалка. Отделните елементи от схемата са в различен мащаб.

Така в хода на титруването, измервайки *потенциометрично* разликата E_{cell} между двата електрода, се получава зависимостта на E_{cell} от обема на титранта известна като *крива на титруване*. В отсъствие на интерфериращи реакции, тя има характерна сигмоидална форма с две “плато” определящи се от стандартните потенциали на анализа и титранта. Когато тяхната реакция протича със стехиометрично съотношение 1:1 не е трудно да се види, че точката на еквивалентност се намира по средата между тези плато, $E_{\text{eq}} = \frac{1}{2}(E_a^{\circ} + E_t^{\circ})$, и тогава се говори за симетрична крива на титруване (Фиг.3а). При различна стехиометрия тя е отместена съответно към потенциала на анализа или титранта и кривата на титруване е несиметрична. Освен това, тъй-като в този момент техните количества се изравняват, в повечето случаи точката на еквивалентност представлява *инфлексна точка* за кривата на титруване [Meites] и оттам нататък потенциалът се определя от съотношението на двете редокс форми на преобладаващия титрант. По този начин, точката на еквивалентност може да бъде определена чрез първата производна на кривата на титруване, която има максимум в инфлексната точка. Също така е ясно, че грешката в определянето на тази точка не може да бъде по-голяма от $V_t^{\text{eq}} \pm \frac{1}{2}\Delta V$ понеже разстоянието между точките е ΔV (т.е. точността зависи от големината на аликвотните порции и от концентрацията на титранта $[T_0]_0$ в тях).

Потенциалът, изразен чрез уравнението на Нернст, може да се представи и като функция на обема на добавения титрант $V_t = n\Delta V$. При условие, че реакцията (1) протича напълно (т.е. има висока равновесна константа), количеството на титранта T_0 ще бъде равно на количеството на окислената форма на анализа A_0 и:

$$[A_0] = nN_t/V(n) ; [A_R] = (N_a - nN_t)/V(n) \quad (4)$$

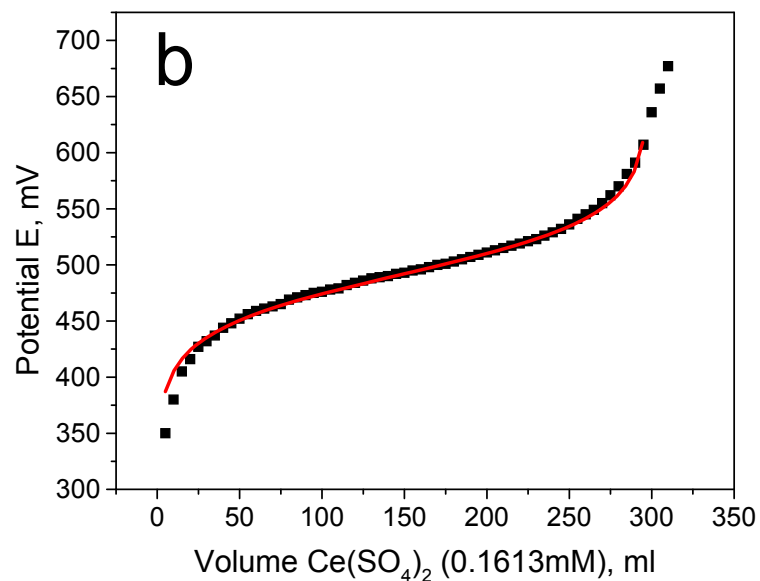
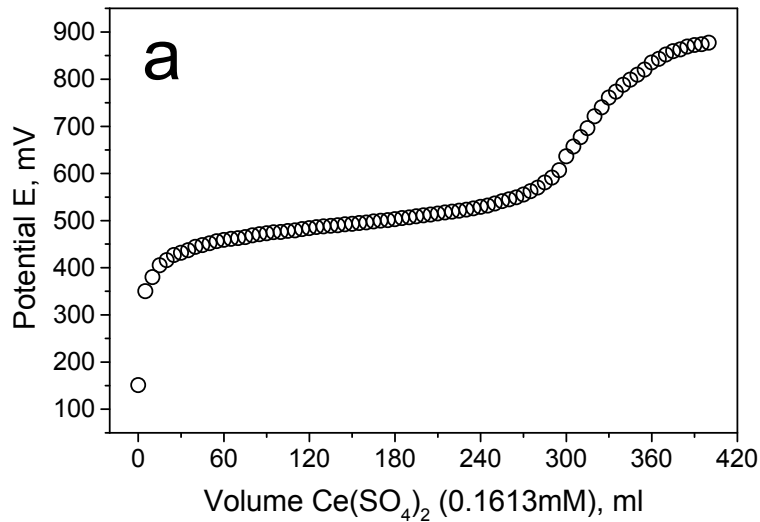
където $V(n) = V_0 + V_t$ е общият обем на разтвора. Тогава (3) приема вида:

$$E = E_a^{\circ} + 0.05916 \log \frac{nN_t}{N_a - nN_t} = E_a^{\circ} + 0.05916 \log \frac{V_t}{A - V_t} \quad (5)$$

където $A = \Delta V N_a / N_t = V_o [A_R]_o / [T_O]_o = \text{const.}$ е постоянна величина за даденото титруване и съдържа неизвестната $[A_R]_o$. Ясно е, че ако кривата на титруване бъде апроксимирана с уравнението (5), константата A може да бъде определена. Това дава един друг начин (разбира се по-неточен) за намиране на количеството на анализа. Такъв пример е показан на Фиг.3b, в който участъкът до точката на еквивалентност от експериментално построената крива на титруване е напасван с функцията:

$$E = B + 59.16 \log \frac{V_t}{A - V_t} \quad (6)$$

(където E и B са в mV, множителят пред логаритъма също в mV, а A и V_t са в ml). Получените стойности за параметрите $A = 297.56 \pm 0.81 \text{ ml}$ и $B = 491.71 \pm 0.97 \text{ mV}$ са едно добро приближение до действителното $A = V_o [A_R]_o / [T_O]_o = 309.98 \text{ ml}$ и теоретичното $B = E_{\text{Fe}}^o - E_{\text{RE}} = 770 - 222 = 548 \text{ mV}$ (тук разликата е по-голяма заради условията на средата – различна йонна сила, рН и т.н.).



Фиг.3. а) Крива на титруване за $V_0 = 50\text{ml}$ железен сулфат, FeSO_4 ($[\text{A}_R]_0 = 1\text{mM}$) с $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ($[\text{T}_O]_0 = 0.1613\text{mM}$); Обемът на аликвотните порции е $\Delta V = 5\text{ml}$; б) Нелинейно напасване (fit) по метода на най-малките квадрати на експериментални данни до точката на еквивалентност.

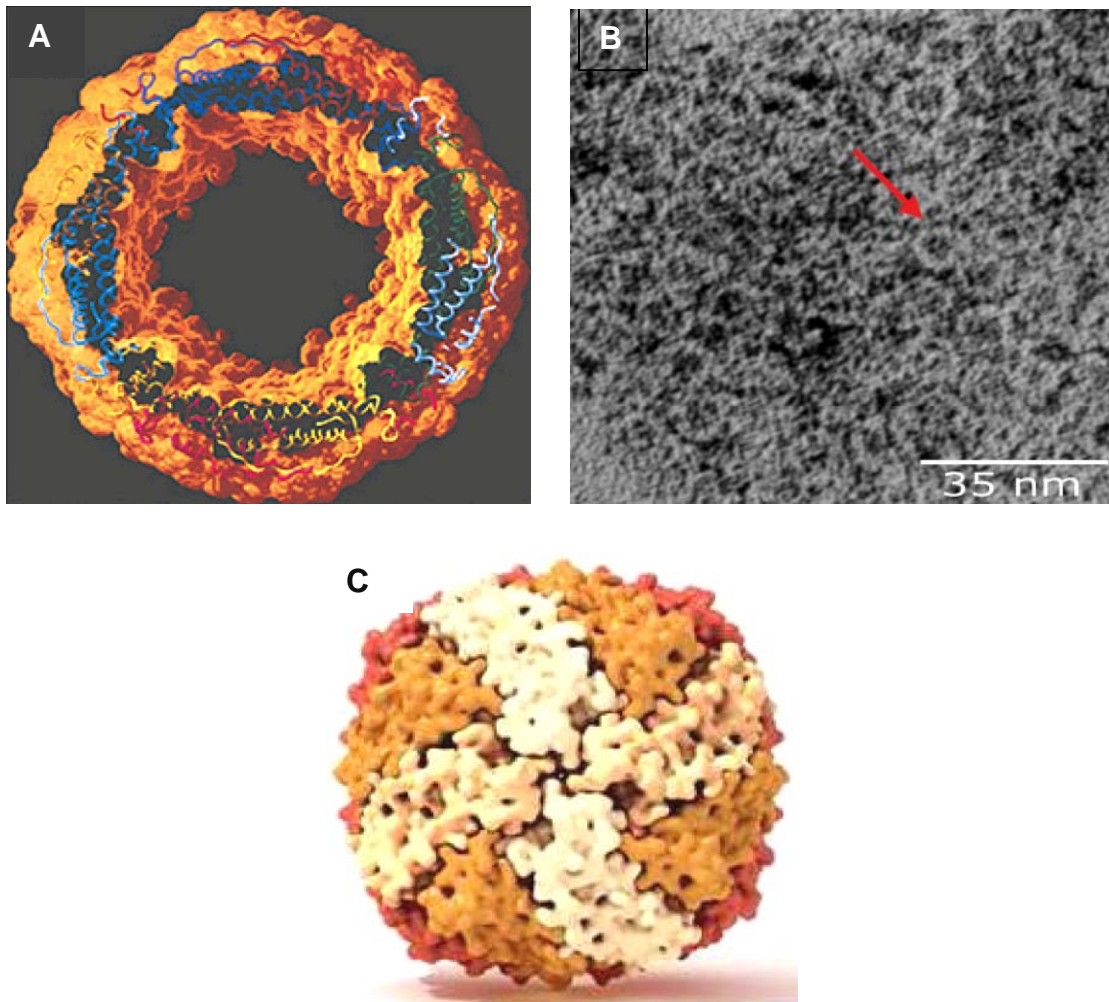
3. Приложение на потенциометричното титруване при изследване свойствата на феритина

3.1. Въведение

Феритините са семейство вездесъщи желязо-запасяващи белтъци в живите системи, еднакво необходими както за бактериите, така и за човека. Те играят ключова роля в биохимичните превръщания на желязото и кислорода, процеси от изключително значение за самото съществуване на организмите. От една страна, тези белтъци регулират съдържанието на желязо като обратимо го натрупват или отделят в цитозола съобразно нуждите за момента, което всъщност е и главната им функция. От друга, те активно участват в обезвреждането на силно реактивните химични видове (радикали, прекиси и т.н.) появяващи се в резултат на желязо/кислородните реакции [Theil-Hintze]. Освен с биологичната си важност, в последните десетилетия феритините привлякоха вниманието на широк кръг специалисти и с техните интригуващи електрохимични и физикохимични свойства. Благодарение на съвременните интензивни изследвания се откриха широки перспективи за използването им в най-различни технологични направления (като например разработването на източници на ток в наноскопични мащаби [Zhang]).

Феритиновите макромолекули са удивително симетрични, със сферична форма и с доста големи размери – 8-12nm вариращи в зависимост от източника: бактериален, растителен или животински. Те наподобяват “кафез” сглобен от различен брой субединици (12 при бактериалните *мини-феритини* или 24 при животинските *макси-феритини*), в средата на който се образува кухина с диаметър приблизително 5-8nm (Фиг.4). Празната протеинова обвивка, не съдържаща желязо (или т.нар. *апоферитин*), при бозайниците има тегло около 474 000 Da [Harrison]. Една такава “клетка” може да събере до 4500 атома желязо, което е еквивалентно на концентрация от порядъка на 0.25M, като по този начин се осигурява необходимата вътреклетъчна норма от $\sim 10^{-4}\text{M}$ докато разтворимостта на $\text{Fe}(\text{III})$ е само 10^{-18}M . С други думи, феритиновата система за запасяване на желязото е в състояние да преодолее един огромен концентрационен градиент от $\sim 10^{14}$ пъти.

Във вътрешността на феритина желязото се съхранява като $\text{Fe}(\text{III})$ оксохидроксидна структура, съдържаща още и фосфатни групи. Най-общата стехиометрия на желязното ядро се задава с формулата $[\text{FeO}(\text{OH})]_8[\text{FeO}(\text{H}_2\text{PO}_4)]_8$, която е подобна на минерала ферихидрит.



Фиг.4. Четвъртична структура на максиферитин: А) Белтъчната обвивка (апоферитин) с централната кухина; В) Трансмисионна електронно-микроскопска (ТЕМ) фотография на феритинови молекули негативно оцветени с уранил ацетат; С) Общ изглед на глобулата от 24 субединици.

В местата където се срещат свързаните със слаби взаимодействия субединици, в четвъртичната глобула се образуват *канални* (или *пори*) през които определени йони и молекули преминават през обвивката и в двете посоки. Структурата и действието на тези канали, естествено, са много съществени за способността на феритина контролируемо да изпуска или поглъща необходимото желязо. Известни са два типа пори – оформени в контактната област на три или на четири субединици. Те притежават различни химични свойства и изпълняват различни функции. Размерите и на двата вида пори са оценени на около 3-5Å [Rice,Ford], но могат да варират в зависимост от вътрешно-молекулната динамика и съответното пренастройване на четвъртичната структура. Нещо повече, някои експериментални резултати, демонстриращи различната проницаемост на разтворените молекули, подкрепят идеята за съществуването на специален механизъм регулиращ отварянето и затварянето на каналите [Liu].

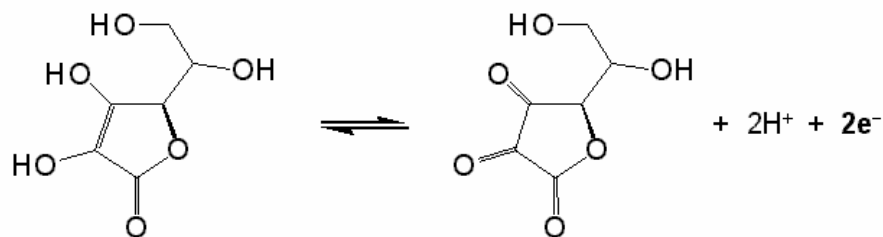
Както бе споменато, желязото във феритиновата сърцевина се натрупва под формата на неразтворим Fe(III) кристал. Поради това, за да бъде освободено минералната решетка трябва да бъде разложена по някакъв начин. Това обикновено се постига чрез редукция на Fe(III) до Fe(II). В двуокисленото си състояние Fe(II) желязото става разтворимо и като хидратиран Fe^{2+} йон $Fe(H_2O)_6^{2+}$, може да напусне белтъка през три-контактните канали които са покрити отвътре с хидрофилни групи.

Съвсем понятно е, че изясняването на механизмите лежащи в основата на процесите на преобразуване на желязото манипулирани от феритина е от особена значимост за много области от науката за живата материя. Наред с други важни нерешени проблеми (като например тези отнасящи се до супрамолекулното асоцииране и генната регулация), това може да бъде посочено като една от основните цели на повечето научно-изследователски програми свързани с феритина.

Електрохимичните методи са безспорно признати като най-ефективното средство за изследване на реакциите на електронен пренос в разтвори [Bard&Faulkner]. Що се отнася до редокс реакциите на електроактивни биомакромолекули, то в случаите където многобройните разновидности на тези методи могат да бъдат приложени, те предлагат един мощен подход за тяхното разгадаване [Watt79-Huang]. В частност, всяка лабораторна процедура която позволява едно достатъчно надеждно определяне на количествата желязо в различните му окислени състояния, възникващи като резултат от такива процеси представлява значителен научен интерес. В тази връзка, тук сме предприели един опит да демонстрираме възможностите които дава потенциометричното титруване [Harvey] за оценка на отделения Fe^{2+} при разпадане на феритиновото минерално ядро под действие на екзогенен редуктор, в случая аскорбинова киселина.

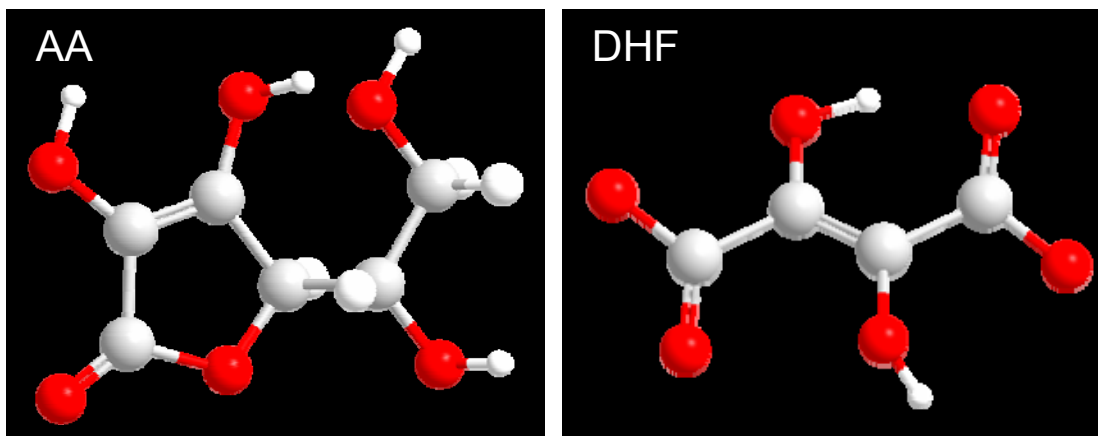
Както бе отбелязано по-горе, за да бъде отделено от феритина, желязото трябва първо да бъде редуцирано, т.е. Fe(III) от минералната сърцевина трябва да бъде превърнато в Fe(II), което впоследствие напуска белтъчната обвивка. Такива експерименти са били многократно провеждани по-рано в най-различни варианти: използвайки редуктори с малки размери (като напр. дихидроксифумарат [Frey] или дитионит $Na_2S_2O_4$ [Richards,Zhang]), способни да проникнат през порите във вътрешността на протеиновия “кафез”; с помощта на чувствително по-големи молекули (включително редокс протеини) които прехвърлят електрони през “пътища” във обвивката (апоферитина) [Sirivech,Watt88]; или директно редуцирайки феритиновите молекули върху метален електрод [Huang].

В дадената работа ролята на екзогенен редуктор е предоставена на аскорбиновата киселина (Витамин С) с цел да се окачестви ефекта ѝ върху изтичането на Fe^{2+} . По-специално, сме се спрели на количественото определяне на Fe^{2+} посредством редокс титруване.



Фиг.5. Дву-електронно окисление на аскорбиновата киселина (AA) до дехидроаскорбинова киселина (DA).

Аскорбиновата киселина, (AA) е най-широко разпространен редутор в живата природа и често се среща в подобен род изследвания [Zhang,Laulhere]. Тя притежава четири хидроксилни групи, две от които са отговорни за нейните редокс свойства (Фиг.5). В това отношение (като химично съдържание и функции) AA наподобява дихидроксифумарата DHF, друг много използван редутор. Въпреки тази прилика обаче, двете съединения се различават съществено по размери и структура (Фиг.6), което се отразява чувствително на механизма им на въздействие върху феритина.



Фиг.6. Структурни формули и пространствени модели на аскорбинова киселина, AA (вляво) и дихидроксифумарат, DHF (вдясно).

Дихидроксифумарата е достатъчно малка молекула, с почти линейна форма, за която се счита, че може да навлезе във феритина през хидрофилните канали и да реагира директно с окисленото минерално ядро. За разлика от него, АА е малко по-голяма и въпреки че понякога (напр. в условия предизвикващи “разхлабване” на четвъртичната структура и разширение на порите) е в състояние да достигне сърцевината, в повечето случаи вероятно прехвърля електрони към нея през “пътища” в обвивката. Механизмът ѝ на действие обаче, не е докрай изяснен. Тъй-като в нашите експерименти сме използвали сравнително ниско рН4, склонни сме да приемем, че АА поне отчасти прониква във вътрешната кухина на феритина.

Каквито и да са подробностите в процеса на мобилизация на желязото под действие на аскорбиновата киселина, тук скромните ни усилия са насочени само към една ефективна оценка на крайното количество отделено желязо Fe^{2+} .

3.2. Материали и методи

3.2.1. Реактиви.

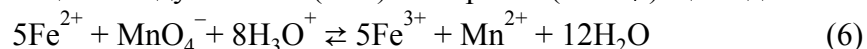
Животински феритин, HoSF (Type I, Sigma) беше използван без някакво допълнително пречистване. Аскорбиновата киселина (АА) като разтвор от 100mg/ml, производство на Фармахим (България), беше закупена от аптечната мрежа. Калиев хлорид, KCl (HANNA Instrument.) с концентрация 0,1М играеше ролята на поддържащ електролит. Цериев дисулфат, $Ce(SO_4)_2$ (CARLO ERBA, Италия) разтворен в 0,1М KCl до концентрация 0.5mM служеше като основен титрант. За илюстрация и стандартизиране на процедурата по редокс титруването бяха използвани: 1) железен сулфат хептахидрат, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (MERCK), разтворен в 0,1М KCl до концентрация 1.83mM, в качеството си на източник на желязо (II) и 2) калиев перманганат, $KMnO_4$ (Фармахим, България) с концентрация 0.01М като окисляващ титрант. При измерванията с феритина, като буфер беше използван калиев хидроген фталат, $KHC_8H_4O_4$ (HANNA Instrument) за поддържане на рН4 на разтвора.

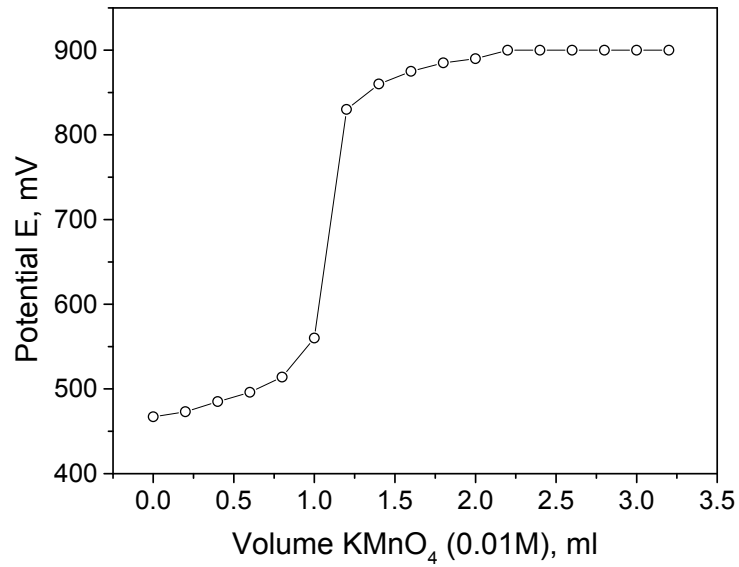
3.2.2. Апаратура.

Потенциометричното титруване беше провеждано с експерименталната установка показана на Фиг.2. В нея точков платинов Pt електрод (OH-09615, Radelkis, Унгария) служеше като работен електрод (WE), а двуконтактен Ag/AgCl електрод (OP-0820P, Radelkis, Унгария) като сравнителен (RE). Последователните порции от титранта бяха внасяни в реакционната среда с пипета-диспенсер (Plastomed, Полша). Разликата в потенциалите на двата електрода (работен, WE и сравнителен, RE) беше измервана с потенциометър N5170 (ELWRO, Полша). Получените данни бяха обработвани с помощта на пакет от програми Origin 5.0.

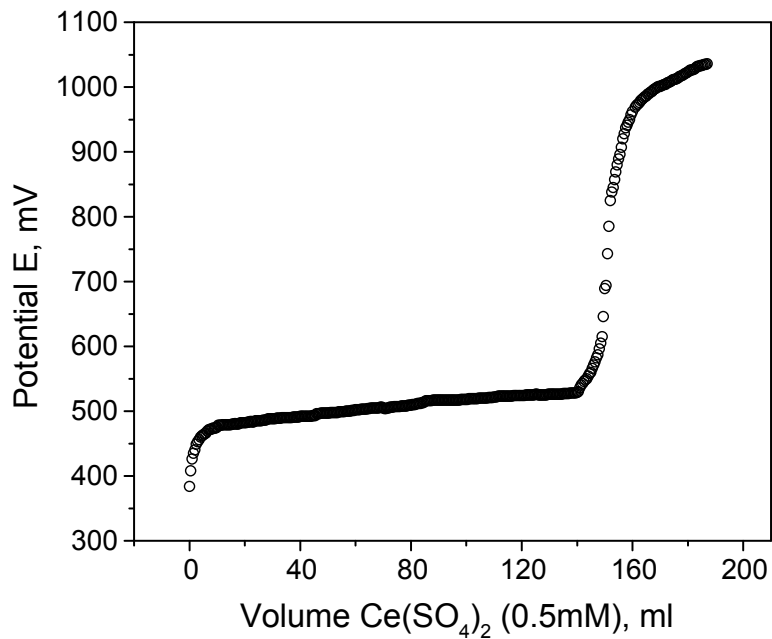
3.3. Резултати и обсъждане

Редокс титруването на Fe^{2+} може да се извърши с различни окисляващи агенти [Harvey]. Един от най-често използваните е перманганатния йон MnO_4^- и както подсказват и нашите резултати (Фиг.7), получените криви на титруване са достатъчно стръмни с ясно изразена инфлексна точка. Съответната окислително-възстановителна реакция между анализа (Fe^{2+}) и титранта (MnO_4^-) ще бъде:





Фиг.7. Крива на титруване за 30ml железен сулфат, FeSO₄ (1.83mM) с перманганат, MnO₄⁻ (0.01M) в 0.1M KCl; V_t^{eq} = 1.1±0.1 ml.



Фиг.8. Крива на титруване за 40ml железен сулфат, FeSO₄ (1.83mM) с Ce⁴⁺ (0.5mM) в 0.1M KCl.

Перманганата обаче, налага някои ограничения свързани със специфичните черти на неговите реакции. Преди всичко, в повечето случаи те са рН зависими, както се вижда и от горния пример (уравнение 6). Освен това, тъй-като манганът от MnO_4^- е в най-високото си окислено състояние (VII), той показва способност да окислява и други присъстващи компоненти чрез едно- или дву-електронни реакции.

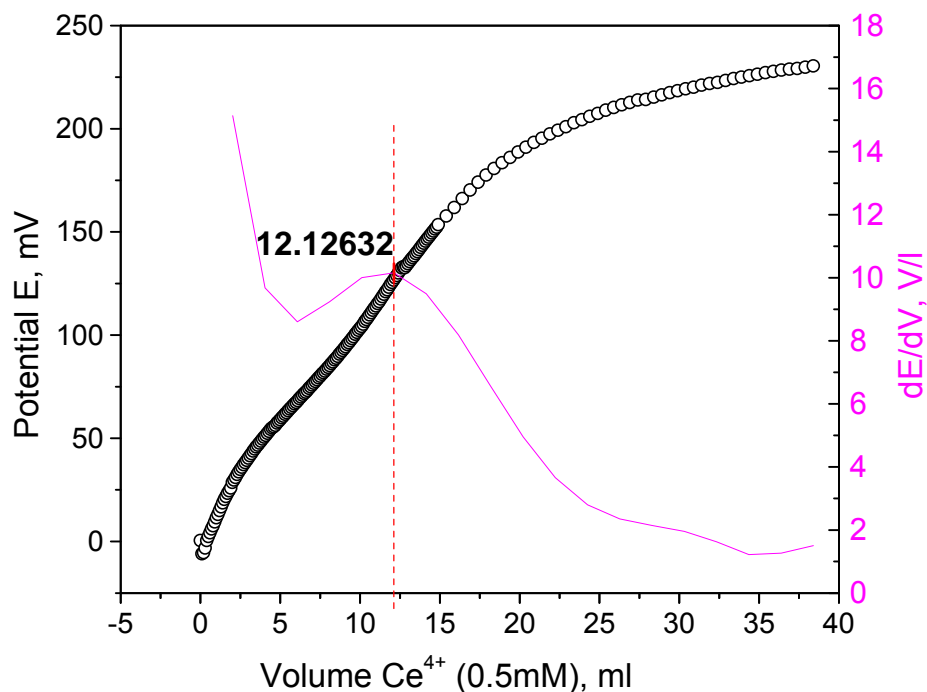
Поради тези причини, тук сме избрали един друг окислител като титрант – Ce^{4+} , известен със своята ефективност именно при определяне на Fe^{2+} . Предимствата му се дължат на факта, че хомогенната реакция между него и желязото (уравнение 7) е много бърза и протича почти напълно (с голяма равновесна константа $K_{eq} \sim 6 \cdot 10^{15}$ [Harvey]).



Като илюстрация на Фиг.8 е показана процедурата на калибриране – титруване на 40ml $FeSO_4$ (концентрация 1.83mM) с Ce^{4+} (концентрация 0.5mM).

По щастливо стечение на обстоятелствата, Ce^{4+} не реагира така интензивно с аскорбиновата киселина, което дава възможност за една естествена селективност спрямо Fe^{2+} когато става дума за смеси съдържащи АА в значителни количества.

И така, редукцията на феритиновото минерално ядро бе проведена в аеробни условия с излишък от екзогенна аскорбинова киселина. Първо, едно количество от 20 μ l феритин (100mg/ml) бе поставено в съда за титруване, след което бяха добавени 1ml фталатен буфер (концентрация 27.5mM) и 0.5ml АА (100mg/ml), и сместа бе разредена с 0.1M KCl до обем от 50ml. Така, в крайно състояние разтвора съдържаеше 5.7mM АА и 8.44 μ M феритин. След период на инкубиране от 60 минути, титруването започна с последователно добавяне към разтвора на аликвотни порции (0.1 ml) от титранта Ce^{4+} (концентрация 0.5mM). Получената крива на титруване е дадена на Фиг.9.



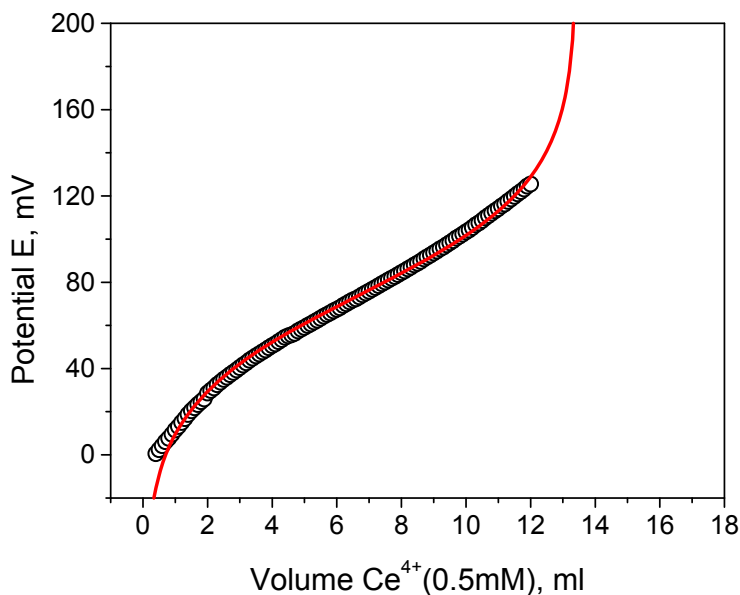
Фиг.9. Крива на титруване за анализираното количество Fe^{2+} с Ce^{4+} (0.5mM) в 0.1M KCl, заедно с нейната производна. Точките отговарят на експерименталните данни (лявата скала), а цветната непрекъсната линия на производната (дясната скала).

Поради наличието на все още достатъчно голямо количество AA (въпреки нейното окисление от кислорода), една промяна във формата на кривата не може да бъде избягната. Това е свързано най-вече със “страничната” реакция между AA и Fe^{3+} в средата извън феритина:



Реакцията (8) предизвиква вторична редукция на част от окисленото (от Ce^{4+}) желязо, вследствие на което са необходими допълнителни количества титрант за да го компенсират. Независимо от това, кривата на титруване има принципно същия ход както и тази от Фиг.3а. Така става възможно точката на еквивалентност да бъде определена чрез инфлексията в нейната непосредствена околност. Намирайки първата производна на експерименталната крива $E = f(V_t)$, получаваме максимум точно в тази точка показваща момента на изравняване на количествата на титранта Ce^{4+} и анализа Fe^{2+} .

Тъй-като максимумът се намира на $\sim 12.13\text{ml}$ от обема на титранта, имайки предвид че концентрацията на Ce^{4+} в отделните порции е $0.5\text{mM} = 0.5\mu\text{mol}/\text{ml}$, не е трудно да пресметнем, че количеството на отделеното Fe^{2+} е около $6.065\mu\text{mol}$. Този резултат изглежда приемлив при условие, че концентрацията на феритина е $8.44\mu\text{M}$ (предполагайки че той съдържа 4500 атома желязо в 1 молекула), и следователно цялото количество желязо ще бъде 1.9mmol . Понеже няма основание да се счита, че при тези условия феритиновата глобула е деградирала, не може да се очаква всичкото желязо да постъпи в разтвора и така получените данни звучат правдоподобно.



Фиг.10. Нелинейна апроксимация на експерименталната крива на титруване до точката на еквивалентност с функцията (6).

От друга страна, напасването на експерименталните данни с представената по-горе функция (6) дава за параметъра $A = 13.43441 \pm 0.06846$, което е близко до стойността получена с производната: $A = N_{\text{Fe}}/[\text{Ce}^{4+}]_0 = 6.065 \mu\text{mol}/0.5\text{mM} = 12.13\text{ml}$. Резултатите са показани на Фиг.10. В крайна сметка, всичко това ни позволява да разглеждаме предложената методика като подходяща за анализ на отделения Fe^{2+} от феритина.

3.4. Заключение

При аеробни условия, феритиновото минерално ядро претърпява редукция ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) под действие на екзогенна аскорбинова киселина. Като следствие, част от запасеното желязо се освобождава навън под формата на Fe^{2+} . Неговото общо количество в края на редукцията може да се определи надеждно чрез потенциометрично титруване на разтвора. Резултатите от представеното изследване показват, че окислителят Ce^{4+} служи като подходящ титрант в тази процедура. Въпреки, че формата на кривата на титруване $E = f(V_t)$ се променя поради вторичната реакция на Fe^{3+} с аскорбиновата киселина извън феритина, все пак е възможно точката на еквивалентност да бъде намерена с помощта на производната dE/dV_t която има максимум на това място.

4. Цитати

D.L.Nelson M.M.Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed., W.H.Freeman and Company, New York, 2005.

E.C.Theil, *J.Nutr.* **133**, 1549S-1553S, 2003.

X.Liu and E.C.Theil, *Acc. Chem. Res.* **38**, 167-175, 2005.

K.J.Hintze and E.C.Theil, *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 591-600, 2006.

P.M.Harrison and P.Arosio, *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 161-203, 1996.

D.W.Rice, G.C.Ford, J.L.White, J.M.A.Smith and P.M.Harrison, *Advances in inorganic biochemistry* **5**, 39-50, 1983.

G.C.Ford, P.M.Harrison, D.W.Rice, J.M.A.Smith, A.Treffry, J.L.White and J.Yariv, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **304**, 551-566, 1984.

X.Liu, W.Jin and E.C.Theil, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 3653–3658, 2003.

A.J.Bard and L.R.Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., p.833, John Wiley & Sons, New York, 2001.

- L.Meites and J.A.Goldman, *Anal. Chim. Acta* 1963, **29**, 472–479.
- G.D.Watt, *Anal.Biochem.*, **99**, 399-407, 1979.
- G.D.Watt, R.B.Frankel and G.C.Papaefthymiou, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **82**(11), 3640-3643, 1985.
- D.L.Jacobs, G.D.Watt, R.B.Frankel, and G.C.Papaefthymiou, *Biochemistry*, **28**, 1650-1655, 1989.
- T.D.Martin, S.A.Monheit, R.J.Niichel, S.C.Peterson, C.H.Campbell, D.C.Zapien, *J.Electroanalytical Chem.*, **420**, 279-290, 1997.
- D.C.Zapien, M.A.Johnson, *J.Electroanalytical Chem.*, **494**, 114-120, 2000.
- H.Q.Huang, Q.M.Lin and T.L.Wang, *Biophys.Chem.* **97**, 17-27, 2002.
- D.Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill Comp.Inc., New York, 2000.
- R.Frey, M.Donlin, J.Bashkin, "Ferritin Molecular-Graphics Tutorial," Washington University: St.Louis, MO, 1995. URL: LabTutorials/Ferritin/FerritinTutorial.html.
- T.D.Richards, K.R.Pitts and G.D.Watt, *J.Inorg.Biochem.* **61**, 1-13, 1996.
- Bo Zhang, Ferritin: Mechanistic studies and electron transfer properties, Ph.D. Thesis, Brigham Young University, 2006.
- S.Sirivech, E.Frieden, S.Osaki, *Biochem. J.*, **143**, 311-315, 1974.
- G.D.Watt, D.Jacobs and R.B.Frankel, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **85**(20), 7457-7461, 1988.
- J-P.Laulhere and J-F.Briat, *Biochem. J.*, **290**, 693-699, 1993.