

## ПОТЕНЦИОМЕТРИЧНОТО ТИТРУВАНЕ КАТО МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОТДЕЛЕНОТО КОЛИЧЕСТВО $Fe^{2+}$ ПРИ РЕДУКЦИЯТА НА ФЕРИТИНА

ЛИЛИЯ ВЛАДИМИРОВА, ВАЛЕРИ КОЧЕВ

*Катедра „Атомна физика“, Физически факултет  
Софийски университет „Св. Климент Охридски“*

*Лилия Владимирова, Валери Кочев. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧНОТО ТИТРУВАНЕ  
КАТО МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОТДЕЛЕНОТО КОЛИЧЕСТВО  $Fe^{2+}$  ПРИ  
РЕДУКЦИЯТА НА ФЕРИТИНА*

В настоящата работа са изследвани възможностите за дефиниране на мобилизираното желязо при електрохимичното възстановяване на феритин *in vitro* от екзогенна аскорбинова киселина (Витамин С). **Желязо-запасяващият белтък бе инкубиран с излишък от редуктора при аеробни условия в отсъствие на комплексиращи агенти в средата. След като бе изчакано освобождаването на желязото да е пълно, общото съдържание на  $Fe^{2+}$  в разтвора бе определено с помощта на потенциометрично титруване, използвайки  $Ce^{4+}$  като окисляващ титрант. Резултатите говорят за сравнително умерено изтичане на желязо под действие на така избрания редуктор. Докато една също такава редукция на протеиновото минерално ядро от дихидроксифумарат съществено допринася за мобилизацията на желязото, то в случая с Витамин С поведението на феритина изглежда различно. Въпреки че двете съединения притежават подобни хидроксилни групи, определящи техните редокс и киселинно-основни свойства, те все пак се различават значително в структурно отношение, което може да бъде основа за обяснение на специфичното им действие към феритина. Използваната методика се очертава като достатъчно надеждна за количествена оценка на отделения  $Fe^{2+}$ , и то в присъствието на аскорбинова киселина.**

---

*За контакти:* Л. Владимирова, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Физически факултет, Катедра Атомна физика, бул. Джеймс Баучер 5, 1164 София, България, Тел: + 359 2 8161 317, Факс: +359 2 962 5276, e-mail: [vladimirova@phys.uni-sofia.bg](mailto:vladimirova@phys.uni-sofia.bg)

Possibilities for quantitative determination of the iron mobilization connected with the ferritin reduction *in vitro* by exogenous ascorbic acid (Vitamin C) are investigated in the work. The iron-storage protein was incubated with the excess of reductant in aerobic conditions without the presence of complexing agents in the medium. The release of  $\text{Fe}^{2+}$  was let to go to completion and the overall content of the  $\text{Fe}^{2+}$  in the solution was evaluated with the aid of potentiometric titration, using  $\text{Ce}^{4+}$  as an oxidizing titrant. The results suggest a moderate iron efflux under the action of the chosen reducing agent. While such a reduction of the protein mineral core by dihydroxyfumarate greatly contributes to the iron mobilization, the ferritin behavior to vitamin C seems to be different. Although these two compounds possess similar hydroxyl groups, determining their redox and acid-base properties, they differ significantly in structure, which could be the base for explanation of the specificities in their interaction with the ferritin. Potentiometric titration seems to be a reliable tool for the evaluation of the amount  $\text{Fe}^{2+}$  present in the solution as a result of the reduction of ferritin's mineral core.

**Keywords:** Ferritin, Ascorbic acid, Redox reactions,  $\text{Fe}^{2+}$ , Potentiometric titration,  $\text{Ce}^{4+}$ .

**PACS numbers:** 87.90.+y

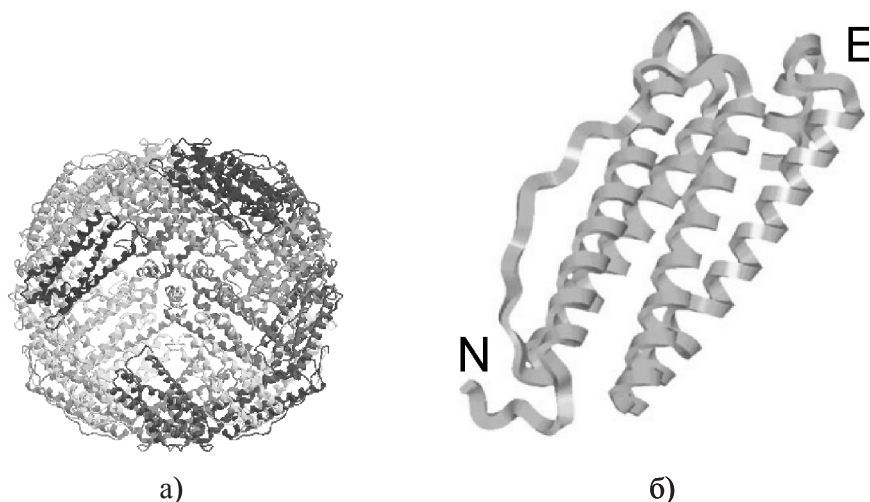
## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Феритините са семейство вездесъщи желязо-запасяващи белтъци в живите системи, от бактериите до 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 страна, те активно участват в обезвреждането на силно реактивните химични видове (радикали, прекиси и т.н.), появяващи се в резултат на желязо/кислородните реакции [1–3]. 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 [19]).

Феритиновите макромолекули са удивително симетрични, със сферична форма и с доста големи размери – 8–12 nm, вариращи в зависимост от източника – бактериален, растителен или животински. Те наподобяват кафез, сглобен от различен брой субединици (12 при бактериалните

мини-фритини или 24 при животинските макси-феритини), в средата на който се образува кухина с диаметър приблизително 5–8 nm (фиг. 1). Празната протеинова обвивка, която не съдържа желязо (или т.нар. апо-феритин), при бозайниците има тегло около 474 000 Da [4]. Една такава „клетка“ може да събере до 4500 атома желязо, което е еквивалентно на концентрация от порядъка на 0,25 M, като по този начин се осигурява необходимата втреклетъчна норма от  $\sim 10^{-4}$  M, докато разтворимостта на Fe(III) е само  $10^{-18}$  M. С други думи, феритиновата система за запасяване на желязо е в състояние да преодолее един огромен концентратен градиент от  $\sim 10^{14}$  пъти.

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



Фиг. 1. а) Четвъртична структура на максиферитин (pdb 1mfr); б)  $\alpha$ -спирален сноп, образуващ отделната субединица, показана с нейния N-край и E-фрагмент (съгласно G.C.Ford и сътр. [6])

В местата, където се срещат свързаните със слаби взаимодействия субединици, в четвъртичната глобула се образуват канали (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 [5, 6], но могат да варират в зависимост от вътрешномолекулната 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 [7].

Както бе споменато, желязото във феритиновата сърцевина се натрупва под формата на неразтворим Fe(III) кристал. Поради това, за да бъде то 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<sup>2+</sup> йон (Fe(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>2+</sup>), може да напусне белтъка през три-контактните канали, които са покрити отвътре с хидрофилни групи.

Съвсем понятно е, че изясняването на механизмите, които са 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.

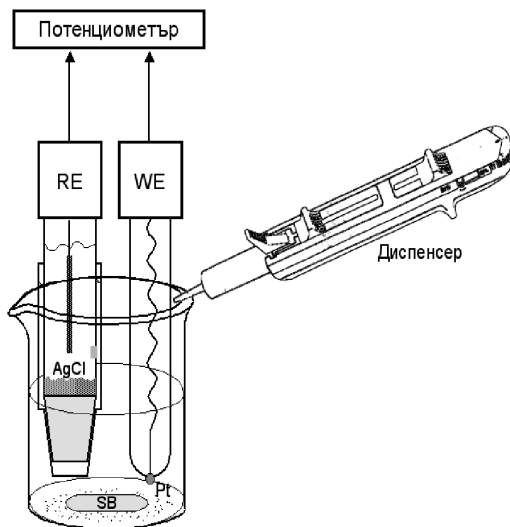
Електрохимичните методи са безспорно признати като най-ефективното средство за изследване на реакциите на електронен пренос в разтвори [8]. Що се отнася до редокс-реакциите на електроактивни биомолекули, то в случаите, където многобройните разновидности на тези методи могат да бъдат приложени, те предлагат един мощен подход за тяхното разгадаване [10–15]. 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 предлага *потенциометричното титруване* [16] за оценка на отделения Fe<sup>2+</sup> при разпадане на феритиновото минерално ядро под действие на екзогенен редуктор, в случая аскорбинова киселина.

## 2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

**Реактиви.** Животински феритин, HoSF (Type I, Sigma), беше използван без някакво допълнително пречистване. Аскорбиновата киселина (AA) като разтвор от 100 mg/ml, производство на Фармахим (Бълга-

рия), беше закупена от аптечната мрежа. Калиев хлорид, KCl (HANNA Instrument.), с концентрация 0,1 М играеше ролята на поддържащ електролит. Цериев дисулфат,  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (CARLO ERBA, Италия), разтворен в 0,1 М KCl до концентрация 0,5 mM, служеше като основен титрант. За илюстрация и стандартизиране на процедурата по редокс-титруването бяха използвани: 1) железен сулфат хептахидрат,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (MERCK), разтворен в 0,1 М KCl до концентрация 1,83 mM, в качеството си на източник на желязо (II); 2) калиев перманганат,  $\text{KMnO}_4$  (Фармахим, България), с концентрация 0,01 М като окисляващ титрант. При измерванията с феритина като буфер беше използван калиев хидроген фталат,  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$  (HANNA Instrument), за поддържане на pH на разтвора.

**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.



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

**Процедура на титруването.** Всяко *редокс-титруване* се основава на някаква окислително-възстановителна реакция между анализа (чиято концентрация се търси) и титранта, който е с известна концентрация [16]. Тъй като редукторите по принцип са нестабилни (особено в присъствието на кислород в разтвора), **по-често се използва титруването на анализ 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 анализа), 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  $T_O$ , поради 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 т. нар. **точка на еквивалентност**.

При това положение (както е и с другите видове титрувания: рН-метрично, комплексометрично, и т.н.), познавайки концентрацията на титранта  $[T_O]_0$  в аликвотните порции, ще бъдем в състояние да намерим търсената концентрация на анализа  $[A_R]_0$ . Наистина, ако  $V_0$  е **началният обем**,  $n$  – броят порции на титранта,  $\Delta V$  – обемът на една порция,  $N_t = [T_O]_0 \Delta V$  е количеството (в молове) на титранта в една порция, а  $N_a = [A_R]_0 V_0$  е началното количество на търсената (в случая редуцираната) форма на анализа, то в точката на еквивалентност ще имаме

$$n_{eq} N_t = n_{eq} [T_O]_0 \Delta V = N_a = [A_R]_0 V_0, \quad (2)$$

където неизвестна е само  $[A_R]_0$ .

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 вишневочервена 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) [8]. **Понеже до точката на еквивалентност** преобладаващо е количеството на анализа, то в тази област уравнението (при  $25\text{ }^{\circ}\text{C} = 298\text{ }^{\circ}\text{K}$  и едно-електронна реакция) **ще има вида**

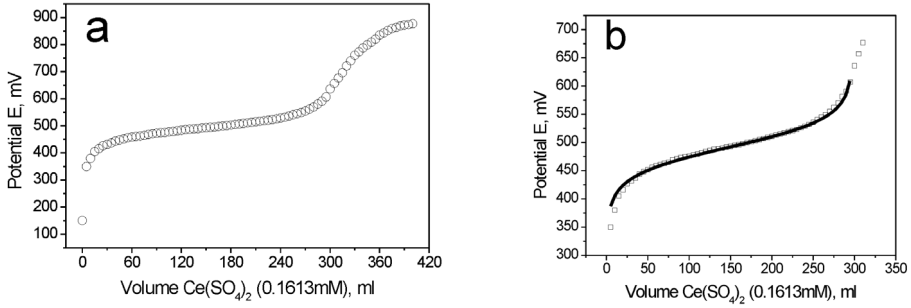
$$E = E_a^{\circ} + \frac{RT}{F} \ln \frac{[A_O]}{[A_R]} = E_a^{\circ} + 0,05916 \log \frac{[A_O]}{[A_R]} \quad (3)$$

а измереното напрежение на клетката ще бъде

$$E_{\text{cell}} = E - E_{\text{RE}},$$

където  $E_a^{\circ}$  е стандартният потенциал на анализа спрямо водородния електрод NHE (във V),  $R$  [J/mol·K] – газова константа,  $T$  – абсолютната температура в келвини градуси (K),  $F = N_A \cdot e$  [C/mol] – константата на Фарадей,  $e$  [C] – зарядът на електрона,  $N_A$  [mol<sup>-1</sup>] – числото на Авогадро, а  $E_{\text{RE}}$  – 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,  $E \rightarrow \infty$ .

Така в хода на титруването, измервайки *потенциометрично* разликата  $E_{\text{cell}}$  между двата електрода, се получава зависимостта на  $E_{\text{cell}}$  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 [9] 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  $\Delta V$  (т.е. точността зависи от големината на аликвотните порции и от концентрацията на титранта  $[T_O]_0$  в тях).



Фиг. 3. а) Крива на титруване за  $V_o = 50$  ml железен сулфат,  $\text{FeSO}_4$  ( $[\text{A}_R]_o = 1\text{mM}$ ) с  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  ( $[\text{T}_O]_o = 0,1613\text{mM}$ ); **обемът на аликвотните порции е  $\Delta V = 5$  ml**; б) Нелинейно напасване (fit) по метода на най-малките квадрати на експерименталните данни до точката на еквивалентност

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  $T_O$  ще бъде равно на количеството на окислената форма на анализа  $A_O$  и

$$[\text{A}_O] = nN_t / V(n) ; [\text{A}_R] = (N_a - nN_t) / V(n) \quad , (4)$$

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

$$E = E_a^o + 0,05916 \log \frac{nN_t}{N_a - nN_t} = E_a^o + 0,05916 \log \frac{V_t}{A - V_t} \quad (5)$$

където  $A = \Delta V N_a / N_t = V_o [\text{A}_R]_o / [\text{T}_O]_o = \text{const}$  е постоянна величина за даденото титруване и съдържа неизвестната  $[\text{A}_R]_o$ . 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.3б, 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 е в [mV], а  $A$  и  $V_t$  са в [ml]). Получените стойности за параметрите  $A = 297,56 \pm 0,81$  ml и  $B = 491,71 \pm 0,97$  mV са едно добро приближение до действителното  $A = V_o[A_R]_o/[T_O]_o = 291,2$  ml и теоретичното  $B = E_{Fe}^o - E_{RE} = 770 - 222 = 548$  mV (тук разликата е по-голяма заради условията на средата – различна йонна сила, рН и т.н.).

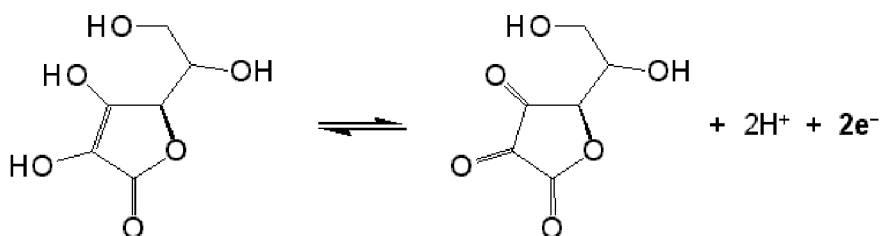
### 3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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 редутори с малки размери (като напр. дихидроксифумарат [17] или дитионит  $Na_2S_2O_4$  [18, 19]), 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) [20, 21]; или директно редуцирайки феритиновите молекули върху метален електрод [15].

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

Аскорбиновата киселина (AA) е широко разпространен редутор в живата природа и често се среща в подобен род изследвания [19, 22]. Тя притежава четири хидроксилни групи, две от които са отговорни за нейните редокс-свойства (фиг. 4). 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, което се отразява чувствително на механизма им на въздействие върху феритина.

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 AA 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

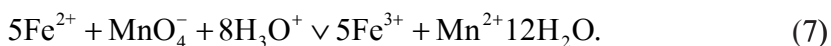


Фиг. 4. Двуетронно окисление на аскорбиновата киселина (AA)  
до дехидроаскорбинова киселина (DA)

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 AA поне отчасти прониква във вътрешната кухня на феритина.

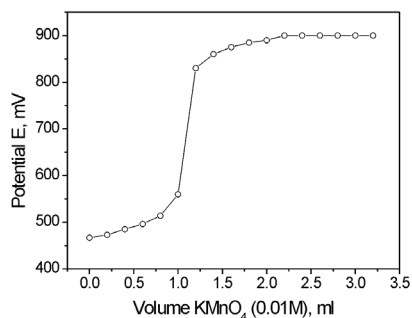
Каквито и да са подробностите в процеса на мобилизация на желязото под действие на аскорбиновата киселина, тук скромните ни усилия са насочени само към една ефективна оценка на крайното количество отделено желязо  $Fe^{2+}$ .

Редокс-титруването на  $Fe^{2+}$  може да се извърши с различни окисляващи агенти [16]. Един от най-често използваните е перманганатния йон  $MnO_4^-$  и както подсказват и нашите резултати (фиг. 5), 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

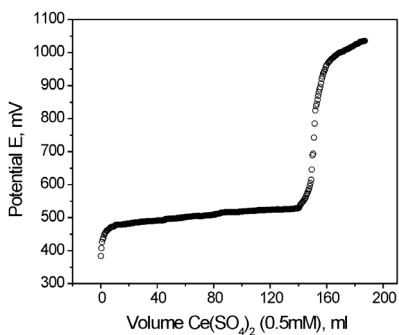


Перманганата обаче налага някои ограничения, свързани със специфичните черти на неговите реакции. Преди всичко в повечето случаи те са рН-зависими, както се вижда и от горния пример (уравнение 7). Освен това, тъй като манганът от  $MnO_4^-$  е в най-високото си окислено състояние (VII), той показва способност да окислява и други присъстващи компоненти чрез едно- или двуетронни реакции.

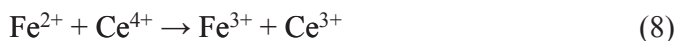
Поради тези причини тук сме избрали един друг окислител като титрант –  $Se^{4+}$ , известен със своята ефективност именно при определяне на  $Fe^{2+}$ . Предимствата му се дължат на факта, че хомогенната реакция между него и желязото (уравнение 8) е много бърза и протича почти напълно (с голяма равновесна константа  $K_{eq} \sim 6 \cdot 10^{15}$  [16]):



Фиг. 5. Крива на титруване за 30 ml железен сулфат,  $\text{FeSO}_4$  (1,83 mM) с перманганат,  $\text{MnO}_4^-$  (0,01 M) в 0,1 M KCl;  $V_t^{\text{eq}} = 1,1 \pm 0,1$  ml



Фиг. 6. Крива на титруване за 40 ml железен сулфат,  $\text{FeSO}_4$  (1,83 mM) с  $\text{Ce}^{4+}$  (0,5 mM) в 0,1 M KCl

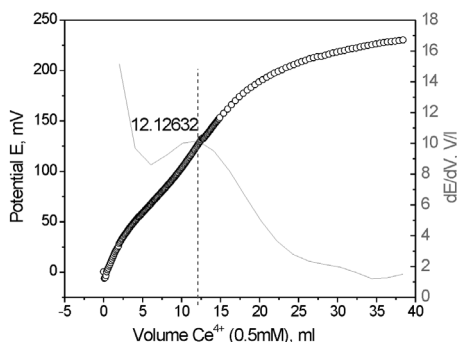


Като илюстрация по-долу е показана (фиг. 6) процедурата на калибриране – титруване на 40 ml  $\text{FeSO}_4$  (концентрация 1,83 mM) с  $\text{Ce}^{4+}$  (концентрация 0,5 mM).

По щастливо стечение на обстоятелствата  $\text{Ce}^{4+}$  не реагира така интензивно с аскорбиновата киселина, което дава възможност за една естествена селективност спрямо  $\text{Fe}^{2+}$ , 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  $\mu\text{l}$  феритин (100 mg/ml) бе поставено в съда за

титруване, след което бяха добавени 1 ml фталатен буфер (концентрация 27,5 mM) и 0,5 ml AA (100 mg/ml) и сместа бе разредена с 0,1M KCl до обем от 50ml. Така в крайно състояние разтворът съдържа 5,7 mM AA и 0,0844  $\mu$ M феритин. След период на инкубиране от 60 минути титруването започна с последователно добавяне към разтвора на аликвотни порции (0,1 ml) от титранта  $\text{Ce}^{4+}$  (концентрация 0,5 mM). Получената крива на титруване е дадена на фиг. 7.



Фиг. 7. Крива на титруване за анализираното количество  $\text{Fe}^{2+}$  с  $\text{Ce}^{4+}$  (0,5mM) в 0,1M KCl, заедно с нейната производна. Точките отговарят на експерименталните данни (лявата скала), а непрекъснатата 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 „странничната“ реакция между AA и  $\text{Fe}^{3+}$  в средата извън феритина:



Реакцията (9) предизвиква вторична редукция на част от окисленото (от  $\text{Ce}^{4+}$ ) 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 предишната фиг. Така става възможно точката на еквивалентност да бъде определена чрез инфлексията в близост до нея. Намирайки първата производна на експерименталната крива  $E = f(V_t)$ , получаваме максимум точно в тази точка, показваща момента на изравняване на количествата на титранта  $\text{Ce}^{4+}$  и анализа  $\text{Fe}^{2+}$ .

Тъй като максимумът се намира на ~12,13 ml от обема на титранта, имайки предвид, че концентрацията на  $\text{Ce}^{4+}$  в отделните порции е  $0,5 \text{ mM} = 0,5 \mu\text{mol/ml}$ , не е трудно да пресметнем, че количеството на отделеното  $\text{Fe}^{2+}$  е около  $6,065 \mu\text{mol}$ . Този резултат изглежда приемлив при условие, че концентрацията на феритина е  $0,0844 \mu\text{M}$  (имайки предвид, че той съдържа 1800 атома желязо в 1 молекула) и следователно цялото количество желязо ще бъде  $7,6 \text{ mmol}$ . 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.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При аеробни условия феритиновото минерално ядро претърпява редукция ( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ). Като следствие част от запасеното желязо се освобождава навън под формата на  $\text{Fe}^{2+}$ . Неговото общо количество в края на редукцията може да се определи надеждно чрез потенциометрично титруване на разтвора. Резултатите от представеното изследване показват, че окислителят  $\text{Ce}^{4+}$  служи като подходящ титрант в тази процедура поради благоприятния факт, че константата на равновесие в редокс реакцията му с  $\text{Fe}^{2+}$  е изключително висока. Въпреки че формата на кривата на титруване  $E = f(V_t)$  се променя поради вторичната реакция на  $\text{Fe}^{3+}$  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 в непосредствената им околност.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Theil, E.C. *J.Nutr.*, 2003, **133**, 1549S.
- [2] Liu, X., E. C. Theil. *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 167.
- [3] Hintze, K.J., E. C. Theil. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006, **63**, 591.
- [4] Harrison, P. M., P. Arosio. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, **1275**, 161.
- [5] Rice, D. W., G. C. Ford, J. L. White, J. M. A. Smith, P. M. Harrison. *Adv. Inorg. Biochem.*, 1983, **5**, 39.
- [6] Ford, G.C., P M. Harrison, D. W. Rice, J. M. A. Smith, A. Treffry, J. L. White, J. Yariv. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser.B*, 1984, **304**, 551.
- [7] Liu, X., W. Jin, E. C. Theil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 3653.
- [8] Bard, A. J., L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., New York, 2001.
- [9] Meites, L., J. A. Goldman. *Anal. Chim. Acta*, 1963, **29**, 472.

- [10] Watt, G. D. *Anal. Biochem.*, 1979, **99**, 399.
- [11] Watt, G. D., R. B. Frankel, G. C. Papaefthymiou. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, **82**(11), 3640.
- [12] Jacobs, D.L., G. D. Watt, R. B. Frankel, and G. C. Papaefthymiou. *Biochemistry*, 1989, **28**, 1650.
- [13] Martin, T. D., S. A. Monheit, R. J. Niichel, S. C. Peterson, C. H. Campbell, D. C. Zapien. *J. Electroanalytical Chem.*, 1997, **420**, 279.
- [14] Zapien, D. C., M. A. Johnson. *J. Electroanalytical Chem.*, 2000, **494**, 114.
- [15] Huang, H. Q., Q. M. Lin, T. L. Wang. *Biophys. Chem.*, 2002, **97**, 17.
- [16] Harvey, D. *Modern Analytical Chemistry*, New York, 2000.
- [17] Frey, R., M. Donlin, J. Bashkin. Ferritin Molecular-Graphics Tutorial, Washington University, St. Louis, MO, 1995. URL: [LabTutorials/Ferritin/FerritinTutorial.html](http://LabTutorials/Ferritin/FerritinTutorial.html).
- [18] Richards, T. D., K. R. Pitts, G. D. Watt. *J. Inorg. Biochem.* 1996, **61**, 1.
- [19] Zhang, Bo. Ferritin: Mechanistic studies and electron transfer properties, Ph.D. Thesis, Brigham Young University, 2006.
- [20] Sirivech, S., E. Frieden, S. Osaki. *Biochem. J.*, 1974, **143**, 311.
- [21] Watt, G. D., D. Jacobs, R. B. Frankel. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, **85**(20), 7457.
- [22] Laulhere, J-P., J-F. Briat. *Biochem. J.*, 1993, **290**, 693.