



УДК 577.112.4.088:543.062

УВЕЛИЧЕНИЕ ТОЧНОСТИ ПРЯМОГО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ИОДТИРОЗИНОВ И ТИРОКСИНА В ИОДИРОВАННЫХ БЕЛКАХ

Гуссаковский Е. Е., Бабаев Т. А.

Институт биохимии Академии наук УзССР, Ташкент

Путем рационального подбора длин волн точность спектрофотометрического определения иодированных аминокислотных остатков в белках увеличена в 2,6 – 7,0 раз.

Одной из важнейших характеристик любого количественного метода является ошибка, с которой проводится определение. Ранее нами был предложен прямой спектрофотометрический метод количественного определения иодированных остатков тирозина и тироксина в белках [1, 2]. Хотя ошибка этого метода не очень велика, она не является наименее возможной. Цель настоящей работы — подбор таких условий измерения, при которых ошибка определения моноиодтирозина, дииодтирозина и тироксина была бы наименьшей.

Измеряемый молярный коэффициент поглощения иодированного белка при длине волны λ ($310 \text{ нм} \leq \lambda \leq 360 \text{ нм}$) — E^λ — описывается выражением

$$E^\lambda = \varepsilon_1^\lambda c_1 + \varepsilon_2^\lambda c_2 + \varepsilon_3^\lambda c_3, \quad (1)$$

где c_i — содержание остатков соответственно моноиодтирозина, дииодтирозина и тироксина в моль/моль белка, а ε_i^λ — молярные коэффициенты поглощения этих остатков при длине волны λ . Для трех длин волн получаем систему линейных уравнений, имеющую единственное решение:

$$c_i = a_{1i} E^{\lambda_1} + a_{2i} E^{\lambda_2} + a_{3i} E^{\lambda_3}. \quad (2)$$

Коэффициенты a_{ji} зависят только от $\varepsilon_i^{\lambda_j}$ и могут легко быть вычислены, например, по методу Крамера [3].

Ошибка Δc_i определяется только коэффициентами a_{ji} и ошибками ΔE^{λ_j} . Если ошибки ΔE^{λ_j} являются стандартными, то справедливо выражение (3) (ср. [3]):

$$\Delta c_i = [(a_{1i})^2 (\Delta E^{\lambda_1})^2 + (a_{2i})^2 (\Delta E^{\lambda_2})^2 + (a_{3i})^2 (\Delta E^{\lambda_3})^2]^{1/2}. \quad (3)$$

Если принять, что ошибки $\Delta E^{\lambda_j} \leq \Delta A/c$, где c — концентрация белка, а ΔA — максимальная ошибка измерения поглощения при всех значениях λ , то выражение (3) можно упростить до

$$\Delta c_i \leq P_i \Delta E, \quad (4)$$

где величина $P_i = [(a_{1i})^2 + (a_{2i})^2 + (a_{3i})^2]^{1/2}$ отражает ошибку метода, а величина $\Delta E = \Delta A/c$ — ошибку измерения.

Хотя выражение (4) дает несколько завышенное значение ошибки Δc_i , оно позволяет вычислить ее гораздо проще.

Ошибка Δc_i может быть уменьшена только уменьшением P_i и (или) ΔE . Величина ΔE полностью определяется условиями измерения спектра поглощения и может быть уменьшена либо повышением концентрации белка, либо понижением ошибки измерения поглощения. Рассмотрим пути уменьшения величины P_i .

Молярные коэффициенты поглощения

λ , нм	ε , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$			λ , нм	ε , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$		
	моноидтиро- зин	диидти- розин	тироксин		моноидтиро- зин	диидти- розин	тироксин
314	3700	4490	4670	328	1100	3160	5720
316	3340	4410	4780	330	880	2780	5760
318	2890	4350	5000	332	750	2340	5720
320	2460	4250	5220	334	620	1960	5640
322	2050	4060	5440	336	510	1590	5500
324	1690	3970	5540	338	410	1280	5390
326	1340	3680	5650	340	300	1040	5220

Таблица 2

Содержание иодированных аминокислотных остатков в тиреоглобулине (моль/моль белка), определенное с помощью уравнений (5) (а) и рекуррентных уравнений, приведенных в работах [1, 2] (б)

Препарат	Моноидтирозин		Диидтирозин		Тироксин	
	а	б	а	б	а	б
Нативный	3,5±0,2	4,1±0,4	7,0±0,2	6,4±0,3	2,4±0,4	2,4±0,4
Дополнительно иодиро- ванный	5,4±0,9	5,4±2,7	15,5±0,9	15,8±1,6	2,1±0,3	2,1±1,9

При составлении системы из уравнений (1) можно пользоваться любой тройкой длин волн из указанной области. Нетрудно видеть, что при $\Delta\lambda \approx 2$ нм в этой области можно выбрать около 25 длин волн, а число троек длин волн и соответствующих им систем уравнений равно $C_{25}^3 = 2300$ (при увеличении спектрального разрешения это число будет резко возрастать). Каждой системе уравнений будет соответствовать своя тройка решений (2), а каждой c_i из этой тройки — свой набор коэффициентов a_{ji} и соответствующая ему величина P_i . Будем рассматривать любую из трех величин P_i , например P_1 , поскольку все они равноправны. Очевидно, среди всевозможных троек длин волн и соответствующих наборов решений можно найти такое, в котором P_1 было бы наименьшим для всех наборов. При этом для P_2 или P_3 подобные тройки могут быть другими. Ясно, что наименьшей величине P_i будет соответствовать наименьшая ошибка Δc_i при одной и той же ошибке измерения ΔE . Тройка длин волн 315, 325 и 335 нм, предложенная ранее [1, 2], была выбрана произвольно.

Исходные данные о молярных коэффициентах поглощения иодитиозинов и тирокина в 8 М растворе мочевины при pH 9,2 [1, 2] представлены в табл. 1. С помощью ЭВМ был выполнен подбор троек длин волн, отвечающий минимальным значениям P_1 , P_2 и P_3 . Результаты такого подбора представлены в виде уравнений (5), которые, таким образом, позволяют определить значения c_i с минимальной ошибкой. Значения E в этих уравнениях (в $10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$; индексы отвечают длинам волн) следует использовать с учетом вклада светорассеяния [4, 5].

$$\begin{aligned}
 c_1 &= 0,496E^{314} - 0,691E^{326} + 0,304E^{340} \\
 c_2 &= -0,197E^{314} + 0,666E^{326} - 0,545E^{340} \\
 c_3 &= 0,022E^{314} - 0,097E^{324} + 0,275E^{340}
 \end{aligned} \quad (5)$$

При этом ошибки Δc_i будут составлять: $\Delta c_1 = 0,903\Delta E$, $\Delta c_2 = 0,883\Delta E$ и $\Delta c_3 = 0,292\Delta E$ (оценка ошибок до оптимизации метода [1, 2]: $\Delta c_1 = -2,357\Delta E$, $\Delta c_2 = 1,800\Delta E$, $\Delta c_3 = 2,047\Delta E$). Эти ошибки являются наименьшими для значений молярных коэффициентов поглощения иодитиозинов

и тироксина, приведенных в табл. 1. Увеличив число длин волн за счет улучшения спектрального разрешения до 1 нм, можно еще уменьшить эти ошибки. Однако, как показал соответствующий расчет, ошибки в том случае уменьшаются только на 20–40%, в то время как спектральное разрешение 1 нм трудно достижимо на спектрофотометрах среднего класса при оптических плотностях около 1.

Минимальная концентрация белка, необходимая для измерения содержания иодтирозинов и тироксина с точностью $\Delta c_i \leq 1$ моль/моль белка, должна составлять при $\Delta A = 0,001$ не более $\Delta A P_{\max} / \Delta c_i = 9,03 \cdot 10^{-7}$ М, что в 2,6 раза меньше, чем для рекуррентных формул, предложенных ранее [1, 2]. При этой концентрации ошибка определения тироксина $\Delta c_3 = 0,3$ моль/моль белка, что особенно важно, поскольку содержание тироксина в иодированных белках обычно не превышает 2–3 моль/моль белка.

В табл. 2 приведено содержание иодтирозинов и тироксина в интактном и дополнительно иодированном тиреоглобулине, полученное по формулам (5) и по рекуррентным формулам из работы [1]. Тиреоглобулин — природно-иодированный белок [6], в котором при дополнительном иодировании появляются новые остатки иодтирозинов и тироксина. Согласно представленным данным, точность определения иодаминокислотных остатков при использовании оптимальных троек длин волн возрастает до максимальной величины, допускаемой разрешением 2 нм. Необходимо отметить, что это повышение точности позволяет уменьшить ошибку до величины менее 1 моль/моль белка при тех же концентрациях белка, что особенно важно для определения содержания тироксина.

Безусловно, уменьшения ошибки при определении содержания иодтирозинов и тироксина можно добиться увеличением концентрации белка, однако это не всегда желательно и возможно. Выбор же оптимальных троек длин волн позволил повысить точность без повышения концентрации белка.

Заметим, что выражение (3), так же как и выражение (4), допускает минимизацию ошибки Δc_i путем подбора тройки длин волн. Однако в этом случае величина ΔE зависит от λ и потому должна быть включена в процесс минимизации. Это приводит к тому, что возникает необходимость использования ЭВМ при каждом конкретном определении содержания иодтирозинов и тироксина, что существенно усложняет метод и в то же время увеличивает его точность всего на 10–30%.

Экспериментальная часть

Для выбора оптимальных троек длин волн использовали специальную ФОРТРАН-программу, алгоритм которой состоит в следующем. Выбираются три строки в табл. 1, соответствующие трем длинам волн. Вычисляется определитель Δ полученной квадратной матрицы и три минора A_j к первому столбцу. Поскольку $A_j / \Delta = a_{j1}$, квадратный корень из суммы квадратов этих миноров, деленный на определитель, дает значение P_1 . Далее выбирается другая тройка строк, вычисляется соответствующая величина P_1 , которая сравнивается с полученной ранее, и запоминается та тройка длин волн, для которой P_1 будет меньше. Эта операция сравнения повторяется до тех пор, пока не будут перебраны все возможные комбинации из троек строк. В результате будет запомнена та тройка, для которой величина P_1 будет наименьшей. То же повторяется для миноров ко второму и третьему столбцу. Расчеты проводили на ЭВМ ЕС 1033.

Гомогенный при аналитическом ультрацентрифугировании и электрофорезе в ПААГ бычий тиреоглобулин был любезно предоставлен А. А. Налбадиян [6, 7]. Иодирование тиреоглобулина производили водным раствором $KI + I_2$ [8] (200 моль I_2 на 1 моль белка, рН 8,1, 37°С). Концентрацию белка в растворе определяли спектрофотометрически, исходя из коэффициента поглощения при 280 нм 0,9 мл/мг [9] и молекулярного веса $6,7 \cdot 10^5$ [6].

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Hitachi EPS-3T (Япония). Пропускание растворов в области 314–340 нм составляло 0,9–0,2, а ошибка в его измерении — 0,002 (0,001 единиц оптической плот-

ности). Величину пропускания переводили в единицы оптической плотности с помощью четырехзначной таблицы. Вклад светорассеяния в поглощение определяли с помощью специальной номограммы [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gussakovsky E. E., Babaev T. A.* J. Mol. Med., 1980, v. 4, № 1–2, p. 247–249.
2. *Гуссаковский Е. Е., Бабаев Т. А., Туракулов Я. Х.* Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 1, с. 46–50.
3. *Гутер Р. С., Овчинский Б. В.* Элементы численного анализа и математической обработки результатов опыта. М.: Наука, 1970, с. 56–63.
4. *Winder A. F., Gent W. L. C.* Biopolymers, 1971, v. 10, № 4, p. 1243–1251.
5. *Гуссаковский Е. Е., Абрамов А. А.* Химия природн. соедин., 1980, № 5, с. 740–741.
6. *Туракулов Я. Х., Бабаев Т. А., Саатов Т. С.* Иодпротеины щитовидной железы. Ташкент: ФАН, 1974, с. 17–29.
7. *Mouris Y., Stanbury Y. B.* Canad. J. Biochem., 1968, v. 46, № 1, p. 51–54.
8. *Wenzel K. W., Rotzsch W.* Acta biol. and med. Germ., 1967, v. 19, p. 803–808.
9. *Гуссаковский Е. Е., Абрамов А. А., Бабаев Т. А., Гуламов Т. Г., Горина О. В.* Биохимия, 1980, т. 45, вып. 5, с. 802–805.

Поступила в редакцию
10.VI.1983

ENHANCEMENT OF THE ACCURACY OF DIRECT SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR QUANTITATION OF IODOTYROSINES AND THYROXINE IN IODINATED PROTEINS

GUSSAKOVSKY E. E., BABAEV T. A.

*Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the Uzbek SSR, Tashkent*

The accuracy of spectrophotometric quantitation of iodinated amino acid residues in proteins was enhanced 2,6–7,0-fold by appropriate choice of wavelengths.