

УДК 577.153.4 : 541.13

ИОНОСЕЛЕКТИВНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

Е. А. Матерова, Е. Б. Никольская

Данный обзор посвящен применению различных типов ионоселективных электродов для изучения активности и каталитических свойств холинэстераз, а также для химического анализа с участием этих энзимов. Рассмотрены работы с применением мембранного «субстратного» электрода, рН-стеклянного электрода, окислительно-восстановительного платинового электрода, а также поликристаллического электрода на основе сульфида серебра. Приведены также работы с ферментными электродами на основе иммобилизованных холинэстераз. Обсуждены преимущества и недостатки отдельных методов, использующих различные типы ионоселективных электродов.

Библиография — 66 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

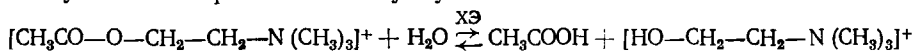
I. Введение	1937
II. «Субстратный» электрод	1938
III. Применение рН-стеклянного электрода	1939
IV. Другие ионоселективные электроды	1940
V. Ферментные электроды с использованием холинэстераз	1941
VI. Заключение	1943

I. ВВЕДЕНИЕ

Особое внимание к изучению холинэстераз (ХЭ) объясняется не только физиологическим значением этого фермента, который играет существенную роль в передаче нервного импульса, но и его большим практическим значением в медицине, токсикологии, фармакологии, направленном синтезе некоторых пестицидов, в аналитической химии. По уровню активности этого фермента диагностируют некоторые заболевания, определяют отравления некоторыми фосфорорганическими соединениями и карбамидами. Холинэстераза является мишенью действия некоторых инсектоакарецидов и, следовательно, для их направленного синтеза необходимо знать особенности свойств холинэстераз различных животных. В аналитической химии ферментативный анализ фосфорорганических соединений и карбаматов по холинэстеразной активности является уникальным по своей чувствительности и избирательности.

Холинэстераза является высокоспецифичным катализатором гидролиза холиновых эфиров и их тиопроизводных, а также катализатором гидролиза некоторых ароматических и алифатических эфиров карбоновых кислот¹. Холинэстеразы, которые гидролизуют с наибольшей скоростью ацетилхолин, получили название истинные холинэстеразы или ацетилхолинэстеразы (АХЭ) (К.Ф. 3.1.1.7), а холинэстеразы, гидролизующие с наибольшей скоростью другие холиновые эфиры (бутирилхолин, пропионилхолин, бензоилхолин и т. д.) называют ложными холинэстеразами или холинэстеразами (К.Ф. 3.1.1.8). Природным субстратом холинэстераз является ацетилхолин, при ферментативном гидролизе которо-

го получается спирт — холин и уксусная кислота:



Все исследования холинэстераз, связанные с их каталитическими свойствами, обязательно включают определение активности фермента или скорости ферментативного гидролиза. Для решения этих задач наряду с другими методами^{2,3} широкое применение нашли ионоселективные электроды. Высокая избирательность, достаточно высокая чувствительность метода, возможность автоматизации при сравнительной простоте проведения анализа и несложности приборного оформления сделали ионометрию весьма привлекательным, а иногда незаменимым методом изучения свойств и активности холинэстераз, а также анализа их субстратов, ингибиторов и активаторов^{4,5}.

При исследованиях холинэстераз могут использоваться ионоселективные электроды, чувствительные либо к субстрату, например к холиновым эфирам, либо к продуктам гидролиза — спирту или кислоте.

II. «СУБСТРАТНЫЙ» ЭЛЕКТРОД

В настоящее время используется только один ионоселективный мембранный электрод, чувствительный к холиновым эфирам, который получил название субстратного электрода⁶. Электрод основан на жидкостной мембране (5%-ный раствор тетра(парахлорфенил)бората ацетилхолина в 3-о-нитроксилале) и является первым ионоселективным электродом, чувствительным к органическим катионам. Этот электрод предложен впервые Баумом для исследования холиновых эфиров, впоследствии был использован им для определения холинэстеразной активности⁷, кинетических характеристик АХЭ и ХЭ^{8,9} и их субстратной специфичности⁹.

При изучении селективности этого электрода по отношению к различным холиновым эфирам⁹ оказалось, что она повышается от холина к бензоилхолину в 10^5 раз в следующей последовательности: холин < ацетилхолин < пропионилхолин и ацетилметилхолин < бутирилхолин < валерилхолин < бензоилхолин. Чувствительность электрода к ионам щелочных металлов⁷ оказалась очень малой по сравнению с ацетилхолином: так, для ионов калия и аммония чувствительность меньше в 10^3 раз, а для ионов натрия даже в — 10^4 раз. Определенные с помощью субстратного электрода кинетические характеристики ферментативного гидролиза (константа Михаэлиса и максимальная скорость) для АХЭ электрического органа угря и ХЭ сыворотки крови лошади находятся в удовлетворительном согласии с имеющимися в литературе значениями этих величин¹⁰. Баум и сотр.⁹ успешно использовали электрод и для анализа биологических сред — для определения холинэстеразной активности в крови.

Недостатком метода «субстратного электрода» для кинетических исследований является уменьшение его чувствительности при увеличении концентрации холиновых эфиров, практически ограничивающая область его применения пределом концентрации субстрата немногим больше 10^{-3} М, поскольку оптимальным вариантом проведения ферментативного гидролиза и регистрации его скорости по изменению концентрации субстрата является прохождение гидролиза на 5% за приемлемый для опыта промежуток времени; этого нельзя ожидать при концентрации субстрата $>10^{-3}$ М. Для изучения действия необратимых ингибиторов при проведении ингибиторного анализа субстратный электрод применять, по-видимому, тоже нельзя, так как для прекращения действия ин-

гибитора требуется большая концентрация субстрата ($\sim 10^{-2}$ М)¹¹⁻¹³. Кроме того, следует отметить, что большая группа обратимых и некоторые из необратимых ингибиторов холинэстераз содержат в своей структуре группу четвертичного азота¹ и могут вследствие этого заметно влиять на показания субстратного электрода.

III. ПРИМЕНЕНИЕ рН-СТЕКЛЯННОГО ЭЛЕКТРОДА

Исторически первым ионоселективным электродом, использованным для определения активности холинэстераз, был стеклянный рН-электрод^{14, 15}.

В работе¹⁶ был предложен метод, основанный на измерении скорости изменения рН реакционной среды за счет накопления в ней уксусной кислоты при ферментативном гидролизе ацетилхолина в небуферной или слабобуферной среде. Автор¹⁶ использовал этот метод для изучения холинэстеразной активности эритроцитов и плазмы крови. Метод получил название «Δ рН».

Исключительная простота метода «Δ рН», его высокая чувствительность привлекла к нему внимание многих исследователей, которые модифицировали метод, внося в него ряд усовершенствований^{4, 17-35}. Метод «Δ рН» нашел применение в клинических исследованиях холинэстераз^{18, 20-22, 24, 25, 28}, в токсикологии^{18, 19, 23, 26}, фармакологии²⁶, для изучения ингибиторов и инсектицидов^{17, 18, 23}, в аналитической химии для массовых экспресс-анализов^{5, 36} (до 50 анализов в час). Следует отметить, что известные сейчас холинэстеразные ферменты электроды^{5, 37-40}, описанные ниже, также имеют в основе метод «Δ рН».

Однако наряду с многими положительными качествами метод «Δ рН» имеет и ряд недостатков. Во-первых, этот метод требует дополнительной калибровки для получения абсолютных значений активности холинэстераз³¹⁻³⁴. Во-вторых, чувствительность метода резко зависит от буферности системы, так что он может быть использован только для небуферных и слабобуферных сред. В-третьих, значительные ошибки связаны с влиянием СО₂ воздуха, следовательно, необходима хорошая защита от СО₂.

Часть этих недостатков удается избежать в методе потенциометрического титрования при постоянном рН, где накапливающаяся при гидролизе кислота оттитровывается щелочью^{14, 15, 41-49}. Титрование можно осуществлять автоматически⁵⁰⁻⁵².

В модификации Яковлева⁴⁹ с применением бюретки-капилляра метод потенциометрического титрования оказался очень удобным для кинетических исследований; трудно указать область изучения холинэстераз, где бы его не применяли. Григорьева⁵³ предложила еще одно усовершенствование метода — подтитровку субстратом одновременно с титрованием выделяющейся кислоты щелочью, что позволило проводить исследования при очень малых постоянных концентрациях субстрата ($1 \cdot 10^{-5}$ М). Такие низкие концентрации субстрата можно использовать только в методе субстратного электрода.

Метод потенциометрического титрования стал своеобразным стандартом при апробации других новых методов изучения активности холинэстераз. Следует однако отметить ограничения этого метода: его применению мешают СО₂ воздуха и высокая буферность среды; необходимы сравнительно большие объемы растворов реагирующих веществ, так как при уменьшении объема реакционной среды заметно уменьшается точность метода.

IV. ПРИМЕНЕНИЕ ДРУГИХ ИОНОСЕЛЕКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Как уже отмечалось, ион водорода — первым из продуктов холинэстеразного гидролиза стал объектом ионометрии. В настоящее время ионометрия настолько далеко продвинулась вперед как в качественном, так и в количественном отношении, что стало возможно использовать для изучения холинэстераз и другие ионы — продукты ферментативного гидролиза. Ионоселективные мембранные электроды на основе трифторацильных групп, чувствительные к анионам ацетата, пропионата и бутирата разработаны в лаборатории ионометрии Ленинградского государственного университета⁵⁴ и использованы для определения активности холинэстераз в лаборатории химии биологически активных веществ Института эволюционной физиологии и биохимии. Опыты показали, что определять активность холинэстеразы таким способом можно; однако исследуемые электроды оказались недостаточно избирательны к анионам карбоновых кислот в присутствии анионов хлора и брома в 100—1000-кратном избытке по сравнению с определяемым ионом. Исключить мешающие ионы обычно нельзя или достаточно трудно. Поэтому для успешного применения этого метода необходимо иметь другие анион-чувствительные ионоселективные электроды с большей избирательностью к исследуемым анионам в присутствии Br^- и Cl^- .

Изучение активности холинэстераз можно проводить по другому продукту гидролиза — спирту, например холину, который имеет катионную группу четвертичного азота. Холиновый электрод существует⁵⁵, но пока нет сведений о его применении для анализа холинэстеразного гидролиза.

Более удачным объектом для применения ионометрии оказался тиохоллин. Дело в том, что тиохоллин за счет $-\text{SH}$ -группы является сравнительно сильным восстановителем, окисляясь многими окислителями, в том числе и кислородом воздуха, до дисульфида (окислительно-восстановительный потенциал этой системы $\sim 300 \text{ мВ}$); это позволяет для определения количеств тиохолина использовать окислительно-восстановительные электроды. Кроме потенциометрических методов при определении тиохолина также используются амперометрические и полярографические^{3, 56}. В данном обзоре рассмотрены только потенциометрические методы.

В 1962 г. авторы работы⁵⁷ использовали платиновые электроды для определения активности холинэстераз с тиоловыми эфирами по количеству тиохолина. Два платиновых электрода и электрод сравнения (хлорсеребряный электрод) помещали в буферный раствор фермента, к которому добавляли раствор иодистого калия. Через раствор пропускали небольшой постоянный ток (5—25 $\mu\text{А}$); при этом на аноде выделялся свободный иод в небольшом постоянном количестве. Платиновый анод и электрод сравнения подсоединяли к потенциометру. При пропускании тока на аноде возникала постоянная разность потенциалов ($\sim 400 \text{ мВ}$). После добавления в реакционную смесь субстрата тиохолинового эфира начинался ферментативный гидролиз, в результате которого в системе появлялся более активный, чем I^- , восстановитель тиохоллин, который вызывал деполяризацию электрода и снижал разность потенциалов. При этом скорость падения потенциала в одном и том же интервале, например от 300 до 100 мВ : оказалась прямо пропорциональна активности холинэстеразы, а конечное значение потенциала зависело от концентрации тиохолинового эфира^{4, 58}. Метод обладает хорошей чувствительностью и высокой точностью ($\sim 1,5\%$); имеется возможность автоматизировать анализ⁵⁹. Авторы метода успешно применили

его для анализа фосфорорганических соединений и карбаматов⁶⁰. Следует отметить, что применение платиновых электродов заставляет с осторожностью относиться к использованию этого метода для исследования сред с большим количеством белка, так как при этом может произойти «отравление» платины.

Для определения количества тиола, получающегося при гидролизе тиохолиновых эфиров, используется также HS-чувствительный ионоселективный электрод с поликристаллической мембраной на основе Ag_2S ^{5, 61, 62}. Этот метод обладает высокой чувствительностью, сочетающейся с достаточной точностью. Однако показания HS-электрода во времени неустойчивы, по-видимому, из-за эрозии поверхности, что заметно ограничивает его применение для определения активности холинэстераз⁵. Более надежные результаты получаются при потенциометрическом титровании с серебряным электродом⁶³.

V. ФЕРМЕНТНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

Для использования холинэстераз в аналитических целях удобным является разработанное в⁶⁴ устройство, которое сочетает иммобилизованный фермент с соответствующим ионоселективным электродом; оно получило название ферментный электрод. Ферментные электроды обладают высокой избирательностью и позволяют анализировать не только ионы, но и неионные органические вещества⁶⁵.

В обзоре Гильбо⁵, посвященном применению ферментных электродов в аналитической химии, описан холинэстеразный ферментный электрод, где растворы холинэстеразы иммобилизованы на поверхности стеклянного рН-электрода с тонкой мембраной*. Кроме раствора ХЭ, авторы³⁷ таким же способом иммобилизовали раствор субстрата, что позволило им не только определять концентрацию ингибиторов в реакционной среде, но и оценивать активность ХЭ в биологических пробах. Однако метод не получил широкого практического применения из-за технической сложности изготовления электрода и его недолговечности, что в большой степени определяется способом иммобилизации фермента.

В этом отношении, по-видимому, большое преимущество имеет способ ковалентного связывания фермента с инертным белком. Такой способ иммобилизации для ацетилхолинэстеразы разработан группой французских исследователей⁶⁶, что дало им возможность приготовить ацетилхолинэстеразный электрод^{38, 39} для определения концентрации ацетилхолина и ингибиторов холинэстераз — прозерина и эзерина. За два месяца активность иммобилизованного фермента уменьшалась на 90%; чувствительность электрода по ацетилхолину составляла $1 \cdot 10^{-4}$ М. Зависимость потенциала электрода от логарифма концентрации ацетилхолина (АХ) в диапазоне концентраций 10^{-4} — 10^{-2} М при рН 8,5 сохранялась линейно ($\Delta E/\lg [\text{АХ}] \sim 35$ мВ). При увеличении концентрации ацетилхолина выше 10^{-2} М величина электродного потенциала практически не менялась. Таким образом, ацетилхолинэстеразный ферментный электрод для измерения концентрации ацетилхолина значительно проигрывает по сравнению с описанным выше субстратным электродом. Однако при измерении концентрации некоторых ингибиторов АХЭ, например никотина, а особенно прозерина (неостигмина) и эзерина (физостигмина), ферментный электрод является весьма чувствительным. Так, линейная зависимость потенциала от логарифма концентрации инги-

* Этот электрод был сделан Кроше и Монтальво в 1973 г.³⁷

Краткая характеристика основных потенциометрических методов определения активности холинэстераз (в оптимальных условиях)

Метод	Ионоселективный электрод	Измеряемый ион	Чувствительность метода			Точность метода	Ограничения метода
			по активности фермента, мг^{-1}	по концентрации субстрата, М	по концентрации продукта гидролиза		
« ΔpH »	pH-электрод (стеклянный)	ион водорода	0,02	$(1 \div 2) \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$\sim 10\%$	небуферная и малобуферная среда; мешает присутствие CO_2 ; требуется специальная калибровка
Потенциометрическое титрование при постоянном pH щелочью	pH-электрод (стеклянный)	ион водорода	0,01—0,02	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$\sim 4\%$	малобуферная среда; мешает присутствие CO_2 ; нужен большой объем реакционной смеси (~ 10 мл)
Метод субстратного электрода	мембранный ионоселективный электрод, чувствительный к холинным эфирам	органические катионы: АХ, ПрХ, БуХ и других холиновых эфиров	0,01—0,02	$1 \cdot 10^{-5}$	—	$\sim 8\%$	нельзя применять высокие концентрации субстрата ($> 10^{-3}$ М); мешает присутствие других соединений четвертичного азота
Окислительно-восстановительная потенциометрия	окислительно-восстановительные электроды	ион тиохолина	0,005	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$\sim 1,5\%$	мешает белковая среда; нужна дополнительная установка для проведения электролиза; метод требует калибровки; можно использовать только тиохолиновые эфиры.

битора в растворах эзерина наблюдается до $5 \cdot 10^{-8}$ М, для прозерина до $5 \cdot 10^{-7}$ М, что позволяет считать метод ферментного электрода весьма перспективным для анализа.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение возможностей самых распространенных методов: «Δ рН», потенциометрическое титрование с рН-электродом, субстратный электрод и окислительно-восстановительный метод Гильбо для тиохолиновых эфиров (см. таблицу) показывает, что несмотря на большое число методов (с учетом их модификации), ни один из них не является универсальным. В каждом конкретном исследовании приходится тщательно выбирать подходящий метод, который тем не менее вносит значительные ошибки в полученные результаты, часто превышающие случайные ошибки измерений.

Все это приводит к необходимости искать и создавать новые ионоселективные электроды, применение которых усовершенствовало бы методы исследования холинэстераз. С нашей точки зрения, такие поиски должны идти по пути создания новых, более чувствительных «субстратных» электродов, анion-чувствительных электродов к карбоксил-ионам с высокой избирательностью в присутствии галогенидных ионов, холинного электрода с высокой избирательностью в присутствии холиновых эфиров.

Второе направление — это создание новых ферментных электродов на основе использования препаратов холинэстераз. Для его успешного развития необходимо промышленное получение высокоактивных и стабилизированных препаратов холинэстераз, разработка новых методов их иммобилизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Handbuch der Experimentellen Pharmacologie, Cholinesterases and Anticholinesterases Agents, G. Coelle, Springer Verlag, Berlin — N. Y., 1963.
2. Methods Enzymatic Analysis, ed. N. U. Bergmeyer, Acad. Press, N. Y. — London, 1965.
3. G. G. Guilbault, Enzymatic Methods of Analysis, Pergamon Press, N. Y., 1970.
4. C. D. Christian, Advances in Biomedical Engineering and Medical Physics, 4, 95 (1970).
5. G. G. Guilbault, Comprehensive Analytical Chemistry, 8, 1 (1977).
6. G. Baum, Anal. Letters, 3, 105 (1970).
7. G. Baum, Anal. Biochem., 42, 65 (1971).
8. G. Baum, F. B. Ward, S. Yaverbaum, Clin. Chim. Acta, 36, 405 (1972).
9. G. Baum, F. B. Ward, Anal. Biochem., 42, 487 (1971).
10. А. П. Бресткин, Ю. Г. Жуковский, Т. М. Сипенкова, Биохимия, 39, 13, (1974).
11. А. П. Бресткин, Р. И. Волкова, Е. В. Розенгарт, ДАН СССР, 157, 1459 (1964).
12. Р. И. Волкова, Биохимия, 30, 292 (1965).
13. А. П. Бресткин, Е. В. Розенгарт, Реакц. способн. орг. соед., 3, 231 (1966).
14. D. Glick, Biochem. J., 31, 521 (1937).
15. G. Scos, C. Cattameo, Enzymologia (Italian), 4, 157 (1937).
16. H. O. Michel, J. Lab. Clin. Med., 34, 1564 (1949).
17. P. A. Giang, S. A. Nall, Anal. Chem., 23, Suppl. 156, 1 (1959).
18. D. O. Namblin, J. F. Marchand, Cholinesterase Test and Their Applicability in the Field, American Cyanamid Co., N. Y., 1951.
19. J. F. Marchand, J. Amer. Med. Ass., 149, 738 (1952).
20. W. N. Aldridge, D. R. Davies, Brit. Med. J., 1, 945 (1952).
21. J. H. Wolfsie, Arch. Indust. Health, 16, 403 (1957).
22. J. H. Wolfsie, C. D. Winter, Arch. Indust. Hyg., 6, 43 (1952).
23. J. H. Tryer, R. G. D. Steel, H. H. Williams, Arch. Indust. Health, 12, 406 (1955).
24. J. M. O. Alcalde, J. Lab. Clin. Med., 36, 391 (1950).
25. W. E. MacDonald, C. B. Pollard, A. H. Gropp, Arch. Indust. Hyg., 6, 241 (1952).
26. J. P. Frawley, H. N. Fuyat, E. C. Hagan, O. G. Fitzhugh, J. Pharmacol. Exp. Ther., 105, 156 (1952).
27. S. Shibata, H. Takahashi, Bull. Yamagushi Med. School, 1, 188 (1953).

28. D. N. Molander, M. M. Friedman, J. S. La Due, *Ann. Intern. Med.*, **41**, 1139 (1954).
29. J. Grégoire, M. Cotte, J. Grégoire, N. Limozin, *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*, **37**, 65 (1955).
30. S. Greenberg, C. Calvert, *Med. Techn. Bull.*, **8**, 59 (1957).
31. L.-E. Tammelin, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **5**, 267 (1953).
32. L.-E. Tammelin, H. Low, *Acta Chem. Scand.*, **5**, 322 (1951).
33. L.-E. Tammelin, B. Strindberg, *Там же*, **6**, 1021 (1952).
34. D. W. Eysel, H. J. Frurnit, S. D. Silver, E. C. Steiner, *Anal. Chem.*, **28**, 408 (1956).
35. D. A. Courville, W. Ledington, *J. Biol. Chem.*, **190**, 575 (1951).
36. G. G. Guilbault, K. Gibson, *Anal. Chim. Acta*, **76**, 245 (1975).
37. K. L. Crochet, J. G. Montalvo, *Там же*, **66**, 259 (1973).
38. C. T. Minh, R. Guyonnet, J. Beax, *Compt. rend.*, **286c**, 115 (1978).
39. C. T. Minh, R. Guyonnet, *Там же*, **286c**, 357 (1978).
40. P. Duraket, *Biochem. Biophys. Acta*, **527**, 277 (1978).
41. G. A. Alles, R. C. Hawes, *J. Biol. Chem.*, **133**, 375 (1940).
42. M. C. Sanz, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **2**, 29 (1944).
43. N. Schümmelfeder, *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, **204**, 454 (1947).
44. A. L. Delannois, H. Casier, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **75**, 371 (1948).
45. W. S. H. M. Mommaerts, P. A. Khairallah, M. F. Dickens, *Circuleit. Res.*, **1**, 460 (1953).
46. B. N. Smallman, L. S. Wolfe, *Enzymologia*, **17**, 133 (1955).
47. A. B. Hargreaves, *An. Acad. Bras. cienc.*, **25**, 291 (1953).
48. A. B. Hargreaves, da Silva, *Hospital (Rio de J.)*, **55**, 99 (1959).
49. В. А. Яковлев, Кинетика ферментативного катализа, «Наука», М., 1965.
50. J. B. Neillands, M. D. Cannon, *Anal. Chem.*, **27**, 29 (1955).
51. L. Larsson, B. Hansen, *Svensk. kem.*, **68**, 521 (1956).
52. J. Jensen-Holin, H. H. Lansen, K. Miethers, K. O. Moller, *Acta Pharmac.*, **15**, 304 (1959).
53. Г. М. Григорьева, Биохимия, **29**, 716 (1964).
54. Е. А. Матерова, С. А. Овчинникова, В. С. Караван, *Электрохимия*, **25**, 1185 (1979).
55. Н. Лакимидараянайах, Мембранные электроды, «Химия», Л., 1979.
56. G. G. Guilbault, *Comprehensive Anal. Chem.*, **8**, 71 (1977).
57. G. G. Guilbault, D. N. Kramer, P. L. Cannon, *Anal. Chem.*, **34**, 842 (1962).
58. G. G. Guilbault, D. N. Kramer, P. I. Goldberg, *Anal. Biochem.*, **5**, 208 (1963).
59. E. K. Bauman, L. H. Goodson, G. G. Guilbault, D. N. Kramer, *Anal. Chem.*, **37**, 1378 (1965).
60. G. G. Guilbault, D. N. Kramer, P. L. Cannon, *Там же*, **34**, 1437 (1962).
61. W. R. Hussein, L. N. von Storp, G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta*, **61**, 89 (1972).
62. G. G. Guilbault, L. N. von Storp, *Там же*, **62**, 425 (1972).
63. L. H. Gruen, B. S. Harrap, *Anal. Biochem.*, **42**, 377 (1971).
64. Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes, *Pure Appl. Chem.*, **48**, 127 (1976).
65. Е. А. Матерова, Т. Я. Барт, сб. Ионный обмен и ионометрия, вып. 2, 73 (1979).
66. C. T. Minh, E. Selegny, C. Broun, *Comp. rend.*, **275c**, 309 (1972).

Ленинградский государственный
университет
Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР,
Ленинград