

УДК 543.2+577.150.87

Определение ионов металлов с использованием нативных и иммобилизованных ферментов

Т. Н. Шеховцова, С. В. Мугинова, И. А. Веселова

ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА ШЕХОВЦОВА — доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: аналитическая химия, ферментативные методы анализа.

СВЕТЛАНА ВАЛЕНТИНОВНА МУГИНОВА — кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: аналитическая химия, ферментативные методы анализа.

ИРИНА АНАТОЛЬЕВНА ВЕСЕЛОВА — кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: аналитическая химия, ферментативные методы анализа.

119992 Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, тел. (095) 939-33-46, факс (095) 939-46-75, E-mail shekhov@analyt.chem.msu.ru

Металлы могут играть двоякую роль в физиологии человека, животных и растений. Некоторые из них необходимы для нормальной жизнедеятельности, в то время как другие при сравнительно низких концентрациях токсичны, причиняют вред организму. Недостаток или избыток макро- и микроэлементов приводит к серьезным нарушениям функционирования организма. Нередки случаи отравления людей и животных ионами металлов, входящими в состав продуктов питания или отходов промышленных технологий [1]. В связи с этим чрезвычайно важен контроль содержания ионов металлов в объектах окружающей среды, продуктах питания, биологических системах, лекарственных средствах.

В настоящее время аналитическая химия располагает значительным арсеналом инструментальных методов определения ионов металлов, включающим, прежде всего, методы спектроскопии: атомно-абсорбционной (ААС), атомно-эмиссионной (АЭС), атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ИСП АЭС), атомно-флуоресцентной (АФС); а также электрохимические, в частности, метод инверсионной вольтамперометрии (ИВА). Несколько обособленно от этих методов стоят ферментативные методы, развивающиеся на стыке аналитической химии и биохимии и являющиеся перспективной областью современного химического анализа. Эти методы благодаря высокой каталитической активности и специфичности действия биокатализаторов отличаются высокой чувствительностью и селективностью. Помимо этого выгодные преимущества ферментативных методов — экспрессность, простота используемого оборудования и методики эксперимента, относительная экономичность.

Наибольшее распространение для определения ионов металлов получили ферменты классов оксидоредуктаз и гидролаз, катализирующие окислительно-восстановительные и гидролитические реакции соответственно. Биокатализаторы данных классов в большинстве своем являются металлозависимыми ферментами, т.е. содержат в активном центре ионы металлов

(кофакторы), которые играют важную роль в проявлении ими каталитической активности. В настоящем обзоре описаны методики (в том числе и тест-методики) определения ионов металлов с использованием нативных и иммобилизованных оксидоредуктаз и гидролаз различного происхождения, обсуждены разработанные авторами подходы к направленному повышению чувствительности и селективности определения ионов металлов, а также обсуждены возможности применения ферментативных методик для определения ионов-металлов в различных объектах.

Ферментативные методы определения ионов металлов по их ингибирующему действию на нативные ферменты

Большинство известных в настоящее время ферментативных методов определения ионов металлов основано на их ингибирующем действии на ферменты. Преимущественно это методы определения ионов тяжелых металлов, таких как Ag(I), Hg(II), Pb(II), Cd(II), Bi(III), Zn(II). Эти ионы давно известны как эффективные ингибиторы каталитической активности уреазы в реакции гидролиза мочевины [2]. Ингибирующий эффект на уреазу положен в основу ферментативных методик определения Ag(I) и Hg(II) в интервале концентраций 2–10 и 40–200 нг/мл, соответственно, [3], Cd(II) [4] и Pb(II), а также Co(II), Ni(II), Cu(II), Mn(II) в интервале их концентраций 0,1–2 мкг/мл [3]. Ингибирующее действие на β -фруктофуранозидазу (инвертазу), катализирующую гидролиз сахарозы, используется при определении Hg(II) в интервале концентраций 0,01–100 нг/мл [5], а также 0,1 мкг/мл Ag(I) [6].

В основу ферментативных методик определения Ag(I) и Hg(II) положено их ингибирующее действие на каталитическую активность глюкозооксидазы [7] и ксантинооксидазы [8]: $C_n(\text{Ag}) = 5$ нг/мл и 0,5 мкг/мл; $C_n(\text{Hg}) = 0,1$ и 1 мкг/мл, соответственно (C_n — нижняя граница определяемых содержаний). Серебро(I) и ртуть(II) ингибируют каталитическую активность алкогольдегидрогеназы (АДГ) из пекарских дрожжей в

интервалах концентраций 1—1000 нг/мл и 2—20 мкг/мл, соответственно [9]. Более низкого предела обнаружения Hg(II) (0,08 мкг/мл) удалось добиться авторам методики [10], использовавшим экстракт АДГ, выделенный из печени лошади. На ингибирующем действии на щелочные фосфатазы, выделенные из кишечной палочки *E.coli* и кишечника цыпленка, разработаны методики определения 3—10 нг/мл бериллия и 3—100 мкг/мл висмута [11], а также 0,075—0,75 мкг/мл цинка [12], соответственно.

Использование нативных пероксидаз для определения ионов металлов

На кафедре аналитической химии МГУ им. М.В.Ломоносова было установлено, что Hg(II), Cd(II), Bi(III) в различных интервалах концентраций ингибируют каталитическую активность пероксидазы из корней хрена в реакциях окисления пероксидом водорода ароматических диаминов [13—17]. Ингибирующее действие кадмия на фермент в реакции окисления *o*-дианизидина (*o*-Д) положено в основу методики его определения в интервале концентрации 0,05—1 мкг/мл; а использование в качестве субстратов пероксидазы *o*-фенилендиамина (*o*-ФДА) и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) позволило снизить нижнюю границу определяемых содержаний (C_n) кадмия до 10 нг/мл [14].

Методика определения Bi(III) с пределом обнаружения (C_{min}) 0,2 нг/мл была разработана с использованием органического серосодержащего ингибитора фермента — 1,3-дигиотреитола, дополнительное введение которого в индикаторную реакцию окисления *o*-Д усиливало ингибирующее действие висмута [16]. Кроме того, было показано, что другое серосодержащее органическое соединение — диэтилдитиокарбаминат натрия (ДЭДТК) является вторым субстратом пероксидазы в той же индикаторной реакции, и в его присутствии на кинетических кривых реакции появляется индукционный период. Величина индукционного периода сокращается при введении Bi(III) в тем большей степени, чем выше его концентрация. Это объясняется взаимодействием иона металла с ДЭДТК, в результате чего изменяется способность последнего к окислению. Наличие обратной пропорциональной зависимости продолжительности индукционного периода от концентрации Bi(III) позволило разработать

методику его определения с $C_n = 0,05$ мкг/мл [17].

Следует отметить, что во всех описываемых исследованиях и разработанных нами методиках каталитическую активность ферментов характеризовали скоростью индикаторных реакций, которую контролировали спектрофотометрическим методом, фиксируя изменение во времени оптической плотности продуктов реакции.

Наиболее эффективный ингибитор пероксидазы — ртуть. Она ингибирует каталитическую активность этого фермента в реакциях окисления пероксидом водорода соединений: *o*-Д, *o*-ФДА, ТМБ. Введение в указанные индикаторные реакции тиомочевины, значительно усиливающей ингибирующее действие ртути(II), позволило разработать один из самых чувствительных и селективных методов определения ртути (табл. 1) [13]. Причины усиления ингибирующего действия ртути(II) на пероксидазу из корней хрена в присутствии тиомочевины обсуждены нами ранее в работах [15, 17, 19, 20]. Отметим лишь, что в основе этого эффекта лежит образование SH-групп (отсутствующих в структуре нативного фермента) в результате восстановления тиомочевинной S—S-связей в молекуле биокатализатора. Дальнейшее взаимодействие иона металла с SH-группами понижает каталитическую активность фермента.

В результате многочисленных исследований авторы данного обзора показали, что перспективным приемом направленного изменения метрологических характеристик ферментативных методов определения ингибиторов, ионов металлов в частности, является использование препаратов одних и тех же ферментов, выделенных из различных источников. Полученные экспериментальные данные по изучению эффекторов растительных пероксидаз и других ферментов, свидетельствуют о том, что степень, а иногда и характер воздействия одних и тех же эффекторов на ферменты различного происхождения отличаются. Это связано, очевидно, с различиями в структурах активных центров ферментов и их окружения, различной последовательностью аминокислотных остатков и их взаимного расположения и т. п.

При сравнении характера и степени действия ртути(II) на активность двух пероксидаз, выделенных из корней хрена и клеток арахиса, в одном и том же индикаторном процессе окисления пероксидом водорода *o*-дианизидина показано, что ртуть(II) начинает про-

Таблица 1

Метрологические характеристики и селективность методик определения ионов ртути с использованием нативных пероксидаз

Индикаторная реакция	Определяемое содержание ртути, пг/мл	s_r^* (для C_n)	C_{min} , пг/мл	Селективность**	Ссылка
Пероксидаза из корней хрена (в присутствии тиомочевины)					
<i>o</i> -Д—H ₂ O ₂	10—1000	0,03	8	10 ³ -кратные избытки Cd(II), Pb(II), Bi(III) и 10 ⁵ -кратные избытки Fe(III)	[18]
<i>o</i> -ФДА—H ₂ O ₂	2—5000	0,05	0,8	100-кратные избытки Cd(II) и Bi(III)	[16]
ТМБ—H ₂ O ₂	0,6—5000	0,05	0,3	10 ³ -кратные избытки Cd(II) и 10 ⁵ -кратные избытки Bi(III) и Pb(II)	[16]
Пероксидаза из клеток арахиса (в отсутствие тиомочевины)					
<i>o</i> -Д—H ₂ O ₂	200—2000	0,10	100	50- и 100-кратные избытки Pb(II) и Cd(II)	[18]

* Относительное стандартное отклонение.

** Характеризуется избыточными количествами М(II), которые мешают определению ртути(II) на уровне C_n

являть индивидуальное ингибирующее действие (в отсутствие тиомочевины) на пероксидазу арахиса при концентрациях в 250 раз меньших (25 нг/мл), чем на пероксидазу хрена. Кроме того, в реакции, катализируемой пероксидазой хрена, тиомочевина повышает чувствительность определения ртути(II) более чем на четыре порядка, а в индикаторной системе в присутствии пероксидазы арахиса тиомочевина практически не влияет на степень ингибирующего эффекта ртути. Очевидно, взаимодействие ртути(II) с пероксидазами арахиса и хрена осуществляется по разным механизмам, что, по-видимому, связано с некоторым различием в их строении. Методика, разработанная с использованием пероксидазы арахиса, позволяет определять ртуть на уровне ПДК (табл. 1), однако уступает по чувствительности и селективности методике определения ртути(II) с использованием пероксидазы хрена в присутствии тиомочевины. В то же время отсутствие необходимости введения в индикаторную реакцию, катализируемую пероксидазой арахиса, дополнительного ингибитора — тиомочевины и исключение в этом случае стадии инкубирования ртути(II) с ферментом позволяет упростить методику эксперимента и значительно (с 30 до 5 мин) сократить время проведения анализа.

Определение ионов металлов с использованием нативных алкогольдегидрогеназ

При изучении влияния ряда ионов металлов на каталитическую активность алкогольдегидрогеназ из пекарских дрожжей (АДГ I) и печени лошади (АДГ II) в реакции окисления этанола никотинамидадениндинуклеотидом (НАД⁺) установлено, что Hg(II), Ag(I), Cd(II), Cu(II) и Zn(II) в различных концентрациях оказывают ингибирующее действие на каталитическую активность обеих АДГ (табл. 2). Разработаны методики определения тех ионов металлов, для которых в указанных в табл. 2 интервалах концентраций наблюдается достаточно ярко выраженная обратно пропорциональная зависимость скорости индикаторного процесса от концентрации ингибитора [21].

Полученные данные свидетельствуют о том, что Hg(II) является наиболее эффективным ингибитором алкогольдегидрогеназ. Различная доступность реакционноспособных сульфгидрильных групп в молекулах АДГ из пекарских дрожжей и печени лошади, а также различная структура их активных форм (тетрамер и димер, соответственно) позволяют определять ртуть(II) с использованием АДГ из пекарских дрож-

жей на уровне значительно меньших концентраций, чем с применением АДГ из печени лошади. Справедливости ради следует отметить, что столь существенное различие в чувствительности двух препаратов АДГ к воздействию металлов-ингибиторов объясняется различием не только в их строении, но и в удельной активности коммерческих препаратов, использованных для исследования (25 и 0,5 ед/мг, соответственно).

Определение ионов металлов с использованием щелочных фосфатаз

Щелочные фосфатазы относятся к классу гидролаз и катализируют гидролиз различных эфиров фосфорной кислоты. Щелочные фосфатазы — металлозависимые ферменты, содержащие в активном центре ионы цинка(II), необходимые для проявления ими каталитической активности.

Нами было изучено влияние ряда ионов металлов, и прежде всего, иона-кофактора — цинка(II) на каталитическую активность нативных щелочных фосфатаз, выделенных из трех различных источников: кишечной палочки *E.coli* (I), кишечника цыпленка (II) и тонкой кишки гренландского тюленя (III). В качестве индикаторной для контроля каталитической активности щелочных фосфатаз была использована реакция гидролиза *n*-нитрофенилфосфата (*n*-НФФ). Установлено, что цинк(II) в различной степени ингибирует каталитическую активность всех фосфатаз, выделенных из различных источников. Так, одинаковая степень его ингибирующего действия (25%) на препараты щелочной фосфатазы I, II и III наблюдается при концентрациях цинка(II) 5,0, 0,5 и 0,25 мкг/мл, соответственно. Наиболее значительное и заметно изменяющееся ингибирующее действие цинка(II) на каталитическую активность щелочной фосфатазы из кишки тюленя было положено в основу селективной ферментативной методики его определения в интервале концентраций 1—10 мкг/мл [22].

Помимо действия цинка(II) было изучено влияние на каталитическую активность трех ферментов ионов кобальта(II), никеля(II), меди(II) и кадмия(II), которые, благодаря их близким к цинку(II) ионным радиусам, способны потенциально замещать ионы цинка(II) в активном центре ферментов. Изучение характера влияния свинца(II) на каталитическую активность щелочных фосфатаз I и III представляло самостоятельный интерес, поскольку ранее [23] ингибирующее действие свинца(II) на нативную щелочную фосфатазу II в упомянутой выше индикаторной реакции было

Таблица 2

Характеристики методик определения ионов металлов M(II), основанных на ингибировании алкогольдегидрогеназ

M(II)	Концентрации M(II), при которых проявляется ингибирование, мкг/мл		Определяемые концентрации M(II), мкг/мл		Время инкубирования $t_{\text{цинк}}$, мин	
	АДГ I	АДГ II	АДГ I	АДГ II	АДГ I	АДГ II
Hg(II)	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$	0,01—1,0	$5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-3}$	0,05—1,0	0	0
Ag(I)	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$	0,05—10	$8 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-3}$	0,1—1,0	5	0
Cd(II)	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$	1—100	—*	—	0	0
Zn(II)	$1 \cdot 10^{-4} - 0,1$	0,1—1,0	$5 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-2}$	0,05—1,0	5	5
Pb(II)	$5 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-2}$	10—100	—	—	15	0
Cu(II)	0,01—1,0	1—100	0,1—1,0	—	0	0

* Отсутствует выраженная зависимость скорости индикаторного процесса от концентрации ингибитора.

положено в основу высокочувствительного ($C_{\min} = 0,1$ нг/мл) ферментативного метода его определения.

Установлено, что Co(II), Ni(II), Cu(II) и Cd(II) при концентрациях на уровне 1 мкг/мл в реакционной смеси не влияют на скорость индикаторной реакции, катализируемой щелочными фосфатазами из всех трех источников. Pb(II) при этих же концентрациях не изменяет каталитическую активность фосфатаз I и III. Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что цинк(II) ингибирует щелочную фосфатазу из кишки тюленя не только при достаточно низких концентрациях, но и селективно [22].

Определение ионов металлов по их активирующему действию на ферменты

В роли активаторов ферментов преимущественно выступают ионы магния, кальция, бария, алюминия, а также некоторых переходных металлов, таких как Mn(II), Co(II), Cu(II), Ni(II), Fe(III). Ферментативные методы определения переходных металлов, как правило, не представляют большого интереса для химиков-аналитиков, поскольку разработаны высокочувствительные и более дешевые кинетические методы их определения, основанные на их каталитическом действии в различных окислительно-восстановительных реакциях [24–26].

Ионы магния и кальция являются наиболее эффективными активаторами оксидоредуктаз и гидролаз, поскольку они входят в состав многих металлоферментов этих классов: пероксидаз, карбоангидраз, щелочных фосфатаз, α -амилаз, фитаз, АТФ-аз и др. Так, ионы кальция в составе пероксидаз растительного происхождения, фитаз, α -амилаз обеспечивают их стабильность, а введенные извне — продлевают время жизни ферментных препаратов за счет понижения чувствительности биокатализаторов к действию ингибиторов [27]. Несмотря на большой интерес исследователей к изучению влияния ионов магния и кальция на различные ферменты, ферментативные методики определения этих металлов в литературе весьма немногочисленны. Анализ литературных данных за последние 40 лет показал, что разработаны единичные ферментативные методики определения указанных металлов. Так, например, авторами [28] разработана методика высокочувствительного определения магния в интервале концентраций 2,4–2400 мкг/мл, основанная на активировании люциферазы светлячков, иммобилизованной на BgCN-активированной сефарозе. Люцифераза светлячков катализирует биолюминесцентную реакцию превращения люциферина в окслюциферин в присутствии аденозинтрифосфорной кислоты и магния. Определению Mg(II) на уровне C_n не мешают Ca(II), Sr(II) и Ba(II) при их 200- и 400-кратных избыточных количествах, соответственно.

Реактивирующее действие ионов кальция на щелочную фосфатазу из кишечника теленка, предварительно ингибированную ЭДТА, в реакции гидролиза *n*-НФФ положено в основу ферментативной методики их определения в довольно узком интервале концентраций 0,1–0,6 мкг/мл [29]. Селективность такой методики невысока, поскольку определению 0,1 мкг/мл Ca(II) мешают соизмеримые количества Ba(II), Sr(II), Mn(II), Be(II), Co(II), Hg(II), Cu(II) и Pb(II), а также 10-кратные избыточные количества Mg(II).

Особо следует остановиться на влиянии ионов магния на щелочные фосфатазы I–III, в аллостерические центры которых входят эти ионы [30]. Нами установлено, что магний в диапазоне его концентраций 0,6 нг/мл–20 мкг/мл в значительной степени активирует щелочную фосфатазу II, а при более высоких концентрациях (0,02–0,2 мг/мл) слабо активирует бактериальный фермент и не влияет на каталитическую активность фосфатазы III. Активирование щелочной фосфатазы II ионами магния может быть обусловлено присутствием в молекуле фермента так называемой «лиофильной» части, присоединяясь к которой ионы магния способствуют лучшему связыванию субстрата (*n*-НФФ), а степень активирующего эффекта зависит от содержания этой лиофильной части в молекуле фосфатазы [31]. Наиболее значительный активирующий эффект магния на щелочную фосфатазу II положен в основу высокочувствительной и селективной ферментативной методики его определения в диапазоне концентраций 0,6–6,0 нг/мл. Определению 0,6 нг/мл магния мешают только Ca(II), Ba(II), Zn(II) и Cd(II) в их 10^5 -, 10^5 -, 10^3 - и 10^2 -кратных избыточных количествах, соответственно. Мешающее влияние указанных ионов связано, вероятно, с тем, что они частично замещают магний в аллостерическом центре фосфатазы, снижая тем самым каталитическую активность фермента.

Определение ионов металлов по реактивации апоферментов

Один из подходов, который позволяет значительно повысить селективность определения ионов металлов, выполняющих роль кофакторов ферментов, — использование явления реактивации апоферментов. При удалении металла-кофактора из активного центра металлозависимого фермента последний полностью или частично теряет каталитическую активность вследствие образования апофермента — белковой части молекулы биокатализатора. Добавление ионов металла-кофактора извне к апоферменту приводит к его реактивации — восстановлению каталитической активности фермента — и обеспечивает высокую селективность и чувствительность определения этих ионов металла. Для получения апоферментов ионы металла-кофактора связывают в устойчивое комплексное соединение различными лигандами, образующими с ним прочные комплексные соединения [32–37], и кроме того, используют диализ [29, 38, 39].

Известны методики определения: Cu(II) по реактивации апо-полифенолоксидазы [32, 33], Zn(II) — по реактивации апоформ пируватоксидазы [34], аминоксипептидазы [35], карбоангидразы [36] и щелочной фосфатазы [29, 37].

Одним из примеров высокочувствительной и селективной методики определения металла-кофактора может служить разработанная нами методика определения ионов железа(III), входящих в состав гема пероксидазы хрена [40]. Для получения каталитически неактивного апофермента была использована салициловая кислота, образующая с Fe(III) чрезвычайно прочный комплекс (логарифм константы устойчивости комплекса $\lg \beta_3 = 36,3$). Реактивирующее действие железа(III) на фермент, предварительно ингибированный указанным лигандом, в индикаторной реакции окисления пероксидом водорода *o*-дианизидина про-

является в интервале концентраций Fe(III) 2–80 пг/мл, предел обнаружения Fe(III) составляет 10 пг/мл. Разработанная методика весьма селективна, определению столь малых концентраций железа не мешают ионы переходных металлов: Fe(II), Co(II), Cu(II), Ni(II), даже при 10⁵-кратных избытках, а Cr(III) и Mn(II) незначительно понижают реактивирующее действие железа при 10³-кратных избытках.

Помимо ионов железа в молекулу пероксидаз, в их аллостерический центр, входят ионы кальция, роль которых заключается в поддержании стабильности ферментов. Для удаления ионов кальция из пероксидазы арахиса нами был использован диализ в течение 24 ч в присутствии ЭДТА. Реактивирующее действие кальция на полученный апофермент в индикаторной реакции окисления пероксидом водорода *o*-дианизида проявляется при концентрации кальция 1 мкг/мл [41].

К наиболее часто встречающимся в оксидоредуктазах и гидролазах металлам-кофакторам относится цинк(II). Содержание цинка в молекулах этих ферментов определяется пространственным строением биокатализаторов и колеблется, например в случае щелочных фосфатаз, от 2 до 4 атомов на субъединицу фермента для димера или достигает 16 атомов для тетрамера [42]. При этом следует отметить, что в оксидоредуктазах (в частности АДГ) цинк, как правило, очень прочно связан с белковой частью молекулы фермента, что затрудняет его удаление из активного центра.

Нами была исследована возможность реактивации апо-алкогольдегидрогеназы из пекарских дрожжей, полученной с применением различных органических лигандов, в частности 1,10-фенантролина (но без диализа, т.е. без удаления избытка добавленного лиганда). Реактивацию проводили ионами цинка и другими ионами: Co(II), Cd(II), Ni(II), Cu(II), образующими устойчивые комплексы с этими лигандами и имеющими близкие ионные радиусы с цинком(II) (табл. 3). Максимальное реактивирующее действие на апо-АДГ, полученную без диализа добавлением 1,10-фенантролина, оказывает Ni(II). Это объясняется, очевидно, тем, что Co(II) и Ni(II) в отличие от других приведенных в таблице ионов не ингибируют нативный фермент.

В случае апоферментов, полученных добавлением ЭДТА и 1,10-фенантролина, но без диализа, наблюдается частичная корреляция между степенью их реактивации ионами Cu(II), Zn(II), Cd(II), константами устойчивости их комплексов с лигандами и степенями их ингибирующего действия на нативную АДГ. Инкубирование апоферментов с Zn(II), Co(II) и Cu(II) повышает их реактивирующую способность; при этом Zn(II) в большей степени реактивирует апо-АДГ, чем Co(II) и Cu(II).

Полученные данные свидетельствуют о том, что селективно реактивировать ионами цинка апо-АДГ из пекарских дрожжей, полученную добавлением органических лигандов (например, 1,10-фенантролина или ЭДТА) без удаления их избытка диализом невозможно. Вследствие этого для разработки селективной и чувствительной методики определения иона металла-кофактора АДГ, а именно цинка, было необходимо получить чистый апофермент, удалив избыток органического лиганда. Полное подавление каталитической

Таблица 3

Характеристики реактивации апо-алкогольдегидрогеназы (апо-АДГ) ионами металлов M(II)

Апо-АДГ получена с применением 1,10-фенантролина; $\lg\beta_3$ — логарифм константы устойчивости комплексных соединений M(II) с 1,10-фенантролином; A_{\max} — степень максимального реактивирующего действия, %; $C_{M(II)}$ — концентрация M(II), при которой достигается указанная степень активирования; $\tau_{\text{инк}}$ — время инкубирования апо-АДГ с M(II)

M(II)	Ионный радиус [43], Å	$\lg\beta_3$	$C_{M(II)}$, мкг/мл	A_{\max} , %, при $\tau_{\text{инк}}$	
				0 мин	15 мин
Zn(II)	0,83	17,00	0,1	82	218
Cd(II)	1,03	14,26	0,1	81	81
Ni(II)	0,78	17,57	1	119	83
Co(II)	0,82	20,00	1	100	150
Cu(II)	0,80	20,41	0,01	86	110

активности АДГ 1,10-фенантролином и ЭДТА (степень ингибирования $I = 100\%$) при проведении диализа в статических условиях в течение 48 ч достигается при их 5 · 10³- и 10⁵-кратных избыточных количествах по отношению к ферменту, соответственно. Проведение диализа в динамических условиях позволило получить апо-АДГ при 100-кратных количествах 1,10-фенантролина и ЭДТА, причем время диализа сократилось до 24 ч. Изучение влияния на полученные апоферменты Zn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) и Cd(II) показало, что только Zn(II) селективно реактивирует оба препарата апофермента АДГ. При использовании 1,10-фенантролина максимальная степень реактивации полученного апофермента выше, а необходимая для ее достижения концентрация ионов цинка ниже, чем при применении ЭДТА. Поэтому для разработки методики определения Zn(II) использовали апо-АДГ, полученную в присутствии 1,10-фенантролина. Разработанная методика применима для определения цинка в диапазоне концентраций 0,05–0,5 нг/мл, $C_{\min} = 20$ пг/мл. Установлено, что Co(II) и Ni(II) не мешают определению цинка при их 10⁵-, Cu(II) — при 10³-, а Cd(II) — при 600-кратных количествах. При совместном присутствии Ni(II), Cd(II) и Cu(II) мешают определению Zn(II) при их 400-кратных избыточных количествах.

Щелочные фосфатазы также содержат ионы цинка в качестве кофакторов. Нами выяснено, что для получения апоформ щелочных фосфатаз, выделенных из *E.coli*, кишечника цыпленка и тонкой кишки гренландского тюленя, из ряда исследованных органических лигандов наиболее перспективен ЭДТА. При этом ЭДТА ингибирует фосфатазу из тонкой кишки гренландского тюленя в наибольшей степени ($I \approx 95\%$) при наименьшем избыточном количестве ($E : L = 1:100$) и при минимальном (15 мин) времени инкубирования с ферментом [44]. Так как величина остаточной невысокой (5%) активности фосфатаз практически не зависит от времени выдерживания фермента с ЭДТА, проведение длительного диализа для получения апо-фосфатазы представлялось нецелесообразным.

Изучение влияния на полученную апо-фосфатазу ионов цинка и других ионов, имеющих близкие к цинку(II) ионные радиусы и константы устойчивости

комплексных соединений с ЭДТА, показало, что реактивацию апо-фосфатазы из кишки тюленя (хотя и небольшую — 25%) вызывает только цинк(II) [44]. Для повышения степени реактивирующего действия цинка на апофермент в индикаторную реакцию гидролиза *n*-нитрофенилфосфата вводили дополнительно магний(II), необходимый для стабилизации фермента. Оказалось, что присутствие 2 мкг/мл магния(II) усиливает реактивирующий эффект цинка, степень реактивации апофермента повышается до 84% [44]. Разработанная ферментативная методика позволяет определять цинк в интервале его концентраций 0,01—0,1 мкг/мл, $C_{\min} = 8$ нг/мл.

В результате изучения влияния ионов магния, кальция и бария на каталитическую активность различных щелочных фосфатаз в реакции гидролиза *n*-НФФ в присутствии ряда комплексонов предложен новый подход к ферментативному определению указанных металлов, основанный на использовании их либеративного действия на щелочную фосфатазу из кишки тюленя, предварительно ингибированную нитрилтриметилфосфоновой кислотой. Либеративное действие ионов металлов заключается в том, что при добавлении в индикаторную систему они уменьшают ингибирующее действие хелатирующего агента за счет связывания его в комплекс и восстанавливают тем самым каталитическую активность фермента. Разработаны чувствительные ферментативные методики определения ионов магния, кальция и бария (C_n — 14, 24 нг/мл и 0,8 мкг/мл, соответственно). Указанная ферментативная методика определения магния(II) превосходит по чувствительности методики его определения методами ААС и АЭС, а также флуориметрическую методику, основанную на образовании комплекса магния(II) с 8-гидроксихинолин-5-сульфо-кислотой ($C_{\min} = 12$ нг/мл) [45].

Использование иммобилизованных ферментов для определения ионов металлов

Ферментативные методы занимают все более прочные позиции в химическом анализе, однако их более широкое распространение ограничено в некоторой степени малой доступностью либо высокой стоимостью очищенных препаратов ферментов, их низкой устойчивостью при хранении и при различных, особенно тепловых, воздействиях, невозможностью многократного использования биокатализатора из-за сложности его отделения от реагентов и продуктов реакций. Эти недостатки можно преодолеть, используя иммобилизованные ферменты, т. е. ферменты, искусственно связанные с не растворимым в воде носителем или модифицированные растворимыми в воде полимерами и сохранившие (полностью или частично) каталитическую активность. Иммобилизация повышает стабильность фермента при длительном хранении, его устойчивость к внешним воздействиям, что облегчает хранение и транспортировку ферментов в экспедиционных условиях, позволяет обеспечить многократность использования биокатализаторов.

В аналитических целях на основе иммобилизованных ферментов создают ферментные электроды, сенсоры, проточные автоматические анализаторы с различными методами регистрации аналитического сигнала (электрохимическими, спектрофотометрическим, люминесцентным) [46]. Так, например, амперометри-

ческие ферментные электроды для определения ионов Pb(II) (0,1—200 мкг/мл) [47], Tl(I) (10—200 мкг/мл), Bi(III) (22—525 мкг/мл), Cd(II) (0,1—100 мкг/мл), Cu(II) (3 пг/мл—64 мкг/мл) [48] разработаны на основе холинэстеразы, иммобилизованной включением в пленки из нитрата целлюлозы. На использовании иммобилизованной уреазы основан потенциометрический электрод для определения 0,08—1,0 мкМ ртути(II) [49]. В [50] описан потенциометрический биосенсор для суммарного определения ртути в соединениях: $Hg(NO_3)_2$, $HgCl_2$, $Hg_2(NO_3)_2$ (0,05—1,0 мкМ), $PhHgCl$ (0,1—5,0 мкМ), по их ингибирующему действию на уреазу, иммобилизованную на поверхности pH-чувствительного электрода на основе оксида иридия. Для определения 5 мкМ—10 мМ ионов ртути и серебра предложен [51] потенциометрический биферментный электрод на основе иммобилизованных глюкозооксидазы и каталазы. Для определения Cu(II), Co(II), Cd(II), Ni(II), Zn(II), Pb(II), Sr(II), Sn(II) в интервале их концентраций 0,05—10 мМ разработан проточно-инжекционный потенциометрический мультиферментный биосенсор, основанный на применении четырех различных ферментов — уреазы, глюкозооксидазы, ацетил- и бутирилхолинэстеразы [52]. Пары фермент—субстрат (уреаза—мочевина, глюкозооксидаза—глюкоза, ацетилхолинэстераза—ацетилхолинйодид, бутирилхолинэстераза—бутирилхолинйодид) были иммобилизованы в отдельных ячейках силиконового планшета. Определение ионов металлов с использованием всех перечисленных электродов основано на их ингибирующем действии на иммобилизованные ферменты. Известны ферментные электроды, созданные для определения ионов металлов по их реактивирующему действию на иммобилизованные апоферменты. Так, для определения 1 мкМ цинка в [53] предложен амперометрический электрод на основе иммобилизованной апофосфатазы. А потенциометрический электрод на основе иммобилизованной полифенолоксидазы создан для определения 0,1—2 мкМ ее кофактора — ионов меди [54].

Использование ферментных реакторов позволило значительно расширить число способов регистрации аналитического сигнала: помимо электрохимических в этих целях применяют спектрофотометрические, люминесцентные, термометрические детекторы. Например, термометрический детектор использован в работе [55] для определения $< 0,1$ М ингибиторов иммобилизованной уреазы — ионов серебра, меди и ртути. Разработан [56] спектрофотометрический метод определения ряда ионов тяжелых металлов: Ag(I) (20 нг/мл), Hg(II) (70 нг/мл) и Cu(II) (250 нг/мл), по их ингибирующему действию на уреазу, иммобилизованную на аммоний-селективной силиконовой мембране, закрепленной на стенке кюветы. Автоматический флуоресцентный уреазный биосенсор для определения ионов Cu(II) и Zn(II) в интервале их концентраций 10—230 мкМ описан в работе [57]. Апофермент иммобилизованной пируватоксидазы использован для хемилюминесцентного определения 10 пг кофактора — ионов цинка [34].

Весьма перспективна для успешного внедрения в аналитическую практику разработка на основе иммобилизованных ферментов простых и экспрессных тест-методик и тест-устройств, не требующих специального оборудования для фиксирования аналитиче-

ского сигнала и пригодных для использования во вне-лабораторных условиях. Для разработки тест-методик с визуальным контролем протекания ферментативных процессов подбирают такие носители, которые должны отвечать не только обычным при иммобилизации требованиям, но также быть бесцветными, обладать удобной для создания тест-устройств формой (в виде полосок, пластинок, таблеток), чтобы возможно было фиксировать изменение окраски от исходных компонентов до промежуточных либо конечных продуктов проводимой на них индикаторной реакции.

Создание высокочувствительных и селективных ферментативных тест-методик в последние годы является одним из направлений активных исследований, проводимых на кафедре аналитической химии МГУ им. М.В. Ломоносова. В основу таких тест-методик с применением биокатализаторов, иммобилизованных на различных носителях, положены выявленные нами эффекты (ингибирующий, активирующий, реактивирующий) ионов металлов на различные нативные ферменты. Для получения иммобилизованных препаратов пероксидазы хрена, алкогольдегидрогеназы из пекарских дрожжей, щелочных фосфатаз из кишечника цыпленка и кишки тюленя и разработки на их основе тест-методик определения ионов ртути, кадмия, свинца, цинка использованы носители разных типов: полистирольный планшет (ПСП), силикагели, хроматографическая бумага (хром. бумага), микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) и пенополиуретаны (ППУ). Для иммобилизации ферментов был выбран метод включения их в пространственную сетку гелей природных полисахаридов (хитозана и N-фталилхитозана) с последующей сорбцией на указанных выше носителях. Данный метод иммобилизации

ферментов обычно в меньшей степени нарушает их структуру, а свойства иммобилизованных таким образом препаратов мало отличаются от свойств нативных ферментов в растворе. Активность иммобилизованных препаратов ферментов контролировали визуально, фиксируя время появления на носителях определенной окраски продуктов окисления или гидролиза тех же субстратов — *o*-Д, *o*-ФДА, ТМБ, НАД, *n*-НФФ, которые использовали в случае нативных ферментов.

На основе ингибирующего действия ртути(II), усиленного тиомочевинной, на каталитическую активность пероксидазы, иммобилизованной на силикагеле, МКЦ и ППУ, в реакциях пероксидазного окисления различных субстратов были разработаны высокочувствительные тест-методики определения Hg(II) с аналитическими характеристиками, представленными в табл. 4.

Все разработанные тест-методики определения ртути достаточно селективны. Так, при изучении мешающего влияния ряда ионов металлов и анионов: Cd(II), Bi(III), Pb(II), Cu(II), Zn(II), Fe(II, III), Ni(II), Co(II), Ca(II), Mg(II), Cl⁻, Br⁻, I⁻, F⁻, S²⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻, на определение ртути(II) с использованием иммобилизованной на ППУ пероксидазы показано, что только Cd(II), Bi(III) и Fe(III) мешают определению 1 пг/мл Hg(II) в их 10⁵-, 10⁵- и 10⁶-кратных количествах, соответственно. При этом кадмий(II) и висмут(III) так же, как и ртуть(II) ингибируют иммобилизованный фермент, а железо(III) при концентрациях ≥ 1 мкг/мл активирует его. Для маскирования железа(III) при определении ртути(II) в тех объектах, в которых оно присутствует в количествах > 1 мкг/мл, следует использовать винную кислоту.

Нами выяснено, что кадмий(II) и свинец(II) инги-

Таблица 4

Аналитические характеристики тест-методик определения ионов металлов по их действию на ферменты, иммобилизованные на различных носителях

Действие: ингибирующее (Инг.), активирующее (Акт.) и реактивирующее (Реакт.). Расшифровку других обозначений см. в тексте

Носитель фермента	Me(II)	Действие на фермент	Индикаторная реакция	Фиксируемый переход окраски	C _n , нг/мл	Ссылки		
Пероксидаза из корней хрена								
ПСП	Hg(II)	Инг.	<i>o</i> -Д—H ₂ O ₂	Зеленый → красный	0,01	[58, 59]		
ПСП			ТМБ—H ₂ O ₂	Голубой → вишневым	0,001	[58, 59]		
Хром. бумага			<i>o</i> -ФДА—H ₂ O	Коричневый → зеленый	0,04	[59—61]		
Хром. бумага			ТМБ—H ₂ O ₂	Голубой → коричневый	0,01	[59—61]		
Силикагель			ТМБ—H ₂ O ₂	Голубой → желтый	0,01	[62]		
МКЦ			ТМБ—H ₂ O ₂	Голубой → желтый	0,005	[62]		
ППУ			<i>o</i> -Д—H ₂ O ₂	Зеленый → красный	0,001	[63]		
ППУ			Cd(II)	Инг.	<i>o</i> -Д—H ₂ O ₂	Зеленый → красный	0,1	[64]
ППУ			Pb(II)	Инг.	<i>o</i> -Д—H ₂ O ₂	Зеленый → красный	0,5	[65]
Алкогольдегидрогеназа из пекарских дрожжей								
Силикагель	Zn(II)	Реакт.	Этанол—НАД ⁺ <i>n</i> -ФДА—H ₂ O ₂	Бесцветный → бурый	0,1	[66]		
Щелочная фосфатаза из кишечника цыпленка								
ППУ	Pb(II)	Инг.	Гидролиз <i>n</i> -НФФ	Бесцветный → зеленый	0,05	[65]		
Хром. бумага	Mg(II)	Акт.	Гидролиз <i>n</i> -НФФ	Бледно-желтый → синий	1000	*		
Щелочная фосфатаза из кишки тюленя								
ППУ	Zn(II)	Инг.	Гидролиз <i>n</i> -НФФ	Бесцветный → зеленый	0,1	[22]		

* Данные не опубликованы

Таблица 5

Результаты определения ионов металлов ферментативным методом (I) и альтернативными методами (II) в различных объектах
Расшифровку сокращений названий методов II см. в тексте

Объект анализа	Определяемый ион, используемый фермент	Содержание иона металла		Ссылка
		I	II	
В о д а		п г / м л		
Азовское море	Hg(II), нативная пероксидаза	450 ± 60	480 (ААС-ХП)	[13]
Каспийское море		810 ± 100	850 (ААС-ХП)	[13]
Средиземное море		650 ± 50	680 (ААС-ХП)	[13]
р. Москва		746 ± 4	749 ± 5 (АФС)	[17]
р. Москва	Hg(II),	210 ± 30	190 (МС)	[17]
р. Обь	иммобилизованная пероксидаза	410 ± 30	390 (ААС-ХП)	[18]
р. Исеть, г. Екатеринбург		288 ± 72	336 ± 84 (ИВА)	[68]
Подземная вода, Московской обл.		820 ± 20	660 ± 40 (АФС)	[69]
Водопроводная вода, г. Москва		3,4 ± 0,3	3,5 ± 0,4 (Метод добавок)	[69]
П о ч в а		м г / к г		
Подзолистая	Hg(II),	3,4 ± 0,3	3,5 (ААС-ХП)	[18]
Глинистая	иммобилизованная пероксидаза	2,2 ± 0,6	2,0 (ААС-ХП)	[18]
Чернозем	Cd(II),	3,2 ± 0,2	3,5 (СААС)	[18]
	иммобилизованная пероксидаза			
Чернозем	Pb(II),	(14,5 ± 0,4)	(16 ± 5) (СААС)	[18]
Краснозем	иммобилизованная щелочная фосфатаза	(15,5 ± 0,3)	(15,0 ± 0,9) (СААС)	[18]
Дерново-подзолистая		(68,4 ± 0,4)	(67 ± 3) (СААС)	[18]
Пойма р. Волга		6,5 ± 0,3	7,2 ± 0,6 (ААС)	[18]
Б и о л о г и ч е с к и е ж и д к о с т и		н г / м л		
Моча	Hg(II), нативная пероксидаза	4,8 ± 0,4	4,9 ± 0,5 (Метод добавок)	[69]
	Mg(II), нативная щелочная фосфатаза	37,40 ± 0,4	33,76 (СФ)	[69]
Сыворотка крови	Hg(II), иммобилизованная пероксидаза	0,052 ± 0,002	0,055 ± 0,004 (Метод добавок)	[69]
	Zn(II), нативная АДГ	3,9 ± 0,3	3,8 ± 0,3 (ААС)	*
	Zn(II), нативная щелочная фосфатаза	9,20 ± 0,01	9,29 ± 0,02 (ААС)	[22]

* Данные не были опубликованы

Таблица 6

Результаты определения ионов металлов в пищевых продуктах с использованием иммобилизованных на пенополиуретане ферментов.

Ферменты: пероксидазы из корней хрена (А), щелочные фосфатазы из кишечника цыпленка (Б) и тонкой кишки тюленя (В)

Объект	Содержание М (II), мг/кг			
	Hg(II) (А)	Cd(II) (А)	Pb(II) (Б)	Zn(II) (В)
Горох	2,2 ± 0,2	0,0062 ± 0,0006	0,13 ± 0,03	5,5 ± 0,2
Виноград	2,4 ± 0,4	0,0024 ± 0,0008	0,23 ± 0,02	1,7 ± 0,3
Говядина	1,5 ± 0,3	0,19 ± 0,02	0,007 ± 0,002	9,4 ± 0,4
Свинина	7 ± 2	< 0,001	0,09 ± 0,02	4,9 ± 0,4

свидетельствует о том, что ферментативными методами можно определять общее содержание ионов металлов в анализируемых образцах независимо от того, в каких ионных состояниях и в виде каких соединений с неорганическими и органическими лигандами находятся в них металлы.

Использование различных эффектов — ингибирующего, активирующего, реактивирующего действия ионов металлов на каталитическую активность нативных и иммобилизованных ферментов и апоферментов, позволяет разрабатывать высокочувствительные селективные, достаточно простые и экспрессные методы

определения. Эффективность определения ионов металлов ферментативными методами подтверждена анализом многочисленных природных, биологических, пищевых объектов на содержание ртути(II), кадмия(II), свинца(II), цинка(II), магния(II).

В исследованиях, проведенных на кафедре аналитической химии МГУ, активное участие принимали А.М. Жаворонкова, Е.В. Жмаева, П.В. Бычков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 01-03-32187, № 04-03-33116).

ЛИТЕРАТУРА

- Zigель X, Zigель A. Некоторые вопросы токсичности металлов. М.: Мир, 1990, 366 с.
- Krajewska B., Leszko A., Zaborska W. J. Chem. Technol. Biotechnol, 1990, v. 48, p. 337—350.
- Weisz H., Rothmaier K. Anal. chim. acta, 1975, v. 80, № 2, p. 357—359.
- Toren E.C., Burger F.J. Mikrochim. acta, 1968, № 5, p. 1949.
- Maslovskaya J., Leszczynska T. Talanta, 1985, v. 32, № 9, p. 883—886.
- Mealor D., Townshend A. Ibid., 1968, v. 15, № 12, p. 1371.
- Toren E.C., Burger F.J. Mikrochim. acta, 1968, № 3, p. 538.
- Guilbault G.G., Kramer D.N., Carron P.L. Anal. Chem., 1964, v. 36, № 3, p. 606—610.
- Townshend A., Vaughan A. Talanta, 1970, v. 17, № 4, p. 299.
- Vanni A., Des Tradis C. Ann. Chim., 1985, v. 75, № 1—2, p. 65.
- Thiel T., Liszkowski L., Bissen S.T. J. Biochem. Biophys. Methods, 1998, v. 37, p. 117—121.
- Thownshend A., Vaughan A. Talanta, 1969, v. 16, № 7, p. 929.
- Долманова И.Ф., Еришова Е.В., Шеховцова Т.Н., Надь В.Ю. Ж. аналит. химии, 1979, т. 34, № 8, с. 1644—1647.
- Долманова И.Ф., Шеховцова Т.Н., Стародумова Н.Н. Там же, 1987, т. 42, № 10, с. 1824—1828.
- Шеховцова Т.Н., Мугинова С.В., Веселова И.А., Долманова И.Ф. Там же, 2002, т. 57, № 12, с. 1308—1316.
- Долманова И.Ф., Попова И.М., Угарова Н.Н., Шеховцова Т.Н. Там же, 1981, т. 36, № 7, с. 1347—1350.
- Shekhovtsova T.N., Muginova S.V., Mizgunova U.M., Dolmanova I.F. Quim. Analit., 1996, v. 15, № 4, p. 312—320.
- Shekhovtsova T.N., Bagirova N.A., Veselova I.A., Muginova S.V. Advanced Research Workshop on Monitoring of Natural and Man-Made Radionuclides and Heavy Metal Waste in Environmental. Dubna, 3—6 Oct., 2000, p. 62.
- Угарова Н.Н., Попова И.М., Долманова И.Ф., Шеховцова Т.Н. Биохимия, 1981, т. 46, № 6, с. 1026—1034.
- Шеховцова Т.Н., Чернецкая С.В., Долманова И.Ф. Ж. аналит. химии, 1995, т. 50, № 3, с. 309—311.
- Buchkov P.V., Zhavoronkova A.M., Zhmaeva E. V., Muginova S.V., Shekhovtsova T.N. Proc. of Biocatalysis-2002: Fundamentals and Applications. Moscow, 2002, p. 77.
- Жаворонкова А.М., Мугинова С.В., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. Ж. аналит. химии, 2003, т. 58, № 1, с. 88—96.
- Dolmanova I.F., Shekhovtsova T.N., Kutcheryaeva V.V. Talanta, 1987, v. 34, № 1, p. 201—205.
- Перес-Бендитто Д., Сильва М. Кинетические методы в аналитической химии. М.: Мир, 1991, с. 147—156.
- Мюллер Г., Отто М., Вернер Г. Каталитические методы в анализе следов элементов, 1983, 170 с.
- Муштакова С.П., Гуменюк А.П., Хмелев С.С. Ж. аналит. химии, 1991, т. 46, № 3, с. 561—564.
- Яцимирский К.Б. Введение в неорганическую биохимию. Киев: Наукова думка, 1976, с. 96.
- Иванова Л.В., Бровко Л.Ю., Шеховцова Т.Н. и др. Прикл. биохимия и микробиология, 1982, т. 18, № 5, с. 721—724.
- Townshend A., Vaughan A. Talanta, 1970, v. 17, № 4, p. 289.
- Gettings P., Coleman J.E. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 8, p. 4991—4994.
- Cloetens R. Biochem. Z., 1941, Bd. 308, S. 37—41.
- Stone J.V., Townshend A. J.C.S. Chem. Comm., 1972, № 9, p. 502.
- Stone J.V., Townshend A. I.C.S. Dalton Trans., 1973, № 5, p. 495.
- Ругин В.И. Ж. аналит. химии, 1979, т. 34, № 4, с. 680—687.
- Lenky P., Stein E.A. Anal. chim. acta, 1974, v. 70, № 1, p. 85—93.
- Kashiwabara K., Hobo T., Kobayashi E., Suzuki S. Ibid., 1985, v. 178, № 2, p. 209—215.
- Iasaitis I.I., Rasumas V.I., Kulis I.I. Ibid., 1983, v. 152, № 1, p. 271.
- Sanjai D., Rajiv D. Mater. Sci., 1995, v.3, № 2, p. 79—83.
- Sanjai D., Rajiv D. Anal. Chem., 1996, v. 68, p. 216—220.
- Шеховцова Т.Н., Чернецкая С.В., Долманова И.Ф. Ж. аналит. химии, 1993, т. 48, № 1, с. 129—136.
- Veselova I.A., Grigoryeva D.L., Orekhova A.E., Shekhovtsova T.N. Abstracts of the 8th Analytical Russian-German-Ukrainian Symp. (ARGUS). Germany, Hamburg, 2003, p. 27.
- Спиро Т.Г. Неорганическая биохимия. Под ред. Г. Эйхгорна. М.: Мир, 1978, т. 1, гл. 17, с. 624.
- Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1989, 448 с.
- Жаворонкова А.М., Мугинова С.В., Шеховцова Т.Н. Ж. аналит. химии, 2003, т. 58, № 6, с. 658—665.
- Armas G., Cladera A., Vecerra E. e. a. Talanta, 2000, v. 52, p. 77.
- Шеховцова Т.Н., Чернецкая С.В., Белкова Н.В., Долманова И.Ф. Ж. аналит. химии, 1994, т. 49, № 8, с. 789—795.
- Будников Г.К., Медянцева Э.П., Бабкина С.С., Волков А.В. Там же, 1989, т. 44, № 12, с. 2253—2257.
- Медянцева Э.П., Будников Г.К., Бабкина С.С. Там же, 1990, т. 45, № 7, с. 1386—1389.
- Tran-Minh C. Ion-selective Electrode Rev., 1985, v. 7, № 1, p. 41.
- Krawczynski vel Krawczyk T., Moszczynska M., Trojanowicz M. Biosensors & Bioelectronics, 2000, v. 15, p. 681—691.
- Liu C.C., Fryburg F.M., Chen A.K. Bioelectrochem. Bioenerg., 1981, v. 8, № 6, p. 703—708.
- Kukla A.L., Kanjuk N.I., Starodub N.F., Shirshov Yu.M. Sensors and Actuators, 1999, B 57, p. 213—218.
- Jasaitis J.J., Rasumas V.J., Kulis J.J. Anal. Chim. Acta, 1983, v. 152, № 1, p. 271—274.
- Stone J.V., Townshend A. J.C.S. Dalton Trans., 1973, № 5, p. 495.
- Mattiasson B., Danielsson D., Hermanson Ch., Moszbzch K. FEBS Lett., 1978, v. 85, № 2, p. 203—206.
- Preiningner C., Wolfbeis O. Biosensors & Bioelectronics, 1996, v. 11, № 10, p. 981—990.
- Tsai H-C., Doong R-A., Chiang H-C., Chen K-T. Analytica Chimica Acta, 2003, v. 481, p. 75—84.
- Шеховцова Т.Н., Чернецкая С.В., Долманова И.Ф., Никольская Е.Б. Ж. аналит. химии, 1994, т. 49, № 8, с. 862—867.
- Shekhovtsova T.N., Chernetskaya S.V. Anal. Lett., 1994, v. 27, № 15, p. 2883—2838.
- Шеховцова Т.Н., Чернецкая С.В., Белкова Н.В., Долманова И.Ф. Ж. аналит. химии, 1995, т. 50, № 5, с. 538—542.
- Мугинова С.В., Аковбян Н.А., Шеховцова Т.Н., Долманова И.Ф. Там же, 1999, т. 54, № 6, с. 645—650.
- Веселова И.А., Мугинова С.В., Шеховцова Т.Н., Долманова И. Ф. Тез. докл. Всерос. симп. «Тест-методы химического анализа». Москва, 2001, с. 62.
- Veselova I.A., Shekhovtsova T.N. Anal. chim. acta, 1999, v. 392, p. 151—158.
- Veselova I.A., Shekhovtsova T.N. Ibid., 2000, v. 413, p. 95.
- Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Мясоедов В.В., Завгородский И.В. Клиническая биохимия. М.: Триада-Х, 2002, 497 с.
- Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К. Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов. М.: Химия, 1996, 320 с.
- Цизин Г.И., Седых Э.М., Банных Л.Н. и др. Ж. аналит. химии, 1995, т. 50, № 1, с. 76—79.
- Алещина Л.В., Стожко Н.Ю., Брайтлина Х.З., Липунова Г.Л. Тез. докл. Поволжской конф. по аналитической химии. Казань, 2001, с. 49.
- Шеховцова Т.Н., Веселова И.А., Мугинова С.В., Долманова И.Ф. Тез. докл. конф. «Химический анализ веществ и материалов». Москва, 2000, с. 105.