

Оценка антиоксидантной активности тетракис(*пара*-аминофенил)порфина по отношению к супероксид анион-радикалу методом вольтамперометрии

С. М. Кузьмин,[@] С. А. Чуловская, В. И. Парфенюк

Посвящается академику РАН А. И. Коновалову по случаю его 80-летнего юбилея

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, 15304 Иваново, Россия

[@]E-mail: smk@isc-ras.ru

Показано, что процессы электровосстановления кислорода и тетракис(*пара*-аминофенил)порфина ($H_2T(p-NH_2Ph)P$) в ДМСО на Pt электроде являются квазиобратимыми процессами с диффузионным контролем электродной реакции. На основании уравнения Ренделса-Шевчика определен коэффициент диффузии порфирина в ДМСО. Показано, что адсорбция порфирина на электроде приводит к увеличению константы гетерогенного переноса электрона. Изучено влияние порфирина на ток электроокисления анион-радикала $O_2^{\bullet-}$, что позволило оценить антиоксидантную активность порфирина по отношению к супероксид анион-радикалу. Сопоставление полученных значений антиоксидантной активности ($H_2T(p-NH_2Ph)P$) с литературными данными по антиоксидантной активности аскорбиновой кислоты позволяет сделать вывод о перспективности применения ($H_2T(p-NH_2Ph)P$) в качестве антиоксиданта.

Ключевые слова: Тетракис(*пара*-аминофенил)порфина, супероксид анион-радикал, антиоксидантная активность, вольтамперометрия.

Estimation of Antioxidant Activity of Tetrakis(*p*-aminophenyl)–porphine regard to Superoxide Ions by Voltammetry Method

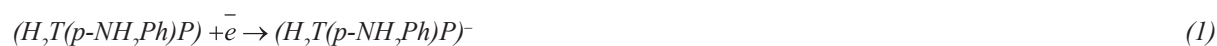
Sergey M. Kuzmin,[@] Svetlana A. Chulovskaya, and Vladimir I. Parfenyuk

Dedicated to Academician of the Russian Academy of Sciences A. I. Konovalov on the occasion of his 80th birthday

G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry of the RAS, 153045 Ivanovo, Russia

[@]Corresponding author E-mail: smk@isc-ras.ru

In this work the interaction of the $O_2^{\bullet-}$ radical with tetrakis(*p*-aminophenyl)porphyrin ($H_2T(p-NH_2Ph)P$) was studied by cyclic voltammetry (CV) at negative potential region vs saturated calomel electrode (SCE) to evaluate an antioxidant activity of porphyrin. Dimethylsulfoxide (DMSO) was selected as a medium for processes control after draft experiments. The analysis of cyclic voltammograms of $H_2T(p-NH_2Ph)P$ solutions indicates the quasi-reversible nature of the RedOx reaction:



The RedOx potential of the ($H_2T(p-NH_2Ph)P$)/($H_2T(p-NH_2Ph)P$)⁻ pair does not depend on the concentration of porphyrin and the potential scan rate is around -1.18 V. The CV analysis of the oxygen saturated solutions show that in DMSO the superoxide ion formation occurs due to one-electron mechanism at RedOx potential around -0.8 V;



The stability of the $O_2^{\bullet-}$ radical in aprotic media is sufficiently high, so that the reaction (2) may be considered as quasi-reversible.

The dependences of current density measured at the peak potential vs potential scan rate show that the limiting step of the electrode process is the diffusion of electro active species to the interface both in the case of oxygen and $H_2T(p-NH_2Ph)P$ electroreduction. It allows to calculate the diffusion coefficients of oxygen and the porphyrin in DMSO using Randles-Sevcik equation. The obtained values were $(1.54 \pm 0.1) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ and $(1.31 \pm 0.3) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ for oxygen and $H_2T(p-NH_2Ph)P$, respectively.

The coulometric analysis of CV demonstrate that $H_2T(p-NH_2Ph)P$ adsorption on the working electrode surface does not inhibit the process of oxygen electroreduction.

The potentials of the current peaks were shifted and current of electrooxidation of $O_2^{\bullet-}$ was increased when small amounts of $H_2T(p-NH_2Ph)P$ were added to oxygen saturated solutions. This changing of the CV curves was attributed to the effect of porphyrin adsorption on the rate of heterogeneous electron transfer. The increasing of the porphyrin concentration leads to a significant decrease in the $O_2^{\bullet-}$ electrooxidation electrochemical current. The effect of $H_2T(p-NH_2Ph)P$ on the superoxide ion oxidation current allowed to estimate the porphyrin antioxidant activity. A comparison of the IC_{50} antioxidant activity values of $H_2T(p-NH_2Ph)P$ with the published data on the ascorbic acid leads to the prospects application of $H_2T(p-NH_2Ph)P$ as an antioxidant toward the superoxide ion.

Keywords: Tetrakis(*p*-aminophenyl)porphyrin, superoxide ion, antioxidant activity, voltammetry.

Введение

Важнейшая роль порфиринов заключается в том, что они регулируют обменные процессы с участием кислорода и зачастую являются антиоксидантами, позволяющими предотвратить разрушающее действие свободных радикалов на клетки живых организмов. Свободные радикалы формируются в живых клетках при различных процессах метаболизма, а также в результате радиационного или химического воздействия. Важным компонентом клеточного метаболизма является кислород, который способен приводить к образованию реакционных окислительных частиц, среди которых супероксид анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксил (OH^{\bullet}), пероксид (H_2O_2), оксиалкильные радикалы (RO^{\bullet}) и т.д. Большинство свободных радикалов чрезвычайно химически активны, поэтому нестабильны. Наиболее опасным и долгоживущим радикалом, приводящим к гибели клетки, старению организма и различным заболеваниям является супероксид анион-радикал $O_2^{\bullet-}$.^[1,2]

В настоящее время накоплен большой опыт исследования антиоксидантных свойств для веществ различных классов и осуществлен синтез огромного количества порфиринов-лигандов с разнообразными заместителями и их металлокомплексов.^[3-5] При этом информация об антиоксидантных свойствах для большинства синтетических порфиринов отсутствует. Так как соединения порфиринового ряда достаточно широко распространены в живой природе, активно участвуют в клеточном метаболизме, достаточно легко проникают через биологические барьеры можно ожидать, что подбор синтетического порфирина с соответствующими заместителями может явиться шагом к созданию высокоэффективных медико-биологических препаратов с антиоксидантной активностью, применение которых не сопровождалось бы различными побочными эффектами. Известно, что антиоксидантную активность проявляют металлопорфи-

рины с *трет*-бутилфенольными заместителями,^[6] а также природные полифенольные соединения.^[7] Влияние добавки тетраакис(4'-декаоксифенил)порфина на процесс электровосстановления кислорода^[8] так же может интерпретироваться как проявление антиоксидантных свойств.

Полифункциональность порфиринов приводит к проявлению принципиально различных свойств этих молекул в различных условиях. Ранее нами показано,^[9] что в области положительных потенциалов рабочего электрода происходит образование электропроводящей поли-порфириновой пленки в растворах тетраакис(*пара*-аминофенил)порфина ($H_2T(p-NH_2Ph)P$) в дихлорметане. В настоящей работе изучено взаимодействие радикала $O_2^{\bullet-}$ с $H_2T(p-NH_2Ph)P$ в области отрицательных потенциалов для оценки антиоксидантных свойств исследуемого порфирина. Антиоксидантную активность порфирина оценивали методом циклической вольтамперометрии

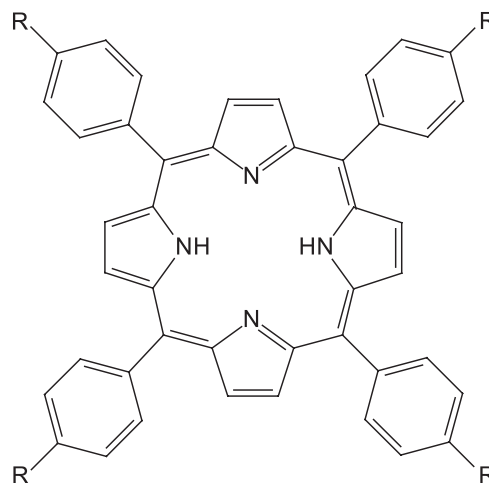


Рисунок 1. Структурная формула $H_2T(p-NH_2Ph)P$, где $R = NH_2$.

(ЦВА). В качестве среды для наблюдения изучаемых процессов выбран диметилсульфоксид (ДМСО), квалификации «хч». Содержание воды в растворителе 0.05 % (по методу Фишера).

Экспериментальная часть

$H_2T(p-NH_2Ph)P$ (Рисунок 1) синтезирован конденсацией соответствующих бензальдегидов с пирролом^[10] и очищен колоночной хроматографией на оксиде алюминия III степени активности по Брокману.

Для проведения исследований готовили растворы в диметилсульфоксиде (ДМСО), содержащим 0.02 М перхлората тетрабутиламония (ТВАР) в качестве фонового электролита. ДМСО применялся без дополнительной очистки. Взвешивание навески порфирина производили на электронных аналитических весах «Sartorius» ME215S (погрешность измерения массы составляла не более 3 %). Для полного растворения суспензию перемешивали в механическом диспергаторе. Растворы меньших концентраций готовили методом последовательного разбавления. Растворы, содержащие $H_2T(p-NH_2Ph)P$ имели спектр (Рисунок 2), в котором положение полос поглощения и их относительные интенсивности совпадают с литературными данными.^[11,12] В присутствии фонового электролита спектр не изменялся, что говорит об отсутствии взаимодействия ионов фонового электролита с исследуемым порфирином.

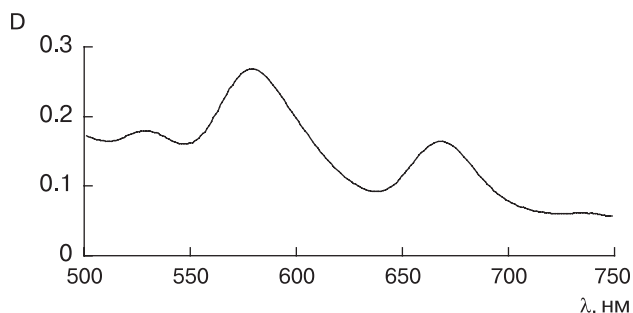


Рисунок 2. Спектр поглощения $H_2T(p-NH_2Ph)P$ в видимой области.

Циклические вольтамперные кривые снимали на автоматизированном комплексе на базе потенциостата Elins P30SM, оснащенного компьютеризированной системой сбора и обработки данных. Эксперимент проводили в трехэлектродной термостатируемой электрохимической ячейке при температуре 25 ± 0.5 °С. Схема измерительной ячейки и основные элементы ее конструкции приведены на Рисунке 3.

Рабочий электрод (1) представляет из себя прямоугольный платиновый брусок (рабочая площадь поверхности 1.2 cm^2), жестко закрепленный во фторопластовой крышке (8). В качестве электрода сравнения применяли насыщенный каломельный электрод (НКЭ) с солевым мостом (3), а в качестве вспомогательного – платиновую проволоку (2), отделенную от основного объема раствора стеклянной мембраной (4). Для уменьшения омической ошибки при измерении потенциала рабочего электрода под током использовали капилляр Лuggина (6), который подвели к электроду на минимальное расстояние. Перед каждым измерением активную поверхность рабочего электрода механически полировали до зеркального блеска, обезжировали спиртом, выдерживали в хромовой смеси в течение 20 минут, тщательно промывали дистиллированной водой, затем исследуемым раствором и погружали в ячейку.

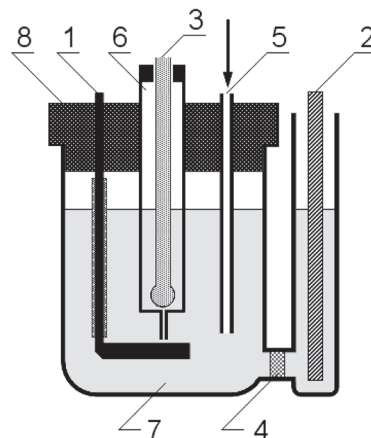


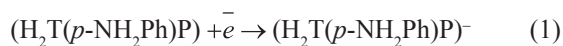
Рисунок 3. Схема электрохимической ячейки: 1 – рабочий электрод; 2 – вспомогательный электрод; 3 – электрод сравнения; 4 – разделительная перегородка из пористого стекла; 5 – капилляр трубка для дегазации раствора или насыщения его молекулярным кислородом; 6 – стеклянный цилиндр с капилляром Лuggина; 7 – исследуемый раствор; 8 – фторопластовая крышка.

Через 10 минут после погружения в раствор потенциал рабочего электрода достигал стабильного значения.

Дегазацию исследуемых растворов проводили барботированием аргона в течение 30 минут через капилляр (5). Насыщение кислородом осуществляли барботированием кислорода при атмосферном давлении. В условиях насыщения концентрация растворенного кислорода составляла 2.2 ммоль/л .^[13] Режим естественной конвекции устанавливался в течение 3 минут после извлечения капилляра из раствора. После этого регистрировали ЦВА при скоростях сканирования потенциала от 5 до 1000 мВ/с . Для исследования процессов взаимодействия порфиринов с супероксид анион-радикалом ($O_2^{\cdot -}$) использовали первый цикл.

Обсуждение результатов

На Рисунке 4(a) представлены циклические вольтамперограммы для растворов ($H_2T(p-NH_2Ph)P$) в диметилсульфоксиде в области отрицательных потенциалов. Амплитуда RedOx пиков возрастает прямо пропорционально концентрации порфирина. Значения потенциалов составляют для катодных пиков $-1.20, -1.23, -1.24, -1.25, -1.34 \text{ В}$; для анодных пиков: $-1.11, -1.10, -1.08, -1.06, -1.05 \text{ В}$ относительно НКЭ при скорости сканирования потенциала 20 мВ/с для концентраций ($H_2T(p-NH_2Ph)P$) $0.1; 0.25; 0.5; 1.0; 2.5 \text{ ммоль/л}$, соответственно. Отношение токовых амплитуд восстановительного и окислительного пиков для ($H_2T(p-NH_2Ph)P$) близко к единице и не зависит от скорости сканирования потенциала. Это указывает на квазиобратимый характер окислительно-восстановительной реакции порфирина на Pt электроде:



Процесс электровосстановления кислорода в ДМСО протекает по одноэлектронному механизму при

потенциалах ≈ -0.8 В (относительно НКЭ) с образованием супероксид анион-радикала:^[14]



Процесс электровосстановления кислорода (Рисунок 4(б)) приводит к заметно большему току, чем в случае порфирина, взятого при близкой концентрации. Значения потенциалов катодного и анодного пиков относительно НКЭ при скорости сканирования 20 мВ/с в условиях насыщения раствора фонового электролита кислородом равны -1.25 и -0.29 В, соответственно. Расстояние между потенциалами пиков окисления O_2 и электроокисления $\text{O}_2^{\bullet-}$ существенно больше, чем для порфирина.

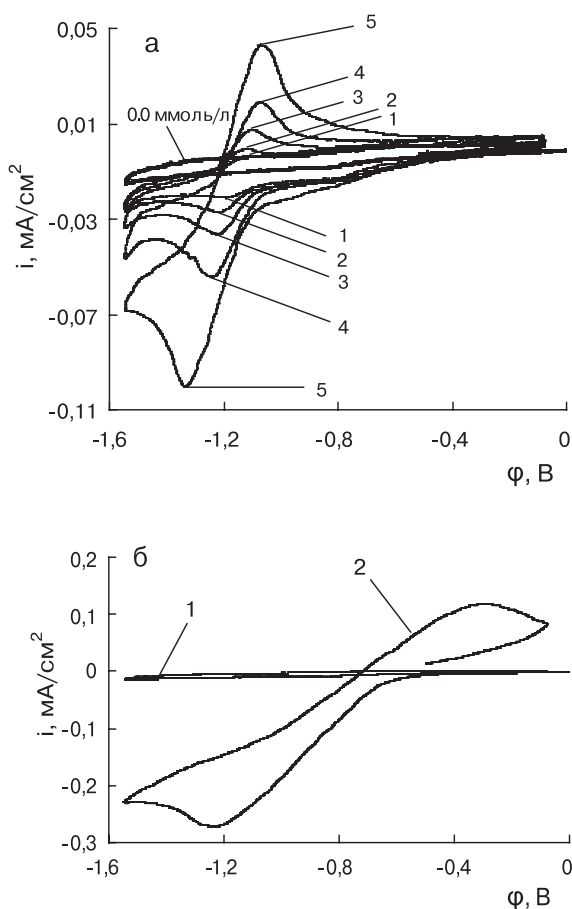
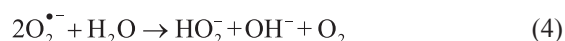


Рисунок 4. ЦВА окислительно-восстановительного процесса (а) в деаэрированном растворе ($\text{H}_2\text{T}(p\text{-NH}_2\text{Ph})\text{P}$) в ДМСО при концентрациях порфирина: 1 – 0.10; 2 – 0.25; 3 – 0.50; 4 – 1.00; 5 – 2.50 ммоль/л; (б) фонового электролита: деаэрированного (1) и насыщенного кислородом (2).

При возрастании скорости развертки потенциала соотношение анодного и катодного пиков в RedOx паре $\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$ увеличивается и стремится к единице. Такое поведение амплитуд токов позволяет утверждать, что электрохимическая стадия сопровождается протеканием химических реакций. Согласно литературным данным^[15,16] в ДМСО и других апротонных растворителях в присутствии следов воды следует ожидать реакций (1) и (2):



В случае образования высоко реакционно-способных радикалов (например, OH^\bullet), время их жизни ограничено процессами взаимодействия с растворителем.^[17] Радикал $\text{O}_2^{\bullet-}$ не вступает в химические взаимодействия с апротонными растворителями, что позволяет использовать метод электролиза при контролируемом потенциале для количественного накопления радикала в растворе.^[18,19]

При обработке результатов циклической вольтамперометрии использовали традиционные подходы, описанные в ряде классических научных изданий (например,^[20]).

Окислительно-восстановительный потенциал реакции электровосстановления ($\text{H}_2\text{T}(p\text{-NH}_2\text{Ph})\text{P}$), рассчитанный по соотношению $E_{\text{RedOx}} = 0.5(E_{\text{ox}} + E_{\text{red}})$, не зависит от концентрации порфирина и скорости сканирования потенциала и составляет ≈ -1.18 В, что находится в хорошем согласии с литературными данными.^[3,12] Аналогичный расчет окислительно-восстановительного потенциала пары $\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$ приводит к величине ≈ -0.8 В, что соответствует литературным данным.^[14]

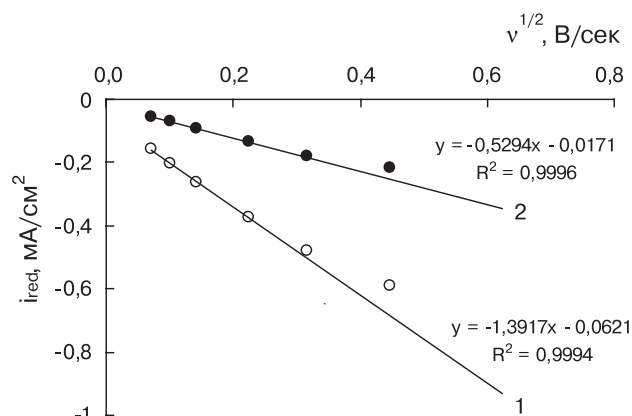


Рисунок 5. Влияние скорости сканирования потенциала на ток электровосстановления кислорода (1) и порфирина (2). Аппроксимирующие прямые проведены по первым четырем точкам.

Увеличение скорости сканирования потенциала ведет к росту плотности тока электровосстановления (Рисунок 5) как для O_2 , так и для ($\text{H}_2\text{T}(p\text{-NH}_2\text{Ph})\text{P}$). Для скоростей сканирования менее 50 мВ/с зависимость линейна в координатах $i_{\text{red}}(v^{0.5})$ и экстраполируется в ноль, что закономерно для случая транспортных ограничений, когда лимитирующей стадией электродного процесса является диффузия электроактивных частиц к границе раздела фаз. Отклонение экспериментальной зависимости от соответствующей прямой при высоких скоростях сканирования потенциала указывает на необходимость учета кинетических ограничений.

В условиях диффузионного контроля величина плотности тока (i_p), измеренная при потенциале пика, подчиняется уравнению Ренделса-Шевчика,^[21] которое для температуры 25 °С может быть представлено в виде

$$i_p = -2.69 \cdot 10^5 n^{3/2} D^{1/2} [C]_{\infty} v^{1/2} \quad (I),$$

где n – число электронов, участвующих в электрохимической стадии; D – коэффициент диффузии окислителя; $[C]_{\infty}$ – концентрация окислителя в объеме электролита; v – скорость сканирования потенциала.

Коэффициенты диффузии порфирина и кислорода в ДМСО, рассчитанные по соотношению (I), составили величину $(1.31 \pm 0.30) \cdot 10^{-6}$ см²/с и $(1.54 \pm 0.10) \cdot 10^{-5}$ см²/с, соответственно. Расчет коэффициентов диффузии для различных концентраций $H_2T(p-NH_2Ph)P$ приводит к близким значениям, что указывает на отсутствие ассоциатов порфирина в растворе. Для кислорода полученное значение коэффициента диффузии находится в хорошем согласии с данными.^[22]

В насыщенном кислородом растворе порфирина содержится два сорта электроактивных частиц. При отсутствии кинетических ограничений по каждому сорту частиц можно ожидать аддитивности диффузионных токов. Данное предположение проверено при помощи кулонометрического анализа вольтамперограмм (Таблица 1). Заряд определен интегрированием $i(t)$ зависимостей, соответствующего электровосстановительного процесса: Q_1 – $H_2T(p-NH_2Ph)P$ (2.5 ммоль/л) в деаэрированном растворе; Q_2 – кислорода; Q_3 – для $H_2T(p-NH_2Ph)P$ в насыщенном кислородом растворе.

Таблица 1. Кулонометрические характеристики электровосстановительных процессов.

Q_1 , мКл	Q_2 , мКл	$Q_1 + Q_2$, мКл	Q_3	Отклонение от аддитивности, %
3.7	16.4	20.1	21.2	4.5

Ожидаемая на основании аддитивности величина прошедшего заряда ($Q_1 + Q_2$) менее чем на 5 % отличается от величины Q_3 , определенной экспериментально при электровосстановлении $H_2T(p-NH_2Ph)P$ в насыщенном кислородом растворе. На основании этого можно утверждать, что адсорбция $H_2T(p-NH_2Ph)P$ на поверхности рабочего электрода не приводит к ингибированию процесса электровосстановления кислорода. Увеличение величины прошедшего заряда может быть связано с образованием аддукта $O_2^{\bullet-}$ и порфирина в случае более легкого окисления этого аддукта. Однако, это предположение не может объяснить снижение тока электроокисления при повышении концентрации порфирина. Поэтому при малых концентрациях порфирина в растворе смещение положения пика электроокисления и увеличение его интенсивности (Рисунок 6), по-видимому, связано с изменением скорости гетерогенного переноса электрона. Так как малые добавки порфирина уменьшают разность потенциалов между катодным и анодным пиками RedOx процесса $O_2/O_2^{\bullet-}$, следует предположить увеличение константы скорости гетерогенного переноса электрона в присутствии порфирина.

Повышение концентрации $H_2T(p-NH_2Ph)P$ приводит к снижению тока электроокисления $O_2^{\bullet-}$ вследствие антиоксидантной активности порфирина к этому радикалу. Взаимодействие антиоксиданта с супероксид анион-радикалом происходит на фоне протекания па-

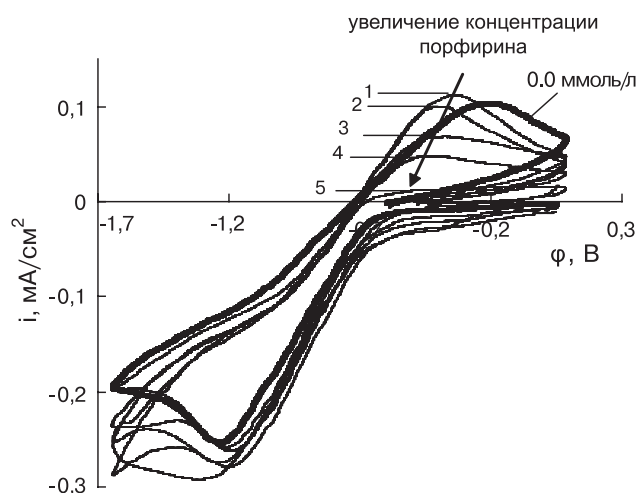


Рисунок 6. Влияние порфирина на RedOx процесс $O_2/O_2^{\bullet-}$. Концентрации $H_2T(p-NH_2Ph)P$: 1 – 0.10; 2 – 0.25; 3 – 0.50; 4 – 1.00; 5 – 2.50 ммоль/л. Скорость сканирования потенциала 20 мВ/с.

раллельных реакций (3) и (4). Согласно литературным данным, скорость этих реакций невысока. В частности, при 25 °С для реакции (3) константа скорости составляет величину $4.38 \cdot 10^3$ моль⁻¹·с⁻¹ (в ДМСО),^[18] а для реакции (4) $(0.5 \div 3.5) \cdot 10^{-3}$ моль⁻¹·с⁻¹ (в ДМФА).^[23] Типичная величина константы скорости реакции супероксид анион-радикала с ферментами (деактивирующими супероксид анион-радикалы в организме) 10^9 моль⁻¹·с⁻¹.^[24] На основании этого влиянием реакций (3) и (4) можно пренебречь и оценивать антиоксидантную активность по величине пика электроокисления $O_2^{\bullet-}$. Величину антиоксидантной активности оценили параметром IC_{50} ,^[25] который равен концентрации антиоксиданта, приводящей к уменьшению вдвое тока электроокисления $O_2^{\bullet-}$ (Рисунок 7).

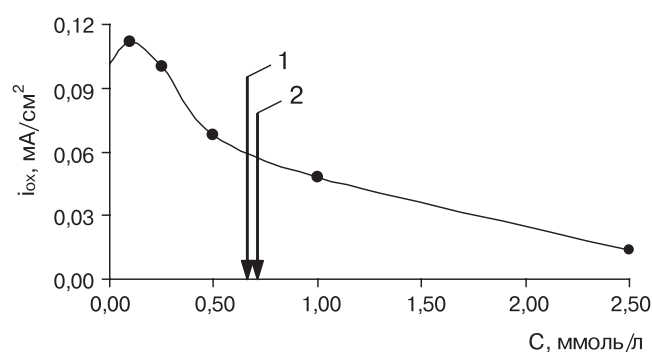


Рисунок 7. Влияние концентрации порфирина на ток электроокисления анион-радикала $O_2^{\bullet-}$. Значение IC_{50} для: 1 – $H_2T(p-NH_2Ph)P$, 2 – для аскорбиновой кислоты.

Сопоставление антиоксидантной активности исследуемого порфирина ($IC_{50} = 0.67$ ммоль/л) с антиоксидантной активностью аскорбиновой кислоты ($IC_{50} = 0.70$ ммоль/л), определенной тем же методом,^[25] позволяет утверждать, что $H_2T(p-NH_2Ph)P$ обладает ярко выраженной антиоксидантной активностью по отношению к супероксид анион-радикалу.

Список литературы

References

1. Droge W. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 47-95.
2. Halliwell B., Cross C.E. *Environ. Health Perspect.* **1994**, *102*, 5-12
3. The Porphyrin Handbook (Kadish K.M., Smith K.M., Guliard R., Eds.). Academic Press: New York, **2000-2003**. Vols. I-XX.
4. Porfiriny: Struktura, Svoystva, Sintez [The Porphyrins: Structure, Properties, Synthesis] (Enikolopyan N.S., Ed.). Moscow: Nauka, **1985**, 333 p. (in Russ.).
5. Tesakova M.V., Noskov A.V., Bazanov M.I., Berezina N.M., Parfenyuk V.I. *Russ. J. Phys. Chem. A* **2012**, *86*, 9-13.
6. Tyurin V., Zhang J., Glukova A., Milaeva E. *Macroheterocycles* **2011**, *4*, 211-212.
7. Safeer A., Faria S. *Czech J. Food Sci.* **2012**, *30*, 153-163.
8. Popov I., Kuzmin S., Chulovskaya S., Semeikin A., Parfenyuk V. *Macroheterocycles* **2012**, *5*, 131-135.
9. Tesakova M., Popov I., Sheinin V., Semeikin A., Parfenyuk V., Koifman O. *Macroheterocycles* **2013**, *6*, 152-157.
10. Semeikin A.S., Koifman O.I., Berezin B.D. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1982**, *10*, 1046-1047.
11. Lan M., Zhao H., Yuan H., Jiang Ch., Zuo Sh., Jiang Y. *Dyes Pigm.* **2007**, *74*, 357-362.
12. Huang Chih Wei, Chiu Kuo Yuan, Cheng Shu-Hua *Dalton Trans.* **2005**, 2417-2422.
13. Emmerich W., Rubin B. *Chem. Rev.* **1973**, *73*, 1-9.
14. Fujinaga T., Isutsy K., Adachi T. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1969**, *42*, 140-145.
15. Ortiz M.E., Nunez-Vergara L.J., Squella J.A. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *519*, 46-52.
16. AlNashef I.M., Leonard M.L., Kittle M.C., Matthews M.A., Weidner J.W. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2001**, *4*, 16-18.
17. Kurmaz V.A., Kotkin A.S., Simbirtseva G.V. *J. Solid State Electrochem.* **2011**, *15*, 2119-2126.
18. Ortiz M.E., Nunez-Vergara L.J., Squella J.A. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 292-296.
19. Jeon S., Sawyer D.T., Paul K.S. *Tsang Methods for Producing Superoxide Ion in situ*. US patent 5143710 A, **1992**.
20. Brett C.M.A., Brett M.A.O. *Electrochemistry. Principles, Methods and Applications*. Oxford Universiti Press Inc.: New York, **1993**.
21. Randles J.E.B. *Trans. Faraday Soc.* **1948**, *44*, 327.
22. Laoire C.O., Mukerjee S., Abraham K.M. *J. Phys. Chem.* **2010**, *114*, 9178-9186.
23. Afanas'ev I.B., Kuprianova N.S. *Int. J. Chem. Kinet.* **1983**, *15*, 1057-1062.
24. Fielden E.M., Roberts P.B., Bray R.C., Lowe D.J., Mautner G.N., Rotilio G., Calabrese L. *Biochem J.* **1974**, *139*, 49-60.
25. Wei Ying-Liang, Dang Xue-Ping, Hu Sheng-Shui. *Wuhan University Journal of Natural Sciences* **2003**, *8*, 866-870.

Received 08.10.2013

Accepted 23.12.2013