

Р. Ф. Бакеева, О. Е. Вахитова, В. В. Зобов,
А. Д. Волошина, Т. С. Горбунова, В. Ф. Сопин

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИЦЕЛЛЯРНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ 5,7-ДИХЛОР-4,6-ДИНИТРОБЕНЗОФУРОКСАНА

Ключевые слова: солюбилизация, критическая концентрация мицеллообразования, поверхностно-активные вещества, биологическая активность, 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуороксан, *Trichophyton mentagrophytes* и *Candida albicans*.

Установлена противогрибковая активность 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуороксана, ДХДНБФО, солюбилизированного в мицеллярных растворах: додецилсульфата натрия (ДСН); цетилтриметиламмонийбромида, (ЦТАБ); p - (1, 1, 3, 3-тетраметилбутил фенокси) полиоксиэтилен гликоля; Tr X-100, цетилового эфира полиоксиэтилена (10); Brij 56 относительно Trichophyton mentagrophytes и Candida albicans.

Keywords: solubilization, critical micellar concentration, surfactant, biological activity, 5,7-dichlorine-4,6-dinitrobenzophyroxan, *Trichophyton mentagrophytes* и *Candida albicans*.

We have studied the fungicide activity of solubilized 5,7-dichlorine-4,6-dinitrobenzophyroxan in micelles of cetyltrimethylammonium bromide, sodium dodecyl sulphate, Tr X 100, Brij 56 and have shown that they depress the growth of Trichophyton mentagrophytes and Candida albicans.

Разработка новых препаратов, создание новых лекарственных форм, а также технологии их получения является одним из современных направлений фармакологии. Актуальным на сегодняшний день является создание водных растворимых форм лекарственных препаратов, поскольку использование плохо растворимых лекарственных препаратов в виде порошков, микроэмульсий, суспензий достаточно часто приводит к закупорке капилляров. Одним из подходов к повышению растворимости является использование мицеллярных систем [1-6]. Однако, не ясно, будет ли сохраняться биологическая активность лекарственных веществ при солюбилизации в мицеллах.

Биологическая активность химических соединений стимулирует их исследование на предмет пригодности для последующего применения в качестве лекарственных средств. В частности, производные бензофуороксана обладают широким спектром биологической активности [7].

Известна антибактериальная и антигрибковая активность гетероциклических производных охинонона, способность ингибировать моноаминоксидазу, а также сосудорасширяющее действие определенным образом замещенных бензофуороксанов [7].

5,7-дихлор-4,6-динитробензофуороксан, ДХДНБФО, является компонентом некоторых биологически активных смесей [8]. Ярко выраженная антибактериальная и фунгицидная активность позволяют использовать, в качестве прекурсоров лекарственных препаратов [8].

Изученные авторами [9] 14 соединений в ряду 5,7-дизамещенных-4,6-динитробензофуороксана обладают выраженными антимикробными, антимикотическими и акарицидными свойствами.

Исследование смеси 4-нитро- и 6-нитро-5,7-дихлорбензофуороксана - «Нитроксан» [10] показало широкий спектр проявляемой ею биологической активности - фунгицидной, бактерицидной, акарицидной, спороцидной, вирулицидной.

Смесь 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуороксана, 5,7-дихлор-6-нитробензофуороксана и 5,7-дихлор-4-нитробензофуороксана,

которая известна как «Тримиксан» оказывает выраженный эффект на нитроксидагическое состояние организма [11]. Этим же свойством обладают «Хлофузан» (4-хлор-6,7-фуороксанбензофуороксан) и «Фениксан» (5,7-бис(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофуороксан) [12].

ДХДНБФО в качестве основного компонента входит в состав лекарственной формы наружного применения «Димиксан» - двухкомпонентной системы на основе 5-нитро-4,6-дихлорбензофуороксана и 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуороксана. Наиболее перспективной областью применения «Димиксана» как лекарственного средства вследствие его высокой акарицидной и фунгицидной активности является ветеринария и медицина [13].

Известны антипаразитарные препараты «Дегельм» и «Депрот», основой которых являются четвертичные соли фосфония с высшими алкильными радикалами нитрозамещенного бензофуороксана в качестве генератора NO [14,15].

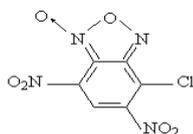
В связи с тем, что растворимость соединений и композиций на основе производных бензофуороксана в воде довольно ограничена, ранее уже возникла необходимость подбора подходящего растворителя этих форм для создания наиболее удобной для применения лекарственной формы. В связи с плохой растворимостью «Эктоцида» в воде возникла необходимость подобрать подходящие растворители для создания удобных для применения лекарственных форм. Лучшим растворителем для «Эктоцида» явился диметилсульфоксид. При разработке стойких суспензий в качестве поверхностно - активных веществ авторами [16] использовались ПЭО - 400 и стеарокс — 6. В качестве мазевой основы использовали ПЭО - 400, ПЭО-1500 и вазелин. Также были показаны стойкие суспензии как для композиций на основе «Димиксана». Например, были разработаны состав и методика получения солюбилизированной формы «Димиксана» в водной среде [13].

Таким образом, благодаря своей биологической активности бензофуороксаны используются в качестве компонента лекарственных препаратов антигельминтного действия, при лечении грибковых

и чесоточных заболеваний, а также могут быть прекурсором лекарственных средств сосудорасширяющего, антиагрегатирующего, противоракового, антилейкемического действия. Однако, биологическая активность ДХДНБФО, солюбилизованного в классических мицеллах ионных и неионных ПАВ не изучалась.

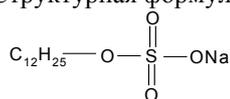
Экспериментальная часть

5,7-Дихлор-4,6-динитробензофуоксан:

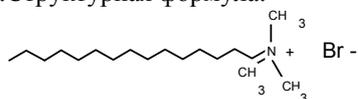


ДХДНБФО, синтезирован Л.М. Юсуповой в лаборатории на кафедре ХТОСА КНИТУ по известной методике [17]. Хорошо растворим в органических растворителях (ДМСО, ацетонитрил), но не растворяется в воде и гексане. Молекулярная масса 295 г/моль.

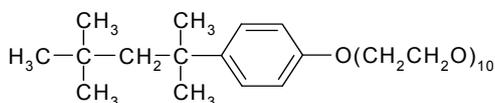
В работе использовали следующие ПАВ. *Додецилсульфат натрия* (ДСН) фирмы «Aldrich». брутто-формула $C_{12}H_{25}OSO_3Na$, после трехкратной перекристаллизации из этанола. Содержание основного вещества 98%. Структурная формула:



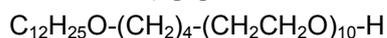
Цетилтриметиламмонийбромид, (ЦТАБ) $C_{16}H_{33}N^+(CH_3)_3Br$ фирмы «Sigma», перекристаллизовывали из этанола. Содержание основного вещества 99,5%. Структурная формула:



p-1,1,3,3-тетраметилбутил фенокси полиоксипропилен гликоль, Тг Х-100 фирмы «Merck». Брутто формула: $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$, где $n = 9-10$. Содержание основного вещества составляет 98,5 %. Структурная формула:



Цетиловый эфир полиоксиэтилена (10), Brij 56 (полиалкиленоксид) фирмы «Aldrich»:



Для приготовления растворов использовали воду дважды перегнанную деионизированную воду.

Для определения биологической активности готовили водные мицеллярные растворы в концентрациях: ДСН - $1,00 \cdot 10^{-2}$ моль/л; ЦТАБ - $5,00 \cdot 10^{-3}$ моль/л; Тг Х-100 - $5,00 \cdot 10^{-3}$ моль/л; Brij 56 - $5,00 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Антимикробное действие композиций определяли аналогично [18]. В качестве тест-объектов нами были использованы следующие микроорганизмы: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* NCTC 8035, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Trichophyton*

mentagrophytes var. *gypseum* 1773, *Aspergillus niger* (ВКМФ-1119).

Бактериостатические фунгистатические свойства изучали методом серийных разведений в жидкой питательной среде по методикам [18]. Для приготовления композиций первоначально готовили мицеллярные растворы изучаемых поверхностно-активных веществ. Затем проводили процесс солюбилизации ДХДНБФО. Для этого избыточное количество ДХДНБФО заливали раствором ПАВ определенной концентрации (в эппендорфе), и тщательно встряхивали в течение 24 часов до достижения максимальной растворимости. Осадок отделяли при помощи центрифуги при температуре $25 \pm 0,5$ °С. Концентрация солюбилизованного ДХДНБФО определялась спектрофотометрически при 410 нм, в пересчете на этанол с использованием $\epsilon = 2259$ моль $^{-1}$ см $^{-1}$ на спектрофотометре Agilent 8453.

Антимикробное действие изучалось для растворов ДХДНБФО, солюбилизованных в мицеллах изучаемых ПАВ в исходных концентрациях: для водного раствора - $0,00153$ моль/л; для раствора Тг Х-100 - $0,00488$ моль/л; для Brij 56 - $0,00590$ моль/л; для ДСН - $0,00595$ моль/л; для ЦТАБ - $0,00301$ моль/л; для бинарных растворов ДМСО : H_2O (20 об.%.:80 об.%) - $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л. 1 мл соответствующего раствора ДХДНБФО добавляли непосредственно в 10 мл агаризованной питательной среды (МПА) или среды Сабуро (для грибов). Полученную суспензию тщательно перемешивали и вносили в стерильные чашки Петри. В контрольные чашки добавляли 1 мл соответствующего растворителя. Опыт проводили в трёхкратной повторности. После застывания агара на поверхность среды бактериологической петлёй наносили культуру каждого тест-штамма бактерий и грибов в виде блишек на МПА и агар Сабуро соответственно. Чашки с МПА инкубировали при температуре $(32,5 \pm 2,5)$ °С в течение 48 ч. Чашки со средой Сабуро инкубировали при температуре $(22,5 \pm 2,5)$ °С в течение 5 суток.

Испытания проводили в лаборатории Химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН.

Обсуждение результатов

Для увеличения растворимости ДХДНБФО мы использовали мицеллярные растворы ионных ПАВ: цетилтриметиламмоний бромид, ЦТАБ; додецилсульфата натрия, ДСН. В качестве неионных ПАВ использовали: Тг Х-100, который имеет в составе молекулы гидрофобный (4-третоктилфенол) и гидрофильные фрагменты (из остатков оксида этилена, в количестве 9-10); Brij 56, который содержит в качестве гидрофобного блока додецильный радикал нормального строения: $C_{12}H_{25}O-(CH_2)_4-(CH_2CH_2O)_{10}-H$.

Для определения биологической активности использовали мицеллярные растворы соответствующих ПАВ с солюбилизованным ДХДНБФО

Впервые введенное Мак - Бенем в понятие «солюбилизация» (от позднелатинского *solubilis* - растворимый), в настоящее время означает «коллоидное растворение, самопроизвольное и обратимое

проникание какого-либо вещества (солюбилизата), слаборастворимого в данной жидкой среде, внутрь находящихся в ней *мицелл* поверхностно-активного вещества или молекулярных клубков (глобул) высокомолекулярного соединения» [2].

Для организованных, в частности мицеллярных сред, образованных ПАВ, солюбилизация возможна благодаря их специфическому строению. Как известно, мицеллы – это агрегаты дифильных молекул, имеющих в своем составе длинный гидрофобный фрагмент (как правило, углеводородный радикал различного строения) и гидрофильный фрагмент – головную группу. Мицеллы образуются по достижении критической концентрации, которая называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). ККМ зависит от многих факторов. Этот вопрос хорошо описан в литературе [19-22] и поэтому мы на нем не останавливаемся. Однако отметим, что именно дифильное строение мицелл ответственно за возможность проявления солюбилизации, возможность инкорпорировать различные по гидрофобности и полярности соединения в различной области – неполярном ядре, в области головных групп, в пограничном слое. Например, гидрофобное ядро мицеллы может быть использовано как область для инкапсулирования разнообразных плохо растворимых терапевтических и диагностических агентов. Такое инкапсулирование существенно увеличивает биодоступность, защищает их от деструктивных факторов (рис. 1) [22].

Мицеллы можно рассматривать как потенциальные системы для доставки лекарств, преимуществом которых является легкость приготовления [3].

По сути дела большинство лекарственных веществ (ЛВ) являются органическими соединениями и закономерности, выявленные для них, наблюдаются для ЛВ.

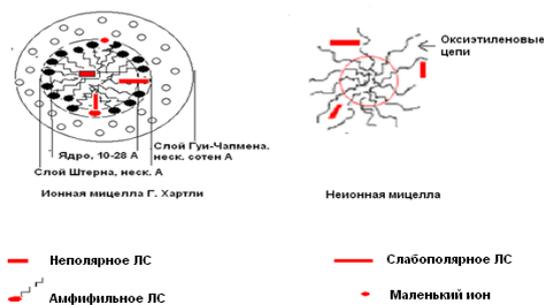


Рис. 1 - Схематическое представление солюбилизации в классических мицеллах ионных и неионных ПАВ

Согласно концепции автора [3], мицеллярная солюбилизация ЛВ может увеличить его биодоступность и стабильность, поэтому дизайн оболочки для ЛВ, является интересной задачей.

Для выбора подходящей среды требуется предварительное изучение растворимости ЛВ в системах мицеллярных ПАВ, что и было проведено для ДХДНБФО в [1] и показано на основе анализа физико-химических характеристик солюбилизации,

что предпочтительными для этих целей являются мицеллы неионных ПАВ.

5,7-дихлор-4,6-динитробензфуроксан является прекурсором лекарственных препаратов, однако неизвестно сохранится ли его биологическая активность в мицеллярных растворах. В связи с этим нами исследовано действие ДХДНБФО, солюбилизированного в мицеллах ДСН, ЦТАБ, Tr X-100, Brij 56 на *Staphilococcus aureus*, *Escherich*, *Bacillus cereus*, *Trichophyton mentagrophyte*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*. Методика определения биологической активности показана в экспериментальной части, а результаты испытаний – в табл.1

Таблица 1 - Результаты испытаний на биологическую активность мицеллярных растворов ДХДНБФО

Наименование препарата	Бактериальные культуры			Культуры грибов		
	Staphylococcus aureus ATCC 6538-P	Escherichia coli ATCC 25922	Bacillus cereus NC TC 8035	Trichophyton mentagrophytes var. gypseum 1773	Aspergillus niger BK MF-1119	Candida albicans ATCC 885-653
ЦТАБ (5*10 ⁻³ моль/л)	-	-	-	±	±	+
I+ЦТАБ I 0,0030 моль/л	±	±	±	-	±	-
Brij56 (5*10 ⁻³ моль/л)	+	+	+	±	+	+
I+Brij 56 I 0,00590 моль/л	+	+	+	-	±	-
Tr X-100 (5*10 ⁻³ моль/л)	+	+	+	-	±	±
I+Tr X-100 I 0,0049 моль/л	+	+	+	-	±	-
ДСН (1*10 ⁻² моль/л)	+	+	+	-	±	-
I+ДСН I 0,0060 моль/л	+	+	+	-	±	-
ДМСО: Н ₂ О (20%): (80%)	+	+	+	+	+	+
I+ДМСО I 0,02 моль/л	+	+	+	-	±	-
Н ₂ О	+	+	+	+	+	+
I+Н ₂ О I 0,0016 моль/л	+	+	+	-	±	-
Контроль тест-микробов	+	+	+	+	+	+

I-ДХДНБФО

Наличие такого же роста тест-микробов, как в контроле, обозначают знаком (+), отсутствие роста знаком (-), слабый, замед-

ленный или угнетённый рост знаком – (±). Если по сравнению с контролем на средах с препаратом наблюдаются заметное уменьшение количества колоний на чашках (более 70%) или отсутствие роста тест-микроорганизмов, можно сделать заключение о наличии антимикробного действия.

Антибактериальным действием ДХДНБФО, солюбилизованный в мицеллах ДСН, Тг Х 100, Вгij 56 не обладает. Мицеллы ЦТАБ обладают антибактериальным действием. Следует отметить, что ДХДНБФО способствует незначительному угнетению роста бактериальных тест-штаммов *Staphylococcus aureus* АТСС 6538-Р, *Escherichia coli* АТСС 25922, *Bacillus cereus* NCTC 8035. При этом ДХДНБФО проявляет одинаковое противогрибковое действие в водных и водно-мицеллярных средах. Причем в отношении дрожжеподобного гриба *Candida albicans* и *Trichophyton mentagrophytes* (возбудитель дерматозов человека и животных) наблюдается полное угнетение тест-микроорганизмов, а в случае фитопатогенного гриба *Aspergillus niger* происходит лишь незначительное замедление его роста.

Таким образом, антигрибковая активность ДХДНБФО сохраняется в мицеллярных системах, изученных анионного и неионных ПАВ. Учитывая данные по солюбилизации и сохранение антигрибковой активности, мицеллярные системы неионных ПАВ можно рекомендовать в качестве наноконтейнеров для ДХДНБФО при разработке систем транспорта лекарственных веществ. В этом случае предпочтительными являются мицеллы неионных ПАВ Вгij 56 и Тг Х-100 вследствие их меньшей токсичности и меньших значениях концентраций при которых образуются мицеллы, ККМ.

Авторы выражают благодарность профессору КХТОСА КНИТУ за предоставленный образец ДХДНБФО.

Литература

1. Бакеева, Р.Ф. Солюбилизационная способность неионных ПАВ по отношению к биологически активному 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуросану / Р.Ф.Бакеева, О.Е. Вахитова, Л.М. Юсупова, В.Ф. Сопин // Вестник Казан. технол. ун-та. – 2013. – Т16. - №4. - С.73-77.
2. Mc Bain, H.E.L. Solubilization and related phenomena / H.E.L Mc Bain; E. Hutehillson // N.Y.; Acad. Press. - 1955. – 254 p.].
3. Bhat, P.A. Rather Solubilization Capabilities of Some Cationic, Anionic, and Nonionic Surfactants toward the Poorly Water-Soluble Antibiotic Drug Erythromycin / P. A. Bhat, A. A. Dar, G. Mohammad / J. Chem.Eng.Data. – 2008. – V.53. – P. 1271-1277]
4. Бакеева, Р.Ф. Использование наноструктурированных мицеллярных сред для модификации 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуросана при определении ароматических аминов / Р.Ф.Бакеева, Т.С. Горбунова, О.Е. Вахитова, Л.И. Сафиуллина, С.Ю. Гармонов, Л.М. Юсупова // Вестник Казан. технол. ун-та. - 2010 г.- № 10 с.37-45
5. Бакеева, Р.Ф. Модификация 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуросана для применения в качестве аналитического реагента и компонента биологически активных композиций. Ч.1 иммобилизация смешанными мицеллами / Р.Ф.Бакеева, Т.С. Горбунова, Л.И. Сафиуллина, О.Е., Вахитова, С.Ю. Гармонов, Л.М. Юсупова,

В.Ф. Сопин // Вестник Казан. технол. ун-та. - 2010 г.- № 5 С.48-54

6. Бакеева, Р.Ф. Модификация 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуросана для применения в качестве аналитического реагента и компонента биологически активных композиций. Ч.II Солюбилизация смешанными мицеллами / Р.Ф.Бакеева, Т.С. Горбунова, Л.И. Сафиуллина, О.Е. Вахитова, С.Ю. Васютина, Л.М. Юсупова, В.Ф. Сопин // Вестник Казан. технол. ун-та. - 2010 г.- № 5 с.60-65
7. Хмельницкий, Л.И. Химия фуросанов (реакции и применение) / Л.И. Хмельницкий, С.С Новиков, Т.И. Годовикова. – М.: Наука, 1996. – 430с.
8. Юсупова, Л.М., Спатлова, Л.В., Фаляхов, И.Ф., Гарипов, Т.В., Шиндала, М.К. Биологическая активность функциональнозамещенных нитропроизводных бензофуросанов // Материалы второй международной конф. «Химия и биологическая активность кислород - и серо-содержащих гетероциклов». – Черногловка - 2003. - С. 122.
9. Пат.2255935 Российская Федерация. 5,7-Дизамещенный-4,6-динитробензофуросан общей формулы $C_6N_4O_6(R1)_2$, обладающий акрицидной и бактерицидной активностью/Л.М. Юсупова, И.Ф. Фаляхов, Л.В. Спатлова, Т.В. Гарипова; опубл. 10.07.2005, Бюл.№19]
10. Салахова, А.С. Разработка рационального способа получения высокоэффективного лекарственного препарата «Нитроксан» // Дисс. к. х. н. – Казань, - 1999. – 153с., 69.
11. Мухаметшина, А.М. Разработка технологии получения высокоэффективного биологически активного вещества «Тримиксан» широкого спектра действия: /автореф. дисс. канд. хим. наук: 15.00.02 / А.М.Мухаметшина.- Казань, 2008. – 19 с.
12. Пат. 2169564 РФ, МКИ 7А61К31/4184; А61Р31/10. Состав для лечения сквамозно-гиперкератотической формы рубромикоза стоп и кистей / Куклин В.Т., Торбина О.В., Фридин В.В., Молодых Ж.В., Гарипов Т.В.; ИОФХ им. А.Е.Арбузова Казанского филиала РАН, Казанская государственная медицинская академия, Казанский государственный технологический университет. - №98112830/14; заявл. 06.07.1998; опубл. 27.06.2001
13. Горелова, Е.Г. Нитропроизводные дихлорбензофуросана и их акрицидные составы в водных средах: автореф. дисс. канд. хим. наук: 15.00.02 / Горелова Елена Георгиевна. - Казань, 2009, - 18 с.
14. Пат. 2413513 Российская Федерация, МПК А61К А61Р. Антигельминтная композиция на основе соли четвертичного фосфония и замещенного динитробензофуросана / Галкина И.В., Егорова С.Н., Юсупова Л.М., Мавлиханов Р.Ф., Лутфуллина Н.А., Воробьева Н.В., Тудрий Е.В., Спатлова Л.В., Штырлин Ю.Г., Галкин В.И., Лутфуллин М.Х.; заявитель и патентообладатель Казанский государственный университет (RU), Галкина Ирина Васильевна (RU). — № 2009112924 ; заявл. 06.04.2009; опубл. 10.03.2011, Бюл. № 7. — 11 с.
15. Пат.2452477 Антибактериальная и антимикотическая композиция широкого спектра действия на основе солей фосфония и замещенного бензофуросана / Галкина И.В., Поздеев О.К., Шулаева, Егорова С.Н., Юсупова Л.М., Тудрий Е.В., Бахтиярова Ю.В., Морозова Л.Г., Кипенская Л.В., Ключина Л.В., Закирьянова Ф.Н., Галкин В.И.; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет» (ФГАОУ ВПО КФУ) (RU), Галкина И.В. (С1RU).RU 2452477; заявл. 12.01.2011; опубл. 10.06.2012 Бюл. №16.
16. Пат. 2404975 Российская Федерация, МПК С07D А61К А61Р. Антигельминтное средство [Текст] / Юсу-

- пова Л.М., Спатлова Л.В., Гармонов С.Ю., Галкина И.В., Бакеева Р.Ф., Лутфуллин М.Х., Идрисов А.М., Никифоров П.Г., Лутфуллина Н.А.; заявитель и патентообладатель Казанский государственный технологический университет (RU), Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана (RU). — № 2009115058; заявл. 20.04.2009; опубл. 27.10.2010, Бюл. № 30. — 10 с.]
17. Пат. 2032678 Российская Федерация, Бюл. № 10 (1995)
18. *Милованова, С.Н.* Методы экспериментальной химиотерапии. - 2-е изд. / С.Н. Милованова, З.Г. Степанищева // М.: Медицина". - 1971. - С. 318-321,81. Ведьмина, Е.А. Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней / Е.А. Ведьмина, Н.М. Фурер //М.: "Медицина".- 1964. - Т.1. - С. 670-675]. [18]ГФ XII ОФС (42-0067-07) с. 163-166 (метод репликаций).
19. *Фролов, Ю.Г.* Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы: учебник для вузов / Ю.Г. Фролов; 2-е изд., перераб. и доп. // М.: «Химия» - 1988. - 464 с.,
20. *Mittel, K.* Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии / К. Миттел; пер. с англ. – М.: Мир.- 1980. – 597 с.
21. *Русанов, А.И.* Мицеллообразование в растворах поверхностно-активных веществ / А.И. Русанов. – СПб.: Химия,1992. – 280 с.
22. *Бакеева, Р.Ф.* Мицеллярные и жидкокристаллические структуры в аналитической химии / Р.Ф.Бакеева – Казань: Новое знание. – 2000. – 108 с.

©**Р. Ф. Бакеева** – д-р хим. наук, проф. каф. аналитической химии, сертификации и менеджмента качества КНИТУ, bakееva@kstu.ru, **О. Е. Вахитова** - асс. той же кафедры, vakh_i_olga@yadex.ru; **В. В. Зобов** – д-р биол. наук, зав. лаб. химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН; проф. каф. прикладной экологии К(П)ФУ, zobov@iopc.ru; **А. Д. Волошина** – мл. науч. сотр. лаб. химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН; **Т. С. Горбунова** – канд. хим. наук, доц. каф. аналитической химии, сертификации и менеджмента качества КНИТУ; **В. Ф. Соппин** – д-р хим. наук, проф., зав. каф. аналитической химии, сертификации и менеджмента качества КНИТУ.