УДК 547.979.733 + 579.2

СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ФТАЛОЦИАНИНА КОБАЛЬТА (II)

[1]Бичан Н.Г., [1]Овченкова Е.Н., [2]Гарасько Е.В., [2]Клюева М.Е.

[1]ФГБУН «Институт химии растворов им. Г.А. Крестова» Российской академии наук, Иваново, e-mail: enk@isc-ras.ru;

[2]ГБОУ ВПО «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново, e-mail: garasko@mail.ru

Исследован процесс супрамолекулярного комплексообразования между высокозамещенным фталоцианином кобальта (II) и органическими основаниями – пиридином (Py) и пиразином (Pyz). Экспериментально спектральными методами установлено, что продуктами реакции являются донорно-акцепторные комплексы стехиометрического состава 1:1. Проведена модификация полипропиленовой пленки синтезированными соединениями с целью выявления их антимикробной активности в отношении грамположительных (золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (кишечная палочка *Escherichia coli*) бактерий и дрожжеподобного гриба (*Candida albicans*). Показано, что донорно-акцепторные комплексы фталоцианина кобальта (II) обладают антибактериальной активностью против *Staphylococcus aureus* при предварительном УФ облучении (365 нм) образцов пленок, модифицированных этим соединением.

Ключевые слова: замещенный фталоцианин кобальта, пиридин, пиразин, полипропиленовые пленки, супрамолекулярные системы, антимикробная активность, грамположительные и грамотрицательные бактерии, дрожжеподобные грибы

SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SUPRAMOLECULAR SYSTEMS BASED ON PHTHALOCYANINE COBALT (II)

[1]Bichan N.G., [1]Ovchenkova E.N., [2]Garasko E.V., [2]Klyueva M.E.

[1]G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Ivanovo, e-mail: enk@isc-ras.ru;

[2]Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, e-mail: garasko@mail.ru

The formation of the supramolecular systems based on donor-acceptor complex between the highly substituted (phthalocyaninato)cobalt(II) and pyridine/pyrazine (Py)/(Pyz) was studied by spectrophotometric method. The reaction product compositions were 1:1. The modification of a polypropylene film by applying the synthesized compounds in order to identify their antimicrobial activity against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*), Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria and yeastlike fungi (*Candida albicans*) was carried out. It was shown that the supramolecular systems under investigation exhibit antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* at the preliminary UV radiation (365 nm) of the modified films.

Keywords: cobalt phthalocyanine, pyridine, pyrazine, polypropylene films, supramolecular sustems, antimicrobial activity, gram positive and gram negative bacteria, yeastlike fungus

В последние годы в связи с ростом резистентности многих бактерий и вирусов к известным антимикробным препаратам заметно вырос интерес к разработке новых супрамолекулярных систем, обладающих антимикробными свойствами [1–5]. Поиск новых стратегий борьбы с микроорганизмами, обладающими множественной лекарственной устойчивостью, является актуальной задачей. Многие авторы представляют фотодинамическую инактивацию микроорганизмов одним из перспективных альтернативных подходов в этой области, число исследований и публикаций в которой растет с каждым годом. В качестве фотосенсибилизирующих агентов в этих случаях используют макрогетероциклические соединения и их комплексы [13]. Авторы работы [11] показали антибактериальную активность фталоцианинов кобальта против патогенных бактерий *Xanthomonas citri* и *Xanthomonas Compstris.* В работе [10] исследовано антимикробное действие протопорфирина кобальта против золотистого стафилококка.

Цель исследования. Синтез супрамолекулярных донорно-акцепторных аксиальных комплексов (окта(3,5-ди-*трет*-бутилфенокси)фталоцианинато) кобальта (II) с биоактивными органическими основаниями (пиридин, пиразин), модификация поверхности полипропиленовой пленки (ПП) синтезированными соединениями и выявление их антибактериальной/противогрибковой активности.

Материалы и методы исследования

(Окта(3,5-ди-*трет*-бутилфенокси)фталоцианинато)кобальта (II) $CoPc(3,5\text{-di-}^t BuPhO)_8$ (рис. 1) был синтезирован по реакции между ацетатом кобальта (II) и соответствующим органическим лигандом ($H_2Pc(3,5\text{-di-}^t BuPhO)_8$) в кипящем

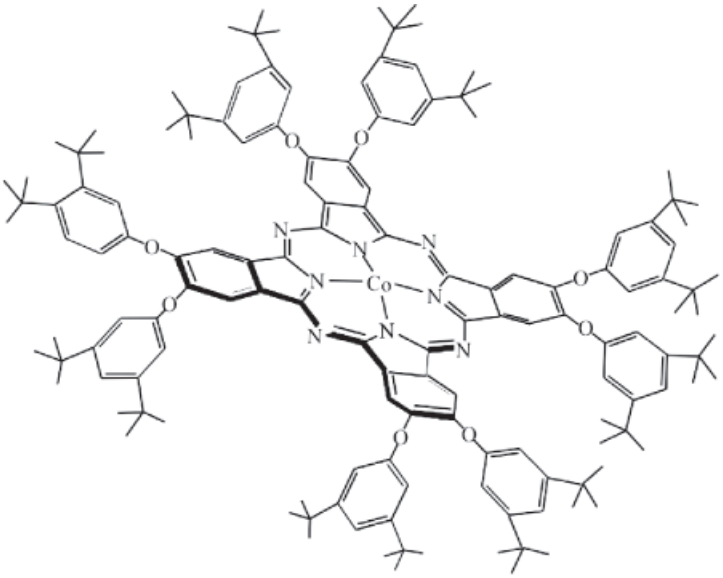
диметилформамиде и очищен колоночной хроматографией (силикагель/CH_2Cl_2). ЭСП (толуол) λ_{max} nm (lgε): 304 (4,76); 340 (4,72); 607 (4,45); 646 (4,53); 673 (5,17). ИК спектр (KBr), ν, cm^{-1}: 2964, 2905, 2868, 1608, 1588, 1524, 1457, 1415, 1363, 1348, 1297, 1274, 1246, 1198, 1145, 1095, 1052, 961, 903, 864, 836, 756, 726, 707. ^{1}H ЯМР (400 MHz; δ, ppm; $CDCl_3$): δ = 8,94 (s, 8 H), 8,03 (s, 8 p-H), 7,29 (s, 16 o-H), 1,35 (s, 144 tert-butyl-H) ppm. Найдено: C 76,79; H 7,47; N 5,23 %; $C_{144}H_{176}N_8O_8Co$ вычислено: C 78,4; H 8,04; N 5,08 %. Масс спектр (MALDI-TOF): m/z = 2203 $[M]^+$.

Реакция аксиальной координации CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ с органическими основаниями (L = Py, Pyz) была изучена при 298 K в толуоле спектрофотометрически, использовался метод молярных отношений. Готовили серию растворов в толуоле с постоянной концентрацией фталоцианинового комплекса ($5{,}0\cdot10^{-6}$ моль/л) и различными концентрациями органического основания (0–0,56 моль/л).

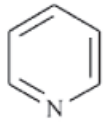
Концентрации растворов аксиальных комплексов фталоцианина кобальта с основанием для модификации полипропиленовой пленки соответствовали условиям окончания титрования исходного фталоцианина кобальта раствором органического основания (в точках эквивалентности).

Оценку биоцидного эффекта осуществляли по воздействию модифицированной синтезированными супрамолекулярными комплексами CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ с биоактивными основаниями полипропиленовой пленки (ПП) на грамположительные (*Staphylococcus aureus*), грамотрицательные (*Escherichia coli)* бактериальные культуры, а также дрожжеподобные грибы рода кандида (*Candida albicans*) на плотных и в жидких питательных средах.

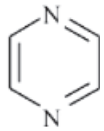
Для проведения эксперимента был использован традиционный метод оценки антимикробной активности пленок. Пленки были помещены на поверхность плотных питательных сред в чашках Петри,



а



б



в

Рис. 1. Структурные формулы CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ (а), пиридина (б) и пиразина (в)

Константы устойчивости донорно-акцепторных комплексов (K_y) определяли по уравнению (1) для трехкомпонентной равновесной системы:

$$K_y = \frac{(A_i - A_0)/(A_\infty - A_0)}{1-(A_i - A_0)/(A_\infty - A_0)} \times \frac{1}{\left(C_L^0 - C_{CoPc}^0 \cdot (A_i - A_0)/(A_\infty - A_0)\right)}, \quad (1)$$

где C_L^0, C_{CoPc}^0 – начальные концентрации органического основания и CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ в толуоле соответственно; A_0, A_i, $A\infty$ – оптические плотности при рабочей длине волны для фталоцианина кобальта, равновесной смеси при определенной концентрации молекулярного лиганда и аксиального донорно-акцепторного комплекса. Количество присоединяемых молекул органического основания определяли как тангенс угла наклона прямой lg$I$ – lgC_L где I – индикаторное отношение, определяемое по уравнению $I = (A_i - A_0)/(A_\infty - A_i)$.

засеянных «методом газона» испытуемым тест-микробом. После 24-часового термостатирования при температуре 37°C определяли величину зоны задержки роста вокруг образцов пленок. Испытания образцов пленок в жидкой питательной среде включали учет роста бактерий и грибов через 24 часа инкубации пробирок с мясопептонным бульоном (МПБ), тест-культурой и образцом пленки в термостате при 37°C. Определяли изменение мутности среды в сравнении с контролем, с последующим высевом микроорганизмов из жидкой питательной среды на чашки Петри с плотными питательными средами, их инкубацией в термостате при 37°C 24 часа и подсчетом колониеобразующих единиц – КОЕ. Кроме того, количество выросших микроорганизмов оценивали спектрофотометрически по изменению мутности раствора, которая увеличивалась/уменьшалась при росте/гибели микроорганизмов. Затем на основании сравнения оптической плотности растворов определяли процент роста культуры.

Испытанию подвергали исходную полипропиленовую пленку и пленку, обработанную испытуемыми супрамолекулярными системами. Проявление антимикробных свойств исследуемых образцов изучали как при обычном освещении, так и при действии УФ облучения (365 нм) в течение 2 минут (антимикробная фотодинамическая терапия).

Результаты исследования и их обсуждение

Электронная абсорбционная спектроскопия является наиболее удобным и распространенным методом для изучения процессов координации органических молекул на макрогетероциклических комплексах металлов. Образование аксиальных комплексов за счет донорно-акцепторного взаимодействия металл – донорный атом органического основания сопровождается смещением и изменением интенсивности основных полос в ЭСП комплекса.

Реакция CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ с пиридином и пиразином изучена в широком диапазоне концентраций оснований. Молекулы Py и Pyz обладают, наряду с σ-донорными, π-акцепторными свойствами и хорошо совмещаются с фталоцианиновым макроциклом в одной координационной сфере, что предопределило выбор органических биоактивных оснований. Кроме того, пиридин является структурным фрагментом ряда биологически активных соединений – витаминов, антибиотиков, алкалоидов, продуктов метаболизма. Пиразин и его производные обладают гербицидной и антибиотической активностью. Пиразиновый цикл входит в состав некоторых феромонов, антибиотиков (аспергилловая кислота), антивирусных, антибактериальных, противоопухолевых (эхиномицин) лекарственных препаратов.

При добавлении органического основания к толуольному раствору CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ в ЭСП наблюдается постепенное уменьшение интенсивности и гипсохромный сдвиг длинноволновой полосы. В случае координации Py величина сдвига Q-полосы составляет 9 нм, а в случае Pyz – 1 нм (рис. 2). Как видно из рис. 2, ЭСП продуктов реакции не претерпевают принципиальных изменений и по-прежнему характеризуют координированный кобальтом (II) макроциклический хромофор. Установленная экспериментально обратимость спектральных изменений свидетельствует о протекании реакции CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ с пиразином и пиридином до состояния равновесия. По тангенсу угла наклона линейной зависимости lg$I$ от lgc_L (рис. 3) определено число присоединившихся лигандов. Образовавшиеся в ходе реакции соединения представляют собой супрамолекулярные донорно-акцепторные комплексы состава 1:1.

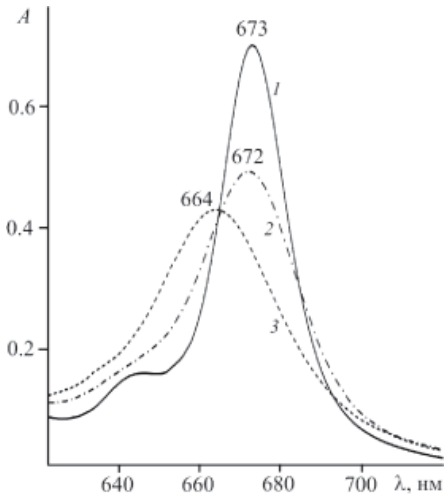


Рис. 2. Электронные спектры поглощения CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ в толуоле (1), в смеси толуол-пиразин (C_{Pyz} = 0,56 моль/л) (2) и толуол-пиридин (C_{Py} = 0,49 моль/л) (2)

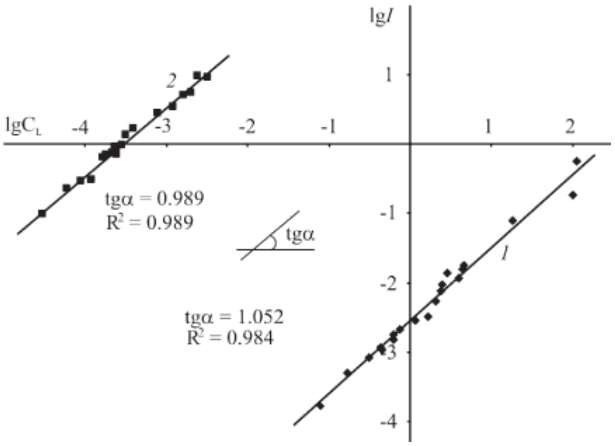


Рис. 3. Зависимости lgI от lgC_L для реакции CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ с пиразином (1) и пиримидином (2)

Полученные данные позволяют описать изучаемую реакцию уравнением

$$\mathrm{CoPc(3,5\text{-}}di\text{-}^{t}\mathrm{BuPhO})_8 + L \xrightleftharpoons{K_y} (L)\mathrm{CoPc(3,5\text{-}}di\text{-}^{t}\mathrm{BuPhO})_8. \quad (2)$$

Константы устойчивости CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ с пиридином и пиразином, рассчитанные по уравнению (1), составляют $(3{,}42 \pm 0{,}47)\cdot 10^3$ и $(4{,}63 \pm 0{,}9)\cdot 10^2$ л/моль соответственно.

Образование донорно-акцепторных комплексов CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ с P_y и P_{yz} подтверждено данными ИК и ^{1}H ЯМР спектроскопии. В ИК спектре продукта реакции (2) наблюдается высокочастотный сдвиг интенсивных полос изоиндольных фрагментов фталоцианина кобальта в области 1440–1450 см$^{-1}$. Эти спектральные изменения в результате координации органического основания с кобальтфталоцианином разумно связать с выходом Co из плоскости макроцикла. Такие внеплоскостные смещения должны будут внести изменения в перекрывание d_π-орбиталей металла и e_g^*-орбиталей фталоцианина, приводя к изменениям энергии колебаний изоиндольных фрагментов фталоцианина. В ИК спектрах (Py)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ и (Pyz)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ наблюдаются также новые полосы, соответствующие колебаниям координированного пиридина (при 1742, 1492, 1408, 1216, 801, 779, 735, 518 см$^{-1}$) и координированного пиразина (при 1737, 881, 807), частоты которых смещены примерно на 5–20 см$^{-1}$ по сравнению с чистым Py и Pyz [7] соответственно. Новые сигналы при 397 и 464 см$^{-1}$ соответствуют связи Co-N$_{Py}$ [12].

Диамагнитный комплекс CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ имеет спектр ^{1}H ЯМР с четко разделенными сигналами протонов бензольных остатков и 3,5-ди-*трет*-бутильных групп в области от 8,94 до 7,29 ppm и 1,35 ppm. Введение в раствор комплекса в $CDCl_3$ пиридина сопровождается появлением двух новых относительно узких сигналов пиридинового кольца при 7,7 и 7,4 ppm, которые претерпевают небольшой сильнопольный сдвиг по сравнению с сигналами некоординированного пиридина [8]. Наиболее заметно влияние на сигналы расположенных близко к макроциклу протонов изоиндольных групп. В спектре CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ протоны изоиндольных групп проявляются в виде синглета с химическим сдвигом 8,94 ppm. Для комплекса с пиридином данные протоны проявляются в виде уширенного синглета в области 8,86 ppm. Сигналы *пара*-протонов фенильных колец претерпевают лишь небольшой сильнопольный сдвиг, тогда как сигналы *орто*-протонов фенильных групп не смещаются, возможно, по причине расположения фенильных колец вне плоскости макроцикла. Аналогичные изменения наблюдаются и при координации пиразина.

(Окта(3,5-ди-*трет*-бутилфенокси) фталоцианинато)кобальт (II) и донорно-акцепторные супрамолекулы на его основе были нанесены на полипропиленовые пленки с целью исследования их актибактериальных/противогрибковых свойств. В результате испытаний образцов пленок на плотной питательной среде установлено, что исследуемые образцы пленок не подавили рост тест-культур *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* и грибов *Candida albicans*. Зон задержки роста вокруг образцов не выявлено, что связано в первую очередь с тем, что синтезированные соединения не растворимы в водных средах и не мигрируют в окружающую среду. Можно говорить лишь о факте задержки роста тест-культур под некоторыми образцами.

Результаты испытаний образцов в жидких питательных средах с последующим высевом демонстрируют данные, полученные при испытаниях на плотных питательных средах (сплошной рост тест-культур – 1000 КОЕ/мл – посевная доза) в отношении *Escherichia coli* и грибов *Candida albicans*. В отношении *Staphylococcus aureus* выявлено отсутствие роста у образца полипропиленовой пленки, модифицированной супрамолекулярным комплексом (Pyz)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ и минимальный рост (45 КОЕ) в случае образца (Py)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ при их предварительном облучении (рис. 4).

Следующим этапом исследования антибактериальной/противогрибковой активности являлась оценка с помощью счетного спектрофотометрического метода. На основании сравнения оптической плотности растворов определяли процент задержки роста культуры (таблица).

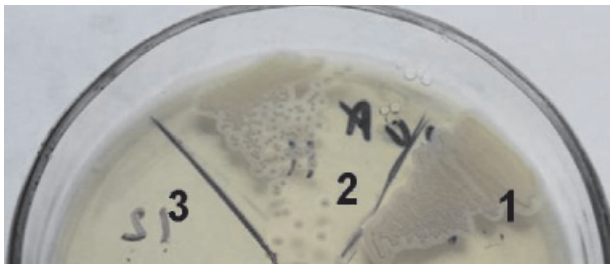


Рис. 4. Результаты воздействия полипропиленовой пленки, модифицированной комплексами на основе CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$, в течение 24 часов на жизнедеятельность микроорганизмов Staphylococcus aureus: 1 – контрольный образец; 2 – CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ + УФ; 3 – (Pyz)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ + УФ

Влияние химической структуры комплексов на антибактериальную/противогрибковую активность

Образцы ПП пленки, модифицированные синтезированными соединениями	Подавление роста культуры, %		
	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Candida albicans
Контроль	0	0	0
Контроль + УФ	5	3	0
CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$	52	0	29
CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ + УФ	68	20	37
(Py)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$	66	5	32
(Py)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ + УФ	82	17	35
(Pyz)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$	71	10	33
(Pyz)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ + УФ	93	10	38

Полученные данные свидетельствуют о том, что синтезированные супрамолекулярные комплексы не проявляют антибактериальную активность относительно кишечной палочки *Escherichia coli*. По балльной системе данные соединения можно оценить в 2 балла, что соответствует незначительному снижению количества микроорганизмов, указывая на недостаточное антимикробное действие [6]. Также наблюдается только незначительный противогрибковый эффект по отношению к *Candida albicans*. Максимальный процент подавления роста культуры проявляют CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ и (Pyz)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ при предварительном УФ облучении образцов (λ = 356 нм) в течение 2 минут. Синтезированные соединения на основе (*октакис*3,5-ди-трет-бутилфенокси)фталоцианинато) кобальта (II) показывают наилучшее антибактериальное действие по отношению к *Staphylococcus aureus*. В 3 балла (90–94 %), что соответствует значительному снижению количества микроорганизмов (хороший антимикробный эффект), можно оценить действие донорно-акцепторного комплекса (Pyz)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$, при предварительном УФ облучении (λ = 356 нм) в течение 2 минут. Без облучения наблюдается недостаточное антимикробное действие (таблица). Возможно, такое избирательное антибактериальное/противогрибковое действие на различные микроорганизмы связано со строением последних. Грамотрицательные бактерии обладают высокоорганизованной внешней мембраной по сравнению с грамположительными бактериями, что создает более высокий барьер для проникновения фотосенсибилизаторов в клетки [9].

Таким образом, установлено, что синтезированные супрамолекулярные аксиальные комплексы на основе окта(3,5-ди-*трет*-бутилфенокси)фталоцианинато) кобальта (II), иммобилизированные на поверхности полипропилена, обладают антибактериальным действием против золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) только при активации макрогетероциклического агента УФ светом (λ = 356 нм). В случае грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* антибактериальный эффект

практически не наблюдается. Относительно *Candida albicans* исследуемые донорно-акцепторные системы обладают слабовыраженным противогрибковым действием.

Полученные супрамолекулярные системы на основе окта(3,5-ди-*трет*-бутилфенокси)фталоцианинато) кобальта(II) могут быть перспективными для создания антибактериальных материалов нового поколения, которые могут использоваться не только в сфере медицины, но и в других областях, где необходимы средства профилактики и защиты от воздействия бактерий.

Заключение

1. Проведено исследование антимикробных свойств образцов пленок на фирмикутных бактериях *Staphylococcus aureus,* грациликутных бактериях *Escherichia coli и* грибах *Candida albicans* на плотных средах и в жидких питательных средах. По результатам испытаний установлено, что на плотных питательных средах исследуемые образцы не проявляют антимикробной активности. Зоны задержки роста тест-культур вокруг исследуемых образцов не выявлены, но под некоторыми образцами рост микроорганизмов отсутствовал.

2. Результаты испытаний образцов в жидких питательных средах с последующим высевом подтвердили данные, полученные при испытаниях на плотных питательных средах (сплошной рост тест-культур – 1000 КОЕ/мл – посевная доза) в отношении *Escherichia coli* и грибов *Candida albicans*. В отношении *Staphylococcus aureus* выявлено отсутствие роста у образца (Pyz)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ и минимальный рост (45 КОЕ) – у образца (Py)CoPc(3,5-di-^{t}BuPhO)$_8$ при предварительном УФ облучении.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Верхневолжский региональный центр физико-химических исследований» и при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-43-03013-р-центр-а).

Список литературы

1. Гарасько Е.В., Шиляев Р.Р., Алексеева О.В. и др. Антибактериальные свойства полимерных композитов с наноразмерными частицами меди // Вестн. Ивановской медицинской академии. – 2009. – Т.14. – № 2. С. 21–25.

2. Гарасько Е.В., Калачева А.Г., Громова О.А., Гришина Т.Р. Микробиологическая активность цинкосодержащих препаратов // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2009. – Т. 14. – С. 18.

3. Гарасько Е.В., Ефимова Е.Г., Пругер И.В. Современные подходы к преодолению лекарственной устойчивости микроорганизмов при проведении антимикробной химиотерапии // Высокие технологии – стратегия XXI века. – 2009. – С. 208–209.

4. Гарасько Е.В., Шиляев Р.Р., Чуловская С.А. и др. Применение наноразмерных медьсодержащих порошков для придания устойчивых фунгицидных свойств полипропиленовым материалам // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2011. – № 5. – С. 93.

5. Гарасько Е.В., Вашурин А.С., Пуховская С.Г. Исследование бактерицидых свойств комплекса водорастворимого порфирина с ацетатом серебра // Биология – наука XXI века: Материалы Междунар. конф. Москва, 24 мая 2012 г. – М.: МАКС Пресс, 2012. – С. 175–177.

6. Пророкова Н.П., Вавилова С.Ю., Кузнецов О.Ю., Бузник В.М. // Российские нанотехнологии. – 2015. – Т. 10. – № 9. – С. 50–57.

7. Gordon A.J., Ford R.A. The Chemist's Companion. NY-London-Sydney-Toronto. 1972.

8. Katck M., Urbanski T. NMR spectra of pyridine, picolines and hydrochlorides and of their hydrochlorides and methiodides // Bull Acad Polonaise Sci Serie: Sci Chim. – 1968. – Vol. 16. – P. 347–350.

9. Ke M.R., Eastel J.M., Ngai K.L.K., Cheung Y.Y., Chan P.K.S., Hui M., Dennis K.P. Ng, Lo P.C. // Eur. J. Med. Chem. – 2014. – Vol. 84. – P. 278–283.

10. Ladan H., Nitzan Y., Malik Z. The antibacterial activity of haemin compared with cobalt, zinc and magnesium protoporphyrin and its effect on pottassium loss and ultrastructure of Staphylococcus aureus // FEMS Microbiology Letters. 1993. – Vol. 112. – P. 173–177.

11. Moinuddin M.H., Khan K.R., Reddy V., Keshavayya J. A Search for Antibacterial Agents. – Chapter 15. 2012. – P. 305–318.

12. Sacconi L., Sabatini A., Gans P., Sacconi L., Sabatini A., Gans P. // Inorg. Chem. – 1964. – Vol. 3. – P. 1772–1774.

13. Xiang-Jiao X., Zhi X., Zu-De Q., An-Xin H., Chao-Hong L., Yi L. // Thermochimica Acta. – 2008. – Vol. 476. – P. 33–38.