

УДК 543.94

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОХИНОНА В ВОДЕ

Вяткина О. В., Кунык А. Н., Биба М. В., Аралкин. О. Л., Бажин В. Ю.

*Таврическая Академия (структурное подразделение) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь, Россия
E-mail: oksana_vyatkina@list.ru*

Изучены количественные параметры сорбции пероксидазы редьки черной из фосфатно-буферного экстракта на силикагелях различной пористости. Методом физической сорбции в статических условиях получены ферментные препараты с максимальной пероксидазной активностью относительно гидрохинона. Показана возможность использования полученных ферментных препаратов для полуколичественного и количественного определения гидрохинона в водных растворах по методике, основанной на образовании окрашенных продуктов пероксидазного окисления гидрохинона в системе с регистрацией сигнала визуальным либо фотокolorиметрическим методом.

Ключевые слова: тест-система, пероксидаза, иммобилизация, гидрохинон.

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире химические тесты широко используются в экологической, промышленной, клинической и криминалистической сферах и обеспечивают возможность простого и недорогого качественного, полуколичественного и количественного анализа. Среди тест-систем особо выделяются в силу своей высокой селективности, активности, а следовательно и низкого порога обнаружения, ферментные препараты. В тест-системах, как правило, используют более стабильные во времени иммобилизованные ферменты. Каталитическая активность иммобилизованных ферментов обычно высока, но зависит от ряда факторов, начиная от способов получения и очистки фермента и заканчивая методом иммобилизации, природой и структурными особенностями подложки и условиями хранения полученного препарата [1]. При выборе ферментов для тест-систем необходимо учитывать возможность получения легко фиксируемого аналитического сигнала. Известно, что фенольные вещества, в частности гидрохинон, являются легко окисляемыми субстратами растительных пероксидаз, образующими в результате пероксидазного окисления окрашенные продукты реакции, что дает возможность как визуальной, так и фотокolorиметрической их идентификации [2]. В качестве носителей для иммобилизованных ферментов могут использоваться различные вещества – природные и синтетические, органические и

неорганические. Они должны соответствовать следующим требованиям: высокая химическая и биологическая стойкость; высокая механическая прочность, возможность получения различных форм, высокая гидрофильность, обеспечивающая возможность связывания фермента с носителем в водной фазе; легкость активации фермента, способность носителя к максимальной «нагрузке» ферментом, низкая стоимость. Всем этим требованиям отвечают силикагелевые матрицы, структурные параметры которых варьируются в зависимости от условий получения [3]. Поэтому представленная работа посвящена изучению перспектив использования препаратов пероксидазы редьки черной, иммобилизованной на различных силикагелях, для создания тест-систем для определения гидрохинона в водных объектах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза, выделенная из корнеплодов редьки черной. Экстракцию фермента фосфатным буфером (рН=7) из очищенного и измельченного растительного сырья проводили в течение 15 мин по стандартной методике, описанной Селибером [4]. В качестве подложки для иммобилизации фермента был использован силикагель, полученный из водного раствора силиката натрия при взаимодействии с 6 М соляной кислотой при рН<2. Иммобилизацию фермента на силикагель проводили методом физической сорбции из раствора, содержащего 20% по объему фосфатно-буферного экстракта пероксидазы (массовое соотношение твердой и жидкой фаз $\approx 1:40$) в течение 2 часов. По истечении времени сорбент отфильтровывали и оставляли сушиться на воздухе при комнатной температуре. В результате нами был получен материал, обладающий максимальной каталитической активностью в реакции пероксидазного окисления гидрохинона, содержание фермента в 1 г которого соответствует его содержанию в 5 мл нативного ферментного препарата [5].

В качестве стандартного образца с известными параметрами поверхности (зернение – 5–40 мкм, удельная активная поверхность – 550 м²/г, диаметр пор – 60 Å) использовали силикагель марки L 5/40. Для представленного стандарта было изучено сорбционное сродство к пероксидазе редьки черной. Сорбцию пероксидазы из фосфатно-буферных экстрактов на силикагеле изучали в статических условиях в системах с объёмными концентрациями экстракта от 5 до 80%, при температуре 25 °С. Время экспозиции варьировали от 10 до 90 мин. Концентрацию фермента в растворе контролировали фотокolorиметрически ($\lambda=400$ нм, $l = 2$ см, $\epsilon_{400} = 9,6 \cdot 10^4$ л/моль·см).

Устанавливали каталитическую активность препаратов, полученных методом физической сорбции фермента на силикагеле. Количество сорбированного фермента характеризовали разностью оптических плотностей растворов адсорбтива до и после сорбции. После чего рассчитывали степень связывания фермента с твердой фазой (N) по формуле (1):

$$N (\%) = \frac{D_{нач} - D_{кон}}{D_{нач}} \cdot 100; \quad (1)$$

где: N (%)–степень связывания фермента на силикагеле,
 $D_{нач}$, $D_{кон}$ – начальная и конечная оптические плотности ферментсодержащего раствора.

Иммобилизацию пероксидазы на стандартный силикагель проводили методом сорбции из фосфатно-буферных растворов с объёмными концентрациями фермента от 10 до 70% в статических условиях при температуре 25°C.

Активность полученных ферментных препаратов определяли по начальной скорости окисления субстрата восстановителя. Изменение концентрации гидрохинона контролировали фотоколориметрическим методом по реакции с *o*-фенантролином в присутствии ионов Fe^{3+} ($\lambda=580$ нм, $l=1$ см, $\epsilon_{580}=13,6 \cdot 10^3$ л/моль·см) [6]. За единицу удельной активности приняли количество окисленного субстрата (мкМ), катализированного 1 г ферментного препарата на протяжении 1 минуты:

$$Au (\text{активность}) = \frac{\Delta C(\text{гидрохинона}) \cdot V(\text{реакционной смеси, л})}{g(\text{ферментного препарата}) \cdot t(\text{мин})}; \quad (2)$$

$$1 \cdot \frac{\text{мкмоль (субстрата)}}{g(\text{ферментного препарата}) \cdot \text{мин}} = 1 \text{ e. a.}$$

Препараты иммобилизованной пероксидазы с максимальной каталитической активностью использовали в качестве компонента аналитических систем для количественного определения фенольного субстрата в водных растворах. В каждую пробу объемом 20 мл, содержащую определенное количество гидрохинона, вносили 1 г ферментного препарата и приливали 2 мл фармакопейного раствора пероксида водорода ($\omega(H_2O_2)= 3\%$). Выдерживали фиксированное время. Далее растворы фильтровали и измеряли оптическую плотность фильтрата на фотоэлектроколориметре КФК-2 при $\lambda=540$ нм и $l=2$ см. Экспериментальные данные обрабатывали методами математической статистики [7]. Полученные результаты сравнивали со стандартным фотоколориметрическим методом количественного определения гидрохинона в системах с Fe^{3+} и *o*-фенантролином [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что структурные характеристики силикагелей, а следовательно и их сорбционная способность, зависят от pH среды гелеобразования и осаждения. Так силикагели, синтезированные при кислых pH, отличаются небольшим размером глобул, малым диаметром пор и большой удельной поверхностью, в то время как силикагели, синтезированные при щелочных pH, отличаются большим размером глобул, большим диаметром пор и малой удельной поверхностью [3]. В исследованиях мы использовали силикагель осажденный при $pH < 2$, который по литературным данным [8] характеризуется удельной поверхностью 650–800 м²/г, средний эффективный диаметр пор – 12–20 Å). Было установлено, что

максимальные степени связывания фермента с подложкой в данном случае достигались в течение 120 минут, при этом формирование монослоя адсорбата происходит в диапазоне объёмных концентраций фермента 10–30%, оптимальными условиями иммобилизации пероксидазы редьки черной на силикагеле с рН синтеза < 2 является сорбция из 20% фосфатно-буферного раствора в течение 120 минут [9].

В качестве эталонного образца применяли силикагель марки L 5/40, характеризующийся большим диаметром пор, соизмеримым с размерами молекулы пероксидазы [10]. Эксперимент показал, что формирование монослоя адсорбата на поверхности адсорбента происходит в течение 60 минут в диапазоне молярных концентраций фермента от $1,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$ до $2 \cdot 10^{-6} \text{M}$ в растворе (рис.1), что соответствует интервалу объёмных концентраций фосфатно-буферного экстракта фермента от 50% до 80% . Это, очевидно, связано с сорбцией молекул пероксидазы не только на поверхности используемого силикагеля, но и в порах, соизмеримых с молекулярными размерами фермента. Причем максимальная степень связывания фермента подложкой наблюдается при его сорбции из 40% раствора, что соответствует началу области формирования монослоя фермента на поверхности силикагеля (рис.2).

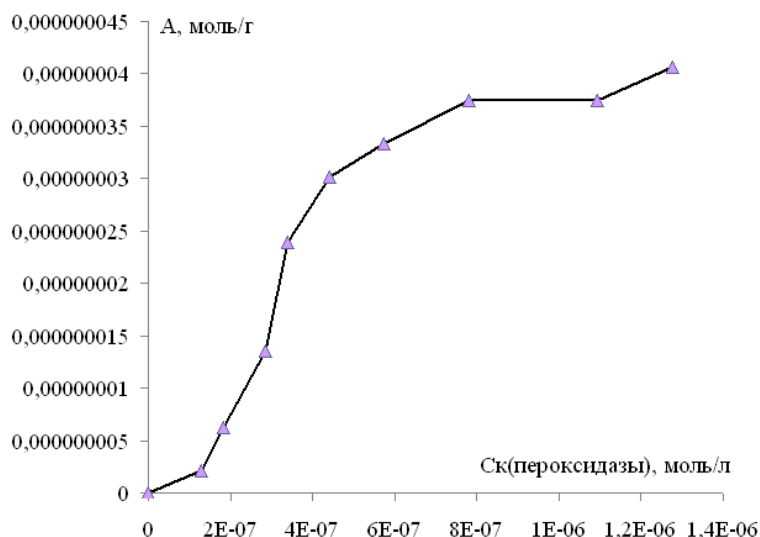


Рис. 1. Изотерма адсорбции пероксидазы корнеплода редьки черной на силикагеле (время экспозиции, $\tau = 60$ мин).

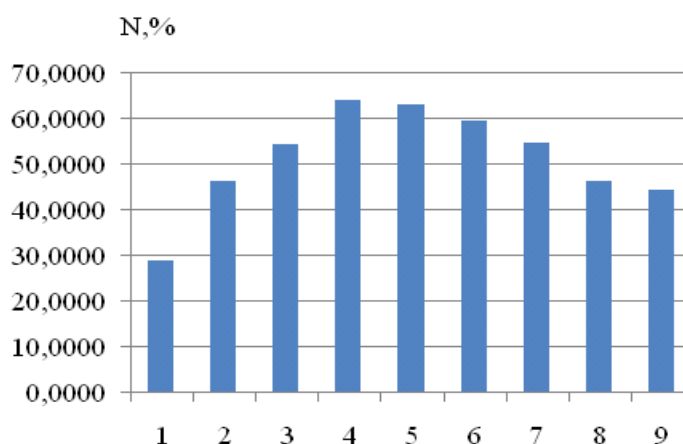


Рис. 2. Зависимость значений степени связывания пероксидазы на силикагеле от концентрации фермента в водных растворах, где объемная концентрация фосфатно-буферного экстракта фермента: 1 – 5%, 2 – 10%, 3 – 20%, 4 – 30%, 5 – 40%, 6 – 50%, 7 – 60%, 8 – 70%, 9 – 80%.

Как правило, формирование полимолекулярных слоёв фермента на поверхности подложки ведёт к уменьшению активности полученных препаратов. Поэтому для установления оптимальных условий иммобилизации пероксидазы на силикагеле марки L 5/40 мы при комнатной температуре в течение 60 минут проводили сорбцию фермента из 10, 20, 30, 50 и 70% растворов. Результаты определения пероксидазной активности полученных препаратов представлены на рисунке 3.

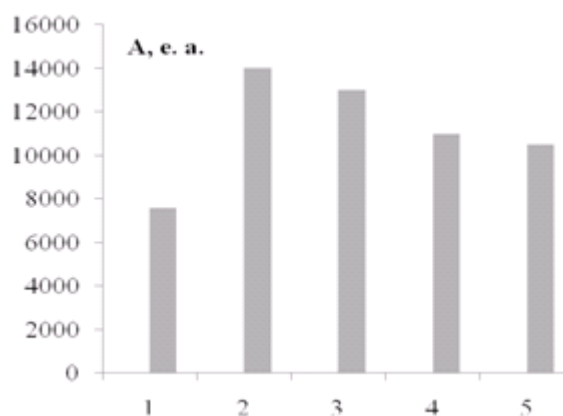


Рис. 3. Зависимость активности ферментного препарата от концентраций пероксидазы сорбционных системах, где объемная концентрация фосфатно-буферного экстракта фермента: 1 – 10%, 2 – 20%, 3 – 30%, 4 – 50%, 5 – 70%.

Эксперимент показал, что наибольшей активностью обладает препарат, полученный сорбцией пероксидазы из 20% раствора, где не происходит образование полислоев адсорбата на поверхности. Таким образом, оптимальным условием иммобилизации пероксидазы редьки черной на силикагеле марки L 5/40 при $t=25^{\circ}\text{C}$ является её сорбция из 20% фосфатно-буферного раствора супернатанта в течение 60 мин.

Ранее было установлено, что продукты пероксидазного окисления гидрохинона окрашивают раствор в красный цвет, причем интенсивность окраски зависит от концентрации субстрата [2]. Поэтому для регистрации аналитического сигнала в аналитической серии растворов нами был выбран метод фотоколориметрии. Измерения производили на приборе КФК-2 при длине волны $\lambda=540$ нм, что соответствует диапазону максимальных значений молярного коэффициента поглощения для растворов с красной окраской. Наблюдения показали, что интенсивное и устойчивое во времени красное окрашивание в системе с анолитом появляется уже в течение первых 10 мин. экспозиции, поэтому именно это время считали достаточным для фиксирования аналитического сигнала – оптической плотности (D) системы. Общее время проведения анализа составило 30 мин. Полученная калибровочная прямая представлена на рисунке 4:

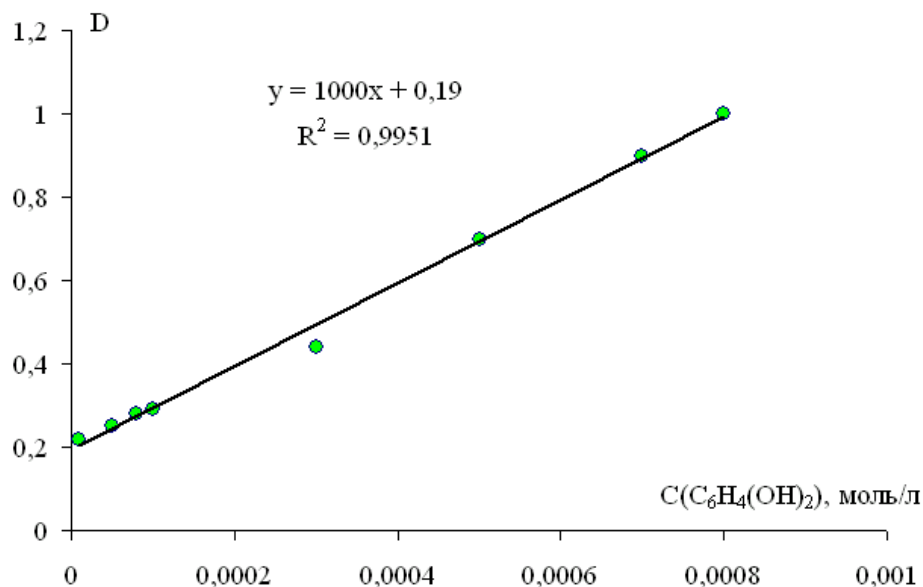


Рис. 4. Зависимость оптической плотности раствора (D) от концентрации $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ в системе с пероксидазой иммобилизованной на силикагеле марки L 5/40 и пероксидом водорода ($\tau=10$ мин).

Тогда как в системе с пероксидазой иммобилизованной на силикагеле с pH синтеза <2 при аналогичном составе красное окрашивание появляется в течение первых 20 минут, но после 40 минут экспозиции интенсивность окраски остается неизменной. Поэтому аналитический сигнал для построения калибровочных кривых в

этих системах измеряли через 40 минут экспозиции. Общее время проведения анализа составило 50 мин. Полученная калибровочная прямая представлена на рис. 5.

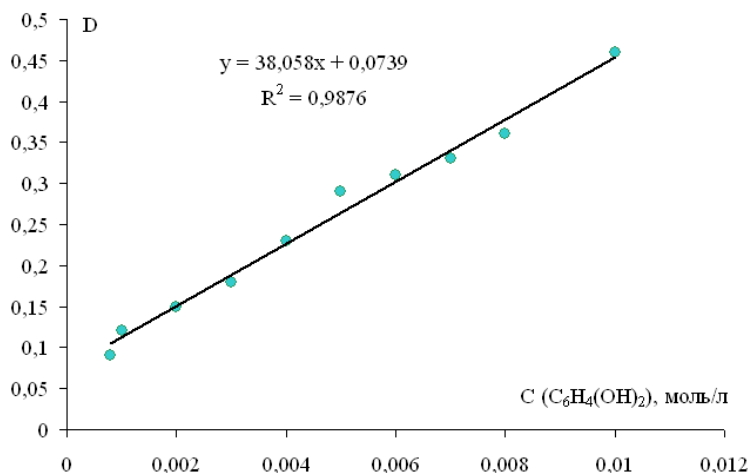


Рис. 5. Зависимость оптической плотности раствора (D) от концентрации $C_6H_4(OH)_2$ в системе с пероксидазой, иммобилизованной на силикагеле, осажденном при $pH < 2$, и пероксидом водорода ($\tau=40$ мин)

Параллельно было проведено определение концентрации гидрохинона по стандартной методике с раствором железа(III) и о-фенантролином (рис. 6). Данный анализ требует большого количества реактивов. Общее время выполнения анализа 90 мин. Калибровочная прямая представлена на рис. 6.

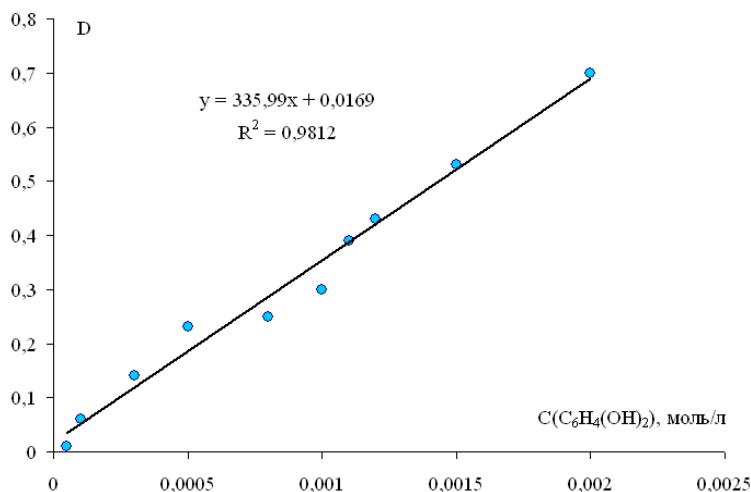


Рис.6. Зависимость оптической плотности раствора (D) от концентрации $C_6H_4(OH)_2$ (стандартная методика).

Калибровочные кривые были аппроксимированы уравнениями типа $y=bx+a$. Значения параметров градуировочного графика а и b и их доверительные интервалы указаны в табл. 1.

Таблица 1

Результаты статистической обработки данных в исследуемых системах

$$y = (b \pm \varepsilon_b) x + (a \pm \varepsilon_a)$$

№	Состав системы	Параметры калибровочной прямой				Стандартный раствор		
		a	ε_a	b	ε_b	\bar{Y}_a	\bar{X}	ε_x
$\lambda = 540 \text{ нм}, l=2\text{см}$								
I	Пероксидаза, иммобилизованная на силикагеле, осажденном при pH<2, m=1г; C(H ₂ O ₂)=0,09 М; C(C ₆ H ₄ (OH) ₂) $8 \cdot 10^{-4} \div 1 \cdot 10^{-2}$ М	0,07	0,02	38	3	0,340	0,007	0,0003
II	Пероксидаза, иммобилизованная на силикагеле L 5/40, m=1г; C(H ₂ O ₂)=0,09 М; C(C ₆ H ₄ (OH) ₂) $1 \cdot 10^{-5} \div 5 \cdot 10^{-3}$ М	0,19	0,002	999	52,6	0,713	0,00052	0,000078
$\lambda=580 \text{ нм}, l=1 \text{ см}$								
III	Стандартная методика	0,02	0,04	336	38	0,30	0,0008	0,00007

Расчетные значения пределов обнаружения (C(min)) представлены в табл. 2, откуда следует, что в системе I с ферментным препаратом, иммобилизованным на силикагель, осажденный в сильно кислой среде, этот параметр больше в 6 раз по сравнению со стандартной методикой, следовательно, чувствительность метода ниже. А в системе II с эталонным силикагелем предел обнаружения в три раза ниже, чем в стандартной методике. Такое различие чувствительности методик с применением ферментных препаратов обусловлено в первую очередь влиянием структуры подложки на активность иммобилизованного ферментного препарата относительно соответствующего субстрата. Так, было установлено, что максимальная удельная активность пероксидазы, сорбированной на силикагеле L 5/40, на четыре порядка превышает активность пероксидазы, сорбированной в оптимальных условиях на силикагеле с pH осаждения <2, что, очевидно, обусловлено различиями в механизмах связывания фермента на подложке [9].

Таблица 2

**Значения пределов обнаружения $C(\min)$ гидрохинона
в исследуемых системах**

Система		
I	II	III
$C(\min) \cdot 10^{-4}$, моль/л		
6±0,2	0,3±0,07	1±0,3

Полученные градуировочные прямые использовали для определения количества гидрохинона в стандартных растворах. Каждая серия состояла из трёх определений. Статистическая обработка полученных результатов показана в табл. 1, откуда видно, что минимальной относительной погрешностью, допустимой в фотоколориметрии, характеризуется результат, полученный в системе I ($\Delta x_I=4,3\%$), что ниже погрешности определения в стандартной методике ($\Delta x_{\text{станд}}=8,8\%$). В системе II погрешность определения ($\Delta x_{II}=15\%$), что неприемлемо для количественного анализа, но удовлетворяет требованиям полуколичественных определений. Однако высокая чувствительность в данной методике показывает перспективу её доработки и совершенствования путем создания аналитических серий с большим числом вариантов, коррекцией массы ферментного препарата либо количества пероксида водорода. Таким образом, системы I и II могут быть нами рекомендованы как тест-системы для полуколичественного колориметрического, а после соответствующей доработки – и количественного фотоколориметрического определения гидрохинона в водных растворах в вышеуказанных диапазонах концентраций, находящихся ниже уровня ПДК гидрохинона в природной воде [11]. Тем более что время выполнения анализа в этом случае системы I почти в два раза меньше, чем в стандартной методике, а методика II в три раза быстрее и нет необходимости использования большого количества растворов реагентов, что облегчает задачу анализа *on-site*. Также эксперимент показал, что для понижения стоимости ферментных тест-систем перспективным является получение в лабораторных условиях силикагелей, осажденных при щелочных pH, обладающих пористостью и параметрами поверхности, сходными с силикагелем L 5/40 и использование их в качестве подложки для иммобилизации пероксидазы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучена сорбция пероксидазы редьки черной на силикагеле марки L 5/40 в статических условиях. Установлено формирование монослоя фермента на поверхности силикагеля при сорбции из растворов, содержащих более 50 объемных процентов фосфатно-буферного экстракта фермента.
2. Определены условия получения ферментного препарата с максимальной пероксидазной активностью методом физической сорбции на силикагеле марки L 5/40: $t=25^\circ\text{C}$, начальная объемная концентрация фосфатно-буферного экстракта фермента – 20%, время экспозиции $\tau=60$ минут. Получен ферментный

препарат с максимальной пероксидазной активностью относительно гидрохинона $A=14000$ е.а.

3. Показана возможность использования ферментных препаратов с пероксидазной активностью для полуколичественного и количественного определения гидрохинона, основанная на образовании окрашенных продуктов пероксидазного окисления гидрохинона в системе, с регистрацией сигнала визуальным либо фотоколориметрическим методом. Определены метрологические характеристики таких методик. Указано влияние структуры подложки на чувствительность ферментных тест-систем.

Список литературы

1. Золотов Ю. А. Химические тест-методы анализа / Ю. А. Золотов, В. М. Иванов, В. Г. Амелин. – М.: Едиториал УРСС, 2002. – 302с.
2. Ермакова М. О. Имобилизация пероксидазы редьки чёрной на силикагелях, синтезированных в кислой среде / М. О. Ермакова, О. В. Вяткина, Е. Л. Кревсун // Тринадцята всеукраїнська конференція з міжнародною участю студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії» (25-27 квітня 2012): Тез. доп. –Київ, 2012. – С. 147
3. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Г. В. Лисичкина. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. – 592 с.
4. Селибер Г. Л. Большой практикум по микробиологии / Г. Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
5. Влияние природы подложки на механизм сорбции пероксидазы редьки черной / О.В. Вяткина // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. – 2012. – Т.25 (64), №4. – С.239-247.
6. Бейерман К. Определение следовых количеств органических веществ / К. Бейерман; пер. с англ. А. А. Кирюшкина. – М.:Мир, 1987г. – 462 с.
7. Чарыков А. К. Математическая обработка результатов химического анализа. Методы обнаружения и оценки ошибок / А. К. Чарыков. – Л.: Химия, 1984. – 168 с.
8. Чукин Г. Д. Химия поверхности и строение дисперсного кремнезёма / Г. Д. Чукин. – М.: Типография Паладин, ООО «Принта», 2008. – 172 с
9. Аралкин О. Л. Роль сорбционных взаимодействий фермент-силикагель в процессе получения пероксидазных катализаторов / О. Л. Аралкин, М. В. Биба, А. Н. Куньк, О. В. Вяткина // Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки: электронный сборник статей по материалам XXX студенческой международной заочной научно-практической конференции. (Новосибирск, апрель 2015). – №4(29). – С.166–176.
10. Рогожин В. В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В.В. Рогожин. – М.: ГИАРД, 2004. – 240 с.
11. Беспаметов Г. П. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник / Г. П. Беспаметов, Ю. А. Кротов.– Л.: Химия, 1985. – 528 с.

APPLICATION OF ENZYMATIC SPECIMEN WITH PEROXIDASE ACTIVITY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF HYDROQUINONE IN WATER

Vyatkina O. V., Kunyk A. N., Biba M. V., Aralkin O. L., Bajin V. U.

*Tavrida Academy (organizational department) of federal national independent educational establishment of the high education "Crimean Federal V.I. Vernadsky University", Simferopol, Russia
E-mail: oksana_vyatkina@list.ru*

In modern world chemical tests are extensively used in ecological, industrial, medical, criminalistic branches. They provide simple and cheap qualitative, half-quantitative and quantitative analysis. Enzymatic specimens, among other test systems, explicitly separated, because of their high selectivity, activity, and therefore low detection threshold. Enzymes, that are more constant in time and immobilized, are usually used in test-systems. Should be considered an ability of obtaining easy-clamp analytical signal, while choosing enzymes for test system. Phenols, in specifically hydroquinone, are known to be easily acetification substrates of vegetable peroxidase, which can generate color reaction product, due to acetification by peroxidase, that makes possible their visual and photocolormetry identification. Silica gel's matrices are mostly used as a supporter for immobilizing enzym, which structural characteristic differ because of obtaining conditions.

We have studied sorption of black radish peroxidase on L 5/40 type of silica gel and silica gel with settlement pH less 2 (<2) in constant conditions. It has been found that on a surface of silica gel by the sorption from solution, consisting more then 50 volumetric percent of phosphate buffer enzyme extract in the first case and sorption from solution with 10 percent in a second case, unimolecular layer of enzyme was formed. It has been evaluated conditions of obtaining enzymatic specimen with maximum of peroxidase activity by methods of physical sorption: $t=25^{\circ}\text{C}$, initial volumetric concentration of phosphate buffer extract of enzyme – 20 percent, exposition time $\tau=60$ minutes, for type L 5/40 of silica gel; sorption from 20 percent phosphate buffer solution during 120 minuets, for silica gel with pH of formation less 2. Ability of using enzyme specimen with peroxidase activity for half quantitative and quantitative determination of hydroquinone has been shown. It's based on forming of color products of hydroquinone acetification by peroxidase in a system with the registration of a signal by visual or photocolormetry methods. Metrological characteristics of these methods have been determined. Influence of structure of padding on sensitivity of enzyme test system has been specified.

Keywords: test system, peroxidase, immobilization, hydroquinone.

Reference

1. Zolotov Y.A. Chemical Test Methods of Analysis / Y.A. Zolotov, V.M. Ivanov, V.G. Amelin. - M.: Editorial URSS, 2002 – 302p. (in Russ.).
2. Ermakova M.O., Vyatkina O.V. Krevsyn E.L. Immobilizing of black radish peroxidase on silica gels witch synthesize in a acid circumstances, thirtieth All Ukrainian conference with participate of international students and graduate students "Modern problems of chemistry"(25-27 april, 2012), p 147, (Kiev 2012)

3. By the redaction of G.V.Lesichkina, Chemistry of the graft surface pull , p 592 (FIZMATLIT, Moscow, 2003)
4. Seliber G.L. Major microbiology practical work , p.492 (Mir, Moscow, 1962)
5. Vyatkina O.V. Influence of nature of undercoat on mechanism sorption black radish peroxidase, Scientifically note V.I.Vernadsky's Tavrida National University, p 239-247 T.25 (64) №4, 2012.
6. Beyerman K. Determination lesser quantity organic substances, p 462 (Mir, Moscow, 1987)
7. Charykow A.K. Mathematical treatment results of chemical analysis. Methods of detecting and rating errors, p 168 (Chemistry, Lvov, 1984)
8. Chykin G.D. Chemistry of surface and structure of silica, p 172, (Typography Paladin, "Printa", Moscow, 2008)
9. Aralkin O.L., Biba M.V. Kynik A.N. Vyatkina O.V. Functional of sorptional coupling enzymatic-silica gel in a process of getting catalysts of peroxidase. Scientifically association students of 21-th centenary. Natural sciences: Electronic collection of articles by materials of 30th international students correspondence of scientific and practical conference. (Novosibirsk, april, 2015) №4(29), p166-176
10. Rogojin V.V. Peroxidase as a component of antioxidant system of living organisms. p 240 (GIARD, Moscow, 2004)
13. Bespametov G.P., Krotov U.A. Down to the limit acceptable concentrations of chemical substances in surrounding environment. Guide, p 528 (Chemistry, Lvov, 1958)

Поступила в редакцию 23.10.2015 г.