

## 大鼠肾脏汞结合金属硫蛋白的联用技术表征研究

黄志勇<sup>1</sup> 沈金灿<sup>3</sup> 庄峙厦<sup>3</sup> 王小如<sup>\*,2,3</sup> 黎先春<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>集美大学生物工程学院, 厦门 361021)

(<sup>2</sup>国家海洋局第一研究所, 青岛 266061)

(<sup>3</sup>厦门大学化学系, 现代分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005)

**摘要:** 通过凝胶色谱(SEC)及反相液相色谱(RPC)分别与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)和电喷雾电离质谱(ESI-MS)联用的技术, 对灌喂 HgCl<sub>2</sub> 大鼠的肾组织中诱导的多金属结合金属硫蛋白(MT)的结构进行表征分析。通过 SEC-ICP-MS 曲线上的金属信号及紫外检测的 MT 光谱吸收特征, 可确认组织提取液中 MT 在色谱曲线上的位置。与对照组相比, 灌喂 HgCl<sub>2</sub> 大鼠肾中 Hg-MT 的诱导量显著增加, 与此同时, Cu-MT 在染毒组的诱导量也相应增加, 说明 MT 在染汞大鼠肾脏中起着对汞的解毒和对铜的调节作用。MT 样品提取物经葡聚糖凝胶(G-75)柱分离纯化并用透析法脱盐后, 用细内径反相色谱柱分离, 进行梯度洗脱, 并与 ESI-MS 联用, 可获得总离子流色谱图及与色谱峰对应的质谱图, 通过对质谱信号的解析及参考脱金属 MT 构型的有关报道, 对汞诱导大鼠肾组织 MT 的不同亚型和次亚型分子结构进行推断。结果证明, 在灌喂 HgCl<sub>2</sub> 大鼠的肾组织中存在着一系列汞结合的 MT 形态。

**关键词:** 汞结合金属硫蛋白; 联用技术; 大鼠肾脏

分类号: O613.51; O614.24\*3

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2005)01-0065-05

## Characterization of Mercurial-bound Metallothioneins in Rat Kidney by Hyphenated Techniques

HUANG Zhi-Yong<sup>1</sup> SHEN Jin-Can<sup>3</sup> ZHUANG Zhi-Xia<sup>3</sup> WANG Xiao-Ru<sup>\*,2,3</sup> LI Xian-Chun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021)

(<sup>2</sup>First Institute Oceanography, S.O.A, Qingdao 266061)

(<sup>3</sup>The Key Laboratory of Analytical Science of Ministry of Education of China, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract:** Multimetal-bound metallothioneins (MT) induced in kidney of rat after oral intake of HgCl<sub>2</sub> were characterized with hyphenated techniques as size-exclusion chromatography (SEC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and reverse phase chromatography (RPC) coupled with electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The identification of MT fractions in the size-exclusion chromatographic profiles was achieved by both of the chromatogram of SEC-ICP-MS and the corresponding UV spectra of MT. The amount of Hg-MT in rat kidney of HgCl<sub>2</sub> group significantly increased compared with that of the control group. In addition, the signal of Cu-MT was largely induced in polluted rat tissue. The results validated the important roles of MT played in the homeostasis of Cu for the detoxification of mercury. After being purified with size-exclusion column (Sephadex G-75) and dialysis ( $M < 1\,000$  Da), the extracts of rat kidney was separated with a narrow-bore reverse phase column and eluted by increasing methanol at gradient mode. The MT polymorphism with different binding-metal (including Hg, Cu and Zn) species was observed by ESI-MS. The tentative formulas of Hg-MT isoforms and subisoforms were interpreted by the measured masses at the vicinity of apex in total ion current (TIC) of ESI-MS

收稿日期: 2004-06-28。收修改稿日期: 2004-08-26。

国家自然科学基金资助项目(No.20175022)。

\*通讯联系人。E-mail: mt2elp@fio.org.cn

第一作者: 黄志勇, 男, 41 岁, 博士, 副教授; 研究方向: 原子光谱质谱研究方向。

and the reference data of apo-MT reported. The results indicated that many Hg-binding MT species existed in the polluted rat kidney.

**Key words:** mercurial-bound metallothioneins (Hg-MT); hyphenated techniques; rat kidney

金属硫蛋白(MT)是一类富含巯基(-SH)的结合金属蛋白,经重金属刺激能使 MT 被大量诱导合成,并在众多位点上抢先与侵入的重金属离子结合。因此,MT 具有保护细胞组织免于有毒元素和大量重金属污染的毒害<sup>[1-3]</sup>。动物基因的多形态特征决定了 MT 在组织中存在着不同的亚型和次亚型结构,如在大多数的哺乳动物中都能找到 MT-1 和 MT-2 这两种最主要的 MT 亚型<sup>[4,5]</sup>。此外,在每个 MT 亚型中还存在着有多种的次亚型结构。研究和表征结合金属的 MT 亚型和次亚型结构对了解 MT 的生理功能具有重要意义。目前,色谱-质谱联用技术对 MT 的表征主要用于对镉结合 MT 的研究,而对汞结合态的金属硫蛋白研究较少<sup>[6-9]</sup>。本工作通过凝胶色谱(SEC)和反相液相色谱(RPC)分别与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)和电喷雾电离质谱(ESI-MS)联用的方法对灌喂 HgCl<sub>2</sub> 大鼠肾中诱导合成的多金属结合 MT 进行亚型、次亚型结构表征,实验结果有助于进一步了解汞对大鼠肾脏的毒性机理和 MT 的解毒功能。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

电感耦合等离子体质谱(ICP-MS, HP4500)、电喷雾电离质谱(ESI-MS)与高效液相色谱仪(HPLC)的联用系统(HP1100 LC/MSD)均系美国安捷伦(Agilent)公司产品。HPLC 同时带有二极管阵列检测器(DAD);孔径为 30 nm 的 Vydac C8 (250 × 2.1 mm, 5 μm)反相色谱柱:美国 Hesperia 产品。凝胶色谱柱(500 mm × 7.9 mm i.d., 5 μm, Shim-pack DIOL-300 型,带有 Shim-pack DIOL 保护柱 4 mm i.d. × 500 mm);日本岛津。SEC-HPLC 与 ICP-MS 系统的连接是用一 Teflon 小管 (0.5 mm, ID), 将经紫外检测后的 HPLC 流动相直接导入 ICP-MS 雾化装置的进样口中,为减少死体积,传输管线应尽量短。自制的玻璃凝胶色谱柱(30 × 1.9 cm):内填葡聚糖凝胶 G-75(40~120 μm)(Pharmacia)。

### 1.2 试剂

MT 标准物质包括 MT-1、MT-2 和 MT 混合物( $n_{\text{MT-1}}:n_{\text{MT-2}}=1:1$ ):兔肝 Cd 诱导生成,购于 Sigma 公司。

MT 的工作溶液:用水或缓冲溶液稀释 MT 储备液配制。MT 标准贮备液及工作溶液均置于 4 °C 冰箱中。30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 溶液:用三羟甲基氨基甲烷(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)(上海)配制,以 6 mol·L<sup>-1</sup> 优级纯 HCl 调其 pH 为 8.0。用于校准 SEC 柱的标准分子量物质为:甲状腺球蛋白 (660 000 Da)、铁传递蛋白(80 000 Da)、牛血清白蛋白(66 000 Da)、兔肝金属硫蛋白 MT-2(6 800 Da)和维生素 B12 (355.4 Da)。甲醇为液相色谱纯(Tedia),醋酸铵为分析纯产品(上海)。实验用水经 Milli-Q50 (Millipore, Bedford, MA)制备。所有流动相都经氩气脱气除氧。

### 1.3 动物试验

实验动物用 20 只体重为 180~220 g 的 wistar 雄性大鼠:由中国医学科学院实验动物研究所提供(编号:SC4K11-00-0006)。它们被随机分为 2 个实验组,每组 10 只大鼠。除正常喂食外,其中一组以 0.01 g/kg bw 为灌喂剂量灌喂 HgCl<sub>2</sub> 两周作为 HgCl<sub>2</sub> 组;另一组灌喂去离子水作为对照组。按照规定的时间灌喂后,分别从大鼠的腹动脉采血,并将血液分离为血浆和红细胞(RBC)另作它用。然后,处死大鼠,经解剖取出肾脏,用生理盐水冲洗后于滤纸上凉干,保存于-80 °C 中。

### 1.4 MT 提取物的分离及脱盐

用手术刀切碎脏器后再按 1:3 (w/v) 的比例与冷却的 250 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖溶液的 0.9%(w/v) NaCl 提取液(pH 7.0)在玻璃均质器中均质。均质后的样品于 4 °C 下离心 30 min (6 000 rpm),取上清液加热 10 min(95 °C)后立即用冰水冷却 5 min,再于 4 °C 下离心 20 min (15 000 rpm)。上清液一部分供凝胶分析柱表征使用,其余用于进一步的分离提纯。

取 0.5 mL 的提取液注入已平衡的自制玻璃凝胶柱,用 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 的 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 8.0)进行洗脱,收集洗脱液每 3 min 为一管。用 ICP-MS 测定每一收集管中的 Hg、Cu 和 Zn 信号,作图得到洗脱曲线。在同样的洗脱条件下,收集、合并 MT 组分收集液,用真空冷冻干燥法(EZ-Dry Kinetics lyophilizer, USA)浓缩 MT 组分。将冻干的 MT 组分溶于 0.1 mL 水中,用分子量小于 1000 Da 的悬浮式透

析袋(PD-3-1, Spectrem, USA)于 4 ℃下透析 24 h 除盐(期间更换 3 次透析水)。脱盐后的透析液体经真空冷冻干燥浓缩后,溶于 50  $\mu\text{L}$  水中供 MT 的表征用。

## 1.5 MT 的表征方法

### 1.5.1 凝胶色谱(SEC)与 ICP-MS 联用的表征

将上述组织制备液 20  $\mu\text{L}$  注入 SEC-ICP-MS 联用系统,以 30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl(pH 8.0)为流动相在流速为 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  下洗脱,依此用 DAD 及 ICP-MS 在线记录流出组分的 UV 色谱图及包括 Hg、Zn、Cu 色谱信号。

### 1.5.2 反相液相色谱(RPC)与 ESI-MS 联用的表征

经葡聚糖凝胶(G-75)纯化、脱盐的组织制备液 20  $\mu\text{L}$  注入 RPC-ESI-MS 联用系统,同时记录紫外检测(225 nm)的色谱图和质谱图。RPC-ESI-MS 联用系统的接口是将 RPC 的洗脱液通过一细的 PTFE 管直接导入 ESI 的石英毛细管中,再通过一喷雾针使样品在加电条件下(4 500 V)喷雾电离。选择正离子分析模式,扫描的质量数范围为 800~1 900 Da。流动相 A 为 pH 6.0 的 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸铵水溶液,流动相 B 为 pH 6.0 的含 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸铵的甲醇和水混合溶液(1:1,  $v/v$ ),在 40 min 内流动相 B 从 10% 增加到 37.5% 进行梯度洗脱。由于使用微柱分离,选择流动相流速为 0.20  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,且此流速与电喷雾进样系统的流速相匹配,故不需使用分流装置而直接进样电离。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大鼠肾中 MT 组分的 SEC-ICP-MS 表征结果

将染汞大鼠的肾脏提取上清液用 SEC-ICP-MS 系统进行分离,图 1 表示紫外检测的色谱流出曲线及其 MT 组分的光谱吸收曲线。

色谱曲线上 MT 组分的确认对 MT 的表征十分重要,虽然通过对 SEC 柱的标定及通过 MT 标准物质的色谱曲线,可按 MT 分子量范围估算出样品的 MT 色谱峰位置,但由于分子量校正法存在较大的误差及不同动物组织诱导的 MT 组分或不同结合金属的 MT 组分其色谱峰的位置存在较大的差别<sup>[10]</sup>。因此,要确认凝胶色谱曲线上的 MT 组分位置还需借助于其他分析信息。为此,实验考察了流出曲线上各色谱峰的紫外光谱特征,由于 MT 分子中不含芳香基团,其紫外光谱在 280 nm 处的吸收强度极弱,

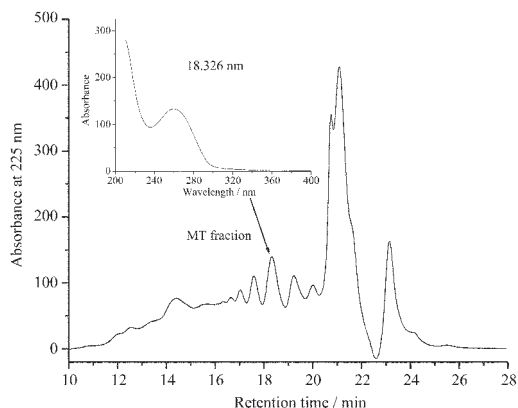


图 1 灌喂  $\text{HgCl}_2$  大鼠肾脏 MT 提取组分的凝胶色谱曲线和 MT 组分的紫外光谱图

Fig.1 SEC chromatogram of MT fraction and its UV spectra in rat kidney of  $\text{HgCl}_2$  group

如图 1 中保留时间为 18.326 min 处的紫外吸收特征,可初步确定样品中 MT 组分的色谱峰位置。MT 色谱峰还可通过其相应的 SEC-ICP-MS 色谱曲线轮廓加以确认。如图 2(a)所示,经标准物质验证,扣除由于 DAD 检测器位于 ICP-MS 之前造成同一色谱峰的保留时间的稍许差别,染汞大鼠肾脏提取物中多金属结合的 MT 组分出现的位置与紫外检测的结果相吻合,如 Hg-MT 组分峰的保留时间为 18.509 min,且提取物中不同金属(如 Hg、Cu 和 Zn)与 MT 结

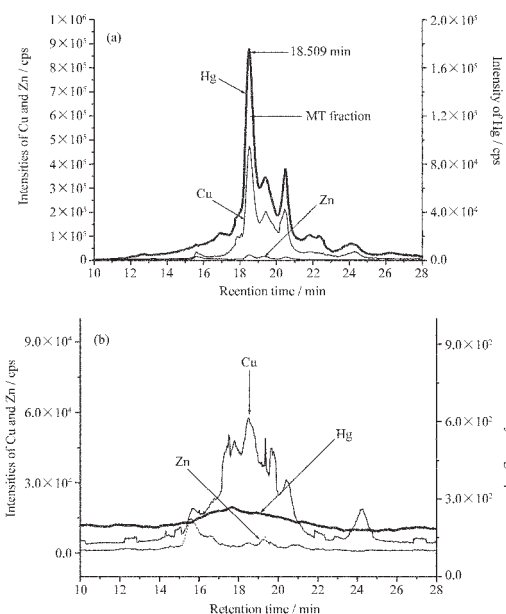


图 2 灌喂  $\text{HgCl}_2$  组(a)和对照组(b)大鼠肾脏 MT 提取组分的 SEC-ICP-MS 色谱图

Fig.2 SEC-ICP-MS chromatograms of MT fractions in rat kidney of  $\text{HgCl}_2$  group (a) and control group (b)

合的组分 Hg-MT、Cu-MT 和 Zn-MT 在凝胶柱的保留时间基本相似。

从图 2 的 SEC-ICP-MS 的检测结果可知, 染汞组的 MT 诱导量显著高于其对照组。其中, 除 Hg-MT 比对照组有显著增加外, HgCl<sub>2</sub> 组肾脏中的 Cu-MT 的信号(峰高)也比对照组的 Cu-MT 高 8 倍以上, 此实验结果与大鼠各脏器中 MT 总量的测定结果和总汞、铜含量的测量结果相一致<sup>[10]</sup>。它表明大鼠的肾脏对口服无机离子态的 Hg<sup>2+</sup> 有较强的蓄积作用, 对肾造成严重毒害<sup>[11,12]</sup>, 而具有应激调节功能的 MT 对染毒肌体产生显著的解毒作用。在染毒肌体中, 一方面重金属汞具有诱导刺激细胞组织合成大量的多金属结合 MT; 另一方面, MT 对细胞组织中的营养元素如 Cu 进行自我调节, 并产生大量的 Cu-MT 以利于汞取代铜产生大量的 Hg-MT 而发挥解毒的作用<sup>[13]</sup>。

## 2.2 染汞大鼠肾脏 MT 亚型和次亚型的 RPC-ESI-MS 表征结果

本实验在 RPC-ESI-MS 分离系统的优化条件下, 用镉诱导 MT-1 和 MT-2 标准物质进行次亚型结构的质谱验证, 以确定本表征系统实验数据的准确性。在此基础上, 将经纯化的大鼠肾脏 MT 提取物用 RPC-ESI-MS 进行分析, 并根据实验结果(如图 3)进行多金属结合 MT 的结构表征。由于目前利用 ESI-MS 技术对 MT 构型研究较多的主要是 Cd 诱导产物, 而 Hg 结合 MT 的 RPC 分离和 ESI-MS 检测方法的研究报道极少。此外, 目前尚无商品化的 Hg-MT 及其亚型标准物质, 因此要准确地对汞结合 MT 质谱信号进行其亚型和次亚型确认和归属比较困难。

通过质谱检测的总离子流(TIC)曲线上色谱峰(如图 3b)对应的质谱信号值与现有报道的脱金属金属硫蛋白(apo-MT)的质量数及假定结合金属的质量数之和进行对比, 是确认归属大鼠 MT 构型的一条有效途径<sup>[7,14,15]</sup>。但由于 ESI-MS 的灵敏度不如 ICP-MS 高。因此, 本实验只考察了 TIC 曲线中较强的质谱信号, 如图 3(c), 并对主要质谱峰进行适当的归属, 结果列于表 1。

其中, 质谱信号中最强的质量数为 7410.5 Da, 根据 apo-MT-2 $\delta$  (6156 Da) 及假定的结合金属种类和数目, 可归属为 Hg<sub>6</sub>Cu-MT-2 $\delta$ , 其理论值为 7409.1 Da。而 7281 Da 的质量数也归于 apo-MT-2 $\delta$  构型, 其对应的分子式为 Hg<sub>5</sub>Zn<sub>2</sub>-MT-2 $\delta$ 。同样 7278.5 Da 和 7272.5 Da 也归属于同一 MT 构型, 即: Hg<sub>5</sub>Cu<sub>2</sub>-MT-2 $\delta$ 。

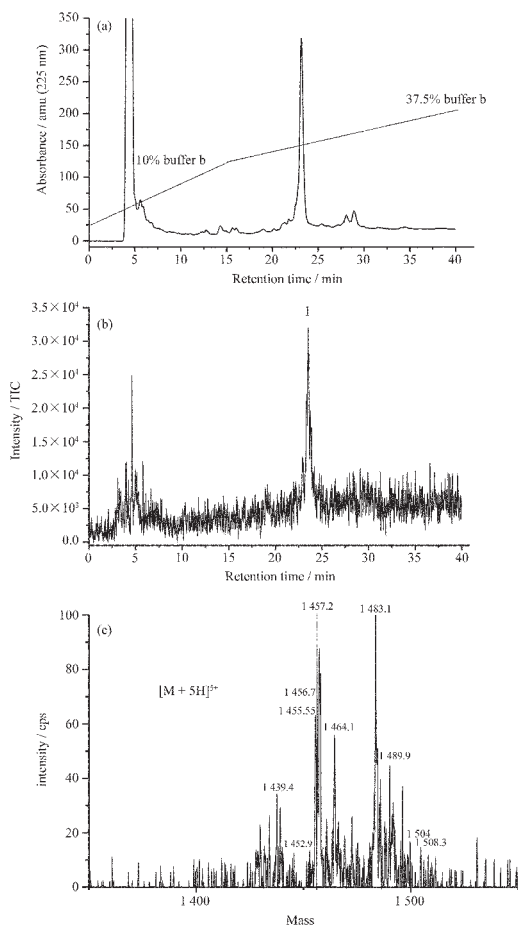


图 3 汞诱导 MT 的 HPLC-ESI-MS 紫外检测色谱图(a)、总离子流图(b)及其对应的 ESI-MS 质谱图(c)

Fig.3 UV chromatogram (a), mass TIC chromatogram (b), and ESI mass spectra near TIC apex (c) of MT-isoforms by HPLC-ESI-MS

质量数为 7315.5 Da 的质谱峰应归属为另一类 MT 构型, 即 apo-MT-2 $\beta$  (6125.1 Da), 其分子构型为 Hg<sub>6</sub>-MT-2 $\beta$ (理论值为 7316.5 Da), 是一个未饱和和金属的 MT 形态。实验发现了结合 7 个汞原子的 MT 分子, 分别是质量数为 7518 Da 和 7536.5 Da, 其相应的结合金属 MT 构型为 Hg<sub>7</sub>-MT-2 $\beta$  (7516 Da, 理论值)和 Hg<sub>7</sub>-MT-2 $\gamma$  (7536.1 Da, 理论值), 只是这两个信号峰都不强, 分别只有 13.8 cps 和 11.1 cps。质量数为 7444.5 Da 是其中被归属为 MT-1 强度最高的构型, 与 Hg<sub>6</sub>Cu-MT-1 $\gamma$  的理论值 7445.1 Da 十分接近。而对质量数为 7192 Da 的信号峰, 很难区分是 Hg<sub>4</sub>Cu<sub>3</sub>-MT-2 $\zeta$  构型还是 Hg<sub>4</sub>Cu<sub>3</sub>-MT-1 $\delta$  构型, 因为它们的 apo-MT 质量数分别为 6214 Da 和 6215 Da, 十分相近。

表 1 大鼠肾组织 MT 亚型和次亚型分子结构的推断

Table 1 MT Isoforms and Sub-isoforms of Rat Kidney Interpreted by ESI-MS Spectra

| Mass found / Da | Tentative formula                      | Mass calculated* / Da | Reference mass of apo-MT / Da | Intensity / cps |
|-----------------|----------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------|
| 7 410.5         | Hg <sub>6</sub> Cu-MT-2δ               | 7 409.1               | 6 156.0                       | 100             |
| 7 281           | Hg <sub>5</sub> Zn <sub>2</sub> -MT-2δ | 7 281.9               | 6 162.2                       | 87.5            |
| 7 278.5         | Hg <sub>5</sub> Cu <sub>2</sub> -MT-2δ | 7 278.2               | 6 162.2                       | 68.1            |
| 7 272.5         | Hg <sub>5</sub> Cu <sub>2</sub> -MT-2δ | 7 272.0               | 6 156.0                       | 63.0            |
| 7 315.5         | Hg <sub>6</sub> -MT-2β                 | 7 316.5               | 6 125.1                       | 56              |
| 7 444.5         | Hg <sub>6</sub> Cu -MT-1γ              | 7 445.1               | 6 192                         | 44.9            |
| 7 518           | Hg <sub>7</sub> -MT-2β                 | 7 516                 | 6 125.1                       | 13.8            |
| 7 536.5         | Hg <sub>7</sub> -MT-2γ                 | 7 536.1               | 6 146                         | 11.1            |
| 7 192           | Hg <sub>4</sub> Cu <sub>3</sub> -MT-2ζ | 7 193                 | 6 214                         | 28.4            |
|                 | Hg <sub>4</sub> Cu <sub>3</sub> -MT-1δ | 7 194                 | 6 215                         |                 |
| 7 259.5         | Hg <sub>5</sub> Zn <sub>2</sub> -MT-1α | 7 260.0               | 6 144.0                       | 13.5            |
| 7 264           | Hg <sub>5</sub> Zn <sub>2</sub> -MT-1α | 7 264.2               | 6 144.0                       | 99.6            |
| 7 427           | Hg <sub>6</sub> Cu-MT-1β               | 7 429.1               | 6 176                         | 68.5            |
| 7 103.5         | Hg <sub>4</sub> Cu <sub>3</sub> -MT-2β | 7 104.1               | 6 125.1                       | 36.2            |
| 7 204.5         | Hg <sub>5</sub> Zn <sub>2</sub> -MT-2α | 7 204.2               | 6 084.5                       | 39.4            |

\* Mass of apo-MT was calculated by the formula:  $M_{MT} = M_{apo-MT} + M_{metals} - M_{14H}$

3 结 论

本工作建立了 SEC-ICP-MS 和 RPC-ESI-MS 联用的系统,对灌喂 HgCl<sub>2</sub> 大鼠的肾组织中诱导的多金属结合金属硫蛋白(MT)的结构进行表征分析。通过 SEC-ICP-MS 曲线上的金属信号及紫外检测的 MT 光谱吸收特征,可确认组织提取液中 MT 在凝胶色谱曲线上的位置。与对照组相比,灌喂 HgCl<sub>2</sub> 大鼠肾中 Hg-MT 的诱导量显著增加。与此同时,在染毒组 Cu-MT 的诱导量也相应增加,这说明了 MT 在染汞大鼠肾脏中起着对汞的解毒和对铜的调节作用。MT 样品提取物经葡聚糖(G-75)凝胶柱分离纯化并用透析法脱盐后,用细内径反相色谱柱分离,进行梯度洗脱。洗脱液通过与 ESI-MS 联用,可获得总离子流色谱图及与色谱峰对应的质谱图,通过对质谱信号的解析及参考脱金属 MT 构型的有关报道,对汞诱导大鼠肾组织 MT 的不同亚型和次亚型分子结构进行推断,结果证明,在灌喂 HgCl<sub>2</sub> 大鼠的肾组织中存在着一系列汞结合的 MT 形态。

参考文献:

[1] Bremner I. *Experientia Suppl.*, **1987**,**52**:81~107

[2] Webb M. *Experientia Suppl.*, **1987**,**52**:109~134

[3] Nordberg M. *Talanta*, **1998**,**46**:243~253

[4] Jacob A, Maret W, Vallee B L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**,**95**:3489~3494

[5] Minami T, Yoshita C, Tanaka M, et al. *Talanta*, **1998**,**46**:347~354

[6] Prange A, Schaumlöffel D, Brätter P, et al. *Anal. Chem.*, **2001**,**371**:764~774

[7] Chassaigne H, Łobiński R. *Anal. Chem.*, **1998**,**70**:2536~2543

[8] Le Blanc J C. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1997**,**12**:525~530

[9] Chassaigne H, Lobinsky R. *Analyst*, **1998**,**123**:2125~2130

[10]HUANG Zhi-Yong (黄志勇). *Thesis for the Doctorate of Xiamen University*(厦门大学博士论文). **2003**.32~52

[11]CHEN Qing(陈清), RU Guo-Cheng (卢国程) *Microelement and Health*(微量元素与健康), Beijing: Beijing University Press, **1989**.33~35

[12]WANG Kui(王夔) *Trace Elements in Life Science*(生命科学中的微量元素). Beijing: Chinese metrology Press, **1996**. 886~927

[13]Dabrio M, Rodríguez A R, Bordin G, et al. *Inorg. Biochem.*, **2002**,**88**:123~134

[14]Chassaigne H, Łobiński R. *J. Chromato. A*, **1998**,**829**:127~136

[15]Chassaigne H, Łobiński R. *Talanta*, **1999**,**48**:109~118