

铬(VI)-谷胱甘肽配合物诱导小牛胸腺 DNA 变性的新表征方法

杨培慧^{*,1,2} 张文豪² 赵秋香² 蔡继业²

(¹ 中国科学院安徽光学精密机械研究所, 合肥 230031)

(² 暨南大学化学系, 广州 510632)

摘要: 本文采用电化学方法对铬(VI)-谷胱甘肽(GSH)配合物诱导 DNA 变性进行表征, 同时运用原子力显微镜(AFM)对 DNA 损伤变性过程进行可视化探测。结果表明: 在 pH=5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中, DNA 溶液中加入 Cr(VI)-GSH 配合物后进行循环伏安扫描, +0.20 V 和 0.00 V(vs SCE)处出现一对新的氧化还原峰, 该氧化还原峰随 Cr(VI)-GSH 配合物浓度增加峰电流上升。DNA 热变性和表面活性剂 SDS 变性实验进一步证明了该峰为 DNA 变性后的氧化还原峰, 且变性 DNA 的峰信号在修饰电极上比裸金电极上更为灵敏。电化学动力学表明在 30 min 内配合物诱导 DNA 变性的程度随时间的上升而增加, 并通过 AFM 观察了配合物作用下 DNA 断链的过程。

关键词: 重铬酸钾; 谷胱甘肽; 电化学; DNA; AFM

中图分类号: O614.61¹; O629.72

文献标识码: A

文章编号: 100-4861(2006)05-0488-06

New Characterization Method on Denaturation of DNA Induced by Cr(VI)-GSH Complexes

YANG Pei-Hui^{*,1,2} ZHANG Wen-Hao² ZHAO Qiu-Xiang² CAI Ji-Ye²

(¹ Anhui Institute of Precision Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

(² Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract: The damages of DNA induced by Cr(VI)-GSH complexes were characterized by electrochemistry, absorption spectra, and AFM imaging. The redox peaks of denatured DNA appeared at potentials of about +0.20 V and 0.00 V in HAc-NaAc buffer solution (pH 5.6) when adding Cr(VI)-GSH complexes to the DNA solution. Moreover, the peaks current increased with the concentration of Cr(VI)-GSH complexes and incubation time. The results showed that the Cr(VI)-GSH complexes resulted in the denaturation of DNA. The heating and SDS denaturation further confirmed the DNA denaturation induced by the Cr(VI)-GSH complexes. AFM imaging was used to illustrate the cleavage process of DNA.

Key words: potassium dichromate; glutathione; electrochemistry; DNA; AFM

近代工业含铬化合物的广泛应用, 对人体健康造成了极大的危害, CrO₄²⁻可以通过细胞膜上的阴离子通道迅速进入人体细胞内而引起基因毒性; 皮肤病和呼吸性癌症也与 Cr(VI)在人体内的作用有关^[1]。研究表明^[2]: 在铬的各种价态中, Cr(VI)对人体的危害

最大。低浓度的 Cr(VI)单独存在时并不与 DNA 作用, 但是在有微量还原剂存在下, 微量的 Cr(VI)将引起 DNA 构象变化。谷胱甘肽(GSH)在人体中的含量较高(毫摩尔级), 能和进入人体的微量 Cr(VI)作用诱导 DNA 损伤, Levina 等^[3]确证了 Cr(VI)和 GSH 作用形成

收稿日期: 2005-08-29。收修改稿日期: 2005-12-08。

广东省自然科学基金(No.021190)和广州市科技计划项目(No.2003Z3-D2041)资助。

*通讯联系人。E-mail: typh@jnu.edu.cn

第一作者: 杨培慧, 女, 39 岁, 副教授; 研究方向: 生物无机与生物分析化学。

一种导致 DNA 构象变化的 Cr(VI)中间态配合物,该配合物在 Cr(VI)致癌过程中起主要作用,但其作用机制有待于进一步研究。文献^[4]采用电化学方法表征了 Cr(VI)-GSH 中间态配合物的形成,在此基础上,本文进一步采用电化学方法对 Cr(VI)-GSH 配合物诱导小牛胸腺 DNA 变性进行表征,这种简便快速的电化学分析方法用于 Cr(VI)-GSH 中间态配合物诱导 DNA 损伤研究未见有文献报道;此外,利用新型的表面显微技术原子力显微镜(AFM)对 DNA 分子的损伤过程进行了可视化探测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660A 电化学工作站 (CH Instruments Co., USA);TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(中国北京普析通用仪器公司);AFM:Nanoscopy III a Controller (Veeco/Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA),E-扫描器:15 μm , 扫描探针采用商用 NCH-100 氮化硅针尖 (Nanosensors, Germany), 力常数为 $21\sim 78\text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$, 成像模式为轻敲式。

小牛胸腺 DNA(Calf Thymus DNA, Sigma 产品, UV 检测 $A_{258}/A_{280}>1.95$, 纯度符合要求);还原型谷胱甘肽(Y-Glu-Cys-Gly, Sigma 产品);重铬酸钾(G.R.);Cr(VI)-GSH 配合物的制备参照文献^[4],Cr(VI)与 GSH 的浓度比为 1:10。其他试剂均为分析纯试剂,实验用水均为二次亚沸蒸馏水。

1.2 实验方法

金电极经金相砂纸磨平, Al_2O_3 抛光后超声波清洗,在 $\text{HNO}_3(1:1)$ 溶液中浸泡 10 min 后用二次亚沸水洗净,放干待用。将处理好的裸金电极放入 DNA 溶液中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行自组装 12 h,形成 DNA 修饰电极,保存于缓冲溶液中待用。

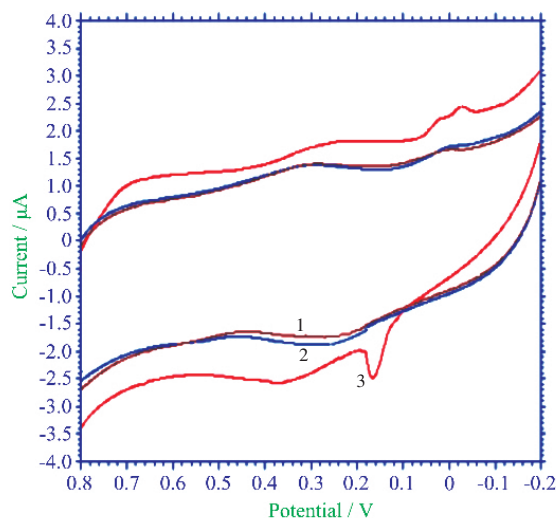
待测溶液转入电解池中,通 N_2 15 min,在 +0.8 ~ -0.2 V 的电位范围内,以 $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速度进行循环伏安扫描,记录 CV 曲线。在 600~200 nm 的光谱范围内进行可见紫外吸收(UV-Vis)光谱扫描,记录吸收光谱曲线。

AFM 成像基片表面处理与样品的制备:室温条件下,将 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Mg}^{2+}$ 滴加在新鲜剥离的云母表面约 5 min,使云母表面带正电, DNA 更容易在云母表面吸附和固定。将待测样品滴在滴加了 Mg^{2+} 的云母基片上,吸附约 10 min 后,用水润洗除去盐分,置于空气中自然风干,用原子力显微镜成像。

2 结果与讨论

2.1 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性的电化学特征

在 pH=5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中,较高浓度的 Cr(VI) ($2.0 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在金电极上于 +0.10 V 处产生一不可逆还原峰,但在较低浓度 ($1.0 \times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 或者还有还原剂(GSH)存在下,该还原峰消失;而 GSH 在金电极上不具有电活性^[4]。当在 DNA 溶液中加入 GSH 时,没有氧化还原峰出现(如图 1(1));而在 DNA 溶液中加入低浓度的 Cr(VI)后,在 +0.28 V 和 0.04 V 左右呈现很弱的氧化还原峰(如图 1(2));当向 DNA 溶液中加入 Cr(VI)-GSH 配合物溶液时, +0.20 V 和 0.00 V 左右处出现较强的氧化还原峰(如图 1(3))。由此可见,低浓度的 Cr(VI)不与 DNA 作用,这与文献报导相符^[3],而 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性的电化学信号则比较明显。



- 1: DNA+GSH on bare gold electrode
- 2: DNA+ Cr(VI) on bare gold electrode
- 3: DNA+ Cr(VI)-GSH on bare gold electrode

Scan rate: $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $C_{\text{DNA}}=4.0 \times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $C_{\text{Cr(VI)-GSH}}=1.0 \times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

$C_{\text{Cr(VI)}}=1.0 \times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $C_{\text{GSH}}=1.0 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

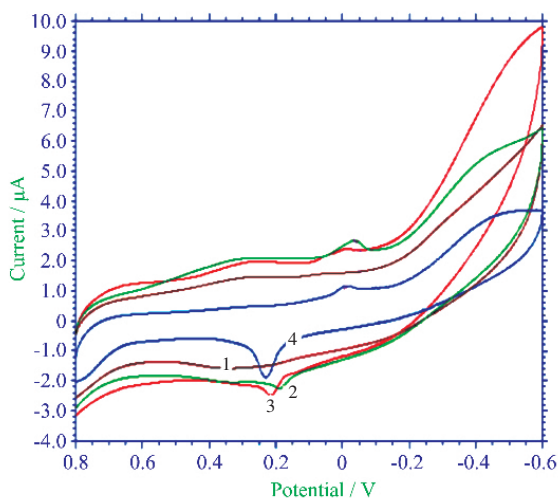
图1 DNA 在不同体系中的电化学特性

Fig.1 Cyclic voltammograms of DNA in GSH, Cr(VI) and Cr(VI)-GSH solution

当 GSH 浓度为 Cr(VI)浓度 5 倍以上时, Cr(VI)与过量 GSH 作用完全并形成一新的中间态配合物,配合物不稳定,在一定时间内缓慢分解^[4],文献报道^[5]提出该配合物对细胞具有较强的基因毒性^[5]。本实验采用裸金电极和 DNA 自组装电极两种方法进行

电化学测定,以考察小牛胸腺 DNA 在 Cr(VI)-GSH 配合物作用下的变性情况。

由图 2 可见,DNA 在裸金电极上未获得峰信号(曲线 1)。DNA 分子的电活性主要是由其碱基引起^[6],由于正常 DNA 分子的碱基包埋在它的双螺旋结构内侧,其电活性较弱,未获得电响应信号;DNA 和 Cr(VI)-GSH 配合物溶液作用 30 min 后,用裸金电极进行 CV 扫描,在+0.18 V 和 0.00 V 处出现一对氧化还原峰(曲线 2);当将 DNA 自组装于金电极表面并置于 Cr(VI)-GSH 溶液中,于+0.20 V 和 0.00 V 处出现一对氧化还原峰(曲线 3);若将 Cr(VI)-GSH 配合物诱导变性的 DNA 修饰到金电极表面并插入 pH=5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中,进行 CV 扫描,+0.24 V 和 0.00 V 处出现一对较强的氧化还原峰(曲线 4)。由此可见,在 Cr(VI)-GSH 配合物的作用下,不同体系中 DNA 的氧化还原信号均增强,这是因为 $K_2Cr_2O_7$ 与 GSH 反应形成的 Cr(VI)-GSH 配合物使 DNA 变性,碱基裸露,变性的 DNA 在电极表面容易发生形变,其氧化、还原位点容易接近电极,导致峰电流上升。从实验结果看,不同体系下对 DNA 变性信号检



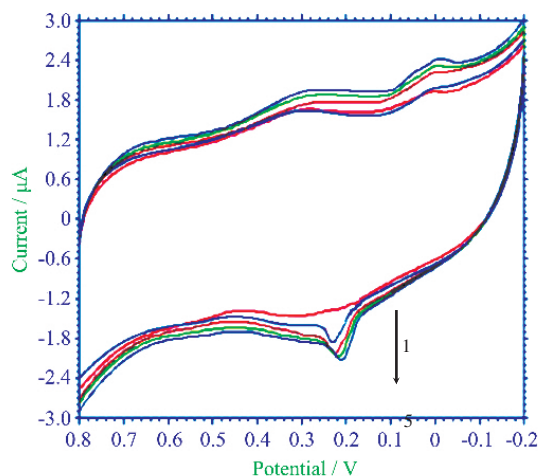
1: DNA on bare gold electrode
2: DNA + Cr(VI)-GSH on bare gold electrode
3: DNA modified on gold electrode +Cr(VI)-GSH
4: denatured DNA induced by Cr(VI)-GSH on gold electrode in HAc-NaAc buffer solution
Scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $C_{\text{DNA}}=4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Cr(VI)-GSH}}=1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图 2 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性后在不同体系中的电化学行为

Fig.2 Electrochemical characteristic of denatured DNA induced by Cr(VI)-GSH complex in different electrode system

测的灵敏度依次为:将 Cr(VI)-GSH 配合物诱导变性的 DNA 修饰到电极表面,DNA 修饰电极在 Cr(VI)-GSH 中,裸金电极在 DNA + Cr(VI)-GSH 溶液中。

在 DNA 溶液中加入不同浓度的 Cr(VI)-GSH 溶液,作用 30 min 后在裸金电极上进行循环伏安扫描(见图 3),随着 Cr(VI)-GSH 配合物浓度的增加,+0.20 V 和 0.00 V 处的氧化还原峰电流随之增大,初步表明该对氧化还原峰信号为 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性的电化学信号。



1: DNA
2: DNA + $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr(VI)-GSH
3: DNA + $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr(VI)-GSH
4: DNA + $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr(VI)-GSH
5: DNA + $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr(VI)-GSH
Scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $C_{\text{DNA}}=4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图 3 Cr(VI)-GSH 配合物浓度对 DNA 变性的影响
Fig.3 Cyclic voltammograms of DNA in different concentration Cr(VI)-GSH complex

2.2 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性的证据

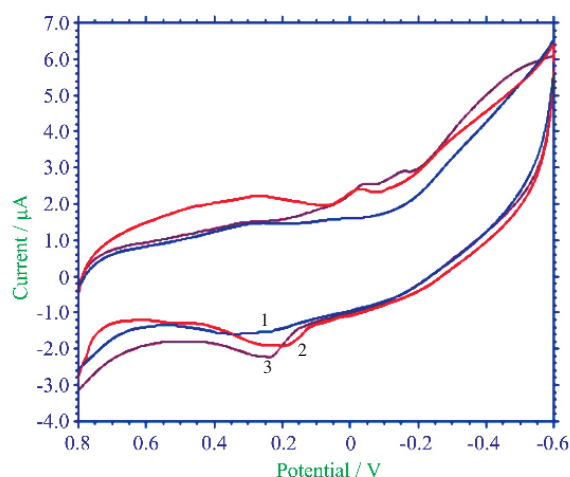
2.2.1 热变性和表面活性剂诱导 DNA 变性的电化学表征

为进一步确定图 1 中+0.20 V 和+0.00 V 处的电化学信号是 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性后形成的氧化还原峰,本实验采用生物技术常用的 DNA 变性方法,表面活性剂 SDS 和热变性,将变性的 DNA 进行循环伏安扫描,考察 DNA 变性后的出峰位置。

热变性可使 DNA 解链,DNA 上具有电活性的碱基裸露出来,从而增强了 DNA 的电响应信号。DNA 的热变性参照 Aposhian^[7]等的方法:将 DNA 于沸水中煮 7 min 后,立即放入冰水中骤冷,迅速进行循环伏安扫描。实验结果如图 4 所示;DNA 在金

电极上无峰信号(曲线1),dsDNA热变性后形成的ssDNA在金电极上的峰信号有所增强(曲线2),而将热变性后的DNA修饰到电极表面后,其峰电流较明显的增大,氧化电位较之裸金电极正移(曲线3)。

采用表面活性剂 SDS 对 DNA 进行变性实验^[8],

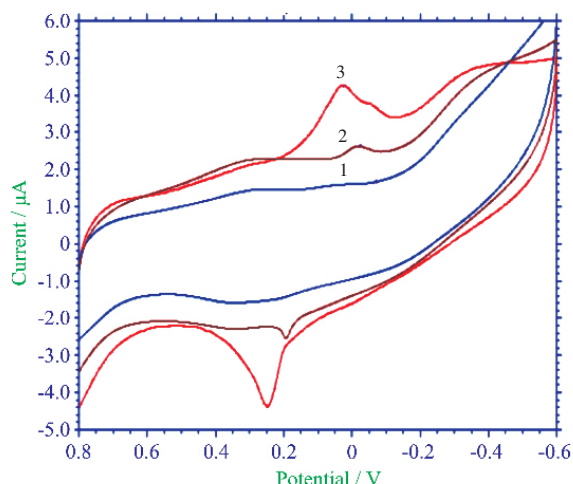


- 1: DNA on bare gold electrode
- 2: denatured DNA induced by heat in bare gold electrode
- 3: denatured DNA induced by heat modified on bare gold electrode in HAc-NaAc buffer solution

Scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $C_{\text{DNA}} = 4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图4 热变性 DNA 的 CV 曲线

Fig.4 Cyclic voltammogram of denatured DNA induced by heat



- 1: DNA on bare gold electrode
 - 2: DNA + SDS in bare gold electrode
 - 3: denatured DNA induced by SDS modified on bare gold electrode in HAc-NaAc buffer solution
- $C_{\text{SDS}} = 4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{DNA}} = 4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图5 SDS 变性 DNA 的 CV 曲线

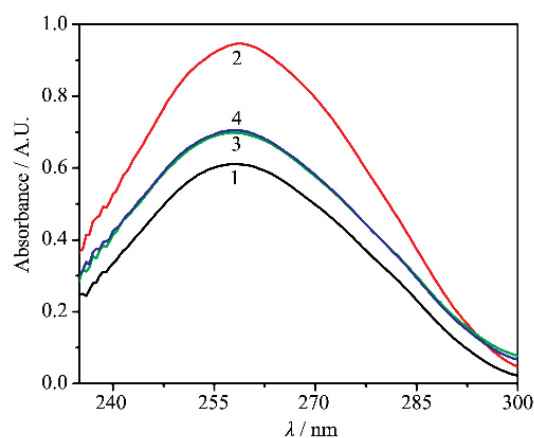
Fig.5 Cyclic voltammograms of denatured DNA by SDS

由于表面活性剂 SDS 分子能与 DNA 通过疏水性作用发生一定程度的结合,改变 DNA 链的表面取向,导致 DNA 变性,实验结果见图 5。DNA 在裸金电极上无峰信号(曲线 1),将裸金电极置于经 SDS 变性的 DNA 溶液中进行 CV 扫描, +0.24 V 和 0.00 V 处出现一对氧化还原峰(曲线 2),而将 DNA 用 SDS 变性后修饰在金电极上,在 pH=5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中进行 CV 扫描,所得峰信号明显高于裸金电极体系中 SDS 变性的 DNA 的峰信号(曲线 3)。

上述两种不同的方法诱导 DNA 变性,与 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性表现出相似的电化学行为,均在 +0.20 V 和 0.00 V 处出现一对氧化还原峰,该峰为 DNA 变性的氧化还原信号。这进一步的证明了 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性的存在。

2.2.2 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性的 UV-Vis 吸收光谱

图 6 中(1)为 DNA 在 258 nm 处的特征紫外吸收峰;(2)是在 DNA 溶液中加入表面活性剂 SDS, SDS 导致 DNA 变性, DNA 特征吸收得到了明显增强;(3)是热变性后的 DNA 的 UV 吸收图, DNA 热变性时的高温使得 DNA 解链, 258 nm 处的特征吸收峰强度增强;(4)是 Cr(VI)-GSH 配合物与 DNA 作用 30 min 后的 UV 吸收图。当溶液存在 Cr(VI)-GSH 时,导致 DNA 变性,其特征吸收峰增高。



- 1: DNA
- 2: DNA + SDS
- 3: denatured DNA induced by heat
- 4: DNA + Cr(VI)-GSH

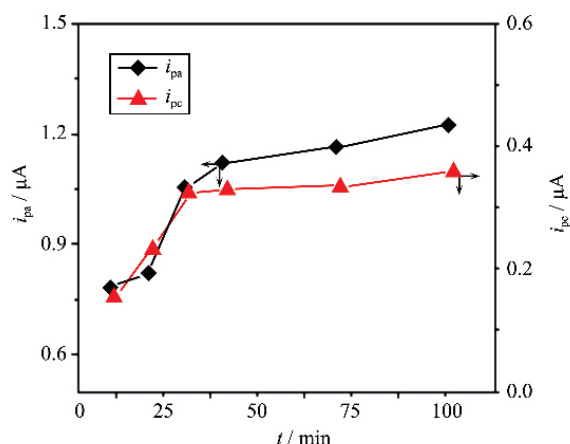
图6 DNA 变性后的 UV-Vis 吸收光谱

Fig.6 UV-Vis adsorption spectra of denatured DNA

实验结果表明,上述 3 种不同的方法诱导 DNA 变性均表现出 DNA 的增色效应,因此,吸收光谱实验进一步证明了 Cr(VI)-GSH 配合物可诱导 DNA 变性。

2.3 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性的动力学

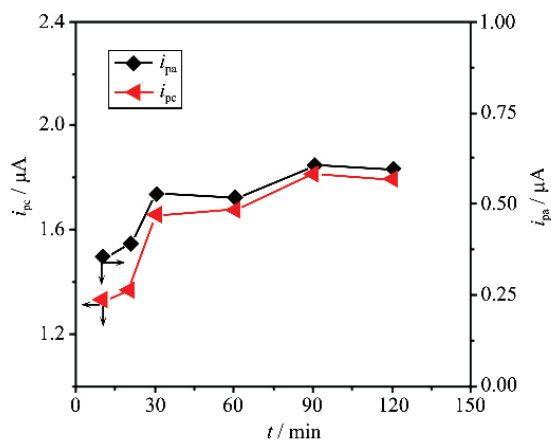
本实验分别采用裸金电极置于 DNA + Cr(VI)-GSH 配合物溶液中和采用 DNA 自组装金电极置于 Cr(VI)-GSH 配合物溶液中 2 种体系, 考察 DNA 在 0.00 V 和 +0.20 V 峰电流随 Cr(VI)-GSH 配合物作用时间的变化情况, 实验结果见图 7 和图 8。



$C_{\text{DNA}} = 4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,
 $C_{\text{Cr(VI)-GSH}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图 7 Cr(VI)-GSH 配合物诱导溶液中 DNA 变性在裸金电极上的电化学动力学

Fig.7 Electrochemical dynamics of denatured DNA in Cr(VI)-GSH solution on bare gold electrode



$C_{\text{DNA}} = 4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,
 $C_{\text{Cr(VI)-GSH}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图 8 Cr(VI)-GSH 配合物诱导修饰在金电极上 DNA 变性电化学动力学

Fig.8 Electrochemical dynamics of DNA denaturation on DNA-modified gold electrode

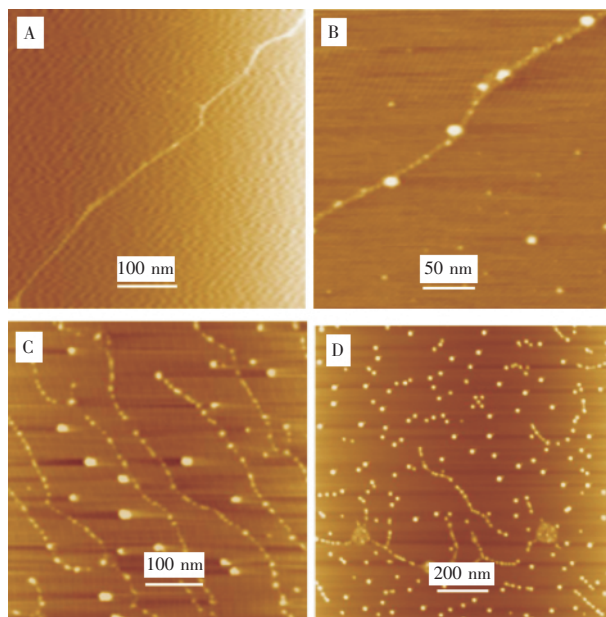
由图可见, 随着 Cr(VI)-GSH 配合物作用时间的延长, 在 30 min 内, 在 0.00 V 和 +0.20 V 处 DNA 的氧化还原峰峰电流明显增加, 因为 Cr(VI)-GSH 中间态配合物形成在 30 min 内比较稳定^[3], 此时配合物

的浓度较高, 诱导 DNA 变性的程度较大, 因此, 峰电流增大较明显。当时间大于 30 min 后, 配合物逐渐分解, 配合物浓度降低后诱导 DNA 变性的程度下降, 峰电流增加趋于缓慢, 当作用时间大于 90 min 后, 配合物分解完全, DNA 变性峰电流基本不变, 此时诱导 DNA 变性趋于稳定。此外, 对比图 7、8 的峰电流值可以看出, DNA 的变性峰信号在 DNA 自组装电极上峰信号比裸金电极上灵敏。

2.4 原子力显微对 DNA 断裂过程的可视化探测

原子力显微镜是一种新型的表面显微技术, 它的独特而又直观的研究方法使其越来越受到生物医学工作者的青睐。本实验采用 AFM 以轻敲模式在云母基片上于空气中进行成像, 观察 DNA 在 Cr(VI)-GSH 配合物作用下不同时间的断链过程。

图 9(A) 是小牛胸腺 DNA 分子单个 DNA 分子的形貌图, 从图像可以看出 DNA 分子舒展呈链状, 链长约为 7.1 μm, 链宽约为 20 nm, 高度约为 0.6 nm。图 9(B) 是 Cr(VI)-GSH 配合物和 DNA 作用 30 min 后的 AFM 形貌图, 可观察到 DNA 链上许多高度突起的白点, 这是因为在 30 min 时间内, Cr(VI)-GSH 中间



A: Single DNA molecule;
 B: Incubation for 30 min;
 C: Incubation for 60 min;
 D: Incubation for 300 min.

图 9 Cr(VI)-GSH 配合物作用下 DNA 的 AFM 图像

Fig.9 AFM imaging of DNA denatured induced by Cr(VI)-GSH in HAc-NaAc buffer solution (pH=5.6), $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA + ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr(VI) + $1.0 \times 10^{-4} \text{ GSH}$)

态配合物形成并键合到 DNA 链的骨架上,导致 DNA 分子构象的变化;DNA 链磷酸骨架收缩、突起,这是 DNA 链断裂前的特征。图 9(C)是 Cr(VI)-GSH 配合物和 DNA 作用 60 min 后的形貌图,可观察到不同长度的 DNA 分子在配合物的作用下开始有明显的断链。图 9(D)是 Cr(VI)-GSH 配合物和 DNA 作用 300 min 后的 AFM 图像,从形貌图上可观察到多数 DNA 链断裂成碎片。由此可见,AFM 对 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 断链过程给予了直观的可视化的表征。

3 结 论

本文运用电化学分析、吸收光谱法以及原子力显微镜(AFM)对 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性的过程进行研究。在 pH=5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中进行循环伏安扫描,DNA 未出现峰信号,当向溶液中加入 Cr(VI)-GSH 配合物时,在+0.20 V 和 0.00 V 出现一对氧化还原峰,该峰电流随 Cr(VI)-GSH 配合物浓度增加而上升;通过热变性和表面活性剂 SDS 变性实验进一步证明了这一位置的电信号是 DNA 变性引起的,由于 Cr(VI)-GSH 配合物诱导了 DNA 的变性,导致 DNA 构象变化或解链、断链,从而使碱基裸露,使峰电流增强。在 UV-Vis 吸收光谱中,258 nm 处 DNA 的特征吸收峰增色效应进一步为 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 变性提供了证据。原子力显微镜的

形貌图进一步直观地表征了 Cr(VI)-GSH 配合物诱导 DNA 的断链过程。从 Cr(VI)-GSH 配合物的稳定性,电化学动力学和 AFM 成像可以看出,在 30 min 内,由于中间态配合物 Cr(VI)-GSH 形成及其与 DNA 的结合,导致 DNA 构象变化,而当时间大于 60 min 后,DNA 会出现断链的变性。本文对 Cr(VI)诱导致癌机制的研究进一步提供了实验依据,同时也展示了一种新的表征方法。

参考文献:

- [1] De F S, Bagnasco M., Serra D. Zancacchi P. *Mutat. Res.*, **1990**, **238**:99~172
- [2] Brauer S L, Wetterhahn K E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**,**113**: 3001~3007
- [3] Levina A, Zhang L B, Lay P A, et al. *Inorg. Chem.*, **2003**,**42**: 767~784
- [4] YANG Pei-Hui(杨培慧), ZHANG Wen-Hao(张文豪), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2005**,**21**(4): 495~499
- [5] Levina A, Ludwig C. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2003**, **96**:176~178
- [6] HUANG Hai-Zhen(黄海珍), YANG Xiu-Rong(杨秀蓉), et al. *Fenxi Huaxue(Chinese J. Anal. Chem.)*, **2002**,**4**:491~497
- [7] Aposhian H V. *J. Biol. Chem.*, **1962**,**237**:519~525
- [8] ZHAO Fa-Qiong(赵发琼), ZEGN Bai-Zhao(曾百肇). *Huaxue Xuebao(Acta Chim. Sinica)*, **2003**,**60**(1):22~28