

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2015.06.006

基于固相萃取/高效液相色谱-质谱联用法的微囊藻毒素代谢产物制备及应用

蓝际荣¹, 杨安平², 吴来燕^{1*}, 王松波¹, 蒋娟娟¹, 王学武¹

(1. 中南民族大学 化学与材料科学学院, 湖北 武汉 430074; 2. 湖北省环境监测中心站, 湖北 武汉 430072)

摘要: 采用 HPLC-MS/MS 监控反应, 合成了微囊藻毒素 RR 的谷胱甘肽和半胱氨酸代谢物 (MC-RR-GSH 及 MC-RR-Cys)。该产物经 AccuBOND C₁₈ 固相萃取小柱纯化后, 纯度大于 95% (HPLC 检测)。结果表明, 合成反应的最佳时间为 60 min。在 SPE 洗脱过程中, 采用纯水淋洗, 1% 甲酸-90% 甲醇洗脱时, MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的平均回收率可达 86.4% ± 1.5% 和 90.2% ± 2.8%。运用 ESI-HPLC-MS/MS 对以上产物进行一级及二级质谱扫描。两种产物的一级质谱电离均以 [M + 2H]²⁺ 为基峰, 对应的质荷比 (*m/z*) 分别为 673.6 和 580.5。以 MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 一级质谱图中丰度最高的双电荷离子为母离子进行二级质谱扫描, 对应的子离子对为 *m/z* 609.0/536.9 和 519.4/520.8, 由上述裂解碎片推断合成的产物为 MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys。以合成产物为标准品, 测定出太湖鲤鱼肾脏中 MC-RR-GSH, MC-RR-Cys 和 MC-RR 的含量 (干重) 分别为未检出, 1.587 5, 0.001 5 μg · kg⁻¹。本文合成的高纯度代谢产物, 可作为相关研究中非商品化的标准对照品, 代谢产物的质谱裂解碎片亦可为环境中微囊藻毒素 MC-RR 的 GSH/Cys 代谢途径分析提供参考。

关键词: 微囊藻毒素 RR; 微囊藻毒素 RR 谷胱甘肽结合产物; 微囊藻毒素 RR 半胱氨酸结合产物; 高效液相色谱-质谱联用

中图分类号: O657.72; O625.15 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2015)06-0664-06

Synthesis and Determination of MC-RR-GSH and MC-RR-Cys by SPE/HPLC-MS/MS

LAN Ji-rong¹, YANG An-ping², WU Lai-yan^{1*}, WANG Song-bo¹, JIANG Juan-juan¹, WANG Xue-wu¹

(1. College of Chemistry and Material Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;
2. Hubei Provincial Environmental Monitoring Center Station, Wuhan 430072, China)

Abstract: GSH and Cys metabolites of microcystin-RR (MC-RR) were synthesized chemically by the monitoring of high liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry (HPLC-ESI-ITMS). Based on the enrichment and purification of AccuBOND C₁₈ solid phase extraction (SPE), the purity of these s-conjugates were higher than 95% by HPLC. In this study, the optimum reaction time and SPE cartridges treatment procedure were also studied, and 60 min was obtained as the optimal time for the s-conjugates synthesis. Extraction parameters including proportions of methanol in elution and washing solution were optimized, and the best mean recoveries were obtained by 90% methanol in elution after water washing, and their recoveries were in the ranges of 86.4% ± 1.5% and 90.2% ± 2.8% for GSH conjugates of MC-RR (MC-RR-GSH) and Cys conjugates of MC-RR (MC-RR-Cys), respectively. These metabolites were subsequently confirmed by high phase liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry (HPLC-ESI-ITMS). The fragment ions of the metabolites of MC-RR were characterized, and the most abundant ions for MC-RR-GSH and MC-RR-Cys were at *m/z* 673.6 and *m/z* 580.5, respectively, and these ions were further selected as precursor ion in MS/MS, while the product ions of these parent ions were at *m/z* 609.0/536.9 and 519.4/520.8, respectively. These purified me-

收稿日期: 2014-12-15; 修回日期: 2015-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(21307164); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZQ11023); 中南民族大学大学生创新创业训练资助项目(KYCX140211, KYCX120208Z)

* 通讯作者: 吴来燕, 博士, 讲师, 研究方向: 环境分析化学, Tel: 027-67842752, E-mail: wulaiyan@163.com

tabolites were successfully applied as standard compounds in the quantification of MC-RR-GSH, MC-RR-Cys and MC-RR in the kidney of common carp, and the contents (dry weight) were obtained at the levels of undetected (ND), 1.587 5, 0.001 5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. Furthermore, these metabolites could be used as significant reference substances in various studies, and the cleavage rules of MC-RR-GSH and MC-RR-Cys could provide some metabolic mechanism of microcystin-RR.

Key words: MC-RR; MC-RR-GSH; MC-RR-Cys; HPLC-MS/MS

微囊藻毒素 (Microcystin, MCs) 是由蓝藻水华产生的环肽类肝毒素^[1], 该类毒素可通过抑制蛋白磷酸酶 PPI 和 PP2A 的活性而导致机体肝损伤^[2], 此外, 亦有报道指出 MCs 具有肾毒性、遗传毒性、胚胎及发育毒性^[3]。MCs 不仅可直接污染饮用水源, 且可经食物链传递对人类健康及畜牧渔业构成危害^[4-5]。目前已知的 MCs 有 90 多种, 其中以 MC-RR 分布范围较广且含量较高^[6-8], 在巢湖、滇池、太湖等大部分报道有微囊藻毒素的湖泊中均有检出^[3]。目前, 微囊藻毒素污染已经成为全球性的环境问题, 世界卫生组织 (WHO) 及我国已颁布执行的生活饮用水卫生标准 (GB 5749-2006) 和地表水环境质量标准 (GB3838-2002) 等均包含了微囊藻毒素 MC-LR (限值为 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$) 检测项目。

MCs 在生物体内的代谢过程因研究方法局限而鲜见报道。Pflugmacher 等^[9-10]发现 MC-LR 在机体内经谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 作用与谷胱甘肽 (GSH) 结合后, 形成水溶性较强的 MC-LR-GSH 结合产物, 继而在多种酶催化下进一步代谢成 MC-LR-Cys 排出体外。Hermansky 等^[11]研究发现 GSH 处理能增强小鼠对 MCs 的抗性。大鼠肝细胞中的 MC-YM 含量与 GSH 的含量相关^[12]。体外实验证实 MCs 经 GST 酶催化形成 MCs 的谷胱甘肽结合物^[13-14]。以上研究表明, GSH 对 MCs 的体内代谢过程起着重要作用, 但由于缺少 MC-GSH 标准品, 无法建立定量方法, 关于 GSH 在 MCs 的代谢过程和规律研究亦无法展开。Kondo 等^[15]利用迈克尔加成反应首次合成了 MC-GSH 和 MC-Cys 结合产物。Dai 等^[16-17]以合成的产物为标准品, 建立了生物体内 MC-LR 和 MC-LR-GSH 的萃取、纯化和检测方法, 并应用于动物体内定量分析检测^[18-19]。MC-RR 是中国湖泊常见的毒素, 但商品化标准品价格昂贵且不易保存。本研究合成的 MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的水溶性更大, 亦未见商品化的标准品。在本研究合成的标准品的基础上, 本课题组已采用 LC-MS/MS 方法对生物体内的 MC-RR, MC-RR-GSH 以及 MC-RR-Cys 进行了测定^[20-23]。

本研究采用 HPLC-MS 定时监测, 通过考察反应时间与代谢产物生成率的关系, 优化了 MC-RR 代谢产物的合成条件。并通过固相萃取纯化得到 MC-RR-GSH, MC-RR-Cys 结合产物纯品, 进一步采用电喷雾离子阱质谱技术对化合物的结构进行表征, 对结合产物的结构和质谱裂解特征进行分析, 为研究 MC-RR 的体内代谢过程与结构修饰提供依据。此外, 本研究合成的 MC-RR-GSH, MC-RR-Cys 标准品也可为 MC-RR 的代谢方法及相关化合物毒性研究提供参考。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

微囊藻毒素-RR 标准品 (日本 Wako 公司), 藻粉来源于滇池水华蓝藻; 谷胱甘肽、半胱氨酸、碳酸钾均为分析纯; 盐酸 (优级纯); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); AccuBOND C₁₈ 固相萃取小柱 (美国 Agilent Technologies 公司); 其他试剂均为分析纯; 实验用水为超纯水 (Milli-Q, Bedford, MA, USA)。

1.2 仪器设备

Eppendorf 5415D 小型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); Christ RVC 2-18 离心浓缩仪 (德国 Martin Christ 公司); EYELA 旋转蒸发仪 (日本 Tokyo Rikakikai 公司); OHAUS Analytical Plus 分析天平 (美国 Ohaus 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 85-2 型磁力搅拌器 (江苏省金坛市宏凯仪器厂)。

岛津 LC-20A 高效液相色谱 (日本 Shimadzu 公司); Surveyor HPLC 系统配 Surveyor 液相泵、自动进样器、光电二极管检测器 (PDA)、LCQ-Advantage MAX 离子阱质谱 (配有电喷雾 ESI 接口) (美国

Thermo Electron Corporation 公司)。

1.3 MC-RR-GSH 及 MC-RR-Cys 的合成与纯化

MC-RR 与谷胱甘肽、半胱氨酸以一定比例在 KOH 碱性溶液中反应, 室温下磁力搅拌。HPLC 监控反应, 当反应完全后, 加入 0.2 mol/L 盐酸调至中性 (pH 7.0)。上述反应产物加至活化并平衡后的 C₁₈ 小柱, 依次用一定量的纯水淋洗, 1% 甲酸甲醇溶液洗脱并干燥。得到 MC-RR-GSH 及 MC-RR-Cys 代谢产物(图 1), 纯度均大于 95%。

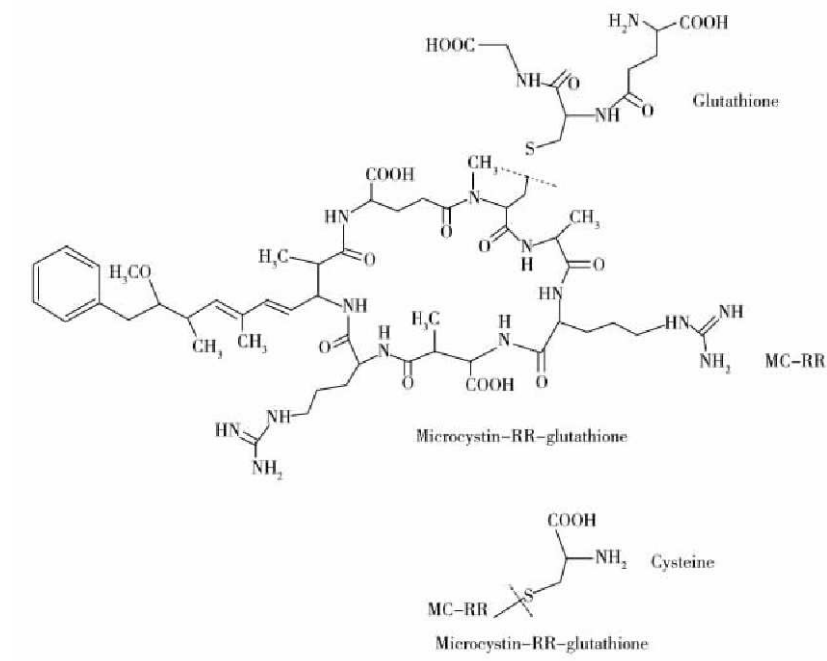


图 1 MC-RR-GSH 与 MC-RR-Cys 的化学结构

Fig. 1 Molecular structures of MC-RR-GSH and MC-RR-Cys

1.4 色谱分离条件

流动相分别为含 0.05% 甲酸水(A) - 0.05% 乙腈(B); 流速为 0.2 mL/min; Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm ID, 3.5 μm); 柱温 40 °C; 样品盘温度 10 °C。洗脱程序: 0~1.0 min, 95%~65% A; 1.0~17.0 min, 65%~55% A; 17.0~17.5 min, 55%~30% A; 17.5~18.0 min, 30%~5% A; 18.0~20.0 min, 5% A; 20.0~20.1 min, 5%~95% A; 20.1~25.0 min, 95% A。

1.5 质谱检测条件

正离子-电喷雾离子化模式(ESI); 喷针电压 4.5 kV; 透镜电压 55.5 V(MC-RR)和 45.5 V(MC-RR-GSH, MC-RR-Cys); 毛细管温度均为 250 °C。MC-RR, MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的母离子分别为 520, 673.7 和 580.2。其它 MS/MS 参数如表 1 所示。

表 1 MC-RR, MC-RR-GSH 及 MC-RR-Cys 的 MS/MS 参数
Table 1 MS/MS parameters for MC-RR, MC-RR-GSH and MC-RR-Cys

Compound	Nominal molecular mass (分子量, Da)	Isolation width (隔离宽度, <i>m/z</i>)	Normalized collision energy (碰撞能量, %)	Precursor ion (母离子, <i>m/z</i>)	Product ions (子离子, <i>m/z</i>)
MC-RR	1 038	2.0	40	520.0	452.8, 887.4
MC-RR-GSH	1 345	2.0	40	673.7	609.0, 536.9
MC-RR-Cys	1 158	2.0	34	580.2	519.4, 520.8

2 结果与讨论

2.1 MC-RR-GSH 及 MC-RR-Cys 合成时间的优化

采用 HPLC 监测合成反应, 考察合成时间对 MC-RR-GSH 及 MC-RR-Cys 含量的影响, 图 2 为 0, 5, 15, 30, 60, 120 min 时的色谱图。

反应开始时(0 min), 两种反应物的保留时间分别为 5.85 min(GSH) 和 13.72 min(MC-RR)。5 min 时出现 MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的色谱峰, 由于代谢产物的水溶性强于 MC-RR, 保留时间分别为 8.75 min 和 8.94 min(见图 2)。由图可知, 当反应时间为 5 min 时, 50% 的 MC-RR 转化为结合产物, 而反应时间达到 30 min 时, 大部分 MC-RR 被转化。继续对反应进行监控, 反应发生 60 min 后, 代谢产物未发生水解。因此, 本实验选择合成反应时间为 60 min。

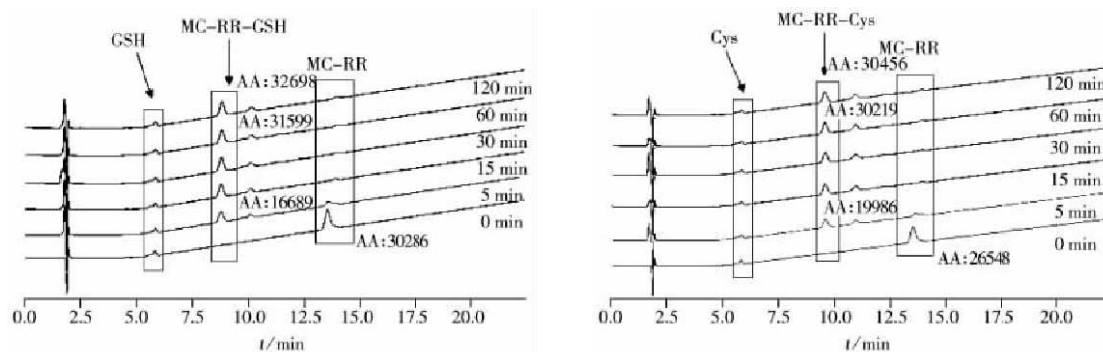


图2 不同合成时间下 MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的含量

Fig. 2 Effects of reaction time on synthetic rates of MC-RR-GSH and MC-RR-Cys

2.2 固相萃取条件的优化

采用 C_{18} 固相萃取小柱对以上合成产物进行富集和纯化, 通过加标回收实验考察了淋洗液及洗脱液中甲醇比例对结合产物回收率的影响(见表 2)。SPE 柱经 10 mL 甲醇, 10 mL 水活化平衡后, 加入 2 mL 浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的反应产物。基于 C_{18} 对目标产物有较强疏水作用, 可采用极性较强的溶剂淋洗除去 GSH, Cys 等水溶性干扰物。由表 2 知, 甲醇水淋洗会导致结合产物损失, 其回收率随着甲醇比例的提高而降低。纯水淋洗能保留 95% 以上的组分, 同时去除了大部分亲水性干扰组分。

表 2 淋洗液中甲醇含量对合成产物回收率的影响

Table 2 Recoveries of MC-RR-GSH and MC-RR-Cys with different methanol proportions in washing solution /%

Recovery	Water	10% Methanol	20% Methanol	50% Methanol	100% Methanol
MC-RR-GSH	5.3 ± 6.4	23.3 ± 1.3	28.6 ± 4.3	45.6 ± 1.8	76.4 ± 3.4
MC-RR-Cys	3.4 ± 3.8	22.6 ± 2.6	21.9 ± 2.1	40.2 ± 3.2	81.4 ± 5.8

SPE 洗脱过程考察了不同比例(50%, 70%, 80%, 90%, 100%) 甲醇水(含 1% 甲酸)作为洗脱液时的洗脱效果。结果表明, MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的回收率随着甲醇比例的提高而增加, 当选择 90% 甲醇对结合产物进行洗脱时, 两种产物的回收率可分别达 $86.4\% \pm 1.5\%$ 和 $90.2\% \pm 2.8\%$ 。然而, 采用纯甲醇时, 由于结合产物的水溶性较强, 纯甲醇的洗脱效果反而稍弱。因此, 本实验采用 90% 甲醇对结合产物进行洗脱。

2.3 MC-RR-GSH 与 MC-RR-Cys 的质谱图

MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的 ESI 一级及二级全扫描正离子质谱图见图 3, 由图 3 可知 MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的电离均以二价正离子($[M+2H]^{2+}$) 为基峰, m/z 分别为 673.56 和 580.54, 其分子量符合 MC-RR-GSH($C_{59}H_{92}N_{16}O_{18}S$) 和 MC-RR-Cys($C_{52}H_{82}N_{14}O_{14}S$) 的分子式。同时有少量的三价和一价正离子产生, 对应的 m/z 分别为 449.51($[M+3H]^{3+}$), 1346.66($[M+H]^+$) 和 1159.58($[M+H]^+$)。MC-RR 的结构中包含了精氨酸的两个游离氨基, 通过反应引入 GSH 后, MC-RR-GSH 分子结构中增加了一个游离的氨基, 因而在电离过程中更容易结合氢质子, 形成三价正离子峰。

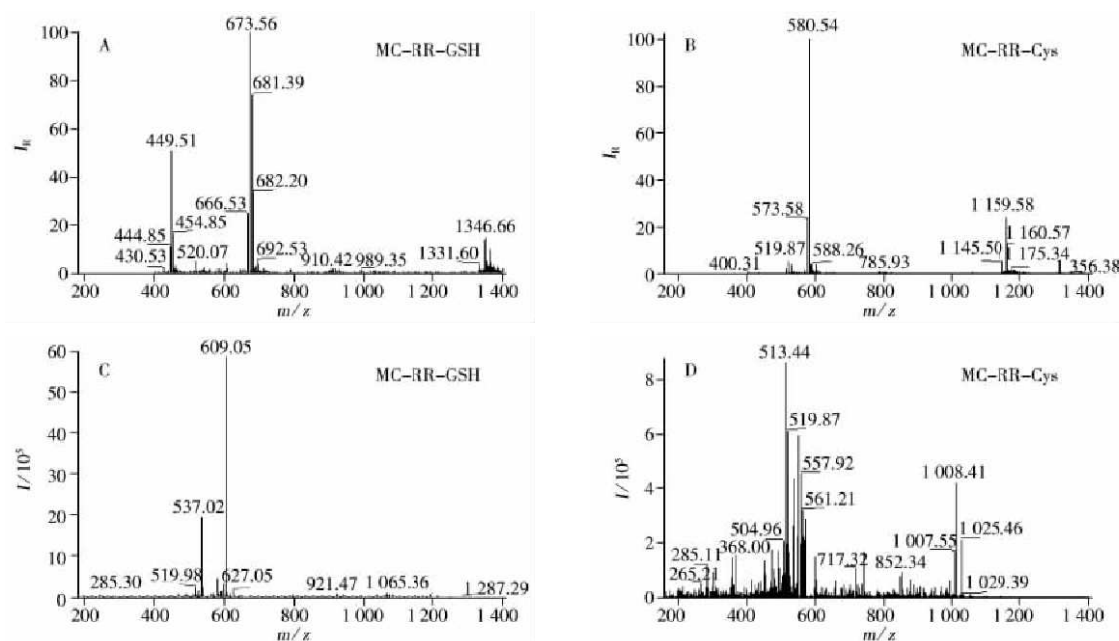


图 3 MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的质谱图

Fig. 3 MS spectra for MC-RR-GSH and MC-RR-Cys

A, B: LC-MS spectra; C, D: LC-MS/MS product-ion mass spectra

以 MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的二价离子峰 ($[M+2H]^{2+}$, m/z 673.56 和 580.54) 为母离子进行二级质谱全扫描。MC-RR-GSH 二级质谱图中丰度较高的离子为 m/z 537.02, 609.05, 519.98; MC-RR-Cys 二级质谱图中丰度较高的离子为 m/z 513.44, 1008.41, 519.87, 对应的离子碎片分别为 $[M-C_9H_{11}O+2H]^{2+}$, $[M-C_9H_{11}O-NH_3+H]^+$ 和 $[M-GSH/Cysteine+2H]^{2+}$ 。表 3 为 MC-RR-GSH 和 MC-RR-Cys 的 (+)-ESI-MS² 质谱图中的各碎片离子信息。

表 3 MC-RR-GSH 及 MC-RR-Cys 的 ESI 一级及二级质谱裂解碎片

Table 3 Characteristic fragment ions in the (+)-ESI-MS/MS spectra of MC-RR-GSH and MC-RR-Cys

MC-RR-GSH		MC-RR-Cys	
Fragment ion(离子碎片)	m/z (质荷比)	Fragment ion(离子碎片)	m/z (质荷比)
$[M+H]^+$	1346.66	$[M+H]^+$	1159.58
$[M+2H]^{2+}$	673.56	$[M+2H]^{2+}$	580.54
$[M+3H]^{3+}$	449.51	$[M-CO+H]^+$	1131.40
$[M-Glu+2H]^{2+}$	609.05	$[M-C_9H_{11}O+2H]^{2+}$	513.44
$[Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha-SH+2H]^{2+}$	537.02	$[M-Cys+2H]^{2+}$	519.87
$[M-GSH+2H]^{2+}$	519.98	$[M-Gly+H_2O+2H]^{2+}$	550.32
$[M-GSH-C_9H_{11}O-NH_3+2H]^{2+}$	443.20	$[M-Cys+2H-CO]^{2+}$	504.96
$[MeAsp-Arg+H]^+$	285.30	$[MeAsp-Arg+H]^+$	285.11
$[M-C_9H_{11}O-NH_3+H]^+$	1194.00	$[M-C_9H_{11}O-NH_3+H]^+$	1008.41

质谱二级全扫描过程中产生的 m/z 519.98, 537.02 分别为七肽环状母体结构和 MC-RR 巯基化结构 ($[Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha-SH+2H]^{2+}$)。由此可知, 在 ESI 源碰撞下, 由于 MC-RR 的结合产物容易丢失经合成产生的侧链, 从而产生了 m/z 519.98 的环状母体结构, 同时也可产生一系列丢失 CO, H₂O 等中性小分子的碎片离子。同时, 母环结构上也可进一步发生裂解, 产生类似 MC-RR 的碎片离子。

2.4 实际样品的检测

以合成的代谢产物为标准对照品, 检测了太湖鲤鱼肾脏中的 MC-RR 及其代谢产物含量^[23]。如图 4 所示, MC-RR-GSH, MC-RR-Cys 和 MC-RR 的保留时间分别为 10.28, 10.73, 11.45 min。其中 MC-RR-GSH 未检出, MC-RR-Cys 和 MC-RR 的含量(DW, 干重)达 1.587 5, 0.001 5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

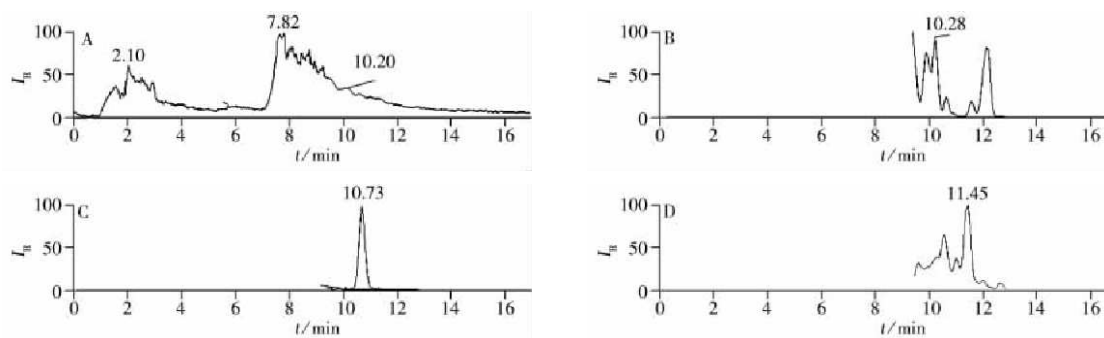


图4 太湖鲤鱼肾脏中MC-RR及其代谢产物的选择离子色谱图

Fig. 4 ESI-LC/MS² in selected reaction monitoring (SRM) chromatograms for MC-RR and its metabolites (MC-RR-GSH and MC-RR-Cys) in the kidney of common carp from Lake Taihu, China

A: total ion chromatogram for extractions from kidney; B-D: SRM chromatograms for MC-RR-GSH, MC-RR-Cys and MC-RR in kidney

3 结论

本文合成了MC-RR-GSH及MC-RR-Cys的标准对照品。HPLC的监控结果表明,合成时间在60 min时,反应达到平衡,MC-RR转化率达95%。SPE结果表明,纯水淋洗,含1%甲酸的90%甲醇水洗脱液对MC-RR-GSH和MC-RR-Cys有较好的富集和纯化效果。采用电喷雾离子阱一级二级质谱解析了相关碎片离子峰,并对化合物的结构进行推断。以上述合成产物作为标准品,检测了太湖鲤鱼肾脏中MC-RR-GSH和MC-RR-Cys的含量。该结合产物可为分析和鉴定生物样品中微囊藻毒素RR的代谢研究提供对照基础。

致谢:衷心感谢中国科学院水生生物研究所谢平研究员课题组为本实验提供的实验条件。

参考文献:

- [1] Botes D P, Kruger H, Viljoen C C. *Toxicol.*, **1982**, 20(6): 945-954.
- [2] Duy T N, Lam P K, Shaw G R, Connell D W. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **2000**, 163: 113-186.
- [3] Xie P. *Microcystin in the Aquatic Organisms and Its Potential Threat to Human Health*. Beijing: Science Press(谢平.水生动物体内的微囊藻毒素及其对人类健康的潜在威胁.北京:科学出版社), **2006**: 52.
- [4] Chen J, Xie P, Li L, Xu J. *Toxicol. Sci.*, **2009**, 108(1): 81-89.
- [5] Chorus I, Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management*. Technical Report. World Health Organization, London, UK. E & FN Spon, **1999**: 81.
- [6] Chen J, Xie P, Zhang D W, Lei H H. *Environ. Pollut.*, **2007**, 147: 150-157.
- [7] Song L R, Chen W, Peng L, Wan N, Gan N Q, Zhang X M. *Water Res.*, **2007**, 41: 2853-2864.
- [8] Xie L Q, Xie P, Guo L G, Li L, Miyabara Y, Park H D. *Environ. Toxicol.*, **2005**, 20: 293-300.
- [9] Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, Beattie K A, Krause E, Codd G A, Steinberg C E W. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1425(3): 527-533.
- [10] Pflugmacher S, Wiegand C, Beattie K A, Krause E, Steinberg C E W, Codd G A. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2001**, 20: 846-852.
- [11] Hermansky S J, Stohs S J, Eldeen Z M, Roche V F, Mereish K A. *J. Appl. Toxicol.*, **1991**, 11(1): 65-73.
- [12] Runnegar M T C, Andrews J, Gerdes R G, Falconer I R. *Toxicol.*, **1987**, 25: 1235-1239.
- [13] Takenaka S. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2001**, 9(4): 135-139.
- [14] Ito E, Takai A, Kondo F, Masui H, Imanishi S, Harada K. *Toxicol.*, **2002**, 40(7): 1017-1025.
- [15] Kondo F, Ikai Y, Oka H, Okumura M, Ishikawa N, Harada K, Matsuura K, Murata H, Suzuki M. *Chem. Res. Toxicol.*, **1992**, 5(5): 591-596.
- [16] Dai M, Xie P, Liang G D, Chen J, Lei H H. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 862: 43-50.
- [17] Dai M. *The Light & Textile Industries of Fujian*(戴明.福建轻纺), **2010**, 10: 38-42.
- [18] Zhang D W, Xie P, Chen J, Dai M, Qiu T, Liu Y Q, Liang G D. *Chemosphere*, **2009**, 76(7): 974-981.
- [19] Zhang D W, Yang Q, Xie P, Deng X W, Chen J, Dai M. *Ecotoxicology*, **2012**, 21(1): 244-252.
- [20] He J, Chen J, Xie P, Zhang D W, Li G Y, Wu L Y, Zhang W, Guo X C, Li S C. *Aquat. Toxicol.*, **2012**, 116/117: 61-68.
- [21] Li W, Chen J, Xie P, He J, Guo X C, Tuo X, Zhang W, Wu L Y. *Aquat. Toxicol.*, **2014**, 147: 18-25.
- [22] Wu L Y, Xie P, Chen J, Zhang D W, Liang G D. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217: 1455-1462.
- [23] Wu L Y, Wang Q, Tao M, Chen J, Ma Z M, Xie P. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2013**, 90: 382-386.