

高效液相色谱法研究铝形态的可靠性

练鸿振^{1,2} 毕树平^{*1} 田笠卿²

(南京大学化学系¹, 现代分析中心², 南京 210093)

摘 要 高效液相色谱法在铝形态的研究中发挥着举足轻重的作用, 而铝形态的易变性和复杂性要求色谱条件无侵入性和检测手段具有形态选择性。文中列举了若干实例说明高效液相色谱法在铝形态分析中的常用方法和注意事项。

关键词 高效液相色谱, 铝形态, 可靠性, 评述

1 引 言

从环境方面看, 溶解态的铝并不多, 有毒铝就更少, 但却影响着整个生态系统。有机物能去铝毒, 却是铝溶解的主要诱因和铝迁移的主要载体^[1]; 从生命方面看, 铝与阿尔茨海默症等疾病之间的潜在关系越来越明朗^[2], 而人们日常摄入铝量却居高不下。可以说, 铝的毒性和生态效应问题是关乎国计民生的大事。

铝在自然环境和生物体系中以各种络合物的形态存在, 铝的生态效应和毒性取决于其存在形式。目前已经达成一致共识的是: 从毒性的角度来看, 操作定义上的不稳定无机单核铝 (labile monomeric Al, Al_i) 包括游离水合铝离子及其无机络合物有毒, 其中最毒的铝形态 (most toxic Al, Al_{mt}) 为最不稳定的游离铝离子和单核羟基铝 Al^{3+} 、 $Al(OH)^{2+}$ 和 $Al(OH)_2^+$, 而铝-氟络合物的毒性要小得多, 铝与有机配体形成的络合物则基本无毒。

铝形态的多样性和复杂性使得铝形态的区别不是简单地建立在价态不同的基础上, 而是与其特殊的配位性质和聚集倾向有关。无论是铝的物种分级 (fractionation) 还是形态分析 (speciation), 色谱方法都是首选的手段。高效液相色谱法 (HPLC) 的优势在于它不是一个测定操作定义上形态的方法, 在大部分情况下可以得到单一形态, 但存在的问题是色谱洗脱需要花费一定的时间, 加上固定相和流动相的影响, 往往会导致铝形态的变化。尽管 HPLC 的分离过程与检测手段相互独立, 可以实现最终测量的最佳化, 但铝的光学活性和电化学活性都较低, 与环境和生物系统中实际存在量相匹配的检测技术, 特别是形态选择性检测技术还相当缺乏。关于以上两个问题, 在实际分析过程中必须引起高度重视。

2 分离过程的稳定性

在测定某一体系中的总铝浓度时, 人们往往采取一些强迫手段, 如消化、加热、萃取、调整介质的 pH 值和离子强度、加入侵入性的螯合试剂以及反应促进剂等, 以达到最大响应值, 即所谓的“最佳化”, 这实际上把所有形态的铝进行了强制统一^[3-5]。而铝形态分析的方法, 必须对体系扰动极小, 尽量保持原生体系不变, 总铝测定时非最佳条件下得到的响应值也许正是某一种或某几种形态的响应值。为了保持铝形态的稳定性, 分析中要注意以下几方面问题。

2.1 降低固定相的侵入性

铝大多以与小分子 (LMW) 配体形成的离子形式存在, 或以有机大分子 (HMW) 络合物的形式存在, 一般能溶于水, 这就要求固定相亲水。强烈疏水的固定相对自然环境中存在的铝形态如羟基铝几乎没有保留, 而对生命物质中存在的铝形态如蛋白铝结合能力又太强。离子交换色谱 (IEC) 和尺寸排阻色谱 (SEC) 是最常用的分离模式, 前者特别是 Milacic 等和 Sanz-Medal 等建立的离子交换快速蛋白质液相色谱 (fast protein liquid chromatography, FPLC) 在实际铝形态的分析方面已有重大突破, 而后者仍主要用于

2003-04-25 收稿; 2004-01-15 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20075011) 和南京大学分析测试基金 (No. CA3-3) 资助课题

铝的物种分级。这两种方法所用的流动相均为水溶性的缓冲体系,是保持铝形态稳定的基本保证。

在低容量阳离子交换柱 Dionex CG2 上,所有不稳定单核铝 $[\text{Al}(\text{OH})_n^{(3-n)+}]$ 转变为 Al^{3+} ,与 Al-F 络合物(AlF^{2+} 、 AlF_2^+)、有机铝等分离^[6~8]。阳离子交换 FPLC 柱 Mono S 可以定量测定对铝的毒性研究尤为重要的各种单核铝 Al^{3+} 、 $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ 、 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ 等^[9~11]。以上的方法在天然水、土壤溶液和茶叶浸泡液中铝形态研究方面都已得到成功应用。阴离子交换 FPLC 柱 Mono Q 可以分离 $\text{Al-柠檬酸}(\text{citrate}, \text{Cit})$ 、 $\text{Al-草酸}(\text{oxalate}, \text{Ox})$ 及其它带负电荷的铝络合物,可用于植物浆液中小分子有机物结合铝的形态分析^[12];还可以分析血清中的铝形态^[13],并进一步得到铝与转铁蛋白($\text{transferring}, \text{Tf}$)的 C-端或 N-端结合的信息^[14]。

凝胶柱 Superose 12 HR 和 Bio-Gel P2 已分别用于茶叶浸泡液中有机关结合铝和土壤溶液中低分子量有机酸结合铝的物种分级^[15,16]。Superdex 75 HR(6.5~100 kD)和 Superdex Peptide HR(0.1~12 kD)柱可以使有机铝分级,得出森林土壤渗滤水中铝形态的分子量分布^[17]。用 Superdex 75 HR 柱分析森林土壤提取物中的铝形态,还可以得到土壤溶液中大分子量腐殖质结合铝和小分子量络合物如 AlF^{2+} 、 Al-Ox 、 Al-Cit 等^[11]。

Seubert 等^[18]专门制作了同时具有阳离子交换和尺寸排阻功能的色谱柱,分析了 pH 3~5 时的 Al^{3+} 及其 F、Ox、Cit 络合物,络合物既可以根据电荷多少又可以根据尺寸大小分离,该方法不但能够测定单配体体系,也能够测定多配体体系,所涉及的 8 种形态几乎都得到了良好的分离,而且在该色谱环境中,这些铝形态与外层配位(outer coordination sphere)络合物如 $\text{Al}(\text{SO}_4)^+$ 和 $\text{Al}(\text{HPO}_4)^+$ 不同,具有很好的稳定性。他们^[19]又制成有类似特殊性质的阴离子交换树脂,并将这种树脂与阳离子交换树脂配套使用,通过阀切换,使色谱柱体系交替呈现阴、阳离子交换性质,能够将阴、阳离子一次洗脱,而且可以提高带相同电荷的形态的分离度,但铝形态与离子交换剂相互作用,从而导致分解的可能性也增加了,特别是系统呈阴离子交换性质时,高配位 Al-F 络合物易分解,得不到单一形态;随着摩尔比的下降和 pH 值的升高, Al-Cit 络合物的生成路线为 $\text{AlCit} \rightarrow \text{AlCit}^- \rightarrow \text{Al}(\text{Cit})_2^-$; Al-Ox 络合物无论是 AlOx_2^- 还是 AlOx_3^{3-} 都没有好的峰形,原因在于它们在色谱分离的过程中就已分解。与最不稳定的配合形态的反应速率相比, HPLC 是个慢的方法,室温下铝对于水的内层配位(inner coordination sphere)配体交换速率大约为 1 Hz。尖锐的、明确定义的色谱峰意味着有关的形态得到了最好的分离,也可能意味着原生形态的分解产物得到了良好的分离,所以选择色谱柱时要最大限度地避免形态分解。

高效亲和色谱(affinity chromatography, AC)可用于测定人体血清中 Tf 结合铝,只有亲和的 Al-Tf 才有荧光响应^[20]。不难理解,高效疏水作用色谱(hydrophobic interaction chromatography, HIC)应该在生命体系铝形态的分析中发挥更大的作用, HIC 填料孔径大,疏水基团的链长短,密度低,对蛋白铝的作用较小,既能有效分离不同蛋白结合的铝,又能保持蛋白铝的活性。

2.2 使用弱侵入性的衍生试剂

柱前衍生-RP-HPLC 法是一种重要的测定铝的方法。在过去的 20 年中,许多衍生试剂如 8-羟基喹啉(8-HQ)等用于环境和生物样品中铝的测定^[3~5],但这些试剂对铝的攻击性太强,不但能与不稳定的无机单核铝配位,还能夺取无毒形态中的铝,引起对有毒形态的过高估计。而分析环境和生物样品中有毒尤其是最毒的无机单核铝形态,比起单纯测定总铝更有意义,是铝形态研究中的关键的具有挑战性的问题,这是因为,毒性越大的铝形态往往越不稳定。另外,从毒性的角度来看,人们关心的是毒性最大的一组形态的总量,而不是每一种形态的量^[21]。

与 8-HQ 相比,黄酮醇色素(morin)和槲皮素(querctetin)对铝的攻击性要弱得多,被认为是具有“微小扰动(minimized disturbance)”的试剂,只能结合一些最不稳定的单核铝形态^[22,23],而这种劣势恰恰是形态分析所需要的。Bi 等^[24,25]建立了柱前色素衍生-RP-HPLC 分离-荧光检测直接测定无机单核铝的新方法。该方法的最大的特点是只有最不稳定的游离铝和羟基铝能够被色素夺取,显示出独特的对毒性最大的铝形态($\text{Al}_{\text{mt}} = \text{Al}^{3+} + \text{Al}(\text{OH})^{2+} + \text{Al}(\text{OH})_2^+$)的选择性。针对无机单核铝的易变性,在优化的实验条件下,铝-色素络合物的荧光响应在 $6.0 \times 10^{-9} \sim 6.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 浓度范围内呈线性,检出限为 $2.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$,在迄今为止的以色素为反应试剂检测铝的所有方法中,本法的线性范围最宽,

检出限最低,而且几乎不受共存离子的影响。特别适用于环境和生物样品中最毒铝的直接测定。Bi 等^[26]等还建立了柱前槲皮素衍生-RP-HPLC 分离-紫外检测直接测定天然水中无机单核铝的方法,测定了毒性最大的铝形态 Al_{in} ,检出限为 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$,水样中的其它离子不干扰测定,铁的干扰可用 1, 10-邻菲罗啉消除。该法的主要优势在于槲皮素无毒无害,且存在于人体内,为利用体内自身配体活体检测有毒铝形态提供了一种前驱方法。还通过 RP-HPLC 分离了铝与桑色素及槲皮素生成的不同络合物,结合摩尔比方法,得到了这些络合物的配位比。结果显示,铝与桑色素生成 11 和 21 两种络合物,而槲皮素只形成一种 11 的络合物,从而进一步提出了这些络合物的可能结构和形成机制^[24]。

2.3 维持流动相与样品介质的一致

尽量避免系统峰出现是常规 HPLC 分析的基本要素,如以阳离子交换柱 Dionex CS2 (Dionex CG2 为保护柱)分离天然水中的 AlF_2^+ 、 AlF^{2+} 、 Al^{3+} ,保持进样溶液的组成和 pH 与流动相一致,才能避免系统峰对测定的干扰^[7]。

对铝形态的分离来说,要尽量选用与样品介质 pH、离子强度一致的流动相,避免流动相对铝形态稳定性的影响。例如在用 SEC 法研究以花岗岩为基岩的云杉林中天然水中的铝形态时,色谱柱为 Superose 12 HR,流动相为 0.05 mol/L NaAc-0.05 mol/L HAc, pH 调节到 4.6,与水样的 pH 一致^[27]。用两种分离模式测定土壤提取液中的铝及其柠檬酸、草酸、氟络合物时,即在 Dionex CG 2 阳离子交换柱上,以 pH 3 的 0.2 mol/L K_2SO_4 为流动相;在 Shodex Asahi Pak-320 HQ 凝胶色谱柱上,以 pH 3 的 0.1 mol/L $NaNO_3$ 为流动相^[28]。在文献[17]的实验中,两种色谱体系的流动相均为纯水。选择水作流动相出于以下考虑:样品的 pH 值保持不变,流动相在色谱分离过程中不改变原始形态。

在生物样品的分析时,则采用与生命体液性质比较接近的流动相。如用 Sephadex G15 柱研究生理 pH 7.4 条件下,铝与神经递质去甲肾上腺素、多巴胺和三磷酸腺苷结合物的分离及结合形态,流动相为 6% 己胺-1% NH_4Cl 缓冲液 (pH 7.4)^[29],这是利用体内原生配体进行铝的活体测定的一个尝试。在阴离子交换柱 TSK DEAE-5PW 上分离血清中铝与蛋白质结合形态,流动相为从 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 9.2) 至 0.05 mol/L Tris/NaCl (pH 9.2) 梯度洗脱,活体条件下 (pH 7.4) 的结合铝有被取代的危险^[30],而用 Protein Pak DEAE-5PW 分离,流动相为从 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) + 0.05 mol/L $NaHCO_3$ 至 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) + 0.05 mol/L $NaHCO_3$ + 1.0 mol/L NaCl 梯度洗脱,能够同时鉴定去铁胺 (desferrioxamine, DFO) 存在时人为添加铝的血清中的 3 种铝络合物 ($Al-Tf$, $Al-DFO$, $Al-Git$)^[31]。

磷酸根 (phosphate) 能够与铝形成具有一定稳定性的络合物,因此一般不推荐加入流动相。Feng 等^[32]研究了 Al -8-羟基喹啉-5-磺酸 (HQS) 与磷酸根离子发生配体交换反应的平衡和动力学。这个研究起因于用磷酸缓冲溶液做流动相时, Al -HQS 出现独特的双峰现象,双峰的相对大小也会发生变化。而用乙酸缓冲溶液或 bis-tris [bis-(2-hydroxyethyl) iminotris (hydroxyethyl) methane] 做流动相时,只出现单峰。在磷酸体系中,其它金属离子只出现单峰,唯独铝离子出现双峰。为了考察酸性和碱性条件下铝与 HQS 络合物的反应机理,该小组用聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物 (PS-DVB) 代替反相键合相作为色谱固定相,流动相为乙腈-水体系,含 10 mmol/L 四丁基溴化铵 (TBABr), 0.5 ~ 4.0 mmol/L HQS, 0.1 mol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 6.5 ~ 9.0)。HQS 和 TBABr 分别含 $R-SO_3^-$ 和 R_4N^+ 基团,这是一个典型的离子对色谱模式。结果表明,双峰现象可用 Al -HQS 和 $H_2PO_4^-$ 或 HPO_4^{2-} 的配体交换反应来解释。实验还探讨了 Al -HQS- $H_2PO_4^-$ 与 Al -HQS- HPO_4^{2-} 的平衡和反应时间、HQS 浓度、磷酸盐浓度、pH、柱温之间的关系。这个结果对铝形态的研究具有一定的参考意义:铝的络合物在色谱图上常有多重峰出现,主要是铝本身的不同形态引起,但也有可能是色谱过程引起,必须认真识别。

2.4 控制分析温度

Seubert 等^[33]在自行研制的色谱柱^[18]上,研究了柱温对分离的影响,结果显示:阳离子交换色谱适于分离稳定的阳离子铝络合物,而弱中性和负离子的形态在色谱过程中或多或少会发生分解,这种分解源于自身的时间不稳定以及离子交换剂的作用,而两个因素都强烈地受到温度的影响。高配位的 $Al-F$ 形态在 0 °C 以下几乎不分解,45 °C 和 55 °C 时,所有的 $Al-F$ 络合物都分解为 Al^{3+} 。阴离子的 $Al-Ox$ 形

态在 10 以下也不分解,温度高于 35 时, AlOx^+ 分解为 Al^{3+} 。铝络合物的动力学惰性随配体配位点的增加而增加,因此单齿配体如 F 或 OH 生成的络合物在色谱分离过程中会遇到较大的困难,柱温以 10 以下为宜;而 Cit 络合物则显现出动力学惰性,适于常温色谱分离,这也是文献中 Al-Cit 被研究得最多的重要原因。

一般认为,桑色素或槲皮素与铝进行配位反应时,需要加热促进反应,实际上经过加热才能反应的是那部分稳定无毒的铝形态。作者用柱前桑色素或槲皮素衍生-RP-HPLC 法测定最毒铝时,加入衍生试剂后,仅在室温下超声振荡 3 min,不加热,避免了结果偏高^[25,26]。

2.5 缩短色谱时间

色谱柱大多尺寸短小(50 mm 长)^[6~14],是为了缩短分离时间,从而有利于铝形态的稳定。为了建立更为可靠和稳定的分离铝形态的离子交换色谱方法,Seubert 等^[34]在 125 mm × 4 mm i. d. (标准)和 50 mm × 2 mm i. d. (微型)柱上,研究了柱的几何尺寸对分离的影响。Al-F 摩尔比从 81 到 48, AlF_2^+ 、 AlF^{2+} 在两种柱上分布一致,而且与计算结果有很好的相关性,但随着 Al-F 摩尔比的下降,计算结果与实验结果出现了误差,表现在 $\text{AlF}_3\ldots_6$ 的计算值偏高,而 AlF_2^+ 的计算值偏低,这种误差在微型柱上要小得多;Al-F 摩尔比为 18 时,柱温从 -5 提高到 50,柱尺寸的影响非常显著。在标准柱上,-5~10 时,出现 $\text{AlF}_3\ldots_6$ 和 AlF_2^+ 的峰,温度升高至 20,只出现一个拖尾的 $\text{AlF}_2\ldots_6$ 峰,说明 $\text{AlF}_3\ldots_6$ 在色谱过程中分解;在微型柱上,温度变化(-5~50)对形态没有影响,色谱图中均只出现 $\text{AlF}_3\ldots_6$ 和 AlF_2^+ 的峰,说明 Al-F 在微型柱中具有很好的稳定性。分析过程越短,铝形态的变化越小,从这个意义上说,微柱 HPLC 具有优势,目前用微柱分析铝形态的实例还很少,但不可否认这是铝形态研究的方向之一。

我们在用桑色素或槲皮素衍生-RP-HPLC 法测定实际环境生物样品中的最毒铝时发现,实际样品的峰高在配制 15~20 min 后开始缓慢升高^[25,26],因此必须现配现测。

3 检测过程的确定性

在铝的形态分析时,人们常采用衍生化反应-紫外-可见、荧光检测和原子吸收光谱(AAS)、电感耦合等离子发射光谱(ICP-AES)、电感耦合等离子质谱(ICP-MS)等元素选择检测器(element-specific detector)或同类物种选择检测器(species-specific detector)。文献[35]采用 FPLC 研究了生理 pH 条件下血清中铝的形态,柱后流出液经 UV 280 nm 检测蛋白质,220 nm 检测 Al-Cit,210 nm 检测 Al-DFO,柱后收集的各组分中的铝和总血铝通过离线电热(ET)AAS 测定。SEC 分析用豆叶改良的腐殖格列土和红灰壤的水提物,色谱柱为 Fractogel TSK HW-40(S),柱后流出液直接进入 ICP-AES 的雾化器进行检测,Al、Fe 和 Mn 均出现多重峰,可以推测这些金属都与有机物结合^[36]。Al-Cit 出现 2 个铝峰,又说明铝与柠檬酸形成了 2 种络合物。采用四极杆质谱和双聚焦磁质谱两种 ICP-MS 进行对比实验,四极杆 ICP-MS 分辨率和灵敏度都较低,只能得到一个 Al-Tf 峰,相当于离线(off-line)FPLC-ETAAS^[35]的水平,而双聚焦磁质谱 ICP-MS 能够直接测定血铝浓度为 2.5 μg/L 的血铝。FPLC-ICP-MS 在线(on-line)连接能够给出时间分辨的谱图轮廓,大大节省了实验时间和步骤,避免敏感的形态变化,而且由于仪器的封闭性,不易沾污,测定目的物不易损失。

实际上,这些检测技术仍存在不足,在同一个色谱峰位置有铝与某配体共存,只能说明它们可能配位,形成络合物,但不能成为它们一定配位的确凿证据,还需要用形态选择检测器(species-specific detector),主要是一些软电离(soft ionisation)方式的质谱(MS)技术如电喷雾(ES)、快原子轰击(FAB)、大气压化学电离(APCI)和非侵入方法如核磁共振²⁷Al-、¹H 和 ¹³C NMR 等多种技术来确定络合物的配位比例。FPLC-ES-MS-MS 方法被 Milacic 等^[37]用于分析 8 位健康志愿者血清中 Al-LMW 结合形态,总血铝及 Al-LMW 中铝含量的测定采用 ETAAS 法,Al-LMW 形态用 ES-MS-MS 进一步进行离线鉴定,采用串联四极杆(tandem quadrupole)质谱,配备 Z 喷雾离子源(Z spray ion source),负电荷电喷雾离子化(negative electrospray ionisation)方式结合碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)实验。Z 喷雾离子源使样品液流与离子源进样锥孔垂直,避免高盐浓度的色谱流出液进入离子源,ES 是一种软电离方式,不会使 Al-LMW 产生很多碎片,而主要得到去质子的 LMW 离子(M-H)⁻峰,选择该母离子(parent ion)再进行 CID

实验,得到其子离子(daughter ion)峰,可进一步确定 LMW 的结构。结果显示血清中同时存在两元的 Al-Cit、Al-phosphate 和三元的 Al-Cit-phosphate 3 种形态。该小组还结合 ETAAS 或 ICP-AES 和 ES-MS 的方法检测了植物浆液中经 FPLC 分离的 Al-LMW 如 Al-Cit、Al-苹果酸(malate)、Al-酒石酸(tartrate)、Al-[顺]乌头酸(aconitate)和 Al-葡糖酸(gluconate)等形态^[12]。考虑到两种植物浆液的总铝浓度分别为 9.3 和 0.065 mg/L,分别用 ICP-AES 和 ETAAS 进行柱后离线检测。重点的铝形态再经过离线 Z-喷负离子 ES-MS 鉴定,结果表明,植物浆液中的 Al-LMW 为负离子络合物,其中 Al-Cit 和 Al-aconitate 占主导地位。

4 色谱体系的净化

HPLC 测定铝形态存在的一个棘手问题是来自色谱体系、试剂、玻璃容器和空气飘尘中的铝污染,外来的铝沾污不仅影响总铝量的测定结果,还对形态信息产生错误判断^[38]。所有实验容器推荐使用高密度聚乙烯容器,使用前须经 10% HNO₃ 淋洗 48 h,能够满足水样长期(1 年)贮存而形态不变的要求。

常用的流动相净化方法是经过螯合树脂 Chelex-100 处理,可降低铝空白值,使单种铝形态的检出限降低到 3 μg/L^[10]。如将经 Chelex-100 处理过的流动相再通过硅基反相色谱固定相 LiChrosorb RP-18 净化,铝空白值可降低至 1 μg/L^[39]。以上净化方法使单种铝形态的检出限降低到 2 μg/L,能够适应实际样品形态分析的要求。Van Landeghem 等^[30]用阴离子交换 HPLC-ETAAS 联用分析血铝形态时,采用在线硅基 C₁₈柱捕集铝。Sanz-Medel 等^[35]则采用惰性配置的 FPLC 系统,色谱仪的泵头、进样器的定量管、所有连接管路均由钛制成。在泵和进样阀之间安插一支浸渍 Kelex-100 螯合剂[7-(4-ethyl-1-methyloctyl)-quinolin-8-ol]的 C₁₈填料(20 μm)柱以捕捉流动相中的铝。实验比较了浸渍 Kelex-100 的 C₁₈捕集柱、未浸渍 Kelex-100 的 C₁₈捕集柱和不用捕集柱对测定的影响,发现前者的效果最好。

5 结束语

众所周知,HPLC 众多的分离模式,强大的分离能力,灵活的检测手段,特别是近年来联用技术的发展,为铝形态的研究提供了更多更好的方法选择。由于铝形态多样性和易变性,加上浓度极低和易被沾污,实际意义上的铝形态分析对 HPLC 提出了更高的要求。我们认为,在分离方法方面,微柱 HPLC 和高效毛细管电泳(CE)、芯片(Chip)技术应该是主要的发展方向;在分离模式方面,亲水性的 IEC、SEC、AC、HIC 以及它们之间的组合等将会发挥更大的作用;在检测手段方面,高度选择性的形态选择检测器与 HPLC 的联用是当务之急。

References

- 1 Spósito G. *The Environmental Chemistry of Aluminum*. 2nd ed., Boca Raton, Florida: CRC Press, 1996: Chapter 5
- 2 Exley C. *Aluminum and Alzheimer's Disease*. Amsterdam: Elsevier, 2001: 1
- 3 Lian H Z, Bi S P, Chen Y J, Dai L M, Cao M, Li H M, Tian L Ch. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 2001, 24(2): 215 ~ 228
- 4 Lian H Z, Kang Y F, Bi S P, Chen Y J, Mao L, Dai L M, Cao M, Tian L Ch. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 2002, 25(19): 3059 ~ 3074
- 5 Lian H Z, Huang Q, Kang Y F, Zou G W, Bi S P, Tian L Ch. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 2003, 26(2): 273 ~ 283
- 6 Fairman B, Sanz-Medel A, Jones P, Evans E H. *Analyst*, 1998, 123(4): 699 ~ 703
- 7 Motellier S, Pitsch H. *J. Chromatogr. A*, 1994, 660(1-2): 211 ~ 217
- 8 Liang J Y, Chung R S, Lin H C. *Food Sci. Agric. Chem.*, 1999, 1(3): 215 ~ 222
- 9 Mitrovic B, Milacic R, Pihlar B. *Analyst*, 1996, 121(5): 627 ~ 634
- 10 Mitrovic B, Milacic R, Pihlar B, Simoncic P. *Analysis*, 1998, 26(10): 381 ~ 388
- 11 Mitrovic B, Milacic R. *Sci. Total Environ.*, 2000, 258(3): 183 ~ 194
- 12 Bantan T, Milacic R, Mitrovic B, Pihlar B. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1999, 365(6): 545 ~ 552
- 13 Soldado Cabezuelo A B, Montes Bayon M, Blanco González E, García Alonso J I, Sanz-Medel A. *Analyst*, 1998, 123(5): 865 ~ 869

- 14 Nagaoka M H, Maitani T. *Analyst*, **2000**, 125(11): 1962 ~ 1965
- 15 Flaten A-K, Lund W. *Sci. Total Environ.*, **1997**, 207(1): 21 ~ 28
- 16 Van Hees P A W, Andersson A-M T, Lundstrom U S. *Chemosphere*, **1996**, 33(10): 1951 ~ 1966
- 17 Hills A, Gote M, JanBen E, Eichhorn J. *Fresenius 'J. Anal. Chem.*, **1999**, 364(5): 457 ~ 461
- 18 Borrmann G, Seubert A. *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 332(2-3): 233 ~ 239
- 19 Borrmann G, Seubert A. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 386(1-2): 77 ~ 88
- 20 Sato M. *Bunseki Kagaku*, **2000**, 49(1): 69 ~ 70
- 21 Sanz-Medel A, Fairman B. *Mikrochim. Acta*, **1992**, 109(1-4): 157 ~ 160
- 22 Browne B A, McColl J G, Driscoll C T. *J. Environ. Qual.*, **1990**, 19(1): 65 ~ 72
- 23 Browne B A, Driscoll C T, McColl J G. *J. Environ. Qual.*, **1990**, 19(1): 73 ~ 82
- 24 Lian H Z, Kang Y F, Yasin A, Bi S P, Shao D L, Chen Y J, Dai L M, Tian L Ch. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 993(1-2): 179 ~ 185
- 25 Lian H Z, Kang Y F, Bi S P, Yasin A, Shao D L, Chen Y J, Dai L M, Tian L Ch. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 376(4): 542 ~ 548
- 26 Lian H Z, Kang Y F, Bi S P, Yasin A, Shao D L, Li D N, Chen Y J, Dai L M, Gan N, Tian L Ch. *Talanta*, **2003**, 62(1): 43 ~ 50
- 27 Zernichow L, Lund W. *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 300(1-3): 167 ~ 171
- 28 Tsunoda K, Yagasaki T, Aizawa S, Akaiwa H, Satake K. *Anal. Sci.*, **1997**, 13(5): 757 ~ 764
- 29 Wang W, Barnard C L R. *Anal. Proc.*, **1992**, 29(2): 49 ~ 51
- 30 Van Landeghem G F, D 'Haese P C, Lamberts L V, De Bore M E. *Anal. Chem.*, **1994**, 66(2): 216 ~ 222
- 31 Wrobel K, Blanco Gonzalez E, Wrobel K, Sanz-Medel A. *Analyst*, **1995**, 120(3): 809 ~ 815
- 32 Feng Y Q, Shibukawa M, Oguma K. *J. Chromatogr. Sci.*, **1996**, 34(10): 425 ~ 430
- 33 Busch M, Seubert A. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 399(3): 223 ~ 235
- 34 Busch M, Seubert A. *Fresenius 'J. Anal. Chem.*, **2000**, 366(4): 351 ~ 355
- 35 Soldado Cabezuelo A B, Blanco Gonzalez E, Sanz-Medel A. *Analyst*, **1997**, 122(6): 573 ~ 577
- 36 Kerven G L, Ostatek-Boczynski Z, Edwards D G, Asher C J, Oweczkin J. *Plant and Soil*, **1995**, 171(1): 29 ~ 34
- 37 Bantan T, Milacic R, Mitrovic B, Pihlar B. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1999**, 14(11): 1743 ~ 1748
- 38 Fairman B, Sanz-Medel A, Gallego M, Jose Qunitela M, Jones P, Benson R. *Anal. Chim. Acta*, **1994**, 286(3): 401 ~ 409
- 39 Bantan T, Milacic R, Pihlar B. *Talanta*, **1998**, 47(4): 929 ~ 941

Reliability of Aluminum Speciation by High Performance Liquid Chromatography

Lian Hongzhen^{1,2}, Bi Shuping^{*1}, Tian Liqing²

(Department of Chemistry¹, Center of Materials Analysis², Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract High performance liquid chromatography (HPLC) plays a very important role in speciative determination of aluminum. It is necessary for chromatographic condition to be non-invasive and that the detection to be species-specific, for the lability and complexity of aluminum species. Some examples are given to describe the common procedures and attention points for the speciation of aluminum by HPLC.

Keywords High performance liquid chromatography, aluminum speciation, reliability, review

(Received 25 April 2003; accepted 15 January 2004)