

· 专论与综述 ·

环境样品中砷的形态分析

徐晶晶, 刘淑娟, 罗明标*, 郭国龙
(东华理工大学应用化学系, 江西 抚州 344000)

摘要: 从砷的提取、不同形态砷的色谱分离和检测技术等 3 个方面综述了环境样品中砷的形态分析研究进展, 指出发展简便、快速的分离富集技术及高灵敏性、高选择性的检测方法是今后的研究重点。

关键词: 砷; 形态分析; 环境样品; 固体样品

中图分类号: O613.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-2009(2009)05-0008-04

Analysis of Arsenic Morphology for Environmental Samples

XU Jing-jing, LIU Shu-juan, LUO Ming-biao*, GUO Guo-long

(Department of Applied Chemistry, East China Institute of Technology, Fuzhou, Jiangxi 344000, China)

Abstract: The development of Arsenic morphology in environmental samples was described from extraction of Arsenic, chromatographic separation of different Arsenic morphology and detective technique. The research keys were at development of simple, fast separating and concentrating technique as well as high sensitive and selective analytic methods in the future.

Key words: Arsenic; Morphological analysis; Environmental samples; Solid sample

砷污染是一个世界性的环境问题。砷的毒性和生物活性取决于其化学形态,因而砷的形态分析在环境治理、代谢组学和医疗卫生等方面具有重要意义。传统的砷的分析方法如光度法、原子吸收光谱法、极谱法等,都是测定样品中砷的总量,但元素的生物有效性并不仅仅取决于其总量,某些元素只有在一定的浓度范围和特定的存在形态^[1]才对生命系统和生物体发挥作用。为了深入探讨致毒元素的生理和毒理作用,一系列形态分析新技术应运而生^[2]。砷的形态分析对于研究其在环境中的循环和转化机理尤为重要,不同形态的砷从化合物中提取、分离和识别的方法也逐渐发展起来^[3-4]。

由于砷在食物、水和动物中形态各异,所以代谢情况也不同。砷在不同形态下毒性不同,砷化合物的毒性顺序为:无机砷 > 有机砷 > 砷甜菜碱 (AsB)、砷胆碱 (AsC)^[5]。因此,在对砷的存在进行风险评估时,需要在复杂环境下对不同基体样品中砷的存在形态进行识别与定量分析^[6]。毒性最强的两种砷主要以亚砷酸盐 (As⁻) 和砷酸盐 (As³⁺) 的形式存在于土壤、沉积物和水。随着时

间积累和生物传递,藻类和海洋动物中也含有高浓度的以无毒形态存在的有机态砷,部分海产品有时会检出痕量毒性较小的砷化合物,如二甲基砷 (MMA) 和二甲基砷酸盐 (DMA)^[7]。无毒的有机态砷一般是 AsC、AsB 和砷糖,其中 AsB 和砷糖主要是海生动物生物合成产物。砷的形态分析已成为国外的研究热点之一, Guerin 等综述了砷的形态研究现状^[8], Gong 等详细报道了其分离技术中的分析过程。文章在广泛调研的基础上,主要从砷的提取、不同形态砷的分离和检测技术等 3 个方面进行综述。

1 砷的提取

1.1 土壤 沉积物

以土壤 沉积物样品浸出和萃取液为研究对

收稿日期: 2009-02-24; 修订日期: 2009-07-16

基金项目: 江西省教育厅科研基金资助项目 (GJJ08303)

作者简介: 徐晶晶 (1985—), 女, 新疆塔城人, 在读研究生, 研究方向为环境分析化学。

* 通讯作者: 罗明标

象,对其中的砷进行形态分析,发现砷的迁移和单个砷的形态与土壤特性有关。羟基氯化铵、不同酸度的重碳酸盐、甲醇水溶液、稀磷酸可以从各种土壤沉积物样品中分别萃取出不同形态的砷^[9],但回收率较低(20%~70%);样品中以无机砷(As_3 和 As_5)为主,有机金属砷通常存在于下水道淤泥中;在小功率微波加热情况下,用磷酸溶液能将其大部分萃取出来,但有部分 As_3 被氧化,Garcia-Manyes等^[10]发现抗坏血酸(维C)和磷酸混合可以有效阻止其氧化。

1.2 蔬菜和食物产品

Raimund 分别用自动稳定装置加速溶解(ASE)和微波方法从胡萝卜中萃取砷,两种方法均只发现无机形态的砷,萃取率为 80%~102%^[11]。Brock 等将绿豆培养于亚砷酸盐/砷酸盐污染的培养基中,研究了绿豆芽中砷的存在形态,结果表明,由于还原作用,亚砷酸盐形态主要积累在根中,在叶片中主要以砷酸盐形式存在。B Hymer 等^[12]用超声波降解法研究了苹果萃取物中砷的形态,发现了亚砷酸盐化合物、 As_3 、 As_5 和 DMA。P Martinez 等用酶萃取方法考察了婴儿食物中砷的形态,发现胰蛋白酶是很好的萃取剂,实验样品中只检测出 As_3 。

1.3 海洋生物样品

大多数海洋生物都含有大量有机砷,其主要化合物形式是 As_3 ,海藻中也含有大量砷酸盐和砷糖。两性或无机砷形态易溶于水溶液,自然形态中极性小的或有机砷更易溶于甲醇。

1.3.1 微生物

使用常规提取方法从微生物(以蚯蚓为代表)中萃取砷,并对其形态分析^[13],发现了多种有机金属砷(As_3 、DMA,以及两种砷糖形态——二甲砷酸核糖甙)。

1.3.2 海产品

从海产品原料萃取和分离砷糖的方法^[14]来看,海产品如海带(褐藻)、锯齿状墨角藻和金属卟啉(红藻),主要含有 4 种砷糖和甲基砷,使用溶剂快速萃取会降低回收率,定性与定量分析需使用液相色谱-电感耦合等离子体质谱(LC-ICP-MS)和液相色谱-电喷雾质谱(LC-ES-MS)联用技术。McSheehy 和 Szpunar 用阴离子交换 LC-ICP-MS 和排阻色谱 LC-ES-MS 联用法检测了 10 种可食用商品海藻中砷的形态,砷糖 1-4 和 DMA

主要存在于海藻提取物中,用串联质谱对砷糖定性分析,并用化学计量法对海藻中砷的萃取进行模拟,结果表明,萃取剂和样品质量是影响萃取结果的两个重要因素,萃取温度和时间的影响不大,该方法分离和识别了 3 种砷糖化合物,少数未识别的峰在海藻提取物的质谱图中同样存在。

海鲜中的砷常用甲醇/水混合液萃取,提取液用 C_{18} 固相萃取柱或 Dowex 阳离子交换柱净化洗脱油脂和脂肪,链霉素残留液用甲醇从 C_{18} 柱上洗脱,经旋转蒸发器减压蒸干,再用三氯甲烷或丙酮去除脂肪,并防止 DMA 丢失。

近年来,在微波加热条件下,以甲醇/水混合液为萃取剂萃取砷已被证明是简单而有效的方法^[15-16]。从鱼肉组织中萃取砷的实验表明,在小功率(50 W~75 W)微波加热条件下,萃取 5 min~10 min,萃取率能超过 85%。Kriby 和 Maher 使用同样的技术提取不同动物组织中的砷,发现要提高萃取率,必须优化混合溶剂组成、微波功率和萃取时间,同时描述了微波辅助蒸馏法从海鲜产品中提取无机形态砷的详细方法。

其他萃取方法如加速溶剂萃取(ASE)、索氏萃取也可用于海产品中砷的提取。Gomez-Ariza 等研究表明,需用正己烷作为萃取剂;Brisbin 和 Caruso 发现,微波辅助萃取(于 75℃ 维持 2 min)在众多方法中最快速、简单。海鲜产品中主要是 As_3 ,还包括痕量甲基砷化物、砷糖及不能识别的砷化物。

1.3.3 海洋参考物质

通常已知总砷含量(CRM)被用来评价萃取效率或色谱分离度,最具代表性的是用鲨鱼肉和龙虾进行的提取实验,以甲醇/水混合液为萃取剂,在有/无微波辅助条件下分别萃取其中不同形态的砷。有报道称,鲨鱼肉中 As_3 的质量比分别为: As_3 (16±1)mg/kg, DMA(0.28±0.1)mg/kg, TeMA₃(0.26±0.05)mg/kg, MMA 和 TMAO 的值比较分散;龙虾的测定结果为: As_3 (13.5±0.5)mg/kg, DMA(1.2±0.4)mg/kg, As_5 (0.4±0.1)mg/kg, 砷糖 0.13 mg/kg, 还发现两个阴、阳离子未知峰。

2 色谱分离

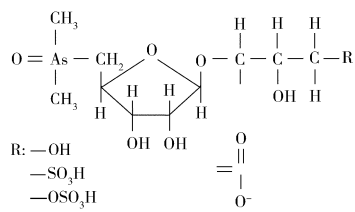
色谱法在砷形态分析中的应用已有报道。砷在不同酸度下,有阴离子、阳离子、中性离子多种形态,可使用离子交换法、离子色谱法或尺寸排阻色

谱法分离。阴离子形态的砷通常用 PRP - X - 100 树脂分离,磷酸缓冲液平衡及梯度洗脱;阳离子形态的砷常用 LC - SAX - 100 树脂分离,洗脱液需用吡啶 - 蚁酸混合溶液。有报道尝试用同一根色谱柱分离出 6 种不同形态的砷 (AsB、AsC、As、DMA、MMA、As)。B rusbin 等发现提高碳酸铵盐 (pH 值 = 8.5) 的浓度,可对已上柱的砷梯度洗脱,但分离时间很长 (27 min),且 AsC (> 12.5 μg/kg) 对 AsB 的分离洗脱有干扰。利用螯合试剂 (如 BDSA 苯 - 1,2 - 二磺酸) 中不同 pH 值的硝酸,可梯度洗脱 8 种不同形态的砷 (As、MMA、DMA、As、AsB、TMAO、AsC、TMA s⁺)。Kohmeyer 等^[17]

利用该技术成功分离出 17 种不同形态的砷,包括两种砷糖及牡蛎提取物中 7 种未经形态确认的砷。

离子色谱柱对于分离带电和中性的溶质具有独到的优势。在砷的形态分析中,四丁基铵离子 (pH 值为 6 ~ 11) 和很多烷基磺酸盐 (pH 值为 2.7 ~ 4.5) 可用于反相色谱柱,进行有效的形态分离,耗时短,但存在基体效应。Wangkam 和 Pergantis 介绍了窄孔 RP - HPLC 方法,用四丁基铵离子 (pH 值 = 6.0) 在 2 min 内分离出 5 种砷的形态,并成功从海藻粉提取物中分离和识别出 4 种砷糖和 DMA。环境样品中砷的形态及结构见表 1。

表 1 环境样品中砷的形态及结构

序号	英文名称	中文名称	结构式	简写
1	Arsenite	亚砷酸盐	AsO ₃ H ₂ ⁻	As
2	Arsenate	砷酸盐	AsO ₄ H ₂ ⁻	As
3	Methylarsonate	甲基胂酸	(CH ₃)AsO ₃ H ₂	MMA
4	Dimethylarsinous acid	二甲基亚胂酸	(CH ₃) ₂ AsOH	DMA
5	Dimethylarsinic acid	二甲基胂酸	(CH ₃) ₂ AsO ₂ H	DMA
6	Dimethylthioarsinous acid	二甲基硫代亚胂酸	(CH ₃) ₂ AsSH	DMTA
7	Dimethylthioarsinic acid	二甲基硫代次胂酸	(CH ₃) ₂ As(S)OH	DMTA
8	Dimethylthioarsinic anhydride	二甲基硫代次胂酸酐	(CH ₃) ₂ As(S)OAs(S)(CH ₃) ₂	DMTA
9	Dimethylthioarsinic acid	二甲基二次硫代次胂酸	(CH ₃) ₂ As ₂ H	DMDTA
10	Arsenobetaine	砷甜菜碱	(CH ₃) ₃ As + CH ₂ COO ⁻	AsB
11	Arsenocholine	砷胆碱	(CH ₃) ₃ As(CH ₂) ₂ OH ⁺	AsC
12	Arsenictrimethyl	四甲基胂离子	(CH ₃) ₄ As ⁺	TMA s ⁺
13	Arsenictrimethide Oxygen	三甲基胂氧	(CH ₃) ₃ AsO	TMAO
14	Arsenictrimethide Metacetic acid	三甲基胂丙酸	(CH ₃) ₃ AsC ₃ O ₂ H ₃	AB
15	Arseno-suger	砷糖		AS

3 检测技术

原则上各种仪器分析方法只要有足够的灵敏度,都可用于元素的形态测定。电感耦合等离子体质谱 (ICP - MS) 与高效液相色谱 (HPLC) 联用技术因灵敏度高,线性范围宽,能同时测定多种元素,被广泛应用于多种元素的形态测定^[18]。在砷的形态分析中,HPLC - ICP - MS 是最有效的检测方法,最低检测限在 1 μg/L 水平。

氢化物发生器将液体的雾化效率比常规提高了 10 ~ 100 倍,与其相关的检测技术有:微波氧化 /

相片氧化 热氧化辅助氢化物发生 - X 射线吸收光谱法 (HG - XAS)^[19]、氢化物发生 - 原子吸收光谱法 (HG - AAS)、氢化物发生 - 原子发射光谱法 (HG - AES)^[20] 和氢化物发生 - 电感耦合等离子体质谱法 (HG - ICP - MS) 等,可用于砷从有机形态转化为水合物形态后的含量测定。过硫酸钾 (K₂S₂O₈) 可有效地将有机砷转化为水合物形态,采用高效液相色谱 - 氢化物发生 - 原子吸收光谱法 (HPLC - HG - AAS) 检测,对 As、As、DMA、MMA 的检测限低于 1 μg/L 水平。

氢化物发生 - 原子荧光光谱法 (HG - AFS) 灵敏度^[21], 干扰主要来自散射光和基体效应^[22]。高效液相色谱 - 氢化物发生 - 原子发射光谱法 (HPLC - HG - AES) 已应用于各种环境样品中砷形态的研究, IC - MS 是最经典的砷的形态分析

方法, 各种分析方法的检测限为 0.02 μg/kg ~ 20 μg/kg。对海藻中提取的砷糖化物的形态分析推荐使用电喷雾质谱法 (ES - MS)。砷形态分析中的检测技术见表 2。

表 2 砷形态分析中的检测技术^[1]

分析方法	联用技术	特点
色谱 高效液相色谱	高效液相色谱 - 原子吸收光谱 (HPLC - AAS)	灵敏度高, 检出限低, 操作简单
	高效液相色谱 - 原子发射光谱 (HPLC - AES)	灵敏度、准确度高, 尤其是 HPLC - IC - AES
	高效液相色谱 - 原子荧光光谱 (HPLC - AFS)	灵敏度高, 检出限低
	高效液相色谱 - 质谱 (HPLC - MS)	耗样量少, 速度快, 灵敏度高, 线性范围宽, HPLC - IC - MS 和 HPLC - IC - AES 较常用
离子色谱	离子色谱 - 电感耦合等离子体质谱 (IC - IC - MS)	灵敏度高, 操作方便
	离子色谱 - 原子吸收/原子发射光谱 (IC - AAS/AES)	有机砷化合物的电荷数、离子大小和疏水性是影响分离效果的主要因素
气相色谱	气相色谱 - 超临界流体色谱 (GC - SFC)	灵敏度高, 对评价某些生理、病理条件下的机体状况具有重要的临床意义
光谱	氢化物发生 - 原子吸收光谱 (HG - AAS)	灵敏度高, 但有时只能分析部分砷化物, 且前处理步骤较复杂
	氢化物发生 - 电感耦合等离子体原子发射光谱 (HG - IC - AES)	
	氢化物发生 - 原子荧光光谱 (HG - AFS)	
	氢化物发生 - 等离子体质谱 (HG - IC - MS)	
毛细管电泳	毛细管电泳 - 氢化物发生 - 等离子体质谱 (CE - HG - IC - MS)	高效, 快速, 样品用量少, 操作简便, 每米理论塔板数为几十万甚至上百万, 一次分析不仅能分辨价态, 还能区别同价态砷的存在形态
	毛细管电泳 - 氢化物发生 - 电感耦合等离子体原子发射光谱 (CE - HG - IC - AES)	
	毛细管电泳 - 激光诱导荧光检测器 (CE - LIF)	

4 结语与展望

砷形态分析的关键点在于从固体样品 (沉积物、土壤、植物或生物棉纸) 中萃取砷, 萃取过程直接关系到砷的形态在样品前处理过程中的降解, 微波辅助^[23]是从土壤和生物中萃取砷的重要技术。

生物体中有很多不明形态的砷, 确定其形态对于研究生物体和环境体系具有重要意义。现有的分离和检测技术较多, 但都存在一些不足, 将分离技术与相应的检测技术耦合, 可以有效地分离、分析砷化合物^[24]。

电喷雾质谱联用技术有助于鉴定未知砷化物结构, 应发展不同的砷总量 (CRM) 检测技术来研究固体样品中砷的形态。环境样品十分复杂, 未知化合物化学结构的鉴定仍存在许多障碍, 缺少标准物质是限制砷形态分析的瓶颈, 没有标准方法也使砷形态分析方法的有效性缺失。发展简便、快速的分离富集技术及高灵敏性、高选择性的检测方法,

仍然是一个具有挑战性的课题, 也将是今后环境样品中砷形态分析方面的研究重点。

[参考文献]

- [1] 甄云鹏, 范必威. 砷形态分析方法进展 [J]. 广东微量元素科学, 2005, 21 (7): 5 - 11.
- [2] 吴宏, 黄德乾, 金焰, 等. 环境样品中铅、镉、汞、硒形态分析研究进展 [J]. 环境监测管理与技术, 2008, 20 (4): 9 - 17.
- [3] 张磊, 吴永宁, 赵云峰. 不同形态砷化合物稳定性研究和砷形态分析中样品前处理技术 [J]. 国外医学卫生学分册, 2007, 34 (4): 238 - 244.
- [4] 熊鹏, 李义连, 张富有, 等. 砷的形态分析方法研究进展 [J]. 安全与环境工程, 2008, 15 (4): 67 - 70.
- [5] GRAFEM, TAPPERO R V, MARCUS M A, et al Arsenic speciation in multiple metal environments: I Bulk-XAFS spectroscopy of model and mixed compounds [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2008 (320): 383 - 399.
- [6] KARTH IKEYAN S, HIRATA S Arsenic speciation in environmental samples [J]. Analytical Letters, 2003, 36 (11): 2355 - 2366.

(下转第 16 页)

- biologia, 2007 (589): 141 - 154.
- [14] 丁蕾, 支崇远. 环境对硅藻的影响及硅藻对环境的监测 [J]. 贵州师范大学学报 (自然科学版), 2006, 24 (3): 13 - 16.
- [15] 齐雨藻, 黄伟建, 骆育敏, 等. 用硅藻群集指数 (Daplo) 和河流污染指数 (RPId) 评价珠江广州河段的水质状况 [J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6 (4): 329 - 335.
- [16] 辛晓云, 杨文杰, 张红, 等. 内蒙古岱海水质的硅藻生物指数评价 [J]. 山西大学学报 (自然科学版), 2000, 23 (3): 263 - 266.
- [17] FED M J, ALMEDA S F P, CRAVEIRO S C, et al A comparison between biotic indices and predictive models in stream water quality assessment based on benthic diatom communities [J]. Ecological Indicators, 2009 (9): 497 - 507.
- [18] 吕亚红, 顾泳洁. 苏州河沉积物中的硅藻及其污染指示作用 [J]. 上海环境科学, 2002, 21 (10): 633 - 637.
- [19] SEELE J, MA YR M, STAAB F, et al Combination of two indication systems in pre-alpine lakes-diatom index and macrophyte index [J]. Ecological Modeling, 2000 (130): 145 - 149.
- [20] PRYGIEL J, CARPENTIER P, ALMEDA S, et al Determination of the biological diatom index (BDNF T 90 - 354): results of an intercomparison exercise [J]. Journal of Applied Phycology, 2002 (14): 27 - 39.
- [21] PASSY S I, BODE R W. Diatom model anity (DMA), a new index for water quality assessment [J]. Hydrobiologia, 2004 (524): 241 - 251.
- [22] TAYLOR J C, HARD NG W R, ARCH BALD C G M, et al Diatoms as indicators of water quality in the Jukskei-Crocodile river system in 1956 and 1957, a re-analysis of diatom count data generated by BJ Chloňky [J]. Water SA, 2005, 31 (2): 237 - 246.
- [23] ATAZADEH I, SHAR IF M, KELLY M G Evaluation of the Trophic Diatom Index for assessing water quality in River Gharasou, western Iran [J]. Hydrobiologia, 2007 (589): 165 - 173.
- [24] KELLY M G, WHITTON B A. The Trophic Diatom Index: a new index for monitoring eutrophication in rivers [J]. Journal of Applied Phycology, 1995 (7): 433 - 444.
- [25] KELLY M G, CAZAUBON A, COR NG E, et al Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe [J]. Journal of Applied Phycology, 1998 (10): 215 - 224.

本栏目责任编辑 姚朝英

(上接第 11 页)

- [7] FR ICKE M, ZELLER M, CULLEN W, et al Dimethylthioarsinic anhydride: A standard for arsenic speciation [J]. Analytica Chimica Acta, 2007 (583): 78 - 83.
- [8] SUZUKI K T, MANDAL B K, OGRA Y. Speciation of arsenic in body fluids [J]. Talanta, 2002 (58): 111 - 119.
- [9] 赵秋香, 李海萍, 赵文海, 等. 土壤中毒性元素 As 的形态分析及其测定 [J]. 分析试验室, 2007, 26 (2): 56 - 59.
- [10] GARCIA-MANYES S, JMENEZ G, PADRO A, et al Arsenic speciation in contaminated soils [J]. Talanta, 2002 (58): 97 - 109.
- [11] WAHLEN R. Fast and accurate determination of arsenobetaine in fish tissues using accelerated solvent extraction and HPLC-ICP-MS determination [J]. Journal of Chromatographic Science, 2004 (42): 217 - 222.
- [12] B HYMER C, CARUSO J A. Evaluation of HPLC systems for the separation and quantification of arsenic compounds from apple extracts [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2002 (25): 639 - 653.
- [13] 李银生, 曾振灵, 陈杖榴, 等. 洛克沙肿污染胁迫下蚯蚓体内砷的富集和释放 [J]. 同济大学学报, 2008, 36 (2): 212 - 217.
- [14] 刘世民, 刘岩, 王长祥. 氢化发生原子吸收法测定海产品中的微量砷 [J]. 分析检测, 2005, 26 (2): 189 - 190.
- [15] 曾泽, 蒋维旗, 谢琰. 微波溶解 - 氢化物发生原子荧光光谱法测定氟石中的砷和汞 [J]. 检验检疫科学, 2008, 18 (6): 32 - 34.
- [16] 许建华, 田锋, 杜青, 等. 微波消解 - 原子荧光法测定土壤中汞、砷、硒 [J]. 环境监测管理与技术, 2007, 19 (4): 34 - 35.
- [17] KOHLMAYER U, KUBALLA J, JANTZEN E. Simultaneous separation of 17 inorganic and organic arsenic compounds in marine biota by means of high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2002, 16 (10): 965 - 974.
- [18] 滕曼, 梁立娜, 蔡亚岐, 等. 离子色谱 - 氢化物发生原子荧光光谱联用技术在砷形态分析中的应用 [J]. 分析试验室, 2007, 26 (1): 22 - 26.
- [19] SMITH P G, KOCH I, REMER K J. An investigation of arsenic compounds in fur and feathers using X-ray absorption spectroscopy speciation and imaging [J]. Science of the Total Environment, 2008 (390): 198 - 204.
- [20] 袁爱萍, 贺大鹏, 龙玉珊, 等. 氢化物发生 - 原子荧光光谱法同时测定滑石中砷和汞 [J]. 岩矿测试, 2008, 27 (5): 389 - 391.
- [21] 沈志群. 双道原子荧光同时测定海水中痕量砷和汞 [J]. 环境监测管理与技术, 2005, 17 (6): 30 - 31.
- [22] 朱宇芳, 张宗祥. 电热板加热消解 - 氢化物原子荧光法测定鱼虾中的总砷 [J]. 福建分析测试, 2009, 18 (1): 74 - 76.
- [23] 马名扬, 张丽佳, 张朝阳, 等. 微波辅助提取 - 氢化物发生原子荧光光谱法测定土壤中无机砷 [J]. 岩矿测试, 2007, 26 (5): 372 - 376.
- [24] 杨红丽, 王锴, 朱四喜, 等. 联用技术在砷形态分析中的应用进展 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2007, 26 (1): 65 - 73.