

评述与进展

高效阴离子交换色谱 脉冲电化学检测方法和应用

丁永胜^{1,2} 牟世芬^{*1}

¹(中国科学院生态环境研究中心,北京 100085) ²(北京大学药学院化学生物系,北京 100083)

摘要 评述了高效阴离子交换色谱和脉冲电化学检测方法。内容包括:色谱柱和流动相;糖和氨基酸在色谱柱上的保留行为;脉冲安培法(PAD)和积分脉冲安培法(IPAD);方法在糖和氨基酸分析中的应用。

关键词 高效阴离子交换色谱,脉冲电化学检测,糖,氨基酸,评述

1 引言

20世纪80年代以前,糖类化合物在离子交换树脂中的分离主要以硼酸盐络合的方式进行^[1],高效阴离子交换色谱法(HPAEC)的出现为糖类物质的分离提供了简单和高效的手段。糖和多数氨基酸缺少紫外吸收,不宜直接用紫外或荧光法检测。用HPLC和GC分析这些物质一般需要进行衍生化反应,增加了方法的复杂性和难度。1986年Johnson^[2]采用脉冲电化学方法(PED)直接测定糖类物质,为糖的分析提供了有力支持。当前,HPAEC-PED已经成为糖类化合物分析的首选方法之一,并且逐渐进入氨基酸分析领域。

2 高效阴离子交换色谱

2.1 分离柱

高效阴离子交换树脂是由具有高强度和稳定性的有机聚合材料制成。目前Dionex公司可以提供以下几种用于糖和氨基酸分离的色谱柱^[3,4]。CarboPac PA1是由表面磺化薄壳型聚苯乙烯/二乙烯基苯聚合树脂和覆盖在树脂表面的键合季胺基团的乳胶微球组成,适于一般单糖、双糖和寡糖的分离。CarboPac PA10与CarboPac PA1类似专用于单糖和双糖的分离,由于其树脂具有更高的交联度和直径更小的乳胶微球,这种色谱柱具有较强的有机溶剂兼容性和较高的柱效。CarboPac PA100是一种由乙烯基苯/二乙烯基苯聚合物为基质的薄壳型树脂,适于低聚糖的分析。CarboPac MA1是由氯乙烯苯/二乙烯基苯聚合而成的大孔型树脂,表面键和疏水性的烃基季胺基。它的交换容量是以上分离柱的十几倍,适合弱保留糖醇类化合物的分析,但是不能和有机溶剂兼容。AminoPac PA10是以乙烯基苯/二乙烯基苯聚合形成的微孔树脂和覆盖的疏水性烃基季胺基乳胶组成,用于氨基酸、氨基糖和糖的分离。

2.2 流动相

在HPAEC-PED中,流动相比较简单,一般采用NaOH溶液和醋酸盐溶液。分离半乳糖、葡萄糖和甘露糖等差向异构体和位置异构体时,流动相NaOH浓度低于20mmol/L。以低浓度NaOH为流动相的缺点有:(1)每次进样前色谱柱需要再生处理;(2)保留时间重现性差;(3)需要柱后加入浓碱以提高被测物的灵敏度。也有人使用5~20mmol/L NaOH和1~2mmol/L Ba(OAc)₂混合溶液为流动相,分离了己醛糖、氨基六糖和一些双糖异构体,获得了较稳定的保留时间^[5]。分离寡糖和多聚糖时,流动相NaOH浓度一般大于100mmol/L,同时在流动相中加入一些洗脱能力较强的离子(如CH₃COO⁻),可以缩短化合物的保留时间^[6]。

2.3 糖在阴离子交换色谱柱上的保留行为

2.3.1 单糖 在碱性溶液中单糖在阴离子交换色谱柱上的保留行为主要与化合物的pK_a有关。保留

2003-09-19收稿;2004-02-23接受

本文系国家重点基础研究计划(973项目)(No.2003CB415001)和国家自然科学基金(No.20475060)资助课题

强弱依次为酸性糖、中性糖和氨基糖。在单糖中不同位置羟基的酸度不同。Koizumi 等^[7]对葡萄糖不同位置的羟基进行甲基取代,得出羟基的离子化强弱顺序为:1-OH > 2-OH > 6-OH > 3-OH > 4-OH,其中吡喃环上的氧原子对 C-1 位半缩醛羟基的吸电子诱导效应,使得 C-1 羟基的酸性最强。由于各种单糖相对应的环醇不具备半缩醛羟基,因此保留时间较短。随着羟基数目减少或者羟基被取代,保留时间会缩短(如鼠李糖、海藻糖和氨基糖)。差向异构体中六元环上的氧原子对竖直 C-1 羟基具有较强的吸电子诱导效应,使得差向异构体的酸性大于差向异构体。甘露糖的保留时间大于半乳糖和葡萄糖,就是由于甘露糖差向异构体的比例大于异构体^[8]。

2.3.2 寡糖和多聚糖 寡糖和多聚糖在阴离子交换树脂上的保留行为主要与分子大小(聚合度)和形状(连结位置与构型)有关。聚合度增加分子中羟基数目增多,保留越强。在寡糖和多聚糖中还原性末端 C-1 羟基对酸性的影响降低,而苷键连结位置与构型成为影响化合物保留行为的主要因素。由一种单糖组成的直链多聚糖的容量因子对数($\lg k$)与聚合度呈线性关系,多聚糖的聚合度越高其容量因子越大。不同构型和连接位置形成的多聚糖的容量因子对数与其聚合度关系曲线的斜率也不同,其大小顺序为: -1,3 > -1,3 > -1,4 > -1,4 > -1,6 > -1,2 > -1,6^[9]。不同聚合单元的多聚糖之间的保留行为差异等也较大。相同聚合度的木聚糖和甘聚糖的保留时间较葡聚糖的短许多,支链多聚糖的保留时间也较直链多聚糖的短^[8]。

2.4 氨基酸在阴离子交换色谱柱上的保留行为

氨基酸在阴离子交换柱上的保留时间主要由羧基和氨基的数目决定。氨基酸在阴离子交换柱上的流出顺序为:碱性氨基酸、中性氨基酸和酸性氨基酸。氨基酸侧链结构中疏水性碳链和芳香基也影响氨基酸在阴离子交换树脂上的保留。在 AminoPac PA10 分离柱上,具有较强疏水性的中性氨基酸(例如缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)的保留时间大于亲水性的中性氨基酸(甘氨酸和苏氨酸)。含有芳香基的组氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸与树脂具有一定的亲和力,保留时间也较长^[10]。

3 脉冲电化学检测

在施加恒定电位条件下,糖和氨基酸可以在贵金属电极(Au和Pt)表面被氧化。由于电极表面易于被聚积的反应物所污染,使电极活性迅速降低。采用施加脉冲电位对电极表面进行在线清洗和活化,可解决电极污染问题,脉冲电化学检测主要分为:脉冲安培法和积分脉冲安培法两种检测方式^[11]。

3.1 脉冲安培法(PAD)

脉冲安培法用于被测物氧化不需要电极表面氧化物催化的测定,适合于糖的测定。它由测定(E_{det})、氧化(E_{oxd})和还原(E_{red})3个不同的电位组成(图1a)。测定电位分为延迟和积分两部分。延迟部分的作用是消除双电层充电电流以降低背景电流,积分部分为采集被测物的氧化电流信号。完成测定之后电位跃迁到较高的氧化电位,通过电极表面的氧化将电极表面的附着物除去。持续一段时间电位又降到较低的还原电位,将电极表面还原,同时吸附被测物,为下次测定做准备。多数糖类物质的测定所采用电位波形的周期为1s。为了满足微孔色谱柱和毛细管电泳中对快速通过色谱峰信号的采集,需要缩短脉冲周期,增加信号的采集频率。Lu等^[12]采用2.6Hz的PAD波形用于60cm×10μm毛细管柱上糖的测定。Jensen等^[13]采用较低的负电位为还原电位,将采集频率提高到6.7Hz。连续使用三电位波形时,工作电极会不断被氧化溶解,影响信号值的重现性。Rocklin等^[14]设计优化了一种四电位的波形(图1b),利用较低的负电位将电极表面的附着物除去,可以避免电极的氧化溶解损失,结果获得较好重现性。

3.2 积分脉冲安培测定(IPAD)

积分脉冲安培法是针对被测物的氧化需要电极表面金属氧化物催化的测定,适合于含氮和硫物质的测定。它的电位时间波形与PAD不同,测定电位由恒定电位改为变化电位,对变化的测定电位进行积分。Welch等^[15]提出了一种三角形电位连续变化的波形图(图1c)。在测定电位由低向高变化时电极自身氧化形成的阳极电流与测定电

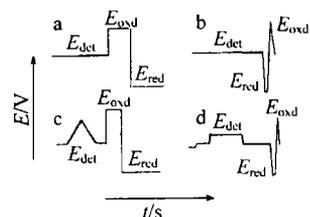


图 1 电位-时间波形图

Fig 1 Potential-time waveforms

位由高向低变化时电极氧化物还原产生的阴极电流相互抵消,使得整个积分区间的背景电流显著下降,使被测物信号增加。在此基础上 Clarke等^[16]提出了另一种波形图(图 1d),将测定电位的积分区域由三角形连续电位扫描变为在两个恒定的高、低电位之间跃迁,它有助于消除由 pH、流动相组成和电极表面积的变化所引起的基线漂移。

4 HPAEC-PED 的应用

4.1 单糖和双糖

在高效阴离子交换色谱柱上,单糖和双糖最佳的分离条件是流动相 OH^- 浓度小于 50 mmol/L。Predollet等^[17]使用水为流动相分析水溶性咖啡中 8 种单糖,其中木糖和甘露糖是一对较难分离的单糖,只有在纯水流动相或者 OH^- 浓度低于 2 mmol/L 的流动相中才能够得到分离。用纯水作流动相时,需要柱后加入浓碱,而且化合物的保留时间较长。Cataldi等^[18,19]用 10 mmol/L NaOH 和 1 mmol/L 醋酸钡的混合流动相分离了牛乳中的单糖和双糖以及葡萄酒中单糖和脯氨酸。Andersen等^[20]建立了 12 种糖醇、单糖和双糖测定方法,用于分析糖果类食品中的添加剂。Corradini等^[21]分析了食用糖中的山梨醇、甘露醇和果糖。Salvador等^[22]测定甜薯、木薯和马铃薯中的阿拉伯糖、鼠李糖、木糖和甘露糖等单糖。Cataldi等^[23]分析了橄榄树中的糖醇和糖代谢物。Hanko等^[24]分析了细胞培养液和发酵液中的糖醇、乙二醇、甘油、乙醇等。Kaiser等^[25]使用 HPAEC-PAD 和固相萃取样品前处理方法对高盐含量的海水样品进行脱盐净化处理后,测定其中的氨基糖等化合物。Smits等^[26]采用固相萃取分离(SPE)技术和 HPAEC-PAD 分析了 *Saccharomyces cerevisiae* 提取液中的磷酸糖等化合物。Torto等^[27]采用在线微透析装置和 HPAEC-PAD 分析了象牙棕榈果实中的甘露糖等。

Yokota等^[28]测定了基因重组药物血纤维蛋白溶酶原激动因子 palmitepase 糖蛋白中的岩藻糖、葡萄糖胺、半乳糖和甘露糖。Chusney等^[29]比较 HPAEC-PAD 和微酶法测定血清中 1 去氧葡萄糖(1,5-anhydro-D-glucitol, AG),用于糖尿病的临床诊断,结果表明 HPAEC-PAD 具有较高的精密度和特异性。Zhou等^[30]测定了重组溶酶体糖蛋白中的 6 磷酸甘露糖含量,方法具有很好的特异性、灵敏度和重现性。

4.2 寡糖和多聚糖分析

Quigley等^[31]对水果、蔬菜和谷类等食品中的非淀粉多聚糖胶质和甜菜中的糖醛(羧)酸的含量进行了评估。Versari等^[32]通过测定草莓水解液中的低聚半乳糖醛酸,评价果胶酯酶的效力。Koch等^[33]分析了不同酶水解的菊粉溶液中的低聚果糖、葡萄糖、果糖和蔗糖的含量,比较不同水解酶活性。Hanashiro等^[34]分析了 11 种植物中的支链淀粉中的多聚糖分布,寻找淀粉的组成特征与植物生长条件之间的关系。Lu等^[35]分析了玉米在不同生长温度条件下淀粉中多聚糖的差别。Murray等^[36]使用 HPAEC-PAD 方法对棉花纤维、木材和纸张水解后的多聚糖进行指纹分析,推测植物细胞壁中纤维素的生物合成。Kotani等^[37]分析绵羊红细胞膜中糖蛋白的氧端寡糖醇。Kunz等^[38]采用 HPAEC-PAD-(FBA)MS 分离和定性了乳汁中的中性和酸性乳聚寡糖,并给出了 28 种相关化合物的摩尔响应因子。Weston等^[39]针对一些新西兰蜂蜜的抗菌作用,对其中的低聚糖成分进行分析。Talaga等^[40,41]分析抗肺炎球菌疫苗中的多聚糖、多聚糖结合物以及多糖杂质(C-polysaccharides)的浓度,对疫苗的质量进行检验。Paula等^[42]测定了预防 B 型血友病(Haemophilus influenzae type b, Hib)疫苗中的多聚磷酸核糖(polyribosyl ribitol phosphate, PRP)与其它蛋白质(如破伤风类毒素)的结合率。

由于多聚糖的标准样品难于获取,定量分析比较困难。一般多根据多聚糖的聚合度与摩尔响应因子的线性关系,采用内标法对聚合度较低的低聚糖进行定量分析。Koch等^[43]研究了玉米支链淀粉单元中的麦芽多糖的聚合度与摩尔响应因子和质量响应因子的关系,分析样品中多聚糖的平均聚合度及分布。Björberg等^[44]比较了 MALDI-TOFMS 和 HPAEC-PAD 两种方法分析淀粉中支链淀粉链长度分布,HPAEC-PAD 在重现性和较长支链淀粉的准确定量方面具有优势。最近,Campa等^[45]比较了 HPAEC-PAD、¹H NMR、ESI-MS 和 MEKC-UV 方法测定不完全酸水解的均一多聚糖中低聚物的聚合度及其分布,其中 HPAEC-PAD 内标法可以对聚合度在 2~9 之间的低聚糖进行准确定量。

4.3 氨基酸及类似物分析

HPAEC-PED 氨基酸分析是该方法在应用方面的一个重要突破,它与传统氨基酸分析方法根本区别在于氨基酸无需衍生化。Clarke 等^[16]测定了蛋白水解液中的 20 种氨基酸,检出限达到 pmol 水平,结果与茚三酮法一致。Hanko 等^[46]在 12 min 内测定蛋白水解液和细胞培养液中的色氨酸,方法不受碱性水解介质和高浓度糖的影响。Yu 等^[47]同时测定酱油中的 17 种氨基酸和 9 种糖。Hanko 等^[48]测定了细胞培养液中的氨基酸和碳水化合物。Jandik 等^[49]采用高低两种检测电位区别了不含羟基的氨基酸和糖类化合物。在一些含有高浓度糖的样品中,氨基酸测定受到糖类化合物的严重干扰。Jandik 等^[50]设计了一种柱切换技术针对含糖多的样品(胡萝卜汁)中氨基酸分析,去除其中糖类物质的干扰。Ding 等^[51]采用较低 NaOH 浓度为初始流动相将氨基酸和糖类在不同保留时间区域分离,避免两类物质的干扰,用于测定绿茶中的氨基酸和糖。Thiele 等^[52]和 Ding 等^[53]分别利用固相萃取法建立了除糖方法,用于含糖多的样品中氨基酸分析。Rohrer 等^[54]测定了糖蛋白中 N 乙酰神经氨酸(Neu5Ac)和 N 糖基神经氨酸(Neu5Gc)。Sato 等^[55]测定了环境和生物样品中的除草剂 glufosinate、bialaphos 和 glyphosate 氨基酸类似物。Draisci 等^[56]分析了变质食物和蔬菜中的生物胺类物质。Fritsch 等^[57]测定生物样品中胞嘧啶 5 单磷酸-N 乙酰神经氨酸(CMP-Neu5Ac)及其代谢产物。

5 展 望

HPAEC-PED 是高效、灵敏和简便的糖和氨基酸分析方法。今后该方法在以下几方面会进一步发展:

- (1)对重要食品和医用原料样品中多聚糖指纹图谱的研究;
- (2)与 MS 联用,解决多聚糖定性和定量方面的问题;
- (3)生物样品和体液中的氨基酸分析;
- (4)其他缺少紫外或荧光的极性脂肪类化合物分析。

References

- 1 Bonn G. *J. Chromatogr.*, **1985**, 322: 411 ~ 424
- 2 Johnson D C. *Nature*, **1986**, 321: 451 ~ 452
- 3 *Dionex Comp Document No 031824-03*, **2002**: 6
- 4 *Dionex Comp Document No 31481-06*, **2002**: 5
- 5 Cataldi T R I, Campa C, Angeletti M, Bufò S A. *J. Chromatogr A*, **1999**, 855: 539 ~ 550
- 6 Cataldi T R I, Campa C, Margiotta G, Bufò S A. *Anal. Chem.*, **1998**, 70: 3940 ~ 3945
- 7 Koizumi K, Kubota Y, Ozaki H, Shigenbu K, Fukuda M, Tanimoto T. *J. Chromatogr.*, **1992**, 595: 340 ~ 345
- 8 Lee Y C. *Anal. Biochem.*, **1990**, 189: 151 ~ 162
- 9 Koizumi K, Kubota Y, Tanimoto T, Okada Y. *J. Chromatogr.*, **1989**, 464: 365 ~ 373
- 10 Yu H, Ding Y, Mou S. *J. Chromatogr A*, **2003**, 997: 145 ~ 153
- 11 LaCourse W R. *Pulsed Electrochemical Detection in High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons Inc, New York, **1997**
- 12 Lu W, Cassidy R M. *Anal. Chem.*, **1993**, 65: 2878 ~ 2881
- 13 Jensen M B, Johnson D C. *Anal. Chem.*, **1997**, 69: 1776 ~ 1781
- 14 Rocklin R D, Clarke A P, Weitzhandler M. *Anal. Chem.*, **1998**, 70: 1496 ~ 1501
- 15 Welch L E, LaCourse W R, Mead D A, Johnson D C, Huet T. *Anal. Chem.*, **1989**, 61: 555 ~ 559
- 16 Clarke A P, Jandik P, Rocklin R D, Liu Y, Avdabvicet N. *Anal. Chem.*, **1999**, 71: 2774 ~ 2781
- 17 Predollet J, Bruehlhart M, Lador F. *J. AOAC Intemet*, **1995**, 78: 749 ~ 757
- 18 Cataldi T R I, Angeletti M, Bianco G. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 485: 43 ~ 49
- 19 Cataldi T R I, Nardiello D. *J. Agri. Food Chem.*, **2003**, 51: 3737 ~ 3742
- 20 Andersen R, Sørensen A. *J. Chromatogr A*, **2000**, 897: 195 ~ 204
- 21 Corradini C, Canali G G, Cogliandro E, Nicoletti I. *J. Chromatogr A*, **1997**, 791: 343 ~ 349
- 22 Salvador L D, Sukanuma T, Kitahara K, Tanoue H, Ichiki M. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48: 3448 ~ 3454
- 23 Cataldi T R I, Margiotta G, Iasi L, Chio B D, Xibyannis C, Bufò S A. *Anal. Chem.*, **2000**, 72: 3902 ~ 3907
- 24 Hanko V P, Rohrer J S. *Anal. Biochem.*, **2000**, 283: 192 ~ 199
- 25 Kaiser K, Benner R. *Anal. Chem.*, **2000**, 72: 2566 ~ 2572

- 26 Snits H P, Cohen A, Buttler T *Anal Biochem.*, **1998**, 261: 36 ~ 42
- 27 Torto N, Marko-Varga G, Gorton L *J. Chromatogr A*, **1996**, 725: 165 ~ 175
- 28 Yokota H, Mori K, Yamaguchi H, Kaniwa H, Saisho N. *J. Pharm. Biomed Anal.*, **1999**, 21: 767 ~ 774
- 29 Chusney G D, Philippa M, Pickup J C. *Clinica Chimica Acta*, **1995**, 235: 91 ~ 99
- 30 Zhou Q, Kyazike J, Edmunds T, Higgins E *Anal Biochem.*, **2002**, 306: 163 ~ 170
- 31 Quigley M E, Englyst H N. *Analyst*, **1994**, 119: 1511 ~ 1518
- 32 Versari A, Biesenbruch S, Barbanti D, Famell P J, Galassi S *Food Chemistry*, **1999**, 66: 257 ~ 261
- 33 Koch K, Andersson R, Rydberg I, Aman P. *J. Sci Food Agric.*, **1999**, 79: 1503 ~ 1510
- 34 Hanashiro I, Abe J J, Hizukuri S *Carbohydr Res.*, **1996**, 283: 151 ~ 159
- 35 Lu T, Jane J, Keeling P L, Singletary G W. *Carbohydr Res.*, **1996**, 282: 157 ~ 170
- 36 Murray A K, Nichols R L, Sassenrath-Cole G F. *Phytochemistry*, **2001**, 57: 975 ~ 986
- 37 Kotani N, Takasaki S *Anal Biochem.*, **1997**, 252: 40 ~ 47
- 38 Kunz C, Rudloff S, Hintemann A, Pohlentz G, Egge H. *J. Chromatogr B*, **1996**, 685: 211 ~ 221
- 39 Weston R J, Brocklebank L K. *Food Chemistry*, **1999**, 64: 33 ~ 37
- 40 Talaga P, Vialle S, Moreau M. *Vaccine*, **2002**, 20: 2474 ~ 2484
- 41 Talaga P, Bellamy L, Moreau M. *Vaccine*, **2001**, 19: 2987 ~ 2994
- 42 Paula L Q, Lamb D H, Heller R, Pietrobbon P. *J. Pharm. Biomed Anal.*, **2000**, 21: 1087 ~ 1091
- 43 Koch K, Andersson R, Aman P. *J. Chromatogr A*, **1998**, 800: 199 ~ 206
- 44 Broberg S, Koch K, Andersson R, Kenne L. *Carbohydrate Polymers*, **2000**, 43: 285 ~ 289
- 45 Campa C, Oust A, Skjåk-Brock G, Paulsen B S, Paoletti S, Christensen B E, Balance S. *J. Chromatogr A*, **2004**, 1026: 271 ~ 281
- 46 Hanko V P, Rohrer J S *Anal Biochem.*, **2002**, 308: 204 ~ 209
- 47 Yu H, Ding Y, Mou S. *J. Chromatogr A*, **2002**, 966: 89 ~ 97
- 48 Hanko V P, Rohrer J S *Anal Biochem.*, **2004**, 324: 29 ~ 38
- 49 Jandik P, Clarke A P, Avdabovic N, Andersen D C, Cacia J. *J. Chromatogr B*, **1999**, 732: 193 ~ 201
- 50 Jandik P, Cheng J, Jensen D, Manz S, Avdabovic N. *J. Chromatogr B*, **2001**, 758: 189 ~ 196
- 51 Ding Y, Yu H, Mou S. *J. Chromatogr A*, **2002**, 982: 237 ~ 245
- 52 Thiele C, Ganzle M G, Vogel R F. *Anal Biochem.*, **2002**, 310: 171 ~ 178
- 53 Ding Y, Yu H, Mou S. *J. Chromatogr A*, **2003**, 997: 155 ~ 160
- 54 Rohrer J S, Thayer J, Weitzhandler M. *Glycobiology*, **1998**, 8: 35 ~ 43
- 55 Sato K, Jin J Y, Takeuchi T, Miwa T, Suenami K, Takekoshi Y, Kanno S. *J. Chromatogr A*, **2001**, 919: 313 ~ 320
- 56 Draisci R, Giannetti L, Boria P, Lucentini L, Palleschi L, Cavalli S. *J. Chromatogr A*, **1998**, 798: 109 ~ 116
- 57 Fritsch M, Geilen C C, Reutter W. *J. Chromatogr A*, **1996**, 727: 223 ~ 230

Application of High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection

Ding Yongsheng^{1,2}, Mou Shifen^{*1}

¹ (Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

² (Department of Chemical Biology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083)

Abstract The method of high performance anion exchange chromatography with pulsed electrochemical detection (HPAEC-PED) was reviewed. The content includes: the column and eluent, retain behavior of sugars and amino acids on the anion-exchange column, pulsed amperometric detection and integrated pulsed amperometric detection and the application in the analysis of sugars and amino acids.

Keywords High performance anion exchange chromatography, pulsed electrochemical detection, sugars, amino acids, review

(Received 19 September 2003; accepted 23 February 2004)