

聚酰胺-胺PAMAM树状聚合物对灯盏花素的溶解性 及其药代动力学的影响

陆珺珺, 吴正红*, 平其能

(中国药科大学药剂教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 测定聚酰胺-胺 PAMAM 树状聚合物对灯盏花素的增溶性能并探讨其增溶机制; 研究 PAMAM 树状聚合物对灯盏花素体内药代动力学的影响。测定和比较了 G1、G1.5、G2、G2.5 代 PAMAM 在不同浓度和不同 pH 时对灯盏花素的增溶量; 另将 12 只大鼠随机均分为 2 组, 每组 6 只, 分别以灯盏花素及灯盏花素-PAMAM 灌胃, 采用反相高效液相色谱法检测血浆药物浓度。在 pH 小于 7.0 时, PAMAM 树状聚合物对灯盏花素的增溶量随着 PAMAM 代数、浓度和溶液 pH 的增加而增大, 其增溶机制为灯盏花素的羧基与 PAMAM 的伯胺和叔胺发生静电作用; 灯盏花素、灯盏花素-PAMAM 口服给药的 $C_{\max}$ 分别为 (119.65 ± 9.36) 和 $(518.17 \pm 17.07) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-8 \text{ h}}$ 分别为 (370.09 ± 63.08) 和 $(1\,219.47 \pm 201.87) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, 两者具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。说明 PAMAM 能显著提高灯盏花素在水中的溶解度; 大大改善灯盏花素口服给药的生物利用度。

关键词: 聚酰胺-胺; PAMAM 树状聚合物; 灯盏花素; 增溶; 药代动力学

中图分类号: R943.4

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 02-0197-06

The effect of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on the solubility and pharmacokinetics of breviscapine

LU Jun-jun, WU Zheng-hong*, PING Qi-neng

(Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: To study the solubilization of breviscapine with polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and probe the solubilizing mechanism and investigate the influence of PAMAM dendrimers on the pharmacokinetics of breviscapine, the solubilization of breviscapine by PAMAM dendrimers of generations G1, G1.5, G2 and G2.5 with different concentrations were determined and compared in different pH conditions. Twelve rats randomized into 2 groups were separately orally administered breviscapine and breviscapine combining with PAMAM. Drug in plasma was extracted and determined with HPLC. In pH condition lower than 7.0, the solubilization of breviscapine by PAMAM dendrimers enhanced as the generation and concentration of PAMAM dendrimers as well as the pH increased. Its solubilizing mechanism involves an electrostatic interaction between the carboxyl group of breviscapine and the primary amines and tertiary amines of PAMAM dendrimers. The pharmacokinetics parameters $C_{\max}$ and $\text{AUC}_{0-8 \text{ h}}$ of breviscapine were $(119.65 \pm 9.36) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(370.09 \pm 63.08) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$. For breviscapine combined with PAMAM dendrimers, the $C_{\max}$ and $\text{AUC}_{0-8 \text{ h}}$ were $(518.17 \pm 17.07) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(1\,219.47 \pm 201.87) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. There were significant differences of $\text{AUC}_{0-8 \text{ h}}$ between breviscapine and breviscapine combined with PAMAM dendrimers ($P < 0.01$). PAMAM dendrimers can greatly increase the solubility of breviscapine in water and can improve the oral bioavailability of breviscapine significantly.

收稿日期: 2008-10-16.

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(06-07ZP21).

*通讯作者 Tel: 13057665381, E-mail: zhenghongwu66@yahoo.com.cn

Key words: polyamidoamine; PAMAM dendrimers; breviscapine; solubilization; pharmacokinetics

树状聚合物 (dendrimers) 是一种人工合成的大分子物质, 最早由美国化学家 Tomalia 博士^[1]于 20 世纪 80 年代初发明合成。该聚合物与传统的聚合物相比, 可在纳米水平上严格控制设计分子大小、结构和表面基团, 因而具有精确的分子结构、致密的球状外形、良好的单分散性和极好的水溶性。树状聚合物作为药物载体, 具有良好的生物相容性和可生物降解性, 药物被包裹在聚合物结构中, 通过静电吸引或共价键连接在聚合物末端功能基团上, 从而提高药物的溶解度, 并提高其生物利用度^[2]。这些均使它们极有希望成为新一代的药物载体和难溶性药物的增溶剂。

在高浓度和长时间孵化时, G3 和 G4 代树状聚合物对 Caco-2 细胞单层有细胞毒性, 而 G0, G1 和 G2 代没有细胞毒性^[3]。G1、G1.5、G2、G2.5 代 PAMAM 的结构特征^[4]见表 1。G1 代和 G1.5 代 PAMAM 的分子结构如图 1 所示。

Table 1 Theoretical characteristics of ethylenediamine core PAMAM dendrimers

Generation	Molecular weight	Diameter	No. of tertiary amines	No. of surface groups	Surface group
1	1 430	1.9	6	8	-NH ₂
2	3 256	2.6	14	16	-NH ₂
1.5	2 809	—	14	16	-COOCH ₃
2.5	5 978	—	30	32	-COOCH ₃

—: Not available

灯盏花素 (breviscapine) 是从菊科植物灯盏细辛中提取的黄酮类成分, 其主要有效成分为灯盏乙素 (scutellarin), 即 4', 5, 6-三羟基黄酮-7-葡萄糖苷。灯盏花素具有扩张血管、改善微循环、增加动脉流量和抑制血小板聚集等作用, 对治疗冠心病、脑血栓、偏瘫及中风后遗症等有确切疗效。但因灯盏花素脂溶性和水溶性都很差, 口服给药几乎不吸收^[5], 生物利用度低。

以灯盏花素为模型, 研究 PAMAM 树状聚合物对灯盏花素增溶的影响, 探讨可能的增溶机制, 并进一步研究大鼠灌胃灯盏花素及其灯盏花素-PAMAM 后的体内药代动力学行为, 验证包合物是否能够改善灯盏花素的吸收, 探索 PAMAM 树状聚合物成为灯盏花素转运载体的可能性。

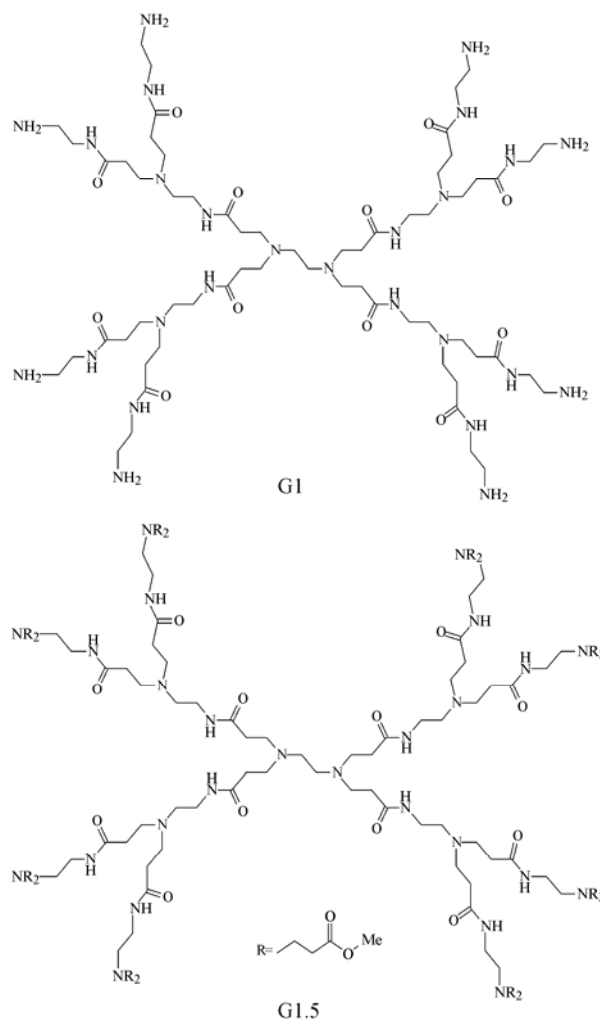


Figure 1 Molecular structures of PAMAM dendrimers with amine (G1) and ester (G1.5) terminated surface functional groups

材料与方法

药品与试剂 G1、G1.5、G2、G2.5 代 PAMAM (华东理工大学提供); 灯盏乙素对照品野黄芩苷 (中国药品生物制品检定所提供); 灯盏花素 (云南玉溪万方天然药物有限公司, 含灯盏乙素 90.28%); 甲醇为色谱纯 (山东禹王实业有限公司化工分公司); 磷酸, 柠檬酸, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, 氢氧化钠等均为分析纯 (南京化学试剂有限公司)。

仪器 SPD-10A、LC-10AT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); XW-80A 旋涡混合仪 (上海医科大学仪器制造厂); TGL 16G 高速台式离心机 (上海医科大学仪器厂); BRUKER AV-300 核磁共振仪。

动物 SD 大鼠, 雄性, 体重(250 ± 20) g, 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 合格证号:

SCXK(沪)2003-0003。

不同代数 PAMAM 树状聚合物对灯盏花素的增溶性能的影响

灯盏花素标准曲线的绘制 精密称取灯盏乙素对照品适量, 甲醇溶解定容, 得灯盏乙素对照品的贮备液, 并稀释成不同浓度, 使其质量浓度分别为 0.01、0.1、1、10、50、300 mg·mL⁻¹, 进样量 20 μL。

PAMAM 树状聚合物对灯盏花素的最大包含量 取 4×10^{-6} mol G1、G1.5、G2、G2.5 代 PAMAM, 用双蒸水 10 mL 溶解, 加入过量灯盏花素, 于 30 °C 恒温水浴中振荡 24 h。移取混悬液 800 μL, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 移取上清液 100 μL, 用流动相适当稀释后取 20 μL 进样。

不同浓度 PAMAM 树状聚合物在不同 pH 时对灯盏花素增溶性能的测定 在 pH 分别为 3.0 和 4.0 的 McIlvaine 缓冲液 (不同比例的 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸和 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液, 用氯化钾将离子强度调至 0.5 mol·L⁻¹)、水和磷酸盐缓冲液 (0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠和 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液, pH 12.0) 中, 测定不同浓度 PAMAM-G1、PAMAM-G1.5、PAMAM-G2 和 PAMAM-G2.5 溶液对灯盏花素的增溶量。将过量灯盏花素分别加入 1 mL 上述各溶液中, 于 30 °C 恒温水浴中振荡 24 h。移取混悬液 800 μL, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 移取上清液 100 μL, 用流动相适当稀释后取 20 μL 进样。

¹H NMR 分析 采用 BRUKER AV-300 核磁共振仪, 以氘代 DMSO 为溶剂, 对灯盏花素、PAMAM-G2、PAMAM-G2.5、PAMAM-G2-灯盏花素和 PAMAM-G2.5-灯盏花素进行 ¹H NMR 分析。

灯盏花素及灯盏花素-PAMAM 大鼠体内药代动力学研究

色谱条件 色谱柱: Shimadzu VP-ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: KH₂PO₄ 缓冲液 (20% 磷酸调 pH 2.5)-乙腈 (80:20); 柱温: 30 °C; 检测波长: 334 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。

血浆样品的处理 精密移取血浆样品 0.2 mL 置 1.5 mL 具塞样品管中, 加入 20% 磷酸 50 μL 涡旋 3 min, 混合均匀, 酸化 20 min 后, 加入甲醇 0.4 mL 涡旋 3 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液转移入另一离心管中于 40 °C 水浴吹干。吹干后的样品加流动相 200 μL 溶解, 涡旋 3 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进样。

标准曲线的绘制 精密称取灯盏乙素对照品适量, 甲醇溶解定容, 得灯盏乙素对照品的贮备液,

并稀释成不同浓度。精密量取一定体积的不同浓度灯盏乙素对照品溶液至 6 支含有 0.2 mL 大鼠空白血浆的离心管中, 使其血药浓度依次为 10、20、50、100、200 和 600 ng·mL⁻¹, 按血浆样品处理方法操作。

方法回收率和精密度实验 精密量取一定体积不同浓度的灯盏乙素对照品溶液至 0.2 mL 大鼠空白血浆中, 配制成低、中、高 3 种浓度, 即分别含灯盏乙素 20、100 和 600 ng·mL⁻¹, 按血浆样品处理方法操作, 依法测定回收率。另同上法准确配制以上 3 个浓度的血浆样品, 测定日内与日间 (3 d) 精密度。

灯盏花素及灯盏花素-PAMAM 大鼠体内药代动力学实验 大鼠 12 只, 给药前禁食 12 h, 不禁水, 随机分为 2 组, 即灯盏花素组和灯盏花素-PAMAM 组, 灯盏花素均匀混悬于水中, 以 25 mg·kg⁻¹ 灌胃 (以灯盏乙素计), 灯盏花素-PAMAM 水溶液 (灯盏花素与 G2-PAMAM 的摩尔比为 16:1) 以相同剂量灌胃, 两给药组分别在 5、10、20、30、40、60、120、240、300、360、420 和 480 min 于眼眶后静脉丛取血 0.5 mL, 高速离心取血浆, 于 -20 °C 冰箱保存待测。

结果

1 不同代数 PAMAM 树状聚合物对灯盏花素的增溶性能的影响

1.1 灯盏花素标准曲线 以测定的灯盏乙素峰面积 (A) 为纵坐标, 浓度 (C) 为横坐标进行线性回归, 得直线方程: $A = 130.08C - 672.41$, $R^2 = 0.9993$ 。结果表明, 灯盏乙素浓度在 0.01~300 mg·mL⁻¹ 与峰面积有良好的线性关系。

1.2 PAMAM 树状聚合物对灯盏花素的最大包含量 各代 PAMAM 树状聚合物对灯盏花素的最大包含量见表 2, 由表可知, PAMAM 对灯盏花素的包合能力随代数的增加而增大。

Table 2 The number of breviscapine molecules per PAMAM dendrimer molecule mostly involving

The generation of PAMAM dendrimers	The number of breviscapine molecules
G1	4
G1.5	5
G2	16
G2.5	18

1.3 不同浓度 PAMAM 树状聚合物在不同 pH 时对灯盏花素增溶性能 不同浓度 PAMAM-G1、PAMAM-G1.5、PAMAM-G2 和 PAMAM-G2.5 溶液在不同 pH 时对灯盏花素的增溶量见图 2。随着 pH 的增加以及 PAMAM 树状聚合物浓度和代数的增加, 灯盏花素的增溶量也增大。在 pH 为 3.0、4.0 及水中, 增溶量与 PAMAM 的浓度呈线性相关。在 pH 为 12.0 时, 各数据间无明显规律, 主要由于在强碱性条件下, 大部分灯盏花素成盐后溶解度增大。半代 PAMAM (G1.5 代) 的增溶能力明显比整代 PAMAM (G2 代) 小。

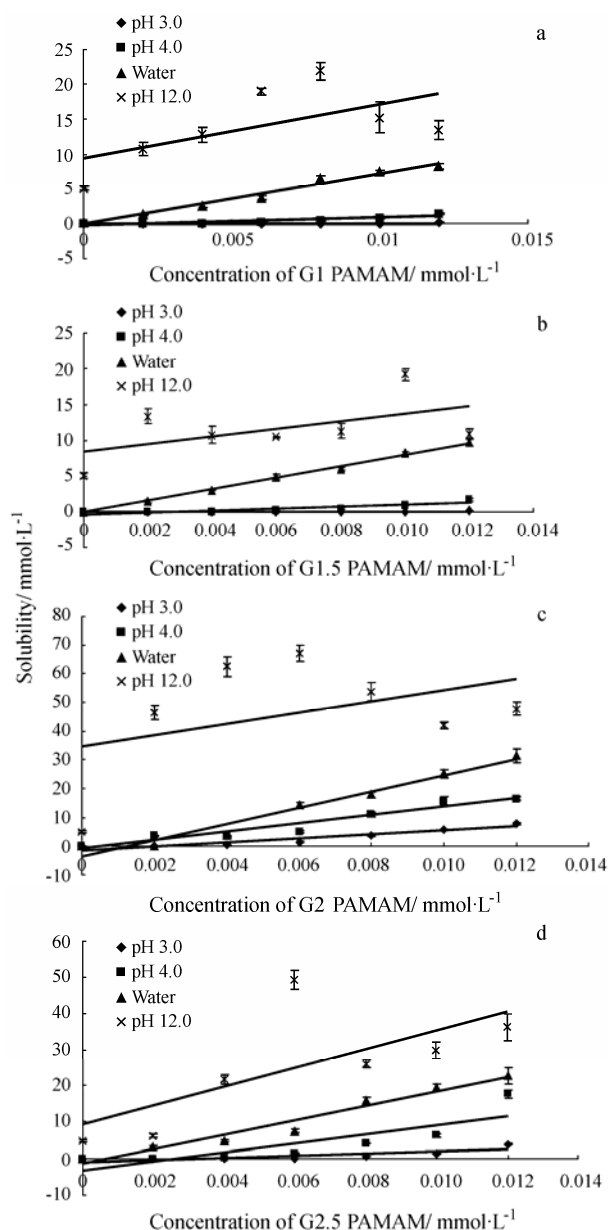


Figure 2 Solubility profiles of breviscapine in the presence of increasing concentrations of PAMAM dendrimers: (a) G1; (b) G1.5; (c) G2; and (d) G2.5

1.4 核磁共振分析 灯盏花素以及 PAMAM-G2、PAMAM-G2.5、PAMAM-G2 或 PAMAM-G2.5 与灯盏花素的混合物的 ^1H NMR 数据如下。核磁共振分析结果表明, 灯盏花素羧基上的氢 (δ 7.91~7.96) 在灯盏花素与 PAMAM 结合后消失, 可推断灯盏花素分子的羧基与 PAMAM 发生作用。

灯盏花素 7.96~7.91 (1H, s, COOH), 6.99~6.46 (6H, s, C₆H₄, C₆H), 5.51~5.21 (6H, s, OH), 4.07~3.33 (5H, d, CH); G2: 4.71 (28H, s, NH), 3.26~2.62 (228H, t, CH₂), 2.56~2.32 (32H, s, NH₂); G2-灯盏花素 7.32~5.85 (6H, s, C₆H₄, C₆H), 4.71~4.45 (s, NH), 2.74~2.48 (s, NH₂); G2.5: 4.70~4.69 (28H, s, NH), 3.63~2.66 (456H, t, CH₂), 2.56~2.34 (96H, s, CH₃); G2.5-灯盏花素 7.02~5.84 (6H, s, C₆H₄, C₆H), 4.85~4.71 (s, NH)。

2 灯盏花素及灯盏花素-PAMAM 大鼠体内药代动力学

2.1 标准曲线与最低定量限 以测定的灯盏乙素峰面积 (A) 为纵坐标, 浓度 (C) 为横坐标进行线性回归, 得直线方程: $A = 135.42C - 753.89$, $R^2 = 0.9992$ 。结果表明, 血浆中灯盏乙素质量浓度在 20~600 ng·mL⁻¹ 与峰面积有良好的线性关系。本法测定血浆中灯盏乙素的最低定量限为 20 ng·mL⁻¹。

2.2 方法回收率和精密度 测定血浆中 20、100 和 600 ng·mL⁻¹ 3 种不同浓度的灯盏乙素的回收率分别为 (98.7 ± 4.21)%、(97.5 ± 5.42)% 和 (95.8 ± 2.67)%。日内 RSD 分别为 5.12%、3.08% 和 3.75%; 日间 RSD 分别为 6.73%、4.06% 和 4.48%。

2.3 灯盏花素及灯盏花素-PAMAM 大鼠体内药代动力学 大鼠单剂量灌胃灯盏花素及灯盏花素-PAMAM 后, 主要成分灯盏乙素的平均血药浓度经时曲线见图 3。

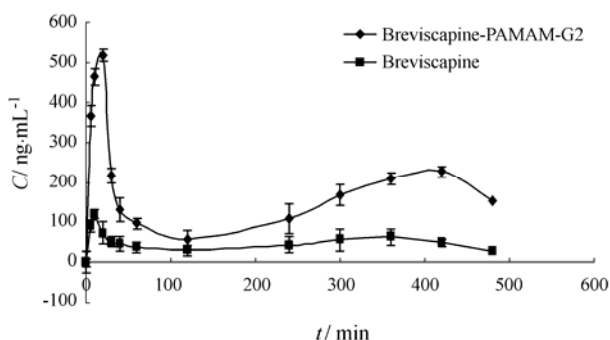


Figure 3 Mean plasma concentration-time curve of breviscapine in rats after ig administration of breviscapine and breviscapine-PAMAM-G2 at single dose

Table 3 Pharmacokinetic parameters of breviscapine and breviscapine-PAMAM-G2 ($n = 6$)

Parameter	$T_{\max}/\text{min}$	$C_{\max}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{AUC}_{0-8\text{h}}/\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	Relative bioavailability
Breviscapine	10	119.65 ± 9.36	370.09 ± 63.08	330%
Breviscapine-PAMAM-G2	20	518.17 ± 17.07	1219.47 ± 201.87	

由于灯盏乙素的药时曲线存在双峰现象, 不宜采用中国药理学学会 3P97 实用药代计算程序中的房室模型进行处理。 $C_{\max}$, $T_{\max}$ 直接由血药浓度曲线得到, AUC_{0-t} 直接由对数梯形法求得。同时以灯盏花素混悬剂为参比计算灯盏花素-PAMAM 的相对生物利用度 F , 结果见表 3。由表 3 可知, 灯盏花素-PAMAM 的达峰时间 $T_{\max}$ 相对推迟, $C_{\max}$ 是单独灯盏花素的 4.33 倍, $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ 是单独灯盏花素的 3.30 倍。灯盏花素与 PAMAM 共同给药后其吸收得到显著改善。相对生物利用度中灯盏花素的生物利用度定义为 100%。

讨论

测定 PAMAM 树状聚合物对灯盏花素的增溶性时, 是在 pH 为 3.0 和 4.0 的 McIlvaine 缓冲液和 pH 为 12.0 的磷酸盐缓冲液^[6]中进行, 而不是用 HCl 和 NaOH 来调节 pH。若用 HCl 和 NaOH 调节溶液 pH, 加入灯盏花素和 PAMAM 树状聚合物后, 溶液的 pH 极易发生改变, 所以选择在缓冲能力较好的缓冲液中进行。

树状聚合物和药物分子的结合机制一般分为 3 种: 包埋、静电作用和共价结合^[2]。PAMAM 内部含有大量酰胺和叔胺, 伯胺的 pK_{a} 为 7~9, 叔胺的 pK_{a} 为 3~6, 靠近内核的叔胺比靠近表面的叔胺 pK_{a} 低^[1, 7, 8]。 pK_{a} 的不同意味着聚合物内部和表面的解离状态将会随着 pH 的改变而改变。整代的 PAMAM 树状聚合物 (G1, G2 代) 的表面基团为伯胺, 灯盏花素是含有羧基的弱酸性药物, 所以其增溶量与 PAMAM 带正电的伯胺和带负电的灯盏花素分子的静电作用有关, 静电作用的程度取决于溶液的 pH。在 pH 3.0、4.0 和水中, PAMAM ($\text{pK}_{\text{a}} < 9$) 都处于阳离子状态, 增溶量将取决于灯盏花素的解离量。灯盏花素 pK_{a} 为 3.29, 在 pH 3.0 时, 解离量小, 导致最小的增溶量。在 pH 4.0 时, 灯盏花素解离量增大, 增溶量也随之增大。在水中, 灯盏花素解离更完全, 增溶达到最大。在 pH 12.0 时, 无明显趋势, 可能是由于灯盏花素在强碱性环境下溶解度增加并发生解离所致。对于半代的 PAMAM 树状聚合物 (G1.5, G2.5 代), 其增溶量比其对应的整代 PAMAM 小得多。半代的 PAMAM

表面为羧基基团, 不可能与灯盏花素的羧基形成静电吸引, 灯盏花素只能与 PAMAM 内部的叔胺形成静电吸引, 使增溶能力下降。

灯盏花素的口服吸收存在双峰现象。其原因可能是小肠上段存在乳糖根皮苷水解酶, 它可将黄酮苷类水解为苷元, 苷元脂溶性增加, 因而易于吸收, 形成第 1 个吸收峰^[9], 第 2 个吸收峰在 6 h 左右, 此时药物可能已到达大鼠结肠部位, 结肠内存在大量菌群产生很多水解酶类, 如 β -葡萄糖酶、 β -葡萄糖醛酸酶等, 可将黄酮苷类水解为苷元后吸收入血^[10, 11], 形成第 2 个吸收峰。也有人认为黄酮类口服双峰吸收现象是由肠肝循环引起的^[12]。灯盏花素-PAMAM 的第 1 达峰时间和第 2 达峰时间均延迟, 可能是由于灯盏花素被包合于 PAMAM 后, PAMAM 对它有一定的缓释作用。灯盏花素-PAMAM 与灯盏花素相比吸收显著增加, 除了提高其溶解度外, 还可能有其他促吸收机制。有文献^[13]报道, 树状聚合物可以绕过药物外流转运载体、抑制 P-糖蛋白和多元抗药性 (multi-drug resistance, MDR) 蛋白, 从而提高药物口服制剂的生物利用度。本课题组研究发现, 多药耐药相关蛋白 (MRP2) 对灯盏花素的外排作用是灯盏花素吸收差的重要原因之一, PAMAM 是否因为抑制了 MRP2 的外排作用, 从而提高灯盏花素的吸收, 这方面正在进一步地研究。

References

- [1] Tomalia DA. A new class of polymers: starburst dendritic macromolecules [J]. Polym J, 1985, 17: 117-132.
- [2] D'Emanuele A, Attwood D. Dendrimer-drug interactions [J]. Adv Drug Deliv Rev. 2005, 57: 2147-2162.
- [3] El-Sayed M, Ginskib M, Rhodesb C, et al. Transepithelial transport of poly (amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers [J]. J Control Release, 2002, 81: 355-365.
- [4] Esfand R, Tomalia DA. Dendrimers and Other Dendritic Polymers [M]. New York: John Wiley, 2001: 589-604.
- [5] Ge QH, Zhou Z, Zhi XJ, et al. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of breviscapine in Beagle dogs [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2003, 34: 618-620.
- [6] Devarakonda B, Hill RA, Liebenberg W, et al. Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble

- niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins [J]. *Int J Pharm*, 2005, 304: 193–209.
- [7] Ottaviani MF, Montalti F, Romanelli M, et al. Characterization of starburst dendrimers by EPR.4. Mn(II) as a probe of interphase properties [J]. *J Phys Chem* 1996, 100: 11033–11042.
- [8] Chen W, Tomalia DA, Thomas LJ. Unusual pH dependent polarity changes in PAMAM dendrimers: evidence for pH-responsive conformational changes [J]. *Macromolecules*, 2000, 33: 9169–9172.
- [9] Andrea JD, Jennifer MG, Susan DP, et al. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65: 1199–1206.
- [10] Tang CH, Peng ZY. Advance in flavonoids. (III)-study on its absorption, metabolism and excretion [J]. *China Food Additives* (中国食品添加剂), 2002, 2: 14–19.
- [11] Bowey E, Adlercreutz H, Rowland I. Metabolism of isoflavones and ligands by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41: 631–636.
- [12] Jeff S, Lori C, Marion K, et al. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats [J]. *J Nutr*, 1997, 127: 1260–1268.
- [13] D'Emanuele A, Jevprasesphant R, Penny J, et al. The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability [J]. *J Control Release*, 2004, 95: 447–453.