

文章编号: 1004-4353(2023)01-0083-06

高效液相色谱法测定复方氨基酸胶囊(8-11)中氨基酸的含量

全迎新¹, 邓代武¹, 金彪², 金东日¹

(1. 延边大学 理学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学 分析测试中心, 吉林 延吉 133002)

摘要: 以 1-(5-氟-2,4-二硝基-苯基)-4-甲基哌嗪(PPZ)为衍生化试剂,建立了一种测定氨基酸含量的柱前衍生化的高效液相色谱法(HPLC)。色谱条件:采用 Cica-reagent Mightysil RP-18 GP(3 μ m, 150 mm \times 4.6 mm)色谱柱,流动相为甲醇和水的混合液(甲醇和水的体积比为 1:1 且混合液中含体积分数为 0.2% 的甲酸),流速为 0.3 mL/min,紫外检测波长为 354 nm,进样体积为 2 μ L。衍生化条件:温度为 40 $^{\circ}$ C,反应时间为 3 h,氨基酸与衍生化试剂的摩尔比为 1:10。对复方氨基酸胶囊(8-11)中的 8 种氨基酸进行测定显示,在 0.5~1 000 μ mol/L 浓度范围内工作曲线呈良好线性关系,且最低检测限为 0.5~5.0 μ mol/L,加标平均回收率为 90.0%~104.3%,相对标准偏差为 0.57%~2.29%。由此表明该方法具有良好的灵敏度、重复性和准确度,可用于测定药物中氨基酸的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 氨基酸含量; 柱前衍生化; 复方氨基酸胶囊(8-11)

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

Determination of amino acids in compound amino acid capsule (8-11) by high performance liquid chromatography

QUAN Yingxin¹, DENG Daiwu¹, JIN Biao², JIN Dongri¹

(1. College of Science, Yanbian University, Yanji 133002, China;

2. Analysis and Testing Center, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: A pre-column derivatization method for the determination of amino acids by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed using 1-(5-fluoro-2,4-dinitro-phenyl)-4-methylpiperazine (PPZ) as derivatization reagent. Chromatographic conditions: the chromatographic column of Cica-reagent Mightysil RP-18 GP (3 μ m, 150 mm \times 4.6 mm) was used, with mobile phase methanol and water volume ratio 1:1 (0.2% formic acid by volume), flow rate of 0.3 mL/min, UV detection wavelength of 354 nm, and injection volume of 2 μ L. The derivatization conditions was 40 $^{\circ}$ C, the reaction time was 3 h, and the molar ratio of amino acids to derivatization reagents was 1:10. The analytical determination of the eight amino acids in the compound amino acid capsules (8-11) showed good linearity in the range of 0.5–1 000 μ mol/L, and the minimum detection limits was 0.5–5.0 μ mol/L. The average spiked recoveries was 90.0%–104.3%, and the relative standard deviations was 0.57%–2.29%. This method showed that the method has good sensitivity, reproducibility and accuracy and can be used for the determination of amino acids in drugs.

Keywords: high performance liquid chromatography; amino acid content; pre-column derivatization; compound amino acid capsule (8-11)

收稿日期: 2022-11-02

基金项目: 国家自然科学基金(22064017)

第一作者: 全迎新(1999—),女,硕士研究生,研究方向为药物分析。

通信作者: 金东日(1965—),男,博士,教授,研究方向为药物分析。

0 引言

氨基酸是人体蛋白质的主要组成部分,具有促进大脑发育、防止细胞退化等生理功能^[1]. 研究显示,人体缺乏氨基酸会引发多种疾病^[2]. 复方氨基酸胶囊(8-11)含有 8 种人体必需氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸和甲硫氨酸)和 11 种维生素,对促进营养组织细胞生长和由氨基酸缺乏导致的蛋白质合成障碍等具有良好的改善效果^[3]. 目前,测定氨基酸的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[4]、薄层色谱法(TLC)^[5]、毛细管电泳法(CE)^[6]等,其中 HPLC 因具有灵敏度高和适用范围广等优点而被广泛应用^[7]. 但由于氨基酸具有极性高、挥发性低以及大部分氨基酸不具有生色基团的特性,因此对其分离和检测存在一定困难^[8]. 目前,一般采用衍生化试剂对氨基酸进行衍生化来提高其检测灵敏度,通常使用的衍生化试剂主要有异硫氰酸苯酯^[9-10]、邻苯二甲醛^[11-12]、2,4-二硝基氟苯^[13-14]等. 其中 2,4-二硝基氟苯也称为桑格(Sanger)试剂,目前已被用于鉴定多肽或蛋白质的 N-末端氨基酸^[15-16]. 2020 年,邓红英等^[8]采用桑格试剂测定了复方氨基酸注射液中的氨基酸含量,但由于该衍生化试剂存在副产物干扰较强等问题而限制了其在氨基酸分析中的应用. 为此,本文采用类桑格试剂 1-(5-氟-2,4-二硝基-苯基)-4-甲基哌嗪(PPZ)作为衍生化试剂,并以此建立了一种测定氨基酸含量的柱前衍生化的高效液相色谱法.

1 实验部分

1.1 仪器

SPD-16 高效液相色谱仪,岛津公司; AV-300 超导核磁共振仪,布鲁克公司; 高效液相色谱-质谱联用仪,安捷伦科技有限公司; N-100 旋转蒸发仪,上海爱朗仪器制造有限公司; XW-80 旋涡混合器,上海驰唐电子有限公司; HB-100 恒温金属浴,杭州大和热磁电子有限公司; TGL-15B 离心机,上海安亭科学仪器厂; 0.46 μm 有机相微孔滤膜,上海安谱科学仪器有限公司; pH 值测试仪、电子天平,上海奥豪斯仪器有限公司.

1.2 材料

乙腈(分析纯),上海安谱科技实验科技股份有限公司; 碳酸氢铵(分析纯),上海斯信生物科技有限公司; 甲醇(色谱级)、甲酸(色谱级),北京伊诺凯试剂有限公司; 缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸:均为分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 亮氨酸(分析纯),上海皓鸿生物医药科技有限公司; 色氨酸(分析纯),上海吉尔生化有限公司; 二氯甲烷(分析纯),大茂化学试剂科技有限公司; N-甲基哌嗪(分析纯),上海 TCI 化学试剂有限公司; 1,5-二氟-2,4-二硝基苯(分析纯),东京化成工业株式会社; 硅胶(37~48 μm),青岛海洋化工厂分厂; 聚丙烯离心管,上海科进生物技术有限公司; 复方氨基酸胶囊(8-11),深圳万和制药有限公司; 移液枪,德国普兰德有限公司.

1.3 衍生化试剂 PPZ 的合成及表征

本文按照文献^[17]的方法合成衍生化试剂 PPZ. 在含有 1 mL 乙腈的圆底烧瓶中加入 1,5-二氟-2,4-二硝基苯(100 mg, 0.5 mmol),然后在搅拌下逐滴加入 28 μL (0.3 mmol) 的 N-甲基哌嗪; 室温下搅拌 30 min,柱层析洗脱浓缩物(洗脱液为二氯甲烷和甲醇混合液(体积比为 20:1))后去溶剂得黄色固体 60.5 mg,产率为 71%. ESI-MS: m/z 285 $[\text{M} + \text{H}]^+$. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), 2.37(s, 3H), 2.59(t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.29(t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 6.79(d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.71(d, $J = 9.0$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD), 158.3(d, $J = 159.8$ Hz), 150.2(d, $J = 7.5$ Hz), 134.4, 127.4(d, $J = 5.3$ Hz), 126.5, 107.7(d, $J = 15.8$ Hz), 53.8, 49.7, 44.5.

1.4 溶液的配制

衍生化试剂:称取 28.4 mg 的 PPZ 置于 10 mL 的容量瓶中,加入乙腈和水的混合溶液(体积比为 22:78)将其溶解并定容至 10 mL,由此得到 10 mmol/L 的 PPZ 标准溶液.

标准对照溶液:首先分别称取 13.1 mg 亮氨酸(Leu)、13.1 mg 异亮氨酸(Ile)、20.4 mg 色氨酸(Trp)、11.7 mg 缬氨酸(Val)、14.9 mg 甲硫氨酸(Met)、16.5 mg 苯丙氨酸(Phe)、11.9 mg 苏氨酸

(Thr)、14.6 mg 赖氨酸(Lys)置于 10 mL 的容量瓶中,然后分别用乙腈和水的混合溶液(体积比为 22 : 78)将其稀释至 10 mL,由此得到 8 种 10 mmol/L 的标准氨基酸溶液。

分别取上述 Lys、Thr、Trp、Phe、Val、Met、Leu、Ile 标准溶液 10 μ L 置于聚丙烯管,然后再加入 20 μ L 乙腈和水的混合溶液(体积比为 22 : 78),由此得到 1 mmol/L 的 8 种混合标准氨基酸溶液。

供试品溶液:取复方氨基酸胶囊(8-11)1 粒(0.35 g/粒),将内容物倾出后研磨成细粉;称取 0.175 g 细粉置于 100 mL 容量瓶内,加入适量乙腈和水的混合溶液(体积比为 22 : 78)后超声 20 min 使其溶解,并定容至刻度;离心 15 min(8 000 r/min),上清液用 0.46 μ m 的微孔滤膜过滤,所得溶液即为供试品溶液。

缓冲溶液:称取碳酸氢铵 1 mmol 置于 100 mL 容量瓶内,用超纯水将其定容至 100 mL 后即得 pH 为 8.49 的碳酸氢铵缓冲溶液。

上述所有溶液均在 4 $^{\circ}$ C 下密封保存。

1.5 通用衍生化反应

分别取 1 mmol/L 的氨基酸(10 μ L)、碳酸氢铵缓冲溶液(25 μ L)和 10 mmol/L 的衍生化试剂 PPZ(10 μ L)置于 1.5 mL 的聚丙烯管中,用旋涡混合器振荡 1 min 后将试管放入恒温(40 $^{\circ}$ C)金属浴装置内反应 3 h。

1.6 色谱条件

色谱柱为 Mightysil RP-18 GP (3 μ m, 150 mm \times 4.6 mm);流动相为甲醇和水的混合液(甲醇和水的体积比为 1 : 1,且混合液中含体积分数为 0.2%的甲酸);流速为 0.3 mL/min;柱温为 25 $^{\circ}$ C;UV 检测波长为 354 nm;进样体积为 2 μ L。

2 结果与分析

2.1 衍生化反应的条件

图 1 为 PPZ 与氨基酸的反应式。在碱性条件下,氨基酸 α -氨基的 N 端攻击 PPZ 的含氟碳,由此生成稳定的氨基酸衍生物。本文以 Trp、Thr 和 Met 来探究反应温度、反应时间和反应摩尔比对该衍生化反应的影响。

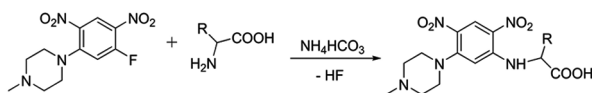


图 1 PPZ 与氨基酸的反应式

2.1.1 反应时间的确定

在反应温度为 40 $^{\circ}$ C、氨基酸与衍生化试剂的摩尔比为 1 : 10 的条件下,选取不同的反应时间(分别为 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4 h)对 Trp、Thr 和 Met 的衍生化反应进行考察。由图 2 可以看出,当反应时间为 3 h 时衍生化产物的收率最大,因此本文确定最佳反应时间为 3 h。

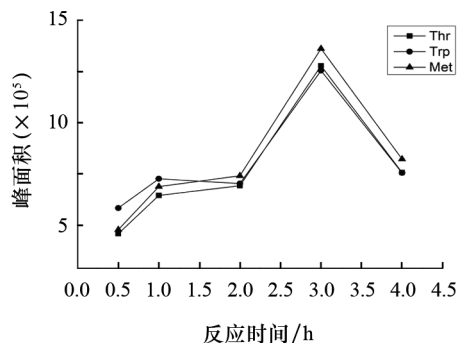


图 2 反应时间对衍生化反应的影响

2.1.2 反应温度的确定

在反应时间为 3 h,氨基酸与衍生化试剂的摩尔比为 1 : 10 的条件下,选取不同的反应温度(分别为 25、30、35、40、45 $^{\circ}$ C)对 Trp、Thr 和 Met 的衍生化反应进行考察。由图 3 可以看出,在 40 $^{\circ}$ C 下衍生化产物的收率最大,因此本文确定最佳反应温度为 40 $^{\circ}$ C。

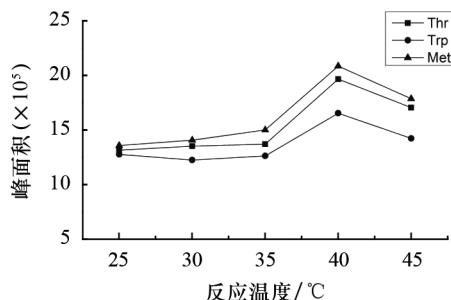


图 3 反应温度对衍生化反应的影响

2.1.3 反应摩尔比的确定

在反应温度为 40 $^{\circ}$ C、反应时间为 3 h 的条件

下,选取不同浓度的衍生化试剂(2、5、10、20、30 mmol/L)与 Trp、Thr 和 Met(1 mmol/L)分别进行衍生化反应(氨基酸与衍生化试剂的摩尔比分别为 1:2、1:5、1:10、1:20、1:30).由图 4 可以看出,当氨基酸与衍生化试剂的摩尔比为 1:10 时衍生化产物的收率最大,因此本文确定最佳反应摩尔比为 1:10.

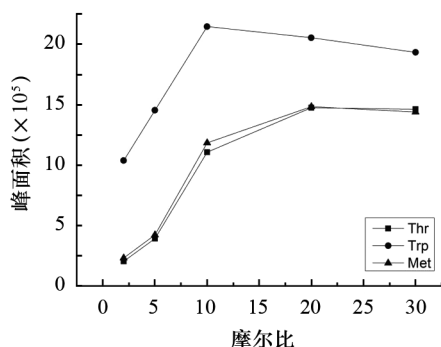
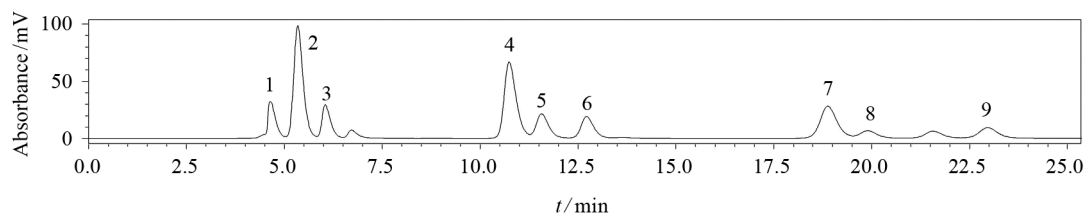


图 4 反应摩尔比对衍生化反应的影响

2.1.4 色谱分离条件的确定

根据优化的衍生化反应条件对 8 种标准混合氨基酸衍生物进行了 HPLC 分析,结果如图 5 所示.由图 5 可以看出,当流动相中的甲醇和水的体积比为 1:1 时,8 种氨基酸的分离效果最好.



1 为 Lys-PPZ, 2 为 PPZ, 3 为 Thr-PPZ, 4 为 Trp-PPZ, 5 为 Met-PPZ, 6 为 Val-PPZ, 7 为 Phe-PPZ, 8 为 Ile-PPZ, 9 为 Leu-PPZ

图 5 8 种标准氨基酸衍生物的 HPLC 图

表 1 8 种氨基酸的线性范围、线性方程、相关系数和最低检测限

氨基酸	线性范围/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	线性方程	相关系数	检出限/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
Lys	0.5~1 000	$y = 608x + 11\,973$	0.998 3	0.5
Thr	2.5~1 000	$y = 673x + 1098$	0.995 8	2.5
Trp	1.0~1 000	$y = 1\,871x + 13\,445$	0.999 6	1.0
Met	1.0~1 000	$y = 663x + 13\,346$	0.996 5	1.0
Val	1.0~1 000	$y = 661x + 15\,210$	0.997 5	1.0
Phe	1.0~1 000	$y = 1\,190x + 19\,099$	0.997 0	1.0
Ile	5.0~1 000	$y = 260x + 1\,825$	0.998 8	5.0
Leu	1.0~1 000	$y = 276x + 1\,969$	0.998 9	1.0

2.1.5 线性关系与检出限

根据优化的衍生化反应和色谱分离条件,在 0.5~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内对 8 种氨基酸进行了衍生化反应.以氨基酸的浓度(x)为横坐标,以对应的衍生化产物的色谱峰面积(y)为纵坐标,得到了 8 种氨基酸的工作曲线、线性方程、相关系数及检出限(LOD),见表 1.本文以各组分信噪比满足 3:1 为检出限.

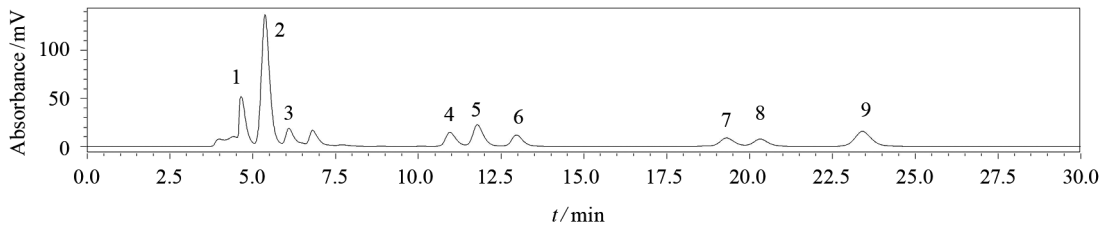
2.2 复方氨基酸胶囊(8-11)的 HPLC 分析

根据优化的衍生化反应和色谱分离条件对复方氨基酸胶囊(8-11)中的 8 种氨基酸衍生物进行 HPLC 分析,结果见图 6.由图 6 可以看出,当流动相中的甲醇和水的体积比为 1:1 时,8 种氨基酸的分离效果最好.

2.3 方法学研究

2.3.1 样品含量的测定及重复性试验

根据优化的衍生化反应和色谱分离条件对复方氨基酸胶囊(8-11)中的 8 种氨基酸衍生物进行 HPLC 分析,平行 3 次,并计算复方氨基酸胶囊样品中各氨基酸的质量,结果见表 2.由表 2 可以看出,测定结果的 RSD 为 0.18%~0.65%,这表明本文方法的重复性良好.



1 为 Lys-PPZ, 2 为 PPZ, 3 为 Thr-PPZ, 4 为 Trp-PPZ, 5 为 Met-PPZ, 6 为 Val-PPZ, 7 为 Phe-PPZ, 8 为 Ile-PPZ, 9 为 Leu-PPZ

图 6 复方氨基酸胶囊(8-11)衍生物的 HPLC 图

表 2 胶囊中 8 种氨基酸的含量及重复性测定结果

氨基酸	标示值/mg	测定值/mg			平均值/mg	RSD/%
Lys	12.50	10.88	10.92	10.92	10.91	0.18
Thr	2.10	2.38	2.38	2.39	2.38	0.23
Trp	2.50	2.26	2.27	2.27	2.27	0.22
Met	9.20	7.71	7.66	7.65	7.67	0.40
Val	3.35	3.68	3.71	3.71	3.70	0.42
Phe	2.50	2.63	2.63	2.64	2.64	0.25
Ile	2.95	6.84	6.86	6.90	6.87	0.46
Leu	9.15	10.68	10.78	10.82	10.76	0.65

2.3.2 加标回收试验

取 1.4 中配制的供试品溶液 6 份(每份 10 μ L)置于聚丙烯管中,并分成 2 组(每组 3 份);在各组中分别加入 1 mmol/L 的标准对照溶液 10、50 μ L,然后将其定容至 100 μ L(加标量分别为 0.1、0.5 mmol/L).根据优化的衍生化反应和色谱分离条件测定各氨基酸的色谱峰面积,并根据峰面积的变化计算回收率(结果见表 3).由表 3 可知,8 种氨基酸的加标平均回收率为 90.0%~104.3%,其 RSD 为 0.57%~2.29%.上述结果表明该方法具有良好的准确度.

表 3 加标回收率(n=6) %

氨基酸	平均回收率	RSD	氨基酸	平均回收率	RSD
Lys	94.6	1.61	Val	101.0	2.13
Thr	104.3	0.80	Phe	94.8	1.69
Trp	93.4	2.29	Ile	92.0	1.41
Met	90.0	0.57	Leu	92.5	1.20

3 结论

利用本文建立的 PPZ 柱前衍生化 HPLC 法对复方氨基酸胶囊(8-11)中的 8 种氨基酸含量进行测定显示,该方法具有重现性好、检出限低、准

确度高等优点,因此该方法可为检测药物中的氨基酸提供参考.在本文研究中,衍生化试剂存在衍生化时间较长的缺点,因此在今后的研究中我们将探讨如何优化衍生化试剂以提高本文方法的适用性.

参考文献:

[1] FERRÉ S, GONZÁLEZ-RUIZ V, GUILLARME D, et al. Analytical strategies for the determination of amino acids: past, present and future trends[J]. Journal of Chromatography B, 2019,1132:121819.

[2] 暴海霞,戴新华. 氨基酸检测方法的进展和现状[J]. 化学试剂,2013,35(7):577-584.

[3] 李洁萍. 复方氨基酸胶囊(8-11)对肝癌 TACE 术后肝损害的疗效观察[J]. 浙江实用医学,2014,19(1):23-27.

[4] YOKOYAM T, TOKUDA M, AMANO M, et al. Simultaneous determination of primary and secondary d- and l-amino acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with two-step labeling method[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017,81(9):1681-1686.

[5] NGUYEN M, FRIED B, SHERMA J. Effects of *Echinostoma caproni* miracidia dose on the amino acid contents of *Biomphalaria glabrata* as deter-

- mined by high-performance thin-layer chromatography[J]. *Acta Parasitol*, 2016, 61(1):108-112.
- [6] 周贤婧, 师彦平. 毛细管电泳-间接紫外检测法测定蜂蜜中的氨基酸[J]. *色谱*, 2013, 31(7):661-666.
- [7] XU W H, ZHONG C C, ZOU C P, et al. Analytical methods for amino acid determination in organisms[J]. *Amino Acids*, 2020, 52(8):1071-1088.
- [8] 邓红英, 张永文, 李永贵. 柱前衍生高效液相色谱法测定复方氨基酸注射液氨基酸的含量[J]. *药学研究*, 2020, 39(1):27-30.
- [9] KLIKAROV J, ESLOV L, FISCHER J. Rapid analysis of phenyl isothiocyanate derivatives of amino acids present in Czech meads[J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1644(13):462134.
- [10] 翁燕, 刘丽娜, 周小燕, 等. 建立 UPLC 法测定复方氨基酸胶囊(9-5)中氨基酸的含量[J]. *实用药物与临床*, 2017, 20(2):202-207.
- [11] 游景水, 王德伟. 柱前在线衍生-反相高效液相色谱法测定羊胎盘枸杞胶囊中 16 种氨基酸的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(11):4671-4676.
- [12] 郭华, 朱智甲, 周晓雅, 等. 柱前衍生液相色谱-串联质谱法测定珍珠粉中氨基酸[J]. *分析科学学报*, 2015, 31(6):855-858.
- [13] LI N N, LIU Y, ZHAO Y, et al. Simultaneous HPLC determination of amino acids in tea infusion coupled to pre-column derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene[J]. *Food Analytical Methods*, 2016, 9(5):1307-1314.
- [14] 赵英莲, 牟德华, 李艳. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生 HPLC 检测树莓中游离氨基酸[J]. *食品科学*, 2015, 36(6):178-182.
- [15] MOTTISHAW J D, ERCK A R, KRAMER J H, et al. Electrostatic potential maps and natural bond orbital analysis: visualization and conceptualization of reactivity in sanger's reagent [J]. *Journal of Chemical Education*, 2015, 92(11):1846-1852.
- [16] KOLLER M, ECKERT H. Derivatization of peptides for their determination by chromatographic methods [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 352(1):31-59.
- [17] NISHIO T, HIGASHI T, FUNAISHI A, et al. Development and application of electrospray-active derivatization reagents for hydroxysteroids [J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2007, 44(3):786-795.

(上接第 29 页)

- [4] KANG D S, DENG Y B. Existence of solution for a singular critical elliptic equation[J]. *J Math Anal Appl*, 2003, 284(2):724-732.
- [5] COFFMAN C V. Uniqueness of the ground state solution for $\Delta u - u + u^3 = 0$ and a variational characterization of other solutions[J]. *Arch Rat Mech Anal*, 1972, 46(2):81-95.
- [6] STRAUSS W A. Existence of solitary waves in higher dimensions[J]. *Comm Math Phys*, 1977, 55:149-162.
- [7] LIONS P L. The concentration-compactness principle in the calculus of variations: The locally compact case: Part 1 [J]. *Ann Inst H Poincare Anal Non Lineaire*, 1984, 1(2):109-145.
- [8] LIONS P L. The concentration-compactness principle in the calculus of variations: The locally compact case: Part 2 [J]. *Ann Inst H Poincare Anal Non Lineaire*, 1984, 1(4):223-283.
- [9] LIONS P L. The concentration-compactness principle in the calculus of variations: The limit case: Part 1 [J]. *Rev Mat Iberoam*, 1985, 1(1):145-201.
- [10] LIONS P L. The concentration-compactness principle in the calculus of variations: The limit case: Part 2 [J]. *Rev Mat Iberoam*, 1985, 1(2):45-121.
- [11] 康东升, 朱小琨. 外部区域上半线性椭圆方程的多解[J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2003, 37(1):3-5.
- [12] 郭竹梅, 姚妙新. 外部区域上一类半线性椭圆型方程解的存在性[J]. *天津师范大学学报(自然科学版)*, 2006, 26(3):34-38.
- [13] 杨敏波, 沈自飞. 无界区域上具有 Hardy 临界指数项的半线性椭圆方程的多解性[J]. *J Sys Sci Math Scis*, 2007, 27(2):229-238.
- [14] LI Y Y, LIN C S. A nonlinear elliptic PDE with two Sobolev-Hardy critical exponents[J]. *Arch Ration Mech Anal*, 2012, 203(3):943-968.
- [15] 陆文端. 微分方程中的变分法[M]. 北京: 科学出版社, 2002:56-67.
- [16] GOULD S H. Variational Methods for Nonlinear Eigenvalue Problems [M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1995:104-122.
- [17] WILLEM M. Minimax Theorems [M]. Boston: Birkhäuser Boston, 1996:7-36.