

多肽及蛋白类药物微球包封率和释放的研究进展

王襄平综述 梅兴国* 审校

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘要:本文针对目前限制多肽、蛋白类药物微球控释系统临床应用的包封率和释放问题,重点介绍了近年来国内外有关的研究进展,包括影响包封率和释放的详细原因、影响因素,以及在提高包封率和控释方面成功的经验和方法技术。

关键词:多肽;蛋白质;微球;包封率;释放

中图分类号:R944 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2006)03-0219-05

随着生物技术的发展,多肽及蛋白类药物不断涌现,其常规制剂尽管疗效早经临床证实,但是生物药物半衰期短,需要长期频繁注射给药,而且不稳定,从患者的心理与经济负担来看,都是难以接受的问题。

如果将大分子药物通过可以生物降解的微球系统给药,不仅能够有效防止药物在体内的很快降解,还可能靶向送达体内的有效部位,从而达到长效缓释目的。但是随着对这类微球制剂研究的深入,发现制备微球过程中的几个重要的难题,即多肽及蛋白类药物的稳定性差、包封率低、载药量小、免疫反应、体内外释放时具有明显突释效应等严重影响着这类制剂的发展。

包封率和释放是评价微球制剂的两个最重要的指标。由于多肽及蛋白类药物的亲水性和不稳定性等特点,使得聚合物材料包裹蛋白质的能力比较低。在释放方面,蛋白质长期处于一个产酸和(或)疏水的并且逐渐降解的聚合物微环境中,遭受不可逆性的集聚和(或)降解以及非特异性的吸附,也都会影响它在微球系统中的释放。

研究表明,微球制剂在其达到稳定释放速率之前就已释放出绝大多数药物,突释现象极为明显,这也使得这些制剂难以推向市场。本文选择了目前影响多肽及蛋白类微球中包封率和释放的一些主要因素,对其原因及控制释放和提高包封率方面所取得的一些成功经验做一综述。

收稿日期:2005-12-29

作者简介:王襄平,女,在读硕士研究生,研究方向:缓控释制剂,

Tel 010-66932654, E-mail: xuan111@sina.com

*通讯作者:梅兴国,男,研究员,博士生导师,研究方向:药物新剂

型与新技术, Tel 010-66932654, E-mail: xg_mei@163.com

1 多肽及蛋白类药物微球包封率的影响因素和提高包封率的方法

目前制备多肽或蛋白类药物微球最为普遍的方法是乳化溶媒挥发-萃取法,因此文中引用的实例大多是采用这种方法制备的。制备微球时,分散相中聚合物快速固化可以减少药物在连续相中的损失,很多提高微球包封率的方法就是基于此原理展开的。

1.1 聚合物的亲水性

聚合物的相对分子质量、单体比例、及化学结构会影响其亲水性,聚合物分子亲水性影响包封率的作用可归结为(1)聚合物亲水性增强导致了其在有机溶媒中的溶解度降低,从而使聚合物固化加快,药物渗漏降低;(2)亲水的聚合物与多肽及蛋白类药物的相互作用更强,更有利于包裹亲水的大分子。

Blanco-Prieto 等^[1]采用喷雾干燥-凝聚法来制备伐普肽微球,单用或联用不同类型的乳酸-羟基乙酸嵌段共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)作为制备材料,结果表明,末端未封闭的 PLGA 所制备微球的包封率较高,而且两种乳酸/羟基乙酸(LA/GA)比例为50:50的混合材料所制备微球的包封率最高(83%),这是因为末端未封闭的且 LA/GA 比例为50:50的 PLGA 亲水性强,与多肽的相互作用增强,从而药物的包封率得到提高;Zambaux 等^[2]报道,可将 PLA 与单甲氧基聚环氧乙烷(MPEO)以一定比例共价结合,再与 PLA 混合后制备蛋白 C 微球,由于 MPEO 提高了 PLA 链亲水性、降低了 PLA 玻璃化转变温度,蛋白 C 的包封率又与聚合物的疏水性质有关,所以按一定比例将 PLA 与 MPEO-PLA 混合作为材料制备微球,提高了蛋白 C 的包封率。

同样,聚乙烯醇(PVA)、聚乙二醇(PEG)等移植

的 PLGA 聚合物中由于含有较小的 PLGA 片段,其亲水性较强,因此该种聚合物包裹大分子的包封率较高。Ruan 等^[3]比较了疏水性不同的聚合物材料制备的人血清白蛋白(HSA)微球的性质。发现聚乳酸-聚乙二醇嵌段共聚物(poly lactide-co-ethylene glycol, PELA)微球的包封率平均要比 PLGA 微球高 10% 左右,因为 PELA 中间有一个亲水性的 PEG 片段,能更好地提高蛋白质的生物活性。

1.2 聚合物的浓度

提高聚合物浓度可以提高微球的包封率。其原因可以归结于两点(1)聚合物在分散相表面固化速度的加快阻止了药物的扩散(2)高浓度的聚合物增加了分散相的粘度,增加了药物从聚合物乳中扩散出来的阻力。

Cho 等^[4]制作溶菌酶的 PLGA 微球。当 PLGA 的浓度增加时,分散相的粘度增加,药物从内水相渗漏到外水相的阻力增加,因此制得的微球的包封率提高。Zhang 等^[5]制备的 BSA 微球,当聚合物浓度从 2% 上升到 8% 的时候,包封率从 66.5% 上升到 91.2%。

1.3 药物在连续相中的溶解性

药物在连续相中的损失主要在分散相处于一种过渡的半固体状态时,如果药物在连续相中的溶解性大于在分散相中的溶解性,那么在这种过渡状态时,药物很容易扩散到连续相中。所以,一方面可以通过调节连续相的 pH 值、渗透压等使药物在其中的溶解性降低;另一方面,可以将药物包合或者修饰后以降低其在连续相中的溶解性来提高包封率。

De Rosa 等^[6]使用羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)包合技术来制备胰岛素的 PLGA 微球,包封率得到很大提升,此为通过形成胰岛素/环糊精复合体改变了胰岛素的二级结构。可能是因为环糊精包合后,药物亲水性大大降低,因此,就提高了药物在分散相中的保持力。Srinivasan 等^[7]制备溶菌酶微球时发现,当内水相的 pH 接近蛋白质的等电点并且在内外水相间达到一个渗透平衡时,所制备的微球包封率最高。

蛋白质是一种典型的水溶性药物,因此,要得到高的包封率是一个难题,制作一个水不溶的蛋白质-锌的复合体是一个比较好的方法,钟延强等^[8]制备干扰素的 PLGA 微球,通过加入锌离子,得到干扰素和锌离子的复合物沉淀,然后加入 PEG 冻干即得到不溶于水的锌离子与干扰素的复合物干粉。这样可

以提高蛋白稳定性和包封率。

1.4 有机溶剂在水中的溶解性

有机溶剂在水中的溶解度对于包封率具有重要意义。溶解度越高,有机溶剂在分散相和连续相之间转移越快,聚合物快速固化,相应的包封率得到提高。选用在水中溶解性高的有机溶剂,或者在水中添加可以与其互溶的有机溶剂,例如丙酮、甲醇、乙酸乙酯、二甲亚砜(DMSO)等均可以增加微球的包封率。Freytag 等^[9]制备的 PLGA 微球中,采用 w/o/w 制备微球,将二氯甲烷换为乙酸乙酯时,包封率从 36.5% 上升到了 77.7%。用 o/w 法制备微球,将二氯甲烷换为乙酸乙酯,包封率从 47.6% 上升到了 66.1%。

1.5 分散相或者萃取剂的体积

连续相的增加也可以增加微球的包封率。这可能是因有利于有机溶媒的挥发和萃取,从而加快了微球固化的速度。Zhang 等^[5]用容积萃取法制作了 BSA 微球。用石油醚来萃取有机溶剂,考察了石油醚的体积对微球包封率的影响,当石油醚的体积从 2 mL 增加到 10 mL 时,微球包封率从 78.6% 上升到 99.0%。

1.6 清除溶剂的速度和时间

溶剂清除的速度和时间直接影响着分散相固化的速度。溶剂清除的速度和时间又与蒸发温度及其变化速度、加入稀释介质的体积以及抽取过程中乳化搅拌的速度时间有关。Cho 等^[4]制备了溶菌酶的 PLGA 微球,重点考察了乳化搅拌的时间对微球包封率的影响,在清除溶剂的过程中,搅拌的时间越长,渗漏到水相中的溶菌酶越多。随着搅拌时间从 5 min 延长至 45 min,溶菌酶的渗漏率从 10% 上升到将近 60%,同时包封率也大大下降。

1.7 加入附加剂

在复乳溶剂挥发/提取法中,初乳的稳定性对于活性成分的内部结构是一个关键的因素。如果初乳不稳定,包封率会很低,可能是因为内水相慢慢并入了外水相,导致药物损失。因此可以在内水相(W1)或者油相中(O)加入一些物质,例如加入牛血清白蛋白(BSA)、吐温-80、司盘-80、PVA 等来提高初乳稳定性,相应提高包封率。Srinivasan 等^[7]制备的溶菌酶的微球中,分别在内外水相中添加了三种附加剂,即鼠血清白蛋白(RSA)、蔗糖和碳酸氢钠,结果发现,单用 RSA 时,不仅提高了包封率,而且提高了药物在微球中的生物活性;单用碳酸氢钠时,包封率从

15%上升到了94%。Zhang等^[5]制备BSA的微球,加入一定量的吐温-80可以提高包封率,达到90%以上。也可以在外水相中加入盐(NaCl或MgCl₂)等提高包封率,这在Freytag等制备的寡聚核苷酸的PLGA微球得到了证实。Castellanos等^[10]制作 α -糜蛋白酶的微球,在内水相中加入PEG,大大增加了包封率,并且包封率随着PEG的分子量变化而变化。

内水相的体积和粘度通常也是包封率的影响因素,内水相的体积越小,粘度越高,包封率也就越高,可能是因为这两个因素共同提高了初乳的稳定性。

2 多肽及蛋白类微球释放的影响因素及控制释放的措施

限制多肽及蛋白类微球广泛应用的另一个关键技术问题就是释放问题。在微球的释放过程中,突释是最重要也最难以控制的一个问题。制剂在进入体内的第一天前后会迅速大量地释放药物,这种现象被称为“突释”。由于给药初期的突释有可能导致血药浓度接近或超过中毒水平,产生明显的毒副作用。因此,突释现象已成为微球控释系统研究者面临的一个急待解决的问题。

2.1 多肽及蛋白类药物微球突释的原因

多肽及蛋白质药物微球突释的原因,一般从以下两个方面来解释,首先是因为药物分子和聚合物分子之间的相互作用太弱,导致药物很容易从微球进入释放介质中。其次,药物在微球中的分布导致了突释,多肽及蛋白质疏松地吸附在微球表层,或包埋在微球的表层。在微球释放初期,药物从微球中的孔洞和缝隙中释放出来。

2.2 微球释放过程中突释的影响因素及控制措施

由上面突释的机理可以看出,分散相的固化速度是影响突释的一个关键因素,因此,上面提到的工艺参数大多都可以用来控制突释。

2.2.1 聚合物的相对分子质量 突释受聚合物相对分子质量(M_r)的影响,但具体如何影响,则见仁见智。一种说法是:聚合物的 M_r 越低,蛋白质的突释越高,一方面是因为 M_r 低的聚合物在有机溶剂中的溶解度比较大,导致固化变慢,制得微球的表面孔隙较多;另一方面,是因为 M_r 低的聚合物制得的微球粒径较小,药物扩散的表面积相应较大。Yang等^[11]制备的BSA微球,考察了聚乙酸内酯(PCL)的 M_r 对微球释放的影响,从其累积释放曲线可以看出, M_r 低的PCL所制备的微球中BSA的突释显著

大于 M_r 高的PCL。

另一种说法是:在一定 M_r 范围内,PLGA M_r 越大,与药物之间的相互作用越弱,则微球突释程度越严重,这是因为聚合物分子和药物分子之间的相互作用在其中起了重要的作用。如Takenaga等^[12]采用不同 M_r 的PLGA制备了胰岛素注射微球,所选用的PLGA平均 M_r 分别为4 000、6 000、8 000、9 000及10 000左右。体内释放研究发现,PLGA的 M_r 超过6 000时, M_r 越高,突释引起的血药浓度越高。

2.2.2 聚合物的浓度 分散相的浓度越低,会导致更多的水从连续相和内水相进入,在分散相固化之前形成水性的孔隙和通道,一旦微球干燥后,水性通道会变得中空,药物便从中扩散导致突释。BSA的PLGA微球得到了同样的结果,聚合物浓度增加,突释越小,Zhang等^[5]制备的BSA微球,当聚合物浓度分别是2%、4%、8%时,突释分别是46%、39%、23%。

2.2.3 聚合物的结构 聚合物的结构影响其亲水性,通常来说,多聚物的亲水性越强,突释越大,释放速度越快。例如PLGA中羟基乙酸的含量越高,聚合物的亲水性越强,从释放介质中吸收的水分越多,突释就越明显,反之亦然。郑彩虹等^[13]制作的BSA三重复合微球,通过改变复合微球中PLGA的比例,可调节释放速率。以PLGA(70:30)为材料的复合微球BSA的突释要比PLGA(50:50)进一步下降,并且至第13周,PLGA(50:50)微球释出70.60%,而PLGA(70:30)微球仅释放出33.37%。

聚合物的晶型也会影响微球的释放,Kim等^[14]比较了聚合物的晶型对微球释放的影响,研究结果表明,半结晶的PLA与无定型的PLGA所制备的生长激素微球具有相似的突释效应(20%),但是,半结晶的PLA微球能在后期缓慢释放,并在一个月内释放完全,而无晶型的PLGA微球在同样时间内只能释放50%,这是因为微球内部的形态结构不同,PLA微球内部孔隙较多,而无定型的PLGA微球内部几乎没有孔隙。

2.2.4 载药量 在很多例子中,载药量增加,突释增加。载药量对于蛋白质释放的影响有两个方面,首先,当微球处于释放介质中时,表面吸附的蛋白形成了充满水的通道,使得微球中相应部位蛋白质得到充分的溶解。由于这些通道的大量形成,高的蛋白质含量导致了高的突释效应。其次,微球与释放介质之间的蛋白质浓度梯度增大,将会增加突释效

应。Leach 等^[15]采用 s/o/o 技术制备了 BSA 的微粒,当以 PLGA 为聚合物材料时,载药量分别是 5% ,10% ,15% 时所制备的微粒的突释分别为 2.5% ~ 4.1% ,6% ,12%。

2.2.5 新技术的采用 随着药物制剂技术的发展,越来越多的新技术运用于微球的制备当中。De Rosa 等^[6]使用环糊精包合技术来制备胰岛素微球,采用傅立叶变换红外光谱法(FTIR)来观察胰岛素/环糊精在微球内部是如何相互作用的,结果发现,胰岛素/环糊精复合体的形成导致了胰岛素二级结构的改变,降低了突释,环糊精包合技术制备的微球释放机制联合 FTIR 结果,可以得出:胰岛素/环糊精复合体的形成对于胰岛素从聚合中的扩散至关重要,从而可以调节药物的释放速度;Hinds 等^[16]将胰岛素 PEG 化后通过微型包裹技术制备 PLGA 微球,即将胰岛素 B 链的氨基端接上一个低分子量的 PEG,修饰的胰岛素可以和 PLGA 共同溶解在二氯甲烷中,然后通过单乳法制备微球,这样制备的微球具有很低的突释效应(< 1%),并且接近零级释放;为考察两亲性聚合物对 BSA 微球释放机制的影响,Morita 等^[17]制备了储库型微球,通过低压冻干技术将 BSA 与两亲性聚合物,如 PEG、聚维酮(PVP)等,共同微粉化,然后将此微粉选择性地分布到 PLGA 和 PLA 的混合物中。这种储库型微球显示了高的包封率和低的突释效应(< 10%),结果表明,这些两亲性的聚合物能够修饰蛋白质的释放模型,使其达到经典的零级释放。

2.2.6 水相中加入附加剂 在外水相中加入盐、糖、L-精氨酸等,内水相中加入吐温等后,可以降低突释。这些物质的存在增加了通过多聚物相的渗透压,当多聚物相处于半固体状态时,其本质上是一个半渗透膜,这样提高了渗透压,阻止了连续相进入分散相,降低了水性通道的形成,便降低了突释。

例如,Yamaguchi 等^[18]用 s/o/w 乳化法制备胰岛素微球,在初乳(s/o)的悬浮液中加入小量的丙三醇,可以通过形成“微乳”使胰岛素在微球中向中心分布,这样使突释由 40% 降到了 10%,电镜图像表明加入丙三醇后,在 37℃ 的磷酸缓冲液中培育 4 h 后,最初呈现在微球表面的孔隙消失了,玻璃化转变降低导致了微球表面孔隙的塌陷、闭合,丙三醇就是通过阻断胰岛素突释的通道来抑制突释效应的。Srinivasan 等^[7]制备的溶菌酶的微球,通过在在水相中加入 RSA 和碳酸氢钠不仅降低了突释,而且提高

了药物的稳定性。为了研究蛋白质的溶解度对释放的影响,Duncana 等^[19]制备了六种多肽及蛋白类药物微球,通过在在水相中加入盐酸胍,结果发现所有的蛋白质微球中药物的释放都随着盐酸胍的浓度变化而变化。因此可以通过调节盐酸胍的浓度来调节蛋白质的释放,以得到需要的释放模型。

除此之外,还有一些因素影响微球的包封率和突释,例如外水相 PVA 的浓度变化影响微球的粒径,包封率和(或)突释,PVA 的浓度越高,由于增加了剪切力和粘度,所以微球的粒径越小。尽管粒径越小,这些微球却降低了突释,或者提高了包封率。因为 PVA 的浓度越大,粘度越高,这样就阻止了内水相向连续相的移动。

3 结语

微球的包封率和释放问题虽然还没有形成系统的理论,但随着生物和制剂技术的发展,多肽及蛋白类药物微球存在的问题将逐一得到解决。目前已经有数种多肽类微球制剂上市,也将会有更多的多肽及蛋白类药物微球制剂获得更加广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] Blanco-Prieto MJ , Campanero MA , Besseghir K , et al . Importance of single or blended polymer types for controlled *in vitro* release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres[J] . *J Control Release* , 2004 , 96(3) :437 - 448 .
- [2] Zambaux MF , Bonneaux F , Gref R , et al . Protein C-loaded monomethoxypoly(ethylene oxide)-poly (lactic acid) nanoparticles [J] . *Int J Pharm* , 2001 , 212(1) :1 - 9 .
- [3] Ruan G , Feng SS , Li QT . Effects of material hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process[J] . *J Control Release* , 2002 , 84(3) :151 - 160 .
- [4] Cho M , Sah H . Formulation and process parameters affecting protein encapsulation into PLGA microspheres during ethyl acetate-based microencapsulation process[J] . *J Microencapsul* , 2005 , 22(1) :1 - 12 .
- [5] Zhang JX , Zhu KJ , Chen D . Preparation of bovine serum albumin loaded poly (D , L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by a modified phase separation technique[J] . *J Microencapsul* , 2005 , 22(2) :117 - 126 .
- [6] De Rosa G , Larobina D , Immacolata La Rotonda M , et al . How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA- based microspheres : the case of insulin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin system[J] . *J Control Release* , 2005 , 102(1) :71 - 83 .
- [7] Srinivasan C , Katare YK , Muthukumar T , et al . Effect of additives on encapsulation efficiency , stability and bioactivity of entrapped

- lysozyme from biodegradable polymer particles[J]. *J Microencapsul*, 2005, 22(2):127-138.
- [8] 钟延强, 吴 诚. 一种干扰素长效注射微球制剂的制备方法[P]. 中国专利:1634570A, 2005-07-06.
- [9] Freytag T, Dashevsky A, Tillman L. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres[J]. *J Control Release*, 2000, 69(1):197-207.
- [10] Castellanos IJ, Flores G, Griebenow K. Effect of the molecular weight of poly(ethylene glycol) used as emulsifier on alpha-chymotrypsin stability upon encapsulation in PLGA microspheres[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(10):1261-1269.
- [11] Yang YY, Chung TS, Ping Ng. Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(3):231-241.
- [12] Takenaga M, Yamaguchi Y, Kitagawa A, et al. A novel sustained-release formulation of insulin with dramatic reduction in initial rapid release[J]. *J Control Release*, 2002, 79(123):81-91.
- [13] 郑彩虹, 梁文权, 虞和永. 海藻酸-壳聚糖-聚乳酸羟乙醇酸复合微球的制备及其对蛋白释放的调节[J]. *药学报*, 2005, 40(2):182-186.
- [14] Kim HK, Park TG. Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release[J]. *J Control Release*, 2004, 98(1):115-125.
- [15] Leach WT, Simpson DT, Val TN, et al. Uniform encapsulation of stable protein nanoparticles produced by spray freezing for the reduction of burst release[J]. *J Pharm Sci*, 2005, 94(1):56-69.
- [16] Hinds KD, Campbella KM, Hollanda KM. PEGylated insulin in PLGA microparticles. *In vivo* and *in vitro* analysis[J]. *J Control Release*, 2005, 104(3):447-460.
- [17] Morita T, Horikiri Y, Suzuki T, et al. Applicability of various amphiphilic polymers to the modification of protein release kinetics from biodegradable reservoir-type microspheres[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2001, 51(1):45-53.
- [18] Yamaguchi Y, Takenaga M, Kitagawa A, et al. Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: initial burst release controlled by hydrophilic additive[J]. *J Control Release*, 2002, 81(3):235-249.
- [19] Duncana G, Thomas J, et al. The influence of protein solubilisation, conformation and size on the burst release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres[J]. *J Control Release*, 2005, 110(1):34-48.

(上接第218页)

- and carbohydrates in high-performance anion-exchange chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2006 Jan 9, [Epub ahead of print].
- [5] Yu H, Ding YS, Mou SF. Some factors affecting separation and detection of amino acids by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. *J Chromatogr A*, 2003, 997(1/2):145-153.
- [6] Yu H, Ding YS, Mou SF, et al. Simultaneous determination of amino acids and carbohydrates by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. *J Chromatogr A*, 2002, 966(1/2):89-97.
- [7] Ding Y, Yu H, Mou S. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. *J Chromatogr A*, 2002, 982(2):237-244.
- [8] Hanko VP, Rohrer JS. Direct determination of tryptophan using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. *Anal Biochem*, 2002, 308(2):204-209.
- [9] Hanko VP, Rohrer JS. Determination of amino acids in cell culture and fermentation broth media using anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. *Anal Biochem*, 2004, 324(1):29-38.
- [10] Ding Y, Yu H, Mou S. Optimizing the quadruple-potential waveform for the pulsed amperometric detection of neomycin[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1039(1/2):39-43.
- [11] Yu H, Ding Y, Mou S. Direct and simultaneous determination of amino acids and sugars in rice wine by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. *Chromatographia*, 2003, 57(11/12):721-728.
- [12] Eberendu AR, Booth C, Luta G, et al. Quantitative determination of saccharides in dietary glyconutritional products by anion-exchange liquid chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. *J AOAC Int*, 2005, 88(4):998-1007.
- [13] Jandik P, Clarke AP. Analyzing mixtures of amino acids and carbohydrates using bi-modal integrated amperometric detection[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, 732(1):193-201.
- [14] Ding Y, Yu H, Mou S. Off-line elimination of carbohydrates for amino acid analysis of samples with high carbohydrate content by ion-exchange chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2003, 997(1/2):155-160.
- [15] Thiele C, Ganze MG, Vogel RF. Sample preparation for amino acid determination by integrated pulsed amperometric detection in foods[J]. *Anal Biochem*, 2002, 310(2):171-178.
- [16] Jandik P, Cheng J, Jensen D, et al. Simplified in-line sample preparation for amino acid analysis in carbohydrate containing samples[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 758(2):189-196.