

基于抑制单核巨噬细胞增殖活性检测的注射用骨肽质量控制

张倩¹, 韩淑娴¹, 陈影¹, 韩冰², 葛一蒙², 廖福龙¹, 游云^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 黑龙江珍宝药业股份有限公司, 哈尔滨 150060)

[摘要] **目的:**通过建立注射用骨肽抑制单核巨噬细胞(THP-1)增殖的生物活性测定法,以补充完善其质量控制方法。**方法:**采用CCK-8法以体外抑制THP-1增殖作用来考察注射用骨肽的生物活性。以A01160410批次注射用骨肽作为对照物质进行效价测定。**结果:**注射用骨肽对THP-1的增殖具有一定的抑制作用。采用量反应平行线(2·2)法作为注射用骨肽抑制THP-1增殖的生物效价检测方法,重复性较好,样品检测结果均能通过可靠性检验(回归 $P < 0.01$, 偏离平行 $P > 0.05$)。A20160102批次注射用骨肽效价 $94.50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,可信限率(FL) = 6.14%,可信限范围为 $88.87 \sim 100.47 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; A01160401批次注射用骨肽效价为 $92.04 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, FL = 4.36%,可信限范围为 $88.12 \sim 96.15 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; A01160406批次注射用骨肽效价为 $83.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, FL = 8.52%,可信限范围为 $76.46 \sim 90.65 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。3个批次注射用骨肽实验结果合并分析结果显示,注射用骨肽抑制THP-1的效价为 $90.37 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, FL = 8.63%,可信限范围为 $82.91 \sim 98.51 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。不同操作人员对注射用骨肽的效价测定结果没有明显差别,具有良好的可重复性。**结论:**该研究建立的生物效价检测方法可以补充作为注射用骨肽生物评价的质控方法之一。

[关键词] 注射用骨肽; 单核巨噬细胞; 生物活性测定; 质量控制

[中图分类号] R284.1; R285.5; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0042-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181017

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1030.024.html>

[网络出版时间] 2018-03-09 11:20

Quality Control of Ossotide for Injection in Inhibiting Proliferation of Monocyte-macrophages

ZHANG Qian¹, HAN Shu-xian¹, CHEN Ying¹, HAN Bing², GE Yi-meng², LIAO Fu-long¹, YOU Yun^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Harbin Zhenbao Pharmaceutical Co. Ltd., Harbin 150060, China)

[Abstract] **Objective:** To supplement and improve the quality control method through a bioassay test about ossotide for injection on inhibiting the proliferation of monocyte-macrophages (THP-1). **Method:** The biological activity of ossotide for injection was investigated by its inhibitory effect on THP-1 proliferation *in vitro* with CCK-8 assay. A01160410 batch of ossotide for injection was used as standard control substance under the potency determination. **Result:** The ossotide for injection had a significant inhibitory effect on the proliferation of THP-1. The parallel line (2·2) assay method as the biopotency detection method for inhibitory effect of ossotide for injection on the proliferation of THP-1, had a good repeatability. All the samples passed the reliable test (regression $P < 0.01$, deviation from parallel $P > 0.05$). A20160102 batch of ossotide for injection potency was $94.50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, with confidence limit rate (FL) = 6.14%, and the confidence limit range was from $88.87 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $100.47 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; A01160401 batch of ossotide for injection potency was $92.04 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ with FL = 4.36%, and the confidence limit ranged from 88.12 to $96.15 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. A01160406 batch of ossotide for

[收稿日期] 20171110(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274006)

[第一作者] 张倩,在读硕士,从事中药药理研究, E-mail: zhangqian408@yeah.net

[通信作者] *游云,研究员,硕士生导师,从事中药心脑血管药理研究与质量控制研究, E-mail: youyunrice@126.com

injection potency was $83.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ with $\text{FL} = 8.52\%$, and the confidence limit ranged from 76.46 to $90.65 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. The combined analysis of the experimental results of three batches of ossotide for injection showed that the potency of ossotide for injection for inhibiting THP-1 was $90.37 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ with $\text{FL} = 8.63\%$, and the confidence limit ranged from 82.91 to $98.51 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Different operators had no significant difference in the potency result of ossotide for injection, with a good repeatability. **Conclusion:** The biopotency detection method established in our study can be used as one of the quality control methods for the bioassay of ossotide for injection.

[**Key words**] ossotide for injection; monocyte-macrophages; bioassay tests; quality control

近年来,多肽类药物的研究进展迅速,对多肽类药物的质量控制主要通过生物检定法、放射性同位素标记法、电泳法、质谱技术、色谱-光谱联用技术和核磁共振法等分析方法,从产品鉴定、纯度分析、生物活性测定 3 个方面进行质量评价^[1]。注射用骨肽属于多肽类药物,又称骨多肽,为新鲜或冷冻的猪或胎牛四肢骨中提取的活性肽类成分,含有十多种与骨代谢有关的生长因子,包括软骨源性生长因子(CBGF),骨生长因子(SGF),骨原性生长因子(BDGF),肌形态发生蛋白(BMP),转化生长因子(TGF),成纤维细胞生长因子(FGF),白细胞介素-6(IL-6), γ -干扰素等^[2-3]。注射用骨肽具有抗炎、消肿、镇痛的作用,可抑制损伤部位的炎症反应,抑制炎症物质渗出,促进渗出物吸收。注射用骨肽临床上用于促进骨折愈合,也可用于增生性骨关节疾病及风湿、类风湿关节炎等症状改善。从其生产到临床应用的过程中,常用的质控方法主要为理化鉴定方法。采用生物活性测定的方法与主要活性成分理化分析方法相结合的药物质量标准,更能全面综合地保证药品的安全性、有效性和质量可控性。目前通过生物活性测定的方法对注射用骨肽进行质量控制的研究却很少。因此,为注射用骨肽建立一种具有质控意义的生物活性测定方法具有极其重要的意义。

单核巨噬细胞的异常的过度活化在强直性脊柱炎、类风湿关节炎以及系统性红斑狼疮等自身免疫系统疾病的发生与发展的过程中扮演着重要的角色^[4]。炎症反应是机体的重要防御机制。在炎症反应发生初期,巨噬细胞受到刺激会被激活,分泌 MCP-1 和 IL-6, MCP-1 和 IL-6 可特异性地作用于单核细胞及细胞信号传导激活核因子- κ B(NF- κ B),造成单核细胞的进一步募集和活化,进而释放更多的炎性介质,导致炎症的进一步发展^[5-6]。

针对注射用骨肽对类风湿性关节炎的治疗作用,本实验采用 CCK-8 法考察注射用骨肽抑制 THP-1 细胞增殖的作用。

1 材料

MCO-15A 型 CO_2 培养箱(日本三洋电机国际贸易有限公司),超净工作台(北京半导体设备一厂),DT5-6A 型台式离心机(北京时代北利离心机有限公司),Axiovret 135A 型倒置显微镜(德国 ZEISS 公司),细胞培养板及培养瓶(美国 Corning 公司)。

RPMI-1640 培养基,青、链霉素(美国 HyClone 公司,批号 AB10190291, J170012),胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 A10112-2770),CCK-8(日本 Dojindo 公司,批号 KM671)。

人单核巨噬细胞(THP-1)(美国 ATCC)。注射用骨肽(冻干品,规格 10 mg/支,黑龙江珍宝岛药业股份有限公司,批号 A20150101, A20151101 用于方法学考察;批号 A20160102, A01160401, A01160406, A01160410 用于效价测定)。

2 方法

2.1 试剂及药液的配制 注射用骨肽溶液:取注射用骨肽冻干粉 1 支(10 mg),加入 1640 完全培养液 500 μL 溶解,配成 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的注射用骨肽母液,再用 1640 完全培养基稀释至工作浓度。现用现配。

2.2 细胞培养 THP-1 细胞培养于 1640 完全培养液(含 10% 胎牛血清, $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青、链霉素)中,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养,取对数生长期细胞进行后续实验。

2.3 注射用骨肽对 THP-1 增殖抑制作用的测定 取对数生长期的 THP-1,调整细胞浓度,接种于 96 孔培养板中,每孔加入细胞悬液 100 μL ,注射用骨肽药液 100 μL ,使药物终浓度达到目标浓度,每个浓度设置 4 个复孔。在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,每孔加入 CCK-8 10 μL ,CCK-8 作用 1.25 h 后,在酶标仪 450,630 nm 波长处测定其吸光度,计算抑制指数。采用抑制指数来评价注射用骨肽对细胞增殖的影响。细胞对照组的抑制指数为 1.00,故规定药物对细胞抑增殖作用的抑制指数不得小于 1.00。

$$\text{抑制指数} = \frac{\text{对照组吸光度} - \text{空白组吸光度}}{\text{药物组吸光度} - \text{空白组吸光度}}$$

2.4 注射用骨肽生物活性测定

2.4.1 标准物质的确定与效价分析 经过测算,选用活性较强批次的药物作为对照组,参与注射用骨肽效价的测定。取对照组注射用骨肽溶液,以 1640 完全培养液精确稀释为含注射用骨肽质量浓度为 2.1, 3.0 g·L⁻¹ 的 2 个稀释液,剂间比 0.7,作为对照组(S)。

注射用骨肽溶液用 1640 完全培养液精确稀释为 2.1, 3.0 g·L⁻¹ 的 2 个不同质量浓度的稀释液,剂间比 0.7,作为供试品组(T)。

依 2.3 项下方法,平行测定 4 次,分别测定两组 OD 值。按《中国药典》(2015 年版)生物检定统计法中量反应平行线法,使用统计软件 BS2000 进行统计学处理,S 效价设为 100 U·mL⁻¹,计算 T 组的效价(PT)和可信限率(FL),并对结果可靠性进行统计学检验。

2.4.2 效价测定精密度考察 选择确定好的标准物质,对注射用骨肽的效价进行重复测定,重复测定 4 次,计算其变异系数,并使用使用统计软件 BS2000 对结果合并计算,得出最终效价(PT)和可信限率(FL)。

3 结果

3.1 最适细胞密度的考察 调整 THP-1 细胞密度为 1 × 10⁵ 个/mL 与 4 × 10⁵ 个/mL,与终质量浓度为 3.0 g·L⁻¹ 药物分别作用 24 h,考察不同细胞密度对注射用骨肽抑制 THP-1 增殖作用的影响。细胞密度为 4 × 10⁵ 个/mL 时,注射用骨肽对 THP-1 增殖的抵制指数较高为 1.70 ± 0.39,抑制作用较强,故选取细胞密度为 4 × 10⁵ 个/mL 进行后续实验。

3.2 注射用骨肽抑制 THP-1 增殖的量效关系 药物质量浓度为 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 g·L⁻¹ 的注射用骨肽与 THP-1 细胞共同孵育 24 h,结果显示注射用骨肽对 THP-1 的增殖具有抑制效应。且质量浓度为 2.0 ~ 3.0 g·L⁻¹ 注射用骨肽对 THP-1 的抑制作用呈一定线性关系(P < 0.05),因此选择 2.1, 3.0 g·L⁻¹ 进行后续实验,剂间比 0.7。

3.3 标准物质的选择与可靠性考察 选择 A20160102, A01160401, A01160406, A01160410 共 4 个批次的注射用骨肽,终质量浓度分别为 2.1, 3.0 g·L⁻¹,与 THP-1 细胞作用 24 h,考察不同批次注射用骨肽对 THP-1 细胞增殖的抑制效应。结果如表 1 所示,通过比较 4 个批次的注射用骨肽对

THP-1 细胞增殖的抑制指数发现, A01160410 批次注射用骨肽的抑制指数较高且最为稳定,因此选取 A01160410 批次注射用骨肽作为标准物质。

表 1 不同批次、不同浓度注射用骨肽对 THP-1 增殖的抑制指数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Inhibition index of different batches and concentrations of ossotide for injection on THP-1 proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

批次	质量浓度/g·L ⁻¹	抑制指数
A20160102	2.1	1.16 ± 0.16
	3.0	1.68 ± 0.33
A01160401	2.1	1.17 ± 0.30
	3.0	2.39 ± 1.37
A01160406	2.1	1.25 ± 0.35
	3.0	1.87 ± 0.66
A01160410	2.1	1.10 ± 0.08
	3.0	1.97 ± 0.08

采用量反应平行线法,以 A01160410 批次注射用骨肽作为对照组,对其他 3 个批次药品进行效价测定,可靠性检验结果见表 2,回归显著(P < 0.01),偏离平行不显著(P > 0.05),表明方法学可靠。

表 2 3 个批次注射用骨肽效价可靠性检验

Table 2 Reliability test of efficiency on 3 batches of ossotide for injection

批次	变异来源	自由度	SS	MS	F	P
A20160102	试品间	1	4 455.6	4 455.6	2.87	<0.05
	回归	1	30 016	30 016	19.34	<0.01
	偏离平行	1	60.063	60.063	<1	>0.05
	剂间	3	34 531	11 510	7.42	<0.01
	误差	12	18 622	1 551.8		
A01160406	试品间	1	37 442	37 442	3.58	>0.05
	回归	1	118 680	118 680	11.36	<0.01
	偏离平行	1	26 732	26 732	2.56	>0.05
	剂间	3	182 850	60 952	5.83	<0.01
	误差	12	125 370	10 447		
A01160410	试品间	1	103 680	103 680	22.21	<0.01
	回归	1	80 089	80 089	17.16	<0.01
	偏离平行	1	10 404	10 404	2.23	>0.05
	剂间	3	194 180	64 726	13.87	<0.01
	误差	12	56 021	4 668.4		

3.4 效价测定及精密度考察 效价测定结果见表 3。3 个批次注射用骨肽效价测定结果的 RSD 均 <

15% ,表明效价测定结果稳定,具有很好的可重复性。使用 BS2000 软件对此每个批次注射用骨肽的 4 次实验结果合并计算,结果显示 A20160102 批次注射用骨肽效价 $94.50 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 14.56% ,可信限率 (FL) = 6.14% ,可信限范围 $88.87 \sim 100.47 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$;A20160401 批次注射用骨肽效价 $92.04 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 9.45% ,FL = 4.36% ,可信限范围为 $88.12 \sim 96.15 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$;A20160406 批次注射用骨肽效价 $83.25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 13.8% ,FL = 8.52% ,可信限范围为 $76.46 \sim 90.65 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 3 3 个批次注射用骨肽抑制 THP-1 增殖的相对生物效价精密密度考察

Table 3 Precision of relative biological value on inhibiting THP-1 proliferation of 3 batches of ossotide for injection

批次	测定编号	效价 / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	FL /%
A20160102	1	90.84	9.11
	2	114.73	23.46
	3	93.51	9.33
	4	82.01	16.24
A01160401	1	94.57	5.39
	2	81.85	33.26
	3	101.58	37.46
	4	87.10	7.70
A01160406	1	66.642	32.27
	2	93.492	33.66
	3	82.258	11.72
	4	85.77	13.66

进一步使用 BS2000 软件对上述 3 个批次所有注射用骨肽实验结果合并计算,结果显示注射用骨肽的效价为 $90.37 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,FL = 8.63% ,可信限范围为 $82.91 \sim 98.51 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.5 中间精密密度考察 更换不同的操作人员,考察注射用骨肽生物活性测定方法的可重复性。选择 A01160410 批次注射用骨肽作为标准对照品,对 A20160102, A01160401, A01160406 批次注射用骨肽进行重复测定,可靠性检验结果显示 4 次结果回归显著 ($P < 0.01$) ,偏离平行不显著 ($P > 0.05$) ,表明方法可靠。由表 4 可知,上述 3 个批次注射用骨肽效价测定结果变异系数均 $< 16\%$,表明不同操作人员的效价测定结果没有明显差别,具有很好的可重复性。使用 BS2000 软件对此每个批次注射用骨

肽的 4 次实验结果合并计算,结果显示 A20160102 批次注射用骨肽效价 $80.67 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 14.7% ,可信限率 FL = 18.20% ,可信限范围为 $67.31 \sim 96.68 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$;A20160401 批次注射用骨肽效价 $82.43 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 8.92% ,FL = 15.14% ,可信限范围为 $70.89 \sim 95.85 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。A20160406 批次注射用骨肽效价 $99.36 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 15.6% ,FL = 14.80% ,可信限范围为 $85.74 \sim 115.16 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 4 3 批次注射用骨肽抑制 THP-1 增殖作用的相对生物效价精密密度考察

Table 4 Precision of relative biological value on inhibiting THP-1 proliferation of 3 batches of ossotide for injection

批号	测定编号	效价 / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	FL /%
A20160102	1	79.78	36.20
	2	91.40	26.85
	3	64.55	45.01
	4	73.04	29.59
A01160401	1	91.25	31.85
	2	79.08	25.89
	3	82.79	22.28
	4	73.94	40.00
A01160406	1	116.67	41.07
	2	98.31	24.47
	3	110.00	32.62
	4	80.55	28.31

对 3 个批次注射用骨肽实验结果合并计算,结果显示注射用骨肽的效价为 $88.04 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,FL = 8.49% ,可信限范围为 $80.88 \sim 95.84 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。中间精密密度考察结果显示,不同操作人员对注射用骨肽的效价测定结果没有明显差别,方法稳定。

4 讨论

中药质量标准与中药安全性和有效性的关联度是衡量中药质量评价体系和质量控制手段科学性、先进性和使用价值的重要标准之一^[7]。基于中药多成分、多靶点的作用特点,生物活性测定可辅助化学测定方法控制药品质量。生物活性测定以药理为基础,生物统计为工具,运用特定的实验设计,在严格控制的实验条件下,比较对照品和供试品对生物体或离体器官与组织的特定生物效应,计算效价,从而评价和控制供试品的质量。适用于成分复杂、具有多种功能相似的已知和未知活性成分药品的定量或半定量测定,目前已经应用于药品、生物制品的质

量控制^[8];一些中药品种如肝炎灵注射液^[9]、红花注射液^[10]、灯盏花素注射液^[11]、注射用肌氨肽苷^[12]等也开展了生物活性测定的方法进行质量控制的研究。

本研究基于注射用骨肽抑制 THP-1 细胞增殖活性,通过 CCK-8 法,建立了注射用骨肽抑制 THP-1 细胞增殖的标准操作规程,综合评价了注射用骨肽对于 THP-1 的抑制效应。包括①确定 THP-1 的铺板密度为 4×10^5 个/mL,确定实验优选的细胞数量;②确定注射用骨肽的效价测定浓度;③细胞铺板操作过程中,吹打过程中避免气泡产生,使细胞均匀分布,降低操作过程中的误差。由检测结果可以看出,注射用骨肽对 THP-1 的增殖有较好的抑制作用。

中药生物活性测定法关键问题之一是对照品的确立^[13],目前注射用骨肽生物效价研究还没有对照品,本研究通过前期试验筛选,选定了 A01160410 批次注射用骨肽作为自身标准物质,进行效价测定及统计分析发现,可靠性检验均成立,表明该方法测得的效价可靠。采用 A01160410 批次注射用骨肽作为标准物质,根据 2015 年版《中国药典》要求,选取 3 个不同批次注射用骨肽,每个批次重复测定 4 次,对 4 次结果合并计算。3 个批次注射用骨肽实验结果合并分析结果显示,注射用骨肽的效价为 $90.37 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,FL = 8.63%,可信限范围为 $82.91 \sim 98.51 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。中间精密度考察,以不同人员操作对注射用骨肽的效价测定结果没有明显差别,具有良好的可重复性。综上可知,本研究建立的注射用骨肽抑制 THP-1 增殖的生物检定方法,重复性较好。注射用骨肽的生物效价可靠,用于质量控制,具有一定的可行性。结果提示不同批次注射用骨肽的质量基本稳定。

注射用骨肽抑制 THP-1 增殖的生物活性测定与其治疗类风湿性关节炎的临床适应症一致,实验操作简单,补充了注射用骨肽的质量控制方法,可以

较为直观地反映出药物的效应及质量。

[参考文献]

- [1] 田文静,任雪,廖海明,等.多肽类药物质量控制研究进展[J].药物分析杂志,2013,33(7):1115-1120.
- [2] 胡文洁.注射用骨肽对股骨转子下骨折愈合时间的影响[J].海峡药学,2011,23(7):150-151.
- [3] 黄咏红.复方骨肽临床应用综述[J].中医临床研究,2012,4(23):119-120.
- [4] 王卫远,李俊芳,聂尚燕,等.非诺贝特通过上调 PPAR α 抑制 LPS 诱导的 THP-1 细胞 TLR4 表达的实验研究[J].西部医学,2016,28(1):32-35.
- [5] Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, et al. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 β and IL-6[J]. Biome Res, 2013, 34(1): 31-40.
- [6] Gupta Mili, Chaturvedi Rashi, Jain Ashish. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease[J]. Cytokine, 2013, 61(3): 892-897.
- [7] 李波,朴晋华.中药生物活性质量控制的思考[J].中国药品标准,2012,13(1):5-8.
- [8] 马莉,金城,李祖伦,等.生物检定与板蓝根质量控制[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(2):134-136.
- [9] 潘善庆,田洪,陈子渊,等.肝炎灵注射液的生物活性测定方法研究[J].中国药品标准,2009,10(4):264-268.
- [10] 陈晨.红花注射液生物活性测定方法的研究[D].北京:中国食品药品检定研究院,2011.
- [11] 欧阳杰湖,潘善庆,陈子渊.灯盏花素注射液的生物活性测定方法的建立[J].中南药学,2011,9(2):103-107.
- [12] 欧阳杰湖,潘善庆,陈子渊.注射用肌氨肽苷的生物活性测定[J].中国药品标准,2009,10(1):32-35.
- [13] 郭玉东,王志斌,周建平,等.中药生物活性测定法中标准品建立的研究[J].药物分析杂志,2013,33(4):706-708,715.

[责任编辑 顾雪竹]