

珍珠明目滴眼液及珍珠液中蛋白多肽类成分的分析

丁晓萍, 费毅琴, 肖凌*, 侯俊杰, 涂奇军

湖北省食品药品监督检验研究院, 湖北 武汉 430064

摘要: 目的 分析不同厂家珍珠明目滴眼液及珍珠液中蛋白多肽类成分的差异, 为保证原料药生产工艺的稳定性, 有效地控制珍珠明目滴眼液的质量提供参考依据。方法 采用 UPLC-Q-TOF MS 正离子模式进行分析, 鉴定珍珠明目滴眼液及珍珠液中的肽类成分, Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 乙腈-0.1%甲醇水溶液作为流动相; 柱前衍生化 HPLC-DAD 法测定珍珠明目滴眼液中 16 种氨基酸。结果 不同生产企业的珍珠明目滴眼液及珍珠液中多肽的相对分子质量 (M_w)、16 种氨基酸分别占总氨基酸量的百分比差异较大。5 家企业中 3 家的原料药珍珠液中肽的 M_w 均小于 2 000, 另 2 个厂家珍珠液中肽的 M_w 为 500~4 746, 以大于 2 000 的肽为主。7 个厂家的珍珠明目滴眼液样品中, 2 个厂家样品中肽的 M_w 以 2 000~4 000 为主, 并含有 4 000 以上的肽, 另 5 个厂家样品中不含 4 000 以上的肽。7 个厂家的珍珠明目滴眼液中 16 种氨基酸质量浓度相对总氨基酸质量浓度的百分比差异较大, 2 个厂家采用酸/酶水解工艺的珍珠液中脯氨酸与丙氨酸质量浓度的比值 >1, 5 个厂家采用水直接提取工艺的二者比值小于 1。结论 建议修订珍珠液质量标准, 明确制备工艺为水直接提取, 确保滴眼液中的有效成分多肽 (M_w 在 500~5 000), 珍珠液及珍珠明目滴眼液质量标准增加检查项脯氨酸与丙氨酸质量浓度的比值及定量测定项氨基酸总量, 以有效控制珍珠明目滴眼液的质量, 确保其有效性。

关键词: 珍珠明目滴眼液; 珍珠液; 多肽; UPLC-Q-TOF MS; 氨基酸; RP-HPLC

中图分类号: R286.02; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)06-0911-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.06.009

Analysis on protein polypeptide in Zhenzhuye and Zhengzhu Mingmu Eye Drops

DING Xiao-ping, FEI Yi-qin, XIAO Ling, HOU Jun-jie, TU Qi-jun

Hubei Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430064, China

Abstract: Objective Analysis for the differences of protein polypeptide ingredients in Zhengzhu Mingmu Eye Drops and Zhenzhuye in order to provide the reference data to ensure the stability of production process of crude material and effectively control the quality of Zhengzhu Mingmu Eye Drops. **Methods** Polypeptide ingredients in Zhengzhu Mingmu Eye Drops and Zhenzhuye were identified by UPLC-Q-TOF MS in positive mode using an Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column. Mobile phase is acetonitrile-0.1% methanol; Contents of 16 amino acids were detected by pre-column derivatization RP-HPLC method. **Results** Molecular weight (M_w) of polypeptide and the contents of the amino acids in Zhengzhu Mingmu Eye Drops and Zhenzhuye were significantly different. In the five manufacturers, M_w of polypeptide was less than 2 000 in Zhenzhuye samples from the three manufacturers, while M_w of polypeptides were 500—4 746 for samples of the other two manufacturers and M_w of main polypeptides were higher than 2 000. M_w ranges of main polypeptides in Zhengzhu Mingmu Eye Drops from two manufacturers were 2 000—4 000 and beyond 4 000. There were not the polypeptides with M_w beyond 4 000 in samples of the other five manufacturers. The content percentages of 16 amino acids in Zhengzhu Mingmu Eye Drops from the seven manufacturers were obviously different. The mass concentration ratios of proline and alanine in Zhenzhuye produced by acid/enzyme hydrolysis from two manufacturers are beyond 1. For the other five manufacturers with water extract technique, the mass concentration ratios of proline and alanine are below 1. **Conclusion** The quality standard of Zhenzhuye should be revised and water extract should be applied in preparation process to ensure the effective ingredients polypeptides (500—5 000). In quality standard of Zhengzhu Mingmu Eye Drops and Zhenzhuye, the mass concentration ratio of proline/alanine and the total contents of amino acids should be added as check and content determination items, respectively, so as to effectively control the quality of Zhengzhu Mingmu Eye Drops and ensure its validity.

Key words: Zhengzhu Mingmu Eye Drops; Zhenzhuye; polypeptides; UPLC-Q-TOF MS; amino acid; RP-HPLC

收稿日期: 2015-11-17

作者简介: 丁晓萍, 女, 副研究员, 主要从事中药质量控制新技术、新方法研究。E-mail: dxp2888@126.com

*通信作者 肖凌, 女, 副主任药师, 主要从事中药质量标准研究。E-mail: lingyun724@126.com

珍珠明目滴眼液主要由珍珠液和冰片配伍制成,是国家食品药品监督管理局批准的二级中药保护品种,收载于《中药成方制剂》第 17 册,其主要功能为清热泻火、养肝明目,主要用于肝虚火旺引起视力疲劳症和慢性结膜炎,长期使用可以保护视力^[1-4]。珍珠液作为珍珠明目滴眼液的原料药,主要有效成分为蛋白多肽。

目前,市售珍珠液的生产工艺主要有水直接提取、酸/酶水解提取,提取方法的差异易造成珍珠液中肽类成分的不同;珍珠液的现行标准中未明确生产工艺,多肽类成分采用紫外分光光度(UV)法测定总蛋白量,方法专属性差,难以鉴别珍珠液中的肽,而且珍珠液的制备工艺不同亦会引起肽类成分的差异。而珍珠明目滴眼液现行质量标准中关于蛋白多肽类成分的控制仅有氨基酸的鉴别项。工艺的不确定及质量标准的不专属,都无法保证制剂质量的稳定。目前,HPLC-MS 技术已经被广泛用于各种生物样品中各种肽的鉴定和测定^[5-15],此外,采用酸水解样品经异硫脲酸苯酯(PITC)柱前衍生 HPLC-UV 方法多用于中药制剂中蛋白类成分的定量测定^[16-19]。

因此,本研究采用 UPLC-Q-TOF MS 鉴定不同厂家珍珠明目滴眼液制剂及珍珠液中的多肽,柱前衍生化 RP-HPLC 法测定滴眼液制剂中 16 种氨基酸,通过肽的相对分子质量(M_w)及氨基酸相对质量浓度的百分比来比较不同生产企业产品中肽类成分的差异,评价不同生产企业制剂及原料药生产工艺,为确保原料药生产工艺的稳定性及有效地控制珍珠明目滴眼液的质量提供参考依据。

1 仪器与材料

Ultimate-3000 高效液相色谱仪,Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); Waters Acquity UPLC-G2-Q-TOF 液质联用仪,Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; DHG-90738S-III 型电热恒温鼓风干燥箱,天津市中环实验电炉有限公司; Mettler Toledo XP205 电子天平; DELTA-320 pH 计; 冷冻干燥机,上海合康实业有限公司。

异硫脲酸苯酯(PITC),批号 NG162899, Thermo Scientific 公司; 乙腈为色谱纯; 甲酸为电子级; 葡聚糖凝胶 G25, 上海源叶生物科技有限公司; 水为双蒸水; 乙腈、正己烷、三乙胺为色谱纯,无水醋酸钠、醋酸、盐酸均为分析纯。

Waters 公司的 17 种氨基酸液体混合对照品溶液(Waters 公司,批号 50G187498),其中天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)浓度为 2.5 μmol/mL,胱氨酸(Cys)浓度为 1.25 μmol/mL。

5 家生产企业的珍珠液各 1 批及 7 家生产企业共 95 批的珍珠明目滴眼液信息见表 1。

表 1 不同生产企业原料药及制剂

Table 1 Raw material and preparation from different manufacturers

序号	珍珠液 (原料药)	珍珠明目滴眼液 (制剂)	制剂批数
1	A 厂	A1 (A 厂产品)	10
2	B 厂	B1 (B 厂产品)	20
3	C 厂	—	
4	D 厂	D1 (D 厂产品)	19
5	E 厂	E1 (E 厂产品)	20
6	—	F 厂	5
7	—	G 厂	3
8	—	H 厂	18

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备

2.1.1 珍珠液 取 5 个厂家提供的珍珠液,经 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,直接质谱进样。

2.1.2 珍珠明目滴眼液 取 7 个不同厂家的珍珠明目滴眼液各 40 mL,冷冻干燥,获得固体粉末,采用 1 mL 水复溶,将样品过 G25 凝胶柱,收集馏出液,0.22 μm 滤膜滤过,进样。

2.2 多肽分析方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱: 0~50 min, 1%~99%乙腈; 柱温 30 °C; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量为 2 μL。

2.2.2 质谱条件 ESI 正负离子模式,锥孔电压 40 V,毛细管电压 2 600 V,离子源温度 100 °C,脱溶剂气温度 350 °C,脱溶剂气体体积流量 600 L/h。采集方式 MSE,采集时间 40 min。质量扫描范围 m/z 100~5 000。碰撞能量: 低能量 6 V, 梯度高能量 20~30 V。碰撞气体: 高纯氦气。

2.3 氨基酸分析方法

氨基酸测定方法采用柱前衍生化 RP-HPLC 法。色谱条件、柱前衍生化方法,氨基酸混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶液的制备方法均参考郑丽慧等^[20]建立的方法。

2.4 珍珠液中多肽分析

从 5 家企业珍珠液 UPLC-Q-TOF MS 测定的基峰离子流 (base peak ion, BPI) 图 (图 1) 中可看出, 5 家企业珍珠液的相同点为均明显可见肽类主要成分峰 (峰 1~4), 但其量明显不同, 从图 2 (峰 1~6 的 MS 图) 中可得出峰 1 的 M_w 为 960、峰 2 的 M_w 为 1 093、峰 3 的 M_w 为 772、峰 4 的 M_w 为 986。A 和 B 2 家企业的珍珠液与其他 3 家企业生产的明显不同, 可见峰 5、6, 此 2 峰呈现多肽类成分簇状峰, 采用 Mass Ent 3 软件对此 2 峰计算 M_w , 结果显示, 峰 5 的 M_w 约为 2 622、峰 6 的 M_w 约为 4 746。

按上述色谱峰的分析结果, 对 5 家企业珍珠液中肽类成分的 M_w 分布进行分析, 并与其制备工艺相对应, 结果见表 2。研究表明, 原料珍珠液存在 2 种明显不同的制备工艺, 一种是直接水提, 所得肽类成分的 M_w 范围较广, 多为多肽类成分; 另一种是酸、酶水解, 多为寡肽, M_w 多在 1 000 及以下。

2.5 珍珠明目滴眼液中多肽测定

从 7 个厂家样品的 UPLC-Q-TOF MS 测定的总离子流色谱图 (total ions chromatogram, TIC, 图 3) 中可看出, 各厂家样品中的肽类主要成分峰分为 3 个区域, 其中 A1 和 F 厂样品的肽类成分主要集中在区域 2 和 3, D1 和 E1 厂样品的肽类成分主要集中在区域 1 和 2, 而另外 3 个厂家 G、B1、H 样品则只在区域 2 有肽类成分。

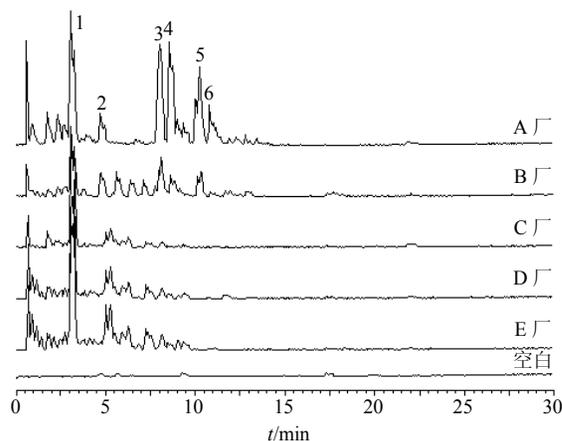


图 1 5 家生产企业珍珠液的 BPI 图

Fig. 1 BPI figures of Zhenzhuye from five manufacturers

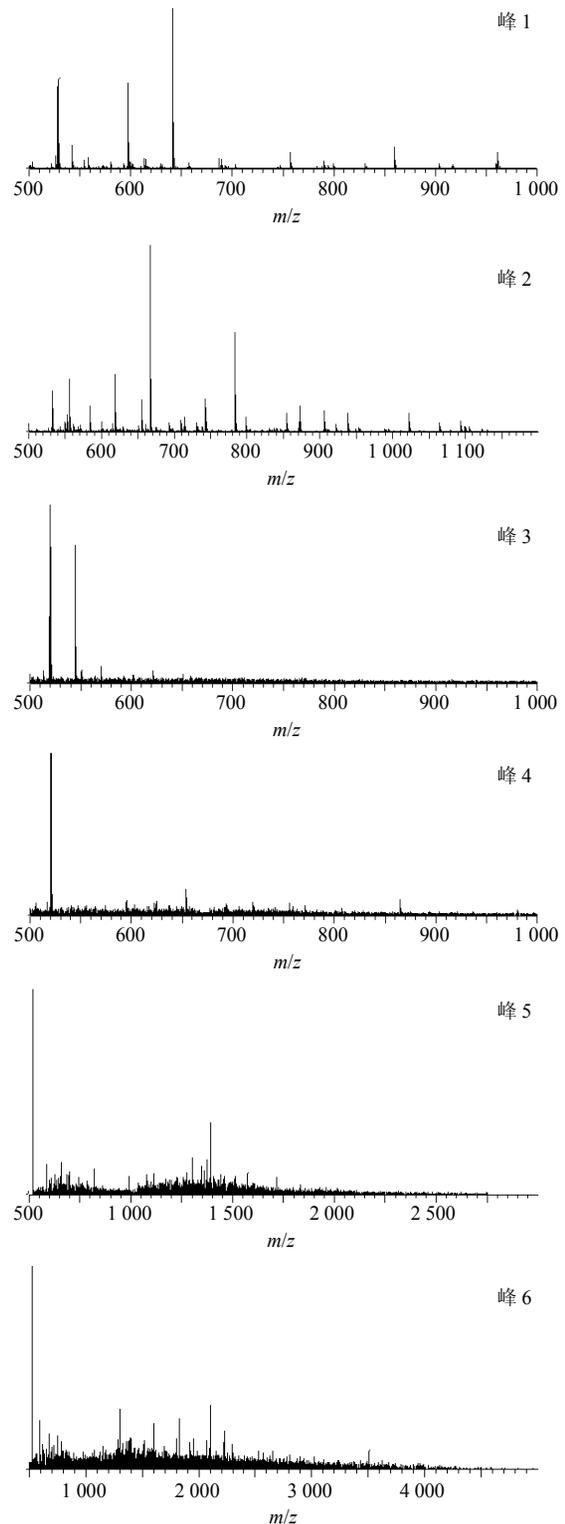


图 2 峰 1~6 的 MS 图

Fig. 2 Mass spectrograms of peaks 1—6

区域 1 中不同保留时间 (t_R) 峰的 MS 图见图 4。 t_R 在 5.416 min 的肽 M_w 为 1 094; t_R 在 9.249 min 的肽 M_w 为 1 300。从图中可看出, 此区域肽类成分的 M_w 在 1 000 左右。

表 2 5 家生产企业珍珠液中多肽的 M_w

Table 2 M_w of polypeptide in Zhenzhuye from five manufacturers

样品编号	生产厂家	肽 M_w 分布	制备工艺 (企业提供)
1	A 厂	519~4 746	水提
2	B 厂	519~4 746	水提
3	C 厂	597~872	酸、酶水解
4	D 厂	532~1 093	酸、酶水解
5	E 厂	525~1 303	酸、酶水解

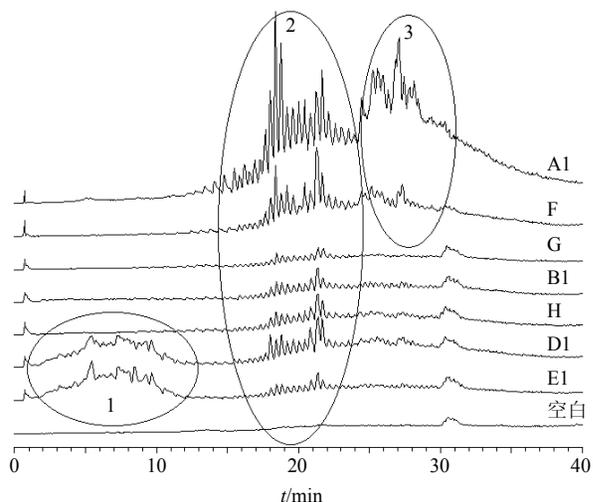


图 3 7 个厂家滴眼液的多肽 TIC 图

Fig. 3 TIC spectra of polypeptide in eye drops from seven manufacturers

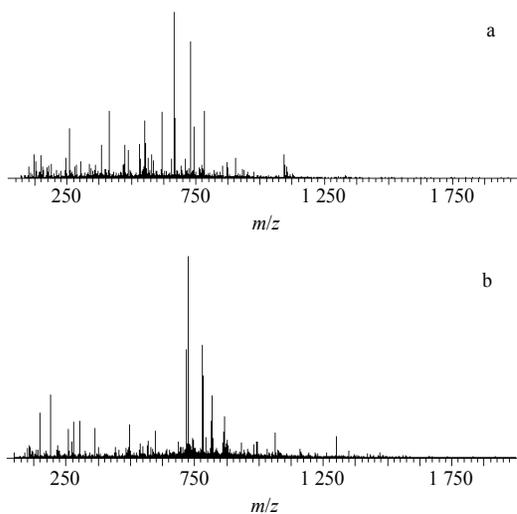


图 4 区域 1 中 t_R 5.416 min (a) 和 t_R 9.249 min (b) 肽的 MS 图

Fig. 4 Mass spectrograms of peaks t_R at 5.416 (a) and 9.249 min (b) in zone 1

区域 2 中不同 t_R 峰的 MS 图见图 5。图中 t_R 为 18.379 min (c)、18.766 min (d)、21.235 min (e)、21.673 min (f) 的 4 个峰均呈多肽类成分簇状峰。

区域 3 中不同 t_R 峰的 MS 图见图 6。图中 t_R 为

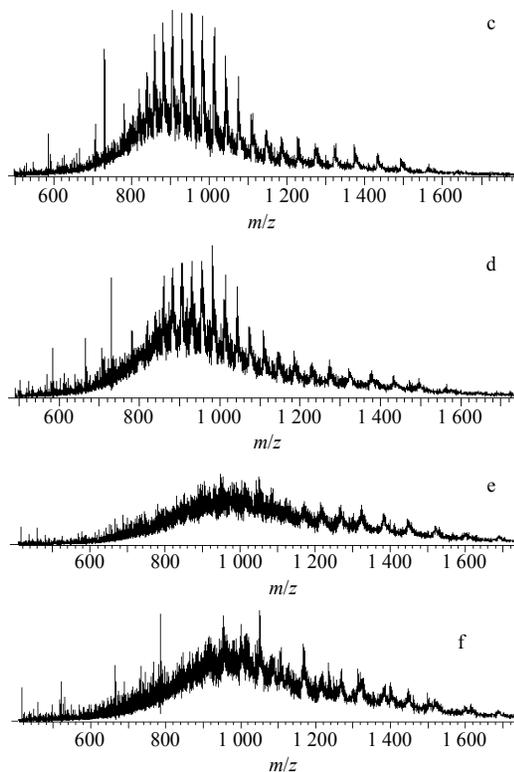


图 5 区域 2 中不同 t_R 峰的 MS 图 (c~f)

Fig. 5 Mass spectra of peaks at different t_R (c~f) in zone 2

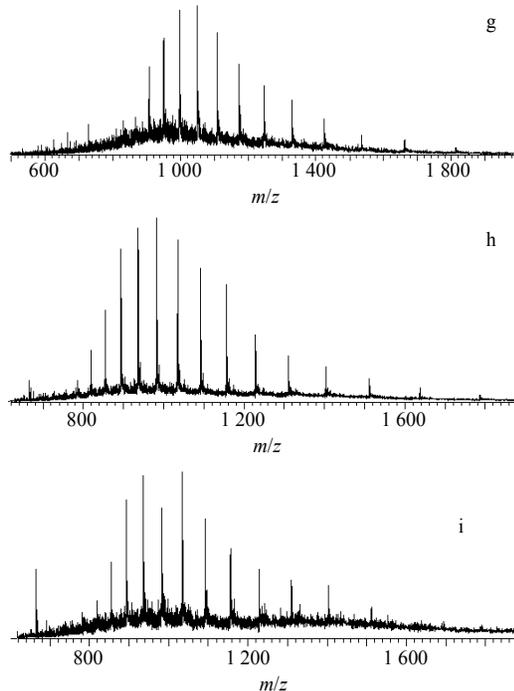


图 6 区域 3 不同 t_R 峰 MS 图 (g~i)

Fig. 6 Mass spectra of peaks at different t_R (g~i) in zone 3

25.993 min (g)、27.099 min (h)、27.407 min (i) 的3个峰均呈多肽类成分簇状峰。

采用 Mass Ent 3 软件对图3中的1、2、3区域中峰的 M_w 进行计算, 7家生产企业的滴眼液中肽类成分的 M_w 分布结果见表3。

表3 7个厂家滴眼液中肽类成分的 M_w
Table 3 M_w of polypeptide in eye drops from seven manufacturers

厂家	肽 M_w		
	1 区域 (5~10 min)	2 区域 (17~22 min)	3 区域 (25~30 min)
A1	665.6~1 169.2	1 975.7~4 793.6, 量较高	8 534.8~9 814.8
F	—	1 017.8~4 895.5, 量较高	4 368.3~9 814.8
G	—	1 017.8~4 895.5, 量较低	—
B1	—	1 017.8~4 895.5, 量较低	—
H	—	1 017.8~4 895.5, 量较低	—
D1	149.0~1 300.6	1 017.8~4 895.5, 量较低	—
E1	149.0~1 094.5	1 017.8~4 895.5, 量较低	—

2.6 珍珠液和珍珠明目滴眼液中的氨基酸测定

5个生产企业提供的珍珠液经柱前衍生 RP-HPLC法测定16种氨基酸分别占总氨基酸量百分比的结果见表4, 16种氨基酸中 Gly 百分比最高, 其他氨基酸百分比不同厂家不尽相同。95批不同厂家的珍珠明目滴眼液中16种氨基酸占总氨基酸量百分比的平均值结果见表5, 其中 Gly 的百分比最高, 与珍珠液结果一致, 但不同厂家之间的差异比珍珠液中 Gly 的差异显著。

将珍珠液和滴眼液中 Pro 与 Ala 的质量浓度测定结果作比值分析, 结果见图7, 图中 C、D、E 厂比值均大于1, 其中 D 和 E 厂珍珠液原料药制备工艺来自 C 生产厂家, 生产企业提供的珍珠液制备工艺为酸/酶水解提取工艺。而其他厂家的远低于1, 采用水提取工艺。通过 Pro 与 Ala 质量浓度比值能够对珍珠液的生产工艺进行区分。

3 讨论

通过 UPLC-Q-TOF MS 测定不同厂家珍珠液原料药和滴眼液制剂中多肽类成分的 M_w , 发现不同厂家样品间差异较大。一般肽中含有的氨基酸的数目为2~9, 根据肽中氨基酸数量的不同, 肽通常被命名为二肽到九肽。 M_w 段在50~1 000的称为小肽、寡肽、低聚肽, 也称为小分子活性多肽。由10~100氨基酸分子脱水缩合而成的化合物叫多肽, M_w

表4 5家生产企业珍珠液中各氨基酸占总氨基酸量百分比
Table 4 Percentages of every amino acid to total content of 16 amino acids in zhenzhuye from 5 manufacturers

氨基酸	占比/%				
	A	B	C	D	E
Asp	5.451	2.835	4.087	0.925	1.784
Glu	7.451	11.339	8.456	4.311	6.762
Ser	8.418	3.622	5.691	4.450	2.096
Gly	26.440	23.858	26.589	26.022	30.785
His	0.857	0.787	0.797	0.731	0.508
Arg	7.604	11.181	8.052	12.590	14.719
Thr	2.110	1.811	2.220	2.572	1.204
Ala	11.560	15.906	8.809	11.563	9.911
Pro	3.670	10.157	10.030	14.561	14.264
Tyr	4.044	0.945	1.090	1.138	1.365
Val	3.648	2.756	3.592	3.414	1.525
Met	2.330	2.677	2.311	2.294	0.865
Ile	5.429	1.417	6.206	1.952	2.007
Leu	4.220	3.622	2.119	4.496	0.955
Phe	5.802	2.283	3.401	2.997	5.085
Lys	0.989	4.803	6.599	6.013	6.146

表5 7家生产企业滴眼液中各氨基酸占总氨基酸量百分比
Table 5 Percentages of every amino acid to total content of 16 amino acids in eye drops from seven manufacturers

氨基酸	占比/%						
	A1	F	G	B1	H	D1	E1
Asp	2.330	3.718	6.832	1.947	3.839	1.263	0.929
Glu	3.224	1.007	7.047	3.012	2.448	3.780	3.214
Ser	9.745	5.728	4.963	7.687	7.364	3.307	3.375
Gly	28.838	34.407	25.028	20.439	25.347	50.718	46.631
His	2.388	2.101	1.944	6.488	4.506	0.836	0.766
Arg	6.418	6.531	9.139	8.687	5.591	8.434	8.208
Thr	2.258	2.995	1.698	4.968	4.084	1.430	1.384
Ala	12.602	6.004	8.261	9.879	15.673	8.062	8.384
Pro	4.462	4.167	3.624	6.918	4.574	10.429	11.604
Tyr	4.260	9.633	5.828	5.910	3.678	0.870	0.974
Val	3.197	3.264	2.758	3.359	2.270	1.833	2.530
Met	0.886	0.181	0.966	0.925	0.246	0.470	0.455
Ile	2.131	2.718	1.754	1.579	1.865	0.881	1.269
Leu	6.042	9.844	10.081	5.127	7.258	2.435	3.100
Phe	7.200	4.979	5.415	8.050	7.373	1.851	2.309
Lys	4.019	2.722	4.663	5.026	3.883	3.401	4.869

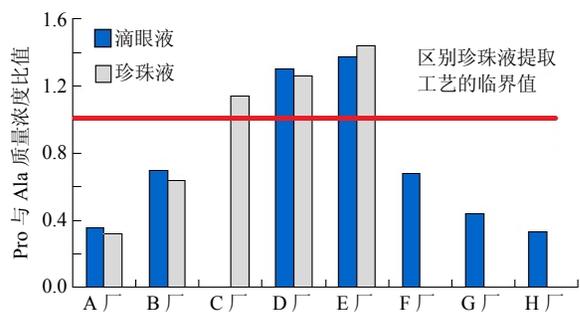


图 7 不同厂家珍珠液和滴眼液中 Pro 与 Ala 质量浓度比值
Fig. 7 Content ratios of proline/alanine in Zhenzhuye and eye drops from different manufacturers

段在 5 000~10 000, 能透过半透膜; 由 50 个以上的氨基酸组成的肽就称为蛋白质, 蛋白质有时也被称为多肽。眼球视网膜上的视紫质由蛋白质组成, 蛋白质缺乏, 可导致视紫质合成不足, 进而出现视力障碍。可见, 滴眼液中的多肽对眼睛起着重要的保护作用。多肽的 M_w 分布测定结果表明, 不同企业的滴眼液中含高 M_w 多肽的 2 个厂家 A1 和 F 厂的样品质量较好。

氨基酸测定结果表明, Pro 与 Ala 质量浓度的比值可用于区分珍珠液的不同制备工艺, 目前珍珠液的生产工艺主要有水直接提取、酸/酶水解提取, Pro/Ala < 1 为水直接提取工艺, Pro/Ala > 1 为酸/酶水解工艺。结合多肽分析结果, 水直接提取工艺制备珍珠液, 其肽类成分 M_w 段在 500~5 000, 较易通过眼球半透膜, 可保证滴眼液制剂质量的有效性。

通过本研究, 建议修订珍珠液质量标准, 明确制备工艺为水直接提取, 珍珠液及珍珠明目滴眼液质量标准增加 Pro 与 Ala 质量浓度的比值为检查项, 总氨基酸测定为定量测定项, 以有效控制珍珠明目滴眼液的质量, 确保其质量的稳定性和有效性。

参考文献

[1] 卫生部药品标准中药成方制剂 (第 17 册) [S]. 1998.
[2] 程敏, 叶小弟, 缪云萍, 等. 珍珠明目滴眼液改善兔眼球结膜微循环的实验研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(8): 856-859.
[3] 牛耘丽, 徐蔚. 珍珠明目滴眼液治疗慢性结膜炎的临床研究 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2005, 26(2): 62-64.
[4] 沈爱祥, 王继红, 丁洁瑾, 等. 珍珠明目滴眼液联合自体血清治疗角膜溃疡临床疗效分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(7): 1361-1363.

[5] 张贵锋, 刘涛, 王前, 等. 高效液相色谱/质谱法识别不同明胶酶解产物中特征多肽 [J]. 分析化学, 2008, 36(11): 1499-1504.
[6] 孙瑞祥, 付岩, 李德泉, 等. 基于质谱技术的计算蛋白质组学研究 [J]. 中国科学 E 辑: 信息科学, 2006, 36(2): 222-234.
[7] 崔琳, 张贵锋, 刘涛, 等. 液相色谱/质谱联用法分析不同年龄鼠皮肤中 I 型、III 型胶原蛋白相对含量 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(4): 71-76.
[8] 田颖刚, 谢明勇, 王维亚, 等. 乌骨鸡肌肉中肌肽的鉴定与测定 [J]. 分析实验室, 2007, 26(1): 5-8.
[9] 孔爱英, 张振清, 乔建忠, 等. HPLC-MS/MS 法测定血浆中十肽化合物 LXT-101 及 Beagle 犬药代动力学研究 [J]. 药学学报, 2008, 43(9): 946-950.
[10] 王丙莲, 孟庆军, 张利群, 等. HPLC-MS/MS 在活性多肽检测中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(6): 159-161.
[11] 丁劲松, 彭文兴, 张祖华, 等. 固相萃取结合 HPLC-MS 测定人血浆中奥曲肽的浓度及相对生物利用度 [J]. 药学学报, 2004, 39(7): 542-545.
[12] 余奕珂, 胡建恩, 白雪芳, 等. HPLC-ESI-MS 对珠蛋白酶解液中的血管紧张素 I 转换酶抑制肽的分离鉴定 [J]. 食品科学, 2007, 28(12): 248-250.
[13] 邵夏炎, 谭远贞, 刘青锋, 等. HPLC-ESI/MS 法测定大鼠血浆及脑组织中 H102 肽的浓度 [J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 22(2): 67-72.
[14] 葛华, 向慎思, 王清清, 等. 大鼠血浆中活性寡肽 RX31 的 HPLC-MS/MS 定量分析方法研究 [J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(3): 206-209.
[15] 向慎思, 王清清, 贾彦波, 等. 在线固相萃取-液质联用法测定小鼠血浆中寡肽 RX31 肽的药代动力学研究 [J]. 军事医学, 2011, 35(10): 758-764.
[16] 邹秦文, 肖新月, 程显隆, 等. 百令胶囊中 17 种氨基酸的柱前衍生化 RP-HPLC 法含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1630-1635.
[17] 郑灏, 程显隆, 魏锋, 等. 雷丸中 16 种氨基酸的柱前衍生化 RP-HPLC 法含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(9): 1631-1635.
[18] 石云峰, 林丽琴, 王金兰. 虫草头孢菌粉中 16 种氨基酸的含量测定 [J]. 医药导报, 2012, 31(12): 1624-1627.
[19] 陈萍红, 王书芳, 田守生, 等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定阿胶中 13 种氨基酸 [J]. 中草药, 2013, 43(14): 1995-1999.
[20] 郑丽慧, 丁晓萍, 胡军林, 等. RP-HPLC 法测定珍珠明目滴眼液中 16 种氨基酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(11): 183-189.