

溶菌酶的处方设计前稳定性研究

周闰臣,刘青锋,鲁莹,钟延强(第二军医大学药学院药剂学教研室,上海 200433)

[摘要] 目的 考察 pH值、温度、保护剂、有机溶剂对溶菌酶物理稳定性和生物活性的影响,为其缓释注射剂的处方学研究提供依据。方法 以 HPLC法测定溶液中溶菌酶的含量,以比浊法测定溶菌酶的生物活性。结果 在 pH4.0、pH10.0条件下溶菌酶的物理稳定性较好,pH4.0条件下溶菌酶可保持较高的生物活性,pH1.0的条件会完全破坏溶菌酶的溶菌活性;低温条件有利于保持溶菌酶的物理稳定性和生物活性;甘露醇对溶菌酶的稳定性具有先增强后减弱的作用;有机溶剂会严重破坏溶菌酶的物理稳定性,但仍保留着一部分溶菌活性。结论 pH值、温度、保护剂、有机溶剂对溶菌酶的物理稳定性和生物活性具有明显影响。

[关键词] 溶菌酶;处方设计前工作;稳定性

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)01-0011-04

Stability studies of lysozyme for preformulation

ZHOU Gui-chen, LU Qing-feng, LU Ying, ZHONG Yan-qiang(Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of pH value, temperature, protectant and organic solvent on the physical stability and biological activity of lysozyme. **Methods** The concentration of lysozyme was determined by HPLC and the biological activity of lysozyme was tested by turbidimetric method. **Results** Lysozyme was physically stable at pH4.0 and pH10.0. The biological activity of lysozyme was kept well at pH4.0 while it was totally destroyed at pH1.0. Low temperature tended to protect lysozyme from damage. Mannitol protected lysozyme at the beginning and then accelerated its destruction. Organic solvent seriously destroyed lysozyme while the biological activity of lysozyme remained to some degree. **Conclusion** The pH value, temperature, protectant and organic solvent can obviously influence the physical stability and biological activity of lysozyme.

[Key words] lysozyme; preformulation; stability

溶菌酶(lysozyme),又称胞壁质酶或乙酰胞壁质聚糖水解酶,是一种作用于微生物细胞壁的水解酶,具有抗菌、抗病毒、抗炎、增强抗生素疗效等作用,可用于治疗慢性鼻炎、急慢性咽喉炎、口腔溃疡、水痘等疾病^[1],同时,溶菌酶也是一种常用的模型蛋白,广泛应用于药物制剂的处方研究中^[2~4]。本实验主要研究了溶菌酶溶液在不同条件下的物理稳定性和生物活性,为溶菌酶的剂型研发及相关的实验研究、工业生产提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 L-2000高效液相色谱仪(日本 Hitachi公司),SHZ-88台式水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂),AL104型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司),NANOpure Diamond™超纯水机(美国 Bamstead公司),Multiskan MK3酶标仪

(美国 Thermo labsystems公司),96孔细胞培养板(美国 Corning公司)。

1.2 材料 溶菌酶(上海西宝生物科技有限公司),溶壁微球菌(南京建成生物工程研究所),N-甲基吡咯烷酮(NMP,美国国际特品公司),色谱纯三氟乙酸(美国 Tedia公司),其它试剂为分析纯或色谱纯。

2 实验方法

2.1 HPLC法测定溶菌酶含量

2.1.1 色谱条件 Welch Materials C₁₈色谱柱(250×4.6 mm,5 μm,300 Å)。流动相:A相-乙腈(含0.1%三氟乙酸),B相-水(含0.1%三氟乙酸),0-15 min,A相 25%→50%;15-25 min,A相 25%。检测波长为 281 nm,流速为 1 ml/min,柱温为 40℃,进样量为 20 μl,出峰时间约为 12.2 min。

2.1.2 标准曲线的建立 精密称取溶菌酶粉末适量,用磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)溶解并稀释成浓度为 176 μg/ml的贮备液。贮备液以 PBS倍比稀释,

[作者简介] 周闰臣(1985-),女,硕士研究生。

[通讯作者] 钟延强. Tel: (021) 81871285, E-mail: yqzhong@smmu.edu.cn.

得浓度为 88, 44, 22, 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列标准液, 进样, 记录峰面积。对浓度 C 和峰面积 S 作线性回归, 得回归方程为: $S = 2102.4C + 727.96$, $r = 1.0000$, 线性范围为 11 ~ 176 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 最低检测限为 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.1.3 精密度实验 取高、中、低浓度的溶菌酶溶液各一份, 以上述色谱条件进样, 每个样品进样 3 次, 连进 3 d。各样品的日内、日间 $RSD < 2\%$, 说明测定方法的精密度良好。

2.1.4 回收率实验 精密配制高、中、低浓度的溶菌酶溶液各 3 份, 以上述色谱条件进样, 结果见表 1。样品的平均回收率为 98.58%, $RSD = 1.2\%$, 说明测定方法的回收率符合要求。

表 1 溶菌酶含量测定方法的回收率 ($n = 3$)

加入量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	测定值 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
22.0	21.43	97.41		
44.0	43.40	98.59	98.58	1.2
88.0	87.77	99.74		

2.2 溶菌酶的生物活性

2.2.1 比浊法测定溶菌酶的生物活性 实验对比

浊法测定溶菌酶的活性^[5, 6], 具体方法为: 取溶壁微球菌干菌粉 5 mg, 加 0.1 mol/L、pH 6.2 磷酸盐缓冲液少许, 在乳钵中研磨 2 min, 倾出, 稀释到 15 ml 左右, 使该悬浮液吸光度在 0.5 ~ 0.7 范围内。先将溶菌酶溶液和菌粉悬浮液放入 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴预热 10 min, 然后吸取 20 μl 溶菌酶待测液、200 μl 菌粉悬浮液加入 96 孔细胞培养板中, 振摇混匀, 并开始计时。空白对照为 20 μl 0.1 mol/L、pH 6.2 磷酸盐缓冲液与 200 μl 菌粉悬浮液的混合液。分别在 0.5 和 4.5 min 测定悬浮液在 450 nm 波长的吸光度, 并计算二者的差值 E , 空白对照所得差值为 E_0 。按公式计算溶菌酶的活力 (A):

$$A(U) = 1000 \times (E - E_0) / 4$$

2.2.2 实验方案 配制不同组成的溶菌酶溶液 (溶菌酶浓度约为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 并放于一定条件下定时取样, 各溶液实验条件见表 2。各样品在 0、0.25、1、2、3、5、7 d 取样, 分别以 HPLC 法和比浊法测定溶菌酶的浓度和溶菌活力。各样品平行 3 份。以 0 d 溶菌酶的浓度为基准, 计算各样品在不同时间的百分含量。分别以平均百分含量和平均溶菌活力对时间作图, 观察二者随时间的变化趋势。

表 2 溶菌酶各实验处方的不同条件

实验条件	处方编号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	1.0	4.0	7.0	10.0	7.0	7.0	7.0	7.0
温度 / $^{\circ}\text{C}$	37	37	37	37	4	37	37	37
添加剂 (w/w)	-	-	-	-	-	5% NMP	1% 甘露醇	5% 甘露醇

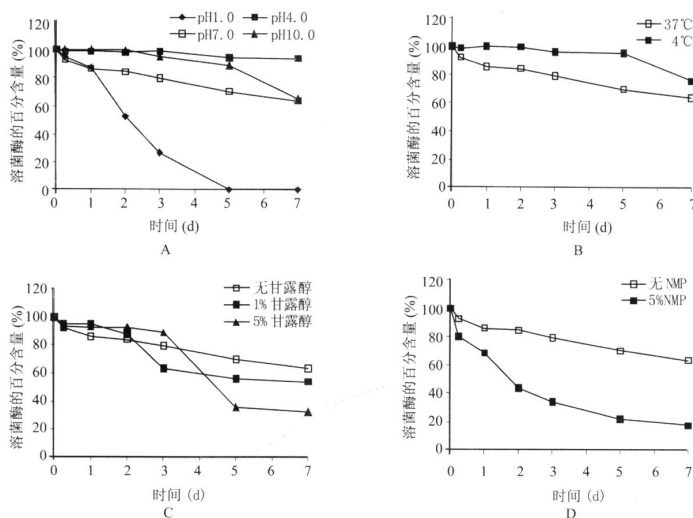


图 1 不同条件下溶菌酶的含量变化趋势图

A - 37 $^{\circ}\text{C}$, 无添加剂 B - pH7.0, 无添加剂 C - pH7.0, 37 $^{\circ}\text{C}$ D - pH7.0, 37 $^{\circ}\text{C}$

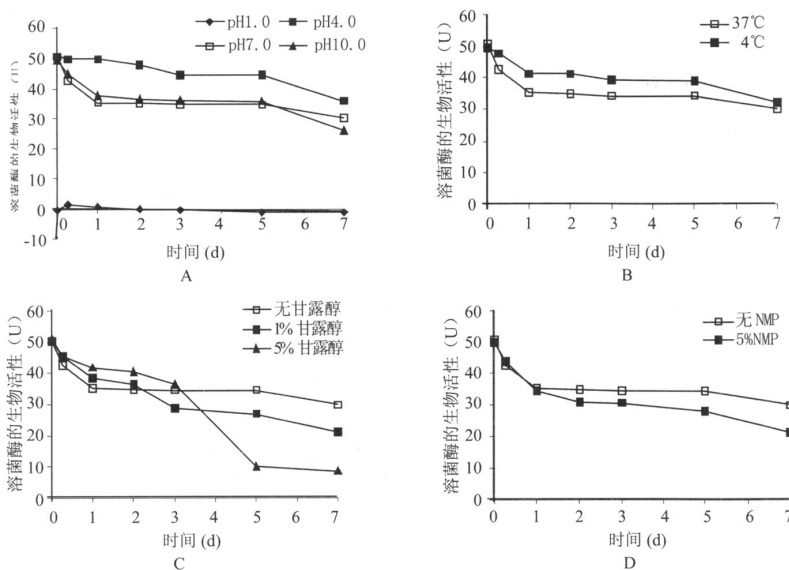


图 2 不同条件下溶菌酶的生物活性变化趋势图

A - 37 °C, 无添加剂 B - pH7.0, 无添加剂 C - pH7.0, 37 °C D - pH7.0, 37 °C

3 结果与讨论

3.1 pH值的影响 溶液的 pH 值对溶菌酶的稳定性具有明显的影响,如图 1(A)所示,溶菌酶在 pH 4.0、pH 10.0 的条件下物理稳定性较好,在 5 d 内含量基本上没有变化,但在 pH 1.0 的条件中含量下降迅速,5 d 时 HPLC 法已经检测不到溶菌酶的峰,在 pH 7.0 条件下也不稳定,在进行实验的 7 d 时间内含量逐渐降低。如图 2(A)所示,溶菌酶在 pH 4.0 的条件下始终保持较高的溶菌活性,在 pH 7.0、pH 10.0 的条件下次之,而 pH 1.0 的条件对溶菌酶的生物活性影响显著,从实验开始就未能检测到溶菌活性,可能是溶菌酶的活性部位在该条件下已经遭到了完全破坏。

3.2 温度的影响 由图 1(B)及图 2(B)可见,低温条件(4 °C)有利于保持溶菌酶的物理稳定性和溶菌活性,尤其是可保持溶菌酶含量在 5 d 内基本不降低。

3.3 保护剂的影响 实验在溶菌酶溶液加入一定量的甘露醇来考察保护剂对溶菌酶活性的影响。比较图 1(C)和图 2(C)可见,甘露醇对溶菌酶的含量和生物活性的影响趋势基本相同:加入甘露醇后溶菌酶在 2 d 内稳定性较好,而且高浓度的甘露醇对溶菌酶保护效果更明显,但是 2 d 后这种保护作用减弱,而后甘露醇却加速了溶菌酶的破坏,这种现象有待于进一步研究。

3.4 有机溶剂的影响 实验在溶菌酶溶液中加入少量 NMP,以考察水溶性有机溶剂对溶菌酶稳定性的影响。从图 1(D)可见,NMP 的加入明显加速

了溶菌酶的破坏,使其含量在 1 d 内减少了 30% 以上,这可能是溶液中有有机溶剂与溶菌酶对水分子的竞争引起的。当溶液中存在 NMP 时,溶菌酶的真实含量很难测量准确,因此在以溶菌酶为模型药物进行制剂处方设计的实验^[7, 8]中,NMP 可能会使实验结果产生偏差。在图 2(D)中,溶菌酶的生物活性也有明显的降低,但是相对于其含量变化来说,生物活性的降低速率要小得多,结合 HPLC 图谱中溶菌酶主峰减小、杂峰明显增大的现象可知:在 NMP 存在的条件下,溶菌酶的降解产物也具有一定的溶菌活性。

总之,溶菌酶溶液在含量和生物活性方面都具有较大的不稳定性,易受 pH 值、温度、保护剂、有机溶剂等因素的影响,因而在溶菌酶的相关研究、生产中必须充分考虑影响其稳定性的各种因素,以确保研究结果真实可信及产品质量符合要求。

【参考文献】

- [1] 刘慧,王凤山,楚杰. 蛋清溶菌酶部分酶学性质及酶活性的影响因素研究[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(6): 385.
- [2] Chhabra S, Sachdeva V, Singh S. Influence of end groups on in vitro release and biological activity of lysozyme from a phase-sensitive smart polymer-based in situ gel forming controlled release drug delivery system[J]. Int J Pharm, 2007, 342(1-2): 72.
- [3] Hiemstra C, Zhong Z, Van Tomme SR, et al. In vitro and in vivo protein delivery from in situ forming poly(ethylene glycol)-poly(lactide) hydrogels[J]. J Control Release, 2007, 119(3): 320.

(下转第 44 页)

法配制溶液并按选定的色谱条件测定,以黄芩苷的含量计算, RSD 为 0.43% ($n=6$)。表明重复性良好。

2.9 稳定性试验 取同一份样品溶液,按上述选定的方法测定,于 0、3、6、9、12 h 测定,以黄芩苷的百分含量计算, RSD 为 0.39%,表明配制好的样品溶液 12 h 内稳定。

2.10 加样回收试验 精密量取适量测知含量的样品 9 份,加入不同量的对照品溶液,配成 3 种不同浓度的溶液各 3 份,共 9 份,同时配制对照品溶液,按上述选定的方法测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 芩蓝滴鼻液中黄芩苷的回收率试验结果

样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1.641	1.2027	2.8326	99.08	98.25	1.06
1.641	1.2027	2.8086	97.08		
1.641	1.2027	2.8267	98.59		
1.641	1.6036	3.2465	100.12	100.69	0.77
1.641	1.6036	3.2507	100.38		
1.641	1.6036	3.2699	101.58		
1.641	2.0045	3.6469	100.07	99.85	0.84
1.641	2.0045	3.6238	98.92		
1.641	2.0045	3.6566	100.55		

2.11 样品的含量测定 取批号为 20051109, 20060121, 20060325 的样品,按“2.3.1 项下的方法配制溶液,精密量取 10 μ l,注入液相色谱仪,按上述选定的色谱条件测定,按外标法以峰面积计算,结果 3 批样品含黄芩苷量分别为 0.328 2、0.327 9、0.329 0 mg/ml。

3 讨论

3.1 查阅有关文献,用高效液相色谱法测定黄芩苷含量时,波长设在 275 nm^[2]、276 nm^[3,4]、277 nm^[5]、278 nm^[6]、280 nm^[7,8] 均有,用甲醇溶解黄芩苷对照品后,在 200~500 nm 波长范围内扫描后,在

277 nm 波长处有最大吸收,故在本方法中将测定波长设在 277 nm。

3.2 分别用 Gemini 5 μ C₁₈ 110A (4.60 mm \times 250 mm, 5 μ m) (美国 phenomenex 公司)和 Hypersil C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) (大连依利特科学仪器有限公司)两种色谱柱进行了测定,结果两种不同型号的色谱柱记录的色谱图峰形均良好,分离度也佳。

3.3 黄芩苷为含羟基的黄酮类化合物^[1],极性较大,选择了经典方法^[8]中的流动相,用该流动相测定本品中的黄芩苷,峰形好,分离度佳。

3.4 本品中含有十三味中药,虽然成分复杂,由于本品制成制剂中已经多次提取,去除了较多的杂质,所以样品用甲醇稀释过滤后就可直接进样测定,样品处理十分方便。

3.5 本方法简便准确,专属性强,较好地测定了芩蓝滴鼻液中的黄芩苷的含量,为控制其质量提供了方法和依据。

【参考文献】

- [1] 杨云,张晶,陈玉婷,等.天然药物化学成分提取分离手册[M].北京:中国中医药出版社,2003:666.
- [2] 张志荣,胡晓颖,蒋大义,等.银黄冲剂中黄芩苷在家兔体内的代谢动力学研究[J].中成药,1996,18(6):1.
- [3] 赵伟贤. HPLC法测定黄芩滴眼液中黄芩苷的含量[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(4):278.
- [4] 王弘,陈济民,张法民.黄芩甙在大鼠胃、离体小肠的吸收动力学研究[J].沈阳药科大学学报,2000,17(1):5.
- [5] 仇峰,何仲贵,程杉,等. RP-HPLC法测定家兔血浆中黄芩甙的浓度[J].沈阳药科大学学报,2001,19[3]:189.
- [6] 李新中,陈萱,杨于嘉,等.黄芩甙在家兔感染性脑水肿模型中的药代动力学研究[J].中国药学杂志,1999,34(2):107.
- [7] 阴健,任天池,曹春林.血浆中黄芩甙的 HPLC测定方法[J].中国实验方剂学杂志,1998,4(1):4.
- [8] 中国药典 2005 版.第一部[S].2005(D):211.

[收稿日期] 2009-04-22

[修回日期] 2009-10-19

(上接第 13 页)

- [4] Wang B, Zhu W, Zhang Y, et al. Synthesis of a chemically-crosslinked thermo-sensitive hydrogel film and in situ encapsulation of model protein drugs[J]. React Funct Polym, 2006, 66(5): 509.
- [5] Bezemer JM, Radersma R, Grijpma DW, et al. Zero-order release of lysozyme from poly(ethylene glycol)/poly(butylene terephthalate) matrices[J]. J Control Release, 2000, 64(1-3): 179.
- [6] WS1-C3-0033-89. 中华人民共和国卫生部药品标准[S].

1989: E6-141.

- [7] DeSnoyer JR, McHugh AJ. The effect of Pluonics on the protein release kinetics of an injectable drug delivery system[J]. J Control Release, 2003, 86(1): 15.
- [8] Singh S, Singh J. Controlled release of a model protein lysozyme from phase sensitive smart polymer systems[J]. Int J Pharm, 2004, 271(1-2): 189.

[收稿日期] 2009-10-10

[修回日期] 2009-11-30