



Lysozyme 製劑之定量法探討

邱進益

摘要

Lysozyme 製劑之定量法隨着製造廠家之不同其檢體酵素之萃取方法亦各有所差異。同一檢體若以不同方法進行萃取，所得結果差異甚大。本研究探討出若磨碎後的檢體粉末，先溶於 0.1 N 鹽酸，作酵素之萃取，過濾後取適量體積，再以 M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.2) 稀釋至力價為 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，爾後與基質液 *Micrococcus lysodeikticus* 作用 10 分鐘並測定其 640 nm 波長之吸光度，發現此萃取法適用於不同廠牌檢體，並且可大大提高受測檢體力價。

前言

Lysozyme 除了發現於鼻涕外，淚液、白血球等亦廣泛的存在着，臨床上或製劑上所使用之 Lysozyme 則主要來自於雞蛋白。

Lysozyme 是由 129 個胺基酸構成之小型酵素，分子量約 14.6 kdal。臨床上 Lysozyme 主要應用於促進組織修復，強化生體防禦機能，分解膿粘液以及止血等目的上。

由於 Lysozyme 製劑在製造過程中較不穩定，因此各廠家在製程中常添加吸附性賦形物或控制物化條件來做為穩定酵素的作用。基於上因，在酵素力價分析時，檢體中酵素抽取處理常隨廠家之不同而有所差異。常用的方法包括有(1)磷酸緩衝液抽取或(2)生理食鹽水抽取¹或(3)磷酸緩衝液與生理食鹽水混合抽取²或(4)加熱方式抽取。不同的處理用於相同檢體的檢測往往會有極大的偏差，造成檢驗人員的困擾，本文主要目的在探討一種能適用於各廠牌 Lysozyme 製劑之萃取方法，以減少因檢驗方法之不同所造成的差異。

材料與方法

一、材料

(一)檢體來源：購自市面藥房，其中檢體 1 係單方製劑每錠含 Lysozyme 力價 30mg，檢體 2 為複方

製劑，每一膠囊含 Lysozyme 力價 10mg。

(二)標準品：Lysozyme Standard (日本國立衛生試驗所標準品，1mg of Lysozyme Standard Contain 1.0mg Lysozyme Potency, Control 814)。

(三)基質：*Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 之乾燥菌體 (Sigma)

(四)試藥：

1. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 及 Na_2HPO_4 (試藥特級，和光純藥工業株式會社)。

2. NaCl (試藥特級，和光純藥工業株式會社)。

3. 鹽酸 (Merck)。

4. Triton $\times 100$ (Sigma)。

(五)儀器：

1. Spectrophotometer (Varian / CARY 210)。

2. Wrist Action Shaker (BURRELL Model 75)。

3. Water bath (Forma Scientific Inc. Model 2564)。

(六)溶液的配製：

1. 磷酸緩衝液 (pH 6.2)：取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10.40g 加水至 1000ml (A 液)，取

Lysozyme 製劑定量法探討

Na₂HPO₄ 9.464 g 加水至 1000 ml (B 液)。取 A 液 815 ml 加 B 液 185 ml，適當調整 pH 至 6.2。

2. 標準液：精確稱量標準品 10 mg，以磷酸緩衝液稀釋至最終力價為 2.5 μg/ml，置於 0°C 冰水中，並儘速於 2 小時內完成檢驗，以防力價下降²。

3. 基質液：稱取基質粉末約 50 mg，使溶於 120 ml 磷酸緩衝液，於波長 640 nm，用緩衝液或基質調整其濃度為 T (transmittance) = 10 %，作為供試之基質液。

4. 檢體酵素之萃取：

(1) 取檢體 20 顆，其中膠囊需小心拉開倒出內容物，並以毛筆刷下附着膠囊內部之內容物，置於天平精確稱取重量，求出每錠 (膠囊) 之平均重量後，置於研鉢中磨成均勻粉末。

(2) 精確稱取一錠之平均重量，置入 50 ml 之量液瓶，各分別加入 a. 磷酸鹽緩衝液。 b. 氯化鈉 (濃度分別為 0.1、0.5、0.9、1.3、1.7、2.1 和 2.5 %)。 c. 鹽酸 (濃度分別為 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 N)。 d. Triton X 100 (濃度分別為 0.1、0.5、1.5 和 2.0 %) 等不同濃度溶液各 25 ml，於 Shaker 中振盪 (振幅 5) 10 分鐘，然後再分別加體積至定容，並置入 0°C 冰水中。

5. 檢體酵素試液之配製：

上述製備至定容之酵素抽取液，分別以 Whatman No.1 濾紙過濾，丟棄前 10 ml 之濾液，再濾過之濾液各取 1 ml，然後均以磷酸緩衝液稀釋至最終力價為 2.5 μg/ml，作為供試液，並置於 0°C 冰水中備用。

二、方法³

參照本局調查研究年報第三號 p. 88 力價試驗部分。計算：

$$\text{檢體百分率力價} = \text{標準品力價} \times \frac{W_S \times (A_B - A_T)}{W_T \times (A_B - A_S)}$$

$$\times \frac{\text{檢體每錠 (膠囊) 平均重量}}{\text{檢體標示力價}} \times 100 \%$$

W_S：稱取之標準品重。

W_T：稱取之檢體重。

A_B：磷酸鹽緩衝液 (對照溶液) 之吸光度 (Absorbance)。

A_T：檢體試液之吸光度。

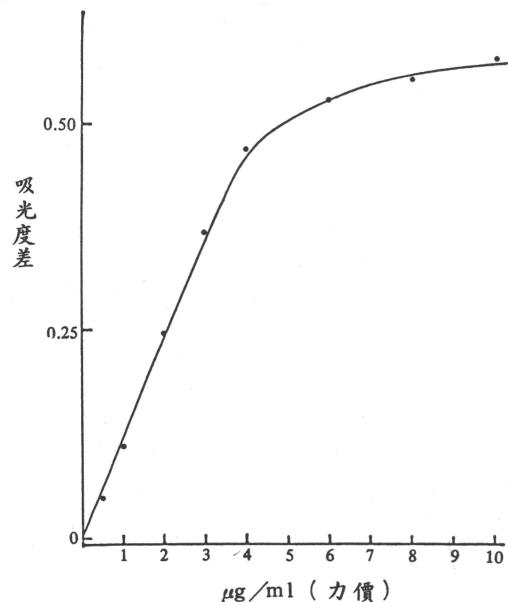
A_S：標準液之吸光度。

結果與討論

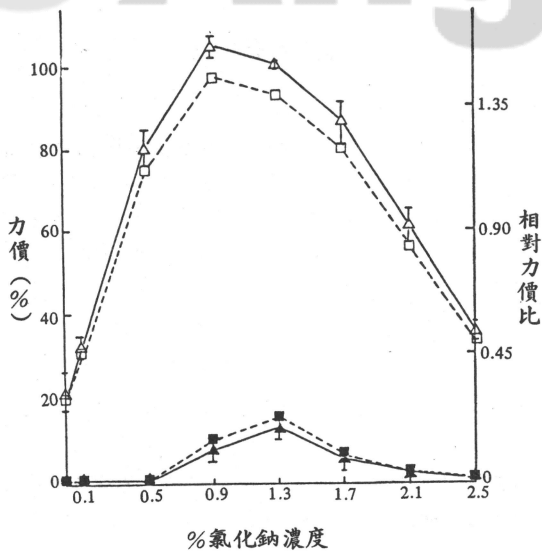
本實驗過程中發現配製好之基質液若貯存於 0 ~ 4°C 冰箱，其 Transmittance 會隨時間增長而逐漸增大，配製好之標準液及檢體試液亦會隨時間增長而力價逐趨下降。谷本剛等人²亦發現有相似現象，因此作為分析 Lysozyme 之基質液、標準液及檢體試液配製完成後宜置於冰水中，並儘速於 2 小時內完成檢驗。

當基質之批號變更時，每次之標準品均應作成檢量曲線，使用其直線部分之最適當濃度。本實驗所求得之直線部分在 0 ~ 4 μg/ml (力價) 之濃度範圍內 (如圖一所示)，因此本文之各項實驗均選定 2.5 μg/ml 作為 Lysozyme 標準液配製基準。

以往抽購 Lysozyme 製劑之檢驗法是以磷酸緩衝液作為酵素之抽取。因此本文簡稱此法為「磷酸法」。西崎笹光等人¹研究指出，若以 0.5 M 氯化鈉溶液代替磷酸緩衝液作為檢體中 Lysozyme 之抽取，則可獲致較高之力價。本研究選用兩種以磷酸法測定所得結果差異較大 (檢體 1 測定力價



圖一 Lysozyme 標準品之檢量曲線
吸光度差 = 對照試驗吸光度 - 標準品吸光度



圖二 不同濃度之氯化鈉對兩種檢體內酵素抽取所得之百分率力價和相對力價比。

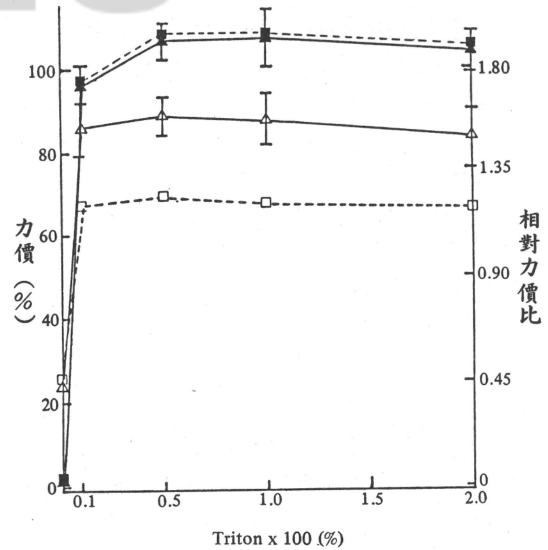
$$\text{相對力價比} = \frac{\text{氯化鈉法測得力價}}{\text{標準法測得力價}}$$

- △——△ 檢體 1 之力價
- ……□ 檢體 1 之相對力價比
- ▲——▲ 檢體 2 之力價
- ……■ 檢體 2 之相對力價比

71.6%，檢體 2 為 54.7%) 的檢體作為不同萃取法探討時之比照。

如圖二所示，以不同濃度之氯化鈉溶液代替磷酸緩衝液作酵素之抽取，發現當氯化鈉濃度在 0.9% 時對檢體 1 達最高測定力價，檢體 2 則以 1.3% 時抽出率較高。隨着氯化鈉濃度之再增高，酵素力價呈急劇下降。圖二同時顯示，以蒸餾水 (氯化鈉濃度 = 0) 抽取，所得力價均偏低。本實驗以氯化鈉溶液抽取酵素在兩種檢體中並未達相同效果，若與磷酸法比較，檢體 1 最高可為磷酸法之 1.6 倍，然用檢體 2 卻只有 0.2 倍左右，因此以氯化鈉溶液抽取酵素並未達本研究目的要求。

由於目前 Lysozyme 主要來源均由雞蛋白抽取，因此考慮到酵素會受脂質類化合物污染的可能，以致於無法以蒸餾水或食鹽水抽出。以不同濃度之 Triton X 100 進行酵素抽取，結果如圖三所示



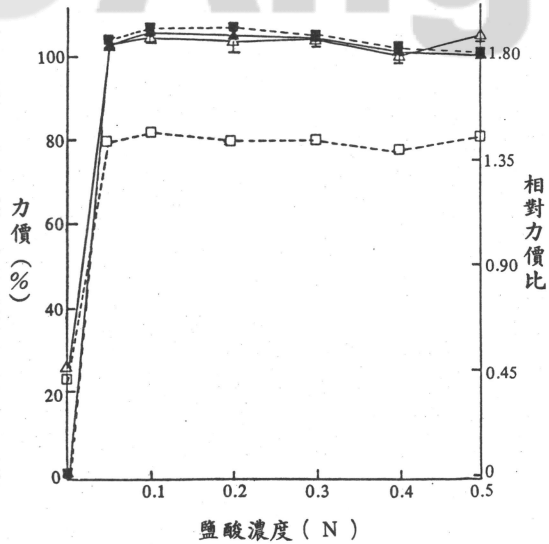
圖三 不同濃度之 Triton X 100 對兩種檢體內酵素抽取所得之力價和相對力價比。

$$\text{相對力價比} = \frac{\text{Triton X 100 測得力價}}{\text{磷酸法測得力價}}$$

- △——△ 檢體 1 之力價
- ……□ 檢體 1 之相對力價比
- ▲——▲ 檢體 2 之力價
- ……■ 檢體 2 之相對力價比

，檢體 2 之力價顯著提高，然而檢體 1 則反較以氯化鈉法抽出者低。但是兩者所測力價均較磷酸法為高。為了確認檢體是否被脂質污染，本研究作了薄層層析，以磷脂質作標準比較，並未發現有磷脂質存在。參照以往有關 Lysozyme 製劑原附處方，發現製劑中常添加有羧酸甲基澱粉鈉 (Sodium Carboxymethyl Starch)、羧甲基纖維素 (Carboxymethyl Cellulose)、硬脂酸鎂 (Magnesium Stearate) 和滑石粉 (Talc) 等賦形物，此等化合物為微溶或不溶於水，因此考慮以稀酸作為製劑中酵素之抽取。圖四顯示，不同濃度鹽酸作酵素之抽取時，兩種檢體所得力價甚為接近，且均在 100% 上下，且以 0.1 N 濃度者為最高。若與磷酸法求得力價作比較，檢體 2 約為磷酸法兩倍，而檢體 1 亦近於 1.5 倍，由以上結果推測，造成檢驗結果重大偏差的主因，可能是製劑賦形物對酵素之

Lysozyme 製劑定量法探討



圖四 不同濃度之鹽酸對兩種檢體內酵素抽取所得之力價和相對力價比。

$$\text{相對力價比} = \frac{\text{鹽酸法測得力價}}{\text{磷酸法測得力價}}$$

- △——△ 檢體 1 之力價
- ……□ 檢體 1 之相對力價比
- ▲——▲ 檢體 2 之力價
- ……■ 檢體 2 之相對力價比

表一 Lysozyme 標準品在不同溶液內之力價穩定度

溶液名稱	力價 %
磷酸緩衝液	100
0.1 N 鹽酸	100.8 ± 0.3
Triton X100	99.6 ± 0.8
0.9% 食鹽水	100.5 ± 0.5

表二 不同檢體以磷酸法和鹽酸法萃取所得力價之比較

檢體編號	萃取法	
	磷酸法	鹽酸法
1	71.6 ± 3.4	103.1 ± 3.0
2	54.7 ± 4.1	105.6 ± 4.8
3	58.2 ± 5.6	83.8 ± 4.2
4	96.0 ± 7.1	105.8 ± 0.7
5	83.9 ± 6.1	82.8 ± 0.9
6	63.5 ± 3.6	81.7 ± 4.8
7	60.0 ± 5.4	98.8 ± 0.6

強力吸附而不易被溶劑抽出所致。

由於 Lysozyme 對酸及高溫均穩定⁴，本實驗為求酵素能更完全的抽出，分別於上述設立之各鹽酸濃度抽取過程中再置於 50 °C 水浴 30 分鐘，結果力價並無提高。

如表一所示，標準品將其分別溶於不同溶液結果，與磷酸法比較，並無差異。以鹽酸法檢測市面抽購檢體，顯示本法優於磷酸法（如表二所示）。

一般作生物體液中 Lysozyme 含量測定除了以吸光度法（即本研究所採用者）外，較常用之另一方法為 Lyso-Plate Assay Method⁵，此法為抗生素 Bioassay 法之延伸，以 Lysozyme 分解菌體後所得之透明圈大小定酵素的力價，此法最適於檢體為不透明或透光率不佳或含其他蛋白質成分者所採用。至於在 Lysozyme 製劑力價測定若採 Lyso-Plate 法當考慮酵素之擴散能力和賦形物對酵素之結合力，因此若能先以鹽酸法將酵素萃取，然後再運用 Lyso-Plate 法將有助於更精確的測定。

參考文獻

- 西崎笹夫，木鴻敬二，橫田椅江，川村次良．1973．リゾチーム製劑のカ價測定について衛生試験所報告，第91号，53-57．
- 谷本 剛，福田秀男，川村次良．1980．酵素製劑の定量試験（その1）リゾチーム製劑．衛生試験所報告，第98号，87-91．
- 簡宏銘，游祥榮．1983．市售 Lysozyme 製劑之品質調查．藥物食品檢驗局調查研究年報，3，87-89．
- The Merck Index, 19th edition, pp. 5460. Lysozyme.
- Prieur, D. J., H. M. Olson and D. M. Young. 1974. Lysozyme deficiency—an inherited disorder of rabbits. *Am. J. Pathol.*, 77(2), 283-296.

藥物食品檢驗局調查研究年報 (Ann. Rept. FDB)



STUDIES ON THE ASSAY OF LYSOZYME IN COMMERCIAL PREPARATIONS

JINN-YIH CHIOU

ABSTRACT

Different pretreatment procedures may give different results on the assay of lysozyme preparations. A standard pretreatment procedure was developed for the analysis of samples from dif-

ferent manufactures. The results showed that this procedure is applicable to the samples from the seven manufacturers studied in this paper.