

高效排斥色谱分离和测定溶菌酶

徐松林 张仁斌

(中国科学院上海药物研究所)

溶菌酶是一种分子量为 14400 含有精氨酸、天冬氨酸和色氨酸等氨基酸的粘多糖酶。它具有抗格兰姆阳性菌和某些病毒的作用⁽¹⁾，医学临床上常用来治疗五官科多种粘膜炎症。目前国内已有此药物生产，并已被列入上海市药品标准中⁽²⁾。

溶菌酶的生产系利用新鲜鸡蛋清为原料，并应用溶酶小球菌——磷酸缓冲液作底物，用分光光度法来测定酶活力的单位从而控制该药物的质量。在实际工作中，所用的溶酶小球菌的质量很难严格控制，以致使该方法的准确性和重复性较差，而且温度对分析结果也有一定的要求。

近年来，高效排斥色谱日益广泛地被用于蛋白质、酶等各种生物大分子物质的分离，这种方法具有分离速度快，分离效率高和活性回收率高等优点。目前常用的商品柱有 Shodex WS 系列柱、TSK-gel SW 系列柱和 Waters 的蛋白柱等，这些柱所用的填料大都是以大孔径硅胶为基质，表面键合多羟基的亲水性固定相。移动相一般都采用接近中性的含有一定浓度无机盐的缓冲液。在这种温和的条件下，蛋白质在分离过程中失变性可减到最小。

本工作中，我们应用 Shodex WS-803F 高效排斥色谱柱研究了在原料鸡蛋清和各种药剂中溶菌酶的色谱分离条件和含量测定方法。

实 验 部 分

仪器和试剂：

采用 Waters 公司 6900A 高压输液泵，10 微升贮样管的 Rheodyne 7125 进样阀用作

定量分析中的进样器。Jasco UVIDE C-100-II 型紫外分光检测器，在 280nm 处，检测各种流出组分。Waters M-730 数据处理器，做面积积分和数据计算。

本工作中，溶菌酶的色谱分离和定量均在 Shodex WS-803F (日本昭和电工株式会社) 高效排斥色谱柱上进行。为提高分离效率，我们将二根内径 8 毫米长 300 毫米的色谱柱串联起来使用，并在柱前加一根 Shodex WS-800P 保护柱 (内径 6 毫米长 50 毫米)。移动相为 0.02M 磷酸氢二钠和磷酸二氢钠的缓冲液 (pH7)——0.1M 硫酸钠，在流速为 1 毫升/分钟时，柱压为 400 磅/时²。实验中水为普通蒸馏水经离子交换后再重蒸一次。各种试剂均为分析纯规格。标准溶菌酶购自美国 Sigma Chemical Co. Ltd.。各种溶菌酶粗制品及溶菌酶口含片、肠溶片由上海长江生化制药厂 (I)、南京第二生物化学制药厂 (II) 和湖北省汉口生物化学制药厂 (III) 提供。Shodex WS 高效排斥色谱柱在每次实验完毕后必须用水冲洗后再用 0.05% 叠氮钠水溶液冲洗、保存，以防柱内填料产生霉菌。

定量校正曲线：

精密称取 20 毫克标准溶菌酶 (Sigma 公司) 置于 1 毫升容量瓶中，加水溶解至刻度。然后吸取一定量的此溶液分别稀释到 2 微克—200 微克的八种不同浓度的标准溶液。在色谱柱冲洗达到基线平衡后，每次吸取 40 微升注入进样器，以保证 10 微升贮样管内的试样浓度不变，每个浓度的溶液重复测定三次，由 M-730 数据处理机得到的峰面积读数平均值与样品浓度作一元线性回归，求得

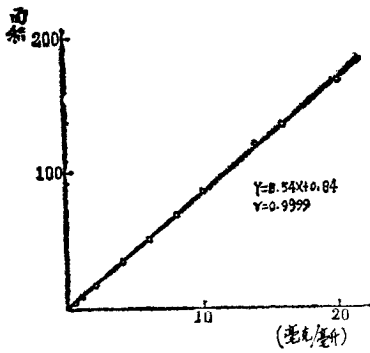


图 1 溶菌酶样品浓度与峰面积的标准曲线

的直线回归方程为 (图 1)

$$Y = 0.84 + 8.54X$$

其中 Y 为峰面积平均值, X 为溶菌酶样品的浓度, 回归直线的相关系数为 $r = 0.9999$ 。

样品分析:

溶菌酶口含片中含溶菌酶 20 毫克, 而肠溶片含溶菌酶 10 毫克, 在样品分析时, 口含片取二片, 肠溶片则取四片, 在玻璃研钵中仔细研细成粉, 准确加 4 毫升蒸馏水再研磨 2—5 分钟, 将此悬浮液移入离心管离心, 吸取 40 微升上清液注入进样器, 进行色谱测定。由数据处理器求得的面积, 经上述标准直线方程求得片剂中的溶菌酶的百分含量。溶菌酶原料粉剂可精确称取 50 毫克于 5 毫升的容量瓶中, 加蒸馏水溶解至刻度后, 吸取 40 微升注入进样器, 直接测定含量。

结果与讨论

生产溶菌酶的原料主要是鸡蛋清, 为研究不同贮藏方式对鸡蛋清中溶菌酶含量的影响, 我们取新鲜鸡蛋、长期室温放置鸡蛋、冰箱贮藏鸡蛋及长时期低温冷冻鸡蛋清进行了色谱分离, 由图 2 可见, 其中除主要成份卵蛋白 (20.17 分) 外, 还有 3—4 个小峰, 当在此鸡蛋清样品中加入少量标准溶菌酶, 图 2 中 (22.20 分) 峰增高, 参考国外文献所载相似色谱图可知该峰系溶菌酶⁽³⁾, 而 (18.97 分) 峰为伴清蛋白, 其余杂质峰未经鉴定, 估计为大分子量的杂质。由色谱图

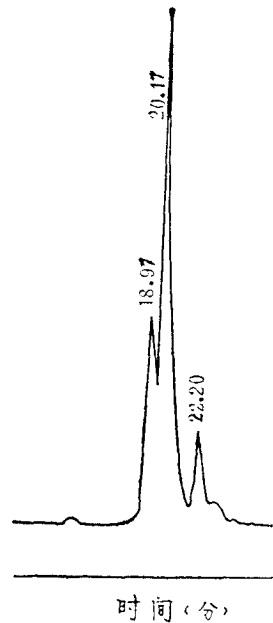


图 2 鸡蛋清分离的色谱图

所得的各个峰, 按面积归一化计算, 溶菌酶的含量约占总鸡蛋清的 7—8%。各种贮存方式的鸡蛋清中溶菌酶的含量基本相同。而新鲜鸡蛋清稠的部分中溶菌酶的含量 (12%) 比稀的部分 (5%) 要高一倍多。

在实验中, 我们首先对用作标准样品的溶菌酶 (Sigma) 进行了

纯度检查。在 Shodex WS-803F 柱上, 用 0.02M 磷酸缓冲液 (pH7) — 0.1M 硫酸钠作冲洗液, 当注入相当大的量 (200—300 微克) 此样品, 仍然只得到单一的色谱峰。说明该样品可以作为标样使用 (图 3-a)。在同样实验条件下, 当注入 100 微克 (I) 厂生

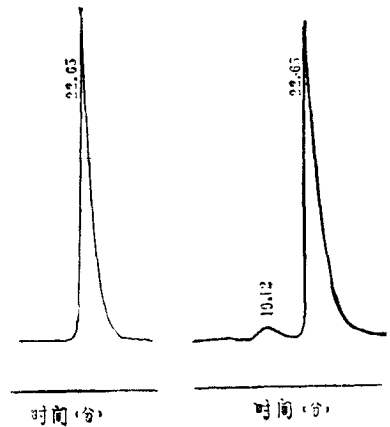


图 3-a 标准溶菌酶 (60 微克) 图 3-b 上海溶菌酶粉 (100 微克)

产的溶菌酶粉剂, 由所得色谱图可见 (图 3-b), 除主要成份溶菌酶外尚含有大分子量的伴清蛋白。而 (I) 厂生产的溶菌酶肠溶片 (图 3-c) 及口含片 (图 3-d) 按实验方法

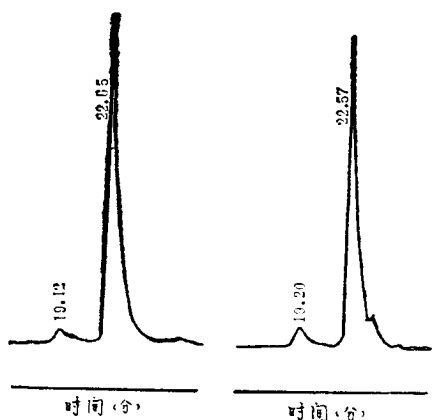


图3-c 上海溶菌酶口 图3-d 上海溶菌酶肠
含片(100微克) 溶片(100微克)

所述样品经前处理后,除溶菌酶和伴清蛋白外,尚存在分子量较小的其它杂质。由此可见,本方法可以快速简便地用于检查各种溶菌酶药剂中的杂质。

如前所述,在本实验条件下,溶菌酶标准样品在2—200微克浓度范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系,应用此关系,以外标法对(I)、(II)、(III)三个厂生产的溶菌酶粉剂、口含片及肠溶片分别进行了含量测定,所得的结果列于表1。由表中数据可见,

(I)、(II)两厂生产的粉剂,用本方法测得的溶菌酶含量基本相近,而(III)厂生产的粉剂其中溶菌酶的含量要低得多,此结果与用溶菌酶小球菌法测得的酶活力是相平行的。为考验方法的准确性,我们采用加入标准法(即在粉剂中加入一定量的标准溶菌酶,将所得的色谱峰总面积中扣除相当于加入标准物的峰面积后再计算粉剂溶菌酶的含量),实验结果是基本一致的。

由(I)、(III)两厂生产的溶菌酶肠溶片,按上述样品分析的实验方法测得溶菌酶含量与酶活力法相比相对含量偏高10%左右。而由(I)、(II)两厂生产的口含片用本方法测得的溶菌酶含量与酶活力法相比则偏低。为阐明其原因,我们将口含片也用加入标准法测定,在扣除加入的标样量后计算所得的溶菌酶含量与原来的结果相符,这说明在整个分析过程中溶菌酶并未丢失,造成二种方法测定含量不一致的原因可能是酶活力法对测定口含片或肠溶片中溶菌酶有一定的局限性。

以上结果说明,应用高效排斥色谱法,不仅可以用来分离和检查生产溶菌酶原料和

表 1 不同剂型溶菌酶药品含量测定的结果

溶菌酶样品 厂家、剂型及批号	含量 (%)	平均含量 (%)	酶活力单位	溶菌酶样品 加入标准溶菌酶	含量 (%)	平均含量 (%)
(I)厂粉剂 批号 850420	71.16 70.86 71.70	71.24	10300	(I)厂粉剂 批号 850420	69.36 70.22 70.19	69.92
(II)厂粉剂 批号 850309	69.67 69.53 68.55	69.25	10200	(II)厂粉剂 批号 850309	69.54 68.98 69.89	69.47
(III)厂粉剂 批号 850330	56.83 56.43 55.66	56.31	8780	(III)厂粉剂 批号 850330	52.04 55.11 52.99	53.38
(I)厂口含片 批号 841603	53.02 54.09 54.03	53.71	9480	(I)厂口含片 批号 841603	53.21 53.02 53.96	53.40
(II)厂口含片 批号 840514	32.36 31.96 32.42	32.25	6250	(II)厂口含片 批号 840514	32.11 32.07 32.15	32.11
(I)厂肠溶片 批号 831103	59.18 59.19 59.32	59.23	7880			
(II)厂肠溶片 批号 831201	35.03 34.75 33.42	34.40	4430			

各种剂型药品中的杂质，并且也可用于溶菌酶的含量测定。此方法与酶活力法相比，重复性、精确度均较好，有实际应用的价值。

致谢：本实验中所用的色谱柱由Showa Denko K.K.提供。溶菌酶样品由上海长江生化制药厂余静娟同志及上海禽蛋二厂徐步华同志提供，特此感谢！

参 考 文 献

1. Martindale the Extra Pharmacopoeia 27th Ed, edited by Ainley Wade, The Pharmaceutical Press, London, P. 579, 1977.
2. 上海市药品标准, 1980年版(下册), 上海科学技术出版社, 第311页, 1982.
3. Shodex技术资料.

(收稿日期: 1985年7月24日)

YZS-3型液相制备色谱仪的研制

徐光国

(天津市科学器材公司仪器修造厂)

一、概 述

在有机化学、药物化学、生物化学、食品、染料、能源与环境化学等许多科学领域的研究工作中，经常遇到混合物分离问题，特别是难分离的组分用一般的分离方法很难得到满意的结果。目前，液相制备色谱法是公认的非常有效的分离技术。在有机分析化学中，标准样品往往是非常需要而难以制取和得到的。例如测定有机化合物的分子结构，质谱法、核磁共振法、红外光谱法和紫外光谱法以及色谱法都需要标准样品；对有机化合物产品的质量检查，也需要标准品。这些问题都可应用液相制备色谱法解决。然而，目前国内适合正相和反相液相制备色谱法的商品仪器还属空白。我厂研制成功的YZS-3型液相制备色谱仪，具有很高的分离能力，即使分离某些很难分离的样品，也能得到与分析型LC和HPLC相似的分离图谱，甚至能获得更丰富的信息；如与普通薄

High Performance Size Exclusion Liquid Chromatographic Separation and Determination of Lysozyme
Xu Song-lin & Zhang Ken-bin, Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica.

A fast and reproducible high performance size exclusion liquid chromatographic method is described for the separation and determination of lysozyme in drugs. The separations were performed by using a Shodex WS-803F protein column and a 0.02 M phosphate buffer (pH=7) —0.1 M Na₂SO₄ eluant at a flow rate of 1 ml/min. The eluates were monitored by UV detector at 280nm. Under this condition an excellent linear relationship between the peak area and the concentration of lysozyme was obtained in the range of 2μg-200μg. The detection limit for lysozyme is less than 1μg injected. This method has been applied to the determination of the lysozyme in crude powder and tablets.

层层析的结果相比，在薄层上难以展开的重迭组分，用YZS-3型仪器能将其明显的分离。

YZS-3型仪器的特点是配备有不同品种规格的高效预装制备柱和装柱快速优质的气动放大式高压气脉冲装柱器；输液泵具有较高的工作压力（50公斤/厘米²）和适当的流量范围（8~40毫升/分）；加上两个波长（254nm、280nm）可同时检测的紫外检测器和通用型示差折光检测器，以及再循环分离、阶梯式外梯度洗脱和高压进样的功能，对反相和正相色谱法都能适用，一次制备量可从几毫克至几百毫克（最大制备量为克量级），能够快速经济地获得足够量的高纯样品（纯度优于99%）。

二、仪器工作原理和基本组成

工作原理和基本组成与分析型LC相同。液路系统如图1所示。

三、仪器的技术性能