

# 溶菌酶口服制剂质量分析及关键质控技术研究

刘莉莎, 何东妹, 李京, 张斗胜, 贺兰英, 董欣, 邓利娟, 王悦, 刘博, 范慧红\* (中国食品药品检定研究院, 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

**摘要:**目的 对溶菌酶口服制剂的质量现状进行检验分析, 并针对现行标准中的共性问题开展关键质控技术研究, 为药品监管提供技术支持。方法 通过国家药品抽检的方式获取的 28 批溶菌酶含片和 47 批溶菌酶肠溶片采用现行法定标准进行检验, 并针对质量现状建立了多项分析方法进行探索性研究。结果 按照法定标准检验, 75 批溶菌酶口服制剂合格率为 100%, 但发现法定标准存在效价测定方法误差较大, 缺少溶出度、含量均匀度等关键质控项目的问题。通过开展相关方法的研究, 发现效价测定结果与法定检验结果差异较大; 溶出度研究结果部分肠溶片不易溶出; 含量均匀度研究结果部分大规格肠溶片不符合规定。结论 作为传统生物提取类生化药品种, 上市时间较早, 部分质量标准已不能控制产品现状, 随着药品监管日趋严格, 企业应优化生产工艺, 完善并提高质量标准。

**关键词:**溶菌酶; 国家药品抽检; 探索性研究; 质量标准

doi:10.11669/cpj.2024.19.009 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)19-1853-08

## Quality Analysis and Key Quality Control Techniques of Lysozyme Oral Preparations

LIU Lisha, HE Dongmei, LI Jing, ZHANG Dousheng, HE Lanying, DONG Xin, DENG Lijuan, WANG Yue, LIU Bo, FAN Huihong\* (NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate and analyze the quality status of lysozyme oral preparations, and study the key quality control technologies for common problems in current standards, so as to provide technical support for drug supervision. **METHODS** The 28 batches of lysozyme lozenges and 47 batches of lysozyme enteric-coated tablets obtained by medicine post market quality surveillance were tested according to the current legal standards, and several analytical methods were established for exploratory research. **RESULTS** According to the legal standard test, although the qualified rate of 75 batches of lysozyme oral preparations was 100%, it was still found that there were problems in the legal standard such as the potency determination has significant errors and lacks key quality control items such as dissolution and content uniformity. The results of exploratory study on potency differed greatly from those of statutory test, the results of dissolution study showed that some enteric-coated tablets were not easy to dissolve, and the results of content uniformity study showed that some large size enteric-coated tablets did not meet the requirements. **CONCLUSION** As a traditional biological extraction type of biochemical drugs, lysozyme oral preparations are marketed early, so some quality standards can no longer reflect the current situation of the products. The enterprises should optimize the production processes and improve current standards.

**KEY WORDS:** lysozyme; medicine post market quality surveillance; exploratory research; quality standard

溶菌酶 (lysozyme) 又称胞壁质酶 (muramidase) 或 *N*-乙酰胞壁质聚糖水解酶 (*N*-acetylmuramide glycanohydrase)<sup>[1]</sup>, 存在于卵清、唾液等生物分泌液中。溶菌酶是由一条多肽链构成的单体蛋白<sup>[2]</sup>, 具有 129 个氨基酸残基, 4 对二硫键, 相对分子质量约为 14 300, 一级结构见图 1。溶菌酶的抗菌机制主要是水解细菌细胞壁肽聚糖中的 *N*-乙酰氨基葡萄糖和 *N*-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键, 导致细胞壁破裂, 细菌溶解死亡<sup>[3]</sup>。早在 20 世纪 70 年代, 溶

菌酶已应用于临床疾病治疗和降低免疫应激性<sup>[4]</sup>, 近年研究发现, 溶菌酶还可应用于病毒性感染疾病, 如艾滋病和新型冠状病毒感染等疾病的治疗<sup>[5-7]</sup>。

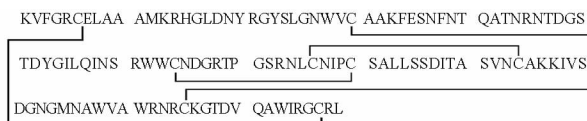


图 1 溶菌酶一级结构图

Fig. 1 Primary structure of lysozyme

作者简介: 刘莉莎, 女, 硕士, 副主任药师 研究方向: 酶类生化药物质量控制; 何东妹, 女, 硕士研究生 研究方向: 酶类药物质量控制。刘莉莎与何东妹为共同第一作者 \* 通讯作者: 范慧红, 女, 博士, 研究员 研究方向: 生化药物质量研究 Tel: (010)53851585

溶菌酶及其口服制剂质量标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》二部第六册生化药品第一分册<sup>[8]</sup>。目前国内上市的溶菌酶口服制剂包括溶菌酶含片和肠溶片,主要用于急慢性咽炎、口腔溃疡等疾病的治疗。中国食品药品检定研究院于2023年对溶菌酶含片及肠溶片开展国家药品抽检工作,对抽取的75批口服制剂采用法定标准进行了检验。同时,针对品种特点,在效价测定、含量均匀度、溶出度及纯度等方面开展了探索性研究,为产品生产及质量标准的提高提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

UV-2700型紫外分光光度计、岛津 NexeraLC-40 高效液相色谱仪,包括:SPD-M40 二极管阵列检测器、LabSolutions 色谱工作站(日本岛津公司);Matrix-F 近红外光谱仪(德国 Bruker 公司);Agilent 708-DS 溶出度仪(美国安捷伦公司);Julabo 708-DS 型恒温水浴槽(德国 Julabo 公司);Millipore-Mili-Q 超纯化水仪(德国默克集团)。

### 1.2 主要试剂及对照品

乙腈(批号:222372,色谱级,美国 Thermo 公司);三氟乙酸(批号:L230V102,质量分数 99.9%,北京百灵威科技有限公司);无水磷酸二氢钠(批号:20200728)、十二水合磷酸氢二钠(批号:20200306)、乙二胺四乙酸二钠(批号:20160218);磷酸二氢钾(批号:20180117)、氢氧化钠(批号:20180329)均为分析纯。

溶菌酶小球菌底物(批号:140610-202214,中国食品药品检定研究院);溶菌酶原料(批号:190305、211201、221001、23040,上海中华药业有限公司);盐酸溶菌酶对照品(批号:LYS03A,日本药局方);溶菌酶高纯试剂(批号:SLCP2287,美国 Sigma 公司);溶菌酶胶囊(批号:223818,香港正美药品有限公司);溶菌酶滴眼液(批号:230302,沈阳兴齐眼药股份有限公司)。

### 1.3 抽检样品

本次国家药品抽检共收到样品75批,其中溶菌酶含片28批,涉及批准文号2个,生产厂家2家,产品规格均为20 mg( $12.5 \times 10^4$  U),抽样主要来自经营单位(82.1%),其余来自使用单位(3.6%)和生产单位(14.3%);溶菌酶肠溶片47批,涉及批准文号4个,生产厂家2家,产品规格分别为10 mg( $6.25 \times 10^4$  U)、25 mg( $15.625 \times 10^4$  U)、50 mg

( $31.25 \times 10^4$  U),抽样主要来自经营单位(85.1%),其余来自使用单位(14.9%)。抽检样品地域覆盖全国17个省级行政区。

## 2 方法

### 2.1 法定检验方法

按《中华人民共和国卫生部药品标准》二部第六册(生化药品第一分册)溶菌酶含片及溶菌酶肠溶片<sup>[8]</sup>检验。

### 2.2 探索性研究方法

效价测定参照《日本药局方》(JP XVIII)<sup>[9]</sup>建立相对法。

含量均匀度和纯度参考文献[10]方法:色谱柱为 Agilent Zorbax 300SB-C<sub>8</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈-水-三氟乙酸(300:700:2),流动相 B 为乙腈-水-三氟乙酸(800:200:2),梯度洗脱(0~9 min,100% A;9~12 min,52% A;12~15 min,40% A;15~25 min,100% A),紫外检测波长为280 nm,进样体积为20 μL。

溶出度按照《中国药典》2020年版四部通则 0931 溶出度与释放度测定法<sup>[11]</sup>要求建立方法。采用小杯法进行溶出,溶出介质为100 mL pH 值6.8 磷酸钾缓冲液,溶出条件为100 r·min<sup>-1</sup>:45 min 取样,高效液相色谱法检测,色谱条件同含量均匀度。

快检研究采用近红外光谱建立了“一厂一品一规”的一致性检验模型,建模参数条件为:二阶导数化+矢量归一化预处理方法,平滑点数13个,谱段为9 000~7 500、6 900~5 600、5 000~4 250 cm<sup>-1</sup>,一致性指数 CI 限度设置为7。

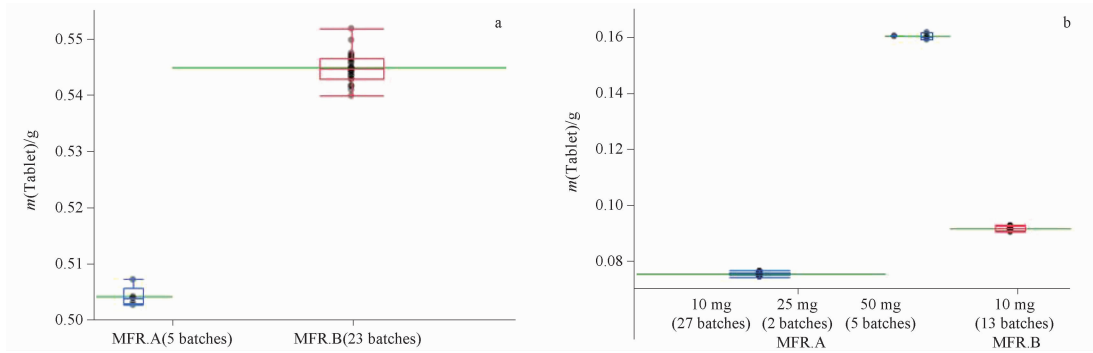
## 3 结果

### 3.1 法定检验结果及分析

按照法定标准检验,28批溶菌酶含片合格率为100%,47批溶菌酶肠溶片合格率为100%。

**3.1.1 性状** 各厂家生产的溶菌酶含片为淡黄色片或淡桔黄色片,溶菌酶肠溶片除去包衣后均呈现白色片芯,符合规定。

**3.1.2 重量差异** 溶菌酶含片仅有1个规格,两个厂家的平均片质量均在0.50~0.54 g之间,A厂家片质量标准偏差为0.001 8,B厂家片质量标准偏差为0.002 8。溶菌酶肠溶片有3个规格,A厂家抽到3个规格样品,B厂家抽到1个规格样品,两个厂家片质量标准偏差接近。本次抽检的75批样品质量差异均符合规定,片质量箱线图见图2,片质量差异总体较好。



MFR. A - A 厂家; MFR. B - B 厂家。

MFR. A - manufacturer A; MFR. B - manufacturer B.

图2 溶菌酶含片(a)和肠溶片(b)片重箱线图

Fig. 2 Heavy box plots of lysozyme buccal tablets(a) and enteric-coated tablets(b)

**3.1.3 崩解时限** 溶菌酶肠溶片法定标准要求检测崩解时限。A 厂家 34 批样品的平均崩解时间为 21 min, B 厂家 13 批样品的平均崩解时间为 43 min,

崩解时间分布见图 3, 两个厂家平均崩解时间相差较大, B 厂家超过 A 厂家两倍以上, 推测两家生产工艺存在差异。

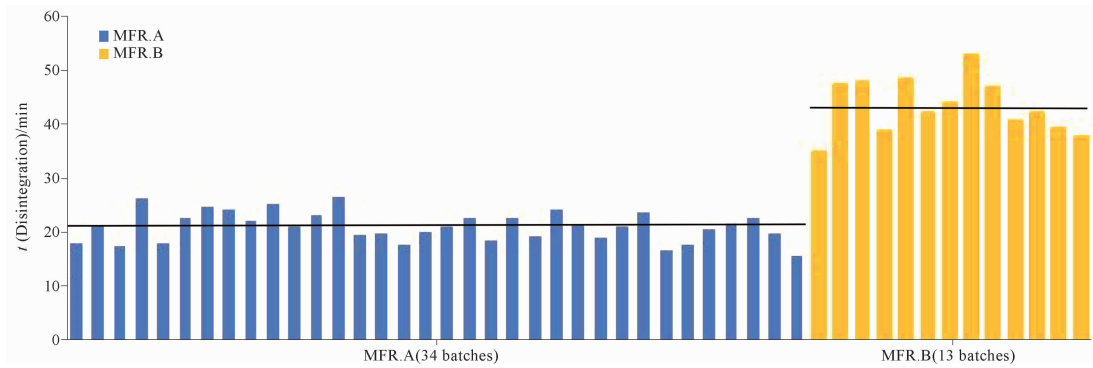


图3 47 批溶菌酶肠溶片崩解时间分布

Fig. 3 Disintegration time distribution for 47 batches of lysozyme enteric-coated tablets

**3.1.4 效价测定** 28 批溶菌酶含片中 A 厂家的平均效价为 103.2%, B 厂家的平均效价为 179.3%; 47 批溶菌酶肠溶片中 A 厂家的平均效价

为 118.8%, B 厂家的平均效价为 158.3%; 全部样品效价均符合规定。B 厂家的总体平均效价高于 A 厂家。效价结果频数分布见图 4。

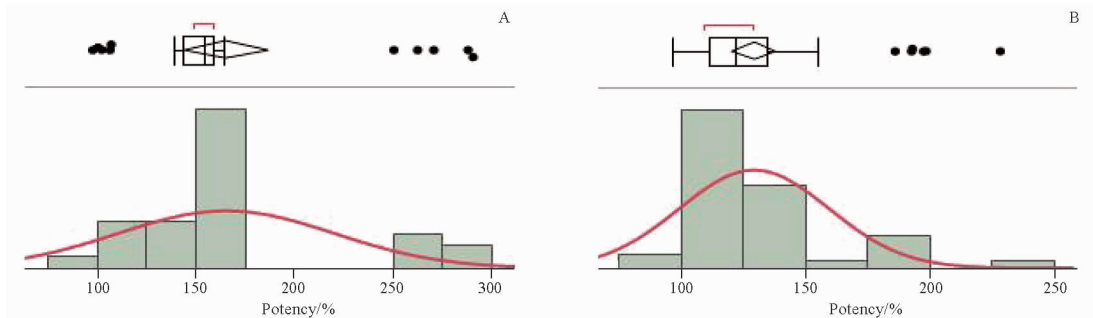


图4 溶菌酶含片(A)和肠溶片(B)效价频数分布图

Fig. 4 Frequency distribution plots of potency of lysozyme lozenges(A) and enteric-coated tablets(B)

### 3.2 探索性研究结果及分析

#### 3.2.1 相对法效价测定 法定标准效价测定方法

为绝对法, 测定结果易受底物悬浮液、时间、温度、pH 值及人员操作等因素的影响<sup>[12]</sup>。JP XⅧ的溶菌

酶效价测定方法原理与我国法定标准的绝对法一致,均以溶菌酶小球菌作为反应底物、测定反应前后吸光度的变化。主要区别在于 JP 方法采用相对法,通过与盐酸溶菌酶对照品的比对来测定供试品效价,可以解决绝对法误差较大、不易重现等问题。因此,本研究参照 JP 建立效价测定的相对法,对溶菌酶原料及部分制剂进行测定,结果与法定检验结果进行比对,见表 1~2。

表 2 采用相对法和绝对法测定溶菌酶制剂效价结果

Tab. 2 Lysozyme preparation potency determined by relative and absolute methods

Preparation	Origin No.	Batch	Specification	Relative method/%	Absolute methods(U/Labeled amount)/%
Lozenges tablets	MFR. A	220801	20 mg(12.5 million units)	22.8	102.7
		220701		25.8	100.8
	MFR. B	220302		30.3	149.0
		220505		41.8	164.5
Enteric-coated tablets	MFR. A	220602	10 mg(6.25 million units)	14.7	126.0
		220801		18.6	113.2
		220804	25 mg(15.625 million units)	24.3	112.0
		220603	50 mg(31.25 million units)	17.6	125.7
	MFR. B	220802		15.3	114.6
		220501	10 mg(6.25 million units)	20.0	155.0
Capsule	Hongkong China	220601		17.4	111.0
		223818	60 mg	127.0	21 178 U · mg <sup>-1</sup>
Eye drops	Domestic	230302	8 mL;40 mg(0.5%)	129.3	157 633 U · mL <sup>-1</sup>

表 1 结果显示,两种方法测得中国大陆产溶菌酶原料与 Sigma 及 JP 对照品差异均在 5% 以内,国内外溶菌酶原料的质量水平相当。溶菌酶法定标准效价限度为 6 250 U · mg<sup>-1</sup>,而实际样品效价已达 30 000 U · mg<sup>-1</sup>,超过限度近 5 倍,说明法定标准限度与实际检测结果相差较大,需要提高质量标准。

表 2 结果显示,溶菌酶制剂采用相对法与法定标准测得结果差异较大。分析原因主要为相对法是以质量计效价,法定标准则以“单位”数计效价。随着产品生产工艺的不断提高,我国溶菌酶原料的纯度和比活都得到了较大提高,而制剂生产厂家按照现行的较低标准水平进行投料,即投入较少质量的原料即可满足法定标准的规定。目前中国大陆产溶菌酶口服制剂的规格描述均为质量和单位并存,测得结果显示虽然效价单位数符合规定,但质量却不符合规格描述。本研究同时测定了中国香港产溶菌酶胶囊及中国大陆产溶菌酶滴眼液,这两种产品的标示量均以质量计,同 JP 一致,不描述单位数,测得的实际投料质量均大于标示量。本研究建立的相对法可以反映产品的实际质量,为与国际产品水平一致,建议对法定标准效

表 1 采用相对法和绝对法测定溶菌酶原料效价结果

Tab. 1 Lysozyme potency determined by relative and absolute methods

Origin	Batch No.	Relative methods/mg · mg <sup>-1</sup>	Absolute methods/U · mg <sup>-1</sup>
Domestic	190305	0.875 9	27 966
	211201	0.890 6	29 696
	221001	0.914 0	27 323
	230401	0.940 0	30 402
Sigma	SLCP2287	0.964 9	29 473
JP	LYS03A	0.980 0	28 636

价测定方法及规格描述进行完善和提高。

**3.2.2 含量均匀度** 法定标准中无含量均匀度检查项,按照《中国药典》2020 年版通则 0941 含量均匀度检查方法<sup>[11]</sup>要求,主药含量小于单剂量 25% 者应进行含量均匀度检查。考虑到效价测定方法较复杂且效率较低,本研究采用高效液相色谱法<sup>[10]</sup>,以 JP 溶菌酶对照品为外标,测定溶菌酶制剂含量均匀度。由于产品投料质量低于规格描述,限度的制定方式参考《中国药典》2020 年版二部胰激肽原酶肠溶片项下<sup>[13]</sup>,考察供试品含量相对于其自身平均值的离散程度。测得含量均匀度相对标准偏差(RSD)值分布图见图 5,图中显示肠溶片的 RSD 值普遍偏高,大规格肠溶片 RSD 值均超过 10%,不符合规定。分析原因可能为产品实际投料质量较低,增加了制剂生产工艺中不均一性的风险。

**3.2.3 溶出度** 肠溶片的法定标准仅检测崩解时限,未控制片剂溶出度,而体外溶出度检查是衡量口服固体制剂有效性的一个关键指标<sup>[14]</sup>,因此有必要对溶菌酶肠溶片进行溶出度考察。本研究对不同规格的部分抽检样品进行溶出度测定,结果见图 6。

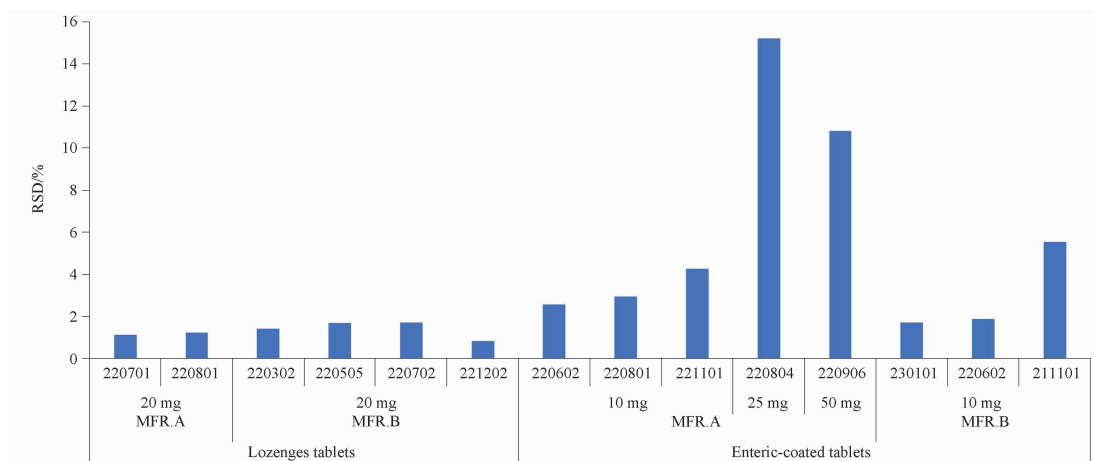


图5 A、B两个厂家各规格肠溶片含量均匀度相对标准偏差(RSD)值分布

Fig. 5 Distribution of RSD value of content uniformity of enteric-coated tablets of each specifications from MFR. A and MFR. B

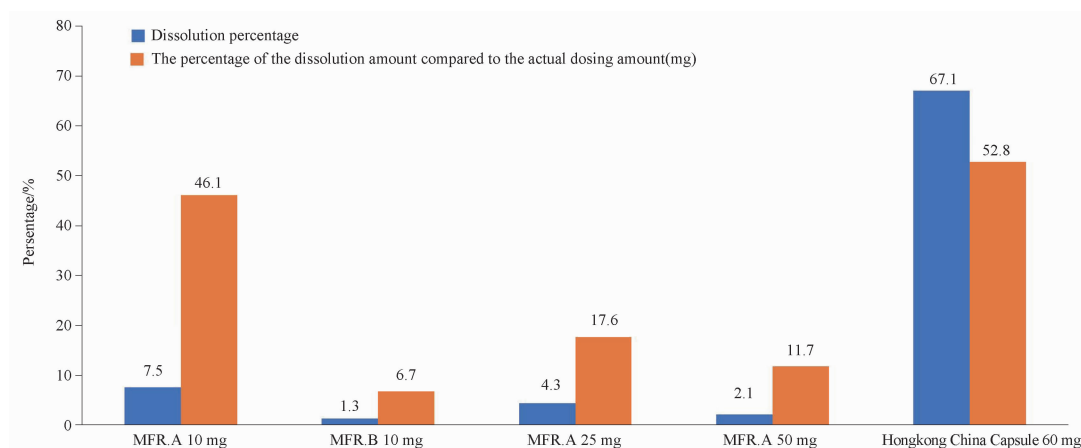


图6 不同厂家各规格溶菌酶肠溶片/胶囊溶出度测定结果

Fig. 6 Dissolution of lysozyme enteric-coated tablets/capsules of different specifications from different manufacturers

结果显示,在45 min时,测定的肠溶片溶出度均不到10%,考虑到样品的实际投料质量要小于标示量,计算出溶出量占实际投料量(mg)的百分比,A厂家10 mg规格的溶出量达到实际投料量的40%以上,其余规格和B厂家的溶出量均不足投料量的20%,中国香港产溶菌酶胶囊在45 min时可溶出67%。以上研究结果提示目前中国大陆产溶菌酶肠溶片虽然崩解时限检查均合格,但溶出度小于中国香港产溶菌酶胶囊。中国大陆产溶菌酶肠溶片可能因不易溶出而导致无法保证临床有效性的问题。法定标准需要增订溶出度检查项,保证产品质量。

**3.2.4 纯度** 溶菌酶的法定标准中无纯度等杂质检查的项目,本研究采用高效液相色谱法<sup>[10]</sup>对溶菌酶原料、制剂、国外对照品及高纯试剂的面积归一化纯度进行了初步考察,结果见图7,典型色谱图见图8。

图7显示,中国大陆产溶菌酶原料纯度已经逐

步超过日本JP对照品及美国Sigma高纯试剂,说明中国大陆产原料的生产工艺已经达到了国际水平。

制剂纯度结果分布见图9,图中显示,肠溶片纯度均达到90%以上,大于含片,含片的生产工艺或产品包装可能存在导致产品不稳定的因素。

**3.2.5 快检研究** 药品快检技术是一种高效快速的检测方法,是药品监管工作的重要组成部分,对于有效提高药品检验检测效率,及时打击假冒伪劣药品,保证药品质量安全具有重要意义<sup>[15]</sup>。本研究采用近红外光谱建立了“一厂一品一规”的一致性检验模型,对不同厂家同种规格的溶菌酶肠溶片样品进行检测,结果见图10。图中显示,B厂家样品的CI值均高于CI限度,表明B厂家的样品光谱与A厂家的参考光谱不具有—致性,即对于同一规格品种,建立的近红外—致性检验模型可以有效鉴别不同厂家的样品。而用同一厂家不同规格的样品进行

检验,见图 11,大部分样品都在 CI 限度内,说明同厂家不同规格样品图谱具有一致性、图谱特征不明

显,即近红外一致性检验模型无法有效鉴别同厂家不同规格样品。

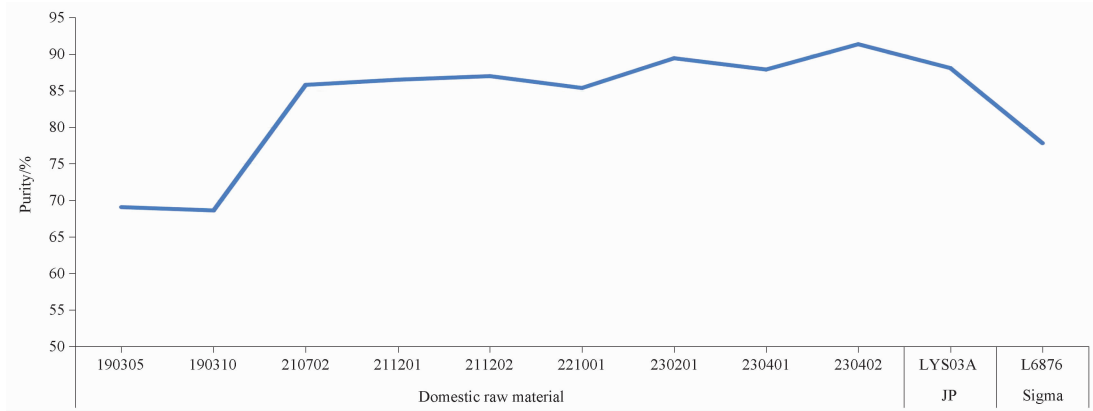
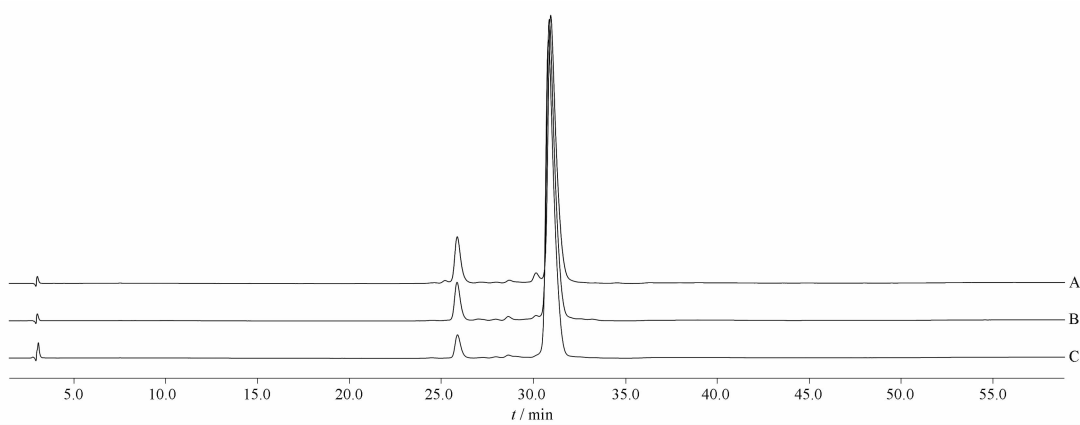


图 7 不同来源各批次溶菌酶原料纯度结果

Fig. 7 Purity determination results of each batch of lysozyme raw material from different sources



A - Sigma L6876; B - JP LYS03A; C - 国产原料 230201。

A - Sigma L6876; B - JP LYS03A; C - Domestic raw materials 230201.

图 8 不同来源溶菌酶原料纯度典型色谱图

Fig. 8 Typical chromatograms for purity of lysozyme raw materials from different sources

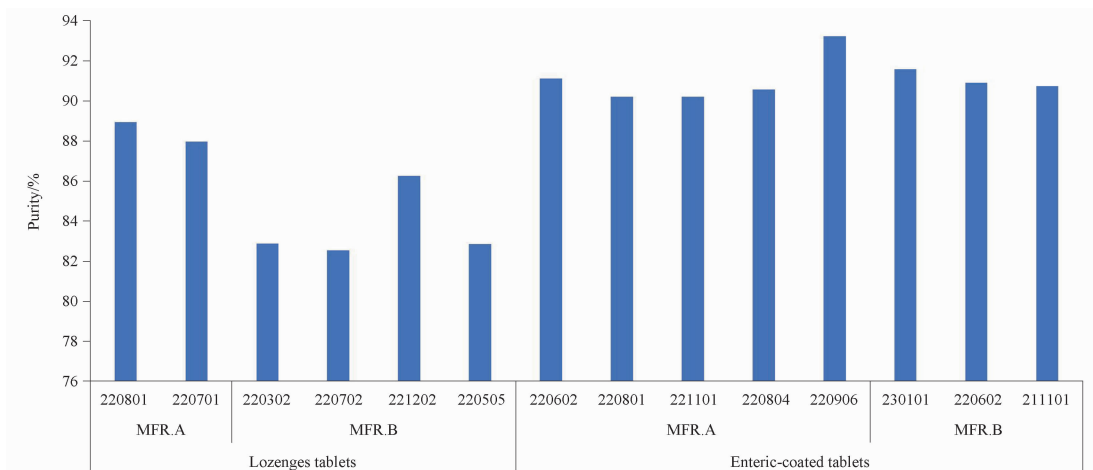
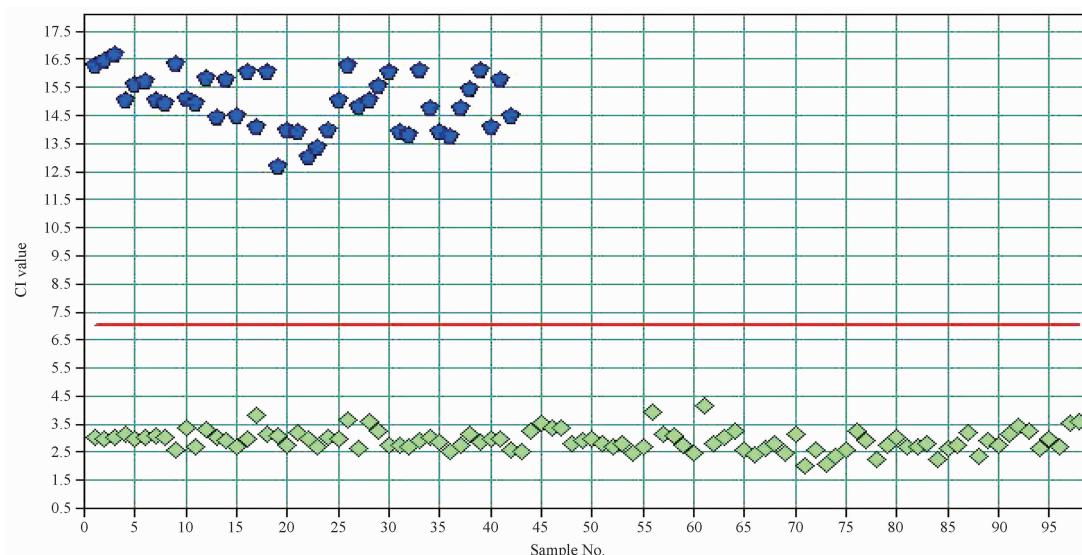


图 9 A、B 厂家不同批次溶菌酶肠溶片和含片纯度分布图

Fig. 9 Purity profile of lysozyme enteric-coated tablets and lozenges from different batches of MFR. A and MFR. B

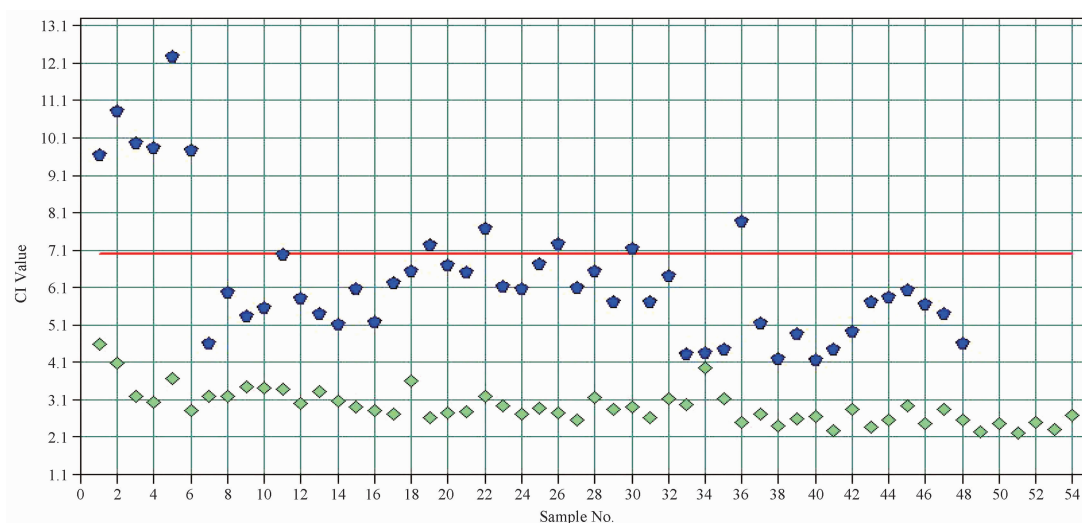


蓝色 - B 厂家, 验证光谱 CI 值; 绿色 - A 厂家, 建模光谱 CI 值。

Blue - B manufacturer, CI of the validation spectrum; Green - A manufacturer, CI value of the modeling spectrum.

图 10 不同厂家 10 mg 规格溶菌酶肠溶片一致性检验模型

Fig. 10 Consistency test model of lysozyme enteric-coated tablets of 10 mg from different manufacturers



蓝色 - 50 mg 溶菌酶肠溶片, 验证光谱 CI 值; 绿色 - 10 mg 溶菌酶肠溶片, 建模光谱 CI 值。

Blue - 50 mg lysozyme enteric-coated tablets, CI of the validation spectrum; Green - 10 mg lysozyme enteric-coated tablets, CI value of the modeling spectrum.

图 11 同一厂家不同规格溶菌酶肠溶片一致性检验模型

Fig. 11 Consistency test model of lysozyme enteric-coated tablets of different specifications from the same manufacturer

#### 4 讨论

作为传统的生物提取酶类品种, 溶菌酶产品开发时间较长, 现行法定标准为 1998 年收载入原卫生部药品标准, 已历时 20 余年。国产溶菌酶原料的质量水平逐年提高, 已经达到或超过国际水平, 但口服制剂的质量水平仍有较大提高空间。本研究发现, 法定标准存在的问题包括项目设置缺少部分关键指标, 效价测定方法误差较大, 限度较低, 无法反映产品的实际质量等; 在生产工艺方

面, 部分溶菌酶肠溶片存在不易溶出的问题。建议尽快对该品种开展标准提高工作, 修订效价测定方法, 增订含量均匀度、纯度及溶出度等指标, 保证产品质量; 建议制剂生产厂家针对自身产品特点进一步优化生产工艺, 加强生产过程控制, 保证产品的稳定性和有效性, 全面提升产品质量, 保证人民用药安全有效。本研究为该品种的标准提高工作提供参考和依据, 为传统生物提取酶类生化药物的产业发展和监管工作提供技术支持。

## REFERENCES

- [ 1 ] FLEMING A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions[J]. *Proc R Soc B Biol Sci*, 1922, 93:306-317.
- [ 2 ] JOHNSON L N, PHILLIPS D C. Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Angstrom resolution[J]. *Nature*, 1965, 206(4986):761-763.
- [ 3 ] WEI Z Z, FU T, LIU R H, *et al.* Research progress on biological function and mechanisms of lysozyme and its application in green production of livestock and poultry[J]. *Chin J Anim Nutr (动物营养学报)*, 2023, 35(7):4224-4230.
- [ 4 ] JIANG L, LI Y H, WANG L Y, *et al.* Recent insights into the prognostic and therapeutic applications of lysozymes [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 767642. DOI: 10.3389/fphar.2021.767642.
- [ 5 ] LI Z, HUANG X, TANG Q Y, *et al.* Functional properties and extraction techniques of chicken egg white proteins[J]. *Foods*, 2022,11(16):2434. DOI: 10.3390/foods11162434.
- [ 6 ] HARTONO Y D, LEE A N, LEE-HUANG S, *et al.* Computational study of bindings of HL9, a nonapeptide fragment of human lysozyme, to HIV-1 fusion protein gp41 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(6):1607-1611.
- [ 7 ] MANN J K, NDUNGU T. The potential of lactoferrin, ovotransferrin and lysozyme as antiviral and immune-modulating agents in COVID-19 [J]. *Future Virol*, 2020, 15(9):609-624.
- [ 8 ] Ministry of Health of the People's Republic of China. Drug Standards Part II Volume 6 (Biochemical Drugs Volume I) [S]. 1998.
- [ 9 ] JP 18th. [S]. 2021: 1283.
- [ 10 ] ZHANG Y, YIN H R, ZHENG L X, *et al.* Establishment of a HPLC method of purity for lysozyme[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2022, 57(14):1205-1208.
- [ 11 ] *Ch. P 2020 Vol IV (中国药典 2020 年版. 四部)* [S]. 2020: 132-137.
- [ 12 ] SONG C Y, ZHANG T, HOU L P, *et al.* Improvement of lysozyme activity determination method and its application in recombinant human lysozyme quality standard establishment[J]. *J Instrum Anal(分析测试学报)*, 2014, 33(8):917-927.
- [ 13 ] *Ch. P 2020 Vol II (中国药典 2020 年版. 二部)* [S]. 2020: 1399-1400.
- [ 14 ] ZHENG L X. Research and application of the key quality indexes of extracted biochemical drugs[D]. Shanghai: China State Institute of Pharmaceutical Industry, 2021.
- [ 15 ] NEI W W. Research on the application strategy of drug rapid detection technology in drug quality sampling and testing[J]. *Home Med(家庭医药·就医选药)*, 2019(1):380.

(收稿日期:2024-04-02)