

反相高效液相色谱法测定重组人溶菌酶的含量及纯度

史瑾, 邓晗, 王维, 郝东, 赵金礼*, 杨小琳

(陕西慧康生物科技有限责任公司, 西安 710054)

摘要 目的: 建立重组人溶菌酶含量及纯度的反相高效液相色谱(RP-HPLC)检测方法。**方法:** 采用 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 含 0.1% 三氟乙酸和 0.9% 氯化钠的水溶液为流动相 A; 含 0.1% 三氟乙酸和 0.9% 氯化钠水溶液-乙腈(40:60)为流动相 B; 检测波长 280 nm, 柱温 32 °C, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 线性梯度洗脱。**结果:** 本方法专属性良好; 供试品 48 h 内稳定, RSD 为 0.51%; 重复性 RSD 为 0.46%, 中间精密度不同工作日间的 RSD 为 0.52%, 不同实验员间的 RSD 为 0.53%; 定量下限 200 ng、检测下限 30 ng; 在进样量 10~60 μg 范围内, 线性关系良好, $r=0.9999$; 平均回收率($n=9$)99.7%, RSD 为 0.94%。测定 3 批重组人溶菌酶冻干粉含量分别为 36.5%、32.8% 和 31.1%; 纯度均大于 98%。**结论:** 方法学验证表明, 该方法符合定量检测重组人溶菌酶含量和纯度的要求, 适用于重组人溶菌酶的质量控制。

关键词: 重组人溶菌酶; 反相高效液相色谱法; 定量检测

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)12-2167-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.12.16

Determination of the content and purity of recombinant human lysozyme by RP-HPLC

SHI Jin, DENG Han, WANG Wei, HAO Dong, ZHAO Jin-li*, YANG Xiao-lin

(Shaanxi Huikang Bio-tech Co., Ltd., Xian 710054, China)

Abstract Objective: To establish a method to determine (recombinant human lysozyme rhLYZ) by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), including quantitative analysis and purity analysis. **Methods:** Chromatography was performed on Welch Ultimate XB-C₁₈ chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), using 0.1% trifluoroacetic acid and 0.9% sodium chloride solution as mobile phase A; and 0.1% trifluoroacetic acid and 0.9% sodium chloride solution-acetonitrile (40:60), as mobile phase B, with linear gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 280 nm, and the column temperature was 32 °C. **Results:** The method has a good specificity. The sample solution is stable within 48, RSD was 0.51%. Repetitive RSD was 0.46%, the intermediate precision (RSD) at different workdays was 0.52% and the RSD was 0.53% from different lab technicians. Quantitative limit was 200 ng and detection limit was 30 ng. In a sample range

* 通信作者 Tel: 13072956479, E-mail: Zhjl999@163.com

第一作者 Tel: 13474102713, E-mail: 34116847@qq.com

of 1060 μg , linearity was good, r was 0.999 9. The average recovery was 99.7% ($n=9$), with RSD of 0.94%. The content of three batches of rhLYZ were 36.5%, 32.8% and 31.1%, respectively, with purity greater than 98%. **Conclusion:** Methodology validation shows that this method conforms to requirement of the quantitative determination of rhLYZ content and purity, and can be applied to quality control.

Keywords: recombinant human lysozyme (rhLYZ); RP-HPLC; quantitative detection

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 glycanohydrlase)^[1], 主要通过破坏细胞壁中 N -乙酰胞壁酸和 N -乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1, 4 糖苷键, 在渗透压的作用下导致革兰氏阳性菌细胞壁破裂, 内容物逸出而使细菌溶解^[2] 从而发挥抗菌、消炎等作用。

人溶菌酶是人体内自有的一种碱性球蛋白, 由 130 个氨基酸组成, 相对分子质量 14 700, 有 4 个二硫键^[3]。在人体广泛分布于体液、细胞和组织器官中^[4-5]。人溶菌酶和人体具有天然相容性, 当在临床上应用时, 比其他溶菌酶更安全, 且没有刺激性和副作用^[6-7]。近年来, 国内外采用 DNA 重组技术, 成功开发出重组人溶菌酶 (recombinant human lysozyme, rhLYZ), 可利用原核或真核表达系统进行大规模生产。rhLYZ 目前在国际国内有相关的学术性研究^[8], 但未见有公司企业规模化生产的报道。本公司致力于 rhLYZ 的研发生产工作, 采用毕赤酵母真核表达系统, 经高密度发酵, 精细纯化获得大批量高纯度的 rhLYZ 冻干粉。

溶菌酶的测定方法有分光光度计法^[9] 和流动注射化学发光法^[10], 天然产物中的溶菌酶测定有关于 HPLC 法^[11] 的文献报道。但 rhLYZ 含量及纯度相关的质量检测方法罕有文献报道。为了更好地对 rhLYZ 相关产品进行质量控制, 通过查阅相关文献^[12-18] 及大量试验, 本研究建立了 rhLYZ 的 RP-HPLC 检测方法, 可快速准确地检测 rhLYZ 的含量及纯度。

1 仪器与试剂

日立高效液相色谱仪 (L-2000), Ohaus Corporation 电子天平 (万分之一), 色谱柱: Welch Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)。超纯水 (电阻率不低于 18.2 M Ω \cdot cm)、乙腈 (色谱级, Fisher Chemical)、三氟乙酸 (色谱级)、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠均为国药集团分析纯试剂。

对照品: 标化研究后的 rhLYZ 对照品 (批号 201706006), 以 rhLYZ 计 5.892 mg \cdot 支⁻¹, 含量 23.35%, 辅料为氯化钠及磷酸钠。供试品: rhLYZ 冻干粉原料 3 批, 批号分别为: 201706008、201706009、201706010, 辅料为氯化钠及磷酸钠。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

流动相 A 为含 0.1% 三氟乙酸和 0.9% 氯化钠的水溶液; 流动相 B 为含 0.1% 三氟乙酸和 0.9% 氯化钠水溶液-乙腈 (40:60) 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 280 nm, 柱温: 32 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL (定量环), 52%B~67%B 30 min 线性梯度洗脱, 见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间 (time)/min	流动相 A (mobile phase A)/%	流动相 B (mobile phase B)/%
0	48	52
2	48	52
32	33	67
34	0	100
40	0	100

2.2 溶液的配制

2.2.1 稀释液

0.9% 氯化钠超纯水溶液。

2.2.2 空白辅料溶液 0.9% 氯化钠, 20 mmol \cdot L⁻¹ pH 7.5 磷酸钠缓冲液。

2.2.3 供试品溶液

精密称量供试品 201706010 批干粉 0.049 2 g, 约含 rhLYZ 15 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 适量超纯水溶解, 用稀释液定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 对照品溶液

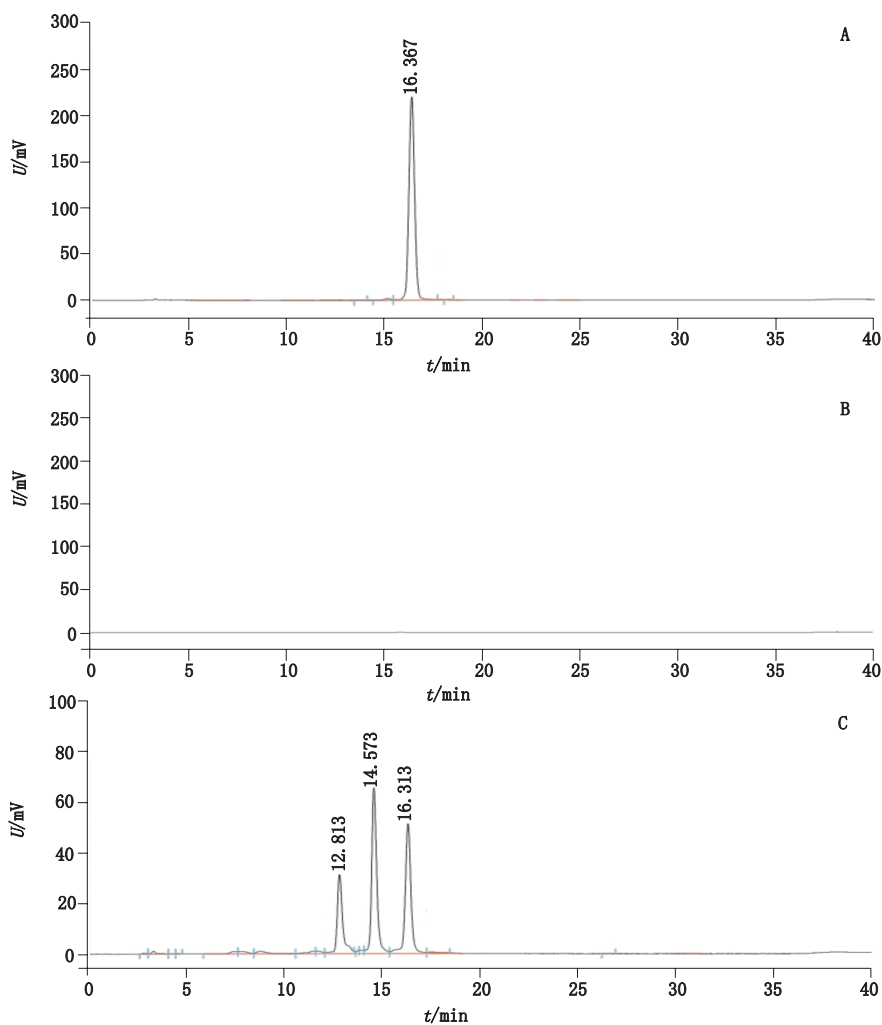
精密称量对照品 0.064 2 g, 含 rhLYZ 15.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 适量超纯水溶解, 用稀释液定容至刻度, 摇匀, 即得 1.50 mg \cdot mL⁻¹ 对照品溶液。

2.3 专属性试验及结果

①对照品: 取对照品溶液。②空白溶剂: 取流动相 A, “2.2.2” 空白辅料溶液。③氧化破坏: 次氯酸钠氧化产物制备: 取对照品溶液 1.0 mL, 加入 0.1% 次氯酸钠溶液 300 μL , 室温氧化反应 2 h, 过滤, 取滤过液即得; 双氧水氧化产物制备: 取对照品溶液 1.0 mL, 加入 30% 双氧水 100 μL , 室温氧化反应 2 h, 过滤, 取滤过液即得。④高温破坏产物制备: 取对照品溶液 1.0 mL, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 室温放置 1 h, 过滤, 取滤过液即得。⑤紫外线照射破坏产物制备: 取对照品溶液 1.0 mL, 紫外灯下照射 5 h, 过滤, 取滤过液即得。⑥盐酸水解产物制备: 取对照品 0.006 4 g, 含 rhLYZ 1.5 mg, 加入 1 mol \cdot L $^{-1}$ 盐酸 100 μL 浸润, 室温酸水解 2 h, 1 mol \cdot L $^{-1}$ 氢氧化钠溶液 100 μL 中

和, 0.9% 氯化钠溶液稀释至 1.0 mL, 过滤, 取滤过液即得。⑦氢氧化钠水解产物制备: 取对照品 0.006 4 g, 含 rhLYZ 1.5 mg, 加入 1 mol \cdot L $^{-1}$ 氢氧化钠溶液 100 μL 浸润, 室温碱水解 20 min, 1 mol \cdot L $^{-1}$ 盐酸 100 μL 中和, 0.9% 氯化钠溶液稀释至 1.0 mL, 过滤, 取滤过液即得。

将上述样品依“2.1”项下方法进行测定。结果表明本色谱条件下, rhLYZ 保留时间约 16 min; 空白溶剂不干扰 rhLYZ 的含量测定; 强碱中主成分全部被破坏, 强酸水解在主峰后产生了一个破坏产物, 加热及紫外照射对主成分均造成了较大破坏, 产生了一系列杂峰, 双氧水对 rhLYZ 影响较小, 次氯酸钠氧化后在 12.8 和 14.5 min 有较大破坏产物, 分离度为 4.1、3.8, 破坏产物和 rhLYZ 主峰可以完全分离, 专属性良好。见图 1。



A. 对照品 (reference standard) B. 空白辅料溶液 (blank excipient solution) C. 次氯酸钠氧化 (oxidation by sodium hypochlorite)

图 1 专属性验证色谱图

Fig. 1 Chromatograms for specificity test

2.4 样品耐用性试验

取供试品溶液,分别于0、1、2、4、6、8、12、24、36、48 h 取样,依“2.1”项下方法进行测定,计算 rhLYZ 峰面积的 RSD 为 0.51%,主峰无明显降解。表明供试品溶液 48 h 内稳定。

2.5 精密度试验

2.5.1 重复性

取供试品,按“2.2.3”项下方法制备样品 6 份,依“2.1”项下方法进行测定,计算 rhLYZ 平均含量分别为 30.71%、30.74%、30.65%、30.65%、30.39%、30.46%,RSD 为 0.46%,重复性良好。

2.5.2 中间精密度

取供试品,按“2.2.3”项下方法分 3 个工作日每日制备样品 3 份,依“2.1”项下方法进行测定,共 9 份验证数据,计算 rhLYZ 峰面积的 RSD 为 0.52%,不同工作日间的中间精密度良好。

测定不同实验员间的变化,取供试品,按“2.2.3”项下方法 3 个实验员每人制备样品 3 份,依“2.1”项下方法进行测定,共 9 份验证数据,计算 rhLYZ 峰面积的 RSD 为 0.53%,不同实验员间的中间精密度良好。

2.6 检测下限和定量下限试验

取对照品,精密称量干粉 0.032 1 g,含 rhLYZ 7.50 mg,置于 5.0 mL 量瓶中,用稀释液溶解并定容至刻度。用 10 mL 量瓶,稀释液精密稀释制样,依“2.1”项下方法进行测定。本试验条件下基线噪音高度约为 0.16 mV,当 rhLYZ 浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,进样量 20 μL ,主峰高度为 1.57 mV,信噪比约为 10:1,定量限为 200 ng; rhLYZ 浓度为 $1.5 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,进样量 20 μL ,主峰高度为 0.53 mV,信噪比约为 3:1,检测限为 30 ng。

2.7 线性关系和范围

取对照品,精密称量干粉 0.428 3 g(含 rhLYZ 100.0 mg),置 10 mL 量瓶中,用稀释液溶解并定容至刻度,摇匀得质量浓度为 $10.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品储备液;再精密量取 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,稀释液定容至刻度,摇匀,制成 rhLYZ 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,依“2.1”项下方法进行测定,记录色谱图。以峰面积 A 对质量浓度 $C(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ 作标准曲线,线性回归方程:

$$C = 3.514 \times 10^{-7} A + 1.095 \times 10^{-3} \quad r = 0.9999$$

在 0.5~3.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, rhLYZ 质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.8 准确度试验

取 201706010 批供试品干粉约 0.35 g,9 份,精密称定,分别置于 9 个 10 mL 量瓶中,用稀释液溶解并定容至刻度,摇匀,制成 9 份含 rhLYZ 约 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品储备液;精密称取对照品 0.429 7 g(含 rhLYZ 100.3 mg),置于 10 mL 量瓶中,用稀释液溶解并定容至刻度,摇匀,制成 $10.03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

从 9 份供试品储备液中各精密量取 1.0 mL,置于 9 个 10 mL 量瓶中,稀释液定容至刻度,摇匀,制成用于测定 9 份供试品中 rhLYZ 含量的溶液;再从 9 份供试品储备液中各精密量取 1.0 mL,置于 9 个 10 mL 量瓶中,从对照品储备液中分别精密量取 1.5、1.0、0.5 mL 各 3 份,分别加入上述 9 个 10 mL 量瓶中,稀释液定容至刻度,摇匀,制成对照品与供试品中 rhLYZ 的比例约为 1.5:1、1:1、0.5:1 的溶液各 3 份,按“2.1”项下方法进行测定,色谱峰面积用标准曲线计算,得各溶液中 rhLYZ 的量,求得平均回收率 ($n=9$) 为 99.7%,RSD 为 0.94%。结果见表 2。

表 2 回收率试验结果 ($n=9$)

Tab. 2 Recovery test result

供试品取样量 (sampling amount)/mg	含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
352.8	10.98	15.05	25.78	98.3	99.7	0.94
351.6	10.93	15.05	25.85	99.1		
351.9	10.94	15.05	25.82	98.9		
364.1	11.32	10.03	21.38	100.3		
363.5	11.31	10.03	21.37	100.3		
366.3	11.39	10.03	21.28	98.6		
336.4	10.46	5.015	15.50	100.5		
336.7	10.48	5.015	15.53	100.7		
337.8	10.51	5.015	15.55	100.5		

2.9 供试品含量与杂质测定

2.9.1 含量测定

精密称量 3 批 rhLYZ 冻干粉适量, 每批 3 份, 置于 10 mL 量瓶中, 用稀释液溶解并定容至刻度,

摇匀, 依“2.1”项下方法进行测定, 色谱峰面积用标准曲线计算得各样品中 rhLYZ 的含量, 结果见表 3。

表 3 3 批 rhLYZ 含量检测结果 ($n=3$)

Tab. 3 The content test results of three batches of rhLYZ

批号 (lot No.)	样品量 (sampling amount)/g	样品浓度 (sampling content)/ (mg · mL ⁻¹)	rhLYZ 浓度 (rhLYZ content)/ (mg · mL ⁻¹)	含量 (content)/%
201706008	0.0521	5.21	1.902	36.5
201706009	0.0503	5.03	1.652	32.8
201706010	0.0515	5.15	1.600	31.1

2.9.2 杂质测定

2.9.2.1 最大进样量及系统适用性验证 精密称量 201706010 批 rhLYZ 冻干粉 7 份, 置于 7 个 10 mL 量瓶中, 用稀释液溶解并定容至刻度, 摇匀制成每 1 mL 含 rhLYZ 分别约为 15、12、10、9、7.5、6、5 mg 的样品溶液, 依“2.1”项下条件进行测定, 记录色谱图, 计算各样品的理论板数, 主峰与最近杂质的分离度, 结果见表 4。从结果可以看出, 供试品中

rhLYZ 最大进样浓度大于 5 mg · mL⁻¹ 的 6 个样品, 进样量过大导致供试品色谱峰板数降低, 主峰与最近杂质无法有效分离, 影响了杂质的分离检测; 供试品中 rhLYZ 进样浓度约为 5 mg · mL⁻¹ 时, 理论板数为 13 120, 主峰与最近杂质的分离度为 1.84, 与其他杂质峰分离良好, 同时可最大限度地使微量杂质准确积分。见图 2。

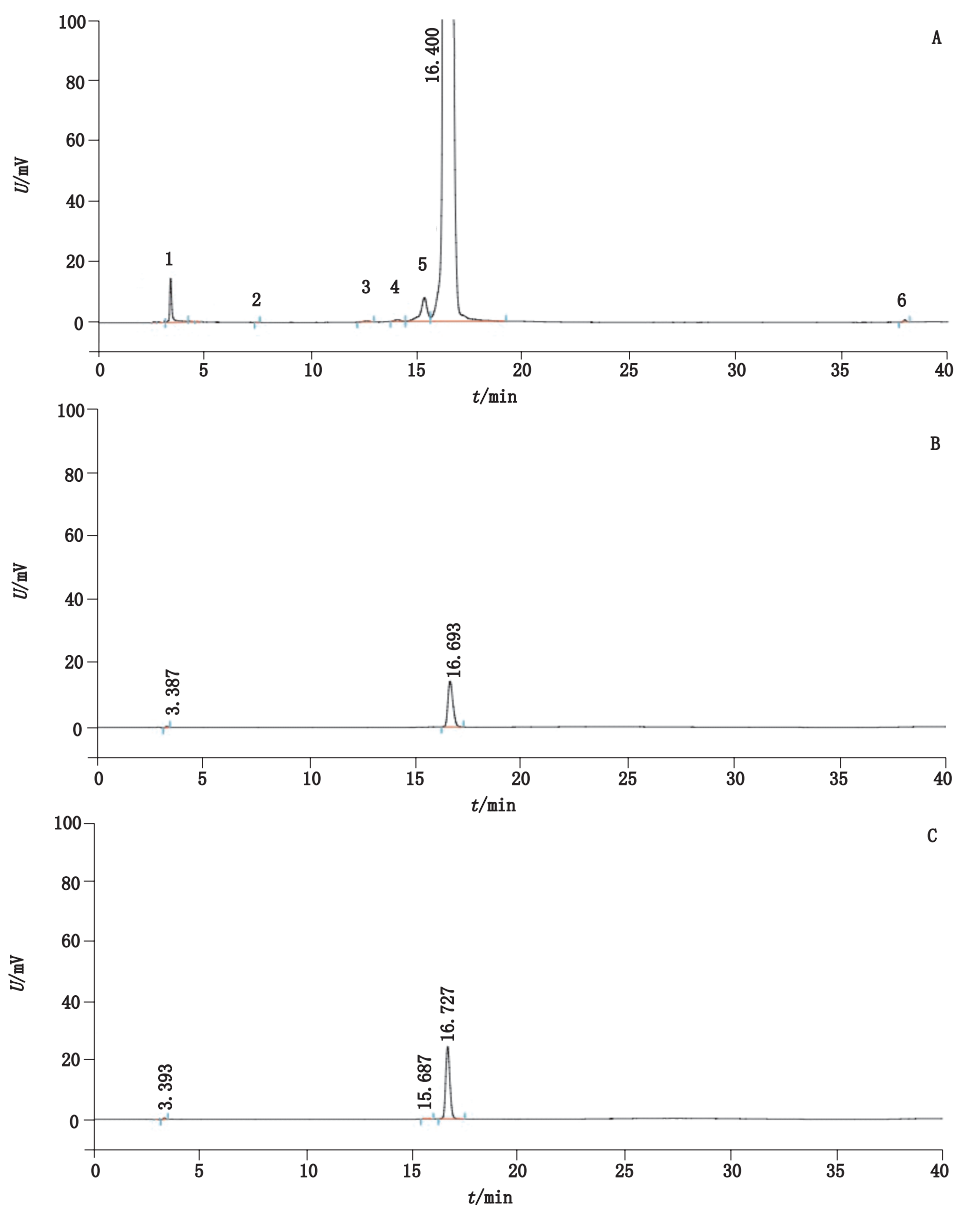
表 4 系统适用性试验结果

Tab. 4 System suitability test results

样品量 (sampling amount)/mg	C /(mg · mL ⁻¹)	理论板数 (theoretical plate number)	分离度 (resolution)
481.8	14.97	7 592	—
384.2	11.94	7 808	—
322.3	10.01	8 903	—
287.7	8.939	9 629	—
240.4	7.469	10 281	—
194.1	6.031	11 309	1.42
161.8	5.027	13 120	1.84

2.9.2.2 杂质限度 精密量取“2.9.2.1”项下含 rhLYZ 约为 5 mg · mL⁻¹ 的供试品溶液 1.5、2 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中, 稀释液定容至刻度, 摇匀, 制得供试品溶液的 1.5%、2.0% 浓度的溶液作为对照溶液, 取供试品溶液和对照溶液, 依“2.1”项下条件测定, 每个样品测定 6 次, 记录色谱图。

供试品溶液中除主峰外共有 6 个杂质峰, 见图 2。其中主要杂质 1 的峰面积 RSD 为 2.4%, 主要杂质 5 的峰面积 RSD 为 3.9%, 总杂质峰面积 RSD 为 4.2%; 1.5% 对照溶液峰面积 RSD 为 0.83%, 2.0% 对照溶液峰面积 RSD 为 0.39%; RSD 均小于 5%。



1. 主要杂质 1 (major impurity 1) 2. 杂质 2 (impurity 2) 3. 杂质 3 (impurity 3) 4. 杂质 4 (impurity 4) 5. 主要杂质 5 (major impurity 5) 6. 杂质 6 (impurity 6)

A. 供试品 (sample) B. 1.5% 的对照 (1.5% reference substance) C. 2.0% 的对照 (2.0% reference substance)

图 2 典型杂质测定色谱图

Fig. 2 Typical chromatograms for impurity determination

2.9.2.3 杂质测定 精密称量 3 批 rhLYZ 干粉适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用稀释液溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为杂质测定用供试品溶液。各精密量取 1.5、2 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中, 稀释液定容至刻度, 摇匀, 制得供试品溶液的 1.5%、2.0% 浓度的溶液作为对照溶液, 取对照溶液和杂质测定用供试品溶液, 依“2.1”项下条件进行测定, 每个样品测

定 3 次, 记录色谱图, 供试品中主成分与杂质峰分离度大于 1.5, 主要杂质峰、总杂质峰及对照溶液峰面积 RSD 均小于 5%, 按不加校正因子的主成分自身对照法计算杂质含量, 结果见表 5。3 批 rhLYZ 冻干粉原料单杂均小于 1.5%, 总杂质均小于 2%, 纯度均大于 98%。

表 5 rhLYZ 杂质测定结果 (%)

Tab. 5 Determination of impurities in rhLYZ

杂质 (impurity)	批号 (lot No.)		
	201706008	201706009	201706010
杂质 1 (impurity 1)	0.406	0.563	0.684
杂质 5 (impurity 5)	1.10	1.05	1.08
总杂质 (total impurity)	1.71	1.83	1.91

3 讨论

3.1 色谱条件

在 rhLYZ 纯化及相关试验过程中,发现该蛋白为盐溶性蛋白,在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的氯化钠水溶液中溶解性良好,低于 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化钠水溶液中 rhLYZ 溶液会呈悬浊状态。常用的反相高效液相色谱的流动相中不添加氯化钠,导致分析过程中 rhLYZ 处于不完全溶解状态,色谱峰面积无法准确反映量效关系。

故对流动相进行了改进,在流动相中添加氯化钠,确保在反相高效液相色谱分析过程中 rhLYZ 的溶解性。在配制流动相 B 时先将氯化钠完全溶于超纯水中,再与乙腈混溶,避免氯化钠在乙腈中不溶,0.9% 氯化钠水溶液与乙腈 (40:60) 的配比使流动相 B 溶解性良好,该配比同时满足本色谱条件下有机相的分析比例。

3.2 检测波长

将重组人溶菌酶溶解在醋酸-醋酸钠缓冲液中,照分光光度法(《中华人民共和国药典》2015 年版三部通则 0401)测定,在 280 nm 的波长处有最大吸收。

3.3 专属性试验

在色谱图中主峰前有一微量杂质,由于是重组生物产品,无法获得该杂质的单一组分。相关实验过程中发现,该杂质的产生可能与生产过程所用水中的微量次氯酸钠氧化有一定的关系,因此在专属性实验中,设计了用次氯酸钠氧化 rhLYZ 的试验,随着次氯酸钠加入量的逐渐加大,该杂质峰会逐渐变大,主峰含量逐渐降低,这一现象很好地验证了本检测方法的专属性。

3.4 杂质测定

rhLYZ 为重组生物制品,在反相色谱法中无法明确每一微量杂质具体为何种物质,故而无法获得各杂质的校正因子,因此在用反相高效液相色谱法测定杂质含量时,使用《中华人民共和国药典》2015 年版色谱法中的不加校正因子的主成分自身对照法,计算杂质含量。

以此法测定供试品中杂质时,进样量应尽量大,使其中的微量杂质尽可能多地被检测出来,但同时进样量过大,主峰面积增大,理论板数降低,与杂质的分离度下降,也不利于杂质的测定,因此设计了最大进样量验证,在满足系统适用性的前提下,最大进样量以 rhLYZ 计约 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。根据药典规定,运用此法时需对相应限度对照溶液的峰面积进行 RSD 的验证,含量在 0.5%~2% 的杂质,峰面积的 RSD 应小于 5%;本研究对不同限度对照溶液峰面积,供试品中主要杂质的峰面积,总杂质峰面积同时进行了验证,相应的 RSD 均小于 5%,表明本法用于 rhLYZ 中杂质含量的测定可行。

3.5 小结

本研究建立的反相高效液相色谱定量检测 rhLYZ 的方法,准确度高,精密度高,重复性稳定,可用于 rhLYZ 的纯度分析及定量检测,并为完善及提高 rhLYZ 原料及相关产品的质量标准提供了一定的实践基础和科学依据。

参考文献

- [1] CALLEWAERT L, MICHIELS CW. Lysozymes in the animal kingdom [J]. J Biosci, 2010, 35 (1): 127
- [2] 王佃亮. 重组人溶菌酶研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23 (9): 59
WANG DL. Advances in recombinant human lysozyme development [J]. J Chin Biotechnol, 2003, 23 (9): 59
- [3] 朱奇, 陈彦. 溶菌酶及其应用 [J]. 生物学通报, 1998, 33 (10): 9
ZHU Q, CHEN Y. Lysozyme and its application [J]. Bull Biol, 1998, 33 (10): 9
- [4] CABALLERO M, RUIZ R, MARQUEZ M, et al. Development of a microparticle-enhanced nephelometric immunoassay for quantitation of human lysozyme in pleural effusion and plasma [J]. J Clin Lab Anal, 1999, (13): 301
- [5] SHIGERU M, MASATO K, MASANORI N, et al. Secretion of active human lysozyme by *Acremonium chrysogenum* using a *Fusarium* alkaline protease promoter system [J]. J Biotechnol, 1995 (42): 1

- [6] 刘仲敏, 何伯安. 溶菌酶及其在食品工业中的应用[J]. 食品与发酵工业, 1995, (5): 80
LIU ZM, HE BA. Lysozyme and its application in food industry[J]. Food Fermentat Ind, 1995 (5): 80
- [7] 高焕春, 吕晓玲, 李文英. 鸡蛋清溶菌酶提取工艺及其应用初探[J]. 天津轻工业学院学报, 1996 (1): 37
GAO HC, LÜ XL, LI WY. The extraction of lysozyme from egg white and its application research[J]. J Tianjin Univ Light Ind, 1996, (1): 37
- [8] 李国才, 孙怀昌, 钱科, 等. 重组人溶菌酶理化及生物学特性的鉴定[J]. 中国乳业, 2005, 33 (4): 11
LI GC, SUN HC, QIAN K, *et al.* The identification of recombinant human lysozyme physicochemical and biological characteristics[J]. China Dairy, 2005, 33 (4): 11
- [9] 王庭欣, 刘峥颢, 夏立姬, 等. 紫外分光光度法测定蜂蜜中溶菌酶的含量[J]. 食品科技, 2010, 35 (4): 292
WANG TX, LIU ZH, XIA LY, *et al.* Determination of total lysozyme in honey with ultraviolet spectrophotometry[J]. Food Sci Technol, 2010, 35 (4): 292
- [10] 稽正平, 王俊, 韩静, 等. 流动注射化学发光法测定溶菌酶含量[J]. 分析化学, 2011, 39 (7): 1100
JI ZP, WANG J, HAN J, *et al.* Detection of lysozyme by flow injection chemiluminescence[J]. Chin J Anal Chem, 2011, 39 (7): 1100
- [11] 庞世琦, 刘青, 刘朝霞, 等. 高效液相色谱法测定葡萄酒中溶菌酶的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7 (9): 3306
PANG SQ, LIU Q, LIU ZX, *et al.* High performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the content of lysozyme in wine[J]. J Food Safety Qual, 2016, 7 (9): 3306
- [12] 齐小雨, 陈熙, 张炜. 人溶菌酶重组酵母工程菌的构建和活性干粉的制备[J]. 江苏农业学报, 2016, 32 (5): 1122
QI XY, CHEN X, ZHANG W. Human lysozyme recombinant the construction of yeast engineering strain and the preparation of active lyophilized powder[J]. Jiangsu J Agric Sci, 2016, 32 (5): 1122
- [13] 张德强, 莫祝容, 柯东华. HPLC 法测定盐酸溶菌酶片的含量[J]. 今日药学, 2012, 22 (10): 608
ZHANG DQ, MO ZR, KE DH. HPLC method for determining the content of hydrochloride lysozyme tablets[J]. Pharm Today, 2012, 22 (10): 608
- [14] 董卫星, 刘淑鑫, 王莹. 溶菌酶测定方法的研究进展[J]. 中南药学, 2012, 10 (1): 58
DONG WX, LIU SX, WANG T. Research progress of determination method of lysozyme[J]. Cent South Pharm, 2012, 10 (1): 58
- [15] 李百裕, 张春美, 朱雪冰. 蜂产品中溶菌酶含量的简易测定方法[J]. 北京农业, 2011 (8): 50
LI BY, ZHANG CM, ZHU XB. Simple measurement for determination of total lysozyme in bee products[J]. Beijing Agric, 2011 (8): 50
- [16] 周闰臣, 刘青锋, 鲁莹, 等. 溶菌酶的处方设计前稳定性研究[J]. 药学实践杂志, 2010, 28 (1): 11
ZHOU GC, LIU QF, LU Y, *et al.* Stability studies of lysozyme for preformulation[J]. J Pharm Pract, 2010, 28 (1): 11
- [17] 左瑞雨, 郭金玲, 任广志, 等. 侧孢芽孢杆菌分泌溶菌酶的变化规律及酶学特性分析[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40 (12): 69
ZUO RY, GUO JL, REN GZ, *et al.* Lateral secretion of spore bacillus and the change rule, of lysozyme enzymology characteristics analysis[J]. Anim Husband Vet Med, 2008, 40 (12): 69
- [18] 中华人民共和国药典 2015 年版. 三部[S]. 2015: 9101
ChP 2015. Vol III [S]. 2015: 9101

(本文于 2018 年 9 月 18 日修改回)