

国立医薬品食品衛生研究所塩化リゾチーム標準品  
(日本薬局方塩化リゾチーム標準品)(Control 031)

開原亜樹子・村上美保・森田有紀子・小出達夫・村井敏美・斎藤博幸・谷本 剛<sup>#</sup>

Lysozyme Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

Akiko Kaihara, Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo Koide, Toshimi Murai, Hiroyuki, Saito, and Tsuyoshi Tanimoto<sup>#</sup>

The "Lysozyme Reference Standard (Control 951031)" of the National Institute of Health Sciences was prepared. The lysozyme potency of the standard material was assayed against the Lysozyme Reference Standard (Control 951) by turbidimetric method two turbidimetric methods using the dried ycells of *Micrococcus luteus* as a substrate. The potency of the standard material was in satisfactory agreement with that of Lysozyme Reference Standard (Control 951) and was defined as 1 mg [potency] per mg.

Key Words: lysozyme, Lysozyme Reference Standard, NIHS Reference Standard

国立医薬品食品衛生研究所塩化リゾチーム標準品の新ロット(第14回標準品, Control 031)を製造したので, その試験成績を報告する.

## 1. 標準品原料

リゾチーム標準品原料として, 6回再結晶したニワトリ卵白リゾチームを生化学工業株式会社より購入した.

## 2. 試験方法

### 2.1 力価

標準品原料の力価を第13回リゾチーム標準品(Control 951)<sup>1)</sup>を対照として, 第十四改正日本薬局方日局第一追補に記載された塩化リゾチームの定量法により試験を行った.

### 2.2 アミノ酸

試料を6 mol/L塩酸試液(1%フェノール含有)及び4 mol/Lメタンスルホン酸溶液(0.2%トリプタミン含有)でそれぞれ18, 24, 30, 48時間, 加水分解した. 加水分解条件については, 加水分解溶液を蒸発乾固し, 残留物を0.05 mol/L塩酸試液に溶かし, L-8500型日立高速アミノ酸分析計で分析した.

### 2.3 SDS・ゲル電気泳動

ファルマシア社製の全自動ゲル電気泳動装置(Phast System)を用いてSDS・ゲル電気泳動を行った. ゲルは本装置専用の既製ゲル(20%ポリアクリルアミドゲル)を用いた. 標準品原料の適量を量り, 水に溶解し, 1 mL当たりそれぞれ125, 250, 500, 1000, 2000  $\mu$ gを含む液を調製し, それぞれの液20  $\mu$ Lに10% SDS溶液20  $\mu$ Lを加えて沸騰水浴中で5分間加熱し, 試料溶液とした.

### 2.4 乾燥減量

第十四改正日本薬局方第一追補に記載された塩化リゾチームの規格に従い, 標準品原料の約0.1 gを精密に量り, 105 °Cで2時間乾燥した.

## 3. 試験の結果

### 3.1 力価

20回の繰り返し測定によって求めた試料1 mg中のリゾチーム量[mg(力価)]は,  $1.003 \pm 0.041$  mg(力価)であった(Table.1). この結果より, 標準品原料の1 mgは1 mg(力価)のリゾチームを含有することが示された.

### 3.2 アミノ酸組成

標準品原料のアミノ酸分析の結果を理論値及びリゾチーム標準品(Control 951)の測定結果とともにTable.2に示した. スレオニン及びセリンは塩酸加水分解の測定結果を0時に外挿して組成比も求め, トリプトファン

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed:

Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka 1-1-43, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel:06-6941-4419; Fax:06-6942-0716; E-mail:tanimoto@nihs.go.jp

Table.1 Potency of the material for Lysozyme Reference Standard

Exp. No.	Potency [mg (potency)/mg]	Exp. No.	Potency [mg (potency)/mg]
1	0.965	11	0.948
2	0.971	12	0.979
3	0.995	13	1.010
4	0.927	14	1.039
5	1.001	15	1.113
6	0.980	16	1.005
7	1.018	17	1.018
8	1.015	18	0.983
9	0.998	19	1.008
10	1.076	20	1.010
Mean ± S.D.		1.003 ± 0.041	

Table.2 Amino acid composition of the material for Lysozyme Reference Standard

Amino Acid	Amino acid residues per mole of lysozyme		
	Material	Standard (Control 951)	Theoretical value <sup>2)</sup>
Asp	20.9	20.6	21
Thr	6.9	6.4	7
Ser	9.7	7.7	10
Glu	5.1	4.9	5
Pro	1.9	1.8	2
Gly	12.4	12.1	12
Ala	12.4	12.1	12
1/2Cys	3.8	2.0	8
Val	5.9	5.9	6
Met	2.0	2.0	2
Ile	5.8	5.8	6
Leu	8.1	8.1	8
Tyr	3.0	3.0	3
Phe	3.0	3.0	3
Lys	6.0	6.1	6
His	1.4	0.9	1
Trp	5.5	—	6
Arg	11.3	11.1	11

組成比はメタンサルホン酸加水分解で求めた。標準品原料のアミノ酸組成は、半シスチンを除いて文献値<sup>2)</sup>とよく一致しており、リゾチーム標準品（Control 951）のそれともよく一致していた。

### 3.3 電気泳動的純度

試験方法に記した試料溶液の1 μLをPhast Systemで電

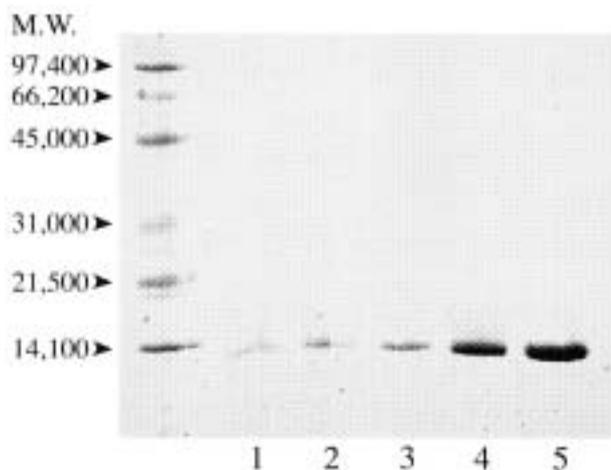


Fig.1 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the standard material 20% acryamide gel (Homogenius 20, Pharmacia) was used. Applied amounts (ng) of the material were as follows; lane 1: 62.5 ng, lane 2: 125 ng, lane 3: 250 ng, lane 4: 500 ng, lane 5: 1000 ng. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

気泳動し、その結果をFig.1に示した。すべてのレーンにおいて単一のバンドが認められ、標準品原料は分子量的に均一な標品であることが示された。

### 3.4 乾燥減量

標準品原料の乾燥減量は3.72%（S.D.: ± 0.05%, n = 3）であった。また、同時に測定したリゾチーム標準品（Control 951）の乾燥減量は5.87%（S.D.: ± 0.25%, n = 3）であった。

### まとめ

国立医薬品食品衛生研究所第14回塩化リゾチーム標準品（日本薬局方塩化リゾチーム標準品）を製造するにあたり、標準品原料の力価を現行のリゾチーム標準品（Control 951）を対照として測定したところ、標準品原料の1 mgは1.003 ± 0.041 mgであった。標準品原料は電気泳動的に均一であり、そのアミノ酸組成は理論値とよく一致し、リゾチーム標準品（Control 951）のアミノ酸組成とも差がなかった。これらの結果から、本標準品原料を国立医薬品食品衛生研究所塩化リゾチーム標準品（日本薬局方塩化リゾチーム標準品）(Control 031)とし、その1 mgはリゾチーム1 mg（力価）を含有するものと定めた。

### 文 献

- 1) Kitajima, A., Tagashira, Y., Maekawa, K., Tanimoto, T. and Okada, S.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **114**, 128-129 (1996)
- 2) R.E. Canfield: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2691 (1963)