消炎酵素剤の溶出試験と腸溶性皮膜の耐酸性の評価

田部和久, 小林淳子, 澤ノ井政美*¹, 山崎 勝, 鎌田 皎*²大阪大学微生物病研究所附属病院薬剤部*¹大阪大学薬学部薬剤学教室*²Dissolution Test of Anti-inflammatory Enzyme Preparations and
Evaluation of Acid Resistance of Their Enteric-coated FilmsKAZUHISA TANABE, JUNKO KOBAYASHI, MASAYOSHI SAWANOI,*¹MASARU YAMAZAKI, and AKIRA KAMADA*²Hospital Attached to the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University*¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University*²

(Received February 10, 1984)

Pharmaceutical properties of 4 kinds of anti-inflammatory enzyme preparations were discussed. All preparations met JP X disintegration test and weight variation test. Activity of the enzyme dissolved by both rotating basket and paddle methods was compared within 120 min in pH 6.0 test fluid as enteric-coated films begin to dissolve. Activity curves of each product showed similar pattern in both methods. Product C was not disintegrated completely in pH 6.0 and 8.0 test fluids even after 120 min. To evaluate acid resistance of enteric-coated film of each product, activity of the enzyme dissolving in JP disintegration test fluids was measured. It is suggested that acid resistance of each product is satisfactorily kept in the 1st fluid, because its maximum activity in 2nd fluid was equal to that in optimal pH range. Activity curve of the enzyme dissolving in pH shift test fluid was different from each other, and each maximum activity was nearly equal to that in optimal pH range. From these results, it is considered that 4 kinds of the preparations tested should have been kept under a quality control for acid resistance of the enteric-coated films. However, as core tablet of the product C was not satisfactorily disintegrated in test fluid studied, improvement on its disintegration property is needed.

Keywords—anti-inflammatory enzyme; dissolution test; enzyme activity; acid resistance; enteric-coated films

はじめに

中性および弱アルカリ性に至適 pH を有する酵素は、酸性域で失活することが多い。そのため製剤化する際には腸溶性皮膜を施している。腸溶性製剤は皮膜物質やコーティング方法が異なり、一般にはノウハウになっている。Seaprose-S 製剤では、酵素の放出パターンや皮膜耐酸性が製品間で差のあることをすでに報告した。¹⁾ ま

た腸溶性の消化酵素剤や消炎酵素剤は、皮膜の耐酸性が製品の品質を評価するうえで非常に重要な因子であることも報告した。^{2,3)}

最近の薬効再評価により、前報³⁾で報告した消炎酵素剤の複合剤は単一成分の製剤となり、1個中の酵素含量が増え、活性単位が高められている。また流通段階での品質保証や治療効果を高める目的から、製剤面の改良が施されていると考えられる。著者らはこれまでの腸溶性製剤の溶出試験には、崩壊試験器を用いて検討してきた。JP X から新たに溶出試験法が試験項目に追加されたので、今回はこの装置を用いて腸溶性消炎酵素剤の溶出試験を行い、皮膜の耐酸性を評価すると同時に、2種

*¹ 吹田市山田丘3-1; Yamadaoka 3-1, Suita, 565 Japan

*² 吹田市山田丘1-6; Yamadaoka 1-6, Suita, 565 Japan

類の試験方法について比較を行ったので報告する。

実 験 方 法

1. 試 料

Table 1 は今回の実験に使用した4種類の製品で、同一ロット番号のものをを用いた。製品Bは腸溶性顆粒を内容物としたカプセル剤で、その他は腸溶性錠剤である。実験に供した試薬のうち、フェノール試薬以外はすべて試薬特級を用いた。

2. 重量偏差試験

JP X 重量偏差試験法の錠剤およびカプセル剤の項に従い、直示天秤（島津製作所、LIBROR L-160 DTP）を用いて測定した。

3. 崩壊試験

JP X 崩壊試験法の腸溶性の製剤の項に従い、崩壊試験器（富山産業、T-2H 型）を使用した。

4. 酵素力価の測定

酵素力価は、Casein-Folin 呈色B法⁴⁾を改変した方法で測定した。基質液はカゼイン（acc.to Hammarsten, Merck 社）600 mg を精秤し、1% ホウ砂液 50 ml を加えて水浴上で5分間加熱溶解し、冷後1 N 塩酸で pH 8.0 に調整したのち、pH 8.0 塩酸・ホウ砂緩衝液で全量 100 ml とし、綿栓ろ過した。

カゼイン基質液 5 ml をあらかじめ 37°C に加温しておき、試料液 1 ml を加えて正確に 10 分間反応させたのち、1.8% トリクロル酢酸沈殿試薬 5 ml を速やかに加えて反応を停止し、37°C で 30 分間放置後ろ過した。一方対照液は、試料液 1 ml に 1.8% トリクロル酢酸沈殿試薬 5 ml、カゼイン基質液 5 ml を加えて混和し、37°C で 30 分間放置後ろ過した。各ろ液 2 ml に 10% 炭酸ナトリウム液 5 ml、3 倍希釈フェノール（フォリン・チオカルト）試薬 1 ml を加え、37°C で 20 分間加温して発色させ、波長 660 nm におけるそれぞれの吸光度を測定

した。別にチロジンをを用いて検量線を作製し、さきの吸光度差より生成チロジン量を算出した。

5. 溶出試験

酵素の溶出試験は JP X 溶出試験装置（富山産業、TMB-8 型）を用いた。試験液 900 ml を 37±0.5°C に保ち、攪拌速度を 100 rpm とし、回転バスケット法とパドル法で行った。

5-1. 一定 pH 試験液

pH 6.0 はリン酸緩衝液、pH 8.0 は塩酸・ホウ砂緩衝液を用いて 120 分まで測定した。

5-2. JP X 崩壊試験液（第1液、第2液）

第1液で錠剤は 120 分間、カプセル内の腸溶性顆粒は 60 分間拌攪したのち速やかに第2液に移し、溶出する酵素の力価を 60 分まで測定した。

5-3. 経時的 pH 変化試験液

本実験では試験液を 900 ml としたので、前報¹⁾の試験液組成および補充液を変更した。すなわち pH 2.6 初期試験液（1 l 中 Na₂HPO₄・12H₂O 2 g, NaCl 2.2 g, 希塩酸 3.3 ml 含有）900 ml を用い、試料採取後の補充液として No. 1~5 は 0.1M Na₂HPO₄ 2 ml を、No. 6~11 は 4% Na₂CO₃ 液 2 ml をそれぞれ用いた。なお試験液の採取時間は前報¹⁾と同じである。

実験結果および考察

1. 重量偏差試験

重量偏差試験結果を Table 2 に示した。4 品目とも JP X 重量偏差試験に適合した。製品 A, B, D は変動係数が 2% 以下であったが、製品 C はやや大きく 4.2% であった。

2. 崩壊試験

Table 3 には崩壊試験による結果を示した。各製品とも第1液では全く崩壊せず、第2液では規定時間内に崩壊した。腸溶性顆粒の製品 B は 4~5 分で完全に崩壊し

Table 1. Anti-inflammatory Enzyme Preparations

Product	Formulation	Lot No.	Component (Activity unit)
A	Tablet	O940	Serrapeptase (10000 Serrapeptase unit)
B	Capsule	564	Pronase (9000 Tyrosine unit)
C	Tablet	C011	Bromelain (40000 Bromelain unit)
D	Tablet	CF22A0	Seaprose-S 15mg

Table 2. Results of Weight Variation Test

				n=20
Product	Mean $\pm$ S.D. (mg)	Max. (mg)	Min. (mg)	C.V. ^{a)}
A	154.3 $\pm$ 2.3	158.5	148.7	1.5
B	183.2 $\pm$ 3.0	189.9	178.6	1.7
C	296.6 $\pm$ 12.5	317.4	273.3	4.2
D	167.5 $\pm$ 3.1	172.8	161.3	1.8

a) Coefficient of variance

Table 3. Results of Disintegration Test

Product	Disintegration time (min)		Max. (min)	Min. (min)
	1st fluid	2nd fluid		
A	—— a)	14.2	20	11
B	—— a)	4.5	5	4
C	—— a)	23.8	29	21
D	—— a)	15.8	18	12

a) Not disintegrated

たが、製品Cは20分以上を要した。

3. 一定 pH 試験液における溶出試験

飯沼ら⁶⁾は腸溶性製剤が小腸上部で速やかに崩壊する条件を検討し、*in vitro* の崩壊試験では、pH 5.0では不変で pH 6.0~6.5 で 7~15分に崩壊するのが望ましいと報告している。そこで回転バスケット法により pH 6.0 試験液に溶出する酵素力価を 120 分まで求めたのが Fig. 1 である。

腸溶性顆粒の製品Bは60分後に最高値を示した。製品Dは40分から60分後に最も多く溶出した。製品Aは120分後にはバスケット内に残存物は認められなかったもので、120分後の力価が最高値であるといえる。製品Cは120分後もバスケット内には中心錠がほとんど崩壊せずに残っていた。そこで120分後に中心錠をガラス棒でつぶした時の酵素力価は生成チロジン量が8mgであったので、120分の時点で酵素は全体量の1/3~1/4しか溶出していないことが明らかとなった。

JP X 溶出試験には回転バスケット法とパドル法があるが、腸溶性製剤の溶出試験については特に記載されていない。製品Cのように回転バスケット法では120分後

も崩壊しなかったところから、試験方法により溶出パターンが異なることが考えられる。そこでパドル法により pH 6.0 試験液に溶出する酵素力価を求めたのが Fig. 2 である。

4製品とも回転バスケット法による溶出曲線(Fig. 1)と類似したパターンを示した。製品Cを除く3品目は、最高力価に達する時間がやや早くなる傾向にあった。製品Cは30分ごろから糖衣層部分が半分にわれ、中心錠が露出してくるのが観察された。パドル法と回転バスケット法とでは、顕著な差が認められなかった。パドル法ではカプセル崩壊後は顆粒がシンカーから試験液に分散し、錠剤と実験条件が異なることになる。これらを考慮して従来から繁用している回転バスケット法で溶出試験を行うことにした。

4製品に処方されている酵素は、活性至適 pH 域が8付近にあるので、pH 8.0 試験液に溶出する酵素の力価を求めたのが Fig. 3 である。

腸溶性顆粒の製品Bは酵素活性が速やかに現われ、20分後に最高力価を示したが、その後は漸減して120分後には40%の減少を認めた。製品Aは60分後に最高値を示

Fig. 1. Activity Curves of the Enzyme Dissolved from Preparations in pH6.0 Test Fluid Using JP X Rotating Basket Method

□, product A; △, product B; ●, product C
○, product D.

Fig. 2. Activity Curves of the Enzyme Dissolved from Preparations in pH6.0 Test Fluid Using JP X Paddle Method

Key: see Fig. 1.

し、120分までは同じ活性を持続した。製品Dは20分から40分で速やかに力価が上昇し、60分後には最高力価となった。製品Cは40分ごろから徐々に酵素は溶出するが、力価の上昇は遅く、120分後でもバスケット内に錠剤の一部が残存していた。pH 6.0 試験液の場合と同じように、残存の錠剤を崩した時の力価は 8.1 mg であった。製品Cの腸溶性皮膜の溶解後、力価の上昇がほぼ直線的であることから、中心錠の崩壊様式は表面溶解形であると推察される。

4. JP X 崩壊試験液 (第1液, 第2液) における溶出試験

腸溶性の消炎酵素剤は、皮膜の耐酸性が製剤の品質を保持するうえで重要な因子となっている。したがって崩壊試験だけでなく、その試験液による溶出試験を行い、第2液に溶出する酵素の力価から製剤の安定性を検討する必要がある。Fig. 4 には、JP X 崩壊試験法の腸溶性

Fig. 3. Activity Curves of the Enzyme Dissolved from Preparations in pH8.0 Test Fluid

Key: see Fig. 1.

Fig. 4. Activity Curves of the Enzyme Dissolved from Preparations in JP X Disintegration Test Fluids

Key: see Fig. 1.

の製剤の項に従い、第2液に溶出した酵素の力価を示した。

第2液で100%溶出するに要した時間は、製品Bが10分後、製品Dが40分後、製品Aが60分後であった。最高力価は pH 8.0 の力価 (Fig. 3) とほとんど同じであったので、第1液による酵素の失活はないと考えてよい。製品Cは第2液の60分後も完全に崩壊しなかったため、ガラス棒で崩したのちの力価は pH 8.0 の力価に等しかった。したがって腸溶性皮膜は他の3品目と同じように耐酸性を有していたといえる。

5. 経時的 pH 変化試験液

医薬品の内服による消化管内移行に対し、pH 変化に伴う製剤の挙動を把握するのは非常に困難である。著者

Fig. 5. Activity Curves of the Enzyme Dissolved from Preparations in pH Shift Test Fluid

Key: see Fig. 1; —, enzyme activity;, pH.

らは消化管の pH 変化を考慮した試験液を調製し、総合消化酵素剤³⁾や Seaprose-S 製剤¹⁾に適用した結果、薬物の溶出曲線から製剤の崩壊性、腸溶性皮膜の耐酸性、および薬物の溶出が始める pH などを同時に求めることができた。神代ら⁷⁾や紀氏ら⁸⁾は消化管内の pH を考慮した試験液を調製し、製剤の品質評価を行っている。また上野ら⁹⁾は L-Keflex 顆粒の製剤の評価をするのに経時的 pH 変化試験液を用い、製剤の特徴を把握することができたと報告している。そこで今回の消炎酵素剤に経時的 pH 変化試験液を用い、溶出する酵素の力価を求めたのが Fig. 5 である。

腸溶性顆粒の製品 B は pH が急激に上昇した 180 分後から酵素は速やかに溶出し、210 分後には最高力価を示した。製品 D は pH 6 以上となる 210 分後から速やかに力価の上昇がみられ、270 分後の最高力価は至適 pH 8.0 の値に等しかった。製品 A や C では 300 分後もバスケット内に中心錠が一部残存しているのが観察された。そこでさらに攪拌時間を延長し、完全に崩壊し酵素が溶出した

時の力価を測定した。その結果、酵素力価は至適 pH 8.0 の力価と等しかったので、腸溶性皮膜は十分に耐酸性を有していることが明らかとなった。

結 論

今回実験に供した 4 種類の製品は、JP X 重量偏差試験および崩壊試験に適合した。また腸溶性製剤として非常に重要な皮膜の耐酸性に関しても、十分な品質が保たれていることが明らかとなった。製品 C は腸溶性皮膜が溶解したあとの中心錠の崩壊性は十分であるとはいえず、製剤的に改良するのが望ましいと思う。JP X 溶出試験の回転バスケット法とパドル法で溶出パターンはほぼ同じとなったが、他の製剤についても同じ結果がえられるとはいえない。今後多くの腸溶性製剤の溶出試験を行い、試験方法を確立すべく検討を重ねてゆく予定である。

文 献

- 1) 田部和久, 益池 豊, 大西 昇, 平岡栄一: 病院薬学, 6, 41 (1980).
- 2) 田部和久, 門林宗男, 畑田昭雄, 平岡栄一: 病院薬学, 6, 21 (1980).
- 3) 田部和久, 千葉幹夫, 門林宗男, 畑田昭雄, 平岡栄一: 病院薬学, 5, 85 (1979).
- 4) 赤堀四郎編: “酵素研究法第 2 巻”, 朝倉書店, 東京, 1956, p.242.
- 5) 飯沼龍一, 薦谷有甫, 土田和男, 沢野昭三: 日病薬雑誌, 10, 223 (1974).
- 6) 飯沼龍一, 薦谷有甫, 土田和男, 長谷川恵子: 日本薬学会第 96 年年会講演要旨集, 1976 年 4 月.
- 7) 神代 昭, 内海紀子, 内藤真佐子: 九州薬学会会報, 27, 9 (1973).
- 8) 紀氏汎恵, 西井諭司, 山路 昭, 平岡栄一: 病院薬学, 3, 150 (1977).
- 9) 上野和行, 福永敬三, 田中義一, 杉本欣司, 平野善信, 尾崎照美: 病院薬学, 7, 300 (1981).