セアプローゼS含有の消炎酵素剤の品質試験^{*1}田部和久^{*2}, 益池 豊, 大西 昇, 平岡栄一^{*3}大阪大学微生物病研究所付属病院薬剤部^{*2}大阪大学医学部付属病院薬剤部^{*3}Quality Test of Anti-inflammatory Enzyme Preparations
Containing Seaprose S^{*1}KAZUHISA TANABE^{*2}, YUTAKA MASUIKE, NOBORU OHNISHI,
and EIICHI HIRAOKA^{*3}Department of Pharmacy, Hospital Attached to the Research Institute for Microbial
Diseases, Osaka University^{*2}, Department of Pharmacy, Osaka University Hospital^{*3}

(Received September 3, 1979)

To evaluate quality of 3 brands of capsules (A, B and C) and 2 brands of tablets (D and E) of seaprose S, weight variation test, content test and dissolution test were made. All products met weight variation test of capsule or tablet (J. P. IX). In the content test, mean content percentage of products B and C were about 82% of each labeled amount and those of the remaining 3 products were not less than 90%. To test acid resistance of the enteric-coated films of each product, activity of seaprose S dissolved in the 1st fluid and the 2nd fluid of disintegration test (J. P. IX) were determined. It was found that the acid resistance of the enteric-coated granules of products A and B was insufficient; especially, the activity of product A dissolved in the 2nd fluid decreased to a half of the activity recorded in the content test. Then, to find the cause of the decrease in activity, protein content and activity of seaprose S dissolved in both fluids were measured simultaneously. It is suggested that seaprose S in granules was partially deactivated by permeation of the 1st fluid through the enteric-coated films and, after that, seaprose S was slowly dissolved in the test fluids. Maximum activities of products A and B in pH shift test solution were 20 and 30%, respectively, of those recorded in the content test. It is, as a result, considered that products D and E are satisfactory enteric-coated preparations.

はじめに

前報¹⁾では5種類の市販消炎酵素剤の品質を評価する目的から、各種試験液を用いて溶出する酵素の力価を測定し、特に腸溶性製剤では、その皮膜の耐酸性が酵素の失活を防止するうえで非常に重要であることを述べた。また腸溶性皮膜の品質を試験する場合、経時的pH変化

試験液を用いるのが有効であることを認めた。さらに、総合消化酵素剤の腸溶性皮膜の品質を評価する場合にも、この試験方法が有効であることを確認した²⁾。

前報での消炎酵素剤のうち一部の腸溶性製剤は、経時的pH変化試験での酵素力価が至適pHでの力価の50%以下に低下した。腸溶性酵素製剤の力価が低下する過程については報告されていないので、今回は消炎作用を有するセアプローゼSのみを含有する5種類の製剤を用い、試験液に溶出する酵素力価および酵素たん白量を同時に測定し、力価低下の原因について検討した。また、品質を総合的に評価するために、重量偏差試験、含量試験をも併せて行ったので報告する。

^{*1} 日本薬学会第98年会(岡山, 1978)で発表。

^{*2} 吹田市大字山田上; Yamadakami, Suita-shi, 565 Japan

^{*3} 大阪市福島区福島1丁目1-50; 1-50, Fukushima 1-chome, Fukushima-ku, Osaka, 553 Japan

実 験 方 法

1. 試 料

実験に使用したセアプローズS含有の消炎酵素剤5種

類を Table 1 に示す。試料A, B および C は腸溶性顆粒を内容物としたカプセル剤で、試料DおよびEは腸溶性錠剤である。なお、実験にはすべて同一ロット番号の製剤を使用した。

Table 1. Seaprose S Preparations Used in Experiment

Product	Formulation	Lot No.	Labeled Amount (mg)
A	capsule	WG290570	10
B	capsule	J2025AT24EW	10
C	capsule	E30WF	10
D	tablet	N6Z7170	5
E	tablet	B31WE	5

2. 重量偏差試験

「日局9」の錠剤およびカプセル剤の重量偏差試験法に従った。

3. セアプローズS力価の測定法

力価の測定は、Casein-Folin・B法³⁾により行った。検量線はチロジンをういて作製し、酵素力価の表示は生成チロジン量 (mg/min/capsule or tablet) で示した。また、セアプローズS原末を用いて上記の方法で力価を求めて検量線を作製し、酵素力価より活性酵素量 (活性たん白量) を求めた。

4. 試料中の酵素たん白量の測定法

試料から試験液に溶出した酵素量を測定する場合、たん白量として求める方法がある。既知量の活性セアプローズSおよび失活セアプローズSについて銅-Folin法⁴⁾を改変した方法で酵素量を測定した結果、同一吸光度となったので、試験液中に活性および失活したセアプローズSが共存し、その比率が異なっても測定による酵素量は同一となる。今回はこの銅-Folin法を用いて、各製剤から試験液中に溶出する酵素たん白量を求めた。

すなわち、予めアルカリ性銅試薬として、試薬A液 (炭酸ナトリウム2gを0.1N NaOHで溶解して100mlとした) 50mlと、試薬B液 (硫酸銅(5水和物)0.5gと酒石酸ナトリウム0.1gを精製水で溶解して100mlとした) 1mlとを用時調製して混和した。溶出した酵素試料液1mlにアルカリ性銅試薬5mlを加え、37°で15分間加温し、次に2倍希釈フォリン試薬0.5mlを加えて発

色させ、37°で20分間加温後ろ過し、波長750nmの吸光度 (B_1) を測定した。対照として、酵素試料液の代わりに pH 8.0 の緩衝液を用い、同様の操作で発色させて吸光度 (B_2) を測定した。なお、セアプローズS原末を用いて検量線を作製し、吸光度差 ($B_1 - B_2$) よりセアプローズSとしての酵素たん白量を算出した。

5. 含量試験

50mlのメスフラスコに試料1個および pH 8.0 緩衝液25mlを入れ、25°で20分間振とうして溶解後、同じ緩衝液で全量50mlとし、さらに緩衝液で希釈して前述の酵素力価の測定法に従って力価を求めた。別に、表示量のセアプローズS原末を用いて力価を求め、その値を含量100%とし、上記力価より含量%を算出した。

6. 酵素の溶出試験

酵素の溶出試験は、「日局9」崩壊試験装置を用い、試験器の補助筒内に錠剤またはカプセル内容物の顆粒を入れ、37±2°に保った試験液1000ml中で上下運動を行い、一定時間毎に採取した。

6-1. 一定 pH 試験液による測定

pH 6.2, 7.2 および 8.0 の試験液を用い、溶出する酵素の力価を120分まで測定した。

6-2. 「日局9」崩壊試験法の第1液、第2液による測定

錠剤は第1液で120分、カプセル内容物の顆粒は60分上下運動し、速やかに第2液に移して60分まで採取し、酵素力価および酵素たん白量を測定した。

6-3. 経時的 pH 変化試験液¹⁾ による測定

薬物の消化管内移行に伴う pH 変化を考慮して調製した試験液で、初期試験液の pH を 2.6 とし、pH を徐々に変化させて 5 時間後の pH が 7 付近となるように調整し、溶出する酵素力価および酵素たん白量を測定した。

実験結果および考察

1. 重量偏差試験

「日局 9」の錠剤およびカプセル剤の重量偏差試験法

に従い測定した結果を Table 2 に示した。全試料とも変動係数は 1.0~2.5% と非常に小さかった。

2. 含量試験

各試料 10 個について含量試験を行った結果を Table 3 に示した。試料 A, D および E は平均含量が 90% 以上であったが、試料 B, C は約 82% と低い値となった。カプセル内の顆粒 A, B および C は、錠剤 D, E に比して平均含量% は低い値となった。試料 B, C, D および E は、含量% の変動係数が 3% 以下であった。著者ら²⁾ は

Table 2. Results of Weight Variation Test for Seaprose S Preparations

n=20				
Product	Mean $\pm$ S.D. (mg)	Max. (mg)	Min. (mg)	C.V. (%)
A	221.2 $\pm$ 5.6	232.3	213.1	2.5
B	336.2 $\pm$ 5.4	349.3	325.6	1.6
C	260.6 $\pm$ 5.7	268.3	251.3	2.2
D	206.9 $\pm$ 2.0	210.3	202.1	1.0
E	159.6 $\pm$ 4.0	167.3	149.4	2.5

消化酵素カプセル剤の腸溶性部分の重量とアルカリ性プロテアーゼ活性との間に良好な相関性を認めた。そこで今回の試料についても同様の検討を試みた結果、カプセル剤, A, B および C の顆粒部分では相関係数 0.8 以上

であり相関性が認められた。

3. 一定 pH 試験液に溶出するセアプローゼ S の力価

各試料とも腸溶性製剤であるので、皮膜の溶解し始める pH およびセアプローゼ S の至適 pH 領域での酵素の溶

Table 3. Results of Content Test for Seaprose S Preparations

n=10				
Product	Mean $\pm$ S.D. (%)	Max. (%)	Min. (%)	C.V. (%)
A	90.7 $\pm$ 3.7	96.0	83.0	3.8
B	81.6 $\pm$ 2.1	85.4	77.8	2.6
C	81.9 $\pm$ 1.7	84.4	79.5	2.1
D	94.2 $\pm$ 2.6	98.5	90.3	2.8
E	94.0 $\pm$ 2.0	100.6	91.7	2.7

出性と溶出後の安定性について検討した。

pH 6.2 の試験液に溶出したセアプローゼ S の力価曲線

を Fig. 1 に示した。試料 A, B および D は 20 分後には最高力価を示し、120 分後も力価低下はほとんど認めら

Fig. 1. Activities of Seaprose S Dissolved from Preparations in pH 6.2 Test Solution

- : product A
- ×— : product B
- : product C
- △— : product D
- : product E

れなかった。試料Eは90分後に初めて力価を示し、120分後でも完全に崩壊していない製剤が観察された。

pH 7.2の試験液に溶出したセアプロゼSの力価曲線を Fig. 2 に示した。pH 6.2と同様、試料Eのみが最高力価を示すまでの時間は遅かったが、各試料とも120分後の力価は最高力価にほぼ等しかった。

pH 8.0の試験液に溶出したセアプロゼSの力価曲線を Fig. 3 に示した。各試料は最高力価を示した後は力価が徐々に低下し、120分後試料A、Eは約10%、試料B、CおよびDは約20%減少した。これはセアプロゼSの自己消化による活性低下であろうと推察している。

3種類の試験液の力価曲線から、各試料とも製剤の崩壊に伴い力価は上昇し、最高力価は3種の試験液ともほぼ同じ値となった。

4. 「日局9」崩壊試験法の第1液・第2液に溶出するセアプロゼSの力価とたん白量

セアプロゼSは胃液のような強酸性の条件では速やかに失活するので、腸溶性皮膜を施した製剤になっている。この皮膜の耐酸性を検討する目的から、「日局9」崩壊試験法の腸溶性の製剤の項に従い、第1液および第2

液に溶出するセアプロゼSの力価を測定した (Fig. 4)。第1液では各試料とも力価は認められなかった。第2液では試料Eを除く4試料は10分後に最高力価を示した。また、各試料の60分後の力価は最高力価に等しかった。これらの力価曲線を pH 7.2の力価曲線 (Fig. 2) と比較すると、錠剤DおよびEの最高力価は同一であったが、カプセル剤内容物の顆粒では最高力価の低下が認められ、試料Aは50%、試料Bは20%低下した。

そこで、力価が低下する原因を明確にするために、第1液および第2液に溶出するセアプロゼSの力価とたん白量とを同時に測定し、その結果をカプセル剤は Fig. 5 に、錠剤は Fig. 6 に示した。カプセル内容物の顆粒の試料BおよびCは第1液に溶出するたん白は認められなかったが、第2液での酵素力価から算出した活性たん白量 (活性酵素量) は試料Bが 6.7 mg、試料Cが 8.2 mg であった。試料Bは、第1液にたん白 (酵素) が溶出せず、含量試験での平均活性たん白量は 8.2 mg であったことから、第2液で活性たん白量が 1.5 mg ほど低下したのは、第1液が皮膜内へ浸透したことによる失活が主たる原因であると考えられる。一方、試料Aは、第

Fig. 2. Activities of Seaprose S Dissolved from Preparations in pH 7.2 Test Solution

—●— : product A
 —×— : product B
 —○— : product C
 —△— : product D
 —□— : product E

Fig. 3. Activities of Seaprose S Dissolved from Preparations in pH 8.0 Test Solution

—●— : product A
 —×— : product B
 —○— : product C
 —△— : product D
 —□— : product E

Fig. 4. Activities of Seaprose S Dissolved from Preparations in Disintegration Test Fluids (J.P.IX)

—●— : product A
 —×— : product B
 —○— : product C
 —△— : product D
 —□— : product E

1液の15分後には溶出するたん白(酵素)を認め、60分後のたん白量は2mgであったが、力価は認められなかった。この製剤1個の平均活性たん白量は、含量試験より9.1mgなので第2液には活性なたん白が約7mg溶出すると予測されたが、実際には4mgと低い値となったので、第1液の60分後には顆粒内の酵素も一部失活していたことになる。したがって、第1液の60分後には、試料Aの失活したセアプロゼSは顆粒内と試験液中とに共存していたと考えられる。

つぎに錠剤の試料DおよびEは、第1液へのたん白(酵素)の溶出は認められず、第2液での活性たん白量

は含量試験から算出した平均活性たん白量と同一値であったので、腸溶性皮膜は十分な耐酸性を有しているといえる。

以上の試料AおよびBの酵素活性が低下する現象から、まず第1液が皮膜内に浸透してセアプロゼSが一部失活し、その後徐々に溶出してくると推察される。ただ試料Aの場合、活性なセアプロゼSが第1液に溶出するか否かは明らかでない。

5. 経時的pH変化試験液に溶出するセアプロゼSの力価とたん白量

前報の経時的pH変化試験液を用い、カプセル中に顆

Fig. 5. Seaprose S Dissolved from Capsules in Disintegration Test Fluids (J.P.IX)

— : Total protein determined from Cu-Folin reagent
 : Active protein calculated from activity

Fig. 6. Seaprose S Dissolved from Tablets in Disintegration Test Fluids (J.P.IX)

— : Total protein determined from Cu-Folin reagent
 : Active protein calculated from activity

Fig. 7. Seaprose S Dissolved from Capsules in pH Shift Test Solution

— : Total protein determined from Cu-Folin reagent
 : Active protein calculated from activity
 - - - : pH

Fig. 8. Seaprose S Dissolved from Tablets in pH Shift Test Solution

— : Total protein determined from Cu-Folin reagent
 : Active protein calculated from activity
 - - - : pH

粒を含む試料A, BおよびCについて, 溶出するセアプローゼSの力価およびたん白量を測定した結果を Fig. 7 に示した. 溶出するたん白は, 試料Aでは30分後に, 試料Bでは60分後に認められ, 以後3時間後まではほぼ直線的に増加した. しかし, 活性なセアプローゼSは全く認められないので, セアプローゼSが試験液に溶出した段階ではすべて失活した状態にあるといえる. pHが急激に上昇した3~3.5時間で顆粒は崩壊し, 3.5時間後には活性たん白は最高値となったが, 含量試験で得た平均活性たん白量に比して著しい低下となり, 試料Aは20%, 試料Bは30%の活性しか示さなかった. 一方, 試料CはpHが6以上となる3.5時間後に初めて溶出するたん白を認めた. 活性たん白は4.5時間後に最高値を示し, 含量試験での平均活性たん白量の90%であったので, この腸溶性皮膜は試料AおよびBに比して十分に耐酸性を有しているといえる.

錠剤の試料DおよびEについて, 経時的pH変化試験液に溶出するセアプローゼSの力価とたん白量を測定した結果を Fig. 8 に示した. 両試料から溶出するたん白はpH6以上で初めて認められ, 試料Dは4.5時間後, 試料Eは3.5時間後であった. また, 活性なたん白は両試料とも4.5時間後に認められた. 試料Dは5時間後も一部の試料は崩壊しなかったもので, 活性たん白量はさらに増加すると考えられる. 一方, 試料Eは4.5~5時間で崩壊し, 5時間後の活性たん白量は含量試験での平均活性たん白量に等しかった.

結 論

5種類のセアプローゼS製剤の品質試験を行うため, 重量偏差試験, 含量試験, 溶出試験および腸溶性皮膜の耐酸性試験を行った. 「日局9」崩壊試験法の腸溶性の製剤の項に従って溶出試験を行った結果, 試料AおよびBは第2液に溶出したセアプローゼSの力価が含量試験の力価に比してかなり低下した. そこで, 試験液に溶出するセアプローゼSの力価とたん白量とを同時に測定して力価が低下する原因を検討した. その結果, まず第1液が腸溶性皮膜内に浸透してセアプローゼSが失活し, その後徐々に溶出してくると推定することができた.

今回の実験結果から, 腸溶性の酵素製剤の品質評価には, 崩壊試験だけでなく少くとも溶出試験も同時に実施し, 第2液に溶出する酵素力価と, 至適pHでの酵素力価を比較して腸溶性皮膜の状態を考察するのが重要であると考えている.

文 献

- 1) 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).
- 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) 赤堀四郎編: 酵素研究法 第2巻, 朝倉書店, 東京, p. 242 (1956).
- 4) 日本化学会編: 実験化学講座 23, 丸善, 東京, p. 39 (1957).
- 5) 田部和久, 門林宗男, 前田義美, 畑田昭雄, 平岡栄一: 病院薬学, 4, 199 (1979).