

杉浦 衛, 小木曾太郎, 酒井利侑, 渡部千尋: 酵素剤の研究 (47)*1.]

消炎酵素剤の製剤学的研究*2

Mamoru Sugiura, Taro Ogiso, Toshiyuki Sakai, Chihiro Watabe:

Studies on Enzyme Preparations XXXXVII*1

Pharmaceutical Studies on Anti-Inflammatory Enzyme Preparations*2

Summary

In order to find the best condition to prepare Anti-inflammatory enzyme tablets, the effect of dilluents, wetting agents, disintegrators, binders and compression on several proteinase as Anti-inflammatory enzymes were investigated.

Dilluents used in this experiment had no effect on enzyme activities, and wetting agents in high concentration gave little effect. Heat to dry granules used for tablet have no effect if it was below 60°.

First pressure when the enzymes were compressed caused comparatively large decrease of the activities and at second pressure less inactivation was observed. With solvent used in coating process of the tablet, methanol caused the inactivation and others gave no effect.

蛋白分解酵素が抗炎症作用を有することは古くから知られていたが、近年臨床面での消炎酵素の使用が急激に増加してきた、これら消炎酵素剤は主に経口抗与の形で使用され、腸管での吸収を期待して一般に腸溶性製剤として市販されている。消化酵素の製剤化は種々の工程を経て行われるが、これらの操作が消炎酵素に変化を与えることは十分予想され得る。したがってその製剤化に際しては酵素の失活を防止するため十分の考慮が必要である。その製剤化工程のうち特に酵素活性に影響を与える要因を解明することによって製剤化の最良条件を見出し、その条件に従い優れた製剤を製造することが肝要である。この観点より右種起源を異にする消炎酵素5種を選び賦形剤、湿潤剤、結合剤、崩壊剤、熱、圧力、および溶媒などの酵素活性に及ぼす影響を検討した。

供試酵素及び実験方法

1. 試料

Table.1 に示すように5種の市販消炎酵素、すなわち、Semi Alkali Proteinase (SAP) は天野製薬、 α -Chymotrypsin および Trypsin はエーザイ株式会社、Bromelain は South Star Chemical Co. LTD (Taiwan)、Pronase E は科研化学株式会社製を使用した。

*1 前報 (46) 杉浦 衛, 伊藤万蔵: 薬誌, 投稿中

*2 本研究は東海薬学会例会 (1967年6月) 発表

Table. I Anti-inflammatory enzyme preparation

Enzyme preparation	Source	Optimum pH	Purity
A. S. A. P.	Filamentous fungus Enzyme	8.0	Crystal
B. α -Chymotrypsin	Animal Enzyme	8-9	Crystal
C. Trypsin	Animal Enzyme	8-9	Crystal
D. Bromelain	Plant Enzyme	8.0	Crude
E. Pronase E	Filamentous fungus Enzyme	8-9	Crude

2. 酵素活性の測定法

2.1 定量法

各酵素の至適 pH に調整した 1% ミルクカゼイン溶液 1 ml を 37°C で予熱し, これに酵素溶液 1 ml を添加し, 37°C で 30 分間反応後 0.44M トリクロル酢酸 2 ml を加える。37°C で 10 分間放置後ろ過する。ろ液 1 ml をとり, 0.55M 炭酸ナトリウム溶液 5 ml および Folin 試液 (5 倍希釈液) 1 ml を加え 37°C で 20 分間保ったのち, この液につき層長 10mm, 波長 660m μ における吸光度 (E) を測定する。空試験は酵素溶液とトリクロル酢酸を逆の順序に加えた。

2.2 基質溶液

ミルクカゼイン (Merck 製: Hammarsten Casein) 1.5 g に 0.1N 水酸化ナトリウム液 30ml を添加し, 加温溶解したのち, 0.1N リン酸で pH8.0 に調製し, pH8.0 の 0.1M リン酸塩緩衝液 20ml および水を加えて 100ml とする。

2.3 酵素溶液

酵素を 0.001M 塩化カルシウム溶液に溶解する。ただし Bromelain は 0.001 M 塩酸システイン溶液に溶解する。酵素濃度は濃度と吸光度との間に直線性の成立する範囲内で調製する。

3. 錠剤の加圧成型法

最高 200.000kg まで加圧できるピストン式油圧機 (島津油圧機) を用い, 直径 8 mm の臼を固定し, 1 錠を 100 mg として加圧成型した。加圧速度は圧力計を読みながら毎秒約 300kg とし目的の圧力に達するまで加圧した。杵及び臼は鉄製に硬クロームメッキしたものを使用した。

実 験 結 果

1. 賦形剤による影響

繁用されている一般的な賦形剤である乳糖, でんぷん, 合成ケイ酸アルミニウムの 3 種を選び, この各賦形剤と酵素とを等量混和したものを 20°, 40°, 60°C にてそれぞれ 30 分, 60 分, 120 分間処理したのち酵素活性を測定した。その結果は Table. II~VI, Fig.1 に示した。実験計画法に従って直交配列の組み合わせで実験を行ない推計学的分析をした結果, SAP は賦形剤間において危険率 5% で優位差が見られ他の消炎酵素では賦形剤間, 温度間および時間による優位差は認められなかった。

すなわち賦形剤においては, 本実験に用いた乳糖, バレイショデンプン, 合成ケイ酸アルミニウムは共に各消炎

Table. II Effect of Diluents on Semi Alkali Proteinase

Ne	Temp (°C)	Diluent	Time (min)	Remaining Activity(%)
1	20	L	120	100
2	40	L	60	100
3	60	L	30	100
4	20	S	60	94
5	40	S	30	97
6	60	S	120	95
7	20	A	30	100
8	40	A	120	100
9	60	A	60	95

L: Lactose S: Potato Starch A: Synthetic aluminium silicate

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Temperature	8.3	2	4.1	5.4
Diluent	33.6	2	16.8	22.4*
Time	11.6	2	5.8	7.8
Error	1.5	2	0.75	
Total	55.0	8		

$$F_2^2 \begin{matrix} 19.00 \\ 99.00 \end{matrix}$$

Table. IV Effect of Diluents on Trypsin

No	Temp (°C)	Diluent	Time (min)	Remaining Activity(%)
1	20	L	120	100
2	40	L	60	96
3	60	L	30	100
4	20	S	60	98
5	40	S	30	100
6	60	S	120	100
7	20	A	30	94
8	40	A	120	97
9	60	A	60	93

L: Lactose S: Patato starch A: Synthetic aluminium silicate

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Temperature	0.22	2	0.11	0.014
Diluent	37.0	2	18.5	2.50
Time	8.0	2	4.0	0.54
Error	14.78	2	7.39	
Total	60.0	8		

$$F_2^2 \begin{matrix} 19.00 \\ 99.00 \end{matrix}$$

Table. III Effect of Diluents on α -Chymotrypsin

No	Temp (°C)	Diluent	Time (min)	Remaining Activity(%)
1	20	L	120	100
2	40	L	60	100
3	60	L	30	100
4	20	S	60	100
5	40	S	30	100
6	60	S	120	100
7	20	A	30	99
8	40	A	120	100
9	60	A	60	100

L: Lactose S: Potato starch A: Synthetic aluminium silicate

Analysis of variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Temperature	0.22	2	0.11	0.95
Diluent	0.22	2	0.11	0.95
Time	0.22	2	0.11	0.95
Error	0.23	2	0.115	
Total	0.89	8		

$$F_2^2 \begin{matrix} 19.00 \\ 99.00 \end{matrix}$$

Table. V Effect of Diluente on Bromelain

No	Temp (°C)	Diluent	Time (min)	Remaining Activity(%)
1	20	L	120	95
2	40	L	60	99
3	60	L	30	95
4	20	S	60	100
5	40	S	30	100
6	60	S	120	100
7	20	A	30	100
8	40	A	120	95
9	60	A	60	91

L: Lactose S: Potato starch A: Synthetic aluminium silicate

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Temperature	16.2	2	8.1	0.54
Diluent	36.2	2	18.1	3.9
Time	5.5	2	2.7	0.18
Error	29.7	2	14.8	
Total	87.6	8		

$$F_2^2 \begin{matrix} 19.00 \\ 99.00 \end{matrix}$$

Table. VI Effect of Diluents on Pronase E

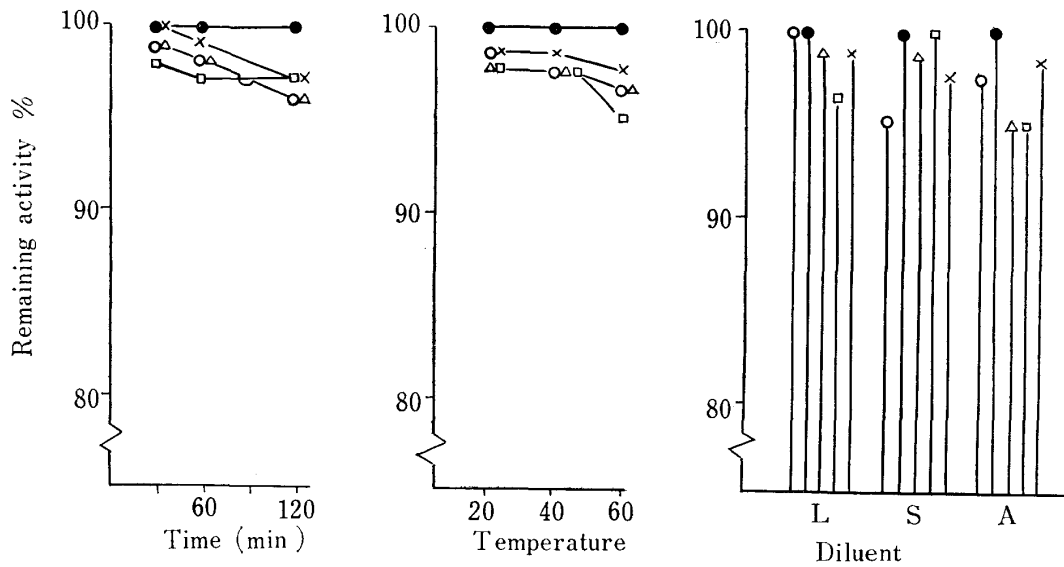
No	Temp (°C)	Diluent	Time (min)	Remaining Activity (%)
1	20	L	120	97
2	40	L	60	100
3	60	L	30	100
4	20	S	60	100
5	40	S	30	97
6	60	S	120	96
7	20	A	30	100
8	40	A	120	97
9	60	A	60	100

L: Lactose S: Potato starch A: Synthetic alminium silicate

Analysis of Variance

Factor	p. p.	d. f.	m. s.	F ₀
Temperature	2.0	2	1.0	0.14
Diluent	8.0	2	4.0	0.57
Time	14.0	2	7.0	1.00
Error	14.0	2	7.0	
Total	38.0	8		

F₂² 19.00
99.00



- — SAP
- — α-chymotrypsin
- △ — Trypsin
- — Bromelain
- × — Pronase E

L: Lactose, S: Potato starch,
A: Synthetic alminium silicate

Fig.1 Effect of Diluents on Various Enzymes

酵素に対して大きな影響を及ぼさないが, SAP に対してはバレイショデンプンが約5%の失活影響を及ぼした。

2. 顆粒調製時における湿潤剤の影響

Table. VII Effect of Wetting Agents on Semi Alkali Proteinase

No	Concentration(%)	Wetting agent	Time (min)	Remaining Activity(%)
1	30	Ethanol	120	71
2	60	Ethanol	60	72
3	90	Ethanol	30	93
4	30	Aceton	60	80
5	60	Aceton	30	94
6	90	Aceton	120	95
7	30	Isopropanol	30	85
8	60	Isopropanol	120	92
9	90	Isopropanol	60	100

Analysis of Vapiance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
%	354.3	2	177.1	3.0
Wetting agent	314.9	2	157.4	2.7
Time	90.3	2	45.1	0.77
Error	177.5	2	58.7	
Total	877.0	8		

$$F_2^2 \begin{matrix} 19.00 \\ 99.00 \end{matrix}$$

Table. IX Effect of Wetting Agents on Trypsin

No	Concentration(%)	Wetting agent	Time	Remaining Activity(%)
1	30	Ethanol	120	15
2	60	Ethanol	60	30
3	90	Ethanol	30	100
4	30	Aceton	60	24
5	60	Aceton	30	35
6	90	Aceton	120	100
7	30	Isopropanol	30	28
8	60	Isopropanol	120	43
9	90	Isopropanol	60	100

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
%	10315	2	5157.5	1146.1*
Wetting agent	156	2	78.0	17.3
Time	11	2	5.5	1.2
Error	9	2	4.5	
Total	10490	8		

$$F_2^2 \begin{matrix} 19.00 \\ 99.00 \end{matrix}$$

Table. VIII Effect of Wetting Agents on α -Chymotrypsin

No	Concentration(%)	Wetting agent	Time (min)	Remaining Activity(%)
1	30	Ethanol	120	10
2	60	Ethanol	60	17
3	90	Ethanol	30	23
4	30	Aceton	60	10
5	60	Aceton	30	13
6	90	Aceton	120	32
7	30	Isopropanol	30	9
8	60	Isopropanol	120	9
9	90	Isopropanol	60	70

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
%	1856.8	2	928.4	4.1
Wetting agent	285.9	2	142.9	0.63
Time	539.5	2	269.7	1.2
Error	452.0	2	226.0	
Total	3134.2	8		

$$F_2^2 \begin{matrix} 19.00 \\ 99.00 \end{matrix}$$

Table. X Effect of Wetting Agents on Bromelain

No	Concentration(%)	Wetting agent	Time	Remaining Activity(%)
1	30	Ethanol	120	67
2	60	Ethanol	60	70
3	90	Ethanol	30	84
4	30	Aceton	60	72
5	60	Aceton	30	80
6	90	Aceton	120	82
7	30	Isopropanol	30	58
8	60	Isopropanol	120	81
9	90	Isopropanol	60	91

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
%	1008.8	2	504.4	58.6*
Wetting agent	1954.0	2	977.0	113.6*
Time	771.7	2	385.8	44.8*
Error	17.3	2	8.6	
Total	3751.8	8		

$$F_2^2 \begin{matrix} 19.00 \\ 99.00 \end{matrix}$$

Table. XI Effect of Wetting Agents on Pronase E

No	Concentration (%)	Wetting agent	Time	Remaining Activity (%)
1	30	Ethanol	120	89
2	60	Ethanol	60	100
3	90	Ethanol	30	100
4	30	Aceton	60	100
5	60	Aceton	30	100
6	90	Aceton	120	100
7	30	Isopropanol	30	89
8	60	Isopropanol	120	95
9	90	Isopropanol	60	98

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
%	77.5	2	38.7	6.7
Wettingagent	54.9	2	27.4	4.7
Time	33.5	2	16.7	2.9
Error	11.7	2	5.8	
Total	177.6	8		

$$F_{2}^{2} \begin{matrix} 19.00 \\ 99.00 \end{matrix}$$

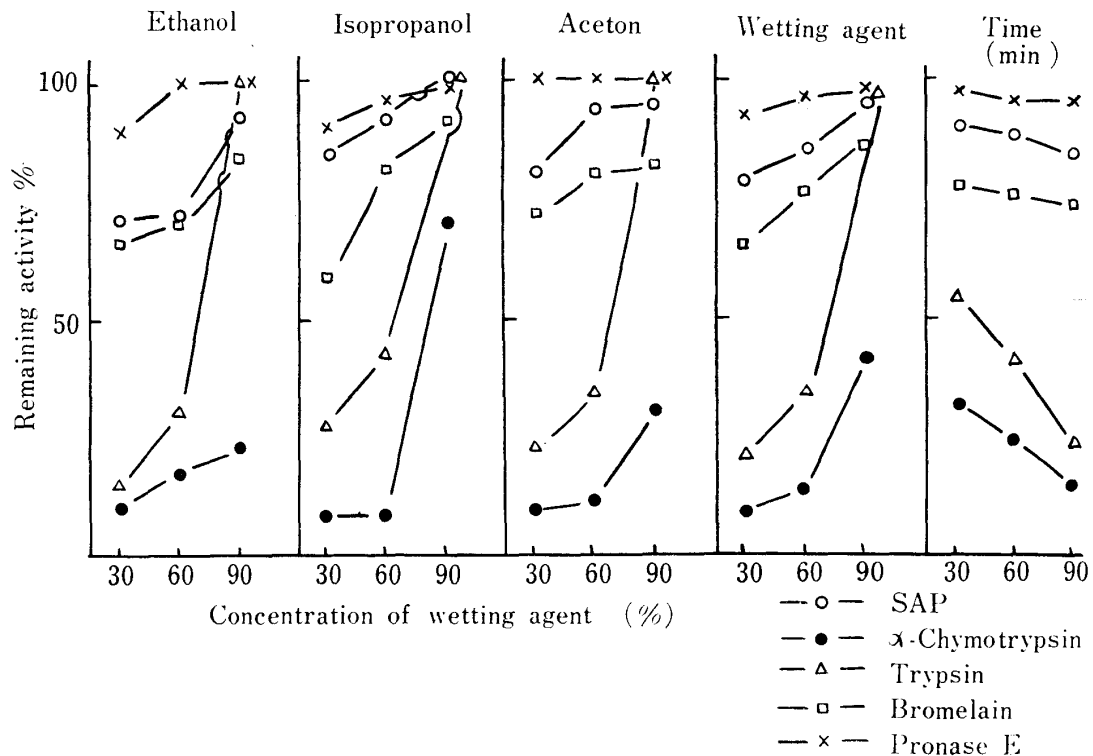


Fig. 2 Effect of Wetting Agents on Various Enzymes

酵素剤の製造時一般に用いられる湿潤剤, Ethanol, Isopropanol, Aceton の 30%, 60%, 90% 濃度のものを調製し, 各酵素をこれらの湿潤剤でそれぞれ 30 分, 60 分および 120 分間 40°C において接触させたのち減圧下で湿潤剤を溜去して酵素活性を測定した。Table. VII~XI および Fig. 2 にその結果を示した。

直交配列の組み合わせで実験を行ない推計学的分析をした結果, Trypsin は湿潤剤の濃度間において危険率5%で優位差が認められ, Bromelain は湿潤剤の種類, 濃度および時間において優位差が認められた。その他の消炎酵素では優位差が認められなかった。Table. 7~11 および Fig. 2 に示すように Trypsin は湿潤剤の濃度により大きく影響を受けた。すなわち90%の高濃度では100%近い残存活性を示すが30%の低濃度では20%の残存活性を残すのみである。これに対して, SAP, Bromelain, Pronase は湿潤剤の濃度および種類に関係なく比較的安定であった。 α -Chymotrypsin は高濃度の湿潤剤に対してもきわめて不安定であった。最も変化の少ないと思われる90% Isopronal で70%の残存活性を示すのみであった。また接触時間の影響については, α -Chymotrypsin と Trypsin は影響を受け易く, 40°C, 120分間で α -Chymotrypsin は15%, Trypsin は23%の残存活性を示すにすぎなかった。

3. 顆粒製造時における結合剤, 崩壊剤の影響

繁用されている結合剤, 崩壊剤の Acasia, Methyl cellulose (MC), Sodium carboxymethyl cellulose (CMC), Polyvinyl alcohol (PVA), Polyvinylpyrrolidone (PP), Gelatin, Sodium lauryl sulfate (SLS), Aerozil の各1%水溶液と酵素溶液を等量混和し, 40°Cでそれぞれ15分, 30分, 60分間処理したのち酵素活性を測定した。その結果は Table. XII~XVI に示した。前記と同様の二元配置法で実験を行ない推計学的分析をした結果, Pronase は結合剤, 崩壊剤間において優位差が認められなかったが, 他の消炎酵素剤では結合剤, 崩壊剤間および時間において危険率5%で優位差が認められた。

Table. XII~XVI に示すように S. A. P. は Acasia により影響を受け易く, 40°C, 60分間の処理条件で54%の活性を残すのみであった。

α -Chymotrypsin は40°C, 60分間処理後 MC で40%, PVA で52%, PVP で47%, Gelatin で40%の失活

Table. XII Effect of Binders on Semi Alkali Proteinase

Time (min)	15	30	60
Acacia	100	72	54(%)
MC	98	95	93
CMC	99	96	93
PVA	100	95	89
PVP	97	94	87
Gelatin	100	92	85
SLS	100	82	80
Aerozil	92	86	80

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Time	988	2	494.0	8.2*
Binder	849	7	121.0	2.0
Error	842	14	60.0	
Total	2679	23		

$$F_{41}^7 \begin{matrix} 2.76 \\ 4.28 \end{matrix} \quad F_{14}^2 \begin{matrix} 3.74 \\ 6.51 \end{matrix}$$

Table. XIII Effect of Binders on α -Chymotrypsin

Time (min)	15	30	60
Acacia	98	87	84(%)
MC	73	67	60
CMC	99	88	83
PVA	69	54	48
PVP	91	71	53
Gelatin	87	79	60
SLS	90	83	79
Aerozil	92	86	82

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Time	3020.3	2	1510.1	56.1*
Binders	1413.0	7	201.8	7.5*
Error	377.7	14	26.9	
Total	4811.0	23		

$$F_{14}^7 \begin{matrix} 2.76 \\ 4.28 \end{matrix} \quad F_{14}^2 \begin{matrix} 3.74 \\ 6.51 \end{matrix}$$

Table. XIV Effect of Binders on Trypsin Proteinase

Time (min) Binders	15	30	60
Acacia	100	97	90(%)
MC	86	83	62
CMC	87	80	60
PVA	100	90	64
PVP	100	98	86
Gelatin	100	90	83
SLS	99	87	65
Aerozil	93	84	60

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Time	2520	2	1260	60.0*
Binders	1297	7	185	8.8*
Error	295	14	21	
Total	4112	23		

$$F_{14}^7 \begin{matrix} 2.76 \\ 4.28 \end{matrix} \quad F_{14}^2 \begin{matrix} 3.74 \\ 6.51 \end{matrix}$$

Table. XV Effect of Binders on Bromelain

Time (min) Binders	15	30	60
Acacia	78	70	62(%)
MC	86	78	65
CMC	76	72	56
PVA	73	62	56
PVP	67	66	53
Gelatin	88	73	63
SLS	80	74	70
Aerozil	85	80	74

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Time	1237.3	2	618.6	66.5*
Binders	733.2	7	104.7	11.2*
Error	130.1	14	9.3	
Total	2100.6	23		

$$F_{14}^7 \begin{matrix} 2.76 \\ 4.28 \end{matrix} \quad F_{14}^2 \begin{matrix} 3.74 \\ 6.51 \end{matrix}$$

Table. XVI Effect of Binders on Pronase E

Time (min) Binders	15	30	60
Acacia	100	95	95(%)
MC	100	100	85
CMC	100	93	89
PVA	100	100	96
PVP	100	98	91
Gelatin	96	95	95
SLS	100	100	100
Aerozil	100	100	86

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Time	309.1	2	154.6	6.20*
Binders	120.5	7	17.2	0.69*
Error	348.2	14	24.9	
Total	777.8	23		

$$F_{14}^7 \begin{matrix} 2.76 \\ 4.28 \end{matrix} \quad F_{14}^2 \begin{matrix} 3.74 \\ 6.51 \end{matrix}$$

がみられた。Trypsin は MC, CMC, PVA, SLS, Aerozil により 40%~45% 失活した。

Bromelain はどの結合剤, 崩壊剤に対しても影響を受け易く Aerozil の 74% の残存活性が最高であった。

これに対して Pronase は, 結合剤, 崩壊剤に対して安定で, 最も影響を受け易い MC においても残存活性は 85% であった。

4. 錠剤成型時における圧力の影響

湿粒法によれば1回の加圧、乾式法によれば2回の加圧によって錠剤が成型される。実験方法で述べた方法により加圧して得られた錠剤を一次圧の錠剤とした。一次圧により製した錠剤を粉碎し、さうにそれぞれ5,000kgまで圧を加え、これを二次圧とした。

各々の錠剤を粉碎したのち、酵素活性を測定し、Table. XVII~XXI の如き結果を得た。

Table. XVII Effect of Pressure on Semi Alkali Proteinase

1 st press 2 nd press	0.5 ^{a)}	1	2	3	5
0 ^{a)}	94	80	65	62	60(%)
0.5	80	74	60	59	58
1	76	64	59	54	53
2	61	55	51	51	47
3	56	53	51	47	47
5	55	51	47	43	42

a) Figures are expressed in ton.

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
1 st press	3361	4	840.2	97.8*
2 nd press	578	5	115.6	13.4*
Error	173	20	8.6	
Total	4112	29		

$$F_{20}^4 \frac{2.87}{4.43} \quad F_{20}^5 \frac{2.71}{4.10}$$

Table. XVIII Effect of Pressure on α -Chymotrypsin

1 st press 2 nd press	0.5 ^{a)}	1	2	3	5
0 ^{a)}	99	93	87	83	80(%)
0.5	90	81	77	77	76
1	88	77	76	74	72
2	84	74	74	72	69
3	77	72	71	71	68
5	73	71	67	67	66

a) Figures are expressed in ton.

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F
1 st press	636.5	4	159.1	21.5*
2 nd press	1201.5	5	240.3	32.5*
Error	147.5	20	7.4	
Total	1985.5	29		

$$F_{20}^4 \frac{2.87}{4.43} \quad F_{20}^5 \frac{2.71}{4.10}$$

Table. XIX Effect of Pressure on Trypsin

1 st press 2 nd press	0.5 ^{a)}	1	2	3	5
0 ^{a)}	99	91	83	78	73(%)
0.5	93	83	79	72	70
1	84	79	72	68	65
2	75	72	70	65	62
3	71	69	67	63	60
5	68	66	64	60	58

a) Figures are expressed in ton.

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F
1 st press	1115	4	279	46.5*
2 nd press	1711	5	342	57.0*
Error	120	20	6	
Total	2986	29		

$$F_{20}^4 \frac{2.87}{4.43} \quad F_{20}^5 \frac{2.71}{4.10}$$

Table. XX Effect of Pressure on Bromelain

1 st press 2 nd press	0.5 ^{a)}	1	2	3	5
0 ^{a)}	92	92	82	80	70(%)
0.5	88	86	67	65	55
1	86	84	63	63	55
2	85	81	62	58	54
3	83	74	62	55	49
5	78	70	60	43	42

a) Figures are expressed in ton.

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
1 st press	4249.9	4	1062.5	88.5*
2 nd press	1701.4	5	340.3	28.4*
Error	240.1	20	12.0	
Total	6191.4	29		

$$F_{20}^4 \frac{2.87}{4.43} \quad F_{20}^5 \frac{2.71}{4.10}$$

Table. XXI Effect of Pressure on Pronase E

1 st press 2 nd press	0.5 ^{a)}	1	2	3	5
0 ^{a)}	98	90	87	83	76(%)
0.5	92	86	82	79	71
1	89	82	79	70	69
2	85	79	77	67	63
3	79	71	67	64	58
5	73	68	65	57	55

a) Figures are expressed in ton.

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
1 st press	1543	4	386	148.4*
2 nd press	1888	5	378	145.3*
Error	52	20	2.6	
Total	3483	29		

F₂₀⁴ 2.87 4.43 F₂₀⁵ 2.71 4.10

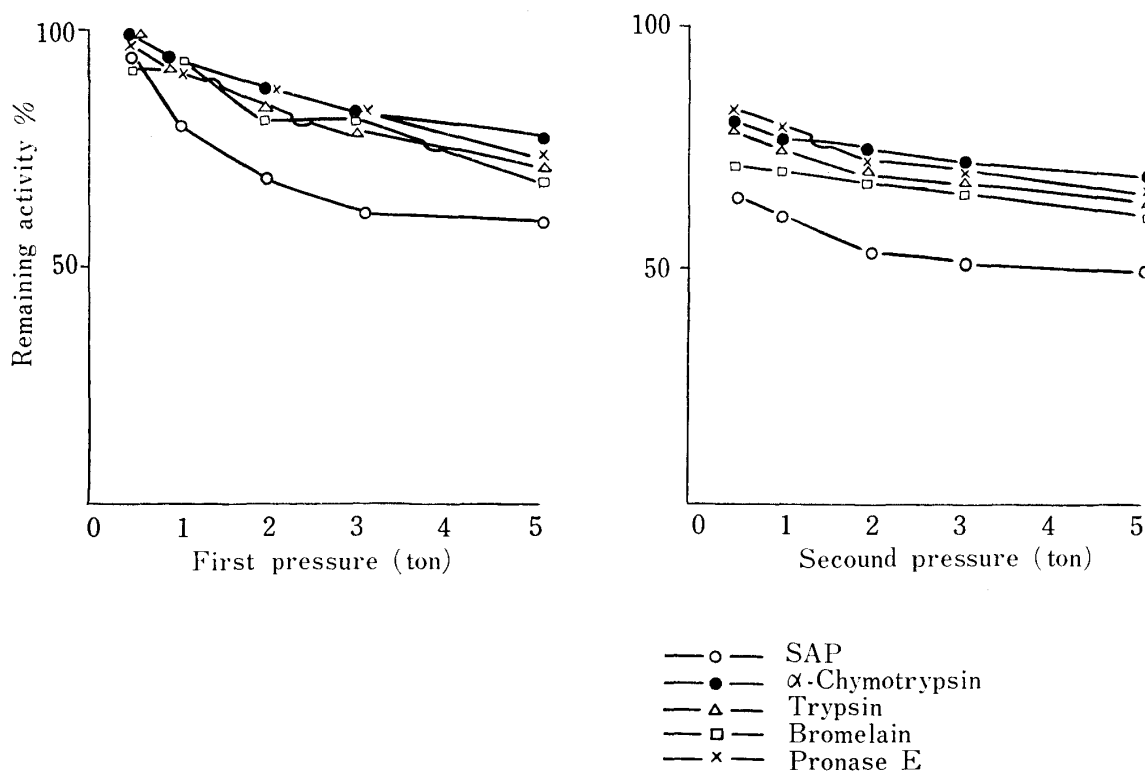


Fig.3 Effect of Pressure on Various Enzymes

Table. IV VII~XXI および Fig. 3 の示すように消炎酵素によって失活の比率は異なるが実験に用いたすべての酵素が加圧によって失活することが認められた。その失活率は 2 ton までの加圧で大きく、それ以上の圧では比較的失活率は少なかった。また二次圧による失活率は一次圧の失活率よりも小さいが二次圧においても失活がみられた。特に S. A. P. は圧によって大きく影響を受け 2 ton の加圧で 65% の残存活性であった。その他の消炎酵素は

いずれも類似した傾向を示し、加圧に対しては比較的安定であるように思われる。

5. 溶媒による影響

Table. XXII Effect of Solvents on Semi Alkali Proteinase

Solvent	Temp.	20	40	60
Methanol		54	38	14(%)
Ethanol		98	97	94
Isopropanol		100	100	100
Ethyl Acetate		100	100	97
Benzen		100	100	97
Chloroform		100	100	95
Ethylen Chloride		100	100	97
Petri ether		100	100	100
Ligroin		100	100	100

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Temp.	197.6	2	98.8	2.4
Solvent	10826.7	8	1353.3	33.0*
Error	656.4	16	41.0	
Total	11680.7	26		

$$F_{16}^8 \begin{matrix} 2.59 \\ 3.89 \end{matrix} \quad F_{16}^2 \begin{matrix} 3.63 \\ 6.24 \end{matrix}$$

Table. XXIV Effect of Solvents on Trypsin

Solvent	Temp.	20	40	60
Methanol		87	68	60(%)
Ethanol		99	91	75
Isopropanol		99	93	77
Ethyl acetate		90	89	82
Benzen		100	91	88
Chloroform		94	93	81
Ethylen chloride		97	92	90
Petri ether		95	94	90
Ligroin		100	93	86

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Temp.	974.0	2	487.0	23.2*
Solvent	1105.3	8	138.2	6.6*
Error	336.7	16	21.0	
Total	2416.0	26		

$$F_{16}^8 \begin{matrix} 2.59 \\ 3.89 \end{matrix} \quad F_{16}^2 \begin{matrix} 3.63 \\ 6.24 \end{matrix}$$

Table. XXIII Effect of Solvents on α -Chymotrypsin

Solvent	Temp.	20	40	60
Methanol		85	79	67(%)
Ethanol		97	94	93
Isopropanol		100	100	99
Ethyl acetate		100	98	87
Benzen		100	93	88
Chloroform		100	100	96
Ethylen chloride		100	93	81
Petri ether		100	100	96
Ligroin		98	97	95

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Temp.	342.6	2	171.3	9.3*
Solvent	1136.3	8	142.0	7.4*
Error	293.1	16	18.3	
Total	1732.0	26		

$$F_{16}^8 \begin{matrix} 2.59 \\ 3.89 \end{matrix} \quad F_{16}^2 \begin{matrix} 3.63 \\ 6.23 \end{matrix}$$

Table. XXV Effect of solvents on Bromelain

Solvent	Temp.	20	40	60
Methanol		92	91	90(%)
Ethanol		99	99	90
Isopropanol		99	94	88
Ethyl acetate		97	93	87
Benzen		99	99	95
Chloroform		99	99	99
Ethylen chloride		100	94	93
Petri ether		100	99	97
Ligroin		100	98	97

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Temp.	230	2	115.0	6.05*
Solvent	939	8	117.3	6.16*
Error	313	16	19.0	
Total	1481	26		

$$F_{16}^8 \begin{matrix} 2.59 \\ 3.89 \end{matrix} \quad F_{16}^2 \begin{matrix} 3.63 \\ 6.23 \end{matrix}$$

Table. XXVI Effect of Solvents on Pronase E

Solvent	Temp.	20	40	60
	Methanol		36	34
Ethanol		98	87	58
Isopropanol		99	94	93
Ethyl acetate		100	97	92
Benzen		100	97	96
Chloroform		100	99	96
Ethylene chloride		100	96	96
Petri ether		100	100	98
Ligroin		99	96	87

Analysis of Variance

Factor	s. s.	d. f.	m. s.	F ₀
Temp	566.0	2	383.0	6.49*
Solvent	11628.0	8	1453.0	24.62*
Error	949.0	16	59.0	
Total	13143.0	26		

F_{16}^8 2.59 F_{16}^2 3.63
 3.89 6.24

錠剤を糖衣, フィルム, 腸溶皮などによって被包する際のコーティングの過程において, 最も影響を与えるのは溶媒であるように考えられる。そこでこれらのコーティングに使用される溶媒 Methanol, Etanol, Isopropanol, Ethyl acetate, Benzen, Chloroform, Ethylene chloride, Petri ether, Ligroin にて酵素を湿したのち 20°, 40°, 60°C で 30 分間接触させ, 減圧下で溶媒を溜去したのち酵素活性を測定し, Table. XII~XXVI の如き結果を得た。

実験計画法に従って二次配置法で実験を行ない推計学的分析をした結果, 本実験に用いた消化酵素はすべて溶媒間において危険率 5% 優位差が認められた。また温度間では α -Chymotrypsin, Trypsin, Pronase が危険率 5% で優位差が認められた。Table. 22~26 に示すように SAP, α -Chymotrypsin, Pronase は Methanol によって著しく影響を受けるのに対し, Bromelain は 90% の残存活性を示した。他の溶媒は消炎酵素に対して比較的影響が少なく 80% 以上の残存活性がみられた。

考 察

消炎酵素の製剤化において考慮すべき問題点につき, 検討を加えた。その結果, 賦形剤では一般に用いられる乳糖, バレイショデンプン, 合成ケイ酸アルミニウム等には影響されないように思われる。湿潤剤としての Ethanol, Isopropanol, Aceton 等の濃度の低いものは酵素を変性させるためその活性に影響を及ぼすが, 高濃度のものについては大きな影響はなかった。消炎酵素の種類によっては結合剤, 崩壊剤により特異的に影響を受ける傾向がある³⁾。その他加圧による影響も大きいので, これらの欠点を充分考慮して製剤化する必要がある。また葛西らはくり返しの加圧では失活をきたさず, 一次圧において塑性変性が終了するため二次圧による影響は受けないと報告しているが, 著者らの実験結果では二次圧によっても幾分失活をきたすようである。したがって錠剤製造における加圧は二次圧を用いる乾式法より一次圧の湿式法を採用すべきであるように思われる。

⁴⁾ 竹中, 伊藤らはアミラーゼについて製剤条件の検討を行っているが, その結果と著者らの成績とは, おおむね類

似した傾向を示した。

結 論

1. 本実験で用いたような一般的な賦形剤では酵素の活性に殆んど影響を及ぼさない。
2. 湿潤剤としてはできるだけ高濃度のものを用うれば、湿潤剤の種類にそれ程関係なくおおむね酵素は安定である。
3. 結合剤、崩壊剤では酵素の種類によって特異的に影響される。
4. 顆粒乾燥時における温度の影響はいずれの酵素も 60°C 位までならば大きな影響はない。
5. 酵素の製剤化においては圧力による影響は大きい、とくに S. A. P. は加圧によって失活が大である。
6. 溶媒による影響は Methanol 以外の溶媒を用うれば酵素に比較的影響を及ぼさない。

終りに臨み、本研究に当り御助言をいただいた、岐阜薬科大学、製剤学、伊藤元助教授に厚く感謝致します。

文 献

- 1) L. Innerfield, A. Schwarz, and A. Angrist: J. Clin. Invest., **31**, 1049 (1952).
- 2) G. J. Martin. et. al: Exper. Med. Surg., **20**, 227(1962).
- 3) 葛西, 内田: 薬剤学, **25**, 279 (1965).
- 4) 竹中, 伊藤: 薬剤学, **28**, 254(1968).

石黒伊三雄・篠原力雄

生体内における FAD, FMN の酵素水解について

Isao Ishiguro, Rikio Shinohara: Enzymatic Hydrolyze of FAD and FMN in Animal Tissues

Summary

Various tissues of normal rat have been clarified it have high specificity in enzymatic activities which can hydrolyze FAD and FMN. When the rats were poisoned with CCl₄, the hydrolyzing activity, B₂ contents and alkaline phosphatase activity were altered particularly in the kidney and small intestine. The rabbits which were poisoned with HgCl₂, in the kidney the activity which can hydrolyze FMN was decreased remarkably, and in the poisoned rabbit, FMN was excreted in large quantity in the urine after the venous injection of FAD and FMN.

緒 論

高等動物の体内に摂取されたビタミン B₂ は、ATP 関与のもとに Flavin mono nucleotide (FMN) を経て、Flavin adenin dinucleotide (FAD) となり、フラビン酵素として、生体酸化に関与するが、生理作用にあずかった FAD は Nucleotide pyrophosphatase により再び FMN となり、更に Phosphomono esterase によって、Ribofabrin (FR) にまで酵素的に水解させて、尿中に排泄される。