

塩化リゾチーム製剤の品質試験および塩化リゾチームシロップの配合変化

鈴木時紀, 伊藤 譲, 鈴木吉成, 山田喜広, 古田知由, 二橋純一,
川影逸郎, 藤井喜一郎
浜松医科大学医学部附属病院薬剤部*

Quality Test of Lysozyme Chloride Preparations and Compatibility of Lysozyme Chloride Syrup with Mixed Solutions

TOKINORI SUZUKI, YUZURU ITO, YOSHINARI SUZUKI, YOSHIHIRO YAMADA,
TOMOYOSHI FURUTA, JUNICHI NIHASHI, ITSURO KAWAKAGE, and
KIICHIRO FUJII

Pharmacy, Hamamatsu University School of Medicine Hospital*

(Received July 5, 1985)

Protein content in syrup preparation of commercial lysozyme chloride could not be determined by Lowry method or spectrophotometric measuring at 280nm due to the presence of additives in syrup which interfered with the measurements. However, highly accurate protein content could be obtained by a filter paper technique for the microdetermination of protein based on Lowry method where protein content in the syrup obtained by this method corresponded to potency. Specific activity of lysozyme in the syrup determined by use of *Micrococcus lysodeikticus* in suspension as lysozyme substrate was the same activity as purified lysozyme. Therefore, it seems that lysozyme highly purified was used for the syrup preparation.

The compatibility of lysozyme syrup with some commercial syrup preparations was studied. When Inolin syrup was mixed with the lysozyme syrup, 50% of the lysozyme activity was lost after 7 days at room temperature, whereas significant loss was not observed at 4°C. However, other syrups showed good compatibility with the lysozyme syrup under the same condition. Consequently, lysozyme chloride syrup seemed to be a stable preparation and to be mixed with other syrups.

Keywords—lysozyme chloride; quality test; lysozyme activity; a filter paper technique

塩化リゾチーム製剤は、錠、カプセル、顆粒、シロップの4剤形が数社から市販されており、錠、カプセル、顆粒剤の品質試験等についての報告はすでに多くなされているが、¹⁻³⁾シロップ剤中の蛋白質量の定量法についての報告は少ない。それは、シロップ剤に添加されている安定剤の影響をうけるため、280nmの極大吸収により算定する方法や、Lowry法では定量不可能であることにその原因があると思われる。著者らは、シロップ剤中の蛋白質量の定量法において、簡便でさらに力価ともよく相関する方法を検討した結果を報告すると同時に、他の剤形についても力価と蛋白質量との関係を検討した。

* 浜松市半田町3600; 3600, Handa-cho, Hamamatsu-shi, 431-31 Japan

さらに、リゾチームシロップ剤と他のシロップ剤との配合変化、ならびにリゾチーム力価の経時の変化を検討した。

実験の部

1. 試料

塩化リゾチーム製剤 A社: 10mg 錠剤 (Lot No. 2401) 90mg 錠剤 (Lot No. 2002) 顆粒剤 (Lot No. 2604), B社: 30mg 錠剤 (Lot No. 181) 顆粒剤 (Lot No. 166) シロップ剤 (Lot No. 088), C社: 30mg 錠剤 (Lot No. 3415) 顆粒剤 (Lot No. 524G16K) シロップ剤 (Lot No. 1974KN)

塩化リゾチーム標準品: Sigma 社製 Lot No. 10F-

8097

基質液: *Micrococcus luteus* 菌体 (生化学工業社製) をリン酸緩衝液 (pH 6.2) で溶かして, 660 nm での透過度が10%になるように調製した (用時調製).

フェノール試薬: 市販 (和光純薬 Lot No. LTJ3181) を2倍に希釈した.

アルカリ性銅溶液: 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液 0.5ml に 2% 酒石酸ナトリウム・カリウム溶液 0.5 ml を加え, さらに 2% Na_2CO_3 -0.1N NaOH 50ml を加えて調製した (用時調製).

2. 力価測定

試料を約 50mg (力価) 対応量を精秤し, 0.4M NaCl 加リン酸緩衝液 (pH 6.2) で抽出後, *Micrococcus luteus* を基質とした菌懸濁法¹⁾ に準じて行った.

3. 蛋白質量の測定

1) UV法¹⁾: 試料を 0.4M NaCl 加リン酸緩衝液 (pH 6.2) で抽出後, リン酸緩衝液 (pH 6.2) で調整後 280 nm における吸光度からリゾチーム蛋白質量を算出した.

2) Lowry 法⁴⁾: 試料を UV 法と同様に調製後, アルカリ性銅溶液を加え10分間室温に放置し, フェノール試薬を加え30分間室温に放置し, 660nm の吸光度から総蛋白質量を算出した.

3) 濾紙を用いた Folin 法の簡便化法⁵⁾: 濾紙 (Whatman 5.5cm) を 1/4 の扇形に切り, 各紙片の識別を可能にし, 濾紙片の中央付近にピンをさして濾紙片を中空に

固定する. この濾紙片に 10 μl の試料を定量的に吸収させ, 10分間室温に放置し, 水分量を減少させる. 50ml のビーカーの中に, 5% Trichloroacetic acid (以下TCA) を濾紙片が十分浸る量を取り, この中に濾紙片を投入し, 15分間ゆっくり振とうさせ, TCAを取り替えて, さらに15分間ずつ2回洗う. 洗う操作がすんだ濾紙片は余分の TCA 溶液を除き, 濾紙片をピンセットで取りはずし試験管中に入れ, ここに 2.5 ml のアルカリ性溶液を加え, 軽く振とう後, 室温に 25 分間以上放置し, 0.125 ml のフェノール試薬をすみやかに加え, 37°C で30分間保温後, 660nm における吸光度を測定する. なお, その値は同一試料を3本作成し, その平均をとり, 検量線を引くための標準試料 (0, 25, 50 μg それぞれ2本ずつ) も同じ操作を行った.

4. シロップ剤の配合変化試験

シロップ剤の配合変化は, 内用液剤の配合変化試験の基準⁶⁾ に準じて行った. まず, リゾチームシロップ 2.5 ml に配合すべき液剤 2.5ml を注加し, さらに精製水 5.0ml を加えた液を試料とする. この試料液を室温, 4°C にそれぞれ放置し, 調製時, 1, 3, 7日後にpH, リゾチーム力価を測定した. 力価測定における配合剤には, 当院で比較的良好に配合されるタベジール, イノリン, ビソルボン, メジコンの各シロップ剤を用いた.

結果と考察

1. 錠剤, 顆粒剤中の蛋白質量と力価

Table 1. Comparison Protein Content and Potency in Tablet or Granule

Product	Protein content (%)		Potency (%)
	Lowry method	UV (280nm)	
A 10mg T	116.1	112.2	101.5
	90mg T	122.0	123.2
	Gra.	117.7	117.6
B 30mg T	101.4	99.9	95.6
	Gra.	102.6	98.6
C 30mg T	102.2	102.6	94.1
	Gra.	98.6	96.0

T : Tablet

Gra. : Granule

錠剤, 顆粒剤中の蛋白質量と力価との相関関係を調べた。蛋白質量の測定には, 一般的に行われている UV 法および Lowry 法を用いた。この方法は, いずれもリゾチーム蛋白質定量には繁用される方法であり, これにより求められた蛋白質量と常法により測定した力価を Table 1 に示した。蛋白質量は, 両方法とも測定値に差異は認められなかった。また, 力価は相対的によく蛋白質量と対応していることから, リゾチーム蛋白質は比較的良好に精製されているといえる。

2. シロップ剤中の蛋白質量と力価

シロップ剤中の蛋白質量を UV 法で測定することは, Fig. 1 に示すように 280nm に極大吸収が認められず, リゾチーム原末とは異なる吸収スペクトルを示すため不可能であった。また, Lowry 法でも B 社製 176%, C 社製 163% (表示量比) と非常に高い蛋白質量を示した。これは, シロップ剤の添加剤が両測定法に影響している

ためであり, 直接にはリゾチーム蛋白質量を測定することはできないと考えられた。そこで, 著者らは, 実験の部 3 で記した方法で蛋白質量を測定した。

Table 2 に示すように, 戸紙法による蛋白質量は B 社製 108%, C 社製 91% (表示量比) の値が得られ, この方法は添加剤の影響をうけることなく蛋白質の定量が可能であった。また, 2 社のシロップ剤の力価を測定し, 単位蛋白質当たりの比活性を算出した結果, B 社製で 0.92 mg 力価/mg 蛋白質, C 社製で 1.02 mg 力価/mg 蛋白質となり, 両製剤とも十分精製された原末が使用されているので, シロップ剤でも他の剤形と同様に蛋白質量を測定すれば, 力価のおおよその目安が付くものと考えられる。

3. 他剤配合によるリゾチーム力価の変化

塩化リゾチーム顆粒を種々のシロップ剤と配合した場合のリゾチームの安定性には多くの報告がある。著者ら

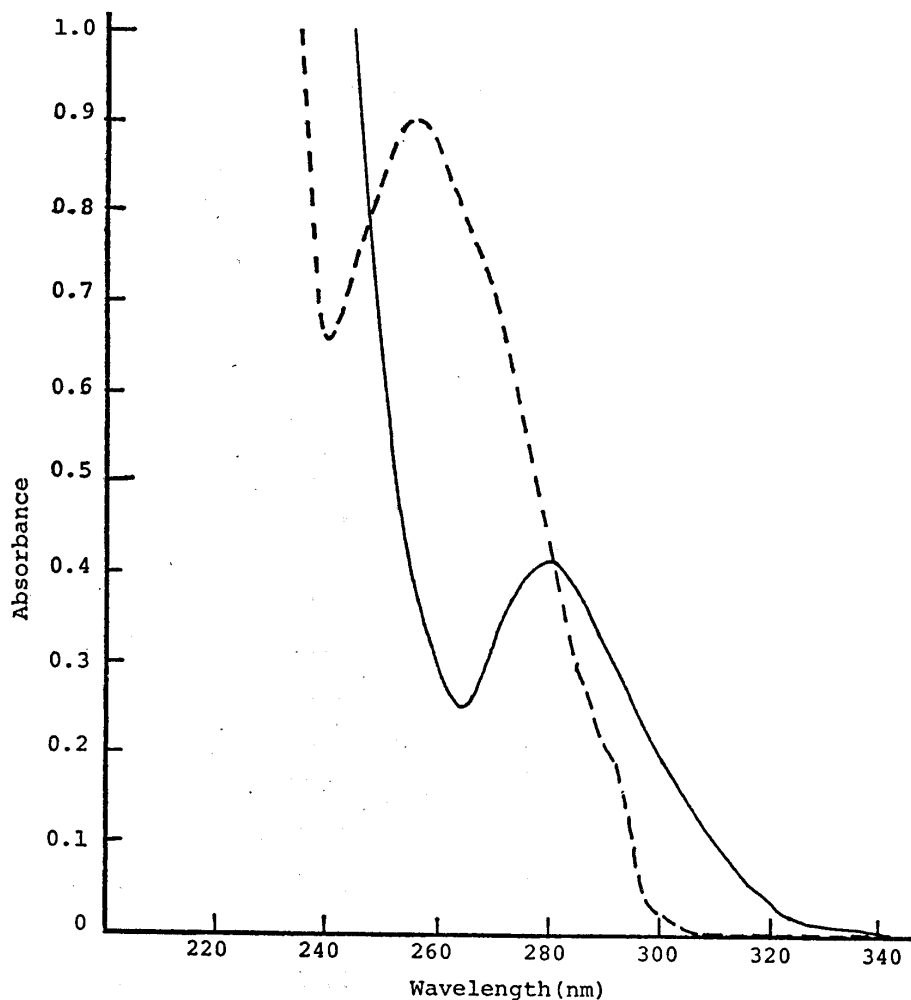


Fig. 1. UV Absorption Spectra of Lysozyme Chloride Obtained from Standard Lysozyme Chloride or the Commercial Syrup

———— Standard lysozyme chloride
 - - - - - The commercial syrup

Table 2. Determination of Protein in Syrups by a Filter Paper Technique and Specific Activity

Sample	Protein content (%)	Potency (%)	Specific activity (mg potency/mg protein)
B	108.1	99.0	0.916
C	91.3	92.7	1.015

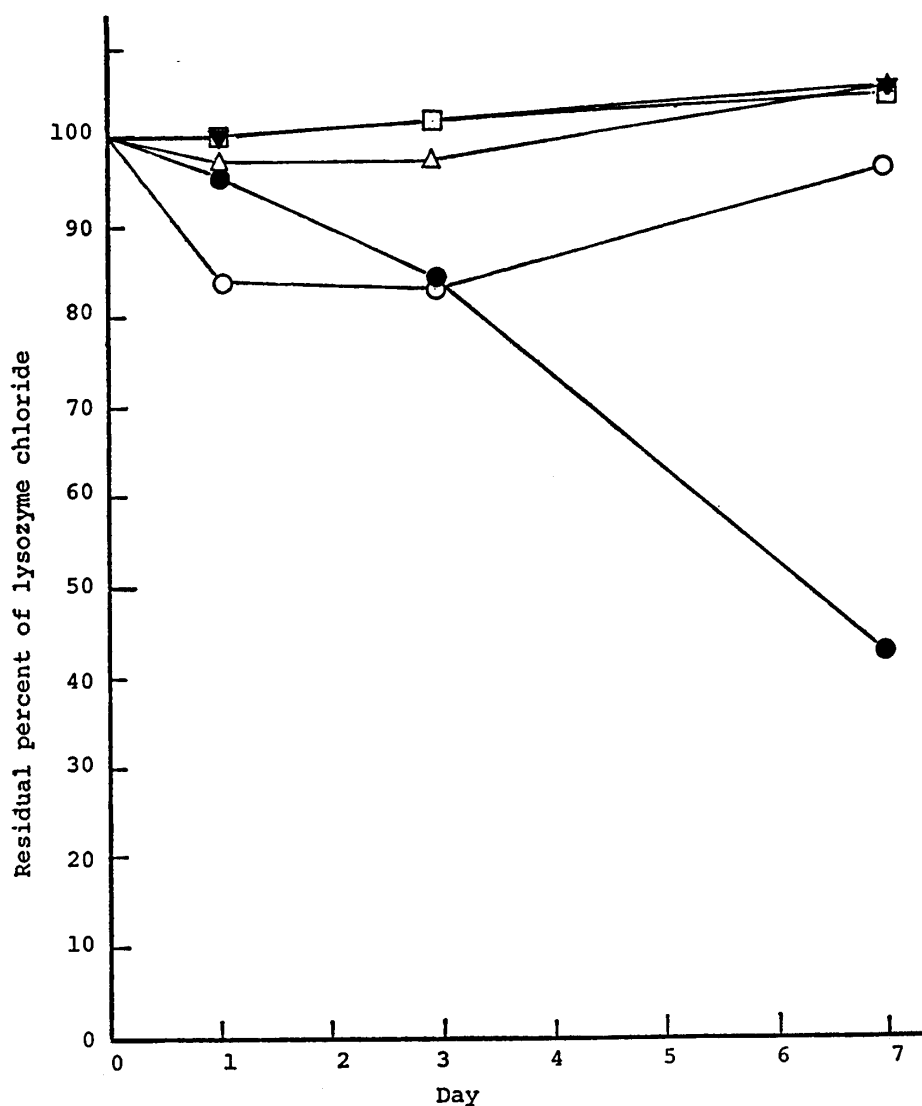


Fig. 2. Stability of Lysozyme Chloride in the Mixed Syrups at Room Temperature for 7 Days

The lysozyme chloride syrup was mixed with water (○—○), Tavegyl (□—□), Medicon (△—△), Inolin (●—●) and Bisolvon (▼—▼) syrups.

Table 3. Change in pH of Admixture

Additives	Initial	1 day		3 days		7 days	
		r.t.	4°C	r.t.	4°C	r.t.	4°C
water	3.3	3.3	3.5	3.1	3.4	3.5	3.7
Tavegyl	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.2	6.4
Inolin	4.1	4.1	4.1	4.2	4.2	4.6	4.5
Bisolvon	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.8	2.8
Medicon	3.5	3.6	3.6	3.5	3.4	3.7	3.8

r.t. : room temperature

は、塩化リゾチームシロップと当院で併用される他のシロップ剤を配合した場合のリゾチームの安定性を検討した。配合剤として水を加え4°Cに放置したものを基準として、他の配合剤のものとを比較した。4°C（遮光）に放置したものは、すべての配合においてリゾチーム力価はほとんど変化していないが、室温（遮光）に放置したもので、イノリンシロップ配合のもののみが7日間で50%以上の力価の低下が認められた。

その変化をみたものが Fig. 2 である。これは、Table 3 で示すように pH の変化による影響ともいえないし、イノリン錠を粉碎したものとリゾチームシロップとの配合では力価の低下は認められなかったため、イノリンシロップの添加剤がリゾチームの力価に何らかの影響をおよぼしているのではないかと考えられる。西田ら⁷⁾は、添加剤は亜硫酸系の抗酸化剤としていて、その影響は温度依存性であると著者らは考えている。

以上のように、イノリンシロップによるリゾチーム力価の低下が認められる以外は他剤と配合しても安定であり、配合性がよい製剤と思われる。

ま と め

以上の実験結果から、各リゾチーム製剤は比較的良好に精製されているので、力価の測定を行わなくても、蛋白質量を測定することによってその力価の一応の目安がたつことが認められた。すなわち、錠剤、顆粒剤では UV

法、Lowry 法で、シロップ剤では、濾紙を用いた Folin 法の簡便法によって品質試験を簡便化できることである。また、濾紙を用いた Folin 法の簡便法は、夾雑物の影響をうけることがないので、他の蛋白質製剤の定量にも応用できるものと思われる。

リゾチームシロップと他剤との配合においては、室温でのイノリンシロップとの配合において力価の低下を示したが、4°C（遮光）に置くことによって、ほとんどのものが7日間以内での投与期間では、力価の低下はある程度まで防げることが認められた。

引用文献

- 1) 谷本剛, 福田秀男, 川村次良: 衛生試験所報告, 98, 87 (1980).
- 2) 新熊傳治, 室親明, 浜口常男, 山中要, 水野亘恭: 病院薬学, 8, 113 (1982).
- 3) 青山敏信, 樋口駿, 堀岡正義: 病院薬学, 4, 74 (1978).
- 4) O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 5) 林博司: 生化学, 55, 257 (1983).
- 6) 神代昭, 川邑年四郎, 北沢式文, 清水龍夫, 中島繁美, 二宮英, 福地坦: 薬剂学, 38, 別冊付録, 24 (1978).
- 7) 西田由美子, 森田邦彦, 坪田芳, 柴田英彦, 小野彪, 島川治己: 薬剂学, 45, 21 (1985).