

消炎酵素劑의 藥劑學의 研究

李康春 · 梁仲益 · 閔信弘 · 李祥義 · 金蓉培*

東亞製藥(株), 中央研究所

Pharmaceutical Studies on Anti-inflammatory Enzyme Preparations

Kang Choon Lee, Joongik Yang, Shin Hong Min, Shangi Rhee, and Yong Bae Kim

(Received Nov. 3, 1977)

Spherical granules of anti-inflammatory enzyme were prepared by mixer granulation and the recovery rate of enzyme activity by processing was compared with tablet ones. In the enteric granule coating processing, the effect of the amount of coating solution and the concentration of fatty alcohol on disintegration and stabilities on the accelerated conditions were also studied.

Being prepared in non-pressure and non-aqueous condition, spherical granules of enzyme made better recovery of enzyme activity than tablet ones by 10 times. Combined processing of both mixer granulation and enteric granule film coating provided the noble enteric coated granules, in the sense of disintegration and stabilities, was obtained from using 0.125% fatty alcohol in coating solution.

緒 論

微生物 培養技術의 急速한 進歩와 아울러, 從來의 動物 및 植物酵素에서 微生物이 產生하는 酵素의 製藥 · 食品工業, 기타 產業 各分野에서의 利用率은 增加되고 있다.

그러나 이들 酵素들의 活性은 酵素蛋白의 高次構造에 依存하고 있으므로 이들의 變性에 의한 力價減少가, 새로운 酵素開發 못지않게 重要的 研究課題가 되고 있다. 特히 醫藥用 酵素의 경우, 物理的인 加工過程을 거쳐 製劑化가 이루어짐은 물론, 이에 따른 製品의 經時變化도 問題點을 안고 있다.

이에 따라 native 酵素를 不溶性酵素로 誘導시키는 方法¹⁻⁵⁾ 및 酵素資源의 開發面에서 試圖된 耐熱性酵素⁶⁾와 耐酸性酵素⁷⁾의 研究등이 根本的인 酵素安定化 方法으로 활발히 研究進行되고 있으나 實用化에는 아직 많은 難題들을 안고 있다. 그러므로 製劑學의 側面에서의 安

* Central Research Laboratory, Dong-A Pharm. Co., Ltd

定化 方法이 더욱 要望되고 있으나 이 方面의 研究는 主로, 製劑條件의 檢討와 安定劑에 對한 研究로 大別된다.

製劑條件과 酵素力價 關係는 杉浦⁹⁾, 竹中⁹⁻¹⁰⁾, 葛西¹¹⁾ 등에 의해 많은 檢討가 되어 있으며, 酵素安定劑 研究는 Ca²⁺의 酵素安定化 效果¹²⁻¹⁴⁾를 비롯하여 casein, potato inhibitor¹⁵⁾ Cl⁻ 및 Br⁻¹⁶⁾, poly-alcohols¹⁷⁾ 등에 대한 檢討가 紹介되고 있다.

그리고 最近, 酵素製劑의 安定化 및 內服時의 崩壞不均 을 防止하기 위한 顆粒攪拌劑가 頻用되고 있으며, 腸溶顆粒劑가 崩解와 生物學的 利用率面에서 腸溶錠劑보다 優秀하다는 報告¹⁸⁻¹⁹⁾가 있으므로, 著者들은 消炎酵素劑인 semi-alkaline proteinase(SAP)의 製劑化에 있어 劑形의 相異에 따른 製造條件의 變化가 酵素活性에 미치는 影響을 檢討함과 아울러 顆粒 腸溶코팅時의 諸般問題點 및 이들이 酵素製劑의 經時變化에 對한 影響을 檢討하였다.

實 驗 方 法

器具 및 機器——Erweka equipment(tableting machine, oscillating granulator, mixer, Kneader, coating pan etc), spray gun, compressor, disintegration tester, life tester, drying oven, 其他 製劑用 機器.

錠劑製法——錠劑處方에 따라 직경 8mm의 標準型 punch을 使用하여 打錠壓力을 약 2,000 kg/cm²으로 조절하고, 1錠當 100mg의 錠劑를 製造하였다.

球形顆粒製法——Mixer granulation 방식에 의해 28~14mesh의 球形顆粒을 製造하였다.

球形顆粒 coating——Hand spray에 의한 pan coating을 행하였으며 條件은, spray gun의 nozzle 直徑 1mm, 乾燥溫度 40°C, 壓縮空氣壓力 4kg/cm², coating pan의 rpm 15로 하였다.

崩解度——K.P. III의 崩解度試驗法에 準하였다. 단 第1液(人工胃液) 중의 試驗은 3時間으로 하였으며 그 以上에서도 崩解하지 않을 경우도 3時間으로 表記하였다.

酵素力價測定法——Semi-alkaline proteinase 20mg에 對應하는 試料를 燻酸鹽緩衝液(pH 8.0) 2,500ml에 녹여 試料溶液으로 한다. 0.6% 카제인 基質液(pH 8.0) 5ml에 試料溶液 1ml를 넣고 37°C에서 10분간 反應시킨 다음, 沈澱試液(0.11M trichloroacetic acid, 0.22 M sod. acetate, 0.33M acetic acid의 混合物) 5ml를 넣어 37°C에서 30分間 放置後, 여액 2ml에 0.55M 炭酸나트륨液 5ml, Folin試液(1→3) 1ml를 넣고 다시 37°C, 30分間 放置한 다음 660m μ 에서 吸光度를 測定한다. 空試驗을 하여 補正한다.

別途로 2ml중의 tyrosine 0, 10, 20, 30, 100 μ g을 각각 含有한 液을 調製하여, 각각 2ml씩을 취하여 同一方法으로 處理하여, 檢量線을 作成하고, 試料의 吸光度에 對應하는 tyrosine 相當量 T를 求하고 다음에 따라 力價를 計算한다.

$$\text{試料溶液 1ml의 力價} = T \times \frac{11}{2} \times \frac{1}{10}$$

經時變化測定——Life tester를 使用하고 處待條件은 RH 90%, 35°C 및 RH 60%, 35°C등 2條件으로 하였으며 일정기간마다 酵素力價를 測定하여 試料 g當 殘存力價를 %로 計算하였다.

實驗結果 및 考察

試料組成——酵素劑의 製劑設計에 있어, 酵素劑의 安定성을 向上시키기 위한 酵素安定化劑의 混合處方은 重要な 問題이나, 本研究은 製造方法設計를 重點의으로 檢討하기 위한 研究이므로 다음과 같은 一般的인 處方을 設定하여 semi-alkaline proteinase의 錠劑 및 球形顆粒을 製造하였다.

Formulations

A. Tablet

Semi-alkaline proteinase	33.4
Lactose	212.7
Syalamine	70.1
Mycrocrystalline cellulose	163.5
Talc	5.2
Sod. caoboxymethyl cellulose	25.2
Magnesium stearate	7.5

B. Spherical granule

Semi-alkaline proteinase	22.5
Lactose	247.5
Starch gum	99.5
Corn starch	27.1
Calcium lactate	36.1
Microcrystalline ceulose	31.5
Hydroxypropl cellulose	6.8

錠劑——錠劑는 製造工程中 打錠壓을 必須的으로 隨伴하고 있으며, 이에 대한 打錠壓과, 酵素力價失活 關係는 많은 檢討¹⁰⁻¹¹⁾가 행해졌다. 특히 松浦⁹⁾등은 Table I의 消炎酵素劑의 製劑化에 있어, 賦形劑, 顆粒製造時의 濕潤劑, 崩解劑 및 打錠壓등이 酵素力價에 미치는 影響을 一般的인 側面에서 檢討하였으며, 打錠壓의 力價失活에 미치는 程度가 가장 뚜렷하였음을 강조하고 있다.

著者등이 上記 錠劑處方 및 錠劑製法에 따라 製造한 semi-alkaline proteinase錠의 工程中 酵素力價失活은 Table II와 같으며 대략 15~20%의 失活率을 나타내고 있다. 이는 消炎酵素劑 自體가 單位 g當 酵素力價를 最大로 하기 위해 高度로 精製된 結晶性 酵素이므로, 外部條件에 crude한 酵素劑보다 敏感하기 때문이라고 思料되어, 酵素力價와 有關한 條件등을 可能한한 避하여 다음의 球形顆粒化를 檢討하게 되었다.

球形顆粒——製藥工業에서 試圖되는 球形顆粒製造方法으로는 pan granulation²¹⁻²²⁾과 壓出一球形化工程²³⁻²⁵⁾ 등이 있으나 이들 方法들은 製造工程中 壓力을 避할 수 없으며 더욱이 非水性 操作은 不可能한 것으로 되어 있다. 따라서 壓力 및 水分에 敏感한 力價減少를 나타내는 酵素製劑등에 利用은 不適合하므로 非壓力—非水性 條件에서 球形顆粒製造가 可能한 著者³⁰⁾ 등에 의해 檢討된 mixer granulation 方式의 適用을 檢討하게 되었으며, 이에 따라 球形顆

Table 1—Anti-inflammatory Enzymes

Enzyme	Source	Optimum pH	Purity	Proteolytic Activity (units/g)
Semi-alkaline proteinase	<i>Aspergillus melleus</i>	8.0	Crystal	304800
α -Chymotrypsin(NF)	Animal	8—9	Crystal	156200
Trypsin(NF)	Animal	8—9	Crystal	216900
Bromelain	Plant	8.0	Crude	25000*
Pronase E	<i>Streptomyces griseus</i>	8—9	Crude	135500

* Cystein added

粒處方에 의해 製造된 semi-alkaline proteinase 球形顆粒의 製造工程中 力價失活은 Table II 에서와 같이 거의 나타나지 않았다.

Table II—Recovery of Enzyme Activity by the Preparation of Tablets and Granules

	Initial Potency(units/g)	Reovery Potency(units/g)	Potency Loss(%)
Tablet	1. 138500	114263	17.5
	2. 138500	104567	24.5
	3. 138500	112462	18.8
	\bar{x} 138500	110431	20.3
Spherical granule	1. 100739	100134	0.6
	2. 100739	99026	1.7
	3. 100739	99832	0.9
	\bar{x} 100739	99664	1.1

製造工程과 酵素力價——劑形 및 이에 따른 製造工程에 따라 主藥의 安定性에 미치는 影響은 一般 醫藥品보다 酵素의 경우 뚜렷한 차이를 豫見할 수 있으며, 이는 酵素가 갖는 物理化學的 性質에 基因하고 있다.

酵素의 活性은 酵素蛋白의 高次構造에 依存하고 있으며 酵素蛋白이 變性하여 그 2次 또는 3次 構造가 變化하고 活性도 同時에 變化하여 失活하게 되는 것이다. 그러므로 酵素製劑의 製造工程中의 失活은 여러가지 原因에 의한 酵素蛋白 高次構造의 變化에 基因하는 것이므로, 酵素劑의 製劑化는 酵素 本來의 高次構造를 損傷시키지 않는 精密한 工程設計가 要求되고 있다.

製劑條件에서 酵素力價失活의 影響因子는 一次的으로 打錠壓과 濕潤劑가 問題가 되므로, 이에 準하여 檢討할 때, Table II에서의 比較와 같이 錠劑보다 球形顆粒할 경우 약 1/10의 力價減少로 結晶性 消炎酵素劑의 製劑化가 可能하다는 事實은 앞으로의 酵素劑 研究에 重要한 意味를 갖는 것이라 思料되며 이러한 結果는 著者등에 의해 檢討된 Mixer granulation 방식이 非壓力—非水性 條件下에서 完壁하게 諸般 製劑條件 設定이 可能할 수 있기 때문이다.

腸溶顆粒코팅과 崩解度—顆粒의 腸溶 film coating은 spray에 의한 pan coating, suspension coating machine²⁶⁾에 의한 方法등이 使用되고 있으며, 著者들은 pan에 의한 方法을 採擇하여, 腸溶코팅液의 組成 및 添加量이 酵素劑 腸溶顆粒의 崩解도와 經時變化에 미치는 影響을 檢討하였다.

腸溶코팅物質로는 cellulose acetate phthalate(CAP), hydroxypropyl methyl cellulose phthalate(HPMCP) 및 Eudragit® L&S 등이 頻用되고 있으며, 腸用被膜의 彈性和 permeability를 向上시키기 위해 添加되는 plasticizer는 diethyl phthalate, dibutyl phthalate, triacetin, castor oil 등이 使用되고 있다.

著者들은 이들 중 cellulose acetate phthalate와 dibutyl phthalate를 基本으로 코팅液 處方을 設定하였으며 fatty alcohol의 一種인 Laurex 18®의 添加效果를 同時에 檢討하였다.

Coating Solutions

A. Coating Solution-1

Cellulose acetate phthalate	40 g
Dibutyl phthalate	12
Acetone-isopropanol(1 : 1)	to make 500ml

B. Coating Solution-2

Cellulose acetate phthalate	40 g
Dibutyl phthalate	12
Fatty alcohol(Laurex 18®)	4-12
Acetone-isopropanol(1 : 1)	to make 500ml

코팅液-1을 mixer granulation 方式에 따라 製造된 酵素顆粒 一定量에 대해 腸溶 film

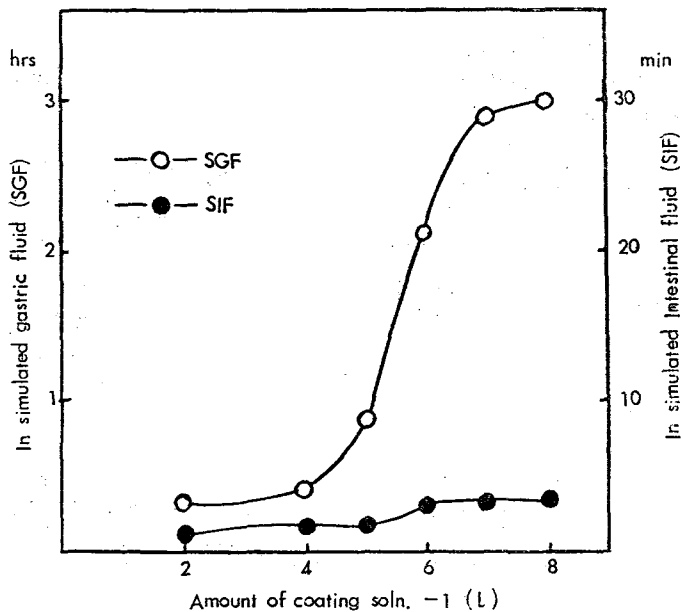


Figure 1—Effect of coating solution-1 on disintegration of enteric coated granule.

코팅을 행할 때, 使用된 코팅液量과 產生된 腸溶顆粒의 人工胃液 및 腸液中的 崩解度는 Fig. 1과 같으며, 8l 以上을 분무할 때 人工胃液에서 3時間 持續이 可能하였으며, 人工腸液으로 옮겨 모두 5分以內에 崩解되었다.

Fatty alcohol의 崩解度에 미치는 影響을 檢討하기 위해 코팅液-2에서 fatty alcohol의 量을 cellulose acetate phthalate量의 10, 20, 30%를 각각 添加, 酵素顆粒 一定量에 8l씩을 코팅하였다. 產生된 腸溶顆粒의 人工胃·腸液에서의 崩解度는 Fig. 2와 같다.

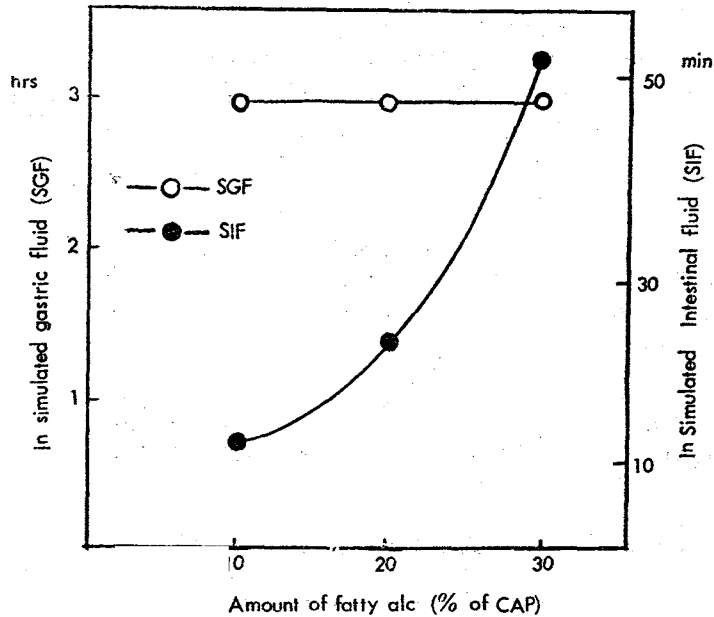


Figure 2—Effect of fatty alcohol in coating solution-2 on the disintegration of enteric coated granule.

Fatty alcohol의 濃度가 增加함에 따라, 人工胃液中的 崩解時間이 길어지며, CAP量의 20%를 넘을 경우 腸內에서 崩解되지 않은 危險性이 있으므로, CAP의 10%線으로 固定하고 이에 따라 製造된 코팅液-2의 使用量과 崩解度 關係를 檢討하였으며 Fig. 3과 같다.

Fig. 3와 같이 코팅液을 5l 以上 使用할 경우, 모두 人工胃液中에서 3時間 以上을 견디는 좋은 結果를 얻었으나 人工腸液에선 崩解가 늦어지는 傾向을 보였다. 그러나 8l의 코팅에서도 11分 이내에 崩解完了되었다.

Fatty alcohol의 崩解度에 미치는 影響은 fatty alcohol의 疏水性 및 CAP膜의 半透膜性을 改善함에 基因하는 것으로 생각된다.

經時變化—製劑의 經時變化豫測은 많은 方法²⁷⁾들이 紹介되고 있으나 대부분이 溫度만을 影響因子로 다루고 있다. 그러나 酵素製劑의 境遇, 溫度와 濕度의 影響은 물론 細菌 및 自己消化등의 外的要因이 複合的으로 作用하고 있으므로 酵素製劑의 安定性 豫測은 많은 問題點을 안고 있다.

著者등은 上記에서 製造된 酵素腸溶顆粒의 經時變化를, RH 60%—35°C 및 RH 90%—35°C

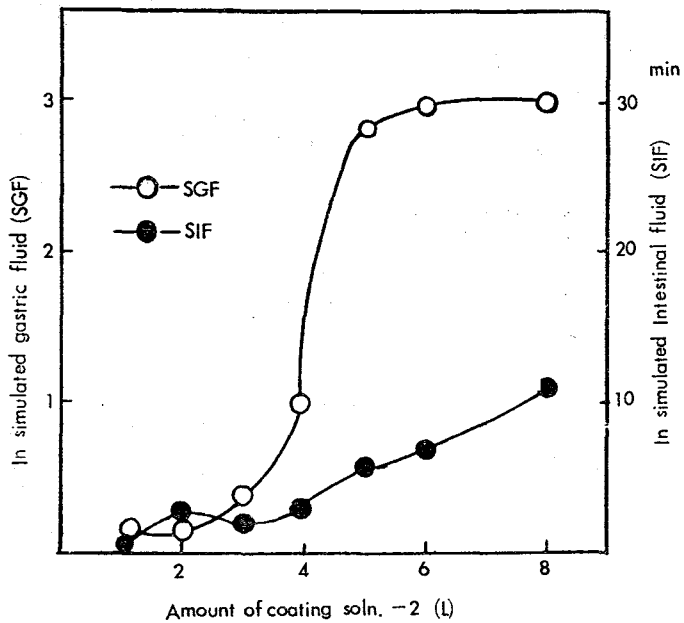


Figure 3—Effect of coating solution-2 on disintegration of enteric coated granule. Amount of fatty alcohol in coating solution: 10% of CAP.

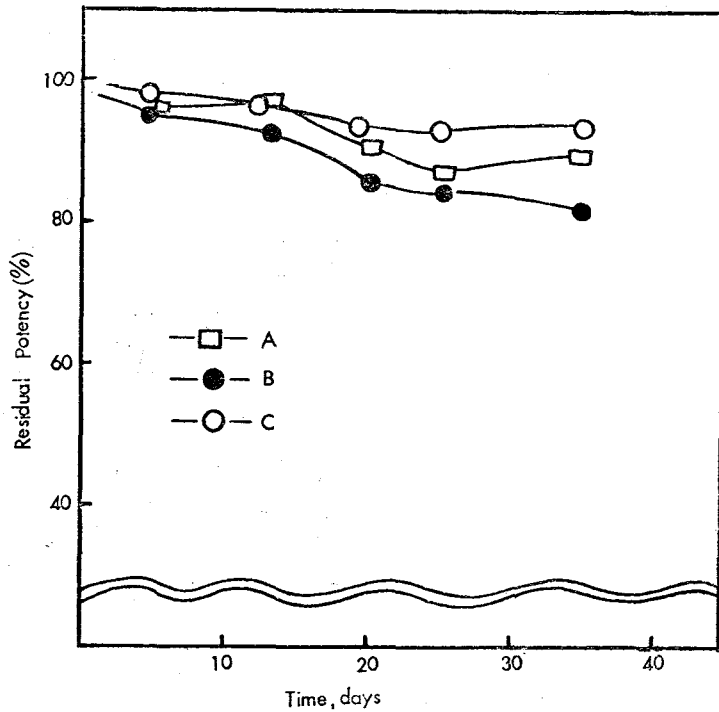
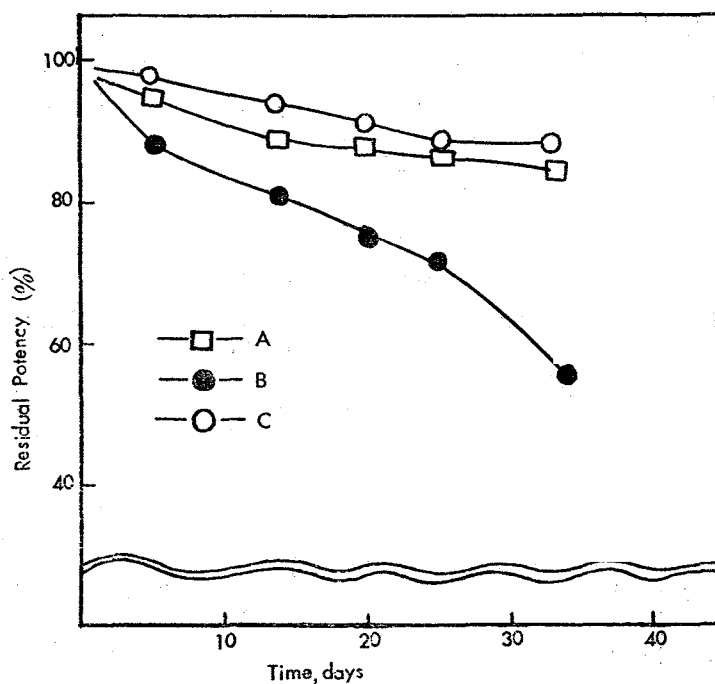


Figure 4—Time course of stability of enteric coated granule. Accelerated condition: RH 60%, 35°C, A: coating solution-2, 8l. B: coating solution-2, 5l, C: coating solution-2, 8l.

Table II—Analysis of Variance Derived from the Stability Data on the Condition RH 60%, 35°C

Factor	D. F	S. S	M. S	F.
Among products	2	4.85	2.42	1.98 < F (0.05) = 4.46
Among days	4	1058.08	264.52	216.8 > F (0.05) = 3.84
Error	8	9.76	1.22	
ST	14	1072.69		

**Figure 5**—Time course of stability of enteric coated granule. [Accelerated condition: RH 90%, 35°C, A: coating solution-1, 8L, B: coating solution-2, 5L, C: coating solution-2, 8L.**Table IV**—Analysis of Variance Derived from the Stability Data on the Condition RH 90%, 35°C

Factor	D. F	S. S	M. S	F.
Among products	2	403.84	201.92	12.06 > F (0.05) = 4.10
Among days	5	1688.30	337.66	20.17 < F (0.05) = 3.33
Error	10	167.43	16.74	
ST	17	2259.59		

등 2條件에서 虐待試驗을 행하여 虐待期間에 對應하는 殘存力價를 測定하였다.

試驗腸溶顆粒은 酵素顆粒 一定量에 A) 코팅液-1을 8L, B) 코팅液-2를 5L, C) 코팅液-2를 8L씩 噴霧하여 얻은 腸溶顆粒으로 虐待條件에서의 經時變化 關係는 Fig. 4, Fig. 5와 같다. 이들 data의 分散分析 結果는 각각 Table. III, IV와 같다.

虐待條件 RH 60%—35°C에서는 3種의 試驗顆粒 모두 安定한 것으로 나타났으며 이들에 대한 分散分析 結果 Data의 有意的인 差를 發見할 수 없었다. 그러나 虐待條件 RH 90%—35°C의 경우, 試驗製品間에 심한 經時變化의 差異를 나타내고 있다. B에 의한 製品은 25日 結果後에 急速한 力價減少를 보이고 있으며 이는 臨界含濕度를 넘은 것으로 생각된다. 더욱기 試驗腸溶顆粒 3種은 崩解度는 커다란 差異가 없으나 經時貨化에서 愚劣을 나타내고 있으며, 이는 崩解도와 酵素劑 安定性的 相關關係에 問題點을 示唆하고 있어, 이 方面의 檢討는 再追試할 豫定이다.

以上の 虐待試驗 結果, 酵素製劑가 溫度보다는 溫度에 敏感함을 알 수 있으며, 따라서 酵素製劑의 品質保護를 위해 preformulation 段階에서 製品包裝에 이르는 全工程에 철저한 防濕을 위한 諸般因子들이 檢討되어야 할 것이며 本 研究도 그러한 試圖의 一部分이라고 思料된다.

結 論

結晶化 消炎酵素인 semi-alkaline proteinase의 製造工程의 變化가 酵素力價失活에 미치는 影響과 球形顆粒코팅時 코팅液 組成 및 使用量이 產生된 腸溶顆粒의 崩解도와 安定성에 미치는 影響을 檢討한 結果 1) Mixer granulation 方式을 結晶化酵素의 製劑化에 應用可能性을 確認하였으며 2) 錠劑보다 mixer granulation 方式에 의한 球形顆粒이 製造工程中 酵素力價失活이 적었으며 3) 그 原因은 非壓力—非水性 條件에서 工程의 進行된 結果임을 알았다. 4) 腸溶코팅液中 fatty alcohol의 添加는 腸溶顆粒의 崩解도와 安定性 改善에 同時에 影響을 주고 있으며 5) 腸溶顆粒 崩解도와 經時變化 相關關係의 疑問點을 發見하였다.

그러므로 結晶化酵素의 腸溶顆粒化는 mixer granulation 및 顆粒腸溶코팅의 效果的인 連結에 의해 工程中 力價失活 및 經時變化를 最少限으로 하는 製劑設計의 可能性을 確認하였다

文 獻

- 1) A. Bar-Eli, et al., *Nature*, **188**, 856 (1960)
- 2) W.E. Hornby, et al., *Biochem Biochem. J.*, **98**, 420 (1966)
- 3) T. Tosa, et al., *Bioeng.*, **9**, 603 (1969)
- 4) *ibid.*, *Agr. Biol. Chem.* (Tokyo), **33**, 1047 (1969)
- 5) 杉浦 等, 藥誌, **93**, 742 (1973)
- 6) 遠藤, 醸工, **40**, 346 (1962)
- 7) 山田, 農化, **37**, 706 (1963)
- 8) 杉浦 等, 岐阜藥大記要, **18**, 44 (1968)
- 9) 竹中 等, 藥劑學, **29**, 228 (1969)
- 10) *ibid.*, **28**, 254 (1968)

- 11) 葛西 等, 藥劑學, **25**, 279 (1965)
- 12) P. Desnulle, *et al.*, *Arch. Biochem Biophys.*, **69**, 475 (1957)
- 13) 高橋 等, 衛生試報, **77**, 289 (1959)
- 14) 福木 等, 化學, **17**, 222 (1962)
- 15) 杉浦 等, 藥劑學, **27**, 314 (1967)
- 16) A. Nishida *et al.*, *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, **31**, 682 (1967)
- 17) K. Yasumatsu, *et al.*, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **29**, 665 (1954)
- 18) 前川 等, 藥劑學, **30**, 94 (1970)
- 19) *ibid.*, **30**, 102 (1970)
- 20) K. C. Lee, *et al.*, *to be printed*
- 21) P. A. Tuerck, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **49**, 344 (1960)
- 22) D. Ganderto, *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, **23**, Suppl., 1S (1971)
- 23) K. C. Lee, *et al.*, *Yakuhak Hoeji*, **18**, 7 (1974)
- 24) Reynolds, *Mfg. Chem. Aerosol News*, **41**, 40 (1970)
- 25) J.W. Conine, *et al.*, *Drug Cosmet. Ind.*, **106**, 38 (1970)
- 26) V. Coletta, *J. Pharm. Sci.*, **53**, 953 (1964)
- 27) 內藤, 藥劑の安定性, 店川書房, Tokyo, 1972, p. 18—78.