The Japan Society for Analytical Chemistry

BUNSEKI KAGAKU Vol. 46, No. 12, pp. 1003-1007 (1997) 

技術論文

# 製剤中の塩化リゾチームの吸光光度定量

内藤みつる*, 森 逸男*, 松尾敬子*, 藤田芳一®*

# Spectrophotometric determination of lysozyme chloride in pharmaceutical preparations

Mitsuru NAITOH, Itsuo MORI, Takako MATSUO and Yoshikazu FUJITA*

*Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki-shi, Osaka 569-11

(Received 17 June 1997, Accepted 7 August 1997)

A spectrophotometric method for the determination of lysozyme chloride was established by using the *o*-sulfophenylfluorone (SPF)-titanium(IV) complex. This method can be used to determine about 10～200 μg/10 ml lysozyme chloride, and is about 2-times more sensitive than the Japanese Standards of Pharmaceutical Ingredients method. This was applied to assays of lysozyme chloride in pharmaceutical preparations(tablet, granule, syrup, drysyrup, capsule and cold medicine). The analytical results and recoveries were satisfactory. The proposed method should be useful for the determination of various enzymes, such as α-amylase, cytochrome *c* and hyaluronidase.

***Keywords*** : lysozyme chloride determination by spectrophotometry; in pharmaceutical preparations; *o*-sulfophenylfluorone-titanium(IV) complex.

## 1 緒 言

著者らが開発したモリブデン(VI)-ピロガロールレッド錯体のような金属-色素錯体[1)~8)]との発色反応を利用するタンパク質定量法は，簡便，高感度で共存物質の影響が少ないため，これまで尿タンパク質，髄液タンパク質などの生体内タンパク質の実用的分析法として高く評価されている．一方，生体内反応のほとんどを司っている酵素の性状や反応などに関しての研究成果に加えて，薬理学，病理学の進展によって，種々の疾患や病態と酵素との関連性がしだいに明らかにされ，それに応じて医薬品として用いられる酵素の数が近年著しく増加し，その適用範囲も多岐にわたってきている．一方，このような酵素製剤の品質試験，分析法に関しての報告，研究はほとんんどされていないのが現況である．ところで，代表的な酵素製剤の塩化リゾチームは，消炎剤として単味製剤で慢性副びこう（鼻腔）炎やかくたん（喀痰）喀出困難などに使用され，又感冒薬，点眼薬，外用薬などにも広く配合されている．しかし，現在実施されている塩化リゾチームの公定法[9)~11)]の原理は，基質 *Micrococcus luteus* にリゾチームを一定時間反応させ，溶菌に伴う濁度の減少を吸光度の減少として測定するので，操作性が悪く，分析値のばらつきも多く，又共存物質の干渉を受けやすい欠点を有している．従って今回，塩化リゾチームの簡便，迅速で実用的な定量法の開発を目的として，著者らが開発した金属-色素錯体法の利用を試みることにした．

* 大阪薬科大学: 569-11 大阪府高槻市奈佐原 4-20-1

## 2 実 験

### 2・1 試薬及び装置

塩化リゾチーム溶液: Sigma 製の塩化リゾチーム (EC 3.2.1.17, Grade VI chicken egg white) 20 mg を水

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry



に溶解し，100 ml とした．溶液は冷蔵保存した．その他用いた酵素は Sigma 製及びナカライテスク製のものを使用した．

*o*-スルホフェニルフルオロン(SPF) 溶液: 文献記載の方法[12]で合成した SPF をメタノールに溶解し，1.0×$10^{-3}$ M 溶液として用いた．

チタン(IV) 溶液: キシダ化学製の原子吸光分析用標準液（1000 ppm）を，0.1 M 塩酸で用時希釈し，1.0×$10^{-3}$ M 溶液として用いた．

界面活性剤溶液: ポリビニルピロリドン K-90 (PVP) 2.5 g 及びポリエチレングリコール-*p*-ノニルフェニルエーテル (Triton N-101) 1.25 g を 80 ml の水に加え，加熱かくはんし，急冷して溶解した後，全量 100 ml の溶液とした．

緩衝液: 0.05 M クエン酸-0.05 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.4) を調製した．その他の試薬は，市販特級品をそのまま用いた．又，本実験ではイオン交換水及び再蒸留メタノールを用いた．

分光光度計: 吸収スペクトル及び吸光度の測定に島津 UV-160 型分光光電光度計で層長 10 mm の石英製セルを用いた．

pH メーター: 堀場 F-22 型複合ガラス電極 pH メーターを使用した．

### 2・2 定量操作

10 ml のメスフラスコに 1.0×$10^{-3}$ M Ti(IV) 液 0.5 ml，分散剤溶液 2.0 ml，0.05 M クエン酸緩衝液 (pH 2.4) 2.0 ml 及び 1.0×$10^{-3}$ M SPF 液 0.5 ml を加え，次いでほぼ 10～200 μg の塩化リゾチームを含む液を加え，水で全量 10 ml とし，試験管に移す．別に同様に処理して得た SPF-Ti(IV) 液と共に 70°C で 30 分加温，5 分間水冷した後，塩化リゾチーム-SPF-Ti(IV) 液の 590 nm での吸光度を試薬空試験値を対照に測定し，あらかじめ作成して得た検量線より塩化リゾチーム量を求める．

## 3 結果と考察

### 3・1 反応系の選定と吸収スペクトル

著者らが開発した 8 種の色素-金属錯体法，すなわちピロガロールレッド-モリブデン(VI) 法[1] (PR-Mo 法)，ピロカテコールバイオレット-モリブデン(VI) 法[2] (PV-Mo 法)，3,4,5,6-テトラクロロガレイン-モリブデン(VI) 法[3] (TCG-Mo 法)，SPF-ウラン(VI) 法[4] (SPF-U 法)，3,4,5,6-テトラクロロ-2- カルボキシフェニルフルオロン-マンガン (II) 法[5] (TCCPF-Mn 法)，クロムアズロール B-ベリリウム(II) 法[6] (CAB-Be 法)，ピロカテコールバイオレット-スズ(IV) 法[7] (PV-Sn 法) 及び SPF-チタン(IV) 改良法[8] (SPF-Ti 法) におけるヒト血清アルブミン定量時の最適条件下でこれら色素-金属錯体と塩化リゾチームの反応性を比較検討した．その結果を Table 1 に示すが，SPF-Ti(IV) 錯体法は，加温反応が必要で，操作時間がやや長い欠点があるものの，他法に比べ，(1)定量感度が最も良い，(2)試薬空試験値が小さい，(3)共存物質の影響が少ない

Table 1 Comparison of response of lysozyme chloride to the dye-metal ion complex developed by us

| dye-metal ion complex | Absorbance at $\lambda_{nm(max)}$ | | ref. |
|---|---|---|---|
| PR-Mo | 0.156 | 600 | 1) |
| PV-Mo | 0.169 | 675 | 2) |
| TCG-Mo | 0.212 | 640 | 3) |
| SPF-U | 0.125 | 540 | 4) |
| TCCPF-Mn | 0.414 | 585 | 5) |
| CAB-Be | 0.534 | 635 | 6) |
| PV-Sn | 0.343 | 645 | 7) |
| SPF-Ti | 0.595 | 590 | 8) |

Lysozyme chloride taken: 100 μg; Reference: each dye-metal ion complex solution

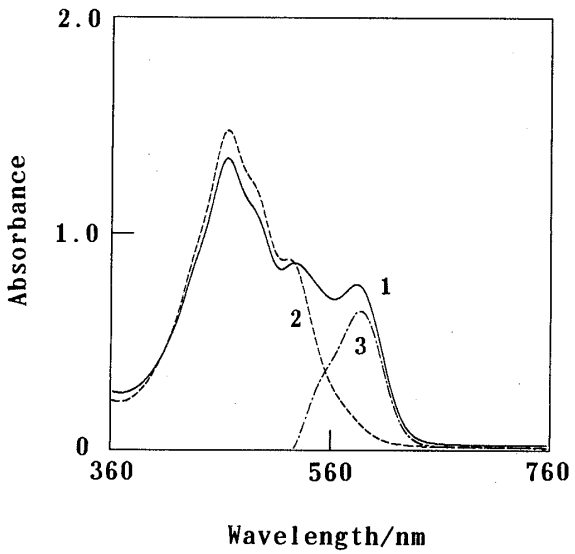


**Fig. 1** Absorption spectra obtained under the standard procedure (2·2)

Lysozyme chloride taken: 100 μg; Curve 1: SPF-Ti(IV)-lysozyme chloride against water; Curve 2: SPF-Ti(IV) against water; Curve 3: curve 1 minus curve 2

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry



ことが期待できる，などの点を考慮して，以下の塩化リゾチームの定量法の開発には SPF-Ti(IV) 錯体を用いることにした．Fig. 1 に塩化リゾチーム-SPF-Ti(IV) 液，SPF-Ti(IV) 液及び両者の差スペクトルを示す．

### 3・2　定量条件の再検討

塩化リゾチーム定量時における最適条件について，液性の影響と緩衝液量，界面活性剤の種類とその濃度，SPF 及び，Ti(IV) 濃度及び反応時間などを再検討した結果，液性の影響と緩衝液量などの点で既法[8]の定量条件と若干異なったので，本塩化リゾチーム定量に際しては，2·2 記載の定量操作を行うことにした．又，SPF に代えてその類似構造を有するキサンテン系色素，すなわちサリチルフルオロン，メチルフルオロン，*o*-カルボキシフェニルフルオロン，*p*-カルボキシフェニルフルオロン，バリニルフルオロン，*o*-クロロフェニルフルオロン，*o*-ニトロフェニルフルオロン，*m*-フルオロフェニルフルオロン，ナフチルフルオロン及びフェニルフルオロンを用いて参考までに検討したところ，分子中にスルホン酸を有する SPF が最も高感度であった．

Table 2　Effect of foreign substances on assay of lysozyme chloride

| Substance | Added/ μg | Absorbance at 590 nm | Recovery, % |
|---|---|---|---|
| Fe(III), alum | $5.6\times10$ | 0.595 | 100.0 |
| Cu(II), sulfate | $6.4\times10$ | 0.595 | 100.0 |
| Ca(II), chloride | $4.0\times10^2$ | 0.595 | 100.0 |
| NaCl | $5.8\times10^3$ | 0.595 | 100.0 |
| $K_2SO_4$ | $1.7\times10^4$ | 0.595 | 100.0 |
| $KNO_3$ | $1.0\times10^4$ | 0.595 | 100.0 |
| Oxalic acid | $1.8\times10^2$ | 0.578 | 97.1 |
| Glucose | $1.8\times10^4$ | 0.595 | 100.0 |
| Glycine | $7.5\times10^3$ | 0.595 | 100.0 |
| Caffeine | $1.9\times10^4$ | 0.595 | 100.0 |
| Ascorbic acid | $8.8\times10^3$ | 0.595 | 100.0 |
| Thiamine | $1.7\times10^3$ | 0.595 | 100.0 |
| Pyridoxine | $8.5\times10^2$ | 0.595 | 100.0 |
| Diphenhydramine | $1.3\times10^3$ | 0.614 | 103.2 |
| Phenylpropanolamine | $7.6\times10^2$ | 0.595 | 100.0 |
| Acetaminophen | $1.5\times10^3$ | 0.595 | 100.0 |
| Ephedrine | $8.3\times10^2$ | 0.595 | 100.0 |

Lysozyme chloride: 100 μg; Ti(IV): $5.0\times10^{-5}$ M; SPF: $5.0\times10^{-5}$ M; Surfactant: 2.0 ml/10 ml; pH: 2.4; Reference: SPF-Ti(IV) solution

Table 3　Determination of lysozyme chloride in pharmaceutical preparations

| Sample[a] | | Content/mg[b)c)] | | | RSD,[c)] % | Recovery,[c)d)] % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Norminal amount | Present method | Other[e)] method | | |
| Tablet | A | 10 | 10.5 | 10.8 | 0.81 | 98.5 |
| | B | 30 | 31.6 | 33.3 | 0.66 | 99.2 |
| | C | 30 | 29.8 | 30.5 | 0.60 | 100.5 |
| | D | 50 | 53.4 | 52.3 | 0.68 | 102.2 |
| | E | 90 | 88.7 | 91.0 | 0.69 | 101.8 |
| Granule | A | 50 | 51.5 | —[f)] | 0.72 | 101.0 |
| | B | 100 | 104.6 | 106.5 | 0.67 | 99.8 |
| | C | 200 | 210.0 | —[f)] | 0.59 | 102.0 |
| | D | 300 | 295.4 | —[f)] | 0.63 | 100.1 |
| Syrup | A | 5 | 4.92 | 5.32 | 0.83 | 101.2 |
| Dry syrup | A | 30 | 29.6 | 28.7 | 0.76 | 98.6 |
| | B | 100 | 107.4 | —[f)] | 0.70 | 100.8 |
| Capsule | A | 90 | 96.5 | 94.2 | 0.67 | 101.3 |
| Cold medicine | | 6.67 | 6.48 | —[f)] | 1.04 | 100.4 |

a) An aliquot of samples(except syrup) was ground in a mortar to fine powder; the powder, exactly weighed, was dissolved in water by means of shaking, the solution was filtered, and then the drug content was determined by the standard procedure. b) Drug content, mg per 1 tablet, granule, dry syrup, capsule and cold medicine (tablet) or mg per 1ml syrup. c) Mean of 5 determinations. d) Lysozyme chloride taken: 50 μg. e) ref. 11). f) undetermined.

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry



### 3・3 検量線の作成

2・2 の定量操作に従って，塩化リゾチームの検量線を作成したところ，10～200 μg の塩化リゾチーム濃度範囲において良好な直線を得た．本操作における塩化リゾチーム定量時の感度は公定法（日本薬局方外医薬品成分規格）の 2 倍以上を示し，繰り返しの相対標準偏差（RSD）は塩化リゾチーム 100 μg（$n$=6）で 0.63% と再現性にも極めて優れている．

### 3・4 共存物質の影響

本定量法における共存物質の影響を，塩化リゾチーム 100 μg を用いて検討したところ，多量のシュウ酸及びジフェンヒドラミンでそれぞれわずかに負，正の誤差を認めるが，その他，塩化リゾチームと配合されやすいアスコルビン酸，チアミン，ピリドキシン，カフェイン，アセトアミノフェン，フェニルプロパノールアミンなどの薬物の影響はほとんどないことを認めた．結果を Table 2 に要約した．

### 3・5 製剤中の塩化リゾチームの分析

本定量法を市販各種製剤（錠剤，か粒剤，シロップ剤，ドライシロップ剤，カプセル剤，複合感冒薬）中の塩化リゾチーム分析に応用したところ，Table 3 に見られるように，前処理操作を行わなくても回収率はほぼ 98～102% を示し，他法（公定法の改良法）との分析結果もよく一致した．又，本法は，公定法が適用できない複合感冒薬中の塩化リゾチームの分析にも適用可能で，製剤中の塩化リゾチームの簡便で高感度な日常分析法として十分利用できることを認めた．

### 3・6 その他の酵素製剤への適用の検討

塩化リゾチーム以外にはん用されている 11 種類の酵素製剤の反応性について検討した．その結果を Table 4 に示す．各酵素により反応性にかなり差はあるが，相対的にその分子量に比べて，塩基性アミノ酸のリジン，アルギニン数が多いほど，感度が良いという結果が得られた．本法における酵素の定量性と酵素活性との相関性について今後検討する必要はあるが，本法は塩化リゾチームをはじめとする各種酵素製剤の分析法として広く適用できることが示唆される．

（1997 年 3 月，日本薬学会第 117 会において発表）

Table 4 Response of various enzymes to the SPF-Ti(IV) complex

| Enzyme[a)] | Absorbance at 590 nm | %[b)] |
|---|---|---|
| Lysozyme chloride | 0.595 | 100.0 |
| α-Amylase | 0.405 | 68.1 |
| α-Chymotrypsin | 0.320 | 53.8 |
| Cytochrome *c* | 0.963 | 161.8 |
| Hyaluronidase | 0.465 | 78.2 |
| Kallidinogenase | 0.003 | 0.5 |
| Papain | 0.017 | 2.9 |
| Pepsin | 0.036 | 6.1 |
| Protease | 0.237 | 39.8 |
| Thrombin | 0.004 | 0.7 |
| Trypsin | 0.318 | 53.4 |
| Urokinase | 0.250 | 42.0 |

a) Enzyme taken: 100 μg/10 ml (uncorrected), b) Percent with respect to lysozyme chloride

## 文 献


1) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano: *Bunseki Kagaku*, **32**, E379 (1983).
2) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4161 (1984).
3) Y. Fujita, I. Mori, K. Ikuta, Y. Nakahashi, K. Kato, T. Nakanishi: *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2452 (1989).
4) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda, K. Kato, M. Nakamura, T. Nakanishi: *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 956 (1990).
5) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda: *Anal. Sci.*, **8**, 313 (1992).
6) Y. Fujita, I. Mori, M. Toyoda: *Anal. Sci.*, **8**, 693 (1992).
7) 藤田芳一，森 逸男，松尾敬子，分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 733 (1995).
8) Y. Fujita, I. Mori, T. Matsuo: *Anal. Sci.*, **13**, 515 (1997).
9) 横田椅江，太田美矢子，谷本 剛，早川堯夫：衛生試験所報告，**111**, 76 (1993).
10) 厚生省薬務局監視指導課：薬監第 49 号，(1992 年 9 月 24 日).
11) 谷本 剛，横田椅江：月刊薬事，**36**, 411 (1994).
12) H. Sano: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **31**, 974 (1958).


NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry



## 要　旨

*o*-スルホフェニルフルオロン-チタン(IV)錯体との発色反応を用いる塩化リゾチームの簡便，迅速で高感度な吸光光度定量法を開発した．590 nm での吸光度を測定する定量操作における繰り返しの相対標準偏差は 0.63%（100 μg，$n$=6）であった．塩化リゾチームと配合されやすいピリドキシン，チアミン，クロルフェニラミン，カフェイン，アセトアミノフェンなどの薬物の共存の影響はほとんどなかった．本法を市販製剤（錠剤，か粒剤，シロップ剤，カプセル剤，複合感冒薬など）中の塩化リゾチーム分析に応用したところ，回収率はほぼ 98～102% を示し，公定法の改良法との分析結果ともよく一致した．又，α-アミラーゼ，トリプシン，チトクローム $c$ など他の酵素剤の定量にも適用できることを認めた．

NII-Electronic Library Service