

PHARMAZEUTISCHE ZEITUNG

VEREINIGT MIT APOTHEKER-ZEITUNG
Zentralorgan für den Deutschen Apothekerstand

Sonderdruck aus 113. Jahrgang, Nr. 45, Seiten 1799—1803 (7. November 1968)

Erfahrung mit der photometrischen Gehaltsbestimmung von Pepsinen und Pepsinweinen

Von WOLFGANG WIEGREBE*)

(Aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie der Techni-
schen Universität Braunschweig)

*) Erweiterte Fassung eines Diskussionsvortrages während des
3. Internationalen Symposiums für Fragen der Arzneimittel-
standardisierung in Halle/Saale, September 1967; zugl. 2. Mittlg.
über galenische Proteasen-Zubereitungen, 1. Mittlg., s. 1).



Vor einigen Jahren berichteten wir über eine von uns entwickelte Variante¹⁾ der Anson-Methode²⁾ zur Gehaltsbestimmung von Pepsinen und Pepsinweinen. Inzwischen haben wir ausreichend Gelegenheit gehabt, dieses Verfahren in der Praxis anzuwenden. Unsere Bestimmung baut auf folgendem Prinzip auf: das Enzym (Pepsin-Lösung bzw. Pepsinwein-Verdünnung) wirkt bei 25° C auf ein speziell denaturiertes Hämoglobin ein; während dieses Verdauungsprozesses werden hauptsächlich solche Peptidbindungen des Proteins gespalten, an denen sog. „aromatische“ Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin, auch Tryptophan) beteiligt sind. Die so freigesetzten Protein-Bruchstücke sind im Gegensatz zu Hämoglobin nicht mit Trichloressigsäure fällbar. Unterbricht man dabei die enzymatische Reaktion nach einer festgelegten Zeit durch Zugabe von Trichloressigsäure-Lösung, so erhält man ein Präzipitat des nicht verdauten Hämoglobins und ein Filtrat, in dem wir den Gehalt an Tyrosin und Tryptophan durch die Faroreaktion mit dem Reagenz nach Folin-Ciocalteus¹⁾**) bestimmten.

Bei der Untersuchung vieler Pepsinproben und Pepsinweine bewährte sich die Methode; die Abweichungen vom Mittelwert waren jeweils kleiner als $\pm 5\%$. Die Bestimmung erfüllt somit die an ein enzymatisches Analysenverfahren zu stellenden Genauigkeitsanforderungen³⁾. Im Laufe der Zeit stellte es sich jedoch heraus, daß bei einigen Pepsinproben und Pepsinweinchargen analytische Schwierigkeiten auftraten, die augenscheinlich nicht im Analysenverfahren, sondern in der Probe selbst begründet waren. Wir sprechen nur dann von probebedingten Schwierigkeiten, wenn innerhalb einer Untersuchungsreihe sich diese oder jene Probe nur mühsam analysieren läßt, während andere Muster sich unter gleichen Bedingungen ohne Umstände untersuchen lassen.

Diese Schwierigkeiten werden verständlich, wenn man bedenkt, daß bei Pepsin-Untersuchungen zwei, bei Pepsinwein-Untersuchungen sogar drei Mehrkomponenten-Gemische miteinander reagieren:

das Enzympräparat mit seinen Begleitstoffen,
die Hämoglobin-Präparation (sie ist durchaus nicht konstant)
und ggf. der Wein.

¹⁾ Wiegereb, W., Arch. Pharmaz., Ber. Dtsch. Pharm. Ges. 36 (1966) 29.

²⁾ In der Literatur findet man außerdem die Schreibweisen Clocaleu und Ciocalteau.

³⁾ Anson M. L., J. Gen. Physiol. 22 (1939) 79.

⁴⁾ Bergmeyer H. U. in H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie GmbH., Weinheim/Bergstr., 1962, S. 9.

Kristallisierte Pepsine haben einen Verdauungswert von etwa 35 000, d. h. 1 g dieser Enzympräparation verdaut 35 kg Eiereiweiß in festgelegten Zeiten⁴). Technisch werden häufig Pepsin-Präparationen mit einem Wirkungswert 1:10 000 verwendet. Aus dem Zahlenvergleich folgt, daß diese Handelspräparate erhebliche Mengen an Ballaststoffen, vornehmlich Proteine enthalten, die in ihren Eigenschaften variieren und somit die Analyse stören können.

Auf Schwankungen des Substrates Hämoglobin gehen wir in Abschnitt B ein.

Von den Rohweinen, die zu Pepsinweinen verarbeitet werden, ist bekannt, daß sie auch in ihren analytisch erfaßbaren Kriterien (z. B. Gerbstoff-, Alkohol- und Elektrolytgehalt) differieren⁵.

Im Folgenden sollen die verschiedenen Ursachen der Untersuchungsschwierigkeiten dargelegt und Möglichkeiten aufgezeigt werden, um diese analytischen Probleme zu lösen.

A) Schwierigkeiten, die in der Probe selbst begründet sind

Bei Proben dieser Art treten starke Streuungen (maximale Abweichungen jeweils $> 10\%$) auf, die sich besonders ausgeprägt in den Leerwerten bemerkbar machen. Dieser Umstand deutet darauf hin, daß die Ursache der Störung in den vom Verdauungsprozeß weitgehend unabhängigen Begleitstoffen zu suchen ist. Da bei unseren Versuchen nicht die spezifische Enzymaktivität (Enzymeinheiten / mg Gesamtprotein), sondern die Gesamt-Enzymaktivität bestimmt werden muß, dürfen Anreicherungsverfahren nicht angewendet werden. Wir führen ggf. so viele Einzelbestimmungen durch, daß 75% aller Werte nicht mehr als $\pm 5\%$ vom Mittelwert abweichen. In vielen Fällen ist es bei dieser Art Proben günstig, die trichloressigsäurelöslichen Aminosäuren bzw. Protein-Bruchstücke durch eine vom o. a. Prinzip abweichende Messung zu bestimmen (vgl. Abschnitt F).

Nach unseren Erfahrungen liegt die Störungsursache häufig im Bereich der Farbreaktion. Wir werden darauf in Abschnitt E näher eingehen.

⁴⁾ Hauschild, F., Pharmakologie u. Grundlagen der Toxikologie, 3. Aufl., Editio Leipzig, 1961, S. 40. — Hauschild führt nicht an, nach welcher Methode dieser Wert bestimmt wurde. The Dispensatory of the USA, 25. edition, 1955, gibt einen Wert von 1:20 000 an, bestimmt nach NF X. Die Bestimmung der NF X entspricht dem Verfahren der NF XII, nach dem der Wirkungswert der 10 000fachen Handelspepsine bestimmt wird.

⁵⁾ Privat-Mittlg. der Fa. Blücher-Schering & Co., Lübeck.

B) Die Frage der Substrat-Konstanz

Hämoglobin für die Proteasen-Bestimmung nach Anson²⁾ ist käuflich. Da es sich um biologisches Material handelt, sind Schwankungen in seinen Eigenschaften nicht zu vermeiden. Die in Tabelle 1 wiedergegebenen Messungen sind mit derselben Pepsin-Lösung, aber zwei verschiedenen Hämoglobin-Chargen derselben Lieferfirma durchgeführt worden: die Leerwerte der Hämoglobin-Chargen differieren beträchtlich. Da aber die Differenz zwischen Leer- und Hauptwert gleichbleibt, führen die Untersuchungen zum praktisch gleichen Ergebnis: die hier verglichenen Hämoglobin-Substrate liefern Resultate, die nur um ca. 1% divergieren. Wir fanden bisher Abweichungen im Endergebnis beim Arbeiten mit Hämoglobin-Präparationen derselben Lieferfirma, die stets kleiner als 3,5% waren. Die in Tabelle 1 zusammengefaßten Werte wurden mit der in Abschnitt F beschriebenen Methodik ermittelt.

Tabelle 1

Hämoglobin a)

Ext. Leerwert	Ext. Hauptwert	Ext.-Differenz
0,096	0,426	0,330
0,098	0,428	0,330

Hämoglobin b)

Ext. Leerwert	Ext. Hauptwert	Ext.-Differenz
0,122	0,446	0,324
0,123	0,451	0,328

Theoretisch läßt sich die Frage der Substrat-Konstanz durch Verwendung synthetischer Substrate vom Typ des N-Carbobenzoxy-tyrosyl-tyrosins⁶⁾ lösen. Abgesehen von wirtschaftlichen Fragen, können solche Substrate nur zur Bestimmung hochgereinigter Proteasen eingesetzt werden, da auch diese Substrate nicht streng Enzym-spezifisch sind⁷⁾.

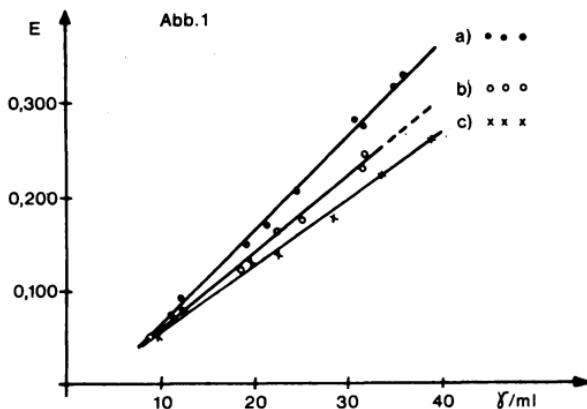
C) Die Frage der Eichenzyme

Unsere Problemstellung ist einer Gleichung mit zwei Unbekannten ähnlich; die eine Unbekannte, das Enzympräparat, hat eine große Variationsbreite, die zweite Unbekannte — die Verdaulichkeit des Substrates — eine vergleichsweise kleine. Es fehlt uns jedoch die zur Lösung einer Gleichung

⁶⁾ International Commission for the Standardisation of Pharmaceutical Enzymes, second report, Journal mondial de Pharmacie 1966, 343.

⁷⁾ Vortrag Dr. A. Lauwers, Ghent, während des Symposiums über Pharmazeutische Enzyme und ihre Bestimmung, Ghent, Mai 1968.

mit zwei Unbekannten notwendige 2. Gleichung. Es müßte sich dabei um eine Enzym-*u n a b h ä n g i g e* Bestimmung der Verdaulichkeit des jeweils verwendeten Substrates handeln — diese Bestimmung gibt es nicht — oder um eine Standardisierung des Substrates mit einem Eichenzym. In diesem Zusammenhang prüften wir die käuflichen kristallisierten Pepsin-Präparationen. Das Ergebnis ist in Abbildung 1 dargestellt.



- a) Pepsin der Fa. A (bezogen Februar 1968),
- b) Pepsin der Fa. B (bezogen Herbst 1965, gelagert bei -4°),
- c) Pepsin der Fa. B (bezogen März 1968).

Bei gleichem Substrat zeigen die Geraden stark voneinander abweichende Steigungen, die durch die verschiedenen starken Verdauungsaktivitäten der untersuchten Pepsine bedingt sind. Handelsübliches kristallisiertes Pepsin ist demnach als Eichenzym unbrauchbar. Das DAB 7 der BRD begegnet der Frage einer Substrat-Standardisierung (vgl. Abschnitt B), indem für die jeweils verwendete Casein-Charge ein „Verdaulichkeitsfaktor“ durch Inkubation mit dem Pepsin-Referenz-Standard der National Formulary (NF) (USA)⁸⁾ bestimmt wird. Es erhebt sich zwangsläufig die Frage, wie dann dieses Referenz-Pepsin seinerseits standardisiert wird. Man kann das Problem nur exakt lösen, wenn entweder jedes Enzympräparat mit einem konstanten Eichenzym verglichen oder mit einem Substrat bekannter und konstanter Verdaulichkeit gearbeitet wird. Auf eine entsprechende Anfrage erhielt ich u. a. folgende Auskünfte⁹⁾: „National Formulary Reference-

⁸⁾ National Formulary, 12. Ausgabe (1965) S. 294, Monographie „Pepsin“.

⁹⁾ Privat-Mittlg. D. F. Dodgen, The National Formulary.

Pepsin wird nach der Methode der National Formulary⁸⁾ analysiert (man läßt das Pepsin in verschiedenen Konzentrationen auf koaguliertes Eiereiweiß einwirken und bestimmt das Volumen der nicht verdauten Protein-Anteile⁹⁾; Anm. d. Verf.). — Das Substrat Eiweiß braucht nicht standardisiert zu werden. Der Standard wird mit dem vorhergehenden Referenz-Standard verglichen (und entsprechend eingestellt; Anm. d. Verf.). „Eier-Eiweiß schwankt stark in seiner Verdaulichkeit (vgl. ¹⁾); da aber in diesem Fall beide Pepsine, der alte und der neue Standard, mit demselben Substrat bestimmt werden, ist in diesem Fall eine Standardisierung nicht notwendig. Man erhält so zwar keine absoluten, aber konstante Werte.

„The International Commission for the Standardisation of Pharmaceutical Enzymes“ hat eine Methode erarbeitet, die Hämoglobin als Substrat verwenden und das zu untersuchende Pepsin mit einem von der Kommission zur Verfügung gestellten kristallinen Pepsin vergleichen läßt¹⁰⁾. Auf Grund der o. a. Ausführungen über kristalline Pepsin-Präparationen liefert auch diese Methode keine Absolut-Werte.

Wir umgehen die Fragen der Substrat-Schwankungen und der Eichenzyme, indem wir — wenn irgend möglich — die anfallenden Probleme in Reihenuntersuchungen zusammenfassend bearbeiten. Man kann für diesen Zeitraum das Substrat als konstant ansehen und erhält Ergebnisse, die innerhalb dieser Reihe gut vergleichbar sind. Wir müssen uns jedoch vor Augen halten, daß Vergleiche mit früher gewonnenen bzw. später zu erarbeitenden Resultaten nur beschränkt möglich sind. Das gleiche gilt für Ergebnisse aus anderen Laboratorien. Wir setzen unsere Ergebnisse zu früheren insofern in Beziehung, als wir bei einem Wechsel der Substrat-Charge ein Enzym-Präparat mit dem alten und dem neuen Substrat bestimmen und die Abweichungen beachten.

D) Schwierigkeiten durch Schwankungen des Leerwertes

Pepsin-Bestimmungen werden im Bereich von pH 1,6—1,8 durchgeführt. Aus diesem Grund verwendet man eine Lösung von Hämoglobin in verdünnter Salzsäure¹¹⁾ als Substrat. Nach Anson²⁾ löst man das Hämoglobin in Wasser zu einer 2,5%igen Lösung und verdünnt kurz vor der Enzym-Reaktion mit 0,3 n HCl auf 2,0% Hämoglobin-Konzentration. Rick^{10, 1)} löst dagegen das Hämoglobin sofort in 0,06 n HCl.

¹⁰⁾ Rick, W., in H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie GmbH., Weinheim-Bergstr. (1962) S. 819.

Anson²⁾ und Rick^{10, 1)} bereiten die Leerwerte in der Reihenfolge:

1. Hämoglobin-Lösung,
2. 5%ige Trichloressigsäure-Lösung,
3. Enzym-Lösung.

Laskowski¹¹⁾ läßt dagegen die Leerwerte in der Reihenfolge

1. Enzym-Lösung,
2. Trichloressigsäure-Lösung,
3. Hämoglobin-Lösung

bereiten.

Bereitet man die Hämoglobin-Lösung nach Rick^{10, 1)} und die Leerwerte in der von Anson²⁾ bzw. Rick^{10, 1)} angegebenen Reihenfolge, so beobachtet man bei der colorimetrischen Bestimmung¹⁾ gelegentlich, daß die Leerwerte innerhalb kurzer Zeit beträchtlich ansteigen. Bei drei Einzelbestimmungen, die im Abstand von je 15 Min. angesetzt wurden, fanden wir die in Tabelle 2 angegebenen Werte:

Tabelle 2

Ext. Leerwert	Ext. Hauptwert	Ext. Differenz
0,132	0,417	0,285
0,142	0,424	0,282
0,154	0,438	0,284

In diesem Fall stieg auch die Extinktion der Hauptwerte praktisch parallel, so daß die Extinktions-Differenz, der für die Berechnung der Enzymaktivität ausschlaggebende Wert, nicht maßgeblich beeinflußt wurde. Das ist jedoch nicht immer der Fall (Tabelle 3), so daß die Meßreihe ungenau bzw. unbrauchbar wird:

Tabelle 3

Ext. Leerwert	Ext. Hauptwert	Ext. Differenz
0,137	0,340	0,203
0,142	0,338	0,196
0,158	0,355	0,197
0,168	0,355	0,187

Die Einzelbestimmungen wurden im Abstand von je 8 Min. angesetzt. Auch in diesem Beispiel war im Anschluß an die Enzymreaktion die o. a. Farbreaktion mit Folin-Ciocalteus-Reagenz¹⁾ durchgeführt worden. Die Extinktionen der tiefblauen Lösungen wurden bei 750 nm gemessen.

Die Schwankungen im Leerwert sind nicht reproduzierbar; aus diesem Grunde haben wir die Ursache bisher nicht klä-

¹¹⁾ Laskowski, M., Sr. et al., Endopeptidases, in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Enzyme, Teil C, Springer-Verlag, Berlin (1966) 275.

ren können. Geprüft wurden folgende Möglichkeiten: bakterielle Zersetzung, säureabhängige Hämoglobin-Hydrolyse und Einwirkung des Konservierungsmittels (vgl. ¹⁾); die entsprechenden Untersuchungen erklärten die Leerwert-Schwankungen nicht. Da dasselbe Enzympräparat mit einer neuen Lösung desselben Substrates u. U. keine Leerwert-Schwankungen zeigt, kann die Ursache nicht im Enzympräparat und nicht im Substratmaterial liegen. Danach bleiben zwei Möglichkeiten:

1. Die Bereitungsweise der Hämoglobin-Lösung,
2. die Reihenfolge, in der die Komponenten bei der Bereitung der Leerwerte gemischt werden.

Mit der in Abschnitt F beschriebenen Meßmethodik, die allerdings von der in der 1. Mitteilung dieser Reihe¹⁾ beschriebenen abweicht, konnten wir keinen Einfluß auf die Extinktionsdifferenz in Abhängigkeit von der Bereitung der Hämoglobin-Lösung bzw. von der Reihenfolge, in der die Leerwert-Komponenten zusammengegeben werden, beobachten.

Wir brachen die Arbeiten über die möglichen Ursachen der Leerwert-Schwankungen ab, als wir feststellten, daß beim Arbeiten mit einer Hämoglobin-Lösung nach Anson²⁾ in Kombination mit der Bereitung der Leerwerte nach Laszkowksi¹⁾ und der in Abschnitt F beschriebenen Bestimmungsmethode nur noch selten Leerwert-Schwankungen beobachtet werden. Diese Kombination schließt auch Schwierigkeiten mit der Farbreaktion aus, auf die im Abschnitt E eingegangen wird.

E) Schwierigkeiten mit der Farbreaktion

In der von Anson²⁾ beschriebenen Farbreaktion zur Bestimmung der enzymatisch freigesetzten trichlortessigsäurelöslichen Protein-Bruchstücke wird das Filtrat mit Natronlauge alkalisiert und mit einer Verdünnung des Reagenzes von Folin-Ciocalteus (Näheres s. ¹⁾) versetzt. Man mißt die Farbtiefe nach einer festgesetzten Reaktionszeit.

Schon Anson²⁾ weist darauf hin, daß die Geschwindigkeit, mit der das Farbreagenz zugesetzt wird, die Farbtiefe beeinflußt. Diese Geschwindigkeit ist nach unseren Erfahrungen kaum zu standardisieren. Beim Zugeben des gelben Reagenzes entwickelt sich meistens schnell die tiefblaue Farbe des Reaktionsproduktes, die Mischfarbe Grün wird im allgemeinen rasch durchlaufen. Wir fanden jedoch gelegentlich, daß die Grünfärbung noch bestand, wenn die festgelegte Reaktionszeit abgelaufen war. Die Messung

führte dann zu falschen Ergebnissen. Da andererseits nach unseren Messungen die Blaufärbung nicht unbegrenzt haltbar ist, muß man die Zeit für die Farbbildung festsetzen.

Häufig trat diese Verzögerung in der Farbreaktion im Anschluß an die enzymatische Umsetzung zur Bestimmung der Verdauungsaktivität im katheptischen Bereich (siehe Abschnitt H) auf.

Bei Pepsin-Wein-Untersuchungen kommt hinzu, daß die Gerbstoffe, die im Handelsprodukt vorhanden sind, mit dem Reagenz nach Folin-Ciocalteus ebenfalls zu Blaufärbungen führen (vgl. ¹)). Die Leerwerte sind dann hoch, die Differenz zwischen Haupt- und Leerwert wird klein und das Ergebnis damit ungenauer als bei der Untersuchung der Handelspepsine.

F) Neue Meßmethodik

Es scheint mir sinnvoller zu sein, die von uns neuerdings sehr häufig angewandte Meßmethodik als Ganzes zu beschreiben, als darauf hinzuweisen, welche Teilstücke aus der ersten Publikation¹) übertragbar sind und was geändert werden muß (vgl. auch²)).

F 1) Bereitung der Probenlösung.

Die Arbeitstemperatur beträgt 35,5° ¹¹) und ist somit den physiologischen Verhältnissen angenähert. Das Pepsin wird im temperierten „Lösungsmittel“ (unvergälltes 90%iges Aethanol 20 ml, 0,1 n HCl 9,0 ml, Wasser ad 90) gelöst. Von den kristallisierten Pepsinpräparationen wähgt man zweckmäßig 0,75 bis 1,10 mg zu 25,00 ml. von den nach NF XII 10 000fachen Handelspepsinen 3,5 bis 4,5 mg ein.

Pepsinweine untersuchen wir normalerweise in einer Verdünnung 5,00 ml zu 25,00 ml mit „Lösungsmittel“; ein Versuch mit einer Verdünnung 7,5 zu 25 ergab ein vergleichbares Resultat.

F 2) Bereitung der Hämoglobin-Lösung (vgl. ²)).

1,0 g Hämoglobin Proteasen-Substrat nach Anson²) wird auf 39 ml Wasser gestreut; man wartet, bis sich das Hämoglobin gelöst hat, filtriert durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schüll 604) und gibt 10,0 ml 0,3 n HCl unter Umschwenken ohne Schaumbildung hinzu.

F 3) Leerwerte (vgl. ¹¹)).

Je 1,00 ml Enzymlösung werden in 4 mit Glasstopfen verschließbare Reagenzgläser pipettiert, mit je 10,0 ml 5%iger Trichloressigsäure-Lösung gemischt und auf 35,5° temperiert. 2 Min. vor dem Beginn der Enzymreaktion im zugeordneten Hauptwert setzt man 5,0 ml Hämoglobin-Lösung zu, schüttelt um, läßt im Thermostaten stehen und filtriert nach 10 Min. (2 Min. vor dem Abbruch der Enzymreaktion im Hauptwert) durch Faltenfilter (Schleicher & Schüll 604, 9 cm Ø).

F 4) Hauptwerte (vgl. 1)).

5—6 Min. vor dem Beginn der Enzymreaktion pipettiert man 5,0 ml Hämoglobin-Lösung in Glasstopfen-Reagenzgläser und temperiert im Thermostaten, danach gibt man 1,00 ml Enzymlösung unter Umschwenken ohne Schaumbildung hinzu. Nach genau 10 Min. — gemessen vom Beginn der Enzymzugabe — unterbricht man die Enzymreaktion durch Zusatz von 10,0 ml 5%iger (g/vol) wäßriger Trichloressigsäurelösung, läßt weitere 2—3 Min. im Thermostaten stehen und filtriert. Je 5,00 ml Filtrat aus Haupt- und Leerwert werden mit 10,00 ml Wasser verdünnt.

F 5) Messung.

Die Extinktionen der Filtrat-Verdünnungen werden bei 280 nm in 1-cm-Küvetten gegen Wasser gemessen.

G) Vergleich der Meßverfahren

Die eigentliche Enzymreaktion ist bei beiden hier diskutierten Bestimmungsmethoden im Prinzip identisch; A n s o n²) berichtet, daß eine Temperatur-Erhöhung von 25° auf 35,5° zu einer 1,82fachen Steigerung an trichloressigsäurelöslichen Spaltprodukten führt (dieser Faktor wurde colorimetrisch bestimmt).

Da die Umsetzung zum Farbstoff bei dem im Abschnitt F beschriebenen Verfahren (Messung bei 280 nm) fehlt, können die in diesem Zusammenhang (Abschnitt E) beschriebenen Schwierigkeiten nicht auftreten. Diesem zweifellos großen Vorteil stehen die höheren Kosten eines Spektralphotometers für die Messungen im UV-Bereich als Nachteil gegenüber.

Beim Vergleich der Einwaagen (vgl. 1)) stellt sich heraus, daß für die Wertbestimmung mit anschließender UV-Messung (Abschnitt F) etwa 3—4fach höhere Einwaagen gebraucht werden als für die Wertbestimmung mit gekoppelter Farbreaktion. Da andererseits die Enzym-Farbreaktions-Methode¹) bei 25,0°, die Enzym-UV-Methode (Abschnitt F) bei 35,5° arbeitet, wäre zu erwarten, daß man gerade bei der Enzym-UV-Methode kleinere Einwaagen braucht. Die Erklärung liefert nach unseren Messungen der Befund, daß die Extinktion einer bestimmten Menge Tyrosin bei 280 nm nur $\frac{1}{8}$ der Extinktion ausmacht, die man nach Umsetzung der gleichen Menge Tyrosin mit dem Farbreagenz bei 750 nm mißt. Bei Tryptophan fanden wir das Verhältnis 1:1,3. Die Notwendigkeit höherer Einwaagen ist ein Vorteil, da die Wägefehler kleiner werden und die Untersuchungsmengen wirtschaftlich gesehen nicht ins Gewicht fallen.

Die Enzym-UV-Bestimmung ist dann mit Vorsicht einzusetzen, wenn das zu untersuchende Enzympräparat nen-

nenswerte Mengen an Verbindungen enthält, die selbst im Bereich um 280 nm stark absorbieren (Aromaten-Absorption). Dann ist der Leerwert entsprechend hoch, die Differenz zwischen Haupt- und Leerwert klein und somit das Ergebnis ungenau (vgl. Abschnitt E).

Die zu Pepsinwein verarbeiteten Rohweine hatten in der zur Wertbestimmung verwendeten Verdünnung ($\approx 4\%$) eine Extinktion $\approx 0,13$ (1-cm-Küvette, gemessen gegen Wasser). Diese Eigenabsorption der Weingrundlage, die durch die Schönung noch verringert wird, ist durchaus tragbar. Wir haben daher die enzymatische Wertbestimmung mit anschließender Extinktionsmessung bei 280 nm zur Chargenkontrolle von Pepsinweinen eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4

Nr. des Weines	Leerwerte	Hauptwerte	Ext. Differenz	Mittelwert u. maximale Abweichung
1	0,179; 0,179; 0,184	0,371; 0,367; 0,370	0,192; 0,188; 0,186	0,189; 2%
2	0,199; 0,196; 0,196; 0,200	0,402; 0,397; 0,398; 0,404	0,203; 0,201; 0,202; 0,204	0,202; 1%
3	0,198; 0,195; 0,196; 0,198	0,398; 0,393; 0,391; 0,401	0,200; 0,198; 0,195; 0,203	0,199; 2%
4	0,178; 0,173; 0,176; 0,176	0,365; 0,356; 0,358; 0,350	0,187; 0,183; 0,182; (0,174)	0,184; 2%
5	0,182; 0,178; 0,183; 0,182	0,388; 0,389; 0,397; 0,396	0,206; 0,211; 0,214; 0,214	0,211; 2,5%
6	0,197; 0,197; 0,196; 0,194	0,403; 0,407; 0,402; 0,399	0,206; 0,210; 0,206; 0,205	0,207; 1,5%
7	0,197; 0,205; 0,201; 0,198	0,409; 0,416; 0,411; 0,408	0,212; 0,211; 0,210; 0,210	0,211; 0,5%
8	0,202; 0,202; 0,200; 0,200	0,418; 0,416; 0,415; 0,419	0,216; 0,214; 0,215; 0,219	0,216; 1,5%
9	0,196; 0,192; 0,193; 0,192	0,403; 0,394; 0,400; 0,400	0,207; 0,202; 0,207; 0,208	0,206; 2%
10	0,211; 0,207; 0,207; 0,207	0,406; 0,403; 0,402; 0,402	0,195; 0,196; 0,195; 0,195	0,195; 0,5%
11	0,213; 0,217; 0,214; 0,213	0,401; 0,407; 0,407; 0,412	0,188; 0,190; 0,193; (0,199)	0,190; 2%
12	0,211; 0,212; 0,208; 0,208	0,418; 0,418; 0,418; 0,417	0,207; 0,206; 0,210; 0,209	0,208; 1%
13	0,296; 0,294; 0,296; 0,293	0,515; 0,511; 0,512; 0,517	0,219; 0,217; 0,216; 0,225	0,219; 3%

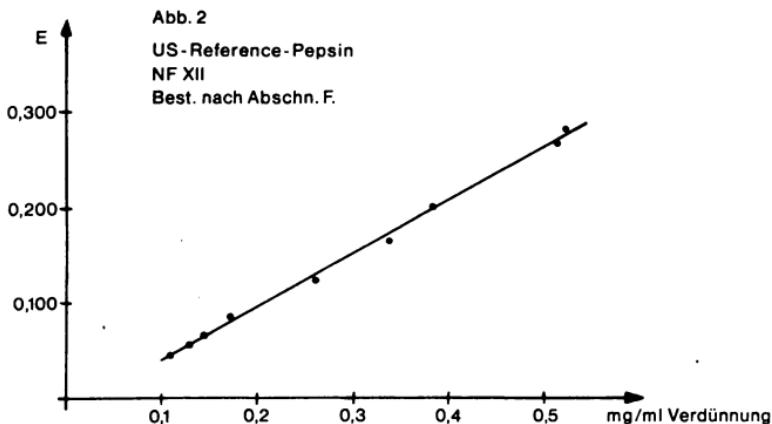
Anm.: Bei den Proben 4 und 11 wurden die eingeklammerten Werte nicht für die Berechnung der Mittelwerte herangezogen, aber auch diese Werte liegen innerhalb der zulässigen 5%-Abweichung¹²⁾.

Nach dem DAB 7¹²⁾ muß die Gehaltsbestimmung pepsinhaltiger Arzneimittel auf DAB 7-Pepsin bezogen werden. Das Pepsin der NF XII erfüllt die Wertbestimmung des DAB 7.

Dieses Pepsin liefert nach der in Abschnitt F beschriebenen Methode die in Abbildung 2 dargestellte Eichkurve.

¹²⁾ DAB 7 der BRD, Monographie „Pepsin“.

Durch Übertragen der bei den Pepsinwein-Untersuchungen ermittelten Extinktionen in diese Eichkurve und Multiplikation mit 500 (unter Berücksichtigung der Weinverdünnung 1:5 und der Umrechnung auf 100 ml) erhält man das Äquivalent an DAB 7-Pepsin in 100 ml Wein.



Berechnungsbeispiel:

Wein Nr. 12. Extinktions-Differenz: 0,208, entsprechend $0,4 \text{ mg NF XII-Referenz-Pepsin} \times 500 = 200$. 100 ml Pepsinwein Nr. 12 entsprechen folglich in ihrer Verdauungsaktivität 200 mg DAB 7-Pepsin.

H) Messungen im katheptischen Bereich

Nach einer Mahlzeit reagiert der Speisebrei im Magen nur schwach sauer, das pH-Optimum des Pepsins ($\text{pH} \approx 1,8$) wird nicht erreicht. Um sicherzustellen, daß bei einer Substitutionstherapie auch im Bereich um pH 4 — im sogenannten „katheptischen Bereich“ — die Verdauung gefördert wird, hielten wir es für notwendig, die Verdauungsaktivität der „Pepsin“-Präparate auch in diesem Gebiet zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde die 2,5%ige Hämoglobin-Lösung nicht mit 0,3 n HCl, sondern mit einer Essigsäure-Ammoniumsulfat-Lösung¹³⁾ auf 2% Hämoglobin-Gehalt verdünnt (pH 3,5). Die auf seine Wirksamkeit im katheptischen Bereich zu untersuchende Pepsin-Probe wurde in einer 20%ig-wäßrigen Verdünnung dieser Lösung gelöst. Pepsinwein wird unverdünnt eingesetzt, die Einwaagen der 10 000fachene Pepsine werden auf das Fünffache erhöht. Im übrigen wurde nach der Methode des Abschnittes F verfahren (die enzymatische Umsetzung mit anschließender Faroreaktion führte zu stark schwankenden Ergebnissen, vgl.

¹³⁾ 1,35 molar an Essigsäure und 0,02 molar an Ammoniumsulfat. (1968).

Abschnitt E). Einige Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt:

Tabelle 5

Probe	Aktivität im katheptischen Bereich bezogen auf peptische Aktivität
a) Handelspepsin 10 000fach	20,5%
b) handelsübliches kristallisiertes Pepsin	19,7%
c) Pepsinweine	19,5%; 19,7%; 20,8%

Es ist auffällig, daß die Aktivitäten innerhalb der Meßgenauigkeit nahezu übereinstimmen, obwohl bei der Darstellung der kristallisierten Pepsine nach Northrop¹⁴⁾ vielfältige Anreicherungsschritte durchlaufen werden. Bei der Herstellung der Pepsinweine wird nach der Enzymzugabe geklärt, und auch diese Maßnahme ändert die Relation der peptischen zur katheptischen Aktivität nicht wesentlich.

Schmidt¹⁵⁾ hat im Zusammenhang mit der von ihm beschriebenen proteolytisch wirksamen Enzympräparation Molsin beim Pepsin praktisch das gleiche Verhältnis gefunden (18—21%).

Da Merten und Mitarbeiter¹⁶⁾ ein Pepsin gewinnen konnten, das bei pH 3,5 keine Aktivität zeigte, wäre der Schluß, diese konstante Relation entspräche einer Eigenschaft des tatsächlich reinen Enzyms Pepsin, unzulässig.

Es soll an dieser Stelle nicht auf die Ursache dieser Proteasen-Aktivität bei pH 3,5 eingegangen werden. Für eine erfolgreiche Therapie ist lediglich der Nachweis notwendig, daß diese Aktivität in ausreichendem Maß vorhanden ist. Die Monographien „Pepsin“ zukünftiger Pharmakopöen sollten aus diesem Grund die Verdauungsaktivitäten im peptischen und im katheptischen Bereich bestimmen lassen. Diese Doppelbestimmung würde einer begründeten therapeutischen Anforderung gerecht.

Zusammenfassung:

Es werden gelegentlich auftretende Störungen bei Aktivitätsbestimmungen von Handelspepsinen und Pepsinweinen nach der Anson-Methode^{2, 1)} diskutiert. Für diese Pepsin-

¹⁴⁾ J. H. Northrop, J. Gen. Physiol. 30, 177 (1947).

¹⁵⁾ Privat-Mittlg. F. H. Schmidt, vgl. Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 186 (1968).

¹⁶⁾ Merten, R., G. Schramm, W. Graßmann u. K. Hanning, Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiol. Chemie 289 (1952) 173.

Präparate bewährt sich die Bestimmung der trichlor-essigsäurelöslichen Proteinbruchstücke durch Messung der Absorption bei 280 nm (vgl. 11)).

Es wird vorgeschlagen, in zukünftigen Pharmakopöen die Bestimmung der peptischen und der katheptischen Verdauungsaktivität in den Monographien „Pepsin“ vorzuschreiben.

Der Fa. Blücher-Schering u. Co., Lübeck, bin ich für die Förderung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

*Anschrift: Dozent Dr. Wolfgang Wiegrefe, 33 Braunschweig,
Institut für Pharmazeutische Technologie, Pockelsstraße 4.*