

## Efervesan Granülelerde Pepsin Aktivitesi

### Pepsin Activity in Effervescent Granules

Kasım C. GÜVEN., Şükran GEÇGİL \*

#### GİRİŞ

Pepsin 1836 senesinde Baumant ve Schwann tarafından keşfedilmiş ve 1930 yılında da Northrop tarafından kristalize halde elde edilmiştir. Domuz, dana, koyun ve keçi mukozasından otodijestion (asit vasatta) veya maserasyon (% 5 alkollü vasatta) yolları ile hazırlanan, proteolitik bir fermenttir. İnsanda midenin pepsin bezleri tarafından propepsin veya pepsinojen şeklinde ifraz edilir. Hidroklorik asitli vasatta bu, pepsine dönüşür. Yeni olarak mideden zimojen adlı bir ferment tecrit edilmiştir. Bu fermentin parçalanması ile iki ferment doğduğu, bunlardan birinin pepsin, diğerinin gene proteolitik bir enzim olan gastrisin olduğu bildirilmiştir<sup>(1)</sup>. Pepsin beyaz - krem renkli özel kokuda bir tozdur. Suda ve gliserinde çözünür. Alkol, kloroform, eter ve asetonda çözünmez. Molekül tartısı 36000 dir. Asit vasatta tesirli ve dayanıklıdır. Optimum tesir pH sı 1.8, stabl olduğu pH ise 3.6 - 4.6 arasındadır. Tuzlar yüksek dozlarda aktivitesi üzerine menfi tesir yapar. Çözeltilerde otolizle parçalanır. Preparatları alkali reaksiyonlu cam kaplarda muhafaza edildiği zaman aktivite kaybı fazladır<sup>(2)</sup>.

pH 5.5 daki çözeltilerine timol ilâve edilmezse mantar ürer ve oda ısısında, 3 haftada ve buz dolabında, 6 haftada parçalanır. Düşük pH da ferment uzun süre stabldır. Stabilizasyon için çözeltilerine seyreltik hidroklorik asit ilâvesi ile 8 - 15 gün arasındaki kayıp % 15.8 - % 22.5 arasında değişir. Çözeltilerine % 10 alkol ilâvesi uygundur. Mide vasatında 1 günde 4°C de % 99.8; 22°C de % 54; 14 günde 4°C de % 98 ve 22°C % 80; 37°C de 4 saatte % 94, 48 saatte % 69 oranında aktivitesini muhafaza eder<sup>(3)</sup>. Klinik neticeler elde edebilmek için hafif dozlu preparatlarının kullanılmaması tavsiye edilmektedir<sup>(4)</sup>.

\* Galenik Farmasi Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite, İstanbul.

Pepsinin teşhis ve aktivite tâyinine gelince: Pepsinin ince tabaka kromatografisi ile teşhisi için Kieselgel G adsorbantı ve etil alkol-N hidroklorik asit çözücüsü ile ninhidrin reaktifi kullanılmıştır<sup>(5)</sup>.

Pepsinin aktivitesini tâyin metodları aşağıdaki gibi özetlenebilir :

- 1 — Yumurta akı ile çalışma; T.K. 1948, D.A.B. 7, B.P. 1963, NF XI.
- 2 — Fibrin ile çalışma; Pharm. Gall. VII.
- 3 — Kazein ile çalışma; Ö.A.B. IX., Pharm. Helv. V.
- 4 — Hemoglobinin ile çalışma; Anson metodu<sup>(6,4,7,8)</sup>

Proteolitik fermentlerin aktivitesi yukarıda özetlendiği gibi değişik yolla yapılır. Bu metodlar her zaman memnun edici sonuç vermez. Bu tâyinde kontrol için standart madde bulma güçlüğü yanında, protein yapısındaki enzimi saf halde elde etmek çok güçtür. Tıbbî pepsin, kollagenaz ve katepsin ihtiva eder; bunlar aktivite üzerine tesir ederler. Substrat olarak en fazla fibrin veya yumurta akı kullanılır. Bu tâyinler süspansiyon halinde sistemin berraklaşması esasına dayanır. Kazein kullandığı hallerde, meydana gelen serbest amino asit titre edilir veya türbidite tâyini yapılır. Kazein ile elde edilen neticeler daima münakaşalıdır<sup>(9)</sup>. Tâyin metodları arasında yumurta akının da mahzuru vardır. Bu, yumurtanın taze veya bayat olmasına, ısıtma süresine, elekten geçirme sonucu parça büyüklüğüne, temperatüre, çalkalamaya tâbidir<sup>(9)</sup>. Bu metodlar arasında Anson metodu, F.İ.P.'in enzimleri standardize etmek için kurduğu komisyon tarafından kabul edilen bir methodtur<sup>(7)</sup>.

Anson metoduna göre Pepsinin miktar tâyini için dozajda, serbest hale geçen bir amino asit olan tirozinin fenol grubundan istifade edilir. Bunun için fenol reaktifi olan Folin - Ciocalteu reaktifi kullanılır ve meydana gelen mavi renk, spektrofotometrede okunur. Mukayese standart tirozinle yapılır. Hata % 4 - 5 arasındadır. Yalnız (OH) grublu madde ihtiva eden preparatlarda hata artar. Zira ekseriya preparatlara ilâve edilen oksiasitler fenol reaktifi ile tirozine benzer cevap verirler<sup>(4,7,8)</sup>.

Yumurta akı ile çalışma, D.A.B. 7 ye göre :

Yumurta, 10 dakika kaynar suda tutulur ve müteakiben 3 dakika 20°C suda bekletilir; yumurta akı ayrılır ve 6 no. lu elekten elenir. 10 g'ı üzerine 50°C deki 100 ml su ve 1.5 ml 3 N HCl, 0.10 g pepsin ilâve edilir. 3 saat 45°C de, her 15 dakikada bir sallayarak su banyosunda bekletilir. Neticede bu karışım bir mezüre alınır; 30 dakika beklemeden sonra parçalanmayan kısım 5 ml'yi geçmemelidir.

Türk Kodeksi (1948) metoduna göre ise taze yumurta kaynar suda 10 dakika ısıtılır, sonra soğuk suda soğutulur. Yumurta akı ayrılır, alınır. 4 no. lu elekten geçirilir. Bir erlen içersinde ve 50°C deki 100 ml su içinde homojen olarak dağıtılır. Üzerine 0.10 g pepsin ilâve edilir. 3 saat 45°C lik etüvde her 15 dakikada bir çalkalanarak bekletilir. Neticede pek az dağılmayan kısım olmalıdır.

#### DENEL KISIM

Biz aşağıda yazılı formül içindeki pepsinin aktivitesi üzerinde çalıştık.

Kullanılan efervesan preparatın formülü aşağıdadır :

Papaverin hidroklorid	0.50 g
Pepsin (3000 ünite)	0.25 g
Şeker	7.25 g
Sodyum fosfat (susuz)	15 g
Sodyum hidrojenkarbonat	40 g
Sitrik asit	16 g
Tartarik asit (susuz)	13 g
Tartarik asit (hidrate)	8 g

Bu formülün granüle haline getirilmesinde pepsinin stabilitesini tâyin edebilmek için aşağıdaki teknikler kullanılmıştır:

a) Bütün maddeler karıştırılır; 105°C deki etüvde bekletilir. Yumuşama görüldüğü zaman granülatörden geçirilir ve 35°C deki etüvde kurutulur, müteakiben 4 no. lu elekten geçirilir.

b) Efervesan kısmı teşkil eden sodyum hidrojenkarbonat, sitrik ve tartarik asit karıştırılır, 105°C deki etüvde yumuşama meydana gelinceye kadar bekletilir. Diğer maddelerin homojen şekilde-

ki karışımları ile karıştırılıp, granülatörden geçirilir. Etüvde 35°C de kurutulduktan sonra 4 no. lu elekten geçirilir.

c) Formülde bulunan papaverin hidroklorid, şeker, sodyum fosfat ve efervesan özelliği veren maddelerden herbiri ayrı ayrı, terkiplerden çıkartılmak sureti ile (a) ve (b) şekline göre granüle hazırlanır.

Aktivite tâyinleri için, 100 ünite (0.1 g) pepsine tekabül edecek miktar granüleden hesaplanarak alındı ve T.K. (1948) de kayıtlı tekniğe göre aktivitesi tâyin edildi.

Bunun için T.K. metodunu aşağıdaki şekilde uyguladık :

Vasata 100 ünite olarak hesaplanmış (0.1 g) pepsine tekabül edecek miktarda pepsin veya pepsin havi preparat ilâve edildi. Efervesan terkiplerde gaz çıkışı tamamlandıktan sonra vasatın pH sı hidroklorik asit (% 12.5) yardımı ile 1.2 ye ayarlandı (İncelediğimiz formüllerde vasatın pH değeri 2.2 - 6.4 arasındadır). 15 dakikada bir çalkalamak sureti ile 3 saat 45°C bekletildi. Dağılmayan kısım kontrol edildi. Bütün bu aktivite tâyinlerinde 100 ünite değerindeki (0.1 g) pepsin ile mukayese yapılmıştır.

#### B U L G U L A R

Bu tâyinler sonunda :

1) Vasatta pepsinden gayri maddelerin % 1 den daha yüksek konsantrasyonlarda mevcudiyetinin pepsin aktivitesi üzerine engelleyici tesir gösterdiği tespit edildi. Vasatta erimiş halde bulunan iyon veya moleküllerin konsantrasyonunun artması ile, yumurta akının parçalanması zorlaşmaktadır. Şeker, papaverin hidroklorid, sodyum fosfat, sodyum hidrojenkarbonat, tartrik ve sitrik asitler ayrı ayrı veya bir arada buldukları zaman inhibitör tesir göstermektedirler. Bu husus ayrı ayrı her maddenin çözeltilisine, vasatın pH sı ayarlandıktan sonra ünitesi belli pepsin ilâvesi ile de kontrol ve tespit edilmiştir.

2) Pepsin aktivitesi tâyininde preparat suda çözündürülüp pH 1.2 civarına ayarlanmadığı hallerde, pepsin aktivitesi düşük olarak bulunmuştur.

3) Aşağıda (4 de) bildirilen teknikle hazırlanan efervesan granüleden 100 ünite (0.1 g) pepsine tekabül edecek miktar alındı; dis-

tile su ile dialize edildi. Dializ bakiyesi olan pepsin aktivitesi kontrol edildi ve netice şahit tecrübeye uygun bulundu. Böylece pepsinin bu formüllerde, birlikte verildiği maddelerin tesiri ile aktivitesini kaybetmediği, fakat vasattaki molekül ve iyon konsantrasyonunun tesiriyle inhiye olduğu tespit edilmiştir.

4) Pepsin ihtiva eden, efervesan granüle şeklindeki preparatın hazırlanması için tespit ettiğimiz en uygun teknik aşağıda gösterilmiştir:

Efervesan kütleyi meydana getiren sodyum hidrojenkarbonat, tartirik ve sitrik asit karışımları toz edilip, 105°C deki etüvde yumuşama gösterinceye kadar bekletildikten sonra diğer maddelerle karıştırılır. Granülatörden geçirilir; müteakiben 35°C de kurutulur ve elekten geçirilir.

#### Ö Z E T

Bu çalışmada, pepsinin efervesan granüle şeklindeki preparatını hazırlamak için uygun bir metot ile, T.K. (1948) e göre pepsinin aktivitesinin tâyini esnasında, preparatın terkiibine giren maddelerin vasattaki konsantrasyonlarının % 1 den yüksek olduğu halde pepsin aktivitesi üzerine inhibitör tesir yaptığı bildirilmektedir.

#### S U M M A R Y

A study was made on the preparation and activity of effervescent granules containing pepsin. The composition of the granules were as follows :

Papaverine hydrochloride	0.50 g
Pepsin (3000 U.I.) (U.S.P.)	0.25 g
Saccharose	7.25 g
Sodium phosphate	15 g
Sodium bicarbonate	40 g
Citric acid (hydrated)	16 g
Tartaric acid (anhydrous)	13 g
Tartaric acid (hydrated)	8 g

In order to prepare the granules, the acid and alcali components of the formula were heated together at 105°C until the mass was moistened by the water of crystallization, liberated from the acids. After the addition of the remaining components, the mass was granulated and dried at 35°C. The pepsin activity of the granules was determined by the egg-albumen method (D.A.B. 7, T.K. 1948). It was seen that the activity of pepsin was inhibited when the concentration of the other components of the granules increased 1%. However, the following experiment showed that such an effect was only inhibitory and did not cause a permanent loss of activity. Weighed samples of granules, prepared according to the formula and method mentioned above, were dissolved in water and the pH of the solution were brought to 1.2. This solution was then dialysed and the pepsin was separated. This residue showed full peptic activity, when analysed.

## L I T E R A T Ü R

1. Tang, J., Tank, K. I., *J. Biol. Chem.*, **238**, 606 (1963).
2. Güven, K. C., *Eczacılık Bülteni*, **3**, 152 (1961).
3. Skinner, F. S., Schlumpf, R., *Pharm. Acta Helv.*, **41**, 588 (1966).
4. Steinke, G., *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **106**, 305 (1966).
5. Güven, K. C., Özsarı, G., Altuncu, S., *Eczacılık Bülteni*, **7**, 192 (1966).
6. Anson, M. L., *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79 (1938) - Ref.: 4 ve 7 no.lu yayın.
7. International Commission for Standardization of Pharmaceutical Enzymes, first report, *J. Mond. Pharm.*, **1**, 11 (1965).
8. Wiegrebe, W., *Mitt. Dtsch. Pharmaz. Ges.*, **36**, 29 (1966).
9. Schlemmer, F., *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **106**, 1591 (1966).

---

(Redaksiyona verildiği tarih : 6 Nisan 1967)