

## DETERMINAÇÃO DA DL-LISINA EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS E DIETÉTICOS\*

Maria Auxiliadora CHAVES\*\*  
Amélia Shioko AKATUKA\*\*  
Mariangela Tirico AURICCHIO\*\*

RIALA6/643

CHAVES, M.A.; AKATUKA, A.S. & AURICCHIO, M.T. — Determinação da DL-lisina em produtos farmacêuticos e dietéticos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48(1/2):49-55, 1988.

**RESUMO:** O presente trabalho estabelece técnica de doseamento de DL-lisina em preparações farmacêuticas ou dietéticas, onde também fazem parte da fórmula substâncias como: Cloridrato de buclisina, vitaminas A e do complexo B e D, triptofano, ácido glutâmico e Cloridrato de betaína. A técnica proposta não requer extração prévia da lisina, e utiliza o nitroprussiato de sódio e tetraborato de sódio, que reagem com o referido aminoácido, formando um composto colorido, com máximo de absorção em 545nm.

**DESCRITORES:** DL-lisina em medicamentos e suplementos dietéticos, determinação; medicamentos, DL-lisina em, determinação; suplementos dietéticos, DL-lisina em, determinação.

### INTRODUÇÃO

A lisina, aminoácido essencial à dieta, desempenha importante papel nutricional no crescimento humano, tornando necessária sua ingestão através de variados alimentos protéicos e de suplementos dietéticos.

As primeiras técnicas analíticas, altamente seletivas para a determinação de lisina, utilizaram como reagente a enzima L-lisina descarboxilase, onde o dióxido de carbono liberado era medido manométricamente<sup>9,10,14</sup>.

Utilizando ainda o método enzimático, foram aprimorados os sistemas de separação e detecção dos produtos da reação enzimática, tais como eletrodo seletivo, cromatografia de troca iônica<sup>4,5,12,14</sup> e fluorimetria, a partir da formação prévia de um derivado fluorogênico da carnitina.

A espectrofotometria de absorção na região do visível também é empregada para o doseamento da

lisina. CARPENTER<sup>1</sup> utilizou a reação do 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno com os grupos  $\epsilon$ -aminos livres da lisina contida na estrutura protéica (lisina biodisponível) e, após a hidrólise ácida, o produto colorido foi extraído e a leitura espectrofotométrica efetuada na região de 346 nm<sup>6</sup>. Outros autores<sup>3,4</sup> aprimoraram essa técnica introduzindo, além do reagente citado anteriormente, as seguintes substâncias químicas: ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico e metacrilato, permitindo a determinação da lisina biodisponível e não disponível existente na proteína.

Com a introdução da cromatografia líquida de alta resolução, a lisina passou a ser determinada com alto grau de sensibilidade e reprodutibilidade, utilizando-se diferentes técnicas de detecção<sup>2,7,8,13</sup>.

Apesar de existirem métodos altamente sofisticados para a quantificação da lisina em diferentes produtos, nem todo laboratório poderá efetuar a mesma pela não disponibilidade de equipamentos e de reativos especiais de custos elevados. Devido à necessi-

\* Realizado na Seção de Química Farmacêutica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

dade do controle quantitativo da lisina em formulações medicamentosas existentes no comércio, os autores se propõem a desenvolver metodologia espectrofotométrica na região do visível, baseada na reação de identificação da DL-lisina inscrita na Farmacopéia Francesa, 8ª edição<sup>11</sup>.

## MATERIAL E MÉTODO

### Material

A técnica desenvolvida pelos autores foi testada em 18 amostras de diferentes medicamentos recebidos para análise no IAL, sendo 12 na forma de solução, 5 comprimidos e uma suspensão, utilizados como complementação alimentar, que são industrializados e comercializados na cidade de São Paulo, e que contém em sua formulação lisina e outros componentes, tais como vitamina A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e D<sub>2</sub>, nicotinamida, pantotenato de cálcio, gluconato de cálcio, hipofosfito de cálcio, citrato férrico amoniacal, hipofosfito de magnésio, hipofosfito de manganês, triptofano, acetilmetionina, inositol, extrato de fígado em pó, DL-carnitina, sorbitol, buclizina, fluoreto de sódio, fosfato tricálcico, sulfato de cobre, extrato de mucosa gástrica, sacarina sódica, nipagin e cloridrato de betaina.

### Equipamento

Espectrofotômetro (Varian, mod. 635)

### Reagentes

Nitroprussiato de sódio p.a.  
Tetraborato de sódio p.a.  
Acetona p.a.  
Monocloridrato de DL-lisina

### Soluções

Solução de nitroprussiato de sódio a 5% em água destilada.

Solução de tetraborato de sódio a 5% em água destilada.

Solução padrão de monocloridrato de DL-lisina: dissolver 150 mg de monocloridrato de DL-lisina em água destilada. Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com água destilada (1 ml desta solução contém 1,5 mg de monocloridrato de DL-lisina).

Solução amostra: preparar uma solução aquosa da amostra que contenha cerca de 1,5 mg de monocloridrato de DL-lisina por ml.

*Curva de calibração* — Pipetar alíquotas, respectivamente, de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 ml de solu-

ção padrão de monocloridrato de DL-lisina para balões volumétricos de 25 ml. Adicionar água destilada suficiente para que o volume de solução permaneça em 5 ml em cada um dos balões. Colocar em cada balão 4 ml de acetona, 1 ml de solução nitroprussiato de sódio a 5% e 5 ml de solução de tetraborato de sódio a 5%. Agitar levemente e deixar em repouso por 60 minutos ao abrigo da luz. Completar o volume de cada balão com água destilada e efetuar imediatamente as leituras de absorvância a 545 nm em espectrofotômetro, usando como branco água destilada, em cubetas de 1 cm de espessura. Traçar a curva de calibração em papel milimetrado, colocando-se as leituras de absorvância no eixo das ordenadas e o valor das concentrações no eixo das abscissas.

*Determinação da DL-lisina na amostra:* Pipetar 1 ml da solução amostra e transferir para um balão volumétrico de 25 ml, e proceder como o descrito em curva de calibração. Calcular a quantidade de DL-lisina utilizando-se a curva de calibração pré-estabelecida.

## RESULTADOS

Para o procedimento analítico descrito na obtenção da curva padrão, fixaram-se as concentrações de nitroprussiato de sódio a 5% e tetraborato de sódio a 5%, consideradas ideais.

O desvio padrão calculado foi de 2,3% e os testes de recuperação de DL-lisina revelaram valor médio de 98,3%. O tratamento estatístico dos dados experimentais estão apresentados na tabela 1.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Analisando-se a curva padrão, constata-se que a faixa de concentração de monocloridrato de DL-lisina que obedece à Lei de Lambert-Beer, após a formação do composto colorido, está compreendida entre 60 e 150 µg por ml, sendo que a melhor leitura de absorvância foi obtida com solução de 120 µg por ml. Destes dados depreende-se que a técnica proposta tem boa aplicação nas amostras onde a quantidade de monocloridrato de DL-lisina a ser determinada não seja demasiadamente pequena, como é o caso de medicamentos e produtos dietéticos, não se destinando à pesquisa bioquímica onde seus níveis de concentração são bem menores.

Foi estabelecido o intervalo de 60 minutos após a adição dos reagentes, porque as melhores faixas de leitura foram obtidas neste tempo, após o que, começaram a decrescer.

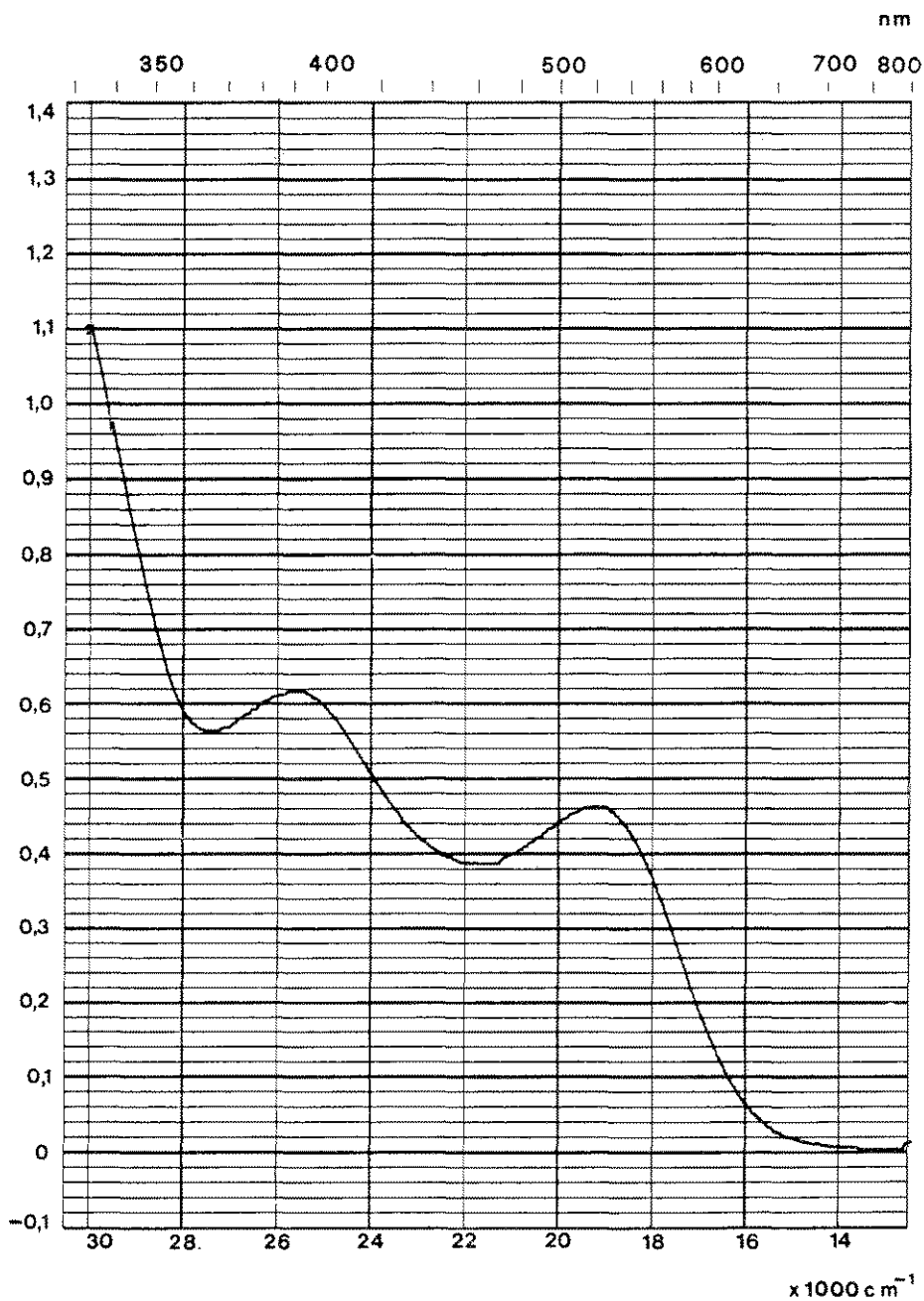


FIGURA 1 — Perfil espectrofotométrico na região de absorção do visível para o composto colorido formado com uma solução padrão de cloridrato de DL-lisina na concentração de 120  $\mu\text{g}$  por ml.

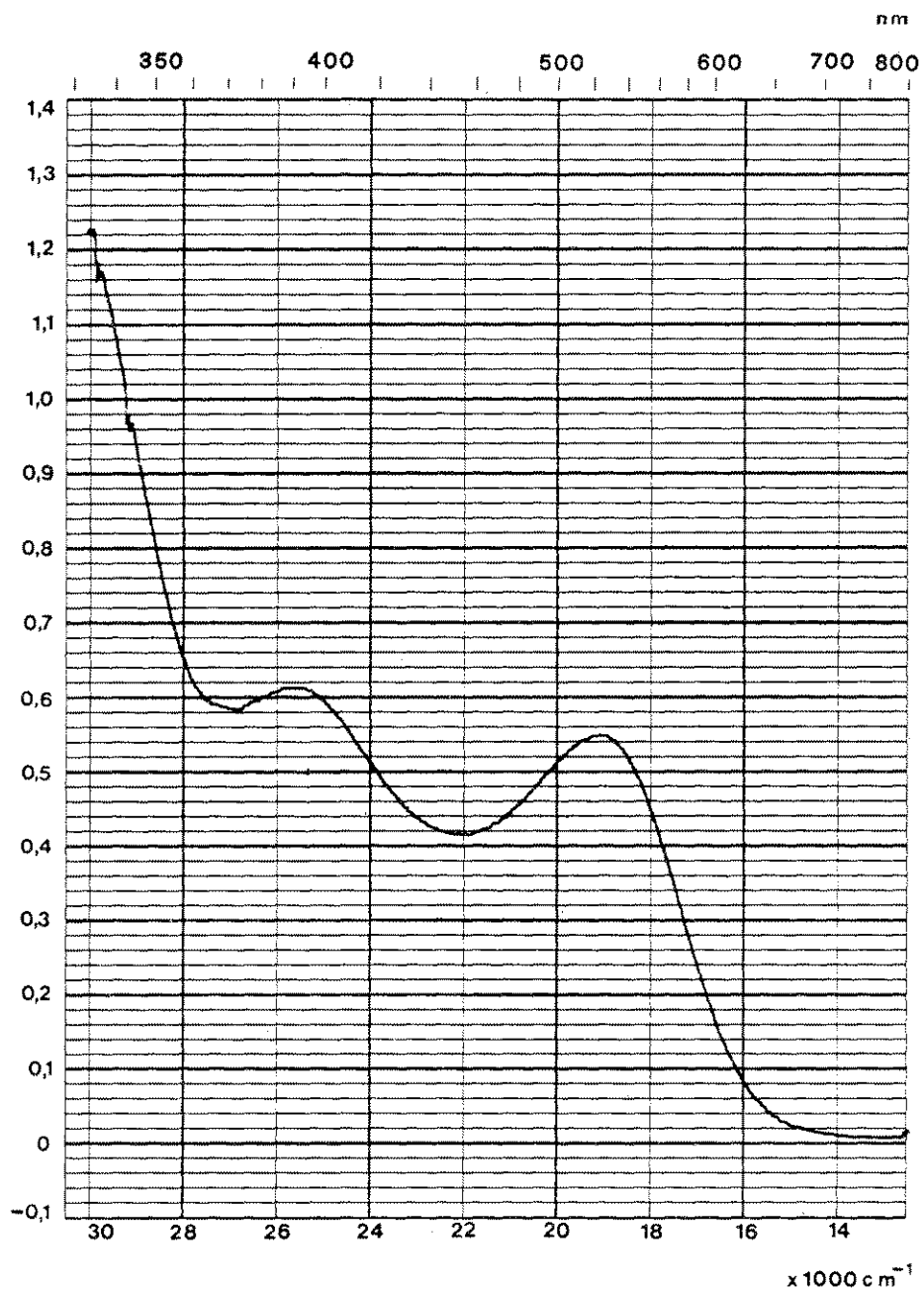


FIGURA 2 —Perfil espectrofotométrico na região de absorção do visível do composto colorido formado com uma solução amostra de cloridrato de DL-lisina, na concentração de 120  $\mu\text{g}$  por ml.

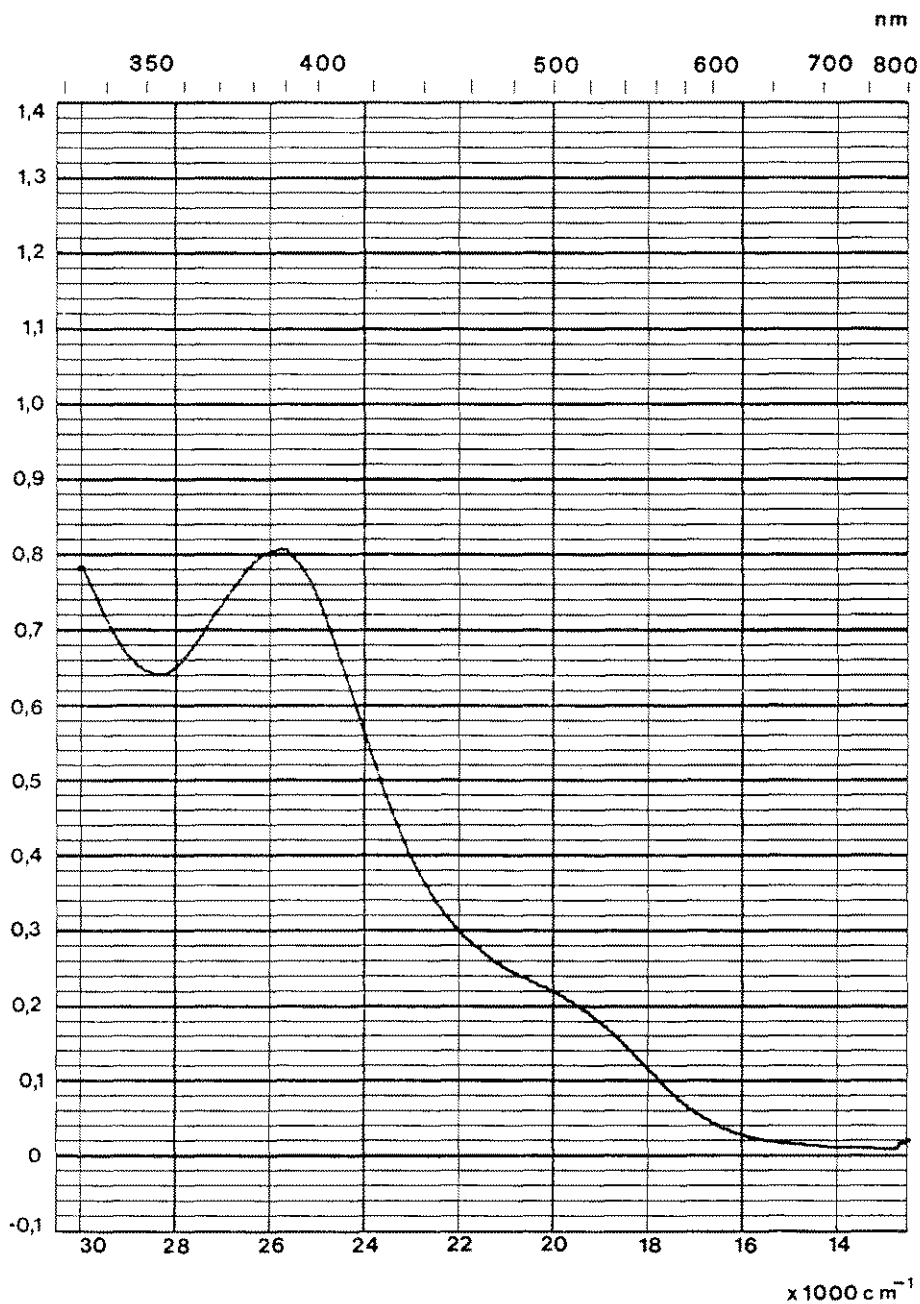


FIGURA 3 — Perfil espectrofotométrico na região de absorção do visível do branco dos reativos utilizados para o desenvolvimento da reação colorimétrica.

TABELA 1

Sumário dos dados estatísticos para o cloridrato de DL-lisina empregando-se o método colorimétrico

Dados estatísticos	Cloridrato de DL-lisina
Intervalo em que a lei de Lambert – Beer é obedecida ( $\mu\text{g}$ por ml)	60 a 150 $\mu\text{g}$
Inclinação da reta (valor de b)	0,004
Intersecção com o eixo do y (valor de a)	-0,139
Coefficiente de correlação	0,993
Equação da reta	$A = -0,139 + 0,004 c$

Paralelamente, foi determinado o perfil espectrofotométrico do branco com os reagentes empregados no desenvolvimento da reação colorida e constatou-se que os mesmos apresentam máximo de absorção em 390 nm, aproximadamente. Os reagentes não exibem absorção em 545 nm, que é o ponto de máxima absorção para o composto colorido formado com o monoclórato de DL-lisina, como pode ser constatado na figura 3.

Em função destas observações pode-se utilizar a água como branco, para o acerto do aparelho.

Os resultados dos perfis espectrofotométricos das amostras e do padrão revelaram que nas diferentes amostras analisadas pela técnica proposta, os

valores de monoclórato de DL-lisina não sofreram interferência analítica dos outros componentes presentes na formulação (Figuras 1 e 2).

A técnica proposta para determinação do monoclórato de DL-lisina não exige extração prévia do aminoácido, ao contrário dos demais métodos colorimétricos, tornando-a adequada para a rotina de análise de formulações complexas de medicamentos e produtos dietéticos.

Por sua simplicidade, precisão, sensibilidade e rapidez na execução, recomenda-se esta metodologia como alternativa aos laboratórios que não possam dispor de equipamentos sofisticados e reagentes de custos onerosos.

RIALA6/643

CHAVES, M.A.; AKATUKA, A.S. & AURICCHIO, M.T. — Determination of DL-lysine in pharmaceuticals and dietetics products. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48(1/2):49-55, 1988.

**ABSTRACT:** A method for quantification of DL-lysine monochloride in pharmaceuticals and dietetics products without previous extraction was proposed.

Other substances as buclizine hydrochloride, vitamin A, D and B complex, tryptophan, glutamic acid, betaine hydrochloride, when presented in such products, did not interfere in this reaction. In this method, lysine reacts with sodium tetraborate and sodium nitroprussiate, producing a colored compound, which exhibits maximum absorption at the wavelength at about 545nm.

**DESCRIPTORS:** DL-lysine in dietetic supplements and pharmaceuticals, determination; dietetic supplements, DL-lysine in, determination; pharmaceuticals, DL-lysine in, determination.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARPENTER, K.J. — The estimation of the available lysine in animal protein foods., *Biochem. J.*, 77:604-10, 1960.
- DAVIS, A.T., INGALLS, S.T. & HOPPEL, C.L. — Determination of free trimethyllysine in plasma and tissue specimens by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 306:79-87, 1984.

3. FINLEY, J.W., & FRIEDMAN, M. — Chemical methods for available lysine. *Cereal Chem.*, **50**:101-5, 1973.
4. GREENSTEIN, J.P. & WINITZ, M. — *Chemistry of the amino acids*. New York, John Wiley, 1961. v.3, p.2097-124.
5. HENNECKE, M. & PLAPP, B.V. — Quantitative analysis of lysine analogs and derivatives. *Anal. Biochem.*, **136**:110-18, 1984.
6. KAKADE, M.L. & LIENER, E.I. — Determination of available lysine in proteins. *Anal. Biochem.*, **27**:273-80, 1969.
7. KELLEY, J. & CHRIN, L. — Thin-layer chromatography of collagen analysis. *J. Chromatogr.*, **311**:400-4, 1984.
8. MORO, L.; MODRICKY, C.; STAGNI, N.; VITTOR, F. & de BERNARD, B. — High-performance liquid chromatographic analysis of urinary hydroxylysyl glycosides as indicator of collagen turnover. *Analyst*, **109**:1621-2, 1984.
9. NEUBERGER, A. & SANGER, F. — The metabolism of lysine. *Biochem. J.*, **38**:119-25, 1944.
10. NEUBERGER, A. — The lysine content of casein and zein. *Biochem. J.*, **158**:717, 1945.
11. PHARMACOPÉE française. 8<sup>ème</sup> ed. Paris, Ordre National des Pharmaciens, 1965. p.653-4.
12. TILLER, J.M. & BLOXAM, D.L. — An enzymatic fluorometric assay for L-lysine in plasma and tissue. *Anal. Biochem.*, **131**:426-9, 1983.
13. TOMARELLI, R.M.; YUHAS, R.J.; FISHER, A. & WEABER, J.R. — An HPLC method for the determination of reactive (available) lysine in milk and infant formulas. *J. Agric. Food Chem.*, **33**:316-8, 1985.
14. VIENOZINSKIENE, J.; JANUSEVICIUTE, R.; PAULIUKONIS, A. & KAZLAUSKAS, D. — Lysine decarboxylase assay by the pH-stat method. *Anal. Biochem.*, **146**:180-3, 1985.
15. ZITTLE, C.A. & ELDRED, N.R. — Determination of L-lysine with a specific decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, **156**:401-9, 1944.

Recebido para publicação em 7 de junho de 1988.

