

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE L(+) ARGININA, L(-) ASPARAGINA E L (+) LISINA COM O-DIACETILBENZOL, EM ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS

Eunice Maria Maffini Antoniazzi e Maria Elisabeth do Canto Vinadé
Departamento de Química. Centro de Ciências Naturais e Exatas. UFSM.
Santa Maria, RS.

RESUMO

Foram determinados os principais parâmetros analíticos para um método espectrofotométrico de análise de amino-ácidos.

A Curva de Ringbom, em 550nm, para a determinação de L(+) Arginina com o-diacetilbenzol, demonstrou que a faixa ideal de concentração é de 150 a 500 µg/ml. A precisão relativa foi de 5,26%.

Para a determinação de L(-)Asparagina com o-diacetilbenzol, a Curva de Ringbom, em 547nm, acusou a faixa de concentração ideal de 40 a 200 µg/ml. A precisão relativa foi de 1,43%.

Para a determinação de L(+)Lisina com o-diacetilbenzol, a Curva de Ringbom, em 547, demonstra a faixa de concentração de 8 a 44 µg/ml como ideal. A precisão relativa foi de 0,18%.

Entre as substâncias estudadas, foram observados que os espectros de absorção do cloridrato de tiamina (Vitamina B₁), cloridrato de riboflavina (Vitamina B₂), cloridrato de piridoxina (Vitamina B₆), carnitina, buclisina, ácido fólico (Vitamina M) e nicotinamida (Vitamina PP) e os espectros de absorção destes compostos com o-diacetilbenzol não interferem com as absorções dos aminoácidos L(+) Arginina, L(-) Asparagina e L(+) Lisina em suas determinações.

A absorção dos compostos cianocobalamina (Vitamina B₁₂) e o ácido γaminobutírico ou as absorções destes compostos em presença de o-diacetilbenzol interferem nas determinações estudadas.

Foram obtidos os espectros de absorção de três diferentes formulações de especialidades farmacêuticas com o o-diacetilbenzol, mostrando a viabilidade da determinação direta dos aminoácidos estudados.

SUMMARY

ANTONIAZZI, E.M. and VINADÉ, M.E.C., Spectrophotometric method for L(+)Arginin, L(-)Asparagin and L(+)Lysin determination in pharmaceutical drugs, with o-diacetylbenzene. Ciência e Natura (4):37-48.

In this work the main analytical parameters for a spectrophotometric method of amino-acids analysis were determined.

The Ringbom curve for L(+)Arginin (550nm), L(-) Asparagin (547nm) and L(+)Lysin (547nm) determination with o-diacetylbenzene

showed different values for concentrations.

The best range of concentration was: L(+)Arginin 150 to 500 $\mu\text{g/ml}$ with a relative error of 5.26%; L(-)Asparagin 40 to 200 $\mu\text{g/ml}$ with relative error 1.43%; and L(+)Lysin 8 to 44 $\mu\text{g/ml}$ with a relative error of 0.18%.

Among the different compounds studied, it was observed the absorptions of the tiamin chloride (Vitamin B₁), riboflavin chloride (Vitamin B₂) piridoxin chloride (Vitamin B₆), carnitin, buclisin, folic acid, and nicotinamide and that this compound in presence of o-diacetylbenzene do not interfere with the absorptions of the amino-acids L(+)Arginin, L(-)Asparagin and L(+)Lysin during their determination. On the other hand, the absorption of the compounds cianocobalamin and γ aminbutiric acid or the absorptions of these compounds in presence of o-diacetylbenzene interfere with absorptions of the amino acids studied.

The absorption spectra of these three pharmaceutical drugs was obtained with o-diacetylbenzene and we found out the possibility of their direct determination by the method described.

INTRODUÇÃO

No Guia Médico (3) os aminoácidos mais freqüentemente encontrados nas formulações farmacêuticas, com excessão da DL-Metionina, são a L(+)Arginina, L(-)Asparagina e L(+)Lisina. Por esta razão, foram escolhidos para a presente pesquisa.

Na Farmacopéia Brasileira (2) não existe prescrição de métodos analíticos para a determinação de aminoácidos. Daí nossa preocupação em estudar um método para a determinação quantitativa de aminoácidos.

Na literatura são encontrados vários métodos para a identificação ou para determinações semi-quantitativas dos aminoácidos, enquanto que nas determinações quantitativas, reduzido número de métodos podem ser utilizados.

Os autoanalisadores de aminoácidos, aparelhos automáticos para a separação e determinação de aminoácidos, representam grande conquista no campo da análise dos aminoácidos. No entanto, quando se tem apenas um aminoácido em mistura com substâncias de outra natureza, como no caso da maioria das especialidades farmacêuticas que contém aminoácidos, o autoanalisador se torna inadequado. O problema então é encontrar um método que permita a separação deste aminoácido das demais substâncias presentes, o que é muito difícil, ou dispor de um método específico para a determinação de aminoácidos sem a necessidade de separação prévia, como é o caso do método proposto.

As substâncias estudadas como interferentes ou não, são as

que comumente encontramos nas formulações das especialidades farmacêuticas que contêm os aminoácidos estudados; como por exemplo, as vitaminas do complexo B, a nicotinamida, a buclisina, a carnitina e o ácido γ aminobutírico.

Este estudo foi feito através da interpretação dos espectros de absorção destas substâncias.

REVISÃO DA LITERATURA

WARTEMBERG (6) testou o o-diacetilbenzol como reagente específico para aminogrupos de proteínas e aminoácidos. Para tanto, utilizou secções de organismo de ratos incubados e observou o aparecimento de manchas azuis e lilãs nos tecidos após a adição do o-diacetilbenzol a 1%.

RIEMSCHNEIDER (4) preconizou o uso do o-diacetilbenzol como reagente para os aminoácidos comparando-o com a ninidrina. Sugeriu também o aproveitamento da reação com os aminoácidos para determinações colorimétricas.

SANTOS *et alli.* (5) propuseram o o-diacetilbenzol para a determinação espectrofotométrica da histidina e da metionina. Para isto foram estudados os principais parâmetros exigidos para um método de análise quantitativa, tais como a curva de Ringbom e a reta de calibração.

Na *British Pharmacopeia* (1), o método descrito para a determinação de aminoácidos é a cromatografia por troca-iônica. O eluato da coluna é recolhido em tubos separados, com intervalos uniformes, usando um coletor de frações. A cada tubo é adicionado 1 ml do reagente ninidrina, aquecido em banho-maria por 20 minutos, esfriado e adicionado 5 ml da mistura em igual volume álcool-água-amônia. A absorbância das frações é medida em 575nm. Alternativamente, o eluato da coluna pode ser analisado por aparelhagem automatizada usando ninidrina como reagente e a determinação quantitativa pode ser feita pela resolução dos picos.

MATERIAL E MÉTODO

As especialidades farmacêuticas analisadas possuem as seguintes formulações:

Especialidade farmacêutica nº 1

Cloridrato de Arginina 1,5g
Excipiente q.s.p.um comprimido efervescente

Especialidade farmacêutica nº 2

Aspartato de potássio 200mg
Aspartato de magnésio 200mg
Vitamina E (acetato)..... 100mg

Vitamina B ₁ (cloridrato de tiamina).....	25mg
Vitamina B ₂ (cloridrato de riboflavina).....	2mg
Vitamina B ₆ (cloridrato de piridoxina).....	10mg
Excipiente q.s.p.	uma drágea

Especialidade farmacêutica nº 3

Ácido acetilsalicílico	200mg
Solução de L(+)Lisina básica a 45% q.s.p....	1ml

Para o estudo da absorção dos aminoácidos com o-diacetilbenzol em função do tempo, as soluções foram preparadas em tampão *Kolthoff* pH 8,0 segundo RIEMSCHEIDER (4) e a absorbância dos compostos foi lida de hora em hora durante um período de 30 horas. Após a determinação do tempo ideal para a reação foram obtidos os espectros de absorção, de 350 a 700 nm, de cada um dos aminoácidos e destes com o o-diacetilbenzol.

As curvas de *Ringbom* foram construídas para verificar o intervalo ideal de concentração para as determinações quantitativas. Para a determinação de L(+)Arginina com o-diacetilbenzol, em 550nm, foram usadas concentrações de 50 a 800 µg/ml de L(+)Arginina em solução tampão *Kolthoff* pH 8,0. Para a determinação de L(-)Asparagina com o o-diacetilbenzol, em 547nm, foram usadas as concentrações de 20 a 340 µg/ml de L(-)Asparagina em solução tampão *Kolthoff* pH 8,0. Para a determinação de L(+)Lisina, em 547nm, as concentrações usadas variam desde 4 a 68 µg por ml em solução tampão *Kolthoff* pH 8,0.

As concentrações para as retas de calibração foram determinadas pelas curvas de *Ringbom*, ou seja para L(+)Arginina de 150 a 500 µg por ml de L(+)Arginina, para L(-)Asparagina de 40 a 200 µg/ml de L(-)Asparagina e para L(+)Lisina de 8 a 32 µg/ml de L(+)Lisina.

O estudo dos interferentes e não interferentes foi feito através dos espectros de absorção, de 350 a 700nm, das substâncias estudadas (Vitamina B₁, Vitamina B₂, Vitamina B₆, Vitamina B₁₂, carnitina, buclisina, ácido γ aminobutírico, nicotinamida e ácido fólico) e destas substâncias com o o-diacetilbenzol em solução tampão *Kolthoff* pH 8,0.

O estudo da viabilidade da determinação dos aminoácidos presentes nas especialidades farmacêuticas nº 1, nº 2 e nº 3 e destas com o o-diacetilbenzol em solução tampão *Kolthoff* pH 8,0, foi feito através da interpretação dos seus espectros de absorção.

No tratamento estatístico dos dados experimentais, para a determinação da reta teórica, foi aplicado o método dos mínimos quadrados.

RESULTADOS

O estudo da absorção dos aminoácidos com o-diacetilbenzol em

função do tempo, revelou que a absorção máxima para o composto L(+) Arginina-o-diacetilbenzol se dá após 22 horas de repouso, a absorção máxima para L(-)Asparagina com o-diacetilbenzol se dá após 25 horas de repouso e a absorção máxima para aL(+)Lisina com o o-diacetilbenzol se dá após 22 horas de repouso.

O espectro de absorção do composto L(+)Arginina -o-diacetilbenzol mostra que a absorção máxima se dá em 550nm. O pico de absorção máxima do composto L(-)Asparagina com o o-diacetilbenzol se dá em 547nm. A absorção máxima do composto L(+)Lisina -o-diacetilbenzol de acordo com o espectro de absorção é em 547nm.

A curva de Ringbom para o doseamento espectrofotométrico da L(+)Arginina, em 550nm, determinou a faixa de concentração ideal para o doseamento como sendo de 150 a 500 $\mu\text{g/ml}$.

A curva de Ringbom para o doseamento espectrofotométrico da L(-)Asparagina em 547nm, mostra que a faixa de melhor concentração é de 40 a 200 $\mu\text{g/ml}$.

A faixa de concentração ideal para o doseamento espectrofotométrico de L(+)Lisina com o o-diacetilbenzol, 547nm, determinada pela curva de Ringbom é de 8 a 44 $\mu\text{g/ml}$.

A reta de calibração para o doseamento da L(+)Arginina é vista na Figura 1. No tratamento estatístico dos dados experimentais, para a determinação desta reta teórica foi aplicado o método dos mínimos quadrados, obtendo-se os seguintes resultados:

valor de a (origem da reta) = -0,221

valor de b (inclinação da reta) = 554,985

valor de $t_{(7)}\text{calculado} = 0,131$ $t_{(7)}\text{tab. 5\% de probabilidade} = 5,36$

Precisão relativa = 5,26%

A Figura 2 mostra a reta de calibração para o doseamento da L(-)Asparagina em 547nm. O tratamento estatístico aplicado aos dados experimentais para a reta teórica foi o método dos mínimos quadrados que apresentou os resultados seguintes:

valor de a (origem da reta) = -2,873

valor de b (inclinação da reta) = 229,670

valor de $t_{(8)}\text{calculado} = -16,511$ $t_{(8)}\text{tabela 5\% de probabilidade} = 2,31$

Precisão relativa = 1,43%

A reta de calibração para o doseamento de L(+)Lisina, em 547nm está na Figura 3. O tratamento estatístico aplicado para a determinação da reta teórica foi o método dos mínimos quadrados que fornece os seguintes resultados:

valor de a = - 0,517

valor de b = 35,193

$t_{\text{calculado}(6)} = -2,781$ $t_{(6)}\text{tabela 5\% probabilidade} = 2,45$

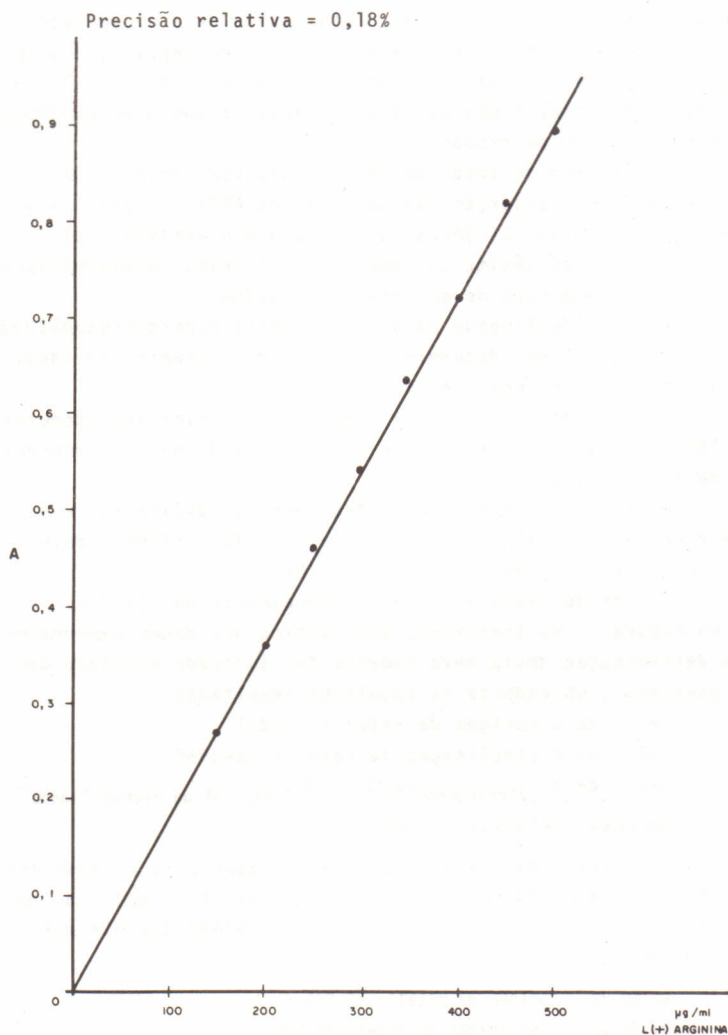


Figura 1. Reta de calibração para o composto L(+)-Arginina -o-diacetilbenzol, após 22 horas de repouso. λ 550nm.

Os espectros de absorção das substâncias, cloridrato de tiamina (Vitamina B₁), cloridrato de riboflavina (Vitamina B₂), cloridrato de piridoxina (Vitamina B₆), carnitina, buclisina, ácido fólico (Vitamina M) e nicotinamida (Vitamina PP) e destas com o o-diacetilbenzol indicam que não há interferência destas substâncias em presença ou não do o-diacetilbenzol na absorção dos aminoácidos estudados.

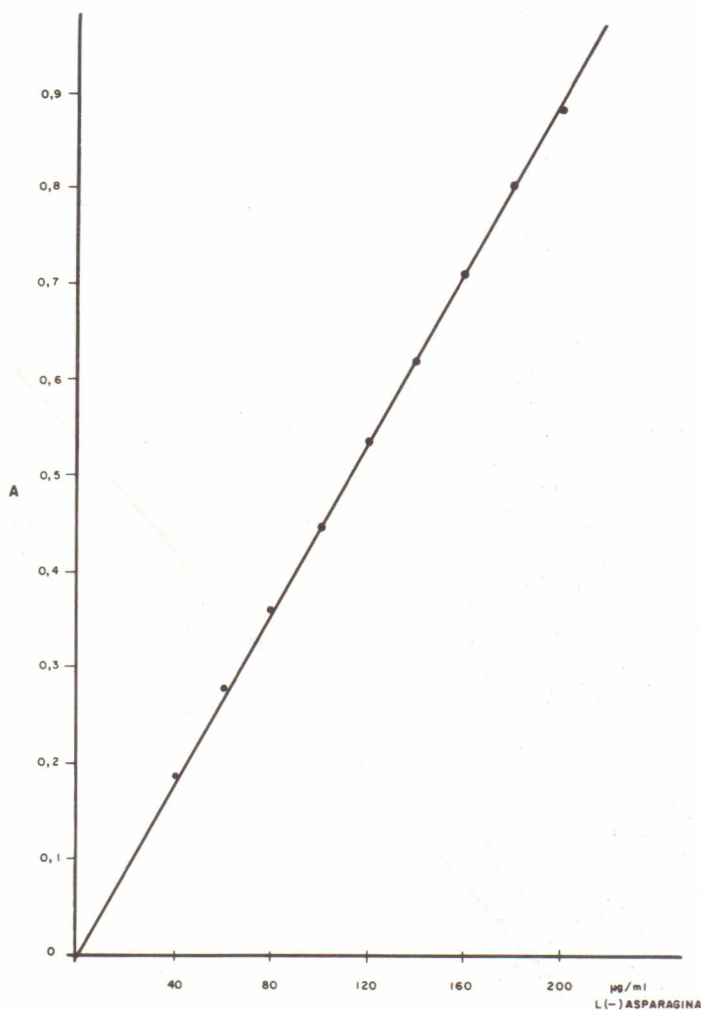


Figura 2. Reta de calibração para o composto L(-)Asparagina -o-diacetilbenzol, após 25 horas de repouso. λ 547nm.

Os espectros de absorção da cianocobalamina (Vitamina B₁₂) e do ácido γ aminobutírico em presença do o-diacetilbenzol, mostram acentuada interferência na absorção dos aminoácidos com o o-diacetilbenzol.

Os espectros de absorção das especialidades farmacêuticas estudadas e destas com o o-diacetilbenzol estão nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

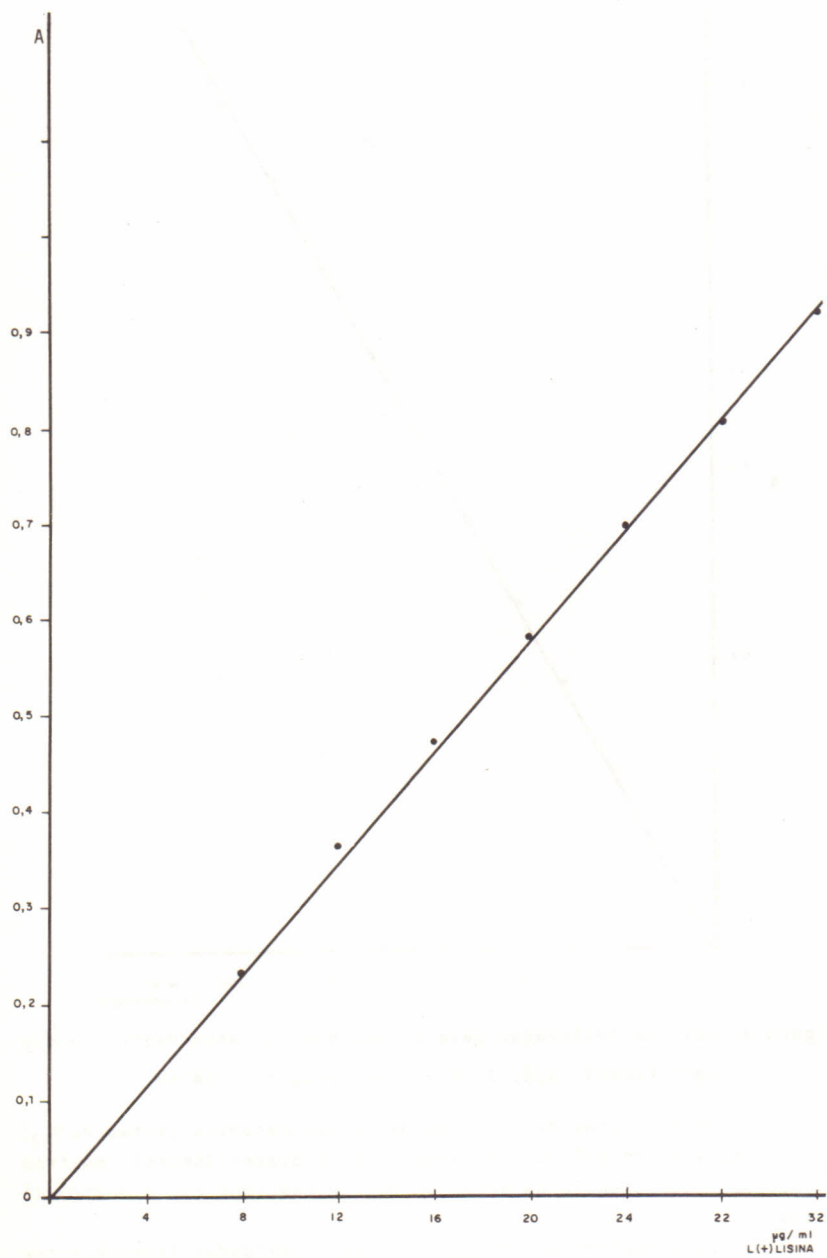


Figura 3. Reta de calibração para o composto L(+)-Lisina-o-diacetil benzol, após 22 horas de repouso. λ 547nm.

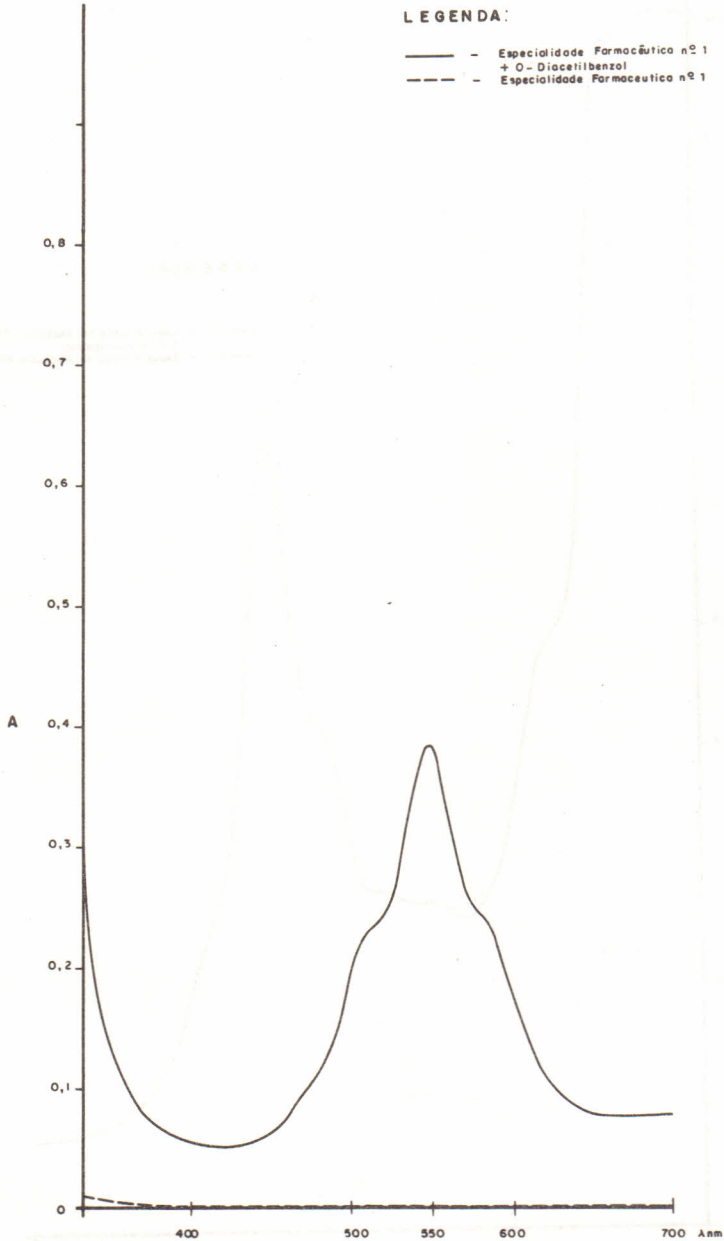


Figura 4. Espectro de absorção da especialidade farmacêutica nº 1 e desta com o orto-diacetilbenzol.

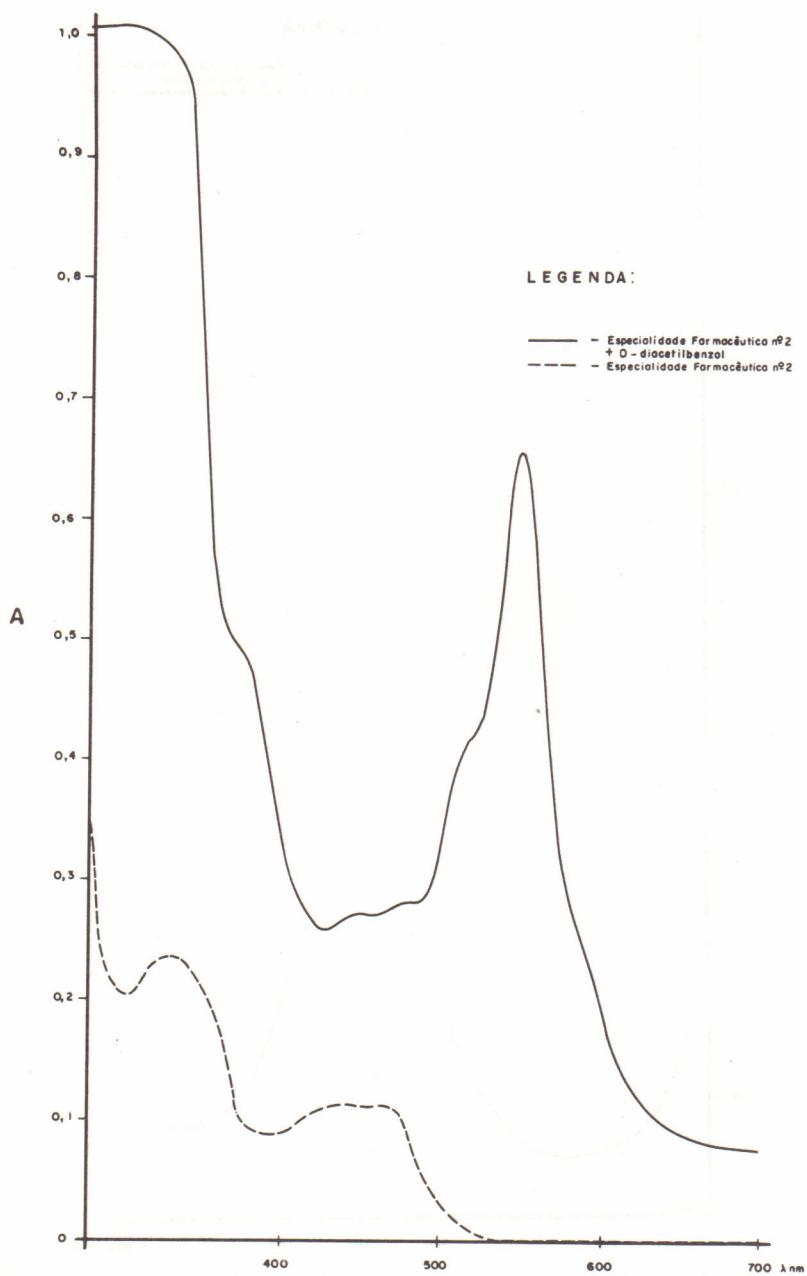


Figura 5. Espectros de absorção da especialidade farmacêutica nº2 e desta com o orto-diacetilbenzol.

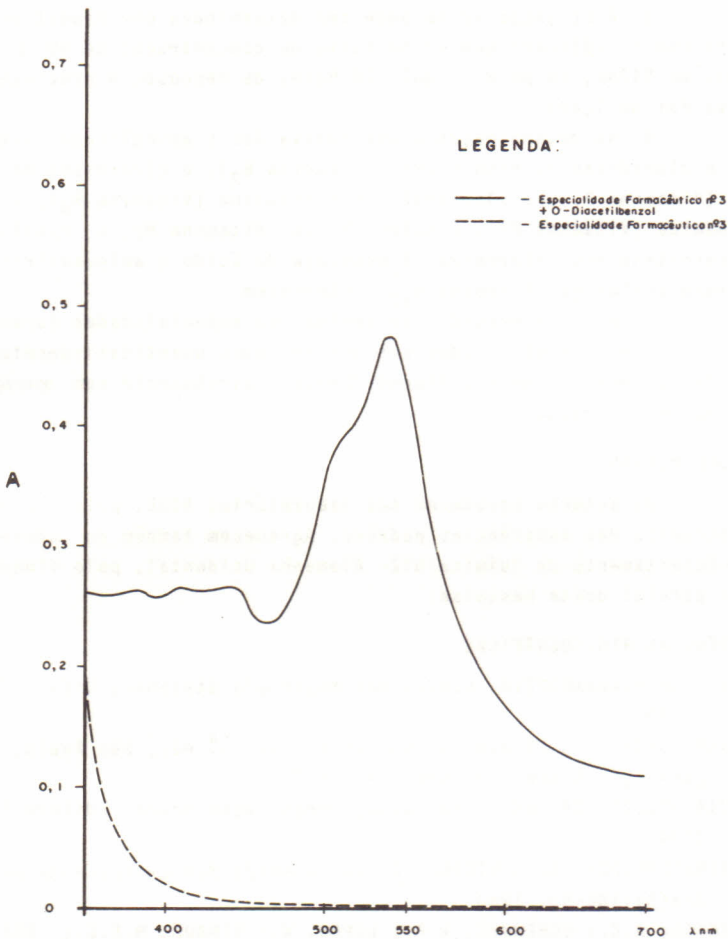


Figura 6. Espectro de absorção da especialidade farmacêutica nº 3 e desta com o orto-diacetilbenzol.

CONCLUSÕES

1. A L(+) Lisina pode ser doseada por espectrofotometria com o o-diacetilbenzol na faixa de concentração de 8 a 44 $\mu\text{g/ml}$, em pH 8,0, no comprimento de onda de 547nm, após 22 horas de repouso. A precisão relativa foi de 0,18%.

2. A L(+) Arginina pode ser doseada espectrofotometricamente com o o-diacetilbenzol na faixa de concentração de 150 a 500 $\mu\text{g/ml}$, em pH 8,0, após 22 horas de repouso, em 550nm. A precisão relativa foi de 5,26%.

3. A L(-)Asparagina pode ser determinada por espectrofotometria com o o-diacetilbenzol na faixa de concentração de 40 a 200 µg/ml, em 547nm, em pH 8,0, após 25 horas de repouso. A precisão relativa foi de 1,43%.

4. Na determinação quantitativa dos L-aminoácidos estudados, o cloridrato de riboflavina (Vitamina B₂), o cloridrato de tiamina (Vitamina B₁), o cloridrato de piridoxina (Vitamina B₆), a nicotinamida (Vitamina PP), o ácido fólico (Vitamina M), a buclisina e a carnitina não interferem. A presença do ácido γ aminobutírico e da cianocobalamina (Vitamina B₁₂) interferem.

5. Os L-aminoácidos presentes nas especialidades farmacêuticas nº 1, nº 2 e nº 3 podem ser determinados quantitativamente por espectrofotometria com o o-diacetilbenzol, diretamente sem operações prévias de separação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos laboratórios ACHÉ, pelo pronto fornecimento das substâncias padrões. Agradecem também ao convênio UFSM-Departamento de Química/GTZ- Alemanha Ocidental, pelo financiamento parcial desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRITISH PHARMACOPEIA. London Her Majesty's Stationery Office, 1973, p. 498.
2. FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 3^a ed., São Paulo, Organização Andrei Editora S.A, 1977.
3. GUIA MEDICO. 34^a ed., São Paulo, Organização Andrei Editora S.A, 1974.
4. RIEMSCHEIDER, R. & WIERER, J. *Zeitschrift fur analytische chemie*, 193(3):186-89, 1963.
5. SANTOS, A.C.; SCHENKEL, W.F.; LOPES, W.; VINADE, M.E.C.; BERNEIRA, Z.C.. *Rev. Centro Ciências da Saúde*, 7(1 e 2):97-120, 1979.
6. WARTEMBERG, H. *Acta Histochem*, 3:145-63, 1956.

Recebido em setembro, 1982; aceito em outubro, 1982.