

## Preparazione e proprietà della nitrosobiotina

ALDO GAUDIANO, GUIDO BELLOMONTE, GIULIA GILARDI (\*)  
ed ELISABETTA SANZINI (\*)

*Laboratorio degli Alimenti*

**Riassunto.** — Viene descritta la preparazione della N-nitrosobiotina, per nitrosazione della biotina. Della sostanza vengono riportate alcune proprietà chimico-fisiche: solubilità in vari solventi, stabilità in soluzioni acquose a diversi valori di pH, spettri UV e IR, attività ottica. Viene anche riportato un metodo di analisi colorimetrica col reattivo di Bratton e Marshall.

**Summary** (*Preparation and properties of nitrosobiotin*). — The preparation of N-nitrosobiotin from biotin is described. Some physicochemical properties of this substance are given: solubility in various solvents, stability in aqueous solutions at different pH values, UV and IR spectra, optical activity. A colorimetric method of analysis with Bratton and Marshall reagent is also reported.

La nitrosobiotina è un composto ipotizzato da Davidek [1] e da noi stessi [2] in ricerche, rispettivamente, di carattere analitico e biochimico, ma che non era stato ancora isolato. Trattandosi di un derivato di una vitamina e, nel contempo, di un nitrosoureide, si prospetta interessante dal punto di vista biologico. Lo abbiamo pertanto preparato e ne abbiamo studiato alcune proprietà.

### PARTE SPERIMENTALE

#### *Materiale e apparecchi*

Abbiamo usato D(+)-biotina per scopi biochimici (purezza 99 %) della ditta Merck. Gli altri prodotti chimici e i solventi erano puri per analisi.

Le misure spettrofotometriche sono state effettuate con uno spettrofotometro Beckman DU-2; la registrazione delle curve di assorbimento e

---

(\*) Borsista del Laboratorio degli Alimenti

di quelle cinetiche è stata eseguita mediante lo spettrofotometro Beckman DB-G, collegato ad un registratore Beckman a 10". Alcune misure, in particolare quelle di soluzioni a bassa concentrazione, sono state eseguite con vaschette da 10 cm, usando lo spettrofotometro Cary 17.

Gli spettri IR sono stati determinati con un apparecchio Perkin Elmer 457, usando la tecnica delle compresse di KBr.

Le misure del punto di fusione sono state eseguite con l'apparecchio Fus-O-mat della ditta Haraeus.

### Preparazione

In prove preliminari [2] abbiamo trovato che la velocità di nitrosazione (seguita registrando l'assorbimento a 248 nm) è massima a pH 1 circa. Al diminuire del pH, d'altra parte, diminuisce la stabilità della nitrosobiotina, nonché quella dell'acido nitroso. È necessario perciò operare piuttosto rapidamente e a bassa temperatura, in ambiente alquanto acido. Inoltre, per avere una buona velocità di nitrosazione, occorre usare un forte eccesso di nitrito. Essendo la biotina pochissimo solubile in acqua e in soluzioni di acidi minerali, oltre che nei comuni solventi organici, abbiamo operato in soluzione di acido formico, seguendo sostanzialmente la tecnica usata da Johnston e coll. [3] per la preparazione di alcune nitrosouree. Descriviamo una preparazione tipica.

100 mg (0,41 mmoli) di biotina sono stati sciolti in 7 ml di acido formico all'85 %; si sono aggiunti 283 mg (4,1 mmoli) di  $\text{NaNO}_2$  sciolti in poca acqua. Dopo agitazione, si è lasciato mezz'ora in frigorifero (4-5 °C). La soluzione è stata diluita con un egual volume di soluzione acquosa satura di solfato d'ammonio ed è stata estratta con acetato di etile (25+25+10 ml). Gli estratti sono stati lavati con soluzione acquosa satura di solfato d'ammonio fino a quasi neutralità e poi filtrati attraverso  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro.

La soluzione è stata concentrata a pressione ridotta a 35-40 °C, poi è stata addizionata di egual volume di pentano e lasciata in frigorifero. I cristalli ottenuti per filtrazione (80 mg) sono stati ricristallizzati a freddo da acetato di etile+pentano, lavati con pentano e seccati sotto vuoto su gel di silice.

La determinazione colorimetrica dei nitriti, con il metodo appresso riportato, ha indicato la presenza di un gruppo -NO per mole. I risultati della microanalisi sono i seguenti:

	C	H	O	S	O
trovato	43,98	5,57	15,14	11,66	23,65
					(per differenza)
calcolato per $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (P.M. 273,31)	43,95	5,53	15,37	11,73	23,42

*Proprietà*

La nitrosobiotina si presenta sotto forma di aghetti microcristallini di colore giallo pallido, che fondono con decomposizione fra 140° e 160 °C (Fig. 1).

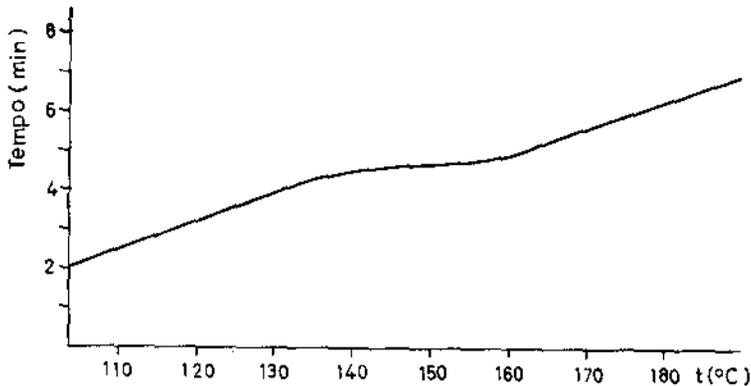


Fig. 1. — Diagramma di fusione della nitrosobiotina.

La solubilità è discreta negli alcoli alifatici inferiori, decrescendo con l'allungarsi della catena carboniosa (intorno a 500 mg/100 ml in alcool metilico e poco meno in alcool etilico assoluto); è minore in diossano, in acetone e in acetato di etile; è scarsa in acqua (circa 20 mg/100 ml), dove tuttavia aumenta notevolmente in ambiente alcalino e diminuisce per salatura, nei solventi organici clorurati e in etere etilico; è praticamente nulla negli idrocarburi alifatici o aromatici.

Come tutti i nitrosoderivati, la nitrosobiotina è poco stabile alla luce. Conservati in essiccatore al buio, i cristalli tendono lentamente ad imbrunire. La stabilità delle soluzioni acquose conservate al riparo dalla luce dipende, oltre che dalla temperatura, dal pH, presentando un massimo a pH 6 (Fig. 2). La velocità di degradazione (seguita spettrofotometricamente a 390 o a 248 nm) ha dapprima l'andamento delle reazioni del 1° ordine, come dimostrato dalla linearità fra il tempo e il log del rapporto fra la concentrazione iniziale e quella al tempo  $t$ , nonché dall'indipendenza del tempo di dimezzamento dalla concentrazione (nell'ambito fra 1 e 200  $\mu$ g/ml). Quando, però, la degradazione è molto avanzata, la sua velocità diminuisce notevolmente. Il tempo di dimezzamento è, a pH fra 5,5 e 6,5, di circa 25 giorni a temperatura ambiente (circa 20 °C) e di 2,4 giorni a 37 °C. Le soluzioni conservate in frigorifero sono alquanto stabili.

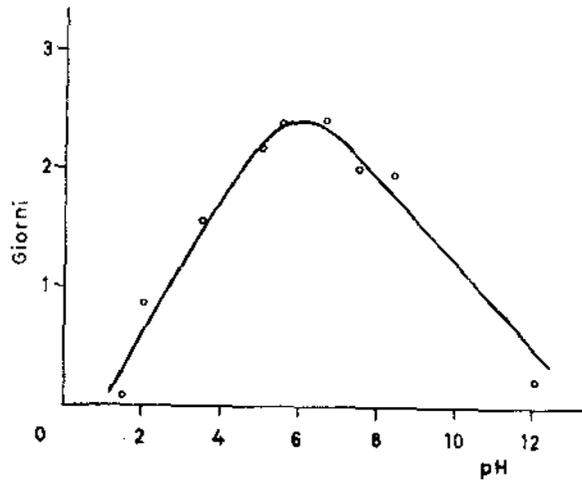


Fig. 2. — Stabilità della nitrosobiotina in funzione del pH ( $t_{1/2}$  a 37°C).

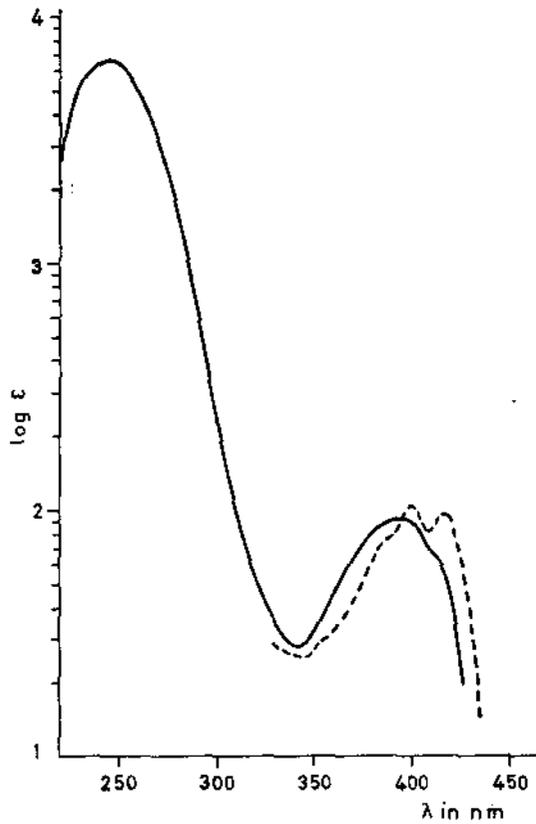


Fig. 3. — Spettri UV della nitrosobiotina in acqua (linea continua) e in alcool metilico (linea tratteggiata).

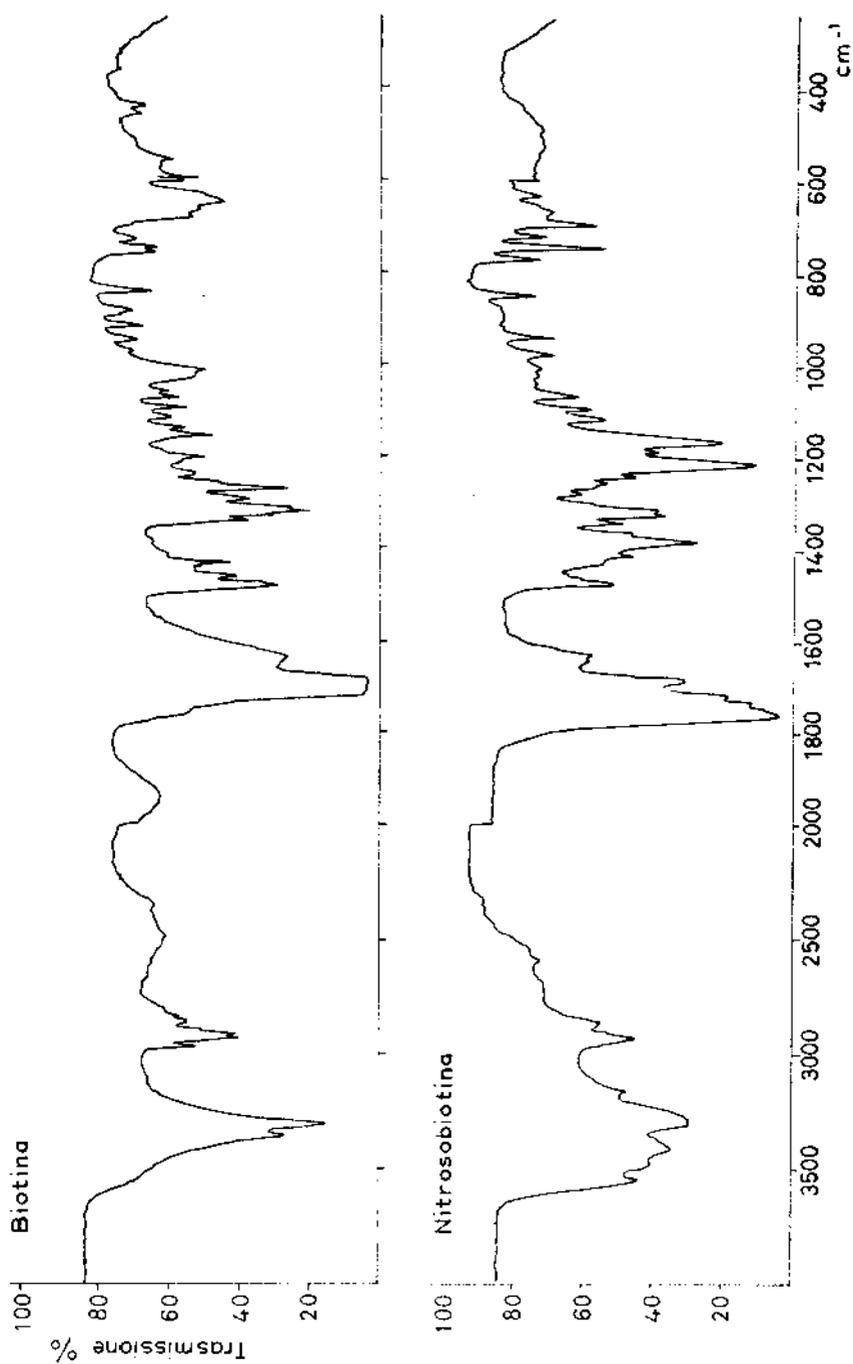


Fig. 4. — Spettro IR della nitrosobiotina (in KBr).

Lo spettro UV della nitrosobiotina (Fig. 3) presenta due massimi principali di assorbimento, posti, a seconda del solvente, a 390–400 nm e a 245–250 nm; i valori dell'estinzione molare sono, rispettivamente, intorno a 100 e a 7000. Da una parte e dall'altra del massimo minore se ne trovano altri due, più o meno pronunciati secondo il solvente. La legge di Beer è seguita, ad entrambe le lunghezze d'onda, almeno fino a valori di estinzione uguali a circa 1.

Lo spettro IR (Fig. 4) presenta una banda  $-NCO$  di notevole intensità nella regione del carbonile a  $1760\text{ cm}^{-1}$ , mentre la corrispondente banda della biotina si trova a  $1690\text{ cm}^{-1}$ ; tale spostamento per effetto della nitrosazione è stato già osservato in altre nitrosouree [3]. Lo spettro della nitrosobiotina presenta inoltre una banda a  $1478\text{ cm}^{-1}$ , da attribuire all'aggruppamento  $-N-N=O$ , e due minori a  $1380$  e a  $1344\text{ cm}^{-1}$  dovute allo *stretch*  $-N=O$ .

Il potere rotatorio specifico è  $[\alpha]_D^{20} = +31,3^{\circ}$  ( $c = 0,06$  in metanolo).

### Analitica

In assenza di sostanze interferenti, la concentrazione in soluzione si può ricavare da una misura spettrofotometrica nell'UV; la misura della estinzione all'uno o all'altro massimo di assorbimento permette di eseguire determinazioni fra circa 4 e 2000  $\mu\text{g/ml}$  (in vaschette da 1 cm). La biotina non interferisce; l'acido nitroso mostra una banda con struttura fine tra 340 e 390 nm, con  $\epsilon$  intorno a 50.

Si può eseguire la determinazione colorimetrica dell'acido nitroso, ad es. secondo Bratton e Marshall [4], dopo la liberazione dell'acido nitroso per effetto di irradiazione UV [5] o, più semplicemente, per idrolisi acida [6, 7]. È conveniente eseguire l'idrolisi direttamente con il reattivo A di Bratton e Marshall, che contiene HCl e solfanilammide (v. dopo), allo scopo di fissare subito l' $\text{HNO}_2$  svolto. Abbiamo trovato che il massimo di resa si ottiene dopo 5 min di idrolisi a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le condizioni di analisi da noi fissate sono le seguenti.

**Reattivi.** — A) Solfanilammide allo 0,5 % in HCl 2 N; B) N-(1-naftil)etilendiammina allo 0,3 % in acqua; questo reattivo deve essere preparato di fresco.

**Esecuzione del metodo.** — A 2 ml di soluzione acquosa (contenente da 1 a 5  $\mu\text{g}$  di nitrosobiotina) si aggiunge 1 ml di reattivo A e si scalda 5 min a b.m. a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; dopo raffreddamento in ghiaccio, si aggiungono 0,2 ml di reattivo B e, dopo 5 min, si porta a 5 ml con acqua. Si misura l'assorbimento

a 540 nm contro un bianco effettuato con i soli reattivi (o semplicemente con acqua, in quanto i reattivi ben preparati sono incolori). La colorazione è stabile (\*).

Il metodo colorimetrico ora descritto è più sensibile e più specifico del metodo spettrofotometrico nell'UV. Se ne può aumentare la specificità facendolo precedere da una separazione cromatografica su strato sottile. Si prestano molto bene le lastre di gel di silice con indicatore fluorescente incorporato (Merck 60 F<sub>254</sub>, spessore 0,25 mm), sulle quali la nitrosobiotina si evidenzia, a luce UV di bassa lunghezza d'onda (254 nm), come macchia scura su fondo fluorescente (sensibilità 0,5-1 µg circa). Indichiamo i valori di Rf per due solventi che si prestano bene allo scopo:

A) *n*-butanolo-etanolo-acqua 9:2:3 in vol. Rf=0,40;

B) benzene-metanolo-acido acetico-acetone 70:20:5:5 in vol. Rf=0,45.

I prodotti di ossidazione (solfone e solfossido) hanno valori di Rf più elevati con il solvente A, più bassi con il solvente B.

All'occorrenza la rivelazione della nitrosobiotina può farsi, sulla lastra cromatografica, per mezzo del reattivo di Bratton e Marshall modificato: si spruzza dapprima con una soluzione ottenuta mescolando 10 ml di HCl 1, 2 N contenente lo 0,2 % di solfanilammide con 6 ml di HCl 5 N. Dopo 1 ora, si spruzza con soluzione acquosa allo 0,1 % di N-(1-naftil)etilendiammina. È conveniente, dopo comparsa della macchia rosa rivelatrice della nitrosobiotina, spruzzare la lastra con soluzione acquosa al 5 % di acido ascorbico, per evitare che il fondo si colora di rosa per ossidazione all'aria. La sensibilità di rivelazione è intorno a 0,5 µg. La determinazione quantitativa si può fare, dopo localizzazione della nitrosobiotina a luce UV, grattando via dalla lastra la zona ad essa corrispondente e riscaldandola per 5 min a 50 °C, in tubicino graduato, con 2 ml di acqua e 1 ml di reattivo A di Bratton e Marshall. Dopo aver effettuato la reazione colorimetrica come sopra descritto, si centrifuga per 15 min a 3000 giri/min, si travasa cautamente il soprannatante in una vaschetta fotometrica e si misura l'assorbimento a 540 nm. Volendo eluire la nitrosobiotina dalla lastra, si può usare la miscela metanolo-cloroformio 1:1.

In gascromatografia la nitrosobiotina si comporta come la biotina, nella quale, evidentemente, si decompone.

Sulla determinazione colorimetrica della nitrosobiotina, sopra descritta, o su quella gascromatografica, effettuata dopo eluizione dalla lastra, abbiamo basato un metodo di dosaggio della biotina nelle preparazioni farmaceutiche [9].

---

(\*) È possibile dosare i nitriti liberi in presenza di nitrosobiotina sostituendo l'HCl del reattivo A con acido acetico al 30 % e omettendo il riscaldamento.

Per la determinazione polarografica, rimandiamo al lavoro di Davídek [1], che ha trovato, in acetato di sodio 0,5 M, un potenziale di semionda di  $-0,83$  V rispetto all'elettrodo a calomelano saturo.

#### DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Mentre i risultati analitici non lasciano dubbi sull'identità del prodotto da noi preparato con la nitrosobiotina, qualche incertezza potrebbe sussistere sulla posizione del radicale  $-\text{NO}$ , che potrebbe essere unito all'N in posizione 1' o a quello in posizione 3'. Riteniamo che, per motivi sterici (presenza della catena dell'acido valerianico in posizione 2), la sostituzione avvenga in posizione 1', analogamente a quanto si verifica per la carbossibiotina [10]. Sembra esclusa la formazione, in quantità apprezzabili, dell'isomero 3'-sostituito, in quanto non abbiamo riscontrato, in cromatografia su strato sottile, più di una macchia.

Se, come è da ritenere, la nitrosobiotina è effettivamente una  $\text{N}_{1'}$ -nitrosobiotina, essa dovrebbe essere priva della capacità metabolica di trasportare  $\text{CO}_2$ , in quanto l'H in posizione 1' è sostituito. Pertanto è da ritenere che l'attività, da essa posseduta, di stimolare, come la biotina, la crescita di *Lactobacillus arabinosus* [11] sia da attribuire alla sua decomposizione in  $\text{HNO}_2$  e biotina, a meno che non si voglia ipotizzare uno scambio fra NO e  $\text{CO}_2$ .

Ringraziamo la dott.ssa Anna Mazzeo Farina per l'esecuzione delle microanalisi.

Ricevuto il 7 dicembre 1976.

Accettato il 22 aprile 1977.

#### BIBLIOGRAFIA

1. DAVÍDEK, J. 1961. Polarographische Bestimmung von Biotin. *Naturwiss.* **48**: 403.
2. GAUDIANO, A., G. BELLOMONTE, L. MAZZEO, G. GILARDI, M. MAZZIOTTI DI CELSO & E. SANZINI. 1975. Comportamento dei nitriti con le vitamine idrosolubili in succo gastrico artificiale. *Riv. Soc. Ital. Sci. Alim.* **4**: 105-108.
3. JOHNSTON, T.P., G.S. McCALEB & J.A. MONTGOMERY. 1963. The synthesis of antineoplastic agents. XXXII. N-Nitrosoureas. I. *J. Med. Chem.* **6**: 669-681.
4. BRATTON, A.C. & E.K. MARSHALL. 1939. A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.* **128**: 537-550.
5. DAIBER, D. & R. PREUSSMANN. 1965. Quantitative colorimetrische Bestimmung organischer N-nitroso-Verbindungen durch photochemische Spaltung der Nitrosaminbindung. *Zf. Analyt. Chem.* **206**: 344-352.

6. LOO, T.L., & R.L. DION. 1965. Colorimetric method for the determination of 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *J. Pharm. Sci.* **53**: 809-810.
7. PREUSSMANN, R. & F. SCHAPER-DRUCKREY. 1972. Investigation of a colorimetric procedure for determination of nitrosamides and comparison with other methods. In: *WHO International Agency for research on cancer. N-nitroso compounds analysis and formation* (IARC Scientific Public. N. 3, Lyon), pp. 81-86.
8. VISWANATHAN, V., F.P. MAHN, V.S. VENTURELLA & B.Z. SENKOWSKI. 1970. Gas-liquid chromatography of *d*-biotin. *J. Pharm. Sci.* **59**: 400-402.
9. GAUDIANO, A., G. BELLOMONTE, E. SANZINI, G. GILARDI & M. RENZI. 1977. Metodo colorimetrico e gascromatografico per la determinazione della biotina nelle preparazioni farmaceutiche. *Ann. Istit. Super. Sanità*, **13**: 783-792.
10. TRAUB, W. 1959. Possible biochemical implications of the crystal structure of biotin. *Science*. **129**: 210.
11. DE FELIP, G. 1976. Comunicazione personale.