

Metodo colorimetrico e gascromatografico per la determinazione della biotina nelle preparazioni farmaceutiche

ALDO GAUDIANO, GUIDO BELLOMONTE, ELISABETTA SANZINI (*),
GIULIA GILARDI (*) e MAURIZIO RENZI (**)

Laboratorio degli Alimenti

Riassunto. — Viene descritto un metodo analitico per la biotina, basato sulla sua trasformazione in N-nitrosobiotina, purificazione di questo derivato e sua determinazione colorimetrica o gascromatografica.

La nitrosazione viene effettuata per trattamento con un eccesso di NaNO_2 in H_2SO_4 0,2 N a temperatura ambiente. La nitrosobiotina viene estratta con cloroformio, dopo salatura con solfato d'ammonio, e purificata per cromatografia su strato sottile. Si determina poi colorimetricamente l' HNO_2 mediante il reattivo di Bratton e Marshall: il materiale raschiato dalla lastra viene fatto reagire per 5 min a 50°C con la prima soluzione (solfanilammide + HCl), per far avvenire l'idrolisi, e poi con la seconda (N-(1-naftil)etilendiammina).

Alternativamente, la nitrosobiotina può essere sottoposta a gascromatografia, dopo silanizzazione con BSA.

L'estrazione della biotina dai preparati polivitaminici solidi si fa con alcool assoluto, partendo da una quantità presunta di biotina di circa 250 μg . È necessario operare in parallelo con uno standard interno.

Summary (*A colorimetric and gaschromatographic method for biotin determination in drugs*). — An analytical method for biotin is described, which is based on its conversion to N-nitrosobiotin, purification of this derivative and its colorimetric or gas chromatographic determination.

Nitrosation is carried out by treatment with an excess of NaNO_2 in 0.2 N H_2SO_4 at room temperature. Nitrosobiotin is extracted with chloroform, after salting out with ammonium sulphate, and purified by thin layer

(*) Borsista del Laboratorio degli Alimenti.

(**) Ospite del Laboratorio degli Alimenti.

chromatography (on silica gel 60 F₂₅₄ with *n*-butanol - ethanol - water 9: 2: 3; *R_f* = 0,40). HNO₂ is then determined colorimetrically (at 540 nm) by the Bratton and Marshall reagent: the scraped off material is let to react for 5 min at 50 °C with the first solution (sulphanilamide + HCl), in order to obtain hydrolysis, and then with the second one (N-(1-naphthyl ethyl enediamine)).

Alternatively, nitrosobiotin can be submitted to gaschromatography, after silylation with BSA (2h at 80 °C). The operating conditions are: a glass column, 2 m long, packed with 3 % SE-30 on Chromosorb WHP; column temperature 190 °C; injector and detector temperature 260 °C; carrier gas: nitrogen (30 ml/min).

The extraction of biotin from multivitamin solid preparations is performed with absolute ethanol, starting from an expected quantity of about 250 µg. It is suggested to work at the same time with an internal standard.

La biotina si trova, nelle preparazioni farmaceutiche, associata con le altre vitamine del gruppo B, ma in quantità molto inferiori rispetto a queste. Ne risulta che i metodi chimici finora proposti per la sua determinazione, non essendo sufficientemente sensibili e specifici [1], non sono applicabili a dette preparazioni. Neanche i metodi gascromatografici recentemente proposti [2, 3] sono impiegabili nella determinazione della biotina in miscele complesse. A tale scopo si usano invece correntemente metodi microbiologici, che sono molto sensibili, ma non altrettanto precisi; inoltre, la loro specificità non è assoluta, in quanto rispondono ad alcuni prodotti di ossidazione della biotina, nonché all'acido oleico [4].

La biotina reagisce con acido nitroso [5] formando N-nitrosobiotina [6, 7]. Su questa reazione è basato un metodo polarografico [5], che tuttavia non risolve il problema analitico.

Il metodo che qui descriviamo è basato sulla preventiva estrazione della nitrosobiotina, sua eventuale purificazione cromatografica e successiva determinazione colorimetrica (impiegando la diazoreazione di Bratton e Marshall [8]) o gascromatografica.

PARTE SPERIMENTALE

Prodotti

Abbiamo usato D(+)-biotina (titolo 99 %) della ditta Merck. I prodotti di ossidazione, solfossidi e solfone, sono stati da noi preparati trattando la biotina con perossido d'idrogeno nelle condizioni descritte dalla letteratura [9, 10]. I reagenti usati erano prodotti puri per analisi.

Apparecchiatura.

Abbiamo impiegato uno spettrofotometro Beckman DB-G, collegato con registratore Beckman a 10 pollici.

Il gascromatografo era il mod. 881 della Perkin-Elmer.

Estrazione della biotina.

Per l'estrazione della vitamina dalle preparazioni farmaceutiche solide, abbiamo scelto l'alcool assoluto, solvente che la scioglie meglio di tutti gli altri (ca. 1 mg/ml), mentre scioglie relativamente poco le altre vitamine idrosolubili. È opportuno poi eliminare l'alcool perché altrimenti questo consuma acido nitroso nella tappa successiva; non è però nociva la permanenza di tracce di alcool, in quanto il nitrito di etile formato si elimina durante la successiva evaporazione (v. dopo).

Nitrosazione.

Negli esperimenti preliminari volti a trovare le condizioni ottimali per la nitrosazione, ci siamo serviti della misura in continuo dell'estinzione a 250 nm, lunghezza d'onda presso la quale la nitrosobiotina ha un intenso massimo d'assorbimento [6, 7], mentre l'assorbimento della biotina è nullo e quello dell'acido nitroso è trascurabile. Come era da aspettarsi, la nitrosazione della biotina avviene con rese tanto migliori quanto più l'ambiente è acido. Abbiamo usato H_2SO_4 (in cui la biotina è più stabile che in HCl) ad una concentrazione 0,2 N, avendo constatato che la resa migliora di poco (3 %) passando dall'acido 0,1 N a quello 0,2 N (Figg. 1 e 2). Il nitrito deve essere in forte eccesso (Figg. 1 e 2); usando un eccesso di 50 moli per mole di biotina, in H_2SO_4 0,2 N a temperatura ambiente (ca. 20 °C), il tempo per avere il massimo di reazione è di 15-20 min; dopo circa un'ora l'estinzione decresce lentamente, per la decomposizione della nitrosobiotina in ambiente acido [6, 7]. Anche la luce decompone lentamente la nitrosobiotina; occorre quindi lavorare a luce ridotta.

In presenza di sostanze che consumano acido nitroso (soprattutto riducenti e ammine, ad es. [6] acido ascorbico, acido folico, acido *p*-amminobenzoico), bisogna tenerne conto nell'aggiunta di nitrito; ci si può servire di una cartina amido-iodurata o di una misura potenziometrica.

La resa della nitrosazione è superiore al 95 %.

Estrazione della nitrosobiotina.

La nitrosobiotina è moderatamente solubile in acqua e nei solventi organici polari [7]. Per separarla dall'eccesso di H_2SO_4 e di HNO_2 e, nello

stesso tempo, da molte altre sostanze presenti nella soluzione, abbiamo trovato conveniente un'estrazione con cloroformio, previa salatura con solfato d'ammonio. Dei solventi immiscibili con acqua, quello che scioglie meglio la nitrosobiotina è l'acetato di etile; abbiamo tuttavia dato la preferenza al cloroformio, in cui la nitrosobiotina è un po' meno solubile, perché l'elevata densità di questo solvente facilita le ripetute estrazioni in imbuto separatore. Per diminuire la solubilità della nitrosobiotina in acqua, abbiamo sciolto in questa il 40 % di solfato d'ammonio; tale concentrazione dà gli stessi risultati della soluzione saturata.

Purificazione per cromatografia su strato sottile.

La separazione della nitrosobiotina dai nitrosoderivati dei prodotti di ossidazione della biotina (solfossidi e solfone) può essere realizzata su lastra di gel di silice addizionato di indicatore fluorescente, usando come solvente

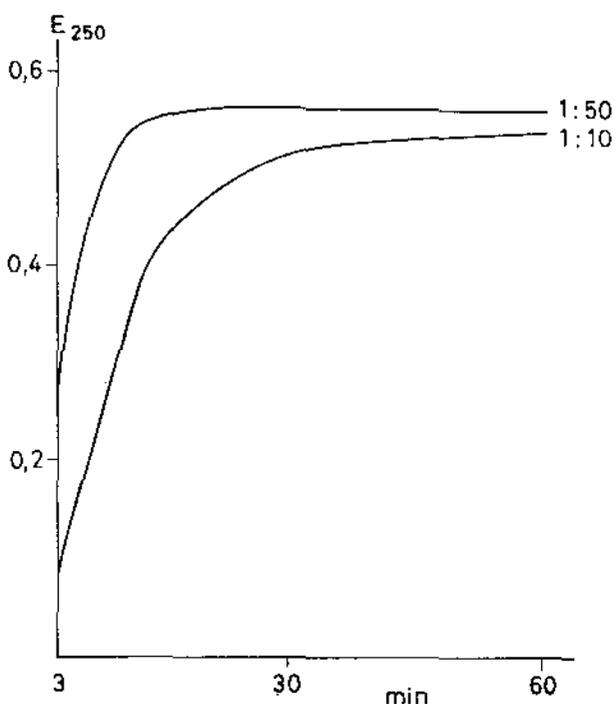


Fig. 1. — Curve della velocità di nitrosazione della biotina, ottenute mediante registrazione dell'estinzione a 250 nm. Condizioni di reazione: temperatura 20 °C; biotina 25 µg/ml in H₂SO₄ 0,1N; i rapporti molar biotina: NaNO₂ sono indicati accanto alle relative curve.

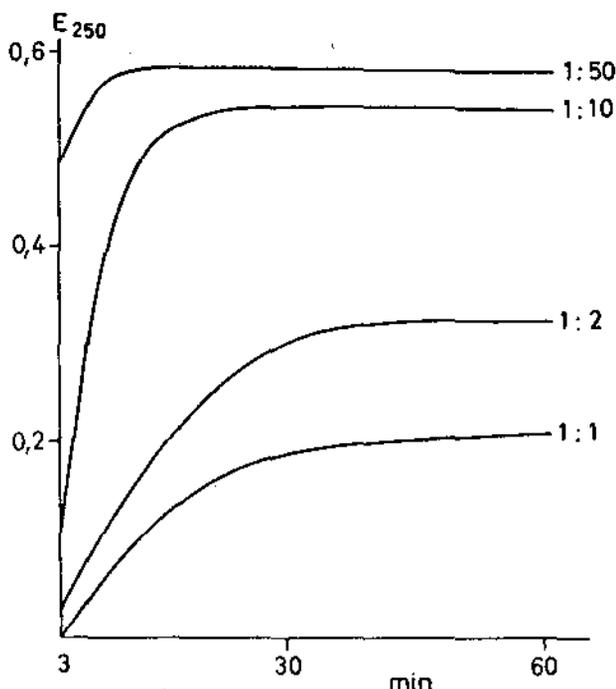


Fig. 2. — Curve della velocità di nitrosazione della biotina, ottenute mediante registrazione dell'estinzione a 250 nm. Condizioni di reazione: temperatura 20 °C; biotina 25 µg/ml in H₂SO₄ 0,2 N; i rapporti molari biotina: NaNO₂ sono indicati accanto alle relative curve.

la miscela *n*-butanolo - etanolo - acqua 9 : 2 : 3. La nitrosobiotina, localizzabile a luce UV (254 nm), ha $R_f = 0,40$, mentre i nitrosoderivati dei suddetti prodotti di ossidazione hanno valori di R_f notevolmente più alti. La riboflavina e la nicotinammide, che nel caso di preparati polivitaminici passano in parte nell'estratto cloroformico, hanno valori di R_f , rispettivamente, di 0,48 e 0,52.

Idrolisi e determinazione colorimetrica.

L'idrolisi della nitrosobiotina, allo scopo di liberare l'acido nitroso per la successiva determinazione colorimetrica, può essere effettuata direttamente sul materiale proveniente dalla cromatografia su strato sottile, con lo stesso reattivo alla solfanilammide, contenente HCl, che sarà poi usato per la reazione colorimetrica; tempo e temperatura di idrolisi sono critici; a 50 °C il tempo ottimale è di 5 min.

Gascromatografia.

La gascromatografia può sostituire la determinazione colorimetrica; inoltre, in assenza di altre sostanze interferenti oltre ai prodotti di ossidazione della biotina, essa rende superflua la purificazione per cromatografia su strato sottile.

Ci siamo discostati dai metodi descritti in letteratura per la biotina [2, 3], oltre che per alcuni particolari di scarso rilievo, per le modalità di silanizzazione e per lo standard interno impiegato. Per la silanizzazione, abbiamo trovato che il BSA (bis-(trimetilsilil)acetammide) dà rese migliori, anziché a 100 °C, a 80 °C, con un tempo ottimale di 2 h. Come standard interno abbiamo usato l'*n*-docosano (C₂₂H₄₆) a differenza dell'*n*-ottacosano impiegato da Viswanathan e coll. [2], che impedirebbe di rilevare la presenza del biotinsolfone, il cui tempo di ritenzione è molto vicino al suo.

È da rilevare che i nitrosoderivati della biotina e dei suoi prodotti di ossidazione si comportano, al gascromatografo, come i corrispondenti composti non nitrosati, nei quali evidentemente si decompongono ad alta temperatura.

Procedimento

Reattivi e materiali.

- 1) Acido solforico;
- 2) Etere etilico;
- 3) Etanolo assoluto;
- 4) Soluzione di NaNO₂ 0,1 M (6,9 g/l); va conservata in frigorifero per non oltre una settimana;
- 5) Ammoniaca diluita;
- 6) Solfato d'ammonio;
- 7) Cloroformio; va bene quello stabilizzato con etanolo;
- 8) Solfato di sodio anidro;
- 9) Metanolo-cloroformio 1:1 (v/v);
- 10) Solvente per cromatografia su strato sottile: *n*-butanolo-etanolo-acqua 9 : 2 : 3 (v/v);
- 11) Soluzione allo 0,5 % di solfanilammide in HCl 2 N;
- 12) Soluzione allo 0,3 % di N-(1-naftil)etilendiammina, preparata di fresco;
- 13) Bis-(trimetilsilil)acetammide (BSA);
- 14) *n*-Docosano: soluzione al 25 % (p/v) in cicloesano;
- 15) Lastre per cromatografia su strato sottile di gel di silice 60 F₂₅₄ (Merck), spessore 0,25 mm.

Esecuzione dell'analisi.

Preparazione e purificazione della nitrosobiotina. — Si suggerisce di lavorare con una quantità presunta di biotina intorno ai 250 μg e di operare con uno standard interno. Le operazioni appresso descritte vanno quindi portate avanti in parallelo per il campione in esame e per lo standard interno. Le preparazioni liquide possono essere usate tal quali, previa eliminazione, per evaporazione a pressione ridotta, dell'alcool eventualmente presente; esse devono essere portate con H_2SO_4 alla concentrazione 0,2 N in acido. Dalle preparazioni solide la biotina va estratta (dopo eventuale eliminazione delle vitamine liposolubili per estrazione eterea) con poco alcool assoluto; l'estratto alcoolico viene poi portato a secco su b.m. in corrente d'azoto e il residuo viene ripreso con ca. 25 ml di H_2SO_4 0,2 N. La soluzione acida contenente circa 250 μg di biotina viene addizionata, in imbutino separatore, con 3,5 mg di NaNO_2 sciolti in poca acqua (0,5 ml della soluzione 4). Se fossero presenti sostanze che consumano HNO_2 , occorre prima aggiungere la quantità occorrente di NaNO_2 , controllando con cartina amido-iodurata o potenziometricamente. Da questo momento occorre operare al riparo dalla luce diretta. Si lascia per 20 min a temperatura ambiente, indi si porta a pH 3,5 con ammoniaca diluita. La soluzione viene poi addizionata col 40 % del suo peso di solfato d'ammonio e, dopo che questo si è sciolto, viene estratta con 10 + 5 + 5 + 5 ml di cloroformio. Gli estratti cloroformici riuniti vengono lavati con poca soluzione satura di solfato d'ammonio, disidratati con solfato di sodio anidro e portati a 25 ml.

10 ml della soluzione cloroformica vengono evaporati a secchezza su b.m. a 40 °C, a pressione ridotta o in corrente d'azoto. Dopo raffreddamento, il residuo viene sciolto in 0,50 ml del solvente 9). 50 μl di tale soluzione (pari a 10 μg di biotina) vengono depositi su lastra per strato sottile di gel di silice addizionato di indicatore fluorescente; si cromatografa col solvente 10). Dopo circa 3 h, si toglie la lastra dalla vasca cromatografica, si lascia evaporare il solvente e si localizza a luce UV (254 nm) la zona della nitrosobiotina ($R_f = 0,40$).

Determinazioni colorimetrica. — La zona contenente la nitrosobiotina viene grattata via dalla lastra e portata quantitativamente in un tubicino graduato da 5 o 10 ml. Vi si introducono 2 ml di acqua e 1 ml di reattivo 11) e si lascia 5 min esatti a b.m. a 50 °C. Si raffredda con ghiaccio e si aggiungono 0,2 ml di reattivo 12). Dopo 5 min si porta a 5 ml con acqua. Si centrifuga per 15 min a 3000 giri/min. Si travasa cautamente la soluzione in una vaschetta fotometrica (spessore 1 cm) e si misura l'assorbimento a 540 nm, usando come liquido di confronto acqua. Dai valori ottenuti con la soluzione in esame e con quella contenente lo standard interno si ricava la concentrazione incognita di biotina.

Determinazione gascromatografica. -- Può essere effettuata alternativamente alla determinazione colorimetrica. Se da prove preliminari si rivela necessaria la purificazione per cromatografia su strato sottile, si procede come sopra, ma cromatografando una quantità di nitrosobiotina pari a circa 25 µg. La zona grattata via dalla lastra viene estratta col solvente 9). Dopo filtrazione ed evaporazione del solvente, si aggiungono al residuo, raccolto in un tubicino a fondo conico, 10 µl di BSA, si tappa e si lascia per 2h a 80 °C. Dopo raffreddamento, si aggiungono 40 µl di soluzione 14). Si iniettano in colonna 2-3 µl, regolando opportunamente la sensibilità. Le condizioni operative sono le seguenti: colonna di vetro, della lunghezza di 2 m e del diametro di 4,5 mm, impaccata con SE-30 al 3 % su Chromosorb WHP; temperatura della colonna 190 °C; temperatura dell'iniettore e del rivelatore 260 °C; gas di trasporto: azoto, con flusso di 30 ml/min; fiamma alimentata da idrogeno a 30 ml/min e aria a 300 ml/min. Il tempo di ritenzione della nitrosobiotina (o della biotina) rispetto al $C_{22}H_{46}$ è 2,4. Determinato il fattore di risposta rispetto al $C_{22}H_{46}$, si ricava la concentrazione incognita di biotina dalle aree corrispondenti al $C_{22}H_{46}$, alla soluzione in esame e a quella contenente lo standard interno.

Il procedimento da noi descritto ha dato una deviazione standard del ± 5 %, indipendentemente dall'impiego, nell'ultima fase, della tecnica colorimetrica o di quella gascromatografica. L'applicazione all'analisi di diverse specialità medicinali ha dato, se si opera per confronto con uno standard di sola biotina, recuperi compresi fra il 50 e il 90 %, secondo la composizione: ciò rende indispensabile l'uso di uno standard interno.

Ricevuto il 7 dicembre 1976

Accettato il 22 aprile 1977

BIBLIOGRAFIA

1. HASHIM, M.H. 1973. Biotin (Vitamin H). In: *Assay of vitamins in pharmaceutical preparations*. Wiley, London, New York, Sidney, Toronto, pp. 228-233.
2. VISWANATHAN, V., F.P. MAHN, V.S. VENTURELLA & B.Z. SENKOWSKI. 1970. Gas-liquid chromatography of *d*-biotin. *J. Pharm. Sci.* **59**: 400-402.
3. JANECKE, H. & H. VOEGE. 1971. Zur gas-chromatographischen Bestimmung von silylierten Biotin, seinen Oxydationsprodukten und anderen Silylierten Vitaminen. *Zf. Analyt. Chem.* **244**: 355-359.
4. GYÖRGY, P. 1967. Biotin. In: *The vitamins*, II Ed., P. György e W.N. Pearson (Ed.). Academic Press, New York, London, vol. VII, pp. 303-310.
5. DAVÍDEK, J. 1961. Polarographische Bestimmung von Biotin. *Naturwiss.* **48**: 403.

6. 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.
7. GAUDIANO, A., G. BELLOMONTE, G. GILARDI & E. SANZINI. 1977. Preparazione e proprietà della nitrosobiotina. *Ann. Istit. Super. Sanità.* 13: 773-782.
8. BRATTON, A.C. & E.K. MARSHALL. 1939. A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.* 128: 537-550.
9. MELVILLE, D.B. 1954. Biotin sulfoxide. *J. Biol. Chem.* 208: 495-501.
10. HOFMANN, K., D.B. MELVILLE & V. du VIGNEAUD. 1941. Characterization of the functional groups of biotin. *J. Biol. Chem.* 141: 207-214.