

25. A. MARIANI e C. VICARI. — **Separazione della morfina dall'oppio per mezzo di resine a scambio di joni e sua determinazione colorimetrica.**

Riassunto. — Viene studiato il comportamento sia della morfina pura che degli estratti da oppio verso le resine a scambio di joni. Particolarmente è stato messo a punto un metodo che permette di fissare, a mezzo di resina acida debole (Amberlite IRC-50) sodica la morfina e la sua eluzione selettiva che permette di ottenere l'alcaloide ad alto grado di purezza.

Per seguire le prove di purificazione è stata applicata la jonoforesi su carta che si è dimostrata di grande utilità.

Vengono confrontati i principali metodi colorimetrici per la determinazione della morfina e si dà la preferenza alla polireazione Guarino che permette, in maniera semplice, una buona riproduzione dei dati analitici.

A conclusione viene descritto, nei suoi particolari, il metodo da seguire per la determinazione della morfina negli oppi grezzi.

Résumé. — On étudie le comportement soit de la morphine pure soit de celle extraite de l'opium envers les résines à échange d'ions. On a mis tout particulièrement au point une méthode qui permet de fixer, au moyen d'une résine acide faible (Amberlite IRC-50) sodique, la morphine et son élution sélective permettant d'obtenir l'alcaloïde à un très haut degré de pureté.

Pour suivre les essais de purification on s'est servi de la jonophorèse sur papier qui s'est démontrée très utile.

On compare les différentes méthodes colorimétriques pour la détermination de la morphine et on donne la préférence à la polyréaction Guarino qui consent, d'une manière simple, la bonne reproduction des données analytiques.

En concluant on décrit, dans ses détails, la méthode à suivre pour la détermination de la morphine dans les opiums bruts.

Summary. The behaviour both of pure morphine and of opium extracts is studied using ion exchange resins. A method is also proposed for fixing morphine by the use of weakly acidic resins (Amberlite IRC 50), in the form of the sodium salt, and selective elution. This method gives the alkaloid in a high degree of purity.

Paper ionophoresis was found very useful for following the purification.

The principal colorimetric methods for morphine determination are compared, and the GUARINO polyreaction is recommended. This method gives good reproduction of the analytical data in a simple way.

The method to be followed for the determination of morphine in raw opium is described in detail.

Zusammenfassung. — Untersucht wird das Verhalten von reinem Morphin wie auch von Opiumextrakten gegenüber Jonaustauscharzen. Insbesondere wurde ein Verfahren ausgearbeitet, das ermöglicht, mittels eines schwachsauren Natriumharzes (Amberlite IRC-50) Morphin zu fixieren und, mittels seiner selektiven Elution, das Alkaloid in sehr hohem Reinheitsgrad zu erhalten.

Zwecks Verfolgung des Reinheitsgrades wurde die Papier Ionophorese angewendet die sich gut bewährt hat.

Die wichtigsten kolorimetrischen Verfahren zur Bestimmung des Morphins wurden miteinander verglichen und es wurde die Polyreaktion von GUARINO bevorzugt, da sie die analytischen Daten sehr gut reproduziert.

Abschliessend wird im Einzelnen ein Verfahren zur Bestimmung des Morphins in Rohopium beschrieben.

Il problema della determinazione della morfina negli oppi è ancora molto discusso e la letteratura in materia così abbondante che è difficile poterla citare tutta. Ciò è dovuto al fatto che i metodi classici riportati in tutte le Farmacopee non soddisfano sia per la riproducibilità che per l'esattezza dei risultati. I difetti insiti in questi metodi sono soprattutto da ricercarsi in:

a) Perdita di alcaloide nel solvente ed incompleta liberazione dalla calce.

b) L'aggiunta di cloruro di ammonio per la precipitazione della morfina non permette di isolare questa in modo quantitativo, inoltre la temperatura ha una notevole influenza sulla precipitazione dell'alcaloide.

c) I cristalli di morfina ottenuti risultano sempre colorati, il che porta spesso a difficoltà nella titolazione finale.

Per ovviare in parte a questi inconvenienti, viene consigliato l'uso di fattori di correzione arbitrari che, come è logico, non possono dare pieno affidamento data la variabilità degli inconvenienti che influenzano i risultati analitici.

In letteratura si trovano molti metodi che, seguendo principi completamente differenti, tendono ad ottenere migliori risultati. Alcuni si basano sull'isolamento della morfina per precipitazione, altri invece si valgono delle varie reazioni colorate della morfina. Fra i primi, il più notevole per praticità ed attendibilità è quello di MANNICH ⁽¹⁾ che è basato sulla precipitazione della morfina con il cloro-dinitrobenzolo dall'estratto purificato con acetato di piombo. Esso è stato preso in esame recentemente da FISCHER e FOLBERTH ⁽²⁾ che hanno consigliato di far precedere una purificazione dell'estratto a mezzo di allumina « acida ». Quelli colorimetrici hanno il vantaggio di una grande rapidità di esecuzione e di una elevata sensibilità; essi permettono di portare a termine l'analisi su piccoli quantitativi di campione ed eseguire inoltre, sullo stesso, più determinazioni. A questi vantaggi, purtroppo, si contrappone il fatto che le reazioni colorimetriche della morfina difettano tutte, più o meno, di specificità. E' sorto quindi il problema di studiare i metodi di purificazione più idonei per ottenere estratti contenenti la totalità della morfina in uno stato di purezza tale da poter applicare vantaggiosamente una qualsiasi reazione colorimetrica.

Tra i mezzi di purificazione che hanno destato maggiore interesse, vi sono quelli basati sull'impiego delle terre acide e delle resine a scambio di joni. KLEE e KIRSCH ⁽³⁾ adoperano un'estrattore continuo con percolazione su terra florisil ed impiegano come veicolo l'alcool metilico; OBERST ⁽⁴⁾ fissa la morfina su permutite e la determina colorimetricamente sull'eluato alcalino. Molti, infine hanno consigliato l'uso delle resine; e mentre alcuni preferiscono la resine basiche, impiegando naturalmente solventi organici per mantenere in soluzione la base libera, altri invece impiegano resine acide per fissare l'alcaloide, procedendo poi ad una sua eluzione. Uno degli ultimi lavori che riguardano l'impiego delle resine per l'isolamento della morfina è quello di HAMLOW e coll. ⁽⁵⁾. Questi AA. preferiscono l'impiego successivo di due resine; una per liberare la base dai suoi sali, ed una seconda per fissare elettivamente la morfina servendosi della funzione fenolica di questa. L'impiego di questa resina (basica forte) sarebbe di grande utilità ma, come gli stessi AA. riportano, non è così elettiva verso la morfina in quanto il procedimento, applicato agli estratti grezzi di oppio, non fornisce un prodotto finito ad alta purezza, probabilmente per la presenza in questi di altre sostanze con funzione fenolica che si comportano in modo simile alla morfina.

L'impiego di resine acide forti, se da una parte facilita la fissazione della morfina, complica la questione della sua eluzione, in quanto questa non è mai quantitativa. Poche sono state le prove effettuate con le resine acide deboli ed i risultati non sono stati forse ben valutati. Ci è sembrato

quindi opportuno studiare con maggiore profondità il comportamento sia della morfina pura che degli estratti grezzi di oppio verso le resine acide deboli, in vista di elaborare un metodo per separare quantitativamente la morfina dagli estratti di oppio ed ottenerla in uno stato di purezza relativamente elevato.

Come guida analitica in questo lavoro ci è stata di grande aiuto la ionoforesi, già applicata da uno di noi agli estratti di oppio (⁶). Tale tecnica è stata utilizzata con molto vantaggio per seguire le varie fasi della purificazione, specialmente quando ci è stato possibile sviluppare le strisce con la reazione colorimetrica di Guarino. Seguendo tale procedimento, infatti, avevamo potuto notare che negli estratti di oppio erano contenute altre sostanze, oltre la morfina, capaci di dare una reazione colorata con il reattivo di Guarino.

PARTE SPERIMENTALE

COMPORTAMENTO DEL CLORIDRATO DI MORFINA RISPETTO A VARI TIPI DI RESINE.

Si è lavorato sempre con cloridrato di morfina puro, ottenuto per neutralizzazione della base purificata per cristallizzazione dall'alcool. Per la cromatografia sono state usate colonne di 12 mm di diametro interno con giunti a smeriglio per facilitare il carico e scarico delle frazioni.

Sono state impiegate:

a) Resina basica forte IRA-400 sotto forma cloridrica. (Una certa quantità di resina, posta in beuta, è stata saturata con HCl N/1 e lavata per decantazione fino a reazione neutra).

b) Resina basica debole IR-4B.OH, lavata per decantazione e poi in colonna con acqua distillata fino a reazione neutra.

c) Resina acida debole IRC-50 sotto forma sodica. (La resina è stata salificata in beuta con un eccesso di NaOH N/1, tenendola in contatto per 30', lavata quindi per decantazione, lavaggio che è stato continuato in colonna fino a reazione neutra) (*).

Per tutte le resine è stato impiegato uno strato di 4 cm di spessore e su ciascuna colonna sono stati fatti passare 20 cm³ di soluzione di clo-

(*) Tutte le resine, della serie « Amberliti » sono prodotte dalla Rohm e Haas Co. di Philadelphia (U.S.A.). Sono state fornite di purezza « grado analitico » dalla Ditta E. Mela e Co. di S. R. Kunkl - Genova, Piazza S. Marcellino 6-5.

ridrato di morfina contenenti 28 mg di base anidra; tutte le colonne sono poi state lavate con acqua bollita fino a raccogliere 50 cm³ esatti di filtrato. Tutti i passaggi su colonna sono stati effettuati per scolamento naturale (senza depressioni).

Su 2 cm³ della soluzione di partenza e su 5 cm³ dei singoli eluati è stata effettuata la reazione colorimetrica di Guarino, leggendo gli assorbimenti con uno spettrofotometro Unicam SP 500. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella I.

TABELLA I

	B ₅₂₀	mg morfina base
Soluzione di partenza	0,346	2,80
Dopo passaggio su IRA-400.HCl	0,350	2,85
Dopo passaggio su IR-4B.OH	0,348	2,80
Dopo passaggio su IRC-50.Na	—	—

Come si può constatare da questa prima prova il cloridrato di morfina in soluzione acquosa passa totalmente sia sulla resina basica forte cloridrica sia attraverso la resina basica debole libera, mentre viene trattenuta dalla resina acida debole sodica. Queste prove sono state eseguite in quanto la resina basica forte cloridrica ha una notevole capacità di scambio verso i sali degli acidi deboli e, sotto questa forma, si poteva pensare che potesse essere adatta a depurare gli estratti vegetali di tutti i radicali acidi organici cedendo una quantità equivalente di cloro-joni. La resina basica debole è stata saggiata in vista di una possibile neutralizzazione di tracce di acidi liberi che avrebbero impedito un successivo trattamento di assorbimento sulla resina acida debole sodica. L'IRC-50, infine, è stata presa in esame in quanto ci interessava fissare debolmente la morfina in vista di una sua possibile eluzione totale. Mentre sotto forma acida questa resina non è capace di trattenere la morfina, qualora questa si trovi sotto forma di cloridrato, la sua forma sodica è capace di fissare totalmente l'alcaloide, purchè naturalmente la soluzione sia perfettamente neutra. Quanto abbiamo potuto constatare è in contrasto con quanto affermato da HAMLOW e coll. (5) i quali però hanno eseguito le loro esperienze con il solfato di morfina.

PROVE DI ELUZIONE DELLA MORFINA FISSATA SULLA RESINA IRC-50.Na.

Una volta riscontrata la possibilità di fissare la morfina sulla resina acida debole ci siamo preoccupati di seguire l'andamento del suo recupero per mezzo di vari solventi. Durante l'eluzione sono state raccolte frazioni di 25 cm³ e su queste è stata determinata la morfina per via colorimetrica. Gli eluenti sperimentati sono stati:

- a) Tampone acetato a pH=4.
- b) Tampone glicocollo—HCl a pH=2.
- c) Acido acetico M.
- d) Acido cloridrico N/10.

Mentre il tampone acetato ed il tampone alla glicocollo eluiscono la morfina solo in parte, anche arrivando a raccogliere 500 cm³, con acido acetico M. e con acido cloridrico N/10 i recuperi sono stati totali impiegando 250 cm³ per il primo e 200 cm³ per il secondo. Ciò è chiaramente rappresentato dalla Tabella II e dal grafico che da essa è stato ricavato (fig. 1).

TABELLA II

Eluzione della morfina dalla IRC-50.Na con HCl N/10 ed acido acetico M.

Frazioni di 50 cm ³	Con HCl N/10	Con HAc. M.
I	mg 23,40	mg 19,90
II	» 4,30	» 5,40
III	» 0,45	» 2,10
IV	—	» 0,51
V	—	—
Totale	mg 28,15	mg 27,91

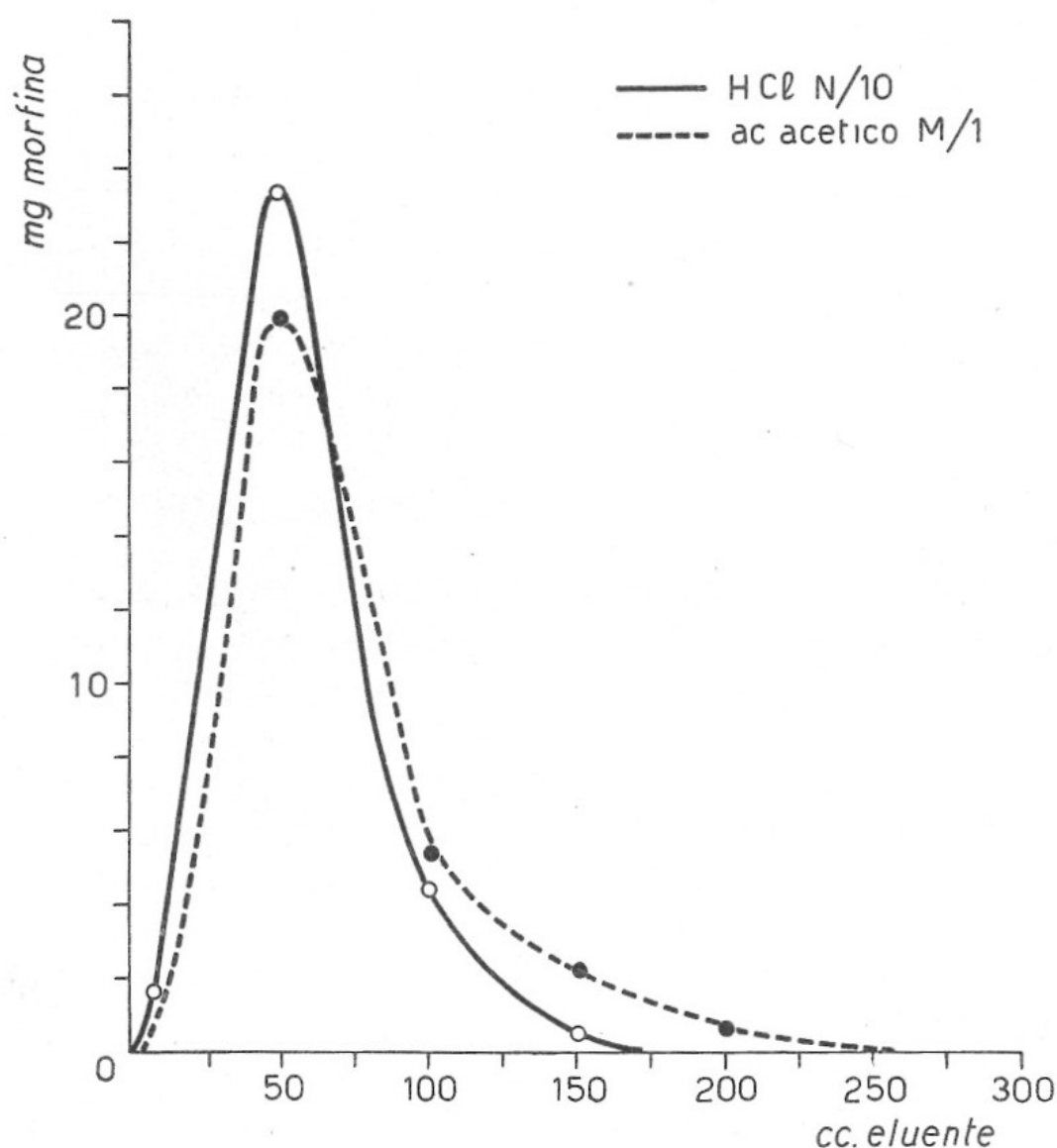


Fig. 1.

COMPORTAMENTO DEGLI ESTRATTI DA OPIO RISPETTO ALLE RESINE.

Per seguire il comportamento degli estratti da oppio rispetto alle stesse resine è stata utilizzata una miscelanza di vari campioni di oppio delle più svariate provenienze. Gli estratti sono stati eseguiti sempre seguendo il metodo di EDER e WÄCKERLIN (⁷), apportandovi lievi varianti e neutralizzando l'estratto esattamente con HCl prima di portarlo a volume con acqua.

L'estratto è stato fatto passare prima su una colonna di IRA-400.HCl e poi su una colonna composta di un primo strato di 1 cm di IR-4B.OH e di un secondo di 4 cm di IRC-50.Na

L'effetto della prima colonna non è stato molto evidente: la morfina passa nell'eluato che viene a decolorarsi soltanto leggermente. Più interessante è invece il comportamento con la seconda colonna. Nello strato superiore della IRC-50 viene fissata la maggior parte del pigmento naturale dell'oppio, insieme alla totalità della morfina, mentre nell'eluato, colorato in giallo chiaro, è stata riscontrata la presenza di sostanze riducenti fenoliche capaci di reagire positivamente con il reattivo di Folin e con l'acido jodico.

Tale eluato è stato quindi sottoposto a prove analitiche su cui verrà riferito in seguito.

ELUZIONE DELLA MORFINA FISSATA SULLA IRC-50.Na.

Era ovvio che l'eluazione totale della morfina potesse essere condotta con HCl N/10, pertanto le prime prove da noi condotte sono state eseguite con questo eluente. E' stato però osservato che in questo caso l'eluazione troppo energica trasportava insieme all'alcaloide anche i pigmenti che si erano fissati alla sommità della colonna. La soluzione cloridrica della morfina, così ottenuta, si è presentata leggermente colorata in giallo e, per effetto della luce e dell'aria, in poche ore si trasformava in una soluzione rosata.

Migliori risultati sono stati invece ottenuti con l'eluazione a mezzo di acido acetico molare. In queste condizioni, mentre si riesce ad eluire la totalità della morfina fissata sulla colonna, sulla sommità di questa rimangono fissati i pigmenti e la soluzione acetica ottenuta si presenta perfettamente incolore, anche dopo lunga esposizione alla luce e all'aria.

Una volta seguito il comportamento dell'estratto dall'oppio rispetto alla resina IRC-50.Na, abbiamo voluto studiare un metodo di depigmentazione da far precedere all'assorbimento sulla resina acida debole per poterlo sostituire al trattamento di doppio scambio con la resina basica

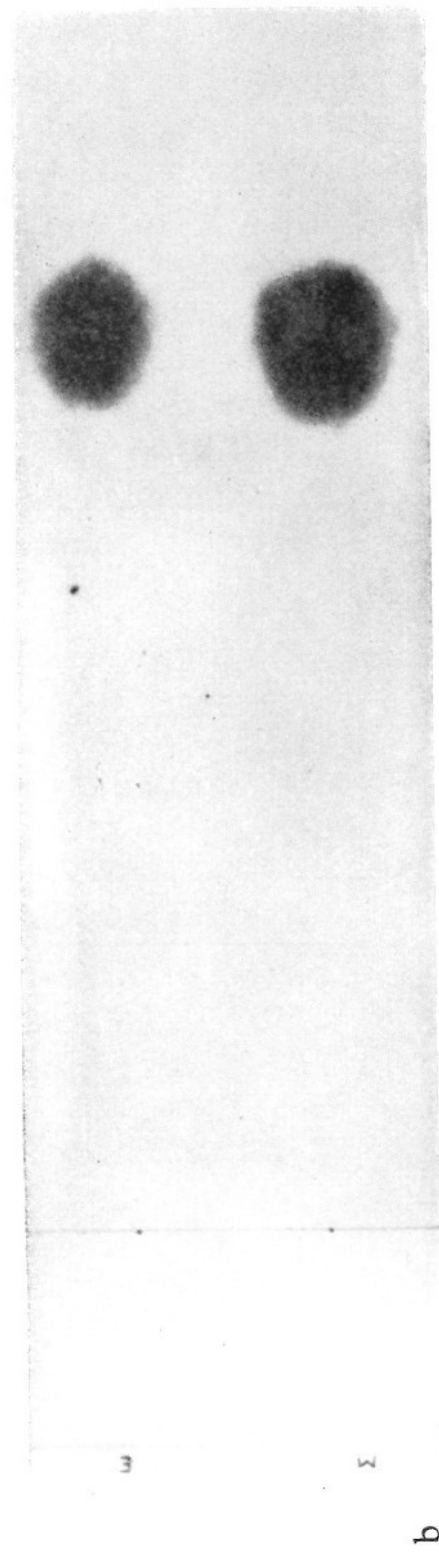
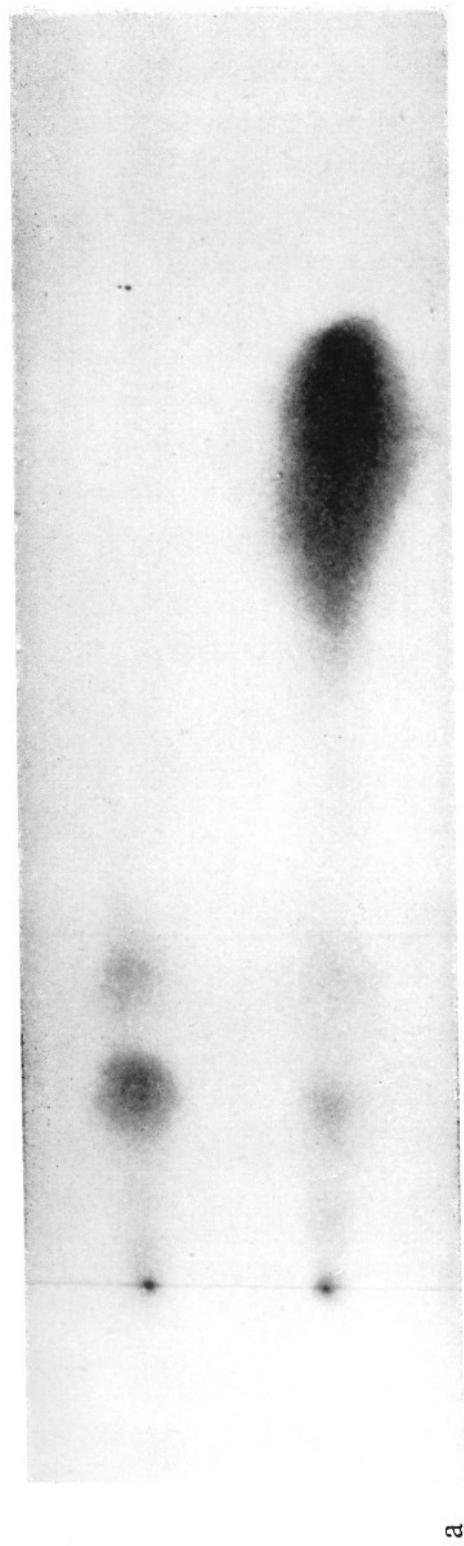
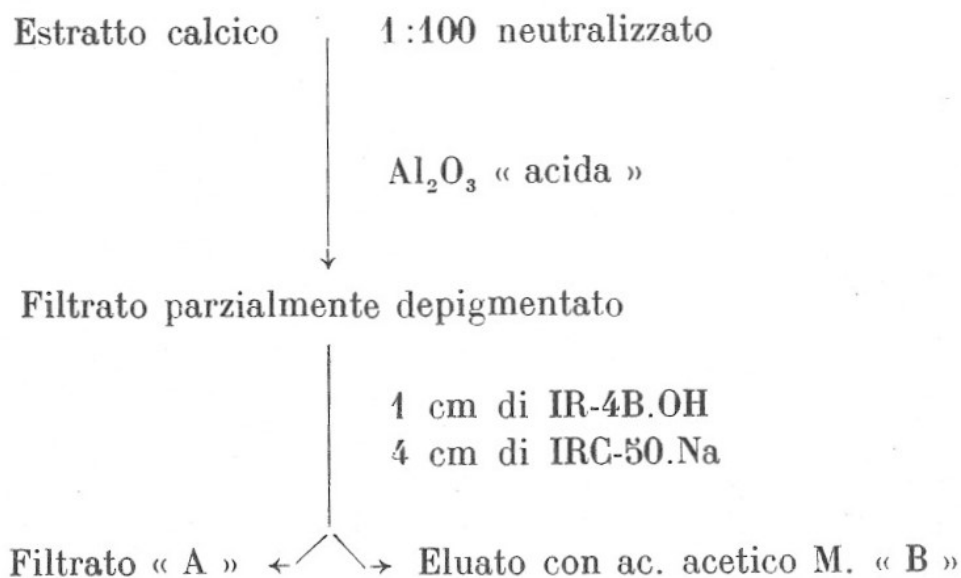


Fig. 2. - Jonoforesi su carta: a) filtrato « A » confrontato con l'estratto calcico; b) eluato con acido acetico confrontato con morfina pura. Sviluppo con polireazione Guarino.

cloridrica che, come abbiamo detto, non ha dato buoni risultati per l'allontanamento dei pigmenti naturali.

Per tale operazione abbiamo effettuato prove con allumina « acida », secondo quanto recentemente consigliato da FISCHER e coll. ⁽²⁾. I risultati sono molto soddisfacenti in quanto abbiamo potuto subito notare che trattando l'estratto calcico neutralizzato con una colonna di 6 cm di allumina « acida », una gran parte dei pigmenti viene trattenuta sotto forma di due anelli ben visibili e che si mantengono pressochè immobili anche con un abbondante lavaggio con acqua. La morfina invece passa molto facilmente attraverso la colonna e può essere recuperata totalmente dopo pochi lavaggi.

Una volta constatato che l'allumina « acida » era utile ad una prima depigmentazione dell'estratto, abbiamo adottato questo metodo di purificazione prima di passare l'estratto sulla colonna di IRC 50 sodica, che avrebbe poi fissato la morfina ed i rimanenti pigmenti. Abbiamo pertanto seguito il seguente schema di trattamento:



Il filtrato « A », che, come abbiamo detto sopra, contiene sostanze riducenti fenoliche, è stato sottoposto a varie prove analitiche:

a) Con acido iodico, in ambiente acido, dà una debole colorazione rossa che si attenua con aggiunta di bicarbonato, ma che imbrunisce per successiva aggiunta di cloruro ferrico.

b) Dà reazione positiva con il reattivo di Folin Ciocalteu.

c) Concentrato nel vuoto e sottoposto ad elettroforesi su carta non presenta nessuna traccia di morfina, mentre rivela la presenza di almeno due componenti rilevabili con la polireazione Guarino, componenti che

sono facilmente riscontrabili nell'estratto calcico iniziale sottoponendolo a medesimo trattamento elettroforetico (fig. 2-a).

L'eluato « B » con acido acetico dalla colonna di IRC-50.Na, privato delle ultime tracce di pigmenti che in questo modo vengono trattenuti sulla colonna, si presenta perfettamente limpido ed incolore. Il suo spettro nell'U.V., come si può vedere nella fig. 3, si avvicina moltissimo a quello della morfina pura, il cui spettro di assorbimento è riportato per confronto. Sottoposto ad elettroforesi, lo stesso eluato ha mostrato che non vi sono altre sostanze, oltre la morfina, rilevabili con la reazione di Guarino (fig. 2-b). Interessante è da notare infine che su questo estratto purificato abbiamo trovato valori identici di contenuto in morfina sia applicando la reazione colorimetrica di Guarino, sia quella colorimetrica alla nitrosazione, sia infine con il reattivo di Folin, anche quindi con reattivi non specifici per la morfina.

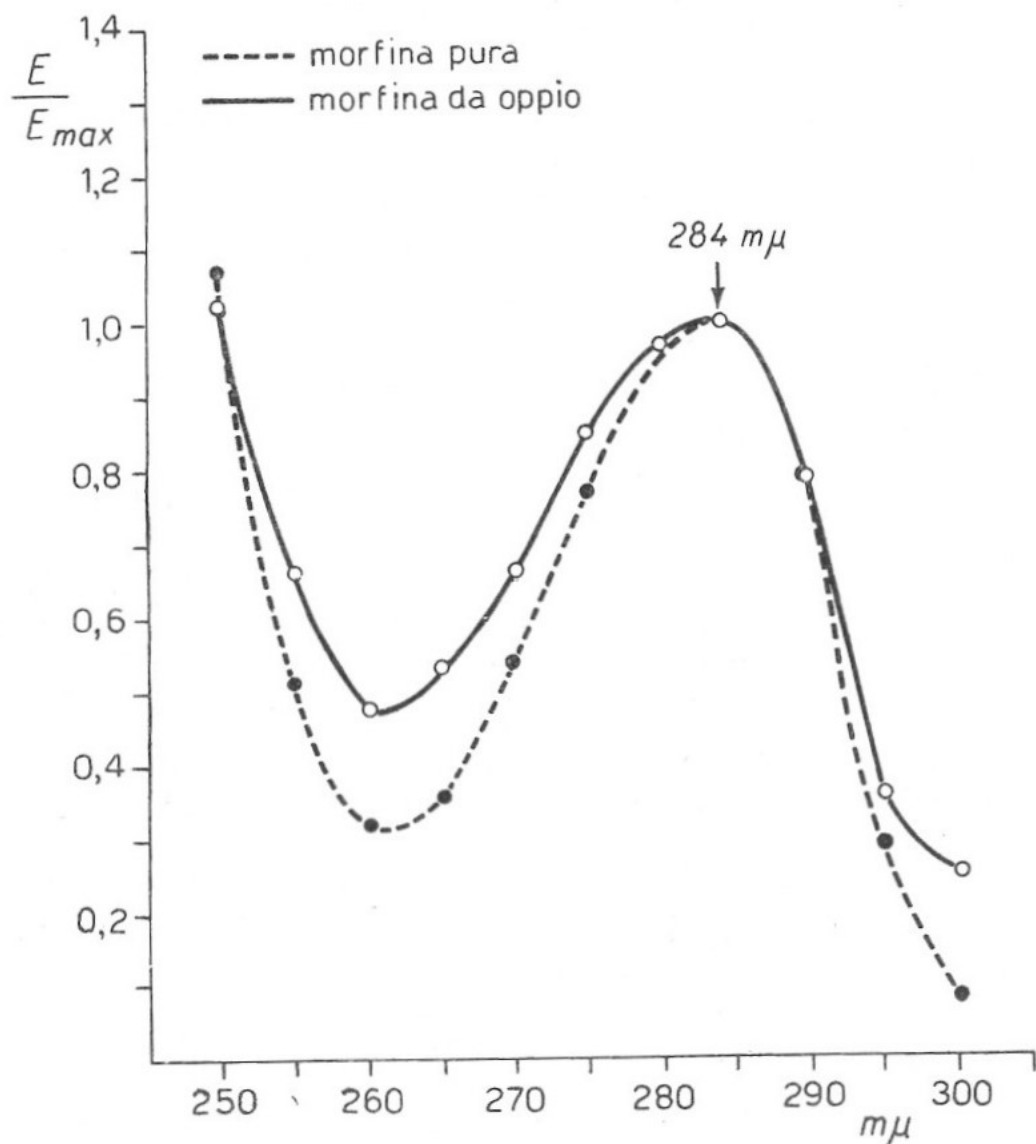


Fig. 3. - Spettro di assorbimento nell'U. V. dell'estratto purificato confrontato con quello della morfina pura.

CONFRONTO FRA I PRINCIPALI METODI COLORIMETRICI PER LA DETERMINAZIONE DELLA MORFINA.

La morfina fornisce varie reazioni colorate, alcune delle quali sono state applicate per la sua determinazione quantitativa. Tutte però mancano della assoluta specificità; inoltre alcune richiedono condizioni ben definite per ottenere risultati riproducibili.

Passando in rassegna le più note, troviamo per prima la reazione di nitrosazione di RADULESCU ⁽⁸⁾ che è stata accettata dalla Farmacopea inglese per il saggio di alcune preparazioni a base di oppio ⁽⁹⁾. Essa è di semplice esecuzione, specialmente se condotta secondo le più recenti varianti proposte da ADAMSON e HANDISYDE ⁽¹⁰⁾. Ma, come questi AA. stessi affermano, la reazione viene disturbata da molte altre sostanze, specialmente a funzione fenolica.

Altra reazione classica è quella di FOLIN CIOCALTEU, comune non soltanto alle sostanze fenoliche riducenti, ma a molte altre sostanze. Inoltre questa reazione, pur essendo tra le più sensibili, richiede circa 12 ore per raggiungere il massimo, e quindi la stabilità, del colore prodotto.

Interessante è la diazoreazione, messa a punto da LAUTENSCHLAGER ⁽¹¹⁾, che però, oltre ad essere anche essa poco specifica, ha una limitata sensibilità.

Vengono quindi le reazioni a catena, che hanno più alta specificità. Per mezzo di tali reazioni la morfina, in ambiente acido, viene fatta reagire con acido jodico, dopo un certo tempo si alcalinizza con carbonato sodico o di ammonio e, in ambiente alcalino, si aggiungono poche gocce di una soluzione diluita di un sale di ferro o di nickel.

L'impiego del cloruro ferrico, proposto da GUARINO ⁽¹²⁾, produce una colorazione violetta; il procedimento analitico per la determinazione quantitativa è stato studiato da DREVON e LAFFITTE ⁽¹³⁾ e da uno di noi ⁽¹⁴⁾, mentre l'impiego del cloruro di nickel, proposto da CRAMER e VOERMAN ⁽¹⁵⁾ ed ultimamente da PRIDE e STERN ⁽¹⁶⁾, produce una colorazione verde.

Tra le due reazioni consigliamo ancora quella al cloruro ferrico, perchè quella al cloruro di nickel, come gli stessi AA. affermano, deve essere condotta a pH ben stabiliti, sia nel primo stadio quando si fa reagire l'acido jodico, sia nell'ultimo quando si aggiunge il reattivo al nickel.

La reazione con il cloruro ferrico, specialmente se eseguita alcalinizzando con bicarbonato sodico invece che con carbonato di ammonio, dà una riproducibilità perfetta forse perchè aggiungendo un eccesso di bicarbonato, si riesce a portare il mezzo al pH più idoneo (quello del bicarbonato sodico saturo) alla seconda fase della reazione.

Per quanto riguarda la specificità delle due reazioni, non abbiamo

approfondito la questione. Interessa soltanto qui ricordare che il filtrato ottenuto dopo la fissazione della morfina sulla colonna di IRC-50.Na dà colorazione sia con il reattivo al cloruro ferrico sia con quello al cloruro di nikel; con quest'ultimo anzi è da notare che si ottiene un colore giallo bruno il cui assorbimento è molto simile a quello riportato da PRIDE e STERN per la pseudo-morfina.

PROCEDIMENTO ANALITICO PROPOSTO PER LA DETERMINAZIONE DELLA MORFINA NEGLI OPPI.

Dopo quanto abbiamo esposto ci sembra utile riportare in dettaglio il procedimento analitico da noi proposto che, applicato a vari campioni di oppio, ha dato valori concordanti con quelli ottenuti con il metodo di MANNICH modificato da FISCHER e FOLBERTH ⁽²⁾, ossia precipitando la morfina dopo purificazione dell'estratto con allumina « acida ».

Triturare g 1 di oppio con cura in un mortaio di circa 30 cm³ di capacità con superficie interna ruvida, aggiungendo 1 cm³ di acqua fino ad avere una pasta omogenea nella quale non si vedano più particelle. Mescolare questa pasta con 1 cm³ di acqua e g 0,4 di ossido di calcio idrato esente da carbonati. Triturare con cura ed aggiungere gradualmente 3 cm³ di acqua. Passare il contenuto del mortaio in un tubo da centrifuga e centrifugare a media velocità; intanto lavare pestello e mortaio con 7 cm³ di acqua.

Dopo centrifugazione, filtrare il liquido in un pallone da 100 cm³, mettere nel tubo la nuova frazione di lavaggio, mescolare bene con una bacchettina di vetro e centrifugare di nuovo. Ripetere l'operazione di lavaggio 5 volte sempre con 7 cm³ di acqua. Quando nel pallone sono state filtrate tutte le frazioni, neutralizzare il liquido con acido cloridrico N/4 (ne occorrono circa 2,6 - 2,7 cm³, saggiare alla teca). Portare quindi a volume con acqua.

Passare 50 cm³ di questo estratto attraverso la colonna di allumina « acida » (*) di 7 cm di altezza e, lavando con acqua, raccogliere 100 cm³ di filtrato. Passare 50 cm³ di questo estratto purificato attraverso una colonna di 4 cm di IRC-50.Na con sopra uno strato di 1 cm di IR-4B.OH. Eliminare il filtrato ed eluire la morfina percolando con acido acetico molare fino a raccogliere esattamente 250 cm³.

Prelevare 10 cm³ di percolato in un palloncino da 50 cm³, aggiungere 1 cm³ di acido cloridrico N/4, poi 1 cm³ di acido jodico al 10%, attendere un minuto e portare quindi a segno con soluzione satura di bicar-

(*) Abbiamo impiegato allumina « acida » per cromatografia della Ditta Carlo Erba.

bonato sodico (attenzione all'effervescenza). Dopo due minuti aggiungere tre gocce di soluzione di cloruro ferrico 1:500, agitare e lasciare in riposo per 60'.

Eseguire la lettura colorimetrica a 520 m μ rispetto ad una prova in bianco senza aggiunta di acido jodico.

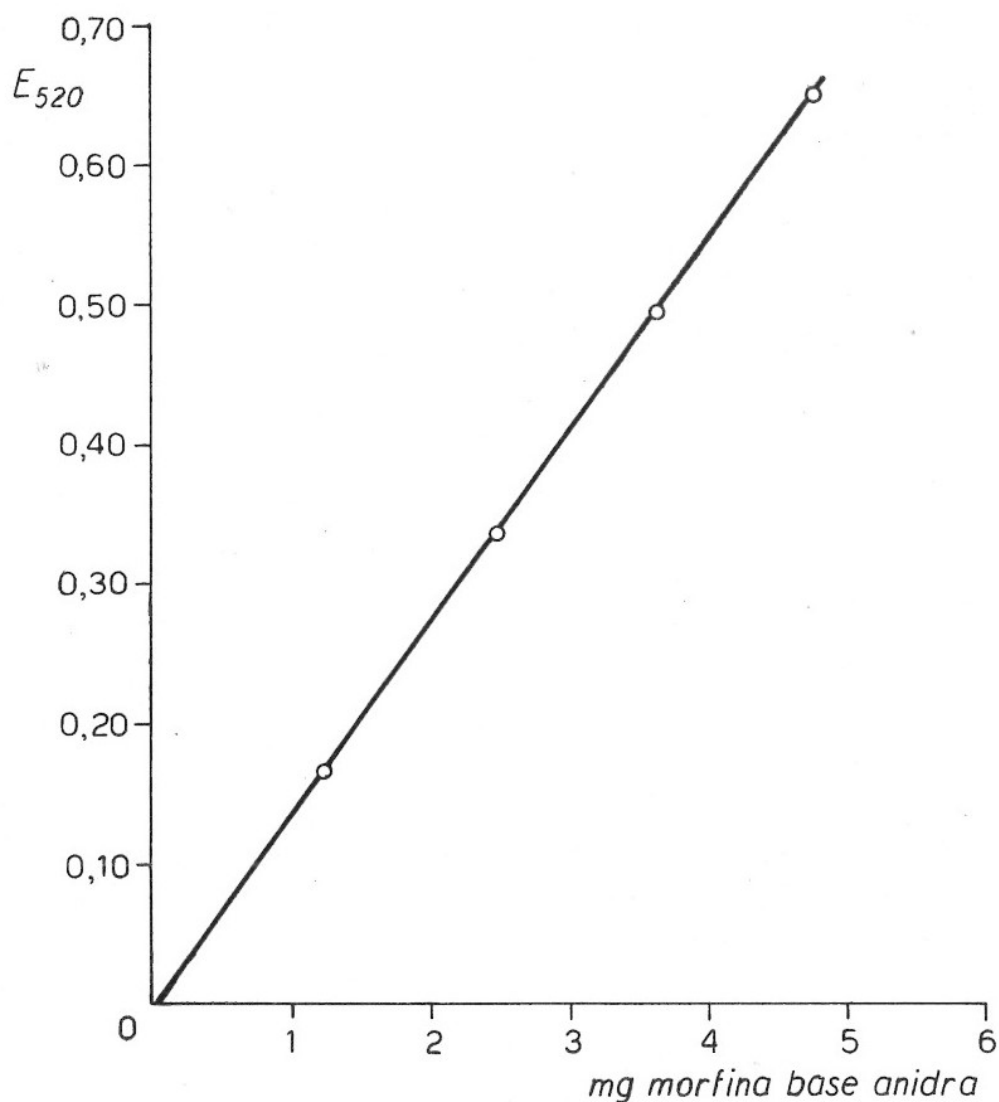


Fig. 4. - Grafico per la determinazione colorimetrica della morfina.

Usando uno spettrofotometro ad alto potere di risoluzione (Beckman DU od Unicam SP 500) e vaschette di 1 cm di spessore, il grafico per la determinazione della morfina base anidra è quello riportato nella fig. 4.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MANNICH C. - Arch. pharm., 280: 336 (1942).
 - (²) BÖHME H., STROHECKER R. - Arzneimittelf., 3: 468 (1953); FISCHER R., FOLBERTH K. - Arzneimittelf., 5: 66 (1953).
 - (³) KLEE F. C., KIRSCH E. - J. Am. Pharm. Ass. Sc. Ed., 42: 146 (1953).
 - (⁴) OBERST F. W. - J. Lab. Clin. Med., 24: 348 (1938).
 - (⁵) HAMLOW E. E., DEKAY H. G., RAMSTAD E.: J. Am. Pharm. Ass. Sc. Ed., 43: 460 (1954).
 - (⁶) MARIANI A. - Pharm. Weekblad, 90: 425 (1953).
 - (⁷) EDER R., WÄCKERLIN E.: Quart. Journ. of Pharmacy and Pharmacology, 10: 680 (1937).
 - (⁸) RADULESCU - Bull. Soc. Sc. Bucuresti, 14: 602 (1903).
 - (⁹) British Pharmacopoeia, 379 (1953).
 - (¹⁰) ADAMSON D. C. M., HANDISYDE E. F. P. - Quart. Journ. of Pharmacy and Pharmacology, 19: 350 (1946).
 - (¹¹) LAUTENSCHLÄGER L. - Arch. der Pharmazie, 257: 13 (1949).
 - (¹²) GUARINO S. - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 20: 754 (1945); Arch. Soc. Biol., 31: 115 (1946); Boll. Soc. It. Biol. Sper., 22: 1226 (1947); Bull. Soc. Chim. Biol., 29: 548 (1947).
 - (¹³) DREVON B., LAFFITTE G. - Ann. Pharm. Franc., 7: 759 (1949); 8: 661 (1951).
 - (¹⁴) MARIANI A., GUARINO S., MARIANI-MARELLI O. - Annali di Chimica, 41: 661 (1951).
 - (¹⁵) CRAMER Y. S. N., VOERMAN J. G. - Pharm. Weekblad, 84: 129 (1949).
 - (¹⁶) PRIDE R. R. A., STERN E. S. - Journ. Pharm. Pharmacology, 6: 590 (1954).
-