

45. Giuseppe PRUNER. — Microdeterminazione ceriometrica della morfina nell'oppio. (*)

Riassunto. — Viene descritto un micrometodo di determinazione della morfina, basato sull'ossidazione della stessa con ferricianuro di potassio e seguente titolazione del ferrocianuro che si forma nella reazione, con solfato di cerio N/200.

Lo stesso principio viene applicato nella determinazione della morfina nell'oppio, dopo che è stata liberata dalle sostanze riducenti che l'accompagnano, per mezzo dell'estrazione con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, defecazione con acetato di piombo e trattamento con etere solforico.

Sono stati esaminati 10 campioni diversi di oppio e confrontati i risultati con quelli ottenuti col metodo di MANNICH.

Résumé. — On décrit une méthode de micro-détermination de la morphine, basé sur l'oxidation de celle-ci avec du ferricyanure de potassium et titrage du ferricyanure formé pendant la réaction avec du sulfate de cérium N/200.

Ce même principe est appliqué dans la détermination de la morphine dans l'opium, après avoir été privée des substances réduisantes qui l'accompagnent, au moyen de l'extraction par $\text{Ca}(\text{OH})_2$, défécation avec l'acétate de plomb et traitement avec l'éther sulfurique.

On a examiné 10 échantillons divers d'opium et comparé les résultats avec ceux obtenus par la méthode Mannich.

Summary. — A micromethod for the determination of morphin has been described, based on the oxydation of the same with potassium ferricyanid and following determination of the ferrocyanid, which has been formed in the reaction, with N/200 ceric sulfate.

The same method is applied for the determination of morphin in opium, after it has been freed from reducing substances, by means of extraction with $\text{Ca}(\text{OH})_2$, defecation with lead acetate and treatment with sulphuric ether.

Ten various samples of opium have been analysed and the results compared with those obtained with the method of Mannich.

Zusammenfassung. — Es wird ein Mikroverfahren zur Morphinbestimmung beschrieben, das auf der Oxydation des Morphins mittels Ka-

(*) Lavoro comunicato al XIV Congresso Internazionale di Chimica pura ed applicata - Zurigo, luglio 1953.

liumferricyanid und anschliessender Titration des sich in der Reaktion bildenden Kaliumferrocyanid beruht. Die Bestimmung desselben erfolgt mittels Cer (IV) sulfatlösung N/200.

Auf dasselbe Prinzip beruht die Bestimmung des Morphins im Opium, nachdem es von den Nebenalkaloiden und reduzierenden Begleitstoffen befreit wurde und zwar mittels der Extraktion mit Ca(OH)_2 , und der Reinigung des Opiumextraktes mit Bleiacetat und Schwefeläther.

Es wurden 10 Opiumsorten verschiedener Herkunft untersucht und die Ergebnisse mit denen der Mannich-Methode verglichen.

Come è noto esistono numerosi metodi per la determinazione della morfina nei preparati farmaceutici e soprattutto nell'oppio.

Per quello che a me risulta, nessun metodo fin oggi studiato è fondato sulla ceriometria e cioè sull'ossidazione della morfina con ferricianuro e determinazione del ferrocianuro che si forma nella reazione, con solfato di cerio; pertanto ho ritenuto utile di studiare l'applicazione di detto principio, sia nella determinazione della morfina pura, come della morfina nell'oppio, al fine soprattutto di ottenere un metodo semplice, rapido e per quanto possibile preciso.

La presente nota è divisa in due parti: la prima tratta la microdeterminazione ceriometrica della morfina pura e la seconda, quella della morfina nell'oppio.

I. - MICRODETERMINAZIONE CERIOMETRICA DELLA MORFINA.

Il comportamento della morfina all'ossidazione con ferrocianuro venne studiato per la prima volta dal farmacista tedesco KIEFFER nel 1857 ⁽¹⁾.

Non esistono metodi utili di determinazione ossidimetrica della morfina, in quanto l'ossidazione di questo alcaloide, anche con ossidanti leggeri, come i ferricianuri in ambiente alcalino, non ha andamento stechiometrico, ma procede più o meno profondamente a seconda delle condizioni; solo quando si opera con quantità equimolecolare di ferricianuro si forma l'ossidimorfina ⁽²⁾.

Traendo motivo da mie precedenti ricerche fatte sulla vitamina B₁ ⁽³⁾, sul glucosio nel sangue ⁽⁴⁾, e l'idrazide dell'acido isonicotinico ⁽⁵⁾, ho voluto applicare lo stesso principio alla morfina che in determinate condizioni dà dei risultati perfettamente riproducibili.

Ciò si ottiene, ad es., ossidando a temperatura ambiente 1 mg di

morfina con 1 cm³ di ferricianuro di potassio all'1% in 5 cm³ di soluzione tampone di pH 10. Dopo 10 minuti si acidifica con 2 cm³ di acido cloridrico e si titola il ferrocianuro formatosi con soluzione N/200 di solfato di cerio in presenza di ferroina come indicatore. La seguente figura n. 1, mostra l'andamento della curva di ossidazione in rapporto al tempo di reazione della morfina col ferricianuro.

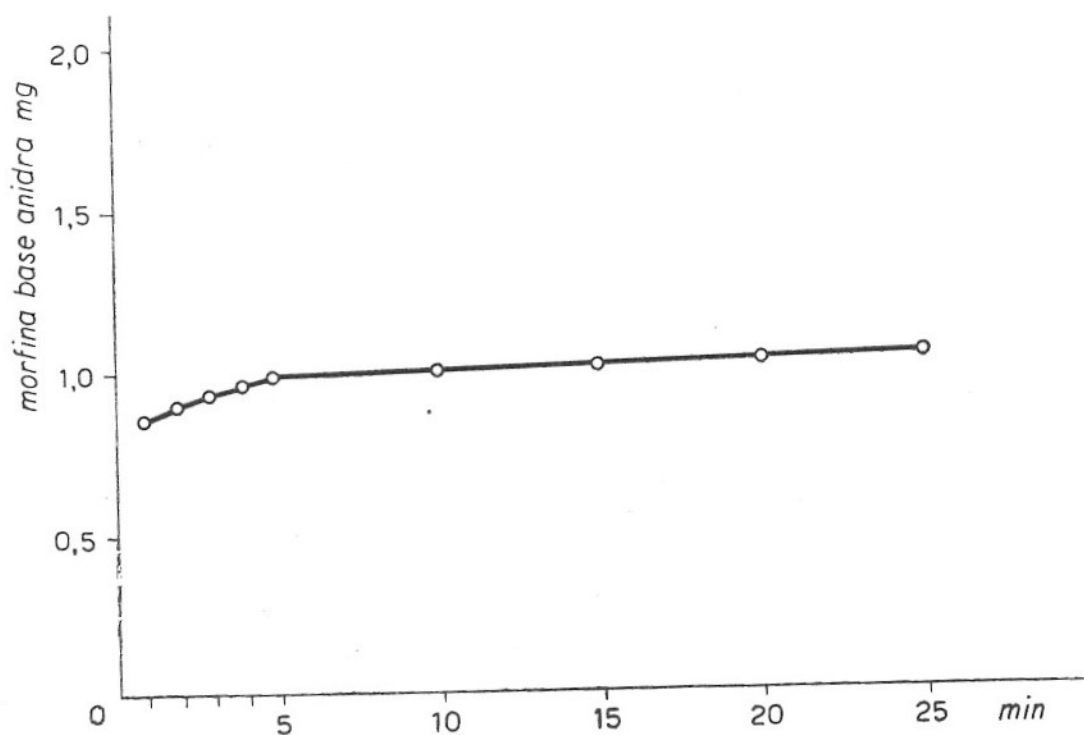


Fig. 1. - Dipendenza del risultato dal tempo di reazione della morfina col $K_3Fe(CN)_6$

Nel primo minuto la reazione è rapida, nei successivi 4 minuti si rallenta, per procedere più lenta ancora dopo i 5 minuti. Determinando la morfina dopo 10 minuti nelle condizioni indicate, gli equivalenti di ossidazione sono esattamente 3,5. Se l'ossidazione non viene arrestata, mediante acidificazione, dopo i 10 minuti, si osserva un continuo graduale aumento della morfina ossidata, corrispondente a μg 8 per ogni 5 minuti di tempo di ossidazione.

Un'altra condizione è quella di operare su una quantità di morfina non superiore ad 1 mg; con quantità superiori non si coglie più bene il viraggio dell'indicatore, a causa dell'azione riducente esercitata dalla morfina ossidata sul complesso ferrico dell'o-fenantrolina.

Le quantità più idonee vanno da mg 0,20 a 0,60 di morfina base, o quantità equivalenti di sale di morfina. Gli esperimenti sono stati eseguiti specialmente con morfina base.

PARTE SPERIMENTALE

Reagenti e soluzioni occorrenti:

1) Soluzione di solfato di cerio $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ N/200.

Si sciolgono g 1,10 circa di sale in un matraccio tarato da 500 cm³ in 250 cm³ circa di acqua, alla quale sono stati aggiunti cm³ 14 di acido solforico conc. e dopo completa soluzione si porta a segno.

2) Soluzione di ferrocianuro di potassio anidro N/200.

Serve per la titolazione della soluzione di solfato di cerio e si prepara volta per volta, sciogliendo g 0,3683 esatti di sale in 200 cm³ di acqua distillata.

Per la titolazione: 8 cm³ di detta soluzione, si acidificano con 2 cm³ di acido cloridrico (soluzione 6) e si titolano, facendo defluire da una semimicroburetta da 10 cm³ la soluzione di $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ N/200 in presenza di 3 gocce di ferroina (soluzione 5), il cui viraggio dal rossoarancio al verde giallo è molto preciso.

3) Soluzione di ferricianuro di potassio all'1%.

4) Soluzione tampone:

Fosfato bisodico dodecaidrato	g 8,325
Fosfato monopotassico	g 1,415
Carbonato di sodio secco	g 4,285
Acqua distillata q.b. a	cm ³ 1000

5) Soluzione dell'indicatore (ferroina) 0,025 M

Si prepara sciogliendo g 0,406 di cloridrato di o-fenantrolina e g 0,174 di solfato ferroso crist. in cm³ 25 di acqua distillata. Di questa soluzione madre, si preleva 1 cm³ che si porta con acqua a cm³ 20; la soluzione così diluita si conserva in flacone contagocce.

6) Acido cloridrico (HCl conc. p. 50 in volume, H₂O p. 50).

DESCRIZIONE DEL METODO

Si sciolgono in 100 cm³ di soluzione tampone 20 mg esattamente pesati di morfina base anidra (P.M. 285,33). In 5 tubetti di vetro bianco da 95/6 mm circa si misurano 1-3 cm³ della soluzione, corrispondenti a mg 0,20 - 0,60 di morfina e si portano a 5 cm³ con soluzione tampone, quindi si immette in ogni tubetto 1 cm³ di soluzione di ferricianuro

all'1%. Trascorsi 10 minuti si aggiungono in ogni tubetto, mediante una buretta, 2 cm³ di acido cloridrico e si titola la miscela con Ce(O₄)₂ N/200, in presenza di 3 gocce di ferroina.

Il contenuto di morfina in 5 cm³ di soluzione in esame si desume dalla seguente formula:

$$M = \frac{Ce - 0,10}{2,454}$$

dove: Ce rappresenta i cm³ della soluzione di solfato di cerio; 0,10 cm³ è il volume costante che si consuma nella prova in bianco; 2,454 sono i cm³ di solfato di cerio N/200 corrispondenti ad 1 mg di morfina base.

I risultati ottenuti che rappresentano la media di diverse determinazioni, sono raccolti nella seguente tabella n. 1.

TABELLA I.

Morfina base data mg	Morfina base trovata mg	Differenze %
0,60	0,590	— 1,67
0,50	0,499	— 0,20
0,40	0,398	— 0,50
0,30	0,302	+ 0,60
0,20	0,203	+ 1,60
	Media:	± 0,91

II. - DETERMINAZIONE DELLA MORFINA NELL'OPPIO.

I metodi di determinazione della morfina nell'oppio pubblicati fino ad oggi, sono numerosissimi, ciò che dimostra le grandi difficoltà che accompagnano i vari tentativi di separare quantitativamente la morfina dagli altri alcaloidi e sostanze dell'oppio.

Uno sguardo panoramico sullo sviluppo della determinazione della morfina nell'oppio negli ultimi 30 anni, si trova nel lavoro di VOLLMER (5).

Un più recente lavoro sull'argomento è stato pubblicato da C. VAN PINXTEREN e G. SMEETS (7). In fine, una descrizione particolareggiata dei metodi più recenti e accreditati, si trova in un recente trattato di F. GSTIRNER (8).

Si tratta in genere di metodi, i più recenti cromatografici, che richiedono per la loro esecuzione molto tempo, materiale, apparecchi speciali ed un'abilità analitica non indifferente. Uno dei metodi più accreditati è quello di MANNICH ⁽⁹⁾, che si è dimostrato fino ad oggi nella pratica il più semplice e razionale rispetto alla raggiungibile esattezza. Esso si basa sulla trasformazione della morfina con clorodinitrobenzolo nell'etere dinitrofenilico difficilmente solubile che viene determinato sia per pesata che per titolazione. Questo metodo ha subito negli ultimi anni varie modifiche, da parte di BAERHEIM SVENDSEN A. e DROTTNING AARNES E. ⁽¹⁰⁾; FISCHER e FOLLBERTH ⁽¹¹⁾; DANN e WIPPERN ⁽¹²⁾ e AWE e REINECKE ⁽¹³⁾.

Come metodo di confronto ho preferito il più semplice metodo originale di MANNICH.

Il procedimento da me studiato si basa sul seguente principio: estrazione completa della morfina, mediante ripetuti trattamenti dell'oppio con acqua di calce. Defecazione dell'estratto con acetato di piombo che non precipita solamente l'acido meconico, i solfati ed altre sostanze estrattive dell'oppio, bensì anche una parte degli alcaloidi secondari. Estrazione delle ultime sostanze riducenti estranee, dal liquido defecato, con etere solforico privo di perossidi ed aldeidi. In fine, determinazione della morfina secondo il metodo ceriometrico descritto.

La seguente figura n. 2 mostra l'influenza della quantità di acetato di piombo sul risultato. Questo esperimento venne eseguito con un campione di oppio, che col metodo di MANNICH ha segnato un contenuto di 13,40% di morfina.

Sull'ordinata troviamo segnate le sostanze riducenti, calcolate in morfina base anidra in 100 g di oppio seccato a 60°C. sull'ascisse sono indicati i cm³ di acetato di piombo 10%.

La curva A mostra il progressivo abbassamento delle sostanze riducenti con l'aumento dell'acetato di piombo. Essa si ottiene con l'aggiunta di soluzione tampone a pH 10 all'estratto calcico di oppio, che ha lo scopo di tenere in soluzione la morfina. Nella curva B al contrario, che ha interesse puramente sperimentale, l'estratto calcico dell'oppio è stato diluito in un primo tempo semplicemente con acqua, pertanto si nota una separazione progressiva della morfina man mano che il pH della soluzione si avvicina al punto isoelettrico, per effetto dell'acetato di piombo, il cui pH corrisponde a circa 6,2. Una ulteriore aggiunta di acetato di piombo fa ridisciogliere la morfina corrispondentemente all'abbassamento del pH della soluzione.

Secondo l'andamento della curva A, l'estratto di oppio ottenuto con Ca(OH)₂ contiene 26,40% di sostanze riducenti, calcolate in mor-

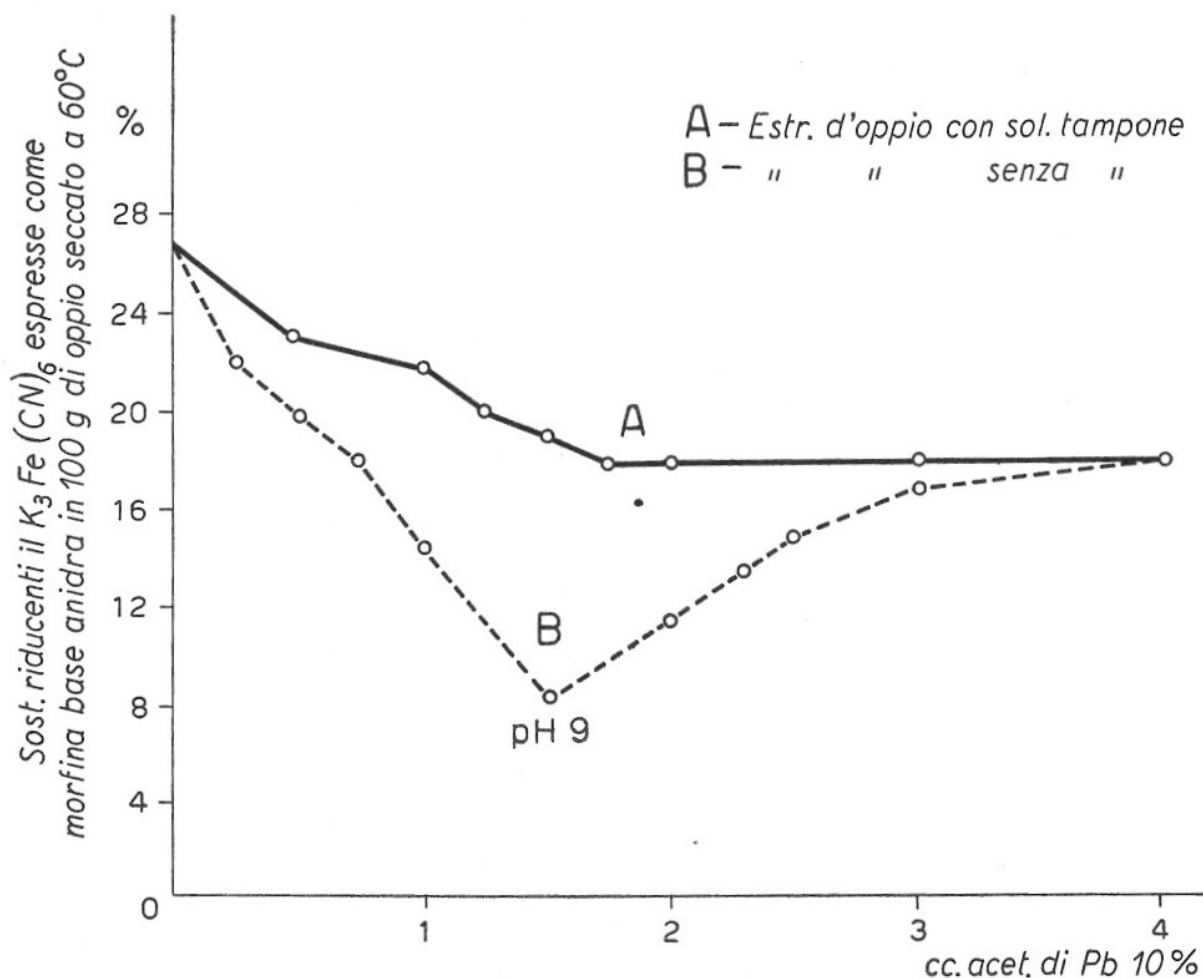


Fig. 2. - Influenza della quantità di acetato di piombo sul risultato.

finà, che per effetto dell'acetato di piombo (1,75 cm³) scendono a 17,90%. Una ulteriore aggiunta di acetato di piombo, anche fino a 4 cm³ lascia tale cifra invariata. A questo punto si pratica l'estrazione con etere solforico, che asporta le ultime sostanze riducenti dall'estratto d'oppio defecato. Il potere riducente corrisponde ora ad un contenuto di 13,40% di morfina, quantità accertata, come già detto col metodo di MANNICH.

PARTE SPERIMENTALE

Reattivi e soluzioni occorrenti.

Sono quelli già descritti nella prima parte del presente lavoro; in più sono da aggiungere:

- 1) Soluzione di acetato di piombo neutro al 10%
- 2) Soluzione di solfato di sodio secco al 3,745%
- 3) Calcio idrato in polvere
- 4) Etere solforico puro, privo di perossidi ed aldeidi.

DESCRIZIONE DEL METODO

Usando un mortaio di circa 6 cm di diametro, vi si riduce in polvere fine 1 g di oppio seccato a 60°C; si aggiungono 2 cm³ di acqua e si continua a tritare così da ottenere una sospensione omogenea, pastosa, senza grumi. Si aggiunge 1 g di idrato di calcio e si continua a tritare, finchè non si scorgono più le particelle bianche di Ca(OH)₂; quindi si aggiungono 3 cm³ di acqua e si mescola ancora per qualche minuto. La miscela ottenuta si versa in tubo da centrifuga da 50 cm³. Si centrifuga per 2 minuti a 2000 giri. Si trasferisce filtrando per carta, il liquido in un matraccio tarato da 100 cm³ e usando una grossa bacchetta di vetro fatta a pestello, si tritura il deposito rimasto nel tubo con altri 25 cm³ d'acqua che si aggiunge poco per volta. Si centrifuga e si filtra come sopra. Si ripete ancora due volte questo trattamento fino a portare il filtrato a 100 cm³.

Di questi se ne prelevano 25 cm³ che si mettono in cilindro da 50 cm³ fornito da tappo a smeriglio; si aggiungono 5 cm³ di soluzione di acetato di piombo e chiuso il cilindro, si mescola. Dopo 5 minuti si introducono 5 cm³ di soluzione di solfato di sodio per precipitare l'eccesso di piombo. Si versano nel cilindro 15 cm³ di soluzione tampone, così da portare il volume a 50 cm³ e si mescola ancora. Dopo qualche minuto si filtra. A questo punto si deve notare, che la morfina in questa fase di estrazione si mantiene per parecchi giorni, anche 10, inalterata, per se tenuta alla temperatura ambiente, essendo il pH della soluzione circa 7. Non lo stesso può dirsi per l'estratto calcico dell'oppio di pH 12 circa, nel quale, anche se tenuto in frigorifero, si nota, già dopo un giorno, un lieve abbassamento del titolo della morfina. Prelevati con pipetta 10 cm³ di filtrato, si immettono in un tubo da centrifuga fornito di tappo a smeriglio; si aggiungono 10 cm³ di etere solforico e si agita per 1 minuto, preferibilmente usando un apparecchio per agitazione. Dopo qualche minuto si toglie con pipetta a stantuffo lo strato eterico e si aggiungono altri 10 cm³ di etere e si agita come sopra per 1 minuto; si centrifuga e si toglie lo strato eterico. Del liquido acquoso se ne prelevano 2 cm³ che si trasferiscono in bevuta da 50 cm³, si diluiscono con 18 cm³ di soluzione tampone e si filtra il precipitato di fosfato di calcio che si forma.

Con una pipetta da 5 cm³ si divide il filtrato in tre tubetti di vetro bianco di Jena o di Pyrex da 95 mm circa di lunghezza per 6 mm di diametro, forniti di tappo a smeriglio.

Usando una semimicroburetta da 10 cm³, si immette in ogni tubetto 1 cm³ di soluzione di ferricianuro di potassio. Dopo 10 minuti si arresta la reazione di ossidazione, introducendo in ogni tubetto 2 cm³ di

HCl (sol. 6). Aggiunte 3 gocce di ferroina in ogni tubo, si titola il ferrocianuro che si è formato nella reazione, con soluzione N/200 di solfato di cerio che si fa discendere da una microburetta finchè si ha un netto viraggio dal rosso arancio al giallo verde, che dopo qualche secondo tende nuovamente al rosso, a causa dell'azione riducente esercitata dalla morfina ossidata sull'indicatore.

Il contenuto in morfina di 1 g di oppio in esame, si desume dalla seguente formula:

$$M = Ce \frac{4 \cdot 100}{2,454} = Ce \cdot 165$$

Che rappresenta la media dei cm³ di solfato di cerio N/200 impiegati in 3 o più titolazioni, meno 0,10 cm³ spettanti alla prova in bianco, moltiplicati per il fattore 163.

CONTROLLO DEL METODO

A tale scopo sono serviti 10 campioni di oppio di varia provenienza. Ogni campione, dopo essere stato polverizzato, mescolato e seccato a 60°C, è stato esaminato col metodo di Mannich e con il presente metodo ceriometrico, impiegando per il primo g 1 di oppio e per il secondo da 0,5 - 1 g, secondo la quantità di oppio disponibile.

Nella seguente tabella n. 2 sono messi a confronto i valori ottenuti.

TABELLA II.

Oppio N.	Metodo Mannich	Metodo ceriometrico	Differenze	
			assolute	percentuali
1. — C	14,80	14,88	+ 0,08	+ 0,54
2. — CT	12,10	12,88	+ 0,78	+ 6,44
3. — M ₁	13,73	13,92	+ 0,19	+ 1,38
4. — M ₂	14,71	14,66	— 0,05	— 0,34
5. — Iran	11,90	12,48	+ 0,58	+ 4,87
6. — Turco ₁	15,80	15,68	— 0,12	— 0,71
7. — Turco ₁	17,12	17,15	+ 0,03	+ 0,17
8. — 948	15,86	16,00	+ 0,14	+ 0,88
9. — 949	15,04	15,73	+ 0,69	+ 4,59
10. — 950	16,43	16,43	0,00	0,00
Differenza med.			± 0,26	± 1,99

La corrispondenza dei risultati è buona, tanto più che essi non rappresentano una media di varie determinazioni, ma di singole prove, eseguite sia col metodo di Mannich che con quello ceriometrico.

CONCLUSIONI

Il metodo descritto si distingue, oltre che per il piccolo quantitativo di oppio richiesto, da 0,1 a 1 g, per la sua semplicità e rapidità di esecuzione, impiegando al massimo 2 ore, tanto da poter essere usato anche in un semplice laboratorio di farmacia, non richiedendo una particolare attrezzatura ed abilità analitica. La riproducibilità è buona, non superando i $\pm 0,20\%$. Quanto ai risultati, ottenuti dall'esame di 10 campioni diversi di oppio e confrontati con quelli del metodo di Mannich essi sono soddisfacenti. Con ciò non si può a priori affermare, che esso si presta per tutti i casi.

Si dimentica in genere che l'oppio è un prodotto naturale di composizione non costante. Non solamente il suo contenuto in morfina varia, entro limiti assai vasti, da 3 a 23%, bensì si possono riscontrare, secondo la sua provenienza, degli alcaloidi secondari diversi, come pure delle sostanze estranee di varia natura.

Per esempio, nelle cassule di papavero mature, che contengono in media da 1 a 6‰ di morfina, si trova in quantità apprezzabile un alcaloide la narcotolina, che secondo PFEIFER e WEISS ⁽¹⁴⁾, non è stata trovata fino ad ora nell'oppio.

Un primo tentativo di determinare la morfina nelle cassule di papavero col metodo descritto ha fornito dei dati troppo elevati. Soltanto dopo una filtrazione preventiva dell'estratto acquoso di cassule di papavero da uno strato di ossido di alluminio, sono riuscito a liberare la morfina dalle numerose sostanze riducenti che l'accompagnano e a determinarla col metodo ceriometrico descritto.

La determinazione della morfina nelle cassule di papavero è in corso di studio e forma l'argomento di una prossima nota.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) KIEFFER L. - Ann., 103: 271 (1857).
- (²) BENTLEY K. W. - The Chemistry of Morphine Alkaloids, Oxford (1934).
- (³) PRUNER G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 14: 222 (1931).
- (⁴) PRUNER G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17: 123 (1934).

- (5) PRUNER G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17: 434 (1954).
 - (6) VOLLMER K. - Dissertation, Bonn (1948).
 - (7) VAN PINXTEREN C. e SMEETS G. - Pharmac. Weekbl, 83, 148 (1950).
 - (8) GSTIRNER F. - Prüfung u. Verarbeitung von Arzneidrogen - Springer Verlag, Berlin (1955).
 - (9) MANNICH C. - Arch. Pharm., 273: 97 (1933); 280: 386 (1942).
 - (10) BAERHEIM SVENDSEN A. e DROTTNING AARNES E. - Scientia Pharmaceutica, 23: 48 (1955).
 - (11) FISCHER R. e FOLLBERTH R. - Arzneim. Forschung, 5: 66 (1955).
 - (12) DANN O. e WIPPERN F. - Deutsche Apoth. Ztg., 91: 903 (1951).
 - (13) AWE W. e REINECKE J. - Arzneim. Forschung, 1: 417 (1951).
 - (14) PFEIFER S. e WEISS F. - Die Pharmazie, 11: 658 (1955).
-