

57. Aurelio MARIANI, Salvatore GUARINO, Olga MARIANI MARELLI. — Sulla determinazione colorimetrica della morfina negli oppi. (\*)

**Riassunto.** -- I metodi attualmente ufficiali per la determinazione della morfina nell'oppio sono soggetti a gravi critiche.

Gli Autori hanno quindi approfondito lo studio di un metodo colorimetrico altamente specifico, già proposto nel 1946, che si basa su di una serie di reazioni cromatiche.

Sono stati esaminati criticamente i vari passaggi e confrontati allo spettrofotometro i colori risultanti dalle diverse reazioni.

Il metodo, fissato nelle varie fasi è risultato di grande rapidità e precisione, in modo che viene giustificata una sua più estesa applicazione.

**Résumé.** — Les méthodes officielles de détermination de la morphine dans l'opium sont soumises à des sérieuses critiques.

Les A.A. font ensuite l'étude approfondie d'une méthode colorimétrique hautement spécifique qui a été proposée déjà en 1946 et qui est basée sur une série de réactions chromatiques.

Ils soumettent à un examen critique les différentes phases de son application et comparent au spectrophotomètre les couleurs obtenues dans les diverses réactions.

Ils constatent que la méthode, dont les phases ont été précisées, est très rapide et très exacte, de sorte que son application plus étendue serait justifiée.

**Summary.** — The present methods of morphia determination in opium are subject to severe criticism.

The authors have carried out an investigation into highly specific colorimetric methods, using a series of colour-reactions, as already suggested in 1946.

Various passages were critically reviewed and the colours, which result from the various reactions were compared by means of the spectrophotometer.

The method, described in its various phases has proved a rapid and reliable one and its application on a wide scale appears entirely justified.

---

(\*) Presentato al VI Congresso Nazionale di Chimica e XXIII Congrès de Chimie Industrielle - Milano, 17-23 settembre 1950.

**Zusammenfassung.** -- Die gegenwärtigen offiziellen Morphiumbestimmungsmethoden in Opium werden scharf kritisiert.

Die Verfasser haben eine hochspezifische, kolorimetrische Methode ausgearbeitet, die schon 1946 vorgeschlagen wurde und auf einer Reihe von Farbenreaktionen beruht.

Die verschiedenen Farbenübergänge wurden kritisch untersucht und die aus den verschiedenen Reaktionen hervorgegangenen Farben spektrophotometrisch ausgewertet.

Die Methode, die nunmehr in ihren verschiedenen Phasen festgelegt ist, erwies sich als sehr rasch und genau, so dass ihre Anwendung in weitem Masstab als gerechtfertigt erscheint.

---

La determinazione della morfina negli oppi viene eseguita universalmente seguendo metodi ufficiali differenti nei vari Paesi; tutti sono lunghi, indaginosi e portano a risultati che sono stati criticati dai maggiori competenti in materia.

La questione di fissare un metodo che possa essere applicato universalmente e che dia risultati di soddisfacente esattezza nella determinazione del contenuto reale di morfina nell'oppio non è stata ancora risolta.

I punti critici dei vari metodi ufficiali sono principalmente:

a) Una incompleta estrazione della morfina contenuta.

b) Incompleta precipitazione dell'alcaloide estratto durante la sua determinazione, cui si è cercato di rimediare fissando arbitrari fattori di correzione che non possono essere validi per tutti gli oppi, sia per la differente concentrazione di morfina, sia per la presenza in quantità variabili di resine, gomma, ecc.

Ne consegue che applicando praticamente i metodi attualmente in uso si hanno forti scarti, principalmente in quei campioni che si discostano maggiormente dal contenuto medio in morfina che è di circa il 10%. La ragione per cui tali metodi sono ancora largamente applicati sta nel fatto che i risultati medi ottenuti non si scostano molto dalle rese industriali di estrazione in alcaloide. Ciò nonostante rimane sempre assodato che finora non si determina il totale contenuto in morfina, si impiega molto materiale di partenza, e si hanno sempre scarti di notevole entità sullo stesso campione.

Da quanto sopra si deduce che potendo disporre di una reazione altamente specifica della morfina è possibile spingere a fondo l'estrazione di questa dall'oppio senza tema che altre sostanze estratte possano disturbare la sua conseguente determinazione.

Tra le molte reazioni colorate che fornisce la morfina, la più specifica e più adatta per la sua determinazione è certamente la polireazione a catena di Guarino. Tale reazione, proposta per la prima volta quale reazione qualitativa nel 1945 <sup>(1)</sup>, è stata successivamente applicata a determinazioni quantitative <sup>(2)</sup>. La reazione suddetta, che è stata studiata particolarmente riguardo alla sua specificità per la morfina <sup>(3)</sup>, si basa sull'ossidazione con eccesso di acido jodico in ambiente acido e sulla conseguente reazione con tracce di cloruro ferrico in ambiente alcalino per bicarbonato di sodio o carbonato di ammonio. La reazione a catena proposta ha suscitato il consenso di molti analisti <sup>(4)</sup> che concordi hanno riconosciuto il grande vantaggio di poter determinare rapidamente il contenuto di morfina in un oppio senza ricorrere a lunghe ed indagginose operazioni ed anche recentemente DREVON e LAFITTE riferiscono di aver da tempo impiegato tale reazione con ottimi risultati.

Lo scopo delle nostre attuali ricerche era quello di studiare a fondo il metodo GUARINO impiegando come mezzo di indagine l'analisi spettrofotometrica, che abbiamo condotto con un apparecchio Beckman mod DU.

La curva di assorbimento della luce presentata dalla morfina pura a seguito della polireazione, presenta un massimo abbastanza netto a 510-520  $\mu$  e si riferisce al colore violetto che si genera dopo aggiunta di cloruro ferrico in ambiente alcalino per bicarbonato di sodio alla morfina ossidata con acido jodico (fig. 1). A confronto di questa abbiamo ricavato la curva di assorbimento del colore ottenuto con la stessa reazione su un estratto cloridrico di un oppio. Come si vede dalla figura, dove sulle

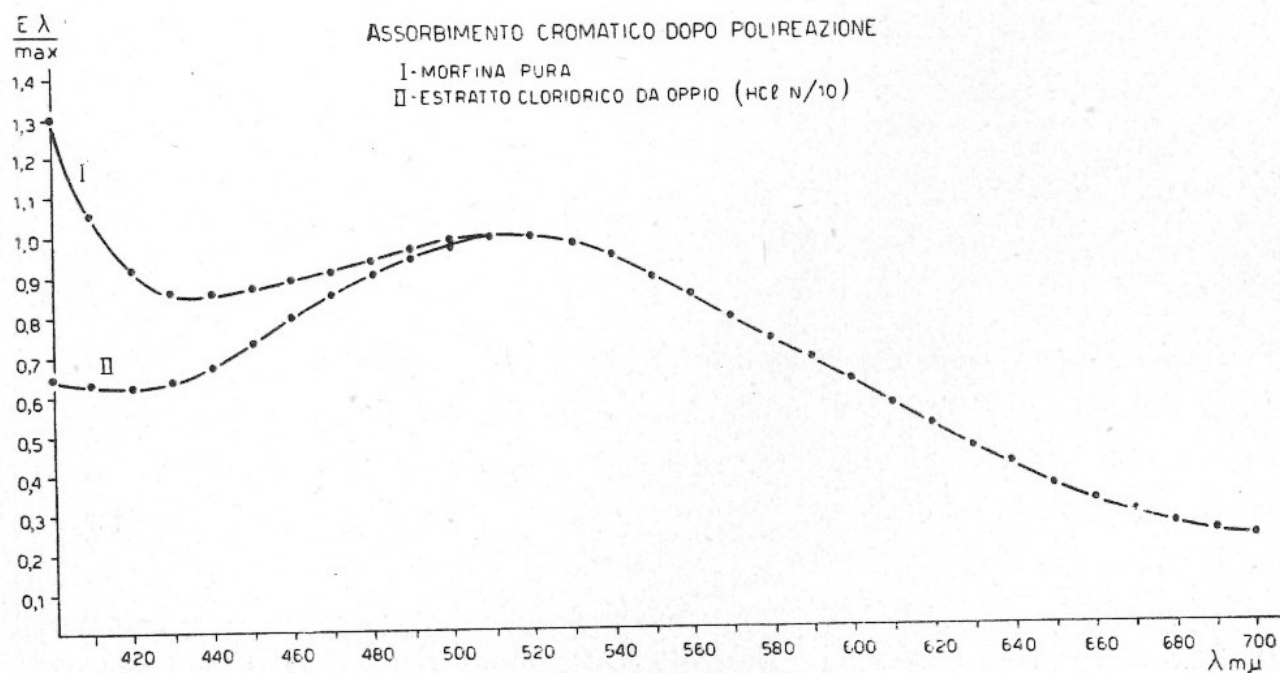


Fig. 1

ordinate sono riportati i valori degli assorbimenti in rapporto con il massimo, il colore ottenuto è, nei due casi, spettralmente identico al di sopra di 500 m $\mu$ . Data poi la grande sensibilità della reazione ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 57,14$ ) e la necessità di lavorare con estratti molto diluiti per rimanere nel campo della lettura fotometrica, il colore di fondo dovuto ai pigmenti ha una

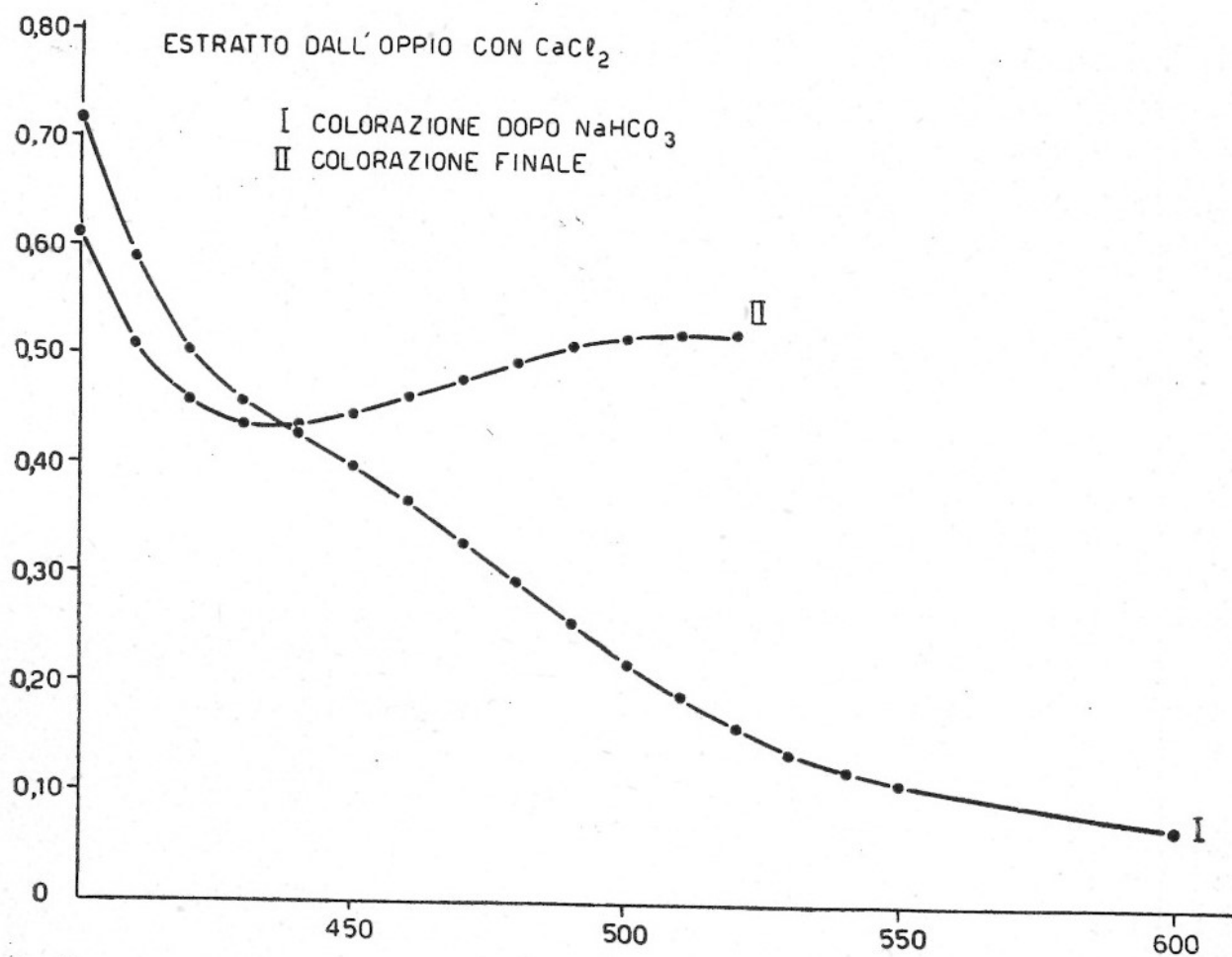


Fig. 2

influenza molto limitata e solo nei casi di oppi fortemente colorati e a basso titolo in morfina. In questi casi, invece di prendere la lettura assoluta a 520 m $\mu$  al termine della reazione è consigliabile prendere la differenza delle letture a 520 m $\mu$  eseguite prima e dopo l'aggiunta del cloruro ferrico (fig. 2).

Trattandosi di reazioni colorate abbiamo voluto seguire e controllare la stabilità delle colorazioni ottenute sia prima dell'aggiunta del cloruro ferrico (colore giallo-arancio) sia dopo l'aggiunta di questo (colore vio-

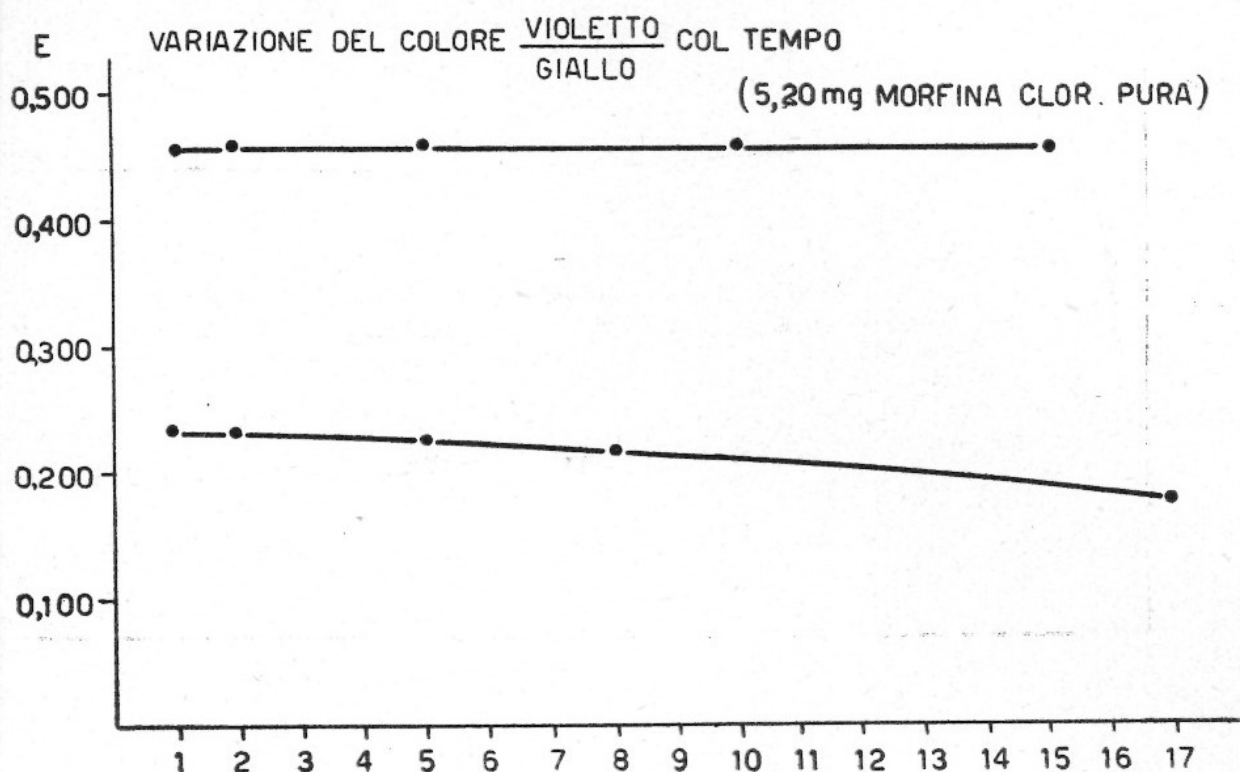


Fig. 3

letto). Il grafico in fig. 3 mostra che la colorazione violetta è di grande stabilità mentre quella gialla lo è entro i 2 minuti dalla alcalinizzazione.

Il punto più delicato della reazione, e che è stato da noi oggetto di particolare studio è la durata di ossidazione acida con acido jodico prima della alcalinizzazione. Con la morfina pura questo tempo, che risulta più critico, deve essere fissato in 30 secondi; infatti il colore scema lentamente, ma sensibilmente aumentando il tempo di ossidazione (fig. 4), mentre è molto meno delicato per l'estratto calcico di un oppio.

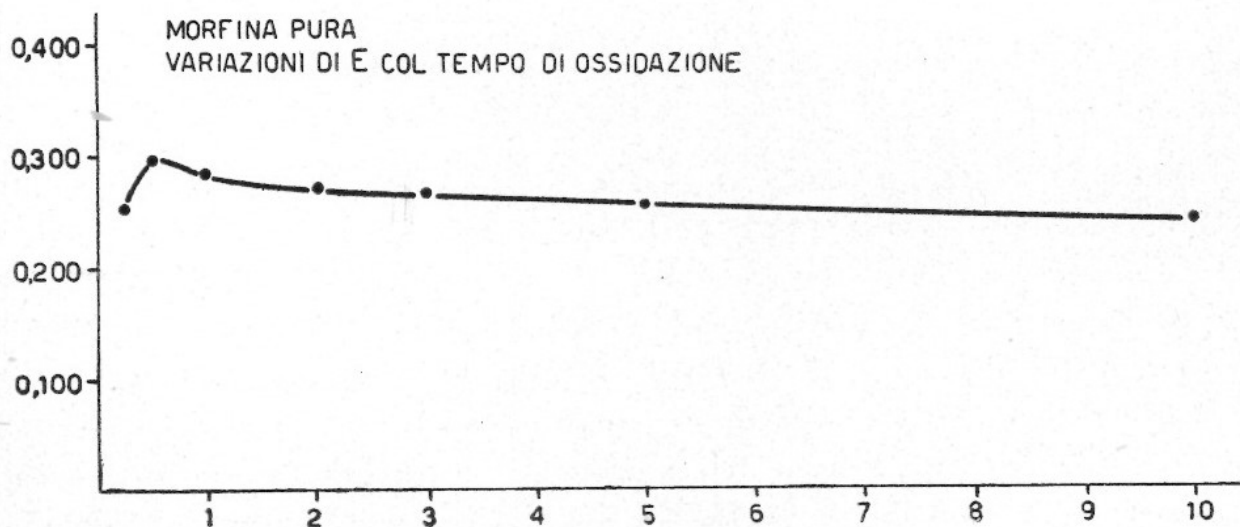


Fig. 4



Fig. 5

In questo caso l'ossidazione fig. 5) procede con maggiore lentezza ma in compenso raggiunge una maggiore stabilità e per avere una ossidazione completa si deve attendere dai due ai quattro minuti prima di alcalinizzare.

Abbiamo quindi ricavato con morfina pura ricristallizzata la curva per la sua determinazione. Come si vede dalla fig. 6 la legge di BEER viene perfettamente rispettata nel campo 0-8 mg in 50 cm<sup>3</sup> finali, sia per la colorazione violetta che per quella giallo-arancio. Nella stessa figura viene anche riportata la curva risultante dalla differenza del colore violetto e del colore giallo, curva che, come abbiamo detto, si presta meglio per la determinazione della morfina in quegli oppi che siano particolarmente ricchi in pigmenti colorati e siano poveri in alcaloide.

*Applicazione del metodo colorimetrico alla determinazione della morfina negli oppi.*

Abbiamo avuto occasione di esaminare diversi campioni di oppio in pani di varia provenienza; ogni campione è stato polverizzato, omogeneizzato e seccato a 60°C. Su ciascuno è stato eseguito il metodo ufficiale per il dosaggio della morfina riportata nella F.U. VI. I risultati sono riportati nella Tabella I in colonna A. Di ognuno di questi è stata ripetuta l'estrazione calcica secondo lo stesso metodo e, dopo diluizione con acido cloridrico N/10, è stata determinata la morfina con il nostro metodo colorimetrico. I risultati di questa serie di analisi sono riportati in colonna B della stessa tabella. Su ogni campione è stata infine eseguita una

GRAFICO PER LA DETERMINAZIONE DELLA MORFINA —  
ASSORBIMENTI A 520 m $\mu$  —

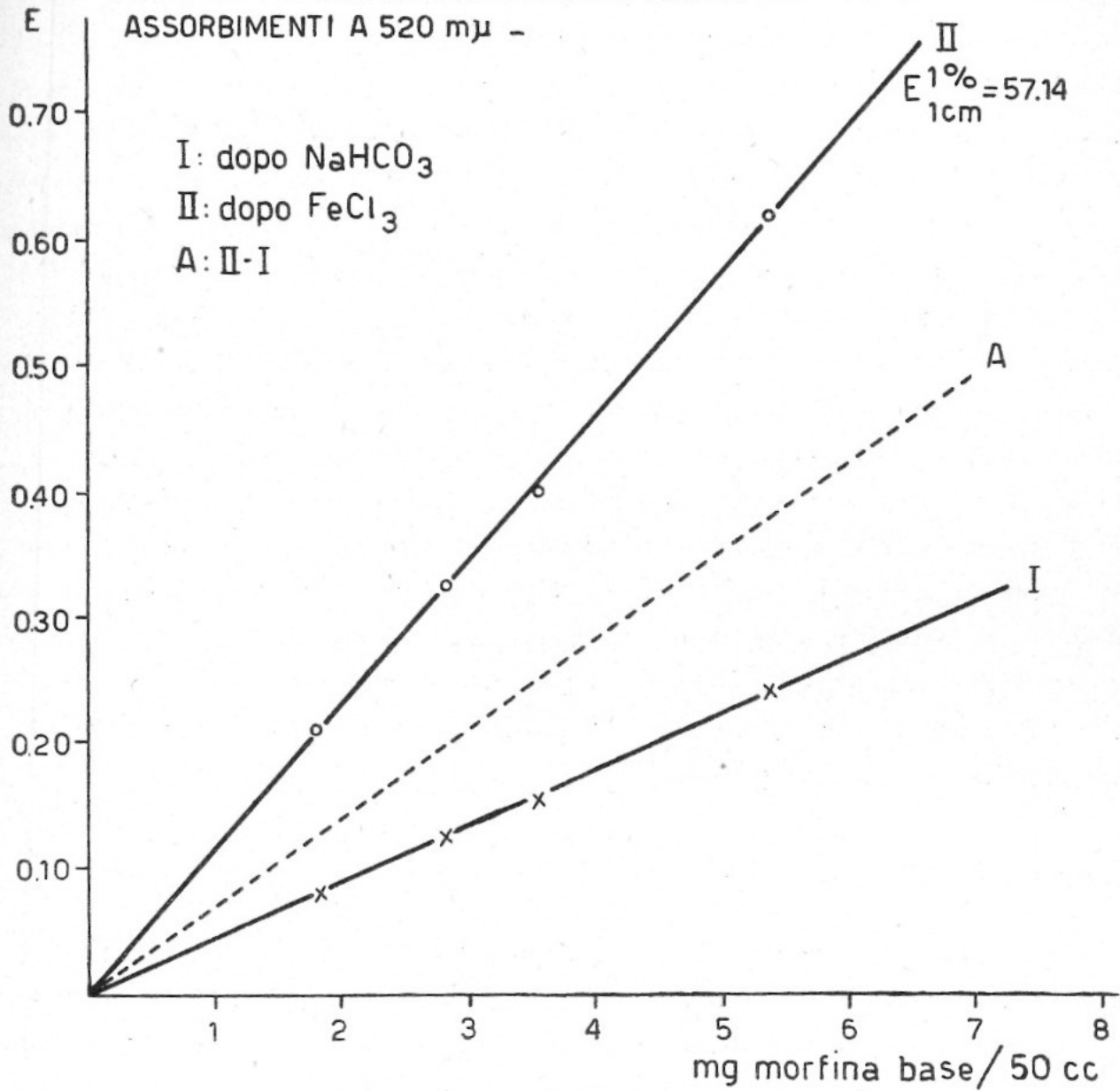


Fig. 6

TABELLA I

Campione N.	A	B	C	% in meno A risp. C	% in meno B risp. C
	Metodo F. U. VI	Estratto calcico sec. F.U. VI	Estratto cloridrico sec. Eder e W.		
1071	15,35	17,16	20,84	— 26,3 %	— 17,5 %
1113	17,52	19,76	24,00	— 27,0 %	— 17,6 %
1114	15,23	18,46	21,72	— 29,8 %	— 15,1 %
1129	16,29	19,24	23,79	— 31,0 %	— 19,0 %
733	16,40	17,68	21,82	— 24,9 %	— 18,8 %

estrazione calcica a fondo come consigliato da EDER e WÄCKERLIN (5), cioè operando con una maggior quantità di liquido (g 1 a 100 cm<sup>3</sup>). Su tale estratto è stata eseguita la determinazione colorimetrica della morfina. Tali risultati sono riportati nella tabella in colonna C. Come si vede dai raffronti, riportati anch'essi in tabella, le differenze che si riscontrano tra i due estratti calcici ammontano a circa il 15% e stanno a dimostrare quanto incompleta sia l'estrazione della morfina eseguita secondo la F.U. VI in presenza di calce con un quantitativo di liquido assolutamente insufficiente a portare in soluzione la totalità della morfina presente, mentre il raffronto fra la determinazione colorimetrica e quella volumetrica sullo stesso estratto mostra evidente che forti perdite di morfina si hanno durante la sua precipitazione e purificazione prima della titolazione.

Ne consegue che il metodo ufficiale con estrazione alla calce fornisce dei risultati in complesso di circa il 25% inferiori al metodo colorimetrico eseguito estraendo la totalità della morfina con il metodo alla calce secondo EDER e WÄCKERLIN. Questa perdita può essere imputata per il 15% circa alla incompleta estrazione e per il rimanente 10% alle perdite di cristallizzazione prima della determinazione volumetrica.

*Riproducibilità dei dati analitici.*

Operando la estrazione a fondo su un grammo di oppio con acqua di calce fino a portare al volume di 100 cm<sup>3</sup> e prelevando di questo estratto 1 cm<sup>3</sup> + 9 cm<sup>3</sup> di acido cloridrico N/10 abbiamo eseguito 5 estratti di un unico campione medio (n. 1071) e su ogni estratto è stata eseguita una serie di 3 determinazioni distinte. Le medie di ogni serie hanno dato i seguenti risultati:

	20,50	20,64	19,90	20,47	20,41		= 20,38%
scarto							
dalla							
media	+0,12	+0,26	-0,48	+0,09	+0,03		

Ciò sta a dimostrare evidentemente che l'estrazione calcica 1:100 porta in soluzione la totalità della morfina presente e che le determinazioni hanno una concordanza pressochè perfetta, pur occorrendo per esse piccole quantità di sostanza e brevità di tempo nell'esecuzione.

In seguito è stata eseguita una prova di aggiunta di morfina pura ad un estratto calcico di oppio ottenendo i seguenti risultati:

1 cm <sup>3</sup> di estratto	E <sub>520</sub> = 0,293	mg 2,55	
1 » sol. morfina	E <sub>520</sub> = 0,306	» 2,65	
1 » estratto + 1 cm <sup>3</sup> di sol. morfina	E <sub>520</sub> = 0,601	» 5,25	(+0,9%)

Da quanto sopra riportato appare evidente l'utilità di prendere in considerazione oltre ai dati relativi che si possono ottenere con l'impiego di lunghi e laboriosi metodi ufficiali, anche i dati assoluti ottenibili con grande rapidità per mezzo del nostro metodo colorimetrico.

Roma, Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Biologia, Chimica Terapeutica e Chimica, luglio 1950.

#### BIBLIOGRAFIA

(<sup>1</sup>) S. GUARINO, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 20, 754, 1945); Arch. Soc. Biol., 31, 115, (1946); Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 22, 1226, (1947).

(<sup>2</sup>) S. GUARINO, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 21, 253 (1946); Arch. Antrop. Crimin., 182 (1947); Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 22, 1223 (1946); Bull. Soc. Chim. Biol., 29, 548 (1947).

(<sup>3</sup>) I. IAVICOLI, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 21, 815 (1946).

(<sup>4</sup>) CHAMBON, Annales Pharm. Franç., 5, 269 (1947); L. NICOLINI, Annales Pharm. Franç., 5, 528 (1947); B. DREVON e LAFITTE; Annales Pharm. Franç. 7, 759 (1949).

(<sup>5</sup>) R. EDER e E. WÄCKERLIN, Quart. J. Pharm. 10, 680 (1937).

---