

DETERMINAREA CALITATIVĂ A ALCALOIZILOR DE OPIU PRIN METODA CROMATOGRAFIEI PE HÎRTIE

Agnes Blazsek

Metoda cromatografiei pe hîrtie s-a dovedit a fi cea mai indicată pentru separarea și determinarea alcaloizilor din extracte vegetale și amestecuri. Celelalte procedee descrise în literatură (1, 10, 12, 14, 17, 19, 22, 30) nu oferă posibilitatea de a efectua analize în cantități infime.

Scopul experiențelor noastre a fost acela de a elabora o metodă cromatografică rapidă cu ajutorul căreia să se poată determina conținutul în alcaloizi al extractului de opiu sau al preparatelor farmaceutice.

Hîrtia

Potrivit datelor bibliografice, cromatografierea se poate efectua numai pe o hîrtie Whatmann Nr. 1 sau Schleicher-Schüll 2043 B. Am reușit să obținem un rezultat bun utilizînd hîrtia de filtru calitativă indigenă, pe lângă hîrțile Whatmann Nr. 4, Schleicher-Schüll 589⁹, Macheray-Nagel 214.

Lichide de irigare

În cazul separării alcaloizilor de opiu se pot folosi în general solvenții cuprinși în tabelul Nr. 1. În cursul experiențelor noastre, utilizînd acești solvenți nu am obținut o separare destul de netă, unii dintre ei dînd spoturi neconturate (cei de la Nr. 8—14), iar alții producînd migrarea alcaloizilor cu frontul fazei mobile (cei de la Nr. 1—7).

Am reușit să preparăm un solvent care a dat rezultate ce s-au putut reproduce la fel de bine pe toate hîrțile amintite. Tamponînd hîrtia la un pH cuprins între 3,4—3,9, irigarea se face cu o soluție compusă din alcool *n*-butilic-toluol-alcool etilic (95%) apă în proporție de 1 : 1 : 1 : 0,25.

Reactivi :

Reactivii utilizați cel mai frecvent în cromatografia pe hîrtie sînt cuprinși în tabelul Nr. II.

După cum rezultă din tabel, unii reactivi dau spoturi care se decolorează repede, iar alții provoacă înșasi reacția de culoare a hîrtiei. Reactivii Nr. 4, 5 și 6 se pot utiliza numai în cazul determinării alcaloizilor care conțin hidroxil fenolic. Utilizarea reactivului K⁺ (PIJ₆) prezintă dezavantajul de a fi prea puțin sensibil (limita de recunoaștere 10—20 mg iar spoturile obținute se decolorează cu timpul).

Reactivul *Dragendorff* s-a dovedit a fi cel mai adecvat, avînd sensibilitatea 1—3 mg, dînd rezultate bune chiar și în cazul spoturilor difuze cum este narceina (sensibilitate 5 mg). Cromatograma dezvoltată cu ajutorul acestui reactiv a fost stabilă. În general alcaloizii dau cu reactivul *Dragendorff* spoturi de culoare portocalie. Numai în cazul apomorfinei obținem spoturi de culoare gri închisă, iar cu narceina — în concentrații mari — o culoare gri-albăstruie. Cu reactivul modificat de către *H. Thies* și *F. H. Reuther* (29)* am obținut o reacție mai sensibilă și pete mai bine conturate, deoarece culoarea proprie a reactivului nu mai stingherește interpretarea cromatogramei.

Tabelul Nr. I.

Nr. crt.	Lichid cu irigare	Proporție	Observații	Bibliografie
1.	alc. butilic n—ac. acetic glac. apă	100:100:50		15
2.	alc. butilic n—ac. acetic glac. apă	100:30:saturat		25
3.	alc. butilic n—ac. acetic glac. apă	10:1:5		18
4.	alc. butilic n—ac. acetic gl. apă—acetat de butil	9:28:16:47		27
5.	alc. butilic n—ac. formic apă	120:20:70		27
6.	alc. butilic n—HCl 35% apă	50:2,5:15		26
7.	n. alc. butilic—apă acid acetic	50 ml:50 ml:1 g		7
8.	Benzen—chloroform	2:3	hîrtie impregnată cu o sol etanolică de formamidă 50%	11,24
9.	alc. butilic n—ac. acetic	proporții diferite	hîrtie tamponată cu sol. de KH_2PO_4 m/2 + KCl m/2	16
10.	alc. butilic n	saturat cu apă	hîrtia tamponată la pH=4,0 cu sol. de citrat de Na 0,1 m/HCl	29
11.	250 g/ NH_4 / SO_4 —250 ml HCl 2 n ad 1000 ml apa			8
12.	alc. butilic n—HCl—apă	100:2:4	hîrtie impregnată cu KCl 0,5 m	8
13.	eter	hîrtia saturată cu apă	hîrtie tamponată la pH=3,9—4,5	2
14.	alc. i—butilic—toluol—apă	50:50—saturat	hîrtie tamponată la pH=3,5	5,6

Cromatogramele se pot cerceta și la lumina U. V. obținînd astfel o fluorescență specifică pentru fiecare alcaloid în parte (2). Executînd cromatografierea pe o hîrtie tamponată la un pH 6,8 papaverină dă o fluorescență verde-gălbuie, sensibilitatea reacției fiind 0,5 > g. La un pH 6,8 narcotina arată o fluorescență albastră. Sensibilitatea reacției se mărește dacă încălzim hîrtia în prealabil la 120°C. Morfina arată o fluorescență violetă albăstruie, thebaina arată o fluorescență galbenă (sensibilitate 200 μg), narceina una albastră în cazul în care cromatograma se încălzește la 120°C. Numai codeina nu arată nici o fluorescență la lumina U.V.

* Se fierbe cîteva minute 2,6 g carbonat bazic de bismut și 7,0 g KJ în 25 ml ac. acetic glacial. Se lasă în repaus o noapte, iar cristalele precipitate se filtrează. 20 ml din această soluție se amestecă cu 80 ml ester acetic. Se păstrează apoi în borcane ermetic închise. Pentru dezvoltare se întrebuițează un reactiv diluat în felul următor: 20 ml din soluția de bază se diluează cu 50 ml ac. acetic glac. și 120 ml ester acetic, după ce se adaugă picătură cu picătură 10 ml de apă.

Tabelul Nr. 11.

Nr.	Denumirea reactivului	Compoziția	Colorația obținută	Sensibilitate μ g	Observații	Bibliografie
1.		K_2MnO_4 1% Na_2CO_3 2% 1:1	pată albă pe fond roz		instabilă	3 27
2.	Brouardel-Boutmy	$K_3/Fe/CN/6/1\%$ + O pic. de $FeCl_3$ 1%	pată albastră	2	hîrtia însăși dă reacție	21
3.	Rădulescu	$NaNO_2 + NaOH$	pată roșcată		instabilă	1
4.	Pauly	ac. sulfamic diluat	pată roșcată		instabilă	21
5.	Folin—Ciocilteu	$Na_2MoO_4 + Na_2WO_4 + Li_2SO_4$ acidulat, oxidat cu Br_2	pată albastră	1	hîrtia însăși dă reacție	21
6.	Sonnenschein modificat	$ZnCl_2$ 1% + HCl 3,8% acid fosfo molidenic 1%	pată albă		hîrtia însăși dă reacție	4,10
7.	Mayer	$K_2/11gJ_4/+/NH_4/2S$	pată gri	100	nesensibilă	7
8.		$K_2/PtW/$	pată de culoare violetă sau albastră			19
9.	Dragendorff	$K/BiJ_4/$	pată portocalie		nesensibilă	2 12

Descrierea metodei.

Înainte de cromatografiere, hîrtia se tratează cu o soluție tampon avînd pH=3,4—3,9 format din acid citric 0,1 m și $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,2 m 135,6 ml acid citric 0,1 m + 64,4 ml Na_2HPO_4 0,2 m (21). Hîrtia de filtru se îmbibă în 200 ml soluție de tampon și se usucă la temperatură ambiantă timp de 3—5 ore. Alcoolul *i*-butilic-toluol-alcool etilic (95%) — apă a fost utilizat în proporția de 1:1:1:0,25. Cromatografierea se efectuează prin aplicarea metodei ascendente, într-un cilindru prevăzut cu dop șlefuit și saturat atît cu vapori de apă cît și cu cei ai solventului. Pentru a asigura saturarea cu vapori a cilindrului pereții acestuia au fost acoperiți cu o hîrtie înbibată în apă. Timpul de irigare în general a fost de 2—3 ore pentru 25 cm. Rezultatele sînt redată în Fig. Nr. 1.

Metoda circulară a fost executată pe hîrtie Schleicher—Schüll 589³, aplicînd procedul descris. Rezultatele sînt cuprinse în Fig. Nr. 2.

Tabelul Nr. III. ilustrează valorile R_f obținute, lucrînd pe hîrtie de diferite calități.

Papaverina și narcotina nu s-au separat pe această cale (valorile R_f fiind 0,95—0,97).

Unidimensional papaverina și narcotina se separa pe o hîrtie tamponată la pH=3,4—3,9 folosind drept solvent eterul. După ce se tamponează și se usucă la temperatura ambiantă, hîrtia de filtru se saturează cu vapori de apă timp de o noapte, apoi se face irigația cu eter. Valoarea R_f a narcotinei est. 0,93, iar a papaverinei 0,30, ceilalți alcaloizi rămînînd la punctul de pornire.

Separarea completă a amestecului de alcaloizi se obține numai cu ajutorul metodei bidimensionale. Se procedează astfel: mai întîi separam alcaloizii pe hîrtie tamponată la un pH=3,4—3,9 utilizînd drept lichid de irigare alcool. *i*-butilic-toluol-alc. etilic (95%) — apă (1:1:1:0,25). Se usucă cromatograma la

raze infraroșii, apoi se constată locul papaverinei și narcotinei la lumina U.V. (spot cu fluorescență galben-verzuie). Cromatograma se saturează cu apă timp de o noapte, apoi se face irigație cu eter perpendicular pe direcția anterioară. (Fig. Nr. 3).

Tabelul Nr. III.

Alcoizoidul analizat	Hirtie de filtru calit. indig Rf	Whatmann 4 Ri	Macheray—Nagel Rf	Schleicher—Schüll 589 ^p Rf
Morfină	0,19	0,14	0,10	0,20
Codeină	0,34	0,30	0,27	0,34
Narceină	0,85	0,88	0,76	0,85
Thebaină	0,70	0,67	0,53	0,65
Papaverină	0,97	0,96	0,80	0,96
Narcotină	0,96	0,97	0,85	0,95

Metoda descrisă a fost utilizată în analiza tincturii de opiu, a extractului de opiu (Fabr. Med. No. 030369/20) și a tincturii de papaveris (extract preparat după procedeul lui Kopp și colab. (13). Alcaloizii au fost identificați pe cromatogramă luindu-se ca bază afit valorile Rf cit și compararea spoturilor prin irigarea unei soluții martor.

Am irigat pe hirtie de filtru 0,01 ml soluție iar în cazul extractului de opiu am preparat în prealabil o soluție acolică 1%. Cromatogramele le-am studiat la lumină UV, apoi le-am dezvoltat cu reactiv Dragendorff. (Fig. Nr.4).

În cursul cercetărilor noastre s-a dovedit că dintre toate extractele analizate, tinctura de opiu conține cei mai numeroși alcaloizi. Prin mărirea cantității cromatografiate am pus în evidență și prezența narceinei. Printr-o apreciere aproximativă, am constatat că conținutul în morfină al tincturii este de cca 100 μg/0,01 ml. Concentrația celorlalți componente variază între aceste valori.

În tabelul Nr. IV. am trecut alcaloizii pe care am reușit să-i punem în evidență în extractele analizate.

Tabelul Nr. IV.

Extractul analizat	Alcaloizii determinați prin cromatografierea a 0.01 ml de soluție	Observații
Tinctură de opiu	morfină codeină thebaină papaverină narcotină	
Tinctură de papaveris	morfină codeină papaverină narcotină un alcaloid necunoscut	Spot purpuru cu reactivul Dragendorff
Extract de opiu	morfină codeină	

În afară de morfină, codeină și papaverină, tinctura papaveris conține și un alcaloid necunoscut care dă cu reactivul Dragendorff o reacție purpurie, având valoarea Rf de=0,09 (pe hirtie filtru calitativă indigenă). Cromatogra-

mele arată la lumina U.V. multe pete fluorescente bine conturate, dintre care numai papaverina și narcotina au dat reacții specifice de alcaloizi.

Irigind o soluție alcoolică de 1% a extractului de opiu am reușit să punem în evidență numai prezența morfinei și a codeinei.

Sosit la redacție: 7 noiembrie 1959.

Bibliografie:

1. L. G. ANDREEVA: *Aptyecsnoe Gyelo* 4, 14 (1958); 2. A. BETSCHART, H. FLÜCK: *Pharm. Acta. Helv.* 31, 260 (1956); 3. H. BRAUNIGER: *Die Pharmazie* 10, 834 (1954); 4. H. BRAUNIGER: *Die Pharmazie* 1, 28 (1956); 5. J. BÜCHI, H. SCHUMACHER: *Pharm. Acta Helv.* 31, 417 (1956); 6. J. BÜCHI, H. SCHUMACHER: *Pharm. Acta Helv.* 32, 273 (1957); 7. I. CSIBAN, F. HEGEDÜS: *Magyar Kém. Folyóirat* 4, 66 (1954); 8. H. HAUSSERMANN, H. J. SCHÜKER: *Archiv der Pharm.* 10, 509 (1957); 9. E. F. HEEGE, W. POETHKE: *Papaver somniferum*. Berlin (1947); 10. V. M. HVATOVSKAIA: *Aptyecsnoe gyelo* 2, 65 (1958); 11. B. KAKAC: *Die Pharmazie* 8, 533 (1956); 12. L. KIRS, A. AULIS: *Aptyecsnoe gyelo* 6, 53 (1958); 13. E. KOPP, E. KOTILLA, K. CSEDO: *Revista Medicală* 1—2, 72 (1955); 14. S. K. KOROMISLOV: *Aptyecsnoe gyelo* 5, 36 (1955); 15. R. MUNIER, W. MACHEBEUF: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 5—6, 1144 (1949); 16. R. MUNIER, M. MACHEBEUF: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1—2, 204 (1952); 17. L. MUREA, C. RUSSO: *Farmacia* 2, 131 (1958); 18. G. NADEAU: *Zeitschr. f. anal. chem.* 157, 3 (1957); 19. V. L. PAVLOV, T. I. BARABAS: *Aptyecsnoe gyelo* 5, 43 (1958); 20. K. PEACH, W. V. TRACEY: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*: Berlin—Göttingen Heidelberg (1955); 21. V. I. PE-REL'MAN: *Kratkii spravochnyik himika. Goshimzdat. Moskva* (1951); 22. N. POPOVICI ȘI COLAB.: *Conf. Naț. a chim. analiști. București* (1958); 23. J. REICHEL'T, M. SARSUNOVA: *Die Pharm.* 1, 21 (1958); 24. J. REICHEL'T: *Die Pharmazie* 4, 234 (1955); 25. A. B. SVENDSEN: *Pharm. Acta Helv.* 26, 323 (1951); 26. GY. SZASZ, M. TAKACS: *Acta Pharm. Hung.* 4, 110 (1954); 27. H. THIES, W. REUTHER: *Naturwiss.* 42, 462 (1955); 28. H. THIES, F. REUTHER: *Naturwiss.* 41, 230:29; G. WAGNER: *Die Pharmazie* 7, 470 (1955); 30. *Pharm. Romină. Ed. VII. București* (1956).

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ ОПИЯ ПУТЕМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Блажек Агнеш

Автор выработал восходящую бумажную хроматографию для определения алкалоидов *Tinctura opii*, *Extractum opii* и *Tinctura papaveris*. Отечественной фильтровальной бумаге придавали pH, 3,4—3,9 с помощью 0,1 м лимонной кислоты и 0,2 м Na_2HPO_4 . Для разделения употреблял изо-бутанол-толуол-этанол (95%) и воду (1:1:1:0,25). Хроматограмму проявил измененным реактивом Драгендорфа. Таким образом получились Rf анализы следующие: морфин 0,19, тебани 0,70, кодеин 0,34, карцени 0,85, наркотин 0,96, папаверин 0,47. Для разделения папаверина и наркотина выработал двухдизензионный способ, тогда для разделения употреблял эфир, при котором анализ Rf наркотина 0,93 у папаверина 0,30.

LA DÉTERMINATION QUALITATIVE DES ALCALOÏDES DE L'OPIMUM A L'AIDE DE LA CROMATOGRAPHIE SUR PAPIR

A. Blazsek

On a utilisé une nouvelle méthode pour la détermination qualitative des alcaloïdes dans *Tinctura Opii*, *Extractum Opium* et *Tinctura Papaveris*. Ce procédé réside dans l'application de la chromatographie sur papier circulaire. Le papier filtre de fabrication indigène a été imprégné dans une solution tampon (0,1 m acide citrique + 0,2 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ayant une valeur pH de 3,4—3,9, puis on a effectué la séparation à l'aide de la solution éluante i-butanol-toluol-étanol (95%) eau (1:1:1:0,25). Les chromatogrammes ont été développés en utilisant le réactif Dragendorff modifié. Les valeurs Rf obtenues sont les suivantes: morphine 0,19; thébaine 0,70; codéine 0,34; narcéine 0,85; narcotine 0,96; papavérine 0,47.

Pour la séparation de la papavérine et narcotine, on a constaté la nécessité d'appliquer une méthode bidimensionnelle. C'est l'éther qu'on a utilisé comme solvant développant dans la deuxième dimension. Les valeurs Rf obtenues sont les suivantes: narcotine 0,93; papavérine 0,30.

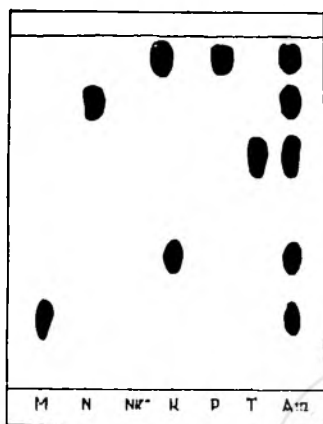


Fig. Nr. 1.



Fig. Nr. 2.

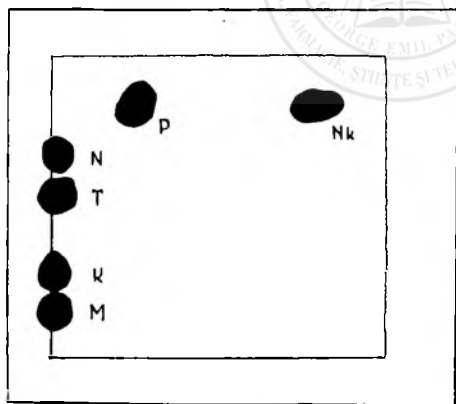


Fig. Nr. 3.



Fig. Nr. 4.

Fig. Nr. 1. - Cromatogramă unidimensională pe hirtie de filtru indigenă (M morfina, N narceină, Nk = narcotină, K = codeină, P papaverină, T = tebaină, Am = amestec).

Fig. Nr. 2. - Cromatogramă circulară pe hirtie de filtru Schleicher-Schull 589¹ (M = morfina, N = narceină, Nk = narcotină, T = tebaină, K = codeină, Am = amestec).

Fig. Nr. 3. - Cromatogramă bidimensională pe hirtie de filtru indigenă (M morfina, K codeină, T = tebaină, N = narceină, P = papaverină, Nk = narcotină).

Fig. Nr. 4. - Cromatogramă a tincturii de opiu și a tincturii papaveris pe hirtie circulară.