



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Recopilación de Métodos para Identificar  
Morfina, Desde el Punto de Vista  
Químico Legal.



DEPTO. DE PASANTES Y  
EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

*Químico Farmacéutico Biólogo*

P R E S E N T A :

Rosa González Jiménez

MEXICO, D. F.

1980

M-21676



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ANEXO II

PAGINA 2

PRESIDENTE, PROF. IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA *Ignacio Diez de Urdanivia*

VOCAL. PROPRA. ETHELVINA MEDRANO DE JAIMES. \_\_\_\_\_

SECRETARIO . PROF. ENRIQUE CALDERON GARCIA \_\_\_\_\_

1º SUPLENTE. PROF. CESAR A. DOMINGUEZ CAMACHO \_\_\_\_\_

2º- SUPLENTE. PROPRA. MA. TERESA FERNANDEZ COPPOLA  
\_\_\_\_\_

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: PROCURADURIA GENERAL DE LA  
REPUBLICA.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE: *Rosa Gonzalez Jimenez*

~~SRITA. ROSA GONZALEZ JIMENEZ.~~

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA; *Ignacio Diez de Urdanivia Mora*

Q.F.B. DIEZ DE URDANIVIA MORA  
IGNACIO.

AMADOS PADRES:

SR. CARLOS GONZALEZ ORTIZ.

SRA. ANGELA JIMENEZ DE GONZALEZ.

CON ADMIRACION Y AGRADECIMIENTO POR

TODO LO QUE ME HAN BRINDADO A LO LARGO

DE MI VIDA.

QUERIDA FAMILIA GONZALEZ GUTIERREZ.

JOSE

MARTHA.

CARLOS

ANTONIO

MARTHA.

DANIEL.

A MIS FAMILIARES.

A TODOS USTEDES, CON CARÍÑO.

RESPETABLES MAESTROS:

QUE ME BRINDARON LA OPORTUNIDAD

DE OBTENER SUS VALIOSOS CONOCIMIENTOS

Y EXPERIENCIAS.

AMIGA Y MAESTRA ( OFELIA )

A LA FAMILIA GONZALEZ MEZA.

POR SU APOYO Y COMPRESION

EN ESTA LABOR.

A USTEDES MIS AMIGOS.

MUCHAS GRACIAS.

CAPITULOS DEL TEMA:

- a.- INTRODUCCION.- PARA QUE SIRVE Y CUAL ES EL FIN DE LA TESIS.
- b.- QUE ES MORFINA Y DONDE SE ENCUENTRA.
- c.- RECOPIACION Y DESCRIPCION DE METODOS PARA IDENTIFICAR MORFINA.
- d.- ESPECIFICIDAD DE LOS MISMOS.
- e.- SUGERENCIAS SOBRE LOS MISMOS.
- f.- BIBLIOGRAFIA.



## OBJETIVO:

La presente tesis, trata de recopilar y describir los diferentes métodos, de que se puede valer el Químico para identificar el alcaloide fenantrénico más importante del opio, que recibe el nombre de Morfina.

## INTRODUCCION:

La morfina es una sustancia utilizada universalmente, aunque esta puede ser sintetizada en el laboratorio, con gran dificultad, muchos derivados semisintéticos están hechos relativamente por una modificación simple de la molécula de Morfina.

De amplios usos en Farmacología y Clínica, la Morfina no es una terapia específica, y da solamente alivio sintomático, su abuso puede ocultar los síntomas ó el progreso de la enfermedad; sólo en casos de enfermedades como cáncer, donde la morfina tiene que ser administrada siempre en grandes dosis, se debe esperar que la dependencia ocurra.

Los farmacólogos y Químicos farmacéuticos están buscando un analgésico efectivo que sustituya a la morfina sin causar dependencia.

La gran cantidad de muestras que llegan a los diferentes laboratorios encargados de controlar, identificar y frenar el transporte ilícito de estupefacientes, entre ellos la morfina y sus sales, ha hecho que los químicos cada vez, se preparen mejor para modificar y obtener resultados de las diferentes mezclas de estupefacientes en un corto tiempo, haciendo uso de los diversos métodos para su identificación: Reacciones coloridas, Pruebas cristlinas, Sistemas cromatográficos, Métodos inmunológicos, etc.

## HISTORIA:

La palabra "opio" se deriva del vocablo griego -

que quiere decir jugo, puesto que este producto se obtiene del jugo que producen las cápsulas de adormidera; del término que las designa en esa misma lengua viene el de "Codeína".

Otro alcaloide natural de ésta planta, la tebaína, toma su nombre de la ciudad egipcia de Tebas, donde se producía cierto tipo de Opio. Se ha conservado el vocablo "tebaico" como adjetivo relativo al opio. El nombre "morfina" deriva del griego "Morphens", dios del sueño.

El uso del Opio se extendió del Asia Menor hacia Grecia. Aunque fué empleado en tiempos anteriores a la historia escrita, la primera referencia se encuentra en las notas de Teofrasto ( siglo III a. de C. ), que le llamó "Meconion", de donde proviene la voz meconio, que hoy se aplica al jugo que se obtiene de las cabezas de Adormidera. Dioscórides, en el siglo I de nuestra era, conocía bien el método para recolectar y preparar el opio, y sus instrucciones para confeccionar el diacodión ó jara-be de adormidera figuran casi sin variación en las farmacopeas modernas. Los médicos Arabes estaban familiarizados con los usos del opio, y fueron los comerciantes árabes quienes lo introdujeron en Oriente y China. Los chinos lo emplearon contra la disentería. El hábito morfínico no se extendió en China hasta la última parte del siglo XVIII, cuándo los portugueses, y después los ingleses, comenzaron a explotar en ese sentido a los nativos.

La historia registra cómo, los conquistadores han empleado el tráfico de narcóticos y la opiomanía como medio de conquista y exigencia de impuestos.

En Europa, a mediados del siglo XVI se conocían bastante bien los usos del opio, que hoy se aceptan todavía.

Paracelso le llamaba "la piedra de la inmortalidad" y le utilizaba mucho en su práctica médica, a él se atribuye la tintura de opio llamada "láudano", que continúa

siendo un preparado oficial.

En 1680, Sydenham escribió: "Entre remedios que Dios Todopoderoso se ha dignado conceder al hombre para aliviar sus sufrimientos, ninguno es tan universal y eficaz como el Opio".

Esta estimulación continúa siendo válida hoy. Si --- fuese necesario elegir un número restringido de medicamentos, la inmensa mayoría de los médicos colocaría a la cabeza de la lista los alcalóides del opio, en especial la Morfina. Su valor como analgésico no tiene par, y sus usos indispensables en medicina y Cirugía están bien definidos.

A van Helmont, contemporáneo de Sydenham, le llamaban "Doctor Opiatus", por la frecuencia con que recetaba éste medicamento.

El elixir paregórico, también preparado oficial, --- procede de un elixir que a comienzos del siglo XVIII preparó por primera vez Le Mort, profesor de Química en Leyden, para el asma.

La palabra paregórico, viene de un vocablo griego --- que quiere decir "calmar".

Otro opiáceo que ha sobrevivido al tiempo es el polvo de Döver. Se le llama así en recuerdo del famoso aventurero y médico inglés Tomás Döver, que le introdujo en 1732, como agente sudorífico para la gota.

Hasta muy avanzado el siglo XIX, los extractos crudos eran los únicos preparados de opio utilizados en Medicina. En 1803, un joven farmacéutico alemán de Hanover, llamado Sertürner, aisló y describió la Morfina.

Este fundamental descubrimiento pasó inadvertido --- hasta la última publicación de Sertürner en 1816, Sertürner estuvo a punto de perder la vida experimentando sobre sí mismo con el Alcaloide. Pronto se descubrieron otros alcaloides del opio, y se extendió rápidamente por todo el mundo médico, el uso de las sustancias Químicas.

puras en vez de las drogas crudas.

En 1832, Robiquet aisló la Codeína, y Merck en 1848 la papaverina.

✓ Origen y Composición del Opio.- El opio es el resultado de la desecación del jugo que se hace fluír por incisiones en las cápsulas verdes de la Adormidera, *Papaver somniferum*. Esta planta es indígena en Asia Menor y se cultiva en otros países entre los que se cuentan Egipto, India, China y Persia.

El jugo lechoso se seca al aire y forma masas gomosas de color pardusco, que se desecan y pulverizan para hacer el polvo de opio. Los alcaloides son los componentes farmacologicamente activos de este medicamento. Pasan de veinte, pero sólo tres tienen uso amplio en Clínica; la morfina, codeína y papaverina. Además, el opio contiene gran número de sustancias químicas que no contribuyen a las propiedades farmacodinámicas del medicamento, tales como ácidos orgánicos, resinas, gomas, esencias, azúcares y cuerpos protéicos, que representan 75% del peso del opio, y los alcaloides aproximadamente un 25% del peso. Los componentes principales formadores que constituyen al opio, la Bencilisoquinolina y el Fenantreno.

A continuación se mencionan los alcaloides de mayor interés médico, así como sus porcentajes aproximados.

TABLA I. Alcaloides del opio.

GRUPO	ALCALOIDE NATURAL	% APROX. EN EL OPIO.
Fenantreno	Morfina	10.0
	Codeína	0.5
	Tebaína	0.2
Bencilisoquinolina	Papaverina	1.0
	Narcotina	6.0
	Narceína	0.3

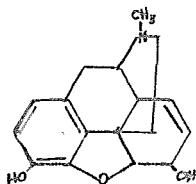
Otros muchos alcaloides naturales existen en cantidades tan pequeñas y contribuyen tan poco a la acción --

del opio que no nos ocuparemos de ellos. No es fácil obtenerlos ni tienen uso clínico por lo pronto.

✓ Estructura química de la molécula de Morfina.- El más importante alcaloide fenantrénico del opio es, con mucho, la morfina, que le da a la droga sus características farmacológicas predominantes.

Se han llevado a cabo considerables investigaciones químicas sobre la fórmula estructural de la morfina. La más aceptada hoy es la de Gulland y Robinson ( 1925 ), comprobada recientemente.

#### Molécula de Morfina.



Puede verse ( como se indica en el esquema ), que la molécula de éste alcaloide esté compuesta por un núcleo fenantrénico parcialmente hidrogenado, un puente de oxígeno, una cadena nitrogenada, la etenamina ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{N}-\text{CH}_3$ ) unida al núcleo fenantrénico en forma extraña y que constituye parte de un anillo heterocíclico de seis vértices y dos oxidrilos. Como se puede observar en la fórmula -- los grupos oxidrilos son los que tienen importancia básica para la acción morfínica y se denominan: oxidrilo fenólico y oxidrilo alcohólico. La morfina se ha obtenido sintéticamente en el laboratorio. Se obtienen muchos derivados, introduciendo un radical químico, relativamente sencillo, en los grupos hidroxilos de la molécula morfínica. Varios alcaloides fenantrénicos naturales sólo difieren de la morfina por los radicales sustituidos en uno ó los dos grupos  $-\text{OH}$ .

RECOPIACION Y DESCRIPCION DE METODOS PARA IDENTIFICAR MORFINA.

METODOS PARA LA OBTENCION DE LA MORFINA.

Existen varios métodos para la identificación de la morfina, siendo a veces necesario el obtener la muestra, ya sea aislándola de ciertos componentes en donde pudiera encontrarse tales como: tabletas ó algunos compuestos que lo contengan. La obtención puede lograrse por extracción y separación con solventes orgánicos, métodos cromatográficos ó por observación microquímicas, con algunos reactivos.

A continuación, mencionaremos algunas técnicas de la obtención y el aislamiento de la morfina.

I.- DETERMINACION DE LA MORFINA CUANDO SE ENCUENTRA EN FORMA SOLIDA.

La determinación de tabletas u otra presentación sólida se pulverizan hasta obtener un polvo fino. Se pesa exactamente una cantidad equivalente a 100-200 mg de alcaloide, y se transfiere a un embudo de separación con 20 ml de agua destilada. Adicionar 1 ml. de ácido sulfúrico 1:9, y se extrae con 5 porciones de 25 ml. de cloroformo isopropanol para morfina ( usar volúmenes mayores de solvente, y de solución acuosa cuando se trate de jarabes ó con exceso de excipiente ). Se ajusta la solución a un pH alcalino, después de la primera extracción, mediante papel indicador. Si no está francamente alcalino adicionar hidróxido de amonio.

DETERMINACIONES MICROQUIMICAS.

En éstas pruebas se usan pequeñas cantidades de muestras y de reactivos, son fácilmente observables al microscopio utilizando el objetivo de 100x500, requiriéndose luz polarizada que nos evitará la birrefringencia y

la dirosomía. La tabla 2 nos muestra, algunas de las características observadas al microscopio de luz polarizada.

TABLA 2.- Pruebas microquímicas.

ALCALOIDE	REACTIVO	OBSERVACION.
Morfina	Ioduro de potasio cádmico.	Precipitado plateado gelatinoso, cristales en masas densas formando agujas finas.
	Ioduro doble de potasio.	Con una pequeña gota de reactivo, produce un fuerte pp café rojizo, que cristaliza lentamente en forma de placas encimadas brillantes que se extienden en ramificaciones.

Dentro de las técnicas de identificación existe una gran variedad, de las cuáles sólo mencionaremos las más importantes; 1) Pruebas de formación de cristales. 2) Reacciones de color. 3) Técnicas cromatográficas. 4) Pruebas espectrofotométricas. 5) Métodos fluorométricos. 6) Pruebas físicas ( DENSITOMETRIA Y ROTACION ESPECIFICA) y 7) Métodos inmunológicos.

I) PRUEBAS DE FORMACION DE CRISTALES.

Las técnicas empleadas en éstas son las siguientes:

a) Microquímicas.

Reacción.- Colocar una gota ( 0.04 ml ) de la solución del alcaloide ( Morfina ) sobre un vaso de precipitado. Adicionar una gota de reactivo, ya sea ioduro doble de potasio cádmico ó ioduro doble de potasio, y sin agitar examinar bajo el microscopio, usando el objetivo de 100-

x 500. Observando qué clase de cristales se forman. Usar microscopio polarizado y observar sus características.

b) Con Reactivo de Marmé.

Reacción .- Se forma un precipitado plateado gelatinoso, (excepto en soluciones muy diluidas), poco colorido. Agujas grandes se forman rápidamente solas ó formando conglomerados.

c) Con Carbonato de sodio.

Reacción.- Se adiciona una gota de carbonato de sodio en solución, y se observan pequeñas rosetas de agujas, sin la formación de un precipitado amorfo.

d) Reactivo de Wagener.

Reacción.- Se forma un precipitado denso, café rojizo el cual forma microcristales en rojo, extendiéndose sobre la placa en ramificaciones. Un exceso de ácido clorhídrico concentrado, frecuentemente ayuda a que se formen los microcristales.

2) REACCIONES COLORIDAS.

Las siguientes reacciones van a formar un color, en base al complejo formado.

a) Reactivo. Solución reactivo de formaldehido.

Método.- A un mg. de sulfato de morfina, en un crisol de porcelana ó en una cápsula pequeña añádase 0.5ml de ácido sulfúrico que contenga en cada ml. una gota de solución reactivo de formaldehido; se produce en seguida color púrpura intenso, que toma rápidamente color azul violáceo intenso (diferencia de codeína) y la dehidromorfinona que da al principio color amarillo a pardo, que posteriormente cambia a color rosa y luego a rojo púrpura



pura.

b) Reactivo. Acido molíbdico.

Método.- A un mg. de sulfato de morfina, en un crisol de porcelana ó en una cápsula pequeña, añádase 0.5 ml. de ácido sulfúrico que contenga en cada ml. 5 mg. de ácido molíbdico; se produce enseguida un color púrpura intenso ( a diferencia de codeína que da al principio color amarillo verdoso pálido que cambia rápidamente a verde y después de unos minutos, cambia de verde oliva obscuro ) diferencia también de dehidromorfinona que produce enseguida color azul violáceo intenso.

c) Reactivo. Solución reactivo de cloruro férrico.

Método .- Disuélvanse 2 mg. de sulfato de morfina en 2 ml. de agua destilada y añádanse a la solución unas gotas de solución de reactivo de ferricianuro de potasio que contenga en cada ml. una gota de solución reactivo de cloruro férrico al 10%, se produce enseguida un color azul intenso ( la dehidromorfinona, da el mismo color ), con la codeína y la etilmorfina no se forma color azul, aún después de varios minutos; la papaverina, da precipitado amarillo.

d) Reactivo. Cloruro férrico-ácido nítrico.

Método.- A una solución de 5 mg. de sulfato de morfina en 5 ml. de ácido sulfúrico, se ponen en un tubo de ensayo, añádanse una gota de solución reactivo de cloruro férrico, mézclese y calientese en agua hirviendo durante dos minutos; se produce color azul que, por adición de una gota de ácido nítrico, cambia a rojo pardo obscuro ( la codeína y la etilmorfina dan la misma reacción de color, pero la dehidromorfinona y la papaverina no producen este cambio de color ).

e) Reactivo. Acido Nítrico.

Método.- Una muestra del polvo por analizar, se le agregan unas gotas de ácido nítrico concentrado, dando un color naranja rojizo, el cuál rápidamente pasa a amarillo.

f) Reactivo. Solución saturada de Ioduro de potasio.

Método.- Se disuelven 20 mg de sulfato de morfina en 5 ml de ácido sulfúrico 10N, adicionar 0.5 ml. de una solución saturada de ioduro de potasio, aquí se produce un color ámbar el cuál logra un máximo, aproximadamente en cinco minutos. Se adicionan 0.5 ml. de solución concentrada de amoniaco, que pasa a color café obscuro ( distinción de la codeína y diamorfina ).

g) Reactivo. Reacción de Deniges.

Método.- Colocar en un tubo de ensayo cierto volúmen de la solución de morfina. Agregar un ml. de agua oxigenada, luego un ml. de amoniaco, y finalmente una gota de solución diluida de sulfato de cobre al 1%, se agita fuertemente con lo que aparece una coloración rosada, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de morfina presente.

h) Reactivo. Vainillina clorhídrico. Reacción de Sánchez.

Método.- Calientese en baño María, unos miligramos de morfina con unas gotas de reactivo Vainillina clorhídrico, obtenido en frío por disolución de 0.30 g. de Vainillina en 100 ml. de ácido sulfúrico, y se observará a los pocos minutos una intensa y hermosa coloración roja violácea.

i) Reactivo. Solución acuosa de molibdato de amonio al 0.5%

Método. A una pequeña cantidad de la muestra se le agrega una gota del reactivo, y se evapora a sequedad, y al residuo se le agrega unas gotas de ácido sulfú

rico concentrado observandose posteriormente los cambios de color.

j) Reactivo. Molibdato de amonio, Reacción de Frohde.

Método. 200 mg. de clorhidrato de morfina se disuelven en 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado, y se le agrega 2 ml. del reactivo ( se disuelven 700 mg de molibdato de amonio en 50 ml. de ácido sulfúrico concentrado ); las dos soluciones se mezclan sobre hielo. La solución toma inicialmente una coloración violeta que vira a azul y finalmente a verde oscuro.

k) Reactivo. Solución acuosa de vanadato de amonio al 0.5%

Método. A una pequeña cantidad de la muestra, se le agrega una gota del reactivo, y se evapora a sequedad y al residuo se le agrega unas gotas de ácido sulfúrico, y se observan los cambios de color.

l) Reactivo. Solución de vanadato de amonio al 0.001%.

Reacción de Mandelin-Erdmann.

Método. 500 mg de clorhidrato de morfina, se disuelven en 10 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Por separado se mezclan 3 ml. de solución de vanadato de amonio al 0.001% con ácido sulfúrico concentrado - dejando caer poco a poco gotas hasta que la coloración amarilla que aparece al adicionar las primeras gotas desaparece, al adicionar más ácido sulfúrico, se obtiene una solución verde oscura.

Dentro de los métodos cromatográficos encontramos:

a.- Cromatografía en Capa fina; Esta técnica se utiliza - un soporte constituido por placas precalibradas de sílica gel, con un espesor de 0.25 mm.

La dosificación se efectúa en dos tiempos: 1) una pre dosificación que da un valor aproximado del contenido

de morfina con puntos de aplicación de 5 ul en una misma placa de 20x20 cm en donde se aplican 5 concentraciones - crecientes de clorhidrato de morfina ( 0.01 a 0.5 % ), y 4 muestras problemas diferentes. 2) consiste en tres de-- terminaciones similares, que se realizan en una misma pla-- ca, con 5 ul de la solución a dosificar del problema, co-- locada entre dos soluciones patrón equivalentes. El sol-- vente es tolueno-acetona-etanol de 96 grados-amoniaco al-- IO% ( 30:40:12:4 v/v ).

Tiempo de migración: De una hora a hora y media.

Revelado de la placa: Se seca al aire, se expone a vapores de HCL y se revela con reactivo de Dragendorff, y ácido-- clorhídrico diluido, en forma de rociado. Se obtienen man-- chas naranja sobre un fondo amarillo que permite una bue-- na densitometría.

b.- Cromatografía combinada de capa fina con micro-reaccio-- nes para la identificación de alcaloides en mezclas.

I.- Técnicas " in situ "; Estas técnicas de cromatografía en capa fina, se combinaron con micro-reacciones aplica-- das " in situ ", ó siguiendo elución ( sin filtración ) - para la identificación de I7 compuestos de diferentes com-- posiciones y estructuras químicas ( morfina y compuestos-- relacionados como papaverina y narcotina, ácido d- lisér-- gico, nicotina y otros derivados beta piridínicos ).

Dependiendo del proceso aplicado, la sensibilidad del mé-- todo varía entre I y I5 ug. de compuesto.

Las micro-reacciones " in situ ", permiten la obtención-- de sustancias estándar, directamente de la cromatopla-- usando solamente pequeñas cantidades de compuestos ( más-- ó menos de 5-I5 ug ). Trabajando con sílica gel. la sensi-- bilidad de la técnica aplicada varia entre I-I5 ug de com-- puesto dependiendo del procedimiento empleado. Se verá la separación e identificación de los siguientes compuestos-- como se muestra en la tabla 3.

Las condiciones de trabajo hecho por los investigado-- res fueron las siguientes: Se empleó como soporte.- Pla--

TABLA.3 ( ).

Resultado experimental en cromatografía en capa fina.

SUSTANCIA	Rf x 100 <sup>a</sup>	FLUORESCENCIA		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
		UV 254 nm	360 nm				
Papaverina	88.00	BL-B <sub>2</sub> <sup>c</sup>	Y	R	M	----	----
Narcotina	73.33	BL-B <sub>r</sub>	Y	R	M	----	----
Nicotina	68.00	BL-B <sub>r</sub>	----	R in	----	----	----
Heroína	60.00	BL-B <sub>r</sub>	----	R	Vi	----	----
(-) Scopolamina	56.66	BL-B <sub>r</sub>	----	R-Y	----	----	----
Acetil morfina	54.00	BL-B <sub>r</sub>	----	R	Vi	U-C	----
Cotinina	53.66	C	----	R-C	----	----	----
Dionina	52.00	BL-B <sub>r</sub>	----	R	Li(Vi)	----	----
Anabaema	51.33	BL-B <sub>r</sub>	----	R-C	----	----	----
Cafeína	50.00	BL-B <sub>r</sub>	----	R	Li(vi)	----	----
Morfina	40.00	BL-B <sub>r</sub>	----	R	Vi	----	----
(+) Atropina	34.00	BL-B <sub>r</sub>	----	R	Y	----	----
Hyosciamina	34.00	BL-B <sub>r</sub>	----	R	Y	----	----
Nornicotina	25.33	BL-B <sub>r</sub>	----	R-C	----	----	----
Acido d-Lysérgico	12.66	BL-B <sub>r</sub>	BL-B <sub>r</sub>	dL-Vi	R-C	----	Vi
Oxnicotina	5.33	BL-B <sub>r</sub>	----	R int	----	----	----
Dioxnicotina	0.00	BL-B <sub>r</sub>	----	R int	----	----	----

a= Los Valores del Rf medidos en el mismo cromatoplate.

b R<sub>1</sub>= Procedimiento b; R<sub>2</sub>= Procedimiento c; R<sub>3</sub>= Procedimiento D; R<sub>4</sub>= Procedimiento E.

BL<sup>c</sup>= Azul; B<sub>r</sub>= Pardo; C= Café cacao pardo; Li= Lila ; U= Naranja ; M= Castaño; R= Rojo;

Vi= Violeta y Y= Amarillo.

cas de vidrio ( 20x20 ), cubiertas con una capa gruesa -- de 250u de sílica gel no activada.

Eluyente.- Es una mezcla monofásica alcalina formada de - tolueno-acetona-metanol-sol. de amonio ( 25% ), en las si- guientes proporciones:4:4:5:I:0.5 v/v. El desarrollo fué- ascendente unidimensional, en una atmósfera saturada por- espacio de 30 min. El inicio se estableció a 2 cm. del -- fondo de la cromatoplaça y a 15 cm. del frente. Las mues- tras disueltas en metanol ( conteniendo aproximadamente-- I-15 ug del compuesto ), se marcaron sobre la línea base, - con un tubo capilar ó una micropipeta especial. Los resul- tados obtenidos fueron idénticos en ambos casos. Los com- puestos fueron aplicados individualmente y/o en varias -- mezclas. Se usaron 4 cromatoplacas separadas, más tarde - fueron reveladas bajo las condiciones anteriormente men-- cionadas.

Detección.- La detección fué realizada de la siguiente ma- nera: a) La localización de las muestras sobre la placa-- fluorecente fué con luz UV a 254 nm ó por su fluorescen-- cia a 360 nm. b) Acidificación de la cromatoplaça seguida por un rociado con el reactivo de Dragendorff's. c) Ro -- ciado con ácido sulfanílico diazoado ( reactivo de Pau-- ly's ) en una mezcla I:I ( v/v ) con alcohol etílico. d)- Un rociado con una solución al 5% de ácido fosfomolibdénico en etanol seguido con un calentamiento de la cromato-- plaça a 110 grados C., durante 15 minutos. e) Rociando--- con una solución ácida de 4-dimetil benzaldehido. Después se secó durante 5 min., a 110 grados C., seguido de un rociado con una solución acuosa al 25% de ácido clorhídrico y acetona ( I:I v/v ) por un secado adicional durante 15- minutos a 110 grados C. En los casos d) y e), los colores obtenidos son registrados y la cromatoplaça es rociada -- con una solución acuosa al 5% de cloruro férrico y aceto- na ( I:I v/v ). Posteriormente se llevó a secar durante - 15 minutos a 110 grados C., tiempo después del cuál los - colores son de nuevo registrados. Siguiendo la aplicación de la separación y los métodos de detección descritos, la identificación de la mancha es llevada a cabo comparando-

los valores de sus R<sub>f</sub>, en relación al de los compuestos - estándar.

Las cromatoplasmas con manchas localizadas con luz UV a 254 nm, y, con el reactivo de Dragendorff's fueron copiadas en papel especial; dos cromatogramas fueron así obtenidos. Estos se consideraron como estándares, ya que coincidieron cuando fueron superpuestos.

El principio del método que fué aplicado, es la separación seguida de la reacción " directa " sobre la cromatoplasma, continuada por una segunda separación a lo largo de la misma dirección ( diagonal ó cromatografía bi-dimensional sobre la misma distancia y con el mismo eluyente - en ambas direcciones.

Se han usado 4 tipos de reacciones: reducción, oxidación, acetilación y saponificación.

Las reacciones " in situ ", se llevaron a cabo humedeciendo la mancha con un reactivo específico ( se uso para estos propósitos un tubo capilar ). Cubriendo el sitio con una placa de vidrio de las mismas dimensiones y dejando la placa en el horno, a una temperatura dependiendo de la reacción involucrada, por un período de 30 min. Mencionaremos los 4 tipos de reacción que se llevaron a cabo:

Oxidación.- La oxidación se realizó con 30% de agua oxigenada a una temperatura de 50-70 grados C., se obtuvo el producto oxinicotina y a 120 grados C., para el compuesto scopolamina.

Reducción.- Para la reducción se usó una mezcla de ácido acético al 10% y ácido clorhídrico al 10%, ( 1:1 v/v ), con polvo de zinc aplicado sobre la mancha.

Acetilación.- Se llevó a cabo con ácido acético ó anhídrido acético y piridina ( 1:2 v/v ).

Saponificación.- Se usó una solución de hidróxido de sodio al 10%.

Los tres últimos procesos se realizaron a una temperatura de 110 grados C. Al final del proceso cada cromato

placa se enfrió a temperatura ambiente y se les aplicó es-  
tandares adecuados. Después se revelaron a lo largo de --  
una segunda dirección de acuerdo al procedimiento emplea-  
do del primer revelador. La misma muestra se marcó en va-  
rias placas para comparar diferentes reactivos para su --  
identificación; ésto mejoró los resultados obtenidos.

2.- MICROREACCIONES SEGUIDAS DE ELUSION. ( Sin remover del  
soporte ).

Esta es la otra técnica empleada para la identifica-  
ción de la muestra.:

La secuencia de operación es la separación por croma  
tografía en capa fina de los compuestos de una mezcla, --  
elusión sin filtración, reacciones y separación también -  
por cromatografía en capa fina de los productos de reac--  
ción y su identificación.

Los compuestos separados y detectados como manchas -  
con luz UV sobre el soporte fluorescente a 254 nm ó con --  
un área de referencia. Rociada con solución de Dragendor-  
ff's fueron cuidadosamente removidas con su soporte. Cada  
mancha se introdujo en un pequeño tubo marcado. Se adicion  
ó a cada muestra una cantidad de 0.1 y 0.2 ml. de una --  
mezcla de elusión ( metanol y agua 7:3 v/v ). Los tubos -  
se cubrieron con un pequeño embudo de vidrio y se calentar  
on en B.M. con una agitación suave durante 15-20 minutos.  
Cuándo, para separar una substancia son necesarias una ó-  
dos reacciones de identificación, el soporte que ha sido-  
removido deberá dividirse en dos ó más porciones y el proo  
cedimiento dado anteriormente será seguido ( en éste caso  
la concentración de la muestra deberá ser mayor ). Depen-  
diendo del compuesto que se cree que esta presente en el-  
tubo de prueba, se añaden los mismos reactivos que se ha-  
bian empleado en las reacciones " in situ ".

Agitando cuidadosamente los tubos fueron de nuevo tau  
pados con embudos y se llevaron a B.M. durante 15-20 minuu  
tos, agitandose periodicamente.



Después de enfriado y sedimentado el soporte sólido el sobrenadante se extrajo con un tubo capilar y se aplicó a la línea base de la cromatoplaca.

Los estándares se colocaron junto a ellos. La elección de los estándares dependió de los compuestos que se creyeron estaban presentes en la mezcla como también de aquellos que pudieran resultar de las reacciones.

Las placas fueron desarrolladas ascendentemente y la detección de las muestras se llevó a cabo como anteriormente se describió en la técnica de " in situ ".

A continuación se menciona una prueba rápida por cromatografía en capa fina de algunos medicamentos y narcóticos importantes, a partir de productos biológicos ( orina)

Proceso de separación.- Los metabolitos no conjugados se extraen primero a pH ácido con éter, y después en medio alcalino con dicloro metano-propanol 85:15. Se hace un cromito del extracto ácido, empleando cloroformo-etanol-amoniaco 15N ( 80:15:5 v/v ), en esa separación se encuentran barbituratos y metabolitos y por otro lado los hipnóticos neutros, que pueden separarse por sus Rf.

En cambio la morfina se extrae a pH 9 ( básico ), así como: anfetamina, analgésicos, alcaloides, opiáceos y fenotiazina como tales ó bien en forma de sus metabolitos correspondientes. Se emplean sustancias de referencia y se corren en los dos solventes siguientes: éster acético-metanol-amoniaco ( 85:10:5 v/v ) y en cloroformo-metanol-amoniaco ( 90:10:1 v/v ).

Todos los compuestos tienen comportamiento diferente y se reconocen fácilmente. Se pueden diferenciar la anfetamina de la 4-amino fenazona.

Todos los compuestos nitrogenados terciarios se revelan con iodo platinado de potasio como alcaloides, analgésicos antidepresivos, opiáceos, fenotiazina. Posteriormente se saturan con nitrato de plata amoniacal, los metabolitos de morfina y fenotiazina.

Para identificar los productos conjugados, la orina se trata con ácido clorhídrico concentrado. Calentando a reflujo 15 minutos, y se extrae a pH 9.25 con dicloro metano-isopropanol. La morfina, codeína, metacualona y fenotiazina se separan con cloroformo-etanol-amoniaco (80:15:5 v/v ) y se revelan con los siguientes reveladores ácido sulfúrico al 5%, iodo platinado de potasio y después con nitrato de plata amoniacal, después del revelado con sulfúrico se seca con aire caliente. Finalmente los metabolitos de la metacualona y otros compuestos básicos que no hayan sido descompuestos por la hidrólisis como la morfina, pueden identificarse llevando a cabo pruebas simultáneas, usando sustancias de referencia, que se colocan en la zona inmediata a la de la morfina.

#### CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA:

5 g. de adormidera seca ó 20 g del vegetal verde, se colocan en 50 ml de metanol hirviendo durante 30 minutos se filtra, se seca, se muele, se agrega cal apagada hasta pH 9-10 y se le adiciona al metanol inicial durante 30 minutos más. Se filtra nuevamente, se evapora al vacío, el residuo seco, se suspende en 5 ml. de metanol y esto constituye el extracto.

Dicho extracto se puede efectuar como para cromatografía en capa fina, ó según la técnica que emplea una muestra de cloroformo-isopropanol a pH 10 en medio amoniacal, con tratamiento de cloruro de sodio, la fase orgánica separada se evapora al vacío y se resuspende en etanol. En todos los casos el extracto se re-evapora y se resuspende de una vez más en una solución de linestrol en concentración de 0.5 ng/ml de estándar interno en una mezcla de isopropanol-cloroformo ( 1:3 v/v ) .

Condiciones de operación.- Fué un detector de ionización de flama, la columna fué de 0.65 cm. de largo x 3 mm de diámetro interior. Impregnado al 5% con SE30 sobre Aeropack 100 120 mallas. La temperatura de 200 grados C., el inyector

tor a 230 grados C., y el detector a 250 grados C., el volumen aplicado de 2 microlitros, los tiempos de retención relativa son:

Estándar interno -----	I
Codeína -----	I.5
Morfina -----	2.0

Sililación.- La muestra ó estándar se disuelven en 1 ml. de piridina.

Se deja reaccionar durante 3 horas, y se evapora la piridina. El residuo se resuspende en el estándar interno que está disuelto en hexano. Los tiempos de retención son:

Codeína -----	I.38
Morfina -----	I.78

Posteriormente, se leen los picos obtenidos en la grafica del aparato empleado.

#### CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO.

Dos ml. de Boffer de borato y 1-2 ml. de suero ó plasma junto con 25 ml. de isobutanol al 10% en cloroformo, fueron colocados en un tubo de vidrio de 50 ml. con tapón y agitado vigorosamente durante 3 minutos. La capa acuosa fué extraída y el solvente centrifugado durante 5 minutos a 2000 rpm, y posteriormente éste fué decantado en una probeta graduada de 25 ml. La capa orgánica en éste punto, se lavó dos veces con 5 ml. de boffer fosfato ( pH 10.1 ), y el volumen del solvente se recobró. Cinco ml de ácido clorhídrico 0.5N fueron adicionados y la probeta se agitó vigorosamente durante tres minutos.

4.5 ml. de ácido extraído fueron transferidos a un tubo de vidrio tapado, y el pH se ajustó a  $8.7 \pm 0.2$ , por la adición de carbonato de potasio anhidro.

La morfina fué entonces extraída de la solución acuosa en 5 ml. de etil acetato conteniendo 10% por volumen de isopropanol; 4.5 ml. de la solución de acetato etil --

isopropanol junto con 0.2 ml de la solución de Nalorfina- fueron transferidos a un tubo de ensaye, con tapón de rosca, con una cubierta de teflón, y posteriormente se evaporó a sequedad con una suave corriente de aire filtrado a 50 grados C., de 1-10 ml. de acetato de etilo y anhídrido trifluoroacético fueron adicionados, y el tubo se tapó para mezclarse vigorosamente en un mezclador Vortex. El tubo fué colocado en un B.M. a 50 grados C., por 20 minutos, después el contenido fué de nuevo evaporado a sequedad como ya se mencionó. La muestra fué reconstituida en 0.1 ml de acetato de etilo, usándose alicuotas de 1-5 ul para cromatografía.

La cuantificación estuvo basada en relación al pico mayor obtenido en el cromatograma de los derivados trifluoroacetilados de morfina y nalorfina.

COLORIMETRIA AUTOMATICA O AUTOMATIZADA.

Este método emplea el uso de un aparato espectrofotométrico, el cuál nos dará lecturas de concentración de las muestras:

La reacción colorimétrica consiste en la copulación de la nitroso morfina con 1-nitroso naftol.

Se adiciona a la muestra convenientemente purificada nitroso naftol más nitrato de potasio, éste hace el papel de estabilizador adicionándole nitrato de sodio y luego agua, finalmente se midió la extensión a 530 nm. Mide los problemas sin contaminación de una muestra con otra.

Condiciones del aparato.- Se emplea un aparato muestreador tipo 2, de Technicon Corp.

Reactivos empleados:

- a) 1-nitroso-2naftol al 0.065% en ácido acético.
- b) Nitrato de plata 15% en agua destilada.
- c) Nitrato de sodio 0.03% en agua destilada.
- d) Acido clorhídrico 1.18 al 5% en agua destilada.

Rangos de concentración de la muestra: Se emplea solución de clorhidrato de morfina en HCL al 5% en concentraciones límites de 0.01 a 0.05%.

Este método se usa cuando se trata de obtener la muestra de materiales biológicos como son: extracción de morfina y quinina.

Técnica.- Dos ml. de muestra ( orina, plasma ó tejido homogenizado ) es transferido a un tubo de vidrio de centrifuga con tapón de 15 ml, el pH es ajustado de 9 a 10 con hidróxido de amonio 3.7 N. Cuatro mililitros de cloroformo-isopropanol ( 3:1 v/v ) es adicionado a cada tubo y las muestras son agitadas manualmente durante 60 seg. Se separa la fase orgánica y se toma una alícuota de 3 ml para el análisis de morfina, y el restante para el análisis de quinina.

Ensayo fluorométrico de morfina.- El extracto orgánico es evaporado a sequedad a B.M. a una temperatura de 85 grados C., en un tubo de vidrio de centrifuga cónico de borosilicato de 15 ml.

Se lleva a sequedad, colocándolo en un horno a 100 - grados C., por 10 minutos. A el residuo presente en cada tubo se le adicionó 0.1 ml. de ácido sulfúrico concentrado y se mezcla en un agitador Vortex-Genie. A cada muestra se adiciona 1 ml de agua destilada, y 1 ml de hidróxido de amonio concentrado. La mezcla se agita en el homogenizador Vortex-Genie, y se lleva al autoclave por 15 minutos a 120 grados C., con una presión de 15-18 lb. Las soluciones se transfieren a cubetas de vidrio de borosilicato de 7 mm x 150 mm y la fluorescencia se observa en la torre espectrofluorométrica automática ( ATS ) utilizando el filtro Corning # 4-77. La máxima emisión de longitud de onda, se obtiene a 410 nm y se leen las muestras utilizando un rango de 100 a 510 nm.

Blanco.- 2 ml de orina sin droga ( blanco ) fueron extraídos por el proceso ya mencionado, se determinó su fluores

cencia en la torre espectrofluorométrica automática como se describió para ambas morfina y quinina. Se recupera de 0.1 a 1.0 ug de morfina ( base libre ) evaporando a sequedad, y de 0.25 a 2.5 ug de morfina de la orina ( $65 \pm 4.5\%$ ).

La usencia de 100% de recuperación fué debida a la extracción incompleta de ésta droga.

Densitometria.- Para ésta técnica es necesario, obtener la muestra de la siguiente manera:

Obtención del extracto.- 5 g de 'adormidera seca ó 20 g del vegetal verde, se ponen en 50 ml de metanol hirviendo durante 30 minutos, se filtra, se seca, se muele; se agrega cal apagada hasta pH de 9-10, y se le adiciona al metanol inicial durante 30 minutos más. Se filtra nuevamente, se evapora al vacío, el residuo seco se suspende en 5 ml de metanol y esto constituye el extracto que se desea. La técnica se efectúa con la ayuda de un aparato Cromoscan - Yoyce-Loebl, operando en transmisión, empleando un filtro 529 y registrando las curvas de absorción.

Se mide la altura máxima de los picos y se traza la recta de referencia. Se ve el punto medio, y se busca la media de los valores obtenidos en cada pico con el extracto antes mencionado. De ésta manera se calcula el contenido de morfina en g/lit.

Rotación específica.- Es una prueba física para la identificación de la morfina, que emplea una simple lectura, siendo diferente, según el caso en que se encuentre como:

a) Clorhidrato.- Debiendo prepararse una solución al 2% - peso/volumen, dándonos una lectura de cerca de -98 grados y,

b) Sulfato.- Se prepara la misma solución, dando una lectura de cerca de -95 grados.

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.- Otro método para la identificación de morfina de líquidos biológicos consiste en la conjugación del hapteno-morfina que se hace antigénico por aco---

plamiento a una proteína en el grupo fenólico de la molécula.

Concentraciones extremadamente bajas de morfina de 0.5 nanogramos, pueden ser medidos por éste procedimiento

Se describirá procedimientos para la conjugación de morfina a proteína, y para la radioinmunoprecipitación de éste conjugado con antisuero específico, el cuál puede ser usado para medir cantidades de morfina en suero captándose niveles de nanogramos.

La morfina se convierte a 3-orto carboxi metil morfina por reacción de la base libre con beta-cloroacetato de sodio en etanol absoluto ( 2:3 v/v ). La carboximetilmorfina fué acoplada a albúmina sérica bovina ( BSA ) en solución acuosa, en presencia de una carbodi-imida hidrosoluble. 8 mg. de carboxi metil morfina se disuelven en 2 ml. de agua destilada conteniendo 10 mg. de albúmina sérica bovina. El pH de la mezcla se ajusta a 5.5 y se adiciona 8 mg. de I-etil-3-(3-dimetil aminopropil)carbodi-imida. La mezcla se incuba durante la noche a temperatura ambiente y se dializa durante 7 días con agua destilada, cambiando la solución dializante de 4 a 5 veces por día.

Conjugados analizados por el procedimiento espectrofluorométrico de Balatre y Col., contenían 3 ó 4 grupos carboxi metil morfina por molécula de albúmina sérica bovina. Se utilizaron conejos albinos Nueva Zelanda, que fueron inmunizados con 1 mg. del complejo carboxi-metilmorfina albúmina sérica bovina.

El inmunógeno fué disuelto en boffer de fosfato a un pH 7.4 y emulsificado con un volumen igual de Adyuvante Completo de Freund's. La dosis inicial fué de 1.6 ml. Se tomó 0.4 ml y se inyectaron en el cojinete plantar. Se aplicó después 100 ug de antígeno en Adyuvante en un intervalo de 6 a 8 semanas de la siguiente manera: 50 ug en cada muslo ó 25 ug. en cada cojinete plantar. Se extrajo --

una muestra de sangre de 5 a 7 días después de la inyección. El antisuero obtenido, se sometió a Radio-inmunoensayo de la siguiente manera:

Varias diluciones de antisuero fueron incubadas en presencia de 100 partes por mol de ( $H^3$ ) dihidromorfina con 4000 conteos/min a 4 grados C., durante la noche.

Después de la incubación una solución neutra de sulfato de amonio saturada se adicionó a todos los tubos, el precipitado, sedimentado por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 grados C., fué lavado dos veces por una porción de sulfato de amonio al 50%. El precipitado lavado conteniendo anticuerpo marcado de morfina, se disolvió en 0.5 ml. de NCS solubilizado, y la radioactividad fué determinada en un espectómetro Packard-Tri-Carb-Cintilación-Líquida. El tubo que contenía dihidromorfina radiactiva, antisuero y morfina sin marcar sirvió como una medida máxima de radioactividad del anticuerpo unido.

La adición de cantidades crecientes de morfina sin marcar a una cantidad fija de ( $H^3$ ) dihidromorfina y antisuero, resultó en una inhibición competitiva de la dihidromorfina marcada para la formación del complejo hapténico. Con la adición de 0.5 ng de morfina sin marcar por tubo ( con una concentración de 1 ng/ml ) antes de la adición de sulfato de amonio al 20% de la dihidromorfina marcada fué desplazada del anticuerpo.

La especificidad del antisuero para la morfina fué demostrada por incubación del hapteno marcado con suero normal de conejo.

La radioactividad restante en el precipitado del suero normal de conejo después del lavado, se restó del valor obtenido en los otros tubos. La capacidad inhibitoria de la codeína, la cuál es eter-3-metil morfina. La codeína comparada con la de morfina. La codeína fué más efectiva que la morfina ( sobre una base molar ) produciendo 50% -



de inhibición de precipitación de complejo hapteno-proteí  
na, marcado.

Esto no es sorpresa ya que la codeína tiene mayor si  
militud estructural al grupo inmunógeno carboxi-metil-mor  
fina de la morfina.

ESPECIFICIDAD DE LOS MISMOS.

1.- PRUEBAS DE FORMACION DE CRISTALES: Con respecto a estas pruebas, que se usan para la detección de la morfina, el emplear porciones pequeñas de la muestra problema para su identificación, nos da la ventaja de poder manejar un mínimo de problema y de reactivos y obtener resultados rápidos y satisfactorios al sólo examinarlos bajo el microscopio, dandonos diversas formas amorfas de cristales y por tanto poder diferenciarlos.

2.- REACCIONES COLORIDAS: En estas reacciones se van a usar pequeñas cantidades de muestras y reactivos específicos desarrollando inmediatamente coloraciones diversas. Estas en ningún momento van a dar un resultado confirmativo puesto que son pruebas presuntivas, ya que existen una serie de interferencias con varios estupefacientes y dar así resultados falseados.

a) Con solución de formaldehído y ácido sulfúrico se produce un color púrpura intenso, que se torna a azul violáceo en la morfina que nos diferencia completamente de la Codeína que da primero color amarillo y luego rojo púrpura. Otros autores mencionan la similitud de la coloración que da la morfina con la Papaverina y en el caso de la Codeína con la Narceína, Nicotina y hasta cierto punto con la Veratrina.

b) Con ácido molibdico torna enseguida a un color púrpura diferenciándose también de la Codeína, que vira a verde olivo y de la dihidromorfina, que se traduce a azul violáceo intenso. Estas reacciones sólo se pueden efectuar cuando la morfina se encuentra en forma de sulfato.

c) Con el empleo de cloruro férrico y ferrocianuro de potasio, da un color azul intenso, que llega a confundirse cuando se encuentra en mezcla con la dihidromorfina, -- siendo entonces no muy específica, a menos que se le adicione ácido nítrico, que da un cambio de color a rojo par

de obscuro, pero encontrándose Codeína y etilmorfina, dan la misma reacción de color.

d) Empleando ácido nítrico concentrado, da un color amarillo que sólo reacciona cuando la muestra se encuentra en forma de sal, en presencia de yoduro de potasio, produce un color ambar, al cual hay que adicionarle amoniaco, que torna a café obscuro para distinguirla de la Codeína y de la diamorfina. Otros autores mencionan la similitud de la coloración que da la morfina con Aconitina, Cocaína, Conicina,,Narceina, Tebaina y finalmente Veratrina.

e) Con el empleo del reactivo de Deniges al que sólo hay que agregar agua oxigenada, amoniaco y sulfato de cobre diluido, da una coloración rosada cuya intensidad es proporcional a la cantidad de morfina presente.

f) Usando el reactivo de Sánchez ( Vainillina-clorhídrico) da una coloración rojo violácea, que solo reacciona en -- presencia de morfina pura.

g) Con el reactivo de Fröhde la morfina debe encontrarse en forma de clorhidrato,agregarle molibdato de amonio, -- que tornará a verde obscuro y efectuarse sobre hielo, ya que es una reacción exotérmica.

h) En presencia de reactivo de Mandelin-Erdmann, a éste -- se le agrega solo vanadato de amonio, ácido sulfúrico que da una tonalidad verde oscura.

3.- METODOS CROMATOGRÁFICOS: Los métodos cromatográficos, resuelven con notable éxito el problema de la separación e identificación de los componentes de un grupo de substancias químicamente parecidas, o la demostración de muestras de muy baja concentración en los líquidos biológicos

El empleo de un soporte inerte, como es el gel de sílice, cuyas propiedades de adsorción, se pueden regular con ciertos disolventes, con estos se desplazan rápido y homogéneamente, la dispersión de la mancha puede modificarse siendo posible aplicar reactivos de identificación-

como ácidos y bases y calentamiento superiores a los 100-grados C. En las cromatografías de capa fina el tiempo de migración es retardado, los reactivos reveladores como el de Dragendorff's permiten identificaciones coloridas, fácilmente observables.

La cromatografía en capa fina, puede combinarse con micro-reacciones aplicadas en el sitio de la mancha eluida para la identificación de diversos compuestos con diferentes estructuras químicas, pudiendo detectar muestras que varían de 1 a 15 ug; permiten también la obtención de las sustancias directamente de la cromatoplaqa, para su detección cuantitativa.

La ventaja de este método, es que por medio de los Rf, nos indican cuantos componentes hay en la mezcla, esencialmente específica ya que utiliza 4 tipos de reacciones: reducción, oxidación, acetilación y saponificación, las cuales son necesarias, para la obtención de los diferentes componentes que se encuentran en el problema.

Para líquidos biológicos la muestra debe ser concentrada en medio ácido y extraída a pH básico y con reflujo. Los reveladores como yodo platinado de potasio, nitrato de plata amoniacal identifican a los componentes que no hayan sido descompuestos por la hidrólisis como en la morfina, siendo fácilmente reconocida.

En cuanto a cromatografía en fase gaseosa, la utilización de material y equipos muy costosos no son muy accesibles en cualquier laboratorio y además que se tiene que utilizar técnicas muy precisas para la preparación de las muestras pero todo esto se compensa en los resultados obtenidos que son muy precisos y los tiempos utilizados en correr las muestras en el cromatografo son relativamente cortos.

CONCLUSIONES:

1) En las pruebas cristalinas se emplean pequeñas porciones de la muestra y de reactivos, se identifican mediante las diferentes formas que presentan los cristales. Las reacciones no se realizan en forma instantánea, los resultados obtenidos son relativamente rápidos hasta confirmación bajo el microscopio.

2) Con respecto a las pruebas coloridas ó de color se deduce lo siguiente: Se usan pequeñas cantidades de muestra ( sólida, líquida ), las reacciones se realizan en forma instantánea; son accesibles en cuanto manipulación ( según la técnica a seguir ), no obstante éste tipo de pruebas son presuntivas debido a la serie de interferencias que presentan los diferentes estupefacientes, es por ésta razón que se tiene que hacer uso de pruebas más específicas para lograr obtener los mejores resultados.

3) Las pruebas inmunológicas son técnicas laboriosas (tardadas en llevarse a cabo) de gran sensibilidad, y en cuanto a su manipulación los aparatos que se emplean son de alto costo, así como los reactivos.

4) En los métodos fluorométricos intervienen una serie de factores como son: efectos del pH, temperatura, tiempo, concentración de los reactivos que se emplean. Son métodos no muy accesibles. Los resultados que se obtienen son de gran precisión.

5) Otras técnicas que se pueden utilizar para la identificación de los alcaloides son: cromatografía de gases y cromatografía de capa fina, intercambio iónico y cristalización fraccionada. Estos métodos son muy precisos aunque lentos y que se necesita de una instalación muy costosa y personal bien entrenado en cuanto a manipulación de aparatos y técnicas e interpretación de resultados.

Con esto se puede llegar a sugerir que el método más fácil y rápido y de menor costo son las reacciones coloridas, aunque aquí debemos tener experiencia en interpretar

las tonalidades de coloración de un alcaloide en particular porqué de lo contrario se puede falsear el resultado. En realidad la desventaja que existe es que son pruebas presuntivas y para confirmarlas es necesario hechar mano de otras técnicas más precisas como las antes mencionadas.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Auterhoff H und Ahlers G. " Reaktionen des Morphins mit Reagenzien, die konzentrierte Schwefelsäure enthalten ". Pharmazeutisches Institut der Universität, Auf der Morgentelle. Eingegangen am. 650-53 ( 1975 ).
- 2.- Achor B. Leonard and Geiling E.M.K. " Isolation and Purification of Semimicro Quantities of Morphine " Analytical Chemistry 26:6, 1061-62 ( 1954 ).
- 3.- Balulescu E. George and Constantinescu Titus. " Thin Layer Chromatography Combined, with Microreactions for the Identification of Alkaloids in Mixtures ". Analytical Chemistry. 47:13 2156-60 ( 1975 ).
- 4.- British Pharmacopeia. British Pharmacopeia Convention. 3<sup>th</sup> Ed. 505-7 ( 1968 ).
- 5.- Buzzo Alfredo. Toxicología. Ed. Amiceto Lopez. 2<sup>nd</sup> Ed. 110-114 ( 1945 ).
- 6.- Clark. G.E. " Isolation and Identification the Drugs in Pharmaceuticals Body, fluids and Post Mortem Materials ". The Pharmaceutical Society of Great Britain. the Pharmaceutical Press. 25:5 431-432 ( 1971 ).
- 7.- Goodman S. Louis, M.A.M.D. y Gilman Alfred, Ph. D. " Bases Farmacológicas de la Terapéutica ". Edit. - Unión Tipográfica. Editorial Hispano Americana. México. 246-306 ( 1962 ).
- 8.- Gramond Paris M, et. R.R. Paris. " Sur différents procédés de dosage de la morphine ( densitométrie, colorimétrie automatique et Chromatographie en phase gazeuse ) applicables aux Pavots indigènes " Annales pharmaceutiques francaises. 32:2, 97-102 ( 1974 ).
- 9.- Mulé J.S. and Hushin P.L. " Semiautomated Fluorometric---

Assay for Submicrogram Quantities of Morphine and Quinine in Human Biological Material ". Analytical Chemistry. 43:6, 708-II ( 1971 ).

10.- A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Ed. Board. Washington, D.C. 12<sup>th</sup> Ed. 556, 670, 672, 681, 706, 709 ( 1975 ).

11.- Sydney Spector and W. Parker Charles. " Morphine Radioimmunoassay ". Science 168:12, 1347-8 (1970)

12.- The Pharmacopeia of the United States of America. United States Pharmacopoeial Convention. 3<sup>th</sup> Ed. 444 ( 1960 ).

13.- Von J. Breiter und Helger R. " Dünnschicht Chromatographischer Schnellnachweis wichtiger Arzneimittel- und Rauschgifte ". Aus der Biochemischen Forschung der E. Merck Darmstadt Eingegaugen am 30:11, 187-9 ( 1973 ).

14.- Wallace Jack E. and Horace E. Hamilton. " Determination of Morphine in Biologic Fluids by Electron Capture Gas-Liquid Chromatography ". Analytical Chemistry. 46:14, 2107-II ( 1974 ).





## Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25

FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD  
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.  
TEL. 548-49-79