

**Sobre la determinación de nicotina. I. Determinación
del alcaloide en soluciones puras y en extractos
comerciales de uso insecticida (*)**

por

Jesús Cabo Torres y Guillermo Tena Núñez

Introducción

Objeto fundamental de nuestro trabajo es hallar un método de determinación de nicotina que, no requiriendo elevada cantidad de muestra como los clásicos y siendo sencillo en su realización, tampoco hiciera imprescindible la posesión de aparatos costosos ni el manejo de reactivos engorrosos en su preparación, poco corrientes en el mercado o de corta duración una vez preparados.

La determinación de nicotina interesa a la Farmacognosia, tanto como a la Toxicología, la Fisiología vegetal o la Fitofarmacia. Por ello nos hemos propuesto poner a punto una técnica que, reuniendo las condiciones generales antes señaladas, sea aplicable a la valoración del alcaloide en hojas de tabaco, vísceras, disoluciones puras o comerciales y cualquier otro producto que pudiera contenerlo.

En esta primera nota resumimos lo más condensadamente posible la labor bibliográfica realizada previamente y damos cuenta de los ensayos

(*) Trabajo presentado a la II Convención Bicenial de la Industria Farmacéutica MADRID - Mayo, 1963.

realizados para conseguir determinar, de manera sencilla, la nicotina en soluciones puras y en extractos comerciales impuros de uso insecticida.

Ateniéndonos al fundamento que inspiran las numerosísimas técnicas propuestas para la valoración de nicotina, podemos clasificar éstas en los siguientes grupos:

- 1.º—*Gravimetrías.*
- 2.º—*Volumetrías.*
- 3.º—*Conductimetrías.*
- 4.º—*Polarografías.*
- 5.º—*Polarimetrías.*
- 6.º—*Refractometrías.*
- 7.º—*Colorimetrías.*
- 8.º—*Nefelometrías.*
- 9.º—*Espectrofotometrías.*
- 10.º—*Tensión superficial.*
- 11.º—*Cromatografías.*
- 12.º—*Valoraciones biológicas.*

Todo ello se refiere al proceso de valoración final. Pero a la enorme variedad que supone la existencia de tan distintos fundamentos, junto con las numerosas modificaciones aplicadas a cada uno de ellos, hay que añadir otra variable, cual es el tipo de técnica adoptado para la extracción previa del alcaloide, especialmente cuando se halla en mezcla compleja, sea artificial o de origen biológico.

La extracción de la nicotina se efectúa siguiendo dos procedimientos generales:

a) Por extracción con disolventes orgánicos, como es usual para los alcaloides.

b) Por destilación en corriente de vapor de agua, ya que la nicotina es uno de los relativamente pocos alcaloides líquidos y volátiles.

Pero cada uno de estos procedimientos se ofrece en un sinnúmero de modalidades y ello, combinado con lo que exponíamos en el párrafo anterior, hace comprender que las posibilidades son prácticamente inagotables.

Las técnicas gravimétricas propuestas alcanzan una cifra considerable, pero la inmensa mayoría se basan en la técnica primitiva de preci-

pitación cuantitativa con ácido silico-wolfrámico, empleada con alcaloides en general y que BERTRAND y JAVILLIER (3) propusieron en 1909. Al final se pesa el precipitado convenientemente desecado o el producto que resulta de su calcinación previa. Para la nicotina goza, aún hoy, de general uso, siendo una de sus modalidades el método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas de EE. UU., en la última edición (1960) de sus «Official Methods of Analysis» (59).

HAGER en 1881 (34) y BREZINA (8) en 1915 fueron los precursores de otro tipo de técnica gravimétrica de general aplicación para alcaloides, basada en la precipitación con ácido pícrico y pesada posterior del precipitado. PFYL y SCHMITT (62) en 1927 estudiaron el proceso aplicándolo a la nicotina y estableciendo además de la modalidad gravimétrica, otra volumétrica basada en la valoración con solución alcalina del pícrico retenido por la nicotina constituyendo el precipitado.

Las técnicas volumétricas son también muy numerosas. Unas se basan en alca'imetría usual, directa o de retroceso, habiéndose propuesto distintos indicadores, siendo el rojo de metilo el de mayor uso. Otras son volumetrías más especiales; entre éstas, la que requiere una previa precipitación de nicotina con ácido pícrico, determinando después la cantidad de éste que forma parte del precipitado (dipicrato de nicotina) mediante álcali. 0,1N en presencia de fenolftaleína. Como dijimos al tratar de la modalidad gravimétrica de este tipo de precipitación, la técnica primitiva fue propuesta por PFYL y SCHMITT. También la precipitación con ácido silico-wolfrámico ha dado lugar a una versión volumétrica (KASANSKY) (39). No faltan otras volumetrías, como las yodométricas y en medio anhidro.

No deseando alargar esta exposición, reunimos en los cuadros adjuntos un resumen bibliográfico con copiosas citas, remitiendo al lector interesado en el tema al extenso trabajo de nuestro compatriota COTA GALAN (14) y al de uno de nosotros (Tena) (86).

Resumen bibliográfico de métodos de valoración de la nicotina

	Fundamentos	Autores	Citas
1	GRAVIMETRIAS:		
	A). Precipitación con ácido silico-wolfrámico	Bertrand y Javillier Dörr Waser y Stahl Rasmussen König Wagner Pizer Spies Ralston Avens y Pearce Asociación ofic. de Quím Agric Ogg, Willits y Ricciuti	3 20 95 73 43 91 63 80 72 1 58 60
	B).—Precipitación con ácido pícrico.	Hager Brezina Pfyf y Schmitt Kraft y Steinhoff Pyriki Wenusch Rasmussen y Kofoed Van Elteren Gorbach y Koegler	34 8 62 42 70 97 75 23 28
	C).—Otros procedimientos gravimétricos.		
	Ac. Arsenicowolfrámico . lodo saturado con cloro .	Guglielmelli y Hordh. Chataway y Porkes	31 11
2	VOLUMETRIAS:		
	Volumetrías normales		
	Directas	Metayer Kissling Bodnar y Nagy Willems Bodnar y Povesalamy Palfray, Sabetay y Metayer König Puccinelli Revol y Pinaton Kasansky	54 40 5 98 6 61 44 69 76 39
	Indirectas	Bertrand y Javillier Spallino Mennelli Wales Dubrisay Cundiff-Markunas	4 80 53 93 21 15-16
	Precipit. con silico-wolframic. (*) Precipit con pícrico . (*) Iodimetria		
	Acido perclórico		

(*) Pese a que tiene lugar una fase previa, el proceso final es volumétrico.

Resumen bibliográfico de métodos de valoración de la nicotina (continuación)

	Fundamentos	Autores	Citas
3	CONDUCTRIMETRÍAS	Rasmussen	74
		Stancie	81
4	POLAROGRAFÍAS	Semerono	79
		Rusconi, Monnier y Wenger	77
		Nangniot y Melomed	57
		Nangniot Melamed y Martens	52
		Hasselbach	35
5	POLARIMETRÍAS	Popovici	67
		Von Degrazia	18
		Toole	88
6	REFRACTOMETRÍAS	Frakin y Roiter	25
7	COLORIMETRÍAS	Hofmann	36
		Sutherland, Darogo y Pollord	85
		Tekeuchi y Mikomi	86
		Policorpo	66
		Gettler y Sunshine	26
		Chezzi	12
		Dobrin	19
		Barta y Marschek	2
		Corcoran, Helmer y Page	13
		Markwood	48-49-50
		Mc. Cornick y Smit	51
		Cuzin y Schwartz	17
		Fabre, Truhaut y Bondène	24
		Morani y Giovannini	46
Cota	14		
Bose y Dalol	7		
8	ESPECTROFOTOMETRÍAS	Hofmann	37
		Vocher y Tovechinon	94
		Willits, Swain, Connelly y Brice	99
		Pleat, Harley y Wiberley	64
		Mocrhy	55
		Eddy y Eisner	22
		Griffith	29
		Kobata, Akinaga e Itaishi	42
		Schartzman	78
		Pleasants	65
Waltz, Haensermann y Nyari	92		
9	NEFELOMETRÍAS	Kisling	40
		Wakehan	96
		Markwood	47

Resumen bibliografico de métodos de valoración de la nicotina (continuación)

	Fundamento	Autores	Citas
10	CROMATOGRAFIA	Porter, Naghiski y Eisner.	69
		Wagner	90
		Leiserson y Wlaker	46
		Griffith, Valteau y Stokes	30
		Jeffrey y Tso.	38
		Goldbaum y Kazzyak.	27
		Pyriki	70
		Carassiti.	10
11	DETERMINACIONES BIOLÓGICAS	Storn van Leume.	83-84
		Hahn y Lauger	33
		Hahn y Ehrisman	32

Parte experimental**DETERMINACIÓN DE NICOTINA PURA EN SOLUCIÓN**

En primer término, pretendemos contrastar la exactitud del proceso a seguir en la valoración, operando con cantidades conocidas de nicotina pura de toda garantía.

Seguimos, en principio, la técnica volumétrica del pírico, más clásica y generalmente admitida, para después compararla con la de volumetría usual, en presencia de rojo de metilo, naturalmente, más cómoda y sencilla y por tanto recomendable, si responde a los requerimientos de una aceptable exactitud.

I.—Por precipitación con pírico*Reactivos:*

Acido pírico M/20 solución acuosa al 11,46 % (prácticamente a saturación).

Acido sulfúrico aproximadamente N/10

NaOH N/10.

NaOH N/40 (= 0,025N).

Tolueno.

Nicotina: preparamos una solución acuosa cuya concentración, rigurosamente controlada, fluctúe alrededor de 0,5 %.

Técnica:

Tomamos un volumen de la solución nicotínica, equivalente a unos 0,02 g del alcaloide, o sea 4 ml de la solución preparada al 0,5 % (pipeta fina). Lo pasamos a un erlenmeyer de 100 ml, diluyendo hasta 25 ml con agua destilada exenta de CO_2 y neutralizamos con ácido sulfúrico aproximadamente 0,1N, en presencia de rojo de metilo, añadiendo después 25 ml de la solución pícrica M/20. Dejamos en reposo un tiempo siempre superior a dos horas y recogemos cuantitativamente el precipitado del dipicrato filtrando por un papel de unos 8 cm de diámetro. Con pequeñas porciones de la solución pícrica que filtró, se lava sucesivamente el erlenmeyer en que tuvo lugar la precipitación, pasando los líquidos de lavado por el filtro; la operación se repite hasta que el arrastre de todo vestigio de precipitado haya sido total. Se lava el precipitado con cuatro ml de agua. Se pasa el filtro con el mismo a un vaso de precipitado de unos 100 ml de capacidad, se añaden 10 ml de agua destilada exenta de CO_2 y se valora en unas determinaciones con NaOH 0,1 N (*) y en otras con NaOH 0,025 N, siempre en presencia de solución de fenoltaleina (4 gotas) hasta aparición de color rosa-anaranjado. Se adicionan entonces 25 ml de tolueno, se agita hasta que desaparezca el tono rosado y se continúa la titulación hasta la reaparición del color rosa-anaranjado persistente tras agitación enérgica.

Realizamos prueba en blanco, de la siguiente manera: en un embudo semejante al empleado para la filtración se pone un filtro de papel de igual calidad y dimensiones al que se usó para recoger el precipitado, se empapa con solución diluida de ácido pícrico, se lava con 4 ml de agua y se procede luego como en el ensayo anterior, sea con NaOH 0,1 N ó 0,025 N, anotando el volumen necesario para conseguir la coloración rosa persistente, volumen que se descuenta del empleado en el ensayo con nicotina.

(*) Normalidad empleada en el método original de PRYL y SCHMIT.

Tabla n.º 1

Determinación de nicotina pura en solución
Método por precipitación con pícrico

Control: 4 ml de solución de nicotina pura al 0,498 %
 (contenido teórico T = 0,0199 g)

Normalidad	Resultados	Medias (M)	T - M	T - M en %
0,1 N	0,0205	0,0209	+ 0,0010	+ 5 %
	0,0213			
	0,0205			
	0,0209			
	0,013			
0,025 N	0,0209	0,0211	+ 0,0012	+ 6 %
	0,0210			
	0,0211			
	0,0215			
	0,0213			

Discusión.

Las medidas obtenidas valorando con una u otra normalidad son prácticamente iguales, porque además no hay ningún salto entre los datos de cada serie de 5 determinaciones. En cambio, las diferencias entre el resultado mínimo y máximo son de 0,0008 g en la serie valorada con NaOH 0,1 N y 0,0004 en la que se empleó NaOH 0,025 N, es decir, de la mitad. Deducimos por ello que es aconsejable el empleo de esta última normalidad, pese a que es mucho más cuidadosa y difícil la percepción del punto de viraje; ello explica que siendo 4 veces mayor la dilución, sea sólo 2 veces menor la diferencia entre los resultados extremos.

II.—Por alcalimetría directa.

Deseando comprobar la exactitud de la valoración volumétrica de nicotina pura en solución, por alcalimetría directa, emprendemos estas determinaciones, con la única novedad de emplear como indicador el rojo de metilo-azul de metileno y la solución ácida 0,025 N, indicador y normalidad con la que uno de nosotros (Cabo Torres) ya ha obtenido buenos resultados, trabajando con otros alcaloides (9).

Reactivos:

Acido: SO_4H_2 0,025 N.

Indicador: Shiro-Tashiro.

Técnica:

La solución patrón de nicotina al 0,5 %, medida y vertida en erlenmeyer de 100 ml y diluida hasta 25 ml como en el ensayo anterior, se neutraliza con la solución ácida 0,025 N previa adición de 2 gotas de cada una de las soluciones que componen el indicador, hasta aparición del color gris-azulado, (punto de viraje.)

Se realiza una prueba en blanco con 25 ml de agua e idénticas cantidades de indicador.

Así obtuvimos los resultados que damos a continuación:

Tabla n.º 2**Determinación de nicotina pura en solución****Método por alcalimetría directa**

Control: 4 ml de solución de nicotina pura al 0,0498 %

(contenido teórico T = 0,0199 g)

Normalidad	Resultados	Media (M)	T - M	T - M en %
0,025 N	0,0205	0,0203	+ 0,0004	+ 2 %
	0,0201			
	0,0201			
	0,0201			
	0,0200			
	0,0203			
	0,0205			
	0,0203			
	0,0205			
	0,0201			
<u>Desviación media: 0,0002</u>				

Discusión.

La diferencia entre los valores máximo y mínimo (0,0005) es inferior a la obtenida empleando una solución de igual normalidad en el método del píerico, pese a que la equivalencia con la nicotina es aquí doble.

Ello se debe a que el punto de viraje se aprecia en la alcalimetría directa con mucha mayor precisión operando con el indicador Shiro-Tashiro. La media obtenida es algo inferior, aproximadamente un 4 %.

Por ello, en la determinación de nicotina pura es más recomendable esta técnica, mucho más corta y cómoda y también más precisa.

III.—Posibilidad de combinar las dos técnicas anteriores en la misma solución problema de nicotina.

Como ya quedó anteriormente anotado, en el procedimiento de determinación de nicotina, previa precipitación del alcaloide al estado de dipicrato, ha de neutralizarse la solución de nicotina en presencia de rojo de metilo.

Pensamos que ese hecho nos ofrece una posibilidad, nada despreciable, de comparar ambas técnicas de determinación si, después de valorada la nicotina por alcalimetría directa en presencia del indicador rojo de metilo-azul de metileno, añadimos la cantidad conveniente de solución saturada de ácido píerico y volvemos a valorar siguiendo la técnica expuesta para determinación del dipicrato. Lo único que podría entorpecer esta valoración sería la introducción del azul de metileno, puesto que en el resto de la técnica nada hay que difiera del *modus operandi* seguido.

Para comprobar este extremo, planteamos la siguiente experiencia:

Partiendo de una misma solución control de nicotina de conocida pureza, hacemos determinaciones mediante la técnica del píerico establecida. Simultáneamente realizamos determinaciones en otras muestras de la misma solución nicotínica, siguiendo el procedimiento de alcalimetría directa. Sobre estas muestras ya valoradas vertemos 25 ml de solución saturada de ácido píerico, procediendo a valorar de nuevo con arreglo a la técnica establecida. Si los datos obtenidos coinciden con los de la valoración píerica previa, no existe inconveniente alguno para poder utilizar, una tras otra, las dos técnicas sobre una misma muestra problema.

Tabla n.º 3

**Determinación de nicotina pura en soluciones
Comparación de métodos de alcalimetría directa y precipitación
pírica aplicados sucesivamente sobre una misma muestra**

*Control: 5 ml de solución de nicotina pura al 0,498 %
(contenido teórico T = 0,02490 g)*

RESULTADOS		MEDIAS	
Alcalimetría directa	Precipitación pírica	Alcalimetría directa	Precipitación pírica
0,0253	0,0255		
0,0248	0,0255		
0,0246	0,0250	0,0248	0,0251
0,0246	0,0248		
0,0246	0,0246		

Discusión.

Como era de esperar, es posible comparar los resultados por una y otra técnica empleando ambas sobre la misma muestra.

Los resultados expuestos en la tabla núm. 3, revelan que ambos métodos coinciden cuando se valora nicotina-base en solución pura. Las medidas se acercan satisfactoriamente a la realidad, si bien sigue siendo ligeramente más alta la obtenida por el procedimiento del pírico, aunque la diferencia entre ambas no es aquí prácticamente significativa.

Es de señalar la ventaja práctica que significa la posibilidad de hacer compatible la realización de ambos métodos sobre una misma muestra. Ello nos será sumamente ventajoso en nuestras investigaciones.

Por otra parte si, junto a la nicotina existiesen otros alcaloides secundarios, como la nor-nicotina, por ejemplo, que no son determinados por precipitación con pírico, la diferencia entre los dos valores obtenidos nos dará una idea global de la proporción en que tales alcaloides estarán presentes.

DETERMINACIÓN DE NICOTINA EN DISOLUCIONES COMERCIALES IMPURAS
AL ESTADO DE SULFATO

En el comercio circulan unas disoluciones de sulfato de nicotina, obtenidas de los desperdicios de tabaco —principalmente pedúnculos y fragmentos de tallos— que una vez diluïdos convenientemente, se destinan a usos agrícolas.

Dichas disoluciones comerciales son muy impuras, por lo que su color es sumamente oscuro (castaño-negruzco) y su aroma fuerte y desagradable. En el mejor de los casos llegan a contener alrededor de un 50 % de alcaloïde.

Pensamos que el método basado en la precipitación con pírico, por operar sobre nicotina al estado de sal, nos brindará la posibilidad de determinar el alcaloïde en dichas soluciones impuras de su sulfato, directamente sin necesidad de proceso extractivo previo.

Partimos de un producto comercial de marca determinada que asigura una riqueza nicotínica de 45-50 %.

Técnica:

Preparamos una disolución acuosa al 2 % (V/V) del sulfato de nicotina comercial. (Esta dilución sigue teniendo color castaño claro y conserva todavía su típico y poco agradable aroma.)

De dicha solución se toman cantidades variables, exactamente medidas (pipeta fina), comprendidas entre 1 y 5 ml. El volumen medido de dicha solución comercial diluida de sulfato de nicotina, se vierte directamente de la pipeta a un erlenmeyer de 100 ml. Se completa con agua hasta unos 25 ml y se añaden 25 ml de la solución M/20 de ácido pírico, siguiendo después la técnica ya anteriormente descrita.

Damos a continuación los resultados obtenidos:

Tabla n.º 4

**Determinación de nicotina en la solución impura de su sulfato
Precipitación picrica**

Control: solución comercial de sulfato de nicotina al 2 % v/v

ml	Cantidad de Nicotina	Medias	Riqueza de la muestra
1 ml	0,0102 0,0104 0,0097 0,0099 0,0102	0,0101	50,5 %
2 ml	0,0180 0,0186 0,0186 0,0180 0,0178	0,0182	45,5 %
3 ml	0,0272 0,0275 0,0277 0,0272 0,0278	0,0275	45,8 %
4 ml	0,0367 0,0367 0,0371 0,0373 0,0373	0,0370	46,3 %
5 ml	0,0555 0,0555 0,0550 0,0548 0,0546	0,0551	45,9 %

Discusión:

Como puede apreciarse, los volúmenes tomados de la solución diluida del sulfato de nicotina impuro, equivalían a cantidades de alcaloide que fluctuaron entre unos 10 y 55 mg.

La riqueza nicotínica hallada para la solución comercial de sulfato, expresada en tanto %, ha sido muy constante en las diversas series de determinaciones realizadas con cantidades de muestra distintas, especialmente si consideramos como mínima la de 2 ml. Vemos entonces que dichas riquezas varían desde un mínimo de 45,5 % a un máximo de 46,3 %. Únicamente la media encontrada para las determinaciones sobre 1 ml de muestra (equivalente a unos 10 mg de nicotina) se separa algo de las restantes, alcanzando el valor de 50,5 %. Pero, naturalmente, en esta serie de determinaciones, por ser menor la muestra, la desviación media es superior, al considerarla en tanto %.

En todo caso, las medias generales obtenidas, rechazando o aceptando el dato en cuestión, son de 45,9 y 46,8 respectivamente y su diferencia apenas llega a un 2 %. Hemos de concluir, por tanto, que determinando la nicotina por el método del pícrico, tal y como se ha descrito, directamente sobre disoluciones *muy impuras* de sulfato de nicotina, se obtienen valores satisfactoriamente reproducibles con tomas de muestra cuyo contenido en alcaloide varía entre 10 y 55 mg.

POSIBILIDAD DE PERFECCIONAMIENTO DE LAS TÉCNICAS EXPUESTAS

Alcalimetría directa en soluciones de nicotina-base

Comprobados los buenos resultados obtenidos, empleando soluciones de normalidad 0,025 N, ocurre sin embargo, que variaciones de 0,1 ml entre dos determinaciones significarían 0,0004 gramos (0,4 mg) de nicotina que, en el caso de existir 10 mg de alcaloide, equivaldrían a un 4 %.

Por ello, basados en la experiencia de uno de nosotros (9), quien operando con otros alcaloides ha podido demostrar que incluso con soluciones ácidas o alcalinas 0,01 N se aprecia con toda exactitud el viraje del rojo de metilo cuando se emplea en la modalidad de Shiro-Tashiro, nos proponemos ahora aplicarlo aquí.

Técnica:

Preparamos una solución acuosa de nicotina pura al 0,01 % (0,1 mg/ml).

Tomamos volúmenes exactos de 1-3-5-10-20 ml (pipeta o bureta de exactitud conveniente) que equivalen respectivamente a 0,1-0,3-0,5-1-2 mg. de alcaloide. En el erlenmeyer de 50 ml de capacidad donde se realizará la valoración, se completan todas las muestras a 25 ml con agua desti-

lada exenta de CO₂, se añaden 2-3 gotas de cada solución del indicador Shiro-Tashiro y se titula con ácido 0,01 N hasta el punto de viraje. Realizamos prueba en blanco sobre 25 ml de agua. Para cantidades de nicotina hasta 2 mg. límite en que quedan comprendidas las estudiadas, se emplea microbureta.

Se realizan cinco determinaciones en cada caso.

Tabla n ° 5

Determinación de nicotina base en soluciones puras

Alcalimetría directa

Cantidades Nicotina	Resultados (mg)	Medias	Desviaciones	Desviaciones medios (en %)
0,1 mg	0,132 0,120 0,084 0,132 0,084	0,110 110 %	0,022 0,010 0,026 0,022 0,026	± 19 %
0,3 mg	0,284 0,284 0,268 0,316 0,268	0,284 95,7 %	0,000 0,000 0,016 0,032 0,016	± 7,3 %
0,5 mg	0,508 0,516 0,452 0,468 0,460	0,481 96,2 %	0,027 0,035 0,029 0,013 0,021	± 4,3 %
1 mg	0,936 0,968 0,968 1,016 0,955	0,969 96,9 %	0,023 0,001 0,001 0,007 0,014	± 2,2 %
2 mg	1,925 2,002 1,978 1,906 1,954	1,953 97,6 %	0,028 0,049 0,025 0,047 0,001	± 1,1 %

Discusión:

La desviación media, calculada para las 25 determinaciones que se han realizado en total, es de 0,02 mg, lo que significa que la técnica de valoración final por alcalimetría directa, en los casos que puede ser empleada, gana efectivamente en precisión cuando se usa solución ácida 0,01 N y microbureta, apreciando el viraje con el indicador de contraste rojo de metilo-azul de metileno según la fórmula de Shiro-Tashiro.

El procedimiento no es muy aceptable para muestras que contengan menos de 0,3 mg de nicotina; vemos que en la muestra de 0,1 mg la desviación alcanza el elevado valor de 19 %. Naturalmente, dicha desviación, así expresada, disminuye al aumentar la concentración de nicotina en la muestra, quedando en un 7 % para una cantidad a valorar de 0,3 mg de alcaloide, para bajar a poco más del 1 % cuando dicha cantidad es del orden de los 2 mg. Es decir que, pasando de 0,3 mg la nicotina a determinar —para dicha cifra, la desviación relativa es aún considerable—, la técnica proporciona datos aceptables. Véase, como corroboración de ello, que la riqueza hallada para la nicotina ensayada en las muestras con 0,5-1 y 2 mg ha sido respectivamente 96, 97 y 98 %.

Alcalimetría específica por valoración del ácido pícrico unido a la nicotina como dipicrato

Elección de la normalidad apropiada de la solución alcalina.

Quedó demostrado que la solución alcalina a emplear en la neutralización del pícrico liberado del precipitado, podía ser 0,025 N, en vez de 0,1 N, como se recomendaba en el método de Pfyl y Schmitt, con lo que se ganaba en precisión.

Sin embargo, es evidente que la apreciación del punto de viraje con fenoltaleína, entorpecido por el color amarillo de la solución, no resulta muy fácil y la dificultad afecta, naturalmente, a la precisión. Por ello nos proponemos ahora comprobar si una normalidad intermedia 0,05 N vendría a compensar la pérdida de precisión debida a la mayor concentración, por la ganancia que significaría un aumento de sensibilidad en la percepción del punto de viraje.

Siguiendo un orden lógico, planteamos una experiencia previa en la que, sobre cantidades de ácido pícrico, variables entre los límites aproximados con que operaríamos, compararemos la dificultad de percepción en los puntos de viraje entre las dos normalidades empleadas.

Para ello, lo que hacemos sencillamente, es operar como se viene diciendo para las pruebas en blanco, pero en unos casos neutralizando con NaOH 0.025 N como siempre y en otros con solución alcalina de normalidad 0,05.

Hemos observado que las dispersiones de los resultados obtenidos en cada caso son, aproximadamente el doble con la solución doblemente diluída.

Por ello no existe razón para seguir empleando la solución alcalina de normalidad 0.025 N toda vez que no aporta ventaja práctica alguna. En cambio aboga en favor del empleo de solución 0.05 N el hecho de que, en igualdad de precisión de los resultados, hay una mayor comodidad en la percepción del punto de viraje de la fenoltaleína.

Las razones expuestas nos inducen a adoptar como normalidad idónea de la solución alcalina la de 0,05 N.

Influencia del lavado del precipitado de dipicrato de nicotina.

Para varios autores es el punto que ahora abordamos uno de los más vulnerables imputados a la técnica del pícrico. Ello debido a que, por la relativa solubilidad del dipicrato en agua, dicha operación de lavado ha de ser muy limitada en número de veces y en volumen. Pero, a su vez, el lavado insuficiente, acarrea una retención del ácido pícrico por el mismo precipitado, que después será valorado como formando parte del reactivo liberado del dipicrato y, por tanto, tiende a dar resultados excesivos.

Operando con nicotina pura, de calidad reconocida, vimos oportunamente que el lavado con la misma solución pícrica excedente de la precipitación y luego con 4 ml de agua, daba resultados aceptables.

Procuramos ahora afinar aún más en este punto, tomando también en consideración la influencia que pudiera haber en la reproductibilidad de los resultados de las pruebas en blanco; para ello planteamos la experiencia que se describe en sus detalles técnicos.

Intentamos previamente averiguar la influencia del lavado del precipitado con cantidades distintas de solución de ácido pícrico M/20 diluída al 1/10.

Técnica:

Partiendo de cantidad conocida de nicotina pura, realizamos el lavado del precipitado como siempre o en cada caso, además, con 1-2-3 porciones. de 5 ml cada una, (5-10-15 ml en total) de solución de ácido pícrico M/20, diluída al 1/10 (v/v), mediante pipeta de chorro fino; a continuación lavamos en todos los casos, como siempre, con 4 ml de agua. En todo lo demás se opera sin ninguna otra variación.

Para cada variante se realizan pruebas en blanco sobre un filtro de igual tamaño que el que recogió el precipitado, impregnándolo de solución de pícrico M/20 y lavándole después de forma idéntica a como se opera con el precipitado.

Tabla n.º 6

**Influencia en los resultados del lavado de dipicrato de nicotina
con solución diluída de ácido pícrico**

Sistema del lavado del precipitado	Volumen (ml) Sol. 0,25 N Gastado (media 5 determ.)	Idem prueba en blanco (media 5 determ.)	Cantidad Nicotina (g)	Diferencias	
				Técnicos Usual	Ensayo en blanco
Técnica usual . . .	4,87 ± 0,02	0,53	0,0176		
5 ml sol. Ac. pícrico M/20 diluída al 1/10	4,74 ± 0,025	0,41	0,0175	0,13	0,12
5 x 2 ml idem. idem.	4,61 ± 0,02	0,28	0,0175	0,26	0,25
5 x 3 ml idem. idem.	4,52 ± 0,04	0,25	0,0173	0,35	0,28

Discusión:

Vemos que los lavados del dipicrato de nicotina obtenido, mediante una, dos y tres porciones de 5 ml (5-10-15 ml en total) de la solución diluída de ácido pícrico apenas influyen en el resultado final, comparado con el que se obtiene operando como antes lo hacíamos, es decir, lavando con la solución pícrica en que tuvo lugar la precipitación, después de filtrada aquélla. Dicha solución está saturada de picrato de nicotina.

Obsérvese el paralelismo entre las diferencias de gasto de la solución alcalina 0,05 N para las determinaciones y las respectivas pruebas

en blanco; dicho paralelismo es casi perfecto entre las series de lavado con 5 y con 10 ml de la solución pícrica diluida. Cuando el volumen total de los lavados asciende a 15 ml, el volumen gastado de la solución titulada, desciende poco en la prueba en blanco y algo más en el ensayo; la consecuencia natural es una ligera disminución en el valor obtenido. Por otra parte, el valor medio de las desviaciones es algo mayor.

Luego no es necesario el proceder a tales lavados del precipitado de dipicrato del alcaloide obtenido, puesto que se alarga y se complica la técnica sin necesidad aparente, ya que el lavado primero con la solución pícrica filtrada «aguas madres de cristalización» cumple también el cometido de recoger todo vestigio del precipitado que quedó en el matraz donde tuvo lugar la precipitación.

TÉCNICAS PROPUESTAS Y ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Determinación de nicotina en soluciones puras de alcaloide-base

Describimos a continuación las técnicas completas de determinación de nicotina que recomendamos para cada tipo de muestra, recogiendo las modificaciones que se han ido incorporando como resultado de las investigaciones que anteceden.

Reactivos:

Solución 0,01 N de ácido sulfúrico.

Indicador Shiro Tashiro.

- a) Disolver 0,25 g de rojo de metilo en 50 ml de alcohol absoluto.
- b) Disolver 0,083 g de azul de metileno en 50 ml de alcohol absoluto.

Material:

Erlenmeyers (o vasos de precipitados) de 50 ml de capacidad.

Bureta de 10-20 ml graduada en 1/20 (0,05 ml).

Técnica:

Se realizan diluciones convenientes de la muestra, para que las tomas de la misma contengan cantidades de alcaloide del orden de 0,5 a 15 mg y el volumen sea apropiado para ser medido con toda exactitud, cómodamente (pipeta o bureta de exactitud conveniente).

El volumen medido se pasa a un erlenmeyer o vaso de precipitado de unos 50 ml de capacidad, donde se realizará la valoración. Se completa a 25 ml con agua destilada exenta de CO_2 , se añaden 2-3 gotas de cada solución del indicador Shiro-Tashiro y se valora con el ácido 0,01 N hasta el punto de viraje (gris-azulado).

Se realizan pruebas en blanco sobre 25 ml de agua destilada exenta de CO_2 (la prueba en blanco suele gastar alrededor de 0,05-0,1 ml del ácido).

1 ml del ácido 0,01 N equivale a... 0,00162 g Nicotina.

Notas:

1.^a Conviene conocer previamente el título aproximado de la solución de nicotina a valorar, para preparar diluciones de la solución problema (con agua exenta de CO_2) cuyo contenido aproximado fluctúe entre 0,5 y 15 mg de alcaloide. Cantidades inferiores a la mínima, naturalmente afectarían a la precisión, como ya vimos (tabla núm. 5); cantidades notablemente superiores a la máxima, harán necesario el uso de recipientes de mayor capacidad que los aconsejados.

2.^a Con cantidades de hasta 3 mg de alcaloide, puede emplearse microbureta (de 2 ml de capacidad total). Entre esta cantidad y 15 mg empleamos «semi-microbureta» de 10 ml de capacidad máxima, graduada en 1/20 ml.

3.^a Aconsejamos preparar una solución que contenga 0,2-2 mg/ml y tomar de ella volúmenes exactamente medidos para que se cumpla la condición anterior.

Tabla n.º 7

Determinación de nicotina en soluciones de alcaloide base

Alcalimetría directa: ácido 0,01 N.

Cantidad nicotina	Resultados	Media	d	(d) ²	
0,5 mg.	0,508	0,478 95,6%	0,030	0,0009	\bar{x} 0,02507 ξ 0,0169 3,4%
	0,516		0,038	0,001444	
	0,452		0,026	0,000676	
	0,468		0,010	0,0001	
	0,460		0,018	0,000324	
	0,470		0,008	0,000064	
	0,490		0,012	0,000144	
	0,460		0,018	0,000324	
	0,508		0,030	0,0009	
	0,450		0,028	0,000784	
1 mg	0,936	0,970 97%	0,034	0,001156	\bar{x} 0,0294 ξ 0,0198 2%
	0,968		0,002	0,000004	
	0,968		0,002	0,000004	
	1,016		0,046	0,002116	
	0,955		0,015	0,000225	
	1,000		0,030	0,0009	
	1,000		0,030	0,0009	
	0,936		0,034	0,001156	
	0,984		0,014	0,000196	
	0,936		0,034	0,001156	
2 mg	1,925	1,956 97,8%	0,031	0,000961	\bar{x} 0,0318 ξ 0,0214 1,1%
	2,002		0,046	0,002116	
	1,978		0,022	0,000484	
	1,906		0,050	0,0025	
	1,954		0,002	0,000004	
	1,938		0,018	0,000324	
	1,970		0,014	0,000196	
	1,978		0,022	0,000484	
	1,922		0,034	0,001156	
	1,986		0,030	0,0009	
5 mg	4,84	4,90 98%	0,06	0,0036	\bar{x} 0,129 ξ 0,087 1,8%
	4,84		0,06	0,0036	
	4,76		0,14	0,0196	
	4,96		0,06	0,0036	
	5,04		0,14	0,0196	
	5,04		0,14	0,0196	
	5,04		0,14	0,0196	
	4,80		0,10	0,01	
	4,68		0,22	0,0484	
	4,96		0,06	0,0036	
10 mg	10,08	9,86 98,6%	0,22	0,0484	\bar{x} 0,173 ξ 0,116 1,2
	10,08		0,22	0,0484	
	9,68		0,18	0,0324	
	9,72		0,14	0,0196	
	9,96		0,10	0,01	
	9,76		0,10	0,01	
	10,04		0,18	0,0324	
	9,92		0,06	0,0036	
	9,72		0,14	0,0196	
	9,64		0,22	0,0484	
15 mg	14,74	14,78 98,5%	0,04	0,0016	\bar{x} 0,151 ξ 0,1018 0,67%
	14,80		0,02	0,0004	
	14,72		0,06	0,0036	
	15,00		0,22	0,0484	
	14,70		0,08	0,0064	
	14,60		0,18	0,0324	
	14,64		0,14	0,0196	
	15,08		0,30	0,0900	
	14,72		0,06	0,0036	
	14,76		0,02	0,0004	

Determinación de nicotina en soluciones de sus sales y de nicotina-base en soluciones impuras

Reactivos:

Solución de ácido péricico aproximadamente M/20: acuosa al 11-12 % (prácticamente a saturación).

Solución 0,05 N de NaOH.

Solución alcohólica de fenoltaleína al 1 %.

Tolueno (R. A.) o éter etílico (R. A.).

Papel de filtro.

Material:

Vasos de precipitados o erlenmeyers de 50-100 ml de capacidad.

Vasos de precipitados de unos 100-150 ml tipo alto.

Embudos de unos 5-6 cm de diámetro.

Varilla de vidrio maciza.

Bureta de 10-20 ml graduada en 1/20 ml (0,05 ml) o microbureta.

Técnica:

Se realizan diluciones convenientes de la muestra, para que las tomas de la misma contengan cantidades de alcaloide no inferiores a 2 mg. El volumen exactamente medido (pipeta fina o bureta) de la solución a valorar se pasa a un vaso o erlenmeyer de unos 50 ml de capacidad y, si fuese necesario, se neutraliza al rojo de metilo.

Se añaden 25 ml de la solución saturada (M/20) de ácido péricico y se deja en reposo, tapando el recipiente, durante dos horas *por lo menos*.

Se recoge el precipitado filtrado por papel (unos 8 cm de diámetro, desplegado) sobre un embudito de 5-6 cm de diámetro, empleando el líquido filtrado para lavar por pequeñas porciones el vaso, hasta conseguir el arrastre *total* del precipitado al filtro.

Una vez escurrido el precipitado, se lava con 4 ml de agua, que cae en chorro fino sobre la parte periférica del papel de filtro, de forma que arrastre el precipitado hacia el vértice del mismo.

Se dejan caer (invirtiendo el embudo) filtro y precipitado en un vaso de unos 100 ml de capacidad, se añaden 10 ml de agua destilada exenta de CO₂ y, con ayuda de una varilla de vidrio, se disgrega el papel, para que el precipitado quede interpuesto en el líquido. Se titula en

presencia de fenolftaleína (4 gotas), con NaOH 0,05 N hasta color anaranjado persistente después de agitación; se adicionan entonces 10 ml de tolueno o éter (*), se agita (la solución recobrará su color amarillo) y se sigue valorando con cuidado, agitando enérgicamente tras cada adición —gota a gota— de la solución alcalina hasta coloración rosa-anaranjada persistente a pesar de la agitación.

Prueba en blanco: en embudo semejante al empleado en los ensayos anteriores, se pone un filtro de papel de igual calidad y dimensiones que el que sirvió para recoger el precipitado de dipicrato; se empapa con solución saturada de ácido pícrico, se deja escurrir y se lava de idéntica manera a como se dijo más arriba; se procede después como con el filtro que contenía el precipitado.

1 ml de solución 0,05 N... 0,00405 g de Nicotina.

Nota:

Cuando las cantidades de nicotina a valorar no pasen notablemente de 5 mg puede emplearse —y así lo hacemos— una microbureta de 2 ml si se dispone de microburetas de 3 ml de capacidad total, pueden usarse para valorar hasta 10 mg del alcaloide.

(*) Hemos comprobado a lo largo de nuestras numerosísimas experiencias que el empleo de uno u otro de los disolventes, carece prácticamente de influencia en los resultados.

Tabla n.º 8
Determinación de nicotina en soluciones de sus sales.
Precipitación pícrica, sin destilación previa

Cantidad nicotina	Resultados	Media	d	id) ²	
2 mg	1,81	1,93 96,5 %	0,12	0,0144)) 0,117 ≡ 0,0789 4 %
	1,94		0,1	0,0001	
	1,81		0,12	0,0144	
	1,90		0,03	0,0009	
	1,94		0,01	0,0001	
	2,10		0,17	0,0289	
	2,10		0,17	0,0289	
	1,86		0,07	0,0049	
	1,81		0,12	0,0144	
2,06	0,13	0,0169			
5 mg.	5,08	4,86 97,2 %	0,22	0,0484)) 0,111 ≡ 0,0748 1,5 %
	5,00		0,14	0,0196	
	4,80		0,06	0,0036	
	4,80		0,06	0,0036	
	4,76		0,10	0,0100	
	4,84		0,02	0,0004	
	4,92		0,06	0,0036	
	4,88		0,02	0,0004	
	4,80		0,06	0,0036	
4,72	0,14	0,0196			
10 mg.	9,61	9,76 97,6 %	0,15	0,0225)) 0,132 ≡ 0,0890 0,9 %
	10,04		0,28	0,0784	
	9,92		0,16	0,0256	
	9,76		0,00	0,0000	
	9,72		0,04	0,0016	
	9,80		0,04	0,0016	
	9,64		0,12	0,0144	
	9,68		0,08	0,0064	
	9,72		0,04	0,0016	
9,68	0,08	0,0064			
15 mg	14,80	14,80 98,7 %	0,00	0,0000)) 0,135 ≡ 0,0910 0,6 %
	14,59		0,21	0,0441	
	14,67		0,13	0,0169	
	14,67		0,13	0,0169	
	14,79		0,01	0,0001	
	14,84		0,04	0,0016	
	14,80		0,00	0,0000	
	14,88		0,08	0,0064	
	15,00		0,20	0,0400	
15,00	0,20	0,0400			

Discusión:

Al estudiar la precisión de la técnica del pítrico partimos de 2 mg de nicotina en la muestra, pues con cantidades inferiores no se obtienen resultados aceptables. Por lo mismo, en la alcalimetría directa partimos de 0,5 mg del alcaloide, pues en la oportuna discusión de los resultados contenidos en la tabla núm. 5 (págs. 317 y 318) ya apreciamos que la técnica daba resultados aceptables, pasando de 0,3 mg la cantidad de nicotina a valorar.

Se deduce de los cuadros 7 y 8 y de lo escrito en el párrafo anterior que con el proceso de alcalimetría directa, tal y como lo hemos puesto a punto, comienzan a obtenerse resultados válidos con cantidades de nicotina cuatro veces menores que con el procedimiento del pítrico. Cosa lógica, porque en la manipulación de precipitados en plan cuantitativo, operando con cantidades muy pequeñas del mencionado precipitado, da lugar a errores considerables. Todavía con 2 mg se obtiene un error del 4 %, superior al obtenido por alcalimetría directa (3,4 %) con la cuarta parte de dicha cantidad y, desde luego, mucho mayor que el que encontramos con este último método para la citada cantidad, que es de 1,1 %.

Para las cantidades superiores, la técnica del pítrico se muestra también aceptable, puesto que el error fluctuó entre 0,6-1,5 %. Sin embargo, las riquezas medias obtenidas en cada serie de cantidades distintas son más constantes para el método de alcalimetría directa. En el intervalo de 2 a 15 mg para esta técnica varió entre un mínimo de 97,8 % y un máximo de 98,6 % (diferencia 0,8 %); en cambio, mediante la técnica del pítrico el mínimo y el máximo van de 96,5 % a 98,7 (diferencia 2,2 %).

Conclusiones

- 1.^a—La nicotina-base, en disoluciones puras, se determina rápida y cómodamente por alcalimetría directa en las condiciones establecidas y sin necesidad de proceso extractivo alguno.
- 2.^a—Queda demostrado cómo dicha alcalimetría puede realizarse incluso con ácido 0,01 N, pues el punto de viraje se aprecia perfectamente empleando el indicador de contraste rojo de metilo azul de metileno, según la fórmula de Shiro-Tashiro.

- 3.^a—La reproductibilidad conseguida es aceptable cuando la cantidad de alcaloide a valorar no es muy inferior a 0,0005 g (0,5 mg).
- 4.^a—Con cantidades que fluctúan entre 0,5 y 15 mg el error calculado con series de 10 determinaciones varía, respectivamente, entre 3,4 y 0,67 %.
- 5.^a—También puede valorarse la nicotina en solución sin proceso extractivo previo, mediante el método basado en la precipitación del dipicrato y posterior determinación del ácido pícrico liberado, por acidimetría en presencia de fenolftaleína.
- 6.^a—En este último método se obtiene mayor precisión empleando solución alcalina 0,025 (N/40) en vez de 0,1 N como preconiza la clásica técnica de Pfyl y Schmitt. Sin embargo, con la mencionada dilución, la percepción del punto de viraje se hace dificultoso, debido al color amarillo propio del líquido que se valora.
- 7.^a—Queda prácticamente soslayada la aludida dificultad, sin que prácticamente se pierda la precisión lograda empleando la solución alcalina 0,05 N (N/20).
- 8.^a—Para el lavado del precipitado de dipicrato de nicotina es necesario el empleo de una solución diluida de ácido pícrico como los autores de la técnica inicial propusieron; puede, no obstante, prescindirse de tal operación, que alarga y complica la técnica seguida. Basta con pasar a través del precipitado las «aguas madres» que filtran previamente, operación que necesariamente se ha de realizar tras enjuagues sucesivos del matraz en que se precipitó para recoger en su totalidad el precipitado obtenido; esta manipulación cumple, pues, un doble objeto: trasvase total del precipitado y lavado del mismo.
- 9.^a—Operando con la técnica del pícrico con las modificaciones introducidas, puede determinarse la nicotina en cantidades que no bajen de 2 mg. Con cantidades que fluctúan entre 2 y 15 mg el error calculado con series de 10 determinaciones varía respectivamente entre 4 y 0,6 %.
- 10.^a—Esta técnica, más larga, menos cómoda y menos sensible (en cuanto a cantidad mínima valorable) que la de alcalimetría directa, es por ello también menos recomendable para valorar la nicotina-base en soluciones puras. En cambio la técnica del pícrico es apli-

cable a la valoración de soluciones impuras del alcaloide-base así como también cuando se encuentra al estado de sal, tanto en soluciones puras como impuras. Ejemplo de estas últimas son las soluciones comerciales de sulfato de nicotina, para uso insecticida.

- 11.^a—Sobre una misma muestra a valorar, puede determinarse la nicotina por alcalimetría directa o de retroceso y, posteriormente por acidimetría subsiguiente a la precipitación pícrica. Ello posibilita un doble control de la muestra así como —en el caso de que el primer valor sea muy superior al segundo— el conocimiento de la proporción global en que pudieran estar presentes otros alcaloides secundarios (nor-nicotina, por ejemplo) que no son determinados por el procedimiento del pícrico.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—AVENS, A. W. y PEARCE, G. W.—*I. E. C. A. E.*, 11, 505 (1939).
- 2.—BARTA, I. y MARSCHEK, Z.—*Mezőgazdasági Kutatásch*, 10, 29 (1937), C. A., 5105 (1938).
- 3.—BERTRAND, G. y JAVILLIER, M.—*Bull. Soc. Chim.*, 5, 241 (1909).
- 4.—BERTRAND, G. y JAVILLIER, M.—*Ann. Chim. Analyt.*, 16, 251 (1911).
- 5.—BODNAR, J. y NAGY, V. L.—*Biochem. Zeitschr.*, 227, 452 (1930).
- 6.—BODNAR, J. y PORCSALAMY, I.—*Revue Intern. des Tabacs*, 27, 147 (1952).
- 7.—BOSE, B. C., DE, H. N. y DALAL, I. H.—*J. Indian Chem. Soc.*, 22, 131 (1956).
- 8.—BREZINA, H.—*Fach. Mit. d. Oesterr. Tabakregie, Heft*, 1, 3, 43 (1915).
- 9.—CABO TORRES, J.—*Medicamenta*, 4, 23 (1952).
- 10.—CARASSITI, V.—*Univ. Cattol. Sacro. Cuore. Facol. Agr. Ann. Sev.*, Milán, 5, 97 (1957).
- 11.—CHATTAWAY, F. D. y PARKES, G. D.—*J. Chem. Soc.*, 2,817 (1929).
- 12.—CHEZZI, G.—*Il Tabacco*, 57, 111 (1953).
- 13.—CORCORAN, A. C.; HELMER, O. M., y PAGE, I. H.—*J. Biol. Chem.*, 129, 89 (1939).
- 14.—COTA, R.—*Estudio de un método abreviado de determinación de nicotina y de algunos de sus aplicaciones*, Tesis, Sevilla (1956).
- 15.—CUNDIFF, R. H., y MARKUNAS, P. C.—*Anal. Chem.*, 27, 1,650 (1955).
- 16.—CUNDIFF, R. H., y MARKUNAS, P. C.—*J. Ass. Off. Agr. Chem.*, 43, 519 (1960).
- 17.—CUZIN, J., y SCHWARTZ, D.—*Ann. Inst. Exptl. Tabac. Bergerac*, 1, 71 (1952).
- 18.—DEGRAZIA, J. von.—*Fach. Mit. Oest. Tabakregie*, 3, 839 (1910).
- 19.—DOBRIN, E. M.—*Instituto para la Industria del Tabaco en la U. R. R. S.*, 104, 9 (1933), C. A. 6,224 (1934).
- 20.—DORR, W.—*Chem. Ztg.*, 56, 623 (1932).

- 21.—DUBRISAY, R.—*Ann. Fals.*, 20, 197 (1927).
- 22.—EDDY, C. R., y EISNER, A.—*A. C.*, 26, 1.428 (1954).
- 23.—ELTEREN, J. F. VAN.—*Chem. Weekblad*, 43, 819 (1947).
- 24.—FABRE, R.; TRUHAUT, R., y BONDÉNE, C.—*Ann. Pharm. Franc.*, 10, 579 (1952).
- 25.—FRANK, R. L., y ROITER, D. A.—*C. Sborn. Rabot. Khin. Oudela.*, 7, 25 (1935)
[C. A. (1936)].
- 26.—GETLER, A. O., y SUNSHINE, I.—*A. C.*, 23, 779 (1951).
- 27.—GOLDBAUM, I. R., y KAZYAK, I.—*Anal. Chem.*, 28, 1.289 (1956).
- 28.—GORBACH, G., y KOEGLER, H.—*Microchim. Acta*, 572 (1957).
- 29.—GRIFFITH, R. B.—*Tobacco*, 145, 26 (1957).
- 30.—GRIFFITH, R. B.; VALLEAU, W. D., y STOKES, G. W.—*Science*, 121, 343 (1955).
- 31.—GUGLIAMELLI, L., y HORDH, V.—*Anal. Soc. Quim. Argentina*, 7, 121 (1919).
- 32.—HAHN, M., y EHRISMAN, O.—*Zeitsch. F. Hygiene*, 660 (1931).
- 33.—HAHN, M., y LAUGER, H.—*Zeitsch. F. Hygiene-Infektionskrankh.*, 90, 22 (1920).
- 34.—HAGER, H.—*Pharm. Zentralh.*, 22, 399 (1881).
- 35.—HASSELTBACH, J.—*J. Prakt. Chemie*, 7, 338 (1959).
- 36.—HOFMANN, R.—*Bioq. Hem. Z.*, 260 (1933).
- 37.—HORMANN, E.—*Arch. Hig. Bakt.*, 128, 179 (1942).
- 38.—JEFFREY, R. N., y TSO, T. C.—*J. Agr. Food. Chem.*, 3, 680 (1955).
- 39.—KASANSKY, B.—*Z. Analit. Chem.*, 83, 107 (1831).
- 40.—KISSLING, R.—*Lehrbuch der Nahrungsmittelchemie* (1926).
- 41.—KISSLING, R.—*Post. Chem. Techn. Analise*, 3 Aulf (1909).
- 42.—KOBATA, J.; AQUINAGA, Y., e ITAISHI, T.—*Sc. Pap. Centr. Res. Inst. Japan. Monop. Corp.*, 96, 43 (1956).
- 43.—KONIG, W.—*Landw. Versuchsstation*, 40, 95 (1919).
- 44.—KÖNIG, W.—*Chem. Ztg.*, 35, 521 (1911).
- 45.—KRAFT, B., y STEINHOFF, G.—*Archiv. Pharm.*, 267, 609 (1929).
- 46.—LEISESON, L., y WALKER, T. B.—*Anal. Chem.*, 27, 1.129 (1955).
- 47.—MARKWOOD, N.—*J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 23, 800 (1940).
- 48.—MARKWOOD, L. N.—*J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 22, 427 (1939).
- 49.—MARKWOOD, L. N.—*J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 23, 729 (1940).
- 50.—MARKWOOD, L. N.—*J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 23, 804 (1940).
- 51.—MCCORNICK, WM. E., y SMITH, M.—*I. E. C. A. E.*, 18, 508 (1946).
- 52.—MELAMED, M. NANGNIOT, P. MARTENS, P. H.—*Bull. Inst. Agron. Gembloux*, 26, 103 (1958).
- 53.—MENNELLI, G.—*Ann. Chim. Appl.*, 31, 68 (1941).
- 54.—METAYER, G.—*Revue. Inter. des Tabacs*, mayo (1948).
- 55.—MOORHY, B. R.—*Nature*, 169, 112 (1952).
- 56.—MORANI, V., y GIOVANNINI, E.—*Chim. Ind.*, 2, 109 (1955).
- 57.—NANGNIOT, P., y MELAMED, N.—*Chim. Anal.*, 40, 3 (1958).
- 58.—*Official Methods of Analysis of the Assoc. offic. Agr. chemist* (A. O. A. C.), 69, Washington (1950).
- 59.—*Official Methods of Analysis of the Assoc. offic. Agr. chemist* (A. O. A. C.), 40 (1960).
- 60.—OGG, L.; WILLITS, C. O., y RICCIUTI, C.—*A. C.*, 22, 335 (1950).
- 61.—PALFRAY, L.; SABETAY, S., y METAYER, G.—*Comp. Rend.*, 224, 1.566 (1947).

- 62.—PFYL, B., y SCHMITT, O.—*Zeitscher. f. Untersu. ch. d. Lebenam.*, 54, 60 (1927).
- 63.—PIZER, M. H.—*J. Soc. Chem. Ind.*, 53, 356 (1934).
- 64.—PLEAL, G. B.; HARLEY, J. H., y WIBERLEY, S. E.—*J. Amer. Pharm. Assoc.*, 40, 107 (1951).
- 65.—PLEASANTS, S. W.; HAYNES, C. M., y HARRLOW, L. S.—*Ass. Off. Agric. Chem. J.* 42, 424 (1959).
- 66.—POLICARPO, L.—*Anales Farm. Bioquim.*, Buenos Aires, 1.^a, 117 (1941)
- 67.—POPOVICI, F.—*Zeitschr. Physiol. Chem.*, 13, 445 (1889).
- 68.—PORTERNAG, L.; NAGHSKI, J., y EISNER, A.—*Arch. Biochem.*, 24, 461 (1949).
- 69.—PUCCINELLI, M.—*Il Tabaco*, marzo, 8 (1941).
- 70.—PYRIKI, C.—*Z. Lebensm. Urtersuch. u. Forsch.*, 86, 89 (1943).
- 71.—PYRIKI, C.—*Die Nahrung*, 1-2, 114 (1957).
- 72.—RALSTON, W.—*I. E. E. C. A. E.*, 10, 533 (1938).
- 73.—RASMUSSEN, H. B.—*Chem. Ztg.*, 39, 25 (1915).
- 74.—RASMUSSEN, H. B., y SCHOU, S. A.—*Pharma. Centralhalle*, 65, 729 (1924).
- 75.—RASMUSSEN, H. B., y KOFOED, H.—*Dansk. Tids. Farm.*, 18, 233 (1944).
- 76.—REVOL, L., y PINATON, J.—*Lyon Pharm.*, 11-12, 37 (1946).
- 77.—RUSCONI, Y.; MONNIER, D., y WENGER, P. E.—*Anal. Chim. Acta*, 5, 222, (1951)
- 78.—SCHWARTZMAN, G.—*J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, 41, 566 (1958).
- 79.—SEMERANO, G.—*Giornali Chim. Ind. Applicta*, 14, 608 (1932).
- 80.—SPALLINO, R.—*Gazz. Chim. Appl.*, 31, 68 (1941).
- 18.—SPIES, J. R.—*J. A. C. S.*, 58, 2.386 (1936).
- 82.—STANCIE, B. N.—*Arch. Pharm.*, 6, 61 (1958).
- 83.—STORN VAN LEEUME, W.—*Pharm. Weekblad*, 54, 1.329 (1917).
- 84.—STORN VAN LEEUME, W.—*Arch. F. Exper. Path.*, 84, 282 (1918).
- 85.—SUTHERLAND, G. L.; DAROGA, R. P., y POLLARD, A. G.—*J. Soc. Chem. Ind.*
- 86.—TEKEUCHI, N., y MIKAMI, K.—*J. Nava. Med. Assoc.*, 3, 10 (1952).
- 87.—TENA NUÑEZ, G.—*Sobre la determinación de nicotina. Nuevo método por destilación directa*. T. D. Fac. Farm. Univ., Granada, 1963.
- 88.—TOOLE, E.—*Anal. Chem.*, 93 188 (1933).
- 89.—WAGNER, O.—*Tabac-Forsch. Wiss. Beilage Tabak Ztg.*, 10, 3 (1953).
- 90.—WAGNER, O.—*Tabac-Forsch. Wiss. Beilage Tabak Ztg.*, 11, 4 (1954).
- 91.—WAGNER, O.—*Chem. Ztg.*, 56, 462 (1932).
- 92.—WALTZ, P.; HAEUSERMANN, M., y NYARI, E.—*Mit. Geb. Lebensmit. u. Hyg.*, Bern., 50, 159 (1959).
- 93.—WALES, H.—*I. E. C.*, 18, 390 (1926).
- 94.—WASSER, M., y TORRECHINON, O.—*Bull. Soc. Chim. Bicl.*, 31, 1.430 (1949).
- 95.—WASER, E., y STAHLI, M.—*Z. Untersuch. Lebensm.*, 64, 475 (1932).
- 96.—WEKEHAM, G.—*Chemist. Analyst.*, 19, 8 (1930).
- 97.—WENUSCH, A.—*Tabac*, 6., 159 (1943).
- 98.—WILLIENS, A.—*Inst. Grand-Duc. Luxemburg, Sect. Sci.-Nt. Phis. et Mat.*, Ars., 17, 93 (1947).
- 99.—WILLITS, C. O.; SWAIN, M. L.; CONNELLI, J. A., y BRICE, B. A.—*A. C.*, 22, 430 (1950).