

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA

degradación de vitamina D₃ deposi- tada sobre placas de capa fina

Josepa Prat Aixelá

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA^L



0701740785

D. SERAFIN GARCIA FERNANDEZ, Catedrático de Fisico-Química Aplicada de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Barcelona y D. JORGE DE BOLOS CAPDEVILA, Prof. Adjunto Numerario de la misma Facultad.

CERTIFICAMOS: Que la Tesina titulada: "DEGRADACION DE VITAMINA D₃ DEPOSITADA SOBRE PLACAS DE CAPA FINA" que presenta D.^a JOSEFA PRAT AIXELA, para optar al Grado de Licenciado en Farmacia, ha sido realizada en los Laboratorios de la Cátedra bajo nuestra dirección, por lo que consideramos que se halla concluida y autorizamos su presentación para ser juzgada por el Tribunal correspondiente,

Y para que conste firmamos el presente certificado en Barcelona a 25 de Septiembre de mil novecientos ochenta.

Jorge de Bolos Capdevila
S. Garcia Fernandez

DEGRADACION DE VITAMINA D₃ DEPOSITADA SOBRE PLACAS DE CA-
PA FINA

Tesina presentada por J. Prat Aixelá.

Esta Tesina ha sido realizada en el Departamento de Fisico-química aplicada de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Barcelona, bajo la dirección de los profesores: Dres. D. Serafín García Fernández y D. Jorge de Bolós Capdevila.

Deseo agradecer sinceramente al profesor Dr. S. García Fernández y en especial al Dr. J. Bolós Capdevila la dirección del presente trabajo, así como las enseñanzas y valiosa ayuda recibida para su realización.

Igualmente quiero expresar mi gratitud a D. E. Cabré por sus enseñanzas, colaboración y ayuda, así como a L.-- Prat y R. Pouplana.

Finalmente hago extensivo mi agradecimiento a todos los componentes del Departamento, por el apoyo recibido en todo momento.

indice

1.-	Introducción	1
2.-	Vitamina D, generalidades	3
2.1.-	Obtención	6
2.2.-	Formación	8
2.3.-	Métodos de análisis	13
2.4.-	Acción farmacológica	17
2.5.-	Mecanismo de acción	19
3.-	Degradación de sustancias al estado sólido	21
4.-	Técnicas utilizadas	
4.1.-	Espectrofotometría UV	39
4.1.1.-	Aplicación al análisis de vitamina D ₃	48
4.2.-	Cromatografía en capa fina	51
4.2.1.-	Aplicación al análisis de vitamina D ₃ con presencia de productos de degradación	59
5.-	Degradación de vitamina D ₃ sobre soporte de capa fina	

5.1.- Objeto del estudio	72
5.2.- Métodos utilizados	74
5.3.- Representación y especificación de los resultados	80
5.4.- Casos estudiados	
5.4.1.- Influencia de la luz	92
5.4.2.- Influencia de la temperatura	108
5.4.3.- Influencia del soporte	123
5.4.4.- Influencia de la presión oxígeno ..	132
5.5.- Discusión de los resultados	165
6.- Conclusiones	168
7.- Bibliografía	171

1 **introducción**

En nuestro laboratorio se vienen realizando estudios sobre la cinética de los procesos de degradación de la Vitamina D₃, estando en la actualidad pendiente de presentación una tesis doctoral sobre este tema (33) y habiéndose también objeto de varios trabajos de tesina, algunos ya presentados (46) y otros pendientes de presentación.

Dentro de este marco general nos hemos propuesto estudiar en el presente trabajo la velocidad de degradación de dicha substancia cuando se encuentra depositada sobre una placa de capa fina.

Debido a que el método de análisis generalmente utilizado en nuestro laboratorio para determinar la cantidad de Vitamina no alterada en presencia de los productos de degradación se basa en una técnica de cromatografía en capa fina cuantitativa, nos ha parecido interesante tener datos experimentales sobre dicha alteración y los factores que la favorecen o reducen, para orientar las precauciones que deben tomarse en dicha técnica cuantitativa.

Por otra parte, hemos querido aprovechar las facilidades que la propia naturaleza de la técnica analítica -- ofrece, para obtener un conjunto de datos fiables sobre la velocidad de dicha degradación en estas condiciones es

peciales pero bien especificadas, pensando que quizás pueden contribuir a esclarecer el complejo mecanismo de degradación seguido por dicha Vitamina. Basta en efecto dejar transcurrir un tiempo controlado entre el proceso de deposito de la Vitamina sobre la placa y el desarrollo del cromatograma, en vez de realizarlo inmediatamente uno después del otro como se recomienda hacer en la técnica analítica mencionada, para obtener el conjunto de datos que presentamos y que son objeto de nuestros comentarios. El estudio de la influencia de los factores ambientales sobre la velocidad de degradación en estas condiciones es el principal objetivo que nos hemos propuesto en esta tesis.

2
vitamina D.
generalidades

Las vitaminas son sustancias que en cantidades muy--pequeñas son esenciales para el metabolismo normal de los seres vivos.

Las vitaminas se dividen en liposolubles e hidrosolu**u**bles, dentro de las liposolubles (solubles en los lípidos) se encuentran las vitaminas D.

Las vitaminas D son un grupo de sustancias relacio--nadas con los esteroides, cuya deficiencia produce raqui--tismo en los niños en crecimiento, tetania infantil y ---osteomalacia en adultos.

En la naturaleza se encuentran varias, pero sólo la vitamina D₃ (colecalfiferol), que constituye la vitamina natural y la D₂ (ergocalciferol) poseen actividad antirra--quítica en el hombre.

Nuestro organismo puede sintetizarla por la acción--de los rayos ultravioletas, procedentes del sol o de ra--diaciones artificiales, sobre la piel, que transforman en vitamina D el ergosterol.

La vitamina D₂ se obtiene por radiación UV del ergosterol que se extrae de la levadura (fig.1).

La vitamina D₃ se prepara por irradiación del 7-dehidrocolesterol preparado a su vez del colesterol (fig.2)--

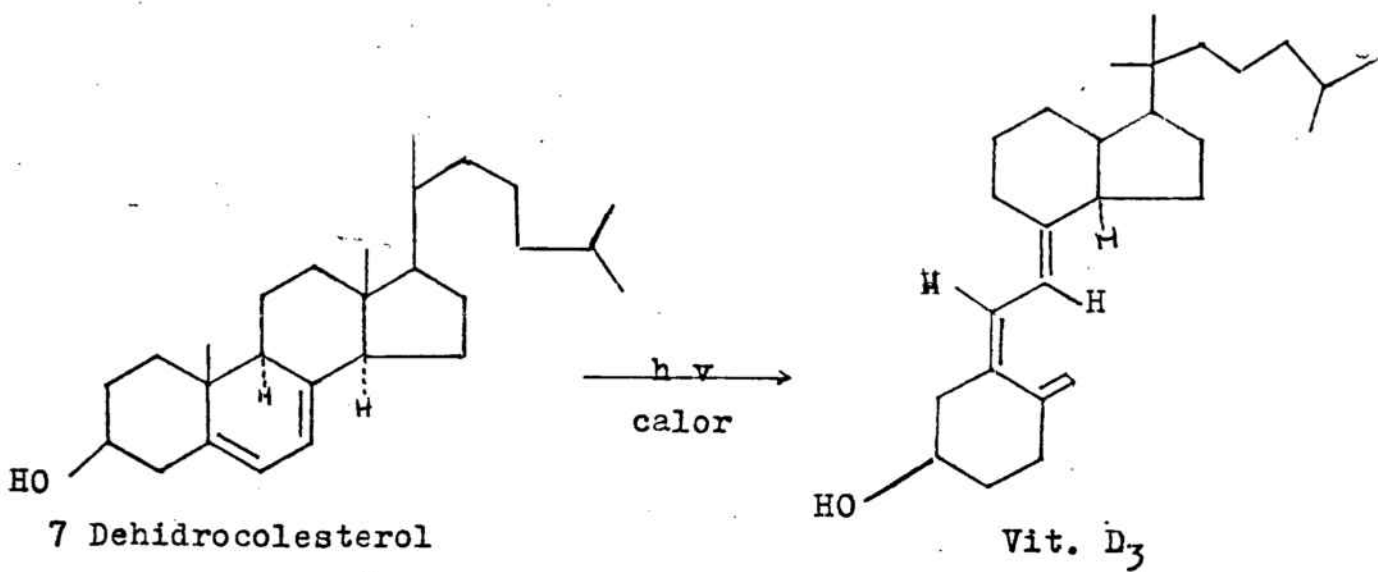


FIG .2

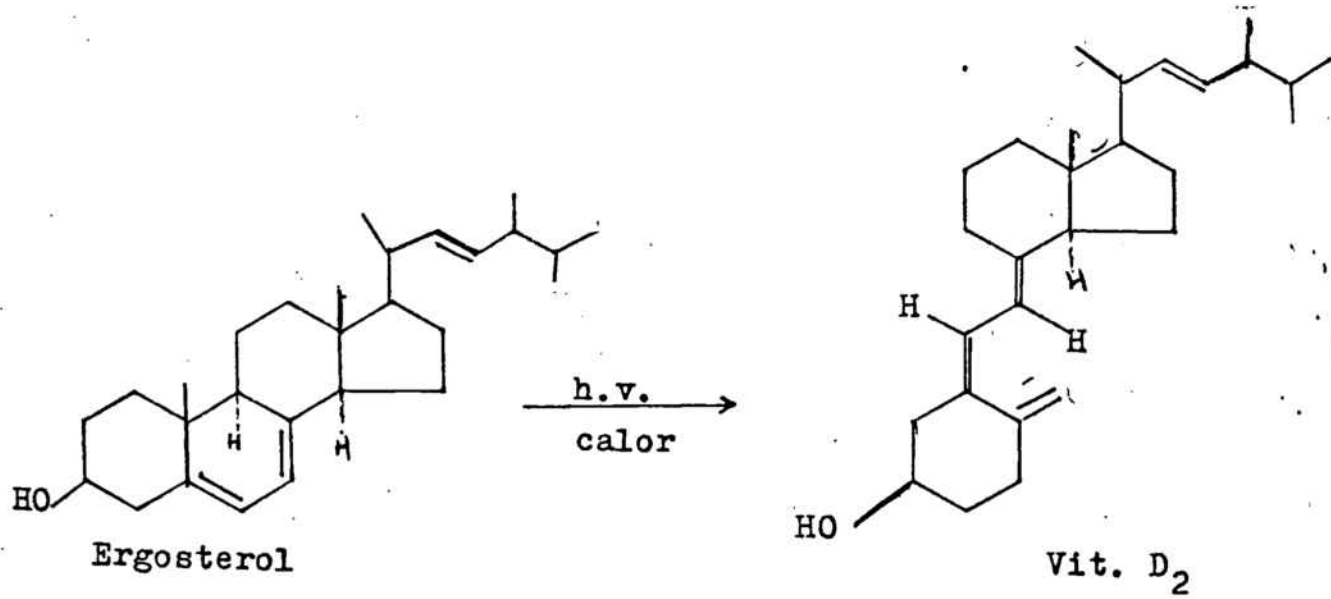


FIG-1

Su actividad está ligada principalmente a la parte-
insaturada conjugada de la molécula, y también depende--
de la existencia de una estereoquímica adecuada en el--
grupo C₃-OH ya que la epimerización de este grupo o su--
conversión en cetona disminuye fuertemente la actividad-
de las vitaminas D₂ y D₃ (1)

2.1.-OBTENCION

=====

Se obtiene de productos naturales o bien sintéticamente.

La vitamina D₃ se encuentra junto con la vitamina A en aceites de hígados de diversos peces, de donde se obtiene por una saponificación y aislamiento del residuo--insaponificable, destilación molecular y extracción con etanol al 95%.

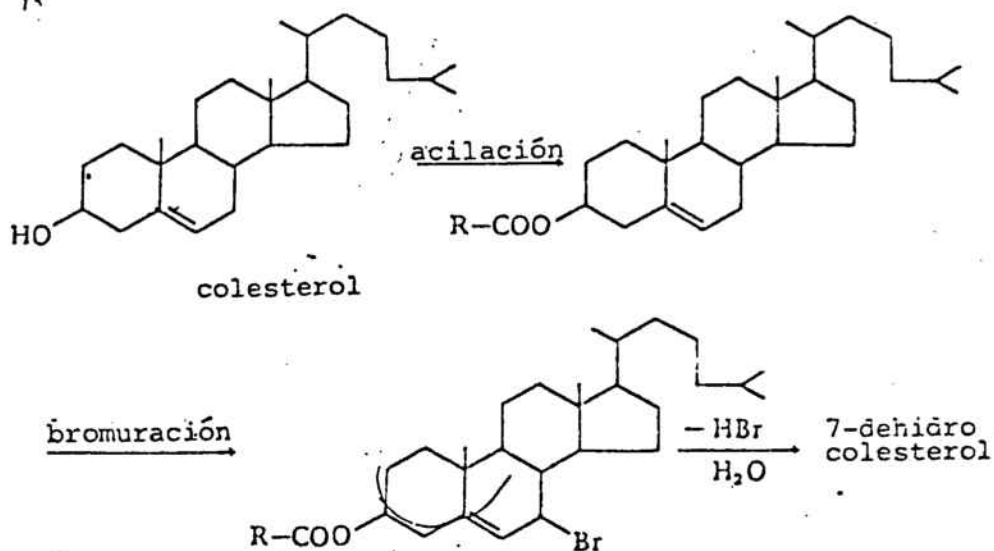
En la industria se realiza un proceso semisintético, consistente en la irradiación UV (275,300 nm) controlada del ergosterol para la vitamina D₂ y el 7-dehidrocolesterol para la D₃. El producto obtenido es básicamente el--precalciferol que mediante una transposición térmica pasa a calciferol.

Las provitaminas D se obtienen:

a.- El ergosterol se extrae de la levadura.

b.- El 7-dehidrocolesterol, aunque se encuentra en la naturaleza, es difícil obtenerlo en estado

puro, por lo que se prepara por síntesis a partir del colesterol (2) (3)



Este método presenta los inconvenientes de que el átomo de Br puede ocupar 2 posiciones estéricas y que el doble enlace conjugado tiende a migrar según las condiciones de la reacción empleada (4) (5). El rendimiento varía entre 30% y 50%.

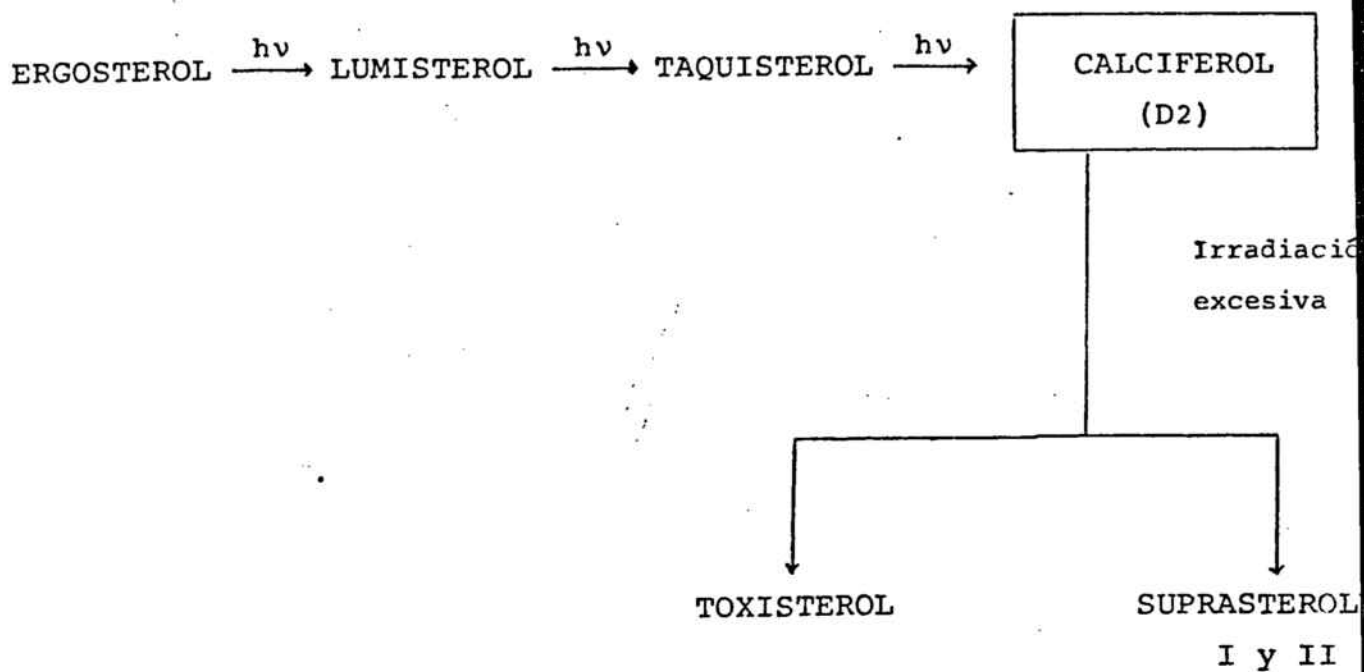
2.2.-FORMACION =====

La formación de la vitamina D a partir de las correspondientes provitaminas, ha interesado siempre mucho a los investigadores.

H. Steenbock (6) y A.I.Hess (7), descubrieron de una manera simultánea e independientemente que la irradiación de las dietas alimenticias de las ratas tienen el mismo efecto beneficioso que la irradiación de las propias ratas raquílicas.

A. Windaus, de la Universidad de Göttingen, dirigió sus investigaciones sobre la estructura del ergosterol de la levadura y sobre el factor vitamínico obtenido de él por irradiación (esquema 1).

Sus conclusiones, que postulaban la formación de vitamina D_2 por vía exclusivamente fotoquímica, fueron aceptados hasta que León Velluz y sus cols. descubrieron que el ergocalciferol (D_2) derivaba directamente de un nuevo compuesto, al que llamaron PRECALCIFEROL, sin aporte de energía luminosa (8).

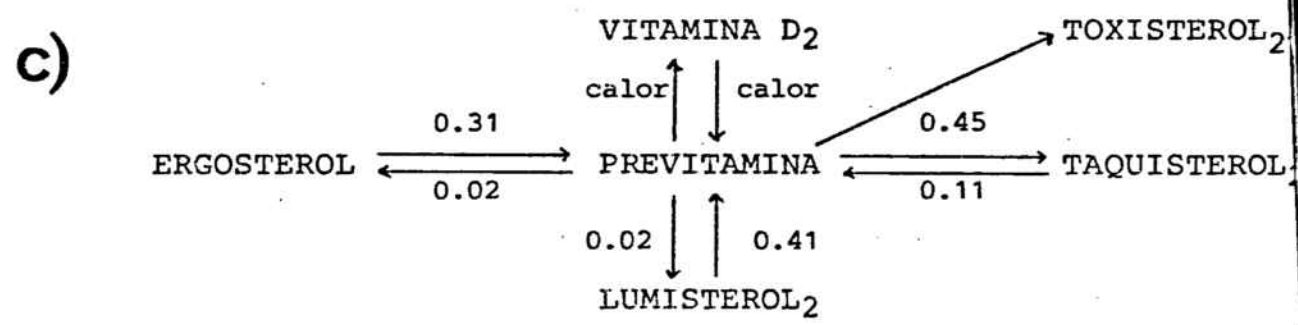
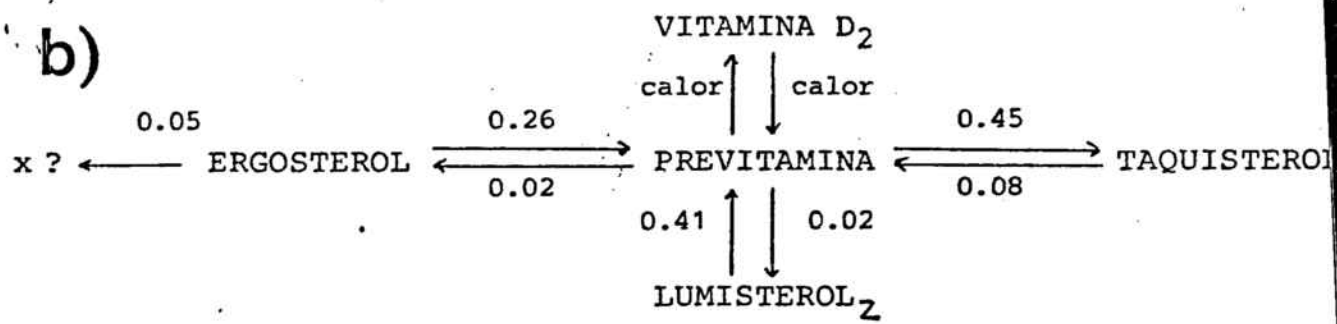
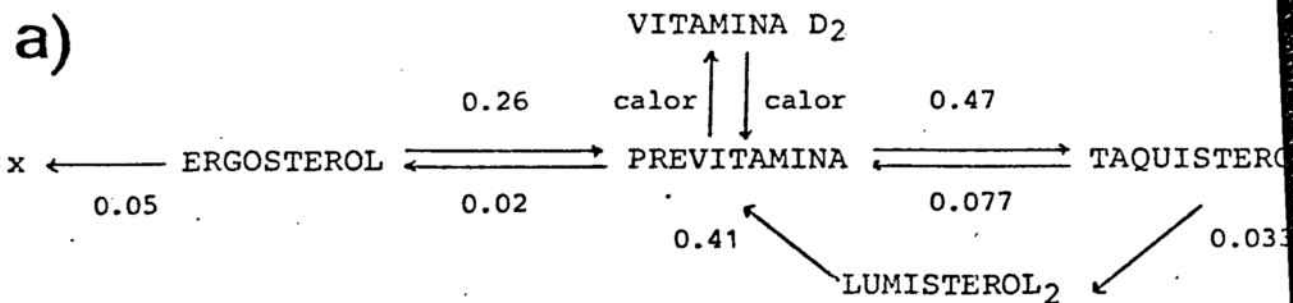


esquema 1

Hipótesis original de Windaus que explicaba la formación de Vitamina D, a partir de su Provitamina.

A partir de este descubrimiento, se realizaron muchos trabajos sobre la fotoquímica de la vitamina D, calculándose de cada paso que tenía lugar, los correspondientes rendimientos cuánticos. En el esquema 2 los mecanismos de --- reacción a que llegaron Rappoldt (1958), Sanders y Haringa (1964) y Sanders (1967).

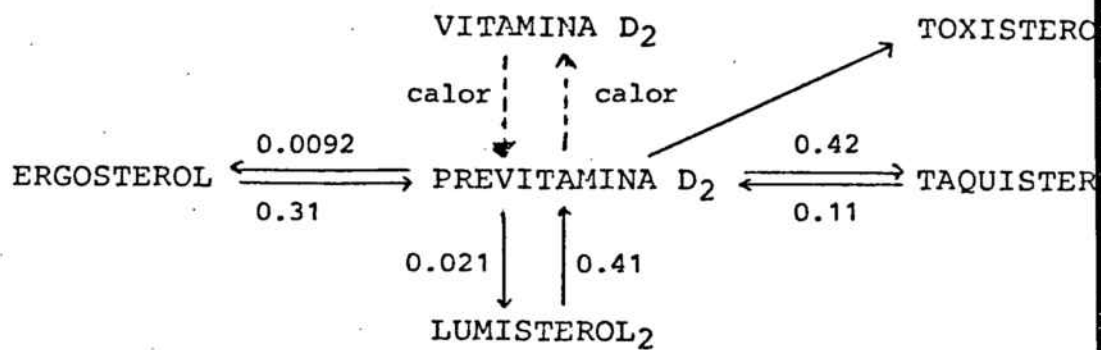
En el año 1973 Mermet-Bouvier obtuvo resultados análogos a los de Sanders (9) con pequeñas variaciones en los rendimientos cuánticos (esquema 3).



esquema 2

Productos formados en la fotoisomerización del Ergosterol, sugeridos por :

- a) Rappoldt (12)
- b) Sanders y Havinga (13)
- c) Sanders (14)



esquema 3

Productos formados en la fotoisomerización del Ergosterol, a baja temperatura, sugerido por Mermet - Bouvier. (15).

2.3.-MÉTODOS DE ANÁLISIS

=====

Existen dos métodos apropiados para el análisis cuantitativo químico o físico-químico de la vitamina D.

- Absorción UV: Medida espectrofotométrica de la absorción UV a 265 nm. Este método es adecuado únicamente para soluciones de vitamina D relativamente concentradas o para preparaciones de vitamina D en polvo siempre que no existan otras sustancias que absorban a 265 nm.

- Reacciones coloreadas: Análisis fotométrico de la vitamina D mediante una reacción coloreada. Se han sugerido numerosos métodos con este fin, El que se emplea todavía con mayor frecuencia es el que se basa en la reacción con tricloruro de antimonio propuesta inicialmente por Brockmann y Chen (10) mejorada ultimamente por otros autores como Nied y cols. (11) que adicionaron cloruro de acetilo al reactivo de tricloruro de antimonio. Este método se basa en las reacciones coloreadas con formación de un producto amarillo-naranja que las vitaminas D₂ y D₃ dan con el tricloruro de antimonio en cloroformo. El máximo de absorción se halla a 500 nm.

El producto de reacción de la vitamina D tarda de 5 a 15 minutos en alcanzar la máxima intensidad coloreada.

El principal inconveniente de este análisis es la inestabilidad del reactivo, pero como se ha citado anteriormente Nield y colaboradores lo mejoraron con la adición de cloruro de acetilo con lo que se incrementa la estabilidad del reactivo y la sensibilidad del mismo.

La mayor desventaja de todos estos métodos para el análisis de vitamina D es su falta de especificidad.

La vitamina A constituye el obstáculo más importante para el análisis exacto de la vitamina D en productos naturales y en muchas especialidades farmacéuticas.

El método más satisfactorio para la separación de vitamina A y D y de otras sustancias interferentes es por cromatografía de partición (fig. 2.4) y por cromatografía en capa fina sobre placas de silicagel. La vitamina D se recupera cuantitativamente después de su aislamiento por ambos métodos.

La vitamina E que interfiere el análisis fotométrico de la vitamina D, (12), también se separa cuantitativamente. Debe destacarse una diferencia fundamental entre los dos procedimientos: En el caso de la cromatografía

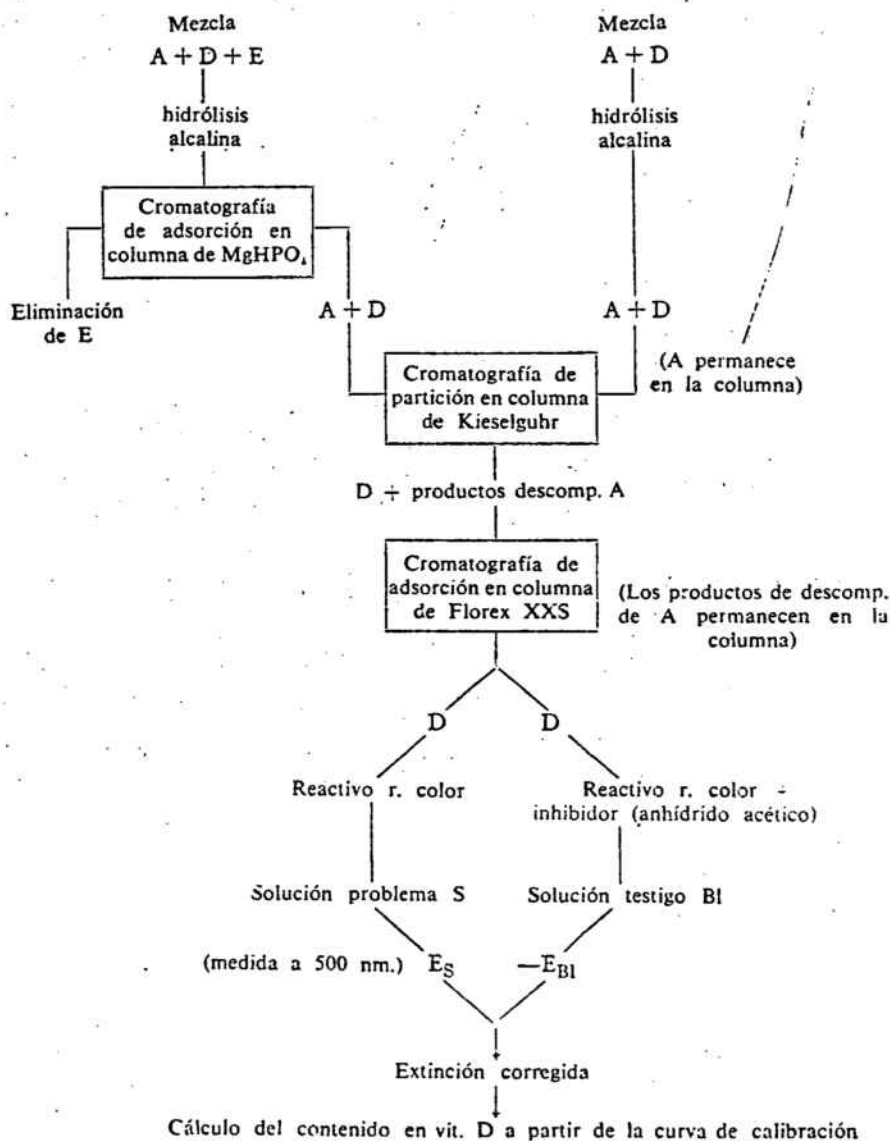


FIG - 2.4

fía de partición la vitamina A debe hallarse en estado de vitamina A-alcohol, es decir, debe hidrolizarse la muestra o extracto. En cambio en la cromatografía en capa fina se eliminan únicamente los ésteres de la vitamina A, que se separan satisfactoriamente de la vitamina D. La presencia de grandes cantidades de vitamina A-alcohol interfiere la separación por cromatografía en capa fina.

- Puede valorarse también por métodos biológicos: Ensayos en ratas y pollos, valoraciones microbiológicas,...

Es indudable que la especificidad de detección de la vitamina D por su actividad biológica no es superada por los otros métodos analíticos, pero el progreso de las técnicas cromatográficas y especialmente de la cromatografía en capa fina ha permitido mejorar de tal modo la valoración química y fisico-química de estas vitaminas que su especificidad alcanza prácticamente la que es característica de los procedimientos biológicos, además son más baratos requieren menos tiempo y los resultados presentan variaciones considerablemente menores. (13)

2.4.-ACCION FARMACOLOGICA

=====

La administración de la vitamina D previene y cura rápidamente el síndrome de carencia de dicha vitamina: Raquitismo infantil y la osteomalacia del adulto.

Es digno de mencionar la normalización dentaria, de manera que se previene o se detiene el desarrollo de las caries sin que ello quiera significar que la vitamina D sea el único factor en las mismas (14).

El examen histológico de los huesos muestra que bajo la acción de la vitamina D, las células del cartílago de conjugación degenera, siendo seguido por invasión de vasos capilares; formación de osteoblastos y finalmente impregnación cálcica de la matriz osea formada.

El efecto de la vitamina D a altas dosis, semejante al de la hormona paratiroidea, ha llevado al empleo de aquélla en el hipoparatiroidismo, con efectos beneficiosos haciendo suprimir la tetania.

A dosis muy elevadas es capaz de provocar reacciones adversas debido esencialmente a la producción de hipercalcemia, que puede alcanzar a 22mg/100ml o sea -----

11 mEq/l; en ese sentido, se considera como dosis tóxica, 3.75 mg o sea 150.000 U.I. por día, sobretudo si es administrada en forma continuada.

Por convenio 1 U.I. de vitamina D corresponde a la actividad de 0,01ml de aceite de hígado de bacalao medicinal promedio y equivale aproximadamente a 0.05 g de calciferol.

Las manifestaciones principales de la hipervitaminosis consisten en anorexia, vómitos, diarrea, lasitud, debilidad muscular, mareos, cefalea, palidez, albuminuria, nicturia y retención nitrogenada. Las alteraciones óseas consisten en osteoporosis; se producen calcificaciones metastásicas en la aorta, corazón, pulmones, vasos, riñones, con insuficiencia de estos órganos pudiendo aun producirse la muerte.

El tratamiento de este hipertiroidismo es simplemente la supresión de la administración del preparado, cediendo generalmente los síntomas, pues las alteraciones son reversibles, si no están muy avanzadas.

2.5.-MECANISMO DE ACCION

=====

La vitamina D interviene en el metabolismo del calcio aumentando el transporte activo desde el intestino.

La vitamina D_3 es producida en la piel de los mamíferos a partir del 7-dehidrocolesterol por la acción a la luz solar. La vitamina D_3 es llevada al hígado, donde es convertida en un metabolito de la vitamina, el 25-hidroxicolecalciferol. El 25-hidroxicolecalciferol es convertido, a su vez en riñón, en el metabolito fisiológicamente activo, 1,25-dihidroxicolecalciferol. Debido a que este metabolito es producido en el cuerpo y transportado en la corriente sanguínea para actuar a distancia de su lugar de producción, a menudo se le denomina hormona. El actúa sobre los núcleos de las células del epitelio intestinal iniciando la formación de RNAm. El RNAm dicta la formación de una proteína que incrementa la actividad del mecanismo transportador de calcio. El 1,25-dihidroxicolecalciferol tiene una acción semejante sobre el hueso, movilizándolo el calcio del hueso viejo. Sin embargo, la absorción defectuosa del calcio en la deficiencia de la

vitamina D , a menudo produce hipocalcemia y, debido al déficit de calcio, la proteína del hueso recién formado no se mineraliza. En los niños y en los animales jóvenes, el resultado es la enfermedad llamada "raquitismo". Es digno de notarse que el raquitismo se puede deber a la ingestión inadecuada de las provitaminas que son convertidas en vitamina D₃ por la luz solar, o a la exposición insuficiente al sol. El raquitismo también se observa como una complicación de la enfermedad renal, posiblemente porque el riñón no produce las cantidades normales de 1,25-dihidroxicolecalciferol. La administración de grandes dosis de vitamina D o de un compuesto relacionado, el "dihidrotaquisterol", eleva el nivel de Ca⁺⁺ plasmático lo suficiente para ser benéfica en el tratamiento del hipoparatiroidismo.

La formación del 1,25-dihidroxicolecalciferol es regulada por el calcio plasmático (15).

3

**degradación de sustancias
en estado sólido**

Los estudios teóricos sobre los mecanismos a través de los que las sustancias al estado sólido sufren procesos de degradación, llenan una importante parcela de la moderna bibliografía sobre cinética química (16) (17) -- (18).

Evidentemente no es posible llegar en este tipo de estudios a la simplicidad y precisión de conceptos que se alcanzan cuando se describen los procesos que tienen lugar en medios homogéneos líquidos o gaseosos.

Los conceptos básicos utilizados en cinética química, tales como velocidad de reacción, constante de velocidad específica, orden de reacción, energía de activación etc, se emplean tan sólo con carácter analógico, ya que no es posible definir en forma correcta el concepto de concentración al que todos los datos cinéticos están vinculados matemáticamente.

Todo ello limita la posible generalización de estos estudios, de manera que más que un planteamiento unificado de este tipo de reacciones, es más útil abordar una serie de casos concretos, muchos de los cuales son susceptibles de ser aplicados a toda una serie de casos análogos y por tanto llegar a cierto nivel de generalización.

Las reacciones a través de las cuales los sólidos se degradan las podemos clasificar en dos grandes grupos:

a.- Reacciones localizadas en delgadas capas líquidas de recubrimiento del sólido o en medios líquidos en contacto con aquel.

b.- Reacciones que tienen lugar en fase sólida propiamente dicha.

Nosotros vamos a ocuparnos de las reacciones de tipo b.- que son las que pueden tener lugar cuando la vitamina D₃ se halla depositada sobre un soporte de capa fina.

Los sólidos cristalizados presentan una gran resistencia al ataque químico, por esto las imperfecciones en la red cristalina juegan un importante papel en los procesos de degradación en estado sólido.

Muchas veces la difusión de un reactivo en el interior del cristal es el factor que controla la velocidad, y dicha difusión sólo es posible a través de los defectos de estructura y grietas que la propia degradación genera en el cristal.

La definición más simple de este tipo de reacciones, puede ser la que establece que son procesos de transformación química que tienen lugar a temperaturas inferiores a las de los puntos de fusión de las mezclas eutécticas, que pueden formar los componentes del sistema. Esta definición excluye automáticamente todas las reacciones que forman un líquido como uno de sus productos.

Moravetz (19) establece tres criterios para reconocer este tipo de reacciones:

a.- Se dan grandes diferencias de reactividad en sustancias muy parecidas.

b.- Diferentes formas cristalinas de un mismo compuesto dan reacciones distintas o presentan reactividad diferente.

c.- Se dan reacciones distintas con formación de productos diferentes muchas veces si la reacción tiene lugar entre las mismas sustancias en fase líquida.

Siguiendo a Stephan R. Byrn (17) podemos distinguir

entre ellas tres tipos fundamentales.

a.- Reacciones fotoquímicas

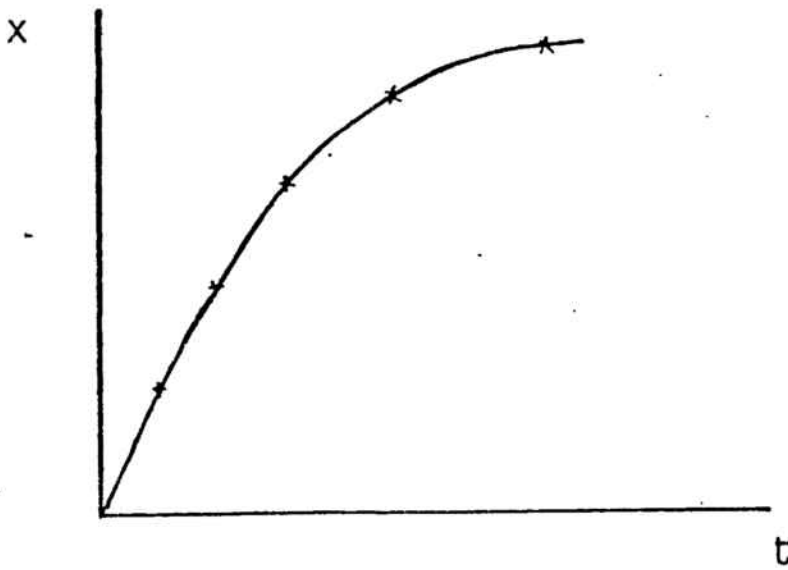
b.- Reacciones de tipo térmico, sólido-sólido

c.- Reacciones sólido-gas

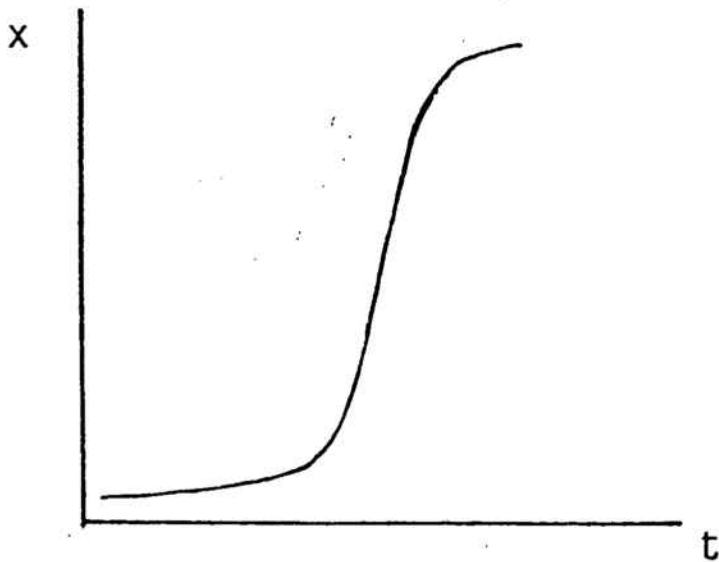
En muchos casos se dan simultáneamente dos o más de estos tipos fundamentales de reacciones.

Las curvas que representan la progresión de la reacción a lo largo del tiempo pueden tipificarse por uno de los dos tipos siguientes:

1.- Se inician a una gran velocidad y luego se aproximan asintóticamente a pequeña velocidad a su realización completa



2.- Se inician muy lentamente, definiendo un periodo de aceleración bastante rápido y acaba en el periodo de decaimiento; presentan una forma sigmoidea característica.



Las reacciones que presentan curvas del tipo 1.- se inician como en casi todos los casos en la superficie, en las aristas y grietas del sólido, formándose núcleos de descomposición que rápidamente crecen hasta llegar a cubrir completamente el cristal. Normalmente los productos formados son también sólidos, pero puede ocurrir en algún caso que los productos resultantes de la reacción sean gases que se desprendan.

Si son sólidos de menor volumen molar que el reactivo, quedan formando una capa porosa y la reacción prosigue en la verdadera superficie del cristal inalterado.

Este tipo de reacciones se rigen por criterios geométricos, decreciendo a medida que la superficie de ataque va siendo menor al avanzar progresivamente hacia el interior del cristal (procesos topoquímicos)

Supongamos por ejemplo que un experimento se lleva a cabo utilizando partículas esféricas que se atacan sin perder la forma, pero disminuyendo de volumen. La velocidad se supone que es en cada momento proporcional a la superficie límite de la partícula inalterada.

$$- \frac{d v}{d t} = K S$$

Siendo V el volumen de la partícula al cabo de un tiempo t poniendo V y S en función del radio r, tenemos

$$- \frac{d}{d t} (4/3 \pi r^3) = 4 K \pi r^2$$

De manera que el radio disminuye a velocidad constante--

$$- \frac{d r}{d t} = K$$

El valor de x o sea la fracción de sustancia descompuesta es igual:

$$x = \frac{4/3 \pi r_0^3 - 4/3 \pi (r_0 - K t)^3}{4/3 \pi r_0^3} = 1 - \left(1 - \frac{K t}{r_0} \right)^3$$

r_0 = radio inicial de la partícula

o sea:

$$(1 - x)^{1/3} = 1 - \frac{K}{r_0} t$$

Si se hubiese partido de partículas de forma cúbica se hubiese llegado a la misma fórmula. Roginski y Schultz (20) muestran como esta ecuación se puede aplicar a la descomposición del permanganato de potasio; al representar $1-(1-x)^{1/3}$ frente al tiempo se obtiene una recta.

Cuando los productos sólidos ocupan mayor volumen que los reactivos, se forma una capa de protección difícilmente permeable que tiende a frenar la reacción. Si la reacción se produce con un gas, éste debe introducirse a través de esta capa y se puede hablar de una reacción controlada por difusión.

La hipótesis más simple es que el espesor de la capa de producto aumente en forma inversamente proporcional a su espesor

$$\frac{d x}{d t} = \frac{K}{x}$$

Siendo K un factor de proporcionalidad relacionado con la permeabilidad de la capa por el gas. El crecimiento de x sigue una ley parabólica:

$$x^2 = 2Kt$$

Las curvas del tipo 2º de forma sigmoidea pueden interpretarse en muchos casos según la teoría propuesta por Prout y Tompkins (21) para interpretar la cinética de descomposición térmica del permanganato de potasio y que ha sido después aplicada a muchos otros tipos de reacciones de descomposición de sólidos.

Un cristal presenta en su superficie y también en cierta medida, aunque con mucha menor frecuencia en su interior, moléculas que por su especial situación en la red, presentan mayor reactividad o inestabilidad. Dicho de otro modo son moléculas que presentan una energía de activación mucho más pequeña que el conjunto de las demás moléculas y por ello su eventual transformación está altamente favorecida; evidentemente la especial situación de estas moléculas se relaciona con la existencia de efectos de diversa índole en la red cristalina.

El comienzo de las reacciones en el estado sólido se inicia en estos puntos, pero cuando alguna de estas moléculas se transforma, se produce un debilitamiento de las moléculas vecinas, propagándose según direcciones determinadas por la estructura del cristal la situación de inestabilidad.

Consideremos que el momento inicial existen un número--

de estas moléculas potencialmente reactivas; a medida que se van transformando van disminuyendo en número igual como lo harán los átomos de una muestra radioactiva. Si N_t son las que quedan al cabo de un tiempo t , al igual que en una muestra radioactiva cabe escribir la relación:

$$-\frac{d N_t}{d t} = -\frac{N_t}{\tau}$$

$$N_t = N_0 e^{-t/\tau}$$

Siendo $1/\tau$ la esperanza media de vida de las moléculas potencialmente reactivas.

De hecho el número de moléculas potencialmente reactivas no decrece, ya que cada vez que alguna se transforma, se induce la formación de otras varias. Dicho número lo expresamos por N y su valor incluye a las iniciales que quedan y las de nueva creación. Todas ellas están afectadas de la misma probabilidad de reacción de manera que se puede escribir la relación:

$$\frac{d n}{d t} = -\frac{N}{\tau}$$

Siendo n el número de moléculas que han reaccionado o el número de moléculas de producto formado.

Si llamamos α al número de moléculas que se forman en termino medio, en exceso sobre la unidad, por cada -- molécula que reacciona, o sea que consideramos α como el factor de ramificación de la cadena de moléculas activadas que se está propagando

$$\frac{d n}{d t} = \alpha \cdot \frac{N}{Z}$$

En un cristal de proporciones finitas este proceso de propagación en cadena tiene una limitación natural, -- ya que la propagación regida por la propia estructura de la red, se efectúa en direcciones y según planos determinados que a medida que el proceso se va desarrollando va interfiriendo y va produciendo la ruptura de cadenas de propagación.

Llamamos β la probabilidad de la interrupción, la -- cual logicamente irá en aumento a lo largo de la propagación de la reacción. La velocidad de formación de nuevas moléculas activadas es realmente:

$$\frac{d n}{d t} = (\alpha - \beta) \frac{N}{2}$$

La idea de que α y β están relacionadas se puede expresar matemáticamente por

$$\beta = \phi \alpha$$

imponiendo la condición de que:

$$\begin{aligned} \phi &= 0 \text{ cuando } t = 0 \\ \phi &= 1 \text{ cuando } \alpha = \beta \end{aligned}$$

Si llamamos n_{\max} el número de moléculas transformadas en el momento de máxima velocidad en la fase de aceleración, el valor que Prout y Tompkins proponen para la velocidad de formación de moléculas activas es:

$$\frac{d n}{d t} = \alpha \left(1 - \frac{n}{n_{\max}} \right) \frac{N}{2}$$

con lo cual:

$$\frac{dN}{dn} = \alpha \left(1 - \frac{n}{n_{\max}} \right)$$

obteniendo por integración:

$$N = \alpha n - \frac{n^2}{2n_{\max}} + N_0$$

de donde se deduce:

$$N_{\max} = N_0 + \frac{\alpha n_{\max}}{2}$$

La velocidad de transformación vendrá dada por consiguiente por la expresión:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{\alpha}{2} n \left(1 - \frac{n}{n_{\max}} \right) + \frac{N_0}{2}$$

Dicha ecuación cinética se puede expresar en función

de la fracción de moléculas transformadas ($x = n/n_f$) siendo n_f el número total de moléculas

$$\frac{d x}{d t} = \frac{\alpha}{\tau} x \left(1 - \frac{x}{\frac{2x}{\max}} \right) + \frac{N_0}{\tau n_f}$$

ecuación en la que se puede despreciar su último término quedando:

$$\frac{d x}{d t} = \frac{\alpha}{\tau} x \left(1 - \frac{x}{\frac{2x}{\max}} \right)$$

que se adapta bastante bien a los datos experimentales obtenidos en la descomposición térmica del permanganato potásico, por lo menos hasta el momento de su máxima velocidad; a partir de este momento la velocidad parece estar controlada por el número de moléculas sin transformar:

$$(n - n_f)$$

multiplicando por un factor que expresa la probabilidad--

de que estas moléculas sean realmente activas; dicho factor se puede expresar por el cociente n/n_f , el cual tiende a valer 1 en las fases finales.

La velocidad en la etapa de decaimiento sería por ello:

$$\frac{d x}{d t} = \frac{1}{\tau} x (1 - x)$$

la cual también se adapta a los resultados experimentales.

La teoría de Prout y Tompkins ha sido aplicada al esclarecimiento de muchos procesos de degradación en estado sólido, particularmente al proceso de descarboxilación del ácido p-amino salicílico (22) (23).

Carstensen, apoyándose en la posibilidad de tener indicaciones experimentales de la cantidad de moléculas activadas N perfecciona el tratamiento matemático. Dicha posibilidad se basa en la medida de la superficie específica de los cristales por el método BET, ya que se considera que el número de centros activos guarda relación de proporcionalidad con la superficie específica.

En la mayoría de los casos estudiados se ve que el periodo de inducción es único y no se repite cuando se produce una interrupción artificial del proceso.

Si la inducción fuese debida a un proceso de difusión y no a la formación de núcleos activos por un mecanismo de propagación en cadena, el periodo de inducción debería repetirse a cada interrupción del proceso.

Las reacciones de índole fotoquímica, se inician en la superficie y pueden propagarse a medida que se va destruyendo la masa del cristal. La mayor parte de casos estudiados presentan una cinética aparente de primer orden, pudiéndose observar en algunos casos cambios de velocidad específica a lo largo del proceso, que deben relacionarse con diferencias en el sustrato, más que a diferencias en el mecanismo de reacción (24) (25).

En la mayor parte de reacciones fotoquímicas de sustancias al estado sólido, los datos estereoquímicos resultan ser de la mayor importancia. Se han establecido los llamados postulados topoquímicos que establecen como norma que en las reacciones fotoquímicas hay el mínimo desplazamiento posible de átomos y moléculas, produciéndose tan solo desplazamientos electrónicos. Si se puede--

conocer con precisión por medio de los rayos X la estructura exacta de los cristales, resulta fácil predecir las reacciones compatibles con dichos postulados (26) (27).

Muchas reacciones fotoquímicas presentan mecanismos mixtos en que se dan junto a fases relacionadas con la radiación, otras fases exclusivamente térmicas, muchas veces del tipo de propagación en cadena.

Las reacciones exclusivamente térmicas sin intervención de reactivos externos (líquidos o gaseosos), se suelen dar en estado sólido si también se dan en una extensión razonable en disolución en un disolvente inerte a temperaturas 60-100° por debajo de su punto de fusión, sin embargo su velocidad es dos a cien veces inferior.

Las reacciones térmicas que tienen lugar con intervención de gases, son particularmente importantes en el estudio de la descomposición de sustancias medicamentosas. El vapor de agua y el oxígeno del aire son los reactivos externos más frecuentes.

El ergocalciferol (vitamina D₂) es sensible al calor, al aire y a la luz. Los productos de su descomposición en presencia de aire no son bien conocidos, pero se sabe por el análisis elemental y por espectrografía de

masa que se obtienen productos de degradación oxidados.-
La radiación no es una condición indispensable para esta degradación.

Se pueden suponer tres mecanismos que actúan independientemente:

a.- El ataque por oxígeno atómico activado fotoquímicamente sobre los grupos diénicos o triénicos.-

b.- El ataque por oxígeno molecular sobre moléculas fotoquímicamente excitadas.

c.- Formación de hidroperóxidos alfa sobre el sistema de dobles enlaces excitados fotoquímicamente o térmicamente los cuales inician un proceso de reacción en cadena.

La mayoría de las reacciones en estado sólido (fotoquímicas y térmicas) empiezan por un proceso de nucleación del tipo Prout y Tompkins. La propagación depende en alto grado de la anisotropía del medio. Existen reacciones que se dan con preferencia según una de las caras del cristal. (28)

técnicas utilizadas⁴

4.1.-ESPECTROFOTOMETRIA ULTRA-VIOLETA

=====

Desde hace mucho tiempo se viene estudiando la absorción de radiaciones en la región UV, pero hasta 1940 no se consiguió un espectrofotómetro fotoeléctrico de fácil manejo. (29)

La espectrofotometría visible y UV se debe a la absorción por las moléculas de las radiaciones correspondientes, aumentando el nivel energético de sus electrones.

La captación de energía radiante puede invertirse no sólo en los cambios de posición de los electrones de la molécula sino en aumentar sus energías de rotación y vibración, pero los saltos energéticos que se detectan en la zona UV afectan tan solo a las excitaciones electrónicas.

Cada especie molecular presenta un espectro característico condicionado por su estructura y por la naturaleza de los saltos electrónicos posibles y su acoplamiento. Es muy interesante conocer este espectro no sólo para la caracterización cualitativa de la sustancia sino para estudiar su posible aprovechamiento en el análisis cuantitativo.

tivo.

Para hacer la representación de la curva espectral se dispone en un diagrama cartesiano los valores de las absorbancias en ordenadas y las longitudes de onda en abscisas. La absorbancia es el valor logarítmico del cociente entre la intensidad de la luz incidente y la transmitida $\log. \frac{I_0}{I_t}$.

La presencia de un máximo bien definido a una longitud de onda dada es una característica favorable ya que en esta longitud de onda se pueden hacer las medidas de absorbancia con un mínimo de error. Hay que tener en cuenta que no se trabaja con luz monocromática, sino con un haz de luz de diferente longitud de onda pero con una pequeña oscilación en su valor (fig.3). Otra característica fundamental para el posible aprovechamiento de la luz UV para el análisis cuantitativo es que en la longitud de onda de dicho máximo se cumpla la ley de Lambert-Beer que se expresa de la manera siguiente:

$$I_t = I_0 e^{-alc}$$

ESPECTRO DE LA VITAMINA D

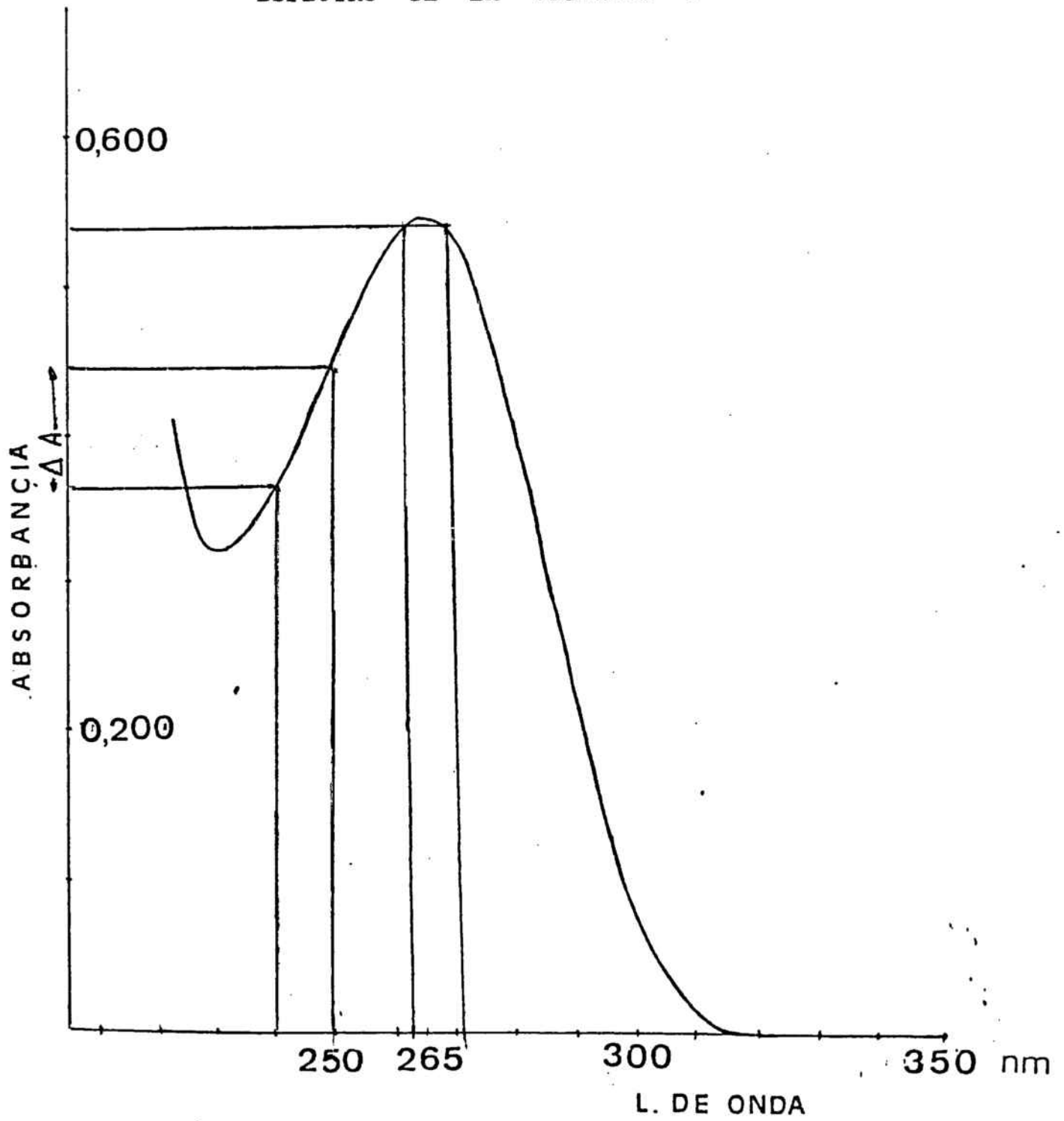


FIG-3

Siendo:

I_t = Intensidad de radiación transmitida a través de la disolución problema.

I_o = Intensidad de la radiación incidente.--

l = Espesor de la disolución atravesada.--

c = Concentración de la solución.

Se puede variar la expresión de la siguiente forma:

$$\frac{I_t}{I_o} = e^{-alc}$$

tomando en la expresión anterior logaritmos neperianos:

$$\ln \frac{I_t}{I_o} = -acl$$

transformándolo a logaritmos decimales queda:

$$\log \frac{I_o}{I_t} = \frac{a}{2.303} l c$$

Siendo:

$$\frac{-a}{2,303} = E$$

E = Coeficiente de extinción

$$\log \frac{I_0}{I_t} = A$$

A = Absorbancia, densidad óptica

$$\frac{I_t}{I_0} = T$$

T = Transmitancia

De lo que se deduce:

$$E = \frac{A}{l \cdot c}$$

Según esté expresada la concentración, E recibe la denominación de:

para:

$C = \text{moles/litro}$ $E = \text{Coeficiente de extinción molar}$

para:

$C = \text{g/100 ml}$ $E = \text{Coeficiente de extinción específica.}$

En el caso particular que la concentración sea 1 g en 100 ml, no directamente medible al espectrofotómetro-- normalmente, y considerando la cubeta de 1 cm de espesor, se obtiene $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ que es característico de cada sustancia-- para una determinada longitud de onda. En la práctica este valor se obtiene por deducción a partir de concentraciones menores medibles en el espectrofotómetro y por aplicación de la ley de Lambert-Beer.

Por la ecuación:

$$A = E l c$$

se ve que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración siempre que sea el mismo espesor el de la cubeta. Esta propiedad es la que se utiliza normalmente en aplicaciones al análisis cuantitativo--

de las espectrofotometrías.

La ley de Lambert-Beer se cumple sólo para radiaciones monocromáticas, y aunque se puede presumir su cumplimiento en todas las sustancias existen muchos casos de comportamiento anómalo, debido a la mayor parte de los casos, a modificación de la estructura molecular con el cambio de concentración. Por ello es necesario su comprobación antes de poner a punto un método de análisis cuantitativo de tipo espectrofotométrico.

En la zona UV la lámpara o fente de radiación es una lámpara de hidrógeno. Condición indispensable es que debe emitir una intensidad constante.

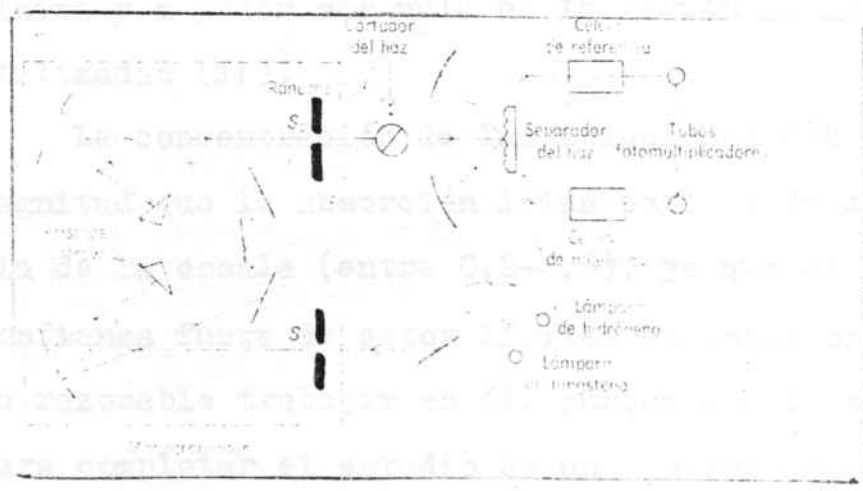
Se utiliza como medio dispersante, prismas o redes de difracción. Los prismas deben ser de cuarzo o sílice para el UV.

Las redes de difracción pueden ser por reflexión o refracción, pero se prefieren las primeras ya que no absorben.

La muestra se coloca en unas cubetas de cuarzo cuyas caras de entrada y de salida del rayo casi monocromático son paralelas, de igual espesor y transparentes, mientras que las laterales son translúcidas para su mejor manejo.

La intensidad de las radiaciones transmitidas se mide por un dispositivo fotosensible que de una respuesta-- lineal en todas las frecuencias y que sea lo suficiente-- mente sensible. Los utilizados normalmente son los foto-- multiplicadores.

Existen los espectrofotómetros de un sólo haz, en es- tos el haz proveniente del foco atraviesa la muestra antes o después del ajuste a 0 del aparato con el blanco con lo que la respuesta del aparato corresponde exclusivamente a la concentración problema, o de doble haz, que es el apa- rato utilizado en muestras mediciones, y en el que tal co- mo se aprecia en la figura:



la radiación procedente de la fuente entra en el monocromador por la ranura S_1 y se dispersa en el prisma tipo--Littrow. Después de abandonar el monocromador se hace que el haz pase alternativamente por la célula de referencia y por la célula de muestra por medio de un cortador del-haz que alterna en 50 ciclos por segundo. El tubo foto--multiplicador recibe entonces pulsos alternativos de radiación, primero procedentes del haz de referencia y luego del haz muestra. Sincronizando con los pulsos alternativos hay un sistema de señales fotoeléctricas que permite comparar las señales de los dos haces. Cualquier desequilibrio entre las dos señales se corrige imponiendo---voltaje procedente de un potenciómetro (30).

Los disolventes utilizados deben tener la absorción mínima y a poder ser nula en la región de frecuencias---utilizadas (31).

La concentración de las soluciones deben ser de tal magnitud que la absorción leída esté en la zona intermedia de la escala (entre 0,2-0,8), ya que el margen de---confianza fuera de estos límites es inferior y no resulta razonable trabajar en él, aunque en algunos casos y---para completar el estudio de un proceso de degradación---sea imprescindible utilizarlo.

4.1.1.-APLICACION AL ANALISIS DE VITAMINA D₃

El espectro de absorción de la vitamina D₂ y D₃ posee un máximo a 265 nm (como se aprecia en la fig. 4). Siendo idénticos debido a que el máximo de absorción se origina por la presencia del sistema trieno conjugado, existente en ambas. Este espectro es típico para aquellos trienos en los que los dobles enlaces no son cíclicos (32)

Este máximo se puede ver interferido si la vitamina va acompañada de esteroides relacionados ya que poseen características con absorbancias importantes a longitudes de onda casi iguales.

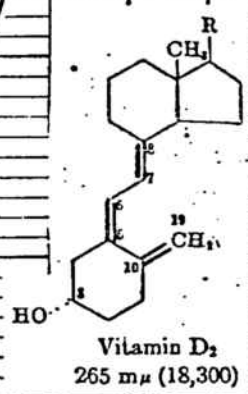
Para su análisis espectroscópico, se preparan soluciones etanólicas de la vitamina a concentraciones de 0,5 a 1,5 mg de vitamina D en 100ml. La extinción de esta solución se mide frente al disolvente a 265 nm en una cubeta de 1 cm.

El contenido en vitamina D se calcula tomando los valores de extinción específica $E_{\frac{1\%}{1\text{cm}}}$ para la vitamina:

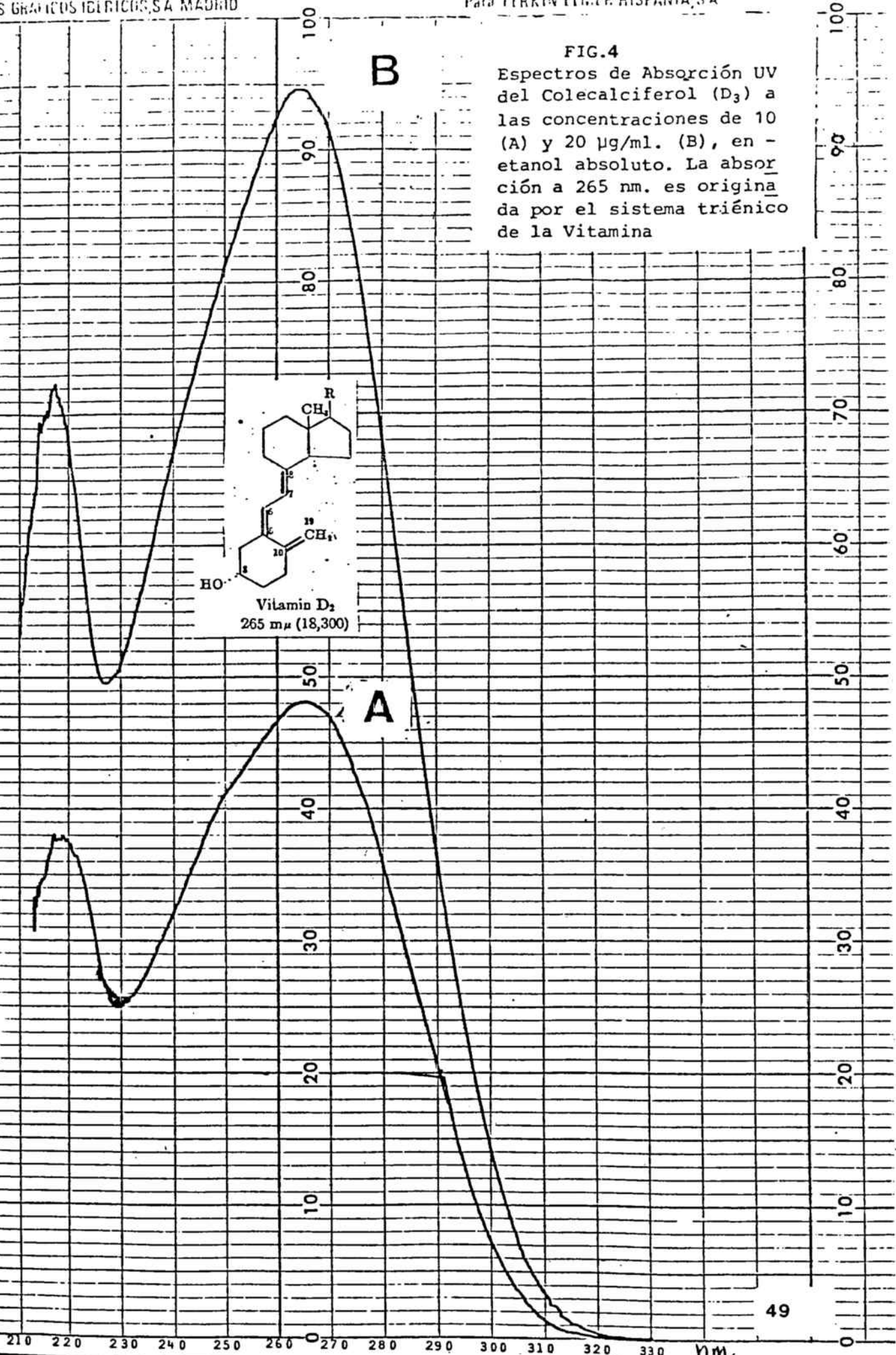
$$E_{\frac{1\%}{1\text{cm}}} (D_2) = 460$$

B

FIG.4
 Espectros de Absorción UV
 del Colecalciferol (D₃) a
 las concentraciones de 10
 (A) y 20 µg/ml. (B), en
 etanol absoluto. La absor-
 ción a 265 nm. es origina-
 da por el sistema triénico
 de la Vitamina



A



$$E_{1\text{cm}}^{1\%} (\text{D}_3) = 485$$

La valoración espectrofotométrica de la vitamina basada en el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer (33)-- en su máximo a 265 nm es uno de los fundamentos del análisis cuantitativo utilizado por nosotros.

4.2.-CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

=====

El análisis cromatográfico es un método físico-químico basado en la competencia. Comprende un sistema móvil que está en equilibrio con una fase estacionaria, de tal forma, que la mezcla a separar se distribuye entre las dos fases. Cuando la fase estacionaria es un sólido y las fuerzas que actúan entre él y la mezcla son del tipo de adsorción, la técnica se llama "Cromatografía de la Adsorción". Cuando la fase estacionaria es un líquido sólo o sostenido en un soporte sólido, la cromatografía se considera "Cromatografía de partición". En general, la cromatografía de adsorción comprende una fase móvil relativamente apolar y va mejor si las sustancias a separar no son muy polares. Por otra parte la cromatografía de partición se realiza con sustancias muy polares y la separación se basa fundamentalmente en los coeficientes de distribución entre un líquido polar y otro apolar.

La cromatografía puede realizarse en columna, papel, capa fina o en forma de gas.

La cromatografía sobre papel se basa en hacer pasar una corriente ascendente o descendente de disolvente adecuado, por una tira de papel sobre la que se ha aplicado la muestra a analizar. Tiene la ventaja de su extrema--- simplicidad y la relativa sencillez de las instalaciones. Los resultados son poco precisos en análisis cuantitativos.

La cromatografía de gases se funda en la volatilización de la sustancia y adsorción posterior al estado gaseoso. Los resultados son muy precisos y prácticamente-- cuantitativos y la operación se realiza con rapidez, pero las instalaciones son costosas y no siempre accesibles.

La cromatografía en capa fina reúne las cualidades----- de todas las anteriores. Como la cromatografía en columna puede elegirse a voluntad la sustancia soporte que--- forma la fase estacionaria y combina la simplicidad de-- las instalaciones y facilidades del revelado de la cromatografía sobre papel, con la velocidad de operación cromatográfica de gases.

En la cromatografía en capa fina se realiza la separación de los componentes de una mezcla, por aplicación de una solución de la misma sobre una placa de cristal, posterior desarrollo mediante disolvente adecuado y reve

lado final por procedimientos diversos (visión directa, luz ultravioleta, reactivos generales y específicos, isótopos radioactivos, etc.).

En toda cromatografía se debe tener en cuenta:

Adsorbente: Es el material sólido que actúa como fase estacionaria (cromatografía de adsorción) o como soporte de la fase estacionaria líquida (cromatografía de partición).

Muestra: Es la sustancia que se va a analizar por cromatografía.

Disolvente: Es el líquido en que va disuelta la muestra para facilitar su aplicación. No interviene en la cromatografía.

Desarrollo: Es el paso de la fase móvil por el adsorbente. Si es un líquido se llama "líquido de desarrollo".

Revelado: Se refiere a la operación de hacer visibles los resultados del cromatograma desarrollado.

Eluente: Se usa sólo cuando la sustancia se separa completamente del adsorbente para su análisis cuantitativo.

R_f: Es la relación que existe entre la distancia recorrida por la muestra y la recorrida por el frente del-

líquido de desarrollo. Es decir:

$$R_f = \frac{d}{D}$$

Es constante y característico para cada sustancia-- en igualdad de condiciones de trabajo (tipo y espesor del adsorbente, líquido de desarrollo, temperatura ambiente, etc.).

Midiendo los R_f de una muestra compleja se puede saber la composición de la misma.

Factores que modifican el R_f : Naturaleza del adsorbente, espesor de la capa cromatográfica, actividad de la capa que viene determinada por la temperatura y el tiempo de secado antes del desarrollo, humedad del aire durante la aplicación de las muestras en las placas, grado de saturación de la cámara cromatográfica, cantidad de eluyente, cantidad de muestra, temperatura, técnica utilizada-- (ascendente o descendente).

R_x : Otra manera de definir la característica cromatográfica de una sustancia es utilizando el concepto de R_x .

El R_x de una sustancia es la relación entre su R_f y el de otra que se toma como referencia. (34)

El Rf a pesar de ser característico para cada sustan
cia se modifica cuando varían las condiciones del trabajo,
por eso para evitar errores se toma en lugar de Rf, Rz.

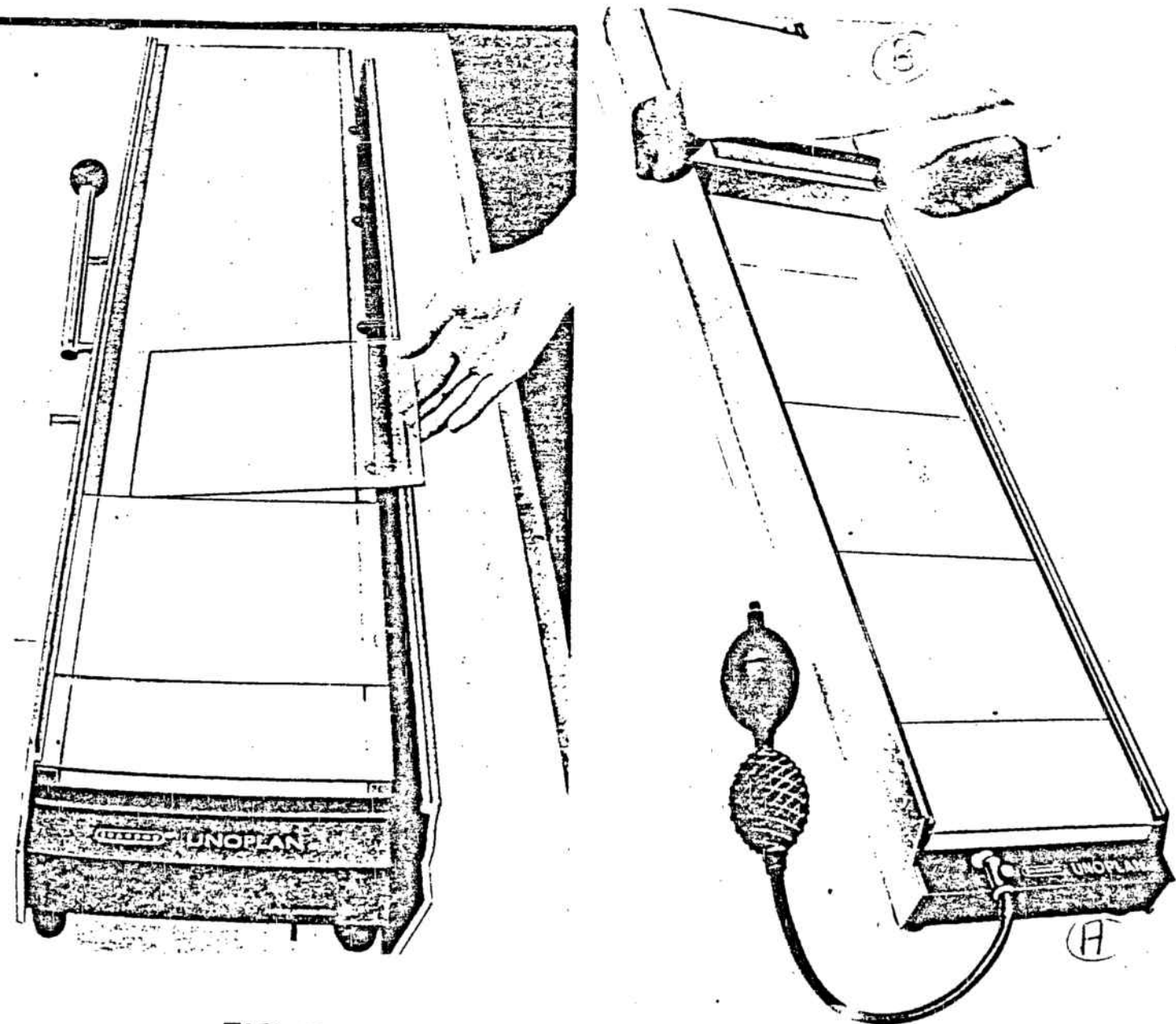


FIG-5

Instrumentación : Para la realización de cromatografía de capa fina puede necesitarse:

a.- Un soporte de material plástico para realizar la extensión de la sustancia que constituye la fase estacionaria o adsorbente.

b.- Una serie de placas de vidrio de espesor idéntico.

c.- Un extensor constituido de manera que permita obtener capas de espesor uniforme.

d.- Cámara de desarrollo provista de una tapa.

e.- Un soporte generalmente metálico para guardar las placas una vez realizada la extensión.

f.- Una serie de micropipetas graduadas.

g.- Un pulverizador o spray.

Preparación de la capa fina : Colocar la placa de aluminio de soporte en una superficie plana y disponer las placas de cristal, limpiadas con mezcla crómica, de forma que se ajusten estrechamente en un orden ascendente de grosor, de forma que las placas más finas queden en el extremo A y las más gruesas en el extremo B. (Fig.-5)

Probar la uniformidad de la superficie moviendo el--
espaciador vacío hasta el final de la placa base desde B-
hacia A, cuando este movimiento del espaciador se comple-
ta sin obstrucciones, entonces es que se ha obtenido una-
superficie suficientemente plana.

Preparar el adsorbente, y trabajar la mezcla hasta--
la desaparición total de las burbujas durante un tiempo--
máximo de dos minutos. Poner el espaciador en la última--
placa en el extremo B y llenarlo con pasta.

Para conseguir una capa uniforme del adsorbente, mo-
ver el espaciador a una velocidad igual sobre todo el lar-
go de la superficie de cristal en estrecho contacto. La--
dirección del movimiento del espaciador es de B hacia A.-
Invertir un tiempo aproximado de un minuto en hacer la ex-
tensión.

Esperar aproximadamente 5 minutos para que la capa--
se fije. Quitar las placas con cuidado (manipular siempre
las placas cogiéndolas por los bordes sin tocar la capa--
de adsorbente), secarlas y activarlas calentándolas en la
estufa a 110°C durante media hora. Transcurrido este-----
tiempo sacarlas de la estufa y guardarlas en el desecador
hasta el momento de su utilización.

Desarrollo : En una cámara cromatográfica, previa-- saturación con el líquido de desarrollo adecuado, colo-- car las placas verticalmente de modo que el extremo en-- el cual se ha aplicado la muestra quede en la parte infe-- rior. La muestra no debe quedar sumergida. Cerrar hermé-- ticamente la cubeta.

Dejar que el líquido de desarrollo vaya subiendo en el material adsorbente, hasta el extremo.

Sacar las placas, y secarlas con una corriente de-- aire caliente.

Si fuese necesario vendría a continuación el revela-- do.

Modernamente, no se preparan las placas, sino que se compran hechas con lo que se ha sustituido el vidrio por un soporte metálico, teniendo la ventaja de ser recorta-- ble.

4.2.1.-APLICACION AL ANALISIS DE VITAMINA D CON PRESEN- CIA DE PRODUCTOS DE DEGRADACION

La cromatografía en capa fina es un valioso aporte al análisis de la vitamina D, puesto que permite el aislamiento y recuperación cuantitativa de ella.

Janecke y Mars-Goebels, fueron los primeros investigadores sobre cromatografía en capa fina de vitamina D, utilizando silicagel como soporte y hexano, hexano-acetato de etilo (90/10) y cloroformo como eluyente. (35)

Pouchon y cols, realizaron un estudio cromatográfico sobre silicagel y alúmina de vitamina D y compuestos relacionados. (36)

Mermet-Bouvier, logra la separación sobre cromatografía en capa fina de alúmina de la vitamina D y de sus isómeros formados durante el proceso de irradiación ultravioleta. (37)

Por este método tanto en alúmina como en silicagel se separan perfectamente los productos de degradación de la vitamina y la vitamina propiamente dicha siendo por ello esta técnica la elegida para la realización de estu

dios de estabilidad , siempre que se tomen ciertas precauciones: - La presencia notable de vitamina A-alcohol puede interferir en el aislamiento de la vitamina D. En contrapartida los esteres de la vitamina A pueden separarse de la vitamina D por cromatografía en capa fina--- siempre que las proporciones se mantengan dentro de los límites normalmente utilizados en los preparados farmacéuticos. (38)

- Evitar intervalos prolongados de tiempo en los que la vitamina se encuentre en estado seco sobre la capa fina, ya que la superficie que ocupa en este estado es muy grande, quedando la molécula de la vitamina libremente expuesta a la acción del oxígeno del aire, luz y temperatura. En estas condiciones y en función del tiempo, la vitamina puede dar lugar a productos de degradación.- Por lo que es aconsejable guardar los cromatofolios ya desarrollados en el interior de la cámara sin contactar con el líquido del fondo. Para el análisis cuantitativo lo mejor es proceder rápidamente a la elución de las manchas por medio del disolvente adecuado.

Las técnicas más citadas en la bibliografía científica (39), (40), (41), (42), (43), (44), para la valoración de las sustancias tras la separación cromatográfica

en capa fina, son las técnicas de elución del spot, los métodos densitométricos, los de tipo radiométrico pueden conseguir una gran sensibilidad y exactitud, pero al exigir productos marcados tienen un campo de aplicación limitado.

En nuestro departamento se ha puesto a punto un método cuantitativo por medio de cromatografía en capa fina con posterior elución del spot que ha demostrado una gran eficacia .(45). Para obtener buenos resultados cuantitativos se debe trabajar en condiciones idénticas en todos los análisis de la serie y se construye una curva de calibración. Los dos principales problemas que posee estos métodos de elución son: -La operación de arrancar el polvo -- impregnado de sustancia de la placa sin que se produzcan pérdidas.

-La obtención de una solución límpida de partículas en suspensión para su posterior lectura en el espectrofotómetro ya que sino podría producir interferencias en la lectura.

Ambas dificultades han sido superadas al utilizar -- para la cromatografía cromatofolios Merck que ofrecen la ventaja que pueden ser recortados sin que el polvo tenga que desprenderse del soporte metálico. Una vez recortado -

se introduce en un pequeño volumen del disolvente adecuado, dejándose el tiempo necesario para que toda la sustancia que se encuentra en el cromatofolio difunda al disolvente y seguidamente se filtra por placa porosa al vacío, con lo que se evita la presencia de partículas en suspensión.

El único problema que puede surgir con este método sería que la extracción con el disolvente no fuera completa, evitándose haciendo un tanteo previo.

En el caso de las soluciones alcohólicas de vitamina D₃, hemos aprovechado los estudios realizados en nuestro departamento, que ha permitido la puesta a punto de un método para determinar cuantitativamente vitamina D₃ en presencia de sus productos de degradación (45), por lo que se ha seguido en nuestro trabajo y lo describimos a continuación con detalle.

Material utilizado

- 1.- Cromatofolios silicagel Merck F 254 (0,25 mm)
- 2.- Cromatofolios Alúmina Merck F 254 (0,25 mm)
- 3.- Cámaras cromatográficas Desaga.
- 4.- Pipetas Drumond Microcaps 10 μ l
- 5.- Vitamina D₃ Merck para fines bioquímicos
- 6.- Etanol absoluto Merck
- 7.- Tetracloruro de Carbono Merck
- 8.- Acetona Merck
- 9.- Lámpara Uvatón 254 y 360 nm
- 10.- Filtros de vidrio G₃ para vacío
- 11.- Espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 124

Método analítico

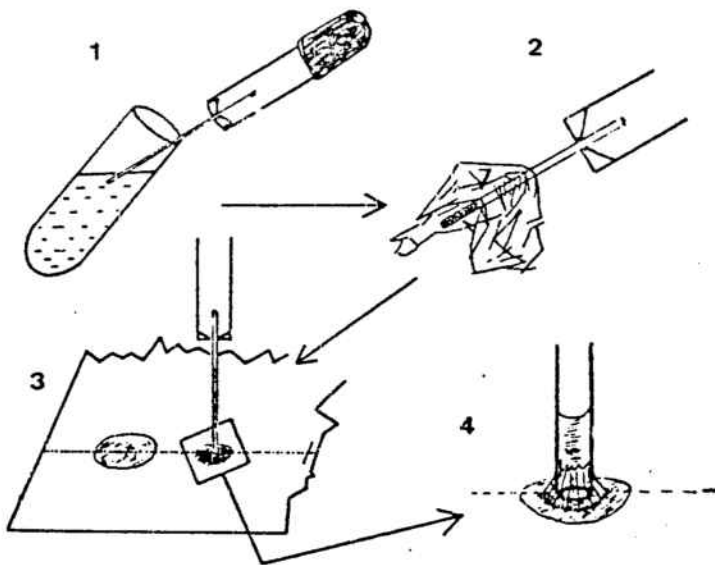
El método analítico pasa por las siguientes fases:

Siembra

Por medio de una pipeta Drumond microcap $10\mu\text{l}$, se depositan sobre el cromatofolio, a una altura de 1cm, varias muestras, procurando que la cantidad de vitamina depositada sea del orden de 100 a 200 microgramos. Se hacen varias siembras, convenientemente distanciadas, para obtener mayor exactitud al trabajar con valores medios.

El volumen vertido por las pipetas utilizadas es muy constante, pero su calibración ($10\mu\text{l}$) es tan solo aproximada, por lo que es muy conveniente trabajar con la misma pipeta a lo largo de un mismo trabajo, la cual si conviene puede ser calibrada adecuadamente.

Es necesario tener presentes ciertas normas para que los resultados sean reproducibles; cuando el microcap lo cargamos no podemos evitar que las paredes externas del mismo queden húmedas del mismo líquido problema y al sembrar sobre la placa puede arrastrar algo de este líquido-- además del volumen interior, modificando el resultado, para



Fases de la carga del microcap y posterior depósito de la muestra.

1. *Carga del microcap.*
2. *Secado de las paredes externas con celulosa absorbente.*
3. *Depósito de la muestra sobre la capa fina.*
4. *Formación de menisco exterior alrededor del microcap durante la deposición de la muestra.*

FIG 6

evitar esto se procede al lavado de la superficie externa antes de depositar el contenido sobre la placa, para ello tomamos una porción de papel absorbente humedecido con el disolvente y con mucho cuidado limpiamos la parte externa. Se debe controlar que la columna del líquido no haya descendido durante la operación. (fig. 6)

Desarrollo

Se utiliza una cámara cromatográfica Desaga u otro similar y con el líquido de desarrollo adecuado. Para cromatofolios de silicagel el utilizado es CCl_4 /Acetona: 50/5.

Para los cromatofolios de Alúmina, después de probar con varios líquidos de desarrollo se consiguió una buena separación entre la vitamina y sus productos de degradación con la proporción CCl_4 / Acetona: 55/2.

Se intentó buscar un líquido de desarrollo para poder utilizar placas de celulosa, habiéndose ensayado:

- Cl_4 C/Acetona: 25/25
- Cl_4 C/Acetona: 60/2
- Cl_4 C/Acetona: 50/5

- Cl₄ C/Acetona: 55/2
- Cl₄ C/Acetona: 55/20
- Benceno/metil etil cetona: 70/30
- Benceno/metil etil cetona: 50/50
- Cloroformo/metil etil cetona: 60/40
- Cloroformo/metil etil cetona: 60/50
- Cloroformo/Acetato de etilo: 80/20
- Cloroformo/Acetato de etilo: 50/50
- Cloroformo/Acetato de etilo: 60/40
- Cloroformo/Acetato de etilo: 90/10
- Acetato de etilo/Cloroformo: 70/30
- Cloroformo/Acetato de etilo: 80/20
- Cloroformo/ Etil metil cetona: 20/80
- Metanol: 100%
- Cloroformo/Metanol: 10/90

- Benceno/Etil metil cetona: 35/35

- Cloroformo/Etil metil cetona: 80/20

Al no conseguir separar con estos líquidos de desarrollo, la vitamina de sus productos de degradación, se abandona la idea de trabajar con placas de celulosa.

Secado

El secado es muy importante para eliminar los restos del líquido del desarrollo que suele ser bastante volátil, es conveniente secar durante cinco minutos con aire caliente.

Revelado

Se basa en la inhibición de fluorescencia mediante una lámpara UV ya que los cromatofolios utilizados presentan un fondo fluorescente de dos longitudes de onda 254 y 360 nm. Para este fin usamos una lámpara Uvatón.

Recortado

Se recortan una serie de cuadros equisuperficiales que contengan los spots y otros de la misma altura sin que

contengan spots para servir de blanco en espectrofotometría y se depositan las distintas porciones convenientemente numeradas en tubos de ensayo o centrífuga.

Elución

Se pueden emplear dos técnicas:

a.- Se introduce en cada uno de los tubos un volumen exactamente medido del disolvente y se cierran herméticamente, manteniéndolos en reposo a temperatura ambiente o en la nevera durante el tiempo necesario apto para que la elución sea completa (3 horas).

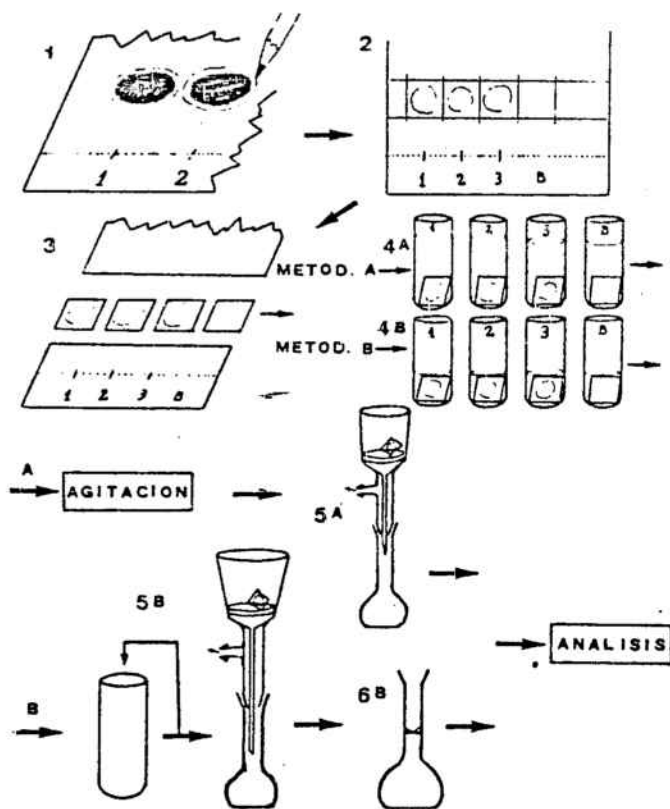
b.- Se introduce en cada tubo un volumen aproximado de 2-3 ml de disolvente, procurando que cubra bien los pequeños cuadros de silicagel, dejándose el tiempo necesario para que la elución sea completa (3 horas).

Filtración y lectura espectrofotométrica

La filtración se realiza mediante filtros de vidrio tipo G₃. Si en la elución se sigue la técnica a.-, se filtran las diversas disoluciones las cuales se observan directamente en el espectrofotómetro, la única precau---

ción a tener en cuenta es realizar una suave homogenización de las disoluciones antes de la filtración.

Si seguimos la técnica b.--, se deben filtrar los líquidos de manera análoga y proceder a la extracción de-- la placa con sucesivos lavados recogiendo todos los fil--trados en un matraz de 10 ml que se enrasa finalmente--- hasta el aforo antes de leer la absorbancia. Esta variante es interesante pues se realiza una verdadera extrac--ción sólido-líquido, pero se debe tener cuidado al transferir las primeras porciones líquidas, para evitar la--- pérdida de una o varias gotas que pueden ocasionar erro--res; en nuestro trabajo hemos utilizado esta segunda técnica (fig. 7).



1. — Señalar con lápiz el borde de los spots, visualizados por U.V., dejando un margen de seguridad. 2. — Marcar con lápiz áreas cuadradas o rectangulares equisuperficiales que engloben cada spot. 3. — Recortar cuidadosamente dichas áreas. 4.A. — Eluir con un volumen exacto (10 ml) de disolvente adecuado. 4.B. — Eluir con 2 ó 3 ml de disolvente. 5.A. — Filtrar. 5.B. — Filtrar y lavar repetidas veces con pequeños volúmenes de disolvente, los tubos y filtro. 6.B. — Enrase final.

FIG -7

5

**degradación de vitamina D₃
sobre soporte
de capa fina**

5.1.-OBJETO DEL ESTUDIO

=====

El objetivo de nuestros ensayos es la realización-- de un estudio experimental de la velocidad del proceso-- de degradación de la Vitamina D₃, cuando se encuentra de-- positada sobre un soporte de capa fina (silicagel o alu-- mina).

Para ello se determina la cantidad de vitamina no-- degradada que queda sobre la placa, siguiendo la técnica de cromatografía en capa fina cuantitativa ya expuesta-- en otra parte de este trabajo, con la salvedad de haber-- dejado transcurrir cierto tiempo entre el depósito de la vitamina sobre el soporte y el desarrollo de la cromato-- grafía. En la técnica analítica precisamente se recomien-- da que el desarrollo se realice inmediatamente después-- de la siembra, para evitar el proceso de degradación.

Como se pretende relacionar el proceso cinético de-- la degradación con las condiciones ambientales en que se encuentra la placa o cromatofolio, es necesario contro-- lar no sólo el tiempo transcurrido desde el momento de--

depositar la vitamina hasta el momento de iniciar el desa
rrollo cromatográfico, sino también las condiciones am---
bientales en que se encuentra la placa durante este inter
valo de tiempo.

Para destacar la influencia que determinados caractere
res ambientales pueden tener sobre el proceso de la degra
dación, se ha procurado realizar ensayos simultáneos en--
condiciones prácticamente iguales excepto en una caractere
rística diferencial que es precisamente la que es objeto-
de estudio.

5.2.- METODOS UTILIZADOS

Material empleado:

- 1.- Cromatofolios silicagel Merck F 254 (0,25 mm)
- 2.- Cromatofolios alúmina Merck F 254 (0,25 mm)
- 3.- Cámaras cromatográficas Desaga
- 4.- Pipetas Drumond Microcaps 10 μ l.
- 5.- Lámpara Uvatón 254 y 360 nm
- 6.- Espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 124
- 7.- Estufa de vacío Heraeus con termoregulación (\pm 1°C)
- 8.- Bomba calorimétrica capaz de resistir presión de
5Kg/cm²
- 9.- Conexiones herméticas para introducir oxígeno en la
bomba
- 10.- Depósito de oxígeno seco a presión con manoreductor
- 11.- Filtros de vidrio poroso G₃ para vacío
- 12.- Matraces aforados de 10ml.
- 13.- Vitamina D₃ Merck pura para fines bioquímicos
- 14.- Etanol absoluto Merck
- 15.- Tetracloruro de carbono Merck para análisis
- 16.- Acetona Merck para análisis

Especificaciones metodológicas

El método seguido por nosotros es bastante sencillo. Se parte de una disolución al 1% de Vitamina D₃ pura ---- Merck en etanol, que se siembra mediante pipetas Drumond-Microcaps, en la parte inferior de una serie de cromatofolios. La cantidad depositada normalmente en cada spot es de 20 μ l., debiéndose efectuar dos siembras consecutivas, con la precaución de no iniciar la segunda siembra antes de que el etanol depositado en la primera se haya evaporado (no más de 1 minuto). Sobre cada cromatofolio a estudiar se hacen tres siembras iguales de este tipo para obtener en cada determinación tres resultados analíticos in dependientes.

Los cromatofolios con la vitamina depositada sobreellos, se conservan en las condiciones ambientales requeridas, y a intervalos definidos de tiempo se separa uno de ellos para desarrollarlo y extraer de él los tres spots de vitamina inalterada según la técnica analítica ya mencionada.

Cada desarrollo cromatográfico da lugar a tres resultados normalmente coincidentes (las discrepancias son infe

riores al 2%), a partir de los cuales se promedia el valor puntual de la cantidad de vitamina inalterada en función del tiempo.

Dichos resultados se dan ya en valores de absorbancia, tal como se leen en el espectrofotómetro. No tendría ningún interés práctico hacer cálculos adicionales para expresar los resultados en cantidad de vitamina remanente, ya que por la ley de Lambert-Beer sabemos que dichos valores deben ser proporcionales y ambos nos sirven por un igual, para establecer valores comparativos. El valor de la absorbancia a tiempo cero nos da la medida de la cantidad de vitamina inicialmente depositada.

Es presumible, que los parámetros que gobiernan este proceso degradatorio de la vitamina depositada sobre un soporte sólido de gran superficie, tengan una gran complejidad y por ello no se debe esperar una reproductibilidad exacta de resultados cuando se repite el mismo proceso, aunque las condiciones controladas de tipo ambiental sean iguales, no obstante hemos podido comprobar, y ello tiene una gran importancia metodológica, que cuando los procesos se realizan simultáneamente, sobre placas distintas pero procedentes del mismo lote, y sometidas

a las mismas condiciones ambientales, se obtienen resultados altamente coincidentes.

Ejemplo: Cromatofolios silicagel en contacto con el aire y en la oscuridad a 55°C.

Tiempo (h)	0	2,75	14,15	18	19,75	73,75
Placa I	0,890	0,390	0,190	0,165	0,160	0,055
Placa II	0,890	0,380	0,185	0,160	0,150	0,040
Placa III	0,900	0,360	0,185	0,155	0,150	0,035

En cambio cuando se pretende reproducir uno de estos procesos en tiempo y circunstancias distintas, es frecuente obtener resultados de similitud mucho menos clara.

Ejemplo:

Placa I

Tiempo(h)	0	2,75	23,25	48,45	71,45
Absorbancia	0,895	0,791	0,460	0,181	0,063

Tiempo(h)	94,70	120,7
Absorbancia	0,043	0,033

Placa II

Tiempo(h)	0	2	13	19,75	51,25
Absorbancia	0,905	0,590	0,368	0,280	0,180
Tiempo(h)	77,25	100,25			
Absorbancia	0,150	0,130			
Cromatofolios de silicagel en contacto con el aire y en la oscuridad a 35°C.					
Obsérvese que en la placa II a las 13h. se ha producido una degradación manifiestamente superior a la de la placa I a las 23,25h..					

Por ello consideramos imprescindible, para poder sacar conclusiones válidas sobre el efecto de un factor--- ambiental determinado, realizar procesos simultáneos -- que sólo difieren en el factor en estudio.

Para poner de manifiesto los efectos de la luz difusa, sobre la degradación, hemos situado las placas bajo una lámpara fluorescente de 40 Wats. a 1 m de distancia y comparando los resultados con otros obtenidos simultáneamente manteniendo las placas al abrigo de la luz.

Los efectos de la temperatura se han estudiado utilizando la estufa de vacío Heraeus, termoregulada con una precisión de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ y la nevera, con la que se ha conseguido temperaturas de $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Los efectos de las distintas presiones de oxígeno se han podido estudiar, introduciendo cortes de cromatofolio en el interior de la bomba calorimétrica, e inyectando posteriormente oxígeno a presión. La bomba herméticamente cerrada se introducía en el interior de la estufa termoregulada y se comparaba la degradación en dichos cromatofolios con la que tenía lugar simultáneamente en otras placas situadas en dicha estufa pero fuera de la bomba calorimétrica en contacto con el aire y a la misma temperatura.

5.3.-REPRESENTACION Y ESPECIFICACION DE LOS RESULTADOS

=====

Una vez realizados los desarrollos cromatográficos y los análisis de la cantidad de vitamina inalterada a distintos tiempos, disponemos de una serie de valores puntuales de la curva $A(t)$ que expresa la disminución de los valores de absorbancia obtenidos en función del tiempo.

Lo primero que cabe hacer es representar dichos puntos en un diagrama cartesiano en el que se expresan los valores de las absorbancias frente al tiempo. Uniendo dichos puntos se tiene una idea aproximada del trazado de la curva de degradación.

Existen razones teóricas que predisponen a esperar que el proceso de degradación en estas condiciones siga una cinética de primer orden. En efecto si se supone que las moléculas de vitamina se encuentran uniformemente esparcidas y adsorbidas sobre la superficie del soporte, se puede considerar que la probabilidad de alteración química, afecta por un igual a todas ellas; y en estas condiciones, al igual que en una muestra radioactiva en trans

formación, se debe producir un proceso cinético de primer orden. Por otra parte no tendría demasiado sentido teórico un proceso cinético de orden superior, ya que la inmovilidad propia de las partículas al estado sólido no permitiría una interpretación lógica del fenómeno.

Por todo ello, nosotros hemos considerado en todos los casos el ajuste de los valores de las absorbancias obtenidas experimentalmente, al comportamiento matemático propio de un proceso cinético de primer orden, regido por la ecuación:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt}$$

en la que A_0 representa la absorbancia a tiempo cero y K es el valor de la velocidad específica de la reacción.

La ecuación anterior puede expresarse en forma logarítmica:

$$-\ln A = -\ln A_0 + Kt$$

de la que se obtiene al considerar sus incrementos:

$$- \frac{\Delta \ln A}{\Delta t} = K$$

Si se cumpliesen las previsiones de una cinética de primer orden los valores de K obtenidos en los intervalos de tiempo entre cada dos determinaciones consecutivas, deberían ser prácticamente iguales, dentro de los límites del error experimental, pero excepto en algunos casos -- aislados esto no es lo que ocurre, obteniéndose valores de K que decrecen considerablemente desde los primeros intervalos estudiados hasta los últimos, no pudiendo en ningún modo admitirse una explicación basada en los errores de experimentación.

Debe por consiguiente concluirse que no es cierto-- que la vitamina se disponga en forma homogénea sobre el soporte, sino que más bien unas partes de ella, precisamente por su especial situación sobre el mismo, tienen-- mayor predisposición a alterarse que otras.

Al margen de cualquier posible interpretación teórica de los hechos, hemos ensayado con bastante éxito, de reconducir los datos experimentales a la superposición-- de varias cinéticas de primer orden que afecten a distintas porciones de la cantidad total de vitamina inicial--

mente depositada. La ecuación teórica a que se llega por este camino es del tipo:

$$A = A_{01} \cdot e^{-K_1 t} + A_{02} \cdot e^{-K_2 t} + A_{03} \cdot e^{-K_3 t} + \dots$$

en la que la observancia inicial valdría

$$A_0 = A_{01} + A_{02} + A_{03} + \dots$$

En la mayor parte de los casos ha sido suficiente-- considerar los dos primeros términos de la serie, para-- obtener valores teóricos que se aproximan mucho a los va-- lores experimentales. Sólo en un caso ha sido necesario-- recurrir a tres de dichos términos para obtener valores-- suficientemente próximos a los experimentales.

Cuando es aceptable la aproximación que incluye tan sólo dos sumandos, puede considerarse formalmente que la vitamina depositada sobre la placa se divide en dos porciones: una que se degrada rápidamente y otra que se degrada más lentamente. Llamamos en estos casos parte "activada" y K_a a su velocidad específica de degradación y-- parte "no activada" a la segunda, siendo K_{na} su veloci--

dad específica correspondiente. Si llamamos C a la fracción del total de vitamina depositada que está en forma "activada", el conjunto de los parámetros C, K_a , K_{na} , y la absorbancia inicial A_0 , son suficientes para expresar un modelo de degradación teórico que se aproxima mucho a los datos obtenidos por experimentación.

Ayuda a obtener estos resultados el hecho de que en las fases finales del proceso de degradación, la parte "activada" está ya prácticamente destruida, apareciendo el proceso de degradación de la parte "no activada" prácticamente sólo. Ello facilita la determinación del valor de K_{na} por aplicación del método de los mínimos cuadrados, y una vez conocido su valor, permite por extrapolación de la ecuación a tiempo cero, determinar la absorbancia inicial que se puede atribuir a la parte de vitamina "no activada" A_{0na} .

Las absorbancias correspondientes a la parte "activada" se obtienen por diferencia, siendo en general relativamente fácil aproximar dichos valores a un proceso cinético de primer orden con velocidad específica K_a .

La ecuación teórica del proceso sería:

$$A = A_{0na} \cdot e^{-K_{na}t} + A_{0a} \cdot e^{-K_a t}$$

En los casos que esta aproximación teórica resulte irrealizable (un caso entre los estudiados), se puede ensayar el mismo procedimiento, pero admitiendo que la vitamina inicialmente depositada se divide en tres porciones en vez de dos, cada una de las cuales sigue una cinética de primer orden independiente. La cinética experimental sería en estos casos la superposición de tres cinéticas de primer orden.

Vamos a exponer con detalle en un caso concreto, - el tratamiento matemático de los datos, tal como lo hemos venido exponiendo, a fin de que sirva de modelo que facilite la comprensión de todos los demás casos.

t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,80 Ka=0,098 Kna=0,0061
0	0,890	0,116				0,890
17,0	0,290	1,237	1,121	17,0	0,065	0,291
24,0	0,190	1,660	0,423	7,0	0,060	0,218
46,0	0,140	1,966	0,306	22,0	0,013	0,138
91,0	0,095	2,353	0,387	45,0	0,008	0,099
163,5	0,060	2,813	0,460	72,5	0,006	0,064
214,5	0,050	2,995	0,182	51,0	0,003	0,047

Los valores de las absorbancias a los tiempos 46h., 94,163,5.h., 214,5h., nos han servido para realizar la aproximación a un proceso cinético de primer orden, buscando la optimización de los parámetros de la recta de regresión:

$$-\ln A = -\ln A_{\text{ona}} + K_{\text{na}} t$$

obteniendo con ello el valor de K_{na} y por extrapolación a tiempo cero el valor de A_{ona} .

Los valores numéricos obtenidos son:

$$K_{\text{na}} = 6,1 \times 10^{-3}$$

$$A_{\text{ona}} = 0,174$$

con un coeficiente de correlación para la regresión de 0,99.

La ecuación del proceso de degradación de la parte "no activada" es:

$$A_{\text{na}} = A_{\text{ona}} \cdot e^{-6,1 \times 10^{-3} t}$$

y de ella se puede deducir las absorbancias correspondien

tes a la parte "no activada" que debe corresponder a cada tiempo. Por diferencia podemos conocer, a su vez, las partes de la absorbancia experimental que deben corresponder a la parte "activada"

t(h)	A-teorica	Diferencias
0	0,174	0,716
17	0,156	0,134
24	0,150	0,040
46	0,131	0,009
91	0,099	
163,5	0,064	
214,5	0,047	

El análisis de los valores numéricos de las absorbancias de la parte activada, permiten en la mayoría de los casos, definir un proceso cinético de primer orden que reproduzca en forma muy aproximada, dichos valores numéricos. Para ello construimos los cocientes $-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$ para los distintos intervalos, aceptando como buena en este caso la velocidad específica que se obtiene en el primer in--

tervalo ,al no verse desmentida,por valores muy distintos,del orden de más de dos veces su valor,en los intervalos posteriores.Cuando las absorbancias de la parte "activada" obtenidas por diferencia son inferiores a 0,050 sirven muy poco para definir este valor,ya que el error experimental pesa demasiado en los valores numéricos obtenidos.Cuando las absorbancias obtenidas por diferencia son superiores a 0,050 y los cocientes $-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$ correspondientes a los distintos intervalos no son muy discrepantes,puede mejorarse la aproximación realizando una regresión lineal de los datos obtenidos.

t(h)	A por defecto	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$
0	0,716	0,334		
17	0,134	2,009	1,679	0,098
24	0,040	3,218	1,259	0,172
46	0,009	4,710	1,492	0,067

Queda por consiguiente la ecuación que proponemos como aproximación teórica:

$$A = 0,716 \cdot e^{-9,8 \cdot 10^{-2} t} + 0,174 \cdot e^{-6,1 \cdot 10^{-3} t}$$

Siendo el valor de C o cociente entre la parte activada y la total

$$C = \frac{A_c}{A_0} = 0,30$$

En cada estudio de degradación se dan los valores de

$$\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$$

por considerar que tienen mucha mayor objetividad que los valores de K_a , K_{na} y C . Estos parametros y la ecuación que definen deben considerarse como el resultado de un esfuerzo simplificador tendente a poder tipificar el proceso de degradación, pero nunca pueden desplazar el valor de las velocidades específicas aparentes en cada intervalo, representadas por dichos cocientes.

También es conveniente considerar que la significación de dichas velocidades específicas aparentes es mucho más objetivo, cuando se ha obtenido a partir de valores grandes de las absorbancias que cuando se basa en valores muy pequeños de las mismas, ya que en este caso el error relativo de tipo experimental es mucho mayor.

El error relativo del cociente, $\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$, viene dado por la suma de los errores relativos del numerador y del

denominador, y si se supone despreciable el error debido a la medida del tiempo, depende tan sólo del error con-- que se conozca el $\Delta \ln A$.

Si admitimos que las absorbancias tienen un margen- de error absoluto de $\pm dA$, ello repercute en un error en el valor de $\ln A$ dado por

$$\pm d \ln A = \pm dA/A$$

y en un error en $\Delta \ln A$ dado por

$$\pm d \Delta \ln A = \pm dA \left(\frac{1}{A_2} - \frac{1}{A_1} \right) = \pm dA \left(\frac{A_1 - A_2}{A_1 A_2} \right)$$

de manera que el error relativo de $\Delta \ln A$ valdrá:

$$\frac{\pm d \Delta \ln A}{\Delta \ln A} = \pm dA \frac{A_1 - A_2}{A_1 A_2 \ln \frac{A_2}{A_1}}$$

El factor $\frac{A_1 - A_2}{A_1 A_2 \ln \frac{A_2}{A_1}}$ permite comparar los erro-

res relativos de las velocidades específicas aparentes, - obtenidas en dos intervalos distintos, suponiendo que en todas las determinaciones se da el mismo error absoluto-

en la medida de las absorbancias.

Así por ejemplo, en la degradación antes considerada, la velocidad específica aparente entre 0 y 17 horas vale $0,067 \text{ h}^{-1}$ y entre 163,5 y 215,5 horas vale $0,003 \text{ h}^{-1}$.

El factor de comparación antes mencionado vale en cada caso:

$$1^{\text{er}} \text{ caso } \frac{0,6}{0,258 \cdot 1,121} = 2,08$$

$$2^{\text{er}} \text{ caso } \frac{0,010}{0,182 \cdot 0,003} = 15,62$$

siendo su relación 7,50 lo que quiere decir que el error relativo en las últimas fases de la degradación es 7,5 veces mayor que en la fase inicial.

Si se tiene en cuenta que los errores absolutos de las absorbancias aumentan cuando estas disminuyen por debajo de 0,2, se comprende que las estimaciones de las velocidades específicas aparentes en las últimas fases de la degradación, están sujetas a un margen de error mucho mayor, y por ello es indispensable efectuar una regresión a partir de varios datos para estimar el valor de la velocidad específica de la parte considerada como "no activada". Las discrepancias no muy grandes que aparezcan en los distintos intervalos de la fase final de la degradación, no, tienen en realidad apenas significación.

5.4.-CASOS ESTUDIADOS

=====

5.4.1.-INFLUENCIA DE LA LUZ

Ensayos efectuados:

Ensayo 1: - Placa de silicagel

- Temperatura: 22°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)

- Oscuridad

- Contacto con el aire

Ensayo 2: - Placa de silicagel

- Temperatura: 22°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)

- Luz difusa

- Contacto con el aire

Ensayo 3: - Placa de silicagel

- Temperatura: 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)

- Luz difusa

- Contacto con el aire

Ensayo 4: - Placa de silicagel
- Temperatura: 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 5: - Placa de silicagel
- Temperatura ambiente
- Luz difusa
- Contacto con el aire

Ensayo 6: - Placa de silicagel
- Temperatura: 60°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Luz difusa
- Contacto con el aire

Ensayo 7: - Placa de silicagel
- Temperatura: 60°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Hemos realizado ensayos de degradación simultáneos en paralelo de placas iluminadas con luz fluorescente y

placas mantenidas al abrigo de la luz a las temperaturas de 22°C, 30°C, 60°C habiendo obtenido los resultados que se reflejan en las tablas correspondientes.

De cada uno de estos ensayos se hace una representación gráfica en la que se ve de forma más intuitiva el trazado de la curva de degradación y el trazado de los procesos teóricos de orden uno, cuya superposición reproducen aproximadamente la degradación.

En el ensayo 5 realizado dejando la placa bajo la acción de la luz fluorescente, se ha obtenido una degradación que puede considerarse de primer orden, es decir, que puede expresarse aproximadamente utilizando un sólo término de la serie en la ecuación teórica general considerada; pero este resultado no lo hemos podido reproducir posteriormente.

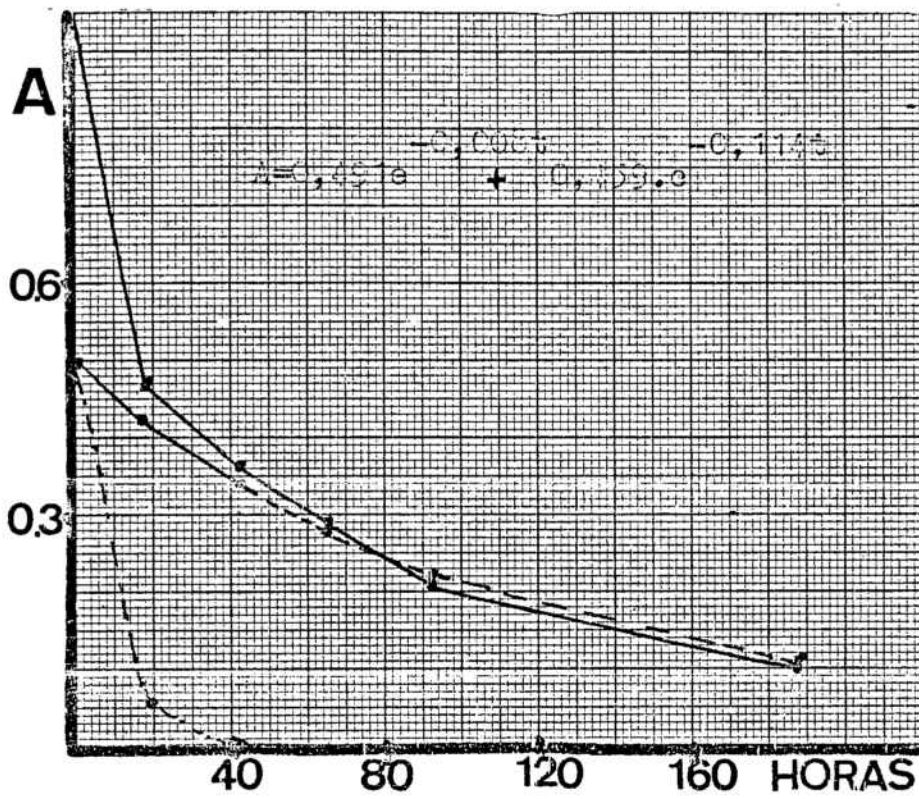
En general consideramos que a través de estos ensayos queda demostrado que la iluminación por luz fluorescente acelera grandemente el proceso de degradación cuando las placas se encuentran a temperatura ambiente (25-30°C), pero su influencia deja de apreciarse a 60°C.

t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$\frac{-\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,48 K _a =0,114 K _{na} =0,008
0	0,950	0,051				0,950
18,48	0,475	0,742	0,691	18,48	0,037	0,475
42,48	0,363	1,013	0,271	24,00	0,011	0,347
65,52	0,290	1,237	0,224	23,04	0,009	0,284
91,20	0,211	1,555	0,318	25,68	0,012	0,229
137,40	0,105	2,253	0,698	96,20	0,007	0,102

Tabla correspondiente al ensayo : 1

t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,52 Ka=0,259 Kns=0,045
0	0,350	0,054				0,347
19,20	0,182	1,703	1,652	19,20	0,086	0,188
43,44	0,068	2,688	0,985	24,24	0,040	0,063
67,20	0,021		1,175	23,76	0,049	0,021

Tabla correspondiente al ensayo : 2



Ensayo : 1

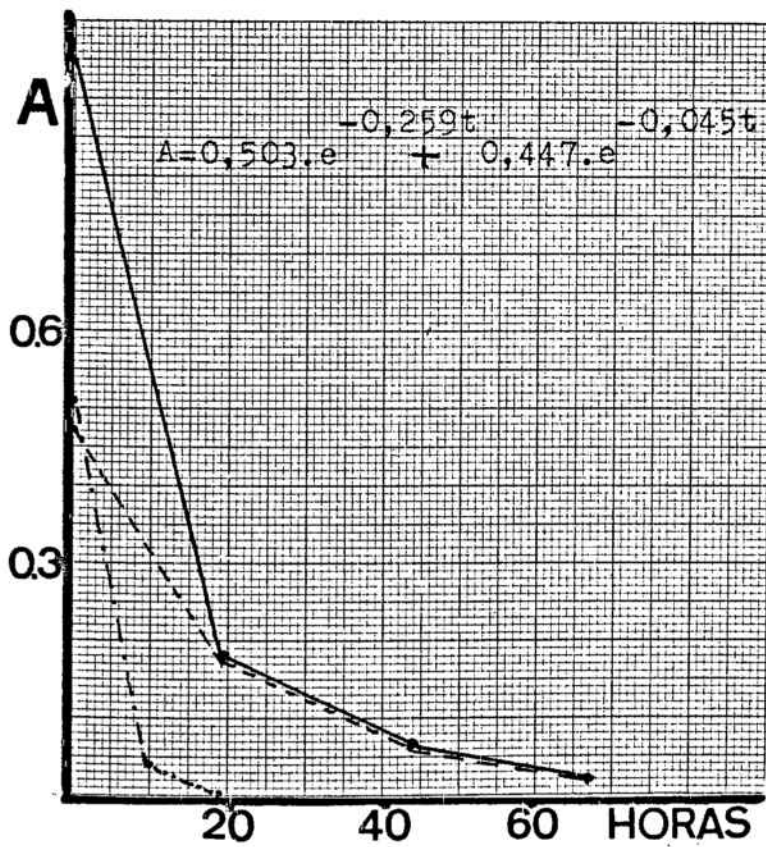
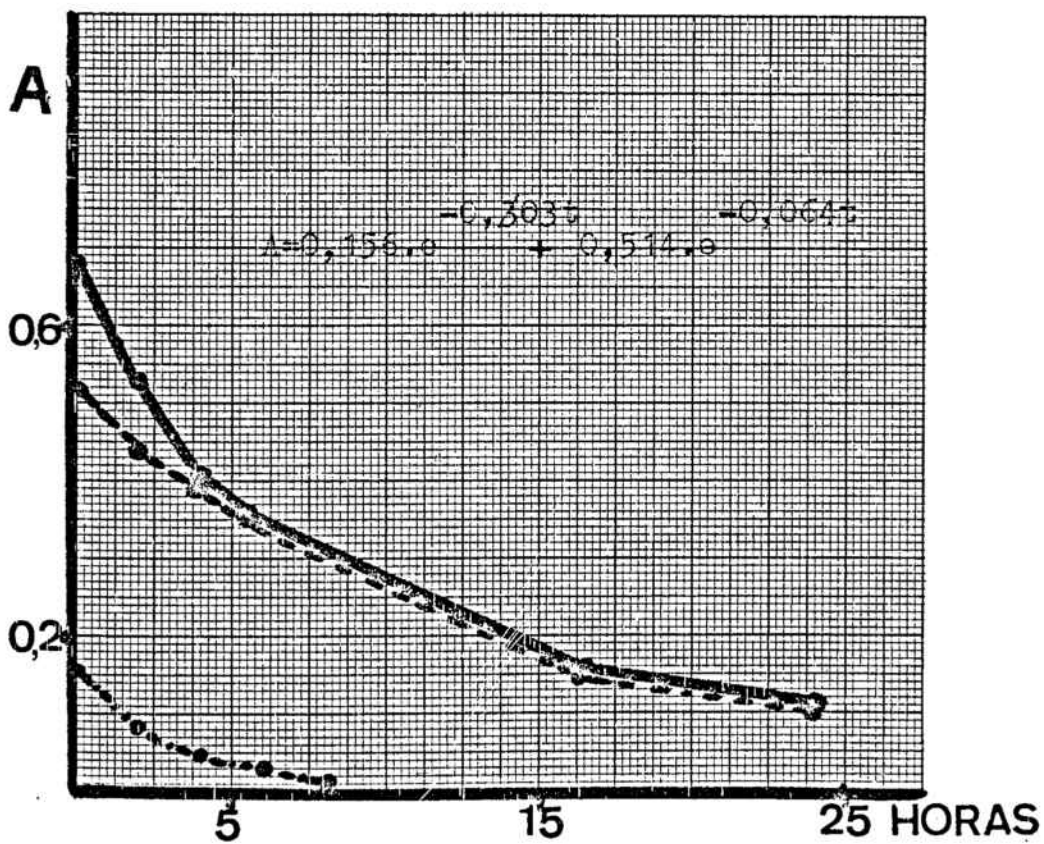


Gráfico correspondiente al
ensayo: 2

t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica $K_a=0,232$ $K_a=0,303$ $K_{na}=0,064$
0	0,670	0,400				0,670
2,16	0,528	0,638	0,238	2,16	0,110	0,528
4,60	0,407	0,898	0,260	1,84	0,141	0,443
5,66	0,366	1,005	0,107	1,66	0,064	0,357
16,66	0,158	1,845	0,840	11,00	0,076	0,176
24,08	0,118	2,137	0,292	7,42	0,045	0,110

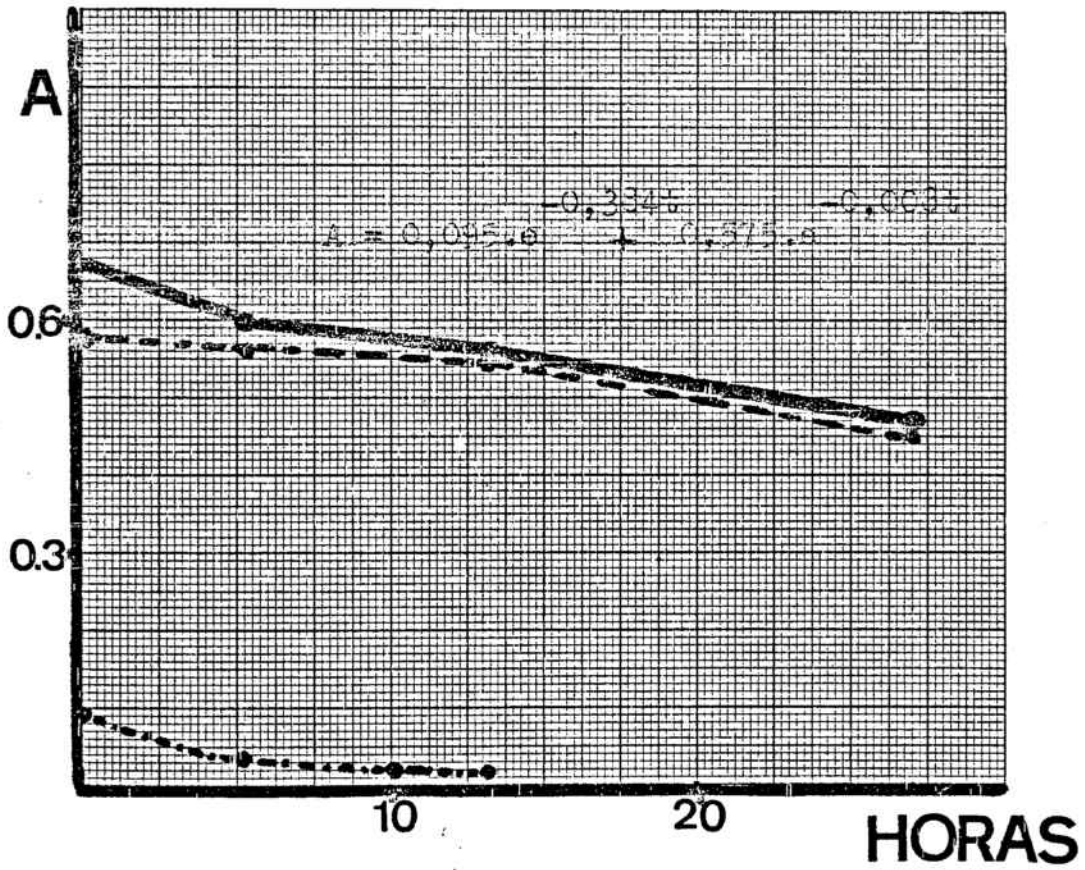
Tabla correspondiente al ensayo : 3

ENSAYO : 3



t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,140 Ka=0,384 Kna=0,008
0	0,670	0,400				0,670
2,75	0,595	0,519	0,119	2,75	0,043	0,595
4,28	0,560	0,579	0,060	1,53	0,023	0,572
27,00	0,465	0,765	0,186	22,72	0,008	0,463

Tabla correspondiente al ensayo : 4

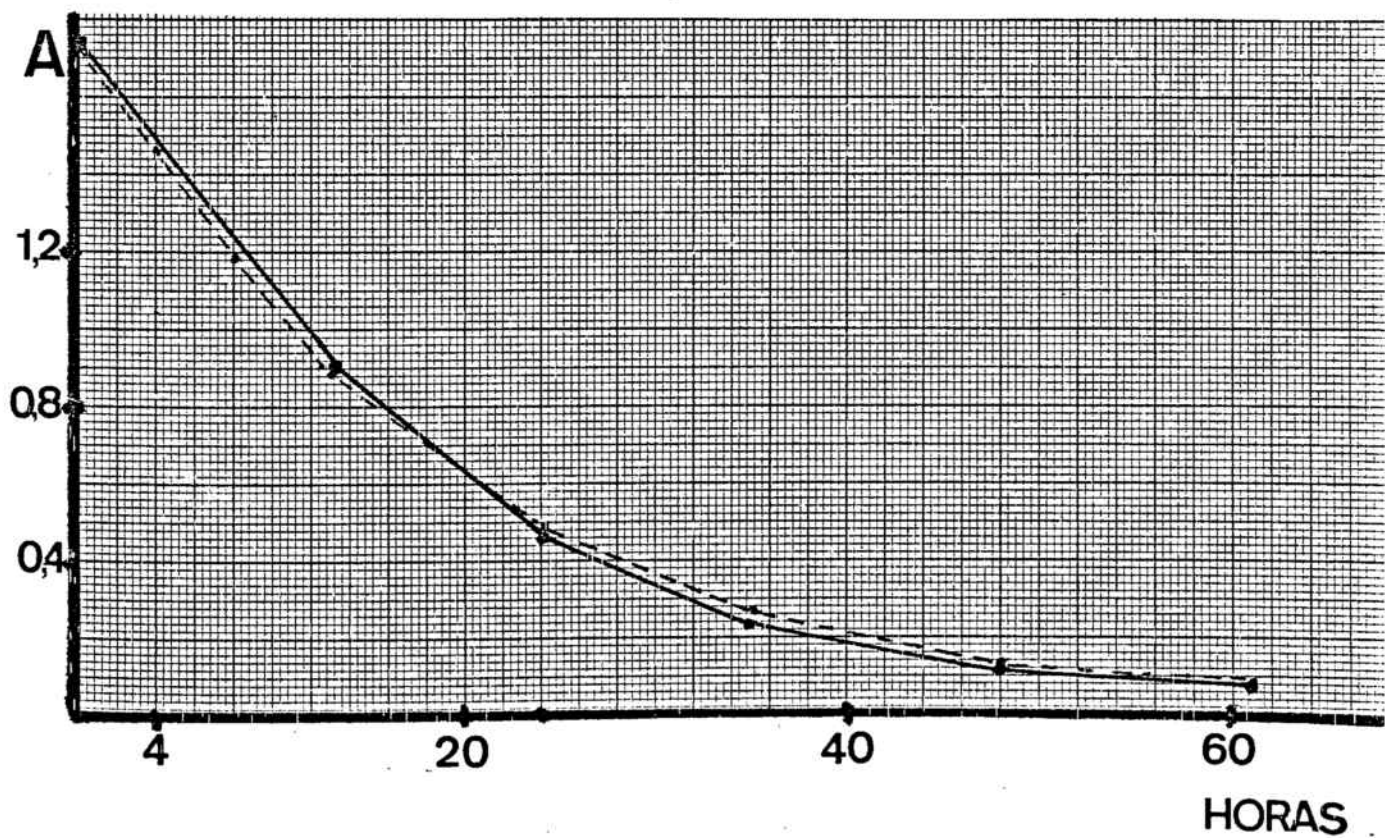


ENSAYO : 4

t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica K=0,053
0	1,800	-0,587				1,800
13	0,910	0,094	0,681	13	0,052	0,895
24	0,462	0,772	0,678	11	0,061	0,497
35	0,230	1,469	0,697	11	0,063	0,275
48	0,120	2,120	0,651	13	0,050	0,137
61	0,075	2,590	0,470	13	0,036	0,069

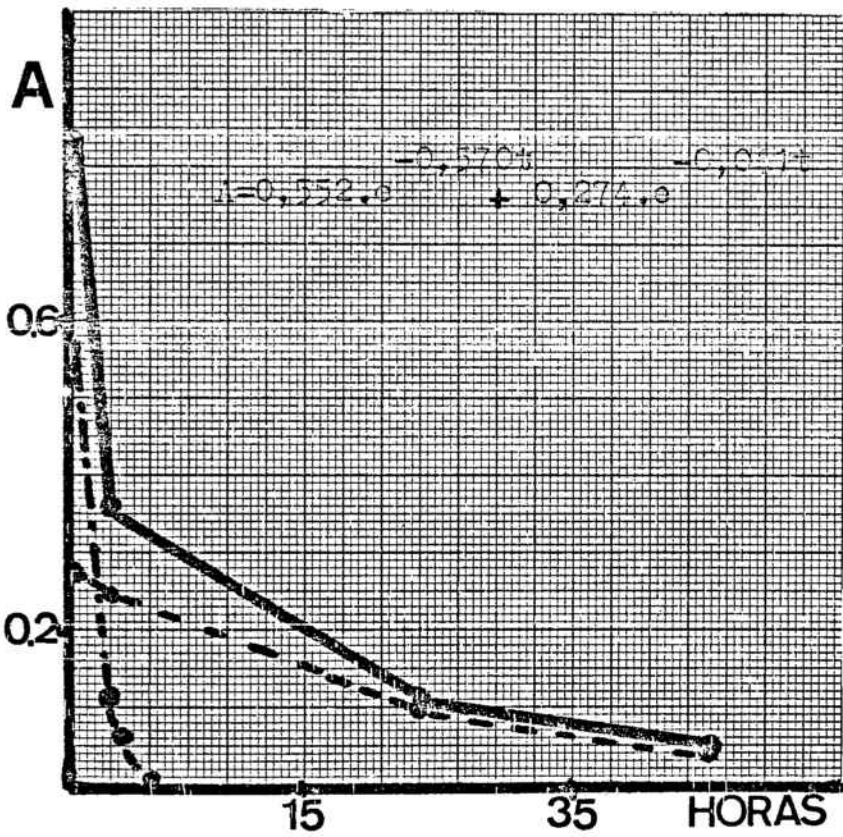
Tabla correspondiente al ensayo : 5

Gráfica correspondiente al ensayo : 5



t (h)	A	-ln A	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,66 Ka=0,570 Kne=0,041
0	0,836	0,1791				0,836
			0,8397	2,75	0,305	
2,75	0,361	1,0188				0,361
			1,1884	19,75	0,059	
22,55	0,110	2,2072				0,108
			0,7885	19,00	0,041	
41,50	0,050	2,9957				0,049

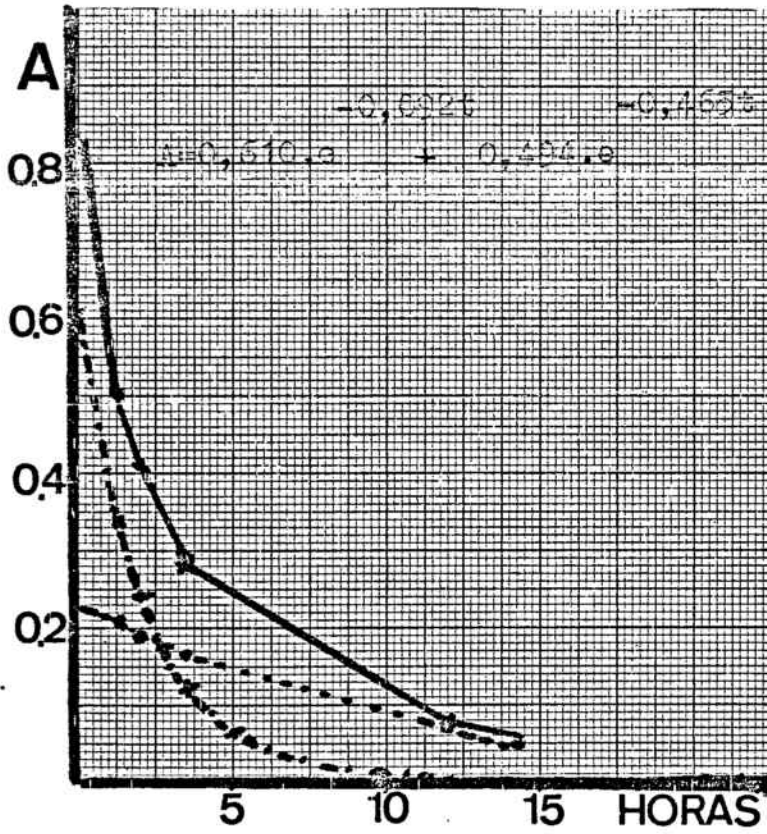
Tabla correspondiente al ensayo : 6



ENSAYO : 6

t (h)	A	$\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$\frac{-\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica $C_a=0,72$ $K_a=0,465$ $K_{na}=0,092$
0	0,836	0,1791				0,836
1,25	0,500	0,6931	0,5140	1,25	0,4112	0,541
2,00	0,415	0,8794	0,1863	0,75	0,2448	0,428
3,50	0,280	1,2729	0,3935	1,50	0,2623	0,282
12,00	0,075	2,590	1,3171	8,50	0,1549	0,075
14,42	0,060	2,813	0,2230	2,42	0,0920	0,059

Tabla correspondiente al ensayo: 7



ENSAYO : 7

5.4.2.-INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Ensayos efectuados:

Ensayo 1: - Placa de silicagel
- Temperatura: 22°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 4: - Placa de silicagel
- Temperatura: 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 7: - Placa de silicagel
- Temperatura: 60°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 8: - Placa de silicagel
- Temperatura: 5°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 9: - Placa de silicagel
- Temperatura: 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo10: - Placa de silicagel
- Temperatura: 22°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo11: - Placa de silicagel
- Temperatura: 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo12: - Placa de silicagel
" 14 - Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
" 15 - Oscuridad
" 16 - Contacto con el aire

Ensayo 17: - Placa de silicagel

" 19 - Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)

" 20 - Oscuridad

- Contacto con el aire

Se han efectuado ensayos de degradación en placas de silicagel a distintas temperaturas: 5°C, 22°C, 25°C, 30°C, 35°C, 55°C y 60°C.

Los ensayos 8 y 9 han sido efectuados simultáneamente.

Apreciándose que la mayor temperatura afecta a las velocidades tanto de la parte activada como de la no activada, pero sobre todo el valor del coeficiente de activación C.

En el ensayo 11, efectuado a 25°C ha sido posible --- aproximar la degradación a un proceso de primer orden, sin que ello pueda generalizarse y debiéndose notar que la degradación se ha interrumpido a los 4,22 días, no habiéndose llegado a las últimas fases del proceso, habiendo la sospecha que no se hubiese podido mantener esta aproximación si se hubiese llegado al final.

En general puede destacarse la influencia de la tem-

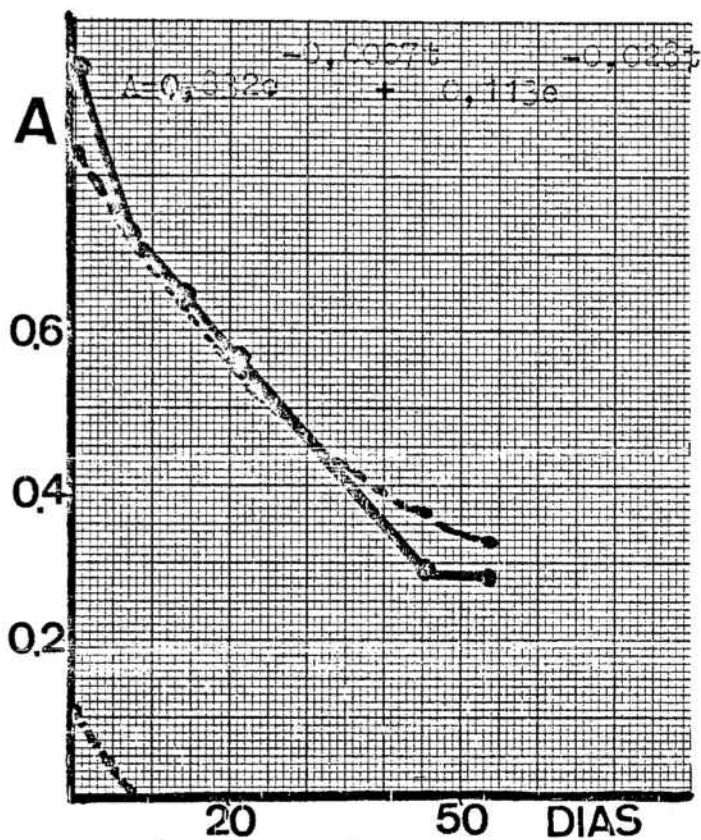
peratura sobre las velocidades específicas y sobre el coe
ficiente de activación y reiterar el hecho de que ensayos
no simultáneos efectuados en condiciones análogas presen-
tan notables diferencias aunque mantienen cierta analogía.

t(dias)	A	-lnA	- $\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,12 K _a =0,028 K _{na} =0,0007
0	0,945	0,056				0,945
7	0,730	0,314	0,258	7	0,036	0,723
14	0,648	0,433	0,119	7	0,017	0,646
21	0,565	0,570	0,137	7	0,019	0,570
45	0,285	1,255	0,685	24	0,028	0,370
53	0,280	1,272	0,017	8	0,002	0,320

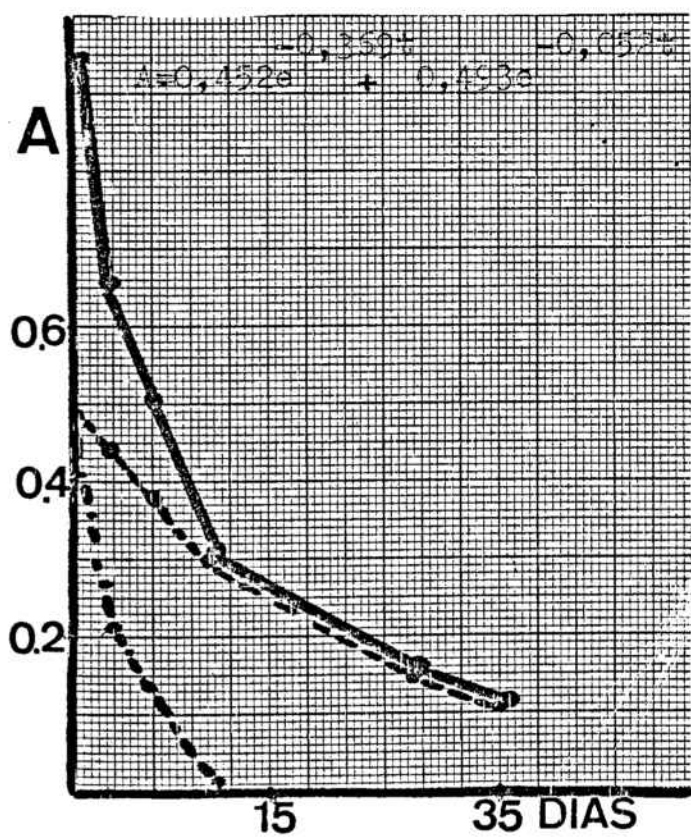
Tabla correspondiente al ensayo : 8

t(días)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,478 K _a =0,015 K _{na} =0,002
0	0,945	0,056	0,359	2	0,179	0,945
2	0,660	0,415	0,262	3	0,087	0,660
5	0,508	0,677	0,494	4	0,123	0,450
9	0,310	1,171	0,725	13	0,055	0,328
22	0,160	1,897	0,265	6	0,044	0,164
28	0,115	2,162				0,121

Tabla correspondiente al ensayo : 9



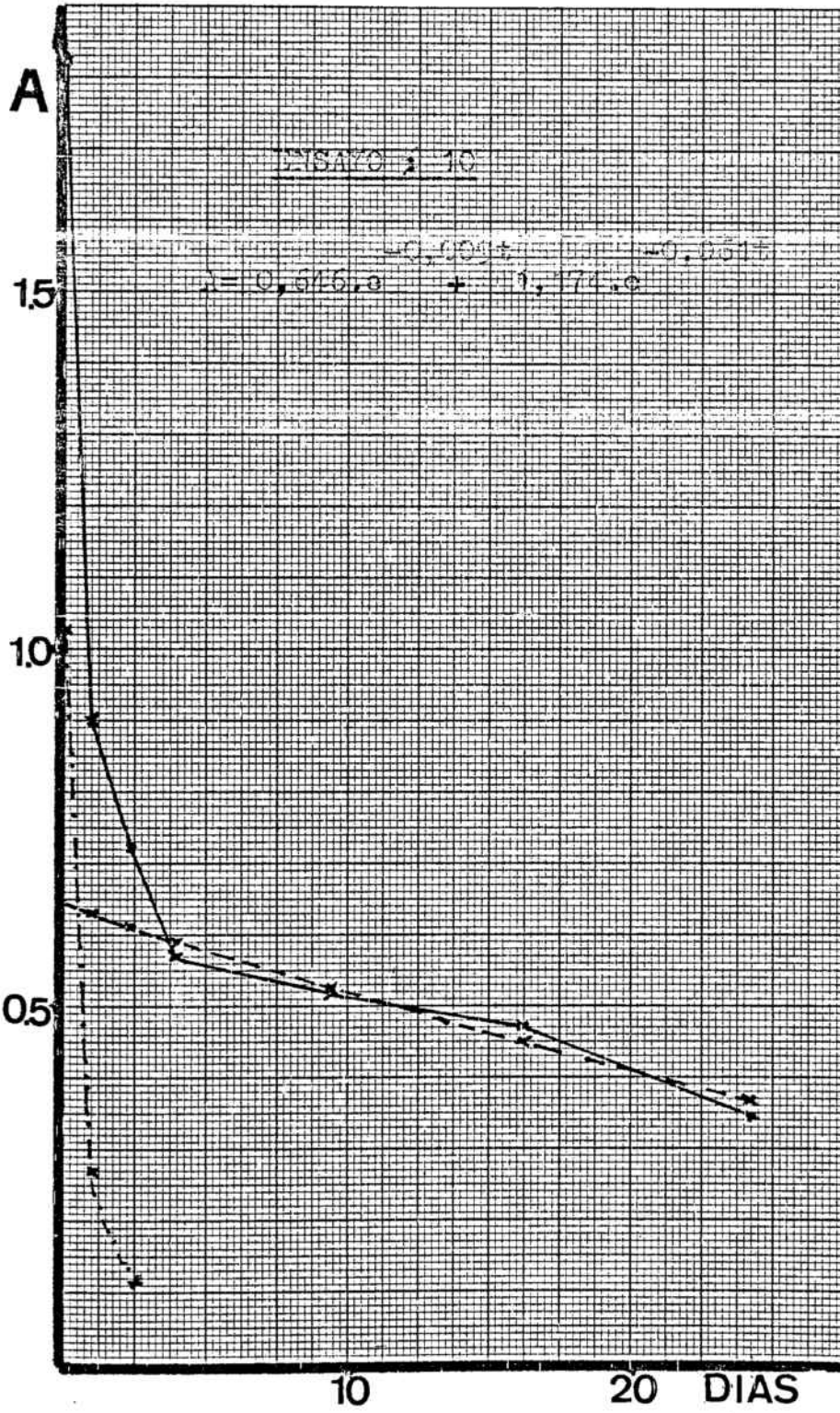
ENSAYO : 8



ENSAYO : 9

t(días)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$\frac{-\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,64 Ka=0,061 Kna=0,009
0	1,820	0,598				1,820
1,00	0,900	0,105	0,741	1,00	0,704	0,900
2,27	0,725	0,321	0,216	1,27	0,170	0,725
3,92	0,565	0,570	0,249	1,65	0,151	0,590
9,41	0,525	0,644	0,073	5,49	0,013	0,520
16,25	0,470	0,755	0,110	6,84	0,016	0,444
24,25	0,345	1,064	0,309	8,00	0,038	0,369

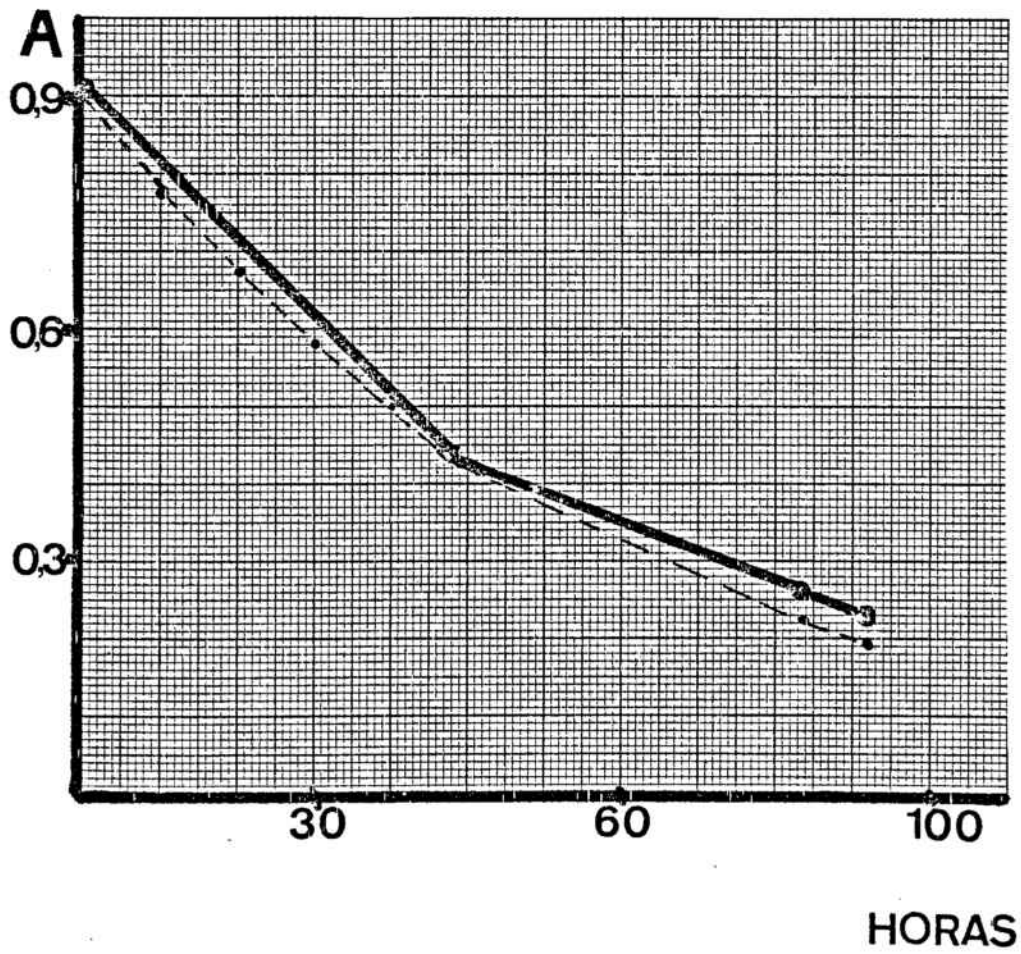
Tabla correspondiente al ensayo : 10



t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$\frac{-\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica K=0,015
0	0,910	0,0943				0,910
48,00	0,440	0,8209	0,7266	48,00	0,015	0,443
93;36	0,262	1,3394	0,5185	45,36	0,011	0,224
101,28	0,230	1,4696	0,1302	7,92	0,016	0,199

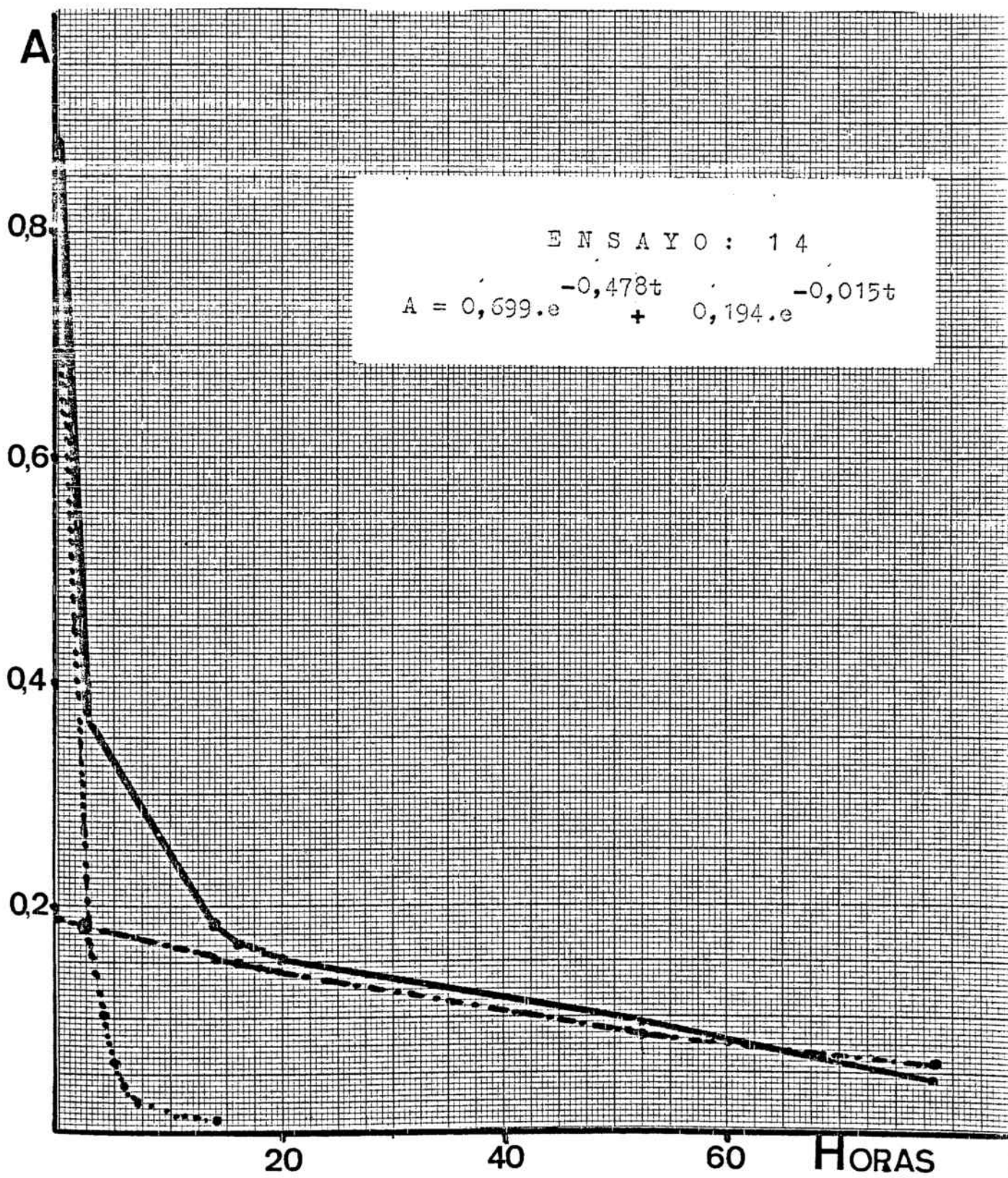
Tabla correspondiente al ensayo : 11

Gráfica correspondiente al ensayo : 11



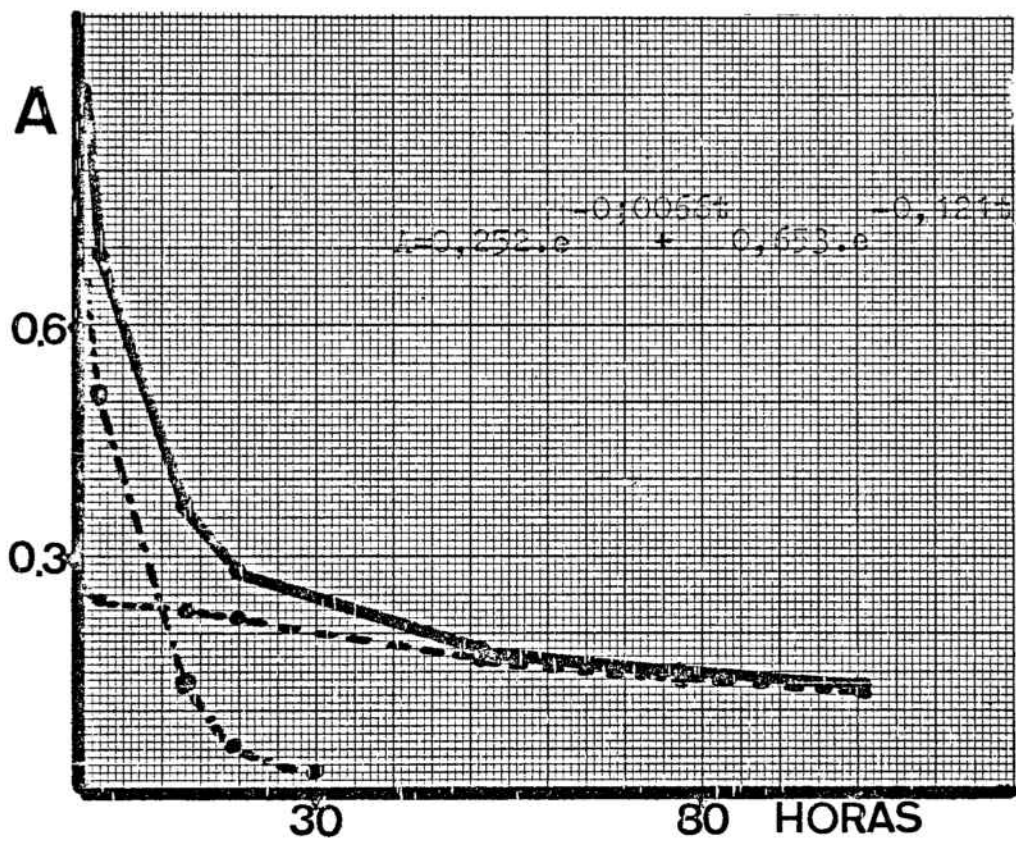
t^c (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln}{\Delta t}$	Aproximación teórica $C_a=0,78$ $K_a=0,478$ $K_{na}=0,015$
0	0,893	0,113	0,873	2,75	0,317	0,893
2,75	0,373	0,936	0,696	11,40	0,061	0,373
14,15	0,186	1,682	0,120	1,85	0,064	0,164
16,00	0,165	1,802	0,031	2,00	0,015	0,152
18,00	0,160	1,833	0,044	1,75	0,025	0,148
19,75	0,153	1,877	0,476	33,00	0,014	0,144
52,75	0,095	2,353	0,460	21,00	0,021	0,087
73,75	0,060	2,813				0,064

Tabla correspondiente al ensayo : 14



t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica $K_a=0,72$ $K_b=0,121$ $K_{na}=0,0066$
0	0,905	0,099				0,905
2,00	0,690	0,370	0,272	2,00	0,136	0,760
13,00	0,368	0,994	0,623	11,00	0,096	0,366
19,75	0,280	1,272	0,278	6,75	0,041	0,280
51,25	0,180	1,714	0,442	31,50	0,014	0,179
77,25	0,150	1,897	0,183	26,00	0,007	0,151
100,25	0,130	2,040	0,149	23,00	0,006	0,130

Tabla correspondiente al ensayo : 19



Ensayo : 19

5.4.3.-INFLUENCIA DEL SOPORTE

Ensayos efectuados:

Ensayo 12: - Placa de silicagel

- Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 13: - Placa de alúmina

- Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 17: - Placa de silicagel

- Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 18: - Placa de alúmina

- Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Nos hemos propuesto estudiar el efecto de los siguientes soportes: celulosa, alúmina y silicagel, de los que se pueden adquirir cromatofolios de la casa Merck.

En el apartado relacionado con la técnica cromatográfica empleada hemos expuesto la dificultad de realizar desarrollo cromatográfico en soporte de celulosa, dificultad que no hemos logrado superar y por ello hemos limitado nuestro estudio a los cromatofolios de alúmina y silicagel.

Hemos tenido que modificar el líquido de desarrollo normalmente empleado en las placas de silicagel para conseguir un buen desarrollo cromatográfico utilizando placas de alúmina y hemos podido comprobar mediante estudios espectrofotométricos la equivalencia de las distintas manchas tanto de la vitamina y el precalciferol como de los diversos productos de degradación.

A través de estos estudios se ha podido comprobar que el aspecto cualitativo de la degradación es análogo, ya que los productos de degradación son los mismos.

En el aspecto cuantitativo hemos realizado ensayos simultáneos utilizando placas de silicagel y alúmina habiéndose obtenido ciertas diferencias a 35°C y una gran coincidencia a 55°C. Las diferencias a 35°C se pueden resumir en

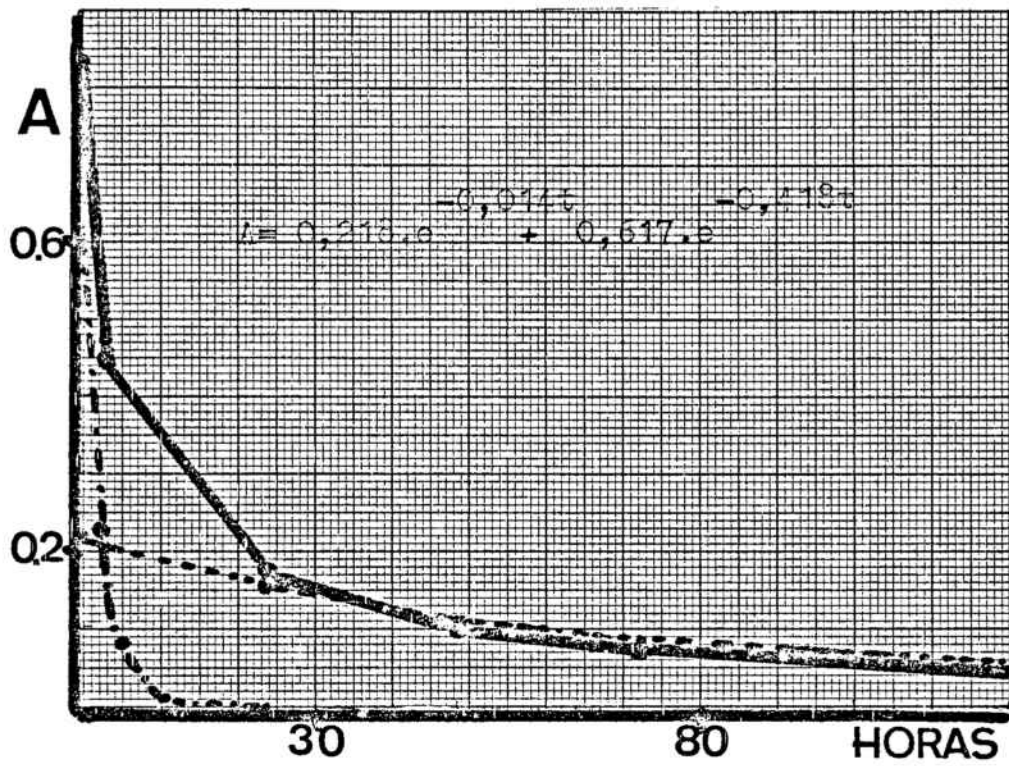
un mayor coeficiente de activación para el silicagel compensado en cierta manera por una menor velocidad específica; habiendo coincidencia, en cambio, en la velocidad específica de la parte no activada.

t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,74 Ka=0,418 Knc=0,014
0	0,835	0,180				0,835
2,33	0,444	0,811	0,631	2,33	0,270	0,444
23,30	0,175	1,742	0,931	20,97	0,044	0,157
48,25	0,100	2,302	0,560	25,00	0,022	0,110
72,25	0,068	2,688	0,386	24,00	0,016	0,079
125,00	0,038	3,270	0,582	52,75	0,011	0,037

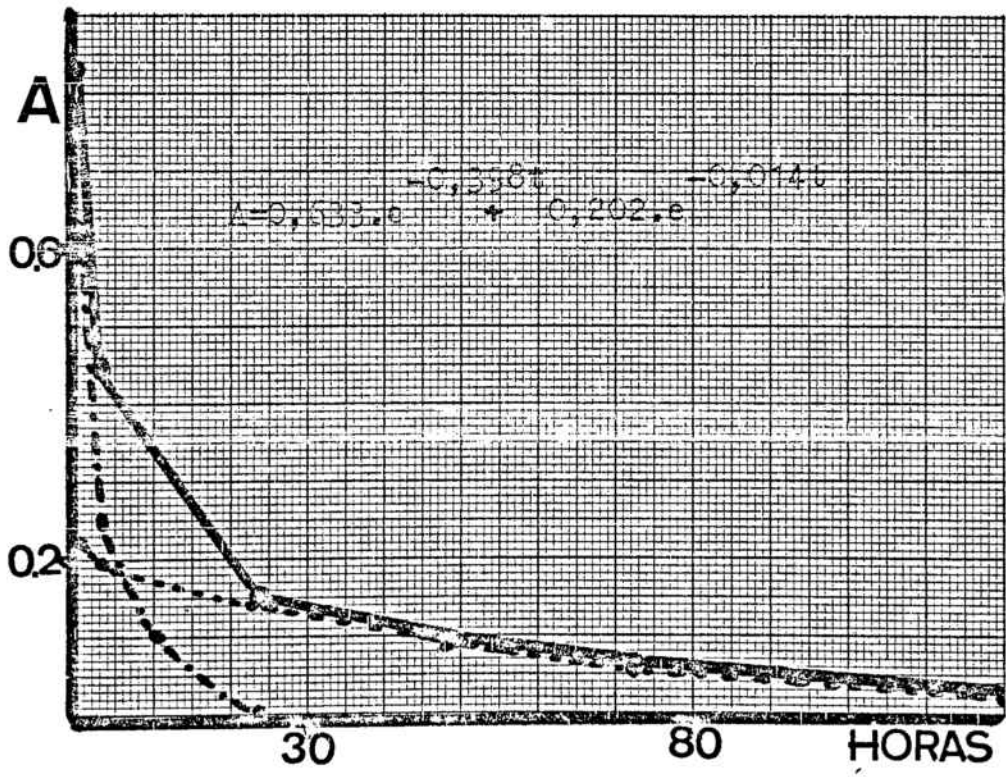
Tabla correspondiente al ensayo: 12

t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,75 Ka=0,398 Kna=0,014
0	0,835	0,180				0,835
2,33	0,445	0,809	0,629	2,33	0,269	0,445
23,30	0,155	1,864	1,055	20,97	0,050	0,145
48,25	0,100	2,302	0,438	24,95	0,017	0,102
72,25	0,065	2,733	0,431	24,00	0,017	0,073
125,00	0,036	3,324	0,541	52,75	0,011	0,035

Tabla correspondiente al ensayo : 13



ENSAYO : 12



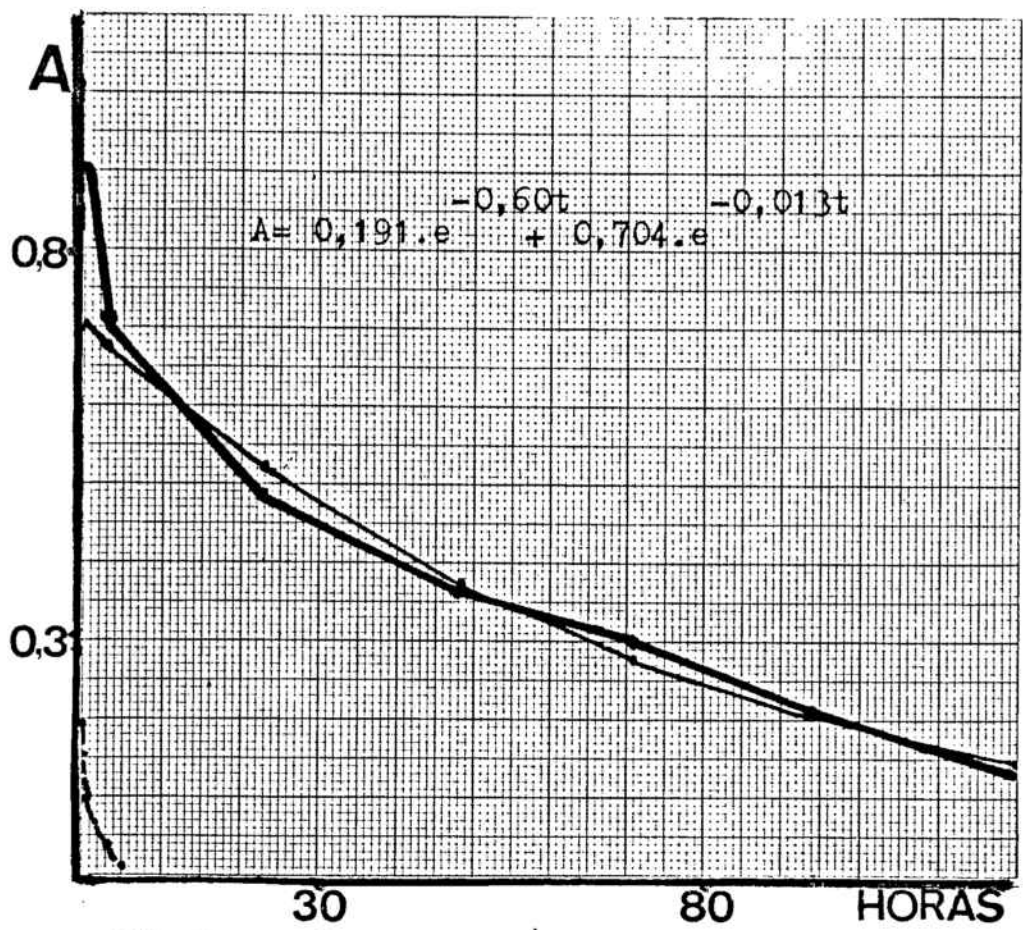
ENSAYO : 13

t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,83 Ka=0,051 Kne=0,013
0	0,895	0,110				0,895
2,75	0,791	0,234	0,124	2,75	0,045	0,791
23,25	0,460	0,776	0,542	20,50	0,026	0,340
48,45	0,189	1,666	0,890	25,20	0,035	0,144
71,45	0,063	2,764	1,098	23,00	0,047	0,068
94,70	0,043	3,146	0,382	23,25	0,016	0,043
120,70	0,033	3,411	0,265	26,00	0,010	0,032

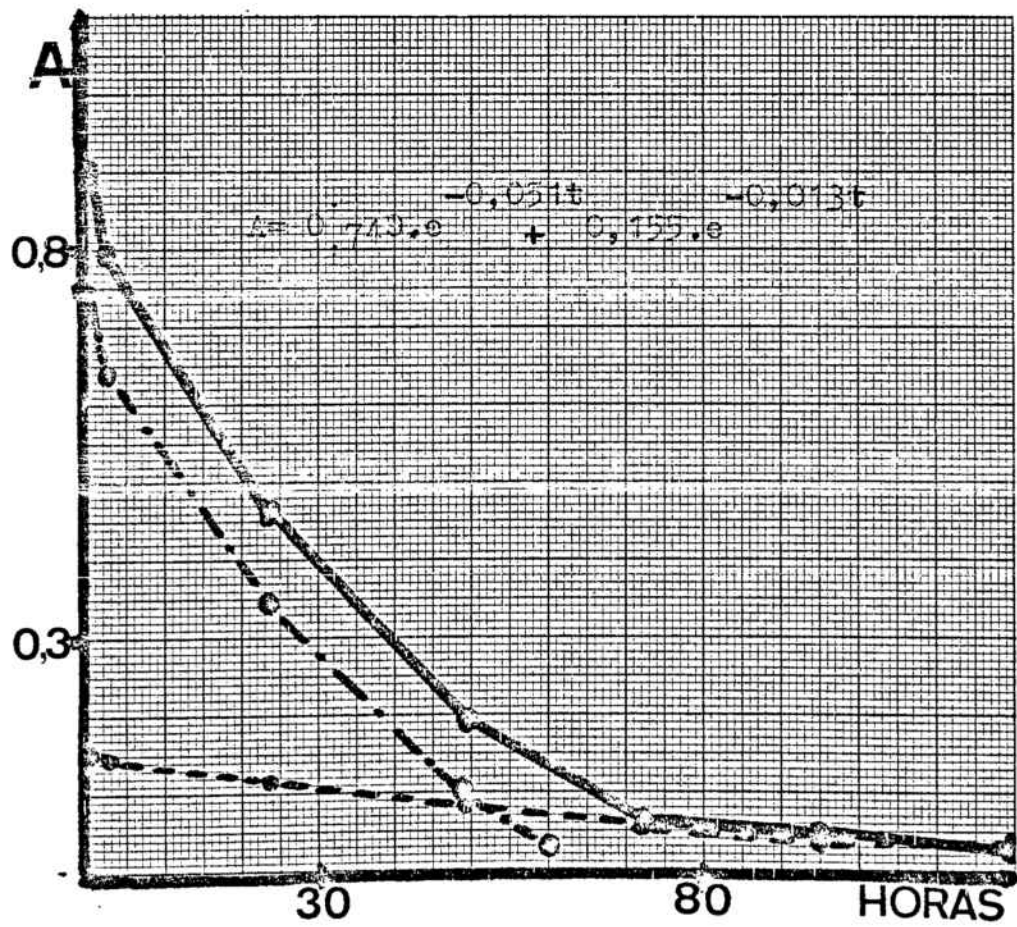
Tabla correspondiente al ensayo : 17

t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,21 Ka=0,060 Kna=0,013
0	0,895	0,110				0,895
2,75	0,715	0,335	0,225	2,75	0,081	0,715
23,25	0,489	0,715	0,380	20,50	0,018	0,520
48,45	0,375	0,980	0,265	25,20	0,010	0,375
71,45	0,300	1,203	0,223	23,00	0,009	0,278
94,70	0,205	1,584	0,381	23,25	0,016	0,205
120,70	0,135	2,002	0,418	26,00	0,016	0,146

Tabla correspondiente al ensayo : 18



ENSAYO : 18



ENSAYO: 17

5.4.4.-INFLUENCIA DE LA PRESION DE OXIGENO

Ensayos efectuados:

Ensayo 15: - Placa de silicagel
- Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 16: - Placa de silicagel
- Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 16: - Placa de silicagel
(bis)
- Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Presión oxígeno: 5kg/cm²

Ensayo 19: - Placa de silicagel
- Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 20: - Placa de silicagel
- Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 21: - Placa de silicagel
- Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Presión oxígeno: 2kg/cm²

Ensayo 22: - Placa de silicagel
- Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Presión oxígeno: 5kg/cm²

Ensayo 23: - Placa de silicagel
- Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Presión oxígeno: 2kg/cm²

Ensayo 24: - Placa silicagel
- Temperatura: 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Vacío

Ensayo 25: - Placa de alúmina
- Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Presión oxígeno: 5kg/cm²

Ensayo 26: - Placa de alúmina
- Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 27: - Placa de alúmina
- Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Presión oxígeno: 2kg/cm²

Ensayo 28: - Placa de alúmina
- Temperatura: 55°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 29: - Placa de alúmina
- Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Presión oxígeno: 2kg/cm²

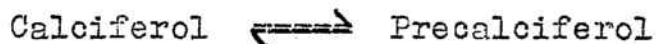
Ensayo 30: - Placa de alúmina
- Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 31: - Placa de alúmina
- Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Contacto con el aire

Ensayo 32: - Placa de alúmina
- Temperatura: 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Oscuridad
- Presión oxígeno: 5kg/cm²

El estudio del efecto de la presión de oxígeno es de gran interés ya que a través de los estudios realizados-- en nuestro departamento (33), sabemos que la ausencia de aire (atmósfera de nitrógeno), paraliza la degradación y-- que la mayor presión de oxígeno no influye de forma claramente proporcional sobre la velocidad de degradación cuando la vitamina se encuentra en solución alcohólica.

A través de una serie de ensayos de tanteo se ha podido poner de manifiesto que en atmósfera de nitrógeno el proceso degradatorio queda limitado a la isomerización --
térnica



que progresa hasta alcanzar el equilibrio siempre muy deplazado a favor de la vitamina.

Hemos intentado comprobar que en ausencia de aire el proceso se paraliza, sustituyendo la atmósfera de nitrógeno por el vacío, empleando la estufa de vacío Heraeus (ensayo 24), habiéndose producido en los primeros intentos-- un inicio de degradación que se explicaba por dificultades técnicas de obtención del vacío, lográndose un nivelde contenido en vitamina, sin ulterior alteración a la---

temperatura de 20°C durante diez días, lo que confirma-- que la presencia de oxígeno es esencial para el proceso de degradación.

A través de una serie de ensayos simultáneos realizados a 35°C y 55°C en soportes de alúmina y silicagel-- se ha podido estudiar el efecto de la presión de oxígeno sobre la degradación.

El ensayo 22 realizado a 35°C en soporte de silicagel bajo la presión de 5kg/cm² de oxígeno se ha efectuado simultáneamente con el ensayo 19 bajo la acción directa del aire. En el ensayo 22, se ha tenido que considerar tres términos que afecta tres porciones de la vitamina depositada para obtener una ecuación teórica que reproduzca los resultados experimentales, la parte más activada que afecta al 51% de la vitamina total depositada, presenta una velocidad específica unas catorce veces superior que la q_v que corresponde al ensayo simultáneo sin-- presión de oxígeno.

Los ensayos 20 y 21 realizados también simultáneamente a 35°C sobre soporte de silicagel y con el carácter-- diferencial de la presión de 2kg/cm² de oxígeno (ensayo-21) presenta en dicho ensayo una velocidad específica de

la parte activada unas tres veces superior y un aumento notable del coeficiente de activación 0,36 en el ensayo 20 y 0,66 en el ensayo 21.

Los ensayos 16 y 16 bis realizados simultáneamente sobre placas de silicagel y a 55°C y con el caracter diferencial de la presión de 5kg/cm² de oxígeno el ensayo 16 bis, presentan un coeficiente de activación parecido, pero la velocidad específica de la parte activada que -- afecta al 78% del total depositado, tiene una velocidad específica unas diez veces superior.

También en los ensayos 15 y 23 realizados simultáneamente a 55°C sobre soporte de silicagel pero con la presión de 2kg/cm² de oxígeno en el ensayo 23. Presentan un coeficiente de activación parecido pero una velocidad específica de la parte activada notablemente superior en el ensayo 23.

Sobre placas de alúmina se han repetido los mismos ensayos de tipo simultáneo a 35°C y 55°C y compresiones de 5 y 2kg/cm² de oxígeno, habiéndose observado en general que sobre este soporte el efecto de la presión de oxígeno es mucho menos importante.

A 55°C y para el caracter diferencial de 5kg/cm² de

oxígeno (ensayos 25 y 26) se obtiene un coeficiente de ac
tivación ligeramente superior y unas velocidades específi
cas prácticamente iguales.

Cuando a la misma temperatura de 55°C se ensaya un--
caracter diferencial de 2kg/cm^2 de presión de oxígeno (en
ensayos 27 y 28) los resultados son prácticamente iguales,--
siendo la única diferencia apreciable que bajo la presión--
de oxígeno la parte activada afecta a un 80% mientras que
en presencia de aire afecta sólo a un 70%.

Los ensayos efectuados a 35°C y en soporte de alúmi--
na presentan también diferencias poco notables. En los en
sayos 31 y 32 con el caracter diferencial de 5kg/cm^2 de --
presión de oxígeno, se obtiene un coeficiente de activa--
ción algo superior (0,49 y 0,75) y una velocidad específi
ca de la parte activada algo superior sin que llegue a do
blar valor que corresponde al ensayo efectuado con el aire.

En los ensayos 29 y 30, efectuados también a la tem--
peratura de 35°C con el caracter diferencial de 2kg/cm^2 de
presión de oxígeno se obtiene un coeficiente de activa --
ción de un valor doble y unas velocidades específicas po--
co diferentes.

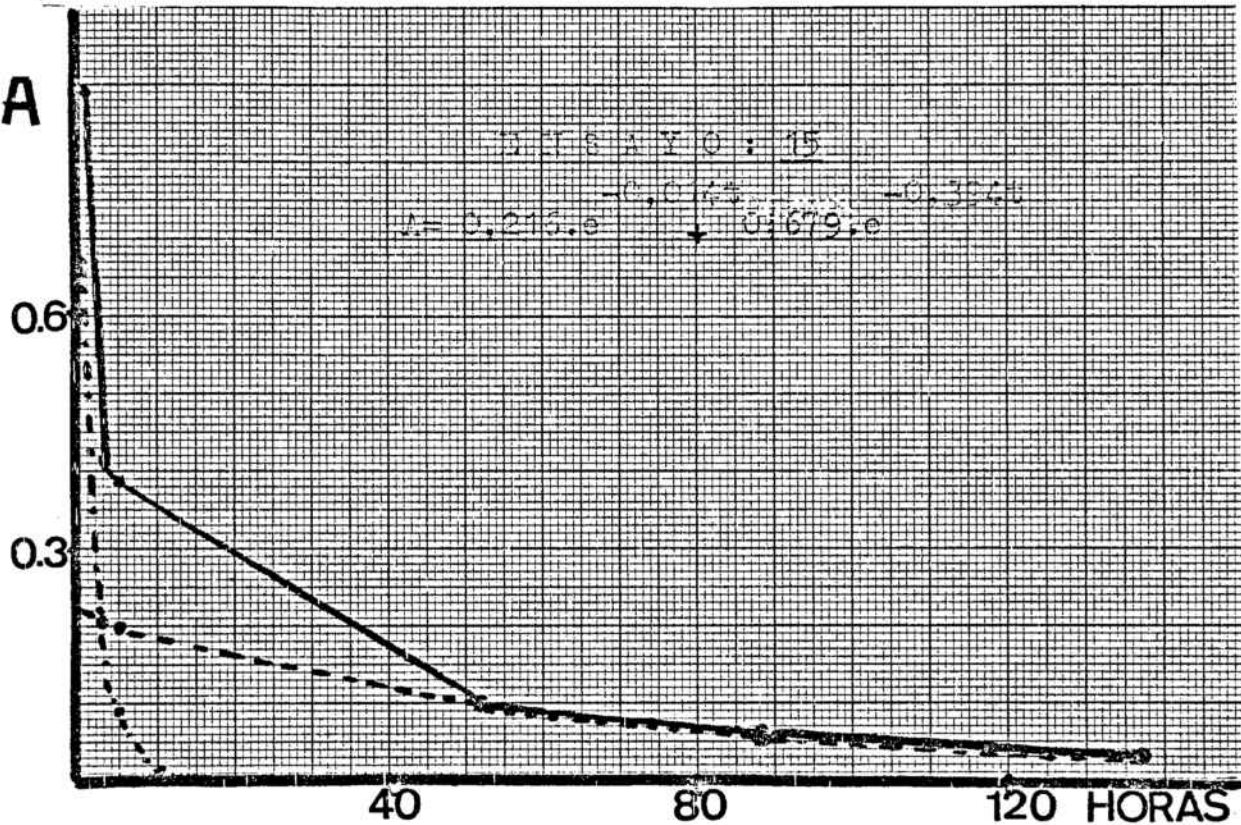
t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,75 Ka=0,399 Kna=0,014
0	0,895	0,111				0,895
3,00	0,415	0,879	0,768	3,00	0,256	0,415
5,00	0,390	0,942	0,063	2,00	0,031	0,294
51,75	0,103	2,273	1,331	46,75	0,028	0,104
87,99	0,060	2,813	0,540	36,24	0,014	0,063
136,99	0,030	3,506	0,793	49,00	0,016	0,031

Tabla correspondiente al ensayo : 15

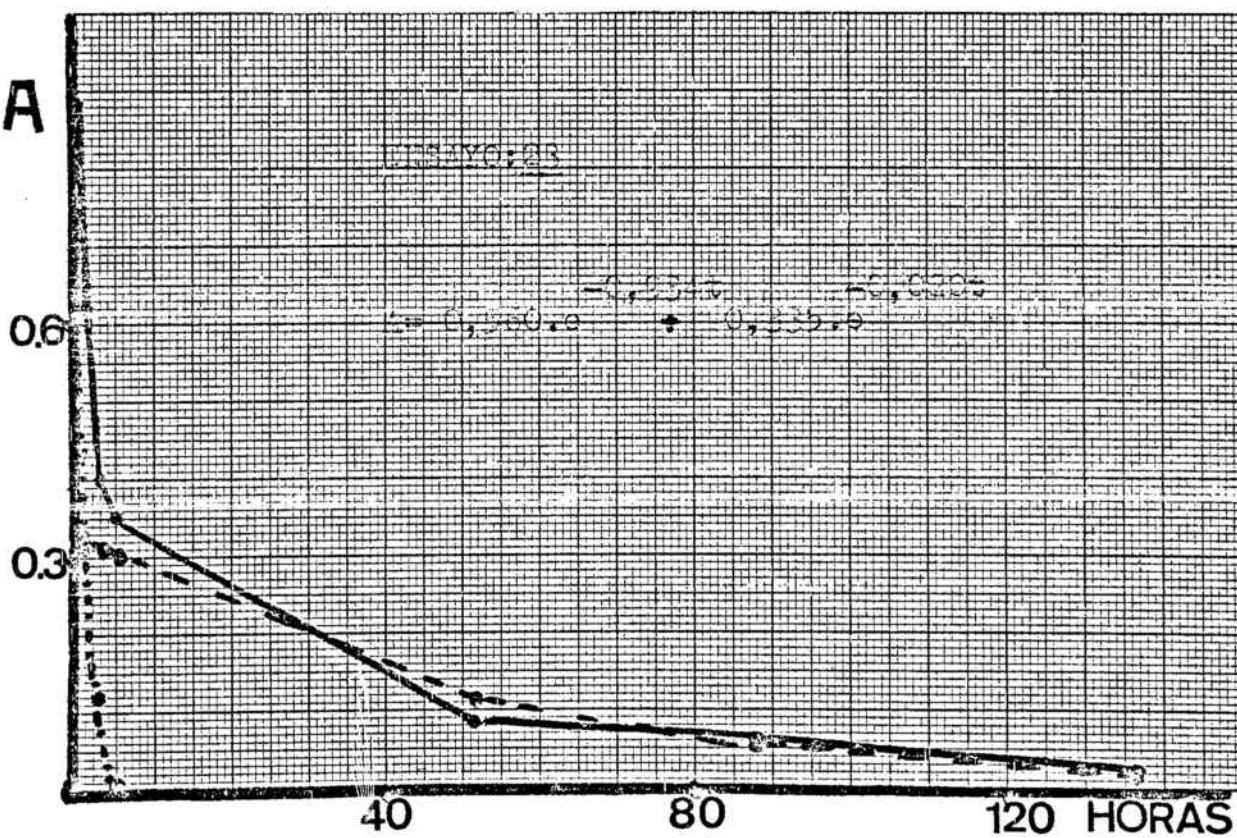
t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,63 Ka=0,534 Kna=0,020
0	0,895	0,111				0,895
1,00	0,620	0,470	0,359	1,00	0,359	0,646
3,00	0,400	0,916	0,446	2,00	0,223	0,427
5,00	0,350	1,049	0,133	2,00	0,065	0,341
51,75	0,085	2,465	1,417	46,75	0,030	0,119
87,99	0,060	2,813	0,347	36,24	0,009	0,057
136,99	0,020	3,912	1,099	49,00	0,022	0,021

Tabla correspondiente al ensayo : 23

A



A

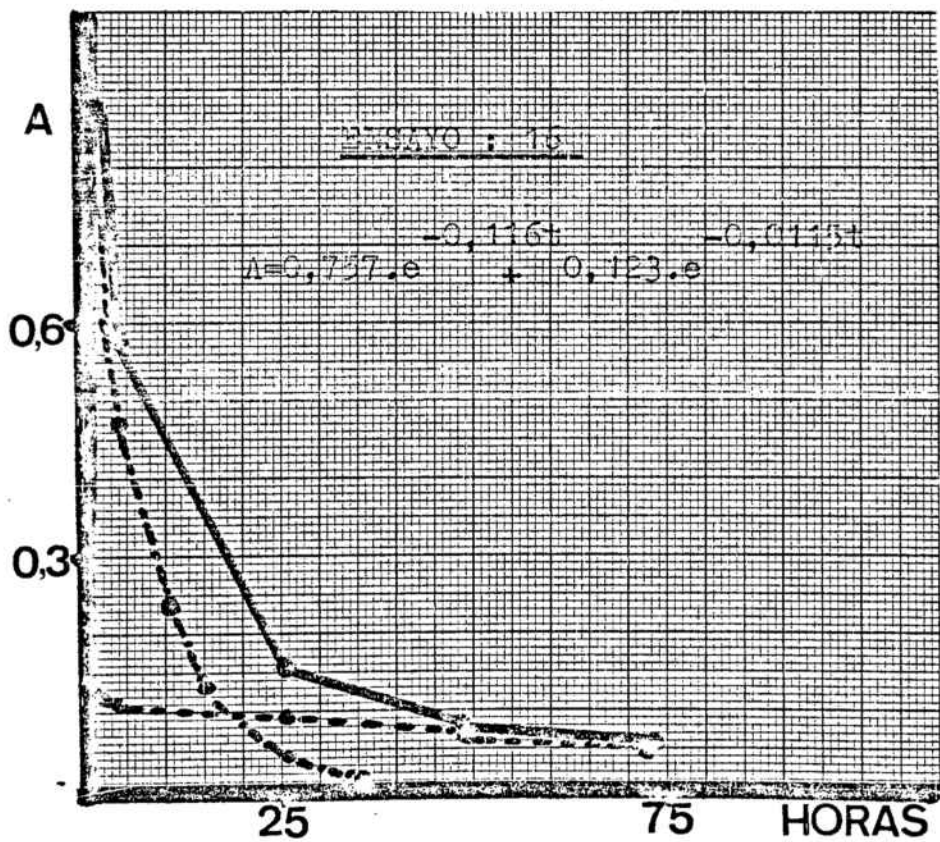
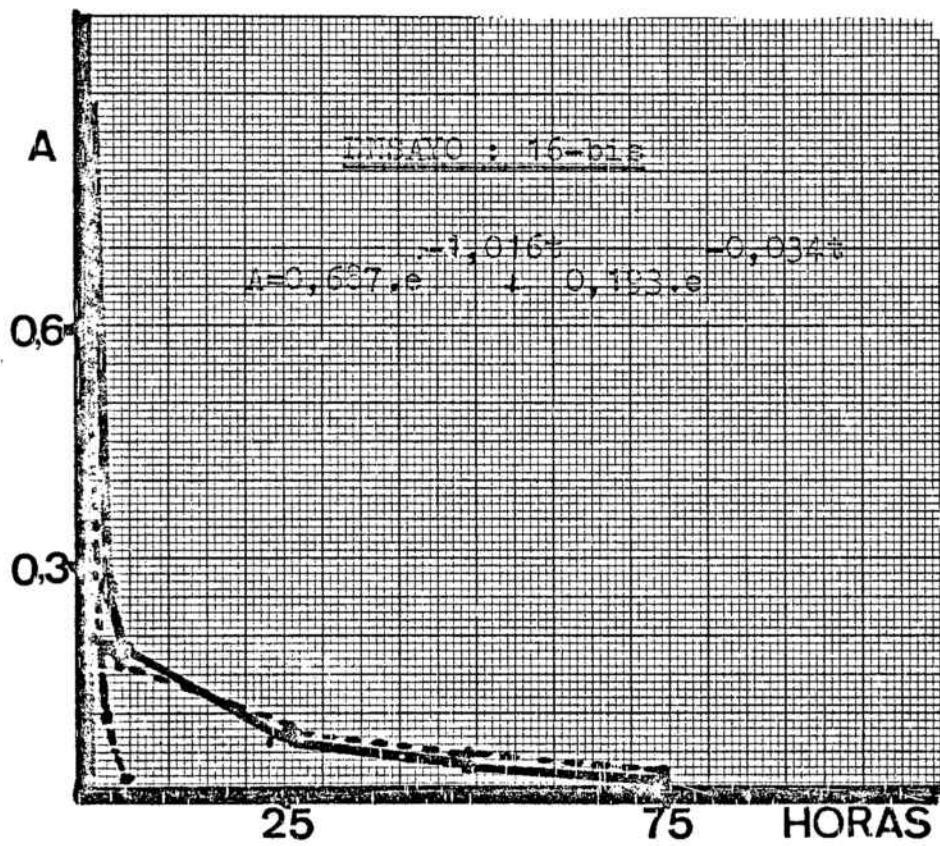


t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,86 Ke=0,116 Kna=0,0115
0	0,880	0,127	0,201	2,00	0,1005	0,880
2,0	0,720	0,382	0,216	2,00	0,1080	0,720
4,0	0,580	0,544	1,288	21,25	0,0606	0,594
25,5	0,160	1,832	0,693	23,00	0,0301	0,130
48,5	0,080	2,525	0,288	25,00	0,0115	0,079
73,5	0,060	2,813				0,060

Tabla correspondiente al ensayo : 16

t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$\frac{-\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,78 Ka=1,016 Kna=0,034
0	0,880	0,127				0,880
2,00	0,270	1,309	1,182	2,00	0,591	0,270
4;00	0,190	1,660	0,351	2,00	0,175	0,179
25,50	0,080	2,525	0,865	21,25	0,040	0,081
48,50	0,035	3,352	0,827	23,00	0,035	0,037
73,50	0,015	4,199	0,847	25,00	0,033	0,015

Tabla correspondiente al ensayo : 16 bis

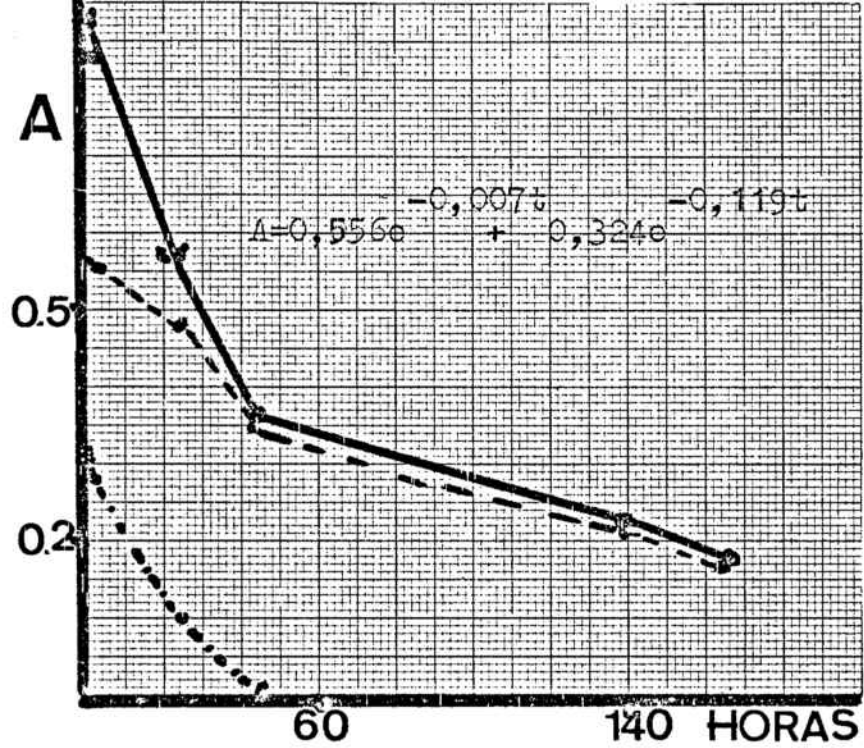


t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,36 Ka=0,119 Kna=0,007
0	0,880	0,127				0,880
1,25	0,830	0,186	0,059	1,25	0,047	0,830
24,00	0,573	0,556	0,370	22,75	0,016	0,490
44,00	0,365	1,007	0,451	20,00	0,022	0,408
140,00	0,232	1,461	0,454	96,00	0,004	0,208
166,00	0,180	1,714	0,253	26,00	0,009	0,173

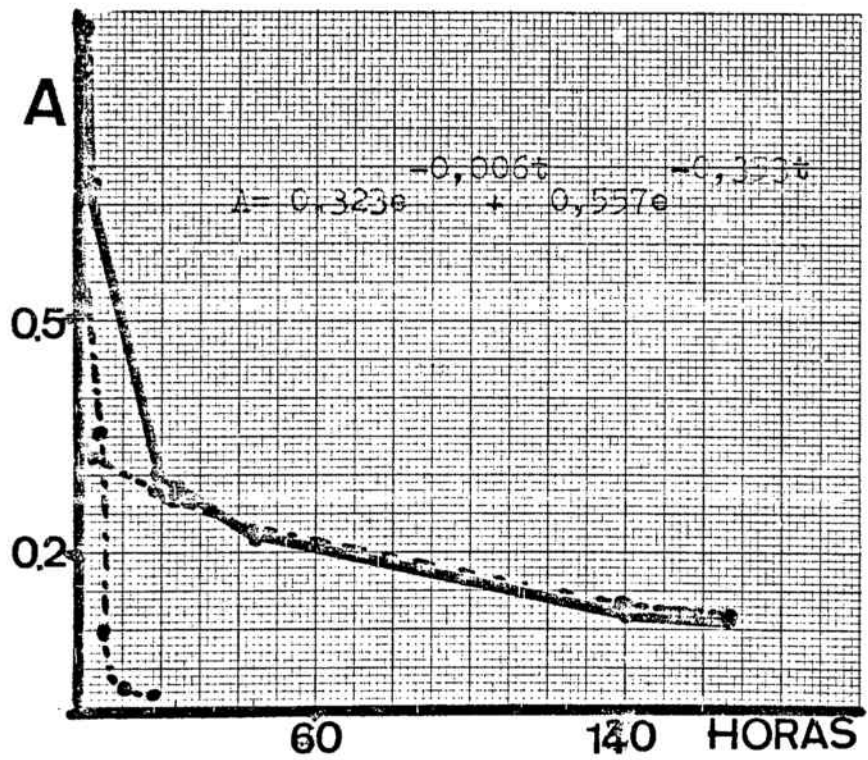
Tabla correspondiente al ensayo : 20

t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$\frac{-\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,66 Ka=0,353 Kna=0,006
0	0,880	0,127				0,880
1,25	0,678	0,388	0,261	1,25	0,208	0,678
19,75	0,300	1,203	0,815	18,50	0,044	0,286
24,00	0,285	1,255	0,052	4,25	0,012	0,279
44,00	0,220	1,514	0,259	20,00	0,012	0,248
140,00	0,120	2,120	0,606	96,00	0,006	0,139
166,00	0,115	2,162	0,042	26,00	0,001	0,119

Tabla correspondiente al ensayo : 21



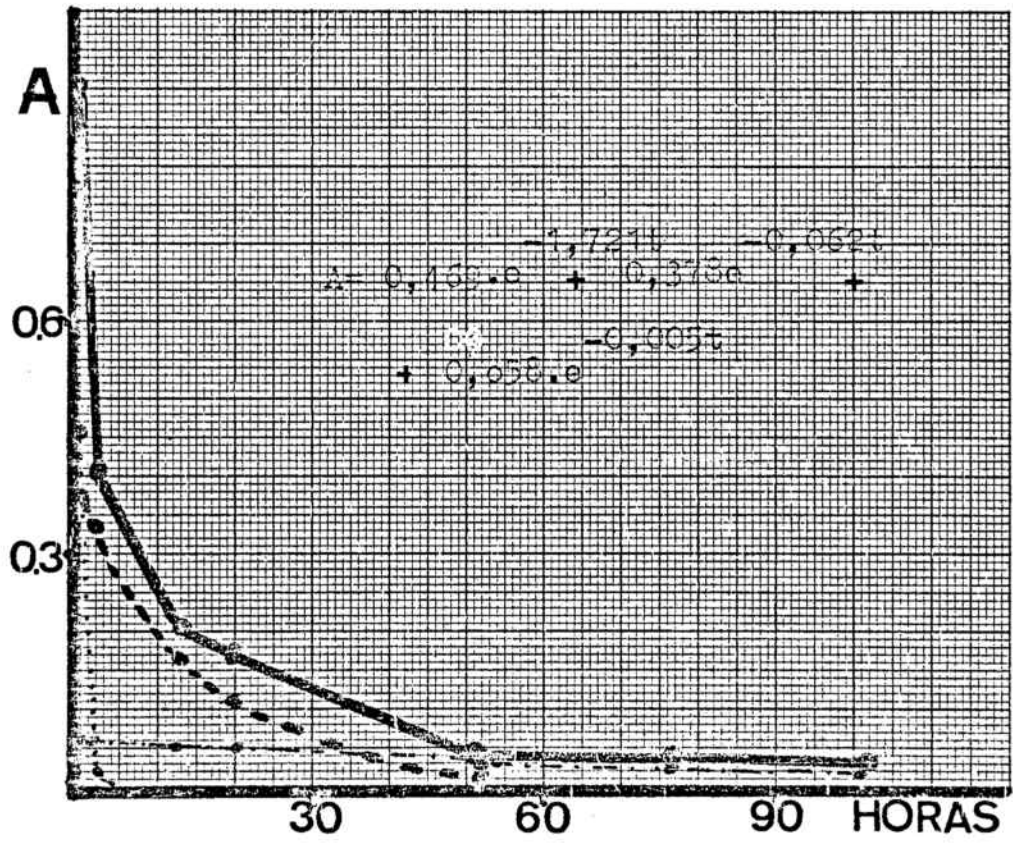
ENSAYO : 20



ENSAYO : 21

t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica. $C=0,578/0,417/C,0$ $K_1=1,721$ $K_2=0,062$ $K_3=0,005$
0	0,905	0,099	0,804	2,00	0,208	0,905
2,00	0,405	0,903	0,081	11,00	0,044	0,405
13,00	0,205	1,584	0,187	6,75	0,027	0,222
19,75	0,170	1,771	1,330	31,50	0,042	0,163
51,25	0,045	3,101	0,117	26,00	0,006	0,060
77,25	0,040	3,218	0,134	23,00	0,005	0,039
100,25	0,035	3,352				0,035

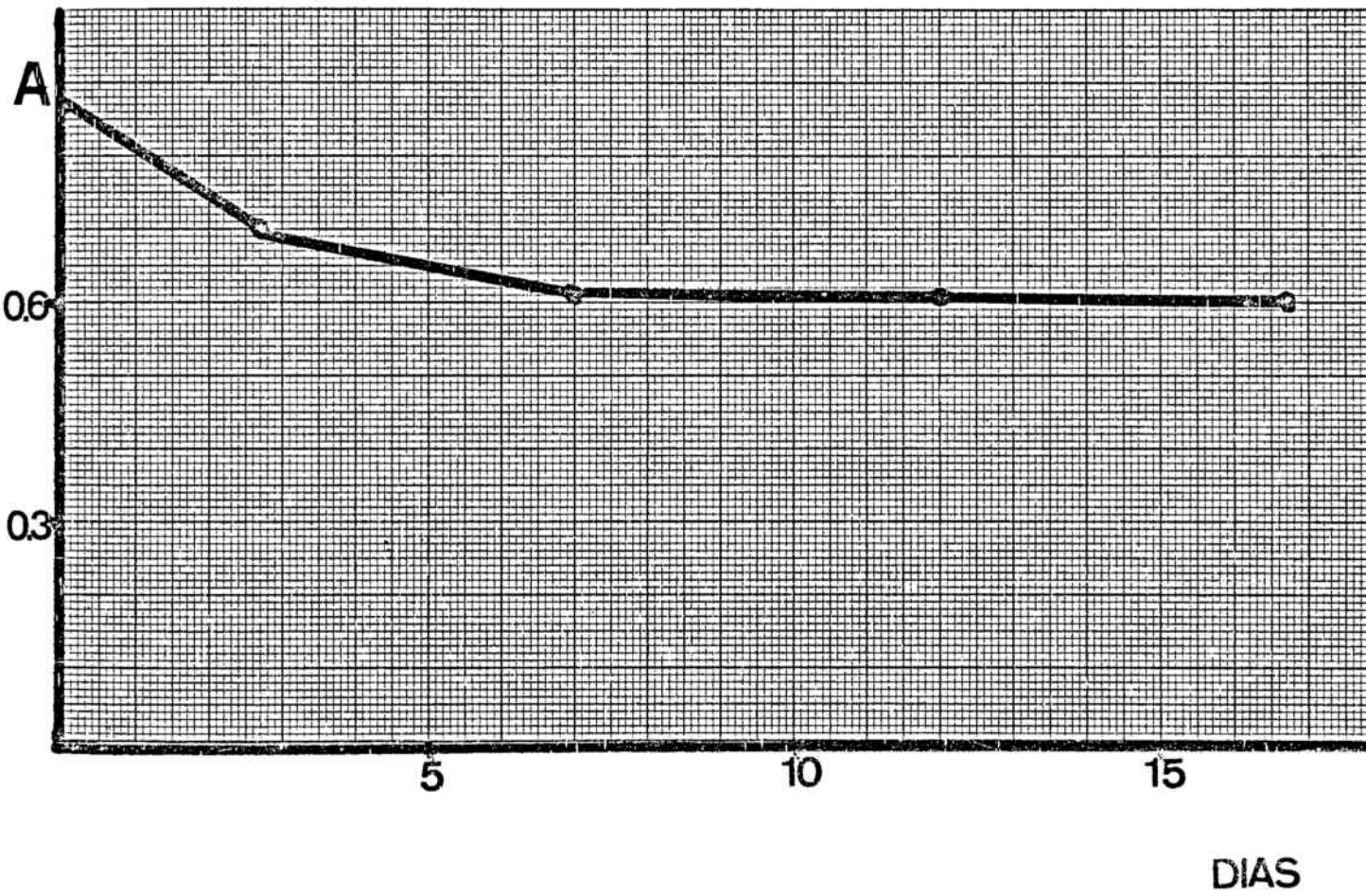
Tabla correspondiente al ensayo : 22



ENSAYO : 22

t (dias)	A
0	0,870
2,68	0,700
6,96	0,610
12,00	0,610
16,70	0,600

Tabla correspondiente al ensayo : 24



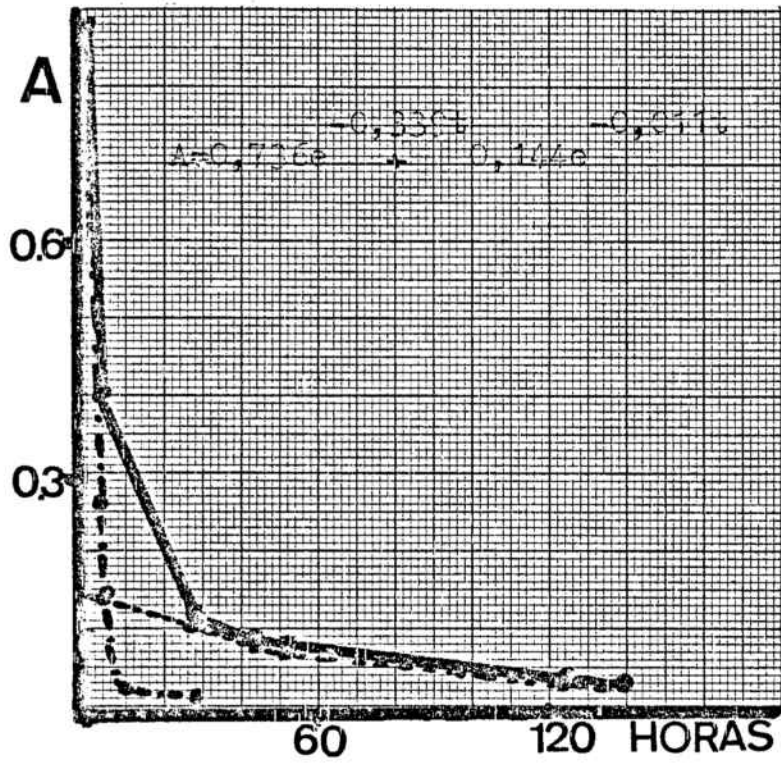
ENSAYO :24

t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica $C_a=0,83$ $K_a=0,339$ $\ln a=0,011$
0	0,580	0,127				0,580
3,00	0,405	0,903	0,776	3,00	0,258	0,405
26,75	0,120	2,120	1,217	23,75	0,051	0,107
43,00	0,090	2,407	0,287	16,25	0,017	0,089
50,75	0,070	2,659	0,252	7,75	0,032	0,082
121,75	0,040	3,218	0,559	71,75	0,007	0,040
138,50	0,030	3,506	0,288	16,75	0,017	0,031

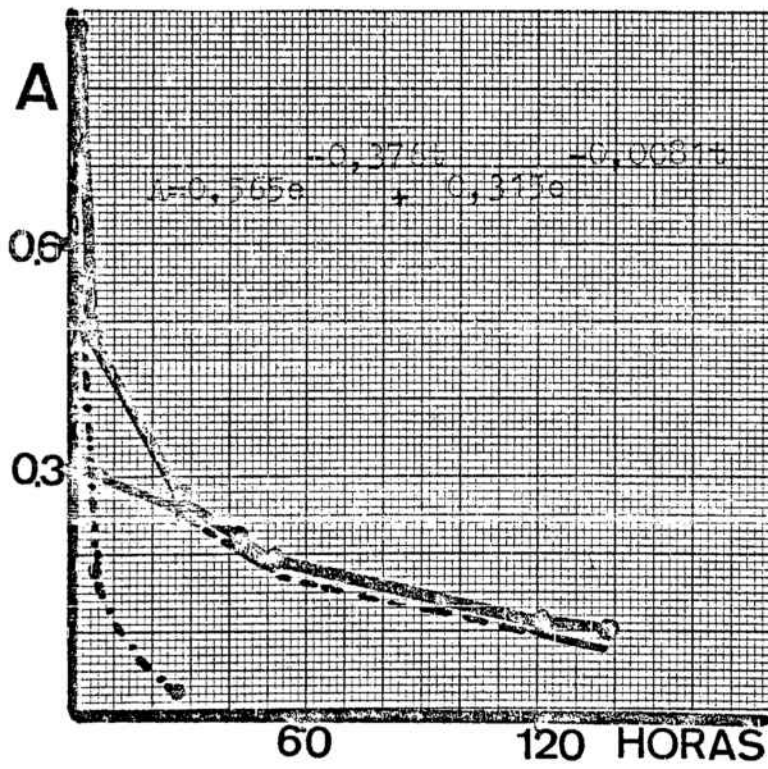
Tabla correspondiente al ensayo : 25

t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica $C_a=0,642$ $k_a=0,376$ $K_{na}=0,0081$
0	0,880	0,127				0,880
3,00	0,490	0,713	0,586	3,00	0,195	0,487
26,75	0,275	1,290	0,577	23,75	0,024	0,275
43,00	0,220	1,514	0,224	16,25	0,013	0,222
50,75	0,190	1,660	0,146	7,25	0,018	0,208
121,75	0,115	2,162	0,502	71,75	0,006	0,117
138,50	0,105	2,253	0,091	16,75	0,005	0,102

Tabla correspondiente al ensayo : 26



ENSAYO : 25



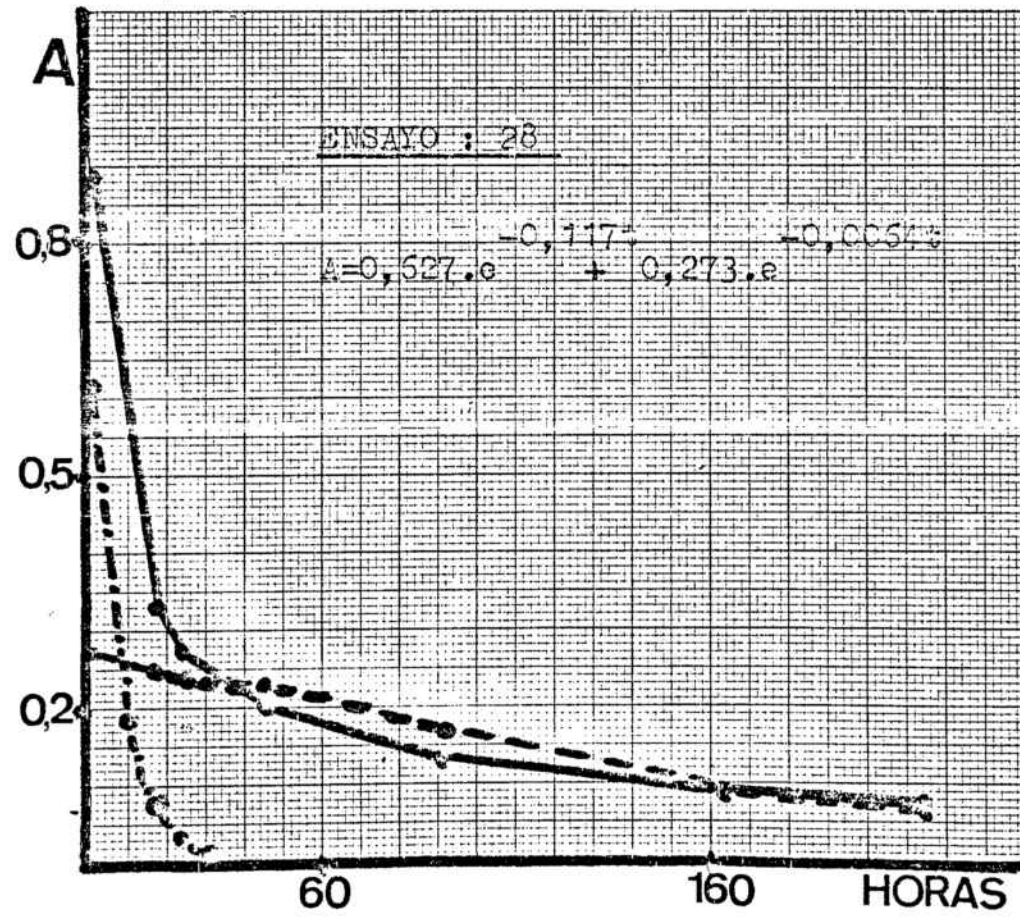
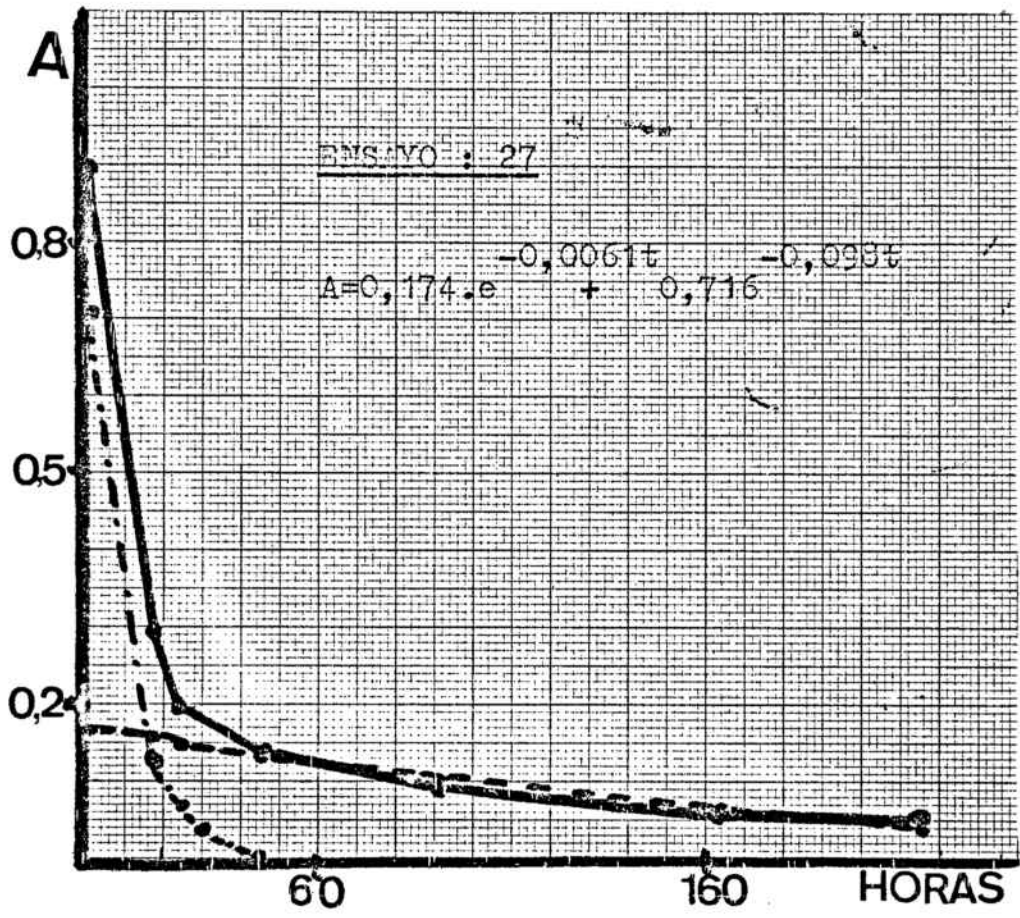
ENSAYO : 26

t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$\frac{-\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica $C_a=0,80$ $K_a=0,098$ $K_{na}=0,0061$
0	0,890	0,116				0,890
17,0	0,290	1,237	1,121	17,0	0,065	0,291
24,0	0,190	1,660	0,423	7,0	0,060	0,218
46,0	0,140	1,966	0,306	22,0	0,013	0,138
91,0	0,095	2,353	0,387	45,0	0,008	0,099
163,5	0,060	2,813	0,460	72,5	0,006	0,064
214,5	0,050	2,995	0,182	51,0	0,003	0,047

Tabla correspondiente al ensayo : 27

t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica- Ca= 0,70 Ka=0,117 Kne=0,0064
0	0,890	0,116				0,880
17,0	0,330	1,108	0,992	17,0	0,058	0,332
24,0	0,270	1,309	0,201	7,0	0,028	0,272
46,0	0,200	1,609	0,300	22,0	0,013	0,206
91,0	0,130	2,040	0,431	45,0	0,009	0,152
163,5	0,090	2,407	0,367	72,5	0,005	0,095
214,5	0,077	2,563	0,156	51,0	0,003	0,069

Tabla correspondiente al ensayo : 28

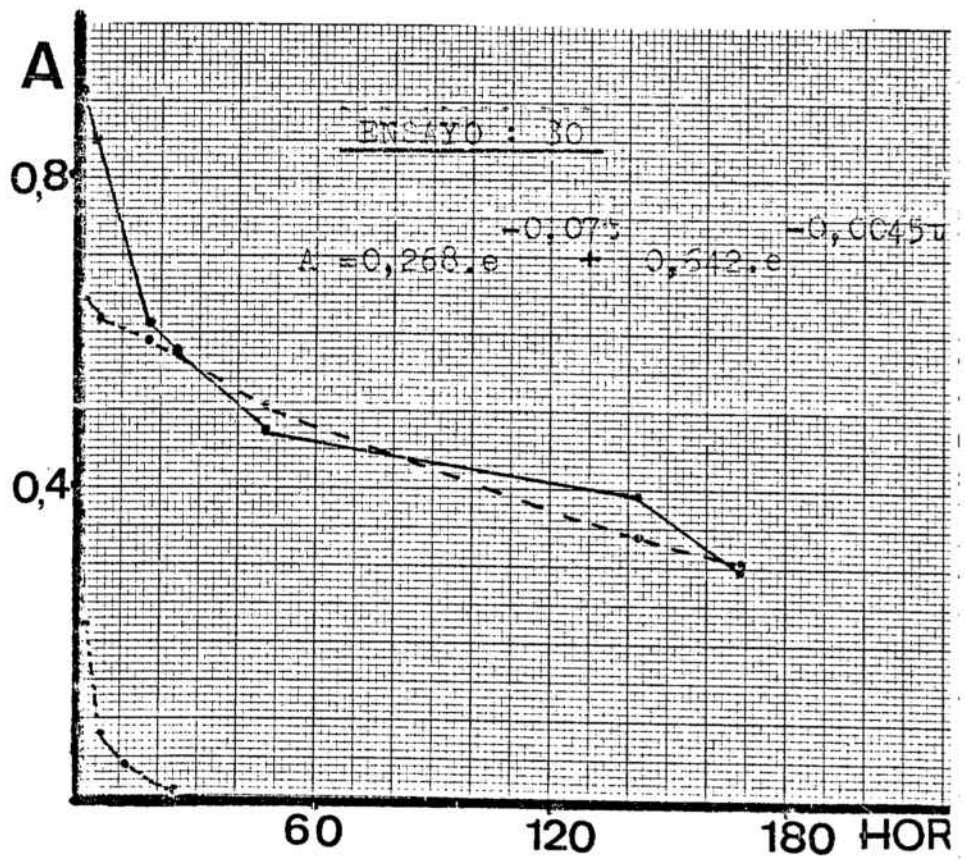
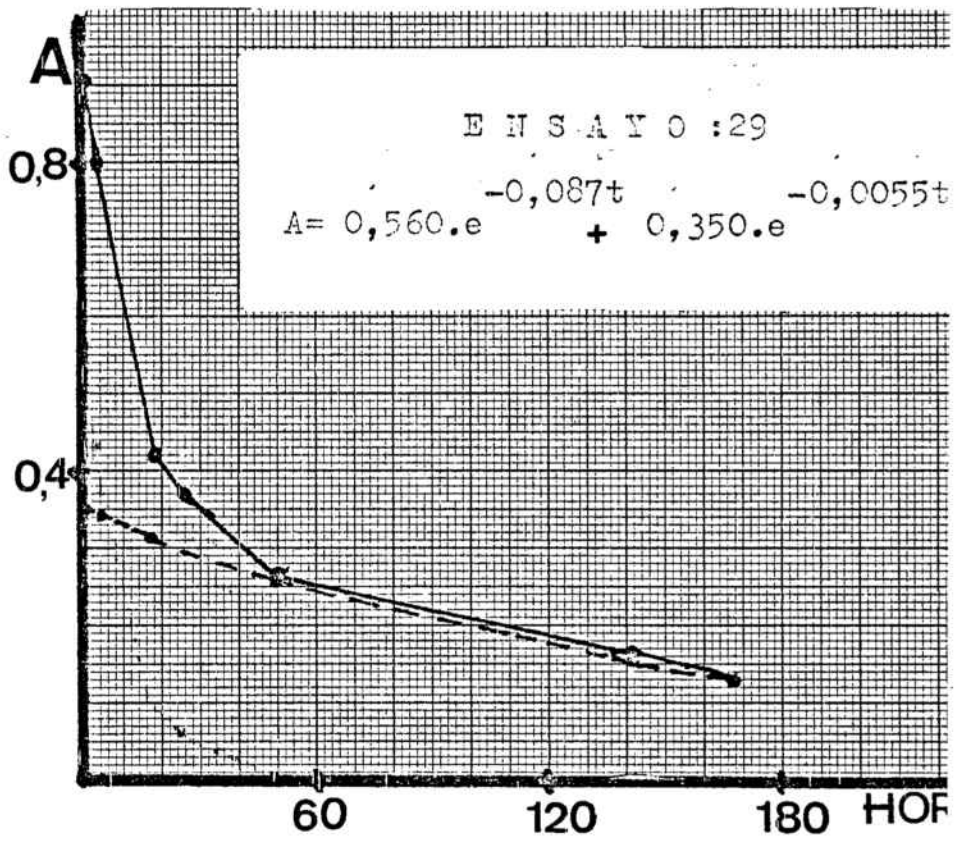


t(h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,61 K _a =0,087 K _{nc} =0,0055
0	0,910	0,094	0,135	3,00	0,045	0,950
3,00	0,795	0,229	0,638	15,50	0,041	0,775
18,50	0,420	0,867	0,127	6,75	0,018	0,427
25,25	0,370	0,994	0,334	24,25	0,013	0,366
49,50	0,265	1,328	0,473	92,75	0,005	0,273
142,25	0,165	1,801	0,201	25,75	0,007	0,160
168,00	0,135	2,002				0,138

Tabla correspondiente al ensayo : 29

t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,29 Ka=0,070 Kna=0,0045
0	0,910	0,094				0,910
3,00	0,850	0,162	0,068	3,00	0,022	0,850
18,50	0,615	0,486	0,324	15,50	0,020	0,663
25,25	0,580	0,544	0,058	6,75	0,008	0,618
49,50	0,475	0,744	0,200	24,25	0,008	0,521
142,25	0,397	1,030	0,286	92,75	0,003	0,338
168,00	0,290	1,237	0,287	25,75	0,008	0,301

Tabla correspondiente al ensayo : 30

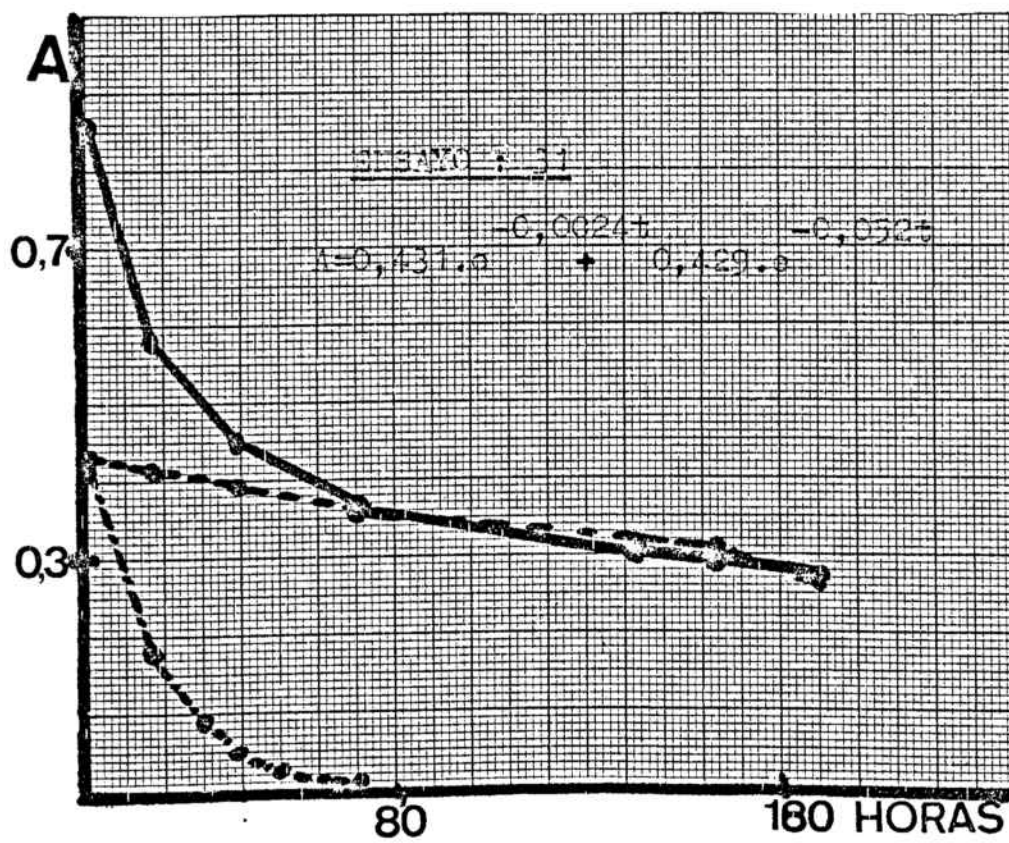
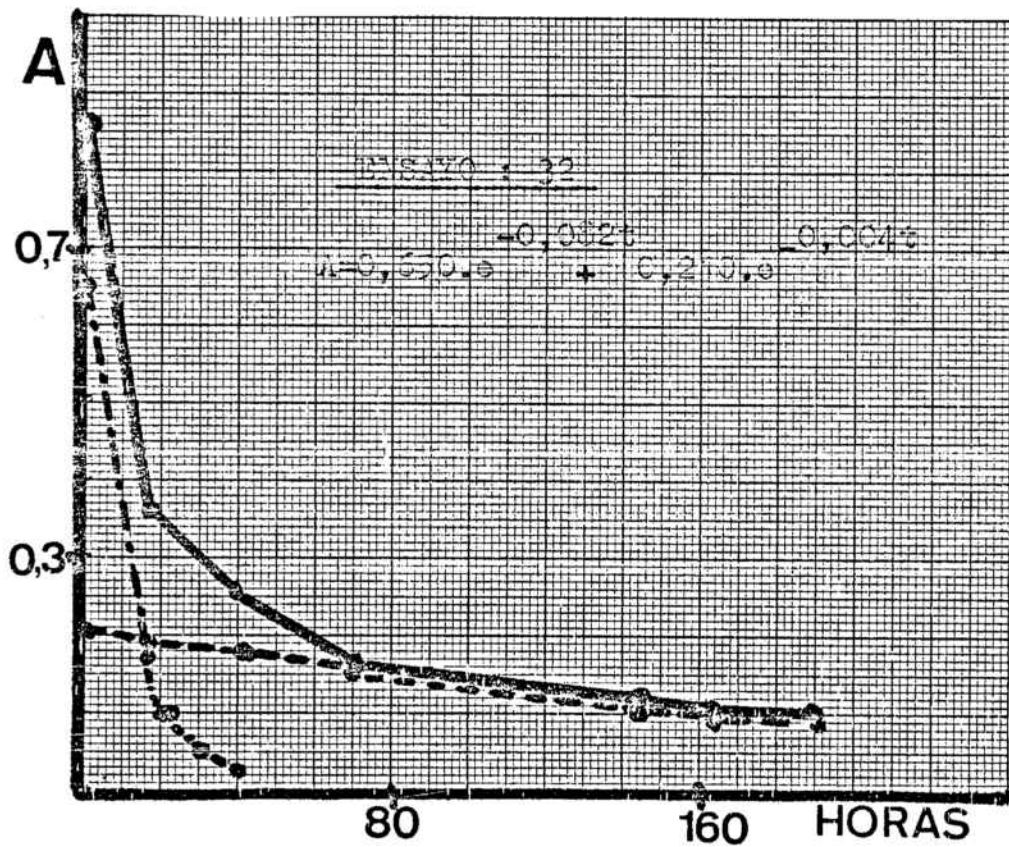


t (h)	A	-lnA	-ΔlnA	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,49 Ka=0,052 Kna=0,0024
0	0,860	0,150				0,860
16,00	0,580	0,544	0,394	16,00	0,024	0,600
39,16	0,450	0,798	0,254	23,16	0,010	0,447
70,50	0,365	1,007	0,309	31,34	0,009	0,373
141,50	0,305	1,187	0,180	71,00	0,002	0,306
163,00	0,290	1,237	0,050	21,50	0,002	0,291
189,50	0,275	1,290	0,053	26,50	0,002	0,273

Tabla correspondiente al ensayo : 31

t (h)	A	$-\ln A$	$-\Delta \ln A$	Δt	$-\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$	Aproximación teórica Ca=0,75 Ka=0,082 Kna=0,004
0	0,860	0,150				0,860
16,00	0,360	1,021	0,871	16,00	0,054	0,371
39,16	0,255	1,366	0,345	23,16	0,014	0,205
75,50	0,160	1,832	0,466	31,34	0,014	0,160
141,50	0,115	2,162	0,330	71,00	0,004	0,119
163,00	0,105	2,253	0,091	21,50	0,004	0,109
189,50	0,100	2,302	0,049	26,50	0,002	0,098

Tabla correspondiente al ensayo 32



5.5.-DISCUSION DE LOS RESULTADOS

=====

A través de los numerosos ensayos efectuados, no hemos podido establecer unos parámetros objetivos, que permitan predecir la evolución de un proceso degradatorio en función de factores fácilmente controlables. El hecho de obtener resultados prácticamente iguales, cuando la degradación tiene lugar simultáneamente y en las mismas condiciones, permite deducir que las discrepancias que se producen en procesos realizados manteniendo iguales los factores bajo control (temperatura, cantidad de sustancia depositada, presión de oxígeno, naturaleza del soporte) se deben a la influencia de otros factores que escapan a -- nuestro control, pero que en procesos simultáneos actúan en la misma forma. Factores de este tipo podrían ser la -- humedad del ambiente, la granulometría de las placas etc.

A través de la técnica de los ensayos simultáneos, hemos podido poner de manifiesto la influencia de una serie de factores tales como la temperatura, la presión de oxígeno, la iluminación o la naturaleza del soporte.

A pesar de las discrepancias cuantitativas a las que

ya hemos hecho referencia, podemos afirmar que en todos los ensayos efectuados en las mismas condiciones se obtienen resultados análogos, quedando bastante bien establecido los límites entre los cuales tiene lugar el proceso degradatorio.

Los valores de las velocidades específicas aparentes que afectan a los diversos intervalos de cada proceso degradatorio y que se especifican por los cocientes $\frac{\Delta \ln A}{\Delta t}$, deben ser considerados como datos objetivos que expresan el resultado de nuestro trabajo experimental, por lo que los damos en todos los ensayos efectuados. Las ecuaciones que proponemos como aproximación teórica y los parámetros que la definen: C, K_a , y K_{na} , no deben ser considerados por encima de su valor real, es decir no son más que el resultado de un esfuerzo simplificador de tipo matemático para interpretar el aspecto cuantitativo del proceso degradatorio. No obstante cabría interpretar los resultados experimentales, suponiendo que las moléculas de vitamina se mantienen prácticamente aisladas y que su reactividad depende de su situación en el soporte, pudiéndose dividir la vitamina depositada en varias porciones que se degradan según una cinética de primer or--

den cuya velocidad específica depende precisamente de su reactividad, dentro de esta interpretación las ecuaciones teóricas que proponemos, podrían tener cierta significación.

Otra posible interpretación podría ser, suponer que la vitamina forma sobre el soporte cristales microscópicos, que se degradan por su superficie, siguiendo un proceso de tipo topoquímico (19) caracterizado por una reactividad alta en las primeras fases del proceso y una velocidad cada vez menor a medida que va decreciendo la superficie exterior de los cristales.

El hecho de que la iluminación por luz fluorescente, determina una gran aceleración del proceso de degradación a la temperatura ambiente pero sus efectos resultan inapreciables a 60°C, hace pensar que existen realmente dos mecanismos de iniciación del proceso de degradación: uno térmico y otro fotoquímico en competencia y que a 60°C es el proceso térmico el que predomina.

6
conclusiones

- 1.- Se ha adaptado y puesto a punto para la realización en cromatofolios de alúmina, la técnica de cromatografía en capa fina cuantitativa (45) que permite determinar la vitamina D₃ en presencia de sus productos de degradación utilizando cromatofolios de silicagel.
- 2.- La degradación sobre placas de silicagel y alúmina de la vitamina D₃, da los mismos productos de degradación, caracterizados por su situación cromatográfica y sus espectros UV.
- 3.- Se ha intentado extender a cromatofolios de celulosa dicha técnica cromatográfica cuantitativa, no habiéndose conseguido realizar una separación satisfactoria a pesar de haber ensayado veinte líquidos de desarrollo distintos.
- 4.- Se ha puesto de manifiesto que las degradaciones realizadas simultáneamente y bajo las mismas condiciones, dan resultados prácticamente iguales, aunque los ensayos se realicen sobre cromatofolios distintos. Sin embargo las degradaciones efectuadas por separado, aunque se realicen en igualdad de condiciones bajo control, presentan discrepancias de cierta importancia.

5.- Se plantea un tratamiento matemático de los datos obtenidos en los diferentes ensayos, que permite realizar una aproximación teórica a los valores experimentales, mediante una ecuación matemática basada en la superposición de varios procesos degradatorios de primer orden que afectan a distintas porciones de la sustancia depositada sobre el soporte.

Se plantea en la discusión el posible alcance -- teórico de este tratamiento.

6.- Se ha puesto de manifiesto que la luz difusa producida por una lámpara fluorescente de 40Wats. ejerce una notable influencia aceleradora del proceso de degradación, a temperatura ambiente, pero no ejerce influencia apreciable cuando la temperatura es de 60°C.

7.- Se ha puesto de manifiesto la notable influencia de la temperatura sobre la velocidad de los procesos de degradación.

8.- Se ha comprobado que sin la presencia del aire el proceso degradatorio se paraliza.

9.- Se ha puesto de manifiesto que sobre soportes de silicagel, la presión de oxígeno determina una fuerte ace

leración del proceso de degradación, existiendo cierta proporcionalidad entre la presión de oxígeno que se aplica y la velocidad específica de degradación-- de la parte activada (fracción que se degrada más rápidamente).

- 10.- Se ha visto que sobre soportes de alúmina el efecto de la presión de oxígeno es notablemente menos importante.

7 **bibliografía**

- (1) Korolkovas, Burckhalter. "Química farmacéutica"; Ed. Reverte S.A. (1978).
- (2) Ziegler K., Spath A., Schaaf E., Schumann W., Winnelmann - E., Ann.Chem., 551, 80, (1942).
- (3) Henbest H.B., Jones E.R.H., Bide A.E., Prevers R.W., Wil-- kinson P.A., Nature, 1946, 158, 169.
- (4) Berneisten S., Binovi L.J., Dorfmann L., Sax K.J., Subba-- row Y., J.Org.Chem., 14, 433, (1949)
- (5) Redel J., Gauthier B., Bull. Soc.Chim.France; 15, 607, ' -- (1948).
- (6) Steenbock H. and Bleck A., J.Biol.Chem., 1924, 61, 403.
- (7) Hess A. and Weinstock M., J.Biol.Chem., 1924, 62, 301.
- (8) L. Velluz y G. Amiard; C.R., 1949, 228, 692.
- (9) G.M. Sanders, Thesis, Leyden University, Leyden, The Neder lands, 1967.
- (10) Brockmann y Y. H.Chen, Hoppe-Seyler's, T.physiol.Chem., 241, 129 (1936).
- (11) C.H.Nield, J.Biol.Chem., 136, 73 (1940).
- (12) Strohecker y H. Pies, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz. - Ges. 294, 800 (1961).
- (13) R.Strohecker. "Análisis de vitaminas". Ed. Paz Montalvo - (1967).

- (14) Litter, "Farmacología". Ed. "El ateneo" (1978). ---
- (15) Ganong, "Fisiología médica". Ed. El manual moderno S.A. (1976).
- (16) K.S. Laider, "Chemical Kinetics", Macgraw Hill London (1965).
- (17) S.R.Byron, J.Pharm.Sci., 65,1 (1976).
- (18) J.T.Carstensen, J.Pharm.Sci., 63,1 (1974).
- (19) H.Morawetz. "Science", 152,705 (1966).
- (20) S.Roginski y E, Schultz, J. Phys. Chem., 138,21 --- (1928).
- (21) E.G.Prout, F.C.Tompkins, Trans Faraday Soc, 40,488- (1944).
- (22) J.T.Carstensen, Polhisiri, J.Pharm.Sci., 64,1,37 (1975).
- (23) S.Kornblum, B.J.Sciarrone, J.Pharm.Sci., 53,8,935-- (1964).
- (24) L.Lachman, C.Swartz, J.Cooper, J.Amer.Pharm. Ass.-- Sci., 49,213 (1960).
- (25) T.Urbanyi, C.Swartz, L.Lachman, J.Amer.Pharm. Ass.-- Sci., 49,163 (1960).
- (26) M.D.Cohen, B.S.Green, Chem. Brit., 4,90 (1973).
- (27) G.M.J.Schmidt, Pure. Appl. Chem., 27,647 (1971).

- (28) Stephen R. Byrn, *J. Pharm. Sci.*, 65, 16 (1976).
- (29) R. Moeller, "Química Orgánica". Ed. Interamericana-- (1968).
- (30) Douglas A. Skoog, Donald M. West; "Análisis instrumental". Ed. Interamericana (1975).
- (31) M. Donbrom, "Instrumental Methods in Analytical Chemistry" I, II, Pitman (1967).
- (32) Huber W., Ewing G.W., Kriger J., *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 609 (1945).
- (33) E. Cabré, Tesis doctoral pendiente de lectura.
- (34) K. Randerath; "Chromatografie sur couches minces".-- Ed. Gauthier Willas Paris (1970).
- (35) H. Janecke y I. Maas-Goebels; *Z. Analyt. Chem.*, 178, 161 (1960).
- (36) Ponchon G., Fellers F.K., *J. Chromatog.*, 35, 53 (1968).
- (37) Mermet-Bouvier R., *J. Chromatog.*, 59, 226 (1971).----
- (38) Kenjiro H., Kenzo I., *J. Pharm. Sci.*, 36, 444 (1967).
- (39) A. Domínguez Gil, R. Cañórniga, "Medicamentos" XXXIX,-- 292, 21, 34, (1972), XL. 293, 277-290, (1972).
- (40) R. Canela, Calzón, *Boll. Chim. Farm.*, CIV, 201, 205-- (1975).
- (41) F. Macioci, C. Fiotex, *Boll. Chim. Farm.*, CIV, 468, 477 (1975).

- (42) L.R. Sellier, V.Torre, Cienc. & Ind. Farm., IV, 5,-
146,153 (1972).
- (43) G.Pouchon,F.S. Faller, J. Chromatog, XXXV, 53,65 --
(1968).
- (44) Karel Macek, "Pharmaceutical applications of Thin--
Layer and paper Chromatography" Elsevier Publ; Corp.
Amsterdam, London, N.Y. (1972).
- (45) J. de Bolos, E. Cabré, R. Piera, V. Vilas; Cienc. &
Ind. Farm., vol.9, nº11 (1977).
- (46) C.Agustin, "Degradación de vitamina D₃ sobre sopor-
tes sólidos". Tesina 1979