

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Comparación del método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y el método de Cromatografía Líquida de Alta Velocidad (UHPLC) para la cuantificación de Capsaicina

Laura Patricia Quiñix Hernández



Química Farmacéutica

Guatemala, Noviembre de 2010

Índice

<u>Contenido</u>	<u>Pag.</u>
1. Resumen	4
2. Introducción	6
3. Antecedentes	8
3.1 Capsaicina	8
3.1.1 Propiedades Físicas y Químicas	9
3.1.2 Usos	10
3.1.2.1 Uso Gastronómico	10
3.1.2.2 Aditivos	10
3.1.2.3 Control de peso corporal	10
3.1.2.4 Uso Farmacológico	11
3.1.2.4.1 Antimutagénico Antitumoral	11
3.1.2.4.2 Analgésico	12
3.1.2.4.3 Prurito	13
3.1.2.4.4 Psoriasis	13
3.1.2.4.5 Trastornos de la micción	13
3.1.3 Propiedades Farmacológicas	14
3.1.3.1 Propiedades Farmacodinámicas	14
3.1.3.1 Propiedades Farmacocinéticas	15
3.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	15
3.2.1 Métodos de Filtración de Solventes en HPLC	16

	3
3.2.2 Métodos de Desgasificación de Solventes en HPLC	16
3.3 Cromatografía Líquida de Alta Velocidad (UPLC)	16
3.4 Estudios Realizados	17
4. Justificación	20
5. Objetivos	21
5.1 General	21
5.2 Específicos	21
6. Hipótesis	22
7. Materiales y Métodos	23
7.1 Universo y Muestra	23
7.2 Materiales	23
7.2.1 Físicos	23
7.2.1.1 Reactivos	23
7.2.1.2 Cristalería	23
7.2.1.3 Equipo	24
7.3 Métodos	24
7.3.1 Metodología de Muestreo	24
7.3.1.1 Recolección	24
7.3.1.2 Extracción de Muestra	25
7.3.2 Análisis de Muestras	25
7.3.3 Cuantificación	25
7.3.3.1 Curva de Calibración	26

7.3.3.2 Procedimiento por el Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	27
7.3.3.2.1 Condiciones Cromatográficas	27
7.3.3.3 Procedimiento por el Método de Cromatografía Líquida de Alta Velocidad (UPLC)	28
7.3.3.3.1 Condiciones Cromatográficas	28
7.4 Diseño de Investigación	29
7.4.1 Precisión	30
7.4.1.1 Repetibilidad	30
7.4.3 Exactitud	30
7.4.4 Prueba de Comparación de Métodos	30
8. Resultados	32
9. Discusión	40
10. Conclusiones	44
11. Recomendaciones	45
12. Referencias	46
13. Anexos	49

1. Resumen

En esta investigación se compararon dos métodos analíticos para la cuantificación de capsaicina. El método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y el método de cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC). Se realizó esta comparación evaluando las variables tiempo, costo, precisión, exactitud y concordancia entre los métodos analíticos expuestos.

El análisis se hizo en cremas que contienen capsaicina presentadas del listado de Medicamentos con registro sanitario del Laboratorio Nacional de Salud. Se determinó que existía únicamente una crema que contiene capsaicina con registro sanitario de venta en Guatemala por lo que se hizo el análisis a este medicamento. Dicha prueba se realizó en la unidad de Físicoquímico de Medicamentos lugar donde se encuentran los equipos y se realiza este tipo de análisis de manera rutinaria.

Se tomó por conveniencia 5 muestras de cremas que contenían capsaicina como principio activo. Se le realizaron tres repeticiones y se analizó mediante ambos métodos analíticos. Se realizó una curva de calibración con un estándar externo de capsaicina para determinar la repetibilidad del método. Las muestras se prepararon disolviéndose en metanol a una temperatura de 60°C para separar el principio activo de la matriz oleosa de la crema y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se utilizó un filtro de 45µm para eliminar impurezas y se colocó en viales, los cuales fueron identificados y tapados para su análisis. Se realizó el análisis en ambos métodos analíticos y se recolectaron los resultados por medio de tablas.

Se determinó entonces la precisión, exactitud, concordancia, costo y tiempo de los métodos utilizando como medidas estadísticas el coeficiente de variación, coeficiente de correlación, el coeficiente de concordancia y el test de student.

Entre los resultados obtenidos se encontró que el método de UPLC es 0.80% más exacto que el método de HPLC, debido a que es un porcentaje tan pequeño no presenta una diferencia significativa. Esta inferencia se hace únicamente con estándares de concentración conocida.

Se determinó de igual manera que el método de UPLC disminuye los gastos en un 55.56% en comparación con los gastos generados con el método de HPLC. Se observa que el UPLC disminuye el tiempo de detección en comparación con el HPLC; pero que le toma mayor tiempo estabilizar el equipo debido a las condiciones de análisis utilizadas.

2. Introducción

Debido al comercio internacional se ha incrementado la importación de diversos medicamentos innovadores al país. El Laboratorio Nacional de Salud es la entidad reguladora que se encarga de realizar los ensayos de verificación de la calidad para productos a la venta en Guatemala. Entre estos se encuentran las cremas de capsaicina, un producto nuevo en el mercado.

La capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) es una oleoresina que es el componente activo de los chiles, esta es la responsable de la sensación de ardor e incluso dolor en la mucosa oral al ser ingerida, ya que estimula los receptores de calor y dolor de la epidermis, provocando así una irrigación sanguínea más intensa. La capsaicina y otras sustancias relacionadas se denominan capsaicinoides y se producen como un metabolito secundario en diversas plantas del género *Capsicum*. La capsaicina se utiliza como principio activo de cremas para el tratamiento de artritis, neuropatía diabética, artrosis, psoriasis, neuralgia postherpética y dolores musculares.

La capsaicina se encuentra en diferentes formas farmacéuticas como cremas, pomadas, parches, etc. También es utilizada en el spray de pimienta, debido a que causa lagrimeo de ojos, dolor y pérdida temporal de la vista

Para realizar las pruebas de control de calidad de las cremas que contienen capsaicina se utilizan distintos métodos analíticos como es el espectrofotómetro UV-Visible y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En la actualidad la tecnología avanza de manera continua y se ha creando así la cromatografía líquida de alta velocidad conocida como UPLC. Ésta tiene la capacidad de alcanzar presiones de hasta el doble que la cromatografía líquida de alta resolución, haciendo así más rápido su análisis.

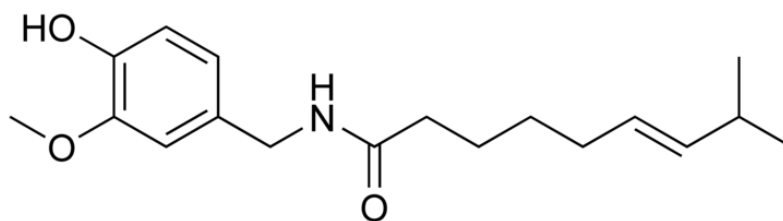
Siendo la verificación de la calidad de distintos productos una de las áreas en las cuales se enfoca el químico farmacéutico, es muy importante que se mantenga al día en cuanto al avance de la tecnología y a la elaboración y validación de nuevos métodos para dichos análisis.

Es por esto que se realizó una comparación entre el Cromatógrafo líquido de alta velocidad (UPLC), y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el análisis de cuantificación de la capsaicina. Se evaluaron las ventajas y desventajas en cuanto a tiempo, costo, precisión, exactitud y concordancia entre los métodos analíticos expuestos y comprobó que el análisis de cuantificación de capsaicina por medio de UPLC genera menos costos y disminuye el tiempo de análisis..

3. Antecedentes

3.1 Capsaicina

La capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) es una oleorresina que se encuentra en el mesocarpio y semillas de chiles de la especie *capsicums*. Ésta es la responsable de la sensación de ardor e incluso dolor en la mucosa oral al ser ingerida, ya que estimula los receptores de calor y dolor de la epidermis, provocando así una irrigación sanguínea más intensa. [1]



Molécula de Capsaicina

La Capsaicina purificada, diluida cien mil veces, sigue siendo tan activa que aún es capaz de producir ampollas en la lengua. Estimula las secreciones gástricas y, si se usa en exceso, ocasiona inflamación. Se sabe que esta molécula es capaz de actuar sobre fibras no mielinizadas delgadas, activando a ciertas subpoblaciones de neuronas sensoriales. [2]

La Capsaicina también posee cualidades descongestivas y, a concentraciones adecuadas, favorece en el cerebro la producción de endorfinas, que son moléculas que promueven la sensación de bienestar. [3]

La Capsaicina se encuentra en diferentes formas farmacéuticas como cremas, pomadas, parches, etc. También es utilizada en el spray de pimienta, debido a que causa lagrimeo de ojos, dolor y pérdida temporal de la vista. [4]

3.1.1 Propiedades Físicas y Químicas:

Su fórmula molecular es $C_{18}H_{27}NO$, está compuesta por un grupo de amidas ácidas, formados a partir de la vanillilamina y ácidos grasos de 8 a 13 átomos de carbono. Es un compuesto orgánico de nitrógeno de naturaleza lipídica frecuentemente clasificado, de forma errónea, como un alcaloide. La capsaicina es identificada por un número CAS¹ 404-86-4. El peso molecular de la capsaicina es de 305.40 g/mol. Se encuentra en forma cristalográfica como láminas rectangulares. Es una sustancia inodora con un punto de fusión de 65°C y un punto de ebullición entre 210-220°C. La presión de vapor a 25°C no es significativa. [1]

La absorción de la capsaicina en el rango de UV-Visible es de 227-281nm presentando una coloración rojo-naranja. Puede estar almacenada en forma estable durante años. [1]

La capsaicina es ligeramente soluble en agua, soluble en grasas, alcohol etílico, alcohol metílico, éter, benceno, cloroformo, acetona, tetracloruro de carbono, benceno, aceites y álcalis calientes. Es insoluble en agua fría. Al extraerla y someter a un proceso de cristalización se pueden obtener cinco compuestos capsaicinoides distintos, entre los cuales se encuentran: capsaicina en un 69%, dihidrocapsaicina en un 22%, y tres compuestos minoritarios que son la nordihidrocapsaicina en un 7%, la homocapsaicina en un 1% y la homodihidrocapsaicina en un 1%. De éstos la capsaicina y la dihidrocapsaicina son los responsables del 90% del sabor picante. [4]

¹ CAS: El registro CAS abarca sustancias identificadas por la literatura científica desde 1957 al presente con algunas clases principales hasta los inicios de los años 1900's. Cada sustancia en este registro se identifica por un Identificador Numérico Único llamado Número CAS de Registro.

3.1.2 Usos

3.1.2.1 Uso gastronómico

Debido a que la capsaicina se encuentra en los chiles, es utilizada como condimento en las comidas. En la antigüedad era ingrediente importante para los mayas en la preparación de cacao y de mole. Se consume en la actualidad en diversas formas: triturado, en conservas, frescos, fritos o asados. En México su consumo es muy alto debido a que es un ingrediente importante en todas las comidas tradicionales. [1]

3.1.2.2 Aditivos

Alrededor de 1990 se encontraron reportes en los medios de comunicación masiva, de la adición de Capsaicina a las pinturas utilizadas en los cascos de los botes y en las válvulas de los sistemas aguas municipales, para evitar el crecimiento de percebes y mejillones cebra. [5]

En España se exporta el pimentón procesado a nivel de oleorresina para usos industriales en la coloración de alimentos y cosméticos. Su materia prima no solamente es producida en sus tierras sino también importada de otros países, principalmente del Perú. [5]

3.1.2.3 Control del Peso Corporal

En los últimos años se ha intensificado la utilización de la capsaicina para controlar el peso corporal en las personas con problemas de obesidad. El chile en general, incrementa el gusto por los alimentos sin grasa. Además ayuda a quemar calorías. Se ha encontrado que 6 g de chile queman alrededor de 45 a 76

calorías extras. El chile actúa como un estimulante energético, haciendo que las glándulas adrenales incrementen ligeramente la producción de cortisona. [5]

3.1.2.4 Gas pimienta

El gas pimienta u oleoresina de capsaicina (OC) es un agente lacrimógeno² que se utiliza como un agente de autodefensa, así como también es considerada por algunos como una herramienta de aplicación de la ley para someter y obtener el control de los individuos considerados indisciplinados. Cuando la piel humana está expuesta a este material, se produce eritema y dolor que puede persistir durante minutos u horas. El gas pimienta se utiliza también para defensa contra perros u osos. [4,5]

3.1.2.4 Uso Farmacológico

3.1.2.4.1 Antimutagénico y antitumoral.

Numerosas investigaciones han llegado a determinar el potencial mutagénico y la actividad carcinogénica que presenta la capsaicina y los pimientos picantes, pero estos resultados son muy discordantes, presentando efectos duales. [6]

Hay estudios que demuestran que la administración de capsaicina en la dieta de ratones albinos provoca la aparición de tumores duodenales. Otros estudios sugieren que tanto la capsaicina como los extractos de los pimientos picantes actúan como agentes carcinogénicos y promotores de tumores.[7]

² Agente lacrimógeno: compuesto químico que irrita los ojos hasta el punto de causar lágrimas, dolor e incluso ceguera temporal.

Por el contrario, en los últimos años, están apareciendo un gran número de estudios que apuntan al potencial quimiopreventivo que presenta la capsaicina. Se ha comprobado que los extractos de pimientos picantes, o los capsaicinoides aislados bloquean los procesos de carcinogénesis y mutagénesis. [7]

Se sugiere que la capsaicina ejerce un efecto quimiopreventivo a través de la modulación del metabolismo de muchos compuestos cancerígenos y mutagénicos y sus interacciones con el ADN. Por ejemplo, los capsaicinoides protegen poderosamente la mutagénesis bacteriana producida por la aflatoxina B1. También se observa que el pretratamiento tópico con capsaicina en ratones atenúa el carcinoma de piel inducido por el vinil carbamato. [8]

3.1.2.4.2 Analgésico

La capsaicina se utiliza como analgésico por vía tópica en procesos dolorosos como la neuralgia postherpética, después de que las lesiones hayan sanado, así como para la neuropatía diabética, la osteoartritis y la artritis reumatoide. Se aplica habitualmente con moderación 3 ó 4 veces al día en forma de crema al 0,025 o 0,075%. [9]

La capsaicina inactiva neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal y de los ganglios trigeminales encargados de transmitir el dolor. Debido a esto se utiliza para el tratamiento de afecciones como artritis reumatoidea, diversos tipos de neuralgia y neuropatía diabética. También se ha demostrado que la capsaicina modula la liberación de

neurotransmisores como la sustancia P², somatostatina y el péptido relacionado al gen de la calcitonina. [10]

3.1.2.4.3 Prurito

La sustancia P posiblemente esté implicada en la transmisión de la sensación de prurito y la capsaicina se ha administrado para aliviar dicha sensación que suele acompañar a diferentes enfermedades y a la hemodiálisis. También se ha utilizado para proporcionar un alivio del prurito inducido por hidroxietil almidón y por el prurito y el dolor asociado a la terapia con PUVA. La terapia PUVA es fotodinámica y se usa para tratar afecciones de la piel como psoriasis, vitiligo y nódulos en la piel a causa del linfoma de células T cutáneo. [3]

3.1.2.4.4 Psoriasis

Dada la implicación de la sustancia P en la fisiopatología de diversos procesos inflamatorios dermatológicos, la capsaicina se ha administrado en numerosos trastornos cutáneos como la psoriasis. [11]

3.1.2.4.5 Trastornos de la micción

Se ha ensayado la capsaicina por vía intravesical en los trastornos dolorosos de la vejiga y para tratar la hiperreflexia del músculo detrusor de la vejiga. Los resultados han sido variables y los efectos sensoriales característicos de la capsaicina hacen que los

² **Sustancia P:** neurotransmisor del dolor presente en las fibras C. Localizado en las neuronas de la raíz dorsal de la médula espinal es transportada hacia la periferia y liberada. Intensifica el dolor por mecanismos que involucran inflamación, liberación de prostaglandinas, liberación de enzimas lisosomales, estimula citocinas y activa linfocitos.

estudios ciegos sean imposibles, pero se han descrito beneficios en algunos pacientes. La instilación³ en el uréter también se ha ensayado en el tratamiento del síndrome del dolor lumbar/hematuria. [12][13]

3.1.3 Propiedades Farmacológicas

3.1.3.1 Propiedades farmacodinámicas

El efecto de la capsaicina tiene lugar, de forma selectiva y reversible, a nivel de las fibras tipo C, las neuronas sensitivas nociceptivas no mielinizadas de pequeño calibre, responsables de la transmisión de impulsos dolorosos y pruríticos desde la periferia hasta el sistema nervioso central. [10]

La acción analgésica de la capsaicina radica en su capacidad para inhibir la liberación, en las terminaciones centrales y periféricas de las fibras tipo C, del neuropéptido sustancia P, principal neurotransmisor de los estímulos dolorosos. Como consecuencia, la capsaicina disminuye la actividad de las neuronas sensitivas y bloquea la transmisión del dolor. [14]

Esta acción de la capsaicina se realiza mediante un proceso secuencial de depleción o vaciado inicial y posterior prevención de la reacumulación de sustancia P. Con las aplicaciones iniciales, la capsaicina entra en contacto con la neurona sensitiva y la estimula de forma selectiva acentuando la liberación y vaciado de sus reservas de sustancia P. La aplicación continuada previene la reacumulación del neurotransmisor, disminuyendo primero su transporte axonal y luego su síntesis. Es entonces cuando se inicia la segunda fase del mecanismo de acción de la capsaicina,

³ **Instilación:** Método que se usa en medicina para incorporar lentamente un líquido en el cuerpo o para ponerlo gota a gota.

en la que la neurona se desensibiliza a los estímulos dolorosos. [11]

El efecto de la capsaicina se limita al bloqueo de la transmisión del dolor y del prurito, no afectando a otros tipos de sensibilidades transmitidas por fibras sensitivas mielinizadas de gran calibre (tacto, presión, frío, vibración). [11]

3.1.3.2 Propiedades farmacocinéticas

Los parámetros farmacocinéticos de la capsaicina se han valorado en animales mediante administración por vía oral, intraperitoneal, endovenosa y subcutánea. La capsaicina puede difundir a través de la piel de rata. Se ha descrito una rápida biotransformación que da lugar a tres metabolitos y a la formación de conjugados. La capsaicina circulante se fija a la seroalbúmina. [14]

3.2 Cromatografía Líquida de Alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución o HPLC por sus siglas en inglés (*High performance liquid chromatography*) es un tipo de cromatografía en columna utilizada para separar componentes de una mezcla basándose en interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

La cromatografía líquida de alta resolución emplea una fase móvil líquida y una fase estacionaria finamente dividida. Para lograr velocidades de flujo satisfactorias, el líquido debe someterse a una presión de varios cientos (o más) de libras por pulgada cuadrada. Ésta se puede clasificar según la naturaleza de la fase estacionaria en:

- ♣ Cromatografía de partición o líquido-líquido

- ♣ Cromatografía de adsorción o líquido-sólido
- ♣ Cromatografía de intercambio iónico
- ♣ Cromatografía de exclusión molecular
- ♣ Cromatografía de afinidad. [15]

3.2.1 Métodos de Filtración de Solventes en HPLC

Existen tres métodos para la filtración previa de los Solventes en HPLC:

- ♣ Filtro a la Entrada del Solvente
- ♣ Filtración al Vacío
- ♣ Filtración en Línea [16]

3.2.2 Métodos de Desgasificación de Solventes en HPLC

Existen cuatro métodos comunes usados para desgasificar solventes en HPLC previos a su uso:

- ♣ Sonificación
- ♣ Burbujear Helio
- ♣ Desgasificación Electrónica en la Línea del Flujo
- ♣ Desgasificación al Vacío en Línea [15]

3.3 Cromatografía Líquida de Alta velocidad (UPLC)

La cromatografía líquida de Alta velocidad o UPLC por sus siglas en inglés (*ultra performance liquid chromatography*) es una nueva categoría de ciencia de separación que aprovecha principios bien establecidos de cromatografía líquida usando partículas porosas de tamaño inferior a los 2 μm . [17]

Estas partículas funcionan a velocidades lineales elevadas de fase móvil para producir separaciones rápidas con sensibilidad y resolución mayores. Debido a esto la UPLC permite reducir notablemente los tiempos de análisis, a la par que satisface los criterios de aceptación del ensayo basándose en el número de platos, la resolución y la retención del analito. [18]

La cromatografía líquida de alta velocidad opera a una presión que llega hasta las 15,000 libras por pulgada cuadrada. Es un equipo con alta sensibilidad, cuyas columnas están elaboradas de materiales con partículas de hasta 1.7 μ m que ayudan a una mejor separación de compuestos inyectados para su análisis. [18]

3.4 Estudios Realizados

No se han encontrado estudios referentes propiamente al análisis cuantitativo de la capsaicina, sin embargo se encontró un trabajo en el que se medía el nivel de pungencia:

- ♣ German Peralta en el año 2007 en su tesis ad gradum titulada “Determinación del nivel de pungencia en unidades Scoville para *Capsicum Annum* Var. *Aviculare* procedente de regiones productoras de Guatemala” concluye que la separación y la cuantificación de la capsaicina por cromatografía líquida de alta resolución es bastante reproducible y robusta para los extractos de *Capsium Nahum* var. *Aviculare*.

En cuanto a comparación de métodos analíticos se encontraron los siguientes trabajos:

- ♣ Marilyn del Rosario Valdéz Pérez en el año 2006 en su tesis ad gradum titulada como “Comparación del Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y el Método de titulación potenciométrica Ácido- Base para la cuantificación de alendronato de sodio utilizados en el Laboratorio Nacional de Salud” concluye que

los métodos de titulación potenciométrica ácido-base son confiables y sustituibles con el método de HPLC.

- ♣ Mata, en el año de 2003 realizó el estudio “comparación del método espectrofotométrico de fosfomolibdovanadato y el método de titulación potenciométrica ácido base para la cuantificación de fosfatos en detergentes en polvo”. Donde se comparan y demuestran las ventajas que presenta el uno sobre el otro con respecto a precisión, confiabilidad, reproductibilidad, ahorro de tiempo y costos.
- ♣ Córdón, 1995, realizó el estudio “Comparación de dos métodos alternativos para la cuantificación de sodio y potasio en sales de rehidratación oral, fabricadas en el laboratorio de producción de medicamentos (LAPROMED) de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia”. En este trabajo se encontró que para la cuantificación de sodio y potasio la metodología por fotometría de llama y el electrodo selectivo de iones son técnicas equivalentes.
- ♣ Vargas, en el año 1994 realizó el “Estudio Comparativo de dos métodos (método por cromatografía de gas (CG) y Método por electrodo selectivo de flúor) para determinar flúor en crema dental”. Este trabajo comparó dos métodos de análisis para determinar flúor en cremas dentales por CG (métodos propuestos por la Comisión Guatemalteca de Normas) y el método de electrodo selectivo de flúor. Se concluye que el método de gas es más preciso que el otro, pero presentando ambos exactitud aceptable; además calculó el costo de cada método en lo que a tiempo y enseres se refiere.

Se encontraron los siguientes estudios realizados en la Universidad de San Carlos de Guatemala:

- ♣ Planta Piloto del Centro de Investigación de Ingeniería Extracciones de distintos géneros de capsicum y extractos en forma de oleorresinas. Análisis bromatológicos en la Facultad de Agronomía enfocados en el análisis proximal. Esta investiga en conteo de nitrógeno, proteínas y cenizas.

En México se han encontrado los siguientes estudios:

- ♣ 2002 INIFAP, CIRCE, Campo de experimental Bajío Unidad de Biotecnología y Departamento Tecnológico Celaya, México. Separación y Cuantificación de compuestos capsaicinoides con diferente calidad Pungente utilizando el método de Cromatografía líquida de alta resolución.

4. Justificación

Debido a la aprobación del tratado de libre comercio en el país se ha incrementado la importación de productos que contienen capsaicina. Es por esto que el Laboratorio Nacional de Salud se ve obligado a llevar a cabo procedimientos rápidos y robustos para la cuantificación del principio activo y para velar por el cumplimiento de las normas creadas por el código de salud.

En la actualidad existen diversos métodos analíticos para la determinación de capsaicina en cremas. El más utilizado es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sin embargo el avance de la tecnología ha modificado este equipo y creado la cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC). Debido a que los análisis de control de calidad son responsabilidad del químico farmacéutico, es importante que éste se mantenga actualizado con los procedimientos y el instrumental de vanguardia.

Es por esto que se pretende apoyar al Laboratorio Nacional de Salud realizando un análisis de cuantificación de la capsaicina en el Cromatógrafo líquido de alta velocidad (UPLC), y crear un precedente sobre su uso.

Se realizó entonces una comparación de los resultados obtenidos con la cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con el propósito de evaluar las ventajas y desventajas en cuanto a tiempo, costo, precisión, exactitud y concordancia entre los métodos analíticos expuestos y comprobar de esta manera si ambos métodos son intercambiables entre sí.

5. Objetivos

5.1 General:

Comparar el método de cromatografía líquida de alta resolución y el método de cromatografía líquida de alta velocidad en el análisis cuantitativo de capsaicina en cuanto a tiempo, costos, precisión y exactitud.

5.2 Específicos:

- 5.2.1 Establecer el tiempo de duración, costos, precisión y exactitud del método de análisis cuantitativo de capsaicina por HPLC.
- 5.2.2 Establecer el tiempo de duración, costos, precisión y exactitud análisis cuantitativo de capsaicina por UPLC.
- 5.2.3 Determinar cuál es el método más conveniente en cuanto a tiempo de análisis, costos, precisión y exactitud.

6. Hipótesis

El análisis cuantitativo de Capsaicina por el método de cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC) reduce costos de operación, reduce tiempo empleado en análisis, es preciso, exacto en los resultados, por lo que genera resultados confiables como los del método de cromatografía líquida de alta resolución.

7. Materiales y Métodos

7.1 Universo y Muestra:

Universo: Cremas de capsaicina presentadas del listado de Medicamentos con registro sanitario del Laboratorio Nacional de Salud, con una concentración de 0.025%.

Muestra: Alícuotas representativas del universo, una réplica tomada de cinco cremas distintas. Realizando tres mediciones por cada método de cada crema, obteniendo entonces 15 mediciones diferentes.

7.2 Materiales:

7.2.1 Físicos

7.2.1.1 Reactivos

- ♣ Metanol grado HPLC
- ♣ Agua grado HPLC
- ♣ Acetronitrilo grado HPLC
- ♣ Buffer acetato de sodio trihidratado
- ♣ Capsaicina Estándar BioChemika

7.2.1.2 Cristalería

- ♣ Probeta
- ♣ Embudo
- ♣ Balones aforados de 25mL.
- ♣ Balones aforados de 10mL
- ♣ Beacker de 100mL
- ♣ Beacker de 250mL
- ♣ Matraz de Separación

- ♣ Pipetas volumétricas de 1, 2mL
- ♣ Viales para HPLC y UPLC
- ♣ Kitazatos
- ♣ Varilla de Agitación

7.2.1.3 Equipo

- ♣ Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Agilent 1200
- ♣ Cromatógrafo líquido de alta velocidad (UPLC) Hitachi
- ♣ Bomba de extracción
- ♣ Balanza analítica
- ♣ Papel filtro 45 μ .
- ♣ Papel Filtro Acetonitrilo HPLC
- ♣ Estufa
- ♣ Agitador magnético
- ♣ Automuestreador HPLC
- ♣ Detector de longitud de onda variable
- ♣ Columna C18 3.9mm ID x15 cm de longitud para HPLC
- ♣ Columna LaChromUltra C18 2 micras end-capped 2mm ID x 50 mmL para UPLC
- ♣ Automuestreador UPLC
- ♣ Baño de Ultrasonido
- ♣ Guantes
- ♣ Mascarilla

7.3 Métodos:

7.3.1 Metodología de muestreo:

7.3.1.1 Recolección:

Por conveniencia 5 muestras distintas de cremas que contienen capsaicina escogidas al azar. Las cremas a utilizar se encuentran

presentes en el listado de Medicamentos con registro sanitario del Laboratorio Nacional de Salud.

7.3.1.2 Extracción de la Muestra:

Pesar 200 mg de crema que contenga capsaicina, solubilizar en un beacker de 50 mL con 25 mL de metanol al 95% grado HPLC. Colocar en estufa para disolver a temperatura de 60°C. Dejar enfriar y filtrar con papel Whatman No. 0.45µ. Se obtiene entonces una concentración final de 0.002 mg/mL. Realizar el procedimiento a las 5 cremas a utilizar como muestra. [20]

MANEJO DE LA CAPSAICINA- manejar con cuidado la capsaicina. Evitar la inhalación de partículas de esta sustancia y su contacto con cualquier parte del cuerpo. Utilizar la indumentaria de protección personal necesaria para evitar el contacto. [21]

7.3.2 Análisis de Muestras:

De cada muestra tomar 3 réplicas, dando un total de 15 réplicas. Cuantificar por ambos métodos analíticos, por medio de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución y por medio de la Cromatografía Líquida de Alta Velocidad.

7.3.3 Cuantificación

Preparar las siguientes soluciones para la cuantificación.

- a) **Solución Stock:** Disolver 25.6 mg de estándar de Capsaicina Bio Chemika \geq 97.0% en metanol grado HPLC para obtener una solución con una concentración de 1.024mg/mL.

- b) **Buffer:** Pesar 400mg de acetato de sodio trihidratado en un balón de 500mL, disolver y aforar con agua grado HPLC.
- c) **Fase móvil:** Medir 175mL de solución Buffer, 200mL de metanol y 200mL de acetonitrilo. Mezclar y llevar a pH 4.0 +/- 0.1 con ácido acético. Medir 900mL de la solución y agregar 100mL de agua grado HPLC. Filtrar y desgasificar en sonicador ultrasónico. [20]

Ver: MANEJO DE LA CAPSAICINA PÁGINA 22.

7.3.3.1. Curva de Calibración

- a) **Estándares:** A partir de la solución Stock realizar las diluciones pertinentes para obtener soluciones más diluidas, según la siguiente tabla:

Tabla No. 1 Diluciones Estándares

	Volumen (mL)	Concentración Capsaicina (ppm)
Estándar 1	1/10	0.010
Estándar 2	2/10	0.020
Estándar 3	3/10	0.030
Estándar 4	4/10	0.040
Estándar 5	5/10	0.050

Fuente: [20]

Inyectar 100 µL de cada uno de los estándares para realizar así una correlación de mínimos cuadrados entre la concentración de Capsaicina y su respectiva área de pico presente en el

cromatograma y obtener así una referencia para la medición de las muestras a cuantificar.

7.3.3.2 Procedimiento por el Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

7.3.3.2.1 Condiciones Cromatográficas

- a) Fase estacionaria: Columna C18 3.9mm ID x15 cm de longitud para HPLC
- b) Temperatura de la columna: 15°C
- c) Longitud de onda: 280nm
- d) Volumen de inyección: 100µL.
- e) Flujo: 1mL/Min
- f) Fase móvil: 175mL buffer, 200mL metanol, 200mL acetonitrilo. Mezclar con agua grado HPLC (90:10)

Dejar enfriar las muestras extraídas a temperatura ambiente. Filtrar las soluciones con un filtro de poro No. 0.45µm. Colocar las soluciones en viales tapados y etiquetados.

Inyectar fase móvil registrar en cromatograma los picos producidos por la misma. Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 100µL) de la solución stock de capsaicina para realizar la curva de calibración, luego inyectar las muestras en el cromatógrafo, registrar los cromatogramas durante un período de tiempo igual al doble del tiempo de retención de la capsaicina y medir las áreas de las respuestas correspondientes a todos los picos.

Calcular el porcentaje de capsaicina en la porción de capsaicina tomada, por la fórmula

$$25000 (C / W) (r_v / r_s)$$

Donde C es la concentración, en miligramos por mililitros del estándar de capsaicina Bio Chemika \geq 97.0% en la solución estándar de capsaicina; W es el peso, en mg, de la porción de capsaicina utilizada para preparar la solución de prueba y r_u y r_s son las respuestas correspondientes a los picos de capsaicina obtenidos a partir de la solución prueba y de la solución estándar de capsaicina respectivamente. [19][23]

Ver: MANEJO DE LA CAPSAICINA PÁGINA 22.

7.3.3.3 Procedimiento por el Método de Cromatografía Líquida de Alta Velocidad (UPLC)

7.3.3.3.1 Condiciones Cromatográficas

- g) Fase estacionaria: Columna C18 para UPLC
- h) Temperatura de la columna: 15°C
- i) Longitud de onda: 280nm
- j) Volumen de inyección: 5 μ L.
- k) Flujo: 0.5mL/Min
- l) Fase móvil: 175mL buffer, 200mL metanol, 200mL acetonitrilo. Mezclar con agua grado HPLC (90:10)

Dejar enfriar las muestras extraídas a temperatura ambiente Filtrar las soluciones con un filtro de poro No. 0.45 μ m. Colocar las soluciones en viales tapados y etiquetados.

Inyectar fase móvil registrar en cromatograma los picos producidos por la misma. Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 100µL) de la solución stock de capsaicina para realizar la curva de calibración, luego inyectar las muestras en el cromatógrafo, registrar los cromatogramas durante un período de tiempo igual al doble del tiempo de retención de la capsaicina y medir las áreas de las respuestas correspondientes a todos los picos.

Calcular el porcentaje de capsaicina en la porción de capsaicina tomada, por la fórmula

$$25000 (C / W) (r_v / r_s)$$

Donde C es la concentración, en miligramos por mililitros del estándar de capsaicina Bio Chemika ≥ 97.0% en la solución estándar de capsaicina; W es el peso, en mg, de la porción de capsaicina utilizada para preparar la solución de prueba y r_u y r_s son las respuestas correspondientes a los picos de capsaicina obtenidos a partir de la solución prueba y de la solución estándar de capsaicina respectivamente. [19][23]

Ver: MANEJO DE LA CAPSAICINA PÁGINA 22.

7.4 Diseño de la Investigación

La investigación es un diseño pareado en el cual a una misma muestra se le realizarán dos mediciones una por cada método analítico.

7.4.1 Precisión:

Se mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos al aplicar los métodos analíticos a una muestra de concentración conocida estableciéndola en base a la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados. [23]

7.4.1.1 Repetibilidad:

Se determina el grado de variación al aplicar cada método por el mismo analista. Analizando la muestra diez veces, se calcula entonces la media, desviación estándar y coeficiente de variación. [23]

7.4.3 Exactitud:

Se realiza una curva de calibración incluyendo cinco concentraciones diferentes utilizando como concentración estándar la utilizada para la determinación de repetibilidad en la prueba de precisión según sea el método analítico. Se determina por el grado de concordancia entre el valor experimental obtenido por el método instrumental y el valor teórico. Los resultados se analizarán por medio del porcentaje de recuperación de las muestras por medio del test de Student para determinar la existencia de diferencias significativas. [23]

7.4.4 Prueba de comparación de métodos:

Para la comparación de métodos se realiza como prueba estadística la prueba de test de Student pareada. Se realizarán 5 muestras por conveniencia de las cuales se realizarán 3 réplicas de cada muestra por cada método. Dando un total de 15 mediciones.

Evaluación de métodos por medio del coeficiente de correlación de concordancia (r_c), midiendo concordancia entre ellos. Se tomará >0.75

como resultado positivo para la comparación de métodos y <0.75 negativo para la comparación. El coeficiente de correlación de concordancia (rc) se da por la siguiente fórmula:

$$rc = \frac{S_A^2 + S_B^2 - (S_{A-B})^2}{S_A^2 + S_B^2 - (X_A - X_B)^2}$$

Donde:

S_A = desviación estándar de los resultados obtenidos por HPLC

S_B = desviación estándar de los resultados obtenidos por UPLC.

X_A = promedio de los resultados obtenidos por HPLC

X_B = promedio de los resultados obtenidos por UPLC. [23]

Los Resultados obtenidos son comparados con los datos obtenidos de la siguiente tabla:

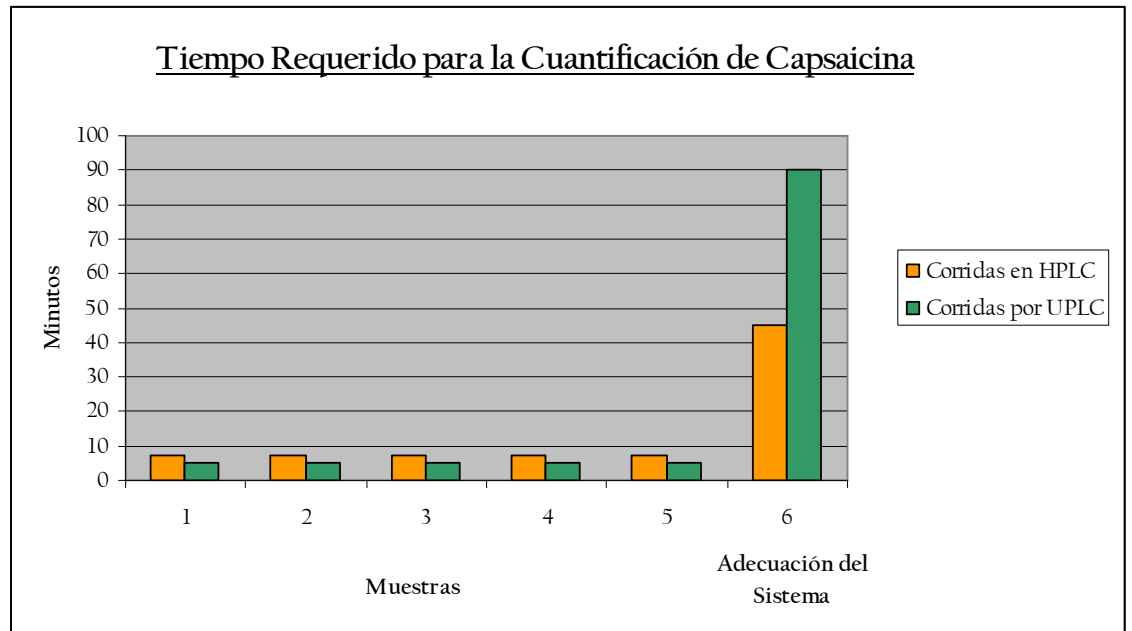
Valor del CCI	Fuerza de la concordancia
> 0.90	Muy buena
0.71 – 0.90	Buena
0.51 – 0.70	Moderada
0.31 – 0.50	Mediocre
< 0.30	Mala o nula

[23]

8. Resultados

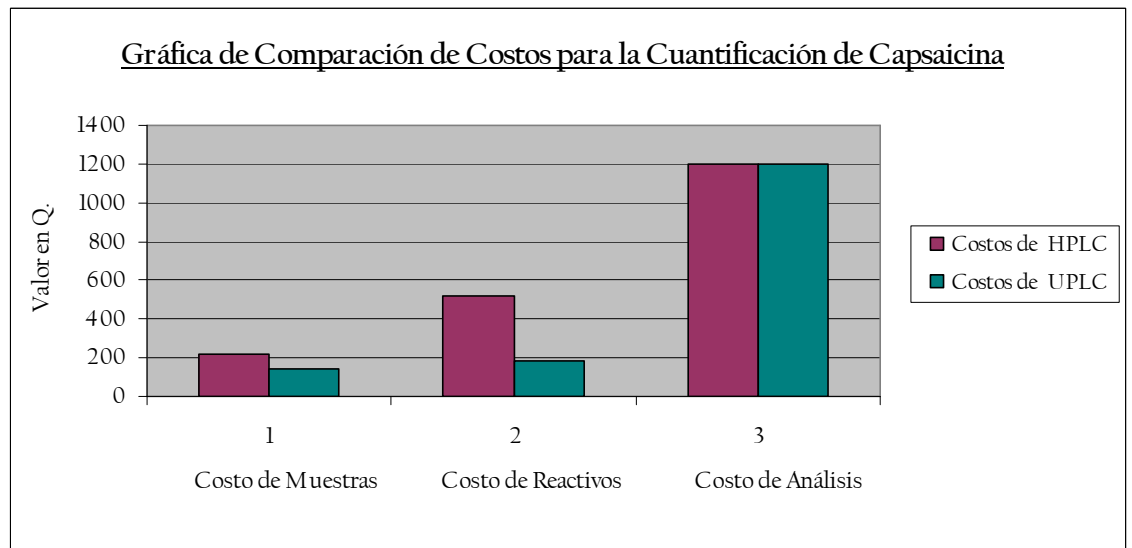
8.1. Tiempo

8.1.1 Gráfica de comparación de tiempo requerido para la cuantificación de capsaicina.



8.2. Costos

8.2.1 Gráfica de comparación de costos



8.3. Exactitud

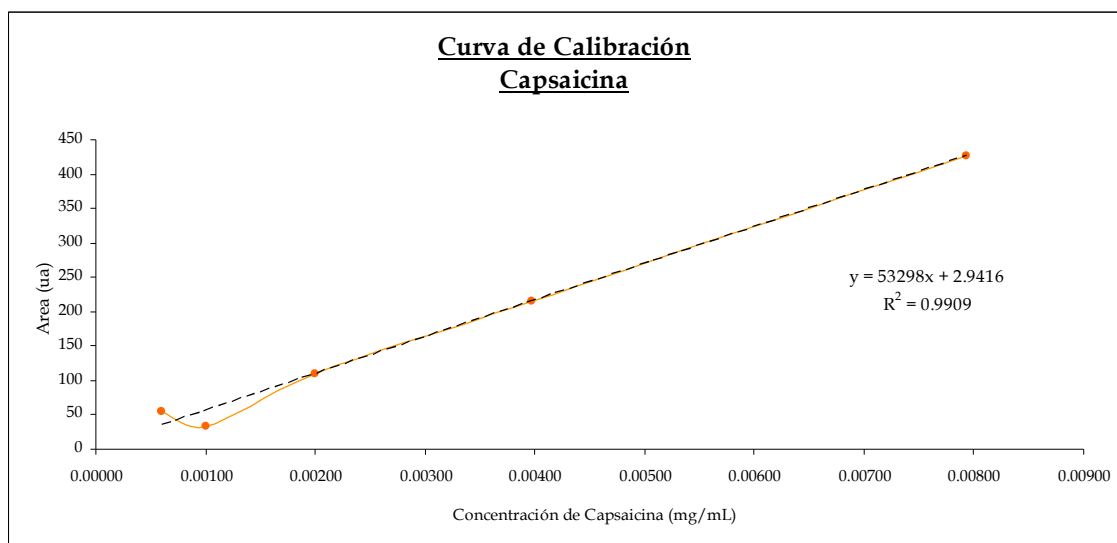
8.3.1. Tabla Curva de calibración del análisis del estándar de la capsaicina por método de HPLC

Estándar	Concentración (mg/mL)	Área
Estándar 1	0.00794	426.744
Estándar 2	0.00397	215.051
Estándar 3	0.0020	110.164
Estándar 4	0.0010	33.514
Estándar 5	0.0006	55.551

Valor $r^2 = 0.9909$

Fuente Experimental

8.3.1.1. Gráfica de Curva de Calibración



Fuente Experimental

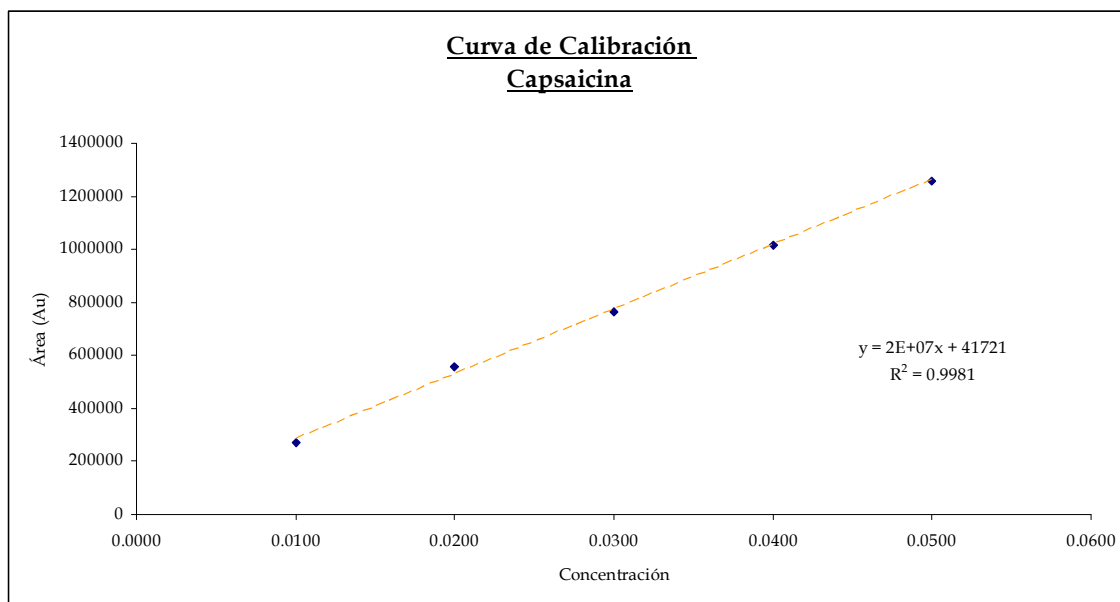
8.3.2. Tabla curva de calibración del análisis del estándar de la capsaicina por método de UPLC

Estándar	Concentración (mg/mL)	Área
Estándar 1	0.0100	269288.6667
Estándar 2	0.0200	557311.333
Estándar 3	0.0300	762818.667
Estándar 4	0.0400	1016789.667
Estándar 5	0.0500	1258124.667

Valor $r^2 = 0.9981$

Fuente Experimental

8.3.2.1. Gráfica de Curva de Calibración



Fuente Experimental

8.4. Comparación de Métodos

8.4.1 Resultados obtenidos del análisis del coeficiente de correlación intraclase.

Al realizar el análisis del coeficiente de correlación intraclase se encontró que el valor absoluto del mismo fue de 0.108 con un intervalo de confianza del 95%. Se determina que este valor le da una fuerza de concordancia nula, ya que su valor es menor a 0.30. Este valor se calculó en base a las medidas promedio de los resultados de ambos métodos analíticos.⁴

8.4.2. Resultados del análisis del test de Student

Al realizar el análisis del test de Student se obtuvo un valor T para un estudio de dos colas que fue el analizado en este caso de 0.03098769. Por lo que se descarta la hipótesis nula que dice que ambos métodos analíticos son iguales.⁵

⁴ Ver tabla de análisis estadístico en anexos.

⁵ Ver tabla de análisis estadístico en anexos.

8.5 Precisión

8.5.1 Repetibilidad

8.5.1.1 Tabla de resultados obtenidos por el método de HPLC

Mx	Réplica	Área	Área Promedio	Peso de la muestra (g)	Porcentaje (%)
M1	1	166.389	166.9513	2.0043	153.44
	2	166.965			
	3	167.5			
M2	1	171.93	172.964	0.2070	154.08
	2	171.945			
	3	1715.7			
M3	1	171.529	171.953	0.2037	155.66
	2	173.847			
	3	171.87			
M4	1	172.84	172.643	0.2057	155.08
	2	173.218			
	3	171.87			
M5	1	171.026	170.542	0.2010	156.44
	2	170.254			
	3	170.347			

Fuente Experimental

8.5.1.1.1 Resultados del análisis estadístico obtenidos con el método de HPLC

El promedio del porcentaje de capsaicina encontrado en las cremas fue de 154.9458442. Se calcula entonces la desviación estándar dando un

valor de 1.2023255 y el coeficiente de variación que da un valor de 1.4455866 determinando así una variación entre resultados pequeña.⁶

8.5.1.2 Tabla de resultados obtenidos por el método de UPLC

Mx	Réplica	Área	Área Promedio	Peso de la muestra (g)	Porcentaje (%)
M1	1	636888	641205.67	2.0100	149.12
	2	648489			
	3	638240			
M2	1	549646	545041.67	2.0081	125.32
	2	5442245			
	3	543234			
M3	1	314740	314799.33	2.0070	68.03
	2	319989			
	3	309669			
M4	1	267744	269704.33	2.0072	56.79
	2	268469			
	3	272900			
M5	1	316971	313117.67	2.0078	68.33
	2	314640			
	3	317042			

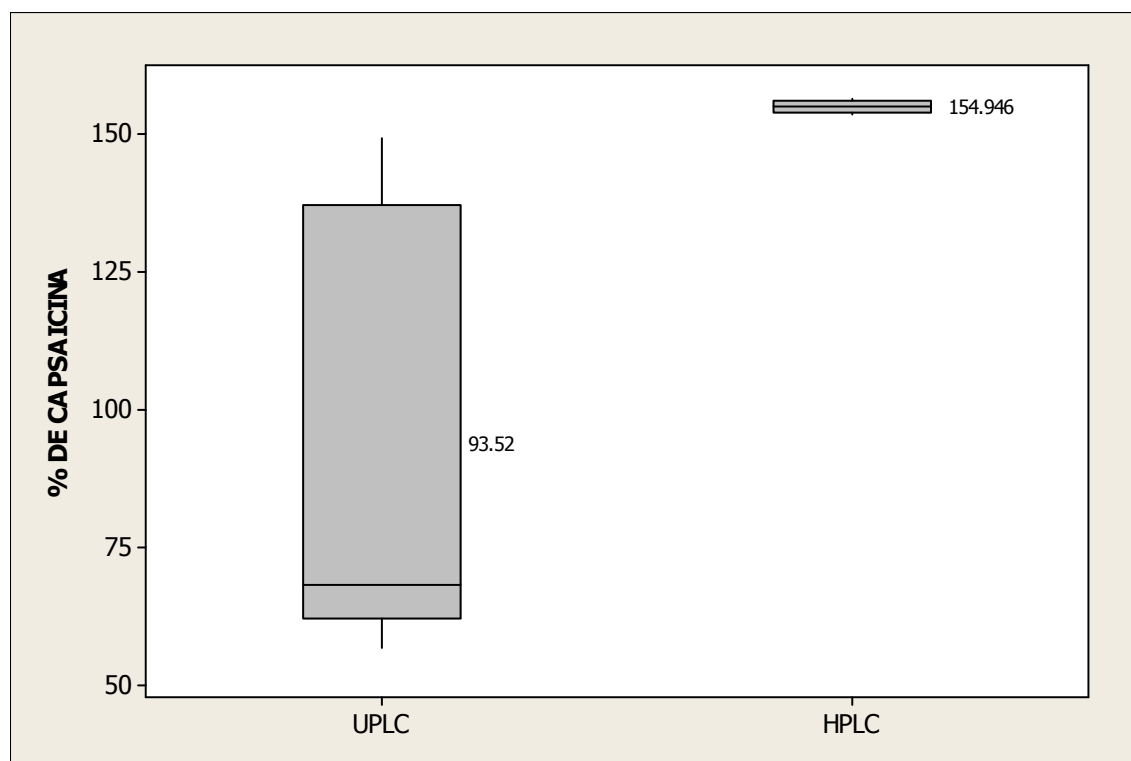
Fuente Experimental

⁶ Ver tabla de análisis estadístico en anexos.

8.5.1.2.1 Tabla con análisis de estadística descriptiva de resultados obtenidos con el método de UPLC

El promedio del porcentaje de capsaicina encontrado en las cremas fue de 93.52073517. Se calcula entonces la desviación estándar dando un valor de 41.03790872 y el coeficiente de variación que da un valor de 1684.109952 determinando así una variación entre resultados muy alta.

8.5.1.3 Gráfica de Turkey para comparar la variabilidad de métodos



Fuente Experimental

9. Discusión

En esta investigación se compararon los métodos analíticos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC). Ambos son utilizados para la determinación y cuantificación de compuestos químicos. Se compararon ambos métodos para la cuantificación de capsaicina en cremas específicamente. Se evaluó entonces la precisión, exactitud, concordancia, tiempo y costo de ambos métodos.

El tratamiento de la muestra fue llevada a cabo de igual manera para su análisis por ambos métodos analíticos, y no mostró ningún efecto sobre la concordancia, costo o tiempo del análisis. Con los resultados obtenidos y presentados en las tablas anteriores se evaluaron los siguientes puntos.

La precisión de ambos métodos se determinó de acuerdo a la repetibilidad. Se realizaron tres réplicas de cada muestra, analizados mediante el uso del coeficiente de varianza como método estadístico. Éste fue el resultado del análisis de ambos métodos analíticos a una misma muestra homogénea. Se realizó entonces en capsaicina en su forma farmacéutica, en este caso en crema para obtener así un ejemplo inicial de los resultados obtenidos al cuantificar la capsaicina cuando se encuentra dentro de una fase oleosa y formulada junto con otros excipientes. Al analizar los resultados obtenidos en la investigación se observa que el coeficiente de variación del método de HPLC es de 1.4455, mientras que el coeficiente de variación del método de UPLC es de 1684.10. Según la teoría, para que un coeficiente de variación sea aceptable, su valor debe ser menor al 2%. Por lo tanto el método de HPLC cumple mientras que el de UPLC, utilizando la misma metodología, aporta un alto porcentaje de variación; lo cual puede observarse en los resultados que tienen un amplio rango que van desde el 56.79 hasta un 149.12% de capsaicina presente en la crema, mientras que los resultados obtenidos por medio del HPLC muestran un rango menor que va desde 153.44 hasta un 156.44% de capsaicina presente en la crema, es de importancia hacer notar que la muestra analizada por HPLC y UPLC era la misma, pero el resultado fue muy disperso.

Al interpretar los resultados se determinó que el método de HPLC es más preciso que el método de UPLC. Sin embargo se deben tomar en cuenta distintos factores como son la fase móvil, la sensibilidad del equipo y la columna utilizada. En el caso de UPLC es un equipo más sensible, y debido a que se utilizó una fase móvil con un buffer de acetato de sodio trihidratado, causó interferencias tanto en el tiempo de retención de la muestra como en la absorbancia de la misma, haciendo que varíen estos resultados. Para que se pueda decir que un método es intercambiable, la diferencia entre ellos debe ser mínima mientras que en este caso el escalonamiento del método no fue funcional ya que los resultados de los análisis son muy dispersos.

La exactitud se midió por medio de los factores de correlación (r), el cual indica que la proporción con la que aumentan las concentraciones de la muestra en un método debe ser directamente proporcional a la medida de su respuesta. En el caso de ambos métodos analíticos, tanto el HPLC como el UPLC, la respuesta se mide por medio de áreas de los picos detectados. Debido a que se realizaron 3 réplicas de cada estándar se calculó el área promedio obtenida y se calculó el factor de correlación. El factor de correlación mientras más cercano a 1 indicará una correlación positiva perfecta, es decir presenta que el grado de relación entre variables es grande. En este caso se obtuvo un $r = 0.9954$ para el método de HPLC y un valor de $r = 0.9990$ para el método de UPLC. Este dato muestra que el método de UPLC es 0.80% más exacto que el método de HPLC.

En cuanto a la comparación de métodos, se puede decir que estos métodos no son del todo comparables entre sí, debido a que no existe metodología específica para la cuantificación de la capsaicina por medio del UPLC. Es por esto que se intentó utilizar la misma metodología utilizada con el HPLC realizando unas pequeñas modificaciones a las condiciones como por ejemplo el flujo y el volumen de inyección. Se utilizó un flujo de 1mL/min con el HPLC mientras que para el UPLC se utilizó un flujo de 0.5mL/min. En cuanto a volumen de inyección, se inyectaron 100 μ L de muestra con el HPLC mientras que para el UPLC se inyectaron únicamente 5 μ L de la misma. De igual manera el tiempo de detección varió de corridas de 7 minutos para el HPLC a corridas de 5 minutos para el UPLC.

Se debe tomar en cuenta también que la fase estacionaria del UPLC contiene partículas más pequeñas que la columna utilizada como fase estacionaria de HPLC. Es

por esto que deben realizarse ajustes tanto de fase móvil como de diluyente, concentración de la muestra y pH. Debido a ello que no se pueden extrapolar las condiciones directamente del HPLC convencional al UPLC, porque son sistemas cromatográficos diferentes.

Al realizar la comparación de métodos se utilizó como herramienta estadística el coeficiente de correlación intraclase. Este sirve para realizar comparaciones de métodos entre variables continuas. Según los valores obtenidos se comparan para determinar la fuerza de la concordancia entre los métodos según la tabla 8.5.3.2 presentada anteriormente. Se determinó que el valor del coeficiente de correlación intraclase fue de 0.108 y al compararlo se obtiene que la concordancia entre los métodos es nula. A pesar que la cromatografía líquida de alta resolución y la cromatografía ultra rápida se basan en el mismo principio, debido a la sensibilidad de los equipos y a lo presentado con anterioridad, no puede decirse que se puede utilizar un mismo método para ambos equipos, sino que deben utilizarse distintas condiciones de análisis para cada método analítico.

Los datos anteriormente mencionados fueron los analizados para medir el tiempo y los costos de cada método analítico. Al realizar el análisis se llegó a la conclusión que aunque el método de HPLC es más confiable, el costo de el análisis es mayor, observando un mayor gasto de reactivos en fase móvil con un costo total de Q517.14, un mayor gasto de muestra con costo de Q215.00, y aumento del uso de solventes. Se debe considerar también que los desechos obtenidos de este análisis deben ser tratados y eso genera un costo adicional. De igual manera se observa debido al tiempo de detección que existe un mayor gasto de energía eléctrica al tener el equipo funcionando. Esto es sin considerar la disponibilidad y el mantenimiento del equipo. El método de UPLC, debido a que es más rápido y utiliza un flujo menor y menor cantidad de muestra para realizar los análisis, presenta un menor costo, siendo el gasto de reactivos de Q184.69, y un gasto de muestra de Q140.00. Se obtiene entonces un gasto total de Q732.14 con el HPLC y un gasto total de Q324.69 con el UPLC. Reduciendo costos en un 55.65% al realizar la cuantificación de la capsaicina en crema por medio del UPLC.

En cuanto a tiempo se observa que el análisis por UPLC toma menos tiempo que el análisis por HPLC en cuanto a corridas de muestras, siendo estas de cinco y siete minutos respectivamente. Debido a que el UPLC como su nombre lo indica está diseñado para trabajar a presiones más altas que el HPLC hace que la muestra pase por columnas diseñadas a soportar estas presiones con mayor rapidez. Esto también provocó ciertas dificultades de desempeño debido al hecho que la fase móvil utilizada era un buffer y las sales saturan la columna que está compuesta por partículas más pequeñas, provocando fallas técnicas al extrapolar las condiciones de trabajo del HPLC al UPLC. Debido a esto en el momento de analizar las muestras el tiempo requerido para adecuar el sistema y el mantenimiento de la línea base tomó noventa minutos para estabilizar el sistema con el UPLC, mientras que con el HPLC tomó únicamente cuarenta y cinco minutos.

Se concluye entonces que el UPLC presenta mayor ventaja en cuanto a ser un método breve y económico. Los resultados ayudan a determinar que el HPLC es un método confiable de elevada precisión y alta exactitud, mientras que el método de UPLC posee una mayor precisión para la cuantificación de la capsaicina.

10. Conclusiones

10.1 La cromatografía líquida de alta velocidad es un método analítico eficiente y confiable para el análisis cuantitativo de la capsaicina.

10.2 La realización del análisis cuantitativo de capsaicina en crema por UPLC reduce costos en un 55.65% en comparación al método analítico de HPLC.

10.3 El método de cuantificación por medio de UPLC reduce el tiempo de detección al realizar el análisis de cuantificación de capsaicina en cremas de siete a cinco minutos.

10.4 El método de cuantificación por medio de HPLC requiere un 50% menos de tiempo en estabilizarse que el requerido por el UPLC.

10.5 El rango de variabilidad en los resultados para la cuantificación de capsaicina en crema es mayor en el método de UPLC con valores desde el 56.79% hasta 149.12% y el rango de variabilidad del HPLC son de 153.44 hasta 156.44%.

10.6 La exactitud del método de UPLC es 0.80% mayor que la exactitud del método de HPLC, el cual no es una diferencia significativa.

10.7 La concordancia entre los resultados obtenidos en el método de HPLC y UPLC es nula.

II. Recomendaciones

- 11.1 Exhortar la investigación en la comparación de distintos métodos analíticos aplicados a otros principios activos, ya que esto permite encontrar alternativas de análisis con ventajas sobre otros métodos, sin que afecten la calidad de los resultados.
- 11.2 Realizar investigación sobre la modificación de las condiciones al utilizar el método de UPLC para cuantificar cualquier producto farmacológico y lograr así obtener resultados exactos y precisos, logrando así aprovechar la reducción de tiempo y costos del análisis.
- 11.3 Crear metodología específica para utilizar en el análisis de capsaicina en crema por medio de la cromatografía líquida de alta velocidad que permita obtener resultados exactos, precisos y análisis a bajo costo.
- 11.4 Realizar validación de métodos analíticos con el uso de la cromatografía líquida de alta velocidad para aprovechar el uso de esos equipos y economizar tanto tiempo como dinero en los análisis cuantitativos.

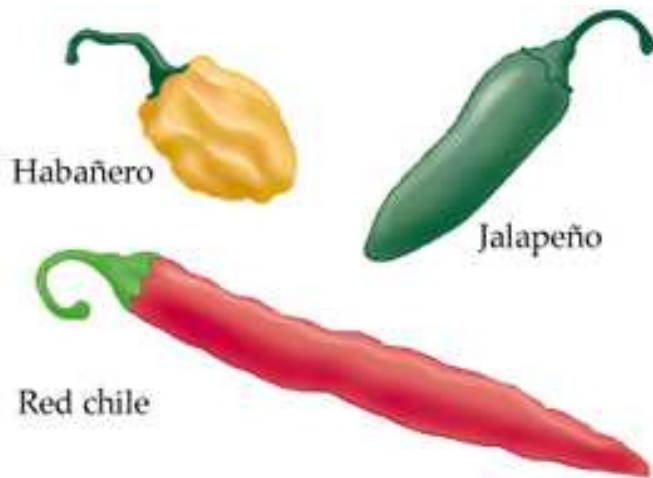
12. Referencias

1. García Velásquez, María de los Angeles. Ruelas Chacón Xochitl. Hernández González, María. Reboloso Padilla, Oscar Noe. “*Determinación Compuestos Capsaicinoides de en Salsas Tradicionales de Saltillo*”, Coahuila.
2. Ciencia Picante. La Alimentación. Nutrición y Ciencia. [En Línea]. Disponible en: http://canales.laverdad.es/cienciaysalud/5_1_4.html. [Consulta 3 enero de 2010]
3. Vidal MA, Calderón E, Román D, Pérez-Bustamante F, Torres LM. “*Topical capsaicin for the management of neuropathic pain*”. Revista Sociedad Española Dolor 2004; 11: 306-318.
4. “The Nature of Capsaicin”. DeWitt, Dave. Disponible en: <http://www.fierlyfoods.com/dave/capsaicin.asp> [Consulta 3 de enero 2010]
5. Ph. D. Tucker, Samuel. “*Capsaicin and Dihydrocapsaicin*”. NIOSH/DPSE. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). Method 5041. Fourth Edition. 5/15/96.
6. Y.J. Surh, S.S. Lee. “(Short Review) *Capsaicin in hot Chili Pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen?*”. Food and Chemical Toxicology, 34: 313-316, 1996
7. B. Toth, P. Gannett. “*Carcinogenicity of lifelong administration of capsaicin of hot pepper in mice*”. In Vivo, 6: 59-63, 1992.
8. M.C. Unnikrishnan, R. Kuttan. “*Tumor reducing and anticarcinogenic activity of selected spices*”. Cancer Letters, 51: 85- 89, 1990.
9. Rains C, Bryson HM, “*Topical Capsaicin a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in post-herpetic neuralgia, diabetic neuropathy and osteoarthritis*”. Drugs aging. 1995: 312-328

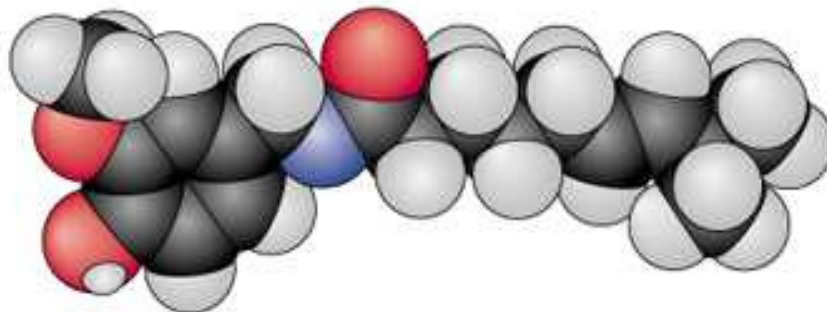
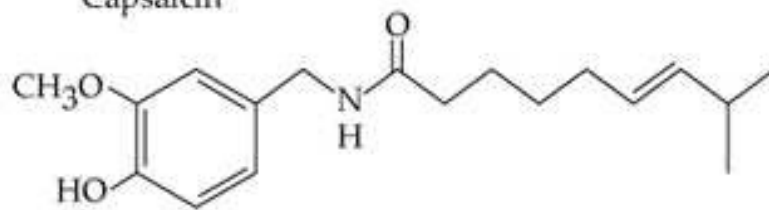
10. Saria A, Lundberg JM, Hua X, Lembec F. 1993. *Capsaicin Induced Substance P release and sensory control of vascular permeability*. Neuroci Lett: 41:167-72
11. Hernández, Sergi. “Tratamiento del dolor mediante capsaicina” Revista española de podología, ISSN 0210-1238, Vol. 18, Nº. 3, 2007 pags. 134-135
12. García Carlos, Fernando Guzmán, Mora Elías, Buitrago Germán, Reyes Luis, Gómez Andrés. “Capsaicina Intravesical: Una alternativa en pacientes con vejiga hiperactiva idiopática de difícil manejo” Revista Med. Volúmen 13. 2005 pag. 70-74.
13. Chancellor MB, de Groat WC. “Intravesical capsaicin and resiniferatoxin therapy: spicing up the ways to treat the overactive bladder”. J Urol. 1999;162:3-11
14. Skoog Douglas, West D, Holler F.J, Crouch S, “Química Analítica”, séptima edición, McGraw-Hill. México. 2004 p: 705-715
15. Kurian AL, Starks AN. “HPLC Analysis of Capsaicinoids Extracted from Whole Orange Habanero Chili,Peppers.” 2002. Journal Food Science. No.67(3). Pp.956- 962.
16. Sherma, Joseph; John D. Frances H. Larkin; “UPLC: ultra performance liquid chromatography” Journal of AOAC Internacional. May-June, 2005
17. Pérez Ana, Victor Gonzales, Ramón Soto, Alejandra Gutierrez, *Capsaicinoides, Vitamina C y Heterosis durante el desarrollo del fruto del chile manzano*. Revista Científica de America Latina, Caribe España y Portugal. Volúmen 41 2007. Pág. 627-635.
18. Y.J. Surh, C.R.J. Lee, K.K. Park, S.T. Mayne, A. Liem, J.A. Miller. “Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamates and N – nitrosodimethylamine”. Carcinogenesis, 16: 2467-2471, 1995.
19. Rachaneewan Karnka; Mongkon, Rayanakorn. “Optimization of High- Performance Liquid Chromatographic Parameters for the Determination of Capsaicinoid Compounds Using of

- Simplex Method*". Analytical Science. June 2002. Vol 18. The Japan Society for Analytical Chemistry.
20. German Peralta "Determinación del nivel de pungencia en unidades Scoville para *Capsicum Annum* Var. *Aviculare* procedente de regiones productoras de Guatemala" Guatemala, 2007.
 21. Bozeta M, "Extracción, purificación y cuantificación de capsaicinoides de *capsicum pubescens* ruiz & pavón (*rocoto*)" Proyecto de la Universidad Católica del Perú. 2005
 22. Yang Ying, Hodges Craig C. "Assay Transfer from HPLC to UPLC for Higher Analysis Throughput". Separation Science Redefined. May 2005.
 23. Sein Gustavo, Gardinalli Claudia, Madrille Eloy, Caferrata Lázaro. "Cuantificación de Capsaicinoides en *Capsicum chacoense* A.T. Hunziker (*Solanaceae*) y en Especialidades Farmacéuticas". La Plata, Argentina. 1997
 24. Swartz Michael. "Ultra performance Liquid Chromatography: An introduction." Separation Science Redefined. Mayo, 2005. Disponible en:<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc/242005/164646/article.pdf> [Consulta 6 de enero 2010]
 25. Maldonado Salvador, Pacheco Irineo, González Mario, Mora María, Herrera Guadalupe, Hernández David. "Análisis preliminar de compuestos fenólicos y capsaicinoides en variedades de Chile con diferente capacidad pungente" Primera Convención Mundial del Chile 2004.
 26. "Creams, Sprays, Gels, Sticks, powders, and Compounds: A Capsaicin Update,n 2000" DeWitt,Dave. Disponible en: <http://www.fieryfoods.com/dave/cap2000.html> [Consulta 10 de enero de 2010].

13. Anexos



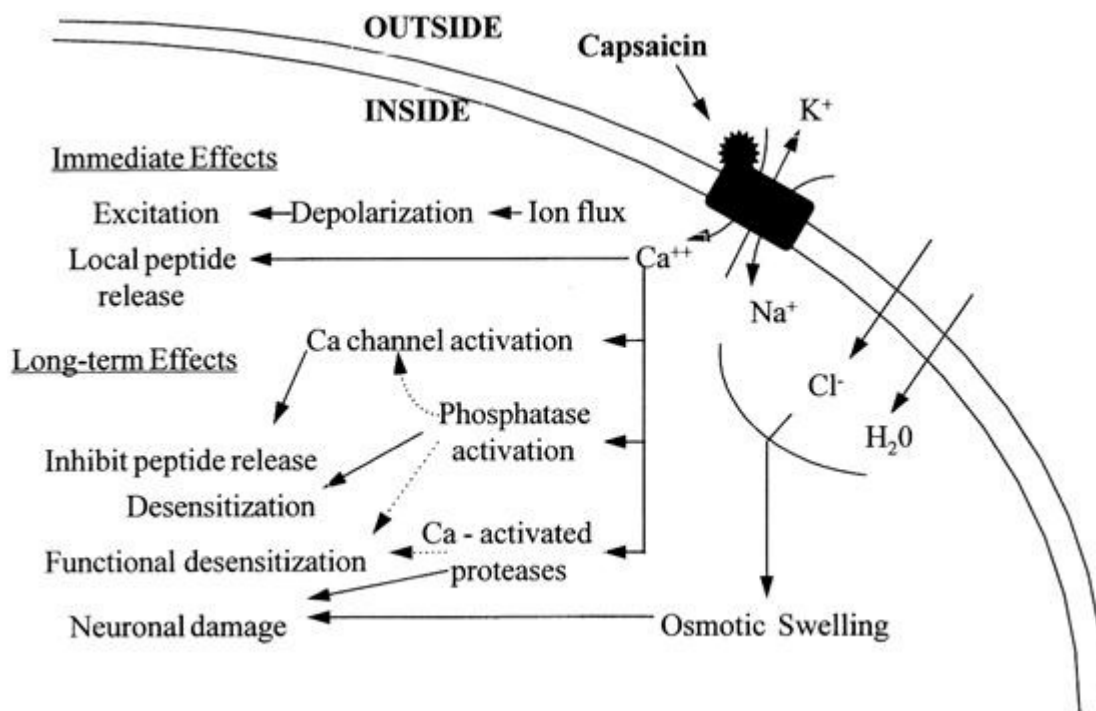
Capsaicin



Molécula de Capsaicina.



Capsaicina en alimentos



Mecanismo de acción de la capsaicina.



Cromatógrafo Agilent 1200



Estándares para curva de calibración



Crema que contiene capsaicina



Pesado de la muestra



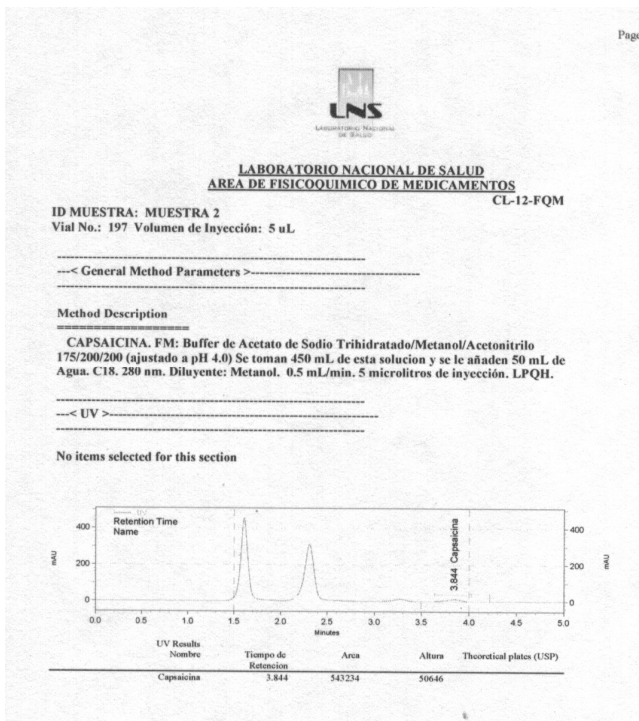
Extracción de muestra por calentamiento



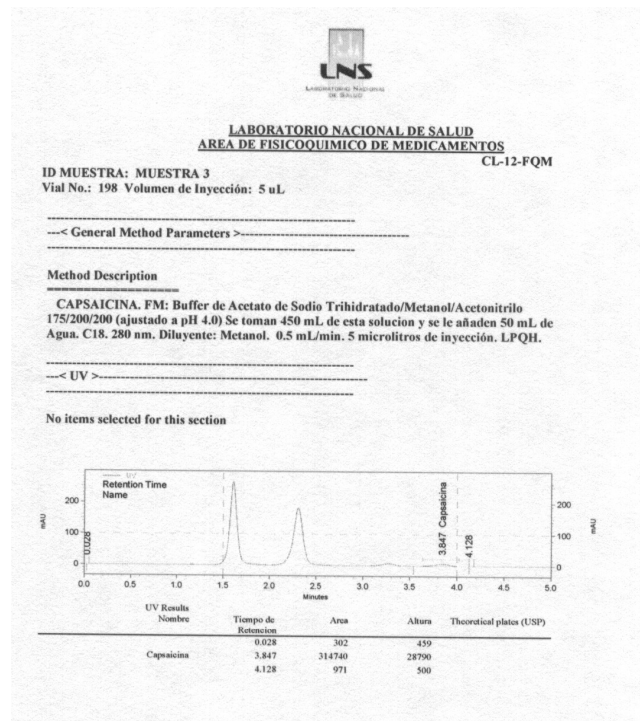
Extracción de muestra



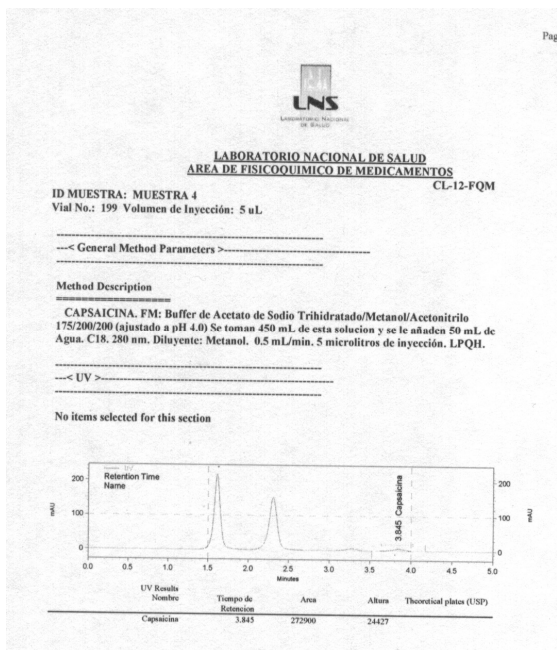
Filtrado de la muestra y llenado de viales



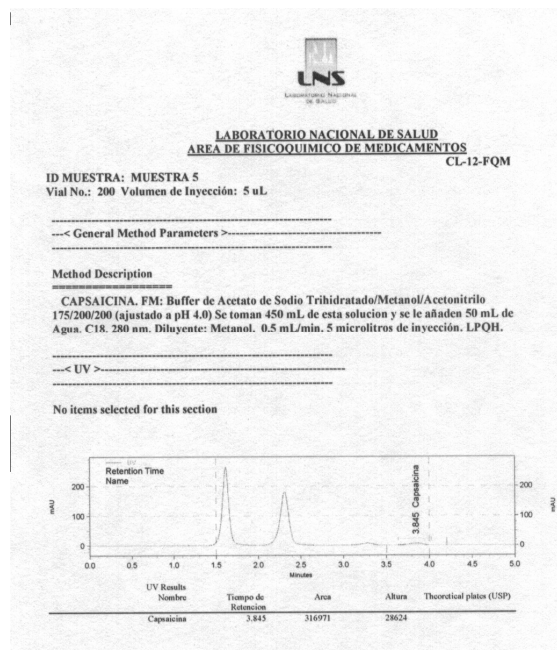
Cromatograma Muestra 2 UPLC



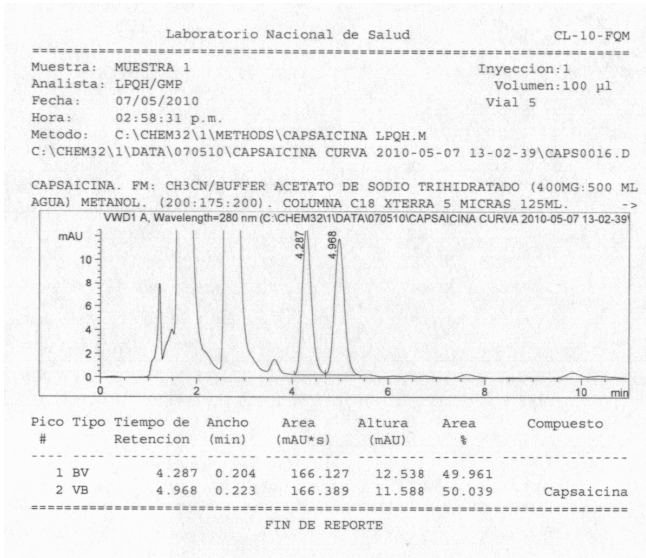
Cromatograma Muestra 3 UPLC



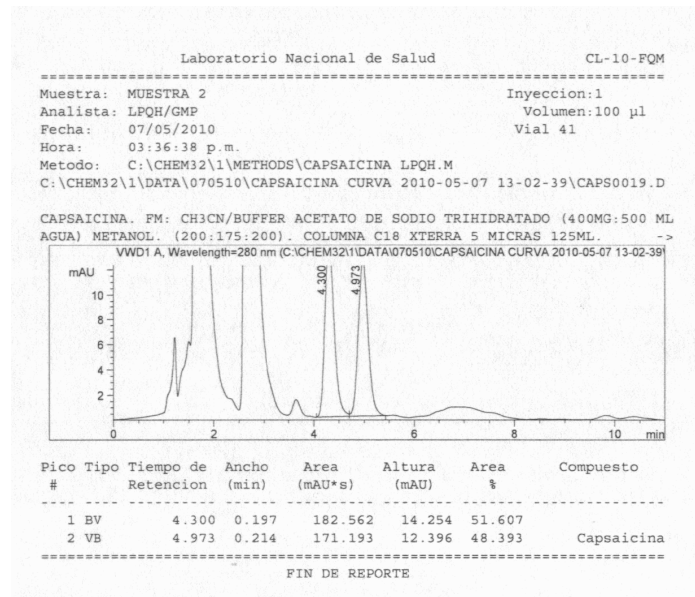
Cromatograma Muestra 4 UPLC



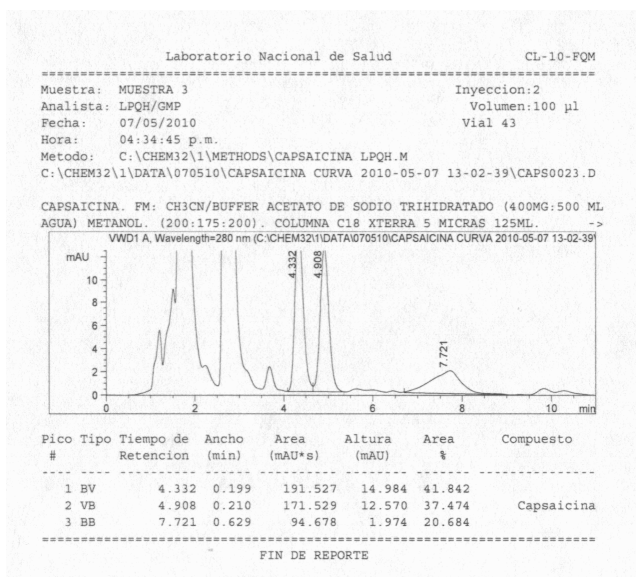
Cromatograma Muestra 5 UPLC



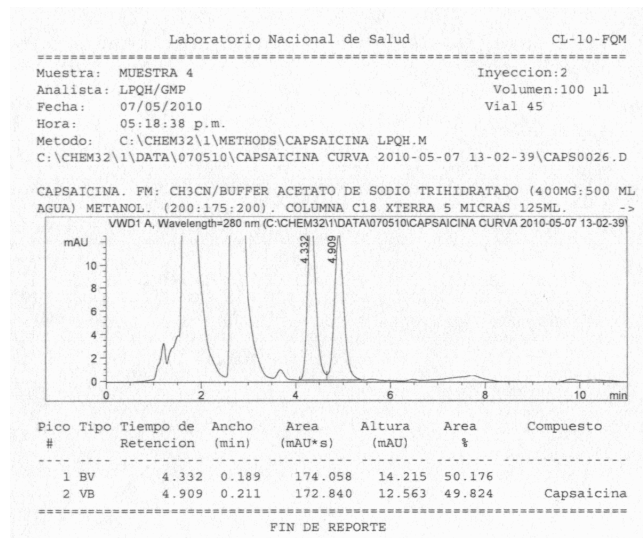
Cromatograma Muestra 1 HPLC



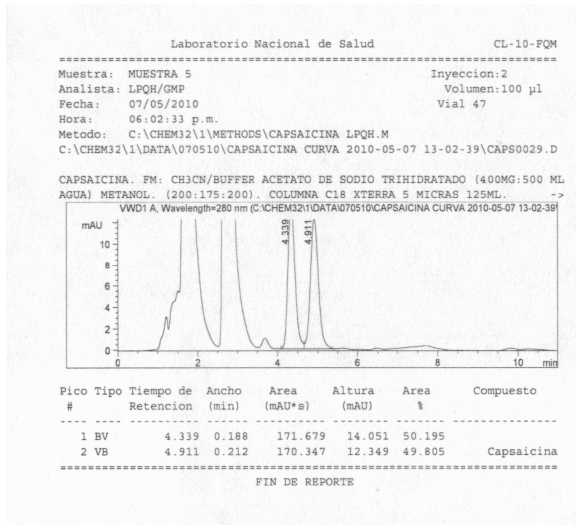
Cromatograma Muestra 2 UPLC



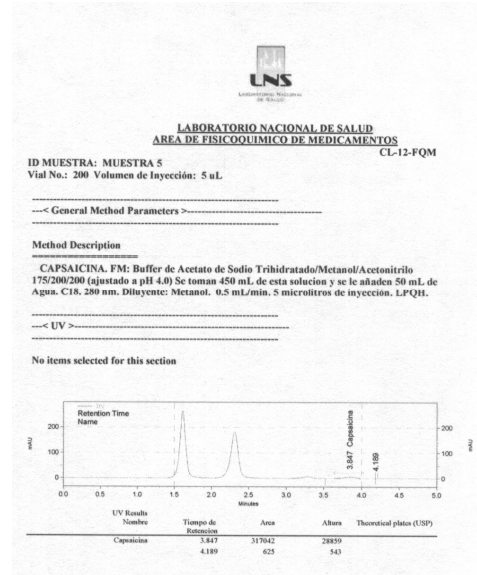
Cromatograma Muestra 3 HPLC



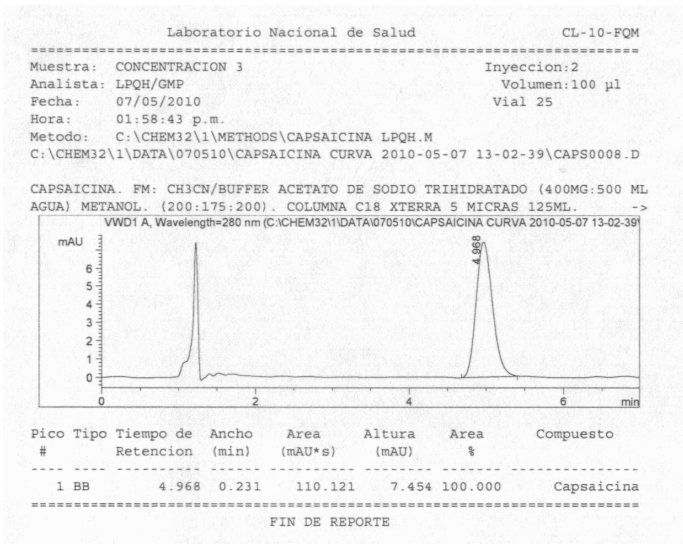
Cromatograma Muestra 4 HPLC



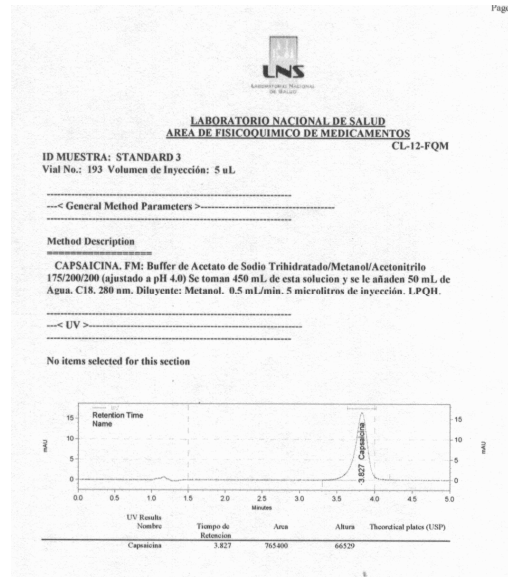
Cromatograma Muestra 5 HPLC



Cromatograma Muestra 5 UPLC



Cromatograma Estándar HPLC



Cromatograma Estándar UPLC

Tabla con análisis estadístico de los resultados obtenidos por el método de HPLC

Promedio	154.9458442
Desviación Estándar	1.20232552
Coefficiente de Variación	1.445586655

Fuente Experimental

Tabla con análisis estadístico de los resultados obtenidos por el método UPLC

Promedio	93.52073517
Desviación Estándar	41.03790872
Coefficiente de Variación	1684.109952

Fuente Experimental

Tabla con resultados obtenidos del análisis del coeficiente de correlación intraclase.

Medición	Valor absoluto Coeficiente de correlación intraclase	Intervalo de confianza 95%		Prueba F
		Lim. Inf	Lim. Sup.	Valor p
Medidas individuales	0.051	-0.828	0.793	0.538
Medidas promedio	0.108	-9.639	0.885	0.538

Fuente Experimental

Tabla con valores de concordancia según los valores del coeficiente de correlación intraclase

Valor del CCI	Fuerza de la concordancia
> 0.90	Muy buena
0.71 – 0.90	Buena
0.51 – 0.70	Moderada
0.31 – 0.50	Mediocre
< 0.30	Mala o nula

[23]

Tabla con resultados del análisis del test de Student

	<i>UPLC</i>	<i>HPLC</i>
Media	93.5207352	154.945844
Varianza	1684.10995	1.44558665
Valor p ($T < = t$) dos colas	0.03098769	
Estadístico t	-3.26318087	

Fuente Experimental