

## Laboratorio 6: Preparación de muestras para HPLC

### Introducción

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una metodología muy utilizada dentro de industria farmacéutica para la determinación de la pureza y el título de analitos de interés. Para dicha aplicación la preparación de muestras se reduce a la realización de una solución del compuesto en la fase móvil seguido de su posterior análisis en equipo. Si bien la preparación de muestras para este tipo de industria no parece representar ninguna complejidad, al momento de realizar la determinación se necesita que el cromatógrafo cumpla con el test de adecuación de sistema.

### Objetivos

- Discutir los requisitos del análisis
- Preparar todo lo necesario para la determinación
- Realizar la preparación de muestras
- Analizar los cromatogramas y evaluar los resultados conseguidos

### Materiales y métodos

#### Equipos:

- Cromatógrafo de Líquidos de líquidos Thermo Ultimate 3000.

#### Configuración:

$V_{inyección}$ : 10  $\mu$ L

$T_{sampler}$ : ambiente

$T_{columna}$ : 30 °C

$t_{corrida}$ : 10 minutos

FMA/FMB/FMC 85/5/10

Flujo 1 mL/min

$\lambda_{detector}$ : 275 nm

- Balanza analítica
- Bomba

#### Materiales

- Matraces
- Viales

- Pipetas
- Sistema de filtrado
- Filtros de 0,45  $\mu\text{m}$

### Reactivos

- Estándar de Cafeína
- FMA: Solución de acetato de sodio anhidro 10 mM pH 4,5
- FMB: Metanol
- FMC: Acetonitrilo

### Procedimiento

#### Solución de resolución:

Pesar 5 mg  $\pm$  0,1 de cafeína en un matraz de 5 mL. Agregar unos mililitros de fase móvil, sonicar hasta disolución completa y enrazar a volumen con el mismo solvente. Transferir 2 mL con pipeta doble aforo a un matraz de 10 mL y enrazar a volumen con fase móvil.

#### Preparación Estándar:

Prepara de igual forma que la solución de resolución.

#### Preparación muestra

Preparar la muestra de igual forma que la solución de resolución

### **Análisis de resultados**

#### Aptitud de sistema:

Se emplea para comprobar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico son aptas para realizar el ensayo.

Para cumplir la aptitud de sistema indica el cálculo del desvío estándar relativo ( $S_R$ ) del pico del analito de interés, para lo cual se emplean los datos de cinco (5) inyecciones repetidas del estándar si el requisito es 2,0 % o menor.

Además, se suele exigir el cumplimiento en los valores máximos para los parámetros: resolución ( $R$ ), eficiencia ( $N$ ) y factor de asimetría ( $F$ ) los cuales se especifican en la monografía correspondiente.

#### Valoración:

Inyectar por separado la Preparación estándar y la Preparación muestra, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Expresar el resultado en %.

#### **Bibliografía**

- Farmacopea Argentina Volumen I, 7<sup>ma</sup> Edición
- Farmacopea Argentina Volumen II, 7<sup>ma</sup> Edición