

## DETERMINACIÓN DE SELENIO EN CAPSULAS DE GELATINA BLANDA POR LA METODOLOGÍA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Luis Kanashiro<sup>a</sup>, Deivy Quiroz<sup>a</sup>, Jenny Huerta<sup>\*b</sup>, Jhonnell Samaniego<sup>b</sup>

### RESUMEN

El selenio es un oligoelemento esencial para la salud humana y la deficiencia de este nutriente provoca con frecuencia trastornos como diabetes, enfermedad de Keshan, disfunción tiroidea y limitación cognitiva. El selenio orgánico y iónico son altamente biodisponibles, pero el selenio elemental lo es difícilmente. En el desarrollo de un producto farmacéutico es necesario utilizar un método analítico específico para cuantificar el principio activo en una formulación. La cromatografía líquida de alta resolución posee diversas aplicaciones y al ser automatizada permite realizar análisis de forma rápida y eficiente y ser aplicado en uso rutinario en el análisis de control de calidad y estabilidad del medicamento. Las condiciones cromatográficas empleadas son columna L1 Octadecil silano 300 mm x 3,9 mm x 10 µm, temperatura del horno a 30 °C, longitud de onda a 330 nm, fase móvil compuesta por Acetonitrilo y agua en proporción 86:14, volumen de inyección 100 µL. Los parámetros de validación evaluados confirmaron la especificidad, la precisión con coeficiente de variación menor a 2 %, la exactitud del 100,64 % y la robustez después de 24 horas con C.V. (%) ≤ 2 %. Concluyendo que el método propuesto es apto para la cuantificación de selenio en capsulas de gelatina.

**Palabras clave:** selenio; cápsula blanda; cromatografía líquida de alta resolución.

## DETERMINATION OF SELENIUM IN SOFT GELATIN CAPSULES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHODOLOGY.

### ABSTRACT

Selenium is an essential trace element for human health and deficiency of this nutrient frequently causes disorders such as diabetes, Keshan disease, thyroid dysfunction and cognitive limitation. Organic and ionic selenium are highly bioavailable, but elemental selenium is hardly available. In the development of a pharmaceutical product, it is necessary to use a specific analytical method to quantify the active ingredient in a formulation. High

---

<sup>a</sup> Laboratorio Medifarma S.A., Jr. Ecuador 787, Lima, Perú.

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad María Auxiliadora, Av. Canto Bello 431, San Juan de Lurigancho, Lima 15408, Perú. [jenny.huerta@uma.edu.pe](mailto:jenny.huerta@uma.edu.pe)

performance liquid chromatography has several applications and, being automated, it allows to perform analyses quickly and efficiently and to be applied in routine use in the analysis of quality control and stability of the drug. The chromatographic conditions used are L1 Octadecyl silane column 300 mm x 3.9 mm x 10  $\mu$ m, oven temperature at 30 °C, wavelength at 330 nm, mobile phase composed of Acetonitrile and water in 86:14 ratio, injection volume 100  $\mu$ L. The evaluated validation parameters confirmed specificity, precision with coefficient of variation less than 2 %, accuracy of 100.64 % and robustness after 24 hours with C.V. (%)  $\leq$  2 %. Concluding that the proposed method is suitable for the quantification of selenium in gelatin capsules.

**Key words:** selenium; soft capsule; high performance liquid chromatography; high performance liquid chromatography

## INTRODUCCIÓN

El selenio es un oligoelemento esencial para la salud humana y en los últimos años, se han reconocido gradualmente sus beneficios para la salud<sup>1</sup>. La deficiencia del nutriente selenio provoca con frecuencia la incidencia de diversos trastornos, como diabetes, la enfermedad de Keshan, disfunción tiroidea y limitación cognitiva<sup>2</sup>.

El selenio existe en el cuerpo humano en forma de selenoproteínas, que pueden derivarse del selenio orgánico o inorgánico ingerido. El selenio orgánico (principalmente selenometionina) y el selenio iónico (p. ej., selenito y selenato) son altamente biodisponibles, pero el selenio elemental es difícil de absorber por el tracto gastrointestinal a menos que sea de tamaño nanométrico<sup>3</sup>. El selenio orgánico de los alimentos es relativamente seguro para el cuerpo humano, mientras que el inorgánico complementado con productos químicos exhibe una ventana estrecha desde el efecto terapéutico hasta el efecto tóxico<sup>4</sup>. Una vez absorbido en el sistema circulatorio, el selenio se unirá con varias proteínas in vivo para formar complejos Se/proteína, es decir, selenoproteínas, para ejercer las acciones fisiológicas. Sin embargo, los residentes en el área que carece de selenio tienen dificultad para asimilar suficiente selenio natural de la dieta diaria, por lo tanto, se producen algunas enfermedades asociadas con la deficiencia de selenio<sup>5-9</sup>. Para estas personas, la suplementación con selenio se convierte en una medida crucial que debe llevarse a cabo. Actualmente, el selenio no solo se utiliza como suplemento nutricional para la prevención y el tratamiento de enfermedades, sino que también se aplica para la administración de fármacos en forma de nanopartículas para potenciar las terapias transportadas. A menudo se complace en anticipar un efecto sinérgico que se produce entre el selenio y la carga útil<sup>10-11</sup>.

En el desarrollo de un producto farmacéutico es necesario utilizar un método analítico específico que permita cuantificar el principio activo en una formulación, y para asegurar su confiabilidad es necesario validarlo<sup>12-14</sup>. Esta validación consiste en determinar diversos parámetros, que van a depender de la categoría a la que pertenezcan<sup>15-16</sup>. Diversos organismos reguladores como la Food and Drug Administration (FDA), Agencia Nacional de vigilancia Sanitaria (ANVISA), Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), así como las referencias The United States Pharmacopeia (USP), International Conference

on Harmonisation (ICH) y Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), exigen y recomiendan la validación como requisito para el cumplimiento de la Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)<sup>15</sup>. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) posee diversas aplicaciones y por ser una técnica automatizada permite analizar de forma rápida y eficiente la separación, cuantificación y detección de las muestras por medio de la identificación de picos en los cromatogramas, que se pueden optimizar mediante el ajuste de múltiples variables en el método (pH de la fase móvil, concentración del buffer, flujo, temperatura de la columna, longitud de onda del detector, etc.)<sup>17-22</sup>. Al obtener un método rápido y confiable, puede ser aplicado en uso rutinario en el análisis de control de calidad y determinación de la estabilidad del medicamento<sup>23-28</sup>. En la presente investigación se tiene como objetivo establecer un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de selenio en cápsulas blandas y para ello establecer parámetros de validación que permitan tener la confiabilidad para el uso rutinario en la determinación de calidad de medicamentos.

## PARTE EXPERIMENTAL

**Reactivos:** Se utilizó 2,3 diaminonaftaleno de Merck (Darmstadt, Alemania), ácido clorhídrico 37% de Merck (Darmstadt, Alemania), Cloruro de sodio de Merck (Darmstadt, Alemania), Selenio solución patrón de Merck (Darmstadt, Alemania), Sodio Selenato de DC Fine Chemicals (London, United Kingdom) y acetonitrilo de Merck (Darmstadt, Alemania)

**Condiciones cromatográficas:** Como fase móvil se utilizó una solución filtrada y desgasificada de Acetonitrilo y Agua purificada en proporción de 86:14. La columna cromatográfica utilizada fue L1 Octadecil silano de 300 mm x 3,9 mm x 10 µm, el detector UV a 330 nm, la temperatura del horno a 30 °C, el volumen de inyección de 100 µL, la velocidad de flujo de 0,9 mL/minuto, el tiempo de retención del pico principal es de 6,0 minutos y el tiempo de cada corrida es de 10 minutos.

**Preparación de estándar:** Se utilizó un estándar de referencia de solución patrón certificada de 1000 ppm de Selenio, a partir de esta se preparó otra transfiriendo una alícuota de 4 mL a una fiola de 200 mL, luego llevar a volumen con ácido clorhídrico 0.1 N y homogeneizar. Luego transferir 5.0 mL a un vaso de precipitación de 250 mL a una concentración aproximada de 0,40 µg/mL. Luego se realizará el proceso para la formación del Complejo.

**Preparación de la muestra:** Se utilizó una cantidad de muestra equivalente a 1000 µg de Selenio en un matraz volumétrico de 1000 mL y se llevó a volumen con agua purificada. Luego se transfirió 20 mL a una fiola de 50 mL para diluir a volumen con agua purificada a una concentración aproximada de 0,40 µg/mL. Luego se realizará el proceso para la formación del Complejo.

**Formación del complejo:** Se utilizaron 3 mL de las soluciones estándar y muestra a una fiola de 25 mL para agregarles 5 mL de una solución de 2,3 diamino naftaleno (concentración de 4 mg/mL en ácido clorhídrico). Luego se llevó a volumen con ácido clorhídrico. El complejo es estable por un periodo de 4 horas

**Determinación de algunos parámetros de validación**

**Especificidad:** Para la determinación de posibles interferencias, se analizó el placebo con el principio activo al 100% y se determinó el grado de interferencia con respecto al análisis del principio activo con y sin placebo debiendo obtener resultados  $\pm 2\%$  del teórico. En la determinación de interferencias de productos de degradación, se expusieron tanto placebo muestra y principio activo a diferentes tipos de estrés como luz UV, calor a 80°C por 24 horas, hidrolisis acida por 2 horas a 80°C, hidrolisis alcalina por 2 horas a 80°C, oxidación con peróxido al 30% por 2 horas.

**Exactitud:** Para determinar este parámetro se utilizaron se prepararon soluciones con placebo enriquecida con principio activo para tres niveles al 75%, 100% y 125%.

**Precisión:** En la repetibilidad se evaluaron 6 muestras independientes. Para la precisión intermedia un segundo analista lo analizó usando el mismo método analítico en diferentes equipos cromatográficos.

**Robustez:** Se consideraron tres muestras del análisis de repetibilidad como análisis inicial las cuales estuvieron 24 horas a temperatura ambiente y luego se volvió a analizar con un estándar preparado recientemente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la evaluación de la especificidad se consideraron las posibles interferencias originadas en la muestra debido al estrés forzado sometido por fotólisis y termólisis, se encontraron los siguientes resultados según tabla 1.

**Tabla 1.** Parámetro de la Especificidad de posibles interferentes en Selenio capsulas blandas.

Especificidad	Muestra		Selenio			
			Añadido (mg)	Hallado (mg)	Promedio hallado (mg)	% Recuperación
Determinación de posibles interferentes	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00	0,00
		Pb2	0,00	0,00	0,00	
	Principio activo + placebo	M1	1,07	1,08	1,07	101,36%
				1,06		
		M2	1,10	1,12	1,13	
				1,13		
Fotólisis	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,0	0,00
				0,00		
		Pb2	0,00	0,00	0,00	
				0,00		
	Principio activo	PA 1	1,08	1,07	1,07	99,06
				1,07		
		PA2	1,04	1,02	1,03	
				1,04		
	Principio activo + Placebo	M1	1,06	1,06	1,05	99,53
				1,04		
		M2	1,05	1,04	1,05	
				1,06		
Termólisis	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00	0,00
				0,00		
		Pb2	0,00	0,00	0,00	
				0,00		
	Principio activo	PA1	1,02	1,03	1,03	100,94
				1,03		
		PA2	1,10	1,11	1,11	
				1,12		
	Principio activo + Placebo	M1	1,06	1,06	1,06	100,95
				1,05		
		M2	1,05	1,08	1,07	
				1,05		

Pb: placebo PA: principio activo M: muestra

En la tabla 2 se muestran los resultados del ensayo de Especificidad en Selenio capsulas blandas sometidas a estrés forzado por hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y estrés oxidativo.

**Tabla 2.** Especificidad de hidrólisis ácida, alcalina y oxidativa.

Especificidad	Muestra		Selenio				
			Añadido (mg)	Hallado (mg)	Promedio hallado (mg)	% Recuperación	
Hidrólisis ácida	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Pb2	0,00	0,00	0,00		
	Principio activo	PA1	1,03	1,01 1,04	1,03	99,06	
		PA2	1,06	1,04 1,04	1,04		
	Principio activo + placebo	M1	1,03	1,02 1,01	1,02	98,13%	
		M2	1,08	1,06 1,04	1,05		
	Hidrólisis alcalina	Placebo	Pb1	0,00	0,00 0,00	0,0	0,00
			Pb2	0,00	0,00 0,00	0,00	
Principio activo		PA 1	1,07	1,08 1,06	1,07	99,52	
		PA2	1,04	1,02 1,03	1,03		
Principio activo + Placebo		M1	1,03	1,02 1,01	1,02	100,46	
		M2	1,06	1,07 1,09	1,08		
Oxidación		Placebo	Pb1	0,00	0,00 0,00	0,00	0,00
			Pb2	0,00	0,00 0,00	0,00	
	Principio activo	PA1	1,02	1,04 1,03	1,04	100,98	
		PA2	1,05	1,04 1,06	1,05		
	Principio activo + Placebo	M1	1,04	1,05 1,06	1,05	100,98	
		M2	1,01	1,03 1,00	1,02		

Pb: placebo PA: principio activo M: muestra

En la tabla 3 se muestran los resultados de la evaluación del parámetro de Exactitud del método, para lo que se elaboraron 3 concentraciones en un rango de trabajo establecido para luego analizar los porcentajes de recuperación obtenidos y demostrar de esta forma si el método cumple con los criterios para demostrar su exactitud.

**Tabla 3.** Exactitud (recuperación) de selenio en cápsulas blandas

Concentración	Muestras	Selenio añadido (mg)	Selenio hallado (mg)	Promedio Selenio hallado (mg)	Recuperación %
75%	M1	0,77	0,77	0,78	101,30
			0,78		
	M2	0,75	0,74	0,74	98,67
			0,73		
	M3	0,78	0,78	0,79	101,28
			0,79		
100%	M1	1,02	1,03	1,03	100,98
			1,03		
	M2	1,06	1,07	1,06	100,00
			1,08		
	M3	1,03	1,04	1,05	101,94
			1,05		
125%	M1	1,24	1,24	1,25	100,81
			1,25		
	M2	1,25	1,24	1,24	99,20
			1,23		
	M3	1,25	1,26	1,27	101,60
			1,27		
Promedio:					100,64 %
Desviación Estándar Relativa:					1,05
Coeficiente de Variación (%):					1,04 %

En la tabla 4 se muestran los resultados del parámetro Precisión del método y para ello se evaluó la repetibilidad de los resultados del análisis en las mismas condiciones de seis muestras y la precisión intermedia utilizando el mismo método realizado por diferentes analistas calificados.

**Tabla 4.** Precisión: repetibilidad y precisión intermedia entre el analista uno y dos de selenio en capsulas blandas

Muestras	Analista 1			Analista 2		
	Selenio mg/cap	Promedio selenio mg/cap	%	Selenio mg/tab	Promedio selenio mg/cap	%
M1	1,02	1,02	102,0	1,03	1,03	103,0
	1,01			1,03		
M2	1,03	1,03	103,0	1,02	1,02	102,0
	1,03			1,01		
M3	1,04	1,04	104,0	1,03	1,03	103,0
	1,03			1,02		
M4	1,04	1,03	103,0	1,01	1,03	103,0
	1,02			1,05		
M5	1,00	1,01	101,0	1,02	1,02	102,0
	1,01			1,02		
M6	1,03	1,02	102,0	1,00	1,01	101,0
	1,01			1,02		
		Promedio:	102,5%		Promedio:	102,3%
		RSD:	0,96		RSD:	0,75
		C.V. (%):	0,93%		C.V. (%):	0,73
Promedio analista 1 y 2:						102,4%
RSD del analista 1 y analista 2:						0,86
C.V. (%) del analista 1 y analista 2:						0,83%

C.V.: coeficiente de variación RSD.: desviación estándar relativa M: muestra

En la tabla 5 se puede observar los resultados del parámetro de Robustez del método evaluando una misma muestra en condiciones de almacenamiento de refrigeración después de 24 horas, analizados frente a estándares recientemente preparados con iguales condiciones y lograr determinar si el método cumple con el parámetro requerido.

**Tabla 5.** Robustez entre análisis inicial y final de selenio en capsulas blandas

Muestra	Inicio			Final (después de 24 horas refrigerado)			Diferencia ly1 - y0l
	Selenio mg/cap.	Promedio selenio mg/cap.	% (y0)	Selenio mg/cap.	Promedio selenio mg/cap.	% (y1)	
M1	1,03	1,03	103,0	1,02	1,03	103,0	0,00
	1,03			1,03			
M2	1,01	1,01	101,0	1,03	1,02	102,0	1,00
	1,00			1,01			
M3	1,04	1,04	104,0	1,02	1,03	103,0	1,00
	1,03			1,03			
	Promedio	1,03	102,7	Promedio	1,03	102,67	
	RSD	0,01	1,25	RSD	0,004	0,47	
	C.V. (%)	1,21 %	1,21 %	C.V. (%)	0,46%	0,46 %	
Promedio de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):							102,69 %
RSD de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):							0,86
C.V. (%) de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):							0,84 %

C.V.: coeficiente de variación RSD: desviación estándar relativa M: muestra

En las Tablas 1 y 2 que reflejan los ensayos para verificar la especificidad del método ante los diferentes agentes que generan un estrés forzado, se puede observar que no tuvo un impacto considerable en los resultados obtenidos y además no presenta interferencias con el pico de principio activo en evaluación selenio. Siendo el resultado de variación menor al 2 % encontrándose dentro de lo sugerido por la AEFI<sup>16</sup> para el caso de una validación de método analítico.

En la Tabla 3 se puede observar que el resultado promedio del porcentaje de recuperación del parámetro de exactitud es de 100,64 %, con un Coeficiente de Variación de 1,05 %. Podríamos decir que estos resultados se encuentran dentro de lo recomendado por AEFI<sup>16</sup> ya que tienen como criterios de aceptación para la recuperación valores entre 98,0 – 102,0 % y en referencia al coeficiente de variación tomamos lo señalado por la USP NF 202212 que debe ser menor a 2 %.

En la evaluación del parámetro de robustez se determinó la estabilidad de la muestra después de 24 horas en refrigeración, la misma que evidenció que a la muestra no sufre cambios con el método analítico y no afectan la reproducibilidad de los resultados, siendo el porcentaje de Coeficiente de Variación C.V. (%) de 0,84 %

## CONCLUSIONES

Se logró establecer parámetros de validación sobre un método analítico para cuantificar selenio en cápsulas blandas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una adecuada separación, una pureza de pico cromatográfico de 99,98 % para el pico del estándar y 99,96 % para el pico de la muestra, para lo cual se utilizó una columna cromatográfica de L1 (Octadecil silano), 300 mm x 3,9 mm x 10  $\mu$ m. Se estableció un tiempo de retención de 6,0 minutos aproximadamente para el pico principal, a una longitud de onda de 330 nm, y con un volumen de inyección de 100  $\mu$ L. El flujo se estableció en 0,9 mL/minuto. Se determinaron algunos parámetros importantes de validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), demostrando que es específico, después de determinar las interferencias una vez sometida a estrés. La precisión se determinó con una repetibilidad y precisión intermedia que tiene un Coeficiente de Variación (C.V.) menor al 2 %. La exactitud mostró un porcentaje de recuperación de 100,64 % y la robustez con un coeficiente de variación de 0,84 % después de 24 horas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Davy T, Castellano S. The genomics of selenium: Its past, present and future. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2018; 1862(11):2427-2432.
2. Duntas LH, Benvenega S. Selenium: an element for life. *Endocrine*. 2015;48(3):756–775.
3. Romero-Pérez A, García-García E, Zavaleta-Mancera A, Revilla-Vasquez A, Hernández-Calva LM, et al. Designing and evaluation of sodium selenite nanoparticles in vitro to improve selenium absorption in ruminants. *Vet Res Comun*. 2010; 34 (1):71–79.
4. Kieliszek M, Błażej S. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*. 2013;29(5):713-8.
5. Kristal AR, Darke AK, Morris JS, Tangen CM, Goodman PJ, Thompson IM, et al. Baseline selenium status and effects of selenium and vitamin e supplementation on prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(3):djt456. doi: 10.1093/jnci/djt456.
6. Gharipour M, Sadeghi M, Behmanesh M, Salehi M, Nezafati P, Gharpour A. Selenium Homeostasis and Clustering of Cardiovascular Risk Factors: A Systematic Review. *Acta Biomed*. 2017;88(3):263-270.
7. Tajaddini MH, Keikha M, Razzazadeh A, Kelishadi R. A systematic review on the association of serum selenium and metabolic syndrome. *J Res Med Sci*. 2015;20(8):782-9.
8. Vinceti M, Filippini T, Cilloni S, Crespi CM. The Epidemiology of Selenium and Human Cancer. *Adv Cancer Res*. 2017;136:1-48.
9. Wojciechowska-Durczynska K, Lewinski A. Search for relevant indications for selenium supplementation in thyroid diseases. *Neuro Endocrinol Lett*. 2017;38(4):237-241.

10. Fang X, Li C, Zheng L, Yang F, Chen T. Dual-Targeted Selenium Nanoparticles for Synergistic Photothermal Therapy and Chemotherapy of Tumors. *Chem Asian J.* 2018; 13 (8): 996–1004.
11. Zhai S, Hu X, Hu Y, Wu B, Xing D. Visible light-induced crosslinking and physiological stabilization of diselenide-rich nanoparticles for redox-responsive drug release and combination chemotherapy. *Biomaterials.* 2017;121:41-54.
12. The United States Pharmacopeia Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 38 NF 33.* Rockville: The United States Pharmacopeia Convention; 2015.
13. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human use. (ICH). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).* Ginebra: ICH; 2005.
14. Vessman J, Stefan RI, van Staden JF, Danzer K, Lindner W, Burns DT, et al. (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl Chem.* 2001; 73(8):1381-1386.
15. Castillo Beatriz, González R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev Cubana Farm[Internet].* 1996 Abr [citado 13 set 2022] ; 30(1). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es).
16. Aguirre L, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Pérez JA, Martí Pujol M. *Validación de Métodos Analíticos.* Madrid: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria; 2001.
17. Pacheco Torreblanca G. *Evaluación de los niveles de Benzo[a] Pireno por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en pollos.* [Tesis de maestría]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2017.
18. Samaniego J, Arias G. *Desarrollo y Validación de una Metodología Analítica por HPLC para la Cuantificación Simultanea de Fenilefrina Clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfenamina Maleato en Tabletas.* *Rev Soc Quím Perú.* 2016; 82(2):196-207.
19. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica.* Octava ed. Madrid: Thomson-Paraninfo; 2005.
20. Rubinson KA, Rubinson JF. *Análisis Instrumental.* Madrid: Pearson Educación S.A.; 2001.
21. Christian GD. *Química Analítica.* Sexta ed. México: Mc Graw-Hill/Interamericana; 2009.
22. Bavand Savadkouhi M, Vahidi H, Ayatollahi AM, Hooshfar S, Kobarfard F. RP-HPLC Method Development and Validation for Determination of Eptifibatide Acetate in Bulk Drug Substance and Pharmaceutical Dosage Forms. *Iran J Pharm Res.* 2017;16(2):490-497.
23. Bor M, Guilarte A, Guzmán L, Macías K, Mendoza W. M. Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas. *Afinidad.* 2018; 75(581): 32-38.
24. Rodríguez Menéndez AE, Liendo Liendo ER. Estudio transversal de las principales dimensiones de la mano en estudiantes de la Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann - Tacna. *Ciencia & Desarrollo.* 2019; 15: 31–33. doi: 10.33326/26176033.2013.15.313

25. Funes JI, Meza MN, Ponce HD. Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de atorvastatina en tabletas mediante HPLC-DAD. *Portal de La Ciencia*. 2016; 9: 27–41. doi: 10.5377/pc.v9i0.2670
26. Guarniz Aguilar D. Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la disolución de ezetimiba 10 mg y simvastatina 40 mg en tabletas. [Tesis grado de bachiller]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2017.
27. Ccorimanya Gutierrez K. Desarrollo y Validación Prospectiva de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar Lidocaína Base en una pomada, Arequipa-2012. [Tesis de título de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2012.
28. Enciso Rodríguez M. Validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato en jarabe. Lima -2013. [Tesis de título de Químico Farmacéutico]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2014.