



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA
ANALÍTICA POR CLAR PARA LA DETERMINACIÓN DE
ANASTROZOL, BICALUTAMIDA, FLUTAMIDA Y
TAMOXIFENO EN AGUA RESIDUAL DE UNA PLANTA
FARMACÉUTICA DE PRODUCTOS ONCOLÓGICOS**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
ORTEGA SOTO HECTOR HUGO**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ LIRA**

MÉXICO, D.F. MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	4
2	MARCO TEÓRICO:.....	6
2.1	Cromatografía	6
2.2	Clasificación de la Cromatografía	6
2.2.1	Cromatografía de Adsorción.....	6
2.2.2	Cromatografía de Reparto	7
2.2.3	Cromatografía de Intercambio Iónico.....	7
2.2.4	Cromatografía de Exclusión.....	7
2.3	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	7
2.3.1	Bomba	9
2.3.2	Inyector	10
2.3.3	Detector.....	11
2.3.4	Integrador.....	12
2.4	Anastrozol	12
2.5	Bicalutamida.....	14
2.6	Flutamida.....	18
2.7	Tamoxifeno.....	20
2.8	Software de simulación cromatográfica.....	22
2.9	Validación de Métodos Analíticos	23
2.9.1	Parámetros Analíticos de Validación	23
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	Objetivo primario	27
4.2	Objetivos secundarios	27
5	HIPÓTESIS.....	28
6	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
6.1	Tipo de Estudio.....	29
6.2	Población en Estudio	29
6.3	Criterios de Inclusión	29
6.4	Criterios de Exclusión y Eliminación	29

6.5	Variables.....	29
7	DESARROLLO.....	30
7.1	Equipos, Reactivos y Materiales	30
7.1.1	Equipos	30
7.1.2	Reactivos	30
7.1.3	Materiales.....	31
7.2	Desarrollo de la Metodología Analítica	31
7.3	Validación de la Metodología Analítica	39
7.3.1	Adecuabilidad	39
7.3.2	Precisión del Sistema	41
7.3.3	Especificidad	42
7.3.4	Linealidad del Sistema	45
7.3.5	Linealidad del Método	51
7.3.6	Repetibilidad.....	55
7.3.7	Precisión Intermedia.....	58
7.3.8	Límite de Detección y Cuantificación	63
7.3.9	Estabilidad de las Soluciones Muestra y Referencia	68
7.3.10	Robustez	74
8	CONCLUSIONES.....	79
8.1	Separación Cromatográfica	79
8.2	Utilización de software	84
8.3	Validación de Método Analítico	92
8.4	Técnica analítica validada	94
9	ANEXOS	97
9.1	Anexo 1. Fórmulas para la determinación de Parámetros Cromatográficos.	97
9.2	Anexo 2. Fórmulas para la determinación de Parámetros Estadísticos.	99
10	REFERENCIAS:.....	101

1 INTRODUCCIÓN

Existen en el mercado medicamentos fabricados con fármacos que son catalogados como oncológicos, la exposición a estas sustancias a personas sanas podría causarles problemas tóxicos graves. Durante la fabricación de estos medicamentos, específicamente en el proceso de limpieza de equipos, uniformes y áreas, los laboratorios farmacéuticos obtienen un residuo de agua contaminada con este tipo de fármacos y en muchos de los casos es desechada en el drenaje municipal sin ser inactivado el peligro tóxico potencial.

El Estado Mexicano obliga a las empresas farmacéuticas a realizar un monitoreo del agua residual de los procesos de fabricación para determinar la cantidad de compuestos químicos peligrosos y evitar que sean desechados de manera irresponsable en el desagüe público.

Para evitar la contaminación con aguas residuales, un laboratorio farmacéutico retiene estas aguas en una cisterna de contención para tratarla por medio de oxidación con hipoclorito de sodio concentrado, posteriormente se realiza una recirculación de las aguas por medio de bombas, al paso de varias horas se toman muestras de esta agua para determinar si el tratamiento fue suficiente para degradar los activos hasta un límite permisible, de no ser así, se realiza una nueva adición de hipoclorito de sodio con una recirculación hasta obtener un límite permisible de los activos. Cuando el tratamiento es satisfactorio, el laboratorio farmacéutico envía esta agua a una planta de tratamiento privada, en donde se encargan de su disposición final.

Los fármacos Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno son catalogados como fármacos oncológicos. En el caso de Anastrozol y Bicalutamida, estos principios activos son un potente inhibidor selectivo no-esteroidal de la aromatasa el cual es prescrito en el tratamiento de cáncer avanzado de seno en mujeres postmenopáusicas.

La Flutamida es un antiandrógeno no-esteroidal que inhibe competitivamente el enlace andrógeno – receptor andrógeno. La Flutamida está relacionada estructuralmente y farmacológicamente con la Bicalutamida.

Este trabajo desarrolló una metodología analítica en la cual se puedan determinar y cuantificar éstos principios activos oncológicos citotóxicos (Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno) en agua residual de procesos de fabricación de productos farmacéuticos.

Debido a las características de sensibilidad, especificidad y selectividad, el método analítico fue desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) la cual permite la separación de los compuestos de la matriz compleja, para su posterior cuantificación por medio de una detección Ultravioleta.

En el momento en que se obtuvieron las condiciones cromatográficas ideales que permitieron la separación de los compuestos de interés y para su posterior cuantificación, se determinó que era susceptible de validación.

Los parámetros de validación que se determinaron fueron: adecuabilidad, precisión del sistema, especificidad, linealidad del sistema, linealidad del método, límite de cuantificación y límite de detección, repetibilidad, precisión intermedia, robustez y estabilidad analítica de las soluciones muestra.

2 MARCO TEÓRICO:

2.1 Cromatografía

La definición de *Cromatografía* fue introducida por primera vez en 1906 por el Químico Botánico Michael Tswett, derivado del griego *Chroma* - color y *Grapho* - escritura. Tswett realizó un trabajo en donde describía la separación de pigmentos coloreados de plantas en bandas por medio de columnas de tiza y otros materiales como polisacáridos. Tswett observó el efecto de las separaciones usando diferentes materiales en la columna y de su tamaño de partícula, sin embargo, su trabajo no resultó útil hasta los años 30's cuando Lederer y otros autores describieron en sus trabajos la separación de pigmentos de plantas, incluyendo carotenos y xanthophylls ⁽¹⁾.

La *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) define la cromatografía de la siguiente manera:

“Un método físico de separación en el cual los componentes a separar son distribuidos entre dos fases, una de ellas está fija (fase estacionaria) y la otra se mueve a una dirección definida (fase móvil)” ⁽²⁾.

2.2 Clasificación de la Cromatografía

Existen distintas clasificaciones de la cromatografía, cada una de éstas clasificaciones involucran ya sea el principio de la separación o alguna característica implícita en el sistema cromatográfico utilizado. Sin embargo, la clasificación más comúnmente utilizada es la clasificación por el principio involucrado en la separación en las cuales se incluyen las siguientes:

2.2.1 Cromatografía de Adsorción

La separación en la cromatografía de adsorción está basada en las diferencias entre la afinidad de adsorción de los componentes de la muestra y la superficie de la fase estacionaria. ⁽²⁾

Los sistemas basados en la cromatografía de adsorción, utilizan solventes no-polares que contienen una proporción pequeña de algún aditivo polar. Cuando la muestra es aplicada, las moléculas de soluto con algún grupo funcional polar se unirán a los sitios activos de la fase estacionaria, los cuales serán desplazados subsecuentemente por las moléculas de aditivos polares de la fase móvil, las moléculas de soluto desplazadas serán re-adsorbidas en sitios activos libres de la fase estacionaria. ⁽¹⁾

El desplazamiento de las moléculas del soluto dependerá de su polaridad relativa, las moléculas más polares serán adsorbidas más fuertemente, mientras que las moléculas menos polares serán débilmente adsorbidas.

2.2.2 Cromatografía de Reparto

A este tipo de cromatografía también se le conoce como cromatografía líquido-líquido. En estos sistemas las moléculas del soluto se distribuyen entre dos líquidos, en el cual uno es fase móvil y otro la estacionaria, la cual se encuentra homogéneamente dispersada en un soporte sólido, finamente dividido.

En 1952, el desarrollo de este sistema le valió para ganar el premio Nobel de química a Martín y Synge, pero la complejidad de la fijación de la fase estacionaria al soporte así como la imposibilidad de realizar gradientes de elución han hecho que estos sistemas hayan sido casi totalmente desplazados. ^{(1), (3)}

2.2.3 Cromatografía de Intercambio Iónico

En estos sistemas cromatográficos, el proceso de intercambio iónico se lleva a cabo cuando una solución que contiene un electrolito entra en contacto con una resina con un intercambiador iónico, en donde el analito es retenido para posteriormente ser desplazado por otros iones de carga similar al analito. ^{(1), (3)}

2.2.4 Cromatografía de Exclusión

Se diferencia fundamentalmente a las anteriores a que la separación se logra principalmente en base al peso y tamaño molecular del analito, en donde las moléculas más grandes logran eluir y salir más rápido que las moléculas de tamaño menor, esto se debe a que las moléculas de peso y tamaño menor son retenidas en los poros que tiene la fase estacionaria.

Principalmente, existen dos clases de materiales utilizados como fase estacionaria en la cromatografía de exclusión, el primero son polímeros macromoleculares semirrígidos y el segundo sílice inerte rígida o vidrio. ⁽¹⁾

2.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Desde los estudios de Tswett en 1906 hasta la fecha, las técnicas cromatográficas se han avanzado enormemente, se han desarrollado nuevos sistemas cromatográficos que son más precisos, se han estudiado nuevos materiales para ser utilizados como fase estacionaria que han resultado más económicos, eficientes, selectivos y resistentes, además se han desarrollado equipos que permiten reducir los tiempos de análisis de una manera impresionante.

Buscando incrementar la eficiencia de las columnas la teoría indica que se debe aumentar el tiempo de contacto del analito con la fase estacionaria, esto se logra mediante la disminución del tamaño de partícula de la fase estacionaria lo que implica un inconveniente, al disminuir el tamaño de la partícula de la fase estacionaria la presión dentro de la columna aumenta, lo que implicó el desarrollo de bombas que fueran capaces de distribuir la fase móvil en la columna de una manera constante, precisa y exacta aunque el sistema aumentara la presión.

Estos cambios en la fase estacionaria implicaron cambios exhaustivos en el diseño y detectores que fueran capaces de resistir las nuevas presiones de trabajo en un análisis por cromatografía de líquidos.

Acorde a la tecnología desarrollada para ese momento Horvarth ⁽⁴⁾ construyó uno de los primeros sistemas de cromatografía de líquidos el que se usó en estudios sobre nucleótidos utilizando materiales micronizados en el empaque de la columna. Este desarrollo dio pie a lo que se conoce como Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o Alta Presión o también conocido como HPLC (por sus siglas en ingles *High Performance Liquid Chromatographic*).

En la actualidad en el mercado existen un sinnúmero de marcas de equipos para CLAR que son más precisos y sensibles que sus antecesores de los años 70's; sin embargo, el concepto general sigue siendo el mismo.

El equipo para CLAR debe contar como mínimo con una bomba que se capaz de desplazar la fase móvil de una manera constante y precisa, un detector el cual debe ser a fin al analito a analizar y un sistema que procese los datos obtenidos durante el análisis (integrador).

Existen aditamentos adicionales que ayudan enormemente a la reproducibilidad del análisis como lo son los automuestreadores, inyectores automatizados, termostato de columna y muestras y controladores e integradores computarizados. En la figura 1 se muestra el diagrama de un sistema CLAR básico.

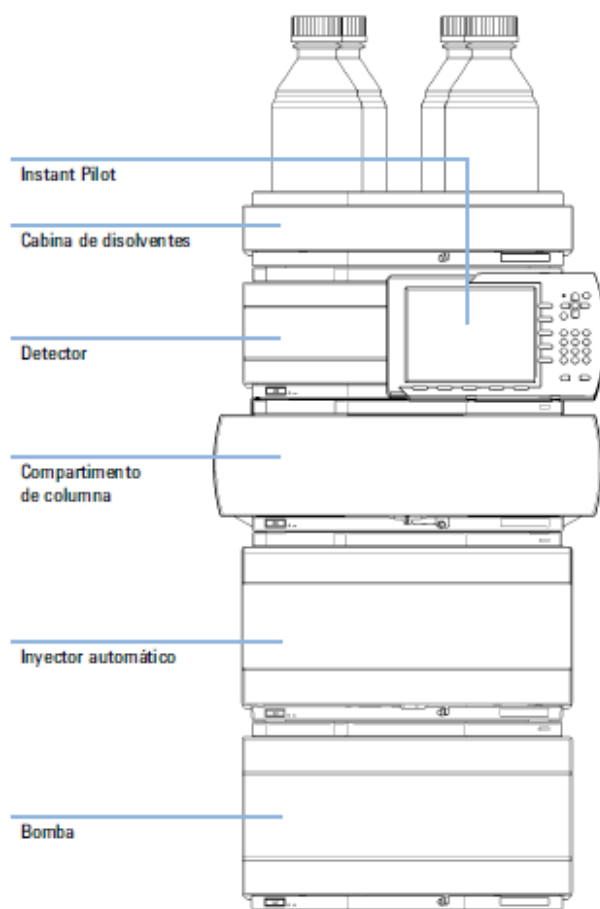


Figura 1. Diagrama de un Sistema CLAR básico ⁽⁵⁾.

2.3.1 Bomba

La bomba sirve para transferir la fase móvil desde los reservorios hasta el inyector y de allí a la columna y al detector. El flujo de disolvente que impulsan puede ser muy variado, en la actualidad existen bombas que son capaces de suministrar volumen en el orden de los microlitros por minutos (cromatografía ultra rápida) pasando por flujos de pocos mililitros por minuto (cromatografía convencional) y hasta valores mucho más altos para separaciones semi-preparativas y/o preparativas.⁽³⁾

Los requerimientos mínimos que debe contener una bomba para CLAR son los siguientes:⁽¹⁾

- Los materiales de construcción deben ser inertes a los solventes comúnmente usados.
- Debe ser capaz de suministrar altos volúmenes de solvente.
- Debe ser capaz de suministrar flujos precisos y exactos.
- El cabezal de la bomba debe tener un volumen pequeño para facilitar un cambio rápido en la composición de la fase móvil.
- Debe ser capaz de sostener altas presiones alrededor de los 7000 Psi; en la actualidad existen bombas capaces de sostener presiones máximas de 17000 Psi.
- Debe ser capaz de suministrar un flujo continuo libre de pulso y no contribuir al ruido en la detección.

Básicamente, existen dos tipos de bombas: las de pistón o reciprocantes y las de desplazamiento continuo (bombas de jeringa).

Bombas reciprocantes. La mayor parte de los equipos cromatográficos utilizan bombas con pistones tipo reciprocante, desde un pistón hasta cuatro, el pistón se conecta a un motor del equipo por medio de engranajes y el movimiento hacia adelante impulsa el solvente despegando una esfera de rubí de su asiento de zafiro y abriendo de esta forma la válvula de salida. La esfera es retenida por una malla de retención al tiempo que el solvente es impulsado hacia el sistema. Simultáneamente la presión generada actúa sobre la otra válvula, la de entrada, en la cual la esfera de rubí es forzada a ubicarse en el asiento de zafiro. Cuando el pistón retrocede por el mecanismo inverso se cierra la válvula de salida y se abre la de entrada permitiendo que el solvente proveniente del reservorio llene la cámara del pistón. Normalmente la válvula de entrada se encuentra en la parte inferior y la de salida en la superior del cabezal de la bomba. Este diseño permite que las burbujas que accidentalmente entren en el sistema sean fácilmente eliminadas.⁽³⁾

Las bombas reciprocantes permiten variar el flujo por alguno de los siguientes mecanismos:

- Variando el recorrido del pistón.
- Variando la velocidad del movimiento del pistón.

En la figura 2 se muestra un diagrama de un cabezal de una bomba recíproca.

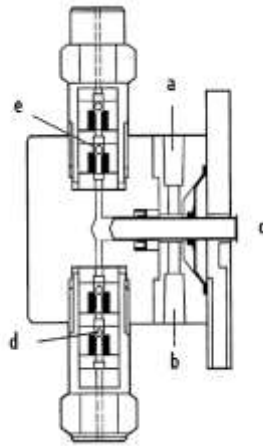


Figura 2. Diagrama de un cabezal de bomba recíproca; a) y b) entrada de solvente de limpieza del pistón, c) pistón, d) y e) válvulas de entrada y salida. ⁽³⁾

Bombas de jeringa. Es un dispositivo de desplazamiento continuo, es decir, el solvente contenido en un cilindro es impulsado hacia el inyector por medio de un movimiento continuo y hacia delante del pistón. El recorrido del pistón y el volumen desplazado suficiente para efectuar un número determinado de ensayos sin necesidad de recargar su cámara. La figura 3 muestra el diagrama de una bomba de jeringa.

La principal ventaja de este tipo de bombas es la total ausencia de pulsos ya que la cámara no necesita ser recargada, mientras que la principal desventaja está dada por el flujo y el tiempo necesario para recargar la cámara cuando ésta se vacía. ⁽³⁾

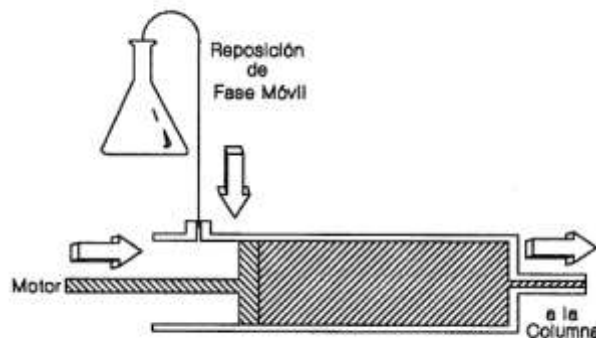


Figura 3. Diagrama de bomba de jeringa. ⁽³⁾

2.3.2 Inyector

Anteriormente la introducción de la muestra en solución se realizaba por medio de inyección manual, con ayuda de una microjeringa, lo que implicaba una gran variación entre inyección e inyección de una misma solución, en la actualidad esto ya no se lleva a la práctica gracias al desarrollo y diseño de los inyectores automatizados.

El inyector es el módulo o dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el flujo del solvente a través del sistema y permite una mínima variación entre inyecciones de la misma muestra.

Un inyector básico debe reunir una serie de características importantes, como lo son:

- Fácil operación.
- Inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso y exacto en la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

Actualmente la totalidad de los inyectores de CLAR son válvulas que orientan el flujo del disolvente hacia la columna, pasando o no (según su posición) a través de un *loop* en el cual se introduce el volumen a inyectar, las válvulas se accionan de manera automatizada.

2.3.3 Detector

La función de un detector es monitorear y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de la muestra que sale de la columna cromatográfica en la fase móvil. ⁽³⁾

Los detectores funcionan por medio de diferentes principios, pero todos utilizan una señal eléctrica que es proporcional a alguna propiedad físico-química de cada uno de los analitos.

En la elección de tipo de detector debe tomarse en cuenta las características físico-químicas del analito y las especies químicas en la muestra y ésta elección puede subsecuentemente determinar el tipo de eluyente a usar y posiblemente la fase estacionaria y el tipo de cromatografía.

El detector ideal debe contar con las siguientes características:

- Alta sensibilidad.
- Buena estabilidad y reproducibilidad.
- La respuesta obtenida debe ser lineal.
- Debe contar con un pequeño volumen interno.
- Debe tener un bajo tiempo de respuesta independiente del flujo.
- Insensible a cambios de temperatura y presión.
- Deben contar con alta confiabilidad y ser fáciles de usar.
- La respuesta obtenida debe ser similar o selectiva para cada clase de analitos.
- No debe ser destructivo.

Los detectores pueden clasificarse en dos clases: generales o universales y detectores selectivos.

Los detectores universales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Como

ejemplos típicos de estos tipos de detectores se cuentan con índice de refracción y de conductividad.

Los detectores selectivos son aquellos que miden alguna propiedad propia del soluto. Como ejemplo se tiene los detectores UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda determinada. Otro ejemplo es el detector de fluorescencia, empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con algún reactivo fluorogénico.

2.3.4 Integrador

El registro de datos obtenidos por la señal proveniente del detector y su eventual procesamiento se realiza por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos de los que podemos nombrar los siguientes:

- Registrador gráfico o graficador.
- Integrador. No solo se obtiene un gráfico sino también un procesamiento matemático de los datos.
- Computadora. En la actualidad este es el sistema más usado, básicamente la computadora (con el software apropiado) permite el registro gráfico del cromatograma, como el procesamiento matemático de los datos, almacenamiento de la información, generación de reportes e incluso el manejo global del cromatógrafo. Como las computadoras necesitan señales digitalizadas, se necesita una interface analógica-digital que convierta la señal analógica del detector.

2.4 Anastrozol

El Anastrozol es un potente inhibidor selectivo no-esteroidal de la aromatasa el cual es prescrito en el tratamiento de cáncer avanzado de seno en mujeres postmenopáusicas y en algunos pacientes con ER diseminación negativa. ^{(6), (7)}

El Anastrozol es un inhibidor de la enzima CYP19 que es responsable de la aromatización de la testosterona a la forma 17- β -estradiol, la administración de Anastrozol puede disminuir los niveles de 17- β -estradiol endógeno. ⁽⁸⁾

El Anastrozol aparece rápidamente en el plasma y su concentración máxima (C_{max}) se obtiene entre 1.2 y 1.3 horas después de una única dosis oral, el anastrozol no es detectable después de 48 horas de la administración de una dosis de 0.5 mg y después de 120 horas de la administración de 1.0 mg. ⁽⁹⁾

Nombres químicos:

- (1,3-benzenediacetonitrile, $\alpha,\alpha,\alpha',\alpha'$ -tetramethyl-5-(1*H*-1,2,4-triazol-yl-methyl)
- [2,2 ϕ -[5-1*H*-1, 2, 4-triazole-1-*y*-methyl)- 1, 3-phenylene] bis (2-methylpropiononitrile)]
- 2-[3-(1-cyano-1-methyl-ethyl)-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)phenyl]-2-methyl propanenitrile

Estructura química:

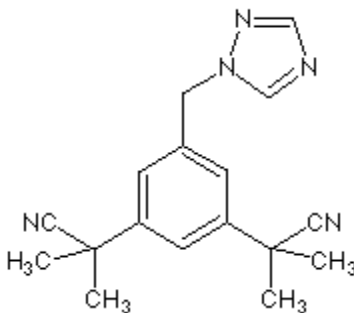


Figura 4. Estructura química del Anastrozol. ⁽¹⁰⁾

Propiedades Físico-químicas

- Fórmula química condensada: C₁₇H₉N₅
- Masa molecular: 297.37 g/mol
- Punto de fusión: 81° - 82° C
- Descripción: Cristales a partir de acetato de etilo / ciclohexano

Productos comercializados

En la industria farmacéutica existen diversos productos que contienen el Anastrozol como principio activo, a continuación se enuncian algunos comercializados en México:

Tabla 1. Medicamentos con Anastrozol como Principio activo. ⁽¹¹⁾

Nombre Comercial	Laboratorio Fabricante
Arimidex	Astrazeneca
Asoinacor	Asofarma
Probitor	Accord Farma
Ultrodona	Cryopharma
Zolazatin	Teva

Métodos Analíticos Propuestos

Para la determinación de Anastrozol en producto terminado existen diversas propuestas de análisis. Kumar ⁽⁶⁾ propone un sistema cromatográfico el cual consiste en una fase móvil compuesta de acetonitrilo mezclada con buffer de fosfatos a un pH de 6.0 ± 0.05 en una proporción de 1:1 v/v, la fase estacionaria consta de una columna Gracemart RP18 100 x 4.6 mm con tamaño de partícula de 5 µm y la detección se llevó a cabo con un detector UV a 215 nm con el sistema descrito se obtuvo el siguiente cromatograma (Figura 5).

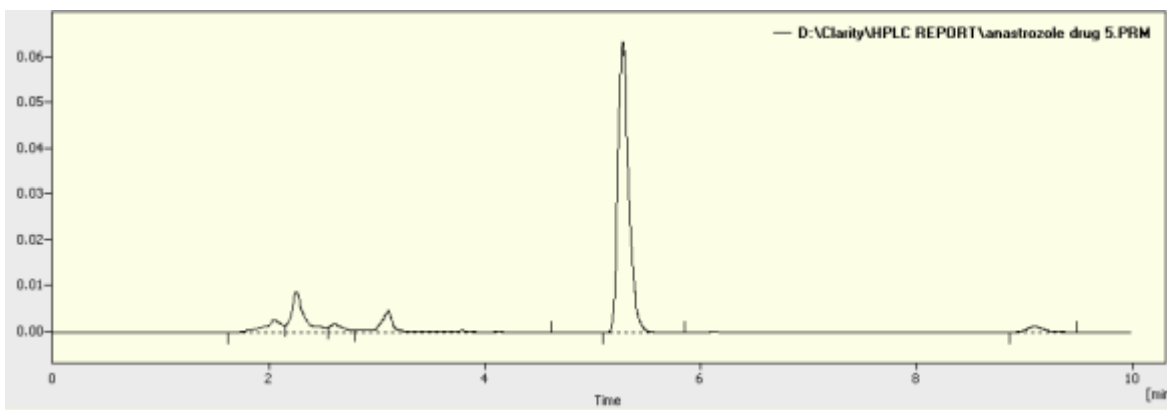


Figura 5. Cromatograma tipo de Anastrozol obtenido por el sistema cromatográfico propuesto por Kumar et al. ⁽⁶⁾

Satynnarayana ⁽¹²⁾ propone un sistema cromatográfico diferente. La fase móvil consta de acetonitrilo-metanol-ácido fosfórico al 0.1% (30:20:50) con un flujo de 1.0 mL/min, la fase estacionaria es una columna C18 y una detección con UV a 256 nm.

Existen también técnicas cromatográficas propuestas para la determinación de posibles sustancias de degradación del Anastrozol. Reddy, et al ⁽¹³⁾, analizó muestras de producto terminado que habían sido sometidas a reacción de oxidación. Se logró separar el Anastrozol de sus productos de degradación y sustancias relacionadas mediante una columna ODS-3V, de 250x4.6 mm y 5 µm. La fase móvil consta de agua-acetonitrilo en un gradiente a un flujo de 1.0 mL/min y una detección con UV a 215 nm.

Otro sistema propuesto para la determinación de sustancias de degradación del Anastrozol es el propuesto por Sitaram, et al. ⁽¹⁴⁾, en donde el activo fue sometido a condiciones de estrés indicados en la ICH guidelines, las muestras fueron analizadas utilizando una columna Oyster ODS-3 de 100x4.6 mm y un tamaño de partícula de 3.0 µm, utilizando como fase móvil una mezcla de formiato de amonio 10 mM y acetonitrilo en una proporción de 60:40 (v/v), a un flujo de 0.5 mL/min, la detección se llevó a cabo con un detector UV a 215 nm.

2.5 Bicalutamida

La Bicalutamida es un agente anti-androgénico no-estoridal que actúa por encuadernación del receptor de andrógeno previniendo la activación de estos receptores por lo que se regula la respuesta androgénica por hormonas, además acelera la degradación del receptor androgénico. Es un potente inhibidor selectivo no-esteroidal de la aromatasa el cual es prescrito en el tratamiento de cáncer avanzado de seno en mujeres postmenopáusicas. ⁽¹⁵⁾

Nombres químicos

- *N*-[4-cyano -3- (trifluoromethyl) phenyl] -3- [(4-fluorophenyl) sulfonyl] -2-hydroxy-2-methyl propanamide.
- (+)-40-Cyano α,α,α,-trifluoro-3-[(p-fluoro phenyl)sulfonyl]-2-methyl-m-lactotoluidide

Estructura

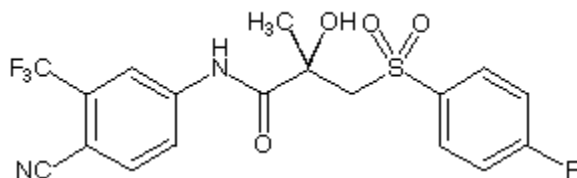


Figura 6. Estructura química de la Bicalutamida. ⁽¹⁰⁾

Propiedades Físico-químicas

- Fórmula química condensada: C₁₈H₁₄F₄N₂O₄S
- Masa molecular: 430.38 g/mol
- Punto de fusión: 191° - 193° C
- Descripción: Cristales a partir de acetato de etilo / éter de petróleo (1:1)

Productos Comercializados

Tabla 2. Medicamentos con Bicalutamida como Principio activo. ⁽¹¹⁾

Nombre Comercial	Laboratorio Fabricante
Advanpro	Accord Farma
Bicotexida	Pisa
Calutol	Asofarma
Casdrogen	Cryopharma
Casodex	Astrazeneca

Métodos Analíticos Propuestos

Lakshmana ⁽¹⁶⁾ propone un sistema cromatográfico para la determinación de Bicalutamida en materia prima y producto terminado bajo las siguientes condiciones cromatográficas. Como fase móvil propone una mezcla de acetonitrilo grado cromatográfico con un buffer de fosfatos pH 2.8 en una proporción 40:60 v/v, a flujo de 1.0 ml/min. Utilizando como fase estacionaria una columna XTERRA-RP 18 de 100 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm y como sistema de detección un detector UV a 270 nm. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 7.

Un sistema cromatográfico propuesto por Chandanam ⁽¹⁷⁾ es muy similar al de Lakshmana, Chandanam propone un sistema cromatográfico para la determinación de Bicalutamida en materia prima y producto terminado bajo las siguientes condiciones cromatográficas. Como fase móvil propone una mezcla de acetonitrilo grado cromatográfico con un buffer de fosfatos pH 2.8 en una proporción 50:50 v/v, a flujo de 1.0 ml/min. Utilizando como fase estacionaria una columna XTERRA-RP 18 de 100 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm y como sistema de detección un detector UV a 270 nm. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 8.

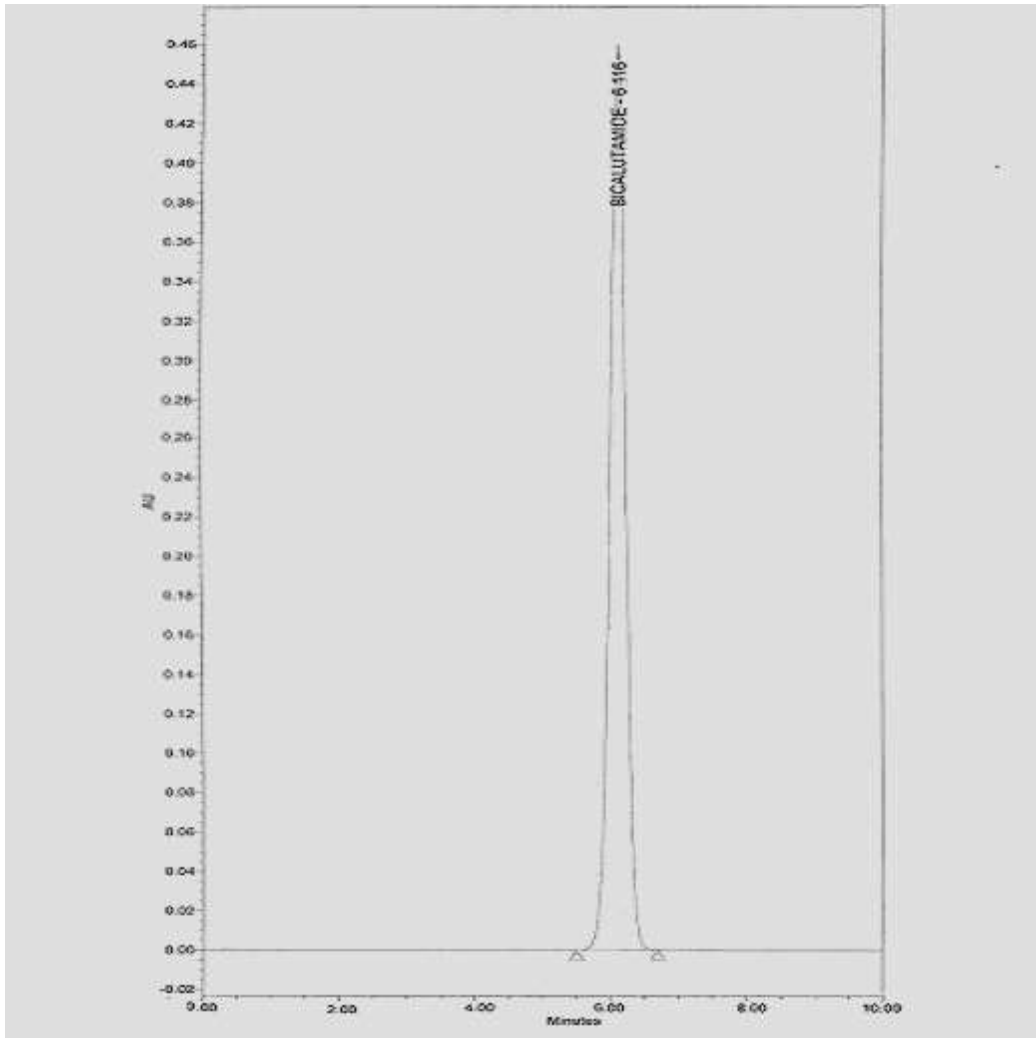


Figura 7. Cromatograma obtenido por Lakshamana Rao bajo las condiciones cromatográficas propuestas. ⁽¹⁶⁾

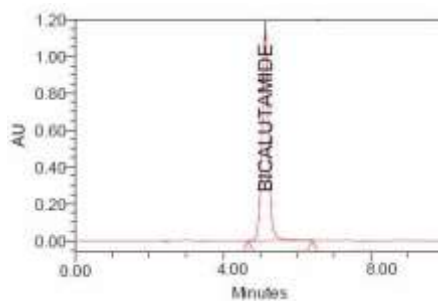


Figura 8. Cromatograma obtenido bajo las condiciones cromatográficas propuestas por Chandanam. ⁽¹⁷⁾

Para la determinación de Bicalutamida y sus sustancias relacionadas y productos de degradación Raman Nanduri ⁽¹⁸⁾ propone dos sistemas cromatográficos. El primero consiste en un sistema CLAR bajo las siguientes condiciones:

Como fase estacionaria se propone una columna Zorbax SB Phenyl de 150x4.6 mm y un tamaño de partícula de 3.5 μm el volumen de inyección fue de 20 μL y la detección se realizó en UV a 220 nm. Parte de la fase móvil consiste en un buffer

0.01 M de fosfato monobásico de sodio a pH 6.0, 0.001 M de ácido 1-octanosulfonato de sodio y 0.0025 M de hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio. Este buffer fue mezclado con acetonitrilo para preparar dos fases móviles (A y B) la fase móvil A consiste en una mezcla de buffer-acetonitrilo en una proporción de 95:5 v/v y la fase móvil B en una mezcla de buffer-acetonitrilo en una proporción de 10:90 v/v. La elución se llevó a cabo por medio de un gradiente el cual fue programado de la siguiente manera:

Tabla 3. Gradiente propuesto por Raman Nanduri para la separación de Bicalutamida y sus sustancias relacionadas por CLAR. ⁽¹⁸⁾

TIEMPO	%A	%B
0	80	20
25	80	20
36	75	25
49	70	30
64	60	40
68	55	45
76	45	55
85	80	20
90	80	20

El cromatograma resultante en el experimento por CLAR se observa en el figura 9.

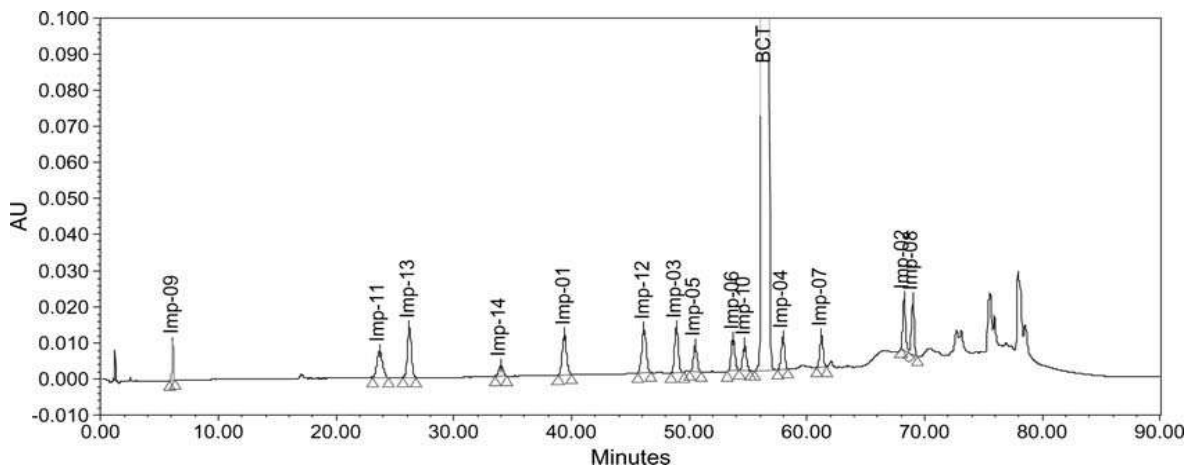


Figura 9. Cromatograma tipo obtenido por Raman Nanduri para la separación de Bicalutamida y sus sustancias relacionadas con el sistema CLAR. ⁽¹⁸⁾

La segunda propuesta por Raman Nanduri consiste en un sistema UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatographic*) consiste en lo siguiente:

Como fase estacionaria se propone una columna HSS T3 100x2.1 mm y un tamaño de partícula de 1.8 μm . el volumen de inyección fue de 2 μl y la detección se realizó en UV a 220 nm. Parte de la fase móvil consiste en un buffer 0.01 M de fosfato monobásico de sodio a pH 6.0. La fase móvil A consiste en solo el buffer y la fase móvil B en una mezcla de buffer-acetonitrilo en una proporción de 10:90 v/v. La elución se llevo a cabo por medio de un gradiente el cual fue programado de la siguiente manera:

Tabla 4. Gradiente propuesto por Raman Nanduri para la separación de Bicalutamida y sus sustancias relacionadas por UPLC. ⁽¹⁸⁾

TIEMPO	%A	%B
0	62	28
26.0	45	55
29.3	45	55
31.3	62	28
34.0	62	28

El cromatograma resultante en el experimento por UPLC se observa en el figura 10.

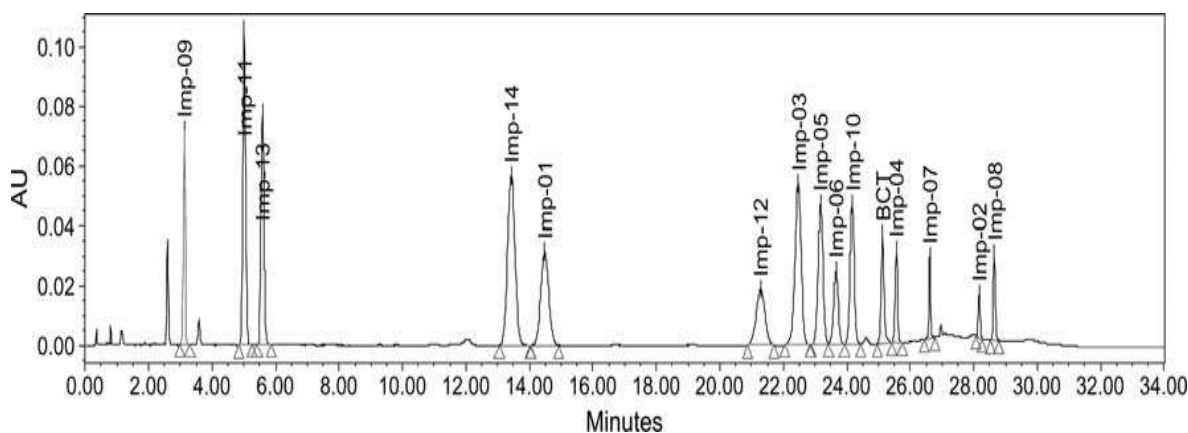


Figura 10. Cromatograma tipo obtenido por Raman Nanduri para la separación de Bicalutamida y sus sustancias relacionadas con el sistema UPLC. ⁽¹⁸⁾

2.6 Flutamida

La Flutamida es un antiandrógeno no-esteroidal que inhibe competitivamente el enlace andrógeno – receptor andrógeno. La Flutamida está relacionada estructuralmente y farmacológicamente con la Bicalutamida. ^{(19), (20)}

Nombres químico

- 2-Methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]propanamide
- α,α,α -trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide
- 4'-nitro-3'-trifluoromethylisobutyranilide

Numero CAS

- 13311-84-7

Estructura

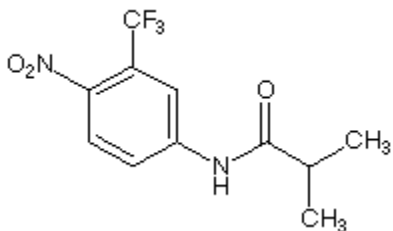


Figura 11. Estructura química de la Flutamida. ⁽¹⁰⁾

Propiedades Físico-químicas

- Fórmula química condensada: C₁₁H₁₁F₃N₂O₃
- Masa molecular: 276.22 g/mol
- Punto de fusión: 111.5° - 112.5° C
- Descripción: Cristales a partir de benceno

Productos Comercializados

Tabla 5. Medicamentos con Flutamida como Principio activo. ⁽¹¹⁾

Nombre Comercial	Laboratorio Fabricante
Tafenil	Asofarma
Euflex	Schering
Fugerel	Schering

Métodos Analíticos Propuestos

Anton Smith *et.al* ⁽²¹⁾ proponen un sistema cromatográfico para la determinación de Flutamida el cual consiste en una fase móvil compuesta de una mezcla de acetonitrilo- agua en una proporción 70:30 (v/v) a un flujo de 1.0 ml/min. La columna utilizada es una Spheri – 5 RP – 18, con tamaño de partícula de 5 µm de 250 x 4.6 mm. La detección se realizó por medio de un detector de fluorescencia equipado con filtros de 255 nm para la excitación y de 375 nm para la emisión. Y para la cuantificación se realiza por medio de un estándar interno el cual no es nombrado. ⁽²¹⁾

Ver cromatograma obtenido en el experimento en la figura 12.

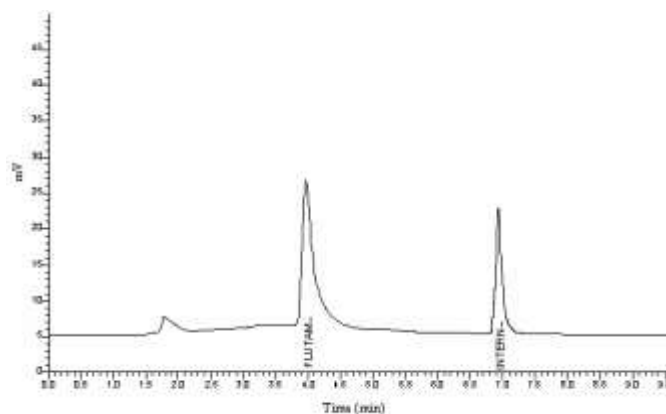


Figura 12. Cromatograma tipo obtenido por Smith et al para la determinación de Flutamida en una formulación farmacéutica. ⁽²¹⁾

Otra propuesta para la determinación de Flutamida, pero en sangre la realizó Filip *et.al.* ⁽²²⁾ esta consiste en la separación de la flutamida de la matriz por medio de una columna Nucleosil 120 C18 de 5 μm de tamaño de partícula, una longitud de 250 mm y un diámetro de 4 mm. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo - agua (60:40 v/v) y con un flujo de 1.0 mL/min. (Figura 13).

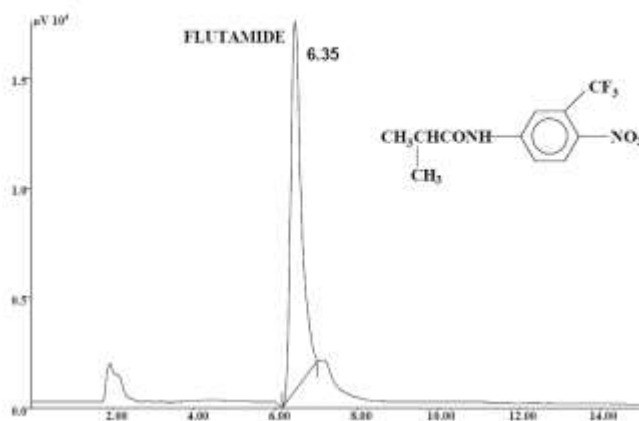


Figura 13. Cromatograma tipo obtenido por Filip et al para la determinación de Flutamida en sangre. ⁽²²⁾

2.7 Tamoxifeno

El principio activo denominado Tamoxifeno está indicado para el tratamiento del carcinoma mamario metastásico en mujeres postmenopáusicas. Tamoxifeno tiene indicación en el caso de carcinoma en estadio I y en otras etapas con ganglios axilares histológicamente negativos, cuando existen factores histológicos desfavorables; su uso se asocia en estos casos a disminución de recurrencias y a mayor supervivencia, especialmente en mujeres posmenopáusicas con receptor estrogénico positivo. ⁽¹¹⁾

Tamoxifeno es un fármaco no esteroideo basado en trifeniletileno que muestra un espectro complejo de antagonista estrogénico y efectos farmacológicos similares a los agonistas de los estrógenos en diferentes tejidos. En pacientes con cáncer de mama, a nivel tumoral, Tamoxifeno actúa principalmente como un anti-estrógeno,

previniendo la unión del estrógeno al receptor estrogénico. Sin embargo, los estudios clínicos han mostrado algún beneficio en los tumores receptor estrógeno negativo, lo cual puede indicar otros mecanismos de acción. En la situación clínica, se reconoce que Tamoxifeno produce reducciones, del orden del 10-20%, en los niveles de colesterol sanguíneo total y en las lipoproteínas de baja densidad en mujeres post-menopáusicas. Adicionalmente, se ha comunicado que Tamoxifeno mantiene la densidad mineral ósea en mujeres post-menopáusicas.⁽¹⁰⁾

Existen monografías compéndiales como la USP⁽²³⁾ en las cuales indican un método analítico para valoración del producto terminado y materia prima, se ha observado que el uso del sistema cromatográfico descrito en la USP en las instalaciones del laboratorio, presenta problemas con la forma del pico de Tamoxifeno, específicamente el coeio, ya que en la adecuabilidad del sistema se presenta un coeio mayor a 2.0, lo cual podría presentar problemas de reproducibilidad en la cuantificación.

Estructura Química

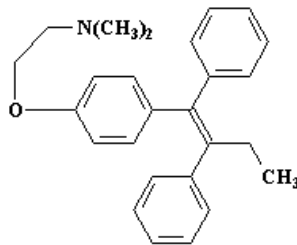


Figura 14. Estructura química del Tamoxifeno.⁽¹⁰⁾

Propiedades Físico-químicas

- Descripción: Polvo cristalino fino y blanco inodoro, Higroscópico; sensibilidad a la luz UV
- Punto de fusión: 140°-142° C
- Solubilidad: Ligeramente soluble en agua, soluble en etanol, metanol y acetona
- Toxicidad: DL₅₀ en ratones y ratas (mg/kg): 200, 600 i.p.; 62.5, 62.5 i.v.; 3000-6000, 1200-2500 oral

Productos Comercializados:

Tabla 6. Medicamentos con Tamoxifeno como Principio activo.⁽¹¹⁾

Nombre Comercial	Laboratorio Fabricante
Novaldex	Astrazeneca
Taxus	Asofarma

Métodos analíticos propuestos para la determinación de Tamoxifeno:

Como ejemplo tenemos el método analítico para la determinación de Tamoxifeno en producto terminado tabletas, éste método está descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos de América del año 2011. ⁽²³⁾

Método analítico para la valoración de Tamoxifeno en producto terminado tabletas.

Fase móvil:

Preparar una solución de metanol que contenga, en cada litro, 320 mL de agua, 2 mL de ácido acético glacial y 1.08 g de 1-octanosulfonato de sodio.

Preparación del Estándar:

Disolver una cantidad exactamente pesada de SRef Tamoxifeno citrato USP en fase móvil para obtener una solución de concentración conocida de aproximadamente 200 µg/mL.

Preparación de la muestra:

Pesar y pulverizar finamente no menos de 20 tabletas. Transferir una cantidad exactamente pesada de polvo, equivalente a 20 mg de Tamoxifeno a un tubo para centrifuga. Pipetear 30 mL de fase móvil dentro del tubo y agitar mecánicamente por no menos de 15 minutos. Centrifugar alrededor de 1000 rpm. Pipetear 5 mL del sobrenadante claro a un matraz volumétrico de 25 mL, diluir con fase móvil y mezclar.

Sistema cromatográfico:

El cromatógrafo de líquidos es equipado con un detector a 254 nm, y una columna de 4 mm x 30 cm empacada con L11. La velocidad de flujo es de 1.5 mL/min.

La desviación estándar relativa entre inyecciones repetidas no es mayor a 3.0%

2.8 Software de simulación cromatográfica.

La implementación de nuevas tecnologías en el desarrollo, optimización e implementación de métodos analíticos cromatográficos ha llevado a la utilización de software capaces de predecir el comportamiento de los compuestos químicos bajo ciertas condiciones cromatográficas determinadas.

Un ejemplo de este tipo de software que se encuentra en el mercado es el ACD/LC & GC Simulator, este software es capaz de predecir el comportamiento de los compuestos químicos en un análisis cromatográfico, por medio de bases de datos con datos experimentales o con cálculos de propiedades fisicoquímicas de los compuestos en el análisis (punto de ebullición, pK_a , etc.). Este simulador ofrece modelos de cromatogramas y predice las condiciones cromatográficas óptimas y tiempos de retención para los compuestos que se pretende separar. ⁽²⁴⁾

2.9 Validación de Métodos Analíticos

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013 “Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos”⁽²⁵⁾ define validación de la siguiente manera:

“Validación, a la evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas, basadas en el conocimiento del proceso, sistema o método, para demostrar funcionalidad, consistencia y robustez”.⁽²⁵⁾

A su vez, el Colegio de Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México (CNQFB) por medio de su Guía de Validación de Métodos Analíticos⁽²⁶⁾ define de una manera más precisa la validación de método analíticos:

“Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada”.⁽²⁶⁾

En función de la aplicación del método analítico, los parámetros a estudiar son los siguientes:

Tabla 7. Parámetros analíticos a realizar en función a la naturaleza del método.⁽²⁶⁾

PARÁMETRO	Contenido / Potencia / Valoración	Pruebas de Impurezas		Identificación
		Contenido	Límite	
Precisión / Adecuabilidad del sistema	SI	SI	SI ^c	*
Linealidad del Sistema	SI	SI	NO	NO
Especificidad ^a	SI	SI	SI	SI
Exactitud y Repetibilidad	SI	SI	NO	NO
Linealidad del Método	SI	SI	NO	NO
Precisión Intermedia ^b	SI	SI	NO	NO
Estabilidad Analítica ^b	*	*	NO	NO
Límite de Detección	NO	NO	SI	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	NO
Robustez	*	*	*	NO
Tolerancia	*	*	*	NO

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

a. La Falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte como por ejemplo cromatografía de capa fina.

b. También es definido como un estudio de Tolerancia.

c. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

2.9.1 Parámetros Analíticos de Validación

2.9.1.1 Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.⁽²⁶⁾

La International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) en su guía Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology⁽²⁷⁾ indica que la precisión expresa el grado de dispersión entre una serie de medidas obtenidas de múltiples muestras de una misma muestra homogénea bajo condiciones preestablecidas.

La precisión se expresa usualmente en términos como varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de las series de medidas.

2.9.1.2 Linealidad del Sistema

La linealidad es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado. ^{(26), (27)}

2.9.1.3 Especificidad

Es la habilidad para determinar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes. Típicamente estas pueden tratarse de impurezas, degradados, matriz, etc. ⁽²⁷⁾

El CNQFB define la especificidad como la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra. ⁽²⁶⁾

2.9.1.4 Exactitud

Es la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y valor de referencia. ⁽²⁶⁾ Es decir, la exactitud nos indica el grado de concordancia que existe entre la cantidad de analito obtenido por medio del método analítico y la cantidad verdadera presente en la muestra. ⁽²⁷⁾

2.9.1.5 Repetibilidad

La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. También puede ser denominada precisión intra-ensayo. ⁽²⁷⁾

Es concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método. ⁽²⁶⁾

2.9.1.6 Linealidad del Método

La Linealidad del Método nos indica el grado de concordancia que existe entre la cantidad de analito obtenido por medio del método analítico y la cantidad verdadera presente en la muestra a diferentes niveles de concentración, generalmente en un intervalo que va desde el 70% hasta el 120% de la concentración de trabajo. ⁽²⁶⁾

2.9.1.7 Precisión del Método o Precisión Intermedia

Precisión de un método analítico, expresado como concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días, diferentes equipos. ^{(26), (27)}

2.9.1.8 Estabilidad Analítica la Muestra

Una información que es muy útil durante el análisis de una muestra es el tiempo en el cual ésta es estable para su exacta cuantificación y por tal motivo la estabilidad analítica de la muestra se define como:

“Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas”⁽²⁶⁾

2.9.1.9 Límite de Detección

Es la concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada de una manera exacta, bajo las condiciones de operación establecidas. ^{(26), (27)}

2.9.1.10 Límite de Cuantificación

Es la concentración mínima del analito en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. El límite de cuantificación es un parámetro para determinaciones cuantitativas de compuestos a bajos niveles y es usado particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación. ^{(26), (27)}

2.9.1.11 Robustez

Capacidad de un método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método. ^{(26), (27)}

2.9.1.12 Tolerancia.

Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser marca de reactivos, equipos y columnas. ⁽²⁶⁾

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria farmacéutica genera desechos y residuos que pueden ser peligrosos para la salud pública y al medio ambiente; por eso, es necesario implementar planes de acción para darle un buen destino a éstos desechos, los cuales deben ser en medida de lo posible sustentables con el ambiente.

Una planta farmacéutica en la cual se fabrican medicamentos de tipo oncológico, genera residuos líquidos provenientes de lavado y sanitización de áreas y equipos de fabricación, éstos desechos se encuentran cargados con una cantidad de principios activos que puede ser perjudiciales para la salud pública, si éstos desechos son descargados en el alcantarillado público sin que sean previamente tratados.

Los principios activos llamados oncológicos son peligrosos para las personas que no se encuentran enfermas de cáncer debido a sus propiedades citotóxicas y citostáticas que pueden provocar en personas sanas mutaciones genéticas, producir efectos negativos no hereditarios en las descendencias o aumentar la frecuencia de éstos o afectar de forma negativa a la función o a la capacidad reproductora o en su defecto producir cáncer o aumentar su frecuencia.⁽²⁸⁾

Por eso es necesario, generar una metodología analítica que permita la detección y cuantificación de los principios activos Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno en el agua residual de los procesos de fabricación de medicamentos oncológicos y así generar un procedimiento adecuado para el almacenamiento de esta agua residual, inactivación, disposición y destrucción final para así evitar riesgos en la salud.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo primario

- Desarrollar y validar una metodología analítica para la determinación de Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno en agua residual de una planta farmacéutica de productos oncológicos.

4.2 Objetivos secundarios

- Determinar las condiciones cromatográficas preliminares para la separación de Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno en agua residual de una planta farmacéutica de productos oncológicos.
- Predecir con el uso del software “**ACD/LC & GC Simulator**” el orden de elución de cada uno de los activos a determinar.
- Desarrollar un método analítico para la determinación de Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno en aguas residuales de una planta farmacéutica de medicamentos oncológicos.
- Diseñar un protocolo de validación de la metodología analítica desarrollada para la determinación de Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno en aguas residuales de una planta farmacéutica de medicamentos oncológicos.
- Validar la metodología analítica desarrollada para la determinación de Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno en aguas residuales de una planta farmacéutica de medicamentos oncológicos.
- Con el método analítico validado realizar la determinación de Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno en agua residual de una planta farmacéutica de productos oncológicos.

5 HIPÓTESIS

Mediante el empleo del software “**ACD/LC & GC Simulator**” se podrá predecir y determinar el sistema cromatográfico más adecuado para la separación de Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno en aguas residuales de una planta farmacéutica.

6 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Tipo de Estudio

- Experimental, prospectivo, trasversal y descriptivo.

6.2 Población en Estudio

- Muestra de agua residual obtenida de la cisterna de contención de aguas residuales de la planta de producción
- Sustancia de referencia de Anastrozol
- Sustancia de referencia de Bicalutamida
- Sustancia de referencia de Flutamida
- Sustancia de referencia de Tamoxifeno

6.3 Criterios de Inclusión

Serán incluidos los cromatogramas en donde los picos eluidos cumplan con las siguientes características:

- Resolución (R): ≥ 2.0 con el pico más próximo
- Platos Teóricos (N): ≥ 2000
- Factor de Coleo (T): ≤ 2.0
- CV entre inyecciones $\leq 5.0\%$ (análisis de trazas)

6.4 Criterios de Exclusión y Eliminación

Serán excluidos los cromatogramas en donde los picos eluidos no cumplan con las siguientes características:

- Resolución (R): ≥ 2.0
- Platos Teóricos (N): ≥ 2000
- Factor de Coleo (T): ≤ 2.0

6.5 Variables

Durante la determinación de las condiciones cromatográficas para la separación de los activos las variables independientes serán las siguientes:

- Tipo y composición de la fase móvil
- pH de la fase móvil
- Flujo de la fase móvil
- Propiedades de fase estacionaria

La variable dependiente será la retención de cada uno de los activos en el cromatograma.

7 DESARROLLO

7.1 Equipos, Reactivos y Materiales

7.1.1 Equipos

Tabla 8. Equipos utilizados durante el desarrollo y validación de la metodología analítica.

EQUIPOS	MARCA	MODELO
Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución	Waters	Modelo 2690 con Detector 2487 (Longitud de Onda Fija)
Columna Cromatográfica	Agilent	Modelo 1290 (Arreglo de Diodos)
Balanza Analítica	Phenomenex	Kinitex XB C-18. 2.6 µm (4.5mm x 150mm)
Sonicador	Mettler Toledo	XP105DR Sensibilidad (0.01 mg)
Purificador de agua (Milli Q)	Branson	5510R-DTH
Centrífuga	Millipore	Gradient A10, Filtro de 0.22 µm
	Hettich	Rotofix 32

7.1.2 Reactivos

Tabla 9. Reactivos utilizados durante el desarrollo y la validación del método analítico.

REACTIVO	GRADO	LOTE / MARCA
Anastrozol	Sustancia de Referencia Secundaria	12100418
Citrato de Tamoxifeno	Sustancia de Referencia Secundaria	12100315
Bicalutamida	Sustancia de Referencia Secundaria	12100375
Flutamida	Sustancia de Referencia Secundaria	12100313
Agua	Purificada	Millipore
Metanol	RA (Reactivo analítico)	Tecsequim
Acetonitrilo (ACN)	Cromatográfico	Tecsequim
Tetrahidrofurano (THF)	Cromatográfico	Tecsequim
Hidróxido de Amonio	RA (Reactivo analítico)	J.T. Baker
Hipoclorito de Sodio	RA (Reactivo analítico)	Tecsequim

7.1.3 Materiales

Tabla 10. Materiales utilizados durante el desarrollo y la validación de la metodología analítica.

MATERIAL	VOLÚMEN (mL)	CLASE
Matraces volumétricos	1000, 250, 200, 100, 50	"A"
Pipetas volumétricas	1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 10.0	"A"
Probeta	1000	"A"
Viales para CLAR	2.0	N/A

7.2 Desarrollo de la Metodología Analítica

De acuerdo a los resultados obtenidos previamente con un método analítico para la cuantificación de Flutamida en producto terminado, se trató de utilizar para separación de más analitos de interés, lo cual a realizarse el ensayo se obtiene una pobre selectividad; la cual es necesaria modificar para que el método analítico pueda ser utilizado.

Se propone el empleo de Tetrahidrofurano (THF) e Hidróxido de Amonio (NH₄OH) para obtener un pH básico, se realizó un experimento con las siguientes condiciones cromatográficas.

Columna: Phenomenex Kinetex XB C18 2.6 µm 150x4.6 mm

Equipo: Módulo de Separación Waters Modelo 2690

Detector UV Waters Modelo 2487

Flujo: 1.0 mL/min

Volumen de Inyección: 10 µL

Fase móvil: Componente A 60%: Componente B 40%

Componente A: Con ayuda de una barra magnética se mezclaron durante 10 minutos 125 mL de Agua grado cromatográfico, 75 mL de THF y se adicionaron 2 mL de NH₄OH concentrado.

Componente B: Se filtró a través de membrana de Nylon de 0.45 µm 500 mL de Acetonitrilo y posteriormente se sonicó durante 10 minutos.

Los cromatogramas obtenidos en el experimento se pueden observar en las figuras 15, 16, 17, 18 y 19.

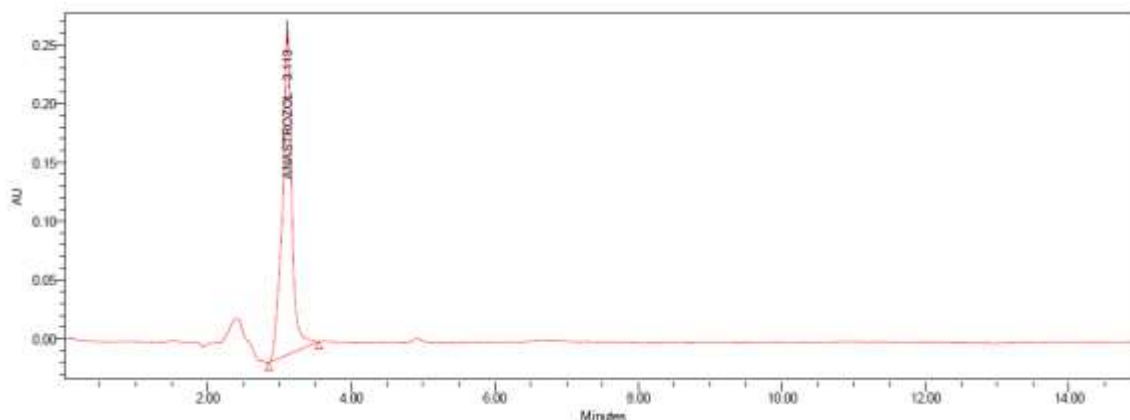


Figura 15. Cromatograma Solución Anastrozol a 210 nm.

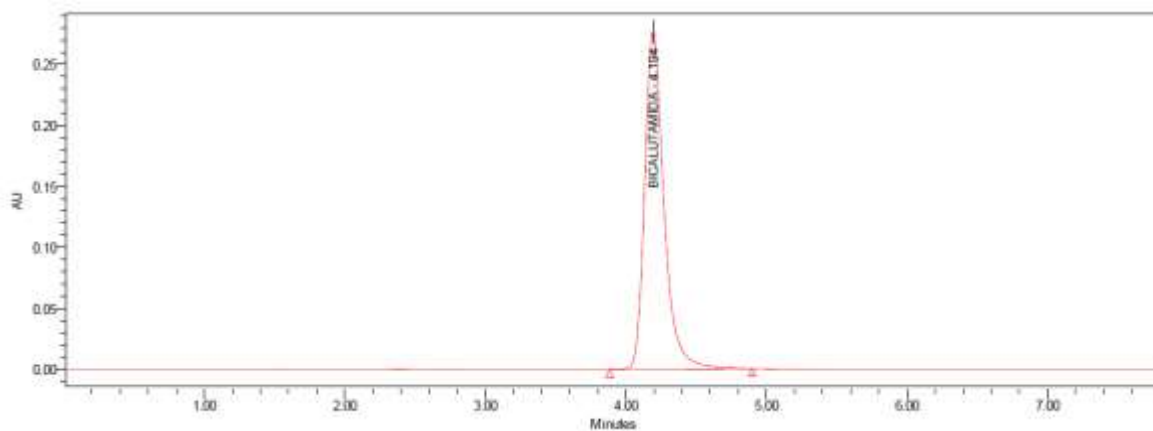


Figura 16. Cromatograma Solución Bicalutamida a 270 nm.

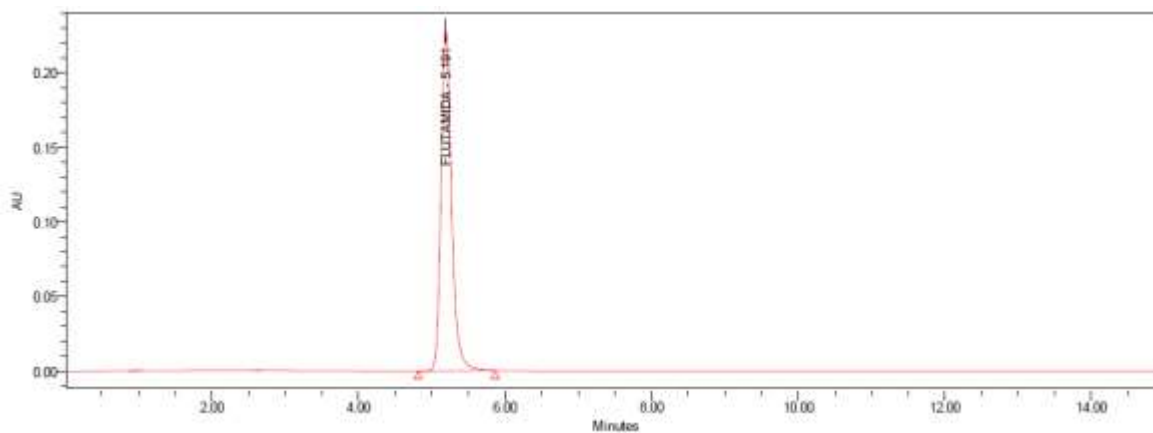


Figura 17. Cromatograma Solución Flutamida a 270 nm.

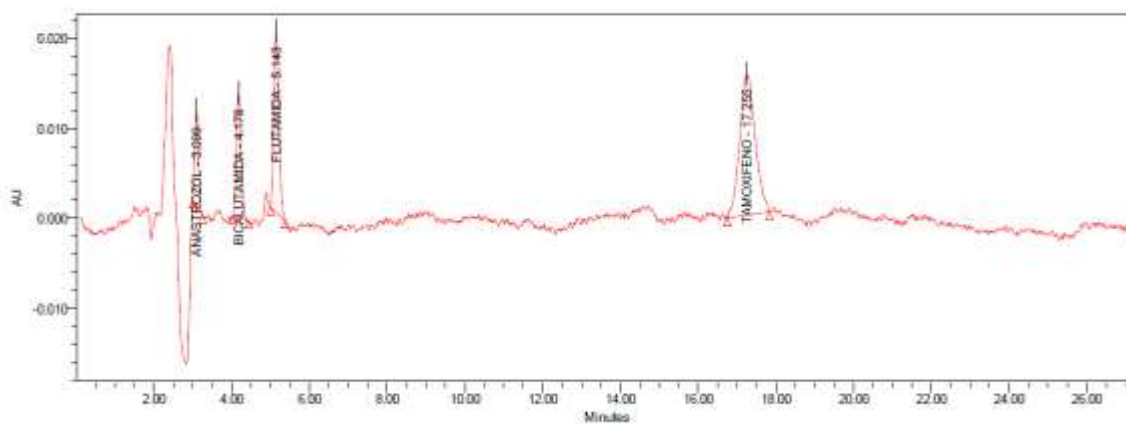


Figura 18. Cromatograma Solución con los cuatro a analitos a 210 nm.

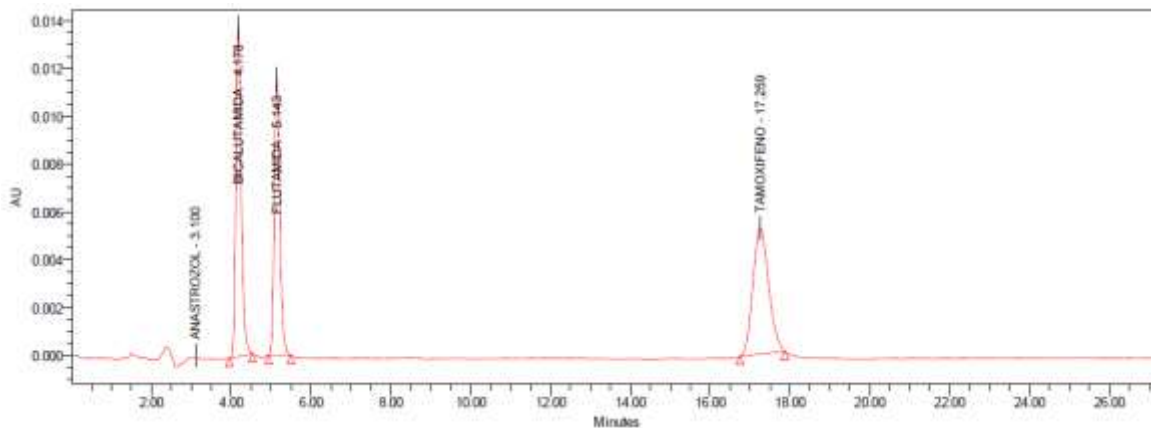


Figura 19. Cromatograma Solución con los cuatro a analitos a 270 nm.

Con los resultados obtenidos en el experimento anterior, se observa que no hay una buena selectividad para el pico de Anastrozol, ya que el pico aparece dentro del volumen muerto, por lo que se decide realizar un cambio gradual en la polaridad en la fase móvil mediante un gradiente, con la intención de aumentar la selectividad (α) del pico de Anastrozol y acortar el tiempo de retención del pico de Tamoxifeno, obteniendo los siguientes resultados:

Columna: Phenomenex Kinetex XB C18 2.6 μ m 150x4.6 mm

Equipo: Cromatografo de Líquidos Agilent Modelo: 1290
Detector Agilent DAD

Flujo: 1.2 mL/min

Volumen de Inyección: 10 μ L

Temperatura de la Columna: 35 $^{\circ}$ C

Fase móvil: Componente Orgánico: Componente Acuoso (Gradiente)

Componente Acuoso: a 500 mL de agua purificada Milli-Q se adicionaron 2 mL de NH₄OH, se mezclaron con ayuda de una barra magnética durante 10 minutos. Se filtró a través de membrana de Nylon de 0.45 μ m, posteriormente se sonicó durante 10 minutos.

Componente Orgánico: Se realizó una mezcla de 700 mL de ACN y 300 mL de THF, previamente filtrado a través de membrana de Nylon de 0.45 μ m, la mezcla se tapó perfectamente y se mezcló con ayuda de una barra magnética durante 10 minutos, posteriormente se sonicó durante 10 minutos.

Tabla 11. Gradiente de Elución.

Gradiente			
	Minutos	Componente Orgánico	Componente Acuoso
1	0.00	70.0	30.0
2	2.00	80.0	20.0
3	6.00	80.0	20.0
4	6.01	70.0	30.0
5	8.00	70.0	30.0

Los cromatogramas obtenidos en el experimento se pueden observar en las figuras 20, 21, 22, 23 y 24.

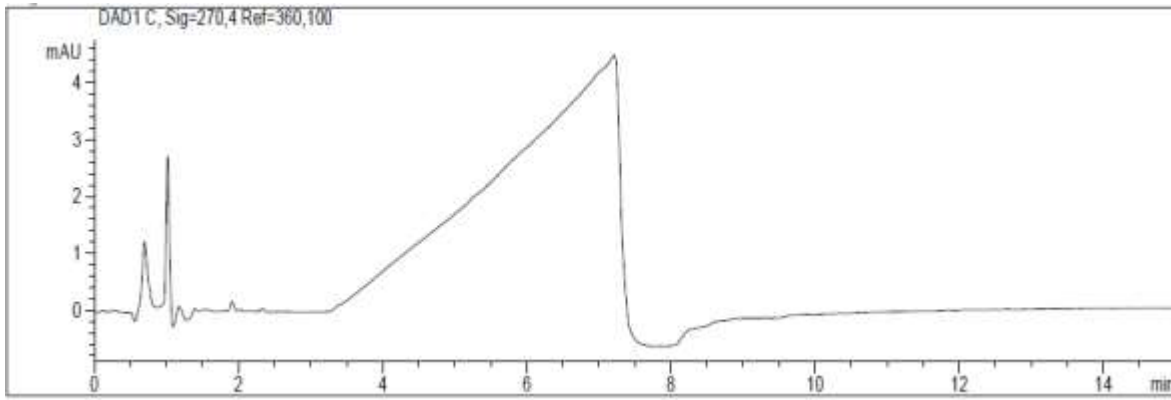


Figura 20. Cromatograma Solución de Anastrozol a 270 nm.

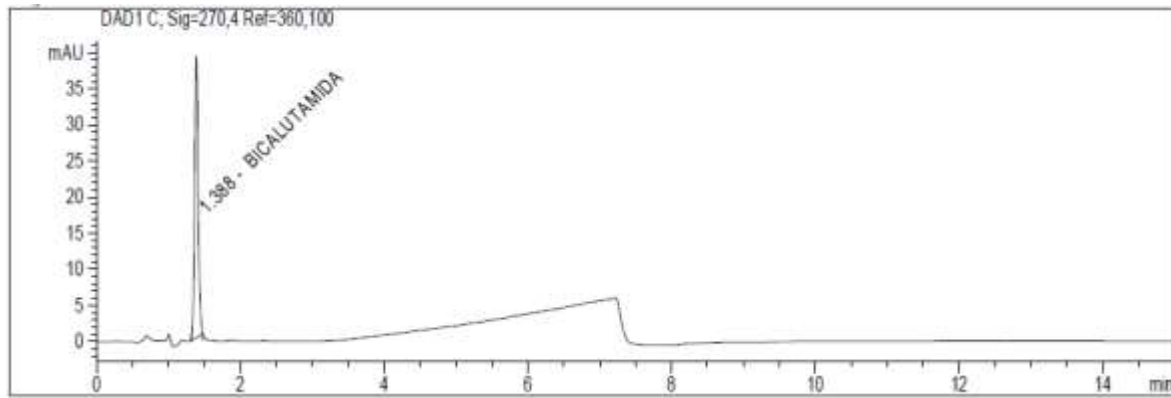


Figura 21. Cromatograma Solución de Bicalutamida a 270 nm.

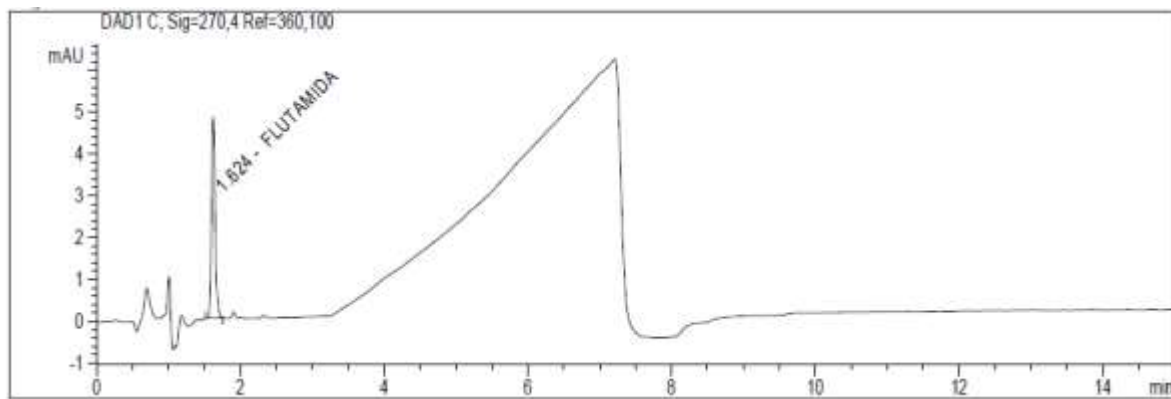


Figura 22. Cromatograma Solución de Flutamida a 270 nm.

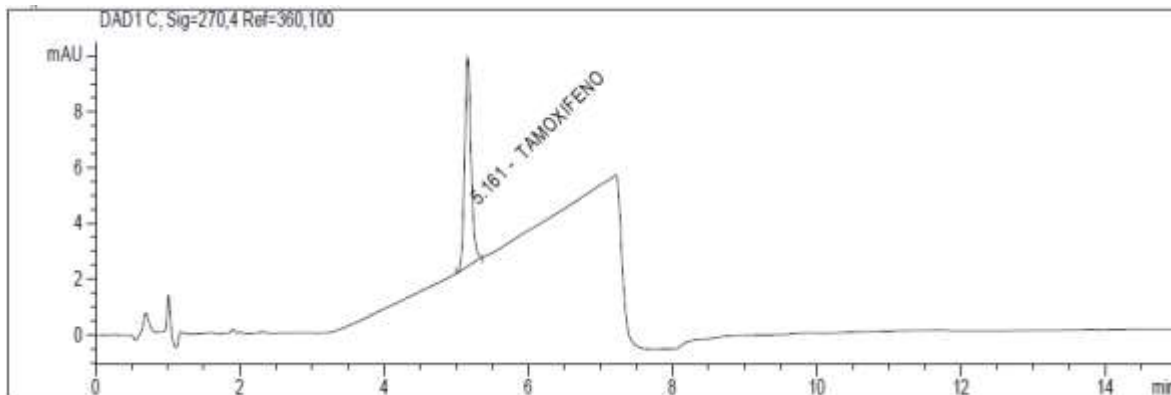


Figura 23. Cromatograma Solución de Tamoxifeno a 270 nm.

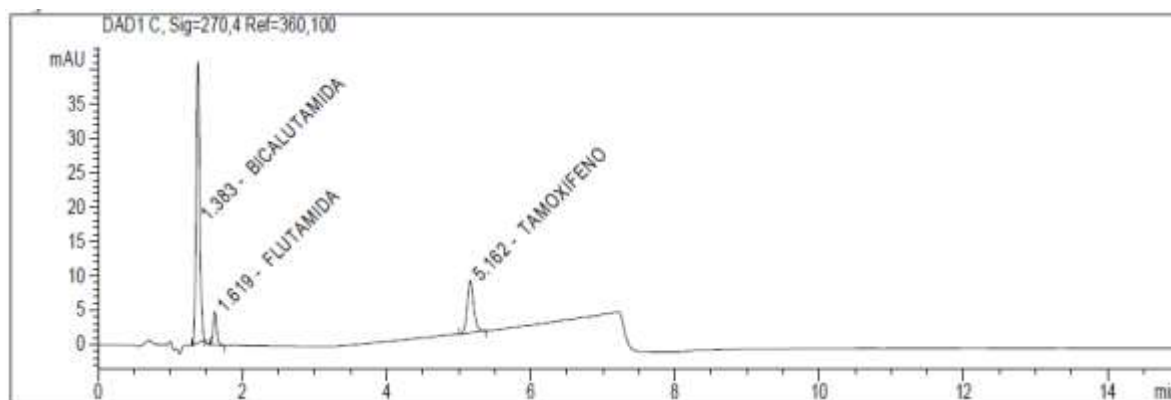


Figura 24. Cromatograma Solución de con los 4 analitos a 270 nm.

Con el sistema cromatográfico propuesto se logró la disminución del tiempo de retención del Tamoxifeno; sin embargo, no se logró aumentar la retención del Anastrozol y siguió saliendo en el volumen muerto como se muestra en Figura 20. Cromatograma Solución de Anastrozol a 270 nm.

Aunado a esto, debido a que no se midió el pH del componente acuoso utilizado en el experimento anterior y que posteriormente se determinó que era de 9.52, produjo un daño irreversible a la columna, produciendo una caída en la presión del equipo, disminución en la eficiencia de la columna y disminución de los tiempos de retención de los analitos. Solo se podría continuar con el uso del sistema cromatográfico anteriormente descrito con el uso de columnas diseñadas para soportar rangos de pH extremos, como son las columnas cromatográficas en base a Zirconio o Titanio que por su estructura no permite la hidrólisis o disolución de la fase estacionaria; sin embargo, el costo de este tipo de columnas es muy alto y no permitió continuar con desarrollo del sistema cromatográfico a pH básico como el que se estaba usando.

Con el fin de evitar en lo posible daños a una nueva columna Cromatográfica y cambiar la selectividad del sistema para poder separar los analitos se decidió modificar el pH del componente acuoso con ácido acético glacial, además de una disminución del Flujo a 0.8 mL/min. Y se obtuvieron los siguientes resultados:

Columna: Phenomenex Kinetex XB C18 2.6 μ m 150x4.6 mm
 Equipo: Cromatografo de Líquidos Agilent Modelo: 1290
 Detector Agilent DAD a 270 nm
 Flujo: 0.8 mL/min
 Volumen de Inyección: 20 μ L
 Temperatura de la Columna: 35° C
 Fase móvil: Componente Orgánico: Componente Acuoso (45 %:55 % v/v)
 Componente Acuoso: a 500 mL de agua purificada Milli-Q se adicionaron 2 mL de NH₄OH, se mezclaron con ayuda de una barra magnética durante 10 minutos. Se ajustó a pH 4.0 con ácido acético glacial Se filtró a través de membrana de Nylon de 0.45 μ m, posteriormente se sonicó durante 10 minutos.
 Componente Orgánico: Se realizó una mezcla de 700 mL de ACN y 300 mL de THF, previamente filtrado a través de membrana de Nylon de 0.45 μ m, la mezcla se tapó perfectamente y se mezcló con ayuda de una barra magnética durante 10 minutos, posteriormente se sonicó durante 10 minutos.

El cromatograma obtenido en el experimento se muestra en la figura 25.

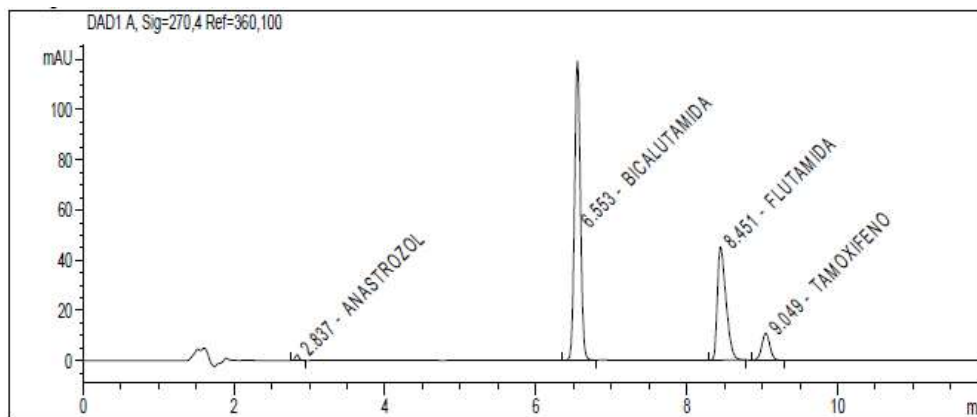


Figura 25. Cromatograma Solución de con los 4 analitos a 270 nm.

Parámetros cromatográficos obtenidos en el experimento.

Tabla 12. Parámetros Cromatográficos obtenidos en el experimento.

Compuesto	Tiempo Retención (RT)	Factor de Coleo (T)	Resolución (R)	Platos Teóricos (N)	Factor de Capacidad (k')	Selectividad (α)	Área
Anastrozol	2.837	1.06		17580	0.5	0.5	7.364
Bicalutamida	6.553	1.05	32.2	34253	2.5	4.8	648.122
Flutamida	8.451	1.52	10.6	26293	3.5	6.8	358.726
Tamoxifeno	9.049	1.03	2.9	34501	3.8	7.4	79.517

Se decidió utilizar una longitud de onda de 270 nm, esto se debe que aunque a 210 nm el pico de Anastrozol tiene mayor absorbancia, el uso de esta longitud de onda hace que el cromatograma se vea más ruidoso debido a que los acetatos adicionados en la fase móvil también absorben a 210 nm.

Como se puede observar en el cromatograma el pico debido al Anastrozol se separó completamente del volumen muerto y la resolución entre todos es mayor a 2.0, la eficiencia en todos los casos es muy superior a 2000 como se recomienda para los métodos cromatográficos. En el caso del Factor de Capacidad (k') el pico de Anastrozol tiene un valor de 0.5, lo que contradice las recomendaciones bibliográficas, sin embargo, este valor se puede justificar por el número de analitos en el cromatograma, ya que este valor permite “dar espacio” a los demás picos como lo indica Quatrocchi.⁽³⁾

Con los resultados obtenidos en el experimento anterior, se decide que esta metodología es susceptible de validarse y garantizar los resultados que posteriormente arroje.

Los datos obtenidos en los experimentos anteriores fueron cargados al software “**ACD/LC & GC Simulator**” para que se realizara una estimación de un cromatograma a pH de fase acuosa de 7.0 y los resultados se muestran en la figura 26 y la tabla 13.

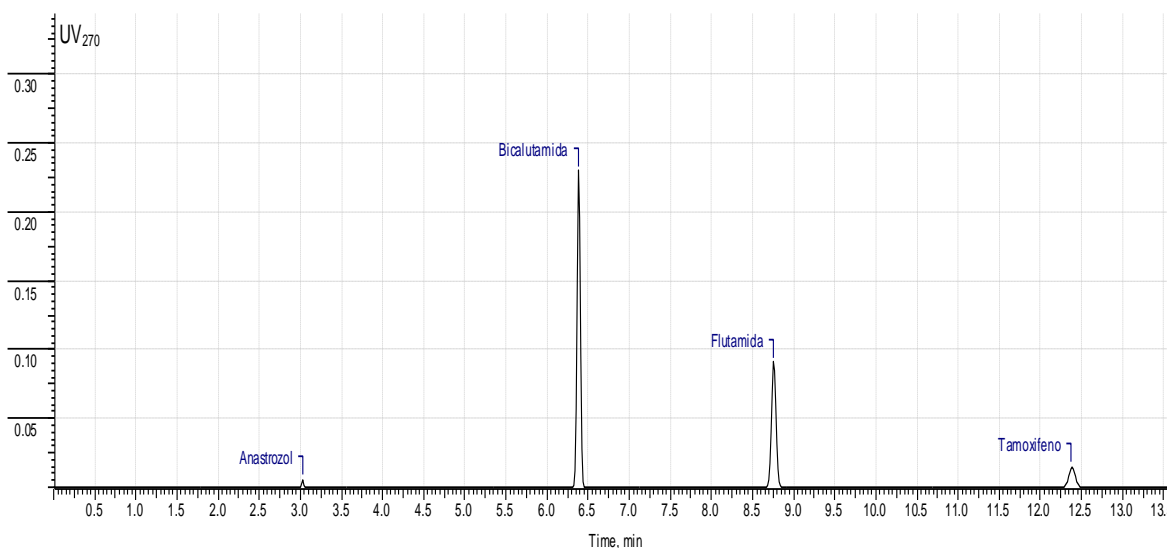


Figura 26. Cromatograma estimado a pH 7.0 por medio del software de simulación ACD/LC Simulator.

Tabla 13. Resultados estimados a pH 7.0 obtenidos por medio de software de simulación ACD/LC Simulator.

No.	Peak Name	tR	Area	Width	As	Peak Model
1	Anastrozol	3.03	7.18	0.04	1	a = -1.4535, b = 2.2319e-1, c = -1.2020e-2
2	Bicalutamida	6.38	648.13	0.08	1	a = -6.6841e-1, b = 5.8611e-1, c = -5.2110e-2
3	Flutamida	8.75	350.33	0.1	1	a = -4.6726e-1, b = 6.5214e-1, c = -5.7030e-2
4	Tamoxifeno	12.37	79	0.15	1	a = 6.4816e-1, b = 1.5733e-1, c = -4.7058e-4

La metodología analítica a validar es la siguiente:

Columna: Phenomenex Kinetex XB C18 2.6 μ m 150x4.6 mm

Equipo: Cromatografo de Líquidos Agilent Modelo: 1290
Detector Agilent DAD a 270 nm

Flujo: 0.8 mL/min

Volumen de Inyección: 20 μ L

Temperatura de la Columna: 35° C

Fase móvil: Componente Orgánico: Componente Acuoso (45 %:55 % v/v)

Componente Acuoso: a 500 mL de agua purificada Milli-Q se adicionar 2 mL de NH₄OH, mezclar con ayuda de una barra magnética durante 10 minutos. Ajustar a pH 4.0 con ácido acético glacial. Filtrar a través de membrana de Nylon de 0.45 μ m, posteriormente sonicar durante 10 minutos.

Componente Orgánico: Realizar una mezcla de 700 mL de ACN y 300 mL de THF previamente filtrados a través de membrana de Nylon de 0.45 μ m, tapar perfectamente y se mezclar con ayuda de una barra magnética durante 10 minutos, posteriormente se sonicar durante 10 minutos.

Preparación de la Solución de Referencia.

Solución de Anastrozol. Pesar aproximadamente con exactitud 14.74 mg de Sustancia de Referencia de Anastrozol y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 25 mL de metanol RA y sonicar hasta disolución completa. Aforar con el mismo disolvente y mezclar.

Solución de Bicalutamida. Pesar aproximadamente con exactitud 14.74 mg de Sustancia de Referencia de Bicalutamida y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 25 mL de metanol RA y sonicar hasta disolución completa. Aforar con el mismo disolvente y mezclar.

Solución de Flutamida. Pesar aproximadamente con exactitud 14.74 mg de Sustancia de Referencia de Flutamida y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 25 mL de metanol RA y sonicar hasta disolución completa. Aforar con el mismo disolvente y mezclar.

Solución de Tamoxifeno. Pesar aproximadamente con exactitud 22.36 mg de Sustancia de Referencia de Citrato de Tamoxifeno (equivalente a 14.74 mg de Tamoxifeno Base) y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 25 mL de metanol RA y sonicar hasta disolución completa. Aforar con el mismo disolvente y mezclar.

De cada una de las soluciones preparadas anteriormente, tomar una alícuota de 3 mL y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 mL diluir, aforar con Agua Purificada y mezclar. (Esta solución tiene una concentración aproximada de 8.84 μ g /mL de cada uno de los componentes).

7.3 Validación de la Metodología Analítica

El plan y la ejecución de los parámetros de estudio fueron definidos en base a lo especificado en el procedimiento Validación de Métodos Analíticos de la Planta Farmacéutica, los cuales se basan en la Guía del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos ⁽²⁶⁾ y la ICH. ⁽²⁷⁾

Los parámetros de Validación de Metodología Analítica que se desarrollaron son los siguientes:

- Adecuabilidad.
- Precisión del Sistema.
- Especificidad.
- Linealidad del Sistema.
- Linealidad del Método.
- Repetibilidad.
- Precisión Intermedia.
- Límite de Detección y Cuantificación.
- Estabilidad de las Soluciones.
- Robustez.

Los cálculos para los parámetros estadísticos de los resultados se muestran en el Anexo 2.

7.3.1 Adecuabilidad

Se inyectaron por quintuplicado la solución de referencia, el sistema cromatográfico y la preparación de la solución de referencia se realizaron como se indica en la metodología analítica.

Los criterios de aceptación para este parámetro son los siguientes:

- C.V. $\leq 1.5\%$ para la señal analítica (área bajo la curva)
- Factor de Capacidad (k'): > 2.0
- Resolución (R): > 2.0
- Factor de Coleo (T): < 2.0
- Selectividad (α): < 2.0

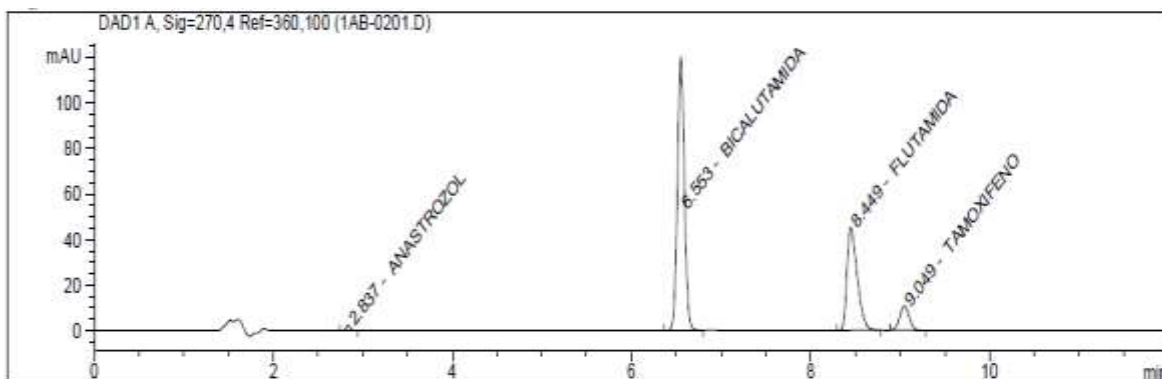


Figura 27. Cromatograma Solución de Referencia en la Adecuabilidad.

Tabla 14. Resultados de Adecuabilidad del pico de Anastrozol.

ADECUABILIDAD DE ANASTROZOL						
Inyección No.	Tiempo Retención (RT)	Factor de Coleo (T)	Factor de Capacidad (k')	Selectividad (α)	Platos Teóricos (N)	Área
1	2.837	1.07	0.52	0.5	17840	7.5
2	2.837	1.06	0.52	0.5	17840	7.5
3	2.840	1.07	0.52	0.5	17872	7.6
4	2.836	1.06	0.52	0.5	17824	7.5
5	2.843	1.07	0.52	0.5	17098	7.5
Media (X)	2.839	1.07	0.5	0.5	17694.8	7.5
Desviación Estándar (σ)	0.003	0.01	0.002	0.002	334.08	0.04
Coefficiente de Variación (C.V.)	0.1	0.5	0.3	0.3	1.9	0.6

Tabla 15. Resultados de Adecuabilidad del pico de Bicalutamida

ADECUABILIDAD DE BICALUTAMIDA							
Inyección No.	Tiempo Retención (RT)	Factor de Coleo (T)	Factor de Capacidad (k')	Selectividad (α)	Resolución (R)	Platos Teóricos (N)	Área
1	6.553	1.05	2.50	4.84	32.25	35184	648.1
2	6.548	1.05	2.50	4.84	32.26	35138	648.1
3	6.555	1.05	2.51	4.83	32.31	35208	648.0
4	6.554	1.05	2.51	4.85	32.26	34268	648.2
5	6.563	1.05	2.51	4.82	32.35	34357	648.2
Media (X)	6.555	1.05	2.5	4.84	32.29	34831	648.1
Desviación Estándar (σ)	0.005	0.00	0.003	0.010	0.043	475.03	0.08
Coefficiente de Variación (C.V.)	0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	1.4	0.0

Tabla 16. Resultados de Adecuabilidad del pico de Flutamida.

ADECUABILIDAD DE FLUTAMIDA							
Inyección No.	Tiempo Retención (RT)	Factor de Coleo (T)	Factor de Capacidad (k')	Selectividad (α)	Resolución (R)	Platos Teóricos (N)	Área
1	8.449	1.55	3.52	6.80	10.59	26863	358.5
2	8.443	1.56	3.52	6.80	10.55	26828	358.1
3	8.455	1.55	3.52	6.79	10.62	26321	357.2
4	8.456	1.55	3.52	6.82	10.53	26906	356.5
5	8.471	1.56	3.53	6.78	10.65	26418	356.2
Media (X)	8.455	1.55	3.5	6.80	10.59	26667.2	357.3
Desviación Estándar (σ)	0.010	0.01	0.006	0.01	0.049	275.31	0.99
Coefficiente de Variación (C.V.)	0.1	0.4	0.2	0.2	0.5	1.0	0.3

Tabla 17. Resultados de Adecuabilidad del pico de Tamoxifeno.

ADECUABILIDAD DE TAMOXIFENO							
Inyección No.	Tiempo Retención (RT)	Factor de Coleo (T)	Factor de Capacidad (k')	Selectividad (α)	Resolución (R)	Platos Teóricos (N)	Área
1	9.049	1.03	3.84	7.42	2.85	34501	79.1
2	9.043	1.03	3.84	7.42	2.92	35271	79.1
3	9.053	1.03	3.84	7.40	2.86	35353	79.7
4	9.064	1.03	3.85	7.44	2.86	35342	79.7
5	9.052	1.03	3.84	7.38	2.89	34619	79.9
Media (X)	9.052	1.03	3.8	7.41	2.88	35017.2	79.5
Desviación Estándar (σ)	0.008	0.00	0.004	0.024	0.029	420.62	0.37
Coefficiente de Variación (C.V.)	0.1	0.0	0.1	0.3	1.0	1.2	0.5

Los datos obtenidos en las tablas anteriores, fueron calculados y proporcionados por el Software del equipo Agilent Modelo 1290 Chem Station, sin embargo en el Anexo 1 se muestran las fórmulas para el cálculo de los parámetros cromatográficos.

7.3.2 Precisión del Sistema

A partir de una pesada se preparó un sextuplicado de soluciones de referencia como se indica en la metodología analítica y fueron inyectadas en el cromatografo de líquidos bajo las condiciones indicadas en la metodología.

Los criterios de aceptación indicados son los siguientes:

- El C.V. de variación de la señal analítica de las seis soluciones debe ser menor o igual a 1.5 %.

Los resultados obtenidos durante el análisis se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 18. Resultados del Parámetro Precisión del Sistema.

PRECISIÓN DEL SISTEMA				
Muestra	Anastrozol	Bicalutamida	Flutamida	Tamoxifeno
1	7.165	645.0	337.0	78.4
2	7.132	644.8	336.7	78.5
3	7.145	645.3	336.3	78.6
4	7.126	645.3	336.3	78.6
5	7.137	645.3	335.9	78.7
6	7.142	645.6	335.9	78.8
Media (X)	7.141	645.2	336.4	78.6
Desviación Estándar (σ)	0.01	0.28	0.44	0.14
Coefficiente de Variación (C.V.)	0.2	0.0	0.1	0.2

7.3.3 Especificidad

Se inyectaron con el sistema cromatográfico descrito en la metodología analítica, soluciones de referencia de cada uno de los analitos a la concentración de la solución de referencia (8.84 µg/mL), además de soluciones de posibles agentes que se encuentran en la matriz de la muestra.

Las soluciones analizadas en el parámetro de Especificidad son las siguientes:

- Solución de metanol (3 mL de metanol en 50 mL de agua) (Ver figura 28).
- Agua grado grado cromatográfico (Ver figura 29).
- Solución de referencia de Anastrozol (Ver figura 30).
- Solución de referencia de Bicalutamida (Ver figura 31).
- Solución de referencia de Flutamida (Ver figura 32).
- Solución de referencia de Tamoxifeno (Ver figura 33).
- Solución de referencia con los 4 analitos (Ver figura 34).
- Solución muestra con los 4 analitos (Ver figura 35).

Como criterio de aceptación se tiene que la respuesta analítica solo se debe al analito.

Los resultados obtenidos en la prueba son los siguientes:

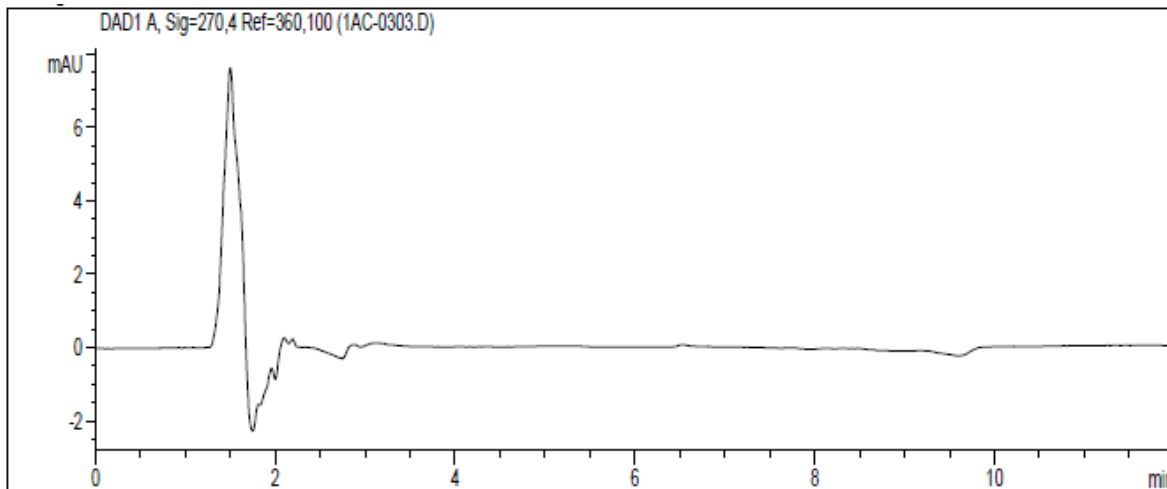


Figura 28. Cromatograma Metanol en el Parámetro de Especificidad.

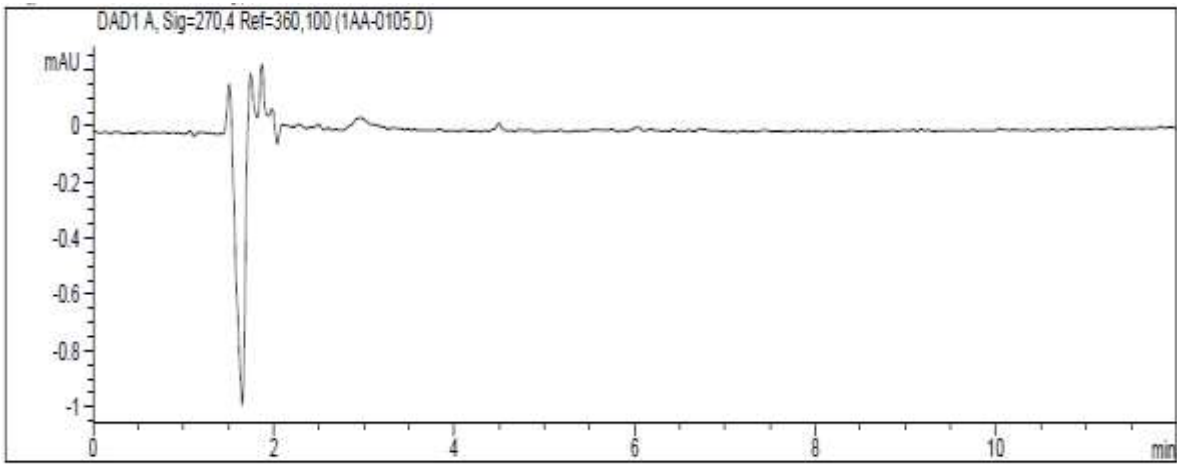


Figura 29. Cromatograma Agua grado cromatográfico en el Parámetro de Especificidad.

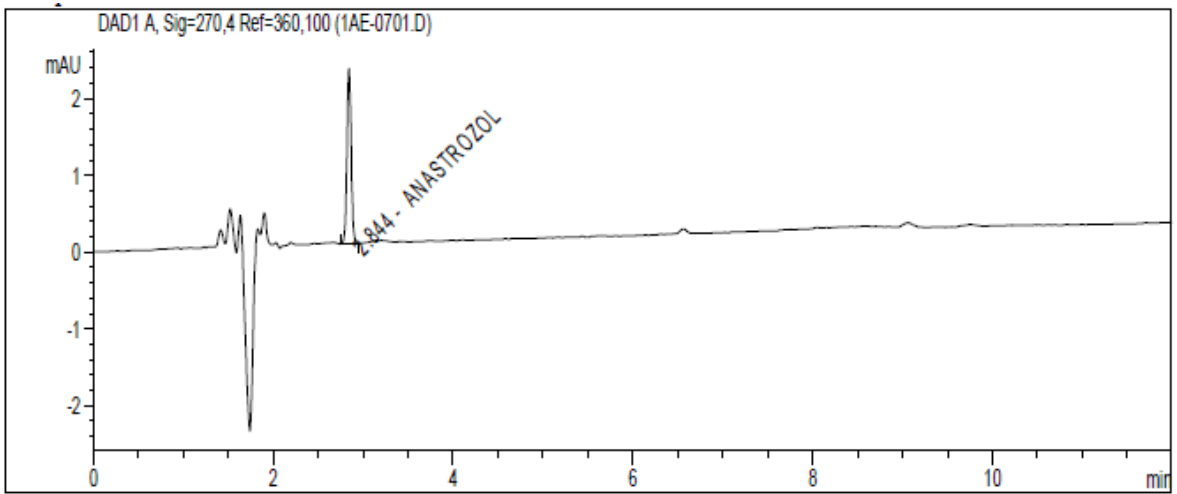


Figura 30. Cromatograma Solución de Referencia de Anastrozol en el Parámetro de Especificidad.

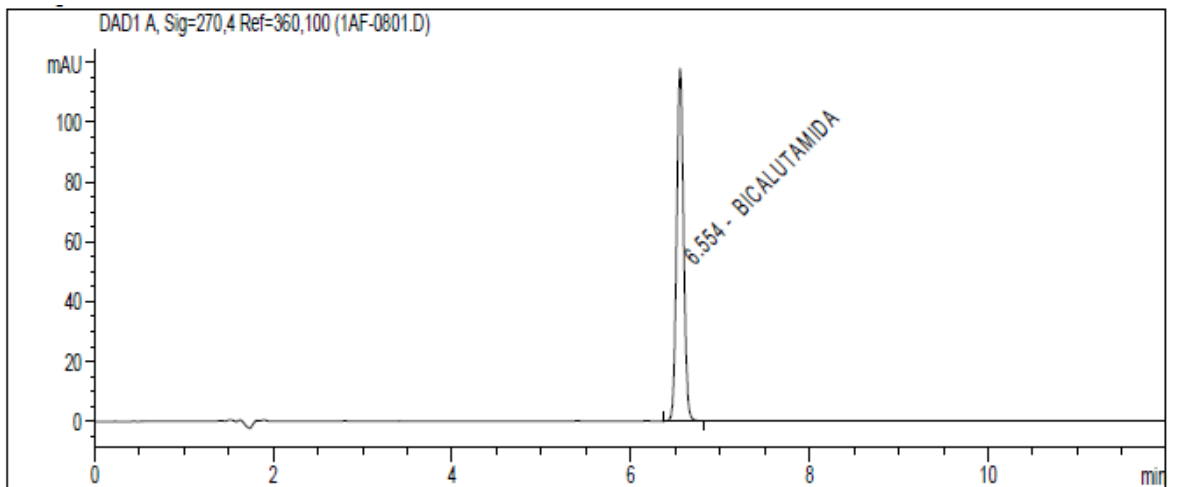


Figura 31. Cromatograma Solución de Referencia de Bicalutamida en el Parámetro de Especificidad.

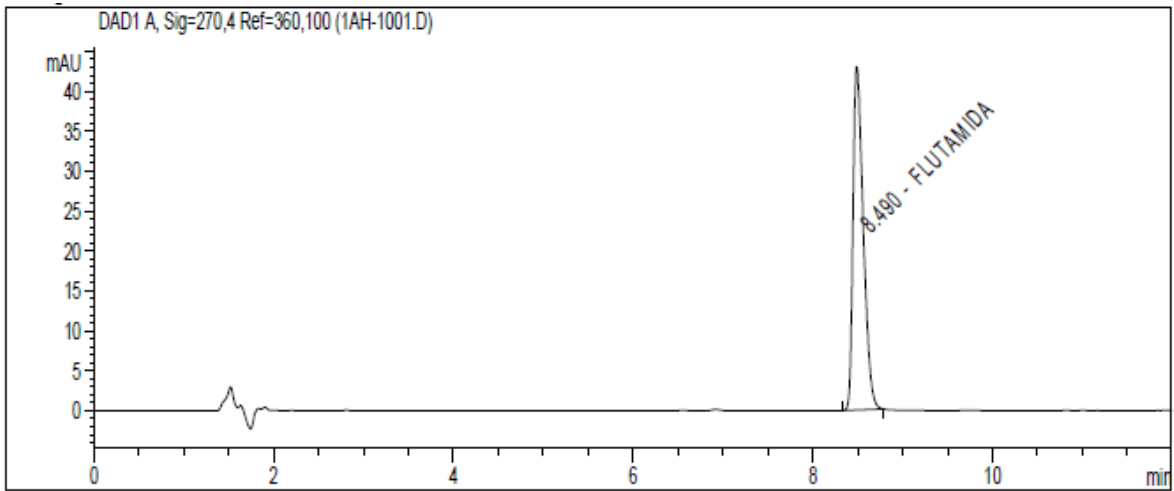


Figura 32. Cromatograma Solución de Referencia de Flutamida en el Parámetro de Especificidad.

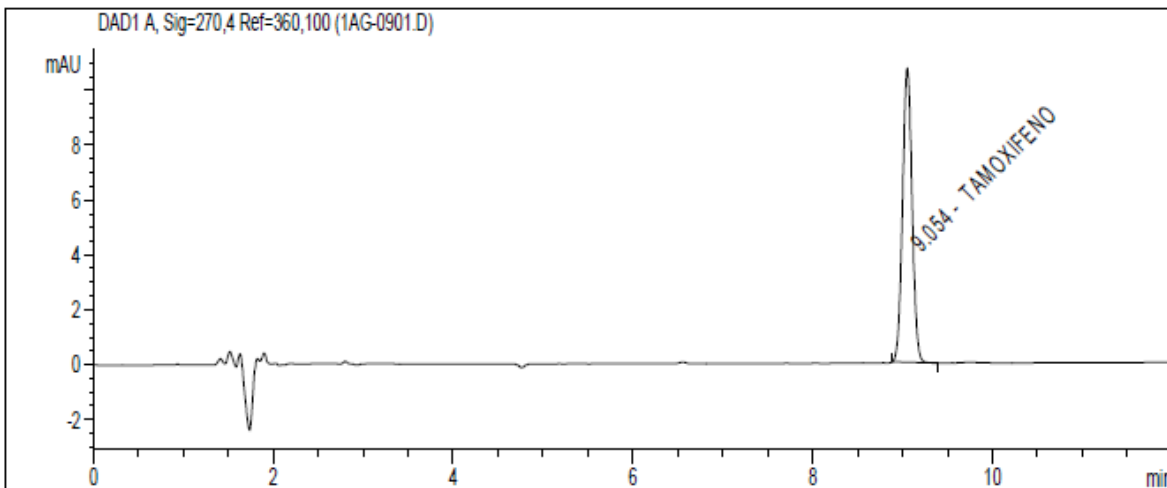


Figura 33. Cromatograma Solución de Referencia de Tamoxifeno en el Parámetro de Especificidad.

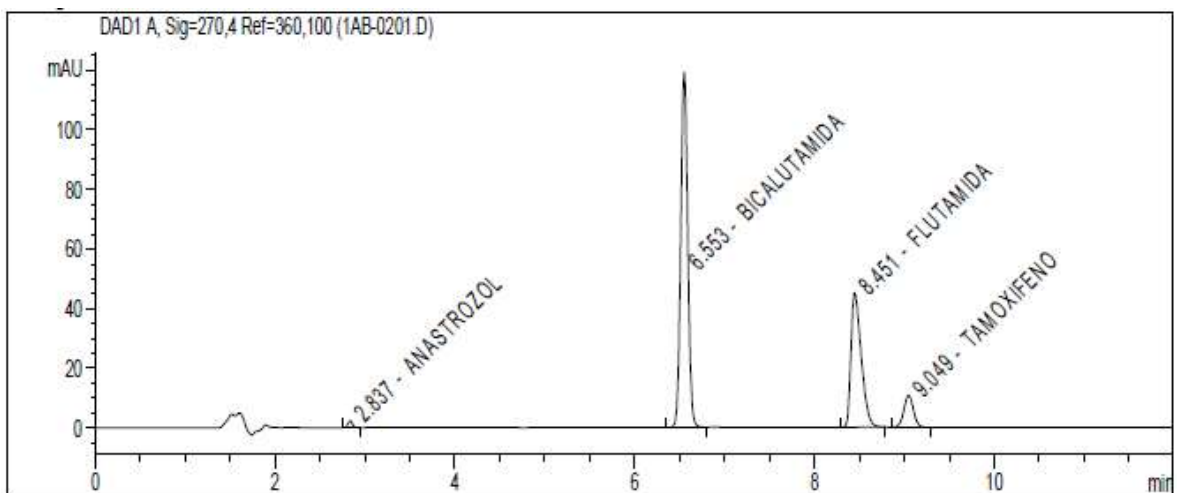


Figura 34. Cromatograma Solución de Referencia con los cuatro Analitos en el Parámetro de Especificidad.

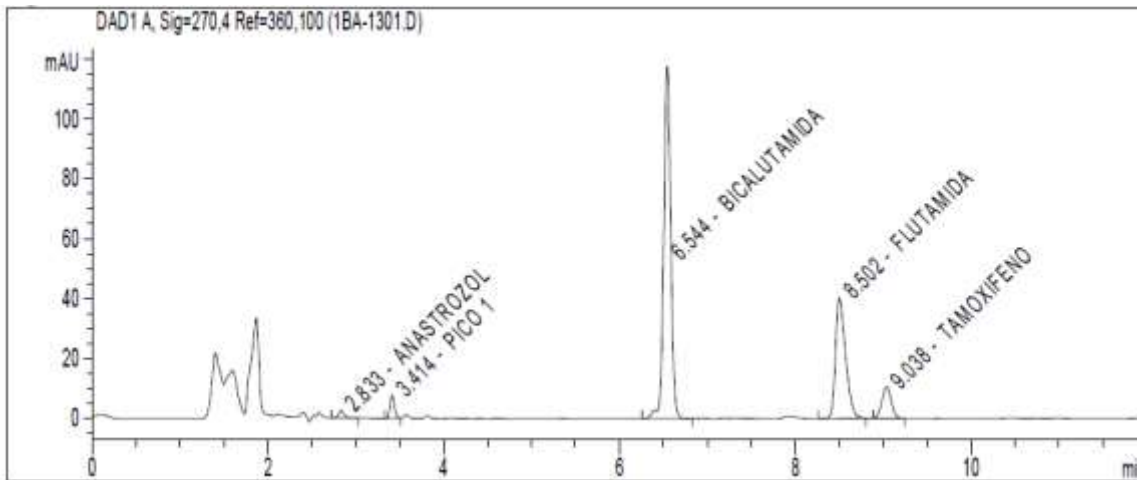


Figura 35. Cromatograma Solución Muestra con los cuatro Analitos en el Parámetro de Especificidad.

Tabla 19. Resultados del Parámetro Especificidad.

ESPECIFICIDAD		
Analito	Tiempo de Retención (Tr)	Tiempo de Retención Relativo (Trr)
Anastrozol	2.837	0.31
Bicalutamida	6.553	0.72
Flutamida	8.451	0.93
Tamoxifeno	9.049	1.00

7.3.4 Linealidad del Sistema

La Linealidad del Sistema o proporcionalidad existente entre la concentración del analito y la señal analítica fue evaluada por medio de una curva de 7 concentraciones conocidas de los analitos, a partir de una solución stock y diluida por triplicado.

Los niveles de concentración estudiados fueron 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 200% y 400%, equivalentes a 1.77 µg/mL, 3.54 µg/mL, 5.30 µg/mL, 7.07 µg/mL, 8.84 µg/mL, 17.68 µg/mL y 35.36 µg/mL respectivamente.

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera: en un matraz volumétrico de 250 mL se pesaron 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Anastrozol, 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Bicalutamida, 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Flutamida y 33.52 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Citrato de Tamoxifeno (equivalente a 22.1 mg de Tamoxifeno), se adicionaron aproximadamente 200 mL de Metanol RA. Se sonicaron hasta que se observó la disolución completa y se aforó con Metanol RA (Solución Madre).

De la solución madre se transfirieron a matraces volumétricos diferentes de 50 mL las alícuotas indicadas en la siguiente tabla y posteriormente se aforaron con agua purificada.

Tabla 20. Linealidad del Sistema.

Nivel (%)	Alícuota Solución Madre (mL)	Volumen Final (mL)	Concentración (µg/mL)
20	1.0	50	1.77
40	2.0	50	3.54
60	3.0	50	5.30
80	4.0	50	7.07
100	5.0	50	8.84
200	5.0	25	17.68
400	10.0	25	35.36

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Anastrozol

Tabla 21. Resultados de Linealidad del Sistema de Anastrozol.

SISTEMA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC	PROMEDIO AREA	DESVIACION AREA	CV AREA
20%	1.78038	1.380	1.388	0.0075	0.5
	1.78038	1.388			
	1.78038	1.395			
40%	3.56075	2.747	2.730	0.0357	1.3
	3.56075	2.689			
	3.56075	2.754			
60%	5.34113	4.085	4.078	0.0075	0.2
	5.34113	4.079			
	5.34113	4.070			
80%	7.12150	5.432	5.426	0.0101	0.2
	7.12150	5.414			
	7.12150	5.431			
100%	8.90188	6.695	6.726	0.0390	0.6
	8.90188	6.714			
	8.90188	6.770			
200%	17.80376	13.426	13.529	0.1137	0.8
	17.80376	13.510			
	17.80376	13.651			
400%	35.60752	24.569	24.989	0.3796	1.5
	35.60752	25.308			
	35.60752	25.089			

Tabla 22. Resultados de Linealidad del Sistema de Anastrozol.

RESULTADOS GLOBALES			
n	21	PENDIENTE	0.6998
Σxy	3789	ORDENADA	0.400
Σx	240.351	r^2	0.9981
Σy	177	S y/x	0.349
Σx^2	5277.615	S b1	0.007
$(\Sigma x)^2$	57768.488	IC b1	0.714
Σy^2	2.72E+03		0.685
x	11.445	S b0	0.110
y	8.40933	IC b0	0.630
x 100%	8.902		0.169
y Calc	6.6294	CV y/x	4.15
T Tablas	2.093	ERROR SIST	6.03

Bicalutamida

Tabla 23. Resultados de Linealidad del Sistema de Bicalutamida.

SISTEMA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC	PROMEDIO AREA	DESVIACION AREA	CV AREA
20%	1.75209	123.118	123.292	0.1933	0.2
	1.75209	123.257			
	1.75209	123.500			
40%	3.50418	243.741	244.832	1.7715	0.7
	3.50418	243.879			
	3.50418	246.876			
60%	5.25626	368.989	368.688	1.3052	0.4
	5.25626	367.259			
	5.25626	369.817			
80%	7.00835	494.177	493.616	2.1740	0.4
	7.00835	491.216			
	7.00835	495.454			
100%	8.76044	610.014	615.665	5.5228	0.9
	8.76044	615.931			
	8.76044	621.050			
200%	17.52088	1231.278	1240.916	9.7354	0.8
	17.52088	1240.723			
	17.52088	1250.746			
400%	35.04176	2462.570	2468.828	7.1974	0.3
	35.04176	2467.220			
	35.04176	2476.693			

Tabla 24. Resultados de Linealidad del Sistema de Bicalutamida.

RESULTADOS GLOBALES			
n	21	PENDIENTE	70.5426
Σxy	360356	ORDENADA	-0.860
Σx	236.532	r^2	1.0000
Σy	16668	S y/x	5.173
Σx^2	5111.238	S b1	0.105
$(\Sigma x)^2$	55947.330	IC b1	70.761
Σy^2	2.54E+07	IC b1	70.324
x	11.263	S b0	1.631
y	793.69086	IC b0	2.555
x 100%	8.760	CV y/x	-4.275
y Calc	617.1240	ERROR SIST	0.65
T Tablas	2.093		-0.14

Flutamida

Tabla 25. Resultados de Linealidad del Sistema de Flutamida.

SISTEMA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC	PROMEDIO AREA	DESVIACION AREA	CV AREA
20%	1.75421	52.277	50.523	8.5643	17.0
	1.75421	58.074			
	1.75421	41.217			
40%	3.50842	125.500	126.455	1.1042	0.9
	3.50842	126.200			
	3.50842	127.664			
60%	5.26263	199.027	198.308	2.0622	1.0
	5.26263	195.983			
	5.26263	199.915			
80%	7.01684	272.822	276.450	3.1508	1.1
	7.01684	278.024			
	7.01684	278.503			
100%	8.77105	350.233	351.433	2.3679	0.7
	8.77105	349.906			
	8.77105	354.161			
200%	17.54210	713.123	715.552	3.6179	0.5
	17.54210	713.823			
	17.54210	719.710			
400%	35.08419	1436.717	1442.808	11.0007	0.8
	35.08419	1436.200			
	35.08419	1455.507			

Debido a que el CV del nivel de 20% es mayor 10% se decidió quitar estos datos del cálculo de estadístico de la Linealidad del Sistema quedando de la siguiente manera:

Tabla 26.Resultados de Linealidad del Sistema de Flutamida.

RESULTADOS GLOBALES			
n	18	PENDIENTE	41.6662
Σxy	209045	ORDENADA	-17.501
Σx	231.556	r^2	0.9999
Σy	9333	S y/x	5.157
Σx^2	5114.392	S b1	0.112
$(\Sigma x)^2$	53618.027	IC b1	41.903
Σy^2	8.55E+06	IC b1	41.430
x	12.864	S b0	1.881
y	518.50100	IC b0	-13.513
x 100%	8.771	IC b0	-21.489
y Calc	347.9548	CV y/x	0.99
T Tablas	2.120	ERROR SIST	-5.03

Tamoxifeno

Tabla 27.Resultados de Linealidad del Sistema de Tamoxifeno.

SISTEMA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC	PROMEDIO AREA	DESVIACION AREA	CV AREA
20%	1.76818	15.039	14.971	0.0759	0.5
	1.76818	14.984			
	1.76818	14.889			
40%	3.53635	29.758	29.826	0.0612	0.2
	3.53635	29.842			
	3.53635	29.877			
60%	5.30453	44.537	44.425	0.1606	0.4
	5.30453	44.241			
	5.30453	44.497			
80%	7.07271	59.364	59.195	0.2962	0.5
	7.07271	58.853			
	7.07271	59.368			
100%	8.84088	73.625	74.203	0.5152	0.7
	8.84088	74.370			
	8.84088	74.614			
200%	17.68177	147.763	149.085	1.5200	1.0
	17.68177	148.747			
	17.68177	150.746			
400%	35.36354	289.694	293.287	3.2190	1.1
	35.36354	295.908			
	35.36354	294.259			

Tabla 28. Resultados de Linealidad del Sistema de Tamoxifeno.

RESULTADOS GLOBALES			
n	21	PENDIENTE	8.2952
Σxy	43350	ORDENADA	0.708
Σx	238.704	r^2	0.9998
Σy	1995	S y/x	1.408
Σx^2	5205.538	S b1	0.028
$(\Sigma x)^2$	56979.537	IC b1	8.354
Σy^2	3.61E+05	S b0	0.444
x	11.367	IC b0	1.638
y	94.99881	IC b0	-0.221
x 100%	8.841	CV y/x	1.48
y Calc	74.0454	ERROR SIST	0.96
T Tablas	2.093		

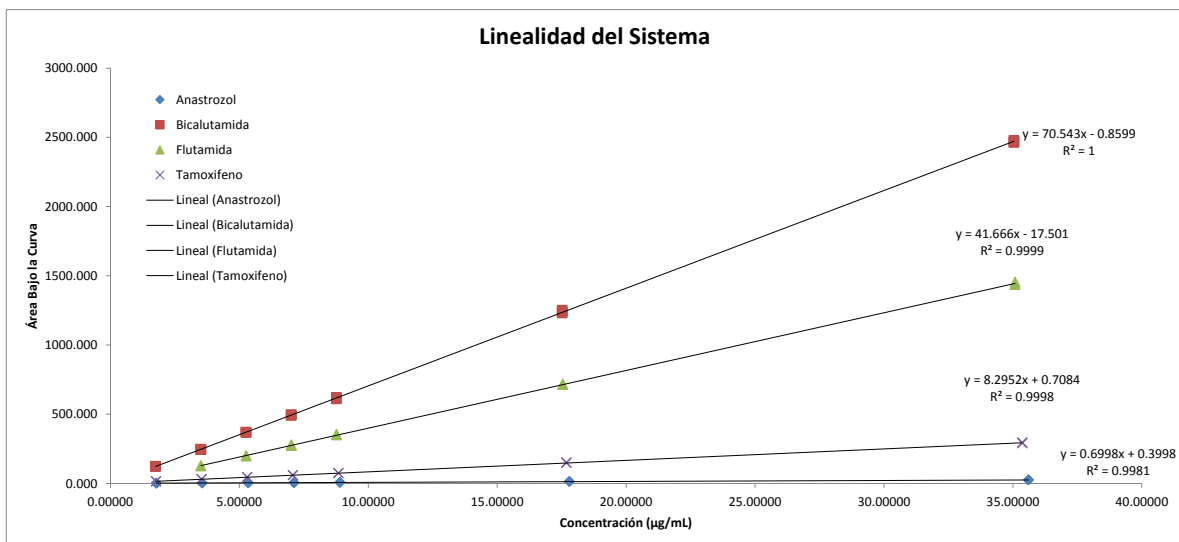


Figura 36. Gráfica de Linealidad del Sistema.

Tabla 29. Resumen de Resultados de Linealidad del Sistema.

RESULTADOS LINEALIDAD DEL SISTEMA					
Analito	r^2	Pendiente	Ordenada	IC(β_1) Sup	IC(β_1) Inf
Anastrozol	0.9981	0.70	0.400	0.7143	0.6853
Bicalutamida	1.0000	70.54	-0.860	70.7614	70.3237
Flutamida	0.9999	41.67	-17.501	41.9028	41.4296
Tamoxifeno	0.9998	8.30	0.708	8.3542	8.2362

7.3.5 Linealidad del Método

Para evaluar la Linealidad del Método, se prepararon e inyectaron en el sistema descrito en la metodología analítica un triplicado de muestras a concentración conocida en tres niveles concentración 50%, 100% y 140%. Las muestras fueron cuantificadas por comparación de áreas contra la solución de referencia descrita en la metodología analítica.

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera:

En un matraz volumétrico de 250 mL pesaron 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Anastrozol, 22.4 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Bicalutamida, 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Flutamida y 33.5 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Citrato de Tamoxifeno (equivalente a 22.1 mg de Tamoxifeno). Se agregaron aproximadamente 200 mL de Metanol RA. Se sonicó hasta la que se observó una disolución completa y se aforó con el mismo disolvente.

De la solución anterior se adicionaron por separado alícuotas a diferentes matraces volumétricos de 50 mL y posteriormente aforar con agua de cisterna sin activos. Las alícuotas para cada uno de los niveles se indican en la siguiente tabla:

Tabla 30. Tabla para la preparación de Linealidad del Método.

Nivel (%)	Alícuota de Solución (mL)	Volumen Final (mL)	Concentración (µg/mL)
50	2.5	50	4.42
100	5.0	50	8.84
140	7.0	50	12.38

Los resultados obtenidos durante la prueba se muestran a continuación:

Anastrozol

Tabla 31. Datos de la Referencia de Anastrozol para la prueba de Linealidad del Método.

REFERENCIA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC
ANASTROZOL		7.108
LOTE 12100413		7.173
PUREZA 100.7	8.9422	7.188
PESO 14.8		7.193
		7.189
		7.165
PROMEDIO		7.169
DES. EST.		0.0
CV %		0.4

Tabla 32. Resultados de Anastrozol para la prueba de Linealidad del Método.

NIVEL	PESO MUESTA (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	AREA	CONCENTRACION RECOBRO (µg/mL)	RECOBRO (%)	PROMEDIO POR NIVEL (%)	CV POR NIVEL	PROMEDIO GLOBAL	DESVIACION ESTANDAR GLOBAL	CV GLOBAL
50 %	22.1	4.45094	3.551	4.42909	99.5	99.6	0.3	99.6	0.5	0.5
	22.1	4.45094	3.546	4.42285	99.4					
	22.1	4.45094	3.570	4.45279	100.0					
100 %	22.1	8.90188	7.104	8.86067	99.5	99.7	0.5			
	22.1	8.90188	7.093	8.84695	99.4					
	22.1	8.90188	7.160	8.93052	100.3					
140 %	22.1	12.46263	9.920	12.37301	99.3	99.3	0.7			
	22.1	12.46263	9.853	12.28944	98.6					
	22.1	12.46263	9.987	12.45658	100.0					

Tabla 33. Resultados Globales de Anastrozol para la prueba de Linealidad del Método.

RESULTADOS GLOBALES					
n	9	PENDIENTE	0.9911	PROMEDIO	99.6
Σxy	758.948854	ORDENADA	0.034	DES. EST	0.5
Σx	77.44636	r ²	0.99978	C.V	0.5
Σy	77.06190	S y/x	0.055	T TABLAS	2.306
Σx ²	763.11459	S b1	0.006	IC(µ)	99.9
(Σx) ²	5997.93806	IC b1	1.004		
Σy ²	754.82799	S b0	0.051		
x	8.60515	IC b0	0.154		
y	8.87938	CV y/x	0.61		
x 100%	8.90188	ERROR SIST	0.38		
y Calc	8.8565				
T Tablas	2.365				

Bicalutamida

Tabla 34. Datos de la Referencia de Bicalutamida para la prueba de Linealidad del Método.

REFERENCIA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC
BICALUTAMIDA		639.7
LOTE	12100375	639.4
PUREZA	99.1	639.7
PESO	14.8	8.8001
		639.8
		639.6
		640.1
PROMEDIO		639.7
DES. EST.		0.2
CV %		0.0

Tabla 35. Resultados de Bicalutamida para la prueba de Linealidad del Método.

NIVEL	PESO MUESTA (mg)	CONCENTRACION (µg/ml)	AREA	CONCENTRACION RECOBRO (µg/ml)	RECOBRO (%)	PROMEDIO POR NIVEL (%)	CV POR NIVEL	PROMEDIO GLOBAL	DESVIACION ESTANDAR GLOBAL	CV GLOBAL
50 %	22.4	4.43968	320.4	4.40749	99.3	100.6	1.3	101.0	0.8	0.8
	22.4	4.43968	325.0	4.47077	100.7					
	22.4	4.43968	329.0	4.52579	101.9					
100 %	22.4	8.87936	652.3	8.97318	101.1	101.2	0.1			
	22.4	8.87936	653.8	8.99381	101.3					
	22.4	8.87936	652.4	8.97455	101.1					
140 %	22.4	12.43110	911.3	12.53604	100.8	101.1	0.8			
	22.4	12.43110	908.5	12.49752	100.5					
	22.4	12.43110	921.4	12.67498	102.0					

Tabla 36. Resultados Globales de Bicalutamida para la prueba de Linealidad del Método.

RESULTADOS GLOBALES					
n	9	PENDIENTE	1.0139	PROMEDIO	101.0
Σxy	767.492153	ORDENADA	-0.030	DES. EST	0.8
Σx	77.25043	r ²	0.9997	C.V	0.8
Σy	78.05414	S y/x	0.060	T TABLAS	2.306
Σx ²	759.25842	S b1	0.006	IC(µ)	101.6
(Σx) ²	5967.62924	IC b1	1.028		100.3
Σy ²	775.84117	S b0	0.999		
x	8.58338	IC b0	0.102		
y	8.98052	CV y/x	0.67		
x 100%	8.87936	ERROR SIST	-0.33		
y Calc	8.9728				
T Tablas	2.365				

Flutamida

Tabla 37. Datos de la Referencia de Flutamida para la prueba de Linealidad del Método.

REFERENCIA	CONCENTRACION (mg/ml)	ABC
FLUTAMIDA		326.4
LOTE 12100313		326.5
PUREZA 99.22	8.8107	326.3
PESO 14.8		326.3
		325.9
		326.1
PROMEDIO		326.3
DES. EST.		0.2
CV %		0.1

Tabla 38. Resultados de Flutamida para la prueba de Linealidad del Método.

NIVEL	PESO MUESTA (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	AREA	CONCENTRACION RECOBRO (µg/mL)	RECOBRO (%)	PROMEDIO POR NIVEL (%)	CV POR NIVEL	PROMEDIO GLOBAL	DESVIACION ESTANDAR GLOBAL	CV GLOBAL
50 %	22.2	4.40537	149.6	4.04011	91.7	95.4	3.5	97.2	3.6	3.7
	22.2	4.40537	160.3	4.32908	98.3					
	22.2	4.40537	156.7	4.23185	96.1					
100 %	22.2	8.81074	321.5	8.68246	98.5	100.2	3.8			
	22.2	8.81074	341.4	9.21988	104.6					
	22.2	8.81074	318.3	8.59604	97.6					
140 %	22.2	12.33503	450.5	12.16624	98.6	95.9	2.5			
	22.2	12.33503	433.1	11.69634	94.8					
	22.2	12.33503	430.5	11.62612	94.3					

Tabla 39. Resultados Globales de Flutamida para la prueba de Linealidad del Método.

RESULTADOS GLOBALES					
n	9	PENDIENTE	0.9658	PROMEDIO	97.2
Σxy	726.736574	ORDENADA	0.062	DES. EST	3.6
Σx	76.65340	r ²	0.9915	C.V	3.7
Σy	74.58811	S y/x	0.328	T TABLAS	2.306
Σx ²	747.56793	S b1	0.034	IC(μ)	100.0
(Σx) ²	5875.74422	IC b1	1.045		94.4
Σy ²	707.24348	S b0	0.307		
x	8.51704	IC b0	0.789		
y	8.83279	CV y/x	3.71		
x 100%	8.81074	ERROR SIST	0.72		
y Calc	8.5712				
T Tablas	2.365				

Tamoxifeno

Tabla 40. Datos de la Referencia de Tamoxifeno para la prueba de Linealidad del Método.

REFERENCIA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC
CITRATO TAMOXIFENO		77.7
LOTE	1210015	77.4
PUREZA	100.01	77.5
PESO	22.1	77.8
FACTOR	0.65	78.1
		77.9
PROMEDIO		77.7
DES. EST.		0.3
CV %		0.3

Tabla 41. Resultados de Tamoxifeno para la prueba de Linealidad del Método.

NIVEL	PESO MUESTRA (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	AREA	CONCENTRACION RECOBRO (µg/mL)	RECOBRO (%)	PROMEDIO POR NIVEL (%)	CV POR NIVEL	PROMEDIO GLOBAL	DESVIACION ESTANDAR GLOBAL	CV GLOBAL
50%	33.5	4.35544	39.2	4.34689	99.8	100.5	0.7	100.8	0.5	0.5
	33.5	4.35544	39.5	4.38016	100.6					
	33.5	4.35544	39.7	4.40234	101.1					
100%	33.5	8.71087	79.4	8.80468	101.1	101.1	0.1			
	33.5	8.71087	79.5	8.81577	101.2					
	33.5	8.71087	79.4	8.80468	101.1					
140%	33.5	12.19522	110.9	12.29772	100.8	100.7	0.4			
	33.5	12.19522	110.3	12.23118	100.3					
	33.5	12.19522	111.1	12.31990	101.0					

Tabla 42. Resultados Globales de Tamoxifeno para la prueba de Linealidad del Método.

RESULTADOS GLOBALES					
n	9	PENDIENTE	1.0089	PROMEDIO	100.8
Σxy	736.749303	ORDENADA	-0.006	DES. EST	0.5
Σx	75.78458	r ²	0.9999	C.V	0.5
Σy	76.40332	S y/x	0.036	T TABLAS	2.306
Σx ²	730.71740	S b1	0.004	IC _(µ)	101.1
(Σx) ²	5743.30222	IC b1	1.018		
Σy ²	742.84003	S b0	0.034		
x	8.42051	IC b0	0.073		
y	8.80838	CV y/x	0.41		
x 100%	8.71087	ERROR SIST	-0.07		
y Calc	8.7822				
T Tablas	2.365				

Tabla 43. Resumen de Resultados para la Linealidad del Método.

Analito	Cantidad Adicionada vs Cantidad Recuperada						Porcentaje de Recobro			
	r ²	IC (β ₁)		IC (β ₀)		CV _{y/x}	Promedio	IC (µ)		CV
		Inferior	Superior	Inferior	Superior			Inferior	Superior	
Anastrozol	0.9998	0.9780	1.0043	-0.0872	0.1544	0.6	99.6	99.2	99.9	0.5
Bicalutamida	0.9997	0.9995	1.0283	-0.1621	0.1024	0.7	101.0	100.3	101.6	0.8
Flutamida	0.9915	0.8861	1.0455	-0.6645	0.7885	3.7	97.2	94.4	100.0	3.7
Tamoxifeno	0.9999	1.0001	1.0177	-0.0854	0.0734	0.4	100.8	100.4	101.1	0.5

7.3.6 Repetibilidad

Para determinar la concordancia existente entre la cantidad adicionada con respecto a la cantidad recuperada se realiza la prueba de repetibilidad, se realizó la preparación de la solución de referencia como se indica en la metodología analítica y se prepararon un sextuplicado de muestras adicionadas al 100% de la concentración de trabajo.

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera:

En un matraz volumétrico de 250 mL pesaron 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Anastrozol, 22.4 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Bicalutamida, 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Flutamida y 33.5 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Citrato de Tamoxifeno (equivalente a 22.1 mg de Tamoxifeno). Se agregaron aproximadamente 200 mL de Metanol RA. Se sonicó hasta la que se observó una disolución completa y se aforó con el mismo disolvente. De la solución anterior se transfirieron por separado alícuotas de 5 mL a matraces volumétricos de 50 mL y posteriormente aforar con agua de cisterna sin activos.

Las muestras fueron cuantificadas por comparación de áreas contra la solución de referencia descrita en la metodología analítica, obteniendo los siguientes resultados:

Anastrozol

Tabla 44. Datos de la Referencia de Anastrozol para la prueba de Repetibilidad.

REFERENCIA	CONCENTRACION (mg/mL)		ABC
ANASTROZOL			
LOTE	12100413		7.097
PUREZA	100.7	8.9422	7.083
PESO	14.8		7.077
			7.106
			7.138
			7.099
		PROMEDIO	7.100
		DES. EST.	0.0
		CV %	0.3

Tabla 45. Resultados de Anastrozol para la prueba de Repetibilidad.

SISTEMA	PESO MUESTA (mg)	CONCENTRACION (mg/mL)	AREA	RECUBRO (%)	PROMEDIO	Desviación	CV	T Tablas	IC (μ)	
									Inferior	Superior
1	22.1	8.9019	7.054	99.8						
2	22.1	8.9019	7.052	99.8						
3	22.1	8.9019	7.070	100.0	99.9	0.2	0.2	2.571	99.7	100.1
4	22.1	8.9019	7.050	99.7						
5	22.1	8.9019	7.091	100.3						
6	22.1	8.9019	7.051	99.8						

Bicalutamida

Tabla 46. Datos de la Referencia de Bicalutamida para la prueba de Repetibilidad.

REFERENCIA	CONCENTRACION (mg/mL)		ABC
BICALUTAMIDA			
LOTE	12100375		636.9
PUREZA	99.1	8.8001	636.5
PESO	14.8		636.1
			636.8
			636.9
			637.1
		PROMEDIO	636.717
		DES. EST.	0.4
		CV %	0.1

Tabla 47. Resultados de Bicalutamida para la prueba de Repetibilidad.

SISTEMA	PESO MUESTA (mg)	CONCENTRACION (mg/mL)	AREA	RECOBRO (%)	PROMEDIO	Desviacion	CV	T Tablas	IC (μ)	
									Inferior	Superior
1	22.4	8.8794	652.9	101.6	101.8	0.2	0.2	2.571	101.5	102.0
2	22.4	8.8794	652.4	101.5						
3	22.4	8.8794	655.9	102.1						
4	22.4	8.8794	652.7	101.6						
5	22.4	8.8794	654.8	101.9						
6	22.4	8.8794	655.6	102.0						

Flutamida

Tabla 48. Datos de la Referencia de Flutamida para la prueba de Repetibilidad.

REFERENCIA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC
FLUTAMIDA		323.2
LOTE	12100313	323.8
PUREZA	99.22	8.8107
PESO	14.8	323.5
		323.3
		323.7
	PROMEDIO	323.4
	DES. EST.	0.3
	CV %	0.1

Tabla 49. Resultados de Flutamida para la prueba de Repetibilidad.

SISTEMA	PESO MUESTA (mg)	CONCENTRACION (mg/mL)	AREA	RECOBRO (%)	PROMEDIO	Desviacion	CV	T Tablas	IC (μ)	
									Inferior	Superior
1	22.2	8.8107	328.7	101.6	101.5	1.8	1.8	2.571	99.6	103.5
2	22.2	8.8107	320.8	99.2						
3	22.2	8.8107	323.8	100.1						
4	22.2	8.8107	327.6	101.3						
5	22.2	8.8107	331.9	102.6						
6	22.2	8.8107	337.6	104.4						

Tamoxifeno

Tabla 50. Datos de la Referencia de Tamoxifeno para la prueba de Repetibilidad.

REFERENCIA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC
CITRATO TAMOXIFENO		77.3
LOTE	12100315	77.3
PUREZA	100.01	8.6199
PESO	22.1	77.4
FACTOR	0.65	77.3
		77.4
	PROMEDIO	77.3
	DES. EST.	0.1
	CV %	0.1

Tabla 51. Resultados de Tamoxifeno para la prueba de Repetibilidad.

SISTEMA	PESO MUESTRA (mg)	CONCENTRACION (mg/mL)	AREA	RECOBRO (%)	PROMEDIO	Desviacion	CV	T Tablas	IC (μ)	
									Inferior	Superior
1	33.5	8.7109	78.9	101.0	100.9	0.2	0.2	2.571	100.7	101.1
2	33.5	8.7109	78.9	101.0						
3	33.5	8.7109	79.0	101.1						
4	33.5	8.7109	78.6	100.6						
5	33.5	8.7109	78.9	101.0						
6	33.5	8.7109	78.7	100.7						

Tabla 52. Resumen de Resultados para la Repetibilidad.

Analito	Porcentaje de Recobro			CV
	Promedio	IC (μ)		
		Inferior	Superior	
Anastrozol	99.9	99.7	100.1	0.2
Bicalutamida	101.8	101.5	102.0	0.2
Flutamida	101.5	99.6	103.5	1.8
Tamoxifeno	100.9	100.7	101.1	0.2

7.3.7 Precisión Intermedia

Para determinar la variación existente dentro de un mismo laboratorio, se prepararon un triplicado de muestras y se analizaron por dos analistas en dos días distintos, utilizando la metodología analítica desarrollada. Las muestras fueron cuantificadas por comparación de áreas contra la solución de referencia preparada por cada analista, obteniendo los siguientes resultados:

Anastrozol

Tabla 53. Resultados de Anastrozol para la prueba de Precisión Intermedia.

ANALISTA 1 DIA 1									
REFERENCIA	CONCENTRACION (μg/mL)	ABC	A1D1	PESO (mg)	CONCENTRACION (μg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
ANASTROZOL		7.097	M1	22.1	8.90188	7.054	99.8	99.9	0.1
LOTE 12100413		7.083	M2	22.1	8.90188	7.052	99.8		
PUREZA 100.7	8.9422	7.077	M3	22.1	8.90188	7.070	100.0		
PESO 14.8		7.106							
		7.138							
		7.099							
		PROMEDIO 7.1							
		DES. EST. 0.0							
		CV % 0.3							

ANALISTA 2 DIA 1									
REFERENCIA	CONCENTRACION (μg/mL)	ABC	A2D1	PESO (mg)	CONCENTRACION (μg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
ANASTROZOL		7.086	M1	22.1	8.90188	7.024	99.5	100.1	0.6
LOTE 12100413		7.085	M2	22.1	8.90188	7.080	100.3		
PUREZA 100.7	8.9422	7.097	M3	22.1	8.90188	7.103	100.6		
PESO 14.8		7.103							
		7.105							
		7.082							
		PROMEDIO 7.1							
		DES. EST. 0.0							
		CV % 0.1							

ANALISTA 1 DIA 2									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A1D2	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
ANASTROZOL		7.052	M1	22.1	8.90188	7.102	101.2	100.9	0.9
LOTE 12100413		7.056	M2	22.1	8.90188	7.012	99.9		
PUREZA 100.7	8.9422	7.056	M3	22.1	8.90188	7.142	101.7		
PESO 14.8		7.068							
		7.043							
		7.042							
	PROMEDIO	7.1							
	DES. EST.	0.0							
	CV %	0.1							

ANALISTA 2 DIA 2									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A2D2	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
ANASTROZOL		7.186	M1	22.1	8.90188	7.102	99.3	99.9	0.6
LOTE 12100413		7.201	M2	22.1	8.90188	7.152	100.0		
PUREZA 100.7	8.9422	7.187	M3	22.1	8.90188	7.186	100.4		
PESO 14.8		7.195							
		7.198							
		7.156							
	PROMEDIO	7.2							
	DES. EST.	0.0							
	CV %	0.2							

Tabla 54. Resultados de Anastrozol para la prueba de Precisión Intermedia.

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	99.8	99.5
		99.8	100.3
		100.0	100.6
	2	101.2	99.3
		99.9	100.0
		101.7	100.4
PROMEDIO (n=12) =		100.2	
Desviación (n=12) =		0.7	
CV (n=12) =		0.7	

Bicalutamida

Tabla 55. Resultados de Bicalutamida para la prueba de Precisión Intermedia.

ANALISTA 1 DIA 1									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A1D1	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA		636.9	M1	22.4	8.87936	652.9	101.6	101.7	0.3
LOTE 12100375		636.5	M2	22.4	8.87936	652.4	101.5		
PUREZA 99.1	8.8001	636.1	M3	22.4	8.87936	655.9	102.1		
PESO 14.8		636.8							
		636.9							
		637.1							
	PROMEDIO	636.7							
	DES. EST.	0.4							
	CV %	0.1							

ANALISTA 2 DIA 1									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A2D1	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA		639.1	M1	22.4	8.87936	649.3	100.7	100.4	0.3
LOTE 12100375		639.3	M2	22.4	8.87936	647.9	100.4		
PUREZA 99.1	8.8001	639.3	M3	22.4	8.87936	646.4	100.2		
PESO 14.8		639.1							
		639.2							
		639.8							
	PROMEDIO	639.3							
	DES. EST.	0.3							
	CV %	0.0							

ANALISTA 1 DIA 2									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A1D2	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA		643.3	M1	22.4	8.87936	654.0	100.7	100.4	0.3
LOTE 12100375		643.9	M2	22.4	8.87936	652.2	100.4		
PUREZA 99.1	8.8001	644.0	M3	22.4	8.87936	650.3	100.1		
PESO 14.8		644.0							
		644.1							
	PROMEDIO	643.9							
	DES. EST.	0.3							
	CV%	0.0							

ANALISTA 2 DIA 2									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A2D2	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA		656.2	M1	22.4	8.87936	646.7	97.7	98.1	0.4
LOTE 12100375		656.2	M2	22.4	8.87936	650.0	98.2		
PUREZA 99.1	8.8001	656.2	M3	22.4	8.87936	651.1	98.4		
PESO 14.8		655.9							
		655.3							
		656.5							
	PROMEDIO	656.1							
	DES. EST.	0.4							
	CV%	0.1							

Tabla 56. Resultados de Bicalutamida para la prueba de Precisión Intermedia.

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	101.6	100.7
		101.5	100.4
		102.1	100.2
	2	100.7	97.7
		100.4	98.2
		100.1	98.4
PROMEDIO (n=12) =		100.2	
Desviación (n=12) =		1.4	
CV (n=12) =		1.4	

Flutamida

Tabla 57. Resultados de Flutamida para la prueba de Precisión Intermedia.

ANALISTA 1 DIA 1									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A1D1	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		323.2	M1	22.2	8.81074	328.7	101.6	100.3	1.2
LOTE 12100313		323.8	M2	22.2	8.81074	320.8	99.2		
PUREZA 99.22	8.8107	323.1	M3	22.2	8.81074	323.8	100.1		
PESO 14.8		323.5							
		323.3							
		323.7							
	PROMEDIO	323.4							
	DES. EST.	0.3							
	CV%	0.1							
ANALISTA 2 DIA 1									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A2D1	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		331.3	M1	22.2	8.81074	338.9	104.0	103.8	0.2
LOTE 12100313		327.9	M2	22.2	8.81074	337.9	103.7		
PUREZA 99.22	8.8107	325.5	M3	22.2	8.81074	338.1	103.7		
PESO 14.8		326.7							
		322.9							
		321.1							
	PROMEDIO	325.9							
	DES. EST.	3.6							
	CV%	1.1							

ANALISTA 1 DIA 2									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A1D2	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		339.7	M1	22.2	8.81074	333.8	97.5	98.1	1.4
LOTE 12100313		341.0	M2	22.2	8.81074	341.4	99.7		
PUREZA 99.22	8.8107	343.2	M3	22.2	8.81074	332.2	97.1		
PESO 14.8		343.5							
		343.8							
		342.4							
	PROMEDIO	342.3							
	DES. EST.	1.6							
	CV %	0.5							

ANALISTA 2 DIA 2									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A2D2	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		337.5	M1	22.2	8.81074	327.6	96.8	97.9	1.7
LOTE 12100313		338.5	M2	22.2	8.81074	328.1	97.0		
PUREZA 99.22	8.8107	338.5	M3	22.2	8.81074	337.6	99.8		
PESO 14.8		337.7							
		338.8							
		339.1							
	PROMEDIO	338.4							
	DES. EST.	0.6							
	CV %	0.2							

Tabla 58. Resultados de Flutamida para la prueba de Precisión Intermedia.

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	101.6	104.0
		99.2	103.7
		100.1	103.7
2	97.5	96.8	
	99.7	97.0	
	97.1	99.8	
PROMEDIO (n=12) =		100.0	
Desviación (n=12) =		2.7	
CV (n=12) =		2.7	

Tamoxifeno

Tabla 59. Resultados de Tamoxifeno para la prueba de Precisión Intermedia.

ANALISTA 1 DIA 1									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A1D1	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
CITRATO TAMOXIFENO		77.3	M1	33.5	8.71087	78.9	101.0	101.0	0.1
LOTE 12100315		77.3	M2	33.5	8.71087	78.9	101.0		
PUREZA 100.01	8.6199	77.3	M3	33.5	8.71087	79.0	101.1		
PESO 22.1		77.4							
FACTOR 0.65		77.3							
		77.4							
	PROMEDIO	77.3							
	DES. EST.	0.1							
	CV %	0.1							

ANALISTA 2 DIA 1									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A2D1	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
CITRATO TAMOXIFENO		77.4	M1	33.5	8.71087	76.1	98.3	97.0	1.4
LOTE 12100315		77.4	M2	33.5	8.71087	75.2	97.2		
PUREZA 100.01	8.7369	77.6	M3	33.5	8.71087	74.0	95.6		
PESO 22.4		77.9							
FACTOR 0.65		77.8							
		77.7							
	PROMEDIO	77.6							
	DES. EST.	0.2							
	CV %	0.3							

ANALISTA 1 DIA 2									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A1D2	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
CITRATO TAMOXIFENO		74.0	M1	33.5	8.71087	76.3	102.0	101.6	0.4
LOTE 12100315		74.1	M2	33.5	8.71087	76.0	101.6		
PUREZA 100.01	8.6199	74.1	M3	33.5	8.71087	75.7	101.2		
PESO 22.1		74.0							
FACTOR 0.65		73.9							
		73.9							
	PROMEDIO	74.0							
	DES. EST.	0.1							
	CV %	0.1							

ANALISTA 2 DIA 2									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	A2D2	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
CITRATO TAMOXIFENO		73.7	M1	33.5	8.71087	74.0	101.4	100.2	2.6
LOTE 12100315		71.9	M2	33.5	8.71087	74.4	102.1		
PUREZA 100.01	8.6199	71.8	M3	33.5	8.71087	70.9	97.2		
PESO 22.1		71.3							
FACTOR 0.65		72.5							
		71.8							
	PROMEDIO	72.2							
	DES. EST.	0.8							
	CV %	1.2							

Tabla 60. Resultados de Tamoxifeno para la prueba de Precisión Intermedia.

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	101.0	98.3
		101.0	97.2
		101.1	95.6
	2	102.0	101.4
		101.6	102.1
		101.2	97.2
PROMEDIO (n=12) =		100.0	
Desviación (n=12) =		2.2	
CV (n=12) =		2.2	

Tabla 61. Resultados de Globales para la prueba de Precisión Intermedia.

RESULTADOS GLOBALES DE PRECISIÓN INTERMEDIA		
	PROMEDIO (n=12)	CV (n=12)
ANASTROZOL	100.2	0.7
BICALUTAMIDA	100.2	1.4
FLUTAMIDA	100.0	2.7
TAMOXIFENO	100.0	2.2

7.3.8 Límite de Detección y Cuantificación

El límite de detección (LD) corresponde a la menor cantidad de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra y se expresa en unidades de concentración.

El límite de cuantificación (LQ) corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables y se expresa también en unidades de concentración.

Los niveles de concentración estudiados fueron 0.1%, 0.5%, 1.0%, 5.0%, 7.0% y 10.0%, equivalentes a 0.00884 µg/mL, 0.0442 µg/mL, 0.0884 µg/mL, 0.4422 µg/mL, 0.6188 µg/mL y 0.8840 µg/mL respectivamente.

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera: en un matraz volumétrico de 250 mL se pesaron 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Anastrozol, 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Bicalutamida, 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Flutamida y 33.52 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Citrato de Tamoxifeno (equivalente a 22.1 mg de Tamoxifeno), se adicionaron aproximadamente 200 mL de Metanol RA. Se sonicaron hasta que se observó la disolución completa y se aforó con Metanol RA (Solución Madre).

De la solución madre se transfirieron 25 mL a un matraz volumétrico de 250 mL y posteriormente se aforaron con agua purificada. De la solución anterior se tomaron alícuotas indicadas en la siguiente tabla y se transfirieron a los matraces volumétricos indicados en la misma, finalmente se aforaron con agua purificada. Estas soluciones se prepararon por quintuplicado.

Tabla 62. Preparación del Límite de Detección y Cuantificación.

Nivel (%)	Volumen de Alícuota (mL)	Volumen Final (mL)	Concentración (µg/mL)
10	10.0	100	0.8840
7	7.0	100	0.6188
5	5.0	100	0.4420
1	1.0	100	0.0884
0.5	1.0	200	0.0442
0.1	1.0	1000	0.00884

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Anastrozol

Tabla 63. Resultados de Anastrozol para la prueba de Límite de Detección y Cuantificación.

SISTEMA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC	PROMEDIO AREA	DESVIACION AREA	CV AREA
0.1%	0.00890	0.136	0.143	0.0142	10.0
	0.00890	0.132			
	0.00890	0.146			
	0.00890	0.133			
	0.00890	0.166			
0.5%	0.04451	0.175	0.177	0.0119	6.7
	0.04451	0.187			
	0.04451	0.187			
	0.04451	0.178			
	0.04451	0.158			
1.0%	0.08902	0.223	0.221	0.0166	7.5
	0.08902	0.200			
	0.08902	0.208			
	0.08902	0.235			
	0.08902	0.238			
5.0%	0.44509	0.530	0.544	0.0208	3.8
	0.44509	0.566			
	0.44509	0.565			
	0.44509	0.538			
	0.44509	0.520			
7.0%	0.62313	0.755	0.741	0.0112	1.5
	0.62313	0.729			
	0.62313	0.730			
	0.62313	0.747			
	0.62313	0.743			
10.0%	0.89019	0.982	0.979	0.0139	1.4
	0.89019	0.990			
	0.89019	0.965			
	0.89019	0.965			
	0.89019	0.995			

Tabla 64. Resultados de Anastrozol para la prueba de Límite de Detección y Cuantificación.

RESULTADOS GLOBALES			
n	30	PENDIENTE	0.9528
Σxy	8	ORDENADA	0.134
Σx	10.504	r^2	0.9975
Σy	14	S y/x	0.016
Σx^2	6.944	S b1	0.009
$(\Sigma x)^2$	110.339	IC b1	0.971
Σy^2	9.53E+00		0.934
x	0.350	S b0	0.004
y	0.46740	IC b0	0.143
x 100%	8.840		0.125
y Calc	8.5563	CV y/x	3.48
T Tablas	2.048	ERROR SIST	0.16
Límite de Detección y Cuantificación			
Límite de Detección		0.0564	µg/mL
Límite de Cuantificación		0.1708	µg/mL

Bicalutamida

Tabla 65. Resultados de Bicalutamida para la prueba de Límite de Detección y Cuantificación.

SISTEMA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC	PROMEDIO AREA	DESVIACION AREA	CV AREA
0.1%	0.00876	0.972	0.996	0.0496	5.0
	0.00876	0.921			
	0.00876	1.021			
	0.00876	1.026			
	0.00876	1.042			
0.5%	0.04380	4.137	4.096	0.0420	1.0
	0.04380	4.032			
	0.04380	4.094			
	0.04380	4.085			
	0.04380	4.130			
1.0%	0.08760	8.037	7.987	0.0473	0.6
	0.08760	7.944			
	0.08760	7.956			
	0.08760	8.040			
	0.08760	7.958			
5.0%	0.43802	39.663	39.819	0.1639	0.4
	0.43802	39.635			
	0.43802	40.012			
	0.43802	39.868			
	0.43802	39.917			
7.0%	0.61323	57.268	57.302	0.1357	0.2
	0.61323	57.287			
	0.61323	57.537			
	0.61323	57.218			
	0.61323	57.202			
10.0%	0.87604	80.461	80.558	0.1445	0.2
	0.87604	80.655			
	0.87604	80.595			
	0.87604	80.363			
	0.87604	80.717			

Tabla 66. Resultados de Bicalutamida para la prueba de Límite de Detección y Cuantificación.

RESULTADOS GLOBALES			
n	30	PENDIENTE	92.1705
Σxy	620	ORDENADA	0.033
Σx	10.337	r^2	0.9998
Σy	954	S y/x	0.433
Σx^2	6.725	S b1	0.243
$(\Sigma x)^2$	106.860	IC b1	92.669
Σy^2	5.72E+04		91.672
x	0.345	S b0	0.115
y	31.79310	IC b0	0.269
x 100%	8.840		-0.203
y Calc	814.8201	CV y/x	1.36
T Tablas	2.048	ERROR SIST	0.00
Limite de Detección y Cuantificación			
Limite de Detección		0.0155	µg/mL
Limite de Cuantificación		0.0470	µg/mL

Flutamida

Tabla 67. Resultados de Flutamida para la prueba de Límite de Detección y Cuantificación.

SISTEMA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC	PROMEDIO AREA	DESVIACION AREA	CV AREA
0.1%	0.00877	0.257	0.282	0.0409	14.5
	0.00877	0.330			
	0.00877	0.233			
	0.00877	0.274			
	0.00877	0.318			
0.5%	0.04386	1.255	1.116	0.0805	7.2
	0.04386	1.080			
	0.04386	1.112			
	0.04386	1.085			
	0.04386	1.050			
1.0%	0.08771	2.027	1.935	0.0558	2.9
	0.08771	1.920			
	0.08771	1.880			
	0.08771	1.938			
	0.08771	1.908			
5.0%	0.43855	11.652	11.625	0.0446	0.4
	0.43855	11.691			
	0.43855	11.599			
	0.43855	11.591			
	0.43855	11.593			
7.0%	0.61397	20.723	20.470	0.2481	1.2
	0.61397	20.623			
	0.61397	20.588			
	0.61397	20.267			
	0.61397	20.148			
10.0%	0.87710	28.780	28.945	0.2119	0.7
	0.87710	28.973			
	0.87710	29.118			
	0.87710	28.681			
	0.87710	29.173			

Tabla 68. Resultados de Flutamida para la prueba de Límite de Detección y Cuantificación.

RESULTADOS GLOBALES			
n	30	PENDIENTE	33.2192
Σxy	216	ORDENADA	-0.732
Σx	10.350	r^2	0.9906
Σy	322	S y/x	1.091
Σx^2	6.741	S b1	0.613
$(\Sigma x)^2$	107.119	IC b1	34.474
Σy^2	6.99E+03	S b0	0.290
x	0.345	IC b0	-0.137
y	10.72890	CV y/x	10.17
x 100%	8.840	ERROR SIST	-0.02
y Calc	292.9261		
T Tablas	2.048		
Límite de Detección y Cuantificación			
Límite de Detección		0.1084	µg/mL
Límite de Cuantificación		0.3284	µg/mL

Tamoxifeno

Tabla 69. Resultados de Tamoxifeno para la prueba de Límite de Detección y Cuantificación.

SISTEMA	CONCENTRACION (mg/mL)	ABC	PROMEDIO AREA	DESVIACION AREA	CV AREA
0.1%	0.00871	0.130	0.130	0.0219	16.9
	0.00871	0.124			
	0.00871	0.096			
	0.00871	0.148			
	0.00871	0.150			
0.5%	0.04355	0.599	0.591	0.0340	5.8
	0.04355	0.572			
	0.04355	0.589			
	0.04355	0.551			
	0.04355	0.642			
1.0%	0.08711	1.070	1.014	0.0423	4.2
	0.08711	0.989			
	0.08711	1.011			
	0.08711	1.038			
	0.08711	0.961			
5.0%	0.43554	4.935	4.869	0.0593	1.2
	0.43554	4.782			
	0.43554	4.876			
	0.43554	4.908			
	0.43554	4.845			
7.0%	0.60976	6.883	6.848	0.0660	1.0
	0.60976	6.887			
	0.60976	6.916			
	0.60976	6.767			
	0.60976	6.789			
10.0%	0.87109	9.736	9.706	0.0213	0.2
	0.87109	9.716			
	0.87109	9.706			
	0.87109	9.683			
	0.87109	9.689			

Tabla 70. Resultados de Tamoxifeno para la prueba de Límite de Detección y Cuantificación.

RESULTADOS GLOBALES			
n	30	PENDIENTE	11.0826
Σxy	74	ORDENADA	0.062
Σx	10.279	r^2	0.9998
Σy	116	S y/x	0.050
Σx^2	6.649	S b1	0.028
$(\Sigma x)^2$	105.654	IC b1	11.140
Σy^2	8.31E+02	S b0	11.025
x	0.343	IC b0	0.013
y	3.85960	CV y/x	0.090
x 100%	8.840	ERROR SIST	0.035
y Calc	98.0325		1.29
T Tablas	2.048		0.01
Limite de Detección y Cuantificación			
Limite de Detección		0.0148	µg/mL
Limite de Cuantificación		0.0449	µg/mL

Tabla 71. Resumen de resultados de la prueba de Límite de Detección y Cuantificación.

RESUMEN DE RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN					
	r^2	IC (b_1)		Límite de Detección ($\mu\text{g/mL}$)	Limite de Cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)
		Inferior	Superior		
Anastrozol	0.9975	0.934	0.971	0.0564	0.1708
Bicalutamida	0.9998	91.672	92.669	0.0155	0.0470
Flutamida	0.9906	31.964	34.474	0.1084	0.3284
Tamoxifeno	0.9998	11.025	11.140	0.0148	0.0449

7.3.9 Estabilidad de las Soluciones Muestra y Referencia

Con el fin de determinar el periodo en el cual las soluciones muestra y las soluciones de referencia pueden ser utilizadas, se realizó el ensayo de ambas soluciones a diferentes tiempos (24h, 48h y 72h) y diferentes condiciones ambientales (Temperatura ambiente y Refrigeración).

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera:

En un matraz volumétrico de 250 mL pesaron 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Anastrozol, 22.4 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Bicalutamida, 22.1 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Flutamida y 33.5 mg de Sustancia de Referencia Secundaria de Citrato de Tamoxifeno (equivalente a 22.1 mg de Tamoxifeno). Se agregaron aproximadamente 200 mL de Metanol RA. Se sonicó hasta la que se observó una disolución completa y se aforó con el mismo disolvente. De la solución anterior se transfirieron por separado alícuotas de 5 mL a matraces volumétricos de 50 mL y posteriormente aforar con agua de cisterna sin activos.

Las muestras fueron cuantificadas por comparación de áreas contra la solución de referencia, preparadas en el día del análisis, obteniendo los siguientes resultados:

Anastrozol

Tabla 72. Resultados de Anastrozol para la prueba de Estabilidad de las Soluciones.

ESTABILIDAD TIEMPO INICIAL										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
ANASTROZOL		7.153	REFERENCIAS							
LOTE 12100375		7.150	M1	14.8	8.94216	7.153	100.0	100.6	0.5	
PUREZA 100.7	8.9422	7.156	M2	14.8	8.94216	7.223	100.9			
PESO 14.8		7.144	M3	14.8	8.94216	7.217	100.9			
		7.140	MUESTRAS							
		7.194	M1	22.2	8.94216	7.232	101.1	100.8	0.3	
PROMEDIO		7.156	M2	22.2	8.94216	7.216	100.8			
DES. EST.		0.0	M3	22.2	8.94216	7.190	100.5			
CV %		0.3								
ESTABILIDAD TIEMPO 24 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
ANASTROZOL		7.190	REFERENCIAS							
LOTE 12100413		7.165	M1	14.8	8.94216	7.130	100.6	101.1	0.5	
PUREZA 100.7	9.0630	7.171	M2	14.8	8.94216	7.164	101.1			
PESO 15.0		7.180	M3	14.8	8.94216	7.201	101.6			
		7.170	MUESTRAS							
		7.204	M1	22.2	8.94216	7.196	101.6	101.5	0.1	
PROMEDIO		7.180	M2	22.2	8.94216	7.193	101.5			
DES. EST.		0.0	M3	22.2	8.94216	7.183	101.4			
CV %		0.2								
ESTABILIDAD TIEMPO 24 HORAS REFRIGERACION										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
ANASTROZOL		7.190	REFERENCIAS							
LOTE 12100413		7.165	M1	14.8	8.94216	7.173	101.3	101.8	1.2	
PUREZA 100.7	9.0630	7.171	M2	14.8	8.94216	7.146	100.9			
PESO 15.0		7.180	M3	14.8	8.94216	7.307	103.1			
		7.170	MUESTRAS							
		7.204	M1	22.2	8.94216	7.826	110.5	105.4	4.2	
PROMEDIO		7.180	M2	22.2	8.94216	7.257	102.4			
DES. EST.		0.0	M3	22.2	8.94216	7.318	103.3			
CV %		0.2								
ESTABILIDAD TIEMPO 48 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
ANASTROZOL		7.199	REFERENCIAS							
LOTE 12100413		7.218	M1	14.8	8.94216	7.220	100.2	101.0	0.7	
PUREZA 100.7	8.9422	7.194	M2	14.8	8.94216	7.295	101.3			
PESO 14.8		7.185	M3	14.8	8.94216	7.313	101.5			
		7.199	MUESTRAS							
		7.218	M1	22.2	8.94216	7.394	102.7	101.5	1.1	
PROMEDIO		7.202	M2	22.2	8.94216	7.256	100.7			
DES. EST.		0.0	M3	22.2	8.94216	7.275	101.0			
CV %		0.2								
ESTABILIDAD TIEMPO 48 HORAS REFRIGERACION										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
ANASTROZOL		7.199	REFERENCIAS							
LOTE 12100413		7.218	M1	14.8	8.94216	7.278	101.1	100.9	1.4	
PUREZA 100.7	8.9422	7.194	M2	14.8	8.94216	7.161	99.4			
PESO 14.8		7.185	M3	14.8	8.94216	7.359	102.2			
		7.199	MUESTRAS							
		7.218	M1	22.2	8.94216	7.568	105.1	103.3	2.0	
PROMEDIO		7.202	M2	22.2	8.94216	7.282	101.1			
DES. EST.		0.0	M3	22.2	8.94216	7.461	103.6			
CV %		0.2								

ESTABILIDAD TIEMPO 72 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
ANASTROZOL		7.170	REFERENCIAS							
LOTE 12100413		7.156	M1	14.8	8.94216	7.176	100.1	99.8	0.3	
PUREZA	100.7	7.183	M2	14.8	8.94216	7.149	99.7			
PESO	14.8	7.164	M3	14.8	8.94216	7.130	99.5			
		7.153	MUESTRAS							
		7.181	M1	22.2	8.94216	7.252	101.2	100.3	0.8	
	PROMEDIO	7.168	M2	22.2	8.94216	7.145	99.7			
	DES. EST.	0.0	M3	22.2	8.94216	7.172	100.1			
	CV %	0.2								

ESTABILIDAD TIEMPO 72 HORAS REFRIGERACIÓN										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
ANASTROZOL		7.170	REFERENCIAS							
LOTE 12100413		7.156	M1	14.8	8.94216	7.168	100.0	100.2	1.1	
PUREZA	100.7	7.183	M2	14.8	8.94216	7.109	99.2			
PESO	14.8	7.164	M3	14.8	8.94216	7.260	101.3			
		7.153	MUESTRAS							
		7.181	M1	22.2	8.94216	7.669	107.0	104.6	2.8	
	PROMEDIO	7.168	M2	22.2	8.94216	7.262	101.3			
	DES. EST.	0.0	M3	22.2	8.94216	7.564	105.5			
	CV %	0.2								

SOLUCIÓN DE REFERENCIA	T=0	TIEMPO	Temperatura Ambiente	l d l	Refrigeración	l d l
		100.6	24 Horas	101.1	0.5	101.8
		48 Horas	101.0	0.4	100.9	0.3
		72 Horas	99.8	0.8	100.2	0.4

SOLUCIÓN DE MUESTRA	T=0	TIEMPO	Temperatura Ambiente	l d l	Refrigeración	l d l
		100.8	24 Horas	101.5	0.7	105.4
		48 Horas	101.5	0.7	103.3	2.5
		72 Horas	100.3	0.5	104.6	3.8

Bicalutamida

Tabla 73. Resultados de Anastrozol para la prueba de Estabilidad de las Soluciones.

ESTABILIDAD TIEMPO INICIAL										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
BICALUTAMIDA		645.4	REFERENCIAS							
LOTE 12100375		645.1	M1	14.8	8.80008	645.4	100.0	100.6	0.5	
PUREZA	99.1	645.3	M2	14.8	8.80008	650.9	100.9			
PESO	14.8	645.4	M3	14.8	8.80008	651.2	100.9			
		645.2	MUESTRAS							
		645.3	M1	22.2	8.80008	644.5	99.9	100.4	0.5	
	PROMEDIO	645.283	M2	22.2	8.80008	651.2	100.9			
	DES. EST.	0.1	M3	22.2	8.80008	647.3	100.3			
	CV %	0.0								

ESTABILIDAD TIEMPO 24 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
BICALUTAMIDA		632.2	REFERENCIAS							
LOTE 12100375		632.9	M1	14.8	8.80008	648.4	102.4	103.2	0.7	
PUREZA	99.1	632.5	M2	14.8	8.80008	656.7	103.8			
PESO	14.8	633.1	M3	14.8	8.80008	653.9	103.3			
		633.2	MUESTRAS							
		633.7	M1	22.2	8.80008	643.2	101.6	101.8	0.2	
	PROMEDIO	632.933	M2	22.2	8.80008	645.6	102.0			
	DES. EST.	0.5	M3	22.2	8.80008	643.7	101.7			
	CV %	0.1								

ESTABILIDAD TIEMPO 24 HORAS REFRIGERACION										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
BICALUTAMIDA		632.2	REFERENCIAS							
LOTE 12100375		632.9	M1	14.8	8.80008	647.1	102.2	102.8	0.5	
PUREZA	99.1	632.5	M2	14.8	8.80008	652.3	103.1			
PESO	14.8	633.1	M3	14.8	8.80008	652.6	103.1			
		633.2	MUESTRAS							
		633.7	M1	22.2	8.80008	640.3	101.2	101.7	0.4	
	PROMEDIO	632.933	M2	22.2	8.80008	645.9	102.0			
	DES. EST.	0.5	M3	22.2	8.80008	644.2	101.8			
	CV %	0.1								

ESTABILIDAD TIEMPO 48 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)		ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA			654.2	REFERENCIAS						
LOTE 12100375			654.1	M1	14.8	8.80008	647.7	99.7	100.3	0.5
PUREZA 99.1	8.8595		654.0	M2	14.8	8.80008	654.2	100.7		
PESO 14.9			654.5	M3	14.8	8.80008	653.6	100.6		
			654.8	MUESTRAS						
			654.8	M1	22.2	8.80008	645.8	99.4	99.3	0.4
PROMEDIO			654.353	M2	22.2	8.80008	647.2	99.6		
DES. EST.			0.3	M3	22.2	8.80008	642.2	98.8		
CV %			0.0							

ESTABILIDAD TIEMPO 48 HORAS REFRIGERACIÓN										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)		ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA			654.2	REFERENCIAS						
LOTE 12100375			654.1	M1	14.8	8.80008	649.5	99.9	100.0	0.2
PUREZA 99.1	8.8595		654.0	M2	14.8	8.80008	652.0	100.3		
PESO 14.9			654.5	M3	14.8	8.80008	649.0	99.9		
			654.8	MUESTRAS						
			654.8	M1	22.2	8.80008	621.8	95.7	97.2	1.4
PROMEDIO			654.349	M2	22.2	8.80008	636.4	97.9		
DES. EST.			0.3	M3	22.2	8.80008	637.8	98.1		
CV %			0.0							

ESTABILIDAD TIEMPO 72 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)		ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA			655.9	REFERENCIAS						
LOTE 12100375			655.9	M1	14.8	8.80008	647.4	99.3	99.8	0.5
PUREZA 99.1	8.8595		655.9	M2	14.8	8.80008	652.6	100.1		
PESO 14.9			656.2	M3	14.8	8.80008	652.5	100.1		
			656.2	MUESTRAS						
			656.5	M1	22.2	8.80008	647.5	99.4	99.2	0.3
PROMEDIO			656.115	M2	22.2	8.80008	646.7	99.2		
DES. EST.			0.3	M3	22.2	8.80008	644.3	98.9		
CV %			0.0							

ESTABILIDAD TIEMPO 72 HORAS REFRIGERACIÓN										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)		ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA			655.9	REFERENCIAS						
LOTE 12100375			655.9	M1	14.8	8.80008	647.3	99.3	99.8	0.5
PUREZA 99.1	8.8595		655.9	M2	14.8	8.80008	653.3	100.2		
PESO 14.9			656.2	M3	14.8	8.80008	650.7	99.8		
			656.2	MUESTRAS						
			656.5	M1	22.2	8.80008	593.5	91.1	92.5	1.5
PROMEDIO			656.115	M2	22.2	8.80008	611.2	93.8		
DES. EST.			0.3	M3	22.2	8.80008	604.0	92.7		
CV %			0.0							

SOLUCIÓN DE REFERENCIA	T=0	TIEMPO	Temperatura Ambiente	l d l	Refrigeración	l d l
	100.6	24 Horas	103.2	2.6	102.8	2.2
		48 Horas	100.3	0.3	100.0	0.6
		72 Horas	99.8	0.8	99.8	0.8

SOLUCIÓN DE MUESTRA	T=0	TIEMPO	Temperatura Ambiente	l d l	Refrigeración	l d l
	100.4	24 Horas	101.8	1.4	101.7	1.3
		48 Horas	99.3	1.1	97.2	3.1
		72 Horas	99.2	1.2	92.5	7.8

Flutamida

Tabla 74. Resultados de Flutamida para la prueba de Estabilidad de las Soluciones.

ESTABILIDAD TIEMPO INICIAL									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		351.0	REFERENCIAS						
LOTE 12100313		350.5	M1	14.8	8.81074	351.0	100.1	99.7	1.3
PUREZA 99.22	8.8107	351.0	M2	14.8	8.81074	344.6	98.3		
PESO 14.8		350.8	M3	14.8	8.81074	353.2	100.8		
		350.0	MUESTRAS						
		350.3	M1	22.2	8.81074	334.1	95.3	96.0	1.0
PROMEDIO		350.569	M2	22.2	8.81074	340.4	97.1		
DES. EST.		0.4	M3	22.2	8.81074	335.6	95.7		
CV %		0.1							
ESTABILIDAD TIEMPO 24 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		345.1	REFERENCIAS						
LOTE 12100313		345.0	M1	14.8	8.81074	333.7	97.4	97.7	1.1
PUREZA 99.22	8.8703	345.0	M2	14.8	8.81074	331.7	96.8		
PESO 14.9		344.7	M3	14.8	8.81074	338.9	98.9		
		344.5	MUESTRAS						
		344.3	M1	22.2	8.81074	327.2	95.5	94.3	1.2
PROMEDIO		344.778	M2	22.2	8.81074	322.5	94.2		
DES. EST.		0.3	M3	22.2	8.81074	319.6	93.3		
CV %		0.1							
ESTABILIDAD TIEMPO 24 HORAS REFRIGERACION									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		345.1	REFERENCIAS						
LOTE 12100313		345.0	M1	14.8	8.81074	266.3	77.8	68.8	23.3
PUREZA 99.22	8.8703	345.0	M2	14.8	8.81074	268.7	78.4		
PESO 14.9		344.7	M3	14.8	8.81074	172.2	50.3		
		344.5	MUESTRAS						
		344.3	M1	22.2	8.81074	327.2	95.5	79.9	32.4
PROMEDIO		344.778	M2	22.2	8.81074	322.5	94.2		
DES. EST.		0.3	M3	22.2	8.81074	171.1	50.0		
CV %		0.1							
ESTABILIDAD TIEMPO 48 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		331.3	REFERENCIAS						
LOTE 12100313		331.6	M1	14.8	8.81074	286.4	86.5	89.4	4.4
PUREZA 99.22	8.8107	329.4	M2	14.8	8.81074	310.6	93.8		
PESO 14.8		331.8	M3	14.8	8.81074	290.6	87.8		
		331.6	MUESTRAS						
		330.7	M1	22.2	8.81074	209.0	63.1	60.7	26.8
PROMEDIO		331.082	M2	22.2	8.81074	250.2	75.6		
DES. EST.		0.9	M3	22.2	8.81074	143.3	43.3		
CV %		0.3							
ESTABILIDAD TIEMPO 48 HORAS REFRIGERACION									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		331.3	REFERENCIAS						
LOTE 12100313		331.6	M1	14.8	8.81074	295.3	89.2	84.9	8.6
PUREZA 99.22	8.8107	329.4	M2	14.8	8.81074	294.7	89.0		
PESO 14.8		331.8	M3	14.8	8.81074	253.0	76.4		
		331.6	MUESTRAS						
		330.7	M1	22.2	8.81074	257.4	77.8	68.7	41.3
PROMEDIO		331.082	M2	22.2	8.81074	303.0	91.5		
DES. EST.		0.9	M3	22.2	8.81074	122.3	36.9		
CV %		0.3							
ESTABILIDAD TIEMPO 72 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		344.6	REFERENCIAS						
LOTE 12100313		344.4	M1	14.8	8.81074	294.4	85.5	85.2	0.3
PUREZA 99.22	8.8107	343.8	M2	14.8	8.81074	293.2	85.2		
PESO 14.8		344.3	M3	14.8	8.81074	292.4	85.0		
		344.0	MUESTRAS						
		343.8	M1	22.2	8.81074	205.9	59.8	49.7	67.9
PROMEDIO		344.151	M2	22.2	8.81074	266.0	77.3		
DES. EST.		0.3	M3	22.2	8.81074	41.6	12.1		
CV %		0.1							

ESTABILIDAD TIEMPO 72 HORAS REFRIGERACIÓN										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
FLUTAMIDA		344.6	REFERENCIAS							
LOTE 12100313		344.4	M1	14.8	8.81074	315.2	91.6	85.2	12.0	
PUREZA	99.22	343.8	M2	14.8	8.81074	311.6	90.5			
PESO	14.8	344.3	M3	14.8	8.81074	252.6	73.4			
		344.0	MUESTRAS							
		343.8	M1	22.2	8.81074	308.2	89.5	70.0	44.7	
PROMEDIO		344.151	M2	22.2	8.81074	298.0	86.6			
DES. EST.		0.3	M3	22.2	8.81074	116.6	33.9			
CV %		0.1								

SOLUCIÓN DE REFERENCIA	T=0	TIEMPO	Temperatura Ambiente	l d l	Refrigeración	l d l
		24 Horas	97.7	2.0	68.8	30.9
	99.7	48 Horas	89.4	10.4	84.9	14.9
		72 Horas	85.2	14.5	85.2	14.6

SOLUCIÓN DE MUESTRA	T=0	TIEMPO	Temperatura Ambiente	l d l	Refrigeración	l d l
		24 Horas	94.3	1.7	79.9	16.1
	96.0	48 Horas	60.7	35.4	68.7	27.3
		72 Horas	49.7	46.3	70.0	26.0

Tamoxifeno

Tabla 75. Resultados de Tamoxifeno para la prueba de Estabilidad de las Soluciones.

ESTABILIDAD TIEMPO INICIAL										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
CITRATO TAMOXIFENO		77.2	REFERENCIAS							
LOTE 12100315		76.8	M1	22.1	8.61986	77.2	100.5	100.0	0.4	
PUREZA	100.01	77.1	M2	22.1	8.61986	76.6	99.7			
PESO	22.1	76.9	M3	22.1	8.61986	76.7	99.8			
FACTOR	0.65	76.4	MUESTRAS							
		76.5	M1	33.5	8.71087	75.9	97.8	97.5	1.0	
PROMEDIO		76.820	M2	33.5	8.71087	76.3	98.3			
DES. EST.		0.3	M3	33.5	8.71087	74.9	96.4			
CV %		0.4								
ESTABILIDAD TIEMPO 24 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
CITRATO TAMOXIFENO		76.2	REFERENCIAS							
LOTE 12100315		76.2	M1	22.1	8.61986	76.9	101.1	101.2	0.5	
PUREZA	100.01	76.1	M2	22.1	8.61986	77.4	101.8			
PESO	22.1	76.0	M3	22.1	8.61986	76.7	100.8			
FACTOR	0.65	76.0	MUESTRAS							
		75.9	M1	33.5	8.71087	76.1	99.0	99.3	0.3	
PROMEDIO		76.066	M2	33.5	8.71087	76.5	99.5			
DES. EST.		0.1	M3	33.5	8.71087	76.3	99.3			
CV %		0.1								
ESTABILIDAD TIEMPO 24 HORAS REFRIGERACION										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
CITRATO TAMOXIFENO		76.2	REFERENCIAS							
LOTE 12100315		76.2	M1	22.1	8.61986	77.1	101.4	101.5	0.2	
PUREZA	100.01	76.1	M2	22.1	8.61986	77.4	101.7			
PESO	22.1	76.0	M3	22.1	8.61986	77.1	101.3			
FACTOR	0.65	76.0	MUESTRAS							
		75.9	M1	33.5	8.71087	76.5	99.5	99.8	0.3	
PROMEDIO		76.066	M2	33.5	8.71087	77.0	100.1			
DES. EST.		0.1	M3	33.5	8.71087	76.6	99.7			
CV %		0.1								

ESTABILIDAD TIEMPO 48 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
CITRATO TAMOXIFENO		75.8	REFERENCIAS							
LOTE 12100315		75.8	M1	22.1	8.61986	75.6	99.7	99.9	0.3	
PUREZA 100.01	8.6199	75.7	M2	22.1	8.61986	75.5	99.7			
PESO 22.1		75.9	M3	22.1	8.61986	75.9	100.2			
FACTOR 0.65		75.8	MUESTRAS							
		75.8	M1	33.5	8.71087	75.0	97.9	97.7	0.4	
	PROMEDIO	75.788	M2	33.5	8.71087	75.1	98.0			
	DES. EST.	0.1	M3	33.5	8.71087	74.5	97.3			
	CV %	0.1								

ESTABILIDAD TIEMPO 48 HORAS REFRIGERACIÓN										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
CITRATO TAMOXIFENO		75.8	REFERENCIAS							
LOTE 12100315		75.8	M1	22.1	8.61986	76.3	100.6	100.2	0.4	
PUREZA 100.01	8.6199	75.7	M2	22.1	8.61986	75.7	99.9			
PESO 22.1		75.9	M3	22.1	8.61986	75.9	100.1			
FACTOR 0.65		75.8	MUESTRAS							
		75.8	M1	33.5	8.71087	74.9	97.8	98.2	0.5	
	PROMEDIO	75.788	M2	33.5	8.71087	75.2	98.1			
	DES. EST.	0.1	M3	33.5	8.71087	75.6	98.7			
	CV %	0.1								

ESTABILIDAD TIEMPO 72 HORAS TEMPERATURA AMBIENTE										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
CITRATO TAMOXIFENO		76.2	REFERENCIAS							
LOTE 12100315		76.1	M1	22.1	8.61986	72.5	95.3	95.6	0.3	
PUREZA 100.01	8.6199	76.1	M2	22.1	8.61986	72.7	95.7			
PESO 22.1		76.0	M3	22.1	8.61986	72.8	95.8			
FACTOR 0.65		75.9	MUESTRAS							
		75.9	M1	33.5	8.71087	72.7	94.7	95.2	1.3	
	PROMEDIO	76.015	M2	33.5	8.71087	72.5	94.3			
	DES. EST.	0.1	M3	33.5	8.71087	74.2	96.6			
	CV %	0.1								

ESTABILIDAD TIEMPO 72 HORAS REFRIGERACIÓN										
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV	
CITRATO TAMOXIFENO		76.2	REFERENCIAS							
LOTE 12100315		76.1	M1	22.1	8.61986	73.8	97.0	96.8	0.3	
PUREZA 100.01	8.6199	76.1	M2	22.1	8.61986	73.3	96.5			
PESO 22.1		76.0	M3	22.1	8.61986	73.6	96.8			
FACTOR 0.65		75.9	MUESTRAS							
		75.9	M1	33.5	8.71087	72.4	94.2	94.9	1.2	
	PROMEDIO	76.015	M2	33.5	8.71087	72.4	94.3			
	DES. EST.	0.1	M3	33.5	8.71087	73.9	96.2			
	CV %	0.1								

SOLUCIÓN DE REFERENCIA	T=0	TIEMPO	Temperatura Ambiente	l d l	Refrigeración	l d l
	100.0	24 Horas	101.2	1.2	101.5	1.5
		48 Horas	99.9	0.1	100.2	0.2
		72 Horas	95.6	4.4	96.8	3.2

SOLUCIÓN DE MUESTRA	T=0	TIEMPO	Temperatura Ambiente	l d l	Refrigeración	l d l
	97.5	24 Horas	99.3	1.8	99.8	2.3
		48 Horas	97.7	0.2	98.2	0.7
		72 Horas	95.2	2.3	94.9	2.6

7.3.10 Robustez

Se realizaron ensayos con pequeños cambios deliberados y se determinaron los efectos producidos por estos, los cambios realizados fueron pH en el componente acuoso y la composición de la fase móvil, obteniendo los siguientes resultados:

Anastrozol

Tabla 76. Resultados de Anastrozol para la prueba de Robustez.

ROBUSTEZ CONDICIONES NORMALES									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
ANASTROZOL		7.170	MUESTRAS						
LOTE 12100375		7.165	M1	22.2	8.94216	7.236	100.9	100.6	0.3
PUREZA 100.7	8.9422	7.189	M2	22.2	8.94216	7.216	100.6		
PESO 14.8		7.150	M3	22.2	8.94216	7.190	100.3		
		7.151							
		7.205							
	PROMEDIO	7.172							
	DES. EST.	0.0							
	CV %	0.3							
pH = 3.5									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
ANASTROZOL		7.216	MUESTRAS						
LOTE 12100413		7.167	M1	22.2	8.94216	7.042	98.1	98.6	0.6
PUREZA 100.7	8.9422	7.180	M2	22.2	8.94216	7.122	99.2		
PESO 14.8		7.121	M3	22.2	8.94216	7.065	98.4		
		7.191							
		7.193							
	PROMEDIO	7.178							
	DES. EST.	0.0							
	CV %	0.4							
pH = 4.5									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
ANASTROZOL		7.216	MUESTRAS						
LOTE 12100413		7.167	M1	22.2	8.94216	7.209	100.4	99.4	0.9
PUREZA 100.7	8.9422	7.180	M2	22.2	8.94216	7.099	98.9		
PESO 14.8		7.121	M3	22.2	8.94216	7.098	98.9		
		7.191							
		7.193							
	PROMEDIO	7.178							
	DES. EST.	0.0							
	CV %	0.4							
COMPOSICIÓN DE FASE MOVIL 60:40									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
ANASTROZOL		7.280	MUESTRAS						
LOTE 12100413		7.310	M1	22.2	8.94216	7.169	98.5	98.8	0.4
PUREZA 100.7	8.9422	7.275	M2	22.2	8.94216	7.231	99.3		
PESO 14.8		7.276	M3	22.2	8.94216	7.181	98.6		
		7.307							
		7.242							
	PROMEDIO	7.282							
	DES. EST.	0.0							
	CV %	0.3							
COMPOSICIÓN DE FASE MOVIL 50:50									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
ANASTROZOL		7.090	MUESTRAS						
LOTE 12100413		7.076	M1	22.2	8.94216	7.167	101.1	101.0	0.2
PUREZA 100.7	8.9422	7.071	M2	22.2	8.94216	7.170	101.2		
PESO 14.8		7.093	M3	22.2	8.94216	7.146	100.8		
		7.095							
		7.098							
	PROMEDIO	7.087							
	DES. EST.	0.0							
	CV %	0.2							

Tabla 77. Resumen de resultados de Anastrozol para la prueba de Robustez.

Condiciones Normales	Variable	V%	l d l
100.6	pH=3.5	98.6	2.0
	pH=4.5	99.4	1.2
	60:40	98.8	1.8
	50:50	101.0	0.4

Bicalutamida

Tabla 78. Resultados de Bicalutamida para la prueba de Robustez.

ROBUSTEZ CONDICIONES NORMALES									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA		645.4	MUESTRAS						
LOTE 12100375		645.2	M1	22.1	8.76044	644.5	100.3	100.8	0.5
PUREZA 99.1	8.8001	645.4	M2	22.1	8.76044	651.2	101.4		
PESO 14.8		645.4	M3	22.1	8.76044	647.4	100.8		
		645.2							
		645.3							
		PROMEDIO							
		DES. EST.							
		CV %							
		645.320							
		0.1							
		0.0							
pH = 3.5									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA		638.4	MUESTRAS						
LOTE 12100375		638.2	M1	22.1	8.76044	645.5	101.7	102.6	0.8
PUREZA 99.1	8.8001	638.7	M2	22.1	8.76044	655.6	103.3		
PESO 14.8		635.6	M3	22.1	8.76044	651.8	102.7		
		637.9							
		638.3							
		PROMEDIO							
		DES. EST.							
		CV %							
		637.861							
		1.1							
		0.2							
pH = 4.5									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA		644.1	MUESTRAS						
LOTE 12100375		664.8	M1	22.1	8.76044	652.3	99.1	99.7	0.8
PUREZA 99.1	8.8001	664.5	M2	22.1	8.76044	662.5	100.6		
PESO 14.8		664.8	M3	22.1	8.76044	653.4	99.3		
		664.6							
		664.8							
		PROMEDIO							
		DES. EST.							
		CV %							
		661.246							
		8.4							
		1.3							
COMPOSICIÓN DE FASE MOVIL 60:40									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA		647.9	MUESTRAS						
LOTE 12100375		647.8	M1	22.1	8.76044	643.7	99.8	100.3	0.5
PUREZA 99.1	8.8001	647.8	M2	22.1	8.76044	650.7	100.9		
PESO 14.8		647.9	M3	22.1	8.76044	647.0	100.3		
		647.8							
		646.6							
		PROMEDIO							
		DES. EST.							
		CV %							
		647.653							
		0.5							
		0.1							
COMPOSICIÓN DE FASE MOVIL 50:50									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
BICALUTAMIDA		652.9	MUESTRAS						
LOTE 12100375		653.2	M1	22.1	8.76044	650.8	100.1	100.6	0.5
PUREZA 99.1	8.8001	652.9	M2	22.1	8.76044	657.5	101.1		
PESO 14.8		652.8	M3	22.1	8.76044	654.1	100.6		
		653.1							
		653.6							
		PROMEDIO							
		DES. EST.							
		CV %							
		653.084							
		0.3							
		0.0							

Tabla 79. Resumen de resultados de Bicalutamida para la prueba de Robustez.

Condiciones Normales	Variable	V%	l d l
100.8	pH=3.5	102.6	1.7
	pH=4.5	99.7	1.2
	60:40	100.3	0.5
	50:50	100.6	0.2

Flutamida

Tabla 80. Resultados de Flutamida para la prueba de Robustez.

ROBUSTEZ CONDICIONES NORMALES									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		351.0	MUESTRAS						
LOTE 12100313		350.5	M1	22.1	8.77105	334.1	95.7	96.5	1.0
PUREZA 99.22	8.8107	351.0	M2	22.1	8.77105	340.4	97.5		
PESO 14.8		350.8	M3	22.1	8.77105	335.6	96.2		
		350.0							
		350.3							
	PROMEDIO	350.569							
	DES. EST.	0.4							
	CV %	0.1							

COMPOSICIÓN DE FASE MOVIL 60:40									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		353.2	MUESTRAS						
LOTE 12100313		352.7	M1	22.1	8.77105	337.7	96.5	97.6	1.2
PUREZA 99.22	8.8107	350.4	M2	22.1	8.77105	345.8	98.8		
PESO 14.8		351.1	M3	22.1	8.77105	340.8	97.4		
		351.9							
		350.3							
	PROMEDIO	351.607							
	DES. EST.	1.2							
	CV %	0.3							

COMPOSICIÓN DE FASE MOVIL 50:50									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
FLUTAMIDA		354.0	MUESTRAS						
LOTE 12100313		354.0	M1	22.1	8.77105	337.8	95.8	96.7	1.0
PUREZA 99.22	8.8107	354.6	M2	22.1	8.77105	344.4	97.7		
PESO 14.8		354.1	M3	22.1	8.77105	340.2	96.5		
		353.5							
		354.3							
	PROMEDIO	354.093							
	DES. EST.	0.3							
	CV %	0.1							

Tabla 81. Resumen de resultados de Flutamida para la prueba de Robustez.

Condiciones Normales	Variable	V%	IdI
96.5	pH=3.5	La resolución entre Flutamida y Tamoxifeno es menor a 2.0	
	pH=4.5	La resolución entre Flutamida y Tamoxifeno es menor a 2.0	
	60:40	97.6	1.1
	50:50	96.7	0.2

El cambio de pH en el componente afecta la resolución entre Flutamida y Tamoxifeno lo cual afecta directamente en la cuantificación, como se puede mostrar en las figuras 37 y 38.

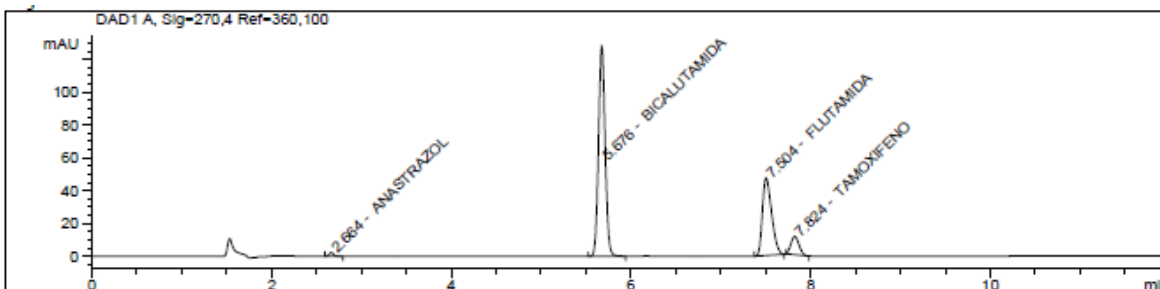


Figura 37. Cromatograma Solución de Referencia a pH 3.5.

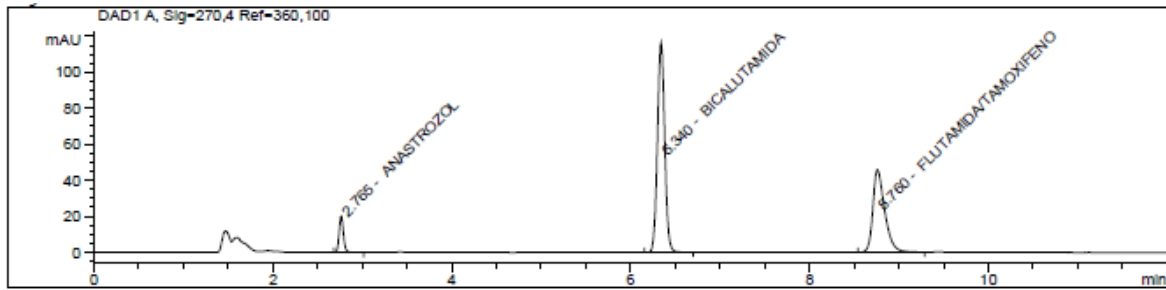


Figura 38. Cromatograma Solución de Referencia a pH 4.5.

Tamoxifeno

Tabla 82. Resultados de Tamoxifeno para la prueba de Robustez.

ROBUSTEZ CONDICIONES NORMALES									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
CITRATO TAMOXIFENO		77.2	MUESTRAS						
LOTE 12100315		76.8	M1	33.6	8.73687	75.9	98.8	98.5	1.0
PUREZA 100.01	8.7369	77.1	M2	33.6	8.73687	76.3	99.3		
PESO 22.4		76.9	M3	33.6	8.73687	74.9	97.4		
FACTOR 0.65		76.4							
		76.5							
	PROMEDIO	76.820							
	DES. EST.	0.3							
	CV %	0.4							

COMPOSICIÓN DE FASE MOVIL 60:40									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
CITRATO TAMOXIFENO		80.3	MUESTRAS						
LOTE 12100315		80.3	M1	33.6	8.73687	79.9	99.8	100.2	0.7
PUREZA 100.01	8.7369	80.0	M2	33.6	8.73687	80.9	101.0		
PESO 22.4		80.0	M3	33.6	8.73687	79.8	99.7		
FACTOR 0.65		80.3							
		79.6							
	PROMEDIO	80.085							
	DES. EST.	0.3							
	CV %	0.3							

COMPOSICIÓN DE FASE MOVIL 50:50									
REFERENCIA	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACION (µg/mL)	ABC	V %	PROMEDIO	CV
CITRATO TAMOXIFENO		78.8	MUESTRAS						
LOTE 12100315		79.0	M1	33.6	8.73687	78.7	99.8	99.9	0.4
PUREZA 100.01	8.7369	78.9	M2	33.6	8.73687	79.1	100.3		
PESO 22.4		78.9	M3	33.6	8.73687	78.5	99.5		
FACTOR 0.65		78.8							
		78.8							
	PROMEDIO	78.842							
	DES. EST.	0.1							
	CV %	0.1							

Tabla 83. Resumen de resultados de Tamoxifeno para la prueba de Robustez.

Condiciones Normales	Variable	V%	IdI
98.5	pH=3.5	La resolución entre Flutamida y Tamoxifeno es menor a 2.0	
	pH=4.5	La resolución entre Flutamida y Tamoxifeno es menor a 2.0	
	60:40	100.2	1.7
	50:50	99.9	1.4

8 CONCLUSIONES

8.1 Separación Cromatográfica

Para la determinación de orden de elusión en el sistema cromatográfico propuesto, se realizaron los diagramas de distribución de especies químicas a diferente pH.

Con ayuda del Software ACD/pKa DB Versión 3.50 se obtuvieron los pKa de los analitos obteniendo los siguientes resultados:

Anastrozol

pKa = 4.78

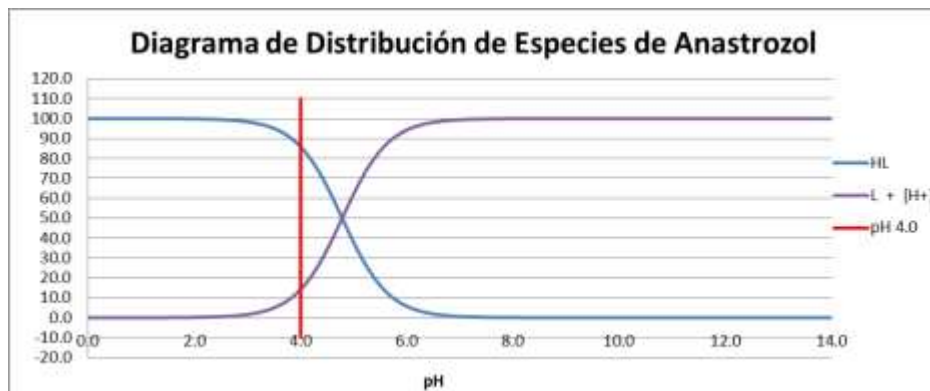
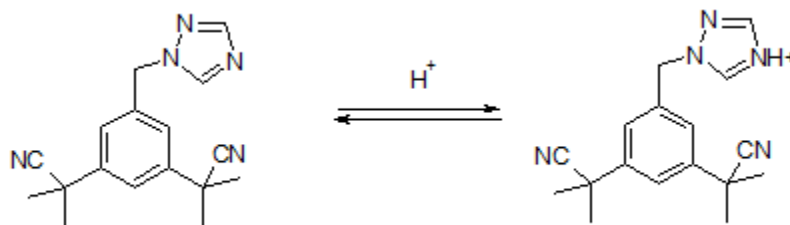


Figura 39. Gráfica de Distribución de Especies de Anastrozol.

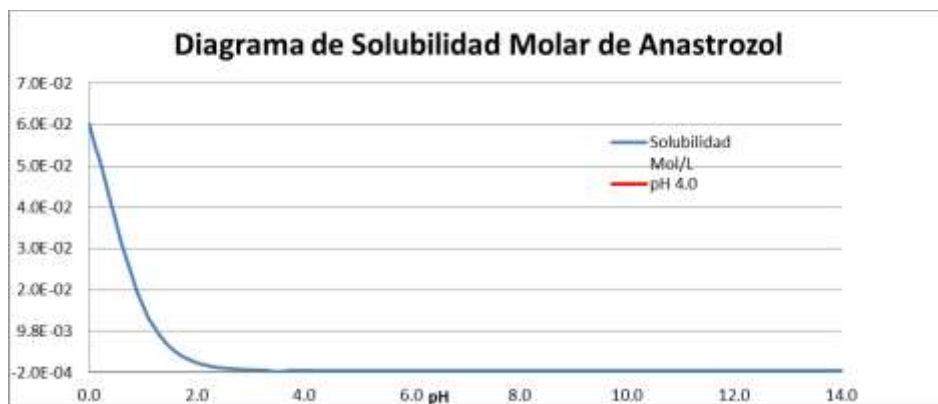


Figura 40. Gráfica de solubilidad molar de Anastrozol.

Como se muestra en el diagrama de distribución de especies (Figura 39), a pH 4.0 la molécula de Anastrozol se encuentra ionizada a aproximadamente al 85 %.

Bicalutamida

pKa = 11.53

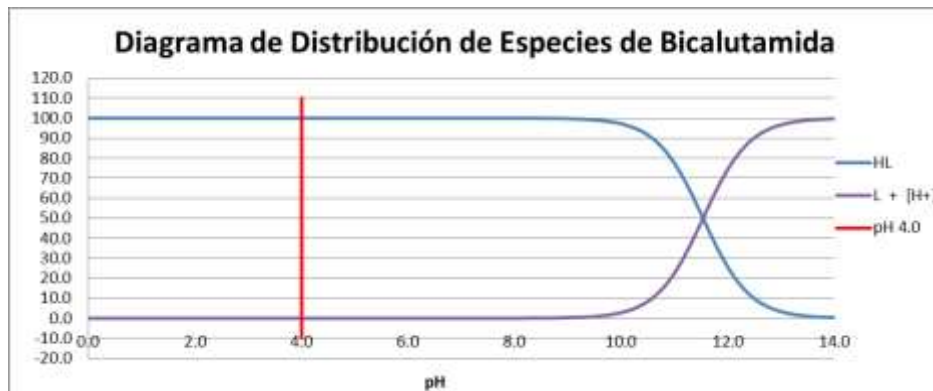
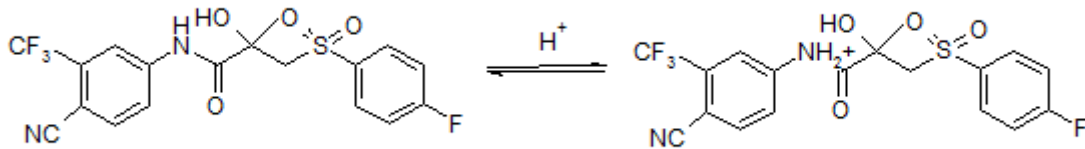


Figura 41. Gráfica de Distribución de Especies de Bicalutamida.

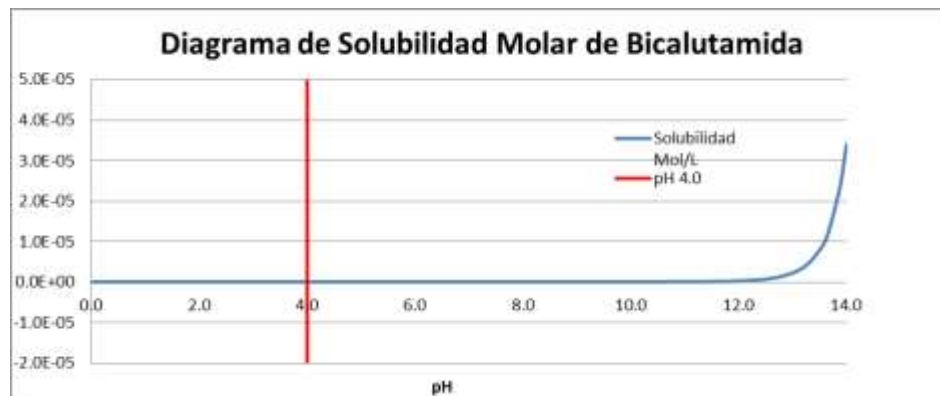


Figura 42. Gráfica de Solubilidad molar de Bicalutamida.

Como se muestra en el diagrama de distribución de especies (Figura 41), a pH 4.0 la molécula de Bicalutamida se encuentra ionizada a aproximadamente al 100 %.

Flutamida

pKa = 13.91

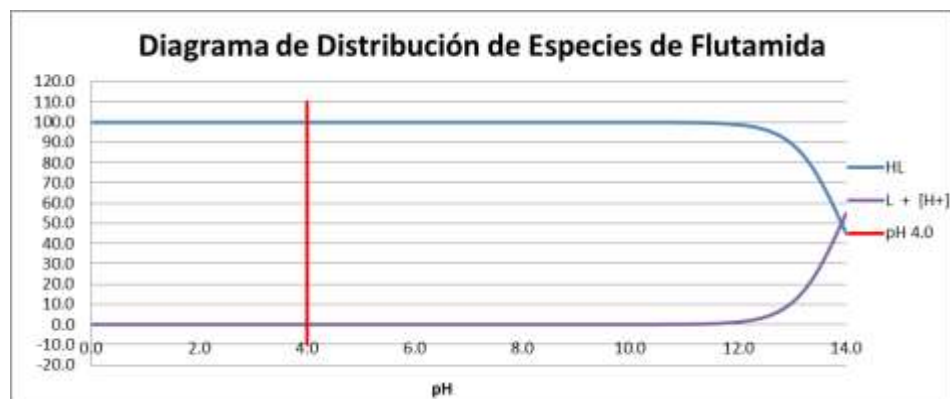
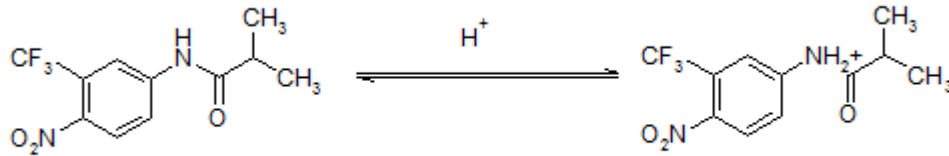


Figura 43. Gráfica de Distribución de Especies de Flutamida.

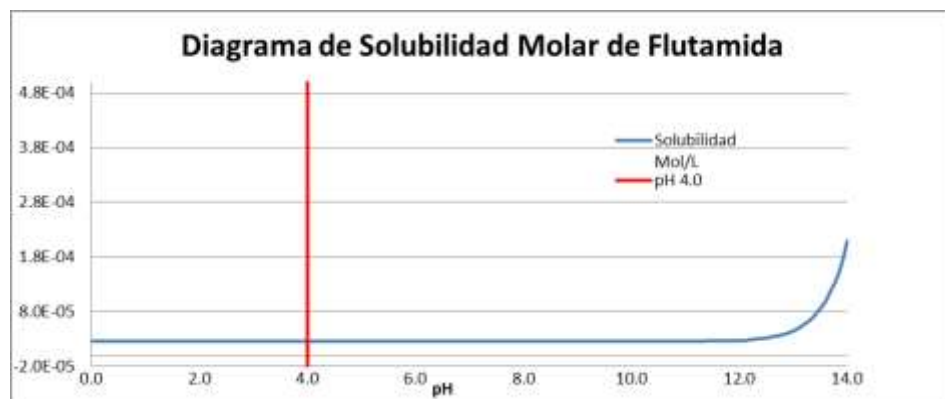


Figura 44. Gráfica de Solubilidad molar de Flutamida.

Como se muestra en el diagrama de distribución de especies (Figura 43), a pH 4.0 la molécula de Flutamida se encuentra ionizada a aproximadamente al 100 %.

Tamoxifeno

pKa = 8.69

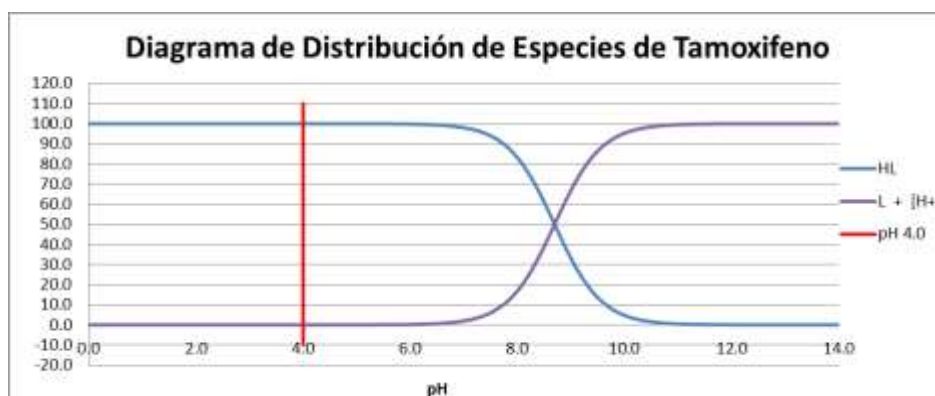
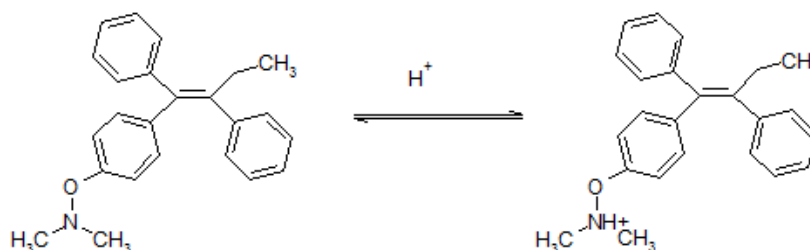


Figura 45. Gráfica de Distribución de Especies de Tamoxifeno.

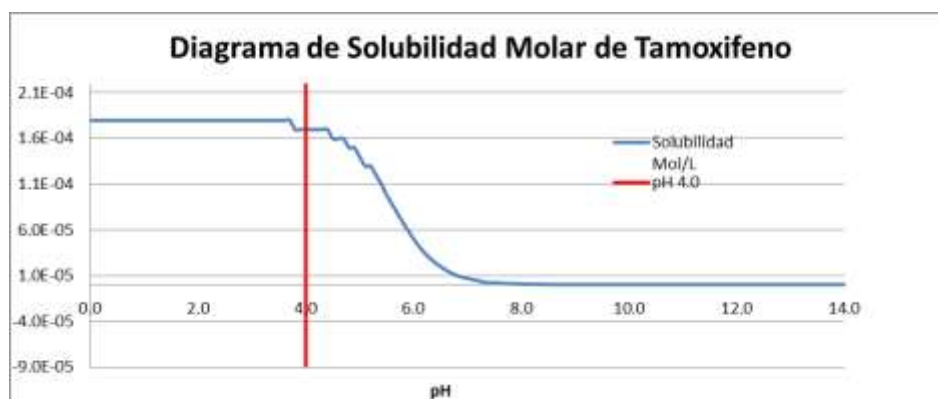


Figura 46. Gráfica de Solubilidad molar de Tamoxifeno.

A pH básico (mayor a 9) las moléculas de los principios activos analizados se encuentran en estado molecular lo que aumentaría la selectividad y retención en la separación, lo cual se podría utilizar en el sistema cromatográfico sin embargo, para la utilización de este pH se requeriría la utilización de columnas cromatográficas diseñadas para soportar este pH extremo como son columnas de con soporte de Zirconio o Titanio.

Por otra parte, el uso de un pH ácido de 4.0 como el que se propuso en el desarrollo analítico en todos los análisis las moléculas se encuentran en forma ionizada, que para este caso ayudo para la separación del Anastrozol del volumen muerto y una resolución suficiente entre los picos de los análisis y este pH puede ser utilizado en columnas cromatográficas comunes.

Al tratarse de una metodología para la determinación de trazas de Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno, el alcance de la metodología no incluye la determinación de posibles compuestos de degradación; sin embargo, al observar su estructura química se puede concluir que de existir estas eluirían en el frente en el volumen muerto. A continuación se presentan las posibles degradaciones de los activos:

Anastrozol

De acuerdo a las investigaciones realizadas por Reddy et al ⁽¹³⁾ y Mendes et a. ⁽²⁹⁾ las siguientes estructuras serían posibles degradaciones de Anastrozol (Figura 47).

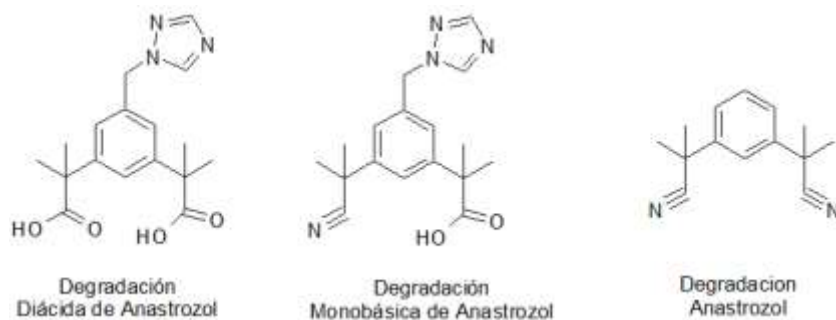


Figura 47. Estructuras de las posibles degradaciones de Anastrozol.

Bicalutamida

Las investigaciones de Nanduri ⁽¹⁸⁾ y Nageswara ⁽³⁰⁾ indican y caracterizan algunas de los posibles productos de degradación de la Bicalutamida y los cuales se muestran a continuación (Figura 48):

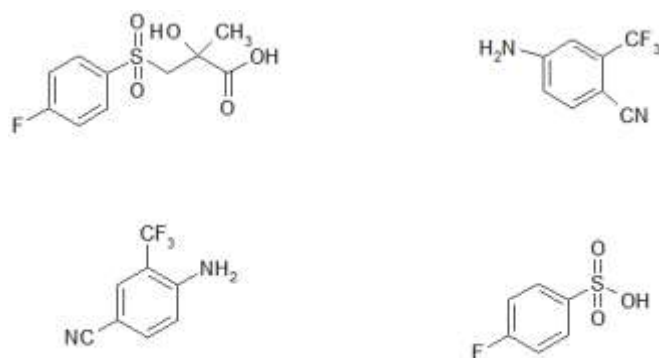


Figura 48. Estructuras de las posibles degradaciones de Bicalutamida.

Flutamida

El-Shaheny y Yamada ⁽³¹⁾ en su investigación identifican los siguientes productos de degradación (Figura 49):

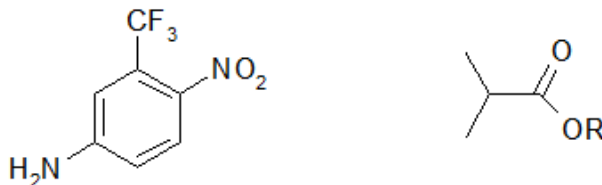


Figura 49. Estructuras de las posibles degradaciones de Flutamida.

8.2 Utilización de software

El uso del Software “**ACD/LC & GC Simulator**” puede ayudar a la optimización de los recursos materiales, reactivos, equipos y tiempo para el desarrollo de metodologías analíticas por técnica de HPLC, ya que con realizar tres ensayos modificando una variable y los datos obtenidos son alimentados en el software, es capaz de predecir las mejores las mejores condiciones cromatográficas para obtener una óptima separación cromatográfica.



Figura 50. Modelo matemático utilizado para la simulación de la separación cromatográfica con el pH como variable.

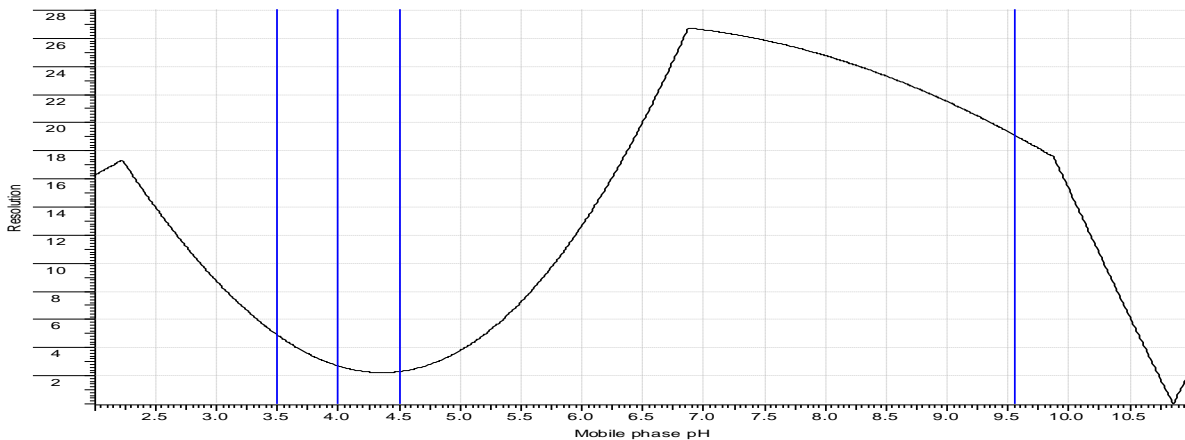


Figura 51. Grafica de resolución con respecto al pH de acuerdo a la simulación realizada por el Software ACD/LC Simulator.

Realizado la simulación con software “**ACD/LC Simulator**” y cargando los datos obtenidos durante el desarrollo analítico variando el pH, nos arroja como resultado que el mejor pH para realizar la separación cromatográfica es pH 6.88, así mismo nos entrega la simulación del cromatograma a ese pH el cual se muestra a continuación (Figura 52 y Tabla 84):

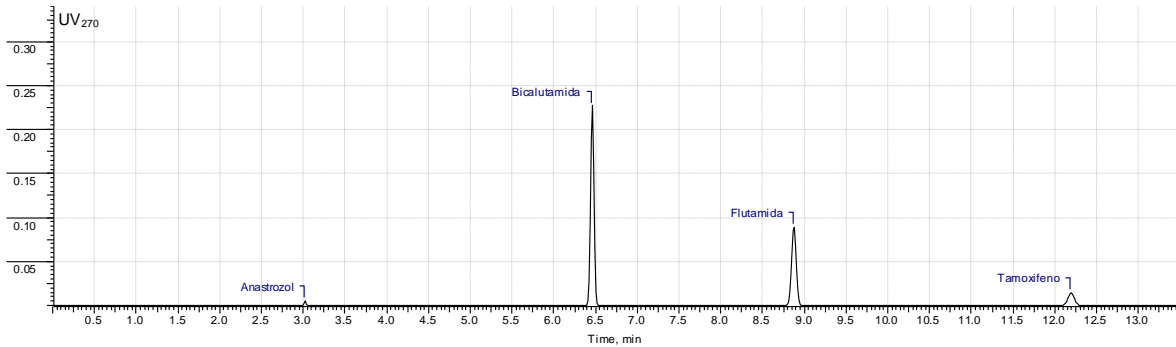


Figura 52. Simulación del Cromatograma a pH 6.88 de acuerdo al Software ACD/LC Simulator.

Tabla 84. Resultados de simulación del cromatograma a pH 6.88 de acuerdo al Software ACD/LC Simulator.

No.	Peak Name	tR	Area	Width	As	Peak Model
1	Anastrozol	3.02	7.18	0.04	1	a = -1.4535, b = 2.2319e-1, c = -1.2020e-2
2	Bicalutamida	6.46	648.13	0.08	1	a = -6.6841e-1, b = 5.8611e-1, c = -5.2110e-2
3	Flutamida	8.87	350.33	0.1	1	a = -4.6726e-1, b = 6.5214e-1, c = -5.7030e-2
4	Tamoxifeno	12.18	79	0.14	1	a = 6.4816e-1, b = 1.5733e-1, c = -4.7058e-4

Utilizando el modelo matemático que el software maneja en la simulación para la determinación del Factor de Capacidad (k') (Figura 50), se realizaron las gráficas de cada uno de los analitos teniendo como variable el pH del componente acuoso. Las gráficas se muestran en las Figuras 53, 54, 55, 56, 57 y 58.

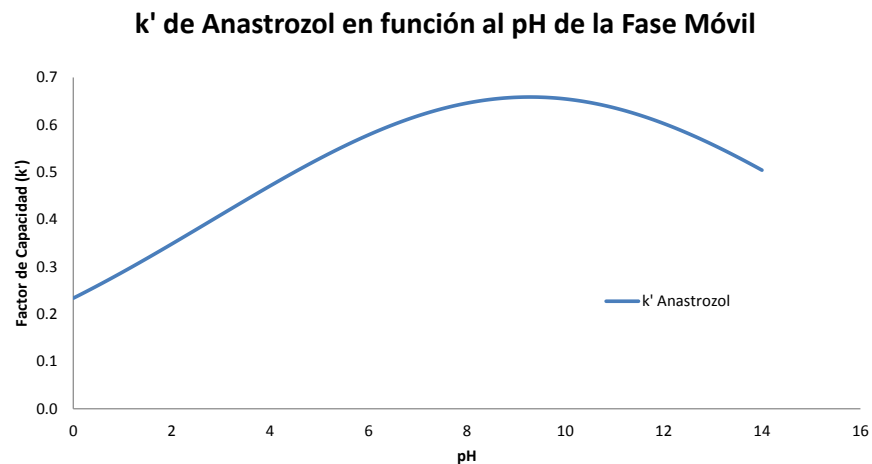


Figura 53. Gráfica de k' de Anastrozol en función al pH del Componente Acuoso de la Fase Móvil.

k' de Bicalutamida en función al pH de la Fase Móvil

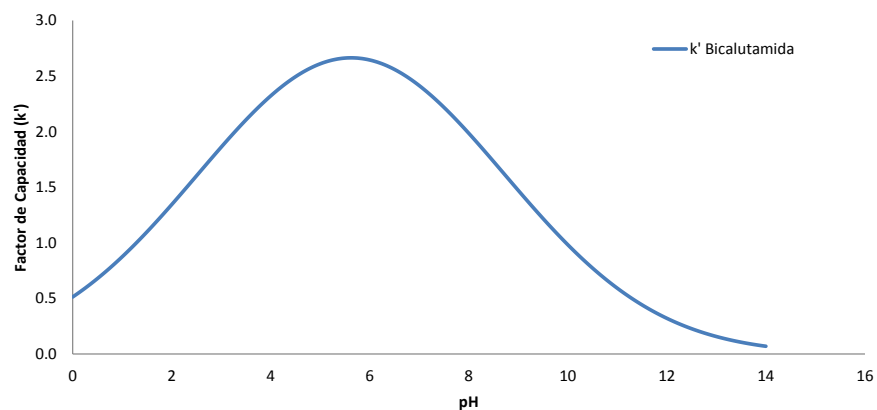


Figura 54. Gráfica de k' de Bicalutamida en función al pH del Componente Acuoso de la Fase Móvil.

k' de Flutamida en función al pH de la Fase Móvil

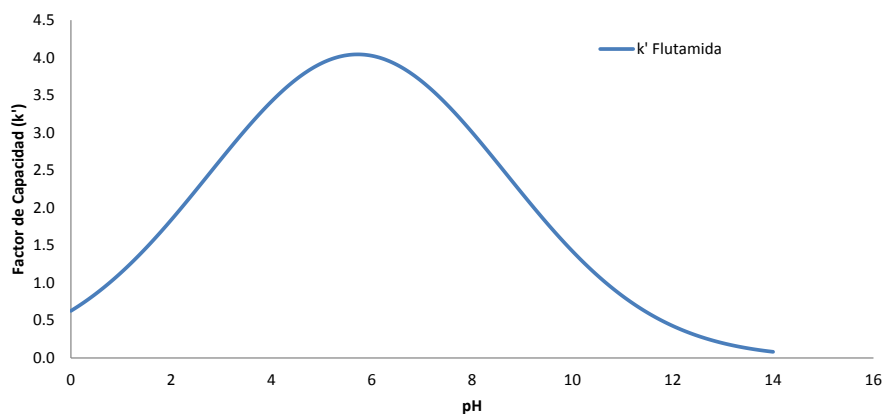


Figura 55. Gráfica de k' de Flutamida en función al pH del Componente Acuoso de la Fase Móvil.

k' de Tamoxifeno en función al pH de la Fase Móvil

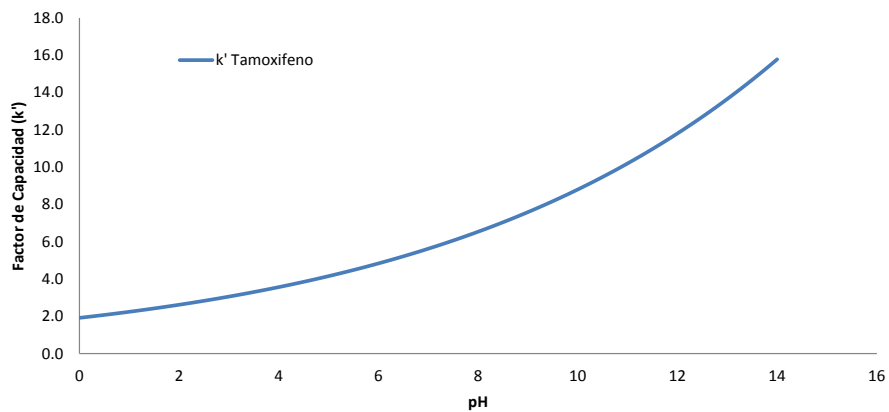


Figura 56. Gráfica de k' de Tamoxifeno en función al pH del Componente Acuoso de la Fase Móvil.

k' en función al pH de la Fase Móvil

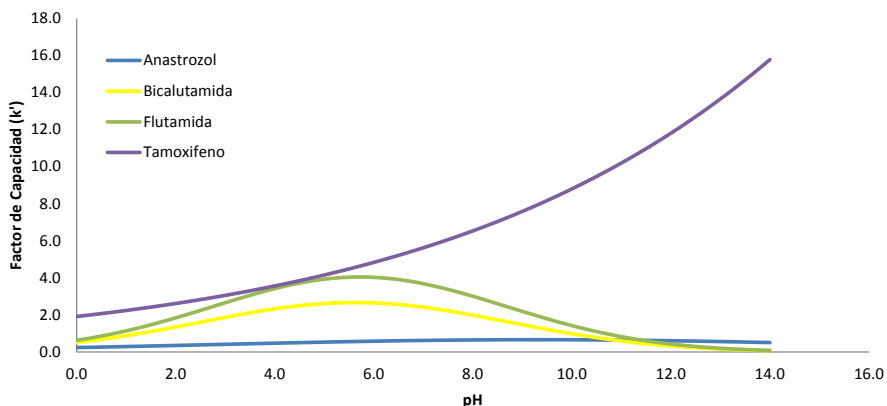


Figura 57. Gráfica de k' de los 4 activos en función al pH del Componente Acuoso de la Fase Móvil.

k' en función al pH de la Fase Móvil (Zoom)

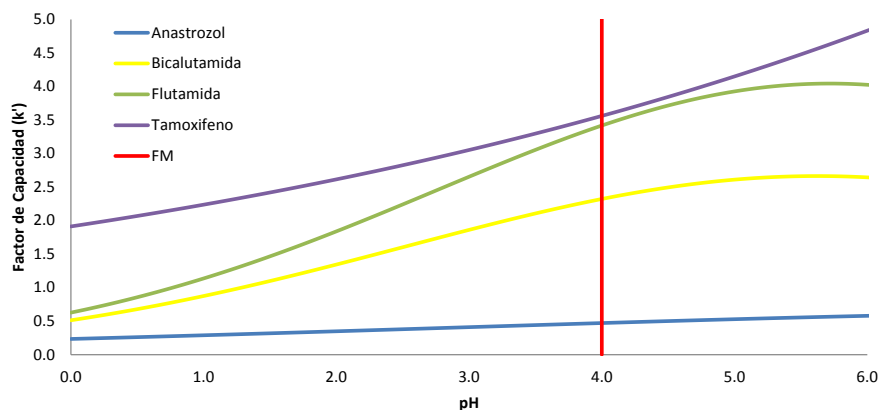


Figura 58. Gráfica de k' de los 4 activos en función al pH del Componente Acuoso de la Fase Móvil (Zoom).

Realizado el mismo ejercicio de simulación con software, pero en ésta ocasión variando la proporción de componente orgánico de la fase móvil se obtuvieron los siguientes resultados:

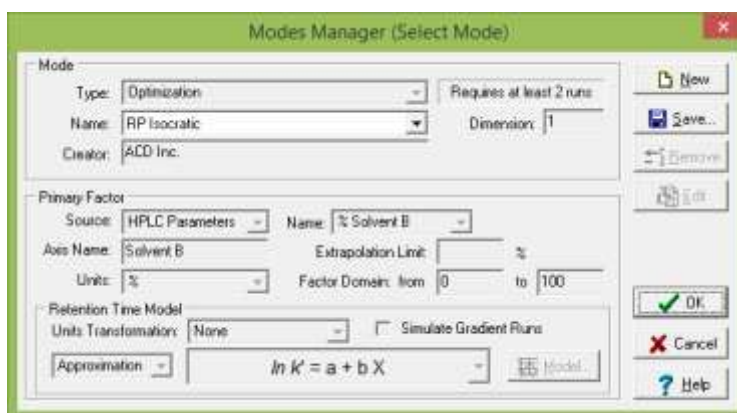


Figura 59. Modelo matemático utilizado para la simulación de la separación cromatográfica con la composición de fase móvil como variable.

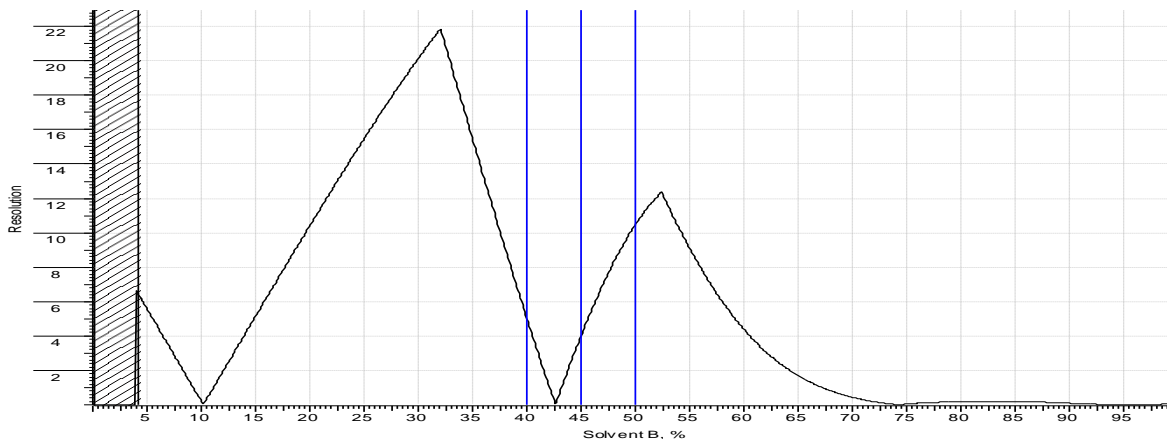


Figura 60. Grafica de resolución con respecto a la composición de componente orgánico de acuerdo a la simulación realizada por el Software ACD/LC Simulator.

De acuerdo a la gráfica de resolución con respecto a la proporción de componente orgánico existen 2 proporciones que ayudan enormemente en la resolución entre picos. La primera proporción es de 32.13 % de componente orgánico y 67.87 % de componente acuoso (Figura 61) y la segunda proporción 52.48 % de componente orgánico y 47.52 % de componente acuoso (Figura 62). A continuación se presentan los resultados de la simulación en ambos casos:

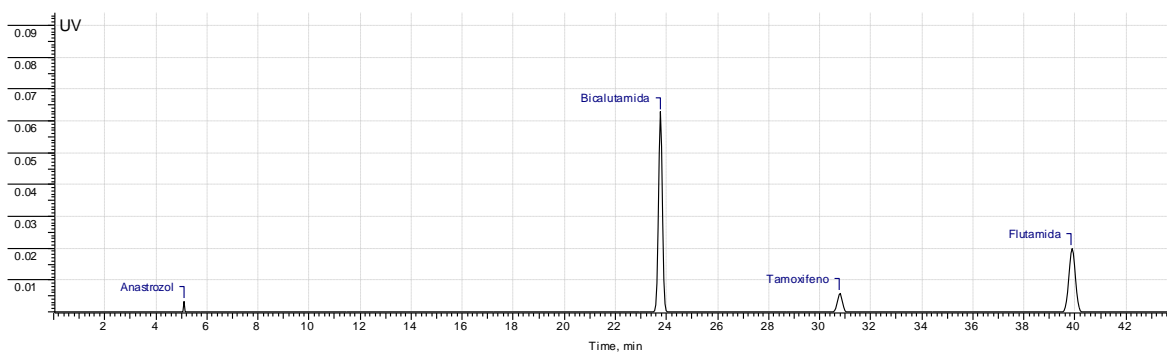


Figura 61. Simulación del Cromatograma a una proporción de 32.13 % de componente orgánico y 67.87 % de componente acuoso de acuerdo al Software ACD/LC Simulator.

Tabla 85. Resultados de simulación del Cromatograma a una proporción de 32.13 % de componente orgánico y 67.87 % de componente acuoso de acuerdo al Software ACD/LC Simulator.

No.	Peak Name	tR	Area	Width	As	Peak Model
1	Anastrozol	5.11	7.06	0.06	1	a = 3.7380, b = 9.9255e-2
2	Bicalutamida	23.74	658.6	0.28	1	a = 6.4944, b = 1.2560e-1
3	Flutamida	39.85	350.4	0.47	1	a = 7.4675, b = 1.3871e-1
4	Tamoxifeno	30.76	77.5	0.36	1	a = 6.3634, b = 1.1285e-1

Figura 62. Simulación del Cromatograma a una proporción de 52.48 % de componente orgánico y 47.52 % de componente acuoso de acuerdo al Software ACD/LC Simulator.

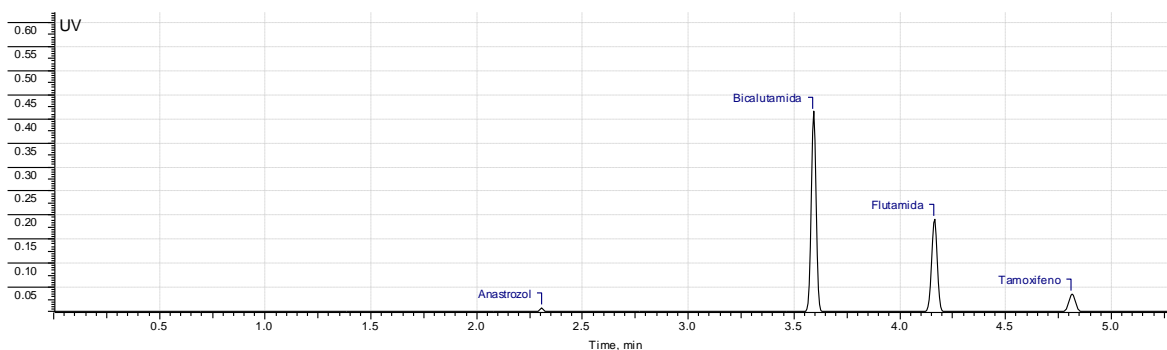


Tabla 86. Resultados de simulación del Cromatograma a una proporción de 52.48 % de componente orgánico y 47.52 % de componente acuoso de acuerdo al Software ACD/LC Simulator.

No.	Peak Name	tR	Area	Width	As	Peak Model
1	Anastrozol	2.3	7.06	0.03	1	a = 3.7380, b = 9.9255e-2
2	Bicalutamida	3.57	658.6	0.04	1	a = 6.4944, b = 1.2560e-1
3	Flutamida	4.13	350.4	0.05	1	a = 7.4675, b = 1.3871e-1
4	Tamoxifeno	4.78	77.5	0.06	1	a = 6.3634, b = 1.1285e-1

Utilizando el modelo matemático que el software maneja en la simulación para la determinación del Factor de Capacidad (k') (Figura 59), se realizaron las gráficas de cada uno de los analitos teniendo como variable el pH del componente acuoso. Las gráficas se muestran en las Figuras 63, 64, 65, 66, 67 y 68.

k' de Anastrozol en función a la proporción de Componente Orgánico en la Fase Móvil

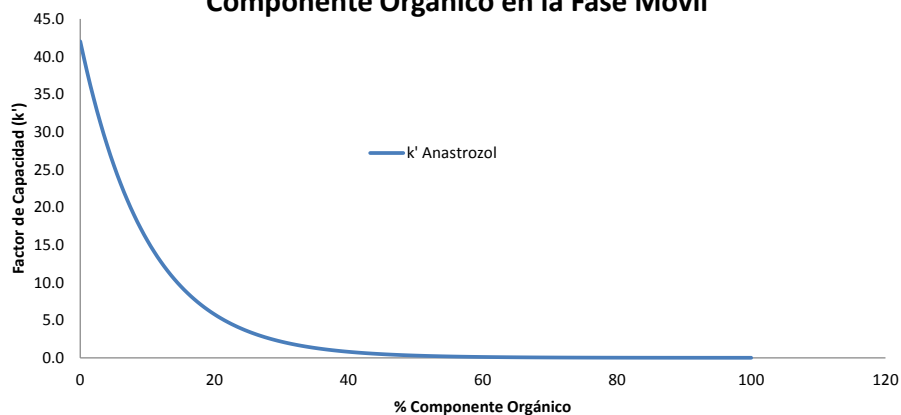


Figura 63. Gráfica de k' de Anastrozol en función a la Proporción de Componente Orgánico de la Fase Móvil.

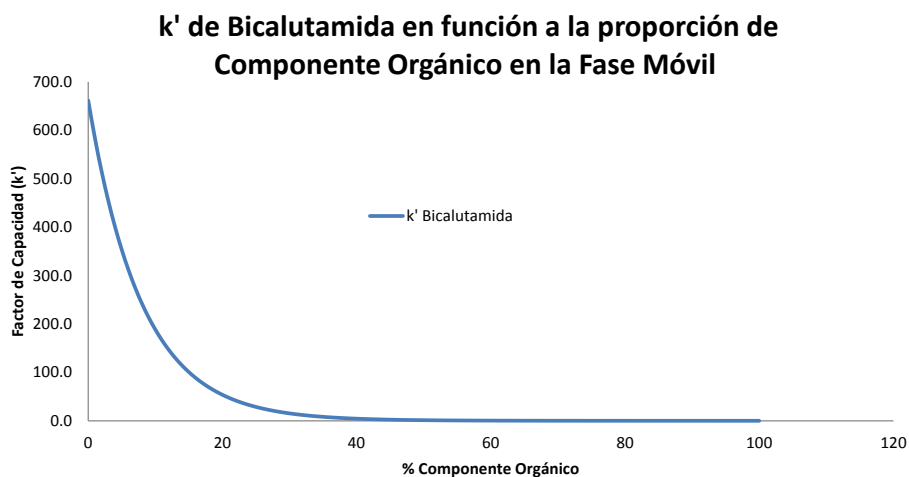


Figura 64. Gráfica de k' de Bicalutamida en función a la Proporción de Componente Orgánico de la Fase Móvil.

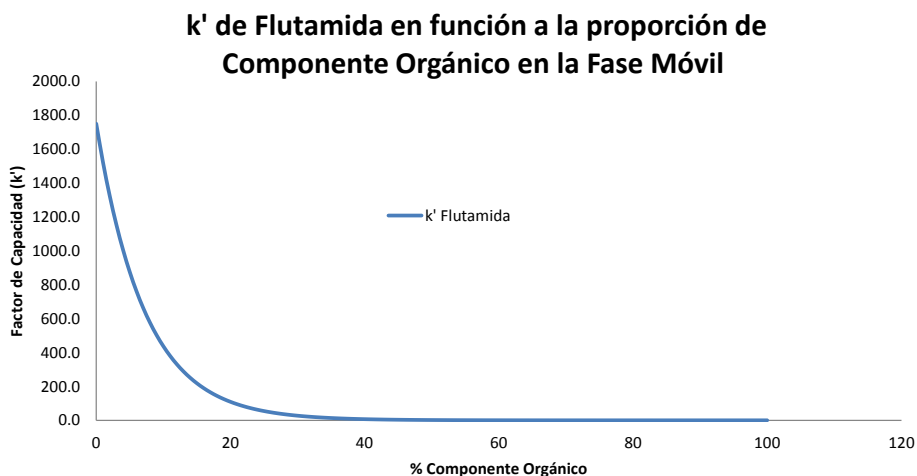


Figura 65. Gráfica de k' de Flutamida en función a la Proporción de Componente Orgánico de la Fase Móvil.

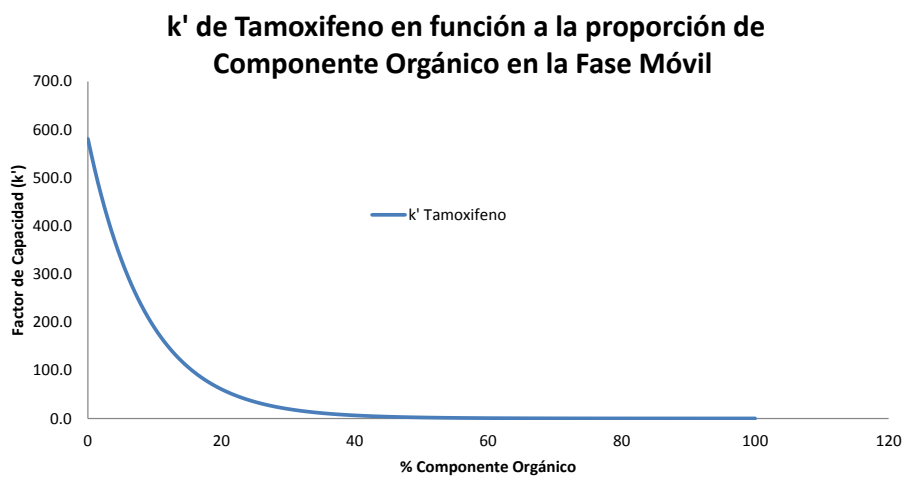


Figura 66. Gráfica de k' de Tamoxifeno en función a la Proporción de Componente Orgánico de la Fase Móvil.

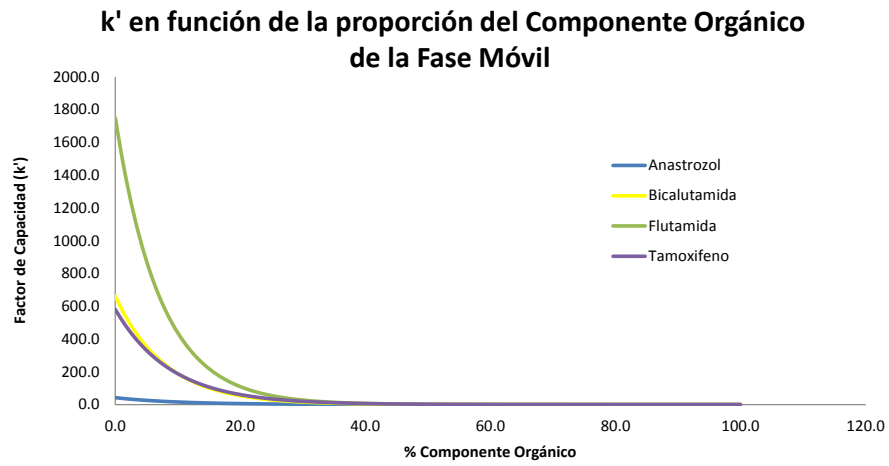


Figura 67. Gráfica de k' en función a la Proporción de Componente Orgánico de la Fase Móvil.

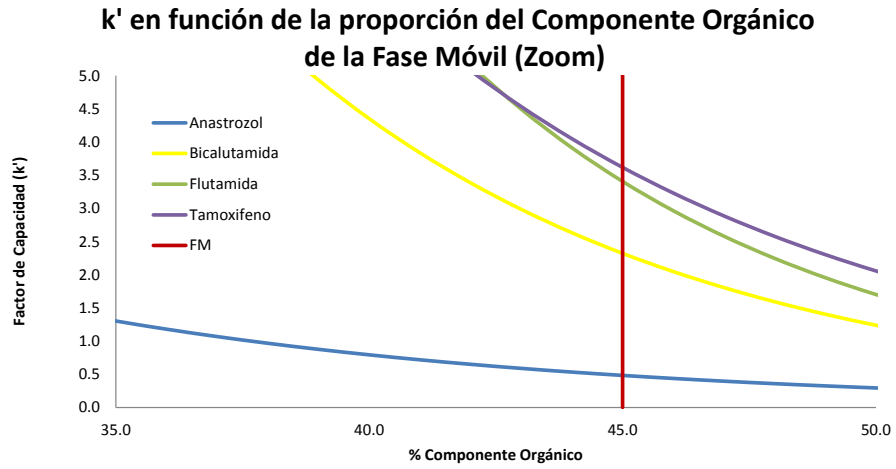


Figura 68. Gráfica de k' en función a la Proporción de Componente Orgánico de la Fase Móvil (Zoom).

8.3 Validación de Método Analítico

Resultados de Validación de Método Analítico					
Parámetro	Criterios de Aceptación	Anastrozol	Bicalutamida	Flutamida	Tamoxifeno
Adecuabilidad	CV ≤ 1.5% K' > 2 R > 2 T < 2	CV = 0.6% K' = 0.5 R = NA T = 1.07 α = 0.50	CV = 0.0% K' = 2.5 R = 32.29 T = 1.05 α = 4.84	CV = 0.3% K' = 3.5 R = 10.59 T = 1.55 α = 6.80	CV = 0.5% K' = 3.8 R = 2.88 T = 1.03 α = 7.41
Precisión del Sistema	CV ≤ 1.5%	0.2 %	0.0 %	0.1 %	0.2 %
Especificidad	La respuesta del método únicamente se debe al analito	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Linealidad del Sistema	r ² ≥ 0.98 IC(β ₁) No debe incluir el cero	r ² = 0.9981 IC(β ₁) 0.6853 a 0.7143	r ² = 1.0000 IC(β ₁) 70.3273 a 70.7614	r ² = 0.9999 IC(β ₁) 41.4296 a 41.9028	r ² = 0.9998 IC(β ₁) 8.2362 a 8.3542
Linealidad del Método	r ² ≥ 0.98 IC(β ₁) Debe incluir la unidad IC(β ₀) Debe incluir el cero CV _{y/x} ≤ 5.0% IC (μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del recobro se incluya en el intervalo 95% a 105% CV del % de recobro ≤ 5.0%	r ² = 0.9998 IC(β ₁) 0.9780 a 1.0043 IC(β ₀) -0.0872 a 0.1544 CV _{y/x} = 0.6% IC (μ) 99.2% a 99.9% X̄ = 99.6% CV = 0.5%	r ² = 0.9997 IC(β ₁) 0.9995 a 1.0283 IC(β ₀) -0.1621 a 0.1024 CV _{y/x} = 0.7% IC (μ) 100.3% a 101.6% X̄ = 101.0% CV = 0.8%	r ² = 0.9915 IC(β ₁) 0.8861 a 1.0455 IC(β ₀) -0.6645 a 0.7885 CV _{y/x} = 3.7% IC (μ) 94.4% a 100.0% X̄ = 97.2% CV = 3.7%	r ² = 0.9999 IC(β ₁) 1.0001 a 1.0177 IC(β ₀) -0.0854 a 0.0734 CV _{y/x} = 0.4% IC (μ) 100.4% a 101.1% X̄ = 100.8% CV = 0.5%
Repetibilidad	IC (μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del recobro se incluya en el intervalo 95% a 105% CV del % de recobro ≤ 3.0%	IC (μ) 99.7% a 100.1% X̄ = 99.9% CV = 0.2%	IC (μ) 101.5% a 102.0% X̄ = 101.8% CV = 0.2%	IC (μ) 99.6% a 103.5% X̄ = 101.5% CV = 1.8%	IC (μ) 100.7% a 101.1% X̄ = 100.9% CV = 0.2%
Precisión Intermedia	CV ≤ 5.0%	X̄ = 100.2% CV = 0.7%	X̄ = 100.2% CV = 1.4%	X̄ = 100.0% CV = 2.7%	X̄ = 100.0% CV = 2.2%

Límite de Detección y Cuantificación	$r^2 \geq 0.98$ IC(β_1) No debe incluir el cero El LD debe ser menor a la especificación de la prueba (8.84 $\mu\text{g/mL}$) El LC debe ser menor a la especificación de la prueba (8.84 $\mu\text{g/mL}$)	$r^2 = 0.9975$ IC(β_1) 0.934 a 0.971 LD = 0.0564 $\mu\text{g/mL}$ LC = 0.1708 $\mu\text{g/mL}$	$r^2 = 0.9998$ IC(β_1) 91.672 a 92.669 LD = 0.0155 $\mu\text{g/mL}$ LC = 0.0470 $\mu\text{g/mL}$	$r^2 = 0.9906$ IC(β_1) 31.964 a 34.474 LD = 0.1084 $\mu\text{g/mL}$ LC = 0.3284 $\mu\text{g/mL}$	$r^2 = 0.9998$ IC(β_1) 11.025 a 11.140 LD = 0.0148 $\mu\text{g/mL}$ LC = 0.0449 $\mu\text{g/mL}$
Estabilidad de la Muestra	$ d \leq 2.0\%$	Solución Referencia 24 Horas TA = 0.5% Ref = 1.2% 48 Horas TA = 0.4% Ref = 0.3% 72 Horas TA = 0.8% Ref = 0.4% Solución Muestra 24 Horas TA = 0.7% Ref = 4.6% 48 Horas TA = 0.7% Ref = 2.5% 72 Horas TA = 0.5% Ref = 3.8%	Solución Referencia 24 Horas TA = 2.6% Ref = 2.2% 48 Horas TA = 0.3% Ref = 0.6% 72 Horas TA = 0.8% Ref = 0.8% Solución Muestra 24 Horas TA = 1.4% Ref = 1.3% 48 Horas TA = 1.1% Ref = 3.1% 72 Horas TA = 1.2% Ref = 7.8%	Solución Referencia 24 Horas TA = 2.0% Ref = 30.9% 48 Horas TA = 10.4% Ref = 14.9% 72 Horas TA = 14.5% Ref = 14.6% Solución Muestra 24 Horas TA = 1.7% Ref = 16.1% 48 Horas TA = 35.4% Ref = 27.3% 72 Horas TA = 46.3% Ref = 26.0%	Solución Referencia 24 Horas TA = 1.2% Ref = 1.5% 48 Horas TA = 0.1% Ref = 0.2% 72 Horas TA = 4.4% Ref = 3.2% Solución Muestra 24 Horas TA = 1.8% Ref = 2.3% 48 Horas TA = 0.2% Ref = 0.7% 72 Horas TA = 2.3% Ref = 2.6%
Robustez	$ d \leq 2.0\%$	pH 3.5 = 2.0% pH 4.5 = 1.2% 60:40 = 1.8% 50:50 = 0.4%	pH 3.5 = 1.7% pH 4.5 = 1.2% 60:40 = 0.5% 50:50 = 0.2%	Con el cambio de pH en el componente acuoso la resolución entre Flutamida y Tamoxifeno es menor a 2.0 60:40 = 1.1% 50:50 = 0.2%	Con el cambio de pH en el componente acuoso la resolución entre Flutamida y Tamoxifeno es menor a 2.0 60:40 = 1.7% 50:50 = 1.4%

De acuerdo a los resultados obtenidos durante la validación del método analítico para la cuantificación de Anastrozol, Bicalutamida, Flutamida y Tamoxifeno en agua residual de una planta farmacéutica de productos oncológicos se concluye que la metodología está validada y puede ser utilizada de forma confiable.

8.4 Técnica analítica validada

DETERMINACIÓN DE TRAZAS EN LA CISTERNA DE CONFINAMIENTO.

Condiciones Cromatográficas.

- **Detector:** UV o Arreglo de Diodos a una longitud de onda de 270nm.
- **Columna cromatográfica:** Phenomenex Kinetex XB C-18 de 2,6 µm (4,6 mm X 150 mm).
- **Fase móvil:** Componente Acuoso : Componente Orgánico (55:45)

Componente Acuoso.

A 500 mL de agua purificada Milli-Q adicionar 2 mL de Hidróxido de amonio, mezclar por 10 minutos. Ajustar el pH con ácido acético glacial a 4.0 y filtrar la mezcla a través de membrana de Nylon de 0.45 µm y sonicar durante 10 minutos.

Componente Orgánico.

Acetonitrilo:Tetrahidrofurano (70:30). Realizar una mezcla que contenga 700 mL de Acetonitrilo grado cromatográfico y 300 mL de Tetrahidrofurano grado cromatográfico. Mezclar durante 10 minutos. Filtrar la mezcla a través de membrana de Nylon de 0.45 µm y sonicar durante 10 minutos.

- **Flujo:** 0.8 mL/min
- **Volumen de Inyección:** 20 µL
- **Temperatura de la Columna:** 35° C
- **Temperatura de la muestra:** 25° C
- **Tiempo de la Corrida:** 12 min

Preparación de la Solución de Referencia

Solución de Anastrozol. Pesar aproximadamente con exactitud 14.8 mg de Sustancia de Referencia de Anastrozol y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100.0 mL, adicionar 25 mL de metanol RA y sonicar hasta disolución completa. Aforar con el mismo disolvente y mezclar.

Solución de Bicalutamida. Pesar aproximadamente con exactitud 14.8 mg de Sustancia de Referencia de Bicalutamida y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 25 mL de metanol RA y sonicar hasta disolución completa. Aforar con el mismo disolvente y mezclar.

Solución de Flutamida. Pesar aproximadamente con exactitud 14.8 mg de Sustancia de Referencia de Flutamida y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 25 mL de metanol RA y sonicar hasta disolución completa. Aforar con el mismo disolvente y mezclar.

Solución de Tamoxifeno. Pesar aproximadamente con exactitud 22.4 mg de Sustancia de Referencia de Citrato de Tamoxifeno (equivalente a 14.8 mg de

Tamoxifeno Base) y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 25 mL de metanol RA y sonicar hasta disolución completa. Aforar con el mismo disolvente y mezclar.

De cada una de las soluciones preparadas anteriormente, tomar una alícuota de 3.0 mL y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 mL diluir, aforar con Agua Purificada y mezclar. (Esta solución tiene una concentración aproximada de 8.84 µg /mL de cada uno de los componentes).

Preparación de la Muestra.

Mezclar el contenido del frasco en donde se encuentra la muestra por medio de agitación magnética durante 5 minutos. Sonicar la muestra por 10 minutos, temperar y tomar 10 mL de la muestra. Colocarla en un tubo para centrifuga y centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm. Tomar el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur y colocarlo en el vial para HPLC. NO FILTRAR.

Procedimiento.

Acondicionar el equipo de Cromatografía por lo menos 30 minutos antes de su uso, manteniendo el flujo de 0.8 mL/min y una concentración de la fase móvil de 45% de componente orgánico y 55% de componente acuoso.

Una vez que la presión del equipo se haya mantenido constante, considerar las condiciones cromatográficas descritas en esta metodología e inyectar una solución blanco (agua purificada).

Adecuabilidad del Sistema: Inyectar por sextuplicado la solución de referencia. Determinar si se cumplen los parámetros descritos en la siguiente tabla. De lo contrario, repetir las inyecciones de la solución estándar hasta cumplir con los criterios de aceptación.

Parámetro.	Criterio de Aceptación.
El coeficiente de variación de las áreas de cada uno de los compuestos.	≤ 5.0%
Resolución (R) entre Flutamida y Tamoxifeno	≥ 2.0

Cumplidos los parámetros de adecuabilidad del sistema, inyectar por simplificado cada una de las soluciones muestra.

Realizar una inyección de la solución de referencia cada 10 inyecciones de soluciones muestra para verificar el sistema durante la corrida.

Cálculos.

Determinar la cantidad de cada uno de los Activos (en µg/mL) presentes en la muestra por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/mL de activo} = \frac{A_M}{A_{SRef}} \times \frac{P_{SRef}}{100\text{mL}} \times \frac{3\text{ mL}}{50\text{ mL}} \times \frac{\text{Pureza}_{SRef}}{100\%} \times 1000$$

En donde:

A_M = Área Bajo la Curva de activo presente en la muestra.

A_{SRef} = Promedio de Áreas Bajo la Curva del activo presente en la solución de referencia 1.

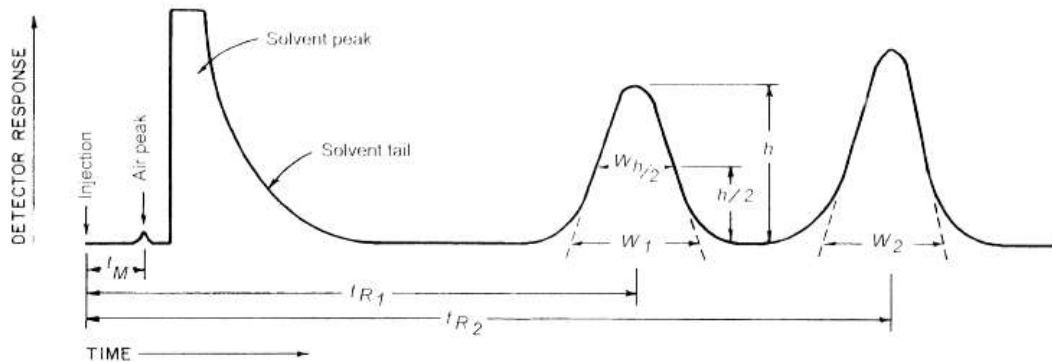
P_{SRef} = Peso en mg de la Sustancia de Referencia.

Pureza $_{SRef}$ = Pureza de la Sustancia de Referencia en %.

1000 = Factor de conversión a μg .

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1. Fórmulas para la determinación de Parámetros Cromatográficos.



Tiempo de Retención (t_R): es el lapso de tiempo entre la inyección de la muestra y la máxima respuesta del pico eluido. ⁽³²⁾

Tiempo Muerto (t_M): es el tiempo requerido para la elución de los compuestos no retenidos.

Volumen Muerto (V_M): es el volumen de fase móvil requerida para la elución de los compuestos no retenidos y se calcula a partir del tiempo muerto (t_m) y de la velocidad de flujo (F):

$$V_m = t_m \times F$$

Numero de Platos Teóricos (N): es la medida de la eficiencia de la columna.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Retención Relativa (r): es la proporción del tiempo de retención ajustado de un compuesto respecto a otro usado como referencia obtenidos bajo las mismas condiciones:

$$r = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m}$$

Retención Relativa (TRR): es la proporción del tiempo de retención sin ser ajustado de un compuesto respecto a otro usado como referencia obtenidos bajo las mismas condiciones:

$$TRR = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Factor de Capacidad (K'): También se conoce como factor de retención y se define como la cantidad de sustancia que se encuentra en la fase estacionaria entre la cantidad de sustancia que se encuentra en la fase móvil, y se calcula como:

$$K' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

Resolución (R_s): es la separación que hay entre dos componentes en una mezcla.

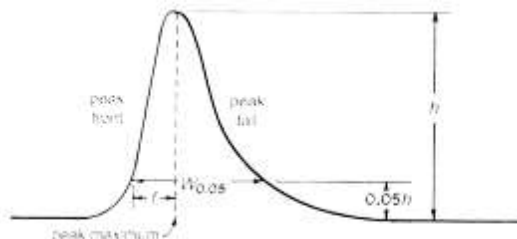
$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

Selectividad (α): o factor de separación es la retención relativa entre dos picos adyacentes.

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1}$$

Factor de Coleo (A_s): o también conocido como factor de asimetría o coleo de pico se calcula mediante la siguiente formula:

$$A_s = \frac{W_{0.05}}{2f}$$



9.2 Anexo 2. Fórmulas para la determinación de Parámetros Estadísticos.

Media Aritmética:

$$\hat{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de Variación

$$CV = \frac{s}{\hat{y}} 100$$

Intervalo de Confianza para la Media Poblacional

$$IC_{(\mu)} = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al Origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de Determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de Confianza para la Pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

Intervalo de Confianza para la Ordenada al Origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$$

$$S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Coefficiente de Variación de la Regresión

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} 100$$

10 REFERENCIAS:

1. **Braithwaite, A. y Smith, F. J.** *Chomatographic Methods*. 5th . Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1999.
2. **International Union of Pure and Applied Chemistry.** *Compendium of Chemical Terminology*. 2.3.2. 2012.
3. **Quattrocchi, Oscar Alberto, Albelaira de Andrizzi, Sara Inés y Laba, Raúl Felipe.** *Introducción a la HPLC Aplicación y práctica*. California : Artes Graficas Farro SA, 1992.
4. **Horvarth, C., Priess, B. y Lipsky, S. R.** 1967, *Analytic Chemistry Acta*, Vol. 35, pág. 305.
5. **Agilent Technologies.** *Manual de Usuario Bomba cuaternaria Agilent 1290 Infinity*. Waldbronn Alemania : s.n., 2012. G4204-95000.
6. *Development and validation of a HPLC method for determination of Anastrozole in tablet dosage form.* **Kumar, Sathis, y otros, y otros.** 2, 2011, *E-journal of Chemistry*, Vol. 8, págs. 794-797.
7. *Method validation and quantitative determination of Anastrozole in Human Plasma by an CMS/MS.* **Daphal, Vinayak, y otros, y otros.** 1, 2012, *Biologica Forum an International Journal*, Vol. 4, págs. 55-60.
8. **Hodgson, Ernest.** *A textbook of modern toxicology*. 3 th. New Jersey : Wiley-Intersciencie, 2004.
9. *Clinical dosage determination of a new aromatase inhibitor, Anastrozole, in postmenospausal japanese womwn with advancen breast cancer.* **Nomura, Yasuo, y otros, y otros.** 5, 2000, *Clin drug invest*, Vol. 20.
10. **O'Neil, Marydele.** *The Merck Index*. [ed.] Maryadele J. O'Neil. 14th. New Jersey : Whitehouse Station, 2006. ISBN 978-0--911910-00-1.
11. **PLM.** *Diccionario de Especialidades Farmacéticas*. [En línea] 2012. [Citado el: 25 de Enero de 2013.] <http://www.medicamentosplm.com/index.html>.
12. *Development and validation method for quantification of Anastrozole in formulation analysis by using RP-HPLC.* **Satyannarayana, Krishnaveni.** 2, 2011, *International Journal of research and reviews in pharmacy and applied*, Vol. 1, págs. 72-77.
13. *LC and LC-MS/MS study of forced decomposition behavior of Anastrozole and establishment analytical method for impurities estimation in low dose anastrozole tablets.* **Reddy, YR, y otros, y otros.** 3, Andhra, India : *Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, J. Pharm Biomed Anal, Vol. 50, págs. 397-404.

14. *Determination and characterization of degradation products of Anastrozole by LC-MS/MS and NMR spectroscopy.* **Sitaram, C, Rupakula, R y Reddy, BN.** 5, 2011, J Pharm Biomed Anal, Vol. 56, págs. 962-968.
15. *Development and Validation of a new stability indicating HPLC method for quantification of process related an degradation impurities of Bicalutamide in tablet dosage forms.* **Palleshwar, Rao, Lanka, Rama Prasad y Srinivasu, Pamidi.** 1, 2012, International Jornal of Pharmacy, Vol. 2, págs. 218-223.
16. *Development and validation of RP-HPLC method for te estimation of Bicalutamida in pure and pharmaceutical dosage forms.* **Lakshmana Rao, A., Taraka Ramesh, G. y Rao, J.V.L.N.S.** 2, 2009, Rasayan Journal Chemistry, Vol. 2, págs. 512-515.
17. *Development and validation of RP-HPLC method for thr estimation of Bicalutamide in pure and pharmaceutical dosage forms.* **Chandanam, Sreedhar, Sowmya, Manala y Sreenivasa, Rao.** 4, 2012, International Journal of PharmTech Research, Vol. 4, págs. 1686-1690.
18. *Development and validation of stability-indicating HPLC and UPLC methods for determination of Bicalutamide.* **Raman Nanduri, V.V.S.S, Prasad Adapa, V.S.S. y Reddy Kura, Ratnakar.** 2012, Journal of Chromatographic science, Vol. 50, págs. 316-323.
19. **Sigma-Aldrich.** SIGMA-ALDRICH. [En línea] 2013. [Citado el: 01 de Abril de 2013.]
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/f9397pis.Par.0001.File.tmp/f9397pis.pdf.
20. **BC Cancer Agency.** BC Cancer Agency. [En línea] 2013. [Citado el: 01 de ABRIL de 2013.] http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/D5D5F6A8-F962-4AAE-BB87-D9C8E32B3229/52878/Flutamide_monograph_1August2012.pdf.
21. *Improved liquid chromatographic method for the determination of Flutamide in pharmaceutical formulation.* **Anton Smith, A., y otros, y otros.** 2, Abril-Junio de 2009, International Journal of PharmaTech Research, Vol. 1, págs. 360-364.
22. *HPLC monitoring of Flutamide Drug used in the prostate cancer treatment.* **Filip, M., y otros, y otros.** Romania : Medi Tech 2007, 2007. 1 st International Conference on advancements of medicine and health care through technology.
23. **The United States Pharmacopeia Convention.** *United States Pharmacopeia USP 34 NF.* 34. Baltimore : United Book Press, 2011.
24. **Advanced Chemistry Development, Inc.** ACD/Labs. [En línea] 1996-2013. [Citado el: 28 de Abril de 2013.]
http://www.acdlabs.com/products/com_iden/meth_dev/lc_sim/.

25. **Salud, Secretaria de.** Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013. *Buenas Practicas de Fabricación de Medicamentos*. México: Diario Oficial de la Federación, 22 Julio 2013.
26. **Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México AC.** *Guía de Validacion de Métodos Analíticos*. México D.F. : s.n., 2002. DGP-F-032.
27. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals fo Human use**. USA : s.n., 2005.
28. **Occupational Safety & Health Administration.** United States Department of Labor. *Controlling Occupational Exposure to Hazard Drugs*. [En línea] 2013. [Citado el: 26 de Abril de 2013.] http://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_vi/otm_vi_2.html.
29. *Anastrazole quantification in human plasma by High-Performance Liquid Chromatography coupled to photospray tandem mass spectrometry applied to pharmacokinetic studies*. **Mendes, Gustavo D., y otros, y otros**. Sao Pablo, Brazil : s.n., 2007, Journal of Chromatography B, Vol. 850, págs. 553-559.
30. *Insolation and characterization of related impurities and degradation products of Bicalutamide and development of RP-HPLC method for impurity profile study*. **Nageswara , Rao R., Narasa, Raju A. y Narsimha, R.** 50, Hyderabad, India : s.n., 2008, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, págs. 505-519.
31. *The influence of pH and temperature on the stability of Flutamide. an HPLC investigation and identification of the degradation product by EI -MS*. **EI-Shaheny, R.N. y Yamada, K.** 3206-3214, 2015, Royal Society of Chemistry, Vol. 5.
32. **The United States Pharmacopeial Convention.** United States Pharmacopeia 37 NF 32. <621> *Chromatography*. Masachussets, USA : s.n., 2014, págs. 6376-6385.