

# TRABAJOS ORIGINALES ORIGINALS WORKS

---

## Un nuevo método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento y de fase inversa para la determinación de flutamida en liposomas, plasma de sangre de rata y formas de dosificación en comprimidos

*A new reverse-phase high performance liquid chromatographic method for determination of flutamide in liposomes, rat blood plasma and tablet dosage forms*

UMRETHIA ML<sup>1</sup>, GHOSH PK<sup>1</sup>, MAJITHIYA RJ<sup>1</sup>, MURTHY RSR\*

<sup>1</sup> Drug Delivery Research Laboratory, Pharmacy Department, The M.S. University of Baroda, Vadodara, India

\*Autor de contacto: Dr. R.S.R. Murthy, Profesor de Farmacia, Drug Delivery Research Laboratory, GH Patel Pharmacy Building, Donor's Plaza, Opposite to M.S. University Office, Fatehgunj, Vadodara-390002, Gujarat, India. Teléfono: +91 265 2434187 Fax: +91 265 2418928. Correo electrónico: murthyrsr@sify.com [m\\_rsr@rediffmail.com](mailto:m_rsr@rediffmail.com)

### RESUMEN

La flutamida es un antiandrógeno ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer de próstata que afecta al nivel de antígeno específico de la próstata (PSA) en sangre, lo que requiere que sea estable en la sangre durante el suficiente tiempo. Se ha desarrollado una nueva forma de dosificación farmacéutica, los liposomas, para mejorar la eficacia de este fármaco. El objeto de este estudio es desarrollar un método HPLC UV para la determinación de la FLT en los liposomas, en el plasma de sangre de rata y en distintas formas de dosificación en comprimidos comercializadas. Los pasos de preparación de muestras requieren menos tiempo. El estándar interno (IS) para el procedimiento de ensayo fue la 6-mercaptopurina. Las muestras se inyectaron en la columna de la fase inversa (Thermosil® C<sub>18</sub>). La fase móvil, metanol: agua (80:20, v/v), se llevó a cabo con una velocidad de flujo de 1 ml/min. durante 8 min. La FLT se detectó mediante un detector de UV con una longitud de onda de 295 nm. Los tiempos de retención del IS y la FLT fueron de 3,03 y 4,02 min. respectivamente. El método fue lineal en el rango de concentración de 20-1000 ng/ml y 50-1000 µg/ml en la fase móvil y en el plasma de sangre de rata respectivamente. Se validó la exactitud, precisión, robustez y recuperación del método. El límite de detección fue de 0,099 µg/ml y de 0,106 µg/ml en la fase móvil y en el plasma de sangre de rata respectivamente. El método demostró ser muy reproducible y parece ser adecuado para el control rutinario de fármaco terapéutico. Se podría utilizar sin ninguna interferencia por parte de lípidos, excipientes de comprimidos y sustancias endógenas de las muestras de plasma.

PALABRAS CLAVE: Flutamida. Cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa.

### ABSTRACT

*Flutamide is an anti-androgen widely used in treatment of prostate cancer by affecting Prostate Specific Antigen (PSA) level in blood, which requires its stability in blood for enough time. A new pharmaceutical dosage form, liposomes, has been developed for improving efficacy of this drug. The aim of this study is to develop HPLC UV method for the determination of FLT in liposomes, rat blood plasma and*

**different marketed tablet dosage forms. The method involved less time-consuming sample preparation steps. The internal standard (IS) for the assay procedure was 6-Mercaptopurine. The samples were injected on to reverse-phase (Thermosil® C<sub>18</sub>) column. The mobile phase, Methanol: Water (80:20, v/v) was run at a flow rate of 1 ml/min for 8 min. The FLT was detected by UV detector at 295 nm wavelength. The retention times for IS and FLT were 3.03 and 4.02 min, respectively. The method was linear over the concentration range 20-1000 ng/ml and 50-1000 µg/ml in mobile phase and rat blood plasma, respectively. The method was validated for accuracy, precision, robustness and recovery. The limit of detection was 0.099 µg/ml and 0.106 µg/ml in mobile phase and rat blood plasma, respectively. The method was shown to be highly reproducible and it seems to be adequate for routine therapeutic drug monitoring. It could be used without any interference from lipids, tablet excipients and endogenous substances from the plasma samples.**

KEY WORDS: Flutamide. Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography.

## INTRODUCCIÓN

La flutamida (FLT) (3-trifluorometilo-4-nitro metilo propionilánilida) es un antiandrógeno puro no esteroideo indicado para el cuidado paliativo del cáncer de próstata avanzado. Actúa inhibiendo la absorción y/o la fijación de la di-hidro testosterona al receptor de la célula de destino, interfiriendo de esta forma con la acción andrógena<sup>1</sup>. Después de su administración oral en humanos, la FLT se absorbe bien en forma oral y se metaboliza rápidamente. Se han identificado seis metabolitos en plasma, incluyendo la 2-hidroxi flutamida, el metabolito principal<sup>2</sup>. Se revisaron la farmacocinética y farmacodinámica de la FLT<sup>3,4</sup>. La vida media de la FLT en plasma es de 5 horas en humanos. Tiene una fijación proteica superior al 90% y se excreta principalmente por los riñones<sup>5</sup>. Sus características farmacocinéticas y de dosificación (normalmente tres dosis al día de 250 mg cada una)<sup>6</sup> hacen de este fármaco un candidato adecuado para el diseño de sistemas de liberación controlada. La FLT actúa de forma específica sobre los PSA (antígenos específicos de la próstata) presentes en la sangre. En este contexto, hemos desarrollado nuevos liposomas de FLT que pueden poder controlar la liberación del fármaco en la sangre durante un tiempo prolongado y reducir la frecuencia y cantidad total de las dosis. Los métodos de HPLC son útiles para la determinación de fármaco en forma de dosificación farmacéutica y muestras biológicas. Se han realizado diversos estudios analíticos para determinar el contenido en fármaco de los productos farmacéuticos. La FLT y sus metabolitos hidroxilados se han determinado mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Las impurezas contenidas en las muestras de FLT se han determinado me-

## INTRODUCTION

Flutamide (FLT) (3-trifluoromethyl-4-nitro methyl propionylanilide) is a non-steroidal pure anti-androgen indicated for palliation of advanced prostate cancer. It acts by inhibiting the uptake and/or binding of di-hydro testosterone to the target cell receptor, thus interfering with androgen action<sup>1</sup>. After human oral administration FLT is well absorbed orally and quickly metabolized. Six plasma metabolites have been identified including 2-hydroxyflutamide the major metabolite<sup>2</sup>. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of FLT are reviewed<sup>3,4</sup>. The plasma half-life of FLT is 5 hr in humans. It has more than 90% protein binding and mainly excreted by kidneys<sup>5</sup>. Its pharmacokinetics and dosage characteristics (usually three doses per day of 250 mg each)<sup>6</sup> make it suitable candidate for design of controlled release delivery systems. FLT specifically acts on PSA (prostate specific antigens) present in blood. In this context, we have developed new FLT liposomes which may be able to control drug release in blood for long time, reduce the total amount of dose as well as a frequency of dose. The HPLC methods are useful in determination of drug in pharmaceutical dosage form and biological samples. A number of different analytical studies have been done to determine drug content in drug products. FLT and its hydroxylated metabolites have been determined by high performance liquid chromatography. Its impurities contained in samples of FLT have been determined by sobrepresurized liquid chromatography and evaluated by densitometry at 237 nm. The chromatographic determination of FLT in presence of its hydrolyzed product (4-nitro-3-trifluoro methyl aniline) also has been described. Related to the determination of FLT

diente cromatografía de líquidos sobrepresurizada y se han evaluado mediante densitometría a 237 nm. La determinación cromatográfica de la FLT en presencia de su producto hidrolizado (4-nitro-3-trifluoro metilo anilina) también se ha descrito. En relación a la determinación de FLT en formas farmacéuticas se ha publicado un método cromatográfico de gas<sup>7</sup>. El estudio de estabilidad de la FLT en estado sólido y en solución acuosa también se realizó por el método HPLC<sup>8</sup>. Estos procedimientos presentaron tiempos de retención largos, no permiten obtener resultados con rapidez, requieren un mayor uso de disolventes caros, utilizan modificadores orgánicos como trietilamina y ácido acético glacial en la composición de la fase móvil y para el mantenimiento del pH<sup>9</sup>, lo que puede ocasionar la precipitación de los lípidos presentes en los liposomas que finalmente limitan la vida de la columna. En la literatura sólo se ha descrito un método de detección HPLC UV para la determinación de la FLT a partir de la forma farmacéutica de dosificación<sup>10</sup>. Este procedimiento publicado tiene un elevado límite de determinación y datos de rango de linealidad. El objetivo del presente estudio es desarrollar un método de detección HPLC UV de fase inversa sensible, preciso, selectivo, específico, reproducible, completamente validado, fácil de realizar y con una rutina de bajo coste, para la determinación de la FLT en material en bruto, plasma de rata, liposomas y distintas formas de dosificación en comprimidos comercializadas sin necesidad de dedicar mucho tiempo a los pasos de preparación de muestras y sin ninguna interferencia de sustancias endógenas de las muestras de plasma para análisis rutinarios.

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Productos químicos y reactivos*

La muestra de flutamida fue amablemente proporcionada gratuitamente por Coral Drugs Pvt. Ltd., Nueva Delhi; India. La fosfotidilcolina (PC) y el colesterol (CHOL) se adquirieron a Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O.; el metanol y el agua de grado HPLC se adquirieron a Spectrochem Pvt. Ltd. Ambos disol-

in pharmaceutical forms a gas chromatographic method has been reported<sup>7</sup>. The stability study of FLT in solid state and in aqueous solution was also studied by HPLC method<sup>8</sup>. These procedures were shown long retention time, do not give results rapidly, more use of expensive solvents, use of organic modifiers viz. tri ethylamine and glacial acetic acid in the mobile phase composition and maintenance of pH<sup>9</sup>, which can leads to the precipitation of lipids present in liposomes which finally limit column life. Only one HPLC UV detection method has been described in the literature for determination of FLT from pharmaceutical dosage form<sup>10</sup>. This reported procedure has high determination limit and linearity range data. The objective of the present study is to develop sensitive, precise, selective, specific, reproducible, fully validated, easy to perform and low cost routine reverse phase HPLC UV detection method for determination of FLT in raw material, rat plasma, liposomes and different marketed tablet dosage forms without any time consuming sample preparation steps and any interferences form endogenous substances from plasma samples for routine analysis.

## EXPERIMENTAL

### *Chemicals and reagents*

Flutamide was kindly supplied as a gift sample by Coral Drugs Pvt. Ltd., New Delhi; India. Phosphotidylcholine (PC) and Cholesterol (CHOL) were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O.; HPLC grade Methanol and Water were purchased from Spectrochem Pvt. Ltd. Both solvents were then combined and filtered (0.45  $\mu$ m HA membrane filter, Millipore, Ireland) to prepare the mobile phase.

### *Apparatus*

The instrument was equipped with Rheodyne Isocratic pump (Model-LC-10 Avp, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) and diode-array detector (Model-SPD Avp, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) set at a wavelength of 295 nm ( $\lambda_{\text{max}}$ ).

ventes se mezclaron y filtraron (filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  HA, Millipore, Irlanda) para preparar la fase móvil.

### *Instrumental*

El instrumental se equipó con una bomba isocrática de reodina (modelo LC-10 Avp, Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) y un detector de matriz de diodos (modelo SPD Avp, Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) ajustado a una longitud de onda de 295 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$ ).

### *Condiciones cromatográficas*

La cromatografía de las muestras se realizó en una columna de  $\text{C}_{18}$  Thermo Hypersil<sup>®</sup> de la fase inversa (250 x 4.6 mm i.d., tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ) (Thermo electron company, Bellefonte, América del Norte) precedida por una columna de guardia (40 x 4 mm) del mismo material. La fase móvil, metanol y agua (80:20, v/v), se filtró a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  Millipore y se desgasificó en vacío antes de su utilización. Se bombeó con un flujo de 1 ml /min. La columna se termostató a temperatura ambiente. El tiempo de ejecución fue de 8 min. en estas condiciones experimentales, con un volumen de inyección de 20  $\mu\text{l}$ . Como estándar interno (IS) se utilizó 6-mercaptopurina.

### *Preparación de estándares*

Se preparó una solución madre de FLT (2 mg/ml) mediante la disolución de 20 mg en 10 ml de fase móvil en un matraz volumétrico de 10 ml. Se preparó una segunda solución madre disolviendo cuatro veces la disolución primera en la fase móvil para obtener una concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$ . A partir de la segunda solución madre se prepararon soluciones estándar de trabajo en fase móvil. El rango de concentración de FLT de las muestras de curva estándar estaba entre 20 y 1000 ng/ml. Por otra parte, se disolvieron 5 mg de IS en 10 ml de fase móvil para obtener una solución madre de 500  $\mu\text{g/ml}$ . Para preparar las muestras de curva estándar se añadieron

### *Chromatographic conditions*

The samples were chromatographed on reverse phase  $\text{C}_{18}$  Thermo Hypersil<sup>®</sup> (250 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$  particle size) column (Thermo electron company, Bellefonte, North America) preceded by a guard column (40 x 4 mm) of the same material. The mobile phase, methanol and water (80:20, v/v), was filtered through 0.45- $\mu\text{m}$  Millipore filter and degassed under vacuum before use. It was pumped at a flow rate of 1 ml /min. The column was thermostated at an ambient temperature. The run time was 8 min under these experimental conditions with an injection volume of 20  $\mu\text{l}$ . 6-Mercaptopurine was used as an internal standard (IS).

### *Preparation of standards*

A stock solution of FLT (2 mg/ml) was prepared by dissolving 20 mg in 10 ml of mobile phase in 10 ml volumetric flask. A second stock solution was also prepared by diluting the first stock solution in mobile phase four times to yield the concentration of 500  $\mu\text{g/ml}$ . Working-standard solutions were prepared in mobile phase from the second stock solution. The concentration range of FLT for the standard curve samples was between 20 and 1000 ng/ml. On the other hand, 5 mg of IS was dissolved in 10 ml of mobile phase to obtain a stock solution of 500  $\mu\text{g/ml}$ . Standard curve samples were prepared by adding 0.3 ml of the IS to working standard solutions of FLT and volume was made up to 5 ml using mobile phase. The calibration curve for HPLC analysis was constructed by plotting the ratio of peak area of drug to that of IS against the drug concentration. Unknown concentration computed from the linear regression equation of the peak area ratio against concentration of FLT.

### *Sample preparation*

The FLT loaded liposomes were prepared by thin film hydration method<sup>11</sup>. Nine batches of FLT liposomes were prepared using rotary vacuum evaporator (Superfit, Rotovap). Drug,

0,3 ml de la solución de estándar interno (IS) a las soluciones estándar de trabajo de FLT, y se completó el volumen hasta 5 ml con fase móvil. La curva de calibración del análisis HPLC se construyó trazando la proporción de área pico del fármaco en comparación con la de IS en relación a la concentración de fármaco. Se calculó la concentración desconocida a partir de la ecuación de regresión lineal de la proporción del área pico en relación a la concentración de FLT.

### *Separación de muestras*

Los liposomas cargados de FLT se prepararon mediante el método de hidratación de película delgada<sup>11</sup>. Se prepararon nueve lotes de liposomas FLT mediante un evaporador rotativo de vacío (Superfit, Rotovap). Se pesaron con exactitud el fármaco, la fosfatidilcolina (PC) y el colesterol (CHOL), y se disolvieron en fase orgánica en un matraz de base redonda. Este matraz se conectó al evaporador rotativo y se giró a un número definido de r.p.m. a 37 °C en vacío (250 mmHg) hasta que se depositó una película delgada y uniforme en el matraz. Se hidrató la película añadiendo fase acuosa al matraz y girándolo a las mismas r.p.m. y a la misma temperatura durante 20 min. o hasta que la película lipídica se hubo dispersado por completo. De cada uno de los lotes preparados se extrajo una cantidad definida de dispersión liposómica y se sometió a centrifugación en una centrifugadora de laboratorio (Sigma, 3K30) a 15.000 r.p.m. durante 15 min. a una temperatura de 0 °C después de mezclarla con 50 µl de solución de protamina (10 mg/ml)<sup>12</sup> mediante una micropipeta. Se separaron el sobrenadante y el sedimento y la cantidad de FLT se determinó mediante la inyección de 20 µl de alícuotas diluidas adecuadamente con fase móvil en el sistema HPLC.

### *Procedimientos de validación*

La exactitud del ensayo se definió como el porcentaje del acuerdo entre el valor medido y el valor real de la forma siguiente<sup>13</sup>:

PC, and CHOL were accurately weighed and dissolved in organic phase in round bottom flask (RBF). The RBF was attached to the rotary evaporator and rotated at definite RPM at 37°C under vacuum (250 mmHg) until uniform film was deposited in the flask. The film was hydrated by adding an aqueous phase in the flask and rotated at the same RPM and temperature for 20 min or until lipid film had completely dispersed. From each prepared batch, a definite amount of liposomal dispersion was taken and subjected to centrifugation on laboratory centrifuge (Sigma, 3K30) at 15, 000 RPM for 15 min at 0°C after mixing with 50 µl protamine solution (10 mg/ml)<sup>12</sup> using micropipette. The clear supernatant and sediment were separated and the amount of FLT was determined by injecting 20 µl of appropriately diluted aliquots with mobile phase in to the HPLC system.

### *Validation procedures*

Accuracy of the assay was defined as the percentage of the agreement between the measured value and the true value as follows<sup>13</sup>:

$$\text{Accuracy} = \frac{\text{True value} - \text{Measured value} \times 100}{\text{True value}} \quad (\text{Equation 1})$$

Accuracy values in intra-day and inter day variation studied at low, medium and high FLT concentrations. In this work, precision of the method was tested on both the inter-day and intra-day reproducibility in the assay. Intra-day variability of the assay method was determined by repeated analysis of three quality control samples at low, medium and high concentrations on the same day. Similarly, Inter-day variability was determined by repeated analysis of three quality control samples at low, medium and high concentrations on three different days. The quality control samples were prepared as a single batch on the same day at each concentration, and then divided into aliquots that were stored at 2-8°C until analysis<sup>13</sup>. For the robustness study, different analytical columns (Thermosil® ODS and Spherisorb® C<sub>18</sub>) and guard columns were used. Effect of temperature of the column, the change in percentage of methanol in mobile phase and

$$\text{exactitud} = \frac{\text{valor real} - \text{valor medido} \times 100}{\text{valor real}} \quad (\text{ecuación 1})$$

Los valores de exactitud en la variación intradía e interdía estudiada a concentraciones bajas, medias y altas de FLT. En este trabajo, la precisión del método se comprobó tanto en cuanto a la reproducibilidad del ensayo intradía como interdía. La variabilidad intradía del método de ensayo se determinó mediante el análisis repetido de tres muestras de control de calidad a concentraciones bajas, medias y altas en el mismo día. De forma similar, la variabilidad interdía se determinó mediante el análisis repetido de tres muestras de control de calidad a concentraciones bajas, medias y altas en tres días diferentes. Las muestras de control de calidad se prepararon como un único lote en el mismo día con cada concentración y, a continuación, se dividieron en alícuotas que se almacenaron a 2-8 °C hasta el análisis<sup>13</sup>. Para el estudio de robustez se utilizaron diversas columnas analíticas (Thermosil® ODS y Spherisorb® C<sub>18</sub>) y de guardia. También se estudiaron los efectos de la temperatura de la columna, el cambio en el porcentaje de metanol en la fase móvil y la variación de la velocidad de flujo<sup>13</sup>. Los estudios de recuperación de FLT por adición en plasma de rata y en formas de dosificación en comprimidos se realizaron añadiendo la cantidad conocida de fármaco puro a muestras previamente analizadas de comprimidos y plasma de rata. El porcentaje de recuperación se calculó mediante la comparación de la concentración obtenida en muestras por adición con la concentración real añadida. La recuperación se calculó tras repetir cinco experimentos.

#### *Aplicación del método*

##### Determinación de FLT en liposomas

Se prepararon distintos lotes de liposomas con FLT para determinar el efecto de la fracción molar de fármaco:lípido y la fracción molar de PC:CHOL en el % de eficiencia de captura (% EC) de los liposomas cargados con FLT. El porcentaje de EC se calculó como sigue:<sup>14</sup>

variation in the flow-rate were also studied<sup>13</sup>. Recovery studies of FLT in spiked rat plasma and tablet dosage forms were performed by adding the known amount of pure drug to pre-analyzed samples of tablets and rat plasma. The percentage recovery was calculated by comparing the concentration obtained from spiked samples with actual added concentration. After five repeated experiments the recovery was calculated.

#### *Application of the method*

##### Determination of FLT in liposomes

Different batches of FLT liposomes were prepared to determine the effect of drug: lipid molar ratio and the PC: CHOL molar ratio on % entrapment efficiency (% EE) of FLT loaded liposomes. The % EE was calculated as follows:<sup>14</sup>

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{Amount of FLT in Sediment} \times 100}{\text{Total Amount of FLT added in sample}} \quad (\text{Equation 2})$$

##### Determination of FLT in rat plasma samples

Drug free plasma samples, obtained from rats, were stored frozen until assay. Thawed plasma samples of 1 ml were spiked with 2 mg/ml of FLT (dissolved in mobile phase) and 3 ml methanol (for denaturation and precipitation of plasma proteins). The tubes were tightly capped, vortexed for 10 min and centrifuged for 10 min at 5000 g. The upper layer was transferred in to clean tube. The different concentrations of FLT solutions were prepared in the range of 50-1000 ng/ml. The concentration of IS was maintained at constant level of 30 µg/ml. These plasma samples of 20 µl were injected and standard curve was constructed for FLT in plasma using the ratio of observed peak area for FLT and IS. Unknown concentrations were computed from linear regression equation of the peak area ratio against the concentration of FLT.

$$\% \text{ EC} = \frac{\text{cantidad de FLT en sedimento} \times 100}{\text{cantidad total de FLT añadido en la muestra}}$$

(Ecuación 2)

#### Determinación de FLT en muestras de plasma de rata

Las muestras de plasma libre de fármaco obtenidas de las ratas se conservaron congeladas hasta la realización del ensayo. Se añadieron 2 mg/ml de FLT (disuelto en fase móvil) y 3 ml de metanol (para la desnaturalización y precipitación de las proteínas plasmáticas) a muestras de plasma descongeladas de 1 ml. Los tubos se taparon con fuerza, se agitaron durante 10 min. y se centrifugaron durante 10 min. a 5000 g. La capa superior se transfirió a un tubo limpio. Las distintas concentraciones de soluciones de FLT se prepararon en un rango de 50-1000 ng/ml. La concentración de IS se mantuvo a un nivel constante de 30 µg/ml. Se inyectaron estas muestras de plasma de 20 µl y se construyó la curva estándar de FLT en plasma utilizando la proporción del área pico observada de FLT e IS. Se calcularon las concentraciones desconocidas a partir de la ecuación de regresión lineal de la proporción del área pico en relación a la concentración de FLT.

#### Determinación de FLT en formas de dosificación comerciales en comprimidos

Se pesaron con exactitud diez comprimidos y se molieron hasta obtener un polvo fino. Se tomaron cinco cantidades de este polvo pesadas con exactitud equivalentes a 10 mg de FLT, se colocaron en matrices diferentes de 10 ml y se diluyeron con fase móvil, se sonicaron durante 10 min. y se completaron hasta volumen con la misma solución. Esta solución se centrifugó y se prepararon las soluciones adecuadas extrayendo los alícuotas adecuados del sobrenadante transparente y añadiendo el volumen constante de solución IS, diluyéndolas con fase móvil para obtener una solución final. Las muestras diluidas de 20 µl se inyectaron en la columna para el análisis HPLC. Se calculó la cantidad de FLT por comprimido.

#### Determination of FLT in commercial tablet dosage forms

Ten tablets were accurately weighed and crushed to a fine powder. Five accurately weighed quantity of this powder equivalent to 10 mg of FLT were taken in different 10 ml flasks and diluted with mobile phase, sonicated for 10 min and then completed to volume with the same solution. This solution was centrifuged and appropriate solutions were prepared by taking suitable aliquots of clear supernatant and adding the constant volume of IS solution, diluting them with mobile phase in order to obtain a final solution. 20 µl of diluted samples was injected to column for HPLC analysis. The amount of FLT per tablets was calculated.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this study the conditions were influenced by physicochemical properties of FLT like solubility, UV absorption and interference from the endogenous substances. The most important target was, therefore, to exclude interference between endogenous substances in biological samples and FLT.

#### HPLC method development

For HPLC method, precision and accuracy can often be enhanced by the use of an appropriate internal standard, which also serves to correct for fluctuations in the detector response. The IS should be different compound from the analyte but one that is well resolved in the separation. The chemical structure of 6-MP is not similar to FLT. However, it was chosen as the internal standard because it not only gave the best peak shape but also gave better resolution and shorter retention time compared to other internal standards in mobile phase and rat plasma. Various mobile phase systems were prepared and used to get an appropriate chromatographic separation, but the proposed mobile phase consisting methanol: water (80:20, v/v) gave better resolution and sensitivity of FLT and IS. The optimum wavelength for detection was 295 nm at which much better

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio, las condiciones estuvieron influenciadas por propiedades físico-químicas de la FLT como la solubilidad, la absorción UV y la interferencia de las sustancias endógenas. Por tanto, el objetivo más importante fue excluir la interferencia entre sustancias endógenas en muestras biológicas y FLT.

### *Desarrollo del método HPLC*

En el método HPLC, la precisión y la exactitud se pueden aumentar mediante el uso de un estándar interno adecuado, que también sirve para corregir fluctuaciones en la respuesta del detector. El IS debe ser un compuesto distinto al analito, pero que se resuelva bien en la separación. La estructura química de la 6-MP no es similar a la de la FLT. No obstante, se eligió como estándar interno porque no sólo proporcionaba la mejor forma de pico, sino que también tenía una mejor resolución y un menor tiempo de retención, en comparación con otros estándares internos en la fase móvil y el plasma de rata. Se prepararon varios sistemas de fase móvil, que se utilizaron para conseguir una separación cromática adecuada, pero la fase móvil propuesta, que consistía en metanol: agua (80:20, v/v) proporcionaba mejor resolución y sensibilidad de FLT e IS. La longitud de onda óptima para la detección era de 295 nm, con la que se obtenía una respuesta del detector ante la FLT mucho mejor. La velocidad de flujo con la que se obtenían mejores resultados, en términos de forma de pico de sensibilidad y tiempo de retención para liposomas, muestras de plasma y formas de dosificación farmacéutica en comprimidos, era de 1ml/min.

### *Características del pico cromatográfico*

Según las condiciones descritas, los tiempos de retención de la FLT fueron de aproximadamente 4,02 min. y 5,1 min. para el IS y la FLT en fase móvil y plasma de rata respectivamente. Los cromatogramas típicos de plasma de rata sin aditivos, plasma con IS, plasma con IS y FLT, fase móvil, fase móvil con IS

detector response for FLT was obtained. The flow rate was obtained as 1 ml/min with these conditions and this mobile phase composition, best results were obtained in terms of shape of peak sensitivity and retention time for liposomes, plasma samples and pharmaceutical tablet dosage forms.

### *Characteristics of the chromatographic peak*

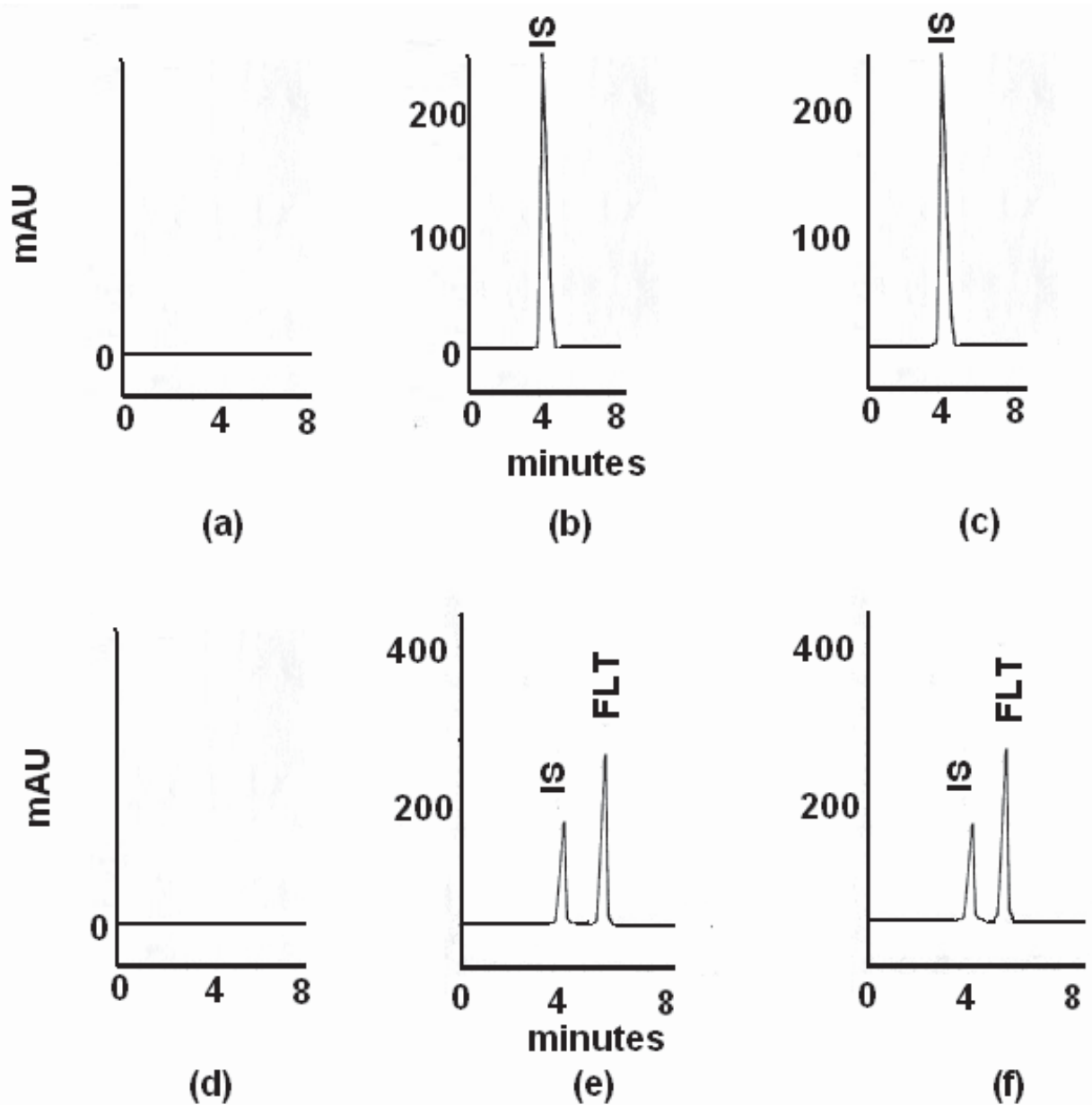
According to the conditions described, the retention times for FLT were about 4.02 min and 5.1 min for IS and FLT in mobile phase and rat plasma, respectively. Typical chromatograms of blank rat plasma, plasma with IS, plasma with IS and FLT, mobile phase, mobile phase with IS and mobile phase with IS and FLT are shown in Fig. 1.



y fase móvil con IS y FLT se muestran en la Fig. 1.

**FIGURA 1:** Cromatogramas de (a) fase móvil sin aditivos (b) fase móvil con IS (30  $\mu\text{g/ml}$ ) (c) plasma con IS (30  $\mu\text{g/ml}$ ) (d) plasma sin aditivos (e) fase móvil con IS (30  $\mu\text{g/ml}$ ) y FLT (2  $\mu\text{g/ml}$ ) y (f) plasma con IS (30  $\mu\text{g/ml}$ ) y FLT (2  $\mu\text{g/ml}$ )

**FIGURE 1:** Chromatograms of (a) blank mobile phase (b) mobile phase with IS (30  $\mu\text{g/ml}$ ) (c) plasma with IS (30  $\mu\text{g/ml}$ ) (d) blank plasma (e) mobile phase with IS (30  $\mu\text{g/ml}$ ) and FLT (2  $\mu\text{g/ml}$ ) and (f) plasma with IS (30  $\mu\text{g/ml}$ ) and FLT (2  $\mu\text{g/ml}$ )



*Validación**Validation*

## Linealidad

## Linearity

En las condiciones cromatográficas descritas en la sección experimental, se observó la relación lineal entre los índices del área pico de FLT y del IS con la concentración de FLT en la fase móvil y en las muestras de plasma de rata como se describe en la tabla 1. La ecuación de regresión media es:

Under the chromatographic conditions described in the experimental section, linear relationship was observed between the ratios of the peak area of FLT to that of IS to the concentration of FLT in mobile phase and rat plasma samples as described in Table 1. The average regression equation is:

$$y = 0,00348 (\pm 0,0000561) * C - 5,7E-04 (\pm 0,000105) \\ \text{para la fase móvil} \quad (\text{ecuación 3})$$

$$y = 0.00348 (\pm 0.0000561) * C - 5.7E-04 (\pm 0.000105) \\ \text{for mobile phase} \quad (\text{Equation 3})$$

$$y = 0,003324 (\pm 0,0000939) * C - 3,28E-04 (\pm 0,000111) \\ \text{para el plasma de sangre de rata} \quad (\text{ecuación 4})$$

$$y = 0.003324 (\pm 0.0000939) * C - 3.28E-04 (\pm 0.000111) \\ \text{for rat blood plasma} \quad (\text{Equation 4})$$

**TABLA 1:** Datos analíticos de los gráficos de calibración obtenidos por el método HPLC UV para la FLT

**TABLE 1:** Analytical data of the calibration graphs obtained by the HPLC UV method for FLT

Medio <i>Medium</i>	Rango de linealidad ( $\mu\text{g/ml}$ ) <i>Linearity range (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	Ecuación de calibración <sup>a</sup> <i>Calibration Equation<sup>a</sup></i>	r <sup>b</sup>	Sr <sup>c</sup>
Fase móvil <i>Mobile phase</i>	0.02-1	$y = 0.00348 (\pm 0.0000561) * C - 5.7E-04 (\pm 0.000105)$	0.9998	1.90454 E-05
Plasma	0.05-1	$y = 0.003324 (\pm 0.0000939) * C - 3.28E-04 (\pm 0.000111)$	0.9959	9.47668 E-05

<sup>a</sup> Relación del área pico de la FLT con la del estándar interno, y, frente a la concentración de FLT,  $C_{\text{FLT}}$ , en  $\mu\text{g/ml}$ ; ocho estándares. (n=5)

<sup>b</sup> Coeficiente de correlación.

<sup>c</sup> Error estándar de la estimación.

<sup>a</sup> Ratio of the peak area of the FLT to that of the internal standard, y, vs. concentration of FLT,  $C_{\text{FLT}}$ , in  $\mu\text{g/ml}$ ; eight standards. (n=5)

<sup>b</sup> Correlation Co-efficient.

<sup>c</sup> Standard error of the estimate.

El límite de detección  $D_L$  y el límite de cuantificación  $Q_L$  se alcanzaron según la definición de IUPAC<sup>15</sup> e ICH Topic Q2B,<sup>16</sup> utilizando la pendiente ( $b$ ) de la curva de calibración y la desviación estándar,  $Sá$ , de la interceptación ( $\hat{a}$ ) mediante la ecuación siguiente:

$$D_L = 3,3 * S\hat{a} / b \quad (\text{ecuación 5})$$

$$Q_L = 10 * S\hat{a} / b \quad (\text{ecuación 6})$$

El  $D_L$  fue de  $0,099 \mu\text{g/ml}$  y  $0,106 \mu\text{g/ml}$  en la fase móvil y en el plasma de sangre, y el  $Q_L$  fue de  $0,3 \mu\text{g/ml}$  y  $0,322 \mu\text{g/ml}$  en la fase móvil y en plasma de sangre, respectivamente.

#### Exactitud, precisión y robustez

La precisión intradía y la exactitud del método se evaluaron mediante la FLT en la fase móvil y el análisis de las muestras de plasma por adición a concentraciones bajas ( $50 \text{ ng/ml}$ ), medias ( $100 \text{ ng/ml}$ ) y altas ( $500 \text{ ng/ml}$ ). Se analizaron cinco réplicas de cada concentración, cuyos resultados se indican en la tabla 2. Para evaluar la precisión, se calcularon los valores medios y porcentuales de RSD en cada concentración. La precisión intradía fue aceptable, encontrándose los valores porcentuales de RSD entre  $0,2$  y  $1,39 \%$  en la fase móvil y entre  $0,18$  y  $0,78 \%$  en el plasma. Además, la exactitud se evaluó mediante el cálculo del error porcentual relativo ( $Er \%$ ), que se encontraba entre  $-0,06$  y  $0,42 \%$  en la fase móvil y entre  $-0,51$  y  $-0,37$  en el plasma. Los datos de precisión y exactitud interdía también se determinaron mediante el análisis de tres lotes de muestra de plasma a concentración baja, alta y media en cinco días distintos. Los valores de  $\% \text{ RSD}$  y  $Er \%$  interdía se encontraban entre  $0,26$  y  $1,13 \%$  y entre  $-1,16$  y  $1,1 \%$  en la fase móvil, y entre  $0,27$  y  $1,43 \%$  y  $-2$  y  $0,08 \%$  en plasma, respectivamente. Los resultados también se indican en la tabla 2. En el estudio de robustez, se utilizaron diferentes columnas analíticas y de guardia, como se ha mencionado en la sección experimental, sin variaciones significativas en los resultados cromatográficos. Al aumentar la temperatura de la columna a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , el tiempo de retención no se modificó. Un elevado

The limit of detection  $D_L$  and the limit of quantitation  $Q_L$  were attained as defined by IUPAC<sup>15</sup> and ICH Topic Q2B,<sup>16</sup> using the slope ( $b$ ) of the calibration curve and the standard deviation,  $S\hat{a}$ , of the intercept ( $\hat{a}$ ) by the following equation:

$$D_L = 3.3 * S\hat{a} / b \quad (\text{Equation 5})$$

$$Q_L = 10 * S\hat{a} / b \quad (\text{Equation 6})$$

The  $D_L$  was found to be  $0.099 \mu\text{g/ml}$  and  $0.106 \mu\text{g/ml}$  in mobile phase and in blood plasma and  $Q_L$  was found to be  $0.3 \mu\text{g/ml}$  and  $0.322 \mu\text{g/ml}$  in mobile phase and in blood plasma, respectively.

#### Accuracy, precision and robustness

Intra-day precision and accuracy of method were assessed by FLT in mobile phase and analyzing spiking plasma samples at low ( $50 \text{ ng/ml}$ ), medium ( $100 \text{ ng/ml}$ ) and high ( $500 \text{ ng/ml}$ ) concentration. Five replicate of each concentration were analyzed and results are given in Table 2. To evaluate precision, the mean values and the  $\% \text{ RSD}$  values were calculated for each concentration. The intra-day precision was found to be acceptable, with the  $\% \text{ RSD}$  values ranging from  $0.2$  to  $1.39 \%$  for mobile phase and from  $0.18$  to  $0.78 \%$  for plasma. Moreover, the accuracy was assessed by calculating the relative percentage error ( $Er \%$ ), which ranged from  $-0.06$  to  $0.42 \%$  for mobile phase and from  $-0.51$  to  $-0.37$  for plasma. The inter-day data for precision and accuracy was also determined by analyzing three sample batches of plasma at low, medium and high concentration on five separate days. The inter-day  $\% \text{ RSD}$  and  $Er \%$  values are ranged from  $0.26$  to  $1.13 \%$  and  $-1.16$  to  $1.1 \%$  for mobile phase and from  $0.27$  to  $1.43 \%$  and  $-2$  to  $0.08 \%$  for plasma, respectively. Results are also presented in Table 2. In robustness study, different analytical columns and guard columns, as mentioned in experimental section, were successfully used with no significant variations in the chromatography results. If the temperature of column was increased to  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , the retention time were not modified. A high percentage of methanol ( $5 \%$  v/v more) in the mobile phase decreased 6-

porcentaje de metanol (5% v/v más) en la fase móvil disminuyó los tiempos de retención de la 6-MP y la FLT (de 4,02 y 5,1 min. a 3,036 min. y 4,1 min. respectivamente) elucionando ambos picos más estrechamente. La variación en el índice de flujo dio como resultado cambios en los tiempos de retención, prolongando el tiempo del cromatograma. No obstante, ningún parámetro, ampliado a límites específicos, tuvo como resultado un efecto adverso dramático en la idoneidad del sistema.

MP and FLT retention times (3.036 min and 4.1 min from 4.02 and 5.1 min, respectively) eluting both peaks more closely. Variation in flow-rate resulted in the change in retention times, prolonging the chromatogram time. Nevertheless, no single parameter, extended to specific limits, resulted in a dramatic adverse effect on the system suitability.

**TABLA 2:** Precisión y exactitud del análisis intradía e interdía para la determinación de FLT en fase móvil y plasma de rata mediante HPLC

**TABLE 2:** Precision and accuracy of intra-day and inter-day analysis for determination of FLT in mobile phase and rat plasma by HPLC

Concentración nominal (ng/ml) <i>Nominal concentration (ng/ml)</i>	Media $\pm$ SD <i>Mean <math>\pm</math> SD</i>		RSD (%) <sup>a</sup>		Er (%) <sup>b</sup>	
	Fase móvil <i>Mobile phase</i>	Plasma <i>Plasma</i>	Fase móvil <i>Mobile phase</i>	Plasma <i>Plasma</i>	Fase móvil <i>Mobile phase</i>	Plasma <i>Plasma</i>
Intradía (n=5) <i>Intra-day (n=5)</i>						
50	50.08 ( $\pm$ 0.35)	49.78 ( $\pm$ 0.39)	0.69	0.78	0.16	-0.44
100	100.42 ( $\pm$ 1.40)	99.63( $\pm$ 0.18)	1.39	0.180	0.42	-0.37
500	499.67 ( $\pm$ 1.20)	497.45 ( $\pm$ 1.14)	0.24	0.22	-0.06	-0.51
Interdía (n=5) <i>Inter-day (n=5)</i>						
50	49.19 ( $\pm$ 0.49)	49.0 ( $\pm$ 0.53)	0.99	1.08	-1.62	-2
100	101.1( $\pm$ 1.5)	98.67( $\pm$ 1.42)	1.13	1.43	1.1	-1.33
500	499.24 ( $\pm$ 1.3)	500.42 ( $\pm$ 1.4)	0.26	0.27	-0.15	0.08

<sup>a</sup> Desviación estándar porcentual relativa = [(SD/Media)x100].

<sup>b</sup> Error porcentual relativo = [concentración del ensayo – concentración nominal ]/ concentración nominal] x 100.

<sup>a</sup> Percent relative standard deviation= [(SD/Mean)x100].

<sup>b</sup> Relative percentage error= [assayed concentration – nominal concentration ]/ nominal concentration] x 100.

### Aplicación del método

#### Aplicación a los liposomas

El método propuesto se podría utilizar para determinar el efecto de los parámetros de formulación en el % EC de FLT en los liposomas. El % EC se calculó mediante la ecuación (2). Estos parámetros se trazaron como la fracción molar de fármaco: lípido y la fracción molar de PC: CHOL en relación al % EC. Los resultados se indican en las figuras 2 y 3. Estaba claro que el % EC de FLT en los liposomas aumentaba con la fracción molar de fármaco: lípido. Además, la fracción molar de PC: CHOL también es un parámetro que afecta al % EC de FLT en los liposomas. La capacidad de carga de fármaco de los lípidos utilizados es de 23  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de lípido. Este método se verificó mediante la replicación de las estimaciones de liposomas, y los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente.

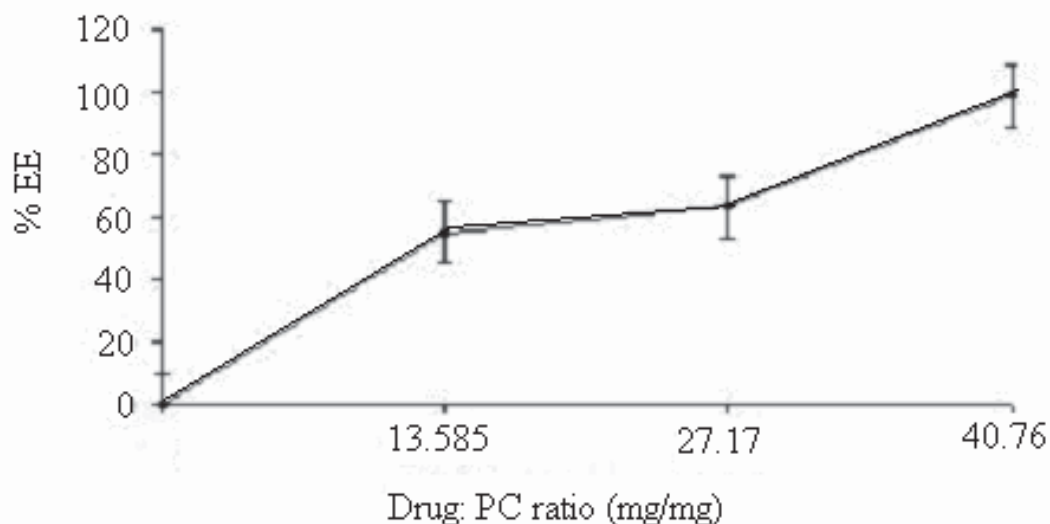
### Application of the method

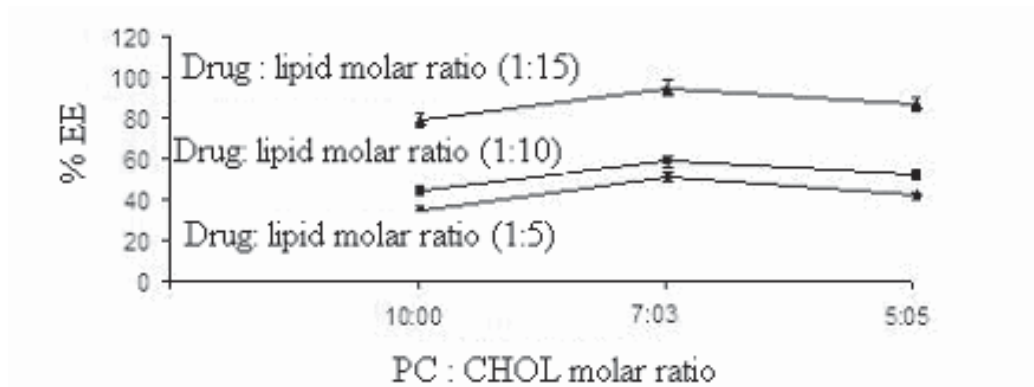
#### Application to liposomes

The proposed method could be used to determine the effect of formulation parameters on % EE of FLT in liposomes. The % EE was calculated by means of Eq (2). These parameters were plotted as the molar ratio of drug: lipid and the molar ratio of PC: CHOL against % EE. The results are reported in Fig (2 & 3). It was clear that the % EE of FLT in liposomes increased with the molar ratio of drug: lipid. Furthermore, the molar ratio of PC: CHOL is also an affecting parameter for % EE of FLT in liposomes. The drug loading capacity of used lipids is 23  $\mu\text{g}/\text{mg}$  of lipid. This method was verified by means of replicate estimations of liposomes and results obtained were evaluated statistically.

**FIGURA 2:** Efecto de la fracción molar fármaco: lípido en el % EC de FLT en liposomas.

**FIGURE 2:** Effect of Drug: lipid molar ratio on % EE of FLT in liposomes.



**FIGURA 3:** Efecto de la fracción molar PC: CHOL en el % EE de FLT en liposomas**FIGURE 3:** Effect of PC: CHOL molar ratio on % EE of FLT in liposomes

#### Aplicación a las muestras de plasma de rata

El presente estudio se aplicó para determinar la FLT en plasma de rata. La tabla 1 muestra los parámetros de la ecuación de calibración. Los parámetros de validación relacionados y los resultados de recuperación obtenidos en las muestras de plasma se indican en las tablas 2 y 3 respectivamente. La estimación de fármaco en plasma requiere la preparación de muestras durante largo tiempo, el uso de disolventes orgánicos y otros productos químicos caros. Aquí, las proteínas plasmáticas se precipitan en la fase móvil (metanol: agua 80:20, v/v) y la mezcla se agita y se centrifuga a 5000 g durante 10 min. El sobrenadante se extrajo cuidadosamente, se diluyó con la fase móvil, se inyectó directamente en la columna y se analizó. La figura 1 (d, c y f) muestra el cromatograma de plasma sin aditivos, plasma con IS y plasma con FLT e IS, respectivamente. Muestra que no hay interferencia de las sustancias endógenas presentes en el plasma. Mediante este método se consiguió una buena recuperación de FLT del plasma de rata, como se indica en la tabla 3.

#### Application to rat plasma samples

The present study was applied to determine FLT in rat plasma. Table 1 shows the calibration equation parameters. The related validation parameters and obtained recovery results of plasma samples are given in Tables 2 and 3, respectively. The estimation of drug in plasma requires time-consuming sample preparation, use of expensive organic solvents and other chemicals. Here, the plasma proteins are precipitated in mobile phase (methanol: water 80:20, v/v) and the mixture is vortexed and centrifuged at 5000 g for 10 min. The supernatant was taken carefully and diluted with mobile phase and directly inject to column and analyzed. Figure 1 (d, c and f) shows the chromatogram of blank plasma, plasma with IS and plasma with FLT and IS, respectively. It shows that no interference from the endogenous substances present in plasma. Good recovery of FLT was achieved from rat plasma by this method as per Table 3.

Aplicación a la forma de dosificación

El mismo método se podría aplicar a la determinación de FLT en comprimidos sin necesidad de separar excipientes. La tabla 3 muestra el contenido en fármaco de este producto según la indicación de la etiqueta. La utilidad de este método se verificó mediante la replicación de las estimaciones de los comprimidos, y los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente. Se realizaron estudios de exactitud y precisión de la técnica propuesta en comprimidos. Los datos de los estudios de recuperación se resumen en la tabla 3. Se concluye que el método propuesto es lo suficientemente exacto y preciso como para poder ser aplicado en las formas de dosificación farmacéutica. Los datos del elevado porcentaje de recuperación muestran que en el método propuesto no interfieren los excipientes utilizados en la formulación de los comprimidos.

Application to dosage form

The same method could be applied for determination of FLT in tablet without separating excipients. Table 3 shows the drug content of this product is as per labeled claim. The utility of this method was verified by means of replicate estimations from the tablets and results obtained were evaluated statistically. Recovery studies were realized from the tablets for accuracy and precision of the proposed technique. The data of recovery studies is summarized in Table 3. It is concluded that the proposed method is sufficiently accurate and precise in order to be applied to pharmaceutical dosage forms. High percentage of recovery data shows that the proposed method is free from the interferences of the excipients used in the tablet formulation.

**TABLA 3:** Estudio de determinación y recuperación de FLT en formas de dosificación en comprimidos y plasma de rata.

**TABLE 3:** Determination and recovery study of FLT in tablet dosage form and rat plasma.

	Comprimido <i>Tablet</i>	Plasma <i>Plasma</i>
Indicación de la etiqueta (mg por comprimido) <i>Labeled claim (mg per tab)</i>	250	-
Media de la cantidad encontrada (n=5) <i>Mean of amount found (n=5)</i>	249,21	-
RSD % de la cantidad encontrada <i>RSD % of amount found</i>	0,481521608	-
Añadida (n=5) <i>Added (n=5)</i>	1 mcg/ml	0,5
Recuperada (n=5) <i>Recovered (n=5)</i>	0,996 mcg/ml	0,496
% de recuperación <i>Recovery %</i>	99,6	99,2
RSD % de recuperación <i>RSD % of recovery</i>	0,803212851	1,209677419

CONCLUSIÓN

El ensayo es un método selectivo, sensible y reproducible para la determinación y separación de flutamida en productos farmacéuticos de muestras biológicas y restos de excipientes y materiales utilizados para preparar

CONCLUSION

The assay is a selective, sensitive and reproducible method for the separation and determination of flutamide in pharmaceuticals from biological samples and the rest of excipients and materials used to prepare the dosa-

la forma de dosificación. La precisión y la exactitud del método propuesto se encuentran dentro de límites aceptables, y el límite de cuantificación también es bajo. Este método permite la determinación de flutamida en una pequeña cantidad de plasma de rata sin llevar a cabo ningún procedimiento de extracción. Por tanto, este método se puede considerar de interés real para la realización de estudios farmacocinéticos y clínicos rápidos y fiables de la flutamida.

ge form. The precision and accuracy of the proposed method are within acceptable limits and the quantitation limit is also low. This method permits the determination of flutamide in a small amount of rat plasma without any extraction procedure. Therefore, this method can be considered to be of real interest for the rapid and reliable clinical and pharmacokinetic studies of flutamide.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a TIFAC- CORE por proporcionar la infraestructura, a Coral Drugs Pvt. Ltd., Nueva Delhi; India, por proporcionar la muestra gratuita de flutamida, y a AICTE por la concesión de la beca de doctorado nacional a Umrethia ML.

### ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to TIFAC- CORE for providing the infrastructure, Coral Drugs Pvt. Ltd., New Delhi; India for free gift sample of flutamide and AICTE for awarded as National Doctoral Fellow to Umrethia ML.

### BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Goldspiel BR, Kholer DR, Flutamide: an antiandrogen for advanced prostate cancer. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy* 1990; 24: 611-623.
2. Berson A., Wolf C., Chachaty C., Metabolic activation of the nitro aromatic antiandrogen flutamide by rat and human cytochromes P-450, including forms belonging to the 3A and 1A subfamilies *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1993; 265: 366-372.
3. Schulz M., Schmoltdt A., Donn F., Becker H., The pharmacokinetics of flutamide and its major metabolites after a single oral dose and during chronic treatment. *Eur.J.Clinical. Pharmacol.* 1988; 34: 633-636.
4. Brogden R., Clissold S., Flutamide: A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetics properties, and its therapeutic efficacy in advanced prostate cancer. *Drugs* 1989; 38:185-203.
5. Aso Y., Akaza H., Koiso K., Kumamoto Y., Hawai T., Origasa S., Hinyokika Kiyo 1993; 39: 381-389.
6. Chabner BA, Allegra CJ, Curt CA, Calabresi P., in: A. Goodman, J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Milinoff, R.W. Ruddan (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed., Mc-Graw Hill, Mexico, 1996, pp. 1309-1367.
7. Squella JA, Pena C., Alvarez-Lueje A., *Electrochemical Study of Flutamide, an Anticancer Drug, and Its Polarographic, UV Spectrophotometric and HPLC Determination in Tablets.* *Electroanalysis* 1998;10(15): 1043-51.
8. Miranda A, Caraballo I, Millan M., Stability study of flutamide in solid state and in aqueous solution. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2002; 28(4): 413 - 422.
9. Campanero MA, Sacaba B, Garcia-Quejglas E, Development of a sensitive method for the determination of ganciclovir by reversed-phase high-performance liquid chromatography *J.Chromatogr.B* 1998; 706: 311-317.
10. Zhong Z, Yum KT, Diakur J, Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin flutamide inclusion complex II: Oral and intravenous pharmacokinetics in rats. *J.Pharm.Pharmaceut.Sci*, 2002; 5(3): 292-298.
11. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC, Preparation of multilamellar vesicles of defined size-distribution by solvent-spherule evaporation. *J. Mol. Biol.* 1965; 13: 238-252.
12. Betagiri GV, Jenkins SA, Parsons DL, *Liposomal Drug Delivery Systems*, tenth ed., Technomic Publications, Lancaster, 1993.
13. Merodia M, Mirshahi T, Mirshahi M, Development of a sensitive method for the determination of ganciclovir by reversed-phase high-performance liquid chromatography *J.Chromatogr.* 2000; 870: 159-167.
14. Bhalerao SS, Harshal AR, Preparation, optimization, characterization, and stability studies of salicylic acid. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2003; 29(4): 451-467.
15. Winefordner JD, Long GL, Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* 1983; 55: 712A-724A.
16. ICH Topic Q2B, *Pharmaceutica*, 8. 1996; 108-111.