

# Nghiên cứu tổng hợp thuốc generic letrozole quy mô 100 g/mẻ đạt tiêu chuẩn dược điển USP38

Nguyễn Cửu Khoa<sup>1,2</sup>, Nguyễn Đại Hải<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 28/2/2018; ngày chuyển phản biện 2/3/2018; ngày nhận phản biện 3/4/2018; ngày chấp nhận đăng 9/4/2018

## Tóm tắt:

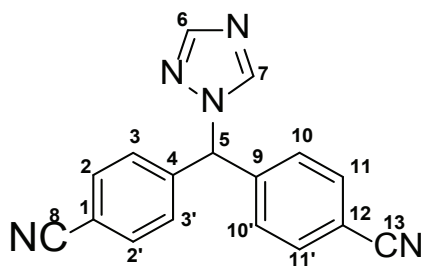
Trong nghiên cứu này, letrozole (quy mô 100 g/mẻ) được tổng hợp thành công từ phản ứng giữa 4-[1-(1,2,4-triazolyl)methyl]benzonitrile (TMB) và p-fluorobenzonitrile với sự có mặt của tác nhân deproton hóa potassium tert-butoxide (t-BuOK) trong dung môi tetrahydrofuran (THF). Letrozole thô sau phản ứng được kết tinh lại hai lần trong hỗn hợp n-hexane:ethyl acetate với tỷ lệ 3:1. Sản phẩm được xác định cấu trúc và tính chất bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (<sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR), khối phổ (MS). Các chỉ tiêu về định tính [phổ hồng ngoại (FTIR), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)], định lượng (HPLC), cân sau nung, tạp chất liên quan A và hàm lượng nước theo quy định của dược điển USP38. Kết quả cho thấy, letrozole có độ tinh khiết đạt 99,79%, các chỉ tiêu khác đều đạt tiêu chuẩn của dược điển USP38. Kết quả đánh giá độ ổn định cho thấy: Sản phẩm có hạn sử dụng trên 24 tháng.

**Từ khóa:** Letrozole, thuốc generic, TMB, ung thư vú.

**Chỉ số phân loại:** 3.4

## Giới thiệu

Nghiên cứu tổng hợp và sản xuất các loại thuốc generic (thuốc đã đăng ký nhưng hết hạn bảo hộ bản quyền và đã được sử dụng) được hầu hết các quốc gia quan tâm, trong đó có Việt Nam. Tuy nhiên, các loại thuốc generic do Việt Nam sản xuất chủ yếu chỉ thực hiện phần bào chế với các hoạt chất nhập khẩu từ nước ngoài [1]. Để có thể chủ động nguồn nguyên liệu thuốc generic, việc nghiên cứu tổng hợp, tiến tới sản xuất các dược chất tại Việt Nam là hết sức cần thiết.

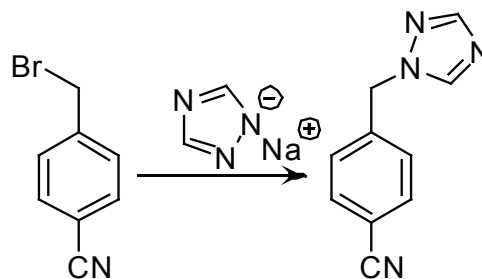


Hình 1. Cấu trúc hóa học letrozole.

Letrozole là một dược chất ức chế enzyme aromatase non-steroid có chọn lọc (hình 1). Enzyme này đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hormone androgen thành hormone estrogen ở phụ nữ sau mãn kinh. Thuốc ức chế enzym aromatase bằng cách gắn kết cạnh tranh với thành phần heme của thành phần sắc tố tế bào P450 ở enzyme này, làm giảm quá trình sinh tổng hợp estrogen ở tất cả các mô.

Thuốc làm giảm nồng độ estrogen ở phụ nữ sau mãn kinh và giúp làm chậm lại hoặc đảo ngược sự phát triển của một số khối u vú cần estrogen để phát triển. Thuốc được chỉ định cho điều trị ung thư vú sau phẫu thuật. Letrozole giúp cải thiện tình trạng bệnh nhân ung thư vú đã điều trị bằng việc uống tamoxifen 5 năm sau phẫu thuật, cải thiện khả năng sống nhờ ngăn chặn sự tái phát và di căn của ung thư [2, 3]. Trên thế giới, đã có rất nhiều nghiên cứu đề cập đến quá trình tổng hợp letrozole. Tuy nhiên, các nghiên cứu này hầu hết đều tập trung vào khả năng chọn lọc vị trí của phản ứng alkyl hóa vòng 1,2,4-triazole [4-6].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tổng hợp letrozole qua hai giai đoạn: (1) Tổng hợp TMB và (2) Tổng hợp letrozole. Ở giai đoạn 1, tiền chất TMB được tổng hợp thành công từ 4-bromomethylbenzonitrile và 1,2,4-triazole sodium, sử dụng dung môi acetone ở nhiệt độ sôi (hình 2).



Hình 2. Phản ứng tổng hợp TMB.

\*Tác giả liên hệ: Email: nguyendaihai0511@gmail.com

# Research on the synthesis of generic drug - letrozole on a scale of 100 g per batch conforming to the United State Pharmacopeia (USP38)

Cuu Khoa Nguyen<sup>1,2</sup>, Dai Hai Nguyen<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate University of Science and Technology, VAST

<sup>2</sup>Institute of Applied Materials Science, VAST

Received 28 February 2018; accepted 9 April 2018

## Abstract:

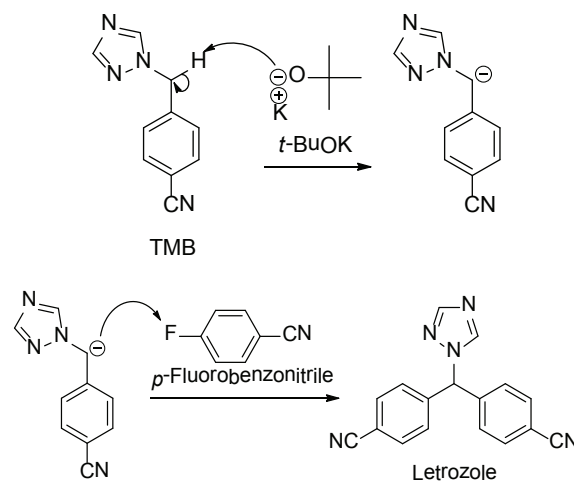
In this research, letrozole, on a scale of 100 g/batch, was successfully synthesized via the reaction between 4-[1-(1,2,4-triazolyl)methyl] benzonitrile (TMB) and *p*-fluorobenzonitrile, with the aid of deprotonated agent called potassium tert-butoxide (*t*-BuOK) dissolved in tetrahydrofuran (THF). The crude letrozole was recrystallized twice using the mixture of *n*-hexane:ethyl acetate (the ratio 3:1). The chemical structure and properties of the obtained product were characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR) and mass spectroscopy (MS). Standards of detection (Fourier transform infrared (FTIR), high performance liquid chromatography (HPLC)) and quantification (HPLC), impurities, and the standard amount of water conformed in the United State Pharmacopeia (USP 38) were also examined. According to the results, the purity of letrozole was 99.79%; besides, other criterions also met the quality standard of USP 38. Both stability test and accelerated aging test showed that the synthesized letrozole had the shelf life of more than 2 years.

**Keywords:** Breast cancer, generic drug, letrozole, TMB.

**Classification number:** 3.4

Ở giai đoạn 2, letrozole được tổng hợp từ hai tiền chất chính là chất trung gian TMB và *p*-fluoro-benzonitrile, với tác nhân deproton hóa *t*-BuOK. Về mặt cơ chế, đầu tiên, dẫn xuất triazole bị deproton hóa ở carbon methylene bởi tác nhân *t*-BuOK. Carbanion hình thành sẽ đóng vai trò như một tác nhân thân hạch tác kích vào chất nền *p*-fluorobenzonitrile theo cơ chế cộng - khử và loại bỏ F theo cơ chế thế thân hạch trên nhân thơm (S<sub>N</sub>Ar) (hình 3). Chất trung gian và sản phẩm được tinh chế để đạt được độ tinh khiết theo yêu cầu. Letrozole sau tinh chế được phân tích cấu trúc bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (<sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR), khối

phổ (MS). Các chi tiêu về định tính [phổ hồng ngoại (FTIR), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)], định lượng (HPLC), cân sau nung, tạp chất liên quan A và hàm lượng nước theo quy định của dược điển USP38. Độ ổn định của sản phẩm được xác định ở điều kiện lão hóa cấp tốc (nhiệt độ 40±2°C, độ ẩm tương đối 75±5%) và điều kiện thường (nhiệt độ 30±2°C, độ ẩm tương đối 75±5%). Ngoài ra, độc tính cấp và độc tính bán trường diễn cũng được thực hiện nhằm đánh giá độc tính của sản phẩm.



Hình 3. Phản ứng tổng hợp letrozole.

## Thực nghiệm

### Hóa chất

4-fluorobenzonitrile 99%, *t*-BuOK 98% (Acros); ammonium acetate, ethyl acetate, sodium hydrogen carbonate, acetic acid glacial extra pure; acetonitrile HPLC grade (Fisher); magnesium sulfate anhydrous, *n*-hexane 99,5%, tetrahydrofuran, water HPLC grade ACS reagent grade (Fisher); 4-[1-(1,2,4-triazolyl)-methyl]benzonitrile (Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng, TCCS).

### Tổng hợp letrozole thô

Quy trình tổng hợp letrozole thô được thực hiện qua 6 bước: (1) Cho *t*-BuOK (174,1 g; 2,8 eq.)/THF khan (1:1) vào bình phản ứng dung tích 20 l đã được làm lạnh -10°C, khuấy và thổi khí nitơ liên tục. (2) Sau khi *t*-BuOK tan hoàn toàn, nhỏ dung dịch TMB (100 g; 1,0 eq.)/THF (1:1) vào bình phản ứng trong 1 giờ. Tiếp tục khuấy hỗn hợp thêm 2 giờ, giữ ở nhiệt độ -10°C. (3) Thêm từng giọt *p*-fluorobenzonitrile (99,5 g; 1,5 eq.)/THF khan vào bình phản ứng trong 30 phút. Khuấy và giữ nhiệt độ bình phản ứng thêm 2 giờ. Phản ứng được theo dõi bằng TLC với hệ dung môi giải ly ethyl acetate:*n*-hexane. (4) Sau khi phản ứng kết thúc, pha loãng hỗn hợp với ethyl acetate khan và lọc nhanh qua cột (flask chromatography). (5) Cô quay chân không, acid hóa hỗn hợp bằng dung dịch acid acetic/nước

đến pH=2. Sau đó, trung hòa lại dung dịch bằng NaHCO<sub>3</sub> đến pH 7. (6) Chiết dung dịch bằng ethyl acetate, làm khan bằng MgSO<sub>4</sub> để thu sản phẩm letrozole thô.

Tiến hành lặp lại 5 lần thí nghiệm như trên để đánh giá độ ổn định của quy trình. Độ tinh khiết của sản phẩm được xác định bằng phương pháp HPLC theo quy định của dược điển USP38.

### Tinh chế letrozole

Letrozole thô được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại 2 lần trong hỗn hợp n-hexane:ethyl acetate (tỷ lệ 3:1). Quy trình tinh chế được thực hiện như sau: Cân 120 g sản phẩm letrozole thô cho vào bình phản ứng dung tích 20 l. Thêm dần 8 l hỗn hợp dung môi n-hexane:ethyl acetate tỷ lệ 3:1, khuấy và gia nhiệt hỗn hợp trong bình đến điểm sôi. Lọc hỗn hợp dung dịch rồi cho vào thiết bị làm lạnh ở 0-5°C qua đêm. Lọc lấy sản phẩm kết tinh bằng phễu Buchner. Làm khô bằng bơm chân không trong 1 giờ. Quá trình kết tinh lại được tiến hành 2 lần liên tục để thu được letrozole tinh chế.

Tiến hành lặp lại 5 lần thí nghiệm để đánh giá độ ổn định của quy trình. Độ tinh khiết của sản phẩm được xác định bằng phương pháp HPLC theo quy định của dược điển USP38, cụ thể:

Điều kiện sắc ký: Hệ thống UHPLC Plexar (PerkinElmer, Mỹ), cột C<sub>18</sub> (4,6 x 150 mm) ở nhiệt độ 25°C, đầu dò Plexar PDA Plus tại bước sóng 230 nm; thể tích tiêm mẫu: 20 µl; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; nồng độ mẫu đo: 10 µg/ml; pha động: Chạy chế độ gradient (bảng 1).

**Bảng 1. Chương trình chạy HPLC.**

Thời gian (phút)	Nước (%)	Acetonitrile (%)
0	70	30
25	30	70

### Đánh giá độ ổn định và thời gian bảo quản

Thời gian bảo quản của letrozole sau tinh chế được thực hiện ở điều kiện lão hóa cấp tốc với 3 mẫu từ 3 mg letrozole tinh chế, tương ứng với Let-01, Let-02 và Let-03. Mẫu được đặt trong chai thủy tinh nâu có nắp đậy và được bảo vệ trong túi nhôm. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 40±2°C, độ ẩm tương đối 75±5% trong thời gian 6 tháng. Đánh giá tính chất và hàm lượng ở thời điểm 0, 1, 3 và 6 tháng. Từ đó đề xuất hạn sử dụng cho sản phẩm [7]. Ngoài ra, độ ổn định ở điều kiện thường của letrozole được đánh giá dựa trên hướng dẫn của ICH ở điều kiện nhiệt độ 30±2°C và độ ẩm tương đối 75±5% trong vòng 24 tháng. Mẫu thử là 3 mg letrozole tinh chế, tương ứng với mẫu Let-01-RT, Let-02-RT và Let-03-RT. Các mẫu được theo dõi về tính chất và hàm lượng ở thời điểm 0, 3, 6, 12 và 24 tháng.

### Đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn

Độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của letrozole được thực hiện tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

- Thử độc tính cấp: Tiến hành trên 70 con chuột nhắt trắng giống Swiss albino, chia làm 6 nhóm với 6 liều lượng khác nhau (0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 g/kg chuột). Cho chuột nhịn ăn 3-4 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống theo nhu cầu. Cho chuột uống hỗn dịch letrozole. Theo dõi biểu hiện ngộ độc của chuột sau khi uống hỗn dịch với tần suất khoảng 15 phút/1 lần trong vòng 1 giờ đầu và giãn dần tần suất trong vòng 24 giờ đầu.

- Thử độc tính bán trường diễn: Tiến hành trên 40 thỏ cái Newzealand, chia làm 4 nhóm (1 nhóm chứng và 3 nhóm uống thuốc với liều 0,078; 0,155; 0,31 mg/kg thỏ) trong vòng 90 ngày. Theo dõi thỏ hàng ngày về mức độ tiêu thụ thức ăn, nước uống, thể trạng và vận động, tình trạng phân, nước tiểu, các biểu hiện bất thường của thỏ. Xét nghiệm các chỉ số huyết học và sinh hóa. Sau thử nghiệm, thỏ được mổ để quan sát đại thể các tổ chức tim, gan, thận, phổi, dạ dày, ruột, tuyến thượng thận và buồng trứng.

### Kết quả và thảo luận

#### Tổng hợp letrozole thô

Kết quả tổng hợp letrozole thô ở quy mô 100 g/mg cho hiệu suất phản ứng đạt 74,2±0,6%. Độ tinh khiết sản phẩm (5 lần lặp lại) đạt 92,47±0,9%. Tuy nhiên, sản phẩm cần được tinh chế để độ tinh khiết đạt tiêu chuẩn dược dụng (tối thiểu 98,5%). Độ lệch chuẩn tương đối về hiệu suất và độ tinh khiết sản phẩm lần lượt là 0,81% và 0,97%. Giá trị này nhỏ hơn 2%, nên quy trình đạt được độ ổn định.

#### Tinh chế letrozole

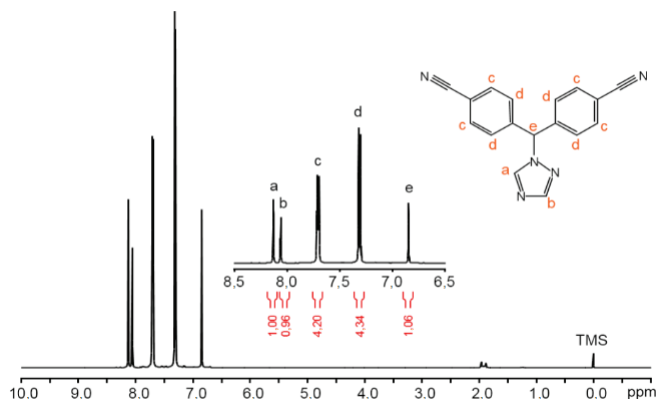
Kết quả lặp lại 5 lần quy trình tinh chế letrozole ở quy mô 100 g/mg cho hiệu suất tinh chế và độ tinh khiết đạt lần lượt là 82,3±1,9% và 99,79±0,05%. Độ tinh khiết của sản phẩm sau tinh chế đạt yêu cầu về dược dụng.

Độ lệch chuẩn tương đối về hiệu suất và độ tinh khiết của quy trình tinh chế lần lượt đạt 1,7% và 0,05%. Giá trị này nhỏ hơn 2%, nên quy trình tinh chế letrozole đạt được độ ổn định [8].

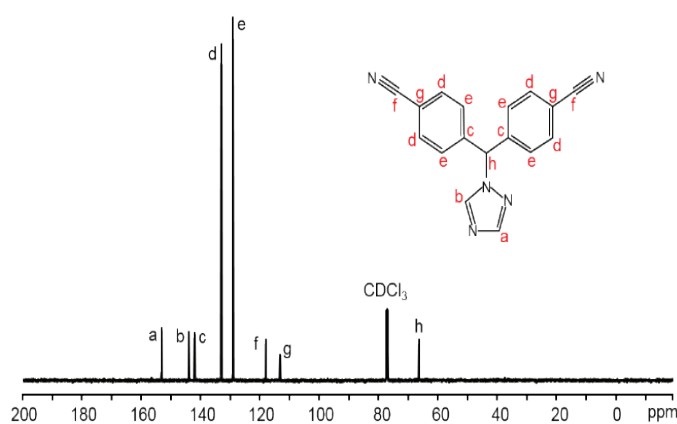
Kết quả phân tích cấu trúc sản phẩm cho thấy: Phổ <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) xuất hiện 2 tín hiệu của 2 proton gắn trên vòng triazole [ $\delta_H$  8,13 ppm; H<sub>a</sub>], [ $\delta_H$  8,06 ppm; H<sub>b</sub>]; 2 mũi chẻ đôi của các proton trên vòng thơm [ $\delta_H$  7,70 ppm; (4H; d; J=8,5 Hz; H<sub>c</sub>)], [ $\delta_H$  7,30 ppm; (4H; d; J=8,5 Hz; H<sub>d</sub>)]; 1 proton ở carbon tam cấp nằm gần nhóm triazole [ $\delta_H$  6,84 ppm; H<sub>e</sub>] tương ứng với cấu trúc của letrozole chuẩn [9, 10] (hình 4).

Phổ <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) xuất hiện 2 tín hiệu của

2 carbon tam cấp của vòng triazole [ $\delta_c$  153,0 ppm; C<sub>a</sub>], [ $\delta_c$  143,8 ppm; C<sub>b</sub>]; 2 tín hiệu của carbon thơm tứ cấp [ $\delta_c$  141,9 ppm; C<sub>c</sub>], [ $\delta_c$  113,2 ppm; C<sub>g</sub>]; 2 tín hiệu của carbon thơm tam cấp [ $\delta_c$  132,9 ppm; C<sub>d</sub>], [ $\delta_c$  128,9 ppm; C<sub>e</sub>]; 1 tín hiệu của 2 carbon nhóm nitrile [ $\delta_c$  117,9 ppm; C<sub>f</sub>]. Ở vùng trường cao, xuất hiện 1 tín hiệu carbon tam cấp [ $\delta_c$  66,3 ppm; C<sub>h</sub>] tương ứng với cấu trúc của letrozole [9, 10] (hình 5).

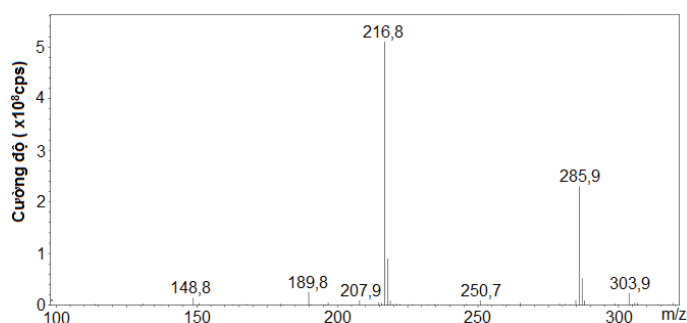


Hình 4. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của sản phẩm letrozole.



Hình 5. Phổ <sup>13</sup>C-NMR của sản phẩm letrozole.

Khối phổ của sản phẩm được xác định bằng kỹ thuật ion hóa electron ESI-MS cho tín hiệu của peak ion giả phân tử m/z = 285,9 [M-H]<sup>+</sup> tương ứng với công thức phân tử của letrozole: C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub> (hình 6).



Hình 6. Phổ MS của sản phẩm letrozole.

Kết quả kiểm nghiệm cho thấy sản phẩm đạt các tiêu chuẩn của dược điển USP38 [11], trong đó:

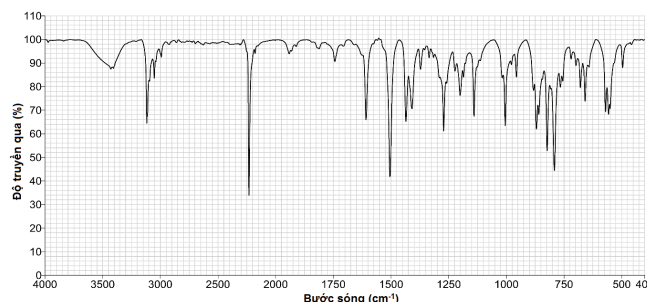
**Định tính:** phổ IR và HPLC cho kết quả đúng với chất chuẩn USP Letrozole RS (hình 7 và 8).

**Định lượng đạt:** 99,73±0,33% (yêu cầu: 98-102%).

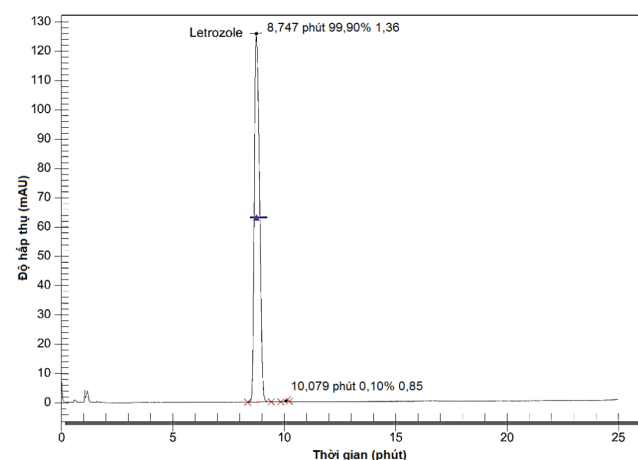
**Cẩn sau nung tối đa đạt:** 0,024% (yêu cầu: <0,1%).

**Tạp chất liên quan A tối đa đạt:** 0,04% (yêu cầu: 0,3%).

**Hàm lượng nước tối đa đạt:** 0,26% (yêu cầu: <0,3%).



Hình 7. Phổ IR của sản phẩm letrozole.



Hình 8. Sắc ký đồ HPLC của sản phẩm letrozole.

#### Đánh giá độ ổn định và thời gian bảo quản

Tại thời điểm 24 tháng, kết quả hàm lượng thấp nhất ở các mẻ là 96,29% tính theo sản phẩm khan. Theo hướng dẫn “Đánh giá dữ liệu về độ ổn định” (Evaluation of Stability Data Q1E) của FDA năm 2004, khảo sát độ ổn định của một dược chất là tìm thời điểm mà ở đó hàm lượng dược chất bị phân hủy còn lại 90% [12] Do đó, sản phẩm letrozole đạt được độ ổn định sau 24 tháng.

Dự đoán tuổi thọ thuốc của mẫu Let-01 là 40,5 tháng, mẫu Let-02 là 56,9 tháng và mẫu Let-03 là 54 tháng. Chọn kết quả thấp nhất từ ba kết quả trên là tuổi thọ của thuốc. Dự đoán tuổi thọ thuốc theo điều kiện lão hóa cấp tốc là 40,5 tháng.

### Thử độc tính cấp

Trong thử nghiệm này, chúng tôi đã tìm được liều không gây chết chuột là 0,25 g mẫu thử/kg chuột. Liều gây chết 100% số chuột thử nghiệm là 1,5 g mẫu thử/kg chuột. Dựa trên số liệu thực nghiệm, chúng tôi đã tìm được liều LD<sub>50</sub> là 0,825 (0,688; 0,962) g mẫu thử/kg chuột. Sau khi uống hỗn dịch thử, chuột có các biểu hiện ngộ độc như sau: Ở mức liều thấp (0,25 g mẫu thử/kg chuột) không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc; ở mức liều trong khoảng từ 0,5 g đến 1,5 g mẫu thử/kg chuột, một số chuột có biểu hiện bị kích động, sau đó nằm mê và co giật trước khi chết. Chuột bị chết trong khoảng thời gian 48 giờ và tỷ lệ chết tùy theo mức liều uống.

### Thử độc tính bán trường diễn

Sau khi cho thỏ uống hỗn dịch letrozole liên tục mỗi ngày một lần trong 90 ngày với 3 mức liều khác nhau, thuốc không ảnh hưởng đến thể trạng, hoạt động của thỏ thử nghiệm. Thỏ khỏe mạnh, tăng cân. Các chỉ số sinh hóa và huyết học (thời gian đông máu, chỉ số glucose, các chỉ số calci toàn phần và ion calci huyết tương) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở trước, giữa và sau thử nghiệm so với nhóm chứng ( $P_{\text{trước TN (T-C)}} > 0,05$ ;  $P_{\text{sau 30 ngày (T-C)}} > 0,05$ ;  $P_{\text{sau 60 ngày (T-C)}} > 0,05$ ;  $P_{\text{sau TN (T-C)}} > 0,05$ ).

Không nhận thấy sự bất thường và khác nhau về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi, buồng trứng, tuyến thượng thận và hệ tiêu hóa khi quan sát đại thể cũng như cấu trúc của gan, thận, buồng trứng, tuyến thượng thận khi quan sát vi thể của thỏ giữa nhóm chứng và 3 nhóm thử.

### Kết luận

Đã xây dựng được quy trình tổng hợp và tinh chế sản phẩm letrozole ở quy mô 100 g/mẻ. Cấu trúc sản phẩm được chứng minh bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân (<sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR), khối phổ (ESI-MS). Độ tinh khiết của sản phẩm đạt 99,79±0,05%. Các chỉ tiêu khác đều đạt yêu cầu quy định của dược điển Hoa Kỳ USP38. Sản phẩm letrozole còn được tiến hành đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn. Kết quả kiểm nghiệm cho thấy letrozole thuộc cấp độ độc IV trong thang GHS. Thời hạn sử dụng của letrozole là

trên 24 tháng.

### LỜI CẢM ƠN

Đề tài nghiên cứu được hỗ trợ bởi Chương trình Hóa dược, Bộ Công thương, mã số đề tài CNHD.ĐT.051/14-16. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Research and Markets (2017), *Generic Oncology Drug Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2017-2022*, p.82.
- [2] Joint Formulary Committee, BNF 70: September 2015-March 2016 (2015), *BMA and Pharmaceutical Society*.
- [3] S.C. Sweetman, Martindale (2009), *The Complete Drug Reference*, Pharmaceutical Press.
- [4] Raja Jyotir Jani, Hetalkumar Virendrabhai Patel, and Rajamannar Thennati (2004), *WO Patent 2004076409 A3*.
- [5] Hasson, et al. (2007), *US 2007/0112203 A1*.
- [6] Jeremie Doiron, Ryan Richard, Mamadou Mansour Touré, Nadia Picot, Rémi Richard, Miroslava Čuperlović-Culf, Gilles A Robichaud, and Mohamed Touaibia (2011), "Synthesis and structure-activity relationship of 1-and 2-substituted-1, 2, 3-triazole letrozole-based analogues as aromatase inhibitors", *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46(9)**, pp.4010-4024.
- [7] S. Ahuja and K.M. Alsante (2003), *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals*, Elsevier Science, pp.102-115.
- [8] B. Davani (2017), *Pharmaceutical Analysis for Small Molecules*, Wiley. p.72.
- [9] [http://bdg.co.nz/coa/coa\\_110096\\_6116.1\\_20091010\\_V1\\_Letrozole.pdf](http://bdg.co.nz/coa/coa_110096_6116.1_20091010_V1_Letrozole.pdf).
- [10] Dr. Sabine Schroder - Lgc (2015), *Certificate of Analysis*, [https://hybris-static-assets-production.s3-eu-west-1.amazonaws.com/sys-master/pdfs/h3e/hcd/9434872578078/en\\_ST-WB-CERT-2052116-1-1-1.PDF](https://hybris-static-assets-production.s3-eu-west-1.amazonaws.com/sys-master/pdfs/h3e/hcd/9434872578078/en_ST-WB-CERT-2052116-1-1-1.PDF).
- [11] The United States Pharmacopeia and National Formulary (2014), *USP 38 - NF 33 The United States Pharmacopeia and National Formulary 2015: Main Edition Plus Supplements 1 and 2*, Deutscher Apotheker Verlag.
- [12] *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in new drug substances Q3A (R2)*, in Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 2006.