

Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de Warfarina Sódica en una preparación extemporánea

Marcel Berrío¹, Mary Trujillo², Bibiana Margarita Vallejo³, Hélber de Jesús Barbosa⁴.

¹ Maestría en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: mberriom@unal.edu.co.

² Grupo Aseguramiento de la Calidad, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: mtrujillo@unal.edu.co.

³ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: bmvallejod@unal.edu.co.

⁴ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: hdbarbosab@unal.edu.co.

Recibido para evaluación: 21 de marzo de 2013.

Aceptado para publicación: 23 de mayo de 2013.

RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo el desarrollo y la validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de Warfarina Sódica en una suspensión para uso hospitalario. La selectividad se evaluó frente a los excipientes y compuestos de degradación; la linealidad en el rango de concentraciones comprendido entre 0,05 y 0,15 mg/mL; la precisión se estudió en los niveles de repetibilidad y precisión intermedia y la exactitud en tres niveles de concentración que corresponden al 75%, 100% y 125%. Los resultados muestran que la validación de la metodología por HPLC es selectiva, lineal, precisa y exacta; por tanto, es confiable para ser utilizada en la cuantificación del activo Warfarina Sódica en una suspensión extemporánea y también en estudios de estabilidad de dicha preparación.

Palabras clave: Warfarina, validación, HPLC-DAD, preparación extemporánea.

SUMMARY

Development and validation of an analytical method by HPLC-DAD for quantification of Warfarin Sodium in an extemporaneous preparation

In this work was carried out the development and quantification of an analytical methodology for quantification of Warfarin Sodium in an extemporaneous suspension for hospital use. Evaluation of specificity was achieved against its excipients and degradation compounds. The selectivity was evaluated against the excipients and degradation compounds. Linearity studies were performed in a range of concentration between 0.05 to 0.15 mg/mL. Precision was evaluated in levels of repeatability and intermediate precision and accuracy in three concentration levels corresponding to the 75, 100 and 125%. The results show that the validation of the methodology is selective, linear, accurate and precise; therefore, it is reliable for use in the quantification of active warfarin sodium in the extemporaneous suspension.

Key words: Warfarin, validation, HPLC-DAD, extemporaneous preparation.

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de utilizar fármacos cumarínicos como la Warfarina Sódica, administrados por vía peroral, ha brindado tanto a los médicos como a los pacientes, una terapia eficaz como anticoagulante; sin embargo, este fármaco presenta una alta incidencia de efectos adversos, entre los cuales el sangrado es el más común y peligroso, llegando a ser fatal. El estrecho margen terapéutico del fármaco, la gran variabilidad interindividual en la respuesta al tratamiento, así como sus numerosas interacciones farmacológicas, hacen de la Warfarina un fármaco difícil de manejar [1-4].

La Warfarina Sódica puede ser administrada tanto por vía intravenosa como peroral; sin embargo, el efecto anticoagulante completo de una dosis, independientemente de la vía de administración, corresponde al tiempo que debe transcurrir para que se agoten los factores de coagulación, cuyas semividas son de 6 horas para el factor VII, 24 horas para el factor IX, 40 horas para el factor X y 60 horas para el factor II, lo cual indica que la administración intravenosa no proporciona un comienzo más rápido de la acción, respecto a la vía peroral [5, 6].

Teniendo en cuenta que en Colombia no se comercializa una forma farmacéutica líquida, sino como tabletas de Warfarina Sódica (5,0 y 2,5 mg), y Warfarina Sódica Caltrato (2,5 mg) [7], la preparación de una forma extemporánea tipo suspensión, elaborada a partir de tabletas, brindaría una excelente alternativa para el control de la dosificación, ya que permitiría la administración de una dosis más exacta y controlada, que la obtenida cuando se fractura una tableta.

En el presente trabajo se desarrolló y validó una metodología para la cuantificación de Warfarina Sódica en una preparación extemporánea, tipo suspensión. Este resultado permitirá contar con una metodología para ser utilizada en los estudios de estabilidad en preparaciones de uso hospitalario con este principio activo.

Propiedades fisicoquímicas de la Warfarina

Nombre químico (IUPAC): (RS)-4-hidroxi-3-(3-oxo-1-fenilbutil)-cumarina, sinónimo: 3-(α -fenil- β -acetiletil)-4-hidroxycumarina, fórmula molecular: $C_{19}H_{16}O_4$.

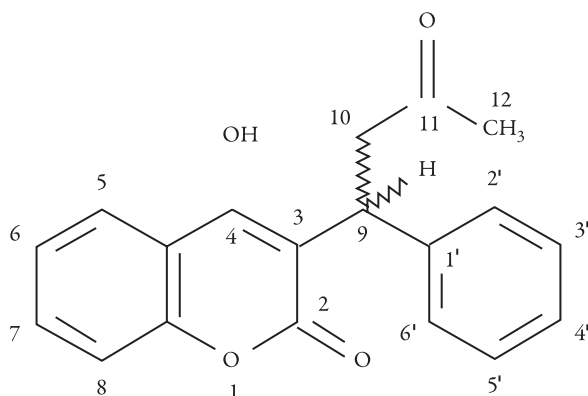


Figura 1. Estructura química de la Warfarina.

Peso molecular: 308,34 g/mol, punto de fusión: 161 °C. Solubilidad: soluble en acetona y dioxano, moderadamente soluble en metanol y etanol, y prácticamente insoluble en benceno y ciclohexano. La solubilidad en HCl 0,1 N es 4,4 mg/L a temperatura ambiente y 7,5 mg/L a 37 °C. La sal sódica es libremente soluble en agua. pKa: $5,05 \pm 0,10$ a temperatura ambiente [10, 12].

METODOLOGÍA

Equipos

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 con detector UV-VIS de arreglo de diodos, utilizando una columna cromatográfica Phenomenex Luna C18 de 250 × 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5 μm .

Reactivos

Estándar USP de Warfarina base RS, metanol y acetonitrilo HPLC (Honeywell), ácido acético glacial (Panreac), ácido clorhídrico fumante, pentóxido de fósforo, lactosa y almidón (Merck), peróxido de hidrógeno (Carlo Erba), hidróxido de sodio (EK CHEM), fosfato monobásico de potasio (Mallinckrodt), dextrosa al 5% y cloruro de sodio al 0,9% estériles (Baxter).

Estandarización del sistema cromatográfico

Debido a que no se encuentra reportado un método oficial para la valoración de Warfarina Sódica en suspensión, se desarrolló y validó la metodología para este producto tomando como punto de partida las condiciones cromatográficas sugeridas por la USP 35 [8], para la cuantificación de Warfarina Sódica en tabletas. Para la estandarización y optimización de las condiciones cromatográficas, se modificó el método con el fin de obtener parámetros cromatográficos que representaran la idoneidad del sistema para la cuantificación del activo en suspensión.

Estandarización del método de extracción

El método de extracción se desarrolló teniendo en cuenta los insumos que generalmente se utilizan en la elaboración de preparaciones extemporáneas de uso hospitalario.

La muestra para análisis se obtuvo mediante la trituración de 30 tabletas (previa determinación de la variación de peso). Una porción se suspendió en cloruro de sodio 0,9% o dextrosa al 5% y se agitó vigorosamente hasta obtener una preparación homogénea, luego se completó a volumen con el vehículo y se agitó nuevamente. La extracción del activo se realizó usando mezclas de solución de *buffer* de fosfato monobásico de potasio pH 7,4 y acetonitrilo.

Selectividad

La selectividad se evaluó respecto a los excipientes y frente a los productos generados por la degradación forzada del activo. Los excipientes se evaluaron uno a uno al doble de

la concentración que normalmente se encuentran en la suspensión. Tanto la Warfarina Sódica como los excipientes que forman parte de la matriz se sometieron a degradación forzada por hidrólisis en medio ácido y básico; también se sometieron a oxidación con peróxido de hidrógeno y fotólisis; esta última tanto por exposición a la luz directa del sol como a las longitudes de onda 254 y 366 nm.

Linealidad

La linealidad del sistema y del método se determinó al preparar soluciones de Warfarina Sódica con las siguientes concentraciones: 0,050, 0,075, 0,100, 0,125 y 0,150 mg/mL.

Precisión

La repetibilidad se evaluó tanto para el sistema como para el método realizando cinco determinaciones de la solución de concentración 0,1 mg/mL. La precisión intermedia se evaluó para dos analistas en dos días diferentes.

Exactitud

La evaluación de este parámetro se determinó mediante el porcentaje de recuperación para tres niveles de concentración: 75%, 100% y 125%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sistema de idoneidad

La idoneidad del sistema cromatográfico se verificó usando el estándar USP de Warfarina Base RS (previamente secado al vacío por 4 horas sobre pentóxido de fósforo), a una concentración aproximada de 0,1 mg/mL. El factor de capacidad fue 3,42, el número de platos teóricos fue 6903 y el factor de asimetría 0,836. Estos parámetros cumplen con lo establecido por la USP 35; por tal razón, se concluye que el sistema cromatográfico es confiable para realizar la validación de la metodología propuesta.

Estandarización del sistema cromatográfico

Después de realizar diversas modificaciones en las condiciones cromatográficas, se observó que no se obtuvo una mejora significativa con respecto a las condiciones sugeridas por la USP 30 [9]; por tanto, se decidió adoptar estas. Las condiciones fueron las siguientes: longitud de onda 280 nm, columna C18 de 250 × 4,6 mm, tamaño de partícula 5 μm, flujo 1,4 mL/min, volumen de inyección 20 μL y fase móvil metanol: agua: ácido acético glacial (68:32:1).

Estandarización del método de extracción

La muestra se obtuvo mediante la trituración de 30 tabletas (previa determinación de la variación de peso). De allí se tomaron aproximadamente 1.100 mg, se llevaron a un balón aforado de 50 mL, se adicionaron 30 mL del vehículo (cloruro de sodio 0,9% o dextrosa al 5%), se agitó vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea, luego se completó a volumen con el vehículo y se agitó nuevamente. Se transfirió una alícuota de 2 mL a un balón aforado de 10 mL, se adicionaron 5 mL de mezcla diluyente (solución *buffer* de fosfato monobásico de potasio pH 7,4; acetonitrilo 85:15); sonicando por 10 minutos, se agitó vigorosamente por un minuto y se aforó con solución diluyente. Al seguir este procedimiento y después de la valoración del activo se obtuvo una concentración de aproximadamente 0,1 mg/mL.

Selectividad

El análisis cromatográfico de las muestras evaluadas permite concluir que ni los excipientes de la matriz ni los productos de degradación generan señales que puedan interferir con las señales correspondientes al principio activo [10] (figuras 2 y 3).

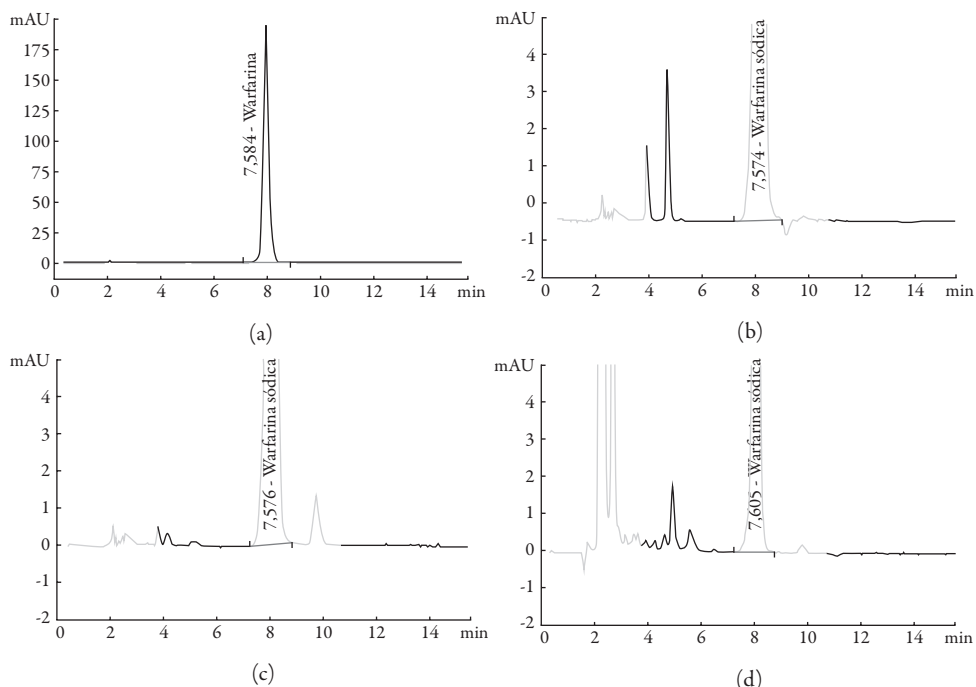
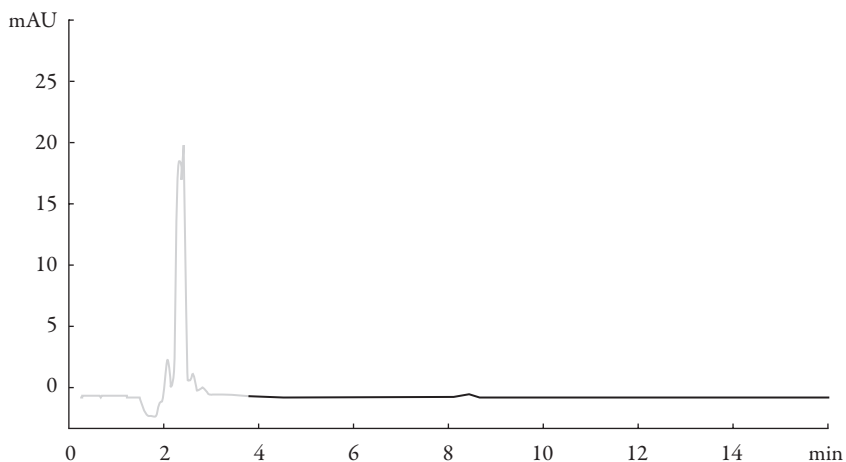
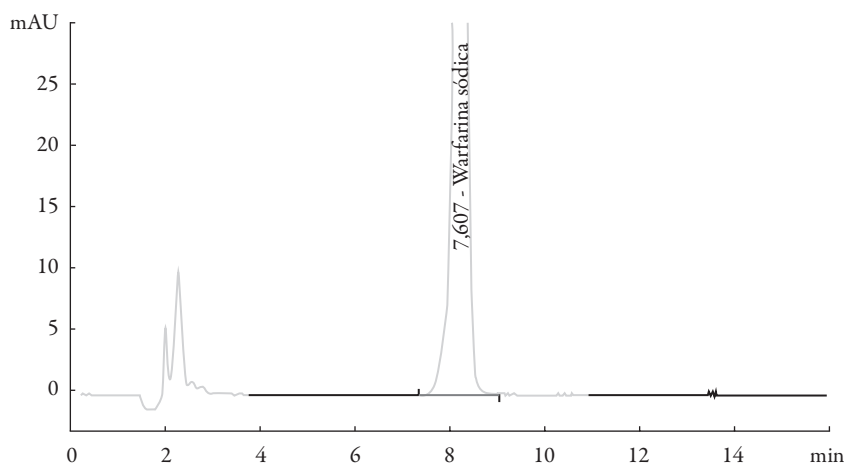


Figura 2. Selectividad frente a los compuestos de degradación. (a) Estándar Warfarina. (b) Hidrólisis ácida. (c) Hidrólisis básica. (d) Oxidación.



(a)



(b)

Figura 3. Selectividad frente a los excipientes. (a) Solución blanco de dextrosa al 5%. (b) Cromatograma correspondiente a la selectividad frente a todos los excipientes.

El cromatograma correspondiente a la hidrólisis ácida presenta tres señales: aproximadamente a los 7,6 minutos aparece la señal correspondiente a la Warfarina Sódica; cerca de los 3,4 y 4,3 minutos aparecen las señales correspondientes posiblemente a la formación de los hemiacetales cíclicos de la 4-hidroxicumarina y 2-hidroxicromona, respectivamente [10].

El cromatograma correspondiente a la hidrólisis básica presenta cuatro señales: aproximadamente a los 7,6 minutos aparece la señal correspondiente a la Warfarina Sódica;

cerca de los 3,3 y 3,8 minutos aparecen las señales correspondientes posiblemente a la formación del ácido hidroxycumarínico proveniente de la hidrólisis lactónica y la subsiguiente descarboxilación del mismo. La ciclación aldólica del último forma, posiblemente, el compuesto correspondiente a la señal obtenida a los 9,4 minutos aproximadamente [10].

El cromatograma correspondiente a la oxidación presenta múltiples señales: aproximadamente a los 7,6 minutos aparece la señal correspondiente a la Warfarina Sódica; cerca de 1,7 a 2,2 minutos aparece la señal correspondiente al blanco; aproximadamente de 2,4 a 6,2 y a los 9,3 minutos aparecen las señales correspondientes a los compuestos formados por la hidroxilación y posible formación de quinonas en las posiciones 4, 4', 6, 7 y 8 de la molécula de Warfarina Sódica [10].

El cromatograma correspondiente a los excipientes no muestra señales debidas a ellos; por tal razón, no interfieren con la cuantificación del analito de interés.

Linealidad

La figura 4 muestra las curvas de calibración para la linealidad del sistema y método, respectivamente. Como se muestra en las tablas 1 y 2, la prueba *t* para un nivel de confianza del 95% y *n*-2 grados de libertad indican que estadísticamente hay proporcionalidad entre la concentración y la respuesta analítica para el rango comprendido entre 0,05 y 0,15 mg/mL. También muestra que la pendiente es estadísticamente diferente a cero y el intercepto no es estadísticamente diferente de dicho valor. Todo lo anterior indica que para el modelo lineal propuesto, los errores sistemáticos no afectan la linealidad ni del sistema ni del método.

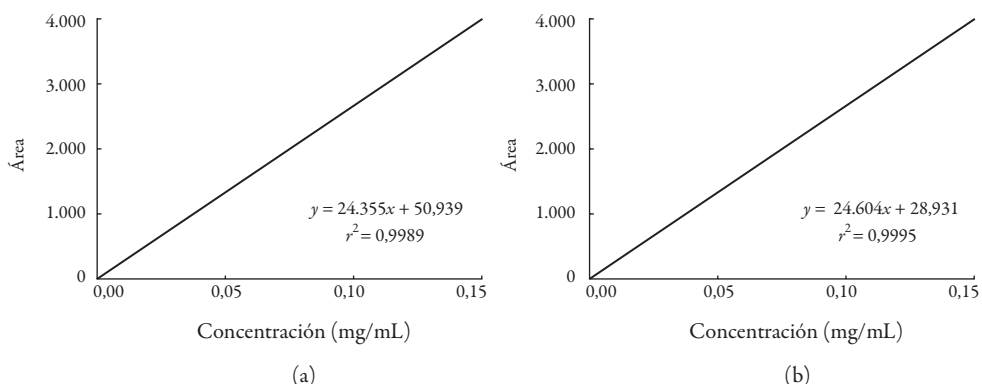


Figura 4. Curvas de calibración de la linealidad. (a) Linealidad del sistema. (b) Linealidad del método.

Tabla 1. Prueba t de Student para la linealidad del sistema.

Parámetro	Hipótesis nula	$t_{\text{observado}}$	t_{tabulado}	Concepto
Intercepto (a)	$H_0: \alpha = 0$	0,12	2,16	Se acepta la hipótesis nula
Pendiente (b)	$H_0: \beta = 0$	6,14	2,16	Se rechaza la hipótesis nula
Correlación (r)	$H_0: r = 0$	108,65	2,16	Se rechaza la hipótesis nula

Tabla 2. Prueba t de Student para la linealidad del método.

Parámetro	Hipótesis nula	$t_{\text{observado}}$	t_{tabulado}	Concepto
Intercepto (a)	$H_0: \alpha = 0$	0,09	2,16	Se acepta la hipótesis nula
Pendiente (b)	$H_0: \beta = 0$	8,25	2,16	Se rechaza la hipótesis nula
Correlación (r)	$H_0: r = 0$	161,20	2,16	Se rechaza la hipótesis nula

Los resultados de las pruebas F y ANOVA (tablas 3 y 4), indican que no hay dispersión estadísticamente significativa entre los resultados de las réplicas de las distintas concentraciones, corroborando el cumplimiento de la linealidad de la metodología.

Tabla 3. Prueba F de Fisher y ANOVA para la linealidad del sistema.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F exp	F tab
Regresión	1	10989241,96	10989241,96	2,11E+04	4,67
Falta de ajuste	3	6,95E+03	2,32E+03	4,44	3,71
Error puro	10	5,22E+03	5,22E+02		
Error residual	13	12161,15			
Error total	14	11001403,11			

Tabla 4. Prueba F de Fisher y ANOVA para la linealidad del método.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F exp	F tab
Regresión	1	11336294,99	11336294,99	50680,55	4,67
Falta de ajuste	3	3,12E+03	1,04E+03	4,64	3,71
Error puro	10	2,24E+03	2,24E+02		
Error residual	13	5353,51			
Error total	14	11341648,50			

Precisión

Los resultados obtenidos muestran coeficientes de variación inferiores al 2% (0,0978 y 0,0725, respectivamente); lo que indica que tanto el sistema como el método son precisos desde el punto de vista de la repetibilidad.

Como se muestra en la tabla 5, el análisis de varianza, mediante un *test* F para la precisión intermedia, indica que no se presentan diferencias estadísticamente significativas por realizar el análisis en días diferentes o con analistas diferentes [11].

Tabla 5. Prueba F de Fisher y ANOVA para la precisión intermedia.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F exp	F tab
Analista	1	300,05620	300,05620	1,04	5,12
Día	1	599,41277	599,41277	2,08	5,12
Error	9	2599,66816	288,85202		
Total	11	3499,13713	318,10338		

Exactitud

La tabla 6 muestra que el porcentaje de recuperación fue superior al 95% e inferior al 105%. Para la prueba *t* de Student se puede apreciar que el valor calculado es mayor que el tabulado. Se acepta entonces la hipótesis alternativa ($H_1: t_{exp} > t_{tab}$) y se afirma que la probabilidad de obtener un valor *t*, con ocho grados de libertad, igual o mayor a 3,351 es aproximadamente 0,005, cuando el promedio es 100,53; es decir, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos y el 100%. La prueba de Cochran muestra que existe homogeneidad entre las varianzas para los diferentes niveles de concentración (tabla 7), indicando que el nivel de concentración no afecta la variación de los resultados.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de Warfarina Sódica en una suspensión extemporánea. Los resultados de la validación muestran que la metodología propuesta es selectiva, lineal, precisa y exacta; por tanto, es confiable para utilizarla en la cuantificación del activo Warfarina Sódica en una preparación extemporánea tipo suspensión.

Tabla 6. Porcentajes de recuperación y prueba *t* de Student para la exactitud.

Nivel de concentración	Número de réplica	Recuperación (%)
80%	1	99,9
	2	100,9
	3	100,9
100%	1	99,9
	2	100,9
	3	100,9
120%	1	99,9
	2	100,9
	3	100,9
Promedio		100,53
Desviación estándar		0,48
Desviación estándar relativa		0,478
<i>t</i> exp		3,351
<i>t</i> tab		2,306

Tabla 7. Prueba G de Cochran para la exactitud.

	Porcentaje de recuperación al 80%	Porcentaje de recuperación al 100%	Porcentaje de recuperación al 120%
Media	100,5	100,5	100,5
SD	0,555	0,55	0,555
CV	0,552	0,52	0,552
n	3	3	3
Varianza	0,308	0,308	0,308
G cal	0,3333		
G tab	0,8709		

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Laboratorio de Investigaciones en Análisis Instrumental y al Laboratorio de Análisis Farmacéutico del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS

1. C. Isaza, J. Henao, L. Beltrán, Resistencia y sensibilidad a warfarina, *Investigaciones Andina*, **12**, 30 (2010).
2. A.E. Rettie, J.P. Jones, Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: Drug-drug interactions and pharmacogenetics, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**, 477 (2005).
3. G. D'Andrea, R. D'Ambrosio, M. Margaglione, Oral anticoagulants: Pharmacogenetics relationship between genetic and non-genetic factors, *Blood Reviews*, **22**, 127 (2007).
4. J.A. Johnson, Ethnic differences in cardiovascular drug response-potential contribution of pharmacogenetics, *Circulation*, **118**, 1383 (2008).
5. J. Flórez, J.A. Armijo, A. Mediavilla, "Farmacología humana", Masson s.a., Barcelona, 1997, vol. 3, p. 801.
6. L.L. Bruton, J.S. Lazo, L.P. Keith, "Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics", McGraw-Hill, New York, 2006, vol. 11, p. 1430.
7. INVIMA, Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, Listado Código Único de Medicamentos Vigentes, URL: <http://web.invima.gov.co/portal/faces/index.jsp?id=54263>, consultado en junio de 2012.
8. US Pharmacopeia 35, The United States Pharmacopeial Convention, City Press, Baltimore, 2012, pp. 4594-4596.
9. US Pharmacopeia 30, The United States Pharmacopeial Convention, City Press, Baltimore, 2007, t. 3, p. 3785.
10. W.R. Porter, Warfarin: History, tautomerism and activity, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **24**, 553 (2010).
11. O.A. Quattrocchi, S.A. de Andrizzi, R.F. Laba, "Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica", Artes Gráficas Farro s.a., Buenos Aires, 1992, vol. 1, p. 317.
12. K.A. Connors, G.L. Amidon, V.J. Stella, "Chemical stability of pharmaceuticals: A handbook for pharmacists", John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 1986, vol. 2, p. 804.