

## Validación de una metodología analítica USP por HPLC para la cuantificación de warfarina sódica en tabletas

Fredys Sánchez-Hoyos<sup>1</sup>, Argenis Cárdenas<sup>1</sup>, Jairo Mercado-Camargo<sup>1,2</sup>, Gina Domínguez-Moré<sup>3</sup>, Harold Gómez-Estrada<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Química de Medicamentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

\* Correo electrónico: [hgomez@unicartagena.edu.co](mailto:hgomez@unicartagena.edu.co)

<sup>2</sup> Unidad de Prestación de Servicios Rafael Ruiz Arango, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

<sup>3</sup> Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia

Recibido para evaluación: 16 de agosto del 2016

Aceptado para publicación: 5 de diciembre del 2016

### RESUMEN

La metodología analítica para la cuantificación de warfarina sódica en tabletas de 5 mg fue estandarizada y validada mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector de arreglo de diodo (HPLC-DAD). Se usó como fase móvil una mezcla compuesta por MeOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (68:1:32), una columna cromatográfica C8e Phenomenex® de 150 x 4,6 mm y tamaño de partícula de 5 µm. Los resultados analíticos muestran que el método es preciso, exacto y selectivo para este fármaco. La curva de calibración se realizó en un intervalo del 80 al 120%, en una concentración nominal de 0,1mg/mL, demostrando ser lineal con un coeficiente de correlación a  $r^2 > 0,990$ ; el porcentaje de recuperación fue de  $98,1\% \pm 1,3$ , la precisión medida a través de la repetibilidad y la precisión intermedia fue adecuada (%RSD < 2). En la prueba de disolución se encontró un porcentaje de  $92,3\% \pm 3,0$ . Por lo tanto, la metodología desarrollada cumple con las especificaciones establecida por la USP 38/NF33.

*Palabras claves:* Validación de métodos analíticos, warfarina sódica, HPLC-DAD.

## SUMMARY

### Validation of an analytical HPLC method for the quantification of warfarin sodium in tablets

The analytic methodology for the quantification of sodium warfarin tablets of 5 mg was standardized and validated by High Efficiency Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector (HPLC-DAD). A mixture of MeOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (68:1:32) was used like mobil phase, a chromatographic column C8e Phenomenex® of 150x4.6 mm and a particle size of 5 µm. The analytic results show that the method is precise, accurate and selective for this drug. The calibration curve was performed in the range of 80 to 120% at a nominal concentration of 0.1 mg/mL, demonstrating to be linear with a correlation coefficient at  $r^2 > 0.990$ ; recovery rate was  $98.1\% \pm 1.3$  and the precision measured through repeatability and intermediate accuracy was adequate (% RSD <2). A percent of  $92.3\% \pm 3.0$  was found in dissolution test, thus, the methodology developed complies with the specifications established by USP 38/NF33.

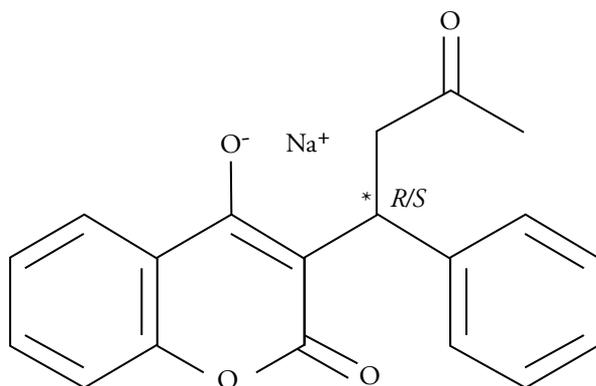
*Keywords:* Validation of analytical methods, sodium warfarin, HPLC-DAD.

## INTRODUCCIÓN

La warfarina (de las siglas “Wisconsin Alumni Research Foundation”, terminado en “arina”, de cumarina) fue descubierta en 1940 por Karl Paul Link, químico de la Universidad de Wisconsin, Estados Unidos [1]. La warfarina es uno de los medicamentos más prescritos en el mundo, usado como anticoagulante oral en profilaxis y el tratamiento de eventos trombóticos: embolismo pulmonar, cardiomiopatías, en complicaciones tromboembólicas asociadas con fibrilación auricular, oclusión vascular retinal y embolismo cerebral, entre otros, así como en el manejo de la terapia antitrombótica, seguida de la intervención coronaria percutánea en pacientes con fibrilación auricular [2].

La warfarina es un derivado sintético de la cumarina, la cual actúa inhibiendo la síntesis por inhibición de la gamma carboxilación de los factores de la coagulación dependientes de la vitamina K, entre los que se encuentran los factores II, VII, IX y X, y las proteínas anticoagulantes C y S.3 [3-6]. En la actualidad se dispone de preparaciones comerciales compuestas por una mezcla racémica de su sal sódica *R* y *S* (1), siendo la *S*-warfarina levorrotatoria cuatro veces más potente en su antagonismo con la vitamina K. Después de su administración oral, la warfarina se absorbe prácticamente en su

totalidad (~90%) con una concentración plasmática máxima observada en las primeras cuatro horas. Este fármaco se elimina casi completamente mediante metabolización por las enzimas microsomales hepáticas (complejo citocromo P-450: por las isoenzimas 2C9, 2C19, 2C8, 2C18, 1A1, 1A2, y 3A4), originando metabolitos hidroxilados inactivos o reducidos, eliminados preferentemente en la orina [5-7]. Aspectos relacionados con la seguridad y con una alta tasa de complicaciones potencialmente mortales han limitado su uso en forma generalizada. El riesgo de sangrado durante el tratamiento con warfarina es probable en personas de más de 65 años, en personas que toman dosis altas de warfarina, o las que toman este medicamento por períodos largos. En algunas ocasiones el tratamiento con warfarina puede causar dolor, hinchazón o incomodidad, sangrado de una cortada que no se detiene en la cantidad de tiempo usual, sangrado de nariz o de las encías, tos, algunas veces acompañada con sangrado, moretones o sangrado inusuales, sangrado vaginal o flujo menstrual más de lo normal, orina de color rosado, rojo o café oscuro, evacuaciones de color rojo o negro alquitranado, dolor de cabeza, mareos y debilidad general [4, 8].



Esquema 1. Estructura molecular de la warfarina sódica.

Adicional a los efectos secundarios y a la necesidad de mantener la vigilancia de la calidad farmacéutica de los preparados que se encuentran en nuestro país, recientemente la Dirección de Medicamentos y Productos Biológicos del INVIMA emitió un reporte de evidencia de resultados no conformes para algunos productos farmacéuticos nacionales que tienen warfarina como principio activo [9]. Es rol fundamental del profesional químico farmacéutico y de las entidades relacionadas con el aseguramiento de la calidad de los medicamentos garantizar y gestionar los sistemas de farmacovigilancia a nivel local y nacional, con el fin de mejorar aspectos que permitan optimizar y mantener la farmacoterapia en los pacientes [10].

El presente trabajo de investigación ofrece el desarrollo de un método analítico validado que permite cuantificar la warfarina sódica como principio activo de formulaciones farmacéuticas tipo tabletas, mediante un método por HPLC-DAD, como herramienta versátil y poderosa para la identificación y la determinación de los componentes químicos en los medicamentos [11-14]. Los resultados analíticos 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 de warfarina sódica en tabletas. Este resultado permitirá contar con una metodología que permita velar por la buena calidad y las buenas prácticas de manufactura (GMP) de los medicamentos que contienen este principio activo [15-16].

## METODOLOGÍA

### Instrumentos y equipos

El cromatógrafo líquido utilizado fue un Shimadzu LC LaChrom Elite<sup>®</sup> System (Shimadzu, Kyoto, Japón), equipado con una bomba cuaternaria modelo L-2130 y un detector de arreglo de diodo (DAD) modelo L-2455. Las pruebas de disolución se realizaron en un equipo disolutor marca VARIANT 705DS, sistema microondas de extracción.

### Reactivos

Estándar USP de warfarina (lote: I1G072), metanol (MeOH, Merck<sup>®</sup>), acetonitrilo (ACN, Merck<sup>®</sup>), ácido acético glacial (AcOH, Merck<sup>®</sup>), hidróxido de sodio (NaOH, Merck<sup>®</sup>), ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Merck<sup>®</sup>), fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Panreac<sup>®</sup>), todos grados analíticos (GA).

### Estandarización de la metodología

En el establecimiento de los parámetros de validación se siguieron las pautas recomendadas por la Farmacopea Americana USP 38, categoría I [17]. Como se mencionó, para cada parámetro de validación las concentraciones empleadas de warfarina sódica guardan relación con las concentraciones etiquetadas en el producto mezcla de los mismos.

### Condiciones cromatográficas

La fase móvil consistió en una mezcla de MeOH:AcOH:H<sub>2</sub>O (68:1:32), filtrada y desgasificada por membrana de 0,45 μm. La columna utilizada fue C8e, Phenomenex<sup>®</sup>, 150 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 μm, la longitud de onda se estableció a 280 nm, flujo 1,4 mL/min, volumen de inyección 20 μL y a una temperatura de trabajo de 30 °C [18,19].

### **Preparación de la solución buffer fosfato**

Se transfirió 1,36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a un matraz volumétrico de 200 mL en 50 mL de agua. Se agrega 39,1 mL de NaOH 0,2 N y con agua hasta completar volumen. Se ajusta con solución de NaOH o  $\text{H}_3\text{PO}_4$  hasta  $\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$ .

### **Preparación de las soluciones estándar y de calibración de warfarina sódica**

A partir del estándar primario de warfarina sódica, se preparó una solución stock de concentración 1,0 mg/L de acuerdo con los criterios establecidos en la USP 38 [17]. A partir de esta solución, se procedió a preparar las diluciones de trabajo para la validación de la metodología utilizada [20,21].

### **Linealidad**

Se preparó una curva de calibración con cinco concentraciones correspondientes a 80%, 90%, 100%, 110% y 120 % de la concentración teórica (0,1 mg/mL). Con los resultados arrojados se realizó el análisis de regresión lineal.

### **Precisión y exactitud**

La precisión fue calculada con el coeficiente de variación a partir de la repetibilidad y la precisión intermedia [21]. Para ello se preparó por triplicado a partir de la solución stock de trabajo la disolución correspondiente al 100% de la concentración, inyectándose tres replicas en el cromatógrafo para el caso de la repetibilidad. En cuanto a la precisión intermedia, se preparó una solución de 100% por dos analistas diferentes en dos días diferentes. La exactitud se determinó con el porcentaje de recuperación a partir de la preparación de tres niveles de concentración de 90%, 100% y 110%.

### **Selectividad**

En la evaluación de la selectividad se preparó una solución al 100% de la concentración de trabajo. De esta última solución se tomaron tres alícuotas de 3 mL que se llevaron a las siguientes condiciones extremas: ácido clorhídrico 0,1 N, hidróxido de sodio 0,1 N y peróxido de hidrogeno al 30%, a reflujo durante una hora a 80 °C. Esto con su respectivo blanco y estándar.

### **Preparación de las muestras comerciales de warfarina sódica**

Para la preparación de las muestras se tuvieron en cuenta los criterios establecidos en la USP 38 [17]. Se pesaron 20 tabletas del producto comercial y se redujeron a polvo fino, transfiriendo una porción de polvo equivalente a 25 mg de warfarina sódica a un balón de 25 mL. Luego se disolvió y diluyó con una solución de buffer fosfato pH 7,4, a partir de esta solución se preparó una solución de trabajo de concentración 0,1 mg/mL,

la cual se filtró a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ , para luego ser inyectada en el cromatógrafo. Este análisis se realizó por triplicado.

### **Prueba de disolución**

El procedimiento analítico tuvo en cuenta la preparación del estándar (warfarina) y la preparación de la muestra. Para la preparación del estándar se pesaron exactamente 25 mg de warfarina, se llevó a un balón volumétrico de 25 mL, se disolvió y completó volumen con medio de disolución. Las muestras comerciales de warfarina se sometieron a pruebas de disolución en un equipo disolutor, para lo cual cada tableta se colocó en un vaso de 900 mL, con medio de disolución (Agua Mili-Q) utilizando el aparato N.º 2 (paletas) a 50 rpm, durante 30 min, a temperatura de  $37^\circ\text{C} \pm 0,5$ ; la cuantificación del analito se realizó en el cromatógrafo líquido [22].

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Validación de valoración**

De acuerdo con la metodología descrita en la USP 38 [17] y usando las condiciones cromatográficas descritas anteriormente, se inyectó en el cromatógrafo por quintuplicado la solución estándar de warfarina a fin de verificar la idoneidad del sistema, obteniéndose un número de platos teóricos igual a 5282, y una asimetría de 1,18, donde lo especificado por la USP acepta un mínimo de 1200 platos teóricos y una asimetría  $< 2$ . Se puede afirmar que se cumple con lo esperado y que el sistema es idóneo.

### **Linealidad**

La curva de calibración resultó ser lineal en el intervalo de concentración comprendido entre 0,08 y 0,12 mg/mL (tabla 1). Al aplicar la regresión lineal a los resultados registrados, se obtuvo la ecuación de la recta que se expresó según  $Y = 1,2 \times 10^7 + 0,7C - 19.926$ . El coeficiente de correlación lineal fue de 0,9955 (figura 1), y un RSD de 0,9990%. El análisis de varianza para la pendiente y el intercepto arrojó que estos son diferentes de cero. Como el valor p de la prueba en la tabla ANOVA es menor de 0,5, hay una relación estadísticamente significativa entre la relación de área y la concentración de warfarina sódica a un nivel de confianza de 95%.

Tabla 1. Resultados estadísticos para la prueba de linealidad del sistema y el método.

Estadísticos	Sistema	Método
Coefficiente de correlación (r)	0,9977	0,9958
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0,9955	0,9917
Intercepto (a)	-19.9263,8667	-1.168.399,533
Pendiente (b)	120.267.596,7	127.682.403,3
Varianza (S <sup>2</sup> y,x)	15.179.841.962	31.540.307.568
Test de Cochran	Gexp: 0,49 Gtab: 0,87 Gexp<Gtab	Gexp: 0,66 Gtab: 0,87 Gexp<Gtab
Desviación estándar de la pendiente (Sb)	2.249.432,666	3.242.442,884
Desviación estándar del intercepto (Sa)	871.201,5255	1.255.792,729
Test de hipótesis para la pendiente	T calculado: 53,47 T tabulado: 2,16 T calculado > T tabulado	T calculado: 39,38 T tabulado: 2,16 T calculado > T tabulado
Test de hipótesis para el intercepto	T calculado: 53,47 T tabulado: 2,16 T calculado > T tabulado	T calculado: 39,38 T tabulado: 2,16 T calculado > T tabulado
Análisis de varianza para la regresión lineal	F calculado: 2858,5860 F tabulado: 2,51 Si F calculado > F tabulado	F calculado: 1550,6630 F tabulado: 2,51 Si F calculado > F tabulado

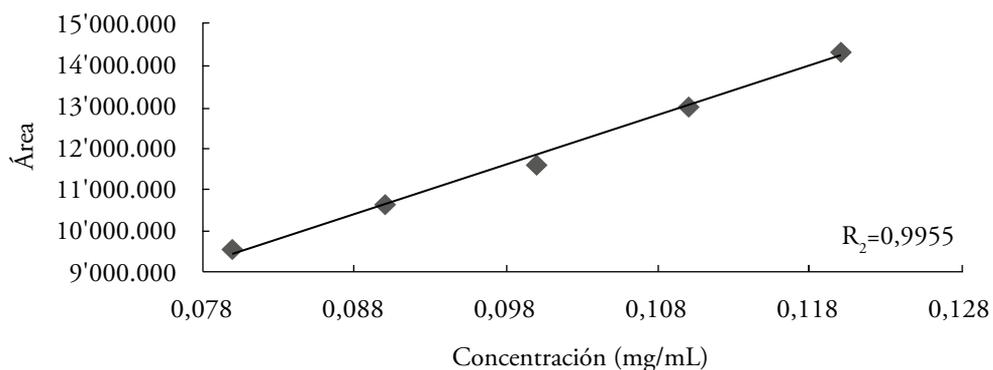


Figura 1. Curva de linealidad del sistema en validación de valoración.

### Precisión

En la tabla 2 se exponen los resultados correspondientes a este estudio. Para el caso específico de la repetibilidad, se utilizó una concentración nominal de 0,1 mg/L por triplicado, y se determinó la concentración a cada replica por inyección de tres veces cada una, arrojando un valor promedio ( $n = 9$ ) de  $97,0\% \pm 1,9$  con un % RSD menor de 2%.

En cuanto a la precisión intermedia, los resultados de recuperación no se presentan diferencias estadísticamente significativas, en razón a que se realizó el análisis en días diferentes o con analistas diferentes (tabla 2).

Tabla 2. Resultados y análisis estadísticos de la precisión intermedia.

Analista	Días	
	1	2
1	98,99	98,88
	98,86	99,01
	98,95	98,91
<b>Promedio</b>	<b>98,9</b>	<b>98,9</b>
<b>SD</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>
<b>% RSD</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>
2	97,41	98,42
	97,31	98,11
	97,35	98,76
<b>Promedio</b>	<b>97,4</b>	<b>98,4</b>
<b>SD</b>	<b>0,05</b>	<b>0,3</b>
<b>% RSD</b>	<b>0,05</b>	<b>0,3</b>

### Exactitud

Para la determinación de la exactitud se empleó el método de porcentaje de recuperación, el cual se realizó a tres niveles de concentración por triplicado de 90%, 100% y 110% de concentración (tabla 3). El alto porcentaje de recuperación para la warfarina sódica fue de  $98,1\% \pm 1,3$ , con un valor de % RSD de 1,4%, muy por debajo del criterio establecido ( $\% \text{RSD} < 2$ ).

Tabla 3. Resultado y análisis para el porcentaje de recuperación en la exactitud.

Concentración (%)	% Recuperación			Media	SD	%RSD
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3			
90	97,51	97,31	97,7	97,5	0,20	0,20
100	99,61	99,7	99,62	99,6	0,05	0,05
110	97,15	97,31	96,9	97,12	0,21	0,21

### Selectividad

En esta prueba las soluciones estándares y las muestras fueron sometidas a condiciones extremas en medio ácido, básico y de oxidación, con el fin de observar si el analito de interés presenta interferencia con sus productos de degradación generados.

En los cromatogramas se pudo observar un único pico característico de la warfarina en un tiempo de retención de 1,2 min en los medios ácidos y básicos, mientras que en condiciones de oxidación se presenta un pico producto de degradación del analito en estudio, eluyendo a un tiempo de retención de 3,0 min, sin presentar interferencia alguna con la señal de la warfarina sódica. Por lo tanto, la metodología utilizada es selectiva para la cuantificación del fármaco de interés.

## VALORACIÓN PRUEBA DE DISOLUCIÓN

### Linealidad del sistema

El valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) entre la cantidad de principio activo adicionado y la cantidad recuperada es de 0,9986. El coeficiente de variación de los factores de respuesta fue de 2. En la figura 2 se muestran la curva de la linealidad dentro del intervalo de trabajo (60%-100%). De acuerdo con el test estadístico indicado en la tabla 4, la linealidad cumple con los criterios de aceptación.

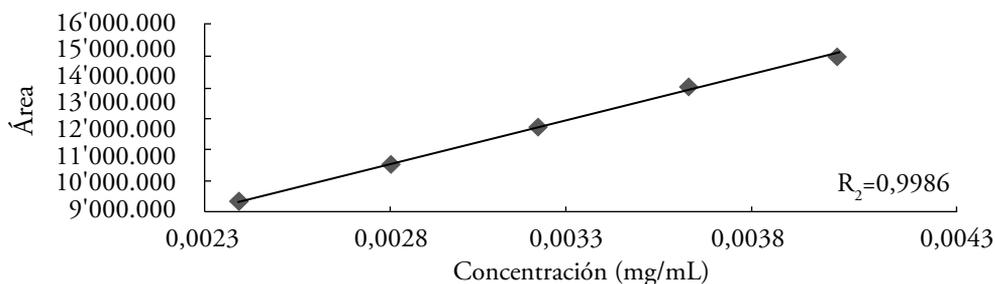


Figura 2. Curva de linealidad del sistema prueba de disolución.

Tabla 4. Resultados estadísticos de la prueba de linealidad del sistema.

Estadística	Sistema
Coefficiente de correlación (r)	0,9978
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0,9957
Intercepto (a)	186870,4917
Pendiente (b)	244077070,1
Varianza (S <sup>2</sup> y,x)	187829604,8
Test de Cochran	G <sub>exp</sub> : 0,38 G <sub>tab</sub> : 0,87 G <sub>exp</sub> <G <sub>tab</sub>
Desviación estándar de la pendiente (S <sub>b</sub> )	24755516,06
Desviación estándar del intercepto (S <sub>a</sub> )	165427,5256
Test de hipótesis para la pendiente	T calculado: 49,15 T tabulado: 2,16 T calculado > T tabulado
Test de hipótesis para el intercepto	T calculado: 49,15 T tabulado: 2,16 T calculado > T tabulado
Análisis de varianza para la regresión lineal	F calculado: 2415,9360 F tabulado: 2,51 Si F calculado > F tabulado

### Prueba de disolución

En la tabla se presentan los resultados para la prueba de disolución de la warfarina sódica comercial, en los que se puede constatar que el Q promedio hallado fue de  $92,3\% \pm 3,7$ , que es mayor al criterio establecido por la USP ( $Q > 80 + 5\%$ ), y un RSD de 4,0% (figura 3).

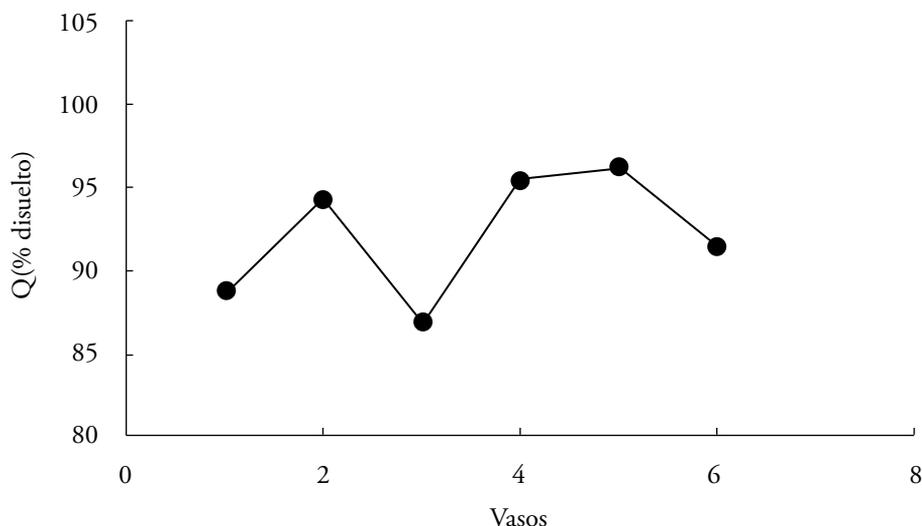


Figura 3. Disolución de las tabletas de warfarina sódica.

## CONCLUSIONES

Los resultados indican que el método para la cuantificación e identificación de warfarina sódica en tabletas, en las condiciones del Laboratorio de Análisis de Medicamentos (LAM), cumple con los parámetros establecidos por la USP 38 para este principio activo y son confiables. Esta metodología podrá ser implementada como apoyo al Centro de Investigación de Servicio Farmacéutico y Monitoreo de Fármaco que se gesta en la región Caribe Colombiana, así como a las entidades regulatorias y al sector farmacéutico a nivel regional y nacional, garantizando de esta manera que los resultados obtenidos puedan ser aplicados en el análisis del producto terminado y en los resultados de estabilidad de la forma farmacéutica sólida de warfarina sódica. El método USP validado en el laboratorio LAM es selectivo, ya que no se detecta interferencia con la matriz, ni con los productos de degradación en diferentes condiciones de pH y oxidación. El método es lineal en el intervalo de concentración del 80 al 120%, en la validación de la valoración. El método es preciso, ya que el grado de concordancia que existe entre las pruebas realizadas al 100% de concentración nos permite obtener resultados repetitivos, obteniéndose un RSD menos al 2% en cada replica; adicionalmente, no hubo diferencias estadísticas significativas entre los ensayos realizados con analistas y en días diferentes.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Cartagena, la Universidad del Atlántico, la Clínica de la Costa y la Gobernación del Atlántico por la financiación del proyecto “Desarrollo de Condiciones de Operaciones para el Centro de Servicios Farmacéuticos y Monitoreo de Fármacos”, BPIN N.º 2013000100105, Convenio N.º 0103\*2015\*000001. También agradecemos los aportes de la profesora Lucía Álvarez Álvarez, y del profesor Roberto Fernández de la Universidad de Cartagena.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

1. M. Ikawa, M.A. Stahmann, K.P. Link, 4-Hydroxycoumarins. V. Condensation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones with 4-hydroxycoumarin, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 902-906 (1944).
2. B.F. Gage, L.J. Lesko, Pharmacogenetics of warfarin: Regulatory, scientific and clinical issues, *J. Thromb. Thrombolys.*, **25**, 45-51 (2008).
3. J. Yurgakya, F. Rodríguez, Warfarina: Uso contemporáneo, *Rev. Fac. Med.*, **17**(1), 107-115 (2009).
4. A.C. Montenegro, A.F. Buitrago, Nueva era de la anticoagulación: Resurgimiento de las clínicas de anticoagulación, *Acta Méd. Colomb.*, **41**(1), 19-20 (2016).
5. L.S. Kaminsky, Z.Y. Zhang, Human P450 metabolism of warfarin, *Pharmacol. Ther.*, **73**(1), 67-74 (1997).
6. L.G. Jacobs, Warfarin pharmacology, clinical management, and evaluation of hemorrhagic risk for the elderly, *Cardiol Clin.*, **26**(2), 157-167 (2008).
7. H. Yamazaki, T. Shimada, Human liver cytochrome P450 enzymes involved in the 7- hydroxylation of R and S warfarin enantiomers, *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 1195-1203 (1997).

8. D.K. Wysowski, P. Nourjah, L. Swartz, Bleeding complications with warfarin use: A prevalent adverse effect resulting in regulatory action, *Arch. Intern. Med.*, **167**, 1414-1419 (2007).
9. Dirección de Medicamentos y Productos Biológicos, Información de seguridad relacionada con el producto: Warfarina tableta de 5 mg/titular: Europack System Ltda./Fabricante Química Patrick, Bogotá, 2016, URL: [https://www.invima.gov.co/images/pdf/alertas\\_portada/ALERTASANITARIAWARFARINAINVIMA.pdf](https://www.invima.gov.co/images/pdf/alertas_portada/ALERTASANITARIAWARFARINAINVIMA.pdf), Consultado en agosto de 2016.
10. K.K. Reynolds, R. Valdes, B.R. Hartung, M.W. Linder, Individualizing warfarin therapy personalized, *Medicine*, **4**, 11-31 (2007).
11. A. Osman, K. Arbring, T.L. Lindahl, A new high-performance liquid chromatographic method for determination of warfarin enantiomers, *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **826**, 75-80 (2005).
12. L. Hu, Y. Liu, S. Cheng, Simultaneous determination of six analytes by HPLC-UV for high throughput analysis in permeability assessment, *J. Chromatogr. Sci.*, **49**(2), 124-128 (2011).
13. P. Ravisankar, Ch.N. Navya, D. Pravallika, D.N. Navya, A review on step-by-step analytical method validation, *IOSR J. Pharmacy*, **5**(10), 7-19 (2015).
14. C.S.P. Sastry, T.N.V. Prasad, E.V. Rao, Recent applications of high performance liquid chromatography in pharmaceutical analysis, *Indian J. Pharm. Educ.*, **21**, 37 (1997).
15. A. Mohamed, M. Mokhtar, R. Mabrouk, Spectrofluorimetric determination of warfarin sodium by using N<sup>1</sup>-Methylnicotinamide chloride as a fluorogenic agent, *J. AOAC Intern.*, **88**(2), 455-461 (2005).
16. G.A. Shab, Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chromatogr. A*, **987**(1-2), 57-66 (2003).
17. The United States Pharmacopeia, USP 38, Official Monographs, Baltimore, Maryland, USA, 2015, p. 6236-6237.

18. Y.A. Chua, W.Z. Abdullah, S.H. Gan, Development of a high-performance liquid chromatography method for warfarin detection in human plasma, *Turk. J. Med. Sci.*, **42**(5), 930-941 (2012).
19. J.W. Dolan, The hazards of adjusting gradients, *LC-GC Chromatogr.*, **20**, 940-947 (2002).
20. J.M. Green, Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation, *Anal. Chem.*, **68**, 305A-309A (1996).
21. J.N. Miller, J.C. Miller, "Estadística y quimiometría para química analítica", Prentice Hall, Madrid, 2002, pp. 97-98.
22. W. Naidong, P.R. Ring, C. Midtlien, X. Jiang, Development and validation of a sensitive and robust LC-tandem MS method for the analysis of warfarin enantiomers in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**, 219-226 (2001).

### CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

F. Sánchez-Hoyos, A. Cárdenas, J. Mercado-Camargo, G. Domínguez-Moré, H. Gómez-Estrada, Validación de una metodología analítica USP por HPLC para la cuantificación de warfarina sódica en tabletas, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(3), 470-483 (2016).