

METODE ANALISA WARFARIN

Mochamad Rizky Fauzy, Yasmiwar Susilawati

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21 Jatinangor, Sumedang
45363, Indonesia

Email korespondensi: rizkyfauzy8@gmail.com

Diserahkan 16/07/2019, diterima 29/01/2020

ABSTRAK

Warfarin merupakan obat antikoagulan atau biasa dikenal dengan obat pengencer darah dengan indeks terapi yang sempit. Pembentukan gumpalan darah di dalam sirkulasi, dapat terjadi di kedua arteri dan pembuluh darah. Penyebabnya bisa beragam, termasuk induksi agregasi platelet, peningkatan daya rekat trombosit, atau peningkatan aktivasi faktor pembekuan seperti protrombin. Trombosis dapat terjadi sehingga dapat menghentikan aliran darah menuju organ penting dan mengakibatkan kerusakan sel secara permanen atau kematian. Terdapat beberapa metode analisa warfarin yang dapat digunakan, salahsatunya ialah menggunakan HPLC. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merupakan salah satu metode analisa yang dapat digunakan untuk menganalisa kadar warfarin karena memiliki beberapa keuntungan seperti efektifitas waktu analisa, kemudahan, dan keakuratan.

Kata Kunci: Warfarin, Gumpalan, Metode analisa, HPLC

ABSTRACT

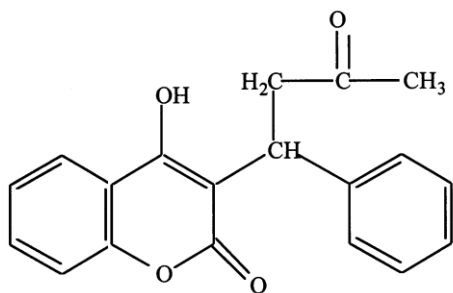
Warfarin is an anticoagulant drug commonly known as blood thinners with narrow therapeutic index. Formation of blood clots in the circulation, can occur in both arteries and veins. It could vary, including the induction of platelet aggregation, increased platelet adhesiveness, or increased activation of coagulation factors such as prothrombin. Thrombosis can occur that can stop the flow of blood to vital organs and lead to cell damage or death permanently. There are several methods of analysis that can be used warfarin, one of them is using HPLC. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) is one method that can be used to analyze the level of warfarin because it has several advantages such as the effectiveness of the analysis, ease, and accuracy.

Keyword: Warfarin, Clots, Analysis methods, HPLC

Pendahuluan

Warfarin (senyawa 4-Hidroksikumarin) adalah obat yang paling banyak digunakan sebagai antikoagulan oral untuk mengobati dan mencegah tromboemboli vena dan arteri. Warfarin lebih populer disebut sebagai "pengencer darah," namun hal tersebut kurang tepat, karena warfarin tidak mempengaruhi kekentalan atau viskositas darah. Sebaliknya, warfarin bekerja pada hati untuk mengurangi

jumlah protein kunci dalam darah yang memungkinkan darah menggumpal (Ulfer, 2005). Warfarin memberikan efek antikoagulan dengan mengurangi sintesis faktor koagulasi dan berhubungan dengan vitamin K (Denooz, 2009).



Warfarin

Gambar 1. Struktur Warfarin

Warfarin merupakan obat dengan indeks terapeutik yang sempit, sehingga memerlukan pemantauan konsentrasi dengan menilai efek farmakologisnya pada rasio normalisasi internasional (INR) (Radwan, 2011). Secara kritis, kontrol INR yang tidak memadai dapat menyebabkan efek buruk yang parah, under-antikoagulasi dapat mempengaruhi pasien untuk trombosis, sedangkan over-antikoagulasi dapat meningkatkan risiko perdarahan (Parfenyuk, 2017).

Pemantauan efek obat ini biasanya dilakukan dengan mengukur parameter koagulasi yaitu rasio normalisasi internasional (INR). Namun, INR masih memiliki keterbatasan dalam mendeteksi faktor-faktor tersebut seperti kepatuhan pasien, resistensi terhadap antikoagulan, interaksi obat dan variasi makanan. Meskipun INR diterima secara luas sebagai standar untuk pemantauan terapi antikoagulasi, dan pemantauan penyesuaian dosis. Pemantauan konsentrasi sangat penting dalam beberapa situasi untuk konfirmasi faktor-faktor yang mempengaruhi antikoagulan, terutama ketika INR ideal sulit untuk ditargetkan (Denooz, 2009).

Beberapa metode analitis telah dikembangkan untuk pengukuran antikoagulan dalam plasma, seperti kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS), kromatografi cair kinerja tinggi – spektrometri massa (HPLC-MS), serta kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Kombinasi antara HPLC dengan ESI-MS / MS menghasilkan waktu retensi yang relatif singkat, selektifitas tinggi, serta memiliki keakuratan yang tinggi. Secara umum semua metode memiliki kelebihan serta kekurangannya masing-masing, dan tidak memenuhi tuntutan dalam hal kecepatan, akurasi dan efisiensi biaya (Sun, 2006).

Bahan dan Metode

Metode yang digunakan dalam menulis *review* artikel ini yaitu dengan studi literatur menggunakan bantuan *search engine* yaitu *google scholar*, dan situs penyedia jurnal online seperti NCBI, PubMed, Elsevier, dll. Pencarian literatur menggunakan sumber data primer berupa hasil penelitian yang dipublikasikan dalam jurnal nasional maupun internasional dalam rentang waktu 10 tahun terakhir.

Tabel 1. Hasil Penelusuran Studi Pustaka Metode Analisa Warfarin

No	Judul	Metode/kondisi analisa	Hasil	Referensi
1	<i>Determination of warfarin and warfarin alcohols in dried blood spots by ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS)</i>	- UHPLC dengan fase terbalik - Baku : - - Kolom : Poroshell C-18 (50x2.1mm, 2,7µm) - Fase gerak : Asam Format 65% : Acetonitril (65 : 35) - Elusi : Isokratik	Metode tervalidasi, waktu analisa cepat, sensitif, dan akurat untuk penentuan warfarin dan kedua diastereoisomer dari warfarin hidroksida dalam sampel darah.	(Ghimienti S <i>et al.</i> , 2017)
2	<i>An electrochemical sensor based on multiwall carbon nanotubes and molecular imprinting strategy for warfarin recognition and determination</i>	Metode elektrokimia Pengukuran dilakukan dengan potensiostat-galvanostat dengan konfigurasi 3 elektroda	Sensor yang dicetak menunjukkan kinetika yang mengikat cepat pada template karena tingginya rasio permukaan yang dicetak, rasio permukaan-terhadap-volume yang besar dan telah menunjukkan afinitas yang besar terhadap template. Akhirnya, kemampuan sensor yang diusulkan dievaluasi dengan penentuan warfarin dalam sampel serum.	(Rezaei B <i>et al.</i> , 2014)
3	<i>Carbonyl reduction of warfarin: Identification and characterization of human warfarin reductases</i>	- UHPLC dengan fase terbalik - Baku : - - Kolom : Zorbax C18 (2,1 50mm, 2,7µm) - Fase gerak : Asam Format 65%: Acetonitril (65 : 35) - Elusi : Gradien - Panjang gelombang : warfarin : 310 nm alkohol warfarin : 390 nm	Telah teridentifikasi AKR1C3 sebagai yang utama, enzim dan CBR1 sebagai enzim minor yang bertanggung jawab untuk warfarin pengurangan sitosol hati manusia dan didapat hasil melakukan studi rinci pembentukan stereoisomer alkohol warfarin individu. Sampai Sekarang, tidak ada penelitian yang secara tegas mengidentifikasi karbonil warfarin dalam mengurangi enzim pada manusia.	(Malatkova <i>et al.</i> , 2016)
4	<i>Determination of warfarin alcohols by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to in vitro enzyme kinetic studies</i>	- UHPLC - Baku : Warfarin - Kolom : ThermoHypersil Gold C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.9 µm) - Fase gerak :	Metode ini tervalidasi, sederhana, akurat dan tepat, saat ini sedang digunakan untuk mendukung studi kinetik enzim warfarin yang membutuhkan penentuan kuantitatif tinggi dari	(Alshogan <i>et al.</i> , 2013)

		Larutan A : air yang mengandung asam format 0,01% (60) Larutan B : (asetonitril mengandung asam format 0,1% (40) - Elusi : Gradien	metabolit warfarin alkohol.	
5	<i>Novel multi-mode ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for profiling enantiomeric hydroxywarfarins and warfarin in human plasma</i>	- UHPLC dengan fase terbalik - Baku : 1. Warfarin 2. Hidroksi-warfarin - Kolom : 1. Phenyl column (2.1mm×150 mm 1.7 µm) 2. Astec Chirobiotic V column [2.1mm×150mm, 5 µm) - Fase gerak : Methanol ; campuran 45% air dan asam format 0,01% (55; 45) - Elusi : Gradien	Hasil pemisahan yang didapat bahwa waktu retensi warfarin dan hidroksiwarfarin ialah 17 menit. Metode ini secara akurat mengukur warfarin dan metabolitnya pada plasma manusia dengan sensitivitas tinggi.	(Jones <i>et al.</i> , 2011)
6	<i>Determination of total and unbound warfarin and warfarin alcohols inhuman plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection</i>	- HPLC fase terbalik - Baku : 1. Warfarin 2. Warfarin alkohol - Kolom : Zorbax Extend – C18 50 mm × 2.1 mm, 1.8 µm - Fasa gerak : Methanol ; acetonitrile ; dapar fosfat pH 7 (25 ; 5 ; 70) - Elusi : isocratic - Panjang gelombang 360 nm	Nilai pengikatan protein untuk warfarin adalah 99,0%. Ini sebanding dengan 99,1% untuk warfarin dalam sampel dari 86 pasien yang menggunakan ¹⁴C berlabel WAR dan ultrafiltrasi dengan perangkat <i>Centrifree</i>. Untuk warfarinhidroksida hasil yang sama diperoleh (98,9%).	(Lomonaco <i>et al.</i> , 2013)
7	<i>Development of a chiral micellar electrokinetic chromatography–tandem mass</i>	- Miselar elektrokinetik kromatografi spektrofotometri	Metode kiral MEKC – ESI-MS / MS memungkinkan kuantisasi R-4 hidroksi wardarin dan S-4	(Wang <i>et al.</i> , 2013)

	<i>spectrometry assay for simultaneous analysis of warfarin and hydroxywarfarin metabolites: Application to the analysis of patients serum samples</i>	massa - Baku : 1. Warfarin 2. Hidroksiwarfari n	hidroksiwarfarin dalam 5% dan 95% dari sampel plasma masing-masing. Nilai LOQ Lebih rendah daripada penelitian
8	<i>Development of a high-performance liquid chromatography method for warfarin detection in human plasma</i>	- HPLC fase terbalik - Baku : Warfarin - Detektor : PDA - Panjang gelombang : 300 nm - Kolom : - - Fase gerak : -	Metode ini memberikan persentase repeatability hampir 90% dan hemat biaya. Secara keseluruhan, metode ini sederhana, ekonomis, nilai resolusi baik dan menghasilkan kromatogram yang sesuai dengan pedoman FDA. (Chua <i>et al.</i> , 2012)
9	<i>Investigation of two-dimensional high performance liquid chromatography approaches for reversed phase resolution of warfarin and hydroxywarfarin isomers</i>	- HPLC fase terbalik - Baku : 1. Warfarin 2. Hidroksi-warfarin - Kolom : Poroshell 120 - C18, dan phenyl hexyl (3.0 mm × 100 mm, 2.7µm) - Fase gerak : - - Detektor : -	Analisis HPLC fase terbalik 2D offline dari semua 12 komponen campuran warfarin dapat dicapai dalam waktu sekitar 25 menit, dapat juga digunakan dengan sistem 2D online yang lebih canggih. Walaupun jauh lebih lambat 8 menit. Metode HPLC 2D bisa digunakan untuk analisa multikomponen dengan hasil yang baik. (Regalado <i>et al.</i> , 2014)
10	<i>Measurement of warfarin in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) and its correlation with the international normalized ratio</i>	- Pengukuran INR dengan MLA 1600 automated coagulometer - Baku : -	Konsentrasi warfarin lebih banyak berkorelasi dengan dosis mingguan dibandingkan dengan INR. Koefisien korelasi antara konsentrasi warfarin dan INR atau dosis mingguan untuk 50 pasien yang diobati adalah 0,55 (p <0,0001) atau 0,25 (p = 0,079). (Lombardi <i>et al.</i> , 2003)
11	<i>Three-phase hollow fiber liquid phase microextraction of warfarin from human plasma and its determination by high-performance liquid chromatography</i>	- HPLC fase terbalik - Baku : Warfarin - Kolom : C18 (250 mm × 4 mm, 5 µm) - Fasa gerak : Methanol ; asam fosfat (63 ; 35) - Elusi : isocratic - Detektor : Uv 360 nm	Metode ini merepresentasikan hasil yang tinggi dan memiliki sensitivitas yang baik, sementara memungkinkan pembersihan sampel yang efisien. Rentang linear yang lebar dari metode ini dapat diterapkan untuk pemantauan terapeutik obat warfarin. (Hadmohammadi <i>et al.</i> , 2012)

12	<i>Determination of free and total warfarin concentrations in plasma using UPLC MS/MS and its application to a patient samples</i>	- UPLC - Baku : Warfarin - Kolom : BEH C18 (50 × 2.1 mm, 1.7 µm - Fasa gerak : Pelarut A, 0.2% asam format dan 1% acetonitrile dalam air Pelarut B, 0.2% asam format dalam acetonitrile (80% -> 70%) - Elusi : Gradien - Detektor : -	Hasil yang didapat cukup baik, metode tervalidasi, dan akurat meskipun pasien tersebut mengkonsumsi obat lain, tapi hal tersebut tidak mengganggu dalam deteksi warfarin menggunakan UPLC MS. (Radwan <i>et al.</i> , 2011)
13	<i>Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of warfarin in human plasma</i>	- UPLC - Kolom : C18 (250 mm × 4.6 mm, 10 µm - Fasa gerak : Methanol ; Asam fosfat 0,5% (65 ; 35) -Detektor : -	Teknik LDS-DLLME dikombinasikan dengan HPLC-UV diterapkan untuk ekstraksi dan penentuan warfarin dalam cairan dan sampel plasma. Metode yang disajikan memiliki pengulangan yang baik dan deteksi rendah. Lebar rentang linear dari metode ini dapat diterapkan secara baik pemantauan terapeutik warfarin. (Ghambari, 2012)
14	<i>Simultaneous Determination of Warfarin Enantiomers and Its Metabolite in Human Plasma by Column-Switching High-Performance Liquid Chromatography With Chiral Separation</i>	- UPLC - Baku : Rasemik Warfarin 99,5% - Kolom : column I; 10 mm 3 4.6 mm x 5 µm column II; 150 mm 3 4.6 mm x 5 µm - Fasa gerak : Methanol ; Asam fosfat 0,5% (65 ; 35) - Elusi : - Panjang gelombang 312 nm	Prosedur HPLC untuk penentuan secara simultan enansiomer warfarin adalah mudah, sensitif, dan dapat diandalkan. Kisaran linearitas dan batas kuantifikasi yang dicapai memungkinkan pengukuran terapeutik konsentrasi (R) -warfarin, (S) -warfarin, dan (S) -7- hidroksiwarfarin dan dapat diterapkan pada farmakokinetik studi yang berkaitan dengan aktivitas CYP2C9 pada manusia. (Uno, 2007)

15	<i>Bioequivalence Study of Warfarin in Healthy Chinese Volunteers With a Validated High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method</i>	- HPLC-MS - Baku : Warfarin 92,3% - Kolom : - - Fasa gerak : - - Detektor : -	Dalam penelitian ini tidak ada perbedaan yang signifikan dalam parameter farmakokinetik antara subjek yang memiliki genotipe CYP2C9 dan VKORC1 berbeda. Polimorfisme gen CYP2C9 dan VKORC1 memiliki sedikit efek pada farmakokinetik tabel natrium warfarin berlapis film dan gula.	(Li et al., 2017)
16	<i>Validation of a method for the determination of (R)-warfarin and (S)-warfarin in human plasma using LC with UV detection</i>	- HPLC - Baku : Rasemik Warfarin - Kolom : Astec b-cyclodextrin 250 x 4.6 mm, 5 cm - Fasa gerak : acetonitrile: glacial acetic acid:triethylamine (1000:3:2.5, v:v:v) - Panjang gelombang 320 nm	Didapatkan hasil validasi yang valid, selain itu waktu analisa bias menjadi lebih cepat dan menghasilkan repeatabilitas yang tinggi.	(Ring, 2000)
17	<i>An HPLC–HR-MS-MS Method for Identification of Anticoagulant Rodenticides in Blood</i>	- HPLC-MS - Baku : Warfarin - Kolom : Altima C18, 5 mm 2.1 x 150 mm - Fasa gerak : - - Detektor : -	Metode sangat spesifik dan sensitif sepenuhnya tervalidasi untuk Analisis LC-MS-MS dari enam rodentisida antikoagulan dalam darah	(Schaff, 2013)
18	<i>A Chiral HPLC-MS/MS Method for Simultaneous Quantification of Warfarin Enantiomers and its Major Hydroxylation Metabolites of CYP2C9 and CYP3A4 in Human Plasma</i>	- HPLC-MS/MS - Baku : 1. R-Warfarin 2. S-Warfarin 3. Rasemik Warfarin - Fasa gerak : Air ; Acetonitril ; Methanol ; Asam asetat - Kolom : Astec Chirobiotic (100 mm × 4.6 mm: 5 µm) - Detektor : -	Metode yang digunakan yaitu HPLC-MS/MS sangat sensitif, waktu retensi relatif lebih pendek dan telah tervalidasi. Instrument MS sangat memungkinkan digunakan untuk penelitian dengan jumlah sampel yang terbatas.	(Ju et al., 2014)

19	<i>A New High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Warfarin Enantiomers</i>	- HPLC - Baku : Warfarin 1mg/ml - Detector : PDA - Elusi : Isokratik - Fasa Gerak : Methanol ; Acetonitril ; Air (50;10;40, v/v) - Kolom : chiral column of type Pirkle (R,R) Whelk-O1 column (250mm×4.6 mm, 5µm - Panjang gelombang 305 nm	Metode yang digunakan spesifik dan terbebas dari gangguan matriks pengotor Metode ini menawarkan deteksi yang dapat direproduksi dan stabil enantiomer warfarin dalam plasma. Metode ini sangat cocok untuk rutinitas harian analisis sampel pasien yang dikirim di laboratorium medis.	(Osman <i>et al.</i> , 2005)
20	<i>Measurement of Warfarin in the Oral Fluid of Patients Undergoing Anticoagulant Oral Therapy</i>	- HPLC-MS/MS - Baku : - - Elusi : isokratik - Kolom : 1. Fase terbalik Chromspher 5 PAH, 150 x 64.6 mm, 5 mm, (Fase gerak PBS 72% ; methanol 28%) 2. Fase terbalik Poroshell 120 EC-C18 10064.6 mm, 2.7 mm (Fase gerak PBS 65% ; methanol 35%) - Panjang gelombang 400 nm	Secara umum metode yang digunakan sangat baik, sensitive, dan tervalidasi Metode ini bebas dari gangguan dan efek matriks, linier dalam kisaran 0,2-100 ng / mL, dengan deteksi batas 0,2 ng / mL. Dosis tidak berkorelasi dengan INR ($r = 20,03$, $p = 0,85$) tetapi berkorelasi positif dengan konsentrasi warfarin dalam cairan oral ($r = 0,39$, $p = 0,006$). Warfarin berdifusi dari darah ke cairan oral. Metode ini memungkinkan untuk mengukur konsentrasinya dalam matriks ini dan untuk menganalisis korelasi dengan INR dan parameter lainnya.	(Ghimenti <i>et al.</i> , 2011)

Simpulan

Dapat disimpulkan secara umum metode yang banyak digunakan dalam berbagai sumber acuan jurnal yang digunakan ialah analisis menggunakan HPLC, dan HPLC-MS/MS. Alasan penggunaan analisa menggunakan HPLC adalah karena sangat sensitif, dapat dipertanggung jawabkan, tervalidasi, *Limit of quantitation* (LOQ) dapat mendeteksi kadar yang

sangat kecil, waktu analisa yang relatif singkat, dan preparasi yang tidak terlalu rumit. Namun terdapat juga kekurangan dari segi biaya yang digunakan cukup mahal.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis kepada dosen pembimbing, Dr. Yasmiwar Susilawati, M.Si., Apt dan dosen mata kuliah metodologi penelitian dan biostatistika, Rizky Abdulah, Ph.D, Apt. Serta keluarga dan sahabat.

Daftar Pustaka

- Chua, Y.A., Zaidah,W., Abdullah., Gan, S.H. 2012. Development of a high-performance liquid chromatography method for warfarin detection in human plasma. *Development of a HPLC method for warfarin detection*
- Denooz, Z R., Douamba, C., Charlier. 2009. Fatal intoxications by acenocoumarol, phenprocoumon and warfarin: method validation in blood using the total error approach, J. Chromatogr. B 877. 2344–2348.
- Ghambari, H., Hadjmohammadi, M. 2012. Low-density solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of warfarin in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 899. 66– 71
- Ghimenti,S., Lomonaco, T., Biagini, D., Bellagambi, F.G., Onor, M., Trivella,M.G., Ruocco, L., Pellegrini, G., Francesco., Fuoco, R, Determination of warfarin and warfarin alcohols in dried blood spots by ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS). *Microchemical Journal*.
- Ghimenti,S., Lomonaco, T., Onor,M., Murgia,L., Paolicchi,A., Fuoco,R., Ruocco,L., Pellegrini,G., Trivella,M,G., Francesco,F,D. 2011. Measurement of Warfarin in the Oral Fluid of Patients Undergoing Anticoagulant Oral Therapy. *Plos One Vol 6 Issue 12*
- Hadjmohammadi, H., Ghambari, G. 2012. Three-phase hollow fiber liquid phase microextraction of warfarin from human plasma and its determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 61. 44– 49.
- Jones, D.R., Boysen, G., Miller,G.P. 2011. Novel multi-mode ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for profiling enantiomeric hydroxywarfarins and warfarin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 879. 1056–1062.
- Ju,W., Peng,K., Sun,H., Sampson,M., Wang,MZ. 2014. A Chiral HPLC-MS/MS Method for Simultaneous Quantification of Warfarin Enantiomers and its Major Hydroxylation Metabolites of CYP2C9 and CYP3A4 in Human Plasma. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry* 1(2)
- Klaasseeen, C.D., M.O. Amdur, J. Doull (Eds.), Casarett and Doull's. 1986. Toxicology: The Basic Science of Poisons, 3rd ed. New York :Macmillan.
- Li, W., Bu, F., Rong Li, BenjieWang., Shaikh, A.S., Zhang, Y., Guo,R., Zhang, R. 2017. Bioequivalence Study ofWarfarin in Healthy Chinese VolunteersWith a Validated High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method. *Clinical Pharmacology in Drug Development* 2017, 00(0).
- Lombardi, R., Chantarangkul, V., Cattaneo, M., Tripodi, A. 2003. Measurement of warfarin in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) and its correlation with the international normalized ratio. *Thrombosis Research* 111. 281–284
- Lomonaco, T., Ghimenti, S., Piga, I., Onor,M., Melai, B., Fuoco,R., Francesco, F.D.2013. Determination of total and unbound warfarin and warfarin alcohols inhuman plasma by high performance liquid chromatography withfluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1314. 54– 62
- Malatkova, P., Sokolova, S., Havilkova, L.C., Wsol, V. 2016. Carbonyl reduction of warfarin: Identification and characterization of human warfarin reductases. *Biochemical Pharmacology*.
- Osman,A., Arbring,K., Lindahl,L,T. 2005. A New High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Warfarin Enantiomers. *Journal of Chromatography B* 826 75-80
- Parfenyuk, E.V., Dolinina, E.S., 2017. Development of novel warfarin-silica

- composite for controlled drug release. *Pharm. Res.* 34, 825–835.
- Radwan, M.A., Bawazeer, G.A., Aloudah, N.M., AlQuadeib, B.T., Aboul, H.Y. 2011. Determination of free and total warfarin concentrations in plasma using UPLC MS/MS and its application to a patient samples. *Biomed. Chromatography*. 26: 6–11
- Radwan.M, Ghada A. Bawazeer , Nouf M. Aloudah ,Bushra T. AlQuadeib and Hassan Y. Aboul-Enein. 2011. Determination of free and total warfarin concentrations in plasma using UPLC MS/MS and its application to a patient samples. *Biomedical Chromatography*. 26. 6-11
- Razei, B., Rahmaian, O., Ensafi Ali, A. 2014. An electrochemical sensor based on multiwall carbon nanotubes and molecular imprinting strategy for warfarin recognition and determination. *Sensors and Actuators B* 196 (2014) 539–545
- Regalado, E.L., Schariter, J.A., Welch, C.J. 2013. Investigation of two-dimensional high performance liquid chromatography approaches for reversed phase resolution of warfarin and hydroxywarfarin isomers. *Journal of Chromatography A*, 1363. 200–206.
- Ring, P.R., Bostick, J.M. 2000. Validation of a method for the determination of (R)-warfarin and (S)-warfarin in human plasma using LC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 22. 573–581
- Schaff, J.E., Montogemery, M.A. 2013. An HPLC–HR-MS-MS Method for Identification of Anticoagulant Rodenticides in Blood. *Journal of Analytical Toxicology*;37:321–325
- Sun, S., Minghua, W., Lequn, Li., Hongjian Li., Dajian Gu. 2006. Study on warfarin plasma concentration and its correlation with international normalized ratio. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42. 218–222
- Ufer, M. 2005. Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol, *Clin. Pharmacokinet.* 44. 1227–1246.
- Uno, T., Niioka, T., Hayakari, M., Sugawara, K., Tateishi, T. 2007. Simultaneous Determination of Warfarin Enantiomers and Its Metabolite in Human Plasma by Column-Switching High-Performance Liquid Chromatography With Chiral Separation. *The Drug Monitoring* Vol 29, Number 3.
- Wang, X., Hou, J., Jann, M., Hon, Y.Y., Shamsi, S.A. 2013. Development of a chiral micellar electrokinetic chromatography–tandem mass spectrometry assay for simultaneous analysis of warfarin and hydroxywarfarin metabolites: Application to the analysis of patients serum samples. *Journal of Chromatography A*, 1271. 207–216