



Review Metode Analisis Warfarin dalam Plasma dengan Berbagai Instrumen

(Review of analytical method of warfarin in plasma with various instruments)

Shofuro Sholihah*¹, Norisca Aliza Putriana² & Rimadani Pratiwi²

¹Program Studi Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia

²Departemen Farmasetika dan Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat

ABSTRACT: Warfarin is an oral anticoagulant drug used to treat thromboembolism-related diseases. Warfarin has a narrow therapeutic index and may interact with drugs and herbs thus requires careful monitoring of its pharmacological effects. Determination of blood warfarin levels is one of the methods of monitoring side effects due to drug interactions and consequently dose adjustments. This article is a literature review to provide an overview of the methods used to analyze the concentration of warfarin in blood plasma and its sample preparation technique. The method used in this article review is a search through the PubMed® database. Results showed that the methods commonly used for determination of warfarin in plasma are high-performance liquid chromatography (HPLC) and ultra-HPLC with ultraviolet (UV), fluorescence (FLD), diode array (DAD), and mass spectroscopy (MS) detectors. Other methods are UV/Vis or fluorescence spectrophotometry and electrophoresis. The HPLC with mass spectroscopy detector is widely used to analyze warfarin and the most preferred sample preparation method is protein precipitation using acetonitrile as a protein precipitant and the addition of acid to increase the recovery.

Keywords: determination; warfarin; blood plasma; HPLC.

ABSTRAK: Warfarin merupakan obat antikoagulan oral yang digunakan untuk menangani penyakit terkait dengan tromboembolisme. Warfarin memiliki indeks terapi yang sempit serta memiliki kecenderungan berinteraksi dengan obat maupun herba sehingga membutuhkan pemantauan yang cermat pada efek farmakologi yang ditimbulkan. Penentuan pemberian dosis serta pengamatan efek dari interaksi warfarin dengan obat atau herba salah satunya dapat diketahui dengan menganalisis konsentrasi warfarin dalam plasma darah. Artikel ini merupakan kajian pustaka yang bertujuan untuk memberikan tinjauan mengenai metode yang digunakan untuk menganalisis konsentrasi warfarin dalam plasma darah serta teknik preparasi sampelnya. Metode yang digunakan dalam review artikel ini menggunakan penelusuran melalui basis data PubMed®. Hasil yang didapatkan bahwa metode yang umum digunakan untuk determinasi warfarin dalam plasma darah yakni *high-performance liquid chromatography* (HPLC) serta ultra-HPLC dengan detektor ultraviolet (UV), fluoresensi (FLD), *diode array* (DAD), maupun spektroskopi massa (MS). Metode lainnya yaitu spektrofotometri UV/Vis dan spektrofotometri fluoresensi serta elektroforesis. Dari metode tersebut, metode HPLC dengan detektor spektroskopi massa paling banyak digunakan untuk menganalisis warfarin serta teknik preparasi sampel yang umum digunakan yakni preparasi sampel yang umum digunakan yakni presipitasi protein menggunakan asetonitril sebagai protein presipitan serta penambahan asam untuk meningkatkan nilai *recovery* warfarin dari plasma darah.

Kata kunci: metode analisis; warfarin; plasma darah; HPLC.

Pendahuluan

Warfarin adalah obat yang digunakan untuk mengencerkan darah atau memiliki efek antikoagulan. Warfarin memiliki indikasi penyakit terkait tromboembolisme. Antikoagulan berfungsi untuk mencegah pembekuan darah dengan cara menghambat fungsi dari faktor-faktor pembekuan darah. Antikoagulan diperlukan untuk mencegah terbentuknya trombus serta emboli yang berperan dalam penyumbatan pembuluh darah. Warfarin di pasaran tersedia dalam bentuk campuran rasemat. Warfarin terdapat dalam bentuk campuran rasemat yang terdiri dari dua enansiomer yakni

R-Warfarin dan S-Warfarin. Struktur warfarin dapat dilihat pada [Gambar 1](#). Warfarin memiliki efektivitas yang tinggi dalam menyelamatkan nyawa, dan lebih dari 30 juta orang per tahun menggunakan warfarin [1].

Warfarin merupakan obat dengan indeks terapi yang sempit, artinya jika ada sedikit perubahan kadar obat dalam darah maka dapat berefek pada perubahan respons. Interaksi warfarin dengan obat maupun herbal dapat mengubah kadar warfarin dalam plasma, baik menjadi bertambah ataupun berkurang. Hal tersebut dapat menyebabkan penggunaan

Article history

Received: 04 Mei 2021
Accepted: 01 Juni 2021
Published: 05 Agustus 2021

Access this article



*Corresponding Author: Shofuro Sholihah

Program Studi Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung Sumedang KM.21, Hegarmanah, Jatinangor, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat, 45363 | Email: shofuro17001@mail.unpad.ac.id

warfarin menjadi tidak aman dan tidak efektif. Oleh karena itu, warfarin memerlukan pemantauan yang cermat atas efek farmakologi yang ditimbulkan. Pemantauan efek farmakologi biasanya dilakukan dengan melihat nilai INR (*International Normalized Ratio*). Pada umumnya, nilai INR yang direkomendasikan setelah penggunaan warfarin yakni 2-3. Nilai INR yang tinggi berarti efek antikoagulan warfarin berlebihan, sehingga terjadi perdarahan sebagai efek samping. Oleh karena itu, diperlukan regimen dosis warfarin yang tepat agar tidak menimbulkan efek samping berupa pendarahan atau sebaliknya tromboembolisma. Penentuan pemberian dosis serta pengamatan efek dari interaksi warfarin dengan obat atau herba salah satunya dapat diketahui dengan menganalisis konsentrasi warfarin dalam plasma darah [2].

Berbagai metode telah banyak dikembangkan untuk menganalisis warfarin secara kuantitatif dalam plasma darah, seperti HPLC dengan detektor Fluoresensi (FLD) yang memberikan nilai batas bawah deteksi mencapai 0,4 ng/mL [3], detektor *Diode Array* (DAD) yang memberikan nilai batas bawah deteksi mencapai 20 ng/mL [4], detektor UV yang memberikan nilai batas bawah deteksi mencapai 1,25 ng/mL [5] maupun detektor MS yang memberikan nilai batas bawah deteksi mencapai 0,08 ng/mL [6]. Selain metode HPLC, digunakan pula metode elektroforesis dengan basis *Carbon Paste Electrode* [7].

Dalam analisis menggunakan sampel biologis seperti plasma darah, perlu diperhatikan pula teknik dalam preparasi sampel. Teknik preparasi sampel yang umum digunakan untuk sampel biologis yakni presipitasi protein, ekstraksi cair-cair, dan ekstraksi fase padat [8]. Adapun modifikasi dari teknik ekstraksi cair-cair yang telah digunakan yakni mikroekstraksi cair-cair [9]. Selain itu, terdapat pula teknik preparasi dengan penambahan ultrafiltrasi [10].

Artikel ini bertujuan untuk memberikan tinjauan serta perbandingan mengenai metode analisis yang digunakan untuk mengkuantifikasi warfarin dalam plasma darah, baik dalam metode preparasi sampel maupun dalam teknik pendeteksian.

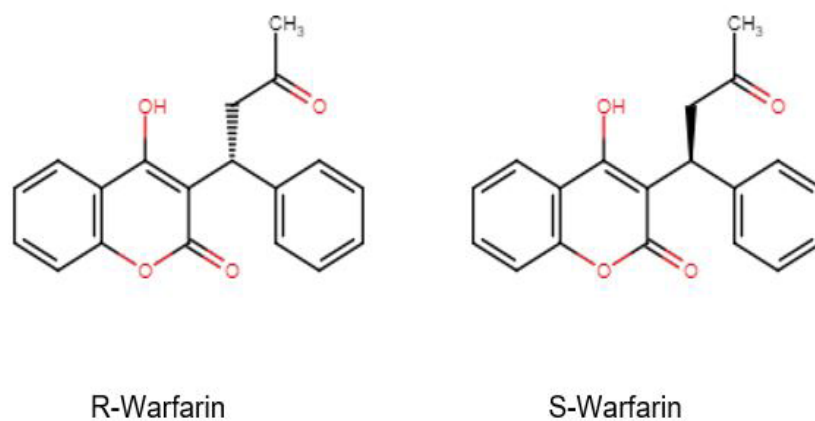
Metode Penelitian

Basis Data yang Digunakan

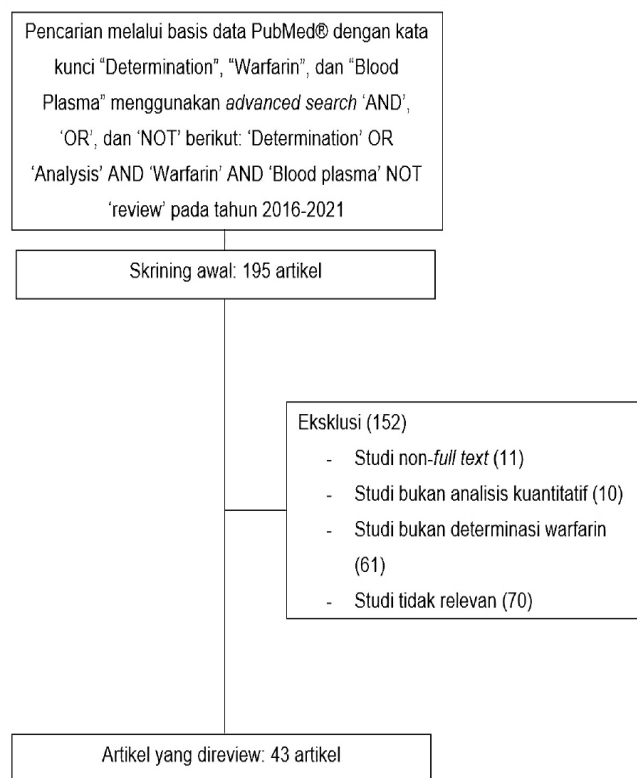
Metode yang digunakan dalam penulisan kajian pustaka ini adalah dengan melakukan penelusuran pustaka dari penelitian yang berkaitan dengan metode analisis warfarin dalam plasma darah melalui basis data PubMed® dengan kata kunci “Determination”, “Warfarin”, dan “Blood Plasma” menggunakan *advanced search* ‘AND’, ‘OR’, dan ‘NOT’ berikut: ‘Determination’ OR ‘Analysis’ AND ‘Warfarin’ AND ‘Blood plasma’ NOT ‘review’. Sumber pustaka yang digunakan diseleksi melalui kriteria inklusi yang meliputi artikel yang terpublikasi setelah tahun 2015, dalam bahasa Inggris, *full text*, analisis kuantitatif, serta determinasi atau analisis yang digunakan untuk warfarin. Sedangkan kriteria eksklusi sumber pustaka adalah *review article*. Artikel yang diperoleh pada pencarian awal sebanyak 195 artikel kemudian setelah diseleksi berdasarkan kriteria, sejumlah 43 artikel digunakan dalam kajian pustaka ini. Diagram alir penelusuran pustaka dapat dilihat pada [Gambar 2](#).

Hasil dan Diskusi

Pada analisis warfarin dalam plasma darah, metode yang umum digunakan yakni metode HPLC, metode spektrofotometri, serta metode elektroforesis seperti yang tertera pada [Tabel 1](#). Ketiga metode tersebut memiliki kondisi analisis serta penggunaan detektor yang



Gambar 1. Struktur enantiomer warfarin

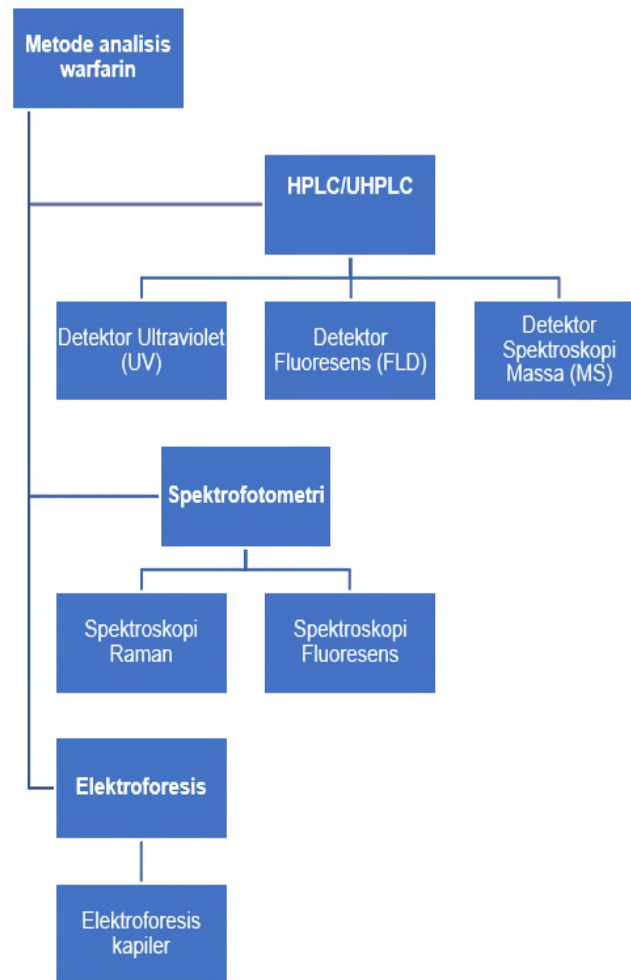


Gambar 2. Diagram alir penyusunan kajian pustaka

berbeda-beda seperti yang terangkum pada [Gambar 3](#). Dalam industri farmasi modern, HPLC merupakan instrumen analisis utama dalam hal penemuan (*drug discovery*), perkembangan (*drug development*), serta produksi obat (*drug production*). Sepanjang proses penemuan obat dan pengembangan obat, metode pemisahan HPLC dikembangkan serta disesuaikan dengan kebutuhan, seperti analisis metabolisme obat, farmakokinetik, penelitian proses, preformulasi, serta formulasi. Dengan tujuan mengurangi runtime dan meningkatkan efisiensi teknik HPLC, sebuah metode alternatif muncul, yaitu Ultra-HPLC (UHPLC), yang memiliki prinsip HPLC yang sama tetapi memungkinkan pemisahan yang lebih cepat serta lebih efisien [11]. Dalam tinjauan artikel ini didapatkan beberapa penelitian telah menggunakan sistem UHPLC yang digabungkan dengan detektor MS. Penggunaan UHPLC memiliki kelebihan salah satunya sensitivitasnya dapat lebih tinggi. Konsentrasi plasma warfarin hanya sebesar 0,7 mg/L karena warfarin memiliki dosis efektif yang kecil yakni 5 mg. Maka dari itu, perlu digunakan metode yang sensitif untuk dapat mendeteksi warfarin dalam plasma

HPLC dianggap sebagai teknik pemisahan *gold standard*, yang digunakan di seluruh dunia terutama karena performanya, baik selektivitas dan sensitivitas yang dicapai ketika digabungkan dengan detektor MS, DAD, FLD,

atau UV dibandingkan dengan metode spektrofotometri atau elektroforesis. Pada artikel ini, 41 dari 43 artikel yang ditinjau menggunakan metode kromatografi sebagai metode analisis. Parameter untuk melihat selektivitas yakni dengan penilaian uji kesesuaian sistem HPLC. Sebelum penelitian, pada instrumen HPLC perlu dilakukan uji kesesuaian sistem dengan tujuan memastikan instrumen dapat digunakan untuk melakukan analisis. Hasil uji kesesuaian sistem harus memenuhi parameter-parameter yang telah ditetapkan untuk memulai analisis. Disamping itu, parameter untuk melihat sensitivitas adalah dengan mengetahui nilai batas bawah kuantifikasi atau LLOQ (*Lower limit of quantification*). LLOQ merupakan batas terendah untuk melakukan kuantifikasi dalam suatu instrumen tertentu. LLOQ didapat berdasarkan metode serta instrumen yang digunakan. Semakin kecil nilai LLOQ berarti metode dapat mengkuantifikasi analit dalam jumlah yang kecil. Hal tersebut amat berguna jika obat yang akan diteliti berjumlah sangat kecil di dalam plasma darah. Nilai LLOQ terkecil yang didapatkan pada metode HPLC ini yakni 0,014 ng/mL yakni pada penelitian [3], dengan metode analisis UHPLC-MS menggunakan fase gerak air 65% yang mengandung asam format 0,1% dan asetonitril 35% yang mengandung asam format 0,1%; kolom C18 dengan sistem elusi isokratik yang diatur laju alirnya sebesar 0,5 mL/min. Nilai LLOQ kecil tersebut menandakan



Gambar 3. Ringkasan metode analisis warfarin dalam plasma darah

bahwa instrumen serta metode cukup sensitif karena dapat digunakan untuk melakukan penelitian dengan jumlah warfarin hingga 0,014 ng/mL. Nilai tersebut merupakan nilai terkecil yang didapatkan dibandingkan dengan metode spektrofotometri dan elektroforesis. Maka sensitivitas HPLC lebih baik dibandingkan dengan spektrofotometri dan elektroforesis. Hal tersebut amat berguna jika obat yang akan diteliti berjumlah sangat kecil di dalam plasma darah. Nilai LLOQ berdasarkan pedoman validasi bioanalisis EMA (*European Medicines Agency*) yakni tidak lebih dari 5% konsentrasi maksimum obat atau nilai C_{max} . Jika nilai C_{max} dari warfarin adalah 700 ng/L seperti yang disebutkan sebelumnya, maka nilai LLOQ tidak boleh lebih dari sekitar 35 ng/L.

Dalam mendapatkan metode analisis yang baik pula perlu mempertimbangkan kondisi kromatografi diantaranya adalah kolom, fase gerak, sistem elusi, laju alir, serta detektor yang digunakan. Sistem HPLC terbagi menjadi dua, yakni HPLC fase normal dan fase terbalik. Perbedaan kedua sistem tersebut terletak pada fase diam

serta fase geraknya. Untuk HPLC fase normal, fase diam bersifat polar dan fase gerak bersifat non polar serta pada HPLC fase terbalik, fase diam bersifat non polar dan fase gerak bersifat polar. Pada analisis warfarin, banyak digunakan sistem fase terbalik. Sistem HPLC fase terbalik memiliki kelebihan yakni menghasilkan kromatogram yang baik pada zat yang bersifat kurang polar seperti warfarin, serta pada fase ini dapat digunakan perubahan pH untuk membantu pemisahan. Pada sistem fase terbalik untuk menganalisis warfarin, kolom yang sering digunakan yaitu kolom C18 dan kolom C8. Kolom C18 lebih banyak digunakan dibanding kolom C8 dalam bioanalisis warfarin yang ditinjau dalam artikel ini, sebanyak 17 penelitian menggunakan kolom C18 sementara hanya 2 penelitian yang menggunakan kolom C8 seperti pada penelitian Hu *et al.* dan Ueng *et al.* Hal tersebut dapat disebabkan karena rantai alkil yang panjang lebih efisien dalam pemisahan senyawa non-polar, sedangkan rantai alkil yang lebih pendek lebih efisien untuk pemisahan senyawa polar. Warfarin bersifat semi polar. Selain itu, kolom C18 lebih

terhalang secara sterik pada permukaan silika dibandingkan kolom C8 serta memiliki luas permukaan yang lebih tinggi untuk berinteraksi dengan senyawa analit.

Pada HPLC dan UHPLC, perbedaannya terletak pada tekanan serta ukuran partikel yang mampu dilewatkan dalam kolom. UHPLC memiliki ukuran partikel yang lebih kecil yaitu di bawah 2 μm , sehingga dapat menghasilkan pemisahan yang lebih efisien. UHPLC dilengkapi juga dengan *bridged ethyl hybrid* (BEH) yang berfungsi untuk meningkatkan ketahanan kolom. Kolom yang digunakan dalam sistem UHPLC untuk analisis warfarin diantaranya adalah kolom kiral Chirobiotic V [8-14]; kolom *Acquity BEH phenyl particle* [14]; kolom Zorbax SB-CN [16-18]; kolom kiral C18 [19,20]; serta kolom C18 BEH [21,22].

Warfarin merupakan senyawa campuran rasemik dari dua enansiomer aktif, yaitu R-Warfarin dan S-Warfarin.

Jika dibutuhkan pemisahan kedua enantiomer ini maka diperlukan kolom kiral. Kolom kiral dapat memisahkan senyawa yang memiliki dua enantiomer, karena kedua enantiomer tersebut bisa teridentifikasi sebagai satu senyawa pada HPLC serta menghasilkan puncak pada waktu retensi yang berbeda. Kolom kiral yang umumnya digunakan untuk determinasi enantiomer warfarin yakni kolom kiral Chirobiotic V serta kolom kiral C18. Kolom kiral yang umumnya digunakan untuk determinasi enantiomer warfarin yakni kolom kiral Chirobiotic V serta kolom kiral C18. Dalam artikel yang tidak menggunakan kolom kiral, hasilnya yakni berupa warfarin saja. Pada penggunaan kolom kiral, warfarin dapat terpisah menjadi R-warfarin dan S-warfarin. Hal ini diperlukan karena kedua enansiomer warfarin ini memiliki potensiasi yang berbeda.

Tabel 1. Metode analisis warfarin dalam plasma darah

NO	Analit	Matriks	Teknik	Sistem	LLOQ (ng/mL)	Pustaka
HPLC						
1	Warfarin	Plasma manusia	HPLC	- Fase gerak : metanol 65 mL dan asam fosfat (0,5%) 35 mL - Kolom: C18 - Elusi: isokratik - Laju alir: 1 mL/min - Detektor: UV/Vis dual wavelength absorbance	1	[40]
2	Warfarin	Plasma manusia	HPLC	- Fase gerak: heksana:2-propanol:asam asetat glasial (75:25:0,5) - Kolom: [R,R]WHELK-01 chiral column - Elusi: isokratik - Laju alir: 1 mL/min - Detektor: UV (313 nm)	5 (S-Warfarin) 10 (R-Warfarin)	[43]
3	Warfarin	Plasma manusia	HPLC	- Fase gerak: asetonitril 80 mL : air 20 mL - Kolom: C18 - Elusi: isokratik - Laju alir: 1 mL/min - Detektor: UV/Vis dual wavelength absorbance	8,91	[42]
4	Warfarin	Plasma tikus	HPLC	- Fase gerak: Na ₂ HPO ₄ 40% (0,01 mol/L pH 4,3) : asetonitril 60% - Kolom: C18 - Elusi: isokratik - Laju alir: 1 mL/min - Detektor: UV (308 nm)	Tidak disebutkan	[41]
5	Warfarin	Plasma tikus	HPLC	- Fase gerak: asetonitril 60% dan air 40% yang mengandung 1 mL trietilamin dan asam fosfat pH 3 - Kolom: hypersil™ BDS C-18 Column - Elusi: isokratik - Laju alir: 1 mL/min - Detektor: UV (310 nm)	Tidak disebutkan	[2]
6	Warfarin	Plasma tikus	HPLC	- Fase gerak: asetonitril : air : asam format 88% (500:500:2) - Kolom: C8 - Elusi: isokratik - Laju alir: 0,8 mL/min - Detektor: UV (305 nm)	Tidak disebutkan	[25]

NO	Analit	Matriks	Teknik	Sistem	LLOQ (ng/mL)	Pustaka
7	Warfarin	Plasma manusia	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: 2 mM NH₄COOH 2 mM dalam air (pH 3.5) : NH₄COOH 2 mM dalam 90/10 CH₃CN/H₂O (pH 3.5) - Kolom: chiralcel OD-3R column - Elusi: gradient - Laju alir: 0,02 mL/min - Detektor: UV (280 nm) 	Tidak disebutkan	[24]
8	Warfarin	Plasma anjing	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: methanol : isopropanol : asam format (90:10:0,5) - Kolom: Lux cellulose-3 chiral column - Elusi: isokratik - Laju alir: 1 mL/min - Waktu retensi warfarin: 9,6 menit untuk R-warfarin dan 7,5 menit untuk S-warfarin - Waktu retensi internal standar: 6,5 menit (IS: diazepam) - Detektor: UV (288 nm) 	Tidak disebutkan	[38]
9	Warfarin	Plasma tikus	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: buffer fosfat (25 mmol/L):methanol:acetonitril (70:20:10) - Kolom: diphenyl column - Elusi: isokratik - Laju alir: 0,8 mL/min - Waktu retensi warfarin: 14,3 menit - Detektor: Floresensi (panjang gelombang eksitasi dan emisi 310 dan 390 nm) 	10	[3]
10	Warfarin	Plasma manusia	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: metanol 30% and buffer fosfat 25 mM pH 7 70% - Kolom: Poroshell EC-C-18 reversed-phase column - Elusi: isokratik - Laju alir: 0,7 mL/min - Detektor: Floresensi (panjang gelombang eksitasi dan emisi 310 dan 390 nm) 	1,3	[37]
LC-MS						
11	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: amonium asetat pH 4,85 25 mM dan asetonitril - Kolom: Zorbax eclipse XDB® C18 column - Elusi: gradient - Laju alir: 0,8 mL/min - Detektor: API-5500 QTrap mass spectrometer 	Tidak disebutkan	[15]
12	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Detektor: Micromass Quattro Micro dengan negative ion electrospray 	5	[44]
13	Warfarin	Plasma manusia	LC-API/MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: NH₄OAc 5 mM dengan 0,05 % asam format dan (90:10 ACN:H₂O) dengan amonium bikarbonat 10 mM - Kolom: C18 - Elusi: gradient - Laju alir: 0,6 mL/min - Detektor: Spektroskopi massa 	2	[23]
14	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: H₂O (0.5% asam asetat) dan metanol (0.5% asam asetat) - Kolom: Chirobiotic V chiral column - Elusi: gradient - Laju alir: 0,3 mL/min - Detektor: Spektroskopi massa QQQ 	0,67	[36]

NO	Analit	Matriks	Teknik	Sistem	LLOQ (ng/mL)	Pustaka
15	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: Asetonitril yang mengandung asam format 0,01% dan asam format 0,01% - Kolom: Chirobiotic V chiral column - Laju alir: 0,2 mL/min - Waktu retensi warfarin: 4,3 menit untuk R-warfarin dan 6,4 menit untuk S-warfarin - Waktu retensi internal standar: 2,3 menit (IS: asam kafeat) - Detektor: Spektroskopi massa quadrupole 	12,7	[25]
16	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asam format 0,1% dalam air dan asetonitril - Kolom: C18 - Elusi: gradient - Laju alir: 0,8 mL/min - Waktu retensi warfarin: 5 menit - Detektor: Spektroskopi massa QTOF 	Tidak disebutkan	[48]
17	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: air:asetonitril - Kolom: chiral column - Elusi: isokratik - Detektor: Spektroskopi massa menggunakan positive Turbo Ion spray ionization 	5	[34]
18	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asetonitril 0.5% : asam metanoat (60:40) - Kolom: ODS-3 column - Elusi: isokratik - Laju alir: 0,8 mL/min - Detektor: ESI-MS 	5	[17]
19	Warfarin	Plasma tikus	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asam format 0,1% dalam air : asetonitril (35:65) - Kolom: C18 - Elusi: isokratik - Laju alir: 0,3 mL/min - Waktu retensi warfarin: 0,7 menit - Waktu retensi internal standar: 2,4 menit (IS: kuersetin) - Detektor: Spektroskopi massa QQQ 	10	[32]
20	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asam format 0.4% dan asetonitril - Kolom: C8 - Elusi: gradient - Detektor: spektroskopi massa QQQ ESI 	1	[49]
21	Warfarin	Plasma tikus	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asam format 0,01% dalam air dan 99% asetonitril dalam air yang mengandung 0,01% asam format - Kolom: C18 - Elusi: gradient - Laju alir: 0,2 mL/min - Waktu retensi warfarin: 1,6 menit - Waktu retensi internal standar: 1,71 menit (IS: coumachlor) - Detektor: spektroskopi massa QQQ ESI 	10	[33]
22	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: ammonium asetat:asam format:asetonitril:methanol - Kolom: chiralcel column - Elusi: isokratik - Laju alir: 1 mL/min - Detektor: Spektroskopi massa 	Tidak disebutkan	[39]
23	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asetonitril : asam asetat : TEA (1000:3:2,5) - Kolom: Astec b cyclodextrin Cyclobond I column - Elusi: isokratik - Waktu retensi warfarin: 2,19 menit - Waktu retensi internal standar: 6,5 menit (diazepam) - Detektor: Spektroskopi massa 	5	[47]

NO	Analit	Matriks	Teknik	Sistem	LLOQ (ng/mL)	Pustaka
24	Warfarin	Plasma tikus	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asam asetat 0,5% dalam air dan asam asetat 0,5% dalam asetonitril (80:20) - Kolom: Chirobiotic M V chiral column - Elusi: isokratik - Laju alir: 1,2 mL/min - Detektor: Spektroskopi massa QQQ ESI 	Tidak disebutkan	[31]
25	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asam format 0,1% : asetonitril (5:95) - Kolom: Chirobiotic V chiral column - Elusi: gradient - Laju alir: 0,01 mL/min - Detektor: Spektroskopi masa QQQ ESI 	130	[13]
26	Warfarin	Plasma manusia	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: air : asetonitril - Kolom: Zorbax Eclipse Plus C18 - Elusi: gradient - Laju alir: 0,3 mL/min - Waktu retensi warfarin: 10,7 menit - Detektor: Spektroskopi masa QQQ negative ESI 	1	[16]
UHPLC						
27	Warfarin	Plasma manusia	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: air dan asetonitril, keduanya mengandung asam format 0,01% - Kolom: C18 - Elusi: gradient - Laju alir: 0,6 mL/min - Detektor: Spektroskopi massa QQQ 	0,03-2,55	[29]
28	Warfarin	Plasma manusia	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: Asetonitril : amonium asetat dalam air 5 mM (30:70) - Kolom: Chirobiotic V chiral column - Elusi: isokratik - Laju alir: 0,5 mL/min - Waktu retensi warfarin: 7,95 untuk R-warfarin dan 8,78 untuk S-warfarin - Waktu retensi internal standar: 6,99 menit (IS: tolbutamide) - Detektor: Spektroskopi massa QQQ 	Tidak disebutkan	[12]
29	Warfarin	Plasma manusia	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: metanol 55%, Air 45% dengan asam format 0,01% - Kolom: Acquity BEH Phenyl particle column - Elusi: isokratik - Laju alir: 0,3 mL/min - Waktu retensi warfarin: 7,95 menit untuk R-warfarin dan 8,78 menit untuk S-warfarin - Waktu retensi internal standar: 6,99 menit (tolbutamide) - Detektor: Spektroskopi massa QQQ 	10	[14]
30	Warfarin	Plasma manusia	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: 0,1% asam format dalam air dan 0,1% asam format dalam methanol - Kolom: ZORBAX SB-CN column - Elusi: gradient - Laju alir: 0,4 mL/min - Detektor: Spektroskopi massa ESI 	2,5	[27]
31	Warfarin	Plasma tikus	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asam format 0,1% dalam air dan asam format 0,1% dalam asetonitril - Kolom: C18 - Elusi: gradient - Laju alir: 0,3 mL/min - Detektor: Spektroskopi massa QQQ ESI 	5	[35]

NO	Analit	Matriks	Teknik	Sistem	LLOQ (ng/mL)	Pustaka
32	Warfarin	Plasma tikus	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asetonitril : amonium asetat 5 mM (15:85) - Kolom: Chirobiotic V chiral column - Elusi: isokratik - Laju alir: 0,2 mL/min - Detektor: Spektroskopi massa QQQ ESI 	Tidak disebutkan	[22]
33	Warfarin	Plasma marmoset	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: metanol 55% dalam 5 mM ammonium hydrogen carbonate (pertama) dan metanol 90% dalam 5 mM ammonium hydrogen carbonate (kedua) - Kolom: C18 column dan chiral separation column - Elusi: gradient - Laju alir: 0,2 mL/min - Detektor: spektroskopi massa 	Tidak disebutkan	[28]
34	Warfarin	Plasma manusia	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: air 65% yang mengandung asam format 0,1% dan asetonitril 35% yang mengandung asam format 0,1% - Kolom: Poroshell 120 EC-C-18 column - Elusi: isokratik - Laju alir: 0,5 mL/min - Waktu retensi warfarin: 3,5 menit - Detektor: Spektroskopi massa QQQ ESI 	0.014	[50]
35	Warfarin	Plasma manusia	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: asam format 0,2% dan asetonitril 1% dalam air serta asam format 0,2% dalam asetonitril - Kolom: C18 - Elusi: gradient - Laju alir: 0,3 mL/min - Waktu retensi warfarin: 3,2 menit - Waktu retensi internal standar: 1,4 menit (etericoxib) - Detektor: Spektroskopi massa QQQ ESI 	0,25	[1]
36	Warfarin	Plasma manusia	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: methanol : ammonium asetat 100 mM : air deionisasi - Kolom: ODS chiral column - Elusi: gradient - Detektor: Spektroskopi massa QQQ ESI 	20	[18]
37	Warfarin	Plasma tikus	UHPLC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: buffer yang mengandung asam format 0,1% dan asetonitril - Kolom: BEH C18 - Elusi: gradient - Laju alir: 0,3 mL/min - Detektor: Spektroskopi masa quadrupole ESI 	5	[19]
38	Warfarin	Plasma tikus	UHPLC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Fase gerak: metanol dan air yang mengandung asam format 0,1% (90:10) - Kolom: BEH C18 - Elusi: isokratik - Laju alir: 0,2 mL/min - Detektor: Spektroskopi masa quadrupole ESI 	Tidak disebutkan	[20]
Spektrofotometri						
39	Warfarin	Plasma manusia	Spektroskopi Raman	<ul style="list-style-type: none"> - Panjang gelombang eksitasi: 638 nm - Volume injek: 400 µL - Waktu koleksi sinyal: 20 detik 	770	[51]
40	Warfarin	Plasma manusia	Spektroskopi Floresensi	<ul style="list-style-type: none"> - Panjang gelombang eksitasi: 300 nm - Panjang gelombang emisi: 390 nm - Laju scanning: 12000 nm/min 	46,7	[52]
Elektroforesis						
41	Warfarin	Plasma manusia	Capillary Electrophoresis	<ul style="list-style-type: none"> - Voltage: 15 kV - Chiral selector: DM-β-CD - Detektor: Capillary electrophoresis-UV (306 nm) 	6,2-6,5	[53]

NO	Analit	Matriks	Teknik	Sistem	LLOQ (ng/mL)	Pustaka
42	Warfarin	Plasma manusia	CBPE dimodifikasi dengan PTCA	Sensor: Carbon Paste Electrode	10300-13400	[45]

Kondisi kromatografi lain yang perlu diperhatikan yakni fase gerak berfungsi untuk mengelusi sampel melewati fase diam sampai pendeteksian. Penentuan fase gerak berpengaruh pada puncak yang muncul dalam kromatogram. Bila digunakan sistem HPLC fase terbalik, fase gerak bersifat lebih polar dibanding fase diam. Nilai pH serta pKa dari senyawa berperan penting dalam fase gerak, keduanya menentukan waktu retensi analit serta bentuk puncak yang dihasilkan pada kromatogram. Selain pH, bentuk puncak pada kromatogram dipengaruhi oleh dapar, fase gerak organik, serta penambahan modifier fase gerak lain. Modifier untuk memperbaiki bentuk puncak yang digunakan seperti asetonitril dan methanol untuk fase gerak organik serta asam fosfat [25,26,33], asam asetat [24,29,36], trietilamin [2,39], dan asam format [1,8,13,14,16,20,22,28,43]. Nilai pH dan pKa dari senyawa menentukan derajat ionisasi analit serta afinitasnya terhadap fase diam dan fase gerak. Pada uji bioanalisis warfarin, banyak fase gerak yang dibuat bersifat asam dengan penambahan buffer [3,8,11,16,20,23-28] atau asam format [1,5-7,10,14,15,17,21-23,26,29-36]. Hal ini menyebabkan warfarin akan terdapat dalam bentuk tak ter-ion sehingga bersifat non polar dan akan lebih terjerap pada fase diam, sehingga puncak yang dihasilkan dapat memiliki resolusi yang baik.

Pada pemisahan warfarin ini, sering digunakan fase gerak asetonitril untuk pelarut bersifat non polar dan air untuk pelarut bersifat polar [1,2,5,7,8,13,18,29-31,33, 37-39]. Asetonitril bersifat polar-aprotik, merupakan fase gerak yang umum digunakan dalam sistem HPLC karena berbagai kelebihan yang dimiliki sehingga dapat memenuhi persyaratan pemilihan fase gerak yang baik, diantaranya adalah absorbansi di daerah panjang gelombang sinar UV yang rendah sehingga tidak mengganggu absorbansi sampel, menghasilkan *noise* yang rendah, dan memberikan bentuk puncak yang baik pada kolom C18. Selain asetonitril, sering digunakan pula metanol sebagai fase gerak [3,9,15,17,20,22,26,27,32,35,40]. Metanol bersifat polar-protik, secara performa kurang jika dibandingkan dengan asetonitril, namun memiliki harga yang lebih murah. Dibandingkan dengan asetonitril, metanol memiliki kekurangan seperti nilai *UV cutoff*-nya yang lebih tinggi, kekuatan mengelusnya yang lebih rendah, dan bila

dicampurkan dengan air maka viskositas metanol dapat meningkat.

Kondisi kromatografi lain yang perlu diperhatikan juga yakni sistem elusi. Sistem elusi kromatografi terbagi menjadi dua, yaitu isokratik dan gradien. Sistem isokratik merupakan sistem elusi dimana kekuatan dari fase gerak konsisten dari awal sampai akhir sedangkan sistem gradien merupakan sistem elusi dimana kekuatan dari fase gerak berubah (perbandingan jumlah fase gerak berubah) dari awal sampai akhir proses. Sistem elusi gradien umumnya digunakan untuk pemisahan senyawa dalam jumlah yang banyak di dalam sampel. Pada tinjauan artikel ini, sistem elusi isokratik lebih banyak digunakan dibandingkan sistem elusi gradien. Sistem elusi isokratik digunakan pada 23 penelitian sedangkan sistem elusi gradien digunakan pada 16 penelitian. Sistem elusi isokratik biasanya memberikan resolusi yang lebih baik. Namun, pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa sistem elusi gradien memiliki kelebihan dibandingkan sistem elusi isokratik yakni memberikan waktu analisis yang lebih cepat tanpa mengurangi performa metode analisis.

Selain sistem elusi, laju alir juga merupakan salah satu kondisi kromatografi yang perlu diperhatikan. Laju alir merupakan kecepatan aliran saat melewati fase diam. Penentuan laju alir termasuk ke dalam proses optimasi metode HPLC yang perlu dilakukan sebelum analisis. Laju alir yang terlalu cepat atau terlalu lambat akan mengakibatkan pemisahan yang tidak sempurna. Laju alir yang ditinjau dalam artikel ini beragam mulai dari 0,01 sampai 1 mL/min.

Dalam pendeteksian sampel, diperlukan detektor yang terhubung dengan HPLC. Detektor yang paling umum digunakan yakni UV, FLD, dan MS untuk determinasi warfarin. Detektor UV merupakan detektor yang umum digunakan dalam analisis HPLC. Namun detektor ini kurang sensitif bila digunakan untuk mendeteksi analit dalam jumlah yang kecil. Dalam tinjauan artikel ini, sejumlah 9 artikel menggunakan detektor UV [2,7,25,32,38,40,41], panjang gelombang maksimum untuk deteksi warfarin yang digunakan beragam, yakni 280 nm [24], 288 nm [38], 305 nm [25], 308 nm [41], 310 nm [2], dan 313 nm [43]. Perbedaan panjang gelombang dapat disebabkan oleh substitusi atau perbedaan fase gerak. Pergeseran absorbansi

ke arah panjang gelombang yang lebih panjang dinamakan pergeseran batokromik, sementara pergeseran absorban ke arah panjang gelombang yang lebih pendek dinamakan pergeseran hipsokromik. Perbedaan panjang gelombang tersebut disebabkan oleh penggunaan fase gerak yang berbeda-beda. Metanol memberikan efek pergeseran panjang gelombang paling kecil diantara fase gerak lainnya dalam metode warfarin dengan HPLC detektor UV ini. Dengan detektor ini, nilai LLOQ berkisar 1-10 ng/mL.

Detektor fluoresensi memiliki kelebihan berupa sensitivitas dan selektivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan detektor UV. Dalam tinjauan artikel ini, sejumlah 2 artikel menggunakan detektor fluoresensi yakni pada penelitian [3,27] keduanya menggunakan panjang gelombang eksitasi dan emisi 310 dan 390 nm untuk deteksi warfarin. HPLC dengan detektor fluoresensi memiliki nilai LLOQ berkisar antara 1,3-10 ng/mL.

Detektor spektroskopi massa memiliki spesifisitas dan selektivitas yang sangat tinggi, dapat digunakan juga dalam menganalisis sampel yang banyak dalam waktu yang singkat. Kekurangannya yakni terletak pada pengeluaran yang dibutuhkan, diperlukan alat-alat yang canggih serta pengeluaran yang cukup mahal untuk penggunaan detektor ini. Meski begitu, detektor ini cukup umum digunakan pada metode analisis kromatografi modern. Dalam tinjauan artikel ini, sejumlah 30 artikel menggunakan detektor spektroskopi massa. Setengah diantaranya menggunakan teknik *electrospray ionization* (ESI). 15 diantaranya QQQ dan 3 diantaranya quadropole. Mode ion yang digunakan beragam, ada yang menggunakan *positive ion spray* [34] dan *negative ion spray* [18,24]. Pada LC-MS, nilai LLOQ berkisar antara 0,5-130 ng/mL. Untuk UHPLC-MS, nilai LLOQ berkisar antara 0,014-20 ng/mL. Sistem UHPLC-MS memberikan nilai LLOQ yang lebih kecil dibandingkan dengan LC-MS, dan selanjutnya dibandingkan dengan HPLC detektor UV dan fluoresensi.

Selain metode kromatografi, dapat pula digunakan metode spektroskopi. Namun tingkat spektroskopi dapat digunakan jika mendapatkan warfarin yang terbebas dari pengaruh matriks. Spektroskopi yang digunakan dalam tinjauan artikel ini yaitu Spektroskopi Fluoresensi dan Spektroskopi Raman. Spektroskopi Fluoresensi berprinsip mengukur intensitas cahaya fluoresensi yang dipancarkan oleh analit sedangkan Spektroskopi Raman merupakan metode yang memberikan spektrum vibrasi dari suatu senyawa, yakni spectrum vibrasional dari gugus fungsi yang terdapat dalam suatu senyawa. Oleh karena itu Spektroskopi Raman ini banyak digunakan dalam fungsi identifikasi suatu molekul.

Pada Spektroskopi Raman untuk mengukur warfarin

yang dilakukan oleh Sultan *et al.*, digunakan panjang gelombang eksitasi 638 nm serta menghasilkan nilai LLOQ 770 ng/mL. Pada Spektroskopi Fluoresensi yang dilakukan Xiao *et al.*, digunakan panjang gelombang eksitasi dan emisi 300 nm dan 390 nm serta nilai LLOQ yang dihasilkan yaitu 46,7 ng/mL. Nilai LLOQ ini lebih besar dibandingkan nilai LLOQ yang dihasilkan oleh sistem kromatografi, maka metode kromatografi memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode spektrofotometri.

Metode lainnya dalam menganalisis warfarin dalam plasma yakni elektroforesis. Elektroforesis merupakan metode pemisahan molekul bermuatan yang didasarkan oleh perbedaan tingkat migrasi dalam suatu medan listrik. Metode elektroforesis yang digunakan yakni elektroforesis kapiler serta elektroforesis berbasis *Carbon Black Paste Electrode* (CBPE) yang dimodifikasi dengan *3,4,9,10-perylenetetra-carboxylic acid* (PTCA) [45]. Metode CBPE dengan dimodifikasi PTCA ini dapat memisahkan senyawa kiral seperti warfarin dan memiliki kelebihan berupa selektivitas yang tinggi. Elektroforesis kapiler merupakan proses elektroforesis yang menggunakan pipa kapiler yang berisi larutan penyangga untuk memisahkan komponen dengan resolusi tinggi. Detektor yang digunakan yakni detektor UV menggunakan panjang gelombang maksimum 306 nm untuk Warfarin. Nilai LLOQ yang dihasilkan dari metode elektroforesis ini cukup besar bila dibandingkan dengan metode kromatografi dan spektrofotometri, yakni 6,2-6,5 ng/mL untuk metode elektroforesis kapiler dan 10.300-13.400 ng/mL untuk yang menggunakan metode CBPE dimodifikasi PTCA. Namun, metode elektroforesis ini dapat memberikan efisiensi puncak yang lebih baik, waktu analisis yang cepat, serta penggunaan jumlah sampel yang lebih sedikit serta mampu digunakan untuk memisahkan senyawa kiral.

Dari metode HPLC, spektroskopi, dan elektroforesis, metode HPLC merupakan metode yang memberikan sensitivitas tertinggi serta memberikan waktu yang lebih singkat. Namun dalam efisiensi biaya, metode spektroskopi dan elektroforesis membutuhkan biaya yang lebih rendah dibandingkan dengan metode HPLC.

Sebelum melakukan analisis, metode preparasi sampel perlu diperhatikan agar pemisahan oleh HPLC dapat dilaksanakan dengan baik dengan cara mengurangi efek dari matriks sebelum dimasukkan ke dalam sistem HPLC. Preparasi sampel dalam bioanalisis merupakan tahap pemisahan pra-analisis yang melibatkan proses isolasi analit dari matriksnya, untuk meminimalisasi atau mengeliminasi efek dari komponen matriks dalam

sampel. Metode preparasi sampel yang ideal harus dapat mengurangi efek matriks dengan tetap mempertahankan *recovery* dari analit yang akan dianalisis. Untuk uji bioanalisis, minimal nilai *recovery* yang diterima yakni 85-115% [46]. Pemilihan metode preparasi sampel dapat didasari dari sifat fisikokimia obat. Diantara teknik yang paling sering digunakan dalam preparasi sampel bioanalisis adalah presipitasi protein, ekstraksi cair-cair, dan ekstraksi fase padat [8]. Dalam analisis warfarin, metode yang banyak digunakan adalah metode presipitasi protein dan ekstraksi cair-cair seperti yang tertera pada Tabel 2.

Presipitasi protein merupakan teknik preparasi sampel yang menggunakan protein presipitan untuk memisahkan obat dari ikatan dengan proteinnya sehingga tidak mengganggu saat kuantifikasi obat dilakukan. Protein presipitan yang umumnya digunakan yaitu pelarut organik yang dapat dicampur dengan air (asetonitril, aseton, etanol, metanol), asam, ion logam, atau garam. Dari 36 artikel yang ditinjau mengenai proses metode preparasi sampelnya, 19 diantaranya menggunakan metode presipitasi protein. Dari metode preparasi protein yang ditinjau dalam artikel ini

sejumlah 15 dari 19 artikel menggunakan asetonitril sebagai protein presipitan. Berdasarkan literatur, penambahan empat kali lipat asetonitril dari volume sampel sudah dapat memisahkan protein dari obat hingga mencapai nilai *recovery* 99,8% [8]. Jumlah asetonitril yang digunakan beragam mulai dari satu hingga lima kali lipat dari jumlah volume sampel. Nilai *recovery* yang didapatkan dalam penambahan lima kali lipat asetonitril yang dilakukan oleh Ungewiss *et al.* mencapai 98% sedangkan yang dilakukan oleh Hu *et al.* mencapai 99,5%. Semua nilai *recovery* yang didapatkan pada penambahan satu hingga lima kali lipat asetonitril mencapai batas penerimaan dalam syarat uji bioanalisis. Protein presipitan lain yang digunakan yakni metanol, asam format, serta asam perklorat. Presipitasi protein menggunakan metanol dalam jumlah 1,5 kali lipat dibanding volume sampel menghasilkan nilai *recovery* 97,8% [40] serta presipitasi protein menggunakan asam menghasilkan nilai *recovery* 87,3-119,7% [26]. Maka pada proses presipitasi protein untuk metode analisis banyak digunakan asetonitril sebagai protein presipitan karena menghasilkan nilai *recovery* yang lebih tinggi.

Tabel 2. Metode preparasi sampel untuk analisis warfarin dalam plasma darah

No	Analit	Matriks	Volume Sampel (µL)	Metode Preparasi	Ekstraksi	Recovery (%)	Pustaka
1	Warfarin	Plasma manusia	250	Ekstraksi cair-cair	Digunakan diklorometan/heksana 1:5 sebagai pelarut ekstraksi, digunakan R-Warfarin d6 dan S-Warfarin d6 sebagai IS	97,67-98,61	[44]
2	Warfarin	Plasma manusia	300	Ekstraksi cair-cair	Digunakan etil asetat:heksana 50:50 sebagai pelarut ekstraksi	Tidak disebutkan	[23]
3	Warfarin	Plasma manusia	1000	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan 200 µL asam hidroklorat 1 N ditambahkan Naproxen (IS) kemudian diekstraksi dengan 800 µL dietil eter, kemudian disentrifugasi	96,2	[43]
4	Warfarin	Plasma manusia	Tidak disebutkan	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan 3,5 µL etil asetat ditambahkan Gliclazide (IS) kemudian divortex selama 3 menit kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit	90,8-109,3	[17]
5	Warfarin	Plasma tikus	100	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan 10 µL asam asetat 0,05 mol/L ditambahkan Naproxen (IS) kemudian divortex selama 30 detik, selanjutnya diekstraksi dengan 3 mL etil asetat selama 2 menit menggunakan alat vortex, berikutnya disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit	89,6	[3]
6	Warfarin	Plasma tikus	100	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan 20 µL metanol sebagai pelarut ekstraksi ditambahkan Quercetin (IS) kemudian divortex, disentrifugasi pada 15000 rpm selama 5 menit	90,73-94,48	[32]
7	Warfarin	Plasma tikus	200	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan 20 µL asam asetat, divortex 1 menit, diekstraksi dengan 3 mL etil asetat, divortex 2 menit, disentrifugasi 3500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4C	Tidak disebutkan	[54]
8	Warfarin	Plasma anjing	200	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan 20 mL asam format 12,5% ditambahkan Diazepam (IS) diekstraksi dengan 1 mL etil asetat, divortex selama 3 menit, disentrifugasi pada 14000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4C	Tidak disebutkan	[38]

No	Analit	Matriks	Volume Sampel (µL)	Metode Preparasi	Ekstraksi	Recovery (%)	Pustaka
9	Warfarin	Plasma tikus	30	Ekstraksi cair-cair	Diekstraksi dengan 200 µL asetonitril:air (1:1) yang mengandung NH ₄ COOH 10 mM pH 4, di-shaker pada 1000 rpm selama 1 jam, disentrifugasi pada 1000 rpm selama 10 detik, digunakan Choumachlor sebagai IS	87,2-98,4	[33]
10	Warfarin	Plasma manusia	500	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan 2 mL H ₂ SO ₄ 0,5 M, diekstraksi dengan 4 mL diklorometan/heksana (1:5), divortex selama 30 detik, disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit	86-89	[37]
11	Warfarin	Plasma manusia	200	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan 100 µL asam asetat, ditambahkan Gatifloxacin (IS), ditambahkan 1 mL etil asetat:diel eter 50:50, divortex	112,5	[18]
12	Warfarin	Plasma manusia	200	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan methyl-t-butyl ether dan dichloromethane sebagai pelarut ekstraksi, digunakan Warfarin-d6 sebagai IS	87,6-96,3	[39]
13	Warfarin	Plasma manusia	Tidak disebutkan	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan dichloromethane: isohexane (1:5) sebagai pelarut ekstraksi	97,2-106,4	[47]
14	Warfarin	Plasma manusia	100	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan dengan 5 µL asam fosfat 85%, diekstraksi dengan 1 mL etil asetat dengan divortex 1,5 menit, disentrifugasi pada 20000 rpm selama 5 menit, diuapkan dengan nitrogen, direkonstitusi dengan 200 µL asam asetat 0,5%:asetonitril 1:1, disentrifugasi pada 20000 rpm selama 8 menit	Tidak disebutkan	[31]
15	Warfarin	Plasma tikus	100	Ekstraksi cair-cair	Ditambahkan 50 µL of asam format 20% dan 1 mL metanol, divortex selama 3 menit, disentrifugasi pada 3000 rppm selama 10 menit	Tidak disebutkan	[19]
16	Warfarin	Plasma manusia	200	Ekstraksi cair-cair (Dispersive liquid - liquid microextraction with poly (ethylene oxide) - mediated stacking)	Ditambahkan 30 µL asam perklorat, divortex selama 1 menit, ditambahkan 100 µL asetonitril, divortex selama 1 menit, disentrifugasi pada 12000 rpm selama 10 menit	92,4-109,4	[53]
17	Warfarin	Plasma manusia	50	Presipitasi protein	Ditambahkan 200 µL asetonitril yang mengandung 10 ng/mL CPDPX (IS), disentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit	Tidak disebutkan	[15]
18	Warfarin	Plasma manusia	2000	Presipitasi protein	Ditambahkan 3 mL metanol lalu divortex selama 10 menit, disimpan dalam suhu -20C selama 10 menit, dicairkan dan disentrifugasi 5000 rpm selama 10 menit, difiltrasi dengan membran filter 0,45 µm	97,8	[40]
19	Warfarin	Plasma manusia	45	Presipitasi protein	Divortex selama 10 detik, ditambahkan Tolbutamide (IS) ditambahkan 5 µL metanol, ditambahkan 150 µL asetonitril, divortex selama 3 menit kemudian disentrifugasi pada 14000 rpm selama 10 menit	91,1-99,05	[12]
20	Warfarin	Plasma manusia	50	Presipitasi protein	Ditambahkan asam format 25 µL 0,5 N kemudian ditambahkan dengan etil asetat 75 µL, kemudian disentrifugasi, digunakan etil asetat yang mengandung asam kafeat sebagai IS	87,3-119,7	[26]
21	Warfarin	Plasma manusia	50	Presipitasi protein	Ditambahkan 250 µL asetonitril yang mengandung asam trifluoroasetat 1%, kemudian disentrifugasi	91-98	[48]
22	Warfarin	Plasma manusia	500	Presipitasi protein	Ditambahkan asetonitril ditambahkan Warfarin-d5 (IS) kemudian disentrifugasi, selanjutnya dilakukan ultrafiltrasi dengan membran selulos 30 kDa	87,7-99,2	[34]
23	Warfarin	Plasma manusia	Tidak disebutkan	Presipitasi protein	Ditambahkan asam perklorat (HClO ₄) 7% kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit	88,8-93	[42]

No	Analit	Matriks	Volume Sampel (μL)	Metode Preparasi	Ekstraksi	Recovery (%)	Pustaka
24	Warfarin	Plasma manusia	50	Presipitasi protein	Ditambahkan asam format 0,2% dalam air (190 μL), kemudian ditambahkan asam format 0,2% dalam asetonitril (1000 μL) kemudian didiamkan dalam suhu 4C selama 30 menit, selanjutnya disentrifugasi pada 16000 rpm selama 10 menit	Tidak disebutkan	[14]
25	Warfarin	Plasma tikus	50	Presipitasi protein	Ditambahkan 150 μL asetonitril dingin, ditambahkan Warfarin-d5 (IS) disentrifugasi pada 17000 rpm selama 10 menit dalam suhu 4C, supernatan diambil dan disimpan dalam kulkas selama 15 menit, disentrifugasi kembali pada 17000 rpm selama 1 menit	101,8-113,8	[35]
26	Warfarin	Plasma tikus	100	Presipitasi protein	Ditambahkan 500 μL etil asetat dingin, ditambahkan Carbamazepin (IS), ditambahkan 50 μL asam hidroklorat (1 mol/L), disentrifugasi 9000 rpm selama 10 menit	Tidak disebutkan	[41]
27	Warfarin	Plasma manusia	100	Presipitasi protein	Ditambahkan 500 μL asetonitril, ditambahkan asam format 1%, disentrifugasi selama 5 menit	99,5-104,67	[49]
28	Warfarin	Plasma manusia	400	Presipitasi protein	Ditambahkan asetonitril (1% asam format), divortex 1 menit, disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit dengan suhu 4C	96-103	[50]
29	Warfarin	Plasma manusia	200	Presipitasi protein	Ditambahkan 800 μL asetonitril, divortex selama 1 menit, disentrifugasi pada 20000 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C	89,8	[1]
30	Warfarin	Plasma tikus	100	Presipitasi protein	Ditambahkan 150 μL asetonitril, ditambahkan Metronidazole (IS), disentrifugasi pada 14000 rpm selama 10 menit	97,95-107,76	[2]
31	Warfarin	Plasma tikus	50	Presipitasi protein	Ditambahkan 50 μL asetonitril, ditambahkan 7-ethoxycoumarin (IS), disentrifugasi pada 13800 selama 15 menit	98,5-107,4	[25]
32	Warfarin	Plasma manusia	50	Presipitasi protein	Ditambahkan 200 μL asetonitril, divortex selma 10 detik, disentrifugasi pada 1000 rpm selama 10 menit	90,1-106,5	[13]
33	Warfarin	Plasma manusia	100	Presipitasi protein	Ditambahkan 400 μL metanol 10% dalam asetonitril yang mengandung BDF-d4 37.5 ng/mL (IS), divortex selama 5 menit, disentrifugasi pada 20000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4C, supernatan diuapkan di bawah tekanan, kemudian residu direkonstitusi dengan 50 mL asetonitril 50% dan disentrifugasi pada 20000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4C	86-96	[29]
34	Warfarin	Plasma manusia	400	Presipitasi protein	Ditambahkan asetonitril dengan rasio 2:1, disonikasi selama 20 menit, disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit	101,4	[52]

Keterangan :

ACN: Asetonitril

BEH: *Brigde ethyl hybrid*CBPE: *Carbon black paste electrode*ESI: *Electron ionic spray*HPLC: *High-performance liquid chromatography*IS: *Internal standard*LC-MS: *Liquid chromatography – Mass spectrophotometry*MS: *Mass spectrophotometry*PTCA: *3,4,9,10-perylenetetracarboxylic acid*QQQ: *Triple quadropole*QTOF: *Quadropole time-of-flight*UHPLC: *Ultra High-performance liquid chromatography*

UV: Ultraviolet

Prosedur metode presipitasi protein ini cukup sederhana yakni dilakukan penambahan protein presipitan kemudian dilakukan proses sentrifugasi untuk membantu proses agregasi dan pengendapan protein. Saat protein dalam sampel berinteraksi dengan presipitan, konformasi protein dalam sampel berubah dan menghasilkan agregasi dan presipitasi dari protein. Sehingga, analit yang terikat pada protein dalam sampel terlepas. Dalam beberapa prosedur, ditambahkan pula asam setelah penambahan protein presipitan asetonitril. Hal tersebut dilakukan untuk mendapatkan nilai *recovery* yang lebih tinggi [8]. Penelitian oleh Hu *et al.* menunjukkan dengan prosedur penambahan asam format didapatkan nilai *recovery* yang mencapai 99,5%, lebih besar dibandingkan yang tidak dilakukan penambahan asam.

Selain presipitasi protein, ada pula metode ekstraksi cair-cair. Pada metode ini, sampel bioanalisis dicampur dengan aditif (penyangga, asam, atau basa) untuk memastikan ekstraksi dapat dilakukan dengan efisien. Kemudian dilakukan penambahan standar internal, diantaranya adalah naproxen, gliclazide, warfarin-d6, warfarin-d5, kuersetin, diazepam, chomachlor, gatifloxacin, tolbutamide, asam kafeat, carbamazepin, metronidazole, dan 7-etoksikumarin. Serta dilakukan penambahan pelarut organik (pelarut pengestraksi). Kemudian dilakukan proses pengocokan selama periode waktu tertentu untuk mencampur sampel dan pelarut organik, sehingga terpisah ke dalam dua fase yaitu fase air dan fase organik. Fase yang mengandung molekul target diambil untuk proses analisis lebih lanjut. Pemilihan pelarut untuk ekstraksi cair-cair perlu mempertimbangkan sifat solubilitas, densitas, viskositas, serta kelarutan dalam air. Pelarut yang biasanya digunakan yakni pelarut yang bersifat organik.

Warfarin bersifat semi polar. Warfarin larut dalam pelarut aseton dan dioksan; agak larut dalam metanol, etanol, dan isopropanol; larut bebas dalam larutan alkali; serta praktis tidak larut dalam benzen dan sikloheksan. Oleh karena itu, warfarin akan terdapat dalam fase yang bersifat organik. Nilai *recovery* tertinggi yang didapatkan pada metode ekstraksi cair-cair yang ditinjau dalam artikel ini mencapai 98,61% dengan pelarut ekstraksi diklorometana : heksana 1:5 yang dilakukan oleh Shen *et al.* Penelitian lainnya menggunakan pelarut dietil eter dan mendapatkan nilai *recovery* 96,2% [43], kemudian menggunakan pelarut etil asetat dan mendapatkan nilai *recovery* 89,6-109,3% [3,19], kemudian menggunakan pelarut diklorometana : heksana 1:5 dan mendapatkan nilai *recovery* 86-106,4% [24,27,48], kemudian menggunakan pelarut metanol dan mendapatkan nilai *recovery* 94,48% [32], kemudian

menggunakan pelarut etil asetat : dietil eter 1:1 dan mendapatkan nilai *recovery* 112,5% [18], dan menggunakan pelarut metil butil eter : diklorometana dan mendapatkan nilai *recovery* 87,6-96,3% [39]. Bila dibandingkan dengan metode presipitasi protein, metode ekstraksi cair-cair ini memiliki nilai *recovery* yang lebih rendah, serta prosedurnya sedikit lebih rumit serta lebih membutuhkan pelarut yang mahal.

Kesimpulan

Metode analisis yang umum digunakan dalam mengukur warfarin secara kuantitatif yakni metode HPLC dengan detektor spektroskopi massa. Metode ini juga memberikan kelebihan berupa sensitivitas dan selektivitas yang tinggi dibandingkan dengan metode dan detektor lainnya karena memiliki nilai batas bawah kuantifikasi paling rendah yakni 0,014 ng/mL. Fase gerak yang memiliki kelebihan untuk digunakan yakni asetonitril, dengan kolom C18. Sementara untuk sistem elusi, gradien lebih memberikan keuntungan meskipun sistem elusi isokratik lebih banyak digunakan. Metode yang paling mudah digunakan yakni presipitasi protein menggunakan asetonitril sebagai protein presipitan, ditambahkan dengan asam untuk meningkatkan nilai *recovery*.

Referensi

- [1]. Radwan MA, Bawazeer GA, Aloudah NM, Alquadeib BT, Aboul-Enein HY. Determination of free and total warfarin concentrations in plasma using UPLC MS/MS and its application to a patient samples. *Biomed Chromatogr.* 2012;26(1):6-11. <https://doi.org/10.1002/bmc.1616>
- [2]. Alnaqeeb M, Mansor KA, Mallah EM, Ghanim BY, Idkaidek N, Qinna NA. Critical pharmacokinetic and pharmacodynamic drug-herb interactions in rats between warfarin and pomegranate peel or guava leaves extracts. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(1):1-12. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2436-5>
- [3]. Lomonaco T, Ghimenti S, Piga I, Onor M, Melai B, Fuoco R, et al. Determination of total and unbound warfarin and warfarin alcohols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A.* 2013;1314:54-62. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.091>
- [4]. Chua YA, Abdullah WZ, Gan SH. Development of a high-performance liquid chromatography method for warfarin detection in human plasma. *Turkish J Med Sci.* 2012;42(5):930-41. <https://doi.org/10.3906/sag-1101-1476>
- [5]. Miura M, Okuyama S, Kato S, Kagaya H, Murata A, Komatsuda A, et al. Simultaneous determination of warfarin and 7-hydroxywarfarin enantiomers by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit.* 2011;33(1):108-14. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31820176d6>
- [6]. Ju W, Peng K, Yang S, Sun H, Sampson M, Wang MZ. 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 J Anal Pharm Chem.* 2014;1(2):1-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26161443> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4494745>

- [7]. Gholivand MB, Torkashvand M, Yavari E. Electrooxidation behavior of warfarin in Fe₃O₄ nanoparticles modified carbon paste electrode and its determination in real samples. *Mater Sci Eng C*. 2015;48:235–42. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.003>
- [8]. Li W, Jian W, Fu Y. Basic Sample Preparation Techniques in LC-MS Bioanalysis. In: *Basic Sample Preparation Techniques in LC-MS Bioanalysis*. 2019. p. 1–30. <https://doi.org/10.1002/9781119274315.ch1>
- [9]. Hadjmohammadi M, Ghambari H. Three-phase hollow fiber liquid phase microextraction of warfarin from human plasma and its determination by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;61:44–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.11.019>
- [10]. Jensen BP, Chin PKL, Begg EJ. Quantification of total and free concentrations of R- and S-warfarin in human plasma by ultrafiltration and LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(7):2187–93. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5303-x>
- [11]. Gouveia F, Bicker J, Gonçalves J, Alves G, Falcão A, Fortuna A. Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review. *Anal Chim Acta*. 2019;1076:18–31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.061>
- [12]. Lv C, Liu C, Liu J, Li Z, Du X, Li Y, et al. The Effect of Compound Danshen Dripping Pills on the Dose and Concentration of Warfarin in Patients with Various Genetic Polymorphisms. *Clin Ther*. 2019;41(6):1097–109. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2019.04.006>
- [13]. Mostafa AA-A. Enantiomeric separation and quantitation of warfarin and its metabolites in human plasma by LC-MS/MS. *Eur J Chem*. 2016;7(3):357–62. <https://doi.org/10.5155/eurjchem.7.3.357-362.1470>
- [14]. Jones DR, Boysen G, Miller GP. Novel multi-mode ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for profiling enantiomeric hydroxywarfarins and warfarin in human plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2011;879(15–16):1056–62. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.022>
- [15]. Shaik AN, Bohnert T, Williams DA, Gan LL, Leduc BW. Mechanism of Drug-Drug Interactions between Warfarin and Statins. *J Pharm Sci*. 2016;105(6):1976–86. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.011>
- [16]. Guo J, Zhang Y, Huo Y, Chang Y, Liu E, Hao J. Monitoring unbound warfarin in drug combination therapy by pharmacokinetics and fluorospectrometry. *Chinese Herb Med*. 2019;11(1):92–7. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2018.10.002>
- [17]. Li W, Bu F, Li R, Wang B, Shaikh AS, Zhang Y, et al. Bioequivalence Study of Warfarin in Healthy Chinese Volunteers With a Validated High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2018;7(3):256–62. <https://doi.org/10.1002/cpdd.348>
- [18]. Farouk F, Nabhan S, Niessen WMA, Azzazy HME. LC-MS/MS assay for assessing medical adherence in patients under warfarin maintenance therapy. *Microchem J*. 2018;141:135–40. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.002>
- [19]. Li H, Jiang Y, Wang Y, Lv H, Xie H, Yang G, et al. The Effects of Warfarin on the Pharmacokinetics of Senkyunolide I in a Rat Model of Biliary Drainage After Administration of Chuanxiong. *Front Pharmacol*. 2018;9:1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01461>
- [20]. Dong H, Ma J, Li T, Xiao Y, Zheng N, Liu J, et al. Global deregulation of ginseng products may be a safety hazard to warfarin takers: Solid evidence of ginseng-warfarin interaction. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–29. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05825-9>
- [21]. Zayed A, Babaresh WM, Darweesh RS, El-Elimat T. Simultaneous determination of warfarin and 7-hydroxywarfarin in rat plasma by HPLC-FLD. *Acta Pharm*. 2020;70(3):343–57. <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0025>
- [22]. Shi Y, Zhang W, Jiang M, Huang L, Zhou Y, Chen J, et al. Effects of sulfotanshinone sodium injection on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats in vivo. *Xenobiotica*. 2020;50(6):705–12. <https://doi.org/10.1080/00498254.2019.1681034>
- [23]. Albrecht D, Turakhia MP, Ries D, Marbury T, Smith W, Dillon D, et al. Pharmacokinetics of tecarfarin and warfarin in patients with severe chronic kidney disease. *Thromb Haemost*. 2017;117(11):2026–33. <https://doi.org/10.1160/TH16-10-0815>
- [24]. Kobayashi S, Ishii K, Yamada Y, Ryu E, Hashizume J, Nose S, et al. Combination index of the concentration and in vivo antagonism activity of racemic warfarin and its metabolites to assess individual drug responses. *J Thromb Thrombolysis*. 2019;47(3):467–72. <https://doi.org/10.1007/s11239-018-1780-5>
- [25]. Ueng YF, Lu CK, Yang SH, Wang HJ, Huang CC. Potentiation of the anticoagulation effect of warfarin by the herbal remedy Shu-Jing-Hwo-Shiee-Tang in rats: The dosing regimen and pharmacokinetic interaction. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2017;32(1):85–91. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2016.11.010>
- [26]. Yang MS, Yu CP, Chao PDL, Lin SP, Hou YC. R- and S-Warfarin Were Transported by Breast Cancer Resistance Protein: From In Vitro to Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies. *J Pharm Sci*. 2017;106(5):1419–25. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.01.012>
- [27]. Noguez JH, Ritchie JC. Quantitation of the oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, apixaban, and warfarin in plasma using ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Methods Mol Biol*. 2016;1383:21–7. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3252-8_3
- [28]. Kusama T, Toda A, Shimizu M, Uehara S, Inoue T, Uno Y, et al. Association with polymorphic marmoset cytochrome P450 2C19 of in vivo hepatic clearances of chirally separated R-omeprazole and S-warfarin using individual marmoset physiologically based pharmacokinetic models. *Xenobiotica*. 2018;48(10):1072–7. <https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1393121>
- [29]. Nosal DG, Feinstein DL, Chen L, van Breemen RB. Separation and quantification of superwarfarin rodenticide diastereomers=>Bromadiolone, difenacoum, flocoumafen, brodifacoum, and difethialone—in human plasma. *J AOAC Int*. 2021;103(3):770–8. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa007>
- [30]. Bedewy AML, Showeta S, Mostafa MH, Kandil LS. The Influence of CYP2C9 and VKORC1 Gene Polymorphisms on the Response to Warfarin in Egyptians. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2018;34(2):328–36. <https://doi.org/10.1007/s12288-016-0725-4>
- [31]. Ge B, Zhang Z, Lam TT, Zuo Z. Puerarin offsets the anticoagulation effect of warfarin in rats by inducing rCyps, upregulating vitamin K epoxide reductase and inhibiting thrombomodulin. *Biopharm Drug Dispos*. 2017;38(1):33–49. <https://doi.org/10.1002/bdd.2054>
- [32]. Zhang X, Zhang X, Wang X, Zhao M. Influence of andrographolide on the pharmacokinetics of warfarin in rats. *Pharm Biol*. 2018;56(1):351–6. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1478431>
- [33]. Chernonosov A. Quantification of Warfarin in Dried Rat Plasma Spots by High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *J Pharm*. 2016;2016:1–6. <https://doi.org/10.1155/2016/6053295>
- [34]. Groenendaal-Van De Meent D, Den Adel M, Rijnders S, Krebs-Brown A, Kerbusch V, Golor G, et al. The Hypoxia-inducible Factor Prollyl-Hydroxylase Inhibitor Roxadustat (FG-4592) and Warfarin in Healthy Volunteers: A Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Drug-Drug Interaction Study. *Clin Ther*. 2016;38(4):918–28. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.02.010>
- [35]. Shakleya D, Rahman Z, Faustino PJ. Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method to determine the bioavailability of warfarin and its major metabolite 7-hydroxy warfarin in rats dosed with oral formulations containing differen. *Biomed Chromatogr*. 2019;33(12):0–2. <https://doi.org/10.1002/bmc.4685>
- [36]. Flora DR, Rettie AE, Brundage RC, Tracy TS. CYP2C9 Genotype-Dependent Warfarin Pharmacokinetics: Impact of CYP2C9 Genotype on R- and S-Warfarin and Their Oxidative Metabolites. *J Clin Pharmacol*. 2017;57(3):382–93. <https://doi.org/10.1002/jcph.813>

- [37]. Lomonaco T, Ghimenti S, Piga I, Biagini D, Onor M, Fuoco R, et al. Monitoring of warfarin therapy: Preliminary results from a longitudinal pilot study. *Microchem J.* 2018;136:170–6. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.010>
- [38]. Shen C, Huang X, Li J, Zhang P, Li L, Zhang W, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of aspirin with warfarin in beagle dogs. *Xenobiotica.* 2016;46(6):530–41. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1096979>
- [39]. Desai A, Yamazaki T, Dietz A, Kowalski D, Lademacher C, Pearlman H, et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of the Drug–Drug Interaction between Isavuconazole and Warfarin in Healthy Subjects. *J Chem Inf Model.* 2013;53(9):1689–99. <https://doi.org/10.1002/cpdd.283>
- [40]. Ranjbar bandforuzi S, Hadjmohammadi MR. Solvent bar microextraction using a reverse micelle containing extraction phase for the determination of warfarin from human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2017;1496:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.037>
- [41]. Ye H, Sui D, Liu W, Yuan Y, Ouyang Z, Wei Y. Effects of CYP2C11 gene knockout on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats. *Xenobiotica.* 2019;49(12):1478–84. <https://doi.org/10.1080/00498254.2019.1579006>
- [42]. Majidi SM, Hadjmohammadi MR. Hydrophobic borneol-based natural deep eutectic solvents as a green extraction media for air-assisted liquid-liquid micro-extraction of warfarin in biological samples. *J Chromatogr A.* 2020;1621(xxxx):461030. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461030>
- [43]. Zambon CF, Pengo V, Moz S, Bozzato D, Fogar P, Padoan A, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic re-evaluation of a genetic-guided warfarin trial. *Eur J Clin Pharmacol.* 2018;74(5):571–82. <https://doi.org/10.1007/s00228-018-2422-8>
- [44]. Shen Z, Lee CA, Wallach K, Valdez S, Wilson DM, Kerr B, et al. Lesinurad: Evaluation of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions With Warfarin in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2019;8(5):657–63. <https://doi.org/10.1002/cpdd.662>
- [45]. Zilberg RA, Maistrenko VN, Zagitova LR, Guskov VY, Dubrovsky DI. Chiral voltammetric sensor for warfarin enantiomers based on carbon black paste electrode modified by 3,4,9,10-perylenetetracarboxylic acid. *J Electroanal Chem.* 2020;861:113986. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.113986>
- [46]. EMA. International Council of Harmonisation Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation. Vol. 44. London; 2019.
- [47]. Bruderer S, Okubo K, Mukai H, Mant T, Dingemans J. Investigation of potential pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions between selexipag and warfarin in healthy male subjects. *Clin Ther.* 2016;38(5):1228–1236.e1. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.014>
- [48]. Ungewiss J, Gericke S, Boriss H. Determination of the Plasma Protein Binding of Liraglutide Using the Escalate * Equilibrium Shift Assay. *J Pharm Sci.* 2019;108(3):1309–14. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.10.018>
- [49]. Hu C, Chen X, Zhao Z, Gao D, Gong S, Zhang L, et al. A Two-Sequence, Four-Period, Crossover, Replicate Study to Demonstrate Bioequivalence of Warfarin Sodium Tablet in Healthy Chinese Subjects Under Fasting and Fed Conditions. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2020;9(4):527–36. <https://doi.org/10.1002/cpdd.783>
- [50]. Ghimenti S, Lomonaco T, Biagini D, Bellagambi FG, Onor M, Trivella MG, et al. 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). *Microchem J.* 2018;136:247–54. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.057>
- [51]. Sultan MA, Abou El-Alamin MM, Wark AW, Azab MM. Detection and quantification of warfarin in pharmaceutical dosage form and in spiked human plasma using surface enhanced Raman scattering. *Spectrochim Acta- Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2020;228:117533. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117533>
- [52]. Xiao R, Wu HL, Hu Y, Yin XL, Gu HW, Liu Z, et al. Simultaneous determination of warfarin and aspirin contents in biological fluids using excitation-emission matrix fluorescence coupled with a second-order calibration method. *Anal Sci.* 2017;33(1):29–34. <https://doi.org/10.2116/analsci.33.29>
- [53]. Chang YT, Wang ZR, Hsieh MM. Sensitive determination of warfarin and its metabolic enantiomers in body fluids via capillary electrophoresis combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and online sample stacking. *Microchem J.* 2019;146:1276–84. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.065>
- [54]. Liu Y, Liu S, Shi Y, Qin M, Sun Z, Liu G. Effects of safflower injection on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of warfarin in rats. *Xenobiotica.* 2018;48(8):818–23. <https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1361051>



Copyright © 2021 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)