

## 와파린의 HPLC 분석법 및 한국인에서의 약동학적 특징

배정우 · 김현경 · 양상인 · 김지홍 · 김경혜 · 장춘곤 · 박영서\* · 손의동\*\* · 이석용#

성균관대학교 약학대학, \*서울아산병원 소아과, \*\*중앙대학교 약학대학

(Received December 20, 2004; Revised March 18, 2005)

### HPLC Determination and Pharmacokinetic Profile of Warfarin in Korean Subjects

Jung-Woo Bae, Hyun-Kyung Kim, Sang-In Yang, Ji-Hong Kim, Kyung-Hye Kim, Choon-Gon Jang,  
Young-Seo Park\*, Uy-Dong Sohn\*\* and Seok-Yong Lee#

Lab. of Pharmacology, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

\*Department of Pediatrics, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul 138-736, Korea

\*\*College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — Warfarin is a widely used oral anticoagulant agent used to treat thromboembolic disease. The purpose of this study was to develop the efficient assay method of warfarin sodium in human plasma and to assess the pharmacokinetic profile of the warfarin in healthy Korean volunteers. The pharmacokinetics of warfarin administered orally was evaluated after a dose of 10 mg. Warfarin in plasma was assayed using a specific HPLC method with UV absorbance at 304 nm. AUC was  $46.33 \pm 9.95 \mu\text{g/ml}\cdot\text{hr}$ ,  $C_{\text{max}}$   $1.22 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$ ,  $T_{\text{max}}$   $2.50 \pm 1.41 \text{ hr}$  and half-life  $43.49 \pm 4.33 \text{ hr}$ .  $T_{\text{max}}$  was slightly shorter than that in Caucasian (3~9 hr), whereas the half-life was longer than that in Caucasian (10~45 hr, mean: 36 hr). These results suggest that warfarin may have a longer duration in Korean than in Caucasian.

**Keywords** □ warfarin sodium, coumadin tablets, HPLC

와파린나트륨(4-Hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)-2H-1-benzopyran-2-one sodium salt)은 경구용 항혈액응고제로서 비타민 K의 2,3-epoxide를 비타민 K quinone으로 전환시키는 효소를 억제하여 결과적으로 비타민 K 의존성 혈액응고인자들(factor VII, factor IX, factor X, prothrombin 등)의 생성을 감소시켜 혈액응고를 억제시키는 약물이다.<sup>1)</sup> 와파린은 정맥의 혈전이나 색전 예방 및 치료, 심장판막 질환, 폐동맥색전증, 관상동맥폐색, 동맥수술 등에 혈액응고 억제 목적으로 사용하며, 심근경색의 예방 목적으로도 사용되어진다. 부작용으로는 탈모, 피부병변, 피부괴사, 발진과 식욕부진, 설사, 오심, 구토, 위경련 등의 위장장애가 있고 또한 백혈구 감소, 잠재성 병변으로 인한 출혈, 무과립구증, 구강궤양과 객혈 그 외 열, 간 독성, 신장손상 등이 나타날 수 있다. 이 약이나 구성성분에 과민증이 있는 환자나 중증의 간장 및 신질환자, 출혈증 또는 출혈성 질환자 그리고 대장암, 위장관계

양, 중증의 고혈압환자, 비타민 K의 결핍환자, 임부 또는 가임부 는 사용을 피하여야 한다.

경구투여에 의해 신속히 거의 완전히 흡수(생체이용률 >95%)<sup>2,3)</sup> 되어 36~72시간에 프로트롬빈 시간에 대한 최대효과를 나타내며, 프로트롬빈 시간에 따라 개인별로 차이가 있으나 통상적인 초회량은 40~60 mg/일, 노약자는 20~30 mg/일을 경구투여하며 유지량은 5~10 mg/일로 알려져 있다. 약물동력학적인 특징을 보면 투약후 3~9시간에 최고혈중농도에 도달하고, 분포용적(volume of distribution)은 체중의 8~27%를 나타내며,<sup>4,5)</sup> 혈장단백과의 결합률이 매우 높아 97~99.5%의 결합률을 나타낸다고 보고되어 있다.<sup>6,7)</sup> 와파린은 간에서의 대사에 의하여 소실되며, 대사산물이 담즙이나 요를 통하여 배설된다. 혈장소실반감기는 백인들을 대상으로 총 와파린에 대하여 총 10~45시간 정도를 나타내며 평균적으로 약 36시간 정도 되는 것으로 알려져 있다.<sup>1,3)</sup> 와파린은 S-이성체와 R-이성체의 혼합물로 이루어져 있는데 보다 활성이 높은 S-이성체는 18~35시간의 소실반감기를 나타내며, R-이성체는 20~60시간의 소실반감기를 나타낸다고 알려져 있다.<sup>8)</sup> 총 혈장 와파린의 청소율(clearance)은 2.5~6.4 ml/h/kg으로 보

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 031-290-7781 (팩스) 031-290-7738  
(E-mail) sylee@skku.ac.kr

고되어 있다.<sup>9)</sup> King 등<sup>10)</sup>의 보고에서는 건강한 백인 성인 남성을 대상으로 와파린나트륨 10 mg 투여시 1~4시간(평균 1시간) 이내에 최고혈중농도  $1.4 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ 에 도달하였고, 혈장소실반감기는  $41 \pm 7$ 시간, AUC는  $62 \pm 16 \mu\text{g/ml} \cdot \text{hr}$ 로 알려져 있다.

각 인종과 민족에 따라 유전적인 소인의 차이가 있어 개개 약물의 약동학적인 특징의 차이가 있을 수 있으며, 이로 인하여 타 인종이나 민족을 대상으로 실험된 결과를 바탕으로 약물치료를 진행할 경우 예상과는 다르게 최선의 효과를 얻지 못하는 경우가 많다. 따라서 국내인을 대상으로 각 약물의 약동학적인 특징을 측정하는 것은 임상적으로 중요한 의미가 있다.

약물의 혈중농도 분석에는 고성능액체크로마토그래피(High performance liquid chromatograph, HPLC)와 가스크로마토그래피(Gas chromatograph, GC)를 이용한 방법이 가장 편리하게 사용되고 있다. 최근에 몇몇의 연구에서 HPLC와 자외선 검출기(UV detector)를 이용하여 와파린 정제의 함량분석법을 보고한바 있다.<sup>11-13)</sup> 본 연구에서는 항응고제인 와파린 혈중농도를 HPLC를 이용한 객관적이고 보다 효율적인 분석법을 개발하고 이를 이용하여 생체 이용률 시험을 수행하여 한국인에서의 약물동력학적인 특징을 연구하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약 및 기기

와파린나트륨(warfarin sodium)은 제일약품의 쿠마딘정(5 mg/tab)을 사용하였으며, 각 피험자에게 성인 1일 유지량에 해당하는 2정(warfarin sodium으로서 10 mg)을 경구투여 하였다.

와파린나트륨 표준품과 내부표준물질로 사용한 4-hydroxycoumarin 및 potassium phosphate(monobasic anhydrous, dibasic anhydrous), 황산은 Sigma(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. HPLC용 메탄올, 디에틸에텔, 빙초산, 테트로히드로푸란(J.T. Baker Co., USA), 생리식염수, 헤파린(중외제약, 한국)을 사용하였다. HPLC System은 Waters 515 HPLC Pump와 Waters 717 Plus Autosampler를, 검출기로는 Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector(이상 Waters, USA)를, 컬럼은 Capcell Pak C18 UG120 5  $\mu\text{m}$ ( $4.6 \times 250$  mm, Shiseido Fine Chemical, 일본)를, 데이터 처리장치로는 영린과학의 Autochro Win-Chromatography Data System(한국)을 사용하였다.

#### 피험자의 선정

피험자는 만 19~55세의 건강한 성인으로서 과거에 소화기계, 간장, 신장, 심혈관계, 중추신경계, 내분비계 및 혈액질환의 병력이 없고, 시험개시 1개월 이내 바르비탈류 약물 등의 약물대사 효소 유도 및 억제 약물을 복용한 사실이 없고 과도한 음주를 하

지 않으며, 현재 타 약물을 복용하고 있지 않은 지원자를 식품의약품안전청의 규정에 따라 모집공고하고 지원신청서를 받은 후 서울 아산병원에서 건강진단을 실시하여 적합판정을 받은 16명을 선정하였다. 피험자의 건강진단은 문진과 내과적인 진찰을 받고 다음과 같은 임상병리검사를 실시하였다. 혈액병리검사(hemoglobin, hematocrit, platelet, WBC, differential count of WBC), 혈액화학검사(BUN, creatinine, total protein, albumin, sGOT, sGPT, total bilirubin, fasting blood sugar, total cholesterol, alkaline phosphatase, PT, aPTT), 뇨검사(specific gravity, colour, pH, glucose, albumin, bilirubin, WBC, RBC), 내과적 검진(기왕력 및 신체검사)을 실시하였다. 피험자로 선정된 사람들의 평균 체중은  $67.6 \pm 7.4$  kg, 나이는  $22.8 \pm 1.3$ 세이었다. 이들로부터 동의서를 받은 후 생체이용률 시험을 실시하였다. 피험자들은 시험 시작 12시간 전부터 금식시켰으며 또한 투약 12시간 전부터 채혈종료시까지 피험자의 운동, 흡연, 크산틴계 음료 및 음주 등을 제한 관리하였다.

#### 약물투여 및 혈액채취

피험자는 시험전일 10시에 취침하여 시험 당일 오전 6시에 기상하였으며, 오전 7시 30분에 피험자들의 상완정맥부위에 heparin-locked catheter를 설치하고 blank 혈액으로 각각 10 ml씩을 채혈하였다. 피험자에 대한 투약은 오전 8시부터 와파린나트륨으로서 10 mg을 물 240 ml와 함께 투약하였다.

채혈은 약물의 예상 혈중소실반감기 36시간<sup>1,3)</sup>을 토대로 반감기의 3배 이상인 120시간 동안 실시하였고, 채혈 횟수는 약물 투약 직전과 투약 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24, 48, 72 및 120시간으로 총 13시점에서 실시하였다. 채혈 방법은 I.V. catheter 중에 남아 있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 2 ml의 혈액을 빼내어 버리고 약 10 ml의 혈액을 채취하여 피험자 관리번호와 채혈시간이 기재되어 있는 vacutainer에 넣었다. 채혈 후 I.V. catheter 안에 잔류하는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리 식염수를 주입하였다. 채혈된 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 혈장을 취하여 혈장 분리관에 옮겨 담고 분석시까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 식사에 의한 영향을 배제하기 위하여 투약 전 12시간 이상 절식한 상태에서 투약 후 4시간까지는 금식 상태를 유지시켰으며, 투약 후 4시간째 채혈을 마친 후 동일한 점심식사를 섭취하였다. 10시간째 채혈이 끝난 후 다시 동일한 저녁 식사를 섭취하였다. 피험자들이 최종 채혈(120시간)이 끝날 때까지 지정된 숙소에서 머물도록 하였으며 과도한 운동, 흡연, 크산틴계 음료 및 음주 및 타 약물의 복용을 금지 시켰다.

#### 혈장중 와파린의 분석

혈장중 와파린의 분석은 기존에 알려진 와파린 HPLC 분석

법<sup>11,14-16</sup>)을 부분적으로 변경하여 실시하였다. 이동상으로는 35% 테트라히드로퓨란과 10% 메탄올과 0.1% 빙초산을 함유한 65% 탈이온수(deionized-water) 혼합용액을 사용하고 유속 1 ml/min에서 정량하였다. UV검출기의 검출과장 선정은 와파린나트륨용액과 내부표준물질로 사용될 4-hydroxycoumarin용액의 200~800 nm까지의 각 과장에서 흡광도를 UV spectrophotometer를 사용하여 측정하여 최적의 검출과장(304 nm)을 선택하였다.

와파린나트륨 표준품을 증류수에 녹인 용액을 blank 혈장으로 1:9의 비율로 희석하여 1 ml의 혈장중 와파린의 농도가 각각 50, 100, 200, 500, 1500 및 2500 ng/ml이 되도록 혈장시료를 만들었다. 각각의 표준혈장 1 ml에 내부표준물질로 4-hydroxycoumarin (5 µg/ml) 100 µl를 가한 후 흔들어 섞고, 5 M 황산 100 µl를 가하여 섞은 후 여기에 6 ml의 디에칠에테를 가하고 30초 동안 vortexing하여 추출한 다음 2,500 rpm에서 10분간 원심분리시켰다. 여기에서 유기용매층을 취하여 깨끗한 시험관에 옮긴 다음 40°C 질소기류하에서 증발·건조시킨 후 잔사를 이동상 400 µl로 용해시킨후 그 중 100 µl를 취하여 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 면적비에 대한 와파린의 면적비를 가지고 검량선을 작성하였다.

정밀성은 와파린과 내부표준물질의 피크면적비의 표준편차를 와파린과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 감도(정량한계)는 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 10으로 하고 정밀성이 20% 이하이고, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였다.

혈장시료의 처리는 혈장 1 ml에 내부표준물질로 4-hydroxycoumarin(5 µg/ml) 100 µl를 가한 후 검량선 작성시 사용한 방법과 동일한 방법으로 전처리한 후 최종시료 100 µl를 HPLC에 주

입하여 와파린의 농도를 구하였다.

**약동학적지표의 산출**

최고혈중농도( $C_{max}$ ), 최고혈중농도시점( $T_{max}$ ), 곡선하면적(AUC), 소실반감기( $T_{1/2}$ ), 소실상수( $K_e$ ) 등은 식품의약품안전청에서 제작한 BA-Calc 2002 프로그램을 사용하여 구하였다.

**실험 결과**

**분석조건의 검증**

와파린과 내부표준물질인 4-hydroxycoumarin의 흡광도를 scanning 한 결과는 Fig. 1과 같았다. 와파린은 약 304 nm에서 최대 흡광도를 나타내며, 4-hydroxycoumarin은 약 285 nm에서 최대흡광도를 나타내었다. 따라서, 본 연구에서는 UV검출기의 과장을 304 nm로 결정하였다.

혈장시료 처리법에 따라 검체를 처리하여 HPLC로 분석하였

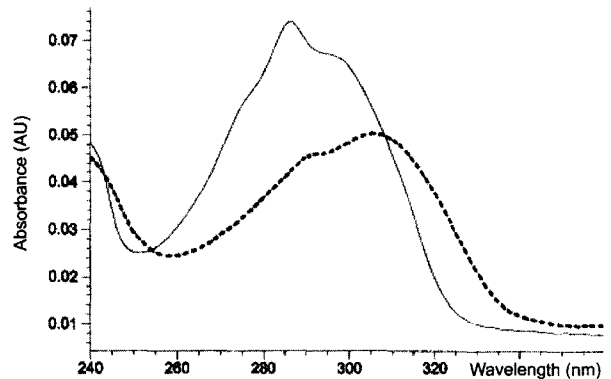


Fig. 1 - Absorbance spectrum of warfarin and 4-hydroxycoumarin (..... : warfarin, — : 4-hydroxycoumarin).

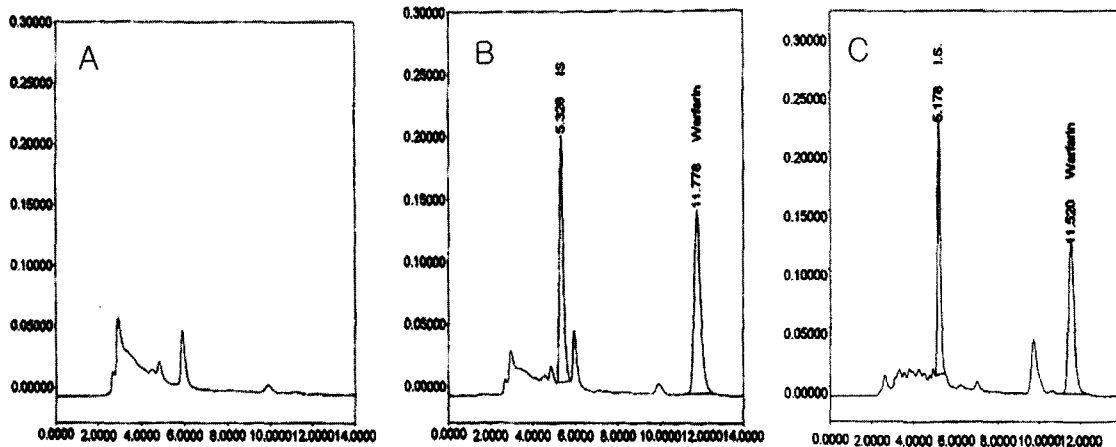


Fig. 2 - HPLC chromatogram of plasma warfarin (A: blank human plasma, B: human plasma spiked with warfarin (1000 ng/ml) and I.S. (4-hydroxycoumarin 500 ng/ml), C: human plasma sample at 3 hr after administration of warfarin sodium 10 mg).

**Table I** – Precision, accuracy and recovery of HPLC assay method for plasma warfarin (n=5 for precision and accuracy, n=3 for recovery)

Concentration (ng/ml)	Precision (CV%)		Accuracy (%)	Recovery (%)	
	Intra-day	Inter-day		Warfarin	I.S.
50	4.20	11.59	90.00	81.48	93.78
100	3.80	9.33	93.46	79.73	98.20
200	4.34	11.57	98.02	87.13	99.17
500	3.34	9.83	97.43	89.94	98.61
1500	9.23	11.93	104.01	89.60	97.56
2500	5.75	7.66	98.57	107.13	101.72
<b>Mean</b>				<b>89.17</b>	<b>98.17</b>
<b>S.D.</b>				<b>9.75</b>	<b>2.59</b>

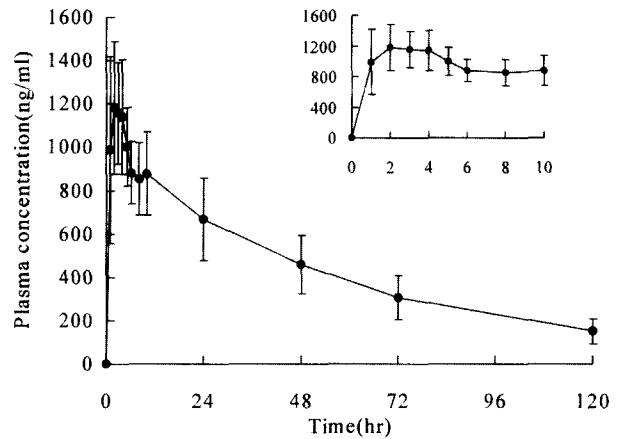
을 때 얻어진 크로마토그램은 Fig. 2와 같았으며, 외파린 피이크의 유지시간은 약 11.8분, 내부표준물질 피이크의 유지시간은 약 5.3분이었고, 분석조건에서 외파린 및 내부표준물질(I.S.)은 기타 혈장 성분들과 잘 분리되었다.

Blank 혈장시료, 5 µg/ml 내부표준물질 100 µl를 spike한 혈장시료, 50(정량한계 농도), 100, 200, 500, 1500 및 2500 ng/ml의 표준액과 5 µg/ml 내부표준물질 100 µl를 spike한 혈장시료를 혈장시료처리법에 의하여 검체를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때, 혈장시료로부터 구한 외파린의 검량선의 계산식은  $y=0.00119x-0.02788(r^2=0.9999)$ 로 50~2500 ng/ml 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 내부표준물질과 시험물질의 회수율은 각각 98.17와 89.17%이었다. 본 분석방법의 정밀성(CV, %)은 일내 정밀성이 10% 이하, 정량한계농도에서의 일내 정밀성은 5% 이하였고, 일간 정밀성은 12% 이하, 정량한계농도에서의 일간 정밀성은 12% 이하였다. 정확성은 93~104%, 정량한계농도에서의 정확성은 90%이었다(Table I). 감도(정량한계농도)는 50 ng/ml이고, 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 10으로 하고 정밀성이 20% 이하이고, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였다.

이들 결과를 고려할 때 혈장중 외파린에 대한 본 HPLC 분석법은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

**혈장중 외파린의 농도추이**

각 피험자에게 외파린나트륨을 투여한 후 구한 평균 혈장 중 약물농도-시간 곡선을 Fig. 3에 나타내었는데 경구투여시 외파린 나트륨의 흡수속도는 16명의 피험자 중 5명이 투여 후 1시간 경과시 최고혈중농도에 도달하였고, 4명이 투여 후 2시간 경과시, 3명이 3시간 경과시 그리고 4명이 4시간 경과시 최고혈중농도에 도달하였으며 소실속도는 매우 느려 외파린의 평균 반감기인 43.49시간의 약 3배에 해당하는 120시간(5일) 이후에도 혈중농도가 최저측정한계농도 이상으로 나타났다.



**Fig. 3** – Plasma concentration of warfarin after oral administration of warfarin sodium 10 mg. Each value represents the Mean ± S.D. of 16 volunteers. Inserts shows plasma concentration-time curves of warfarin from 0 to 10 hours.

**Table II** – Pharmacokinetic parameters of oral warfarin (10 mg) in 16 Korean volunteers

Parameters	AUC (µg/ml · hr)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	T <sub>max</sub> (hr)	K <sub>e</sub> (hr <sup>-1</sup> )	T <sub>1/2</sub> (hr)
<b>Mean</b>	<b>46.33</b>	<b>1216</b>	<b>2.50</b>	<b>0.016</b>	<b>43.49</b>
<b>S.D.</b>	<b>9.95</b>	<b>223</b>	<b>1.41</b>	<b>0.001</b>	<b>4.33</b>

**외파린의 약동학적 파라메타**

각 피험자의 AUC, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, K<sub>e</sub> 및 T<sub>1/2</sub>과 같은 생체이용률 파라메타를 BA-Calc 2002 프로그램을 이용하여 구하였으며, 그 평균값을 정리하여 Table II에 나타내었다.

경구 투여시 외파린의 평균최고혈중농도 도달시간은 2.50 ± 1.41시간이었다. 최고혈중농도는 가장 높은 피험자가 1736 ng/ml이었으며, 가장 낮은 피험자가 984 ng/ml로 다소 큰 차이를 보였으며 평균은 1216 ± 223 ng/ml이었다. AUC는 가장 높은 피험자가 75.11 µg/ml · hr인데 비하여 가장 낮은 피험자가 38.61 µg/ml · hr로 나타났다. 평균은 46.33 ± 9.95 µg/ml · hr이었다. 소실상수는 평균 0.016 ± 0.001 hr<sup>-1</sup>이고, 소실반감기는 평균 43.49 ± 4.33시간으로서 느리게 나타났다.

**고 찰**

혈장내 외파린의 농도 분석법은 기존에 보고된 방법<sup>11-16)</sup>을 변형하여 혈장중 외파린을 효율적으로 분리하고 효과적으로 정량할 수 있는 새로운 HPLC 분석법을 개발하였다. 디에틸에터를 사용하여 혈장 중 외파린과 내부표준물질인 4-hydroxycoumarin를 분리한 추출법은 수득률이 높고 일정하여 효율성과 편리성이 매우 높은 추출법을 확인하였다. 이 방법을 본 실험에 적용하였을 때 다른 내인성 피이크와 중첩없이 잘 분리 되었으며, 측정감

도도 와파린의 혈중농도를 측정하기에 적합하였다.

본 연구에서 16명의 피험자에게 10 mg의 와파린나트륨 정제를 복용시  $T_{max}$ 와 소실반감기는 각각 평균  $2.50 \pm 1.41$  및  $43.5 \pm 4.33$  시간으로 나타났다. 이는 백인들을 대상으로한 연구<sup>1,3-5)</sup>에서 최고혈중농도 도달시간 3~9시간과 소실반감기 10~45시간(평균 36시간)과 비교해 볼 때, 한국인에서는 최고혈중농도 도달 시간은 다소 빠른 반면에 소실반감기에서는 백인에 비해 다소 느려지는 것으로 보여 한국인에게 있어 와파린 나트륨에 대한 항응고작용의 지속효과가 좀더 길게 나타날 수 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

본 연구를 포함하여 연구자와 연구대상뿐만 아니라 각 개인에 따라 와파린의 약물동력학적 파라메타들이 많은 차이를 보이고 있다. 와파린은 임상적으로 투여시 racemic체로 투여되지만, 와파린작용의 약 75% 정도는 S-이성질체에 의한 것이다.<sup>19)</sup> 와파린은 흡수과정에서 완전히 소화관에서 흡수되어 거의 대부분이 혈장 단백질과 결합하여 간장의 microsome효소에 의하여 대사되며 대사후 약물의 효과를 상실한다. 와파린의 대사에 CYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19 및 3A4 등의 효소가 관여하며<sup>17)</sup> 그 중 S-warfarin의 80% 이상이 CYP2C9에 의해 대사가 이뤄진다.<sup>20,21)</sup> 최근에 와파린의 대사에 중요하게 작용하는 효소중 하나인 cytochrome P450 중의 하나인 CYP2C9의 유전적 소인과 약물의 대사에 있어서의 관련성에 관한 보고가 이루어지고 있다.<sup>17,18,21-25)</sup> 이는 각 인종과 민족, 대상에 따라 약물의 약동학적인 특징의 차이를 좀더 분명히 설명해 줌으로써 일률적인 약물치료를 진행할 경우 예상과는 다르게 최선의 효과를 얻지 못하는 경우가 나타날 수 있을 말해준다. 또 이들의 결과를 토대로 보면 CYP2C9의 유전형에 따른 분석을 통하여 부작용이 나타나지 않고 치료효과를 높일 수 있는 와파린의 적절한 약용량의 예측이 가능함을 제시해 준다고 할 수 있다.

## 문 헌

- 1) Dollery, C., *The Therapeutic Drugs*. 2nd ed. Churchill Livingstone, London, p. W1 (1999).
- 2) O'reilly, R. A., Aggeler, P. M. and Leong, L. S. : Studies on the coumarin anticoagulant drugs: The pharmacodynamics of warfarin in man. *J. Clin. Invest.* **42**, 1542 (1963).
- 3) Breckenridge, A. and Orme, M. : Measurement of plasma warfarin concentration in clinical practice. In *Biological Effects of Drugs in Relation to their Plasma Concentrations*. Mavmillan, London, 145 (1973).
- 4) O'Reilly, R. A. : Studies on the optical enantiomorphs of warfarin in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* **16**, 348 (1974).
- 5) Hewick, D. S. and McEwen, J. : Plasma half-lives, plasma metabolites and anticoagulant efficacies of the enantiomers of warfarin in man. *J. Pharm. Pharmacol.* **25**, 458 (1973).
- 6) Scott, A. K., Park, B. K. and Breckenridge, A. M. : Interaction between warfarin and propranolol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **17**, 559 (1984).
- 7) O'Reilly, R. A. : The binding of sodium warfarin to plasma albumin and its displacement by phenylbutazone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **226**, 293 (1973).
- 8) Hignite, C., Uetrecht, J., Tschanz, C. and Azarnoff, P. : Kinetics of R and S warfarin enantiomers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **28**, 99 (1980).
- 9) Loun, B. and Hage, D. S. : Chiral separation mechanisms in protein-based HPLC columns. 1. Thermodynamic studies of (R)- and (S)-warfarin binding to immobilized human serum albumin. *Anal. Chem.* **66**, 3814 (1994).
- 10) King, S. Y., Joslin, M. A., Taudibaugh, K., Pieniaszek, H. J. and Benedek, I. H. : Dose-dependent pharmacokinetics of warfarin in healthy volunteers. *Pharm. Res.* **12**, 1874 (1995).
- 11) Ring, P. R. and Bostick, J. M. : Validation of a method for the determination of (R)-warfarin and (S)-warfarin in human plasma using LC with UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22**, 573 (2000).
- 12) Robertson, P. Jr., Hellriegel, E. T., Arora, S. and Nelson, M. : Effect of modafinil at steady state on the single-dose pharmacokinetic profile of warfarin in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **42**, 205 (2002).
- 13) Boppana, V. K., Schaefer, W. H. and Cyronak, M. J. : High-performance liquid-chromatographic determination of warfarin enantiomers in plasma with automated on-line sample enrichment. *J. Biochem. Biophys. Methods* **54**, 315 (2002).
- 14) Shearer, M. J. : High-performance liquid chromatography of K vitamins and their antagonists. *Adv. Chromatogr.* **21**, 243 (1983)
- 15) Naidong, W. and Lee, J. W. : Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for the quantitation of warfarin enantiomers in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**, 785 (1993).
- 16) Moore, E. S. : Liquid chromatographic determination of coumarin anticoagulants in tablets: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 834 (1987).
- 17) Haber, L. T., Maier, A., Gentry, P. R., Clewell, H. J. and Dourson, M. L. : Genetic polymorphisms in assessing interindividual variability in delivered dose. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **35**, 177 (2002).
- 18) Takahashi, H., Wilkinson, G. R., Caraco, Y., Muszkat, M., Kim, R. B., Kashima, T., Kimura, S. and Echizen, H. : Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasian and Japanese patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **73**, 253 (2003).
- 19) Choonara, I. A., Cholerton, S., Haynes, B. P., Breckenridge, A.

- M. and Park, B. K. : Stereoselective interaction between the R enantiomer of warfarin and cimetidine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **21**, 271 (1986).
- 20) Black, D. J., Kunze, K. L., Wienkers L. C., Gidal, B. E., Seaton, T. L., McDonnell, N. D., Evans, J. S., Bauwens, J. E. and Trager, W. F. : Warfarin-fluconazole. II. A metabolically based drug interaction: *in vivo* studies. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 422 (1996).
- 21) Rettie, A. E., Korzekwa, K. R., Kunze, K. L., Lawrence, R. F., Eddy, A. C., Aoyama, T., Gelboin, H. V., Gonzalez, F. J. and Trager, W. F. : Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 54 (1992).
- 22) Takahashi, H. and Echizen, H. : Pharmacogenetics of CYP2C9 and interindividual variability in anticoagulant response to warfarin. *Pharmacogenomics J.* **3**, 202 (2003).
- 23) Linder, M. W., Looney, S., Adams, J. E. 3rd., Johnson, N., Antonino-Green, D., Laceyfield, N., Bukaveckas, B. L. and Valdes, R. Jr. : Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *J. Thromb. Thrombolysis* **14**, 227 (2002).
- 24) Aithal, G. P., Day, C. P., Kesteven, P. J. and Daly, A. K. : Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet.* **353**, 717 (1999).
- 25) Daly, A. K. and King, B. P. : Pharmacogenetics of oral anticoagulants. *Pharmacogenetics* **13**, 247 (2003).