

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ТЕОФІЛІНУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ МЕТОДОМ  
ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇА.І.Косован, О.О.Яковлева, А.Д.Бухтій, О.В.Ільченко,  
М.А.Станіславчук

ВІННИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ.М.І.ПИРОГОВА

## РЕЗЮМЕ

Розроблено простий та дешевий метод визначення теофіліна в сироватці крові. До 0.5 мл сироватки додається 0.5 мл 1 N соляної кислоти, суміш піддається екстрагуванню протягом 20 хвилин. Екстрагент - 10 мл системи хлороформ-ізопропанол (19:1). Шар органічної рідини відокремлюється, фільтрується та упарюється досуха. Сухий залишок розчиняють в 200 мкл 0,03 н соляної кислоти. До колонки (Сепарон С-18 RPS 5 мкм, 64x2 мм) вводиться 20 мкл цього розведення. Застосовано ізократичне елювання із складом мобільної фази - 85% води і 15% ацетонітрила, швидкість елювання - 100 мкл/хв, УФ детектування велось при довжині хвилі 270 нм. Час виходу теофіліну з колонки складав 4 хвилини.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: теофілін, вискоєфективна рідинна хроматографія, астма.

ВСТУП. Теофілін (ТФ) та його аналоги вже більше 50 років застосовуються для лікування хворих на бронхіальну астму. Широкий спектр застосування ТФ обумовлений багатоплановістю терапевтичного ефекту препарату. Основними механізмами його дії слід вважати: блокаду ізоформ фосфодіестерази циклічних нуклеотидів, конкурентну з аденозином взаємодію з пуриновими рецепторами, зміну рівня внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$ , вплив на вивільнення катехоламінів [1, 2, 13]. Також було показано, що ТФ також властиві імуномодулюючі, протизапальні, бронхопротекторні властивості [8, 12].

ТФ в концентраціях близьких до терапевтичних зменшує активність природних кілерів [9], може блокувати вивільнення цитокінів із моноцитів, мастоцитів та макрофагів дихальних шляхів

[11, 14]. Протизапальна дія ТФ проявляється в достатньо низьких концентраціях у порівнянні з терапевтичними (які забезпечують бронходилатативний ефект – 10-20 мкг/мл).

Прослідкована тісна залежність терапевтичного ефекту ТФ від його концентрації в плазмі крові. Так при концентрації ТФ в плазмі на рівні 5 мкг/мл об'єм форсованого видоходу зростає лише на 50%, тоді як при 10 мкг/мл – майже на 80%. Оскільки максимальний приріст об'єму форсованого видоходу спостерігали при концентрації в межах 10 – 20 мкг/мл, вона і вважається оптимальною для хворих [6, 15]. При зростанні концентрації ТФ в плазмі крові вище 20 мкг/мл у хворих спостерігаються дозозалежні токсичні ефекти [7, 10].

Наведені дані свідчать про необхідність моніторингу концентрації ТФ в плазмі крові хворих в процесі фармакотерапії.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** За основу методу визначення ТФ в сироватці крові прийнято методики, викладені у статтях [4, 5], які було адаптовано у відповідності до наявних умов – розміру хроматографічної колонки, застосованої насадки. При цьому удалося дещо спростити склад застосованих розчинів, а використання мікроколонки значно зменшило вартість кожного визначення.

Як стандартний зразок використовували ТФ фармакопейної якості.

За літературними даними [4, 5] розрахований коефіцієнт розподілу ТФ між водною та органічною фазами складає 1,76, тобто за умов екстракції ступінь екстрагування має складати 0,92. Експериментально було доведено, що ця величина є вірною.

При розробці методу визначення ТФ в сироватці крові визначені кількості препарату додавали до сироватки, яка не містила ТФ. Показано, що сироватка крові не містить речовин, час виходу яких з колонки співпадає би з часом виходу ТФ.

Метрологічні характеристики методу наведено в таблиці 1.

Власне методика визначення така: до 0.5 мл сироватки додається 0.5 мл 1 N соляної кислоти. Суміш перемішується, після чого до суміші додається екстрагуюча рідина, яка складається з 9,5 мл хлороформу і 0,5 мл ізопропанолу. Екстракція провадиться протягом 20-25 хвилин шляхом енергійного стряхування. По завершенні екстрагування органічна фаза відокремлюється центрифугуванням при 3000 об/хв на протязі 10 хвилин. Шар органічної рідини

відокремлюється та фільтрується на мембранному фторопластовому фільтрі МФФКГ-3 (НПФ "Біохром") з розміром пор 0,45 мкм з подальшим промиванням фільтру додатковою порцією розчинника.

Таблиця 1

Метрологічні характеристики методики кількісного визначення теофіліну в сироватці крові

Додано теофіліну до 1 мл	Метрологічні характеристики							
	f	X <sub>ср</sub>	S <sup>2</sup>	S <sub>x</sub>	P	f(P, f)	ΔX	ε. %
0,50	5	0,44	3,476	0,833	0,95	2,776	2,314	2,620
1,00	5	0,91	3,380	0,822	0,95	2,776	2,282	2,558
4,00	5	3,60	3,295	0,811	0,95	2,776	2,250	2,506

Екстракт після фільтрування упарюється досуха, сухий залишок розчиняють в 200 мкл 0,03 н соляної кислоти. До колонки вводиться 20 мкл цього розведення.

Визначення проводили на вискоефективному рідинному хроматографі "Міліхром-4" на мікроколонці розмірами 64x2 мм, наповненою насадкою Сепарон С-18 RPS з розмірами гранул 5 мкм.

При визначенні застосовано ізократичне елювання із складом мобільної фази - 85% води і 15% ацетонітрила, швидкість елювання - 100 мкл/хв, УФ детектування велося при довжині хвилі 270 нм.

Визначення проводилося при температурі колонки 20°C, при цьому час виходу теофіліну з колонки складав 4 хвилини. Час виходу всіх домішок, які були присутні у пробі, не перевищував 2 хвилин.

При визначенні використовувався метод абсолютного калібрування. Було показано, що якщо в колонку вводиться 20-2000 нг ТФ (концентрація в сироватці з урахуванням втрат при приготуванні проб складає приблизно 0,12-12 мкг/мл), висота піка пропорційна кількості теофіліну, який присутній у пробі (при незмінному часі виходу препарату з колонки).

Концентрація ТФ в сироватці розраховувалась за формулою

$$C = \frac{H \times K_c \times K_e \times V_{xl} \times V_{реел}}{V_{xl.відібр.} \times V_{пр} \times V_{сир}}$$

де:  $H$  - висота піку теофіліну;  
 $K_k$  - калібрувальний коефіцієнт;  
 $K_e$  - ступінь екстракції з сироватки до екстрагенту;  
 $V_{кл}$  - об'єм екстрагенту, що додається до сироватки;  
 $V_{реел}$  - об'єм рідини, в якій розчиняється сухий залишок;  
 $V_{кл.відібр.}$  - об'єм екстрагенту, який відібрано для подальшого фільтрування;  
 $V_{кол}$  - об'єм проби, що вводиться до колонки;  
 $V_{сир}$  - об'єм сироватки, яку взято для аналізу.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ. Описаним методом було вивчено фармакокінетику ТФ у хворих на бронхіальну астму при прийомі його у вигляді препарату пролонгованої дії "Теопек". Фармакокінетику теопека вивчали у 6 хворих на БА - жінок, віком від 38 до 56 років, середня маса тіла -  $67,1 \pm 2,3$  кг. До досліджу не включали хворих з порушенням функції печінки, нирок чи серця, а також тих, які протягом останнього місяця вживали препарати з властивостями індукторів чи інгібіторів мікросомальних ферментів. Напередодні і в день проведення дослідження відмінялись усі лікарські препарати. Хворий натще приймав теопек (300 мг), запиваючи 100 мл води. Кров для аналізу брали з ліктьової вени до прийому препарату і через 3, 6, 9, 12 та 24 год після його прийому.

Дослідження показали (табл. 2), що фармакокінетика ТФ у хворих в цілому відповідає літературним даним. Виявилось, що ТФ з лікарської форми теопек досить повільно всмоктується з шлунково-кишкового тракту. Концентрація ТФ досягає максимуму лише на шосту годину з часу прийому, а в одному випадку максимальну концентрацію зареєстровано на дев'яту годину дослідження. Після досягнення максимального рівня концентрація препарату починає знижуватись, причому темпи зниження спочатку (до 12 год) були більш стрімкими, що відповідає альфа-фазі фармакокінетичної кривої. В цей час відбуваються процеси розподілу препарату між органами і тканинами, що й обумовлює більш швидкі темпи зниження його концентрації.

Фармакокінетика ТФ у хворих на БА ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ )

Час після прийому теопеку, год	Концентрація ТФ, мкг/мл
3,0	$2,93 \pm 0,50$
6,0	$4,79 \pm 0,62$
9,0	$4,23 \pm 0,30$
12,0	$3,03 \pm 0,28$
24,0	$1,83 \pm 0,16$

В цей же період розпочинаються процеси елімінації, які складаються з біотрансформації та ниркової і печінкової екскреції, проте вклад цих процесів в альфа-фазу незначний. Після 12 год темпи зниження концентрації ТФ уповільнювались, що свідчило про перехід фармакокінетичної кривої у бета-фазу. За наступні 12 год (на 24 год) падіння склало усього 40% ( $3,03 \pm 0,28$  до  $1,83 \pm 0,16$  мкг/мл). Проте варто зазначити, що для препаратів з уповільненим вивільненням розподіл на такі дві фази є досить умовним, оскільки відносно низькі темпи зниження концентрації препарату в плазмі крові на етапі "раннього" та "пізнього", після досягнення максимальної концентрації, періоду обумовленні не стільки повільним розподілом чи елімінацією, скільки всмоктуванням препарату з шлунково-кишкового тракту, яке продовжується протягом більше 12 год після прийому. З наведених в таблиці середніх концентрації ТФ в плазмі крові 6 хворих видно, що фармакокінетика ТФ характеризується значними міжіндивідуальними відмінностями. Найбільша різниця між концентраціями ТФ була в момент досягнення максимуму (від 9,1 до 3,13 мкг/мл).

Параметри фармакокінетики ТФ по кожному хворому розраховували за двочастинною моделлю з урахуванням всмоктування (табл. 3). Розрахована за цією моделлю максимальна концентрація ( $C_{max}$ ) практично повністю співпадає з фактичною, що свідчить про адекватність застосованої математичної моделі.

Варто відмітити, що навіть  $C_{max}$ , яка створюється лікарською формою теопек, не досягала загальноприйнятого терапевтичного рівня для непродлонгованих препаратів ТФ (10-20 мкг/мл). Отримані нами дані, щодо низьких концентрацій ТФ в плазмі крові при дослідженні фармакокінетики теопеку відповідають результатам

досліджень інших авторів [3].

Таблиця 3

Параметри фармакокінетики ТФ у хворих на БА

ПАРАМЕТР	ВЕЛИЧИНА
Максимальна концентрація ( $C_{max}$ ), мкг/мл	4,80±0,55
Час досягнення максимальної концентрації ( $T_{max}$ ), год	6,58±0,61
Період напівабсорбції ( $T_{1/2a}$ ), год	2,89±0,50
Період напіврозподілу ( $T_{1/2\alpha}$ ), год	5,99±1,20
Період напівелімінації ( $T_{1/2\beta}$ ), год	9,63±0,57
Константа елімінації $K_{el}$ , $10^{-3}$	1,4±0,11
Об'єм розподілу в центральній камері ( $V_c$ ), л	37,5±4,19
Стаціонарний об'єм розподілу ( $V_s$ ), л	39,86±9,87
Кінетичний об'єм розподілу ( $V_k$ ), л	26,38±4,13
Площа під фармакокінетичною кривою ( $AUC_{0-\infty}$ ), мкгхгодхмл <sup>-1</sup>	103,2±8,24
Кліренс (Cl), мл/хв	49,61±4,03
Середній час утримання ТФ в крові (MRT), год	10,85±1,64

Висновки

1. Розроблено методику кількісного визначення теофіліну у сироватці крові на високоефективному рідинному хроматографі "Міліхром-4".
2. Проведено вивчення фармакокінетики теофіліну при прийомі препарату пролонгованої дії "Теопек".

Література

1. Белоусов Ю.Б., Омеляновский В.В. Клиническая фармакология болезней органов дыхания.-М.:Универсум Паблишинг,1996.-134 с.
2. Гуцин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль.-М. "Фармарус принт.", 1998.-154 с.
3. Дидковский Н.А., Белоусов Ю.Б., Абазова Ф.И. и др. Клиническая эффективность и особенности фармакокинетики теопека и теобиолонга у больных бронхиальной астмой // Тер. архив. - 1991. - №8. - С. 10-15.

4. Количественное определение теофиллина в сыворотке крови и слюне человека с помощью ВЭЖХ / Б.Е.Кушкенбаева, А.П.Арзамасцев, Е.Т.Гнеушев, Э.М.Казьмина//Хим.фарм.ж.-1988.-№ 4.-С. 501-503.
5. Соколов А.В., Брежнева Е.Г. Применение концентрирующей щелочной рекстракции при определении теофиллина с помощью ВЭЖХ // Хим.фарм.ж.-1988.-№ 2.-С. 252-254
6. Age related differences in plasma theophylline levels/ O.Elidemir, S.Kosay, O.Hepzden et al.//Eur.J Drug Metab. Pharmacokinet.- 1994.-Vol.19, Suppl.1.-P. 37-39.
7. Theophylline target concentration in severe airways obstruction - 10 or 20 mg/L? A randomised concentration-controlled trial/ N.Holford, P.Black, R.Couch et al. //Clin. Pharmacokinet.-1993.-Vol. 25, Suppl.6.-P. 495-505.
8. Suppression of airway inflammation by theophylline in adult bronchial asthma /T.Horiguchi, S.Tachikawa, J.Kasahara et al.// Respiration.- 1999. Vol. 66, Suppl.2.-P. 124-127.
9. Ohta K., Yamashita N. Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation // J. Allergy Clin. Immunol.-1999.-Vol. 104.-P. 14-21.
10. Okuma M., Iikura Y. Analysis of the theophylline pharmacokinetics of sustained-release theophylline dry syrup in children // Arerugi.-1999.-Vol. 48, Suppl.6.-P. 589-596.
11. Peleman R.A., Kips J.C., Pauwels R.A. Therapeutic activities of theophylline in chronic obstructive pulmonary disease//Clin.Exp.Allergy.-1998.-Vol. 28, Suppl. 3.-P.53-56.
12. Rabe K.F., Dent G. Theophylline and airway inflammation // Clin. Exp. Allergy.-1998.-Vol. 28, Suppl 3.-P. 35-41.
13. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for Purines and Pyrimidines // Pharmacol. Reviews.-1998.-Vol. 50.-P. 413-492.
14. Theophylline inhibits the release of eosinophil survival cytokines Raf-1 the protein kinase A target?/ J.K.Shute, H.Tenor, M.K.Church, S.T.Holgate // Clin. Exp. Allergy.-1998.-Vol.28, Suppl. 3.-P. 47-52.
15. Thomson N.C. Asthma therapy: theophylline // Can. Respir. J.-1998.-Vol.5, Suppl .-P. 60A-63A.

А.И.Косован

О.О.Яковлева

А.Д.Бухтій

О.В.Ільченко

М.А.Станіславчук

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕОФИЛЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ  
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.И.Косован, О.А.Яковлева, А.Д.Бухтий, А.В.Ильченко, Н.А.Станиславчук  
ВИННИЦКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ.Н.И.ПИРОГОВА

Разработан простой, быстрый и дешевый метод определения теофиллина в сыворотке крови. К 0.5 мл сыворотки добавляется 0.5 мл 1 N соляной кислоты, смесь подвергается экстрагированию в течение 20 минут. Экстрагент – 10 мл системы хлороформ-изопропанол (19:1). Органический слой отделяется, фильтруется и упаривается досуха. Сухой остаток растворяют в 200 мкл 0,03 н соляной кислоты. В колонку (Сепарон С-18 RPS 5 мкм, 64x2 мм) вводится 20 мкл этого разведения. Применялось изократическое элюирование с составом мобильной фазы – 85% воды и 15% ацетонитрила, скорость элюирования – 100 мкл/мин, УФ детектирование проводилось при длине волны 270 нм. Время выхода теофиллина из колонки составило 4 минуты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: теофиллин, высокоэффективная жидкостная хроматография, астма.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF THEOPHYLLINE IN SERUM BY HIGH  
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

A.I.Kosovan, O.A.Yakovleva, A.D.Buhtij, A.V.Il'chenko, M.A.Stanislavchuk  
VINNICA STATE MEDICAL UNIVERSITY NAMED AFTER N.I.PIROGOV

A sensitive HPLC method is reported for the determination of theophylline in serum. After a single extraction of the drug from 0.5 ml of serum with 10 ml chloroform/isopropanol mixture (9.5 + 0.5 by volume) with presense of 0.5 ml 1 N HCl it was resolved with 200 mkl 0.03 N HCl and quantified using a reversed-phase column (Separon C-18 RPS 5 mkm, 64x2 mm). The drug are eluted with a binary-solvent isocratic system (acetonitrile/water 15:85) at room temperature and monitored at 270 nm. Quantitation is based on peak-height. The method is linear to 40 mg/l of theophylline.

KEY WORDS: theophylline, high performance liquid chromatography,  
asthma



## АВТОРИ

Анжеліка Іванівна Косован

Ольга Олександрівна Яковлева – доктор медичних наук, професор

Анатолій Дмитрович Бухтій

Олександр Володимирович Ільченко – кандидат хімічних наук

Микола Адамович Станіславчук – доктор медичних наук

Листування і переговори можна вести з

Олександром Володимировичем Ільченко

21021, Вінниця, вул. 600-річчя, 32, кв. 27

телефон дом (0432) 46-76-63

роб (0432) 43-82-40

факс (0432) 46-55-30

e-mail: [ilch@vsmu.vinnica.ua](mailto:ilch@vsmu.vinnica.ua)

site: <http://ilch.vsmu.edu.ua>

## Література

1. Белоусов Ю.Б., Омельяновский В.В. Клиническая фармакология болезней органов дыхания.-М.:Универсум Паблишинг,1996.-134 с.
2. Гуцин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль.-М. "Фармарус принт.", 1998.-154 с.
3. Дидковский Н.А., Белоусов Ю.Б., Абазова Ф.И. и др. Клиническая эффективность и особенности фармакокинетики теопэка и теобиолонга у больных бронхиальной астмой // Тер. архив. - 1991. - №8. - С. 10-15.
4. Количественное определение теофиллина в сыворотке крови и слюне человека с помощью ВЭЖХ / Б.Е.Кушкенбаева, А.П.Арзамасцев, Е.Т.Гнеушев, Э.М.Казьмина//Хим.фарм.ж.-1988.-№ 4.-С. 501-503.
5. Соколов А.В., Брежнева Е.Г. Применение концентрирующей щелочной реэкстракции при определении теофиллина с помощью ВЭЖХ // Хим.фарм.ж.-1988.-№ 2.-С. 252-254
6. Age related differences in plasma theophylline levels/ O.Elidemir, S.Kosay, O.Hepzden et al.//Eur.J Drug Metab. Pharmacokinet.- 1994.-Vol.19, Suppl.1.-P. 37-39.
7. Theophylline target concentration in severe airways obstruction - 10 or 20 mg/L? A randomised concentration-controlled trial/ N.Holford, P.Black, R.Couch et al. //Clin. Pharmacokinet.-1993.-Vol. 25, Suppl.6.-P. 495-505.
8. Suppression of airway inflammation by theophylline in adult bronchial asthma /T.Horiguchi, S.Tachikawa, J.Kasahara et al.// Respiration.- 1999. Vol. 66, Suppl.2.-P. 124-127.
9. Ohta K., Yamashita N. Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation // J. Allergy Clin. Immunol.-1999.-Vol. 104.-P. 14-21.
10. Okuma M., Iikura Y. Analysis of the theophylline pharmacokinetics of sustained-release theophylline dry syrup in children // Arerugi.-1999.-Vol. 48, Suppl.6.-P. 589-596.
11. Peleman R.A., Kips J.C., Pauwels R.A. Therapeutic activities of theophylline in chronic obstructive pulmonary disease//Clin.Exp.Allergy.-1998.-Vol. 28, Suppl. 3.-P.53-56.
12. Rabe K.F., Dent G. Theophylline and airway inflammation // Clin. Exp. Allergy.-1998.-Vol. 28, Suppl 3.-P. 35-41.
13. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for Purines and Pyrimidines // Pharmacol. Reviews.-1998.-Vol. 50.-P. 413-492.
14. Theophylline inhibits the release of eosinophil survival cytokines Raf-1 the protein kinase A target?/ J.K.Shute, H.Tenor, M.K.Church, S.T.Holgate // Clin. Exp. Allergy.-1998.-Vol.28, Suppl. 3.-P. 47-52.
15. Thomson N.C. Asthma therapy: theophylline // Can. Respir. J.-1998.-Vol.5, Suppl .-P. 60A-63A.