

USPOREDBA SPEKTROFOTOMETRIJSKE,  
FLUORIMETRIJSKE,  
TEKUĆINSKOKROMATOGRFSKE VISOKE  
DJELOTVORNOSTI I RADIOIMUNOKEMIJSKE  
METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE  
TEOFILINA U BIOLOŠKOM MATERIJALU

F. PLAVŠIĆ

*Laboratorij za kliničku farmakologiju, Zavod za kliničku farmakologiju, Klinika za unutrašnje bolesti s poliklinikama Medicinskog fakulteta i Klinički bolnički centar, Zagreb*

*(Primljeno 6. X 1981)*

Uvedene su spektrofotometrijska, fluorimetrijska, tekućinsko-kromatografska i radioimunokemijska metoda za određivanje teofilina u biološkom materijalu. Kod fotometrijskih tehnika i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti teofilin je izoliran adsorpcijom na aktivni ugljen. Kod uvođenja radioimunokemijske metode vezano je antitijelo kemijski na cijanobromiranu Sepharozu.

Sve analitičke metode zadovoljavale su s obzirom na osjetljivost ( $0,5-1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) i preciznost (CV unutar odnosno između određivanja ispod 10% u terapijskom području koncentracija), ali su s obzirom na selektivnost fotometrijske metode bile nepouzdanе pri rutinskom određivanju koncentracija teofilina. Korelacija između pojedinih metoda je bila dobra i koeficijenti korelacije imali su vrijednosti više od 0,95.

Razvoj analitičke kemije, osobito u prošlom desetljeću, donio je nove spoznaje o sudbini mnogih lijekova u organizmu i korelaciji koncentracije lijeka u biološkom materijalu s njegovim učinkom. Teofilinu je u tom razdoblju bila posvećena velika pažnja nakon što je spoznata veza između koncentracija u krvi s terapijskim učinkom (1, 2) i toksičnim manifestacijama te se otkrile velike interindividualne razlike u njegovoj farmakokinetici (3, 4, 5). Grupa metilksantinâ u koju pripadaju teofilin, kofein i teobromin su tvari široko upotrebljavane u terapijske svrhe, ali i u svakidašnjem životu. Kofein, važan sastojak nekih napitaka koji se upotrebljavaju za uživanje i stimulaciju metabolizira se dije-

lom u teofilin. Teobromin je prirodni sastojak čokolade pa se tim putem unosi u organizam. Jedan od produkata njegove N-demetilacije je kofein pa stoga postoji međuzavisnost tih metilksantina. Iako su to davno poznate tvari i dugo upotrebljavani lijekovi kao teofilin i teobromin, tek nedavno su počela opsežnija istraživanja njihovih toksičnih učinaka. Izgleda da kofein u velikim dozama, barem kod pokusnih životinja, može izazvati teratogene i mutagene učinke. Zbog toga se javlja potreba za dobrim analitičkim metodama njihova mjerenja u biološkom materijalu.

Opisi novih analitičkih metoda slijedili su razvoj analitičke kemije pa su do danas opisane spektrofotometrijska (6, 7, 8), fluorometrijska (9), tekućinskokromatografska (10—13), plinskokromatografska (14, 15), tankoslojnikromatografska (16), radioimunokemijska (17) i enzimsko-imunokemijska (18) metoda za njegovo određivanje u biološkom materijalu.

Prisutni su i radovi usporedbe analitičkih metoda za određivanje koncentracije teofilina u biološkom materijalu koji daju prednosti pojedinoj analitičkoj metodi s obzirom na faktore kao što su cijena ili jednostavnost izvođenja (19). Međutim, zadnjih godina se opaža napuštanje jednostavnih fotometrijskih metoda uglavnom zbog malene selektivnosti.

Ovim istraživanjem smo namjeravali uvesti analitičke metode koje uključuju izolaciju teofilina adsorpcijom na aktivni ugljen i pokušati izabrati optimalnu analitičku metodu za potrebe daljnjih istraživanja.

#### MATERIJALI I METODE

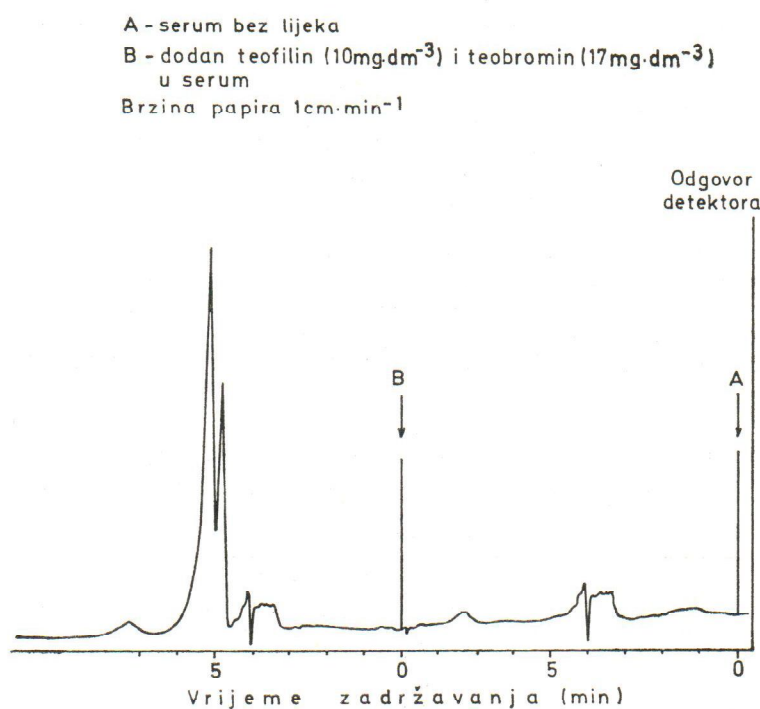
Standard teofilina je nabavljen od tvornice farmaceutskih proizvoda Lek, Ljubljana. Antitijelo na teofilin (Lot No. 2201) nabavljeno je od tvrtke Clinical Assays, Cambridge, SAD. Teofilin obilježen izotopom joda mase 125 (Lot No. 121 880) nabavljen je od tvrtke Clinical Assays, Cambridge, SAD. Cijanobromirana Sepharoza 4 B (šarža 11 810) nabavljena je od tvrtke Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Švedska. Kolona za tekućinsku kromatografiju Partisil PXS 10/25 PAV (kemijski vezana nitrilna faza) nabavljena je od tvrtke Whatman, Maidstone, Engleska. Aktivni ugljena Norit A kiselo pran nabavljen je od tvrtke Serva, Heidelberg, Njemačka. Otapala za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti bila su reda čistoće za UV-spektroskopiju nabavljena od tvrtke Kemika, Zagreb. Sve ostale kemikalije za pripremu pufera kao i otapala te reagencije bili su reda čistoće p. a. nabavljeni od Kemike, Zagreb.

Apsorpcija svjetla mjerena je na UV-VIS spektrofotometru SP6—500 tvrtke Pye Unicam, Cambridge, Engleska. Fluorescencija je mjerena na fluorimetru M250 tvrtke Perkin Elmer. Radioaktivnost je mjerena na gama-brojaču Gamacord II tvrtke Ames, Elkhart, SAD.

Tekućinska kromatografija je izvođena na LC3-XP instrumentu tvrtke Pye Unicam (Cambridge, Engleska) opremljenom mješačem otapala i programatorom te varijabilnim UV-detektorom.

#### Spektrofotometrijska metoda

U epruvetu za centrifugiranje od 10 mL doda se uzorak seruma ili standarda (1 mL),  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  karbonatni pufer pH = 9,5 (2,5 mL) i suspenzija aktivnog ugljena (2,5 mg u 0,1 mL vode). Suspenzija se potreskuje na tresilici (Vortex mikser) 30 s i centrifugira 5 min na 2 000 G. Supernatant se baci i ostatku doda voda (3 mL). Nakon potreskivanja na tresilici tokom 30 s i centrifugiranja na 2 000 G tokom 5 min, supernatant se baci i u epruvetu doda metanol (3 mL). Epruveta se potreskuje na tresilici 30 s i centrifugira na 2 000 G tokom 5 min. Apsorbancija supernatanta se mjeri kod 275 nm. Osjetljivost metode iznosila je  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Na tablici 1. su prikazani koeficijenti varijacije (CV) izračunati iz rezultata provjere preciznosti metode paralelnom analizom 10 uzo-



Sl. 1. Reprezentativni kromatogram uzorka plazme bez teofilina i uzorka plazme s dodanim teofilinom. Interni standard teobromin u koncentraciji  $10,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  i teofilin u koncentraciji  $14,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

raka plazme za svaku koncentraciju teofilina u području 5,9–29,2 mg · L<sup>-1</sup> i analizom 10 uzoraka na dan za svaku koncentraciju teofilina u području 5,9–29,2 mg · L<sup>-1</sup> tokom 30 dana pohranjenog u hladnjaku na temperaturi -20 °C.

Tablica 1.

*Koeficijenti varijacije i iskorištenje izolacije kod spektrofotometrijske metode za određivanje teofilina dodanog u plazmu. Broj određivanja u seriji: 10 uzoraka za svaku koncentraciju. Broj serija: 2 za svaku koncentraciju.*

Koncentracija teofilina (mg · L <sup>-1</sup> )	Koeficijenti varijacije (CV) (%)		Iskorištenje izolacije (%)
	Između određivanja	Unutar određivanja	
5,9	11,4	10,9	76
9,3	6,1	2,9	78
16,9	4,8	3,1	72
29,2	3,7	2,3	68

#### *Fluorimetrijska metoda*

Postupak izolacije iz plazme (0,5 mL) opisan je kod spektrofotometrijske metode. Nakon elucije s ugljena, otapalo se upari u struji zraka i ostatak otopi u 0,02 mol · L<sup>-1</sup> bakar (II)-sulfatu (0,2 mL) i zatim doda 0,05 mol · L<sup>-1</sup> otopina cerij (IV)-amonij-sulfata u 1 mol · L<sup>-1</sup> perklornoj kiselini (0,01 mL). Nakon potreskivanja na treslici i inkubacije od 10 min doda se 0,02 mol · L<sup>-1</sup> otopina bakar (II)-sulfata (3 mL) i mjeri fluorescencija na 400 nm uz ekscitaciju na 325 nm. Metoda je modifikacija postupka *Meole* i sur. (9) koja se sastojala u drugačijem načinu izolacije lijeka. Osjetljivost metode je iznosila 0,5 mg · L<sup>-1</sup>. Na tablici 2. prikazani su koeficijenti varijacije koji su izračunati iz rezultata pro-

Tablica 2.

*Koeficijenti varijacije unutar i između određivanja kod fluorimetrijske metode za određivanje koncentracije teofilina dodanog u plazmu ili serum. Broj određivanja u seriji: 10 uzoraka za svaku koncentraciju. Broj serija: 2 za svaku od koncentracija*

Koncentracija teofilina (mg L <sup>-1</sup> )	Koeficijenti varijacije (CV) (%)	
	Unutar određivanja	Između određivanja
6,4	7,6	10,4
12,4	3,6	
15,6	3,9	3,1
18,4	3,6	
30,1	1,9	2,1

vjeravanja preciznosti metode paralelnim određivanjem teofilina u 10 uzoraka plazme za svaku koncentraciju lijeka u području 6,4—30,1 mg · L<sup>-1</sup> i analizom 10 uzoraka na dan za svaku koncentraciju teofilina u istom području koncentracija tokom mjesec dana pohranjenog na —20 °C.

#### *Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti*

Izolacija teofilina iz plazme (0,5 mL) u koju je dodan interni standard teobromina u koncentraciji 15 mg · L<sup>-1</sup> provedena je kako je opisano kod spektrofotometrijske metode. Elucija s ugljena je vršena smjesom kloroform/metanol u omjeru 80/20 (v/v). Nakon sušenja na bezvodnom natrij-sulfatu organski ekstrakt je direktno ubacivan u injektor instrumenta. Kromatografija je provođena smjesom kloroforma i metanola u omjeru 80/20 uz protok 1,5 mL · min<sup>-1</sup>. Promjene u efluentu su detektirane varijabilnim UV-detektorom podešenim na valnu duljinu 235 nm. Koncentracija je određivana mjerenjem visine signala pisača.

Na slici 2 prikazan je reprezentativni kromatogram uzorka plazme bez teofilina i s dodanim teofilinom. Na tablici 3. prikazana su vremena zadržavanja strukturno sličnih ksantina koji ne interferiraju kod metode a mogu se paralelno odrediti.

Tablica 3.

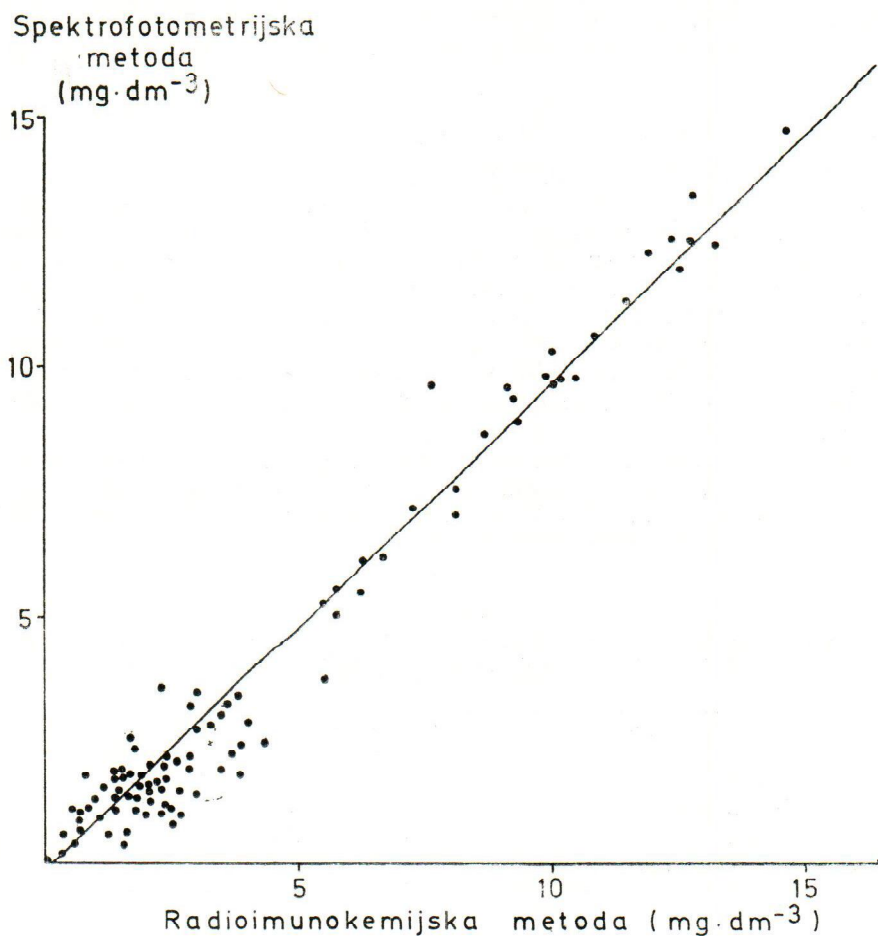
*Vremena zadržavanja nekih ksantina kod tekućinske kromatografije na nitrilnoj fazi. Elucija smjesom otapala kloroform i metanol u omjeru 80:20 i protok mobilne faze 1,5 mL min<sup>-1</sup>*

Tvar	Vrijeme zadržavanja/min
Kofein	4,2
Teobromin	4,8
Teofilin	5,2
Mokraćna kiselina	7,4

Na tablici 4. prikazani su koeficijenti varijacije kao mjera preciznosti metode koji su određivani paralelnim mjerenjem 10 uzoraka plazme za svaku od koncentracija teofilina u području 3,7—21,3 mg · L<sup>-1</sup> i mjerenjem 10 uzoraka na dan za koncentraciju teofilina 14,5 mg · L<sup>-1</sup> tokom mjesec dana pohranjenog u hladnjaku na —20 °C.

#### *Radioimunokemijska metoda*

Teofilinsko antitijelo je vezano na cijanobromiranu Sepharozu prema propisu proizvođača za vezanje proteina kod pH = 8,5. U plastičnu epruvetu od 2 mL doda se uzorak ili standard (0,025 mL), radioizotopom obi-



Sl. 2. Korelacija između rezultata mjerenja koncentracije teofilina u 80 uzoraka plazmi ispitanika spektrofotometrijskom metodom i radioimunokemijskom metodom. Korelacija slijedi jednadžbu  $C_{\text{spektr.}} = 0,28 \pm 0,99 C_{\text{RIA}}$ . Koefficient korelacije  $r = 0,97$  a standardne greške  $s_{x,y} = 2,87$ ,  $s_0 = 0,17$  i  $s_1 = 0,03$

Tablica 4.

Koeficijenti varijacije unutar i između određivanja kod tekućinskromatografske metode za određivanje teofilina u plazmi ili serumu. Broj određivanja u seriji: 10 uzoraka za svaku koncentraciju. Broj serija: 2

Koncentracija	Koeficijenti varijacije (CV) (%)	
	Unutar određivanja	između određivanja
3,7	8,8	
8,1	4,3	
14,5	2,7	4,6
21,3	3,2	

Tablica 5.

Koeficijenti varijacije kod radioimunokemijske metode za određivanje koncentracije teofilina dodanog u plazmu. Broj određivanja: 10 uzoraka za svaku koncentraciju.

Koeficijenti varijacije (CV) (%) unutar određivanja	Koncentracija teofilina (mg L <sup>-1</sup> )
2,4	11,9
5,6	5,2
16,9	4,2

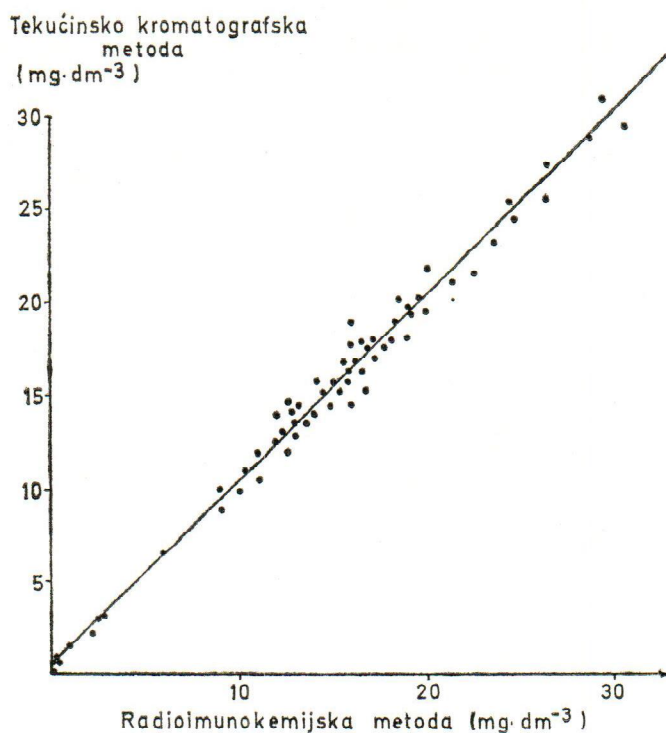
Ileženi teofilin (0,050 mL) te suspenzija Sepharoze s vezanim antitijelom (0,1 mL) i inkubira 30 min kod sobne temperature. Nakon centrifugiranja na 2 000 G tokom 5 min baci se supernatant i ostatku mjeri radioaktivnost na gama-brojaču. Osjetljivost metode iznosila je 0,5 mg · L<sup>-1</sup>. Na tablici 5. prikazani su koeficijenti varijacije kao mjera preciznosti metode izračunati iz rezultata mjerenja koncentracije teofilina u 10 uzoraka plazme svake od koncentracija u području 2,4—16,9 mg · L<sup>-1</sup>.

#### Obradba rezultata

Svi statistički i drugi proračuni rađeni su na Hewlett-Packard računalu HP 65 s gotovim programima iste tvrtke.

## REZULTATI

Korelacija između spektrofotometrijske i radioimunokemijske metode određena mjerenjem koncentracije teofilina u 80 uzoraka plazme ispitanika slijedila je jednadžbu  $C_{\text{spektr.}} = 0,28 \pm 0,99C_{\text{RIA}}$ . Koeficijent korelacije između metoda iznosio je  $r = 0,97$  a odgovaraju standardne greške



Sl. 3. Korelacija između rezultata mjerenja koncentracije teofilina u 76 uzoraka plazme radioimunokemijskom i tekućinskokromatografskom metodom. Korelacija slijedi jednadžbu  $C_{HPLC} = -0,21 \pm 1,05 C_{RIA}$ . Koeficijent korelacije između dvije metode  $r = 0,97$  a standard. greške  $s_{x,y} = 2,23$ ,  $S_0 = 0,21$  i  $s_1 = 0,03$

$s_{x,y} = 2,87$ ,  $s_0 = 0,17$  i  $s_1 = 0,03$ . Rezultati ispitivanja korelacije između spektrofotometrijske i radioimunokemijske metode prikazani su na slici 2. Na slici 3. prikazana je korelacija između tekućinskokromatografske i radioimunokemijske metode. Rezultati su dobiveni na osnovi mjerenja koncentracije teofilina u 76 uzoraka plazme ispitanika koji su uzimali teofilin na usta. Korelacija je slijedila jednadžbu  $C_{HPLC} = -0,21 + 1,05 C_{RIA}$  uz koeficijent korelacije  $r = 0,97$ . Standardne greške iznosile su  $s_{x,y} = 2,23$ ,  $S_0 = 0,21$  i  $s_1 = 0,03$ .

#### RASPRAVA

Opisane spektrofotometrijske metode (6, 7) za određivanje koncentracije teofilina nisu nas zadovoljavale zbog kompliciranog postupka izo-



lacije organskim otapalom, potrebe za velikom količinom organskog otapala i biološkog materijala pa smo u prethodnim istraživanjima razvili tehniku izolacije lijekova preko aktivnog ugljena (8, 20). Nadalje, neki podaci (19), a i naša vlastita iskustva govorili su o nepouzdanosti spektrofotometrijske metode zbog visokih interferencija raznih tvari. Iako je naša spektrofotometrijska metoda (8, 20) davala dobre rezultate kod farmakokinetičkih istraživanja (5, 21, 22) gdje se uvijek uzimao slijepi uzorak svakog ispitanika prije nego je dobio lijek, postojala je sumnja u njezinu pouzdanost kod rutinskih određivanja. Ti su nas razlozi ponukali na potragu za selektivnijom analitičkom metodom. Rezultat su radovi na uvođenju fluorimetrijske, tekućinsko-kromatografske i radioimunokemijske metode. Nedavno opisana fluorimetrijska metoda (9) za određivanje koncentracije teofilina, koja se temelji na redoks-procesu između teofilina i iona cerija (IV) pri čemu se mjeri fluorescencija nastalih cerij (III) iona, činila se zanimljivom zbog lake dostupnosti kemikalija, malene potrošnje biološkog materijala i selektivnosti redoks procesa. Postavljanjem originalne metode ustanovljeno je da treba ekstrakciju organskim otapalom zamijeniti drugom tehnikom zbog već opisanih negativnih strana te tehnike. S obzirom na preciznost i osjetljivost metoda je davala dobre rezultate (tablica 2). Interferencija koekstrakata, međutim, može biti znatna. Selektivnija metoda bi se možda mogla dobiti frakcioniranjem biološkog materijala npr. preko ionskih izmjenjivača, prije fluorimetrijskog mjerenja. Može se reći isto što i za spektrofotometrijsku metodu da je dobra kod farmakokinetičkih istraživanja ali nepouzdana u rutinskoj praksi gdje nije moguće dobiti uzorak krvi pacijenta bez teofilina.

Svi opisani radovi o određivanju tekućinskom kromatografijom odnose se na nepolarne oktadecilsilanske faze (10—13). Mi smo pokušali razviti metodu koja bi se koristila slabo polarnom nitrilnom fazom i jeftinijim otapalima koja su dostupna u našoj zemlji. Naime, kod kromatografije na oktadecilsilanskoj fazi (kromatografija na obrnutim fazama) obično je sastavni dio eluensa teško dostupni acetonitril reda čistoće za tekućinsku kromatografiju. U ovom radu koristili smo se otapalima reda čistoće za UV-spektroskopiju koja su prije upotrebe propuštena kroz kolone aluminijske oksida aktiviranog zagrijavanjem na 600 °C (stupanj aktivnosti nije određivan) i sušenjem na molekulskim sitima. Interferencije koekstrakata i strukturno sličnih tvari nisu zabilježene (slika 1. i tablica 3). Namjerno nije izabrana tehnika direktnog injiciranja plazme nakon taloženja proteina zbog mogućnosti začepljenja kolone. Uz neke modifikacije, tj. uparavanje otapala nakon ekstrakcije i rekonstituciju ostatka u maloj količini mobilne faze, metoda bi zahtijevala čak 10 puta manje količine biološkog materijala nego spektrofotometrijska, ali bi postupak bio kompliciran. Tekućinskokromatografska metoda je s obzirom na osjetljivost, preciznost i selektivnost bolja od fotometrijskih tehnika, ali je zbog skupe opreme i reagensija primjenjiva samo u malom broju laboratorija.

Prije približno 4 godine pojavila su se komercijalno dostupna antitijela na teofilin, što nam je omogućilo uvođenje radioimunokemijske metode na čvrstom nosaču. Prednosti ove tehnike pred taloženjem polietilenglikolom su manji broj operacija tokom analize i manja greška kod istresanja supernatanta nakon centrifugiranja zbog malene viskoznosti otapala. Vežanje antitijela na Sepharozu je jednostavan i dobro opisan postupak (23) pa je bilo lako naći optimalne uvjete vežanja antitijela na čvrsti nosač. Radioimunokemijska metoda je imala osjetljivost, preciznost i selektivnost jednako dobre kao tekućinskokromatografska, ali je jednostavnija s obzirom na način izvođenja i potrebne su male količine biološkog materijala. Nedostatak radioimunokemijske metode je visoka cijena reagencija a postoje i poteškoće s dobavom. Naše iskustvo sa setovima reagencija za fluoroimunokemijsko određivanje teofilina (set reagencija tvrtke Ames) pokazalo je da neradioaktivno obilježeni antigen ima neke prednosti. S obzirom na osjetljivost u koncentracijskom području  $L^{-1}$  fluoroimunokemijska metoda je usporediva s radioimunokemijskom ili bilo kojom metodom o kojoj smo raspravljali u ovom radu.

Nije jednostavno reći koja je analitička metoda bolja a koja lošija, jer će to ovisiti o području istraživanja te kadrovskim i instrumentalnim mogućnostima laboratorija. Međutim, fluorimetrijska i spektrofotometrijska metoda su sigurno mnogo manje pouzdane zbog slabe selektivnosti od druge dvije raspravljane metode.

#### Literatura

1. Washington University Care Conference: Clin. Chem., 24 (1978) 1603.
2. Warren, S. L.: Ann. Allergy, 38 (1977) 198.
3. Mitenko, P. A., Agilvie, R. I.: Clin. Pharmacol. Ther., 14 (1973) 509.
4. Francis, A.: Clin. Pharmacol. Ther., 22 (1977) 1881.
5. Plavšić, F., Bakran, I. ml., Vrhovac, B.: Lij. vjes., 100 (1978) 613.
6. Schwertner, H. A., Walance, J. F., Blum, K.: Clin. Chem., 24 (1978) 360.
7. Vasiliades, A.: Clin. Chim. Acta, 69 (1976) 491.
8. Plavšić, F.: Clin. Chim. Acta, 88 (1978) 551.
9. Meola, J. M., Brown, H. H., Whift, T.: Clin. Chem, 25 (1979) 1835.
10. Adams, R. F., Vandemark, F. L., Schmidt, J. G.: Clin. Chem., 22 (1976) 1903.
11. Orcutt, J. J., Kozak, P. P. J., Gilman, S. A., Cummins, L. H.: Clin. Chem., 23 (1977) 599.
12. Sitar, D. S., Piafsky, K. M., Rangno, R. E., Ogilvie, R. I.: Clin. Chem., 21 (1975) 1774.
13. Peat, A. M., Jennison, A. T., Chim, D. M.: Anal. Toxicol., 1 (1977) 204.
14. Reid, R., Fareed, J., Bermes, E. W., Ivery, D., Messmore, H.: Clin. Chem, 22 (1976) 37.
15. Schwertner, H. A.: Clin. Chem., 24 (1978) s024.
16. Hezel, U.: International Labor. May/June (1978) 73.

17. Duran, O.: *Clin. Chem.*, 25 (1979) 812.
18. Gushaw, J. B., Hu, M. W., Singh, P., Miller, J. G., Schneider, R. S.: *Clin. Chem.*, 23 (1975) 1144.
19. Chamberlain, R. T.: *Clin. Chem.*, 24 (1978) 1057.
20. Plavšić, F.: *Period. Biol.*, 82 (1980) 289.
21. Plavšić, F., Vrhovac, B., Bakran, I. ml.: *Lij. vjes.*, 100 (1978) 610.
22. Bakran, I. ml., Vrhovac, B., Plavšić, F.: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 18 (1980) 442.
23. Wide, L., Porath, J.: *Biochem. Biophys. Acta*, 130 (1966) 257.

#### Summary

#### COMPARISON OF SPECTROPHOTOMETRIC, FLUORIMETRIC, HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHIC AND RADIOIMMUNOLOGICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF THEOPHYLLINE CONCENTRATIONS IN BIOLOGICAL MATERIAL

Spectrophotometric, fluorimetric, high-performance liquid chromatographic (HPLC) and radioimmunological (RIA) methods have been introduced for the determination of theophylline levels in the serum. The extraction on charcoal was used for drug isolation from biological fluids before spectrophotometric, fluorimetric and HPLC measurements. For the solid-phase RIA theophylline antibody was covalently bound to CNBr-activated Sepharose.

For all introduced methods the inter- and intra-assay coefficients of variation were below 10 per cent in the therapeutic range of concentrations, and the sensitivity was below 1.0 mg L<sup>-1</sup>.

With the photometric methods high interferences of structurally similar drugs and other materials were observed. The correlations between different methods were good ( $r = 0.97$  and  $0.98$ ).

*Department of Clinical Pharmacology  
University Hospital, Zagreb*

*Received for publication  
October 4, 1981*