

Komponenten in einer solchen Menge enthalten, dass sie zusammen mit dem vorher zur Hämolyse des Blutes zugesetzten Wasser Isotonie ergeben.

Aus dem hämolytischen Blut werden die Leukocyten durch differenziertes Zentrifugieren gewonnen; man zentrifugiert bei möglichst geringer Tourenzahl, um eine Schädigung und Verklumpung der weissen Blutzellen zu vermeiden, bis die Leukocyten zu Boden gegangen sind, die Blutschatten und Blutplättchen sich aber noch grösstenteils in Suspension befinden. Die noch durch der Hämolyse entgangene Erythrocyten rotgefärbten Bodensätze vereinigt man in ca. 100 cm³ physiologischer NaCl-Lösung und wäscht sie an der Zentrifuge, bis der Bodensatz der Leukocyten nicht mehr oder nur noch gering gefärbt ist. Da man jetzt in kleineren Zentrifugengläsern arbeitet, verringert man die Zentrifugierdauer.

Bei dieser Art des Vorgehens geraten einige Leukocyten, besonders die kleineren Lymphocyten, in die Überstände. Will man auch jene noch erfassen, zentrifugiert man die abgegossenen Überstände zu Boden und wiederholt den oben beschriebenen Vorgang.

Wir benutzen eine Zentrifuge der Fa. Stock, Marburg, des Typs 8 × 350 und zentrifugieren bei der geringstmöglichen Geschwindigkeit (750 Upm entsprechend 800 g) zunächst in Gläsern von 250 cm³ Inhalt 4 min lang (Anlaufzeit mit eingerechnet) und bremsen anschliessend ab. Die anfallenden Bodensätze werden in 100 cm³ physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und in zwei 50 cm³ fassenden Gläsern 2 bis 3 min zentrifugiert.

Die von uns nach Hämolyse bei einem Blut:Wasser-Verhältnis von 1:2 gewonnenen Leukocyten aus Rinderblut (normale und leukotische Tiere) phagocytierten gut; sie zeigen im histologischen Bild keinerlei morphologische Veränderungen, und das zahlenmässige Verhältnis der einzelnen Leukocytenarten zueinander entspricht in etwa dem des benutzten Gesamtblutes.

Die geschilderte Methode lässt sich auch auf das Blut anderer Tierarten übertragen. Die zuzusetzende Wassermenge wird ermittelt, indem man eine abgemessene kleine

Menge des zu verarbeitenden Blutes aus einer Bürette mit soviel Wasser vermischt, bis ein ausreichender Hämolysegrad erreicht ist; dieser lässt sich mikroskopisch einfach feststellen.

Die zur Hämolyse benötigte Wassermenge ist beim Menschen und den einzelnen Tierarten sehr unterschiedlich; so beträgt das Blut:Wasser-Verhältnis beim Menschen 1:4, bei der Ziege 1:1.

Wie orientierende Versuche ergaben, liegen die Dinge praktisch so, dass bei manchen Blutarten die angegebene Methode, bei anderen die Verwendung von *Gummi arabicum* oder ähnlichen Zusätzen angebracht ist. Untersuchungen in dieser Richtung sind im Gange. Die beschriebene Methode hat den Vorteil, dass sie alle Leukocytenarten erfasst und sich rasch durchführen lässt; aus letzterem Grund verwenden wir sie sogar bei Pferdeblut, bei dem das rasche Sedimentieren der Erythrocyten eine besondere Methode erübrigt⁹.

Summary. A method is described for separating the white elements of cow's blood. Addition of water causes a complete haemolysis. About 30 sec later, isotonic conditions are restored by admixing appropriate concentrations of physiological solutions. Differential centrifugation follows for separating the leucocytes.

M. BEHRENS und F. ESCH

Ableitung für Zell- und Gewebechemie am Physiologisch-Chemischen Institut der Justus-Liebig-Universität, Giessen (Deutschland), 26. Februar 1963.

⁹ Die histologische Untersuchung der anfallenden Leukocyten wurde freundlicherweise von Herrn Dr. HOFMANN (Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität) vorgenommen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeiten.

Theophylline Plasma Levels Following the Oral and Rectal Administration of Theophylline *p*-Aminobenzoate of Piperazine

Introduction. Theophylline, whilst being a useful drug in the treatment of bronchial asthma, suffers from two serious disadvantages, namely its low aqueous solubility and its action in causing gastric irritation. In order to overcome or minimize these effects, water soluble derivatives have been prepared which are stable over a wide range of pH. TURNER-WARWICK¹ has studied several such compounds for their effectiveness when taken orally by patients suffering from asthma.

We report here the plasma concentrations of theophylline following the oral and rectal administration of theophylline *p*-aminobenzoate of piperazine (Antalby, Bailly Ltd., London).

Experimental. All subjects fasted overnight and were allowed no tea or coffee before or during the period in which blood samples were taken. The complex was given as a single dose and samples of venous blood taken immediately prior to administration and at known intervals of time up to 8 h. The blood was taken into sequestrene tubes, centrifuged and the theophylline content determined, using a spectrophotometric method similar to that described by SCHACK and WAXLER². Preliminary investi-

gations showed that quantitative extraction of theophylline into the final solvent occurred and that the other constituents did not interfere with the theophylline determination. A plasma 'blank' was performed on each subject immediately prior to administration and the value obtained used to correct the concentrations calculated for all subsequent samples.

Results and Discussion. The theophylline plasma levels obtained from the six subjects are shown in Tables I and II.

With reference to Table I, it is apparent that there is a wide individual variation in response to the drug as measured by the time at which the maximum plasma concentration is reached, although the time taken by any one individual to reach his maximum concentration is approximately constant and independent of the dose received.

There is also a substantial variation, between subjects, in the amount of theophylline present in the plasma at these peak concentrations. Unfortunately it was not possible to continue sampling until the plasma level at zero time was regained. In this way it would have been possible to see if the total amount absorbed by each subject was

¹ M. TURNER-WARWICK, Brit. Med. J. 2, 67 (1957).

² J. A. SCHACK and S. H. WAXLER, J. Pharmacol. 97, 283 (1949).

Table I. Theophylline plasma levels following oral administration of Antalby

Subject	Dose received ($\equiv$ mg theophylline)	Theophylline plasma level (mg/100 ml plasma)								
		Time in h		1	2	3	4	5	6	8
		0	$\frac{1}{2}$							
P.F.	176	nil	0.352	–	0.456	–	0.420	–	–	0.240
C.D.	264	nil	0.012	0.120	0.410	–	0.596	–	–	0.412
D.P.	264	nil	0.036	0.108	0.120	–	–	0.616	–	0.420
A.W.	264	nil	0.068	0.080	0.272	–	0.472	–	–	–
O.E.	264	nil	–	0.616	0.744	0.740	0.620	–	0.464	–
D.B.	264	nil	–	nil	0.480	0.632	0.612	–	0.488	–
D.B.	352	nil	–	0.024	0.832	0.836	0.696	–	0.540	–
D.P.	352	nil	–	0.020	0.124	0.452	0.836	–	0.740	–
P.F.	528	nil	–	1.005	1.497	1.373	1.211	–	0.984	–
C.D.	528	nil	–	0.028	0.436	1.397	1.541	–	1.193	–

Table II. Theophylline plasma levels following rectal administration of Antalby

Subject	Dose received ($\equiv$ mg theophylline)	Theophylline plasma level (mg/100 ml plasma)								
		Time in h		1	2	3	4	5	6	8
		0	$\frac{1}{2}$							
P.F.	307	nil	–	0.105	0.364	0.364	0.496	–	0.468	–
C.D.	307	nil	–	0.304	0.464	0.456	0.504	–	0.712	–
D.B.	307	nil	–	–	0.356	0.432	0.524	–	0.568	0.604
D.P.	307	nil	–	–	0.472	0.473	0.448	–	0.352	0.340

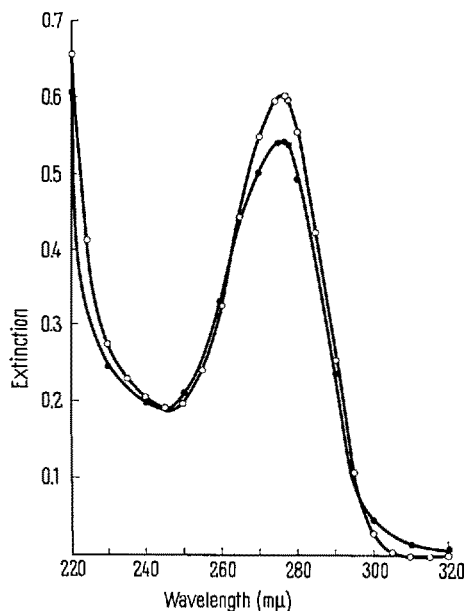
the same for the same dose, even though the initial rates of absorption differ markedly.

Increases in the dose given cause proportionate increases in the maximum plasma concentration, although

in the two instances where 528 mg were administered (Table I) the peak concentrations are greater than expected. This may be due to the maximum at the lower dose level lying between two sampling times.

Table II shows the plasma levels obtained following the administration of one suppository containing 307 mg of theophylline. With three subjects the rate of absorption is equal to, or less than, that obtained with an equivalent tablet dosage. The rate at which the plasma concentration falls off is, however, slower, and this suggests the use of suppositories in those cases where prolonged action is required without frequent dosage. In the remaining subject (D.P.) the rate of absorption is increased although the maximum plasma concentration is less, when compared with tablets.

It is hoped in future clinical trials to study the effectiveness of theophylline *p*-aminobenzoate of piperazine in patients suffering from bronchial asthma and dyspnoea in the light of the results presented herein.



Absorption spectra of two samples of theophylline in 0.1N NaOH.
 ○ 10.175 mg theophylline per 100 ml. ● One tablet of Antalby,
 equivalent to 8.8 mg of theophylline per 100 ml.

Zusammenfassung. Nach Verabreichung von Theophyllin (als *p*-Aminobenzoat-piperazin) in Form von Tabletten und Zäpfchen wurden bei einigen Versuchspersonen spektrophotometrisch Plasmakonzentrationen bestimmt.

J. SWARBRICK and C. P. FARTHING

Chelsea School of Pharmacy, Chelsea College of Science and Technology, London, and King's College Hospital, Denmark Hill, London (England), March 22, 1963.