

شناسایی و تعیین مقدار سریع فنوباریتال در موارد مسمومیت به روش طیف سنجی فرابنفش

دکتر محمد عبداللہی^۱، دکتر هوری بینش^۲، دکتر شکوفه نیکفر^۳، دکتر ناصر جلالی^۴، دکتر علی اکبر مقدم نیا^۵

خلاصه

مقدمه: باربیتوراتها بعنوان داروهای خواب آور و آرام بخش بطور گسترده ای در پزشکی مصرف می شوند. متأسفانه، مسمومیت با این داروها خصوصاً فنوباریتال بسیار بالاست. شناسایی و تعیین مقدار سریع فنوباریتال در خون افراد مسموم می تواند راهگشای خوبی برای درمان باشد. مواد و روشها: در این مطالعه برای تعیین مقدار فنوباریتال در خون مسمومین از یک روش تغییر یافته طیف سنجی فرابنفش استفاده شده است. اساس این روش برای طیف های افتراقی قلیایی فنوباریتال در دو استاندارد pH استوار است. نتایج بدست آمده با این روش با نتایج یک روش قبلی مقایسه گردید. همه مسمومین به قصد خودکشی مسموم شده و پس از بهبودی از بیمارستان مرخص شدند.

یافته ها: ارتباط خوبی بین نتایج این دو روش و بدست آمد ($r = 0/998$). در این روش زمان آزمایش تقریباً ۴۵ دقیقه و حساسیت آن 2 mg/ml ، دقت $7/034$ درصد و میزان بازیابی نمونه های دستی $99/1$ درصد بود. علائم و نشانه های بالینی و نیز نتایج معاینات مسمومین نیز ثبت گردید. نتایج نشان می دهند که مسمومیت با فنوباریتال عمدتاً با آرام بخشی، تاکی کاردی، اختلالات نورولوژیک، افت فشار خون، میوز و هیپوکسی همراه است. همچنین بین افزایش ضربانات قلب و غلظت خونی فنوباریتال نیز رابطه وجود داشت ($r = 0/945$). البته در این بررسی، رابطه ای بین غلظت خونی و میزان هوشیاری یا درجه کوما دیده نشد.

نتیجه گیری: استفاده از این روش برای تشخیص مسمومیت و تعیین مقدار فنوباریتال در اوردوز آن بعنوان یک روش سریع در موارد اورژانس توصیه می گردد.

واژه های کلیدی: فنوباریتال، آوردوز، مسمومیت، تعیین مقدار.

۱- متخصص سم شناسی و داروشناسی - استادیار دانشکده داروسازی - دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دکتر داروساز

۳- دکتر داروساز و کارشناس اطلاع رسانی سموم و داروها - وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی

۴- دانشیار سم شناسی بالینی - بیمارستان لقمان حکیم - دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۵- متخصص سم شناسی و داروشناسی - استادیار دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی بابل

مقدمه

باربیتوراتها، که بعنوان داروهای خواب آور طبقه بندی می شوند، به مقاصد متعددی در طب تجویزی می گردند. این داروها بعنوان آرام بخش و نیز بعنوان کنترل کننده تشنج مصرف می شوند (۱ و ۲). گرچه بسیاری از داروها می توانند علت بروز مسمومیت ها باشند. ولی باربیتوراتها یکی از رایج ترین عوامل ایجاد کننده مسمومیت معرفی شده اند (۳ و ۴ و ۵ و ۶). در مسمومیت با باربیتوراتها نیاز به تشخیص و تعیین مقدار سریع می باشد چون اگر در ساعات اولیه مسمومیت ناشی از آن تشخیص داده شود، و یک درمان اولیه و حمایت اولیه شروع شود، مسموم از خطرات جدی و گاهی مرگ رسته و بهبود می یابد، حتی اگر مقادیر زیادی واردوز شده باشند. (۷ و ۸). روش های متعددی برای تعیین مقدار فنوباریتال در مایعات بیولوژیک معرفی شدند ولی بیشتر آنها وقت گیر بوده و نیاز به مهارت بالا و تجهیزات گرانقیمت دارند که در اغلب بخش های اورژانس مسمومیت قابل دسترسی نیستند. (۹ و ۱۰). این روش ها را می توان در مراکز تعیین مقدار دارو یا TDM (Therapeutic Drug Monitoring) پیاده نمود. بسیاری از محققین، روش طیف سنجی فرابنفش را بعنوان یکی از روش های انتخابی برای موارد اورژانس معرفی کرده اند. این روش ساده، سریع، حساس و بسیار اختصاصی است. و برای تشخیص مسمومیت با باربیتوراتها در کلینیک و نیز به مقاصد تحقیقاتی در سم شناسی براحتی قابل دسترسی است. (۱۱ و ۱۲). شکل تغییر یافته این روش، استفاده از طیف سنجی افتراقی فرابنفش برای تعیین مقدار دارو در خون است.

هدف این مطالعه، تغییر روش طیف سنجی قبلی به

منظور تعیین مقدار سریع تر و با حساسیت بیشتر فنوباریتال در خون افرادی است که به قصد خودکشی از آن استفاده کرده اند و به بخش مسمومیت های بیمارستان لقمان حکیم مراجعه نمودند. همچنین ارزیابی وضعیت بالینی افراد مسموم هم جزء اهداف این بررسی بود.

مواد و روشها

۱- مواد: تمامی مواد شیمیایی بکار رفته در این مطالعه از شرکت مواد شیمیایی Sigma خریداری شد. و بصورت زیر تهیه شدند.

- بافر فسفات (۷/۴ = pH): مقدار ۴ گرم سود در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. سپس ۱۳/۶۱ گرم KH_2PO_4 در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر بصورت محلول یک مولار در آمد. به ۵۰ میلی لیتر محلول یک مولار فوق، ۳۹/۱ میلی لیتر سود (یک مولار) اضافه گردید تا pH به ۷/۴ برسد. سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

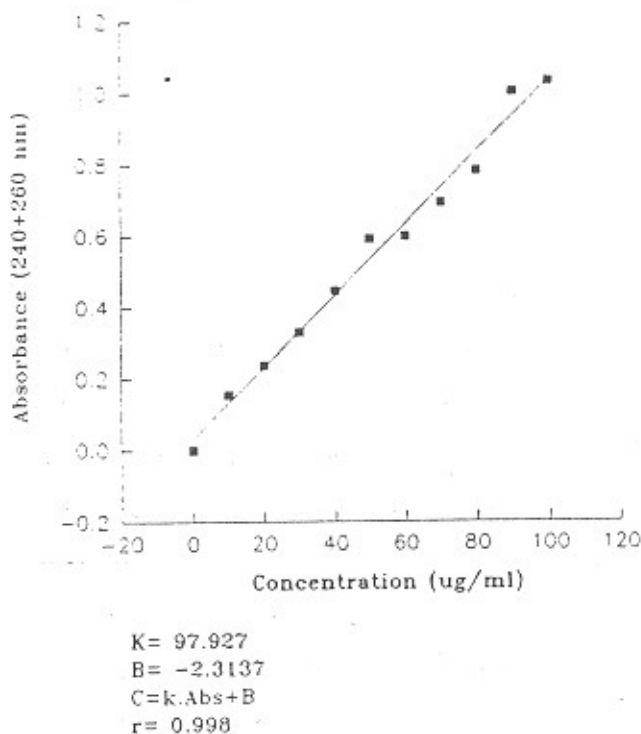
- آمونیوم کلراید ۳ مولار: ۱۶ گرم NH_4 را در یک مزور ریخته و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید. محلول ۰/۴۵ مولار سود: ۱۸ گرم سود در آب حل شده و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسید.

- تهیه محلول Stock فنوباریتال (۱۰۰mg/۱۰۰ml): ۱۰۰mg فنوباریتال را در یک مزور ریخته و سپس در الکل ۹۵ درجه حل می گردد. و نهایتاً با الکل به حجم ۱۰۰ میلی لیتر می رسد.

- محلول دستی فنوباریتال (غلظت های ۱۰، ۲۰، تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر): برای تهیه این محلول مقادیر ۱۰، ۲۰ تا ۱۰۰ میکروگرم از محلول استوک را در یک مزور ریخته و روی هر کدام ۱۰ میلی لیتر پلاسما اضافه می گردد. از مواد دیگری همچون دی کرومتان هم استفاده گردید.

۲- روش آنالیز فنوباریتال: ۲ میلی لیتر از پلاسما،

حاصل شود. نمونه‌های مورد آزمایش، شامل نمونه پلاسمای بیمار و نیز پلاسمای تهیه شده بودند.



شکل ۱. منحنی استاندارد با استفاده از یازده غلظت مشخص فنوباریتال. هر غلظت ۵ بار مورد آزمایش قرار گرفت

۳- انتخاب بیمار: افراد مورد آزمایش در این مطالعه ۲ مرد و ۵ زن بودند که مقادیر زیادی فنوباریتال به قصد خودکشی مصرف کرده بودند. که در نیمه اول سال ۱۳۷۳ به بخش مسمومین که بیمارستان لقمان حکیم مراجعه کردند. از مسمومین پس از مراجعه شرح حال کامل گرفته و ضمن اینکه علائم و نشانه‌های مسمومیت ثبت می‌گردید، ۵ میلی لیتر نمونه خون گرفته و با هپارین مخلوط شده و برای آزمایش ارسال گردید.

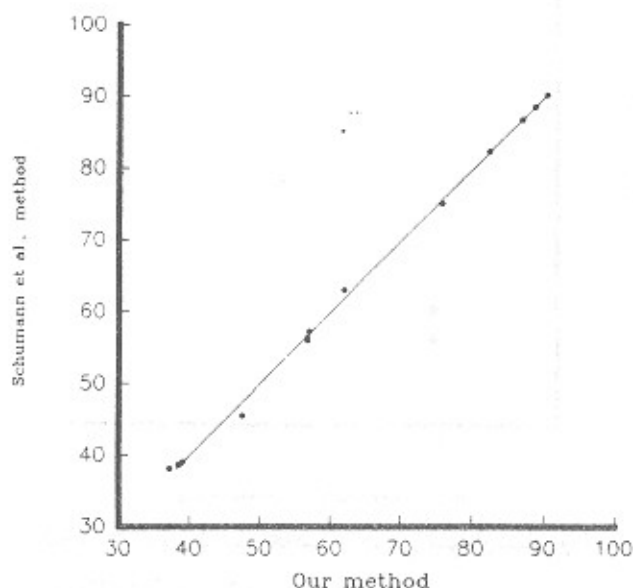
۴- تست آماری: پس از انجام آزمایشات و بدست آمدن داده‌ها، داده‌ها با روش آنالیز رگرسیون و آزمون t ارزیابی شدند. اختلاف بین نتایج با $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

۵/۰ میلی لیتر بافر و ۲۵ میلی لیتر دی کلرومتان در یک لوله در پیچ دار ریخته و به مدت ۵ دقیقه تکان داده می‌شوند. لایه مائی فوقانی با استفاده از ساکشن خارج می‌شود. باقی مانده محلول دی کلرومتان، صاف می‌گردد. به این محلول صاف شده، ۶ میلی لیتر محلول ۴۵/۰ مولار سود اضافه می‌شود. لوله به مدت ۵ دقیقه تکان داده می‌شود. محلول فوقانی جمع آوری و سپس به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شده و دو قسمت ۲/۵ میلی لیتری تقسیم می‌گردد. pH یک قسمت با افزودن ۵/۰ میلی لیتر محلول سه مولار کلروآمونیم به حدود ۱۰/۳ می‌رسد. pH محلول دیگر، با افزودن ۵/۰ میلی لیتر محلول سود ۴۵/۰ مولار به ۱۳/۵ می‌رسد.

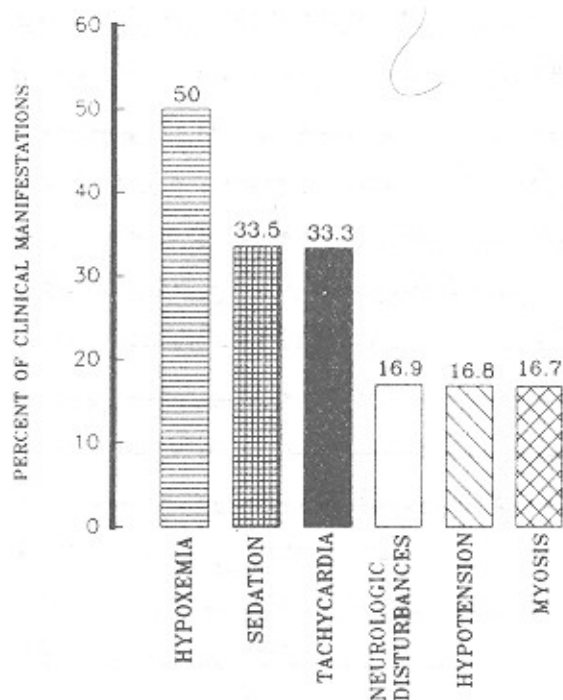
محلولی که به pH ۱۳/۵ رسیده است را به یک کووت نمونه منتقل کرده و محلول با pH مساوی ۱۰/۳ بعنوان کووت شاهد (رفرانس) در نظر گرفته می‌شود. سپس با استفاده از دستگاه UV-visible (مدل ۱۶۰A Shimadzu) منحنی شاخص برای باریتورانها در طول موج ۲۴۰ تا ۲۶۰ نانومتر رسم گردید. از رسم با جمع مقادیر بدست آمده در دو طول موج در مقابل غلظت، منحنی استاندارد بدست می‌آید.

برای تثبیت منحنی استاندارد و نیز بدست آوردن شرایط Optimum (مطلوب) در روش طیف سنجی فرابنفش، غلظت‌های ساخته شده و مشخص فنوباریتال مورد آزمایش قرار گرفت. منحنی استاندارد با استفاده از یازده غلظت مشخص (۱۰۰ mg/ml و ۹۰ و ۸۰ و ۷۰ و ۶۰ و ۵۰ و ۴۰ و ۳۰ و ۲۰ و ۱۰) رسم گردید و هر غلظت ۵ بار مورد آزمایش قرار گرفت (شکل ۱)

حساسیت این روش با استفاده از ۱۱ نمونه حاوی غلظت‌های شناخته شده فنوباریتال (۴ mg/ml و ۳ و ۲ و ۱ و ۰) تعیین شد. دقت و زمان بازیابی نیز با استفاده از سه غلظت (۸۰ و ۵۰ و ۳۰ mg/ml) فنوباریتال بدست آمد. هر غلظت ۵ بار مورد آزمایش مجدد قرار گرفت تا از صحت آن اطمینان



شکل ۲. ارتباط بین نتایج طیف سنجی فرابنفش در این مطالعه و مطالعه Schumann et al. برای فنوباریتال ($r = 0.972$)



شکل ۳. درصد علائم مسمومیت ناشی از فنوباریتال به تفکیک اهمیت در ۷ نفر مسموم

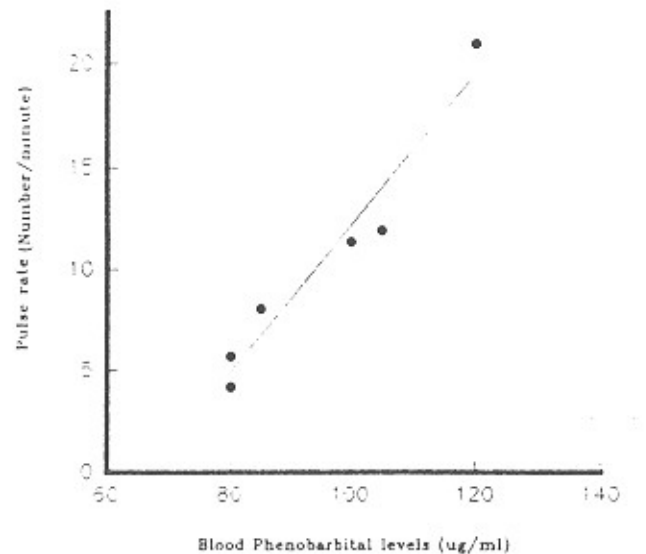
یافته‌ها

با رسم منحنی جمع absorbance در طول موج‌های ۲۴۰ و ۲۶۰ نانومتر در مقابل غلظت‌های مختلف فنوباریتال در پلاسما، یک منحنی استاندارد و بدست آمد (شکل ۱). این منحنی بین غلظت‌های صفر تا ۱۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر خطی گردید. بررسی حساسیت روش، نشان داد که غلظت‌های کمتر از ۲ میکروگرم در میلی لیتر با این روش ردیابی می‌شوند. دقت (بین آزمایشات) این روش ۷ درصد بود. این دقت با نتایج بدست آمده از ۱۵ نمونه‌هایی حاوی سه غلظت مشخص فنوباریتال (۸۰، ۵۰، ۳۰) میکروگرم در میلی لیتر) بدست آمد.

بازیافت فنوباریتال افزوده شده به پلاسما در غلظت‌های مختلف با این روش ۹۹/۱ درصد بود. با توجه به شکل شماره ۲، منحنی بدست آمده در این مطالعه با منحنی استاندارد بدست آمده از مطالعه Schumann et al. ارتباط تنگاتنگی دارد.

از نظر بروز علائم بالینی همانگونه که در شکل ۳، نشان داده شده است، تظاهرات اصلی بالینی در مسمومین این مطالعه، میوز، اختلالات عصبی (لرزش، خواب آلودگی، اغتشاش فکری)، افت فشار خون، هیپوکسی، آرام بخشی و تاکیکاردی، بودند. همه بیماران به قصد خودکشی از دارو مصرف کرده‌اند. و حدود $\frac{2}{3}$ از افراد در سنین ۲۰ تا ۳۰ تحت همدبالیز قرار گرفتند. غلظت‌های خونی فنوباریتال در این افراد بین ۸۰ الی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اندازه‌گیری گردید. ارتباط قابل توجهی بین افزایش ضربانات و غلظت خونی فنوباریتال در مسمومین دیده شد ($r = 0.945$ ، شکل ۴).

مطالعه، حساسیت آزمایش تا ۲ میکروگرم در میلی لیتر در مقابل ۲/۵ ($P < 0/05$) و میزان بازیافت فنوباریتال میکروگرم در میلی لیتر روش اولیه از نمونه های پلاسمائی تا ۹۹/۱ درصد در مقابل ۹۶/۱ درصد قبلی ($P < 0/05$) افزایش داده شد. دقت بین آزمایشات در این روش ۷ درصد بدست آمده که بیشتر از روش قبلی (۵/۴ درصد) می باشد. ارتباط بین نتایج بدست آمده از این روش با روش قبلی مناسب و قابل قبول است ($r = 0/998$). غلظت های شناخته شده فنوباریتال در پلاسما که با این روش اندازه گیری شدند، در مقایسه با روش قبلی بهتر بوده و به غلظت های واقعی نزدیک ترند ($P < 0/05$). شدت مسمومیت ناشی از آوردوز فنوباریتال با میزان تضعیف سیستم عصبی مرکزی و کاهش فعالیت سیستم تنفسی مشخص می شود. علائم خفیف شامل آتاکسی، نیستاگموس، سرگیجه و کاهش تمرکز معمولاً در غلظت های بالای ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر خون اتفاق می افتد. این علائم در غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی لیتر شدید شده و در غلظت های بالای ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهدید کننده زندگی می باشند و اگر اقدامات حمایتی صورت نگیرد، مرگ معمولاً در اثر وقفه تنفسی اتفاق می افتد (۲۴ و ۲۳ و ۲۲ و ۷). در این مطالعه همه بیماران در محدوده مسمومیت شدید بودند. قسمت اعظم آنها در محدوده سنی ۳۰-۲۰ سال بودند که مطالعات قبلی هم آن را تأیید کند (۵). هیچ یک از آنان تلف نشدند و همگی پس از بهبودی از بیمارستان مرخص گردیدند. در شکل ۳، نشان داده شده است که عمده ترین علائم مسمومیت آوردوز با فنوباریتال هیپوکسمی، افت فشار خون، تاکیکاردی، آرام بخشی، اختلالات نورولوژیک و میوزاست که البته در مطالعات گذشته هم به تأیید رسیده اند (۲۴ و ۷ و ۶). ارتباط



شکل ۴. ارتباط بین غلظت خونی فنوباریتال و تعداد ضربانات قلبی ($r = 0/945$).

بحث

روشهای زیادی برای تعیین مقدار فنوباریتال در مایعات بیولوژیک وجود دارد. از جمله این روشها کروماتوگرافی گازی (۱۵ و ۱۴ و ۱۳)، کروماتوگرافی مایع (۱۸ و ۱۷ و ۱۶)، کروماتوگرافی غشاء نازک (۱۹) و ایمنواسی (۲۰) می باشند. ولی همه این روشها وقت گیر و پرهزینه بوده و در ضمن نیاز به افراد با تجربه و ماهر برای انجام دارند. روش طیفسنجی نوری، برای تعیین مقدار فنوباریتال که پیش از این معرفی شده بود (۲۱)، روش سریع، دقیق و حساسی است و برای موارد اورژانس مسمومیتها مناسب می باشد. در این مطالعه، برای بهبودی حساسیت، دقت و بازیافت فنوباریتال در پلاسما تغییراتی در متد قبلی (۲۲) داده شد.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که تنظیم مناسب pH، رسم منحنی کالیبراسیون بر اساس جمع absorbance دو طول موج مختلف و استخراج فنوباریتال با تکان دادن مناسب و استفاده از حلال دی کلرومتان به جای کلروفرم، مراحل تعیین کننده در تعیین مقدار سریع فنوباریتال در پلاسما می باشند. در این

References:

1. Aitkenhead AR. Do barbiturates protect the brain. Brit J Anaesth 1981; 53: 1011-1013.
2. Theodore WH. Rational use of antiepileptic drug levels. Pharmacol Ther 1992; 54: 297-305.
3. Mathew H, Proudfoot AT, Brown SS. Acute poisoning: Organization and workload of a treatment center. Br Med J 1969; 3:489-493.
4. Whelton A, Snyder DS, Walker WG. Acute toxic ingestions at the Johns Hopkins Hospital 1963 through 1970. Johns Hopkins Med J, 1973;132:157-167.
5. Litovitz TL, Schmitz BF, Matyunas N, Martin TG. 1987 Annual report of the American association of poison control centers data collection system. Am J Emerg Med 1988; 6:479-485.
6. Karpova MN, Kryzhanovskii GN, Abrosimov II. Anticonvulsant and neurotoxic effects of various combinations of phenobarbital, diazepam, sodium valproate, and 1,4-dihydroxyridine ryodipine. Biull Eksp Biol Med 1994;118:14-16.
7. Osborn H, Goldfrank LR, Howland MA, Bresnitz EA, Kirstein RH. Barbiturates and other sedative - hypnotics. In: Goldfrank's Toxicologic Emergencies, eds Goldfrank LR

قابل قبولی بین درجات کوما یا میزان هوشیاری و غلظت فنوباریتال در خون پیدا نشد. تصور می شود که تعیین مقدار فنوباریتال در خون ارزش بالائی در تشخیص و پیشگیری شدن مسمومیت دارویی و در پیشگیری طول مدت کوما فاقد ارزش است. در حقیقت، درجه و طول کوما بیشتر به غلظت های مغزی وابسته است تا پلاسمائی (۲۴ و ۲۳ و ۷ و ۵) همانگونه که در شکل ۴، نشان داده شده است. بین ضربانات و غلظت های خونی فنوباریتال هم رابطه معقولی وجود دارد (۲=۰/۹۴۵) گزارشات قبلی در این خصوص وجود ندارد و این در مطالعه حاضر به اثبات رسیده است. این مسئله ممکن است در تعیین شدت آوردوز فنوباریتال ارزشمند بوده و در رسیدگی به مسمومین در ساعات اولیه پس از مسمومیت بسیار کار ساز باشد.

بالاخره، بر اساس این مطالعه استفاده از روش طیف سنجی نوری تغییر یافته برای آنالیز فنوباریتال در خون مسمومین جهت تشخیص سریع و دقیق مسمومیت و نیز اقدام به درمان مناسب، توصیه می شود.

- et al. Appleton & Lange, New York, 1990; 449-454.
8. Ekrub MG, Retsru MW, Greb JM, Kolling DE, Fincham RW. Effect of the charcoal preparations on oral and intravenous phenobarbital. Clin Res Regul Aff 1993;10:81-98.
9. Gupta RN. Drug level monitoring Lefever D. Ultraviolet spectrophotometric analysis of barbiturates. Am J Clin pathol,

1976;66:823-829.

10. Liu H, Delgado M, Forman LJ, Eggers

CM, Montoya JL. Principal kinetics of drug action in disease. J Pharm Sci 1993; 82: 229-230.

11. Kaplan A, Szabo LL, Opheim KE. Clinical chemistry, interpretation and techniques, 3rd, Lea & Febiger Inc., Philadelphia 1988; 368-372.

12. Parimoo P, Umapathi P, Srinivasan KS. Simultaneous quantitative determination of phenobarbitone and theophylline in drug preparations by difference spectroscopy. Indian Drugs, 1992; 29: 442-444.

13. Pillai DN, Dilli S. Analysis of barbiturates by gas chromatography. J Chromatogr 1981; 220:253-274.

14. Soo VA, Bergert RJ, Deutsch DG. Screening and quantification of hypnotic sedatives in serum by capillary gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector, and confirmation by capillary gas chromatography-mass spectrometry. Clin Clin Chem 1986; 32: 325-328.

15. Mule SJ, Casella GA. barbiturates in human urine by gas chromatography / mass spectrometry. J Anal Toxicol 1989; 69:15-19.

16. Baker JK, Skelton RE, Ma CY. Gas chromatography assay for thiopental in

plasma, with use of a nitrogen-specific detector. Clin Chem 1981; 27: 113-115.

17. Kabra PM, Stafford BE, Marton LJ. Rapid method for screening toxic drugs in serum with liquid chromatography. J Anal Toxicol, 1981; 5:177-181.

18. Atwell SH, Green VA, Haney WG. Developmental and evaluation of a method for simultaneous determination of phenobarbital and diphenylhydantoin in plasma by high-pressure liquid chromatography. J Pharm Sci 1975; 64:806-809.

19. Toxi-LAB AB drug detection system. Toxi-LAB, Inc., Irvine, CA, 1989.

20. Watson AT, Manno JE, Manno BR. Quantitation of barbiturates by a modification of the Emit-tox serum barbiturate assay. J Anal Toxicol 1983; 7:257-261.

21. Schumann GB, Leuenstein K. Sedative hypnotics. J Chromat 1985; 340:139-172.

22. Eisenberg HM, Frankowski RF, Contant CF, Marshall LF, Walker MD. High-dose barbiturate control of elevated intracranial pressure in patients with severe head injury. J Neurosurg 1988; 69:15-19.

23. Hoffman A, Klockowski P, Levy G. Simultaneous determination of carbamazepine, phenytoin, phenobarbital, primidone and their metabolites by high performance liquid chromatography with photodiode array detection. J Chromatogr Biomed Appl

1993; 127: 105-115.

24. Sylvester CE, Marchlewski A, Manaligod JM. **Primidone or phenobarbital use complicating disruptive bahavior disorders.**

Clin pediatri phila 1994;33:252-253.