● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال اول، شمارهٔ ۱، صفحه ۳۴ الی ۴۱، ۱۳۷۷

شناسایی وتعیین مقدار سریع فنوباربیتال در موارد مسمومیت به روش طیف سنجی فرابنفش

دکترمحمدعبداللهی [۱]،دکترهوری‌بینش [۲]،دکترشکوفه‌نیکفر [۳]،دکترناصرجلالی [۴]،دکترعلی‌اکبر مقدم‌نیا [۵]

خلاصه

مقدمه: باربیتوراتهابعنوان‌داروهای خواب آور و آرام بخش بطورگسترده‌ای در پزشکی مصرف می‌شوند. متأسفانه، مسمومیت با این داروها خصوصاً فنوباربیتال بسیار بالاست. شناسایی و تعیین مقدار سریع فنوباربیتال در خون افراد مسموم می‌تواند راهگشای خوبی برای درمان باشد.

مواد و روشها: دراین مطالعه برای تعیین مقدار فنوباربیتال در خون مسمومین از یک روش تغییر یافته طیف سنجی فرابنفش استفاده شده است. اساس این روش برای طیف‌های افتراقی قلیایی فنوباربیتال 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 وپس از بهبودی از بیمارستان مرخص شدند.

یافته‌ها: ارتباط خوبی بین نتایج این دو روش وبدست آمد (۰/۹۹۸ = r). در این روش زمان آزمایش تقریباً ۴۵ دقیقه وحساسیت آن ۲ mg/ml، دقت ۷/۰۳۴ درصد و میزان بازیابی نمونه‌های دستی ۹۹/۱ درصد بود. علائم ونشانه‌های بالینی ونیز نتایج معاینات مسمومین نیزثبت گردید. نتایج نشان می‌دهند که مسمومیت با فنوباربیتال عمدتاً با آرام بخشی، تاکی کاردی، اختلالات نورولوژیک، افت فشار خون، میوز و هیپوکسی همراه است. همچنین بین افزایش ضربانات قلب و غلظت خونی فنوباربیتال نیز رابطه وجود داشت (۰/۹۴۵=r) . البته دراین بررسی، رابطه‌ای بین غلظت خونی و میزان هوشیاری یا درجه کوما دیده نشد.

نتیجه‌گیری: استفاده از این روش برای تشخیص مسمومیت وتعیین مقدار فنوباربیتال در اوردوز آن بعنوان یک روش سریع در موارد اورژانس توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: فنوباربیتال، اوردوز، مسمومیت، تعیین مقدار.

۱ـ متخصص سم‌شناسی و داروشناسی ـ استادیار دانشکده داروسازی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲ـ دکتر داروساز

۳ـ دکتر داروساز و کارشناس اطلاع رسانی سموم و داروها ـ وزارت بهداشت ودرمان وآموزش پزشکی

۴ـ دانشیار سم‌شناسی بالینی ـ بیمارستان لقمان حکیم ـ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۵ـ متخصص سم‌شناسی و داروشناسی ـ استادیار دانشکده پزشکی ـ دانشگاه علوم پزشکی بابل

[DOR: 20.1001.1.15614107.1377.1.1.5.6]

مقدمه

باربیتوراتها، که بعنوان داروهای خواب آور طبقه بندی می‌شوند، به مقاصد متعددی در طب تجویزمی گردند. این داورها بعنوان آرام بخش ونیز بعنوان کنترل کننده تشنج مصرف می‌شوند (۲و۱). گرچه بسیاری از داروها می‌توانند علت بروز مسمومیت‌ها باشند. ولی باربیتوراتها یکی از رایج‌ترین عوامل ایجاد کننده مسمومیت معرفی شده‌اند (۶و۵و۴و۳). در مسمومیت با باربیتوراتها نیاز به تشخیص وتعیین مقدار سریع می‌باشد چون اگر در ساعات اولیه مسمومیت ناشی از آن تشخیص داده شود، و یک درمان اولیه وحمایت اولیه شروع شود، مسموم از خطرات جدی و گاهی مرگ رسته و بهبود می‌یابد، حتی اگر مقادیر زیادی اوردوز شده باشند. (۸و۷). روش‌های متعددی برای تعیین مقدار فنوباربیتال در مایعات بیولوژیک معرفی شدند ولی بیشتر آنها وقت گیر بوده ونیاز به مهارت بالا و تجهیزات گرانقیمت دارند که در اغلب بخش‌های اورژانس مسمومیت قابل دسترسی نیستند. (۹،۱۰). این روش‌ها را می‌توان در مراکز تعیین مقدار دارو یا TDM (Therapeutic Drug Monitoring) پیاده نمود. بسیاری از محققین، روش طیف سنجی فرابنفش را بعنوان یکی از روش‌های انتخابی برای موارد اورژانس معرفی کرده‌اند. این روش ساده ، سریع، حساس و بسیار اختصاصی است. وبرای تشخیص مسمومیت با باربیتوراتها در کلینیک ونیز به مقاصد تحقیقاتی در سم‌شناسی براحتی قابل دسترسی است. (۱۲و۱۱). 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 سریع‌تر وبا حساسیت بیشتر فنوباربیتال در خون افرادی است که به قصد خودکشی از آن استفاده کرده‌اند و به بخش مسمومیت‌های 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 دراین مطالعه از شرکت مواد شیمیایی Sigma خریداری شد. و بصورت زیر تهیه شدند.

- **بافرفسفات (pH = ۷/۴)**: 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 لیترسود (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 وبا آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید.
- **محلول ۰/۴۵ مولار سود:** ۱۸ گرم سود در آب حل شده وبا آب مقطر به حجم یک لیتر رسید.
- **تهیه محلول Stock فنوباربیتال (۱۰۰ml/۱۰۰mg)**: ۱۰۰mg فنوباربیتال را در یک مزور ریخته و سپس در الکل ۹۵ درجه حل می‌گردد. و نهایتاً با الکل به حجم ۱۰۰ میلی لیتر می‌رسد.
- **محلول دستی فنوباربیتال (غلظت‌های 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 وروی هر کدام ۱۰ میلی لیتر پلاسما اضافه می‌گردد. از مواد دیگری همچون دی کلرومتان هم استفاده گردید.

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

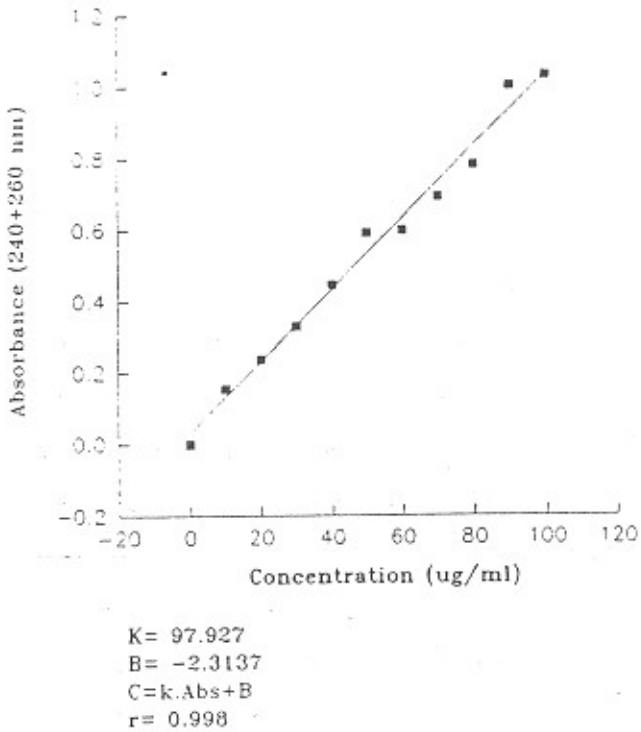
[DOR: 20.1001.1.15614107.1377.1.1.5.6]

۰/۵ میلی لیتر بافر و ۲۵ میلی لیتر دی کلرومتان در یک لوله در پیچ دار ریخته وبه 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 ۰/۴۵ مولار سود اضافه می‌شود. لوله به مدت ۵ دقیقه تکان داده می‌شود. محلول فوقانی جمع آوری وسپس به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شده و دو قسمت ۲/۵ میلی لیتری تقسیم می‌گردد. pH یک قسمت با افزودن ۰/۵ میلی لیتر محلول سه مولار کلروآمونیوم به حدود ۱۰/۳ می‌رسد. pH محلول دیگر، با افزودن ۰/۵ میلی لیتر محلول سود ۰/۴۵ 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) درنظر گرفته می‌شود. سپس با استفاده از دستگاه UV-visible (مدل ۱۶۰A Shimadzu) منحنی شاخص برای باربیتوراتها 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 فنوباربیتال مورد آزمایش قرار گرفت. منحنی استاندارد با استفاده از یازده غلظت مشخص (۱۰۰mg/ml و۹۰و...و۲۰و۱۰و۰) 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 فنوباربیتال (۴mg/ml و۳ و۲ و۱و۰) تعیین شد. دقت وزمان بازیابی نیز با استفاده از سه غلظت (mg/ml ۸۰و۵۰و۳۰) فنوباربیتال بدست آمد. هر غلظت ۵ بار مورد آزمایش مجدد قرار گرفت تا از صحت آن اطمینان حاصل شود. نمونه‌های مورد آزمایش، شامل نمونه پلاسمای بیمار ونیز پلاسمای تهیه شده بودند.



شکل ۱. منحنی استاندارد با استفاده از یازده غلظت مشخص فنوباربیتال. 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 فنوباربیتال 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 ونشانه‌های 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 درنظر گرفته شد.

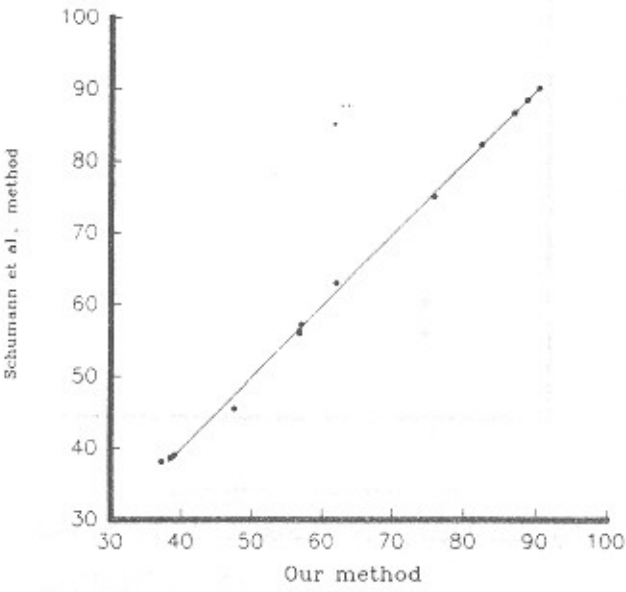
[DOR: 20.1001.1.15614107.1377.1.1.5.6]

یافته‌ها

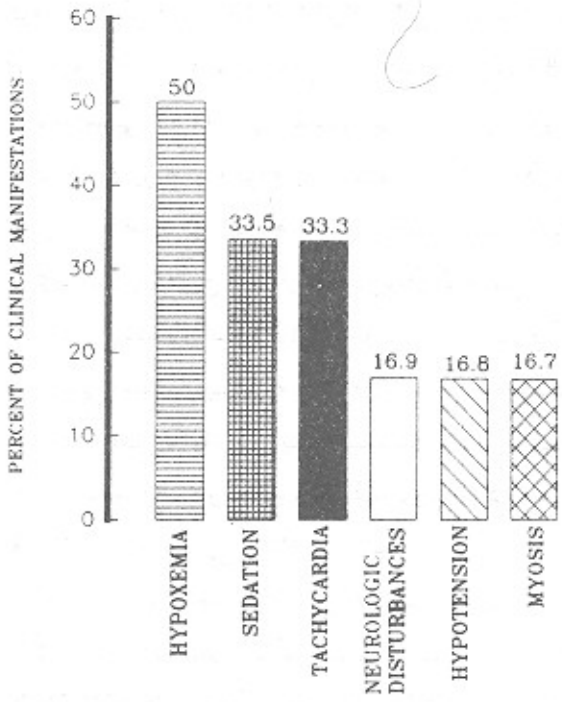
با رسم منحنی جمع absorbance در طول موج‌های ۲۴۰ و ۲۶۰ نانومتر در مقابل غلظت‌های مختلف فنوباربیتال در پلاسما، یک منحنی استاندارد و بدست آمد (شکل ۱). این منحنی بین غلظت‌های صفر تا ۱۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر خطی گردید. بررسی حساسیت روش، نشان داد که غلظت‌های کمتر از ۲ میکروگرم درمیلی لیتر با این روش ردیابی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

بازیافت فنوباربیتال افزوده شده به پلاسما در غلظت‌های مختلف با این روش ۹۹/۱ درصد بود. با توجه به شکل شمارهٔ ۲، منحنی بدست آمده در این مطالعه با منحنی استاندارد بدست آمده از مطالعهٔ 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 همودیالیز قرار گرفتند. غلظت‌های خونی فنوباربیتال دراین افراد بین ۸۰ الی ۱۰۰ میکروگرم درمیلی لیتر اندازه‌گیری گردید. ارتباط قابل توجهی بین افزایش ضربانات و غلظت خونی فنوباربیتال درمسمومین دیده شد (۰/۹۴۵ = r، شکل ۴).

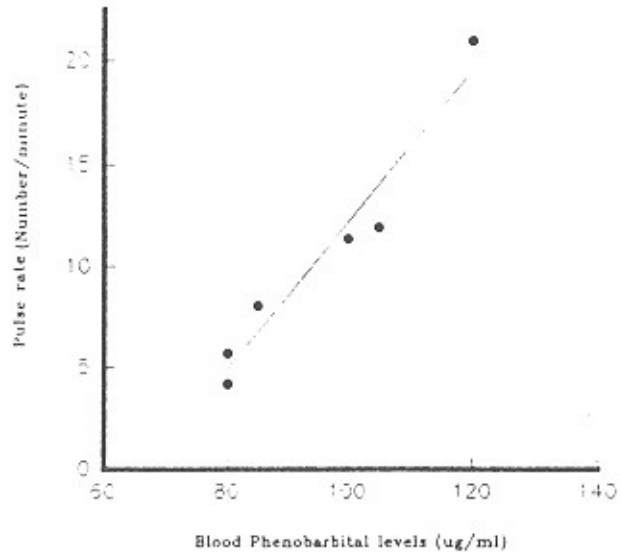


شکل ۲. ارتباط بین نتایج طیف سنجی فرابنفش در این مطالعه و مطالعهٔ Schumann et al. برای فنوباربیتال (۰/۹۷۲ = r)



شکل ۳. در صد علائم مسمومیت ناشی از فنوباربیتال به تفکیک اهمیت در ۷ نفر مسموم

[DOR: 20.1001.1.15614107.1377.1.1.5.6]



شکل ۴. ارتباط بین غلظت خونی فنوباربیتال و تعداد ضربانات قلبی (r = ۰/۹۴۵).

بحث

روشهای زیادی برای تعیین مقدار فنوباربیتال در مایعات بیولوژیک وجود دارد. از جمله این روشها کروماتوگرافی گازی (۱۵و۱۴و۱۳)، کروماتوگرافی مایع (۱۸و۱۷و۱۶) ، کروماتوگرافی غشاء نازک (۱۹) و ایمنواسی (۲۰) می‌باشند. ولی همه این روشها وقت گیر و پر هزینه بوده و در ضمن نیاز به افراد با تجربه و ماهر برای انجام دارند. روش طیف سنجی نوری، برای تعیین مقدار فنوباربیتال که پیش از این معرفی شده بود (۲۱)، روش سریع، دقیق و حساسی است و برای موارد اورژانس مسمومیت‌ها مناسب می‌باشد. در این مطالعه، برای بهبودی حساسیت، دقت و باز یافت فنوباربیتال در پلاسما تغییراتی در متد قبلی (۲۲) داده شد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تنظیم مناسب pH، رسم منحنی کالیبراسیون بر اساس جمع absorbance دو طول موج مختلف و استخراج فنوباربیتال با تکان دادن مناسب و استفاده از حلال دی کلرومتان به جای کلروفرم، مراحل تعیین کننده در تعیین مقدار سریع فنوباربیتال در پلاسما می‌باشند. در این مطالعه، حساسیت آزمایش تا ۲ میکروگرم در میلی لیتر در مقابل ۲/۵ ($P<0/05$) ومیزان بازیافت فنوباربیتال میکروگرم در میلی لیتر روش اولیه از نمونه‌های پلاسمائی تا ۹۹/۱ درصد در مقابل ۹۶/۱درصد قبلی ($P<0/05$) افزایش داده شد. دقت بین آزمایشات دراین روش ۷ درصد بدست آمده که بیشتر از روش قبلی (۵/۴ درصد) می‌باشد. ارتباط بین نتایج بدست آمده از این روش با روش قبلی مناسب و قابل قبول است ($r=0/998$). غلظت‌های شناخته شده فنوباربیتال در پلاسما که با این روش اندازه‌گیری شدند، در مقایسه با روش قبلی بهتر بوده و به غلظت‌های واقعی نزدیک ترند ($P<0/05$). شدت مسمومیت ناشی از آوردوز فنوباربیتال با میزان تضعیف سیستم عصبی مرکزی و کاهش فعالیت سیستم تنفسی مشخص می‌شود. علائم خفیف شامل آتاکسی، نیستاگموس، سرگیجه و کاهش تمرکز معمولاً در غلظت‌های بالای ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر خون اتفاق می‌افتد. این علائم در غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی لیتر شدید شده و در غلظت‌های بالای ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهدید کننده زندگی می‌باشندو اگر اقدامات حمایتی صورت نگیرد، مرگ معمولاً دراثر وقفه تنفسی اتفاق می‌افتد (۲۴و۲۳و۲۲و۷). 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 تائید کند (۵). هیچ یک از آنان تلف نشدند و همگی پس از بهبودی از بیمارستان مرخص گردیدند. درشکل ۳، نشان داده شده است که عمده‌ترین علائم مسمومیت آوردوز با فنوباربیتال هیپوکسمی، افت فشار خون، تاکیکاردی، آرام بخشی، اختلالات نورولوژیک و میوزاست که البته در مطالعات گذشتگان هم به تائید رسیده‌اند(۲۴و۷و۶). ارتباط

[DOR: 20.1001.1.15614107.1377.1.1.5.6]

قابل قبولی بین درجات کوما یا میزان هوشیاری و غلظت فنوباربیتال در خون پیدا نشد. تصور می‌شود که تعیین مقدار فنوباربیتال در خون ارزش بالائی در تشخیص و پیشگیری شدن مسمومیت دارویی ودر پیشگیری طول مدت کومافاقد ارزش است. در حقیقت، درجه و طول کوما بیشتر به غلظت‌های مغزی وابسته است تا پلاسمائی (۲۴و۲۳و۷و۵) همانگونه که در شکل ۴، نشان داده شده است. بین ضربانات وغلظت‌های خونی فنوباربیتال هم رابطه معقولی وجود دارد (r=۰/۹۴۵) گزارشات قبلی دراین خصوص وجود ندارد واین در مطالعه حاضر به اثبات رسیده است. این مسئله ممکن است در تعیین شدت آوردوز فنوباربیتال ارزشمند بوده ودر 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 فنوباربیتال در خون مسمومین جهت تشخیص سریع ودقیق مسمومیت و نیز اقدام به درمان مناسب، توصیه می‌شود.

****

References:

1. Aitkenhead AR. **Do barbiturates protect the brain.** Brit J Anaesth 1981; 53: 1011-1013.

2. Theodore WH. **Rational use of antiepi leptic 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 phenoberbital ,diazepam, sodium valproate , and 1,4-dihydroyridine ryod ipine**, 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 et al. Appletton & Lange , Newyork,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 spectrophoto metric analysis of barbiturates** .Am J Clin pathol,

[DOR: 20.1001.1.15614107.1377.1.1.5.6]

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, Ophein KE. **Clinical chemistry ,interpretation and techniques**,3rd, Lea & Febiger Inc., Philadelphia 1988; 368-372.

12. Parimoo P, Umapathi P, Srinivasan KS. **Simultaneous quantitative determi nation of phenobarbitone and theo phylline in drug preparations by differnce spectr oscopy**. Lindian Drugs, 1992; 29: 442-444.

13. Pillai DN, Dilli S. **Analysis of barbiturates by gas chromato graphy**.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 - phos phorus 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 chromatogra phy / mass spectro metry**. J Anal Toxicol 1989; 69:15-19.

16. Baker JK, Skelton RE Ma CY. **Gas chr omatography assay for thiopen tal in plasma , with use of a nitrogen -specific detector** .Clin Chem 1981; 27: 113-115.

17. Kabra PM, Stafford BE, Marton LJ. **Rapidmethod for screening toxic drugs in serum with liquid chromat ography**. J Anal Toxi col, 1981; 5:177-181.

18. Atwell SH, Green VA, Haney WG. **Developmental and evaluation of a method for sinultaneous determination of pheno berbital and diphenylhdantoin in plasma by high-pressure liquid chromatog raphy**. 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 modi fication of the Emit-tox serim 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 patienys with severe heas injury.** J Neurosurg 1988;69:15-19.

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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1377.1.1.5.6]

1993; 127: 105-115.

24. Sylvester CE, Marchlewski A, Mana ligod JM. **Primidone or phenobarbital use complicating disruptive bahavior disorders.** Clin pediatr phila 1994;33:252-253.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1377.1.1.5.6]