

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

دکتر محمد عبدالله‌ی<sup>۱</sup>، دکتر هوری بینش<sup>۲</sup>، دکتر شکوفه نیکفر<sup>۳</sup>، دکتر ناصر جلالی<sup>۴</sup>، دکتر علی اکبر مقدم‌نیا<sup>۵</sup>

### خلاصه

مقدمه: باربیتورات‌ها بعنوان داروهای خواب آور و آرام‌بخش بطور گسترده‌ای 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: در این 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 و پس از بهبودی از بیمارستان مرخص شدند.

یافته‌ها: ارتباط خوبی بین نتایج این دو روش وجود دارد ( $99.8\% = ۲$ ). در این روش زمان آزمایش تقریباً ۴۵ دقیقه و حساسیت آن  $2 \text{ mg/ml}$ ، دقت  $0.34\%$  درصد و میزان بازیابی نمونه‌های دستی  $99.1\%$  درصد بود. علائم و نشانه‌های بالینی و نیز نتایج معاینات مسمومین نیز ثبت گردید. نتایج نشان می‌دهند که مسمومیت با فنوباربیتال عمدتاً با آرام‌بخشی، تاکی کارده، اختلالات نورولوژیک، افت فشار خون، میوز و هپوکسی همراه است. همچنین بین افزایش ضربانات قلب و غلظت خونی فنوباربیتال نیز رابطه وجود داشت ( $0.945 = ۲$ ). البته در این بررسی، رابطه‌ای بین غلظت خونی و میزان هوشیاری یا درجه کوما دیده نشد.

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

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

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

۲- دکتر داروساز

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

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

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

منظور تعیین مقدار سریع تر و با حساسیت بیشتر فنوباربیتال در خون افرادی است که به قصد خودکشی از آن استفاده کرده‌اند و به بخش مسمومیت‌های بیمارستان لقمان حکیم مراجعه نمودند. همچین 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 ( $\text{pH} = 7/4$ ): مقدار ۴ گرم سود در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. سپس ۶۱/۱۳ گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر بصورت محلول یک مولار در آمد. به ۵۰ میلی لیتر محلول یک مولار فوق، ۱/۳۹ میلی لیتر سود (یک مولار) اضافه گردید تا  $\text{pH}$  به ۷/۴ برسد. سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

- آمونیوم کلراید ۳ مولار: ۱۶ گرم  $\text{NH}_4\text{Cl}$  را در یک میزور ریخته و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید. محلول ۴۵٪ مولار سود: ۱۸ گرم سود در آب حل شده و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسید.

- تهیه محلول Stock فنوباربیتال (۱۰۰ml): ۱۰۰mg  $\text{mg}$  فنوباربیتال را در یک میزور 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، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ تا ۲۰۰): برای تهیه این محلول مقدار ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (برای تهیه در کلینیک ویژه استوک را در یک میزور ریخته و روی هر کدام ۱۰ میلی لیتر پلاسما اضافه می‌گردد. از مواد دیگری همچون دی کلرومتان هم استفاده گردید).

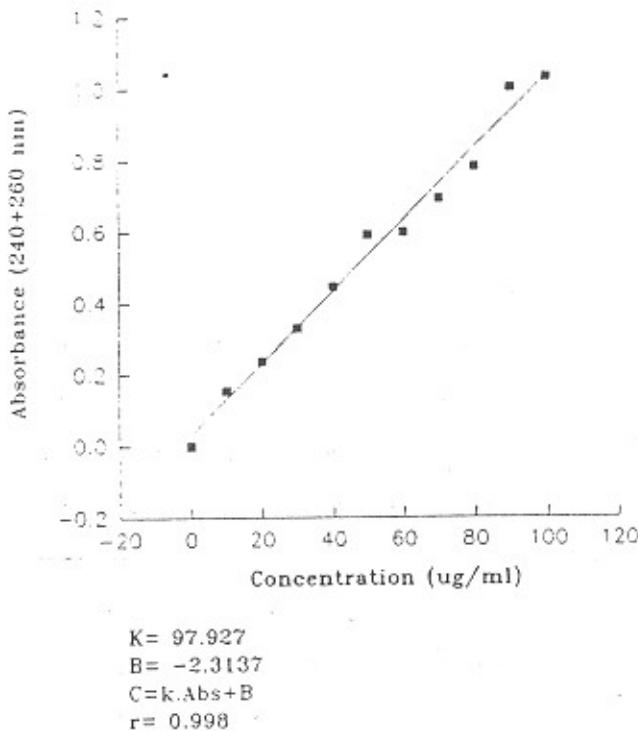
۲- روش آنالیز فنوباربیتال: ۲ میلی لیتر از پلاسما،

### مقدمه

باربیتورات‌ها، که بعنوان داروهای خواب آور طبقه بندی می‌شوند، به مقاصد متعددی در طب تجویز می‌گردند. این داروها بعنوان آرام بخش و نیز بعنوان کنترل کننده تشنج مصرف می‌شوند (۱۲). گرچه بسیاری از داروهای می‌توانند علت بروز مسمومیت‌ها باشند. ولی باربیتورات‌ها بکمی از رایج ترین عوامل ایجاد کننده مسمومیت معرفی شده‌اند (۳ و ۴ و ۵ و ۶). در مسمومیت با باربیتورات‌ها نیاز به تشخیص و تعیین مقدار سریع می‌باشد چون اگر در ساعت‌های 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 می‌یابد، حتی اگر مقدار زیادی اوردوز شده باشند. (۷ و ۸). روش‌های متعددی برای تعیین مقدار فنوباربیتال در مایعات بیولوژیک معرفی شدند ولی بیشتر آنها وقت گیر بوده و نیاز به مهارت بالا و تجهیزات گرانقیمت دارند که در اغلب بخش‌های اورژانس مسمومیت قابل دسترسی نیستند. (۹، ۱۰). این روش‌ها را می‌توان در مراکز TDM (Therapeutic Drug Monitoring) پیاده نمود. بسیاری از محققین، روش طیف سنجی فرابینش را بعنوان یکی از روش‌های انتخابی برای موارد اورژانس معرفی کرده‌اند. این روش ساده، سریع، حساس و بسیار اختصاصی است. و برای تشخیص مسمومیت با باربیتورات‌ها در کلینیک ویژه مقاصد تحقیقاتی در سم‌شناسی برآحتی قابل دسترسی است. (۱۱ و ۱۲). شکل تغییر یافته این روش، استفاده از طیف سنجی افتراقی فرابینش برای تعیین مقدار دارو در خون است.

هدف این مطالعه، تغییر روش طیف سنجی قبلی به

حاصل شود. نمونه های 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 مراجعته شرح حال کامل گرفته و ضمن اینکه علائم و نشانه های مسمومیت ثبت می گردید، 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 داده ها، داده ها با روش آنالیز رگرسیون و آزمون  $t$  ارزیابی شدند. اختلاف بین نتایج با  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

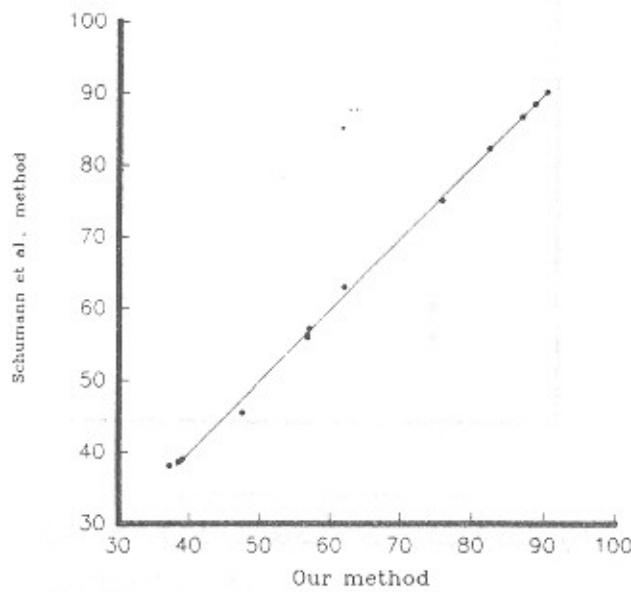
۵/۰ میلی لیتر بافر و ۲۵ میلی لیتر دی کلرومنتان در یک لوله در پیچ دار ریخته و به مدت ۵ دقیقه تکان داده می شوند. لایه مائی فوکانی با استفاده از ساکشن خارج می شود. باقی مانده محلول دی کلرومنتان، صاف می گردد. به این محلول صاف شده، ۶ میلی لیتر محلول ۴۵/۰ مولار سود اضافه می شود. لوله به مدت ۵ دقیقه تکان داده می شود. محلول فرقانی جمع آوری و سپس به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شده و دو قسمت ۲/۵ میلی لیتری تقسیم می گردد. pH یک قسمت با افزودن ۵/۰ میلی لیتر محلول سه مولار کلروآمونیوم به حدود ۱۰/۳ میلی رسد. pH محلول دیگر، با افزودن ۵/۰ میلی لیتر محلول سود ۴۵/۰ مولار به ۱۳/۵ می رسد.

محلولی که به pH ۱۳/۵ رسیده است را به یک کروتو نمونه منتقل کرده و محلول با pH مساوی ۱۰/۳ بعنوان کروتو شاهد (رفرانس) در نظر گرفته می شود. سپس با استفاده از دستگاه UV-visible (مدل Shimadzu ۱۶۰A) منحنی شاخص برای باریتوراتها 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 می آید.

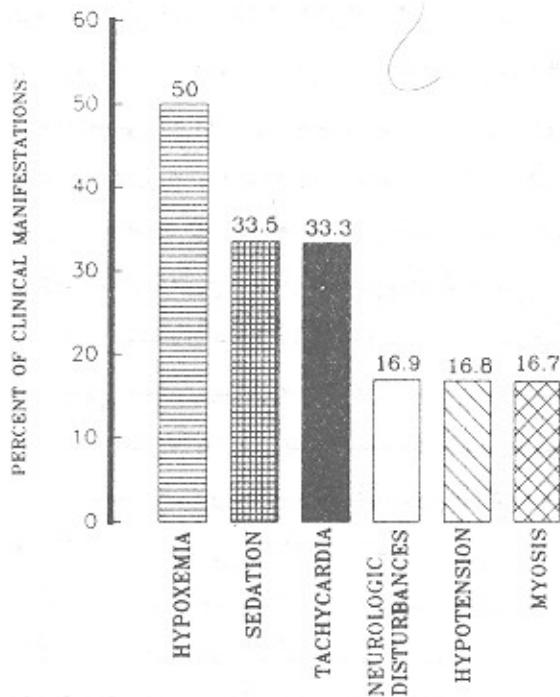
برای تثبیت منحنی استاندارد و نیز بدست آوردن شرایط Optimum (مطلوب) در روش طیف سنجی فرابینش، غلظت های ساخته شده و مشخص فنوباریتال مورد آزمایش فرار گرفت. منحنی استاندارد با استفاده از یازده غلظت مشخص (۱۰۰mg/ml و ۹۰... و ۲۰... و ۱۰) رسم گردید و هر غلظت ۵ بار مورد آزمایش فرار گرفت (شکل ۱)

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

## یافته‌ها



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



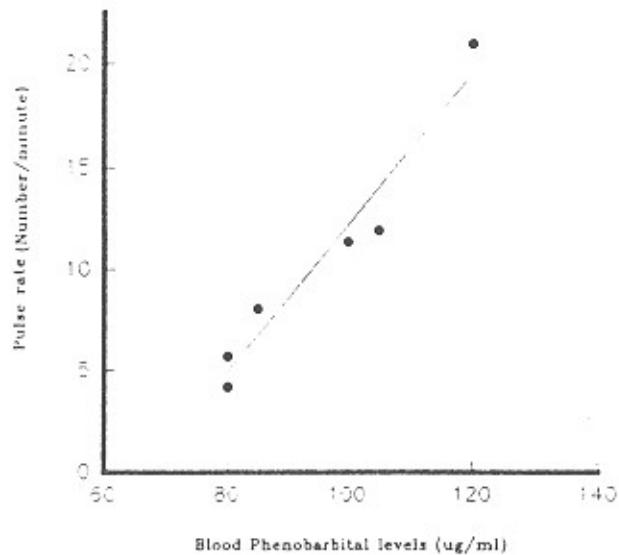
شکل ۳. درصد علائم مسمومیت ناشی از فنوباریتال به تفکیک اهمیت در ۷ نفر مسموم

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 ۱۵ 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 (۳۰، ۵۰، ۸۰ 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 تاکبکاردي، 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 فنوباریتال در این افراد بین ۸۰ الى 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  $2/5 (P < 0.05)$  و میزان بازیافت فنوباربیتال میکروگرم در میلی لیتر روش اویله از نمونه های پلاسمائی تا  $99/1$  درصد در مقابل  $96/1$  درصد قبلی ( $P < 0.05$ ) افزایش داده شد. دقت بین آزمایشات در این روش ۷ درصد بدست آمده که بیشتر از روش قبلی ( $5/4$  درصد) می باشد. ارتباط بین نتایج بدست آمده از این روش با روش قبلی مناسب و قابل قبول است ( $99.8\% = 2$ ). غلط های شناخته شده فنوباربیتال در پلاسمائیکه با این روش اندازه گیری شدند، در مقایسه با روش قبلی بهتر بوده و به غلط های واقعی نزدیک ترند ( $P < 0.05$ ). شدت مسمومیت ناشی از آوردوز فنوباربیتال با میزان تضعیف سیستم عصبی مرکزی و کاهش فعالیت سیستم تنفسی مشخص می شود. علائم خفیف شامل آناکسی، نیستاگموس، سرگیجه و کاهش تمرکز معمولاً در غلط های بالای ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر خون اتفاق می افتد. این علائم در غلط  $60$  میکروگرم در میلی لیتر شدید شده و در غلط های بالای  $100$  میکروگرم در میلی لیتر تهدید کننده زندگی می باشند و اگر اندامات حمایتی صورت نگیرد، مرگ معمولاً دراثر وقفه تنفسی اتفاق می افتد ( $24$  و  $22$  و  $23$  و  $27$ ). در این مطالعه همه بیماران در محدوده مسمومیت شدید بودند. قسمت اعظم آنها در محدوده سنی  $20-30$  سال بودند که مطالعات قبلی هم آن را تائید کند ( $5$ ). هیچ یک از آنان تلف نشدن و همگی پس از بهبودی از بیمارستان مرخص گردیدند. در شکل ۳، نشان داده شده است که عمدۀ ترین علائم مسمومیت آوردوز با فنوباربیتال هیپوکسیمی، افت فشار خون، تاکیکاردی، آرام بخشی، اختلالات نورولوژیک و میوزاست که البته در مطالعات گذشتگان هم به تائید رسیده اند ( $24$  و  $27$  و  $6$ ). ارتباط



شکل ۴. ارتباط بین غلط خونی فنوباربیتال و تعداد ضربانات قلبی ( $945\% = 2$ ).

### بحث

روشهای زیادی برای تعیین مقدار فنوباربیتال در مایعات بپولوژیک وجود دارد. از جمله این روشهای کروماتوگرافی گازی ( $15$  و  $14$  و  $13$ )، کروماتوگرافی مایع ( $16$  و  $17$  و  $18$ )، کروماتوگرافی غشاء نازک ( $19$ ) و ایمنواسی ( $20$ ) می باشند. ولی همه این روشهای وقت گیر و پرهزینه 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 ( $21$ ، روش سریع، دقیق و حساسی است و برای موارد اورژانس مسمومیت ها مناسب می باشد. در این مطالعه، برای بهبودی حساسیت، دقت و بازیافت فنوباربیتال در پلاسما تغییراتی در متد قبلی ( $22$ ) 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 فنوباربیتال با نکان دادن مناسب و استفاده از حلال دی کلرومنان به جای کلروفرم، مراحل تعیین کننده در تعیین مقدار سریع فنوباربیتال 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 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. Appleton & 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 spectrophotometric analysis of barbiturates .*Am J Clin pathol*,

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 کومافاقد ارزش است. در حقیقت، درجه و طول کوما بیشتر به غلظت های مغزی وابسته است تا پلاسمائی (۲۴ و ۲۳ و ۵ و ۷) همانگونه که در شکل ۲، نشان داده شده است. بین ضربانات و غلظت های خونی فنوباریتال هم رابطه معقولی وجود دارد (۰/۹۴۵ = ۰=۰) گزارشات قبلی ذراین 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 ساعت 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.

\*\*\*\*\*

- 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 determination of phenobarbitone and theophylline in drug preparations by difference spectroscopy. *Lindian 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 spectro metry. *J Anal Toxicol* 1989; 69:15-19.
16. Baker JK, Skelton RE Ma CY. Gas chromatography 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 chromatography. *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 phenobarbital 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 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 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*

1993; 127: 105-115.

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