Archive of SID

اندازه گیری استامینوفن در پلاسما به روش اسپکتروفتومتری مریی و مقایسه آن با روش HPLC

*دکتر محمد حسن زاده خیاط، ** دکتر جلیل توکلی، *** دکتر میرزاعلی محمد شفیعی میبدی
*دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
**دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ***داروساز

خلاصه

استامینوفن یك داروی ضددرد و ضدتب موثر بوده و دارای عوارض جانبی خفیف و نادر است. تجویز بیش ازحد استامینوفن ممکن است باعث صدمات شدیدی به کبد وگاهی به کلیه گردد. لذا برای تعیین میزان این صدمات در این گونه موارد اندازه گیری غلظت آن در پلاسما از اهمیت خاصی برخوردار است. در این مطالعه روش جدید و ساده ای برای اندازه گیری استامینوفن در پلاسما با استفاده از اسپکتروفتومتری مریی معرفی می گردد.

روش های مختلفی برای تعیین غلظت استامینوفن در پلاسما نظیر روش اسپکتروفتومتری مریی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ارائه شده است. از آنجایی که روش اسپکتروفتومتری مریی، روشی ساده، آسان، ارزان و قابل انجام در اکثر آزمایشگاهها می باشد، لذا در این مطالعه روش جدید و ساده ای برای اندازه گیری استامینوفن در پلاسما با استفاده از اسپکتروفتومتری مریی معرفی می گردد. دراین روش ۲۰۰ میکروگرم پلاسما را هیدرولیز نموده و پس از تشکیل یك کمپلکس، جذب آن در طول موج ۶۳۵ نانومتر اندازه گیری می شود. میزان تداخل احتمالی هشتاد و چهار داروی مختلف در اندازه گیری استامینوفن با این روش مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور مقایسه روش مذکور با یك روش HPLC، میزان استامینوفن در بیست و سه نمونه استاندارد پلاسما حاوی مقادیر مختلف استامینوفن و همچنین در دوازده نمونه از داوطلبانی که قرص استامینوفن مصرف نموده بودند با هردو روش اسپکتروفتومتری مریی و HPLC اندازه گیری و مقایسه شد. مطالعات آماری نشان داد که تفاوت معنی داری بین نتایج به دست آمده توسط این دو روش وجود ندارد. با توجه به نتایج به دست آمده و مقایسه آماری انجام شده می توان پیشنهاد نمود که این روش اسپکتروفتومتری مریی روشی ساده، ارزان ،سریع ، دقیق و قابل مقایسه با این روش HPLC می باشد. لذا استفاده از این روش جهت اندازه گیری استامینوفن در پلاسما، درموارد مسمومیت ها و TDM و زمانی که سایر روشهای دقیق تر در دسترس نباشد، توصیه می گردد.

کلمات کلیدی: استامینوفن، اسپکتروفتومتری مریی، HPLC

مقدمه

استامینوفن با نام شیمیایی N– استیل پارا آمینوفنل، یك داروی تب بر و ضددرد است که دارای اثر ضدالتهابی ضعیف نیز می باشد. استامینوفن یکی از کم خطرترین و پرمصرف ترین داروهای تب بر و ضددرد است. سمیت استامینوفن از آسپیرین و حتی از فناستین، که قبلا در ترکیبات دارویی تجارتی موجود بوده و از دسته مشتقات پاراآمینوفنل است، به مراتب کمتر است. این دارو در بیماران به خوبی تحمل شده و عوارض جانبی آن خفیف و نادر است. به طوری که علاوه بر تجویز توسط پزشکان، به آسانی و بدون نسخه به عنوان یك مسکن خانگی در دسترس عموم قرار دارد. استامینوفن از طریق خوراکی به سرعت و تقریبا به طور کامل جذب می گردد.

مصرف بیش از حد این دارو منجر به آسیبهای کبدی کشنده شده و عامل تعدادی از مسمومیت های ناشی از خود درمانی می باشد در بیمارانی که کمتر از ۱۵۰ mg/kg استامینوفن مصرف می کرده اند هیچ حالتی از مسمومیت مشاهده نشده است. ولی مصرف بیش از ۳۰۰ mg/kg یا ۷/۵

www.SID.ir

Archive of SID

گرم، منجر به مرگ هم شده است. نارسایی کبدی با آسیب کبدی بین دو دوز فوق مشاهده گردیده است. تشخیص سریع در درمان سمیت استامینوفن بسیار موثر است.

تعیین غلظت استامینوفن در پلاسما نشان دهنده وضعیت بیمار مسموم بوده و کمك زیادی به نحوه درمان مسمومیت درجهت جلوگیری از آسیب های احتمالی کبدی می نماید. روش های مختلفی جهت تعیین غلظت استامینوفن در پلاسما، ادرار و دیگر مایعات بیولوژیك موجود است. مهمترین این روش ها عبارتند از: تعیین مقدار استامینوفن با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) (۵، ۱۲، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۳، ۲۵)، تعیین مقدار استامینوفن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری مریی (۲، ۳، ۸، ۱۴، ۱۵، ۱۷، ۲۲ و ۲۴) و تعیین مقدار استامینوفن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری ماورای بنفش (۴، ۶ و ۷). علاوه بر روش های فوق از روش های دیگری مانند روش های گاز کروماتوگراف متصل به اسپکتروفتومتر جرم (۹)، کرونوآمپرومتری (۱)، جداسازی با پتانسیل الکتریکی (۱۰)، کروماتوگرافی با لایه نازك(۱۱)، کروماتوگرافی گاز (۱۶)، اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته (۲۶)، نیز جهت اندازه گیری استامینوفن در مایعات بیولوژیك استفاده شده است. در بین روشهای فوق روش HPLC از حساسیت و دقت بیشتری برخوردار است، در حالی که روش اسپکتروفتومتری مرئی از سادگی بیشتری برخوردار است.

امروزه اندازه گیری غلظت داروها در مایعات بیولوژیك، تجزیه و تحلیل نتایج حاصله و استفاده از آنها در تنظیم دوز دارویی، کنترل عوارض جانبی، بررسی فارماکوکینتیك بالینی و غیره ضروری می باشد. ازجمله دلائل منطقی که برای درخواست اندازه گیری غلظت یك دارو در سرم وجود دارد، می توان به مواردی از قبیل: تاثیر درمانی، احتمال مسمومیت با داروها، احتمال به دست نیامدن پاسخ درمانی مناسب از تجویز داروها، بی اثر بودن داروها، مصرف نکردن داروها، تغییر در کلیرانس داروها، تغییر در جذب داروها، مصرف بیش ازحد داروها، ارتباط ضعیف بین میزان مصرف و اثر درمانی داروها، بررسی متابولیت های فعال و سمی داروها، تغییر در فارماکوکینتیك داروها و احتمال تداخل دارویی داروها، اشاره نمود (۱۳).

بدیهی است که برای اندازه گیری غلظت های کم اکثر داروها از جمله استامینوفن در مایعات بیولوژیك باید از روش HPLC استفاده نمود. ولی با توجه به سادگی روش اسپکتروفتومتری مریی، حداقل در مورد اندازه گیری استامینوفن در پلاسما، هنگامی که غلظت آن در پلاسما خیلی پایین نباشد، امکان تعیین غلظت آن در پلاسما با روش اسپکتروفتومتری مریی میسر خواهد بود.

از استامینوفن به علت عوارض کمتر نسبت به آسپیرین و سایر داروهای مسکن، علاوه بر استفاده به عنوان مسکن خانگی، مبادرت به تجویز دوزهای بالا و حاد آن می شود که به دنبال آن منجر به مسمومیت های فراوانی می گردد. نیاز به اندازه گیری غلظت استامینوفن در پلاسما (TDM) برای درمان این مسمومیت ها بسیار حائز اهمیت است.

از طرفی، باتوجه به اینکه دستگاه اسپکتروفتومتری مریی تقریبا در اکثر آزمایشگاههای بالینی و در هر مرکز تشخیصی و بهداشتی اعم از شهری و روستایی یافت می شود و همچنین به دلیل سهولت، سادگی، عدم نیاز به پرسنل کاملا متخصص، هزینه کم و غیره، استفاده از این روش برای اندازه گیری غلظت استامینوفن در پلاسمای این گونه بیماران، می تواند مورد توجه قرار گیرد. هدف این پژوهش معرفی یك روش ساده، ارزان و قابل اجرا در اکثر آزمایشگاههای موجود، جهت اندازه گیری استامینوفن در پلاسما می باشد. مسلما استفاده از نتایج این آزمایشات کمك فراوانی به درمان سریع تر مسمومین با استامینوفن خواهد نمود. برای اطمینان از نتایج روش اسپکتروفتومتری مریی، همزمان مقایسه ای بین نتایج این اندازه گیری با نتایج حاصل از اندازه گیری به روش HPLC نیز انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

روش کار

مواد و حلالهای مورداستفاده در این تحقیق همگی از نوع مرك (Merck) با درجه آنالیتیکال بودند. برای اندازه گیری غلظت استامینوفن از دستگاه اسپکتروفتومتری شیماتزو مدل UV-A-160 و دستگاه HPLC واترز مدل 600E استفاده گردید.

برای تهیه معرف رنگی از ۸۲ میلی گرم ۲، ۵- دی متیل فنل و ۳۲ میلی گرم پریدات سدیم درصد میلی لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم ۰/۴ M استفاده می شود.

اندازه گیری استامینوفن در پلاسما به روش اسپکتروفتومتری مریی

همانطور که در مقدمه ذکر گردید، روش های زیادی جهت اندازه گیری استامینوفن در سرم (پلاسما) با استفاده از روش اسپکتروفتومتری مریی منتشر گردیده است. هر یك از روش های فوق دارای محدودیتی بود، که از بین آنها روشی که انجام آن نسبتا ساده تر و مناسب تر بود، انتخاب گردید (۲۲) و با انجام تغییراتی جهت اندازه گیری استامینوفن در پلاسما مورد ارزیابی استفاده قرار گرفت.

روش آزمایش

در یك لوله آزمایش با ابعاد mm ۷۵×۱۰، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما را با ۵۰۰ میکرولیتر اتیل استات و ۰/۱ گرم کریستال سدیم کلراید به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس نموده تا کاملا مخلوط گردد. لوله را برای چند دقیقه ساکن گذاشته تا دو فاز آبی (مایی) و آلی از یکدیگر جدا شوند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از فاز آلی (لایه فوقانی) به داخل لوله ای دیگر منتقل نموده و به آن ۱۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریك شش نرمال اضافه گردید. محلول اسیدی حاصل را به مدت ده دقیقه در حمام آب جوش قرار داده، پس از سرد شدن ۳ میلی لیتر معرف رنگی به آن افزوده شود. پس از ده دقیقه ، جذب کمپلکس آبی تشکیل شده در طول موج ۶۳۵ نانومتر اندازه گیری می شود.

رسم منحنی استاندارد: برای اثبات خطی بودن رابطه غلظت و جذب در نمونه های موردسنجش در محدوده درمانی (غلظت درمانی استامینوفن بین ۱۰ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و غلظت سمی آن از ۳۰ تا ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر است)، غلظت های استاندارد ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استامینوفن در پلاسما انتخاب شده و براساس نتایج مربوط به آنها منحنی استاندارد تهیه گردید.

بررسی میزان دقت روش

دقت روش براساس ارزیابی تغییرات درون روزی و بین روزی بررسی گردید. برای بررسی تغییرات درون روزی از چهار غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استامینوفن در پلاسما استفاده گردید. از هر غلظت شش نمونه تهیه شده و پس از آماده سازی نمونه، جذب آنها اندازه گیری و میزان تغییرات بررسی گردید. در تغییرات بین روزی از ۹ غلظت مختلف ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استامینوفن در پلاسما استفاده گردید. از هر غلظت در زمانهای متفاوت شش نمونه تهیه شده و پس از آماده سازی نمونه جذب آنها اندازه گیری و میزان تغییرات بررسی گردید. در هر مورد با کمك منحنی استاندارد غلظت هر نمونه محاسبه گردید.

تعیین میزان ارزیابی روش

برای ارزیابی صحت روش از میزان بازیابی دارو در پلاسما نسبت به آب استفاده گردید. در این بررسی از چهار غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استامینوفن در پلاسما و آب استفاده گردید. پس از آماده سازی نمونه ها جذب آنها اندازه گیری شده و نسبت میزان استامینوفن در پلاسما به آب محاسبه گردید.

بررسی انتخابی بودن روش

انتخابی بودن روش بررسی شده و به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت.

الف - بررسی تداخل مستقیم داروها با این روش: در این بررسی تعداد ۸۴ داروی موجود و قابل دسترس مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب که از این داروها محلولهایی با غلظت سمی و یا غلظت درمانی آن دارو تهیه گردید و سپس مطابق

www.SID.ir

Archive of SID

روش فوق مورد اندازه گیری قرار گرفت. در این اندازه گیری ها، درمورد هر دارو به جای استامینوفن از محلول آن دارو استفاده گردید. جذب نمونه ها پس از آماده سازی در طول موج ۶۳۵ نانومتر اندازه گیری شد.

ب - بررسی تداخل حضور داروهای مختلف در اندازه گیری استامینوفن: این بررسی به این منظور انجام گرفت که ممکن است دارویی براساس آزمایش قبل (قسمت الف) تداخل مستقیمی با روش مورد بررسی نداشته باشد ولی احتمالا درحضور استامینوفن با ایجاد تغییری در رنگ بتواند به نحوی در روش تداخل نماید. در این بررسی نیز از ۸۴ داروی موجود و قابل دسترس استفاده شد. آزمایشات همانند فوق انجام شد با این تفاوت که در هر محلولی علاوه بر استامینوفن یکی از داروهای ذکر شده در جدول نیز در محلول حضور داشت و جذب این نمونه باجذب نمونه ای که فقط حاوی استامینوفن می باشد، مقایسه گردید.

روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)

همان طور که در مقدمه اشاره شد، روش های HPLC زیادی برای اندازه گیری استامینوفن در سرم (پلاسما) منتشر گردیده است. از بین این روشها پس از بررسی بسیار، مناسب ترین روشی را که اجرای آن با امکانات موجود در آزمایشگاه میسر بود، انتخاب نموده (۲۵) و با انجام تغییراتی جهت اندازه گیری استامینوفن در پلاسما مورد استفاده قرار گرفت.

شرایط دستگاه HPLC و روش آزمایش

در دستگاه HPLC از شرایط زیر استفاده گردید:

ستون بکار رفته از نوع فاز معکوس μ Bondapak- C18 به طول ۳۰ سانتی متر، دتکتور ماورا بنفش - مریی با طول موج ۲۵۰ نانومتر، فاز متحرك مورد استفاده مخلوطی از متانول، استونیتریل و محلول یك در هزار اسید استیك در آب به نسبت (۶۰: ۱: ۳۹)، سرعت جریان فاز متحرك ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه، درجه حرارت اطاق، سرعت حرکت کاغذ ۰/۵ سانتی متر در دقیقه. در این روش از یك میلی لیتر پلاسما و یك میلی لیتر محلول ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر تئوفیلین (به عنوان استاندارد داخلی) در اتانول ۹۵٪ استفاده گردید. دو میلی لیتر اتیل استات به مخلوط فوق افزوده و پس از ورتکس و سانتریفوژ از لایه فوقانی ۱۰ میکرولیتر به داخل ستون دستگاه HPLC تزریق گردید. دقت روش نیز مورد ارزیابی مجدد قرار گرفت.

ارزیابی روش و رسم منحنی استاندارد HPLC

برای رسم منحنی استاندارد از غلظت های ۵، ۱۰، ۱۲، ۱۸، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر استامینوفن در پلاسما استفاده گردید.

ارزیابی دقت روش

دقت روش براساس ارزیابی تغییرات درون روزی با استفاده از غلظت های ۱۰، ۱۸ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر استامینوفن در پلاسما انجام شد. برای بررسی تغییرات بین روزی از غلظت های ۵، ۱۰، ۱۲، ۱۸، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم درمیلی لیتر استامینوفن در پلاسما استفاده گردید. در هر مورد شش نمونه متفاوت تهیه نموده و پس از آماده سازی نمونه به دستگاه HPLC تزریق شد و با کمك منحنی استاندارد غلظت هر نمونه محاسبه گردید.

برای ارزیابی صحت روش، از میزان بازیابی دارو در پلاسما نسبت به آب استفاده گردید. در این بررسی نیز از سه غلظت ۱۰، ۱۸، ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر استامینوفن در پلاسما و آب استفاده گردید.

تعیین مقدار استامینوفن نمونه های استاندارد با دو روش فوق

تعدادی نمونه های استامینوفن در پلاسما با غلظت های مشخص بین ۵۰ تا ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه گردید. میزان استامینوفن در این نمونه ها هر کدام با استفاده از دو روش مختلف ، روش اسپکتروفتومتری مریی موردنظر و روش HPLC آزمایش شده در فوق ، تعیین و مقایسه گردید.

تعیین مقدار استامینوفن در پلاسمای افراد داوطلب با دو روش فوق

به منظور ایجاد غلظت های مختلف استامینوفن در پلاسمای افراد سالم و تعیین مقادیر آنها با روش های ذکر شده به دوازده

www.SID.ir

Archive of SID

فرد داوطلب سالم درحالت ناشتا بین ۳ تا ۵ قرص استامینوفن ۳۲۵ میلی گرمی در یك نوبت تجویز گردید. یك ساعت قبل از تجویز دارو و یك ساعت پس از تجویز دارو از داوطلبان نمونه گیری خون به عمل آمد. میزان استامینوفن در پلاسمای افراد داوطلب با دو روش مختلف مورد بررسی یعنی روش اسپکتروفتومتری مریی و روش HPLC، مورد سنجش قرارگرفت.

بررسی آماری نتایج

نتایج ۲۳ نمونه پلاسمایی استاندارد و ۱۲ نمونه خونی داوطلبین اندازه گیری شده با دو روش مختلف اسپکتروفتومتری مریی و HPLC با استفاده از روش آماری ناپارامتری مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

تعیین مقدار به روش اسپکتروفتومتری مریی

نمونه ها مطابق روش ذکر شده در قسمت روش کار آماده شده و جذب آنها اندازه گیری گردید. برای اطمینان از صحت و دقت روش تغییرات درون روزی و بین روزی مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی خطی بودن روش

با استفاده از روش حداقل مربعات، خطی بودن رابطه بین جذب و غلظت استامینوفن در پلاسما مورد ارزیابی قرار گرفت. برای محدوده غلظتی بین ۱۰ تا ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استامینوفن در پلاسما، ضریب همبستگی برابر r^2= ۰/۹۹۹۶، شیب خطی برابر $۲/۰۷ \times ۱۰^{-۳}$ و عرض از مبدا برابر $-۶/۴۹ \times ۱۰^{-۳}$ به دست آمد. منحنی استاندارد در شکل ۱ نمایش داده شده است

بررسی تغییرات درون روزی

برای بررسی تغییرات درون روزی از چهار غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استامینوفن در پلاسما استفاده گردید. نتایج شش بار تکرار هر یك از نمونه های فوق در یك روز در جدول ۱ ذکر گردیده است.

بررسی تغییرات بین روزی

در بررسی تغییرات بین روزی از شش غلظت مختلف ۱۰ تا ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استامینوفن در پلاسما استفاده گردید. نتایج شش بار تکرار هر یك از نمونه ها ی فوق در روزهای مختلف در جدول ۲ ذکر گردیده است.

بررسی میزان بازیابی روش اسپکتروفتومتری مریی

میزان بازیابی روش با اندازه گیری نسبت دارو در پلاسما و آب انجام شد. در این بررسی از چهار غلظت از ۵۰ تا ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استامینوفن در پلاسما استفاده گردید. نتایج در جدول ۳ آمده است.

بررسی تداخل داروها با روش اسپکتروفتومتری مریی

برای بررسی تداخل داروها از ۸۴ داروی موجود استفاده گردید. این داروها بدون حضور استامینوفن در محیط و با حضور استامینوفن در محیط مورد بررسی قرار گرفتند (جدول۴). نتایج نشان داد که از ۸۴ داروی آزمایش شده تنها ۸ داروی ریفامپین، اریترومایسین، سولفات آهن، پرومتازین، داکسی سایکلین ، نیکلوزامید، سولفاسالازین و تتراسایکلین در هنگام حضور و یا عدم حضور استامینوفن در پلاسما، بر اندازه گیری استامینوفن در پلاسما تاثیر گذاشته و موجب تغییر شدت رنگ به میزان ۵ تا ۲۰٪ می گردند. سایر داروها تاثیری برروی میزان اندازه گیری نداشتند.

تعیین مقدار به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

در این آزمایشات نمونه ها براساس روش کار آماده و منحنی استاندارد درمحدوده غلظتی ۵ الی ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر استامینوفن در پلاسما رسم گردید. برای منحنی استاندارد ضریب همبستگی برابرr^2= ۰/۹۹۶۶ شیب خطی برابر ۰/۰۶۲۵ و عرض از مبدا برابر ۰/۰۲۴۴ به دست آمد.

به منظور بررسی تکرار پذیری سیستم و روش آنالیز، تغییرات درون روزی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز نمونه ها نشان داد که ضریب تغییرات برای سه غلظت ۱۰، ۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱ : بررسی تغییرات درون روزی تعیین غلظت استامینوفن در پلاسما بروش اسپکتروفتومتری مریی

تعداد نمونه ها	*غلظت استاندارد(µg/ml)	میانگین غلظت اندازه گیری شده (µg/ml)	SD	%CV
۱	۵۰	٤٤/۹۹	۱/۲۱	۲/۷
۲	۱۰۰	۹۳/۵۸	۲/۳۵	۲/۵
۳	۲۰۰	۲۰۳/۵۸	۳/۰۸	۱/۵
٤	۳۰۰	۳۱۱/٤۳	٤/٤۱	۱/٤

* میانگین شش نمونه اندازه گیری شده مختلف

جدول ۲ : بررسی تغییرات بین روزی در تعیین غلظت استامینوفن در پلاسما بروش اسپکتروفتومتری مریی

تعداد نمونه ها	*غلظت استاندارد(µg/ml)	میانگین غلظت اندازه گیری شده(µg/ml)	SD	%CV
۱	۱۰	۱۰/۵۸	۰/۰٤	۰/۳۷
۲	۳۰	۲۹/۷۲	۱/۱٤	۳/۸٤
۳	۵۰	٤۷/۱۵	۱/۷۰	۳/٦۱
٤	۱۰۰	۹۵/۵٦	۱/۷۵	۱/۸۳
۵	۲۰۰	۲۰۷/٦۳	۲/٦۲	۱/۲٦
٦	۳۰۰	۳۱٤/۳٤	۵/۳۹	۱/۷۱
۷	٤۰۰	٤۰۲/۱۱	٦/٤۹	۱/٦۱
۸	۵۰۰	٤۹۹/۷۹	۳/۹۸	۰/۸۰
۹	٦۰۰	٦۰۳/۷۵	۳/٦۲	۰/٦۰

* میانگین شش نمونه اندازه گیری شده مختلف

جدول ۳ : بررسی میزان بازیابی استامینوفن در روش اسپکتروفتومتری مریی

تعداد نمونه ها	*غلظت استاندارد (µg/ml)	*میانگین غلظت اندازه گیری شده (µg/ml)		درصد بازیابی آب/پلاسما
		در آب	در پلاسما	
۱	۵۰	٤٦/۱۰ ± ۲/۱۰	٤٤/٦٦ ±۲/۱٦	۹٦/۸۸
۲	۱۰۰	۹۵/۱۱ ± ۳/۰٤	۹۳/۳۸ ± ۱/۳۱	۹۸/۱۸
۳	۲۰۰	۲۰۸/۵۰ ± ٦/٤۳	۲۰۵/۲٦ ± ۰/۸۸	۹۸/٤٤
٤	۳۰۰	۳۱۸/۲۳ ± ۱۱/٦۷	۳۱۵/٦۸ ± ۱/۸٦	۹۹/۲۰
Mean±SD %CV				۹۸/۱۷ ± ۰/۹۷ ۰/۹۸

*میانگین پنج نمونه اندازه گیری شده مختلف

جدول ٤ : لیست داروهای آزمایش شده که تداخلی با روش اندازه گیری استامینوفن نشان نداده اند .

آلوپورینول	دیازپام	ایزونیازید	پنی سیلین پروکائین
آلومینیوم هیدروکسید	دیگوکسین	ایزوسورباید	پروپرانولول
آمینوفیلین	دیفن هیدرامین	کانامایسین	پزودوافدرین
آمی تریپتیلین	دیفنوکسیلات	لوامیزول	رزرپین
آموکسی سیلین	اتامبوتول	لیتیوم کربنات	سالبوتامول
آمپی سیلین	اتینیل استرادیول	مبندازول	استرپتومایسین
آتروپین سولفات	اتوسوکسماید	مدروکسی پروژسترون	تئوفیلین
پنی سیلین بنزاتین	فلوفنازین	مت فورمین	تیوریدازین
بی پریدین	فولیک اسید	متیل دوپا	تری فلوپرازین
کاربامازپین	فروزماید	متوکلوپرامید	وراپامیل
کاربنی سیلین	جنتامایسین	مترونیدازول	ویتامین A
کلرامفنیکول	گریزوفلووین	نئوستیگمین	ویتامین B_1
کلرپرومازین	هالوپریدول	نیفیدیپین	ویتامین B_6
کلروکین	هپارین	نیتروفورانتوئین	ویتامین C
سایمتیدین	هیدروکلرتیازید	اکسی توسین	ویتامین D
کلومیفن سیترات	هیدروکورتیزون	فنوباربیتال	وارفارین
کلوگزاسیلین	هیوسین	فنی توئین	
کدیین فسفات	ایبوپروفن	پرازوسین	
دگزامتازون	ایندومتاسین	پردنیزولون	

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵: مقایسه میانگین غلظت استامینوفن بدست آمده از اندازه گیری نمونه های استاندارد مختلف استامینوفن در پلاسما به دو روش مختلف اسپکتروفتومتری مریی و HPLC

تعداد نمونه ها	غلظت استاندارد (µg/ml)	*میانگین غلظت اندازه گیری شده (µg/ml) به روش HPLC	*میانگین غلظت اندازه گیری شده (µg/ml) به روش اسپکتروسکوپی مریی
۱	۵۰	۵۱/۲۲	٤٦/۲۲
۲	۷۵	۷۵/۵۱	۷۵/۵۰
۲	۱۰۰	۹٦/۷۵	۹۲/۷۷
٤	۱۲۵	۱۳۷/۵۲	۱۲۵/۰٦
۵	۱۵۰	۱٤۹/۹۹	۱۵۷/۸۳
٦	۱۷۵	۱۸٤/٦٤	۱۷٤/۲۹
۷	۲۰۰	۱۹۷/۷۲	۲۰٦/۱۰
۸	۲۲۵	۲۳۵/۲۵	۲۲٤/۹۸
۹	۲۵۰	۲٤۸/۵۰	۲۵٦/۱٤
۱۰	۲۷۵	۲٦۲/۱۷	۲۷۵/۱۹
۱۱	۳۰۰	۲۹۹/۰۸	۳۰۲/٤۷
۱۲	۳۲۵	۳۳۵/۸٤	۳۲۵/۰۷
۱۳	۳۵۰	۳٤۸/۹۳	۳۵٤/٦۱
۱٤	۳۷۵	۳۷۱/۹۳	۳۷۵/۲۸
۱۵	٤۰۰	۳۹۹/۱۱	۳۹۳/۳٦
۱٦	٤۲۵	٤۲۳/۹۳	٤۲٤/۸٤
۱۷	٤۵۰	٤٤۸/۸۲	٤٤۸/۲۵
۱۸	٤۷۵	٤٦٦/۳۷	٤۷۵/۳۷
۱۹	۵۰۰	۵۰۱/۹۵	٤۹۳/٦۱
۲۰	۵۲۵	۵۲٤/۲۷	۵۲۵/٤۱
۲۱	۵۵۰	۵۵٤/۵۹	۵٤۸/۳۳
۲۲	۵۷۵	۵۸۵/۸۸	۵۷۵/۱٤
۲۳	٦۰۰	٦۱۱/۷۹	۵۹۸/۵٤

* میانگین سه اندازه گیری مختلف

و ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بین ۰/۷۳ تا ۱/۶۲ ٪ قرار داشت.برای بررسی تغییرات بین روزی از شش غلظت مختلف ۵ الی ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر استامینوفن در پلاسما استفاده گردید. نتایج آنالیز این نمونه ها نشان داد که ضریب تغییرات بین ۰/۵۱٪ تا ۲/۱۴٪ قرار داشت. میزان بازیابی روش با اندازه گیری نسبت غلظت استامینوفن در پلاسما به آب در سه غلظت از استامینوفن معادل ۰/۹۷ ± ۹۸/۱۷ بود.

تعیین مقدار استامینوفن در پلاسما درنمونه های استاندارد با دو روش فوق

پس از اطمینان از دقت و صحت دوروش اسپکتروفتومتری مریی و HPLC، تعداد ۲۳ نمونه پلاسما حاوی مقادیر معینی استامینوفن (بین ۵۰ تا ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) با دو روش فوق اندازه گیری شد. نتایج در جدول ۵ ذکر گردیده است.

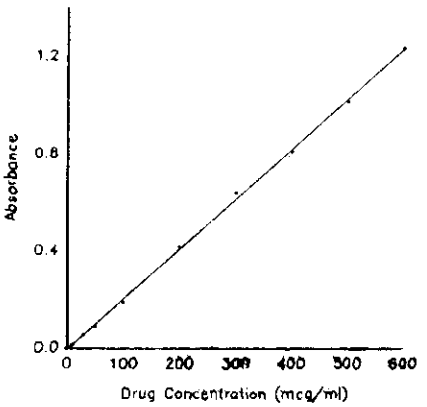
نتایج به دست آمده از آنالیز ۲۳ نمونه حاوی استامینوفن در پلاسما به دو روش اسپکتروفتومتری مریی و HPLC ازنظر آماری مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شد که اختلاف معنی داری بین نتایج حاصل از دو روش فوق وجود ندارد.

نتایج تعیین مقدار استامینوفن در پلاسما در نمونه های پلاسمایی افراد داوطلب سالم

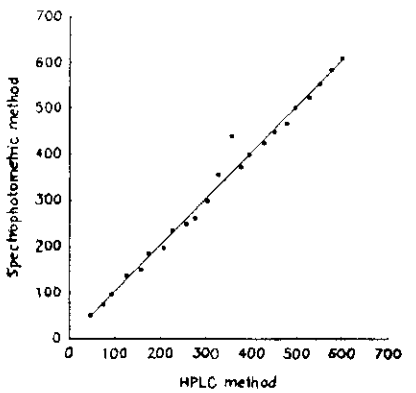
برای مقایسه بیشتر این دو روش با یکدیگر و از طرفی برای اطمینان از اینکه روش اسپکتروفتومتری مورد بحث قادربه تشخیص غلظت های مورد نظر.پس از تجویز استامینوفن می باشد، نمونه های خونی مربوط به ۱۲ داوطلب سالم پس از

www.SID.ir

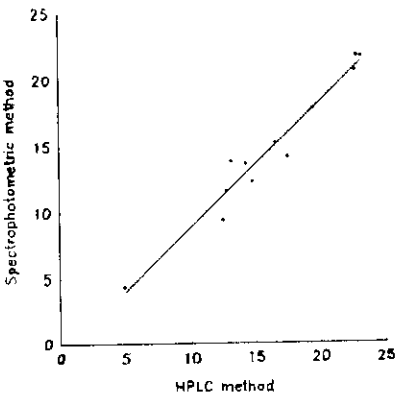
Archive of SID



شکل ۱: منحنی استاندارد استامینوفن در پلاسما به روش اسپکتروفتومتری مریی



شکل۲: مقایسه بین آنالیز بیست و سه نمونه پلاسمایی استاندارد استامینوفن با دو روش اسپکتروفتومتری مریی و HPLC



شکل ۳: مقایسه بین آنالیز دوازده نمونه پلاسمایی استامینوفن در افراد سالم با دو روش اسپکتروفتومتری مریی و HPLC

جدول ٦ : مقایسه میانگین غلظت استامینوفن بدست آمده از اندازه گیری استامینوفن در نمونه های پلاسمایی داوطلبان مختلف به دو روش مختلف اسپکتروفتومتری مریی و HPLC

تعداد نمونه ها	*میانگین غلظت اندازه گیری شده (µg/ml) به روش HPLC	*میانگین غلظت اندازه گیری شده (µg/ml) به روش اسپکتوسکپی مریی
۱	۱۵/۲۷	۱٦/۵۷
۲	۱۷/۸۵	۱۹/٤۸
۳	۱۳/۷۰	۱٤/۳۱
٤	٤/۳۹	٤/۹۵
۵	۱٤/۲۰	۱۷/٤۸
٦	۹/٤٤	۱۲/۵٤
۷	۱۳/۸۵	۱۳/۱۸
۸	۱۱/٦۳	۱۲/۸٦
۹	۲۱/۸۲	۲۲/۸۷
۱۰	۱۲/۳۳	۱٤/۸۰
۱۱	۲۰/٦۸	۲۲/۷۱
۱۲	۲۱/۷٤	۲۳/۱۹

*میانگین سه اندازه گیری مختلف

تجویز ۳ تا ۵ قرص استامینوفن با هر دو روش مورد سنجش قرار گرفت نتایج در جدول ۶ ذکر گردیده است. بررسی آماری به دست آمده از مقایسه نتایج دو روش نشان داد که باز هم اختلاف معنی داری در نتایج به دست آمده از دو روش مشاهده نمی شود.

بحث

استامینوفن دارویی پرمصرف است که در دوزهای بالا توسط پزشکان و یا به صورت خود درمانی مورد استفاده قرار می گیرد. باتوجه به اینکه این دارو سریعا از راه خوراکی جذب می شود در دوزهای بالا منجر به مسمومیت و آسیب کبدی می گردد. تعیین غلظت استامینوفن در پلاسما نشان دهنده وضعیت بیمار مسموم بوده و می تواند کمك به درمان آن باشد. برای اندازه گیری غلظت استامینوفن در پلاسما یك روش اسپکتروفتومتری مریی ارائه شده که با تعدیل در روشهای منتشر شده قبلی، منجر به ارائه روشی ساده، ارزان و قابل انجام در اکثر آزمایشگاههای بالینی می باشد. دراین پژوهش حجم پلاسمای مورداستفاده برای اندازه گیری استامینوفن بسیار

www.SID.ir

Archive of SID

ناچیز و حدود ۲۰۰ میکرولیتر است و زمان لازم بـرای آمـاده نمودن نمونه کمتر از یك ساعت می باشد.

در طـی آمـاده شـدن نمونـه پـس از رسـوب پروتئین های پلاسما و جداسازی استامینوفن توسط حلال اتیـل استات از سایر مواد آندوژن ، استامینوفن موجـود در نمونـه در محیط اسیدی و حرارت هیدرولیز گردیده و بـه پـاراآمینو فنـل تبدیل می شود. به پـاراآمینوفنل تولیـدی مقـدار کـافی معـرف رنگی افزوده تا کمپلکس آبی رنگی ایجاد شود.

بررسی دقت روش (تغییرات درون روزی و بـین روزی) و تعیـین مـیزان بازیـابی روش هـا نشـان داد کـه روش اسپکتروفتومتری مریـی ارائـه شـده از دقـت و صحـت خـوبی برخوردار است. نکته مهم دیگری که درمورد ایـن روش قـابل ذکر است، انتخابی بـودن آن اسـت . تداخـل ایـن روش بـا ۸۴ داروی مختلف مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شـد کـه از ۸۴ داروی آزمایش شده فقط هشت مورد تداخـل وجـود دارد. نتایج به دست آمده از این روش، با روش HPLC که روشـی حساس، دقیق و قـابل اطمینـان اسـت، مقایسـه گردیـد. آنـالیز دوسری نمونه های مختلف که مربـوط بـه ۲۳ نمونـه اسـتاندارد حاوی استامینوفن در پلاسما و ۱۲ نمونه مربوط به داوطلبانی که ۳ تا ۵ قرص ۳۲۵ میلی گرمی استامینوفن به آنها تجویـز شـده بود، نشان داد که نتایج اندازه گیری نمونه ها با دو روش مختلف موردبحث تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. بـرای مقایسـه دقیق تر نتایج به دسـت آمـده از ایـن دو روش، هـر گـروه از نتایج، یعنی نتایج مربوط به ۲۳ نمونه استاندارد اسـتامینوفن در پلاسما و نتایج مربوط به ۱۲ نمونه مربوطه به داوطلبـان، بطـور جداگانه بصورت منحنی رسم گردیدنـد (شـکل ۲و۳). ضریـب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو روش برای نتـایج بـالا به ترتیب r^2= ۰/۹۹۳۵ وr^2 =۰/۹۷۸۰ بودند که نشان دهنده نزدیکی هرچه بیشتر این نتایج به یکدیگر می باشد. باتوجه بـه آزمایشـات انجـام شـده مـی تـوان گفـت کـه روش اسپکتروفتومتری مریی ارائه شده روشـی سـاده، آسـان، ارزان وقابل انجام در تقریبـا همـه آزمایشـگاههای بـالینی در شـهر و روستا با نتایج قابل اعتماد می باشد. بدین ترتیب از ایـن روش ساده می توان در تعیین غلظت اسـتامینوفن در مـوارد مختلـف، بالاخص در موارد مربوط بـه مسـمومیت بـا اسـتامینوفن کـه غلظت خونی آن به اندازه کافی بالا مـی باشـد اسـتفاده نمـوده و بدینوسیله به درمان این بیماران کمك نمود.

References

1. Bramwell H., Cass A. E., Gibbs P. N., Green M. J., 1990, Method for determining paracetamol in whole blood by chronoamperometry following enzymatic hydrolysis, Analyst, 115 (2):185-188.
2. Bridges R. R., Kinniburgh D. W., Keehn B. J., Jennison T. A., 1983, An evaluation of common methods for acetaminophen quantitation for small hospital, Clinical Toxicolgy, 20:1-17.
3. Buttery J. E., Braitta E. A., pannall P.R., 1982, Plasma acetaminophen results are method dependent, J. Toxicol. Clin. Toxicol., 19:1117-1122.
4. Chatterjee P. K., Jain C. L., Seth P. D., 1989, Simultaneous determination of chorzoxazone and acetaminophen in combined dosage forms by an absorbance ratio technique and difference Spectrophotmetry, J. Pharm. Biomed. Anal., 7: 693-698.
5. Colin P., Sirois G., Chakrabarti S., 1987, Rapid high performance liquid chromatographic assay of acetaminophen in serum and tissue homogenates, J. Chromatography, 413: 151-160.
6. Dingeon B., Charvin M. A., Quenard Mt., Thome H., 1988, Multiwavelength analyses of Second derivative Spectra for rapid determination of acetaminophen in serum, Clin. Chem., 34(6):1119-1121.
7. Fan G. P., Lu L. F., Fang Y., Cheng J., 1990, Determination of paracetamol and vitamin C in vitamin C by dual wavelength UV spectrophotometry,Chin. J. Hosp. Pharm., 10: 169-171.
8. Frings C. S., Saloom J. M., 1979, Colorimetric method for the quantitation of acetaminophen in serum, Clin. Toxicol., 15:67-73.
9. Garland W. A., Hsiao K. C. *et al.*, 1977, J. Pharm. Sci., 66(3): 340-344.
10. Jones A. F., McAleer J. F. *et al.*, 1990, Rapid sideroom test for paracetamol, The Lancet, 31:794.
11. Kalatzis E. and Zarbi I., 1976, J. Pharm. Sci., 65(1):71-75.
12. Kamali F., Herd B., 1990; Liquid- liquid extraction and analysis of paracetamol (acetaminophen) and its major metabolites in biological fluids by reversed phase ion pair chromatography, (letter), J. Chromatogr., 530 (1): 222-225
13. Marks V., Therapeutic drug monitoring, in: Clarke E.G. (ed), Isolation and Identification of Drugs, The Pharmaceutical Press, London, 1986, 101-110.
14. Miccll J. N., Aravind M. K., and Alan K. Done, 1979, A rapid, simple acetaminophen spectrophotometric determination, Pediatrics, 63(4): 609-611.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Patel H. V., Morton D. J., Specificity of a calorimetric paracetamol assay technique for use in casses of overdose, J. of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 13: 233-238.
16. Prescott L. F., 1976, Gas liquid chromatographic estimation of phenacetin and paracetamol (acetaminophen) in plasma and urine, J. Pharm. Pharmacol., 23: 111-115.
17. Pual W. Hale, Jr. and Aphonse poklis, 1983, Evalution of a modified serum, J. Analytical Toxicology, vol.7.
18. Rona K., Foldes K., Gachalyi B., 1990, Determination of paracetamol in urine by liquid chromatography, Acta. Pharm. Hung, 60(4):156-161.
19. Sanchez Sanchez E., Evora Garcia C. M., 1989, Titration of paracetamol in urine by enzymatic hydrolysis HPLC, Cienc. Ind. Farm., 8:56-59.
20. Scott D. O., Serensen L. R., Lunte C. E., 1990, In vivo micro dialysis sampling coupled to liquid chromatography for the study of acetaminophen metabolism, J. Chromatogr., 506: 461-469.
21. Tebbett R., Omile C. I.. and Danesh B., 1985, Determination of paracetamol, salicylic acid, acetyl salicylic acid in serum by high performance liquid chromatography, J. Chromatogr., 329:196-198.
22. Tsan- Zon Liu and Kris H. Oka, 1980, Spectrophotometric screening method for acetaminophen in serum and plasma, Clin. Chem., 26(1):69-71.
23. Uges D. R. A, Blemhof H. and Christensen J. E K., 1981, An HPLC method for the determination of salicylic acid, phenacetin and paracetamol in serum, with indications, two Case-reports of intoxication, Pharmaceutisch Weekbladd Scientific Edition, 3:211.
24. Welch R. H. Conney A.H., 1965, A simple method for the quantitative determination of N-acetyl- p- amino phenol (APAP) in urine, Clin. Chem., 11: 1064-1067.
25. West J.C., 1981, Rapid HPLC analysis of paracetamol (acetaminophen) in blood and postmortem viscera, J. Analytical Toxicoloy, Vol. 5.
26. Wilson I. D., Nicholson J. K, 1988, Solid phase extraction chromatography and NMR spectroscopy for the rapid identification of drug metabolites in urine, J. Pharm. Biomed. Anal., 6:151-165.

www.SID.ir