Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۵، شماره ۱، بهار و تابستان ۸۰

ارزیابی دو روش رنگ سنجی استامینوفن در اورمی

مهدی صائب، جواد ساجدیان فرد

دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده دامپزشکی، بخش بیوشیمی و فارماکولوژی

چکیده

استفاده از استامینوفن به عنوان مسکن، تب بر و یک جانشین مناسب جهت آسپیرین در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. به هر حال مصرف بالای استامینوفن ایجاد مسمومیت کبدی و نارسایی کلیوی را در پی دارد. بدین لحاظ استفاده از یک روش مناسب، بدون تداخل جهت اندازه‌گیری استامینوفن سرم الزامی می‌باشد. روش‌های اسپکتروفتومتری مختلفی برای اندازه‌گیری استامینوفن ابداع شده است. دو تا از روش‌های متداول Chafetz & Walberg و ایندوفنل می‌باشند. جهت ارزیابی دو روش، میزان بازیافت غلظت‌های مختلف استامینوفن از ۲۰۰-۲۰ میلی‌گرم / لیتر در حضور و عدم حضور اوره و کراتی‌نین و همچنین در سرم طبیعی و اورمیک مطالعه گردید. متوسط میزان بازیافت استامینوفن در نمونه بدون اوره و کراتینین ۷۹٪ و در نمونه حاوی اوره و کراتینین ۸۶٪ می‌باشد که تفاضل ۷٪ نتیجه تداخل اوره و کراتینین در روش C&W می‌باشد. این تفاضل از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (P = ۰/۰۰۵ ، t = ۳/۲٤). میزان بازیافت استامینوفن در سرم طبیعی و سرم اورمی با روش C&W به ترتیب ۷۲٪ و ۸۶٪ می‌باشد که تفاضل ۱٤٪ آن نشان‌گر تداخل اوره و کراتینین و ترکیبات فنولیک در روش اندازه‌گیری بوده که از لحاظ آماری نیز معنی‌دار می‌باشد (P = ۰/۰۰۰۱، t=۵/٦۷)، میزان بازیافت استامینوفن در روش ایندوفنل در حضور اوره و کراتینین و بدون حضور اوره و کراتینین و همچنین در سرم طبیعی و سرم اورمیک حدود ۸۹٪ بوده که از لحاظ آماری نیز معنی‌دار نمی‌باشد. بدین معنی که اورمی و یا حضور اوره و کراتینین تأثیر و تداخلی در اندازه‌گیری استامینوفن به وجود نمی‌آورد. نتایج حاصل از ضریب تغییرات دو روش اندازه‌گیری در دو غلظت نمونه سرمی استامینوفن (٤۰ میلی‌گرم / لیتر و ۱۰۰ میلی‌گرم / لیتر) در مجموع نشان می‌دهد که دقت روش ایندوفنل در اندازه‌گیری استامینوفن بیشتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : استامینوفن، مسمومیت کبدی، نارسایی کلیوی، اسپکتروفتومتری، سنجش دارو.

مقدمه

استامینوفن (پاراستامول، N- استیل پارا آمینوفنل) به عنوان، یک داروی مسکن و تب‌بر در بیش از ۵۰ نام تجارتی و ۲۰۰ ترکیب دارویی در آمریکا وجود دارد [۱ و ۱۳]. به دلیل دسترسی آسان به استامینوفن، افزایش مصرف آن به ویژه دریچه‌ها متداول می‌باشد [۱ و ٤]. همچنین مصرف بالای استامینوفن علاوه بر مسمومیت

www.SID.ir

Archive of SID

کبدی، مسمومیت کلیوی نیز ایجاد می‌نماید [٦ و ١٤]. تشخیص و درمان مسمومیت با استامینوفن بیشتر بر پایه اطلاع از غلظت سرمی دارو می‌باشد [١ و ٢]. درمان مسمومیت با استامینوفن تجویز مقادیر بالای ترکیبات سولفیدریل‌دار (N- استیل سیس تئین) و بستری شدن در بیمارستان می‌باشد که خالی از اشکال نیست [٢]. همچنین اخیراً پی برده شده است که ترکیبات آلی سولفوردار موجود در سیر و سولفات روی می‌توانند در مسمومیت کبدی استامینوفن مؤثر واقع شوند [٢٣ و ٢٦]. چنانچه غلظت استامینوفن سرم به ترتیب ٤ ساعت یا ١٢ ساعت پس ا مصرف آن به حدود ٣٠٠ میلی‌گرم / لیتر یا ٥٠ میلی‌گرم / لیتر رسیده باشد، احتمال مسمومیت کبدی وجود دارد [٢].

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری استامینوفن در سرم وجود دارد که از آن جمله می‌توان روش‌های اولترا‌ویوله [٩] و اسپکتروفتومتری رمئی [١٥]، کروماتوگرافی گاز ـ مایع [١٧] و HPLC را نام برد [٥]. علی رغم پیدایش روش‌های مختلف و حساس کروماتوگرافی جهت اندازه‌گیری استامینوفن، روش‌های اسپکتروفتومتری در بیشتر آزمایشگاه‌ها به دلیل سادگی، هزینه اقتصادی و سرعت عمل رایج می‌باشند. با توجه به اهمیت اندازه‌گیری استامینوفن در آزمایشگاه‌های بالینی و سم‌شناسی، روش اسپکتروفتومتری که بتواند سریع و حساس بوده باشد، از اهمیت و ویژگی خاصی برخوردار است. متأسفانه در روش های مختلف اسپکتروفتومتری که جهت اندازه‌گیری استامینوفن ابداع شده‌اند، به اختصاصی بودن روش کمتر توجه شده و به راحتی روش بیشتر بها داده شده است [١٠ و ١٥]. در این تحقیق دو روش متداول از روش‌های رنگ سنجی استامینوفن به ویژه در حالتی که افزایش اوره خون (اورمی) نیز مطرح بوده باشد، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد [٨، ١٦ و ٢٢]. در روش ایندوفنل، پس از خارج نمودن پروتئین‌ها، استامینوفن توسط هیدرولیز اسیدی به پارا ـ آمینوفنل تبدیل می‌شود که با فنل در مجاورت هیدروکسید آمونیوم ترکیب و رنگ آبی ایندوفنل را به وجود می‌آورد که در طول موج ٦٢٠ نانومتر حداکثر جذب نوری را دارا می‌باشد. در روش Chafetz & Walberg تحت تأثیر نیتراسیون استامینوفن توسط اسید نیتروترکیب ٢- نیترو – ٤- استامیدوفنل به وجود می‌آید که در pH قلیایی با تشکیل آنیون فنولات رنگ قهوه‌ای را تشکیل می‌دهد که دارای حداکثر جذب نوری در طول موج ٤٣٠ نانومتر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی موجود در این تحقیق از درجه خلوص بالایی برخوردار می‌باشند. جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر مرئی مدل Shimadzo model 160A اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری استامینوفن با روش C&W : مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده در این روش عبارتند از : آمونیوم سولفامات ١/٣ مول/لیتر در آب، اسید کلریدریک ٦ مول/لیتر، نیتریت سدیم ١/٤ مول/لیتر در آب (در شیشه رنگی نگهداری نموده و باید آن را تازه تهیه کرد). سود ١٢/٥ مول/لیتر در آب، تری کلرواستیک اسید ٦ مول/لیتر در آب (در شیشه قهوه‌ای در ٨-٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود). استاندارد اولیه استامینوفن (از نوع استانداردهای USP)، ١٠٠ گرم/لیتر در متانول. ٢٠٠٠ میلی‌گرم از آن را در ٢ میلی‌لیتر متانول حل و در ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. هر ماه یک بار باید آن را تهیه کرد. برای تهیه استاندارد

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰۰۰ میلی‌گرم /لیتر، ۰/۵ میلی‌لیتر (۵۰ میلی‌گرم) از استاندارد اولیه تبخیر و باقیمانده در ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل می‌شود. برای تهیه غلظت‌های مختلف استاندارد کاری، استاندارد اولیه (۱۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر) را می‌توان با آب دیونیزه طوری تهیه کرد که غلظت‌های ۳۰۰-۲۰۰ میلی‌گرم/لیتر آن به دست آید. استاندارد کاری هنگام آزمایش تهیه می‌شود.

روش : یک میلی‌لیتر نمونه (سرم بیمار، استاندارد کاری، یا سرم کنترل) را داخل لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتر ریخته و سپس ۲ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/٦ مول/لیتر به آن اضافه می‌شود. پروتئین‌ها رسوب نموده و سپس در ۳۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شود. ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی شفاف خارج و در لوله‌های جداگانه ریخته می‌شود. به هر لوله ۰/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ٦ مول/لیتر اضافه و مخلوط می‌شود با اضافه نمودن ۰/۵ میلی‌لیتر نیتریت سدیم ۱/٤ مول/لیتر و مخلوط نمودن اسید نیترو تولید می‌شود. پس از دو دقیقه با اضافه نمودن ۰/۵ میلی‌لیتر آمونیم سولفامات ۱/۳ مول/لیتر به صورت قطره قطره اسید نیترو خنثی می‌شود. پس از مخلوط کردن، بلافاصله ۰/۵ میلی‌لیتر سود ۱۲/۵ مول/لیتر اضافه و به مدت یک دقیقه ورتکس و مخلوط می‌شود. جذب نوری هر نمونه در ٤۳۰ نانومتر در مقابل شاهد اندازه‌گیری می‌شود. با مقایسه میزان جذب نوری نمونه‌های بیمار و کنترل با استانداردهای کاری می‌توان غلظت استامینوفن را تعیین کرد.

اندازه‌گیری استامینوفن با روش ایندوفنل : مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده در این روش عبارتند از : اسید کلریدریک غلیظ، فنل ۲۰ گرم/لیتر، در شیشه قهوه‌ای در حرارت آزمایشگاه به مدت دو ماه پایدار می‌باشد. هیدروکسید آمونیوم ٤ مول/لیتر، در شیشه قهوه‌ای در حرارت آزمایشگاه به مدت دو ماه پایدار می‌باشد. تری کلرواستیک اسید ۲۰۰ گرم/لیتر، در شیشه قهوه‌ای و در حرارت ۷-٤ درجه سانتی‌گراد پایدار می‌باشد. برای تهیه شاهد سرمی (سرم بلانک) نمونه‌های سرمی سالم را پس از ١٦ ساعت ذخیره با پشم شیشه صاف کرده و در بخش‌های یک میلی‌لیتری به حالت انجماد نگهداری می‌شود. استاندارد سرمی استامینوفن با رقیق کردن ۱ میلی‌لیتر استاندارد اولیه استامینوفن با ۹ میلی‌لیتر سرم بلانک تهیه گردیده و در بخش‌های یک میلی‌لیتری منجمد می‌شود. استاندارد کاری استامینوفن با رقیق کردن ۰/۲، ۰/۸، ۱/۲، ۱/٦، ۲/۲ و ۲/۵ میلی‌لیتر از استاندارد اولیه استامینوفن با سرم بلانک صورت می‌گیرد. به طوری که حجم نهایی ده میلی‌لیتر می‌باشد. غلظت نهایی استامینوفن ۲۰ تا ۲۵۰ میلی‌گرم/لیتر می‌باشد. در بخش‌های یک میلی‌لیتری به حالت انجماد نگهداری می‌شود.

روش : روش ایندوفنل در حقیقت روش تغییر یافته Frings & Sallom می‌باشد [۱۰]. یک میلی‌لیتر نمونه (سرم بیمار، استاندارد یا سرم کنترل) را در لوله آزمایش ۱۰۰×١٦ میلی‌متر ریخته پس از اضافه نمودن ۲ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک به مدت ۵ ثانیه ورتکس و مخلوط می‌شود. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰×g سانتریفوژ می‌شوند. یک میلی‌لیتر از مایع رویی شفاف را در لوله آزمایش ۱۵۰×١٦ میلی‌متر انتقال داده و سپس با ۰/٤ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۷ مول/لیتر معرف رنگ‌زا و مخلوط نمودن، بعد از ۱۵ دقیقه جذب نوری هر لوله در طول موج ٦۲۰ نانومتر در مقابل سرم بلانک قرائت می‌شود.

تهیه سرم ذخیره‌ای : از دو سری سرم ۸۵ تایی اورمی و طبیعی با توجه به میزان کراتینین و ازت اوره آنها ۹ عدد

www.SID.ir

Archive of SID

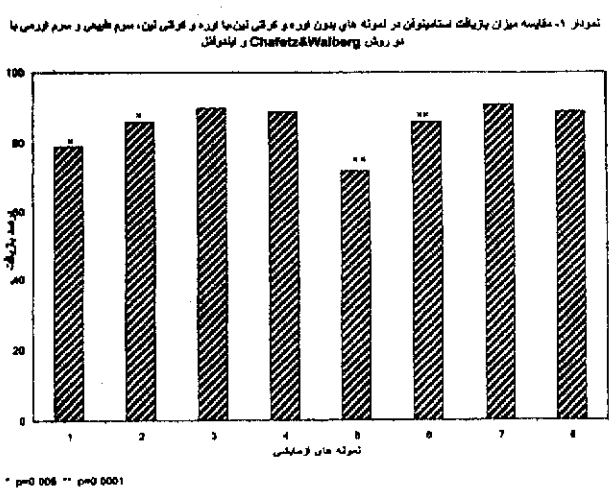
به صورت تصادفی انتخاب گردید. میزان اوره و کراتینین در نمونه‌های طبیعی و اورمی به ترتیب ۵۵ ± ۱۵۲ (Mean±SD) و ۳/۹۵±۱۱ میلی‌گرم/لیتر و ۴۹±۸۷۸ و ۵۵±۷۹ میلی‌گرم/لیتر می‌باشد. هر یک از سرم‌های اورمی و سرم‌های طبیعی را مخلوط نموده به طوریکه یک سرم ذخیره‌ای برای هر کدام تهیه می‌شود. در سرم‌های ذخیره‌ای استامینوفن غیر قابل اندازه‌گیری است. به نمونه‌های سرم اورمی و طبیعی استامینوفن به غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/لیتر اضافه می‌شود. همچنین از نمونه استامینوفن حاوی ۰/۱ گرم/لیتر کراتینین و یک گرم/لیتر اوره با همان غلظت‌های قبلی استفاده گردید. سرم‌های ذخیره‌ای در بخش‌های یک میلی‌لیتری در حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شوند. از سرم کنترل طبیعی حاوی ۴۰ میلی‌گرم/لیتر و ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر استامینوفن جهت بررسی دقت دو روش استفاده گردید.

آنالیز آماری : جهت بررسی اختلاف بین میزان بازیافت استامینوفن از آزمون میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) و آزمون آماری t-student استفاده گردید. جهت بررسی دقت دو روش اندازه‌گیری استامینوفن ضریب تغییرات (CV) به کار برده شد.

نتایج

در نمودار ۱ مقایسه میزان بازیافت استامینوفن در نمونه‌های بدون اوره و کراتینین، با اوره و کراتینین، سرم طبعی و سرم اورمی با دو روش Chafetz & Walberg و ایندوفنل نمایش داده شده است. در جدول شماره ۱ مقایسه میزان بازیافت استامینوفن نمونه حاوی اوره و کراتینین اضافی با دو روش اندازه‌گیری نشان داده شده است. متوسط درصد بازیافت استامینوفن با روش C & W در نمونه حاوی اوره و کراتینین ۷۹٪ (دامنه تغییرات ۸۵٪-۷۳٪) و با روش ایندوفنل ۹۰٪ (دامنه تغییرات ۹۵٪-۸۲٪) می‌باشد. این میزان بازیافت در نمونه بدون اوره و کراتینین به ترتیب ۸۶٪ (دامنه تغییرات ۹۲٪-۸۰٪) و ۸۹٪ (دامنه تغییرات ۹۳٪-۸۴٪) می‌باشد. در (جدول ۲) میزان استامینوفن اضافه شده به سرم طبیعی و اورمی نشان داده شده است. متوسط درصد بازیافت استامینوفن با روش C&W در سرم طبیعی ۷۲٪ (دامنه تغییرات ۸۰٪-۶۵٪) و با روش ایندوفنل ۹۱٪ (دامنه تغییرات ۹۷٪-۸۶٪) می‌باشد. این میزان بازیافت در سرم اورمی به ترتیب ۸۶٪ (دامنه تغییرات ۹۳٪-۷۶٪) و ۸۹٪ (دامنه تغییرات ۹۵٪-۸۴٪) می باشد. در (جدول ۳) بررسی میزان دقت در

نمودار ۱- مقایسه میزان بازیافت استامینوفن در نمونه‌های بدون اوره و کراتینین با اوره و کراتینین، سرم طبیعی و سرم اورمی با دو روش Chafetz & Walberg و ایندوفنل.



۱- نمونه بدون اوره و کراتینین (C&W). ۲- نمونه با اوره کراتینین (C&W). ۳- نمونه بدون اوره و کراتینین (ایندوفنل) ٤- نمونه با اوره و کراتینین (ایندوفنل). ۵- سرم طبیعی (C&W). ٦- سرم اورمی (C&W). ۷- سرم طبیعی (ایندوفنل). ۸- سرم اورمی (ایندوفنل).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مقایسه میزان بازیافت استامینوفن در نمونه حاوی اوره و کراتینین اضافی با دو روش اندازه‌گیری

فاکتور	استامینوفن اضافی میلیگرم/ لیتر	روش Chafetz & Walberg				روش ایندوفنل			
نمونه		استامینوفن قابل بازیافت میلیگرم/لیتر	Mean ± SD	درصد بازیافت	Mean ± SD	استامینوفن قابل بازیافت میلیگرم/لیتر	درصد بازیافت	Mean ± SD	
	۲۰	۱۶		۸۰		۱۶/۴	۸۲		
	۴۰	۳۱/۲		۷۸		۳۸/۴	۹۶		
	۶۰	۴۸/۶		۸۱		۵۳/۴	۸۹		
	۸۰	۶۰/۸	۸۳/۴۴	۷۶	۷۹/۱۱ *	۷۳/۶	۹۲	۹۵/۲	۹۰
بدون	۱۰۰	۸۵	±	۸۵	±	۹۳	۹۳	±	±
اوره و	۱۲۰	۸۷/۶	۴۹/۵۱	۷۳	۳/۶۹	۱۰۸	۹۰	۵۵/۱۱	۴/۵۳
کراتی‌نین	۱۵۰	۱۲۳		۸۲		۱۲۹	۸۶		NS
n=۹	۱۸۰	۱۳۶/۸		۷۶		۱۷۱	۹۵		
	۲۰۰	۱۶۲		۸۱		۱۷۴	۸۷		
	۲۰	۱۶/۲		۸۱		۱۸/۴	۹۲		
	۴۰	۳۴		۸۵		۳۳/۶	۸۴		
با اوره و	۶۰	۵۵/۲		۹۲		۵۲/۸	۸۸		
کراتی‌نین	۸۰	۶۴		۸۰	۸۶/۱۱ *	۷۴/۴	۹۳	۹۳/۵۱	۸۹
n=۹	۱۰۰	۹۰	۹۲	۹۰	±	۹۱	۹۱	±	±
	۱۲۰	۹۳/۶	±	۷۸	۵/۳۳	۱۱۰/۴	۹۲	۵۴	۳/۳۵
	۱۵۰	۱۳۳/۵	۵۶/۴	۸۹		۱۲۹	۸۶		NS
	۱۸۰	۱۶۵/۶		۹۲		۱۶۲	۹۰		
	۲۰۰	۱۷۶		۸۸		۱۷۰	۸۵		

*: p=/۰۰۵ ، t=۳/۲۴ ، معنی‌دار نمی‌باشد = NS.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مقایسه میزان بازیافت استامینوفن اضافی به سرم طبیعی و اورمی با دو روش اندازه‌گیری.

فاکتور	استامینوفن اضافی میلیگرم/لیتر	روش Chafetz & Walberg				روش ایندوفنل			
نمونه		استامینوفن قابل بازیافت میلیگرم/لیتر	Mean ± SD	درصد بازیافت	Mean ± SD	استامینوفن قابل بازیافت میلیگرم/لیتر	درصد بازیافت	Mean ± SD	
سرم طبیعی	۲۰	۱۴/۴		۷۲		۱۷/۴	۸۷		
	۴۰	۳۰/۴		۷۶		۳۷/۲	۹۳		
	۶۰	۴۰/۸		۶۸		۵۱/۶	۸۶		
	۸۰	۶۴	**	۸۰		۷۶	۹۵	۹۸	۹۱/۸۹
	۱۰۰	۷۸	۷۵/۵۱	۷۸	±	۹۷	۹۷	±	
	۱۲۰	۷۸	±	۶۵	۴۳/۷۹	۱۰۵/۶	۸۸	۵۹/۵	۴/۲
	۱۵۰	۱۰۲	۴۳/۷۹	۶۸		۱۳۵	۹۰		NS
	۱۸۰	۱۲۶		۷۰		۱۷۲/۸	۹۶		
	۲۰۰	۱۴۶		۷۳		۱۹۰	۹۵		
اورمی	۲۰	۱۵/۲		۷۶		۱۸/۲	۹۱		
	۴۰	۳۵/۲		۸۸		۳۴/۴	۸۶		
	۶۰	۵۴		۹۰		۵۰/۴	۸۴		
	۸۰	۶۷/۲	**	۸۴	۹۲/۵	۷۶	۹۵	۹۴/۴۵	۸۹/۳۳
	۱۰۰	۹۳	±	۹۳	±	۹۰	۹۰	±	
	۱۲۰	۹۶	۵۵/۴۷	۸۰	۵/۶۸	۱۰۵/۶	۸۸	۵۵/۶۳	۳/۴۱
	۱۵۰	۱۳۸		۹۲		۱۳۹/۵	۹۳		NS
	۱۸۰	۱۶۲		۹۰		۱۶۲	۹۰		
	۲۰۰	۱۷۲		۸۶		۱۷۴	۸۷		

**: $p=۰/۰۰۰۱$ ، $t=۵/۶۷$ ، معنی‌دار نمی‌باشد = NS.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- بررسی میزان دقت در اندازه‌گیری استامینوفن با دو روش C&W و ایندوفنل.

روش / فاکتور	داخل اندازه‌گیری (Within run)		روز به روز (day-to-day)	
	روش C & W	روش ایندوفنل	روش C & W	روش ایندوفنل
میانگین (میلی‌گرم / لیتر)	۳۶/۲	۳۷	۳۵/۱	۳۵/۷
SD (میلی‌گرم / لیتر)	۱/۳۸	۰/۷۲	۱/۶	۰/۸۱
CV (ضریب تغییرات)	۳/۱ **	۱/۹۴ *	۴/۵ **	۲/۳ *
کنترل ۴۰ میلی‌گرم / لیتر n=۱۳				
میانگین (میلی‌گرم / لیتر)	۸۵/۴	۹۰/۳	۸۶/۴	۸۸/۶
SD (میلی‌گرم / لیتر)	۳/۱	۲/۵۸	۴/۶۵	۳/۲۵
CV (ضریب تغییرات)	۳/۶ **	۲/۸۵ *	۵/۳۸ **	۳/۶۶ *
کنترل ۱۰۰ میلی‌گرم / لیتر n=۱۷				

ضریب تغییرات روش ایندوفنل (*) در مقایسه با روش C & W (**) پایین تر می‌باشد.

اندازه‌گیری استامینوفن با دو روش C&W و ایندوفنل نشان داده شده است. چنانکه از مقایسه ضریب تغییرات در داخل اندازه‌گیری و روز به روز برای دو غلظت سرم کنترل استامینوفن (۴۰ میلی‌گرم/لیتر و ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر) بر می‌آید، در مجموع ضریب تغییرات روش ایندوفنل کمتر از روش C&W می‌باشد.

بحث

یکی از ترکیباتی که باعث پیدایش مسمومیت کبدی می‌شود، استامینوفن می‌باشد. این دارو توسط سیستم سیتوکروم P450 میکروزومی به متابولیت سمی فعال تبدیل می‌شود که در غلظت‌های کم توسط آنزیم گلوتاتیون ـ s – ترانسفراز باگلوتاتیون ترکیب و غیر فعال می‌گردد [۱۱]. مصرف استامینوفن در دوزهای سمی باعث ناتوانی کبد در دفع متابولیت سمی می‌گردد که به دنبال آن با کاهش ذخیره گلوتاتیون کبدی و تجمع متابولیت نکروز کبد به وجود می‌آید. تشخیص اولیه مسمومیت کبدی استامینوفن از این جهت مهم می‌باشد که بتوان طی ۱۶ ساعت از مصرف استامینوفن اقدامات درمانی اولیه مانند تجویز N- استیل سیس تئین را شروع نمود. چون باعث کاهش آسیب کبدی و کاهش مرگ و میر می‌گردد [۱۹]. بنابراین اندازه‌گیری غلظت استامینوفن و سرعت کلیرانس آن راهی مفید در تشخیص و پیشگویی مسمومیت کبدی می‌باشد. با اندازه‌گیری استامینوفن نه تنها حالت افزایش مصرف آن مشخص می‌شود، بلکه با اندازه‌گیری متوالی آن می‌توان نیمه عمر دارو را نیز پیدا کرد. افزایش نیمه عمر دارو می‌تواند باعث بروز مسمومیت کبدی شود [۲۱].

امروزه روش های مختلفی اعم از اسپکتروفتومتری [۱۲ و ۱۵]، کروماتوگرافی [۱۷ و ۲۵]، آنزیم ایمونواسی برای اندازه‌گیری استامینوفن ابداع شده است [۷]. روش‌های اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری استامینوفن متعدد و متداول بوده ولی انتخاب بهترین روش اسپکتروفتومتری که در عین حال حساس و از دقت بالایی برخوردار بوده

www.SID.ir

Archive of SID

و امکان انجام آن در آزمایشگاه‌های بالینی وسم شناسی مقدور باشد، از اهمیت خاصی برخوردار است. چنانچه Wiener اشاره می‌نماید، اختصاصی بودن روش اندازه‌گیری استامینوفن در سم‌شناسی مهم بوده و از روش‌هایی که به طور غیر اختصاصی تداخل ایجاد می‌نمایند، نباید استفاده کرد [۲٤].

در تحقیق حاضر دو روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری استامینوفن مورد ارزیابی قرار گرفته است. با توجه به (جدول ۱) درصد بازیافت استامینوفن در استاندارد حاوی اوره و کراتینین توسط C&W کمتر از استاندارد بدون اوره و کراتینین می‌باشد (۳/٦۹٪±۷۹/۱۱٪ در مقابل ۵/۳۳٪±۸٦/۱۱٪). مقایسه این دو بازیافت از لحاظ آماری معنی‌دار بوده و نشان می‌دهد که حضور اوره و کراتینین مباعث کاهش میزان بازیافت استامینوفن در اندازه‌گیری آن می‌شود (P = ۰/۰۰۵ ، t = ۳/۲٤). Bailey گزارش نمود که اوره و کراتینین همراه با اسیدهای فنولیک با روش C&W تداخل می‌نمایند [۳]. میزان این تداخل در روش C&W حدود ۷٪ می‌باشد. گرچه میزان بازیافت استامینوفن در روش ایندوفنل جهت استاندارد استامینوفن حاوی اوره و کراتینین تقریباً برابر استاندارد بدون اوره و کراتینین می‌باشد (٤/۵۳٪±۹۰٪ در مقابل ۳/۳۵±۸۹٪) و این مقدار بازیافت از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد. یعنی حضور اوره و کراتینین در روش ایندوفنل تداخل ایجاد نمی‌کند.

با توجه به (جدول ۲) میزان بازیافت استامینوفن در سرم طبیعی در مقایسه با سرم اورمی کمتر می‌باشد (۷/۲۲٪±۵٪ در مقابل ۸٦/۵۵٪±٦۸٪). چنانچه Bialey گزارش کرده است، دلیل بالا بودن میزان بازیافت استامینوفن در نمونه‌های اورمیک تداخل ترکیبات فنولیک در اندازه‌گیری استامینوفن می‌باشد [۳]. میزان این تداخل در روش C&W حدود ۱٤٪ می‌باشد که از لحاظ آماری نیز معنی‌دار می‌باشد (P = ۰/۰۰۰۱ ، t = ۵/٦۷). میزان بازیافت استامینوفن در سرم‌های طبیعی و اورمیک که به روش ایندوفنل اندازه‌گیری شده‌اند، به ترتیب برابر ۹۱٪ و ۸۹٪ می‌باشد که از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده نشان دهنده عدم تداخل ترکیبات فنلی در اندازه‌گیری استامینوفن می‌باشد. بنابراین روش C&W جهت بیماران اورمی یک روش مناسب نمی‌باشد. در مطالعه حاضر سنجش استامینوفن با روش C&W نتایج مثبت کاذب به میزان ۱٤٪ را به وجود می‌آورد. چنانکه Ambro و همکاران گزارش نموده‌اند هر چند که این افزایش ممکن است ظاهراً مهم نباشد ولی در حالاتی که حدود ۱۲ ساعت از مصرف استامینوفن گذشته باشد، می‌تواند به طور کاذب نمایانگر افزایش استامینوفن سرم باشد [۲]. به علاوه این چنین یافته‌ای می‌تواند نشان دهنده یک اتیولوژی کاذب در بررسی بیماری کلیه در فرد باشد. از آنجائی که استامینوفن غیر کونژوگه ۷۵-۱٤٪ استامینوفن تام را تشکیل می‌دهد، در روش‌هایی که فقط استامینوفن غیر کونژوگه را اندازه‌گیری می‌نمایند، ریسک وجود مسمومیت کبدی در بیمار کاهش می‌یابد [۱۸]. هر چند که شکل فعال دارو شکل غیر کونژوگه می‌باشد. نومروگرام‌هایی که بر پایه آن درمان مسمومیت با استامینوفن پایه ریزی شده است بر اساس اندازه‌گیری استامینوفن تام می‌باشد ولی به هر حال چنانکه Novotny و همکاران گزارش نموده‌اند از نتایج حاصل از رنگ سنجی ایندوفنل می‌توان به عنوان یک راهنما در درمان مسمومیت با استامینوفن استاده کرد [۱٦]. به علاوه Wtewart و همکاران پیشنهاد می‌نمایند که با اندازه‌گیری استامینوفن غیر کونژوگه می‌توان وضعیت درمان مسمومیت کبدی را مشخص کرد [۲۰]. با توجه به جدول

www.SID.ir

Archive of SID

۳ میزان دقت (قابلیت تکرار) روش ایندوفنل در اندازه‌گیری استامینوفن در مقایسه با روش C&W بیشتر می‌باشد. بررسی ضریب تغییرات دو روش اندازه‌گیری در غلظت‌های ۴۰ میلی‌گرم/لیتر و ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر از سرم کنترل استامینوفن نشان دهنده دقت بیشتر روی ایندوفنل می‌باشد. این یافته همانند یافته‌هایی می‌باشد که قبلاً توسط Novtny و همکاران جهت روش ایندوفنل تغییر یافته مورد تأیید قرار گرفته است [۱۶].

به هر حال بدون هیچ دلیل اندازه‌گیری استامینوفن در هر آزمایشگاه سم‌شناسی باید جزو برنامه باشد زیرا درمان مسمومیت کبدی (مصرف N- استیل سیس تئین) بر پایه دانستن غلظت سرمی استامینوفن می‌باشد. به علاوه Frings و همکاران با مطالعه اثر تداخلی بیش از ۷۰ دارو در اندازه‌گیری استامینوفن با روش ایندوفنل نشان داده‌اند که این تداخل وجود ندارد [۱۰]. بنابراین با توجه به ارزیابی حاصل روش ایندوفنل سریع، آسان و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد و از طرفی از این روش می‌توان به عنوان یک روش اولیه اندازه‌گیری دارو استفاده کرد. مخصوصاً در حالاتی که روش‌های معمول رنگ‌سنجی استامینوفن نتایج مثبت کاذب ایجاد می‌نمایند و وضعیت بیماری کلیه فرد نیز نامشخص می‌باشد و یا حالاتی که امکان دسترسی به روش‌های حساس و پرهزینه و وقت‌گیر کروماتوگرافی (به ویژه HPLC) میسر نباشد.

تشکر و قدردانی

مقاله موجود بخشی از یافته‌های پژوهشی طرح شماره ۶۲۳-۱۰۷۶-VE-۷۷ مصوب دانشگاه شیراز می‌باشد. جا دارد که از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و همچنین معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی تشکر و قدردانی به عمل آید. از سرکار خانم ده‌بالایی که در تایپ مقاله زحمت کشیده‌اند نیز صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

[1] Ameer, B. and Greeblatt, D.J. Acetaminophen, ***Ann. Intern Med.,*** 87 (1977) 202-209.

[2] Ambre, J. and Alexander, M. Liver toxicity after acetaminophen ingestion, ***J. Am. Med. Assoc,*** 238 (1977) 500-501.

[3] Bailey, D.N. Colorimetry of serum acetaminophen (Paracetamol) in uremia, ***Clin. Chem,*** 28 (1982) 187-190.

[4] Baker, J.D. deCarle, D.J. and Anuras, S. Chronic excessive acetaminophen use and liver damage, ***Ann. Inter Med.,*** 87 (1977) 299-301.

[5] Blair, D. and Rumack, BH. Acetaminophen in serum and plasma estimated by high-pressure liquid chromatography, A micro-scale method, ***Clin Chem,*** 23 (1977) 743-745.

[6] Boyer, T.D. and Rouff, S.L. Acetaminophen-induced hepatic necrosis and renal failure, ***J. Am. Med. Assoc,*** 218 (1971) 440-441.

[7] Campbell, R.S. Proce, C.P. Experience with an homogneus immuno-assay for paracetamol (acetaminophen), ***J. Clin Chem Biochm,*** 24 (1986) 155-159.

[8] Chafetz, L. Daly, R.E. Schriftman, H. and Lomnor, J.J. Selective colorimertic determination of acetaminophen, ***J. Pharm. Sci.,*** 60 (1971) 463-466.

[9] Dingeon, B. Charvin, M.A. Quenard, M.T. and Thome, H. Multi-wave length analyses of second-derivative spectra for rapid determination of acetaminophen in serum, ***Clin. Chem.,*** 34 (1988) 1119-1121.

[10] Frings, C.S. Saloom, M. Colorimetric method

www.SID.ir

Archive of SID

for the quantitative determination of acetaminophen in serum, ***Clin. Toxicol,*** 15 (1979) 67-73.

[11] Holme, J.A. Jacobsen, D. Mechanism of paracetamol toxicity, ***Lancet,*** II (1986) 804-805.

[12] Issopoulos, P.B. A sensitsive spectrophotometric determination of acetaminophen, ***Acta Pharm-Hung,*** 62 (1992) 31-38.

[13] Koch-Weser, J. Acetaminophen, ***N. Engl. J. Med.,*** 259 (1976) 1297-1300.

[14] mcMurtry, R.J. Snodgrass, W.R. and Mitchell, J.R. Renal necrosis, gluathione depletion, and covalent binding after acetaminophen, ***Toxicol Pharmacol,*** 46 (1978) 87-100.

[15] Meola, J.M. Emergency determination of acetaminophen, ***Clin Chem,*** 24 (1978) 1642-1643.

[16] Novotny, P.E. and Elser, R.C. Indophenol method for acetaminophen serum examined, ***Clin Chem,*** 30 (1984) 884-886.

[17] Prescott, L.F. The gas-liquid chromatographic estimation of phenacetin and paracetamol in plasma and urine, ***J. Pharm Pharmacol,*** 23 (1971) 111-115.

[18] Rumack, B. Matthew, H. Acetaminophen poisoning and toxicity, ***Pediatrics,*** 55 (1975) 871-876.

[19] Smith, F.A. Therapeutic drug monitoring of theophylline, salicylater, and acetaminophen, In: ***Clinics and Laboratory Medicine,*** 1, J.B. Henry, Ed. W.B. Saunders, Philadelphia, P.A. (1980) 559-579.

[20] Stewart M.J. Adraenssens P.I. Jarvie D.R. Prescott, L.F. Inappropriate methods for emergency determination of plasma paracetamol, ***Ann. Clin Biochem,*** 16 (1979) 89-95.

[21] Tietz, N.W. ***Texbook of Clinical Chemistry,*** W.B. Saunders, Philadelphia, P.A. (1986) 1731-1732.

[22] Walberg, C.B. Determination of acetaminophen in serum, ***J. Anal Toxicol,*** 1 (1977) 79-80.

[23] Wang, E.J. Li, Y. Lin, M. Chen, L. Stein, A.P. Reuhl, K.R. Yang, C.S. Protective effects of garlic and related organosulfur componds on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice, ***Txicol Appl Pharmacol,*** 136 (1996) 146-154.

[24] Wiener, K., A review of methods for plasma paracetamol estimation, ***Ann. Clin Biochem,*** 15 (1978) 187-96.

[25] Whelpton, R. Fernandes, K. Wilkinson, K.A. Goldhill, D.R. Determination of paracetamol (acetaminophen) in blood and plasma using high performance liquid chromatography with dual electrode colorometric quantification in the redox mode, ***Biomed Chromatogr,*** 7 (1993) 90-93.

[26] Woo, P.C. Kann, S.K. Cho, C.H., Evidence for potential application of zinc as an antidote to acetaminophen induced hepatotoxicity, ***Eur. J. Pharmacol.,*** 293 (1995) 217-224.

www.SID.ir