

Saopćenje
UDK 615.214:616-074

KOLORIMETRIJSKA I UV-METODA
ZA BRZO ODREĐIVANJE FENOBARBITONA
U SERUMU*

RADOJKA NIKOLIĆ i V. JEREMIĆ-DIKLIĆ

*Institut za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta i Neuropsihijatrijska
klinika Medicinskog fakulteta, Novi Sad*

(Primljeno 22. XII 1978)

Opisane su dve metode za određivanje fenobarbitona u serumu. Kolorimetrijska metoda je jednostavna i brza metoda za određivanje fenobarbitona u krvnom serumu, ali nije pogodna za određivanje nižih koncentracija. UV-metoda je osjetljivija i pogodna za određivanje fenobarbitona u serumu osoba lečenih ovim ili drugim lekovima čiji je metabolit fenobarbiton.

Fenobarbiton je najčešće primenjivani derivat barbiturne kiseline, koji se koristi kao sedativ, hipnotik i antiepileptik. Lako je pristupačan, pa su suicidalna i akcidentalna trovanja česta. Količinu fenobarbitona u krvi važno je odrediti ne samo u slučajevima trovanja već i kod bolesnika koji su pod terapijom fenobarbitonom, posebno zbog njegovog kumulativnog delovanja.

Za određivanje fenobarbitona u krvi primenjuju se ove metode: kolorimetrijska, UV-metoda, denzitometrija hromatograma na tankom sloju, gasna hromatografija i masena spektrometrija. Kolorimetrijska i UV-metoda mogu da se primene za rutinsku analizu fenobarbitona. Rutinska analiza treba da bude brza, jednostavna i tačna.

Kolorimetrijska metoda se zasniva na osobini barbiturata da grade kompleksno jedinjenje sa Hg jonima, koji se boje difenilkarbazonom ili ditizonom (1, 2, 3). *Goldbaum* je još 1948. godine ukazao na mogućnost određivanja fenobarbitona UV-metodom (4), koja je od tada do danas modifikovana više puta (5, 6, 7 i 8). Ova metoda se zasniva na maksimal-

* Saopćeno na 3. radnom sastanku Udruženja toksikologa Jugoslavije, Kranjska Gora, svibanj 1978.

noj razlici ekstinkcija rastvora fenobarbitona pri pH 13 i pH 10,5 na talasnoj dužini 260 nm. U našem radu su upotrebljene kolorimetrijska metoda po *Baeru* (3) sa malim modifikacijama i *Godbaumova* (4) UV-metoda po modifikaciji *Jeremić* i *Nikolić* (8).

MATERIJAL I METODA RADA

1. Kolorimetrijska metoda

Količinu od 0,5 ml seruma mučkali smo sa 5 ml hloroforma u epruveti sa brušenim zatvaračem 30 sekundi, a zatim profiltrirali kroz filter »Selekta« 589' u drugu epruvetu i mučkali sa 0,5 ml 40 mg % rastvora $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ u 0,15 M fosfatnom puferu pH 8. Hloroformsku smo fazu odvajali filtriranjem i odmah prenosili 2,5 ml u kivetu u kojoj se već nalazilo 0,5 ml 0,1% hloroformskog rastvora difenilkarbazona. Kivetu smo zatvorili i ekstinkciju promućkanog hloroformskog rastvora čitali na spektrofotometru na talasnoj dužini 560 nm prema slepoj probi. Slepa proba bila je 2,5 ml hloroforma sa 0,5 ml 0,1%-tnog hloroformskog rastvora difenilkarbazona. Boja nastalog kompleksa nije dugo stabilna, pa je očitavanje ekstinkcije trebalo izvršiti u roku od 40 minuta.

2. UV-metoda

Količinu od 2 ml seruma mučkali smo sa 25 ml prethodno ispranog etilenhlorida u levku za odvajanje 5 minuta, vodeni sloj smo odbacili, a etilenhlorid mučkali sa 3 ml 0,45 N NaOH 5 minuta u levku za odvajanje. Vodeni sloj odvojili od sloja organskog rastvarača centrifugiranjem na brzini 3000 rpm u roku od 10 minuta. Jedan deo alkalnog vodenog rastvora odmah smo spektrofotometrili, a drugom smo delu dodali 30%-tni rastvor NH_4Cl do pH 10,5, pa smo i tom rastvoru određivali ekstinkciju na talasnoj dužini 260 nm. Koncentracija se izračunava na sledeći način:

$$C = \frac{\Delta E_{260} \text{ analize} \times C \text{ standarda}}{\Delta E_{260} \text{ standarda}}$$

REZULTATI I DISKUSIJA

Kolorimetrijskom metodom smo određivali tri različite koncentracije fenobarbitona u serumu, čiji su rezultati prikazani u tablici 1, zajedno sa standardnim devijacijama i srednjim vrednostima. Ova metoda je pogodna za veće koncentracije leka u serumu, jer se koristi samo 0,5 ml seruma za analizu, ali ne može da se primeni za određivanje niskih koncentracija fenobarbitona. Pri radu sa većim količinama seruma dobili smo veće rasipanje rezultata, jer se filtriranjem ne može dobro odvojiti hloroformski ekstrakt od vodene faze, kao što se to postiže sa

0,5 ml. UV-metoda je osjetljivija od kolorimetrijske i omogućuje određivanje niskih koncentracija fenobarbitona u serumu. U tablici 2. izneti su rezultati dobijeni određivanjem fenobarbitona u serumu sa poznatom količinom ovog leka.

Tablica 1.

Rezultati dobijeni određivanjem fenobarbitona u serumu kolorimetrijskom metodom

Koncentracija fenobarbitona ($\mu\text{g/ml}$)			
Pripravljena	Nađena (X)	\bar{X}	SD
20,0	18,5	18,5	1,12
	17,0		
	18,0		
	20,0		
	19,0		
50,0	48,5	48,0	0,79
	49,0		
	47,5		
	48,0		
	47,0		
100,0	98,5	99,1	0,82
	99,5		
	100,0		
	98,0		
	99,5		

Tablica 2.

Rezultati dobijeni određivanjem fenobarbitona u serumu UV-metodom (u serumu je bilo 10 $\mu\text{g/ml}$ fenobarbitona)

Nađena koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	\bar{X}	\pm	SD
9,30	9,62		0,29
9,92			
9,52			
9,92			
9,49			
10,00			
9,25			
9,27			
9,63			
9,89			

ZAKLJUČCI

Kolorimetrijska metoda je jednostavna i brza metoda za određivanje fenobarbitona u serumu. Smatramo da je ova metoda pogodna za brzo određivanje fenobarbitona u serumu kod slučajeva akutnih trovanja.

UV-metoda je osetljivija od kolorimetrijske i sledstveno tome pogodnija za određivanje niskih koncentracija fenobarbitona u serumu bolesnika, koji su pod terapijom ovim ili drugim lekom, čiji je metabolit fenobarbiton.

Literatura

1. Björling, C. O., Berggren, A., Willman-Johnson, B.: J. Pharm. Pharmacol., 11 (1959) 297.
2. Zaar, B., Grönwall, A.: Scand. J. Clin. Lab. Invest., 13 (1961) 225.
3. Baer, D. M.: Amer. J. Clin. Pathol., 44 (1965) 114.
4. Goldbaum, L. R.: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 94 (1948) 68.
5. Goldbaum, L. R.: Analyt. Chem., 24 (1952) 1604.
6. Broughton, P. M. G.: Biochem. J., 63 (1956) 207.
7. Dain, D. W., Trainer Th. D.: Clin. Chem., 16 (1970) 318.
8. Jeremić, V., Nikolić, R.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 15 (1976) 479.

Summary

COLORIMETRIC AND UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR RAPID MONITORING OF PHENOBARBITAL IN SERUM

The colorimetric method is the most simple and rapid procedure for the measurement of phenobarbital level in the serum, especially for toxicological purposes. However, it is not sensitive enough for the determination of low concentrations. The UV-spectrophotometric method is therefore considered preferable.

*Institute of Chemistry, Faculty of Science,
Medical Faculty, University Department of
Neuropsychiatry, Novi Sad*

*Received for publication
December 22, 1978.*