

Cuantificación de niveles tóxicos de acetaminofén en niños

Dr. Hugo Pérez Olguín**
Dr. Fidel Pizaña Chávez**
Dra. Janett Flores Pérez*
Dra. Patricia Escalante**
Dra. Carmen Flores Pérez*
Dr. Ismael Lares Asseff**+

Resumen

El propósito de este trabajo es desarrollar un micrométodo por cromatografía de líquidos de alta presión para cuantificar niveles tanto en rango normal como tóxico de acetaminofén en niños.

La extracción del fármaco es utilizando una mezcla isopropanol/cloroformo (5/95), tanto de las muestras de pacientes como de la validación, se evaporaron con nitrógeno e inyectaron al cromatógrafo utilizando una columna C18 y detectadas al ultravioleta a 254 nm.

Durante la validación se observó una precisión de $98 \pm 6.5\%$ y un coeficiente de variación ≤ 8.5 como indicador de exactitud. La linealidad fue de 0.9989 entre la concentración y la relación de alturas de los picos. Se analizaron las muestras de 18 pacientes con sospecha de intoxicación con acetaminofén, 2 de los cuales alcanzaron niveles potencialmente tóxicos (mayores de 100 mcg/ml), uno no presentó niveles.

La principal ventaja que ofrece el método propuesto consiste en que sólo se requieren 100 µl de plasma, además, el resultado se obtiene en un período no mayor a 25 minutos, ya que los tiempos de retención de los compuestos son menores a los 10 min. El método puede ser utilizado confiablemente para la detección de este tipo de intoxicaciones.

Palabras clave: Acetaminofén, Cromatografía, Intoxicaciones, Plasma, Urgencias

Summary

The purpose of this work was to develop a micromethod by high pressure liquid chromatographic to quantified levels as in normal as toxic range of acetaminophen in children.

The extraction of drug was carried out using isopropanol/chlorophorm (5/95), as patient as validation samples, then these were evaporated with nitrogen and injected to chromatograph equipated with C18 column and ultraviolet detector at 254 nm.

During validation phase, the preciseness was of $98 \pm 6.5\%$ and coefficient variation ≤ 8.5 as accuracy. Linearity was near to 0.9989 as rate between concentration with peak height. Samples of 18 patients under suspect of intoxication with acetaminophen were analyzed. Two patients reached potentially toxic levels (greater than 100 mcg/ml), one patient had not levels.

The principal advantage with proposed method is that only 100 µl of plasma is required to be analized, beside, time consumed for analysis is less than 25 minutes, because compounds are retained down to 10 minutes. The method is reliable as support to detect this kind of intoxications.

Key words: Acetaminophen, Chromatography, Intoxications, Plasmatic levels, Urgency

*Unidad de Farmacología clínica, Instituto Nacional de Pediatría, *Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM

** Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, **Facultad de Medicina, Universidad Juárez del Estado de Durango.

Correspondencia: juarezol@yahoo.com

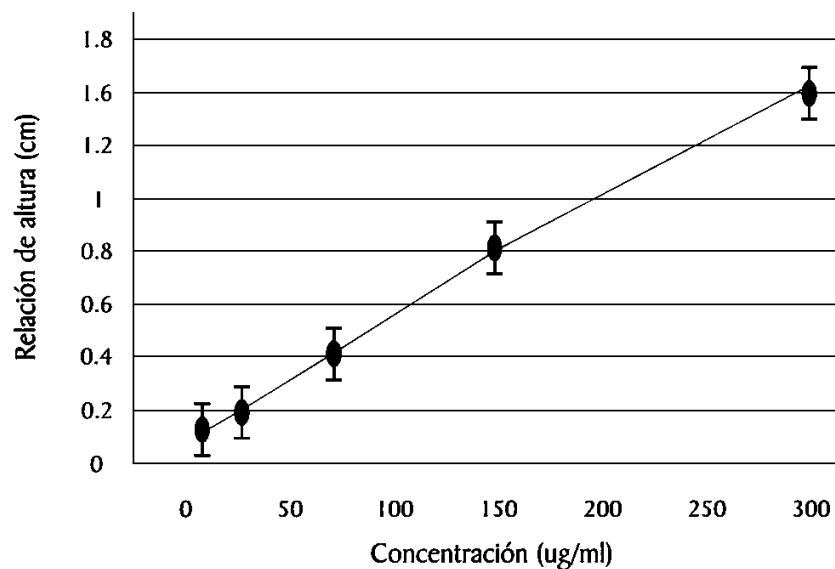
Introducción

El acetaminofén (N-acetil-p-aminofenol) es un agente analgésico-antipirético ampliamente utilizado después del ácido acetilsalicílico¹, el abuso puede ocasionar daños asociados con hepatotoxicidad frecuente², además existen reportes de que puede llegar a causar necrosis hepática como manifestación principal de su efecto deletéreo. En el caso de la nefrotoxicidad se tienen indicios en estudios hechos por Hart en 1996³. La dosis indicada en población pediátrica es de 10 a 15 mg/kg cada 4 a 6 horas. Debido a su riesgo de intoxicación se recomienda no exceder una dosis máxima diaria mayor de 60 a 65 mg/kg, ya que con ésta es probable alcanzar concentraciones elevadas^{4,5}. Así mismo, en estudios previos se han observado que los principales efectos tóxicos ocurren con mayor frecuencia en concentraciones mayores a los 300 mcg/ml, permaneciendo al menos por cuatro horas en el organismo. Es común que se

presenten situaciones de intoxicación producidas por la administración de dosis elevadas del medicamento cuando la fiebre no cede en especial en niños pequeños.

En las unidades de farmacología y toxicología es de vital importancia contar con métodos analíticos confiables que garanticen el apoyo en casos de intoxicación farmacológica. En el caso específico de las unidades pediátricas, se requiere disponer de métodos analíticos que además de las ventajas que ofrezcan ocupen volúmenes sanguíneos relativamente pequeños, sobretodo para ser utilizado en los niños de bajo peso que generalmente se intoxican por la administración continua del fármaco. Edinboro reporta un método por cromatografía y lo compara con otros métodos de laboratorio destacando las ventajas que ofrecen los métodos de cromatografía⁶. Otros autores reportan métodos en los que determinan además alguno de los metabolitos del acetaminofén, con la intención de investigar algunos efec-

Parámetros de validación de un micrométodo por CLAR para cuantificar acetaminofén en plasma.



Linealidad $r=0.9989$, coeficiente de variación ≤ 8.5 , y CMC ≥ 0.5 mcg/ml.

Figura 1.

tos adversos producidos por tales compuestos^{7,9}.

Sin embargo, los métodos cromatográficos hasta ahora utilizados tienen como inconveniente el manejar grandes volúmenes de sangre. Por tal motivo, el propósito del presente trabajo consistió en desarrollar un micrométodo para cuantificar niveles de acetaminofén para medir concentraciones tóxicas de manera confiable, y una vez validado aplicarlo en la detección y control de niveles de toxicidad en pacientes que asisten a urgencias pediátricas.

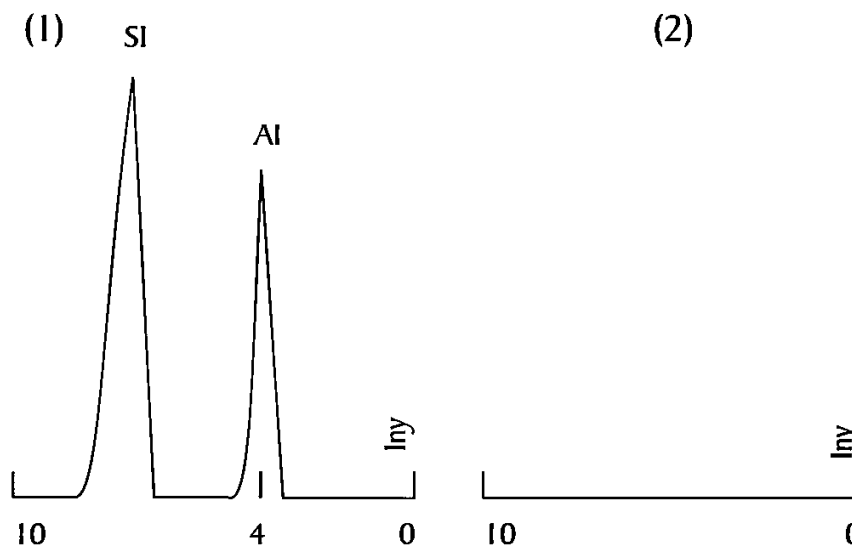
Material y Método

En el estudio se incluyeron las muestras de 18 pacientes pediátricos que acudieron al Servicio de Urgencias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, de los cuales se tenía sospecha de intoxicación por

acetaminofén. El grupo de edades fluctuaba de entre 0.04 a 17.0 años, siendo 12 del sexo masculino y 6 del femenino. Se les tomaron 0.2 ml de sangre para posteriormente centrifugarlas y almacenarlas hasta su análisis. Para procesar las muestras se utilizó un método previamente validado en nuestro laboratorio para lo cual se tomaron 100 µl de plasma con las concentraciones del acetaminofén, a una concentración fija de 100 mcg/mL de 2-hidroxibenzamida como estándar interno (SI). La extracción se realiza utilizando 5 ml de isopropanol/cloroformo (5/95 v/v), se agita en vortex durante un minuto para después centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.

Posteriormente se separa la fase orgánica y se evapora a sequedad con nitrógeno, para después reconstituir con 100 µl de fase móvil se inyectan 20 µl al sistema cromatográfico; el cual consistió de una bomba modelo 510, inyector rheodyne, detector espectrofotométrico modelo 490, y registrador 746, todos los componentes de la marca Waters

Cromatogramas típicos que corresponden a un paciente



1: Acetaminofén (A), Estándar interno (SI).

2: Especificidad, Plasma conteniendo AAS, Dipirona, N-acetilcisteína.

Figura 2.

(Milford, MA, USA). Se utilizó una columna micro-bondapak C18 de 39 x 300 mm, a un flujo de 1.5 ml/min, de la fase móvil la cual consistió de una mezcla de agua/metanol/ácido fórmico (85:15:0.15) con una longitud de onda de 254 nm. La concentración de acetaminofén se determinó mediante la relación de alturas entre SI con los picos de acetaminofén. Una vez estandarizado el método, éste fue validado llevando a cabo pruebas de linealidad, precisión, exactitud, especificidad y límites de cuantificación.

Resultados

La linealidad describió una correlación de 0.9989 entre la concentración y la respuesta obtenida dentro del rango de 5 a 300 mcg/ml. Dicho parámetro se obtuvo luego de promediar los datos de tres curvas. De los datos de esta curva promedio, es posible conocer la cantidad mínima cuantificable (CMC), trazando una paralela a una desviación estándar de la curva, luego de ese ejercicio matemático se encontró que la CMC es de 0.5 mcg/ml. Los ensayos para determinar la precisión mostraron un rango de variación de $98 \pm 6.5\%$ como promedio de los análisis efectuados por triplicado durante tres días. Como indicador de la exactitud de esas mismas muestras se obtuvo un coeficiente de variación de ≤ 8.5 . Los datos que complementan los valores de la validación del método se muestran en la figura 1.

Para la prueba de especificidad de analizaron muestras con ácido acetil salicílico, dipirona así como con la N-acetil cisteína, con el propósito de advertir de la posible interacción con la prueba principal. No se encontraron interferencias con los picos tanto de SI ni con los de acetaminofén. Los tiempos de retención obtenidos durante la fase de estandarización del método fueron de $4 \text{ min} \pm 2 \text{ seg}$ para el acetaminofén y de $6 \text{ min} \pm 30 \text{ seg} \pm 2 \text{ seg}$ para el SI.

El cromatograma típico correspondiente a la muestra de un paciente se muestra en la figura 2, igualmente se presenta la prueba de especificidad en dicho cromatograma. Respecto a las muestras de los pacientes, las concentraciones de acetaminofén fueron desde los casos en que no se encontraron niveles de fármaco (0.0 mcg/ml) hasta aquellos pacientes cuyos valores ascendieron a más de 100 mcg/ml. Se observan dos casos con niveles potencialmente tóxicos. Los datos que indican los valores del resto de los pacientes se presentan en la cuadro 1.

Varios de estos datos coinciden con el momento en que se obtuvo la muestra para medir niveles de acetaminofén.

Discusión

Las diferentes pruebas requeridas para determinar la confiabilidad del método propuesto cumplieron con los criterios establecidos, con lo cual se concluye que el método es confiable para cuantificar niveles de acetaminofén.

En el caso de la exactitud, se consideró el promedio de las determinaciones en cada punto de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, dicho promedio debería estar dentro del $\pm 15\%$ del valor de cada concentración, nuestra variación fue $\leq 8.5\%$.

Una de las principales ventajas del presente trabajo radica en que el volumen necesario para efectuar el análisis de las muestras es de 100 mcl utilizando un método de CLAR, donde varios autores han utilizado entre 300 y 500 mcl para poder efectuar dicha prueba, lo cual pudiera tener ciertos inconvenientes sobre todo cuando se trabaja con niños recién nacidos de bajo peso en quienes es inadecuado tomar volúmenes altos de sangre, quedando ello como limitante.

Una ventaja más sobre otros métodos reportados comprende el tiempo en que se obtienen los resultados. Con el presente trabajo se requiere de un tiempo que oscila entre 20 y 25 minutos debido a que los tiempos de retención de los compuestos analizados son menores a los 10 minutos, con aplicación clínica eficaz brindando la asistencia oportuna en las salas de urgencias pediátricas.

Como antes se mencionó, se analizaron las muestras enviadas a laboratorio de farmacología de aquellos pacientes quienes se sospechaba de intoxicación por acetaminofén. De los datos proporcionados por las madres de los pacientes, indicaban que ya había transcurrido un período de tiempo de entre unas horas hasta tres días en que se supone ocurrió la ingesta del medicamento. Ello hace suponer que los niveles del mismo aparentemente se encontraban en etapa de eliminación.

La mayoría de los pacientes fueron dados de alta incluso el mismo día en que se les tomó la muestra, sólo los pacientes 2 y 4 continuaron su estancia en el hospital, sin embargo, por los datos complementarios de laboratorio se consideró no necesario continuar con el monitoreo de niveles de acetaminofén, aunque tuvieran programada su cita en días posteriores.

Cuantificación de acetaminofén en muestras de plasma de niños con sospecha de intoxicación

Paciente	Sexo	Edad (años)	Peso (kg)	Concentración (mcg/ml)
1	M	0.4	1.9	5.94
2	M	0.04	2.9	153.2
3	M	2.0	10.2	10.94
4	M	0.2	2.1	122.6
5	M	0.9	2.8	31.2
6	M	1.2	6.2	2.9
7	F	0.1	8.9	5.7
8	M	0.7	3.2	0.0
9	M	2.6	14.5	1.37
10	F	1.0	10.0	4.5
11	F	2.1	12.0	7.2
12	F	2.1	11.5	46.9
13	F	1.2	6.3	17.5
14	M	3.2	18.3	9.6
15	M	1.1	15.0	15.1
16	F	1.6	6.25	9.5
17	M	17.0	48.0	8.1
18	M	1.1	12.0	2.3

Cuadro 1.

- Styrt B, Sugarman B.** Antipyresis and fever. Arch Intern Med 1990; 150: 1589-615.
- Black M.** Acetaminophen hepatotoxicity. Ann Rev Med 1984; 35: 577-91.
- Hart EG.** Acetaminophen nephrotoxicity. Toxicol and App Pharmacol 1996; 136: 162-68.
- Flanagan RJ, Meredith TJ.** Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. Am J Med 1991; 91: 131S-139S
- Lewis RK, Paloucek FP.** Assessment and treatment of acetaminophen overdose. Clin Pharm 1991; 10: 765-74.
- Edinboro LE, Jackson GF, Jortani SA, Poklis A.** Determination of serum acetaminophen in emergency toxicology: evaluation of newer methods. J Clin Toxicol 1991; 29: 241-55.
- Knox JH, Jurant J.** Determination of paracetamol and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography using reverse-phase bonded supports. J Chromatogr 1977; 142: 651-70.
- Esteban A, Graells M, Satorre J, Perez M.** Determination of paracetamol and its four major metabolites in mouse plasma by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1992; 573: 121-26.
- Lou GS, Critchley LA.** The estimation of paracetamol and its major metabolites in both plasma and urine by a single high-performance liquid chromatography assay. J Pharm Biomed Anal 1994; 12: 1563-72.