

DETERMINACION DE METHAMIDOPHOS EN SUERO SANGUINEO

Por

*Isidro J. Pérez Alvarez

**José L. Martínez Vidal

***C. Martín Rubí

INTRODUCCION

La técnica de la hemoperfusión ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de pacientes intoxicados por ingestión de tóxicos en general y, más específicamente, de plaguicidas.

Dicha técnica emplea las propiedades adsorbentes ampliamente experimentadas del carbón activo y resinas, a fin de conseguir la retención de la mayor cantidad posible de tóxico (1, 2).

La diagnosis y terapia del envenenamiento se ha basado durante muchos años en la sintomatología del paciente y en la determinación de la actividad de colinesterasa (3) más que en una rigurosa determinación analítica del agente tóxico mismo. La razón parece centrarse en la carencia de métodos analíticos específicos. Recientemente, las técnicas de cromatografía de líquidos y de gases han permitido el avance hacia la resolución del problema analítico.

En el presente trabajo se aborda el establecimiento de un nuevo método analítico para la determinación de Methamidophos en suero humano. Se ha elegido este plaguicida por ser uno de los más ampliamente utilizados y, por esa misma razón, que más frecuentemente aparecen en casos de intoxicación. Si bien en todo el mundo ha disminuido sensiblemente la incidencia de intoxicaciones accidentales por el uso de plaguicidas, es de gran importancia en la provincia de Almería el alto número de intoxicaciones por estos productos.

El trabajo que a continuación se resume es el primero de una serie de ellos encaminada a dilucidar los efectos que diferentes variables ejercen sobre el proceso de hemoperfusión, así como de ampliar el estudio a otros plaguicidas y de correlacionar sus contenidos en sangre con un estudio pormenorizado de la clínica del paciente.

*Depto. de Química Orgánica.

**Depto. de Química Analítica.

***Médico.

MATERIALES Y METODOS

PATRONES

Se prepararon disoluciones de Methamidophos puro (99,5%), suministrado por Xpectric, en acetato de Etilo y en Tolueno, con unas concentraciones de 55 y 150 ppm en cada caso, pesando la cantidad necesaria para preparar 250 ml de disolución.

DISOLVENTES

El acetato de Etilo y el Tolueno químicamente puros (99,5%), suministrados por Probus, fueron sometidos a deshidratación y posteriormente a destilación fraccionada, recogiendo la fracción de cada uno de ellos que solamente presentaba un pico nítido en cromatografía de gases.

CROMATOGRAFO

Se ha utilizado para todas las determinaciones un cromatógrafo Carlo Erba modelo FTV 2400-V. De entre las columnas disponibles se seleccionó una de vidrio, de 3 mm de diámetro interno y 2 metros de longitud, rellena con una mezcla de SP-2250 al 1,5% y SP-2401 al 1,95%, sobre Suppelcoport 100-120 (suministrada por Teknokroma), cuya efectividad en la separación de pesticidas ha sido ampliamente comprobada, tanto en el caso de los organoclorados como en el de los organofosforados.

El detector utilizado ha sido un ECD Carlo Erba de Níquel-63.

La señal del detector fue procesada en un registro integrador KONIK suministrado por la casa Xpectri.

RESULTADOS Y DISCUSION

DETERMINACION DE TIEMPOS DE RETENCION. CONDICIONES OPTIMAS

Para establecer las condiciones de trabajo más adecuadas, se procedió a determinar la temperatura y flujo de gas portador (nitrógeno) que ofrecían una mejor separación del compuesto a analizar, así como una mayor sensibilidad.

La mejor relación señal-ruido, utilizando un detector de captura electrónica (ECD), se consiguió estabilizando el horno del cromatógrafo a 178° durante al menos 48 horas mientras el flujo de portador se estabilizaba en 60 ml por minuto y la temperatura más conveniente del detector era de 250°C, con lo que el umbral de detección se situaba por debajo de 15 ng ($1.5 \cdot 10^{-8}$ g inyectados en la columna).

En estas condiciones se compararon los resultados obtenidos al analizar las disoluciones patrón, inyectando cantidades variables de cada una de ellas.

Se comprobó que los resultados eran más repetitivos en el caso de las disoluciones toluénicas que en las de igual concentración preparadas con acetato de etilo.

Por otra parte, se determinó que el tiempo de retención del Methamidophos en las condiciones operatorias establecidas es de 2,21 minutos y que dicho tiempo de retención no se modifica después de varias semanas desde la preparación de las disoluciones. Asimismo observamos que el área correspondiente a este pico se mantiene constante a lo largo del tiempo. Ello indica que las disoluciones de Methamidophos en tolueno son estables durante al menos un mes.

Para la realización de sucesivas experiencias optamos por el empleo de tolueno como disolvente, ya que, además de la razón antes expuesta, es menos miscible con el agua que el acetato de etilo, por lo que su uso en procesos de extracción proporciona mejores separaciones.

ESTABLECIMIENTO DE LA RECTA DE CALIBRADO EN TOLUENO

Procedimos a continuación a estudiar el intervalo en el que el área del pico cromatográfico es proporcional a la concentración de Methamidophos. Para ello se operó sobre la disolución de 55 ppm de Methamidophos en tolueno, de la que se inyectaron en el cromatógrafo volúmenes de 0,5 - 1,0 - 1,5 y 2,0 microlitros, repitiendo tres veces cada determinación.

En la Tabla nº 1 se reúnen los resultados encontrados en estos análisis, los cuales se representan gráficamente en la figura 1.

Puede observarse la buena linealidad existente en el rango de concentración estudiado, así como un buen coeficiente de correlación ($r = 0,992$).

TABLA 1
Estudio de la recta de calibrado

Methamidophos (ng)	AREAS		
	1ª det.	2ª det.	3ª det.
27,5	764	925	707
55,0	1.509	1.282	1.279
82,5	1.950	2.036	2.142
110,0	2.733	2.744	2.769

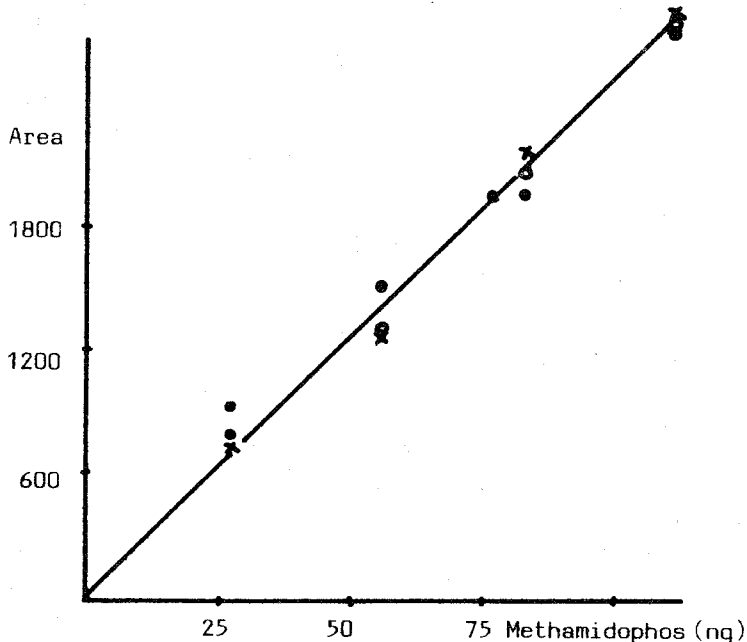


Figura 1: Variación del área del pico cromatográfico (tiempo de retención, 2,21 minutos) con la concentración de methamidophos.

METODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACION DE METHAMIDOPHOS EN TOLUENO

Estabilizado el cromatógrafo de gases en las condiciones de temperaturas y flujos establecidas anteriormente, inyectar en columna dos microlitros de disolución de Methamidophos en tolueno de concentración adecuada para que los contenidos finales queden comprendidos entre 27 y 110 ng de Methamidophos.

Por comparación entre el área obtenida para el problema y la recta de calibrado establecida a través de disoluciones de concentración conocida, se determina la concentración de Methamidophos en la disolución problema.

ERROR Y REPRODUCIBILIDAD DEL METODO PROPUESTO

Se determinó inyectando en el cromatógrafo ocho alícuotas, conteniendo cada una de ellas igual concentración de Methamidophos. El volumen inyectado fue en todos los casos de dos microlitros.

En la Tabla 2 se reúnen las áreas integradas para estas muestras así como algunas variables estadísticas.

TABLA 2
Error y reproducibilidad del Método

(ng)	Methamidophos ($X - X_m$)	($X - X_m$) ²
242,6	-25,0	625,0
280,6	13,0	169,0
286,6	19,0	361,0
237,7	-29,9	894,0
248,7	-18,9	357,2
288,1	20,5	420,3
292,6	25,0	625,0
263,9	-3,7	13,7
$X_m = 267,6$	$\sum (X - X_m)^2 = 2.846,4$	

A partir de estos datos y mediante cálculos estadísticos sencillos, se obtiene:

$$\text{VARIANZA} = 406,6$$

$$\text{DESVIACION TIPICA} = 20,2$$

$$\text{DESVIACION MEDIA} = 7,6$$

Conocida la t de Student para $N = 7$ y $P = 0,5$, ninguna de las determinaciones efectuadas es rechazable.

El error relativo sobre el valor medio resulta ser del 7,6%.

DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE REPARTO DE METHAMIDOPHOS ENTRE SUERO SANGUINEO Y TOLUENO

Dado que la aplicación inmediata para la que ha sido puesto a punto el método analítico es la determinación del contenido en Metamidophos de sueros sanguíneos de pacientes intoxicados, procedimos a estudiar el proceso de extracción de dicho pesticida entre suero y tolueno.

Para ello calculamos el coeficiente de reparto por comparación de las áreas obtenidas al analizar cromatográficamente muestras de Methamidophos en tolueno y las encontradas tras extraer con tolueno suero sanguíneo tratado con cantidades conocidas de Methamidophos.

A tal fin se partió de un «pull» de suero carente de Methamidophos, al que se adicionaron cantidades diversas del pesticida.

El volumen de suero sometido a extracción fue en cada caso de dos mililitros y la cantidad de Methamidophos adicionada fue la precisa para que la concentración final en el suero fuese de 0,0 - 82,5 - 110,0 y 137,5 ppm.

Las disoluciones así preparadas se extrajeron con 5 ml de tolueno, tras diez minutos de agitación, tiempo que se consideró suficiente para que la extracción alcanzara el equilibrio. Después de reposar una hora, se separan las fases, secando la orgánica con sulfato sódico anhidro. Finalmente, se procedió al análisis cromatográfico de cada uno de los extractos, por inyección de 1,0 - 1,5 - 2,0 y 2,5 microlitros y repitiendo tres veces la determinación para cada una de las muestras.

Es de destacar que los cromatogramas correspondientes al extracto del suero carente de pesticida no presentan ningún pico que pudiera interferir con el debido al Methamidophos en las muestras contaminadas (Fig. 2).

En la Tabla 3 se reúnen los resultados encontrados. A partir de ellos y por comparación entre las cantidades de Methamidophos puestas y las halladas, procedimos al cálculo de los correspondientes coeficientes de reparto, valores que se listan también en la citada tabla.

TABLA 3
Determinación del coeficiente de reparto de Methamidophos
entre suero sanguíneo y tolueno.

Methamidophos en suero (mg/ml)	Methamidophos inyectado (ng)	Methamidophos encontrado		Coefic. de reparto
		(ng)	(mg/ml)	
0,0825	82,50	14,79	0,01479	0,18
»	123,75	21,37	0,01424	0,17
»	165,00	25,53	0,01276	0,17
»	206,25	27,86	0,01114	0,14
0,1100	165,00	24,25	0,01616	0,15
»	220,00	36,36	0,01818	0,17
»	275,00	42,89	0,01716	0,16
0,1375	206,25	32,39	0,02159	0,16
»	275,00	47,06	0,02353	0,17
»	343,75	54,44	0,02177	0,16

De la observación de los resultados obtenidos se deduce que, en el intervalo de concentración de Methamidophos estudiado, el coeficiente de reparto no resulta afectado por la variación de la misma. A partir de los valores encontrados

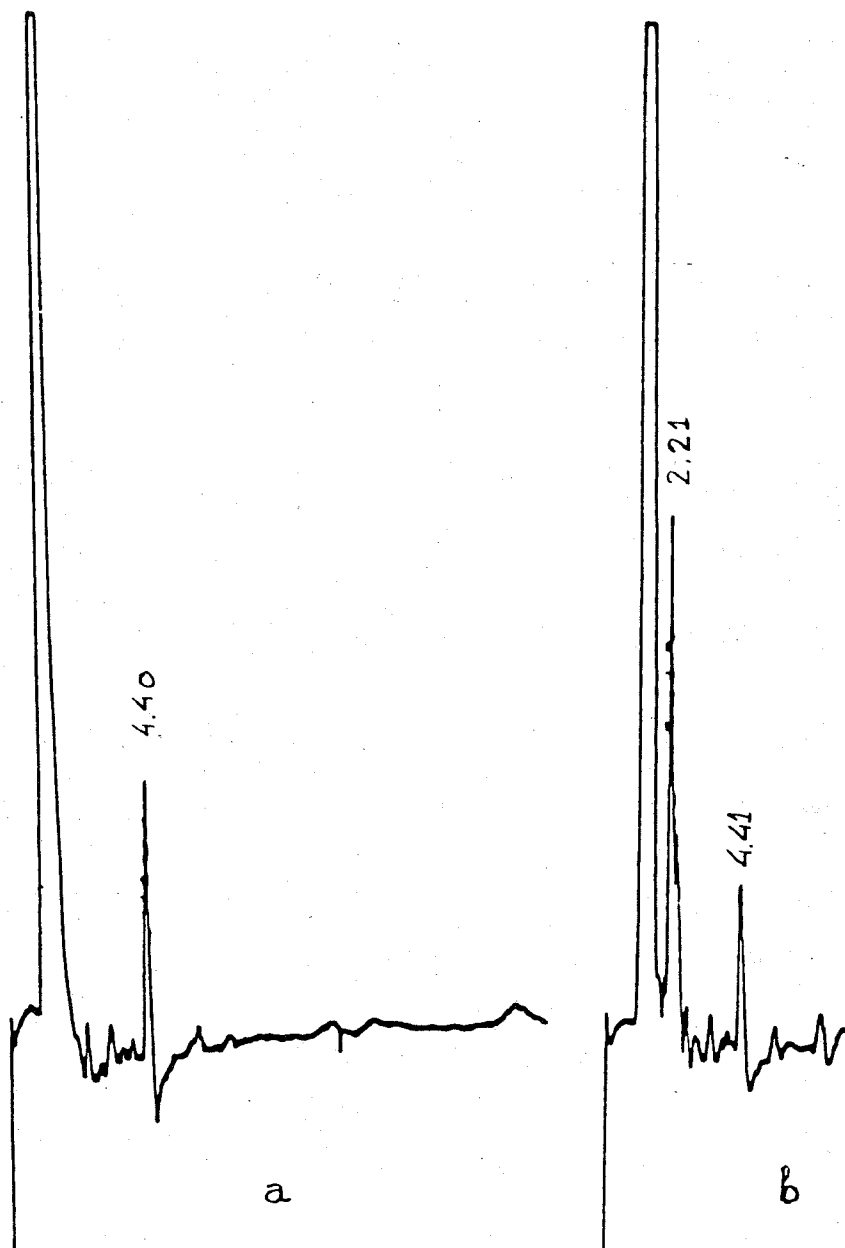


Figura 2: Cromatogramas típicos de extractos toluénicos de suero sanguíneo:
a) sin methamidophos; b) con methamidophos.

en la experiencia realizada, calculamos un valor medio para el coeficiente de reparto del Methamidophos entre el suero sanguíneo y tolueno de 0,163.

Este valor está en concordancia con la alta solubilidad del Methamidophos en agua y su relativamente escasa solubilidad en disolventes orgánicos en general y en tolueno en concreto, como ya quedó expuesto en la introducción.

APLICACION DEL METODO PROPUESTO A LA DETERMINACION DE METHAMIDOPHOS EN SUERO SANGUINEO DE PACIENTES INTOXICADOS

METODO OPERATORIO

Tomar 2 ml de suero sanguíneo del paciente y adicionarles 5 ml de tolueno. Agitar en embudo de decantación durante 10 minutos y dejar reposar por al menos 30 minutos hasta separar ambas fases. Desechar la fase acuosa y secar la orgánica sobre sulfato sódico anhidro. Filtrar e inyectar en el cromatógrafo un volumen de 2,0 microlitros, medir el área obtenida para un tiempo de retención de 2,21 minutos y compararla con la recta de calibrado hallada operando con disoluciones de Methamidophos en tolueno de concentraciones conocidas.

Calcular la concentración de Methamidophos en el suero sanguíneo dividiendo la obtenida de la recta de calibrado por el coeficiente de reparto 0,163.

Determinación del contenido de Methamidophos en suero sanguíneo del paciente F.P.

Procediendo tal como se ha descrito en el método operatorio, encontramos las áreas y concentraciones que se reúnen en la Tabla 4. Cada uno de los valores es el promedio de al menos tres determinaciones cromatográficas.

TABLA 4
Contenido de Methamidophos en sangre del paciente F.P.

Muestra n°	Area	Concentración (mg/l)
1	2349	567,1
2	3246	783,7
3	699	168,8
4	801	193,4
5	111	26,8

DETERMINACION DE METHAMIDOPHOS EN SUERO SANGUINEO

Las muestras analizadas y numeradas del 1 al 5 corresponden a las fechas y situaciones en la evolución del paciente que a continuación se relacionan.

Muestra n.º 1	Fecha: 19-3-1986	Ingreso en la UCI
» n.º 2	21-3-1986	Tomada antes de Hemoperfusión.
» n.º 3	21-3-1986	Tomada durante la Hemoperfusión.
» n.º 4	21-3-1986	Tomada después de Hemoperfusión.
» n.º 5	22-3-1986	Tomada después de 2ª Hemoperfusión.

Determinación del contenido de Methamidophos en el suero sanguíneo del paciente C.V.

Los resultados encontrados tras la aplicación del método operatorio descrito a muestras de suero sanguíneo del paciente C.V. se reúnen en la Tabla 5.

TABLA 5
Contenido de Methamidophos en sangre del paciente C.V.

Muestra n.º	Area	Concentración (mg/l)
1	2113	510,2
2	140	33,8
3	932,5	225,1

Las muestras analizadas corresponden a las siguientes condiciones:

Muestra n.º 1	Fecha: 6-9-1986	Tomada antes de Hemoperfusión.
» n.º 2	6-9-1986	Tomada durante la Hemoperfusión.
» n.º 3	6-9-1986	Tomada después de la Hemoperfusión.

Determinación del contenido de Methamidophos en el suero sanguíneo del paciente X.M.

La Tabla 6 recopila los resultados obtenidos al aplicar el Método operatorio descrito a las muestras de suero sanguíneo del paciente X.M.

TABLA 6
Contenido de Methamidophos en sangre del paciente X.M.

Muestra n.º	Area	Concentración (mg/l)
1	5460	1.318,3
2	3511	847,7
3	2364	570,9
4	1509	364,3

Las condiciones en que fueron tomadas estas muestras fueron las siguientes:

- Muestra n.º 1 Fecha: 27-10-1986 Ingreso en la UCI.
 » n.º 2 27-10 (14 horas) Durante Hemoperfusión.
 » n.º 3 27-10 (15,15 h.) Durante Hemoperfusión.
 » n.º 4 27-10 (17,30 h.) Después de Hemoperfusión.

Determinación del contenido de Methamidophos en el suero sanguíneo del paciente C.E.

Procediendo análogamente a los casos anteriores, se obtuvieron para el paciente C.E. los resultados reunidos en la Tabla 7.

TABLA 7
Contenido de Methamidophos en sangre del paciente C.E.

Muestra n.º	Area	Concentración (mg/l)
1	846	204,2
2	997	240,7

Estas muestras corresponden a las condiciones que se detallan seguidamente:

- Muestra n.º 1 Fecha: 15-4-1987 Ingreso en UCI.
 » n.º 2 15-4 (2 h. desp.) Antes de Hemoperfusión.

Determinación del contenido de Methamidophos en el suero sanguíneo del paciente R.C.

Siguiendo el mismo método operatorio, se obtuvieron para el paciente R.C. los datos que se tabulan en la Tabla 8.

TABLA 8
Contenido de Methamidophos en sangre del paciente R.C.

Muestra n°	Area	Concentración (mg/l)
1	600	145,0
2	310	74,8
3	181,5	43,8

Las muestras analizadas se tomaron en las condiciones que se dan a continuación:

Muestra n° 1	Fecha: 9-10-1986	Ingreso en UCI.
» n° 2	9-10-1986	Durante Hemoperfusión.
» n° 3	9-10-1986	Después de Hemoperfusión.

De la observación de los resultados encontrados por aplicación del método descrito para la determinación de Methamidophos a muestras de suero sanguíneo de pacientes intoxicados por este plaguicida, se constata una evolución de los contenidos de tóxico en sangre relacionada con la aplicación de la hemoperfusión.

Al considerar las concentraciones medidas «durante la hemoperfusión» en los casos de los pacientes F.P., C.V. y X.M., observamos que la cantidad absoluta de tóxico retirado de la sangre es prácticamente la misma (aproximadamente 470 mg/l) como se aprecia en la Tabla 9. Este valor debe estar relacionado con la capacidad máxima de retención del cartucho utilizado.

TABLA 9
Concentraciones de Methamidophos y eficacia de la retención

Paciente	X_0 mg/l	retenido %	retenido mg/l	X_1 mg/l	$(X_1)^2/X_0$ mg/l
F.P.	783,7	78,5	445,2	34,1	65,96
C.V.	510,2	93,4	476,4	44,1	99,31
X.M.	1.318,3	35,7	470,6	27,6	100,67

X_0 representa la concentración inicial de tóxico en sangre y
 X_1 la concentración estabilizada después de la hemoperfusión.

Por otra parte, en alguno de los pacientes estudiados, las muestras tomadas nos han permitido verificar un aumento de la concentración de Methamidophos en sangre desde el momento de ingreso en UCI hasta transcurridas unas horas. En cambio, una vez realizada la hemoperfusión, la concentración medida unas horas después parece ser inversamente proporcional a la concentración alcanzada durante la aplicación de la técnica (ver Tabla 9).

La concentración medida «después de la hemoperfusión» está directamente relacionada con la inicial y en estos mismos pacientes se aproxima —sobre todo en dos de ellos— a la forma

$$X_1 = 10. \sqrt{X_0}$$

Para la realización de futuros trabajos, es aconsejable un control minucioso y preciso de la analítica del enfermo durante los días de tratamiento, relacionándola con la determinación del tóxico aún no eliminado o redisuelto en la sangre posteriormente.

Asimismo, es aconsejable la medida del flujo sanguíneo en el proceso de hemoperfusión, a fin de poder aplicar el concepto de «velocidad de aclaramiento».

BIBLIOGRAFIA

OKONEK, S.; Arch. Toxicol.; 35, 221-227 (1976).

OKONEK, S. et Al.; Artif. Organs., 3, 341-345 (1979).

GROB, D.; «Anticholinesterase intoxication in man and its treatment», Springer Verlag, Göttingen - Heidelberg (1963).
