

Determinación cromatográfica de desferrioxamina (DFO) y sus quelatos con hierro y aluminio en suero

P. Menéndez Fraga, E. Blanco González *, A. Sanz Medel * y J. B. Cannata

Unidad de Investigación. Metabolismo Oseo y Mineral. Hospital Central de Asturias. Oviedo.

* Departamento de Química Física y Analítica. Oviedo. Universidad de Oviedo (España).

Introducción

La *desferrioxamina* (DFO) es un ácido trihidroxámico que quela con efectividad iones metálicos trivalentes, tales como el hierro y aluminio. Desde 1980 se viene empleando en el tratamiento de la intoxicación aluminica en enfermos con insuficiencia renal crónica, pues forma un quelato (Al-DFO) fácilmente dializable^{1,2}. Sin embargo, la DFO puede inducir efectos tóxicos³; de ahí el interés en establecer su dosis mínima eficaz, así como el momento idóneo de administración, apoyándose en estudios farmacocinéticos de eliminación del quelante.

En los últimos años, la *cromatografía líquida de alta resolución* (HPLC) ha demostrado ser una técnica muy adecuada para el análisis de fármacos en fluidos biológicos. Sin embargo, los métodos de HPLC existentes en la actualidad para el control analítico de la DFO y sus quelatos con hierro y aluminio son bastante escasos y no demasiado satisfactorios^{4,5}.

El objetivo del presente trabajo fue poner a punto un método analítico para la determinación de DFO y sus quelatos con hierro (Fe-DFO) y aluminio (Al-DFO) utilizando la técnica de HPLC.

Material y métodos

Instrumentación

Equipo de cromatografía líquida (LKB) con válvula de inyección inerte (loop 200 µl), columna Lichrosorb RP18, 5 µm (250 mm × 4 d.i.), detector espectrofotométrico UV-VIS de longitud de onda variable e integrador.

Correspondencia: Dr. J. B. Cannata.
Unidad de Investigación.
Metabolismo Oseo y Mineral.
Hospital Central de Asturias.
Apto. 243
33006 Oviedo

Reactivos y disoluciones

Disolución patrón de DFO (100 µg/ml) en agua (Desferín [Ciba-Geigy]). Disoluciones patrón de Al (III) (1.000 µg/ml) y Fe (III) (1.000 µg/ml) (Merck). Disolventes orgánicos de calidad HPLC. Ácidos, bases, sales, etc. (Merck). Agua ultrapura (NANOpure II, Barnstead).

Metodología

- a) Preparación de las disoluciones estándares de desferrioxamina (DFO), ferrioxamina (Fe-DFO) y aluminioxamina (Al-DFO)

Las disoluciones estándares de DFO se prepararon por dilución adecuada de la disolución patrón de DFO (1.000 µg/ml). Las correspondientes a los complejos Al-DFO y Fe-DFO se prepararon por mezcla de ésta con las disoluciones patrón de aluminio y hierro.

- b) Optimización de la separación cromatográfica

En primer lugar se efectuó la selección de la longitud de onda para la detección espectrofotométrica (UV-VIS) de las especies en estudio. A continuación se evaluó el efecto del pH de la fase móvil (variando entre 3 y 6 con reguladora de fosfatos 0,02 M), manteniendo constante el porcentaje de acetonitrilo (13 % v/v). Por último, se estudió el efecto del flujo de la fase móvil entre 0,4 y 0,8 ml/min.

- c) Prevención o control de la contaminación

Para evitar que la DFO inyectada en el cromatógrafo se convierta en Fe-DFO se requiere una purga del sistema cromatográfico con DFO durante 12 horas previas al análisis.

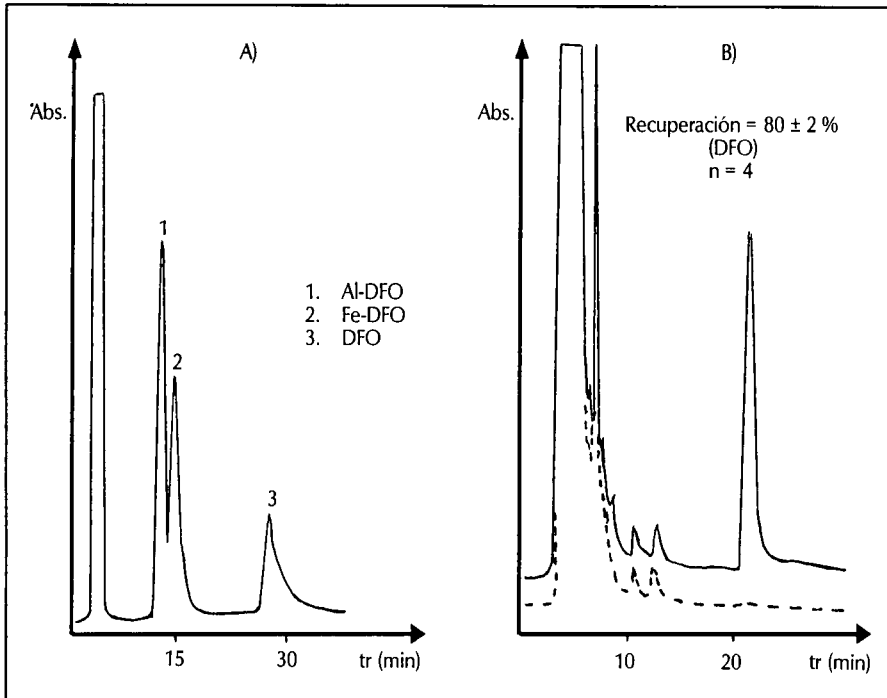


Fig. 1.—a) Cromatograma de una disolución estándar de Al-DFO (3,7 µM), Fe-DFO (1,8 µM) y DFO (4 µM). b) Cromatogramas típicos de ultrafiltrado de suero humano (---) sin DFO y (—) con una adición de 50 µg/ml (89,3 µM) de DFO. Condiciones cromatográficas en el texto.

d) Calibración del sistema HPLC para la cuantificación de Al-DFO, Fe-DFO y DFO

Se procedió a establecer las características analíticas (precisión, límite de detección y linealidad) utilizando disoluciones estándares de los tres solutos en estudio disueltos en fase móvil (pH = 7,4).

e) Tratamiento previo de las muestras de suero

Un ml de suero procedente de pacientes en hemodiálisis se ultrafiltra en un sistema MPS-1, AMICON (membranas YMT, 5.000 daltons) a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos a 25° C. El ultrafiltrado se inyecta en el cromatógrafo directamente. Para los estudios de recuperación se adicionan 50 µg/ml DFO a una muestra de suero humano (n = 4).

Resultados

La figura 1a muestra el cromatograma de una disolución estándar de los tres solutos investigados utilizando una fase móvil de 13 % (v/v) acetonitrilo en reguladora de fosfatos 0,02 M (pH = 6) a un flujo de 0,6 ml/min con cambio a 0,8 ml/min a los 18 minutos y detección UV a 220 nm. El cromatograma obtenido para la DFO en suero humano y su blanco correspondiente tras el proceso de ultrafiltración aparece en la figura 1b (recuperación 80 ± 2 %).

En la tabla I se recoge la precisión (CV) límite de detección (LD) y linealidad de la metodología propuesta.

Conclusiones

— Se ha puesto a punto un método cromatográfico para la determinación sensible y precisa de la DFO y sus quelatos con hierro y aluminio.

Tabla I. Características analíticas

	CV (%) (n = 7)	LD * (µM)	Linealidad (µM)	r
Desferrioxamina (DFO)	5,4	0,36	0,36-5,36 5,36-178,57 **	0,9924 0,9997
Aluminoxamina (Al-DFO)	0,9	0,02	37,04 **	0,9997
Ferrioxamina (Fe-DFO)	5,2	0,09	25,0	0,9995

* Cálculo basado en una relación señal/ruido = 3.
** Máxima concentración ensayada.

— La metodología desarrollada puede ser aplicada al análisis de DFO en suero humano previo proceso de ultrafiltración (desproteínización).

Agradecimientos

Este trabajo ha recibido financiación de FIS 91/0329 y FICYT 1990-1192.

Bibliografía

1. Mazzuchi N, Cannata JB: «Prevención, diagnóstico y tratamiento de la intoxicación aluminica: Revisión y perspectivas». *Nefrología* 15-19, 1989.
2. Cannata JB: «Intoxicación aluminica: Análisis de una década clave en el conocimiento de los efectos biológicos de este elemento». *Rev Clin Esp* 184, 1989.
3. Olivieri MF, Buncine JR, Chew E, Gallant T, Harrison RV, Loga N, Mitchell D, Ricci G, Skarf B, Taylor M, Freedman MH: «Visual and auditory neurotoxicity in patients receiving subcutaneous deferoxamine infusions». *New Engl J Med* 34:869-873, 1986.
4. Mattiello G, Rizzo F, Zoccolan R, Adriani M: «High pressure liquid chromatography determination of low levels of free desferrioxamine and its iron and aluminium chelates». *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 3:241-245, 1986.
5. Hughes H, Hagen LE, Cameron EC, Sutton RAL: «Estimation of aluminioxamine and ferrioxamine in plasma by high performance liquid chromatography». *Clinica Chimica Acta* 157:115-120, 1986.