

GC-MS에 의한 혈중 5-fluorouracil의 정량법

신호상 · 서배석* · 오윤숙** · 박성우***

공주대학교 환경교육과
*가톨릭대학교 의과대학 화학과
**한국환경수도연구소
***국립과학수사연구소
(1997. 8. 9 접수)

The Determination of 5-Fluorouracil in Human Plasma by a Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Ho-Sang Shin, Bae-Seck Seo*, Yun-Suk Oh** and Sung-Woo Park***

Department of Environmental Education, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

*Department of Chemistry, Catholic University Medical College, Seoul 137-701, Korea

**Korea Environment & Water Works Institute

***National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-097, Korea

(Received August 9, 1997)

요 약: GC-MS를 이용한 사람의 혈중 5-fluorouracil(5-FU)의 정량법이 연구되었다. 5-FU은 isopropanol-ether(20:80) 혼합용매 10ml로서 추출하였고 pentafluoro-benzoylation에 의해 유도체화 하였다. 시료주입은 자동으로 수행하였으며 분리에 사용한 칼럼은 비극성 capillary column이었고 검출은 MSD로 하였다. 위의 조건하에서 내인성 물질들의 방해현상은 없었고 검출한계는 0.5 ml의 혈액시료를 사용하였을 때 3 ng/ml이었으며 추출효율은 80%이상을 나타냈다. 5-FU로 항암치료를 받는 환자의 시료 500개중에 혈중 5-FU의 농도 측정에 적용하였으며 이 방법이 우수한 monitoring법임을 알수 있었다.

ABSTRACT: A gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of 5-fluorouracil in human plasma is described. The method involves a single extraction procedure with 10 ml of isopropanol-ether(20:80) solution and pentafluoro-benzoylation. Samples were injected using an automatic injector, followed by separation on a nonpolar capillary column and detection with a mass selective detector(MSD). No endogenous compounds were found to interfere. The detection limit, based upon an assayed plasma volume of 0.5, was 3 ng/ml. The extraction yield was found to be above 80%. Plasma 5-FU concentrations were determined by this method in about 500 plasma samples from cancer patients undergoing treatment with 5-FU. This method is suitable for monitoring of 5-FU in plasma of cancer patients.

Key words: 5-FU, Determination, Plasma, GC-MS

1. 서 론

5-FU은 현재 가장 많이 사용되어지고 있는 암 치료 약 중 하나로서 위암, 자궁암, 유방암을 포함한 각종 암의 치료에 leucovorin 등의 보조약과와 동시 또는 단독 투여되면서 사용되고 있다. 5-FU은 비교적 극성

이 강한 약물로서 분석하기에 어려운 항목이다. 이의 분석방법은 무엇보다도 정확하면서 간단하고 감도가 좋은 방법이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 위의 조건을 만족시킬 수 있는 분석법을 개발하는데 그 목적을 갖고 있다.

5-FU의 혈중농도 분석법은 폭넓게 연구되어져 왔

다. ^{19}F NMR을 이용한 암세포에 있는 5-FU의 정량법이 연구되어졌고¹⁻⁴ spectrophotometry법이⁵ 소개되었으나 검출한계가 혈중 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. Ion pair chromatography에⁶ 의한 연구도 발표되었다. 기존에 발표된 5-FU 혈중농도 분석법은 대부분 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 방법들이다.⁷⁻¹⁷ 이들 중에는 직접 시료주입법, column switching법, precolumn derivatization법들이 연구되어 졌으며 이중 precolumn derivatization에 의해 혈중농도 0.5 ng/ml까지 검출이 가능하였다. 또한 gas chromatography(GC)를 이용하여 분리 후 여러 가지 검출기로서 검출하여 정량한 방법도 발표되고 있다. Di-N-ditrifluoromethylbenzyl(DTFMBz)¹⁸ 및 pentafluorobenzyl¹⁹ 유도체를 만들어 negative ion chemical ionization을 사용한 5-FU의 혈중농도 정량법이 소개되었으며 CI-MS,²⁰ NPD,^{21,22} ECD,²² MS²³⁻²⁶의 검출법을 이용한 GC정량법이 또한 소개되었다. 이들 방법은 매우 감도가 좋은 것으로 소개되어 있으나 고가장비, 복잡한 검사법, 정량성의 부족등 단점들이 지적되고 있다.

2. 실험방법

2.1. 시약 및 표준물질

5-FU은 한국원자력병원으로부터 구입되었고 내부표준물질로 사용한 isopropylantipyrine은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 사용한 유기용매 n-pentane, isopropanol, methanol등은 독일의 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 한편 K_2CO_3 , Na_2SO_4 , NaHCO_3 등은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2.2. 표준용액

5-FU은 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 ethylacetate에 녹여 이를 4°C에 보관하면서 필요한 농도로 묽혀 사용하였다. Isopropylantipyrine을 내부표준물질로 사용하였으며 앞에서 설명된 방법에 의해 만들어진 용액 약 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 methanol로서 100배 묽혀 사용하였다.

2.3. 검정곡선 및 정량

5-FU의 검정곡선은 plasma 0.5 ml에 내부표준물질 200 ng(10 $\mu\text{g}/\text{ml} \times 20 \mu\text{l}$)을 첨가한 후 5-FU을 0,

10, 25, 50, 100 ng을 첨가한 후 내부표준물질과 5-FU의 면적비를 구해 이값을 5-FU의 농도에 대해 plot함으로써 작성하였다.

2.4. 시료전처리

채취한 혈액은 바로 heparin으로 처리한 후 이를 약 1000 g의 속도로 원심분리한 후 위의 plasma층만을 분석에 사용하였다. 이 시료는 -20°C에서 냉동보관하다가 분석시에 상온에서 녹여 사용하였다. Plasma 0.5 ml를 정확히 측정하여 20 ml 유리시험관에 옮긴 후 내부표준물질 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 20 μl 를 첨가한 후 잘 흔들어 섞어 준다. 여기에 isopropanol 2 ml를 넣어 흔들어 줌으로써 단백질을 침전시킨 후 ethylether 8 ml를 추가한 다음 유리마개를 막아 준 후 약 20분간 진탕기에서 흔들어 준 다음 800 g의 속도로 원심분리시킨다. 분리된 유기층(위층)을 새로운 시험관에 옮긴 후 이를 약 50°C의 물중탕을 이용한 진공건조기에서 건조시킨 후 질소가스로서 완전히 건조시킨다.

2.5. 유도체화과정

앞에서 건조된 잔류물에 acetone 200 μm 와 K_2CO_3 100 mg을 넣고 잔류물을 잘 녹여 준다. 여기에 pentafluorobenzyl bromide 20 μl 를 넣어 준 후 heating block내에서 60°C로서 30분간 가열하여 반응을 시킨다. 반응시킨 후 상온에서 냉각시킨 후 K_2CO_3 가루가 섞여 들어가지 않게 위의 층만 auto sampler vial내에 V-shape안에 조심스럽게 옮긴다. 옮겨진 용액의 양은 50 μl 이상이 되도록 한다.

2.6. 가스크로마토그래피

모든 GC실험은 Hewlett Packard(HP) 5890B를 사용하였다. 검출기로서 NPD와 ECD를 사용하였다. 모든 data는 personal computer에서 받아 data처리가 이루어 졌다. 시료주입은 HP 7673A autosampler를 이용하여 3 μl 씩 주입하였다. GC의 자세한 조건들은 Table 1에 정리하였다.

2.7. Gas Chromatography-Mass Spectrometry

표준물질, 유도체 물질 및 시료중 5-FU 등의 확인 및 정량분석을 위해 HP 5890/5971B mass spectrometry를 사용하였다. Ion source는 electron ionization mode로서 150°C에서 70 eV를 사용하였다.

Table 1. Gas chromatographic conditions used for the determination of 5-FU concentration in plasma

Parameter	Conditions
Column	HP fused-silica capillary, cross-linked 5% phenylmethyl silicone (SE-54); 25 m × 0.2 mm I.D., film thickness 0.33 μm
Injector temperature	300°C
Detector temperature	300°C
Initial Temperature	100°C
Programming rate	20°C/min
Final temperature and time	310°C for 10 min
Carrier gas flow-rate	Helium at 0.95 ml/min
Auxiliary gas flow-rate	Helium at 25 ml/min
Hydrogen flow-rate	4.0 ml/min
Air flow-rate	100 ml/min
Splitting ratio	1 : 10
Septum-purge flow-rate	5.1 ml/min

Table 2. Gas chromatography-mass spectrometry conditions used for the determination of 5-FU concentration in plasma

Parameter	Conditions
Column	HP fused-silica capillary, cross-linked 5% phenylmethyl silicone (SE-54); 25 m × 0.2 mm I.D., film thickness 0.33 μm
Injector temperature	300°C
Detector temperature	300°C
Initial Temperature	100°C
Programming rate	20°C/min
Final temperature and time	310°C for 10 min
Carrier gas flow-rate	Helium at 1.2 ml/min
Splitting ratio	1 : 10
Septum-purge flow-rate	4.5 ml/min

Full-scan mass spectra는 m/z 40~500을 사용하였으며 이때 GC조건은 Table 2와 같다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 5-FU의 GC내에서 안정성

5-FU의 GC 내에서의 안정성이 조사되었다. 5-FU은 acetone, methanol ethylacetate 등의 용매에 녹아 있는 상태로 GC-MS로서 분석하였을때에 새로운

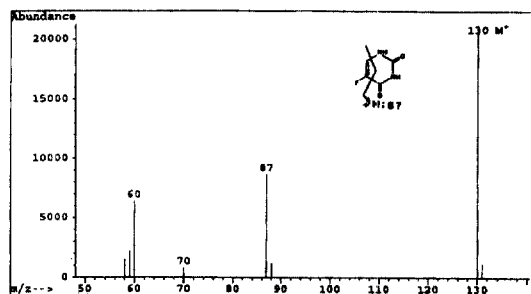


Fig. 1. EI spectrum of 5-fluorouracil.

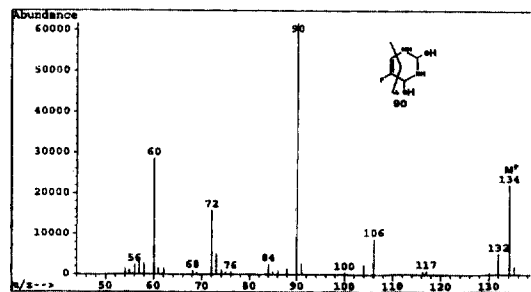


Fig. 2. EI spectrum of a new produced peak of 5-fluorouracil in GC.

peak가 생성되었다. 5-FU과 새로이 생성된 물질의 mass spectrum을 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 1은 분자량 130의 5-FU의 mass spectrum으로서 나타낸 바와 같이 fragmentation pattern을 보이고 있다. 한편 Fig. 2의 새로 생성된 물질은 분자량이 4 증가되었고 나타낸 바와같이 mass fragmentation을 보이고 있다. 이 물질은 acetone과 methanol을 용매로 사용시에 더 많이 생성되는 것을 관찰할 수 있었다. Mass spectrum으로부터 이 생성물은 5-FU이 환원되어 두 개의 ketone group이 알코올로 바뀐 것으로 추정되고 있다. 이 물질은 pentafluorobenzoylation후에 단일 peak로 바뀌는 것을 관찰할 수 있었다.

3.2. 5-FU의 유도체화

5-FU을 pentafluorobenzylbromide로서 유도체화시켰다. 이때 용매로서 acetone, base로서 K₂CO₃를 사용하였다. 반응조건은 60°C에서 30분으로 완전히 유도체화 되는 것으로 관찰되었다. 생성된 유도체는 bis-pentafluorobenzyl-5-FU로서 Fig. 3에 mass spectrum을 나타내었다. Pentafluorobenzyl group은 5-FU에 2개의 -N-H group에 추가되었으며 1개의 생성

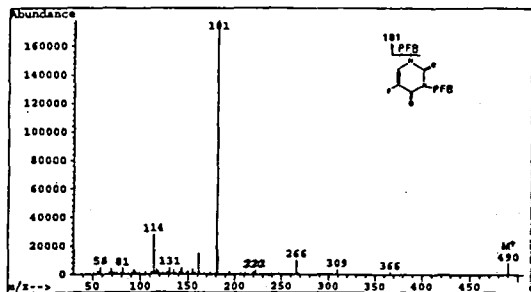


Fig. 3. EI spectrum of PFB-5-fluorouracil derivative.

물만이 생성되었다. 위의 alkylation반응시 자주 사용되는 방법으로 acetonitrile을 용매로 하고 pyridine이나 triethylamine과같은 염기를 사용하여 반응을 시키나 본 실험에서는 보다 약한 반응조건을 택하여 부생성물이 생성되지 않도록 하였다. 이 유도체 생성물은 열이나 다른 GC 조건하에서 안정하였고 상온에서 적어도 일주일간 변화되지 않았다. 또한 위의 유도체 생성물은 GC조건하에서 매우 sharp한 peak로 나타났으며 이를 이용하여 생체시료로부터 5-FU의 분석이 가능함을 보여 주었다.

3.3. 5-FU의 추출법

5-FU은 비교적 극성이 강한 물질로서 보통 pH6정도의 조건하에서 isopropanol+ethylether(20~30%+80~70%)의 용매를 이용하여 추출하였다. 본 실험에서는 pH는 중성(약 7.2), 추출용매는 isopropanol(20%)+ethylether(80%) 혼합용매 약 10 ml를 사용하여 추출효율을 조사하였다. 그 결과 80%이상의 높은 효율을 보였고 추가적으로 많은 방해물질들이 제거되어 정량성이 매우 개선되었을 뿐 아니라 추출과정에서 pH 조절이 필요없이 처리과정이 간단해졌다.

3.4. 검출기의 선택

GC column에서 분리된 후 용출된 물질을 검출하는 검출기는 매우 중요하다. 본 연구에서는 MS, ECD와 NPD를 비교하여 최적 검출기를 조사하였다. 검출기를 선택할때는 분석물질의 감도도 중요할 뿐 아니라 방해물질들로부터 선택적 검출도 매우 중요하다. MS를 검출기로 사용할 때에는 몇몇 이온들을 선택함으로써 방해물질들을 검출되지 않게 하면서 선택이온의 검출빈도를 높여 감도를 높이고 있다. ECD는 할로젠 원소가 함유된 물질에 선택적인 감도가 높으나 할로젠 원소가

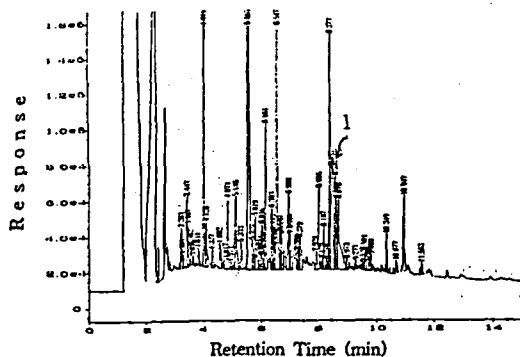


Fig. 4. Chromatogram by GC-ECD of human plasma extracts: plasma to which 100ng/ml of 5-FU were added. 1= PFB-5-FU (8.43 min).

함유되어 있지 않은 물질들은 상대적인 감도가 낮다. NPD는 nitrogen이나 phosphorus가 함유된 물질은 탄소함유물질에 비해 104~105배의 감도를 보이고 있어 이를 통해 방해물질로부터 선택적 검출이 가능하다.

본 연구에서는 pentafluorobenzyl group을 5-FU에 도입하였기 때문에 5-FU의 유도체에는 fluoride가 6개가 함유되어 있어 ECD에 의한 감도가 높은 편이다. 그러나 Fig. 4에 도시된 바와같이 plasma로부터 함께 추출된 지방산, 유기산 등의 물질들에게도 할로젠 원소가 도입되어 방해물질들이 매우 많아지게 된다. 따라서 ECD에 의해 5-FU의 유도체의 감도도 증가되거나 상대적으로 방해물질들이 많아지기 때문에 검출한계는 상대적으로 많은 방해 peak와 비교적 낮은 감도의 5-FU 유도체 peak를 얻게 되었다. 5-FU의 유도체는 NPD에 의해 비교적 좋은 감도를 보였고 상대적으로

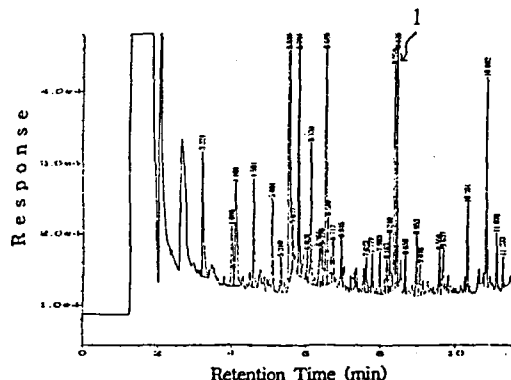


Fig. 5. Chromatogram by GC-NPD of human plasma extracts: plasma to which 100ng/ml of 5-FU were added. 1= PFB-5-FU (8.43 min).

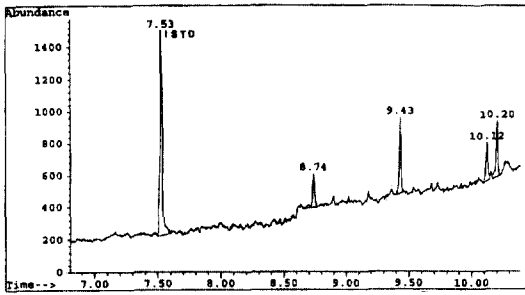


Fig. 6. Chromatogram by GC-MS(SIM) of human blank plasma extracts:

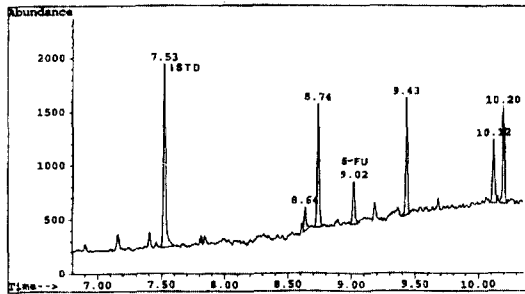


Fig. 7. Chromatogram by GC-MS(SIM) of human plasma extracts : plasma to which 100ng/ml of 5-FU were added. 1=PFB-5-FU (9.02 min).

로 지방산, 유기산 등의 유도체들은 낮은 감도를 보였으나 이 경우에도 5-FU의 낮은 농도에서는 많은 방해물질이 존재하여 정량하기에 어려웠다(Fig. 5). GC-MS(SIM mode)를 사용하였을 때에는 선택이 매우 중요하다. 5-FU의 유도체의 base peak은 m/z 181이나 이 이온은 유도체 시약에서 유래되었기 때문에 이 이온을 함유하고 있는 peak가 매우 많다. 따라서 비교적 감도는 낮지만 방해물질을 제거할 수 있어 m/z 114, 266, 490등이 선택되었으며 본 연구에서는 GC-MS(SIM mode)로서 정량을 하였다. 어떤 약물도 사용하지 않은 건강한 사람으로부터의 plasma를 blank plasma로 사용하였고 이때 GC-MS에 의한 chromatogram을 Fig. 6에, 그리고 5-FU을 혈액에 첨가하여 분석한 GC-MS 결과는 Fig. 7에 나타내었다.

3.5. 검량곡선

5-FU의 검량곡선은 pentafluorobenzyl-5-FU의 면적과 내부표준물질의 면적비를 5-FU의 농도의 변화 함수로써 plotting함으로써 작성하였다. 이때의 직선 방

정식은 $y=0.00105x+0.00445$ 이었으며 correlation coefficient가 0.998로서 직선성이 좋았다. 정량시에는 위의 면적비를 구하여 직선식으로 부터 계산하였다.

Table 3. Precision and accuracy of the determination of 5-FU concentration in a 0.5ml sample of human serum

Concentration added (µg/ml)	N	Concentration found (mean ± S.D.) (µg/ml)	C.V. (%)
0.100	3	0.097 ± 0.007	7.45
0.200	3	0.190 ± 0.017	5.32
0.500	3	0.449 ± 0.019	7.37

Table 4. 5-FU concentration in plasma of patients at different time points.

Name	Sex (Age)	Sampling	Concentration
YB Cha	M(55)	07-31	0.000
		08-01	0.207
		08-02	0.458
		08-03	0.215
		08-04	0.204
		08-05	0.638
SW Rhyu	M(64)	08-05	0.000
		08-06	0.034
		08-07	0.030
		08-08	0.063
		08-09	0.118
		08-10	0.044
HG Kim	M(58)	08-09	0.00
		08-10	0.126
		08-11	0.430
		08-12	0.169
		08-13	0.564
		08-14	0.466
NS Song	M(63)	08-09	0.221
		08-10	2.154
		08-11	0.283
		08-12	0.497
		08-13	0.987
		08-14	0.00
GS Chung	F(35)	08-15	0.034
		08-16	0.190
		08-17	0.279
		08-18	0.150
		08-19	0.278
		08-15	0.00
OS Lee	F(53)	08-15	0.001
		08-16	0.082
		08-17	0.789
		08-18	0.129
		08-19	0.101

3.6. 정확도 및 정밀도

위의 분석방법의 정확도 및 정밀도를 구하기 위해 3개의 농도(0.10, 0.20, 0.50 ppm)에서 3개의 시료를 반복 실험하여 구하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 그 결과 3가지 다른 농도 모두에서 상대표준편차가 8%이내임을 알 수 있었다.

3.7. 검출한계

Plasma 0.5 ml를 사용하였을 때 위의 실험방법에 의한 검출한계는 3 ng/ml임을 알 수 있었다. 이 값은 S/N 비가 3일때로 계산하였고 시료의 양을 늘일 경우 검출한계를 더 낮출 수 있었다.

3.8. 적용실험

앞에서 개발된 방법에 의해 실제 환자시료 500개 이상에 적용실험을 하였다. 이때 35개로부터 5-FU의 정량분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. 이 값들은 환자의 임상상태와 5-FU의 측정값을 비교 분석함으로써 환자의 치료효과를 연구하고 새로운 치료법을 개발하려는데 이용하였기 때문에 현재의 결과만으로는 특별한 의미부여가 어려우나 단지 이미 5-FU의 화학적 치료를 받고있는 암 환자로부터 혈중 항암제의 모니터링에 성공적으로 이용되었음을 보여주고 있다.

감사의 글

이 연구 내용은 과학기술처에서 시행한 원자력연구개발 중.장기 계획사업의 연구결과입니다.

참 고 문 헌

1. R. M. McSheehy, R. J. Maxwell and J. R. Griffiths, *NMR Biomed.*, **4**, 274(1991).
2. A. el-Tahtawy and W. Wolf, *Cancer Res.*, **51**, 5806(1991).
3. R. E. Port, P. Bachert and W. Semmler, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **49**, 497(1991).
4. P. E. Sijens, Y. M. Huang, N. J. Baldwin and T. C. Ng, *Cancer Res.*, **51**, 1384(1991).
5. A. M. Kumar and R. Nayak, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 1153(1990).
6. J. A. Bierman, H. Lingeman, H. J. Reeuwijk, E. A. de Bruijn, U. R. Tjaden and J. van der Greef, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7**, 611(1989).
7. R. J. Mullin and D. S. Duch, *J. Chromatogr.*, **555**, 254(1991).
8. J. A. Smith-Rogers, W. P. Tong, M. E. Duafala, M. Markman and J. R. Bertino, *J. Chromatogr.*, **566**, 147(1991).
9. V. Cavrini, D. Bonazzi and A. M. Di Pietra, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9**, 401(1991).
10. H. Imai and G. Tamai, *Biomed. Chromatogr.*, **3**, 192(1989).
11. C. G. Kindberg, C. M. Riley, J. F. Stobaugh and M. Slavik, J. Goldberg, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9**, 19(1991).
12. C. J. Van Groeningen, H. M. Pinedo, J. Heddes, R. M. Kok, A. P. de Jong, E. Wattel, G. J. Peters and J. Lankelma, *Cancer Res.*, **48**, 6956(1988).
13. J. R. Bronk, N. Lister and S. Lynch, *Clin. Sci.*, **72**, 705(1987).
14. G. D. Heggie, J. P. Sommadossi, D. S. Cross, W. J. Huster and R. B. Diasio, *Cancer Res.*, **47**, 2203(1987).
15. F. P. LaCreta and W. M. Williams, *J. Chromatogr.*, **414**, 197(1987).
16. L. J. Schaaf, D. G. Ferry, C. T. Hung, D. G. Pirrier and I. R. Edwards, *J. Chromatogr.*, **342**, 303(1985).
17. C. D. Bates, D. G. Watson, N. Willmott, H. Logan and J. Goldberg, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9**, 19(1991).
18. R. M. Kok, A. P. de Jong, C. J. van Groeningen, G. J. Peters and J. Lankelma, *J. Chromatogr.*, **343**, 59(1985).
19. C. Aubert, J. P. Sommadossi, P. Coassolo, J. P. Cano and J. P. Rigault, *Biomed. Mass Spectrom.*, **9**, 336(1982).
20. W. M. Williams, B. S. Warren and F. Lin, *Anal. Biochem.*, **147**, 478(1985).
21. E. A. De Bruin, U. R. Tjaden, A. T. van Osterom, P. Leeftang and P. A. Leclercq, *J. Chromatogr.*, **279**, 603(1983).
22. M. C. Cosyns-Dnyck, A. A. Cruyl, A. P. De Leenher, A. De Schryver, J. V. Huys and F. M. Belpaire, *Biomed. Mass Spectrom.*, **7**, 61(1980).
23. A. P. de Leenher and M. C. Cosyns-Duyck, *J. Chromatogr.*, **174**, 325(1979).
24. J. P. Cano, J. P. Rigault, C. Aubert, Y. Carcassonne and J. F. Seitz, *Bull. Cancer*, **66**, 67(1979).
25. D. B. LaKings and R. H. Adamson, *J. Chromatogr.*, **146**, 512(1978).