

## FAAS를 이용한 혈중 Cisplatin의 분석법 개발

백만정 · 임호섭 · 정미진 · 이경옥 · 신호상<sup>†</sup>  
서울임상병리검사센터(SCL), 서울의과학연구소  
<sup>†</sup>공주대학교 환경교육학과  
(1998. 2. 2 접수)

### The Development of Cisplatin Analysis Method in Plasma by Flameless Atomic Absorption Spectrometry

Man-Jeong Paik, Ho-Sub Lim, Mi-Jin Jeong, Kyoung-Ok Lee and Ho-Sang Shin<sup>†</sup>  
Seoul Clinical Laboratories (SCL), Seoul Medical Science Institute, Seoul 140-230, Korea  
<sup>†</sup>Department of Environmental Education, Kongju University, Kongju 314-701, Cheung Nam  
(Received February 2, 1998)

**요 약 :** 백금을 함유한 항암제로 신장과 신경계에 심각한 부작용을 일으키는 cisplatin의 혈중 농도를 flameless atomic absorption spectrometry법(FAAS)으로 분석하였다. 이 방법은 시료전처리 과정이 필요 없어 신속하고 간단한 분석법이다. 검정곡선에 대한 직선성을 조사한 결과 20~1000 ng/mL 농도 범위에서  $r=0.999$ 로 나타났으며, 정확도는 50 ng/mL 이상의 농도에서 상대표준편차가 5.0% 이하 이었다. 그리고, 혈장시료 200  $\mu$ L에 대한 검출한계는 10 ng/mL이었다. 본 방법은 cisplatin의 최적 치료 조건과 독성 경감을 위한 혈중 모니터링에 그 활용이 크게 기대된다.

**Abstract :** Cisplatin is a platinum-containing antitumor agent with nephrotoxic and neurotoxic side effects. An analytical method for measuring cisplatin in plasma by FAAS was developed, which is rapid, simple and need no sample preparation. The linearity test of calibration curve in the range of 20~1000 ng/mL showed good correlation coefficient of  $r=0.999$ . The result of accuracy test appeared to be relative standard deviation of < 5.0% at concentration range from 50 to 1000 ng/mL. When 200  $\mu$ L of plasma was used, detection limit was 10 ng/mL. Therefore, it can be applied for the monitoring in plasma for optimal condition of treatment and reduce of toxicity.

**Key words :** cisplatin, FAAS, plasma, total platinum

#### 1. 서 론

Cisplatin(*cis*-diamine dichloro platinum(II),  $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ )은 백금 주위에 암모니아와 염소이온들이 *cis* 형태로 결합되어 있는 항암제로 두경부 종양 및 고환, 방광 및 난소암이나 자궁암 같은 비뇨생식계 종양치료에 매우 효과적이지만<sup>1,2</sup> 신장독성과 신경계의 부작용을 일으킨다고 알려져 있다.<sup>3-5</sup> 신장 독성은 적당한 이뇨제의 사용과 충분한 수액의 공급으로 어느정도 극복이 되고 있으나, cisplatin의 투여가 반복되고 총 투여량이 증가하면서 신경계 독성, 특히

말초신경에 대한 독성의 발현으로 환자에게 더 이상의 화학요법을 할 수 없게되며, 화학요법을 중단한 후에도 그 신경계에 대한 부작용은 쉽게 개선되지 않아 심각한 후유증을 남긴다.<sup>4</sup> 최근 이러한 cisplatin에 대한 신경계 독성은 체내 glutathione의 부족시 심하며, glutathione의 투여에 의해 cisplatin의 신경계 독성을 어느정도 예방할 수 있다는 보고가 발표되고 있다.<sup>5</sup> 그러나, 암세포내에서는 glutathione의 농도가 높은 경우 cisplatin에 대한 내성의 원인이 될 수 있어, 체내의 glutathione의 농도를 저하시키는 것이 cisplatin에 대한 내성 극복의 방법이 될 수 있

다는 보고도 있다.<sup>6</sup> 그러나 이렇게 cisplatin의 신경계 독성방지를 위해서 glutathione을 투여하는 것이 치료에 도움이 되는지의 여부는 아직 확실하게 결론지을 수 없다. 한편 위의 약물의 독성을 감소시키고, 효율을 증가시키기 위한 노력으로 1300여종의 cisplatin 유사 약물이 합성되었고,<sup>7-10</sup> 독성과 연관이 있는 체내 대사체를 모니터링하고 혈중 cisplatin의 분석법 개발에 대한 중요성이 강조되고 있다.<sup>11</sup> 현재까지의 연구에 의하면 cisplatin중 백금의 분석은 혈액, 혈장, 뇨 그리고 조직을 균일하게 만든 후 직접 분석하는 flameless atomic absorption spectrometry법 (FAAS),<sup>3,12-14</sup> cisplatin의 대사체들을 동시에 분석하는 high performance thin layer chromatography (HPTLC)법,<sup>9</sup>과 high performance liquid chromatography(HPLC) 법을 많이 이용하고 있으며, 검출기로 UV detector,<sup>10-16,17</sup> electro chemical detector (ECD),<sup>18-20</sup> 및 radioactivity detector<sup>21</sup>등이 이용되고 있다. 특히 HPLC 분석법은 기능이 있는 그룹들에 대한 선택성이 좋고 대사체 각각에 대한 차별 분석이 가능하지만, cisplatin이 비수용성용매에 대한 용해도가 낮고, 전처리 시간이 길어 생화학적 대사체의 변성을 초래하는 문제점이 있다. 그리고 ECD법의 경우 감도는 높지만 조건 설정이 어려우며, postcolumn derivatization UV 법은 최근 Pt<sup>2+</sup>에 감도가 특히뛰어난 것으로 보고 되고 있지만, 전처리 과정이 복잡하고, 분석시간이 길다는 단점이 있다. 이외에 HPLC와 FAAS를 결합하여 HPLC법의 element specific response 결핍을 보강하고,<sup>22</sup> inductivity coupled plasma(ICP)<sup>11</sup>와 ICP-mass spectrometry(ICP-MS)<sup>11</sup>를 결합하여 검출한계를 낮추고 감도를 향상시킨 방법과 isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)와 electrothermal atomic absorption spectrometry(EAAS)의 matrix에 대한 영향을 비교 분석하여 GC-MS의 장점을 보고하였지만, 이들 장비들은 고가이기 때문에 routine 분석에 이용하는데 어려움이 있다.<sup>8</sup>

본 연구에서는 cisplatin의 최적 치료조건을 위한 혈중에서의 신속한 모니터링을 실시하기 위하여 FAAS 방법을 이용하였으며 이 방법은 시료 전처리 과정이 따로 필요없이 직접 분석이 가능하고, 분석시료양이 적게 필요하며 분석시간이 짧아 적합한 분석법이라고 할 수 있다.

## 2. 실험

### 2.1. 기기 및 시약

본 연구에서 사용한 graphite furnace(zeeman) atomic absorption spectrometer는 Varian사제, Spectr AA-800/GTA100이다. Cisplatin은 원자력병원으로부터 공급받아 사용하였으며, platinum 표준용액(970 µg/mL)은 Aldrich사제, Triton X-100과 antifoam B는 Sigma사제, 그리고 HNO<sub>3</sub>는 Merck사제 특급시약이다.

### 2.2. 표준용액 조제

백금 표준용액(970 µg/mL)과 cisplatin(500 µg/mL) 표준용액 일정량을 정확하게 취해서 각각 0.1% HNO<sub>3</sub> 용액으로 묽혀 20~1000 ng/mL로 조제한 후 4°C에 보관하여 사용하였다.

### 2.3. 시료 수집

본 연구에서 바탕시료, 검정곡선작성, 정확도와 검출한계 측정에 사용한 혈장은 본 연구소의 생화학 검사실에서 생화학검사 결과 정상으로 판정된 사람의 혈장을 성별, 연령별 구분 없이 모아서 충분히 혼합하고, 원심분리하여 상층액만을 conical test tube에 모았다. 이어서 회전식 혼합기에서 균일하게 혼합한 후 -70°C deepfreezer에 보관하여 사용하였다.

### 2.4. 검정곡선 작성, 정확도와 검출한계 측정

혈장에 백금 또는 cisplatin 표준용액을 각각 첨가하여 20~1000 ng/mL로 조제한 후 표준시료첨가법을 이용하여 검정곡선을 작성하고 정밀도 및 정확도를 조사하였다. 그리고, 혈장 200 µL를 사용했을 때 cisplatin의 검출한계를 American Industrial Hygiene Association(AIHA)<sup>23</sup>의 방법을 이용하여 계산하였다. 이때 cisplatin 표준시료 분석의 검정곡선 작성시 얻어진 식  $y=0.0003X-0.001$ 과 cisplatin 20 ng/mL을 세 번 분석하여 얻어진 흡광도값  $0.005 \pm 0.001(M \pm SD)$ 을 이용하였다. 계산은 흡광도의 표준편차값을 세 배 곱한 값을 검정곡선식의 기울기 값으로 나누었다( $3S/b$ :  $S$ =standard deviation of absorbance,  $b$ =slope of calibration curve).

### 2.5. 시료 전처리

백금 또는 cisplatin이 각각 0.50 µg/mL 함유된 조

Table 1. Sample preparation by standard addition method

| Name       | Plasma* | 3th  | 0.5%   | 0.1%             | Total |
|------------|---------|------|--------|------------------|-------|
|            |         | D.W. | Triton | HNO <sub>3</sub> |       |
|            |         |      | (μL)   |                  |       |
| Blank      | 0       | 200  | 200    | 200              | 600   |
| Addition 0 | 200     | 0    | 200    | 200              | 600   |
| Addition 1 | 200     | 0    | 200    | 200              | 600   |
| Addition 2 | 200     | 0    | 200    | 200              | 600   |
| Addition 3 | 200     | 0    | 200    | 200              | 600   |

\*Concentration of cisplatin or platinum in plasma is adjusted to final concentration, (0.20, 0.50 and 1.00 μg/mL) followed by 200 μL of plasma is added.

Table 2. Instrument setting for the determination of cisplatin in plasma by FFAS

| Parameter             | Condition         |
|-----------------------|-------------------|
| Element               | Pt                |
| Calibration mode      | Standard addition |
| Measurement mode      | Peak height       |
| Sampling mode         | Premix            |
| Lamp Position         | 2                 |
| Lamp current          | 10.0              |
| Slit width            | 0.5               |
| Slit height           | Reduced           |
| Wave length           | 265.9             |
| Background correction | on                |
| Sample volume         | 20 μL             |

성이 균일한 혈장을 만든 후, 백금 또는 cisplatin 표준용액을 0.00, 0.20, 0.50 그리고 1.00 μg/mL 함유되도록 가한다음, 각각 200 μL씩 정확히 취하였다. 그리고, 0.5% Triton X-100 용액 200 μL과 기포제거제로 antifoam B를 소량 가한다음 0.1% HNO<sub>3</sub> 용액 200 μL을 가하여 최종부피가 600 μL 되도록 표준용액을 만들었다. 이때 바탕시험용액은 백금 또는 cisplatin 표준용액을 가한 혈청대신 3차증류수 200 μL을 취하고, 위와 같은 방법으로 만들었는데, 표준용액 및 바탕시험 용액의 조제방법은 Table 1과 같다. 위의 혼합용액중에서 20 μL을 정확히 취하여 furnace에 주입하고, Table 2에 수록된 최적기 및 측정조건에서 흡광도를 측정하였다. 이때, furnace의 온도 조건은 300°C 범위의 건조단계를 지나 900°C에서 회화시키고 이어서 2800°C에서 원자화 시켰다.

### 3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 FAAS법을 이용한 전체의 백금농도

분석을 통하여 cisplatin의 혈중 농도 분석법을 개발하였다. 이러한 FAAS법의 장점은 원자화 효율이 좋고, 감도가 높아 ng/mL의 검출 범위를 갖고 있다. Siddik<sup>13</sup>등이 시료 물집 목적으로 0.1 M HCl을 사용한 반면, 본 방법에서는 0.1% HNO<sub>3</sub>와 계면 활성제인 Triton X-100을 사용하였다. HCl을 사용할 경우 matrix 내에서 가열될 때 휘발성 물질의 생성으로 회수율이 감소되는 문제점이 발생할 우려가 있기 때문에 사용하지 않았다. 기포제거를 위해서는 소량의 antifoam B를 가하였다. 그리고, 바탕선 보정법으로서 structured background와 스펙트럼 간섭을 보정할 수 있는 장점을 갖는 zeeman 보정법을 사용하여 간섭을 최대한 배제하여 분석을 수행 하였다.

#### 3.1. 검정곡선, 정확도 및 표준시료의 분석

현재까지의 연구중에서 일부 외부표준법으로 정량 분석한 방법이 보고되었는데,<sup>15</sup> 본 연구의 cisplatin의 분석에서는 실제 시료와 유사한 matrix 조건을 만들고 정확도를 증가시키기 위하여 표준시료 첨가법을 이용하였다. 또한 표준시료의 백금을 사용할때와 cisplatin을 사용할때의 차이를 보기 위하여 위의 두가지를 각각 표준물질로 사용하였다.

먼저 혈장에 첨가한 백금의 검정곡선에서 상관계수  $r=0.999(Y=0.00046X + 0.23184)$ 로 기존의 FAAS 분석에서 보고된<sup>14</sup> 0.98 및 GC-MS법<sup>8</sup>의 0.968보다 좋은 직선성을 나타냈으며(Table 3), cisplatin 또한 상관계수  $r=0.999(Y=0.00071X + 0.23184)$ 로 HPLC-ICP-

Table 3. Calibration table of platinum determination

| Platinum concentration added (ng/mL) | Absorbance* |
|--------------------------------------|-------------|
| Reagent blank                        | -0.003      |
| Addition 0**                         | 0           |
| Addition 1                           | 20          |
| Addition 2                           | 50          |
| Addition 3                           | 100         |
| Addition 4                           | 200         |
| Addition 5                           | 500         |
| Addition 6                           | 1000        |

Standard calibration curve  $Y=0.00046X + 0.23184$  ( $r=0.999$ )

\*Absorbance values are presented as a mean of the triplicate determinations.

\*\*Addition 0 is containing 500 ng/mL of platinum in plasma.

Table 4. Precision of platinum determination from plasma

| Pt concentration added (ng/mL) | Pt concentration found* (ng/mL) | % RSD |
|--------------------------------|---------------------------------|-------|
| 20                             | 19.3± 1.1                       | 5.9   |
| 50                             | 51.4± 1.1                       | 2.1   |
| 100                            | 98.0± 1.9                       | 1.9   |
| 200                            | 212.7± 5.0                      | 2.4   |
| 500                            | 538.0±12.2                      | 2.3   |
| 1000                           | 985.3±13.1                      | 1.3   |

\*Concentration values are presented as a mean ±SD of the six separate determinations.

Table 5. Precision of cisplatin determination from plasma

| Cisplatin concentration added (ng/mL) | Cisplatin concentration found* (ng/mL) | % RSD |
|---------------------------------------|--|-------|
| 20                                    | 17.5± 1.8                              | 10.5  |
| 50                                    | 49.6± 1.7                              | 3.5   |
| 100                                   | 98.0± 4.9                              | 5.0   |
| 200                                   | 205.4± 8.6                             | 4.2   |
| 500                                   | 511.0±18.2                             | 3.6   |
| 1000                                  | 980.1±30.5                             | 3.1   |

\*Concentration values are presented as a mean ±SD of the triplicate determinations.

MS법과<sup>11</sup> HPLC-radioactivity detection의 0.997 그리고 HPLC-UV법<sup>17</sup>의 0.998보다 좋은 직선성을 나타냈다. 정밀성 및 정확도를 조사한 결과에서 백금은 20 ng/mL을 제외하고 모두 2.5% 이하의 상대표준편차로 재현성이 있었으며, 정확도는 모든 범위에서 97% 이상으로 나타났다(Table 4). 그리고 cisplatin의 정밀성 및 정확도는 50 ng/mL 이상에서 5.0% 이하로 재현성이 있었으며, 정확도는 20 ng/mL의 88%를 제외하고 50 ng/mL 이상에서는 98% 이상을 나타냈다(Table 5). 이상의 결과와 같이 백금과 cisplatin을 각각 사용했을 때 뚜렷한 차이점이 없었다. 500과 1000 ng/mL에서 또한 cisplatin 표준시료중에 함유하고 있는 백금을 분석한 결과 이론적인 함량 65%와 다소 차이가 있는 62.8과 63.5%로 나타났다(Table 6).

Table 6. Contents (%) of platinum in cisplatin

| Cisplatin concentration added (ng/mL) | Pt concentration found* (ng/mL) | Theoretical contents of platinum in cisplatin (%) | Experimental contents of platinum in cisplatin** (%) |
|---------------------------------------|---------------------------------|---|--|
| 500                                   | 314±11                          | 65.0  | 62.8   |
| 1000                                  | 635±21                          | 65.0  | 63.5   |

\*Concentration values are presented as a mean ±SD of the triplicate determinations.

\*\* (Weight of Pt/weight of cisplatin) × 100.

### 3.2. 검출한계

Jones,<sup>12</sup> Reece<sup>14</sup> 그리고 Baldew<sup>21</sup> 등이 보고한 혈중에서의 FAAS에 의한 cisplatin의 검출 한계는 10~40 ng/mL 이었고, De Waal<sup>22</sup> 등의 분석법에 따른 비교에 의하면, HPLC-direct UV법의 경우는 150 ng/mL, postcolumn derivatization-UV 법은 40 ng/mL, 그리고 ICP-AES 법과 HPLC-radioactivity detection의 경우는 각각 35 ng/mL과 10 ng/mL 이었다. 그러나, 본 연구에서는 혈장시료 200 µL를 사용했을 때 cisplatin의 검출한계가 10 ng/mL로 비교적 낮게 나타났다. 그리고, 항암치료를 받는 환자의 혈장이나 뇨에서 한외여과후 검출되는 전체의 백금 농도가 0.25~50 µg/mL로 보고된 결과를 볼때,<sup>11</sup> 10 ng/mL의 cisplatin 농도는 platinum 농도로 환산하면 약 0.0065 µg/mL 정도이므로 제시된 방법은 혈중 cisplatin 분석에 충분한 감도를 갖고 있음을 알 수 있었다.

## 4. 결 론

본 연구를 통하여 FAAS에 의한 혈중 cisplatin 분석법이 개발되었다. 그 결과, Cisplatin에 대한 검정곡선은 20~1000 ng/mL 범위에서 상관계수  $r=0.999$ 로 좋은 직선성을 나타냈고, 50 ng/mL 이상에서 정밀성은 5.0% 이하의 재현성을 보였으며, 정확도는 98% 이상이었다. 그리고, 검출한계는 혈장 200 µL을 사용할 때 10 ng/mL으로 혈중 cisplatin 분석에 충분한 감도를 갖고 있음을 알 수 있었다.

일반적으로, HPLC 분석 방법의 경우 대사체 각각을 차별 분석 할 수 있는 장점이 있지만, 실제 임상시료에 적용할 때 시료 전처리 과정이 복잡하고 분석 시간이 많이 걸려 신속한 분석을 통하여 환자의 독성을 예측하고 저감시킬 수 있는 기술에 적용하기 어렵다. 반면, 본 연구를 통하여 확립된 FAAS에 의한 혈중 cisplatin의 분석법은 원자화 효율이 좋고 AAS 법보다 감도가 뛰어나며, 적은 시료량으로 전처리 과정없

이 분석할 수 있는 장점을 갖고 있어, 임상치료 분석에 충분히 응용이 가능할 것으로 사료되며, 특히 항암 치료를 받고 있는 환자의 독성을 신속하게 예측하고 모니터링 할 수 있는 가장 간단한 분석방법으로써 그 임상적 활용이 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 1996년도 보건 복지부에서 주관한 G7 의료공학 기술개발사업으로서 수행 되었다.

### 참 고 문 헌

1. 유병철, 한양대학교 의과대학 석사학위논문, 1 (1984)
2. J. Lokich, T. Zipoli and R. Green, *Cancer* **58**, 2389 (1986).
3. P. T. Daley and D.C. McBrien, *Biochem.*, **18**, 3063 (1983).
4. F. P. Hamers, W. H. Gispen and J. P. Neijt, *Eur. J. Cancer.*, **27**, 372 (1991).
5. S. Casxinu, L. Cordella, E. D. feno, M. Fronzoni and G. Catalano, *J. Clin. Oncol.*, **13**, 26 (1995).
6. C. Meijer and N. H. Mulder, *Cancer Res.*, **52**, 6885 (1992).
7. C. M. Riley, L. A. Sternson, A. J. Repta and R. W. Siegler, *J. Chromatogr.*, **229**, 373 (1982).
8. S. Aggarwal, N. Gemma, M. Kinter, J. Nicholson, J. Shipe, D. Herold, *Anal. Biochem.* **210**, 113 (1993).
9. B. D. Spiegelleer, G. Slegers and W. V. Bossche and P. D. Moerloose, *J. Chromatogr.*, **315**, 481 (1984).
10. C. M. Riley, L. A. Sternson, A. J. Repta, *J. Pharm. Science*, **72**, 351 (1983).
11. Z. Zhao, K. Tepperman, J. G. Dorsey and R. C. Elder, *J. Chromatogr.*, **615**, 83 (1993).
12. A. H. Jones, *Anal. chem.*, **48**, 1472 (1976).
13. Z. H. Siddik, F. E. Boxall and K. R. Harrap, *Anal. Biochem.*, **163**, 21 (1987).
14. P. A. Reece, J. T. McCall, G. Powis and R. L. Richardson, *J. Chromatogr.*, **306**, 417 (1984).
15. F. I. Raynaud, P. Mistry, A. Donaghue, G. K. Poon, L. R. Kelland, C. F. J. Barnard, B. A. Murrer and K. R. Harrap, *Cancer Chemother Pharmacol.*, **38**, 155 (1996).
16. R. Kizu, S. Higashi and M. Miyazaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4614 (1985).
17. R. Kizu, T. Yamamoto, T. Yokoyama, M. Tanaka and M. Miyazaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 108 (1995).
18. S. J. Bannister, L. A. Sternson and A. J. Repta, *J. Chromatogr.*, **273**, 301 (1983).
19. M. Treskes, J. D. Jong, O. R. Leeuwenkamp and W. J. F. Van der Vijoh, *J. Liquid. Chromatogr.*, **13**, 1321 (1990).
20. P. J. Parsons, P. F. Morrison and A. F. Leroy, *J. Chromatogr.*, **385**, 323 (1987).
21. G. S. Baldew, K. J. Volkers and J. J. M. De Goeij, *J. Chromatogr.*, **491**, 163 (1989).
22. W. A. J. De Waal, F. J. M. J. Maessen and J. C. Kraak, *J. Chromatogr.*, **407**, 253 (1987).
23. 대한산업보건협회, *산업보건*, **113**, 45 (1997).