

수은피막 박막흐름전지를 이용한 Anthracycline계 항생제의 전류법 정량

김경은 · 한영희*

상명대학교 자연과학대학 화학과
(2004. 8. 16 접수, 2004. 11. 24 승인)

Amperometric Determination of Anthracycline Antibiotics with the Mercury Film Thin Layer Flow Cell

Kyung Eun Kim and Younghee Hahn*

Department of Chemistry, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea
(Received Aug. 16, 2004, Accepted Nov. 24, 2004)

요 약 : 박막흐름전지 (TLFC)의 작업전극인 유리질 탄소전극 (GCE; $A=0.208 \text{ cm}^2$) 표면에 $5 \mu\text{L}$ 의 HgO 피복용액 (0.5% HgO + 0.25% polystyrene /cyclohexanone)을 피복시키고 pH 4.5 acetate buffer를 흘려주면서 -0.40 V에서 300초간 전해시켰을 때 doxorubicin의 전기환원에 대하여 최대의 감도를 나타내는 수은피막 박막흐름전지 (MFTLFC)를 제작할 수 있었다. MFTLFC에서 doxorubicin은 Ag/AgCl (3 M NaCl)에 대하여 -0.53 V에 이르러 확산전류 (I_d)값을 주었으며 수식하지 않은 GCE를 사용한 박막흐름전지 (TLFC)에서 보다 1.7배 더 큰 I_d 를 나타내었다. 붕우리 면적 (전하)을 doxorubicin 과 daunorubicin 표준용액 농도에 대하여 도시한 결과, $1.0 \times 10^{-8} \text{ M} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 농도범위에서 검량인자는 각각 $1.12 \times 10^8 \mu\text{C/M}$ (상관계수: 0.969) 과 $0.98 \times 10^8 \mu\text{C/M}$ (상관계수: 0.999)이었다.

Abstract : The mercury film thin layer flow cell (MFTLFC) which yielded the highest sensitivity for the electrochemical reduction of doxorubicin was constructed by coating the glassy carbon working electrode (GCE; $A=0.208 \text{ cm}^2$) with $5 \mu\text{L}$ of HgO coating solution (0.5% HgO + 0.25% polystyrene /cyclohexanone) and subsequently followed by applying a potential of -0.40 V for 300 sec in the flow stream of an acetate buffer of pH 4.5. The voltammogram of doxorubicin reached the diffusion current plateau at -0.53 V vs. a Ag/AgCl (3 M NaCl) in the MFTLFC. The diffusion current (I_d) of doxorubicin at the MFTLFC was 1.7 times greater than the I_d obtained at the TLFC employing a bare glassy carbon working electrode. When the peak areas (electric charge) were plotted vs. concentrations of standard anthracyclines, the calibration factors of doxorubicin and daunorubicin were $1.12 \times 10^8 \mu\text{C/M}$ (coefficient of determination; R^2 : 0.969) and $0.98 \times 10^8 \mu\text{C/M}$ (R^2 : 0.999), respectively in the

* Corresponding author

Phone : +82+(0)2-2287-5144 Fax : +82+(0)2-394-9585

E-mail : yhahn@smu.ac.kr

concentration range between 1.0×10^{-8} M and 1.0×10^{-6} M.

Key words : mercury film thin layer flow cell, doxorubicin, daunorubicin, flow injection analysis

1. 서 론

Doxorubicin 과 daunorubicin은 핵산과 결합하여 항암 작용을 나타내는 anthracycline계 항생제로서 폐암, 유방암, 백혈병 등의 종양치료에 널리 사용되고 있으나 심장에 유해한 부작용이 있어서, 임상적 적용에 있어서 약물의 혈중 농도를 정확히 감시할 필요가 있다. 한국 식품의약품안전청에서 발간한 항생물질의약품기준에 의하면 doxorubicin은 미생물학적 분석법인 원통평판법과 495 nm에서의 흡광도를 측정하여 역가를 시험하고 daunorubicin은 미생물학적 방법과 254 nm의 자외부 흡광광도계를 장착한 고성능 액체 크로마토그래프법(HPLC)으로 역가를 시험한다.¹ 미국약전(USP)², 영국약전(BP)³ 및 유럽약전(EP)⁴에서도 이들 항암항생제에 대한 분석방법으로 HPLC-UV (254 nm)를 채택하고 있다. 그 밖에 형광검출기^{5,6}, 전기화학검출기⁷, 질량분석기⁸를 활용한 HPLC 법과 탄소원형전극의 전기화학검출기를 장착한 모세관 전기영동법(CE)⁹이 문헌에 보고된 바 있다. Anthracycline계 항생제의 구조는 Fig. 1에 보여진 바와 같이 anthraquinone aglycone 과 이에 결합된 aminosugar로 구성되어 있으며 aglycone의 구조 내에 phenolic hydroxyl기와 quinone moiety의 전기 화학적 산화/환원이 HPLC 및 CE의 전기화학 검출의 근거가 된다. 전기화학 검출기를 장착한 HPLC-EC법에서는 palladium 기준전극에 대하여 -0.30 V에서 전기량을 측정하였고⁷, CE-EC법에서는 Ag/AgCl (3 M KCl)기준전극에 대하여 +0.95 V에서 전류를 측정하였다.⁹ 본 연구실에서는 Anthracycline계 항생제의 일종인 doxorubicin의 전기 화학적 거동을 수은전극에서 연구한 결과 전기환원에는 aglycone 내의 quinone moiety가 관여하고 H^+/e^- 비가 1임을 보고한 바 있다.¹⁰ HPLC의 전기화학 검출기로 널리 사용되고 있는 유리질 탄소 전극(glassy carbon electrode; GCE)은 전극활성물질의 표면흡착으로 인하여 검출한계 농도가 비교적 높고(10^{-7} M), 직선 농도범위가 크지 않아서 GCE를 수식하여 수은피막을 형성하는 방법을 모색하였다. 일반적으로 GCE에 수은 피막을 입히는 방법 중에는 전해질 용액으로 제조한 Hg(II)용액을

전기환원 시키거나, 시료 용액에 Hg(II)를 직접 첨가하여 분석물질과 함께 환원시키는 방법으로 주로 중금속 이온들의 산화전극 벗김 분석(anodic stripping analysis; ASV)에 이용되어왔다.¹¹⁻¹³ 최근에 수은 전구체로서 Hg_2Cl_2 , $HgCl_2$ 또는 HgO 를 고분자 결합체와 cyclohexanone에 용해시켜서 탄소 혼합 전극(carbon composite electrode)을 수식하고 Pb와 Cd 중금속이온에 대한 ASV 분석을 상세하게 연구한 실험에서 HgO 피복용액으로 수식한 전극의 감도가 제일 우수함을 Lee 등은 보고한 바 있다.¹⁴ 본 연구에서는 HPLC의 전기화학 검출기로 활용할 수 있는 수은피막 박막흐름전지(Mercury Film Thin Layer Flow Cell; MFTLFC)를 만들어서 anthracycline계 항생물질들을 전류법으로 분리 분석하려는 목적이어서 흐름관(flow line)을 오염시키지 않고 순수한 수은 피막만을 GCE 상에 형성시키고자 하였다. 그리하여 HgO 피복용액으로 GCE를 수식하고 전기환원시켜서 MFTLFC를 제작하고 doxorubicin 과 daunorubicin에 대한 흐름주입분석(Flow Injection Analysis; FIA)을 연구하였다. HgO 피복용액으로 수식하여 만든 수은피막 전극은 분석물질의 흡착 시 수은피막의 제거와 전극을 다시 수식하는 방법이 용이하였다.

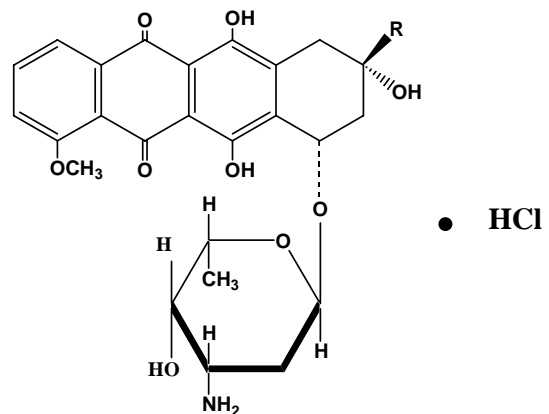


Fig. 1. Chemical structures of anthracycline antibiotics.
doxorubicin: R= $COCH_2OH$
daunorubicin: R= $COCH_3$

2. 실험

2.1. 기기

FIA를 실행하기 위해 Waters 600E Multisolvent Delivery System Pump (또는 영린 SP930D 용매이송펌프), Waters model U_{6k} Universal LC Injector (또는 Rheodyne injector 7725-018), BAS model CC-5 Flow cell 과 LC-4C Amperometric Detector 그리고 Autochrowin version 2.0 plus software를 사용하였다. 박막흐름전지(thin layer flow cell; TLFC)는 유리질 탄소전극(glassy carbon electrode; GCE; A=0.283 cm²), Ag/AgCl (3 M NaCl) 기준전극과 stainless body의 보조전극으로 구성되었다.

2.2. 시약 및 용액

시약은 모두 1급 이상 분석용 시약을 사용하였으며 daunorubicin hydrochloride (C₂₇H₂₉NO₁₀ · HCl:95%) 와 doxorubicin hydrochloride (C₂₇H₂₉NO₁₁ · HCl:97%)는 동아 제약에서 제공하였다. 물은 이차 증류수 제조기(제일과학 model 0-102)에서 만들어진 증류수를 순수제조기(Millipore, model Milli-Q)에 통과시켜 물의 전기저항이 18MΩ이상인 것을 사용하였고, acetate buffer는 sodium acetate trihydrate (F.W. 136.08, Shinyo Co.) 13.605 g 을 물에 녹인 후, 고 순도 glycolic acid (Aldrich Co.)를 사용하여 pH 3.5 ~ 4.5로 조절하고 전체용액의 부피가 1.00 L가 되게 하였다. HgO 피복용액은 1 mL의 cyclohexanone이 들어있는 바이알에 5 mg의 polystyrene을 넣고 초음파 세정기(ultrasonicator)상에서 10분간 진동시켜서 완전히 용해시킨 후 2.5 mg의 HgO (Samchun Chem.)를 넣고 흔들어 균일한 용액을 제조하였다.

2.3. 수은피막 박막흐름전지 (mercury film thin layer flow cell; MFTLFC)의 제작

박막흐름전지(TLFC)의 GCE 표면에 수은피막을 형성시키기 위하여 일정량(2 ~ 10 μL)의 HgO 피복용액을 GCE 표면에 피복시킨다. 100 °C에서 10분간 건조시킨 후 실온으로 냉각하고 흐름전지(flow cell; FC)를 재조립한다. 이어서 FC에 pH 4.5 acetate buffer용액을 1.0 mL/min 속도로 흘려주면서 HgO로 수식된 GCE에 -0.4V를 일정시간(100 ~ 600초) 부하시켜서 HgO를 Hg로 환원시킨다.

3. 결과 및 고찰

3.1. HgO 수식 유리질 탄소전극의 SEM 사진

깨끗한 유리질 탄소전극(bare GCE)과 HgO 피복용액 5 μL를 입힌 GCE(HgO-수식 GCE) 그리고 HgO-수식 GCE를 -0.4 V에서 300초간 환원시킨 수은-피막 GCE를 주사현미경(Jeol, Model JSM-5600LV)으로 사진을 찍어 보았더니 Fig. 2와 같았다. SEM사진에서 a는 carbon tape(경계선 윗부분)를 대조하여 찍은 bare GCE 표면(경계선 아랫부분)이고 b는 HgO-수식 GCE로서 bare GCE표면에서 볼 수 없었던 HgO의 입자덩어리들을 관찰할 수 있었으며 c 와 d는 수은-피막 GCE로서 Hg의 입자들은 HgO의 입자들보다 작게 나타났다. 사진 c는 bare GCE에서 직접 수은-피막 GCE를 제작한 후 즉시 촬영한 사진이며, 사진 d는 bare GCE 와 HgO-수식 GCE의 사진을 각각 촬영한 후 수은-피막 GCE를 제작하고 찍은 사진으로서 c 와 d에서 수은 피막 형태상의 차이점은 없었다.

3.2. 수은피막 박막흐름전지(MFTLFC)에서 doxorubicin의 전압전류곡선

HgO로 수식하지 않은 TLFC와 수은-피막 GCE를 작업전극으로 사용한 MFTLFC에서 doxorubicin에 대한 전압전류곡선(voltammogram)을 각각 그렸다. 수은 전극 상에서 doxorubicin의 전기화학 거동은 pH 3.5 ~ 4.5의 acetate buffer를 지지전해질로 사용할 때 의가역적(pseudo-reversible)으로 나타난 바 있다.¹⁰ 그리하여 전압을 -0.2 V에서 -0.62 V 까지 30 mV 간격으로 바꾸어 주면서, pH 4.5 acetate buffer를 흐름전지 속으로 통과 시킬 때와 pH 4.5 acetate buffer로 제조한 1.0 × 10⁻⁵ M doxorubicin 용액 200 μL를 주입시켰을 때 흐르는 전류의 차이를 측정하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 수은-피막을 입힌 MFTLFC는 같은 실험 조건 하에서 TLFC보다 doxorubicin에 대하여 더 큰 전류 값을 나타내었으며 -0.53 V에 이르러 확산전류(diffusion current; I_d)를 나타내었다. MFTLFC의 확산전류(diffusion current; I_d)는 TLFC의 확산전류보다 약 1.7배 더 크게 나타났다. TLFC는 흔히 분석 대상물질이 GCE전극표면에 흡착할 경우 전기화학적 산화/환원 방법으로 처리하거나, 오염이 심할 경우에는 연마 등의 물리적인 방법으로 처리하게 되는데 TLFC의 GCE를 따로 분리하기도 어려우며 연마하고 세척하는데 오랜 시간이 소비된다. 그러나

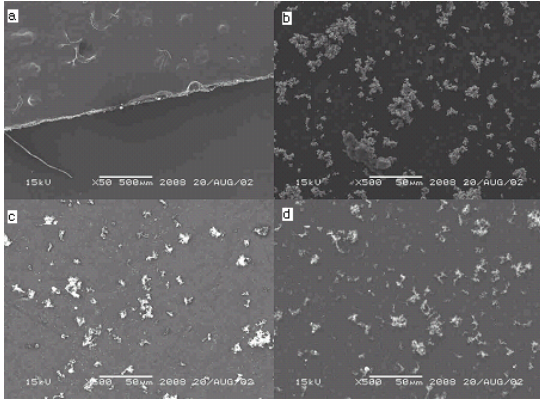


Fig. 2. Surface morphology of the HgO-modified GCE.

- a: bare GCE vs. carbon tape
 b: HgO-modified GCE
 c & d: Hg-film GCE

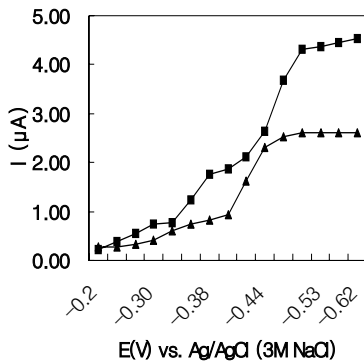


Fig. 3. Voltammograms of 1.0×10^{-5} M doxorubicin/acetate buffer of pH 4.5.

- ▲ : thin layer flow cell
 ● : mercury film thin layer flow cell
 (HgO coating solution; 10 μ L,
 electrolysis time; 300 sec)
 flow rate : 1.0 mL/min
 injection volume : 200 μ L

MFTLFC의 수은피막을 입힌 GCE는 분석물질이 흡착하였을 때 cyclohexanone을 묻힌 면봉으로 MFGCE 전극표면을 깨끗이 닦아준 후 polystyrene 과 수은이 전극표면에 잔류하지 않도록 진한 황산을 전극표면에 한 방울 떨어뜨리고 면봉으로 다시 닦아주면 된다. 표면이 깨끗하게 재생된 GCE를 실험 2.3 방법에 따라 다시 수은피

막을 입혀 MFTLFC를 제작하였으며 새로 피복된 수은피막은 8시간 동안 연속적으로 FIA를 실행할 수 있었으나 그 이후에는 잡음신호가 발생하고 안정한 base line을 얻기 힘들었다. 이 연구 실험기간 동안 동일한 GCE에 수은피막을 재생시켜서 사용하였다.

3.3. 실험조건에 따른 Hg 피막의 형성

실험 2.3의 MFTLFC 제작 방법에 준하여 GCE 작업 전극에 -0.4V를 부하하고 100초 ~ 600초간 전해시켜서 수은 피막을 형성시켰다. 그리고 전해시간을 각각 달리 한 MFTLFC를 사용하여 pH 4.5 acetate buffer로 제조한 1.0×10^{-5} M doxorubicin에 대한 Id측정을 -0.53 V에서 시행하였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 전해시간이 100초부터 증가할수록 Id가 증가하다가 300초 이상에서는 오히려 확산전류가 감소하였다. HgO 피복용액 10 μ L를 GCE에 피복시킬 때 -0.4 V에서의 전해시간은 300초가 최적이며 수은피막의 면적이 최대인 것으로 나타났다.

HgO 피복용액을 2, 5, 8 μ L 부피로 각각 GCE에 피복시킨 후 -0.4 V에서 전해시간을 300초로 고정하여 Hg 피막을 형성시키고 1×10^{-5} M doxorubicin 용액에 대한 Id측정을 하였다. Table 1에서 나타난 바와 같이 5 μ L까지는 Id가 증가하다가 8 μ L가 되면서 오히려 감소하였다. 따라서 본 실험의 FIA에서는 5 μ L의 HgO 피복용액 (0.5% HgO + 0.25% polystyrene /cyclohexanone)을 GCE ($A=0.208\text{cm}^2$)표면에 피복시키고 -0.4 V에서 300초간 전해시켜서 제작한 MFTLFC를 사용하였다.

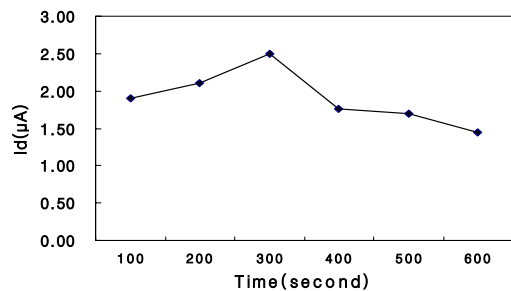


Fig. 4. Effects of electrolysis time on Id of 1.0×10^{-5} M doxorubicin.

- HgO coating solution; 10 μ L
 $E_{app} = -0.40$ V vs. a Ag/AgCl (3 M NaCl)
 injection volume : 200 μ L
 flow rate : 1.0 mL/min

Table 1. Volume effects of HgO coating solution on Id of doxorubicin & daunorubicin at the concentration of 1.0×10^{-5} M

volume (μ L)	Id (μ A)	
	daunorubicin	doxorubicin
2	3.15	2.93
5	5.24	5.80
8	1.52	1.88

3.4. MFTLFC에서 anthracyclines 용액에 대한 검량곡선

Doxorubicin과 daunorubicin 용액을 pH 3.5 acetate buffer를 사용하여 각각 1.0×10^{-8} M ~ 5.0×10^{-4} M 로 제조한 후, 이 anthracyclines 표준용액을 200 μ L씩 주입하여 FIA로 -0.53 V에서의 Id를 3번 반복 측정하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 3번 반복 측정한 1.0×10^{-6} M doxorubicin용액의 FIA data를 분석하면 봉우리높이는 5.13 ± 0.19 μ A (상대표준편차; 3.7%)이었고 봉우리면적은 153.95 ± 8.12 μ C (상대표준편차; 5.3%)이었다. Anthracyclines 표준용액에 대하여 봉우리 면적 (μ C)을 도시한 결과 1.0×10^{-8} M ~ 1.0×10^{-6} M 농도범위에서 doxorubicin 과 daunorubicin은 각각 1.12×10^8 μ C/M 과 0.98×10^8 μ C/M의 검량인자 (calibration factor)를 나타내었고 상관계수는 각각 0.969와 0.999로서 직선적이었다 (Fig. 6). 그러나 높은 농도범위 (5.0×10^{-6} M ~ 5.0×10^{-4} M)에서는 낮은 농도범위와 비교하여 검량인자가 doxorubicin은 0.53×10^8 μ C/M 이었고, daunorubicin은 0.32×10^8 μ C/M 로 낮았다. MFTLFC를 사용하여 FIA로 anthracyclines 항생제를 정량할 때, 2차수 농도 범위에서 직선적인 검량곡선을 그릴 수 있었고 10^{-8} M 농도 까지도 검출할 수 있었다. 봉우리 전류를 항생제 표준용액에 대하여 도시할 때에도 유사한 결과를 나타내었다.

MFTLFC를 HPLC의 검출기로 활용하면 다양한 anthracycline계 항생제와 대사산물, 또는 분해산물을 분리 분석할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 연구는 2004년도 상명대학교 자연과학연구소 학술연구비 지원으로 이루어졌습니다.

Doxorubicin 과 daunorubicin을 제공하여 주신 동아제약과 polystyrene을 공급하여 주신 건국대학교 화학과 박종만 교수님께 감사를 드립니다.

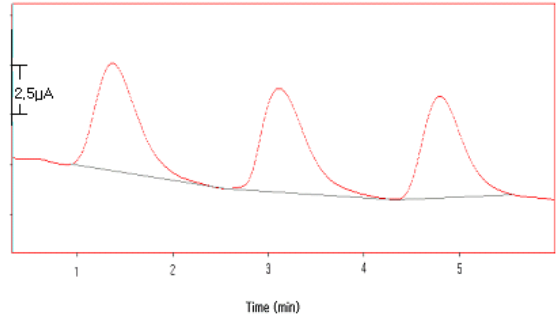


Fig. 5. FIA data of 1.0×10^{-6} M doxorubicin/acetate buffer of pH 3.5.

HgO coating solution; 5 μ L
 $E_{app} = -0.40$ V vs. a Ag/AgCl (3 M NaCl)
 electrolysis time; 300 sec
 injection volume : 200 μ L
 flow rate : 1.0 mL/min

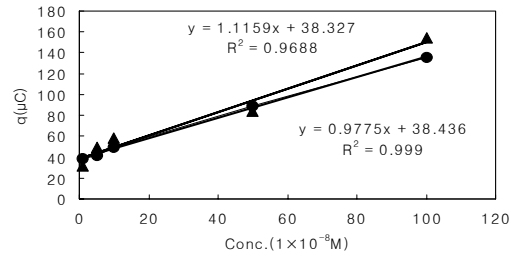


Fig. 6. Calibration curves of anthracyclines.

Concentration range: 1.0×10^{-8} M ~ 1.0×10^{-6} M
 ▲: doxorubicin ●: daunorubicin

참고 문헌

1. 한국 식품 의약품 안전청, “항생물질의약품기준”, 315-320, 약업신문사, 한국, 2000.
2. United States Pharmacopeial Convention, “U. S. Pharmacopeia & National Formulary”, 498, 606, National Publishing, Philadelphia, PA U.S.A., 2000.
3. British Pharmacopoeia Commission, “British Pharmacopoeia”, 492, 594, The Stationery Office, London, England, 2000.
4. European Pharmacopoeia Commission, “European Pharmacopoeia”, 706, 784, Council of Europe, Strasbourg, 1997.

5. P. W. Buehler, S. J. Robles, G. R. Adami, R. Gajee and A. Negrusz, *Chromatographia*, **49**, 557-561(1999).
6. L. Álvarez-Cedrón, M. L. Sayalero and J. M. Lanao, *J. Chromatogr. B*, **721**, 271-278(1999).
7. R. Ricciarello, S. Pichini, R. Pacifici, I. Altieri, M. Pellegrini, A. Fattorossi and P. Zuccaro, *J. Chromatogr. B*, **707**, 219-225(1998).
8. F. Lachâtre, P. Marquet, S. Ragot, J. M. Gaulier, P. Cardot and J. L. Dupuy, *J. Chromatogr. B*, **738**, 281-291(2000).
9. Q. Hu, L. Zhang, T. Zhou and Y. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **416**, 15-19(2000).
10. Y. Hahn and H. Y. Lee, *Arch. Pharm. Res.*, **27**, 31-34(2004).
11. R. G.-M. Carra, A. Sánchez-Misiego and A. Zirino, *Anal. Chem.*, **67**, 4484-4486(1995).
12. H. P. Wu, *Anal. Chem.*, **66**, 3151-3157(1994).
13. Y. Hahn and J.-Y. Yoo, *J. Kor. Chem. Soc.*, **41**, 180-185(1997).
14. T. Lee, K.-C. Chung and J. Park, *Electroanalysis*, **14**, 833-838(2002).