

Inductively coupled plasma mass spectrometry: een zeer gevoelige techniek voor het meten van metaalbevattende oncolytica

L.D. Moes ^{a*}, E.E.M. Brouwers ^b, J.H.M. Schellens ^{ce} en J.H. Beijnen ^{de}

^a Stagiair, student farmacie, Apotheek Slotervaartziekenhuis/Antoni van Leeuwenhoekziekenhuis/Het Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam.

^b Ziekenhuisapotheker in opleiding, Apotheek Slotervaartziekenhuis/Antoni van Leeuwenhoekziekenhuis/Het Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam.

^c Internist-oncoloog, afdelingen Medische Oncologie en Experimentele Therapie, Divisie Klinische Farmacologie, Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis/Het Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam.

^d Ziekenhuisapotheker, Apotheek Slotervaartziekenhuis/Antoni van Leeuwenhoekziekenhuis/Het Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam.

^e Afdeling Geneesmiddelen toxicologie, Divisie Farmaceutische Wetenschappen, Bètafaculteit, Universiteit Utrecht.

* Correspondentie: lambertusmoes@hotmail.com.

Kernpunten

- De verdere ontwikkeling van platinabevattende oncolytica vraagt om nauwkeurige en gevoelige methoden voor de kwantitatieve analyse van deze middelen.
- De veelzijdigheid van *inductively coupled plasma mass spectrometry* biedt door de hoge gevoeligheid veel mogelijkheden voor de analyse van platinabevattende oncolytica.

De remmende werking van cisplatine op tumoren is in 1965 per toeval ontdekt door de biofysicus Barnett Rosenberg [1]. Cisplatine veranderde testiscarcinoom van een levensbedreigende ziekte in een ziekte met een genezingskans van meer dan 80% [2]. Ruim veertig jaar later hebben de platinaverbindingen cisplatine, carboplatine en oxaliplatine (figuur 1) een belangrijke plaats ingenomen in de strijd tegen kanker.

Met de groeiende belangstelling voor platinabevattende oncolytica is de behoefte aan nauwkeurige en gevoelige methoden voor de kwantitatieve analyse van deze middelen toegenomen. De bepaling van platinabevattende oncolytica in klinische monsters is belangrijk voor begrip van de farmacokinetiek en de farmacodynamiek van deze middelen. De methoden die hiervoor nodig zijn, moeten platinaverbindingen en gevormde metabolieten kunnen meten in weefsel of biologische vloeistoffen als bloed, serum, plasma, ultrafiltraat en urine. Omdat platinabevattende oncolytica in het lichaam kunnen zijn gebonden aan eiwitten, DNA en andere kleine moleculen, is bepaling van deze adducten ook van belang. Naast de analyse van platinaverbindingen in biologische matrices ten behoeve van klinisch onderzoek, kunnen bepalingsmethoden worden ingezet om de mogelijke blootstelling van bereidend personeel aan deze cytostatica vast te stellen. In aanvulling op de bepaling van de opname van platinabevattende oncolytica in het

Abstract

Inductively coupled plasma mass spectrometry: a very sensitive method for determination of metal containing anticancer agents

The discovery of the antiproliferative properties of cisplatin had a major impact on the prognosis of several malignancies. The platinum-based drugs cisplatin, carboplatin and oxaliplatin continue to have a major role in medical oncology. Clinical monitoring of these drugs is important to understand their pharmacokinetics and pharmacodynamics. In addition, determination of platinum originating from anticancer agents is relevant to assess occupational exposure of health care personnel working with these compounds. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is a highly sensitive technique that is able to determine platinum-based agents in a wide range of sample matrices, including those of biological and environmental origin. Coupling of chromatographic methods to ICP-MS can be used for the separation of the parent compounds, their metabolites and the various reaction products. In the current review we provide an overview of the technique and the clinical applications of ICP-MS in platinum-based anticancer therapy.

PW Wetenschappelijk Platform 2009;3(12):212-216

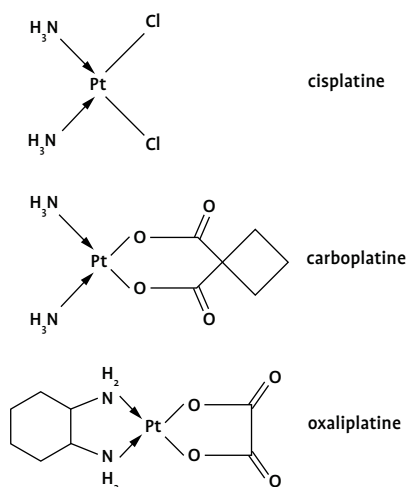
lichaam, geeft de analyse van oppervlaktemonsters informatie over verontreiniging op de werkplek.

Vanwege de beperkte beschikbaarheid van het monster en de lage concentraties geneesmiddel, zijn voor de eerder genoemde bepalingen gevoelige en specifieke methoden vereist. In de loop der jaren zijn verschillende technieken gebruikt om platinabevattende cytostatica te analyseren [3]. Een van deze technieken is massaspectrometrie (MS) met ionisatie in een inductief gekoppeld plasma (*inductively coupled plasma*, ICP). De eerste publicatie over de bepaling van platinaverbindingen met ICP-MS verscheen in 1990 [4]. Bijna twintig jaar later heeft ICP-MS in dit deelgebied van de oncologie een vooraanstaande positie verworven. De hoge gevoeligheid en de brede toepasbaarheid op zowel oppervlakte- als biologische monsters hebben hieraan bijgedragen [5, 6]. In dit artikel zullen de techniek en de verschillende toepassingen van ICP-MS als detectiemethode voor de bepaling van platinabevattende oncolytica worden besproken.

Inductively coupled plasma mass spectrometry

De detectiemethode ICP-MS gebruikt inductief gekoppeld plasma als ionisatietechniek voor massaspectrometrie (figuur 2). Het monsterintrysysteem is opgebouwd uit een vernevelaar en een peristaltische pomp. Dit systeem zet het vloeibare monster om

Figuur 1
Structuurformules van platinabevattende oncolytica



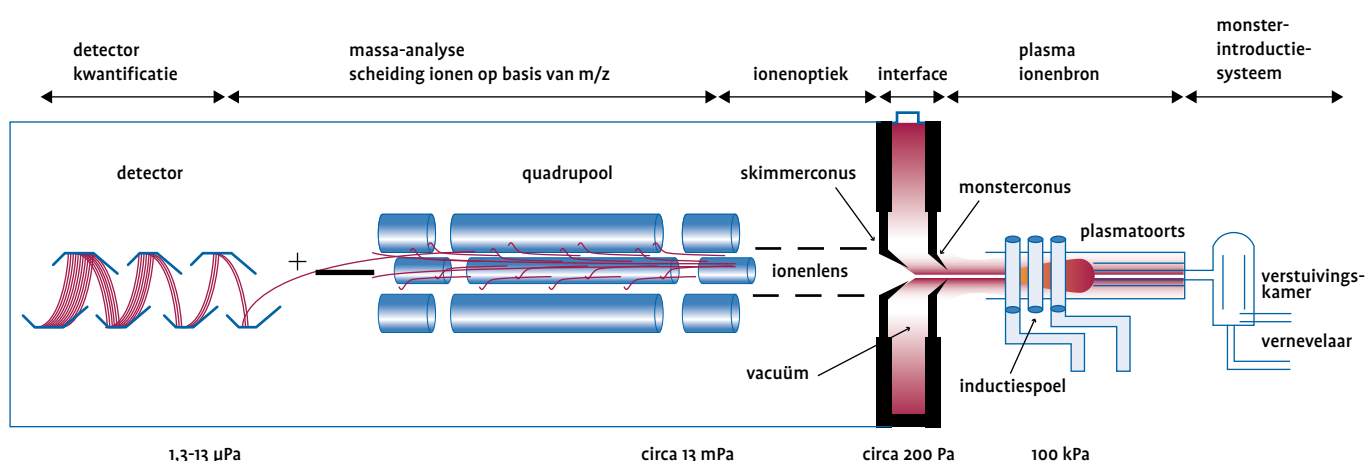
in een aerosol die in de verstuivingskamer terecht komt. Onder invloed van de zwaartekracht scheidt de verstuivingskamer de druppeltjes in de aerosol op grootte, zodat alleen de kleinste druppeltjes het ICP kunnen bereiken.

Een ICP is opgebouwd uit drie concentrische kwartsbuizen, de zogenaamde toorts, waarin argongas stroomt (figuur 3.1). In de

buitenste buis stroomt het koelgas, dat de wanden van de toorts beschermt tegen de hoge temperaturen van het plasma. Tevens vormt het koelgas de belangrijkste bron voor de instandhouding van het plasma. Rondom de centrale buis stroomt het hulpgas, dat de positie van het plasma in de toorts kan aanpassen. Een stroom argongas door de centrale buis leidt het monster naar het plasma. Een inductiespoel, aangesloten op een generator van radiofrequente stroom, omsluit het bovenste deel van de toorts en is in staat in de toorts een magnetisch veld op te wekken (figuur 3.2). Een elektrostatistische ontlading in het gas zet een proces in gang waarbij elektronen worden vrijgemaakt van argonatomen (figuur 3.3). Onder invloed van het magnetische veld veroorzaakt dit een kettingreactie van botsingen, wat resulteert in de vorming van een plasma (figuur 3.4). Het plasma kan temperaturen bereiken van 6000 tot 8000 K. In het plasma ondergaan de aerosoldruppels processen als desolvatie, dissociatie, atomisatie en ionisatie (figuur 3.5) [8]. De in het monster aanwezige moleculen worden afgebroken tot atomen en voornamelijk omgezet in eenwaardig geladen ionen. Dit maakt plasma een ideale bron voor massaspectrometrie. Een belangrijk verschil met ionisatietechnieken als elektropray-ionisatie en *matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI) is dat door de kracht van het plasma alle moleculen volledig uiteenvallen in de elementen waaruit ze zijn opgebouwd.

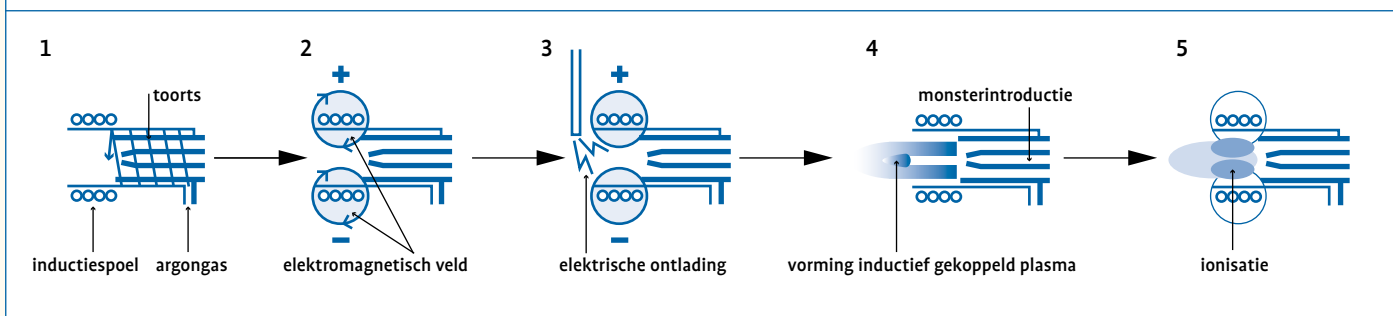
Een interface koppelt het ICP aan de massaspectrometer om de ionen in staat te stellen de verschillen in druk en temperatuur tussen beide compartimenten te overbruggen. De interface bestaat uit twee trechtervormige conussen en een mechanische pomp, zodat op efficiënte wijze de ionen van atmosferische druk naar

Figuur 2
Schematische weergave van een massaspectrometer met inductief gekoppeld plasma [5]



Figuur 3

Schematische weergave van de vorming van inductief gekoppeld plasma [7]



vacuümomstandigheden worden overgebracht. Direct achter de interface bevindt zich de ionenlens, die de ionen in de richting van de massaspectrometer stuurt. In de meeste gevallen wordt een quadrupool gebruikt als massaspectrometer. De quadrupool is opgebouwd uit twee paar parallelle staven. Door een bepaalde spanning op deze staven te zetten, kunnen alleen ionen met de geselecteerde verhouding massa/lading (m/z) de quadrupool passeren. Omdat een quadrupool snel de spanningsinstellingen kan veranderen, kunnen in een kort tijdsbestek vele massa's en dus vele elementen worden bepaald. De ionen die de quadrupool passeren, arriveren op het actieve oppervlak van de detector. De detector is in feite een elektronenvermenigvuldiger, die een cascade aan elektronen vrijgeeft totdat een signaal meetbaar is. Dit signaal staat in verhouding tot het aantal ionen dat de detector heeft geraakt.

ICP-MS wordt gebruikt voor de bepaling van metalen zoals platina en lood, alsook voor de bepaling van elementen die niet tot de groep van metalen behoren, bijvoorbeeld de metalloïden antimoon [9] en boor [10] en het halogeen jood [11]. De hoge gevoeligheid (tot 10^{-12} g/l) en het vermogen meerdere elementen in één monster tegelijk te bepalen onderscheiden ICP-MS van vergelijkbare detectiemethoden als atoomabsorptiespectrometrie (AAS) en atoomemissiespectrometrie (AES).

Platinaverbindingen in biologische monsters

Na intraveneuze toediening worden platinaverbindingen omgezet in gehydrolyseerde metabolieten. Deze reactieve metabolieten verdelen zich snel over het lichaam en komen vrij voor in de bloedbaan of gebonden aan plasma-eiwitten, erythrocyten en witte bloedcellen. Vanwege de snelle biotransformatie en hoge reactiviteit van de metabolieten is farmacokinetisch onderzoek van de moederstof of de metabolieten technisch moeilijk en in de praktijk niet uitvoerbaar. Daarom is de bepaling van de totale hoeveelheid platina een algemeen geaccepteerde benadering voor de analyse van

platinabevattende oncolytica in verschillende biologische matrices [12, 13].

In 1990 werd voor het eerst gebruikgemaakt van ICP-MS in oncologisch onderzoek [4]. Sindsdien is ICP-MS uitgegroeid tot een geaccepteerde en veel gebruikte detectiemethode voor de bepaling van platina-atomen afkomstig van cytostatica in biologische vloeistoffen en weefsels. Het gebruik van ICP-MS voor de bepaling van de totale hoeveelheid platina levert informatie op die onafhankelijk is van de moleculaire structuur van de moederstof en zijn metabolieten.

In de literatuur staan analyses beschreven in plasma, serum, ultragefiltreerd plasma, ultracentrifugeerd plasma, eiwitgeprecipiteerd plasma en urine. Plasma en serum bevatten de eiwitgebonden en vrije platinaverbindingen, ultragefiltreerd, ultracentrifugeerd en eiwitgeprecipiteerd plasma bevatten de vrije fractie, die als farmacologisch actieve fractie wordt beschouwd [14]. Zenuwweefsel en nierweefsel zijn naast tumorcellen de meest onderzochte weefsels. Onderzoek van genoemde weefsels is met name interessant vanwege de renale en neurale toxiciteit die kenmerkend is voor platinabevattende cytostatica.

De hoge gevoeligheid van ICP-MS maakt het mogelijk na behandeling met platinaverbindingen de platina-accumulatie in het lichaam op lange termijn te evalueren [15-17] en platina te bepalen in kleine hoeveelheden weefselmonsters. Analyse van late blootstelling, jaren na de laatste toediening, kan inzicht verschaffen in relaties tussen blootstelling gedurende de tijd en toxiciteit. In figuur 4 zijn de resultaten van een studie naar de retentie van platina in het lichaam op lange termijn weergegeven [17]. Ieder punt in figuur 4 komt overeen met de platinaconcentratie in plasma (ng/l) van één patiënt op het op de x-as aangegeven moment.

Platinaverbindingen gebonden aan DNA

Hoewel het exacte werkingsmechanisme van platinaverbindingen niet bekend is, wordt aangenomen dat de binding van platina aan

DNA in de celkern de bepalende stap is die leidt tot celdood. Na intraveneuze toediening en het binnengaan in de cel, binden de gevormde reactieve metabolieten aan verschillende biomoleculen, waaronder DNA. De reactieve metabolieten binden DNA bij voorkeur op de nucleofiele N7-posities van de purinebasen guanine en adenine. Dit leidt tot de vorming van DNA-adducten tussen basen in dezelfde keten (intrastrand) of tegengestelde ketens (interstrand) [18]. De gevormde platina-DNA-adducten beïnvloeden de replicatie en de transcriptie van DNA en remmen hiermee de tumorgroei. Dit mechanisme maakt de bepaling van de hoeveelheid DNA-adducten in het lichaam interessant. Van de moleculen cisplatine en carboplatine die cellen weten binnen te dringen, slaagt slechts 1% erin te binden aan DNA-moleculen [19]. Gezien de kleine hoeveelheid platina die aan DNA bindt, is een gevoelige techniek vereist om een dergelijke bepaling te kunnen uitvoeren. De hoge gevoeligheid van ICP-MS maakt dit mogelijk. In de literatuur zijn verschillende studies beschreven waarin ICP-MS gebruikt wordt om DNA-adducten te kwantificeren in witte bloedcellen en weefsels van patiënten na behandeling met platinabevattende oncolytica [20, 21]. ICP-MS is in staat platina-DNA-adducten te bepalen in slechts 1 mg weefsel, oftewel 5 µg DNA [22].

Platinaverbindingen in oppervlaktemonsters

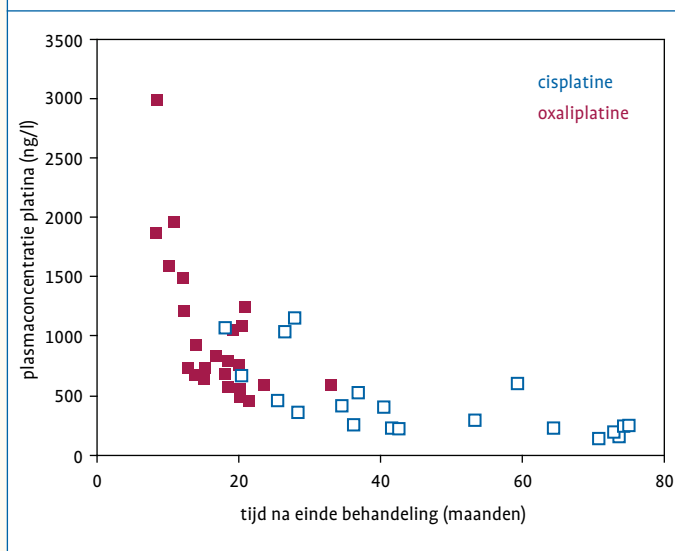
Platinaverbindingen spelen een belangrijke rol in de behandeling van kanker. Dit houdt in dat deze middelen op grote schaal voor toediening gereedgemaakt moeten worden. Blootstelling van ziekenhuispersoneel aan platinaverbindingen kan op verschillende manieren plaatsvinden: via direct contact bij bereiding of toediening van de cytostatica of door verontreiniging van de werkomgeving bij de productie van infusen met deze middelen. Daarnaast kan besmetting plaatsvinden via excreta of afvalwater. Onderzoek heeft namelijk aangetoond dat aanzienlijke hoeveelheden platinabevattende oncolytica via de urine van patiënten in het afvalwater kunnen terechtkomen [23]. Men dient rekening te houden met de eventuele gezondheidsrisico's die blootstelling van gezonde mensen aan cytostatica met zich meebrengt. Het is daarom van belang de besmettingsrisico's op de werkplek in kaart te brengen. Vanwege de lage concentraties platina die aanwezig zijn in de biologische monsters van personeel en in de oppervlaktemonsters van de werkomgeving, is ICP-MS een veelgebruikte methode voor deze bepalingen [24-26].

Scheiding voorafgaand aan ICP-MS

De farmacokinetiek van platinaverbindingen in het lichaam is complex. Daarom is de bepaling van de totale hoeveelheid platina een algemeen geaccepteerde methode voor de analyse van platinabevattende oncolytica in het lichaam. Het bepalen van de moederstof, de verschillende metabolieten en de gevormde adducten met DNA en eiwitten zoals albumine en transferrine is echter ook van

Figuur 4

Concentratie platina in plasma uitgezet tegen de tijd na het einde van de behandeling [17]



belang voor de verbetering van de kennis omtrent deze middelen. Hiertoe kan men een scheidingsmethode combineren met ICP-MS-detectie. Vloeistofchromatografie in combinatie met ICP-MS is een veelzijdige methode om de verschillende platinabevattende moleculen te scheiden. In de literatuur staan verschillende typen kolommen beschreven die voor deze analyses gebruikt worden, waaronder *reversed phase*, *size exclusion*, *ion-exchange* en *ion-pair*-chromatografie. De koppeling van HPLC aan ICP-MS vindt plaats door een slangetje te plaatsen tussen de uitgang van de HPLC-kolom en de vernevelaar van de ICP-MS. Bij de koppeling van beide technieken is de samenstelling van de mobiele fase een belangrijk punt van aandacht. Vanwege de negatieve invloed die organische oplosmiddelen en zouten hebben op de prestaties van de ICP-MS, moeten de hoeveelheden van deze stoffen in de mobiele fase tot een minimum worden beperkt [5].

Een voorbeeld van vloeistofchromatografie gekoppeld aan ICP-MS is de scheiding van de verschillende platinametabolieten gevolgd door detectie van platina in de fracties [27, 28]. Een ander voorbeeld van een dergelijke methode is de scheiding en detectie van platinacomplexen gebonden aan eiwitten [29]. Hoewel niet geheel duidelijk is welke rol die eiwitbinding speelt in het werkingsmechanisme van deze cytostatica, zou ze van invloed kunnen zijn op de effectiviteit en de bijwerkingen van deze middelen [30]. Scheiding en detectie van de verschillende platina-DNA-adducten is ook mogelijk [31]. Informatie over de verschillende DNA-adducten kan meer inzicht geven in het mechanisme dat verantwoordelijk is voor celdood. Tot

slot gebruikt men de genoemde combinatie voor het scheiden en detecteren van platinaverbindingen in oppervlaktemonsters en afvalwater [32]. Dit is van belang omdat de moleculaire structuur de toxiciteit van platina bepaalt.

Conclusie

De succesvolle toepassing van ICP-MS in de oncologie heeft grote invloed gehad op de ontwikkeling van de kwantitatieve analyse van platinabevattende oncolytica in biologische en oppervlaktemonsters. De hoge gevoeligheid van ICP-MS maakt deze techniek geschikt voor farmacokinetische studies en voor de bepaling van platina-accumulatie in cellen en de binding van platina aan DNA en eiwitten. Daarnaast kan met ICP-MS de mogelijke blootstelling van ziekenhuispersoneel aan platinabevattende oncolytica worden bepaald. De huidige ICP-MS-instrumenten zijn in staat metaal-elementen te kwantificeren tot concentraties van 10^{-12} g/l. Deze eigenschap maakt ICP-MS een bruikbare techniek voor verder onderzoek naar de behandeling van kanker met platinabevattende middelen en het zoeken naar de opheldering van het exacte werkingsmechanisme dat achter deze effectieve cytostatica schuilgaat.

LITERATUUR

- 1 Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965;205:698-9.
- 2 Masters JR, Koberle B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* 2003;3(7):517-25.
- 3 Hodes TJ, Underberg WJ, Los G, et al. Platinum antitumour agents: a review of (bio)analysis. *Pharm Weekbl Sci* 1992;14(3):61-77.
- 4 Tothill P, Matheson LM, Smyth JF. Inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of platinum in animal tissue and a comparison with atomic absorption spectrometry. *Anal At Spectrom* 1990;5:619-22.
- 5 Brouwers EE, Tibben M, Rosing H, et al. The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in clinical pharmacological oncology research. *Mass Spectrom Rev* 2008;27(2):67-100.
- 6 Brouwers E. Inductively coupled plasma mass spectrometry: a unique, ultrasensitive tool for exploring the pharmacology of metal based anticancer agents [proefschrift]. Amsterdam: Slotervaartziekenhuis/Het Nederlands Kanker Instituut; 2007.
- 7 Thomas R. A Beginner's Guide to ICP-MS. *Spectroscopy* 2001;16(6):26-30.
- 8 Jarvis KE, Gray AL, Houk RS. Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry. Londen: Blackie Academic & Professional; 1992.
- 9 Bazzi A, Nriagu JO, Inhorn MC, et al. Determination of antimony in human blood with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J Environ Monit* 2005;7(12):1251-4.
- 10 Linko S, Revitzer H, Zilliacus R, et al. Boron detection from blood samples by ICP-AES and ICP-MS during boron neutron capture therapy. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68(8):696-702.
- 11 Michalke B, Schramel P. Iodine speciation in biological samples by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Electrophoresis* 1999;20(12):2547-53.
- 12 De Waal WA, Maessen FJ, Kraak JC. Analytical methodologies for the quantitation of platinum anti cancer drugs and related compounds in biological media. *J Pharm Biomed Anal* 1990;8:1-30.
- 13 Yang Z, Hou X, Jones BT. Determination of platinum in clinical samples. *Appl Spectrosc Rev* 2002;37:57-88.
- 14 Calvert H, Judson I, van der Vijgh WJ. Platinum complexes in cancer medicine: pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to toxicity and therapeutic activity. *Cancer Surv* 1993;17:189-217.
- 15 Tothill P, Klys HS, Matheson LM, et al. The long-term retention of platinum in human tissues following the administration of cisplatin or carboplatin for cancer chemotherapy. *Eur J Cancer* 1992;28A(8-9):1358-61.
- 16 Screnci D, McKeage MJ, Galettis P, et al. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. *Br J Cancer* 2000;82(4):966-72.
- 17 Brouwers EE, Huitema AD, Beijnen JH, et al. Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin. *BMC Clin Pharmacol* 2008;8:7.
- 18 Bose RN. Biomolecular targets for platinum antitumor drugs. *Mini Rev Med Chem* 2002;2(2):103-11.
- 19 Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* 1998;34(10):1535-42.
- 20 Cooper BW, Veal GJ, Radivoyevitch T, et al. A phase I and pharmacodynamic study of fludarabine, carboplatin, and topotecan in patients with relapsed, refractory, or high-risk acute leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):6830-9.
- 21 Bonetti A, Apostoli P, Zaninelli M, et al. Inductively coupled plasma mass spectroscopy quantitation of platinum-DNA adducts in peripheral blood leukocytes of patients receiving cisplatin- or carboplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 1996;2(11):1829-35.
- 22 Brouwers EE, Tibben MM, Pluim D, et al. Inductively coupled plasma mass spectrometric analysis of the total amount of platinum in DNA extracts from peripheral blood mononuclear cells and tissue from patients treated with cisplatin. *Anal Bioanal Chem* 2008;577-85.
- 23 Lenz K, Hann S, Koellensperger G, et al. Presence of cancerostatic platinum compounds in hospital wastewater and possible elimination by adsorption to activated sludge. *Sci Total Environ* 2005;345(1-3):141-52.
- 24 Brouwers EE, Huitema AD, Bakker EN, et al. Monitoring of platinum surface contamination in seven Dutch hospital pharmacies using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int Arch Occup Environ Health* 2007;80(8):689-99.
- 25 Mason HJ, Blair S, Sams C, et al. Exposure to antineoplastic drugs in two UK hospital pharmacy units. *Ann Occup Hyg* 2005;49(7):603-10.
- 26 Ziegler E, Mason HJ, Baxter PJ. Occupational exposure to cytotoxic drugs in two UK oncology wards. *Occup Environ Med* 2002;59(9):608-12.
- 27 Zhao Z, Tepperman K, Dorsey JG, et al. Determination of cisplatin and some possible metabolites by ion-pairing chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *J Chromatogr* 1993;615(1):83-9.
- 28 Allain P, Heudi O, Cailleux A, et al. Early biotransformations of oxaliplatin after its intravenous administration to cancer patients. *Drug Metab Dispos* 2000;28(11):1379-84.
- 29 Szpunar J, Makarov A, Pieper T, et al. Investigation of metaldrug-protein interactions by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Anal Chim Acta* 1999;387:135-44.
- 30 Timerbaev AR, Alekseenko SS, Polec-Pawlak K, et al. Platinum metaldrug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin. *Electrophoresis* 2004;25(13):1988-95.
- 31 Hann S, Zenker A, Galanski M, et al. HPLC-UV-ICP-SFMS study of the interaction of cisplatin with guanosine monophosphate. *Fresenius J Anal Chem* 2001;370(5):581-6.
- 32 Hann S, Stefanka Z, Lenz K, et al. Novel separation method for highly sensitive speciation of cancerostatic platinum compounds by HPLC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2005;381(2):405-12.