

GC-MS/MS를 이용한 모발 중 암페타민 유도체 및 노르케타민 동시분석

김진영* · 신순호 · 고범준 · 정재철 · 서용준 · 인문교

대검찰청 마약감식실

(2009. 4. 26. 접수, 2009. 5. 18. 승인)

Simultaneous determination of amphetamine derivatives and norketamine in hair by GC-MS/MS

Jin Young Kim*, Soon Ho Shin, Beom Jun Ko, Jae Cheol Chung,
Yong Jun Suh and Moon Kyo In

Drug Analysis Laboratory, Supreme Prosecutors' Office, 706 Banpo-ro, Seocho-gu, Seoul 137-730, Korea

(Received April 26, 2009; Accepted May 18, 2009)

요 약: GC-MS/MS를 이용하여 모발 중 암페타민계 마약류 4종과 노르케타민의 동시 분석법을 확립하였으며 결과의 신뢰도를 높이기 위해 분석법 검정을 실시하였다. 모발 시료의 전처리 과정은 증류수와 아세톤을 이용하여 세척, 자동분쇄기를 이용한 세절, 메탄올 용매를 이용한 추출 및 배양 그리고 HFBA로 유도체화하는 단계를 거쳐 GC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. 그 결과 모든 분석물질에 대해 정량 범위 내에서 우수한 직선성을 나타내었으며, 실제 마약 복용자의 모발감정에 이용될 수 있는 충분한 감도와 선택성, 정밀도와 정확도를 확인하였다. 검정곡선의 결정계수(r^2)는 0.998 이상을 나타내었고 검출 한계는 0.007 ng/mg 이하였으며 회수율은 75.9-100.9%이었다. 일내 (intra-day) 및 일간 (inter-day) 정확도는 -2.6-17.0%의 범위를 나타내었으며 정밀도는 10.7%이하로 모두 기준값(20% 이하)이내의 값을 나타내었다. 확립된 분석법을 마약 복용자의 모발에 적용한 결과 메스암페타민의 농도 분포는 0.97-19.30 ng/mg이었으며 암페타민은 0.14-2.56 ng/mg이었다.

Abstract: A gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) method was developed and validated for simultaneous determination of amphetamine derivatives and norketamine in human hair. Preparation of hair involves external decontamination, mechanical pulverization, incubation and extraction prior to instrumental analysis. The samples were derivatized using heptafluorobutyric anhydride, and analyzed by GC-MS/MS. The linear ranges were 0.05-20.0 ng/mg for the analytes except for 3,4-methylenedioxyamphetamine, with good coefficients of determination ($r^2 > 0.998$). The intra-day and inter-day precisions were within 10.7% and 8.5%, respectively. The intra-day and inter-day accuracies were between -1.6 and 17.0% and -2.6 and 10.5%, respectively. The limits of detections for each analyte were lower than 0.007 ng/mg, while recoveries were 75.9-100.9%. When the method was applied to hair samples obtained from suspected drug abusers, the concentrations in hair samples were 0.97-19.30 ng/mg for methamphetamine and 0.14-2.56 ng/mg for amphetamine.

Key words: Amphetamine derivatives, norketamine, GC-MS/MS, hair

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-535-4173 Fax : +82-(0)2-535-4175

E-mail : paxus@spo.go.kr

1. 서 론

암페타민 유도체 범주에 포함되며 국내에서 남용빈도가 높은 마약류로는 메스암페타민(MA, methamphetamine), 엠디에이(MDMA, 3,4-methylenedioxy-methamphetamine), 엠디에이(MDA, 3,4-methylenedioxy-amphetamine), 펜터민(phentermine) 등이 있다. 이러한 합성마약류는 제조가 용이하고 구입비용이 저렴하고 환각효과가 오랜 기간 지속되는 것으로 알려져 있으며 복용 방법은 코로 흡입하거나 주사 또는 경구투여 등이 이용된다. 국내에서 가장 많이 남용되는 마약인 MA는 강력한 중추신경 흥분 작용을 일으키며 체내 대사과정을 거쳐 대사체로 암페타민(AP, amphetamine)이 형성되어 체외로 배설된다.¹ 또한 MDMA는 MA와 더불어 1990년대 말부터 사회적 문제를 일으킨 마약으로 주요 대사체는 MDA이다.² 엑스터시(MDMA)는 순수한 MDMA 단일 성분으로 유통되는 경우가 드물고 케타민(ketamine), MDA, 카페인(caffeine) 등과 혼합되어 유통된다.³ 특히 케타민은 대사과정을 통해 노르케타민(NKT, norketamine)으로 변형되고 이러한 대사체는 모약물의 복용여부를 확인하는 분석 물질로 이용되기도 한다.⁴ 케타민은 MA나 MDMA 만큼은 아니지만 최근 우리나라와 아시아 지역에서 남용이 증가하는 경향을 보여주고 있다.^{5,6} 따라서 국내에서 남용 빈도가 높고 향후 남용 가능성이 큰 이들 약물의 위험성이 커짐에 따라 복용여부 확인이 빠르고 간편한 분석법에 대한 요구와 관심이 집중되고 있는 상황이다.

법과학 분야 중 마약류 분석에 널리 쓰이는 시료는 소변, 혈액, 모발 등이다.⁷ 소변 및 혈액 분석이 최근의 복용여부에 대한 정보를 주는 반면, 모발은 소변 또는 혈액 등과 상호 보완을 이루는 분석 시료로서 수개월에서 1년 이내의 복용 여부 확인에 이용될 수 있다. 약물은 모근으로부터 모발에 축적되어 성장하게 되므로 모발의 길이에 해당하는 기간 동안 약물 복용 여부를 확인할 수 있으며, 모발 분할분석(sectional analysis)을 통해 상습 복용 여부도 확인할 수 있다.^{8,9}

일반적인 모발 분석 과정은 다섯 단계로 구분할 수 있다. 모발의 세척(decontamination), 세절(pulverization), 배양(incubation), 추출(extraction) 및 기기분석(instrumental analysis)으로 구성된다. 다섯 단계 중 모발의 세절 단계가 시간 소요가 많고 노동력이 많이 투입되는데, 가위를 이용하여 모발을 밀리미터 크기로 세절하는 방법, 쇠구슬(ball)을 이용하는 방법, 탄환모양의 비드(bead)를 이용하는 방법 등이 사용된다.¹⁰⁻¹² 이러

한 방법 중 쇠구슬이나 비드를 이용한 모발 분쇄방법은 가위로 세절한 모발의 크기에 비해 10배 이상 작은 모발 입자로 분쇄되므로 분석시 모발 자체에 포함되어 있는 기질(matrix)의 영향을 많이 받게 된다. 기질 내에 포함되어 있는 분석 방해물질을 효과적으로 제거하기 위한 방법으로 고체상 추출법(solid-phase extraction) 또는 액체상 추출법(liquid-liquid extraction)이 있으나 추가적인 전처리과정 도입에 따른 처리비용과 소요 시간이 발생하는 문제점이 있다.

전처리 단계 중 배양 및 추출과정의 단점을 극복하기 위해 도입된 방법이 직접추출법이다. 직접추출법은 배양과 추출과정을 한번에 처리함으로써 짧은 시간 안에 효과적인 추출이 이루어질 수 있도록 항온수조 내에서 초음파로 추출이 진행된다. 모발 중 암페타민 유도체 분석에 사용된 추출용매로는 5 M hydrochloric acid (HCl)/methanol (1:20, v/v), 0.25 M methanolic HCl, acetone, methanol 등이 사용된다.¹³⁻¹⁶ 다만 모발의 세절 방법에 따라 기질로부터 발생하는 방해물질이 분석에 미치는 영향이 다르므로 각각의 용매에 대한 비교 시험이 반드시 필요하다. 이는 세절된 모발의 입자 크기에 따라 용매에 따른 추출효율과 방해물질의 영향이 다르게 나타날 수 있기 때문이다.

마약류 분석에 주로 사용되는 방법으로는 기체크로마토그래피-질량분석법(GC-MS),^{14,17,18} 액체크로마토그래피와 대기압 하에서 이온화하여 분석물질을 검출하는 질량분석법(LC-MS/MS)^{19,21} 그리고 항온항체 반응을 이용하여 분석하는 면역반응측정법²² 등이 보고되어 있다. 본 연구에서는 국내에서 오남용 빈도가 높은 마약류 분석을 위해 분석 물질로 MA, AP, MDMA, MDA, NKT를 선정하였으며 마약 복용 여부를 빠르고 간편하게 확인할 뿐만 아니라 고감도 분석법 개발을 위해 시료 기질로부터 발생하는 방해물질을 효과적으로 차단할 수 있는 추출과정 개선, 시간과 노동력이 소요가 많은 모발 세절단계의 자동화 및 미량분석에 적합한 GC-MS/MS를 이용한 분석법 개발을 수행하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

2.1.1. 시약

표준물질과 내부표준물질은 각각 1 mL 용량의 유리병(vial)에 1 mg/mL 농도로 제조된 MA, AP, MDMA, MDA, NKT와 1 mL 용량의 유리병에 100 µg/mL 농도로 제조된 MA-d₁₁, AP-d₈, MDMA-d₅,

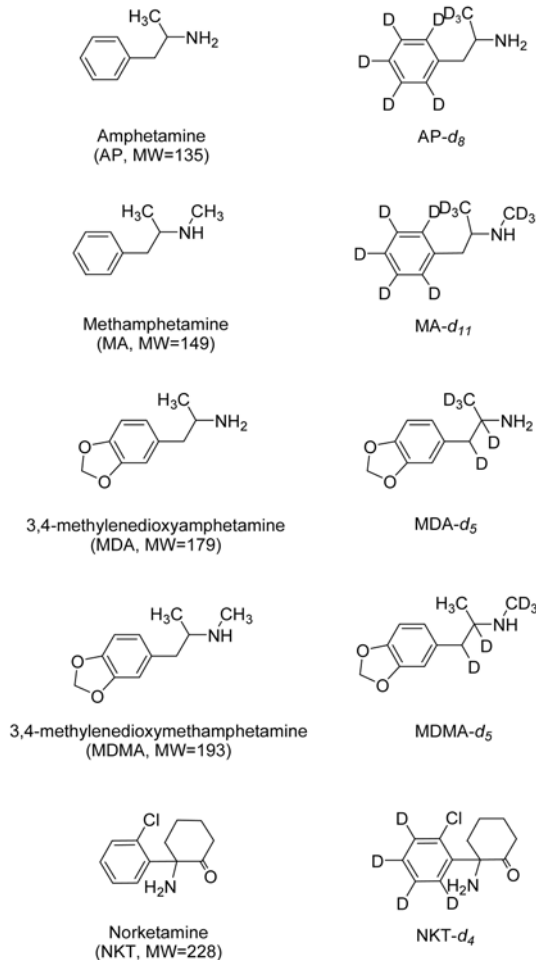


Fig. 1. Chemical structures of amphetamine derivatives and norketamine, and internal standards used.

MDA- d_5 , NKT- d_4 를 미국 Cerilliant사에서 구입하였다(Fig. 1). 메탄올, 아세톤 등의 용매는 미국 J. T. Baker사의 HPLC 등급 시약을 사용하였고 증류수는 Milli-Q water purification system을 통과한 3차 증류수를 이용하였다. 유도체화 시약으로 사용된 heptafluorobutyric anhydride (HFBA)는 벨기에 Acros Organics사로부터 구입하였다. 그리고 실험에 사용된 5종의 표준물질은 필요에 따라 메탄올에 녹여 희석시켜 조제하였으며, 사용하기 전까지 -20°C 에서 냉동 보관하였다.

2.1.2. 기구

모발 세정과정에서 사용한 분쇄기는 프랑스 Bertin Technologies사의 Precellys 24 자동분쇄기를 사용하였

고 세절에 사용된 용기는 6개의 스테인리스 스틸 구슬(2.8 mm diameter)이 담긴 2 mL 용량의 튜브를 사용하였다. 추출용매의 정제를 위해 영국 Whatman사의 PTFE (polytetrafluoroethylene) 시린지 필터(13 mm diameter, 0.2 μm pore size)를 사용하였고, 시료의 농축을 위해 미국 Caliper Lifescience사의 TurboVap LV 증발기를 사용하였다.

2.1.3. 분석기기

본 실험에서 사용된 분석기기는 미국 Agilent Technologies사 6890 Gas Chromatograph에 연결된 미국 Waters사 Quattro micro GC tandem mass spectrometer를 사용하였다. 분리관은 DB-5MS (30 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness, J&W Scientific, USA)를 사용하였으며, 분리관 온도는 90°C 에서 0.5 분간 유지시킨 후 계속하여 $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 150°C 까지 승온시키고 1.5 분간 유지시킨 후, 다시 상승 속도를 $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 바꿔 210°C 까지 승온시켜 1.5 분간 유지한 후 마지막 단계로 $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 310°C 까지 승온시키고 1.1 분간 유지하였다. 주입구와 검출기의 온도는 각각 260°C 와 280°C 로 설정하였다. 운반기체 헬륨의 유속은 1.1 mL/min이었으며, 주입방법은 splitless mode로 purge-on time은 0.35 분으로 설정하였다. 시료의 주입은 미국 Agilent Technologies사의 자동주입기(7683B automatic liquid sampler)를 사용하여 1 μL 씩 주입하였다.

질량분석기의 이온화 소스(source)의 온도는 200°C 로 설정되었고 이온화 방식은 EI (electron impact)이었으며 MRM (multiple reaction monitoring) 방법을 사용하여 정량하였다. MS/MS fragmentation을 위해 충돌기체로 아르곤을 이용하였으며 충돌이 일어나는 collision cell 내의 압력을 2.75 ± 1.0 mTorr로 유지하였다. 최대 감도와 최적의 product ion 생성 조건을 찾기 위해 collision energy를 5-15 eV 범위까지 변화시켰고 이때 분석물질의 precursor ion으로부터 생성된 특징적인 product ion을 선정하여 각각을 하나의 쌍으로 모니터링 하였다.

2.2. 시료채취

모발 시료는 2009년 3월 12일부터 3월 26일까지 본 기관에 의뢰되었던 마약 복용 용의자의 모발이며 검량선 작성 및 QC 시료 제조에 사용된 바탕시료 (blank hair)는 약물을 복용하지 않은 사람의 모발로 하였다.

2.3. 전처리 방법

모발 시료 10 mg을 시험관(16×100 mm)에 넣은 후, 증류수 5 mL로 2회, acetone 5 mL로 2회 진탕하여 세척하였다. 세척된 시료를 무균 상에서 1 시간 동안 건조시키고 프랑스 Bertin Technologies사의 자동분쇄기(Precellys 24)를 이용하여 5000 rpm에서 90 초간 모발을 분쇄하였다. 모발 시료가 담긴 튜브에 내부표준물질(0.3 µg/mg) 50 µL와 메탄올 1 mL를 첨가한 후 항온수조(50 °C)에서 1 시간 동안 초음파 추출하였다. 상층액을 PTFE 시린지 필터(13 mm diameter, 0.2 µm pore size)로 여과한 후, 일정한 압력(4.5 psi)과 온도(40 °C)하에서 질소기류를 이용하여 증발시켰다. 건조된 잔사에 아세톤 50 µL와 유도체 시약 HFBA 50 µL를 가하여 50 °C에서 30 분간 유도체 반응을 시켰다. 시료를 상온으로 냉각시킨 후 다시 혼합물을 질소기류 하에서 증발 건조시켰다. 건조된 시료를 ethyl acetate 50 µL로 녹여 1 µL를 GC-MS/MS에 주입하여 분석하였다.

2.4. 표준 검정곡선 작성

분석에 사용된 분석물질의 표준품은 1 mg/mL 농도로 제조된 MA, AP, MDMA, MDA, NKT를 메탄올에 녹여 순차적으로 100, 10, 1, 0.1 µg/mL 농도로 희석하여 표준용액을 제조하였다. 또한 동위원소로 치환된 내부표준물질인 MA-*d*₁₁, AP-*d*₈, MDMA-*d*₅, MDA-*d*₅, NKT-*d*₄도 메탄올에 희석하여 0.3 µg/mL이 되도록 내부표준용액을 제조하였다. 검정곡선을 작성하기 위해 모발 중 MDA를 제외한 분석물질의 농도는 0.05, 0.15, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 20 ng/mg이 되도록 하고, 내부표준물질은 모두 1.5 ng/mg이 되도록 하였다. 단

MDA의 모발 중 농도는 0.05, 0.15, 0.2, 0.5, 1, 5 ng/mg이 되도록 하였다. 앞에서 설정한 전처리 방법에 따라 시료를 처리한 이후 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 확인하고, 내부표준물질의 피크 면적에 대한 분석물질의 피크 면적 비를 가지고 검정곡선을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시료 전처리 방법의 최적화

시료로부터 분석물질을 효과적으로 추출하기 위해 모발 시료를 작은 크기로 세절하는 과정이 필요하다. 이때 모발 시료의 입자 크기가 작아질수록 입자의 표면적이 증가하게 되어 추출 효율이 높아지는 장점이 있다. 반면 추출 효율이 높아지면 결국 모발의 기질효과(matrix effect)에 의한 방해물질의 영향도 함께 커지게 되므로 모발 입자의 크기를 조절하여 분석물질의 회수율을 높이기 위한 작업이 필요하다.

모발 세절에 이용되는 기존 방법은 가위를 이용한 방법으로 시간 소모가 많고 노동력이 많이 소요되는 문제점이 있었다. 반면 쇠구슬(ball) 또는 비드(bead)를 이용한 자동분쇄 방법이 전처리 과정에 쉽게 적용되지 못했는데 이는 모발의 입자가 마이크로미터 수준으로 모발 입자의 크기가 작아지면서 같이 증가되는 방해물질의 영향을 효과적으로 차단하지 못했기 때문이다.

본 연구에서는 모발의 세절을 위해 24 개 시료를 동시에 처리가 가능한 Precellys 24 자동분쇄기를 이용하여 직경이 2.8 mm의 스테인리스 스틸 비드 6 개가 담긴 2 mL 용량의 튜브에 시료를 담아 5 000 rpm

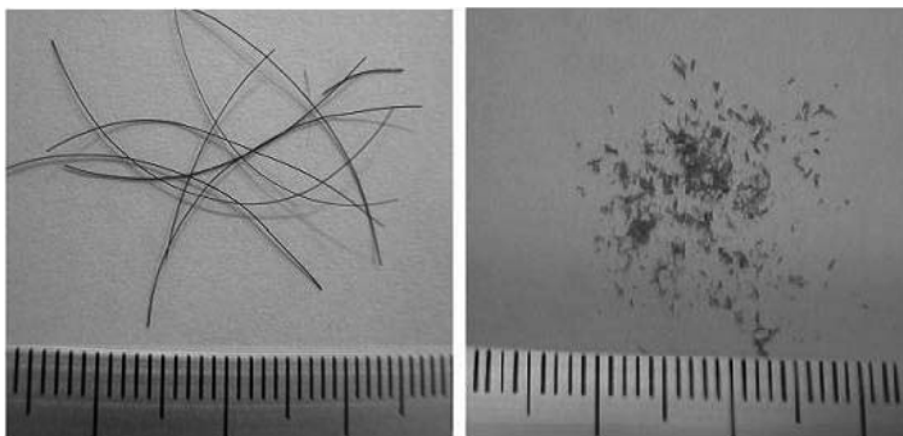


Fig. 2. Pictures of the blank hair before and after pulverization.

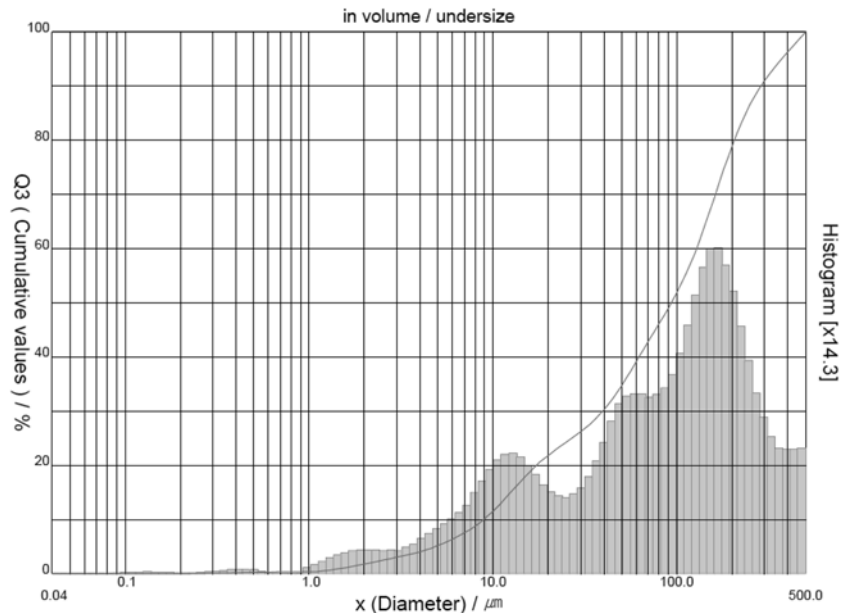


Fig. 3. Particle size distribution of pulverized hair powder.

에서 1분 30초간 세절하였다. 세절된 모발 입자의 크기는 분쇄용 튜브의 손상을 최소화하고 방해물질의 추출이 적고 분석 대상물질의 회수율이 극대화될 수 있도록 설정하였으며 이때 입자의 크기는 Cilas 1064 Particle Size Analyzer를 이용하여 측정한 결과 평균 123 μm 이었다. 세절 전후의 모발을 Fig. 2에 나타내었으며 세절후의 모발입자 크기의 분포는 Fig. 3에 표시하였다. 이때 분포 곡선이 좌우 대칭을 이루지 못하는 원인은 개별 모발의 길이, 두께 등이 다르고 미세하게 분쇄된 모발 입자 사이의 응집력에 의한 영향에 의한 것으로 추정된다.

방해물질의 영향을 최소화하면서 분석물질 추출 효율이 우수한 용매 선택을 위해 0.25 M methanolic HCl과 메탄올을 비교하고자 하였다. 그러나 염산이 포함된 메탄올 혼합용액을 추출용매로 사용한 경우 크로마토그램 상에서 분석물질이 검출되지 않아 상대적인 비교를 할 수 없었다. 이는 모발 자체에 함유된 방해물질이 분리관의 고정상에 흡착되어 분리능 상실이 원인으로 추정된다. 따라서 모발과 약물의 결합위치에서 약물의 확산을 증진시키는 성질인 팽윤성 (swelling property)이 뛰어난 용매로 보고된 메탄올을 추출용매로 선정하였다.²³

추출용액을 정제하는 방법으로는 10 000 g로 원심 분리 후 얻어진 상층액을 취하여 시린지 필터(syringe filter)로 여과하였다. PTFE 재질의 통과가능한 입자의

크기가 0.2 μm 이하인 시린지 필터를 사용하여 불순물을 제거함으로써 시료 기질 효과의 감소와 재현성 향상에 도움이 되었다.

3.2. 크로마토그램과 질량스펙트럼

본 연구에서 검토한 분석방법으로 표준용액을 첨가한 시료를 분석한 결과 암페타민 유도체 및 노르케타민 5 종의 성분을 동시에 분리 및 확인하고 정량할 수 있음을 확인할 수 있었다. 분석물질은 GC의 온도기울기 조건하에서 10 분 이내에 모두 용리되었고 분석물질에 대한 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었다.

Fig. 1의 화학구조식을 살펴보면 분석물질 내에 아민기(-NH)를 포함하고 있어 GC의 분리관 내벽에 흡착이 일어나 분리가 쉽지 않다. 따라서 성분들의 분리와 감도를 향상시키기 위해서는 아민기를 비극성 성질로 전환해주는 유도체화 과정이 필요하다. 암페타민 유도체의 유도체화 과정에 주로 사용되는 방법은 아실화(acylation) 반응으로 trifluoroacetic anhydride (TFAA), pentafluoropropionic anhydride (PFPA), heptafluorobutyric anhydride (HFBA) 등의 시약을 사용하여 유도체화한다.²⁴ 특히 AP와 MA에 대해 HFBA는 TFAA 또는 PFPA 보다 선택성과 회수율이 우수하므로 본 실험의 유도체화 시약으로 사용하였다.²⁵

유도체화 과정을 거친 분석물질을 EI 방식의 양이온 모드에서 이온화하여 MRM 방법을 사용하여 분석하였

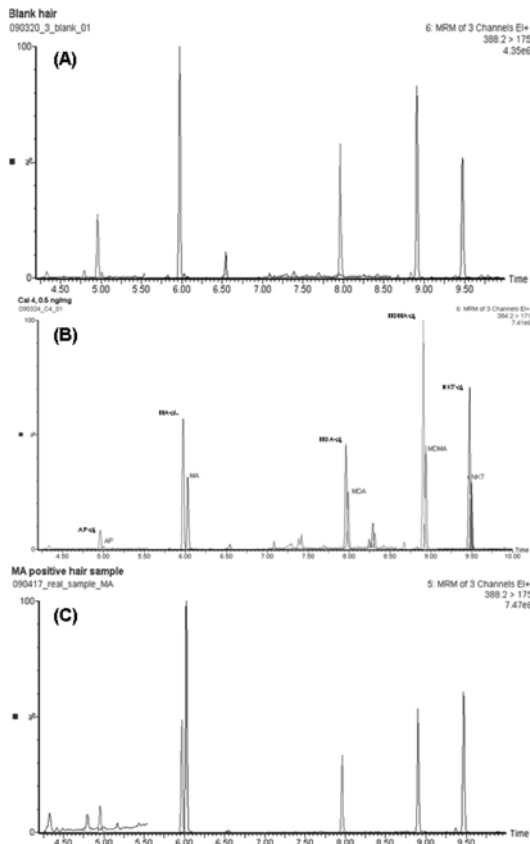


Fig. 4. GC-MS/MS chromatogram for HFB derivatives of 5 analytes and corresponding internal standards, including (A) drug-free hair, (B) drug-fortified hair at the concentration of 0.5 ng/mg for each analyte, and (C) drug user hair samples.

다. 각각의 분석물질의 질량스펙트럼(mass spectrum)을 얻어 기준이온(base ion) 또는 특성이온을 precursor ion으로 사용하였으며, collision energy를 가하여 생성된 product ion으로 분석물질을 모니터링하였다. AP와 MA의 precursor ion으로 $[M-C_7H_7]^+$ 인 m/z 240와 254가 검출되고 collision cell에서 아르곤 기체와의 충돌로 AP는 m/z 192와 169, MA는 m/z 210을 생성한다. MDA의 precursor ion으로 $[M-C_6H_5F_7NO]^+$ 의 m/z 135, MDMA의 precursor ion으로 $[M-C_8H_7O_2]^+$ 의 m/z 254가 검출되고 MDA의 product ion은 m/z 77, MDMA의 product ion은 m/z 210을 생성한다. NKT의 precursor ion은 molecular ion $[M]^+$ 이온이 HCl 분자를 잃은 m/z 384가 검출되고 product ion으로 m/z 171이 생성된다. 분석물질과 내부표준물질의 MRM transition과 collision energy를 Table 1에 정리하였다.

3.3. 분석방법의 유효성 확인

검정곡선을 작성하기 위해 바탕시료의 농도가 0.05-20 ng/mg (MA, AP, MDMA, NKT)과 0.05-5.0 ng/mg (MDA)의 범위가 되도록 표준물질을 첨가하여 확립된 전처리 방법을 거쳐 GC-MS/MS로 분석하였으며 분석 결과는 내부표준법을 사용하여 검정곡선을 작성하였다. 암페타민 유도체 및 노르케타민 5종에 대한 검정곡선의 결정계수는 모두 $r^2=0.998$ 이상으로 정량범위 내에서 우수한 직선성을 나타내었다.

검출한계(limit of detection, LOD)는 바탕시료의 노이즈(N, noise)를 증가하는 시그널(S, signal)을 만들어내는 시료에 포함된 분석물질의 최소량을 나타낸다. 검출한계는 동일 농도의 시료 6개를 분석한 결과 값의 시그널과 6개의 바탕시료로부터 얻은 노이즈의 표준편차를 이용하여 S/N 비가 3 이상인 농도를 검출한계, 정량한계는 10 이상으로 정의하였고 검출한계는 0.001-0.007 ng/mg의 범위를 나타냄으로써 극미량 수준까지 검출이 가능했다(Table 2).

실험방법의 회수율(recovery)은 대조시료와 기준시료를 비교하여 실험하였다. 대조시료는 모발 시료에 표준물질을 첨가하여 시료 전처리 과정을 거친 후 내부표준물질을 첨가하여 기기분석을 수행하였다. 기준시료는 전처리 과정 없이 대조시료의 최종 용매의 양에 대조시료에 첨가한 양(amount)의 표준물질을 첨가하고 내부표준물질을 첨가하여 기기분석을 한다. 그리고 기준시료를 사용하여 검정곡선을 작성하여 대조시료를 검정곡선에 적용하여 농도를 계산하여 절대 회수율을 구했다. 여기서 회수율(%)은 전처리를 거친 후 회수된 양과 전처리를 거치지 않은 표준물질의 양에 100을 곱한 값으로 정의된다. 세 농도(0.3, 3, 15 ng/mg)에서 측정된 AP, MA, MDMA, NKT와 두 농도(0.3, 3 ng/mg)에서 측정된 MDA의 회수율은 75.9-100.9%이었다(Table 3).

실험 방법의 정밀도와 정확도를 평가하기 위해서 모발 중 분석물질의 농도가 AP, MA, MDMA, NKT는 0.3, 5, 15 ng/mg, MDA는 0.3, 3 ng/mg이 되도록 바탕시료에 표준물질을 첨가하였으며 농도 당 여섯 개의 시료를 제조하여 측정하였다. 일내(intra-day, n=3) 및 일간(inter-day, n=4) 정밀도(% RSD)는 10.7%와 8.5% 이하의 범위로 양호하였고, 일내 및 일간 정확도(% bias)는 -1.6-17.0%와 -2.6-10.5%로 재현성 있는 실험값을 얻었다. 낮은 농도(0.3 ng/mg)의 시료에서 20% 이내의 정확도와 정밀도를 나타내었으며, 중간 및 높은 농도(AP, MA, MDMA, NKT: 3, 15 ng/

Table 1. GC-MS/MS information of 5 analytes and internal standards used as their HFB derivatives

No	Analyte	Molecular weight	Retention time (min)	MRM transitions		CE (eV)
				precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	
1	AP	331	4.98	<u>240.2</u> *	<u>192.0</u>	8.0
				240.2	168.9	10.5
2	AP- d_8	339	4.95	<u>243.2</u>	168.9	11.5
3	MA	345	6.03	<u>254.2</u>	<u>209.9</u>	8.5
				210.2	168.9	9.0
4	MA- d_{11}	356	5.97	<u>260.3</u>	<u>212.9</u>	8.0
5	MDA	375	7.97	<u>135.2</u>	<u>77.0</u>	13.0
				162.2	131.0	10.5
6	MDA- d_5	380	7.88	<u>136.2</u>	<u>78.0</u>	13.0
7	MDMA	389	8.90	<u>254.2</u>	<u>209.9</u>	7.5
				210.2	168.9	8.5
8	MDMA- d_5	394	8.87	<u>258.3</u>	<u>212.9</u>	8.0
9	NKT	420	9.49	<u>384.2</u>	<u>171.0</u>	10.0
				356.2	338.8	6.0
10	NKT- d_4	424	9.47	<u>388.2</u>	<u>175.0</u>	10.0

*Underlined transitions were used for quantification

Table 2. Sensitivity and calibration results

Analyte	Calibration range (ng/mg)	Slope	y-intercept	Linearity ^a (r^2)	LOD ^b (ng/mg)	LOQ ^c (ng/mg)
AP	0.05-20.0	0.2292	0.0249	0.9993	0.007	0.023
MA	0.05-20.0	0.8608	-0.0051	0.9995	0.005	0.016
MDA	0.05-5.0	0.6371	0.0632	0.9981	0.006	0.018
MDMA	0.05-20.0	0.7419	-0.0178	0.9995	0.003	0.008
NKT	0.05-20.0	0.7625	-0.0468	0.9997	0.001	0.002

^aLinearity is described by the coefficient of determination (r^2) for the calibration curve.

^bLimit of detection (LOD) and ^climit of quantification (LOQ) were based on the concentration corresponding to 3 and 10 standard deviations from the mean of six replicates of QC samples.

mg, MDA: 3 ng/mg)에서 이내의 값을 나타내므로 비교적 우수한 유효성 실험을 수행하였다(Table 3).²⁶

3.4. 모발 시료 내의 농도 결정

앞에서 설정된 분석방법을 이용하여 2009년 3월 12일부터 26일까지 의뢰된 마약복용 용의자의 모발 (n=15)을 분석한 결과 MA의 농도는 0.97-19.30 ng/mg의 범위를 나타내었으며 MA의 주요 대사체인 AP의 농도는 0.14-2.56 ng/mg을 나타내었다. AP의 농도 대비 MA의 농도를 비로 나타내면 2.99-40.0을 나타내었다. 단 MA의 모발 중 농도가 0.97-2.65 ng/mg의 범위인 경우에는 AP의 농도가 정량한계 이하의 농도를 나타내었다.

모발 감정에 있어서 모약물(parent drug)의 대사체의 확인은 양성 판단 기준의 중요한 요소이므로 대사체가 검출되지 않은 모발 시료의 경우 본 연구대상에서 제외하였다.

4. 결론

모발 중에 잔류하는 암페타민 유도체 및 노르케타민 5종을 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 고감도 동시 분석법을 확립하였다. 효과적인 시료 전처리를 위해서 모발 기질로부터 발생하는 방해물질을 효과적으로 차단하고 분석물질의 추출 효율이 우수한 메탄올을 추출 과정에 도입하였으며 시간과 노동력이 소모가 많은 모

Table 3. Results of method validation

Analyte	Nominal concentration (ng/mg)	Recovery (% mean \pm SD ^a)	Intra-day (n=3)		Inter-day (n=4)	
			Precision ^b (% RSD)	Accuracy ^c (% bias)	Precision (% RSD)	Accuracy (% bias)
AP	0.3	88.1 \pm 2.2	4.8	3.9	7.0	4.1
	3	95.9 \pm 3.9	2.9	-2.3	2.5	-2.6
	15	100.9 \pm 9.7	2.9	-1.2	1.8	-1.8
MA	0.3	75.9 \pm 9.0	1.0	17.0	6.3	8.3
	3	91.4 \pm 6.1	0.9	-0.6	2.1	0.9
	15	99.7 \pm 8.2	2.1	0.3	2.1	2.3
MDA	0.3	78.3 \pm 9.3	10.7	-1.6	3.1	7.0
	3	95.1 \pm 6.6	1.0	5.8	0.8	4.0
MDMA	0.3	85.6 \pm 4.9	3.0	14.0	8.5	10.5
	3	88.3 \pm 0.6	3.2	1.9	3.7	2.4
	15	91.3 \pm 3.7	3.5	1.5	3.7	3.2
NKT	0.3	79.6 \pm 4.0	3.1	3.4	7.4	2.4
	3	87.7 \pm 2.7	1.0	0.4	0.7	0.7
	15	95.2 \pm 1.8	1.2	-0.4	1.9	0.1

^aStandard deviation.

^bExpressed as the coefficient of variance of the peak area ratios of analyte/internal standard.

^cCalculated as [(mean calculated concentration - nominal concentration)/nominal concentration] \times 100.

발 세절단계를 자동화함으로써 분석시간을 단축하여 신속한 분석이 수행되도록 분석법을 개선하였다.

GC-MS/MS를 사용한 MRM 방법을 이용하여 분석 물질의 선택성(selectivity)이 개선되었으며, 0.007 ng/mg 이하의 우수한 검출한계를 나타내었다. 정량범위 내에서 검정곡선을 구한 결과 결정계수가 0.998 이상으로 직선성이 매우 우수하였고 증수소로 치환된 내부표준물질을 사용함으로써 정확도 및 정밀도를 개선한 분석법으로 볼 수 있다.

따라서 개발된 분석방법은 마약 복용 여부를 빠르고 간편하게 확인할 뿐만 아니라 동시에 미량분석이 가능한 분석법으로 지속적으로 증가하는 마약사범 적발에 유용한 모발 감정기법이 될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구과제는 대한민국 교육과학기술부(MEST)와 한국과학재단(KOSEF)의 특정연구개발사업 프로그램(M10640010000-06N4001-00100)에 의해 일부 지원되었습니다.

참고문헌

1. C. E. Cook, A. R. Jeffcoat, M. Perez-Reyes, B. M. Sadler, R. D. Voyksner, J. A. Hill, W. R. White and S. McDonald, *Eur. J. Pharmacol.*, **183**, 456-457(1990).
2. H. H. Maurer, J. Bickeboeller-Friedrich, T. Kraemer and F. T. Peters, *Toxicol. Lett.*, **112-113**, 133-142(2000).
3. A. C. Parrott, *Psychopharmacology*, **173**(3-4), 234-241(2004).
4. J. Y. Kim, M. K. In and J. H. Kim, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 3159-3162(2006).
5. Supreme Prosecutors' Office, *Drug Trend Report*, Seoul, Korea, **12**, 16-18(2005).
6. K. Kulsudjarit, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1025**, 446-457(2004).
7. F. Musshoff and B. Madea, *Ther. Drug Monit.*, **28**(2), 155-163(2006).
8. T. Saito, I. Yamamoto, T. Kusakabe, X. L. Huang, N. Yukawa and S. Takeichi, *Forensic Sci. Int.*, **112**(1), 65-71(2000).
9. V. A. Boumba, K. S. Ziavrou and T. Vougiouklakis, *Int. J. Toxicol.*, **25**(3), 143-163(2006).
10. J. Y. Kim, S. I. Suh, B. J. Ko, J. I. Lee, J. C. Jeong, Y. J. Suh and M. K. In, *Yakhak Hoeji*, **47**(3), 142-147(2003).
11. G. Frison, L. Tedeschi, D. Favretto, A. Reheman and S. D. Ferrara, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**(7),

- 919-927(2005).
12. H. Miyaguchi, Y. T. Iwata, T. Kanamori, K. Tsujikawa, K. Kuwayama and H. Inoue, *J. Chromatogr. A*, **1216**(18), 4063-4070(2009).
13. Y. Nakahara, *Forensic Sci. Int.*, **70** 135-153(1995).
14. J. Y. Kim, K. S. Jung, M. K. Kim, J. I. Lee and M. K. In, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**(11), 1705-1720(2007).
15. J. V. Goodpaster, J. J. Bishop and B. A. Benner, Jr., *J. Forensic Sci.*, **48**(2), 1-8(2003).
16. Y. Nakahara and R. Kikura, *Forensic Sci. Int.*, **84**, 165-177(1997).
17. Y. H. Wu, K. L. Lin, S. C. Chen and Y. Z. Chang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**(6), 887-897(2008).
18. J. Y. Kim, S. I. Suh, M. K. In and B. C. Chung, *J. Anal. Toxicol.*, **29**(5), 370-375(2005).
19. R. Kronstrand, I. Nyström, J. Strandberg and H. Druid, *Forensic Sci. Int.*, **145**(2-3), 183-190(2004).
20. R. Stanaszek and W. Piekoszewski, *J. Anal. Toxicol.*, **28**, 77-85(2004).
21. H. Miyaguchi, M. Kakuta, Y. T. Iwata, H. Matsuda, H. Tazawa, H. Kimura and H. Inoue, *J. Chromatogr. A*, **1163**(1), 43-48(2007).
22. E. Han, E. Miller, J. Lee, Y. Park, M. Lim and H. Chung, *J. Anal. Toxicol.*, **30**, 380-385(2006).
23. H. P. Eser, L. Pötsch, G. Skopp and M. R. Moeller, *Forensic Sci. Int.*, **84**(1-3), 271-279(1997).
24. J. Segura, R. Ventura and C. Jurado, *J. Chromatogr. B*, **713**, 61-90(1998).
25. R. Bruce and W. Maynard, *Anal. Chem.*, **41**(7), 977-979(1969).
26. Forensic Toxicology Laboratory Guidelines 2006 Version, Society of Forensic Toxicologists (SOFT)/American Academy of Forensic Sciences (AAFS). Available: <http://www.soft-tox.org/docs/Guidelines%202006%20Final.pdf>.