

인증표준물질(CRM)을 이용한 소변 중 대마 대사체 분석법 평가

고범준★ · 김진영 · 김종상¹ · 이정직¹ · 정재철 · 서승일 · 인문교

대검찰청 마약감식실, ¹한국건설시험연구원 품질경영부
(2009. 10. 19. 접수, 2010. 1. 18. 승인)

Analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in urine with certified reference material

Beom Jun Ko★, Jin Young Kim, Jong Sang Kim¹, Jeong Jik Lee¹,
Jae Chul Cheong, Sunglll Suh and Moon Kyo In

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

¹Department of Quality Management, Korea Institute of Construction Materials, Seoul 137-073, Korea

(Received October 19, 2009; Accepted January 18, 2010)

요 약: 대검찰청 마약감식실은 대마 흡연여부를 판별하는 수단인 소변 중 대마 대사체 성분 분석법에 대한 신뢰도 평가를 위하여 인증표준물질을 이용한 시험을 실시하였다. 시험에 사용된 인증표준물질은 미국 NIST에서 판매하는 Standard Reference Material 1507b로, 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCCOOH)가 함유된 냉동 건조 소변이었다. NIST에서 구매한 인증표준물질의 농도값과 실험실에서 측정된 농도값을 비교 평가해 본 결과, 약 95% 신뢰수준에서 일치하였다.

Abstract: For the evaluation of our laboratory's 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCCOOH) urinalysis test, THCCOOH urinalysis test was carried out with Certified Reference Material (CRM). The used CRM was THCCOOH in freeze-dried urine produced by NIST as Standard Reference Material 1507b. Comparing the estimated value of our laboratory with CRM, the results was coincided in the confidence level of approximately 95%.

Key words: 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, certified reference material, urinalysis

1. 서 론

대마는 국내에서 메스암페타민 다음으로 많이 남용되는 약물로 환각효과가 있는 성분은 tetrahydrocannabinol (THC)로 알려져 있다.¹ 소변을 이용한 대마 흡연여부는 THC의 생체 대사체인 11-hydroxy-THC와 11-

nor-9-carboxy- Δ^9 -THC (THCCOOH) 성분을 분석하여 확인한다. 지금까지 보고된 분석방법으로는 GC/MS, LC/MS, GC/MS/MS, HPLC/ESI/MS 등이 있다.²⁻¹⁵ 대마 대사체 성분의 분석을 통한 복용여부 확인에서 사용하는 분석법의 정확도는 그 결과의 신뢰성 평가에 중요한 요인이다.

★ Corresponding author

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

E-mail : pinus@spo.go.kr

분석결과의 신뢰성은 표준물질(Reference Material, RM)이나, 인증표준물질(Certified Reference Material, CRM)을 이용하여 평가한다. 인증표준물질은 인증서가 붙어있는 표준물질이며, 값이 정해진 소급성(traceability) 절차에 따라 인증되고, 신뢰할 만한 수준의 측정 불확도(uncertainty)가 표기된 물질을 의미한다.^{16,17}

국내에서는 1998년 한국표준과학연구원은 측정 불확도를 표현하는 지침¹⁸을 발간하였고, 그 지침에 따라 2000년도에 KOLAS (Korea Laboratory Accreditation Scheme) 사무국은 측정결과의 불확도 산정 및 표현을 위한 실무지침¹⁹을 만들었다. 실무지침은 국제공인시험기관이 시험방법에 대한 측정 불확도 추정을 의무화하고 있다. 이와 더불어 KOLAS 사무국은 공인시험기관의 인정분야의 측정수행능력을 지속적으로 입증하기 위하여 주요 인정분야별로 KOLAS가 주관하거나 인정된 숙련도시험에 3년에 1회 이상 참가를 요구하고 있다.²⁰

이런 추세에 따라 법과학 분야에도 분석결과의 신뢰도를 객관적으로 나타내는 수단으로 측정 불확도의 개념을 도입하게 되었다. 대검찰청 마약감식실은 2008년에 대마 흡연여부를 확인하는 수단인 GC/MS를 이용한 소변 중 대마 대사체 분석법에 측정 불확도 개념을 적용하여 그 신뢰도를 객관적으로 평가하여 보고하였다. 보고 논문은 분석결과에 영향을 줄 수 있는 여러 요인들을 찾아내어, 그들을 나타낼 수 있는 관계식(measurand)을 설정하고, 요인별 측정값으로부터 순차적으로 표준 불확도(standard uncertainty), 합성 표준 불확도(combined standard uncertainty) 및 확장 불확도(expanded uncertainty)를 구하여 측정 불확도로 분석결과의 신뢰도를 나타내었다. 분석결과를 약 95%의 신뢰도 수준의 측정값의 존재 범위로 표기하였다.²¹

법과학 분야에 있어서 마약류 분석분야의 숙련도시험 참가는 마약류에 대한 법적규제와 더불어 국내외에 마약류에 대한 시험기관이 다른 인증분야에 비해 적어 인정분야의 측정수행능력을 입증할 수 있는 시험의 참가가 어렵기에 측정능력에 대한 입증과 평가가 힘들다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구는 대검찰청 마약감식실에서 대마 흡연여부를 판별하는데 사용되는 소변 중 대마 대사체 성분 분석법에 대한 측정수행능력을 미국 NIST에서 구매한 인증표준물질을 이용하여 평가하고자 하였다. 평가는 인증값과 인증표준물질을 분석한 값을 서로 비교하여 이루어졌다. 인증표준물질을 이용한 측정수행능력 평가를

통하여, 대검찰청 마약감식실에서 수행하고 있는 소변 중 대마 대사체 성분 분석법이 신뢰할 수 있다는 것을 확인하였다.

2. 실 험

2.1. 시약 및 재료

소변 중 대마 대사체 성분 분석 능력을 평가하기 위한 동결건조 소변 내에 THCCOOH가 포함된 인증표준물질은 NIST (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. NIST에서 구입한 인증표준물질은 THCCOOH 농도가 Low (11.7±1.4 ng/mL), Medium (24.1±1.3 ng/mL), Blank 의 냉동건조 3병으로 구성되어 있었다. 검량선 작성에 사용된 표준물질 THCCOOH는 100 µg/mL, 중수소가 치환된 내부표준물질 THCCOOH-d₃는 10 µg/mL 농도의 것을 Cerilliant (Round Rock, TX, USA)사에서 구입하였다. 유도체 시약은 *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide/1% trimethylchlorosilane (BSTFA/1% TMCS)으로 Alltech-Applied Science (State College, PA, USA)사에서 구입하였다. 추출과정에 사용된 용매 및 시약은 모두 특급이며 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)사에서 구입하였다. 고체상 추출에 사용된 카트리지는 양이온 교환수지 60 mg이 충전된 MCX 3 cc (Waters, Milford, MA, USA)를 구입하여 사용하였다. 표준용액은 표준물질을 메탄올에 녹여 순차적으로 10, 1, 0.1 µg/mL의 농도로 희석하여 제조하였고, 내부표준용액은 내부표준물질을 메탄올에 녹여 1 µg/mL로 희석하여 사용하였다. 두 용액 모두 사용하기 전에는 -20 °C에서 보관하였다.

2.2. 기기 및 분석조건

희석된 표준용액과 인증표준물질을 제조하기 위해 용량 플라스크(Schott-Duran, Mainz, Germany)와 피펫(Eppendorf, Hamburg, Germany)을 사용하였다. 전처리 과정은 Rapid Trace SPE workstation (Caliper, Hopkinton, MA, USA)을 사용하여 고체상 추출을 수행하였다.

분석기기는 시료 자동주입기 HP 6890 series injector와 HP 6890 series Gas Chromatograph가 장착된 HP 5973 Mass Selective Detector (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 분석칼럼은 DB-5MS (30 m×0.25 mm I.D. 0.25 µm film thickness, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. 운반기체는 헬륨 가스를 사용하였으며, 유속은 0.7

mL/min으로 하였다. 칼럼 온도는 200 °C에서 1 분간 유지시킨 후 290 °C까지는 30 °C/min의 속도로 온도를 올린 다음, 300 °C까지는 35 °C/min의 속도로 온도를 올린 후 2 분 동안 유지시켰다. 주입구와 검출기의 온도는 각각 250 °C와 280 °C로 설정하였다. 시료 주입은 splitless 모드 방식을 적용하였으며, 이온 검출 방법은 selected ion monitoring 모드를 적용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 시료의 제조

NIST에서 구매한 인증표준물질 THCCOOH의 Low, Medium을 탈이온수로 용해시켜 20 mL 용량 플라스크에 담고 부피를 맞추었다.

2.3.2. 추출방법

시험은 대검찰청 마약감식실에서 소변 중 대마 대사체 성분을 분석하기 위하여 현재 사용하고 있는 ‘소변 중 대마 성분 감식법’(SPO-DRUG-QA-04, 2006)에 규정된 방법에 따라 아래와 같이 실시하였다.²² 시료 3 mL를 시험관(16×100 mm)에 놓은 후, 1 µg/mL 농도의 내부표준물질 30 µL를 첨가하였다. 내부표준물질이 첨가된 시험관에 10 M KOH 200 µL을 넣고 실온에서 10초간 혼합하고, 다시 sulfamic acid 100 mg을 첨가한 후 교반기를 이용하여 실온에서 10초 동안 혼합하였다. 혼합한 시료를 고체상 자동추출장비에 정착하였다. 시료에 초산을 첨가하여 pH 4로 조정된 다음, 고체상 추출용 카트리지를 활성화시키기 위해 메탄올과 탈이온수를 1 mL씩 순서대로 2 mL/min의 속도로 주입하였다. 활성화된 카트리지에 시료 주입 후 방해물질을 제거하기 위하여, 카트리지에 0.1 M NaOH 2 mL를 2 mL/min의 속도로 흘려준 후, 탈이온수 2 mL와 hexane 4 mL를 순서대로 8 mL/min의 속도로 흘려주었다. 방해물질이 제거된 카트리지에 추출용매 ethyl acetate 3 mL를 2 mL/min의 속도로 주입하여 THCCOOH 성분을 추출하였다. 카트리지에서 유출된 추출액을 45 °C의 수욕조에서 질소가스(압력 30 kPa) 하에서 증발 건조시켰다.

2.3.3. 유도체화 방법

추출액을 증발 건조시켜 생성된 시험관 안의 잔사에 ethyl acetate 30 µL를 가하여 용해시킨 후, 유도체 시약(BSTFA/1% TMCS) 30 µL를 첨가하고 혼합한 후 70 °C에서 15 분 동안 유도체화 반응을 시켰다. 반응액을 상온으로 냉각시킨 다음 그 중 1 µL를 GC/

MS에 주입하여 분석하였다.

2.3.4. 검량선 작성

3가지 농도의 THCCOOH 희석된 표준용액(10, 1, 0.1 µg/mL)을 대조 소변 시료 3 mL에 THCCOOH의 농도가 2, 10, 20, 40 ng/mL가 첨가하여 제조하였다. 제조된 시료를 질소하에서 증발시킨 후, 각각의 농도에 내부 표준용액(THCCOOH-d₃, 1 µg/mL) 30 µL를 첨가하고 시료 처리 방법과 동일하게 처리하고 분석하여 검량선을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시료의 분석 결과

시료내의 대마 대사체 성분 THCCOOH의 분석은 유도체화된 THCCOOH-2TMS와 내부표준물질 THCCOOH-d₃-2TMS의 특성이온들(대마 대사체 성분; m/z 371, 473, 488 (M⁺), 내부표준물질; m/z 374, 476, 491 (M⁺))를 이용하여 분석하였다(Fig. 1). 시료내의 대마 대사체 성분의 정량은 시료와 동일하게 처리된 검량선(Fig. 2)을 이용하여 3회 반복 시험하여 구하였고, 검량선의 상관계수는 0.9957 이었다.

3.2. 시료의 확장 불확도 계산 및 결과

시료의 확장 불확도를 계산하기 위하여 불확도 요인을 고려하여 만든 관계식²¹을 변형한 측정량 관계식 (1)과 신뢰구간에 따른 포함인자를 포함한 식 (2)를 이용 하였다(Table 1).

$$C_i = x_i \cdot f_{vol} \cdot f_{std} \cdot f_{cal} \cdot f_{variation} \cdot f_{person} \tag{1}$$

$$U_r(E) = k \times u_r(C) \tag{2}$$

- C_i : 소변에서 측정된 THCCOOH의 농도
- x_i : y_i-b/m, 작성된 검량선에서의 농도 측정값
- f_{vol} : 채취된 소변의 부피 편차율
- f_{std} : 희석된 표준용액의 농도 편차율
- f_{cal} : 검량선의 직선성에 의한 편차율
- f_{variation} : QC 시료의 측정 편차율
- U_r(E) : 상대 확장 불확도
- k : 포함인자
- u_r(C) : 상대 합성 표준 불확도

3.3. 인증표준물질과 시험결과의 차이 비교

본 논문에서는 인증표준물질과 시험자간의 시험결

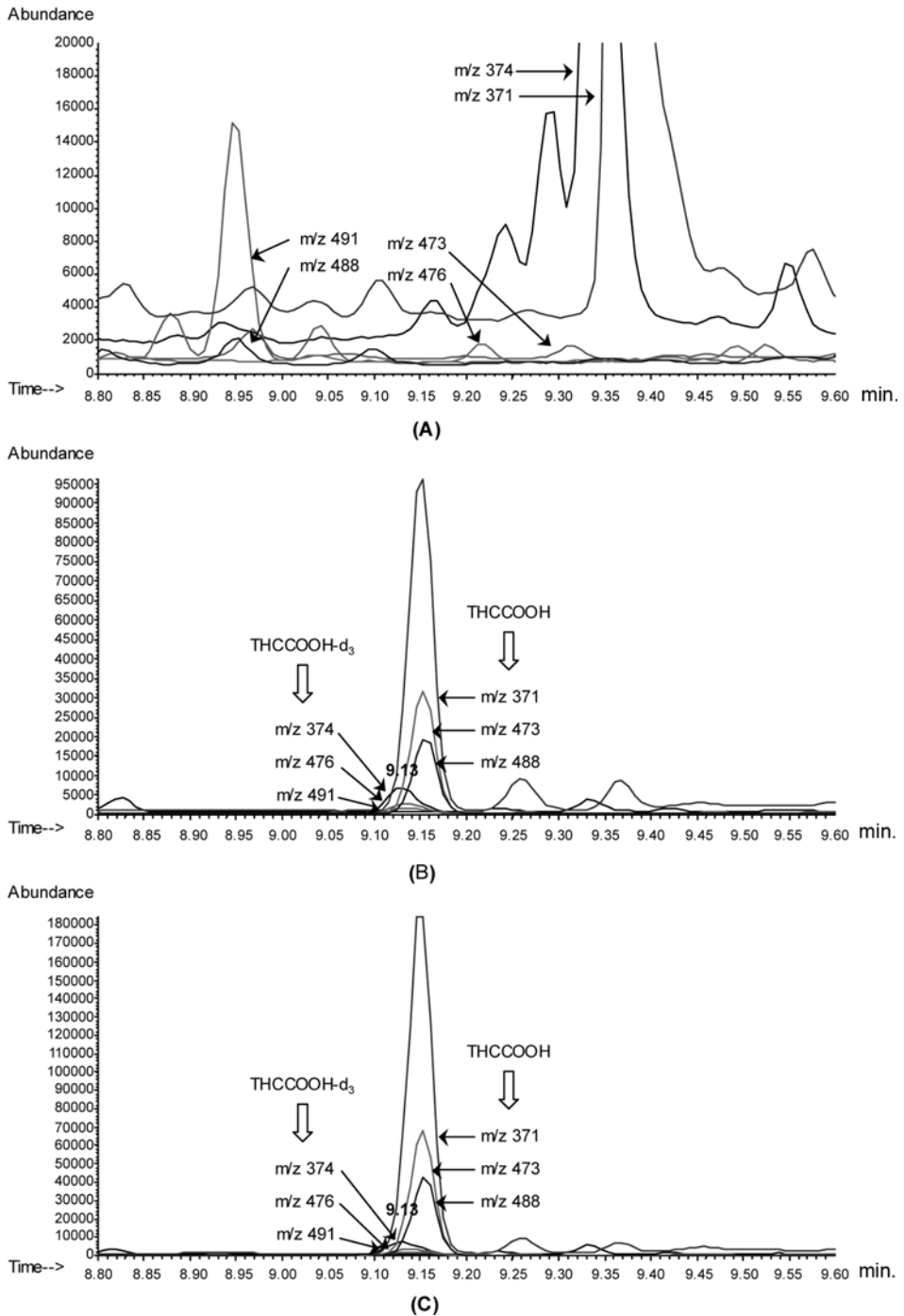


Fig. 1. GC/MS SIM chromatograms of TMS derivatized THCCOOH and THCCOOH-d₃ (IS) in CRM. (A) blank urine, (B) CRM-LOW, (C) CRM-Medium.

과의 이상 여부를 판정하기 위하여, *t*-검정법과 ISO Guide 35의 방법을 비교 검토하여 반복측정의 불확도

를 구하는 방법을 제시한 최종오 등²²의 식 (3)를 사용하였다.

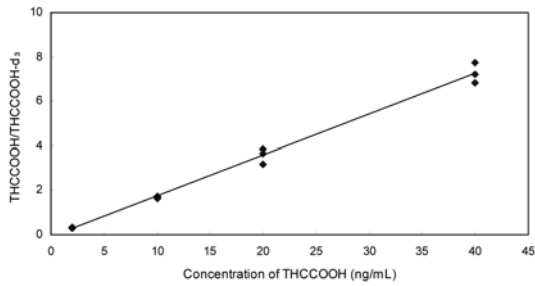


Fig. 2. Calculation curve of THCCOOH.

$$\frac{|x_{CRM}-m|}{\sqrt{u_{CRM}^2+u_T^2}} \leq k \quad (3)$$

x_{CRM} : 표준물질의 인증값

m : 실험실에서 표준물질을 측정 한 값

u_{CRM} : 인증값의 불확도

$$u_T = \sqrt{u_S^2(y) + \frac{u_{R,P}(y)^2}{n}}$$

: 실험실에서 n 회 측정 한 표준물질의 불확도

$$u_S(y) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n u_S(y_i)$$

: 실험실에서 n 회 측정 한 표준물질의 계통효과에 의한 불확도

$$u_{R,P}(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n u_R^2(y_i)}{n}}$$

: 실험실에서 n 회 측정 한 표준물질의 우연효과에 의한 불확도

n : 측정 횟수

k : 포함인자

식 (2)에서 구해진 확장 불확도와 인증표준물질에서 주어진 확장 불확도를 식 (3)을 이용하여 기준값과의 차이 여부를 확인해 본 결과, 약 95% 신뢰수준에서 인증표준물질-Low는 0.924, 인증표준물질-Medium은 1.063 이었다(Table 2). 인증표준물질-Low와 Medium의 포함인자 k 값은 각각 2.1과 2.3으로 식 (3)에 의해

Table 1. Detailed estimation of uncertainty in the results of THCCOOH analysis in CRMs

Uncertainty factors	CRM-Low ^a	CRM-Medium ^b
Sample volume ($u_{r \text{ vol}}$)	0.002	0.002
Standard solution ($u_{r \text{ std}}$)	0.010	0.010
Run control (precision, $u_{r \text{ variation}}$)	0.033	0.033
Inter-person (precision, $u_{r \text{ person}}$)	0.039	0.039
Calibration curve ($u_{r \text{ cal}}$)	0.100	0.050
Relative combined standard uncertainty ($u_r(C)$)	0.113	0.072
Relative expanded uncertainty ($U_r(E)$)	0.262	0.153
Coverage factor (k)	2.3	2.1
Concentration (ng/mL)	12.06 ± 3.16	24.38 ± 3.73

^aThe certified concentration of CRM-Low at the approximate 95 percent interval is 11.7 ± 1.4 ng/mL

^bThe certified concentration of CRM-Medium at the approximate 95 percent interval is 24.1 ± 1.3 ng/mL

The concentration is expressed as 95.45 percent confidence level.

Table 2. The statistical comparison CRM and test

	^a u_{CRM}	^b u_S	^c $u_{R,P}(y)$	^d u_T	Calculated Value by formula (3)	^e k
CRM-Low	0.125	0.263	0.263	0.371	0.924	2.3
CRM-Medium	0.054	0.154	0.154	0.218	1.063	2.1

^aRelative expanded uncertainty of CRM

^bRelative uncertainty from systematic error in test

^cRelative uncertainty from random error in repeated test

^dRelative expanded uncertainty of test

^eCoverage factor

서 구해진 값들은 각 시험측정치의 포함인자보다 작았다. 이는 약 95% 신뢰수준에서 인증표준물질의 인증값과 시험측정값의 통계적인 차이가 없다는 것을 의미한다. 또한 현재 대검찰청 마약감식실에서 적용하고 있는 소변 중 대마 대사체 성분분석 방법이 유효하다는 것을 의미한다.

4. 결 론

대검찰청 마약감식실에서 대마 흡연여부 확인을 위해 현재 적용하고 있는 소변 중 대마 대사체 성분 분석법의 신뢰도 평가를 위하여 인증표준물질을 이용한 시험을 실시하였다. 시험에 사용된 인증표준물질은 미국 NIST에서 판매하는 THCCOOH가 함유된 냉동 건조 소변이었다. NIST에서 구매한 인증표준물질의 농도값과 실험실에서 측정된 농도값을 비교 평가해 본 결과, 약 95% 신뢰수준에서 일치하였다. 이 결과는 대검찰청 마약감식실에서 현재 사용하고 있는 소변 중 대마 성분 분석법이 신뢰성이 있음을 의미한다. 그리고 측정불확도를 산정하기 위한 요인들과 관계식이 타당성 있다고 볼 수 있다.

감사의글

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

참고문헌

1. '2008 Drug control in Korea', Supreme Prosecutors' Office.
2. V. Rajananda, V. Navarantnam and N. K. Nair, 'Analytical methods for the identification of the principal cannabinoids metabolite in urine', 113 V. Navarantnam Ed., National Drug Research Centre Universiti Sains, Malaysia, 1985.
3. 'TDx/TDxFLx; Cannabinoids', 10, Abbott Laboratories, U.S.A, 1994.
4. R. A. Gustafson, E. T. Moolchan, A. Barnes, B. Levine and M. A. Huestis, *J. Chromatogr. B*, **798**, 145-154(2003).
5. P. Kintz, D. Machart, C. Jamey and P. Mangin, *J. Anal. Toxicol.*, **19**(5), 304-306(2000).
6. P. Kintz and V. Cirmele, *Biomed. Chromatogr.*, **11**, 371-376(1997).
7. C. Staub, *J. Chromatogr. B*, **733**, 199-126(1999).
8. M. A. Huestis, J. M. Mitchell and E. J. Cone, *J. Anal. Toxicol.*, **20**(6), 441-452(1996).
9. M. A. Elsohly and S. Feng, *J. Anal. Toxicol.*, **20**(4), 329-335(1998).
10. D. A. Armbruster, R. H. Schwarzhoff, E. C. Hubster and M. K. Liserio, *Clin. Chem.*, **39**, 2137-2141(1993).
11. P. M. Kemp, I. K. Abukhalaf, J. E. Manno, B. R. Manno, D. D. Alford, M. E. McWilliams, F. E. Nixon, M. J. Fitzgerald, R. R. Reeves and M. J. Wood, *J. Anal. Toxicol.*, **19**(5), 292-298(1995).
12. H. Teixeira, P. Proenca, A. Castanheira, S. Santos, M. Lopez-Rivadulla, F. Corte-Real, E. P. Marques and D. N. Vieira, *Forensic Sci. Int.*, **146**, Suppl: S61-63(2004).
13. G. M. Aballero, C. D'Angelo, M. S. Fraguio and O. T. Cenrurion, *J. Chromatogr. Sci.*, **42**(10), 540-544(2004).
14. H. Teixeira, P. Proenca, A. Verstanete, F. Corte-Real, and D. N. Vieira, *Forensic Sci. Int.*, **150**, 205-211(2006).
15. M. A. Elsohly, S. Feng, W. J. Kopycki, T. P. Murpury, A. B. Jones, A. Davis and D. Carr, *J. Anal. Toxicol.*, **21**(3), 240-242(1997).
16. ISO Guide 35, 'Certification of reference material-general and statistical principles', ISO, Geneva.
17. A. M. H. vander Veen, *Accred. Qual. Assur.*, **7**, 2-6(2002).
18. 측정불확도 표현지침, 한국표준과학연구원 (1998).
19. 측정결과의 불확도 산정 및 표현을 위한 지침, KOLAS(Korea Laboratory Accreditation Scheme) (2000).
20. 숙련도시험운영 기준, KOLAS(Korea Laboratory Accreditation Scheme) (2007).
21. 김진영, 정재철, 서승일, 서용준, 이정직, 김종상, 인문교, *약학회지*, **52**, 480-487(2008).
22. 정재철, 김진영, 인문교, 정원조, *한국분석과학회지*, **19**(5), 441-448(2006).
23. 최종오, 소현영, 우진춘, 황의진, *한국분석과학회지*, **15**(6), 580-583(2002).