

GC-NCI-MS/MS를 이용한 모발 중 대마 대사체 분석의 측정불확도 평가

김진영* · 이재일 · 정재철 · 서용준 · 인문교

대검찰청 마약감식실

(2010. 8. 17. 접수, 2011. 1. 25. 승인)

Uncertainty evaluation of the analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in hair by GC-NCI-MS/MS

Jin Young Kim*, Jae Il Lee, Jae Chul Cheong, Yong Jun Suh and Moon Kyo In

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

(Received August 17, 2010; Accepted January 25, 2011)

요 약: 대마 흡연 여부 확인을 위해 사용되는 모발 중 대마 대사체 정량분석 결과의 측정불확도를 평가하였다. 대마초 성분 중 활성물질은 Δ^9 -tetrahydrocannabinol이며 대사과정을 거쳐 생성된 주요 대사체는 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH)이다. 따라서 생체 대사물질인 THC-COOH는 대마 흡연 여부를 판단하는 지표물질로 사용되고 있다. 실험방법은 모발의 세척, 건조, 질량측정, 세절, 가수분해, 비드를 이용한 액체-액체 추출, 유도체화 반응 및 기기분석 과정으로 구성되었다. 측정의 소급성이 유지될 수 있도록 상위 규정기로부터 하위 측정기까지 교정을 통해 확보하였다. 측정불확도 평가에 앞서 정량분석시 측정값에 영향을 주는 인자들을 찾아내고 각각의 요소들이 측정결과에 어떤 영향을 주는가를 살펴보았다. 산출 결과, 재현성, 회수율, 검정곡선, 표준물질, 질량측정의 요소 순으로 불확도에 영향을 미치고 있음을 확인하였고 재현성의 요소가 측정불확도에 가장 큰 영향을 미치고 있었다. 실제 대마 복용자의 모발을 분석한 결과 대마 대사체 농도 측정값에 대한 오차 범위의 상대불확도는 17% 이었으며, 본 연구의 측정불확도 평가 결과는 향후 분석방법의 개선 및 측정결과에 신뢰도 제고를 위한 근거자료로 활용할 예정이다.

Abstract: We described an estimation of measurement uncertainty in quantitative analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH), the metabolite of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, in hair samples by using the bead-assisted liquid-liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometric (GC-NCI-MS/MS) detection. Traceability of measurement was established through the use of reference materials, calibrated volumetric tubes, volume measuring devices, and measuring instruments. The analytical results were compared and the different contributions to the uncertainty were evaluated. Inter-day variation was performed by using statistical analysis of several indicative factors. Measurement uncertainty associated with the analyte in real

★ Corresponding author

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

E-mail : paxus@spo.go.kr

forensic hair samples were estimated using QC data. The major factor of contribution to combined standard uncertainty was inter-day repeatability, while those associated with preparation of analytical standard and also sample of weight were insignificant considering the degree of contribution. Relative uncertainty of relative extended standard uncertainty divided into the measured concentration of the analyte was 17% in a hair sample. The uncertainty of result evaluation will be invaluable to improve quality of the analysis.

Key words: Measurement uncertainty, hair analysis, 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, GC-NCI-MS/MS

1. 서 론

대마(*Cannabis sativa* L.)는 메스암페타민(methamphetamine) 다음으로 국내에서 가장 많이 남용되는 마약류이다.¹ 대마초는 대마의 잎과 꽃에서 얻어지는 물질로 대마에는 420종 이상의 화합물이 존재하는데, 이들 화합물 중에는 최소 60여 종의 칸나비노이드(cannabinoid)가 있다. 칸나비노이드 성분 중 Δ^9 -tetrahydrocannabinol(THC)이 환각작용과 관련이 있는 주요 활성성분(psychoactive compound)이며, 체내 대사과정을 거쳐 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH)로 대사된다.^{2,4}

대마의 흡연 여부 확인은 최근까지 소변을 이용한 분석법만을 이용하여 복용여부를 확인할 수 있었다. 일반적으로 소변 중 대마 대사체(THC-COOH)는 흡연 후 4~8 시간부터 최대 4주 정도까지 확인이 가능하다. 반면에 모발 감정은 소변 감정과 달리 수개월 전 흡연 사실뿐만 아니라 시기나 빈도 등 남용이력 추정도 가능한 장점이 있어 마약류 복용여부 확인에 널리 이용되고 있다.^{5,6}

국내에서는 마약 성분 중 암페타민계 흥분제류에 대한 모발 분석법 개발 연구가 대마 모발분석법 연구에 비해 상대적으로 활발하였다. 이는 국내에서 널리 남용되고 있는 아민계 유도체와 달리 대마 대사체 성분은 모발에 축적되는 비율이 현저히 낮아 모발로 전이가 잘 되지 않는 특성이 있기 때문이다. 따라서 모발 내에 미량의 THC-COOH를 효과적으로 분석하기 위해서는 검출한계를 낮출 수 있는 고감도 분석법의 개발이 선행되어야 하므로 분석법 개발 연구가 활발하지 못하였다.⁷⁻⁹ 이러한 문제점을 극복하기 위해 본 연구실에서는 미량 분석에 적합한 음이온 화학적 이온화 방식(negative ion chemical ionization, NCI)과 분석물질 확인에 선택성이 뛰어난 tandem 질량분석기(tandem mass spectrometer, MS/MS)를 이용한 대마 모발분석법을 개발하여 감정 업무에 적용하고 있다.

대마 대사체 정량 결과를 근거로 흡연 여부를 판정하는 모발 감정은 분석결과와 신뢰도가 매우 중요하다. 기존의 측정방법의 적합성평가(analytical method validation) 항목으로는 모발 시료 분석결과에 대한 THC-COOH 농도의 측정불확도를 정량적으로 표현하지 못했다.¹⁰ 다만 QC 시료의 정밀도와 정확도로 분석결과와 신뢰도를 간접적으로 표시할 수 있었다. 그러나 이러한 표현 방법은 분석법을 구성하는 요소인 시료 채취량 측정, 표준용액 제조과정, 검정 곡선 작성 등 개별 인자로부터 발생하는 불확도를 수치로 표현할 수 없었으며 각각의 불확도 발생요인들을 상호 비교하고 평가한 결과를 분석법 개선에 활용하기도 쉽지 않았다.

따라서 본 연구는 측정불확도 개념을 대마 모발감정 분야에 도입하여 정량분석 결과의 신뢰도를 보다 객관적으로 표현하고자 하였다.^{11,12} 우선 모발 중 대마 대사체 분석 과정에서 측정결과에 영향을 줄 수 있는 요인들을 찾아내어 측정량을 설정하고, 측정값으로부터 표준불확도, 합성표준불확도 및 확장불확도를 구하였다. 측정결과에 대한 불확도는 약 95%의 신뢰수준에서의 포함인자를 적용하여 산출하였다.¹³⁻¹⁶ 향후 본 연구의 측정불확도에 영향을 미치는 개별 요인들에 대한 평가 결과는 분석법의 개선 및 불확도 요인의 영향을 감소시키는 기초 자료로 활용할 예정이다.

2. 실험 및 방법

2.1. 시약 및 재료

표준물질과 내부표준물질은 각각 1 mL 바이알에 1000 mg/L 농도로 제조된 THC-COOH와 100 mg/L 농도로 제조된 THC-COOH-*d*₉를 미국 Cerilliant사로부터 구입하였다. 전처리 과정에 사용된 용매는 HPLC-grade로 n-hexane, ethyl acetate, isopropyl alcohol이며 미국 J. T. Baker사에서 구입하였다. 유도체 시약인 pentafluoropropionic anhydride (PFPA)와 penta-

fluoropropanol (PFPOH)는 벨기에 Acros Organics사에서 구입하였으며, pH 조절에 사용된 acetic acid는 일본 Wako사 제품이다. THC-COOH 표준용액은 methanol로 순차적으로 희석하여 각각 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 mg/L 농도로 제조하였으며, 사용하기 전까지는 -20 °C에서 냉동 보관하였다.

2 mL Safe-Lock tube는 독일 Eppendorf사에서 구입하였으며 직경 2.8 mm 스테인리스 스틸 비드는 국내 대일베어링사에서 구입하였다. 직경 13 mm PTFE (polytetrafluoroethylene, 0.2 µm pore size) 시린지 필터는 영국 Whatman사에서 구입하였다.

시험에 사용한 모발시료는 2010년 7월 1개월 동안 수도권 소재 검찰청으로부터 감정 의뢰된 대마 남용자의 모발을 연구용 시료로 사용하였다. 대조 모발 시료는 약물을 복용하지 않은 사람의 모발을 채취하여 사용하였다.

2.2. 기기 및 분석 조건

농도별 표준용액 제조를 위해 독일 Brand사의 부피 플라스크(10 mL)와 독일 Eppendorf사의 피펫(pipette, 1000 µL)을 사용하였다. 시료량 측정은 독일 Sartorius사 전기식 지시저울(CP225D)을 사용하였다. 모발 세절과정에 사용한 분쇄기는 독일 Retsch사의 Qiagen TissueLyser II를 사용하였고 3개의 스테인리스 스틸 비드(2.8 mm diameter)가 담긴 2 mL 튜브를 사용하여 세절하였다.

분석에 사용된 장비는 미국 Agilent Technologies사 6890N Gas Chromatograph (GC)에 미국 Waters사 Quattro micro GC tandem mass spectrometer가 연결된 GC-MS/MS를 사용하였다. 분리관은 DB-5MS (25 m × 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness, J&W Scientific, USA)를 사용하였다. 분리관 온도는 처음 100 °C에서 1분간 유지시킨 후, 35 °C/min으로 275 °C까지 온도를 올려 3분간 유지시키고, 다시 25 °C/min으로 바꿔 300 °C까지 온도를 상승시킨 후 3.5분간 유지시켰다. 주입구와 검출기 부위의 온도는 각각 260 °C와 280 °C로 설정하였다. 운반기체 헬륨의 유속은 1.0 mL/min로 고정하였고, 주입방법은 splitless mode로 purge-on time을 1.0분으로 설정하였다. 시료는 미국 Agilent Technologies사의 7683B 시료자동주입장치를 사용하여 분석 장비에 주입하였다.

질량분석기의 ion source의 온도는 200 °C로 설정하였고 이온화 방식은 음이온 화학적 이온화 방식이었으며 MRM (multiple reaction monitoring) 방법을 사용

하여 정량하였다. MS/MS fragmentation을 위해 충돌기체로 아르곤을 사용하였으며 충돌이 일어나는 collision cell 내의 압력을(3.0 ± 0.3) 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 각각 하나의 쌍으로 모니터링 하였다. THC-COOH의 MRM transition pair는 m/z 602 → m/z 474, m/z 602 → m/z 513이며 THC-COOH- d_9 는 m/z 611 → m/z 483이다.

2.3. 시료의 세척 및 추출

시험은 ‘모발 중 대마 성분 감식기법(SPO-DRUG-QA-07, 2010)’에 정해진 표준시험방법에 따라 수행하였다.

모발 시료 25 mg을 시험관(16 mm × 125 mm)에 넣은 후, isopropyl alcohol 10 mL로 3회 진탕하여 세척하였다. 세척된 시료를 무균 상에서 1 시간 동안 건조시키고 독일 Retsch사의 자동분쇄기(Qiagen TissueLyser II)를 이용하여 2 mL Safe-Lock tube에서 30 Hz에서 8분간 모발을 분쇄하였다. 시료에 0.001 mg/L 농도의 내부표준물질 50 µL 첨가한 후 1 M 수산화나트륨 용액 0.7 mL를 넣어 95 °C에서 30분간 가수분해하였다. 시료에 acetic acid 120 µL를 첨가하여 pH를 산성으로 조정된 후, 혼합 추출용매 헥산과 에틸아세테이트의 혼합 추출용매 (9:1, V/V) 0.8 mL를 넣고 10 Hz에서 2분간 진탕 추출하였다. 17420 rpm에서 3 분간 원심 분리한 후 상층을 새로운 시험관(16 mm × 100 mm)에 옮겨 담았다. 다시 시료를 동일한 조건에서 재추출한 후 상층액을 앞서 추출한 용매와 합하여 30 kPa의 압력과 40 °C의 온도 조건에서 질소기류를 이용하여 증발·건조시켰다. 건조된 잔사에 유도체 시약 PFPOH 30 µL와 PFPA 50 µL를 가하여 70 °C에서 30분간 유도체화 반응을 진행하였다. 반응이 끝난 시료를 상온으로 냉각하고 다시 질소기류를 이용하여 증발·건조시켰다. 시료를 ethyl acetate 100 µL로 재용해하여 PTFE 시린지 필터로 여과한 후 1 µL를 GC-NCI-MS/MS에 주입하여 분석하였다.

2.4. 검정 곡선 작성

정량 범위는 모발 중에 검출되는 농도를 고려하여 농도 범위를 설정하였고 THC-COOH의 모발 중 농도는 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 µg/kg이 되도록 첨가하여 검정 곡선을 작성하였다. 내부표준물질 THC-COOH- d_9 을

메탄올에 녹여 0.001 mg/L 농도로 제조한 후, 표준용액 50 μ L를 취하여 모발 시료에 첨가하였다. 앞에서 설정한 전처리 방법에 따라 시료를 처리한 후 얻은 크로마

토그램으로부터 피크의 머무름 시간을 확인하고, 내부 표준물질의 피크 면적에 대한 분석 대상물질의 피크 면적 비로 검정 곡선을 작성하였다.

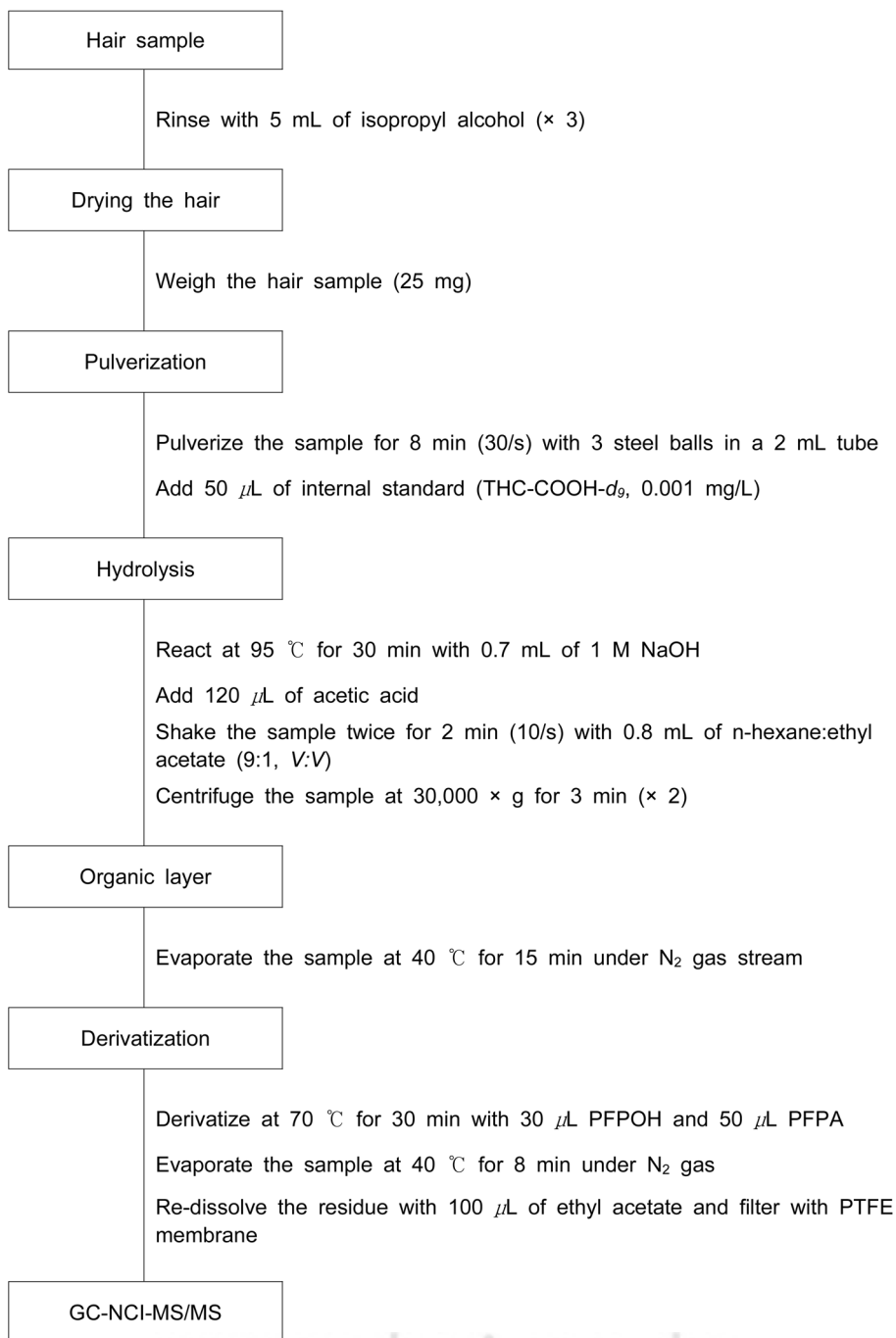


Fig. 1. Hair analysis procedure of THC-COOH.

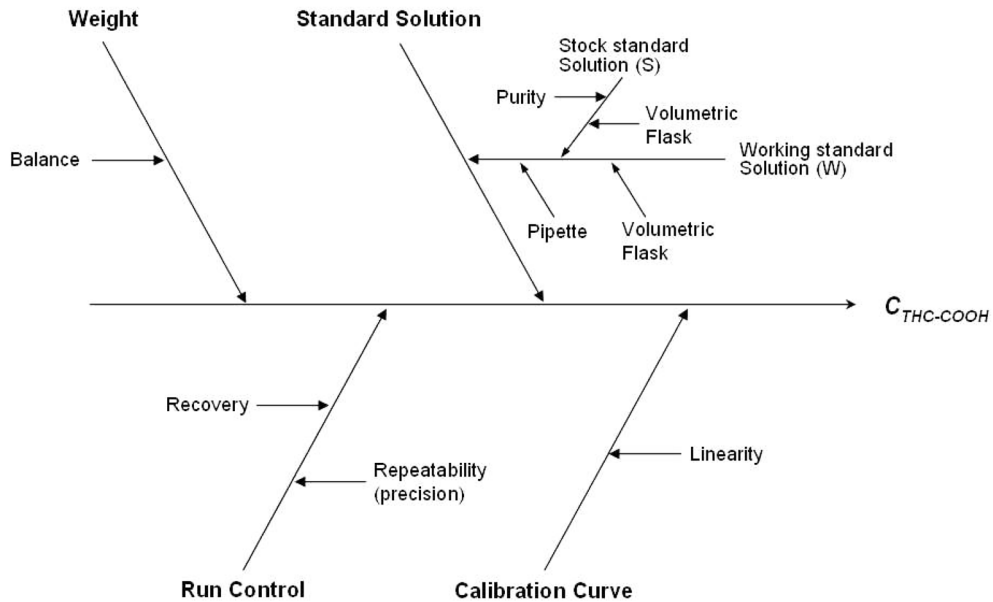


Fig. 2. Cause and effect diagram.

2.5. QC 시료의 정밀도 및 회수율

대조 모발 시료에 THC-COOH 표준용액을 정량범위 내에 저, 중, 고의 농도에 해당되는 양을 첨가하고, 시료와 같은 방법으로 처리 분석한 후, 측정된 정량값을 비교하여 정밀도 및 회수율을 검토하였다. 일간 정밀도는 4일간 반복하였고 회수율은 7회 반복하여 측정하였다.

2.6. 측정모델

모발에서 대마 대사체 분석과정은 시료의 세척과 건조, 질량 측정, 성분 추출과 정제 등을 포함하는 전처리 및 GC-NCI-MS/MS를 이용한 기기분석 과정으로 구분된다(Fig. 1).

모발에서 THC-COOH 농도 측정에 관계되는 불확도 요소는 크게 시료량 측정과정에서 발생하는 불확도, 분석에 사용된 표준용액의 자체의 불확도 및 희석할 때 발생하는 불확도, 분석 결과로부터 측정값을 계산하는 과정에서 발생하는 검정 곡선에 대한 불확도, 측정이 시간을 두고 반복적으로 이루어질 때 발생하는 재현성에 대한 불확도 그리고 회수율 측정시 발생하는 불확도 등의 5가지 요소를 추출하였다.

따라서 모발에서 THC-COOH 분석 결과로부터 정량값 측정에 영향을 미치는 불확도 요인에 대한 관계식을 다음과 같이 설정하였다.

$$C_i = x \cdot \frac{m_{\text{mg}}}{m_0} \cdot f_{\text{std}} \cdot f_{\text{cal}} \cdot f_{\text{precision}} \cdot f_{\text{recovery}} \quad (1)$$

C_i : 모발에서 측정된 THC-COOH 성분의 농도

x : $\frac{y-b}{m}$, 작성된 검정 곡선에서의 농도 측정값

$\frac{m_{\text{mg}}}{m_0}$: 측정에 사용된 모발시료 질량

f_{std} : 검정 곡선 작성에 사용된 표준용액의 농도

f_{cal} : 검정 곡선식

$f_{\text{precision}}$: QC 시료의 정밀도

f_{recovery} : QC 시료의 회수율

THC-COOH의 농도를 산출하는 관계식 (1)에 포함된 불확도 요인들을 Fig. 2에 특성요인도로 나타내었다.

모발 중 THC-COOH 성분의 양을 시료량으로 나누어 농도로 표현하므로 관계식에 시료 질량에 대한 요소가 포함되었다. f_{std} 는 표준용액 제조과정에서 발생하는 오차에 대한 요소이며, $f_{\text{precision}}$ 와 f_{recovery} 는 실제 대마 흡연자의 모발을 분석할 때 발생할 수 있는 기질의 영향, 분석방법의 안정성 및 재현성 등을 QC 시료에 대한 정밀도 및 회수율 측정시 발생하는 오차를 반영하여 나타낸 것이다.

본 연구는 동위원소로 치환된 내부표준물질을 첨가하는 내부표준법을 사용함으로써 전처리 과정에서 발생할 수 있는 불완전한 추출, 시험자의 조작 손실 등은 보정될 수 있는 것으로 가정하였다.

3. 결과 및 고찰

측정불확도 평가는 측정량과 입력량들 사이의 수학적 관계식(측정모델) 설정, 표준불확도 산출, 합성표준불확도 및 확장불확도의 계산 단계로 구분할 수 있다. 관계식에 포함된 개별 요인의 불확도 요소로부터 표준불확도를 산출하고, 측정모델에 불확도 전파법칙을 적용하여 합성표준불확도를 구하였으며 여기에 신뢰수준 95%에 상당하는 포함인자(k)를 곱하여 확장불확도를 구하였다.

3.1. 질량 측정에서의 불확도

측정 농도 값에는 모발량을 측정하는 과정에서 발생하는 불확도 요인이 포함되어 있다. 질량 측정시 발생하는 불확도는 교정기관이 발행한 교정성적서의 교정불확도를 활용하여 산출하였다. 교정성적서로부터 95%의 신뢰구간에서 교정불확도($k=2$)는 0.018 mg였으며 따라서 저울 자체의 표준불확도(u_{balance})는 0.009 mg이며 이때 유효자유도(ν_{eff})는 8이다. 상대표준불확도($u_{r \text{ balance}}$)는 식 (2)에 적용하여 0.00036의 값을 얻었다.

$$u_{r \text{ balance}} = \frac{u_{\text{balance}}}{m_0} \quad (2)$$

(m_0 : 25 mg)

3.2. 표준용액 제조과정에서의 불확도

표준용액 제조는 필요에 따라 1차 표준용액(reference material)을 희석 제조하여 사용한다. 표준용액 제조과정의 불확도는 1차 표준용액의 불확도, 사용된 부피플라스크 및 피펫의 요인이 포함된다.

1차 표준물질의 제조규격은 (100 ± 0.2) mg/L로 신뢰구간을 확인하여 표준불확도(u_{RM})를 구한 결과 0.11547 mg/L이었으며 식 (3)을 이용하여 상대표준불확도($u_{r \text{ RM}}$)를 구한 결과 0.00116이었다. 신뢰구간 내의 한계값만이 주어지는 값의 불확도는 직사각형 확률분포로 가정되어야 한다. 따라서 반너비의 한계값으로 주어진 경우 직사각형 모양의 분포함수에 따르는 평가 방법을 이용하여 입력값의 불확도를 계산하였다. 상대표준불확도는 표준불확도를 초기 농도로 나누어 구하였다.

$$u_{r \text{ RM}} = \frac{u_{\text{RM}}}{C_0} \quad (3)$$

($u_{\text{RM}} = \frac{u_{\text{cert}'}}{\sqrt{3}}$, C_0 : 100 mg/L, $u_{\text{cert}'}$: 0.2 mg/L)

표준용액 희석에 사용된 부피플라스크에 의한 불확

도 발생 요소는 부피플라스크 자체의 불확도, 온도에 의한 불확도의 두 가지 요소를 고려하였다. 부피플라스크 자체의 불확도는 교정성적서로부터 95%의 신뢰구간에서 불확도($k=2$)가 0.008 mL로 표준불확도($u_{\text{cert}'}$)는 0.004 mL을 알 수 있었다. 온도에 의한 표준불확도는 팽창계수가 $0.00025 \text{ mL}^\circ\text{C}$ 이고 실험실내 온도 조건이 (20 ± 5)°C 이므로 표준불확도($u_{\text{temp}'}$)는 0.00072 mL이었다. 이때 유효자유도(ν_{eff})는 8이다.

불확도 전파 법칙에 따라 부피플라스크를 이용한 부피 측정에서의 합성표준불확도($u_{\text{vol}'\text{flask}}$)는 0.004 mL이었고, 유효자유도(ν_{eff})는 요인별 표준편차의 자유도를 식 (4)의 Welch-Satterthwaite equation에 적용하여 구한 결과 8였다. 상대표준불확도($u_{\text{vol}'\text{flask}}$)는 식 (5)에 적용하여 0.0004의 값을 구하였다.

$$\nu_{\text{eff}} = \frac{u_c^4}{\sum \frac{u_i^4}{\nu_i}} \quad (4)$$

$$u_{r \text{ vol}'\text{flask}} = \frac{u_{\text{vol}'\text{flask}}}{V_0} \quad (5)$$

$$(u_{\text{vol}'\text{flask}} = \sqrt{(u_{\text{cert}'})^2 + (u_{\text{temp}'})^2}, V_0 = 10 \text{ mL})$$

부피 측정시 발생하는 피펫의 불확도는 교정기관이 발행한 교정성적서의 불확도를 활용하여 산출하였다. 1.0 mL용 피펫의 성적서로부터 교정불확도는 0.006 mL였으며 표준불확도(u_{pipette})는 0.003 mL이었으며 식 (6)을 이용하여 상대표준불확도($u_{r \text{ pipette}}$)를 구한 결과 0.003이었다. 이때 유효자유도는 ∞ 였다.

$$u_{r \text{ pipette}} = \frac{u_{\text{pipette}}}{V_1} \quad (6)$$

$$(V_1 = 1 \text{ mL})$$

표준용액 제조과정에서 발생하는 불확도는 1차 표준물질, 용량 플라스크, 피펫에 의한 세 가지 인자로부터 식 (7)에 적용하여 상대표준불확도($u_{r \text{ std}}$)를 산출한 결과, 그 값은 0.00751였고 유효자유도는 8였다.

$$u_{r \text{ std}} = \sqrt{(u_{r \text{ RM}})^2 + 6 \times (u_{r \text{ vol}'\text{flask}})^2 + 6 \times (u_{r \text{ pipette}})^2} \quad (7)$$

3.3. 회수를 편차에 의한 불확도 평가

측정이 이루어지는 동안 일정한 값을 유지하는 회수율에 의한 불확도 요인을 평가하기 위해 기존의 검정된 분석법으로 QC 시료를 측정하여 얻은 회수율을 이용하여 불확도를 산출하였다. 이때 검정곡선의 농도 범위는 0.05-10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었으며 측정된 QC 시료의 농도는 0.2,

Table 1. Relative standard uncertainty of recovery measurement from QC samples (n=21)

No.	QC samples		
	0.2 µg/kg	2.0 µg/kg	6.0 µg/kg
1	82.146	85.967	78.351
2	89.663	86.682	79.534
3	91.617	84.150	79.749
4	87.507	84.381	79.673
5	84.750	83.617	79.631
6	85.729	83.619	81.057
7	87.849	80.891	83.789
Mean	87.037	84.187	80.255
Standard deviation	3.152	1.868	1.745
Standard uncertainty (u_{recovery})	2.3432		
Relative standard uncertainty ($u_{\text{r recovery}}$)	0.02795		

2.0, 6.0 µg/kg으로 각각의 시료에 대해 7회 반복하여 측정하였다. 이 값들을 식 (8)에 적용하여 표준불확도를 산출한 결과, 회수율에 대한 상대표준불확도($u_{\text{r recovery}}$)는 0.02795이었으며 유효자유도는 18이었다(Table 1).

$$u_{\text{recovery}} = \sqrt{\frac{\sum(s_i^2 \times (n_i - 1))}{\sum(n_i - 1)}} \quad (8)$$

(s_i : standard deviation of each group, n_i : number of measurements)

3.4. 측정모델의 재현성에 대한 불확도

실험적 데이터에 의해 있을 수 있는 계통효과에 대한 불확도가 확인된 후에는 확률분포에 근거한 표준

불확도로 나타내어야 한다. 측정 결과에 대한 기질(matrix)의 영향 및 재현성은 기기분석시 고려해야 할 사항으로 동위원소가 치환된 내부표준물질을 사용한 내부표준법을 적용하여 측정된 일간 QC 시료의 정밀도 측정값으로부터 측정모델의 기질의 영향 및 재현성에 대한 불확도를 산정할 수 있다. 본 실험에서는 3개 농도 중 가장 정밀도의 표준편차가 큰 농도인 0.2 µg/kg에 해당하는 QC 시료를 이용하여 불확도를 산출하였다. 일간 정밀도 측정을 위해 4일간 반복하여 측정하였으며 식 (9)를 이용하여 표준불확도를 산출하였다. 또한 THC-COOH의 상대표준불확도($u_{\text{r precision}}$)는 0.07267이었으며 자유도는 20이었다(Table 2).

$$u_{\text{precision}} = \sqrt{\frac{\sum(s_i^2 \times (n_i - 1))}{\sum(n_i - 1)}} \quad (9)$$

(s_i : standard deviation of each day, n_i : number of measurements)

3.5. 검정 곡선에 의한 불확도 평가

검정 곡선의 비직선성은 측정결과 값의 불확도 요인이 된다. 일반적으로 다점교정에 의한 검정 곡선의 직선성 정도는 회귀분석을 수행하여 결정계수(R^2)를 산출함으로써 평가할 수 있다. 이러한 검정 곡선의 불확도 평가를 위한 수학적 관계 모델식 (10)은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$y = b + m \cdot x \quad (10)$$

(y : ratio of the analyte area to internal standard area, analyte concentration, m : slope, b : intercept of the curve)

검정 곡선은 5개 농도(0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 µg/kg)의 표준용액을 1회 분석하여 작성하였다(Table

Table 2. Relative standard uncertainty of precision measurement from QC samples (n=24)

No.	THC-COOH (0.2 µg/kg)			
	1st day	2nd day	3rd day	4th day
1	0.184	0.225	0.189	0.200
2	0.162	0.223	0.211	0.223
3	0.170	0.209	0.211	0.222
4	0.165	0.238	0.228	0.219
5	0.162	0.224	0.188	0.227
6	0.172	0.238	0.198	0.266
Mean	0.169	0.226	0.204	0.226
Standard deviation	0.008	0.011	0.016	0.022
Standard uncertainty (u_{recovery})	0.0141			
Relative standard uncertainty ($u_{\text{r recovery}}$)	0.07267			

Table 3. Calculations for least-squares analysis of calibration curve

No.	x_i	y_i	$x_i \cdot y_i$	x_i^2	d_i	d_i^2	$d_i - \bar{d}$	$(d_i - \bar{d})^2$	S_{xx}
1	0.05	0.029	0.001	0.003	-0.00518	0.00003	-0.005237	0.000027	0.4624
2	0.1	0.061	0.006	0.010	0.00340	0.00001	0.003344	0.000011	0.3969
3	0.5	0.250	0.125	0.250	0.00027	0.00000	0.000216	0.000000	0.0529
4	1.0	0.493	0.493	1.000	0.00356	0.00001	0.003502	0.000012	0.0729
5	2.0	0.968	1.935	4.000	-0.00177	0.00000	-0.001825	0.000003	1.6129
Sum	3.65	1.801	2.56	5.26		0.0000543		0.0000543	2.5980

$$x_i = \frac{y_i - b}{m}, d_i = y_i - mx_i - b, \bar{d}_i = \frac{\sum d_i}{n}, S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2$$

Table 4. Detailed estimation of uncertainty contributions in the results of THC-COOH analysis in hair

Uncertainty factors	Relative standard uncertainty	Effective degrees of freedom (v_{eff})	Coverage factor (k)	Degree of contribution (%)
Sample mass (u_r balance)	0.00036	8	-	0.00
Standard solution (u_r std)	0.00751	8	-	0.86
Repeatability (u_r precision)	0.07267	20	-	80.35
Recovery (u_r recovery)	0.02795	18	-	11.89
Calibration curve (u_r cal)	0.0213	4	-	6.90
Relative combined standard uncertainty ($u_r(C)$)	0.08107	29.2	2.1	100
Relative expanded uncertainty ($U_r(C)$)	0.16944	-	-	-

Uncertainty was quantified for a single measurement of drug user hair sample.

Coverage factor (k) was obtained from the Student's t -distribution corresponding to the calculated effective degrees of freedom of relative combined standard uncertainty using a confidence level of 95.45%.

3). 검정 곡선과 관련된 변수는 가로축 값의 불확도가 세로축 값의 불확도보다 작다는 가정을 전제 조건으로 하여 선형 최소제곱법으로 계산하였다. 그 결과 THC-COOH의 검정 곡선은 결정계수 0.9999, 기울기 0.4798, y -절편 0.0098의 값을 나타내었다. 실제 복용자의 모발 시료로부터 각 성분의 검정 곡선에 적용하여 얻은 THC-COOH 농도는 0.47 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다.

선형 최소제곱법으로 작성한 검정 곡선에 의한 불확도는 다음의 식에 의해 계산할 수 있다.

$$u_{\text{cal}} = \frac{s_y}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{S_{xx}}} \quad (11)$$

(x_i , number of measurements to determine x , n number of measurements for the calibration, $d_i = y_i - m \times x_i - b$, $\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n}$, $s_y = \frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n-2}$, $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$, $S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2$)

Table 4의 값을 식 (11)에 적용하여 얻어진 검정 곡선에 대한 상대표준불확도(u_r cal)는 0.02130이었으며 유효자유도는 4였다.

3.6. 확장불확도의 계산

확장불확도를 계산하기 위하여 THC-COOH의 불확도 요인들에 대한 상대표준불확도를 Table 4에 정리하였다. 그리고 개개 인자의 불확도의 자유도로부터 유효자유도를 구하고, 약 95% 신뢰수준에서의 포함인자 (k)를 추정하였으며 그 때의 값은 2.1이었다. 개별 요소에 대한 상대표준불확도를 이용하여 계산한 결과 THC-COOH의 상대합성표준불확도($u_r(C)$)는 0.08107 이었고 식 (12)을 이용하여 상대확장불확도(U_r)를 계산한 결과 0.16944였다.

$$U_r(C) = k \cdot u_r(C) \quad (12)$$

따라서 실제 대마 흡연자의 모발에서 THC-COOH의 농도 측정값을 95% 신뢰구간에서 불확도를 포함하여 표기하면(0.47 \pm 0.08) $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k = 2.1$, 신뢰수준 약 95%)이었고 대마 대사체 농도 측정값에 대한 불확도는 17%였다.

대마 대사체 분석의 측정불확도 평가 결과를 최종적으로 Table 4에 정리하였다.

4. 결 론

일반적으로 분석과정을 거쳐 산출된 측정값에는 오차를 발생시키는 여러 요인으로부터 기인하는 불확도가 포함되어 있고 이를 효과적으로 평가하고 분석방법을 개선하여 오차를 줄이는 작업은 기술적인 경쟁력을 함양하고 신뢰성 있는 결과를 얻기 위해 매우 중요한 업무임에 틀림없다.

본 연구는 모발을 이용하여 대마 흡연 여부를 확인하는 분석법에 측정불확도 개념을 처음 적용하여 실제 남용자의 모발 시료에서 측정된 대마 대사체 정량값의 불확도 범위를 객관적으로 추정하였다. 특히 회수율 측정값에 대한 불확도를 개별 요소로 추가하였다는 점에 그 의미를 갖고 있다.

본 연구에서 불확도 평가는 측정불확도 표현 지침서(GUM, Guide to the expression of Uncertainty in Measurement)에 나타나있는 방법에 따라 수행하였으며, 검토된 불확도 요인은 질량 측정, 표준용액의 순도 및 제조, 정밀도, 회수율 및 검정 곡선의 비직선성이었다. 측정불확도 평가를 통하여 위의 5가지 요인 중 QC 시료의 정밀도가 가장 큰 영향을 미치는 요인임을 확인할 수 있었다. 이는 기질로부터 함께 추출되는 방해물질의 영향이 일정 정도 작용을 할 뿐만 아니라 음이온 화학적 이온화 방식으로 분석물질을 이온화하는 경우 반응기체인 메탄가스에 의한 ion source의 오염에 의해 안정성이 저해되고 결과적으로 이러한 요인들에 의해 측정의 재현성에 상당한 영향을 미친 것으로 판단된다. 향후 이러한 측정불확도 추정 및 평가 결과를 분석방법 개선에 반영하여 가장 큰 오차 요인의 영향을 감소시키는 방향으로 연구의 초점을 맞출 예정이다.

감사의 글

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

참고문헌

1. 대검찰청, “2009 마약류범죄백서”, 2010.
2. M. E. Wall, D. R. Brine, G. A. Brine, C. G. Pitt, R. I. Freudenthal and H. D. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3466-3468(1970).
3. S. Agurell, I. M. Nilsson and M. Widman, In Marihuana Chemistry, ‘Biochemistry and Cellular Effects’, 141, Springer-Verlag, New York, U.S.A., 1976.
4. U.S. Department of Health and Human Services, ‘NIDA Research Monograph 42’, 43, National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD, U.S.A., 1982.
5. T. Saito, I. Yamamoto, T. Kusakabe, X. L. Huang, N. Yukawa and S. Takeichi, *Forensic Sci. Int.*, **112**, 65-71(2000).
6. A. P. Mason and A. J. McBay, *J. Forensic Sci.*, **30**, 615-631(1985).
7. K. M. Clauwaert, J. F. Van Bocxlaer, W. E. Lambert and A. P. De Leenheer, *Forensic Sci. Int.*, **110**, 157-166(2000).
8. H. Sachs and P. Kintz, *J. Chromatogr. B*, **713**, 147-161(1998).
9. M. Rothe, F. Pragst, K. Spiegel, T. Harrach, K. Fischer and J. Kunkel, *Forensic Sci. Int.*, **89**, 111-128(1997).
10. J. Y. Kim and M. K. In, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 1339-1342(2007).
11. 한국표준과학연구원, “측정불확도 표현지침”, 1998.
12. Korea Laboratory Accreditation Scheme (KOLAS), “측정결과의 불확도 산정 및 표현을 위한 지침”, 2000.
13. KS Q 4001, “측정결과의 불확도 추정 및 표현을 위한 지침”, 2005.
14. ISO, “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement”, ISO, Geneva, Switzerland, 1993.
15. EURACHEM/CITAC, “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement”, 2nd Ed., EURACHEM/CITAC Guide CG 4, 2000.
16. 한국표준과학연구원, “도전! 측정불확도, 기초에서 중급까지”, 2008.