

LC-MS/MS를 이용한 소변 중 크레아티닌 분석의 측정불확도 평가

김진영★ · 권운용 · 서승일 · 인문교

대검찰청 마약감식실

(2011. 12. 5. 접수, 2012. 1. 18. 수정, 2012. 1. 18. 승인)

Uncertainty evaluation for the determination of creatinine in urine by LC-MS/MS

Jin Young Kim★, Woonyong Kwon, SungIl Suh and Moon Kyo In

Drug Analysis Laboratory, Supreme Prosecutors' Office, 157 Banpodaero,
Seocho-gu, Seoul 137-730, Korea

(Received December 5, 2011; Revised January 18, 2012; Accepted January 18, 2012)

요 약: 소변 중 크레아티닌의 정상적인 농도범위는 30 - 300 mg/dL로 마약류 감정에 앞서 크레아티닌 농도를 측정함으로써 소변 시료의 유효성을 확인하고 있다. 크레아티닌 농도 측정을 위해 액체크로마토그래피-질량분광분석법(LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry)을 사용하였다. 우선 소변 시료를 고속으로 원심분리한 후 10 μ L를 분취하여 증류수 390 μ L와 혼합하여 희석하였다. 희석된 시료 20 μ L에 내부표준물질(5 μ g/mL) 30 μ L와 acetonitrile 10 μ L를 첨가하여 혼합한 후 여과한 시료를 LC-MS/MS에 주입하였다. 크레아티닌은 multi-mode ODS column (Scherzo SM-C18, 75 \times 2.0 mm, I.D. 3 μ m)을 이용하여 분리하였고, 이동상은 0.2% formic acid와 acetonitrile로 구성되었으며 유속은 150 μ L/min으로 하였다. 크레아티닌과 내부표준물질은 [M+H]⁺ precursor ion과 특징적인 product ion을 한 쌍으로 m/z 114.0 \rightarrow 86.0과 m/z 117.0 \rightarrow 89.1에서 모니터링하여 정량에 적합한 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 측정불확도 평가에 앞서 정량분석시 측정값에 영향을 주는 인자들을 찾아내고 각각의 요소들이 측정 결과에 어떤 영향을 주는가를 살펴보았다. 시료 희석, 검정 곡선, 재현성, 표준물질의 인자 순으로 측정 불확도에 영향을 미치고 있음을 확인하였다. 실제 사람의 소변에서 크레아티닌 농도를 측정된 결과, 측정값에 대한 오차 범위의 상대불확도는 14.2%로 산출되었다.

Abstract: The objective of the study was to estimate the measurement uncertainty associated with determination of creatinine (Cr) in urine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Centrifuged urine samples (10 μ L) were diluted with 390 μ L of distilled water. To 20 μ L aliquots of diluted urine samples, 30 μ L of internal standard solution (Cr-*d*₃, 5 μ g/mL) and 10 μ L of acetonitrile were added and filtered. The samples (1 μ L) were introduced into LC-MS/MS with no further pretreatment. Cr was separated on a multi-mode ODS column (Scherzo SM-C18, 75 \times 2.0 mm I.D., 3 μ m) and quantified by LC-MS/MS

★ Corresponding author

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

E-mail : paxus@spo.go.kr

operating in MRM mode (Cr, m/z 114.0 \rightarrow 86.0; Cr- d_3 , m/z 117.0 \rightarrow 89.1). The four factors that contribute uncertainty to the final result were extracted and evaluated. The principal factors of contribution to combined standard uncertainty were sample dilution, calibration curve and repeatability, while the preparation of standard solution was only a minor factor. Relative extended uncertainty of the measured concentration was 14.2% in a real urine sample.

Key words: Measurement uncertainty, urine analysis, creatinine, LC-MS/MS

1. 서 론

마약류 감정에 사용되는 시료는 소변, 혈액, 모발, 타액 등이 사용되고 있다. 이 중에서 소변은 체내에서 대사된 물질 대부분이 최종적으로 배출되는 경로이며 소변 내의 모약물(parent drug) 또는 대사체(metabolite)의 농도가 다른 시료에 비해 상대적으로 높고 채취가 용이하기 때문에 마약류 감정에 널리 사용되는 생체시료이다.¹

소변 시료는 24 시간 모아서 채취하는 방법과 현장에서 채취하는 방법이 있다. 소변을 24 시간 모아서 채취하는 방법은 편의성과 실행가능성이 떨어져 대부분의 마약류 감정과 관련된 소변 채취는 현장 시료채취방법(spot urine sample)이 사용되고 있다. 그러나 소변의 배설양은 변화가 크기 때문에 현장 시료채취방법을 사용하게 되면 소변에 함유되어 있는 약물 및 대사체의 농도에 영향을 주게 된다. 즉 소변에 함유되어 있는 수분의 양에 의하여 농도가 변하게 되므로 수분의 양에 따라 소변 내에 함유되어 있는 약물 또는 대사체의 농도가 희석되거나 농축될 수 있는 문제가 발생하게 된다.²

현장 시료채취방법으로 얻은 소변을 이용하여 분석을 수행한 후, 소변 중 대사체의 희석 또는 농축을 보정하는 방법으로 소변 내 크레아티닌(Cr, creatinine) 농도, 비중 그리고 삼투압 등을 사용하고 있다. 이들 방법 중에서 크레아티닌으로 보정된 대사체의 농도가 혈액 내의 농도와 상관관계를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다.³⁻⁵

정상적인 약물분석을 방해하려는 의도로 소변 시료를 희석하거나 다른 이물질들을 첨가하는 것을 방지할 목적으로 미국 정부는 소변 시료의 유효성시험을 수행할 것을 의무화하였다. 이 규정에 따르면 희석된 소변은 소변 중 Cr의 농도가 2-20 mg/dL의 범위일 경우에 해당되며, 극히 비정상적인 비중 값을 갖고 Cr의 농도가 2 mg/dL 이하인 경우 다른 물질로 대체된 소

변으로 표시하고 있다. 한편 세계보건기구(World Health Organization)에서는 소변 중 Cr의 농도가 30-300 mg/dL의 범위일 경우에 유효농도범위라고 권고하였다.^{6,7}

소변 중 Cr을 분석하는 방법으로 액체크로마토그래피법, 기체크로마토그래피-질량분석법, 액체크로마토그래피-질량분석법(LC-MS/MS) 등이 있다.⁹⁻¹⁵ 그러나 이러한 유효성이 확인된 방법을 이용하여 분석할 경우에도 시료의 기질, 전처리 과정, 분석기기의 오차에 의하여 결과의 차이가 발생하게 된다. 특히 마약류 감정의 경우 소변 시료의 희석 또는 대체는 위음성(false-negative) 또는 위양성(false-positive)의 결과를 초래할 수 있으므로 Cr 농도를 측정하여 시료의 유효성 여부를 판정하는 소변 중 Cr 농도 측정방법은 분석결과의 신뢰도가 매우 중요하다.

측정불확도(uncertainty of measurement)는 측정결과의 신뢰도를 나타내기 위한 정량적 지표로써 측정량을 합리적으로 추정한 값의 분산 상태를 나타낸다. 측정방법의 적합성평가(analytical method validation) 항목 중 정밀도 측정은 분석결과의 신뢰도를 간접적으로 표시할 뿐 분석결과에 대한 크레아티닌 농도의 측정불확도를 정량적으로 표현하지 못했다.

따라서 본 연구는 측정불확도 개념을 소변 중 Cr 농도 측정에 도입하여 정량분석 결과의 신뢰도를 보다 객관적으로 표현하고자 하였다. 우선 분석과정에서 측정결과에 영향을 줄 수 있는 인자들을 찾아내어 측정량(measurand)을 설정하고, 측정값으로부터 표준불확도, 합성표준불확도 및 확장불확도를 구하였다. 측정결과에 대한 불확도는 약 95%의 신뢰수준에서의 포함인자(k , coverage factor)를 적용하여 산출하였다.¹⁶⁻¹⁹ 향후 측정불확도에 영향을 미치는 개별 인자에 대한 평가 결과를 통해 불확도 발생요인의 영향을 최소화하고 분석법 개선에 활용하고자 한다.

2. 실험 및 방법

2.1. 시약 및 재료

표준용액 제조에 사용된 Cr (creatinine)은 벨기에 Acros Organics사에서 구입하였으며, 내부표준물질로 사용된 Cr- d_3 는 캐나다 CDN Isotopes사에서 구입하였다. 표준물질과 내부표준물질을 정확히 10 mg을 측정하여 용량플라스크(10 mL, volumetric flask)에 넣은 후 증류수로 채워 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 보관표준용액 (stock standard solution)을 제조하였다. 분석에 사용된 용매는 HPLC-grade acetonitrile로 미국 J. T. Baker사에서 구입하였으며, 증류수는 Milli-Q water purification system을 통과한 3차 증류수를 이용하였다. pH 조절을 위해 사용된 formic acid는 미국 Sigma사 제품이다. Cr 표준용액은 증류수로 순차적으로 희석하여 각각 100, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 제조하였고 내부표준용액 (Cr- d_3)은 5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 제조하였으며 사용 전까지 4 °C에서 냉장 보관하였다.

시료 원심분리에 사용된 Safe-Lock tube (1.5 mL)는 독일 Eppendorf사에서 구입하였으며, 여과에 사용된 직경 13 mm nylon syringe filter (0.2 μm pore size)는 미국 Restek사에서 구입하였다.

2.2. 기기 및 분석 조건

표준용액 제조를 위해 독일 Brand사의 부피플라스크(10 mL)와 독일 Eppendorf사의 100 μL 와 1000 μL 용량의 피펫(pipette)을 사용하였다. 표준물질의 무게 측정은 스위스 Mettler사 전기식 지시저울(XS205DUV)을 사용하였다.

분석에 사용된 장비는 미국 Agilent Technologies사 1200 series high-performance liquid chromatograph (HPLC)와 미국 AB SCIEX사 API 3200 QTrap triple-quadrupole mass spectrometer가 연결된 LC-MS/MS를 사용하였다. 분리관은 multi-mode ODS column (Scherzo SM-C18, 75 \times 2.0 mm I.D., 3 μm , Imtakt, Japan)을 사용하였다. 이동상 A와 B는 0.2% formic acid와 acetonitrile으로 유속은 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, 시료 주입량은 1 μL 를 최적화 조건으로 하였다. 이동상의 acetonitrile 조성은 처음 3.5 분간 10%에서 20%로 증가시킨 후, 다시 4.5 분까지 50%로 상승시키고 0.5 분간 유지시켰다. 질량분석기의 turbo gas(N_2)의 온도는 550 °C로 설정하였고 이온화 방식은 양이온 (positive ion) 전자분무 이온화 (electrospray ionization) 방식으로 MRM (multiple reaction monitoring) 방법을 사용하여 정량하

였다. MS/MS fragmentation을 위해 충돌기체로 질소를 사용하였으며 최대 감도와 최적의 product ion 생성을 위해 collision energy를 15 V로 설정하였다. 이때 분석물질의 precursor ion과 precursor ion으로부터 생성된 특징적인 product ion을 선정하여 하나의 쌍으로 모니터링 하였다. Cr의 MRM transition pair는 m/z 114.0 \rightarrow 86.0, m/z 114.0 \rightarrow 44.0으로 Cr- d_3 는 m/z 117.0 \rightarrow 89.1, m/z 117.0 \rightarrow 47.0로 설정하였다.

2.3. 시료의 전처리

피펫(1000 μL)으로 소변 1 mL를 1.5 mL Safe-Lock tube에 옮겨 담은 후 50000 g에서 3분간 고속으로 원심분리하였다. 상층을 피펫(100 μL)으로 10 μL 를 분취하여 증류수 390 μL 와 혼합하여 희석하였다. 희석된 시료 20 μL 에 내부표준물질(5 $\mu\text{g/mL}$) 30 μL 와 acetonitrile 10 μL 를 첨가하여 혼합한 후 nylon syringe filter로 여과한 시료를 LC-MS/MS에 1 μL 주입하였다.

2.4. 검정 곡선 작성

정량 범위는 소변 중 검출되는 Cr의 농도를 고려하여 설정하였으며 소변 중 농도는 1, 10, 50, 100, 300 mg/dL가 되도록 첨가하여 검정 곡선(calibration curve)을 작성하였다. 앞에서 설정한 전처리 방법에 따라 시료를 처리한 후 얻은 크로마토그램으로부터 피크의 머무름 시간을 확인하고, Cr- d_3 의 피크 면적에 대한 Cr의 피크 면적 비로 검정 곡선을 작성하였다.

2.5. QC 시료의 정밀도

Cr 표준용액을 정량범위 내에 QC 시료 중 낮은 농도에 해당되는 2 mg/dL의 농도로 첨가하고, 시료와 같은 방법으로 처리 분석한 후, 측정된 정량 값을 비교하여 정밀도를 산출하였다. 정밀도 측정은 5 일간 반복하여 측정하였다.

2.6. 측정모델

소변에서 Cr 분석과정은 원심분리, 희석, 정제 과정을 포함하는 전처리 및 LC-MS/MS를 이용한 기기 분석 과정으로 구분된다(Fig. 1).

소변 중 Cr 농도 측정과 연관된 불확도 인자는 크게 시료 희석과정 중 발생하는 불확도, 분석에 사용된 표준물질의 순도 및 표준용액 제조시 발생하는 불확도, 분석 결과로부터 측정값 계산과정에서 발생하는 검정 곡선에 대한 불확도, 측정이 시간을 두고 반복적으로 이루어질 때 발생하는 재현성에 대한 불확도의

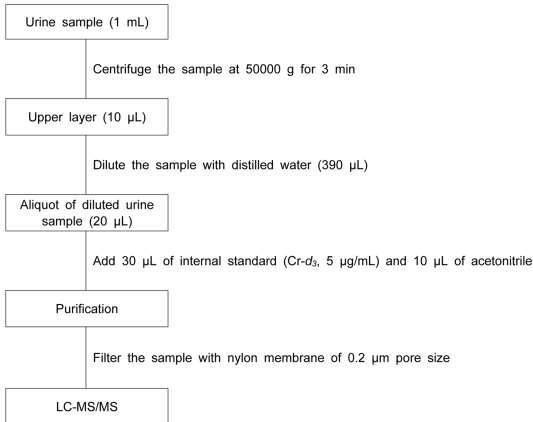


Fig. 1. Urine analysis procedure of Cr.

4 가지 요소를 추출하였다. 소변 중 Cr 분석 결과로부터 정량값에 영향을 미치는 불확도 인자에 대한 측정량은 다음과 같다.

$$C_{Cr} = C_0 \times D_f \times S_f \times C_f \times R_f \quad (1)$$

(C_{Cr} : Concentration of urine sample, C_0 : Measured concentration of urine sample)

소변 시료 중 Cr의 농도 산출을 위한 관계식 (1)에서 D_f 는 소변 시료 희석과정에서 발생하는 오차이며, S_f 는 표준용액 제조과정에서 발생하는 오차에 대한 요소이며, R_f 는 측정모델의 기질의 영향 및 재현성 측정시 발생하는 오차에 대한 요소를 나타내고 있으며, C_f 는 검량 곡선으로부터 발생하는 오차에 대한 요소를 나타낸 것이다. 또한 소변 시료 중 Cr의 농도를 산출하는 과정에 포함된 4가지 불확도 요인들을 특성요인도로 나타내었다(Fig. 2).

본 연구는 동위원소로 치환된 내부표준물질을 첨가

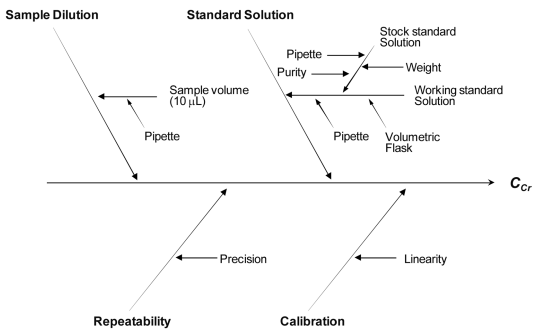


Fig. 2. Cause and effect diagram.

하는 내부표준법을 사용함으로써 전처리 과정에서 발생할 수 있는 시험자의 조작 손실은 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 불확도전파법칙을 적용하여 합성표준불확도를 구하였으며 여기에 신뢰수준 95%에 해당하는 포함인자(k)를 곱하여 확장불확도를 구하였다.

3.1. 표준용액 제조과정에서의 불확도

Cr 표준물질의 순도는 성적서에 99%로 표기되어 있고 불확도를 포함하고 있지 않아 rectangular distribution으로 가정하여 계산하였다. 표준불확도($u(P)$)와 상대표준불확도($u_r(P)$)는 다음과 같다.

$$u(P) = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 0.005774$$

$$u_r(P) = 0.005774$$

질량 측정시 발생하는 불확도는 교정기관이 발행한 교정성적서의 교정불확도를 활용하여 산출하였다. 교정성적서로부터 95%의 신뢰구간에서 교정불확도($k=2$)는 0.059 mg이었으며 이때 유효자유도(ν_{eff})는 ∞ 이다. 저울의 표준불확도($u(W)$)와 표준물질 10 mg을 측정할 때 상대표준불확도($u_r(W)$)는 다음과 같다.

$$u(W) = 0.0295 \text{ mg}$$

$$u_r(W) = \frac{u(W)}{W_0} = 0.00295 (W_0 = 10 \text{ mg})$$

표준용액 제조는 필요에 따라 보관표준용액을 희석 제조하여 사용한다. 표준용액 제조과정의 불확도는 보관표준용액의 불확도, 사용된 용량플라스크 및 피펫의 요인이 포함된다.

표준용액 희석에 사용된 용량플라스크에 의한 불확도 발생 요소는 용량플라스크 자체의 불확도, 온도 변화에 따른 플라스크 부피변화에 대한 불확도의 두 가지 요소를 고려하였다. 용량플라스크 자체의 불확도는 교정성적서로부터 95%의 신뢰구간에서 교정불확도($k=2$)는 0.01 mL로 표준불확도($u(V_{flask})$)는 아래

와 같은 값을 얻었다. 물에 대한 부피의 팽창계수가 0.00021 mL/°C이고 실험실내 온도 조건이 (20 ± 5) °C 이므로 표준불확도(u(T))는 다음과 같이 구하였다. 유효자유도(v_{eff})는 ∞이다.

$$u(V_{\text{flask}}) = 0.005 \text{ mL}$$

$$u(T) = \frac{10 \times 5 \times 0.00021}{\sqrt{3}} = 0.006217 \text{ mL}$$

불확도 전과 법칙에 따라 부피플라스크를 이용한 부피 측정에서의 합성표준불확도(u(V_F))는 0.007978 mL 이었고, 유효자유도는 요인별 표준편차의 자유도를 식 (2)의 Welch-Satterthwaite equation에 적용하여 구한 결과 ∞였다. 합성표준불확도(u(V_F))와 10 mL 측정시 상대표준불확도(u_r(V_F))를 계산한 결과는 다음과 같다.

$$v_{\text{eff}} = \frac{u_c^4}{\sum \frac{u_i^4}{v_i}} \quad (2)$$

$$u(V_F) = \sqrt{(u(F_{\text{flask}}))^2 + (u(T))^2} = 0.007978 \text{ mL}$$

$$u_r(V_F) = \frac{u(V_F)}{V_0} = 0.000798 (V_0 = 10 \text{ mL})$$

부피 측정시 발생하는 피펫의 불확도는 교정성적서의 불확도를 활용하여 산출하였다. 1000 µL 용량의 피펫의 성적서로부터 교정불확도는 6 µL였다. 1000 µL 용량 피펫의 표준불확도(u(V_{P1000}))와 1000 µL 측정시 상대표준불확도(u_r(V_{P1000}))를 구한 결과는 다음과 같다. 이때 유효자유도는 ∞였다.

$$u(V_{P1000}) = 3 \text{ µL}$$

$$u_r(V_{P1000}) = \frac{u(V_{P1000})}{V_1} = 0.003 (V_1 = 1000 \text{ µL})$$

표준용액 제조과정에서 발생하는 불확도는 표준물질의 무게측정, 용량 플라스크, 피펫에 의한 세 가지 인자로부터 상대표준불확도(u_r(S))를 산출한 결과는 다음과 같다. 이때 유효자유도는 ∞였다.

$$u_r(S) = \sqrt{(u_r(P))^2 + (u_r(W))^2 + 4 \times (u_r(V_F))^2 + 3 \times (u_r(V_{P1000}))^2}$$

$$= 0.008468$$

3.2. 시료 희석과정에서의 불확도

부피 측정시 발생하는 피펫의 불확도는 교정성적서의 불확도를 활용하여 산출하였다. 100 µL 용량의 피펫의 성적서로부터 교정불확도는 0.74 µL였다. 100

µL 용량 피펫의 표준불확도(u(P₁₀₀))와 10 µL 측정시 상대표준불확도(u_r(P₁₀)), 20 µL 측정시 상대표준불확도(u_r(P₂₀)), 30 µL 측정시 상대표준불확도(u_r(P₃₀))를 구한 결과와 1000 µL 용량 피펫으로 390 µL 측정시 상대표준불확도(u_r(P₃₉₀))를 구한 결과는 다음과 같다. 이때 유효자유도는 ∞였다.

$$u(P_{100}) = 0.37 \text{ µL}$$

$$u_r(P_{10}) = \frac{u(P_{100})}{V_1} = 0.037 (V_1 = 10 \text{ µL})$$

$$u_r(P_{20}) = \frac{u(P_{100})}{V_2} = 0.0185 (V_2 = 20 \text{ µL})$$

$$u_r(P_{30}) = \frac{u(P_{100})}{V_3} = 0.012333 (V_3 = 30 \text{ µL})$$

$$u_r(P_{390}) = \frac{u(P_{1000})}{V_4} = 0.007692 (V_4 = 390 \text{ µL})$$

소변 시료 분취 및 희석과정에서 발생하는 불확도는 피펫에 의한 인자로부터 발생한다. 시료 제조과정에서 발생하는 상대표준불확도(u_r(V_U))를 산출한 결과는 다음과 같다. 이때 유효자유도는 ∞였다.

$$u_r(V_U) = \sqrt{(u_r(P_{10}))^2 + (u_r(P_{20}))^2 + (u_r(P_{30}))^2 + (u_r(P_{390}))^2}$$

$$= 0.043847$$

3.3. 측정모델의 재현성에 대한 불확도

실험적 데이터에 분포하는 계통효과에 의한 오차는 확률분포에 근거한 표준불확도로 표현되어야 한다. 측정 결과에 대한 기질(matrix)의 영향 및 재현성은 기기분석시 반드시 고려해야 할 사항이다. 동위원소가 치환된 내부표준물질을 사용한 내부표준법을 적용하여 일간 QC 시료의 정밀도를 측정함으로써 측정모델의 기질의 영향 및 재현성에 대한 불확도를 산출할 수 있다. 본 실험에서는 3 개 농도 중 가장 정밀도의 표준편차가 큰 2 mg/dL에 해당하는 QC 시료를 이용하여 불확도를 산출하였다. 일간 정밀도 측정을 위해 5 일간 반복하여 측정하였으며, 측정결과로부터 아래와 같이 표준불확도(u(R))와 상대표준불확도(u_r(R))를 산출하였다. 이때 유효자유도는 30이었다(Table 1).

$$u(R) = \sqrt{\frac{\sum (s_i^2 \times (n_i - 1))}{\sum (n_i - 1)}} = 0.077223$$

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

Table 1. Relative standard uncertainty of precision measurement from QC samples (n = 35)

No.	Cr (2 mg/dL)				
	1 st day	2 nd day	3 rd day	4 th day	5 th day
1	1.989	2.155	2.234	2.518	2.340
2	1.979	2.060	2.168	2.353	2.253
3	1.951	2.117	2.071	2.419	2.445
4	2.038	2.280	2.092	2.309	2.415
5	2.052	2.116	2.123	2.461	2.369
6	2.131	2.006	2.364	2.382	2.219
7	2.257	2.282	2.083	2.531	2.349
Mean (\bar{x})	2.057	2.145	2.162	2.425	2.342
Standard deviation	0.106	0.104	0.106	0.083	0.081
Standard uncertainty (u(R))	0.077223				
Relative standard uncertainty (u _r (R))	0.034690				

Table 2. Calculations for least-squares analysis of calibration

No.	x _i	y _i	x _i · y _i	x _i ²	d _i	d _i ²	d _i d _i - \bar{d}	(d _i - \bar{d}) ²	s _{xx}
1	1	0.038	0.038	1	0.0321	0.00103	0.030176	0.00091	8317.4
2	10	0.302	3.017	100	0.0318	0.00101	0.029851	0.00089	6756.8
3	50	1.479	73.932	2500	0.0367	0.00135	0.034776	0.00121	1780.8
4	100	2.771	277.06	10000	-0.1363	0.01858	-0.138256	0.01911	60.8
5	300	8.812	2643.69	90000	0.0454	0.00206	0.043453	0.00189	43180.8
Sum	461	13.402	2997.74	102601		0.02403		0.02401	60096.8

$$\left(u_r(R) = \frac{u(R)}{\bar{x}} = 0.034690, \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}\right)$$

3.4. 검정 곡선에 의한 불확도 평가

검정 곡선의 비직선성은 측정결과 값의 불확도 요인이 된다. 일반적으로 다점검정에 의한 검정 곡선의 직선성 정도는 회귀분석을 수행하여 결정계수(R²)를 산출함으로써 평가할 수 있다. 이러한 검정 곡선의 불확도 평가를 위한 수학적 관계 모델식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$y_i = b + (m \times x_i)$$

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

검정 곡선은 5개 농도(1, 10, 50, 100, 300 mg/dL)의 표준용액을 1회 분석하여 작성하였다(Table 2). 검정 곡선과 관련된 변수는 가로축 값의 불확도가 세로축 값의 불확도보다 작다는 가정을 전제 조건으로 하여 선형 최소제곱법으로 계산하였다. 그 결과 Cr의 검

정 곡선은 결정계수 (R²) 0.9995, 기울기 (m) 0.0293, y-intercept -0.0231의 값을 나타내었다. 실제 소변 시료를 검정 곡선에 적용하여 얻은 Cr 농도는 88.03 mg/dL이었다.

선형 최소제곱법으로 작성한 검정 곡선에 의한 표준불확도(u(C₀))와 상대표준불확도(u_r(C₀))를 다음과 같이 산출하였다(Table 2). 이때 유효자유도는 4였다.

$$u(C_0) = \frac{s_y}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x}_i)^2}{S_{xx}}} = 3.415719$$

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

$$u_r(C_0) = \frac{u(C_0)}{C_s} = 0.038801 (C_s = 88.03 \text{ mg/dL})$$

3.5. 확장불확도의 계산

확장불확도를 계산하기 위하여 Cr의 불확도 요인들에 대한 상대표준불확도를 Table 3에 정리하였다.

Table 3. Detailed estimation of uncertainty contributions in the results of Cr analysis in urine

Uncertainty factors	Relative standard uncertainty	Effective degrees of freedom (v_{eff})	Coverage factor (k)	Degree of contribution (%)
Standard solution ($u_r(S)$)	0.008468	8	-	1.5
Sample dilution ($u_r(V_U)$)	0.043847	8	-	40.9
Repeatability ($u_r(R)$)	0.034690	30	-	25.6
Calibration curve ($u_r(C_0)$)	0.038801	4	-	32.0
Relative combined standard uncertainty ($u_r(C)$)	0.068580	36	2.1	100
Relative expanded uncertainty ($U_r(C)$)	0.142234	-	-	-

Uncertainty was quantified for a single measurement of urine 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%.

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 Cr의 상대합성표준불확도($u_r(C)$)는 0.068580이었고 식 (3)을 이용하여 상대확장불확도($U_r(C)$)를 계산한 결과 0.142234였다.

$$U_r(C) = u_r(C) \times k \quad (3)$$

따라서 실제 대마 흡연자의 소변에서 Cr의 농도 측정값을 95% 신뢰구간에서 불확도를 포함하여 표기하면 (88.03 ± 12.52) mg/dL ($k = 2.1$, 신뢰수준 약 95%)이었고 Cr 농도 측정값에 대한 불확도는 14.2%였다.

4. 결 론

본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용하여 소변 중 Cr의 농도를 측정하는 과정에서 발생할 수 있는 측정불확도를 ‘측정불확도 표현 지침서’(Guide to the expression of Uncertainty in Measurement)에 따라 산출하였다. 검토된 불확도 요인은 시료 희석, 표준용액의 순도 및 제조, 정밀도 및 검정 곡선의 비직선성이다. 그 중 시료 희석 과정과 검량 곡선의 비직선성의 2 가지 인자가 불확도에 가장 큰 영향을 미치는 요인임을 확인할 수 있었다. 우선 소변 시료의 희석 과정에서 발생하는 오차를 줄이기 위해서는 희석에 사용되는 시료의 양을 증가시키거나 분석에 사용되는 시료를 여러 번에 나누어 분취함으로써 희석 과정시 피펫으로부터 발생하는 불확도를 줄일 수 있을 것으로 판단된다. 다음으로 검량 곡선으로부터 발생하는 오차의 경우 정량 농

도 범위를 줄여 여러 개의 농도범위로 세분화하거나 검량 곡선 작성에 사용되는 농도의 수를 증가시켜 분석함으로써 검량 곡선으로부터 발생하는 측정 결과의 불확도를 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구의 측정불확도 평가 결과를 분석법 개선에 반영하여 오차를 발생시키는 인자의 영향을 최소화할 수 있도록 향후 연구의 진행 방향을 설정할 예정이다.

감사의 글

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

참고문헌

1. D. Vearyer, J. A. Curtis and M. I. Greenberg, *EXS*, **100**, 489-517 (2010).
2. D. B. Barr, L. C. Wilder, S. P. Caudill, A. J. Gonzalez, L. L. Needham and J. L. Pirkle, *Environ. Health Persp.*, **113**, 192-200 (2005).
3. J. To-Figueras, M. Sala, R. Otero, C. Barrot, M. Santiago-Siva, M. Rodamilans, C. Herrero, J. Grimalt and J. Sunyer, *Environ. Health Persp.*, **105**, 78-83 (1997).
4. J.-H. Lee and R.-M. Ahn, *J. Env. Hlth. Sci.*, **36**, 215-221 (2010).
5. M. L. Smith, A. J. Barnes and M. A. Heustis, *J. Anal. Toxicol.*, **33**, 185-189 (2009).
6. U.S. Department of Health and Human Services, *Fed. Regist.*, **69**, 19644-19673 (2004).

7. World Health Organization (WHO), 'Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace: guidelines', Vol. 1, Geneva, 1996.
9. Y. Zuo, Y. Yang, Z. Zhu, W. He and Z. Aydin, *Talanta*, **83**, 1707-1710 (2011).
10. T. Seki, K. Yamaji, Y. Orita, S. Moriguchi and A. Shinoda, *J. Chromatogr. A*, **730**, 139-145 (1996).
11. X. B. Chen, A. G. Calder, P. Prasitkusol, D. J. Kyle and M. C. Jayasuriya, *J. Mass Spectrom.*, **33**, 130-137 (1998).
12. D. Tsikas, A. Wolf, A. Mitschke, F. M. Gutzki, W. Will and M. Bader, *J. Chromatogr. B*, **878**, 2582-2592 (2010).
13. R. Husková, P. Chrastina, T. Adam and P. Schneiderka, *Clin. Chim. Acta.*, **350**, 99-106 (2004).
14. N. Takahashi, G. Boysen, F. Li, Y. Li and J. A. Swenberg, *Kidney Int.*, **71**, 266-271 (2007).
15. E. K. Park, T. Watanabe, S. J. Gee, M. B. Schenker and B. D. Hammock, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 333-336 (2008).
16. Korea Research Institute of Standards and Science (KRISS), 'Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement', 1998.
17. Korea Laboratory Accreditation Scheme (KOLAS), 'Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (KOLAS-G-002)', 2007.
18. International Organization for Standardization (ISO), 'Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement', ISO, Geneva, Switzerland, 1993.
19. EURACHEM/CITAC, 'Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement', 2nd Ed., EURACHEM/CITAC Guide CG 4, 2000.