

Simultaneous determination of 11-nor- Δ^9 -carboxy-tetrahydrocannabinol and 11-nor- Δ^9 -carboxy-tetrahydrocannabinol-glucuronide in urine samples by LC-MS/MS and its application to forensic science

Meejung Park[★] and Sineun Kim

Forensic Toxicology & Chemistry, Busan Institute of National Forensic Service 50 Kumo-ro, Mulgum-eup, Yangsan 50612, Korea

(Received September 14, 2021; Revised November 11, 2021; Accepted November 15, 2021)

LC-MS/MS를 이용한 소변 중 11-nor- Δ^9 -carboxy-tetrahydrocannabinol 및 11-nor- Δ^9 -carboxy-tetrahydrocannabinol-glucuronide의 동시 분석 및 법과학적 적용

박미정[★] · 김신은

국립과학수사연구원 부산과학수사연구소 독성화학과
(2021. 9. 14. 접수, 2021. 11. 11. 수정, 2021. 11. 15. 승인)

Abstract: Cannabis (Marijuana) is one of the most widely used drugs in the world, and its distribution has been controlled in South Korea since 1976. Identification of 11-nor- Δ^9 -carboxy-tetrahydrocannabinol (THCCOOH) in urine can provide important proof of cannabis use, and it is considered scientific evidence in the forensic field. In this study, we describe a simultaneous quantitative method for identifying THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine, using simple liquid-liquid extraction (LLE), and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). THCCOOH-D₃ and THCCOOH-glucuronide-D₃ were used as internal standards. Validation results of the matrix effect, as well as recovery, linearity, precision, accuracy, process efficiency, and stability were all satisfactory. No carryover, endogenous or exogenous interferences were observed. The limit of detection (LOD) of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide were 0.3 and 0.2 ng/mL, respectively. The developed method was applied to 28 authentic human urine samples that tested positive in immunoassay screening and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) tests. The ranges of concentrations of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in the samples were less than LOQ~266.90 ng/mL and 6.43~2133.03 ng/mL, respectively. The concentrations of THCCOOH-glucuronide were higher than those of THCCOOH in all samples. This method can be effectively and successfully applied for the confirmation of cannabinoid use in human urine samples in the forensic field.

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)55-380-4110 Fax : +82-(0)55-380-4140

E-mail : meejung@korea.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

요약: 대마는 전 세계적으로 가장 많이 남용되고 있는 물질 중의 하나이며, 우리나라에서는 메트암페타민 다음으로 많이 남용되고 있으며, 1976년부터 국내에서 마약류관리법에 의해 규제되고 있다. 소변 중 대마성분의 검출을 위하여는 대마의 유효 성분인 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC)의 생체내 주된 대사체인 11-nor- Δ^9 -carboxy-tetrahydrocannabinol (THCCOOH)을 확인하는 것이 일반적이며, 이는 과학수사 및 사법처리와 관련된 법과학 분야에서 중요한 증거로 받아들여지고 있다. 본 연구에서는 소변 중 대마 대사체의 분석을 위하여 분석법이 간단하고 단시간이 소요되는 분석방법으로 THCCOOH 및 THCCOOH-glucuronide를 액상 추출하고 액체크로마토그래피/질량분석법(LC-MS/MS)을 사용하여 동시 분석하는 방법을 확립하였다. 내부표준물질로는 THCCOOH-D₃ 및 THCCOOH-glucuronide-D₃를 사용하였다. 시험방법의 유효화를 위하여 매질 효과, 회수율, 직선성, 정밀도, 정확도, 시험과정의 효율성 및 안정성 등을 시험하였고, 모든 결과가 적합함을 알 수 있었다. 실험 과정에서의 carryover는 나타나지 않았으며, 선택성 및 간섭성도 우수하였다. THCCOOH 및 THCCOOH-glucuronide의 검출 한계는 각각 0.3 및 0.2 ng/mL이었다. 확립된 분석방법을 면역시험법과 가스크로마토그래피/질량분석법(GC/MS)법에서 대마 양성으로 최종 판정된 28개의 실제 소변에 적용하여 분석법의 적합성을 검토하였다. 28개 소변 중 THCCOOH 및 THCCOOH-glucuronide의 농도는 각각 정량 한계 미만~226.90 ng/mL 및 6.43~2133.03 ng/mL이었고, 모든 시료에서 THCCOOH-glucuronide가 THCCOOH 보다 많이 검출되었다. 본 분석법을 소변 중 대마의 흡연여부를 판정하는 감정시험에 적용함으로써 단시간에 효율적인 분석을 실시할 수 있게 되어 과학수사 발전에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

Key words: forensic, cannabinoid glucuronide, LC-MS/MS, LLE

1. 서 론

대마(Cannabis)는 우리나라에서 메트암페타민 다음으로 많이 남용되는 마약류이며, 대마 식물(Cannabis Sativa L.)의 잎, 화분 등을 건조하여 사용하거나, 오일, 수지, 해쉬쉬(hashish) 등의 형태로 남용된다.^{1,2} 대마 사용 여부 확인을 위한 시료로는 소변과 모발이 일반적이며, 소변의 경우 사용 후 수 일까지 단기간 경과 시의 양성 여부 판정 시료로 적합하다.³⁻⁵ 현재 우리나라에서 마약류 투약 여부를 판정하는 업무기관으로는 국립과학수사연구원(국과수) 및 대검찰청 디엔에이·화학분석과가 존재하며, 공신력 있는 감정 기관으로서 마약 투약 및 마약 진위 여부 등을 판별하여 결과를 제공함으로써 피의자 신병 구속, 사법처리 및 형사재판 등의 사법 집행에 결정적인 과학적 증거를 제공하고 있다. 따라서, 법과학 실험실의 신속하고 정확한 결과 통보는 이러한 절차 수행을 위한 필수적이고 중요한 임무 중 하나이다.

대마를 복용한 경우 환각 등의 유효한 정신작용을 나타내는 성분은 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC)이며, 이는 체내에서 대사되어 11-nor- Δ^9 -carboxy-tetrahydrocannabinol (THCCOOH) 및 이의 포합체인 11-nor- Δ^9 -carboxy-tetrahydrocannabinol-glucuronide (THCCOOH-

glucuronide)의 형태로 변화되어 소변으로 배설된다 (Fig. 1).^{6,7} 국과수에서는 소변 중 대마 성분의 확인을 위하여 면역시험법에 의한 예비시험과 질량분석법을 이용한 확인시험을 실시하고 있다. 즉, 면역시험법 결과 cut-off인 25 ng/mL 이상인 시료에 대하여 확인시험을 실시하고 있으며, THCCOOH-glucuronide를 효소로 가수분해하여 THCCOOH로 변화시킨 후 유기용매를 사용하여 액상추출하고, 극성을 줄이기 위해 trimethylsilyl (TMS)기로 유도체화 한 다음 가스크로마토그래피/질량분석법 (GC/MS)을 이용하여 확인시험을 시행하고 있다.⁸⁻¹⁰ 그러나, 이러한 방법은 고비용이고 장시간이 소요되며, 유도체화 시약 사용으로 실험자에게 유해한 영향이 미칠 수 있으며, GC/MS 컬럼의 성능을 저하시키는 등의 문제점을 가지고 있다. 본 연구에서는 THCCOOH 및 THCCOOH-glucuronide를 동시에 추출하여 LC-MS/MS를 통해 분석함으로써, 가수분해 및 유도체화 과정 없이 단시간에 효율적으로 대마 대사체를 분석하는 방법을 확립하였고, 이 방법에 대한 실험방법 유효화를 실시하였다. 확립된 분석방법의 유효성을 검증하기 위하여 실제 수사기관에서 접수된 시료 중 면역분석법과 GC/MS법에 의해 대마 양성으로 판정된 시료 28종에 대하여 본 분석법을 적용하여 결과를 비교함으로써 분석방법의 적합성을 검토하였다.

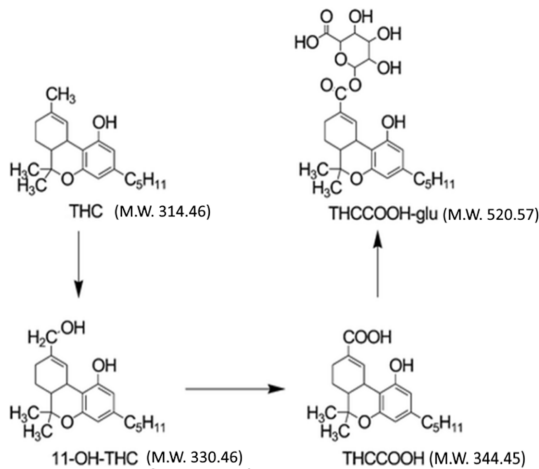


Fig. 1. Metabolic pathways of tetrahydrocannabinol (THC).

2. 실험 방법

2.1. 시약 및 표준품

본 시험에 사용된 acetonitrile, methanol 및 증류수는 HPLC급을 사용하였고, ethyl acetate, formic acid, ammonium formate, 빙초산 (glacial acetic acid) 등은 특급 (GR)시약을 사용하였다. 표준물질 및 내부표준물질인 THCCOOH, THCCOOH-glucuronide, THCCOOH-D₃ 및 THCCOOH-glucuronide-D₃ 4종은 모두 100 µg/mL 메탄올 용액을 Cerilliant사 (RoundRock, TX, USA)로부터 구매하였고, 이를 희석하여 1 µg/mL, 100 ng/mL 으로 제조한 후 시험에 사용하였으며, -20 °C에서 보관하였다.

2.2. 추출 방법

소변을 시험관에 취하고, 빙초산 0.1 mL를 넣어 산성화한 후 ethyl acetate를 넣고 자동 회전추출기 (rotator)로 30분 동안 회전시켜 목적 성분을 추출하였다. 3,500 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 상층의 유기용매 층을 취하여 45 °C에서 질소농축하였고, 잔사에 메탄올 100 µL를 넣고 재현탁 시킨 후 0.22 µm로 필터하여 LC-MS/MS 분석 시료로 사용하였다.

실제 대마 양성시료를 사용하여 분석법을 검토하고자 28 종의 소변을 분석하였다. 최근 3개월 동안 수사 기관에서 의뢰된 소변 중 감정시험 결과 대마 양성으로 판정된 시료를 사용하였다. 대마 양성 판정은 면역분석기인 Cobas C311 (ROCHE Diagnostics, Rotkreut, Switzerland)의 시험 결과 cut-off인 25 ng/mL 이상으

로 반응된 소변에 대하여 GC/MS법으로 THCCOOH의 확인시험을 실시하여 판정하였다. 본 연구에서는 면역분석법에서 판정된 예비시험의 수치를 참고하여 소변 채취량을 결정하였다. 즉, 면역분석법 결과 100 ng/mL이하는 1 mL, 100~200 ng/mL 사이는 0.5 mL, 200 ng/mL 이상에서는 0.2 mL의 소변을 취하여 분석하였으며, 그 이유는 고농도 시료에 의한 carry-over 및 시험 과정에서의 오염을 막기 위함이었다. 분석에 사용된 희석에 의한 결과값의 변화를 보기 위하여 2배 및 5배에 대한 dilution integrity를 검사하였다.

2.3. LC-MS/MS법

LC-MS/MS분석은 pump, autosampler, on-line degasser 및 column compartment로 구성된 1290 infinity UHPLC (Agilent Technologies, CA, USA) 및 AB SCIEX QTRAP 4500 MS/MS (AB SCIEX, MA, USA)를 사용하였다. 크로마토그램 분석은 20분이 소요되었다. 분석에 사용된 컬럼은 Zorbax Eclipse plus RRHD C₁₈ column (1.8 µm, 100 mm × 2.1 mm ID, Agilent technology)이었으며, 컬럼 보관부는 40 °C로 유지되었고, autosampler는 10 °C로 유지되었다. 이동상은 2.5 mM ammonium formate와 0.1% formic acid 수용액(이동상 A) 및 2.5 mM ammonium formate와 0.1% formic acid 아세트 니트릴 용액(이동상 B)이었으며, gradient mode를 사용하였다. 즉, 이동상 B가 2 분까지 10%이었다가, 90%로 7분까지 증가하였으며, 15 분까지 유지하고 처음의 조건으로 되돌린 후 5분 동안 재평형 되게 하였고, 시료의 주입량은 2 µL이었다. MS 시스템은 electrospray ionization (ESI)의 negative mode를 사용하였고, multiple reaction monitoring (MRM) 및 EPI (enhanced product ion) 방식을 동시에 수행하였으며, 최적의 분석 조건을 확립하기 위하여 AB SCIEX사의 ANALYST system 중 compound optimization program을 사용하였다. 각 목적 성분 및 내부표준물질의 MRM 전이, retention times 및 기타 조건들은 Table 1에 나타내었다.

2.4. 시험방법의 유효화

유효화 인자로는 선택성(selectivity), 매트릭 효과(matrix effect), 회수율(recovery), 시험과정 효율성(process efficiency), 직선성(linearity), 검출 한계(limit of detection, LOD), 정량 한계(limit of quantification, LOQ), 정밀도 (precision), 정확도(accuracy), dilution integrity 및 안정성(stability) 등을 시험하였다.¹¹⁻¹³ 소변 7종을 혼합한 후 대마성분이 검출되지 않음을 확인한 후 공시료 소변으

Table 1. MRM transitions, retention times and conditions for THCCOOH, THCCOOH-glucuronide, THCCOOH-D₃, and THCCOOH-glucuronide-D₃

| Compound | Precursor ion (m/z) | Product ion (m/z) | Retention time (min) | DP ^{a)} | EP ^{b)} | CE ^{c)} | CXP ^{d)} |
|------------------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| THCCOOH | 343.0 | <u>293.0</u> | 8.0 | -70 | -10 | -28 | -9 |
| | | 245.0 | | -75 | -10 | -42 | -9 |
| THCCOOH-glucuronide | 519.0 | <u>342.9</u> | 7.0 | -90 | -10 | -40 | -13 |
| | | 298.9 | | -95 | -10 | -50 | -15 |
| THCCOOH-D ₃ | 346.0 | <u>301.9</u> | 8.0 | -105 | -10 | -30 | -11 |
| | | 248.0 | | -105 | -10 | -38 | -13 |
| THCCOOH-glucuronide-D ₃ | 521.9 | <u>192.9</u> | 7.0 | -100 | -10 | -26 | -17 |
| | | 346.0 | | -100 | -10 | -34 | -13 |

The quantification transition is underlined.

DP^{a)}, declustering potential; EP^{b)}, entrance potential; CE^{c)}, collision energy; CXP^{d)}, collision cell exit potential

로 사용하였으며, 기지 농도의 목적 성분 및 내부표준 물질을 공시료 소변에 첨가하여 유효화 시험을 실시하였다. 검량선은 정량 한계(2.5 ng/mL)부터 100 ng/mL까지 7 농도를 5회 반복하여 작성하였으며, 사용된 농도는 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 및 100 ng/mL이었다. 검출 한계 및 정량 한계는 공시료 소변에 기지의 농도를 첨가하고 분석하여 결정하였으며, 검출 한계는 공시료 소변을 5회 추출하여 분석 한 뒤 S/N (signal/noise)비가 3인 농도로 결정하였고, 정량 한계는 동일한 방법으로 시험하여 정밀도(CV) 및 정확도(bias)가 각각 20% 이내인 최저 농도를 선택하였다. 매질 효과, 회수율 및 실험과정 효율성은 표준 용액(1세트), 5개의 서로 다른 소변 시료를 용매 추출 한 후 표준 물질 추가(2세트) 및 표준 물질 추가 후 추출(3세트)의 3세트에 대하여 매질 효과(2세트/1세트), 회수율(3세트/2세트), 실험과정 효율성(3세트/1세트)을 측정하였다. 실험방법의 정밀도(precision) 및 정확도(accuracy)는 공시료 소변에 저농도(10 ng/mL), 중간농도(50 ng/mL) 및 고농도(100 ng/mL)의 THCCOOH 및 THCCOOH-glucuronide를 첨가한 후 검량선을 통하여 얻은 정량값으로 당일 에 동시에 시험한 intra-assay 및 5일 간 수행한 inter-assay에 대한 결과값을 CVs (coefficients of variation, %) 및 bias (%)로 나타내었다. 실험에 사용한 희석 배수인 2 배 및 5 배에 대하여 dilution integrity를 검토하기 위하여 100 ng/mL를 공시료 소변으로 2 배 희석한 50 ng/mL 및 5 배 희석한 20 ng/mL의 농도에 대하여 5회 반복 실험하여 얻은 결과값에 희석 배수를 곱한 후 이를 100 ng/mL의 결과값과 비교하였다. THCCOOH 및 THCCOOH-glucuronide의 상호 가역적인 변화와 냉장 및 냉동 보관, 상온에서의 안정성을 시험하였다. 즉, 상온에서 24 시간, 냉장(-4 °C)에서 72 시간 및 -20 °C에서

12 시간 냉동 및 해동을 3회 반복 후 등 3가지 조건에 대하여 저농도 및 고농도인 10 및 100 ng/mL을 각각 실험하여 변화율을 측정함으로써 안정성을 검토하였다.

3. 결과 및 고찰

대마(Cannabis)의 사용 여부에 대한 분석은 예비시험으로 면역분석법을 시행하고, 그 결과 양성인 시료에 대하여 질량분석법으로 확인 시험을 실시하는 것이 국제적으로 공인된 방법이다.¹⁴⁻¹⁶ THCCOOH는 소변에서 약 80%가 glucuronide 포함체로 존재하므로 기존 GC/MS에 의한 확인 시험을 위해서는 이의 가수분해가 필요하며, 주로 알칼리 및 glucuronidase의 효소를 이용하여 포함체를 유리 상태로 변화시킨 후 이를 액상추출하고, 극성을 줄이기 위해 trimethylsilyl (TMS)기를 사용하여 유도체화 한 후 GC/MS분석을 시행하고 있다. 그러나, 최근에는 대마 성분의 분석을 LC-MS/MS로 시행하는 연구가 국제적으로 많이 보고되어 있으며,¹⁷⁻¹⁸ 당 연구원에서는 모발 중 대마 양성을 판단하기 위하여 모발을 알칼리성하에서 분해한 후 THCCOOH를 LC-MS/MS로 분석하는 방법을 도입하여 시료에 적용하고 있다.¹⁹

본 연구에서는 소변에서 대마 대사체의 신속하고 간단한 분석을 위하여 액상추출법과 LC-MS/MS를 이용한 분석법을 검토하였다. THCCOOH는 지용성이 강하고 산성에 추출되므로 소변을 초산으로 산성화한 후 추출하였으며, 사용된 용매는 ethyl acetate이었다. 추출 효율을 비교하기 위하여 hexane, hexane:ethyl acetate (=9:1) 및 ethyl acetate를 각각 사용하였고, 그 결과 ethyl acetate를 사용한 결과의 효율이 가장 우수하여 이 용매를 최종 선택하였다. THCCOOH 및

THCCOOH-glucuronide를 동시에 분석하기 위하여 극성 물질 분석에 효율적인 Zorbax Eclipse Plus RRHD C₁₈ column을 선택하였으며, 이는 생체시료에서 합성 대마를 분석하는 용도로 현재 당 원에서 사용 중인 컬럼과 동일하다.²⁰ 공시료 소변 10 종을 본 분석법으로 추출 및 LC-MS/MS 분석한 결과 목적 성분 및 내부표준물질의 retention time 위치에서 동일한 peak 및 EPI spectrum이 확인되지 않아 간섭성 및 선택성이 우수함을 알 수 있었다. LC-MS/MS 분석 결과 두 성분의

retention time은 THCCOOH의 경우 8분, THCCOOH-glucuronide의 경우 7분에 검출되었으며, 분석에 소요되는 시간은 20분이었다.

시험 방법의 유효화 결과 THCCOOH 및 THCCOOH-glucuronide의 LOD는 각각 0.3 및 0.2 ng/mL이었고, LOQ는 두 성분 모두 2.5 ng/mL이었다. 실제 양성 소변 시료, 표준물질을 추가한 소변 및 공시료 소변에 대한 total ion chromatogram 및 ion extracted chromatogram은 Fig. 2에 나타내었다. 직선성을 검토하기 위한 검량

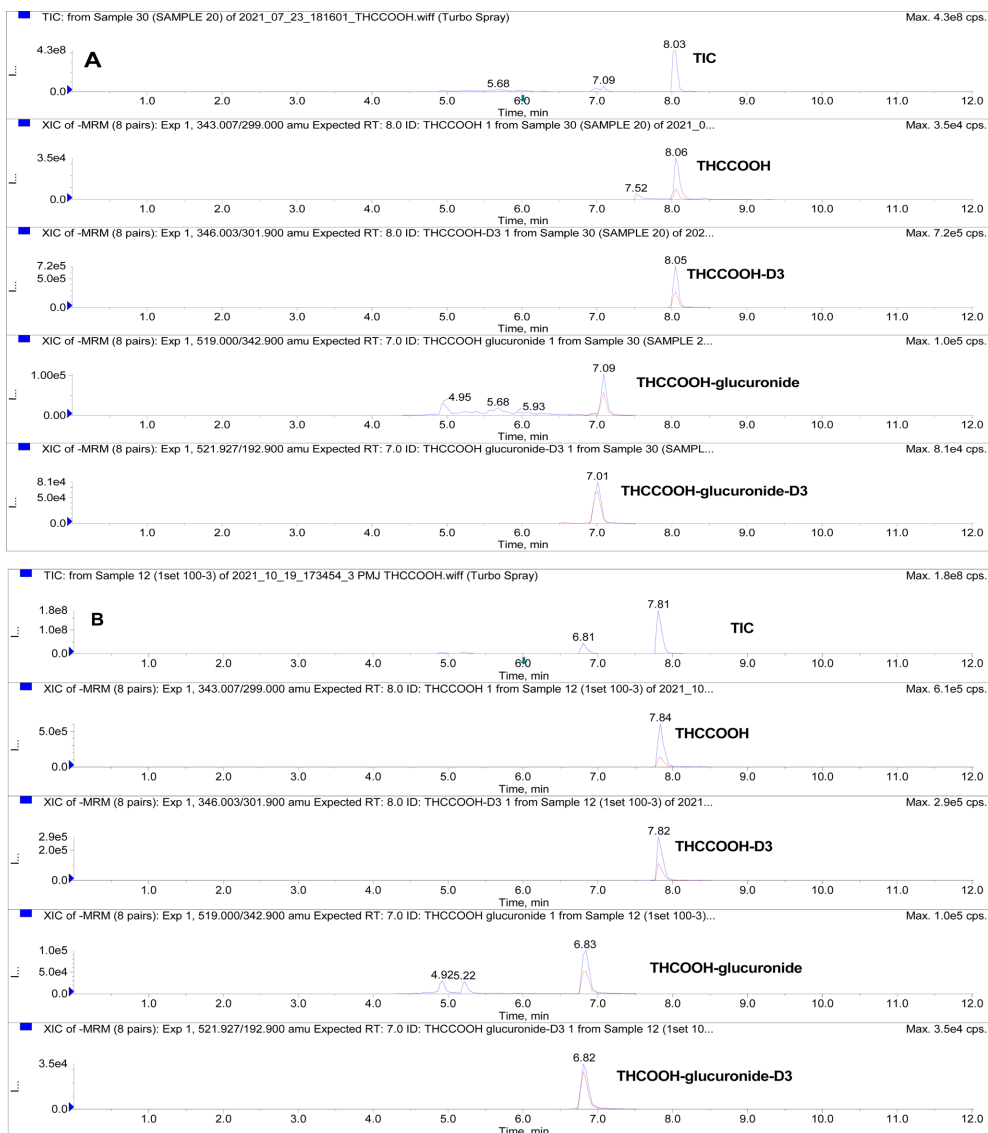


Fig. 2. Representative chromatograms of THCCOOH, THCCOOH-glucuronide, THCCOOH-D₃ and THCCOOH-glucuronide-D₃ in authentic urine samples (A), fortified standards (B) and blank urine samples (C).

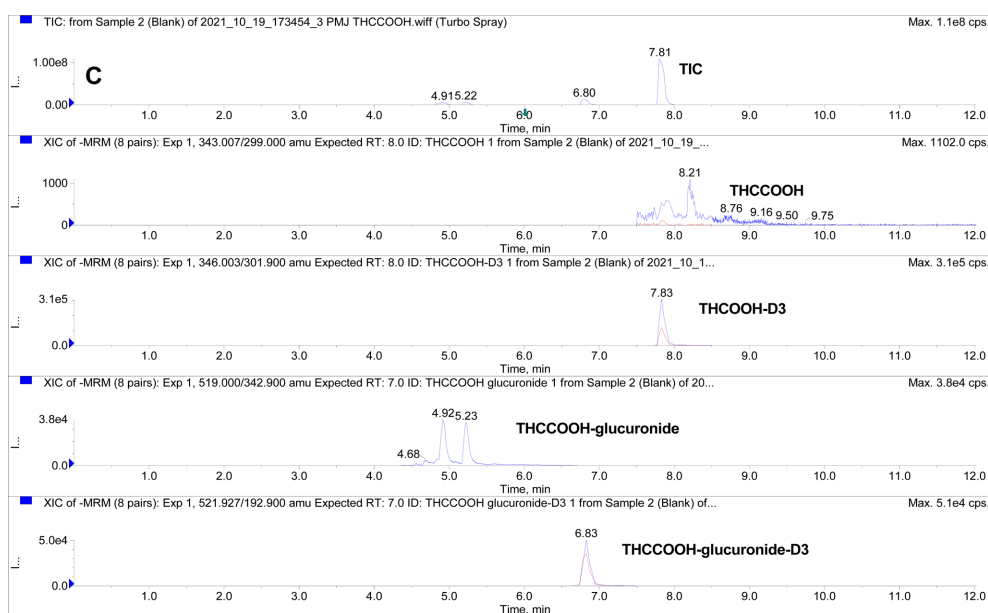


Fig. 2. continued

Table 2. LOD, LOQ and linearity, precision and accuracy for THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine samples

| Analyte | LOD | LOQ | Calibration curve | | | Conc. (ng/mL) | Intra-assay | | Inter-assay | |
|---------------------|-----|-----|-------------------|-----------|-----------------------------|---------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | | | Slope | Intercept | Correlation coefficient (r) | | Precision (CV, %) | Accuracy (bias, %) | Precision (CV, %) | Accuracy (bias, %) |
| THCCOOH | 0.3 | 2.5 | 0.0156 | 0.0270 | 0.9999 | 10 | 8.94 | -3.74 | 2.43 | 7.23 |
| | | | | | | 50 | 6.18 | 7.58 | 9.77 | 4.79 |
| | | | | | | 100 | 12.18 | 1.95 | 2.16 | 0.40 |
| THCCOOH-glucuronide | 0.2 | 2.5 | 0.0263 | 0.0043 | 0.9998 | 10 | 2.89 | 2.79 | 3.78 | -3.82 |
| | | | | | | 50 | 2.68 | 2.11 | 4.98 | -2.37 |
| | | | | | | 100 | 2.50 | -2.92 | 3.50 | -0.78 |

Table 3. Matrix effect, recovery, process efficiency, stability at room temperature, 4 and -20 °C for THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine samples

| | Conc (ng/mL) | Matrix effect | | Recovery | | Process efficiency | | Room temp. (24 h) | 4 °C (72 h) | 3 freeze-thaw cycles (-20 °C) |
|------------------------------------|--------------|---------------|--------|----------|--------|--------------------|--------|-------------------|-------------|-------------------------------|
| | | Mean (%) | CV (%) | Mean (%) | CV (%) | Mean (%) | CV (%) | (%, N=5) | (%, N=5) | (%, N=5) |
| THCCOOH | 10 | 109.0 | 7.3 | 81.6 | 6.9 | 88.9 | 7.3 | -13.30 | -10.72 | -9.26 |
| | 100 | 92.5 | 1.2 | 88.4 | 1.6 | 81.7 | 2.7 | -12.45 | -11.76 | -11.67 |
| THCCOOH-glucuronide | 10 | 98.5 | 7.6 | 96.4 | 6.3 | 94.7 | 5.9 | -12.40 | -10.73 | -6.30 |
| | 100 | 81.8 | 4.4 | 106.1 | 8.4 | 86.6 | 4.5 | -7.13 | -8.56 | -10.81 |
| THCCOOH-D ₃ | 50 | 90.9 | 8.6 | 81.7 | 14.6 | 73.6 | 8.5 | | | |
| THCCOOH-glucuronide-D ₃ | 50 | 91.3 | 8.6 | 99.1 | 7.2 | 90.3 | 7.9 | | | |

선 작성 결과 소변에서 두 성분의 correlation coefficient (r)는 모두 0.999이상이었고, 기울기의 평균은 각각 0.0156 및 0.0263이었으며, y절편은 각각 0.027 및 0.0043이었다(Table 2). Intra-assay 및 inter-assay의 정밀도 및 정확도는 Table 2에 나타내었으며, CVs (%) 및 bias (%)는 모두 15 % 미만이었다. 분석 방법의 매질 효과, 회수율 및 시험 과정 효율성은 Table 3에 나타내었으며, 모든 값이 15 % 미만으로 만족한 결과를 나타내었다. 실험에 사용한 희석 배수인 2배 및 5배에 대하여 dilution integrity를 검토한 결과 THCCOOH의 경우 2배 희석과 5배 희석시 각각 -4.32 % 및 -1.73 %이었으며, THCCOOH-glucuronide의 경우 각각 -0.56 % 및 2.20 %로 희석에 의한 영향이 크지 않음을 알 수 있었다. 안정성 시험에 대한 결과는 Table 3에 나타내었으며, 3가지 조건에서 감소가 나타났으나, 모두 -15 % 이하로 큰 변화가 없음을 알 수 있었다.

본 분석방법을 실제 대마 양성 시료에 적용하여 적합성을 검토하고, 정량값을 비교하였다. 즉, 당 연구소에 접수되어 면역분석법 및 GC/MS법에서 대마 양성으로 확인된 소변 시료 28 종에 대하여 본 시험법을 적용하였다. 그 결과 모든 시료에서 THCCOOH 및 THCCOOH-glucuronide가 검출되었으며, 두 성분의 농도는 Table 4에 나타내었다. THCCOOH의 농도는 정량한계 미만~266.90 ng/mL까지 이었으며, THCCOOH-

glucuronide는 6.43~2133.03 ng/mL이었다. 모든 시료에서 포합체 형태인 THCCOOH-glucuronide가 THCCOOH보다 많은 비율로 검출되었으며, THCCOOH-glucuronide/THCCOOH의 비율이 5 이하가 16건, 6~10이 3건, 11 이상은 3건으로, 대부분의 시료에서 포합체의 농도가 유리 형태 보다 5배 이하이었다(Fig. 3). GC/MS법으로는 유리 형태의 THCCOOH를 정량하였고 결과는 Table 4에 나타내었다. THCCOOH의 농도는 13.39~2652.37 ng/mL 범위로 검출되었고, LC-MS/MS 방법에 의한 정량값과 비교하였을 때, 유사한 결과를 나타내었다. 대마의 주된 성분인 THC는 지용성이 커 간에서 수용성으로 변화되어 배설되는 데, 카르복시기가 부착된 후 다시 글루쿠론산 포합체의 형태로 변화되

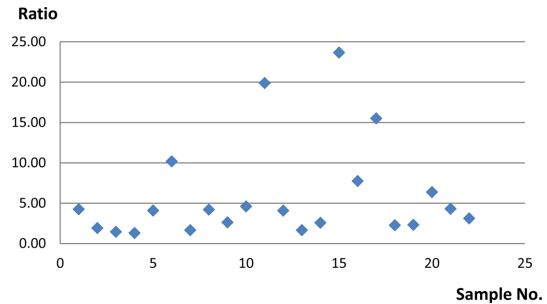


Fig. 3. Distribution of ratio of THCCOOH-glucuronide/THCCOOH in 22 urine samples.

Table 4. Concentration of THCCOOH, THCCOOH-glucuronide and ratio of THCCOOH-glucuronide/THCCOOH in authentic urine samples

| Sample No. | LC-MS/MS conc.(ng/mL) | | Ratio | GC/MS conc. (ng/mL) | Sample No. | LC-MS/MS Conc. (ng/mL) | | Ratio | GC/MS conc. (ng/mL) |
|------------|-----------------------|---------------------|-------|---------------------|------------|------------------------|---------------------|-------|---------------------|
| | THCCOOH | THCCOOH-glucuronide | | | | THCCOOH | THCCOOH-glucuronide | | |
| 1 | 3.99 | 16.98 | 4.26 | 31.93 | 16 | 2.50 | 6.43 | 2.58 | 16.34 |
| 2 | 14.42 | 27.73 | 1.92 | 36.12 | 17 | 15.16 | 358.72 | 23.66 | 411.36 |
| 3 | 10.81 | 15.79 | 1.46 | 59.11 | 18 | 6.53 | 50.66 | 7.75 | 65.01 |
| 4 | 168.51 | 220.20 | 1.31 | 390.35 | 19 | < LOQ | 38.52 | - | 66.85 |
| 5 | 20.94 | 85.69 | 4.09 | 187.87 | 20 | < LOQ | 9.95 | - | 19.87 |
| 6 | 9.79 | 99.68 | 10.19 | 134.28 | 21 | 3.59 | 55.65 | 15.52 | 97.57 |
| 7 | 226.90 | 444.64 | 1.67 | 515.40 | 22 | 165.72 | 376.06 | 2.27 | 669.81 |
| 8 | 42.70 | 179.60 | 4.21 | 466.31 | 23 | 70.91 | 165.15 | 2.33 | 228.36 |
| 9 | < LOQ | 10.32 | - | 30.25 | 24 | 5.00 | 31.87 | 6.38 | 31.38 |
| 10 | 5.46 | 14.33 | 2.62 | 26.19 | 25 | 5.05 | 21.77 | 4.31 | 31.75 |
| 11 | 71.68 | 329.64 | 4.60 | 374.31 | 26 | < LOQ | 27.05 | - | 28.11 |
| 12 | 107.22 | 2133.03 | 19.89 | 2652.37 | 27 | < LOQ | 10.81 | - | 29.24 |
| 13 | 117.70 | 480.48 | 4.08 | 582.03 | 28 | 42.86 | 133.78 | 3.12 | 442.21 |
| 14 | 54.49 | 90.42 | 1.66 | 221.14 | | | | | |
| 15 | < LOQ | 7.67 | - | 13.39 | | | | | |

어 배설되며, 소변에서는 대부분이 이러한 포합체의 형태로 존재한다고 알려져 있는 데, 본 실험결과에서도 동일한 결과가 나타남을 알 수 있었다. 실제 법과학 분야에서 대마 성분의 감정에서는 면역시험법을 실시하여 일정 농도 이상인 경우에만 정밀시험으로 질량분석법을 시행하여 목적성분에 대한 확인시험을 실시하며, 소변에서의 정량시험은 실시하지 않는다.

4. 결 론

대마 (Cannabis)의 사용 여부를 감정하기 위해서는 THC의 주요 체내 대사체인 THCCOOH을 소변에서 분석해야 한다. 소변 중 대마 성분의 분석은 면역분석법 및 질량분석법으로 확인 시험을 실시하는 것이 일반적이다. 본 연구에서는 기존에 실시하던 가수분해 및 유도체화를 거친 고비용의 복잡하고 장시간이 소요되는 GC/MS방법을 개량하여, THCCOOH 및 그 glucuronide 포합체를 LC-MS/MS로 동시 분석하는 방법을 개발하였으며, 이를 실제 시료에 적용하여 적합성을 검토하였다. 본 시험법을 실제 법과학 분야에 적용함으로써 대마 사용 판정의 신속한 통보가 가능하여 우리나라 과학수사 분야에 기여할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 행정안전부 주관 국립과학수사연구원 중장기과학수사감정기법연구개발(R&D)사업의 지원을 받아 수행한 연구(NFS2020-2021DNT01)임.

References

1. H. S. Chung, 'Drug testing in biological fluids', Shinilbooks, Seoul, 2000.
2. 'Narcotics Monthly Trends', Supreme Prosecutor's Office, 2020.
3. R. S. Goodwin, W. D. Darwin, C. N. Chiang, M. Shih, S. H. Li and M. A. Huestis, *J. Anal. Toxicol.*, **32**(8), 562-569 (2008).
4. F. Musshoff and B. Madea, *Ther. Drug Monit.*, **28**, 155-163 (2006).
5. C. Baselt and R. H. Cravey, 'Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man', 11th ed., Chemical toxicology institute, Forster city, California, 2017.
6. M. E. Wall, B. M. Sadler, D. Brine, H. Taylor and M. Perez-Reyes, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **34**, 352-363 (1983).
7. U. Mareck, N. Haenelt, H. Geyer, S. Guddat, M. Kamber, R. Brenneisen, M. Thevis and W. Schänzer, *Drug Test. Anal.*, **1**, 505-510 (2009).
8. 'Recommended Methods for the Detection and assay of Heroin, Cannabinoids, cocaine, Amphetamine, Methamphetamine and Ring-substitute amphetamine derivatives in Biological Specimens: Manual for use by National Laboratories', United Nations Office on Drugs and Crime(UNODC), Vienna, 1995.
9. 'Urine Testing for Drugs of Abuse', National Institute on Drug Abuse(NIDA) Research Monograph 73, Baltimore, 1980.
10. T. T. Abraham, R. H. Lowe, S. O. Pimay, W. D. Darwin and M. A. Huestis, *J. Anal. Toxicol.*, **31**(8), 477-485 (2007).
11. 'The fitness for purpose of analytical methods-A laboratory guide to method validation and related topics', EURACHEM, Oly(UK), 1998.
12. F. T. Peter, O. H. Drummer and F. Musshoff, *Forensic Sci. Int.*, **165**, 216-224 (2007).
13. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer and C. M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.*, **75**, 3019-3030 (2003).
14. S. D. Ferrara, L. Tedeschi and G. Frison, *J. Anal. Toxicol.*, **18**, 278-291 (1994).
15. Z. J. Nelson, S. J. Stellpflug and K. M. Engebrestsen, *J. Pharm. Pract.*, **29**(5), 516-526 (2016).
16. O. Boldis, G. Kocsis, A. Gachalyi and J. Furesz, *J. Chromatogr. Sci.*, **41**(4), 190-194 (2003).
17. W. H. Abd-Elsalam, M. A. Asherbiny, J. Y. Kung, D. W. Pate and R. Lobenberg, *Talanta*, **204**, 846-967 (2019).
18. M. J. Rumpler, *J. Chromatogr. B.*, **957**, 77-83 (2014).
19. M. J. Park, J. H. Kim, Y. R. Park, S. H. In, E. M. Kim and Y. H. Park, *J. Chromatogr. B.*, **947-948**, 179-185 (2014).
20. M. H. Jang, I. C. Shin, W. K. Yang, H. J. Chang, H. Y. Yoo, J. S. Lee and E. M. Kim, *Forensic Sci. Int.*, **244**, 85-91 (2014).

Author's Position

- Meejung Park : Chief of Forensic toxicology & chemistry,
Governmental researcher
Sineun Kim : Governmental researcher