

Determination of methamphetamine, 4-hydroxymethamphetamine, amphetamine and 4-hydroxyamphetamine in urine using dilute-and-shoot liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Bo-Reum Heo, NamHee Kwon, and Jin Young Kim[★]

Forensic Genetics & Chemistry Division, Supreme Prosecutors' Office, Seoul 06590, Korea

(Received July 3, 2018; Revised July 23, 2018; Accepted July 25, 2018)

시료 희석 주입 LC-MS/MS를 이용한 소변 중 메스암페타민, 4-하이드록시메스암페타민, 암페타민 및 4-하이드록시암페타민 동시 분석

허보름 · 권남희 · 김진영[★]

대검찰청 과학수사부 디엔에이·화학분석과

(2018. 7. 3. 접수, 2018. 7. 23. 수정, 2018. 7. 25. 승인)

Abstract The epidemic of disorders associated with synthetic stimulants, such as methamphetamine (MA) and amphetamine (AP), is a health, social, legal, and financial problem. Owing to the high potential of their abuse and addiction, reliable analytical methods are required to detect and identify MA, AP, and their metabolites in biological samples. Thus, a dilute-and-shoot liquid chromatography-tandem mass spectrophotometry (LC-MS/MS) was developed for simultaneous determination of MA, 4-hydroxymethamphetamine (4HMA), AP, and 4-hydroxyamphetamine (4HA) in urine. Urine sample (100 μ L) was mixed with 50 μ L of mobile phase consisting of 0.4 % formic acid and methanol and 50 μ L of working internal-standard solution. Aliquots of 8 μ L diluted urine was injected into the LC-MS/MS system. For all analytes, chromatographic separation was performed using a C18 reversed-phase column with gradient elution and a total run time of 5 min. The identification and quantification were performed by multiple reaction monitoring (MRM). Linear least-squares regression was conducted to generate a calibration curve, with $1/x^2$ as the weighting factor. The linear ranges were 2.0-200, 1.0-800, and 10-2500 ng/mL for 4HA and 4HMA, AP, and MA, respectively. The inter- and intraday precisions were within 6.6 %, whereas the inter- and intraday accuracies ranged from -14.9 to 11.3 %. The low limits of quantification were 2.0 ng/mL (4HA and 4HMA), 1.0 ng/mL (AP), and 10 ng/mL (MA). The proposed method exhibited satisfactory selectivity, dilution integrity, matrix effect, and stability, which are required for validation. Moreover, the purification efficiency of high-speed centrifugation was clearly higher than 6-15 % for QC samples (n=5), which was higher than that of the membrane-filtration method. The applicability of

[★] Corresponding author

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

E-mail : paxus@spo.go.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.

the proposed method was tested by forensic analysis of urine samples from drug abusers.

요약: 메스암페타민(methamphetamine, MA)과 암페타민(amphetamine, AP)은 전세계적으로 널리 퍼진 합성 흥분제로 보건 및 사회 문제, 경제적 비용 발생 등의 다양한 문제를 일으킨다. 또한 이러한 마약은 중독 및 남용 가능성이 매우 높기 때문에 확산 방지를 위한 방안의 하나로 복용자의 생체시료에서 이들 마약을 검출하기 위한 분석법 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 액체크로마토그래피-질량분석법(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)를 이용하여 소변에서 MA와 4-하이드록시 메스암페타민(4-hydroxymethamphetamine, 4HMA), AP, 4-하이드록시암페타민(4-hydroxyamphetamine, 4HA)을 동시에 분석할 수 있는 분석법을 개발하였고 유효성 평가를 수행하였다. 전처리 시간 단축을 위해 50000 g에서 3 min 동안 초고속원심분리 후 시료 희석 주입법을 이용하여 LC-MS/MS에 주입하였다. 분리관은 역상 C18 컬럼을 사용하였고, 정량분석을 위해 MRM (multiple reaction monitoring) 모드를 적용하였다. 가중계수 $1/x^2$ 에서 정량 범위는 MA는 10-2500 ng/mL, AP는 1.0-800 ng/mL, 4HA와 4HMA는 2.0-200 ng/mL로 설정하였고, 검량선의 직선성은 결정계수(r^2)를 구하여 평가하였다. 초고속원심분리법의 효율성을 확인하기 위해 전처리 과정으로 시린지 필터(membrane-filtration)를 적용한 결과와 비교하였고, 그 결과 분석물질에 따라 6-15 % 성능이 우수한 것으로 나타났다. 일내(intra-day)와 일간(inter-day) 정밀도는 6.6 % 미만이었으며, 정확도는 -14.9-11.3 % 였다. 최저정량한계(LLOQ)는 2.0 ng/mL (4HA 및 4HMA), 1.0 ng/mL (AP), 10 ng/mL (MA)로 확인되었다. 선택성, 검출한계, 회색무결성, 기질효과, 효율성, 안정성을 평가한 결과 만족스러운 측정값을 얻었다. 또한 개발된 분석법을 마약 복용자의 소변에 적용하여 분석법의 유용성을 확인하였다.

Key words: methamphetamine, 4-hydroxymethamphetamine, amphetamine, 4-hydroxyamphetamine, urine, high-speed centrifugation, LC-MS/MS

1. 서 론

메스암페타민(methamphetamine, MA)은 중독성이 높은 마약성 흥분제로 환각작용을 유발한다.¹ World Drug Report (2016)에 따르면 MA를 포함한 암페타민계 흥분제의 사용이 전세계적으로 증가하고 있으며, 다른 마약에 비해 값이 싸고 구매하기 쉬워 헤로인과 코카인을 대체하는 물질로 빠르게 자리 잡고 있다.² 대검찰청 마약류 범죄백서에 따르면 MA는 한국에서 가장 많이 남용되는 마약이다.³ MA는 여러 경로를 통해 대사되는 것으로 알려져 있다. 주요 대사과정은 변형없이 MA로 배설되거나 4-하이드록시메스암페타민(4-hydroxymethamphetamine, 4HMA)과 암페타민(amphetamine, AP)으로 배설되기도 한다.⁴⁻⁵ AP는 4-하이드록시암페타민 (4-hydroxyamphetamine, 4HA), 벤조산, 1-페닐프로판-2-온 (1-phenylpropan-2-one), 노르에페드린 (norephedrine), 4-하이드록시노르에페드린 (4-hydroxynorephedrine)으로 대사과정을 거치며, 이 중 4HA가 교감신경 흥분작용을 일으키는 것으로 알려져 있다.⁶⁻⁷ MA, 4HMA, AP 및 4HA에 대한 대사과정 및 화학구조를 Fig. 1에 나타내었다.

AP는 그 자체가 활성 대사체로 중독성이 높은 물질이지만, 주의력결핍과잉행동장애(ADHD)나 기면증, 우울증 등 다양한 질병의 치료제로 사용된다.⁸⁻¹⁰ 최근 학생들이 잠재적 인지능력을 높이기 위해 ADHD 치료제인 AP뿐 아니라 메틸페니데이트(methylphenidate)를 불법적으로 남용하는 경우가 국내외에서 빈번하게 발생하고 있다.¹¹⁻¹⁵ 이러한 물질의 무분별한 유통 및 남용에 의한 중독 가능성을 배제할 수 없어 대부분의 나라에서 의료용 목적으로만 허용하고 있으며, 그 사용을 엄격하게 규제하고 있다.

마약 복용여부를 신속히 확인하기 위해 소변 시료에서 MA와 AP에 대한 다양한 예비감정 및 확인감정 분석법이 개발되었다. MA와 AP의 복용여부 확인을 위해서는 우선 면역화학분석법을 이용하여 예비감정을 수행한 후 기체크로마토그래피-질량분석기(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS)로 확인감정을 거친다.¹⁶⁻¹⁷ 1차 면역화학분석법은 두 화합물 사이의 유사한 분자 구조 또는 대사과정을 거친 화합물을 모두 감지한다. 이러한 이유로 면역학적 검사만으로는 소변에서 AP를 복용하였는지, MA를 복용하였는지를 구분할 수 없어 추가적인 확인감정을

진행해야 한다.¹⁸ GC-MS는 마약류 분석에 가장 널리 사용되는 분석기기이다. 하지만 최근 마약감정에 사용되는 분석기기의 경향이 변화함에 따라 액체크로마토그래피-탄탈질량분석기 (LC-MS/MS),^{19,20} 액체크로마토그래피-고분해능 질량분석기 (LC-HRMS), 액체크로마토그래피에 연결된 비행시간 질량분석기(TOF-MS) 나 Orbitrap MS²¹⁻²² 등이 GC-MS²³⁻²⁴의 역할을 대신하고 있다. LC-MS/MS는 GC-MS 보다 생체시료에서 상대적으로 높은 극성을 띤 물질의 분석에 유용하며, 유도체화 과정을 거치지 않고 분석이 가능하므로 상대적으로 시료 전처리 시간이 짧다는 장점이 있다.²⁵

본 연구에서는 초고속원심분리법과 시료 희석 주입법을 이용하여 MA, 4HMA, AP 및 4HA를 LC-MS/MS로 동시 분석하여 신속·정확한 결과를 얻고자 하였다. 시료 전처리 방법의 효율성 확인을 위해 본 연구에 적용된 초고속원심분리법과 일반적으로 사용되는 시린지 여과(filtration) 방법을 적용하여 기질의 영향이 얼마나 제거되었는가를 비교하였다. 또한 개발된 LC-MS/MS 분석법의 유효성을 평가하였고, 실제 복용자 12명의 소변 시료를 분석하여 그 활용 가능성을 확인하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

표준물질 MA와 AP 및 내부표준물질 AP-d₈과 MA-d₁₁ 모두 Cerilliant사 (Austin, TX, USA)에서 구입하였다. 4HA hydrobromide는 USP사 (Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 4HMA는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Fig. 1에 분석대상물질의 대사 경로 및 화학적 구조를 나타내었다. 이동상에 첨가된 formic acid (LC-MS LiChropur grade)는 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다. 이동상으로 쓰인 HPLC 등

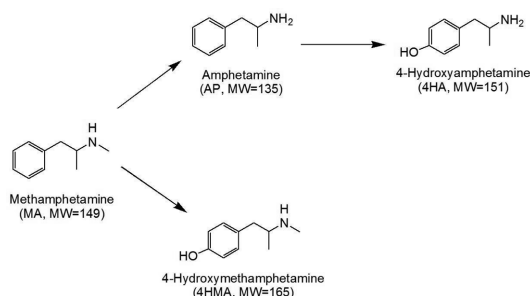


Fig. 1. Metabolic pathway and chemical structures of the analytes.

급의 메탄올(methanol)과 아세토니트릴(acetonitrile)은 J.T. Baker/Avantor사(Center Valley, PA, USA)에서 구입하였고, 증류수(LiChrosolv grade)는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 이외의 시약은 ACS 등급에 해당하는 시약을 사용하였고, polypropylene microcentrifuge tube (1.5 mL)는 Eppendorf사 (Hamburg, Germany)에서 구입하였다.

표준물질 4HMA, AP 및 4HA는 최종 10 µg/mL 농도로, MA는 최종 50 µg/mL 농도로 메탄올에 희석하여 혼합하였다. 내부표준물질 AP-d₈과 MA-d₁₁은 메탄올로 0.1 µg/mL와 0.4 µg/mL의 농도로 희석하여 혼합하였다. 제조된 표준물질 용액은 사용 전까지 -20 °C에서 보관하였다.

2.2. 소변 시료

바탕시료는 약물을 복용하지 않은 사람의 소변을 사용하였으며, 검량선 작성 및 QC 시료 제조 시 사용하였다. 검량선 작성을 위해 바탕시료에 AP는 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 800 ng/mL가 되도록 제조하였고, 4HA와 4HMA는 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 ng/mL의 농도로 제조하였으며, MA는 10, 25, 50, 125, 250, 500, 1000, 2500 ng/mL로 제조하였다. QC 시료 제조를 위해 바탕시료에 AP는 3, 30, 300 ng/mL, 4HA와 4HMA는 6, 30, 300 ng/mL, MA는 30, 150, 1500 ng/mL가 되도록 제조하였다.

실제 복용자의 소변 시료는 수도권지역 지방검찰청에서 의뢰한 12명의 소변을 사용하였다. 시료는 20일 동안 4 °C 조건에서 보관하였고, 재분석이 필요한 소변 시료의 경우 별도로 분류하여 사용 전까지 -20 °C에서 보관 하였다.

2.3. 분석기기

본 연구에 사용한 액체크로마토그래프는 진공탈기장치(vacuum degasser), 이차 펌프(binary pump), 자동 시료주입기 및 컬럼오븐으로 구성된 Nanospace NASCA HPLC(Shiseido Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 컬럼은 Hypersil Gold C18 column (150 × 2.1 mm I.d., 5 µm, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 이동상 A는 0.4 % formic acid가 포함된 증류수를 사용하였고, 이동상 B 용매로는 메탄올을 사용하였다. 이동상의 유속은 400 µL/min으로 이동상 B는 10 %로 설정하여 1 min 동안 흘려준 뒤에 3.5 min이 될 때 까지 20 %로 증가시킨 후, 8 min이 되었을 때 90 %가 되도록 설정하였고, 이후 0.2 min 동안 용

매를 흘려주었다. 컬럼을 안정화하기 위해 이동상 B를 10 %로 설정하여 2 min 동안 흘려주었다.

액체크로마토그래프에 연결된 질량분석기는 전자분무이온화 (Electrospray ionization, ESI) 장치가 장착된 Sciex QTrap 6500 triple-quadrupole mass spectrometer (AB SCIEX, Foster city, CA, USA)를 사용하였다. 전자분무이온화 장치는 양이온 방식으로, nebulizing gas 55, curtain gas 60, turbo ion spray heater gas 80으로 설정하였다. Turbo-gas의 온도는 600 °C, 이온화 전압은 5000 V로 설정하였다. 질량분석을 위해 MRM (multiple reaction monitoring) 방법을 사용하였고, 모이온(precursor ion)의 조각화(fragmentation)를 위한 충돌기체(collision gas)로 질소 가스를 사용하였다.

2.4. 전처리 방법

소변 시료 100 μ L를 1.5 mL polypropylene tube에 넣고, 이동상 50 μ L와 AP-d₈과 MA-d₁₁이 포함된 내부표준물질 50 μ L를 첨가하여 혼합하였다. Sigma 3-30K 원심분리기(Sigma Group Inc., Munich, Germany)를 이용하여 50000 g에서 3 min 동안 초고속원심분리한 후, 상층액 8 μ L를 LC-MS/MS에 주입하였다.

2.5. 분석법 유효성 확인

분석법의 유효성은 선택성, 검출한계(limit of detection, LOD), 최저정량한계(lower limit of quantification, LLOQ), 직선성(linearity), 정확도(accuracy) 및 정밀도(precision), 희석무결성(dilution integrity), 기질효과(matrix effect), 효율성(process efficiency, PE), 안정성(stability)의 항목을 평가하였다.²⁶⁻²⁷

선택성은 서로 다른 소변시료를 분석하여 분석물질 및 내부표준물질의 머무름 시간(retention time)에서 방해물질에 의한 영향이 있는지 여부를 크로마토그램상의 피크를 확인하여 비교 평가하였다.

검출한계는 동일 농도의 시료 6 개를 분석한 결과값의 시그널(signal, S)과 6 개의 바탕시료로부터 얻은 노이즈(noise, N)의 표준편차를 이용하여 S/N 비가 3 이상인 농도를 검출한계, 정량한계는 10 이상으로 검량선에서 정밀도(% CV, coefficient of variance)가 20 % 미만, 정확도(% bias)는 ± 20 % 이내인 가장 낮은 농도로 결정하였다.

검량선의 정량 범위는 MA는 10-2500 ng/mL, AP는 1.0-800 ng/mL, 4HA와 4HMA는 2.0-200 ng/mL로 작성된 검량선의 직선성은 결정계수(r^2)를 구하여 평가하였고, 이때 적용된 가중계수는 $1/x^2$ 이었다.

동일한 분석물질에 대한 재현성 (repeatability) 확인을 위해 일내 (intra-day), 일간 (inter-day) 정밀도 및 정확도를 측정하였다. 균질화된 시료로부터 취한 여러 개의 등분체(aliquots)로 반복 분석하였을 때 측정값의 근접성을 의미하는 정밀도와 실제값과 측정값 사이의 차이를 나타내는 분석법의 정확도는 3가지 농도(저, 중, 고)의 QC 시료를 제조하여 각 농도별 6회 반복 측정하였다. 이때 측정된 평균값의 정확도는 실측값의 15 % (bias) 이내로 하였고, 정밀도는 변동계수가 15 %를 넘지 않도록 하였다.

희석무결성은 최고정량한계(upper limit of quantification)의 3 배에 해당하는 농도로 제조한 소변시료를 준비한 후, 바탕시료를 첨가하여 순차적으로 5, 10, 20 농도로 희석하였다. 희석된 시료는 6 개의 등분체로 나누어 제조하였으며 전처리 과정을 거쳐 분석하였다.

기질효과 측정을 위하여 Harvard Syringe Pump (Harvard Apparatus)를 사용하여 5 ng/min으로 분석물질 및 내부표준물질을 분리관 후단에 주입하는 post-column infusion 방법을 적용하였고, 전처리 과정을 거친 바탕시료를 LC-MS/MS에 주입하여 확인하였다.

효율성(%)은 Matuszewski 등에 따라 A와 B 세트 모두 여섯 개의 등분체로 시료를 제조한 후 분석하였다.²⁸ 세트 A는 이동상에 분석물질과 내부표준물질을 첨가하여 제조하였고, 세트 B는 바탕시료에 분석물질과 내부표준물질을 첨가하여 제조하였다. 2세트의 등분체를 분석하여 얻은 피크 면적의 비를 구하여 효율성(PE=B/A $\times$ 100)을 평가하였다.

소변 내 분석물질의 안정성 측정을 위해 AP는 3, 30, 300 ng/mL, 4HA와 4HMA는 6, 30, 300 ng/mL, MA는 30, 150, 1500 ng/mL의 농도로 QC 시료(n=5)를 제조한 뒤 반복 측정하였다. 단기 안정성(short-term stability)은 시료를 전처리하고 분석하는 조건에 해당하는 12시간과 24시간 동안 상온에 노출되는 경우를 평가하였고, 장기 안정성(long-term stability)은 시료 보관 조건에 해당하는 10일에서 20일 동안에 4 °C 냉장보관 뒤 시료를 상호 비교하였다. 액체크로마토그래프의 자동시료주입기 안정성(autosampler stability)은 시료가 든 바이알(vial)을 15 °C에서 12시간동안 보관한 후 다시 주입하여 분석한 결과를 비교하여 평가하였다. 농도별 QC 시료들을 각각 5 개씩 분석하여 처음 분석하였던 농도별 QC 시료들과 비교분석하여 계산하였다. 소변 내 분석물질의 안정성은 정확도는 85-115 % 이내, 정밀도는 15 %를 넘지 않는 경우 안

정성이 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시료 전처리 과정

본 연구에서는 LC-MS/MS 분석 시 시료 전처리 과정을 단순화하고 시간을 단축할 수 있는 방법으로 시료 희석 주입법을 도입하였다. 이러한 시료 희석 주입법은 시료 중 분석물질의 손실 방지에 유용하다. 또한 시료 기질에 의한 방해물질의 간섭현상을 효과적으로 배제하기 위해 전처리 과정에 초고속원심분리법을 적용하였다.

초고속원심분리법의 효율성 평가를 위해 AP, 4HA, 4HMA의 농도가 30 ng/mL, MA의 농도가 150 ng/mL가 되도록 QC 시료를 5 개의 등분체로 제조하여 분석하였다. 본 연구의 전처리 방법에 의한 분석물질의 크로마토그램 피크 면적과 LC-MS/MS 분석에 일반적으로 사용되는 시린지 필터 후 시료 희석 주입법을 적용한 분석물질의 크로마토그램 피크 면적을 비교하여 상대적인 효율성(%)을 평가하였다. 본 연구의 전처리 방법을 적용하였을 때 효율성은 AP는 9%, 4HA와 4HMA는 6%, MA는 15% 향상되었다(Fig. 2). 이러한 결과로부터 시료의 기질에 의한 방해물질의 간섭현상을 최소화하는데 초고속원심분리법이 효과적임을 알 수 있었다.

3.2. HPLC 조건의 최적화

피크의 머무름 시간(retention time)과 모양(shape)을 최적화하기 위해 ammonium formate, ammonium acetate, formic acid, acetic acid의 농도를 달리하여 이동상 A 용매로 제조하였고, 메탄올과 아세트오니트릴을 이동상

B 용매로 선정하였다. 이동상 A와 B를 조합하여 사용한 결과 MA, 4HMA, AP 및 4HA 분석에 가장 효과적인 조합은 0.4% formic acid가 포함된 증류수(A)와 메탄올(B)이었다.

증류수-아세트오니트릴로 구성된 이동상 조합은 MA의 MRM 크로마토그램의 강도(intensity)를 증가시키는 것으로 확인되었다. 증류수-메탄올의 이동상 조합은 증류수-아세트오니트릴 조합보다 기질에 의한 방해물질의 간섭요소를 최소화시키는 것에 효과적인 것으로 나타났다. ammonium formate, ammonium acetate, formic acid 및 acetic acid 등의 첨가물질의 농도를 달리한 결과, 분석물질의 머무름 시간 이동, 피크 사이의 분리능 변화, 검출 강도의 차이를 확인할 수 있었다. 이동상 조합을 총 22가지로 달리하여 확인한 결과, 0.4% formic acid가 포함된 증류수와 메탄올 조합이 기질에 의한 방해물질의 간섭요소를 최소화하면서 피크의 검출 강도가 높게 나타났으며, 대부분의 분석물질에 대한 크로마토그램 상의 피크 분리능이 탁월하여 이동상으로써 가장 적합한 것으로 확인되었다. 다만, 이동상 A에 formic acid 또는 acetic acid를 첨가한 경우 보다 ammonium formate 또는 ammonium acetate를 이동상에 첨가하였을 때 분석물질의 머무름 시간을 뒤로 밀려 분석시간이 증가하였다.

3.3. MS/MS 분석

MS/MS 변수는 분석물질이 최대 감도를 나타낼 수 있도록 최적화하였다. 분석물질의 머무름 시간을 특정하고 특징적인 MRM 이온쌍(MRM ion pair)을 선정하여 분석에 사용하였다. MA, 4HMA, AP 및 4HA에 대한 대표적인 LC-MS/MS 크로마토그램은 Fig. 3에 나타내었다. 정량분석에 사용된 분석물질에 대한 질량분석기의 변수 조건은 Table 1에 표시하였다.

3.4. 분석법 유효성 확인

시료 희석 주입 LC-MS/MS 분석법의 유효성 확인을 위해 선택성, LOD 및 LLOQ, 직선성, 정확도 및 정밀도, 희석무결성, 기질효과, 효율성, 안정성을 확인하였다. 선택성 확인을 위해 약물을 복용하지 않은 10명의 소변시료를 분석한 결과, MA, HMA, AP 및 HAP 분석에 영향을 미치는 방해 성분은 없었다.

분석물질에 대한 가중계수 $1/x^2$ 에서 검량선의 결정계수(r^2)는 0.99 이상으로 정량범위 내에서 직선성을 나타내었다. 검출한계와 최저 정량한계는 0.3-3.0 ng/mL 및 1.0-10 ng/mL의 범위로 확인되었다(Table 2).

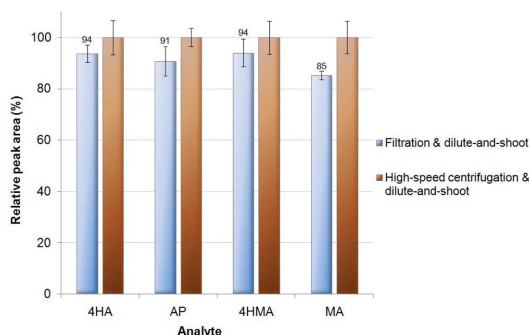


Fig. 2. Assessment of the contribution of high-speed centrifugation in urine sample preparation.

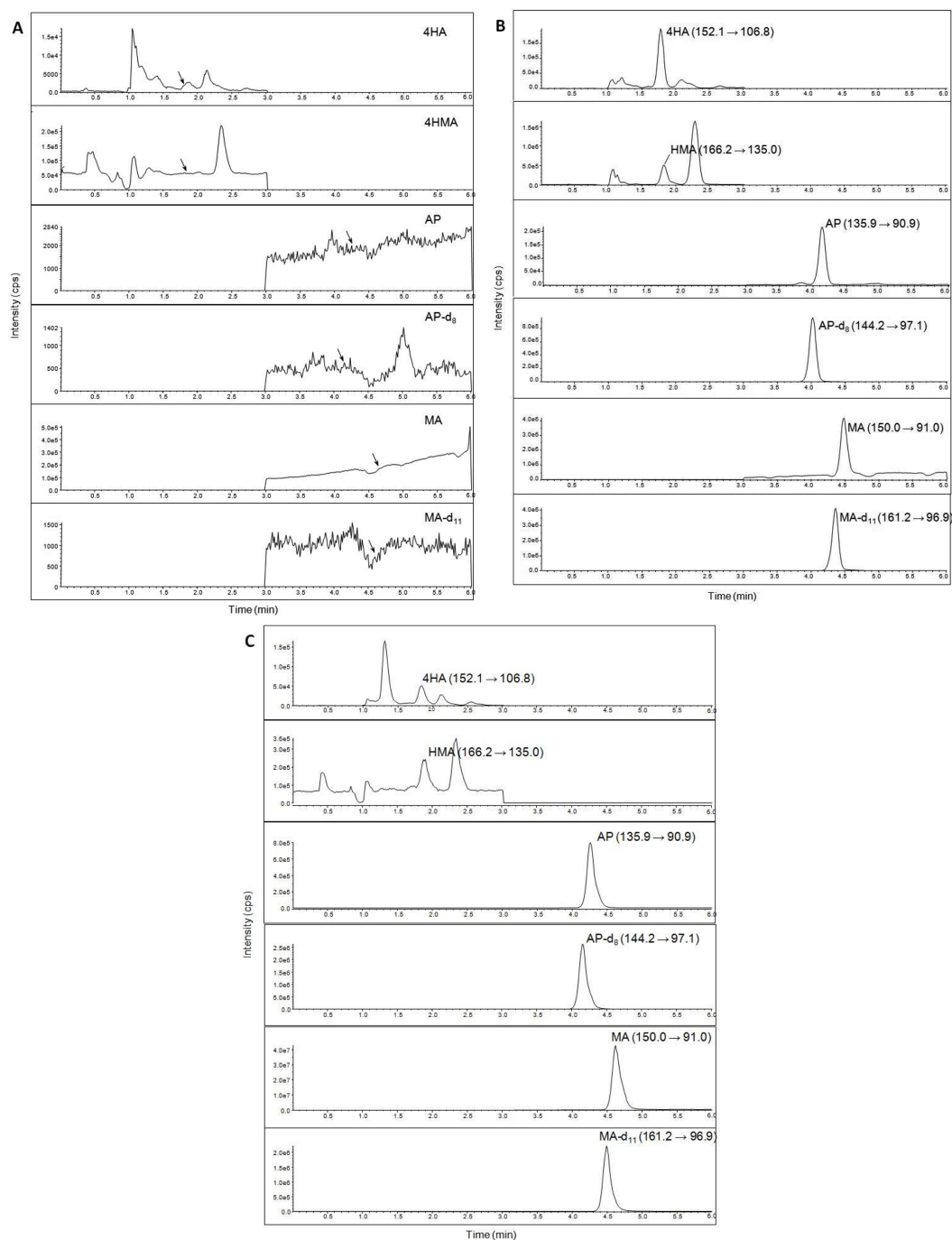


Fig. 3. Representative MRM chromatograms of (a) blank urine, (b) spiked urine containing 30 ng/mL of 4HA, AP, and 4HMA and 150 ng/mL of MA, and (c) drug positive urine samples. The arrows indicate the expected retention time.

Table 3에 분석법의 정밀도 및 정확도 측정 결과를 나타내었다. 정밀도는 일내 4.4%, 일간 6.6% 이내로

측정되었고, 정확도는 일내 -14.9-11.3%, 일간 -13.1-11.3%로 측정되었다. 정확도 및 정밀도 모두 15% 이

Table 1. Retention times, MRM transitions and compound dependent parameters for LC-ESI-MS/MS analysis of the analytes and internal standards

Compound	Retention time (min)	Precursor ion	Product ion	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
4HA	1.84	152	135	16	10	11	8
		152	107	16	10	23	16
4HMA	1.87	166	135	36	10	15	8
		166	107	36	10	27	6
AP-d ₈	4.17	144	97	23	10	21	16
AP	4.28	136	91	26	10	23	14
		136	119	26	10	11	8
MA	4.64	150	91	31	10	23	14
		150	119	31	10	15	8
MA-d ₁₁	4.52	161	97	31	10	25	12

DP: declustering potential

EP: entrance potential

CE: collision energy

CXP: collision cell exit potential

Product ion underlined was used for quantification

Table 2. Method calibration

Compound	Concentration range (ng/mL)	Weighting factor	Slope	y-Intercept	Linearity (r ²)	LOD (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)
4HA	2-500	1/x ²	0.0028±0.0024	0.0053±0.0044	0.99	0.6	2
4HMA	2-500	1/x ²	0.0083±0.0068	-0.0116±0.0100	0.99	0.4	2
AP	1-800	1/x ²	0.0037±0.0035	-0.0008±0.0017	1.00	0.2	1
MA	10-2500	1/x ²	0.0085±0.0007	-0.0346±0.0106	0.99	3.0	10

Linearity is described by the correlation coefficient for the calibration curve.

Limit of detection (LOD) was based on the concentration corresponding to a signal plus 3 standard deviations above from the mean of ten replicates of blank urine.

Lower limit of quantification (LLOQ) was defined as the lowest concentration on the calibration curve with precision (% CV) less than 20 % and accuracy (% bias) within ±20 %.

내의 편차와 -15 %-15 %를 넘지 않는 변동계수 값을 갖는 양호한 결과를 얻었다.

회석무결성 실험을 통해 최고정량한계를 4HA, AP, 4HMA는 1500 ng/mL, MA는 7500 ng/mL까지 확장할 수 있었다. 최고정량한계를 3배 넘어서는 시료를 5, 10, 20 배 희석하여 측정된 정밀도(% CV)는 1.4-3.6 %, 정확도(% bias)는 -3.8-8.3 %로 나타났다.

기질효과(matrix-effect) 측정을 위해 post-column infusion 방법으로 주입된 분석물질의 시그널을 모니터링한 결과, 각각의 분석물질의 머무름 시간에서의 MRM 크로마토그램 상 피크의 상승 또는 감소(ion suppression or enhancement)가 나타나지 않았다. 분석물질에 대한 분석법의 효율성 평가 결과는 4HA는

79.9-89.7 %, AP는 89.6-100.1 %, 4HMA는 85.1-89.6 %, MA는 82.9-90.8 %로 나타났다(Table 4).

소변 내 분석물질의 안정성을 측정한 결과, 단기 안정성은 24시간 동안 상온에서 보관했을 때 변화의 정도는 8.5 % 미만이었으며, 장기 안정성은 20일간 4 °C 조건에서 시료를 보관하였을 때 12.7 % 미만이었다. 액체크로마토그래프의 자동시료주입기 안정성은 5 % 이내로 측정되었다. 이러한 결과로부터 일상적인 실험실 환경에서 시료 안정성이 있는 것으로 판단하였다.

3.5. 소변시료 중 분석 대상물질의 농도

면역화학분석기 Cobas C311 (Roche, Hitachi)와 Amphetamine II (Roche, Hitachi) 시약으로 분석한 결

Table 3. Intra- and inter-day precision and accuracy

Compound	Nominal concentration (ng/mL)	Intra-day (n=6)		Inter-day (n=30)	
		Precision (% CV)	Accuracy (% bias)	Precision (% CV)	Accuracy (% bias)
4HA	6	3.3	-3.3	4.9	3.9
	30	2.2	0.0	6.0	4.8
	300	2.7	-5.7	4.7	-0.2
4HMA	6	2.2	-13.9	2.2	-13.1
	30	1.6	7.1	3.1	11.1
	300	2.2	-14.9	6.6	-8.6
AP	3	4.4	-4.1	3.2	1.5
	30	1.0	-4.5	5.3	2.3
	300	1.5	-5.4	4.2	0.8
MA	30	4.1	11.3	4.7	11.3
	150	0.7	5.2	3.3	10.9
	1500	1.2	-14.6	6.2	-8.2

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

Calculated as [(mean calculated concentration – nominal concentration)/nominal concentration] × 100.

Table 4. Process efficiency (% mean, n=5)

Concentrations (ng/mL)	Compound			
	4HA	AP	4HMA	MA
3	-	89.6	-	-
6	79.9	-	89.6	-
30	76.6	92.7	85.1	90.8
150	85.1	96.6	86.8	84.2
1500	-	-	-	88.6

Table 5. Analytes concentration in forensic urine samples (ng/mL)

Sample No.	4HA	AP	4HMA	MA
1	-	60.2	48.8	82.5
2	-	473.0	9.5	1954.5
3	39.2	3448.6	503.4	27281.2
4	3.5	682.2	59.6	1018.4
5	21.4	900.7	67.0	2103.0
6	12.3	325.2	169.2	1523.8
7	15.8	1214.3	490.2	12857.7
8	7.8	672.1	32.8	966.0
9	3.1	160.8	25.7	408.9
10	52.0	494.6	994.9	7236.0
11	2.0	110.1	5.7	208.5
12	10.0	502.7	-	-

과 1차 예비감정결과 양성인 소변 시료 12건을 본 연구를 통해 개발된 분석법의 유용성 확인을 위한 분석

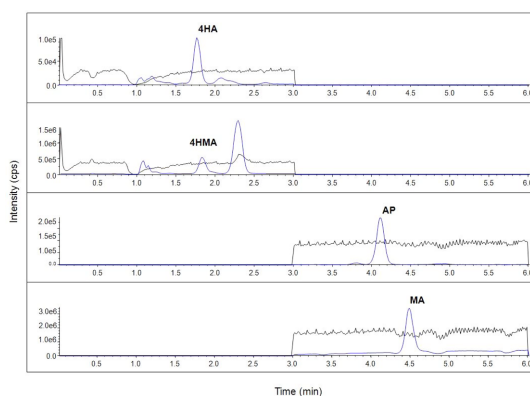


Fig. 4. Matrix effect of urine sample on mass spectrometry signals during post-column infusion of 30 ng/min of 4HA, AP, 4HMA, and MA and subsequent injection of diluted urine sample.

시료로 사용하였다. 메스암페타민 복용자의 소변시료 분석결과를 LC-MS/MS 크로마토그램으로 Fig. 3C에 나타내었다. 소변시료에서 모약물(parent drug)과 체내 대사과정을 거쳐 체외 소변으로 배출되는 대사체(metabolite) 모두를 검출하는 경우 약물 복용의 증거가 된다. 소변 중 MA, 4HMA, AP 및 4HA에 대한 측정 농도를 Table 5에 정리하였다. 상대적으로 소변 중 MA 농도가 낮은 1, 2번 시료의 경우 4HA를 확인할 수 없었다. 반면 고농도의 MA를 포함하고 있는 소변 시료의 경우 4HA를 포함하여 4종의 분석물질 모두

를 확인할 수 있었다. 12번 시료의 측정 결과 AP와 AP의 대사체인 4HA의 2종만이 검출되었고, 이는 AP 복용의 증거로 볼 수 있다. 본 연구에서 개발된 분석법은 소변 중 4HA, AP, 4HMA, MA 동시 분석에 적합하였으며, 정성 및 정량분석 결과를 통해 MA, AP 중 어느 약물을 복용했는가에 대한 구분이 가능할 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 전처리 과정이 간단하면서도 정량적 신뢰성을 확보한 소변 중 MA, 4HMA, AP 및 4HA에 대한 LC-MS/MS 분석법을 개발하였고 그 유효성을 확인하였다. 추가적인 정제과정 없이 50000 g에서 3 min 동안 초고속원심분리를 진행하여 기질의 방해 물질에 의한 background noise를 효과적으로 제거할 수 있었다. 전처리 과정에 시료 희석 주입법을 적용함으로써 시료의 손실을 최소화하고 처리 시간을 줄일 수 있었다. 본 연구를 통해 개발된 분석법을 실제 복용자 12 명의 소변 시료에 적용했을 때 방해물질의 간섭 없이 신속히 MA, 4HMA, AP, 4HA에 대한 정량 분석을 수행할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 대검찰청의 시험연구비(과제번호 SPO-TR-2017-01) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. R. A. Glennon, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **64**, 251-256 (1999).
2. United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 2017, Vienna, United Nations, 2017.
3. Supreme Prosecutors' Office, White Paper on Drug-Related Crimes 2016, Seoul, Korea, 2017.
4. J. Caldwell, L. G. Dring, and R. T. Williams, *Biochem. J.*, **129**, 11-22 (1972).
5. T. R. Gray, T. Kelly, L. L. LaGasse, L. M. Smith, C. Derauf, W. Haning, P. Grant, R. Shah, A. Arria, A. Strauss, B. M. Lester, and M. A. Huestis, *Ther. Drug Monit.*, **31**, 70-75 (2008).
6. L. G. Dring, R. L. Smith, and R. T. Williams, *Biochem. J.*, **116**, 425-435 (1970).
7. A. K. Cho and J. Wright, *Life Sci.*, **22**, 363-372 (1978).
8. R. D. Stevenson and M. L. Wolraich, *Pediatr. Clin. North Am.*, **36**, 1183-1197 (1989).
9. J. D. Parkes and G. W. Fenton, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **36**, 1076-1081 (1973).
10. K. Orr and D. Taylor, *CNS Drugs*, **21**, 239-257 (2007).
11. C. M. Hartung, W. H. Canu, C. S. Cleveland, E. K. Lefler, M. J. Mignogna, D. A. Fedele, C. J. Correia, T. R. Leffingwell, and J. D. Clapp, *Psychol. Addict. Behav.*, **27**, 832-840 (2013).
12. J. Mazanov, M. Dunn, J. Connor, and M.-L. Fielding, *Performance Enhancement & Health*, **2**, 110-118 (2013).
13. A. D. DeSantis, E. M. Webb, and S. M. Noar, *J. Am. Coll. Health*, **57**, 315-324 (2008).
14. M. R. Meyer and H. H. Maurer, *Pharmacogenomics*, **12**, 215-233 (2011).
15. W. Kwon, S. I. Suh, M. K. In, and J. Y. Kim, *Mass Spectrom. Lett.*, **5**, 104-109 (2014).
16. K. Lachenmeier, F. Musshoff, and B. Madea, *Forensic Sci. Int.*, **159**, 189-199 (2006).
17. M. A. von Mach, C. Weber, M. R. Meyer, L. S. Weilemann, H. H. Maurer, and F. T. Peters, *Ther. Drug Monit.*, **29**, 27-39 (2007).
18. L. Broussard, Chap. 20 Interpretation of amphetamines screening and confirmation testing, in: A. Dasgupta (Ed), *Handbook of Drug Monitoring Methods - Therapeutics and Drugs of Abuse*, p379, Humana Press, New Jersey, 2008.
19. M. Chèze, M. Deveau, C. Martin, M. Lhermitte, and G. Pépin, *Forensic Sci. Int.*, **170**, 100-104 (2007).
20. A. D. De Jager and N. L. Bailey, *J. Chromatogr. B*, **879**, 2642-2652 (2011).
21. I. L. Tsai, T. I. Weng, Y. J. Tseng, H. K. L. Tan, H. J. Sun, and C. H. Kuo, *J. Anal. Toxicol.*, **37**, 642-651 (2013).
22. X. Li, B. Shen, Z. Jiang, Y. Huang, and X. Zhuo, *J. Chromatogr. A*, **1302**, 95-104 (2013).
23. K. Hara, S. Kashimura, Y. Hieda, and M. Kageura, *J. Anal. Toxicol.*, **21**, 54-58 (1997).
24. W. A. Wan Raihana, S. H. Gan, and S. C. Tan, *J. Chromatogr. B*, **879**, 8-16 (2011).
25. Y. Iwasaki, T. Sawada, K. Hatayama, A. Ohayagi, Y. Tsukuda, K. Namekawa, R. Ito, K. Saito, and H. Nakazawa, *Metabolites*, **2**, 496-515 (2012).

26. F. T. Peters, O. H. Drummer, and F. Musshoff, *Forensic Sci. Int.*, **165**, 216-224 (2007).
27. U.S. Department of Health Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation in U.S., Beltsville, MD, 2001.
28. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.*, **75**, 3019-3030 (2003).