

## GC/MS를 이용한 소변 중 대마 대사체 분석의 측정불확도 평가

김진영<sup>#</sup> · 정재철 · 서승일 · 서용준 · 이정직\* · 김종상\* · 인문교

대검찰청 마약감식실, \*한국건설자재시험연구원 품질경영부

(Received October 6, 2008; Revised December 2, 2008)

### Uncertainty Evaluation of the Analysis of 11-Nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in Human Urine by GC/MS

Jin Young Kim<sup>#</sup>, Jae Chul Jeong, Sungll Suh, Yong Jun Suh, Jeong Jik Lee\*, Jong Sang Kim\* and Moon Kyo In

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

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

**Abstract** — We described an estimation of measurement uncertainty in quantitative analysis of 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), the major metabolite of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, in urine sample by solid-phase extraction (SPE) and GC/MS detection. The analytical results were compared and the different contributions to the uncertainty were evaluated. Inter-day and inter-person validation were performed using statistical analysis of several indicative factors. Measurement uncertainty associated with target analyte in real forensic samples was estimated using quality control (QC) data. Traceability of measurement was established through traceable standards, calibrated volumetric glassware and volume measuring device. The major factors of contribution to combined standard uncertainty, were calibration linearity, inter-day repeatability and inter-person reproducibility, while those associated with preparation of analytical standards and sampling volume were not so important considering the degree of contribution. Relative combined standard uncertainties associated with the described method was 12.05% for THCCOOH.

**Keywords** □ uncertainty of measurement, urinalysis, GC/MS, 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol

대마(*Cannabis sativa* L.)는 메스암페타민(methamphetamine) 다음으로 국내에서 가장 많이 남용되는 마약류이다.<sup>1)</sup> 흔히 대마의 환각효과 때문에 하이(high), 해피스모크(happy smoke)로 불리기도 하고, 젊은이들 사이에서는 풀, 떨 등으로 불린다. 대마는 영어로 헵(hemp)이지만 말아 피우면 마리화나(marijuana)가 된다. 꽃에서 나오는 수지를 추출해 가루로 만든 것은 해시시(hashishi)이다. 우리나라에서는 1960년대 중반 주한미군 등을 통해 알려져 1970년대 초 젊은 층에 크게 확산되다가 1975년 강력한 단속으로 급속히 감소하였다. 2000년에는 기존 대마관리가 폐기되고 마약류 관리에 관한 법률'로 관련 법조항이 통합되면서 관리와 처벌수위가 한층 강화되었다.

대마에는 420종 이상의 화합물이 존재하는데, 이들 화합물 내에는 최소 60여 종의 칸나비노이드(cannabinoid)가 있다. 칸나비

노이드 성분 중  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol(THC)이 환각작용과 관련이 있는 주요 활성성분이며, 체내 대사과정을 거쳐 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol(THCCOOH)로 대사된다(Fig. 1).<sup>2-4)</sup> 현재 THCCOOH는 소변 검사에서 대마 흡연 여부를 판정하는 기준 물질로 활용되고 있다.<sup>5)</sup> 일반적으로 소변 중 THCCOOH는 대마 흡연 후 4~8시간부터 최대 4주 정도까지 확인이 가능한 것으로 알려져 있다.<sup>6,7)</sup>

소변 내에서 대마 대사체 성분을 분석하여 얻은 결과를 근거로 흡연여부를 판정하는 소변 감정은 분석결과에 대한 신뢰도가 매우 중요하다. 지금까지 소변 감정의 개별 시료에서 대마 성분 대한 분석결과 불확도를 정량적으로 표현하지 못했다. 다만 분석법을 개발할 때 실시하는 분석방법에 대한 검증(method validation) 과정과 실제 시료와 함께 분석하는 품질관리(QC) 시료의 정밀도(precision)와 정확도(accuracy)로 분석결과 신뢰도를 나타내었다. 그러나 이러한 표현 방법은 분석법을 구성하는 요소인 시료량 측정, 시험자간 불확도, 용액제조 시 희석에 의한 오차, 검량선 작성에 따른 오차 등 개별 인자들의 오차 크기를

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-535-4173 (팩스) 02-535-4175  
(E-mail) paxus@spo.go.kr

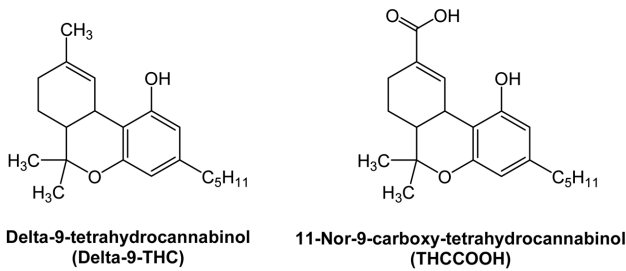


Fig. 1 – Chemical structures of delta-9-tetrahydrocannabinol and its metabolite(11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol).

비교 가능한 수치로 표시하고 이를 근거로 분석법을 개선하는데 유용하지 못하였다.

따라서 본 연구는 측정불확도(uncertainty of measurement) 개념<sup>8)</sup>을 정량이 필요한 법과학 분야에 도입하여 분석결과 신뢰도를 보다 정확하고 객관적으로 표현하고자 하는데 목적이 있다. 본 연구에서는 대마 흡연여부 확인을 위한 소변 감정에 대한 불확도를 추정하고 평가하였다. 우선 소변 중 대마 대사체를 분석하는 과정에서 결과에 영향을 줄 수 있는 요인들을 찾아내어, 관계식(measurand)을 설정하고, 요인별 측정값으로부터 표준불확도(standard uncertainty), 합성표준불확도(combined standard uncertainty) 및 확장불확도(expanded uncertainty)를 구하였다. 이러한 분석결과에 대한 측정불확도 표시는 약 95%의 신뢰도에서 측정값의 존재 범위로 표기하였다.<sup>9)</sup> 그리고 불확도 요인들에 대한 측정불확도 평가 결과를 시험법 개선 및 오차요인의 영향을 감소시키는데 활용하였다.

### 실험 방법

#### 시약

표준물질 THCCOOH은 1 ml 용량의 유리병(vial)에 0.1 mg/ml 농도로, 내부표준물질 THCCOOH-d<sub>3</sub>은 1 ml 용량의 유리병에 10 µg/ml 농도로 제조된 제품을 미국 Cerilliant사에서 구입하였다. 추출과정에 사용된 용매 및 시약은 특급이며 미국 J. T. Baker사에서 구입하였다. 유도체 시약인 N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide/1% trimethylchlorosilane(BSTFA/1% TMCS)는 미국 Alltech사로부터 구입하였다. 고체상 추출에 사용된 카트리지로 Oasis MCX(60 mg, 3 ml)는 미국 Waters사에서 구입하였다. 보관표준용액은 각각의 표준물질을 methanol에 녹여 순차적으로 10, 1, 0.1 µg/ml 농도로 희석시켜 조제하였으며, 사용하기 전까지 -20°C에서 냉동 보관하였다.

#### 기기 및 분석 조건

희석된 표준용액을 조제하기 위해 독일 Brand사의 용량 플라스크(10 ml)와 독일 Eppendorf사의 피펫(1000 µl)을 사용하였으

며, 시험에 사용될 소변 시료의 양을 측정하기 위해 독일 Eppendorf사의 피펫(1000 µl)을 사용하였다. 전처리 과정은 자동화 장비인 미국 캘리포사의 Rapid Trace SPE workstation을 사용하여 고체상 추출(solid-phase extraction, SPE)을 수행하였다.

분석에 사용된 장비는 미국 Agilent Technologies사 6890 Gas Chromatograph(GC)에 5973 Mass Selective Detector가 연결된 GC/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 200°C에서 1분간 유지시킨 후, 30°C/min으로 290°C까지 온도를 올리고, 계속하여 상승 속도를 35°C/min으로 바꿔 300°C까지 온도를 상승시켜 2분간 유지시켰다. 주입구와 검출기 부위의 온도는 각각 250°C와 280°C로 설정하였다. 운반기체 헬륨의 유속은 0.7 ml/min으로 고정하였고, 주입방법은 비분할 방식(splitless mode)으로 purge-on time을 0.75분으로 설정하였다. 시료는 미국 Agilent Technologies사 7683 자동주입장치(autosampler)를 사용하여 분석 장비에 주입하였다.

#### 소변 시료

2008년 6월부터 7월까지 약 2개월 동안 수도권 소재 검찰청으로부터 감정 의뢰된 대마초 흡연 용의자의 소변을 연구용 시료로 사용하였다. 그리고 약물을 복용하지 않은 사람의 소변을 채취하여 대조 시료로 사용하였다. 연구용 및 대조 시료로 사용된 소변은 사용 전까지 -20°C에서 냉동 보관하였다.

#### 시료 전처리 과정

시험은 '소변 중 대마 성분 감식법'(SPO-DRUG-QA-04, 2006)에 규정된 방법에 따라 실시하였다.<sup>9)</sup>

소변 시료 3 ml를 1 ml씩 3회 분취하여 시험관(16×100 mm)에 넣은 후, 1 µg/ml 농도의 내부표준물질 45 µl를 첨가하였다. 10 M KOH 용액 200 µl를 넣고 교반기를 이용하여 상온에서 30 초간 혼합한 후, 아세트산을 첨가하여 pH 4로 조정하였다. 고체상 추출용 카트리지를 활성화하기 위해 메탄올 1 ml와 증류수 1 ml를 순서대로 2 ml/min의 속도로 각각 흘려주었다. 활성화된 카트리지에 시료를 2 ml/min의 속도로 흘려준 후, 증류수 2 ml와 hexan 4 ml를 순서대로 흘려주어 세척하였다. 시료내의 방해물질을 제거한 카트리지에 추출용매인 ethyl acetate 3 ml를 2 ml/min의 속도로 흘려주어 소변내의 THCCOOH 성분을 추출하였다. 용리액은 일정 압력(30 kPa)과 온도(45°C)로 질소기류 하에서 증발시킨 후, 건조된 잔사에 유도체 시약 BSTFA/1% TMCS 50 µl를 가하여 70°C에서 15분간 유도체 반응을 시켰다. 시료를 상온으로 냉각한 다음 그 중 1 µl를 GC/MS에 주입하여 분석하였다(Fig. 2).

#### 검량선 작성

정량 범위는 소변 중에 존재하는 농도를 고려하여 농도 범위

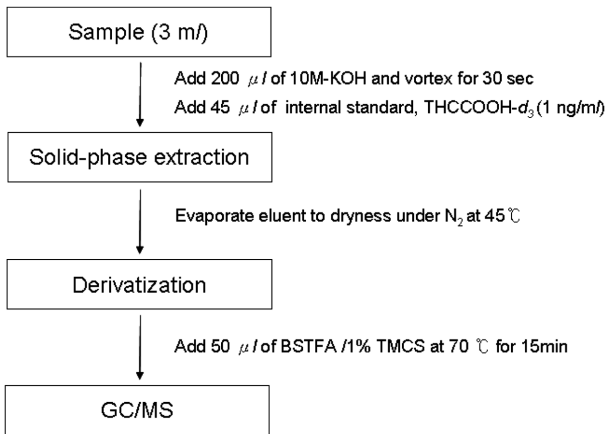


Fig. 2 – Preparation procedures of urine sample for the analysis of THCCOOH.

를 정하였으며, 3가지 농도의 THCCOOH 희석된 표준용액(10, 1, 0.1 μg/ml)을 대조 소변 시료에 첨가하여 검량선(calibration curve)을 작성하였다. 본 연구에서는 THCCOOH의 정량 농도 범위를 2.0~40 ng/ml로 정하여 표준용액을 첨가하여 4개의 농도의 검량점(calibration point)에 해당하는 시료를 제조하였다. 여기에 THCCOOH-d<sub>3</sub>을 메탄올에 녹여 1 μg/ml 농도로 제조한 내부표준용액 45 μl를 취하여 넣은 다음 시료와 동일한 방법으로 처리하여 분석하였다. 최종 전처리 단계를 거친 시료 중 1 μl를 GC/MS에 주입하여 분석하였으며, 그 결과로부터 검량선을 작성하였다.

**품질관리(QC) 시료의 정밀도**

대조 소변 시료 3 ml에 THCCOOH 표준용액을 첨가하여 소

변 중 대마 대사체의 농도를 5 ng/ml로 맞추고, 시료와 같은 방법으로 처리 분석한 후, 측정된 양을 비교하여 정밀도를 검토하였다. 일간(inter-day) 정밀도는 한명의 시험자가 4일간 반복하여 측정하였으며, 시험자간(inter-person) 정밀도는 세 명의 시험자가 반복하여 측정하였다.

**불확도 요인 및 측정량 관계식**

소변에서 THCCOOH의 분석 과정은 시료의 분취(urine sampling), 성분 추출과 정제 등이 포함된 전처리 및 GC/MS 장비를 이용한 기기분석 과정으로 구분된다.

소변에서 THCCOOH의 농도 측정에 관계되는 불확도 요소는 시료 분취과정에서 발생하는 불확도, 측정에 사용된 표준용액을 희석할 때 발생하는 불확도, 검량선을 이용하여 분석 결과의 측정값을 계산할 때 발생하는 불확도, 측정이 반복될 때 측정기기의 상태변화에 의해 생기는 불확도 그리고 서로 다른 시험자에 의해서 측정이 반복될 때 발생하는 불확도 등 5가지 요소로 나눌 수 있다.

따라서 소변에서 THCCOOH 분석 결과로부터 각각의 농도를 산출하는 불확도 요인을 고려한 관계식을 다음과 같이 설정하였다.

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

- C<sub>i</sub> : 소변에서 측정된 THCCOOH의 농도
- x<sub>i</sub> : y<sub>i</sub>-b/m, 작성된 검량선에서 농도 측정값
- f<sub>vol'</sub> : 채취된 소변의 부피 편차율
- f<sub>std</sub> : 희석된 표준용액의 농도 편차율
- f<sub>cal'</sub> : 검량곡선의 직선성에 의한 편차율

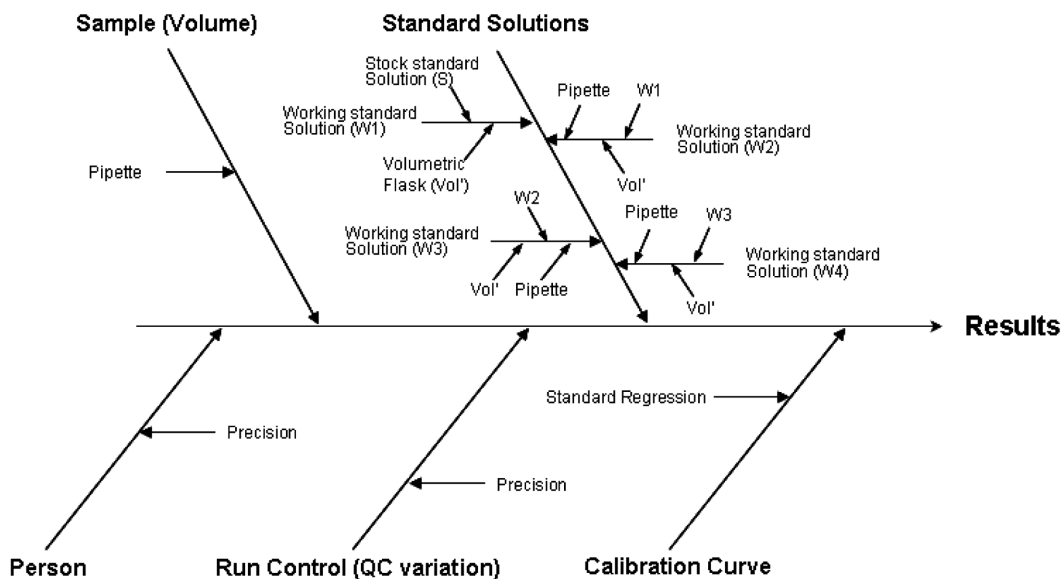


Fig. 3 – Uncertainty factors associated with measurement results.

$f_{\text{variation}}$  : QC 시료의 측정 편차율  
 $f_{\text{person}}$  : 시험자간 측정 편차율

THCCOOH의 농도를 산출하는 관계식 (1)에 포함된 불확도 요인들을 Fig. 3에 도식화하여 표시하였으며, 각각의 불확도 요소는 다음과 같다.

$f_{\text{vol}}$ 은 소변 중 THCCOOH의 양을 시료 부피로 나누어 농도로 표현할 때 발생하는 불확도 요소이다.  $f_{\text{cal}}$ 는 검량선을 이용하여 분석 결과로부터 측정값을 계산하는 과정에서 발생하는 불확도 요소이며,  $f_{\text{std}}$ 는 표준용액을 희석하면서 발생하는 희석오차에 대한 요소이다. 그리고  $f_{\text{variation}}$ 은 실제 대마 흡연자의 소변을 분석할 때 발생할 수 있는 요인(기질의 영향, 측정의 반복성 등)에 의한 불확도 요소이며,  $f_{\text{person}}$ 는 서로 다른 시험자가 반복하여 측정할 때 발생하는 요인(측정시스템, 재현성 등)에 의한 불확도 요소이다.  $f_{\text{variation}}$ 과  $f_{\text{person}}$ 는 품질관리(QC) 시료에 대한 정밀도로 반영하여 나타내었다.<sup>10,11)</sup>

본 연구는 대조 소변을 포함한 모든 시료에 동위원소로 치환된 내부표준물질을 첨가하는 내부표준법을 사용함으로써 분석과정 중 전처리단계에서 발생할 수 있는 불완전한 추출, 용매의 증발, 칼럼 통과시 손실되는 양과 시험자의 조작 손실 등은 보정되는 것으로 가정하였다.<sup>12)</sup>

### 결과 및 고찰

불확도 평가는 GUM(Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement)의 절차<sup>8)</sup>를 근거로 요인별 관계 모델(입력량과 출력량의 함수식 표현)의 설정, 불확도를 포함하고 있는 요인 파악, 입력량의 요소별 표준불확도 계산, 실제 시료에서 측정불확도의 계산 및 각각의 불확도 요소에 대한 평가와 불확도를 수치로 나타내는 4단계로 나눌 수 있다. 즉 측정모델에 포함된 개개 요인의 불확도 요소로부터 표준불확도를 산출하고, 모든 표준불확도를 합하여 합성표준불확도를 구한다. 그리고 합성표준불확도에 신뢰 수준에 상당하는 포함인자(coverage factor, k)를 곱하여 확장불확도를 계산하고, 그 결과로부터 불확도를 수치로 나타낸다.<sup>13)</sup>

#### 시료 부피 측정과정의 불확도 평가

분석 대상 성분의 측정 농도 값에는 시료 부피를 측정하는 과정에서 발생하는 피펫(pipette)의 불확도( $u_{\text{pipet}}$ ) 요인이 포함되어 있다.

피펫 자체의 불확도는 교정성적서 자료를 활용하였다. 교정성적서로부터 95%의 신뢰구간에서 불확도(k=2)가 0.006 mL였으며, 피펫의 표준불확도( $u_{\text{pipet}}$ )는 0.003 mL이었다. 따라서 측정량 1 mL에 대한 피펫의 상대표준불확도( $u_{r \text{ pipet}}$ )를 계산하면 0.003이었다.

1 mL 피펫을 사용하여 시료 3 mL의 부피를 측정할 때 발생하는 불확도는 1 mL씩 3회 측정된 부피의 불확도로부터 표준불확도를 계산하였다. 따라서 1 mL씩 3회 반복 측정에 의한 상대표준 불확도( $u_{r \text{ vol}}$ )는 식(2)에 적용한 결과, 0.001732 mL임을 알 수 있었다.

$$u_{r \text{ vol}} = \frac{u_{r \text{ pipet}}}{\sqrt{n}} = \frac{0.003}{\sqrt{3}} \quad (2)$$

(n : 1, 2, ..., i)

시료 부피 측정 과정의 유효자유도( $v_{\text{eff}}$ )는 요인별 표준편차의 자유도를 식(3)의 Welch-Satterthwaite equation에 적용하여 구한 결과 그 값은 무한대( $\infty$ )였다.

$$v_{\text{eff}} = \frac{u_c^4}{\sum \frac{u_i^4}{v_i}} \quad (3)$$

( $v_{\text{eff}}$ : the effective degrees of freedom,  $u_c$ : the combined standard uncertainty,  $u_i$ : the individual standard uncertainties,  $v_i$ : the degrees of freedom)

#### 표준용액 조제과정의 불확도 평가

표준용액은 필요에 따라 보관표준용액(stock standard solution, S)을 희석 제조하여 사용한다. 표준용액 조제과정의 불확도는 보관표준용액의 순도, 사용된 용량플라스크(volumetric flask) 및 피펫의 요인이 포함된다.

보관표준용액을 10배 희석한 1차 표준용액(1st working standard solution, W1)을 제조하는 과정의 불확도 산출을 위하여 먼저 보관표준용액의 표준불확도를 계산하였다.

보관용 표준물질의 인증서로부터 순도를 확인하여 표준불확도( $u_{\text{purity(S)}}$ ) 및 상대표준불확도( $u_{r \text{ purity(S)}}$ )를 계산하여 Table I에 정리하였다. 보관표준물질의 순도에 적용된 표준불확도는 직사각형 모양의 분포함수에 따르는 B형 불확도 평가 방법을 이용하여 계산하였고, 상대표준불확도는 표준불확도를 초기 농도로 나누어 구하였다.

표준용액 희석에 사용된 용량플라스크에 의한 불확도 발생 요소는 용량플라스크 자체의 불확도, 온도에 의한 불확도로 생각된다. 플라스크 자체의 불확도는 교정성적서로부터 95%의 신뢰구간에서 불확도(k=2)가 0.008 mL로 표준불확도( $u_{\text{cert}}$ )는 0.004 mL임을 알 수 있었다. 온도에 의한 표준불확도는 팽창계수가

Table I – Uncertainty of purity of THCCOOH

Analyte	Concentration range (mg/mL)	Standard uncertainty ( $u_{\text{purity(S)}}$ )	Relative standard uncertainty ( $u_{r \text{ purity(S)}}$ )
THCCOOH	0.0968±0.0008	0.000462	0.004771

**Table II** – Relative standard uncertainties of diluted standard solutions (working solutions) and standard preparation

Analyte	Conc' (mg/ml)	$u_r$ purity(S)	$u_r$ flask	$u_r$ pipet'	$u_r$ std(W1)	$u_r$ std(W2)	$u_r$ std(W3)	$u_r$ std
THCCOOH	0.1	0.00477149	0.00040007	-	0.00478823	-	-	-
	0.01	-	0.00040007	0.003	0.00478823	0.00566456	-	-
	0.001	-	0.00040007	0.003	-	0.00566456	0.00642240	-
	0.0001	-	0.00040007	0.003	-	-	0.00642240	-
	-	-	-	-	0.00478823	0.00566456	0.00642240	0.009811

0.00025 ml/°C이고 실험실내 온도 조건이  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 이므로 표준불확도( $u_{temp}$ )는 0.000722 ml임을 알 수 있었다.

불확도 전과 법칙에 따라 용량플라스크를 이용한 부피 측정에서의 합성표준불확도( $u_{flask}$ )는 0.004 ml이었고, 유효자유도( $v_{eff}$ )는 무한대로 계산되었다. 그리고 상대표준불확도( $u_r$  flask)는 식(4)에 적용하여 0.0004의 값을 구하였다.

$$u_{r\ flask} = \frac{u_{vol}}{V_1} \quad (4)$$

$$(u_{flask} = \sqrt{(u_{cert})^2 + (u_{temp})^2}, V_1 = 10\text{ ml})$$

1차 표준용액(W1)의 조제과정에서 발생하는 불확도에 영향을 미치는 인자는 보관표준물질의 순도와 용량플라스크에 의한 두 가지 인자로부터 식(5)에 적용하여 상대표준불확도( $u_r$  std(W1))를 산출하였고, 그 값을 Table II에 정리하였다.

$$u_{r\ std(W1)} = \sqrt{(u_{r\ purity(S)})^2 + (u_{r\ flask})^2} \quad (5)$$

2차 표준용액(W2)은 1차 표준용액을 다시 10배 희석하여 제조한다. W2 제조시 예상되는 불확도는 1차 표준용액의 불확도, 희석에 사용된 용량플라스크 인자, 피펫 작업에 의한 인자 세 가지를 식(6)에 적용하여 2차 표준용액의 상대표준불확도( $u_r$  std(W2))를 산출하였다. 동일한 방법으로 식(7)에 적용하여 3차 표준용액(W3)에 대한 상대표준불확도를 계산하여 결과를 Table II에 추가하였다.

$$u_{r\ std(W2)} = \sqrt{(u_{r\ pipet'})^2 + (u_{r\ flask})^2 + (u_{r\ std(W1)})^2} \quad (6)$$

$$u_{r\ std(W3)} = \sqrt{(u_{r\ pipet'})^2 + (u_{r\ flask})^2 + (u_{r\ std(W2)})^2} \quad (7)$$

표준용액 희석에 사용된 피펫에 의한 불확도 요소는 교정성적서로부터 95%의 신뢰구간에서 불확도( $k=2$ )가 0.006 ml이므로 표준불확도( $u_{pipet'}$ )는 0.003 ml가 됨을 알 수 있다.

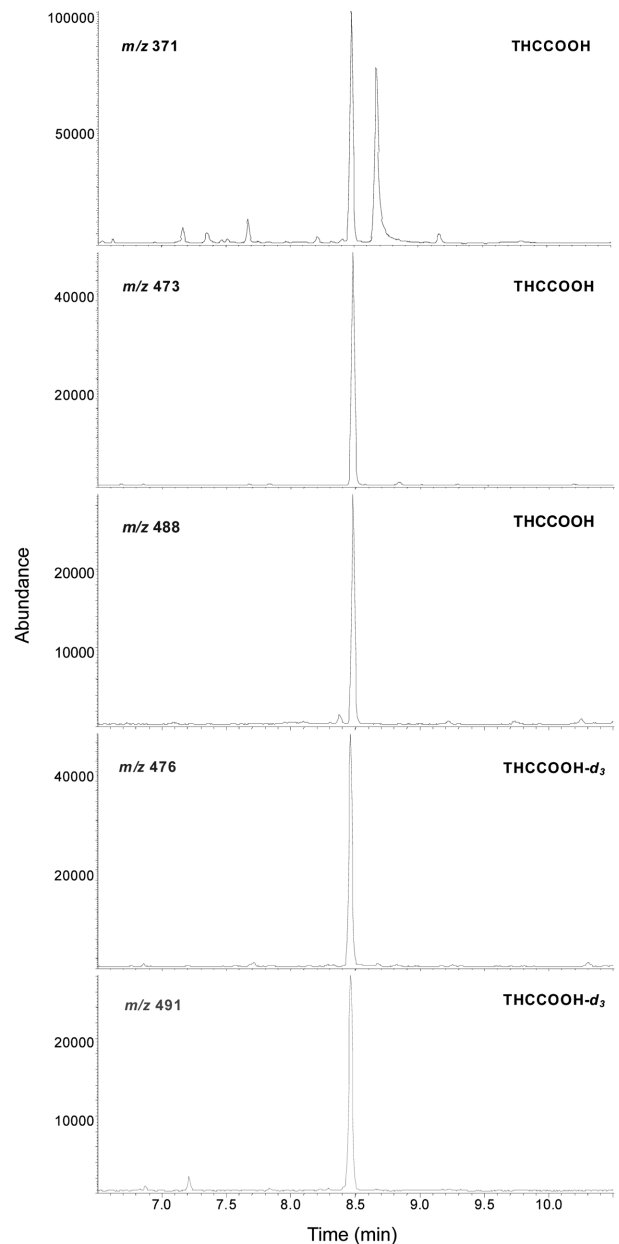
상대표준불확도( $u_r$  pipet')는 식(8)에 적용하여 계산한 결과 0.003임을 알 수 있었고, 유효자유도( $v_{eff}$ )는 무한대였다.

$$u_{r\ pipet'} = \frac{u_{pipet'}}{V_2} \quad (8)$$

$$(V_2 = 1\text{ ml})$$

표준용액 제조와 관련된 불확도는 불확도 전과의 법칙에 따라

표준용액 조제과정의 상대표준불확도를 식(9)을 적용하여 계산한 결과 0.009811이었으며 이 값을 Table II에 나타내었다.



**Fig. 4** – Representative SIM (selected ion monitoring) chromatogram obtained from spiked urine sample containing 15 ng/ml of THCCOOH.

$$u_{r\text{std}} = \sqrt{(u_{r\text{std}}(W_1))^2 + (u_{r\text{std}}(W_2))^2 + (u_{r\text{std}}(W_3))^2} \quad (9)$$

**QC 시료에 의한 불확도 평가**

측정시스템의 선형성, 기질의 영향(matrix effect), 측정의 반복성 및 재현성은 기기분석에 있어 항상 검토되어야 할 사항으로 본 측정에서는 내부표준법에 의한 QC 시료를 사용함에 따라 QC 시료의 정밀도(precision) 분석결과로부터 측정시스템의 제반 인자에 대한 불확도( $u_{\text{precision}}$ )를 산정할 수 있다.<sup>14)</sup> 본 실험에서는 5.0 ng/ml 농도의 QC 시료를 선택하여 불확도를 산출하였다. 한 명의 시험자가 일간(inter-day) 정밀도 측정을 위해 4일간 반복하여 측정하였으며 또한 서로 다른 세 명의 시험자 사이에서 측정이 반복적으로 이루어질 때 발생하는 측정시스템 및 재현성의 요소를 QC 시료에 대한 정밀도로 반영하였다. Fig. 4는 대마 대사체 성분과 내부표준물질을 포함한 QC 시료의 크로마토그램이다.

일원배치분산분석<sup>15)</sup>과 관련한 수학적 모델식은 식(10)과 같으며, inter-day 및 inter-person 에 대한 표준불확도는 식(11)와 같이 추정되어진다. 식(11)로부터 산출한 THCCOOH에 대한 일간

QC 시료의 측정 편차율과 시험자간 측정 편차율에 대한 표준불확도는 0.165032와 0.197161이었으며, 일간 QC 시료의 측정 편차율과 시험자간 측정 편차율에 대한 상대표준불확도( $u_{r\text{variation}}$ ,  $u_{r\text{person}}$ )는 각각 0.033과 0.039이었다(Table III, IV).

$$y = \mu + A_i + \epsilon_{ij} \quad (10)$$

( $\mu$ : expected value of random variable  $x$ ,  $A_i$ : error between the groups,  $\epsilon_{ij}$ : measurement error)

$$u_{\text{precision}} = s_A = \sqrt{\frac{M_{\text{between}} - M_{\text{within}}}{n_0}} \quad (11)$$

( $M_{\text{between}}$ : sum of squares between groups,  $M_{\text{within}}$ : sum of squares within groups,  $n_0$ : number of measurements)

**검량선에 의한 불확도 평가**

검량선의 비직선성은 측정결과 값의 주요한 불확도 요인이 된다. 일반적으로 다점교정(1차식)에 의한 검량선의 정도는 회귀분석을 실시하여 결정계수( $R^2$ )를 산출함으로써 평가할 수 있다. 이러한 검량선의 불확도 평가를 위한 수학적 관계 모델식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$y_i = (m \times x_i) + b \quad (12)$$

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

검량선은 4개 농도(2, 10, 20, 40 ng/ml)의 표준용액을 각각 2회 분석하여 작성하였다(Table V). 검량선과 관련된 변수는 가로축 값의 불확도가 세로축 값의 불확도보다 작다는 가정을 전제 조건으로 하여 선형 최소제곱법으로 계산하였다. 그 결과 THCCOOH의 검량선은 결정계수 0.9995, 기울기 0.0631, y-절편 0.009의 값을 나타내었다. 실제 복용자의 소변 시료로부터 THCCOOH 성분의 검량선에 적용하여 2회 분석하여 얻은 평균 농도는 11.53 ng/ml이었다.

선형 최소제곱법으로 작성한 검량선에 의한 불확도는 다음의 식에 의해 계산할 수 있다.<sup>16)</sup>

$$u_{\text{cal}} = \frac{s_y}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{S_{xx}}} \quad (13)$$

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

Table V의 값을 식(13)에 적용하여 얻어진 검량선에 대한 상대표준불확도( $u_{r\text{cal}}$ )는 0.024853이었으며 그 결과를 Table VI에 나타내었다.

**Table III** – Standard uncertainty of inter-day repeatability

No.	THCCOOH (5.0 ng/ml)			
	1st day	2nd day	3rd day	4th day
1	4.720	4.846	4.467	4.495
2	5.023	4.736	4.487	4.693
3	4.972	4.736	4.508	4.696
4	4.924	4.741	4.509	4.883
Mean	4.920	4.765	4.493	4.692
Variance	0.018	0.003	0.0004	0.025
Standard uncertainty ( $u_{\text{variation}}$ )	0.165032			
Relative standard uncertainty ( $u_{r\text{variation}}$ )	0.033			

**Table IV** – Standard uncertainty of inter-person reproducibility

No.	THCCOOH (5.0 ng/ml)		
	1st person	2nd person	3rd person
1	4.720	4.609	4.714
2	5.023	4.870	4.527
3	4.972	4.991	4.390
4	4.924	4.863	4.604
5	4.959	4.922	4.435
Mean	4.920	4.851	4.534
Variance	0.014	0.021	0.017
Standard uncertainty ( $u_{\text{person}}$ )	0.197161		
Relative standard uncertainty ( $u_{r\text{person}}$ )	0.039		

Table V – Calculations for least-squares analysis

No.	$x_i$	$y_i$	$x_i \cdot y_i$	$x_i^2$	$d_i$	$d_i^2$	$d_i \cdot \bar{d}$	$(d_i - \bar{d})^2$	$S_{xx}$
1	2	0.124	0.249	4.0	-0.01091	0.00012	-0.010257	0.000105	256
2	2	0.136	0.273	4.0	0.00120	0.00000	0.001857	0.000003	256
3	10	0.655	6.548	100.0	0.01480	0.00022	0.015462	0.000239	64
4	10	0.643	6.428	100.0	0.00281	0.00001	0.003467	0.000012	64
5	20	1.279	25.571	400.0	0.00754	0.00006	0.008195	0.000067	4
6	20	1.253	25.052	400.0	-0.01841	0.00034	-0.017754	0.000315	4
7	40	2.499	99.951	1600.0	-0.03422	0.00117	-0.033564	0.001127	484
8	40	2.565	102.597	1600.0	0.03193	0.00102	0.032593	0.001062	484
Sum	144	9.153	266.67	4208.0	-	0.0029344	-	0.0029309	1616

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

Table VI – Detailed estimation of uncertainty contributions in the results of THCCOOH analysis in human urine samples

Uncertainty factors	THCCOOH			
	Relative standard uncertainty	Effective degrees of freedom, $\nu_{\text{eff}}$	Coverage factor, k	Degree of contribution (%)
Sample volume ( $u_{r \text{ vol}}$ )	0.002	8	-	0.2
Standard solution ( $u_{r \text{ std}}$ )	0.010	8	-	5.3
Run control (precision, $u_{r \text{ variation}}$ )	0.033	15.0	-	23.3
Inter-person (precision, $u_{r \text{ person}}$ )	0.039	14.0	-	37.6
Calibration curve ( $u_{r \text{ cal}}$ )	0.025	6.0	-	33.7
Relative combined standard uncertainty ( $u_r(C)$ )	0.058	35.8	2.1	100.0
Relative expanded uncertainty ( $U_r(E)$ )	0.12	-	-	-

Uncertainty was quantified for a single measurement of drug user 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%.

### 확장불확도의 계산

확장불확도를 계산하기 위하여 각각의 불확도 요인들에 대한 상대표준불확도를 Table VI에 정리하였다. 그리고 개개 인자의 불확도의 자유도로부터 유효자유도를 구하고, 약 95% 신뢰수준에서의 포함인자 k를 추정하였으며, 각각의 상대표준불확도로부터 얻어진 상대합성표준불확도( $u_r(C)$ )는 0.058이었다. 이 값을 이용하여 얻어진 상대확장불확도( $U_r(E)$ )는 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$U_r(E) = k \times u_r(C) \quad (14)$$

식(14)으로부터 계산한 결과 상대확장불확도( $U_r(E)$ )는 0.12이었으며, 그 값을 Table VI에 추가하였다.

따라서 소변에서 THCCOOH의 농도 측정값을 95% 신뢰구간에서 불확도를 포함하여 표기하면( $11.53 \pm 1.39$ ) ng/ml( $k=2.1$ , 신뢰수준 약 95%)이었다.

Table VI에서 GC/MS를 이용한 소변 중 대마 대사체 분석의 측정불확도 평가 결과를 최종적으로 종합·정리하였다.

## 결론

시료로부터 산출되는 최종 분석결과 값 내에는 시험을 거치면

서 발생하는 다양한 불확도 요인들이 포함되어 있다. 따라서 본 연구에서는 소변 중 THCCOOH 측정 결과 값에 여러 요인으로 부터 기인한 불확도를 표기하여 측정값의 존재 범위를 표시함으로써 분석 결과의 품질을 정량적으로 나타내고자 하였다.

불확도 평가는 측정불확도 표현 지침서에 나타나있는 방법에 따라 수행하였다. 요약하면 측정값을 산출하는데 관련 있는 요인들을 포함하는 모델식 설정, 각 입력량에 대한 불확도 요소의 측정값 산출, 산출된 값으로부터 표준불확도를 계산하는 과정으로 압축될 수 있다. 또한 불확도 전파의 법칙에 근거해 표준불확도로부터 합성표준불확도를 구하고, 포함인자(k)를 곱하여 최종 확장불확도를 계산하였다. 실제 대마 흡연자의 소변에서 THCCOOH의 농도 측정값은 11.53이었고, 상대확장불확도는 0.12였다. 측정값을 약 95%의 신뢰구간에서 포함인자  $k=2.1$ 일 때 불확도를 포함하여 표기하면( $11.53 \pm 1.39$ ) ng/ml( $k=2.1$ , 신뢰수준 약 95%)이었으며, 불확도는 THCCOOH의 농도에 대해서 12.05%였다.

본 연구를 통하여 검토된 불확도 요인은 크게 5가지로 시료의 분취, 표준용액의 제조, 일간 측정의 반복성, 시험자간 측정의 재현성 및 GC/MS 검량선의 비직선성이었다. 불확도 추정 및 평가 과정을 통하여 5가지 요인 중 시험자간 측정의 재현성, 일간 측

정의 반복성, 검량선의 비직선성에 의한 요소가 가장 큰 영향을 미치는 요인임을 알 수 있었다. 첫째, 시험자간 측정 편차에 의한 불확도는 시험자간 숙련도, 경험, 자질 등의 차이에 의한 것으로 볼 수 있다. 시험자간 측정 편차는 직무 교육, 비교숙련도 시험 참가 등 품질보증 프로그램을 통해 시험자간 편차를 줄여 나갈 수 있을 것으로 판단된다. 둘째, 일간 측정의 반복성에 의한 불확도는 시험자간 측정 편차에 의한 불확도와 중복되는 부분이 있을 것으로 생각되므로 중복되는 부분을 효과적으로 배제할 수 있는 기법을 고안하여 적용해야 정확한 불확도를 계량화할 수 있을 것으로 생각된다. 다음으로 검량선의 비직선성에 의한 불확도는 기질의 특이성과 소변내의 방해물질의 영향에 의한 것으로 판단되며, 분석대상 물질의 분리능(separation resolution)과 선택성(selectivity)을 향상시킴으로써 일정 정도 개선될 것으로 판단된다. 이러한 시험방법에 대한 불확도 추정 및 평가 결과는 향후 시험법 개선에 반영시켜 오차 요인들의 영향을 감소시키는 데 활용할 예정이다.

또한 본 연구는 소변을 이용하여 대마 흡연 여부를 확인하는 분석방법에 측정불확도 개념을 처음 적용하여 투약여부 확인의 근거가 되는 THCCOOH 성분의 농도 측정값이 존재하는 범위를 합리적으로 추정하였다는 점에 그 의미를 갖고 있다.

### 감사의 말씀

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

### 참고문헌

- 1) 대검찰청 : 2007 마약류범죄백서. 대검찰청 마약·조직범죄부, p. 16 (2008).
- 2) Wall, M. E., Brine, D. R., Brine, G. A., Pitt, C. G., Freudenthal, R. I. and Christensen, H. D. : Isolation, structure, and biological activity of several metabolites of delta-9-tetrahydrocannabinol. *J. Am. Chem. Soc.* **92**(11), 3466 (1970).
- 3) Agurell, S., Nilsson, I. M. and Widman, M. : In *Marihuana Chemistry, Biochemistry and Cellular Effects*, Nahas, G. (ed.). Springer-Verlag: New York, p. 141 (1976).
- 4) U.S. Department of Health and Human Services : NIDA Research Monograph 42, National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD, USA, p. 43 (1982).
- 5) 정재철, 김진영, 인문교, 정원조 : 고체상 추출과 GC/MS를 이용한 소변 중 대마 대사체(THCCOOH) 분석. *한국분석과학회지* **19**(5), 441 (2006).
- 6) Mason, A. P. and McBay A. J. : Cannabis: pharmacology and interpretation of effects. *J. Forensic Sci.* **30**(3), 615 (1985).
- 7) Vandevenne, M., Vandebussche, H. and Verstraete, A. : Detection time of drugs of abuse in urine. *Acta Clin. Belg.* **55**(6), 323 (2000).
- 8) Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM). ISO/IEC Guide 98 (1995).
- 9) EURACHEM/CITAC : Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement 2nd ed., EURACHEM/CITAC Guide CG 4 (2000).
- 10) 우진춘 : 측정 및 분석 결과의 불확도(II) -국제 규범(GUM)에 맞는 불확도 산출 및 표현. *한국분석과학회지* **13**(3), 49A (2000).
- 11) Sin, Della W. M., Wong, Y. C., Mak, C. Y., Sze, S. T. and Yao, W. Y. : Determination of five phenolic antioxidants in edible oils: Method validation and estimation of measurement uncertainty. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 784 (2006).
- 12) 문수정, 김병훈, 우진춘, 장윤석 : 혈액 시료 중 다이옥신의 농도 분석 결과에 대한 불확도 평가. *한국분석과학회지* **16**(6), 475 (2003).
- 13) 김종상, 조남호 : 측정결과의 불확도산정을 위한 모델링과 불확도 전파에 관한 연구. *한국컴퓨터정보학회* **8**(4), 167 (2002).
- 14) White, G. H. and Farrance, I. : Uncertainty of measurement in quantitative medical testing: A laboratory implementation guide. *Clin. Biochem. Rev.* **25**(iv), 207 (2004).
- 15) 정영해, 조지현, 황현식, 정은진 : SPSS 14.0 통계자료분석, 한국사회조사연구소, 광주 p. 219 (2008).
- 16) Harris, D. C. : *Quantitative Chemical Analysis* 3rd ed., W. H. Freeman and Company, New York, p. 63 (1991).