

# Application News

No. 04-JMST-209-ENK

## Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8050 LCMS-8050과 Supported Liquid Extraction 전처리를 이용한 소변 내 THC 대사체 분석 Detection of THC Metabolites in Urine by LCMS-8050 with Supported Liquid Extraction Method

### ■ 서론

대마초는 기분전환용 및 의약품으로 사용되고 있음에도 불구하고, 잠재적으로 장기적인 효과로서 개인의 일상 업무에 영향을 주는 의존성과 행동 장애를 일으킬 수 있다. 이러한 우려로 정부는 특히 체액에서 대마초 섭취 흔적을 추적하기 위한 첨단 기술을 고려하게 되었으며, 소변은 일반적으로 대마초 추적에 자주 사용되는 생체시료 중 하나이다.

모약물인 Δ9-tetrahydrocannabinol(THC)는 반감기가 30분 미만으로 소변 내에서 추적하기 어렵다. THC는 간에서 1차 대사가 이루어지는 동안 1차 대사체인 11-hydroxy-Δ9-tetrahydrocannabinol(11-OH-THC) 및 11-nor-9-carboxy-Δ9-tetrahydrocannabinol(THC-COOH)로 전환된다. 이 두 대사체는 2차 대사에서 11-OH-THC와 THC-COOH의 glucuronide 결합체를 생성하기 위해 추가로 대사되고 소변으로 배출된다. Glucuronate 결합체는 일반적으로 60분 이내에 소변에서 나타나지만 4시간 이후에는 흡수/흡입이 일어날 수 있다. THC-COOH의 반감기는 광범위하며 1회 사용으로 최대 7일 동안 소변에서 검출될 수 있다. 따라서 소변 샘플에서 대마초 섭취를 추적하는 것이 가능하다.

질량 분석법은 우수한 감도와 선택성으로 인해 법의학 및 임상 분석 분야에서 뛰어난 분석법이다. 이 뉴스레터에서는 소변샘플에서 THC 대사체를 측정하기 위해 액체 크로마토그래피 삼중사극자 질량분석시스템 (LCMS-8050)을 사용하였다.

효소 가수분해는 THC 대사체로부터 glucuronide 부분을 가수분해하기 위한 필수 단계이다. 따라서 소변 샘플 전처리에서 샘플의 정제는 필수적이다. 이에 따라 샘플의 추출 및 정제에 Supported liquid extraction (Biotage ISOLUTE™ SLE+) 전처리법이 이용되었다.

표 1. 소변샘플 중 THC 대사체 분석조건

Column	Biphenyl column (100 mm x 2.1 mm x 2.6 μm)
Mobile phase	(A) 0.2 % Formic Acid in Water (B) 0.2 % Formic Acid in Methanol
Gradient program	0-1 min (5%B), 1.01-2min (40%B), 2.01-7 min (100%B), 7.01-10 min (100%B), 10.01-14 min (5%B)
Flow rate	0-8 min (0.3 mL/min), 8.01-11 min (0.5 mL/min), 11.01-14 min (0.3 mL/min)
Oven temperature	40 °C
Injection volume	1 μL
Interface	Heated ESI
MS mode	MRM, positive mode
Heat block temperature	400 °C
DL temperature	250 °C
Interface temperature	300 °C
Nebulizing gas	N <sub>2</sub> , 3 L/min
Drying gas	N <sub>2</sub> , 10 L/min
Heating gas	Zero air, 10 L/min

표 2. 분석물질과 내부표준물질의 MRM 조건

Analyte	Transitions	Analyte	Transitions	Analyte	Transitions	Analyte	Transitions
THC-COOH	345.21>327.20*	THC-COOH-D3	348.20>330.15	11-OH-THC	331.23> 193.20*	11-OH-THC-D3	334.30>316.35
	345.21>193.15		348.20>302.15		331.23>201.15		334.30>196.15
	345.21>119.20		348.20>90.90				334.30>201.15

\*정량이온

표 3. 매질효과와 회수율 (n=6)

Analyte	매질효과 (%)			회수율 (%)		
	15 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL	15 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
THC-COOH	101.1	89.8	91.5	104.9	92.0	103.7
11-OH-THC	71.0	87.5	94.6	106.2	99.8	105.2

표 4. 정확도와 정밀도 (일내 및 일간 반복성, n=3)

Analyte	정확도 (%)			정밀도 (%)		
	15 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL	15 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
THC-COOH	101.3	92.1	90.4	2.9	9.0	3.1
11-OH-THC	106.4	96.5	97.1	2.5	8.3	1.1

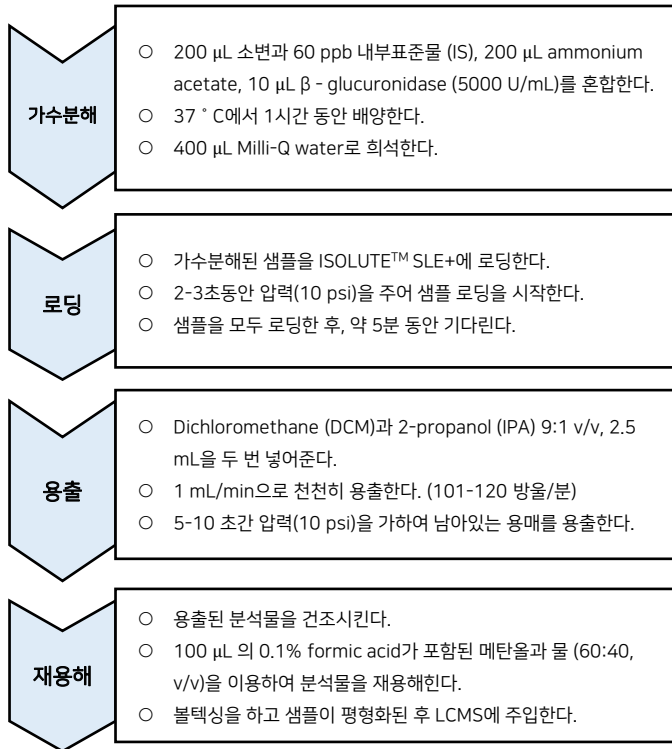


그림 1. 샘플 전처리 방법

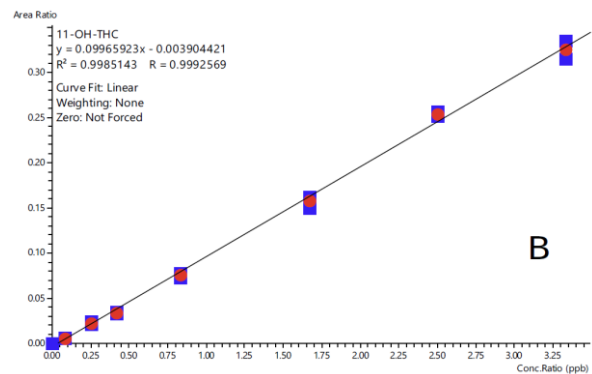
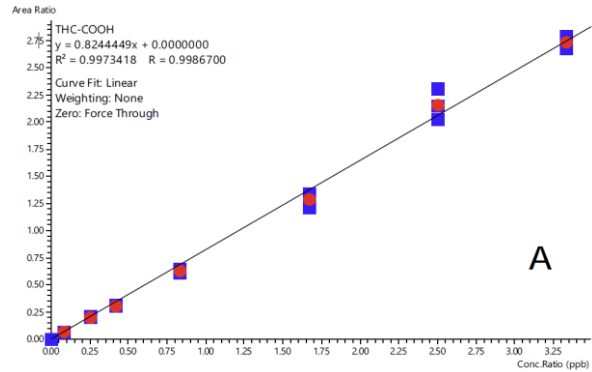


그림 2. 대표적인 매질 첨가 검정곡선 (A) THC-COOH (B) 11-OH-THC

■ 측정 조건 및 샘플

시료 전처리

시료 전처리는 그림 1과 같이 Biotage ISOLUTE™ SLE+ 1mL 카트리지를 (P/N: 820-0140-C)를 이용하여 4단계 (가수분해, 로딩, 용출, 재용해 단계)로 수행되었다. 분석은 Schedule MRM을 사용하여 LCMS-8050으로 진행하였으며, 분석조건(액체 크로마토그래피, 질량분석 및 MRM 조건)은 표 1과 2에 나타내었다.

■ 결과 및 토의

SLE는 분석 물질이 유기 용출 용매에 따라 SLE 상에서 분리되는 원리를 기반으로 작동하며, 보다 소수성인 분석물질이 더 분리가 잘 될 가능성이 높다. THC-COOH 및 11-OH-THC는 소수성 화합물 (각각 logP 5.24 및 5.78) 이므로 유기 용매(DCM 및 IPA)을 이용해 용출하면 SLE 상에서 분리하는 것이 보다 용이할 것이다. 따라서 SLE가 샘플 정제 및 추출에 활용되었다.

THC 대사체와 IS의 검출 및 정량을 위해 2-3개의 MRM 조건이 사용되었다. MRM 조건은 Shimadzu LC/MS/MS

법의학독성 데이터베이스(P/N: 225-31175-92) 또는 자동 MRM 최적화를 기반으로 하였으며, 사용이 편리한 이 데이터베이스는 법의학 또는 임상 분석에 있어서 분석 비용과 시간을 줄이는 데 매우 효과적이다. 자동 MRM 최적화 기능은 LabSolutions™ 소프트웨어에서 이용할 수 있으며, 사용자가 한번의 주입으로 각 분석물의 최적화된 파라미터(MRM, 충돌 에너지)를 얻을 수 있도록 도와준다.

UNODC가 정한 생체 시료에서 THC 대사체의 MS 기반 검출에 대한 기준은 직선성, LOQ(정량 한계), 추출 회수율, 매트릭스 효과, 정확도, 정밀도, 특이성/선택성 등 7가지이다.

직선성과 정량한계

분석법의 유효성 검증은 UN 마약범죄사무소 (UNODC) 가이드 라인에 따라 수행되었다. 검정곡선은 공소변 시료에 7 개의 서로 다른 농도 (5, 15, 25, 50, 100, 150, 200 ng/mL)를 포함하도록 작성하였다. 각 농도별로 3 반복 분석을 수행하였다(n=3).

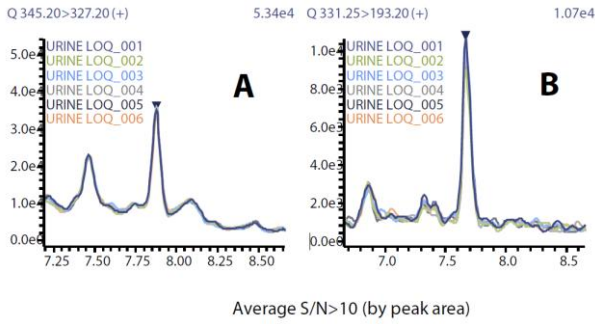


그림 3. 공매질 내 LOQ(5 ng/mL)의 THC-COOH (A)와 11-OH-THC (B)의 중첩 크로마토그램

매질을 기반으로 작성한 검정곡선은 일별 반복성을 조사하기 위해 6 일간 반복하였으며, 검정곡선의 직선성은 0.992 이상으로 나타났다.(그림 2)

정량한계(LOQ)는 signal-to-noise가 10 보다 큰 최저 농도로 결정하였으며(S/N>10), LOQ 측정을 위해 6 회 반복 분석하였다. LOQ는 5 ng/mL로 소변 중 카나비노이드에 대해 요구되는 농도 기준인 15 ng/mL 보다 훨씬 낮았다. (그림 3)(말레이시아 보건부).

### 회수율과 매질 효과

표 3은 추출 회수율과 매질효과의 측정 결과를 보여준다. 매질효과를 확인하기 위하여 표준물질과 추출 후 첨가된 공매질의 분석물질 면적비율을 비교하였다. 매질효과는 (71~101) %로 확인하였다.

회수율은 3 개의 서로 다른 농도에서 분석한 결과를 바탕으로 계산되었다. 각 농도에 대해 6개의 추출 반복시료를 LCMS-8050으로 측정하였으며, 회수율은 92 %에서 106 %로 나타났다. 이와 같은 결과들은 SLE 전처리법의 추출 및 정제 효율성을 보여준다.

### 정확도 및 정밀도

공소변에 서로 다른 3 개 농도(15, 50, 100ng/mL)의 THC 대사체를 첨가하여, 3일 연속(일간 반복성, n=3) 반복 분석(일내 반복성, n=3)하여 정확도를 측정하였으며, 두 대사체의 정확도는 (90.4~106.4)% 범위 이내였다(표 4). 이는 모든 결과가 저농도에서는 예상값의 ±20% 이내, 고농도에서는 ±15% 이내여야 한다는 기준에 적합하였다. 정밀도는 측정 정확도를 바탕으로 결정되었으며, 각 농도에 대한 %RSD로 나타내었다. %RSD는 저농도에서는 20 % 이내, 고농도에서 15 % 이내의 기준을 충족하여야 한다. 3 개의 서로 다른 농도에서의 THC-COOH 및 11-OH-THC의 %RSD는 9 % 이하로 관찰되었다(표 4).

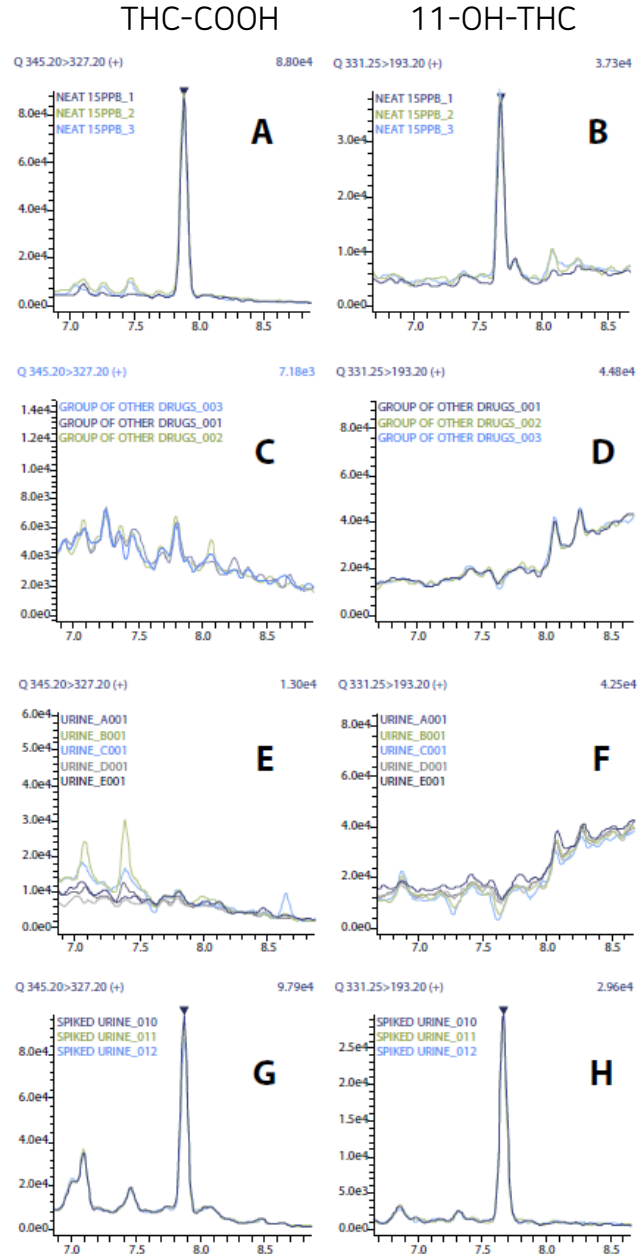


그림 4. 크로마토그램 비교

(A & B) 표준물질/용매 내 15 ng/mL THC 대사체 (n=3),  
 (C & D) THC 대사체의 RT 창에 있는 다른 약물 그룹 (n=3),  
 (E & F) 5종의 공소변 샘플 (n=5),  
 (G & H) THC 대사체 15 ng/mL를 첨가된 공소변 샘플 (n=3)

### 특이성/선택성

특이성/선택성은 다음의 분석에 따라 물질 간섭을 기반으로 조사하였다.

- 관심 약물의 표준 용액 (THC 대사체)
- amphetamine, morphine, diazepam, alprazolam, dextromethorphan과 같은 다른 그룹의 약물 표준 용액
- 5가지 다른 출처의 공소변
- 관심 약물(THC 대사체)이 첨가된 공소변

표준용액 및 공소변에 첨가한 약물 농도는 15 ng/mL로 하였으며, 공소변에 약물을 첨가한 샘플을 주입하였을 때, THC 대사체의 RT에는 간섭 물질이 존재하지 않았다(그림 4). 또한, 다른 그룹 약물의 RT는 THC 대사체의 RT와 차이가 있었다.

## ■ 결론

UNODC의 지침에 따라 Shimadzu LCMS-8050을 사용하여 소변에서 THC 대사체인 THC-COOH 및 11-OH-THC를 검출하기 위한 LCMS 기반 분석법의 유효성을 검증하였다. 소변 샘플의 추출 및 정제를 위해 Biotage ISOLUTE™ SLE+를 사용한 SLE 방법을 사용하였다. 이 방법은 생체시료에서 THC 대사체의 MS 기반 검출법에 대해 UNODC에서 설정한 모든 기준(직선성, 정량한계, 회수율, 정확도, 정밀도, 특이성/선택성)을 충족하였다. LCMS-8050의 뛰어난 감도와 SLE 전처리 효과로 인해 이 분석법은 생체시료에서 THC 대사체의 일반적인 스크리닝에 대해서 상당한 도움이 될 것으로 기대된다.