

Application News

No. SSK-GCMS-2403

Gas chromatography – negative chemical ionization mass spectrometry GC-NCI-MS/MS를 이용한 모발 시료 중 11-nor- Δ 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) 분석

Analysis of 11-nor- Δ 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair sample using GC-MS/MS(NCI)

■ 서론

매년 마약 관련 오남용 문제들이 증가하는 가운데 대마초는 전세계적으로 가장 많이 남용되는 물질 중 하나이다^[1]. 대마초는 크게 Cannabidiol(CBD) 와 Tetrahydrocannabinol (THC)라는 물질로 구성되는데, CBD는 통증완화, 불안감 진정, 수면의 질 개선 등 긍정적인 효과를 보이는 반면, THC는 특정 뇌세포 수용체에 작용해 뇌의 일부분을 과도하게 활성화 시켜 환각이나 환청을 일으키는 부정적인 효과를 보인다. 이런 부정적인 효과로 인해 개인의 건강 악화와 더불어 사회적 문제를 불러올 수 있다. 문제가 되는 THC는 체내에서 대사를 통해 THC-COOH 형태로 축적되기 때문에 생체 시료로부터 THC-COOH를 분석하는 것으로 대마초 흡연 여부를 확인하는 지표로 사용될 수 있다.

이러한 대마성분을 생체 시료에서 분석하는 대표적인 방법으로 소변 및 모발 시료를 이용한 분석 방법이 있다. 소변 시료 분석의 경우, 최근 또는 현재 노출에 대한 지표로 사용되는 반면 모발 시료 분석의 경우, 상대적으로 오래전에 노출이 이루어졌거나 반복 노출에 대한 유무를 판단할 때 사용된다^[2].

이에, 본 뉴스레터에서는 미국 약물남용 및 정신보건국(SAMHSA, Substance Abuse and Mental Health Services Administration) 기준을 바탕으로 장기간의 대마초 흡연 여부를 판단할 수 있는 모발 시료를 이용하여 THC-COOH를 분석하는 GC-NCI-MS/MS 분석법을 소개하고자 한다^[4].



그림 1. GCMS-TQ8050 NX

■ 시약 및 장비

표준물질 및 내부표준물질은 각각 THC-COOH와 THC-COOH-d₉를 사용하였으며, 가수분해 시약으로 NaOH, 산성화 시약으로 Acetic acid를 사용하였다. 액-액 추출을 위한 용매로는 Hexane 과 Ethyl acetate를 사용하였으며, 모발 시료 세척을 위해 Isopropyl alcohol을 사용하였다. 또, 유도체화시약으로는 Pentafluoropropanol, 이하 PFPOH)와 Pentafluoropropionic anhydride, 이하 PFPA)를 사용하였으며, 분석은 NCI(Negative Chemical Ionization) Ion source를 이용하여 Shimadzu GCMS-TQ8050NX로 분석을 진행하였다(그림 1).

■ 전처리 방법

샘플 준비 및 전처리 방법의 모식도는 그림 2와 같으며, Blank 모발 시료는 Isopropyl alcohol 10 mL로 3 회 세척한 후, 건조 시킨 샘플 25 mg을 균질 분쇄하여 모발 분말 시료로 하였다^[3]. 시료의 전처리는 모발 분말 시료에 50 μ L 내부표준물질(THC-COOH-d₉ 1.0 ng/mL)을 첨가하고 1.0 M 수산화나트륨을 0.7 mL 넣은 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30 분간 반응시켜 가수분해하였다. 이후에 아세트산 120 μ L으로 산성화시킨 후, n-Hexane/Ethyl acetate(9:1, v/v) 0.8 mL을 추가하여 액-액 추출(Liquid-Liquid-Extraction)하였다. 층분리를 위해 30,000 g에서 3 분간 고속 원심분리한 후, 상층액(유기층)을 40 $^{\circ}$ C에서 N₂ 가스로 농축하였다. 여기에 PFPOH 30 μ L, PFPA 50 μ L를 넣고 Heating block 70 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 유도체화를 진행한 후, N₂ 가스로 재농축하였다. 마지막으로 100 μ L Ethyl acetate로 재용리한 후, 0.2 μ m Polytetrafluoroethylene (13 mm diameter) Syringe filter를 사용하여 필터링하고 GC-NCI-MS/MS로 분석하였다.

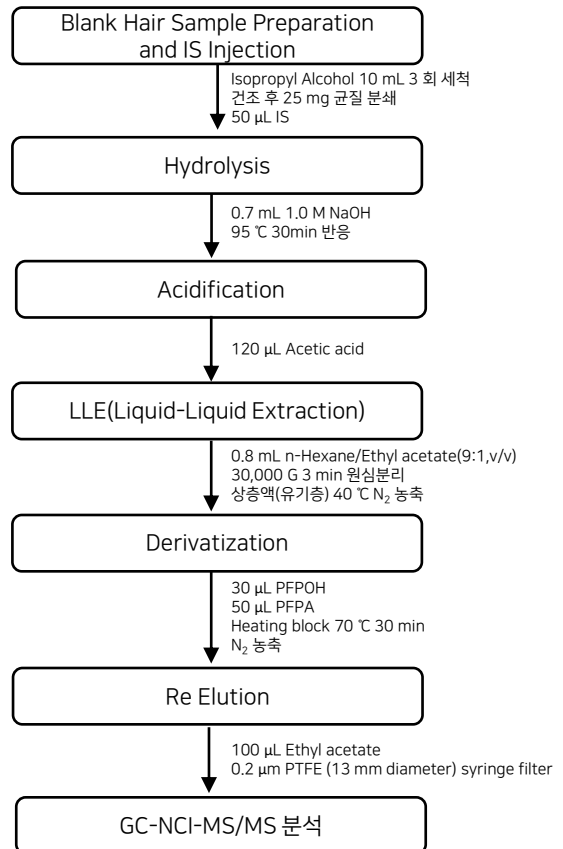


그림 2. 전처리 방법 모식도

■ 기기 및 분석 조건

분석은 GC-NCI-MS/MS(그림 1)를 사용하였으며, 세부 분석 조건은 아래 표 1과 같다.

표 1. GC-NCI-MS/MS 분석 조건

GC System	Nexis GC-2030
Analytical Column	: SH-I-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m)
Carrier Gas	: He (99.999%)
Column Flow	: 1.0 mL/min
Injection Temp.	: 260 $^{\circ}$ C
Carrier Gas	: Splitless
Flow Control	: Column flow
Oven Temperature	: 100 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 35 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 275 $^{\circ}$ C (3 min) \rightarrow 25 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 300 $^{\circ}$ C (3.5 min) Total : 13.5 min
Injection Mode	: High pressure injection (250 kPa, 1 min)
MS/MS System	GCMS-TQ8050 NX
Ionization Method	: NCI
Interface Temp.	: 280 $^{\circ}$ C
Ion Source Temp.	: 150 $^{\circ}$ C
Acquisition Mode	: MRM
MRM Condition	THC-COOH : 602>474.15(12), 602>513.15(8) THC-COOH-d ₉ : 611>483.2(26), 611>522.3(18), 611>350.3(30)

■ 크로마토그램

유도체화를 진행한 THC-COOH와 내부표준물질 THC-COOH-d₉의 크로마토그램은 그림 3과 같다.

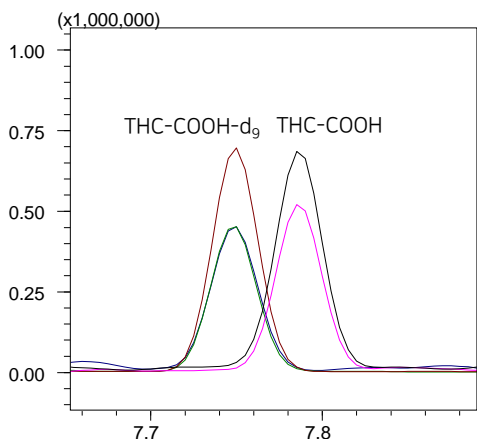


그림 3. THC-COOH 및 THC-COOH-d₉의 크로마토그램

■ 검정곡선

검정곡선을 위한 THC-COOH 표준용액은 (0.05, 0.1, 0.5, 2) pg/mg, 내부표준물질 THC-COOH-d₉은 0.5 pg/mg 가 되도록 준비하였다. 내부표준법을 이용한 THC-COOH의 검량 곡선은 그림 4와 같으며, 결정계수(R²)는 0.999로 우수하게 나타났다.

■ 정확도 및 정밀도

정확도(Accuracy) 및 정밀도(Precision)는 THC-COOH 표준용액 2 ng/mL 50 μ L와 내부표준물질 THC-COOH-d₉ 1 ng/mL 50 μ L를 넣고 그림 2와 같이 전처리하여 1 pg/mg 농도로 만들었으며, 이를 5 반복 분석하여 평가하였다. 분석결과, 정확도

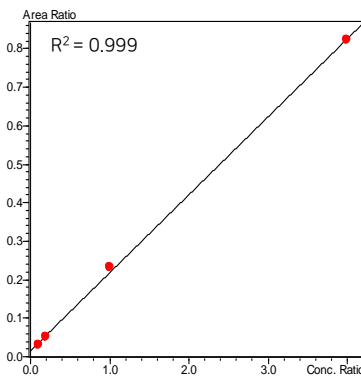


그림 4. THC-COOH의 검정곡선

는 (92 ~ 106) %, 정밀도는 5.34 %로 나타났다.

표 2. THC-COOH의 정확도 및 정밀도 (1 pg/mg, n=5)

Retention time (min)	Conc.* (pg/mg)	Recovery (%)	Ave.** (%)	RSD (%)
7.79	0.99	99	99.6	5.34
	0.98	98		
	0.92	92		
	1.06	106		
	1.03	103		

Conc.* Concentration
Ave.** Average

■ 결론

대마초 노출 확인을 위해 GC-MS/MS로 모발의 THC-COOH를 분석할 경우, 미국 약물남용 및 정신보건국(SAMHSA, Substance Abuse and Mental Health Services Administration)와 같은 여러 기관에서는 0.05 pg/mg의 검출한계를 요구하고 있다. 이에 본 뉴스레터에서는 검정곡선 범위를 (0.05 - 2) pg/mg으로 하여 내부표준물질 THC-COOH-d₉을 사용하여 내부표준법으로 직선성을 확인하였으며, 그 결과 결정계수 R²는 0.999로 우수하게 나타났다. 또, 정확도 및 정밀도는 농도 1 pg/mg 시료를 5 회 반복 분석하여 평가하였으며, 그 결과 정확도는 (92~106) %, 정밀도는 5.34 %로 양호하게 나타났다.

■ Reference

- [1] World Drug Report 2023, World Drug Report 2023 - Statistical Annex
- [2] K.M. Clauwaert, J.F. Van Boclaer, W.E. Lambert, A.P. De Leenheer, Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases, Forensic Sci. Int. 110 (2000) 157-166.
- [3] JY KIM 외 3명, Improved gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometric method for determination of 11-nor-D9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using mechanical pulverization and bead-assisted liquid-liquid extraction, Forensic Science International, Volume 206, 2011, 7e99-102.
- [4] High sensitivity analysis of THC-COOH in hair by using UFMS GCMS TQ in Negative Chemical Ionization mode. Shimadzu Europa GmbH, Shimadzu Italia.