

고체상 추출과 GC/MS를 이용한 소변 중 대마 대사체 (THCCOOH) 분석

정재철* · 김진영 · 인문교 · 정원조¹

대검찰청 마약감식실, ¹인하대학교 화학과
(2006. 5. 11. 접수, 2006. 8. 28. 승인)

Determination of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH) in human urine by solid-phase extraction and GC/MS

Jae Chul Cheong*, Jin Young Kim, Moon Kyo In and Won Jo Cheong¹

Drug Analysis Laboratory, Forensic Science Division, Supreme Prosecutors' Office, Seoul 137-730, Korea

¹Department of Chemistry, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received May 11, 2006; Accepted August 28, 2006)

요 약: 소변 중 대마 남용여부를 판별하는데 기준이 되는 tetrahydrocannabinol (THC)의 대사체 성분인 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH)를 고체상 추출법 (solid-phase extraction, SPE)과 가스 크로마토그래피/질량분석법 (GC/MS)을 이용하여 신속하게 분석 할 수 있는 방법을 제시하였다. 본 실험은 시험관에 소변 3 mL를 취해 염기성 (pH 10) 조건에서 가수분해 한 후, 양이온교환 카트리지를 사용하여 THCCOOH 성분을 선택적으로 추출하고, 증발·건고한 다음 유도체 반응을 시켜 GC/MS로 분석하였다. 그 결과 분석방법의 검출한계 (LOD)는 0.4 ng/mL이고, 정량한계 (LOQ)는 1.2 ng/mL이었다. 검정곡선의 직선성 상관계수 (r^2)는 1.2 (LLE는 1.3)~50.0 ng/mL의 농도범위에서 0.999를 나타내었다. 그리고 정밀도 (precision)와 정확도 (accuracy)는 모두 $\pm 1.20\%$ 이내로 안정적이었으며, 회수율(recovery)은 83.6~90.7%로 측정되었다. 액체상 추출법 (liquid-liquid extraction, LLE)과 비교할 때, SPE 방법이 회수율은 낮았지만 검출한계, 정량한계, 정밀도 및 정확도에서는 큰 차이가 없었다. 그러나 LLE 방법은 추출과정에 시간과 노력이 많이 드는 반면, SPE 방법은 상대적으로 추출 조작이 간편하고 신속하게 추출되었으며, 추출 잔류물도 깨끗하였다. SPE를 이용한 추출방법을 다수의 대마 흡연자 소변에 적용하였을 때 기존에 사용하던 LLE 방법보다 간편하고, 신속하게 대마 대사체 분석이 가능하였다.

Abstract: 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH) is the major metabolite of tetrahydrocannabinol (THC) which is the primary psychoactive component of marijuana. It is also the target analyte for the discrimination marijuana use. A method using solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) was developed for the determination of THCCOOH in human urine. Urine samples (3 mL) were extracted by SPE column with a cation exchange cartridge after basic hydrolysis. The eluents were then evaporated, derivatized, and injected into the GC/MS. The limits of detection (LOD) and quantitation

★ Corresponding author

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

E-mail: saturn-jjc@spo.go.kr, jc2661_2000@naver.com

(LOQ) were 0.4 and 1.2 ng/mL, respectively. The response was linear with a correlation coefficient of 0.999 within the concentration range of 1.2 (LLE 1.3)~50.0 ng/mL. The precision and accuracy were stable within 1.20% and the recovery was 83.6~90.7%. The recovery of SPE method was lower than that of liquid-liquid extraction (LLE), but there were no apparent differences in LOD, LOQ, precision and accuracy between the two methods. While SPE method is used as a very effective and rapid procedure for sample pretreatment, and clean extracts, LLE method was not suitable for the extraction procedure of THCCOOH in urine. The applicability of the method was proven by analyzing a urine samples from a marijuana abusers.

Key words: THCCOOH, LLE, SPE, GC/MS, Urine

1. 서 론

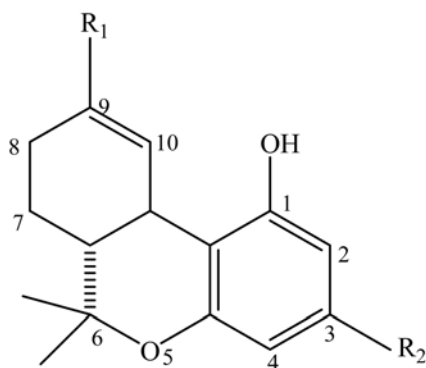
지금까지 약 60여종 이상의 대마 성분이 분리 확인되었으나, 그 성분들 중 tetrahydrocannabinol (THC)과 tetrahydrocannabivarin 성분만이 환각효과가 있는 것으로 알려졌다 (Fig. 1).^{1,2} THC는 탄소의 이중결합 위치에 따라 Δ^8 -THC와 Δ^9 -THC 두 종류가 존재하며 Δ^9 -THC의 환각효과가 보다 큰 것으로 알려졌다.³

THC의 인체 주요 대사체 성분으로 11-hydroxy-THC와 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC (THCCOOH)가 알려져 있으며, 대마 흡연시 THC는 흡연한 양의 약 95~99%가 대사체로 변화되고, 1~5%는 THC 자체

로 소변으로 배설된다.³ 대사체 성분 중 THCCOOH는 소변 분석시 대마 흡연 여부를 판정하는 기준 성분이다.¹ 연구 보고에 따르면 소변을 이용하여 대마 흡연 여부를 확인할 수 있는 기간은 흡연 후 4~8시간부터 최대 약 1개월까지 가능한 것으로 알려졌다.⁴⁻⁶

조사한 바에 의하면 소변에서 대마 대사체 성분을 분석하는 방법으로 GC/MS,^{3,7-14} LC/MS,¹⁵ GC/MS/MS,¹⁶ HPLC/ESI/MS¹⁷ 등이 보고되어져 있다. 그 중 GC/MS 방법이 THCCOOH를 확인하는데 가장 많이 사용되고 있다. GC/MS로 분석하기 위해서는 THCCOOH 성분이 당과 결합된 형태로 소변으로 배설되기 때문에 가수분해 전처리 과정이 필요하다. 소변에서 당과 결합된 포합체 형태의 THCCOOH를 가수분해시키는 방법에는 효소와 산·알칼리를 이용한 방법이 있다. 일반적으로 효소 가수분해가 효율적이나, 비용과 시간이 많이 소요되기 때문에 일상적인 분석에는 산·알칼리를 이용한 가수분해를 실시한다. 대마 흡연 여부를 확인하기 위한 소변 분석에서는 염기성 조건하의 알칼리 가수분해를 실시하는 방법이 주로 이용된다.⁷ 추출방법에는 액체상 추출법 (liquid-liquid extraction, LLE)과 고체상 추출법 (solid-phase extraction, SPE)이 많이 이용되고 있다.^{3,18-20} 일반적으로 SPE 방법은 LLE 방법 보다 비용이 많이 들지만, 시료를 신속하게 처리해야 하는 법과학 분야에서는 처리 시간이 짧고 조작도 간편한 SPE 방법이 많이 이용되고 있다.

본 연구는 대마 남용자 수사에서 채취한 흡연자 소변을 감식할 때 LLE 방법 대신에 전처리가 간편한 SPE 방법을 적용하여 대마 대사체 성분 THCCOOH를 추출하고, GC/MS로 분석할 수 있는 신속한 방법을 개발하는데 그 목적이 있다.



	R ₁	R ₂
Tetrahydrocannabivarin	CH ₃	C ₃ H ₇
Δ^9 - tetrahydrocannabinol (THC)	CH ₃	C ₅ H ₁₁
11-hydroxy-THC	OH	C ₅ H ₁₁
11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC (THCCOOH)	COOH	C ₅ H ₁₁

Fig. 1. Chemical structure of major cannabinoids.

2. 실험

2.1. 시약 및 재료

표준물질 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH)과 중수소가 치환된 내부표준물질 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol- d_3 (THCCOOH- d_3)은 미국 Cerilliant사에서 구입하였다. 고체상 추출용 cartridge는 양이온 교환수지(60 mg)가 충전된 미국 Waters사 MCX cartridge를 사용하였다. 유도체 시약으로 *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide(BSTFA)에 1% trimethylchlorosilane(TMCS) 첨가된 혼합 시약을 미국 Alltech사에서 구입하였다. 추출과정에 사용된 용매 및 시약은 모두 특급시약을 사용하였다. 표준용액은 표준물질을 메탄올에 녹여 농도를 1 $\mu\text{g/mL}$ 로 제조하였고, 내부표준용액은 내부표준물질을 메탄올에 녹여 1 $\mu\text{g/mL}$ 로 희석시켜 사용하였다. 두 용액 모두 사용하기 전에는 -20°C 에서 보관하였다.

2.2. 분석기기 및 작동조건

고체상 자동추출장비는 미국 Caliper사의 Rapid-Trace™가 사용되었다. 분석기기는 미국 Hewlett-Packard사의 HP 6890 Series Gas Chromatograph/HP 5973 Mass Selective Detector를 사용하였으며, 시료 자동주입기는 HP 6890 series injector를 사용하였다. 분석 칼럼은 미국 Agilent Technologies사의 DB-5MS(30 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness)를 사용하였다. 운반기체는 헬륨 가스를 사용하였으며, 유속은 0.7 mL/min으로 하였다. 칼럼 온도는 200°C 에서 1분간 유지시킨 후 290°C 까지는 $30^\circ\text{C}/\text{min}$ 속도로 온도를 높이고, 그 후 300°C 까지는 $35^\circ\text{C}/\text{min}$ 속도로 승온 한 다음 2분 동안 유지시켰다. 주입구와 검출기의 온도는 각각 250°C 와 280°C 로 설정하였다. 시료 주입은 splitless 모드 방식을 적용하였으며, 이온 검출 방법은 selected ion monitoring 모드를 적용하였다.

2.3. 시료

연구에 사용된 시료는 전국 검찰청 마약수사팀에서 의뢰한 대마 흡연자로 의심되는 시료 중 예비감식방법인 형광평판면역반응측정(TDx) 결과가 양성인 31명의 소변에 대해 적용하였다. 분석 전 시료는 4°C 의 저온 냉장고에 보관하였다. 그리고 대조 소변 시료는 대마를 흡연한 사실이 없는 38세 건강한 남자 소변을 채취하여 사용하였다.

2.4. 실험방법

2.4.1. 추출방법

(1) 액체상 추출법

시료 3 mL를 시험관(16 \times 125 mm)에 넣은 후, 내부 표준물질(1 $\mu\text{g/mL}$) 30 μL 를 첨가한다. 10 M KOH을 가하여 pH 10으로 조절하고, sulfamic acid 100 mg를 첨가한 후 교반기로 상온에서 10초 동안 혼합한다. 혼합한 시료에 acetic acid를 가하여 pH 4로 조정 한 후, 혼합 추출용매 hexane/ethyl acetate(9:1, v/v) 3 mL를 넣어 20분 동안 진탕 추출한다. 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 다음 분리된 유기용매층을 45°C 의 수욕조에서 질소가스(압력 4.5 psi) 하에 증발·건고시킨다.

(2) 고체상 추출법

시료 3 mL를 시험관(16 \times 100 mm)에 넣은 후, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 내부표준물질 30 μL 를 첨가한다. 10 M KOH을 사용하여 pH 10으로 조절하고, sulfamic acid 100 mg를 첨가한 후 교반기를 이용하여 상온에서 10초 동안 혼합한다. 혼합한 시료를 고체상 자동추출장비에 장착한다. 시료에 acetic acid를 첨가하여 pH 4로 조정한다. 메탄올과 증류수를 1 mL 씩 순서대로 2 mL/min 속도로 흘려 cartridge를 활성화시킨다. 활성화된 cartridge에 시료를 2 mL/min 속도로 주입한다. 시료 주입 후 방해물질 제거를 위해 0.1 M NaOH 2 mL를 2 mL/min 속도로 흘려준 후, 증류수 2 mL와 hexane 4 mL를 순서대로 8 mL/min 속도로 흘려준다. 방해물질이 제거 된 cartridge에 추출용매 ethyl acetate 3 mL를 2 mL/min 속도로 주입하여 THCCOOH 성분을 추출한다. Cartridge에서 유출된 추출액을 45°C 의 수욕조에서 질소가스(압력 4.5 psi) 하에 증발·건고시킨다.

2.4.2. 유도체화 방법

추출액을 증발·건고시켜 생성된 시험관 안의 잔사에 ethyl acetate 30 μL 를 가하여 용해시킨 후, 시료 자동주입기용 vial에 옮긴다. 그리고 유도체시약 (BSTFA/1% TMCS) 30 μL 를 첨가하고 혼합한 후 70°C 에서 15분 동안 유도체화 반응을 시킨다. 반응액을 상온으로 냉각시킨 다음 그 중 1 μL 를 GC/MS에 주입하여 분석한다.

2.4.3. 검정곡선 작성 및 유효성 검정

농도 1 $\mu\text{g/mL}$ 표준용액을 이용하여 검정곡선 작성용 표준액을 1.2 (LLE는 1.3), 2, 5, 10, 20, 50 ng/mL의 농도로 제조하였다. 검정곡선 작성용 표준액은 대조 소변 3 mL에 각각의 농도에 맞추어 표준용액을

첨가하여 질소 하에 증발시킨 후, 각각의 농도에 내부 표준용액(THCCOOH-d₃, 1 µg/mL) 30 µL를 첨가하여 실험을 실시하였다. 실험은 SPE와 LLE 각각의 시료 처리 방법과 동일하게 처리하고 분석하여 검정곡선을 작성하였다.

검출한계(limit of detection, LOD)는 신호대 잡음비(signal/noise, S/N)가 3 이상인 농도를 검출한계 값으로 정하였다. 그리고 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 S/N 비가 ≥10인 값을 정량한계 값으로 정하였다.

회수율 실험은 대조 소변에 농도 1 µg/mL 표준용액을 이용하여 5, 15, 40 ng/mL의 농도가 되도록 각각 첨가한 후 시료 처리방법과 동일한 방법으로 처리하고 분석하였다. 회수율은 대조 소변에 표준용액을 첨가하여 추출 한 후 분석한 결과와 대조 소변을 추출 한 후 표준용액을 첨가하여 분석한 결과를 상호 비교하여 구하였다.

정밀도(precision)와 정확도(accuracy) 실험은 대조 소변에 농도 1 µg/mL 표준용액을 이용하여 5, 15, 40 ng/mL의 농도가 되도록 각각 첨가한 후 시료 처리방법과 동일한 방법으로 처리하고 분석하여 측정하였다. 정밀도는 각각의 농도에서 측정된 값들을 비교하여 구하였으며, 그 결과는 변동계수(coefficient of variance, % CV)로 나타냈다. 그리고 정확도는 각 농도의 표준용액을 분석하여 얻은 측정농도(calculated concentration)와 첨가농도(nominal concentration)를 비교하여 구하였다. 그 결과는 편중값(% bias)으로 나타냈다.

Intraday는 1일 동안 3회 실험한 결과를 가지고 구하였다. 그리고 interday는 10일 동안 반복 실험한 결과를 가지고 측정하였다.

2.4.4. 시료 희석에 따른 농도 변화

대마 흡연자 소변을 증류수와 대조 소변으로 각각 희석하였을 때 기질의 영향에 의한 농도 변화를 확인하였다. 이는 남용 빈도가 많은 흡연자의 경우 정량 농도범위 이상(50 ng/mL)에 해당되는 시료들이 많아

정량 분석시 희석이 필요하기 때문이다. 희석 배율은 증류수와 대조 소변을 각각 사용하여 5, 10, 20으로 하였다. 흡연자 소변을 증류수와 대조 소변으로 각각 희석하여 준비한 시료를 SPE 방법에 따라 3회 추출하고 GC/MS로 분석한 후, 희석하지 않은 흡연자 소변의 농도와 비교하여 회수율을 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 특성이온 선정

대마 대사체 성분 THCCOOH는 화학구조식(Fig. 1)에 카르복실기(-COOH)와 수산화기(-OH)가 포함되어 있어 GC의 칼럼 내벽에 흡착이 일어나 분리가 쉽지 않다. 따라서 성분의 분리와 감도를 향상시키기 위해서는 카르복실기와 수산화기를 비극성 성질로 전환해주는 유도체화 과정이 필요하다. 이를 위해 유도체 시약(BSTFA/1% TMCS)을 사용한 TMS 유도체를 합성하여 분석하였다. Table 1은 대마 대사체인 THCCOOH-2 TMS와 내부표준물질 THCCOOH-d₃-2 TMS의 검출이온과 머무름 시간을 나타낸 것이다. Fig. 2의 (A)는 대조 소변(blank urine)의 크로마토그램으로 (B)와 (C) 크로마토그램과 비교시 동일 한 위치의 머무름 시간에서 방해물질이 전혀 나타나지 않았다. 또한 Fig. 3의 질량 스펙트럼으로부터 대사체 성분의 특성이온 *m/z* 371, 473, 488 (M+)과 내부표준물질의 특성이온 *m/z* 374, 476, 491 (M+)을 확인하였다.

3.2. 검정곡선과 유효성 검정결과

검정곡선은 LLE와 SPE 방법 모두 정량범위 내에서 상관계수(*r*²) 0.999의 직선성을 나타냈다(Table 2). 회수율은 LLE 방법은 94.1~96.1%, SPE 방법은 83.6~90.7%로 측정되었다. LLE 및 SPE 방법 모두 검출한계(LOD)는 0.4 ng/mL로 동일하였으며, 정량한계(LOQ)는 LLE 방법은 1.3 ng/mL, SPE 방법은 1.2 ng/mL로 측정되었다. 정확도 실험결과 LLE 방법의 bias 값은 -7.6~-0.6% 편차를 나타냈으며, SPE 방법은 -8.6

Table 1. Retention time and characteristic ions of the trimethylsilylated (TMS) THCCOOH

Compounds	Molecular weight	Retention time (min)	Characteristic ion (<i>m/z</i>)
THCCOOH-2 TMS	488	8.73	<u>371</u> ^a , 473, 488
THCCOOH-d ₃ -2 TMS (IS ^b)	491	8.70	<u>374</u> , 476, 491

^aUnderlined ion used for the quantification

^bInternal standard

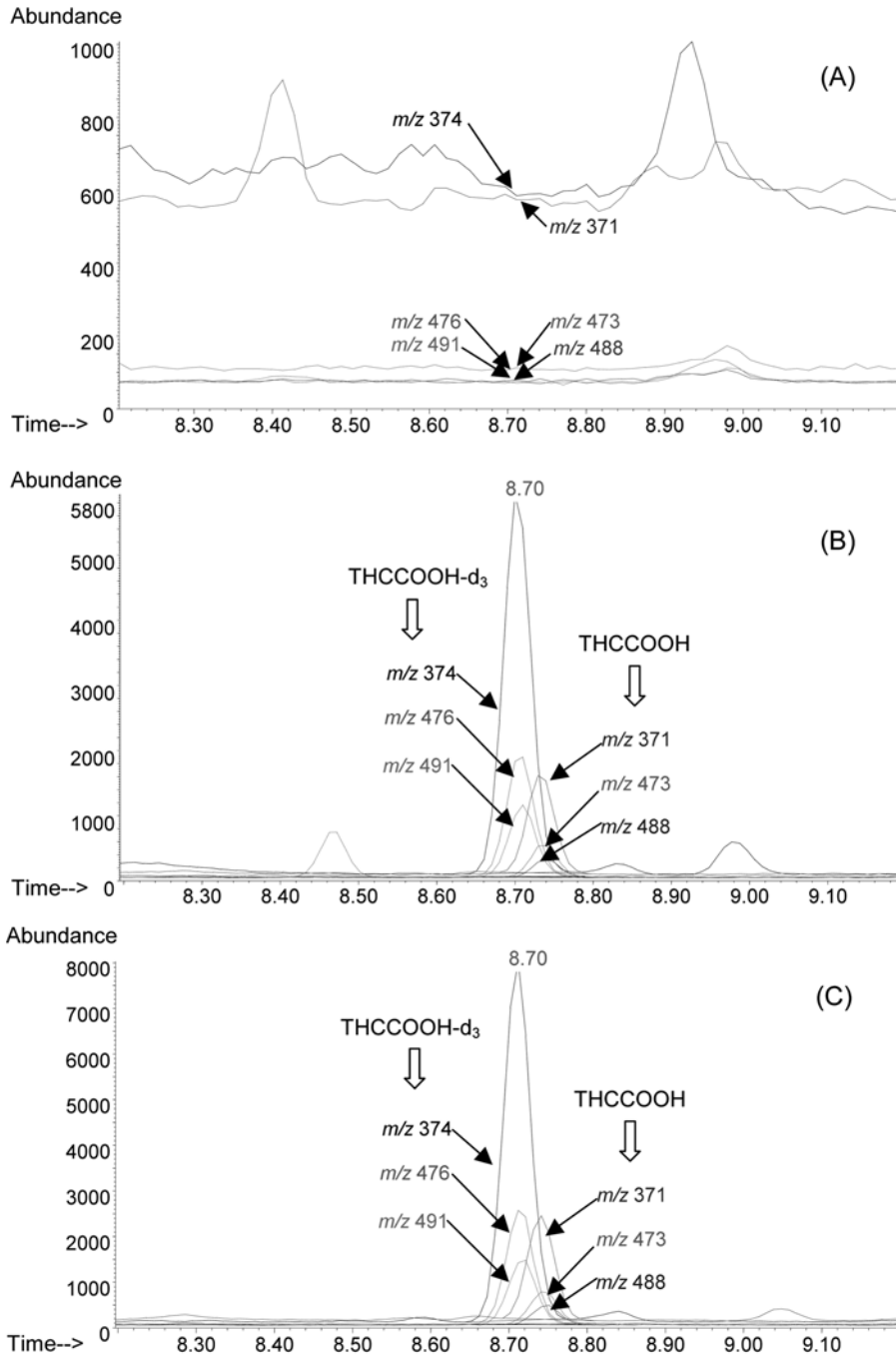


Fig. 2. GC/MS SIM chromatograms of TMS derivatized THCCOOH and THCCOOH-d₃ (IS) in human urine. (A) blank urine, (B) urine sample spiked at 5 ng/mL THCCOOH and 10 ng/mL IS, (C) positive sample.

~0.1% 편차를 나타냈다. 정밀도 실험결과 LLE 방법의 CV 값은 2.1~4.5% 범위이고, SPE 방법은 4.5~8.3% 범위로 유의성 있는 결과를 나타내고 있다.

3.3. 시료 회석에 따른 농도 변화

증류수와 대조 소변으로 대마 흡연자 소변을 각각 회석하여 분석한 결과를 Table 3에 나타내었다. 이들

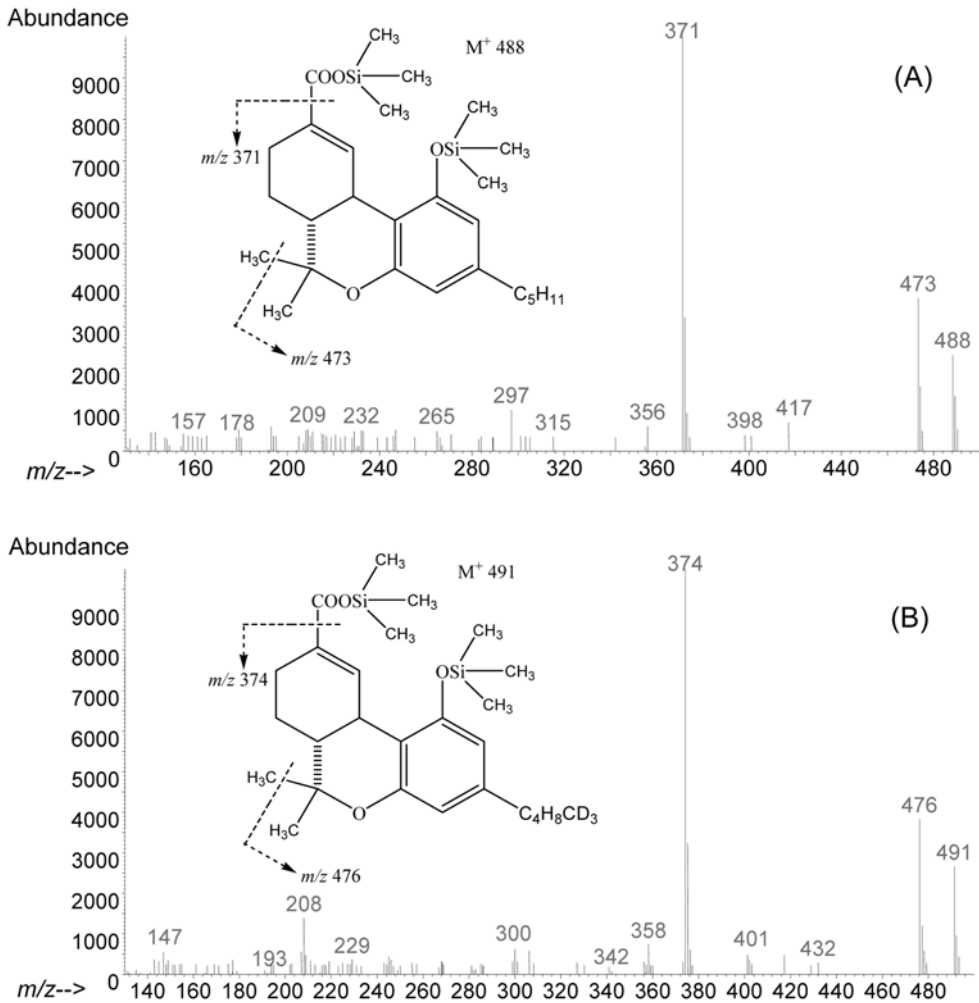


Fig. 3. EI mass spectra of TMS derivatives of (A) THCCOOH and (B) THCCOOH-d₃.

두 기질에 의해 5, 10, 20 배로 희석하여 분석한 농도를 희석하기 전의 농도와 비교한 결과 회수율은 96.8~99.4%로 나타났다. 그리고 증류수와 대조 소변의 서로 다른 기질에 따른 회수율 또한 큰 차이가 없었다. 본 결과로부터 두 기질을 이용하여 정량 농도범위 이상(50 ng/mL)의 대마 흡연자 소변을 일정 배율 이하로 희석하여도 농도 변화는 거의 없었다.

3.4. 대마 흡연자 분석결과

대마 흡연자 소변을 LLE와 SPE의 두 방법을 이용하여 GC/MS로 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. 소변 중 일부는 양이 부족하여 두 가지 방법 모두에 대한 정량값을 나타내지 못하였다. LLE 방법에 의한

회수율이 높아 정량값들이 일반적으로 SPE 방법 보다 높게 나타났다. 그러나 SPE 방법의 정량값들이 낮게 나타났지만, 검출한계가 0.4 ng/mL로 LLE 방법과 동일하게 측정되어, SPE 방법을 이용하여 소변 중 대마 흡연 여부를 확인하는 것은 문제가 되지 않음을 대마 흡연자 소변 분석결과로부터 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구 결과로부터 우리는 대마 흡연자의 소변 중에 포함된 대마 대사체 성분 THCCOOH를 SPE 방법을 이용하여 추출하고, GC/MS로 신속하게 분석할 수 있는 방법을 개발하였다. 기존 LLE 방법과 개발한

Table 2. Validation data for the analysis of THCCOOH in human urine.

	LLE	SPE		
Concentration range (ng/mL)	1.3~50.0	1.2 ~50.0		
Linearity (r ²)	0.999	0.999		
LOD ^a	0.4	0.4		
LOQ ^b	1.3	1.2		
Recovery (%)	Mean ± SD ^c	Mean ± SD		
5.0 ng/mL	94.9 ± 3.1	90.7 ± 3.5		
15.0	94.1 ± 1.8	83.6 ± 2.1		
40.0	96.1 ± 0.8	86.0 ± 2.4		
Accuracy ^d (% bias)	Intraday (n=3)		Interday (n=10)	
	LLE	SPE	LLE	SPE
5.0 ng/mL	-4.3	-7.3	-7.6	-8.6
15.0	-5.6	-2.5	-0.6	-4.4
40.0	-3.0	-0.1	-4.5	-2.7
Precision ^e (% CV)				
5.0 ng/mL	3.9	7.2	4.5	8.3
15.0	3.2	4.5	2.1	4.5
40.0	2.9	4.7	4.5	7.2

^aLimit of detection ^bLimit of quantitation ^cStandard deviation

^dCalculated as [(mean calculated concentration-nominal concentration)/nominal concentration]×100

^eExpressed as the coefficient of variance of the peak area ratios of THCCOOH/THCCOOH-d₃

Table 3. The matrices effect of the concentration of a urine sample diluted with blank urine and deionized water on the recoveries of THCCOOH on the SPE method.

Dilution (times)	Matrices		
	5	10	20
Deionized water	97.9 ^a (0.6) ^b	98.6 (0.4)	99.4 (0.0)
Blank urine	97.3 (0.2)	97.7 (0.1)	96.8 (0.2)

^aRecovery (%)

^bStandard deviation

SPE 방법을 비교 검토한 결과 SPE 방법은 LLE 방법에 비하여 처리과정이 간편하고 처리 시간도 짧으며, 추출된 잔류물도 상대적으로 깨끗하였다. 대마 흡연여부 확인을 위하여 다수의 소변 시료를 신속·정확하게 처리해야 하는 마약류 감식 분야에서는 시료 처리과정의 자동화가 필요하다. 그러나 기존의 LLE 방법을 사용할 경우 추출과 원심분리 과정의 자동화가 어렵다. 개발한 SPE 방법은 LLE 방법에 비하여 처리시간이 단축되고, 깨끗한 추출 잔류물을 얻을 수 있을 뿐만 아니라 소변 처리과정의 자동화에도 적합하였다. 결

Table 4. The quantitative results of THCCOOH using LLE and SPE in urine samples (ng/mL)

Subject NO.	GC/MS		Subject NO.	GC/MS	
	LLE	SPE		LLE	SPE
1	6.5	-	17	4.5	-
2	2.5	-	18	5.8	-
3	8.2	-	19	6.8	-
4	7.4	-	20	4.5	-
5	4.1	-	21	6.9	-
6	41.4	40.7	22	26.0	25.9
7	4.9	-	23	5.5	-
8	5.7	5.2	24	3.0	-
9	4.9	-	25	4.8	5.1
10	6.8	5.7	26	9.4	-
11	6.3	-	27	18.7	18.2
12	18.8	16.7	28	24.6	24.3
13	12.4	12.7	29	6.4	-
14	4.8	-	30	4.4	-
15	4.1	4.0	31	53.3	51.8
16	9.9	10.0			

론적으로, 대마 흡연자 소변에 SPE 추출방법과 GC/MS에 의한 분석방법을 적용함으로써 간편하고, 신속하게 흡연여부 확인이 가능하였다.

감사의 글

본 연구과제는 대한민국 과학기술부(MOST)와 한국 과학재단(KOSEF)의 특정연구개발사업 프로그램(M10640010000-06N4001-00100)에 의해 지원되었습니다.

참고문헌

1. V. Rajananda, V. Navaratnam, and N. K. Nair, "Analytical methods for the identification of the principal cannabinoid metabolite in urine", 113, V. Navaratnam Ed., National Drug Research Centre Universiti Sains, Malaysia, 1985.
2. "TDx/TDxFLx; Cannbinoids", 10, Abbott Laboratories, U.S.A., 1994.
3. R. A. Gustafson, E. T. Moolchan, A. Barnes, B. Levine, and M. A. Huestis, *J. Chromatogr., B* **798**, 145-154 (2003).
4. A. P. Mason and A. J. McBay, *J. Forensic Sci.*, **30**(3), 615-31 (1985).
5. R. C. Baselt, "Disposition of toxic drugs and chemicals in man", 2nd Ed., 795, Biomedical Publications, U.S.A., 1982.
6. M. Vandevenne, H. Vandebussche, and A Verstraete, *Acta. Clin. Belg.*, **55**(6), 323-333 (2000).
7. P. Kintz, D. Machart, C. Jamey, and P. Mangin, *J. Anal. Toxicol.*, **19**(5), 304-306 (1995).
8. P. Kintz and V. Cirimele, *Biomed. Chromatogr.*, **11**, 371-376 (1997).
9. C. Staub, *J. Chromatogr., B* **733**, 119-126 (1999).
10. M. A. Huestis, J. M. Mitchell, and E. J. Cone. *J. Anal. Toxicol.*, **20**(6), 441-452 (1996).
11. M. A. Elsohly and S. Feng, *J. Anal. Toxicol.*, **22**(4), 329-335 (1998).
12. D. A. Armbruster, R. H. Schwarzhoff, E. C. Hubster, and M. K. Liserio, *Clin. Chem.*, **39**, 2137-2141 (1993).
13. P. M. Kemp, I. K. Abukhalaf, J. E. Manno, B. R. Manno, D. D. Alford, M. E. McWilliams, F. E. Nixon, M. J. Fitzgerald, R. R. Reeves, and M. J. Wood, *J. Anal. Toxicol.*, **19**(5), 292-298 (1995).
14. H. Teixeira, P. Proenca, A. Castanheira, S. Santos, M. Lopez-Rivadulla, F. Corte-Real, E. P. Marques, and D. N. Vieira, *Forensic Sci. Int.*, **146**, Suppl : S61-63 (2004).
15. G. M. aballero, C. D'Angelo, M. S. Fraguio, and O. T. Cenrurion, *J. Chromatogr. Sci.*, **42**(10), 540-544 (2004).
16. H. Teixeira, P. Proenca, A. Verstraete, F. Corte-Real, and D. N. Vieira, *Forensic Sci. Int.*, **150**, 205-211 (2006).
17. M. A. Elsohly, S. Feng, W. J. Kopycki, T. P. Murply, A. B. Jones, A. Davis, and D. Carr, *J. Anal. Toxicol.*, **21**(3), 240-242 (1997).
18. L. O'Dell, K. Rymut, G. Chaney, T. Darpino, and M. Telepchak, *J. Anal. Toxicol.*, **21**(6), 433-437 (1997).
19. "Forensic applications notebook", 51, Waters Corporation, U.S.A., 2001.
20. M. C. Langen, G. A. de Bijl, and A. C. Egberts, *J. Anal. Toxicol.*, **24**(6), 433-437 (2000).