

## 가스크로마토그래피/질량분석기를 이용한 약물의 확인 및 간이 정량분석 프로그램 개발

김은미<sup>#</sup> · 한은영 · 홍효정 · 정수진 · 최상길\* · 이종숙 · 정진미 · 염혜선 · 이한선 · 이상기

국립과학수사연구원 약독물과, \*마약분석과

(Received December 14, 2010; Revised March 22, 2011; Accepted March 28, 2011)

### Development of Rapid and Simple Drug Identification and Semi Quantitative Analytical Program by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Eunmi Kim<sup>#</sup>, Eunyong Han, Hyojeong Hong, Sujin Jeong, Sanggil Choe\*, Jongsook Rhee, Jinmi Jung, Hyesun Yeom, Hansun Lee and Sangki Lee

Drug & Toxicology Div., National Forensic Service, Seoul 158-707, Korea

\*Narcotic Analysis Div., National Forensic Service, Seoul 158-707, Korea

**Abstract** — Systematic toxicological analysis (STA) means the process for general unknown screening of drugs and toxic compounds in biological fluids. In order to establish STA, in previous study we investigated pattern of drugs & poisons in autopsy cases during 2007~2009 in Korea, and finally selected 62 drugs as target drugs for STA. In this study, rapid and simple drug identification and quantitative analytical program by gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) was developed. The in-house program, "DrugMan", consisted of modified chemstation data analysis menu and newly developed macro modules. Total 55 drugs among 62 target drugs were applied to this program, they were 14 antidepressants, 8 anti-histamines, 5 sedatives/hypnotics, 5 narcotic analgesics, 3 antipsychotic drugs, and etc. For calibration curves, fifty five drugs were divided into four groups of range considering their therapeutic or toxic concentrations in blood specimen, i.e. 0.05~1 mg/l, 0.1~1 mg/l, 0.1~5 mg/l or 0.5~10 mg/l. Standards spiked bloods were extracted by solid-phase extraction (SPE) with trimipramine-D<sub>3</sub> as internal standard. Parameters such as retention times, 3 mass fragment ions, and calibration curves for each drug were registered to DrugMan. A series of identification, semi quantitation of target drugs and reporting the results were performed automatically. Calibration curves for most drugs were linear with correlation coefficients exceeding 0.98. Sensitivity rate of DrugMan was 0.90 (90%) for 55 drugs at the level of 0.5 mg/l. For standard spiked bloods at the level of 0.5 mg/l for 29 drugs, semi quantitative concentrations were ranged 0.36~0.64 mg/l by DrugMan. If more drugs are registered to database in DrugMan in further study, it will be useful tools for STA in forensic toxicology.

**Key words** : systematic toxicological analysis (STA), GC-MS, DrugMan

약독물 검출시스템(systematic toxicological analysis: STA)이란 혈액과 같은 생체시료에 존재할 수 있는 미지의 약물 또는 독성물질을 추출하여 확인하는 분석법이라고 정의할 수 있으며 'general unknown screening(GUS)이라고도 한다.<sup>1)</sup> 변사사건이 발생하였을 때 사법 부검을 통하여 사인을 판단하게 되는데 먼저 부검에서 얻어지는 위내용물이나 혈액 등의 생체시료를 분석하여 약독물의 검출여부를 확인하는 과정이 선행되어야 한다. 실

제 분석결과 어떤 약물이 검출되었을 경우 함량분석을 시행하여 치료농도 또는 독성농도, 간혹 사망농도 범위에 있는가를 구별하여야 하므로 법독성학(forensic toxicology)에서 약독물 검출시스템의 확립은 중요한 의미를 갖는다. 대부분의 변사사건의 경우 사망 전 변사자가 어떤 약물을 복용하였는지에 대한 정보는 거의 알려져 있지 않기 때문에 약독물 검출시스템은 특정약물이 아닌 미지 약독물에 대한 광범위 검색이므로 임상의학에서와 같이 특정약물을 대상으로 분석하는 소위 target drug monitoring과는 구별된다. 약독물 검출시스템을 확립하려면 광범위한 약독물을 모두 대상으로 하기는 어렵기 때문에 우선 분석하고자 하는 약물을 선정하는 과정이 필요하다. 이와 관련하여 저자 등은

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-2600-4911 (팩스) 02-2600-4919  
(E-mail) emkim4725@korea.kr

최근 3년간 우리나라 변사체 중 약독물의 검출 유형과 빈도수를 조사하여 약독물 검출시스템에 필요한 목표 약물 62종을 선정하였다.<sup>2)</sup> 이들의 선별기준은 의료용 약물을 우선으로 하여 염기성이고, 분석기기(GC-MS)의 특성을 고려하여 열에 안정하고, 자타살 목적으로 많이 사용되는 정신신경계용 약, 그리고 검출빈도가 높은 약물을 중심으로 선별하였다. 본 연구에서는 이들 약물을 중심으로 생체시료에서의 확인 및 간이 정량분석을 동시에 할 수 있는 분석법을 확립하고자 하였다. 약물의 추출은 고상추출법(SPE)을 사용하였고 최종 확인 및 정량분석은 가스크로마토그래피-질량분석법(GC-MS)을 이용하였으며 자체 개발한 약물의 자동 확인 프로그램인 DrugMan<sup>3)</sup>을 이용하여 정량분석 기능을 추가로 개발하여 약물의 확인 및 간이 정량분석 결과가 동시에 이루어질 수 있도록 설계하였다.

**실험방법**

**시약 및 재료**

약독물 검출시스템에 사용한 55종의 약물과 표준품의 구입처를 Table I에 나타내었다. Amitriptyline 등 36종의 약물은 Cerilliant사(Austin, TX, USA), benztropine 등 13종의 약물은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, bupivacaine, cloperastine 및 carbinoxamine은 Fluka사(St. Louis, MO, USA)에서, cyproheptadine은 Aldrich사 (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였으며 itopride 및 tiropramide는 국내 제약회사에서 각각 표준품을 분양받아 사용하였다. 이들 표준품은 각각 메탄올로 1 및 10 mg/l 농도로 제조하여 표준용액으로 사용하였으며 분석시까지 -20°C에서 보관하였다. 내부표준물질로 트리미프라민-중수소치환체(Trimipramine-D<sub>3</sub>, 100 mg/l, Cerilliant)를 메탄올로 희석하여 5 mg/l 농도로 조제한 것을 사용하였다. 시료 전처리에는 자동고상추출 장치(ASPEC XL 4<sup>TM</sup>, Gilson) 및 카트리지(Bond Elut-Certify<sup>®</sup>, 130 mg/3 ml, Varian)를 사용하였으며, 약독물 추출 등의 분석에 사용한 유기용매 및 기타 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

**시료전처리 및 추출**

혈액에서 55종 약물의 분석은 고상추출법을 사용하였으며 추출과정은 전보<sup>4)</sup>에 준하였다. 약물이 검출되지 않음을 확인한 공시료 혈액 1 ml에 표준용액 일정량 및 내부표준물질 30 µl를 가하고, 0.1 M 인산완충액(pH 6.0) 5 ml를 넣고 혼합 한 후 15분간 초음파 분해한 후 원심분리(2500 rpm, 10 min)하여 상정액(~5 ml)을 취하여 고상추출장치에 장착하였다. 카트리지는 메탄올 2 ml, 0.1 M 인산완충액(pH 6.0) 2 ml를 통과시켜 활성화시킨 후 시료는 1 ml/min의 속도로 적용하였다. 증류수 1 ml, 0.2 M acetic acid 2 ml를 카트리지에 통과시켜 세척한 후 질소 가스

**Table I** – Drug and Manufacturing Co lists

No	Drug*	Manufacture Co
1	Amitriptyline	Cerilliant
2	Benzotropine	Sigma-Aldrich
3	Bromhexine	Sigma-Aldrich
4	Buflomedil	Sigma-Aldrich
5	Bupivacaine	Fluka
6	Bupropion	Cerilliant
7	Buspiron	Sigma-Aldrich
8	Carbinoxamine	Fluka
9	Chlorpheniramine	Cerilliant
10	Chlorpromazine	Cerilliant
11	Citalopram	Cerilliant
12	Clomipramine	Cerilliant
13	Cloperastine	Fluka
14	Clozapine	Cerilliant
15	Codeine	Cerilliant
16	Cyproheptadine	Aldrich
17	Desipramine	Cerilliant
18	Dextromethorphan	Cerilliant
19	Dihydrocodeine	Cerilliant
20	Diphenhydramine	Cerilliant
21	Diphenylpyraline	Sigma-Aldrich
22	Doxylamine	Cerilliant
23	Ephedrine	Cerilliant
24	Fluoxetine	Cerilliant
25	Hydroxyzine	Sigma-Aldrich
26	Imipramine	Cerilliant
27	Itopride	국내제약회사
28	Ketamine	Cerilliant
29	Levomepromazine	Cerilliant
30	Lidocaine	Cerilliant
31	Methylephedrine	Cerilliant
32	Metoclopramide	Sigma-Aldrich
33	Midazolam	Cerilliant
34	Mirtazapine	Cerilliant
35	Norfluoxetine	Cerilliant
36	Nortriptyline	Cerilliant
37	Oxycodone	Cerilliant
38	Paroxetine	Cerilliant
39	Pethidine	Cerilliant
40	Phendimetrazine	Sigma-Aldrich
41	Pheniramine	Cerilliant
42	Phentermine	Cerilliant
43	Prilocaine	Sigma-Aldrich
44	Procyclidine	Sigma-Aldrich
45	Propranolol	Cerilliant
46	Sertraline	Cerilliant
47	Sibutramine	Cerilliant
48	Tiropamide	국내제약회사
49	Tramadol	Cerilliant
50	Trazodone	Cerilliant
51	Trihexyphenidyl	Sigma-Aldrich
52	Trimetazidine	Sigma-Aldrich
53	Tripolidine	sigma-Aldrich
54	Venlafaxine	Cerilliant
55	Zolpidem	Cerilliant

\*Drug name: in alphabetical order.

(5 min at 29 psi)로 건조시켰다. 클로로포름/아세트(1:1, V/V) 3 ml를 통과하여 산성분획 불순물을 제거한 후 용출용매 2% ammonia-ethylacetate 3 ml를 통과하여 최종적으로 염기성 약물 분획을 얻었다. 45°C 수욕상에서 질소 가스로 농축한 후 얻어진 잔사에 메탄올 100 µl를 가하여 GC-MS용 분석시료로 하였다. 분석기기 및 조건은 전보<sup>2)</sup>의 방법과 동일하였는데, GC-MS는 Agilent사의 HP 5973i MSD를 사용하였고, 컬럼은 HP-5MS(0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness, 30 M)를 사용하여 분석하였다. 컬럼 온도는 80°C에서 1분간 머무르고 300°C까지 분당 20°C씩 올린 후 15분간 유지하였으며, 시료는 splitless mode로 5890 GC에 1 µl 주입하였다. EI full-scan mode를 사용하였고 MS range는 40~550으로 설정하였다.

#### 약물의 확인 및 간이정량을 위한 DrugMan 프로그램 설계

저자 등이 2008년에 처음으로 자체 개발한 약물 검색 프로그램 DrugMan<sup>3)</sup>은 visual basic을 기반으로 한 일종의 데이터베이스 프로그램으로서 당시에는 운전이 영향을 미치는 약물검색에 응용하고자 개발하였다. 즉 약물복용이 의심되는 운전자의 혈액을 추출하여 GC-MS 분석을 한 후 본 프로그램에 의하여 운전이 영향을 미치는 벤조디아제핀계 약물 등 49종의 약물을 자동적으로 검색하도록 설계한 것이다. 개발 당시 파라미터로서 49종 약물의 GC-MS 분석에 따른 표준 유지시간과 주요 프라그먼트(fragment) 이온을 등록하였고, 장비회사에서 제공한 chemstation data analysis 메뉴에 연계시켜 목적 약물에 대한 피크 선별 및 data processing이 이루어지도록 하여 생체시료 중 49종 약물을 동시에 검색할 수 있도록 하였다. 본 연구에서는 DrugMan의 프로그램을 기반으로 하여 약물검출 시스템에 사용되는 약물 55종을 선별하여 이들 약물을 0.5 mg/l의 농도로 공시료 혈액에 가한 후 추출하여 얻어지는 크로마토그램을 갖고 파라미터로서 우선 GC-MS 분석에 따른 표준 유지시간, 주요 프라그먼트 이온을 데이터베이스로 등록하였다. 또한 각 약물별 질량분석 스펙트럼을 얻어 3개의 주요 프라그먼트 이온을 선별하였고, 그중 주요 이온을 정량이온(quantifier ion)으로 정하고, 다른 2개 이온은 약물 확인을 위한 검증이온(qualifier ion)으로 정하였다. 그 외에 개개 약물별로 검량선을 등록하여 선별한 55종 약물에 대한 간이 정량 분석이 가능하도록 설계하였다.

#### 검량선 작성

검량선은 농도범위에 따라 55종의 약물을 크게 4그룹으로 나누어 작성하였는데 즉, 1그룹(0.05, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/l), 2그룹(0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/l), 3그룹(0.1, 1.5, 2.5, 3.5, 5 mg/l) 및 4그룹(0.5, 2.5, 5, 7.5, 10 mg/l)으로 분류하였다. 공시료 혈액 1 ml에 표준용액(1 및 10 mg/l in MeOH)을 검량선의 범위에 따라 일정량씩 가하고 내부표준물질 30 µl씩 넣은 후 잘 혼합하여

전술한 방법과 같이 추출하여 GC-MS 분석을 하였다. 검량선 작성은 내부표준물질 및 각 선별물질의 정량이온에 대한 피크 면적비로 계산하였고, 각 농도별로 3회씩 작성하여 평균값을 사용하였다.

#### 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

55종 약물에 대한 검출한계 및 정량한계는 전보<sup>14)</sup>에 준하여 구하였다. 즉, 검출한계는 S/N ratio가 3:1 이상이고, 유지시간이 표준물질과 일치할 때의 농도를 선택하였고, 정량한계는 LOD의 조건을 충족하면서 목적농도의 범위가 검량선에서 계산하였을 때 20% 이내의 농도를 선택하였다.

#### 민감도율(sensitivity rate)

DrugMan이 실제 양성 시료를 양성으로 판단하는 능력을 알아보기 위하여 민감도율을 계산하였다. 55종 약물의 표준용액을 0.05 및 0.5 mg/l 농도로 공시료 혈액에 동시에 모두 첨가한 후 내부표준물질 및 0.1 M 인산완충액을 넣고 전술한 방법과 같이 추출하여 DrugMan 프로그램을 적용하였을 때 의음성 시료 개수(양성이나 음성으로 판단하는 약물 수)를 조사하여 아래의 식에 따라 민감도율을 계산하였다.<sup>9)</sup> 시료는 3회씩 반복 시험하여 평균값을 구하였다.

$$\text{Sensitivity rate} = \frac{tp}{tp + fn}$$

tp: 실제 첨가한 표준 약물 개수(known true positive test samples)

fn: 의음성 약물 개수(false negative samples)

#### 정확도(Accuracy or Bias) 및 정밀도(Precision)

55종 약물 중 검출빈도가 높은 약물 29종을 선별하여 정확도를 계산하였다. 정확도는 공시료 혈액에 각 표준용액을 0.5 mg/l의 농도로 첨가하고 전술한 방법과 같이 추출하여 DrugMan에서 계산하였을 때 간이 정량 분석값과 기준 농도(0.5 mg/l)와의 차이를 비교하였다. 3회 반복시험하여 평균값을 구하였다. 정밀도는 공시료 혈액에 각 표준용액을 0.5 mg/l의 농도로 첨가하여 3일간 연속하여 반복실험을 하고 GC-MS 분석하였다. 일별로 4개의 시료를 준비하여 시행하였으며, 얻어진 시험결과에 대한 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 정밀도를 상대표준편차 CV(%)로 나타내었다.<sup>15)</sup>

#### 실제 시료에의 적용

본 원에 부검 의뢰된 변사체 혈액시료 중 약물이 검출되었던 실제 시료를 대상으로 본 프로그램을 적용하였다. 검출된 약물에 대하여 DrugMan 프로그램에서 얻어진 간이 정량값과 별도

로 검량선을 작성하여 계산한 결과(기준값)를 비교하여 정확도를 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 약독물 검출 시스템을 위한 약물의 선정

DrugMan 프로그램에 등록하기 위한 약물의 선정은 전보<sup>2)</sup>에서 보고한 62종 약물에 의거하였는데 이들은 최근 3년간 국내 변사체 혈액에서 검출된 약물 중 의료용 약물 중심으로 검출빈도수가 높으며, 자타살 목적으로 많이 사용되는 정신신경계용 약물을 중심으로 선별한 것이었다. 이들 약물 가운데 정량용 표준품이 없거나 GC-MS 분석이 적합하지 않은 7종의 약물은 본 연구에서 제외하고 최종적으로 55종의 약물을 선정하였다(Table II). 이들은 항우울제(대사제 포함) 14종, 항히스타민제 8종, 진정수면제 5종, 마약성진통제 5종, 항정신병약 3종, 국소마취제 3종, 진해거담제 3종, 파킨슨치료제 3종, 비만치료제 3종 및 기타 약물류 7종으로 구성되었다(Table II).

### 약물 자동 검색 및 간이 정량 프로그램(DrugMan)을 위한 파라미터

선별된 약물 55종에 대한 GC-MS 분석시 표준유지시간(standard retention time), 3가지 주요 프라그먼트 이온(정량이온 및 검증이온), 검량선 범위, 검량선의 기울기, y절편 값 및 상관계수( $r^2$ )를 파라미터로서 DrugMan에 입력하였으며, 이때 입력 데이터는 Table II와 같았다. 본 분석조건에서 55종 약물은 6.31분(ephedrine)에서 22.20분(tiropramide)까지 광범위하게 검출되었는데 약물의 유지시간은 분석환경에 따라 다소 변화할 수 있으므로 프로그램에 입력한 표준유지시간은 내부표준물질의 유지시간으로 나눈 값 즉, 상대유지시간(relative retention time)이 자동적으로 계산되도록 하여 유지시간의 변화를 보정하도록 하였다.

검량선은 각 약물의 치료농도 또는 독성농도 범위<sup>5-8)</sup>와 GC-MS의 감도 등을 고려하여 4개의 그룹으로 나누어 작성하였으며 그룹별 검량선 범위 및 약물의 수는 Table II와 같이 1그룹(0.05~1 mg/l, 42), 2그룹(0.1~1 mg/l, 9), 3그룹(0.1~5 mg/l, 1) 및 4그룹(0.5~10 mg/l, 3)이었다. 검량선 작성 결과 대다수의 약물은 상관계수( $r^2$ )가 0.98 이상이었으며, 특히 20종의 약물은  $r^2$ 값이 0.99 이상으로 좋은 직선성을 보였다. 한편 phendimetrazine은  $r^2$ 값이 0.887로서 분석 약물 중 가장 낮은 직선성을 보여 좀더 검도가 필요할 것으로 사료되었다(Table II).

### 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

전술한 방법에 따라 얻어진 55종 약물에 대한 검출한계 및 정량한계를 Table III에 요약하였다. 본 분석조건에서 itopride와 trazodone의 LOD 및 LOQ는 모두 0.5 mg/l이었으며, 대부분 약

물의 LOD는 0.01~0.05 mg/l 범위이었고, LOQ는 0.05~0.1 mg/l 범위이었다(Table III).

### DrugMan의 민감도를, 정확도 및 정밀도

개발한 프로그램의 적용성 및 활용가능성을 검토하기 위하여 민감도와 정확도를 측정하고 실제 시료에 적용하여 결과를 비교하였다.

**민감도를** - 55종 약물을 0.5 mg/l 농도로 공시료 혈액에 동시에 첨가한 후 추출하여 DrugMan 프로그램에 적용한 결과 49종의 약물을 양성으로 검출하고 6종의 약물은 인식하는데 실패하였다. 전술한 식에 따라 민감도를 계산하였을 때 0.90(90%)이었다(Table IV). 이는 통계학적으로 볼 때 일반적인 유의수준 95%에는 못 미쳤으나 의음성(false negative)으로 반응한 6종의 약물 중 cloperastine과 codeine은 GC-MS 분석시 유지시간이 각각 12.07분 및 12.05분으로 dihydrocodeine의 유지시간인 12.06분과 유사하였고, 동일농도에서 GC-MS의 반응성이 dihydrocodeine이 가장 높아서 프로그램상에서 이들 약물을 각각 분리하여 인식하지 못하고 모두 dihydrocodeine으로 판단하였으며, trihexyphenidyl의 경우도 11.38분으로서 triprolidine의 유지시간(11.37분)과 비슷하였는데 동일농도에서 GC-MS 반응성이 큰 triprolidine으로만 인식하여 의음성으로 반응하였다(Table II & IV). 하지만 이들 3종의 의음성 약물은 주요 프라그먼트 이온들을 입력하면 개별적으로 확인이 가능하였으므로 추출상의 문제는 없는 것으로 판단되었다. 한편 itopride, phentermine 및 trazodone의 경우는 주요 프라그먼트 이온에 대한 피크 면적이 너무 낮아 프로그램상에서 음성으로 인식하였는데, 이는 55종의 약물을 동시에 주입함에 따라 약물간의 간섭효과로 인하여 상대적으로 감도가 낮아진 것으로 추정되었으며 이들 약물에 대한 향후 분석조건 또는 추출조건의 검토하여 추출효율을 높일 수 있는 연구가 필요할 것으로 사료되었다. 한편 0.05 mg/l에서는 위의 의음성 약물 6종 이외에 7종의 약물을 인식하지 못하여 모두 13종의 약물이 의음성으로 나타나 0.81(81%)의 민감도를 보였다(data was not shown). 이들 7종의 약물은 bromhexine, buspirone, ephedrine, hydroxyzine, paroxetine, propranolol 및 tiropramide로 LOD가 0.05 mg/l 이상으로 다소 높게 나타난 약물이었다(Table III).

**정확도 및 정밀도** - 29종의 약물을 공시료 혈액에 0.5 mg/l의 농도로 첨가하고 DrugMan 프로그램으로 분석하였을 때 정확도 및 정밀도는 Table V와 같았다. 각 약물 0.5 mg/l농도에서 DrugMan에 의한 간이 정량값은 0.36~0.64 mg/l로서 기준값(0.5 mg/l)에 대한 백분율로 환산하였을 때  $\pm 28\%$  이내였다(Table V). 대부분의 약물은  $\pm 10\%$  이내의 정확도를 보였지만 chlorpromazine, dihydrocodeine, diphenhydramine 및 imipramine의 4종 약물의 정확도가  $\pm 20\%$  이상으로 비교적 크게 나타났다. 한

Table II – The standard retention times, three qualifier ions and calibration curves for 55 drugs

No	Drug	Category	Standard retention time (min)	Mass fragment ions ( <i>m/z</i> )			Calibration curves			
				Quantifier ion	Qualifier ion 1	Qualifier ion 2	Range (mg/L)	Slope	Intercept	<i>r</i> <sup>2</sup>
1	Amitriptyline	항우울제	10.76	58	202	215	0.05-1	21.72	-0.44	0.980
2	Benzotropine	파킨슨치료제	11.69	140	83	124	0.05-1	4.87	-0.07	0.985
3	Bromhexine	거담제	11.98	70	264	293	0.05-1	0.87	0.04	0.991
4	Buflomedil	말초혈관확장제	11.94	84	97	195	0.1-5	7.01	-1.02	0.982
5	Bupivacaine	국소마취제	11.51	140	84	56	0.05-1	19.65	-1.38	0.955
6	Bupropion	항우울제	7.87	44	100	57	0.05-1	1.64	0.15	0.947
7	Buspirone	진정제	20.72	177	277	265	0.05-1	4.29	-0.08	0.987
8	Carbinoxamine	항히스타민제	10.49	58	71	167	0.05-1	21.93	-0.05	0.997
9	Chlorpheniramine	항히스타민제	10.16	203	58	167	0.05-1	9.52	-0.66	0.967
10	Chlorpromazine	항정신병약	12.58	58	86	318	0.05-1	5.39	-0.34	0.991
11	Citalopram	항우울제	12.03	58	238	324	0.05-1	10.79	-0.72	0.967
12	Clomipramine	항우울제	12.10	269	58	85	0.05-1	2.89	-0.04	0.978
13	Cloperastine	진해제	12.07	98	85	165	0.1-1	12.72	-0.59	0.991
14	Clozapine	항정신병약	15.27	243	256	192	0.05-1	1.48	-0.10	0.957
15	Codeine	마약성진통제	12.05	299	229	162	0.05-1	7.28	-0.03	0.983
16	Cyproheptadine	항히스타민제	11.89	287	215	96	0.05-1	4.88	-0.08	0.999
17	Desipramine <sup>a)</sup>	항우울제	11.34	234	195	208	0.1-1	1.07	-0.02	0.991
18	Dextromethorphan	진해제	10.86	59	271	150	0.05-1	2.07	-0.13	0.979
19	Dihydrocodeine	마약성진통제	12.06	301	164	42	0.05-1	12.08	-0.54	0.966
20	Diphenhydramine	항히스타민제	9.40	58	73	165	0.05-1	26.08	-1.11	0.967
21	Diphenylpyraline	항히스타민제	10.65	99	114	165	0.05-1	4.49	0.03	0.999
22	Doxylamine	항히스타민제	9.69	58	71	167	0.05-1	17.84	-0.92	0.967
23	Ephedrine	교감신경흥분제	6.31	58	77	105	0.05-1	4.74	0.05	0.961
24	Fluoxetine	항우울제	9.34	44	104	309	0.05-1	6.02	-0.40	0.974
25	Hydroxyzine	진정제	14.98	201	165	281	0.05-1	1.34	-0.10	0.958
26	Imipramine	항우울제	11.23	234	58	85	0.05-1	3.61	-0.20	0.976
27	Itopride	위장관조절제	17.82	58	165	358	0.5-10	9.50	-2.58	0.997
28	Ketamine	마취제	9.43	180	209	152	0.05-1	4.59	-0.08	0.998
29	Levomepromazine	진정제	12.71	58	328	185	0.05-1	4.36	-0.37	0.970
30	Lidocaine	국소마취제	9.50	86	58	234	0.05-1	14.95	-0.65	0.965
31	Methylephedrine	교감신경흥분제	6.66	72	77	73	0.05-1	9.35	-0.39	0.996
32	Metoclopramide	진토제	13.22	86	99	184	0.1-1	7.03	-0.44	0.968
33	Midazolam	수면제	13.13	310	325	297	0.05-1	9.83	-0.18	0.985
34	Mirtazapine	항우울제	11.42	195	208	265	0.05-1	14.56	-0.44	0.994
35	Norfluoxetine <sup>b)</sup>	항우울제	9.24	134	104	143	0.1-1	0.13	0.00	0.992
36	Nortriptyline <sup>c)</sup>	항우울제	11.19	44	202	265	0.05-1	10.48	-0.61	0.992
37	Oxycodone	마약성진통제	12.83	315	230	258	0.1-1	3.00	-0.30	0.964
38	Paroxetine	항우울제	12.98	44	192	329	0.1-1	0.39	0.01	0.986
39	Pethidine	마약성진통제	8.77	71	247	172	0.05-1	2.68	0.07	0.978
40	Phendimetrazine	식욕억제제	6.86	57	85	42	0.05-1	19.12	-1.85	0.887
41	Pheniramine	항히스타민제	9.14	169	58	72	0.05-1	19.73	-0.73	0.968
42	Phentermine	식욕억제제	4.73	58	91	134	0.05-1	22.31	-1.53	0.944
43	Prilocaine	국소마취제	9.23	86	44	106	0.5-10	18.46	-0.38	0.997
44	Procyclidine	파킨슨치료제	11.03	84	204	55	0.1-1	17.87	-1.40	0.970
45	Propranolol	항고혈압약	10.89	72	115	144	0.1-1	0.11	-0.01	0.995
46	Sertraline	항우울제	11.93	274	159	262	0.05-1	3.27	-0.11	0.996
47	Sibutramine	비만치료제	9.32	114	72	58	0.05-1	2.61	0.07	0.932
48	Tiropamide	진경제	22.20	86	105	-	0.05-1	12.09	-0.53	0.985
49	Tramadol	마약성진통제	9.88	58	263	135	0.05-1	22.77	-1.11	0.993
50	Trazodone	항우울제	21.72	205	278	176	0.5-10	2.55	-1.56	0.994
51	Trihexyphenidyl	파킨슨치료제	11.38	98	218	55	0.05-1	2.37	-0.06	0.965
52	Trimetazidine	항고혈압약	10.09	181	85	56	0.05-1	6.42	-0.15	0.983
53	Tripolidine	항히스타민제	11.37	208	193	278	0.05-1	8.88	-0.16	0.997
54	Venlafaxine	항우울제	10.54	58	134	179	0.05-1	22.90	-1.14	0.991
55	Zolpidem	진정수면제	14.65	235	219	307	0.1-1	11.37	-0.83	0.953
56	Trimipramine-D <sub>3</sub> <sup>d)</sup>	-	11.20	61	249	297	-	-	-	-

a) Metabolite of Imipramine; b) metabolite of Fluoxetine; c) metabolite of Amitriptyline; d) internal standard.

**Table III** – LODs and LOQs of 55 drugs in blood

No	Drug	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
1	Amitriptyline	0.01	0.05
2	Benztrapine	0.01	0.05
3	Bromhexine	0.05	0.05
4	Buflomedil	0.05	0.1
5	Bupivacaine	0.01	0.05
6	Bupropion	0.01	0.05
7	Buspirone	0.05	0.05
8	Carbinoxamine	0.01	0.05
9	Chlorpheniramine	0.01	0.05
10	Chlorpromazine	0.01	0.05
11	Citalopram	0.01	0.05
12	Clomipramine	0.01	0.05
13	Cloperastine	0.01	0.1
14	Clozapine	0.01	0.05
15	Codeine	0.01	0.05
16	Cyproheptadine	0.01	0.05
17	Desipramine	0.01	0.1
18	Dextromethorphan	0.01	0.05
19	Dihydrocodeine	0.01	0.05
20	Diphenhydramine	0.01	0.05
21	Diphenylpyraline	0.01	0.05
22	Doxylamine	0.01	0.05
23	Ephedrine	0.05	0.05
24	Fluoxetine	0.01	0.05
25	Hydroxyzine	0.05	0.05
26	Imipramine	0.01	0.05
27	Itopride	0.5	0.5
28	Ketamine	0.01	0.05
29	Levomepromazine	0.01	0.05
30	Lidocaine	0.01	0.05
31	Methylephedrine	0.01	0.05
32	Metoclopramide	0.01	0.1
33	Midazolam	0.01	0.05
34	Mirtazapine	0.01	0.05
35	Norfluoxetine	0.05	0.1
36	Nortriptyline	0.01	0.05
37	Oxycodone	0.05	0.1
38	Paroxetine	0.1	0.1
39	Pethidine	0.01	0.05
40	Phendimetrazine	0.01	0.05
41	Pheniramine	0.01	0.05
42	Phentermine	0.01	0.05
43	Prilocaine	0.01	0.5
44	Procyclidine	0.01	0.05
45	Propranolol	0.1	0.1
46	Sertraline	0.01	0.05
47	Sibutramine	0.01	0.05
48	Tiropamide	0.05	0.05
49	Tramadol	0.01	0.05
50	Trazodone	0.5	0.5
51	Trihexyphenidyl	0.01	0.05
52	Trimetazidine	0.01	0.05
53	Tripolidine	0.01	0.05
54	Venlafaxine	0.01	0.05
55	Zolpidem	0.01	0.05

**Table IV** – Drug identification by DrugMan for 55 standards spiked blood at the level of 0.5 mg/l

No	Drug	Result
1	Amitriptyline	Pos <sup>a)</sup>
2	Benztrapine	Pos
3	Bromhexine	Pos
4	Buflomedil	Pos
5	Bupivacaine	Pos
6	Bupropion	Pos
7	Buspirone	Pos
8	Carbinoxamine	Pos
9	Chlorpheniramine	Pos
10	Chlorpromazine	Pos
11	Citalopram	Pos
12	Clomipramine	Pos
13	Cloperastine	Neg <sup>b)</sup>
14	Clozapine	Pos
15	Codeine	Neg
16	Cyproheptadine	Pos
17	Desipramine	Pos
18	Dextromethorphan	Pos
19	Dihydrocodeine	Pos
20	Diphenhydramine	Pos
21	Diphenylpyraline	Pos
22	Doxylamine	Pos
23	Ephedrine	Pos
24	Fluoxetine	Pos
25	Hydroxyzine	Pos
26	Imipramine	Pos
27	Itopride	Neg
28	Ketamine	Pos
29	Levomepromazine	Pos
30	Lidocaine	Pos
31	Methylephedrine	Pos
32	Metoclopramide	Pos
33	Midazolam	Pos
34	Mirtazapine	Pos
35	Norfluoxetine	Pos
36	Nortriptyline	Pos
37	Oxycodone	Pos
38	Paroxetine	Pos
39	Pethidine	Pos
40	Phendimetrazine	Pos
41	Pheniramine	Pos
42	Phentermine	Neg
43	Prilocaine	Pos
44	Procyclidine	Pos
45	Propranolol	Pos
46	Sertraline	Pos
47	Sibutramine	Pos
48	Tiropamide	Pos
49	Tramadol	Pos
50	Trazodone	Neg
51	Trihexyphenidyl	Neg
52	Trimetazidine	Pos
53	Tripolidine	Pos
54	Venlafaxine	Pos
55	Zolpidem	Pos

<sup>a)</sup>Pos: classified as positive by DrugMan

<sup>b)</sup>Neg: classified as negative by DrugMan

$$\text{Sensitivity rate} = \frac{tp}{tp+fn}$$

tp: known true positive test samples (n=55)

fn: false negative samples (n=6)

55/(55+6)=0.90 (sensitivity rate, 90%)

편 29종 약물에 대한 정밀도를 계산하였더니 일간(inter-day) 정밀도는 모두 15% 이내였고, 일내(intra-day) 정밀도는 zolpidem

**Table V** – Accuracies and precisions of DrugMan for 29 standards spiked blood at the level of 0.5 mg/l

No	Drug	Result		
		Accuracy (%) <sup>a)</sup>	Precision (%) <sup>b)</sup>	
			Intra-day	Inter-day
1	Amitriptyline	6	5.4	2.4
2	Benzotropine	-4	5.2	3.5
3	Bupivacaine	2	9.8	4.5
4	Chlorpheniramine	4	9.0	5.2
5	Chlorpromazine	28	4.9	2.4
6	Citalopram	2	7.5	2.7
7	Clomipramine	-8	7.4	3.2
8	Dextromethorphan	0	6.5	2.6
9	Dihydrocodeine	-28	18.2	7.2
10	Diphenhydramine	-22	11.0	2.7
11	Doxylamine	-14	11.7	3.1
12	Fluoxetine	-6	10.1	3.1
13	Imipramine	20	6.6	3.2
14	Ketamine	0	18.2	15
15	Levomopromazine	-8	6.4	3.1
16	Lidocaine	-8	13.4	4.1
17	Metoclopramide	16	17.4	11.9
18	Midazolam	-6	14.8	11.8
19	Mirtazapine	2	10.8	4.9
20	Norfluoxetine	-8	17.8	5.2
21	Nortriptyline	18	7.4	5.4
22	Pethidine	16	12.3	3.0
23	Pheniramine	-6	15.4	3.2
24	Prilocaine	5	18.5	5.0
25	Sertraline	18	4.4	1.9
26	Tramadol	-14	13.3	6.5
27	Trihexyphenidyl	13	8.3	6.7
28	Venlafaxine	-10	10.7	4.9
29	Zolpidem	12	15.3	9.7

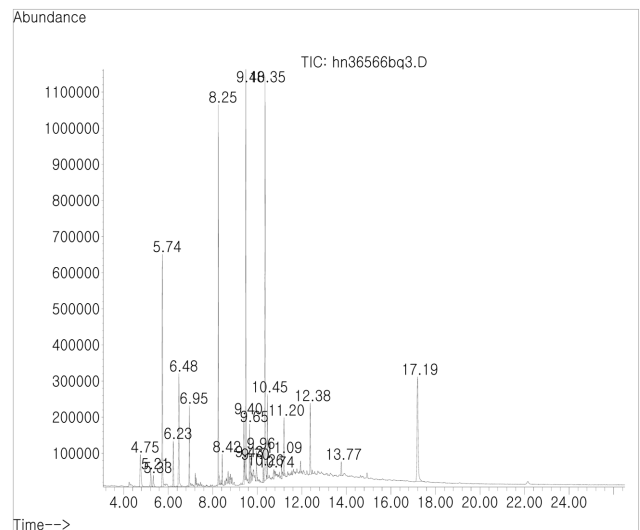
a) Accuracy (or Bias) =  $(M_i - \text{Nominal value}) \times 100 / \text{Nominal value}$ .  
 $M_i$ : Mean of measured value by DrugMan (n=3); Nominal value = 0.5 mg/l.

b) For estimation of precision, four blood samples which were spiked with 0.5 mg/l of 29 standards were extracted and analyzed by GC-MS. The extraction procedure was repeated independently on three successive days.

등 7종의 약물이 15.3~18.5%로 다소 높게 나타났으나 이들을 제외한 다른 약물은 모두 15% 이내였다(Table V). 이는 29종 약물을 동시에 첨가하여 분석하였기 때문에 약물간의 간섭작용에 의하여 일부 약물의 정확도 및 정밀도가 떨어졌을 것으로 추정되었다.

#### DrugMan 프로그램을 이용한 실제 시료에의 적용

DrugMan 프로그램을 실제 시료에 직접 적용시켜 약물 검색 및 간이 정량을 시행하였다. 시료는 당 연구원에 부검의뢰된 변사체의 혈액(ID 36566)을 사용하였는데, 혈액 1 ml를 취하여 전술한 바와 같이 추출한 후 GC-MS 분석을 한 결과 Fig. 1과 같은 크로마토그램을 얻었다. Fig. 1에서 내부표준물질의 유지시간을 확인한 후 Fig. 2와 같이 DrugMan 프로그램을 구동하여 내



**Fig. 1** – Total ion chromatogram of blood specimen by GC-MS.  
 a) One ml of blood was extracted by SPE and analyzed to GC-MS. b) Retention time of internal standard (trimipramine-D<sub>3</sub>) was 11.20 min under our analytical condition.

부표준물질의 유지시간을 입력한 후 분석 크로마토그램을 chemstation menu로 전송하였다. 1분 이내에 시료에 대한 55종 약물에 대한 검색결과 및 함량이 Fig. 3과 같이 출력되었다. DrugMan에 의한 분석결과 변사자 혈액에서 항히스타민제인 diphenhydramine 및 doxylamine이 양성으로 검출되었으며, 간 이 정량값은 각각 0.11 및 0.10 mg/l이었다. Fig. 4는 결과에서 약물이 검출되었던 부분을 확대하여 나타낸 것이다.

한편 본 혈액에서 검출된 diphenhydramine 및 doxylamine의 정량분석을 위하여 별도로 검량선을 각각 작성하여 함량분석을 시행한 결과 두 약물 모두 0.13 mg/l이었다. DrugMan에 의한 간 이 정량값과의 정확도를 계산하였을 때 diphenhydramine은 -15.4%, doxylamine은 23.1% 이었다(data was not shown).

가스 크로마토그래피/질량분석기(GC-MS)를 이용한 약물의 자동검색 및 정량 프로그램을 개발하기 위한 시도는 최근 일본에서 이루어지고 있다. Kadokami 등<sup>10)</sup>은 약 700여종에 달하는 화학물질의 데이터베이스를 만들어 환경 또는 식품 중에 존재하는 미량의 오염물질을 효과적으로 분석하고자 시도한 바 있으며, Ishida 등<sup>11)</sup>은 30종의 남용약물에 대한 데이터베이스를 만들고 정량분석이 가능하도록 프로그램을 개발(NAGINATA<sup>TM</sup>) 하여 실제 남용자의 소변에서 적용한 사례를 보고하였다. 또한 Kudo 등<sup>12,13)</sup>이 NAGINATA에 약물을 추가로 입력하여 총 156종의 약물의 데이터베이스를 확보하여 실제 혈액시료에 적용하여 약독물 분야에서 유용하게 활용할 수 있음을 시사하였다.

본 연구에서는 55종의 약물을 선별하여 우선 자동 검색 및 간 이 정량 기능을 가진 프로그램을 개발하였으며, 실제 변사자의 혈액 시료를 적용하였을 때 목적약물을 빠르게 검출하였을 뿐만



Fig. 2 – Data export to DrugMan for drug identification and semi quantitative analysis.

a) At first in order to adjust standard retention time of 55 drug, retention time of internal standard was confirmed. b) Automatically retention time of drugs were revised following their reference retention time. c) Revised data was exported to Data Chemstation menu and drug identification and semi quantitative analysis were performed by DrugMan simultaneously.

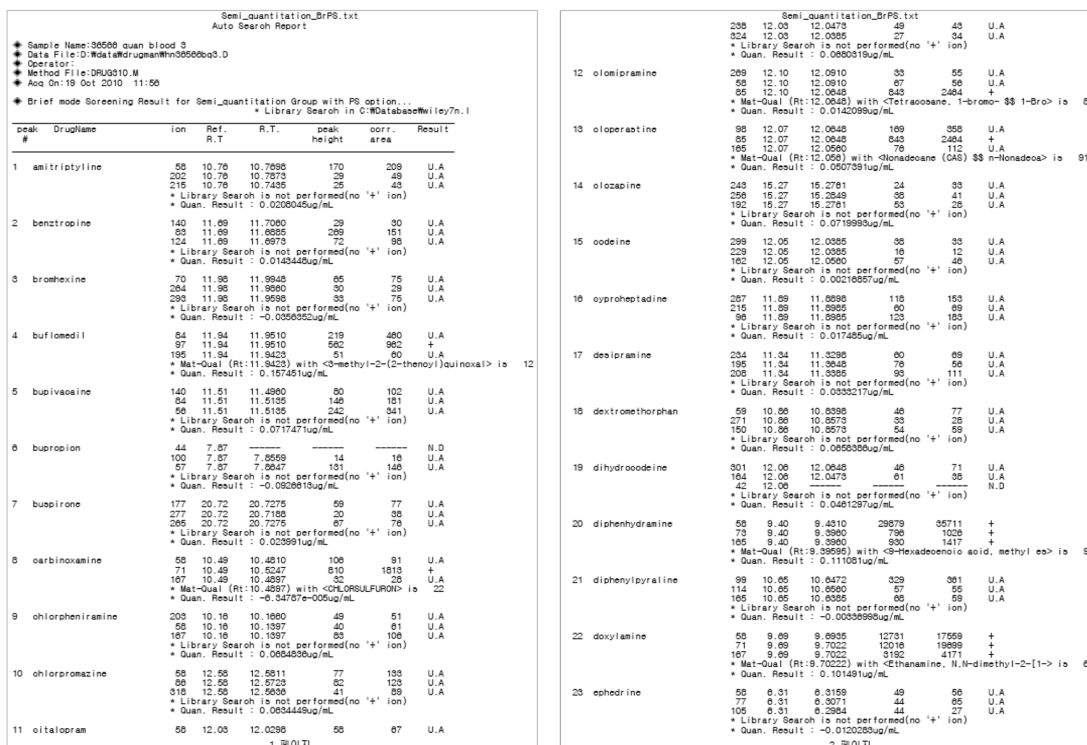


Fig. 3 – Custom report for sample by DrugMan.

a) Less than one minute custom report was produced by DrugMan. b) Total 55 drugs were listed in the report.



20	diphenhydramine	58	9.40	9.4310	29879	35711	+
		73	9.40	9.3960	796	1026	+
		165	9.40	9.3960	930	1417	+
		* Mat-Qual (Rt:9.39595) with <9-Hexadecenoic acid, methyl e					
* Quan. Result : 0.111081ug/mL							
21	diphenylpyraline	99	10.65	10.6472	329	361	U.A
		114	10.65	10.6560	57	55	U.A
		165	10.65	10.6385	68	59	U.A
		* Library Search is not performed(no '+' ion)					
* Quan. Result : -0.0033698ug/mL							
22	doxylamine	58	9.69	9.6935	12731	17559	+
		71	9.69	9.7022	12016	19699	+
		167	9.69	9.7022	3192	4171	+
		* Mat-Qual (Rt:9.70222) with <Ethanamine, N,N-dimethyl-2-[1					
* Quan. Result : 0.101491ug/mL							

Fig. 4 – Enlargement for the drug positive part from Fig. 3.

Diphenhydramine and doxylamine were detected and semi quantitated in blood sample (ID 36566) by DrugMan.

아니라 간이 정량까지 일련의 과정이 1분 이내에 이루어짐을 확인하였다. 비록 약물의 수는 전술한 일본의 프로그램에 비하여 적지만 실제 우리나라에서 가장 빈번하게 사용되는 약물을 대상으로 하였다는 점에서 의의가 있다고 생각된다. 또한 프로그램에 의한 간이 정량값의 정확도는  $\pm 10\%$  이상으로서 다소 높게 나타나 향후 생체시료에서 약물간의 간섭효과를 최대한 제거할 수 있는 전처리 방법의 개선 등 더욱 많은 연구가 필요할 것으로 사료되지만, 약물의 범위를 넓혀가면서 많은 약물을 데이터베이스로 프로그램에 입력시킨다면 생체시료에서 신속하고 정확한 약물물 분석결과를 도출할 수 있어 앞으로 법독성학 분야에서 유용할 것으로 기대된다.

## 결 론

1. 약물물 검출 시스템 확립을 위하여 목표약물 55종을 선별하였으며, 이들은 항우울제 14종, 항히스타민제 8종, 진정·수면제 5종, 마약성진통제 5종, 항정신병약 3종, 국소마취제 3종, 진해거담제 3종, 파킨슨치료제 3종, 비만치료제 3종 및 기타 약물류 7종이었다.

2. 생체시료(혈액)에서 55종 약물의 동시 검색 및 간이 정량분석이 가능한 프로그램 DrugMan을 자체 개발하였으며 파라미터로서 GC-MS분석에 따른 유지시간, 주요 프라그먼트 이온 및 검량선을 입력하였다.

3. 검량선 범위에 따라 55종 약물을 4그룹으로 나누어 작성하였는데, 대다수의 약물은 상관계수( $r^2$ )가 0.98 이상으로 직선성을 나타냈다.

4. 55종 약물을 0.5 mg/l 농도로 첨가한 후 추출하여 DrugMan을 적용하여 검색한 결과 49종의 약물이 양성으로 반응하여 0.90(90%)의 민감도를 보였다.

5. 29종 약물을 0.5 mg/l 농도로 첨가한 후 추출하여 DrugMan을 적용하여 정량하였더니 0.36~0.64 mg/l 범위로서 정확도는  $\pm 28\%$  이내였으며, 3일간 연속하여 반복 실험한 후 분석하였을 때 일간(inter-day) 정밀도는 모두 15% 이내였으며, 일내(intra-day) 정밀도는 zolpidem 등 7종의 약물을 제외하고 모두 15% 이

내였다.

6. 실제 번사자의 혈액을 대상으로 DrugMan을 적용한 결과 1분 이내에 약물의 검색 및 간이 정량이 가능하였으므로 향후 더 많은 약물을 데이터베이스로 DrugMan에 입력하여 활용한다면 법독성학에서 매우 유용할 것으로 판단되었다.

## 감사의 말

본 연구는 국립과학수사연구원 R&D 사업(과제명: 생체시료에서 법과학적 증거물질의 확정에 관한 연구)으로부터 재정적 지원을 받았기에 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Polettini, A. : Applications of LC-MS in Toxicology, Pharmaceutical Press (2006).
- 김은미, 김지현, 홍효정, 정수진, 인상환, 이종숙, 정진미, 이한선, 이상기 : 최근 3년간 국내 번사체 중 약물물 검출 유형(2007~2009)-약물물 검출 시스템 확립을 위한 목표 약물의 선별. 약학회지 **54**, 341 (2010).
- 최혜영, 이주선, 최상길, 김은미, 김재균, 김영운, 임미애, 정희선 : 음주운전자 275명 혈액 중 마약류 및 남용약물의 분석. 약학회지 **52**, 137 (2008).
- 인상환, 김지현, 홍효정, 이정아, 정진일, 민승식, 하정민, 최화경, 정희선 : LC/MS 및 direct MS에 의한 약물 분석 및 Library 구축(II), 27종의 수면진정제류. 국립과학수사연구소연보 **40**, 334 (2008).
- Baselt, R. C. : Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 8th ed, Biomedical Publications (2008).
- Molina, D. K. : Handbook of Forensic Toxicology for Medical Examiners, CRC Press (2010).
- Moffat, A. C., Osselton, M. D. and Widdop, B. : Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material, 3rd ed, Pharmaceutical Press (2004).
- Reference blood level list of therapeutic and toxic substances, <http://www.tiaft.org>.
- Trullols, E., Ruisanchez, I. and Rius, F. X. : Validation of qualitative analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry* **23**, 137 (2004).
- Kadokami, K., Tanada, K., Taneda, K. and Nakagawa, K. : Novel gas chromatography-mass spectrometry database for automatic identification and quantification of micropollutants. *Journal of Chromatography A* **1089**, 219 (2005).
- Ishida, T., Kudo, K., Naka, S., Toubou, K., Noguchi, T. and Ikeda, N. : Rapid diagnosis of drug intoxication using novel NAGINATA™ gas chromatography/mass spectrometry software. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 3129 (2007).

- 12) Kudo, K., Ishida, T., Hikiji, W., Hayashida, H., Uekusa, K., Usumoto, Y., Tsuji, A. and Ikeda, N. : Construction of calibration-locking database for rapid and reliable drug screening by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicol.* **27**, 21 (2009).
- 13) Kudo, K., Ishida, T., Hikiji, W., Usumoto, Y., Umehara, T., Nagamatsu, K., Tsuji, A. and Ikeda, N. : Pattern of poisoning in Japan: selection of drugs and poisons for systematic toxicological analysis. *Forensic Toxicol.* **28**, 25 (2010).
- 14) 김은미, 이주선, 최혜영, 임미애, 정희선 : 고상추출법 및 NCI-GC-MS를 이용한 소변 중 15종 벤조디아제핀계 약물 동시분석. *한국법과학회지* **8**, 24 (2007).
- 15) Peters, F. T. : Analytical Method Development and Validation, FBI Laboratory Symposium on Forensic Toxicology, Washington D.C., August 29-30 (2004).