Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 33, No. 3, 151-158, 2020
https://doi.org/10.5806/AST.2020.33.3.151

Analysis of ethyl glucuronide (EtG) in Hair for the diagnosis of chronic alcohol abuse of Korean

Bokyoung Gong, Young-Hoon Jo, Soyeong Ju, Ji-Sook Min, and Mia Kwon★
Forensic Chemistry Division, National Forensic Service, Wonju 26460, Korea
(Received February 13, 2020; Revised May 27, 2020; Accepted June 1, 2020)

한국인의 만성 알코올 중독 진단을 위한 모발에서 Ethyl Glucuronide (EtG) 분석법 연구

공보경 · 조영훈 · 주소영 · 민지숙 · 권미아★
국립과학수사연구원 법생화학부 법화학과
(2020. 2. 13. 접수, 2020. 5. 27. 수정, 2020. 6. 1. 승인)

Abstract: Alcohol, which can easily be obtained in the same way as ordinary beverages, is harmful enough to cause death due to excessive drinking and chronic alcohol intake, so it is important to maintain a proper amount of drinking and healthy drinking habits. In addition, the incidence of behavioral disturbances and impaired judgments that can be caused by chronic alcohol drinking of more than adequate amounts of alcohol is also significant. Accordingly it is very useful for forensic science to check whether the person involved is drunken or is alcoholism state in various accidents. Currently, in Korea, alcohol consumption is determined by detecting the level of alcohol or alcohol metabolism 'ethyl glucuronide (EtG)' in blood or urine samples. However, analysis of alcohol or EtG in blood or urine can only provide information about the current state of alcohol consumption because of a narrow window of detection time. Therefore, it is important to analyze the EtG as a long-term direct alcohol metabolite bio-marker in human hair and to investigate relationship between alcohol consumption and EtG concentration for the evaluation of chronic ethanol consumption. In this study, we established an analytical method for the detection of EtG in Korean hair efficiently and validated selectivity, linearity, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), matrix effect, recovery, process efficiency, accuracy and precision using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In addition, the assay performance was evaluated in Korean social drinker's hair and the postmortem hair of a chronic alcoholism. The results of this study can be useful in monitoring the alcohol abuse of Korean in clinical cases and legal procedures related to custody and provide a useful tool to evaluate postmortem diagnosis of alcoholic ketoacidosis in forensics.

요 약: 일반적인 음료처럼 주변에 손쉽게 구할 수 있는 알코올(술)은 남용 및 중독 섭취로 인하여 사망

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)33-902-5525 Fax : +82-(0)33-902-5933
E-mail : miakwon@korea.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons. org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에 이를 수 있을 만큼 유해한 물질이므로 적정량의 음주량을 유지하고 올바른 음주습관을 가지는 것이 중요하다. 뿐만 아니라 적정량 이상의 알코올을 장기간 섭취함으로써 야기될 수 있는 행동장애 및 판단장애로 인해 일어나는 사건 또한 상당하므로, 각종 사건, 사고에서 관련자가 음주 상태였는지, 그리고 관련자의 알코올 중독 여부를 확인하는 것이 법과학적으로 매우 중요하다. 현재 우리나라에서는 혈액이나 뇨에서 알코올 농도 혹은 알코올 대사체인 ethyl glucuronide (EtG)를 검출하는 것으로 알코올 섭취 여부를 판단하고 있다. 하지만 혈액이나 뇨에서 알코올이나 EtG를 검출하는 것은 검출 가능 시간이 짧기 때문에 비교적 최근 음주에 대한 정보만을 알 수 있다는 한계가 있다. 그러므로 오랫동안 알코올 대사체가 존재할 수 있는 모발에서 EtG를 검출하여, 장기간의 음주 여부와 주취 정도를 분석하고 알코올 중독 여부를 진단하고자 하였다. 이번 연구에서는 지속적인 음주를 하는 한국인의 모발 시료를 대상으로, 일관성 있으면서 효율적으로 모발에서 EtG를 추출 및 전처리 하는 방법을 정립하고 이를 LC-MS/MS를 이용하여 정성 정량하는 분석법을 확립하였으며, 평소 음주를 하는 사회 음주자의 실제 모발과 만성 알코올 중독이 의심되는 변사자의 모발을 대상으로 EtG를 분석해 보았다. 이 연구 결과는 한국인의 알코올 중독 진단 및 치료 과정에서 금주를 모니터링 하는 데 유용할 뿐만 아니라, 양육권 관련 법적 절차나 운전면허 재발급 및 갱신 등을 위한 절차에 근거로 응용할 수도 있을 것이다. 또한 변사자들의 알코올 남용에 대한 확실한 객관적 지표를 제공함으로써 보다 명확한 사인을 규명하는데 법과학적 응용 가능성이 기대된다.

Key words: chronic alcohol abuse, alcohol metabolites, ethyl glucuronide (EtG), hair

1. 서 론

알코올(술)은 가장 쉽게 구할 수 있는 중독성 약물로서 살인, 방화 등의 강력사건 뿐만 아니라 가정폭력, 성폭력과 같은 알코올 의존성의 범죄와 연관되어 있다. 국외의 사례로 독일 등의 유럽에서는 알코올 중독자 치료 효과를 모니터링하고 실제 음주 감소율을 점검하기 위하여 모발에서 알코올 대사체인 에틸글루쿠로나이드(ethyl glucuronide, EtG) 측정이 널리 쓰이고 있으며, 양육권 관련 법적 절차 및 음주운전으로 처벌된 피의자의 운전면허 갱신 등을 위한 조치로 모발에서 지속적인 EtG 측정을 의무화 한 곳도 있다.[1~5] 그리고 알코올 중독자가 음주에 의한 가정폭력을 행사하는 경우, 피해자인 아동 또는 가족을 격리시키고 일정 시간 동안 알코올 중독자의 금주를 진단하고 음주 정도를 추적 할 때 모발에서 EtG를 검출여부가 가족과의 격리 해제를 판단하는데 이용되고 있다.[6-10]

이처럼 국외에서는 상습적인 음주 운전자에 대한 규제 및 음주에 의한 가정폭력을 제재하기 위하여 피의자의 모발에서 알코올 대사체를 분석하고 음주 정도를 파악하는 등 활발한 연구가 진행되고 이를 실제 사건에 적용하는 사례가 많이 있으나,[11-13] 국내에서는 알코올 남용에 대한 확실한 증거를 제시할 수 있는 객관적 지표에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 신체적으로 한국인은 외국인과는 음주습관이나 알코올 대사효소 등에 차이가 있으므로 한국인의 알코올 남용 및 중독 판별을 하기위해서, 한국인의 모발에서 알코올 대사체인 EtG를 추출하고 분석하는 시험법, 유효화 및 알코올 섭취 정도에 따른 정량분석 등의 기준 확립을 위한 연구가 요구된다.

현재 국립과학수사연구원에서는 단순 음주운전건과 관련하여 의뢰되는 혈액과 뇨, 그리고 부검의뢰 되는 변사자의 혈액이나 안방수 같은 체액 및 조직 등 생체시료에서 알코올 혹은 알코올 대사체인 EtG를 검출하는 것으로 알코올 섭취 여부를 판단하고 있다. 하지만 혈액이나 뇨, 안방수 같은 체액 및 조직 생체시료에서 알코올이나 알코올 대사체를 검출하는 것은 시료의 부패 가능성이 있으며 알코올 대사체가 체내에 존재할 수 있는 검출 가능 시간이 짧기 때문에 비교적 최근 음주에 대한 정보만을 수 얻을 수 있다는 한계가 있다.[14-20] 그러므로 본 연구는 안정하고 부패에 영향을 받지 않으며 오랫동안 알코올 대사체가 존재할 수 있는 생체 시료인 모발에서 EtG를 검출하여, 장기간의 음주 여부 및 알코올 남용과 중독 여부를 진단 할 수 있도록 LC-MS/MS를 이용한 시험분석법을 확립하고자 하였다. 또한 이 시험분석법을 토대로 일상생활에서 지속적인 음주를 하는 한국인 사회음주자와 알코올 중독 가능성이 높은 변사자의 모발에서

EtG를 분석함으로써 만성 알코올 남용 진단 및 사인 분석을 위한 법과학적 지표로 활용 가능성을 보기 위해 본 연구가 진행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 모발시료

본 연구의 시험분석법 확립을 위한 blank 모발 시료로는 음주를 하지 않는 13세 미만의 어린이를 대상으로 펌이나 염색 등의 화학처리가 안된 모발을 임의로 제출 받아서 사용하였다. 일주일에 평균 소주 5 병 이상 지속적으로 음주를 하는 한국인 사회음주자 2 명의 모발과 국립과학수사연구원 중앙법의센터에서 시행한 부검 중 만성 알코올 중독 혹은 알코올 남용 추정자의 모발을 확보하여 실험을 준비하였다. 모든 모발 시료는 정수리 뒤쪽 두피에서 3 cm에 해당하는 모발을 채취하여 실험하였다(IRB 승인번호 906-180118-HR-001-02).

2.2. 시약 및 재료

EtG (ethyl glucuronide)와 정량분석을 위한 내부표준물질(IS, internal standard)로 사용된 d5-EtG (penta-deuterated EtG, IS)는 Medichem diagnotics (Steinenbonn, Germany)사에서 구입하였으며, 그 외 formic acid 98-100 % (Merck KGaA. Darmstadt, Germany), DI water, methanol (Avantor, PA, USA), acetonitrile (Avantor, PA, USA) 등의 용매는 HPLC 용 특급시약이 사용되었다. 모발 전처리 과정에 사용되는 필터로 Empty SPE catridge (Agilent, with two 20 μm frits) 필터컬럼을 사용하였다.

2.3. 사용 기기 및 분석조건

모발에서 EtG 확인 및 정량분석을 위해 사용된 LC-MS/MS 기기는 Thermo Scientific TSQ EnduraTM triple quadrupole mass spectrometer (Thermo fisher Scientific, Waltham, MA, USA)가 연결된 Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) HPLC를 사용하였다. HPLC는 binary pump와 auto sampler, 그리고 temperature-controlled column oven이 장착되어 있고, mass spectrometer에는 heated electro-spray ionization (H-ESI)가 장착되어 있다. 모발에서 효과적인 EtG 검출을 위해 HypercarbTM column (100 mm × 2.1 mm, 5.0 μm particle size; Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였으며, 기기 제어 및 데이터 분석은 분석프로그램 Xcalibur software (version 3.0, Thermo fisher Scientific, USA)을 이용하였다. 이동상은 A용매로 0.05 % aqueous formic acid DI water와 B용매로 100 % acetonitrile을 사용하였다. 주입량(injection volume)은 20 μL로 진행하고, 이동상 속도는 0.4 mL/min로 10 % B용매로 시작하여 13분간 gradient mode를 적용하였다(*Table* 1). Column oven 온도는 50 °C로 유지하였다.

Table 1. LC mobile phase composition over time

Total time (min)	B solvent (%)	A solvent (%)
0.00	10	90
3.00	10	90
6.00	55	45
7.00	90	10
9.00	90	10
10.00	10	90
13.00	10	90

Table 2. MRM parameters for EtG

Compound	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	RF Lens	Collision energy (eV)
EtG	221	75	87	17
EtG-d5	226	75	86	17

검출 이온은 negative mode에서 multiple reaction monitoring (MRM)을 실행하였다. 이온 소스는 negative spray voltage static 2500V, ion transfer tube temperature 315 °C, vaporizer temperature 400 °C로 설정되었다. 실험을 통해 collision gas pressure는 1.5 mTorr로, dwell time은 100 msec으로 셋팅되었다. *Table* 2에서 MRM transition ions, collision energy 및 RF lens 값을 보여주고 있다(*Table* 2).

2.4. 표준시료 및 QC 시료

EtG와 d5-EtG는 DI water에 녹여 0.01 mg/mL 농도의 stock solution을 제조하였고, 이를 DI water로 희석한 후 모발 시료에 spike하여 표준시료 및 QC 시료를 만들었다. 검정(calibration)용 표준시료는 50 mg의 모발에 EtG 50 μL를 spike하여 EtG 최종 농도가 5, 10, 15, 30, 50, 100, 200, 500 pg/mg이 되도록 EtG 표준용액을 제조하였고, 모발 QC 시료는 같은 방법으로 모발 추출 용액에 들어있는 EtG의 최종 농도가 5, 50, 400 pg/mg이 되도록 만들었다. 내부표준물질인 d5-EtG는 DI water로 희석하여 100 pg/μL로 제조하고 모

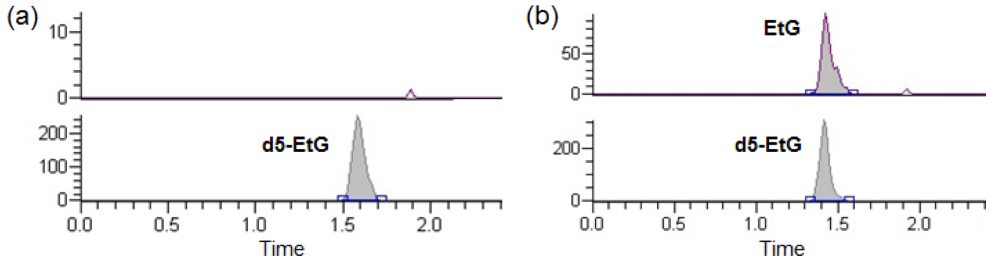

Fig. 1. LC-MSMS MRM chromatograms m/z 221/75 (target, top) of EtG (50 pg/mg) and 226/75 (IS, bottom) of d5-EtG (100 pg/mg) in a blank hair sample. (a) A blank hair sample was analyzed with only IS (left). (b) A blank hair sample was analyzed with IS and EtG (right).

발 50 mg에 d5-EtG 50 μL를 spike 하여 사용하였다.

2.5. 모발 전처리 및 실험방법

모근으로부터 3 cm 길이의 모발을 준비하여 모근을 제거하였다. SPE catridge 필터컬럼에 모발 50 mg을 넣고 아세톤(acetone)과 DI water를 이용하여 3번씩 번갈아가며 vortex mixing하여 세척한 후, 질소 가스를 불어주어 건조시켜 주었다. 모발이 들어있는 SPE catridge 필터컬럼에 메탄올(methanol) 3 mL를 넣어 한 번 헹구어(rinsing) 주었다. SPE catridge 필터컬럼의 3분의 2정도가 되도록 메탄올을 채운 뒤, 가위로 모발을 약 1 mm 이하 길이가 되게 잘게 잘라주고 마그네틱 바를 SPE catridge 필터컬럼 안에 넣은 후 메탄올로 한 번 더 rinsing 해 주었다. SPE catridge 필터컬럼 용출 부분을 마개로 막고, 모발이 들어있는 SPE catridge 필터컬럼에 DI water 2 mL와 내부표준물질인 d5-EtG(100 pg/μL 수용액) 50 μL를 넣어주고(이 때 검정곡선을 그리기 위한 calibration 용액을 제조하는 경우 내부표준물질 d5-EtG와 함께 calibration 해당 농도에 상당하는 EtG 표준용액을 함께 넣어준다), 실온(25 °C)에서 16 시간 동안 stirring하면서 incubation 해주어 모발에 있는 EtG를 추출 해 주었다. 16시간 후 SPE catridge 필터컬럼 안 추출용액을 테스트 튜브에 필터하고, 질소농축기(EYELA MGS-2200E)를 이용하여 40 °C에서 질소 가스로 추출용매를 날려 건조시켜 주었다. 마지막으로 건조시킨 테스트 튜브에 0.05% formic acid 100 μL를 넣어 건조된 시료를 완전 용해시켜 준 뒤, LC-MS/MS에 주입하여 측정하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. 유효화 시험(Validation test)

선택성(selectivity) 확인을 위해 어린이로부터 채취한 blank 모발 시료를 이용하였다. blank 모발 시료에 내부표준물질(IS)인 d5-EtG를 넣어준 것(*Fig.* 1(a))과 blank 모발 시료에 d5-EtG와 표준물질 EtG도 함께 넣어준 모발 시료(*Fig.* 1(b))를 분석하여, 모발 매트릭스(matrix)에서 타겟물질 EtG와 내부표준물질 d5-EtG의 분석을 방해하는 성분이 있는지 그리고 EtG가 선택적으로 검출되는지를 살펴보았다. 그 결과 전체 blank 모발 시료에서 EtG와 d5-EtG(IS)의 RT에 영향을 주는 특이 간섭물질 없이 EtG가 선택적으로 검출되는 것을 확인할 수 있었다(*Fig.* 1).

Blank 모발 50 mg 시료에 IS d5-EtG 50 μL (100 pg/μL)를 넣어주고 EtG 표준용액 농도가 5, 10, 15, 30, 50, 100, 200, 500 pg/mg이 되도록 calibration 용 시료를 만들어 분석한다. 8-포인트에 대한 검량선(calibration curve)을 구하고 전체 5 ~ 500 pg/mg 농도 범위 구간에서 $r^2 > 0.999$로 직선성(linearity)을 확인하였다(*Fig.* 2).

분석 검출 한계와 정량분석 한계를 추정하기 위해 EtG 5 pg/mg 표준용액을 spike 한 blank 모발 7 개를 반복 실험하였다. 그 결과, 검출한계 LOD (limit of

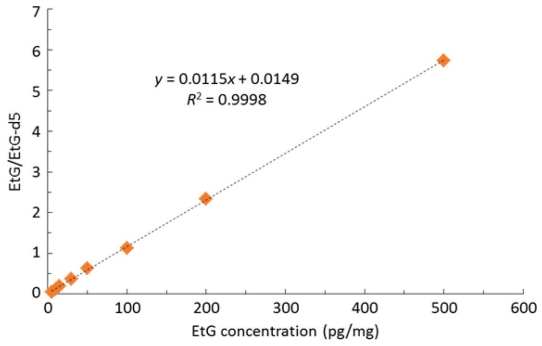

Fig. 2. EtG calibration curve (concentration: 5, 10, 15, 30, 50, 100, 200, 500 pg/mg).

Table 3. Summary of validation data for matrix effect, recovery and process efficiency (①; EtG 5, 50 and 400 pg/mg neat standards, ②; The extracts of three blank samples spiked with EtG(5, 50 and 400 pg/mg) before extraction, ③; The extracts of three blank samples spiked with EtG (5, 50 and 400 pg/mg) after extraction

Analyte	Concentration (pg/mg)	Matrix effect (%) (n=3)	Recovery (%) (n=3)	Process efficiency (%) (n=3)
		③/①	②/③	②/①
Ethyl glucuronide	5	97.1	99.5	96.2
	50	104.5	97.6	101.3
	400	100.3	100.2	100.2

detection)는 3SD/s (기울기) = 약 1.5 pg/mg, 정량한계 LOQ (limit of quantification)는 3SD/s (기울기) = 약 5.0 pg/mg 임을 구하고, CV = RSD (relative standard deviation) = (SD/Mean) × 100 = 10.25 %로 LOQ 평균 정확도가 20 % 이내를 유지함을 확인하였다.

모발에서 EtG를 검출하는 분석법의 매트릭스 영향(matrix effect), 회수율(recovery), 과정 효율성(process efficiency)을 살펴보기 위해, 실험 샘플 세 그룹을 준비하였다. 그룹1(①) EtG 표준용액, 그룹2(②) blank 모발에 EtG를 첨가 후 추출한 용액, 그리고 그룹3(③) blank 모발 먼저 추출 후 EtG를 첨가한 용액이다. 이때 모발에 첨가된 EtG 용액은 세 가지 농도 low (5 pg/mg), medium(50 pg/mg), high (400 pg/mg)로 각 3회씩 반복 실험하여 수행되었다. 매트릭스 영향(matrix effect) = ③/①, 회수율(recovery) = ②/③, 과정 효율성(process efficiency) = ②/① 각 그룹의 비로 그 값을 구할 수 있으며, 이 값들은 *Table* 3에 나타내었다(*Table* 3).

마지막으로 이 분석법의 신뢰성 있는 검증을 위한 유효화 시험으로 정확도(accuracy)와 정밀도(precision)를 보고자 하였다. 세 가지 QC 시료로 EtG 농도 low (5 pg/mg), medium (50 pg/mg), high (400 pg/mg)를 준비하여 분석법의 전 과정을 하루에 같은 조건 하에서 각 농도 당 3회씩 반복 측정하고, 동일한 방법 및 조건하에서 일주일 간격으로 3일 반복 분석하여 Bias(%) = (측정값-이론값)/이론값 × 100 값과 CV(coefficient of variation) 값으로 정확도(accuracy)와 정밀도(precision)를 평가하였다. 그 값은 *Table* 4 및 *Table* 5에 나오는 것처럼 각 농도에서 CV값 15 % 미만 (LOQ 근처 농도에서는 20 % 미만), bias ±15 % 미만 (LOQ 근처 농도에서는 20 % 미만)이므로 모든 농도에서 본 시험분석 방법의 유효성이 신뢰할 만한 정확도(accuracy)와 정밀도(precision)를 충족함을 알 수 있었다(*Table* 4, 5).[4, 20,21]

Table 4. The intra-day run precision was determined by analyzing, on the same day and in the same conditions, three aliquots of each type of sample (n = 3, Low QC: 5 pg/mg, Med QC: 50 pg/m, High QC: 400 pg/mg)

Ethyl glucuronide		Concentration (pg/mg)		
		Low QC 5.00	Med. QC 50.0	High QC 400
Intra run 1 (n = 3)	Mean	5.27	49.88	396.41
	SD	0.23	3.96	10.18
	CV, %	4.43	7.94	2.57
	Bias, %	5.41	0.23	0.90
Intra run 2 (n = 3)	Mean	5.06	50.45	369.61
	SD	0.23	5.07	12.68
	CV, %	4.57	10.05	3.43
	Bias, %	1.17	0.91	7.60
Intra run 3 (n = 3)	Mean	5.64	50.49	400.76
	SD	0.59	1.75	2.76
	CV, %	10.46	3.47	0.69
	Bias, %	12.81	0.98	0.19

SD: standard deviation
CV: coefficient of variation

Table 5. The inter-day run precision data were obtained from analyses of nine replicates of the samples performed on three different days (n = 9, Low QC: 5 pg/mg, Med QC: 50 pg/m, High QC: 400 pg/mg)

Ethyl glucuronide		Concentration (pg/mg)		
		Low QC 5.00	Med. QC 50.0	High QC 400
Inter run (n = 9)	Mean	5.32	50.28	388.93
	SD	0.29	0.34	16.87
	CV, %	5.53	0.68	4.34
	Bias, %	6.46	0.55	2.77

SD: standard deviation
CV: coefficient of variation

3.2. 실험 결과

유효성이 검증된 시료 전처리법과 시험분석법을 실

제 음주자의 모발과 알코올 중독으로 추정되는 사망자의 모발에 적용하여 알코올 대사체인 EtG가 검출되는지 살펴보고자 하였다. 모발에서 EtG 분석은 시료 채취가 비교적 용이하고 오랜 시간 안정하게 모발에 존재할 수 있다는 장점이 있어 만성 알코올 중독 여부를 진단하는데 유용하다. Society of Hair Testing (SoHT)에서 제시하는 cut-off 값에 의하면, 모발에서 EtG 농도가 7 pg/mg 미만이면 금주자(abstinence), 7 pg/mg 이상 30 pg/mg 미만이면 사회음주자(social drinker), 30 pg/mg 이상일 때 만성 알코올 중독자(chronic drinker)로 분류하고 있다.[22]

일주일에 평균 음주량이 소주 5병(소주량 기준)으로 지속적으로 음주를 하는 한국인 모발에서 EtG를 분석하였다. 하루에 1번 머리를 감으며 평소에 헤어 스타일링 제품을 사용하지 않고 염색이나 탈색, 퍼머를 하지 않은 모발 위주로 음주량 이외 외부 환경적인 요소에 의한 영향이 최소화 될 수 있는 두 명을 선별하여 분석하였다. 모발에서 EtG 농도는 각각 23.80 pg/mg, 20.53 pg/mg으로 SoHT에서 제시한 모발에서의 EtG 농도 값이 7 pg/mg 이상 30 pg/mg 미만에 해당하는 사회음주자(social drinker)로 분류됨을 확인할 수 있었다(*Table* 6). 또한 음주자와 알코올 사용장애를 선별하는데 사용되는 한국판 알코올 사용장애 선별검사(AUDIT-K)를 실시하였는데, 대상자의 설문조사 AUDIT-K 점수에 따라, 0~9점은 적정음주군, 10~19점은 위험음주군, 20점 이상은 알코올 사용장애 추정군으로 규정된다. 그 결과 여자는 AUDIT-K 23점으로 알코올 사용장애 추정군으로, 남자는 AUDIT-K 10점으로 위험음주군으로 분류되는 것으로 보아 모발에서 EtG 농도 값으로부터 두 명 모두 사회음주자(social drinker)로 분류된 것과는 상이한 결과를 보였다. 음주자들의 작성한 AUDIT-K 점수는 지원자들의 주관적인 기준에 의한 것으로 개개인별로 주관적인 점수 차이가 있을 수 있으므로 AUDIT-K 점수와 모발에서의 EtG 농도 값의 절대적인 결과 값 비교를 하기에는 무리가 있어 보였다.

변사체의 경우 심각한 부패 등으로 인해 알코올이 생성되기도 하므로 음주여부 결과 해석에 어려움이 있는 경우가 많다. 기존의 감정방법으로는 특히 만성 알코올 중독 및 알코올성 케토산증을 판단하는데 있어 알코올 남용에 대한 해석과 사망원인에 대한 명확한 법과학적 지표로 제시되는데 한계가 있었다. 그러므로 수개월에 걸쳐 음주에 대한 추적이 가능하고 사체 부패에 큰 영향을 받지 않는 모발 시료를 대상으로 확립한 LC-MS/MS 분석법을 적용하여 알코올 대사체 EtG를 검출하고자 하였다. 국립과학수사연구원에 부검의뢰 되는 대상자 중 알코올 중독이 의심되는 변사체 2구를 대상으로 그 모발을 수집하여 분석하였다. Case 1은 만성 알코올 중독 이력이 있는 40대 중반 여성으로 우울증 및 알코올 중독 증상과 당뇨약을 복용 중이었다. 알코올 중독 및 남용에 대한 사건 기록과 이력이 있는 경우로 모발에서 EtG 농도가 1,244 pg/mg 이었다(EtG 표준시료 농도 15, 30, 50, 200, 1000, 3000 pg/mg를 이용하여 검량곡선을 그려 변사체 모발에서의 EtG 농도를 계산하였다). Case 2는 60대 일용직 노동자로 식사를 거의 하지 않으며 술을 자주 마셨고, 전날 아침에도 지인들과 술을 마신 사건 기록이 있었다. 술을 자주 마시는 습관 이외에는 사건 기록에 특이사항이 없는 경우로 모발에서 EtG 농도가 54 pg/mg 검출되었다. Case 1, 2 모두 SoHT에서 제시하는 EtG 농도가 30 pg/mg 이상에 해당하는 만성 알코올 중독자(chronic drinker)에 해당하며 사인 또한 만성 알코

Table 6. Information and the results of EtG for Korean social drinkers

Case	Gender	Age (years)	Height (cm)/ Weight (kg)	Average alcohol consumption per 1week (based on Soju)	AUDIT-K score	EtG (pg/mg)
1	Woman	35	160/55	5 bottle	23	23.80
2	Man	57	168/73	5 bottle	10	20.53

Table 7. Information and the results of EtG for alcoholics autopsy case

Case	Gender	Height (cm)/Weight (kg)	Medical history and Autupsy records	EtG (pg/mg)
1	Woman	158/50	Alcoholism. Depression. Diabetes medication. Drinking on an empty stomach.	1,244
2	Man	170/63	Rarely eats. Drinking every day.	54

올 중독이었다(*Table* 7).

4. 결 론

본 연구의 목표는 알코올의 지표물질인 ethyl glucuronide (EtG)를 모발에서 검출하는 분석법을 확립하는 것으로서, EtG를 검출하기 위한 분석기기로 LC-MS/MS를 선택하여 한국인의 모발 전처리 및 분석조건을 확립하였다. 알코올 섭취를 배제할 수 있는 어린이의 모발을 blank 시료로 활용하여, 선택성(selectivity), 직선성(linearity), 매트릭스 영향(matrix effect), 회수율(recovery), 과정 효율성(process efficiency)를 확인하는 시험 및 정확도(accuracy), 정밀도(precision) 시험을 수행하였으며, 유효화 단계를 거친 시험법의 감도는 LOD 1.5 pg/mg, LOQ 5.0 pg/mg을 나타내었다. 이렇게 유효성이 확립된 EtG 정성정량 분석법을 바탕으로 실제 지속적으로 음주를 해온 한국인 사회음주자와 알코올 중독 가능성이 높은 변사자의 모발에서 EtG 농도를 분석하여 SoHT에서 제시하는 cut-off 분류기준에 따라 각각 사회음주자와 만성 알코올 중독자로 분류되는 것을 최초로 제시하였으며 이러한 연구 결과는 추후 만성 알코올 남용 진단과 사인 분석을 위한 법과학적 지표로서 새로운 활용 가능성을 보여준다.

모발은 오랜 시간이 지나도 안정한 샘플로 샘플 채취가 용이하며 취급 및 저장 측면에서도 편리할 뿐만 아니라 장기간에 대한 정보를 줄 수 있다는 측면에서 진단 샘플로서 많은 이점을 지닌다. 혈액이나 뇨 같은 생체시료와는 다르게, 모발에서의 알코올 대사체 EtG 분석은 수개월에 걸친 장기간 음주에 대한 정보를 제공하므로 법과학적인 측면에서 한국인을 대상으로 알코올 중독 및 남용 여부를 판별하는 감정기법에 활용될 수 있다. 실제 지속적인 음주를 하는 한국인의 모발로부터 EtG를 성공적으로 검출할 수 있는 것을 확인하였고, EtG 농도가 SoHT에서 제시하는 사회 음주자(social drinker)의 범주에 들어가는 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 좀 더 많은 사회 음주자들을 대상으로 음주 양이나 빈도 등에 대한 정보와 함께 검출된 EtG 양과의 상관관계를 확인한다면 한국인의 음주 알코올 지표를 구축하는데 기여할 수 있을 것이다. 일반적으로 변사체의 사인을 추정하기 위해서 다양한 시료의 분석이 이뤄지는데, 알코올 중독자로 추정이 된다 하더라도 사망 후의 혈중알코올 농도 자체가 음성 수치인(0.010 % 미만)인 경우가 많고, 변사체 부패의 영향으로 혈중알코올이 검출되기도 하므로 사인에 대한 해석이 어려운 경우가 많다. 이 때, 모발에서 EtG를 분석하면 사망 전 수개월 동안의 음주여부 및 정도를 확인함으로써 사망 원인을 규명하는데 법과학적인 지표로 충분히 활용될 수 있을 것으로 보여진다.

현재로서는 EtG 농도로부터 정확한 음주량을 확인할 수는 없으나, EtG 농도는 음주량에 비례하므로 추후 다양한 음주량을 가지는 좀 더 많은 사람들을 대상으로 모발에서 EtG 검출 농도를 분석함으로써 평소 음주량에 따른 EtG 검출 농도 값을 데이터화 해 놓는다면, 알코올 중독자 추정 모발에서 검출되는 EtG 농도 값은 음주량을 추정할 수 있는 객관적인 지표로 사용될 수 있을 것이다. 이런 추정은 외국에서 활용하는 것처럼 알코올 중독 치료 과정에서 환자의 개선을 추적하거나 습관적 음주 운전자의 운전면허 허가 및 갱신여부, 상습 음주 폭행 등의 판단근거 가능성을 제시하고 심신미약을 주장하는 범죄자의 음주습관을 추정하는데 활용할 수 있게 된다. 또한 부검의뢰 되는 건 중 알코올 중독이 의심되는 변사체의 모발로부터 EtG 농도를 측정하여 알코올성 케토산증에 대한 신뢰할 수 있는 지표로 마련하여 변사자의 사인을 밝히는데 충분히 유의미한 자료로 쓰일 수 있을 것이다. 이는 결국 새로운 법과학 감정 영역의 확대와 더불어 좀 더 명확한 법과학적인 정보를 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구과제는 국립과학수사연구원 과학수사감정기법 연구개발사업(2018-법화학-01)의 일환으로 진행되었으며 이에 감사 드립니다.

References

1. P. Kintz, A. Salomone and M. Vincenti, 'Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology', 1st Ed., Academic Press, 2015.
2. C. L. Crunelle, M. Yegles, A. L. van Nuijs, A. Covaci, M.D. Doncker, K. E. Maudens, B. Sabbe, G. Dom, W. E. Lambert, P. Michielsen and H. Neels, *Drug Alcohol Depend.*, **134**, 1-11 (2014).
3. A. Salomone, M.R. Baumgartner, T. Lombardo, E. Alladio, D. Di Corcia and M. Vincenti, *Forensic Sci. Int.*, **267**, 60-65 (2016).
4. Society of Toxicological and Forensic Chemistry, 'Guide-

lines and Recommendations of the GTFCh : Appendix B-Requirements for the validation of analytical methods', **76**(3), 185-208 (2009).
5. Society of Toxicological and Forensic Chemistry, 'Guidelines and Recommendations of the GTFCh : Appendix C-Requirements for the analysis of hair samples' , **76**(3), 209-216 (2009).
6. R. Agius, T. Nadulski, H. G. Kahl and B. Dufaux, *Forensic Sci. Int*., **215**, 32-37 (2012).
7. W. Schubert and R. Mattern, 'Beurteilungskriterien: Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik (German Driving Licence Regranting Guidelines)', Kirschbaum Verlag Bonn, Germany, 178, 2009.
8. G. Tassoni, D. Mirtella, M. Zampi, L. Ferrante, M. Cippitelli, E. Cognigni, R. Froldi, and M. Cingolani, *Forensic Sci. Int*., **244**, 16-19 (2014).
9. C. Stramesi, M. Polla, C. Vignali, A. Zucchella and A. Groppi, *Forensic Sci. Int.,* **176**, 34-37 (2008).
10. L. Politi, L. Morini, F. Leone and A. Polettini, *Addiction*, **101**(10), 1408-1412 (2006).
11. I. Kerekes and M. Yegles, *Ther. Drug Monit.,* **35**, 527-529 (2013).
12. F. Pragst and M. A. Balikova, *Clin. Chim. Acta.,* **370**, 17-49 (2006).
13. L. Morini, A. Zucchella, A. Polettini, L. Politi and A. Groppi, *Forensic Sci. Int*., **198**, 23-27 (2010).
14. B. M. R. Appenzeller, R. Agirman, P. Neuberg, M. Yegles and R. Wennig, *Forensic Sci. Int.*, **173**, 87-92 (2007).
15. R. Agius and P. Kintz, *Drug Test. Anal.*, **2**(8), 367-376 (2010).
16. C. L. Crunelle, D. Cappelle, M. Yegles, M. D. Doncker, P. Michielsen, G. Dom, A. L. van Nuijs, K. E. Maudens, A. Covaci and H. Neels, *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 2019-2025 (2016).
17. H. Kharbouche, M. Faouzi, N. Sanchez, J. B. Daeppen, M. Augsburger, P. Mangin, C. Staub and F. Sporkert, *Int. J. Legal. Med.*, **126**, 243-250 (2012).
18. R. Agius, T. Nadulski, H. G. Kahl and B. Dufaux, *Forensic Sci. Int.,* **218**, 10-14 (2012).
19. M. Hastedt, M. Buchner, M. Rothe, R. Gapert, S. Herre, F. Krumbiegel, M. Tsokos, T. Kienast, A. Heinz and S. Hartwig, *Forensic Sci. Med. Pathol.,* **9**, 471-477 (2013).
20. V. Pirro, D. D. Corcia, F. Seganti, A. Salomone and M. Vincenti, *Forensic Sci. Int.*, **232**, 229-236 (2013).
21. F. T. Peter, O. H. Drummer and F. Musshoff, *Forensic Sci. Int.*, **165**, 216-224 (2007).
22. Society of Hair Testing, http://www/soht/org/consensus, Assessed May 2019.

Authors' Positions

Bokyoung Gong : Forensic scientist
Young-Hoon Jo : Forensic scientist
Soyeong Ju : Researcher
Ji-Sook Min : Director
Mia Kwon : Director