

Method validation of detecting ethanol metabolites (EtG, EtS) in post-mortem spleen

Soo-Min Kim, Young-Hoon Jo, Song-Hie An, Woo-Jae Lee, and Mia Kwon[★]

Department of Forensic Chemistry, National Forensic Service, Ipchunro 10, Wonju 26460, Korea

(Received March 18, 2021; Revised April 13, 2021; Accepted April 28, 2021)

비장 조직에서 에탄올 대사체(EtG, EtS)를 검출하는 방법과 유효성 확인

김수민 · 조영훈 · 안성희 · 이우재 · 권미아[★]

국립과학수사연구원 화학과

(2021. 3. 18. 접수, 2021. 4. 13. 수정, 2021. 4. 28. 승인)

Abstract: Ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulfate (EtS), which are ethanol metabolites, are direct indicators of ethanol intake; they have been studied in a variety of biological samples in forensic science. It is necessary to analyze ethanol metabolites to determine whether the ethanol detected in autopsy cases was due to alcohol consumption before death or due to the ethanol produced from post-mortem decay. In general, EtG and EtS are detected in the blood together with ethanol; however, it may be difficult to secure blood depending on the extent of decay. Therefore, the aforementioned method should be replaced by detecting the ethanol metabolites using tissue biological samples. In this study, we determined the optimal experimental conditions for detecting EtG and EtS from spleen samples using Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). Herein, the test method was validated, and an analysis method was applied to the actual autopsy cases.

요약: 에탄올 대사체인 에틸글루쿠로나이드(ethyl glucuronide, EtG)와 에틸설페이트(ethyl sulfate, EtS)는 에탄올 섭취의 직접적인 지표물질로서 여러 생체 시료에서 법과학적으로 다양하게 연구되고 있다. 부검 변사자에게서 검출된 에탄올이 사망 전 음주에 의한 것인지 사후 부패에 의해 생성된 에탄올인지 판단하기 위해서는 에탄올 대사체를 분석할 필요가 있다. 일반적으로 혈액에서 에탄올과 함께 EtG, EtS를 검출하고 있지만 부패 상황에 따라 혈액을 확보하는 것이 어려우므로 조직 생체시료를 이용해 에탄올 대사체를 검출함으로써 이를 대체해야 한다. 본 연구에서는 조직 중에서 비장을 선택하여 LC-MS/MS를 이용해 EtG, EtS를 검출하였으며 시험법이 적합한 방법인지를 증명하기 위해 밸리데이션을 수행하여 법과학적 감정에 사용할 수 있는 분석법을 완성하고 실제 부검 사례에 적용하였다.

Key words: ethanol, metabolite, ethyl glucuronide, ethyl sulfate, spleen

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)33-902-5510 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.

1. 서 론

에틸글루쿠로나이드(Ethyl glucuronide, EtG)와 에틸 설페이트(Ethyl sulfate, EtS)는 에탄올(ethanol, EtOH)의 비산화반응에 의한 마이너 대사체로서 EtG는 간에서 UDP-glucuronosyltransferase 효소에 의해, EtS는 sulfotransferase에 의해 생성된다.^{1,2} 에탄올의 직접적인 반응으로 생성되므로 에탄올의 섭취량을 알 수 있으며, 생체시료에서 혈중알코올농도보다 더 오래 검출되므로 법과학에서 음주뺑소니, 하강기판단(운전과 혈액 채취 시간까지 혈중알코올농도 상승기이므로 운전 시점에서는 더 낮은 농도라고 주장), 사고 후 음주(hip-flask, 사고 후 술을 마시고 사고 당시에는 음주상태가 아니었다는 주장), 외부오염(구강세정제 사용, 에탄올 포함된 소독솜의 사용으로 알코올이 검출되었다고 주장) 등의 지능형음주범죄를 판단하는 주요 지표물질로 활용되고 있다.^{3,4,5,6} 또한 부검 건에서도 변사자의 정확한 음주 판단과 음주 후 사망 시간을 추정하거나, 알코올중독 같은 사망 전의 음주량 파악 등에서도 에탄올 대사체가 이용될 수 있어 최근 국내에서도 연구가 활발하게 진행되고 있다.⁷

에탄올은 사망 후 사체의 부패에 의해서도 생성된다. 변사자의 사망 전 음주에 의한 에탄올인지 사후 부패에 의해 생성된 에탄올인지 구별하기 위한 해석은 일반적으로 혈액에서 에탄올과 함께 나타나는 부패지표물질인 노르말-프로판올(*n*-propanol, *n*-PrOH)과 노르말-부탄올(*n*-butanol, *n*-BuOH)로 하고 있다. 하지만 EtOH/*n*-PrOH 비가 광범위하게 나타나 음주 여부를 판단하는데 한계가 있어 최근에는 에탄올 대사체인 EtG, EtS를 검출하여 사망 전 정확한 음주여부를 확인하는 필요성이 대두되고 있다.^{8,9} 혈액에서 EtG, EtS를 검출하는 연구는 본 연구원에서 이미 보고되었으나², 부패 사체에서는 시간과 온도, 환경 등 부패 영향에 따라 혈액 시료를 확보할 수 없는 상황이 대부분이다. 이럴 경우에는 근육, 비장과 같은 조직 생체 시료에서 에탄올 농도를 확인함과 동시에 EtG, EtS를 검출하여야 한다.

본 연구에서는 조직 생체시료에서 에탄올 대사체를 검출하는 방법을 확립하기 위해 근육과 비장을 선택하여 실험을 진행하였으며 두 조직 중에서 보다 적합한 조직으로 비장을 선택하였다. 그리고 직선성, 회수율, 정확도 등을 통해 LC-MS/MS를 이용한 시험분석법과 유효성을 검증하였다. 또한, 실제 부패된 비장의 사례를 통한 분석 결과 값으로 음주와 부패에 대한

해석을 해보았다.

2. 재료와 방법

2.1. 조직 시료

본 연구에 사용된 모든 조직 시료는 당 연구원의 부검 변사자에서 알코올농도를 확인하기 위해 채취되어 의뢰된 것으로 국립과학연구원 생명윤리위원회에서 승인된 검체를 사용하였다(국립과학수사연구원 IRB No. 906-200114-BR-003-01). 공시료 (blank)는 음주를 하지 않은 변사자의 조직을 사용하였으며, 실제 사례로 사용된 비장은 부패로 인해 혈액 채취가 불가능한 변사자의 비장이었으며, 모든 조직 시료는 4 °C 냉장 보관 후 실험하였다.

2.2. 시약 및 재료

EtG와 내부표준물질(Internal standard, IS)인 EtG-d₅는 Medichem diagnostics (Steinenborn, Germany)사에서 구입하였고 EtS와 EtS-d₅(IS)는 Lipomed (Arllesheim, Switzerland)에서 구입하였다. 용매로는 포름산(formic acid 98 ~ 100 %, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 메탄올(methanol, Avantor, PA, USA), 아세토니트릴(acetonitrile, Avantor, PA, USA) 등의 HPLC 용 시약을 사용하였다.

2.3. 분석기기 및 조건

조직에서 EtG, EtS 분석을 위한 LC-MS/MS 기기로는 열 전자분무이온화 소스(heated electrospray ionization, H-ESI)가 장착된 Thermo Scientific TSQ Endura™ triple quadrupole mass spectrometer (Thermo fisher Scientific, Waltham, MA, USA)와 컬럼 오븐(temperature-controlled column oven), 바이너리 펌프(binary pump) 그리고 오토 샘플러(auto sampler)가 장착된 Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) HPLC를 연결하여 사용하였다. 컬럼은 Hypercarb™ column (100 mm × 2.1 mm, 5.0 μm particle size; Thermo fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였고 기기 제어 및 데이터 분석프로그램은 Xcalibur software (version 3.0, Thermo fisher Scientific, USA)로 이용하였다. 에탄올과 부패지표물질 농도 분석을 위해서는 헤드스페이스-기체크로마토그래피(HS-GC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다.

다중반응검지법(Multiple reaction monitoring, MRM)을 이용하여 negative mode에서 이온을 검출하였다.

Table 1. The LC-MS/MS parameters for EtS, EtG

Compound	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (V)	RF Lens (V)
EtS	125	97	15	70
EtS-d ₅	130	98	17	74
EtG	221	75	17	87
EtG-d ₅	226	75	17	86

*CE : Collision energy, RF lens : Radion frequency lens.

Table 2. Composition of LC mobile phase

Total run time (min)	A eluent (%)	B eluent (%)
0	90	10
3	90	10
6	45	55
7	10	90
9	10	90
10	90	10
13	90	10

상세 조건은 다음과 같다. Ion spray voltage: 2500 V, vaporizer temperature: 400 °C, CID gas 1.5 mTorr, ion transfer tube temperature: 315 °C로 세팅되었고 EtG, EtS에 대한 조건은 Table 1에 나타내었다. 이동상은 0.05 % 포름산(A용매)과 100 % 아세트니트릴(B용매)을 사용하였고 총 분석 시간은 13분으로 gradient mode를 적용하였다(Table 2). 이동상 속도는 0.4 mL/min이고 주입량(injection volume)은 20 µL이며 분석되는 동안 컬럼 온도는 50 °C로 유지하였다.

2.4. 실험 준비 및 방법

비장에서 EtG와 EtS 분석을 위한 검량선 표준시료는 농도가 0.25 ~ 8.0 µg/g가 되도록 DI water에 희석하여 표준용액을 제조하였다. 내부표준물질(IS)인 EtG-d₅와 EtS-d₅는 DI water로 희석하여 5 mg/L로 제조해 사용하였다. 비장에서 EtG와 EtS를 추출하는 용매로 메탄올, 아세트니트릴, 메탄올과 아세트니트릴 혼합 용매를 시험 비교하였다. 아세트니트릴을 사용하였을 때 회수율이 저, 중, 고농도에서 모두 50 % 미만으로 추출용매로는 부적절하였다. 메탄올 단일 용매와 메탄올과 아세트니트릴을 1:1로 혼합한 용매를 사용하였을 때는 둘 다 90 ~ 111 % 범위 내에서 비슷한 회수율을 나타내었으나 혼합 용매를 사용하였을 때 표준편차가 더 크다는 것을 확인하였다. 따라서 메탄올과 혼합 용매 모두 비슷한 효율을 보여주었지만 표준편차가 더 작은 메탄올을 추출 용매로 선택하였다.

Vol. 34, No. 3, 2021

Tube에 비장 시료를 가위로 잘게 잘라 0.05 g을 채취하여 IS 50 µL, cold methanol 400 µL를 함께 넣고 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 시켰다. 원심 분리 후 상등액 350 µL를 test tube에 옮겨 질소 농축기(EYELA MGS-2200E)를 이용하여 45 °C에서 추출용매를 약 20분간 evaporation 하였다. 그리고 건조시킨 test tube에 0.05 % formic acid 200 µL를 첨가하여 vortexing을 한 후, syringe filter (0.2 µm PTFE membrane)로 filtration하였다. 마지막으로 insert가 들어있는 LC vial에 150 µL를 넣어 액체크로마토그래피-질량분석기(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)로 분석하였다. HS-GC를 사용한 에탄올 농도 분석은 기존의 실험 방법을 이용하였다.²

3. 결과 및 토의

3.1. 근육과 비장 조직의 비교

근육과 비장에서 EtG와 EtS를 검출하였다. 두 조직에서 같은 실험 방법으로 에탄올 대사체를 검출한 결과, 근육보다 비장에서 약 3배 정도 더 많은 대사체 농도가 검출되었다(Table 3). 따라서 근육이 아닌 비장 시료를 선택하여 유효화 실험을 진행하였고, 음주를 하지 않은 사람의 비장 시료를 확보하여 blank로 사용해 타겟 물질을 넣어 분석하였다.

Table 3. EtS and EtG concentration in the spleen and muscle

n=3	EtS (µg/g)		EtG (µg/g)	
	Spleen	Muscle	Spleen	Muscle
1st	1.53	0.41	2.13	0.51
2nd	1.85	0.54	2.60	0.79
3rd	1.55	0.63	1.76	0.94

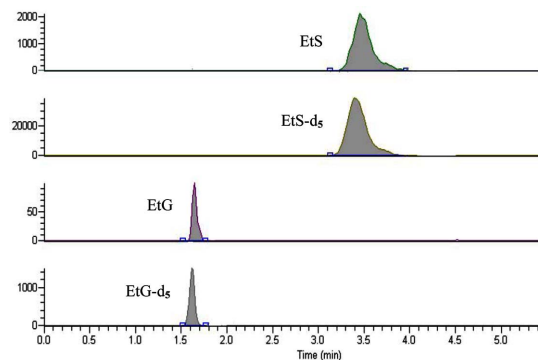


Fig. 1. LC-MS/MS chromatogram of blank tissue spiked with EtG, EtS and IS (EtG-d₅, EtS-d₅).

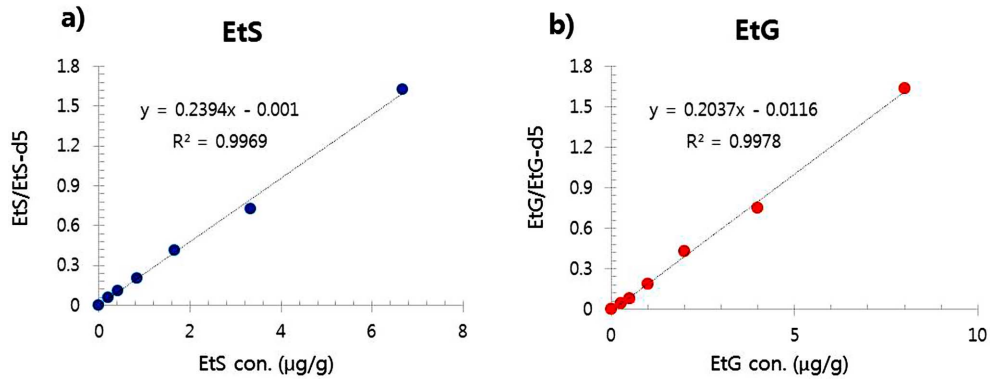


Fig. 2. (a) EtS, (b) EtG calibration using standard addition method.

3.2. 유효화 검증

10세 미만의 음주를 하지 않은 사람의 blank 비장 시료를 이용하여 내부표준물질 (IS)만 spike 시킨 것과 EtG, EtS와 IS를 함께 spike 시킨 것을 분석하여 EtG와 EtS가 선택적으로 검출되는 것을 확인하였으며 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. 직선성(linearity)을 확인해보기 위해 비장 blank 시료에 IS (5 µg/g)와 농도가 0.25 ~ 8.0 µg/g인 EtG, EtS 표준용액 6 개를 spike 시켜 검량선을 구하였다(Fig. 2). 검량선을 그리려면 blank 용액을 포함하여 적어도 5 ~ 8 개의 표준용액을 이용해야 한다.^{10,11} 추출 용액에 들어있는 최종 농도가 EtS는 0.21 ~ 6.67 µg/g이고 EtG 농도가 0.25 ~ 8.0 µg/g인 전체 농도 범위에서 $r^2 > 0.99$ 이며 우수한 직선성을 나타내었다. 0.25 µg/g 표준용액을 spike 한 blank 비장 시료 6개를 반복 실험하여 검출한계 LOD는 EtG가 0.08 µg/g, EtS는 0.07 µg/g이고 정량한계

LOQ는 EtG가 0.25 µg/g, EtS는 0.21 µg/g으로 측정되었다. LOD와 LOQ는 표준편차를 사용하여 각각 3.3SD/s (기울기)와 10SD/s (기울기)로 구하였고 RSD (relative standard deviation)는 EtG, EtS 각각 2.19%, 2.29%로 LOQ 평균 정확도가 5% 이내라는 것을 확인하였다. EtG와 EtS를 spike 시켜 만든 저, 중, 고농도(0.25 low, 2.0 medium, 8.0 high µg/g)인 시료를 각 농도 당 하루에 3번 반복 실험하고 같은 방법 하에서 일주일 간격으로 총 3회 분석하여 정밀도(precision)를 구하였다(Table 4). 특히, 저농도에서 6회 반복 분석한 평균값, 표준편차, CV 그리고 bias를 포함한 정확도를 구하여 Table 5에 나타내었다. 또한, 회수율(recovery)은 세 개의 농도에서 3번 반복 측정하여 얻은 평균값과 표준편차로 나타내었다(Table 6). 각 농도에서 추출 전에 spike한 농도와 추출 후 spike한 농도를 비교하여 회수율의 일관성과 재현성을 평가하였다.

Table 4. Intra-day and inter-day precision at different concentration levels

		Low		Med.		High	
Analyte		EtS	EtG	EtS	EtG	EtS	EtG
Con. (µg/g)		0.21	0.25	1.67	2.00	6.67	8.00
Intra-day 1 (n=3)	Mean	0.22	0.29	1.74	1.24	6.98	8.14
	CV (%)	3.13	13.67	1.70	7.00	0.50	4.07
Intra-day 2 (n=3)	Mean	0.22	0.32	1.78	2.02	7.50	9.11
	CV (%)	0.95	13.53	5.18	12.08	12.62	14.30
Intra-day 3 (n=3)	Mean	0.22	0.24	1.71	1.98	6.94	7.90
	CV (%)	1.17	6.27	0.38	3.79	1.50	3.15
Inter-day (n=9)	Mean	0.22	0.28	1.74	2.00	7.14	8.39
	SD	0.00	0.04	0.03	0.03	0.32	0.64
	CV (%)	0.84	10.96	1.58	1.04	3.61	6.20

*CV : Coefficient of variation, SD : Standard deviation.

Table 5. Accuracy and precision obtained by measuring repeatedly at low concentration (0.25 µg/g)

n=6	Low concentration (µg/g)	
	EtS(0.21)	EtG(0.25)
Mean	0.22	0.23
(SD)	(0.01)	(0.01)
CV (%)	2.09	2.00
Accuracy, %	107	92
(bias)	(4.87)	(7.72)

*CV : Coefficient of variation.

Intra-day 정밀도와 inter-day 정밀도 결과는 CV (coefficient of variation)로 나타내었으며 값은 15% 미만으로 분석법의 유효화 시험에서 허용되는 기준을¹² 모든 농도에서 충족함을 알 수 있었다(Table 4). 저농도(0.25 µg/g)에서 6회 반복 분석하여 얻은 CV 평균값은 EtG와 EtS에서 모두 5% 미만으로 우수한 값을 보여주었으며 신뢰할 수 있는 정량 분석 결과이다(Table 5). 측정된 평균값의 정확도 (% bias)는 92~107%로 일반적으로 시험 농도의 80~120%라는 범위를¹³ 만족하였고 bias는 10% 미만으로 신뢰할 만한 정확도임을 알 수 있다.

정밀도에서와 같이 직선성의 농도 범위에서 3가지 농도를 선택하여 실험한 평균 회수율 분석 결과, 98~110% 범위 내에서 RSD(상대표준편차)는 고농도

EtG를 제외하고는 10% 이내, 모든 농도에서 20% 이내로^{14,15} 분석되었다. Matrix effect 또한 분석법의 정확도와 정밀도 및 감도에 영향을 미치기 때문에 신뢰할 수 있는 데이터를 얻기 위해 평가해야 할 요소이다. 앞선 실험처럼 blank 비장 시료에 저, 중, 고농도의 EtG, EtS를 spike 시켜 실험을 진행하였고 Matrix effect가 100보다 크면 ion enhancement, 100보다 작으면 ion suppression을 나타낸다.¹⁶ 따라서 생체시료 성분이 분석 물질에 미치는 영향도 조사하여 Table 6에 회수율과 함께 나타내었다.

3.3. 실제 사례

본 연구원에 의뢰된 부패로 인해 혈액이 확보되지 못한 사례 9개에서 각각 에탄올, 부패지표물질(*n*-PrOH), EtG, EtS를 분석하였다(Table 7). 9개 사례에서 모두 에탄올이 검출되었으며 사례 3을 제외하고 *n*-PrOH도 검출되었다. 법과학에서 일반적으로 사후 부패로 인한 에탄올 생성을 판단하는 기준으로, *n*-PrOH이 검출되고 EtOH/*n*-PrOH의 비율이 20보다 작으면 사망 전 음주로 인한 것이 아니라 사후 생성된 에탄올로 판단한다.¹⁷ 9개 사례에서 EtG는 0.00~1.14 µg/g의 농도 범위로 검출되었고, EtS는 0.01~1.38 µg/g로 검출되었다. EtG의 정량한계농도(LOQ)인 0.25 µg/g 이상인 사례는 1, 4, 9이며, EtS의 정량한계농도(LOQ)인 0.21 µg/g 이상인 사례도 1, 4, 9이다.

Table 6. Results of recovery and matrix effect analyzed on the three different days (n=3, Low: 0.25, Med.: 2.0, High: 8.0 µg/g)

Concentration (µg/g)	Recovery (%)		RSD (%)		Matrix effect (%)	
	EtS	EtG	EtS	EtG	EtS	EtG
n=3						
0.25	103.5	106.7	3.6	9.4	100.1	88.0
2.0	101.2	98.3	3.3	3.9	104.5	99.4
8.0	114.3	110.9	6.5	16.5	94.5	90.2

Table 7. Detection of ethanol, marker of putrefaction (*n*-PrOH), EtS and EtG concentration in spleen from 9 autopsy cases

Case number	EtS con. (µg/g)	EtG con. (µg/g)	EtOH (%)	<i>n</i> -PrOH (%)	EtOH/ <i>n</i> -PrOH
1	1.38	0.26	0.039	0.0016	24.4
2	0.02	0.04	0.024	0.0024	10.0
3	0.02	0.00	0.044	0.0000	-
4	0.78	1.14	0.186	0.0221	8.4
5	0.02	0.01	0.070	0.0088	8.0
6	0.01	0.04	0.037	0.0012	30.8
7	0.02	0.05	0.100	0.0039	25.6
8	0.01	0.02	0.066	0.0012	55.0
9	0.28	0.29	0.043	0.0040	10.8

그러므로 9 개의 사례 중에 실제 음주를 하였다고 판단되는 것은 1, 4, 9이다. 사례 4, 9 번은 EtOH/*n*-PrOH의 비율이 20 이하로써 부패로 생성된 에탄올을 배제하지 못하며 또한 사망 전에 음주도 하였음을 알 수 있다. 사례 3의 경우는 혈액에서 에탄올 농도가 0.044%가 검출되었고 부패지표물질인 *n*-PrOH은 검출되지 않아 부패에 의해 생성된 것이 아닌 음주에 의한 에탄올 농도라고 판단할 수 있다. 하지만 EtG, EtS가 검출한계(LOD)보다 작거나 검출되지 않은 것으로 보아 음주와 상관없는 부패에 의해 생성된 에탄올이라고 판단된다. Wang et al.에 의하면, 혈중알코올이 검출된 부검 42 건에서 18 건이 *n*-PrOH이 검출되지 않아 사망 전 음주라고 판단할 수 있으나 18 건 중 2 건에서 EtG와 EtS가 검출되지 않아 음주로 판단 할 수 없다는 사례를 발표하였으며 *n*-PrOH가 사후 부패에 의한 에탄올 생성을 판단하는 지표로 부족하고 잘못된 결과를 도출할 수도 있다고 하였다.¹⁷ 그러므로 부패된 부검 건에서는 반드시 에탄올 대사체를 분석하여 음주 에탄올인지 부패 에탄올인지를 정확히 판단해야 한다. 사례 6, 7, 8에서 에탄올 농도가 0.037, 0.100, 0.066%가 검출되었고 EtOH/*n*-PrOH의 비율이 20 이상이므로 사망 전 음주라고 판단 할 수 있다. 하지만 EtG, EtS가 검출한계보다 낮아 음주에 의한 것이라기보다 부패에 의해 사후에 생성된 에탄올이라고 판단해야 한다.

4. 결 론

본 연구의 목적은 LC-MS/MS를 이용하여 조직 생체시료에서 EtG, EtS를 검출하는 방법을 확립하고 유효성을 검증하는데 있다. 이전에도 변사자의 다양한 조직에서 에탄올 대사체를 검출하는 연구에 대해 발표된 논문들이^{18,19} 있었으나 비장 시료에서 에탄올 대사체를 검출하고 유효성을 확인한 연구는 없었다. 현재 국립과학수사연구원에서는 변사체가 부패되어 혈액이 채취가 안 되는 경우에는 케톤체, 일산화탄소 등을 분석하기 위해 비장 시료가 가장 많이 채취되기도 한다. 에탄올 농도로 의뢰되는 근육과의 비교를 위해 근육과 비장을 선택하여 효율성이 좋은 비장을 선택하였으며 추출용매 비교를 통하여 가장 적합한 시험법을 완성하였다.

선택성(Selectivity), 직선성(Linearity), 정밀도(Precision), 회수율(Recovery), 매트릭스 효과(matrix effect) 및 정확도(Accuracy) 시험을 통하여 분석법을 검증하였다.

유효성 검증을 통해 확립된 이 방법은 변사자의 혈액을 확보할 수 없을 때 조직 생체시료에서 에탄올 대사체를 검출할 수 있어 변사자의 음주 여부를 판단하는데 에탄올과 더불어 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 실제 사례를 통해 비장의 EtG, EtS 농도 범위를 확인하고 음주 판단을 적용해보았다.

하지만 변사자의 음주 여부를 넘어 정확한 음주량을 알기 위해서는 혈액과 비장의 농도 비율 등 앞으로 연구가 더 되어야 한다. 비장 시료를 꾸준히 확보하고 EtG, EtS 농도를 검출하여 데이터를 구축해 놓는다면 변사자의 조직에서 검출한 에탄올 대사체 농도 값을 음주여부 판단 및 정도를 확인하는 지표로 구축할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 행정안전부 주관 국립과학수사연구원 중장기과학수사감정기법연구개발(R&D) 사업의 지원을 받아 수행한 연구임 (NFS20201CHE01).

References

1. H. Schneider and H. Glatt, *Biochem. J.*, **383**, 543-549 (2004).
2. M. Kwon, H. J. Choi, Y. H. Jo, M. H. Son, J. S. M., N. Y. Kim and J. E. Jung, *Forensic Sci. Int.*, **302**, 109857 (2019).
3. R. S. Foti and M. B. Fisher, *Forensic Sci. Int.*, **153**, 109-116 (2005).
4. N. E. Walsham and R. A. Sherwood, *Ann Clin. Biochem.*, **49**, 110-117 (2012).
5. G. Hoiseth, G. O. Berg-Hansen and J. Morland, *Forensic Sci. Int.*, **257**, 398-402 (2015).
6. K. Borucki, R. Schreiner, J. Dierkes, K. Jachau, D. Krause, S. Westphal, F. M. Wurst, C. Luley and H. Schmidt-Gayk, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **29**, 781-787 (2005).
7. Y. H. Jo, S. M. Kim, W. J. Lee, K. W. Kim, S. H. An and M. Kwon, *Korean J. Forensic Sci. Int.*, **21**, 71-75 (2020).
8. H. Wang, J. Li, Z. Huang, F. Wang, Y. Zhang, J. Chang and Y. Rao, *Forensic Toxicology*, **38**, 195-202 (2019).
9. G. Hoiseth, R. Karinen, A. S. Christophersen, L. Olsen, P. T. Normann and J. Morland, *Forensic Sci. Int.*, **165**,

- 41-45 (2007).
10. F. T. Peters, O. H. Drummer and F. Musshoff, *Forensic Sci. Int.*, **165**, 216-224 (2007).
 11. V. P. Shah, K. K. Midha, J. W. A. Findlay, H. M. Hill, J. D. Hulse, I. J. McGilveray, G. McKay, K. J. Miller, R. N. Patnaik, M. K. Powell, A. Tonelli, C. T. Viswanathan and A. Yacobi, *Pharm. Res.*, **17**, 1551-1557 (2000).
 12. Committee for Medicinal Products for Human Use, 'Guideline on bioanalytical method validation', EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Re.1 Corr.2** (2011).
 13. 의약품등 분석법의 밸리데이션 가이드라인 해설서, 식품의약품안전평가원, (2015).
 14. S. Walorczyk, *Talanta*, **120**, 106-113 (2014).
 15. European Commission DG-SANTE, 'Method validation and quality control: Procedures for pesticide residues analysis in food and feed', Document No. SANTE/11945/2015 (2016).
 16. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer and C. M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.*, **75**(13), 3019-3030 (2003).
 17. H. Wang, J. Li, Z. Huang, F. Wang, Y. Zhang, J. Chang and Y. Rao, *Forensic Toxicology*, **38**, 195-202 (2020).
 18. H. Schloegl, T. Rost, W. Schmidt, F. M. Wurst and W. Weinmann, *Forensic Sci. Int.*, **156**, 213-218 (2006).
 19. L. Politi, L. Morini, F. Mari, A. Groppi and E. Bertol, *Int. J. Legal Med.*, **122**, 507-509 (2008).

Authors' Positions

Soo-Min Kim : Assistant Researcher
Woo-Jae Lee : Assistant Researcher
Young-Hoon Jo : Researcher
Song-Hie An : Researcher
Mia Kwon : Senior Researcher