

Urine 中の Methamphetamine 成分 分析에 關한 研究

機器分析科

李源九·權奇源·崔晉澤·裴基哲

A study on the analysis of Methamphetamine in urine

Instrumental Analysis Division

W. K. Lee, K. W. Kwon, J. T. Choi, K. C. Bae

Abstract

The purpose of this research was give to fundamental investigation information of Methamphetamine test.

In relation to Qualitative limit of TBPE and the limit of Qualitative and Quantitative by GC/MSD.

As a result, the following findings were found.

1. Qualitative reaction of TBPE was coloured by some drugs and in case of Methamphetamine, it was possible to examine with the naked eye to $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$
2. As a result of urine concentrated 100 times, Qualitative limit of GC/MSD was $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$
3. Qualitative and Quantitative of low limit was improved by much urine sample

I. 緒 論

最近 급속히 확산되는 Methamphetamine(일명 philopon)의 濫用은 종래 복수집단이나 유흥업소 종업원 등 일부 계층에 국한된 問題였으나 現在 一般 家庭 主婦, 中高校學生 등에 까지

침투되어 國民健康의 危害는 물론 二次的 犯罪까지 유발하는 등 그 심각성이 날로 확산일로에 있다.

이러한 Methamphetamine은 주사에 의한 주입, 음료에 혼합하여 복용, 가열하여 증기의 흡입등을 통해 體内に 投入되어 대사과정을 통해 혈액이나 Urine 중에도 存在하게 되는데 Methamphetamine의 投與여부는 주로 Urine을 對象으로 한 鑑定이 대부분이다.

이러한 Urine에 의한 鑑定에는 그 方法이 TLC¹⁰, GC²⁰, HPLC⁹, EMIT에 의한 方法²¹ 및 GC/MSD²²에 의한 方法들이 알려져 있는데 現在 우리 研究院에서는 제1차 現場에서 TBPE法에 의한 呈色反應이 陽性으로 판명된 시료에 한해 GC/MSD로 最終 確認 鑑定하여 함유여부를 決定하는바 TBPE法은 Alkaloid나 Steroid계제의 일부 약물의 복용시에도 陽性반응이 나타나며 微量함유시 그 한계가 불분명하다.

또한 GC/MSD에 의한 鑑定時 Typical하게 Fragment된 Mass/charge라 할지라도 그 판독에는 신중을 기하여야 한다.

따라서 本 研究는 TBPE呈色反應의 한계점과 GC/MSD에 의한 정량, 정성의 下限界線을 설치 Urine試料를 통한 상관 관계로 알아봄으로서 麻藥 및 philopon 事犯根絶에 基礎資料로 活用하고자 한다.

II. 分 析

1. 試 藥

TBPE-Methylene Chloride Solution, Sodium borate, E-ether, Sodium Sulfate anhydrous, KOH 등을 Barker社 製品 特級으로 使用하였다.

2. 裝置 및 分析 條件

〈장 치〉

GC/MSD(HP 5970B MSD, HP 5890AGC, HP 5970B Mass Chemstation), 원심분리기(Model No HA 1000-3 Hanil), 진탕기(Model No 0342 Dongil)

〈조 건〉

GC/MSD :

Analyzer : Quadrupole Mass Filter(203mm)

Ionization Mode : Electron Impact

Ionization Potential : 70ev

Column : Ultra 2(Crosslinked 5% ph Me Silicone)

25m × 0.2mm × 0.33μm film thickness

Injector : 270°C

Oven : 100°C(3min) $\xrightarrow{15^\circ\text{C}/\text{min}}$ 280°C (15min)

Transfer Line : 280°C

Septum purge : 6ml/min

Split ratio : 1/25

3. 分析方法

1) TBPE Method

Sample 1~2ml

↓ ← Sodium Borate 0.1~0.2g

Saturate

↓ ← TBPE Solution 0.5~1ml

Shake

↓
Red(+)

2) GC/MSD

○ Standard Solution : DCC에서 분양받은 Working Solution 1000μg/ml을 희석 사용하였다.

○ Blank Urine Sample

(Standard add) 5ml

← add 0.5ml of 5N KOH

← add 2~5ml of diethylether

← add 3g of anhydrous Na₂SO₄

← Shake mechanically for 10~20min

← Centrifuge for 5min at 2500rpm

← Transfer about 1.5ml of ether fraction into ampul

50μl concentration

GC/MSD

III. 結果 및 考察

1. TBPE에 의한 呈色反應)

TBPE에 의한 體內 함유의 Methamphetamine 함유여부는 微量 Sample(Urine)을 採取現場에서 즉시 그 함유여부를 判斷할 수 있는 간이방법으로서 現在 수사의 초중단계에서 1차 Screen法으로 가장 많이 활용되고 있는 方法인데 本 實驗에서는 Methamphetamine을 증류수와 藥物을 복용한 事例가 없는 Blank Urine에 각각 단계적으로 Standard를 添加하여 그 發색된 정도를 判斷한 結果는 Table 1과 같다.

Table 1. Colorimetry changes in distilled water and urine at various Methamphetamine Standard concentration.

증 류 수			Urine		
No.	첨가된 농도	검출된 색상	No.	첨가된 농도	검출된 색상
1	500~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	진한 보라	1	500~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	진한 보라
2	200~ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	검붉은 적색	2	200~ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	검붉은 적색
3	50~ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	적 색	3	50~ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	적 색
4	1~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	엷은 적색	4	1~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	엷은 적색
5	0.2~0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$	황색에 가까운 적색	5	0.2~0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$	황색에 가까운 적색
6	0.02~0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$	관독이 애매한 적색	6	0.02~0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$	관독이 애매한 적색
7	0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하	확인불능의 노랑색	7	0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하	확인불능의 노랑색

Table 1에서의 結果는 관독여부가능성에 대해 증류수나 Urine 모두가 거의 비슷하였으며 실제 육안 관독이 애매한 시료까지 의뢰된다고 假定時 그 下限界는 약 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 라고 볼 수 있으나 이는 試料의 使用量에 따라 달라질 수도 있을 것이다.

결과와 육안 관독에 있어서 밀폐된 空間내의 형광등 하에서의 관독과 백열등 전구아래에서의 관독이 서로 相異 하였는데 특히 형광등하에서는 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도는 관독이 거의 녹색으로 나타났는데 이는 형광의 Vis 파장을 일부 흡수하는데에서 기인된다고 사료되며 Sample에 있어서 alcohol 성분이 40~50% 이상 함유된 시료는 Methamphetamine의 함유여부에 관계없이 모두 TBPE 試藥에 滴은 青色의 發색이 있었는데 이것은 향후 研究해야 될 과제로 남았다.

한편 Steroid계제나 Alkaloid 계제에 대한 발색여부를 確認하기 위해 시종약국에서 판매 중인 10여종의 Mycin을 구입하여 정색검정 結果 3種類 Mycin이 적색으로 발색 되는 것으로 봐서 이의 복용시 尿에서의 TBPE 정색 반응시 陽性으로 판별될 可能性이 다분히 存在한다고 추정되었다.

2. GC/MSD에 의한 정량

MS에 의한 分析方法은 最近 分析裝備의 發達로 LC/MS에까지 그 수준이 향상되고 있는데

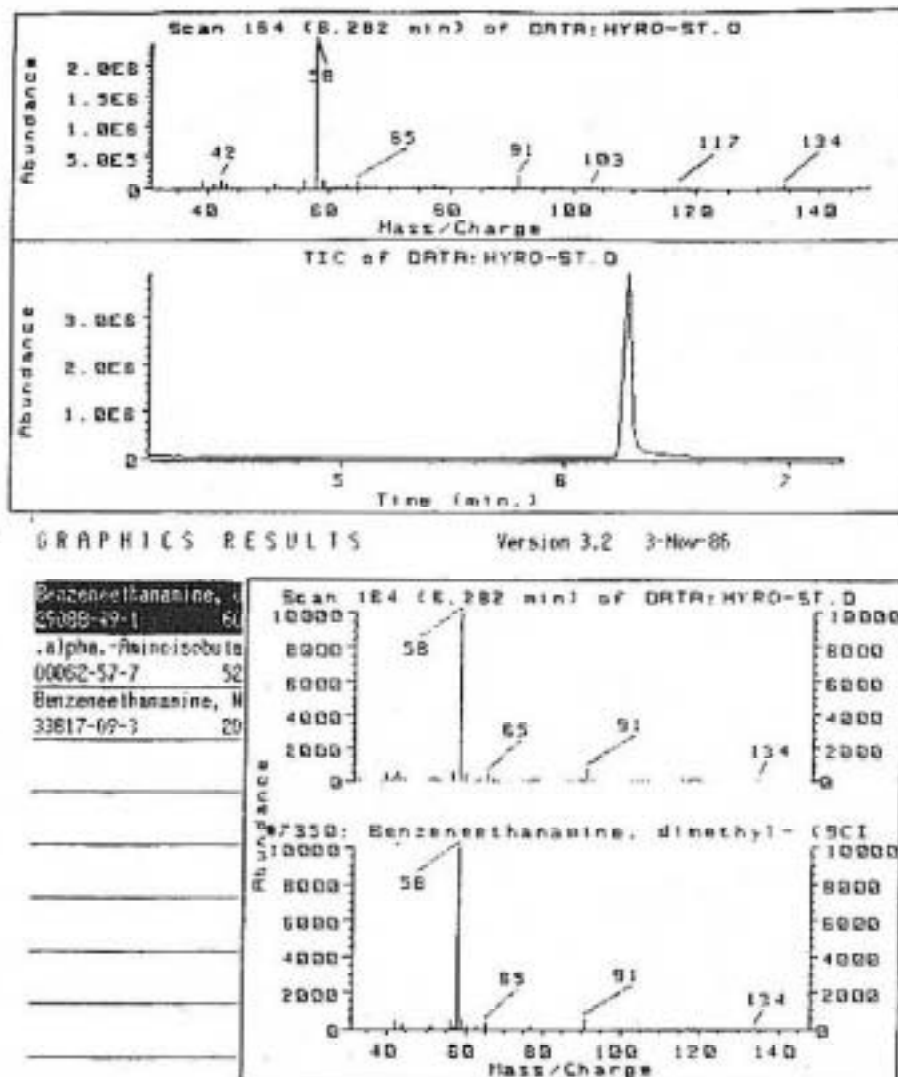


Fig. 1 Comparison of standard peak derived spectrum and computer-stored spectrum.

本實驗에서 사용한 MS는 EI方式에 의한 GC/MSD를 사용하여 TBPB 정색반응에서 그 判定이 불분명한 Urine을 對象으로 實驗하였는데 標準 Standard를 注入하여 얻은 Total Ion Chromatogram과 여기에서 나온 peak를 Fragmentation시켜 그 結果를 內藏되어 있는 標準 Mass/charge와 比較해서 Computer에 의해 Search된 結果는 Fig. 1과 같다.

TBPE에서 判讀이 용이한 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지의 비교 분석에서는 실지 Urine에 0.025ppm Methamphetamine을 添加한 試料를 分析한 結果 Methamphetamine 成分이 fragment된 ion들이 Base m/e인 58부터 65, 91, 113, 134까지 確認되었고 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우 134m/e가 나타날때와 그렇지 않은 경우가 있어 7회에 걸친 再試驗 結果 1회만 나타나지 않았고 나머지는 모두 나타났다.

그러나 정량한계를 結定 지을수 있는 integration에 대하여서는 m/e 134가 나타나지 않는 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지도 그 結果를 얻을 수 있었는데 이는 Table 2와 같다.

Table 2. m/e chart and integration results(6.221min) of 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ methamphetamine standard.

Scan 159(6.221 min) of DATA : $\times 0.01\text{D}$							
m/z	abund	m/z	abund	m/z	abund	m/z	abund
31.05	15969	40.15	2394	45.05	4438	59.05	4848
32.05	17088	41.15	8805	45.95	1830	65.10	2620
36.95	2079	42.05	8520	55.05	1757	73.10	2613
38.05	2120	43.05	6674	56.05	4187	79.10	3389
39.05	8662	44.05	8829	58.05	62288	91.10	3380
TIC of DATA : $\times 0.01\text{D}$							
Peaks	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time	
1	4.348	BV	0.048	7173111	4.304	4.479	
2	4.573	VV	0.045	3384816	4.539	4.705	
3	4.816	PV	0.040	7120494	4.747	4.864	
4	6.033	BV	0.039	8332688	5.880	6.113	
5	6.225	VB	0.044	3796068	6.195	6.354	

Table 2에서 Peak #5의 RT 6.225min에서 intekgration이 可能함으로서 해서 정량한계선은 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였고 본 실험에서 最少 濃度인 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 結果는 Fragment 134는 나타나지

않고 integration 또한 peak가 너무 작아 정량은 不可하였으나 fragment된 mass/charge와 이것을 computer에 内藏된 SIM mode方式의 分析 結果가 아니더라도 간단한 Ion Chromato 機能의 活用으로 정성의 判정은 可能하다고 思料되는데 그 結果는 Fig. 2와 같다.

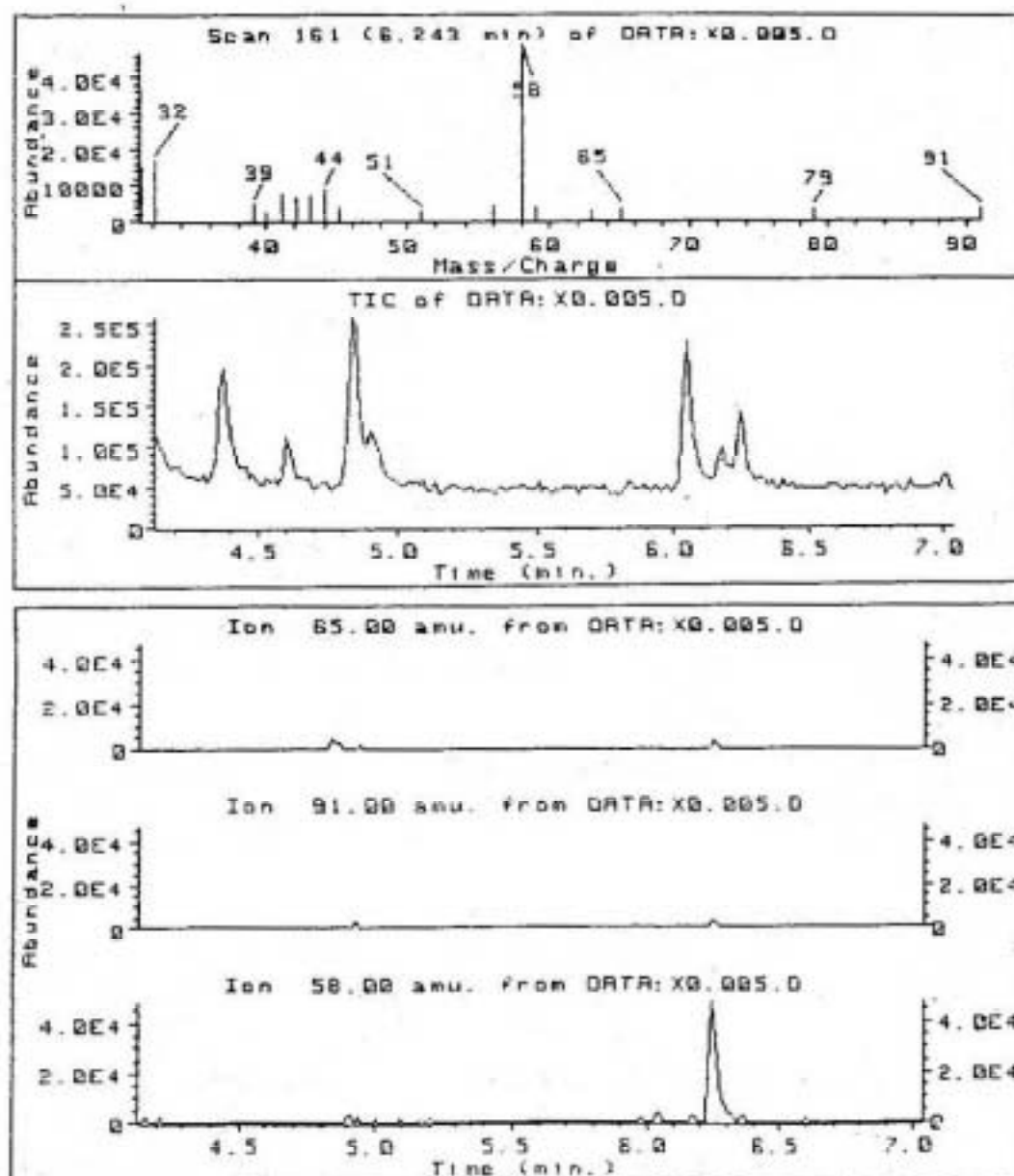


Fig. 2 Mass Spectrum, TIC and Ion Chromato of 0.005mg/l Methamphetamine Standard.

Fig. 2에서 RT 6.243min의 적은 peak에서 scanning된 Flagement Base ion인 58과 그의 91, 65만 가지고 검출을 確定지을수가 있는데 그 이유는

첫째 : 가장 主要한 요소인 Standard와 RT가 같다.

둘째 : 이 peak에서 Methamphetamine의 고유한 m/e 58, 91, 65이온들이 존재하며

셋째 : Ion Chromato 기능에 의한 Base ion 58m/e가 尿中 다른 peak보다 그 量이 월등히 많고 91, 65 또한 많은 量이 存在하는데 특히 이 ion들이 모두 RT 6.243min에서 동일선상에 있다.

따라서 이 3가지 요인들로 인하여 비록 mass/charge상에 나타난 m/e의 값들이 standard와 比較해 월등히 적다하더라도 그 正성여부는 可能하다고 판단된다.

한편 GC/MSD에 의한 實驗 報告書는 경우에 따라서는 10^{-10} g까지 測定 可能하다는 報告¹⁰⁾도 있는데 本 實驗의 경우 시료를 5ml 취해 약 100배 농축하여 實施한 結果임으로 Urine의 量을 더 많이 취하던지, 농축의 배수를 더 높일때에는 5mg/ml이하에서도 Methamphetamine의 精량 및 正성이 可能할 수 있음을 알 수 있었다.

IV. 結 論

本 實驗은 Methamphetamine 鑑定에 대한 기초자료제공의 目的으로서 TBPE의 正성한계와 GC/MSD의 精량 및 正성 한계의 상관계에 대하여 研究한 結果임.

1. TBPE法에 의한 正성반응은 Mycin과 같은 藥物에서는 일부 발색되며 Methamphetamine의 경우 약 0.02 μ g/ml까지 육안 判定이 可能하였다.
2. GC/MSD에 의한 精량 한계는 5ml의 urine을 100배 농축 추출한 결과 0.01 μ g/ml까지 可能하였고 精량한계를 벗어난 0.005mg/ml이하에서도 Ion Chromato 기능에 의하여 함유여부가 精確히 判定되었다.
3. TBPE에 의한 1차 screen 显色反應이나 GC/MSD에 의한 正성, 精량의 하한계선은 試料의 취취량에 따라 더 나아질 수도 있다고 懸料되었다.

參 考 文 獻

1. D. Eskes : A procedure for the differentiation of the optical isomers of amphetamine and methamphetamine by thin-layer chromatography, J. Chro. 117, 442, 1976
2. R. J. Bussey and R. C. Backer : Thin-layer chromatographic differentiation of amphetamine from other primary amine drugs in urine, Clin. Chem. 20(2), 302

3. K. Takaichi : Gas chromatographic separation and identification of metabolites of methamphetamine in urine, 22(2), 30, 1969
4. W. J. A. Vanden, W. L. Gardiner and E. C. Horning : Characterization and separation of amines by gas chromatography, Anal. Chem. 36(8), 1550, 1964.
5. F. T. Noggle JR. : Enhanced detectability and chromatography of some amines by high pressure liquid chromatography, Anal. chem, 63(4), 702, 1980
6. I. Sunshine : Drug Analysis by immunoassay, Instrumental application in forensic drug chemistry, proceedings of the international Symposium, May 29~30, 1978, DEA, USA.
7. Monroe, Enzyme immunoassay. Anal. chem. 56, 921~931. 1984
8. A. H. Beckett, F. T. Coutis and F. A. Ogunboda, Metabolism of amphetamines, Identification of N-oxygenated products by gas chromatography and mass spectrometry. J. Pharm Pharmac. 25, 708~717(1973)
9. T. Kojima, I. Une, Yasshiki, T. Noda and I. Tsukue, Follow-up of concentration of methamphetamine in blood and urine of methamphetamine abuser. 日法誌. 37(5), 527~530(1983)
10. M. Morrita and H. Ando, Analysis of methamphetamine and its metabolites in urine from a habitual user of the stimulant, Eisei kagaku. 29(5) 318~322. (1983)
11. E. Anggard and G. Sedvall : Gas chromatography of catecholamine metabolites using electron capture detection and mass spectrometry, Anal. Chem. 41(10), 1251, 1969.