

시료 희석 직접 주입 LC-MS/MS를 이용한 법화학 수용액 시료 중 카페인 신속 분석

최윤정 · 김희승 · 인문교 · 김진영*^{#,}

대검찰청 과학수사2과, *대검찰청 과학수사기획관실
(Received March 14, 2016; Revised April 25, 2016; Accepted May 3, 2016)

Rapid Determination of Caffeine in Forensic Aqueous Sample by Dilute and Shoot LC-MS/MS

Yun Jeong Choi, Hee Seung Kim, Moon Kyo In and Jin Young Kim*^{#,}

Forensic Science Division II, Supreme Prosecutors' Office, Seoul 06590, Korea

*Office of Forensic Science Planning, Supreme Prosecutors' Office, Seoul 06590, Korea

Abstract — A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated for the determination of caffeine in forensic aqueous sample. The centrifuged sample (100 μ l) was diluted 50-fold with distilled water. The diluted sample (400 μ l) was then diluted further with 200 μ l of 0.1% formic acid solution and 400 μ l of acetonitrile containing 500 ng of caffeine-(3-methyl-¹³C₃) prior to LC-MS/MS analysis. The mobile phase was composed of 0.1% formic acid in distilled water (A) and acetonitrile (B). Chromatographic separation was performed by using a Zorbax SB-C18 (100 mm \times 2.1 mm i.d., 3.5 μ m) column and caffeine was eluted within 1.1 min. Linear least-squares regression with a 1/x weighting factor was used to generate a calibration curve with the coefficients of determination ($r^2=0.9983$). The lower limit of quantification was 25 ng/ml for the analyte. The process efficiency was 98.6~100.1%. Intra- and inter-day precisions were not more than 2.1% and 1.7%, while intra- and inter-day accuracies were ranged from -6.8 to 4.5%, respectively. The suitability of the method was examined by analyzing unknown forensic aqueous samples.

Keywords □ caffeine, dilute and shoot, HPLC, mass spectrometry, forensic sample

최근 고 카페인(caffeine) 음료의 섭취가 사회적 관심사가 되고 있다. 특히 고용량 카페인 에너지 음료를 마시는 학생, 일반인들이 늘어나면서 부작용을 걱정하는 목소리도 커지고 있다. 성장기의 중·고생, 대학생은 물론 어린 아이들까지 에너지음료를 즐겨 찾고 있기 때문이다. 고 카페인 음료를 마시면 일정 시간동안 각성 효과를 볼 수 있어 시험을 앞둔 청소년들이 잠을 쫓기 위해 주로 찾고 있다. 시중에서 쉽게 볼 수 있는 에너지음료로는 '핫식스'(롯데칠성), '레드불'(동서음료), '변 인텐스'(코카콜라) 등이 있다.

에너지음료를 마시면 졸리지 않고 집중이 잘 되는 이유는 음

료 속에 들어 있는 카페인 성분이 각성제 역할을 하기 때문이다. 그러나 과량섭취하게 되면 불면증, 과잉 흥분 상태 등의 부작용이 나타날 수 있으며 카페인에 대한 반응은 나이가 어릴수록 민감하게 나타나기 때문에 필요 이상으로 많은 카페인을 섭취하지 않도록 주의해야 할 필요가 있다.^{1,2)}

카페인인 식물성 알칼로이드계 물질로 물이나 알코올에 녹고 쓴 맛을 내는 성분이다. 카페인인 알칼로이드계 물질 중에서도 독성이 적은 물질로 알려져 있기 때문에 중독에 의한 사망은 흔치 않으나 의약품 또는 기호식품으로 인한 카페인 섭취가 증가하면서 야기되는 건강상 문제를 고려하지 않을 수 없다.³⁾

한편, 알코올이 포함된 카페인 에너지 음료(alcohol mixed with energy drink, AmED)의 인기가 급격히 증가함에 따라 여러 논문에서 그 위험성을 경고하고 있다. AmED 복용 후에는 마약 사용에 대한 거부감이 줄어들어 마약이나 약물의 복용이 오히려 증가하고 무방비적 성관계(unprotected sex)로 이어지는 경향이 있다고 보고하고 있다.^{4,5)} 이러한 AmED의 위험성에 대해 고찰한

#Corresponding Author

Jin Young Kim

Office of Forensic Science Planning, Supreme Prosecutors' Office,
157 Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 06590, Korea

Tel.: 02-3480-3640 Fax.: 02-3480-2758

E-mail: paxus@spo.go.kr

연구 결과에 따르면, 우선 카페인 성분이 알코올의 진정효과를 상쇄하여 취했다는 느낌을 줄여주며, 이로 인한 판단력 장애에 대한 감각 저하 및 추가 음주로 이어져 판단력과 인지능력의 손상이 더해지게 된다고 하였다.^{6,8)}

국내에서도 최근 홍대, 이태원 등의 클럽을 중심으로 고용량 카페인과 알코올이 혼합된 에너지폭탄주, 일명 슈퍼 밤(super bomb)이 유행하고 있다는 언론보도가 있다.^{9,10)} 이러한 알코올과 카페인 성분이 마약류로 분류되지는 않지만 클럽약물(club drug)이나 마약 대용으로 사용될 개연성은 크다고 볼 수 있어 카페인 성분에 대한 신속 정확한 분석법의 개발이 필요한 상황이다.

카페인의 정량분석법으로 자외선분광법(UV spectrometry)과 분광광도법(spectrophotometric method)의 AOAC 방법,¹¹⁾ 가스 크로마토그래피법(GC),¹²⁾ 액체크로마토그래피법(LC),¹³⁾ 박층판 크로마토그래피-질량분석법(TLC-MS),¹⁴⁾ 액체크로마토그래피-질량분석법(LC-MS/MS)¹⁵⁾ 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 기질효과(matrix effect), 즉 방해물질의 영향을 최소화하면서 카페인 성분 분석의 감도 및 신속성을 높이기 위해 초고속 원심분리법 및 액체크로마토그래피-질량분석법을 도입하였다. 시료 희석법을 전처리 과정에 도입하여 추출과정을 단순화하였고, 동위원소로 치환된 내부표준물질을 사용하여 측정의 정확·정밀성을 향상시키고자 하였다. 또한 카페인 분석 시 크로마토그램 상에 기질효과 영향은 받지 않으면서 머무름시간(retention time)은 최소화되도록 설정함으로써 신속한 분석이 수행되도록 하였다.

실험 방법

시약 및 재료

카페인 표준물질은 Cerilliant사(Austin, TX, USA)에서 구입하였고, 내부표준물질(internal standard, IS)로 사용된 동위원소로 치환된 카페인(cafeine-(3-methyl-¹³C₃))은 Cambridge Isotope Laboratories사(Tewksbury, MA, USA)에서 제조되었다. 메탄올과 이동상으로 사용된 증류수와 아세트니트릴은 JT Baker/Avantor 사(Phillipsburg, NJ, USA)의 HPLC 등급 시약을 사용하였다. 개미산(formic acid) 및 아세트산은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 LC-MS Ultra 및 ACS reagent 등급 시약을 사용하였다. 시료 원심분리에 사용된 폴리프로필렌 튜브는 Eppendorf 사(Hamburg, Germany)의 1.5 ml 용량 Safety-Lock 튜브를 구입하여 사용하였다.

분석에 사용된 보관표준용액(stock standard solution)은 카페인 표준물질을 아세트니트릴에 녹여 1000 µg/ml의 농도로 조제하였으며, 사용 전까지 -20°C에서 냉동 보관하면서 필요에 따라 보관표준용액을 희석하여 작업표준용액(working standard solution)으로 사용하였다. 검량선 작성 및 QC 시료 제조에 사용

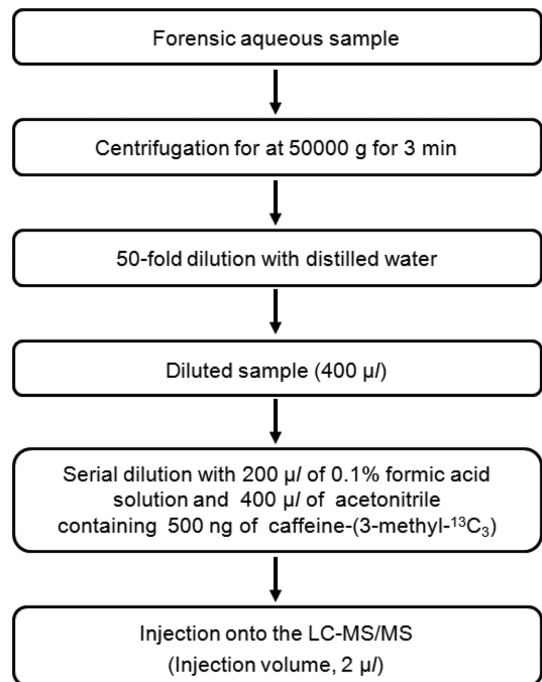


Fig. 1 – Sample preparation for the analysis of caffeine.

된 바탕시료(blank sample)로는 무카페인 음료(Slow Cow®, EKO-VIT, Poland)를 구입하여 사용하였다.

전처리 방법

수용액 시료를 50000 g에서 3분간 원심분리한 후, 상층 100 µl 에 증류수를 혼합하여 50배 희석하였다. 희석된 시료 400 µl를 취하여 0.1% 개미산이 포함된 증류수 200 µl와 내부표준물질(cafeine-(3-methyl-¹³C₃)) 500 ng이 포함된 아세트니트릴 400 µl를 혼합하였다. 혼합시료(2 µl)를 LC-MS/MS에 주입하여 분석하였다(Fig. 1).

LC-MS/MS 분석 조건

분석에 사용된 기기는 Agilent Technologies사(Palo Alto, CA, USA)의 1200 series Liquid Chromatograph에 연결된 Applied Biosystem사(Foster city, CA, USA) API 3200 QTrap triple-quadrupole mass spectrometer를 사용하였다. 분리관은 Agilent Technologies사 Zorbax SB-C18(100 mm×2.1 mm i.d., 3.5 µm)를 사용하였고, 이동상으로 0.1% 개미산이 포함된 증류수(A)와 아세트니트릴(B)의 두 가지 용매를 기울기 용리하였다. 이동상의 용매 기울기는 처음 유기용매 아세트니트릴(B)의 비율을 30%에서 시작하여 2분까지 80%까지 올린 후 다시 유기용매의 비율이 30%까지 낮추고 안정화될 때까지 4분간 유지하였다. 이동상의 유속은 300 µl/min이며, 이때 분석기기 주입량은 2 µl였다(Table I).

Table I – Condition for LC-MS/MS analysis of caffeine

LC condition			
Column	Agilent, Zorbax SB-C18, 2.1×100 mm, 3.5 μm		
Flow rate	300 μl/min		
Injection volume	2.0 μl		
Column temperature	25°C		
Sample temperature	Room temperature		
	Time (min)	A (%) ^a	B (%) ^b
Mobile phase	1.5	70	30
	2.0	20	80
	2.1	20	80
	2.2	70	30
	4.5	70	30
MS condition			
Ionspray Voltage (V)	5500		
Curtain gas (arbitrary unit)	45		
Source temperature (°C)	650		
Ion source gas 1 (arbitrary unit)	50		
Ion source gas 2 (arbitrary unit)	55		

^a0.1% formic acid in water.^bAcetonitrile.

질량분석기의 이온화 방식은 ESI(electrospray ionization)로 이온화 장치에 유입되는 질소가스 온도는 650°C, 이온화 전압은 5500 V로 설정하였고, MRM(multiple reaction monitoring) 방법을 사용하여 정량하였다. 모 이온(precursor ion)의 조각화(fragmentation)를 위해 충돌기체로 질소 가스를 사용하였다. 카페인 성분 분석 감도향상을 위해 질량분석기 변수 조건을 검색하여 정리하였으며, 이때 분석물질의 모 이온(precursor ion)으로부터 생성된 특징적인 조각이온(product ion)을 선정하여 하나의 이온쌍(MRM pair)으로 분석하였다(Table II).

분석방법 유효성 검증

분석방법의 유효성 검증을 위하여 기질효과(matrix effect), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD)와 최저정량한계(lower limit of quantification, LLOQ), 효율성(process efficiency,

PE), 정밀도(precision) 및 정확도(accuracy)를 평가하였다.^{16,17)}

기질효과 측정을 위하여 5 ng/min으로 카페인 및 내부표준물질을 분리관 후단에 주입하는 post-column infusion을 수행하였고, 전처리 과정을 거친 바탕시료를 LC-MS/MS에 주입하여 확인하였다.

작성된 검량선의 직선성은 결정계수(r^2)를 구하여 판단하였다. 카페인은 25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000 ng/ml의 농도에서 직선성을 평가하였다. 앞에서 설정한 전처리 방법에 따라 시료를 처리한 이후 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 확인하고, 내부표준물질의 피크 면적에 대한 분석물질의 피크 면적 비를 가지고 검정곡선을 작성하였다.

검출한계는 신호 대 잡음 비 3으로 계산하였고, 정량한계는 정밀도와 정확도가 20% 이내인 검량선의 가장 낮은 농도로 정의하였다.

효율성(%)은 Matuszewski 등에 따르면 A와 B의 2 세트를 여섯 개의 등분체(aliquot)로 시료를 제조하여 분석하였다.¹⁸⁾ 세트 A는 이동상에 분석물질과 내부표준물을 첨가하여 제조하였으며, 세트 B는 바탕시료에 분석물질과 내부표준물을 첨가하여 제조하였다. 두 세트의 시료를 분석하여 얻은 피크 면적을 비교하여 효율성($PE=B/A \times 100$)을 측정하였다.

동일한 분석물질에 대한 실험환경에 따른 변화를 확인하기 위하여 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 정밀도를 측정하였다. 균질화된 시료로부터 취한 여러 개의 등분체로 반복 분석하였을 때 측정값의 근접성을 의미하는 정밀도는 최저정량한계(25 ng/ml) 및 3가지 농도(75, 375, 700 ng/ml)의 QC 시료를 제조하여 각 농도별 6회 반복 분석하여 측정하였다. 또한 실제값과 측정값 사이의 차이를 나타내는 분석법의 정확도는 정밀도 측정 시와 동일한 시료를 사용하여 각 농도에 대해 6회 반복 분석을 수행하였다. 이때 측정된 평균값의 정확도는 실측값의 15%(bias) 이내로 하였고, 최저정량한계에서도 20%(bias)를 넘지 않도록 하였으며, 정밀도는 변동계수(Coefficient of Variation, CV)가 15%를 초과하지 않도록 하였으며, 최저정량한계에서는 CV가 20%를 넘지 않도록 하였다.

Table II – Retention times, MRM transitions and compound dependent parameters for LC-MS/MS analysis of caffeine and an internal standard (IS)

Compound	RT ^a (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	DP ^b (V)	EP ^c (V)	CEP ^d (V)	CE ^e (V)	CXP ^f (V)
Caffeine	1.10	195.1	<u>138.2</u> ^g	61	2.5	12	21	4
	1.10	195.1	110.1	61	2.5	12	27	4
Caffeine-(3-methyl- ¹³ C ₃) (IS)	1.10	198.1	<u>140.2</u>	56	7.5	12	25	4

^aRT, retention time.^bDP, declustering potential.^cEP, entrance potential.^dCEP, collision cell entrance potential.^eCE, collision energy.^fCXP, collision cell exit potential.^gProduct ion underlined was used for quantification.

결과 및 고찰

LC-MS/MS 분석조건 확립

클립 등에서 마약대용으로 사용되어 문제를 일으키는 수퍼밤은 알코올 도수가 높은 위스키류와 고 카페인 에너지 음료가 혼합된 에너지폭탄주를 일컬으며, 법과학 기관에 의뢰되는 카페인 성분이 포함된 수용액 시료이다. 이러한 고 농도 카페인 함유 시료의 효율적인 분석을 위해서는 높은 농도의 카페인을 적절한 비율로 낮추어 분석에 적합한 낮은 농도로 희석시키는 과정이 중요하다. 본 실험에서는 1차 50배, 2차 이동상과 조성이 같도록 1.5배 희석하였다.

또한 에너지폭탄주 등의 음료에는 알코올, 카페인 뿐 아니라 타우린, 당류 등 여러 성분이 포함되어 있어 고성능액체크로마토그래피에 다양한 분리관을 적용하여 분석 대상 성분에 대한 분리능을 증가시키고자 하였으며, 여러 이동상 용매 조합을 검색하여 최적의 분석조건을 설정하였다. 카페인 분석에 적합한 분리관(analytical column) 선정을 위해 Agilent사의 Zorbax SB-C18 (30 mm×2.1 mm i.d., 3.5 μm), Shiseido사(Tokyo, Japan)의 Capcell Pak C18 MG II(100 mm×2.0 mm i.d., 3 μm) 및 Zorbax SB-C18(100 mm×2.1 mm i.d., 3.5 μm)의 3종을 분석에 적용하였다. Agilent사의 Zorbax SB-C18(30 mm×2.1 mm i.d., 3.5 μm)는 검토 대상 분리관 중 분리능(resolution)이 가장 낮았으며, Capcell Pak C18 MG II(100 mm×2.0 mm i.d., 3 μm)의 경우 피크 끌림 현상(tailing)이 발생하여 상대적으로 분리능과 피크의 형태가 뛰어난 Zorbax SB-C18(100 mm×2.1 mm i.d., 3.5 μm)을 최종 분석에 사용하였다. 그리고 피크의 머무름 시간과 모양(shape)을 최적화하기 위해 0.1%와 0.2% 개미산 수용액, 0.1%와 0.2% 초산 수용액 4종을 A 용매로 아세트니트릴과 0.1% 및 0.2% 개미산이 포함된 아세트니트릴 3종을 B 용매로 하여 이동상 A와 B를 조합하여 사용한 결과, 카페인 분석에 가장 효과적인 조합인 0.1% 개미산 수용액(A)과 아세트니트릴(B)을 이동상으로 결정하였다.

또한, 카페인 정량 분석의 정확도와 정밀도를 개선하기 위해 동위원소로 치환된 내부표준물질과 검출기로 이중질량분석기(tandem mass spectrometry)를 사용하였다.

분석방법의 유효성 확인

카페인에 대한 기질효과를 확인하기 위해 카페인 및 내부표준

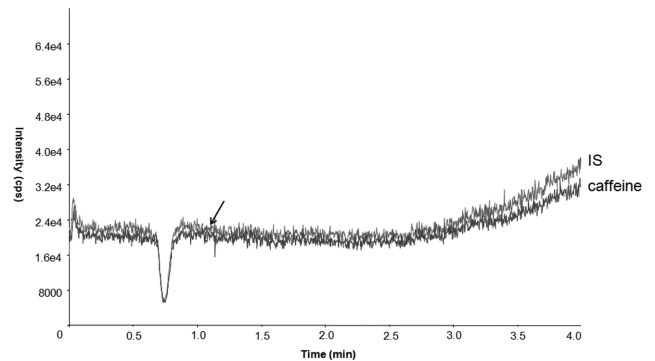


Fig. 2 – Ion suppression studied by monitoring MRM chromatograms during post-column infusion of 5 ng/min of caffeine and caffeine-(3-methyl-¹³C₃) and subsequent injection of diluted blank sample.

Table IV – Process efficiency (PE, %) for the analytes

Compound	Nominal concentration (ng/ml)	PE (%)
Caffeine	25	100.1
	75	98.0
	375	99.5
	700	98.6

물질을 5 ng/min으로 분리관 후단에 흘려준 후 전처리 과정을 거친 바탕시료를 주입하여 크로마토그램을 확인하였다. Fig. 2에서와 같이 화살표로 표시한 카페인 성분의 머무름 시간(1.10 min)과 이온 억제(ion suppression)가 일어나는 0.7~0.8 min 사이의 구간과는 겹치지 않으므로 기질효과 영향의 거의 받지 않는 것으로 확인되었다.

검량선 작성하기 위해 바탕시료에 카페인 표준물질을 첨가하여 25~1000 ng/ml의 범위가 되도록 시료(calibrator)를 제조한 후, 본 연구의 전처리 방법을 거쳐 LC-MS/MS로 분석한 후 내부표준법을 사용하여 검량선을 작성(weighting factor, 1/x)하였다. 카페인 검량선의 결정계수는 $r^2=0.9986$ 으로 정량범위 내에서 우수한 직선성을 나타내었고, 검출한계는 0.3 ng/ml, 최저정량한계는 25 ng/ml으로 측정되었다(Table III).

분석법의 효율성(PE)은 이동상에 분석물질과 내부표준물을 첨가하여 제조한 세트 A와 바탕시료에 분석물질과 내부표준물을 첨가하여 제조한 세트 B를 비교하여 실험하였다. 4가지 농도에서 측정된 PE 값은 98.0~100.1%이었다(Table IV).

Table III – Method calibration

Compound	Concentration range (ng/ml)	Slope (mean±SD)	y-Intercept (mean)	r^2	LOD ^a (ng/ml)	LLOQ ^b (ng/ml)
Caffeine	25~1000	0.0328±0.0226	0.0074	0.9986	0.3	25

^aLimit of detection (LOD) was based on the concentration corresponding to a signal plus 3 standard deviations above from the mean of ten replicates of blank urine.

^bLower limit of quantification (LLOQ) was defined as the lowest concentration on the calibration curve with precision (% CV) less than 20% and accuracy (% bias) within ±20%.

Table V - Intra- and inter-day precision and accuracy for the LLOQ and QC samples

Compound	Nominal concentration (ng/ml)	Intra-day (<i>n</i> =6)		Inter-day (<i>n</i> =24)	
		Precision ^a (% CV)	Accuracy ^b (% bias)	Precision (% CV)	Accuracy (% bias)
Caffeine	25	2.1	-0.8	1.7	-6.8
	75	1.3	4.5	0.9	-0.3
	375	0.4	0.9	0.6	-0.9
	700	1.3	-1.4	0.5	-3.4

^aExpressed as the coefficient of variance of the peak area ratios of analyte/internal standard.

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

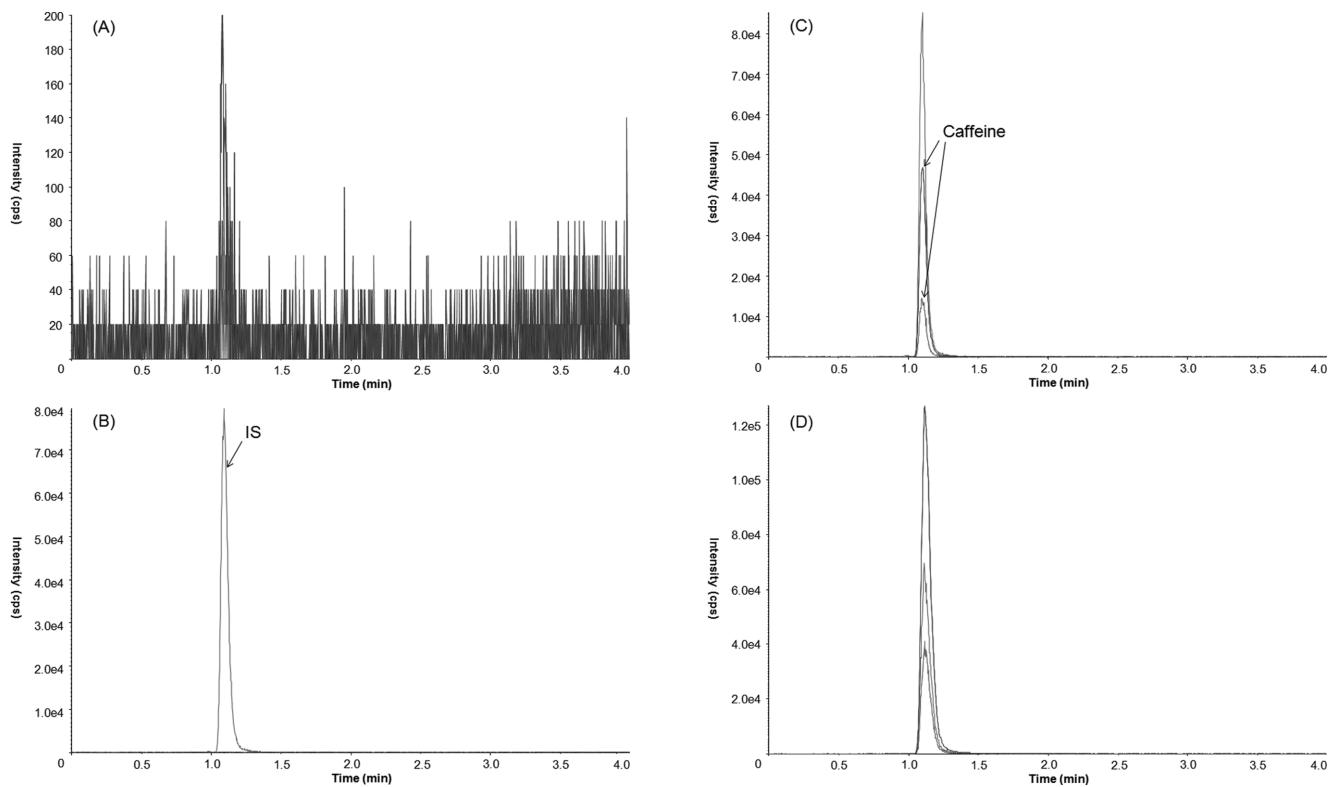


Fig. 3 – Representative MRM chromatograms including blank sample without IS (A), blank sample (B), spiked urine containing 75 ng/ml of caffeine (C), and an unknown forensic aqueous sample (D).

실험방법의 정밀도와 정확도를 평가하기 위해서 효율성 실험에 사용된 농도와 동일한 농도의 시료를 사용하였으며, 측정된 결과, 일내(*n*=6) 및 일간(*n*=24) 정확도(% bias)는 -1.4 ~ 4.5%와 -6.8 ~ -0.3%의 범위로 양호하였고, 일내 및 일간 정밀도(% CV)는 2.1%와 1.7% 이하로 재현성 있는 실험값을 얻었다. 최저 정량한계 및 저, 중, 고의 3개 농도의 QC 시료 모두에서 정밀도는 2.1% 이내, 정확도는 ±6.8% 이내의 상당히 우수한 값을 나타내었다(Table V).

미지시료 내의 카페인 농도 결정

앞에서 설정된 분석방법을 이용하여 의뢰받은 미지 법화학 수용액 시료를 분석한 결과 카페인의 농도는 295.0 ng/ml로 측정

되었다. 식품의약품안전처에서 권장하는 1일 카페인 섭취량은 체중(kg)당 2.5 mg을 제시하고 있고, 일제로 성인여성의 경우 평균체중은 57 kg(2013 기준, 국민건강보험공단)으로 산술계산하면 하루 섭취량은 142.5 mg 이하로 권고된다. 미지 시료에서 카페인 함량 측정결과 295 ng/ml이고 폭탄주 제조에 사용되는 맥주컵의 용량은 225 ml로 컵에 담기는 액체의 양을 200 ml로 계산할 때 컵에 담기는 카페인의 양은 59 mg이 된다. 이는 일일 섭취 권고량의 2/5에 해당하는 양으로 알코올과 같이 복용하는 경우 카페인 성분이 알코올의 진정효과를 상쇄하여 취했다는 느낌을 줄여주고 과량을 섭취하게 되므로 클럽약물로 오용되어 성범죄 등에 사용되었을 경우 그 폐해의 심각성은 크다고 볼 수 있다.

결 론

본 연구는 수용액 시료 중 카페인 함량 측정방법을 개발하였고, 분석방법의 유효성을 확인하였다. 고농도의 카페인을 함유하고 있는 법화학 수용액 시료의 경우 증류수를 이용하여 희석한 후, 이동상과 같은 조성으로 다시 희석하여 그 일부를 액체크로마토그래프에 직접 주입하여 분석하였다. 시료 중 불순물 또는 분석 방해물질 제거를 위해 50000 g의 초고속원심분리 과정을 도입하였으며, 동위원소로 치환된 내부표준물질과 이중질량분석기(tandem mass spectrometry)를 사용함으로써 카페인 정량 분석의 정확도와 정밀도를 개선하였다. 이동상, 분리관 등의 분석 조건을 최적화하여 카페인 성분을 1.1 min 이내에 신속한 분석이 가능하였다. 본 연구를 통해 시료 내에 카페인 함유 여부를 빠르고 간편하게 확인할 뿐만 아니라 동시에 미량분석이 가능하였으며, 법과학 기관에 의뢰되는 시료 중 카페인 함유 여부 및 함량 측정 의뢰 시 본 실험의 결과가 증거자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

References

- 1) Reissiga, C. J., Straina, E. C. and Griffiths, R. R. : Caffeinated energy drinks-A growing problem. *Drug Alcohol Depend.* **99**, 1 (2009).
- 2) Jackson, D. A., Cotter, B. V., Merchant, R. C., Babu, K. M., Baird, J. R., Nirenberg, T. and Linakis, J. G. : Behavioral and physiologic adverse effects in adolescent and young adult emergency department patients reporting use of energy drinks and caffeine. *Clin. Toxicol. (Phila.)* **51**, 557 (2013).
- 3) Wolk, B. J., Ganetsky, M. and Babu, K. M. : Toxicity of energy drinks. *Curr. Opin. Pediatr.* **24**, 243 (2012).
- 4) Miller, K. E. : Alcohol mixed with energy drink use and sexual risk-taking: casual, intoxicated, and unprotected sex. *J. Caffeine Res.* **2**, 62 (2012).
- 5) Snipes, D. J. and Benotsch, E. G. : High-risk cocktails and high-risk sex: examining the relation between alcohol mixed with energy drink consumption, sexual behavior, and drug use in college students. *Addict. Behav.* **38**, 1418 (2013).
- 6) O'Brien, M. C., McCoy, T. P., Rhodes, S. D., Wagoner, A. and Wolfson, M. : Caffeinated cocktails: energy drink consumption,

high-risk drinking, and alcohol-related consequences among college students. *Acad. Emerg. Med.* **15**, 453 (2008).

- 7) Torpy, J. M. and Livingston, E. H. : Energy drinks. *JAMA* **309**, 297 (2013).
- 8) Heinz, A. J., de Wit, H., Lilje, T. C. and Kassel, J. D. : The combined effects of alcohol, caffeine, and expectancies on subjective experience, impulsivity, and risk-taking. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* **21**, 222 (2013).
- 9) 박동욱 : [이슈진단①] 피로 회복 · 다이어트 · 성적 쾌감 증대 ...청정국 오염시키는 신종 마약이 몰려온다. *뉴시스* (2015).
- 10) 정명진 : 젊은이들에게 유행하는 졸피뎀 · 슈퍼밤 부작용 없나. *파이낸셜뉴스* (2013).
- 11) AOAC : Official Method of Analysis AOAC Intl. 19th ed. Method 962.13, 979.11. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA (2012).
- 12) McCusker, R. R., Goldberger, B. A. and Cone, E. J. : Caffeine content of energy drinks, carbonated sodas, and other beverages. *J. Anal. Toxicol.* **30**, 112 (2006).
- 13) Olmos, V., Bardoni, N., Ridolfi, A. S. and Villaamil Lepori, E. C. : Caffeine levels in beverages from Argentina's market: application to caffeine dietary intake assessment. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **26**, 275 (2009).
- 14) Ford, M. J., Deibel, M. A., Tomkins, B. A. and Van Berkel, G. J. : Quantitative thin-layer chromatography/mass spectrometry analysis of caffeine using a surface sampling probe electrospray ionization tandem mass spectrometry system. *Anal. Chem.* **77**, 4385 (2005).
- 15) Perrone, D., Donangelo, C. M. and Farah, A. : Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **110**, 1030 (2008).
- 16) Peters, F. T., Drummer, O. H. and Musshoff, F. : Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* **165**, 216 (2007).
- 17) U.S. Department of Health and Human Services : Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation in U.S., Beltsville, MD (2001).
- 18) Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. and Chavez-Eng, C. M. : Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 3019 (2003).