

고분해능 accurate mass 분석법 (LC/Q-TOF MS) 및 accurate mass 도구에 의한 양파 내 imidacloprid 대사체 식별

응용 자료

식품

저자

E. Michael Thurman and
Imma Ferrer
Center for Environmental
Mass Spectrometry
Department of Environmental
Engineering
University of Colorado
Boulder, CO
USA

Jerry A. Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

개요

Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 시스템 및 Agilent MassHunter 소프트웨어 도구를 사용한 MS/MS 분석으로 imidacloprid의 6가지 새로운 대사체를 식별할 수 있었습니다. Accurate mass를 이용한 MS/MS 연구를 통해 imidacloprid 대사체와 그 구조를 추정하고 양파 내 imidacloprid 대사 및 독성 연구를 위한 새로운 표적 대사체에 대해 보다 심층적인 정보를 얻을 수 있었습니다.



Agilent Technologies

소개

이 응용 자료는 해당 연구에 대한 완전한 기술 보고서에서 사용된 도구를 설명합니다[1]. Imidacloprid는 1990년대 후반에 동시류 해충(진딧물, 애벌레, 가루이 및 특정 딱정벌레 등)을 통제하기 위해 시장에 출시된 네오니코티노이드 계열의 농약입니다. Imidacloprid는 가장 광범위하게 사용되는 살충제 중 하나로, 특히 농업에 많이 쓰입니다. Imidacloprid는 nicotinoid acetylcholine 수용체의 작용제로써 곤충에 대한 특이성이 매우 높습니다[2,3].

Imidacloprid는 특히 꿀벌에게 가장 유해한 살충제 중 하나입니다. 연구 결과에 따르면 2006년 이래로 유럽과 북미에서 꿀벌 군집이 감소되는 데 있어 농업분야에 대한 imidacloprid 및 기타 농약의 광범위한 사용이 영향을 미칠 수 있다고 합니다. 따라서 imidacloprid는 식물 운명(plant fate) 및 대사 연구에 대한 중요 조사 대상 살충제라 할 수 있습니다 [4].

기존에 많은 농작물을 대상으로 imidacloprid 대사를 연구해왔지만, 양파에 대해서는 상세히 연구되지 않았습니다. 이 응용 자료에서는 초고성능 액체 크로마토그래피/quadrupole time-of-flight 질량 분석법(UHPLC/Q-TOF MS)을 MS, All Ions MS/MS 및 표적 MS/MS 모드에서 사용하여 양파 내 imidacloprid 대사체 확인을 위한 방법론과 도구를 설명합니다. 여러 가지 accurate mass 도구를 사용하여 이전에 보고된 적이 없는 6가지 화합물을 포함한 대사체를 식별하였습니다. 이 방법론을 사용하여 양파와 토양 및 침출액 사이의 imidacloprid 대사체 분포를 확인하였습니다.

실험

시약 및 표준물질

개별 농약 원액(약 1000µg/mL)을 methanol로 제조하여 -18°C에 저장했습니다. 표준 용액은 이전의 연구를 통해 소개한 바와 같이 위의 용액을 acetonitrile과 물로 희석하여 제조하였습니다[1]. Guanidine 대사체는 imidacloprid를 1.0N HCl에서 1시간 동안 45°C로 가수분해하여 합성하였습니다. 이 과정 역시 이전의 연구에서 기술한 방법을 따랐습니다[1].

기기

본 연구는 Agilent 1290 Infinity LC 시스템과 전자 분무 Jet Stream 기술을 장착한 Agilent 6540 Ultra High Definition(UHD) Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 시스템을 결합하여 수행하였습니다. 분석 조건이 표 1에 표시되어 있습니다.

표 1. LC 및 Q-TOF MS 분석 조건

LC 분석 조건

컬럼	분석 컬럼: Agilent ZORBAX Eclipse XDB C8 Reversed-Phase, 4.6 × 150mm, 3.5µm (p/n 963967-906)
컬럼 온도	25°C
주입량	20µL
이동상	A = 0.1% formic acid in water v/v B = Acetonitrile
선형 그레디언트	10% B, 5분간 유지, 25분 동안 10% B에서 100% B로 상승, 일정 유속, 100% B에서 10분간 유지
유속	0.6mL/분

Q-TOF MS 조건

이온 모드	ESI, 양이온 모드
분무기 압력	45psig
건조 가스 유량	10L/분
건조 가스 온도	250°C
Sheath 가스 유량	11L/분
Sheath 가스 온도	350°C
노즐 전압	0V(양이온 모드에서)
Fragmentor 전압	190V
캐필러리 전압	3,500V
질량 범위	50~1,000m/z
검출기 속도	2GHz
분해능	35,000 ± 500
정확도	2ppm

농약의 살포

양파 시료는 이전 연구에서 기술한 방법으로 인증된 양파 (*Allium cepa* L.) 종자를 온실 환경에서 재배하여 얻었습니다[1]. 2.5µg/mL imidacloprid를 200mL 물에 섞어 각 양파 모종에 살포하였습니다.

시료 전처리

물 시료(침출액)는 1주일에 한 번 3주에 걸쳐 수집하였습니다. 토양 및 양파 시료는 28, 38 그리고 53일차, 3회에 걸쳐 수집하여, 토양 및 양파 각각 총 36개의 시료를 준비하였습니다. 필요한 경우 물 시료를 여과하고, 중수소화 imidacloprid를 첨가하였습니다. 그림 1의 절차에 따라 토양 및 양파를 추출하였습니다.

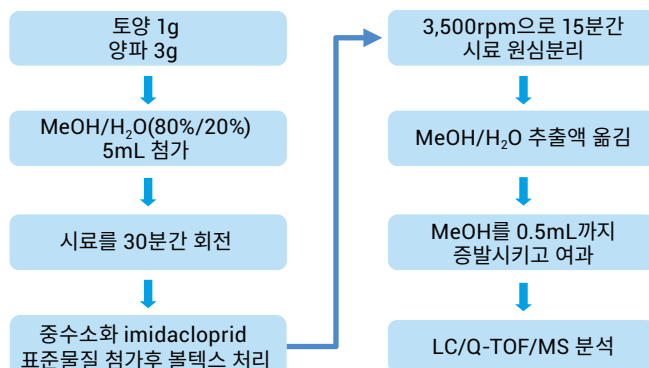


그림 1. 토양 및 양파 시료의 추출 흐름도

데이터 분석

Imidacloprid 대사체 식별에 도움이 되는 몇 가지 애질런트 소프트웨어 도구, 즉 Molecular Feature Extractor, Molecular Formula Generator, Mass Profiler 및 accurate mass 데이터베이스를 사용하였습니다. 어미 화합물이 염소화 되어있기 때문에 Chlorine Filter를 포함하여[6] 소프트웨어를 저자의 구성으로 변경하여 사용하였습니다[5].

결과 및 토의

데이터베이스에서 알려진 대사체 검색

양파 추출액의 일반적인 총 이온 크로마토그램(TIC)은 매우 복잡해서 imidacloprid 대사체를 식별하기가 매우 어렵습니다(그림 2A). 하지만 데이터베이스에서 imidacloprid와 알려진 12가지 대사체를 검색한 결과, 적어도 2개의 피크가 존재하는 것을 밝혀내었고, 이는 양파 추출액의 추출 이온 크로마토그램(EIC, 그림 2B)에서 확인할 수 있듯이 어미 화합물(m/z 256.0594로 측정됨)과 guanidine 대사체(m/z 211.0743으로 측정됨)에 해당할 수 있습니다. MS/MS 분석으로 m/z 256 피크를 분석한 결과 imidacloprid로 식별되었습니다[1].

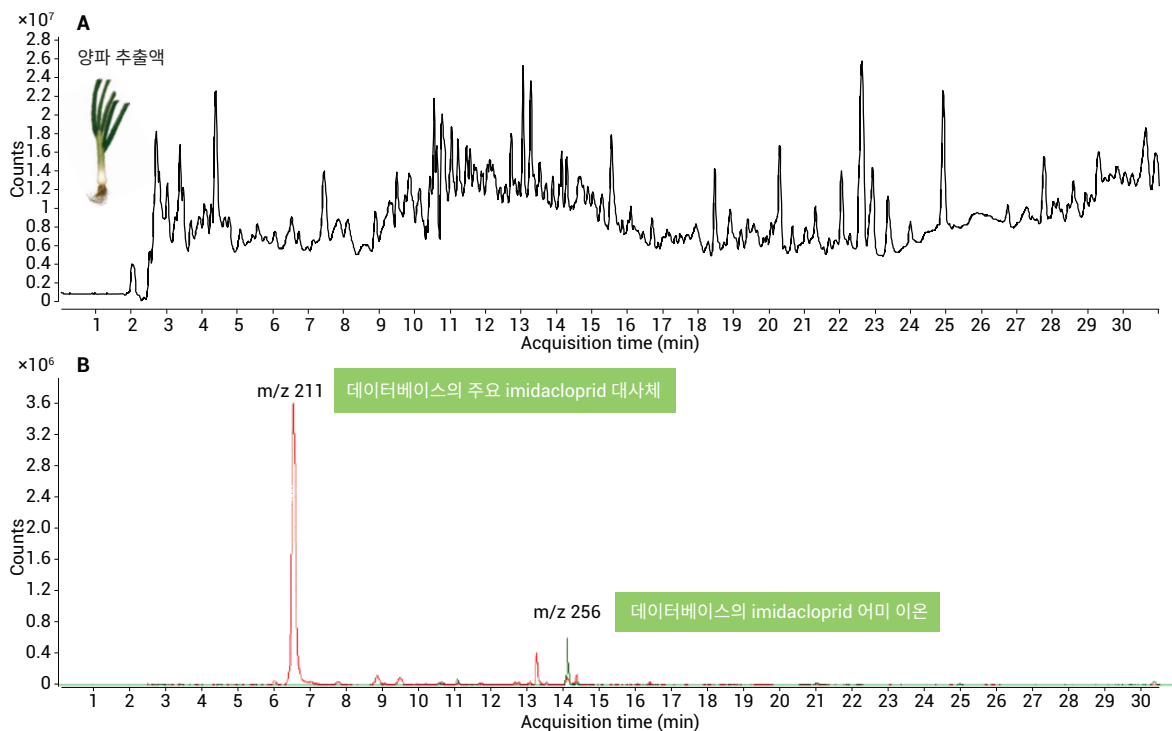


그림 2. Imidacloprid 처리 28일 후 수확한 양파로부터 얻어진 양파 추출액의 일반적인 TIC(A) 및 어미 화합물과 m/z 211 guanidine 대사체의 주요 피크를 나타내는 imidacloprid의 알려진 여러 대사체에 대한 EIC(B)

m/z 211.0743 피크는 guanidine 대사체의 exact mass 계산값에 대해 1ppm 이내에 있었고, 이 피크를 MS/MS 분석하여 그 정체를 밝힐 수 있었습니다[1]. 이 결과를 해당 화합물의 표준물질과 비교하여 그 정체를 확인하였습니다.

Exact mass 데이터베이스 검색을 통해 12개의 알려진 대사체 중 4-hydroxyimidacloprid와 imidacloprid의 요소(urea) 유사체라는 두 가지 대사체를 추가로 발견하였습니다. 5-ppm 미만 accurate mass 구간 내의 accurate mass 및 추출 이온 크로마토그램을 검토한 결과, 나머지 9개의 알려진 대사체는 양파 추출액에 존재하지 않았습니다[1].

진단용 이온 및 All Ions MS/MS

진단용 조각 이온은 imidacloprid 관련 구조의 화합물 사이에서 일관성을 보이고 그 대사체에 일반적으로 존재하는 imidacloprid 구조의 일부분을 의미합니다. 이것은 All Ions MS/MS 접근 방식으로 조각화하여 생성될 수 있어 전체 크로마토그램에서 진단용 이온 검색(DIS)을

수행할 수 있습니다. 이 작업은 fragmentor(TOF 또는 Q-TOF)를 저전압에서 고전압으로 교차 적용하거나 충돌 에너지를 0에서 적당한 충돌 에너지로 교차 적용(quadrupole을 Rf only 모드에서 사용한 Q-TOF만 해당)하여 수행합니다. 이를 통해 진단용 대상 이온을 생성하여 새로운 대사체를 잠정적으로 식별할 수 있습니다.

MS/MS상에서 imidacloprid의 guanidine 대사체로부터 m/z 126의 진단용 이온을 생성하였고, 이는 imidacloprid 어미 화합물 구조의 일부입니다(그림 3). m/z 126 이온을 사용하여 imidacloprid로 처리한 양파 추출액에 대해 DIS를 수행한 결과, 대사체로 추정되는 몇 가지 피크를 식별하였습니다(그림 3). 이 중 하나는 guanidine 유사체(머무름 시간 또는 RT 6.6분)로, 알려진 대사체였습니다. 후속 MS/MS 분석을 통해 m/z 209.0589(RT 6.4분)의 숄더(shoulder) 피크는 새로 관측된 대사체로서[1], guanidine 유사체의 올레핀(olefin)으로 식별되었습니다. m/z 226.0845(RT 6.0분)의 세 번째 피크는 MS/MS에 의해 imidacloprid의 환원된 amine 유사체로 식별되었습니다. 이 대사체 또한 이전에 보고된 적이 없는 것입니다[1]. Imidacloprid로 처리하지 않은 양파 시료에 대해 DIS를 수행한 결과에서는 m/z 126에서 어떤 피크도 나타나지 않았습니다.

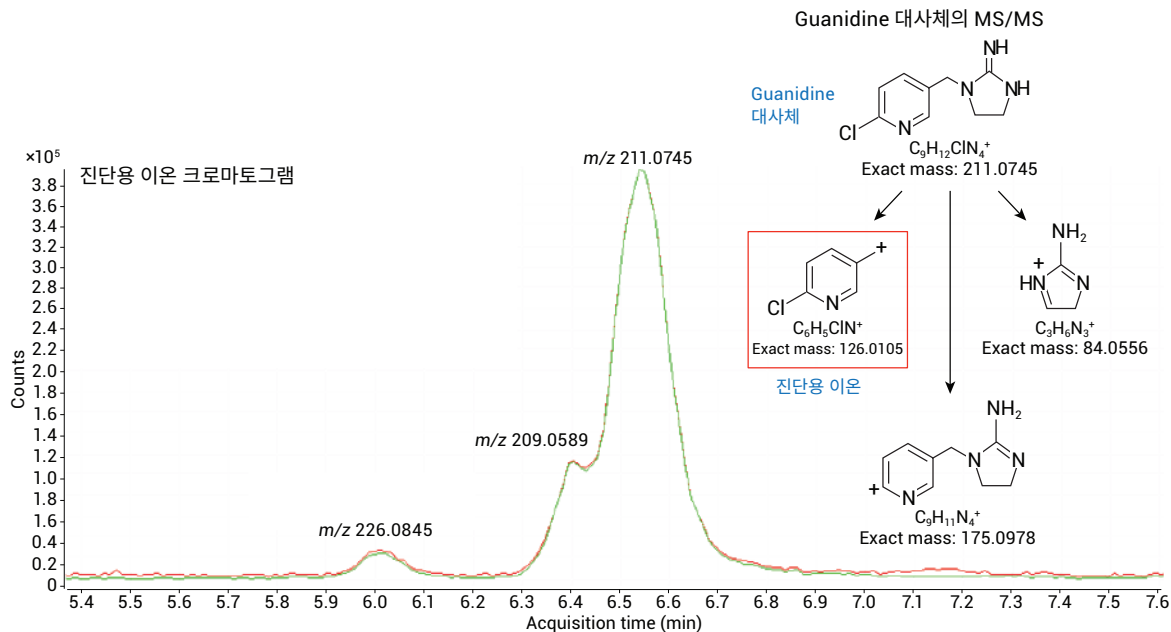


그림 3. Imidacloprid로 처리한 양파 추출액의 All Ions MS/MS 분석에 대한 진단용 이온(guanidine 대사체 및 imidacloprid 구조 일부에 대한 MS/MS 산물인 m/z 126 이온 사용). 양파 시료는 농약 살포 후 28일 후에 수집. 충돌 전압은 0 및 30eV로 설정

Chlorine Filter를 사용한 대사적 발굴

MassHunter 소프트웨어의 Chlorine Filter[6]는 새로운 대사체를 식별하기 위해 사용하는 또 다른 도구입니다. 우선 Molecular Feature Extractor를 사용하여 이온 세기가 10,000을 넘는 화합물을 크로마토그램에서 찾았습니다. 그런 다음 imidacloprid가 단 하나의 염소 원자를 포함하기 때문에 추출된 화합물에서 염소 원자를 1 개만 포함하는 분자식을 생성하였습니다. 양파 추출액에 Chlorine Filter를 적용한 결과, 데이터베이스 검색이나 진단용 이온 검색에서는 찾을 수 없었던 몇 가지 새로운 추정 대사체를 발견하였습니다(그림 4).

Chlorine Filter를 통해서만 발견된 화합물 중 하나는 m/z 354.0955의 질량 및 10.96분의 머무름 시간을 가지며 이는 질량 단위로 imidacloprid보다 98만큼 더 컸습니다. 분자식은 어미 화합물 대비 5개의 탄소와 2 개의 산소 원자를 더 가지고 있는 반면, 염소 및 질소 함량은 어미 화합물과 같았기 때문에, 다른 작용기와의 결합이 예상되었습니다.

Cysteine, glycine, glutamic acid로 구성된 tripeptide인 glutathione과의 결합이 농약과 함께 보고된 바가 있었지만 imidacloprid는 아니었습니다. 새로운 대사체를 구성하기에 glutathione의 질량은 너무 크지만 glutamic acid 부분만 보면 구성 추가 가능성이 있는 5개의 탄소를 포함하고 있습니다. 하지만 glutamic acid는 imidacloprid보다 98만큼이 아닌 147만큼의 더 많은 질량값을 갖습니다.

Cpd	RT	Label	Formula	m/z	Height	Mass (Tgt)	Diff (Tgt, ppm)	Score
1387	14.084	Cpd 1387: C9 H10 Cl N5 O2	C9 H10 Cl N5 O2	256.0578	601240			
336	6.544	Cpd 336: C9 H11 Cl N4	C9 H11 Cl N4	211.0738	3575138			
314	6.011	Cpd 314: C9 H9 Cl N4	C9 H9 Cl N4	209.0582	145349			
337	6.544	Cpd 337: C6 H4 Cl N	C6 H4 Cl N	126.0104	393210			
773	10.964	Cpd 773: C14 H16 Cl N5 O4	C14 H16 Cl N5 O4	354.0955	254645			
1413	14.257	Cpd 1413: 14.257		297.0552	99487			
625	10.192	Cpd 625: C12 H14 Cl N5 O2	C12 H14 Cl N5 O2	296.0891	101477			
785	11.045	Cpd 785: C12 H14 Cl N5 O2	C12 H14 Cl N5 O2	296.0903	87287			
1135	12.814	Cpd 1135: 12.814						
1700	17.054	Cpd 1700: 17.054						
1	2.019	Cpd 1: 2.019						
2	2.022	Cpd 2: 2.022						
3	2.023	Cpd 3: 2.023						
4	2.055	Cpd 4: 2.055						

Element	Minimum	Maximum
C	0	20
H	0	25
O	0	5
N	0	5
S	0	0
Cl	1	1

그림 4. 염소 원자를 1 개만 포함하도록 제한하여 분자식을 생성하는 Chlorine Filter. 이 도구를 통해 accurate mass m/z 354.0955로 측정된 새로운 대사체(강조 표시)를 포함한 여러 대사체를 확인함

MS/MS로 이 화합물을 분석한 결과, 두 개의 46amu 부분에서 neutral loss가 있음이 밝혀졌습니다(그림 5). 각 loss의 질량을 측정하여 COOH_2 (formic acid)로 답을 좁힐 수 있었습니다. Glutamic acid에 의한 니트로기 환원은 이 데이터와 일치합니다. 다른 주요 조각은 m/z 209.0550(측정된 accurate mass) 이온으로, 이 조각 또한 glutamic acid의 손실에 의해 형성될 수 있습니다(그림 5). 데이터는 이 새로운 대사체의 구조를 imidacloprid의 glutamic acid 결합체로 식별합니다.

Chlorine Filter로 발견한 또 다른 화합물은 m/z 240.0996으로, 분자식은 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{ClN}_5$ 였습니다. 이는 m/z 226(imidacloprid의 amine 유사체)의 대사체에 메틸기를 추가한 것과 일치하며 MS/MS를 통해 methyl imidacloprid로 식별하였습니다[1]. 메틸화는 DNA 측면에서는 양파에서 흔히 볼 수 있지만 농약에서는 흔히 볼 수 없는 것입니다. 앞선 추론을 토대로, 이 추정된 구조는 아마도 독성이 있을 수 있는 imidacloprid의 새로운 대사체를 나타냅니다.

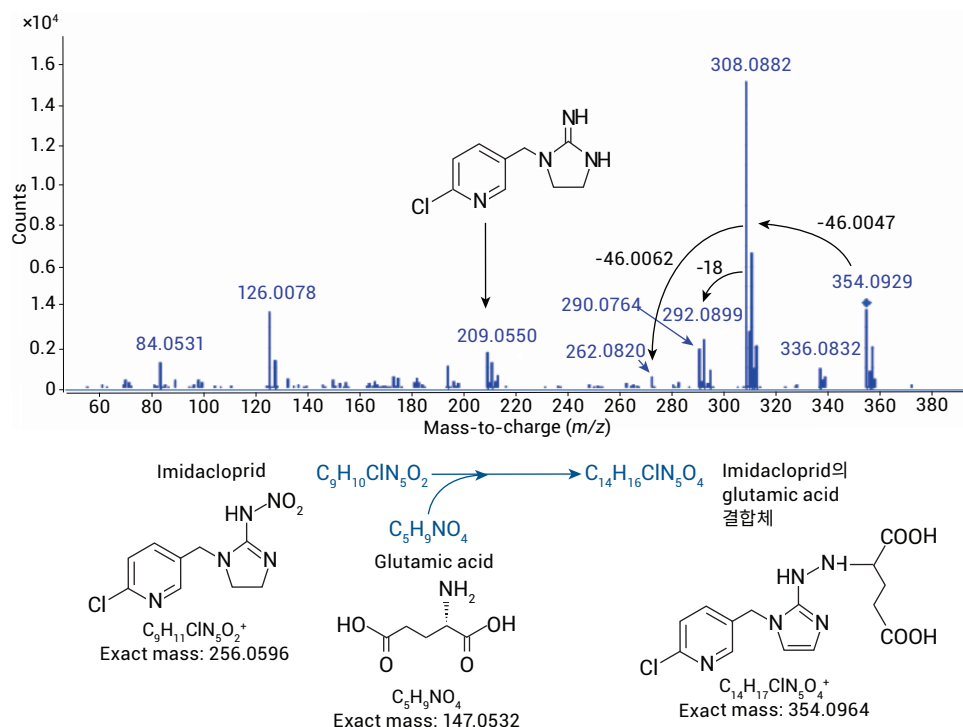


그림 5. MS/MS 전이 및 양파 대사 관련 지식을 활용한 m/z 354.0955 대사체 구조 확인. 두 46amu 부분의 neutral loss는 오직 2개의 COOH_2 (formic acid) 작용기 손실로 설명할 수 있음. Glutamic acid에 의한 imidacloprid의 니트로기 환원은 대사체 상의 2개 카르복실기 및 imidacloprid에 의한 5개의 탄소 및 6개의 수소 획득을 설명해 주며, 대사체의 정확한 질량을 제공

Mass Profiler에 의한 차이점 구별

Agilent Mass Profiler 소프트웨어의 Molecular Feature Extractor를 사용하여 농약을 살포한 양파에서 발견한 모든 화합물과 대조군(농약처리 하지 않은 양파)에서 발견한 모든 화합물을 비교하였습니다(그림 6). 두 가지 양파 추출액의 프로파일은 너무 복잡하여 추정 대사체를 추출할 수는 없지만, 결과를 통해 양파에 농약을 살포하는 것이 양파의 화학적 조성뿐만 아니라 농약 자체의 대사에 많은 변화를 초래한다는 것을 시사합니다. 이로써 농약이 양파의 영양 성분에 미치는 긍정적 및 부정적 영향에 대한 추가적인 연구가 필요하다는 것이 분명해졌습니다.

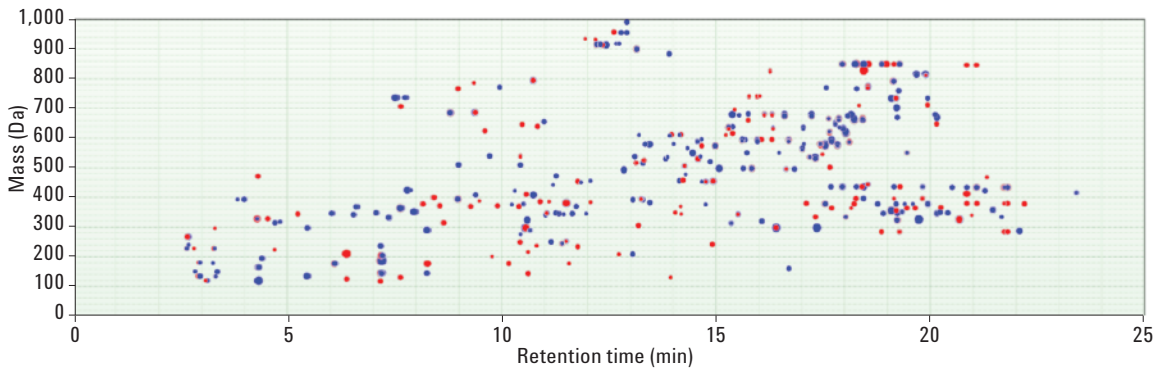


그림 6. 질량 및 머무름 시간 비교와 농약 처리하지 않은 바탕 양파 추출액 3 개의 평균 대비 imidacloprid 처리 후 28일째 수확한 시료 3 개 평균에 대한 질량 대 머무름 시간 비교(파란색 점은 두 시료 세트에서 공통되는 특징이고 빨간색 점은 농약 처리된 시료의 고유 특징임)

Imidacloprid 및 대사체 분포

본 연구를 통해 imidacloprid의 6가지 새로운 대사체를 식별하였습니다(표 2). Imidacloprid 및 이 6가지 대사체에 대한 양파 및 토양 추출액을 분석한 결과 양파는 주로 guanidine 대사체를 함유하고, 토양은 주로 대사 작용을 하지 않는 농약을 함유하는 것으로 나타났습니다. 나머지 5개의 새로운 대사체는 모두 guanidine 대사체 및 어미 농약에 비해 극미량으로 존재합니다(그림 7).

표 2. MS/MS 분석을 통해 새롭게 식별된 6개의 imidacloprid 대사체

대사체	원소 조성	머무름 시간(분)	Exact mass [M+H] ⁺	화학 구조
Methylated imidacloprid	C ₁₀ H ₁₄ ClN ₅	8.3	240.1010	
Guanidine 유사체의 올레핀	C ₉ H ₉ ClN ₄	6.4	209.0589	
Imidacloprid-amine 유사체	C ₉ H ₁₂ ClN ₅	6.0	226.0854	
Olefin-imidacloprid-amine 유사체	C ₉ H ₁₀ ClN ₅	4.8	224.0697	
Imidacloprid olefin guanidine의 glutamic acid 결합체	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₅ O ₄	10.7	354.0964	
Guanidine imidacloprid의 이성질체	C ₉ H ₁₁ ClN ₄	7.1	211.0745	

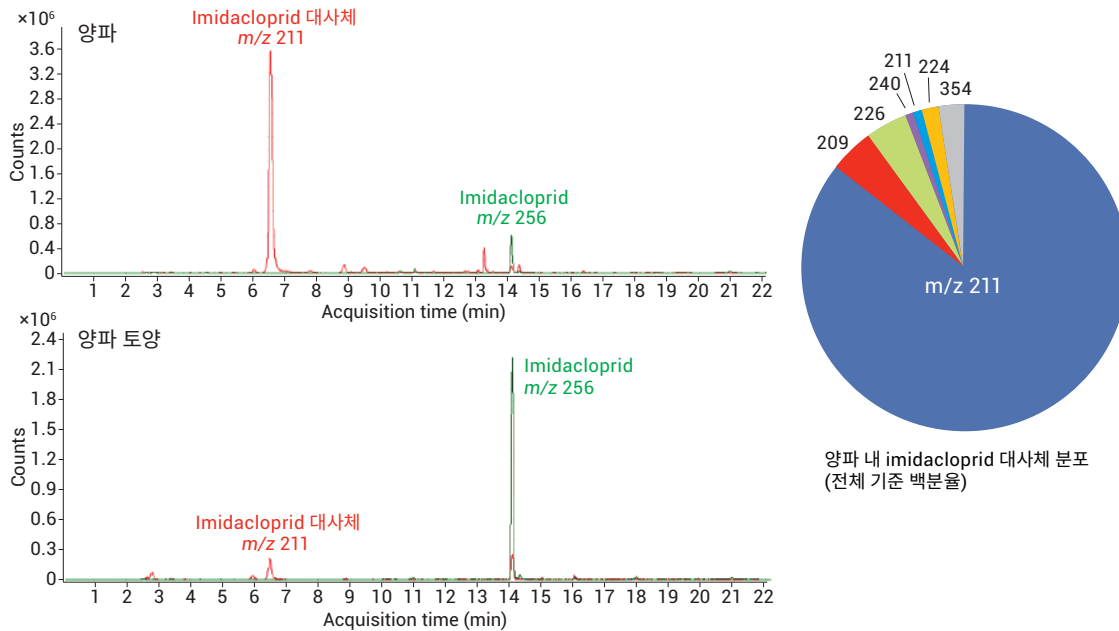


그림 7. 토양과 양파 추출액 모두에서 농약 및 농약의 주 대사체인 guanidine 유사체(m/z 211)의 분포. 원 그래프는 새롭게 식별된 5가지 대사체와 guanidine 유사체(m/z 211)의 양파 내 분포를 guanidine 유사체의 두 가지 이성질체를 포함하는 총 7가지 대사체 기준의 백분율로 나타냄

결론

Agilent 6540 Ultra High Definition(UHD) Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 시스템 및 소프트웨어는 imidacloprid의 대사체를 식별하고 그 특성을 규명할 뿐만 아니라 식물 및 환경 내에서 농약의 운명에 관한 자세한 연구를 가능하게 하는 강력한 도구를 제공합니다. Accurate mass 데이터베이스 검색, All Ions MS/MS를 이용한 진단용 이온, Chlorine Filter 그리고 Mass Profiler와 같은 도구를 사용하면 새로운 대사체를 그 구조에 대한 사전 지식이 거의 없거나 전혀 없는 상태에서도 규명할 수 있습니다. 이 도구들은 복잡한 시료에서 중간정도의 세기로 나타나는 다수의 미지 어미 화합물 유도체의 식별이 필요한 모든 연구에 일반적으로 적용할 수 있습니다.

참고문헌

1. E.M. Thurman, *et al.* "Identification of imidacloprid metabolites in onion (*Allium cepa* L.) using high-resolution mass spectrometry and accurate mass tools" *Rapid Commun Mass Spectrom.* **27**(17):1891-903 (2013)
2. S. Kagabu "Discovery of imidacloprid and further developments from strategic molecular designs" *J. Agric. Food Chem.* **59**, 2887- 2896 (2011)
3. M. Tomizawa, J.E. Casida "Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors" *Annu. Rev. Entomol.* **48**, 339-364 (2003)
4. T. Iwasa, *et al.* "Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*" *Crop Protection* **23**, 371-378 (2004)
5. E.M. Thurman and I. Ferrer "The isotopic mass defect: A tool for limiting molecular formula by accurate mass" *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 2807-2816 (2010)
6. I. Ferrer and E.M. Thurman "Identification of a new antidepressant and its glucuronide metabolite in water samples using liquid chromatography/quadrupole time-of- flight mass spectrometry" *Anal. Chem.* **82**, 8161-8168 (2010)

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품 및 서비스에 대한 자세한 내용은 애질런트 웹사이트 (www.agilent.com/chem)를 참조하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2013
한국에서 인쇄
2013년 11월 22일
5991-3397KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies