

Agilent 6545 Q-TOF의 All Ion MS/MS 기술을 이용한 복잡한 식품 매트릭스 내의 240종 농약에 대한 신속한 스크리닝 및 정량

응용 자료

저자

Dan-Hui Dorothy Yang,
Christian Klein, Crystal Cody,
and Huy Bui
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA 95051

개요

본 응용 자료는 Agilent All Ions MS/MS 기술을 사용하여 복잡한 식품 매트릭스 내의 240종 농약 및 농약 대사체를 검출하는 UHPLC/Q-TOF/MS 분석법을 소개합니다. 이 분석법은 Agilent 1290 Infinity UHPLC 시스템을 이용하여 크로마토그래피 분리능을 향상시켰으며 Agilent Jet Stream 이온화원으로 이온화율을 높였습니다. 무엇보다 Agilent 6545 Q-TOF 시스템의 향상된 감도와 부서지기 쉬운 유기 분자 이온의 전송을 최적화해주는 튜닝으로 신속하고 정확한 스크리닝과 정량이 가능합니다. All Ions MS/MS 기술로 데이터 수집 분석 조건을 쉽게 설정할 수 있으며 확장된 라이브러리를 이용하여 데이터를 소급하여 연구할 수 있습니다. 복잡성을 띠는 홍차 매트릭스와 고지질 함유 식품을 대표하는 시료 매트릭스로서 아보카도를 선택하였습니다.

6545 Q-TOF LC/MS 시스템은 작은 유기 분자에 대한 검출 감도를 향상하여 대부분의 표적 농약을 최대 잔류 허용량(MRLs) 이하로 스크리닝과 정량이 가능한 분석 결과를 나타냈습니다.



Agilent Technologies

소개

식품 중의 잔류 농약 스크리닝은 식품 안정성 분석에 있어 가장 까다로운 응용 분야 중 하나입니다. 식품 안에는 1,000가지 이상의 농약 및 농약 대사체가 포함되어 있습니다. 유럽연합 위원회 규정(European Commission regulation, EC) 396/2005 및 부록에서는 17만 개 이상의 매트릭스-농약 조합에 대한 최대 잔류 허용량(Maximum Residue Limits, MRL)을 정하고 있습니다¹. 다른 지역에도 이와 유사한 규정이 있습니다². 따라서 광범위한 식품 매트릭스 내 미량의 농약에 대한 정량 분석을 위해서는 신속하고 신뢰할 수 있는 분석법이 필요합니다. Accurate mass LC/MS는 조각화 조건에 대한 사전 정보 없이도 대량의 분석물질을 쉽게 검출할 수 있는 분석법 설정을 가능하게 합니다. 특히 상업적 시험기관이 합리적인 비용으로 시험 범위를 늘리고 처리량을 높이는 데 중요한 역할을 합니다.

Accurate mass LC/MS는 MS 데이터의 여러 정보를 이용하여 잔류 농약의 스크리닝과 정량 분석을 합니다. 질량 정확도, 동위원소 존재비, 동위원소 간격 및 부가물의 패턴을 분석합니다. 머무름 시간 또한 화합물 매칭에서 자주 고려되는 중요한 요소입니다. 또한 식별된 잔류 농약은 적당한 충돌에너지를 설정하여 auto MS/MS 혹은 표적 MS/MS로 분석하고 PCDL(Personal Compound Database and Library)로 MS/MS 스펙트럼을 비교하여 추가로 확인할 수 있습니다. 이는 QuEChERS 추출물과 같은 복잡한 매트릭스 성분 분석에서의 위양성(false positive)을 배제하기 위한 매우 중요한 과정입니다.

그러나 복잡한 매트릭스 성분 자체의 높은 존재비 때문에 조각화 이온을 선택하는 과정에서 홍차 및 아보카도와 같은 복잡한 매트릭스 중의 미량의 분석물질에 대한 의미 있는 auto MS/MS 스펙트럼을 얻기는 쉽지 않습니다. 농약 스크리닝과 구조 확인을 위해 표적 MS/MS를 이용할 수 있습니다. 표적 MS/MS 분석법 설정을 위해서는 특정 이온 종의 머무름 시간에 대한 정보가 필요합니다. 이처럼 새롭거나 미지의 잔류물질에 대한

데이터를 다시 연구하기 위해서는 데이터 재수집 과정이 필요합니다. 애질런트는 이러한 복잡한 매트릭스에서의 auto 및 표적 MS/MS의 한계를 극복하기 위해 All Ions MS/MS 기술을 개발하였습니다³.

All Ions MS/MS 기술은 전구 이온을 미리 선택하지 않고, 고 에너지 채널에서 모든 전구 물질을 조각화하여 쉽게 분석 조건을 설정할 수 있습니다. 그런 다음 MS/MS 라이브러리를 이용하여 생성 이온의 스펙트럼을 확인합니다. 위양성(false positive)을 배제하기 위해, 생성 이온이 전구 이온의 조각화에 의한 것인지 검증하는 과정이 필요하며 전구 이온과 생성 이온의 크로마토그래피 동시 용리에 대한 확인이 필요합니다. 또한 MassHunter Qualitative/Quantitative 분석법으로 신속하게 데이터를 수집하여 워크플로를 간소화할 수 있습니다. MassHunter Qualitative 분석으로 얻은 화합물 정보로 정성 이온을 생성 이온으로 설정하여 정량 분석법 개발에 이용할 수 있습니다. 또한 SANCO/12571/2013⁴과 같은 지침 문서에 규정되어 있는 분석법 검증 및 품질 관리 절차에 대한 잔류 농약 식별 기준을 충족할 수 있습니다. TOF 스펙트럼에서 얻은 accurate mass 데이터로 라이브러리를 확장할 수 있어 추가된 화합물에 대해서도 소급하여 간단하게 재분석할 수 있습니다. MassHunter Acquisition B.06.01로 분석 수행 시 저분자에 대한 최적화된 튜닝으로 감도가 향상되어, 수백 종의 농약류 분석도 All Ions MS/MS 기술을 이용하여 단 한번의 분석으로 스크리닝과 정량 분석을 할 수 있어 실험실의 분석 효율이 크게 향상됩니다.

본 응용 자료는 Agilent Pesticide Comprehensive Test Mix(p/n 5190-0551)의 성분 분석을 위한 All Ions MS/MS 분석법을 설명합니다. Agilent 1290 Infinity UHPLC 시스템과 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 시스템을 결합하였습니다. 데이터 수집은 양이온 모드로 진행하였습니다. 6545 Q-TOF LC/MS 시스템에서의 일부 개선 사항으로 분석 성능이 더욱 향상되었습니다. 새로운 디자인의 slicer로 고감도 및 고분해능 모드로 작동되도록 개선하였으며, 새로운 고성능 고전압 전원 장치로 고분자에

대한 질량 분해능을 향상시켰습니다. 또한 새롭게 향상된 gain shifted 검출기로 검출기의 사용 수명이 더 증가되었습니다. PSO(Particle Swarm Optimization) 기술은 질량 분석기의 최적화를 위해 최초로 상용화된 기술로, 기기를 더욱 신속하고 강력하게 튜닝할 수 있습니다. 일괄적인 기존의 Auto Tune과 달리 SWARM Tune은 응용 목적에 따른 맞춤형 기기 최적화라는 새로운 장을 열었습니다. 이 알고리즘은 부서지기 쉬운(fragile) 저분자의 이온 전송을 사용자 선택으로 최적화할 수 있습니다(예: 50~250m/z, 및 50~750m/z). 6540 Q-TOF LC/MS의 기존 autotune과 비교하면 시스템 튜닝 속도가 4배 향상되었습니다.

실험

시약 및 화학 물질

모든 시약과 용매는 HPLC 또는 LC/MS 등급을 사용하였습니다. Acetonitrile과 methanol은 Honeywell(Morristown, NJ, USA) 사의 제품을 사용하였습니다. 초순수는 LC-Pak Polisher와 0.22µm POU(point-of-use) 멤브레인 필터 카트리지(EMD Milipore, Billerica, MA, USA)를 장착하여 Milli-Q integral 시스템을 이용해 제조하였습니다. Formic acid는 Fluka(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 ammonium formate 용액(5M)은 애질런트(p/n G1946-85021)에서 구입하였습니다. 농약 시료는 Agilent Pesticide Comprehensive Test Mix(p/n 5190-0551)를 사용하였습니다. 검량 시료는 QuEChERS 추출물에 10ppm의 농약 시료를 첨가하여 준비하였습니다.

시료 전처리

유기농 홍차와 유기농 아보카도는 현지 식료품점에서 구매하였습니다. 시료는 공식 citrate buffered QuEChERS 프로토콜에 따라 Agilent BondElut QuEChERS 키트(p/n 5982-5650)⁵를 이용해 추출하였습니다. 균질화된 아보카도 10g과 홍차 2g을 50mL 폴리프로필렌 튜브에 넣고 acetonitrile 10mL를 추가해 1분간 강하게 흔들어 추출하였습니다. 홍차 시료는 추출 2시간 전에 8mL의 초순수에 담가

두었습니다. 아보카도 원추출물은 지질 제거를 위해 dispersive SPE (p/n 5982-5158)로 정제하였고 홍차 원추출물은 graphitized carbon black(GCB)로 정제하였습니다. 최종 추출물에 6단계 농도(1, 5, 10, 20, 50 및 100ng/g)의 농약을 첨가하였습니다. 주입 전에 시료 매트릭스와 같은 농도의 표준물질을 준비하였습니다.

장비 및 소프트웨어

분리 과정은 다음 구성으로 이루어진 Agilent 1290 Infinity UHPLC 시스템을 이용해 수행하였습니다.

- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프(G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 고성능 자동 시료 주입기(G4226A) 및 시료 냉각기(G1330B),
- Agilent 1290 Infinity 향온 컬럼 장치(G1316C)

Agilent Jet Stream 전기분무 이중 이온화원이 장착된 Agilent 6545 Accurate Mass Q-TOF LC/MS 시스템과 UHPLC 시스템을 결합하였습니다. Agilent MassHunter Workstation 소프트웨어를 사용하여 데이터 수집(B.06.01, build 6.01.6145), 정성 분석(B.07.00, build 7.0.7024.0) 및 정량 분석(B.07.00, build 7.0.457.0)을 수행하였습니다.

분석법

1290 Infinity UHPLC 조건을 표 1에 요약하였습니다. 분석은 양이온 모드에서 수행하였으며, 최종 추출액 3µL를 주입하였습니다. 240종의 농약류를 대표하는 14종의 농약을 선택하여 이온화원의 분석 조건을 최적화하였습니다. 6545 Q-TOF LC/MS 분석 조건에 대한 요약은 표 2에 정리하였습니다.

MassHunter Qualitative 및 Quantitative Analysis 소프트웨어를 이용하여 데이터를 평가하였으며, 2차 방정식, 가중치(1/x)를 사용하여 원점을 지나는 검량선을 작성하였습니다.

표 1. Agilent 1290 UHPLC 분석조건

분석조건	값
컬럼	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 × 150mm, 1.8µm (p/n 959759-902)
컬럼 온도	45°C
주입량	3µL
샘플러 온도	5°C
니들 세척	10초(80% MeOH/20% water)
이동상	A) Water, 5mM NH ₄ formate + 0.1% formic acid B) MeOH, 5 mM NH ₄ formate + 0.1% formic acid
유속	0.4mL/분
기울기 용리 조건	시간 %B
	0 5
	1 5
	4 50
	17 100
	20 100
	20.1 5
분석 시간	22분
평형 시간	1분

표 2. Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 시스템 분석조건

분석조건	값
모드	양이온, 4GHz 고분해능
튜닝	50~250m/z
건조 가스 온도	150°C
건조 가스 유량	10L/분
Sheath 가스 온도	375°C
Sheath 가스 유량	12L/분
분무기 압력	35psi
캐필러리 전압	3,500V
노즐 전압	200V
Fragmentor	125V
Skimmer	45V
Oct1 RF Vpp	750V
수집 질량 범위	50~1,000m/z
수집 속도	3 spectra/초
충돌 에너지	0V, 20V, 40V
기준 이온 질량	121.050873, 922.009798

결과 및 토의

데이터 처리

데이터 파일은 본 연구의 모든 농약을 포함하는 맞춤형 PCDL에 대응하기 위해 FbF(Find by Formula) 알고리즘을 사용하여 처리하였습니다. FbF는 All Ions MS/MS 기술을 지원할 수 있도록 업데이트 되었습니다. MassHunter Qualitative Analysis B.07의 **fragment confirmation** 탭 아래에는 이 All Ions MS/MS 기술에 대한 매우 유용한 기능이 포함되어 있습니다. **molecular ion optional** 확인란을 선택하면 포화 전구 이온 또는 매우 약한 전구 이온의 경우 All Ions MS/MS 응용의 매칭 스코어에 어떤 영향도 미치지 않음을 확인할 수 있습니다. 이는 화합물의 질량 감응 및 취약성(fragility)에

유의한 차이가 있으므로 수백 가지 농약 스크리닝 등 여러 분석물질 식별에 매우 중요합니다. 먼저 PCDL에서 저에너지 채널의 MS 피크와 동일한 m/z 값을 가지는 화합물을 검색하였습니다. 식별 화합물의 경우 PCDL의 MS/MS 스펙트럼 내 조각 이온을 고에너지 채널의 이온과 비교하여 매칭되는 조각이 존재하는지 확인하였습니다.

PCDL로 대부분 화합물(240 개 중 224개)의 MS/MS 스펙트럼을 검색하여 가장 높은 존재비를 보이는 생성 이온의 EIC를 추출하였습니다. PCDL에서 검출되지 않은 MS/MS 스펙트럼은 화합물 분석을 위한 식별을 하였습니다. 각 조각 이온은 크로마토그래피 평가를 수행하여 지정 시간 범위의 전구 이온과 생성 이온간의 연관성을 확인하였습니다.

사용자는 MassHunter Qualitative Analysis의 compound detail view 창을 통해 적합하지 않은 조각을 제거하여 매칭률을 높여 빠르게 화합물을 검출할 수 있습니다. 그림 1에 5ppb linuron을 예로 분석 결과의 일반적인 레이아웃을 설명하였습니다. 분석된 화합물 목록이 나열되어 있어 빠르게 검색할 수 있습니다. 전구 이온 및 생성 이온 크로마토그램을 겹쳐 표시하였고 동시용리 점수도 나타냈습니다. 동시용리 점수는 그림 1 왼쪽에 표시된 바와 같이 머무를 시간만이 아닌 전체 피크 데이터를 사용하여 나타냈습니다. 오른쪽에는 라이브러리 매칭 결과를 비롯하여 시그널 세기, 신호 대 잡음 비(S/N), 충돌 에너지가 명시되어 있습니다. MS 스펙트럼과 조각 스펙트럼을 보여주며, 조각 이온은 라이브러리와 매칭하여 나타내었고 라이브러리는 배경에 색상으로 강조 표시하여 나타냈습니다.

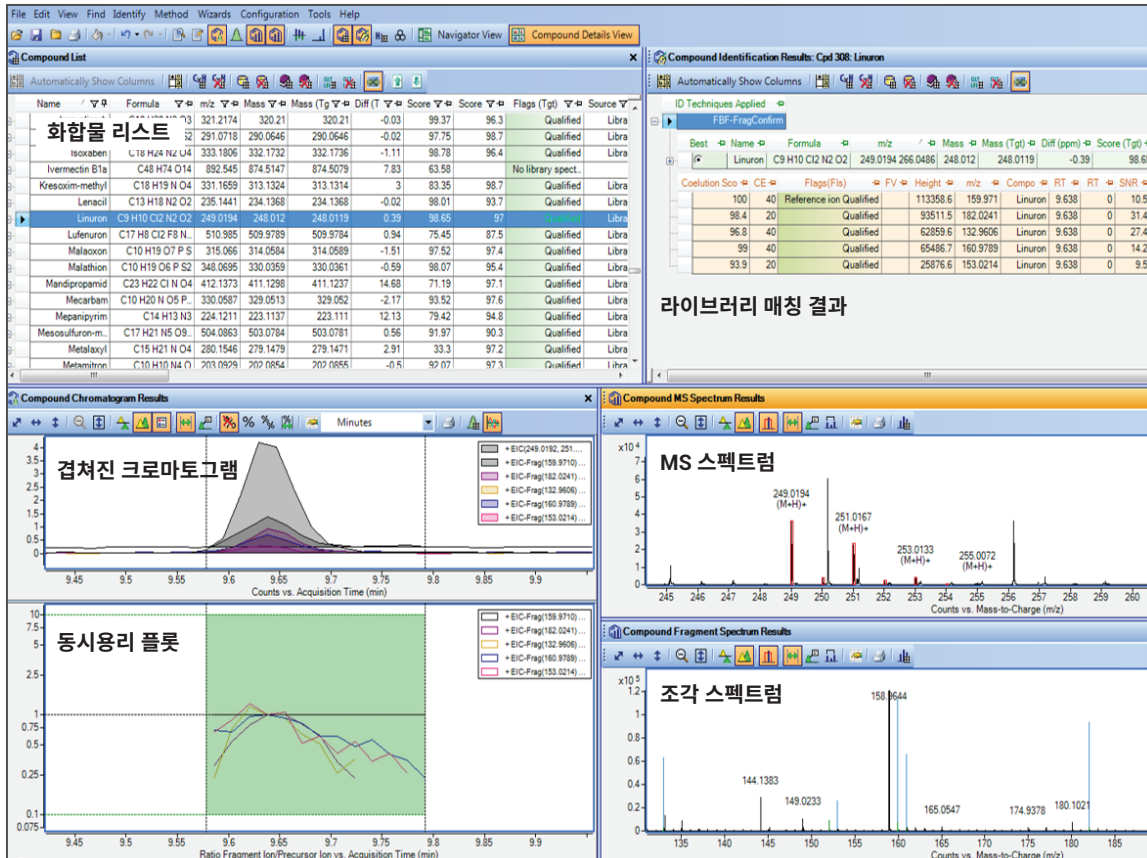


그림 1. All Ions MS/MS 기술에 사용되는 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 데이터 검색 창. 사용자는 각 화합물에 대한 동시용리 점수, 라이브러리 매칭 및 질량 스펙트럼의 데이터 품질을 평가할 수 있음

화합물에 대한 정보(이름, RT, 전구 이온 m/z 값, 생성 이온 m/z , 충돌 에너지 값)를 compound exchange file(.cef)로 변환하여 MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어로 내보낼 수 있습니다. 그런 다음 검량 농도를 추가하여 간단하게 배치 분석법을 생성할 수 있습니다. 본 워크플로를 사용하면 수백 종의 농약을 배치 모드로 정량할 수 있습니다.

복잡한 매트릭스 중의 240종 농약 검출

일부 화합물은 생성 이온의 낮은 S/N, 낮은 동시 용리 점수 혹은 머무름 시간의 오차 범위(± 0.2 분) 벗어나 부적합하였습니다. 적합하지 않은 화합물은 정량 분석을 위한 .cef 파일에서 배제하였습니다. 그림 2는 홍차 중의 benalaxyl과 아보카도 중의 amidosulfuron의 검량선 예시를 보여줍니다. 가장 높은 존재비를 가진 생성 이온을 정성 이온으로 선택하였습니다. 홍차 중의 2ppb, 아보카도 중의 10ppb에 해당하는 10ng/g을 첨가한 실험에서 홍차 중 72%의 농약 성분과 아보카도 중 80%의 농약 성분을 정량 분석할 수 있었습니다.

시스템 내구성

6545 Q-TOF LC/MS는 하드웨어의 변화로 복잡한 매트릭스에 대한 시스템의 내구성을 향상하였습니다. 홍차 및 아보카도의 식품 안정성 테스트를 위한 시스템 QC 분석을 약 1주일에 걸쳐 수행하였으며, acetonitrile 내 20ppb의 240종 농약을 MS에서 검출하였습니다. 7차례 QC 분석을 반복 실행하였으며(총 14개 데이터 파일) 포화되거나 갈라진 피크를 배제한 후 90% 이상의 화합물의 CV가 10% 미만이었습니다. 조금 더 큰 CV에서도 뚜렷한 하락 추세를 보이지 않았으며, 하나 또는 두 개 정도만이 무작위로 벗어나는 결과를 보였습니다. 7차례 실행한 QC 분석의 평균 CV는 7.6%로 복잡한 매트릭스의 연속 주입에서도 뛰어난 시스템 안정성을 보여주었습니다.

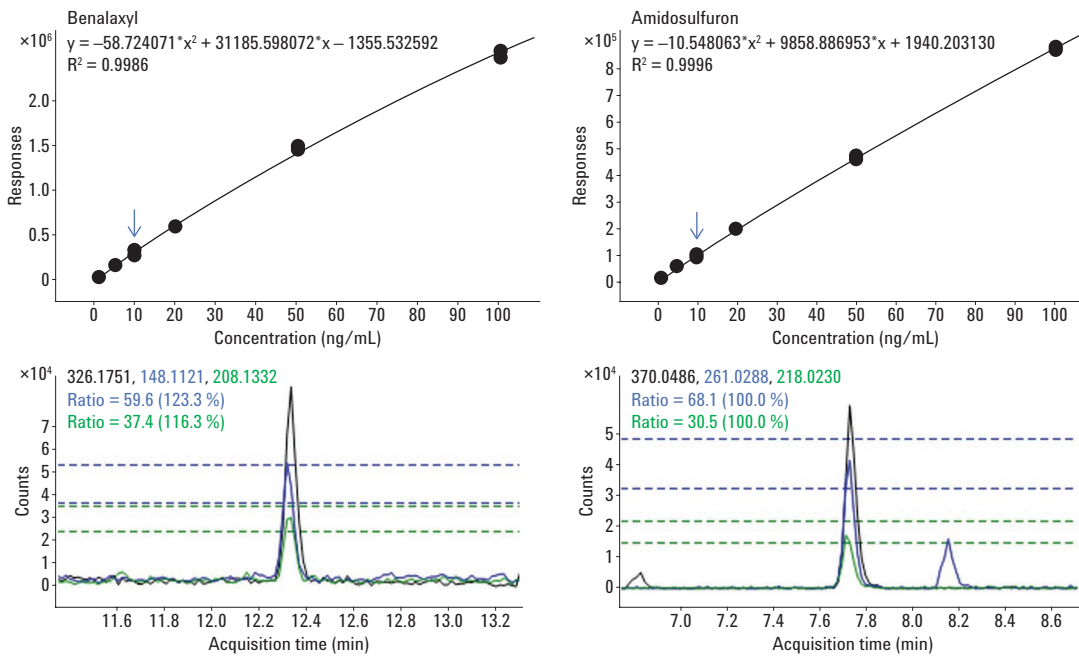


그림 2. 홍차 시료(왼쪽)의 benalaxyl 및 아보카도 시료(오른쪽)의 amidosulfuron에 대한 검량선 예. 홍차 시료 및 아보카도 시료의 경우 10ng/g 첨가 농도에서 각각 농약의 72% 및 80%를 검출하였음

결론

All Ions MS/MS는 표적 MS/MS 혹은 auto MS/MS로는 한계가 있는 식품, 혈장, 소변과 같은 복잡한 매트릭스 중의 수백 종의 분석물질 검출에 매우 유용한 분석 기술입니다. 이 기술은 전구 이온 선택과 조각화 조건에 대한 사전 정보 없이도 쉽게 분석법을 설정할 수 있으며, 시료의 재분석 없이도 새로운 분석물질에 대한 데이터 파일을 다시 연구할 수 있습니다. MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어는 각 화합물의 조각 라이브러리 매칭 결과와 전구 이온 및 생성 이온의 크로마토그래피 동시용리 정보를 쉽게 볼 수 있도록 수치화하여 나타내줍니다. 또한 MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어는 간소화된 MassHunter Qualitative/Quantitative 분석법을 제공하여 검량 농도만 간단히 입력하여 수백 종의 농약을 배치 모드로 분석할 수 있도록 하였습니다. Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 시스템은 부서지기 쉬운 유기 분자의 이온 전송을 최적화하여 감도를 향상시킨 제품으로 관련 응용 시장에 새롭게 추가된 유용한 시스템입니다. 복잡한 혼합물 내 대부분의 농약과 농약 대사체를 최대 잔류 허용량(MRLs) 이하로 검출할 수 있습니다. 애질런트는 분석자가 쉽게 분석법을 개발하고 validation 할 수 있도록 시약 키트부터 UHPLC//MS, PCDLs, MassHunter Qualitative/Quantitative Analysis 소프트웨어까지의 토탈 솔루션을 제공합니다.

참고문헌

1. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin (including amendments as of 18 March 2008) and complying with regulation (EC) 1107/2009.
2. US Regulation 40 CFR part 180 Tolerance Information for Pesticide Chemicals in Food and Feed Commodities.
3. Wuest, B; Glauner, T; Madden, S; Taylor, L; Payne, T. Rapid Pesticide Screening and Identification Using the High Resolution All Ions MS/MS Technique. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-2295EN.
4. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/12571/2013. http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf
5. Zhao, L; Stevens, J. Analysis of Pesticides Residues in Spinach Using Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC Kit by LC/MS/MS Detection. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-4248EN, 2012.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
2015년 2월 27일, 한국에서 발행
5991-5552KO

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



Agilent Technologies