



# 고분해능 Accurate Mass GC/Q-TOF와 계량분석화학 (chemometrics)법을 이용한 폐수의 환경오염물질 식별

## 응용 자료

환경

## 저자

Anthony Gravell, Praveen Kutty  
Natural Resources Wales  
Llanelli Laboratory  
Wales, United Kingdom

Sofia Nieto  
Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara, CA  
USA

## 개요

Agilent 7200 시리즈 GC/Q-TOF 시스템과 Agilent Mass Profiler Professional 소프트웨어의 계량분석화학(chemometrics)도구를 사용하는 GC/Q-TOF 분석법은 다양한 폐수처리장의 복잡한 폐수 시료의 환경오염물질을 확인하고 처리 과정 중에 환경 오염원의 변화를 추적하는 데에 효과적인 분석법입니다.



**Agilent Technologies**

## 소개

다양한 폐수 흐름에 존재하는 수 많은 화합물은 폐수 처리 중의 환경오염물질의 특성을 규명하는 데에 방해가 됩니다 [1]. 가스 크로마토그래피/질량 분석기(GC/MS)를 이용한 폐수의 농약 및 기타 환경오염물질의 Untargeted 분석은 NIST 14와 같은 포괄적인 EI 라이브러리를 사용합니다. NIST 14는 80,000개 이상의 화합물에 대한 머무름인덱스(RI) 값과 함께 200,000 개 이상의 EI 스펙트럼을 포함하고 있습니다. 그러나, 매우 복잡한 크로마토그램과 거대한 데이터 세트를 갖는 이러한 워크플로(workflow)의 특징은 상당한 분석적 문제를 가집니다[2,3].

단위 질량 전자 이온화(EI) 데이터의 deconvolution에 이은 질량 스펙트럼 라이브러리 검색은 환경오염물질 식별에 사용되는 가장 일반적인 워크플로이지만, 이 방법을 이용한 화합물 식별은 신뢰하기 어려우며, 특히 라이브러리 매칭 결과가 낮은 경우에 그러합니다. 고분해능을 이용한 GC/Q-TOF의 accurate mass 기능은 믿을 수 있는 화합물 식별을 위해 필요한 도구를 분석가에게 제공합니다.

본 응용 자료는 폐수의 수 많은 미지 화합물의 식별 효율을 높이기 위해 고분해능 accurate mass 사중극자-시간비행형 질량분석기(Q-TOF MS)를 사용한 untargeted과 targeted 분석을 결합한 새로운 접근법을 제시합니다. 뿐만 아니라, Agilent MPP(Mass Profiler Profiler Professional) 소프트웨어를 이용한 계량분석화학기술은 폐수 처리 중 환경오염물질의 특징을 규명하기 위한 통계 분석과 데이터 해석에 사용합니다.

## 실험

### 실험 기기

본 연구는 Agilent 7200 시리즈 GC/Q-TOF 시스템과 Agilent 7890B GC 시스템을 사용하였습니다. 기기 조건은 표 1과 같습니다.

표 1. GC 및 질량 분석기 조건

GC 분석 조건	
컬럼	Agilent DB-5 MS Ultra Inert, 30m×0.25mm, 0.25µm film (p/n 122-5532UI)
주입량	1µL
분할비	10:1
분할/비분할 주입구 온도	300°C
오븐 온도 프로그램	70°C에서 2분간 유지 25°C/분으로 160°C까지 승온 3°C/분으로 205°C까지 승온 8°C/분으로 280°C까지 승온, 7.5분간 유지 40°C/분으로 325°C까지 승온, 2분간 유지
운반 가스	헬륨, 1.5mL/분, 일정 유량
이송 라인(Transfer line) 온도	300°C
MS 조건	
이온화 모드	EI
소스 온도	280°C
사중극자 온도	150°C
질량 범위	50 ~ 600m/z

### 시료 전처리

영국 남부 웨일스의 폐수처리장 세 곳에서 1차와 최종 폐수 시료를 며칠에 걸쳐 수집하였습니다. 5개씩 나누어 담은 각 폐수장의 최종 폐수, 1차 폐수 시료와 바탕 시료는 dichloromethane으로 추출하여 적은 양으로 농축합니다. 추출 전 각각의 시료에 내부표준물질인 deuterated phenanthrene(D<sub>10</sub>)을 첨가합니다.

## 데이터 처리 및 통계 분석

데이터는 Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어(버전 B.07)의 Unknowns Analysis 소프트웨어를 이용하여 크로마토그래피 deconvolution하였으며, 그 다음에는 NIST 14 질량 스펙트럼 라이브러리와 비교하여 잠정적으로 화합물을 식별합니다. MassHunter Quality Analysis 소프트웨어(버전 B.07)의 accurate mass 도구를 이용하여 식별된 환경오염물질을 추가 확인합니다. 식별한 성분에서 확인이 필요한 대략 200개의 추정되는 오염물질 세트를 선택하고 MassHunter Quantitative Analysis 사용하여 반정량(semiquantitation) 합니다.

이후, 정량 분석 결과를 가져와 다변량 통계 패키지인 Mass Profiler Profiler Professional(MPP, 버전 13)로 처리하여 폐수처리장 환경오염물질의 변화를 확인합니다. 그림 1은 데이터 분석 워크플로의 개요입니다.

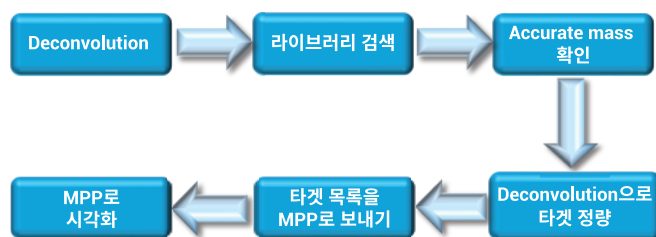


그림 1. 데이터 분석 워크플로

## 결과 및 토의

### 크로마토그래피 deconvolution, 라이브러리 검색 및 accurate mass 확인

크로마토그래피 deconvolution과 NIST 라이브러리 검색을 이용해 각각의 시료에서 약 600개의 성분을 잠정적으로 식별합니다(그림 2). 화합물 식별은 정확한 질량 정보, 관련 동위원소 accurate mass 정보와 Molecular Formula Generator(MFG)를 포함한 MassHunter accurate mass 도구를 이용하여 추가로 확인합니다(그림 3). 우수한 질량 정확도와 낮은 동위원소 존재비 오차는 잠정적인 결과 확인을 용이하게 합니다(표 2). 데이터는 내부 표준물질로 표준화(normalized)된 피크 면적을 사용하여 MassHunter Quantity Analysis 소프트웨어로 추가 처리합니다.

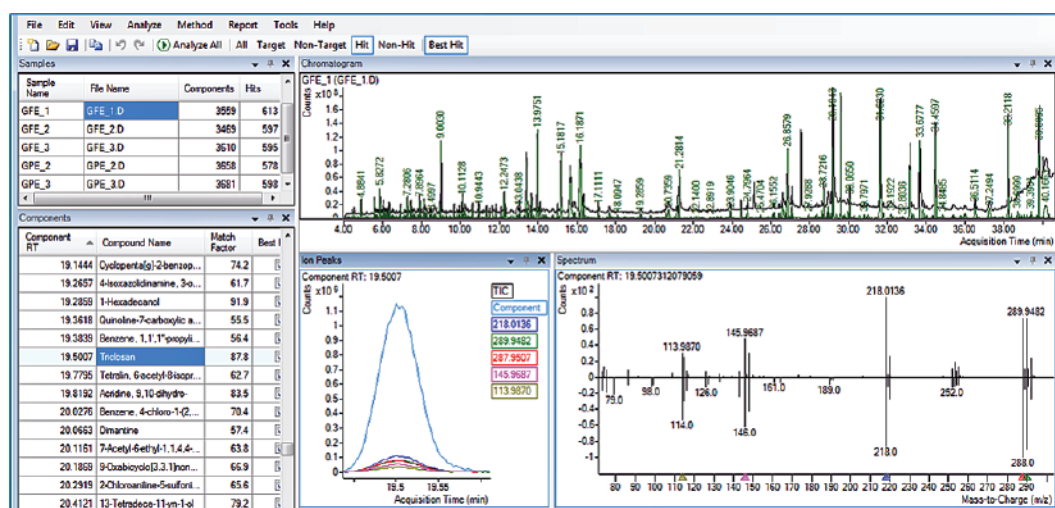


그림 2. Unknowns Analysis 도구는 deconvolution 및 NIST 라이브러리 검색에 사용됩니다. 하단 중간 패널에는 선택한 성분에 대한 deconvolution 이온이 표시됩니다. 모두 같은 피크 모양을 가져 모두가 같은 성분인 것을 확인할 수 있어 화합물의 식별을 돕습니다(이 경우 triclosan)

Best	Name	Formula	Score	Mass	Mass (Tgt)	Mass (DB)	Diff (ppm)	Diff (abs. ppm)	Diff (mDa)	RT	RT (Tgt)	RT Diff
	C18 H26 O		85.31	258.1987			-1.45	1.45	-0.37			
Species	Ion Formula	m/z	Height	Score (MFG)	Score (MS)	Score (mass)	Score (iso. abund)	Score (iso. spacing)				
	M+	C18 H26 O	258.19	38562	85.31	85.31	98.48	94.86				47.48
m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)	Diff (mDa)	Height	Height (Calc)	Height %	Height % (Calc)	Height Sum %	Height Sum % (Calc)			
258.1981	258.1978	-1.1	-0.3	38562	38584.2	100	100	83.4	83.5			
259.202	259.2012	-3.19	-0.8	7663.9	7641.8	19.9	19.8	16.6	16.5			
Best	Name	Formula	Score	Mass	Mass (Tgt)	Mass (DB)	Diff (ppm)	Diff (abs. ppm)	Diff (mDa)	RT	RT (Tgt)	RT Diff
	C17 H26 O		84.39	246.2027			-17.52	17.52	-4.31			
	C18 H12 O		83.66	244.0932			-18.14	18.14	-4.43			
	C17 H23 O		77.2	243.176			-4.43	4.43	-1.08			
	C13 H14 O		77.09	186.0993			27.83	27.83	5.18			
	C15 H18 O		75.54	214.1307			26.19	26.19	5.61			

그림 3. Molecular Formula Generator 결과

표 2. 사이트 3의 최종 폐수 중 일부 화합물에 대한 질량 및 M+1 분자 이온 동위원소 존재비 오차

화합물	화합식	절대 m/z	연산 m/z	MI*의 질량 오차(ppm)	M+1 존재비 오차(%)
p-Dichlorobenzene	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	145.9684	145.9685	-0.69	0.3
1,2,4-Trithiolane	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S <sub>3</sub>	123.9469	123.947	-0.81	-0.7
2,6-Dichlorophenol	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O	161.963	161.9634	-2.47	-1.2
Benzothiazole	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NS	135.0142	135.0137	3.70	-0.1
3,5-Dichloroaniline	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> N	160.9795	160.9794	0.62	0.8
Chloroxylenol	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> ClO	156.0336	156.0336	-0.30	0.7
5-Methylbenzotriazole	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub>	133.0636	133.0634	1.00	0.9
2,3,4-Trichloroaniline	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub> N	194.9404	194.9404	0.02	-1.5
4-Methyl-1H-benzotriazole	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub>	133.0634	133.0634	-0.20	-0.5
Crotamiton	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> NO	203.131	203.1305	2.46	2.2
Benzophenone	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O	182.0733	182.0726	3.84	0.1
Tonalide (ANTH)	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O	258.1981	258.1978	1.16	0.1
평균				1.44	0.76

\*MI = 분자 이온

## 통계 분석

확인이 필요한 추정 오염물질 타겟 목록을 선택하고, 이어 정량결과를 가져와 다변량 통계 패키지인 MPP에서 폐수처리장 오염물질의 변화를 확인합니다. 그림 1은 데이터 분석 워크플로의 개요입니다.

## 주성분 분석(Principle Component Analysis, PCA)

주성분 분석(PCA)은 데이터 차원 감소에 대한 무감독(無監督) 다변량 통계분석기술로 흔히 사용됩니다. PCA 분석으로 각각의 사이트의 1차 및 최종 폐수의 차이뿐만 아니라, 세 곳의 폐수처리장(wastewater treatment works, WWTW)간의 구성요소와 존재비 차이에 대해 뚜렷하게 구분되는 데이터 클러스터가 밝혀졌습니다(그림 4). Z축을 따라 데이터 포인트를 그룹화하면 세 개의 사이트 모두에 대한 1차 폐수의 화학적 유사성이 나타납니다.

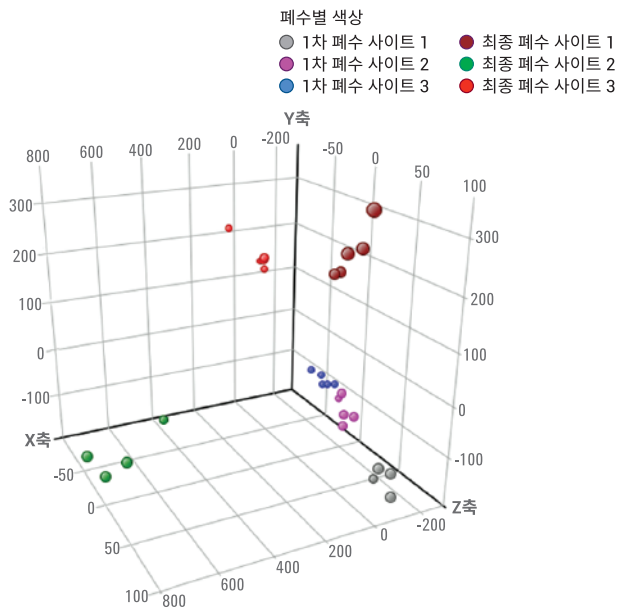


그림 4. PCA 도표를 통해 각 유형의 폐수를 나누어 담은 시료들에 대한 뚜렷이 구별되는 화합물 클러스터를 확인할 수 있습니다. 1차 폐수(PE); 최종 폐수(FE)

## Heat map 분석

WWTW 세 곳의 1차 및 최종 폐수에 대한 환경오염물질의 변화를 나타내기 위해 MPP를 이용하여 heat map을 생성하였습니다(그림 5). 이들 화합물의 일부는 우측에 상세한 보기로 표기하였습니다. 1차 폐수 대비 최종 폐수에서 일부 화합물의 존재비가 감소하였습니다. 예를 들어, caffeine과 tonalide(AHTN)는 사이트 3의 최종 폐수에서 존재비가 모두 크게 감소한 반면, cashmeran(DPMI)은 사이트 1과 2에서 관련 존재비의 큰 변화는 없었습니다. 실제, 다른 화합물들은 사이트 3의 2,3,4-trichlorophenol과 같이 1차 폐수 대비 최종 폐수에서 존재비가 증가하였습니다.

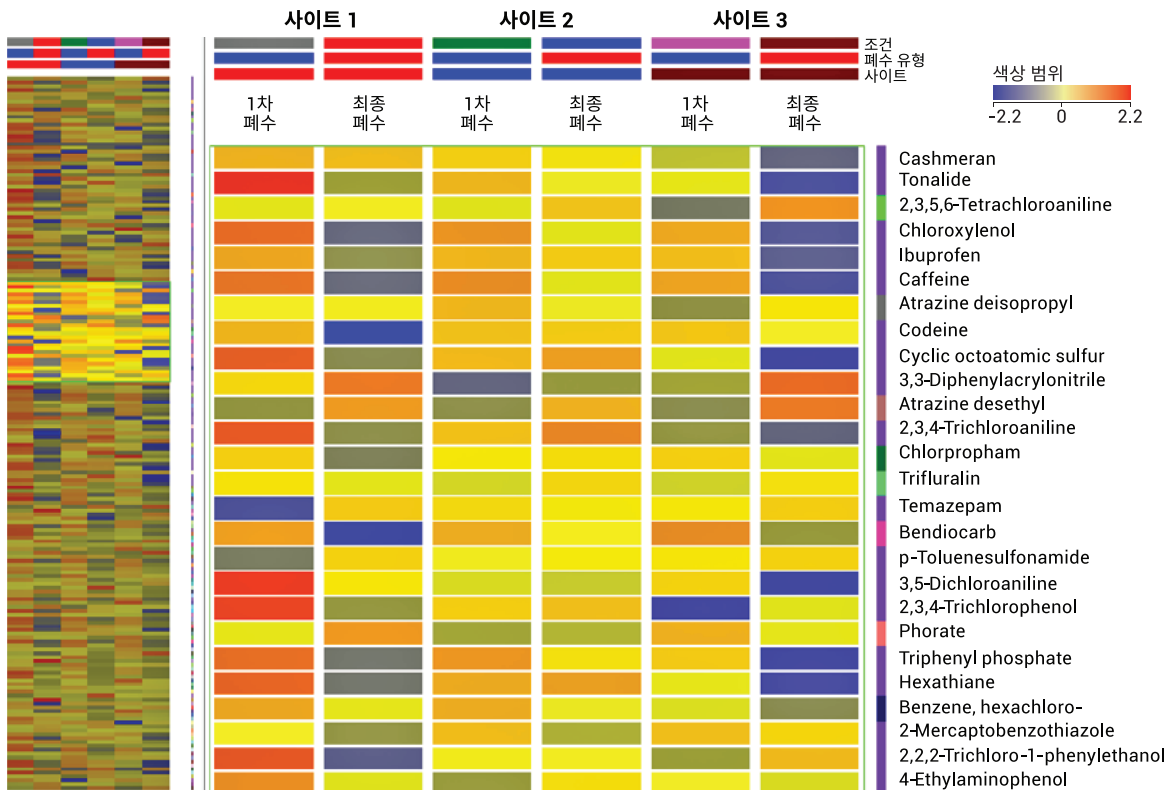


그림 5. MPP Heat map 요약(왼쪽) 및 상세 보기(오른쪽). 세로 열은 폐수 유형 및 처리장을 나타내며 가로 열은 화합물을 나타냅니다

## K-means clustering 분석

MPP의 K-means clustering 도구는 서로 다른 조건(1차 및 2차 폐수)에서 화합물 반응의 유사성에 기초하여 물질(화합물)을 그룹(클러스터)으로 나눕니다. K-means clusters는 각 그룹의 일반적인 반응(배출 변화 정도에 따라 측정된 존재비의 증가 또는 감소)을 다른 그룹과 구별하도록 만들어졌습니다. 그림 6은 사이트 3에서 분석한 두

화합물 그룹에 대한 K-means clusters를 나타냅니다. 왼쪽 패널에서는 그룹의 모든 화합물은 1차 폐수 대비 최종 폐수에서 유사한 방식으로 존재비가 감소합니다. 반대로, 오른쪽 패널에 있는 그룹의 모든 화합물은 최종 폐수에서 유사한 방식으로 존재비가 증가합니다. 이러한 방법으로, 유사한 존재비 변화를 보이는 여러 화합물 그룹을 식별합니다.

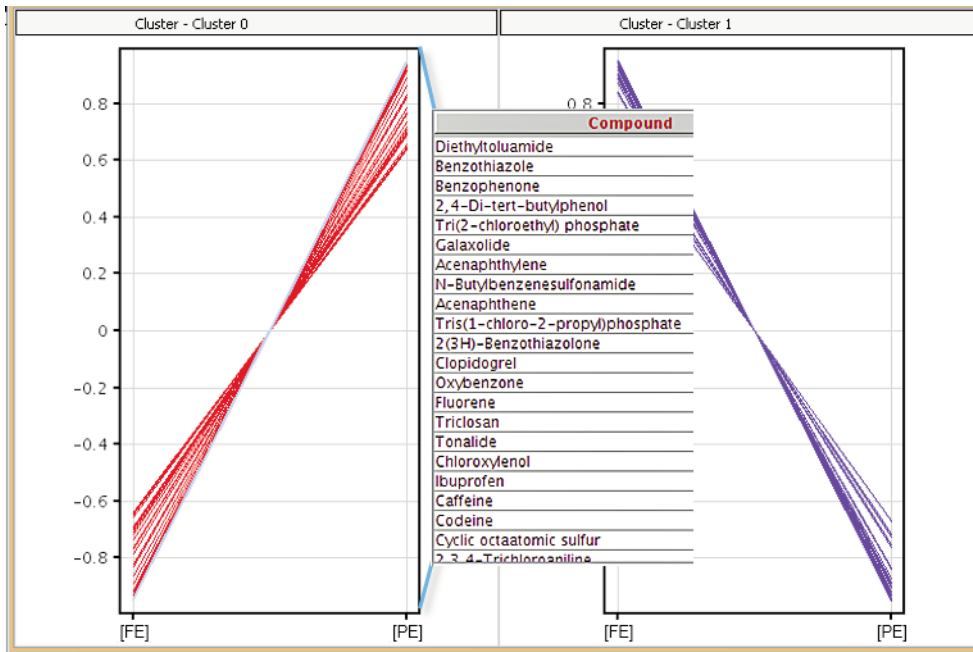


그림 6. 사이트 3의 대표적인 두 종류 화합물 그룹에 대한 K-means clustering은 1차 폐수(오른쪽 그래프)와 최종 폐수(왼쪽 그래프) 모두에서 존재비의 유사한 배출 변화 정도를 보입니다. 왼쪽 클러스터의 화합물 중 일부는 텍스트 상자에 표기하였습니다.

## 벤 다이어그램(Venn diagram)

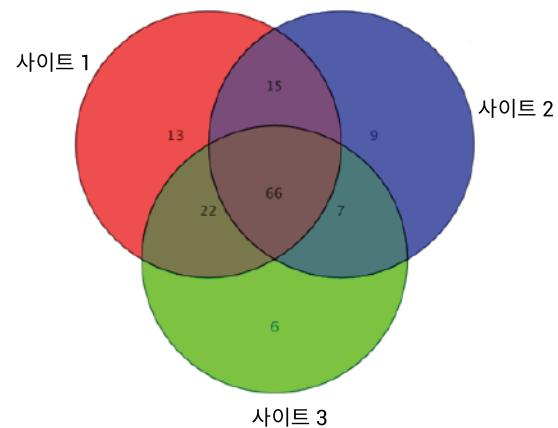
처리 과정 중 제거, 축적, 공통적으로 존재, 고유한 화합물의 수에 대한 사이트 별 시각적 비교를 위해 벤 다이어그램이 사용됩니다(그림 7). 모든 사이트에서 1차 폐수(그림 7의 왼쪽)에서 제거된 화합물의 수가 누적된 화합물의 수보다 더 큼니다.

## 결론

가스 크로마토그래피, 고분해능 Q-TOF 질량분석기와 계량 분석화학법의 조합은 다양한 폐수처리장에서의 복잡한 폐수 시료에 대한 환경오염원을 특징화하고 식별하는 데 성공적으로 사용됩니다. Targeted 및 untargeted 접근법을 모두 사용한 데이터 분석은 특히, 1차 폐수에 존재하나 최종 폐수에서는 저농도로 크게 감소하는 약물, benzothiazole 계 부식 방지제, polycyclic musk를 포함한 수 많은 화합물을 밝혀냅니다.

처리장 및 화합물 그룹 간 폐수처리방식의 유사성과 차이를 밝히는 Agilent Mass Profiler Professional의 통계 분석 도구는 다양한 통계적 접근법을 사용하여 그 결과를 쉽고 빠르게 시각화합니다. 따라서, 이러한 접근법은 극미량 유기 오염물질 제거에 대한 폐수처리효과의 해석을 용이하게 합니다.

**A** 최종 폐수의 존재비 감소 화합물



**B** 최종 폐수의 존재비 증가 화합물

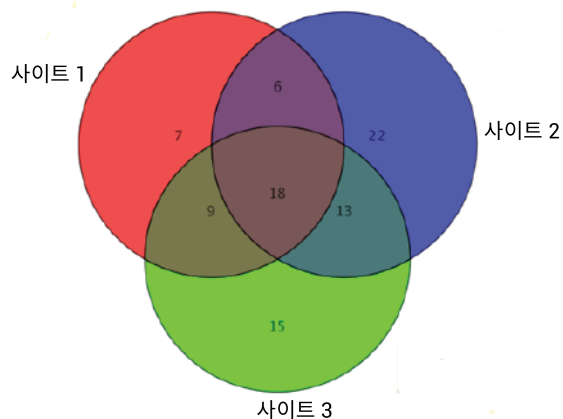


그림 7. 최종 폐수 대비 1차 폐수에 상당히 높은 농도로 존재하는 화합물을 보이는 벤 다이어그램(A) 1차 폐수 대비 최종 폐수의 축적된 화합물을 보이는 벤 다이어그램(B) 다양한 사이트에 공통으로 존재하는 화합물의 수는 다이어그램의 겹쳐진 부분으로 표기됩니다.

## 참고문헌

1. T. Portoles, E. Pitarch, F. J. Lopez, J. V. Sancho, F. J. Hernandez. "Methodical approach for the use of GC-TOF MS for screening and confirmation of organic pollutants in environmental water." *J. Mass Spectrom.* **42(9)**, 1175-85 (2007).
2. T. Portoles, E. Pitarch, F. J. Lopez, F. Hernandez. "Development and validation of a rapid and wide-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural water and wastewater by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry." *J. Chromatogr. A* **1218(2)**, 303-15 (2011).
3. F. Hernandez, T. Portoles, E. Pitarch, F. J. Lopez. "Gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry to analyze trace-level organic compounds in the environment, food safety and toxicology." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **30(2)**, 388-400 (2011).

## 자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다.  
애질런트 제품에 대한 더 자세한 정보를 알아보시려면  
[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)을 방문하십시오.

[www.agilent.com/chem](http://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., 2015  
2015년 12월 7일 월요일  
한국에서 인쇄  
5991-6488KO

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



**Agilent Technologies**