



GC/Q-TOF를 사용한 식품 내 농약 스크리닝

Agilent MassHunter GC/Q-TOF 농약 개별 화합물 데이터베이스 및 라이브러리를 사용한 검색 및 검증

응용 자료

식품 안전

저자

Kai Chen, Joan Stevens 및 Sofia Nieto
Agilent Technologies, Inc.

개요

다중 잔류 농약 스크리닝 분석법 개발을 위해 고분해능 정확한 질량 GC/Q-TOF 질량 분석법을 사용하는 것에 관한 관심이 고조되고 있습니다. Agilent 7200 시리즈 고분해능 정확한 질량 GC/Q-TOF 시스템의 전자 이온화(EI) 전체 스펙트럼 수집 모드는 분석물질의 조각 이온에 대한 정확한 질량 정보를 제공합니다. Agilent MassHunter 소프트웨어 도구와 업데이트된 Agilent MassHunter GC/Q-TOF 농약 개별 화합물 데이터베이스 및 라이브러리(PCDL)를 함께 사용하면 복잡한 식품 매트릭스에서 농약에 대한 오염 의심 물질을 스크리닝할 수 있습니다. 동시용리된 추출 이온, 조각 이온의 상대적 존재비, 각 정성 이온의 질량 오차를 사용해 가장 높은 신뢰도로 화합물 식별을 검증합니다. 새로운 관심 농약의 정확한 질량 스펙트럼을 Agilent MassHunter 정성(Qualitative) 소프트웨어로 사용자 지정 PCDL에 직접 추가해 감시 계획을 지속적으로 확대할 수 있습니다.



Agilent Technologies

소개

식품에서 다양한 농약을 스크리닝하는 것이 현대 식품 안전 실험실에서 요구하는 가장 까다로운 응용 중 하나입니다. 고분해능 사중극자 비행시간(Q-TOF) 기기를 사용해 미량 오염물질의 정확한 질량을 측정할 수 있어 스크리닝 검출 한계가 낮아지고 스펙트럼 확인이 향상됩니다. Agilent 7200 시리즈 GC/Q-TOF 시스템을 사용해 전체 수집 모드에서 스펙트럼을 수집할 수 있습니다. 이러한 비표적 접근법의 장점은 GC로 측정 가능한 모든 성분의 스펙트럼 정보를 획득해 더욱 포괄적인 데이터 분석이 가능하다는 것으로, 예상치 못한 또는 새로운 오염물질이 나타나는 경우에 특히 유용합니다. 따라서 식별 신뢰도가 높은 다중 잔류농약 스크리닝 방법을 개발하기 위해 고분해능 GC/Q-TOF 기기를 사용하는 것에 관한 관심이 고조되고 있습니다[1].

7200 시리즈 GC/Q-TOF 시스템을 사용한 다양한 식품에서의 농약 스크리닝 분석법과 워크플로는 이미 논의했습니다[2,3]. 이러한 연구에서 Agilent MassHunter 소프트웨어와 PCDL은 다양한 농약 중 오염 의심 물질 스크리닝을 수행할 수 있었습니다. 애질런트 워크플로는 PCDL의 MS 스펙트럼에서 각 화합물의 가장 특징적인 이온을 선택하고, 전체 이온 크로마토그램에서 추출합니다. 정성 분석은 동시 용리 점수를 기반으로 하며, 이는 참고 머무름 시간(RT) window에서 추출한 이온의 공분산을 결정합니다. 이러한 연구에서 다양한 농도로 첨가된 여러 가지 농약 중 95% 이상을 다양한 식품 매질에서 식별할 수 있다는 점이 입증되었습니다.

이 응용 자료는 정확한 질량 스펙트럼 정보를 이용해 식품 매트릭스 중 농약 스크리닝 결과를 검토하고 검증하는 데 초점을 맞춥니다. 향상된 표적/오염 의심 물질 스크리닝 워크플로 및 업데이트된 Agilent MassHunter GC/Q-TOF 농약 개별 화합물 데이터베이스와 라이브러리(PCDL) (p/n G3892AA)를 사용해 혼합된 식품 매트릭스에서 대표적인 농약에 대한 오염 의심 물질 스크리닝을 수행했습니다. RT 차이, 전자 이온화(EI)를 통해 생성된 특성 조각 이온의 상대적 존재비, 이러한 이온의 질량 오차를 사용해 식별 신뢰도를 높였습니다. GC/Q-TOF 농약 PCDL은 사용자 지정이 가능합니다. 이러한 사용자 지정을 통해 사용자는 새로운 화합물을 PCDL에 추가한 다음 Agilent MassHunter 정성 소프트웨어에서 얻어진 맞춤형 정확한 질량 스펙트럼을 추가할 수 있습니다.

실험

기기

이 연구는 Agilent 7200B Q-TOF 시스템과 연결된 Agilent 7890B GC 시스템을 사용하였습니다. 그림 1은 기기 구성을 보여주며, 표 1은 기기 조건이 나타나 있습니다. GC는 일정 유량하에서 머무름 시간 고정(RTL)과, 컬럼중간 백플러싱 스크리닝 분석법을 사용했습니다.

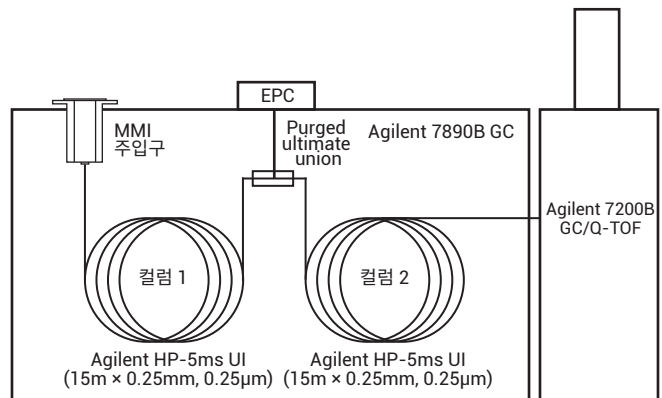


그림 1. 컬럼중간 백플러싱으로 구성된 Agilent 7200 GC/Q-TOF 시스템 Agilent 7890B GC와 Agilent 7200B Q-TOF 질량 분석기를 연결해 사용했습니다.

표 1. Agilent 7890B GC 및 Agilent 7200B GC/Q-TOF 질량 분석기 조건

GC	
컬럼	Agilent HP-5ms UI, 15m × 0.25mm, 0.25µm(2개)
운반 가스	헬륨
컬럼 1 유량	1.0mL/분
컬럼 2 유량	1.2mL/분
주입 부피	2µL 냉각 비분할
주입구 라이너	2mm id Ultra Inert Dimpled (p/n 5190-2296)
MMI 온도 프로그램	0.2분간 60°C 600°C/분 ~ 300°C, 유지 330°C, 분석 후
오븐 온도 프로그램	1분간 60°C 40°C/분 ~ 170°C, 0분 10°C/분 ~ 310°C, 3분
분석 시간	20.75분
백플러시	5분 (분석 후)
머무름 시간 고정	Chlorpyrifos-methyl을 9.143분에 고정
이송 라인 온도	280°C
Q-TOF MS	
이온화 모드	EI
이온화원 온도	300°C
사중극자 온도	180°C
질량 범위	45~550m/z
스펙트럼 수집 속도	5Hz, 중심 모드 및 프로파일 모드 모두에서 수집
수집 모드	4GHz 고분해능

시료 전처리

이 연구에서는 평가를 위해 혼합된 식품 매트릭스의 추출물을 사용했습니다. 식품 시료는 현지 시장에서 구입했습니다. 추출 전처리는 Agilent 추출염과 분산 키트를 사용해 QuEChERS(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe)의 유럽 공인(EN) 분석법 기반으로 준비했으며, 추출 및 세척 단계는 앞서 기술되었습니다[2]. 애질런트 농약 검사 표준물질 혼합물(p/n 5190-0494)을 10ng/mL 농도로 추출물에 첨가한 다음, GC/Q-TOF 시스템을 사용해 분석했습니다.

결과 및 토의

Find by Fragments 도구를 사용한 화합물 식별

최신 Agilent MassHunter GC/Q-TOF Pesticide PCDL(p/n G3892AA)을 사용해 오염 의심 물질 스크리닝을 수행했습니다. PCDL에는 850종 이상의 화합물이 포함되어 있으며 각 화합물에는 참고 RT 및 고분해능 정확한 질량 스펙트럼이 포함되어 본 RT 고정 크로마토그래피법에 사용할 수 있습니다. 오염 의심 물질 스크리닝을 위한 데이터 분석은 MassHunter 정성 분석(Qualitative Analysis) 소프트웨어(B.08.00)의 Find by Fragments 알고리즘에 의존합니다. 소프트웨어는 PCDL EI MS 스펙트럼에서 각 화합물의 정확한 질량 이온들을 선택해 각 분석물질 참고 RT 근처의 이온 크로마토그램을 추출합니다. 참고 이온으로 사용할 이온을 하나 선택합니다. 그런 다음, 소프트웨어에서 동시 용리 점수(값 0 ~ 100)를 계산해 각 조각 이온의 공분산을 평가합니다. 동시 용리 점수는 참고

이온의 용리 시간 범위에서 조각 이온과 참고 이온 간의 강도비에 근거합니다. 피크 폭 또는 피크 대칭(앞쪽 끌림, 테일링)에서 RT 이동 차이는 동시 용리 점수에 부정적인 영향을 미칩니다. (소프트웨어내 정성으로 표시된) 각 화합물을 식별하려면 사용자 정의된 수만개의 다른 조각 이온도 참고 이온에 대한 동시 용리 기준에 부합해야 합니다 (예: 동시 용리 점수 70 이하). 사용자는 PCDL에서 참고 RT 양쪽에 최대 허용 RT 편차(예: 0.1분 이하)를 설정할 수 있습니다. 표 2는 총 6회 반복 주입된 농약 검사 표준물질 혼합물내 10ng/mL 농도의 17종 농약 모두를 혼합된 식품 매트릭스에서 성공적으로 식별해 냈음을 보여줍니다. RTL 수집 분석법으로 획득한 농약 RT는 ±0.03분 window에서 참고 값과 잘 일치합니다. 따라서 RTL 분석법을 수집에 사용하는 경우 PCDL내 참고 RT가 분석물질 식별에 유용함이 입증되었습니다. 특히, 크로마토그래피법으로 분리할 수 있는 동종 원소 화합물의 경우 유용합니다. 표 2에서 나타난 것처럼, 17종 농약 각각에는 2개 이상의 정성 이온이 있고 질량 오차는 5ppm을 넘지 않습니다.

표 2. 혼합 식품 추출물에서 화합물 식별 요약*

화학명	화학적식	참고 RT (분)	ΔRT (분)	정성 이온	정성 이온(I)		정성 이온(II)	
					m/z	질량 차이	m/z	질량 차이
Dichlorvos	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	4.679	0.013	6	219.9464	3.6	184.9744	2.2
Mevinphos	C ₇ H ₁₃ O ₆ P	5.610	0.005	4	192.0198	2.8	164.0233	2.8
Ethalfuralin	C ₁₃ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₄	7.139	0.005	5	316.0911	1.8	292.0548	2.7
Trifluralin	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	7.247	0.003	6	306.0709	2.3	290.0755	3.3
Atrazine	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	7.887	0.000	6	215.0932	3.7	202.068	3.2
Chlorpyrifos-methyl	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ P _S	9.143	0.002	6	287.9236	3.8	285.9267	2.3
Heptachlor	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	9.339	0.000	6	336.8496	2.8	271.8106	2.9
Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	9.729	0.003	5	124.9824	3.0	99.0077	3.6
DDE, p,p'-	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	11.612	0.006	6	317.9349	3.9	315.9375	1.9
Dieldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	11.717	0.005	6	276.8722	1.3	260.8595	1.1
Hexazinone	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₂	13.195	0.012	5	172.0896	5.0	171.0877	1.7
Propargite	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	13.318	-0.001	4	173.0955	3.9	136.0835	2.9
Mirex	C ₁₀ Cl ₁₂	14.874	0.005	6	269.8127	2.1	236.8409	2.1
Fenarimol	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	15.084	0.009	5	219.0317	2.9	138.9941	2.6
Coumaphos	C ₁₄ H ₁₆ ClO ₅ PS	15.853	0.012	5	362.0139	2.6	333.9822	2.4
Etofenprox	C ₂₅ H ₂₈ O ₃	16.777	0.019	3	164.1155	3.0	163.1124	2.0
Deltamethrin	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	18.117	0.023	3	252.9053	3.8	171.9882	4.2

* ΔRT 및 질량 오차는 반복 주입 평균 값을 나타냅니다(n=6).

화합물 검증을 통한 신뢰도 향상

EI 전체 스펙트럼 수집 고분해능 정확한 질량 측정은 각 분석물질의 조각 이온 정보를 충분히 제공합니다. 농약 식별에 이 충분한 정보를 활용하는 Agilent MassHunter Find by Fragments 알고리즘은 라이브러리의 참고 스펙트럼을 사용해 식별된 각 분석물질 정성 이온간 상대적 존재비 일치를 근거로 조각 비율 점수를 산출할 수 있습니다. 조각 비율 점수, 정성 이온의 질량 오차, 그리고 PCDL내 예상 RT대비 RT 차이를 검증함으로써 각 화합물의 식별 신뢰도가 더욱 높아질 수 있습니다. 그림 2는 농약 atrazine 식별을 검증한 예입니다. 이 농약의 측정된 RT는 7.887 분으로 PCDL의 참고 RT와 동일합니다. 조각 이온의 EIC

플롯은 우수한 동시 용리(점수: 98.64)를 보여주고, 모든 정성 이온들의 질량 오차(분자 및 조각 이온 모두 포함)는 5ppm 이하였습니다. Atrazine의 특성 이온은 혼합된 식품 매트릭스의 복잡한 백그라운드 존재에도 불구하고 가공되지 않은 스펙트럼에서 명확하게 구별할 수 있습니다. (100 점 만점에서) 99.62점을 넘는 조각 비율 점수는 식별된 6개 모든 이온의 존재비가 MS 스펙트럼 라이브러리의 이온 존재비와 비슷하다는 것을 나타냅니다. 식품 시료에 대한 스크리닝 결과의 일부로 보여지는 재구성된 이온 플롯과 atrazine의 라이브러리 스펙트럼을 비교시 높은 점수를 확인할 수 있습니다.

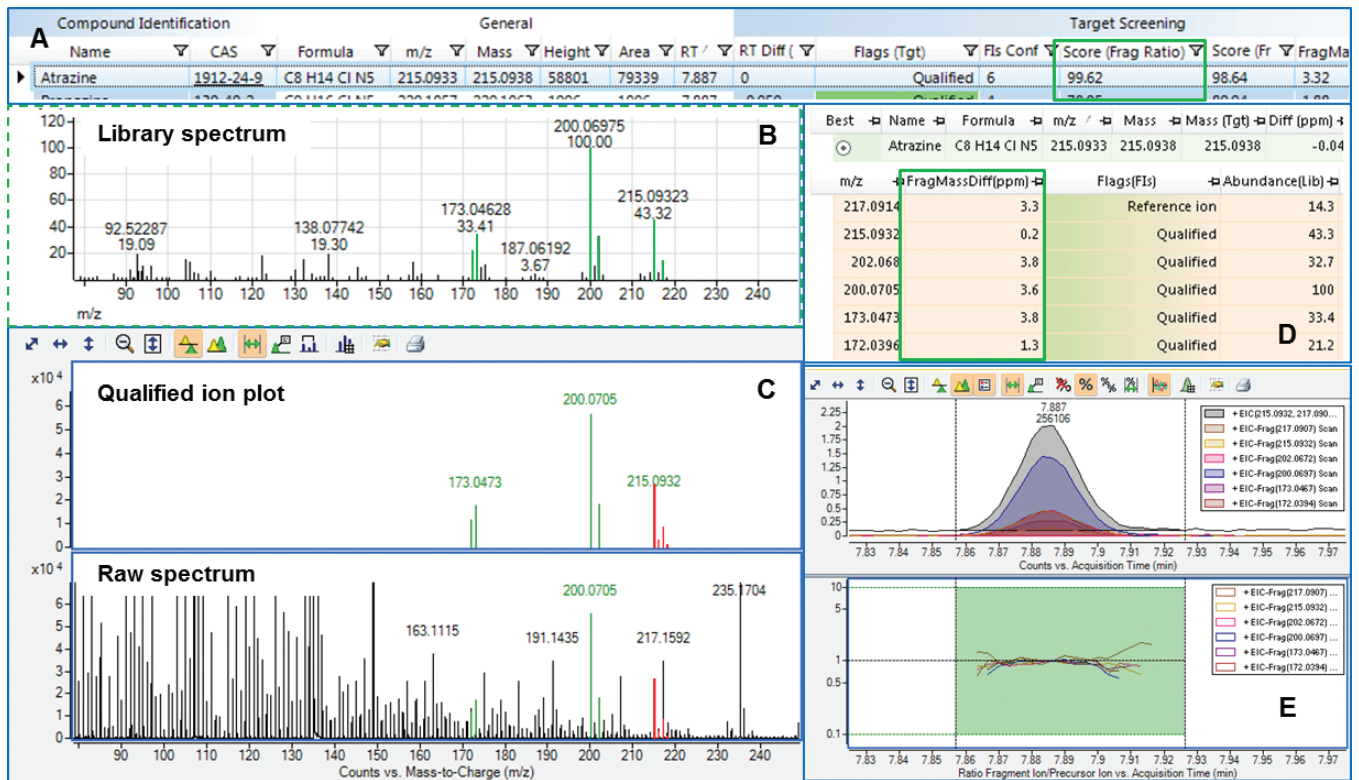


그림 2. Atrazine 식별 결과를 검증해 식별 신뢰도를 높였습니다. 99 이상의 조각 비율 점수(A)는 라이브러리 스펙트럼(B)과 측정된 스펙트럼(C) 간 정성 이온의 상대적 존재비가 비슷함을 나타냅니다. 모든 정성 이온의 질량 오차는 5ppm 미만(D)이고 이러한 이온의 EIC 정렬 상태가 우수(E)합니다. *라이브러리 스펙트럼은 Agilent MassHunter PCDL 관리자 소프트웨어에서 확인할 수 있습니다.

예상하지 못한 화합물 검출

GC/Q-TOF의 전체 스펙트럼 수집 모드의 또 다른 장점은 비표적 수집으로 예상하지 못한 화합물을 검출할 수 있다는 것입니다. 검증 목적으로 조각 비율 점수, 질량 오차 및 RT 차이를 사용해 예상하지 못한 화합물 식별을 포괄적으로 평가할 수 있습니다. 그림 3은 농약 검사 표준물질 혼합물 화합물 목록에 없음에도 불구하고, 미량 신호를 통해 식품 시료내 농약 *o,p'*-DDE를 식별하였음을 보여줍니다. 조각 비율 점수가 80을 초과하며, EIC 정렬이 양호하고 각 정성 이온의 질량 오차가 작다(5ppm 미만)는 점은 농약 *o,p'*-DDE의 존재를 확인시켜 줍니다. 이 화합물의 기원을 이해하기 위해서 매트릭스 바탕 시료와 두 개 다른 농도의 농약 검사 표준물질 혼합물 첨가 시료의 EIC 결과(*m/z* 이온

245.9998)를 비교했습니다. 각 이성질체의 참고 RT와 함께 고려하는 경우, *m/z* 245.9998 이온은 *o,p'*-DDE 및 *p,p'*-DDE 모두의 존재에 대한 고유 식별자입니다. 11.1분 및 11.6분 RT에서 이 특성 이온의 EIC 피크가 나타나지 않는 것은 화합물, *o,p'*-DDE 및 *p,p'*-DDE가 모두 매트릭스 바탕 시료에 존재하지 않음을 보여주는 것입니다. 11.6분 RT에서 EIC 신호는 *p,p'*-DDE가 예상하는 대로 농약 표준물질 혼합물에 존재함을 확인시켜 줍니다. 이성질체 *o,p'*-DDE가 훨씬 더 낮은 농도에서 존재함도 보여줍니다(11.1분 RT). 게다가 *p,p'*-DDE에 대한 *o,p'*-DDE의 응답 비율(약 1.5%)이 농약 검사 표준물질 혼합물의 두 개 농도 모두에서 비슷하게 관찰되었습니다. 이는 *o,p'*-DDE가 표준물질 혼합물내 미량 불순물임을 확인시켜 줍니다.

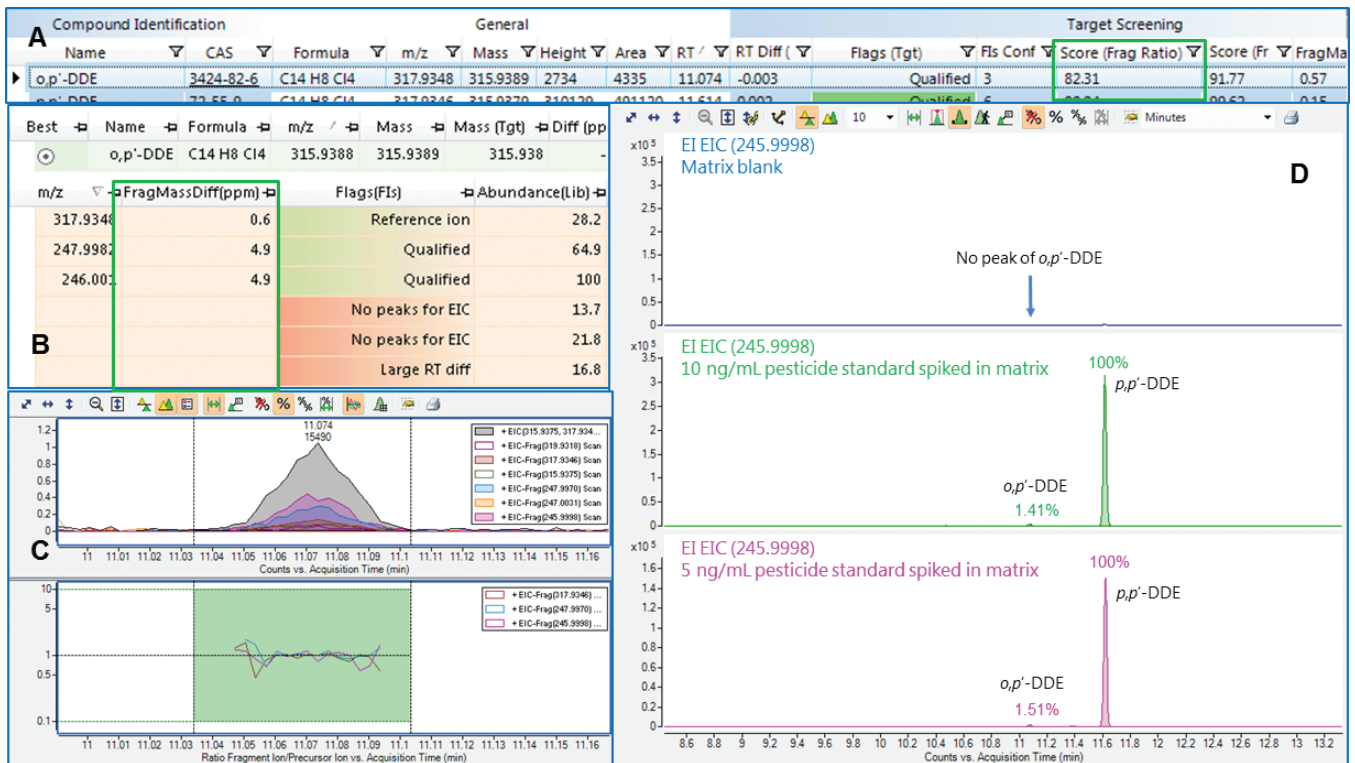


그림 3. 예상치 못한 *o,p'*-DDE의 피크는 조각 비율 점수(A), 정성 조각 이온 질량 오차(B) 및 EIC 정렬을 통해 검증할 수 있습니다. 매트릭스 바탕 시료에서 *o,p'*-DDE의 신호가 검출되지 않았었습니다(D 상단). 두개 다른 농도(D 중간 및 하단 패널)로 첨가한 농약 검사 표준용액 혼합물 시료에서 *p,p'*-DDE의 참고 피크 대비 *o,p'*-DDE의 응답 비율이 비슷한 것으로 나타났고, 이는 예상치 못한 피크가 첨가된 표준물질 혼합물내 미량 불순물임을 확인시켜 줍니다.

확장성 있는 PCDL

전체 스펙트럼 수집 모드에서 GC/Q-TOF 시스템은 각 시료에 존재하는 GC로 측정 가능한 모든 화합물의 질량 스펙트럼을 기록합니다. 결과 데이터를 기록해 나중에 새로운 관심 분석물질에 대해 다시 분석할 수 있습니다. 매년 전 세계적으로 매우 다양한 농약이 사용됩니다. 따라서 일부 농약은 현 감시 계획이나 시중 라이브러리에 포함되어 있지 않을 수 있습니다. MassHunter 소프트웨어는 새로운 화합물에 대한 맞춤형 EI GC/Q-TOF 정확한 질량 스펙트럼을 사용자 지정 PCDL에 추가할 수 있는 워크플로를 제공합니다. 이러한 새로운 PCDL 항목은 기록 데이터의 회고 분석에도 사용할 수 있습니다.

맞춤형 과정에서 소프트웨어는 조각 질량의 화학식을 알아내고, 이것이 해당 화합물의 중성 화학식 중 하위 화학식으로 유효한지 검증합니다. 그런 다음, 소프트웨어는 측정된 정확한 질량 값을 해당하는 이론 값에 맞춰 수정합니다. 유효한 하위 화학식이 없는 이온은 화합물에서 기인한 것이 아닌 것으로 간주되며 삭제됩니다. 그런 다음, 맞춤형 스펙트럼을 식별된 화합물에 대한 새로운 스펙트럼으로 PCDL로 스펙트럼 보내기 기능을 사용해 지정된 PCDL로 전송할 수 있습니다. 그림 4는 획득된 cyprazine($C_9H_{14}ClN_5$)의 정확한 질량 스펙트럼을 사용해 농약 EI GC/Q-TOF 맞춤형 스펙트럼으로 만드는 과정을 보여줍니다. 측정된 질량 스펙트럼에서 조각 이온 질량 피크에는 소프트웨어에 의해 자동으로 주석이 달립니다.

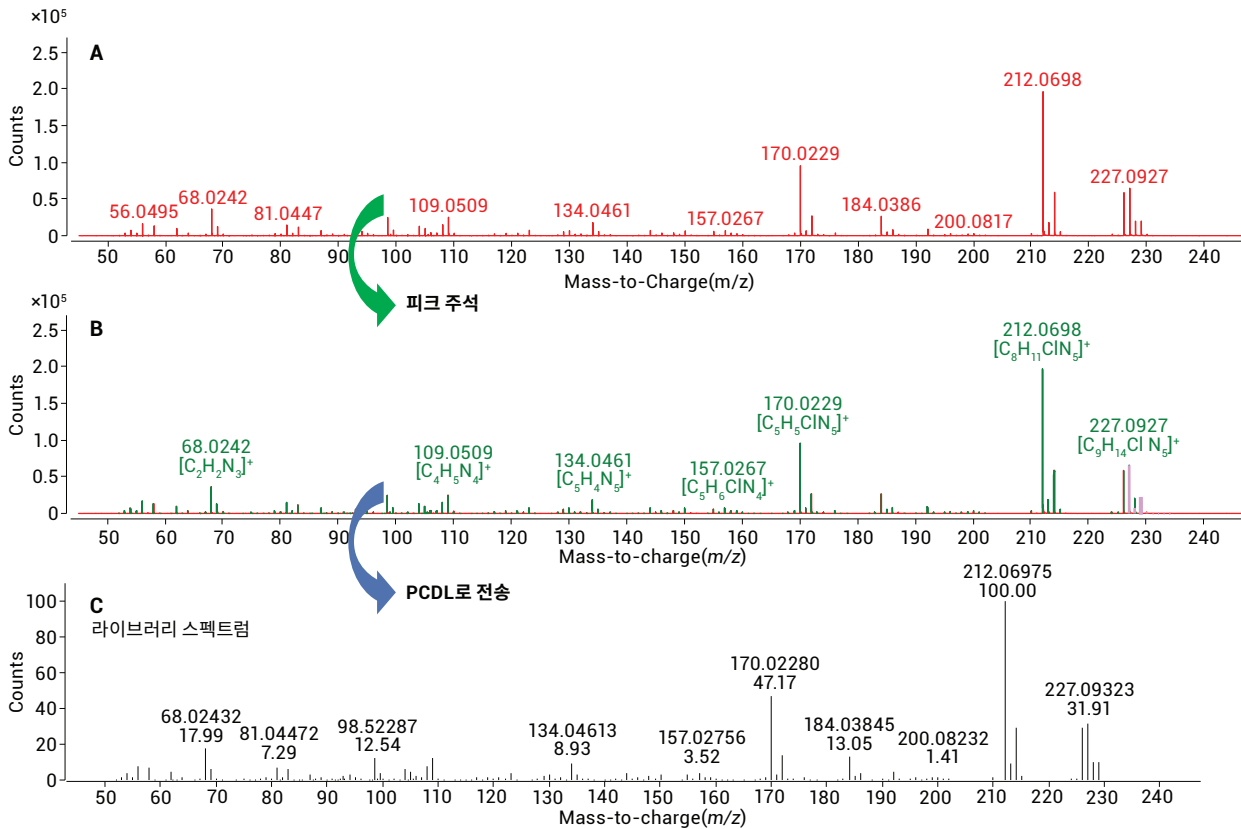


그림 4. 농약 cyprazine에 대한 맞춤형 MS 스펙트럼을 Agilent MassHunter 정성 분석에서 PCDL로 스펙트럼 보내기 기능을 사용해 PCDL에 추가했습니다. 백그라운드를 뺀 측정된 스펙트럼(A), 화학식 $C_9H_{15}ClN_5$ 을 기반으로 한 조각 피크 주석(B), PCDL내 맞춤형 스펙트럼(C)이 묘사되어 있습니다.

결론

일반적으로 규제기관에서는 식품 매트릭스 추출물의 잔류농약 농도를 10ng/mL 이하로 지정하고 있으며 이는 Agilent 7200 시리즈 GC/Q-TOF 시스템을 사용해 스크리닝할 수 있습니다. EI 전체 스펙트럼 수집 정확한 질량 Agilent MassHunter GC/Q-TOF Pesticide PCDL 및 Agilent MassHunter 정성 소프트웨어와 함께 사용하는 경우 목적에 맞는 스크리닝 솔루션임을 보여주는 사례입니다. 조각 비율 점수, 질량 오차 및 RT 차이를 검토해 농약 식별 신뢰도를 크게 향상시킬 수 있습니다. 이러한 항목은 Find by Fragments 알고리즘의 화합물 결과에서 확인할 수 있습니다. PCDL은 사용자 지정할 수 있으며 새로운 관심 화합물의 맞춤형 스펙트럼을 MassHunter 정성 분석 소프트웨어에서 바로 PCDL에 추가할 수 있습니다. 이러한 새로운 PCDL 항목들을 사용해 감시 계획을 확대할 수 있습니다. MassHunter 정성 분석을 사용해 분석법을 구축하고 정성 스크리닝을 수행할 수 있을 뿐만 아니라, 검량선을 이용한 정량 및 확인을 위해 화합물 정보를 정량 분석에 쉽게 전송할 수 있습니다.

참고문헌

1. N. Belmonte-Valles, et al. "Analysis of pesticide residues in fruits and vegetables using gas chromatography-high resolution time-of-flight mass spectrometry" *Anal. Methods* **7**, 2162-2171 (2015).
2. P. L. Wylie, J. Stevens, S. Nieto, Screening for More Than 740 Pesticide Residues in Food Using an Agilent GC/Q-TOF and an Exact Mass Pesticide Library". *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5633EN (2015).
3. A. R. Fernández-Alba; S. Uclés, J. Riener, Screening for Hundreds of Pesticide Residues Using a GC/Q-TOF with an Exact Mass Pesticide Database in Food, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5894EN (2015).

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트의 제품 및 서비스에 대한 자세한 정보는 애질런트 웹 사이트 (www.agilent.com/chem)를 방문하십시오.

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., 2017

2017년 2월 10일

한국에서 인쇄

5991-6884KO

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



Agilent Technologies