

포괄적인 농약 분석을 위한 GC/Q-TOF 워크플로

저자

Christoph Moschet¹,
 Tarun Anumol², Philip
 L. Wylie², Thomas M. Young¹

¹ Department of Civil and
 Environmental Engineering,
 University of California,
 One Shields Avenue, Davis,
 California 95616, USA

² Agilent Technologies, Inc.
 2850 Centerville Rd.,
 Wilmington, DE 19808, USA

개요

고분해능 GC/Q-TOF 질량분석법은 정성 및 정량 동시 스크리닝에 최적화된 분석법으로 환경 시료의 특성을 높은 처리량으로 분석할 수 있습니다.

이 응용 자료는 세가지 상호보완적인 GC/Q-TOF 워크플로를 소개하고, 환경 시료 중 농약과 관련 화합물을 포괄적으로 분석하는 방법을 설명합니다.

- 표적 정량
- 고분해능 GC/Q-TOF의 정확한 질량 데이터를 활용한 오염 의심 물질 스크리닝 (suspect screening)
- 스펙트럼 디콘볼루션과 라이브러리 검색을 활용한 비표적 스크리닝

캘리포니아 새크라멘토-산호아킨 강 삼각주(Sacramento-San Joaquin River Delta) 지역에서 채취한 시료 51개를 Agilent 7200 GC/Q-TOF로 분석하였습니다. 시료는 2회의 강우에 걸쳐 첫 번째 강우 전, 첫 번째와 두 번째 강우 사이, 두 번째 강우가 끝난 후 채취하였습니다. 여과 후, 고체상 추출법으로 강물 추출물에 함유된 오염물질을 분리하고 용매 증발법으로 농축하였습니다. 미립자에 결합된 오염물질을 회수하기 위해 필터에서 오염물질을 추출하였습니다. 정량분석법은 21개 표적 농약을 음이온 화학적 이온화 모드에서 GC/Q-TOF로 분석하여 검증하였습니다. 최소 2개의 강물 추출물에서 16종의 표적 농약이 검출되었습니다. 그 다음 전자 이온화(EI) 모드에서 시료를 반복 분석하였습니다. 애질런트 MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어가 제공하는 Find by Formula(FBF) 기능을 활용하여 데이터 파일을 처리하였습니다. GC/Q-TOF용 애질런트 PCDL(Personal Compound Database and Library)에 수록된 약 750여 종의 농약과 관련 화합물에 대하여 시료를 스크리닝하였습니다. 정확한 질량 데이터로 높은 선택성을 얻을 수 있었으며, 머무름 시간 고정(retention time locking)을 통해 위양성(false positive) 결과를 최소화할 수 있었습니다. 이 기법을 통해 41개의 오염 의심 물질이 추가로 확인되었으며, 대부분 표준물질과 비교 분석하여 성분 규명이 가능하였습니다. 오염 의심 물질 41종 중 24종은 LC/Q-TOF에서도 검출되었으며, 17종은 GC-EI-Q-TOF에서만 검출되었습니다.

비표적 스크리닝에 사용되는 애질런트 MassHunter Unknowns Analysis 소프트웨어는 먼저 크로마토그램에서 스펙트럼을 디콘볼루션하고 디콘볼루션된 성분을 선택한 질량 스펙트럼 라이브러리(NIST14와 Agilent GC/Q-TOF Pesticides PCDL)에서 검색합니다. 앞서 설명된 두가지 GC-Q/TOF 접근법으로 검출되지 않은 농약 5종과 변형 생성물(transformation product, TP)이 Unknowns Analysis에서 잠정적으로 확인되었습니다. 또한, 몇몇 할로겐 및 비할로겐 유기인계 난연제와 폐놀계 향산화제 및 다양한 유기할로겐 화합물을 잠정적으로 확인할 수 있었습니다.

소개

폐수, 지표수 및 지하수, 먹는물 내 미량 오염물질에 대한 노출 정도와 위험성을 평가하기 위해서는 지속적인 모니터링이 중요합니다. 미량 오염물질 분석에는 일반적으로 GC/MS를 사용하며, 스캔 또는 단일 이온 모니터링(SIM) 모드에서 분석을 수행합니다. 그러나 복잡한 환경 시료를 분석하는 경우 단일 사중극자 기기는 충분한 선택성을 얻을 수 없습니다. GC 삼중 사중극자 MS의 다중 반응 모니터링(MRM) 기능으로 더 나은 선택성을 얻을 수 있으나, 이는 표적 화합물 분석에만 최적화된 기법입니다. 표적 리스트에 포함되지 않은 화합물은 농도와 무관하게 검출 과정에서 누락될 수 있습니다. 이러한 제약으로 노출 정도와 위험성을 정확히 평가하기 어렵습니다. 이상적인 계획에서는 표적 화합물을 표준 시료와 비교하여 정량할 수 있어야 합니다. 또한, 표적 외 다양한 오염물질을 검출하고 표준물질이 존재한다면, 검출된 성분을 정량할 수 있어야 합니다.

이 응용 자료는 세 가지 GC/Q-TOF 워크플로를 활용한 지표수에 함유된 비극성 및 반극성 미량 오염물질(예, 농약 등)을 확인하고 설명합니다. 첫 번째 접근법은 표적 분석법으로, 표준물질이 존재하는 화합물을 정량하였습니다. 이 접근법에서 21종 표적 화합물 중 대부분은 할로겐 원소를 포함하므로 Q-TOF를 음이온 화학적 이온화 모드(NCI)에서 작동할 때 최적의 감도를 얻을 수 있습니다. 두 번째 접근법은 오염 의심 물질을 스크리닝하는 방법으로, 티 데이터를 애질런트 MassHunter Qualitative Analysis 도구와 Agilent GC/Q-TOF Personal Compound Database and Library(PCDL)를 활용하여 분석하였습니다. Find by Formula^a 워크플로에서는 머무름 시간(retention time, Rt)이 알려진 화합물의 가장 특이적인 이온들로 크로마토그램을 추출합니다. 머무름 시간과 질량 범위, 추출 이온 수 등 화합물 확인에 필요한 사항은 사용자가

^a 최신 버전의 애질런트 MassHunter Qualitative Analysis Software(B.08.00 Workflows)에서는 이 절차를 Find by Fragments라 부릅니다.

설정할 수 있습니다. 이 접근법에서 사용자는 분석 표준물질 없이 화합물을 추정할 수 있습니다.

세 번째 접근법은 애질런트 MassHunter Unknowns Analysis를 활용한 비표적 스크리닝 방법입니다. 이 소프트웨어는 전체 크로마토그램에 나타난 모든 스펙트럼을 디콘볼루션하여 간섭을 일으키는 스펙트럼을 확인하고 제거한 후, 개별 성분을 확인합니다. 개별 성분은 대규모 질량 스펙트럼 라이브러리에서 검색할 수 있습니다. 이 작업은 240,000종 이상 화합물의 스펙트럼이 저장된 NIST14 단위 질량 스펙트럼 라이브러리와 Agilent GC/Q-TOF Pesticides PCDL을 검색합니다. 전체적인 워크플로는 그림 1과 같습니다.

GC/Q-TOF 워크플로를 활용한 표적 및 오염 의심 물질 스크리닝 방법으로 캘리포니아 북부 새크라멘토-산호아킨 강 삼각주 지역 Cache Slough에서 채취한 51개 지표수 시료를 분석하였습니다. 추출물에 어떤 화합물이 함유되어 있는지 포괄적인 정보를 얻기 위해, Unknowns Analysis를 활용하여 시료 6개를 분석하였습니다.

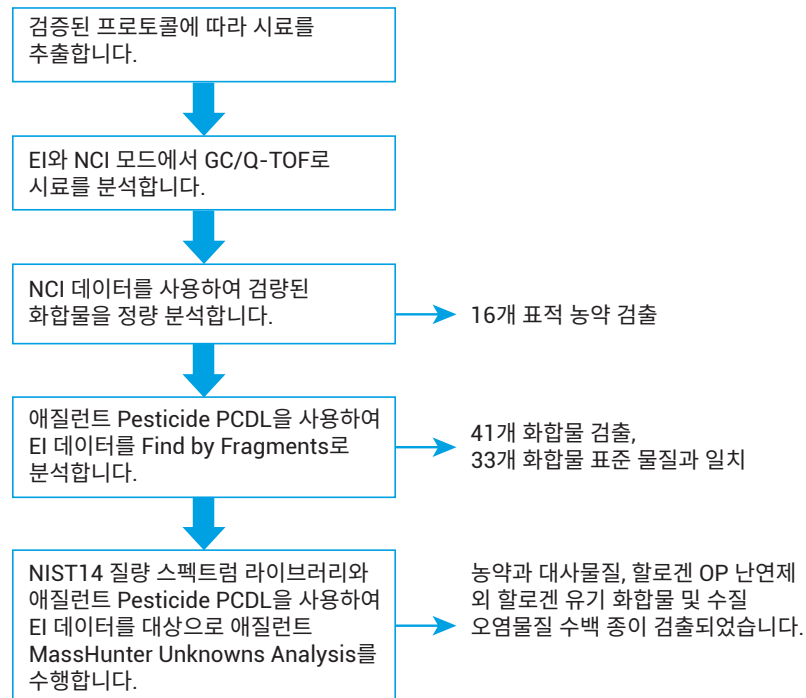


그림 1. GC/Q-TOF를 이용한 표적 농약 정량분석(1)과 애질런트 Pesticides PCDL을 활용한 수 백 종의 농약 스크리닝(2) 및 추가 화합물 스크리닝을 위한 NIST 질량 스펙트럼 라이브러리 검색(3) 워크플로

시료는 2회의 강우에 걸쳐 첫 번째 강우 전, 첫 번째와 두 번째 강우 사이, 두 번째 강우가 끝난 후 채취하였습니다. 표적 정량 분석법과 오염 의심 물질 정성 스크리닝 분석법은 LC- and GC-Q-TOF-MS as Complimentary Tools for a Comprehensive Micropollutant Analysis in Aquatic Systems (상호보완적인 LC- 및 GC-Q-TOF-MS를 활용한 포괄적인 수생계 미량 오염물질 분석)¹에서 자세히 기술하였습니다. 분석하고자 하는 화합물 중 일부는 GC/MS 분석에 적합하지 않으므로, 이 연구 논문에서는 시료의 화학적 프로파일을 제공하는 상호보완적인 LC/Q-TOF 워크플로^{1,2}를 사용하였습니다.

실험

표적 화합물 및 표준물질

GC 분석에 적합한 21개 농약은 표적 GC/Q-TOF 워크플로에 포함되었습니다 (표 1). 대부분 pyrethroid 화합물로 할로겐 원소를 함유하고 있어 NCI 모드에 적합합니다. 내부 표준물질로 4,4'-dibromooctafluorobiphenyl, surrogate로 chlorpyrifos D10과 etofenprox D5를 사용하였습니다. 분석법의 유효성 검증과 품질 관리를 위해, 추출 전 (prespike), 시료 주입 전(post spiked), 그리고 전처리 절차상의 바탕시료(초순수 추출물)를 3회 반복 분석하였습니다.

표 1. 표적 농약과 강물 및 필터 추출물 검증 결과

화합물	CASRN	MDL(ng/L)	강물 추출물 절대회수율(%)	필터 추출물 절대회수율(%)	정확도 (%)	정밀도(n = 3) (%)
Bifenthrin	82657-04-3	0.2	73%	82%	106%	1%
Bioallethrin	28434-00-6	0.1	76%	72%	111%	0%
Chlorothalonil	1897-45-6	0.6	94%	0%	103%	7%
Chlorpyrifos	2921-88-2	0.1	80%	62%	108%	0%
Cyfluthrin ¹	68359-37-5	1.0	-	-	-	-
Cyhalothrin	91465-08-6	0.1	82%	82%	110%	1%
Cypermethrin	65731-84-2	1.0	85%	62%	120%	1%
Cyphenothrin	39515-40-7	0.5	48%	81%	113%	2%
Deltamethrin	52918-63-5	1.0	96%	66%	123%	1%
Esfenvalerate	66230-04-4	0.1	93%	80%	118%	1%
Fipronil	120068-37-3	0.5	92%	77%	105%	3%
Fipronil amide	-	0.1	98%	82%	116%	0%
Fipronil-desulfinyl	205650-65-3	0.2	77%	96%	87%	1%
Fipronil-desulfinyl amide	-	0.2	88%	74%	247%	0%
Fipronil-sulfide	120067-83-6	0.1	79%	89%	74%	1%
Fipronil-sulfone	120068-36-2	0.2	91%	85%	102%	3%
Novaluron	116714-46-6	0.05	48%	91%	96%	3%
Permethrin	52645-53-1	2.0	84%	80%	113%	2%
Phenothrin	26002-80-2	5.0	47%	75%	123%	2%
Prallethrin	23031-36-9	0.1	299%	36%	81%	6%
Tetramethrin	7696-12-0	5.0	80%	205%	106%	1%

¹ 검증 실험 당시 표준물질을 확보하지 못해 확인하지 못함

시료 전처리

캘리포니아 북부 새크라멘토-산호아킨 강 삼각주 지역에서 2회의 강우에 걸쳐, 첫 번째 강우 전, 첫 번째와 두 번째 강우 사이, 두 번째 강우가 끝난 후 수면 아래 30cm 지점에서 51개의 시료(1L)를 채취하였습니다. 모든 시료는 냉각 운송되었고 추출할 때까지 어두운 곳에서 4°C에 보관하였습니다. 강물 시료(1L)를 GF/F 필터로 여과하고 surrogate(2종)를 첨가한 뒤, 고분자 고체상 추출(SPE) 카트리지로 여과하였습니다. 카트리지를 1시간 동안 건조한 후, ethyl acetate(10mL)로 용리하였습니다. 유리 표면에 흡착으로 인한 pyrethroid의 손실 방지를 위해 1L 용기를 dichloromethane으로 헹구었습니다(3x4mL). 총 추출물을 0.2mL로 농축하였습니다. GF/F 필터들을 1:1 hexane/acetone(2 x 20mL)으로 초음파추출(sonication)한 후 전체 필터 추출물을 0.2mL로 농축하였습니다. 모든 시료에 4,4'-dibromooctafluorophenyl(10ng)을 첨가하였습니다. 0.1 ~ 250ng/mL(ethyl acetate 용액) 범위 내 10개 농도의 검량선을 만들었으며, 내부 표준물질과 surrogate는 동일한 농도를 사용하였습니다.

시료 분석

Agilent 7200B Q-TOF MS와 Agilent 7890B GC를 사용하여 시료를 분석하였으며, 일차 분석은 메탄을 반응 가스로 사용한 NCI 모드에서, 이차 분석은 EI 모드에서 수행하였습니다. 표 2에 기기 조건을 요약하였습니다.

표 2. 기기 및 분석 조건

GC-NCI-MS 분석법	
주입량	2.5µL
주입 모드	Splitless
Split 배출구(vent) 퍼지 유량	0.75분에 33mL/분
주입구 온도	280°C
GC 설정	
컬럼	Agilent HP-5MS(30m x 0.25mm, 025µm)
초기 오븐 온도	100°C, hold 1min
Ramp 1	15°C/min to 200°C
Ramp 2	3.8°C/min to 290°C
Ramp 3	10°C/min to 300°C, hold 4 min
헬륨 유량	1.35mL/min, 일정 유량
이송 라인 온도	300°C
MS 설정	
N ₂ 충돌 가스	1.5mL/min
반응 가스(메탄)	40%
이온화원 온도	200°C
필라멘트 방출 전류	90µA
전자 에너지	70eV
데이터 수집 범위	35-1,000m/z
데이터 수집 속도	3 spectra/sec
질량 검량	두 시료마다 자동 질량 검량 수행
GC-EI-MS 분석법	
주입량	2.5µL
주입 모드	Splitless
Split 배출구(vent) 퍼지 유량	0.75분에 33mL/분
주입구 온도	280°C
GC 설정	
컬럼	Agilent HP-5MS(30m x 0.25mm, 025µm)
초기 오븐 온도	60°C, hold 1min
Ramp 1	40°C/min to 120°C
Ramp 2	5°C/min to 310°C
RT 고정을 위한 최적 헬륨 유량	0.776mL/분, 일정 유량
이송 라인 온도	280°C
MS 설정	
N ₂ 충돌 가스	1.5mL/min
이온화원 온도	300°C
필라멘트 방출 전류	35µA
전자 에너지	70eV
스캔 범위	35-1,000m/z
스캔 속도	4 spectra/sec
질량 검량	두 시료마다 자동 질량 검량 수행

결과 및 토의

표적 분석법 데이터 처리와 분석

모든 시료 추출물에 함유된 농약은 NCI 데이터를 Agilent MassHunter Quantitative Analysis Software(B.07.00)로 분석하여 정량하였습니다. 주요 NCI 조각 이온은 정량 분석에, 추가적인 조각 이온 2개는 정성 분석에 사용하였습니다.

GC-NIC-Q-TOF 방법으로 총 21종의 표적 화합물을 검증한 결과, 강물 추출물에서는 17종, 필터 추출물에서는 15종이 절대 회수율 70% 이상이었습니다. 화합물 19종의 정확도는 70 ~ 130%이었으며, 정밀도는 21종 모두 10% 미만이었습니다. 화합물 18종의 MDL은 1ng/L 미만이었습니다 (표 1). 회수율이 70% 미만인 모든 화합물 (예, phenothrin, cyphenothrin, and prallethrin 등)은 할로겐 원소를 포함하지 않는 합성 pyrethroid로, NCI 모드에서 이온화 효율성이 낮을 것으로 예상됩니다.

GC/Q-TOF와 Pesticides PCDL를 활용한 오염 의심 물질 스크리닝

추가적인 농약과 관련 화합물을 검출하기 위해 강물 추출물을 EI 모드에서 재분석하여 오염 의심 물질을 스크리닝하였습니다.

MassHunter Qualitative Analysis Software(B.07.00)의 Find By Formula (FBF) 워크플로를 사용하여 GC/Q-TOF용 애질런트 Pesticides PCDL에 저장된 750종 화합물^b을 스크리닝하였습니다. PCDL은 라이브러리에 포함된 모든 화합물의 정확한 EI GC/MS 질량 스펙트럼과 함께 고정 머무름 시간을 제공합니다(표 2). 백플러싱(backflushing)이 가능한 15m 컬럼을 이용하는 경우 20분 및 40분 분석법에 적용할 수 있는 고정 머무름 시간이 수록되어 있습니다³. 세 번째로, 백플러싱이 가능하도록 5m 컬럼과 15m 컬럼을 함께 사용하는 경우 총 20분 분석법에 적용할 수 있는 고정 머무름 시간 값도 수록되어 있습니다.

^b 최신 GC/Q-TOF용 Pesticides PCDL에는 850종 이상의 화합물 수록

먼저 GC 머무름 시간이 PCDL에 근사하도록 컬럼 유속을 조정하였습니다. 다음으로, 머무름 시간 고정을 위해 5회 반복 분석을 수행하였습니다. 명목 유속에서 1회, 명목 유속 $\pm 10\%$ 와 $\pm 20\%$ 에서 추가적으로 4회 분석하였습니다. 컬럼 유속과 고정용 표준물질의 머무름 시간 상관관계를 나타내는 검량선은 MassHunter Acquisition 소프트웨어가 자동으로 생성합니다. 크로마토그램의 중앙 지점에서 용리되는 chlorpyrifos를 머무름 시간 고정용 표준물질로 사용하였습니다. 검량선을 사용하여 모든 화합물의 RT가 PCDL 값에 오차범위 ± 0.2 분 내에 오도록 유속을 미세 조정하였습니다.

MassHunter Qualitative Analysis Software(B.07.00)를 이용한 FBF 데이터 분석에서는 Pesticides PCDL을 사용하였으며, 설정값을 표 3에 요약하였습니다. 이 경우, 화합물별 고정된 머무름 시간 ± 0.2 분 범위 내에서 지정된 질량 범위 내 화합물별 가장 특이적인 이온 5개를 추출하였습니다. 소프트웨어는 RT와 피크 모양을 참조하여 하나의 EIC를 자동 선택합니다. 선택된 EIC와 나머지 네 개 EIC의 RT와 피크 모양을 비교하여, 분석법상 허용 기준에 부합하는지 확인합니다. 이 경우, 참고 이온과 2개의 추가 이온이 허용 기준에 부합하는 경우에만 해당 화합물을 매칭 성분(hit)으로 분류합니다. 그림 2는 전체 51개 시료에서 검출된 살진균제인 boscalid의 EIC를 나타냅니다.

표 3. GC/Q-TOF를 이용한 오염 의심 물질 스크리닝에서 사용된 파라미터

파라미터	값
소프트웨어	애질런트 MassHunter Qualitative Analysis(B.07.00)
워크플로	화학적 화합물 식별
매칭값	질량 및 머무름 시간(머무름 시간은 선택 사항)
라이브러리	애질런트 GC/Q-TOF - Pesticide PCDL(머무름 시간 포함) 화합물 750종
추출 알고리즘	Agile 2
매치 허용 질량	± 20 ppm
머무름 시간 허용오차	± 0.2 min
허용되는 부가 생성물	pos: - 전자
허용되는 하전 상태	1
동위원소 모델	공통 유기 분자
피크 간격 허용 오차	0.0025m/z, +7ppm
점수(가중치)	질량 점수: 100 동위원소 존재비 점수: 60 동위원소 간격 점수: 50 머무름 시간 점수: 100
Find by formula 점수	>70(최대 100)
절대 높이	>1,000 카운트
조각 이온으로 확인	분자 이온(가능한 경우)
MS/MS 라이브러리에서 화합물 특이적인 이온의 수	5
RT 차이	± 0.1 분
S/N	NA
동시 용리 점수	>85(최대 100)
허용 기준에 부합하는 최소 조각 이온수	2

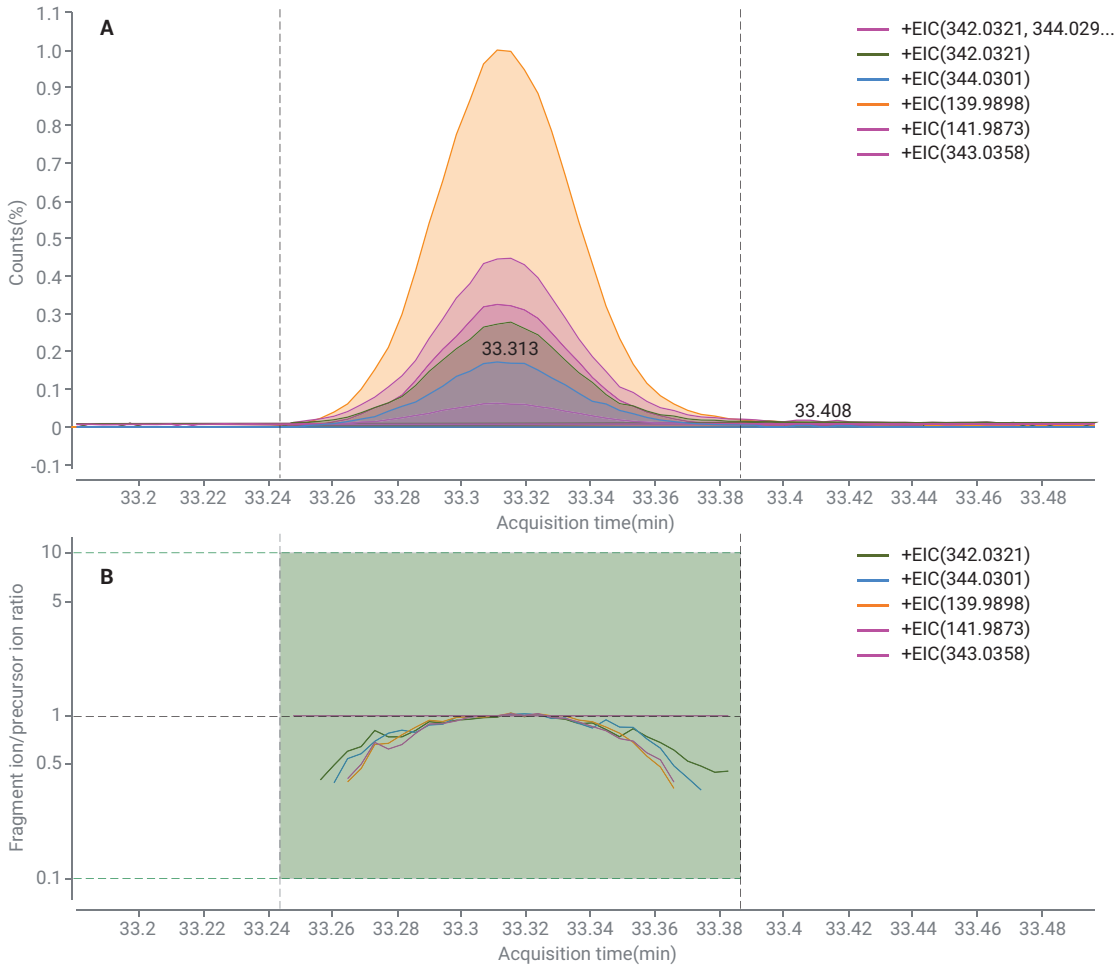


그림 2. A) 강물 추출 시료에서 검출된 boscalid의 추출 이온 스펙트럼 정규화된 동시 용리 그래프(B)에서 네 개의 EIC의 피크 모양과 참고 이온의 피크 모양을 비교할 수 있습니다. 피크 모양이 완전히 같다면, 하나의 수평선으로 나타나게 됩니다.

그림 3은 FBF 소프트웨어가 제공하는 추가 정보를 나타냅니다.

- 조각 이온별 동시 용리 점수(coelution score)(최대 100)
- 실험에서 측정된 단일 동위원소 분자 이온 질량과 이론값의 차이
- Boscalid의 측정 RT와 PCDL에 수록된 RT 차이

분자 이온이 검출된 경우, 소프트웨어는 이론적인 동위원소 질량 간격과 존재비를 측정값과 비교합니다(그림 4). 화합물

확인엔 분자 이온이 반드시 필요하지는 않으며, 많은 경우 분자 이온은 GC-ESI-MS 스펙트럼에 주요 피크로 나타나지 않습니다 (표 3 조각 이온으로 화합물 확인 설정 참조). FBF 분석을 통해 표 1에 수록한 표적 화합물 외 오염 의심 물질 41종을 확인하였습니다 (표 4). 이 중 33종은 표준물질을 사용하여 명확히 확인할 수 있었습니다. 나머지 8종은 표준물질이 존재하지 않아, 잠정적으로만 확인되었습니다.

FBF 워크플로를 활용한 오염 의심 물질 스크리닝 방법은 표준물질이 없는 경우에도

PCDL 포함된 화합물이라면 잠정적인 확인이 가능합니다. 머무름 시간 일치 요건 적용 뿐만 아니라 복수의 조각 이온을 확인함으로써 위양성(false positive)을 최소화할 수 있습니다. 이로써 표준물질이 존재하는 소수의 화합물만을 확인하는 데 그치지 않고 PCDL에 수록된 수백 종의 화합물에 대한 스크리닝이 가능합니다. 그러나, 잠정적으로 확인된 화합물을 명확히 확인하기 위해서는 여전히 표준물질이 필요합니다.

Compound Identification Results: Cpd 20: Boscalid (Nicobifen); C18 H12 Cl2 N2 O; 33.312

ID Techniques Applied / FBF-FragConfirm

Best	Name	Formula	Mass (Tgt)	Diff (ppm)	RT	RT (Tgt)	RT Diff	Notes
A	Boscalid (Nicobifen)	C18 H12 Cl2 N2 O	342.0327	1.48	33.312	33.364	-0.052	Forensic and Toxicology drug; Pesticide; Herbicide; Veterinary drug

Coelution Score	FragMassDiff(ppm)	Flags(FIs)	Height	Abundance(Lib)	mz(Lib)	m/z	ObsPkHeight(MS)	Compound Name	RT	RT Diff
99.61	7.5	Qualified	1188635.2	25.5	342.0321	342.0296	462191.6	Boscalid (Nicobifen)	33.315	0.003
99.57	3.7	Qualified	738186.8	17.1	344.0301	344.0289	284425.5	Boscalid (Nicobifen)	33.313	0.001
99.79	6.9	Qualified	4289525.9	100	139.9898	139.9888	1623222.8	Boscalid (Nicobifen)	33.314	0.002
99.64	9.2	Qualified	1392828.4	33.3	141.9873	141.986	518813.1	Boscalid (Nicobifen)	33.314	0.001
100	0.2	Reference ion	256859	5.1	343.0358	343.0357	119453.7	Boscalid (Nicobifen)	33.312	0

Compound Identification Results: Cpd 20: Boscalid (Nicobifen); C18 H12 Cl2 N2 O; 33.312 Method Editor: Find by Fragments

그림 3. Boscalid FBF 분석 결과에서 동시 용리 점수(coelution score)(A), 단일 동위원소 분자 이온 질량의 측정값과 이론값 차이(B), 측정된 머무름 시간과 데이터베이스 값 차이(C)를 확인할 수 있습니다.

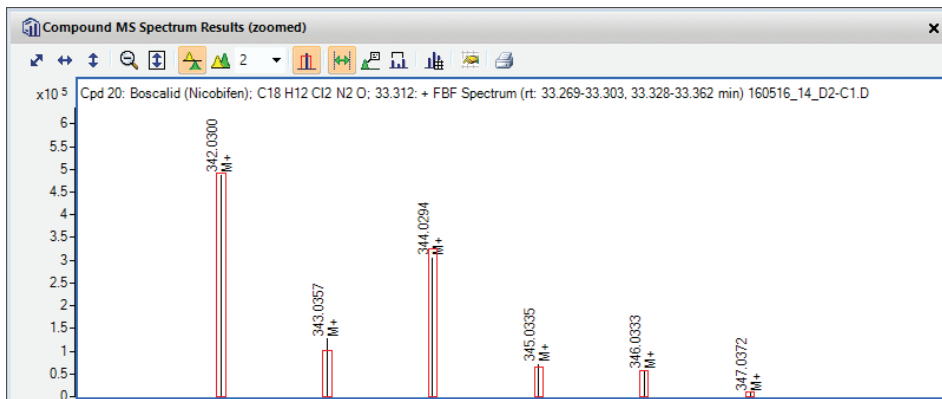


그림 4. Cache Slough 강물에서 검출된 boscalid의 이론적(적색 사각형)과 측정적 분자 이온 동위원소 패턴

MassHunter Unknowns Analysis 소프트웨어를 활용한 비표적 스크리닝

PCDL에 포함된 750여 종의 화합물에 대하여 스크리닝한 결과는 추출물내 다른 관심 화합물의 존재유무를 알아내는데 유용할 수 있습니다. MassHunter Unknowns Analysis(UA)는 이 경우와 같이 비표적 스크리닝에 적합하도록 고안되었습니다. Unknowns Analysis에서는 디콘볼루션을 통해 복잡하게 중첩된 스펙트럼에서 단일 성분 스펙트럼을 분리합니다. 다음으로, 성분 스펙트럼을 라이브러리에서 검색해 매칭 성분을 확인합니다. 현재는 정확한 질량 정보를 제공하는 포괄적인 라이브러리가 아직 구축되지 않았으므로, 가능한 많은 매칭 성분을 확인하기 위해 NIST 단위 질량 라이브러리를 사용합니다. 총 850여 종이 넘는 화합물의 정확한 질량 정보를 제공하는 Pesticides PCDL(B.08.00)도 활용되었습니다. 디콘볼루션 기법을 활용한 Unknowns Analysis는 FBF 워크플로 기반 스크리닝과는 다른 데이터 수집 기법으로, FBF 분석 과정에서 누락된 화합물을 확인할 수 있습니다. Unknowns Analysis에서 가장 중요한 설정값을 표 5에 요약하였습니다.

강물 추출물에 다른 오염물질이 포함되어 있는지 확인하기 위해 51개 시료 중 6개를 Unknowns Analysis로 분석하였습니다. 디콘볼루션으로 1,500 ~ 4,500여 성분에 달하는 스펙트럼이 분리되었으며, 그 수는 추출물 시료에 따라 달랐습니다. 이 중, 90 - 325개의 스펙트럼이 NIST 라이브러리와 70을 초과하는 일치도(match factor)를 보였으며, 60 - 120여 개는 일치도가 80을 초과하였습니다. 매칭 결과를 검토하는 가장 효율적인 방법 중 하나는 분자 구조를 참고면서 매칭 성분을 일일이 검토하는 것입니다. 관심 화합물이 발견된 경우, 스펙트럼 일치도를 자세히 검토하고 추출 이온의 피크 모양이 적합한지 확인합니다.

표 4. FBF 알고리즘으로 확인된 오염 의심 물질

화합물	용도	CAS 번호
2,4,6-Tribromophenol ¹	기타 용도	118-79-6
2,4-Dimethylphenol(2,4-xyleneol)	기타 용도	105-67-9
2-Methylphenol	기타 용도	95-48-7
4-Methylphenol	기타 용도	106-44-5
Azoxystrobin	살진균제	131860-33-8
Boscalid	살진균제	188425-85-6
Bromacil	제초제	314-40-9
Carvone ¹	방충제	99-49-0
Chlorthal-dimethyl(Dacthal 또는 DCPA)	제초제	1861-32-1
Cyprodinil	살진균제	121552-61-2
DEET	방충제	134-62-3
Diazinon(Dimpylate)	살충제	333-41-5
Dichlobenil	제초제	1194-65-6
Dimethenamid(SAN 582H)	제초제	87674-68-8
Dimethoate	살충제	60-51-5
Diphenylamine ¹	살진균제	122-39-4
Dithiopyr	제초제	97886-45-8
Diuron metabolite [3,4-Dichlorophenylisocyanate] ¹	제초제 TP	-
Eugenol ¹	곤충유인제	97-53-0
Fluridone	제초제	59756-60-4
Hexazinone	제초제	51235-04-2
Iprodione(Glyphophen)	살진균제	36734-19-7
Malathion	살충제	121-75-5
Mepanipyrim ¹	살진균제	110235-47-7
Metolachlor	제초제	51218-45-2
Napropamide	제초제	15299-99-7
Norflurazon	제초제	23576-24-1
Norflurazon-desmethyl	제초제 TP	23576-24-1
Omethoate	살충제 TP	1113-02-06
Oxadiazon	제초제	19666-30-9
Oxyfluorofen	제초제	42874-03-3
p,p'-DDE ¹	살충제 TP	72-55-9
Pendimethalin	제초제	40487-42-1
Pentachlorophenol (PCP)	기타 용도	87-86-5
Prodiamine	제초제	29091-21-2
Propiconazole	살진균제	60207-90-1
Propyl cresol ¹	기타 용도	-
Sulfentrazone	제초제	122836-35-5
Tebuthiuron	제초제	34014-18-1
Triclosan	살생물제	3380-34-5
Trifluralin	제초제	1582-09-08

¹ 잠정적으로 확인(비교 가능한 표준물질이 없음)

소프트웨어로 각 성분의 피크 모양 점수 (peak shape quality value)(최대 100)를 계산하였으며, 일부 성분을 제외하고 피크 모양 점수는 대부분 60을 초과하였습니다. Pesticides PCDL를 표적 라이브러리로 사용하는 경우, 머무름 시간이 라이브러리 값에 근사한 경우에만 매칭 성분으로 분류되며, 이를 통해 매칭의 신뢰도를 높일 수 있습니다.

UA 방법을 활용하여 6개 시료에서 농약 25종, 농약 변환 생성물(TP) 3종, 유기인계 화합물 6종(염소계 난연제 3종), 수질 오염물질 13종(예, 페놀계 항산화제)을 잠정적으로 확인하였습니다. UA를 통해 GC/Q-TOF 오염 의심 물질 스크리닝에서 표적하지 않은 농약 5종과 TP 1종(2,6-diisopropylnaphthalene, 3,4-dichloroaniline, fenbuconazole, fluorpyram, fluxapyroxad, and simazine)을 확인할 수 있었습니다. 2,6-diisopropylnaphthalene, 3,4-dichloroaniline은 이전 버전의 Pesticides PCDL에 포함되지 않은 화합물이며, 나머지 4종은 LC/Q-TOF를 이용한 오염 의심 물질 스크리닝에서 표적 화합물로 포함되었습니다.

표 5. Unknowns Analysis에서 사용된 주요 설정값

탭/파라미터 ¹	설정값
피크 검출	
피크 검출	디콘볼루션
SNR 한도	0
면적 필터	절대 면적 ≥1,000
디콘볼루션	
RT 범위 크기 인자	25, 50, 100, 200
왼쪽 m/z 델타	0.3amu 또는 50ppm
오른쪽 m/z 델타	0.7amu 또는 50ppm
m/z 정수값 사용	단위 질량에 체크 표시, 50ppm 사용에 체크 표시 해제
성분 모양	기준 피크 모양 사용에 체크 표시
선명도(Sharpness) 허용 한계	75%
라이브러리 검색	
라이브러리	NIST14.L 및 Pesticides PCDL(버전 B.08.00)
조정 점수	체크 표시
중복 매치 제외	체크 표시 해제
RT 매치 사용	NIST는 체크 표시 해제, PCDL는 체크 표시
RT 페널티 함수(Penalty function)	Gaussian(30초)
RT Mismatch penalty	Multiplicative
Max RT penalty	20
화합물 확인	
최대 매칭 성분 수	1
최소 매치 인자	NIST14.L은 70, PCDL은 20
최소 m/z	30
라이브러리 검색 유형	스펙트럼 검색
표적 매치	NA
Blank subtraction	
Blank subtraction 적용	체크 표시 해제

¹ 파라미터를 명시하지 않은 경우 초기 설정값 사용

일부 시료에서 검출된 난연제 *tris*(2,3-dichloropropyl) phosphate의 Unknowns Analysis 결과를 그림 5에 나타내었습니다. 많은 유기인계 화합물이 가소제나 난연제로 광범위하게 사용되어 환경에 널리 분포되어 있으며 전처리 절차상의 바탕시료에서도

검출될 가능성이 있습니다. UA 분석에서 적어도 하나의 전처리 절차상의 바탕시료에서 triphenyl phosphate, tributyl phosphate, *tris*(2-chloroethyl) phosphate 및 *tris*(2,4-di-*tert*-butylphenyl) phosphate 이 검출되었습니다.

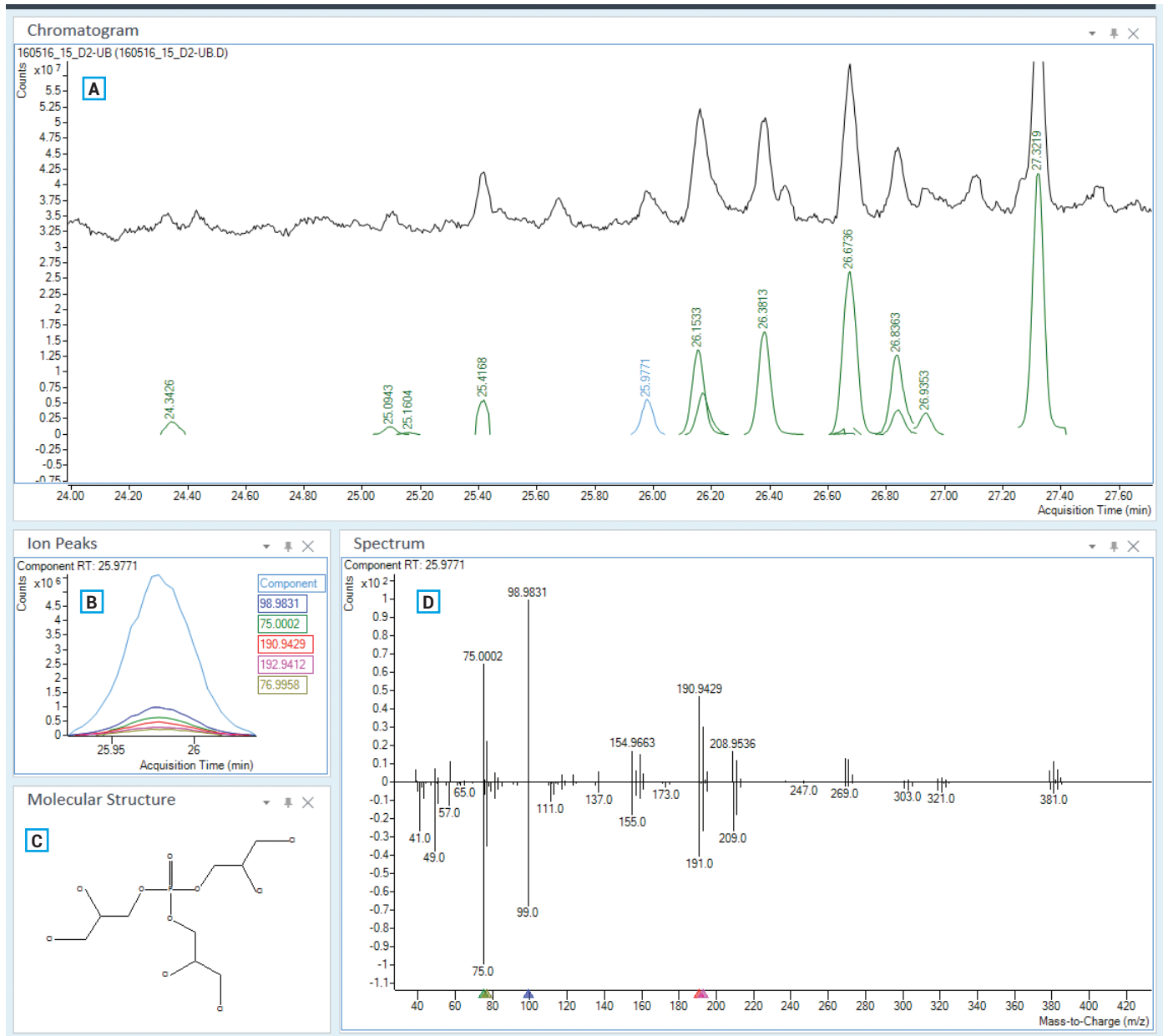


그림 5. Cache Slough 강물 시료에서 검출된 *tris*(2,3-dichloropropyl) phosphate를 보여주는 애질런트 MassHunter Unknowns Analysis 결과. A) TIC(검정)와 디콘볼루션 성분[녹색(청색, 결과가 표시된 성분의 피크)], B) 성분 피크와 중첩하여 나타난 주요 EIC 피크, C) 분자 구조, D) 라이브러리 스펙트럼과 비교하여 나타난 성분 스펙트럼(위). 이 화합물의 NIST 라이브러리 일치 점수는 84였으며, 성분 모양 점수는 82였습니다.

그 외, dichloronitrobenzene 이성질체와 bis(dichloromethyl)ether, cyanomelamine, dibenzazepine, 및 trichloronaphthalene 이성질체가 UA 분석에서 확인되었습니다. 이 화합물은 잠정적으로 확인된 것으로 표준물질이 없어 성분을 정확히 확인할 수 없었습니다. UA 분석에서 확인된 화합물을 표6에

나타냈습니다. 표6의 상위 37종 화합물은 머무름 시간이 PCDL 값과 일치하므로, 매칭 결과 신뢰도가 높게 확인되었습니다. 나머지 9종은 NIST 라이브러리 매치 점수를 토대로 잠정 확인된 화합물입니다.

표 6. UA에서 잠정적으로 확인된 농약, TP, 그 외 수질 오염물질

PCDL에서 머무름 시간 확인
2-Methylphenol ¹
4-Methylphenol ¹
Trichloronaphthalene 이성질체
2,6-Diisopropylnaphthalene
3,4-Dichloroaniline(propanil TP)
Azoxystrobin ¹
Boscalid ¹
Bromacil ¹
Chlorothalonil ²
Chlorpyrifos ²
Cyprodinil ¹
DEET ¹
Desmethylnorflurazon
Diazinon ¹
Dimethenamid ¹
Dimethoate ¹
Dithiopyr ¹
Diuron mnetabolite (3,4-dichlorophenylisocyanate) ¹
Fenbuconazole
Fipronil ¹
Fluorpyram
Fluridone ¹
Fluxapyroxad
Hexazinone ¹

PCDL에서 머무름 시간 확인
Metolachlor ¹
Oxadiazon ¹
Oxyfluorfen ¹
Propiconazole ¹
Simazine
Sulfentrazon ¹
Tributyl phosphate
Trifluralin ¹
tris(2-Butoxyethyl)phosphate
tris(2,4-Ditertbutyl)phosphate
tris(2,3-Dichloropropyl)phosphate
tris(2-Chloroethyl)phosphate
tris(2-Chloroisopropyl)phosphate
NIST 라이브러리 검색 결과 매치 점수가 >80 이었으나, RT가 확인되지 않은 화합물
Benothiazole
Dichloronitrobenzene 이성질체
Benzenesulfonamide, N-butyl-
Benzonitrile
p-Cresol
Cyanomelamine
bis(dichloromethyl) ether
Octodrylene
Dibenzazepine (iminostilbene)

키워드: 농약 변형 생성물 수질 오염물질 유기인계 화합물

¹ GC/Q-TOF 오염 의심 물질 스크리닝 워크플로 참조

² GC/Q-TOF 표적 분석 참조

결론

애질런트 GC/Q-TOF는 표적 및 비표적 스크리닝에 가장 적합한 분석 도구입니다. 강물 시료에 21종의 표적 화합물(대부분 pyrethroid)이 ng/L 농도 미만으로 함유되어 있는지 NCI 모드에서 분석하였으며, 16종의 화합물이 0.6 ~ 33ng/L 농도로 존재하는 것으로 확인되었습니다. GC/Q-TOF용 Pesticide PCDL와 함께 Find by Formula 기법을 활용하여 추가로 41종의 오염 의심 물질을 잠정적으로 확인하였으며, 표준물질과 비교하여 대부분 정확한 성분을 규명할 수 있었습니다. 데이터베이스에 수록된 고정 머무름 시간을 토대로 화합물별 가장 특이적인 이온 5종을 추출하였습니다. 참고 이온과 2종의 추가 이온이 분석법에 명시된 요건(표 3)을 충족하고, 머무름 시간이 PCDL 값과 일치하는 경우에만 매칭 성분으로 간주됩니다. 애질런트 MassHunter Unknowns Analysis를 활용한 비표적 스크리닝에서 6개의 강물 추출물을 분석하였습니다. 이 방법에서는

디콘볼루션을 통해 스펙트럼에서 수백 개의 개별 성분을 분리합니다. 다음으로, 분리된 개별 성분을 NIST14 질량 스펙트럼 라이브러리와 애질런트 Pesticides PCDL에서 검색하였습니다. 농약 25종과 농약 변환 생성물 3종, 유기인계 화합물 6종, 향산화제, 몇몇 할로겐 화합물 외 오염물질 다수가 확인되었습니다. 대부분 분석된 머무름 시간을 PCDL 값과 비교하여 잠정적으로 확인이 가능하였습니다.

GC-Q/TOF 워크플로(표적, 오염 의심 물질 및 비표적 스크리닝)에서 총 80여 종의 반극성 및 비극성 수질 오염물질을 확인할 수 있었습니다. 같은 시료를 LC/Q-TOF로 분석한 실험에서는 100여 종의 극성 및 반극성 수질 오염물질이 확인되었습니다^{1,2}. 비록 중간 극성 범위 화합물질 약 30종이 두 장비에서 모두 검출되었지만, 결과는 GC-Q/TOF와 LC-Q/TOF가 상호보완적이며, 환경 시료에 함유된 오염 물질의 포괄적인 프로파일을 얻으려면 두 플랫폼을 동시에 사용해야 한다는 점을 시사합니다.

참고문헌

1. Moschet, C.; et al. LC- and GC-QTOF-MS as Complimentary Tools for a Comprehensive Micropollutant Analysis in Aquatic Systems. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, 51(3), 1553-1561.
2. Moshet, C.; Young, T. M.; Anumol, T. LC/Q-TOF Workflows for Comprehensive Micropollutant Analysis. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8459EN, October 2, **2017**.
3. Chen, K.; Sanderson, J. Screening of Pesticides and Other Contaminants in Food Matrices Using a Novel Highresolution GC/Q-TOF with a Lowenergycapable EI Source. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8170EN, June 16, **2017**.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 3월 14일, 한국에서 인쇄
5991-9132KO

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