

고분해능 GC/Q-TOF를 이용한 지표수의 환경 오염물질에 대한 포괄적인 프로파일링

저자

Sofia Nieto and Kai Chen
Agilent Technologies, Inc

Chris Alaimo and
Thomas Young
Department of Civil and
Environmental Engineering,
University of California Davis,
CA, USA

개요

지표수의 환경 오염물질 모니터링은 수많은 오염물질, 환경에 의한 지속적인 변화 및 낮은 검출 한계의 분석법이 필요한 저농도에서의 독성(예, pyrethroid과 일부 유기인산염 농약)으로 매우 까다로운 작업입니다.¹ 시료의 알고 있는 또는 미지 오염물질을 규명하기 위한 accurate mass 고분해능 MS(HRMS) 기법의 사용이 점점 인기를 얻고 있습니다. 그러나, 일부 환경 오염물질은 저분자량(LMW), 휘발성 또는 비극성으로 LC 보다는 GC 분석에 훨씬 적합합니다.

따라서, 확장된 분석 범위와 고감도의 실현을 위해, 고분해능 accurate mass GC/Q-TOF를 이용한 표적 정량, 추정물질 스크리닝 및 비표적 접근법을 비롯한 포괄적인 워크플로를 수질 시료의 환경 오염물질 스크리닝에 적용하였습니다.

서론

유기 미량오염물질의 분석은 환경 품질 평가에서 중요한 부분입니다. 이 모니터링의 기존 접근법은 표적 분석물질에 적합한 데이터 수집모드를 선택하여 운영하는 기기인 질량 분석기를 이용하여 표적 화합물의 정의된 수를 분석하는 것입니다. 그러나, 이러한 접근법은 보다 포괄적인 비표적 스크리닝과 비교하여 오염물질에 대한 노출과 위험을 크게 과소 평가한다는 지적이 있습니다.

최근 질량 분석법의 발전으로 전체 스펙트럼 수집 모드로 고분해능 accurate mass 기기를 이용한 경우, 확장된 분석 범위와 제한 없는 감도 또는 선택성을 제공할 수 있게 되었습니다. Accurate mass 정보는 보다 풍부한 세부정보를 제공하며 표적 및 비표적 성분 모두를 측정할 수 있게 합니다.

이 정보가 풍부한 데이터가 가지는 어려움 중 하나는 어떤 시료가 더 상세한 분석이 필요한지를 결정하는 것입니다. 이 응용 자료는 관심 시료의 환경 오염물질 프로파일링을 위한 accurate mass 고분해능 GC/Q-TOF를 이용한 워크플로를 제공합니다. 또한, 미지 화합물의 식별에 대한 지침을 제공합니다.

실험

시료 전처리

캘리포니아 북부의 새크라멘토 - 샌 호아킨 강 삼각주에 위치한 Cache Slough Complex의 여러 위치에서 시료를 채취하였습니다. 점미량오염물질과 비점오염물질은 주로 Ulatis Creek을 통해 유입된 것으로 예상됩니다. 모든 시료는 운반하는 동안 냉장하였으며, 추출할 때까지 4의 암실에서 보관했습니다.

추출은 지표수 1L를 GF/F 필터에 필터링하여 수행했습니다. 여과물은 폴리머 고체상 추출(SPE) 카트리지에 통과시켰습니다. 한시간 동안 건조 후, 카트리지를 ethyl acetate 10mL로 용리하였습니다. 필터는 헥산/아세톤으로 추출한 다음, ethyl acetate로 부분 용매를 교환했습니다.

데이터 수집 및 사전 처리

소스 오염, 분석 시간 및 캐리오버 감소를 위해 사용하는 중간 컬럼 백플러시 구성 (그림 1)을 갖춘 Agilent 7890B GC로 시료를 분리한 후, 고분해능 Agilent 7250 GC/Q-TOF 시스템을 사용하여 데이터를 수집하였습니다. 20분의 분석법은 농약 및 환경 오염물질에 대한 GC/Q-TOF accurate mass 라이브러리와 RT 일관성을 보장하기 위해 chlorpyrifos-methyl(RT 9.143분)에 머무름 시간 고정(RTL)을 적용했습니다. 표 1은 GC/Q-TOF 파라미터입니다.

수집한 데이터 파일은 모든 다운스트림 데이터 처리를 위해 SureMass 형식²으로 변환했습니다.

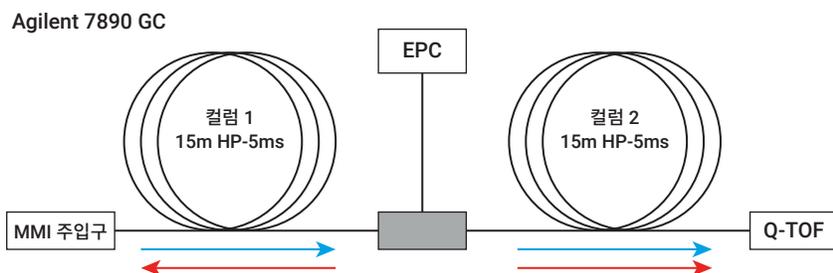


그림 1. 중간 컬럼 백플러시 구성. 분석 마지막, 백플러시 동안의 헬륨 유동 경로는 빨간색 화살표로 표시하였습니다. 퍼지 유니온의 압력은 주입구의 압력이 떨어질 때 증가합니다. 그 결과, 첫 번째 컬럼의 흐름은 역전되고, 고비점 화합물은 분할 배출구로 제거됩니다.

추정 물질 및 비표적 스크리닝 워크플로

표적 정량과 추정물질 스크리닝을 결합한 워크플로를 물 시료 및 필터 추출물의 오염물질 식별에 사용했습니다(그림 2). 이 통합 워크플로는 Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어 10.1이 제공하는 GC/Q-TOF 스크리닝 기능을 사용했습니다. 추정 물질 스크리닝은 1,000개 이상 화합물에 대한 RT 및 스펙트럼을 포함하는 농약 및 환경 오염물질에 대한 Agilent GC/Q-TOF accurate mass PCDL (personal compound database and library)에 기반합니다. 스크리닝 분석법은 각 PCDL 스펙트럼에서 자동 선택된 특정 accurate mass 이온을 사용했습니다. SANTE 및 FDA 지침에 따라, 라이브러리 매치 스코어, RT 범위, 동시 용리 스코어 및 질량 오차와 같은 스크리닝 분석법 파라미터를 선택하였습니다.^{3,4}

PCDL 범위를 벗어난 오염물질을 식별하기 위해, MassHunter Quantitative Analysis 10.1의 Agilent MassHunter Unknowns Analysis를 사용하여 크로마토그래피 deconvolution과 NIST17.L 라이브러리 검색을 수행했습니다. 그런 다음, Unknowns Analysis의 ExactMass 도구를 사용하여 단위 질량 NIST17 라이브러리의 일치 성분에 기반한 조각 화학식으로 deconvoluted accurate mass GC/Q-TOF 스펙트럼에 주석을 달았습니다. 이 단계는 accurate mass 불일치를 기반으로 위양성을 제거하는 데 도움이 될 수 있도록 포함하였습니다.

표 1. GC/Q-TOF 수집 파라미터

GC		Agilent 7890B GC	
비활성 유동 경로 구성	중간 컬럼 백플러시		
컬럼	2개, Agilent J&W HP-5ms Ultra Inert, 15m, 0.25mm id, 0.25µm film		
주입구	MMI, UI liner single taper with wool		
주입량	1µL		
주입 모드	냉각 비분할		
주입 온도 프로그램	0.2분간 60°C		
	600°C/분으로 300°C까지, 유지		
	330°C, 분석 후 실행		
주입구 유속(컬럼 1)	1.0mL/분(9.143분, chlorpyrifos-methyl 고정)		
PUU 유속(컬럼 2)	컬럼 1 유속 + 0.2mL/분		
오븐 온도 프로그램	60°C(1분 유지)		
	그 다음 40°C/분으로 170°C까지,		
	그 다음 10°C/분으로 310°C까지(3분 유지)		
	분석 시간 20.75분		
이송 라인	280°C		
중간 컬럼 백플러시			
타이밍	분석 후 실행 동안 5분간 지속		
오븐 온도	310°C		
보조 EPC 압력	~50psi		
주입구 압력	~2psi		
MS		Agilent 7250 Q-TOF	
이온화원 온도	280°C		
사중극자 온도	150°C		
충돌 셀 가스 유속	1mL/분, N ₂		
	4mL/분, He		
전자 에너지	70eV(표준 EI)		
	15eV(저에너지 EI)		
수집 질량 범위	m/z 45~550		
스펙트럼 수집 속도	5스펙트럼/초		

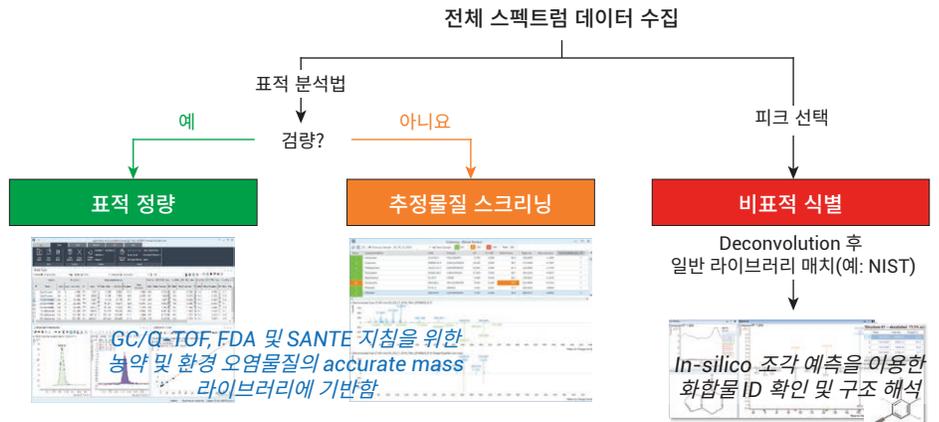


그림 2. GC/Q-TOF PCDL을 사용한 표적 및 추정물질 스크리닝 접근법과 NIST 라이브러리를 사용한 비표적 스크리닝 및 미지물질의 구조 해석에 기반한 오염물질 스크리닝 워크플로의 결합

미지물질 식별

미지물질 식별의 첫 단계는 분자 이온의 m/z 를 찾는 것입니다. 미지물질의 분자 이온을 식별하기 위해, GC/Q-TOF의 낮은 전자 에너지 모드인 소프트 이온화를 적용하였습니다. 분자 이온 확인 후, 잠정 식별된 분자 이온 m/z 를 전구체로 사용하여 표적 MS/MS 모드에서 미지 물질의 accurate mass 생성 이온 스펙트럼을 생성했습니다. 그런 다음, MS/MS 데이터를 MSC(Molecular Structure Correlator) 소프트웨어로 가져와 구조 해석을 수행했습니다.

결과 및 토의

추정물질 스크리닝 결과

GC/Q-TOF PCDL과 GC/Q-TOF 스크리닝 워크플로를 사용하여 각각의 물 추출물(비온 뒤 3일 후 수집)에서 수 많은 농약 및 환경 오염물질(>100)을 식별하고 확인하였습니다. 화합물 검증에 사용한 기준 중 일부는 accurate mass <5ppm, 그림 3은 GC/Q-TOF 스크리닝(위)과 정량 결과(아래) 창의 예입니다. 스크리닝 결과 표는 검증(녹색으로 표시) 및 잠정 식별된

(주황색으로 표시) 화합물만 표시되도록 설정했습니다. 잠정 식별된 화합물(현재 보기에는 표시되지 않음)은 하나 이상의 기준(예, RT 차이)에 미치지 못하였지만 실제로는 일치한 성분일 수도 있습니다. 이러한 잠정 일치 성분은 검증을 위해 수동 검토가 필요합니다. 스크리닝 요약 표 아래의 두 개의 미리 플롯은 각각 상단과 하단 패널에 표시된 스크리너에 의해 선택된 특정 이온 또는 전체 스펙트럼에 대한 deconvoluted(파란색, 상단) 대 PCDL(녹색, 하단) 화합물 스펙트럼을 나타냅니다.

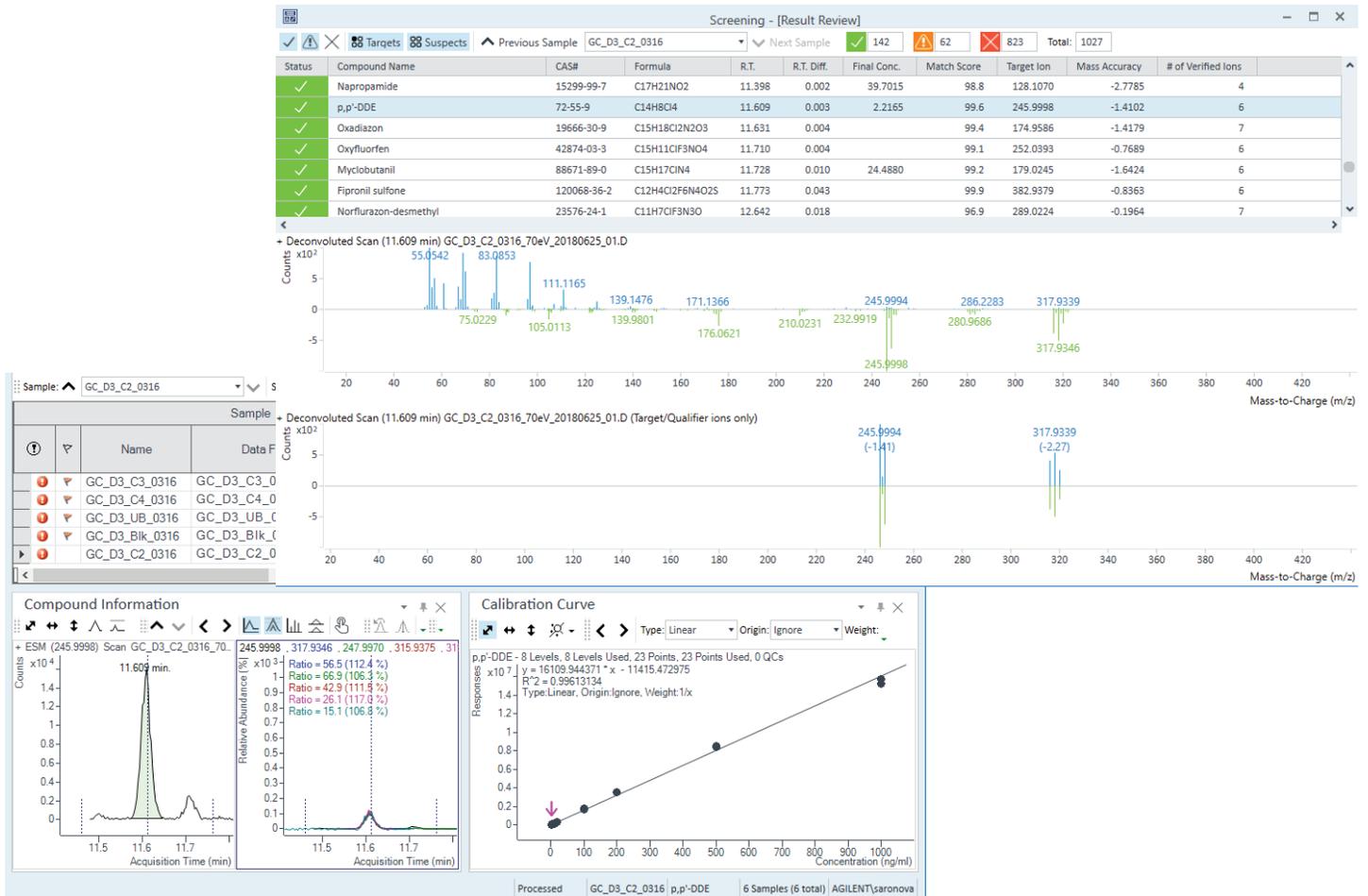


그림 3. Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어 10.1의 추정물질 스크리닝. 간편한 검토 절차를 위해, Screening 및 Quantitation Results 창은 모두 연결됩니다.

표 2는 이 연구에 포함된 가장 높은 업스트림 (UB) 샘플링 위치에 대한 표적 정량과 추정물질 스크리닝 결과의 요약입니다. 바닷물에서 식별된 오염물질은 이 목록에서 제외하였습니다. 식별된 오염물질은 주로 제초제(36%)와 뒤 이어 살진균제(25%) 및 살충제(21%)이었으며, 이는 샘플링 위치가 농업 개발 부지에 인접해 있다는 점에서 놀라운 일은 아니었습니다(그림 4).

표 2. UB 샘플링 위치의 표적 및 추정물질 스크리닝 결과 요약. 보고된 양은 주입 용액의 농도입니다.

화합물 명	조각 비율 스코어	질량 차(ppm)	양 또는 의심물질 ID만(ng/mL)
2,4,6-Tribromoanisole	99.6	1.68	ID만
2-Phenylphenol	86.2	0.59	ID만
Anthraquinone	93.7	2.35	ID만
Atrazine	98.5	0.77	6.5
Atrazine-Desethyl	90.1	3.41	ID만
Atrazine-Desisopropyl	94.4	2.42	ID만
Azoxystrobin	99.9	0.89	95.1
BAM/Dichlorbenzamide	84.3	0.57	ID만
Boscalid (Nicobifen)	99.8	0.03	ID만
Bromacil	99.4	0.53	116.5
Carvone	86.6	3.5	ID만
Chlorantraniliprole	96.1	0.59	304.6
Chloroneb	96.1	0.57	ID만
Chlorothalonil	99.9	0.83	7.3
Coumaphos	88.4	0.47	ID만
Cyprodinil	99.7	1.53	ID만
D CPA/Chlorthal-Dimethyl	99.4	2.06	ID만
Diethyltoluamide (DEET)	99.7	1.47	ID만
Diazinon (Dimpylate)	86.5	0.86	265
Diazoxon	99.5	0.21	ID만
Dichlobenil	98.1	1.24	ID만
Difenoconazole(l)	95.7	1.32	26.1
Dimethenamid-P	99	1.11	ID만
Dimethoate	98.6	2.03	1048.1
Disugran	67.9	2.44	ID만
Dithiopyr	99.8	1.38	ID만
Diuron Metabolite [3,4-Dichlorophenylisocyanate]	100	0.64	ID만
Fenbuconazole	92.8	0.64	ID만
Fipronil	91.9	1.26	ID만
Fipronil sulfide	99.6	0.27	ID만
Fipronil sulfone	99.9	0.06	ID만
Flonicamid	89.1	0.73	ID만
Flumioxazin	96.6	0.26	ID만
Fluopyram	99.1	1.11	ID만
Fluridone	96.1	1.43	ID만
Flurprimidol	92.6	2.3	ID만
Flutolanil	78.5	0.34	ID만
Fluxapyroxad	99.3	0.9	ID만
Fthalide	84.9	1.22	ID만
Hexazinone	84.4	1.89	ID만
Indoxacarb	71.6	1.5	37.9
Iprodione(Glycophen)	99.4	0.78	ID만

화합물 명	조각 비율 스코어	질량 차(ppm)	양 또는 의심물질 ID만(ng/mL)
Isoxaben	88.1	1.46	ID만
Malathion	94.5	0.98	7.9
Metalaxyl	90.4	0.59	11.6
Metolachlor	99.1	0.21	178
Metribuzin	97.4	2.98	ID만
Myclobutanil	99.5	1.22	10
N-(2,4-Dimethylphenyl) Formamide	80.9	3.27	ID만
Napropamide	90.7	0.47	11.5
Nitrapyrin	72.2	2.84	ID만
Norflurazon	96.3	0.98	ID만
Norflurazon-Desmethyl	94.7	0.75	ID만
Octhilinone	94.3	1.06	ID만
Omethoate	98.5	0.19	31.8
Oryzalin	99.8	0.35	ID만
Oxadiazon	99.9	0.78	ID만
Oxyfluorfen	99.2	0.27	ID만
<i>p,p'</i> -DDE	99.8	1.41	1.9
PCP/pentachlorophenol	72.8	1.35	3.1
Pendimethalin(Penoxalin)	99.8	0.54	ID만
Pentachloroanisole	89.8	0.09	ID만
Phenanthrene	99.5	1.76	ID만
Phenothiazine	87.5	1.43	ID만
Phosmet(Imidan)	80.6	1.79	ID만
Phthalide	94.5	2.81	ID만
Prodiamine	99.9	0.31	ID만
Prometon	90.1	1.04	ID만
Propiconazole(I)	99.3	1.13	ID만
Propiconazole(II)	99.4	0.42	ID만
Propyzamide(Pronamide)	80.1	1.07	2.2
Pyraclostrobin	93.8	0.71	ID만
Pyrimethanil	88.6	2.26	ID만
Simazine	99.8	0.27	ID만
Sulfentrazone	99.9	0.32	ID만
Tebuconazole(I)	91.4	1.03	ID만
Tebuthiuron	90.4	0.89	ID만
Tetraconazole	84.3	1.74	ID만
Thanite	86.5	3.98	ID만
Thiamethoxam	97.1	1.24	34.1
Triclosan	95.7	1.15	ID만
Trifloxystrobin	87	1.27	ID만
Trifluralin	95.8	2.22	ID만
Tris(2-Butoxyethyl)Phosphate	96	2.02	ID만
Tris(3-Chloropropyl)Phosphate	98.6	2.63	ID만
Tris(b-Chloropropyl)Phosphate	99.1	0.9	ID만

물 시료 외에도, 필터 입자로 추출을 수행하였습니다. 대부분의 오염물질은 물 추출물에 존재했지만, 필터 추출물에서도 약간의 오염물질이 식별되었습니다(그림 5). 흥미롭게도, 일부 pyrethroids와 PAH는 필터 추출물에서만 식별되었습니다. 필터 입자에 대한 이 성분들의 강한 친화력은 그것들의 높은 소수성으로 설명될 수 있습니다.

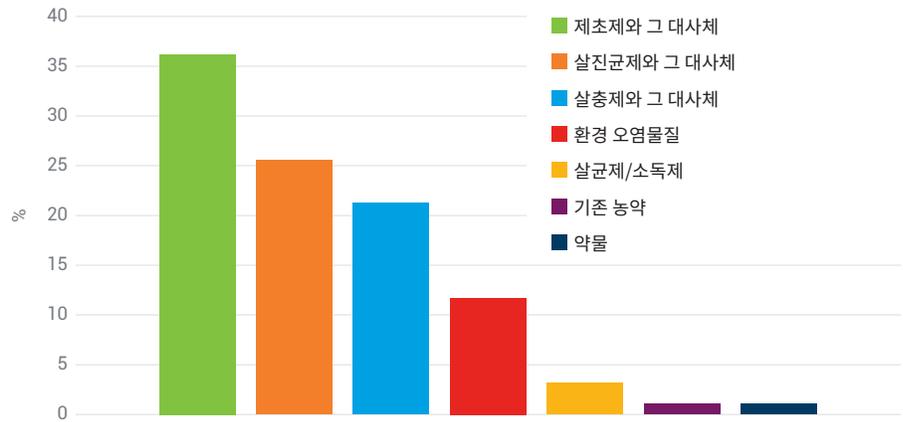
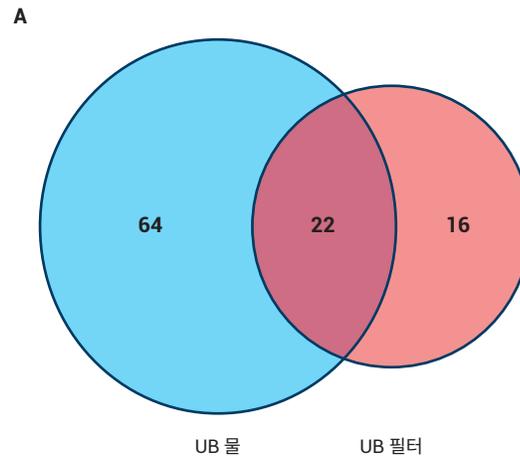


그림 4. GC/Q-TOF 스크리닝 워크플로 및 PCDL로 식별된 UB 샘플링 위치의 오염물질 분포



B

UB 필터 추출물에서 고유하게 식별된 화합물:

- | | |
|----------------------------|-------------------------------|
| <i>Diphenylamine (DFA)</i> | <i>Bifenthrin</i> |
| <i>Hexachlorobenzene</i> | <i>Chrysene</i> |
| <i>Pentachloroaniline</i> | <i>cis-Permethrin</i> |
| <i>Fluoranthene</i> | <i>trans-Permethrin</i> |
| <i>Pyrene</i> | <i>Benzo[b]fluoranthene</i> |
| <i>Nonachlor-trans</i> | <i>Benzo[a]pyrene</i> |
| <i>p,p'-DDD</i> | <i>Dinonylphthalate</i> |
| <i>Dihexylphthalate</i> | <i>Indeno[1,2,3-cd]pyrene</i> |

그림 5. UB 위치의 물과 필터 추출물 사이의 오염물질 분포

여러 위치에서 샘플링한 물 추출물에서 표적 및 추정물질 스크리닝 접근법으로 식별한 오염물질을 비교했습니다. C2 샘플링 위치의 물 추출물은 PCDL 스크리닝 접근법을 사용하여 가장 많은 수의 오염물질을 식별하였습니다. 식별한 모든 오염물질의 약 절반이 UB, C2 및 C4 샘플링 위치에서 공통으로 나타났습니다 (그림 6A 및 6B). 모든 샘플링 위치에서 식별된 오염물질의 상대적 양은 3D 영역 그래프로 표시하여 공간 경향을 더욱 시각화하였습니다(그림 7).

비표적 스크리닝 결과 및 잠정 일치 성분 확인

표적 및 추정물질 스크리닝에 대한 보완 접근법인 비표적 분석을 이용하여 물 추출물에서 몇 가지 추가적인 화합물을 식별했습니다. 그림 8은 NIST17.L 라이브러리와 Unknowns Analysis를 이용하여 UB 위치의 추출물에서 잠정 식별된 화합물의 예를 보여줍니다. NIST17.L은 단위 질량 라이브러리이므로, accurate mass 데이터는 라이브러리

매칭에 자동으로 고려되지 않습니다. 그러나, Unknowns Analysis는 NIST 일치 성분의 분자식과 관련하여 보았을 때, accurate mass 정보를 기반으로 잠정 일치 성분의 식별 확인 또는 위양성 무효화에 도움이 될 수 있습니다. 이것은 Unknowns Analysis의 ExactMass 기능을 사용하여 수행됩니다. 그림 8에 나타난 바와 같이, 이러한 각각의 잠정 일치 성분들에 대한 대부분의 이온은 5ppm 질량 오차 내에서 일치 성분들에 대한 분자식의 하위 집합으로 설명될 수 있습니다.

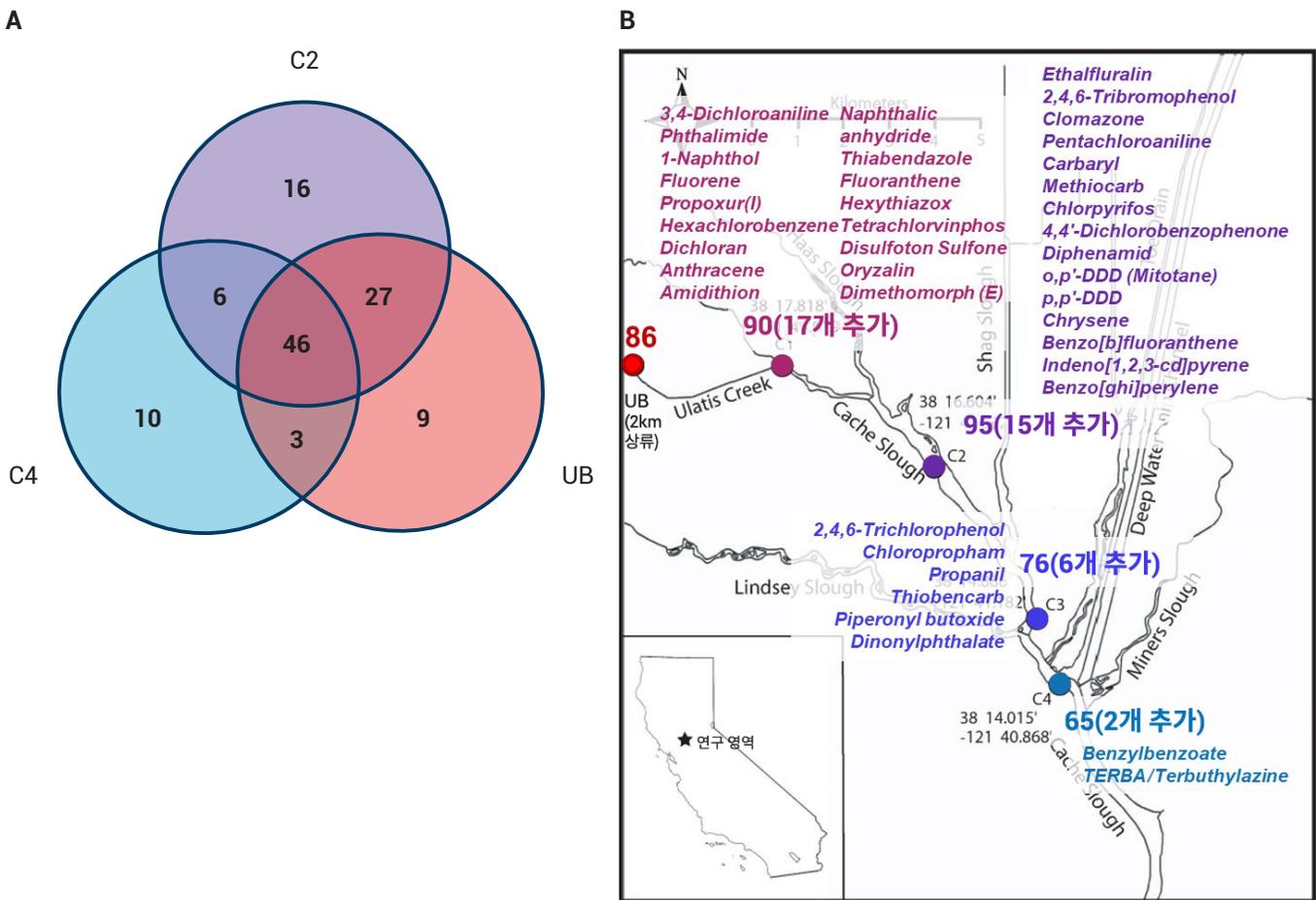


그림 6. 오염물질의 지리적 분포. UB, C2 및 C4 위치에서 식별된 오염물질 비교(A). 각 위치에서 식별된 오염물질 수와 흐름에 추가된 새로운 오염물질을 보여주는 샘플링 맵(B).

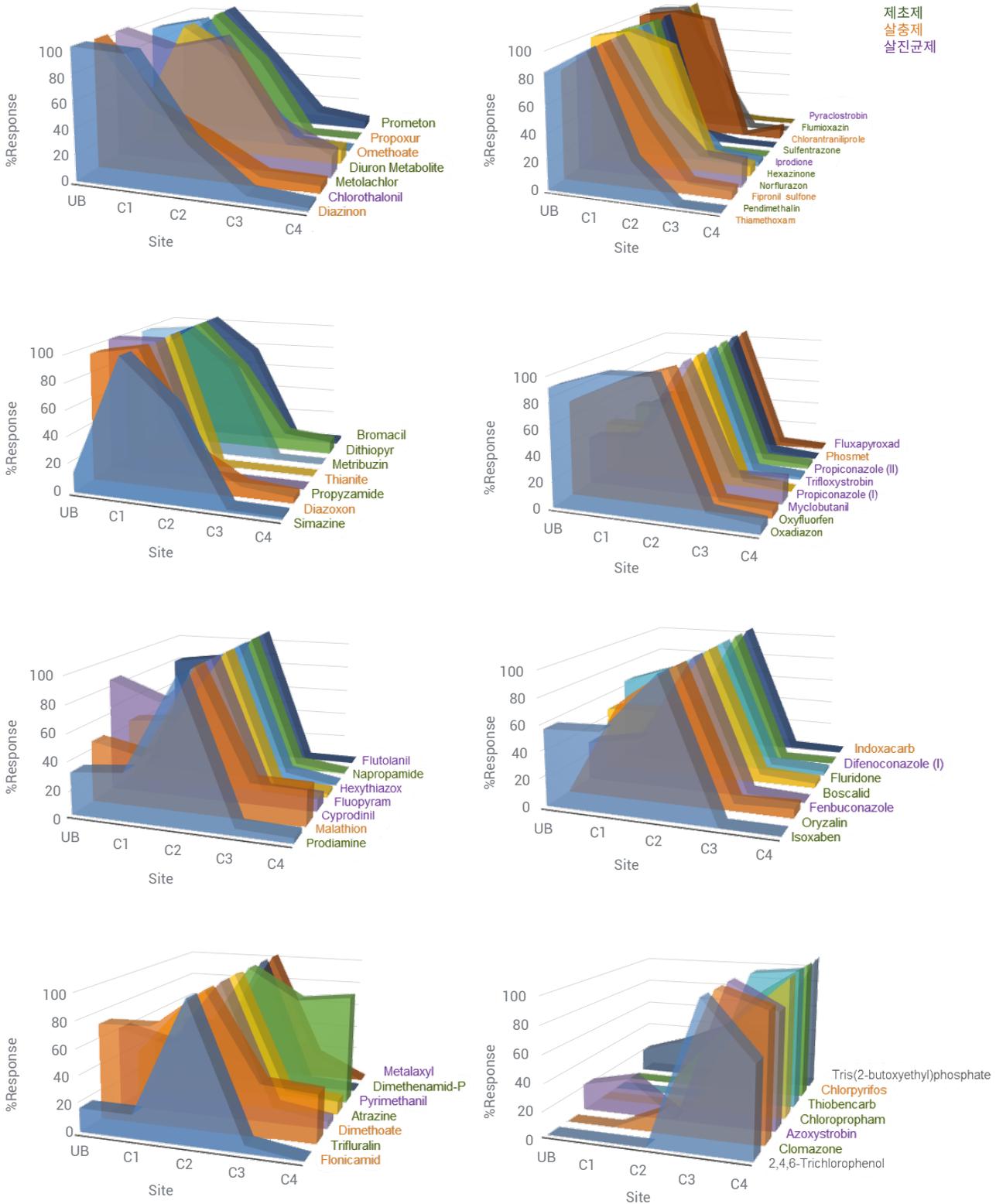
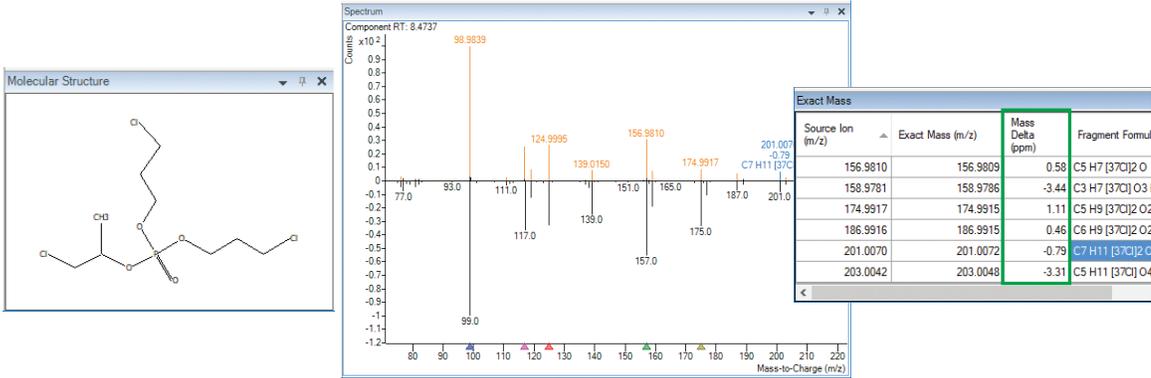
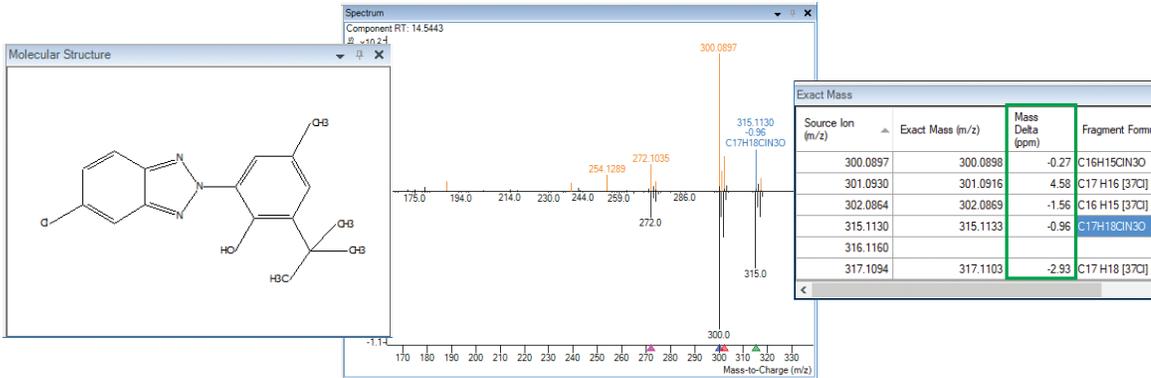


그림 7. 모든 샘플링 위치에서 식별된 오염물질의 상대적 양. 화합물은 지리적 분포 프로파일에 따라 그룹화했습니다.

잠정 일치 성분: Bis(3-chloro-2-propyl)(1-chloro-2-propyl)phosphate (C₉H₁₈Cl₃O₄P)



잠정 일치 성분: Bumetrizole(C₂₇H₁₈ClN₃O)



잠정 일치 성분: Methoxsalen(C₁₂H₈O₄)

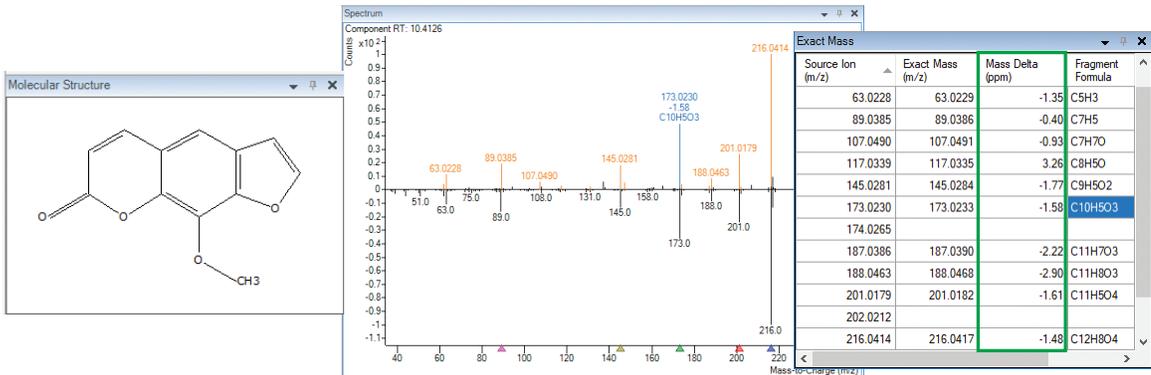


그림 8. Agilent MassHunter Unknowns Analysis 소프트웨어 및 NIST17.L 라이브러리를 사용하여 UB 위치에서 잠정 식별된 오염물질의 예. Deconvoluted 스펙트럼의 조각에 대한 낮은 질량 오차는 일치 성분의 분자식을 확인하기 위한 추가 정보를 제공합니다.

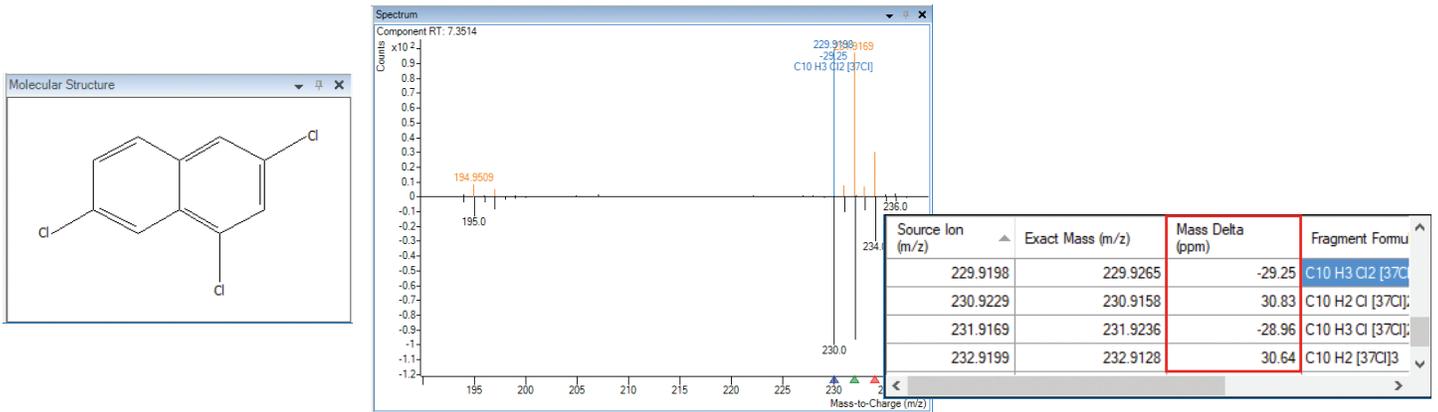
미지성분 식별

잠정 일치 성분의 일부는 큰 질량 오차로 확인되지 않았으며 추가 분석이 필요합니다. 그림 9는 이러한 경우의 예를 보여줍니다. 라이브러리 매칭 스코어가 73.9으로 NIST 라이브러리에서 1,3,7-trichloronaphthalene 으로 잠정 식별된 일치 성분은 일치 성분의

분자 이온 동위원소 클러스터에 해당하는 화합물 스펙트럼 이온과 이론적 이온 사이의 큰 질량 차이(약 30ppm)로 ExactMass 기능을 이용한 평가 후에 제외되었습니다. 화합물을 식별하기 위해, 낮은 전자 에너지 설정(15eV)으로 분자 이온을 확인하고 MassHunter Qualitative Analysis

소프트웨어의 MFG(Molecular Formula Generation) 기능으로 잠정 분자 이온의 동위원소 클러스터에 주석을 달았습니다(그림 9B, 1단계). 다음으로 잠정 분자 이온을 전구체로 사용하여 MS/MS 분석을 수행했습니다(그림 9B, 2단계). 이어서, MSC(Molecular Structure Correlator)로

A 잠정적인 NIST17 일치 성분: 1,3,7-trichloronaphthalene (C₁₀H₅Cl₃)



B 1단계: M+ 확인 → 2단계: 조각 이온 확인 → 3단계: 후보 성분의 구조 해석

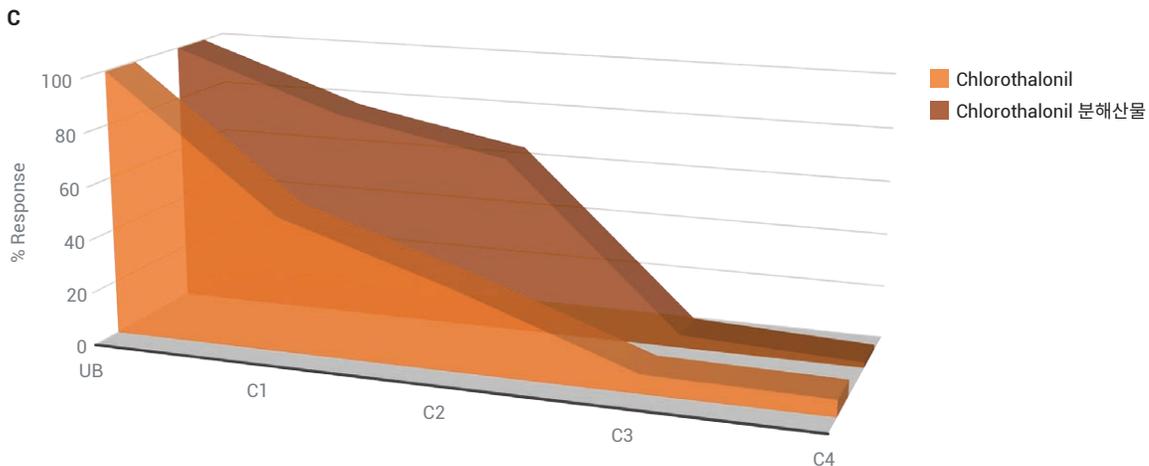
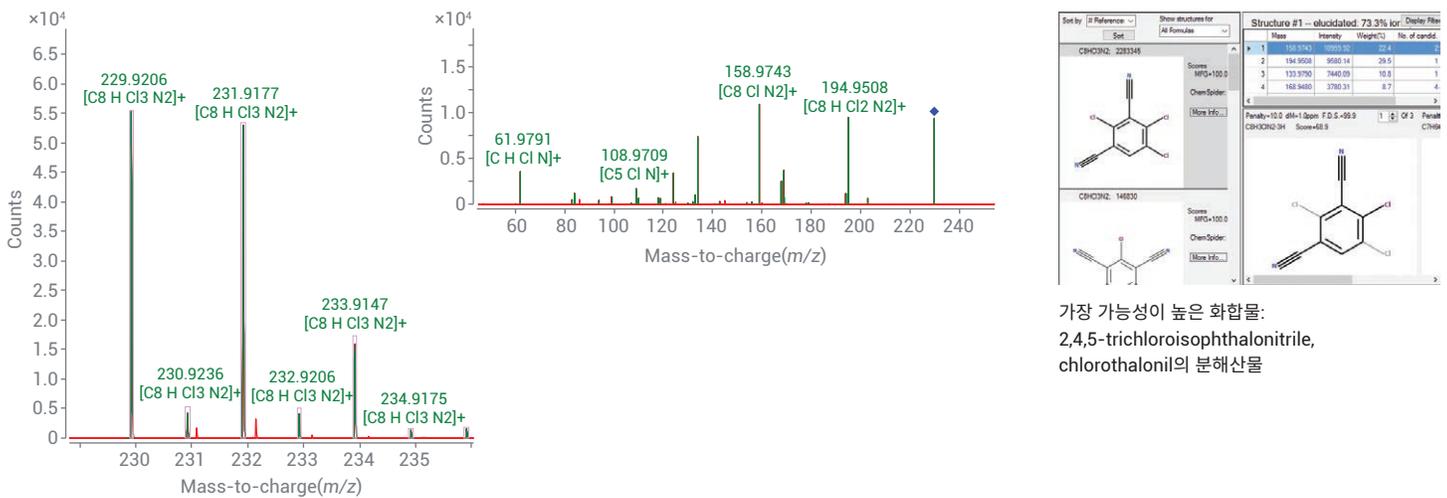


그림 9. 잠정 일치 성분 중 하나에 대한 식별 확인과 구조 해석, 큰 질량 오차는 화합물의 부정확한 식별을 나타냅니다(A). 화합물은 accurate mass 생성 이온 스펙트럼을 MSC(Molecular Structure Correlator) 도구에 입력함으로써 식별되었습니다(B). 모든 샘플링 위치에서의 chlorothalonil 및 그 분해산물인 2,4,5-trichloroisophthalonitrile의 분포(C).

MS/MS 데이터를 처리하여 이 미지 화합물에 대한 구조를 제안했습니다 (그림 9B, 3단계). 참조물질 수에 기초한 가장 가능성 있는 구조는 chlorothalonil의 분해산물인 2,4,5-trichloroisophthalonitrile입니다. 놀랍게도, chlorothalonil의 프로파일은 분해산물(그림 9C)과 매우 유사합니다.

결론

표적 정량, GC/Q-TOF accurate mass PCDL에 기초한 추정물질 스크리닝 및 비표적 접근법을 비롯한 포괄적인 워크플로를 이용하여 지표수 시료의 수 많은 농약과 기타 환경 오염물질을 식별했습니다.

저에너지 티와 accurate mass MS/MS는 비표적 스크리닝과 미지물질 구조 해석에서 화합물의 식별에 도움이 되었습니다. 미지 물질 중 하나는 chlorothalonil의 분해산물인 2,4,5-trichloroisophthalonitrile로 잠정 식별되었습니다.

참고문헌

1. Geissen, V.; *et al.* Emerging Pollutants in the Environment: A Challenge for Water Resource Management. *International Soil and Water Conservation Research* **2015**, *3(1)*, 57–65.
2. Agilent SureMass. Agilent Technologies technical overview, publication number 5991-8048EN, **2017**.
3. SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (**2015**).
4. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Memorandum: Acceptance Criteria for Confirmation of Identity of Chemical Residues using Exact Mass Data within the Office of Foods and Veterinary Medicine (**2015**).

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 9월 16일 한국에서 인쇄,
5994-1371KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울 특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com