



LC MS(MSMS)를 이용한 일본 잔류농약 동시분석

LC MS(MS/MS)를 이용한 일본 잔류농약 동시분석

신현수
영인과학

1. Introduction

일본은 2004년 이래로 중국 등에서 수입하는 농산물을 대상으로 검역을 실시하고 있습니다. 2005년에는 260여 농약 과 Veterinary Drug을 분석하는 Negative System을 운영하여 왔고 2006년에는 대상을 늘려 447여 농약 과 Veterinary Drug을 분석하는 Positive System을 적용하고 있습니다.

그리고 분석장비는 GC-MS, HPLC, LC-MS(MS/MS)를 사용하는데 HPLC에서 검출되는 농약은 LC MS(MS/MS)로 Confirm하도록 하고 있습니다. 감도는 Maximum Residue Level 0.01ppm을 적용합니다.

분석성분들은 Metabolite Toxicology연구로 계속 증가하는데 예를 들어 Metabolite 및 관련 독성 연구 등으로 파프리카중의 Flonicamide 분석은 Flonicamide 와 metabolite인 TFNA, TFNA-AM 그리고 TFNG를 동시에 분석하고 있습니다.

그러므로 농약분석에서는 미량정량(1-10ppb 이하 재현성), 정성확인(RT, 분자량정성), 다 성분 동시 분석 등이 중요한 요소입니다

Multi Residue Method I : LC MS(MS/MS) 결과

Agricultural Chemicals	Substances to be Analyzed	Relative Retention Time	LC/MS Monitoring Ions (m/z)						LC/MS/MS Monitoring Ions (m/z)						Limit of Measurement (ng)				
			Positive Mode			Negative Mode			Positive Mode			Negative mode			LC/MS	LC/MS/MS			
			Quantitative	Qualitative		Quantitative	Qualitative		Parent	Daughter (Quantitative)	Daughter (Qualitative)	Parent	Daughter (Quantitative)	Daughter (Qualitative)					
Azamesthalphos	Azamesthalphos	0.82	325	347	215	183			325	183	112					0.003	0.002		
Azinphos-methyl	Azinphos-methyl	1.05	328	160	132				318	159.9	76.97	132					0.005	0.003	
Amifos	Amifos	1.22	368	390	180	157			368	199.1	125						0.003	0.001	
Abamectin	Abamectin B1a	1.46	896	897	567	305			891	367.3	385.3	568					0.024	0.028	
Isoaflurole	Isoaflurole	1.00	377	360	283	251	-350	-359	360	251	360	144					0.004	0.003	
Iprovalicarb	Iprovalicarb	1.15	321	343	119				321	119	203						0.002	0.001	
Imidacloprid	Imidacloprid	0.53	256	208	175				256	209	175						0.008	0.005	
Indoxacarb	Indoxacarb	1.28	528	550	203	150			528	150	203						0.002	0.004	
Oxycarboxin	Oxycarboxin	0.82	268	207	175				268	174.9	147						0.004	0.001	
Oryzalin	Oryzalin	1.17															0.003	0.001	
Quazalofop-ethyl	Quazalofop-p-tefuryl	1.30	429	431	289				429	299.1	85			-345	-281	-78	-147	0.002	0.001
Clonazotocet-mesyli	Clonazotocet-mesyli	1.34	326	358	238				356	238	192	179					0.014	0.001	
Clofenthicid	Clofenthicid	0.54	250	189					250	188.9	132						0.002	0.002	
Chromafenozide	Chromafenozide	1.15	395	175					395	175.1	339	147					0.002	0.001	
Clomepropr	Clomepropr	1.33	324	346	120				324	120.3	203	105					0.004	0.006	
Chloridazon	Chloridazon	0.61	222	244	104	65			222	65	77						0.004	0.002	
Cyazofamid	Cyazofamid	1.18	325	140	108				325	108	325	261					0.005	0.001	
Cyflufenamid	Cyflufenamid	1.25	423	435	285	241			413	295.1	241.1	203					0.005	0.001	
Simetonazole	Simetonazole	1.16	294	295	135				294	70	73						0.002	0.002	
Dimethirimol	Dimethirimol	0.96	220	232	140	71			210	71	140						0.001	0.001	
Thiacloprid	Thiacloprid	0.64	253	255	126				253	126.1	90	73					0.004	0.002	
Thiobenzazolinol	Thiobenzazolinol	0.75	282	203	175				282	174.9	131						0.003	0.001	
Thiamethoxam	Thiamethoxam	0.44	292	221	314				292	211.1	181						0.003	0.004	
Tralkoxydim	Tralkoxydim (isomer 1)	0.94	320	284													0.009	0.001	
Tralkoxydim	Tralkoxydim (isomer 2)	1.08	320	331	170				330	137.9	284			-328	-254		-66	0.001	0.0004
Triticonazole	Triticonazole	1.15	328	320	70				318	70	318	125					0.004	0.003	
Tridemorph	Tridemorph (isomer 1)	1.56	298	130	299				298	130.1	56.97	98					0.009	0.012	
Tridemorph	Tridemorph (isomer 2)	1.57	298	299					298	130.1	98						0.053	0.105	
Napromilide	Napromilide	1.19	292	293	171				292	170.9	120						0.003	0.001	
Pyrazolynate	Pyrazolynate	1.26	429	441	173				429	91	229	173			-280	-143	-93	0.004	0.001
Priflutid	Priflutid	1.05	329	320	139				319	139.1	179	93					0.001	0.001	
Fenoxycarb	Fenoxycarb	1.20	302	116					302	116.2	88						0.005	0.001	
Ferimzone	Ferimzone (E)	1.10	255	277	132				255	132	91						0.002	0.001	
Ferimzone	Ferimzone (Z)	1.11	255	277	132	124			255	124.2	91	132					0.001	0.001	
Phenmedipham	Phenmedipham	1.03	301	136	168				318	301	167.9	136.1					0.003	0.001	
Butafenacil	Butafenacil	1.15	492	475	349	331	180		492	330.9		180					0.001	0.001	
Furathiocarb	Furathiocarb	1.32	383	405	252				383	252.2	195						0.004	0.001	
Benzoifenop	Benzoifenop	1.31	421	433	119	105			431	105.2	119						0.003	0.002	
Milbemectin	Milbemectin A3	1.43	546	511	493				551	547	511.1	240	337				0.031	0.012	
Milbemectin	Milbemectin A4	1.47	560	525	507				565	561	525.2	240	337				0.092	0.031	
Methoxyfenozide	Methoxyfenozide	1.12															0.002	0.001	
Lactofen	Lactofen	1.32	479	481	344				479	343.9	223						0.004	0.002	

2. Identification System

규제를 가하는 농약 분석에서 정성은 critical 요소입니다. LC MS(MS/MS)는 정성에 RT, 모분자 이온(Parent Ion), 조각 이온(Daughter Ion)을 사용하는데 Identification Point를 제공합니다. 정성점수는 분석결과를 최종 확인하는 데에 결정적인 요소가 됩니다. 일반적으로 3-4점 이상을 사용합니다.



정성점수 산출

MS-Techniques	Number of ions	IP
GC-MS (EI or CI)	n	n
GC-MS (EI and CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI or CI) 2 derivatives	2 (Derivative A) + 2 (Derivative B)	4
LC-MS	n	n
GC-MS-MS	1 precursor and 2 daughters	4
LC-MS-MS	1 precursor and 2 daughters	4
GC-MS-MS	2 precursor ions, each with 1 daughter	5
LC-MS-MS	2 precursor ions, each with 1 daughter	5
LC-MS-MS	1 precursor, 1 daughter, 2 granddaughters	5,5
HRMS	n	2 n
GC-MS and LC-MS	2 + 2	4
GC-MS and HRMS	2 + 1	4

MS의 정성점수 기준

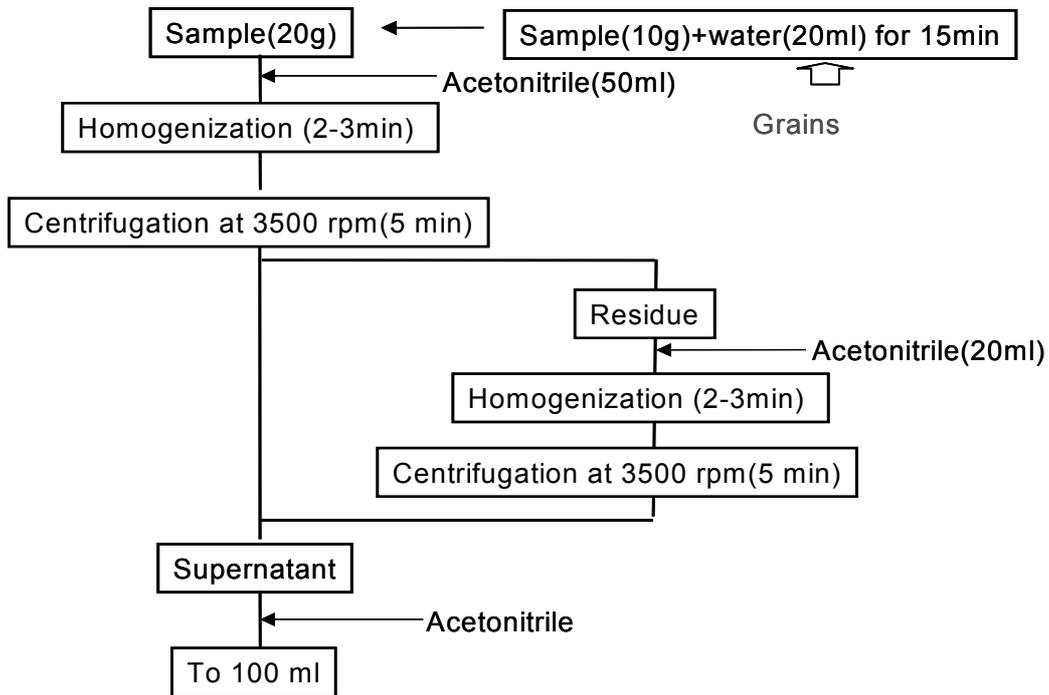
MS – Technique	IP / ion
Low resolution mass spectrometry (LR-MS)	1.0
LR-MS ⁿ Precursor ion	1.0
LR-MS ⁿ Transition products	1.5
High resolution mass spectrometry (HR-MS)	2.0
HR-MS ⁿ Precursor ion	2.0
HR-MS ⁿ Transition products	2.5

3, 잔류농약 동시분석 Method Development

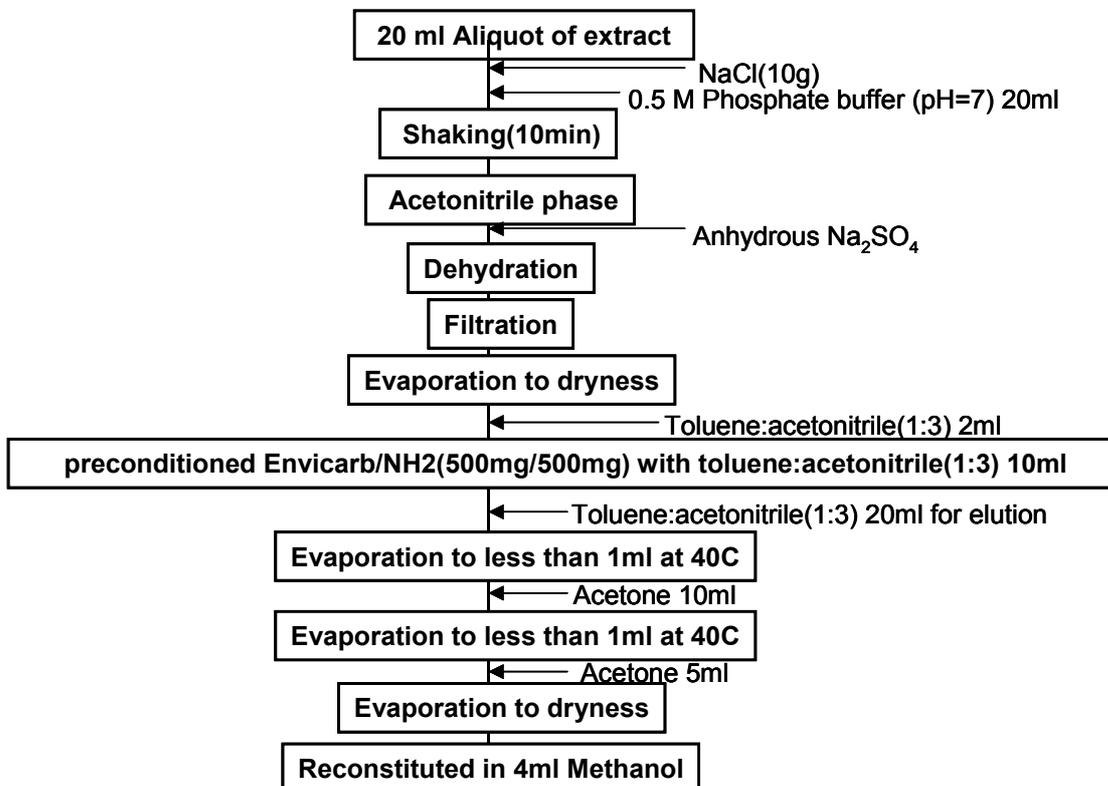
일본 공전에 있는 성분을 최근 LC MSMS(1200 RRLC, 6410 QQQ)로 분석하여 비교하였습니다. 분석은 시료 전 처리 조건, LC조건, MS조건이 절차로 진행되며 결과는 감도, 직선성, 재현성, Ion Suppression(Matrix Effect)등을 만족하는 선에서 최대한의 성분을 적용합니다. 우선 STDs 에서는 LOD/LOQ산출, 적용농도범위의 직선성, 재현성을 검증하고 시료에서는 시료 전 처리(추출, 정제), Spike 시료의 Ion Suppression, 재현성등을 검증하여 Method Development합니다. 이러한 조건에서 누락하는 성분들은 별도의 조건으로 조건 II를 만듭니다. 최종적으로 정부 규제요구사항을 충분히 충족하는지 최종 확인합니다.

Target 성분은 Pesticide, Veterinary Drug, Mycotoxin을 MRM list방법을 적용하여 실험하였습니다. 이러한 방법을 Target Screen이라고 하는데 감도, 직선성, 재현성, 시료 전 처리 등에서 우수한 성능을 보여주고 있습니다.

시료 추출 과정



시료 정제 과정





Spike 시료의 Ion Suppression

No	Pesticides	1	2	3	4	Average	SDEV	RSD
1	Aldoxycarb	69	93	68	83	79	11.966	15.21
2	Oxamyl	83	91	84	85	86	3.533	4.12
3	Methomyl	89	88	92	83	88	3.742	4.25
4	Thiamethoxam	71	80	73	78	76	4.203	5.57
5	Clothianidin	89	96	88	92	91	3.511	3.85
6	Thiabendazole	90	97	102	93	95	5.121	5.36
7	Chloridazon	88	94	89	89	90	2.760	3.07
8	Imidacloprid	103	105	105	106	105	1.158	1.10
9	Dimethirimol	83	88	89	87	87	2.533	2.91
10	Thiacloprid	94	94	96	97	95	1.367	1.44
11	Oxycarboxine	101	99	103	99	100	1.741	1.74
12	Aldicarb	78	89	86	82	84	4.931	5.89
13	Tebuthiuron	86	87	88	90	88	1.929	2.20
14	Pirimicarb	83	87	89	86	86	2.369	2.74
15	Azamethiphos	97	101	101	99	100	2.073	2.08
16	Imazalil	103	98	102	107	103	3.589	3.50
17	Ferimzone(E)	89	92	90	91	91	1.279	1.41
18	Thiodicarb	104	97	97	104	100	3.872	3.86
19	Carbofuran	84	87	87	92	88	3.091	3.53
20	Bendiocarb	86	83	85	86	85	1.510	1.77
21	Ferimzone(Z)	89	103	91	91	93	6.502	6.96
22	Methabenzthiazuron	100	101	100	96	99	2.250	2.27
23	Carbaryl	94	89	93	95	93	2.907	3.14
24	Diuron	89	84	86	99	89	6.548	7.32
25	Monolinuron	95	90	94	92	92	2.228	2.41

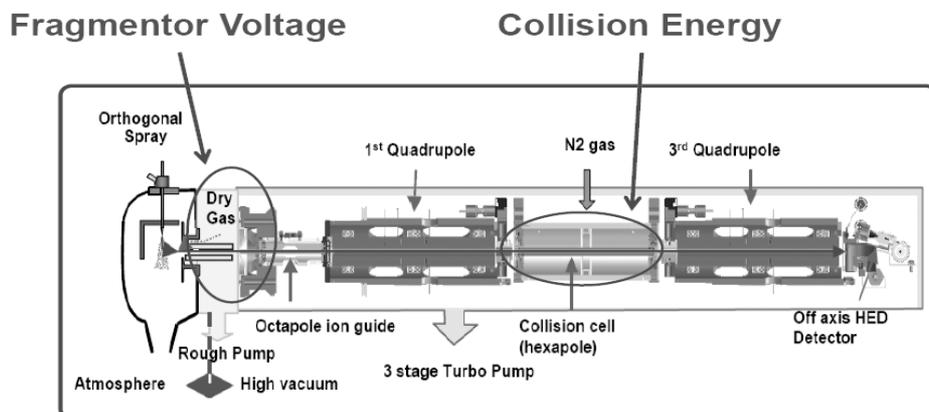
4. MRM 조건을 구하는 방법

MRM 조건을 구하는 방법은 Manual과 Auto방법이 있습니다.

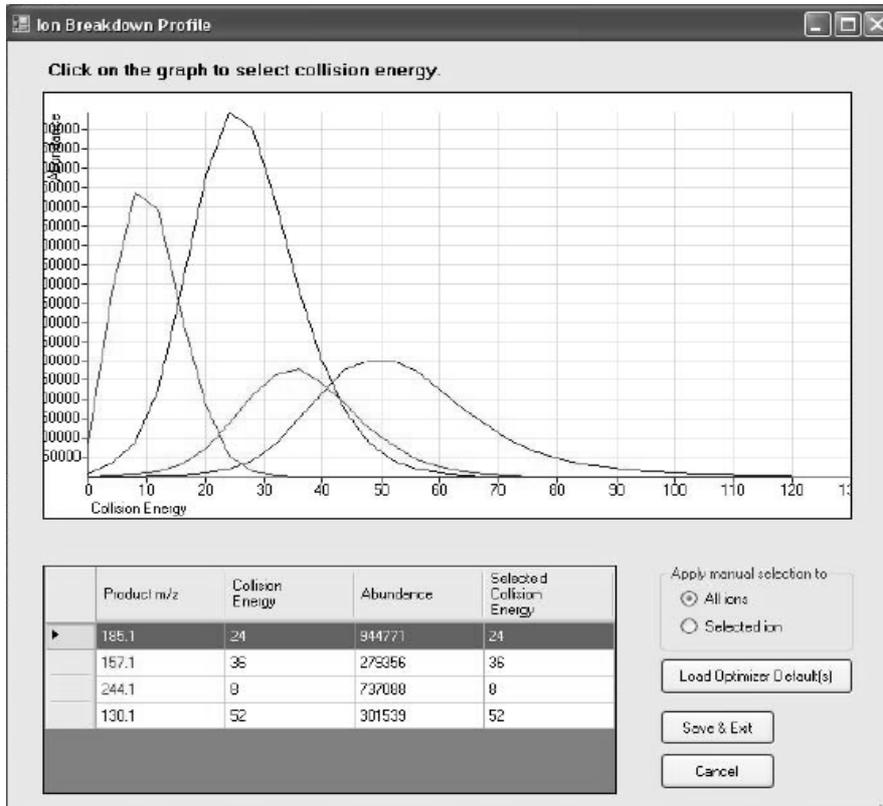
일반적으로 Manual방법에서는 약 500여 성분의 조건을 구하는데 숙련된 전문가는 약 한 달 이상 소요가 됩니다. 그러나 Optimizer를 사용하는 Auto 방법에서는 약 1주일 이내에 진행이 가능합니다. 이렇게 만들어진 MRM list는 Database file로 활용 가능합니다.

MRM(SIM-SIM)조건의 핵심은 모분자 이온과 그 이온의 조각이온을 만드는 것입니다. MS에서는 Fragmentor Voltage, Collision Energy가 2 Key Point입니다.

2 Key Points : 모 분자이온, 조각이온



4. Product Ions => 2 이온 선택하여 Quant/Qual Ion으로 사용함



MRM List file : Target Screen용 Database로 활용 가능함

Filter Compounds:

- Optimized Compounds
- Date From: 01/20/2000 To: 01/20/2000
- Group Name: PPCP
- Project Name: PPCP1
- Polarity: Positive

Search Compounds:

- Compound Name
- Formula
- Show All Records
- Show results summary

Compound Name	Method	Precursor Ion	Fragmentor	Product Ion	Collision Energy	Abundance	Project Name
Sulfamethoxazole	D:\MassHunter\m	254.0599	75	<input checked="" type="checkbox"/> 64.67146	35	1619	PPCP1
				<input checked="" type="checkbox"/> 91.92621	35	3754	PPCP1
				<input checked="" type="checkbox"/> 107.7074	20	2754	PPCP1
				<input checked="" type="checkbox"/> 64.67146	35	1619	ppcp2
				<input type="checkbox"/> 91.92621	35	3754	ppcp2
Carbadox	D:\MassHunter\m	263.078	81	<input type="checkbox"/> 107.7074	20	2754	ppcp2
				<input checked="" type="checkbox"/> 66.7	31	642	PPCP1
				<input checked="" type="checkbox"/> 230.8	8	2377	PPCP1
				<input checked="" type="checkbox"/> 244.7	16	1039	PPCP1
				<input type="checkbox"/> 230.8	8	2377	ppcp2
				<input type="checkbox"/> 244.7	16	1039	ppcp2

Refresh Save Import Cancel



5. Non Targeted Screening

Screen분석은 다음 3가지로 분류합니다.

A. Targeted Screen

MS는 QQQ tandem mass가 최적이고

MS data는 MRM(SIM/SIM) 기술로 수집합니다.

Identification Point System을 적용합니다.

B. Non-Targeted Screen

MS는 High Resolution TOF 등이 최적이고

MS data는 MS scan 기술로 수집합니다.

AMRT, Isotope Ratio등을 적용합니다.

C. Unknown Screen

MS는 Q-TOF 이상이 최적이고

MS data는 Data Dependent Analysis(MS, MSMS scan) 기술로 수집합니다.

Profiling Approach 기술 등을 사용합니다.

Target성분 분취, NMR, RT-IR, 원소분석 등을 병행합니다.

Target 성분(1000-1500성분 이상) 및 시료의 다양성은 계속 증가하고 있습니다. 시료분석 결과를 신속하고 정확하게 제공하는 데에 시료 전 처리, 분석 시간 등이 bottle-neck이 되고 있습니다.

여기에 MS의 선택적인 분자량이온 검출 분석은 Matrix effect를 감소시켜 시료 전 처리 단순화 하는 데 기여하고 있습니다. 분석시간의 단축에는 QQQ MS는 동시 MRM 속도 및 감도의 발달로 좋은 결과를 제공하고 있습니다.

MRM list방법은 다 성분 동시분석에서 감도, 재현성, 속도 등에서 우수한 결과를 제공합니다. 그러므로 QQQ MS는 Regulation에서 최종 검증하는 장비로서 자리매김을 하고 있습니다. 그리고 약 20분 이내에 200-300성분을 추적할 수도 있습니다.

그러나 미 지정 성분까지 분석하는 데에는 MRM list는 한계가 있으므로 HR MS인 TOF MS등을 활용하려는 경향이 있는데 분석 속도에서 가장 앞서고 있습니다. 최근에는 기술발전으로 TOF의 감도가 1-10ppb 이하를 추적할 수 있기 때문에 TOF MS에 의한 Non Targeted Screen연구도 많이 진행이 되고 있습니다.

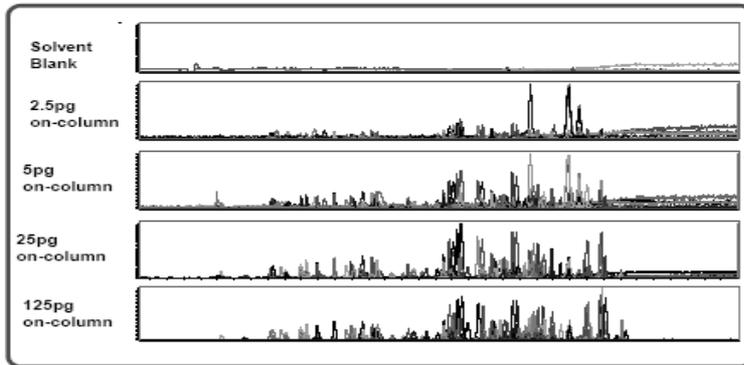
대안으로 다음과 같은 절차도 고려할 수 있습니다.

A. TOF MS에 의한 Non-Targeted Screen으로 예상 성분 검출

B. QQQ MS에 의한 Targeted Screen으로 유해성분 최종 검증

최근에는 HR TOF MS의 감도, 속도 등에서 많은 발전을 이루고 있습니다.

Non Targeted Screen



HPLC Method (Agilent 1200SL HPLC/1290 Infinity [TOF]):
 Column: Zorbax Eclipse Plus C18, 2.1 x 50mm (1.8µm)
 Column temperature: 55°C
 Injection volume: 5 µL
 Autosampler temp: 4°C
 Needle wash: flushport (100% methanol), 5 sec

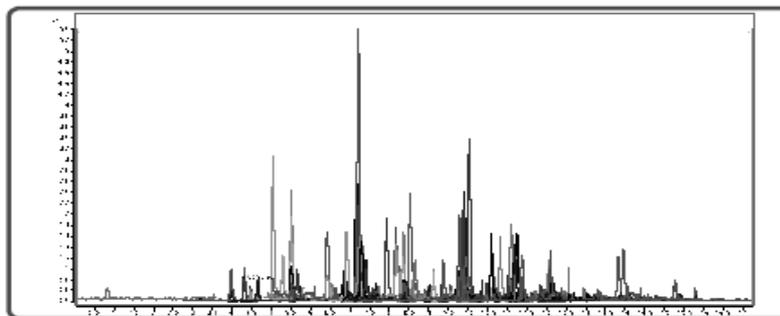
Mobile phase: A = 5mM NH₄formate/0.01% formic acid in water
 B = 0.01% formic acid in acetonitrile

Gradient flow rate: 0.3 mL/min (QqQ); 1.0 ml/min (TOF)

Table 1. HPLC Gradient Profile.

Time (min) TOF	%B TOF	Time (min) QqQ	%B QqQ
0.00	6	0.00	6
0.15	6	0.50	6
2.10	95	14.00	95
3.00	95	17.00	95

Targeted Screen



100fg level EIC (87% coverage & identification).

감사합니다.