

# VYUŽITÍ LC-MS PRO OCHRANU OPYLOVAČŮ

VOŘÍŠEK VIKTOR<sup>1,2</sup>, KABRHELOVÁ JANA<sup>1</sup>, HORNA ALEŠ<sup>1,3</sup>



- 1) RADANAL s.r.o., Okružní 613, 530 03 Pardubice, Česká republika
- 2) Fakultní nemocnice, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové - Nový Hradec Králové, Česká republika
- 3) Institut Nutrce a Diagnostiky Pardubice, Sakařova 1400, 530 03 Pardubice, Česká republika



Autor pro korespondenci: horna@radanal.cz

## ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera* L.) je hospodářsky velmi využívána, a to především za účelem opylování rostlin a zisku včelích produktů. Současný nárůst mortality včelstev vzbuzuje pozornost i u široké veřejnosti. Včely přitom nejsou ohroženy pouze zjevnými faktory, jako jsou nemoci (např. varoáza, akarapidóza, virus deformovaných křídel, mor včelího plodu) a škůdci (např. zavíječ voskový, včelomorka obecná). Důležitou roli zde sehrává i rozsáhlá urbanizace a industrializace. Včasná identifikace faktorů vedoucích k jejich úmrtí umožňuje rychlejší dekontaminace prostředí a s tím spojenou záchranu dalších živočichů či zábranu šíření znečištěných včelích produktů mezi obyvatelstvo.

Pesticidy ze skupiny organofosfátů a karbamátů patří mezi tzv. blokátory acetylcholinesterázy (AChE). AChE slouží k rozkladu neurotransmiteru acetylcholinu (ACh), kdy je vazebné místo AChE acetylováno za vzniku volného cholinu a následně hydrolyzováno za vzniku kyseliny octové. Při reakci enzymu s organofosfáty a karbamáty však dochází k tvorbě mnohem stabilnějšího, obtížně hydrolyzovatelného produktu, což vede k akumulaci ACh v synaptické štěrbině. Ta způsobuje vysokou a dlouhodobou stimulaci nervových buněk vedoucí k třesu, křečím, hyperaktivitě, ztrátě koordinace, paralýze a smrti.

Představujeme analytickou metodu pro monitorování organofosfátů na bázi UPLC-MS/MS. Acefát, dimethoát, diazinon, chlorfenvinfos, chlorpyrifos byly chromatograficky odděleny pomocí chromatografické kolony Ascentis Expres C18 (5 cm x 2,1 mm, 2 μm, Supelco Analytical) s předkolonou Ascentis® Expres C18 (0,5 cm x 2,1 mm, 2 μm, Supelco Analytical) a gradientovou elucí mobilních fází vodného roztoku mravenčanu amonného a roztoku mravenčanu amonného v acetonitrilu. Pro hmotnostní spektrometrickou detekci ionizace elektrosprejem a byl použit režim selektivního monitorování reakce (SRM). Jednotlivé kroky vyvinuté metody byly optimalizovány. Všechno data byla statisticky vyhodnocena.

## UPLC-MS/MS

Vysokoučinný kapalinový chromatograf UltiMate 3000 Binary RSLC ve spojení s hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem TSQ Quantum Access Max, vybaveného ionizací elektrosprejem H-ESI (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Kolona:** Ascentis Expres C18 (5 cm x 2,1 mm, 2 μm, Supelco Analytical) s ochrannou kolonou Ascentis® Expres C18 (0,5 cm x 2,1 mm, 2 μm, analytické Supelco)

**Mobilní fáze A:** 25 μM vodný roztok mravenčanu amonného

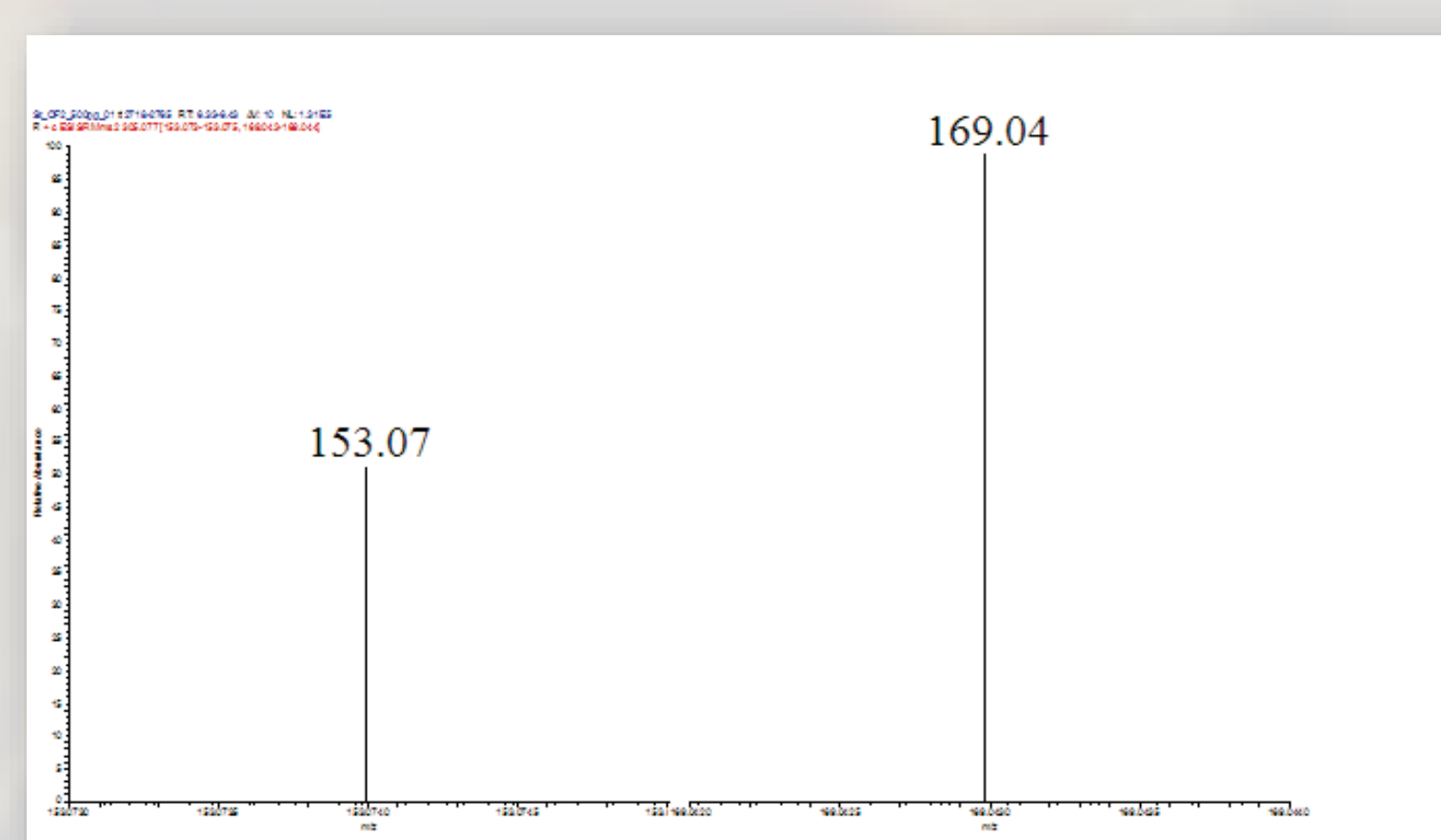
**Mobilní fáze B:** 25 μM roztok mravenčanu amonného v acetonitrilu

### Parametry MS:

Doba cyklu: 0,5 s  
Tlak kolizního plynu: 1,5 mTorr  
Teplota kapiláry: 325 °C  
Teplota odpařovací jednotky: 300 °C  
Tlak sušícího plynu: 45 arb unites  
Tlak čistícího plynu: 2 arb unites  
Hodnota sprejového napětí: 3300 V

## PŘÍPRAVA VZORKU - QUECHERS metoda

- Rozdrcení mrtvého těla včely
- Přidání extrakčního činidla acetonitril:hexan (7:2)
- Třepání - 6 minut, 600 ot./min
- Vysolení - přidání pufovacích solí: (200 mg MgSO<sub>4</sub>, 50 mg NaCl, 25 mg C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>•1,5 H<sub>2</sub>O, 50 mg C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>•2 H<sub>2</sub>O)
- Třepání - 5 minut, 600 ot./min
- Odstředění - 5 minut, 10 000 ot./min
- Odebrání vrstvy acetonitrilu nad sedimentem biologické matrice
- Přidání 60 mg sorbentu C18/PSA k vrstvě acetonitrilu
- Třepání - 2 minut, 600 ot./min
- Odstředění - 5 minut, 11 000 ot./min
- Supernatantová filtrace - nylon, 0,22 μm



Analyt	m/z rodičovský ion [Da]	m/z dceřinný ion [Da]	Kolizní energie [eV]	Tube Lens [V]	RT [min]
Acefát	184.116	143.014	5	51	10.02
	184.116	49.171	20	51	
Diazinon	305.077	153.074	19	61	5.13
	305.077	169.043	19	61	
Dimethoát	230.002	170.948	15	49	6.64
	230.022	124.975	20	49	
Chlorfenvinfos	358.941	99.007	28	56	10.78
	358.941	169.906	36	56	
Chlorpyrifos	351.927	199.861	17	56	11.23
	351.927	99.007	28	56	

Tato práce byla vypracována s grantovou podporou TAČR, projekt č. TH03030336.