



Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., Dol
252 66 Libčice nad Vltavou

Tel: 220 941 259, 220 940 480 Fax: 220 941 252 e-mail: beedol@beedol.cz

Výroční zpráva za rok 2005

**o plnění úkolů vyplývajících ze Smlouvy o dílo č. 7-16230-2005
uzavřené mezi MZe ČR a VÚVč v Dole k řešení problematiky
monitoringu léčiv proti chrobám včel**

Objednatel : Česká republika – Ministerstvo zemědělství ČR
Těšnov 17, 117 05 Praha 1

Zastoupená : Ing. Jiřím Pondělíčkem Ph.D.
ředitelem odboru rybnářství, myslivosti a včelařství

Zmocněnec pro věcná jednání: Ing. Hana Kovářová

Zhotovitel : Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.
Dol, 252 66 Libčice n. Vlt.

Zastoupený : Dr. Ing. Františkem Kamlerem, ředitelem ústavu

IČO : 62968335
Pověřený pracovník : Ing. Dalibor Titěra, CSc

Anotace

Největší užitek přinášejí včely tím, že opylují rostliny. Ekonomika včelařství je ale odvozená od produkce a realizace medu a dalších včelích produktů. Odpovídající ceny lze získat pouze za včelí produkty nejlepší kvality, zcela prosté reziduí cizorodých látek. Jedním z potenciálních zdrojů reziduí jsou účinné látky používané ve včelařství v boji proti nemocem a parazitům. Tato práce shrnuje a analyzuje rizika v této problematice.

Byly vyvinuty další chybějící metody stanovení reziduí metabolitů amitrazu, tau-fluvalinatu a acrinathrinu v medu, vosku a propolisu.

Rozbory více než 150 vzorků těchto produktů potvrdily předpoklady, vyslovené na základě analýzy rizika.

Všechny tři hlavní účinné látky používané plošně proti varroáze včel - amitraz, acrinathrin a tau-fluvalinate - nepředstavují při dodržení metodiky aplikace žádné hygienické riziko pro včelí produkty.

Po jedné aplikaci thymolu, který je v zahraničí propagován, do pokusných včelstev byla nalezena rezidua v kvantech blízkých se hygienickému limitu. Thymol představuje hygienické riziko pro konzumní med.

V Dole, 24.11.2005

Dr.Ing. František Kamler
ředitel VÚVč Dol

Ing. Dalibor Titěra, CSc
vedoucí odd. výzkumu

Obsah

- I. Úvod do problematiky a předmět smlouvy
- II. Analýza současné situace
- III. Analýza rizika
- IV. Vývoj metod a analytická stanovení vybraných látek
- V. Komentář k čerpání finančních prostředků
- VI. Závěrečné shrnutí

Příloha: Rukopis publikace do *Analytica chimica acta*



Odběr vzorku pro stanovení reziduí thymolu v medu - Liběchov 2005

I. Úvod do problematiky a předmět smlouvy

Největší užitek včel je v jejich opylovací činnosti, různé výpočty udávají, že význam opylování převyšuje 15 až 20x hodnotu včelích produktů. To je obecně přijímáno, ale ekonomicky se přesto chov včel opírá o marketing včelích produktů, zejména medu. Výrobní náklady na jednotku produkce nejsou na světě všude stejné, takže světový obchod velmi využívá relativně dobré trvanlivosti a skladovatelnosti medu k tomu, že se med vozí z krajů, kde je levná produkce, do zemí, kde se dobře prodává. Med vožený ve velkém z levných zdrojových oblastí může být levnější i na pultech ve spotřebitelském balení a přesto přinese značný zisk. Domácí produkce, která má vyšší výrobní náklady, je pak dražší i v tržním balení a je prodejná pouze za předpokladu, že spotřebitelé uznají vyšší kvalitu a tím i vyšší hodnotu domácích medu. Situace v okolních evropských zemích je podobná. Česká společnost je dosud velmi orientovaná na výběr zboží podle ceny a jen pomalu zohledňuje kvalitativní hlediska.

Máme-li trvale budovat stabilitu oboru včelařství, která stabilizovaným počtem včelstev a jejich chovatelů zajistí primární funkci chovu včel, to jest opylování, musíme usilovat o ekonomickou prosperitu oboru. Horizontem je dobrý odbyt včelích produktů zejména na domácím trhu a odpovídající, přestože ne nejlevnější, ceny.

Marketing založený na propagaci kvality medu se osvědčil např. v Německu. Zde funguje celý systém nástrojů, jak domácí produkci medu držet v ohnisku zájmu spotřebitelů. Mezi tyto nástroje patří i chráněné vzory sklenic, etiket, národních standardů kvality. Každoroční soutěže kvality spojují několik účelů: úspěch v soutěži je reklama pro producenta i pro komoditu samotnou a složitý systém vyhodnocení je vlastně důkladná kontrola kvality prováděná na široké bázi, dobrovolně a účinně.

Česká republika měla vždycky velmi přísná kritéria na kvalitu medu. Po zavedení jednotné evropské normy to znamenalo, že některé kvalitativní parametry medu, zejména obsah HMF (hydroxymethylfurfural, který je markérem dlouhodobého zahřívání a nešetrného skladování) jsou nyní stanoveny volněji než v původní ČSN. Tento volnější přístup k evropské normě je zdůvodňován rozsahem místních klimatických a produkčních podmínek ("od Sicílie až po Skandinávii"), nelze však nevidět ani snahu obchodních lobby, kterým měkké normy usnadňují práci. Česká republika proto, podobně jako další země a regiony, vydala vlastní kvalitativně přísnější normu, která umožňuje definovat a zřetelně označit med lepší kvality, než jen obecně vyhovující evropskému standardu. Med splňující tuto přísnější normu může používat ochrannou známku "Český med".

Pojem kvality, v našem případě medu, je však třeba stále brát v úvahu nejen jako marketinkový faktor, ale hlavně a především ve smyslu faktické kvality. Kvalitní potravina, a v případě medu jde rozhodně i o vlastnosti přispívající ke zdraví konzumenta, nesmí být narušena: falšováním, chybným zpracováním a skladováním a znečištěním cizorodými látkami. Cizorodé látky by se do medu mohly obecně dostat z přírody nebo z prostředků, které chovatel používá při léčení včel.

Otázku kontaminace medu z okolního prostředí studovaly rozsáhlé dlouhodobé projekty (Monitoring kontaminace potravinových řetězců, podílelo se Ministerstvo zemědělství, školství i životního prostředí, Státní veterinární správa, Vysoká škola chemicko-technologická, VÚ včelařský, VÚ pícninářský, Státní zdravotní ústavy v Praze a v Ústí nad Labem a další.) Med a další včelí produkty byly souběžně zkoumány vedle dalších matric, jako byla dešťová, povrchová i podzemní voda, rostlinná biomasa, maso domácích i volně žijících zvířat, mléko aj. Průzkum probíhal na celém území ČR a byl záměrně situován do lokalit považovaných za nejvíce a nejméně zatížené cizorodými látkami. Výsledek byl poměrně překvapující. Med a včelí vosk analyzovaný v tomto výzkumu ukázal zcela minimální znečištění. V mnohých případech pod hranicí detekce (polychlorované uhlovodíky) a ve všech případech pod hranicí

hygienických limitů (kovy a další poluteranty). Tento výsledek je důležitým poznatkem, že středoevropské prostředí, ve které naše včely chováme, stále ještě umožňuje právě včelám samotným, aby svými přirozenými mechanismy hledaly, sbíraly, zpracovávaly a využívaly přírodní potravu relativně velmi čistou. Včelí produkty proto můžeme považovat za nezatížené a bezpečné.

Hodnocení rizika kontaminace včelích produktů látkami používanými při léčení včel je úkolem trvalým. Některé jeho aspekty jsou i cílem tohoto úkolu.

Léčení včel není ve světě prováděno jednotně. Liší se spektrum nemocí, spektrum povolených a nepovolených přípravků, aplikační metody a organizace léčení.

Vzhledem k výše popsanému rozsáhlému obchodu s medem je třeba zahrnout do analýzy rizika domácí i zahraniční včelí produkty a vytipovat rizikové látky.

Obecným cílem jsou kvalitní včelí produkty, které jsou

- prospěšné konzumentovi,
- jsou dobrým zbožím a
- mají trvale dobrou pověst, neposkvřenou mediálními aférami vyrůstajícími z nálezů kvalitativních problémů

Předmětem smlouvy 7-16230-2005 je zajištění monitoringu léčiv proti chorobám včel, používaných na území České republiky v tuzemských a v dovážených medech a dalších včelařských výrobcích.

V rámci této smlouvy byly ze strany zhotovitele provedeny tyto práce a činnosti :

Analýza současné situace

Analýza rizika

Vývoj metod a analytická stanovení vybraných látek

II. Analýza současné situace.

Které látky se mohou vyskytnout a které je třeba monitorovat?

Produkční chov včel je postihován řadou nemocí. Nemoci se tlumí buď zootechnickými metodami, případně radikálně, likvidací ohnisek, nebo se používají léčiva. Skutečně účinná léčiva jsou v naprosté většině případů syntetické látky, tedy alopatická léčiva.

- Tlumení bakteriálních chorob

Bakteriální choroby včelího plodu se podáváním léků úspěšně tlumit nedají. Naše předpisy zcela vylučují použití antibiotik ve včelařství. Dovážené medy jsou kontrolovány moderními metodami ve Státním veterinárním ústavu v Jihlavě. Tento monitoring je možné považovat za dostačující.

Považujeme současnou situaci za relativně příznivou. V žádném případě nepovažujeme za potřebné opouštět radikální postup s likvidací ohnisek, tedy likvidací včelstev a všeho kontaminovaného materiálu. Závěrečná desinfekce je založena na použití hydroxidu sodného a chlornanu sodného. Vzhledem ke způsobu použití kontaminace včelích produktů v provozu nehrozí. Kontaminace výrobních linek (medomety, odvíčkovací a stáček zařízení) případným použitím chlornanu sodného není kritická, lze úspěšně využít postupů osvědčených v mlékárnách a pivovarech. Detekce chloru v medu je modelově zvládnutá a používá se při kvalitativní kontrole medů určených pro farmacii.

– Tlumení prvoka *Nosema apis*

Tento parazit způsobuje závažnou včelí chorobu zvanou nosematóza (příp. nose móza). Nosemou je nakažena ve střední Evropě odhadem asi polovina včelstev. Nákaza je často latentní, ale někdy propuká v intenzivních až epidemických vlnách, které mohou včelstva oslabit i zcela zničit. Nosema se tlumí řadou chovatelských opatření zahrnujících mj. chov silných včelstev, obměnu včelích plástů a desinfekci. V případě periodického výskytu silné nosemové vlny s výraznými klinickými příznaky se dá použít jediné účinné léčivo, fumagillin. Tento přípravek, s obchodním názvem Fumagillin nebo Fumidill B, je momentálně registrován jen v některých evropských zemích, ale znovu se vážně uvažuje o jeho celoevropské registraci za nově stanovených podmínek.

Doplňkový efekt pro tlumení nosemové nákazy má aplikace kyseliny mravenčí, primárně určená pro léčení varroázy.

– Tlumení varroázy, nemoci způsobené roztočem *Varroa destructor*

Varroáza je trvale největším problémem světového včelařství. Kromě vlastní parazitace působí roztoč *Varroa destructor* také jako vektor patogenů všech existujících bakteriálních, houbových a virových onemocnění včel. V posledních letech přibývá případů hromadných úhynů včelstev s prokázanou účastí virů akutní paralýzy včel, deformovaných křídel včel a Kašmírského viru.

Strategie, cílená pouze na snížení populace roztočů pod hranici působící škody, hlásaná dříve v řadě evropských zemí, způsobila naopak mnoho škod.

V ČR je likvidace nebo alespoň silné omezení populace roztočů *Varroa destructor* v zimním období zabezpečena systémově. Jde o povinná opatření, přičemž závazná metodika nařizuje používání takových postupů, aby bylo minimalizováno nebezpečí kontaminace včelích produktů účinnými látkami. Minimalizace je zajištěna jednak vhodným dávkováním, jednak dobou aplikace v bezsnůškovém a hlavně v bezplodovém období.

Dokonalé doléčení včelstev v bezplodovém období je nejúčinnějším opatřením nejen proti virózám, ale také proti rezistentním populacím roztočů.

K tlumení varroázy se používají tyto účinné látky:

- amitraz
- acrinathrin
- tau-fluvalinate
- kyselina mravenčí

I když zatím boj proti rezistentním populacím lze označit za úspěšný, musí být připravena k nasazení i náhradní léčiva. Z hlediska nižší pravděpodobnosti tvorby rezistence přicházejí

v úvahu dvě skupiny přírodních látek: nízkomolekulární organické kyseliny a éterické oleje. Oproti osvědčeným syntetickým látkám vykazují nižší účinnost a vyžadují až o několik řádů vyšší dávkování. Některé z nich mají i vyšší toxicitu pro obratlovce. Připraveny k eventuálnímu použití jsou

- thymol
- kyselina šťavelová.

III. Analýza rizika

Jak u léčiv stabilně využívaných, tak u léčiv potenciálních je třeba analýza možných rizik. Jakmile se použijí ve včelařství, nelze a priori vyloučit dopad na včelí produkty a na zdraví spotřebitelů.

Tabulka 1.

Sledované účinné látky používané ve včelařství, jejich dávkování a toxicita

	1	2	3	4	5	6
0		dávkování včelstvo/rok	LD ₅₀ /kg	LD ₅₀ /člověk* * = 70 kg	ADI (nebo 0,01% LD)	dávkování roční dávka/ 365 ADI
1	Amitraz	20 mg	600 mg	42 g	0,2 mg	0,3
2	Acrinathrin	1 mg	4 000 mg	250 g	7 mg	0,0004
3	tau-fluvalinate CZ	70 mg	3 500 mg	245 g	1,4 mg	0,14
4	tau-fluvalinate EU	400 mg	3 500 mg	245 g	1,4 mg	0,78
5	Kys. mravenčí	40 000 mg	1 100 mg	77 g	(0,1 mg)	1095
6	Thymol	30 000 mg	980 mg	68 g	(0,1 mg)	820
7	Kys. šťavelová	8 000 mg	475 mg	33 g	(0,05 mg)	438
8	Fumagillin	500 mg	n.s.	n.s.	0,04 µg	34000
9	NaCl	-	2 500 mg			

Pozn.: LD = letální dávka, ADI = přípustná denní dávka v potravě, n.s. = není stanoveno

Analýzu rizika je možné provést na základě dat uvedených v tabulce 1.

V záhlaví tabulky (řádek 0) jsou uvedeny tyto parametry

V prvním sloupci jsou látky, které se v České republice používají a připravují k použití ve včelařství.

Řádky 1 až 7 představují účinné látky proti varroáze, v osmém řádku je pro srovnání uveden fumagillin - účinná látka proti nosematóze.

V posledním řádku tabulky je, rovněž pro srovnání, uvedena kuchyňská sůl.

V druhém sloupci je dávkování podle předepsané metodiky.

Ve třetím a čtvrtém sloupci jsou uvedeny tabulkové hodnoty smrtelné dávky pro savce (na kg a na 70 kilového jedince). LD = lethal dosis

V 5. sloupci je hodnota ADI = acceptable daily intake, přípustný každodenní příjem

Tato hodnota je buď stanovena experimentálně a je publikována v toxikologických dokumentacích příslušných látek, kde je odvozována od hodnot NOEL (no effect level, dávka nezpůsobující žádnou újmu) - řádky 1 až 4. Pokud tyto hodnoty nejsou známy, je pro rizikovou analýzu použita hodnota 0,1 promile LD₅₀ /kg (řádky 5 - 7). V případě fumagillinu je ADI kalkulována z navrženého hygienického limitu 15 µg/kg . Pokud bychom uvažovali rovnoměrnou spotřebu 1 kg medu, což je zhruba spotřeba evropského konzumenta, vyjde teoretická denní hodnota asi 0,04 µg.

Poslední sloupec tabulky udává relaci mezi roční dávkou účinné látky do jednoho včelstva (sloupec 1) a roční dávkou kalkulovanou jako 365 násobek ADI (sloupec 5). Například pro amitraz - nejběžnější a nejdůležitější účinnou látku používanou povinně a plošně v ČR - je tato hodnota 0,3. To znamená, že při předepsaném ošetření včelstva se do úlu teoreticky vpraví jen třetina přípustné hygienické dávky. Ani kdyby nedošlo k odbourání amitrazu a veškerá použitá dávka se přenesla do konzumního medu (což je absurdní model) je ještě trojnásobná rezerva, že med nepřekročí kalkulovanou dávku ADI.

Komentář k jednotlivým řádkům tabulky

Řádek 1. Amitraz

Amitraz je účinná látka přípravků Varidol FUM a Varidol AER. V České republice se používá od roku 1983. Používá se trojnásobné ošetření s několikanásobným odstupem a celková dávka na jedno včelstvo je 20 mg.

V aplikační praxi je amitraz používán jako kouř nebo aerosol, který se váže na povrch včel. Povrch jedné včely je díky obrvení minimálně 10 cm². V takovém případě je v úlu na podzim povrch včel jednoho včelstva asi 2000 dm² a povrch všech plástů ve včelstvu 200 dm². Povrch včel je minimálně desetkrát větší, než povrch plástů. Tato kalkulace je však statická, není uvažováno dýchání včel. Experimentálně jsme prokázali, že při fumigaci včelstva se použitý kouř adsorbuje na včely. Toto pozorování není přesně kvantifikováno, ale lze počítat minimálně s devíti desetinami použité dávky. V takovém modelu je možné očekávat v zásobách včelstva těsně po aplikacích méně než 0,5 procenta použité účinné látky, což je maximálně 10 µg/kg zásob. Ze zimních zásob se může do medu dostat maximálně 10 reálně však asi 1%.

Amitraz má v Evropě stanovenou hodnotu maximálního přípustného limitu reziduí MLR 200 µg/kg což je mnohem méně, než ADI, ale i tak je sto až tisícinásobná rezerva, že ani teoreticky amitraz v medu MLR nepřekročí.

Experimentálně je prokázáno, že amitraz se odbourává poměrně rychle až na neškodné komponenty. Hygienicky je sledován toxický a poměrně stabilní degradační produkt amitrazu, 2,4-dimethylanilin (DMA). V kyselém hydratovaném prostředí, které ve včelstvu je, se i DMA dále degraduje až na CO₂ a vodu. Poločas rozkladu je řádově v desítkách dnů, takže medná snůška vytáčená za 6 měsíců po aplikaci amitrazu může teoreticky obsahovat jen méně než 1/(2⁶), což jsou promile vnesené dávky.

Monitoring amitrazu v českém medu není opodstatněný. I maximální očekávaná kvanta jsou hluboko pod prahem detekce analytických metod (1 µg/kg). Ani v zahraničí, kde se používají mnohem větší dávky, nebyly nikdy amitraz, nebo jeho degradační produkty v medu nalezeny. Pro spolehlivé posouzení této látky zbývalo experimentálně prověřit, zda se amitraz nehromadí ve vosku. Vzhledem k více než 20 leté aplikační praxi je tento monitoring velmi důležitý. Včelí vosk je matrice, která není snadno analyzovatelná. Vývoj analytické metody byl součástí této práce. Výsledky potvrdily předpoklad, že ani z vosku zpětně není med amitrazem ohrožen.

Dalším včelím produktem, který je v úlech dlouhodobě a neprochází zpracováním, je propolis. Monitoring propolisu byl do této studie také zařazen. Ani zde nebyla nalezena kvanta ohrožující zpětně med.

Závěr rizikové analýzy: **použití amitrazu nepřináší hygienické riziko**

Řádek 2. Acrinathrin

Acrinathrin je účinná látka použitá v druhém nejdůležitějším přípravku proti varroáze v České republice, v proužcích s dlouhodobým účinkem GABON PA 92. Přípravek se používá od roku 1992. Proužky jsou aplikovány po snůšce, tedy minimálně 8 měsíců před dalším odběrem medu.

V ČR se každý rok přípravkem GABON PA 92 ošetřuje jen asi jedna třetina včelstev. V dalších letech jsou to zase včelstva jiná, jak to vyplývá z aktuální nálezové situace.

Dávkování je minimální, toxicita pro člověka velmi nízká. Ošetřením se vnáší do včelstva množství, které je v desetitisícinách 365 násobku ADI.

Podobně jako u amitrazu, monitoring má smysl hlavně ve vosku, odkud by byl med při dlouhodobém kontaktu teoreticky kontaminován. Provedené analýzy potvrdily, že vosk neobsahuje acrinathrin v kvantech nad detekční limit (1 µg/kg)

Závěr rizikové analýzy: **použití acrinathrinu nepřináší hygienické riziko**

Řádek 3. a 4. Tau-fluvalinate

Tau-fluvalinate je účinná látka v českém přípravku GABON PF 90. Tento přípravek je doplňkový a je používán jen u malého množství včelstev (asi 5 %) ve zvláštních případech.

V zahraničí se používá tau-fluvalinate v přípravku Apistan a dávkování je asi 30 větší než v české metodice s Gabonem PF 90. V obou případech je aplikovaná dávka ve zlomcích ročního limitu.

Vzhledem k těmto nízkým dávkám má smysl monitoring hlavně ve vosku, odkud by byl med při dlouhodobém kontaktu teoreticky kontaminován. Provedené analýzy potvrdily, že vosk neobsahuje kvanta hygienicky významná. Výsledky jsou příznivé i u analyzovaných vzorků vosku ze sousedních zemí. Kladně se projevilo vysazení Apistanu na několik let po té, co byla zaznamenána rezistence roztočů *Varroa destructor* vůči tau-fluvalinatu v některých evropských oblastech. Trend snížení reziduí ve vosku v Německu, Rakousku a Švýcarsku potvrdila i laboratoř Stuttgartské univerzity (Walner, osobní sdělení).

Závěr rizikové analýzy: **použití tau-fluvalinatu nepřináší hygienické riziko,**

Řádek 5. Kyselina mravenčí

Aplikace kyseliny mravenčí je v ČR povolena ve formě odparných desek Formidol s dávkou 40 ml 85% kyseliny mravenčí. Ne všechna včelstva jsou kyselinou mravenčí léčena, jen velmi malá část včelstev je opakovaně léčena v jednom roce. V zahraničí se používají metody a dávky podobné. Toxicita pro člověka není vysoká. Přesto dochází vlivem vysokých aplikačních dávek k mnohonásobnému překročení poměru "roční dávka/365ADI". Z tohoto důvodu je

opodstatněné experimentálně se stanovením kyseliny mravenčí v medu zabývat. Metodika stanovení byla vyvinuta a soubor medů jsme podrobili analýze. Ukázalo se, že kyselina mravenčí je přirozenou součástí medu. Odlišení pozadí a reziduí po ošetření není analyticky možné. V modelových pokusech bylo zjištěno, že měřitelné navýšení v obsahu kyseliny mravenčí v ošetřených včelstvech nastane, ale po čase (několik týdnů) se hodnoty vrátí k počátečnímu stavu, což se dá vysvětlit těkavostí kyseliny mravenčí, případně jejím hydrolytickým odbouráním. Množství reziduí kyseliny mravenčí po léčení varroázy nepřekračuje rozsah přirozeného obsahu kyseliny mravenčí v medu.

Přechod kyseliny mravenčí do vosku a zpětnou kontaminaci medu kyselinou mravenčí z vosku jsme modelovali a neprokázala se.

Závěr rizikové analýzy: použití kyseliny mravenčí nepřináší hygienické riziko,

Řádek 6. Thymol

Thymol v koncentrované krystalické podobě je látka použitelná pro likvidaci roztočů *Varroa destructor*. Postupně se pracuje na registraci a legalizaci této látky v řadě zemí. Přichází v úvahu k aplikaci jako čistá substance nebo jako přípravek ve formě nejčastěji gelové báze a vysokého podílu thymolu. Thymol se do úlového prostředí uvolňuje v podobě par - za běžných teplot sublimuje. Dávkování je ve srovnání s ostatními akaricidy (viz řádky 1 - 3) velmi vysoké. 30 gramů na jedno včelstvo představuje tisícinásobky miligramových aplikací amitrazu a statisícové násobky ve srovnání s acrinathrinem. Toxicita thymolu není, navzdory přírodně znějícímu názvu, malá. Je řádově srovnatelná s dalšími látkami uvedenými v této tabulce, avšak při tisíckrát větší dávce představuje tisíckrát vyšší toxickou zátěž. Jednorozměrné ošetření překračuje 800 krát "365 ADI". Švýcarský limit MLR je například 0,8 mg/kg. Monitoring reziduí thymolu ve včelích produktech je nezbytný. Vývoj metody je součástí letošních aktivit.

Závěr rizikové analýzy: použití thymolu přináší značné hygienické riziko

Řádek 7. Kyselina šťavelová

Kyselina šťavelová se při vhodném dávkování a aplikační formě dá použít pro účinné snížení populace parazitického roztoče *Varroa destructor*. Vedlejší účinky na včely ale nejsou zanedbatelné. Aplikace ve všech variantách znamená vnesení asi 10 gramů účinné látky do včelstva za jeden rok. Toto množství již představuje zdroj reziduí měřitelný v medu. Metodika stanovení je k dispozici. Přesné stanovení je možné jen v experimentech, některé byly prováděny např. v roce 2004. Kyselina šťavelová je v některých medech přítomna z přírodních zdrojů. Neznáme-li přirozenou hladinu medu před ošetřením, je měření reziduí po aplikaci kyseliny šťavelové zatíženo chybou. Kyselina šťavelová není zatím registrována v ČR, počítá se s ní jako se záložní látkou pro případ rezistence roztočů *Varroa*.

Závěr rizikové analýzy: použití kyseliny šťavelové přináší hygienické riziko

Řádek 8. Fumagillin

Fumagillin je účinná látka přípravků Fumagillin a Fumidill B. Přípravky se aplikují v indikovaných případech do krmení nebo postřikem včel. Přípravek není pro člověka toxický, ale je řazen mezi antibiotika a jeho rezidua se dají takto posuzovat. MLR ani ADI není oficiálně stanoveno. Namísto ADI bereme pro účely této rizikové analýzy limit 15 ppb.

Absence MLR je překážkou obnovení registrace podle současných postupů. Registrace striktně vyžaduje stanovený maximální limit reziduí (MLR), pro jehož určení je autorizována organizace EMEA (GB).

Již řadu let se diskutuje o tom, že pro med nejsou stanoveny limity antibiotik jako je tomu u masa a mléka. Jako rozumná hladina celkového limitu antibiotik v medu je navrhováno 15 ppb. Pro registraci novou registraci fumagillinu by to ovšem nestačilo, jen by to pravděpodobně usnadnilo a zlevnilo registrační proces.

V podmínkách České republiky vidíme potřebnost tohoto přípravku pro řešení závažných případů, postihujících exponované chovy, např. větší chovy včelích matek. V této souvislosti jsme se zaměřili na výzkumné modelové aplikace přípravku fumagillin a sledování kinetiky účinné látky ve včelstvu. Zahájili jsme vývoj stanovení reziduí fumagillinu v zásobách s co možná nejvyšší citlivostí. Zatím bylo dosaženo detekčního limitu 50 ng/g a na této úrovni byl analyzován soubor medů z modelových experimentů. Ve vývoji budeme pokračovat, jsou založeny experimenty k zjištění farmakokinetiky ve včelstvu a interakce včel na tomto procesu.

Tyto výsledky budou podkladem pro novou metodiku aplikace fumagillinu, pokud bude opět registrován, nebo pokud bude aplikován na výjimku v souladu s předpisy.

Podobně jako u kyseliny mravenčí a šťavelové, dochází při aplikaci fumagillinu vlivem vysokých aplikačních dávek k mnohonásobnému překročení poměru v sloupci "roční dávka/365ADI".

Monitoring reziduí v medu v případě jakéhokoliv použití bude potřebný, aby se předešlo zpochybnění kvality včelích produktů. Přenos fumagillinu do ostatních včelích produktů musí být ještě ověřen. Vyvíjená metoda, primárně určená pro med by na to měla postačovat.

Závěr rizikové analýzy: použití fumagillinu přináší hygienické riziko

IV. Experimentální práce

1. Stanovení amitrazu ve vosku
2. Stanovení amitrazu v propolisu
3. Stanovení acrinathrinu ve vosku
4. Stanovení tau-fluvalinatu ve vosku
5. Stanovení thymolu v medu
6. Stanovení fumagillinu v medu

1. Stanovení rozkladných produktů amitrazu ve vosku

Spolupráce: ZÚ Ústí nad Labem

Materiál:

Plásty, vosk a mezistěny z různých lokalit ČR a Rakouska

Metodika:

Ve vzorcích vosků byl stanovován obsah amitrazu, jeho rozkladných produktů (deriváty dimethylformamidu) a 2,4-dimethylanilinu (2,4-DMA).

Vzorky byly extrahovány roztokem kyseliny chlorovodíkové, amitraz a jeho rozkladné produkty byly v témž kroku hydrolyzovány na 2,4-DMA. Ten byl zakoncentrován po zalkalizování technikou SPME v parní fázi a stanoven plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

Výsledky:

Výsledky jsou uvedeny v nanogramech 2,4-DMA na 1 g vzorku a jsou korigovány na výtěžnost extrakce (78%).

Tabulka 2. Koncentrace metabolitu amitrazu (2,4-DMA) ve vybraných vzorcích včelího vosku

	Materiál	Lokalita a popis	Koncentrace DMA (ng.g ⁻¹)
1	Mezistěny	Pekařov, vosk od včelaře	4,2
2	Vosk vytavený z plástů	Dol, divočina bez mezistěn	8,7
3	Vosk vytavený z plástů	Dol, divočina bez mezistěn	8,5
4	Vosk vytavený z plástů	Dobříš, běžné plásty	4,1
5	Vosk vytavený z plástů	Dobříš, směs plástů	20,5
6	Mezistěny	Firma WAKO, víčka plástů	3,8
7	Mezistěny	Firma Škola, komerční mezistěny	16,3
8	Mezistěny	Firma Vašek, komerční mezistěny	11,9
9	Mezistěny	Firma Kieweg, Rakousko "BIO"	2,4
10	Mezistěny	Firma Kassl, Rakousko, komerce	34,6
11- 30	Vosk z výroby mezistěn	různý, blíže neznámý původ	4,5 až 17,2

Diskuse

Dosažený detekční limit vyvinuté analytické metody LOD = 0,3 ng.g⁻¹ a limit kvantifikace LOQ = 1 ng.g⁻¹ = 1 ppb v tak složité matici jako je vosk je možné považovat za vynikající výsledek. Práce je zaslána k publikaci v časopise Analytica Chimica Acta (Impact factor 2004: 2.588)

Vzhledem k tomu, že amitraz má vyhlášenou maximální přípustnou koncentraci MLR v medu 200 ppb je metoda schopna zachytit již zátěž od necelého 1 % povoleného limitu. Ani největší nalezená kvanta DMA ve vosku nepřesáhla hygienického 20 % limitu. Přitom přechod DMA z vosku do medu neprobíhá v měřitelných kvantech. Nebyl prokázán ani v modelových experimentech s uměle připravenou zvýšenou zátěží DMA ve vosku.

V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky vosků různého, ale definovaného původu.

Nálezy ve voscích z celé ČR kolísaly od 4 do 20 ppb, nejméně zatížen byl vosk mezistěn vyrobených z více medných plástů. Tento vosk (řádek 4), podobně jako vosk deklarovaný jako "bio" (řádek 6), již představuje v podstatě přirozené pozadí stop DMA, které mohou pocházet i z přírody a agrochemikálií. Toxikologicky a hygienicky nemají tato kvanta žádný význam.

Největší nalezené množství DMA bylo v zahraničních mezistěnách (řádek 10), přestože amitraz není v Rakousku registrován. Ani zde však nedosahuje nalezené množství pětinu limitu.

2. Stanovení rozkladných produktů amitrazu v propolisu

Spolupráce: ZÚ Ústí nad Labem, Purus Blučina

Při vývoji metodiky stanovení se ukázalo, že ve vosku může při zpracování v roztaveném stavu společně s vodou v kyselém prostředí docházet k hydrolyze amitrazu a produktů postupné degradace. To je poznatek velmi příznivý pro situaci, kdy je amitraz používán ve včelařství dlouhodobě a je recyklován přes zpracování a výrobu mezistěn. Abychom ověřili hladinu zatížení amitrazem na dalším včelím produktu, analyzovali jsme propolis, který se nezpracovává jako vosk, ale těží se ve včelstvech seškrabáváním z povrchu úlu. Propolis může být ve včelstvu, narozdíl od konzumního medu, i v době zimního ošetření včelstev předepsanými metodami

Materiál:

Vzhledem k variabilitě složení propolisu a obsahu látek strukturálně podobným hledanému analytu se po řadě pokusů ukázalo jako schůdné pracovat se zprůměrovaným vzorkem. Pro vývoj metodiky a rozbor propolisu byla použita homogenizační metoda, kterou vyvinuli ve firmě Purus pro aplikaci propolisu do svých výrobků.

82 vzorky propolisu pocházející ze včelstev z Moravy a Čech, každý po 100 g, byly smíchány a ve zmraženém stavu rozemlety kulovým mlýnem. Směs byla homogenizována opakovaným promícháním.

Z tohoto základního vzorku byla připravena kalibrační řada s definovaným obsahem přísadků amitrazu.

Metodika stanovení:

Obsah amitrazu a jeho metabolitů vyjádřených jako 2,4-dimethylanilin (2,4-DMA) v propolisu byl stanoven modifikovanou metodou použitou u vosku (odst. 1.1.). Vzorek propolisu byl extrahován puřrem o pH 1,5 s přísadkem 2,4-dinitrofenylhydrazinu. 2,4-DMA byl z extraktu izolován po zalkalizování metodou head space mikroextrakcí na tuhou fázi (SPME) a dále stanoven plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

Obsah je vyjádřen v nanogramech 2,4-DMA na 1 g vzorku (ppb)

Výsledek vyšetření:

Směšný vzorek 1519/05 obsah 2,4-DMA: **41 ± 17 ng/g**

Diskuse:

Propolis z regionu ČR neobsahuje hygienicky významná kvanta amitrazu a jeho rozkladných produktů

3. a 4. Stanovení acrinathrinu a tau-fluvalinatu ve vosku

Spolupráce: VÚP Troubsko

Materiál:

Vzorky vosku z ČR a Rakouska :

20 vzorků mezistěn z výroben v ČR

(Včelpo s.r.o., Obora, Vašek Kewa Boskovice, Výrobna mezistěn s.r.o. Strážisko)

7 vzorků z technologických pokusů VÚVč Dol, viz tab. 3

Metodika stanovení:

Stanovení acrinathrinu a tau-fluvalinátu bylo prováděno na plynovém chromatografu GC 6820 firmy Agilent Technology. Nastavení: kapilární kolona DB 1, 30 m, teplota 130 °C 1min., nárůst 20°C na 230°C, nárůst 0,5°C/1 min. na 250°C. Doba trvání jedné analýzy 60 minut. Jako standard byl použit tau-tau-fluvalinate od firmy Chem Service, acrinathrin od firmy Dr.Ehrenstorfer GmbH.

Standardy byly rozpuštěny ve směsi toluen, isooktan 1:1, nástřik 0,1-1 mikrolitr,

Vzorky vosku 0,5 g byly rozpouštěno ve 2 ml směsi toluen, isooktan.

Nástřik 1 mikrolitr.

Výsledky

20 vzorků mezistěn od firem Včelpo s.r.o.,Obora, Vašek Kewa Boskovice, Výrobna mezistěn s.r.o. Strážisko:

Nebyly nalezeny hledané látky (LOD = 0,5 mg / 1 kg vosku (tau-fluvalinate) resp. 0,1 mg/kg (acrinathrin))

Tabulka 3

Obsah acrinathrinu a tau-fluvalinatu ve vosku

Vzorek	Acrinathrin	tau-fluvalinate
1. Směs Dol - staré pláсты, taveno 2005	< 0,1 mg/kg	< 0,5 mg/kg
2. Pláсты ze včelstva ošetřeného v r. 2005 Gabonem PF 90	< 0,1 mg/kg	< 0,5 mg/kg
3. Pláсты z obalsti Brno-venkov ošetřené v r. 2003 Gab. PF 90, v roce 2004 a 2005 Gab. PA 92	< 0,1 mg/kg	< 0,5 mg/kg
4. Mezistěny - Kováč 2005	< 0,1 mg/kg	< 0,5 mg/kg
5. Mezistěny Rakousko, firma Schröder 2005	< 0,1 mg/kg	> 0,5 mg/kg
6. Liběchov 1997, výroba z panenského díla	< 0,1 mg/kg	< 0,5 mg/kg
7. Komerční mezistěny Jabloňany 2004	< 0,1 mg/kg	< 0,5 mg/kg

Diskuse:

Nad detekčním limitem byl nalezen pouze tau-fluvalinate v rakouském vosku. Tento nález má zcela logické vysvětlení: Rakousko používalo po řadu let přípravek Apistan s účinnou látkou tau-fluvalinate a zátěž ve vosku koluje ještě nyní.

Tento nález ještě neohrožuje med při kontaktu s pláсты na podobných mezistěnách vystavěnými.

5. Stanovení thymolu v medu

Spolupráce: ZÚ Ústí nad Labem

Materiál:

25 vzorků medu z modelového pokusu s aplikací thymolu (popis je v tabulce 4)

Metodika:

Vzorky byly po SPE čištění analyzovány metodou HPLC s UV detekcí. Pro konfirmaci pozitivních nálezů thymolu byla použita technika SPME / GC- MS.

Hodnoty jsou udány v mg/kg medu a jsou v tabulce 4

Výsledky:

Tabulka 4

Vzorek	Lokalita	Aplikace thymolu	Úl číslo	Pozice odběrového místa v úlu	Nález thymolu mg/kg
1	Dol	krystalický	64	6-1	0,3
2	Dol	krystalický	64	6-1	0,2
3	Dol	krystalický	64	1-1	2,3
4	Dol	krystalický	64	1-2	1,8
5	Dol	krystalický	64	10-1	<0,2
6	Dol	krystalický	64	10-2	<0,2
7	Dol	krystalický	68	6-1	<0,2
8	Dol	krystalický	68	6-2	<0,2
9	Dol	krystalický	68	1-1	0,5
10	Dol	krystalický	68	1-2	0,9
11	Dol	krystalický	68	10-1	<0,2
12	Dol	krystalický	68	10-2	<0,2
13	Dol	negativní kontrola	Zentiva	1237/05	<0,2
14	Dol	negativní kontrola	59	6	<0,2
15	Dol	negativní kontrola	59	1	<0,2
16	Liběchov	krystalický	12	2	<0,2
17	Liběchov	krystalický	12	7	<0,2
18	Liběchov	krystalický	13	2	<0,2
19	Liběchov	krystalický	13	7	<0,2
20	Liběchov	Apilife VAR	27	3	<0,2
21	Liběchov	Apilife VAR	27	5	<0,2
22	Liběchov	Apilife VAR	28	2	<0,2
23	Liběchov	Apilife VAR	28	6	1
24	Liběchov	negativní kontrola	31	3	<0,2
25	Liběchov	negativní kontrola	31	4	<0,2

Poznámky k tabulce:

Zentiva: vzorek medu z kontrolované produkce pro farmaceutické účely

Krystalický thymol byl aplikován v rámkové kapse.

Přípravek *ApilifeVAR* je komerční italský preparát připravovaný k registraci v ČR

Diskuse

Nález reziduí thymolu v medu po jediném ošetření včelstva je závažný problém, který je nutno zohlednit při dalším vývoji aplikačních metod a podmínek případného použití.

Použití thymolu představuje hygienické riziko

6. Stanovení fumagillinu v medu

Spolupráce: Nemocnice Homolka, ing. Pehal

Materiál: modelová včelstva kvantitativně krmená terapeutickou dávkou účinné látky (komerční přípravek Fumidil B, Ceva, Řecko), Standard: amoniová sůl fumagillinu p.a. (Sigma)

Pro analýzu je použita aniontová derivatizace v nízkém pH a plynová chromatografie s hmotnostní detekcí.

Soubor vzorků z pokusných včelstev představuje odběry před aplikací, při aplikaci a další odběry, které nyní budou prováděny až do léta příštího roku.

V. Komentář k čerpání finančních prostředků

Náklady na tento úkol jsou sledovány v interní analytické evidenci a byly čerpány v souladu se smlouvou ve výši 398 650,- Kč včetně DPH. Z uvedené částky nebyly placeny žádné investiční náklady.

Náklady na řešení (včetně DPH) :

1. Materiál	42 300 Kč
2. Práce (osobní náklady)	154 225 Kč
3. Rozbory provedené externími laboratořemi	117 900 Kč
4. Režie 30 % (mimo ad 3.)	84 225 Kč

VI. Závěrečné shrnutí

Poznatky získané realizací tohoto úkolu zásadním způsobem zlepšily znalosti o problematice reziduí léčiv proti včelím chorobám ve včelích produktech.

Vyvinuté metodiky je možno kdykoliv použít pro další monitorovací, kontrolní a výzkumné projekty.

Práce budou pokračovat ve spolupráci s výše zmíněnými partnery, Státní veterinární správou a a Státní zemědělsko-potravinářskou inspekcí.