

**OSTANKI AMITRAZA, KUMAFOSA IN TIMOLA V
MEDU SLOVENSКИH ČEBELARJEV
V LETIH 2017 - 2021**

Helena Baša Česnik

Veronika Kmecl

Izdal in založil

Kmetijski inštitut Slovenije

Ljubljana, Hacquetova ulica 17

Avtorici dr. Helena Baša Česnik, univ.dipl. inž. kemije

dr. Veronika Kmecl, univ. dipl. inž. kem. teh.

Uredila Lili Marinček, univ. dipl. inž. zoot.

Publikacija bo izšla v elektronski obliki in bo dostopna na spletni strani
Kmetijskega inštituta Slovenije https://www.kis.si/Druge_publicacije/

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 72350211

ISBN 978-961-6998-50-5 (PDF)

Vpeljava metod je bila financirana s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS), v okviru raziskovalnega programa št. P4-0133 iz državnega proračuna.

Doseženi rezultati izvajanja meritev so nastali v okviru Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2017-2019 in v letih 2020-2022, ki je bil financiran iz sredstev državnega proračuna in proračuna Evropske unije.

Vsebina

1 Uvod	4
2 Metoda za določanje ostankov amitraza in njegovih razpadnih produktov	5
2.1 Ekstrakcija in čiščenje	5
2.2 Določitev.....	5
2.3 Validacija	7
3 Metoda za določanje ostankov kumafosa in timola.....	9
3.1 Ekstrakcija	9
3.2 Določitev	10
3.3 Validacija	11
4 Rezultati spremljanja ostankov amitraza, kumafosa in timola.....	14
4.1 Vzorčenje	14
4.2 Rezultati	15
4.3 Ocena tveganja.....	16
4.3.1 Kronična izpostavljenost potrošnika.....	16
4.3.2 Akutna izpostavljenost potrošnika.....	17
4.3.3 Rezultati izračuna ocene tveganja.....	17
5 Zaključki	23
6 Literatura	24

1 UVOD

Čebele proizvajajo in predelujejo med iz nektarja in medene rose rastlin. Med vsebuje naravne sladkorje, kot sta glukoza in fruktoza, amino kisline, encime, minerale in antioksidante (Zhou in sod.; 2014). Dandanes se med, ki je cenjen zaradi svoje hranilne vrednosti, uporablja tudi kot naravno sladilo, kar je zelo pomembno za diabetike.

Na žalost imajo čebele sovražnika, imenovanega pršica *Varroa*, natančneje *Varroa destructor* in *Varroa jacobsoni*, ki sta jih opisala Anderson in Trueman (2000) in predstavljajo veliko nevarnost za populacije čebel po vsem svetu. Bolezen se imenuje varoza in jo zatirajo s pripravki, ki vsebujejo:

- v ekološki pridelavi: timol, mentol, evkaliptol, kafro, mravljično kislino, mlečno kislino, očetno kislino in oksalno kislino, kot je določeno v Uredbi (ES) 889/2008, ter
- v konvencionalni pridelavi: predvsem amitraz, kumafos, flumetrin in tau-fluvalinat (tau-fluvalinat v Sloveniji ni registriran).

Za aktivne snovi, dovoljene v ekološki pridelavi, Evropska Unija ni določila maksimalno dovoljenih količin ostankov (Maximum Residue Limits, MRLs). Za aktivne snovi v konvencionalni pridelavi, so MRL-ji predpisani v uredbi (ES) št. 37/2010. Za amitraz znaša MRL 0,2 mg/kg, za kumafos pa 0,1 mg/kg.

V naših preiskavah smo se osredotočili na vsebnosti najpogosteje uporabljenih aktivnih snovi: amitraza, kumafosa in timola. Metode za določanje teh treh aktivnih snovi smo objavili v znanstvenem članku (Baša in sod.; 2019), rezultate meritev vzorcev medu pa v znanstvenem (Baša Česnik in Kmecl; 2021) in štirih strokovnih člankih (Baša Česnik in Kmecl; 2017, 2018, 2019, 2021). V tej monografiji smo zbrali rezultate petih let spremljanja ostankov akaricidov v medu.

2 METODA ZA DOLOČANJE OSTANKOV AMITRAZA IN NJEGOVIH RAZPADNIH PRODUKTOV

2.1 Ekstrakcija in čiščenje

Definicija ostankov amitraza, glede na katero je postavljen MRL, je vsota amitraza in vseh metabolitov, ki vsebujejo 2,4- dimetilanilinsko polovico, izraženo kot amitraz. Zato smo vsebnost amitraza in njegovih razgradnih produktov določali po hidrolizi kot 2,4-dimetilanilin.

K 10 g vzorca medu, smo dodali 40 ml 2 N HCl. Vsebino čaše smo mešali 1 uro. Nato smo dodali 2 M NaOH, dokler ni raztopina dosegla pH 11. Dodali smo 20 ml n-heksana in tekočino prenesli v lij ločnik. Po ločitvi organske faze od vodne, smo vodno ponovno ekstrahirali. Organski fazi smo zbrali in dodali n-heksan tako, da je bil končen volumen 40 ml. Alikvot 1,5 ml smo prenesli v epruveto in dodali heptafluorobutirični anhidrid (heptafluorobutyric anhydride, HFBA). Derivatizacija je potekala 5 minut pri sobni temperaturi. Presežek HFBA smo odstranili s 4 ml 1 M vodne raztopine Na₂CO₃. Organsko fazo smo prenesli v vialo za določitev s plinskim kromatografom sklopljenim z masnim spektrometrom (GC-MS) (Jimenez in sod. 2002; Kmecl in Baša, 2011; Baša in sod.; 2019).

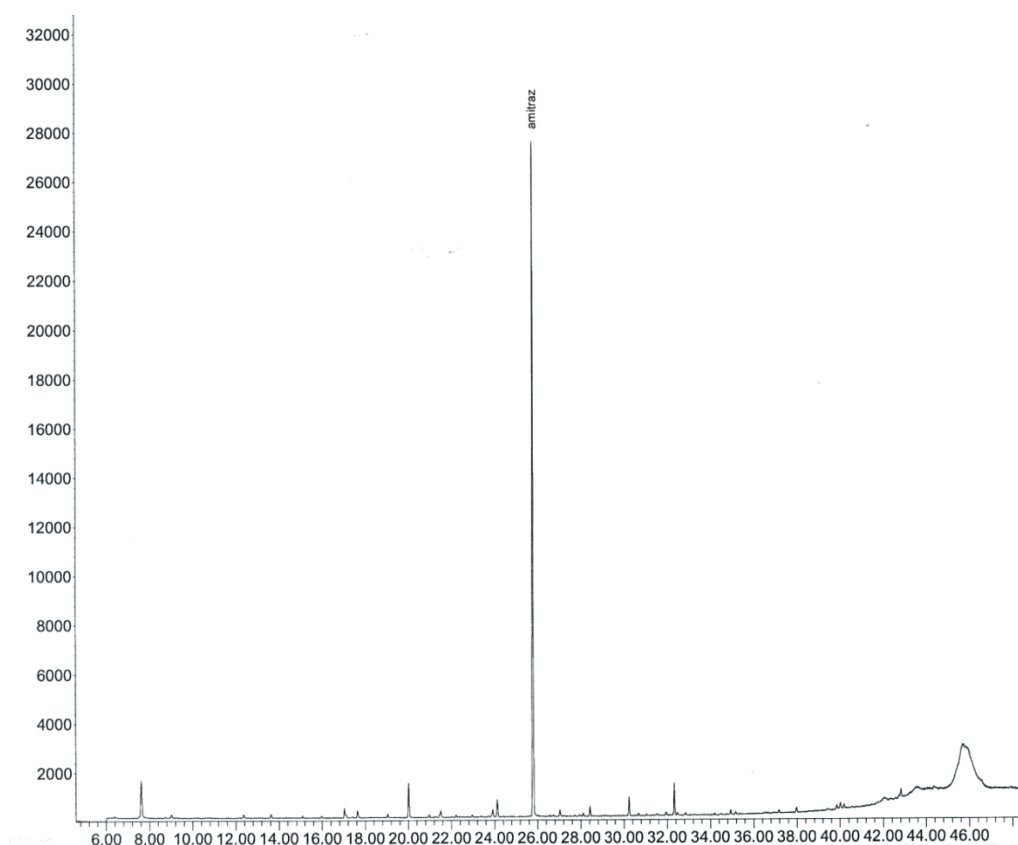
2.2 Določitev

Določitev aktivne snovi je potekala z GC-MS, katerega nastavitve so podane v preglednici 1.

Preglednica 1: Pogoji GC-MS instrumenta za določanje amitraza

Liner:	Agilent 5082-3587
Temperatura injektorja:	220 °C
Način injiciranja:	Pulsed Splitless
Predkolona:	2 m * 0,25 mm
Kolona:	J & W Scientific, DB-225MS, 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm
Temperaturni gradient kolone:	50 °C; 1 min 4 °C/min; od 50 °C do 220 °C 220 °C; 5 min
Temperatura ionskega izvora:	230 °C
Temperatura vmesnika:	240 °C
Temperatura detektorja:	150 °C
Nosilni plin:	Helij 6.0, 1,2 ml/min konstantni pretok
Volumen injiciranja:	1 µl
Detekcija	Snemanje izbranih ionov (T, Q1, Q2): 2,4-Dimetilanilin (148, 317, 120)

Kromatogram standarda v matriki za amitraz je prikazan na sliki 1.



Slika 1: Kromatogram standarda v matriki (matrix-match standarda) za določanje amitraza.

2.3 Validacija

LOQ in linearnost

Linearnost odziva smo preverili s kalibracijskimi standardi v matriki (matrix match standards). Imeli smo 6 koncentracijskih nivojev, s petimi ponovitvami na vsakem nivoju. Linearnost in območje linearnosti smo določili z linearno regresijo, s pomočjo F testa. Linearnost smo dokazali v območju 0,01 mg/kg – 0,3 mg/kg. R^2 je bil 0,994.

Mejo kvantitativne določitve metode (Limit of quantification, LOQ) smo ocenili iz kromatogramov kalibracijskih standardov v matriki (matrix match standards). LOQ smo izbrali pri razmerju S/N vsaj 10. Izbrani LOQ za amitraz je bil 0,01 mg/kg.

Merilna negotovost

Standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti smo določili v skladu z ISO 5725. Kupljeni ekološki med smo analizirali, da smo dokazali, da v njem ni bilo ostankov amitraza. Nato smo analizirali ekstrakte matrike z dodanim standardom (naspajkan med) na koncentracijskem nivoju pri LOQ. V časovni periodi 10 dni, smo vsak dan pripravili dve paralelki matrik z dodanim standardom. Nato smo iz površin vrhov za vsako aktivno spojino izračunali standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti.

Negotovost ponovljivosti (U_r) in negotovost obnovljivosti (U_R) smo izračunali tako, da smo standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti pomnožili s Studentovim t faktorjem za 9 prostostnih stopenj in 95 % nivojem zaupanja ($t_{95;9} = 2.262$).

$$U_r = t_{95;9} \times S_r ; U_R = t_{95;9} \times S_R$$

Merilna negotovost ponovljivosti je bila 0,001 mg/kg, kar predstavlja 10 % LOQ-ja. Merilna negotovost obnovljivosti je bila 0,002 mg/kg, kar predstavlja 20 % LOQ-ja.

Merilna negotovost za ostanke FFS mora biti 50%, kot je to predlagano v smernici SANTE/11813/2017, oziroma v Sloveniji zakonsko predpisano v Uradnem listu (Ur. l. RS št. 108/2007). Med validacijo pa je potrebno dokazati, da je merilna negotovost manjša ali enaka predlagani merilni negotovosti. Pri naši metodi je bila merilna negotovost sprejemljiva.

Točnost

Točnost smo preverili s preverjanjem izkoristkov. Analizirali smo 10 ekstraktov matrik z dodanim standardom (naspajkan ekološki med) na koncentracijskem nivoju pri LOQ. Vsako paralelko smo injicirali dvakrat. Izračunali smo povprečje izkoristkov. Dobljeni izkoristek za amitraz je bil 79,5 % z RSD 5,0 %. Glede na zahteve smernice SANTE/11813/2017 so sprejemljivi izkoristki med validacijo v območju 70% do 120%, z relativno standardno deviacijo $\leq 20\%$. Glede na smernice za validacijo, ki jih je podal Alder in sod. (2000), pa so sprejemljivi izkoristki pri koncentraciji >0.001 mg/kg in ≤ 0.01 mg/kg: 60% do 120%, RSD $\leq 30\%$. Naši izkoristki so sprejemljivi glede na zahteve obeh smernic.

3 METODA ZA DOLOČANJE OSTANKOV KUMAFOSA IN TIMOLA

3.1 Ekstrakcija

V čaši smo 20 g vzorca medu raztopili v 15 ml MilliQ vode. Dodali smo 40 ml acetona. Mešanico smo z mikserjem mešali 2 minuti. Dodali smo 80 ml mešanice petroletra in diklorometana v volumskem razmerju 1:1 in mešali še nadaljnji 2 minuti. Mešanico smo prenesli v lij ločnik, ki je vseboval 3 g NaCl. Čašo smo sprali z 80 ml mešanice petroletra in diklorometana v volumskem razmerju 1:1. Topilo smo dodali v lij ločnik, katerega smo stresali 1 minuto. Zgornjo organsko fazo smo filtrirali preko filtrirnega papirja črni trak, ki je vseboval 15 g brezvodnega Na_2SO_4 , v 500 ml Soxhletovo bučko. Spodnjo vodno fazo smo z istim postopkom ekstrahirali še dvakrat. Topila iz zbranih organskih faz smo odparili do približno 2 ml na rotavaporju in jih nato z dušikom izpihali do suhega. Pri vzorcih smo suhi eluat raztopili v 2 ml mešanice etilacetat : cikloheksan v volumskem razmerju 1:1 s pomočjo ultrazvočne kopeli, pri standardih za kalibracijo v matriki (matrix match standards) pa smo suhemu eluatu dodali 2 ml delovnih raztopin z merjenimi aktivnimi snovmi in vsebino raztopili s pomočjo ultrazvočne kopeli.

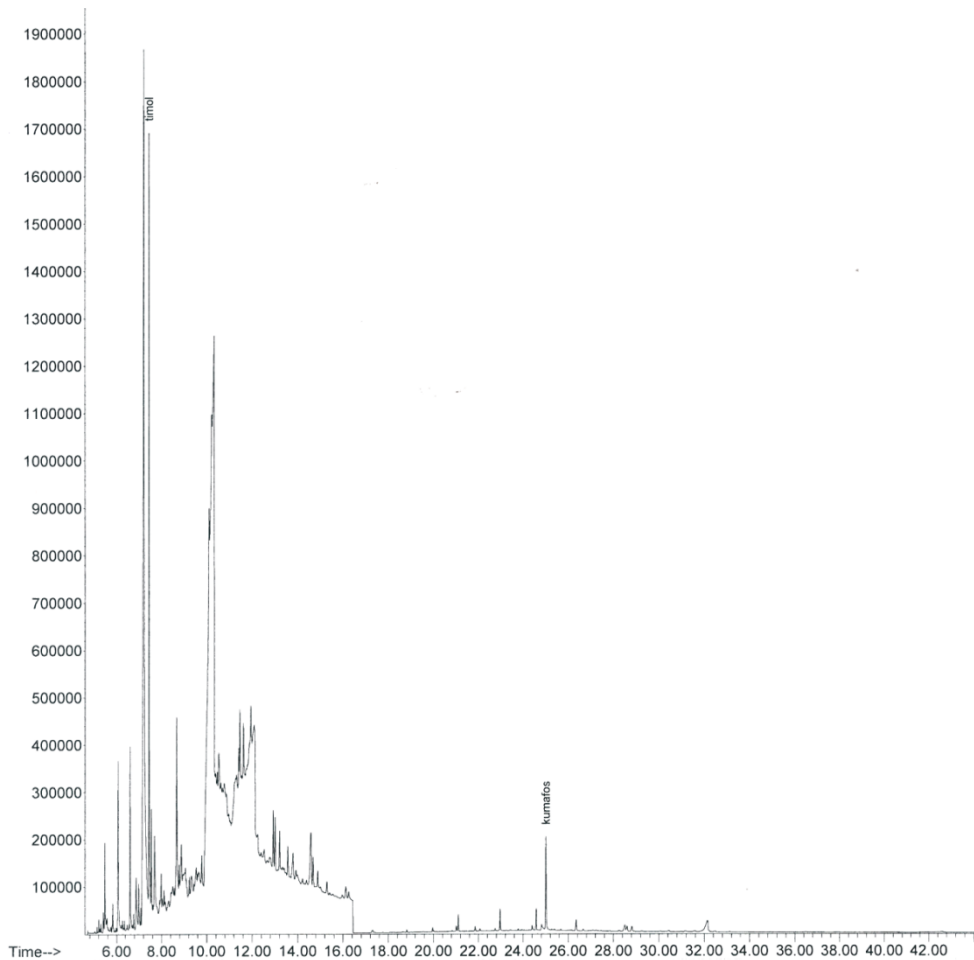
3.2 Določitev

Določitev kumafosa in timola je potekala z GC-MS, katerega nastavitve so podane v preglednici 2.

Preglednica 2: Pogoji GC-MS instrumenta za določevanje kumafosa in timola

Liner:	Agilent 5181-3316
Temperatura injektorja:	250 °C
Način injiciranja:	Pulsed Splitless
Predkolona:	2 m * 0,25 mm
Kolona:	Agilent J & W, HP-5MS, 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm
Temperaturni gradient kolone:	40 °C; 1 min 20 °C/min; od 40 °C do 150 °C 5 °C/min; od 150 °C do 200 °C 10 °C/min; od 200 °C do 280 °C 280 °C; 20 min
Temperatura ionskega izvora:	230 °C
Temperatura vmesnika:	280 °C
Temperatura detektorja:	150 °C
Nosilni plin:	Helij 6.0, 1,2 ml/min konstantni pretok
Volumen injiciranja:	1 µl
Detekcija	Snemanje izbranih ionov (T, Q1, Q2, Q3): Kumafos (362, 364, 226, 210) Timol (135, 150, 91)

Kromatogram standarda v matriki za kumafos in timol je prikazan na sliki 2.



Slika 2: Kromatogram standarda v matriki (matrix-match standarda) za določanje kumafosa in timola.

3.3 Validacija

LOQ in linearnost

Linearnost odzivov smo preverili s kalibracijskimi standardi v matriki (matrix match standards). Imeli smo 6 koncentracijskih nivojev, s petimi ponovitvami na vsakem nivoju. Linearnost in območje linearnosti smo določili z linearno regresijo, s pomočjo F testa. Linearni model ustreza za kumafos in timol. Linearnost smo dokazali v območju 0,009 mg/kg–0,45 mg/kg za kumafos in v območju 0,07–3,5 mg/kg za timol. R^2 je bil za kumafos 0,985 in za timol 0,996.

Meje kvantitativne določitve metode (Limits of quantification, LOQs) smo ocenili iz kromatogramov kalibracijskih standardov v matriki (matrix match standards). LOQ smo izbrali pri razmerju S/N vsaj 10. Izbrani LOQ je bil za kumafos 0,009 mg/kg in za timol 0,07 mg/kg.

Merilna negotovost

Standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti smo določili v skladu z ISO 5725. Kupljeni ekološki med smo analizirali, da smo dokazali, da v njem ni bilo ostankov FFS. Nato smo analizirali ekstrakte matrike z dodanim standardom (naspajkan ekološki med) na koncentracijskem nivoju pri LOQ. V časovni periodi 10 dni, smo vsak dan pripravili dve paralelki matrik z dodanim standardom. Nato smo iz površin vrhov za vsako aktivno spojino izračunali standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti.

Negotovost ponovljivosti (U_r) in negotovost obnovljivosti (U_R) smo izračunali tako, da smo standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti pomnožili s Studentovim t faktorjem za 9 prostostnih stopenj in 95 % nivojem zaupanja ($t_{95;9} = 2.262$).

$$U_r = t_{95;9} \times S_r ; U_R = t_{95;9} \times S_R$$

Merilna negotovost ponovljivosti je bila 0,0013 mg/kg za kumafos, kar predstavlja 14 % LOQ-ja, ter 0,012 mg/kg za timol, kar predstavlja 17 % LOQ-ja. Merilna negotovost obnovljivosti je bila 0,0013 mg/kg za kumafos, kar predstavlja 14 % LOQ-ja, ter 0,013 mg/kg za timol, kar predstavlja 19 % LOQ-ja.

Merilna negotovost za ostanke FFS mora biti 50%, kot je to predlagano v smernici SANTE/11813/2017, oziroma v Sloveniji zakonsko predpisano v Uradnem listu (Ur. l. RS št. 108/2007). Med validacijo pa je potrebno dokazati, da je merilna negotovost manjša ali enaka predlagani merilni negotovosti. Pri naši metodi je bila merilna negotovost sprejemljiva za kumafos in timol.

Točnost

Točnost smo preverili s preverjanjem izkoristkov. Analizirali smo 10 ekstraktov matrik z dodanim standardom (naspajkan ekološki med) na koncentracijskem nivoju pri LOQ. Vsako paralelko smo injicirali dvakrat. Izračunali smo povprečje izkoristkov. Dobljeni izkoristek za kumafos je bil 89,1 % z RSD 8,6 %. Dobljeni izkoristek za timol je bil 74,1 % z RSD 5,8 %. Glede na zahteve smernice SANTE/11813/2017 so sprejemljivi izkoristki med validacijo v območju 70% do 120%, z relativno standardno deviacijo $\leq 20\%$. Glede na smernice za validacijo, ki jih je podal Alder in sod. (2000), pa so sprejemljivi izkoristki: (a) pri koncentraciji >0.01 mg/kg in ≤ 0.1 mg/kg: 70% do 120%, RSD $\leq 20\%$ in (b) pri koncentraciji >0.001 mg/kg in ≤ 0.01 mg/kg: 60% do 120%, RSD $\leq 30\%$. Naša izkoristka sta sprejemljiva glede na zahteve obeh smernic.

4 REZULTATI SPREMLJANJA OSTANKOV AMITRAZA, KUMAFOSA IN TIMOLA V MEDU

4.1 VZORČENJE

V letih 2017-2021, smo zbrali 386 vzorcev medu slovenskih čebelarjev: 77 iz ekološke pridelave in 309 iz konvencionalne pridelave. Vzorce smo zbrali iz vseh dvanajstih statističnih regij v Sloveniji. Pregled zbranih vzorcev je prikazan v preglednici 3.

Preglednica 3: Število vzorcev iz ekološke in konvencionalne pridelave iz različnih statističnih regij v Sloveniji, zbranih v letih 2017-2021.

Statistična regija	Konvencionalna pridelava	Ekološka pridelava	Vsota
Gorenjska	23	5	28
Goriška	27	4	31
Jugovzhodna Slovenija	29	8	37
Koroška	18	1	19
Notranje kraška	10	4	14
Obalno kraška	28	6	34
Osrednja Slovenija	40	10	50
Podravska	30	5	35
Pomurska	27	5	32
Savinjska	60	17	77
Spodnje posavska	8	7	15
Zasavska	9	5	14
Vsota	309	77	386

Ob oddaji vzorca so čebelarji navedli podatek o uporabi zdravil za zatiranje varoj v obdobju zadnjih treh let. Iz podatkov je razvidno, da so nekateri čebelarji uporabljali samo ekološka sredstva, na osnovi mravljične, oksalne in mlečne kisline ter timola (FORMIVAR, VARROMED, APIBIOXAL, OXUVAR, THYMOVAR, APILIFE VAR, MAQS). Drugi čebelarji so poleg ekoloških pripravkov uporabljali tudi kemične pripravke na osnovi amitraza (VARIDOL, APIVAR, MITAK), kumafosa (CHECKMITE) in flumetrina (BAYVAROL, POLYVAR YELLOW). Vzorce smo razvrstili pod ekološke, ko so čebelarji za zatiranje varoze uporabili le pripravke, dovoljene v ekološki pridelavi.

4.2. REZULTATI

Vsebnost amitraza (0,29 mg/kg) je v enem vzorcu iz konvencionalne pridelave presegala MRL, ki je določen v Uredbi Komisije (EU) št. 37/2010 (0,2 mg/kg). Amitraz smo določili v 7,8 % pregledanih vzorcev iz ekološke pridelave in v 36,9 % pregledanih vzorcev iz konvencionalne pridelave. Amitraza nismo določili v 92,2 % pregledanih vzorcev iz ekološke pridelave in v 63,1 % pregledanih vzorcev iz konvencionalne pridelave. Amitraz smo določili v 31,1 % vseh pregledanih vzorcev. Razlog za pogosto uporabo amitraza med čebelarji je verjetno ta, da se amitraz v medu razgradi že v 10 dnevih, medtem ko se kumafos šele v 9 mesecih (Korta in sod.; 2001).

Vsebnosti kumafosa niso presegle veljavnega MRL iz Uredbe Komisije (EU) št. 37/2010 (0,1 mg/kg). Kumafos smo določili v 1,3 % pregledanih vzorcev iz ekološke pridelave in v 9,7 % pregledanih vzorcev iz konvencionalne pridelave. Kumafosa nismo določili v 98,7 % pregledanih vzorcev iz ekološke pridelave in v 90,3 % pregledanih vzorcev iz konvencionalne pridelave. Kumafos smo določili v 8,0 % vseh pregledanih vzorcev.

V Evropski uniji MRL za timol ni določen. Ostanke timola v medu so varni do koncentracije 50 mg/kg (Bogdanov in sod., 1998). Toda zaznavni prag timola v medu je med 1,1 in 1,6 mg/kg (Bogdanov in sod., 1998). Da ne bi spremenili naravnega okusa medu, so Švicarji postavili MRL za timol na 0,8 mg/kg. Vsebnosti timola v naših vzorcih niso presegle švicarskega MRL. Timol smo določili v 3,9 % pregledanih vzorcev iz ekološke pridelave in v 2,3 % pregledanih vzorcev iz konvencionalne pridelave. Timola nismo določili v 96,1 % pregledanih vzorcev iz ekološke pridelave in v 97,7 % pregledanih vzorcev iz konvencionalne pridelave. Timol smo določili v 2,6 % vseh pregledanih vzorcev. Razlog, da se čebelarji redkeje odločijo za uporabo timola, kljub temu, da je dovoljen v ekološki pridelavi, je verjetno ta, da timol lahko v visokih koncentracijah spremeni naravni okus medu (Bogdanov in sod., 1998).

Ostanke dveh aktivnih snovi smo določili v 2,3 % vseh pregledanih vzorcev. Vsi so izhajali iz konvencionalne pridelave. 1,8 % jih je vsebovalo amitraz in kumafos, 0,5 % jih je vsebovalo amitraz in timol.

Preglednica 4: Maksimalne dovoljene količine ostankov (MRL), meje kvantitativne določitve metode (LOQ) in ostanki akaricidov v medu v letih 2017 - 2021

	AMITRAZ	KUMAFOS	TIMOL
MRL (mg/kg)	0,2	0,1	/
LOQ (mg/kg)	0,01	0,009	0,07
EKOLOŠKA PRIDELAVA			
koncentracija (mg/kg)	0,01-0,06	0,024	0,15-0,43
povprečna koncentracija (mg/kg)	0,02	/	0,25
standardni odmik (mg/kg)	0,02	/	0,16
delež vzorcev z ostanki < LOQ (%)	92,2	98,7	96,1
delež vzorcev z ostanki \geq LOQ \leq MRL (%)	7,8	1,3	3,9
delež vzorcev z ostanki > MRL (%)	0,0	0,0	0,0
KONVENCIONALNA PRIDELAVA			
koncentracija (mg/kg)	0,01-0,29	0,009-0,062	0,08-0,22
povprečna koncentracija (mg/kg)	0,03	0,03	0,13
standardni odmik (mg/kg)	0,03	0,02	0,05
delež vzorcev z ostanki < LOQ (%)	63,1	90,3	97,7
delež vzorcev z ostanki \geq LOQ \leq MRL (%)	36,6	9,7	2,3
delež vzorcev z ostanki > MRL (%)	0,3	0,0	0,0

4.3 OCENA TVEGANJA

4.3.1 KRONIČNA IZPOSTAVLJENOST POTROŠNIKA

S kronično izpostavljenost potrošnika izračunamo, koliko snovi lahko človek zaužije vsak dan svojega življenja, ne da bi to imelo negativne posledice na njegovo zdravje. Za izračun kronične izpostavljenosti potrošnika, ki uživa med, smo uporabili zadnji veljaven model Evropske agencije za varno hrano (EFSA) dostopen na spletu (EFSA PRIMo rev. 3.1). Izračunali smo srednjo vsebnost posamezne aktivne spojine v vseh vzorcih medu, ki so bili predmet raziskave (Supervised Trial Median Residue, STMR) in ga primerjali s sprejemljivim dnevnim vnosom za potrošnika (Acceptable Daily Intake, ADI). Kronično izpostavljenost potrošnika smo podali v % ADI (Theoretical Maximum Daily Intake, TMDI). Meja za sprejemljivost kronične izpostavljenosti je 100% ADI. Za kumafos ADI ni določen, zato zanj nismo izračunali kronične izpostavljenosti.

4.3.2 AKUTNA IZPOSTAVLJENOST POTROŠNIKA

Z akutno izpostavljenost potrošnika izračunamo, koliko snovi lahko človek zaužije z enim obrokom, ne da bi to imelo negativne posledice na njegovo zdravje. Za izračun akutne izpostavljenosti potrošnika, ki uživa med, smo uporabili zadnji veljaven model Evropske agencije za varno hrano (European Food Safety Agency, EFSA) dostopen na spletu (EFSA PRIMo rev. 3.1). Najvišjo vsebnost posamezne aktivne spojine v vseh vzorcih medu, ki so bili predmet raziskave (Highest Residue, HR) smo primerjali z akutno referenčno dozo (Acute Reference Dose, ARfD) spojine. Akutno izpostavljenost potrošnika smo podali v % ARfD (International Estimated Intake, IESTI). Meja za sprejemljivost akutne izpostavljenosti je 100% ARfD. Za kumafos ARfD ni določen, zato zanj nismo izračunali akutne izpostavljenosti.

4.3.3. REZULTATI IZRAČUNA OCENE TVEGANJA

Za izračun kronične izpostavljenosti za amitraz smo uporabili STMR 0,02 mg/kg in ADI 0,003 mg/kg telesne teže/dan. Za izračun akutne izpostavljenosti za amitraz smo uporabili HR 0,29 mg/kg in ARfD 0,01 mg/kg telesne teže. Najvišja izračunana kronična izpostavljenost predstavlja 0,1 % ADI, najvišja izračunana akutna izpostavljenost pa 10 % ARfD. Rezultati ocene tveganja so prikazani na sliki 3 in 4. Kljub temu, da najvišji ostanek presega MRL, je pregledan med glede amitraza varen za potrošnika. MRL-ji so namreč standardi za trgovanje in ne toksikološke meje. Morajo pa biti toksikološko sprejemljivi.

amitraz			
LOQs (mg/kg) range from:		to:	
Toxicological reference values			
ADI (mg/kg bw/day):	0,003	ARfD (mg/kg bw):	0,01
Source of ADI:	EFSA	Source of ARfD:	EFSA
Year of evaluation:		Year of evaluation:	

Input values	
Details - chronic risk assessment	Supplementary results - chronic risk assessment
Details - acute risk assessment/children	Details - acute risk assessment/adults

Comments:											
Normal mode											
Chronic risk assessment: JMPR methodology (IEDI/TMDI)											
No of diets exceeding the ADI :										---	
Calculated exposure (% of ADI)	MS Diet	Exposure (µg/kg bw per day)	Highest contributor to MS diet (in % of ADI)	Commodity/ group of commodities	2nd contributor to MS diet (in % of ADI)	Commodity/ group of commodities	3rd contributor to MS diet (in % of ADI)	Commodity/ group of commodities	Exposure resulting from		
									MRLs set at the LOQ (in % of ADI)	commodities not under assessment (in % of ADI)	
TMDI/NEDI/IEDI calculation (based on average food consumption)	0,1%	DE child	0,00	0,1%		Honey and other apiculture products					
	0,0%	UK infant	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	NL toddler	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	DE general	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	FR toddler 2 3 yr	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	DE women 14-50 yr	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	SE general	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	FR child 3 15 yr	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	UK toddler	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	NL child	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	FR adult	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	ES child	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	ES adult	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	RO general	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	UK adult	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	NL general	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	FI 3 yr	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	FR infant	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	FI 6 yr	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
	0,0%	IE child	0,00	0,0%		Honey and other apiculture products		FRUIT AND TREE NUTS			
		DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS		
		DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS		
		DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS		
		DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS		
		DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS		
		DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS		
		DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS		
		DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS		
		DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS		
		DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS		
	DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS			
	DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS			
	DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS			
	DK child					FRUIT AND TREE NUTS		FRUIT AND TREE NUTS			
Conclusion: The estimated long-term dietary intake (TMDI/NEDI/IEDI) was below the ADI. The long-term intake of residues of amitraz is unlikely to present a public health concern.											

Slika 3: Izračun kronične izpostavljenosti za amitraz z EFSA PRIMo modelom, rev.3.1

Acute risk assessment /children		Acute risk assessment / adults / general population		Acute risk assessment /children		Acute risk assessment / adults / general population		
Details - acute risk assessment /children		Details - acute risk assessment/adults		Hide IESTI new calculations		Show IESTI new calculations		
The acute risk assessment is based on the ARID. The calculation is based on the large portion of the most critical consumer group.				IESTI new calculations: The calculation is performed with the MRL and the peeling/processing factor (PF), taking into account the residue in the edible portion and/or the conversion factor for the residue definition (CF). For case 2a, 2b and 3 calculations a variability factor of 3 is used. Since this methodology is not based on internationally agreed principles, the results are considered as indicative only. Since this methodology is not based on internationally agreed principles, the results are considered as indicative only.				
Show results for all crops								
Unprocessed commodities	Results for children No. of commodities for which ARID/ADI is exceeded (IESTI):		---		Results for adults No. of commodities for which ARID/ADI is exceeded (IESTI):		---	
	IESTI		IESTI		IESTI new		IESTI new	
	Highest % of ARID/ADI	Commodities	MRL / input for RA (mg/kg)	Exposure (µg/kg bw)	Highest % of ARID/ADI	Commodities	MRL / input for RA (mg/kg)	Exposure (µg/kg bw)
	10%	Honey and other	0 / 0,29	1,0	4%	Honey and other	0 / 0,29	0,40
	Expand/collapse list							
Total number of commodities exceeding the ARID/ADI in children and adult diets (IESTI calculation)				Total number of commodities found exceeding the ARID/ADI in children and adult diets (IESTI new calculation)				

Slika 4: Izračun akutne izpostavljenosti za amitraz z EFSA PRIMo modelom, rev.3.1

Za izračun kronične izpostavljenosti za timol smo uporabili STMR 0,15 mg/kg in ADI 0,03 mg/kg telesne teže/dan. Za izračun akutne izpostavljenosti za timol smo uporabili HR 0,43 mg/kg in ARfD 0,08 mg/kg telesne teže. Najvišja izračunana kronična izpostavljenost predstavlja 0,1 % ADI, najvišja izračunana akutna izpostavljenost pa 2 % ARfD. Rezultati ocene tveganja so prikazani na sliki 5 in 6. Pregledan med je glede timola varen za potrošnika.

Acute risk assessment /children		Acute risk assessment / adults / general population		Acute risk assessment /children		Acute risk assessment / adults / general population		
Details - acute risk assessment /children		Details - acute risk assessment/adults		Hide IESTI new calculations		Show IESTI new calculations		
The acute risk assessment is based on the ARID. The calculation is based on the large portion of the most critical consumer group.				IESTI new calculations: The calculation is performed with the MRL and the peeling/processing factor (PF), taking into account the residue in the edible portion and/or the conversion factor for the residue definition (CF). For case 2a, 2b and 3 calculations a variability factor of 3 is used. Since this methodology is not based on internationally agreed principles, the results are considered as indicative only. Since this methodology is not based on internationally agreed principles, the results are considered as indicative only.				
Show results for all crops								
Unprocessed commodities	Results for children No. of commodities for which ARID/ADI is exceeded (IESTI):		---		Results for adults No. of commodities for which ARID/ADI is exceeded (IESTI):		---	
	IESTI		IESTI		IESTI new		IESTI new	
	Highest % of ARID/ADI	Commodities	MRL / input for RA (mg/kg)	Exposure (µg/kg bw)	Highest % of ARID/ADI	Commodities	MRL / input for RA (mg/kg)	Exposure (µg/kg bw)
	2%	Honey and other	0 / 0,43	1,5	0,7%	Honey and other	0 / 0,43	0,59
	Expand/collapse list							
Total number of commodities exceeding the ARID/ADI in children and adult diets (IESTI calculation)				Total number of commodities found exceeding the ARID/ADI in children and adult diets (IESTI new calculation)				

Slika 6: Izračun akutne izpostavljenosti za timol z EFSA PRIMo modelom, rev.3.1

5 ZAKLJUČKI

Kmetijski inštitut Slovenije ima dve validirani analizni GC-MS metodi za določanje ostankov amitraza in njegovih razpadnih produktov, ter kumafosa in timola. Z obema metodama smo v letih 2017-2021 analizirali 386 vzorcev in ugotovili, da je bilo preseženih 0,3 % vseh pregledanih vzorcev, da je ostanke vsaj ene aktivne snovi nad LOQ in hkrati pod ali enako MRL vsebovalo 37,6 % vseh pregledanih vzorcev, ter da ostankov ni vsebovalo 62,2 % vseh pregledanih vzorcev. Ocena tveganja je pokazala, da je ves pregledan med varen za potrošnika.

6 LITERATURA

Alder L., Hill A., Holland P.T., Lantos J., Lee S.M., MacNeil J.D., O'Rangers J., van Zoonen P., Ambrus A. 2000. Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals, Principles and practices of method validation (ed.: A. Fajgelj, A. Ambrus). The Royal Society of Chemistry, str. 179 – 252.

Anderson, D.L., Trueman, J.W.H. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24: 165-189.

Baša Česnik H., Kmecl V. 2017. Vsebnost nekaterih akaricidov v medu slovenskih čebelarjev v letu 2017. *Kemija v šoli in družbi*, št. 1.

Baša Česnik H., Kmecl V. 2018. Vsebnost nekaterih akaricidov v medu slovenskih čebelarjev v letu 2018. *Kemija v šoli in družbi*, št. 1.

Baša Česnik H., Kmecl V. 2019. Vsebnost nekaterih akaricidov v medu slovenskih čebelarjev v letu 2019. *Kemija v šoli in družbi*, št. 1.

Baša Česnik H., Kmecl V. 2021. Vsebnost nekaterih akaricidov v medu slovenskih čebelarjev v medu točenem v letih 2020 in 2021. *Kemija v šoli in družbi*, št. 1.

Baša Česnik H., Kmecl V., Velikonja Bolta Š. 2019. Pesticide and veterinary drug residues in honey - validation of methods and a survey of organic and conventional honeys from Slovenia. *Food additives & contaminants. Part A., Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 36: 1358-1375.

Baša Česnik H., Kmecl V. 2021. Investigation on amitraz, coumaphos and thymol concentrations in honey produced by Slovenian beekeepers in 2020. *Acta Agriculturae Slovenica*, 117: 1-7.

Bogdanov, S., Imdorf, A., Kilchenmann, V. 1998. Residues in wax and honey after Apilife VAR treatment. *Apidologie*, 29: 513-524.

ISO 5725. 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method, pp. 1-42.

Kmecl, V., Baša Česnik, H. 2011. A survey of total amitraz residues in honey produced in Slovenia. V: Pulkrabová, J. (ur.), Tomaniová, M. (ur.). *Book of abstracts*, 5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, November 1-4 2011, Prague, Czech Republic. Prague: Institute of Chemical Technology, str. 407.

Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., Kilchenmann, V., Bogdanov, S. 2001. Study on acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 49: 5835-5842.

SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. DG SANTE, European Commission, 2017.

Uradni list Republike Slovenije št. 108/2007, str. 14834.

Uredba o izvajanju Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2017-2019, Ur. list RS, št. 73/ 2016, z dne 18.11.2016.

Uredba o izvajanju Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2020-2022, Ur. list RS, št. 78/ 2019, z dne 20.12.2019.

Uredba Komisije (ES) št. 889/2008 z dne 5. septembra 2008 o določitvi podrobnih pravil za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 834/2007 o ekološki pridelavi in označevanju ekoloških proizvodov glede ekološke pridelave, označevanja in nadzora.

Uredba Komisije (EU) št. 37/2010, z dne 22. decembra 2009 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora.

Zhou J., Yao L., Li Y., Chen L., Wu L., Zhao J. 2014. Floral classification of honey using liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry and chemometric analysis. Food Chemistry, 145: 941-949.