

## БОРЬБА ПРОТИВ ВАРРОАТОЗА: СТАБИЛЬНОСТЬ ДОМАШНЕГО РАСТВОРА ЩАВЕЛЕВОЙ КИСЛОТЫ С ВОДОЙ И САХАРОМ

Лучиана ПРАНДИН, Нисолетта ДАЙНЕСЕ, Барбара ЖИРАРДИ, Орнелла ДАМОЛИН, Р. ПИРО, Ф. МУТИНЕЛЛИ, ИТАЛИЯ

*Luciana PRANDIN, Nicoletta DAINESE, Barbara GIRARDI, Ornella DAMOLIN, R. PIRO, F. MUTINELLI  
Centro Regionale per l'Apicoltura c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie,  
Via Romea 14/A, 35020 Legnaro (PD), ITALY  
Tel.: +39 049 8084344, Fax: +39 049 8830572, E-mail: fmutinelli@izsvenezie.it*

### 1. Введение

После опубликования работы РАДЕЦКОГО с сотр. (1994) о применении щавелевой кислоты в борьбе с варроатозом, появились и другие работы, поддерживающие эффективность и толерантность данной органической кислоты, применяемой пульверизацией или накапыванием. Проведены тесты пульверизации щавелевой кислоты, разбавленной водой (ТАКЕУКИ и ХАРАДА, 1983; НАНЕТТИ с сотр., 1995; НАНЕТТИ и СТРАДИ, 1997) или накапывания раствора кислоты с водой и сахаром (МУТИНЕЛЛИ с сотр., 1997; ШАРИЕР, 1997; ИМДОРФ с сотр., 1997; НАНЕТТИ, 1999) в период без расплода. Раствор щавелевой кислоты с водой и сахаром, а также раствор щавелевой кислоты с водой (ИХЕС с сотр., 1999) были, случайным образом, ответственными за потери пчел после применения курса лечения такими растворами, без представления данных о стабильности этих растворов на долгое время.

Так как раствор щавелевой кислоты с водой и сахаром широко применяется против варроатоза пчеловодами в периоды без расплода, мы попытались установить характеристики и стабильность домашнего раствора щавелевой кислоты с водой и сахаром в разных условиях его хранения для определения изменений активных ингредиентов, возможно с токсичностью для пчел.

### 2. Материал и методика

#### 2.1. Приготовление раствора щавелевой кислоты

Раствор щавелевой кислоты с водой и сахаром (OAWS) приготовленный в лаборатории не отличается от такового, применяемого для борьбы с варроатозом. Он состоит из 100 г дигидрата щавелевой кислоты (Sigma), 1000 г сахара из торговой сети и 1000 г питьевой воды. Характеристики воды были следующими: pH, 7,5, твердость, 320 мг/л, жесткость, 21,7 °Ф, хлорат, 8,0 мг/л, нитрат, 17,5 мг/л, сульфат, 21,5 мг/л, железо, 5 мкг/л. Раствор разлит в 10 пробирках (по 10 мл каждая) и хранили в разных условиях: -20 °C, +4 °C и при комнатной температуре (RT) в темноте и свете. Раствор был также анализирован после приготовления: щавелевая кислота, цвет, pH, гидроксиметилфурфурол и сахар. Данные параметры были установлены спустя 3, 7, 15 и 30 дней, а также спустя 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 месяцев, в случае каждых условий хранения.

#### 2.2. Определение щавелевой кислоты

Щавелевая кислота определена использованием установки из торговой сети (Oxalate SIGMA Diagnostics kit, Cat. N. 591-D), приспособленная для меда (МУТИНЕЛЛИ, 1997). Данный энзиматический метод основывается на окислении оксидазы оксалат с оксалатом, после чего измеряли пероксид водорода, производимый реакцией пероксидаза-каталаза (КИРИБОГА, 1963. 100 мкл раствора OAWS разбавлено до 100 мл, а 10 мкл добавлено к смеси оксалат оксидазы, пероксидазы и субстратам (3-метил-бензотиазолина и 3-диметиламино бензойной кислоты), которые реагируют с перекисью водорода для получения красителя индамина, проявляющего максимальное всасывание при 590 нм. Квантификация щавелевой кислоты экстраполирована от стандартной кривой, полученной использованием стандартного оксалата (22,5, 45, 90 мг/л). Содержание щавелевой кислоты выражено в мг/кг.

#### 2.3. Определение цвета

Цвет раствора OAWS определен Компаратором 2000 (Ловибонд), применяемого для определения цвета меда. Раковина (лабораторная) наполнена раствором, затем введен компаратор. Цвет раствора сравнен с различными стандартными цветами диска. Гамма цветов включалась в пределах 5 и 100 мм шкалы Пфунда.

## 2.4. Определение гидроксиметилфурфурола

Гидроксиметилфурфурол (ГМФ) определен путем использования обратной фазы жидкой хроматографии рекордных показателей (HPLC), обнаруженной детекцией ультрафиолетовыми лучами (UV) (ЙОИРИНГ, 1980). 1 мл раствора OAWS разбавлен при 50 мл и инжигтирован в колонку обратной фазы C<sup>18</sup>. Применена мобильная фаза вода/метанол (90+10, в объеме). Определение пиков ГМФ осуществлено при 285 нм, причем сигнал образца сравнен со стандартом (1000 мкг). Содержание ГМФ выражено в мг/л.

## 2.5. Определение сахаров (фруктозы, глюкозы, сахарозы)

Сахары определены методом HPLC, при использовании хроматографа Dionex DX 500. Гидраты углерода (pKa от 12 до 13) показывают себя как слабые кислоты при высоком значении pH (12-14) и ионизированы частично или тотально. Таким образом их можно сепарировать механизмом обмена ионами, применяя колонку пленочной непористой смолы (Carborac PA 100, Dionex). Раствор OAWS разбавлен (1:10000) и инжигтирован в извилину хроматографа. Сахары элюированы раствором гидрата окиси (50 мМ) в изократном условии и определены с помощью амперометрической системы со стабильным и чувствительным ответом благодаря постоянному удалению препаратов окисления сахаров.

Квантификация фруктозы, глюкозы и сахарозы определена сравнением с пиковой зоной стандартного раствора, содержащего 50 мл/л глюкозы, 50 мг/л фруктозы и 10 мг/кг сахарозы. Содержание сахаров выражено в мг/л.

## 3. Результаты

Свежий раствор OAWS выглядит прозрачным как вода, является сильно кислым (pH 0-1), содержа 4,2 мг/л щавелевой кислоты, 18,9 мг/л сахарозы, 26,5 мг/л глюкозы, 24,0 мг/л фруктозы и небольшое значение ГМФ (1,7 мг/л) (таблица I).

Таблица I

Состав свежего и 16-месячного раствора OAWS

	Свежий раствор	16-месячный раствор			
		-20 °C	4 °C	RT темнота	RT свет
Щавелевая кислота (мг/л)	4,2	3,9	4,0	3,5	3,5
Цвет (мм) Пфунд	<5	<5	<5	100	100
pH	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1
Сахароза (мг/л)	18,9	13,9	0,3	0,2	0,2
Глюкоза (мг/л)	25,6	26,2	32,9	33,9	33,8
Фруктоза (мг/л)	24,0	26,6	32,6	24,4	24,1
ГМФ (мг/кг)	1,7	4,2	50,6	1945,1	2107,0

Щавелевая кислота оказалась очень стабильной в пробах, храненных при -20 °C и 4 °C. Спустя 16 месяцев ее значение составляло 92,9% и, соответственно, 95,2% из первоначальной концентрации. Небольшое снижение содержания щавелевой кислоты обнаружено в растворе OAWS, храненном при комнатной температуре. Снижение значения в пределах 10% зарегистрировано спустя 3 месяца в растворе, храненном при свете и 5 месяцев в растворе, храненном при темноте. Обе пробы показали 3,5 мг/л щавелевой кислоты (83%) спустя 16 месяцев. Значение pH установлено с помощью теста на бумаге и оставилось постоянным (0-1) во время проведения нашего теста. Первоначальный цвет раствора был прозрачным как вода (< 5 мм) и остался стабильным до последнего определения (спустя 16 месяцев) в пробах, хранимых при -20 °C и 4 °C. В случае хранения при комнатной температуре цвет проб стал темнее спустя 60 дней (при свете) и 90 дней (при темноте). Спустя 16 месяцев нашего эксперимента цвет изменился от ясного как вода (18-34 мм) до очень светло янтарного (35-50 мм), светло янтарного (51-85 мм), янтарного (86-114 мм) и в конце эксперимента до темно янтарного (> 115 мм).

Содержание ГМФ раствора повысилось значительно. ГМФ является спонтанным продуктом. Он получается в результате деградирования сахаров, главным образом, фруктозы в кислотных условиях. Значение ГМФ было очень низким в пробе, храненной при -20 °C. Спустя 16 месяцев данное содержание сохранилось на том же уровне, как и в свежем растворе; в пробе, храненной при 4 °C значение ГМФ повысилось до 50,6 мг/кг из-за медленного гидролиза сахара. Деградирование сахара отмечено и в случае пробы, храненной при комнатной температуре. Спустя 15 дней значение ГМФ составляло около 100 мг/кг, спустя 5 месяцев – в 5 раз выше, а спустя 6 месяцев превышало 1000 мг/кг. В конце эксперимента значение ГМФ достигло 2107 мг/кг в пробе, храненной при свете и 1945 мг/кг в пробе, храненной в темноте.

Не отмечено разницы между деградированием сахара при свете и темноте. Свежий раствор ОАВС содержал почти одинаковую пропорцию трех сахаров, но через несколько дней пропорция радикально изменилась. Сахароза – дисахарид из фруктозы и глюкозы и в кислотных условиях одновременно разлагается в двух указанных сахарах. В пробе, храненной при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , данное разложение прогрессивно развилось и через 16 месяцев уровень сахарозы понизилось от 18,9 мг/л до 13,9 мг/л. Данное разложение проходило медленнее в пробе, храненной при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Спустя 30 дней значение сахарозы составляло 1,8 мг/л, а спустя 3 месяца – 0,3 мг/л. Гидролиз сахарозы происходит немедленно в пробе, храненной при комнатной температуре, а спустя 3 дня концентрация этого сахара составляла 0,5 мг/л, независимо от хранения пробы на свете или в темноте. При сокращении содержания сахарозы повышается значение фруктозы и глюкозы. В свежем растворе ОАВС концентрация фруктозы и глюкозы была одинаковой (24 и 25,6 мг/л, соответственно). При  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  увеличение концентрации фруктозы и глюкозы менее явно проявляется чем в случае проб, храненных в других условиях.

Спустя 16 месяцев пробы, храненные при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  проявили повышение концентрации фруктозы и глюкозы до 32,6 и 32,9 мг/л, соответственно. В пробе, храненной при комнатной температуре, концентрация фруктозы в начале повысилась, но спустя 3 месяца немного понизилась. Одновременно отмечено повышение концентрации ГМФ.

#### 4. Дискуссии

Настоящий эксперимент доказал, что значения концентрации щавелевой кислоты и pH остаются устойчивыми во всех условиях хранения и спустя продолжительного периода времени, в отличии от других характеристик. Изменения цвета, отмеченные в пробах, храненных при комнатной температуре были связаны с многочисленными реакциями конденсирования (реакция Маярда), которые производят ряд многоциклических компонентов, всасывая свет в видимой зоне. Основное изменение состоит в производстве большого количества ГМФ. ГМФ является токсичным для пчел и при высоких концентрациях вызывает ранение пищеварительной системы. ЯХИМОВИЧ и Эль ШЕРБИН (1975) продемонстрировали, что концентрация содержания ГМФ ниже 30 мг/л является безопасной, но значения, превышающие 150 мг/л являются токсичными и могут повышать уровень гибели пчел. Следовательно, обработка ульев более старым раствором ОАВС, храненным при комнатной температуре, остается эффективным в борьбе с варроатозом, но ГМФ может оставаться в меду, храненном для кормления личинок, причиняя их гибель.

Другое отмеченное изменение – гидролиз сахарозы в глюкозе и фруктозе из-за кислотного условия. Особая ситуация отмечена в пробах, храненных при комнатной температуре. Концентрация фруктозы первоначально повысилась, но через 3 месяца регистрировала снижение уровня. Этот факт можно объяснять одновременным повышением концентрации ГМФ. Фактически, ГМФ производится в основном в результате разложения фруктозы. Согласно результатам нашего эксперимента, рекомендуем применение свежего раствора ОАВС в борьбе с варроатозом пчел, когда в семьях нет расплода. При необходимости хранения раствора, рекомендуется температура  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

- Charrière J.D., Potentiel et limites de l'emploi des acides organiques, *Sanitaire* 161 (1997): 219-227  
 Chiriboga J., Some properties of an oxalic oxidase purified from barley seedlings, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 11 (1963): 277  
 Higes M., Meana A., Suárez M., Llorente J., Negative long-term effects on bee colonies treated with acid against *Varroa jacobsoni* Oud., *Apidologie* 30 (1999): 289-292  
 Imdorf A., Charrière J.D., Bachofen B., Efficiency checking of the *Varroa jacobsoni* control methods by means of oxalic acid, *Apiacta* 32 (1997): 89-91  
 Jachimowich T., El Sherbiny G., Zür Problematik der verwendung von Invertzucker für die Bienenfütterung, *Apidologie* 6 (1975): 121-143  
 Jeuring J., Kuppers F., High performance liquid chromatographic of furfural and hydroxymethylfurfural in honey, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62 (1980): 1215-1218  
 Mutinelli F., Baggio A., Capolongo F., Piro R., Prandin L., Biasion L., A scientific note on oxalic acid by topical application for the control of varroasis, *Apidologie* 28 (1997): 461-462  
 Nanetti A., Massi A., Mutinelli F., Cremasco S., L'acido ossalico nel controllo della varroasi: note preliminari, *Apitalia* 22 (1995): 29-32  
 Nanetti A., Stradi G., Varroasi: trattamento chimico con acido ossalico in sciroppo zuccherino, *L'Ape Nostra Amica* 19 (1997): 6-14  
 Nanetti A., Oxalic acid for mite control – Results and review, In: Proceedings of the Concerted Action 3686 meeting "Coordination in Europe of research on integrated control of *Varroa* mites in honey bee colonies", Merelbeke, Belgium, November 13-14, 1999, pp. 7-14  
 Radetzki T., Reiter M., von Negelein B., Oxalsäure zur Varroabekämpfung, *Schweiz Bienen-Zeitung* 117 (1994): 263-267  
 Takeuchi K., Harada K., Control of *Varroa jacobsoni* mites with oxalic acid spray, *Honeybee Sci.* 4 (1983): 113-116 (in Japanese)