

Kakvoća pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu

Ledinski, Gloria

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:911757>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**KAKVOĆA PČELINJEG VOSKA NA MEĐUNARODNOM
TRŽIŠTU**

DIPLOMSKI RAD

Gloria Ledinski

Zagreb, srpanj, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Ekološka poljoprivreda i agroturizam

**KAKVOĆA PČELINJEG VOSKA NA MEĐUNARODNOM
TRŽIŠTU**

DIPLOMSKI RAD

Gloria Ledinski

Mentor:

Doc. dr. sc. Lidija Svečnjak

Zagreb, srpanj, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Gloria Ledinski**, JMBAG 0178095576, rođen/a 27.01.1994 u Koprivnici, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

KAKVOĆA PČELINJEG VOSKA NA MEĐUNARODNOM TRŽIŠTU

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Gloria Ledinski**, JMBAG 0178095576, naslova

Kakvoća pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|-------------------------------------|--------|-------|
| 1. | doc. dr. sc. Lidija Svečnjak | mentor | _____ |
| 2. | prof. dr. sc. Dragan Bubalo | član | _____ |
| 3. | izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković | član | _____ |

Zahvale

Prije svega bih zahvalila mentorici, doc. dr. sc. Lidiji Svečnjak koja mi je pomogla pri izradi ovog rada svojim preporukama, brojnim savjetima te sugestijama i kritikama. Neizmjenno hvala na susretljivosti, strpljenju i ustupljenim materijalima.

Zahvaljujem svojim roditeljima Darku i Radi te bratu Fabianu koji su mi omogućili studiranje, pružili ljubav, podršku i vjeru u moj uspjeh. Veliko hvala što ste ljubav prema selu i poljoprivredi prenijeli na mene i pokazali mi da bez rada, upornosti i vjere nema uspjeha.

Veliko hvala mom suprugu Hrvoju koji me iz dana u dan bodrio, koji mi je moralna i financijska potpora te oslonac kroz cijeli život. Od srca hvala na strpljenju, podršci i razumijevanju u proteklih nekoliko godina. Hvala ti što si svoje slobodno vrijeme podredio mom studiranju.

Posebne zahvale upućujem svojim djevojčicama Katji i Evi kojima posvećujem ovaj rad. Hvala na strpljenju i motivaciji. Oprostite na danima vašeg djetinjstva koje sam željela provesti s vama, a to nije bilo moguće. Moja ste najveća snaga, inspiracija i motivacija za dalje.

Zahvaljujem svekrvi, svekru i šogoricama na potpori te na čuvanju djece.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj rada	1
2. Pregled literature	2
2.1. Pčelinji vosak	2
2.1.1. <i>Sinteza pčelinjeg voska</i>	2
2.1.2. <i>Važnost i uloga pčelinjeg voska u pčelinjoj zajednici</i>	3
2.2. Kemijski sastav pčelinjeg voska	4
2.2.1. <i>Esteri viših masnih kiselina</i>	5
2.2.2. <i>Ugljikovodici</i>	5
2.2.3. <i>Slobodne masne kiseline</i>	6
2.2.4. <i>Slobodni masni alkoholi</i>	6
2.3. Fizikalna svojstva pčelinjeg voska	6
2.4. Konstrukcija saća	7
2.5. Proizvodnja, prerada i primjena pčelinjeg voska	9
2.5.1. <i>Manipulacija saćem</i>	9
2.5.2. <i>Pretapanje saća i izrada satnih osnova</i>	10
2.5.3. <i>Primjena pčelinjeg voska</i>	12
2.5.4. <i>Povijest primjene pčelinjeg voska</i>	13
2.6. Kriteriji i kontrola kakvoće pčelinjeg voska	14
2.6.1. <i>Kontrola kakvoće pčelinjeg voska u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji</i> ..	15
2.6.2. <i>Kontrola kakvoće pčelinjeg voska u pčelarskom sektoru</i>	17
2.7. Patvorenje pčelinjeg voska	19
2.7.1. <i>Definicija patvorenja</i>	19
2.7.2. <i>Problem patvorenja pčelinjeg voska</i>	19
2.7.3. <i>Patvorine pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu</i>	20
2.7.4. <i>Parafin</i>	23
2.7.5. <i>Stearin/stearinska kiselina</i>	23
2.7.6. <i>Negativni učinci patvorenja pčelinjeg voska</i>	23
2.8. Analitičke metode za utvrđivanje patvorenja pčelinjeg voska	24
2.8.1. <i>Plinska kromatografija (GC) – masena spektrometrija (MS)</i>	24
2.8.2. <i>Plinska kromatografija (GC) s plameno-ionizacijskim detektorom (FID)</i>	25
2.8.3. <i>Infracrvena (IR) spektroskopija</i>	25
2.8.4. <i>FTIR-ATR tehnika snimanja spektara</i>	26
3. Materijali i metode	28
3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka za analizu	28
3.2. Priprema internog referentnog materijala	29
3.3. Analiza uzoraka metodom FTIR-ATR spektroskopije	30
4. Rezultati i rasprava	32
4.1. Spektralna analiza internog referentnog materijala	32
4.1.1. <i>Konstrukcija kalibracijskih krivulja</i>	33
4.2. Rezultati analize uzoraka pčelinjeg voska s međunarodnog tržišta	36

4.2.1.	<i>Distribucija analiziranih uzoraka pčelinjeg voska prema tipu patvorina.....</i>	36
4.2.2.	<i>Distribucija analiziranih uzoraka pčelinjeg voska prema razini patvorenja</i>	37
4.2.3.	<i>Distribucija analiziranih uzoraka pčelinjeg voska prema zemlji podrijetla.....</i>	37
5.	Zaključak.....	42
6.	Popis literature	43

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Glorije Ledinski**, naslova

Kakvoća pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu

Zbog nedostatka zakonske regulative i obvezne kontrole kakvoće, pčelinji je vosak česta meta patvorenja i rastući problem diljem svijeta. Cilj je ovog rada bio utvrditi kakvoću pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu. Uzorci pčelinjeg voska (satnih osnova i blokova voska) prikupljeni su iz 33 Zemlje svijeta (n=300) te analizirani metodom infracrvene (FTIR-ATR) spektroskopije. Rezultati su pokazali kako je 166 (55,3 %) uzoraka bilo patvoreno parafinom (51 %) i stearinom/stearinskom kiselinom (4,3 %). Udio parafina u patvorenim uzorcima kretao se od 3,5 do 100 %, a stearina/stearinske kiseline od 1,5 do 29,2 %. Najviši udjeli parafina (> 90 %) utvrđeni su u uzorcima iz Bosne i Hercegovine, Srbije i Kine, a stearin/stearinska kiselina su detektirani u uzorcima iz Belgije i Nizozemske. Patvorine nisu utvrđene samo u uzorcima iz nekoliko europskih zemalja (Luksenburg, Švedska i Ujedinjeno kraljevstvo), afričkih zemalja (Kamerun, Kongo, Etiopija) te Australije, Novog Zelanda, Kanade, Rusije i Vijetnama. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na hitnu potrebu za rješavanjem problema patvorenja pčelinjeg voska na međunarodnoj razini.

Ključne riječi: pčelinji vosak, kakvoća, patvorenje, međunarodno tržište

Summary

Of the master's thesis – student **Gloria Ledinski**, entitled

Quality of beeswax on the international market

Due to the lack of legislation and mandatory quality control, beeswax is a frequent target of adulteration and a growing problem worldwide. The aim of this study was to determine the quality of beeswax on the international market. Beeswax samples (comb foundations and beeswax blocks) were collected from 33 countries (n=300), and analysed by infrared (FTIR-ATR) spectroscopy. The results have revealed that 166 (55.3%) samples were adulterated with paraffin (51%) and stearin/stearic acid (4.3%). The proportion of paraffin in adulterated samples ranged from 3.5 to 100%, and of stearin/stearic acid from 1.5 to 29.2%. The highest proportions of paraffin (> 90%) were detected in samples from Bosnia and Herzegovina, Serbia and China, while stearin/stearic acid were detected in samples from Belgium and Netherlands. Adulterants were not found only in samples from several European countries (Luxembourg, Sweden and the United Kingdom), African countries (Cameroon, Congo, Ethiopia), as well as Australia, New Zealand, Canada, Russia and Vietnam. The results of this study indicate an urgent need to resolve the problem of beeswax adulteration on international level.

Keywords: beeswax, quality, adulteration, international market

1. Uvod

Patvorenje pčelinjeg voska (satnih osnova) velik je i rastući problem diljem svijeta. Niz je čimbenika koji ukazuju da je tržište satnih osnova preplavljeno patvorenim materijalima. Primarno je to visoka cijena pčelinjeg voska, niska cijena lako dostupnih patvorina pčelinjeg voska (primarno parafina) te nedostatak zakonske regulative koja definira kriterije kakvoće i rutinsku kontrolu autentičnosti voska. Utvrđeno je kako se za patvorenje pčelinjeg voska danas koristi više od 15 prirodnih i umjetnih voskova. Najučestalije patvorine voska su parafin i stearin/stearinska kiselina, no u posljednje vrijeme se na tržištu pojavljuju i druge patvorine. Patvorenje uzrokuje degradaciju sastava voska, a unosom patvorenog voska (satnih osnova) u košnice ugrožava se dobrobit pčelinje zajednice u vidu narušene kemijske komunikacije, destrukcije izgrađenog saća te narušenih uvjeta za normalan fiziološki razvoj legla i skladištenje hrane (nektara i peludi). Patvorenjem voska u pitanje se dovodi i javno zdravlje s obzirom na to da pčelinji vosak (saće) predstavlja prvu prirodnu ambalažu meda. Farmaceutska i prehrambena industrija uključuju stroge EU propise koji definiraju kriterije kakvoće pčelinjeg voska te imaju standardizirane analitičke metode za njihovo ispitivanje. U sektoru pčelarstva pčelinji je vosak klasificiran kao nusproizvod životinjskog podrijetla koji nije namijenjen prehrani ljudi, a koristi se u obliku satnih osnova i blokova voska (pretopljenog saća) za njihovu izradu. Kao takav ne podliježe obaveznoj kontroli kakvoće niti ispitivanju autentičnosti prije stavljanja na tržište. Tijekom posljednja dva desetljeća s ciljem pronalaska pouzdanih analitičkih metoda za otkrivanja patvorenja pčelinjeg voska razvijene su dvije instrumentalne analitičke metode za kvalitativno i kvantitativno (LoD:<5 %) otkrivanje patvorenja pčelinjeg voska: plinska kromatografija u kombinaciji s dva detektora (spektrometrija masa ili plamenoionizacijski detektor) i infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR). Obje metode pokazale su pouzdane rezultate u otkrivanju parafina i stearina/stearinske kiseline u pčelinjem vosku jer pružaju dobre granice detekcije u usporedbi s fizikalno-kemijskim metodama, ali FTIR spektroskopiju karakterizira niz prednosti, uključujući pouzdanost u detekciji svih vrsta patvorina. Međutim, spomenute analitičke metode nisu službeno validirane međulaboratorijskim usporedbama (postupak je trenutno u tijeku) te posljedično tome još uvijek ne postoje zakonski akti koji se odnose na kriterije kakvoće pčelinjeg voska u pčelarskom sektoru. Iako je brojnim istraživanjima potvrđena prisutnost različitih patvorina pčelinjeg voska na domaćem i međunarodnom tržištu, sustavno i sveobuhvatno istraživanje kakvoće (autentičnosti) pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu dosad nije provedeno.

1.1. Cilj rada

Cilj je ovog rada bio utvrditi kakvoću pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu kvalitativnom i kvantitativnom FTIR spektroskopskom analizom (utvrđivanjem tipa i udjela patvorina) uzoraka pčelinjeg voska prikupljenim iz 33 Zemalje svijeta.

2. Pregled literature

2.1. Pčelinji vosak

2.1.1. *Sinteza pčelinjeg voska*

Pčelinji vosak je proizvod pčela radilica koje ga koriste kao građevni materijal za izgradnju saća. Proizvode ga pčele radilice u dobi od 12 do 18 dana (graditeljice) pomoću četiri para specijaliziranih voštanih žlijezda smještenih na ventralnoj strani zatka (Slika 1.). Kod starijih pčela aktivnost voštanih žlijezda se smanjuje, no u iznimnim situacijama sinteza pčelinjeg voska može se ponovno aktivirati. Najveće količine pčelinjeg voska radilice proizvode u razdoblju od travnja do lipnja, odnosno tijekom intenzivnog razvoja pčelinje zajednice.

Glavni izvori sirovina koji pčelama služe za proizvodnju pčelinjeg voska su ugljikohidrati (fruktoza, glukoza, saharoza) (Weiss 1965., prema Bogdanov 2017.), no pčelama su za proizvodnju voska potrebne i velike količine peludi radi razvoja voštanih žlijezdi. Kada se pčele intenzivno hrane medom i peludom, proizvode znatne količine pčelinjeg voska. Vosak se sintetizira i nagomilava u voštanim žlijezdama u tekućem obliku, a u dodiru sa zrakom nakon izlučivanja skrutne u obliku voštanih ljuskica (Slika 2.). Pčele sa stražnjim nogama voštane ljuskice prebacuju prema usnom ustroju (čeljjustima) kojima ih obrađuju i lijepe na saće koje se gradi. Jedna voštana ljuskica teži oko 1 mg, a sukladno tome za 1 g pčelinjeg voska pčele proizvedu oko 1 000 voštanih ljuskica, dok je za proizvodnju 1 kg voska potrebno oko milijun ljuskica (Bogdanov 2004.). Weiss je 1965. godine (prema Hepburn 2014.) utvrdio kako pčele za proizvodnju 1 kg pčelinjeg voska utroše 6,25 kg meda, dok recentniji podaci ukazuju na veći utrošak meda koji se kreće između 8 i 15 kg (FAO 1990.; EC 2017.). Izgrađeno saće je izuzetno čvrsto te jedan okvir LR (Lanstroth-Root) košnice koji sadrži oko 100 g pčelinjeg voska može držati 2 – 4 kg meda (Bogdanov 2017.).

Nekoliko je čimbenika o kojima ovisi proizvodnja pčelinjeg voska i izgradnja saća u pčelinjoj zajednici:

- medonosna paša (što je obilnija paša, potrebno je više saća za smještaj prikupljenog nektara)
- uzgoj legla (što je više zaleženih jaja, potrebno je više saća za odlaganje jaja)
- prisutnost matice (samo zajednice s maticom grade saće)
- temperatura (temperatura iznad 15 °C pogoduje izgradnji saća)
- prisutnost peludi (izvor proteina) (Bogdanov 2017.).



Slika 1. Izlučene voštane luskice radilice

(Izvor: <https://beeorganics.wordpress.com/2012/12/20/how-do-honey-bees-make-beeswax/wax-glands/>)



Slika 2. Izgled voštane luskice pod sekcijom mikroskopom

(Izvor: Svečnjak i sur. 2019a.)

2.1.2. Važnost i uloga pčelinjeg voska u pčelinjoj zajednici

Pčelinji vosak ima multifunkcionalnu i složenu ulogu u pčelinjoj zajednici. Služi kao materijal za izgradnju saća, skladištenje hrane (nektara i peludi), razvoj legla, ima važnu ulogu u kemijskoj komunikaciji i termoregulaciji u zajednici te mehaničkoj (pčelinji ples) komunikaciji (Svečnjak i sur. 2019a.). Pčelinji vosak (stanice saća) je ujedno prvi prirodni ambalažni materijal u kojem se skladišti med u košnici (Svečnjak i sur. 2018b.).

Reakcija pčela i harmonično funkcioniranje unutar pčelinje zajednice regulirane su kemijskim tvarima (feromonima) koje djeluju kao kemijski signali, odnosno poruke drugim jedinkama u istoj zajednici (Svečnjak 2015b.). Na sličan način djeluju i sastavnice pčelinjeg voska te imaju važnu ulogu u kemijskoj komunikaciji unutar pčelinje zajednice. Lipidne komponente sastava pčelinjeg voska (esteri viših masnih kiselina i slobodne masne kiseline) imaju važnu ulogu kao kemijski signali prepoznavanja jedinki iste zajednice (Breed i sur. 1988a., Hepburn 2014.). Ove mehanizme kemijske komunikacije u pčelinjoj zajednici proučavali su Breed i sur. u seriji istraživanja (1988a., 1988b., 1992., 1995a., 1995b., 1998., 2004.). a rezultati su pokazali kako su masne kiseline iz pčelinjeg voska ključne u

prepoznavanju jedinki unutar zajednica. Četiri nezasićene kiseline (palmitooleinska, oleinska, linolna i linolenska) i dvije zasićene masne kiseline (palmitinska i lignocerična) glavne su masne kiseline koje djeluju kao signal prepoznavanja unutar zajednice; jedino je za stearinsku kiselinu utvrđeno da je neaktivna u tom kontekstu (Breed i sur. 1995a., 1995b., 1998., 2004., Fröhlich i sur. 2000., Brockmann i sur. 2003., D'ettore i sur. 2006.).

Masne kiseline iz pčelinjeg voska važne su i za mehanička svojstva voska i izgrađenog saća jer mu osiguravaju specifičnu konzistenciju i čvrstoću (Buchwald i sur. 2005., 2006., 2009.).

Pčelinji vosak prikladan je medij za prijenos zvuka budući da se intenzitet zvuka smanjuje s gustoćom medija i s udaljenošću (Hepburn 2014.).

2.2. Kemijski sastav pčelinjeg voska

Prema sastavu pčelinji je vosak složena smjesa koja sadrži preko 300 različitih sastojaka, a glavninu sastava pčelinjeg voska čine esteri viših masnih kiselina (67 %). Uz estere pčelinji vosak sadrži i ugljikovodike (14 %), slobodne masne kiseline (12 %) te druge tvari u manjim količinama (Tablica 1.) (Tulloch 1980.).

Udio sastavnica pčelinjeg voska može se razlikovati ovisno o vrsti pčela i zemljopisnom podrijetlu, ali su razlike u udjelu pojedinih sastavnica pčelinjeg voska male (Aichholz i Lorbeer 1999.). Aichholz i Lorbeer navode kako je u pčelinjem vosku ukupni sadržaj monoestera od 27 do 40 %, hidroksimonoestera od 9 do 23 %, diestera od 7 do 16 %, hidroksidiestera 3,9 %, ugljikovodika od 11 do 28 %, zasićenih, nerazgranatih slobodnih masnih kiselina od 1 do 18 %. U pčelinjem vosku identificirano je 50 komponenata arome (Ferber i Nursten 1977.).

Svečnjak i sur. (2019a.) su temeljem podataka iz sveobuhvatne znanstvene literature dali pregled sastava pčelinjeg voska s detaljnijim uvidom u udjele njegovih sastavnica, kako je prikazano u Tablici 2.

Tablica 1. Kemijski sastav pčelinjeg voska

SASTAVNICA	KOLIČINA (g/100g)
Monoesteri	35
Diesteri	14
Triesteri	3
Hidroksimonoesteri	4
Hidroksipoliesteri	8
Kiseli esteri	1
Kiseli poliesteri	2
Ukupno esteri	67
Ugljikovodici	14
Slobodne kiseline	12
Alkoholi	1
Ostalo	6

Izvor: Tulloch 1980.

Tablica 2. Kemijski sastav voska medonosne pčele (*Apis mellifera*)

Sastavnica	Količina (%)	Duljina lanca (broj C atoma)
Ugljikovodici	15,7	C23 – C35
Zasićeni (alkani)	12,8	C23 – C35
Nezasićeni (alkeni)	2,9	C29 – C33
Masne kiseline	18	C20 – C36
	5,8	C24:O (zasićeni) C14 – C36 ^a
Masni alkoholi	0,6	C33, C35 C24 – C34 ^a
Monoestri (palmitati, oleati)	40,8	C38 – C54
	6,6	C40
	11,9	C46
	9	C48
Hidroksimonoestri	9,2	C40 – C50
Diesteri	7,4	C54 – C65
Ukupno esteri	57,4	C38 – C64
Sveukupno	91,7	C14 – C64

^a Prema navodima drugih autora uz Aichholz i Lorbeer, 1999./2000.: Serra Bonvehí i Orantes Bermejo (2012.), Jiménez i sur. (2003., 2004., 2006.)

Izvor: Svečnjak i sur. 2019a.

2.2.1. Esteri viših masnih kiselina

Monoestri masnih kiselina najzastupljeniji su spojevi u pčelinjem vosku i čine oko 35% pčelinjeg voska. Monoestri pčelinjeg voska linearni su esteri koji su izvedeni iz palmitinske (palmitati) i oleinske kiseline (oleati), sastoje se od dvije strukture: zasićeni alkil palmitati (C38 – C52) i nezasićeni alkil esteri oleinske kiseline (C46 – C54) čija struktura prevladava (Aichholz i Lorbeer 1999., Tulloch 1980.). U usporedbi s monoesterima, hidroksimonoestri (9,2 %) i diesteri (7,4 %) u pčelinjem vosku nalaze se u manjem udjelu (Aichholz i Lorbeer 1999.).

2.2.2. Ugljikovodici

Najbrojnija skupina ugljikovodika u pčelinjem vosku su linearni zasićeni ugljikovodici (n-alkani) koji čine 67 % svih ugljikovodika koji se javljaju u pčelinjem vosku, dok razgranati ugljikovodici javljaju se u manjoj količini (0,2 %) (Streibl i sur. 1996., prema Svečnjak i sur. 2019a.). U pčelinjem vosku uglavnom se nalaze ugljikovodici n-alkana s neparnim brojem ugljikovih atoma (C23 – C33). Kao najbrojniji u pčelinjem vosku *A. mellifera* su heptakozan (C27), nonakozan (C29), hentriakontan (C31), pentakozan (C25) i trikozan (C23) (Jiménez i sur. 2004., Serra Bonvehí i Orantes Bermejo 2012., Maia i Nunes 2013., Waś i sur. 2014a., 2014b.). Alkan C27 (heptakozan) čini 6,2 % ukupnog sastava pčelinjeg voska vrste *A. mellifera* (Aichholz i Lorbeer 1999.). Maia i Nunes (2013.) izvjestili su o još većoj prisutnosti

heptakozana u pčelinjem vosku; prosječan udio koji je utvrđen iznosio je 13 % (kretao se od 9,19 do 16,8 %). Postotni udio alkana s parnim brojem ugljikovih atoma u odnosu na neparne (95 %) znatno je manji, gotovo zanemariv (Waś i sur. 2014a., 2014b.).

Od najčešćih n-alkena u pčelinjem vosku *A. mellifera* su alkeni s neparnim lancem (C27 – C39) s cis – dvostrukom vezom na C10 položaju (Aichholz i Lorbeer 1999.). Duljina ugljikovog lanca kraća je kod voskova azijskih pčela nego kod *A. mellifera*. U usporedbi s *A. mellifera*, kod azijskih voskova viši je udio C25 ugljikovodika (Hepburn 2014.).

2.2.3. Slobodne masne kiseline

Slobodne masne kiseline u pčelinjem vosku su nerazgranate zasićene molekule koje imaju paran broj ugljikovih atoma (C20 – C36). Kao najzastupljenija masna kiselina u pčelinjem vosku *A. mellifera* je tetrakozanska (lignocerična) (6 %) kiselina (C24) (Aichholz i Lorbeer 1999.). Prema recentnijim istraživanjima, pčelinji vosak uglavnom sadrži zasićene nerazgranate dugolančane masne kiseline (oko 85 %) od kojih se kao glavna kiselina ističe palmitinska kiselina (C16) s koncentracijom oko 14,8 %, a zatim slijede tetrakozanska i oktakozanska (C28) (Serra Bonvehí i Orantes Bermejo (2012.)). Zabilježene su i nezasićene masne kiseline, ali u manjim udjelima. Kao što je opisano u prethodnom poglavlju, masne kiseline imaju važnu ulogu u kemijskoj komunikaciji u pčelinjoj zajednici jer djeluju kao kemijski signali prepoznavanja jedinki iste zajednice.

2.2.4. Slobodni masni alkoholi

Slobodni masni alkoholi s C33 (0,3 % - 1,8 %) i C35 (0,3 %) identificirani su u pčelinjem vosku *A. mellifera*, *Apis florea* i *Apis cerana* (Aichholz i Lorbeer 1999.). Slobodni masni alkoholi čine oko 1 % ukupnog sastava pčelinjeg voska. Serra Bonvehí i Orantes Bermejo (2012.) navode da se zasićeni masni alkoholi C30 i C32 nalaze u višim koncentracija, dok Aichholz i Lorbeer (1999.) ističu masne kiseline C33 i C35.

2.3. Fizikalna svojstva pčelinjeg voska

Svježe proizvedeni pčelinji vosak bijele je boje, no kasnije poprima žućkaste nijanse koje potječu od propolisa i peludi. Boja pčelinjeg voska može se razlikovati ovisno o relativnim količinama raznolikih pigmenata propolisa i peludi, mijenja se ovisno o duljini korištenja te varira od žute pa sve do smečkaste boje. Žuta boja potječe od pigmenta koji potječe od propolisa i peludi, a smeđa boja može potjecati i od pigmenata izmeta ličinki koji zaostaje u saću (Bogdanov 2017.). Prema Uredbi komisije (EU) br. 231 (2012.) žuti pčelinji vosak je proizvod dobiven topljenjem stijenki saća koje je izgradila medonosna pčela (*Apis mellifera* L.), pomoću vruće vode i uklanjanjem stranih tvari. Kako bi se dobio bijeli pčelinji vosak, žuti pčelinji vosak se izbjeljuje (Uredba Komisije (EU) br. 231, 2012.).

Karakterističnog je mirisa koji podrijetlom dolazi od drugih pčelinjih proizvoda (propolisa, meda i peludi) (Ferber i Nursten 1977.). Pčelinji vosak obično nema specifičan

okus, ako je okus neugodan to je znak pogoršanja kakvoće pčelinjeg voska od strane stranih tvari.

Struktura pčelinjeg voska je kristalinična, a kristalizacija ovisi o skladištenju. Proces kristalizacije pčelinjeg voska nakon skladištenja 3 – 4 mjeseca se povećava, a samim time se povećava njegova elastičnost i krutost. Pčelinji vosak kemijski je inertan materijal te ima visoku plastičnost na niskoj temperaturi (32 °C). Kada se vosak zagrijava mijenjaju se fizikalna svojstva. Na temperaturi 30 – 35°C postaje plastičan, 46 – 47°C tvrdoća voska potpuno je uništena, a između 60 – 70°C počinje se topiti. Prosječna točka tališta pčelinjeg voska iznosi 64 – 65°C. Prilikom zagrijavanja na 95 – 105°C nastaje površinska pjena, a na 140 °C spojevi koji su isparljivi počinju isparavati. Nakon hlađenja pčelinjeg voska on se smanjuje za 10 %, a grijanjem na 120 °C u vremenskom razdoblju od 30 minuta dolazi do povećanja tvrdoće zbog uklanjanja preostale vode (Bogdanov, 2017.).

Mehanička svojstva pčelinjeg voska važna su s obzirom na to da ima ulogu građevnog materijala za konstrukciju saća u pčelinjoj zajednici (Buchwald i sur. 2009.).

Pčelinji je vosak netopiv u vodi i otporan je na mnoge kiseline. Topljiv je u organskim otapalima (acetone, eter, benzen, ksilon, toluen, kloroform, tetraklormetan). Na sobnoj temperaturi nije potpuno topiv u ovim otapalima, ali nakon zagrijavanja iznad točke tališta topiv je u većini organskih otapala, posebno u etanolu (Bogdanov 2017.).

U Uredbi Komisije (EU) br. 231 (2012.) stoji da je pčelinji vosak topljiv u alkoholu, a vrlo topljiv u kloroformu i eteru.

Nakon rezanja pčelinji vosak se ne lijepi, te je fino granuliran (Bogdanov 2017.).

Specifična težina mu je od 0,950 - 0,965, a indeks refrakcije na temperaturi od 75°C 1,440 – 1,445 (Uredba Komisije (EU) br. 231., 2012.) (Tablica 3.).

Tablica 3. Senzorska i fizikalna svojstva pčelinjeg voska

Parametar	Zahtjev
Boja	Žuta do smeđežuta
Presjek	Fino granuliran
Miris	Poput meda
Konzistencija	Nakon rezanja nije ljepljiv
Točka tališta	62 – 65°C
Specifična težina	0,950 – 0,965
Indeks refrakcije	1,440 – 1,445

Izvor: Bogdanov 2004.

2.4. Konstrukcija saća

Pčele u nastambi u kojoj žive (košnica, stijena, šupljina drveta) žive na saću. Stanice saća pčele grade s velikom preciznošću, imaju oblik šesterokuta koji im daje čvrstoću (Slika 3.) Svaka pojedinačna radilička stanica saća *A. mellifera* promjera je od 5 do 6 milimetara i debljine oko 0,25 mm (Bogdanov, 2017.). Za izgradnju 20 cm² saća potreban je 1g voska (Al-Waili 2005., prema Bogdanov 2017.).

Svako saće ima stanice s obje strane, odnosno sastoji se od dva reda šestostranih stanica (Slika 4.). Stanice saća pravilno su poredane jedna do druge, složene tako da svaka stanica ima zajedničku stijenku s devet susjednih stanica (sa šest na istoj strani saća i s tri stanice s nasuprotne strane preko dna). Kada se saće okrene prema svijetlu, sa suprotne strane vide se tri stanice te upravo ova mrežasta struktura izgrađenom saću daje specifičnu čvrstoću.

Konstrukcija saća nastaje međusobnim djelovanjem vertikalnih i bočnih sila koje djeluju na saće, s vremenom dolazi do nepravilnosti kod gradnje stanica koje pčele zatim poprave (Hepburn 2014.).

Pravilnost strukture saća vizualno je vidljiva, a dodatno je pojačana upotrebom satnih osnova. Prirodno izgrađeno saće ukazuje na češće nepravilnosti, često su to kvadratne i peterostrane stanice. Do nepravilnosti u izgradnji dolazi tijekom popravka oštećenih dijelova, promjena iz radilačkih u trutovske stanice prilikom izgradnje saća te na spojevima dijelova saća izgrađenim na različitim udaljenostima tijekom gradnje stanica (Svečnjak i sur. 2019a.).

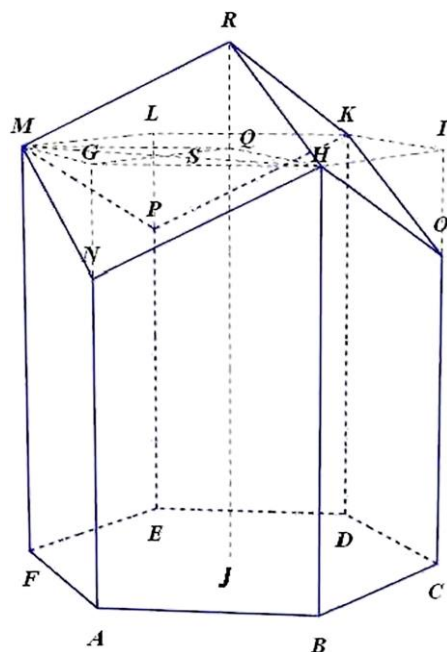
Debljina dvorednog potpuno izgrađenog saća je 21,5 – 25,5 mm, a duljina iznosi 10 – 12 mm. Položaj stanica saća je vodoravan, otvori su sastrane, dno okrenuto prema unutra, a stanice su lagano ukošene prema gore za 9 – 14 ° (Kezić i sur. 2014.).

Postoje radilačke i trutovske stanice te matičnjaci. Matičnjaci su stanice koje služe za razvoj matica. U odnosu na radilačke, trutovske se stanice razlikuju po veličini i obliku. Matičnjak ima oblik žira, veličina je oko 2,5 cm, a na saću se nalazi u okomitom ili visećem položaju. Nakon što se matica izleže pčele unište matičnjak. On ne služi za skladištenje meda i peludi. Uloga radilačkih stanica je razvoj radilica te skladištenje meda i peludi. Uloga trutovskih stanica je razvoj trutova, skladištenje meda i rjeđe peludi. Oblik trutovske i radilačke stanice je isti, no trutovska je stanica veća.



Slika 3. Stanice saća

(Izvor: <https://patrologija.com/sace/>)



Slika 4. Trodimenzijalni prikaz stanica saća
(Izvor: Svečnjak i sur. 2019a.)

2.5. Proizvodnja, prerada i primjena pčelinjeg voska

2.5.1. Manipulacija saćem

Uspješna manipulacija saćem važan je dio tehnologije pčelarenja. Boja saća kreće se od bijele (djevičanski vosak) prema žutoj, smeđoj i crnoj boji. Uzrok tamne boje saća je izmet ličinki, ostaci kukuljica i propolis. Med koji je uskladišten u tamnom saću poprima tamnu boju i onečišćen je česticama prljavštine. Pčelinji vosak u najčišćem obliku bijele je boje, žuto obojenje dobiva od propolisa i peludi (Coggshall i Morse 1984.). Saće ujedno može biti i izvor zaraze. Pčelinji vosak može biti onečišćen patvorinama i pesticidima, no s obzirom na to da se ne konzumira izravno u prehrani, nisu definirane granice rezidua navedenih tvari koje vosak ne smije sadržavati (Svečnjak i sur. 2019a.). Međutim, mnoge tvari lako prelaze iz pčelinjeg voska u med (Tremolada i sur. 2004.; Wallner 1999.; prema Svečnjak i sur. 2019a.; Svečnjak i sur. 2020.; EFSA 2020.) pa i male količine patvorina i/ili pesticida mogu biti opasne. Također, zbog nedostatka definiranih kriterija kakvoće pčelinjeg voska u pčelarskom sektoru, komercijalno dostupne satne osnove predstavljaju visok rizik za prijenos različitih bolesti pčela (Mutinelli 2011.).

Svake godine pčelari bi trebali staro saće iz košnice ukloniti čime pčele motiviraju na gradnju novog saća. Postoji plodišno i medišno saće. Radi suzbijanja širenja bolesti na pčelinjaku svake 2 – 3 godine plodišno saće trebalo bi u cijelosti zamijeniti novim. Medišno saće mijenja se ako se tijekom vrcanja znatno ošteti. Pčelinji vosak se prerađuje tako da se voština iz starog saća iz košnice, saće s okvira i ostataka iz košnice otopi, dakle svi stari dijelovi saća spremaju se i pripremaju za pretapanje i proizvodnju satnih osnova.

Staro saće treba odvojiti od novijeg saća jer je niže kakvoće; što je saće tamnije, to je niži sadržaj pčelinjeg voska. Med iz saća treba ukloniti da ne bi tijekom skladištenja saća došlo do stvaranja plijesni ili fermentacije. Staro saće potrebno je reciklirati, odnosno pretopiti i sterilizirati, čime se uklanjaju nečistoće i dobiva čisti pčelinji vosak koji se zatim nanovo koristi u tehnologiji pčelarenja u formi satnih osnova. Na taj se način izbjegavaju infestacije voskovim moljcem i plijesnima koje se javljaju tijekom skladištenja (Bogdanov 2017.), kao i širenje američke gnjiloće pčelinjeg legla i drugih bolesti pčela. Prinos čistog pčelinjeg voska ovisi o metodi prerade pčelinjeg voska i o udjelu starog saća, a kreće se od 30 do 50 %, a kad se radi o svježije izgrađenom saću, prinos može biti i do 100 % (Bogdanov 2004.).

2.5.2. Pretapanje saća i izrada satnih osnova

Industrijska proizvodnja pčelinjeg voska započela je još u 19. stoljeću kada je pokrenuta proizvodnja satnih osnova. Mehring (Njemačka) je 1857. godine pokrenuo industrijsku proizvodnju satnih osnova (Coggshall i Morse 1984.). Satna osnova je na početku sadržavala samo dna stanice pa je S. Wagner (SAD) dodao početke stijenki stanica saća i tako unaprijedio satnu osnovu (Kezić i sur. 2014.).

U svijetu je uglavnom praksa da pčelari sakupljeni sirovi pčelinji vosak ili staro saće daju specijaliziranim proizvođačima pčelinjeg voska na preradu. Manje proizvodne jedinice koriste principe koji će biti opisani u narednom tekstu.

Kvaliteta pčelinjeg voska ovisi o načinima proizvodnje. Postoje dvije metode proizvodnje pčelinjeg voska: topljenje i kemijska ekstrakcija.

Kemijska ekstrakcija provodi se otapalima i izvediva je samo u laboratorijima. Od otapala koriste se benzin i ksilen. Nedostatak ove metode je taj što se sva onečišćenja otope te to smanjuje kvalitetu pčelinjeg voska.

Topljenje pčelinjeg voska najčešće je korištena metoda koju uglavnom provode pčelari; vosak se može topiti kipućom vodom, parom ili električnom i sunčevom energijom. Najbolju kvalitetu ima vosak u poklopljenim stanicama saća, što se tiče općih kriterija kvalitete.

Pčelinji vosak ne smije se zagrijavati u posudama koje u svom sastavu imaju željezo, cink, bakar ili mjed (metali potamnjuju boju voska). Posude od olova također nisu prikladne za manipulaciju i/ili skladištenje voska zbog onečišćenja. Aluminijski i nehrđajući čelik mogu se koristiti, ali na njih negativno može djelovati oksalna kiselina.

Nakon topljenja pčelinji vosak nije dovoljno čist. U industrijske svrhe pčelinji vosak pročišćava se filtracijom i centrifugiranjem, a u maloj proizvodnji pčelinji vosak stavlja se u spremnik za grijanje od visokokvalitetnog čelika. U vodenoj kupelji pčelinji vosak trebao bi ostati što dulje (najbolje preko noći) na temperaturi od 75 – 80°C. Pčelinji vosak lakši je od vode i pluta na površini, a nečistoće tonu u donji dio pčelinjeg voska koji se nakon hlađenja otklanjaju i ostaje samo čisti gornji sloj pčelinjeg voska. Hlađenje se mora odvijati što sporije i mora se izbjegavati pomicanje spremnika (Bogdanov 2017.).

Blokovi voska dobiveni nakon pretapanja saća (sirovi vosak) u sektoru pčelarstva se koriste za izradu satnih osnova koje se nanovo unose u košnice (kako kalup za izgradnju saća) čime se vosak ustvari reciklira.

Satna osnova dobila je naziv po tome što čini središnji dio satine. Pčele grade saće tako da formiraju grozd, satna osnova umeće se u sredinu grozda kako bi se pčele potaknulo na gradnju saća na okvirima (Kezić i sur. 2014.). Satne osnove izrađuju se pomoću preše (Slika 5.) ili valjka (Slika 6.). Satne osnove proizvedene u prešama su krute, ne savitljive i lako se lome. Za kilogram pčelinjeg voska dobije se manje satnih osnova jer su deblje. Ploče preše premazuju se sirutkom, sapunicom ili štirkom kako se satne osnove ne bi lijepile za prešu. Temperatura pčelinjeg vosak pri izradi satnih osnova mora biti od 85 – 90°C.

Satne osnove proizvedene valjcima savitljive su i mogu se namatati na rolu kao platno. Pčelinji vosak prvo prolazi kroz ravne valjke i nastaje traka jednake debljine, zatim traka prolazi kroz gravirane valjke čiji oblik poprima. Pritisak kroz koji pčelinji vosak prolazi stvara veliki pritisak, što mijenja raspored molekule i ploča postaje savitljiva. Prije nego se pčelinji vosak postavi na prešu ili valjak, mora se zagrijati na temperaturu veću od 120 °C kako bi se uništile spore uzročnika američke gnjiloće (*Paenibacillus larvae*) (Svečnjak i sur. 2019a.).

Prilikom vrcanja može doći do pucanja saća, stoga je satne osnove potrebno pojačavati na okvir žicama. Na okvirima se izbuše rupe u koje se uvlače žice. Raspored žica na okviru može biti horizontalan (Slika 7.), okomit, kos ili kombiniran. Bitno je kako se žica stavlja jer ona „nosi“ teret meda. Za žicu je važno da bude što napetija jer to daje čvrstoću i stabilnost što je prijeko potrebno zbog satne osnove koja se stavlja na nju. Na tako postavljene užićene okvire satne osnove se utiskuje zagrijavanjem žica.



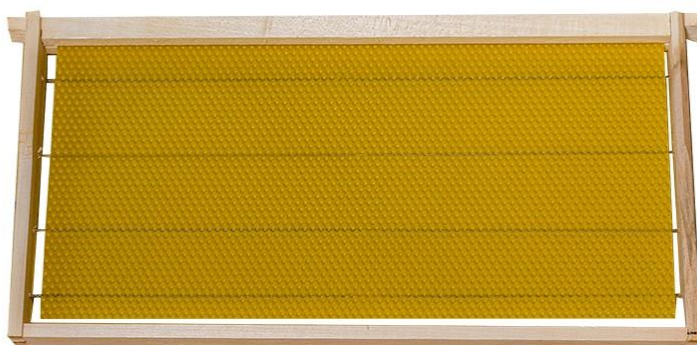
Slika 5. Preša za izradu satnih osnova

(Izvor: https://prodajapcela.com/index.php?page=izrada_satnih)



Slika 6. Valjak za izradu satnih osnova

(Izvor: <https://www.njuskalo.hr/pcelarstvo/linija-proizvodnju-satne-osnove-apital-oglas-23203176>)



Slika 7. Satna osnova horizontalno užićena na okvir

(Izvor: <http://prodavnica.zlatnapcela-rios.com/kupi/ram-sa-satom-osnovom-horizontalno-ozicen-lr-97>)

Kakvoća pčelinjeg voska ovisi o uvjetima skladištenja. Uzorke pčelinjeg voska treba skladištiti u odgovarajućoj ambalaži (plastične posude ili vrećice, staklene posude, spremnici od nehrđajućeg čelika, papir za omatanje). Temperatura skladištenja pčelinjeg voska mora biti između 10 i 23 °C (Svečnjak i sur. 2019a.). Pčelinji vosak treba čuvati na suhom i tamnom mjestu izvan dohvata izravne sunčeve svjetlosti.

2.5.3. Primjena pčelinjeg voska

Osim što se glavnina voska utroši za proizvodnju satnih osnova, vosak se također koristi u kozmetici (25 – 30 %), farmaceutici (25 – 30 %), proizvodnji svijeća (20 %) i za ostale svrhe (10 – 20 %) (Kezić i sur. 2014.), uključujući prehrambenu industriju. Iako nema konkretnih podataka o proizvodnji i primjeni pčelinjeg voska na svjetskoj razini, općenito se

ističe kako je glavna primjena pčelinjeg voska proizvodnja satnih osnova (Svečnjak i sur. 2019a.) kojom se, kako je prethodno opisano, vosak reciklira i nanovo ulazi u tehnologiju pčelarenja.

Pčelinji vosak u farmaceutskoj proizvodnji definiran je kriterijima kakvoće i ima jasnu definiciju (kategoriziran je kao *cera flava* – žuti pčelinji vosak i *cera alba* – bijeli pčelinji vosak). Od kozmetičkih pripravaka pčelinji se vosak koristi u hladnim kremama, dezodoransima, depilatorima, kremama za kosu, balzamima za kosu, maskarama, ruževima i sjenilima za oči i druge svrhe. Pčelinji vosak i ulja osnovni su sastojci koji se u različitim omjerima koriste u kremama, losionima i mastima. Ako se pčelinji vosak pravilno koristi u farmaceutskim formulacijama ne uzrokuje probleme ili začepeljivanje pora. Ima puno pozitivnih svojstava kao što je zacjeljivanje kože, antiseptik je i sredstvo koje ublažava kozmetičke proizvode, poboljšava zaštitno djelovanje od sunca, ne izaziva alergijske reakcije, daje koži elastičnost, svježinu i glatkoću te ima antibakterijska svojstva. Ruževima za usne daje sjaj, konzistenciju i stabilizaciju boje (Bogdanov 2016.).

Pčelinji se vosak koristi i u prehrambenoj industriji. Pčelinji vosak kroz probavni sustav i tijelo prolazi nepromijenjen, no tvari koje su otopljene ili u obliku kapsula se oslobađaju. U Europskoj uniji (EU) pčelinji se vosak koristi kao glazirano sredstvo za slastičarstvo te za pekarske proizvode (Bogdanov 2016.). Kao prehrambeni aditiv dopušten za korištenje u EU nosi naziv E 901, nosač je boja i koristi se kao sredstvo za glazure mnogih pekarskih proizvoda, no nije dopušten kao nosač okusa (EFSA 2007.). Pčelinji vosak kao aditiv E 901 u prehrambenoj industriji služi i kao sredstvo za površinsku obradu voća (svježi agrumi, dinje, jabuke, kruške, breskve, ananas).

Pčelinji vosak dodaje se i u proizvode za poliranje namještaja i lak za drvo (u obliku paste ili tekući) (Bogdanov 2016.). Upotrebljava se za restauraciju slika, kod cijepjenja voćaka u rasadnicima te u izradi muzičkih instrumenata (primjerice za omekšavanje i smanjenje poroziteta usnih dijelova puhačkih instrumenata) (Bogdanov 2004).

2.5.4. Povijest primjene pčelinjeg voska

Izuzetna svojstva pčelinjeg voska zainteresirala su ljude još u davna vremena. Egipćani su pčelinjim voskom mumificirali i balzamirali mumije, koristili su ga za zadržavanje i postojanost kovrčavih perika i za čuvanje svitaka od papirusa i zaštitu slika (Bogdanov 2016.). Figure pčelinjeg voska iz kraljevskih Egipatskih grobnica datiraju 3 400 godina prije Krista (Bogdanov 2004.). Pčelinji vosak spominje se u zapisima na papirusu u Egiptu 1 550. godina prije Krista (Bogdanov 2016.).

U literaturi se navodi kako su u Rimu gorjele svijeće od pčelinjeg voska u čast bogovima i boginjama. Od početka kršćanstva u Europi u crkvi su se koristile svijeće od pčelinjeg voska. Rimokatolička crkva zahtijevala je da se svijeće smiju koristiti samo od 100 % - tnog pčelinjeg voska, zakon je i dalje na snazi, no više nije potrebno da vosak bude 100 % pčelinji. Danas su svijeće od pčelinjeg voska izgubile na popularnosti zbog uvođenja znatno jeftinijeg parafinskog voska (Bogdanov 2016.). Svijeće od pčelinjeg voska od davnina se koriste u vjerskim obredima. Pčelinji vosak ima više talište od većine parafinskih voskova pa svijeće

ostaju ravne na višim temperaturama. Također je znatna prednost svijeća izrađenih od pčelinjeg voska što gore znatno duže od parafinskih svijeća (Bogdanov 2016.).

U povijesnim se zapisima navodi kako je drevni bog Pan, čuvar pčela, spajajući trske i pčelinji vosak izumio glazbeni instrument „Pan’s Pipes“ kroz koji se pušući stvarala glazba. Grčki liječnik Discordies koji se bavio farmakologijom i botanikom, napisao je kako se od pčelinjeg voska izrađivalo umjetno cvijeće. Boje koje su sadržavale vosak na drevnim zidnim staklima i ikonama ostale su nepromjenjive više od 2 000 godina. Grčko-rimski liječnik Klaudije Galen (129.-200. god.) koristio je pčelinji vosak u terapijske svrhe. U najpoznatijoj kineskoj knjizi lijekova „Knjiga biljaka Shen Nong“ iz 1.-2. stoljeća prije Krista piše da je pčelinji vosak poznat kao vrhunski sastojak koji se u kineskoj medicini upotrebljava u mnogim receptima (Bogdanov 2016.).

Kroz povijest pčelinji se vosak koristio kao pečat dokumenata u trgovini i poslovanju, no najpoznatija upotreba pčelinjeg voska u povijesti je *cire-perdue* ili postupak izgubljenog voska. Ta je tehnika korištena u Sumeranskoj, indijskoj, kineskoj i egipatskoj kulturi (Bogdanov 2004). Tijekom povijesti postojale su mnoge hipoteze o podrijetlu pčelinjeg voska. Tako je grčki filozof Aristotel (384. – 322. pr. Kr.) napisao da pčelinji vosak potječe od cvijeća. Njemački znanstvenik 1744. godine daje prvi točan opis podrijetla pčelinjeg voska, opisao je podrijetlo i uporabu voštanih ljuskica (Svečnjak i sur. 2019a.). John Hunter 1792. godine objavljuje da pčele grade saće i da su voštane ljuskice bijele boje i primijetio je da im ne treba pelud da bi napravile vosak. Huberovi pokusi 1814. godine pokazali su da šećer (med) potiče izlučivanje voska (Hepburn 2014.). Tek 1903. godine Dreyling je detaljno opisao proces sinteze pčelinjeg voska od strane pčela (Crane 1999., prema Bogdanov 2016.).

2.6. Kriteriji i kontrola kakvoće pčelinjeg voska

Pčelinji vosak (saće) predstavlja prvu prirodnu ambalažu meda. Međutim, unatoč izravnom kontaktu s medom (hranom), pčelinji vosak koji se koristi u sektoru pčelarstva (satne osnove koje se unose u košnicu) ne podliježe nikakvoj kontroli kakvoće prije stavljanja na tržište (Svečnjak i sur. 2019b.). Bez obzira na to što patvorenje pčelinjeg voska dovodi u pitanje autentičnost i kakvoću pčelinjeg voska, još uvijek ne postoje međunarodno standardizirane analitičke metode za rutinsku kontrolu autentičnosti pčelinjeg voska koji se koristi u pčelarskom sektoru (Svečnjak i sur. 2015.). Za pčelinji vosak koji se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji postoje strogi propisi Europske unije koji definiraju kriterije kakvoće i analitičku metode za njegovo ispitivanje. Međutim, pčelinji vosak koji se koristi u pčelarstvu je prema Uredbi EZ br. 1069/2009 kategoriziran kao nusproizvod životinjskog podrijetla koji nije namjenjen prehrani ljudi te prije stavljanja na tržište nije podvrgnut nikakvoj obaveznoj kontroli kakvoće. Zbog nedostatka zakonske regulative i jasno definiranih kriterija kakvoće, kontaminirani pčelinji vosak nekontrolirano ulazi u tehnologiju pčelarstva (Svečnjak i sur. 2018a). Samo kod pčelinjeg voska koji se koristi kao prehrambeni aditiv E901 (EFSA 2007.) ili kao proizvod u farmaceutskim pripravcima (Vijeće Europe 2020.), primjenjuje se kontrola kakvoće.

Postoje različite međunarodne i nacionalne farmakopeje koje definiraju određene fizikalno-kemijske parametre kao kriterije sastava i kakvoće pčelinjeg voska, no prevladavaju Europska i Američka farmakopeja (Bogdanov 2017.). Razlike u analitičkim vrijednostima

kriterija za pčelinji vosak u spomenutim farmakopejama su male (Svečnjak i sur. 2019a.), a u znanstvenoj se literaturi najčešće koristi metodologija Europske farmakopeje.

U farmaceutskoj i prehrambenoj industriji postoji niz pravnih akata kojima fizikalno-kemijski parametri pčelinjeg voska moraju biti utvrđeni prije upotrebe pčelinjeg voska u navedenim sektorima. Međutim, u pčelarskom sektoru još uvijek ne postoje definirani kriteriji čistoće/kakvoće niti međunarodno propisane (standardizirane) analitičke metode za rutinsku kontrolu kakvoće.

EFSA (2020.) navodi kako su za istraživanje pčelinjeg voska najčešće korištene metode određivanja i s njima povezane vrijednosti točke tališta, saponifikacijskog broja, kiselinskog broja i esterskog broja. Međutim, analitička odstupanja, odnosno vrijednosti izvan predloženih graničnih vrijednosti kiselinskog broja, saponifikacijskog broja, vrijednosti estera i omjera estera/kiselina utvrđena su za nepatvoreni (autentični) pčelinji vosak. Istraživanjima autentičnog pčelinjeg voska (zaperaka) utvrđeno je kako postoje određena odstupanja u graničnim vrijednostima fizikalno-kemijskih parametara propisanim za čisti pčelinji vosak (Bernal i sur. 2005.; Maia i Nunes 2013.; Svečnjak i sur. 2015.). Odstupanja mogu nastati i kod pčelinjeg voska različitog zemljopisnog podrijetla (Beverly i sur. 1995.). Varijacije u sastavu pčelinjeg voska postoje i između zajednica medonosnih pčela (Svečnjak i sur. 2015.; Svečnjak i sur. 2019a.). Istraživanjima je također dokazano kako je minimalna količina najčešćih patvorina pčelinjeg voska (parafin, stearinska kiselina, loj, karnauba vosak) koja se može otkriti fizikalno-kemijskim metodama velika i varira od 2 do 50 % (Bernal i sur. 2005.).

Nadalje, izloženost pčelinjeg voska toplinskoj obradi kao sastavnog dijela procesa proizvodnje satnih osnova može utjecati na analitičke vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara pčelinjeg voska i detekciju patvorenja (saponifikacijski broj, esterski broj, omjer estera/kiseline (Tulloch 1973.)). Uz navedeno, pčelinji vosak se podvrgava toplinskim postupcima, odnosno sterilizaciji visokim temperaturama (do 140 °C, uobičajeno 125 – 130 °C kako bi se uništile spore *P. larvae* koje su otporne na toplinu), što predstavlja sastavni dio procesa izrade satnih osnova. Spomenuta analitička odstupanja mogu se djelomično objasniti i primjenom toplinske obrade (izlaganje voska temperaturama višim od 100 °C može promijeniti vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara) (Tulloch 1973., Svečnjak i sur. 2015., Bogdanov, 2017.). Neke od fizikalno-kemijskih analitičkih metoda u manjoj mjeri korištenih za provjeru autentičnosti pčelinjeg voska (određivanje specifične težine pčelinjeg voska, peroksidnog broja, jodnog broja, refrakcijskog indeksa i sadržaja pepela) sporadično se primjenjuju i zasad ne nalaze primjenu u utvrđivanju kakvoće pčelinjeg voska.

S obzirom na gore navedeno, kod provjere autentičnosti pčelinjeg voska korištenjem fizikalno-kemijskih metoda u obzir bi se trebala uzeti sva navedena odstupanja izvan graničnih vrijednosti definiranih za čisti pčelinji vosak (Svečnjak i sur. 2019a.).

2.6.1. Kontrola kakvoće pčelinjeg voska u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji

Postoje zakonski dokumenti iz Europske unije i FAO/WHO koji daju jasnu definiciju pčelinjeg voska, opisuju ga i daju kriterije čistoće. Pčelinji vosak u farmaceutskom sektoru definiran je u skladu s Europskom farmakopejom – 1. izdanje, dodatak 10.2. (Vijeće Europe 2020.): u prehrambenoj industriji gdje se koristi kao prehrambeni aditiv E901 (Uredba

komisije 2021.; Direktiva komisije 2009., EFSA 2007.). Provjera autentičnosti pčelinjeg voska u ovim sektorima odvija se temeljem određivanja brojnih fizikalno-kemijskih parametara koji definiraju čisti pčelinji vosak.

U Tablici 4. je prikazan usporedni pregled fizikalno-kemijskih parametara koji se primjenjuju kao kriteriji kakvoće u zakonskim aktima vezanim za pčelinji vosak pčelinjem vosku u farmaciji (Vijeće Europe 2020.) te u prehrambenoj industriji gdje se koristi kao prehrambeni aditiv E901 (Direktiva Komisije 2009/10/EC).

Tablica 4. Komparativni pregled fizikalno-kemijskih parametara koji definiraju čistoću pčelinjeg voska prema FAO / WHO (JECFA 2005.), EFSA (2007.) i Europskom zakonodavstvu o prehrambenim aditivima (Direktiva Komisije 2009./10. /EC; Uredba Komisije (EU) 231/2012.), Europskoj farmakopeji (Vijeće Europe 2020.)

Kriterij čistoće	Kemijska i tehnička procjena FAO/WHO (JECFA, 2005)*	EFSA Znanstveno mišljenje (EFSA, 2007)**	Europsko zakonodavstvo o prehrambenim aditivima (2009/10/EC)***	Europska farmakopeja 10.2 (2020)	Europska farmakopeja 10.2 (2020)
				Žuti pčelinji vosak	Bijeli pčelinji vosak
Udio vode (%)	-	-	-	-	-
Točka tališta (°C)	62 – 65	62 – 65	62 – 65	61 – 66	61 – 66
Specifična težina (D2020, g/cm ³):	-	0.96	0.96	0.960	0.960
Refrakcijski indeks (pri 75°C)	-	-	-	-	-
Kiselinski broj (mg KOH/g)	17 – 24	17 – 24	17 – 24	17 – 22	17 – 24
Saponifikacijski broj (mg KOH/g)	87 – 104	87 – 104	87 – 104	87 – 102	87 – 104
Esterski broj (mg KOH/g)	-	-	-	70 – 80	70 – 80
Omjer estera / kiselina	-	-	-	-	-
Peroksidni broj (mM H ₂ O ₂ /kg)	<5	<5	<5	-	-
Glicerol i drugi polioli (%)	<0.5	<0.5	<0.5	Odsutni	Odsutni
Karnauba vosak	Prolazi test			-	-
Cerezin, parafini i drugi voskovi	Prolazi test	Odsutni	Odsutni	Odsutni	Odsutni

Masti, japanski vosak, smole i sapuni	Prolazi test	Odsutni	Odsutni	Odsutni	Odsutni
Arsen (mg/kg)	-	<3	<3	-	-
Olovo (mg/kg)	<2	<5	<5	-	-
Živa (mg/kg)	-	<1	<1	-	-

*FAO/WHO (JECFA 2005.) - Joint FAO/WHO *Expert Committee on Food additives* - znanstvena savjetodavna skupina koja procjenjuje prehrambene additive utemeljena kao suradnja Organizacije za prehranu i poljoprivredu (FAO) i Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). Temeljni zadatak JECFA-e je kontrola kemikalija u hrani i zaštita zdravlja potrošača – “Pčelinji vosak - Kemijska i tehnička procjena”

** EFSA Znanstveno mišljenje panela o prehrambenim aditivima, aromama, procesnim pomagalima i materijalima u dodiru s hranom (AFC) – “Pčelinji vosak (E 901) kao sredstvo za glaziranje i kao nosač okusa”

***Direktiva Komisije 2009/10 /EC o izmjeni i dopuni Direktive 2008/84 / EZ o utvrđivanju posebnih kriterija čistoće za prehrambene aditive koji nisu boje i zaslađivači;

Uredba Komisije (EU) 231/2012. o utvrđivanju specifikacija za prehrambene aditive navedene u prilogima II. i III. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća

Izvor: EFSA 2020.; tablica modificirana prema Svečnjak sur. 2019a.

2.6.2. Kontrola kakvoće pčelinjeg voska u pčelarskom sektoru

Kako je prethodno navedeno, u pčelarskom sektoru još uvijek ne postoje definirani kriteriji čistoće/kakvoće niti međunarodno propisane (standardizirane) analitičke metode za rutinsku kontrolu kakvoće (čistoće) pčelinjeg voska namijenjenog primjeni u pčelarstvu (satne osnove i blokovi voska za njihovu izradu).

Međunarodna komisija za med (engl. *International Honey Commission* - IHC) je 2009. godine prvi put dala prijedlog kriterija kakvoće za pčelinji vosak koji se koristi u pčelarstvu temeljem 10 fizikalno- kemijskih parametara (Bogdanov 2009., 2017.), kako je prikazano u Tablici 5. Kriteriji su primarno bili temeljeni na standardima Europske farmakopeje (Vijeće Europe 2011.), ali su nadopunjeni dodatnim parametrima (sadržaj vode, refrakcijski indeks, mehaničke nečistoće, aditivi i sadržaj ugljikovodika). Prijedlog IHC-a nikad nije usvojen jer nema dovoljno znanstvenih dokaza za većinu dodatnih predloženih parametara kao pouzdanih kriterija kakvoće (EFSA 2020.). Tijekom proizvodnog procesa izrade satnih osnova pčelinji vosak izlaže se postupku sterilizacije pri temperaturi iznad 100° C. Nakon izlaganja pčelinjeg voska visokim temperaturama vrijednosti određenih fizikalno-kemijskih parametara (naročito kiselinskog, esterskog i saponifikacijskog broja) odstupaju od graničnih vrijednosti definiranih farmakopejom. Shodno tome, predložene granične vrijednosti i predložene kriterije kakvoće u sektoru pčelarstva potrebno je redefinirati jer su nepouzdan (Svečnjak 2018b.).

Tablica 5. Kriteriji kakvoće za rutinsko ispitivanje pčelinjeg voska predloženi od strane Međunarodne komisije za med

Kriterij kakvoće	Vrijednosti	Metode
Sadržaj vode	<1 %	DGF-M-V-2 *
Indeks refrakcije (na 75°C)	0,4398 – 1,4451	EP **
Točka tališta	61 – 65°C	EP
Kiselinski broj	17 – 22	EP
Esterski broj	70 – 90	EP
Omjer esterskog i kiselinskog broja	3,3 – 4,3	
Saponifikacijski broj	87 – 102	EP
Mehaničke nečistoće, aditivi	Odsutni	DGF-M-V-3
Gliceroli, polioli, masne kiseline	Odsutni	EP
Ugljikovodici	Max. 14,5 % ***	DGF-M-V-6

*DGF-M-V-2,3,6 – „Methods of Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft“ (Njemačko društvo za istraživanje lipida)

** EP – Europska farmakopeja, 7. izdanje, 2008.

*** Vosak afričkih pčela: max. 13,8

Izvor: Bogdanov 2009./2017.

Na tragu pronalaženja rješenja ovog problema, a s ciljem postavljanja jasno definiranih i pouzdanih kriterija čistoće za pčelinji vosak u sektoru pčelarstvu, našao se nedavno objavljeno Tehničko izvješće i prijedlog kriterija čistoće za pčelinji vosak Europske agencije za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority – EFSA 2020.*). Navodeći rezultate recentnog istraživanja kojim su validirane analitičke metode za utvrđivanje autentičnosti, odnosno detekciju patvorina u pčelinjem vosku (Svečnjak i sur. 2020.), EFSA ističe kako je za pouzdanu detekciju i kvantifikaciju patvorina u pčelinjem vosku potrebno primijeniti instrumentalne analitičke metode, odnosno kako isključiva upotreba fizikalno-kemijskih analiza nije dovoljna za otkrivanje patvorina i ne jamči čistoću pčelinjeg voska. Stoga bi ispitivanje čistoće pčelinjeg voska namijenjenoga primjeni u pčelarstvu (satne osnove, blokovi voska za njihovu izradu) trebalo obuhvaćati korištenje najmanje dvije fizikalno-kemijske metode u kombinaciji s jednom ili više kromatografskih i/ili spektroskopskih metoda (HTGC-FID, HTGC-MS ili FTIR-ATR; pojašnjenja skraćenica navedena su u nastavku teksta pod poglavljem „2.8. Analitičke metode za utvrđivanje patvorenja pčelinjeg voska“) kako bi se pouzdano detektirale i kvantificirale patvorine. Prijedlog EFSA-e trenutno je u razmatranju od strane Europske komisije.

Tablica 6. Kriteriji čistoće za pčelinji vosak namijenjen primjeni u pčelarstvu

Kriterij čistoće	Vrijednost	Metoda*
Točka tališta (°C)	61 – 65	<i>Ph. Eur.</i>
Specifična težina	0.950 – 0.960	<i>Ph. Eur.</i>
Kiselinski broj (mg KOH/g)	17 – 24	<i>Ph. Eur.</i>
Esterski broj (mg KOH/g)	70 – 90	<i>Ph. Eur.</i>
Saponifikacijski broj (mg KOH/g)	87 – 104	<i>Ph. Eur.</i>
Mehaničke nečistoće	Odsutne	Vizualni pregled
Parafin	Odsutan	GC-MS, (HT)GC-FID, FTIR-ATR
Stearin / stearinska kiselina	Odsutni	(HT)GC-FID/GC-FID (MS), FTIR-ATR
Ostale patvorine	Odsutne	GC-MS, (HT)GC-FID/GC-FID (MS), FTIR-ATR

Izvor: EFSA 2020.

2.7. Patvorenje pčelinjeg voska

2.7.1. Definicija patvorenja

Patvorenje je svako namjerno mijenjanje svojstava i kemijskog sastava nekog proizvoda dodavanjem tvari koje inače nisu u njegovom sastavu i zbog kojih je namirnica neprikladna, nepoželjna i/ili opasna po zdravlje. Patvorenje se može definirati i kao namjerno degradacija kakvoće proizvoda dodavanjem jeftinijih supstanci, a s ciljem stjecanja protupravne koristi. Patvorine su proizvodi naizgled slični pravim, ali imaju manju vrijednost. Pojam patvorine najčešće se odnosi na namirnice, kozmetiku, lijekove, odjeću, obuću i tehničku robu. Patvori se velik broj proizvoda. Vinu, pivi i mlijeku dodaju se razrijeđeni i nedopušteni aditivi ili se miješaju kvalitetni s manje kvalitetnim proizvodima. Meso se patvori dodavanjem soli, manje kvalitetnog mesa i loja te začina. Kolačima se umjesto jaja dodaju umjetna bojila žute boje, medu šećerni sirupi, dok se maslinovo ulje miješa s manje kvalitetnim uljima. Patvorenje namirnica, kozmetičkih proizvoda i lijekova zakonski je kažnjivo.

Patvorenje pčelinjeg voska mijenja njegov sastav čime se narušava dobrobit pčelinje zajednice, a u pitanje se dovodi javno zdravlje i ispravnost proizvoda od pčelinjeg voska (Svečnjak 2018b.).

2.7.2. Problem patvorenja pčelinjeg voska

Zbog relativno visoke cijene na tržištu pčelinji je vosak česta meta patvorenja (Svečnjak i sur. 2019a). Jedan od glavnih ekonomskih problema suvremenog pčelarstva je marketing satnih osnova (Tanner i Lichtenberg-Kraag 2019.). Deklaracija satnih osnova na tržištu uobičajeno ne ukazuje na to da osnove sadrže strane tvari/patvorine. Patvorenje može otežati

vrcanje, ugroziti dobrobit pčelinje zajednice zbog narušenih uvjeta za komunikaciju unutar pčelinje zajednice te negativno utjecati na normalan fiziološki razvoj legla (Reybroeck i Van Nevel 2018.).

Mnoga istraživanja ukazuju na to da je tržište satnih osnova preplavljeno patvorenim materijalom što predstavlja gorući i rastući problem širom svijeta (Tulloch 1973., Bogdanov 2004., Serra Bonvehi i Orantes Bermejo 2012., Maia i sur. 2013., Svečnjak i sur. 2015., Waś i sur. 2016., Reybroeck i Van Nevel 2018., Tanner i Lichtenberg-Kraag 2019., Svečnjak i sur. 2019b., Svečnjak i sur., 2020. EFSA 2020.). Krajem 2017. godine Europska komisija, odnosno Sustav mreže protiv prijevare hranom (engl. *EU Food Fraud Network* – FFN) ističe niz problema vezanih za EU tržište pčelinjeg voska i pojavu patvorenja:

- Nedostatne količine pčelinjeg voska na tržištu
- Zbog visokih cijena prirodnog pčelinjeg voska dolazi do dodavanja stranih tvari (u EU najčešće: stearin i parafin)
- Nedostatne količine pčelinjeg voska za pokrivanje potreba europskog tržišta
- Neprimjerena deklaracija i marketing pčelinjeg voska koji ne ukazuju na to da vosak sadrži parafin, stearin i druge patvorine (EU FFN 2017.).

Svečnjak (2018.) ističe i sljedeće čimbenike zbog kojih je tržište preplavljeno patvorenim materijalom:

- Zakonski propisi vezani za EU tržište i pčelinji vosak neusklađeni su i ne provode se
- Nedostatak rutinske kontrole kakvoće (pčelinji vosak koji se koristi za izradu satnih osnova ne podliježe kontroli, odnosno analitičkom ispitivanju autentičnosti prije stavljanja na tržište)
- Analitičke metode za ispitivanje pčelinjeg voska neusklađene su i dostupnost im je ograničena
- Neetičnost i neodgovornost poslovanja dionika prilikom proizvodnje i distribucije satnih osnova.

2.7.3. Patvorine pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu

Patvorenje pčelinjeg voska datira unatrag nekoliko desetljeća, no o njemu se učestalo izvještava posljednje desetljeće. Danas na tržištu postoji više od 15 supstanci kojima se pčelinji vosak patvori. Te supstance mogu biti različitog podrijetla (biljnog, životinjskog, mineralnog i sintetski voskovi), no najzastupljenije su različiti tipovi parafina (Bogdanov 2017., Svečnjak i sur. 2019a.). Parafin je gotovo idealan za patvorenje zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava (kemijski je inertan, bez intenzivnog mirisa, bijele boje ili bezbojan), cijena mu je niska i lako je dostupan). Ostale supstance, poput stearina i/ili stearinske kiseline, loja (goveđeg i ovčjeg), mikrokristalnog voska i drugih patvorina, u pčelinjem su vosku orkrivene sporadično. O prisutnosti patvorina u satnim osnovama diljem svijeta izvijestili su mnogi znanstvenici u sljedećim istraživanjima:

Serra Bonvehi i Orantes Bermejo (2012.) proveli su istraživanje na 90 uzoraka španjolskog komercijalnog pčelinjeg voska (*A. mellifera*). Utvrđivali su fizikalne i kemijske parametre (točku tališta i saponifikacijski broj), udio ugljikovodika, monoestera, kiselina i alkohola. Za utvrđivanje patvorenja korišteni su parafini različite točke tališta, loj, stearinska kiselina i karnauba vosak. Za ispitivanje je korištena HTGC – FID/MS metoda, a istraživanje je bilo

usredotočeno na parafine i mikrokristalne voskove. Granice detekcije određene su pomoću čistog i patvorenog pčelinjeg voska u koji su dodane različite količine patvorina (5, 10, 20, 30 %). Autori su utvrdili kako se u istraživanim uzorcima može otkriti od 1 do 5 % patvorina, a parafinski voskovi potvrđeni su u 33 od ukupno 90 analiziranih uzoraka u postocima između 5 i 30 %.

Znanstvenici iz Portugala (Maia i sur. 2013.) proveli su preliminarno istraživanje kojim su primijenili metodu infracrvene spektroskopije za otkrivanje patvorenja pčelinjeg voska. Metoda pouzdano detektira najčešće patvorine pčelinjeg voska (parafin, mikrokristalni vosak, loj i stearinsku kiselinu). Cilj istraživanja bio je utvrditi granice detekcije, odnosno najmanju količinu patvorina koja se ovom metodom može otkriti pa se ispitivao udio patvorina od 0,5 – 30%. Uzorci čistog pčelinjeg voska odvojeno su pomiješani sa sljedećim količinama patvorina: 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 5,0 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %. Ovim je preliminarnim istraživanjem utvrđeno kako granice detekcije za većinu patvorina iznose do 5 %.

Pomoću GC-MS metode Waš i sur. (2016.) analizirali su uzorke pčelinjeg voska s dodatkom parafina (3, 5, 10, 30, 50 %). Cilj istraživanja bio je usporedba sastava ugljikovodika različitih vrsta parafina. Rezultati analize su pokazali da se vrste parafina koje su dostupne na tržištu razlikuju u sastavu ugljikovodika. U svim vrstama parafina pronađene su homologne serije n-alkana duže od onih koje se nalaze u pčelinjem vosku. Na patvorenje pčelinjeg voska parafinom ukazuje prisutnost ugljikovodika koji sadrže preko 35 atoma ugljika u molekuli i sadržaj n-alkana ($C_{20}H_{42}$ – $C_{35}H_{72}$) koji je veći u usporedbi s maksimalnim sadržajem u čistom pčelinjem vosku. U ovom istraživanju minimalni postotak parafina koji je bilo moguće otkriti GC-MS metodom bio je 3 %.

U znanstvenom radu „An approach for routine analytical detection of beeswax adulteration using FTIR-ATR spectroscopy“ razrađena je analitička metoda za kvalitativno i kvantitativno utvrđivanje patvorina u pčelinjem vosku primjenom infracrvene (FTIR-ATR) spektroskopije. Cilj je ovog istraživanja bio uspostaviti analitičku proceduru pogodnu za rutinsko otkrivanje patvorenja pčelinjeg voska pomoću FTIR-ATR spektroskopije. Tom metodom Agronomski fakultet u Zagrebu od 2015. godine prati situaciju na tržištu pčelinjeg voska (satnih osnova) na nacionalnoj i međunarodnoj razini. Za utvrđivanje kalibracijskih krivulja korišteni su referentni IR spektri čistog pčelinjeg voska, parafina i smjesa koje sadrže različite postotke parafina i govedeg loja (5 – 95 %). Uzorci satnih osnova (n=56) su prikupljeni s međunarodnog tržišta, a rezultati su otkrili da je većina analiziranih uzoraka (89 %) bila patvorena parafinom: 11 % uzoraka identificirano je kao čisti pčelinji vosak, 28 % uzoraka sadržavalo je > 46 % parafina, a većina analiziranih uzoraka (oko 50 %) bila je patvorena s 5 – 20 % parafina. Metoda je daljnjim istraživanjima nadograđena i optimizirana (Svečnjak i sur. 2019a.).

Na međunarodnom kongresu EURBEE 8 koji je bio održan u Gentu (Belgija) od 18-20. rujna 2018. godine predstavljena su 2 istraživanja o negativnim aspektima patvorenja pčelinjeg voska. Jedno istraživanje dotiče se utjecaja patvorenja satnih osnova stearinom (mješavina stearinske i palmitinske kiseline) na razvoj radilačkog legla (Reybroeck i Van Nevel 2018.) kojim je dokazano da patvorenje pčelinjeg voska ima negativan utjecaj na pčelinju zajednicu. Belgijski pčelari tijekom 2016. godine apelirali su na problem vezan za slab razvoj pčelinje zajednice i gubitke pčela nakon stavljanja komercijalno dostupnih satnih osnova u zajednice.

Nakon analize istih satnih osnova utvrđeno je da je pčelinji vosak bio patvoren stearinom (20 - 30 %). Reybroeck i Van Nevel (2018.) s Flanders Instituta za poljoprivredu, ribarstvo i hranu (engl. *Flanders Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food – ILVO*) proveli su pokuse na pčelinjim zajednicama kako bi ispitali dovodi li dodavanje stearina u pčelinji vosak do mortaliteta u pčelinjoj zajednici. U različitim koncentracijama (15, 20, 25, 30, 35 i 40 %) dodavali su stearin u pčelinji vosak koji je u obliku satnih osnova stavljen u košnice. Nakon što je matica polegla jajašca u saće koje su pčele izgradile na patvorenim satnim osnovama, pratili su daljnji razvoj legla i izračunali postotak preživjelih jedinki. Rezultati istraživanja pokazali su da je prosječna najniža smrtnost iznosila 49 % (kada je udio stearina u vosku bio 15 %), dok je najviša prosječna smrtnost iznosila 71 % (kada je udio stearina u vosku iznosio 35 %). Rezultati su pokazali da dodatak stearina u pčelinji vosak ima štetan učinak na pčele i nije prikladan za upotrebu u pčelarskom sektoru.

Drugo istraživanje odnosi se na stanje na tržištu satnih osnova temeljem uzoraka koji su prikupljeni iz 15 zemalja Europe (Svečnjak i sur. 2018a.). U navedenom se istraživanju u razdoblju od 2016. do 2018. prikupilo 137 uzoraka satnih osnova (ili blokova voska koje su korištene za proizvodnju satnih osnova) u svrhu ispitivanja kakvoće pčelinjeg voska prisutnog na EU tržištu. Uzorci su prikupljeni iz 15 europskih zemalja, 13 članica EU (Austrija, Belgija, Francuska, Hrvatska, Italija, Latvija, Mađarska, Nizozemska, Njemačka, Rumunjska, Slovenija, Švedska, Velika Britanija) i dvije zemlje izvan EU (Bosna i Hercegovina, Srbija). Uzorci su analizirani FTIR-ATR spektroskopijom. Rezultati istraživanja pokazali su kako je 67,2 % analiziranih uzoraka pčelinjeg voska bilo patvoreno parafinom i stearinskom kiselinom i/ili stearinom. Od ukupno 137 uzoraka prisutnost različitih udjela parafina (5 – 93,5 %) pronađena je u 82 uzorka, dok je stearinska kiselina otkrivena u 10 uzoraka. Ovi rezultati ukazuju na hitnu potrebu za donošenjem zakonske regulative kojom će se kontrolirati kakvoća pčelinjeg voska u pčelarskom sektoru EU.

Korištenjem iste metode (FTIR-ATR) njemački znanstvenici Tanner i Lichtenberg-Kraag (2019.) analizirali su 358 uzoraka pčelinjeg voska. Uzorci pčelinjeg voska koji su patvoreni s više od 5 različitih patvorina identificirani su s istom točnošću kao i uzorci pčelinjeg voska u kojima je otkrivena samo jedna patvorina. U pojedinačnim i višestruko patvorenim uzorcima pčelinjeg voska otkriveni su parafin, stearinska kiselina, loj, karnauba vosak i vosak kandelile. Najveći broj analiziranih uzoraka bio je podrijetlom iz Njemačke (n=273). U 16,1 % uzoraka otkrivene su sljedeće patvorine: 10,9 % sadržavalo je parafin, 6,2 % stearinsku kiselinu, 0,7 % loj i 1,8 % više patvorina (parafin + stearinska kiselina, loj + stearinska kiselina). Analizirani su uzorci koji potječu s međunarodnog tržišta (uzorci s europskog tržišta n=303; uključujući i njemačko tržište); drugih zemalja svijeta (n=12) i uzorci čije podrijetlo nije bilo poznato (n=43). Od ukupno 358 analiziranih uzoraka, za 21, 8% uzoraka pokazalo se da su patvoreni. Rezultati istraživanja pokazali su kako je 54,2 % istraživanih uzoraka sadržavao postotak patvorina manji od 5 %. Rezultati su također pokazali kako je najistaknutija patvorina parafin (pronađen u 13,4 % uzoraka), a slijedi stearinska kiselina (5,3 % uzoraka). U 2 % uzoraka pronađeno je više patvorina. Autori su analizirali i interpretirali još 14 različitih prirodnih i sintetičkih voskova, a rezultati će se koristiti za daljnja istraživanja.

2.7.4. Parafin

Parafin se dobiva iz nekih frakcija nakon destilacije nafte. Nakon hlađenja frakcija na temperaturu oko -40 °C dolazi do izlučivanja parafinskog voska koji se odvaja filtracijom. Iz parafinskog voska dobiva se čisti parafin, cerezin i vazelin. Čvrsti parafin je mikrokristalna bijela tvar, smjesa n-alkana, odnosno parafinskih ugljikovodika s 18 do 35 ugljikovih atoma, tališta od 45 do 55 °C. Smjese alkana koje sadrže manje od 5 atoma ugljika na sobnoj temperaturi su plinovitog stanja, one koje imaju 5 do 17 atoma ugljika su tekućine, a n-alkani s više od 17 ugljikovih atoma su krute tvari (EFSA 2020.). Parafin se upotrebljava za izradu svijeća, voštanog papira, za impregnaciju tkanina i kože. EFSA (2020.) navodi kako se koriste u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji u skladu s točno navedenim specifikacijama i u jasno definiranim maksimalno dozvoljenim količinama.

Parafin predstavlja najveći problem i najučestalija je patvorina pčelinjeg voska zbog široke dostupnosti, niske cijene i fizikalno-kemijskih svojstava (kemijski inertan, bijele ili bezbojne tvari bez mirisa) koji ga čine „idealnim“ za patvorenje (Svečnjak 2015b.).

2.7.5. Stearin/stearinska kiselina

Komercijalno dostupan stearin je najčešće mješavina masnih kiselina, odnosno stearinske i palmitinske kiseline (u raznim omjerima). Kemijski, stearin je glicerol tristearat, triglicerid u kojem su sva tri glicerola hidroksila esterificirana stearinskom kiselinom. Također, stearin može biti zajednički naziv za stearinsku kiselinu ili smjesu stearinske i palmitinske kiseline. Dobiva se iz masti ili ulja biljnog ili životinjskog podrijetla. Stearin dobiven iz biljnih ulja ili masti primjenjuje se u prehrambene svrhe, dok stearin životinjskog podrijetla nije namijenjen za prehranu ljudi te spada pod Uredbu (EZ) br. 1069/2009 (EFSA 2020.). Koristi se u proizvodnji svijeća i sapuna.

Za patvorenje pčelinjeg voska najčešće se koristi čista stearinska kiselina (uglavnom životinjskog podrijetla) ili stearin kao mješavina stearinske i palmitinske kiseline. Ove su supstance kemijski vrlo slične, stoga se kod otkrivanja patvorenja voska ovim supstancama za iste uobičajeno koristi termin „stearin/stearinska kiselina“ (Svečnjak i sur. 2020.; EFSA 2020.).

2.7.6. Negativni učinci patvorenja pčelinjeg voska

Pčelinji vosak (saće) je prva prirodna ambalaža meda, odnosno prirodni medij u kojem se skladišti med i gdje dozrijeva (med dolazi u izravni kontakt s pčelinjim voskom). Iako su pčelinji vosak i med (hrana) u izravnom kontaktu, pčelinji vosak u sektoru pčelarstva ne podliježe obaveznoj kontroli kakvoće prije stavljanja na tržište. Posljednjih godina intenzivno se govori o negativnim učincima patvorenja pčelinjeg voska. Destrukcija saća, narušena kemijska i mehanička komunikacija unutar pčelinje zajednice, narušeni uvjeti za normalan fiziološki razvoj legla i skladištenje hrane te utjecaj na sastav i kakvoću meda glavni su negativni faktori koji imaju štetan utjecaj na pčelinju zajednicu (Svečnjak 2019.). Europska komisija, odnosno Sustav mreže protiv prijevare s hranom (engl. *EU Food Fraud Network*

FFN) krajem 2017. godine ukazao je na ozbiljnost problema patvorenja pčelinjeg voska. FFN ukazuje na to kako negativni učinci patvorenja pčelinjeg voska dovode u pitanje i javno zdravlje s obzirom na to da je med koji ulazi u prehrambeni lanac u izravnom dodiru s pčelinjim voskom (saćem) (EU FFN 2017.). Istraživanjem utjecaja patvorenja pčelinjeg voska na med dokazano je kako patvorenje pčelinjeg voska ima negativan utjecaj na sastav i kakvoću meda (Svečnjak i sur. 2019b.). Ovim je istraživanjem predstavljen prvi i zasad jedini znanstveni dokaz o negativnom učinku patvorenja pčelinjeg voska na med. Rezultati ovog istraživanja ukazuju kako med koji je skladišten u saću izgrađenom na satnim osnovama patvorenim s 90 % parafina sadrži statistički viši udio vode te niži omjer glukoze/vode i viši udio octene i limunske kiseline u odnosu na med koji je dozrijeva u čistom pčelinjem vosku. Rezultati ukazuju kako kod meda koji dozrijeva u saću izgrađenom na parafinskim satnim osnovama dolazi do kemijskih promjena u procesu dozrijevanja, posebno u vidu podložnosti meda fermentaciji i intenzivnijim oksidativnim procesima.

2.8. Analitičke metode za utvrđivanje patvorenja pčelinjeg voska

Analitičke metode za utvrđivanje kakvoće pčelinjeg voska podijeljene su na klasične fizikalno-kemijske metode te instrumentalne, odnosno kromatografske i spektroskopske analitičke metode. Kao što je već navedeno, fizikalno-kemijske metode ne omogućuju pouzdanu detekciju patvorina u pčelinjem vosku. Bernal i sur. (2005.) navode kako je minimalna količina najčešće korištenih patvorina (parafin, stearin, stearinska kiselina, loj, karnauba vosak) koja se može otkriti fizikalno-kemijskim metodama relativno visoka (između 2 % i 50 %) pa određivanje fizikalno-kemijskih parametara ne garantira odsutnost patvorina. Uz navedeno, fizikalno-kemijske metode karakteriziraju i drugi nedostaci koji su opširnije opisani u poglavlju „Kriteriji kakvoće pčelinjeg voska“.

Tijekom posljednja dva desetljeća razvijene su dvije instrumentalne analitičke metode za pouzdanu kvalitativno i kvantitativno (LoD i LoQ: < 5 %) otkrivanje patvorina u pčelinjem vosku: plinske kromatografija (u kombinaciji s dva detektora - spektrometrija masa ili plameno-ionizacijski detektor) i infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom.

Za pouzdanu detekciju patvorina u pčelinjem vosku preporučuje se utvrđivanje najmanje dva fizikalno-kemijska parametra uz potvrdu instrumentalnim metodama (EFSA 2020., Svečnjak i sur. 2020.).

2.8.1. Plinska kromatografija (GC) – masena spektrometrija (MS)

Plinska kromatografija-masena spektrometrija (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) primarno je razvijena za utvrđivanje ugljikovodika u pčelinjem vosku, a opisali su je Waš i sur. (2014a.). Waš i sur. (2015., 2016.) su GC-MS metodu dalje razvijali za otkrivanje patvorenja pčelinjeg voska ugljikovodicima stranog podrijetla (parafin ili cerezin). Razrađena analitička procedura omogućuje identifikaciju ugljikovodika pčelinjeg voska (alkani, alkeni i dieni) i kvantifikaciju n-alkana stranog podrijetla, no metoda nije primijenjena za detekciju stearina i/ili stearinske kiseline (Svečnjak i sur. 2020.).

2.8.2. Plinska kromatografija (GC) s plameno-ionizacijskim detektorom (FID)

Jiménez i sur. (2009.) i Serra Bonvehí i Orantes Bermejo (2012.) predstavili su analitičku metodu za određivanje patvorina pčelinjeg voska primjenom plinska kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (engl. *gas chromatography with flame ionization detector*, GC-FID) Jiménez i sur. (2009.) koristili su visokotemperaturnu plinsku kromatografiju (HTGC) s plameno-ionizacijskim detektorom i utvrdili minimalan postotak patvorenja s tri parafina različitih točki tališta te s goveđim lojem, stearinskom kiselinom i karnauba voskom. Koncentracije 93 endogenih sastojaka pčelinjeg voska (alifatski ugljikovodici, olefini, kiseline, monoesteri, alkoholi i hidrosikiseline) izmjerene su u odnosu na interni standard (oktadeal oktadekanoat) u smjesama pčelinjeg voska s 5, 10, 20 i 30 % patvorina. Jedna od glavnih prednosti GC-FID metode je što je primjenjiva na sve vrste patvorina.

Serra Bonvehí i Orantes Bermejo (2012.) proveli su istraživanje s ciljem utvrđivanja patvorenja pčelinjeg voska različitih točki tališta s goveđim lojem, stearinskom kiselinom i karnauba voskom kako bi otkrili spojeve indikativne za patvorine. Koristili su HTGC-FID i HTGC-MS metodu. Granice detekcije određene su pomoću čistog i patvorenog pčelinjeg voska s različitim količinama dodanih patvorina (5, 10, 20 i 30 %). U smjesama su utvrđene granice detekcije od 1 % za stearinsku kiselinu i 5 % za parafin.

Maia i Nunes su u daljnjim istraživanjima (2013.) potvrdili kako se HTGC-FID metodom može razlikovati autentični i patvoreni pčelinji vosak. Ovo je istraživanje bilo ograničeno na otkrivanje parafina.

2.8.3. Infracrvena (IR) spektroskopija

Spektroskopija je znanost koja proučava međudjelovanje elektromagnetskog zračenja i materije, u mnogim granama prirodnih znanosti koristi se u analitičke svrhe jer daje informacije o građi i sastavu tvari. Infracrvena (engl. *infrared*, IR) spektroskopija kao fizički medij za ispitivanje molekularne strukture uzoraka koristi infracrveno zračenje (Svečnjak 2015a.).

Kada uzorak apsorbira IR zračenje molekule počinju vibrirati točno određenim amplitudama (molekule dobivaju energiju) i daju širok spektar vibracijskih modova koji su karakteristični za funkcionalne skupine molekula. U spektru elektromagnetskog zračenja infracrveni dio kreće se od 0,8 do 1000 μm (800 nm – 1 mm) valne duljine. Frekvencija je još jedan parametar koji obilježava valno gibanje, a predstavlja broj titraja polja u sekundi (mjerna jedinica je Hz). Infracrveni dio proteže se od 375 THz do 300 GHz. U IR spektroskopiji najčešća je mjerna jedinica valni broj. Valni broj je recipročna vrijednost valne duljine ($1/\lambda$) izražena u recipročnim centimetrima (cm^{-1}) (Svečnjak 2015.). Prema valnom broju, infracrveni dio spektra pokriva raspon od 12 500 do 10 cm^{-1} : daleko IR područje ($< 400 \text{ cm}^{-1}$), srednje IR područje (4 000 – 400 cm^{-1}) i blisko IR područje (12 500 – 4 000 cm^{-1}) (Günzler i Gremlich 2006.). IR spektroskopija je metoda koja nosi informacije o ukupnom kemijskom sastavu uzorka. Apsorbiranjem IR zračenja pobuđuju se molekulska gibanja (vibracije) u uzorku, molekule vibriraju u određenim amplitudama i to se očituje u

karakterističnom IR spektru uzorka – mjerenju rezultata. IR spektar uzorka predstavlja tzv. „otisak prsta“ (engl. *fingerprint*), tu su signali najbrojniji i razlika između rezultata najistaknutija (Svečnjak 2015a.).

Birshtein i Tul'chinskii su 1977. godine prvi primijenili IR spektroskopiju za analizu pčelinjeg voska, a primarno su istraživali osnovni sastav pčelinjeg voska. Maia i sur. (2013.) doveli su do znatnog napredka u spektroskopskom istraživanju pčelinjeg voska. U analitiku pčelinjeg voska uveli su FTIR-ATR (engl. *Fourier - transform infrared spectroscopy* – FTIR; *attenuated total reflectance* – ATR) tehniku snimanja spektara, a cilj im je bio otkriti patvorine u pčelinjem vosku koristeći brzu, jeftinu i nedestruktivnu analitičku metodu. Maia i sur. (2013.) razvili su FTIR-ATR metodu bez korištenja reagensa za otkrivanje patvorina pčelinjeg voska i utvrdili su niske granice detekcije (0,5 – 5 %) za 4 najčešće korištene patvorine pčelinjeg voska: parafin, mikrokristalni vosak, goveđi loj i stearinsku kiselinu.

Ova je metoda daljnjim istraživanjima modificirana u smislu bržeg snimanja spektara, drugačijeg pristupa obradi spektralnih podataka i izradi boljih kalibracijskih krivulja (Svečnjak i sur. 2015.) s granicom detekcije patvorina ispod 3 %. Svečnjak i sur. (2019a.) su nadalje optimizirali metodu za detekciju parafina, goveđeg loja, karnauba voska i stearinske kiseline. Također, autori u ovom istraživanju navode kako se spektralna područja indikativna za detekciju stearinske kiseline u pčelinjem vosku mogu koristiti i za otkrivanje palmitinske kiseline i stearina u radi sličnih (gotovo istih) spektralnih značajki. Na temelju daljnje primjene FTIR-ATR metode (Tanner i Lichtenberg-Kraag 2019.) utvrđeno je kako je metoda pouzdana i za detekciju višestrukog patvorenja, odnosno za detekciju patvorenja u slučaju kada uzorci sadrže više od jedne patvorine. Tako su Tanner i Lichtenberg-Kraag utvrdili kako se pet patvorina (parafin, stearinska kiselinu, goveđi loj, karnauba vosak i kandelila vosak) u jednom patvorenom uzorku pčelinjeg voska mogu otkriti i kvantificirati s jednakom preciznošću i točnošću kao i u slučaju kada je pčelinji vosak patvoren s jednom tvari (patvorinom).

2.8.4. FTIR-ATR tehnika snimanja spektara

Spektroskopija u srednjem infracrvenom dijelu spektra s Fourierovom transformacijom (eng. *Fourier transform infrared spectroscopy* u kombinaciji s prigušenom totalnom refleksijom, odnosno ATR (eng. *attenuated total reflectance*) tehnikom je metoda snimanja IR spektara uzoraka koja omogućuje kvalitativno i kvantitativno utvrđivanje svih vrsta patvorina u pčelinjem vosku. FTIR-ATR tehnika snimanja ima brojne prednosti u odnosu na konvencionalnu (disperzivnu) spektroskopiju. FTIR spektrometri koriste interferometar temeljen na matematičkom principu Fourierove transformacije te tako vrijeme mjerenja brže, a dobiveni rezultati mjerenja su visoke kvalitete (preciznost, pouzdanost) (Svečnjak i sur. 2019a).

Pomoću ATR instrumentalnog dodatka znatno se pojednostavljuje postupak analize uzorka pčelinjeg voska; uzorak se analizira u izvornom stanju (krutom ili tekućem), a da pri tome nije potrebna prethodna priprema uzorka (ATR tehnika omogućuje učinkovito prodiranje IR zračenja u uzorak (između 0,5 i 5 μm) bez obzira na debljinu uzorka. Također, mala količina uzorka (1g) dostatna je za analizu. U ATR spektroskopiji koristi se unutarnja refleksija; snop zračenja koji ulazi u ATR kristal podvrgnut je potpunoj unutarnjoj refleksiji

kada je upadni kut na granici između kristala i uzorka veći od kritičnog kuta. Kristali korišteni u ATR instrumentalnim dodacima izgrađeni su od optički gustih materijala koji imaju visok indeks loma svjetlosti (dijamant, germanij (Ge), cinkov selenid (ZnSe)). Dijamant se smatra najboljim materijalom zbog izdržljivosti (tvrdoće), kemijske inertnosti i robusnosti (Svečnjak i sur. 2019).

3. Materijali i metode

3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka za analizu

Uzorci pčelinjeg voska (satnih osnova i blokova voska namijenjenih za njihovu proizvodnju) prikupljeni su iz 33 zemlje svijeta (iz 16 zemalja članica Europske unije – Austrija, Belgija, Češka, Cipar, Francuska, Hrvatska, Italija, Latvija, Luksemburg, Mađarska, Nizozemska, Njemačka, Poljska, Rumunjska, Slovenija, Španjolska i Švedska; drugih zemalja s područja Europe - Bosna i Hercegovina, Crna Gora, Srbija i Ujedinjeno kraljevstvo te drugih kontinenata - Australija, Brazil, Etiopija, Južna Koreja, Kamerun, Kanada, Kina, Kongo, Novi Zeland, Ruanda, Rusija i Vijetnam) u razdoblju od 2016. do 2019. godine (Tablica 7.). Prikupljeno je ukupno 300 uzoraka pčelinjeg voska iz pčelarskog sektora. Uzorci su prikupljeni sukcesivno tijekom navedenog razdoblja s domaćeg i međunarodnog tržišta (od pčelara i proizvođača satnih osnova, s pčelarskih sajmova ili iz specijaliziranih pčelarskih trgovina). Uzorci su čuvani na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi (23 ± 2 °C) do analize.

Tablica 7. Distribucija prikupljenih uzoraka pčelinjeg voska prema zemlji podrijetla i godini uzorkovanja

R.B.	Zemlja	2016.	2017.	2018.	2019.	2016.-2019.
1	Australija	1				1
2	Austrija	1	1	1		3
3	Belgija	13			1	14
4	Bosna i Hercegovina	2	1	3		6
5	Brazil				1	1
6	Češka				1	1
7	Cipar			5	7	12
8	Crna gora			1		1
9	Etiopija				1	1
10	Francuska	5	3			8
11	Hrvatska	3	19	30	24	76
12	Italija	1	10	4	5	20
13	Južna Koreja		4			4
14	Kamerun	4			2	6
15	Kanada			4		4
16	Kina	3	2		9	14
17	Kongo				1	1
18	Latvija	3			1	4
19	Luksemburg				1	1
20	Mađarska		2			2
21	Nizozemska	6	8			14
22	Novi Zeland		24			24
23	Njemačka	1	2			3

24	Poljska			15	13	28
25	Ruanda		1			1
26	Rumunjska			1		1
27	Rusija				2	2
28	Slovenija	10	8	4		22
29	Srbija	7	1	4		12
30	Španjolska	1				1
31	Švedska	9				9
32	Ujedinjeno Kraljevstvo			1		1
33	Vijetnam				2	2
Ukupno		70	86	73	71	300

3.2. Priprema internog referentnog materijala

Generiranje internog referentnog materijala (kalibracijskih standarda) uključivalo je pripremu smjesa pčelinjeg voska i parafina (*Paraffinum solidum*, Ph.Eur. 7,8: PS smjese) te smjesa pčelinjeg voska i stearinske kiseline (*Acidum stearicum*, Ph.Eur. 8.1: AS smjese) s različitim udjelima dodanih patvorina, od 5 % do 95 % (0 % - čisti pčelinji vosak, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % - čista patvorina; 2 seta smjesa: PS i AS; n=41). Interni referentni materijal pripremljen je s ciljem unapređenja primijenjene spektroskopske analitičke metode (opisane dalje u tekstu pod 3.3.) za detekciju najučestalijih patvorina pčelinjeg voska - parafina i stearinske kiseline (smanjenje mjerne pogreške i granica detekcije patvorina). Pripremljene smjese pčelinjeg voska i patvorina (interni referentni materijal) prikazane su na Slikama 8. i 9.

Smjese su otopljene i homogenizirane zagrijavanjem na 90 °C kroz 3 sata, ostavljene da se ohlade na sobnoj temperaturi i čuvane na sobnoj temperaturi (23±2 °C) na tamnom mjestu do analiza. Za pripremu smjesa korišten je autentičan pčelinji vosak dobiven od zaperaka, poklopaca i pretopljenog saća izgrađenog na praznim okvirima iz kojih su zatim uobičajenim postupkom izrađene satne osnove (radi lakše manipulacije uzorcima i uniformnog postupka s uzorcima pčelinjeg voska), Referentni uzorci parafina i stearinske kiseline za pripremu internog referentnog materijala nabavljene su iz specijalizirane trgovine (Kemig d.o.o.).

Smjese pčelinjeg voska i patvorina (interni referentni material) Slika 8. i 9.) su analizirane primjenom fizikalno-kemijskih i spektroskopskih (¹HNMR, FTIR-ATR, SPME/GC-MS) metoda kako bi se provela dodatna kemijska karakterizacija smjesa i utvrdili pozadinski mehanizmi kemijskih alteracija do kojih dolazi patvorenjem te posljedični negativni učinci kontaminacije pčelinjeg voska na pčelinju zajednicu.



Slika 8. Pripremljene smjese pčelinjeg voska i parafina (*Paraffinum solidum* = PS smjese)



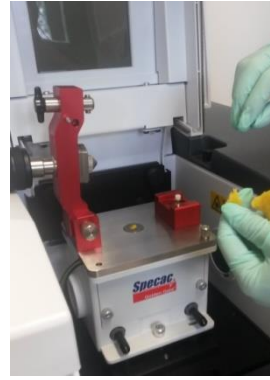
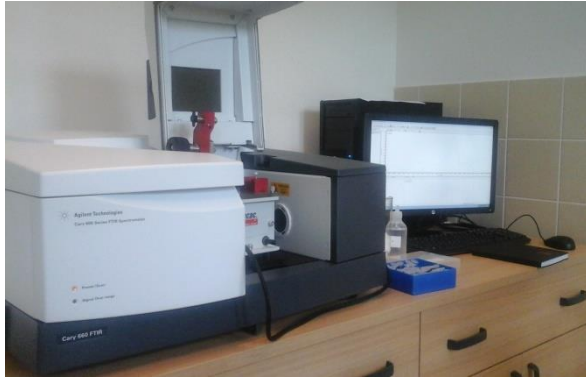
Slika 9. Pripremljene smjese pčelinjeg voska i stearinske kiseline (*Acidum stearicum* = AS smjese)

3.3. Analiza uzoraka metodom FTIR-ATR spektroskopije

Uzorci pčelinjeg voska analizirani su metodom infracrvene (IR) spektroskopije kako bi se utvrdila autentičnost ispitivanih uzoraka (prisutnost i udio patvorina). Za kvalitativno i kvantitativno utvrđivanje patvorina u pčelinjem vosku primijenjena je metoda FTIR-ATR spektroskopije. Spektralna analiza je provedena sukladno metodologiji Svečnjak i sur. (2019a.) uz modifikaciju metode u vidu konstrukcije preciznije kalibracijske krivulje za utvrđivanje udjela najučestalijih patvorina pčelinjeg voska (parafina i stearinske kiseline).

Infracrveni spektri pripremljenog internog referentnog materijala (kalibracijski set; n=41) i prikupljenih uzoraka pčelinjeg voska s tržišta (uzorci pčelinjeg voska s međunarodnog tržišta; validacijski set: n=300) snimljeni su pomoću infracrvenog spektrometra Cary 660 (Agilent Technologies) s DTGS (deuterirani triglicin sulfat) detektorom, a za snimanje spektara primijenjena je tehnika jednorefleksijske prigušene totalne refleksije (ATR tehnika) koristeći Golden Gate (Specac) ATR instrumentalni dodatak (Slika 10.) s dijamantom kao internim refleksijskim elementom i ZnSe (cinkov selenid) optičkim komponentama. Uzorci su prije snimanja spektara otopljeni zagrijavanjem ATR kristala na 75°C kako bi se omogućila homogenizacija uzorka (uzorci su analizirani tekućem stanju). Apsorpcijski spektri ispitivanih uzoraka pčelinjeg voska snimljeni su na sobnoj temperaturi (23±2 °C) pri spektralnoj rezoluciji od 4 cm⁻¹. Svaki spektar snimljen je kao razlika spektra uzorka i ATR elementa bez uzorka. Za svaki spektar prikupljeno je 64 snimaka (skenova).

Sirovi FTIR-ATR spektri pohranjeni su pomoću softverskog paketa Agilent ResolutionsPro (version 5.3.0, Agilent Technologies), kojim je provedeno i kemometrijsko modeliranje te kvantitativna obrada podataka s ciljem utvrđivanja točnog udjela patvorina u pčelinjem vosku (kalibracija, validacija). Kvalitativna i dodatna statistička obrada spektralnih podataka provedena je programskim paketom Origin version 8.1 (Origin Lab Corporation).



Slika 10. Infracrveni (FTIR) spektrometar s ATR instrumentalnim dodatkom (lijevo) i analiza uzoraka satne osnove FTIR-ATR tehnikom snimanja spektara (desno)

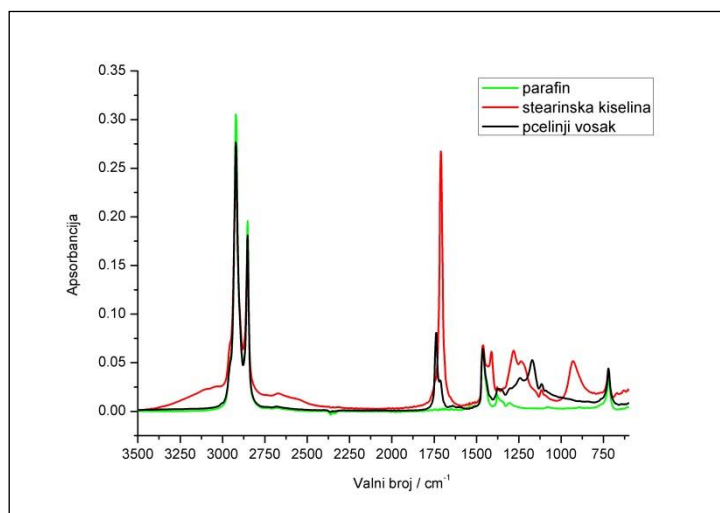
4. Rezultati i rasprava

4.1. Spektralna analiza internog referentnog materijala

Karakteristični FTIR-ATR spektri i spektralne značajke pčelinjeg voska i patvorina (parafina i stearinske kiseline) korištenih za pripremu kalibracijskih standarda (smjesa pčelinjeg voska i patvorina) prikazani su na Grafikonu 1. S obzirom na to da glavčinu pčelinjeg voska čine esteri viših masnih kiselina (~ 67 %), ugljikovodici (~14 %) i slobodne masne kiseline (~13 %), u karakterističnom IR spektru prirodnog pčelinjeg voska dominiraju apsorpcijske vrpce funkcionalnih skupina navedenih kemijskih spojeva. Detaljnu asignaciju molekulskih vibracija funkcionalnih skupina u spektru pčelinjeg voska prikazali su Maia i sur. (2013.) te Svečnjak i sur. (2015., 2019a.) te istaknuli kako se indikativno područje za utvrđivanje patvorenja nalazi između 1800 i 900 cm^{-1} (*fingerprint* područje – područje „otiska prsta“).

Na Grafikonu 1. su vidljive komparativne spektralne razlike između pčelinjeg voska i parafina, pri čemu se ističu tri apsorpcijske vrpce koje najviše doprinose razlikama: intenzivna vrpca u spektru pčelinjeg voska s maksimumom na 1738 cm^{-1} koja pripada isteznim vibracijama karboksilnih skupina estera, vrpca slabijeg intenziteta na 1714 cm^{-1} pripisana isteznim vibracijama karboksilnih skupina slobodnih masnih kiselina, te široka srednje jaka vrpca s apsorpcijskim maksimumom na 1171 cm^{-1} povezana s vibracijama funkcionalnih skupina (C–O) estera. Naime, parafin ne sadrži estere i masne kiseline stoga u spektru parafina nema spomenutih apsorpcijskih vrpca.

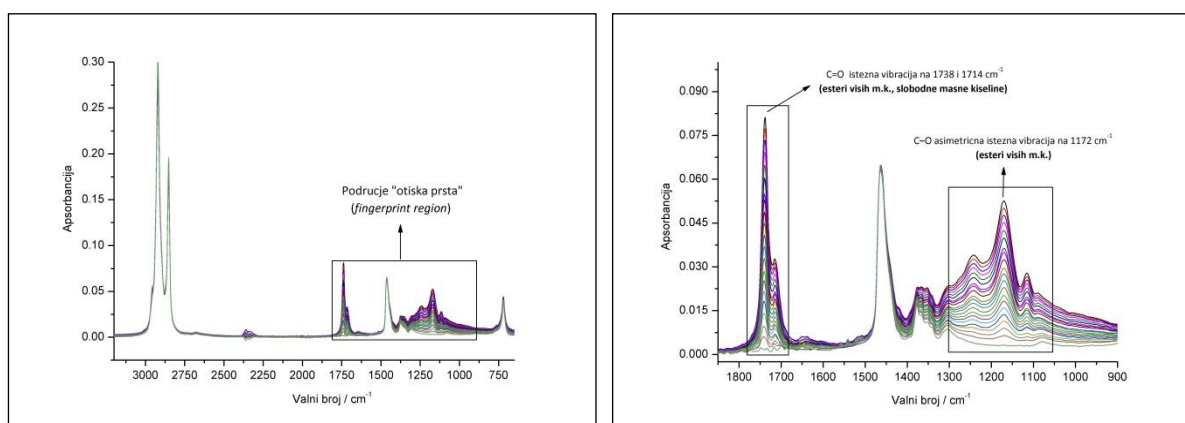
Suprotno tome, stearinska kiselina pokazuje specifičan IR spektar s brojnim apsorpcijskim vrpca koje ne uočavamo u IR spektru pčelinjeg voska, pri čemu su najistaknutije vrpce s apsorpcijskim maksimumom na 1710, 1412, 1281 i 929 cm^{-1} . Spomenuta spektralna područja indikativna su za detekciju patvorenja voska stearinskom kiselinom, kao što je prikazano u poglavlju 4.1.1. Spektralne značajke analiziranih uzoraka pčelinjeg voska, parafina i stearinske kiseline su u skladu s asignacijom molekulskih vibracija predmetnih uzoraka prikazanih od strane drugih autora (Maia i sur. 2013., Svečnjak i sur. 2015., 2019a; Tanner i Lichtenberg-Kraag 2019.).



Grafikon 1. Infracrveni (FTIR-ATR) spektar pčelinjeg voska, parafina i stearinske kiseline

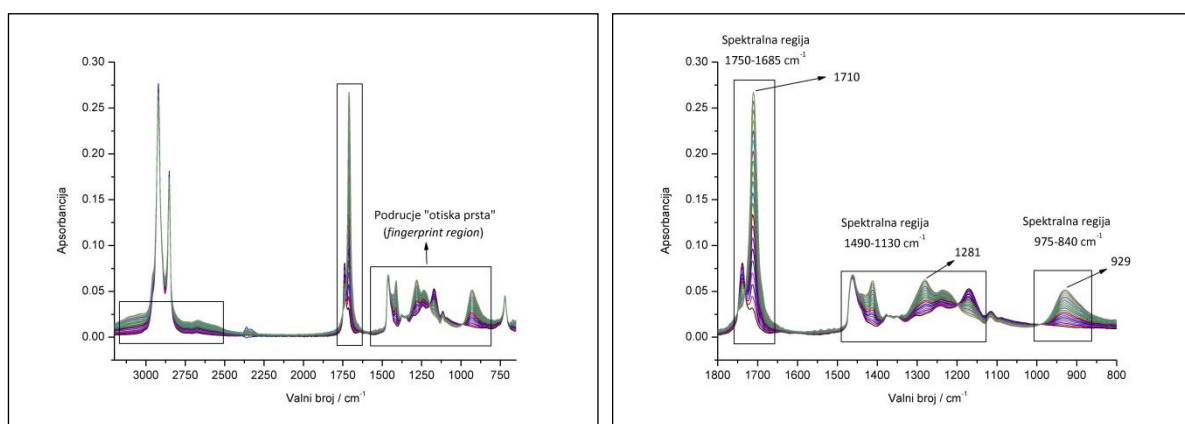
4.1.1. Konstrukcija kalibracijskih krivulja

S ciljem preciznijeg utvrđivanja udjela patvorina (< 5 %) u pčelinjem vosku nepoznatog kemijskog sastava (uzorci satnih osnova i sirovina s međunarodnog tržišta), pripravljene su smjese pčelinjeg voska s različitim udjelom parafina i stearinske kiseline kako je prethodno opisano te snimljeni njihovi IR spektri. Kao što je vidljivo na Grafikonu 2., FTIR-ATR spektri pripremljenih smjesa pčelinjeg voska i parafina pokazali su jasno linearno smanjenje intenziteta apsorpcije lipidnih sastavnica u području između 1760 i 1700 cm^{-1} (esteri i slobodne masne kiseline s apsorpcijskim maksimumima na 1738 cm^{-1} i 1714 cm^{-1}) te između 1260 i 1100 cm^{-1} (esteri s apsorpcijom maksimalno na 1171 cm^{-1}), koje prati povećanje udjela dodanog parafina.



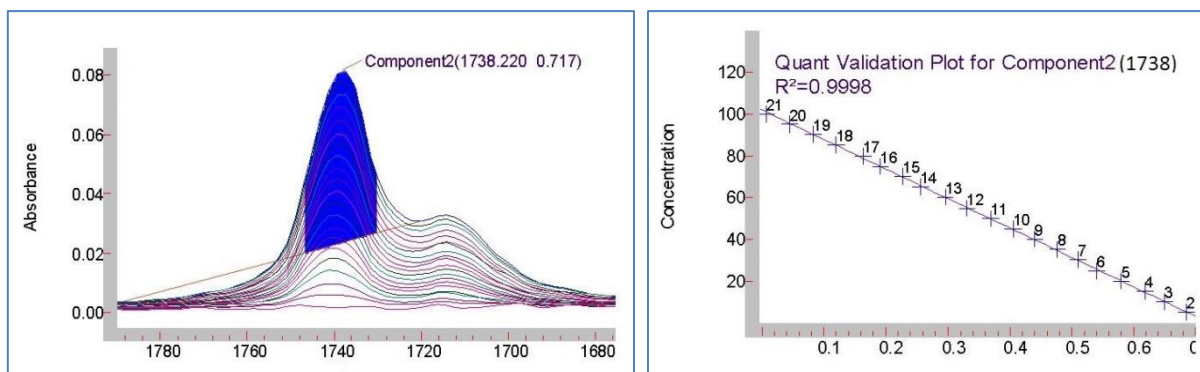
Grafikon 2. FTIR-ATR spektri smjesa pčelinjeg voska i parafina s različitim udjelom parafina (0 – 100 %): cijelo spektralno područje 3200-700 cm^{-1} (lijevo); *fingerprint* područje 1800-900 cm^{-1} (desno)

Stearinska kiselina i njezine mješavine s pčelinjem voskom pokazuju jedinstvene i složene spektralne značajke s brojnim spektralnim područjima koja su indikativna za patvorenje (Grafikon 3.). Pojava jake vrpce na 1710 cm^{-1} u IR spektru stearinske kiseline može se pripisati C=O isteznim vibracijama zasićenih alifatskih karboksilnih kiselina kao dimera s obzirom na to da se te vrpce karakteristično pojavljuju u području između $1730\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$. Takav spektralni efekt može se objasniti dimernim povezivanjem stearinske kiseline u različitim otopinama i smjesama; proces kristalizacije stearinske kiseline u različitim medijima može dovesti do različitih polimornih oblika ovisno o različitim parametrima kristalizacije (Garti i sur. 1986., Pielichowska i sur. 2008.). Na Grafikonu 3. vidljiva su i druga za patvorenje indikativna spektralna područja, a najznačajnije su vibracije s apsorpcijskim maksimumom na 1412 , 1281 i 929 cm^{-1} .

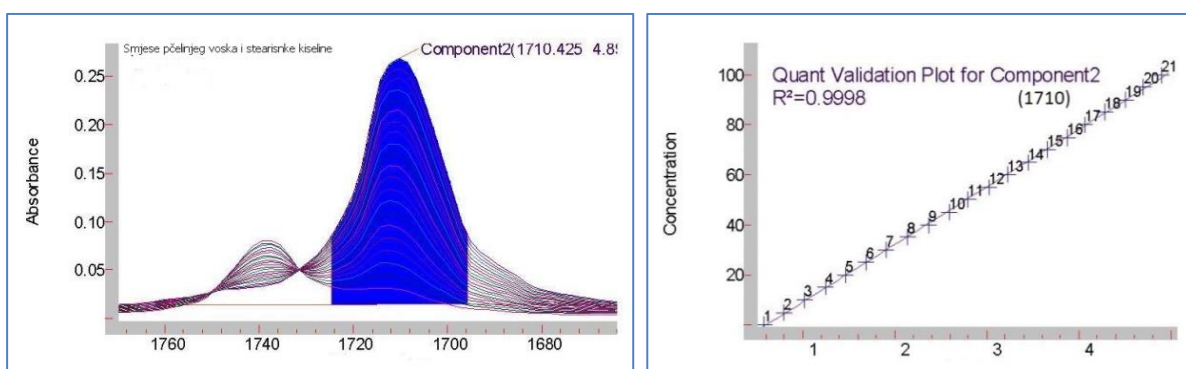


Grafikon 3. FTIR-ATR spektri smjesa pčelinjeg voska i stearinske kiseline s različitim udjelom stearinske kiseline (0 – 100 %): cijelo spektralno područje $3200\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ (lijevo); *fingerprint* područje $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ (desno)

Za detekciju patvorina u uzorcima nepoznatog kemijskog sastava (pčelinji vosak s tržišta) odabrana su spektralna područja koja polučuju najbolje parametre predikacije, odnosno područje vrpce s apsorpcijskim maksimumom na 1738 cm^{-1} ($R^2=0,9998$; mjerna pogreška: $\pm 1,27\%$) (Grafikon 4.) uz potvrdu rezultata koristeći druga spektralna područja indikativna za detekciju parafina, te područje vrpce s apsorpcijskim maksimumom na 1710 cm^{-1} ($R^2=0,9998$; mjerna pogreška: $\pm 0,73\%$) (Grafikon 5.) uz potvrdu rezultata koristeći druga spektralna područja indikativna za detekciju stearinske kiseline.



Grafikon 4. Referentna apsorpcijska vrpca / apsorbancija na 1738 cm^{-1} (lijevo) koja pokazuje najbolje rezultate korelacije između stvarnog udjela parafina u smjesama i instrumentalne predikcije udjela parafina (desno: *quant validation plot* - brojevi od 1 do 21 odnose se na smjese s udjelom parafina od 0 do 100 %)



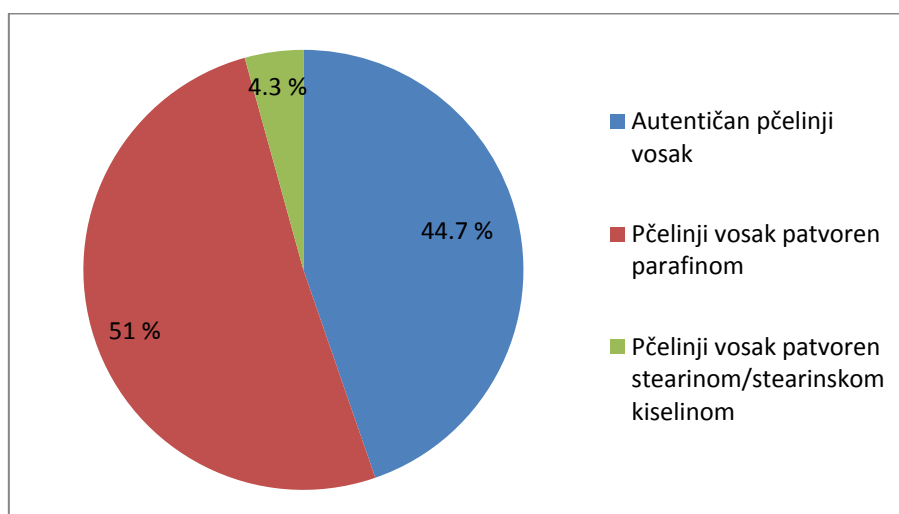
Grafikon 5. Referentna apsorpcijska vrpca / apsorbancija na 1710 cm^{-1} (lijevo) koja pokazuje najbolje rezultate korelacije između stvarnog udjela stearinske kiseline u smjesama i instrumentalne predikcije udjela stearinske kiseline (desno: *quant validation plot* - brojevi od 1 do 21 odnose se na smjese s udjelom stearinske kiseline od 0 do 100 %)

Ovim je kalibracijskim postavkama (modifikacijom kalibracijskih standarda s većim brojem kalibracijskih smjesa) i dobivenim validacijskim parametrima dokazano kako je preciznost mjerenja poboljšana u odnosu na izvorno uspostavljenu analitičku proceduru (Svečnjak i sur. 2015.) gdje je mjerna pogreška u slučaju detekcije parafina iznosila $\pm 2,17\%$. Također, FTIR-ATR metodologija za otkrivanje patvorenja je nadograđena uspostavljanjem pouzdane analitičke procedure za otkrivanje patvorenja pčelinjeg voska stearinskom kiselinom. Ovim je istraživanjem potvrđeno kako isto spektralno područje definirano kao indikativno za detekciju stearinske kiseline može poslužiti i za otkrivanje palmitinske kiseline i stearina (mješavina stearinske i palmitinske kiseline) u pčelinjem vosku s obzirom na to da sve tri supstance daju gotovo iste IR spektralne značajke.

4.2. Rezultati analize uzoraka pčelinjeg voska s međunarodnog tržišta

4.2.1. Distribucija analiziranih uzoraka pčelinjeg voska prema tipu patvorina

Kako je prikazano na Grafikonu 6., rezultati su pokazali kako je ukupno 166 (55,3 %) od ukupno 300 analiziranih uzoraka pčelinjeg voska bilo patvoreno parafinom (51 %) i stearinom/stearinskom kiselinom (4,3 %). Manje od polovine analiziranih uzoraka (44,7 %; 134 uzoraka) identificirano je kao autentičan nepatvoreni pčelinji vosak, odnosno vosak koji sadrži < 3,5 % parafina i < 1,5 % stearina/stearinske kiseline (uvažavajući utvrđene granice detekcije za patvorine i prirodne varijacije sastava pčelinjeg voska iz prethodnih istraživanja - Maia i sur. 2013., Svečnjak i sur. 2019a., Svečnjak i sur. 2020.). Ovi rezultati potvrđuju kako je parafin najučestalija patvorina pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu i u skladu su s rezultatima dosadašnjih istraživanja na nacionalnoj (Serra Bonvehí i Orantes Bermejo 2012., Maia i sur. 2013., Svečnjak i sur. 2015., Waś i sur. 2016.) i međunarodnoj razini (Svečnjak i sur. 2018a., Tanner i Lichtenberg-Kraag 2019.) kojima je također potvrđena dominacija parafina kao najzastupljenije patvorine te sporadična pojava stearina/sterinske kiseline. U analiziranim uzorcima nisu utvrđene primjese drugih patvorina (goveđeg loja, karnauba voska i/ili drugih stranih tvari) niti kombinacije mješavina patvorina.



Grafikon 6. Zastupljenost autentičnog i patvorenog pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu (n=300; uzorci prikupljeni iz 33 zemlje svijeta)

4.2.2. Distribucija analiziranih uzoraka pčelinjeg voska prema razini patvorenja

Tablica 8. prikazuje rezultate analize patvorenih uzoraka pčelinjeg voska (n=166) kategoriziranih s obzirom na razinu patvorenja parafinom i stearinom/stearinskom kiselinom. U 153 (92,2 %) od ukupno 166 patvorenih uzoraka utvrđena je prisutnost različitih udjela parafina (udio se kretao od 3,5 do 100 %), dok je stearin/stearinska kiselina utvrđena u znatno manjem broju uzoraka (n=13). Udio stearina/stearinske kiseline kretao se od 1,5 do 29,2 %. Rezultati su pokazali kako je većina patvorenih uzoraka (63,9 %) sadržavala niži udio patvorina (5 – 20 %), 17,5 % uzoraka sadržavalo je 20 – 40 % parafina ili stearina/stearinske kiseline, dok je 18,6 % uzoraka sadržavalo više od 40% parafina. Izuzetno visoka razina patvorenja (> 80 % parafina) utvrđena je u 15 % uzoraka.

Tablica 8. Kategorizacija patvorenih uzoraka pčelinjeg voska prema razini patvorenja parafinom i stearinskom kiselinom

Razina patvorenja	Prisutnost parafina (broj uzoraka)	Prisutnost stearina/stearinske kiseline (broj uzoraka)	% uzoraka prema razini patvorenja
>80 %	25	–	15
60-80 %	2	–	1,2
40-60 %	4	–	2,4
20-40 %	19	10	17,5
3,5-20 %	103	3	63,9
<i>Ukupno patvoreno (n)</i>	<i>153</i>	<i>13</i>	<i>166</i>
<i>Ukupno patvoreno (%)</i>	<i>92,2</i>	<i>7,8</i>	<i>100</i>

4.2.3. Distribucija analiziranih uzoraka pčelinjeg voska prema zemlji podrijetla

U Tablici 9. prikazana je distribucija analiziranih uzoraka pčelinjeg voska prema zemlji podrijetla te tipu i udjelu utvrđenih patvorina. Spektroskopskom je analizom utvrđeno kako je većina analiziranih uzoraka satnih osnova (manjim dijelom i blokova voska namijenjenih za njihovu izradu) podrijetlom iz 16 zemalja članica EU te zemljama izvan EU bila patvorena parafinom, dok su stearin/stearinska kiselina utvrđeni u samo 13 uzoraka podrijetlom iz Belgije i Nizozemske. U većini tih uzoraka su utvrđene zabrinjavajuće količine stearina/stearinske kiseline (do 29,2 %) obzirom da je recentnim istraživanjima utvrđeno kako i male količine stearina u satnim osnovama (15 %) mogu uzrokovati visoke stope mortalitet pčela u ličinačkoj fazi razvoja (Reybroeck i Van Nevel 2018.).

Od brojnih zemalja Europe uključenih u ovo istraživanje, patvorine nisu utvrđene samo u uzorcima iz Luksemburga (n=1), Švedske (n=9) i Ujedinjenog kraljevstva (n=1). Uz navedene

europske zemlje, nepatvoreni uzorci autentičnog pčelinjeg voska zapaženi su i na drugim kontinentima, a pritom se posebice se ističu uzorci pčelinjeg voska prikupljeni iz Novog Zelanda i Australije u kojima (n=25) nisu utvrđene primjese niti jednog tipa patvorine. Ovaj svijetli primjer slijede i uzorci iz afričkih zemalja (Kamerun, Kongo, Etiopija) te uzorci iz Kanade, Rusije i Vijetnama koji su također identificirani kao autentičan pčelinji vosak bez primjese patvorina.

Najviši udjeli parafina utvrđeni su u uzorcima podrijetlom iz Bosne i Hercegovine, Crne Gore, Srbije i Kine. Svi uzorci prikupljeni iz BiH (n=6) i većina uzoraka iz Srbije (n=11) bili su patvoreni različitim udjelima parafina, a posebice visokim udjelima parafina (> 90 %). Visoki udjeli parafina detektirani su sporadično i u jednom uzorku iz Poljske (99,6 %) i Crne Gore (95,3 %) te šest uzoraka iz Hrvatske (86,3 – 90,1 % parafina). Kineske satne osnove najbolje odražavaju zabrinjavajuću situaciju u vidu nekontroliranog plasmana satnih osnova upitnog kemijskog sastava na međunarodno tržište. Naime, rezultati analize satnih osnova prikupljenih s pčelarskog sajma u okviru Međunarodnog pčelarskog kongresa „Apimondia“ u Montrealu 2019. godine su pokazali kako je velik broj kineskih satnih osnova sadržavao visok udio parafina (> 90 %), a mnoge su osnove bile izrađene od 100 % parafina. Također, u nekoliko je kineskih satnih osnova zamijećena i prisutnost umjetnih bojila (Slika 11.; crvena i smeđa satna osnova) čiji dodatak u EU nije dopušten (sukladno Uredbi EZ 1069/2009). Deklaracija proizvoda nije ukazivala na to da osnove sadrže parafin niti umjetna bojila, već su bile plasirane kao satne osnove od „čistog pčelinjeg voska“.



Slika 11. Kineske satne osnove prikupljene na Međunarodnom pčelarskom kongresu „Apimondia“ u Montrealu 2019. godine
(Izvor: Svečnjak 2020.)

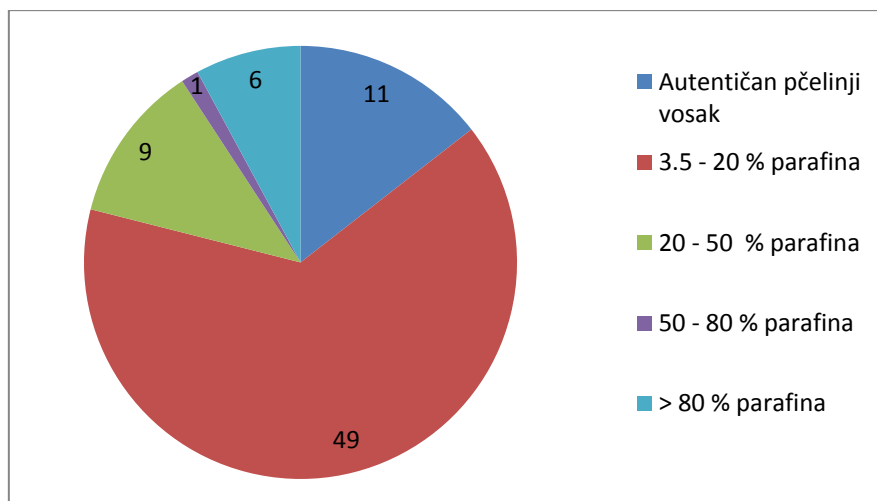
Iz Tablice 9. je razvidno kako je većina analiziranih uzoraka pčelinjeg voska neovisno o podrijetlu sadržavala umjerene količine parafina (do 20 %). U francuskim i slovenskim uzorcima detektirani su relativno niski udjeli parafina koji su rijetko prelazili 10%, a slično je zamijećeno i u uzorcima iz Belgije, Češke, Latvije, Nizozemske, Rumunjske i Španjolske.

Također, od ukupno 20 uzoraka prikupljenih iz Italije, 17 je nije sadržavalo patvorine, dok je u samo jednom uzorku detektirano više od 10 % parafina (23,7 %), dok su preostala dva uzorka sadržavala manje od 5 % parafina. Iz Tablice 9. je vidljivo kako je iz Hrvatske prikupljen najveći broj uzoraka (n=76). Uzorci prikupljeni s područja RH bili su uglavnom patvoreni s nižim udjelima parafina (do 20 %; n=49), dok su viši udjeli (> 20 %) otkriveni u znatno manjem broju uzoraka, odnosno u 16 uzoraka (Grafikon 7.) Radi malog broja uzoraka (≤ 3) prikupljenih iz pojedinih zemalja, teško je donijeti sud o stanju glede patvorenja u dotičnim zemljama, no može se zaključiti kako pojavnost patvorina ne poznaje granice. Trenutna situacija vezana za nedostatak zakonske regulative koja kontrolira kakvoću voska u pčelarskom sektoru te nekontroliran uvoz/izvoz satnih osnova svakako doprinosi patvorenju i diseminaciji kontaminiranog pčelinjeg voska diljem svijeta.

Tablica 9. Distribucija analiziranih uzoraka pčelinjeg voska (satnih osnova i blokova voska) prikupljenih s međunarodnog tržišta (n=300) s obzirom na zemlju podrijetla, tip i udio prisutnih patvorina

Zemlja podrijetla	Autentičan pčelinji vosak (n)*	Patvoreni pčelinji vosak (n)	Udio parafina (%)	Udio stearina / stearinske kiseline (%)
Australija (n=1)	1	–	–	–
Austrija (n=3)	1	2	5,1 – 19,6	–
Belgija (n=14)	6	8	9,5	1,5 – 27,9
Bosna i Hercegovina (n=6)	–	6	77,4 – 93	–
Brazil (n=1)	–	1	94,7	–
Češka (n=1)	–	1	4,7	–
Cipar (n=12)	6	6	4,1 – 28,2	–
Crna gora (n=1)	–	1	95,3	–
Etiopija (n=1)	1	–	–	–
Francuska (n=8)	5	3	3,7 – 7,2	–
Hrvatska (n=76)	11	65	3,6 – 90,1	–
Italija (n=20)	17	3	3,6 – 23,7	–
Južna Koreja (n=4)	3	1	3,9	–
Kamerun (n=6)	6	–	–	–
Kanada (n=4)	4	–	–	–
Kina (n=14)	3	11	5,8 – 100	–
Kongo (n=1)	1	–	–	–
Latvija (n=4)	3	1	11,6	–
Luksemburg (n=1)	1	–	–	–
Mađarska (n=2)	–	2	3,6 – 39,7	–
Nizozemska (n=14)	2	12	3,6 – 6,9	20 – 29,2
Novi Zeland (n=24)	24	–	–	–
Njemačka (n=3)	1	2	41,2 – 43,1	–
Poljska (n=28)	16	12	3,8 – 99,6	–
Ruanda (n=1)	–	1	7,1	–
Rumunjska (n=1)	–	1	11,2	–
Rusija (n=2)	2	–	–	–
Slovenija (n=22)	7	15	3,5 – 11,6	–
Srbija (n=12)	1	11	11,5 – 94,3	–
Španjolska (n=1)	–	1	6,5	–
Švedska (n=9)	9	–	–	–
Ujedinjeno Kraljevstvo (n=1)	1	–	–	–
Vijetnam (n=2)	2	–	–	–
Ukupno	134	166	3,5 – 100 %	1,5 – 29,2 %

*< LOD (3,5 % za parafin, 1,5 % za stearin/stearinsku kiselinu)



Grafikon 7. Zastupljenost autentičnog i patvorenog pčelinjeg voska na području Hrvatske (n=76) i distribucija broja uzoraka prema udjelu parafina

5. Zaključak

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na gorući problem patvorenja pčelinjeg voska (satnih osnova i blokova voska) u sektoru pčelarstva na međunarodnoj razini.

Rezultati istraživanja su pokazali kako je 166 (55,3 %) od ukupno 300 analiziranih uzoraka pčelinjeg voska prikupljenih iz 33 Zemlje svijeta bilo patvoreno parafinom (51 %) ili stearinom/stearinskom kiselinom (4,3 %). Manje od polovine analiziranih uzoraka (44,7 %; 134 uzoraka) identificirano je kao autentičan nepatvoreni pčelinji vosak, odnosno vosak koji sadrži < 3,5 % parafina i < 1,5 % stearina/stearinske kiseline. Ovi rezultati potvrđuju kako je parafin najučestalija patvorina pčelinjeg voska na međunarodnom tržištu te kako se sporadično pojavljuje stearin/stearinska kiselina.

Rezultati analize patvorenih uzoraka pčelinjeg voska (n=166) kategoriziranih s obzirom na razinu patvorenja parafinom i stearinom/stearinskom kiselinom pokazali su kako je u 153 (92,2 %) od ukupno 166 patvorenih uzoraka utvrđena prisutnost različitih udjela parafina (udio se kretao od 3,5 do 100 %), dok je stearin/stearinska kiselina utvrđena u znatno manjem broju uzoraka (n=13). Udio stearina/stearinske kiseline kretao se od 1,5 do 29,2 %. Rezultati su pokazali kako je većina patvorenih uzoraka (63,9 %) sadržavala niži udio patvorina (5 – 20 %), 17,5 % uzoraka sadržavalo je 20 – 40 % parafina ili stearina/stearinske kiseline, dok je 18,6 % uzoraka sadržavalo više od 40% parafina. Izuzetno visoka razina patvorenja (> 80 % parafina) utvrđena je u 15 % uzoraka.

Stearin/stearinska kiselina utvrđeni su u samo 13 uzoraka podrijetlom iz Belgije i Nizozemske. U većini tih uzoraka su utvrđene zabrinjavajuće količine stearina/stearinske kiseline (do 29,2 %) obzirom da male količine stearina u satnim osnovama (15 %) mogu uzrokovati visoke stope mortalitet pčela u ličinačkoj fazi razvoja.

Patvorine nisu utvrđene samo u uzorcima iz Luksemburga (n=1), Švedske (n=9) i Ujedinjenog Kraljevstva (n=1). Uz navedene europske zemlje, nepatvoreni uzorci autentičnog pčelinjeg voska zapaženi su i na drugim kontinentima, a pritom se posebice ističu uzorci pčelinjeg voska iz Novog Zelanda i Australije u kojima (n=25) nisu utvrđene primjese niti jednog tipa patvorine. Ovaj svijetli primjer slijede i uzorci iz afričkih zemalja (Kamerun, Kongo, Etiopija) te uzorci iz Kanade, Rusije i Vijetnama koji su također identificirani kao autentičan pčelinji vosak bez primjesa patvorina.

Najviši udjeli parafina utvrđeni su u uzorcima podrijetlom iz Bosne i Hercegovine, Srbije i Kine. Svi uzorci prikupljeni iz BiH i većina uzoraka iz Srbije i Kine bili su patvoreni izuzetno visokim udjelima parafina (> 90 %).

Radi malog broja uzoraka (≤ 3) prikupljenih iz pojedinih zemalja, teško je donijeti sud o stanju glede patvorenja u dotičnim zemljama, no može se zaključiti kako pojavnost patvorina ne poznaje granice. Trenutna situacija vezana za nedostatak zakonske regulative koja kontrolira kakvoću voska u pčelarskom sektoru te nekontroliran uvoz/izvoz satnih osnova svakako doprinosi patvorenju i diseminaciji kontaminiranog pčelinjeg voska diljem svijeta. Navedeno ukazuje na hitnu potrebu za izradom zakonske regulative koja definira kriterije kakvoće/čistoće za pčelinji vosak namijenjen primjeni u pčelarstvu uz obavezno rutinsko ispitivanje kakvoće prije stavljanja na tržište.

6. Popis literature

1. Aichholz R., Lorbeer E. (1999). Investigation of comb wax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry. I. High-temperature gas chromatography. *Journal of Chromatography* 855(2): 601-615.
2. Aichholz R., Lorbeer E. (2000). Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. II: High temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 883 (1-2): 75-88.
3. Bernal J.L., Jiménez J.J., Del Nozal M.J., Torbio L., Martin M.T. (2005). Physico – chemical parameters for the characterization of pure beeswax and detection of adulterations. *European Journal of Lipid Science And Tehnology*. 107:158-166.
4. Beverly M.B., Kay P.T., Voorhees K.J., (1995). Principal component analysis of the pyrolysis mass spectra from African, Africanized hybrid and European beeswax. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 34(2): 251-263.
5. Birshtein V. Y., Tul'chinskii V.M. (1977). Determination of beeswax and some impurities by IR spectroscopy. *Chemistry of Natural Compounds* 13(2): 232-235.
6. Bogdanov S. (2004). Beeswax: Quality issues today, *Bee World* 85. 46-50.
7. Bogdanov S. (2009). Beeswax: Production, Properties, Composition and Control. *Beeswax book*. Bee Product Science. 1 – pp17
8. Bogdanov S. (2016). Beeswax: History, Uses and Trade. *Beeswax book*. Chapter 2. Bee Product Science
9. Bogdanov S. (2017). Beeswax: Production, Properties, Composition and Control. *Beeswax book*. Chapter 1. Bee Product Science
10. Breed, M. D., & Stiller, T. M. (1992). Honeybee, *Apis mellifera*, nestmate discrimination – Hydrocarbon effects and the evolutionary implications of comb choice. *Animal Behaviour*, 43, 875–883.
11. Breed, M. D., Diaz, P. H., & Lucero, D. (2004). Olfactory information processing in honeybee, *Apis mellifera*, nestmate recognition. *Animal Behaviour*, 68, 921–928.
12. Breed, M. D., Garry, M. F., Pearce, A. N., Hibbard, B. E., Bjostad, L. B., & Page, R. E. (1995a). The role of wax comb in honey-bee nestmate recognition. *Animal Behaviour*, 50(2), 489–496.
13. Breed, M. D., Leger, E. A., Pearce, A. N., & Wang, Y. J. (1998). Comb wax effects on the ontogeny of honey bee nestmate recognition. *Animal Behaviour*, 55, 13–20.
14. Breed, M. D., Page, R. E., Hibbard, B. E., & Bjostad, L. B. (1995b). Interfamily variation in comb wax hydrocarbons produced by honey bees. *Journal of Chemical Ecology*, 21, 1329–1338.
15. Breed, M. D., Stiller, T. M., & Moor, M. J. (1988b). The ontogeny of kin discrimination cues in the honey bee, *Apis mellifera*. *Behavior Genetics*, 18, 439–448.
16. Breed, M. D., Williams, K. R., & Fewell, J. H. (1988a). Comb wax mediates the acquisition of nest-mate recognition cues in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 8766–8769.

17. Brockmann, A., Groh, C., & Fröhlich, B. (2003). Wax perception in honeybees: Contact is not necessary. *Naturwissenschaften*, 90, 424–427.
18. Buchwald, A. R., Breed, M. D., Bjostad, L., Hibbard, B. E., & Greenberg, A. R. (2009). The role of fatty acids in the mechanical properties of beeswax. *Apidologie*, 40(5), 585–594.
19. Buchwald, R., Breed, M. D., Greenberg, A. R., & Otis, G. (2006). Interspecific variation in beeswax as a biological construction material. *The Journal of Experimental Biology*, 209, 3984–3989.
20. Buchwald, R., Greenberg, A. R., & Breed, M. D. (2005). Biomechanical perspective on beeswax. *American Entomologist*, 51(1), 39-41.
21. Fröhlich, B., Riederer, M., & Tautz, J. (2000). Comb-wax discrimination by honeybees tested with the proboscis extension reflex. *Journal of Experimental Biology*, 203(10), 1581–1587.
22. Cogshall W.L., Morse R.A. (1984). *Beeswax. Production, harvesting and products*. Wicwas Press New York, New York
23. D'ettore, P., Wenseleers, T., Dawson, J., Hutchinson, S., Boswell, T., Ratnieks, F. L. W. (2006). Wax comb mediate nestmate recognition by guard honeybees. *Animal Behaviour*, 71(4), 773-779.
24. Direktiva Komisije. (2009.). Direktiva Komisije 2009/10 / EZ od 13. veljače 2009. o izmjeni Direktive 2008/84 / EZ kojom se utvrđuju posebni kriteriji čistoće za aditive za hranu osim boja i zaslađivača. *Službeni list Europske unije*, L 44, 62–78. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32009L0010>
25. EC (2017). European Commission. EU Food Fraud Network – coordinated case, Beeswax intended for honey production adulterated with paraffin and stearin. In addition: Adulteration of beeswax intended for honey production with stearin and paraffin. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/food-fraud_succ-coop_beeswax.pdf **Pristupljeno: 20.05.2021**
26. EFSA (2007). European Food Safety Authority. Beeswax (E 901) as a glazing agent and as carrier for flavours. *The EFSA Journal* 615. 128 <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/615>
27. EFSA (2020). European Food Safety Authority. Risk assessment of beeswax adulterated with paraffin and/or stearin/stearic acid when used in apiculture and as food (honeycomb) *Efsa supporting publication* 2020:EN-189 <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1859>
28. EU Food Fraud Network – coordinate case, European Commission (2017). Beeswax intended for honey production adulterated with paraffin and stearin. In addition: Adulteration of beeswax intended for honey production with stearin and paraffin (draft – the content under evaluation of EC)
29. FAO (1990). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/3/t0104e/T0104E04.htm#Chapter%201%20Introduction>
30. Ferber C.E.M., Nursten H. E. (1977). The aroma of wax. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28: 511-518.
31. Fröhlich, B., Riederer, M., Tautz, J. (2020). Comb-waxdiscrimination by honeybees tested with the proboscis extension reflex. *Journal of Experimental Biology*, 203(10), 1581-1587.

31. Garti, M., Sato, K., Schlichter, J., & Wellner, E. (1986). The dimer association of stearic acid in solution. *Crystal Research and Technology*, 21(5), 653–656. doi:10.1002/crat.2170210518
32. Günzler H., Gremlich H.-U. (2006). Uvod u infracrvenu spektroskopiju. Preveli Meić Z., Baranović G. Školska knjiga. Zagreb
33. Hepburn H.R., Pirk C.W.W., Duangphakde O. (2014). *Honeybee Nests: Composition, Structure, Function*. Springer. Berlin
34. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2005). Compendium of food additive specifications Addendum 13. Revised specifications prepared at the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 65th meeting (2005) and published in FNP (FAO Food and Nutrition Paper) 52 Add. 13. p. 11-13. <http://www.fao.org/3/a-a0044e.pdf>
35. Jiménez J.J., Bernal J., Aumente S., del Nozal M.J., Martín T., Toribio L. (2009). Identification of adulterants added to beeswax: Estimation of detectable minimum percentages. *European Journal of Lipid Science and Tehnology* 111 (9): 902-911
36. Jiménez J.J., Bernal J.L, Aumente S., del Nozal M.J., Martín M.T., Bernal J. (2004). Quality assurance of commercial beeswax I. Gas chromatography-electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoesters. *Journal of Chromatography A*, 1024: 147-154.
37. Jiménez J.J., Bernal J.L, Aumente S., Toribio L., Bernal J. (2003). Quality assurance of commercial beeswax II. Gas chromatography-electron impact ionisation mass spectrometry of alcohols and acids. *Journal of Chromatography A*, 1007: 101-116.
38. Jiménez J.J., Bernal J.L, del Nozal M.J., Martín M.T., Bernal J. (2006). Sample preparation methods for beeswax characterization by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 1129: 262-272.
39. Kezić N., Bubalo D., Grgić Z., Dražić M., Barišić D., Filipi J., Jakopović I., Šavar M., Krakar D., Tretinjak V. (2014). *Priručnik: Konvencionalno i ekološko pčelarenje*. (CIP Katalogizacija), Zagreb.
40. Maia M., Barros A.I.R.N.A., Nunes F.M., (2013). A novel, direct, reagent – free method for the detection of bee – wax adulteration by single – reflection attenuated total reflection mid – infrared spectroscopy. *Talanta* 107: 74 – 80.
41. Maia M., Nunes F.M. (2013). Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. *Food chemistry* 136(2): 961-968.
42. Mutinelli, F. (2011). The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): Overview and recent developments. *Revue. Scientifique et Technique de l'Office international des Epizooties*, 30(1)
43. Pielichowska, K., Głowinkowski, S., Lekki, J., Binias, D., Pielichowski, K., & Jencyk, J. (2008). PEO/fatty acid blends for thermal energy storage materials. Structural/morphological features and hydrogen interactions. *European Polymer Journal*, 44: 3344–3360. doi:10.1016/j.eurpolymj.2008.07.047

Pristupljeno 3.6.2021

44. Reybroeck W., Van Nevel J. (2018). Effect of beeswax adulterated with sterin on the development of worker bee brood: results of a field trial. In Program & Abstract Book EurBee 8. 8th Congress of Apidology, Ghent, Belgium, 18-20 September 2018. p. 115.
45. Serra Bonvehí J.S., Orantes Bermejo F.J. (2012). Detection of adulterated commercial Spanish beeswax. *Food Chemistry* 132(1): 642 – 648.
46. Svečnjak L. (2015a). Infracrvena spektroskopija u identifikaciji botaničkog i zemljopisnog podrijetla meda. *Doktorski rad. Zagreb*
47. Svečnjak L. (2015b). Patvorenje pčelinjeg voska – problematika i otkrivanje metodom infracrvene spektroskopije. *Hrvatska pčela*. 134, 9: 270-274.
48. Svečnjak L. (2018a). Nova saznanja o negativnim učincima patvorenja pčelinjeg voska i stanju na tržištu satnih osnova. *Hrvatska pčela*, 137, 11; 340 – 343.
49. Svečnjak L. (2018b). Pčelinji vosak u pčelarskom sektoru. *Hrvatska pčela*, 137, 4; 123-126.
50. Svečnjak L. (2019). Utjecaj patvorenja pčelinjeg voska parafinom na sastav i kakvoću meda. *Hrvatska pčela*, 138, 6: 196-200.
51. Svečnjak L. Prđun S., Baranović G., Damić M., Rogina J. (2018a). Alarming situation on the EU beeswax market: the prevalence of adulterated beeswax material and related safety issues. *EurBee 8. 8th Congress of Apidology, Ghent, Belgium, 18-20 September 2018. pp. 114-115.*
52. Svečnjak L., Baranović G., Vinceković M., Prđun S., Bubalo D., Tlak Gajger I., (2015). An approach for routine analytical detection of beeswax adulteration using FTIR – ATR spectroscopy. *Journal of Apicultural Science*, 59(2): 37–49.
53. Svečnjak L., Chesson L.A., Gallina A., Maia M., Martenello M., Mutinelli F., Necasti Muz M., Nunes F.M., Saucy F., Tipple B.J., Wallner K., Waś E., Waters T.A. (2019a). Standard methods for *Apis mellifera* beeswax reasearch. *Journal of Apicultural Research* 58 (2): 1-108.
54. Svečnjak L., Jović O., Prđun S., Rogina J., Marijanović Z., Car J., Matošević M., Jerković I. (2019b). Influence of beeswax adulteration with parafin on the composition and quality of honey determined by phisico – chemical analysis, 1H NMR, FTIR-ATR spectroscopy. *Food chemistry*, 232: 286-294.
55. Svečnjak L., Nunes F.M., Gracia Matas R., Cravedi J-P., Christodoulidou A., Rortais A., Saegerman C. (2020). Validation of analytical methods for the detection of beeseax adulteration with a focus on paraffin. *Food Control*
56. Tanner N., Lichtenberg-Kraag B. (2019). Identification of Quantification of Single and Multi-Adulteration of Beeswax by FTIR-ATR Spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Tehnology*, 121: 1-10.
57. Tulloch A.P. (1973). Factors affecting values of beeswax and detection of adulteration. *Journal of the American Oil Chemist'S Society* 50 (7): 269 – 272.
58. Tulloch A.P. (1980). Beeswax – composition and analysis. *Bee world* 61, 47 – 62.
59. Uredba komisije (2021). Provedbena uredba komisije (EU) 2021/632 od 13. travnja 2021. o utvrđivanju pravila za primjenu Uredbe (EU) 2017/625 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu popisa životinja, proizvoda životinjskog podrijetla, zametnih proizvoda, nusproizvoda životinjskog podrijetla i dobivenih proizvoda, mješovitih

proizvoda te sijena i slame koji podliježu službenim kontrolama na graničnim kontrolnim postajama i o stavljanju izvan snage Provedbene uredbe Komisije (EU) 2019/2007 i Odluke Komisije 2007/275/EZ <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R0632&from=HR>

60. Uredba komisije (EU) br. 1069/2009 o utvrđivanju zdravstvenih pravila za nusproizvode životinjskog podrijetla i od njih dobivene proizvode koji nisu namijenjeni prehrani ljudi te o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1774/2002 (Uredba o nusproizvodima životinjskog podrijetla) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1069&from=EN>
61. Uredba Komisije (EU) br. 231/2012 o utvrđivanju specifikacija za prehrambene aditive navedene u prilogima II. i III. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=celex%3A32012R0231>
62. Vijeće Europe (2011). European Pharmacopoeia 7th ed. Volume 2. Strasbourg : EDQM European Directorate for the Quality of Medicine & Healthcare. https://pheur.edqm.eu/app/arch/content/arch-11264/2011_7th_Edition_7.0_Volume_2_E.pdf
63. Vijeće Europe (2020). European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th ed. Supplement 2. EDQM — European Directorate for the Quality of Medicine and Healthcare. Strasbourg, France. pp. 1804-1805.
64. Waś E., Szcześna T., Raybak-Chmielewska H. (2014a). Determination of beeswax hydrocarbons by gas chromatography with a mass detector (GC-MS) technique. *Journal of Apicultural Science* 58, 1, 145 – 157.
65. Waś E., Szcześna T., Raybak-Chmielewska H. (2015). Application of gas chromatography with the mass detector (GC-MS) technique for detection of beeswax adulteration with paraffin. *Journal of Apicultural Science* 59(1): 143 – 152.
66. Waś E., Szcześna T., Raybak-Chmielewska H. (2016). Efficiency of GC-MS method in detection of beeswax adulterated with paraffin. *Journal of Apicultural Science* 60(1): 131-147.
67. Waś E., Szcześna T., Raybak-Chmielewska H., (2014b). Hydrocarbon composition of beeswax (*Apis mellifera*) collected from light and dark coloured combs. *Journal of Apicultural*. 58: 99-106.
68. Weiss K. (1965). Über den Zuckerverbrauch und die Beanspruchung der Bienen bei der Wachserzeugung. *Z Bienenforrch* 8:106–124.

Životopis

Gloria Ledinski (rođ. Prugović) rođena je 27.01.1994. godine u Koprivnici. Prebivalište je u Potočkoj ulici 39 u Križevcima. Osnovnu školu „Grigor Vitez“ pohađala je u Sv. Ivanu Žabnu od 2001. do 2009. godine, a nakon toga upisala je srednju školu Gimnazija Ivana Zakmardija Dijankovečkog u Križevcima smjer Prirodoslovno - matematička gimnazija. Srednjoškolsko obrazovanje trajalo je od 2009. do 2013. godine. Agronomski fakultet upisuje 2013. godine. Preddiplomski studij, smjer Biljne znanosti završava 2017. godine. Diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda i agroturizam završava 2021. godine. Dobro razumije i govori engleski i njemački jezik. Dobro poznaje rad na računalu, osobito rad u Word-u, MS Exel-u i Power Point-u.