

Pouzdanost fizikalno-kemijskih metoda u otkrivanju patvorenja pčelinjeg voska

Svečnjak, Lidija; Horg, Mateja; Prđun, Saša; Bubalo, Dragan; Mihaljević, Ivan

Source / Izvornik: **Zbornik radova 57. hrvatskog i 17. međunarodnog simpozija agronoma, 2022, 388 - 392**

Conference paper / Rad u zborniku

Publication status / Verzija rada: **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:047408>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

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



Pouzdanost fizikalno-kemijskih metoda u otkrivanju patvorenja pčelinjeg voska

Lidija Svečnjak, Mateja Horg, Saša Prđun, Dragan Bubalo, Ivan Mihaljević

*Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, Zagreb, Hrvatska
(lsvecnjak@agr.hr)*

Sažetak

Dodavanjem patvorina u pčelinji vosak mijenja se njegov sastav, kakvoća i fizikalno-kemijska svojstva. Cilj je ovog rada bio utvrditi pouzdanost fizikalno-kemijskih metoda u otkrivanju patvorenja pčelinjeg voska. Rezultati istraživanja pokazali su kako određivanje kiselinskog broja pokazuje zadovoljavajuću mjernu pouzdanost u otkrivanju patvorenja ($R^2=0,996$ za parafin; $R^2=0,9997$ za stearinsku kiselinu), dok je određivanje točke tališta ($R^2=0,8969$ za parafin; $R^2=0,8823$ za stearinsku kiselinu) i specifične težine ($R^2=0,9824$ za parafin; $R^2=0,1489$ za stearinsku kiselinu) upitne pouzdanosti ovisno o tipu patvorina te navedeni fizikalno-kemijski parametri mogu poslužiti samo kao indikacija patvorenja.

Ključne riječi: pčelinji vosak, patvorenje, parafin, stearinska kiselina, fizikalno-kemijske metode

Uvod

Pčelinji je vosak česta meta patvorenja, a danas na međunarodnom tržištu postoji preko 15 tvari različitog podrijetla kojima se patvori pčelinji vosak (Bogdanov, 2017.). Uz parafin kao najučestaliju patvorinu pčelinjeg voska, u posljednjih se nekoliko godina na tržištu sve češće pojavljuju i druge patvorine (primarno stearin i/ili stearinske kiseline), kao i višestruko patvorenje (Reybroeck i van Nevel, 2018.; Svečnjak i sur., 2018., Tanner i Lichtenberg-Kraag, 2020.). Analitičke metode koje se primjenjuju u otkrivanju patvorenja pčelinjeg voska uključuju klasične fizikalno-kemijske metode te instrumentalne analitičke tehnike (spektroskopske i kromatografske).

Iako se na upitnu pouzdanost fizikalno-kemijskih metoda u otkrivanju patvorenja pčelinjeg voska sustavno ukazuje (Tulloch, 1973.; Bernal i sur., 2005.; Serra Bonvehi i Orantes Bermejo, 2012., Maia i Nunes, 2013.; Svečnjak i sur., 2015., 2021.), njihova je primjena implementirana u EU zakonsku regulativu vezanu za kriterije kakvoće (čistoće) pčelinjeg voska koji je namijenjen primjeni u farmaceutskoj (Vijeće Europe, 2020.) i prehrambenoj industriji (Uredba Komisije, 2012.), dok se kontrola kakvoće i provjera autentičnosti pčelinjeg voska u sektoru pčelarstva (satne osnove, blokovi voska namijenjeni za njihovu izradu) na EU razini još uvijek ne provode. Na cjelokupnu problematiku patvorenja pčelinjeg voska, uključujući i aspekte pouzdanosti i implementacije analitičkih metoda u otkrivanju patvorenja, nedavno je ukazala i Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, 2021.).

Cilj je ovog rada bio utvrditi pouzdanost primjene fizikalno-kemijskih metoda (određivanje točke tališta, specifične težine i kiselinskog broja) u otkrivanju patvorenja pčelinjeg voska.

Materijal i metode

Pripremljene su smjese pčelinjeg voska i parafina (*Paraffinum solidum*, Ph.Eur. 7,8: PS smjese) te smjese pčelinjeg voska i stearinske kiseline (*Acidum stearicum*, Ph.Eur. 8,1: AS smjese) s različitim udjelima dodanih patvorina koji se kretao od 5 % do 95 % (w/w), slijedeći porast od 5 % dodanih patvorina u pojedinim smjesama. Smjese su homogenizirane

zagrijavanjem na 90 °C kroz 3 sata, ostavljene da se ohlade na sobnoj temperaturi te čuvane na sobnoj temperaturi na tamnom mjestu do analiza

Pripremljene smjese pčelinjeg voska i patvorina analizirane su primjenom fizikalno-kemijskih metoda kako bi se utvrdio tip i intenzitet promjena odabranih fizikalno-kemijskih svojstava patvorenog pčelinjeg voska u ovisnosti o različitoj razini patvorenja parafinom i stearinskom kiselinom. Uzorci autentičnog pčelinjeg voska i patvorina (parafina i stearinske kiseline) te smjesa pčelinjeg voska i patvorina analizirani su sljedećim fizikalno-kemijskim metodama: određivanje točke tališta, specifične težine i kiselinskog broja.

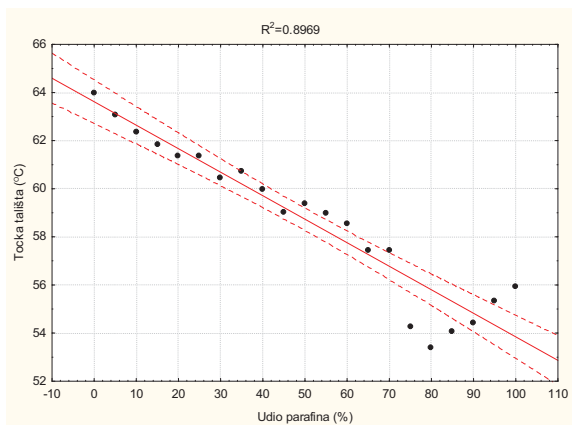
Specifična težina određena je pomoću digitalne precizne analitičke vage (MS 204 Mettler Toledo, SAD) kojom je određena masa uzorka na zraku i u mediju (apsolutni alkohol), a vrijednost specifične težine uzorka izražena je kao:

$$ST = \frac{\text{gustoća tvari}}{\text{gustoća medija}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

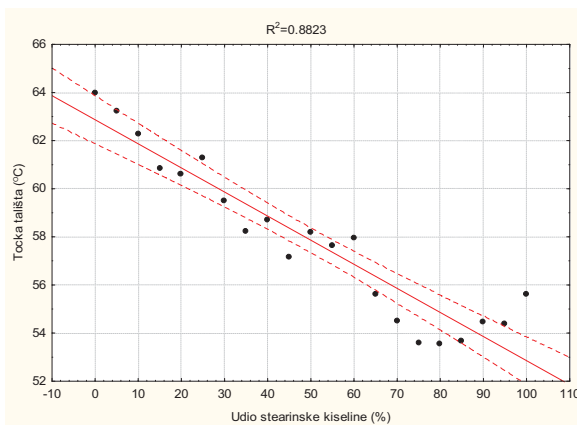
Određivanje točke tališta istraživanih uzoraka provedeno je pomoću digitalnog talištometra (MP 55 Melting Point System, Mettler Toledo, SAD) temeljenom na kapilarnoj metodi za automatsko određivanje točke tališta koji koristi mikroprocesorski sustav povećanja temperature. Određivanje kiselinskog broja provedeno je sukladno metodologiji propisanoj Europskom farmakopejom (Vijeće Europe, 2020.). Kiselinski broj ispitivanih uzoraka određen je potenciometrijskom metodom pomoću digitalnog pH metra za kiselo-bazne titracije (Mettler Toledo, SAD). Analiza i obrada podataka provedena je regresijskim analizama koristeći statistički paket Statistica version 7. (StatSoft Inc.).

Rezultati i rasprava

Obradom rezultata vrijednosti točke tališta uočeno je kako postoji linearan trend pada točke tališta dodatkom parafina i stearinske kiseline u pčelinji vosak, međutim rezultati (koeficijent determinacije R^2) nisu pokazali precizne kalibracijske krivulje u slučaju smjesa pčelinjeg voska s različitim udjelima parafina (Grafikon 1.; $R^2=0,8969$) niti različitim udjelima stearinske kiseline (Grafikon 2.; $R^2=0,8823$). Također, treba naglasiti da se u svrhu patvorenja koriste supstance sa širokim rasponom točke tališta (posebice parafini) koje su često istovjetne točki tališta prirodnog pčelinjeg voska (61-65 °C). Stoga točka tališta u nekim slučajevima može poslužiti samo kao indikacija patvorenja, ali ne daje jasan dokaz o patvorenju. Serra Bonvehi i Orantes Bermejo (2012.) u svom istraživanju također dolaze do zaključka kako vrijednost točke tališta pčelinjeg voska unutar raspona koje je predložila Europska farmakopeja ne osigurava autentičnost proizvoda, ali može poslužiti kao indikator patvorenja. Naime, već i male količine patvorina mijenjaju vrijednost točke tališta, odnosno proširuju raspon njezine vrijednosti pa tako pčelinji vosak koji je patvoren parafinom s niskom točkom tališta (54-56 °C) smanjuje točku tališta na < 61 °C kada je udio dodanog parafina veći od 10%. Kako je prikazano na Grafikonu 2., dodavanjem stearinske kiseline pčelinjem vosku, također je uočeno značajno smanjenje vrijednosti točke tališta (> 65 °C), ali regresijski pravac i vrijednost koeficijenta determinacije ($R^2=0,8823$) ukazuje na određeni stupanj mjerne nesigurnosti.

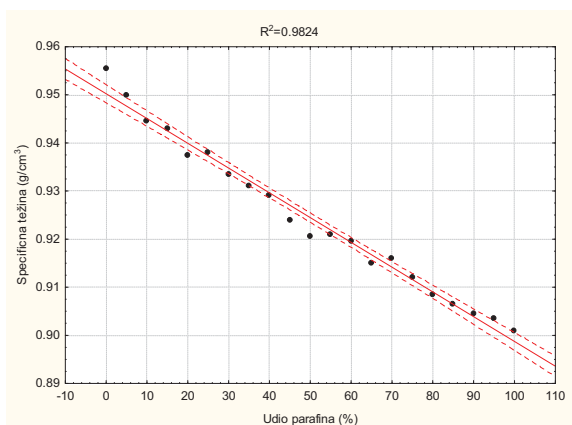


Grafikon 1. Odnos između utvrđene točke tališta i udjela parafina u smjesama pčelinjeg voska i parafina (model jednostavne linearne regresije)

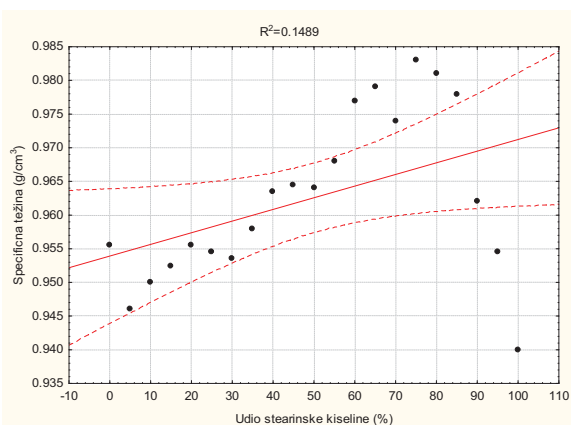


Grafikon 2. Odnos između utvrđene točke tališta i udjela stearinske kiseline u smjesama pčelinjeg voska i stearinske kiseline (model jednostavne linearne regresije)

Rezultati analize specifične težine ispitivanih uzoraka smjesa pčelinjeg voska i patvorina prikazani su na Grafikonu 3. i 4. Obradom rezultata utvrđeno je kako se patvorenje parafinom može utvrditi temeljem ovog parametra; naime, uočen je linearan trend pada specifične težine dodatkom parafina u pčelinji vosak (Grafikon 3.; $R^2=0,9824$), ali valja istaknuti kako su razlike u vrijednostima specifične težine pčelinjeg voska i parafina neznatne što narušava pouzdanost rezultata. Suprotno tome, u slučaju patvorenja stearinskom kiselinom nije moguće utvrditi patvorenje obzirom da se vrijednosti specifične težine dodatkom stearinske kiseline mijenjaju i značajno variraju, ali ne u ovisnosti o %-tnom (w/w) udjelu stearinske kiseline (Grafikon 4., $R^2=0,1489$). Tako neke od smjesa pčelinjeg voska i stearinske kiseline imaju vrijednost specifične težine gotovo istovjetnu specifičnoj težini autentičnog pčelinjeg voska, koja prosječno iznosi $0,956 \text{ g/cm}^3$.



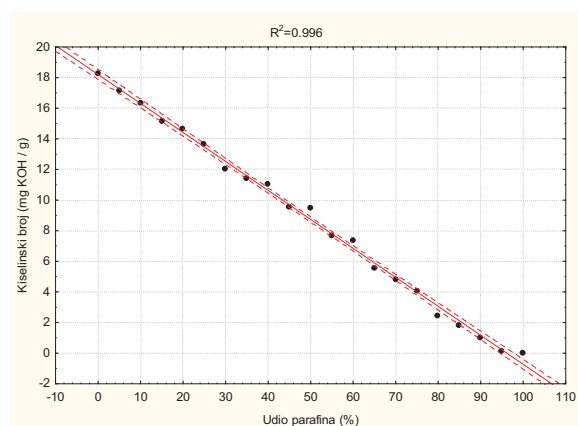
Grafikon 3. Odnos između utvrđene specifične težine i udjela parafina u smjesama pčelinjeg voska i parafina (model jednostavne linearne regresije)



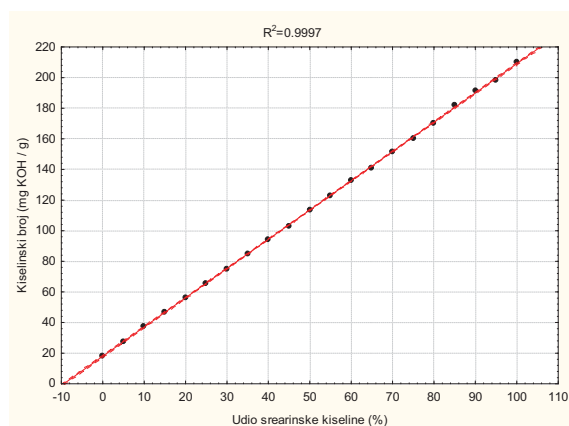
Grafikon 4. Odnos između specifične težine i udjela stearinske kiseline u smjesama pčelinjeg voska i stearinske kiseline (model jednostavne linearne regresije)

Rezultati korelacije između vrijednosti kiselinskog broja i udjela patvorina u smjesama pčelinjeg voska i patvorina (parafina i stearinske kiseline) prikazani su na Grafikonu 5. i 6. Grafikon 5. prikazuje pouzdan linearan trend pada kiselinskog broja dodatkom parafina u

pčelinji vosak ($R^2=0,996$), a nasuprot tome, trend porasta dodatkom stearinske kiseline (Grafikon 6.; $R^2=0,9997$). Ovakav je ishod očekivan obzirom da parafin ne sadrži lipidne sastavnice (estere i masne kiseline), dok stearinska kiselina logično povisuje vrijednost ovog parametra. Navedeni rezultati impliciraju kako je kiselinski broj najpouzdaniji fizikalno-kemijski parametar u otkrivanju patvorenja pčelinjeg voska, što je u skladu s rezultatima iz dostupne znanstvene literature (Bernal i sur., 2005.; Maia i Nunes, 2013.; Svečnjak i sur., 2015.).



Grafikon 5. Odnos između kiselinskog broja i udjela parafina u smjesama pčelinjeg voska i parafina (model jednostavne linearne regresije)



Grafikon 6. Odnos između kiselinskog broja i udjela stearinske kiseline u smjesama pčelinjeg voska i stearinske kiseline (model jednostavne linearne regresije)

Zaključak

Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako određivanje kiselinskog broja pčelinjeg voska pokazuje zadovoljavajuću mjernu pouzdanost u otkrivanju patvorenja ($R^2=0,996$ za parafin; $R^2=0,9997$ za stearinsku kiselinu). Temeljem rezultata analize vrijednosti specifične težine istraživanih uzoraka voska, utvrđeno je kako radi neznatnih razlika u vrijednostima između pčelinjeg voska i parafina / stearinske kiseline nije moguće utvrditi patvorenje, a točka tališta kao parametar kakvoće pčelinjeg voska može poslužiti samo kao indicacija patvorenja. Utvrđivanje patvorenja pčelinjeg voska koristeći isključivo fizikalno-kemijske parametre ne pruža zadovoljavajuće rezultate za potvrdu autentičnosti pčelinjeg voska, stoga se za pouzdanu detekciju patvorina u pčelinjem vosku preporuča kombinacija analiza minimalno dva fizikalno-kemijska parametra uz provjeru rezultata instrumentalnim analitičkim tehnikama (kromatografskim i/ili spektroskopskim) koje ujedno omogućuju pouzdanu kvantifikaciju patvorina u pčelinjem vosku s niskim granicama detekcije ($< 3,5\%$).

Napomena

Istraživanja neophodna za ovaj rad dio su projekta „Kemijska karakterizacija kontaminiranog pčelinjeg voska i utvrđivanje pozadinskih mehanizama negativnih učinaka kontaminacije primjenom fizikalno-kemijskih i spektroskopskih (NMR, FTIR-ATR, GC-MS) metoda“ kojeg je financirala Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju.

Literatura

Bernal J. L., Jiménez J. J., Del Nozal M. J., Torbio L., Martín M. T. (2005). Physico-chemical parameters for the characterization of pure beeswax and detection of adulterations. *European Journal of Lipid Science And Tehnology*. 107(3):158-166.

- Bogdanov S. (2017). Beeswax: Production, Properties, Composition and Control. Beeswax book: Chapter 1. Bee Product Science: 1-19.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2020). Risk assessment of beeswax adulterated with paraffin and/or stearin/stearic acid when used in apiculture and as food (honeycomb). EFSA Supporting Publication. 17(5): 1-64.
- 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.
- Serra Bonvehí J. S., Orantes Bermejo F. J. (2012). Detection of adulterated commercial Spanish beeswax. Food Chemistry. 132(1): 642- 648.
- Reybroeck W., Van Nevel J. (2018). Effect of beeswax adulterated with sterin on the development of worker bee brood: results of a field trial. Program & Abstract Book EurBee 8. 8th Congress of Apidology, Ghent, Belgium, p. 115.
- 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.
- Svečnjak, L., Prđun, S., Baranović, G., Damić, M., Rogina, J. (2018). Alarming situation on the EU beeswax market: The prevalence of adulterated beeswax material and related safety issues. Program & Abstract Book EurBee 8. 8th Congress of Apidology, Ghent, Belgium, p. 114-115.
- Svečnjak L., Nunes F. M., Garcia Matas R., Cravedi J.-P., Christodoulidou A., Rortais A., Saegerman C. (2021). Validation of analytical methods for the detection of beeswax adulteration with a focus on paraffin. Food control. 120, 107503: 1-13.
- 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.
- 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.
- Uredba Komisije (2012). br. 231/2012 o utvrđivanju specifikacija za prehrambene aditive navedene u prilogima II. i III. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća. Official Journal of the European Union. L83: 1-295.
- Vijeće Europe (2020). European Pharmacopoeia 10.2 (Ph. Eur. 10th ed.): Beeswax. white (01/2008:0069), Beeswax yellow (01/2008: 0070). In EDQM -European Directorate for the Quality of Medicine and Healthcare. Cedex, France, 1804-1805.

Reliability of physico-chemical methods in beeswax adulteration detection

Abstract

The addition of adulterants to beeswax changes its composition, quality, and physico-chemical properties. The aim of this study was to determine the reliability of physico-chemical methods in the detection of beeswax adulteration. The results showed that the determination of the acid number shows satisfactory measurement reliability in the detection of adulteration ($R^2=0.996$ for paraffin; $R^2=0.9997$ for stearic acid), while the determination of the melting point ($R^2=0.8969$ for paraffin; $R^2=0,8823$ for stearic acid), and specific gravity ($R^2=0.9824$ for paraffin; $R^2=0.1489$ for stearic acid) reflects questionable reliability depending on the type of adulterant. Therefore, the latter physico-chemical parameters can only serve as an indication of adulteration.

Key words: beeswax, adulteration, paraffin, stearic acid, physico-chemical methods