

## **Verslag van de analyses betreffende de “sjoemelwas” uitgevoerd op het laboratorium van de Vakgroep OMC, UGent.**

*Eric J. Goethals en Bernhard De Meyer, Vakgroep Organische en Macromoleculaire Chemie, Universiteit Gent, Krijgslaan 281, 9000 Gent*

### **SAMENVATTING.**

Thermische analyses door middel van “Differential Scanning Calorimetry” (DSC) tonen aan dat bijenwassen afkomstig van *Apis mellifera* van verschillende geografische oorsprong een typisch en herkenbaar smelttraject vertonen dat aanvangt bij ongeveer 35°C en eindigt bij 62 – 65°C. Karakteristiek is het voorkomen van twee maxima in de thermogrammen: een klein piek met maximum bij 48-52°C en een hoofdpiek met maximum bij 61-65°C. Toevoeging van 25% stearine of paraffine leidt tot een dramatische verandering van de thermogrammen. De “kleine” piek verschuift naar lagere temperaturen en wordt hoofdpiek. De tweede piek wordt nu de kleinste. Het verschil is het meest uitgesproken bij het stearine-mengsel.

Aan de hand van deze DSC analyses kon bewezen worden dat de “sjoemelwas”, die in 2015-16 op de markt gebracht is (lotnr's 212225 tot 213110 zijn “verdacht”), bestaat uit een mengsel bijenwas/stearine (tussen 75/25 en 70/30). Deze “was” vertoont hetzelfde afwijkend smeltgedrag dat werd vastgesteld bij de hoger vermelde zelfgemaakte bijenwas/stearine mengsels.

De resultaten worden bevestigd door FTIR-spectroscopie en chromatografische analyses.

De stearine werd geanalyseerd door vloeistof-chromatografie. Het is een mengsel van stearinezuur en palmitinezuur in een verhouding 75stea/25palm.

Deze resultaten wijzen er op dat de problemen met de waswafels gemaakt met sjoemelwas te wijten kunnen zijn aan het afwijkend (te laag) smeltgedrag van die was. De fysische (mechanische) eigenschappen van een materiaal staan inderdaad rechtstreeks in verband met zijn kristallisatie gehalte. Bijenwas is een complex mengsel van esters, alkanen, zuren, alcoholen enz. die aan dit materiaal unieke fysische (mechanische) eigenschappen verleent. Grote afwijkingen van die eigenschappen, zoals hier het geval is, kan de oorzaak zijn van de niet-aanvaarding.

### **Inleiding**

In 2016 werd van verschillende kanten gewag gemaakt van een commerciële bijenwas, die door de bijen niet aanvaard wordt. De niet-aanvaarding uit zich door dat waswafelramen, gemaakt van deze was, door de koningin wel belegd worden maar dat de larfjes die gevormd worden door de werksters om een of andere reden verwijderd worden waardoor het fenomeen “hagelschot” optreedt. Hierdoor kan het broed zich niet normaal ontwikkelen met een verzwakking of zelfs

teloorgang van het bijenvolk tot gevolg. Volgens een mededeling van het FAVV zouden de wassen met lotnummers 212225 t.e.m. 213110 verdacht zijn.

Bij het begin van de vaststelling van de problemen werd gedacht aan de klassieke, bekende wasvervalsingen van bijenwas: paraffine en stearine.

In de loop van ons onderzoek hebben wij twee monsters van “gegarandeerde sjoemelwas” gekregen van twee college-imkers: ADC en MDW.

De bedoeling van dit onderzoek was (1) een eenvoudige, snelle analysemethode te vinden waarmee een sjoemelwas kan opgespoord worden, (2) de samenstelling van de sjoemelwas te bepalen en (3) na te gaan wat de oorzaak is van de problemen met de sjoemelwas.

In dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van verschillende analysemethodes: DSC, FTIR, SEC en HPLC.

### **DSC-studie van bijenwas, paraffine, stearine, mengsels daarvan en sjoemelwas.**

In deze studie gaan we dieper in op één van de zuiverheidscriteria van bijenwas: het smeltpunt. Deze belangrijke karakteristiek wordt in de Europese Pharmacopea aangeduid met “drop point”, letterlijk vertaald het “druippunt” of “druppelpunt”. Dit hangt samen met de manier waarop dit punt bepaald wordt: de glas capillair methode. De te meten stof wordt in een glazen buisje geplaatst en dit buisje wordt langzaam opgewarmd. De temperatuur waarbij de inhoud uit het buisje druppelt is het druippunt. In een variante wordt de temperatuur geregistreerd waarbij de stof in het buisje doorzichtig wordt.

Bijenwas bestaat uit een mengsel van meer dan tweehonderd stoffen. Alhoewel de Pharmacopea stipuleert dat bijenwas een smeltpunt tussen 61 en 66°C moet hebben, spreekt het eigenlijk vanzelf dat dergelijk mengsel geen scherp smelt-punt kan vertonen maar een smelt-traject. Het “druippunt” is dan wel de temperatuur waarbij alles gesmolten is maar geeft geen info over eventuele smeltprocessen die reeds bij lagere temperaturen plaats vinden. Dat smelt-traject kan door Differentiaal Scanning Calorimetrie (DSC) gevisualiseerd worden. D.m.v. DSC wordt via de benodigde energietoevoer het smeltproces in functie van de temperatuur uitgetekend: een thermogram of smeltcurve. Aangezien de fysische (mechanische) eigenschappen van een materiaal in grote mate bepaald worden door de kristallisatie-toestand, is de kennis van de kristallisatie ook een maat voor de fysische eigenschappen van dat materiaal.

## DSC van bijenwas

Het eerste wat nagegaan werd is of bijenwassen geproduceerd door “onze” bijen specifieke, reproduceerbare thermogrammen vertonen. In Figuur 1 staan drie thermogrammen van (1) een waswafel gemaakt uit eigen ontzegelwas, (2) idem van een West-Vlaamse collega-imker en (3) een was uit een wildbouw-raat (dus compleet onbewerkt). We zien dat de thermogrammen gelijkaardig zijn. In alle gevallen begint de stijging van de curve bij 30 – 35°C en er zijn steeds twee “pieken” te zien: een kleinere met maximum bij 48 -52°C en een hoofdpijk met maximum bij 62 - 65°C. De curve van de was van de wildbouw-raat ligt ongeveer één graad hoger dan de andere twee.

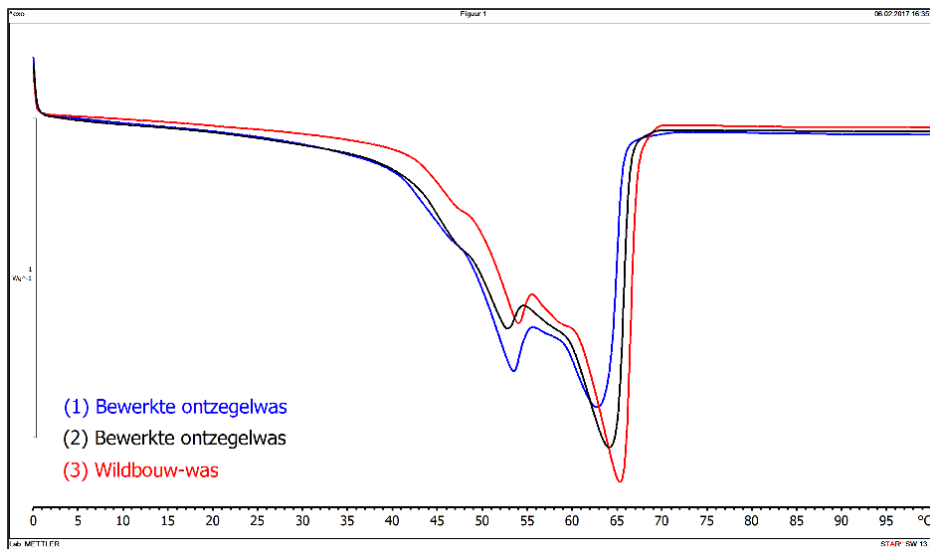


Fig. 1: Thermogrammen van verschillende (Vlaamse) bijenwassen

In een tweede reeks werden thermogrammen van wassen van verschillende oorsprong vergeleken. Daarvoor gingen we te rade bij Dr. Reybroeck van het ILVO te Melle. Daar kregen we monsters van was uit China, India, Nigeria, Kameroen en Spanje. De thermogrammen staan in Figuur 2. We zien dat vier van de vijf wassen (Spanje, Nigeria, China, Kameroen) hetzelfde patroon vertonen als onze lokale wassen maar dat één monster duidelijk verschilt: de was uit India. Het ganse thermogram is met een paar graden naar lagere waarden verschoven maar het maximum van de hoogste smeltpiek (60-61°C) ligt nog net binnen de Pharmacopea-grenzen.

Dan werden thermogrammen van de sjoemelwas-stalen opgenomen. Het betreft de lotnrs. 212432 en 212822. In Figuur 3 staan deze thermogrammen afgebeeld, samen met een thermogram van een zuivere was. Het is zonder meer duidelijk dat thermogrammen van beide

stalen zeer verschillen van die van zuivere was. De eerste piek is nu groter dan de tweede en zowel de eerste als de tweede liggen bij beduidend lagere temperaturen. Dit betekent dat deze was bij een lagere temperatuur “week” wordt dan echte was. Het maximum van de hogere piek ligt bij ongeveer 60°C. Dit betekent dat het “druippunt” ook bij deze temperatuur ligt zodat het, volgens de pharmacopea, nog dicht in de buurt van de onderste grenswaarde ligt.

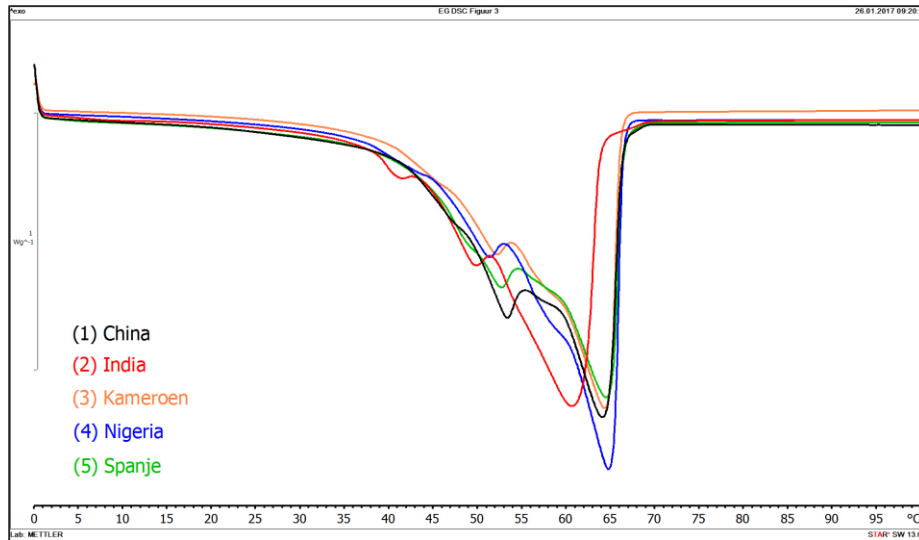


Fig. 2: Thermogrammen van bijenwassen van uiteenlopende afkomst: China, India, Nigeria, Kameroen en Spanje

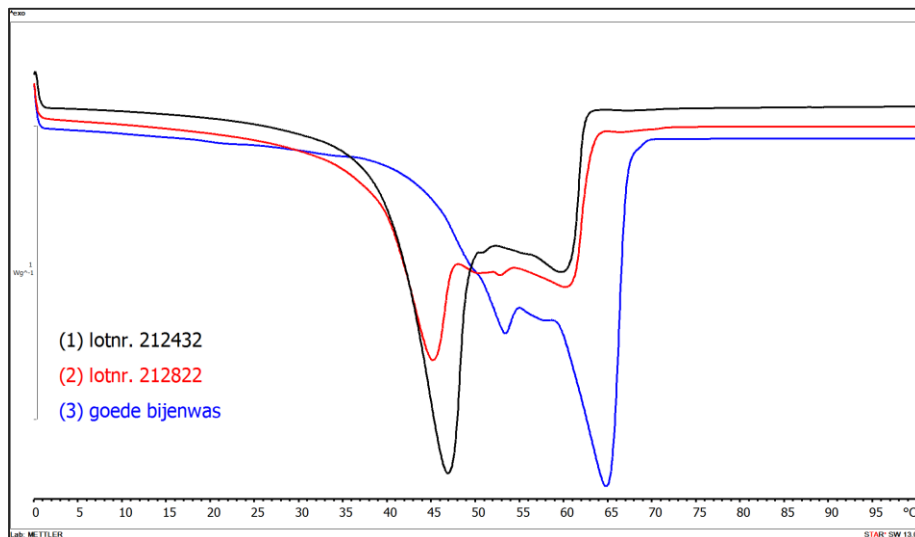


Fig. 3: Thermogrammen van bijenwas lotnrs. 212432 (zwart) en 212822 (rood) en van goede bijenwas (blauw)

Besluit: Zuivere bijenwassen, ongeacht hun oorsprong, geven een typisch en duidelijk herkenbaar smelttraject. De sjoemelwas-stalen vertonen een smelttraject dat duidelijk verschilt van dat van zuivere was: het belangrijkste smeltproces begint hier bij 40-45°C.

In wat volgt zal onderzocht worden wat de samenstelling van de sjoemelwas is.

## DSC's van paraffine en stearine

**Paraffine** is een product van de petrochemie dat bestaat uit een mengsel van alkanen met oplopend aantal koolstoffen. De relatieve concentraties van die alkanen volgen een quasi-Gaussiaanse verdeling. Bijenwas bevat eveneens een niet onbelangrijke fractie (14%) aan alkanen maar dat zijn alleen alkanen met onpare aantallen koolstoffen (bv. C27, C29, C31, ...). Bij paraffine zijn pare én onpare aanwezig (C27, C28, C29, C30, ...). Vandaar dat gaschromatografie (GC) een aangewezen manier is om vervalsing met paraffine op te sporen: als er alkanen met even aantal koolstoffen aanwezig zijn, dan is de was vervalst met paraffine.

Er bestaan verschillende soorten paraffine die zich onderscheiden door de samenstelling van de alkanen. Hoe hoger het gemiddeld aantal koolstoffen, hoe hoger het smeltpunt. Veel gebruikte paraffines zijn die met smeltpunt rond de 60°C omdat dat ideaal is voor de kaarsfabricage. Dit is, niet toevallig, zeer dicht bij het "smeltpunt" van bijenwas die sinds eeuwen voor kaarsfabricage gebruikt wordt.

Wij hebben bij het "Bijenhof" paraffine voor kaarsenfabricage aangekocht. In Figuur 4 staat een DSC-thermogram van deze paraffine afgebeeld. We zien dat de top van de smeltcurve bij 58-59°C ligt maar dat het einde van het smeltproces (het "druippunt") bij 60-61°C ligt, dus nog net binnen de pharmacopea-grenzen voor bijenwas. We zien ook dat er nog een zwak smeltproces optreedt bij lagere temperatuur zoals aangeduid door de (kleinere) piek rond de 40°C.

**Stearine** is een product van dierlijke oorsprong. Het wordt verkregen uit talg ("tallow"), dat is een vet-mengsel geproduceerd door runderen en/of schapen. Dierlijke vetten bestaan hoofdzakelijk uit triglyceriden waarvan de zuuronderdelen hoofdzakelijk verzadigde vetzuren zijn. Door hydrolyse van de triglyceriden worden vrije vetzuren gevormd die bij afkoelen van het reactiemengsel neerslaan als een vaste substantie, die stearine genoemd wordt. Het belangrijkste bestanddeel van stearine is stearinezuur, een verzadigd vetzuur met 18 koolstoffen:



Zuiver stearinezuur heeft een smeltpunt van 69,6°C.

In Figuur 4 staat de DSC-smeltcurve van de aangekochte stearine. We zien dat het smeltpunt (top van de curve) bij 58-59°C ligt, dus net onder de pharmacopea-grenzen voor bijenwas. Het smeltpunt toont aan dat dit stearine geen zuiver stearinezuur is (heeft smpt 69,6°C) maar waarschijnlijk een deel andere vetzuren bevat.

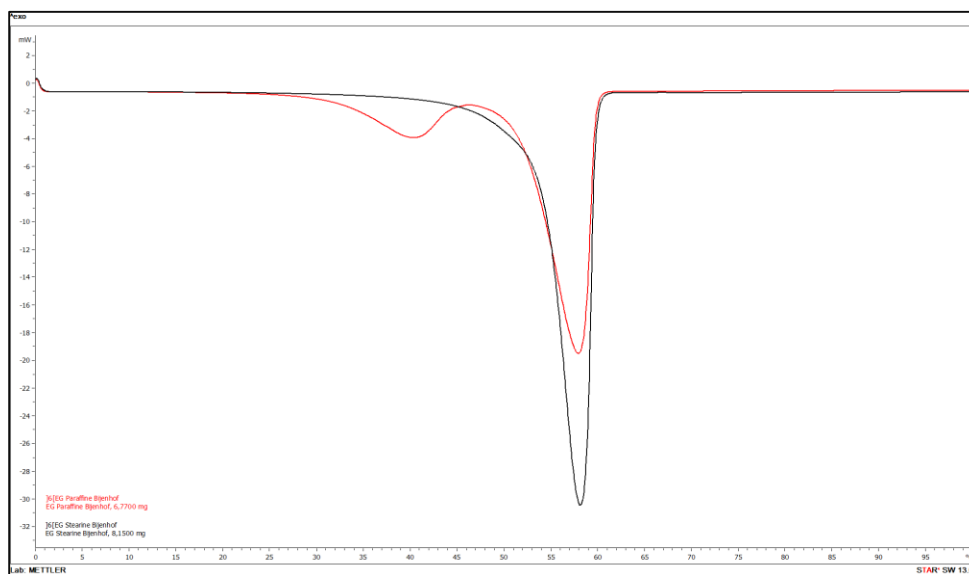


Fig. 4 Thermogrammen van stearine (zwart) en paraffine (rood)

### DSC's van mengsels bijenwas/stearine en bijenwas/paraffine

Er werden mengsels gemaakt van zuivere bijenwas en stearine en van zuivere bijenwas en paraffine, in een gewichtsverhouding 75/25 en van deze mengsels werden DSC opnamen gemaakt. Ze staan beschreven in Figuur 5. Als referentie wordt ook een thermogram van zuivere bijenwas getoond.

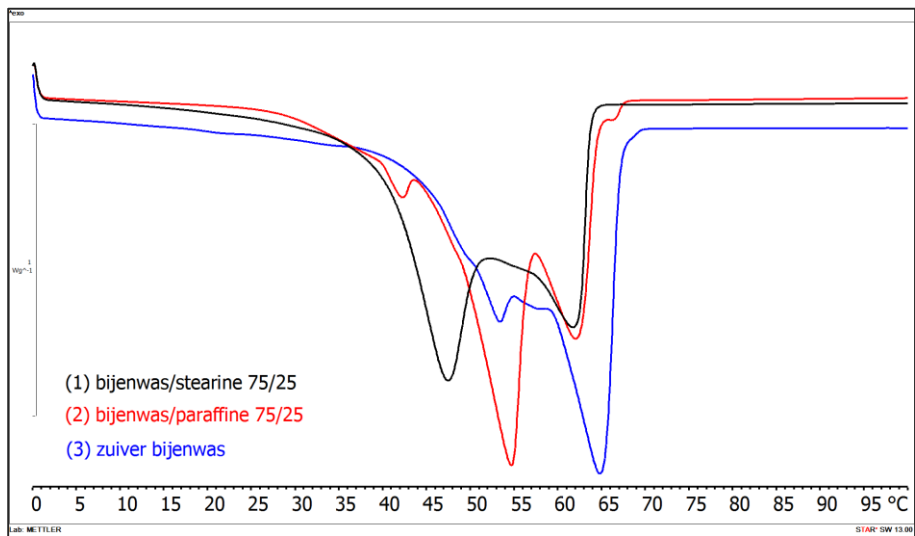


Fig. 5: Thermogrammen van mengsels bijenwas/stearine (zwart) en bijenwas/paraffine (rood) (beide 75/25) en zuivere bijenwas (blauw)

We zien dat beide mengsels thermogrammen produceren die duidelijk verschillen van het zuiver bijenwas-thermogram. Het valt in beide gevallen op dat twee stoffen met een praktisch gelijk “smeltpunt” (58 voor stearine of paraffine en 64 voor was) tot een mengsel leiden met een duidelijk lagere smeltemperatuur. Ook valt meteen de gelijkenis op tussen het thermogram van het was/stearine mengsel en het thermogram van de sjoemelwassen. Ter illustratie staat in Figuur 6 een overlay van lotnr 212432 met ons was/stearine-mengsel. Het is duidelijk dat het hier om analoge samenstellingen gaat.

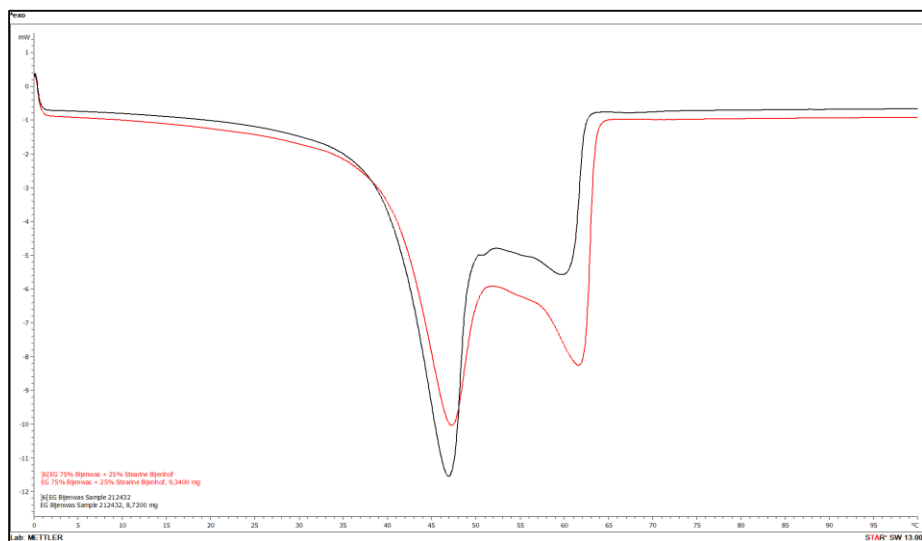


Fig. 6 : Overlay van thermogram van lotnr. 212432 (zwart) en thermogram van bijenwas/stearine mengsel (75/25)(rood)

Doordat de hoogten van de pieken iets verschillen, menen wij te kunnen besluiten dat de sjoemelwas een mengsel is van 70-75 % bijenwas en 30-25% stearine.

## Bevestiging d.m.v. FTIR spectroscopie

Fourier Transform Infra Red (FTIR) spectroscopie is een krachtig middel om de structuur van een product of mengsel van producten te analyseren. Als twee FTIR spectra identiek zijn dan zijn de monsters ook gelijk aan elkaar.

Er werd een FTIR spectrum van sjoemelwas (212432) opgenomen en vergeleken met het spectrum van zuivere was. De spectra vertonen een duidelijk verschil in de 1700 - 1750  $\text{cm}^{-1}$  regio die toegeschreven worden aan carbonyl-groepen. De zuivere was toont een absorptie-piek bij 1735 met een kleine schouder bij 1710 en de sjoemelwas een twee intense pieken bij 1735 en 1710. De eerste is toe te schrijven aan de carbonyl van een esterfunctie, de tweede aan de carbonyl van een zuurfunctie. Dan werden de spectra van het bijenwas/stearine (75/25) mengsel met dat van lotnr. 212432 vergeleken. In Figuur 7 worden beide spectra op elkaar gesuperposeerd en zoals men kan zien zijn beide spectra niet van elkaar te onderscheiden. Hiermee wordt het besluit van de vorige paragraaf bevestigd: de sjoemelwas is een mengsel van bijenwas en stearine.

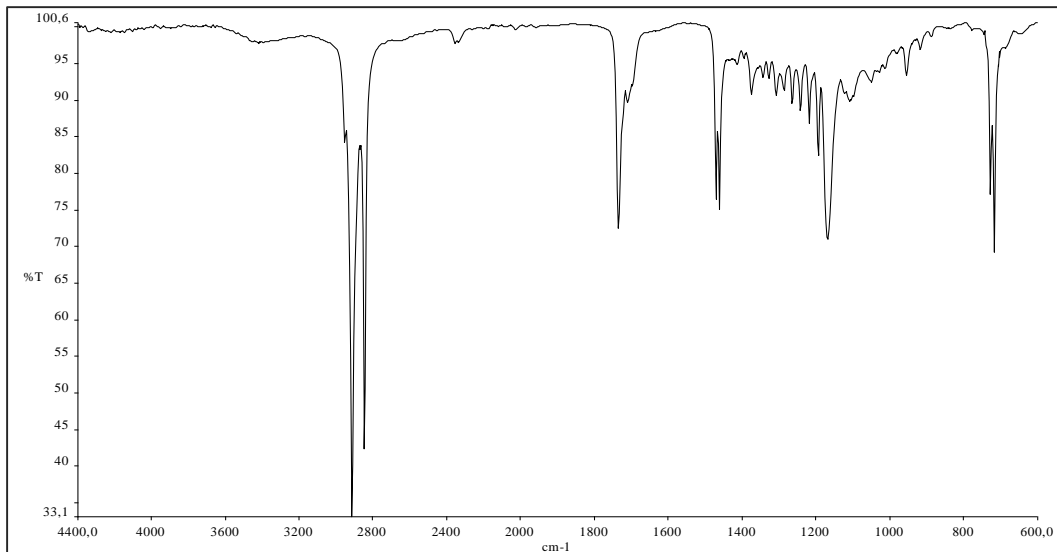


Fig. 7: FTIR spectrum van zuivere bijenwas



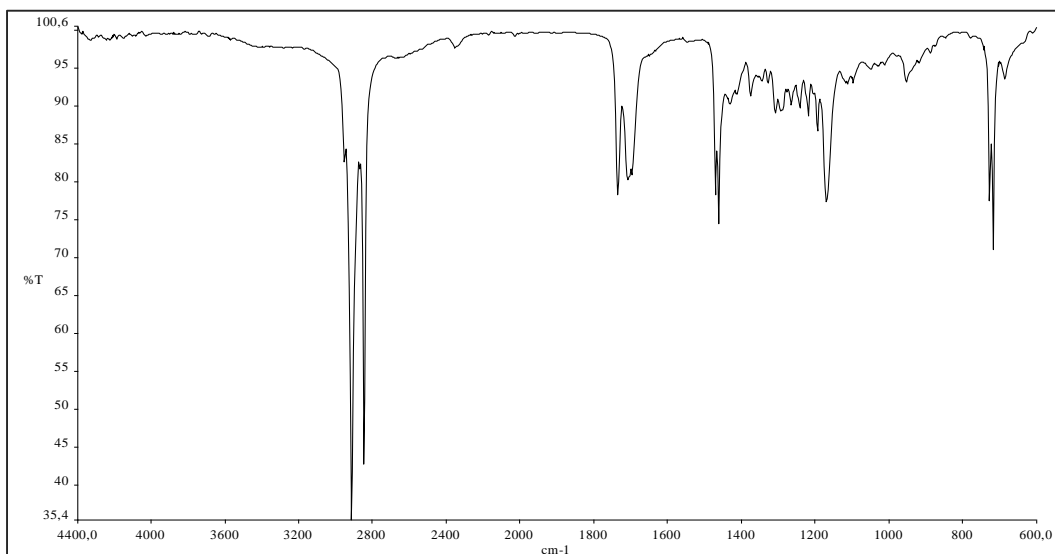


Fig. 8: FTIR spectrum van lotnr 212432

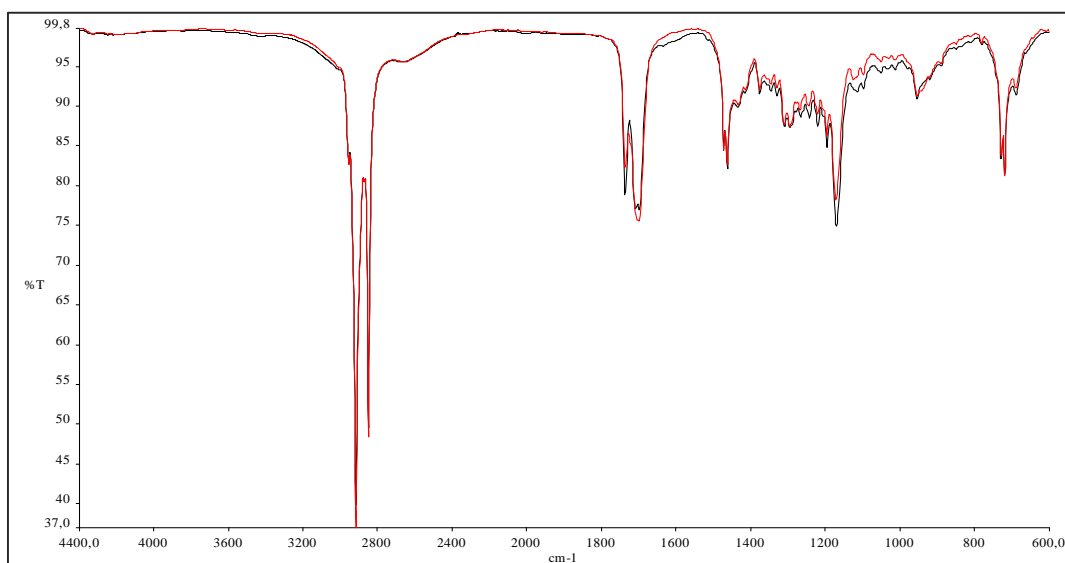
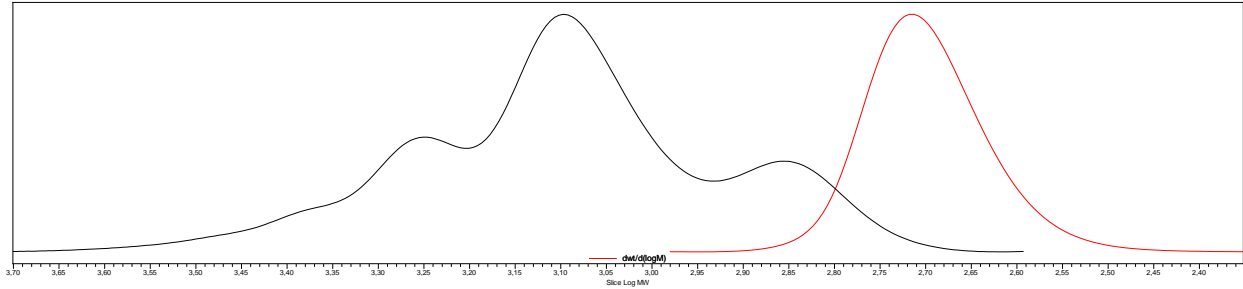


Fig. 9: Superpositie van twee FTIR spectra: lotnummer 212432 (rood) en bijenwas/stearine mengsel 75/25 (zwart)

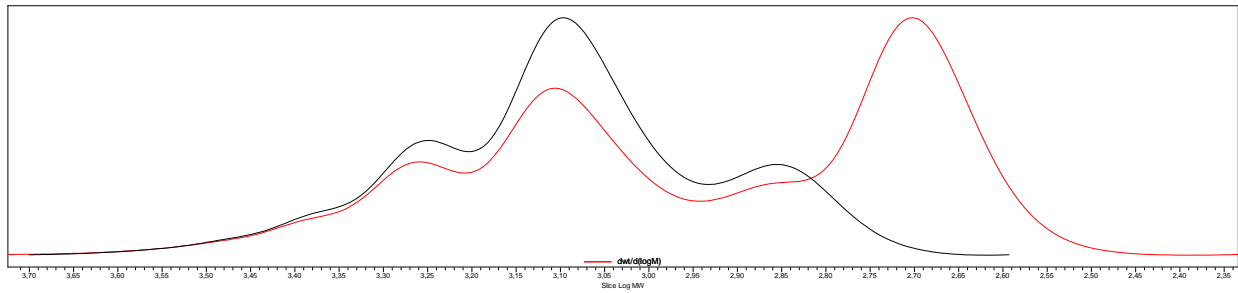
### Bevestiging door SEC-analyses

Size Exclusion Chromatography is een scheidingstechniek die gebaseerd is op de afmetingen van de te scheiden componenten. In Figuur 10 staan de SEC's van zuivere bijenwas en van stearine.

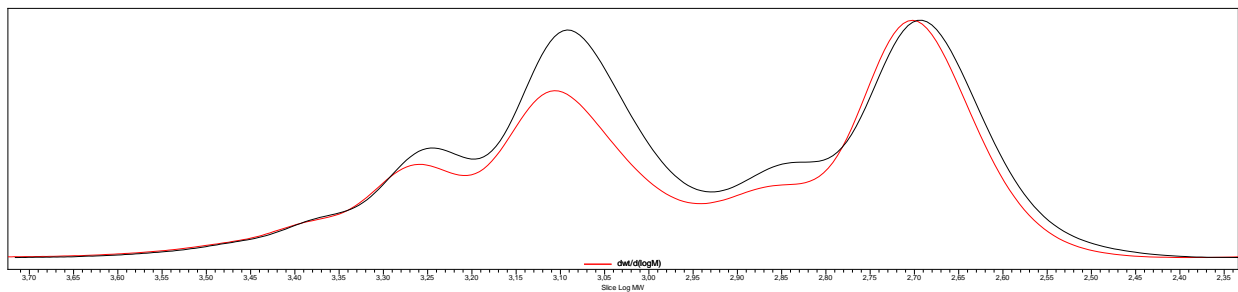
In Figuur 11 staan de SEC's van zuivere bijenwas en van de sjoemelwas lotnr. 212432 en in Figuur 12 een overlay van een was/stearine mengsel (75/25) met lotnr. 212432.



*Fig. 10: SEC-analyse zuivere bijenwas (zwart) en stearine (rood)*



*Fig. 11: SEC-analyse zuivere bijenwas (zwart) en van lotnr. 212432 (rood)*



*Fig. 12: Overlay van SEC-analyses van lotnr. 212432 (rood) en van was/stearine mengsel (75/25) (zwart)*

De resultaten bevestigen de vorige besluiten: de sjoemelwas is een mengsel van bijenwas en stearine. Uit het laatste chromatogram kan eveneens bevestigd worden dat lotnr. 212432 meer dan 25% stearine bevat (eerder 30%).

## Addendum: analyse van de gebruikte stearine en paraffine

Omdat zowel stearine als paraffine mengsels van verschillende componenten zijn vonden we het belangrijk de door ons gebruikte stoffen nader te karakteriseren.

Voor paraffine bestaat de karakterisatie uit het bepalen van welke alkanen er in voorkomen. Voor stearine is het probleem complexer. Er bestaat namelijk enige verwarring betreffende de definitie van stearine. Volgens Wikipedia is stearine een triglyceride met drie stearinezuurresten (dus glycerol tristearaat). Het wordt (volgens dezelfde bron) ook tristearine genoemd. Deze stof heeft een smpt van 55°C. Volgens andere bronnen is stearine een hoog smeltend hydrolyse product van dierlijk vet, talg (“tallow”) dat in 1830 voor het eerst geproduceerd werd door de Franse chemicus Chevreul en dat een bekende grondstof is voor de fabricage van kaarsen. Het bestaat hoofdzakelijk uit stearinezuur plus nog enkele verzadigde vetzuren zoals palmitinezuur (een verzadigd C16 vetzuur). Bijkomende complicatie is dat tegenwoordig ook “stearine” uit plantaardige grondstoffen op de markt gebracht worden zoals “palmstearine”. Deze stearine bevat meer palmitinezuur en heeft dan ook een lager smeltpunt.

Het is derhalve wenselijk dat de stearine waarmee onze DSC-studie werd uitgevoerd, nauwkeurig geanalyseerd wordt. Uit het FTIR spectrum kan afgeleid worden dat “bijnhof-stearine” zuurfuncties bevat (piek bij 1735  $\text{cm}^{-1}$ ) en geen esterfuncties (geen piek bij 1710  $\text{cm}^{-1}$ ). De glycerol tristearaat structuur kan dus uitgesloten worden. Maar het is geen zuiver stearinezuur want het smeltpunt klopt niet.

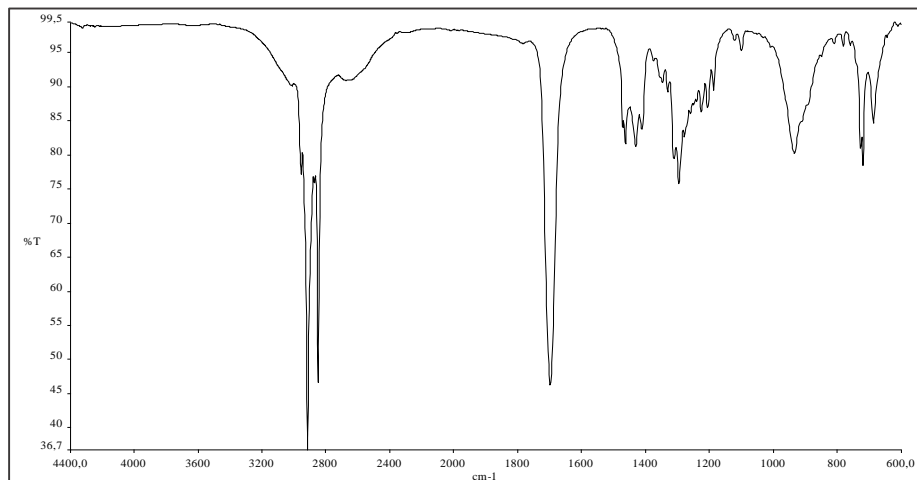


Fig. 13: FTIR-spectrum van “Bijnhof-stearine”: de piek bij 1710  $\text{cm}^{-1}$  duidt op een carbonzuur functie

Daarom werden HPLC analyses uitgevoerd van stearinezuur, palmitinezuur en de bijenhof-stearine. De chromatogrammen staan afgebeeld in figuur 14. Hieruit volgt duidelijk dat de bijenhof-stearine bestaat uit een mengsel van de twee vetzuren in een verhouding van 75stea/25palm.

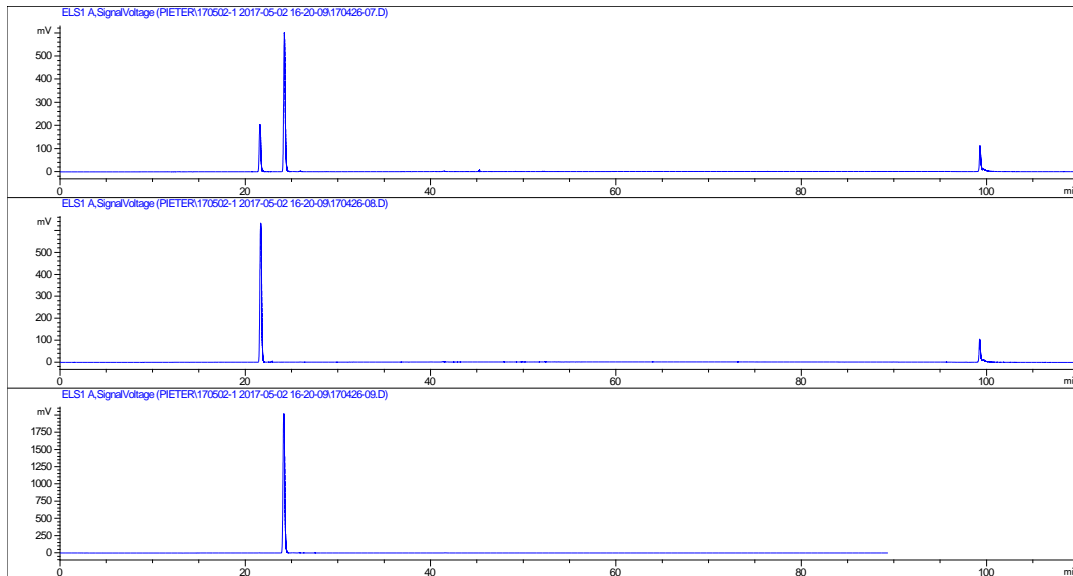


Fig.14: HPLC analyses van “bijenhof-stearine” (boven), palmitinezuur (midden) en stearinezuur (onder)

Voor paraffine is de studie gebeurd met High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Figuur 13 toont het chromatogram. We zien dat alkanen met een Gaussiaanse verdeling liggen tussen de C.. en de C..

**Dit moet nog gedaan worden.**

Gent, 3 mei 2017