

Na osnovu člana 17. stav 2. i člana 72. Zakona o hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 50/04) i člana 17. Zakona o Vijeću ministara Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH", br. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 i 24/08), Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Agencije za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine, u saradnji s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, na 76. sjednici održanoj 12. februara 2009. godine, donijelo je

PRAVILNIK

O METODAMA ZA KONTROLU MEDA I DRUGIH PČELINJIH PROIZVODA

DIO PRVI - OPĆE ODREDBE

Član 1.

(Predmet)

(1) Pravilnikom o metodama za kontrolu meda i drugih pčelinjih proizvoda (u daljnjem tekstu: Pravilnik) propisuju se metode za kontrolu kvaliteta meda i drugih pčelinjih proizvoda, te proizvoda na bazi meda i drugih pčelinjih proizvoda (u daljnjem tekstu: proizvod).

(2) Pravilnikom su definirane:

- a) metode uzimanja uzoraka,
- b) metode fizičkih, hemijskih i bioloških analiza za proizvode.

(3) Uzimanje uzoraka, fizičke, hemijske i biološke analize proizvoda vrše se po metodama koje su navedene u aneksima I. i II., koji su sastavni dio ovog pravilnika.

DIO DRUGI - POSEBNE ODREDBE

Član 2.

(Metode uzimanja uzoraka)

Metode uzimanja uzoraka meda i drugih proizvoda kojima se utvrđuju postupci i načini uzimanja uzoraka na kojima se vrši kontrola kvaliteta tih proizvoda navedene su u Aneksu I. ovog pravilnika.

Član 3.

(Metode fizičkih, hemijskih i bioloških analiza)

Metode fizičkih, hemijskih i bioloških analiza meda i drugih proizvoda kojima se utvrđuju uslovi i postupci za vršenje fizičkih, hemijskih i bioloških ispitivanja proizvoda radi provjeravanja kvaliteta navedene su u Aneksu II. ovog pravilnika.

Član 4.

(Upotreba reagensa)

Svi reagensi koji se upotrebljavaju za hemijske analize proizvoda na koje se odnose odredbe ovog pravilnika moraju biti propisane analitičke čistoće, a voda koja se koristi mora biti destilirana.

Član 5.

(Preciznost određivanja)

(1) Preciznost određivanja metoda fizičkih, hemijskih i bioloških analiza, u skladu s ovim pravilnikom, utvrđuje se prema principima dobre laboratorijske prakse, a izražava se kao relativno odstupanje od prosjeka dobivenog iz najmanje dva paralelna određivanja.

(2) Dozvoljena razlika rezultata dva pojedinačna određivanja, koja su izvršena uporedno ili ubrzo jedno za drugim, na istom uzorku za ispitivanje, istom metodom, u istim uslovima, koje je izvršio isti analitičar i u istoj laboratoriji, mora biti u granicama propisane metode, kako je to utvrđeno ovim pravilnikom.

DIO TREĆI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Član 6.

(Prestanak važenja odredbi)

Danom stupanja na snagu ovog pravilnika prestaju važiti odredbe Pravilnika o kvalitetu meda i drugih pčelinjih proizvoda i metodama za kontrolu kvaliteta meda i drugih pčelinjih proizvoda ("Službeni list SFRJ", br. 4/85 i 7/92), kojim se propisuju metode za kontrolu kvaliteta meda i drugih pčelinjih proizvoda.

Član 7.

(Stupanje na snagu)

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH".

VM broj 93/09
12. februara 2009. godine
Sarajevo

Predsjedavajući
Vijeća ministara BiH
Dr. **Nikola Špirić**, s. r.

ANEKS I

POGLAVLJE I. METODE UZIMANJA UZORAKA

Odjeljak A. Uzimanje uzoraka

- (1) Uzorci meda i drugih pčelinjih proizvoda, prilikom vršenja inspekcijskog nadzora, mogu se uzeti u fazi proizvodnje, prerade, obrade i distribucije.
- (2) Uzeti uzorak za ispitivanje mora predstavljati prosječan sastav cjelokupne količine proizvoda od kojeg se uzorak uzima.

Odjeljak B. Proizvodna serija, ambalažna jedinica, pošiljka

- (1) Pod proizvodnom serijom, u smislu ovog pravilnika, podrazumijeva se odgovarajuća količina proizvoda iste vrste, proizvedena istog dana, odgovarajuće zapremine, s obaveznom oznakom za identifikaciju.
- (2) Pod ambalažnom jedinicom meda i drugih pčelinjih proizvoda podrazumijevaju se utvrđene količine proizvoda iste vrste, upakovane u pojedinačna pakovanja odgovarajuće zapremine, s obaveznom oznakom za identifikaciju.
- (3) Ambalažne jedinice mogu biti upakovane u zbirna transportna pakovanja, na koja se primjenjuju odredbe ovog pravilnika.
- (4) Pod pošiljkom proizvoda podrazumijeva se istovremeno isporučena količina proizvoda u pojedinačnim i zbirnim pakovanjima koja se stavljaju u promet.

Odjeljak C. Uzorak, zapisnik, pakovanje i čuvanje uzorka

- (1) Uzorak za ispitivanje proizvoda čine najmanje tri identične ambalažne jedinice od ukupno uzetog uzorka, s tim da te jedinice moraju biti identičnog sastava i jednake zapremine.
- (2) O uzimanju uzoraka proizvoda zapisnik obavezno sačinjava ovlašteno lice koje uzima uzorak za ispitivanje u koji unosi podatke značajne za rezultat ispitivanja: mjesto, datum i vrijeme uzimanja uzorka, svrhu uzimanja uzorka, vrstu i količinu proizvoda od kojeg se uzima uzorak, broj pojedinačno uzetih uzoraka i količinu ukupno uzetog uzorka, oznake za identifikaciju uzorka i količinu uzorka koja se dostavlja za ispitivanje.
- (3) Uzorak se pakuje u staklene ili plastične sudove koji se zatvaraju čistim i suhim zatvaračima i označavaju tako da se oznaka ne može lako skinuti i izbrisati, a zatim se u njih utiskuje službeni pečat ili stavlja plomba.
- (4) Uzeti uzorci čuvaju se pod uslovima propisanim ovim pravilnikom za odgovarajuće proizvode.
- (5) Ako su proizvodi upakovani u originalne ambalažne jedinice manjih zapremina ili masa, uzeti uzorak može biti svaka nasumice uzeta pojedinačna jedinica.

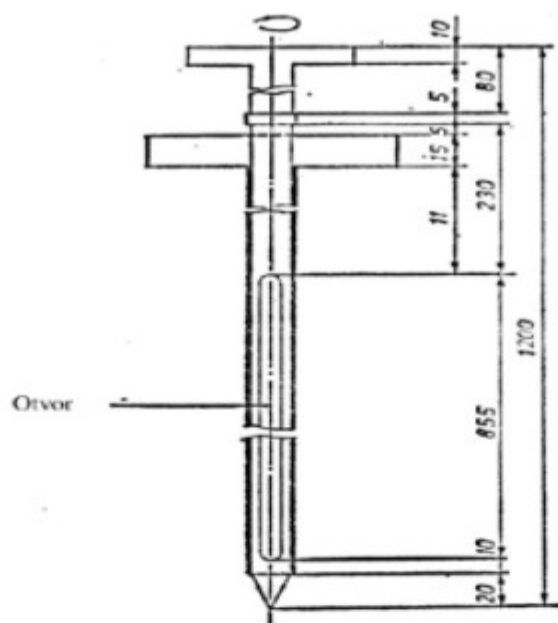
POGLAVLJE II. UZIMANJE UZORAKA MEDA I DRUGIH PČELINJIH PROIZVODA

Odjeljak A. Broj uzoraka, formiranje uzorka

- (1) Broj jedinica uzetog uzorka za ispitivanje zavisi od vrste proizvoda i veličine proizvodne serije, odnosno pošiljke.
- (2) Broj jedinica uzetog uzorka utvrđuje se na osnovu sljedeće tabele:

<i>Vrsta pakovanja</i>	<i>Količina od koje se uzorak uzima</i>	<i>Broj ambalažnih jedinica koje se uzimaju kao uzorak</i>	<i>Masa ukupno uzetog uzorka (u g)</i>
Kante ili burad	1 jedinica	1	500
	od 2 do 5 jedinica	2	500
	> 5 do 60 jedinica	3	1 000
	> 60 do 80 jedinica	4	1 000
	> 80 do 100 jedinica	5	1 000
Za svaku daljnu stotinu ili započetu stotinu kanti/bačvi broj kanti/bačvi za uzimanje uzoraka povećava se za 1.			
Staklenke ili tegle (do 1 kg)	od 1 do 100 jedinica	1	500
	> 100 do 500 jedinica	2	500
	> 500 do 1 000 jedinica	3	500
	> 1 000 do 10 000 jedinica	4	500
Ako je pošiljka veća od 10 000 staklenki, na svakih daljnjih 2 500 staklenki uzima se još po jedan uzorak.			
Ostale vrste pakovanja (do 250 g)	do 5 000 jedinica	1	—
	za svakih daljnjih 2 000 jedinica	1	—

- (3) Ako svaki uzeti uzorak meda ukupno iznosi više od tri ambalažne jedinice, od njih se formira jedan uzorak, pri čemu za svaku ambalažnu jedinicu uzorka mora imati istu mogućnost da bude izdvojena kao ambalažna jedinica uzorka uzetog za ispitivanje.
- (4) Za uzimanje uzoraka meda iz kante/bačve, koristi se metalna sonda sa odjeljcima (slika 1.). Metalna sonda sastoji se od dvije koncentrične cijevi koje ulaze jedna u drugu. Donji dio sonde je zašiljen. Unutrašnja cijev sonde ima ručicu čijim se okretanjem za 90° sonda može zatvoriti.
- (5) Uzorak meda uzima se tako što se zatvorena, čista i osušena sonda potopi u med do kraja zajedničkog otvora. U medu se sonda otvori pa zatvori i sa uzetim uzorkom izvuče iz proizvoda.



Slika 1. Metalna sonda za uzimanje uzoraka meda

ANEKS II.

POGLAVLJE I. METODE FIZIČKIH, HEMIJSKIH I BIOLOŠKIH ANALIZA MEDA I DRUGIH PČELINJIH PROIZVODA

Odjeljak A. Metode fizičkih, hemijskih i bioloških analiza

Metode fizičkih, hemijskih i bioloških analiza kojima se vrši kontrola kvaliteta meda i drugih pčelinjih proizvoda su:

- a) priprema uzoraka za analizu;¹
- b) određivanje električne provodljivosti;^{1, 2}
- c) određivanje redukovanih šećera;¹
- d) određivanje saharoze;¹
- e) određivanje vode u medu;¹
- f) određivanje materija nerastvorljivih u vodi (gravimetrijska metoda);²
- g) određivanje pepela;²
- h) određivanje kiselosti;^{1, 2}
- i) određivanje aktivnosti diastaze;¹
- j) određivanje hidroksimetilfurfurola HMF (fotometrijska metoda po Winkleru² i metoda na dvije talasne dužine po White-u²);¹
- k) biološka metoda polenske analize meda;
- l) određivanje vode u matičnoj mliječi i polenu;
- m) određivanje proteina u matičnoj mliječi;
- n) određivanje ekstrakta propolisa u alkoholnom rastvoru.

¹ Codex standard for honey

² Usklađene metode Evropske komisije za med

POGLAVLJE II. METODE FIZIČKIH, HEMIJSKIH I BIOLOŠKIH ANALIZA KOJIMA SE VRŠI KONTROLA KVALITETA MEĐA I DRUGIH PČELINJIH PROIZVODA

Odjeljak A. Priprema uzorka za analizu

- (1) Zavisno od konzistencije međa, uzorci za analizu pripremaju se na različite načine.
- (2) Ako je med u tečnom stanju, prije početka analize, lagano se izmiješa štapićem ili mućkanjem.
- (3) Ako je med granuliran, zatvorena posuda sa uzorkom stavi se u vodeno kupatilo i zagrijava 30 minuta na temperaturi 60 °C, a po potrebi i na temperaturi od 65° C. U toku zagrijavanja može se promiješati štapićem ili kružno promućkati, a zatim brzo ohladiti.
- (4) Ako se određuje dijastaza ili hidroksimetilfurfurol, med se ne zagrijava.
- (5) Ako med sadrži strane materije, kao što je vosak, dijelovi pčela ili dijelovi saća, uzorak se zagrijava na temperaturi 40 °C u vodenom kupatilu, a zatim procijedi kroz tkaninu koja se stavlja na lijepak zagrijavan toplom vodom.
- (6) Ako je med u saću, saće se otvori, procijedi kroz žičano sito s kvadratnim otvorom dimenzije 0,5 x 0,5 mm. Ako dio saća i voska prođe kroz sito, uzorak se zagrije u vodenom kupatilu na temperaturi 60 °C, a po potrebi zagrijava se 30 minuta i na temperaturi od 65 °C. U toku zagrijavanja promiješa se štapićem ili promućka kružnim pokretima, a zatim se brzo ohladi.
- (7) Ako je med u saću granuliran, zagrijava se da bi se otopio vosak, promiješa se i ohladi. Poslije hlađenja, vosak se odstrani.

Odjeljak B. Određivanje električne provodljivosti

Oblast primjene

Metoda je validna za određivanje električne provodljivosti u medu u rasponu od 0,1 do 3 miliSimens/cm⁻¹ (mS/cm⁻¹).

Definicija

Električna provodljivost u medu definirana je pomoću 20 %-nog zapreminskog vodenog rastvora međa na 20 °C, gdje se 20 % odnosi na suhu materiju međa. Rezultati su izraženi u miliSimens/cm⁻¹.

Princip

Električna provodljivost rastvora koji sadrži 20 grama suhe materije međa u 100 ml destilirane vode mjerise pomoću elektrokonduktometrijske ćelije. Određivanje električne provodljivosti zasniva se na mjerenju električne otpornosti, koja je recipročna električnoj provodljivosti. Metoda je zasnovana na originalnom radu Vorwohl (1 - 5).

Reagensi

Ukoliko nije na drugi način precizirano, reagensi moraju biti prepoznatljive analitičke čistoće ili kvaliteta. Voda bi trebalo da bude svježe destilirana ili ekvivalentnog kvaliteta.

Rastvor kalijum-hlorida 0,1 M: Rastvoriti 7,4557 g KCl (kalijum-hlorida), osušenog na 130 °C, u svježe destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 1000 ml i nadopuniti do oznake destiliranom vodom. Pripremiti je na dan korištenja.

Oprema

Konduktometar, nižeg reda 10^{-7} S.

Konduktometrijske ćelije, platinske duple elektrode (imerzione elektrode).

Termometar sa osjetljivošću mjerenja 0,1 °C.

Vodeno kupatilo, termostatičke kontrole temperature na $20 \pm 0,5$ °C.

Odmjerne tikvice, 100 i 1000 ml.

Menzura, visoka forma.

Procedura

Određivanje konstante ćelije

Ukoliko konstanta konduktometrijske ćelije nije poznata, procedura je sljedeća: usuti 40 ml rastvora kalijum-hlorida u menzuru; podesiti konduktometrijsku ćeliju na mjerenje konduktivnosti; snažno isprati rastvorom kalijum-hlorida i uroniti ćeliju u rastvor zajedno s termometrom; očitati električnu provodljivost rastvora u miliSimensima nakon postizanja temperature od 20 °C.

Napomena

Da bi se izbjegle greške kod rezultata zbog efekta polarizacije, vrijeme mjerenja trebalo bi da bude što je moguće kraće.

Izračunavanje konstante ćelije K vrši se pomoću sljedeće formule:

$$K = 11,691 \times 1/G$$

gdje je:

- K - konstanta ćelije izražena u cm^{-1} ;
- G - električna provodljivost u miliSimensima mjerena s konduktometrijskom ćelijom;
- 11,691- zbir srednje vrijednosti električne provodljivosti svježe destilirane vode u miliSimensima po centimetru i električne provodljivosti 0,1 M rastvora kalijum-hlorida na 20 °C.

Elektrodu snažno isprati destiliranom vodom nakon određivanja konstante ćelije. Kada nije u upotrebi, elektroda se drži u destiliranoj vodi da bi se izbjeglo starenje platinske elektrode.

Priprema uzorka

Priprema uzorka vrši se prema metodi pripreme uzorka za analizu koja je propisana u Odjeljku A ovog poglavlja.

Priprema rastvora sa uzorkom

Rastvoriti količinu meda koja je ekvivalentna 20 g anhidriranog meda u destiliranoj vodi. Prenijeti kvantitativno rastvor u volumetrijski sud od 100 ml i dopuniti do oznake destiliranom vodom.

Presuti 40 ml rastvora u menzuru koju nakon toga treba staviti u vodeno kupatilo na 20 °C. Isprati snažno konduktometrijsku ćeliju sa značajnim dijelom rastvora uzorka. Uroniti konduktometrijsku ćeliju u rastvor uzorka. Očitati provodljivost u miliSimensima nakon što se postigne navedena temperatura.

Napomena:

1. Mjerenje bi se trebalo obaviti što je moguće brže da bi se izbjegle greške u rezultatu.
2. Ako je određivanje rađeno na različitim temperaturama, zbog nedostatka termostatičke ćelije, tada se za izračunavanje može koristiti korekcijski faktor za 20 °C, za temperaturu iznad 20 °C umanjujemo za 3,2 % od vrijednosti za svaki °C, a za temperaturu ispod 20 °C uvećavamo za 3,2 % vrijednost za svaki °C.

Podatke mjerenja koje smo korigirali s navedenim vrijednostima faktora, ne možemo validirati u ring kontrolama. Međutim, nema značajne razlike između konduktivnosti 50 medova mjerenih na 20 °C i na temperaturama koje variraju od 20 do 26 °C nakon primjene navedenih faktora korekcije.

Izračunavanje i izražavanje rezultata

Izračunavanje električne provodljivosti vrši se prema sljedećoj formuli :

$$S_H = K \times G$$

gdje je:

- | | |
|---------|--|
| S_H – | električna provodljivost rastvora meda u miliSimensima/cm; |
| G – | provodljivost u miliSimensima; |
| K – | konstanta ćelije u cm. |

Odjeljak C. Određivanje reduciranih šećera

a) Metoda s Fehlingovim rastvorima

Princip

Princip ove metode zasniva se na redukciji Fehlingovog rastvora titracijom rastvorom reduciranih šećera meda uz korištenje metilen-plavog kao indikatora.

Reagensi

(1) Fehlingov rastvor

- a) Rastvor A: rastvori se 69,28 g bakar-sulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) i do jednog litra dopuni destiliranom vodom. Rastvor se priprema dan ranije prije postupka titracije.
- b) Rastvor B: rastvori se 346 g kalijum-natrijum-tartarata ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) i 100 g natrijum-hidroksida (NaOH) u jednom litru destilirane vode. Rastvor se zatim filtrira.

(2) Standardni rastvor invertnog šećera (10 g/l vode): odmjeri se 9,5 g čiste saharoze, doda 5 ml rastvora hlorovodonične kiseline HCl (oko 36,5 %) i dopuni destiliranom vodom do 100 ml. Rastvor se može čuvati nekoliko dana, zavisno od temperature: na temperaturi 12 °C do 15 °C do sedam dana, a na temperaturi 20 °C do 25 °C do tri dana. Pripremljeni rastvor dopuni se vodom do jednog litra. Neposredno prije upotrebe, odgovarajuća zapremina rastvora neutralizira se sa 1 mol rastvorom $\text{NaOH}/1$ i zatim se razblaži do zahtijevane potrebne koncentracije (2 g/l) - standardni rastvor.

Napomena: 1 %-ni zakiseljen rastvor invertnog šećera stabilan je nekoliko mjeseci.

(3) Rastvor metilen-plavog: rastvori se 2 g metilen-plavog u destiliranoj vodi, a zatim do jednog litra razblaži vodom.

(4) Stipsa (alaun)

- a) Rastvor stipse: pripremi se hladno zasićen rastvor ($\text{K}_2\text{SO}_4\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$) u vodi. Zatim se, uz konstantno miješanje štapićem, doda amonijum-hidroksid dok rastvor ne postane alkalni, što se utvrđuje lakmus papirom. Rastvor se ostavi da se slegne i ispire vodom uz dekantovanje sve dok voda daje blag pozitivan test na sulfate, što se utvrđuje rastvorom barijum-hlorida. Višak vode se odlije, a preostala pasta ostavlja u boci sa šlifovanim zatvaračem.

Pripremanje uzorka

I. Postupak - Primjenjivo za med koji može da sadrži talog

- a) Odmjeri se 25 g (W_1) homogeniziranog meda i prenese u odmjernu tikvicu zapremine 100 ml, doda 5 ml stipse, dopuni se vodom do oznake pri temperaturi od 20°C, pa se rastvor filtrira.
- b) U odmjernu tikvicu zapremine 500 ml pipetira se 10 ml uzorka pod „a“ i razblaži destiliranom vodom do oznake na tikvici (razblaženi rastvor meda).

II. Postupak

- a) Odmjeri se 2 g homogeniziranog meda (W_2), prenese u odmjernu tikvicu zapremine 200 ml, rastvori u vodi i dopuni vodom do oznake na tikvici (rastvor meda).
- b) Odmjeri se 50 ml rastvora meda pod „a“ i dopuni destiliranom vodom do 100 ml (razblaženi rastvor meda).

Standardizacija Fehlingovog rastvora

Fehlingov rastvor standardizira se tako što se otpipetira 5 ml Fehlingovog rastvora A i pomiješa sa 5 ml rastvora B (Fehlingov rastvor). Taj rastvor mora ukupno reagirati sa

0,050 g invertnog šećera dodatog u količini od 25 ml kao standardni rastvor invertnog šećera (2 g/l).

Prethodna titracija

Ukupna zapremina materija koje reagiraju na kraju redukcione titracije mora iznositi 35 ml, što se postiže dodavanjem određene količine vode prije početka titracije. S obzirom na to da se posebnim propisom o medu i drugim pčelinjim proizvodima propisuje više od 60 % reduciranih šećera (računato kao invertni šećer), potrebno je prethodno obaviti titraciju da bi se utvrdila tačna zapremina vode koja se dodaje, kako bi se u postupku analize osigurala redukcija pri konstantnoj zapremini. Zapremina potrebne količine vode dobiva se oduzimanjem utrošene zapremine razblaženog rastvora meda u prethodnoj titraciji („X ml“) od 25 ml (25 ml – „X“).

Pipetom se odmjeri 5 ml Fehlingovog rastvora A i prenese u konusnu Erlenmajer tikvicu, zapremine 250 ml, doda se 5 ml Fehlingovog rastvora B, 7 ml destilirane vode, malo plovuća ili drugog sličnog sredstva i 15 ml razblaženog rastvora meda iz birete. Medna mješavina zagrijava se do ključanja i dvije minute održava umanjeno ključanje. Zatim se, za vrijeme ključanja rastvora, doda 1 ml 0,2 %-nog rastvora metilen-plavog i titracija završi za ukupno tri minute, uz ponovljeno dodavanje razblaženog rastvora meda, sve dok iščezne boja indikatora. Utrošena zapremina razblaženog rastvora meda koji je kompletno reduciran obilježava se sa „X ml“.

Određivanje. Pipetom se odmjeri 5 ml Fehlingovog rastvora A i prenese u konusnu erlenmajer tikvicu zapremine 250 ml i doda 5 ml Fehlingovog rastvora B. Zatim se doda (25 ml – „X ml“) destilirane vode, malo kamena-plovuća ili drugog odgovarajućeg sredstva i iz birete doda razblaženi rastvor meda, tako da za kompletnu titraciju ostane oko 1,5 ml (X ml - 1,5ml). Zatim se hladna mješavina zagrijava do ključanja i dvije minute održava umjereno ključanje. U toku ključanja doda se 1,0 ml 0,2 %-nog rastvora metilen-plavog, pa se titracija, dodavanjem razblaženog rastvora meda do obezbojenja indikatora, mora završiti za tri minute ukupnog ključanja. Utrošena količina razblaženog rastvora meda obilježava se sa „Y ml“.

Izračunavanje

Invertni šećer izražava se u g/100 g meda (%) i izračunava se zavisno od načina pripremanja uzoraka (I. ili II. postupak).

Ako se primijeni postupak I., izračunavanje se vrši po sljedećoj formuli:

$$\text{Procent invertnog šećera } C = \frac{25}{W_1} \times \frac{1000}{Y_1}$$

gdje je:

- C - invertni šećer, u g;
- W_1 - masa uzetog uzorka, u g;
- Y_1 - zapremina razblaženog rastvora meda utrošenog za određivanje, u ml.

Ako se primijeni postupak II., izračunavanje se vrši po sljedećoj formuli:

$$\text{Procent invertnog šećera } C = \frac{2}{W_2} \times \frac{1000}{Y_2}$$

gdje je:

- C - invertni šećer u g.
W₂ - masa uzetog uzorka u g.
Y₂ - zapremina razblaženog rastvora meda utrošenog za određivanje u ml.

Napomena:	Za preciznost i ponovljivost rezultata neophodno je da se za svaku probu odredi potrebna zapremina dodate vode da bi ukupna zapremina iznosila 35 ml. U sljedećoj tabeli date su približne vrijednosti pod pretpostavkom da je početna masa uzorka iznosila 25 g, odnosno 2 g.	
	Sadržaj invertnog šećera, u procentima	Potrebna količina vode, u ml
	60	8,3
	65	9,6
	70	10,7
	75	11,6

Ponovljivost:

Razlika između titracija dva određivanja izvršena uporedo ili ubrzo jedno za drugim ne iznosi više od 0,1 ml.

b) Metoda volumetrijski po Luff - Schoorlu

Ova metoda zasniva se na principu da u određenim uslovima reducirajući šećer (prirodni invert) prevede Cu²⁺ jone u Cu⁺ jone. Neutrošena količina Cu²⁺ jona retitrira se rastvorom tiosulfata. Iz razlike utroška za slijepu probu i probu očita se količina šećera iz tabele.

Nereducirajući disaharid (saharoza) mora se prethodno invertirati, odnosno hidrolizirati na nereducirajuće monosaharide pomoću kiseline, a zatim se određuju pomoću Luffovog reagensa. Na ovaj način dobiva se podatak o ukupnoj količini šećera u ispitivanom uzorku.

Razlika između dobivenog ukupnog inverta i prirodnog inverta daje količinu reducirajućih šećera nastalih inverzijom saharoze.

Reagensi:

(1) Luffov reagens:

- rastvor bakar-sulfata (25g CuSO₄ x 5H₂O u 100 cm³ destilirane vode);
- rastvor limunske kiseline (50 g C₆H₈O₇ x H₂O u 50 cm³ destilirane vode);
- rastvor natrijum-karbonata (143 g bezvodnog Na₂CO₂ u oko 300 cm³ tople destilirane vode).

U odmjernu tikvicu od 1 000 cm³ unese se rastvor natrijum-karbonata i, uz oprezno miješanje, doda rastvor limunske kiseline. Miješa se do nestanka ugljendioksida, a zatim se doda rastvor bakar-sulfata i odmjerna tikvica se dopuni destiliranom vodom do oznake.

- (2) Natrijum-tiosulfat, rastvor 0,1 mol/dm³;
- (3) Skrob, 0,5 %-tni rastvor;
- (4) Sumporna kiselina, rastvor 6 mol/dm³
- (5) Kalijum-jodid, 30 %-tni rastvor;
- (6) Natrijum-hidroksid, rastvor 0,1 mol/dm³;
- (7) Natrijum-hidroksid, rastvor 1 mol/dm³;
- (8) Carrez I (21,95 g Zn(CH₃COO)₂ × 2H₂O ili 24 g Zn(CH₃COO)₂ × 3H₂O i 3 g glacijalne sirćetne kiseline rastvori dr i dopuni do oznake destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 cm³);
- (9) Carrez II (10,6 g KFe(CN)₆ × 3H₂O se rastvori u destiliranoj vodi i dopuni do oznake u odmjernoj tikvici od 100 cm³);
- (10) Hlorovodonična kiselina, koncentrirana.

Postupak

Odvaže se oko 5 g uzorka (s tačnošću od ± 0,001 g). Uzorak se sa 200 cm³ destilirane vode kvantitativno prenese u čašu od 400 cm³. Balastne materije uklone se dodatkom po 5 cm³ rastvora Carrez I i II. Nakon svakog dodavanja sadržaj se dobro promiješa. Cjelokupni sadržaj iz čaše prenese se u odmjernu tikvicu od 250 cm³, dopuni do oznake destiliranom vodom, promiješa i filtrira. To je filtrat I.

U odmjernu tikvicu od 100 cm³ otpipetira se 10 cm³ filtrata I i dopuni destiliranom vodom do oznake na tikvici. Sadržaj u tikvici dobro se promiješa i u Erlenmajer tikvicu do 300 cm³ se otpipetira 25 cm³ Luffovog reagensa i 25 cm³ razrijeđenog filtrata I. Erlenmajer tikvica se stavi na zagrijano tijelo i sadržaj treba da proključa za dva minuta, a zatim se na tikvicu stavlja povratno hladilo i sadržaj u tikvici treba da ključa 10 minuta. Nakon toga tikvica se hladi pod vodenim mlazom i nakon hlađenja ostavi da stoji pet minuta. Poslije toga u tikvicu se doda 10 cm³ rastvora kalijum-jodida i 25 cm³ rastvora sumporne kiseline. Sumporna kiselina dodaje se polako i oprezno zbog mogućnosti stvaranja pjene. Zatim se sadržaj u tikvici titrira rastvorom natrijum-tiosulfata dok sadržaj u tikvici ne dobije svijetložutu boju, tada se doda nekoliko cm³ rastvora skroba i titracija se nastavi do nastanka plave boje.

U istim uslovima izvrši se i slijepa proba sa istom količinom Luffovog reagensa, a umjesto razrijeđenog filtrata I, doda se 25 cm³ destilirane vode.

Od ukupnog utroška rastvora natrijum-tiosulfata (cm³) za titraciju slijepe probe oduzme se utrošak rastvora natrijum-tiosulfata za probu i za tabele za određivanje šećera po Luffu očita se količina invertnog šećera u mg, koja odgovara toj razlici.

Sadržaj prirodnog inverta izračunava se prema sljedećoj formuli:

Izračunavanje:

$$\text{Sadržaj prirodnog inverta (\%)} = \frac{V \times V_2 \times a}{Ok \times V_1 \times V_3 \times 1000} \times 100$$

gdje je:

- V – cm³ matičnog rastvora;
- V₁ – cm³ filtrata I;
- V₂ – cm³ razrijeđenog filtrata I;
- V₃ – cm³ razrijeđenog filtrata I u kojima se određuju šećeri;
- a – količina invertnog šećera očitana iz tabele (mg);
- Ok – odvagana količina uzorka (g).

Količina ukupnog inverta određuje se tako da se otpipetira 10 cm³ filtrata I u odmjernu tikvicu od 100 cm³, razrijedi se sa 30 cm³ destilirane vode i doda 0,5 cm³ koncentrirane hlorovodonične kiseline. Odmjerna tikvica sa sadržajem stavi se u ključalo vodeno kupatilo, da se izvrši inverzija u trajanju od 30 minuta. Nakon toga, sadržaj u tikvici neutralizira se rastvorom natrijum-hidroksida koncentracije 1 mol/dm³ i dopuni destiliranom vodom do oznake na tikvici. Iz odmjerne tikvice otpipetira se 25 cm³ uzorka za titraciju, a daljnji postupak je isti kao i kod prirodnog inverta.

Sadržaj ukupnog inverta izračunava se prema sljedećoj formuli:

Izračunavanje:

$$\text{Sadržaj ukupnog inverta (\%)} = \frac{V \times V_2 \times a}{Ok \times V_1 \times V_3 \times 1000} \times 100$$

gdje je:

- V – cm³ matičnog rastvora;
- V₁ – cm³ filtrata I;
- V₂ – cm³ razrijeđenog filtrata I nakon inverzije;
- V₃ – cm³ razrijeđenog filtrata I u kojima se određuju šećeri;
- a – količina invertnog šećera očitana iz tabele (mg);
- Ok – odvagana količina uzorka (g).

Sadržaj saharoze (%) u uzorku izračunava se prema sljedećoj formuli:

$$\text{Sadržaj saharoze (\%)} = (B - A) \times 0,95$$

gdje je:

- A – procenat prirodnog inverta;
- B – procenat ukupnog inverta.

Tabela za određivanje količine šećera sa 23 cm³ Luffovog reagensa

Rastvor natrijum tiosulfata $C = \text{mol/dm}^3$	Glukoza, fruktoza ili invertni šećer		Rastvor natrijum tiosulfata $C = 0,1 \text{ mol/dm}^3$	Glukoza, fruktoza ili invertni šećer	
	mg	razlika		mg	razlika
1	2,4		13	33,0	2,7
2	4,8	2,4	14	35,0	2,7
3	7,2	2,4	15	38,5	2,8
4	9,7	2,5	16	41,3	2,8
5	12,2	2,5	17	44,2	2,9
6	14,7	2,5	18	47,1	2,9
7	17,2	2,5	19	50,0	2,9
8	19,8	2,6	20	53,0	3,0
9	22,4	2,6	21	56,0	3,0
10	25,0	2,6	22	59,1	3,1
11	27,6	2,6	23	62,2	3,1
12	30,3	2,7			

Odjeljak D. Određivanje saharoze

Princip

Princip ove metode zasniva se na hidrolizi saharoze, redukciji Fehlingovog rastvora titracijom s reduciranim šećerima iz hidrolizata meda uz metilen-plavog.

Reagensi

- (1) Fehlingov rastvor (A i B), utvrđen metodom određivanja reduciranih šećera.
- (2) Standardni rastvor invertnog šećera, utvrđen metodom određivanja reduciranih šećera.
- (3) Hlorovodonična kiselina C (HCl) = 6,34 mol/l.
- (4) Rastvor natrijum-hidroksida C (NaOH) = 5 mol/l.
- (5) 2 %-tni rastvor metilen-plavog (2 g/l).

Pripremanje uzorka

I. Postupak

Odmjeri se 25 g (W_1) homogeniziranog meda i prenese u odmjernu tikvicu zapremine 100 ml, doda se 5 ml stipse, dopuni se vodom do oznake na tikvici, pri temperaturi od 20 °C, pa se rastvor filtrira.

Odmjeri se 10 ml tog rastvora i dopuni destiliranom vodom do 250 ml rastvora meda (za određivanje saharoze).

II. Postupak

Odmjeri se 2 g (W_2) homogeniziranog meda i prenese u odmjernu tikvicu, rastvori u destiliranoj vodi i dopuni u tikvici do 200 ml (rastvor meda).

Hidroliza uzorka

Rastvor meda (50 ml) prenese se u odmjernu tikvicu zapremine 100 ml i doda 25 ml destilirane vode. Termometar se zaroni u pripremljeni uzorak i zagrijava se do 65 °C u ključalom vodenom kupatilu. Tikvica se zatim iznese iz vodenog kupatila i doda 10 ml hlorovodonične kiseline [$C(HCl) = 6 \text{ mol/l}$]. Rastvor ostaviti da se hladi 15 minuta, zatim se temperatura podesi na 20 °C i neutralizira sa 5 mol rastvora NaOH/l, uz korištenje lakmus-papira kao indikatora, ponovo ohladi (20 °C) i dopuni do 100 ml (razblaženi rastvor meda).

Određivanje

Određivanje je istovjetno kao i određivanje reduciranih šećera, a odnosi se na prethodnu titraciju i postupak određivanja količine invertnog šećera prije inverzije.

Izračunavanje

Najprije se obračunava procenat invertnog šećera poslije inverzije, s tim što se pritom koristi formula predviđena za određivanje procenta invertnog šećera prije inverzije.

Saharoza se izražava u g/100 g meda i izračunava se po sljedećoj formuli:

$\text{masa saharoze, g/100 g} = \text{količina invertnog šećera poslije inverzije} - \text{količina invertnog šećera prije inverzije} \times 0,95$

Odjeljak E. Određivanje vode u medu

a) Refraktometrijsko određivanje

Princip

Princip ove metode zasniva se na refraktometrijskom određivanju.

Aparatura i pribor

Pored uobičajene laboratorijske opreme, potreban je i refraktometar.

Pripremanje uzorka

Uzorak se priprema na način predviđen za metodu pripremanja uzorka za analizu, a zatim se indeks refrakcije uzorka odredi refraktometrom, pri konstantnoj temperaturi od 20 °C. Na osnovu indeksa refrakcije, izračunava se količina vode (% m/m), pri čemu se koristi priložena tabela. Ako se indeks ne odredi na temperaturi od 20° C, uzima se u obzir korekcija temperature i rezultati se svode na temperaturu od 20° C.

Tabela za izračunavanje sadržaja vode u medu

Indeks refrakcije (20°C)	Sadržaj vode (%)	Indeks refrakcije (20°C)	Sadržaj vode (%)	Indeks refrakcije (20°C)	Sadržaj vode (%)
1,5044	13,0	1,4935	17,2	1,4830	21,4
1,5038	13,2	1,4930	17,4	1,4825	21,6
1,5033	13,4	1,4925	17,6	1,4820	21,8
1,5028	13,6	1,4920	17,8	1,4815	22,0
1,5023	13,8	1,4915	18,0	1,4810	22,2
1,5018	14,0	1,4910	18,2	1,4805	22,4
1,5012	14,2	1,4905	18,4	1,4800	22,6
1,5007	14,4	1,4900	18,6	1,4795	22,8
1,5002	14,6	1,4895	18,8	1,4790	23,0
1,4997	14,8	1,4890	19,0	1,4785	23,2
1,4992	15,0	1,4885	19,2	1,4780	23,4
1,4987	15,2	1,4880	19,4	1,4775	23,6
1,4982	15,4	1,4875	19,6	1,4770	23,8
1,4976	15,6	1,4870	19,8	1,4765	24,0
1,4971	15,8	1,4865	20,0	1,4760	24,2
1,4966	16,0	1,4860	20,2	1,4755	24,4
1,4961	16,2	1,4855	20,4	1,4750	24,6
1,4956	16,4	1,4850	20,6	1,4745	24,8
1,4951	16,6	1,4845	20,8	1,4740	25,0
1,4946	16,8	1,4840	21,0		
1,4940	17,0	1,4835	21,2		

Napomena: Korekcija temperature - indeks refrakcije:

- temperatura preko 20 °C - dodati 0,00023 za svaki °C;

- temperatura do 20 °C - oduzeti 0,00023 za svaki °C.

b) Određivanje vode metodom sušenja, standardni postupak

Princip

Metoda određivanja vode sušenjem zasniva se na sušenju uzoraka do konstantne mase u raznim vrstama sušnica.

Sušenje u običnoj sušnici.

Postupak:

Posuda za sušenje snabdjevena odgovarajućim poklopcem (posuda za vaganje staklena, aluminijska i niklovana) suši se u sušnici najmanje 1 sat na temperaturi od 100-105 °C, ohladi u eksikatoru na sobnu temperaturu i izmjeri s tačnošću ± 0.001 g. U posudu se brzo stavi određena količina meda (1 – 2 g), pokrije poklopcem i mjeri. Posuda sa uzorkom se stavi u sušnicu, s koso postavljenim poklopcem. Suši se određeno vrijeme (4 do 5 sati). Poslije završenog sušenja posuda se pokrije poklopcem i stavlja u eksikator i poslije hlađenja (od 45 minuta do 1 sata) se vaga. Ponovo se stavi u sušnicu od pola sata do sat, hladi i ponovo mjeri. To se ponavlja dok se ne postigne konstantna masa.

Izračunavanje:

Iz razlike u težini posude sa uzorkom prije i poslije sušenja izračuna se sadržaj vode:

$$\text{Sadržaj vode} = \frac{a \times 100}{Ok}$$

gdje je:

a – razlika u težini posude sa uzorkom prije i poslije sušenja (g)
Ok – odmjerena količina uzorka (g)

Odjeljak F. Određivanje nerastvorljivih materija u vodi (gravimetrijska metoda)

Pripremanje uzorka

Odmjeri se 20 g uzorka s tačnošću ± 10 mg, rastvori se u određenoj količini destilirane vode na temperaturi od 80 °C i dobro izmiješa.

Određivanje

Pripremljeni uzorak se najprije filtrira kroz osušen i odmjeran sinterovani lijevak, veličine pora 15 do 40 μm . Talog se ispere vrelom vodom (80 °C), pri čemu se oslobodi šećer, što se utvrđuje testom po Mohru. Ljevak se osuši za jedan sat na temperaturi od 135 °C, ohladi i mjeri s tačnošću od 0,1 mg.

Izračunavanje

Količina materija nerastvorljivih u vodi izražava se u procentima (m/m) i izračunava po sljedećoj formuli:

$$\text{procent materija nerastvorljivih u vodi} = \frac{100 \times \text{količina ostatka}}{\text{odmjereni uzorak}}$$

Odjeljak G. Određivanje pepela

Princip

Princip ove metode zasniva se na postupku sagorijevanja uzorka na 600 °C do konstantne mase.

Aparatura i pribor

Pored uobičajene laboratorijske opreme, koristi se i:

- (1) platinska posuda, posuda od silicija ili lončić za žarenje;
- (2) vodeno kupatilo;
- (3) pješčano kupatilo ili Bunsenov plamenik;
- (4) peć za žarenje.

Određivanje

U užarenom platinskom ili porculanskom lončiću izvaga se 5 do 10 g uzorka i zagrijava na vodenom kupatilu dok veći dio vode ispari. Nakon toga, uzorak se stavi na pješčano kupatilo ili Bunsenov plamenik do ugljenisanja. Ostatak se zatim žari u peći za žarenje, na temperaturi 600 °C, do konstantne mase. Prije mjerenja uzorak se ohladi.

Izračunavanje

Masa pepela izražava se u g/100 g proizvoda i izračunava po sljedećoj formuli:

$$\text{masa pepela} \quad \text{g} / 100 \text{ g} = \frac{\text{ostatak} \times 100}{\text{odmjereni uzorak}}$$

Odjeljak H. Određivanje kiselosti

Princip

Pripremljeni uzorak titrira se u prisustvu fenolftaleina rastvorom 0,1 mol/l natrijum-hidroksida do pojave svijetloružičaste boje.

Aparatura i pribor

Pri određivanju stepena kiselosti koristi se uobičajena laboratorijska oprema.

Reagensi

- (1) Rastvor natrijum-hidroksida, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ (bez karbonata);
- (2) 1 %-ni rastvor fenolftaleina (m/V) u etanolu, neutraliziran;
- (3) destilirana voda bez CO_2 , dobivena kuhanjem a zatim ohlađena.

Određivanje

Odmjeri se 10 g uzorka i rastvori u 75 ml destilirane vode.

Pripremljeni uzorak titrira se sa 0,1 mol rastvorom (NaOH)/l, uz četiri do pet kapi fenolftaleina kao indikatora. Na kraju titracije boja se mora održati 10 sekundi.

Za uzorke tamne boje odmjerava se manja količina uzorka.

Alternativno se može koristiti pH-metar i titirati uzorak do pH - 8,3.

Izračunavanje

Kiselost se iskazuje u milimolima kiseline/kg i izračunava se po formuli:

$$\text{kiselost} = 10 \times V$$

gdje je:

V – broj utrošenih ml 0,1 mol (NaOH)/l za neutralizaciju 10 g meda.

Odjeljak I. Određivanje aktivnosti diastaze

Princip

Princip ove metode zasniva se na hidrolizi 1 %-nog rastvora skroba enzimom iz 1 g meda u toku jednog sata na temperaturi od 40 °C.

Aparatura i pribor

Pored uobičajene laboratorijske opreme, upotrebljavaju se i:

- (1) odmjerne tikvice zapremine 1 litar, 0,5 litara, 0,1 litara;
- (2) konusna tikvica zapremine 0,250 litra;
- (3) plamenik;
- (4) vođeno kupatilo na $40 \pm 0,2$ °C;
- (5) spektrofotometar s očitavanjem na 660 nm.

Reagensi

- (1) Matični rastvori joda: rastvori se 8,8 g joda p.a, pomiješa se sa 22 g kalijum-jodida i rastvori u 30 - 40 ml vode, a zatim razblaži do jednog litra.
- (2) Rastvor joda priprema se u odmjernoj tikvici zapremine 500 ml tako što se rastvori 20 g K-jodida p.a u 30 - 40 ml vode. Zatim se doda 5 ml matičnog rastvora joda i dopuni vodom do oznake.

Rastvor joda $c(\frac{I_2}{2}) 0,0007 \text{ mol/l}$: u odmjernoj tikvici

- (3) Acetatni pufer - pH 5,3: rastvori se 87 g natrijum-acetata ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) u 400 ml vode, doda oko 10,5 ml ledene sirćetne kiseline i dopuni vodom do 500 ml. Ako je to potrebno, pH-vrijednost regulira se natrijum-acetatom ili sirćetnom kiselinom do 5,3 uz korištenje pH-metra, po potrebi.
- (4) Rastvor natrijum-hlorida, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$: rastvori se 14,5 g natrijum-hlorida u prokuhanoj destiliranoj vodi i dopuni do 50 ml. Rok trajanja tog rastvora je ograničen.

- (5) Pripremanje topivog skroba: u konusnu tikvicu s povratnim hladnjakom, koja je uronjena u vodeno kupatilo, odmjeri se 20 g skroba, doda se mješavina 100 ml 95 %-nog etanola i 7 ml 1 mol/l hlorovodonične kiseline i ostavi da ključa jedan sat. Rastvor se ohladi, filtrira, kroz filter (veličine pora 90 do 150 μm) i ispire vodom sve dok voda za ispiranje prestane da pokazuje reakciju na hloride. Skrob se potpuno osuši na zraku čija je temperatura 35 °C. Rastvor skroba mora se čuvati u dobro zatvorenoj tikvici.

(6) Određivanje vode u topivom skrobu

Odmjeri se oko 2 g topivog skroba i u tankom sloju rasporedi na dno posudice prečnika 5 cm. Suši se 1,5 sat na temperaturi od 180 °C. Zatim se ohladi u eksikatoru i premjeri. Gubitak mase u odnosu na 100 g jeste količina vode. Količina vode pripremljenog skroba mora iznositi 7 do 8 % (m/m), zavisno od vlažnosti zraka na kojem je uzorak osušen.

(7) Rastvor skroba

Upotrebljava se skrob čija je plava vrijednost između 0,5 do 0,55 određena prema niže opisanom postupku i očitana u kiveti od 1 cm.

Odmjeri se količina skroba koja odgovara masi od 2,0 g bezvodnog skroba i izmiješa sa 90 ml vode u konusnoj tikvici zapremine 250 ml. Odmah se prenese do plamenika preko kojeg je postavljena azbestna mrežica i ostavi da blago ključa tri minute. Potom se rastvor skloni s plamenika, pokrije i ostavi da se postepeno ohladi do sobne temperature. Rastvor se zatim prenese u odmjernu bocu od 100 ml i stavi na vodeno kupatilo zagrijano na 40 °C. Kad rastvor dostigne tu temperaturu, dopuni se vodom do oznake na boci.

Utvrđivanje plave vrijednosti skroba

Količina skroba koja odgovara masi od 1 g bezvodnog skroba rastvori se prema opisanom postupku, ohladi se i doda 2,5 ml acetatnog pufera i dopuni vodom u odmornoj tikvici do 100 ml. U odmjernu tikvicu zapremine 100 ml doda se 75 ml vode, 1 ml

$$1 \text{ mol/l (HCl) i } 1,5 \text{ ml rastvora } 0,02 \text{ mol/l } \left(\frac{\text{J}}{2} \right)$$

Rastvor se ostavi jedan sat na tamnom mjestu i očita apsorpcija na spektrofotometru pri 660 nm, u kiveti od 1 cm, prema slijepoj probi koja sadrži sve sastojke osim rastvora skroba.

Očitana apsorpcija = plava vrijednost.

Određivanje

Pripremanje uzorka za određivanje

Uzorak za analizu ne smije se zagrijavati. Odmjeri se 10 g uzorka i prenese u čašu zapremine 50 ml, doda 5 ml acetatnog pufera i 20 ml vode da bi se uzorak rastvorio i promiješa štapićem. Uzorak se već na hladno potpuno rastvori. Zatim se u odmjernu tikvicu zapremine 50 ml, doda 3 ml rastvora natrijum-hlorida i otopljen rastvor meda i dopuni vodom do oznake.

Uzorak mora biti puferizovan prije miješanja s natrijum-hloridom.

Pripremanje standardnog rastvora

Rastvor skroba zagrijava se na temperaturi 40 °C, a zatim se 5 ml rastvora otpipetira u 10 ml vode, čija je temperatura 40 °C i dobro izmiješa. Od pripremljenog rastvora otpipetira se 1 ml i doda u 10 ml.

$0,0007 \text{ mol/l} \left(\frac{I_2}{2} \right)$ rastvora joda, razblaži sa 35 ml vode i dobro izmiješa.

Nastala boja očitava se na 660 nm prema slijepoj probi.

Vrijednost apsorpcije treba da bude $0,760 \pm 0,020$. Ako je potrebno, može se dodati određena zapremina vode, tako da se dobije ispravna apsorpcija.

Određivanje apsorpcije

Pipetom se odmjeri 10 ml rastvora meda, prenese u graduirani cilindar od 50 ml i stavi u vodeno kupatilo na temperaturi od $40 \text{ °C} \pm 0,2 \text{ °C}$, zajedno s posudom u kojoj je rastvor skroba. Poslije 15 minuta, pipetom se odmjeri 5 ml rastvora skroba i doda u rastvor meda, promiješa i uključi sat. U intervalima od po pet minuta izdvoji se 1 ml alikvota i doda u

10 ml $0,0007 \text{ mol/l} \left(\frac{I_2}{2} \right)$ /l rastvora joda

Promiješa se i razblaži do zapremine 35 ml (pripremanje uzorka za određivanje). Apsorbancija se odmah određuje na 660 nm, nastavi se uzimati alikvot sve dok se apsorbancija ne smanji do vrijednosti od 0,235.

Izračunavanje i izražavanje rezultata

U grafikon se unosi vrijednost apsorbancije kao funkcije vremena (min).

Kroz najmanje tri posljednje tačke povuče se prava linija da bi se odredilo vrijeme kad reakciona smjesa dostiže vrijednost apsorbancije od 0,235. Podijeli se 300 s vremenom izraženim u minutama da bi se dobio broj dijastaze (DN). Taj broj izražava aktivnost dijastaze kao ml 1 %-nog rastvora skroba koji je hidroliziran enzimom u 1 g meda za vrijeme od jednog sata pri 40 °C. Broj dijastaze odgovara broju na Gothe-skali.

Aktivnost dijastaze DN = ml 1 %-nog rastvora skroba po g meda/h pri temperaturi od 40 °C.

$$\text{Napomena : broj dijastaze} = \frac{60}{t} \times \frac{0,10}{0,01} \times \frac{1,0}{2} = \frac{300}{t}$$

gdje je:

t – redukcija u minutama.

Odjeljak J . Određivanje hidroksimetilfurfurola

a) Fotometrijska metoda po Winkleru

Princip

Princip ove metode zasniva se na reakciji hidroksimetilfurfurola s barbiturnom kiselinom i p-toluidinom, pri čemu nastaje ružičasto obojenje koje se mora mjeriti na talasnoj dužini od 550 nm.

Aparatura i pribor

Pored uobičajene laboratorijske opreme, koriste se i:

- (1) odmjerne tikvice zapremine 50 ml i 100 ml;
- (2) vodeno kupatilo;
- (3) spektrofotometar (očitanje na 550 nm).

Reagensi

- (1) Rastvor barbiturne kiseline: odmjeri se 500 mg barbiturne kiseline i sa 70 ml vode prenese u odmjernu tikvicu zapremine 100 ml. Stavi se u vodeno kupatilo da se rastvori, a zatim se ohladi i dopuni vodom do oznake.
- (2) Rastvor p-toluidina: odmjeri se 10 g p-toluidina i laganim zagrijavanjem na vodenom kupatilu rastvori u približno 50 ml izopropanola. Sa izopropanolom se prenese u odmjernu tikvicu zapremine 100 ml i doda 10 ml ledene sirćetne kiseline, ohladi i dopuni izopropanolom do oznake. Rastvor se čuva na tamnom mjestu i ne koristi najmanje 24 sata.
- (3) Destilirana voda bez kiseonika: kroz vruću vodu propušta se azot. Voda se zatim ohladi.

Pripremanje uzorka

Uzorak se priprema na način predviđen za metodu pripremanja uzorka za analizu, bez zagrijavanja.

Određivanje

Odmjeri se 10 g uzorka i bez zagrijavanja rastvori u 20 ml destilirane vode bez kiseonika. Zatim se prenese u odmjernu tikvicu zapremine 50 ml i dopuni do oznake (rastvor meda). Odmah poslije pripremanja nastavlja se određivanje.

Od pripremljenog uzorka odmjeri se pipetom 2 ml, prenese se u svaku od dvije epruvete i doda 5 ml p-toluidina. U jednu epruvetu pipetira se 1 ml vode, a u drugu 1 ml rastvora barbiturne kiseline, pa se sadržaj dobro promiješa. Epruveta u kojoj je voda služi kao slijepa proba. Reagens treba dodavati bez prekida i to završiti za 1 do 2 minute. Kad intenzitet boje dostigne maksimum (3 do 4 minute), očita se apsorbancija na 550 nm u kiveti od 10 mm.

Količina hidroksimetilfurfurola izražava se u mg/100 g meda i grubo izračunava prema formuli:

$$\text{mg HMF/100 g meda} = \frac{\text{apsorbancija}}{\text{debljina sloja}} \times 19,2$$

Napomena: Količina HMF može se izračunati pomoću baždarenog dijagrama primjenom standardnih rastvora od 5 do 300/ µg.

b) Određivanje hidroksimetilfurfurola na dvije talasne dužine (metoda po Whiteu)

Princip:

Određivanje sadržaja hidroksimetilfurfurola zasnovano je na apsorbciji hidroksimetilfurfurola u UV dijelu spektra 284 nm. Kako bi se spriječila interferencija drugih komponenata na ovoj talasnoj dužini, određuju se razlike između apsorbcije čiste solucije meda i nakon dodavanja disulfita.

Reagensi:

Carrez I:

- rastvoriti 15 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$ u vodi i dosuti 100ml u odmjerne tikvici

Carrez II:

- rastvoriti 30 g $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i nadopuniti do 100 ml u odmjernu tikvicu

Na-bisulfit rastvor

- 0,20 gr./100 g

Rastvoriti 0,20 g čvrstog NaHSO_3 (metabisulfit) i razrijediti do 100 ml. Dnevno se priprema svjež rastvor.

Oprema

- spektrofotometar - talasna dužina 284 i 336 nm;
- kvarcne kivete, 1 cm;
- filter papir.

Procedura:

Odvagati 5 g meda i rastvoriti u 25 ml destilirane vode. Kvantitativno prenijeti rastvor u omjernu tikvicu od 50 ml, dodati 0,5 ml Carrez I rastvora i promiješati, a zatim dodati 0,5 ml Carrez II, ponovo promiješati i dopuniti do linije s destiliranom vodom (kapljica etanola može se dodati kako bi se spriječilo stvaranje pjene). Sadržaj iz tikvice profiltrirati kroz filter papir s tim što se prvih 10 ml odbaci. Od filtrata otpipetiramo 5 ml u svaku od test epruveta (18 x 150 mm). Dodati 5 ml vode u jednu od test epruveta i dobro izmiješati

(rastvor sa uzorkom), a u drugu dodati 5 ml 0,2 %-tnog rastvora Na-bisulfita i dobro izmiješati (referentni rastvor).

Dodati u test epruvete	Rastvor sa uzorkom	Referentni rastvor
Inicijalni rastvor meda	5,0 ml	5,0 ml
Voda	5,0 ml	-
Na-bisulfat	-	5,0 ml

Odrediti apsorbanciju rastvora sa uzorkom nasuprot referentnog rastvora na 284 i 336 nm u kvarenoj kiveri od 10 mm u toku 1 sat. Ako apsorbancija na 284 nm prelazi vrijednost 0,6, potrebno je razrijediti rastvor uzorkom destilirane vode, a referentni rastvor Na-bisulfatom u istom odnosu da bi se dobila dovoljno niska apsorbancija. Ako je potrebno razrjeđivanje rastvora, neophodno je izvršiti korekciju rezultata.

$$D = \frac{\text{konačni rastvor uzorka}}{10}$$

Rezultati:

$$\text{HMF u mg/kg} = (A_{284} - A_{336}) \times 149,7 \times 5 \times D/W$$

A_{284} je apsorbancija na 284

A_{336} je apsorbancija na 336

$$126 \times 1000 \times 1000$$

$$\lambda \cdot 49,7 = \text{faktor}$$

$$16\,830 \times 10 \times 5$$

126 - je molekulska masa HMF;

16 830 - je molarna apsorbancija na 284 nm;

1000 - je konverzija grama u kg;

5 - je teoretska težina uzorka;

D - je faktor razrjeđenja ako je razrjeđenje neophodno;

W - je težina uzorka meda u g;

λ - je 284 nm.

Rezultati se izražavaju u mg/kg na jednu decimalu.

Odjeljak K. Biološka metoda polenske analize meda

Odvaga se 10 g dobro izmiješanog meda i otopi u 20 ml vode i stavi u vodeno kupatilo na temperaturu od 45 °C. Rastvor se centrifugira 15 minuta na 3 500 obrtaja. Tekući dio se odlije, a sediment se prenese mikropipetom na predmetno staklo i ravnomjerno razmaže na površinu 15 x 20 mm. Preparat se osuši u termostatu na temperaturi ne višoj od 45 °C i uklopi u glicerol želatinu. Nakon toga, preparat se boji dodavanjem kapi fuksina u glicerol želatinu. Uzorak se pokrije pokrovnim staklom i vraća u termostat na sušenje. Uvijek se rade dva paralelna uzorka istog meda. Mikroskopira se pri povećanju 200 do 600 puta. Mijenjaju se vidna polja dok se ne izbroji 300 polenovih zrna. Prebrojana polenova zrna razvrstavaju se prema biljnoj vrsti.

Biljne vrste determiniraju se na osnovu oblika polenovog zrna, veličine zrna, građe stijenke, te prema vrsti, obliku i broju otvora za klijanje. Polenova zrna upoređuju se s referentnim preparatima i slikom iz atlasa. Ovom analizom utvrđuje se botaničko porijeklo meda.

Odjeljak L. Određivanje vode u matičnom mliječu i polenu

Princip

Princip ove metode zasniva se na predestilaciji vode iz ispitivanog uzorka u specijalnom aparatu pomoću organskog rastvarača koji se ne miješa s vodom, a zatim se predestilirana količina izmjeri u građiranoj menzuri.

Metoda se primjenjuje prilikom određivanja vode u matičnom mliječu i cvijetnom prahu.

Aparatura i pribor

Pored uobičajene laboratorijske opreme, koriste se i:

- (1) aparat za određivanje vode po Dean-Starku (sl. 2), zapremine 250 ml;
- (2) analitička vaga;
- (3) menzure zapremine 10 ml i 100 ml.

Reagens: ksilol

Određivanje

Odmjeri se 5 g matičnog mliječa, odnosno 30 g polena, stavi u tikvicu za destilaciju i prelije sa 150 ml ksilola. Zatim se aparat sastavi, voda pusti kroz hladnjak i pristupi destilaciji. Smjesa se lagano destilira, pri čemu se vodena para i para organskog rastvarača kondenziraju i skupljaju u građiranoj cijevi, a višak rastvarača vraća se natrag. Destilacija traje sve dok kondenzat ne postane potpuno bistar. Tada se zagrijavanje prekida i kondenzat ostavi izvjesno vrijeme da se voda potpuno izdvoji. Donji (vodeni) sloj ispusti se u menzuru i očitava se količina vode.

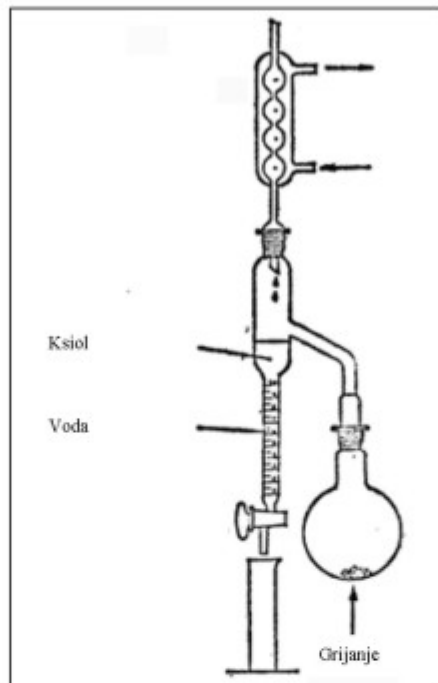
Izračunavanje

Količina vode izražava se u procentima i izračunava po sljedećoj formuli:

$$\text{procenat vode} = \frac{100 a}{B}$$

gdje je:

- a – broj ml očitane vode,
B – odmjereni uzorak, u g.



Slika 2. Aparat za destilaciju po Dean-Starku

Odjeljak M. Određivanje proteina u matičnom mliječu

Princip

Princip ove metode se zasniva na biuret - reakciji, odnosno reakciji bakra s peptidnom vezom, pri čemu nastaje ljubičasta boja, koja se određuje spektrofotometrijski na 546 nm. Izmjerena apsorbancija srazmjerna je koncentraciji proteina u rastvoru.

Aparatura i pribor

Pored uobičajene laboratorijske opreme, koriste se i:

- (1) spektrofotometar;
- (2) analitička vaga;
- (3) centrifuga;
- (4) odmjerna tikvica zapremine 100 ml i 1 000 ml;
- (5) kiveta;
- (6) pipeta od 1 ml i 10 ml.

Reagensi

- (1) Biuretski reagens: 4,5 g kalijum-natrijum-tartarata rastvori se u 40 ml NaOH 0,2 mol/l, doda se 1,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ prethodno rastvorenog u 10 ml destilirane vode i 0,5 g kalijum-jodida. Rastvor se lagano izmiješa, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu zapremine 100 ml i dopuni do 100 ml sa 0,2 mol/l rastvora NaOH.

Rastvor mora biti bistar i bez taloga.

- (2) Rastvor natrijum-hidroksida, $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$; u odmjernu tikvicu zapremine 1 000 ml rastvori se 8,4 g NaOH u oko 950 ml destilirane vode.

Rastvor se ohladi i dopuni vodom do oznake.

- (3) Rastvor za stabilizaciju: rastvori se 5 g kalijum-jodida u 0,2 mol/l NaOH i dopuni rastvorom 0,2 mol/l NaOH do 1 000 ml.
(4) Proteinski standard 6 g/l: serum krvi u kojem je poznata količina proteina ili kristaliziran ljudski albumin.

Određivanje

Na aluminijskoj foliji dimenzija 15 mm x 15 mm odmjeri se na analitičkoj vagi 100 mg matičnog mliječa. Sve se prenese u kivetu za centrifugiranje i pomoću staklenog štapića potopi do dna kivete. Pipetom se doda 8 ml rastvora za stabilizaciju i još jednom dobro promiješa da bi se mliječ rastopio. Centrifugira se 10 minuta na 3 000 obrtaja. Poslije centrifugiranja, odmjeri se 4 ml rastvora mliječa, prenese u drugu kivetu i doda 1 ml biuretskog reagensa.

Istovremeno se pripremi slijepa proba od 4 ml reagensa za stabilizaciju i 1 ml biuretskog reagensa. Poslije 30 minuta mjeri se apsorbancija na talasnoj dužini od 546 nm.

Pod istim uslovima odredi se i apsorbancija standardnog rastvora.

Izračunavanje

Količina proteina izražava se u procentima i izračunava po sljedećoj formuli:

$$\text{procent proteina} = \frac{(A_v - A_{sl}/f \times 2 \times 100)}{a}$$

gde je:

A_v – apsorbancija uzorka;

A_{sl} – apsorbancija slijepe probe;

$$f - \text{faktor} = \frac{A_s - A_{sl}}{C_s}$$

a – količina uzorka, u mg;

A_s – apsorbancija standarda;

Cs – količina proteina u standardu.

Odjeljak N. Određivanje ekstrakta propolisa u alkoholnom rastvoru

Aparatura i pribor

Za određivanje ekstrakta propolisa u alkoholnom rastvoru koristi se uobičajena laboratorijska oprema.

Reagens: etanol

Određivanje

Odmjeri se 5 g propolisa i prenese u konusnu tikvicu (Erlenmajer), prelije sa 50 g etanola i ostavi na sobnoj temperaturi da se ekstrahuje preko noći. Nakon toga, tečnost se filtrira i uzima alikvot od tri grama filtrata koji se dva sata suši u sušnici, na temperaturi od 105 °C. Poslije dva sata, uzorak se izvadi iz sušnice, stavi u eksikator i ohladi. Ohlađen uzorak se mjeri.

Izračunavanje

Količina suhe materije (ekstrakta) izražava se u procentima i izračunava po sljedećoj formuli:

$$\text{procent ekstrakta} = \frac{100 \times b \times c}{d \times (a - c)}$$

gdje je:

- a – masa filtrata, u g;
- b – masa rastvarača, u g;
- c – masa suhog ostatka, u g;
- d – masa uzorka, u g.