

PRAVILNIK

O METODAMA ZA KONTROLU MEDA I DRUGIH PČELINJIH PROIZVODA

DIO PRVI - OPĆE ODREDBE

Članak 1.

(Predmet)

- (1) Pravilnikom o metodama za kontrolu meda i drugih pčelinjih proizvoda (u daljnjem tekstu: Pravilnik) propisuju se metode kontrole kvalitete 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, kemijskih i bioloških analiza proizvoda.
- (3) Uzimanje uzoraka, fizičke, kemijske i biološke analize proizvoda provode se prema metodama navedenim u aneksima I. i II. koji su sastavni dio ovoga Pravilnika.

DIO DRUGI - POSEBNE ODREDBE

Članak 2.

(Metode uzorkovanja)

Metode uzimanja uzoraka meda i drugih proizvoda kojima se utvrđuju postupci i načini uzimanja uzoraka na kojima se obavlja kontrola kvalitete tih proizvoda navedene su u Aneksu I. ovoga Pravilnika.

Članak 3.

(Metode fizičkih, kemijskih i bioloških analiza)

Metode fizičkih, kemijskih i bioloških analiza meda i drugih proizvoda kojima se utvrđuju uvjeti i postupci za izvođenje fizičkih, kemijskih i bioloških ispitivanja proizvoda radi provjeravanja kvalitete navedene su u Aneksu II. ovoga Pravilnika.

Članak 4.

(Upotreba reagensa)

Svi reagensi koji se upotrebljavaju za kemijske analize proizvoda obuhvaćenih ovim Pravilnikom moraju biti u granicama propisane analitičke čistoće, a voda koja se koristi mora biti destilirana.

Članak 5.

(Preciznost određivanja)

- (1) Preciznost određivanja metoda fizičkih, kemijskih i bioloških analiza, u skladu s ovim Pravilnikom, utvrđuje se prema načelima dobre laboratorijske prakse, a izražava se kao relativno odstupanje od prosjeka dobivenog u najmanje dva istovremena određivanja.

(2) Dopusštena razlika rezultata dvaju pojedinačnih određivanja izvedenih usporedo ili ubrzo jedno za drugim, na istom uzorku za ispitivanje, istom metodom, u istim uvjetima, koje je obavio isti analitičar i u istom laboratoriju, mora biti u granicama propisane metode, kako je to utvrđeno ovim Pravilnikom.

DIO TREĆI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Članak 6.

(Prestanak važenja odredaba)

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

Članak 7.

(Stupanje na snagu)

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmoga dana od dana objave u "Službenom glasniku BiH".

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

Predsjedatelj
Vijeća ministara BiH
Dr. Nikola Špirić, v. r.

ANEKS I.

POGLAVLJE I. METODE UZIMANJA UZORAKA

Odjeljak A. Uzimanje uzoraka

- (1) Pri obavljanju inspekcijskog nadzora, uzorci meda i drugih pčelinjih proizvoda 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 ovoga Pravilnika, podrazumijeva se odgovarajuća količina proizvoda iste vrste proizvedena istoga dana, odgovarajućeg obujma, s obavezatnom identifikacijskom oznakom.
- (2) Pod ambalažnom jedinicom meda i drugih pčelinjih proizvoda podrazumijevaju se utvrđene količine proizvoda iste vrste upakirane u pojedinačna pakiranja odgovarajućeg obujma, s obveznom identifikacijskom oznakom.
- (3) Ambalažne jedinice mogu biti upakirane u zbirna transportna pakiranja, na koja se primjenjuju odredbe ovoga Pravilnika.
- (4) Pod pošiljkom proizvoda podrazumijeva se istovremeno isporučena količina proizvoda u pojedinačnim i zbirnim pakiranjima koja se stavljaju u promet.

Odjeljak C. Uzorak, zapisnik, pakiranje i čuvanje uzorka

- (1) Uzorak za ispitivanje proizvoda čine najmanje tri istovjetne ambalažne jedinice od ukupno uzetog uzorka, s tim što te jedinice moraju biti istovjetne po sastavu i obujmu.
- (2) Ovlaštena osoba koja uzima uzorak za ispitivanje obvezatno sastavlja zapisnik o uzimanju uzoraka, u koji unosi podatke važne 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, identifikacijske oznake za uzorak i količinu uzorka koja se dostavlja na ispitivanje.
- (3) Uzorak se pakira u staklene ili plastične posude koje se zatvaraju čistim i suhim zatvaračima i označavaju tako da se oznaka ne može lako skinuti ni izbrisati, a potom se u njih utiskuje službeni pečat ili stavlja plomba.
- (4) Uzeti uzorci čuvaju se u uvjetima propisanim ovim Pravilnikom za odgovarajuće proizvode.
- (5) Ako su proizvodi upakirani u originalne ambalažne jedinice manjeg obujma ili mase, uzeti uzorak može biti svaka nasumice uzeta pojedinačna jedinica.

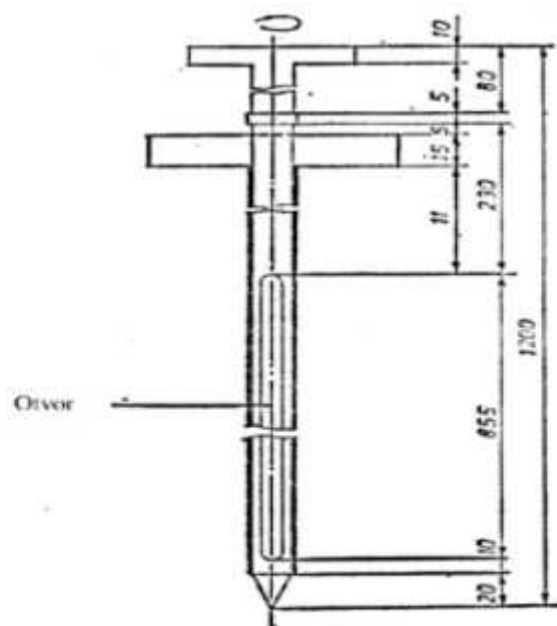
POGLAVLJE II. UZIMANJE UZORAKA MEĐA I DRUGIH PČELINJIH PROIZVODA

Odjeljak A. Broj uzoraka, formiranje uzorka

- (1) Broj jedinica uzetog uzorka za ispitivanje ovisi o vrsti proizvoda i veličini proizvodne serije odnosno pošiljke.
- (2) Broj jedinica uzetog uzorka utvrđuje se prema sljedećoj tablici:

<i>Vrsta pakiranja</i>	<i>Količina od koje se uzorak uzima</i>	<i>Broj ambalažnih jedinica koje se uzimaju kao uzorak</i>	<i>Masa uzetog (g)</i>	<i>ukupno uzorka</i>
Kante ili bačve	1 jedinica	1	500	
	2 - 5 jedinica	2	500	
	> 5 - 60 jedinica	3	1 000	
	> 60 - 80 jedinica	4	1 000	
	> 80 - 100 jedinica	5	1 000	
Za svaku daljnju stotinu ili započetu stotinu kanti/bačvi, broj kanti/bačvi za uzimanje uzoraka povećava se za 1.				
Staklenke (do 1 kg)	1 - 100 jedinica	1	500	
	> 100 - 500 jedinica	2	500	
	> 500 - 1.000 jedinica	3	500	
	> 1.000 - 10.000 jedinica	4	500	
Ako je pošiljka veća od 10.000 staklenki, na svakih daljnjih 2.500 staklenki uzima se po još jedan uzorak.				
Ostale vrste pakiranja (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 postojati jednaka mogućnost da bude izdvojena kao ambalažna jedinica uzorka uzetog za ispitivanje.
- (4) Za uzimanje uzoraka meda iz kante/bačve upotrebljava se metalna sonda s odjeljcima (slika 1). Metalna se sonda sastoji od dviju koncentričnih cijevi koje ulaze jedna u drugu. Donji dio sonde je zašiljen. Unutarnja cijev sonde ima ručicu kojom se sonda može zatvoriti kada je okrenemo za 90°.
- (5) Uzorak meda uzima se tako što se zatvorena, čista i osušena sonda uroni u med do kraja zajedničkog otvora. U medu se sonda otvori pa zatvori i s uzetim uzorkom izvlači iz proizvoda.



Slika 1. Metalna sonda za uzimanje uzoraka meda

ANEKS II.

POGLAVLJE I. METODE FIZIKALNIH, KEMIJSKIH I BIOLOŠKIH ANALIZA MEDA I DRUGIH PČELINJIH PROIZVODA

Odjeljak A. Metode fizikalnih, kemijskih i bioloških analiza

Metode fizikalnih, kemijskih i bioloških analiza kojima se obavlja kontrola kvaliteta meda i drugih pčelinjih proizvoda su:

- a) priprava uzoraka za analizu;¹
- b) određivanje električne vodljivosti;^{1, 2}
- c) određivanje reduciranih šećera;¹
- d) određivanje saharoze;¹
- e) određivanje vode u medu;¹
- f) određivanje tvari netopivih 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 valne duljine po Whiteu²);¹
- k) biološka metoda analize peluda u medu;
- l) određivanje vode u matičnoj mliječi i peludu;
- m) određivanje bjelančevina u matičnoj mliječi;
- n) određivanje ekstrakta propolisa u alkoholnoj otopini.

¹ *Codex standard for honey*

² Usklađene metode za med Europske komisije

POGLAVLJE II. METODE FIZIKALNIH, KEMIJSKIH I BIOLOŠKIH ANALIZA KOJIMA SE ISPITUJE KONTROLA KVALITETE MEDA I DRUGIH PČELINJIH PROIZVODA

Odjeljak A. Priprava uzorka za analizu

- (1) Ovisno o konzistenciji meda, uzorci za analizu pripremaju se na razne načine.
- (2) Ako je med u tekućem stanju, prije početka analize polako se izmiješa štapićem ili se protrese.
- (3) Ako je med granuliran, zatvorena posuda s uzorkom stavi se u vodenu kupelj i zagrijava 30 minuta na temperaturi od 60 °C, a prema potrebi i na temperaturi od 65 °C. Za vrijeme zagrijavanja može se promiješati štapićem ili kružno protresti, a potom brzo prohladiti.
- (4) Ako se određuje diastaza ili hidroksimetilfurfurol, med se ne zagrijava.
- (5) Ako med sadrži strane tvari, poput voska, dijelove pčela ili dijelove saća, uzorak se zagrijava na temperaturi od 40 °C u vodenoj kupelji, a potom procijedi kroz tkaninu koja se stavlja na ljepljivo zagrijavano toplom vodom.
- (6) Ako je med u saću, saće se otvori, procijedi kroz žičano sito s kvadratnim otvorima dimenzija 0,5 x 0,5 mm. Ako dio saća i voska prođe kroz sito, uzorak se zagrijava u vodenoj kupelji na temperaturi od 60 °C, a prema potrebi zagrijava se 30 minuta i na temperaturi od 65 °C. Za vrijeme zagrijavanja promiješa se štapićem ili protrese kružnim pokretima, a potom se brzo ohladi.
- (7) Ako je med u saću granuliran, zagrijava se da bi se vosak otopio, promiješa se i ohladi. Nakon hlađenja vosak se odstrani.

Odjeljak B. Određivanje električne vodljivosti

Područje primjene

Metoda je valjana za određivanje električne vodljivosti meda u rasponu od 0,1 do 3 miliSimensa po centimetru⁻¹ (mS/cm⁻¹).

Definicija

Električna vodljivost meda definirana je s pomoću 20%-tne volumne vodene otopine meda na 20 °C, pri čemu se 20% odnosi na suhu tvar meda. Rezultati su izraženi u mS/cm⁻¹.

Načelo

Električna vodljivost otopine koja sadrži 20 g suhe tvari meda u 100 ml destilirane vode mjeri se s pomoću elektrokonduktometrijske ćelije. Određivanje električne vodljivosti temelji se na mjerenju električne otpornosti, koja je recipročna električnoj vodljivosti. Metoda je utemeljena na originalnom Vorwlohlovom radu (1 - 5).

Reagensi

Ukoliko nije na drukčije određeno, reagensi moraju biti prepoznatljive analitičke čistoće ili kvalitete. Voda bi trebala biti svježje destilirana ili ekvivalentne kvalitete.

Otopina kalijeva klorida 0,1 M: otopiti 7,4557 g KCl (kalijeva klorida), osušenog na 130 °C, u svježe destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici obujma 1.000 ml i dopuniti do oznake destiliranom vodom. Pripraviti je na dan korištenja.

Oprema

Konduktometar, nižeg reda 10^{-7} S.

Konduktometrijske ćelije, platinske dvostruke elektrode (imerzicijske elektrode).

Termometar s osjetljivošću mjerenja 0,1 °C.

Vodena kupelj, termostatičke kontrole temperature na $20 \pm 0,5$ °C.

Odmjerne tikvice, obujma 100 i 1.000 ml.

Menzura, visokog oblika.

Postupak

Određivanje konstante ćelije

Ukoliko konstanta konduktometrijske ćelije nije poznata, postupak je sljedeći: uliti 40 ml otopine kalijeva klorida u menzuru; ugoditi konduktometrijsku ćeliju na mjerenje konduktivnosti; temeljito isprati otopinom kalijeva klorida i uroniti ćeliju u otopinu zajedno s termometrom; očitati električnu vodljivost otopine u mS nakon postizanja temperature od 20 °C.

Napomena

Da bi se izbjegle pogreške u rezultatu zbog efekta polarizacije, vrijeme mjerenja trebalo bi biti što je moguće kraće.

Konstanta ćelije K izračunava se s pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

- K - konstanta ćelije izražena u cm^{-1} ;
- G - električna vodljivost (mS) mjerena s konduktometrijskom ćelijom;
- 11,691- zbroj srednje vrijednosti električne vodljivosti svježe destilirane vode u mS/cm i električne vodljivosti 0,1 M otopine kalijeva klorida na 20 °C.

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

Priprava uzorka

Uzorak se pripravlja prema metodi pripreme uzorka za analizu propisanu u Odjeljku A. ovoga Poglavlja.

Priprava otopine s uzorkom

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

Uliti 40 ml otopine u menzuru koju nakon toga treba staviti u vodenu kupelj na 20 °C. Temeljito isprati konduktometrijsku ćeliju s većim dijelom otopine uzorka. Uroniti konduktometrijsku ćeliju u otopinu uzorka. Očitati vodljivost (mS) nakon što se postigne navedena temperatura.

Napomena:

1. Mjerenje bi se trebalo obaviti što je moguće brže da bi se izbjegle pogreške u rezultatu.
2. Ako je određivanje rađeno na različitim temperaturama zbog nedostatka termostatičke ćelije, tada se za izračun 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% od vrijednosti za svaki °C.

Mjerne podatke koje smo korigirali spomenutim vrijednostima faktora ne možemo validirati u ring kontrolama. Međutim, nema značajne razlike između konduktivnosti 50 uzoraka meda mjerenih na 20 °C i na temperaturama koje variraju od 20 do 26 °C nakon primjene spomenutih korekcijskih faktora.

Izračun i izražavanje rezultata

Električna vodljivost izračunava se prema sljedećoj formuli :

$$S_H = K \times G$$

gdje je:

- | | |
|---------|--|
| S_H – | električna vodljivost otopine meda (mS/cm) |
| G – | vodljivost (mS) |
| K – | konstanta ćelije (cm). |

Odjeljak C. Određivanje reduciranih šećera

a) Metoda s Fehlingovim otopinama

Načelo

Ova metoda temelji se na redukciji Fehlingove otopine titracijom s pomoću otopine reduciranih šećera iz meda uz upotrebu metilenskog modrog bojila kao indikatora.

Reagensi

(1) Fehlingova otopina

- a) Otopina A: otopi se 69,28 g bakrenog sulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) i dopuni se destiliranom vodom do jedne litre. Otopina se pripravi dan ranije prije postupka titracije.
- b) Otopina B: otopi se 346 g kalijnatrijeva tartarata ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) i 100 g natrijeva hidroksida (NaOH) u jednoj litri destilirane vode. Otopina se potom filtrira.

- (2) Standardna otopina invertnog šećera (10 g/l vode): izvaže se 9,5 g čiste saharoze, doda 5 ml otopine klorovodonične (solne) kiseline HCl (oko 36,5 %) i dopuni destiliranom vodom do 100 ml. Otopina se može pohraniti nekoliko dana, ovisno o temperaturi: na temperaturi od 12 °C do 15 °C do sedam dana, a na temperaturi od 20 °C do 25 °C do tri dana. Pripravljena otopina dopuni se vodom do jedne litre. Neposredno prije upotrebe odgovarajući se obujam otopine neutralizira 1 mol otopinom NaOH /l i zatim se razrijedi do zahtijevane potrebne koncentracije (2 g/l) - standardna otopina.

Napomena: 1%-na zakiseljena otopina invertnog šećera stabilna je nekoliko mjeseci.

- (3) Otopina metilenskog modrog bojila: otopi se 2 g metilenskog modrog bojila u destiliranoj vodi, a zatim se razrijedi vodom do jedne litre.

(4) Stipsa (alaun)

- a) Otopina stipse: pripravi se hladno zasićena otopina ($\text{K}_2\text{SO}_4\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$) u vodi. Potom se, uz stalno miješanje štapićem, dodaje amonijev hidroksid dok otopina ne postane alkalna, što se utvrđuje lakmus-papirom. Otopina se pusti da se slegne i ispire vodom uz dekantiranje sve dok je voda slabo pozitivna testiranjem na sulfate, što se utvrđuje otopinom barijeva klorida. Višak vode se odlije, a preostala pasta pohrani u boci s brušenim zatvaračem.

Priprava uzorka

Postupak I. (primjenjiv na med koji može sadržati talog)

- a) Izvaže se 25 g (W_1) homogeniziranog meda i prenese u odmjernu tikvicu obujma 100 ml, doda se 5 ml stipse i dopuni vodom do oznake, pri temperaturi od 20 °C, pa se otopina filtrira.
- b) U odmjernu tikvicu obujma 500 ml otpipetira se 10 ml uzorka pod a) i razrijedi destiliranom vodom do oznake na tikvici (razrijeđena otopina meda).

Postupak II.

- a) Izvaže se 2 g homogeniziranog meda (W_2), prenese u odmjernu tikvicu obujma 200 ml i otopi u vodi, a zatim se dopuni vodom do oznake na tikvici (otopina meda).
- b) Odmjeri se 50 ml otopine meda pod a) i dopuni destiliranom vodom do 100 ml (razrijeđena otopina meda).

Standardizacija Fehlingove otopine

Fehlingova se otopina standardizira tako što se otpipetira 5 ml Fehlingove otopine A i pomiješa s 5 ml otopine B (Fehlingova otopina). Ta otopina mora potpuno reagirati s 0,050

g invertnog šećera dodanog u količini od 25 ml kao standardna otopina invertnog šećera (2 g/l).

Prethodna titracija

Ukupni obujam tvari koje reagiraju na kraju redukcijske titracije mora iznositi 35 ml, što se postiže dodavanjem određene količine vode prije početka titracije. Budući 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 utvrdio točan obujam vode koja se dodaje, kako bi se u postupku analize osigurala redukcija pri stalnom obujmu. Obujam potrebne količine vode dobiva se oduzimanjem potrošenog obujma razrijeđene otopine meda u prethodnoj titraciji („X ml“) od 25 ml (25 ml – „X“).

Pipetom se odmjeri 5 ml Fehlingove otopine A i prenese u stožastu Erlenmeyerovu tikvicu obujma 250 ml, doda se 5 ml Fehlingove otopine B, 7 ml destilirane vode, malo plovućca ili drugog sličnog sredstva i 15 ml razrijeđene otopine meda iz birete. Medna se mješavina zagrijava do vrenja i dvije minute održava da polako vrije. Za vrijeme vrenja otopine, doda se 1 ml 0,2%-ne otopine metilenskog modrog bojila i titracija se završi za ukupno tri minute, uz ponovno dodavanje razrijeđene otopine meda sve dok ne iščezne boja indikatora. Potrošeni obujam razrijeđene otopine meda koji je potpuno reduciran obilježava se s „X ml“.

Određivanje. Pipetom se odmjeri 5 ml Fehlingove otopine A i prenese u stožastu Erlenmeyerovu tikvicu obujma 250 ml, te se doda 5 ml Fehlingove otopine B. Zatim se doda (25 ml – „X ml“) destilirane vode, malo kamena plovućca ili drugog odgovarajućeg sredstva i iz birete razrijeđena otopina meda, tako da za kompletnu titraciju ostane oko 1,5 ml (X ml - 1,5ml). Potom se hladna mješavina zagrijava do vrenja i dvije minute održava da umjereno vrije. Za vrijeme vrenja doda se 1,0 ml 0,2%-ne otopine metilenskog modrog bojila, pa se titracija, dodavanjem razrijeđene otopine meda do obezbojenja indikatora, mora završiti ukupno za tri minute vrenja. Potrošena količina razrijeđene otopine meda obilježava se s „Y ml“.

Izračun

Invertni šećer izražava se u g/100 g meda (%) i izračunava ovisno o načinu pripreme uzoraka (postupak I. ili II).

Ako se primijeni postupak I, izračunava se prema sljedećoj formuli:

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

gdje je:

- C - invertni šećer (g)
- W_1 - masa uzetog uzorka (g)
- Y_1 - obujam razrijeđene otopine meda potrošenog za određivanje (ml).

Ako se primijeni postupak II, izračunava se prema sljedećoj formuli:

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

gdje je:

- C - invertni šećer (g)
W₂ - masa uzetog uzorka (g)
Y₂ - obujam razrijeđene otopine meda potrošenog za određivanje (ml).

Napomena:	Radi preciznosti i ponovljivosti rezultata, za svaki je pokus nužno odrediti potreban obujam vode koju treba dodati da bi ukupan obujam iznosio 35 ml. U sljedećoj su tablici dane približne vrijednosti, pod pretpostavkom da je početna masa uzorka iznosila 25 g odnosno 2 g.	
	Sadržaj invertnog šećera (%)	Potrebna količina vode, (ml)
	60	8,3
	65	9,6
	70	10,7
	75	11,6

Ponovljivost:

Razlika između titracija u dva određivanja izvedena istovremeno ili ubrzo jedno za drugim ne iznosi više od 0,1 ml.

b) Volumetrijska metoda po Luff - Schoorlu

Ova metoda temelji se na načelu da u određenim uvjetima reducirani šećer (prirodni invert) prevede Cu²⁺ ione u Cu⁺ ione. Nepotrošena količina Cu²⁺ iona retitrira se otopinom tiosulfata. Iz razlike utroška za slijepi pokus i pokus očitava se količina šećera iz tablice.

Nereducirani disaharid (saharoza) mora se predhodno invertirati, odnosno hidrolizirati na nereducirane monosaharide s pomoću kiseline, a zatim se određuju s pomoću Luffovog reagensa. Na taj se način dobiva podatak o ukupnoj količini šećera u ispitivanom uzorku.

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

Reagensi:

(1) Luffov reagens:

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

U odmjernu tikvicu obujma 1.000 cm^3 unese se otopina natrijeva karbonata i uz oprezno miješanje doda otopina limunske kiseline. Miješa se do nestanka ugljičnog dioksida, a zatim se doda otopina bakrenog sulfata te se odmjerna tikvica dopuni destiliranom vodom do oznake.

- (2) Natrijev tiosulfat, otopina $0,1\text{ mol/dm}^3$;
- (3) Škrob, 0,5%-tna otopina;
- (4) Sumporna kiselina, otopina 6 mol/dm^3 ;
- (5) Kalijev jodid, 30%-tna otopina;
- (6) Natrijev hidroksid, otopina $0,1\text{ mol/dm}^3$;
- (7) Natrijev hidroksid, otopina 1 mol/dm^3 ;
- (8) Carrez I. ($21,95\text{ g Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ili $24\text{ g Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ i 3 g glacijalne octene kiseline se otopi i dopuni do oznake destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 cm^3);
- (9) Carrez II. ($10,6\text{ g KFe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$ se otopi u destiliranoj vodi i dopuni do oznake u odmjernoj tikvici od 100 cm^3);
- (10) Solna kiselina, koncentrirana.

Postupak

Izvaže se oko 5 g uzorka (s točnošću od $\pm 0,001\text{ g}$). Uzorak se s 200 cm^3 destilirane vode kvantitativno prenese u čašu od 400 cm^3 . Balastne se tvari uklone dodavanjem po 5 cm^3 otopine Carrez I i II. Nakon svakog dodavanja sadržaj se dobro promiješa. Cijeli se sadržaj iz čaše prenese u odmjernu tikvicu od 250 cm^3 , dopuni do oznake destiliranom vodom, promiješa i filtrira. To je filtrat I.

U odmjernu tikvicu od 100 cm^3 otpipetira se 10 cm^3 filtrata I. i dopuni destiliranom vodom do oznake na tikvici. Sadržaj u tikvici se dobro promiješa i u Erlenmeyerovu tikvicu do 300 cm^3 otpipetira se 25 cm^3 Luffovog reagensa i 25 cm^3 razrijeđenog filtrata I. Erlenmeyerova se tikvica stavi na zagrijano tijelo i sadržaj treba da zavrije za dvije minute, a zatim se na tikvicu stavlja povratno hladilo te sadržaj u tikvici treba da vrije 10 minuta. Nakon toga se tikvica hladi pod vodenim mlazom i nakon hlađenja pusti da stoji 5 minuta. Potom se u tikvicu doda 10 cm^3 otopine kalijeva jodida i 25 cm^3 otopine sumporne kiseline. Sumporna se kiselina dodaje polako i oprezno zbog mogućnosti stvaranje pjene. Zatim se sadržaj u tikvici titrira otopinom natrijev tiosulfata dok sadržaj u tikvici ne dobije svijetložutu boju. Tada se doda nekoliko cm^3 otopine škroba i titracija se nastavlja dok se ne pojavi modra boja.

Pod istim se uvjetima izvodi i slijepi pokus, s istom količinom Luffovog reagensa, a umjesto razrijeđenog filtrata I. dodaje se 25 cm^3 destilirane vode.

Od ukupno potrošene otopine natrijeva tiosulfata (cm^3), za titraciju slijepog pokusa oduzima se potrošena otopina natrijeva tiosulfata za probu i za tablice za određivanje šećera po Luffu očita se količina invertnog šećera (mg), koja odgovara toj razlici.

Sadržaj prirodnog inverta izračunava se prema sljedećoj formuli:

Izračun:

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

gdje je:

- V – cm³ matične otopine
- V₁ – cm³ filtrata I.
- V₂ – cm³ razrijeđenog filtrata I.
- V₃ – cm³ razrijeđenog filtrata I. u kojem se određuju šećeri
- a – količina invertnog šećera očitana iz tablice (mg)
- Ok – izvagana količina uzorka (g).

Količina ukupnog inverta određuje se tako što se otpipetira 10 cm³ filtrata I. u odmjernu tikvicu od 100 cm³, razrijedi se s 30 cm³ destilirane vode i doda 0,5 cm³ koncentrirane solne kiseline. Odmjerna tikvica sa sadržajem stavi se u kipuću vodenu kupelj da bi se izvršila inverzija u trajanju od 30 minuta. Nakon toga se sadržaj tikvice neutralizira otopinom natrijeva hidroksida koncentracije 1 mol/dm³ i dopuni destiliranom vodom do oznake na tikvici. Iz odmjerne se tikvice otpipetira 25 cm³ uzorka za titraciju, a daljnji je postupak isti kao i kod prirodnog inverta.

Sadržaj ukupnog inverta izračunava se prema sljedećoj formuli:

Izračun:

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

gdje je:

- V – cm³ matične otopine
- V₁ – cm³ filtrata I.
- V₂ – cm³ razrijeđenog filtrata I. nakon inverzije
- V₃ – cm³ razrijeđenog filtrata I. u kojem se određuju šećeri
- a – količina invertnog šećera očitana iz tablice (mg)
- Ok – izvagana količina uzorka (g).

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

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

gdje je:

- A – postotak prirodnog inverta
- B – postotak ukupnog inverta.

Tablica za određivanje količine šećera s 23 cm³ Luffovog reagensa

Otopina natrijeva tiosulfata $C = \text{mol/dm}^3$	Glukoza, fruktoza ili invertni šećer		Otopina natrijeva 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

Načelo

Ova metoda temelji se na hidrolizi saharoze, redukciji Fehlingove otopine titracijom s reduciranim šećerima iz hidrolizata meda uz metilensko modro bojilo.

Reagensi

- (1) Fehlingova otopina (A i B), utvrđena metodom određivanja reduciranih šećera;
- (2) Standardna otopina invertnog šećera, utvrđena metodom određivanja reduciranih šećera;
- (3) Solna kiselina C (HCl) = 6,34 mol/l;
- (4) Otopina natrijevog hidroksida C (NaOH) = 5 mol/l;
- (5) 2%-tna otopina metilenskog modrog bojila (2 g/l).

Priprava uzorka

Postupak I.

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

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

Postupak II.

Izvaže se 2 g (W_2) homogeniziranog meda i prenese u odmjernu tikvicu, otopi u destiliranoj vodi i dopuni u tikvici do 200 ml (otopina meda).

Hidroliza uzorka

Otopina meda (50 ml) prenese se u odmjernu tikvicu obujma 100 ml i doda 25 ml destilirane vode. Termometar se uroni u pripremljeni uzorak i zagrijava se do 65 °C u kipućej vodenoj kupelji. Tikvica se zatim iznese iz vodene kupelji i doda 10 ml solne kiseline [$C(HCl) = 6 \text{ mol/l}$]. Otopina se pusti da se hladi 15 minuta, zatim se temperatura ugodi na 20 °C i neutralizira 5 mol otopinom NaOH/l, uz upotrebu lakmus-papira kao indikatora, ponovno se ohladi (20 °C) te se dopuni do 100 ml (razrijeđena otopina meda).

Određivanje

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

Izračun

Prvo se obračunava postotak invertnog šećera nakon inverzije, pri čemu se primjenjuje formula predviđena za određivanje postotka invertnog šećera prije inverzije.

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

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

Odjeljak E. Određivanje vode u medu

a) Refraktometrijsko određivanje

Načelo

Ova metoda temelji se na refraktometrijskom određivanju.

Aparatura i pribor

Osim uobičajene laboratorijske opreme potreban je i refraktometar.

Priprava uzorka

Uzorak se pripravlja na način određen za metodu priprave uzorka za analizu, a zatim se indeks refrakcije uzorka odredi refraktometrom, pri stalnoj temperaturi od 20 °C. Na temelju indeksa refrakcije izračuna se količina vode (% m/m), pri čemu se koristi priložena tablica. Ako se indeks ne odredi na temperaturi od 20 °C, u obzir se uzima korekcija temperature i rezultati se svode na temperaturu od 20 °C.

Tabela za izračun 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 viša od 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

Načelo

Metoda određivanja vode sušenjem temelji se na sušenju uzoraka do stalne mase u raznim vrstama sušionika.

Sušenje u običnom sušioniku.

Postupak:

Posuda za sušenje s odgovarajućim poklopcem (staklena, aluminijska i niklana posuda za vaganje) suši se u sušioniku najmanje 1 sat na temperaturi od 100 do 105 °C, ohladi se u eksikatoru do sobne temperature i izmjeri s točnošću ± 0.001 g. U posudu se brzo stavi određena količina meda (1 – 2 g), pokrije poklopcem i mjeri. Posuda s uzorkom stavi se u sušionik, s koso postavljenim poklopcem. Suši se određeno vrijeme (4 – 5 sati). Nakon što sušenje završi posuda se pokrije poklopcem i stavlja u eksikator, te se nakon hlađenja (od 45 minuta do 1 sata) važe. Ponovno se stavi u sušionik $\frac{1}{2}$ sata – 1 sat, hladi i ponovno važe. To se ponavlja dok se ne postigne stalna masa.

Izračun:

Iz razlike u težini posude s uzorkom prije i poslije sušenja izračunava se sadržaj vode:

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

gdje je:

a – razlika u težini posude s uzorkom prije i poslije sušenja (g)

Ok – izvagana količina uzorka (g)

Odjeljak F. Određivanje netopljivih tvari u vodi (gravimetrijska metoda)

Priprava uzorka

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

Određivanje

Pripremljeni uzorak prvo se filtrira kroz osušen i izvagan sinterirani lijevak, veličine pora od 15 do 40 μm . Talog se ispere vrućom vodom (80 °C), pri čemu se oslobodi šećer, što se utvrđuje testom po Mohru. Lijevak se osuši za jedan sat na temperaturi od 135 °C, ohladi i važe s točnošću od 0,1 mg.

Izračun

Količina tvari netopljivih u vodi izražava se u postotcima (m/m) i izračunava prema sljedećoj formuli:

$$\text{postotak tvari netopljivih u vodi} = \frac{100 \times \text{količina ostatka}}{\text{izvagani uzorak}}$$

Odjeljak G. Određivanje pepela

Načelo

Ova metoda temelji se na postupku izgaranja uzorka na 600 °C do stalne mase.

Aparatura i pribor

Osim uobičajene laboratorijske opreme, upotrebljava se:

- (1) platinska posuda, posuda od silicija ili lončić za žarenje;
- (2) vodena kupelj;
- (3) pješčana kupelj ili Bunsenov plamenik;
- (4) peć za žarenje.

Određivanje

U užarenoj platinskoj ili porculanskoj posudi izvaže se od 5 do 10 g uzorka i zagrijava u vodenoj kupelji dok veći dio vode ne ispari. Potom se uzorak stavi na pješčanu kupelj ili Bunsenov plamenik do pougljenja. Ostatak se zatim žari u peći za žarenje na temperaturi 600 °C do stalne mase. Prije vaganja uzorak se ohladi.

Izračun

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

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

Odjeljak H. Određivanje kiselosti

Načelo

Pripravljeni se uzorak titrira, uz fenolftalein, otopinom 0,1 mol/l natrijeva hidroksida do pojave svijetloružičaste boje.

Aparatura i pribor

Pri određivanju stupnja kiselosti upotrebljava se uobičajena laboratorijska oprema.

Reagensi

- (1) Otopina natrijeva hidroksida, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ (bez karbonata);
- (2) 1%-na otopina fenolftaleina (m/V) u etanolu, neutralizirana;
- (3) destilirana voda bez CO_2 , dobivena kuhanjem a zatim ohlađena.

Određivanje

Izvaže se 10 g uzorka i otopi u 75 ml destilirane vode.

Pripravljeni se uzorak titrira s 0,1 mol otopinom (NaOH)/l, uz 4-5 kapi fenolftaleina kao indikatora. Na kraju titracije boja mora biti postojana 10 sekundi.

Za uzorke tamne boje izvaže se manja količina uzorka.

Alternativno se može upotrijebiti pH-metar i titrirati uzorak do pH - 8,3.

Izračun

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

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

gdje je:

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

Odjeljak I. Određivanje aktivnosti diastaze

Načelo

Načelo ove metode temelji se na hidrolizi 1%-ne otopine škroba enzimom iz 1 g meda tijekom jednog sata na temperaturi od 40 °C.

Aparatura i pribor

Osim uobičajene laboratorijske opreme, upotrebljavaju se:

- (1) odmjerne tikvice obujma 1 litre, 0,5 litre i 0,1 litre;
- (2) stožasta tikvica obujma 0,250 l;
- (3) plamenik;
- (4) vodena kupelj temperature $40 \pm 0,2$ °C;
- (5) spektrofotometar s očitavanjem na 660 nm.

Reagensi

- (1) Matična jodna otopina: otopi se 8,8 g joda p.a., pomiješa se s 22 g kalijeva jodida i otopi u 30 - 40 ml vode, a zatim razrijedi do jedne litre.
- (2) Jodna otopina se pripravlja u odmjernoj tikvici obujma 500 ml tako što se otopi 20 g kalijeva jodida p.a. u 30 - 40 ml vode. Zatim se doda 5 ml matične jodne otopine i dopuni vodom do oznake.

Jodna otopina c ($\frac{J_2}{2}$ 0,0007 mol/l) : u odmjernoj tikvici

- (3) Acetatni pufer - pH 5,3: otopi se 87 g natrijeva acetata ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) u 400 ml vode, doda oko 10,5 ml ledene octene kiseline i dopuni vodom do 500 ml. Ako je potrebno, pH-vrijednost se dotjera natrijevim acetatom ili octenom kiselinom do 5,3 uz upotrebu pH-metra, prema potrebi.

- (4) Otopina natrijeva klorida, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$: otopi se 14,5 g natrijeva klorida u prokuhanoj destiliranoj vodi i dopuni do 50 ml. Rok trajanja te otopine je ograničen.
- (5) Priprava topljivog škroba: u stožastoj tikvici s povratnim hladilom koja je uronjena u vodenu kupelj izvaže se 20 g škroba, doda se mješavina 100 ml 95 %-nog etanola i 7 ml 1 mol/l solne kiseline i ostavi da vrije jedan sat. Otopina se ohladi, filtrira kroz filter (veličine pora od 90 do 150 μm) i ispire vodom sve dok voda za ispiranje prestane pokazivati reakciju na kloride. Škrob se potpuno osuši na zraku temperature 35 °C. Škrobna se otopina mora pohrati u dobro zatvorenu tikvicu.

(6) Određivanje vode u topljivom škrobu

Izvaže se oko 2 g topljivog škroba i u tankom sloju rasporedi po dnu posudice promjera 5 cm. Suši se 1,5 sat na temperaturi od 180 °C. Zatim se ohladi u eksikatoru i izvaže. Gubitak mase na 100 g jest količina vode. Količina vode pripremljenog škroba mora iznositi od 7% do 8% (m/m), ovisno o vlažnosti zraka na kojem je uzorak osušen.

(7) Škrobna otopina

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

Izvaže se količina škroba koja odgovara masi od 2,0 g bezvodnog škroba i izmješa s 90 ml vode u stožastoj tikvici obujma 250 ml. Odmah se prenese na plamenik, preko kojega je postavljena azbestna mrežica, i pusti da polako vrije tri minute. Potom se otopina skloni s plamenika, pokrije i ostavi da se postupno ohladi do sobne temperature. Otopina se zatim prenese u odmjernu bocu obujma 100 ml i stavi u vodenu kupelj zagrijanu na 40 °C. Kada otopina dostigne tu temperaturu, dopuni se vodom do oznake na boci.

Utvrđivanje plave vrijednosti škroba

Količina škroba koja odgovara masi od 1 g bezvodnog škroba otopi se prema opisanom postupku, ohladi se i doda 2,5 ml acetatnog pufera te dopuni vodom u odmjernoj tikvici do 100 ml. U odmjernu tikvicu obujma 100 ml doda se 75 ml vode, 1 ml

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

Otopina se pusti jedan sat na tamnom mjestu i očita se apsorpcija na spektrofotometru pri 660 nm, u kiveti od 1 cm, prema slijepom pokusu sa svim sastojcima osim škrobne otopine.

Očitana apsorpcija = plava vrijednost.

Određivanje

Priprava uzorka za određivanje

Uzorak za analizu ne smije se zagrijavati. Izvaže se 10 g uzorka i prenese u čašu obujma 50 ml, doda se 5 ml acetatnog pufera i 20 ml vode da bi se uzorak otopio i promiješa

štapićem. Uzorak se već na hladnom potpuno otopi. Zatim se u odmjernu tikvicu obujma 50 ml doda 3 ml otopine natrijeva klorida i otopina meda te se dopuni vodom do oznake.

Uzorak mora biti puferiziran prije miješanja s natrijevim kloridom.

Priprava standardne otopine

Škrobna otopina zagrijava se na temperaturi od 40 °C, a zatim se 5 ml otopine otpipetira u 10 ml vode, čija je temperatura 40 °C, i dobro izmiješa. Od pripravljene otopine otpipetira se 1 ml i doda u 10 ml

$$0,0007 \text{ mol/l} \left(\frac{J_2}{2} \right) \text{ jodne otopine se razrijedi s 35 ml vode i dobro izmiješa.}$$

Nastala boja očitava se na 660 nm prema slijepom pokusu.

Vrijednost apsorbancije treba iznositi $0,760 \pm 0,020$. Ako je potrebno, može se dodati određeni obujam vode kako bi se dobila ispravna apsorbancija.

Određivanje apsorbancije

Pipetom se odmjeri 10 ml otopine meda, prenese u građuirani cilindar od 50 ml i stavi u vodenu kupelj temperature $40^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$, zajedno s posudom u kojoj je škrobna otopina. Nakon 15 minuta pipetom se odmjeri 5 ml škrobne otopine i doda otopini meda, promiješa i uključi sat. U razmacima od pet minuta izdvoji se 1 ml alikvote i doda u

$$10 \text{ ml } 0,0007 \text{ mol/l } (J_2/2) \text{ / l jodne otopine}$$

Promiješa se i razrijedi do obujma 35 ml (priprava uzorka za određivanje). Apsorbancija se odmah određuje na 660 nm, nastavi se uzimati alikvota sve dok se apsorbancija ne smanji do vrijednosti od 0,235.

Izračun i izražavanje rezultata

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

Kroz najmanje tri posljednje točke povuče se ravna crta da bi se odredilo vrijeme kad reakcijska 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%-ne škrobne otopine koja je hidrolizirana enzimom u 1 g meda jedan sat pri 40 °C. Broj dijastaze odgovara broju na Gotheovoj ljestvici.

Aktivnost dijastaze $DN = \text{ml } 1\text{-ne škrobne otopine po g meda/h pri temperaturi od } 40^\circ\text{C}$.

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

gdje je:

t – redukcija u minutama.

Odjeljak J . Određivanje hidroksimetilfurfurola

a) Fotometrijska metoda po Winkleru

Načelo

Ova metoda temelji se na reakciji hidroksimetilfurfurola s barbiturnom kiselinom i p-toluidinom, pri čemu nastaje ružičasta boja koja se mora mjeriti na valnoj duljini od 550 nm.

Aparatura i pribor

Osim uobičajene laboratorijske opreme, upotrebljavaju se:

- (1) odmjerne tikvice obujma 50 ml i 100 ml;
- (2) vodena kupelj;
- (3) spektrofotometar (očitanje na 550 nm).

Reagensi

- (1) Otopina barbiturne kiseline: izvaže se 500 mg barbiturne kiseline i sa 70 ml vode prenese u odmjernu tikvicu obujma 100 ml. Stavi se u vodenu kupelj da se otopi, a zatim se ohladi i dopuni vodom do oznake.
- (2) Otopina p-toluidina: izvaže se 10 g p-toluidina i polako zagrijavajući u vodenoj kupelji otopi u približno 50 ml izopropanola. S izopropanolom se prenese u odmjernu tikvicu obujma 100 ml i doda 10 ml ledene octene kiseline, ohladi i dopuni izopropanolom do oznake. Otopina se čuva na tamnom mjestu i ne upotrebljava najmanje 24 sata.
- (3) Destilirana voda bez kisika: kroz vruću vodu propušta se dušik. Voda se zatim ohladi.

Priprava uzorka

Uzorak se pripravlja na način određen za metodu priprave uzorka za analizu, bez zagrijavanja.

Određivanje

Izvaže se 10 g uzorka i bez zagrijavanja otopi u 20 ml destilirane vode bez kisika. Zatim se prenese u odmjernu tikvicu obujma 50 ml i dopuni do oznake (otopina meda). Odmah nakon priprave nastavlja se određivanje.

Od pripravljenog uzorka odmjeri se pipetom 2 ml, prenese se u svaku od dviju epruveta i doda 5 ml p-toluidina. U jednu epruvetu pipetira se 1 ml vode, a u drugu 1 ml otopine barbiturne kiseline, pa se sadržaj dobro promiješa. Epruveta u kojoj je voda služi za slijepi pokus. Reagens treba dodavati bez prekida i sve završiti za 1-2 minute. Kada intenzitet boje dostigne maksimum (3-4 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 s pomoću baždarnog dijagrama, primjenom standardnih otopina od 5 do 300 µg.

b) Određivanje hidroksimetilfurfurola na dvije valne duljine (metoda po Whiteu)

Načelo

Određivanje sadržaja hidroksimetilfurfurola utemeljeno je na apsorbanciji hidroksimetilfurfurola u UV dijelu spektra od 284 nm. Kako bi se spriječila interferencija drugih komponenata na ovoj valnoj duljini, određuju se razlike između apsorbancije čiste solucije meda i nakon dodavanja disulfita.

Reagensi

Carrez I:

- otopiti 15 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$ u vodi i doliti 100 ml u odmjernu tikvicu

Carrez II:

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

natrijeva bisulfit otopina

- 0,20 gr/100 g

Otopiti 0,20 g čvrstog NaHSO_3 (metabisulfit) i razrijediti do 100 ml. Dnevno se pripravlja svježa otopina.

Oprema

- Spektrofotometar - valna duljina od 284 i 336 nm;
- kvarcne kivete, 1 cm;
- filter-papir.

Postupak

Izvagati 5 g meda i otopiti u 25 ml destilirane vode. Kvantitativno prenijeti otopinu u odmjernu tikvicu obujma 50 ml, dodati 0,5 ml Carrez I. otopine i promiješati, a zatim dodati 0,5 ml Carrez II, ponovno promiješati i dopuniti do crte s destiliranom vodom (može se dodati kapljica etanola da bi se spriječilo stvaranje pjene). Sadržaj tikvice profiltrirati kroz filter-papir, s tim što se prvih 10 ml odbaci. Od filtrata otpipetiramo 5 ml u svaku od pokusnih epruveta (18 x 150 mm). Dodati 5 ml vode u jednu od pokusnih

epruveta i dobro izmiješati (otopina s uzorkom), a u drugu dodati 5 ml 0,2%-tne otopine natrijeva bisulfita i dobro izmiješati (referentna otopina).

Dodati u pokusne epruvete	Otopina s uzorkom	Referentna otopina
Inicijalna otopina meda	5,0 ml	5,0 ml
Voda	5,0 ml	-
Na-bisulfat	-	5,0 ml

Odrediti apsorbanciju otopine s uzorkom spram referentne otopine na 284 i 336 nm u kvarenoj kiveti od 10 mm tijekom jednoga sata. Ako apsorbancija na 284 nm premašuje vrijednost od 0,6 - potrebno je razrijediti otopinu uzorkom destilirane vode, a referentnu otopinu Na-bisulfatom u jednakom omjeru kako bi se dobila dovoljno niska apsorbancija. Ako je otopinu potrebno razrijediti, nužno je korigirati rezultate.

$$D = \frac{\text{konačna otopina uzorka}}{10}$$

Rezultati

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

A_{284} - apsorbancija na 284

A_{336} - apsorbancija na 336

$$126 \times 1000 \times 1000$$

$$\lambda \cdot 49,7 = \frac{\quad}{16\,830 \times 10 \times 5} = \text{faktor}$$

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

126 - molekulska masa HMF

16 830 - molarna apsorbancija na 284 nm

1000 - pretvaranje g u kg

5 - teoretska težina uzorka

D - faktor razrjeđenja, ako je razrjeđivanje potrebno

W - težina uzorka meda (g)

λ - 284 nm.

Rezultati se izražavaju u mg/kg na jednu decimalu.

Odjeljak K. Biološka metoda peludne analize meda

Izvaže se 10 g dobro izmiješanog meda i otopi u 20 ml vode te stavi u vodenu kupelj na temperaturu od 45 °C. Otopina se centrifugira 15 minuta na 3.500 okretaja. Tekući dio se odlije, a sediment se prenese mikropipetom na predmetno staklo i ravnomjerno razmaže na površinu 15 x 20 mm. Pripravak se osuši u termostatu na temperaturi ne višoj od 45 °C i uklopi u glicerinsku želatinu. Nakon toga se pripravak boji dodavanjem kapi fuksina u glicerinsku želatinu. Uzorak se pokrije pokrovnim staklom i vraća u termostat na sušenje. Uvijek se rade dva paralelna uzorka istog meda. Mikroskopira se pri povećanju od 200 do 600 puta. Mijenjaju se vidna polja dok se ne izbroji 300 peludnih zrnaca. Prebrojana peludna zrnca razvrstavaju se prema biljnoj vrsti.

Biljne se vrste određuju prema obliku peludnog zrnca, veličini peludnog zrnca, građi stijenke, te prema vrsti, obliku i broju pora klijanja. Peludna zrnca uspoređuju se s referentnim pripravcima i slikom iz atlasa. Ovom se analizom utvrđuje botaničko podrijetlo meda.

Odjeljak L. Određivanje vode u matičnoj mliječi i cvijetnom prahu

Načelo

Ova metoda temelji se na predestilaciji vode iz ispitnog uzorka u specijalnom aparatu, s pomoću organskog otapala koje se ne miješa s vodom, a zatim se predestilirana količina izmjeri u graduiranoj menzuri.

Metoda se primjenjuje pri određivanju vode u matičnoj mliječi i cvijetnom prahu.

Aparatura i pribor

Osim uobičajene laboratorijske opreme, upotrebljavaju se:

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

Reagens: ksilol

Određivanje

Izvaže se 5 g matične mliječi odnosno 30 g cvjetnog praha, stavi u tikvicu za destilaciju i prelije sa 150 ml ksilola. Zatim se aparat sastavi, voda pusti kroz hladnjak i počne destilacija. Smjesa se polako destilira, pri čemu se vodena para i para organskog otapala kondenziraju i skupljaju u graduiranoj cijevi, a višak otapala 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 izluči. Donji (vodeni) sloj ispusti se u menzuru i očita se količina vode.

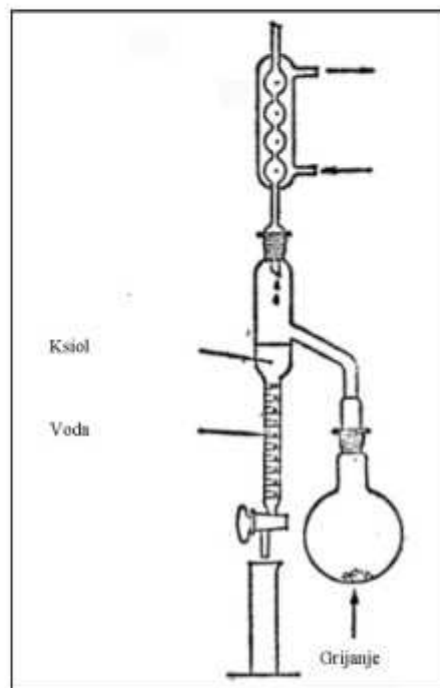
Izračun

Količina vode izražava se u postotcima i izračunava prema sljedećoj formuli:

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

gdje je:

- a – broj ml očitane vode,
B – izvagani uzorak (g).



Slika 2. Aparat za destilaciju po Dean-Starku

Odjeljak M. Određivanje bjelančevina u matičnoj mliječi

Načelo

Ova metoda temelji se na biuretskoj reakciji odnosno reakciji bakra s peptidnom vezom, pri čemu nastaje ljubičasta boja koja se određuje spektrofotometrijski na 546 nm. Izmjerena apsorbancija je razmjerna koncentraciji bjelančevina u otopini.

Aparatura i pribor

Osim uobičajene laboratorijske opreme, upotrebljavaju se:

- (1) spektrofotometar;
- (2) analitička vaga;
- (3) centrifuga;
- (4) odmijerna tikvica obujma 100 ml i 1.000 ml;
- (5) kiveta;

(6) pipeta obujma 1 ml i 10 ml.

Reagensi

- (1) Biuretski reagens: 4,5 g kalij-natrijeva tartarata otopi 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 otopljenog u 10 ml destilirane vode i 0,5 g kalijeva jodida. Otopina se polako promiješa, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu obujma 100 ml i dopuni do 100 ml s 0,2 mol/l otopine NaOH.

Otopina mora biti bistra i bez taloga.

- (2) Otopina natrijeva hidroksida, $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$: u odmjernu tikvicu obujma 1.000 ml otopi se 8,4 g NaOH u oko 950 ml destilirane vode.

Otopina se ohladi i dopuni vodom do oznake.

- (3) Otopina za stabilizaciju: otopi se 5 g kalijeva jodida u 0,2 mol/l NaOH i dopuni otopinom 0,2 mol/l NaOH do 1.000 ml.
- (4) Bjelančevinski standard 6 g/l: krvni serum u kojemu je poznata količina bjelančevina ili kristaliziran ljudski albumin.

Određivanje

Na aluminijskoj foliji dimenzija 15 mm x 15 mm izvaže se na analitičkoj vagi 100 mg matične mliječi. Sve se prenese u kivetu za centrifugiranje i s pomoću staklenog štapića potopi do dna kivete. Pipetom se doda 8 ml otopine za stabilizaciju i još jednom dobro promiješa da bi se mliječ rastopila. Centrifugira se 10 minuta na 3.000 okretaja. Nakon centrifugiranja se izvaže 4 ml otopine mliječi, prenese u drugu kivetu i doda 1 ml biuretskog reagensa.

Istovremeno se pripravi uzorak za slijepi pokus od 4 ml reagensa za stabilizaciju i 1 ml biuretskog reagensa. Nakon 30 minuta mjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 546 nm.

Pod istim se uvjetima određuje i apsorbancija standardne otopine.

Izračun

Količina bjelančevina izražava se u postotcima i izračunava prema sljedećoj formuli:

$$\text{postotak bjelančjel na} = \frac{(A_v - A_{sl})/f \times 2 \times 100}{a}$$

gde je:

A_v – apsorbancija uzorka

A_{sl} – apsorbancija slijepog pokusa

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

- a – količina uzorka (mg)
- As – apsorbancija standarda
- Cs – količina bjelančevina u standardu.

Odjeljak N. Određivanje ekstrakta propolisa u alkoholnoj otopini

Aparatura i pribor

Za određivanje ekstrakta propolisa u alkoholnoj otopini upotrebljava se uobičajena laboratorijska oprema.

Reagens: etanol

Određivanje

Izvaže se 5 g propolisa i prenese u stožastu tikvicu (Erlenmeyerovu), prelije s 50 g etanola i pusti da se preko noći ekstrahira na sobnoj temperaturi. Nakon toga se tekućina filtrira i uzima alikvota od 3 g filtrata koji se dva sata suši u sušioniku, na temperaturi od 105 °C. Nakon dva sata se uzorak izvadi iz sušionika, stavi u eksikator i ohladi. Ohlađen se uzorak važe.

Izračun

Količina suhe tvari (ekstrakta) izražava se u postotcima i izračunava prema sljedećoj formuli:

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

gdje je:

- a – masa filtrata (g)
- b – masa otapala (g)
- c – masa suhog ostatka (g)
- d – masa uzorka (g).