

На основу члан 17. став 2. и члана 72. Закона о храни ("Службени гласник БиХ", број 50/04) и члана 17. Закона о Савјету министара Босне и Херцеговине ("Службени гласник БиХ", бр. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 и 24/08), Савјет министара Босне и Херцеговине, на предлог Агенције за безбједност хране Босне и Херцеговине, у сарадњи са надлежним органима ентитета и Брчко Дистрикта Босне и Херцеговине, на 76. сједници одржаној 12. фебруара 2009. године, донио је

ПРАВИЛНИК

О МЕТОДАМА ЗА КОНТРОЛУ МЕДА И ДРУГИХ ПЧЕЛИЊИХ ПРОИЗВОДА

ДИО ПРВИ - ОПШТЕ ОДРЕДБЕ

Члан 1.

(Предмет)

- (1) Правилником о методама за контролу меда и других пчелињих производа (у даљњем тексту: Правилник) прописују се методе за контролу квалитета меда и других пчелињих производа, те производа на бази меда и других пчелињих производа (у даљњем тексту: производ).
- (2) Правилником су дефинисане:
 - а) методе узимања узорака,
 - б) методе физичких, хемијских и биолошких анализа за производе.
- (3) Узимање узорака, физичке, хемијске и биолошке анализе производа врше се по методама наведеним у анексима I и II, који су саставни дио овог правилника.

ДИО ДРУГИ - ПОСЕБНЕ ОДРЕДБЕ

Члан 2.

(Методе узимања узорака)

Методе узимања узорака меда и других производа којима се утврђују поступци и начини узимања узорака на којима се врши контрола квалитета тих производа наведене су у Анексу I овог правилника.

Члан 3.

(Методе физичких, хемијских и биолошких анализа)

Методе физичких, хемијских и биолошких анализа меда и других производа којима се утврђују услови и поступци за

вршење физичких, хемијских и биолошких испитивања производа ради провјеравања квалитета наведене су у Анексу II овог правилника.

Члан 4.

(Употреба реагенса)

Сви реагенси који се употребљавају за хемијске анализе производа на које се односе одредбе овог правилника морају бити прописане аналитичке чистоће, а вода која се користи мора бити дестилована.

Члан 5.

(Прецизност одређивања)

- (1) Прецизност одређивања метода физичких, хемијских и биолошких анализа, у складу са овим правилником, утврђује се према принципима добре лабораторијске праксе, а изражава се као релативно одступање од просјека добијеног из најмање два паралелна одређивања.
- (2) Дозвољена разлика резултата два појединачна одређивања, која су извршена упоредно или убрзано једно за другим, на истом узорку за испитивање, истом методом, у истим условима, које је извршио исти аналитичар у истој лабораторији, мора бити у границама прописане методе, како је то утврђено овим правилником.

ДИО ТРЕЋИ - ПРЕЛАЗНЕ И ЗАВРШНЕ ОДРЕДБЕ

Члан 6.

(Престанак важења одредаба)

Даном ступања на снагу овог правилника престају да важе одредбе Правилника о квалитету меда и других пчелињих производа и методама за контролу квалитета меда и других пчелињих производа ("Службени лист СФРЈ", бр. 4/85 и 7/92), којим се прописују методе за контролу квалитета меда и других пчелињих производа.

Члан 7.

(Ступање на снагу)

Овај правилник ступа на снагу осмог дана од дана објављивања у "Службеном гласнику БиХ".

СМ број 93/09
12. фебруара 2009. године
Сарајево

Предсједавајући
Савјета министара БиХ
Др **Никола Шпирић**, с. р.

АНЕКС I

ГЛАВА I - МЕТОДЕ УЗИМАЊА УЗОРАКА

Одјељак А. Узимање узорака

- (1) Узорци меда и других пчелињих производа, приликом вршења инспекцијског надзора, могу се узети у фази производње, прераде, обраде и дистрибуције.
- (2) Узети узорак за испитивање мора представљати просјечан састав цјелокупне количине производа од којег се узорак узима.

Одјељак Б. Производна серија, амбалажна јединица, пошиљка

- (1) Под производном серијом у смислу овог правилника подразумијева се одговарајућа количина производа исте врсте, произведена истог дана, одговарајуће запремине, са обавезном ознаком за идентификацију.
- (2) Под амбалажном јединицом меда и других пчелињих производа подразумијевају се утврђене количине производа исте врсте, упаковане у појединачна паковања одговарајуће запремине, са обавезном ознаком за идентификацију.
- (3) Амбалажне јединице могу бити упаковане у збирна транспортна паковања, на која се примјењују одредбе овог правилника.
- (4) Под пошиљком производа подразумијева се истовремено испоручена количина производа у појединачним и збирним паковањима која се стављају у промет.

Одјељак Ц. Узорак, записник, паковање и чување узорка

- (1) Узорак за испитивање производа чине најмање три идентичне амбалажне јединице од укупно узетог узорка, с тим да те јединице морају имати исти састав и запремину.
- (2) Овлашћено лице које узима узорак за испитивање обавезно сачињава записник о узимању узорака производа, у који уноси податке значајне за резултат испитивања: мјесто, датум и вријеме узимања узорка, сврху узимања узорка, врсту и количину производа од којег се узима узорак, број појединачно узетих узорака и количину укупно узетог узорка, ознаке за идентификацију узорка и количину узорка која се доставља за испитивање.
- (3) Узорак се пакује у стаклене или пластичне посуде које се затварају чистим и сувим затварачима и означавају тако да се ознака не може лако скинути и избрисати, а затим се у њих утискује службени печат или ставља пломба.
- (4) Узети узорци чувају се под условима прописаним овим правилником за одговарајуће производе.
- (5) Ако су производи упаковани у оригиналне амбалажне јединице мањих запремина или маса, узети узорак може бити свака насумице узета појединачна јединица.

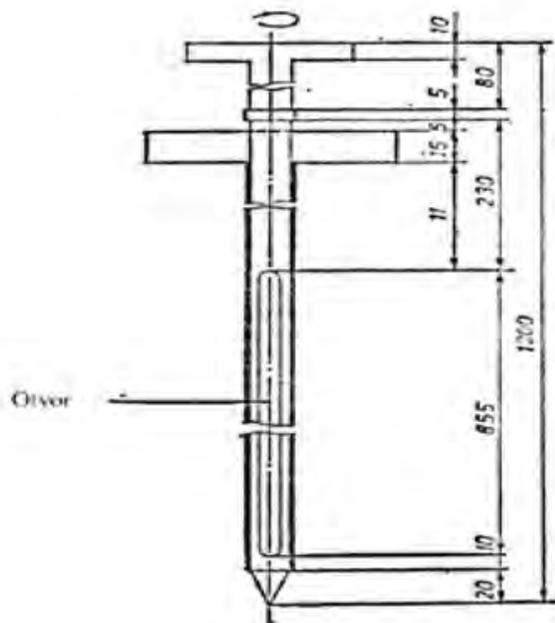
ГЛАВА II - УЗИМАЊЕ УЗОРАКА МЕДА И ДРУГИХ ПЧЕЛНИЊИХ ПРОИЗВОДА

Одјељак А. Број узорака, формирање узорка

- (1) Број јединица узетог узорка за испитивање зависи од врсте производа и величине производне серије, односно пошиљке.
 (2) Број јединица узетог узорка утврђује се на основу следеће табеле:

<i>Врста паковања</i>	<i>Количина од које се узорак узима</i>	<i>Број амбалажних јединица које се узимају као узорак</i>	<i>Маса укупно узетог узорка (у g)</i>
Канте или бурад	1 јединица	1	500
	од 2 до 5 јединица	2	500
	> 5 до 60 јединица	3	1 000
	> 60 до 80 јединица	4	1 000
	> 80 до 100 јединица	5	1 000
За сваку даљу стотину или започету стотину канти/бачви број канти/бачви за узимање узорака повећава се за 1.			
Стакленке или тегле (до 1 kg)	од 1 до 100 јединица	1	500
	> 100 до 500 јединица	2	500
	> 500 до 1 000 јединица	3	500
	> 1 000 до 10 000 јединица	4	500
Ако је пошиљка већа од 10.000 стакленки, на сваких даљих 2.500 стакленки узима се још по један узорак.			
Остале врсте паковања (до 250 g)	до 5.000 јединица	1	—
	за сваких даљих 2.000 јединица	1	—

- (3) Ако сваки узети узорак меда укупно износи више од три амбалажне јединице, од њих се формира један узорак, при чему за сваку амбалажну јединицу узорка мора постојати једнака могућност да буде издвојена као амбалажна јединица узорка узетог за испитивање.
 (4) За узимање узорака меда из канте/бачве користи се метална сонда са одјељцима (слика 1). Метална сонда састоји се од двије концентричне цијеве које улазе једна у другу. Доњи дио сонде је зашиљен. Унутрашња цијев сонде има ручицу чијим се окретањем за 90° сонда може затворити.
 (5) Узорак меда узима се тако што се затворена, чиста и осушена сонда потопи у мед до краја заједничког отвора. У меду се сонда отвори па затвори и са узетим узорком извуче из производа.



Слика 1. Метална сонда за узимање узорака меда

АНЕКС II

ГЛАВА I - МЕТОДЕ ФИЗИЧКИХ, ХЕМИЈСКИХ И БИОЛОШКИХ АНАЛИЗА МЕДА И ДРУГИХ ПЧЕЛНИЊИХ ПРОИЗВОДА

Одјељак А. Методе физичких, хемијских и биолошких анализа

Методе физичких, хемијских и биолошких анализа којима се врши контрола квалитета меда и других пчелињих производа су:

- а) припрема узорака за анализу;¹
- б) одређивање електричне проводљивости;^{1, 2}
- ц) одређивање редукованих шећера;¹
- д) одређивање сахарозе;¹
- е) одређивање воде у меду;¹
- ф) одређивање материја нерастворљивих у води (гравиметријска метода);²
- г) одређивање пепела;²
- х) одређивање киселости;^{1, 2}
- и) одређивање активности дијастазе;¹
- ј) одређивање хидроксиметилфурфурола НМФ (фотометријска метода по *Winkler*² и метода на двије гласне дужине по *White*²);¹
- к) биолошка метода поленске анализе меда;
- л) одређивање воде у матичној млијечи и полену;
- м) одређивање протеина у матичној млијечи;
- н) одређивање екстракта прополиса у алкохолном раствору.

¹ Codex standard for honey

² Усклађене методе Европске комисије за мед

ГЛАВА II - МЕТОДЕ ФИЗИЧКИХ, ХЕМИЈСКИХ И БИОЛОШКИХ АНАЛИЗА КОЈИМА СЕ ВРШИ КОНТРОЛА КВАЛИТЕТА МЕДА И ДРУГИХ ПЧЕЛИЊИХ ПРОИЗВОДА

Одјељак А. Припремање узорка за анализу

- (1) Зависно од конзистенције меда, узорци за анализу припремају се на различите начине.
- (2) Ако је мед у течном стању, прије почетка анализе, лагано се измијеша штапићем или мућкањем.
- (3) Ако је мед гранулиран, затворена посуда са узорком стави се у водено купатило и загријава 30 минута на температури од 60°C, а по потреби и на температури од 65°C. У току загријавања може се промијешати штапићем или кружно промућкати, а затим брзо прохладити.
- (4) Ако се одређује дијастаза или хидроксиметилфурфурол, мед се не загријава.
- (5) Ако мед садржи стране материје, као што је восак, дијелови пчела или дијелови саћа, узорак се загријава на температури од 40°C у воденом купатилу, а затим проциједи кроз тканину која се ставља на њепак загријаван топлом водом.
- (6) Ако је мед у саћу, саће се отвори, проциједи кроз жичано сито са квадратним отвором димензије 0,5 x 0,5 mm. Ако дио саћа и воска прође кроз сито, узорак се загрије у воденом купатилу на температури од 60°C, а по потреби загријава се 30 минута и на температури од 65°C. У току загријавања промијеша се штапићем или промућка кружним покретима, а затим се брзо прохлади.
- (7) Ако је мед у саћу гранулиран, загријава се да би се отопио восак, промијеша се и охлади. Послије хлађења, восак се одстрани.

Одјељак Б. Одређивање електричне проводљивости

Област примјене

Метода је валидна за одређивање електричне проводљивости у меду у распону од 0,1 до 3 мили Сименса по центиметру⁻¹ (mS/cm⁻¹).

Дефиниција

Електрична проводљивост у меду је дефинисана помоћу 20%-ног запреминског воденог раствора меда на 20°C, гдје се 20% односи на суву материју меда. Резултати су изражени у мили Сименсима по центиметру (mS/cm⁻¹).

Принцип

Електрична проводљивост раствора који садржи 20 грама суве материје меда у 100 ml дестиловане воде мјери се помоћу електрокондуктометријске ћелије. Одређивање електричне проводљивости заснива се на мјерењу електричне отпорности, која је реципрочна електричној проводљивости. Метода је заснована на оригиналном раду *Vorwohl* (1-5).

Reagensi

Ako nije na drugi начин прецизирано, реагенси морају бити препознатљиве аналитичке чистоте или квалитета. Вода би требало да буде свјеже дестилована или еквивалентног квалитета.

Раствор калијум-хлорида 0,1 М: Растворити 7,4557 g KCl (калијум-хлорида), осушеног на 130°C, у свјеже дестилованој води у одмјерној тиквици од 1000 ml и надопунити дестилованом водом до ознаке. Припремити је на дап коришћења.

Опрема

Кондуктометар, нижег реда 10^{-7} S.

Кондуктометријске ћелије, платинске дупле електроде (имерзионе електроде).

Термометар са осјетљивошћу мјерења 0,1°C.

Водено купатило, термостатичке контроле температуре на $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Одмјерне тиквице, 100 и 1000 ml.

Мензура, висока форма.

Процедура

Одређивање константе ћелије

Уколико константа кондуктометријске ћелије није позната, процедура је следећа: усуги 40 ml раствора калијум-хлорида у мензуру; подесити кондуктометријску ћелију на мјерење кондуктивности; снажно испрати са раствором калијум-хлорида и уронити ћелију у раствор заједно са термометром; очитати електричну проводљивост раствора у мили Сименсима након постизања температуре од 20°C.

Напомена

Да би се избјегле грешке код резултата због ефекта поларизације, вријеме мјерења би требало да буде што је могуће краће.

Израчунавање константе ћелије K врши се помоћу следеће формуле:

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

гдје је:

K - константа ћелије изражена у cm^{-1} ;

G - електрична проводљивост у мили Сименсима мјерена са кондуктометријском ћелијом;

11,691- збир средње вриједности електричне проводљивости свјеже дестиловане воде у мили Сименсима по центиметру и електричне проводљивости 0,1 М раствора калијум-хлорида на 20°C.

Електроду снажно испрати дестилованом водом након одређивања константе ћелије. Када није у употреби, електрода се држи у дестилованој води да би се избјегло старење платинске електроде.

Припрема узорка

Припрема узорка врши се према методи припреме узорка за анализу која је прописана у Одјелјку А. ове главе.

Припрема раствора са узорком

Растворити количину меда која је еквивалентна 20 g анхидрованог меда, у дестилованој води. Пренијети квантитативно раствор у волуметријски суд од 100 ml и допунити дестилованом водом до ознаке.

Пресути 40 ml раствора у мензурку коју након тога треба ставити у водено купатило на 20°C. Испрати снажно кондуктометријску ћелију са значајним дијелом раствора узорка. Уронити кондуктометријску ћелију у раствор узорка. Очитати проводљивост у мили Сименсима након што се постигне наведена температура.

Напомена:

1. Мјерења би требало обавити што је могуће брже да би се избјегле грешке у резултату.
2. Ако је одређивање рађено на различитим температурама, због недостатка термостатичке ћелије, тада се за израчунавање може користити корекцијски фактор за 20°C, за температуру изнад 20°C умањујемо за 3,2% од вриједности за сваки °C, а за температуру испод 20°C увећавамо за 3,2% вриједност за сваки °C.

Податке мјерења које смо кориговали са горе наведеним вриједностима фактора не можемо валидирати у ринг контролама. Међутим, нема значајне разлике између кондуктивности 50 медова мјерених на 20°C и на температурама које варирају од 20°C до 26°C након примјене наведених фактора корекције.

Израчунавање и изражавање резултата

Електрична проводљивост израчунава се по следећој формули:

$$S_H = K \times G$$

гдје је:

- S_H – електрична проводљивост раствора меда у мили Сименсима по центиметру;
 G – проводљивост у мили Сименсима;
 K – константа ћелије у cm.

Одјелјак Ц. Одређивање редукованих шећера

а) Метода са Фелинговим растворима**Принцип**

Принцип ове методе заснива се на редукцији Фелинговог раствора титрацијом раствора редукованих шећера меда уз коришћење метилен-плавог као индикатора.

Реагенси**(1) Фелингов раствор**

- а) Раствор А: раствори се 69,28 g бакар-сулфата ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и до једног литра допуни дестилованом водом. Раствор се припрема дан раније прије поступка титрације.
- б) Раствор Б: раствори се 346 g калијум-натријум-тартарата ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) и 100 g натријум-хидроксида (NaOH) у једном литру дестиловане воде. Раствор се затим филтрира.

- (2) Стандардни раствор инвертног шећера (10 g/l воде): одмјери се 9,5 g чисте сахарозе, дода 5 ml раствора хлороводоничне киселине HCl (око 36,5 %) и допуни дестилованом водом до 100 ml. Раствор се може чувати неколико дана, зависно од температуре: на температури од 12°C до 15°C до седам дана, а на температури од 20°C до 25°C до три дана. Припремљени раствор допуни се водом до једног литра. Непосредно прије употребе, одговарајућа запремина раствора неутралише се са 1 mol раствором NaOH/l и затим се разблажи до захтијеване потребне концентрације (2 g/l) - стандардни раствор.

Напомена: 1%-ни закисељен раствор инвертног шећера стабилан је неколико мјесеци.

- (3) Раствор метилен-плавог: раствори се 2 g метилен-плавог у дестилованој води, а затим до једног литра разблажи водом.

(4) Стипса (алаун)

- а) Раствор стипсе: припреми се хладно засићен раствор ($\text{K}_2\text{SO}_4\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$) у води. Затим се, уз константно мијешање штапићем, дода амонијум-хидроксид док раствор не постане алкалан, што се утврђује лакмус папиром. Раствор се остави да се слегне и испире водом уз декантовање све док вода даје благ позитиван тест на сулфате, што се утврђује раствором баријум-хлорида. Вишак воде се одлије, а преостала паста оставља у боци са шлифованим затварачем.

Припремање узорка

I - Поступак - Примјењиво за мед који може да садржи талог

- а) Одмјери се 25 g (W_1) хомогенизованог меда и пренесе у одмјерну тиквицу запремине 100 ml, дода 5 ml стипсе, допуни се водом до ознаке при температури од 20°C , па се раствор филтрира.

б) У одмјерну тиквицу запремине 500 ml пипетира се 10 ml узорка под а) и разблажи дестилованом водом до ознаке на тиквици (разблажени раствор меда).

II - Поступак

а) Одмјери се 2 g хомогенизованог меда (W_2), пренесе у одмјерну тиквицу запремине 200 ml, раствори у води и допуни водом до ознаке на тиквици (раствор меда).

б) Одмјери се 50 ml раствора меда под „а” и допуни дестилованом водом до 100 ml (разблажени раствор меда).

Стандардизација Фелинговог раствора

Фелингов раствор стандардизује се тако што се отпипетира 5 ml Фелинговог раствора А и помијеша са 5 ml раствора Б (Фелингов раствор). Тај раствор мора укупно реаговати са 0,050 g инвертног шећера додатог у количини од 25 ml као стандардни раствор инвертног шећера (2 g/l).

Претходна титрација

Укупна запремина материја које реагују на крају редукционе титрације мора износити 35 ml, што се постиже додавањем одређене количине воде прије почетка титрације. С обзиром на то да се посебним прописом о меду и другим пчелињим производима прописује више од 60% редукованих шећера (рачунато као инвертни шећер), потребно је претходно обавити титрацију да би се утврдила тачна запремина воде која се додаје, како би се у поступку анализе обезбиједила редукција при константној запремини. Запремина потребне количине воде добија се одузимањем утрошене запремине разблаженог раствора меда у претходној титрацији („X ml“) од 25 ml (25 ml – „X“).

Пипетом се одмјери 5 ml Фелинговог раствора А и пренесе у конусну Ерленмајерову тиквицу, запремине 250 ml, дода се 5 ml Фелинговог раствора Б, 7 ml дестиловане воде, мало пловучца или другог сличног средства и 15 ml разблаженог раствора меда из бирете. Медна мјешавина се загријава до кључања и двије минуте одржава умањено кључање. Затим се, за вријеме кључања раствора, дода 1 ml 0,2%-ног раствора метилен-плавог и титрација заврши за укупно три минуте, уз поновљено додавање разблаженог раствора меда, све док ишчезне боја индикатора. Утрошена запремина разблаженог раствора меда који је комплетно редукован обиљежава се са „X ml“.

Одређивање. Пипетом се одмјери 5 ml Фелинговог раствора А и пренесе у конусну ерленмајер тиквицу запремине 250 ml и дода 5 ml Фелинговог раствора Б. Затим се дода (25 ml – „X ml“) дестиловане воде, мало камена-пловучца или другог одговарајућег средства и из бирете дода разблажени раствор меда, тако да за комплетну титрацију остане око 1,5 ml (X ml – 1,5 ml). Затим се хладна мјешавина загријава до кључања и двије минуте одржава умјерено кључање. У току кључања дода се 1 ml 0,2%-ног раствора метилен-плавог, па се титрација, додавањем разблаженог раствора меда до обезбојења индикатора, мора завршити за три минуте

укупног кључања. Утрошена количина разблаженог раствора меда обиљежава се са „Y ml“.

Израчунавање

Инвертни шећер изражава се у g/100 g меда (%) и израчунава се зависно од начина припремања узорка (I или II поступак).

Ако се примјени I поступак, израчунавање се врши по следећој формули:

$$\text{Процент инвертног шећера } C = \frac{25}{W_1} \times \frac{1000}{Y_1}$$

гдје је:

- C - инвертни шећер, у g;
- W_1 - маса узетог узорка, у g;
- Y_1 - запремина разблаженог раствора меда утрошеног за одређивање, у ml.

Ако се примјени II поступак, израчунавање се врши по следећој формули:

$$\text{Процент инвертног шећера } C = \frac{2}{W_2} \times \frac{1000}{Y_2}$$

гдје је:

- C - инвертни шећер у g;
- W_2 - маса узетог узорка у g.
- Y_2 - запремина разблаженог раствора меда утрошеног за одређивање у ml.

Напомена:	За прецизност и поновљивост резултата неопходно је да се за сваку пробу одреди потребна запремина додате воде да би укупна запремина износила 35 ml. У следећој табели дате су приближне вриједности под претпоставком да је почетна маса узорка износила 25 g, односно 2 g.	
	Садржај инвертног шећера, у процентима	Потребна количина воде, у ml
	60	8,3
	65	9,6
	70	10,7
	75	11,6

Поновљивост:

Разлика између титрација у два одређивања извршена истовремено или убрзо једно за другим не износи више од 0,1 ml.

б) Метода волуметријски по Luff - Schoorlu

Ова метода заснива се на принципу да у одређеним условима редукујући шећер (природни инверт) преведе Cu^{2+} јоне у Cu^+ јоне. Неутрошена количина Cu^{2+} јона

ретитрира се раствором тиосулфата. Из разлике утрошка за слијепу пробу и пробу чита се количина шећера из табеле.

Передукујући дисахарид (сахароза) мора се претходно инвертовати, односно хидролизовати на передукујуће моносахариде помоћу киселине, а затим се одређују помоћу Луфовог реагенса. На овај начин добија се податак о укупној количини шећера у испитиваном узорку.

Разлика између добијеног укупног инверта и природног инверта даје количину редукујућих шећера насталих инверзијом сахарозе.

Реагенси:

(1) Луфов реагенс:

- раствор бакар-сулфата ($25 \text{ g CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ у 100 cm^3 дестиловане воде);
- раствор лимунске киселине ($50 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ у 50 cm^3 дестиловане воде);
- раствор натријум-карбоната (143 g безводног Na_2CO_2 у око 300 cm^3 топле дестиловане воде).

У одмјерну тиквицу од $1\,000 \text{ cm}^3$ унесе се раствор натријум-карбоната и уз опрезно мијешање дода раствор лимунске киселине. Мијеша се до нестанка угљен-диоксида, а затим се дода раствор бакар-сулфата и одмјерна тиквица допуни дестилованом водом до ознаке.

(2) Натријум-тиосулфат, раствор $0,1 \text{ mol/dm}^3$;

(3) Скроб, 0,5%-тни раствор;

(4) Сумпорна киселина, раствор 6 mol/dm^3 ;

(5) Калијум-јодид, 30%-тни раствор;

(6) Натријум-хидроксид, раствор $0,1 \text{ mol/dm}^3$;

(7) Натријум-хидроксид, раствор 1 mol/dm^3 ;

(8) *Carrez I* ($21,95 \text{ g Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ или $24 \text{ g Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ и 3 g глацијалне сирћетне киселине раствори се и допуни дестилованом водом до ознаке у одмјерној тиквици од 100 cm^3);

(9) *Carrez II* ($10,6 \text{ g KFe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$ раствори се у дестилованој води и допуни до ознаке у одмјерној тиквици од 100 cm^3);

(10) Хлороводонична киселина, концентрована.

Поступак

Одваже се око 5 g узорка (са тачношћу од $\pm 0,001 \text{ g}$). Узорак се са 200 cm^3 дестиловане воде квантитативно пренесе у чашу од 400 cm^3 . Баластне материје уклоне се додатком по 5 cm^3 раствора *Carrez I* и *II*. Након сваког додавања садржај се добро промијеша. Цјелокупни садржај из чаше пренесе се у одмјерну тиквицу од 250 cm^3 , допуни до ознаке дестилованом водом, промијеша и филтрира. То је филтрат I.

У одмјерну тиквицу од 100 cm^3 отпипетира се 10 cm^3 филтрата I и допуни дестилованом водом до ознаке на тиквици. Садржај у тиквици добро се промијеша и у Ерленмајерову тиквицу до 300 cm^3 се отпипетира 25 cm^3 Луфовог реагенса и 25 cm^3 разријеђеног филтрата I. Ерленмајерова тиквица стави се на загријано тијело и

садржај треба да прокључа за два минута, а затим се на тиквицу ставља повратно хладило и садржај у тиквици треба да кључа 10 минута. Након тога тиквица се хлади под воденим млазом и након хлађења остави да стоји пет минута. Послије тога у тиквицу се дода 10 cm^3 раствора калијум-јодида и 25 cm^3 раствора сумпорне киселине. Сумпорна киселина додаје се полако и опрезно због могућности стварања пјене. Затим се садржај у тиквици титрира раствором натријум-тиосулфата док садржај у тиквици не добије свијетложуту боју, тада се дода неколико cm^3 раствора скроба и титрација се настави до настанка плаве боје.

У истим условима изврши се и слијена проба са истом количином Луфовог реагенса, а умјесто разријеђеног филтрата I дода се 25 cm^3 дестиловане воде.

Од укупног утрошка раствора натријум-тиосулфата (cm^3) за титрацију слијене пробе одузме се утрошак раствора натријум-тиосулфата за пробу и за табеле за одређивање шећера по Луфу очита се количина инвертног шећера у mg, која одговара тој разлици.

Садржај природног инверта израчунава се према следећој формули:

Израчунавање:

$$\text{Садржај природног инверта (\%)} = \frac{V \times V_2 \times a}{Ok \times V_1 \times V_3 \times 1000} \times 100$$

гдје је:

- V – cm^3 матичног раствора;
- V_1 – cm^3 филтрата I;
- V_2 – cm^3 разријеђеног филтрата I
- V_3 – cm^3 разријеђеног филтрата I у којима се одређују шећери;
- a – количина инвертног шећера очитана из табеле (mg);
- Ok – одвагана количина узорка (g).

Количина укупног инверта одређује се тако да се отпипетира 10 cm^3 филтрата I у одмјерну тиквицу од 100 cm^3 , разриједи се са 30 cm^3 дестиловане воде и дода $0,5 \text{ cm}^3$ концентроване хлороводоничне киселине. Одмјерна тиквица са садржајем стави се у кључало водено купатило, да се изврши инверзија у трајању од 30 минута. Након тога се садржај у тиквици неутралише раствором натријум-хидроксида концентрације 1 mol/dm^3 и допуни дестилованом водом до ознаке на тиквици. Из одмјерне тиквице отпипетира се 25 cm^3 узорка за титрацију, а даљи поступак је исти као и код природног инверта.

Садржај укупног инверта израчуна се према следећој формули:

Израчунавање:

$$\text{Садржај укупног инверта (\%)} = \frac{V \times V_2 \times a}{Ok \times V_1 \times V_3 \times 1000} \times 100$$

гдје је:

- V – cm^3 матичног раствора;
- V_1 – cm^3 филтрата I;
- V_2 – cm^3 разријеђеног филтрата I након инверзије;
- V_3 – cm^3 разријеђеног филтрата I у којима се одређују шећери;
- a – количина инвертног шећера очитана из табеле (mg);
- Ok – одвагана количина узорка (g).

Садржај сахарозе (%) у узорку израчунава се према следећој формули:

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

гдје је:

- A – проценат природног инверта;
- B – проценат укупног инверта.

Табела за одређивање количине шећера са 23 cm^3 Луфовог реагенса

Раствор натријум- тиосулфата $C = \text{mol/dm}^3$	Глукоза, фруктоза или инвертни шећер		Раствор натријум- тиосулфата $C = 0,1 \text{ mol/dm}^3$	Глукоза, фруктоза или инвертни шећер	
	mg	разлика		mg	разлика
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			

Одјељак Д. Одређивање сахарозе

Принцип

Ова метода заснива се на хидролизи сахарозе, редукцији Фелинговог раствора титрацијом са редукованим шећерима из хидролизата меда уз метилен-плаво.

Реагенси

(1) Фелингов раствор (А и В), утврђен методом одређивања редукованих шећера.

- (2) Стандардни раствор инвертног шећера, утврђен методом одређивања редукованих шећера.
- (3) Хлороводонична киселина C (HCl) = 6,34 mol/l.
- (4) Раствор натријум-хидроксида C (NaOH) = 5 mol/l.
- (5) 2 %-ти раствор метилен-плавог (2 g/l).

Припремање узорка

I Поступак

Одмјери се 25 g (W_1) хомогенизованог меда и пренесе у одмјерну тиквицу запремине 100 ml, дода се 5 ml етипсе, допуни се водом до ознаке на тиквици, при температури од 20°C, па се раствор филтрира.

Одмјери се 10 ml тог раствора и допуни дестилованом водом до 250 ml раствора меда (за одређивање сахарозе).

II Поступак

Одмјери се 2 g (W_2) хомогенизованог меда и пренесе у одмјерну тиквицу, раствори у дестилованој води и допуни у тиквици до 200 ml (раствор меда).

Хидролиза узорка

Раствор меда (50 ml) пренесе се у одмјерну тиквицу запремине 100 ml и дода 25 ml дестиловане воде. Термометар се зарони у припремљени узорак и загријава се до 65°C у кључалом воденом купатилу. Тиквица се затим изнесе из воденог купатила и дода 10 ml хлороводоничне киселине [C(HCl) = 6 mol/l]. Раствор оставити да се хлади 15 минута, затим се температура подеси на 20°C и неутралише са 5 mol раствора NaOH/l, уз коришћење лакмус папира као индикатора, поново охлади (20 °C) и допуни до 100 ml (разблажени раствор меда).

Одређивање

Одређивање је истовјетно као и одређивање редукованих шећера, а односи се на претходну титрацију и поступак одређивања количине инвертног шећера прије инверзије.

Израчунавање

Најприје се обрачунава проценат инвертног шећера послје инверзије, с тим што се при томе користи формула предвиђена за одређивање процента инвертног шећера прије инверзије.

Сахароза се изражава у g/100 g меда и израчунава се по сљедећој формули:

маса сахарозе, g/100 g = количина инвертног шећера послје инверзије – количина инвертног шећера прије инверзије x 0,95.

Одјељак Е. Одређивање воде у меду

а) Рефрактометријско одређивање

Принцип

Ова метода заснива се на рефрактометријском одређивању.

Апаратура и прибор

Поред уобичајене лабораторијске опреме, потребан је и рефрактометар.

Припремање узорка

Узорак се припрема на начин предвиђен за методу припремања узорка за анализу, а затим се индекс рефракције узорка одреди рефрактометром, при константној температури од 20°C. На основу индекса рефракције, израчунава се количина воде (% m/m), при чему се користи приложена табела. Ако се индекс не одреди на температури од 20°C, узима се у обзир корекција температуре и резултати се свде на температуру од 20°C.

Табела за израчунавање садржаја воде у меду

Индекс рефракције (20°C)	Садржај воде (%)	Индекс рефракције (20°C)	Садржај воде (%)	Индекс рефракције (20°C)	Садржај воде (%)
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		

Напомена: Корекција температуре - индексе рефракције:

- температура преко 20°C - додати 0,00023 за сваки °C;

- температура до 20°C - одузети 0,00023 за сваки °C.

б) Одређивање воде методом сушења, стандардни поступак

Принцип

Метода одређивања воде сушењем заснива се на сушењу узорка до константне масе у разним врстама сушионика.

Сушење у обичном сушионику.

Поступак:

Посуда за сушење са одговарајућим поклопцем (посуда за вагање стаклена, алуминијска и никлована) суши се у сушионику најмање 1 сат на температури од 100°C до 105°C, охлади у ексикатору на собну температуру и измјери са тачношћу ± 0,001 g. У посуду се брзо стави одређена количина меда (1–2 g), покрије поклопцем и мјери. Посуда са узорком стави се у сушионик, са косо постављеним поклопцем. Суши се одређено вријеме (4–5 сати). После завршеног сушења посуда се покрије поклопцем и ставља у ексикатор и после хлађења (од 45 минута до 1 сата) вага се. Поново се стави у сушионик пола сата до један сат, хлади и поново мјери. То се понавља док се не постигне константна маса.

Израчунавање:

На основу разлике у тежини посуде са узорком прије и после сушења израчуна се садржај воде:

$$\text{Садржај воде} = \frac{a \times 100}{Ok}$$

гдје је:

a – разлика у тежини посуде са узорком прије и после сушења (g)

Ok – одмјерена количина узорка (g)

Одјељак Ф. Одређивање нерастворљивих материја у води (гравиметријска метода)

Припремање узорка

Одмјери се 20 g узорка са тачношћу ±10 mg, раствори се у одређеној количини дестиловане воде на температури од 80°C и добро измијеша.

Одређивање

Припремљени узорак се најприје филтрира кроз осушен и одмјерен синтеровани лијевак, величине пора 15 до 40 μm. Талог се испере врелом водом (80°C), при чему

се ослободи шећер, што се утврђује тестом по Мору. Лијевак се осуши за један сат на температури од 135°C, охлади и мјери са тачношћу од 0,1 mg.

Израчунавање

Количина материја нерастворљивих у води изражава се у процентима (m/m) и израчунава по следећој формули:

$$\text{процент материја нерастворљивих у води} = \frac{100 \times \text{количина остатка}}{\text{одмјерени узорак}}$$

Одјељак Г. Одређивање пепела

Принцип

Принцип ове методе заснива се на поступку сагоријевања узорка на 600°C до константне масе.

Апаратура и прибор

Осим уобичајене лабораторијске опреме, користи се и:

- (1) платинска посуда, посуда од силицијума или лончић за жарење;
- (2) водено купатило;
- (3) пјешчано купатило или Вунсенов пламеник;
- (4) пећ за жарење.

Одређивање

У ужареном платинском или порцуланском лончићу извага се 5 до 10 g узорка и загријава на воденом купатилу док већи дио воде испари. После тога узорак се стави на пјешчано купатило или Вунсенов пламеник до угљенисања. Остатак се затим жари у пећи за жарење, на температури 600°C, до константне масе. Прије мјерења узорак се охлади.

Израчунавање

Маса пепела изражава се у g/100 g производа и израчунава по следећој формули:

$$\text{маса пепела} \quad g/100 \text{ g} = \frac{\text{остатак} \times 100}{\text{одмјерени узорак}}$$

Одјељак Х. Одређивање киселости

Принцип

Припремљени узорак титрира се у присуству фенолфталеина раствором 0,1 mol/l натријум-хидроксида до појаве свијетлоружичасте боје.

Апаратура и прибор

При одређивању степена киселости, користи се уобичајена лабораторијска опрема.

Реагенси

- (1) Раствор натријум-хидроксида, (NaOH) = 0,1 mol/l (без карбоната);
- (2) 1 %-ни раствор фенолфталеина (m/v) у етанолу, неутрализован;
- (3) дестилована вода без CO₂, добијена кувањем а затим охлађена.

Одређивање

Одмјери се 10 g узорка и раствори у 75 ml дестиловане воде.

Припремљени узорак титрира се са 0,1 mol раствором (NaOH)/l, уз четири до пет капи фенолфталеина као индикатора. На крају титрације боја се мора одржати 10 секунди.

За узорке тамне боје одмјерава се мања количина узорка.

Алтернативно се може користити рН-метар и титрирати узорак до рН - 8,3.

Израчунавање

Киселост се исказује у милимолима киселине/kg и израчунава се по формули:

$$\text{киселост} = 10 \times V$$

гдје је:

V – број утрошених ml 0,1 mol (NaOH)/l за неутрализацију 10 g меда.

Одјељак II. Одређивање активности дијастазе

Принцип

Ова метода заснива се на хидролизи 1%-ног раствора скроба ензимом из 1 g меда у току једног сата на температури од 40°C.

Апаратура и прибор

Поред уобичајене лабораторијске опреме употребљавају се и:

- (1) одмјерне тиквице запремине 1 литар, 0,5 литара, 0,1 литара;
- (2) конусна тиквица запремине 0,250 литра;
- (3) пламеник;
- (4) водено купатило на $40 \pm 0,2^\circ\text{C}$;

(5) спектрофотометар са читавањем на 660 nm.

Реагенси

- (1) Матични раствори јода: раствори са 8,8 g јода р.а. помијеша се са 22 g калијум-јодида и раствори у 30-40 ml воде, а затим разблажи до једног литра.
- (2) Раствор јода припрема се у одмјерној тиквици запремине 500 ml тако што се раствори 20 g K-јодида р.а у 30-40 ml воде. Затим се дода 5 ml матичног раствора јода и допуни водом до ознаке.

Раствор јода с ($\frac{I_2}{2}$ 0,0007 mol/l): у одмјерној тиквици

- (3) Ацетатни пуфер - рН 5,3: раствори се 87 g натријум-ацетата ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) у 400 ml воде, дода око 10,5 ml ледене сирћетне киселине и допуни водом до 500 ml. Ако је то потребно, рН вриједност регулише се натријум-ацетатом или сирћетном киселином до 5,3 уз коришћење рН метра, по потреби.
- (4) Раствор натријум-хлорида, $c(NaCl) = 0,5 \text{ mol/l}$: раствори се 14,5 g натријум-хлорида у прокуваној дестилованој води и допуни до 50 ml. Рок трајања тог раствора је ограничен.
- (5) Припремање топивог скроба: у конусну тиквицу са повратним хладњаком, која је уроњена у водено купатило, одмјери се 20 g скроба, дода се мјешавина 100 ml 95%-ног етанола и 7 ml 1 mol/l хлороводоничне киселине и остави да кључа један сат. Раствор се охлади, филтрира, кроз филтер (величине пора 90 до 150 μm) и испири водом све док вода за испирање престане да показује реакцију на хлориде.
Скроб се потпуно осуши на ваздуху чија је температура 35°C. Раствор скроба се мора чувати у добро затвореној тиквици.

(6) Одређивање воде у топивом скробу

Одмјери се око 2 g топивог скроба и у танком слоју распореди на дно посуднице пречника 5 cm. Суши се сат и по на температури од 180°C. Затим се охлади у ексикатору и премјери.

Губитак масе у односу на 100 g јесте количина воде. Количина воде припремљеног скроба мора износити од 7 до 8% (m/m), зависно од влажности ваздуха на којем је узорак осушен.

(7) Раствор скроба

Употребљава се скроб чија је плава вриједност између 0,5 до 0,55 одређена према ниже описаном поступку и прочитана у кивети од 1 cm.

Одмјери се количина скроба која одговара маси од 2,0 g безводног скроба и измијеша са 90 ml воде у конусној тиквици запремине 250 ml. Одмах се пренесе до пламеника преко којег је постављена азбестна мрежица и остави да благо кључа три минуте. Потом се раствор склопи са пламеника, покрије и остави да се постепено охлади до собне температуре. Раствор се затим пренесе у одмјерну боцу од 100 ml и стави на водено купатило загријано на 40°C. Кад раствор достигне ту температуру, допуни се водом до ознаке на боци.

Utvrđivanje плаве вриједности скроба

Количина скроба која одговара маси од 1 g безводног скроба раствори се по описаном поступку, охлади се и дода 2,5 ml ацетатног пуфера и допуни водом у одмјерној тиквици до 100 ml. У одмјерну тиквицу запремине 100 ml дода се 75 ml воде, 1 ml

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

Раствор се остави један сат на тамном мјесту и очита апсорпција на спектрофотометру при 660 nm, у кивети од 1 cm, према слиједој проби која садржи све састојке осим раствора скроба.

Очитана апсорпција = плава вриједност.

Одређивање**Припремање узорка за одређивање**

Узорак за анализу не смије се загријавати. Одмјери се 10 g узорка и пренесе у чашу запремине 50 ml, дода 5 ml ацетатног пуфера и 20 ml воде да би се узорак растворио и промијеша штапићем. Узорак се већ на хладно потпуно раствори. Затим се у одмјерну тиквицу запремине 50 ml, дода 3 ml раствора натријум-хлорида и отопљен раствор меда и допуни водом до ознаке.

Узорак мора бити пуферизован прије мијешања са натријум-хлоридом.

Припремање стандардног раствора

Раствор скроба загријава се на температури од 40°C, а затим се 5 ml раствора отпипетира у 10 ml воде, чија је температура 40°C и добро измијеша. Од припремљеног раствора отпипетира се 1 ml и дода у 10 ml.

$$0,0007 \text{ mol/l} \left(\frac{J_2}{2} \right) \text{ раствора јода, разблажи са } 35 \text{ ml воде и измијеша}$$

Настала боја очитава се на 660 nm према слиједој проби.

Вриједност апсорбанције треба да буде $0,760 \pm 0,020$. Ако је потребно, може се додати одређена запремина воде, тако да се добије исправна апсорпција.

Одређивање апсорпције

Пипетом се одмјери 10 ml раствора меда, пренесе у градуисани цилиндар од 50 ml и стави у водено купатило на температури од $40^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$, заједно са посудом у којој је раствор скроба. Послије 15 минута, пипетом се одмјери 5 ml раствора скроба и

дода у раствор меда, промијеша и укључи сат. У интервалима од по пет минута издвоји се 1 ml аликвота и дода у 10 ml 0,0007 mol/l (I₂/2) /l раствора јода.

Промијеша се и разблажи до запремине 35 ml (припремање узорка за одређивање). Апсорбанција се одмах одређује на 660 nm, настави се узимати аликвот све док се апсорбанција не смањи до вриједности од 0,235.

Израчунавање и изражавање резултата

У графикон се уноси вриједност апсорбанције као функције времена (мин).

Кроз најмање три посљедње тачке повуче се права линија да би се одредило вријеме кад реакциона смјеса достиже вриједност апсорбанције од 0,235. Подијели се 300 са временом израженим у минутима да би се добио број дијастазе (DN). Тај број изражава активност дијастазе као ml 1%-ног раствора скроба који је хидролизован ензимом у 1 g меда за вријеме од једног сата при 40°C. Број дијастазе одговара броју на *Gothe* скали.

Активност дијастазе DN = ml 1%-ног раствора скроба по g меда/h при температури од 40°C

$$\text{Напомена : број дијастазе} = \frac{60}{t} \times \frac{0,10}{0,01} \times \frac{1,0}{2} = \frac{300}{t}$$

гдје је:

t – редуција у минутима.

Одјељак Ј . Одређивање хидроксиметилфурфурола

а) Фотометријска метода по Вишлеру

Принцип

Ова метода заснива се на реакцији хидроксиметилфурфурола са барбитурном киселином и п-толуидином, при чему настаје ружичаста боја које се мора мјерити на таласној дужини од 550 nm.

Апаратура и прибор

Осим уобичајене лабораторијске опреме користе се и:

- (1) одмјерне тиквице запремине 50 ml и 100 ml;
- (2) водено купатило;
- (3) спектрофотометар (очитавање на 550 nm).

Реагенси

- (1) Раствор барбитурне киселине: одмјери се 500 mg барбитурне киселине и са 70 ml воде пренесе у одмјерну тиквицу запремине 100 ml. Стави се у водено купатило да се раствори, а затим се охлади и допуни водом до ознаке.
- (2) Раствор п-толуидина: одмјери се 10 g п-толуидина и лаганим загријавањем на воденом купатилу раствори у приближно 50 ml изопропанола. Са изопропанолом пренесе се у одмјерну тиквицу запремине 100 ml и дода 10 ml ледене сирћетне киселине, охлади и допуни изопропанолом до ознаке. Раствор се чува на тамном мјесту и не користи најмање 24 сата.
- (3) Дестилована вода без кисеоника: кроз врућу воду пропушта се азот. Вода се затим охлади.

Припремање узорка

Узорак се припрема на начин предвиђен за методу припремања узорка за анализу, без загријавања.

Одређивање

Одмјери се 10 g узорка и без загријавања раствори у 20 ml дестиловане воде без кисеоника. Затим се пренесе у одмјерну тиквицу запремине 50 ml и допуни до ознаке (раствор меда). Одмах после припремања наставља се одређивање.

Од припремљеног узорка одмјери се пипетом 2 ml, пренесе се у сваку од двије епрувете и дода 5 ml п-толуидина. У једну епрувету пипетира се 1 ml воде, а у другу 1 ml раствора барбитурне киселине, па се садржај добро промијеша. Епрувета у којој је вода служи као слијена проба. Реагенс треба додавати без прекида и то завршити за један до два минута. Кад интензитет боје достигне максимум (три до четири минута), очита се апсорбанција на 550 nm у кивети од 10 mm.

Количина хидроксиметилфурфузола изражава се у mg/100 g меда и грубо израчунава према формули:

$$\text{mg HMF}/100 \text{ g меда} = \frac{\text{апсорбанција}}{\text{дебљина слоја}} \times 19,2$$

Напомена: Количина HMF може се израчунати помоћу баждареног дијаграма, примјеном стандардних раствора од 5 до 300/ µg.

б) Одређивање хидроксиметилфурфузола на двије таласне дужине (метода по Вајту)

Принцип:

Одређивање садржаја хидроксиметилфурфузола засновано је на апсорбанцији хидроксиметилфурфузола у UV дијелу спектра 284 nm. Како би се спријечила интерференција других компонената на овој таласној дужини, одређују се разлике између апсорбанције чисте солуције меда и након додавања дисулфита.

Reagensi:**Carrez I:**

- растворити 15 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ у води и додати 100 ml у одмјерној тиквици

Carrez II:

- растворити 30 g $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ и надопунити до 100 ml у одмјерну тиквицу

Натријум-бисулфит раствор

- 0,20 gr/100 g

Растворити 0,20 g чврстог $NaHSO_3$ (метабисулфит) и разриједити до 100 ml. Дневно се припрема свјеж раствор.

Опрема

- Спектрофотометар - таласна дужина 284 и 336 nm;
- кварцне кивете, 1 cm;
- филтер папир.

Процедура:

Одвагати 5 g меда и растворити у 25 ml дестиловане воде. Квантитативно пренијети раствор у одмјерну тиквицу од 50 ml, додати 0,5 ml Carrez I раствора и промијешати, а затим додати 0,5 ml Carrez II, поново промијешати и допунити до црте са дестилованом водом (може да додати капљица етанола да би се спријечило стварање пјене). Садржај из тиквице профилирати кроз филтер папир, с тим што се првих 10 ml одбаци. Од филтрата отипетирамо 5 ml у сваку од епрувета за тестирање (18 x 150 mm). Додати 5 ml воде у једну од епрувета за тестирање и добро измијешати (раствор са узорком), а у другу додати 5 ml 0,2%-тног раствора Натријум-бисулфата и добро измијешати (референтни раствор).

Додати у епрувете за тестирање	Раствор са узорком	Референтни раствор
Иницијални раствор меда	5,0 ml	5,0 ml
Вода	5,0 ml	-
Натријум-бисулфат	-	5,0 ml

Одредити апсорбацију раствора са узорком насупротив референтног раствора на 284 и 336 nm у кварцној кивети од 10 mm у току једног сата. Ако апсорбација на 284 nm прелази вриједност 0,6, потребно је разриједити раствор са узорком дестиловане воде, а референтни раствор са Натријум-бисулфатом у истом односу да би се добила довољно ниска апсорбација. Ако је потребно разрјеђивање раствора, неопходно је извршити корекцију резултата.

$$D = \frac{\text{коначни раствор узорка}}{10}$$

Резултати:

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

A_{284} је апсорбација на 284

A_{336} је апсорбација на 336

$$\lambda \cdot 49,7 = \frac{126 \times 1000 \times 1000}{16\,830 \times 10 \times 5} = \text{фактор}$$

126 - је молекулска маса HMF;

16 830 - је моларна апсорбација на 284 nm;

1000 - је конверзија грама у kg;

5 - је теоретска тежина узорка;

D- је фактор разрјеђења ако је разрјеђење неопходно;

W - је тежина узорка меда у g;

λ - је 284 nm.

Резултати се изражавају у mg/kg на једну децималу.

Одјељак К. Биолошка метода поленске анализе меда

Одвага се 10 g добро измијешаног меда и отопи у 20 ml воде и стави у водено купатило на температуру од 45°C. Раствор се центрифугира 15 минута на 3.500 обртаја. Текући дио се одлије, а седимент се пренесе микропипетом на предметно стакло и равномјерно размаже на површину 15 x 20 mm. Препарат се осуши у термостату на температури не вишој од 45°C и уклопи у глицеринску желатину. Након тога препарат се боји додавањем капи фуксина у глицеринску желатину. Узорак се покрије покровним стаклом и враћа у термостат на сушење. Увијек се раде два паралелна узорка истог меда. Микроскопира се при повећању 200 до 600 пута. Мијењају се видна поља док се не изброји 300 поленових зрна. Пребројана поленова зрна разврставају се према биљној врсти.

Биљне врсте детерминишу се на основу облика поленовог зрна, величине зрна, грађе опне, те према врсти, облику и броју отвора за клијање. Поленова зрна упоређују се

са референтним препаратима и сликом из атласа. Овом анализом се утврђује ботаничко поријекло меда.

Одјељак Ј. Одређивање воде у матичној млијечи и полену

Принцип

Принцип ове методе заснива се на предестилацији воде из испитиваног узорка у специјалном апарату помоћу органског растварача који се не мијеша са водом, а затим се предестилована количина измјери у градуисаној мензури.

Метода се примјењује приликом одређивање воде у матичној млијечи и цвјетном праху.

Апаратура и прибор

Осим уобичајене лабораторијске опреме, користе се и:

- (1) апарат за одређивање воде по *Dean-Starku* (сл. 2), запремине 250 ml;
- (2) аналитичка вага;
- (3) мензуре запремине 10 ml и 100 ml.

Реагенс: ксилол

Одређивање

Одмјери се 5 g матичне млијечи, односно 30 g полена, стави у тиквицу за дестилацију и прелије са 150 ml ксилола. Затим се апарат састави, вода пусти кроз хладњак и приступи дестилацији. Смјеша се лагано дестилише, при чему се водена пара и пара органског растварача кондензују и скупљају у градуисаној цијеви, а вишак растварача се враћа натраг. Дестилација траје све док кондензат не постане потпуно бистар. Тада се загријавање прекида и кондензат остави извјесно вријеме да се вода потпуно издвоји. Доњи (водени слој) испусти се у мензур у и прочита се количина воде.

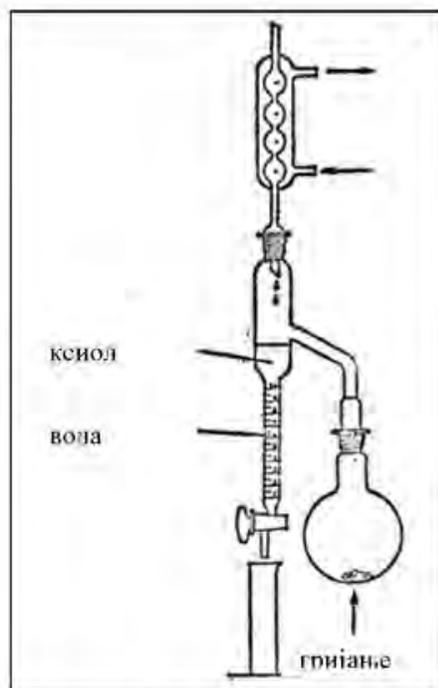
Израчунавање

Количина воде изражава се у процентима и израчунава по следећој формули:

$$\text{процент воде} = \frac{100 a}{B}$$

гдје је:

- а – број ml очитане воде,
- В – одмјерени узорак, у g.



Слика 2. Апарат за дестилацију по *Dean-Starku*

Одјељак М. Одређивање протеина у матичној млијечи

Принцип

Принцип ове методе заснива се на биурет-реакцији, односно реакцији бакра са пептидном везом, при чему настаје љубичаста боја, која се одређује спектрофотометријски на 546 nm. Измјерена апсорбација је сразмјерна концентрацији протеина у раствору.

Апаратура и прибор

Осим уобичајене лабораторијске опреме, користе се и:

- (1) спектрофотометар;
- (2) аналитичка вага;
- (3) центрифуга;
- (4) одмјерна тиквица запремине 100 ml и 1 000 ml;
- (5) кивета;
- (6) пипета од 1 ml и 10 ml.

Реагенси

- (1) Биуретски реагенс: 4,5 g калијум-натријум-тартарата раствори се у 40 ml NaOH 0,2 mol/l, дода се 1,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ претходно раствореног у 10 ml дестиловане

воде и 0,5 g калијум-јодида. Раствор се лагано измијеша, квантитативно пренесе у одмјерну тиквицу запремине 100 ml и допуни до 100 ml са 0,2 mol/l раствора NaOH.

Раствор мора бити бистар и без талога.

- (2) Раствор натријум-хидроксида, $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$; у одмјерну тиквицу запремине 1000 ml раствори се 8,4 g NaOH у око 950 ml дестиловане воде.

Раствор се охлади и допуни водом до ознаке.

- (3) Раствор за стабилизацију: раствори се 5 g калијум-јодида у 0,2 mol/l NaOH и допуни раствором 0,2 mol/l NaOH до 1000 ml.
 (4) Протеински стандард 6 g/l: серум крви у којем је позната количина протеина или кристалисан људски албумин.

Одређивање

На алуминијумској фолији димензија 15 mm x 15 mm одмјери се на аналитичкој ваги 100 mg матичног млијеча. Све се пренесе у кивету за центрифугирање и помоћу стакленог штапића потопаи до дна кивете. Пипетом се дода 8 ml раствора за стабилизацију и још једном добро промијеша да би се млијеч растопио. Центрифугира се 10 минута на 3 000 обртаја. После центрифугирања, одмјери се 4 ml раствора млијеча, пренесе у другу кивету и дода 1 ml биуретског реагенса.

Истовремено се припреми слијена проба од 4 ml реагенса за стабилизацију и 1 ml биуретског реагенса. После 30 минута мјери се апсорбација на таласној дужини од 546 nm

Под истим условима одреди се и апсорбација стандардног раствора.

Израчунавање

Количина протеина изражава се у процентима и израчунава по следећој формули:

$$\text{процент протеина} = \frac{(A_v - A_{s1}) / f \times 2 \times 100}{a}$$

где је:

- A_v – апсорбација узорка;
 A_{s1} – апсорбација слијене пробе;

$$\phi\text{-фактор} = \frac{A_s - A_{s1}}{C_s}$$

- a – количина узорка, у mg;
 A_s – апсорбација стандарда;
 C_s – количина протеина у стандарду.

Одјељак II. Одређивање екстракта прополиса у алкохолном раствору

Апаратура и прибор

За одређивање екстракта прополиса у алкохолном раствору користи се уобичајна лабораторијска опрема.

Реагенс: етанол

Одређивање

Одмјери се 5 g прополиса и пренесе у конусну тиквицу (Ерленмајер), прелије са 50 g етанола и остави на собној температури да се екстрахује преко ноћи. Након тога течност се филтрира и узима аликвот од три грама филтрата који се два сата суши у сушионику, на температури од 105°C. После две сата узорак се изводи из сушионика, стави у ексикатор и охлади. Охлађен узорак се мјери.

Израчунавање

Количина суве материје (екстракта) изражава се у процентима и израчунава по следећој формули:

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

гдје је:

- a – маса филтрата, у g;
- b – маса растварача, у g;
- c – маса сувог остатка, у g;
- d – маса узорка, у g.