

LIETUVOS RESPUBLIKOS ŽEMĖS ŪKIO MINISTRO

**Į S A K Y M A S
DĖL MEDAUS ANALIZĖS METODŲ**

2000 m. sausio 10 d. Nr. 5
Vilnius

Siekdamas suderinti Lietuvos teisės bazę su Europos Sąjungoje taikoma teisės baze,

1. T v i r t i n u Medaus analizės metodus (pridedama).
2. Nustatau, kad medaus analizės metodų gaminamiems ir importuojamiems šios grupės gaminiams būtų laikomasi nuo 2000 m. kovo 1 d.

ŽEMĖS ŪKIO Ministras

Edvardas Makelis

SUDERINTA
Valstybinės kokybės inspekcijos
viršininkas
B. Pauža
1999 m. gruodžio 8 d.

SUDERINTA
Lietuvos valstybinės veterinarijos tarnybos
direktorius
K. Lukauskas
1999 m. gruodžio 27 d.

PATVIRTINTA

Lietuvos Respublikos žemės ūkio
ministro 2000 m. sausio 10 d.
įsakymu Nr. 5

MEDAUS ANALIZĖS METODAI

PRATARMĖ

Lietuvos Respublikos bitininkai vietinei ir užsienio rinkai privalo tiekti geros kokybės medų. Svarbus etapas įteisinant medaus kokybę, gamybos, ženklavimo, gabenimo ir laikymo reikalavimus yra Lietuvos standarto LST 1466:1997 „Medus (techninės sąlygos)“ taikymas.

Medaus kokybė pagal šio standarto reikalavimus turi būti tikrinama visose medų tiriančiose laboratorijose.

Pateikiami medaus kokybės rodiklių nustatymo metodai parengti atsižvelgiant į šiuos dokumentus:

1. EB Tarybos 1974 m. liepos 22 d. direktyvą Nr. 74/409 EES;
2. CODEX STAN 12-1981 „Medus (tarptautinis standartas)“;
3. LST 1466: 1997. „Medus (techninės sąlygos)“;
4. Louveaux J., Maurizio A., Vorwohl G. Methods of melissopalynology / International Commission for Bee Botany of IUBS // Bee World. – 1978. – N 59(4). – P. 139-157.

BANDINIŲ PARUOŠIMO IR ANALIZĖS METODAI

1. Taikymo sritis

Šios analizių metodikos taikomos medaus kokybei nustatyti.

2. Bandinių paruošimas

2.1. Skystas arba tąsus medus

Kai bandinys nesusikristalizavęs, jis išmaišomas, o jei susikristalizavęs, – šildoma 60 °C temperatūroje 30 min. Jei neištirpsta, pamaišant šildoma 65 °C temperatūroje tol, kol suskystėja. Kai bandinys suskystėja, jis išmaišomas ir greitai atšaldomas. Hidroksimetilfurfurolui ir diastazei nustatyti medus nešildomas. Jeigu bandinyje yra pašalinių medžiagų (vaško, korio dalelių ir kt.), prieš sveriant būtina pašildyti iki 40 °C temperatūros ir filtruoti per sietą, kurio skylučių matmenys (0,5 x 0,5) mm¹.

2.2. Korio medus

Kai medus koryje uždengtas, bandinys išpjaunamas iš korio viršaus, medus išspaudžiamas, filtruojamas per 2.1 punkte nurodytą sietą. Kai medus koryje susikristalizavęs, jis šildomas tol, kol ištirps vaškas. Po to išmaišomas, atšaldomas ir atskiriamas nuo vaško filtruojant.

3. Redukuojančio cukraus kiekio nustatymas

3.1. Termino apibrėžimas

Redukuojantis cukrus – cukrus, turintis laisvą aldehydinę grupę. Meduje redukuojantį cukrų sudaro monosacharidai gliukozė ir fruktozė.

Invertuotasis cukrus – tai bendrasis gliukozės ir fruktozės kiekis meduje.

3.2. Metodo esmė

Šis metodas – Lane ir Eynono (1923) metodo modifikacija. Naudojamas Soksleto (Soxhlet) modifikuotas Felingo tirpalas, kuris virinant titruojamas redukuojančiu medaus cukrumi, naudojant indikatorių metileno mėlį.

Atliekant analizę tokiu būdu, didžiausias tikslumas pasiekiamas tada, kai tiriamojo tirpalo tūris pastovus. Norint nustatyti, kiek vandens reikia įpilti prieš analizę, atliekamas preliminarus titravimas.

3.3. Reagentai

3.3.1. Soksleto (Soxhlet) modifikuotas Felingio tirpalas

A tirpalas: ištirpinama 69,28 g vario sulfato pentahidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 249,71 molekulinės masės) viename litre distiliuoto vandens. Šviežiai pagamintą tirpalą laikyti vieną dieną iki titravimo.

B tirpalas: ištirpinama 346 g kalio natrio tartarato ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 282,23 molekulinės masės) ir 100 g natrio šarmo (NaOH 40 molekulinės masės) viename litre distiliuoto vandens. Filtruojama per asbestinį filtrą.

3.3.2. Etaloninis invertuotojo cukraus tirpalas (10 g/l)

Pasveriami 9,5 g švrios sacharozės, įpilama 5 ml druskos rūgšties (36,5 % HCl), praskiedžiama 100 ml vandens. Šis tirpalas laikomas 7 dienas (12–15) °C arba 3 dienas (20–25) °C, po to praskiedžiamas iki vieno litro (parūgštintas 1,0 % invertuotojo cukraus tirpalas išlieka stabilus kelis mėnesius). Prieš pat naudojimą reikalingas šio tirpalo tūris neutralizuojamas 1M natrio šarmo tirpalu (40 g/l) ir praskiedžiamas iki koncentracijos 2 g/l. Šis tirpalas naudojamas Felingio tirpalo koncentracijai patikrinti.

3.3.3. Metileno mėlio tirpalas

Ištirpinama 2 g metileno mėlio distiliuotame vandenyje ir praskiedžiama iki vieno litro.

3.3.4. Aliuminio hidroksidas

Gaminamas šaltas prisotintas vandeninis kalio – aliuminio – alūno ($\text{K}_2\text{SO}_4\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$) tirpalas. Pastoviai tirpalą maišant, pilamas amonio hidroksidas (NH_4OH), kol tirpalas tampa šarminis (tikrinama lakmusu); nuosėdoms nusėdus, plaunamas tol, kol vanduo su bario chloridu (BaCl_2) rodo silpną sulfatų reakciją. Vanduo nupilamas, aliuminio hidroksido tirpalas laikomas užkimštas.

3.3.5. Pirmasis tiriamojo bandinio paruošimo būdas (taikomas medui, kuriame gali būti nuosėdų):

a) 0,1g tikslumu pasveriami 25 g prieš tai homogenizuoto medaus, supilama į 100 ml matavimo indą, įpilama 5 ml aliuminio hidroksido (3.3.4), praskiedžiama iki brūkšnio 20 °C temperatūros distiliuotu vandeniu ir filtruojama;

b) 10 ml šio tirpalo praskiedžiama iki 500 ml distiliuotu vandeniu.

3.3.6. Antrasis tiriamojo bandinio paruošimo būdas:

a) 0,1 g tikslumu pasveriami 2 g homogenizuoto medaus, ištirpinama distiliuotame vandenyje ir matavimo kolboje praskiedžiama iki 200 ml;

b) 50 ml šio tirpalo praskiedžiama iki 100 ml distiliuotu vandeniu.

3.3.7. Modifikuoto Felingio tirpalo koncentracijos patikrinimas. Į 5 ml A Felingio tirpalą įpilama apie 5 ml B Felingio tirpalo. Šių tirpalų mišinys turi sureaguoti su 0,05 g invertuotojo cukraus, t. y. su įpiltu 25 ml praskiesto invertuotojo cukraus tirpalu (2 g/l).

3.3.8. Preliminarus titravimas

Į 250 ml Erlenmejerio kolbą pipete įpilama 5 ml A Felingio tirpalo, apytikriai 5 ml B Felingio tirpalo ir 7 ml distiliuoto vandens, nedaug susmulkintos pemzos arba kitos putojimą mažinančios medžiagos. Iš biuretės įleidžiama 15 ml praskiesto medaus tirpalo. Tirpalai užvirinami ir 2 min. palaikomas saikingas virimas. Po to įpilama 1 ml 0,2 % vandeninio metileno mėlio tirpalo. Titruojama įlašinant praskiesto medaus tirpalo, kol išblunka indikatoriaus spalva. Titravimas baigiamas po 3 minučių nuo virimo pradžios. Užrašomas titravimui sunaudoto praskiesto medaus tirpalo tūris (x ml).

Bendras tirpalo tūris su reagentais turi būti 35 ml. Jei trūksta, reikiamas vandens kiekis įpilamas prieš titruojant. Meduje turi būti daugiau kaip 60 % redukuojančio cukraus (invertuotojo cukraus), todėl prieš nustatant medaus sudėtį, atliekamas preliminarus titravimas, kad būtų nustatyta, kiek reikia įpilti vandens analizuojamam bandiniui. Titruojamas pastovus tūris. Šio vandens tūris apskaičiuojamas iš 25 ml atėmus preliminarium titravimui sunaudotą praskiesto medaus tūrį (x ml).

3.3.9. Bandinio analizė

Apskaičiuojamas reikalingas vandens tūris, kuris turi būti papildytas iki 35 ml. Šis vandens tūris apskaičiuojamas iš 25 ml atėmus preliminariam titravimui sunaudotą praskiesto medaus tūrį (x ml).

Į 250 ml Erlenmejerio kolbą įpilama 5 ml A Felingo tirpalo ir apytikriai 5 ml B Felingo tirpalo. Įpilama (25-x) ml distiliuoto vandens, nedaug susmulkintos pemzos arba kitos putojimą mažinančios medžiagos ir iš biuretės įlašinamas preliminariu titravimu nustatytas praskiesto medaus tūris ir dar 1,5 ml praskiesto medaus tirpalo. Tirpalas užvirinamas ir 2 min. palaikomas saikingas virimas. Po to įpilama 1 ml 0,2 % metileno mėlio tirpalo. Titruojama lašinant praskiestą medaus tirpalą tol, kol išblunka indikatoriaus spalva. Titravimas užbaigiamas po 3 min. nuo virimo pradžios. Užrašomas sunaudoto medaus tirpalo tūris (y ml). Titravimas kartojamas. Skirtumas tarp rezultatų negali būti didesnis kaip 0,1 ml.

3.4. Rezultatų skaičiavimas

Naudojant pirmąjį mėginio paruošimo būdą (3.3.5):

$$C = \frac{25}{W_1} \times \frac{1000}{Y_1}$$

Naudojant antrąjį mėginio paruošimo būdą (3.3.6):

$$C = \frac{2}{W_2} \times \frac{1000}{Y_2}$$

čia:

C – invertuotojo cukraus kiekis g/100 g medaus;

W_1 – medaus masė, paimta pagal 3.3.5 punkto reikalavimus (g);

W_2 – medaus masė, paimta pagal 3.3.6 punkto reikalavimus (g);

Y_1 – titravimo metu sunaudoto praskiesto medaus tirpalo tūris (ml), kai bandinys paruoštas pagal 3.3.5 punkto reikalavimus;

Y_2 – titravimo metu sunaudoto praskiesto medaus tirpalo tūris (ml), kai bandinys paruoštas pagal 3.3.6 punkto reikalavimus.

3.5. Metodinės pastabos

Būtina pakartotinai tiksliai nustatyti vandens tūrį, reikalingą įpilti į reakcijos mišinį iki bendro 35 ml tūrio kiekvienam bandiniui atskirai. 1 lentelėje nurodomas invertuotojo cukraus kiekis ir vandens tūris, kurie gali būti preliminarus titravimo metu, kai bandinio masė paimta pagal 3.3.5 punktą, yra 25 g, o pagal 3.3.6 punktą – 2g.

1 lentelė. Vandens kiekis, reikalingas medaus tirpalo papildymui, esant skirtingam cukraus kiekiui medaus mėginiuose

Invertuotojo cukraus kiekis, %	Distiliuoto vandens tūris, ml
60	8,3
65	9,6
70	10,7
75	11,6

4. Sacharozės kiekio nustatymas

4.1. Terminų apibrėžimas

Sacharozė – angliavandenis disacharidas. Rūgštinės hidrolizės metu arba veikiant fermentui invertazei, sacharozė skyla į monosacharidus – gliukozę ir fruktozę.

4.2. Taikomas H. S. Valkerio (H. S. Walker, 1917) inversijos metodas.

4.3. Reagentai

4.3.1. Soksleto (Soxhlet) modifikuotas Felingo tirpalas (3.3.1).

4.3.2. Etaloninis invertuotojo cukraus tirpalas (3.3.2).

4.3.3. Druskos rūgštis (HCl), 6,34 M.

4.3.4. Natrio šarmas (NaOH), 5 M.

4.3.5. Metileno mėlio tirpalas, 2 g/l (3.3.3).

4.4. Bandinio paruošimas

Tyrimams medus paruošiamas, kaip nurodyta 2 skyriuje.

4.5. Bandinio analizė

4.5.1. Tiriamojo bandinio paruošimas analizei

Medų paruošti taip, kaip nurodyta 3.3.5 punkto (a) dalyje. 10 ml medaus tirpalo praskiesti distiliuotu vandeniu iki 250 ml (medaus tirpalas sacharozei nustatyti). Arba paruošti medaus tirpalą taip, kaip nurodyta 3.3.6 punkto (a) dalyje.

4.5.2. Tiriamojo bandinio hidrolizė

Į 100 ml matavimo kolbą įpilama 50 ml medaus tirpalo ir 25 ml distiliuoto vandens. Bandinys šildomas verdančio vandens vonioje iki 65°C temperatūros. Po to kolba išimama iš vandens ir į ją įpilama 10 ml 6,34 M druskos rūgšties. Tirpalas aušinamas 15 min. kambario temperatūroje, po to neutralizuojamas 5 M natrio šarmu 20°C temperatūroje, naudojant indikatoriumi lakmuso popierėlį. Atšaldoma ir praskiedžiama vandeniu iki 100 ml.

4.5.3. Titravimas

Titruojama taip, kaip nurodyta 3.3.8 ir 3.3.9 punktuose.

4.6. Rezultatų skaičiavimas

Invertuotojo cukraus kiekis procentais skaičiuojamas (invertuotojo cukraus g/100 g medaus) prieš ir po inversijos pagal 3.4 poskyryje nurodytą formulę. Sacharozės kiekis skaičiuojamas iš invertuotojo cukraus kiekio po inversijos atėmus invertuotojo cukraus kiekį prieš inversiją ir padauginus iš 0,95, t. y.

$$C = (X - Y) \times 0,95$$

čia:

C – sacharozės kiekis meduje, % (g/100 g medaus);

X – invertuotojo cukraus kiekis po inversijos, %;

Y – invertuotojo cukraus kiekis prieš inversiją, %.

5. Drėgnumo nustatymas

5.1. Metodo esmė

Nustatoma refraktometru, taikant H. D. Čatvejaus (H. D. Chataway, 1932) metodą. Metodą patobulino E. B. Vedmoras (E. B. Wedmore, 1955).

5.2. Prietaisas

Refraktometras medaus drėgnumui nustatyti.

5.3. Bandinio paruošimas analizei

Medus paruošiamas tyrimui taip, kaip nurodyta 2 skyriuje.

5.4. Atlikimo metodika

5.4.1. Refrakcijos indekso nustatymas

Refrakcijos indeksas nustatomas refraktometru 20°C temperatūroje.

Drėgnumas (%) priklausomai nuo refrakcijos indekso pateiktas 2 lentelėje.

2 lentelė. Medaus drėgnumas ir refrakcijos indeksas

Refrakcijos indeksas	Drėgnumas%	Refrakcijos indeksas	Drėgnumas%	Refrakcijos indeksas	Drėgnumas%
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		

Jei drėgnumas nustatytas ne 20°C temperatūroje, tada refrakcijos indeksas koreguojamas taip:

esant aukštesnei kaip 20°C temperatūrai pridėjama 0,00023/°C,
esant žemesnei kaip 20°C temperatūrai atimama 0,00023/°C.

6. Vandenyje netirpių medžiagų kiekio nustatymas svorio metodu

6.1. Bandinio paruošimas

Medus tyrimui paruošiamas taip, kaip nurodyta 2 skyriuje.

6.2. Atlikimo metodika

6.2.1. Bandinio paruošimas analizei

0,01 g tikslumu pasveriami 20 g medaus, ištirpinama 80°C temperatūros vandenyje, gerai išmaišoma.

Tiriamasis bandinys filtruojamas per iš anksto iškaitintą iki pastovaus svorio ir pasvertą stiklinį filtrą, kurio porų skersmuo (15-40) μm ir plaunama karštu (80°C temperatūros) vandeniu tol, kol praplovimo vandenyje nelieka cukraus (Mohr testas). Stiklinis filtras džiovinamas valandą 135°C temperatūroje, po to atšaldoma eksikatoriuje ir pasveriami 0,1 mg tikslumu.

Netirpių medžiagų kiekis skaičiuojamas pagal formulę:

$$X = \frac{N_1 - N_0}{N} \times 100$$

čia:

X – netirpių medžiagų kiekis meduje, %;

N_0 – filtro masė, g;

N_1 – filtro masė su netirpiomis priemaisomis, g;

N – medaus masė, g.

7. Mineralinių medžiagų (pelenų) kiekio nustatymas

7.1. Bandinio paruošimas analizei

Medus tyrimui paruošiamas taip, kaip nurodyta 2 skyriuje.

7.2. Atlikimo metodika

7.2.1. Medaus sudeginimas

Iš anksto mufelinėje krosnyje iškaitintame iki pastovaus svorio platininiame arba keraminiame tiglyje 0,01 g tikslumu pasveriamas 5-10 g medaus. Bandinys kaitinamas mufelinėje krosnyje, kol pasidaro sausas ir juodas, nėra putojimo ir išsiliejimo pavojaus. Bandinį galima suanglinti ir infraraudonaisiais spinduliais. Putojimui sumažinti galima įpilti kelis lašus aliejaus. Po suanglinimo bandinys kaitinamas 600 °C temperatūroje iki pastovaus svorio. Prieš sveriant tigliui atšaldomi eksikatoriuje. Sveriamas 0,1 mg tikslumu.

Bendras mineralinių medžiagų (pelenų) kiekis skaičiuojamas pagal formulę:

$$Y = \frac{M_1 - M_0}{M} \times 100$$

čia:

Y – mineralinės medžiagos meduje, %;

M_0 – tiglio masė, g;

M_1 – tiglio masė su pelenais, g;

M – medaus masė, g.

8. Bendrojo rūgštingumo nustatymas

8.1. Termino apibrėžimas

Medaus bendrasis rūgštingumas – tai bendras laisvų bei sujungtų organinių ir neorganinių rūgščių kiekis, esantis meduje.

8.2. Bandinio paruošimas

Medus tyrimui paruošiamas taip, kaip nurodyta 2 skyriuje.

8.3. Reagentai

8.3.1. 0,1 M NaOH (iš kurio pašalintas CO₂).

8.3.2. 1 % fenolftaleinas (spiritinis).

8.3.3. Distiliuotas vanduo turi būti pavirintas (nuvirinama 1/3 vandens tūrio) tam, kad būtų pašalintas anglies dioksidas.

8.4. Atlikimo metodika

8.4.1. Bandinio paruošimas analizei

0,01 g tikslumu pasveriamas 10 g medaus ir ištirpinama 75 ml distiliuoto vandens (8.3.3).

8.4.2. Titravimas

Bandinys titruojamas 0,1 M natrio šarmu, į titravimo kolbutę įlašinus 4-5 lašus fenolftaleino. Pakitusi tirpalo spalva turi išlikti stabili 10 sekundžių. Jei bandinys yra tamsios spalvos, tada analizei imamas mažesnis svėrinys. Jei naudojamas pH-metras, bandinys titruojamas iki pH 8,3.

8.5. Rezultatų skaičiavimas

Rezultatai išreiškiami rūgštingumo miliekivalentais 1 kg medaus ir skaičiuojami taip:

$$R = 10 \times V$$

čia:

R – medaus rūgštingumas, mekv/kg;

V – 0,1 M NaOH (ml) panaudoto 10 g medaus neutralizuoti.

9. Diastazės aktyvumo nustatymas

9.1. Terminų apibrėžimai

Diastazė – fermentas, skaidantis krakmolą į aminodekstrinus, kurio aktyvumas išreiškiamas diastazės skaičiumi (Gotės vienetais).

Gotės vienetas – 1% krakmolo tirpalo kiekis ml, kurį per valandą $40 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatūroje suskaido 1 grame absoliučiai sauso medaus esanti diastazė.

9.2. Metodas remiasi J. E. Šadės (J. E. Schade ir kt., 1958), modifikuotu J. W. Vaito (J. W. Whit ir kt., 1959) ir H. Hadorno (H. Hadorn, 1961) metodais.

9.3. Reagentai

9.3.1. Pagrindinis jodo tirpalas

30-40 ml vandens tirpinama 22 g KJ, po to – 8,8 g jodo, praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 1 litro.

9.3.2. 0,0007 M jodo tirpalas

Ištirpinama 20 g KJ 30-40 ml distiliuoto vandens 500 ml kolboje. Įpilama 5 ml pagrindinio jodo tirpalo ir praskiedžiama iki brūkšnio. Tirpalas naudojamas ne ilgiau kaip dvi dienas.

9.3.3. Acetatinis buferis – 5,3 pH (1,59 M)

Ištirpinama 87 g natrio acetato trihidrato ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 400 ml vandens, įpilama apie 10,5 ml ledinės acto rūgšties ir praskiedžiama iki 500 ml. Tirpalo rūgštingumas 5,3 pH pasiekiamas koreguojant natrio acetatu arba acto rūgštimi.

9.3.4. 0,5 M NaCl tirpalas

Ištirpinama 14,5 g NaCl distiliuotame virintame vandenyje, praskiedžiama iki 500 ml. Ilgiau laikant šis tirpalas netinka naudoti, kadangi jame atsiranda pelėsių.

9.3.5. Krakmolo tirpalas

a) tirpaus krakmolo paruošimas:

Į kolbutę įpilama 20 g tirpaus krakmolo, 100 ml 95 % spirito ir 7 ml 1 M HCl. Kolbutė panardinama į vandens vonią, sujungiama su grįžtamu vandens šaldytuvu. Mišinys virinamas 1 valandą. Atšaldoma, filtruojama per (15-90) μm porų stiklo plokštelių filtrą, plaunama vandeniu tol, kol vanduo nebebus rūgščios reakcijos. Tirpus krakmolą laikomas sandariai uždarytas;

b) drėgmės kiekis tirpiame krakmole nustatomas taip:

0,01 g tikslumu pasveriami 2 g tirpaus krakmolo, paskleidžiama 2–3 sluoksniu. Džiovinama 1–1,5 val. 130°C temperatūroje. Atšaldoma eksikatoriuje ir vėl pasveriami. Drėgmė turi būti (7–8) % priklausomai nuo oro drėgmės džiovinant;

c) krakmolo tirpalas analizei paruošiamas taip:

0,01 g tikslumu pasveriami 2 g tirpaus krakmolo ir sumaišoma su 90 ml vandens 250 ml kolbutėje. Virinama maišant 3 minutes, po to uždengiama, leidžiama atvėsti kambario temperatūroje. Perpilama į 100 ml kolbutę, įstatytą į 40°C vandens vonią. Kai kolbutėje temperatūra pakyla iki 40°C , krakmolo tirpalas praskiedžiamas iki 100 ml. Analizei naudojamas tirpaus krakmolo tirpalas, kurio absorbcija 0,5–0,55. Absorbcija nustatoma žemiau aprašytu metodu;

d) krakmolo tirpalo mėlynos spalvos nustatymo metodas:

0,01 g tikslumu pasveriami 1 g tirpaus krakmolo, ištirpinama aprašytuoju metodu, atšaldoma. Prieš praskiedžiant iki 100 ml matavimo kolboje, įpilama 2,5 ml acetatinio buferio. Į 100 ml matavimo kolbą įpilama 75 ml distiliuoto vandens, 1 ml 1 M HCl ir 1,5 ml 0,02 M jodo tirpalo. Pridedama 0,5 ml krakmolo tirpalo ir praskiedžiama vandeniu iki brūkšnio. Paliekama 1 val. tamsioje vietoje, po to matuojama absorbcija spektrofotometru nustatytą bangos ilgį 660 nm, 1 cm kiuvetėje. Palyginamajame tirpale turi būti ištirpinti visi reagentai, išskyrus krakmolą. Matuojamojo tirpalo absorbcija turi būti nuo 0,5 iki 0,55.

9.4. Prietaisai

9.4.1. Vandens vonia $40 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

9.4.2. Spektrofotometras (matavimui nustatomas 660 nm bangos ilgis).

9.5. Bandinio paruošimas

Medus paruošiamas jo nešildant, kaip nurodyta 2 skyriuje.

9.6. Analizė

9.6.1. Bandinių paruošimas

Medaus tirpalas: 0,01 g tikslumu pasveriamas 10 g medaus į 50 ml indelį. 5 ml acetatinio buferio įpilama į 20 ml vandens, medus ištirpinamas šiame buferyje. Bandinys ištirpinamas maišant šaltą tirpalą. Į 50 ml matavimo kolbutę įpilama 3 ml 0,5 M NaCl tirpalo. Ištirpintas medaus tirpalas supilamas į šią kolbutę, praskiedžiamas iki 50 ml.

Pastaba. Medų buferyje būtina ištirpinti prieš sumaišant jį su NaCl tirpalu.

9.6.2. Krakmolo tirpalo paruošimas

Krakmolo tirpalas, pagamintas pagal 9.3.5(c) punktą, šildomas iki 40 °C temperatūros, po to jo 5 ml įpilami į 10 ml vandens ir gerai sumaišoma. 1 ml šio tirpalo įpilama į 10 ml 0,0007 M jodo tirpalo, praskiedžiama vandeniu iki 35 ml, gerai išmaišoma. Absorbcija matuojama nustatčius 660 nm bangos ilgį. Palyginamasis tirpalas yra vanduo. Naudojamos 1 cm kiuvetės.

Absorbcija turi būti $0,760 \pm 0,020$. Jei būtina, papildyti vandeniu, kad būtų pasiekta reikalinga absorbcija.

9.6.3. Absorbcijos nustatymas

Įpilama 10 ml medaus tirpalo į 50 ml graduotą cilindrą ir įstatoma į 40°C temperatūros vandens vonią. Krakmolo tirpalas šildomas toje pačioje vandens vonioje. Po 15 min. 2 % krakmolo tirpalas įpilamas į medaus tirpalą, sumaišoma, įjungiamas sekundmatis. Kas 3–5 minutes imama 1 ml tirpalo, įpilama į 10 ml 0,0007 M jodo tirpalo. Sumaišoma, praskiedžiama iki krakmolo tirpalo derinimo metu (9.6.2) nustatyto tūrio, tuoj pat matuojama absorbcija spektrofotometru 1 cm kiuvetėje. Toliau imama po 1 ml tirpalo (medus su krakmolu), kol absorbcija sumažėja iki 0,235.

9.7. Rezultatų skaičiavimas

Braižomas absorbcijos priklausomumo nuo laiko grafikas. Tiesi linija yra brėžiama mažiausiai per 3 paskutinius taškus tam, kad būtų nustatytas tikslus laikas, per kurį tirpalo absorbcija sumažėja iki 0,235. Ten, kur tirpalo absorbciją rodanti tiesė kerta absorbcijos rodiklį 0,235, atskaitomas reakcijos laikas. Diastazės skaičius yra gaunamas 300 padalijus iš laiko (minutėmis). Šis skaičius išreiškia 1 g medaus esančios diastazės aktyvumą, kuri hidrolizuoja 1 % krakmolo tirpalą per 1 val., esant 40°C temperatūrai. Šis diastazės skaičius atitinka Gotės (Gothes) skalės vienetus.

$$DA = \frac{300}{t}$$

čia:

DA – diastazės aktyvumas Gotės (Gothes) vienetais;

t – laikas minutėmis.

10. Hidroksimetilfurfurolo (HMF) nustatymas

10.1. Terminų apibrėžimas

Hidroksimetilfurfurolas (HMF) – aldehidas, nuodingas junginys, susidarantis skylant gliukozei ir fruktozei.

10.2. Metodo esmė

Nustatoma remiantis O. Vinkleriu (O. Winkler, 1955). HMF, veikiamas barbitūro rūgštimi ir p-toluidinu, nusispalvina raudonai.

10.3. Reagentai

10.3.1. Barbitūro rūgšties tirpalas

Pasveriamas 500 mg barbitūro rūgšties į 100 ml matavimo kolbą, ištirpinama 70 ml vandens, šildant vandens vonioje. Atvėsinus praskiedžiama iki brūkšnio. Tirpalas laikomas šaldytuve.

10.3.2. p-toluidino tirpalas

0,01 g tikslumu pasveriamas 10 g gryno p-toluidino. Ištirpinama 50 ml izopropilo alkoholyje 100 ml matavimo kolboje. Įpilama 10 ml ledinės acto rūgšties ir praskiedžiama izopropilo alkoholiu iki brūkšnio. Naudojama po 24 valandų. Tamsiame inde šaltai laikomas tirpalas tinka naudoti 1 mėnesį.

10.3.3. Distiliuotas vanduo (be deguonies)

Distiliuotas vanduo turi būti virintas ir pro jį praleistos azoto dujos (iš vandens turi būti pašalintas deguonis).

10.4. Prietaisas

Spektrofotometras (tiriamasis tirpalas matuojamas, nustačius prietaise bangos ilgį – 550 nm).

10.5. Bandinio paruošimas

Medus paruošiamas taip, kaip nurodyta 2 skyriuje (nešildant).

10.6. Analizė

10.6.1. Medaus tirpalo paruošimas

0,01 g tikslumu pasveriami 2 g medaus 25 ml indelyje. Užpilama keliais ml šviežiai virinto distiliuoto vandens ir perpilama į graduotą 10 ml mėgintuvėlį. Praskiedžiama iki brūkšnio, sumaišoma.

10.6.2. Paruošimas matavimui

Į du mėgintuvėlius su šlifais įpilama 2 ml medaus tirpalo (10.6.1) ir 5 ml p-toluidino reagento. Į pirmąjį mėgintuvėlį įpilama 1 ml vandens (kontrolinis), į kitą – 1 ml barbitūro rūgšties tirpalo, apverčiama kelis kartus (žr. bandymo schemą). Reagentai supilami ne ilgiau kaip per 2 minutes, tirpalai tuoj pat spektrofotometruojami, nustačius bangos ilgį 550 nm, 1 cm kiuvetėje. Įpylus barbitūro rūgštį, ekstinkcija pasiekia maksimumą po 3–4 min., po to pradeda staigiai mažėti. Skaičiuojant naudojamos didžiausios ekstinkcijos reikšmės.

3 lentelė. Bandymo schema

TIRPALAS	KONTROLINIS (ML)	PAGRINDINIS (ML)
Medaus tirpalas	2	2
p-toluidino tirpalas	5	5
Barbitūro rūgšties tirpalas	-	1
Vanduo	1	-

10.7. Rezultatų skaičiavimas

$$F = 192 \times E$$

čia:

F – HMF kiekis meduje, mg/kg;

E – ekstinkcija;

192 – proporcingumo koeficientas.

11. Medaus botaninės sudėties nustatymas

11.1. Terminų apibrėžimas

Melisopalinologija – mokslas, tiriantis bičių produktuose esančių žiedadulkių botaninę sudėtį.

Lipčiaus medus – bičių perdirbtos cukringos augalų arba jais besimaitinančių vabzdžių išskyros.

11.2. Metodo esmė

Atskirų augalų žiedadulkių procentinės sudėties nustatymas medaus tirpalo nuosėdose.

11.3. Prietaisai ir priemonės

11.3.1. Mikroskopas, didinantis ne mažiau kaip 400 kartų.

11.3.2. Centrifuga, kurios rotoriaus sūkių dažnis ne mažesnis kaip 3000 aps./min.

11.3.3. (10-20) ml konusiniai centrifuginiai mėgintuvėliai.

11.3.4. Objektiniai mikroskopiniai stikleliai.

11.3.5. Dengiamieji mikroskopiniai stikleliai.

11.3.6. Mikropipetės.

11.3.7. Svarstyklės (0,01 g tikslumo).

11.3.8. Reagentas Kaiserio glicerolio želatina („Merck“ firmos).

11.4. Bandinio paruošimas

Pasveriami 10 g medaus, ištirpinama 20 ml distiliuoto vandens, supilama į konusinius centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguojama 10 min. 3000 aps./min. dažniu. Po to viršutinis tirpalo sluoksnis nupilamas, užpilama 10 ml vandens ir centrifuguojama 5 min. Viršutinis tirpalo sluoksnis nupilamas, paliekant ant nuosėdų (0,1-0,3) ml tirpalo. Nuosėdos išmaišomos.

11.5. Preparato paruošimas mikroskopavimui

Į pipetę pritraukiama apie 0,1 ml išmaišytų nuosėdų, užlašinama jų ant objektinio mikroskopinio stiklelio, paskirstoma 1 cm² plote. Džiovinama ne aukštesnėje kaip 40°C temperatūroje. Ant išdžiovintų nuosėdų arba ant dengiamojo mikroskopinio stiklelio užlašinamas lašas Kaiserio glicerolio želatinos. Nuosėdos uždengiamos dengiamuoju mikroskopiniu stikleliu, džiovinama 40°C temperatūroje tol, kol nebelieka oro burbulų ir visas preparatas išdžiūsta.

11.6. Mikroskopavimas

Žiedadulkės identifikuojamos mikroskopu naudojant ne mažesnę kaip 400 kartų padidinimą. Perstumiant mikroskopo stalielį, preparate suskaičiuojama 200–300 žiedadulkių. Skirtingų augalų žiedadulkių kiekis surašomos lentelėje. Jeigu preparate yra tik dviejų augalų žiedadulkės, pakanka jų suskaičiuoti 200. Nektaro neišskiriančių augalų žiedadulkės ir lipčiaus elementai iš bendro nektaringų augalų žiedadulkių skaičiaus atimami.

Lipčiaus medaus bandinyje žiedadulkių būna mažai, nuo 50 iki 150 vienetų.

Meduje esančių žiedadulkių arba lipčiaus kiekis (procentais) skaičiuojami pagal formulę:

$$Z = \frac{a \times 100}{b}$$

čia:

Z – vienos augalų rūšies žiedadulkės, %;

a – vienos augalų rūšies identifikuotos žiedadulkės (arba lipčius);

b – bendras žiedadulkių kiekis.

Identifikuojami trys bandiniai. Jeigu tarp jų skirtumas yra didesnis kaip 5 %, tiriamas ketvirtas bandinys.

Vidurkis skaičiuojamas iš trijų artimiausių rezultatų.
