

U Poglavlju II. Metode fizikalnih, kemijskih i bioloških analiza kojima se obavlja kontrola meda i drugih pčelinjih proizvoda, u Odjeljku C. Određivanje reduciranih šećera pod točkom b) Volumetrijska metoda po Luff-Schoorlu u dijelu Reagensi stavak (9) mijenja se i glasi:

"Otopina Carrez (II): otopiti u vodi 10,6 g kalijevog heksacijanoferata (II) trihidrata $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ i nadopuniti vodom do 100 ml".

U Odjeljku D. Određivanje saharoze u pododjeljku Reagensi stavak (5) mijenja se i glasi:

"0,2%-na otopina metilenskog plavog (2g/l)".

Iza Odjeljka D. dodaje se novi Odjeljak D1. koji glasi:

"Odjeljak D1. Određivanje šećera

a) metoda HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Područje primjene

Metodom se određuju fruktoza, glukoza, saharoza, turanoza i maltoza u medu za koji su dobiveni podaci o preciznosti.

Može se koristiti i za kvantitativno određivanje ostalih šećera u medu, kao što su melecitoza, erloza, izomaltoza, rafinoza i drugi, kako je to opisano u izvorno objavljenoj Bogdanovoj i Baumannovoj metodi.

Definicije

Udjel svakog šećera definiran je kao onaj izračunat iz formule dane u metodi (1).

Princip

Ova metoda temelji se na izvorno objavljenoj Bogdanovoj i Baumannovoj metodi (1).

Nakon filtriranja otopine sadržaj šećera određuje se pomoću HPLC-a s RI detektorom. Pikovi šećera se identificiraju na osnovi vremena zadržavanja (retencije). Kvantifikacija se izvodi metodom eksternog standarda, određivanjem površine ili visine pika.

Reagensi

Ako nije drukčije navedeno, treba koristiti reagense analitičke čistoće. Moraju se koristiti destilirana voda ili drugi ekvivalenti analitičke čistoće.

- Metanol, HPLC čistoće
- Acetonitril, HPLC čistoće

Pažnja: acetonitril je opasna tvar te je potrebno koristiti mjere opreza i zaštite pri rukovanju. Mobilna faza (elucija otopine za HPLC) sastoji se od mješavine 80 volumnih dijelova acetonitrila i 20 volumnih dijelova vode. Potrebno je degasirati prije upotrebe.

Standardne tvari fruktoza, glukoza, saharoza, turanoza i maltoza mogu se nabaviti od uobičajenih dobavljača, kao i melecitoza, rafinoza i izomaltoza. Vidjeti rezolucije i vremena zadržavanja svih šećera u medu.

Pipetirati 25 mL metanola u kalibracijske tikvice od 100 mL. Ovisno o šećeru koji se analizira, otopiti odvagu kako je niže opisano u oko 40 mL vode i kvantitativno prenijeti u tikvicu, promiješati te dopuniti vodom do oznake.

fruktoza: 2.000 g; glukoza: 1.500 g; saharoza: 0.250 g; turanoza: 0.150 g; maltoza: 0.150 g.

Pomoću šprice preko membranskog filtra prenijeti uzorke u označene vijalice.

Otopine standarda su stabilne 4 tjedna u hladnjaku na 4 °C ili šest mjeseci na -18 °C.

Pribor i oprema

- Vijalice za uzorke
- Ultrazvučna kupelj
- Kalibrirane posude od 100 mL

"EI"

Na temelju članka 17. stavak 2. i članka 72. Zakona o hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 50/04) i članka 17. Zakona o Vijeću ministara Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH", br. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 i 24/08), Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Agencije za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine, u suradnji s nadležnim tijelima entiteta i Brčko distrikta Bosne i Hercegovine, na 178. sjednici održanoj 12. studenoga 2019. godine, donijelo je

PRAVILNIK O IZMJENAMA I DOPUNAMA PRAVILNIKA O METODAMA ZA KONTROLU MEDA I DRUGIH PČELINJIH PROIZVODA

Članak 1.

U Pravilniku o metodama za kontrolu meda i drugih pčelinjih proizvoda ("Službeni glasnik BiH", broj 37/09), u dijelu POSEBNE ODREDBE, u članku 3. (Metode fizikalnih, kemijskih i bioloških analiza) iza stavka (1) dodaje se novi stavak (2), koji glasi:

"(2) Za utvrđivanje sukladnosti kvalitete meda i drugih pčelinjih proizvoda s propisanim zahtjevima kvalitete priznaju se i sve druge međunarodno priznate ovlaštene metode."

Članak 2.

U Aneksu II. Poglavlja I. Metode fizikalnih, kemijskih i bioloških analiza meda i drugih pčelinjih proizvoda, u Odjeljku A. Metode fizikalnih, kemijskih i bioloških analiza iza točke d): "određivanje saharoze"¹ dodaje se nova točka e) koja glasi: **"e) određivanje šećera (HPLC) metoda^{1,2}".**

Točke i) i j) mijenjaju se i glase:

"i) određivanje aktivnosti dijastaze^{1,2}

j) određivanje hidroksimetilfurfurola HMF (metoda HPLC², Winklerova fotometrijska metoda² i Whiteove metode na dvije valne duljine²)^{1,1}".

Dosadašnje toč. e, f, g, h, i, j, k, l, m i n postaju toč. f, g, h, i, j, k, l, m, n i o.

- Pipete od 25 mL
- Membranski filtri za vodene otopine, veličina pora 0,45 µm
- Odgovarajuća šprica s adapterom za membranske filtre
- Uređaj za HPLC s pumpom, odgovarajućim injektorom, RI-detektor termostiran na 30 °C, toplinski regulirana peć na stupcu na 30 °C, integrator
- HPLC stupac, npr. 4.6 mm dijametar, 250 mm duljina, punjena aminomodificiranim silika-gelom veličine čestica 5-7 µm.

Prije upotrebe HPLC stupca, obaviti test prikladnosti (system suitability test) da bi se utvrdila separacija svih šećera.

Napomena: kromatografiranje se može obavljati na sobnoj temperaturi bez znatnog utjecaja na rezultate, osim erloze i melecitoze.

Postupak

Priprema uzorka

Ako je potrebno, pripremiti med prema poglavlju o uzorkovanju i općim metodama sukladno harmoniziranoj metodi Međunarodne komisije za med.

Odvagati 5 g meda u čašu i otopiti u 40 ml vode. U normalni sud od 100 ml pipetirati 25 ml metanola, a zatim kvantitativno dodati vodenu otopinu meda iz čaše. Dopuniti normalni sud vodom do oznake. Profiltrirati uzorke i prenijeti u označene bočice za uzorke. Po potrebi, uskladištiti bočice za uzorke kao i otopine standarda.

Uvjeti za HPLC

Ako se koristi prethodno opisan kromatografski stupac, onda se zadovoljavajući rezultati mogu očekivati u sljedećim uvjetima: protok mobilne faze 1.3 ml/min; mobilna faza acetonitril; voda (80:20 v/v); temperatura stupca i detektora 30 °C; volumen injektiranja 10 µl.

Napomena 1: ako nije moguće provesti kromatografiranje s temperaturom stupca i detektora na 30 °C, onda se može raditi u ambijentalnim uvjetima. U tim uvjetima separacija melecitoze i erloze neće biti uspješna.

Napomena 2: treba se injektirati istovjetni volumen uzorka i standardne otopine.

Računanje i izražavanje rezultata

Identifikacija i kvantifikacija šećera u medu radi se usporedbom vremena zadržavanja i površina pikova sa signalima iz otopina standarda šećera.

Maseni postotak određivanih šećera (W), fruktoze, glukoze, itd. i maltoze u 100 grama uzorka (g/100g) izračuna se prema sljedećoj formuli metodom eksternog standarda:

$$W = A_1 \times V_1 \times m_1 \times 100 / A_2 \times V_2 \times m_0$$

gdje je: A_1 = površina ili visina pika šećera iz otopine standarda; A_2 = površina ili visina pika šećera iz otopine uzorka; V_1 = ukupni volumen otopine uzorka (ml); V_2 = ukupni volumen otopine standarda (ml); m_1 = masa šećera (g) u ukupnom volumenu otopine standarda (V_2). m_0 = odvaga uzorka (g). Rezultat se zaokružuje na jedno decimalno mjesto.

Preciznost postupka

Parametri r i R su određeni u ring DIN međulaboratorijskom testiranju (2).

Broj uzorka	Fruktoza g/100	r	R
1	31.2	0.8	1.6
2	42.4	0.9	2.3
3	37.9	1.0	1.6

Broj uzorka	Glukoza g/100	r	R
1	23.0	0.9	2.1
2	28.5	0.8	1.8
3	32.0	1.1	1.4

Broj uzorka	Saharoza g/100	r	R
1	-	-	-
2	-	-	-
3	2.8	0.4	0.9

Broj uzorka	Turanoza g/100	r	R
1	2.1	0.4	0.8
2	1.7	0.3	0.5
3	1.3	0.3	0.8

Broj uzorka	Maltoza g/100	r	R
1	4.8	0.5	2.5
2	2.0	0.6	1.3
3	2.3	0.5	0.7

Ponovljivost (r) i reproducibilnost (R) rezultata su izračunati na tri vrste uzorka meda u svim laboratorijima koji su sudjelovali u testiranju.

Reference:

1. Određivanje šećera meda pomoću HPLC-a (S. Bogdanov, S. E. Baumann, Bestimmung von Honigzucker mit HPLC. Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg., 79, 198-206. (1988)
2. Određivanje sadržaja saharida. Metoda HPLC (DIN Norm 10758, Bestimmung des Gehaltes an Sacchariden. HPLC Verfahren. (1992).

Preuzeto iz metoda Međunarodne komisije za med (Harmonized methods of the International Honey Commission, 2009)".

Članak 3.

Odjeljak I. Određivanje aktivnosti diastaze zamjenjuje se novim Odjeljkom I. koji glasi:

"Odjeljak I. Određivanje aktivnosti diastaze a1) Metoda po IHC-u (odgovara Schadeovoj metodi) Područje primjene

Ova metoda može se primijeniti na sve uzorke meda.

Definicije

Jedinica aktivnosti diastaze, jedinica Gothe, definira se kao količina enzima koja će pretvoriti 0,01 grama škroba do propisane krajnje točke u jednom satu na 40 °C pod testnim uvjetima. Rezultati su izraženi u jedinicama Gothe (ili jedinicama Schade) po gramu meda.

Princip

Ova metoda temelji se na hidrolizi 1%-ne otopine škroba enzimom iz 1 g meda tijekom jednog sata na temperaturi od 40 °C. Standardna otopina škroba u reakciji s otopinom joda daje intenzivno obojenje. U reakciji enzima i standardne otopine škroba uslijed hidrolize nastaje plava boja joda, čije se nestajanje mjeri u intervalima. Iz odnosa apsorbancije i vremena određuje se t_x - reakcijsko vrijeme nestajanja boje do specifične apsorbancije, čija je vrijednost 0,235*. Aktivnost diastaze izražava se kao broj 300/ t_x .

Ova metoda zasnovana je na izvornoj Schadeovoj metodi (1), modificiranoj po Hadornovoj i Zürcherovoj (2) te Whiteovoj i Pairentovoj (3) metodi, te je dana u Codex Alimentariusu.

Aparatura i pribor

Oprema ne smije imati tragove deterdženta!

Uz uobičajenu laboratorijsku opremu, koriste se i:

- (1) odmjerne tikvice volumena od 50, 100 i 500 ml
- (2) konusna tikvica volumena 250 ml
- (3) plamenik
- (4) vodena kupelj na 40,0 ± 0,2 °C
- (5) štoperica
- (6) kivete od 1 cm
- (7) spektrofotometar s očitanjem na 660 nm.

Reagensi

- (1) Matična otopina joda: otopi se 11,0 g joda p.a., pomiješa s 22,0 g kalijevog jodida i rastvori u 30 – 40 ml destilirane vode, a zatim razblaži do 500 ml.
Pripremljenu otopinu čuvati u zatvorenoj tamnoj boci najdulje oko godinu dana.
- (2) Razblažena otopina joda: priprema se u odmjernoj tikvici volumena 500 ml tako što se otopi 20,0 g kalijevog jodida p.a. u destiliranoj vodi, uz dodatak 2 ml matične otopine joda, nakon čega se dopuni vodom do oznake.
Razblažena otopina joda priprema se na dan upotrebe i treba je čuvati od utjecaja zraka, zatvarajući tikvicu odmah nakon upotrebe.
- (3) Acetatni pufer - pH 5,3: otopiti 43,5 g natrijevog acetata ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) u destiliranoj vodi, uz dodatak 5 ml ledene octene kiseline radi podešavanja pH vrijednosti, a zatim dopuniti vodom do 250 ml. Ako je potrebno, pH vrijednost podesiti s natrijevim acetatom ili octenom kiselinom uz korištenje pH metra.
- (4) Otopina natrijevog klorida: otopi se 2,9 g natrijevog klorida (NaCl) u odmjernoj tikvici od 100 ml s destiliranom vodom i razblaži do oznake.
- (5) Škrob topljivi p.a.

Određivanje vode u topljivom škrobu

Odmjeri se oko 2 g topljivog škroba i u tankom sloju rasporedi na dnu posudice (promjera 5 cm i visine 3 cm) s poklopcem. Vagati s točnošću od $\pm 0,1$ mg i sušiti 90 minuta na temperaturi od 130 °C. Nakon sušenja zatvorenu posudicu hladiti u eksikatoru te poslije jednog sata vagati. Gubitak mase u odnosu na 100 g je količina vode.

Priprema otopine škroba

Odmjeri se količina škroba koja odgovara masi od 2.000 g bezvodnog škroba i izmiješa s 90 ml destilirane vode u konusnoj tikvici od 250 ml. Nastalu suspenziju brzo dovesti do točke ključanja, te neprestano miješati i kuhati 3 minute. Odmah prebaciti otopljeni sadržaj u odmjernu tikvicu od 100 ml, te hladiti pod mlazom vode. Nakon postizanja sobne temperature, otopinu dopuniti destiliranom vodom do oznake i dobro promućkati. Otopina se priprema na dan upotrebe.

Napomena: koristiti otopinu škroba koja generira plavu vrijednost prihvatljive apsorbancije (vidjeti Kalibracija otopine škroba/određivanje plave vrijednosti).

Određivanje**Priprema uzorka za određivanje**

Odmjeri se 10,0 g meda i otopi s oko 15 ml destilirane vode, na hladno, uz dodatak 5 ml acetatnog pufera. Ovako pripremljen sadržaj prebaciti u odmjernu tikvicu od 50 ml u koju smo prethodno otpipetirali 3 ml otopine natrijevog klorida, a zatim dopuniti destiliranom vodom do oznake. Važno je da uzorak bude puferiran prije miješanja s natrijevim kloridom. Otopinu meda pripremiti neposredno prije određivanja jer je stabilna tek nekoliko sati.

Kalibracija otopine škroba/određivanje plave vrijednosti

Postupak kalibracije pomaže nam pri određivanju potrebne količine vode koju treba dodati reakcijskoj smjesi za postizanje intervala apsorbancije otopine jod – škrob od 0,745 – 0,770. U konusnu tikvicu otpipetirati po 20, 21, 22, 23, 24 i 25 ml destilirane vode. Pri izvođenju kalibracije u svaku tikvicu dodati 5 ml razblažene otopine joda, a zatim 0,5 ml smjese koja se sastoji od 10 ml destilirane vode i 5 ml otopine škroba. Dobro izmiješati i odmah odrediti vrijednost apsorbancije mjerenjem na spektrofotometru na valnoj duljini od 660 nm u odnosu na slijepu probu koja je destilirana voda. Količina vode određena na ovaj

način dodaje se u uzorak koji se analizira primjenom ispitane otopine škroba. Ako je postignuta apsorbancija manja od 0,745 pri dodatku 20 ml destilirane vode, ili veća od 0,770 pri dodatku 25 ml destilirane vode, pripremljena otopina škroba nije primjenjiva za određivanje aktivnosti diastaze.

Određivanje apsorbancije

Otpipetirati 10 ml otopine meda u konusnu tikvicu od 50 ml i staviti je u vodenu kupelj na 40 °C, zajedno s još jednom tikvicom koja sadrži 10 ml otopine škroba. Nakon 15 minuta otpipetirati 5 ml otopine škroba u tikvicu s otopinom meda, promiješati i pokreniti štopericu. U periodičnim intervalima, a prvi put nakon 5 minuta, pipetirati 0,5 ml pripremljene alikvote kojoj dodajemo 5 ml razblažene otopine joda. Tome dodajemo prethodno utvrđenu količinu vode, miješamo smjesu i mjerimo vrijednost apsorbancije na spektrofotometru na valnoj duljini od 660 nm u odnosu na slijepu probu (voda), primjenom kiveteta od 1 cm.

Napomena: intervali izdvajanja alikvote iz reakcijske smjese nakon prvog puta moraju se podesiti na takav način da se postignu 3-4 mjerenja unutar intervala apsorbancije 0,456 - 0,155 (linearni raspon).

U sljedećoj tablici dani su preporučeni intervali izdvajanja alikvote iz reakcijske smjese u odnosu na dobivenu vrijednost apsorbancije:

Apsorbancija na t = 5 min	Vremenski interval
$A > 0,658$	više od 10 min
$0,658 > A > 0,523$	5-10 min
$0,523 > A > 0,456$	2-5 min

Ako je apsorbancija nakon t = 5 minuta manja od 0,350*, treba skratiti vrijeme prvog mjerenja.

Potrebno je provjeriti apsorbanciju uzorka bez djelovanja škroba. Pipetirati 10 ml uzorka, dodati 5 ml destilirane vode i temeljito izmiješati. Iz pripremljene smjese otpipetirati 0,5 ml alikvote u konusnu Erlenmayerovu tikvicu, dodati 5 ml razblažene otopine joda te prethodno utvrđenu količinu vode. Sadržaj dobro izmiješati i mjeriti apsorbanciju na spektrofotometru na valnoj duljini od 660 nm, u kivetu od 1 cm. Ukoliko se očita određena vrijednost apsorbancije, istu tu vrijednost treba oduzeti od vrijednosti dobivene tijekom postupka ispitivanja uzorka.

Računanje i izražavanje rezultata

U grafikon se unosi vrijednost apsorbancije kao funkcije vremena (minuta). Kroz najmanje tri posljednje točke povuče se ravna crta kako bi se odredilo vrijeme kad reakcijska smjesa doseže vrijednost apsorbancije od 0,235*. Broj diastaze dobiva se dijeljenjem 300 s vremenom izraženim u minutama. Taj broj izražava aktivnost diastaze kao ml 1%-ne otopine škroba koja je hidrolizirana enzimom u 1 g meda za vrijeme od jednog sata pri 40 °C. Broj diastaze odgovara broju na Gotheovoj ljestvici.

Aktivnost diastaze izražava se kao broj diastaze (DN) koji se računa na sljedeći način:

$$DN = \frac{60 \text{ min}}{t_x} \times \frac{0,10}{0,01} \times \frac{1,0}{2,0} = \frac{300}{t_x}$$

t_x - vrijeme reakcije za koje se postigne apsorbancija $A = 0,235$.

Preciznost postupka

Parametri ponovljivosti (r) i reproducibilnosti (R) određeni su međulaboratorijskim testiranjem u 14 laboratorija Europske unije (4,5) na devet uzoraka meda, pri čemu su dobiveni sljedeći rezultati:

DN	8,7	14,2	16,4	19,5	23,6	24,2	25,5	29,8	37,7
r	0,64	2,15	1,48	0,92	1,20	3,07	1,87	2,06	5,35
R	5,45	9,01	10,40	10,22	12,33	13,93	15,82	15,79	23,68

Iz ovih su podataka dobivene sljedeće korelacijske jednadžbe:

$$r = -0,721 + 0,126 \text{ DN}$$

$$R = -0,0571 + 0,587 \text{ DN}$$

Reference:

1. Aktivnost dijestaze i hidroksimetilfurfurala u medu i njihova korisnost u otkrivanju toplinske adulteracije (J. E. Schade, G. L. Marsh and J. E. Eckert Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat adulteration. Food Research 23, 446-463 (1958).
2. Jednostavna kinetička metoda za određivanje broja dijestaza u medu (H. Hadorn and K. Zürcher: Eine einfache kinetische Methode zur Bestimmung der Diastasezahl in Honig. Deutsche Lebensmittel Rundschau 68, 209-216 (1972).
3. Izvješće o analizi meda (J. W. White and F.W. Pairent: Report on the analysis of honey. J.Assoc.Off.Agric.Chemists, 42, 341-348 (1959)).
4. Određivanje aktivnosti dijestaze (DIN-Norm 10750 Bestimmung der Diastase-Aktivität, (1990)*.
5. Codexov standard za med (Codex Alimentarius Standard for Honey, Ref. Nr. CL 1993/14-SH, FAO and WHO, Rome (1993)).
6. Medulaboratorijsko ispitivanje Međunarodne komisije za med, Phadebas i Schade dijestaze, vlažnost refraktometrijom i aktivnost invertaze (S. Bogdanov and P. Lischer, Interlaboratory trial of the International Honey Commission, Phadebas and Schade Diastase determination methods, Humidity by refractometry and Invertase activity: Report for the participants (1993)).

a2) Metoda po Codexovom standardu za med (odgovara Schadeovoj metodi)

Područje primjene

Ova metoda može se primijeniti na sve uzorke meda.

Princip

Ova metoda temelji se na hidrolizi 1%-ne otopine škroba enzimom iz 1 g meda tijekom jednog sata na temperaturi od 40 °C. Standardna otopina škroba u reakciji s otopinom joda daje intenzivno obojenje. U reakciji enzima i standardne otopine škroba uslijed hidrolize nestaje plava boja joda, čije se nestajanje mjeri u intervalima. Iz odnosa apsorbancije i vremena određuje se t_x - reakcijsko vrijeme nestajanja boje do specifične apsorbancije 0,235. Aktivnost dijestaze izražava se kao broj $300/t_x$. Ova metoda je zasnovana na izvornoj Schadeovoj metodi i drugim (1) i dana je u Codex Alimentariusu.

Aparatura i pribor

Oprema ne smije imati tragove deterđenta!

Uz uobičajenu laboratorijsku opremu, koriste se i:

- (1) odmjerne tikvice volumena 1 litra, 0,5 litre, 0,1 litre
- (2) konusna tikvica volumena 0,250 litre
- (3) plamenik
- (4) vodena kupelj na $40 \pm 0,2$ °C
- (5) spektrofotometar s očitanjem na 660 nm.

Reagensi

- (1) Matične otopine joda: otopi se 8,8 g joda p.a., pomiješa se s 22 g kalijevog jodida i rastvori u 30-40 ml vode, a zatim razblaži do jedne litre.
- (2) Razblažena otopina joda: priprema se u odmjernoj tikvici volumena 500 ml tako što se otopi 20 g K-jodida p.a. u 30-40 ml vode. Zatim se doda 5 ml matične otopine joda i dopuni vodom do oznake.

Otopina joda $c\left(\frac{J_2}{2}, 0,0007 \text{ mol/l}\right)$: u odmjernoj tikvici

- (3) Acetatni pufer- pH 5,3: otopi se 87 g natrijevog 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 to potrebno, pH vrijednost regulira se natrijevim acetatom ili octenom kiselinom do 5,3 uz korištenje pH metra, po potrebi.
- (4) Otopina natrijevog klorida, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$: otopi se 1,45 g natrijevog klorida u prokuhanoj destiliranoj vodi i dopuni do 50 ml. Rok trajanja te otopine je ograničen.
- (5) Škrob topljivi p.a. (npr. iz krumpira)
- (6) Određivanje vode u topljivom škrobu
Odmjeri se oko 2 g topljivog škroba i u tankom sloju rasporedi na dno posudice promjera 5 cm. Suši se sat i pol na temperaturi od 130 °C. Zatim se ohladi u eksikatoru i premjeri. Gubitak mase u odnosu na 100 g jest količina vode.
- (7) Otopina škroba
Odmjeri se količina škroba koja odgovara masi od 2,0 g bezvodnog škroba i izmiješa s 90 ml vode u konusnoj tikvici volumena 250 ml. Odmah se prenese do plamenika preko kojeg je postavljena azbestna mrežica i ostavi da blago kluža 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 od 100 ml i stavi na vodenu kupelj zagrijanu na 40°C. Kad otopina dosegne tu temperaturu, dopuni se vodom do oznake na boci.

Određivanje

Priprema uzorka za određivanje

Uzorak za analizu ne smije se zagrijavati. Odmjeri se 10 g uzorka i prenese u čašu volumena 50 ml, doda 5 ml acetatnog pufera i 20 ml vode kako bi se uzorak otopio i promiješa štapićem. Uzorak se već na hladno potpuno otopi. Zatim se u odmjernu tikvicu volumena 50 ml doda 3 ml otopine natrijevog klorida i rastvorena otopina meda i dopuni vodom do oznake.

Uzorak mora biti puferiziran prije miješanja s natrijevim kloridom.

Priprema standardne otopine

Otopina škroba 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 pripremljene otopine otpipetira se 1 ml i doda u 10 ml $0,0007 \text{ mol/l} \left(\frac{J_2}{2}\right)$ otopine joda, razblaži s 35 ml

vode i izmiješa.

Nastala boja očitava se na 660 nm prema slijepoj probi.

Vrijednost apsorbancije treba biti $0,760 \pm 0,020$. Ako je potrebno, može se dodati određena zapremina vode, tako da se dobije ispravna apsorbancija.

Određivanje apsorbancije

Pipetom se odmjeri 10 ml otopine meda, prenese u gradirani cilindar od 50 ml i stavi u vodenu kupelj na temperaturu od 40 °C $\pm 0,2$ °C, zajedno s posudom u kojoj je otopina škroba. Poslije 15 minuta, pipetom se odmjeri 5 ml otopine škroba i doda u otopinu meda, promiješa i uključi sat. U intervalima od po pet minuta izdvoji se 1 ml alikvota i doda u 10 ml $0,0007 \text{ mol/l}$

$\left(\frac{J_2}{2}\right)$ otopine joda.

Promiješa se i razblaži sa zapreminom vode od 35 ml (Priprema standardne otopine).

Apsorbancija se odmah određuje na 660 nm, nastavi se uzimati alikvota sve dok se apsorbancija ne smanji do vrijednosti od 0,235.

Računanje i izražavanje rezultata

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

Kroz najmanje tri posljednje točke povuče se ravna crta kako bi se odredilo vrijeme kad reakcijska smjesa dosegne vrijednost apsorbancije od 0,235. Podijeli se 300 s vremenom izraženim u minutama kako bi se dobio broj dijastaze (DN). Taj broj izražava aktivnost dijastaze kao ml 1%-ne otopine škroba koja je hidrolizirana enzimom u 1 g meda za vrijeme od jednog sata pri 40 °C. Broj dijastaze odgovara broju na Gotheovoj ljestvici.

Aktivnost dijastaze DN = ml 1%-ne otopine škroba po g meda/h pri temperaturi od 40 °C

$$\text{broj dijastaze (DN)} = \frac{60}{t} \times \frac{0,10}{0,01} \times \frac{1,0}{2} = \frac{300}{t}$$

gdje je: t - redukcija u minutama.

Reference:

Codex standard for honey(AOAC 958.09)

b) Metoda po Codexovom standardu za med i IHC-u (Određivanje aktivnosti dijastaze po Phadebasu) Područje primjene

Ova metoda može se primijeniti na sve uzorke meda.

Definicija

Jedinica aktivnosti dijastaze, jedinica Gothe, definira se kao količina enzima koja će pretvoriti 0.01 grama škroba na propisanu krajnju točku za jedan sat na 40 °C pod testnim uvjetima. Rezultati se izražavaju u jedinicama Gothe (ili jedinicama Schade) po gramu meda.

Princip

Određivanje dijastatske aktivnosti meda je fotometrijska metoda po kojoj se netopljiva plavo obojena umrežena vrsta škroba koristi kao supstrat. Hidrolizira ga enzim dajući plave fragmente koji su topivi u vodi i koji se određuju fotometrijski na 620 nm. Apsorbancija otopine je izravno proporcionalna dijastatskoj aktivnosti uzorka. Metoda se zasniva na prvotno objavljenoj Siegenthalerovoj metodi (1) i izmijenjenoj po Bogdanovu (2).

Reagensi

- (1) Tablete Phadebas, Pharmacia Diagnostics
- (2) Natrijev hidroksid 0,5M
- (3) Acetatni pufer (0,1M, pH 5.2): otopiti 13.6 g natrij-acetat-trihidrata u vodi. Podesiti pH otopine do 5.2 s ledenom octenom kiselinom (1 - 2 ml) i razblažiti vodom do 1 L.

Oprema

- (1) Fotometar/spektrofotometar
- (2) Vortex
- (3) Termostatska vodena kupelj
- (4) Štoperica.

Postupak

Priprema testnih uzoraka

Određivanje

Odmjeriti 1.00 g meda u odmjernu tikvicu od 100 ml, otopiti u acetatnom puferu i dopuniti do oznake. Dovršiti postupak u roku od jednog sata. Prebaciti 5.0 ml otopine u testnu epruvetu i postaviti u vodenu kupelj na 40 °C. Pripremiti slijepu probu postavljanjem 5.0 ml alikvotne acetatnog pufera u drugu testnu epruvetu koja se tretira isto kao otopina uzorka.

U obje otopine dodati tablete Phadebas pomoću pinceta i uključiti štopericu. Izmiješati otopine na Vortexu dok se tablete ne raspadnu (oko 10 sekundi) i vratiti ih u vodenu kupelj.

Prekinuti reakciju nakon točno 30 minuta dodavanjem 1 ml otopine natrijevog hidroksida. Ponovno izmiješati smjesu na Vortexu približno 5 sekundi. Odmah filtrirati otopine kroz filter-papire i izmjeriti apsorbanciju u kivetama od 1 cm na 620 nm pomoću vode kao reference. Apsorbancija slijepa probe se oduzima iz otopine uzorka (ΔA_{620}). Ako je apsorbancija veća od 1.0, razblažiti uzorak vodom. Uzeti u obzir faktor razblaženja prilikom računanja rezultata.

Računanje i izražavanje rezultata

Klasična metoda za određivanje dijastatske aktivnosti meda je Schadeova metoda (3,4).

Dijastatska aktivnost izražava se kao broj dijastaze (DN) u jedinicama Schade i definira se kako slijedi: jedna dijastatska jedinica odgovara enzimskoj aktivnosti od 1 g meda, koji može hidrolizirati 0.01 g škroba za jedan sat na 40 °C.

Izvedena su istovremena mjerenja po Phadebasovim i Schadeovim metodama na 57 različitih uzoraka meda koji pokrivaju raspon dijastatske aktivnosti od 8 do 40.

Postoji veoma dobar odnos ($r=0.987$) između dva mjerenja. Linearna regresija y (DN) naspram x (ΔA_{620}) dovela je do sljedećeg odnosa:

$$DN = 28.2 \times \Delta A_{620} + 2.64$$

gdje su 28.2 i 2.64 redom navedeni nagib (slope) i presjek (intercept) najbolje ravne crte dobivene pomoću linearne regresije ΔA_{620} (x osa) na DN (y osi).

Za niske dijastatske vrijednosti (između 0 i 6 DN) vrlo dobar odnos ($R^2 = 0,927$) sa sljedećom linearnom regresijom y (DN) naspram x (ΔA_{620}) dala je sljedeći odnos:

$$DN = 35.2 \times \Delta A_{620} - 0.46$$

gdje su 35.2 i 0.46 redom navedeni nagib i presjek najbolje ravne crte dobivene pomoću linearne regresije ΔA_{620} (x osa) na DN (y osi).

Ovu jednadžbu treba koristiti za određivanje dijastatske aktivnosti do 8 dijastatskih jedinica.

Preciznost

- Podaci o preciznosti utvrđeni u međulaboratorijskoj poredbi laboratorija u Švicarskoj (5):
 - Tri različite vrste meda bile su testirane u tri laboratorija. Maksimalno odstupanje (raspon) DN utvrđeno s tabletama iz iste serije, između laboratorija, bilo je 3,7%.
 - Standardno odstupanje dijastatske aktivnosti utvrđene s tabletama iz dvije različite serije s istim medom, u jednom laboratoriju, bilo je 3,7 % (za n=24, n što je broj analiza po seriji).
 - Raspon težine, za uzorak od 20 tableta, bio je 5%, sa standardnim odstupanjem od 2%.

Međulaboratorijsko ispitivanje provela je 1992. Međunarodna komisija za med s 14 laboratorija Europske unije i 21 švicarskim laboratorijem korištenjem Phadebasove metode sa sedam medova čije su vrijednosti A_{620} varirale od 0,31 do 1,29 (6). Nisu bile naznačene serije reagensa Phadebas.

Dobivene su sljedeće vrijednosti ponovljivosti (r) i reproducibilnosti (R):

A-620	0,212	0,314	0,414	0,588	0,704	0,705	0,734	0,970	1,294
r	0,034	0,032	0,032	0,042	0,049	0,043	0,050	0,065	0,060
R	0,107	0,134	0,161	0,202	0,273	0,311	0,250	0,336	0,428

gdje je A-620 vrijednost apsorbancije.

Iz ovih podataka izračunate su sljedeće korelacijske jednadžbe:

$$r = 0.02 + 0.03 \times A_{620}$$

$$R = 0.04 + 0.32 \times A_{620}$$

Reference:

1. Određivanje amilaze u medu s komercijalno dostupnim supstratom označenim bojom, (U. Siegenthaler, Mitt Geb. Lebensm. Hyg 66, 393-399 (1975).
2. Usporedba različitih metoda određivanja, (S. Bogdanov, Honig diastase, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 75, 214-220 (1984)
3. Aktivnost diastaze i hidrosimetilfurfurala u medu i njihova korisnost u otkrivanju toplinske adulteracije. (J. E. Schade, G. L. Marsh i J. E. Eckert: Food Research 23, 446-463 (1958).
4. Određivanje aktivnosti diastaze. (DIN-NORM 10750(1990).
5. Određivanje amiloaktivnosti (prema Phadebasu), Švicarska knjiga hrane Poglavlje 23: Med, EDMZ, Bern, (1995).
6. Međulaboratorijsko ispitivanje Međunarodne komisije za med: Metode određivanja diastaze po Phadebasu i Schadeu, Vlažnost refraktometrijom i aktivnost invertaze: Izvješće za sudionike (S. Bogdanov i P. Lischer, Interlaboratory trial of the International Honey Commission, Phadebas and Schade Diastase determination methods, Humidity by refractometry and Invertase activity: Report for the participants (1993)).
7. Znanstvena napomena o Phadebasovoj metodi za mase s niskim sadržajem enzima. (L. Persano Oddo, P. Pulcini, Apidologie 30, 347-348 (1999).

Preuzeto iz metoda Međunarodne komisije za med (Harmonized methods of the International Honey Commission, 2009)".

Članak 4.

U Odjelku J. Određivanje hidrosimetilfurfurola dosadašnja točka **a)** mijenja se i glasi: "**a) Određivanje hidrosimetilfurfurola (HMF) metodom HPLC-a (High Performance Liquid Chromatography)**", a dosadašnje toč. **a)** i **b)** postaju toč. **b)** i **c)**.

Određivanje hidrosimetilfurfurola (HMF) metodom HPLC-a (High Performance Liquid Chromatography) **Područje primjene**

Metoda se može primijeniti na sve uzorke meda. Potrebno je manje uzorka kada je koncentracija HMF-a vrlo visoka.

Sadržaj

Metodom se određuju koncentracije 5-(hidrosimetil) furan-2-karbaldehida. Rezultat se obično izražava u miligramu po kilogramu.

Princip

HMF se odredi u bistroj filtriranoj vodenoj otopini meda korištenjem reverzne faze HPLC-a s UV detekcijom. Signal se uspoređuje s onima iz uzorka standarda poznate koncentracije.

Reagensi

Mobilna faza: voda-metanol (90:10, v/v), HPLC čistoće.

Standardna otopina: 5-(hidrosimetil) furan-2-karbaldehid (HMF), (npr. Merck br. 820 678 ili Fluka br. 55690). Od osnovne otopine HMF-a pripremiti kalibracijske otopine 1, 2, 5 i 10 mg/L vodene otopine. Otopine treba pripremiti na dan korištenja.

Određivanje sadržaja u standardu HMF-a: A apsorbancija pripremljene standardne otopine određena je pomoću UV spektrofotometra na 285 nm u 1 cm kvadratnim kivetama s vodom u praznoj ćeliji. Koncentracije standarda otopine mogu se izračunati iz literaturnih vrijednosti za molaru apsorpciju, $\epsilon = 16830$ ili apsorpciju, $a_{1\text{cm}1\%} = 133.57$ (3).

koncentracija u mg/L = $\frac{A}{1 \times 133.57} \times 1,000$, gdje je A apsorbancija standardne otopine.

Izračunati sadržaj mora odgovarati specifikacijama dobavljača. Standard se mora čuvati na 4 - 8 °C. Standard HMF-a je izuzetno higroskopan.

Preporuka: najbolje je standard HMF-a čuvati pod dušikom.

Aparatura i pribor

- Tekući kromatograf (HPLC) s UV detektorom i integratorom
- Stupac: bilo koji s RP C18-reverznom fazom materijala, npr. Hypersil ODS 5 μm , 125 mm x 4 mm ili 250 mm x 4 mm
- Membranski filter, 0,45 μm (npr. Dynagard).

Postupak

Precizno izmjeriti oko 10 g pripremljenog uzorka meda u posudu od 50 ml. Otopiti uzorak u oko 25 ml vode i kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 50 ml. Razrijediti vodom do 50 ml. Filtrirati uzorak kroz membranski filter od 0,45 μm kako bi se dobila otopina uzorka spremna za kromatografiju.

Uvjeti kromatografiranja:

- brzina protoka 1,0 ml/min
- volumen injektiranja 20 μL uzorka ili standardne otopine
- detekcija UV 285 nm; raspon: 0,2 AUFS.

Način računanja:

Sadržaj HMF-a u uzorku izračunava se usporedbom pika iz uzoraka i standardnih otopina, uzimajući u obzir razrjeđivanje. Postoji linearni odnos između koncentracije i površine pika HMF-a. Rezultati se izražavaju u mg/kg, na jedno decimalno mjesto.

Preciznost metode odredila je Međunarodna komisija za med. Ponovljivost (r) i reproducibilnost (R) izračunati su iz rezultata tri vrste meda analiziranog u svim laboratorijima koji su sudjelovali u poredbenim testiranjima, što je prikazano u sljedećoj tablici.

Broj uzorka	HMF mg/kg	r	R
1	5,2	0,4	1,6
2	22,8	1,2	4,9
3	42,3	2,1	7,3

Na niskim koncentracijama HMF-a (oko 5 mg/kg) vrijednosti dobivene ovom metodom su usporedive s onima dobivene Whiteovom metodom, ali su niže od onih dobivenih metodom p-toluidina. Na višim koncentracijama HMF-a (20 i 40 mg/kg) vrijednosti sve tri metode nemaju značajne međusobne razlike.

Napomena

Za furfural, koji se nalazi samo u vrlo malim količinama u usporedbi s HMF-om, može se koristiti ista metoda. Furfural eluira oko 1,5 minuta nakon HMF-a.

Reference:

1. Visoko učinkovita tekuća kromatografija furfurala i hidrosimetilfurfurala u alkoholu i medu. (J. Jeuring i F. Kuppers, J. Ass. Chem. 63, 1215 (1980).
2. Određivanje hidrosimetilfurfurala pomoću HPLC-a, (Swiss Food Manual, Kapitel Honig, Eidg. Druck und Material Zentrale (1995).
3. Spektrofotometrijska metoda za određivanje hidrosimetilfurfurala u medu, (J. White, J. Ass Off. Chem. 62, 509 (1979).
4. Izvješće o međulaboratorijskom ispitivanju HMF-a Međunarodne komisije za med, Basel, V. Figueiredo, (1991)".

U točki b) **Određivanje hidrosimetilfurfurola na dvije valne duljine (Whiteova metoda)** u pododjeljku Rezultati formula: „ $149,7 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 1000}{16830 \cdot 10 \cdot 5} = \text{faktor}$ “ mijenja se i glasi:

„ $149,7 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 1000}{16830 \cdot 10 \cdot 5} = \text{faktor}$ “.

Preuzeto iz metoda Međunarodne komisije za med (Harmonized methods of the International Honey Commission, 2009)".

Članak 5.

(Usklađenost sa propisima EU)

Ovim pravilnikom preuzimaju se odredbe članka 4. stavak 1. Direktive Vijeća 2001/110/EZ od prosinca 2001. o među i odredbe Direktive 2014/63/EU Evropskog parlamenta i Vijeća od 15. svibnja 2014. godine.

Članak 6.

(Stupanje na snagu)

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

VM broj 175/19
12. studenoga 2019. godine
Sarajevo

Predsjedatelj
Vijeća ministara BiH
Dr. **Denis Zvizdić**, v. r.