

"(2) **Za utvrđivanje uskladenosti kvaliteta meda i drugih pčelinjih proizvoda s propisanim zahtjevima kvaliteta priznaju se i sve druge međunarodno priznate akreditirane metode.**"

Član 2.

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

Tačke i) i j) mijenjaju se i glase:

:"i) određivanje aktivnosti diastaze^{1,2}"

"j) određivanje hidrosimetilfurfurola HMF(HPLC metoda², fotometrijska metoda po Winkleru² i metodama na dvije talasne dužine po Whiteu²)¹"

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

U Poglavlju II. Metode fizičkih, hemijskih i bioloških analiza kojima se vrši kontrola meda i drugih pčelinjih proizvoda, u Odjeljku C. Određivanje reduciranih šećera pod tačkom b) "Metoda volumetrijski po Luff-Schoorlu" u dijelu Reagensi stav (9) mijenja se i glasi: "**Carrez rastvor (II): rastvoriti 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 stav (5) mijenja se i glasi: "**0,2%-tni rastvor metilenplavog(2g/l)**".

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

"Odjeljak D1. Određivanje šećera

a) metoda HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Oblast 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 kao što je opisano u izvorno objavljenoj metodi Bogdanov i Baumann.

Definicije

Udio svakog od šećera definiran je kao onaj izračunat iz formule date u metodi (1).

Princip

Ova metoda zasniva se na izvorno objavljenoj metodi Bogdanov i Baumann (1).

Nakon filtracije rastvora sadržaj šećera određuje se pomoću HPLC s RI detektorom. Pikovi šećera identificiraju se na osnovu vremena zadržavanja (retencije). Kvantifikacija se vrši metodom eksternog standarda određivanjem površine ili visine pika.

Reagensi

Ako nije navedeno drugačije, potrebno je koristiti reagentne analitičke čistoće. Mora se koristiti destilirana voda ili drugi ekvivalentni analitičke čistoće.

- Metanol, HPLC čistoće
- Acetonitril, HPLC čistoće

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

Standardne supstance: 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.

"EI"

Na osnovu člana 17. stav 2. i člana 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 saradnji s nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, na 178. sjednici, održanoj 12. novembra 2019. godine, donijelo je

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

Član 1.

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

Pipetirati 25 mL metanola u kalibracione tikvice od 100 mL. U zavisnosti od šećera koji se analizira rastvoriti odvagu kako je opisano dolje u oko 40 mL vode i kvantitativno prenijeti u tikvicu, promiješati i dopuniti vodom do oznake.

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

Uz pomoć šprice preko membranskog filtera prenijeti uzorke u označene vialice.

Rastvori standarda stabilni su četiri sedmice u frižideru na 4 °C ili šest mjeseci na -18 °C.

Pribor i oprema

- Vialice za uzorke
- Ultrasonično kupatilo
- Kalibrirani sudovi od 100 mL
- Pipete od 25 mL
- Membranski filteri za vodene rastvore, veličina pora 0,45 μm
- Odgovarajuća šprica s adapterom za membranske filtere
- HPLC uređaj s pumpom, odgovarajućim injektorom, RI-detektor termostiran na 30 ° C, termički regulirana peć na koloni na 30 ° C, integrator
- HPLC kolona, npr. 4.6 mm dijametar, 250 mm dužina, punjena aminomodificiranim silika- gelom veličine čestica 5-7 μm.

Prije upotrebe HPLC kolone uraditi test prikladnosti (system suitability test) da bi se utvrdila separacija svih šećera.

Napomena: Hromatografiranje se može vršiti na sobnoj temperaturi bez značajnog uticaja na rezultate osim erloze i melecitoze.

Postupak

Priprema uzorka

Ako je potrebno, pripremiti med prema poglavlju o uzorkovanju i općim metodama u skladu s harmoniziranom metodom Međunarodne komisije za med.

Odvagati 5 g meda u čašu i rastvoriti u 40 ml vode. U normalni sud od 100 ml pipetirati 25 ml metanola a zatim kvantitativno dodati vodeni rastvor 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 rastvore standarda.

HPLC uslovi

Ako se upotrijebi prethodno opisana hromatografska kolona, onda se zadovoljavajući rezultati mogu očekivati u sljedećim uslovima: protok mobilne faze 1.3 ml/min; mobilna faza acetonitril; voda (80:20 v/v); temperatura kolone i detektora 30°C; volumen injektiranja 10 μl.

Napomena 1: Ako nije moguće hromatografiranje provesti s temperaturom kolone i detektora na 30°C, onda se može raditi u ambijentalnim uslovima. U ovim uslovima separacija melecitoze i erloze neće biti uspješna.

Napomena 2: Treba se injektirati istovjetni volumen uzorka i standardnog rastvora.

Proračun i izražavanje rezultata

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

Maseni procenat određivanja 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 rastvora standarda; A_2 = površina ili visina pika šećera iz rastvora uzorka; V_1 = Ukupni volumen rastvora uzorka (ml); V_2 = Ukupni volumen rastvora standarda (ml); m_1 = masa šećera (g) u ukupnom

volumenu rastvora 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 izračunati su na tri vrste uzorka meda kod svih laboratorija učesnica u testiranju.

Reference:

1. Određivanje šećera meda s HPLC (S. Bogdanov, S. E. Baumann, Bestimmung von Honigzucker mit HPLC. Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg., 79, 198-206. (1988)
2. Određivanje sadržaja saharida. HPLC metoda. (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)".

Član 3.

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

"Odjeljak I. Određivanje aktivnosti dijastaze

a1) Metoda po IHC-u (odgovara metodi Schade)

Oblast primjene

Ova metoda može se primijeniti na sve uzorke meda.

Definicije

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

Princip

Ova metoda zasniva se na hidrolizi 1%-nog rastvora škroba enzimom iz 1 g meda u toku jednog sata na temperaturi od 40 °C. Standardni rastvor škroba u reakciji s rastvorom joda daje intenzivno obojenje. U reakciji enzima i standardnog rastvora škroba usljed hidrolize nastaje plava boja joda čije se nestajanje mjeri u intervalima. Iz odnosa apsorbance i vremena određuje se t_x – reakciono vrijeme nestajanja boje do specifične apsorbance čija

je vrijednost $0,235^*$. Aktivnost dijestaze izražava se kao broj $300/t_x$.

Ova metoda bazirana je na originalnoj metodi Schade (1), modificiranoj po Hadorn i Zürcher (2) te White i Parent (3) metodi, i data je u Codexu Alimentariusu.

Aparatura i pribor

Oprema ne smije imati tragove deterdženta!

Pored uobičajene laboratorijske opreme upotrebljavaju se i:

- (1) odmjerne tikvice zapremine od 50, 100 i 500 ml;
- (2) konusna tikvica zapremine 250 ml;
- (3) plamenik;
- (4) vodeno kupatilo na $40,0 \pm 0,2$ °C;
- (5) štoperica;
- (6) kivet od 1 cm;
- (7) spektrofotometar sa očitanjem na 660 nm.

Reagensi

- (1) Matični rastvor joda: rastvori se 11,0 g joda p.a. pomiješa sa 22,0 g kalijevog jodida i rastvori u 30 do 40 ml destilirane vode, a zatim razblaži do 500 ml.
Pripremljen rastvor čuvati u zatvorenoj, tamnoj boci, najduže oko godinu dana.
- (2) Razblaženi rastvor joda: priprema se u odmjerne tikvici zapremine 500 ml tako što se rastvori 20,0 g kalijevog jodida p.a. u destiliranoj vodi, uz dodatak 2 ml matičnog rastvora joda nakon čega se dopuni vodom do oznake.
Razblaženi rastvor joda priprema se na dan upotrebe i treba ga čuvati od uticaja zraka, zatvarajući tikvicu odmah nakon upotrebe.
- (3) Acetati pufer - pH 5,3: rastvoriti 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 sirćetne kiseline radi podešavanja pH vrijednosti, a zatim vodom dopuniti do 250 ml. Ako je potrebno, pH vrijednost podesiti s natrijevim acetatom ili sirćetnom kiselinom uz korištenje pH metra.
- (4) Rastvor natrijevog hlorida: rastvori se 2,9 g natrijevog hlorida (NaCl) u odmjerne tikvici od 100 ml s destiliranom vodom i razblaži do oznake.
- (5) Škrob rastvorljivi p.a.

Određivanje vode u rastvorljivom škrobu

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

Priprema rastvora škroba

Odmjeri se količina škroba koja odgovara masi od 2,000 g bezvodnog škroba i izmiješa sa 90 ml destilirane vode u konusnoj tikvici od 250 ml. Nastalu suspenziju brzo dovesti do tačke ključanja, te neprestano miješati i kuhati tri minute. Odmah prebaciti rastvoreni sadržaj u odmjernu tikvicu od 100 ml, te hladiti pod mlazom vode. Nakon postizanja sobne temperature, rastvor dopuniti destiliranom vodom do oznake i dobro promućkati. Rastvor se priprema na dan upotrebe.

Napomena: Koristiti rastvor škroba koji generira plavu vrijednost prihvatljive apsorbance (vidjeti: Kalibracija rastvora škroba/Određivanje plave vrijednosti).

Određivanje

Priprema uzorka za određivanje

Odmjeri se 10,0 g meda i rastvori sa 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 rastvora natrijevog hlorida, a

zatim dopuniti destiliranom vodom do oznake. Važno je da uzorak bude puferovan prije miješanja s natrijevim hloridom. Rastvor meda pripremiti neposredno prije određivanja jer je stabilan tek nekoliko sati.

Kalibracija rastvora škroba/Određivanje plave vrijednosti

Postupak kalibracije pomaže nam pri određivanju potrebne količine vode koju treba dodati reakcionoj smjesi da bi se postigao interval apsorbance rastvora jod - škrob od 0,745 do 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 razblaženog rastvora joda, a zatim 0,5 ml smjese koja se sastoji od 10 ml destilirane vode i 5 ml rastvora škroba. Dobro izmiješati i odmah odrediti vrijednost apsorbance mjerenjem na spektrofotometru na talasnoj dužini 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 ispitnog rastvora škroba. Ako je postignuta apsorbance manja od 0,745 pri dodatku 20 ml destilirane vode, ili veća od 0,770 pri dodatku 25 ml destilirane vode, pripremljeni rastvor škroba nije primjenjiv za određivanje aktivnosti dijestaze.

Određivanje apsorbance

Otpipetirati 10 ml rastvora meda u konusnu tikvicu od 50 ml i staviti je u vodeno kupatilo na 40 °C, zajedno s još jednom tikvicom koja sadrži 10 ml rastvora škroba. Nakon 15 minuta otpipetirati 5 ml rastvora škroba u tikvicu s rastvorom meda, promiješati i pokreniti štopericu. U periodičnim intervalima, a prvi put nakon pet minuta, pipetirati 0,5 ml pripremljenog alikvota kojem dodajemo 5 ml razblaženog rastvora joda. Tome dodajemo prethodno utvrđenu količinu vode, miješamo smjesu i mjerimo vrijednost apsorbance na spektrofotometru na talasnoj dužini od 660 nm u odnosu na slijepu probu (voda), primjenom kiveta od 1 cm.

Napomena: Intervali izdvajanja alikvota iz reakcione smjese nakon prvog puta moraju se podesiti na takav način da se postignu 3-4 mjerenja unutar intervala apsorbance 0,456 - 0,155 (linearni raspon).

Slijedeća tabela daje preporučene intervale izdvajanja alikvota iz reakcione smjese u odnosu na dobivenu vrijednost apsorbance:

Apsorbance 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 apsorbance nakon $t = 5$ minuta manja od $0,350^*$, potrebno je skratiti vrijeme prvog mjerenja.

Potrebno je izvršiti provjeru apsorbance uzorka bez djelovanja škroba. Pipetirati 10 ml uzorka, dodati 5 ml destilirane vode i temeljito izmiješati. Od pripremljene smjese otpipetirati 0,5 ml alikvota u konusnu erlenmajericu, dodati 5 ml razblaženog rastvora joda te prethodno utvrđenu količinu vode. Sadržaj dobro izmiješati i mjeriti apsorbancu na spektrofotometru na talasnoj dužini od 660 nm, u kivetu od 1 cm. Ako se očita određena vrijednost apsorbance, potrebno je tu istu vrijednost oduzeti od vrijednosti dobivene tokom procesa ispitivanja uzorka.

Izračunavanje i izražavanje rezultata

U grafikon se unosi vrijednost apsorbance kao funkcije vremena (minuta). Kroz najmanje tri posljednje tačke povuče se prava linija da bi se odredilo vrijeme kad reakciona smjesa dostiže vrijednost apsorbance od $0,235^*$. Broj dijestaze dobiva se dijeljenjem 300 s vremenom izraženim u minutama. Taj broj izražava aktivnost dijestaze kao ml 1%-nog rastvora škroba koji je hidroliziran enzimom u 1 g meda za vrijeme od jednog sata pri 40 °C. Broj dijestaze odgovara broju na Gothe skali.

Aktivnost dijestaze se izražava kao broj dijestaze (DN) koji se računa kao:

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

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

Preciznost postupka

Parametri ponovljivosti (r) i reproducibilnosti (R) određeni su u međulaboratorijskom testiranju u 14 laboratorija Evropske 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 podataka dobivene su sljedeće korelacione jednačine:

$$r = -0,721 + 0,126 DN$$

$$R = -0,0571 + 0,587 DN$$

Reference:

1. Aktivnost dijestaze i hidrosimetilfurfural u medu i njihova korisnost u otkrivanju toplotne 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. Izvještaj o analizi meda (J. W. White and F. W. Parent: 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. Kodeksov standard za med (Codex Alimentarius Standard for Honey, Ref. Nr. CL 1993/14-SH, FAO and WHO, Rome (1993)).
6. Međulaboratorijsko 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 Kodeksovom standardu za med (odgovara metodi Schade)

Oblast primjene

Ova metoda može se primijeniti na sve uzorke meda.

Princip

Ova metoda zasniva se na hidrolizi 1%-nog rastvora škroba enzimom iz 1 g meda u toku jednog sata na temperaturi od 40 °C. Standardni rastvor škroba u reakciji s rastvorom joda daje intenzivno obojenje. U reakciji enzima i standardnog rastvora škroba uslijed hidrolize nestaje plava boja joda čije se nestajanje mjeri u intervalima. Iz odnosa apsorbancije i vremena određuje se t_x - reakciono vrijeme nestajanja boje do specifične apsorbancije 0,235. Aktivnost dijestaze izražava se kao broj $300/t_x$. Ova metoda bazirana je na originalnoj metodi Schade i drugi (1) i data je u Codexu Alimentariusu.

Aparatura i pribor

Oprema ne smije imati tragove deterđenta!

Pored uobičajene laboratorijske opreme, upotrebljavaju se i:

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

Reagensi

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

Rastvor joda $c(\frac{J_2}{2})$ 0,0007 mol/l) : u odmjerne tikvici

- (3) Acetatni pufer- pH 5,3: rastvori se 87 g natrijevog acetata ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) u 400 ml vode, doda oko 10,5 ml ledene sirćetne kiseline i dopuni vodom do 500 ml. Ako je to potrebno, pH vrijednost regulira se natrijevim acetatom ili sirćetnom kiselinom do 5,3 uz korištenje pH metra, po potrebi.
- (4) Rastvor natrijevog hlorida, $c(NaCl) = 0,5$ mol/l: rastvori se 1,45 g natrijevog hlorida u prokuhanoj destiliranoj vodi i dopuni do 50 ml. Rok trajanja tog rastvora je ograničen.
- (5) Škrob rastvorljivi p.a. (npr. iz krompira)
- (6) Određivanje vode u rastvorljivom škrobu
Odmjeri se oko 2 g rastvorljivog škroba i u tankom sloju rasporedi na dno posudice promjera 5 cm. Suši se sat i po na temperaturi od 130 °C. Zatim se ohladi u eksikatoru i premjeri. Gubitak mase u odnosu na 100g jeste količina vode.
- (7) Rastvor škroba
Odmjeri se količina škroba koja odgovara masi od 2,0 g bezvodnog škroba i izmiješa sa 90 ml vode u konusnoj tikvici zapremine 250 ml. Odmah se prenese do plamenika preko kojeg je postavljena azbestna mrežica i ostavi da blago ključa tri minute. Potom se rastvor skloni s plamenika, pokrije i ostavi da se postepeno ohladi do sobne temperature. Rastvor se zatim prenese u odmjernu bocu od 100 ml i stavi na vodeno kupatilo zagrijano na 40°C. Kad rastvor dostigne tu temperaturu, dopuni se vodom do oznake na boci.

Određivanje

Pripremanje uzorka za određivanje

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

Uzorak mora biti puferiziran prije miješanja s natrijevim hloridom.

Pripremanje standardnog rastvora

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

doda u 10 ml 0,0007 mol/l $(\frac{J_2}{2})$ rastvora joda, razblaži sa 35

ml vode i izmiješa.

Nastala boja očitava se na 660 nm prema slijepoj probi.

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

Одређивање апсорбације

Pipetom se odmjeri 10 ml rastvora meda, prenese u gradirani cilindar od 50 ml i stavi u vodeno kupatilo na temperaturi od $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$, zajedno s posudom u kojoj je rastvor škroba. Poslije 15 minuta, pipetom se odmjeri 5 ml rastvora škroba i doda u rastvor meda, promiješa i uključi sat. U intervalima od po pet minuta izdvoji se 1 ml alikvota i doda u 10 ml 0,0007

$\text{mol/l} \left(\frac{J_2}{2} \right)$ rastvora joda.

Promiješa se i razblaži sa zapreminom vode od 35 ml (Pripremanje standardnog rastvora).

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

Izračunavanje i izražavanje rezultata

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

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

Aktivnost dijastaze DN = ml 1%-nog rastvora škroba po g meda/h pri temperature od $40 \text{ }^\circ\text{C}$

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

gdje je: t- redukcija u minutama.

Reference:

Codex standard for honey (AOAC 958.09)

b) Metoda po Kodeksovom standardu za med i IHC-u (Određivanje aktivnosti dijastaze sa Phadebas)

Oblast primjene

Ova metoda može se primijeniti na sve uzorke meda.

Definicija

Jedinica aktivnosti dijastaze, Gothe jedinica, definira se kao količina enzima koja će pretvoriti 0,01 grama škroba na propisanu krajnju tačku za jedan sat na $40 \text{ }^\circ\text{C}$ pod testnim uslovima. Rezultati se izražavaju u Gothe jedinicama (ili Schade jedinicama) po gramu meda.

Princip

Određivanje dijastatske aktivnosti meda je fotometrijska metoda po kojoj se nerastvorljiva 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 rastvora je direktno proporcionalna dijastatskoj aktivnosti uzorka. Metoda se zasniva na prvobitno objavljenoj Siegenthalerovoj (1) metodi i izmijenjenoj po Bogdanovu (2).

Reagensi

- (1) Phadebas tablete, Pharmacia Diagnostics;
- (2) Natrijev hidroksid 0.5M.
- (3) Acetatni pufer (0.1M, pH 5.2): Rastvoriti 13,6 g natrijevog acetat trihidrata u vodi. Podesiti pH rastvora do 5.2 s glacijalnom sirćetnom kiselinom (1 - 2 ml) i razblažiti do 1L s vodom.

Oprema

- (1) fotometar/spektrofotometar
- (2) Vortex

(3) Termostatsko vodeno kupatilo

(4) Štoperica

Procedura

Priprema testnog uzoraka

Određivanje

Odmjeriti 1.00 g meda u odmjernu tikvicu od 100 ml, rastvoriti u acetatnom puferu i dopuniti do oznake. Dovršiti proceduru u roku od jednog sata. Prebaciti 5.0 ml rastvora u testnu epruvetu i postaviti u vodeno kupatilo na $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Pripremiti slijepu probu postavljanjem 5.0 ml alikvota acetat pufera u drugu testnu epruvetu koja se tretira isto kao rastvor uzorka.

U oba rastvora dodati Phadebas tablete pomoću pinceta i uključiti štopericu. Izmiješati rastvore na Vortexu dok se tablete ne raspadnu (oko 10 sekundi) i vratiti ih u vodeno kupatilo.

Prekinuti reakciju nakon tačno 30 minuta dodavanjem 1 ml rastvora natrijevog hidroksida. Ponovo smjesu izmiješati na Vortexu približno pet sekundi. Odmah filtrirati rastvore kroz filter papire i izmjeriti apsorbanciju u kivetama od 1 cm na 620 nm pomoću vode kao reference. Apsorbancija slijepa probe oduzima se iz rastvora uzorka ($\Delta A 620$). Ako je apsorbancija veća od 1.0, razblažiti uzorak s 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 Schade jedinicama 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 $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Izvedena su istovremena mjerenja po metodama Phadebas i Schade 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 ($\Delta A 620$) dovela je do sljedećeg odnosa:

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

gdje su 28.2 i 2.64 redom navedeni nagib (slope) i presjek (intercept) najbolje prave linije dobijene pomoću linearne regresije $\Delta A 620$ (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 ($\Delta A 620$) dala je sljedeći odnos:

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

gdje su 35.2 i 0.46 redom navedeni nagib i presjek najbolje prave linije dobivene pomoću linearne regresije $\Delta A 620$ (x osa) na DN (y osi).

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

Preciznost

- Podaci o preciznosti utvrđeni u međulaboratorijskom poređenju laboratorija u Švicarskoj (5):
 - Tri različite vrste meda bile su testirane u tri laboratorije. 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 sa istim medom, u jednoj laboratoriji, 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 Međunarodna komisija za med 1992. s 14 laboratorija Evropske unije i 21 švicarskom laboratorijom primjenom 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.

Od ovih podataka izračunate su sljedeće korelacione jednačine:

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

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

Reference

1. Određivanje amilaze u medu s komercijalno dostupnim supstratom označenim bojom, (U. Siegenthaler, Mitt Geb. Lebensm. Hyg 66, 393-399 (1975))
2. Poređenje različitih metoda određivanja (S. Bogdanov, Honig diastase, Mitt.Gebiete Lebensm. Hyg. 75, 214-220 (1984))
3. Aktivnost diastaze i hidroksimetilfurfural u medu i njihova korisnost u otkrivanju toplotne 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 Phadebas i Schade diastaze, Vlažnost refraktometrijom i aktivnost invertaze: Izvještaj za učesnike (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. Naučna 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)".

Član 4.

U Odjeljku J. Određivanje hidroksimetilfurfurola, dosadašnja tačka "a)" mijenja se i glasi: "a) **Određivanje hidroksimetilfurfurola (HMF) metodom HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**" , a dosadašnje tač. "a) i b)" postaju tačke "b) i c)".

"**Određivanje hidroksimetilfurfurola (HMF) metodom HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**"

Oblast primjene

Metoda se može primijeniti na sve uzorke meda. Manje uzorka je potrebno kada je koncentracija HMF vrlo visoka.

Sadržaj

Metodom se određuje koncentracije 5- (hidroksimetil) furan-2-karbaldehida. Rezultat se obično izražava u miligramima po kilogramu.

Princip

HMF se odredi u bistroj, filtriranoj, vodenom rastvoru meda upotrebom HPLC reverzne faze s UV detekcijom. Signal se upoređuje s onima iz uzoraka standarda poznate koncentracije

Reagensi

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

Standardni rastvor: 5-(hidroksimetil) furan-2-karbaldehid (HMF), (npr. Merck br. 820 678 ili Fluka br. 55690). Od osnovnog rastvora HMF-a pripremiti kalibracione rastvore 1, 2, 5 i

10 mg/L vodenog rastvora. Rastvore treba pripremiti na dan korištenja.

Određivanje sadržaja u standardu HMF-a: Apsorbancija A pripremljenog standardnog rastvora određena je pomoću UV spektrofotometra na 285 nm u 1 cm kvarcnim kivetama s vodom u praznoj ćeliji. Koncentracije standarda rastvora mogu se izračunati iz literaturnih vrijednosti za molarnu apsorbanciju, $\epsilon = 16830$ ili apsorbanciju, 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 standardnog rastvora.

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

Preporuka: Najbolje je HMF standard čuvati pod dušikom.

Aparatura i pribor

- Tečni hromatograf (HPLC) s UV detektorom i integratorom
- Kolona: bilo koja sa 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 do 50 ml s vodom. Filtrirati uzorak kroz membranski filter od 0,45 μm da bi se dobio rastvor uzorka spremna za hromatografiju.

Uslovi hromatografiranja:

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

Način izračunavanja:

Sadržaj HMF-a u uzorku izračunava se poređenjem pika iz uzoraka i standardnih rastvora, uzimajući u obzir razrjeđivanje. Postoji linearni odnos između koncentracije i površine pika HMF. 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 koje su učestvovala u poredbenim testiranjima, što je prikazano u sljedećoj tabeli.

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 uporedive s onima dobivenim White 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 poređenju s HMF-om, može se koristiti i ista metoda. Furfural eluira oko 1,5 minuta nakon HMF-a.

Reference:

1. Visoko efikasna tečna hromatografija furfurala i hidroksimetilfurfurala u alkoholu i medu (J. Jeuring i F. Koppers, J. Ass. Chem. 63, 1215 (1980))
2. Određivanje hidroksimetilfurfurala pomoću HPLC, (Swiss Food Manual, Kapitel Honig, Eidg. Druck und Material Zentrale (1995))

3. Spektrofotometrijska metoda za određivanje hidrosimetilfurfural u medu, (J. White, J. Ass Off. Chem. 62, 509 (1979)
4. Izvještaj međulaboratorijskom ispitivanju HMF-a Međunarodne komisije za med, Basel, V. Figueiredo, (1991)"

U tački b) „Određivanje hidrosimetilfurfurola na dvije talasne dužine (metoda po Whiteu) u pododjeljku Rezultati, formula: „ $149,7 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 1000}{16830 \cdot 10^{-5}} = \text{faktor}$ “ mijenja se i glasi: „ $149,7 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 1000}{16830 \cdot 10^{-5}} = \text{faktor}$ “.

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

Član 5.

(Usklađenost sa propisima EU)

Ovim pravilnikom preuzimaju se odredbe člana 4. stav 1. Direktive Vijeća 2001/110/EZ od decembra 2001. o medu i odredbe Direktive 2014/63/EU Evropskog parlamenta i Vijeća od 15. maja 2014. godine.

Član 6.

(Stupanje na snagu)

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

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

Predsjedavajući
Vijeća ministara BiH
Dr. **Denis Zvizdić**, s. r.