

869

"ЕГ"

На основу члана 17. став 2. и члана 72. Закона о храни ("Службени гласник БиХ", број 50/04), и члана 17. Закона о Савјету министара Босне и Херцеговине ("Службени гласник БиХ", бр. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 и 24/08), Савјет министара Босне и Херцеговине, на приједлог Агенције за безбједност хране Босне и Херцеговине, у сарадњи са надлежним органима ентитета и Брчко Дистрикта Босне и Херцеговине, на 178. сједници, одржаној 12. новембра 2019. године, донио је

**ПРАВИЛНИК
О ИЗМЈЕНАМА И ДОПУНАМА ПРАВИЛНИКА О
МЕТОДАМА ЗА КОНТРОЛУ МЕДА И ДРУГИХ
ПЧЕЛИЊИХ ПРОИЗВОДА**

Члан 1.

У Правилнику о методама за контролу меда и других пчелињих производа ("Службени гласник БиХ", број 37/09) у дијелу ПОСЕБНЕ ОДРЕДБЕ у члану 3. (Методе физичких, хемијских и биолошких анализа) иза става (1) додаје се нови став (2) који гласи:

"(2) За утврђивање усклађености квалитета меда и других пчелињих производа са прописаним захтјевима квалитета признају се и све друге међународно признате акредитоване методе."

Члан 2.

У Анексу II Поглављу I Методе физичких, хемијских и биолошких анализа меда и других пчелињих производа, у Одјелку А. Методе физичких, хемијских и биолошких анализа иза тачке д): "одређивање сахарозе" додаје се нова тачка е) која гласи: **"е) одређивање шећера (HPLC метода^{1,2},"**

Тачка и) и ј) мијењају се и гласи:

"и) одређивање активности дијастазе^{1,2},"

"ј) одређивање хидроксиметилфурфурола HMF (HPLC метода², фотометријска метода по Winkler² и методама на двије таласне дужине по White²)¹"

"Досадашње тач. е), ф), г), х), и), ј), к), л), м) и н) постају тач. ф), г), х), и), ј), к), л), м), н), и о)."

У Поглављу II Методе физичких, хемијских и биолошких анализа којима се врши контрола меда и других пчелињих производа, у Одјелку Ц. Одређивање редукованих шећера под тачком б) "Метода волуметријски по Luff-Schoorli" у дијелу Реагенси став (9) мијења се и гласи: **"Carrez раствор (II): растворити у води 10,6 g калијумовог хексацијаноферата (II) трихидрата $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ и надопунити водом до 100 mL."**

У Одјелку Д. Одређивање сахарозе у пододјелку Реагенси став (5) мијења се и гласи: **"0,2%-ни раствор метилен-плавог(2г/л)".**

Иза Одјелка Д. додаје се нови Одјелак Д1, који гласи:

"Одјелак Д1. Одређивање шећера

а) метода HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Област примјене

Методом се одређују фруктоза, глукоза, сахароза, тураноза и малтоза у меду за који су добијени подаци о прецизности.

Може се користити и за квантитативно одређивање осталих шећера у меду као што су мелецитоза, ерлоза, изомалтоза, рафиноза и други, као што је описано у првобитно објављеној методи Bogdanov и Baumann.

Дефиниције

Удио сваког од шећера је дефинисан као онај израчунат из формуле дате у методи (1).

Принцип

Ова метода се заснива на изворно објављеној методи Bogdanov и Baumann (1).

Након филтрације раствора садржај шећера се одређује помоћу HPLC са RI детектором. Пикови шећера се идентификују на основу времена задржавања (ретенције). Квантификација се врши методом екстерног стандарда одређивањем површине или висине пика.

Реагенси

Ако није наведено другачије, потребно је користити реагенсе аналитичке чистоте. Мора се користити дестилована вода или други еквиваленти аналитичке чистоте.

- Метанол, HPLC чистоте
- Ацетонитрил, HPLC чистоте

Пажња: Ацетонитрил је опасна супстанца те је потребно користити мјере опреза и заштите при руковању. Мобилна фаза (елуциони раствор за HPLC) састоји се од мјешавине 80 волумних дијелова ацетонитрила и 20 волумних дијелова воде. Потребно је дегасирати прије употребе.

Стандардне супстанце фруктоза, глукоза, сахароза, тураноза и малтоза могу се набавити од уобичајених добављача, као и мелецитоза, рафиноза и изомалтоза. Видјети резолуције и времена задржавања свих шећера у меду.

Пипетирати 25 mL метанола у калибрационе тиквице од 100 mL. У зависности од шећера који се анализира, растворити одвагу како је описано ниже у око 40 mL воде и квантитативно пренијети у тиквицу, промијешати и допунити водом до ознаке.

фруктоза: 2.000 g; глукоза: 1.500 g; сахароза: 0.250 g; тураноза: 0.150 g; малтоза: 0.150 g.

Уз помоћ шприце преко мембранског филтера пренијети узорке у означене виале.

Раствори стандарда су стабилни четири седмице у фрижидеру на 4°C или шест мјесеци на -18°C.

Прибор и опрема

- Виалице за узорке
- Ултрасонично купатило
- Калибрисани судови од 100 mL
- Пипете од 25 mL
- Мембрански филтери за водене растворе, величина пора 0,45 µm
- Одговарајућа шприца са адаптером за мембранске филтере
- HPLC уређај са пумпом, одговарајућим инјектором, RI-детектор термостирани на 30°C, термички регулисана пећ на колони на 30°C, интегратор
- HPLC колона, нпр. 4.6 mm дијаметар, 250 mm дужина, пуњена аминоксидификованим силика гелом величине честица 5-7 µm.

Прије употребе HPLC колоне урадити тест прикладности (систем suitability тест) да би се утврдила сепарација свих шећера.

Напомена: Хроматографисање се може вршити на собној температури без значајног утицаја на резултате осим ерлозе и мелецитозе.

Поступак

Припремање узорка

Ако је потребно, припремити мед према поглављу о узорковању и општим методама у складу са хармонизованом методом Међународне комисије за мед.

Одвагати 5 g меда у чашу и отопити у 40 ml воде. У нормални суд од 100 ml пипетирати 25 ml метанола а затим квантитативно додати водени раствор меда из чаше. Допунити нормални суд са водом до ознаке. Профилтрирати узорке и пренијети у означене бочице за узорке. По потреби, ускладиштити бочице за узорке као и растворе стандарда.

HPLC услови

Ако се употреби хроматографска колона претходно описана, онда се задовољавајући резултати могу очекивати у сљедећим условима: проток мобилне фазе 1.3 ml/min; мобилна фаза ацетонитрил; вода (80:20 v/v); температура колоне и детектора 30°C; волумен инјектирања 10 µl.

Напомена 1: Ако није могуће обавити хроматографисање са температуром колоне и детектора на 30°C, онда се може радити у амбијенталним условима. У овим условима сепарација мелецитозе и ерлозе неће бити успешна.

Напомена 2: Потребно је инјектирати истовјетни волумен узорка и стандардног раствора.

Израчунавање и изражавање резултата

Идентификација и квантификација шећера у меду ради се компарацијом времена задржавања и површина пикова са сигнаlima из раствора стандарда шећера.

Масени проценат одређиваних шећера (W), фруктозе, глукозе, итд. и малтозе у 100 грама узорка (g/100g) израчунава се према сљедећој формули методом екстерног стандарда:

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

гдје је, A_1 = површина или висина пика шећера из раствора стандарда; A_2 = површина или висина пика шећера из раствора узорка; V_1 = Укупни волумен раствора узорка (мл); V_2 = Укупни волумен раствора стандарда (мл); m_1 = маса шећера (g) у укупном волумену раствора стандарда (V_2); m_0 = одвага узорка (g). Резултат се заокружи на једно децимално мјесто.

Прецизност поступка

Параметри γ и R одређени су у ринг DIN међулабораторијском тестирању (2).

Број узорка	Фруктоза g/100	γ	R
1	31.2	0.8	1.6
2	42.4	0.9	2.3
3	37.9	1.0	1.6

Број узорка	Глукоза g/100	γ	R
1	23.0	0.9	2.1
2	28.5	0.8	1.8
3	32.0	1.1	1.4

Број узорка	Сахароза g/100	γ	R
1	-	-	-
2	-	-	-
3	2.8	0.4	0.9

Број узорка	Тураноза g/100	γ	R

1	2.1	0.4	0.8
2	1.7	0.3	0.5
3	1.3	0.3	0.8

Број узорка	Малтоза g/100	γ	R
1	4.8	0.5	2.5
2	2.0	0.6	1.3
3	2.3	0.5	0.7

Поновљивост (γ) и репродуцибилност (R) резултата израчунати су на три врсте узорка меда уосвим лабораторијама које су учествовале у тестирању.

Референце:

- Одређивање шећера меда са HPLC (S. Bogdanov, S. E. Baumann, Bestimmung von Honigzucker mit HPLC. Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg., 79, 198-206. (1988)
- Одређивање садржаја сахара. HPLC метода (DIN Norm 10758, Bestimmung des Gehaltes an Sacchariden. HPLC Verfahren (1992).

Преузето из Метода међународне комисије за мед (Harmonized methods of the International Honey Commission, 2009)."

Члан 3.

Одјељак I. Одређивање активности дијастазе замјењује се новим Одјељком I. који гласи:

"Одјељак I. Одређивање активности дијастазе

a1) Метода по ИНС-у (одговара методи Schade)

Област примјене

Ова метода може се примјенити на све узорке меда.

Дефиниције

Јединица активности дијастазе, Gothe јединица, дефинише се као количина ензима која ће претворити 0,01 грама скроба до прописане крајње тачке у једном сату на 40°C под тестним условима. Резултати су изражени у Gothe јединицама (или Schade јединицама) по граму меда.

Принцип

Ова метода заснива се на хидролизе 1%-ног раствора скроба ензимом из 1 g меда у току једног сата на температури од 40°C. Стандардни раствор скроба у реакцији са раствором јода даје интензивно обојење. У реакцији ензима и стандардног раствора скроба услед хидролизе настаје плава боја јода, чије се нестајање мјери у интервалима. Из односа апсорбанце и времена одређује се t_x - реакционо вријеме нестајања боје до специфичне апсорбанце чија је вриједност 0,235. Активност дијастазе изражава се као број 300/ t_x .

Ова метода заснива се на оригиналној методи Schade (1), модификованој по Hadorn и Zürcher (2) те White и Pairent (3) методи, и дата је у Codex Alimentariusu.

Апаратура и прибор

Опрема не смије садржавати трагове детергента!

Осим уобичајене лабораторијске опреме, употребљавају се и:

- одмјерне тиквице запремине од 50, 100 и 500 ml;
- конусна тиквица запремине 250 ml;
- пламеник;
- водено купатило на $40,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$;
- штоперница;
- кивете од 1 cm;
- спектрофотометар са читањем на 660 nm.

Реагенси

- Матични раствор јода: раствори се 11,0 g јода п.а., помијеша са 22,0 g калијум- јодида и раствори у 30 до 40 ml дестиловане воде, а затим разблажи до 500 ml.

Припремљен раствор чувати у затвореној, тамној боци, најдуже око годину дана.

- (2) Разблажени раствор јода: припрема се у одмјерној тиквици запремине 500 ml тако што се раствори 20,0 g калијум-јодида п.а. у дестилованој води, уз додатак 2 ml матичног раствора јода, након чега се допуни водом до ознаке.
Разблажени раствор јода припрема се на дан употребе и треба га чувати од утицаја ваздуха, затварајући тиквицу одмах након употребе.
- (3) Ацетатни пуфер - рН 5,3: растворити 43,5 g натријум-ацетата ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) у дестилованој води, уз додатак 5 ml ледене сирћетне киселине ради подешавања рН вриједности, а затим допунити до 250 ml водом. Ако је потребно, рН вриједност подесити са натријум-ацетатом или сирћетном киселином уз коришћење рН метра.
- (4) Раствор натријум-хлорида: раствори се 2,9 g натријум-хлорида (NaCl) у одмјерној тиквици од 100 ml са дестилованом водом и разблажи до ознаке.
- (5) Скроб растворљиви п.а.

Одређивање воде у растворљивом скробу

Одмјери се око 2 g растворљивог скроба и у танком слоју распореди на дну посуднице (промјера 5 cm и висине 3 cm) са поклопцем. Вагати са тачношћу од $\pm 0,1$ mg и сушити 90 минута на температури од 130°C . Након сушења затворену посудницу хладити у ексикатору те након једног сата вагати. Губитак масе у односу на 100 g јесте количина воде.

Припремање раствора скроба

Одмјери се количина скроба која одговара маси од 2,000 g безводног скроба и измијеша са 90 ml дестиловане воде у конусној тиквици од 250 ml. Насталу суспензију брзо довести до тачке кључања, те непрестано мијешати и кувати три минута. Одмах преbacити растворени садржај у одмјерну тиквицу од 100 ml, те хладити под млазом воде. Након постизања собне температуре, раствор допунити дестилованом водом до ознаке и добро промућкати. Раствор се припрема на дан употребе.

Напомена: Користити раствор скроба који генерише плаву вриједност прихватљиве апсорбанце (видјети Калибрација раствора скроба/Одређивање плаве вриједности).

Одређивање

Припремање узорка за одређивање

Одмјери се 10,0 g меда и раствори са око 15 ml дестиловане воде, на хладно, уз додатак 5 ml ацетатног пуфера. Овако припремљен садржај преbacити у одмјерну тиквицу од 50 ml у коју смо претходно отпипетирали 3 ml раствора натријум-хлорида, а затим допунити дестилованом водом до ознаке. Важно је да узорак буде пуферован прије мијешања са натријум-хлоридом. Раствор меда припремити непосредно прије одређивања јер је стабилан тек неколико сати.

Калибрација раствора скроба/одређивање плаве вриједности

Поступак калибрације помаже нам при одређивању потребне количине воде коју треба додати реакционој смјеси да би се постигао интервал апсорбанце раствора јод - скроб од 0,745 - 0,770. У конусну тиквицу отпипетирати по 20, 21, 22, 23, 24 и 25 ml дестиловане воде. При извођењу калибрације, у сваку тиквицу додати 5 ml разблаженог раствора јода, а затим 0,5 ml смјесе која се састоји од 10 ml дестиловане воде и 5 ml раствора скроба. Добро измијешати и одмах одредити вриједност апсорбанце мјерењем на

спектрофотометру на таласној дужини од 660 nm у односу на слијепу пробу која је дестилована вода. Количина воде одређена на овај начин додаје се у узорак који се анализира примјеном испитаног раствора скроба. Ако је постигнута апсорбанца мања од 0,745 при додатку 20 ml дестиловане воде, или већа од 0,770 при додатку 25 ml дестиловане воде, припремљени раствор скроба није примјенив за одређивање активности дијастазе.

Одређивање апсорбанце

Отпипетирати 10 ml раствора меда у конусну тиквицу од 50 ml и ставити је у водено купатило на 40°C , заједно са још једном тиквицом која садржи 10 ml раствора скроба. Након 15 минута отпипетирати 5 ml раствора скроба у тиквицу са раствором меда, промијешати и покренути штоперицу. У периодичним интервалима, а први пут након пет минута, пипетирати 0,5 ml припремљеног аликвота којем додајемо 5 ml разблаженог раствора јода. Томе додајемо претходно утврђену количину воде, мијешамо смјесу и мјеримо вриједност апсорбанце на спектрофотометру на таласној дужини од 660 nm у односу на слијепу пробу (вода), примјеном кивета од 1 cm.

Напомена: Интервали издвајања аликвота из реакционе смјесе након првог пута морају се подесити на такав начин да се постигну три-четири мјерења унутар интервала апсорбанце 0,456 - 0,155 (линеарни распон).

У сљедећј табели дати су препоручени интервали издвајања аликвота из реакционе смјесе у односу на добијену вриједност апсорбанце:

Апсорбанца на $t = 5$ мин.	Временски интервал
$A > 0,658$	више од 10 мин.
$0,658 > A > 0,523$	5-10 мин.
$0,523 > A > 0,456$	2-5 мин.

Ако је апсорбанца након $t = 5$ минута мања од $0,350^*$ потребно је скратити вријеме првог мјерења.

Потребно је урадити провјеру апсорбанце узорка без дејства скроба. Пипетирати 10 ml узорка, додати 5 ml дестиловане воде и темељито измијешати. Од припремљене смјесе отпипетирати 0,5 ml аликвота у конусну ерленмајерицу, додати 5 ml разблаженог раствора јода те претходно утврђену количину воде. Садржај добро измијешати и мјерити апсорбанцу на спектрофотометру на таласној дужини од 660 nm, у кивети од 1 cm. Ако се чита одређена вриједност апсорбанце, потребно је исту ту вриједност одузети од вриједности добијене током процеса испитивања узорка.

Израчунавање и изражавање резултата

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

Активност дијастазе изражава се као број дијастазе (DN) који се рачуна као:

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

t_x - реакционо вријеме за које се постигне апсорбанца $A = 0,235$.

Прецизност поступка

Параметри поновљивости (r) и репродуцибилности (R) одређени су у међулабораторијском тестирању у 14 лабораторија Европске уније (4, 5) на девет узорака меда, при чему су добијени следећи резултати:

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

Из ових података добијене су следеће корелационе једначине:

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

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

Референце:

- Активност дијастазе и хидроксиметилфурфурал у меду и њихова корисност у откривању топлотне адултерације (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).
- Једноставна кинетичка метода за одређивање броја дијастаза у меду (H. Hadorn and K. Zürcher: Eine einfache kinetische Methode zur Bestimmung der Diastasezahl in Honig. Deutsche Lebensmittel Rundschau 68, 209-216 (1972).
- Извјештај о анализи меда (J. W. White and F. W. Parent: Report on the analysis of honey. J. Assoc. Off. Agric. Chemists, 42, 341-348 (1959)).
- Одређивање активности дијастазе (DIN-Norm 10750 Bestimmung der Diastase-Aktivität. (1990)*.
- Codexov стандард за мед (Codex Alimentarius Standard for Honey, Ref. Nr. CL 1993/14-SH, FAO and WHO, Rome (1993)).
- Међулабораторијско испитивање Међународне комисије за мед, Phadebas and Schade дијастазе, влажност рефрактометријом и активност инвертазе (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) Метода по Codexovом стандарду за мед (одговара методи Schade)**Област примјене**

Ова метода се може примијенити на све узорке меда.

Принцип

Ова метода заснива се на хидролизе 1%-ног раствора скроба ензимом из 1 г меда у току једног сата на температури од 40°C. Стандардни раствор скроба у реакцији са раствором јода даје интензивно обојење. У реакцији ензима и стандардног раствора скроба усљед хидролизе нестаје плава боја јода чије се нестајање мјери у интервалима. Из односа апсорбанције и времена одређује се t_x - реакционо вријеме нестајања боје до специфичне апсорбанције 0,235. Активност дијастазе се изражава као број $300/t_x$. Ова метода је базирана на оригиналној методи Schade и други (1) и дата је у Codexu Alimentariusu.

Апаратура и прибор

Опрема не смије садржавати трагове детерџента!

Осим уобичајене лабораторијске опреме, употребљавају се и:

- одмјерне тиквице запремине 1 литар, 0,5 литара, 0,1 литара;
- конусна тиквица запремине 0,250 литара;
- пламеник;

(4) водено купатило на $40 \pm 0,2$ °C;

(5) спектрофотометар са читавањем на 660 nm.

Реагенси

- Матични раствори јода: раствори се 8,8 г јода п.а., помијеша се са 22 г калијум-јодида и раствори у 30-40 ml воде, а затим разблажи до једног литра.
- Разблажени раствор јода: припрема се у одмјерној тиквици запремине 500 ml тако што се раствори 20 г К-јодида п.а. у 30-40 ml воде. Затим се дода 5 ml матичног раствора јода и допуни водом до ознаке.

Раствор јода $c\left(\frac{J_2}{2} 0,0007 \text{ mol/l}\right)$: у одмјерној тиквици

- Ацетатни пуфер- рН 5,3: раствори се 87 г натријум-ацетата ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) у 400 ml воде, дода око 10,5 ml ледене сирћетне киселине и допуни водом до 500 ml. Ако је то потребно, рН вриједност регулише се натријум-ацетатом или сирћетном киселином до 5,3 уз коришћење рН-метра, по потреби.
- Раствор натријум-хлорида, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$: раствори се 1,45 г натријум-хлорида у прокуваној дестилованој води и допуни до 50 ml. Рок трајања тог раствора је ограничен.
- Скроб растворљиви п.а. (нпр. из кромпира).
- Одређивање воде у растворљивом скробу
Одмјери се око 2 г растворљивог скроба и у танком слоју распореди на дно посуднице промјера 5 cm. Суши се сат и по на температуре од 130°C. Затим се охлади у ексикатору и премјери. Губитак масе у односу на 100 г јесте количина воде.
- Раствор скроба
Одмјери се количина скроба која одговара маси од 2,0 г безводног скроба и измијеша са 90 ml воде у конусној тиквици запремине 250 ml. Одмах се пренесе до пламеника преко којег је постављена азбестна мрежица и остави да благо кључа три минуте. Потом се раствор склони са пламеника, покрије и остави да се постепено охлади до собне температуре. Раствор се затим пренесе у одмјерну боцу од 100 ml и стави на водено купатило загријано на 40°C. Кад раствор достигне ту температуру, допуни се водом до ознаке на боци.

Одређивање**Припремање узорка за одређивање**

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

Узорак мора бити пуферизован прије мијешања са натријум-хлоридом.

Припремање стандардног раствора

Раствор скроба загријава се на температури од 40°C, а затим се 5 ml раствора отпипетира у 10 ml воде, чија је температура 40°C и добро измијеша. Од припремљеног раствора отпипетира се 1 ml и дода у 10 ml $0,0007 \text{ mol/l}$

$\left(\frac{J_2}{2}\right)$ раствора јода, разблажи са 35 ml воде и измијеша.

Настала боја читава се на 660 nm према слијепој проби. Вриједност апсорбанције треба да буде $0,760 \pm 0,020$. Ако је потребно, може се додати одређена запремина воде, тако да се добије исправна апсорпција.

Одређивање апсорбанције

Пипетом се одмјери 10 ml раствора меда, пренесе у градирану цилиндар од 50 ml и стави у водено купатило на температури од $40^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, заједно са посудом у којој је раствор скроба. Послије 15 минута пипетом се одмјери 5 ml раствора скроба и дода у раствор меда, промијеша и укључи сат. У интервалима од по пет минута издвоји се 1 ml аликвота и дода у

10 ml $0,0007 \text{ mol/l} \left(\frac{J_2}{2}\right)$ rastvora joda.

Промијеша се и разблажи са запремином воде од 35 ml (припремање стандардног раствора).

Апсорбанција се одмах одређује на 660 nm, настави се узимати аликвот све док се апсорбанција не смањи до вриједности од 0,235.

Израчунавање и изражавање резултата

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

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

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

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

гдје је: t - редукција у минутима.

Референце:

Codex standard for honey (АОАС 958.09)

б) Метода по Codexovom стандарду за мед и ИНС-у (Одређивање активности дијастазе са Phadebas)

Област примјене

Ова метода може се примијенити на све узорке меда.

Дефиниција

Јединица активности дијастазе, Gothe јединица, дефинише се као количина ензима која ће претворити 0.01 грама скроба на прописану крајњу тачку за један сат на 40°C под тестним условима. Резултати се изражавају у Gothe јединицама (или Schade јединицама) по граму меда.

Принцип

Одређивање дијастатске активности меда је фотометријска метода по којој се нерастворљива плаво обојена умрежена врста скроба користи као супстрат. Хидролизује га ензим дајући плаве фрагменте који су растворљиви у води и који се одређују фотометријски на 620 nm. Апсорбанција раствора је директно пропорционална дијастатској активности узорка. Метода се заснива на првобитно објављеној Siegenthalerovoj методи (1) и измијењеној по Bogdanovu (2).

Реагенси

- (1) Phadebas таблете, Pharmacia Diagnostics;
- (2) Натријум-хидроксид 0.5M.
- (3) Ацетатни пуфер (0.1M, pH 5.2): Растворити 13.6 g натријум ацетат трихидрата у води. Подесити рХ раствора до 5.2 са глацијалном сирћетном киселином (1 - 2 ml) и разблажити водом до 1L.

Опрема

- (1) фотометар/спектрофотометар
- (2) Vortex
- (3) Термостатско водено купатило
- (4) Штоперица

Процедура

Припрема тест узорка

Одређивање

Одмјерити 1.00 g меда у одмјерну тиквицу од 100 ml, растворити у ацетатном пуферу и допунити до ознаке. Довршити процедуру у року од једног сата. Пребацити 5.0 ml раствора у тестну епрувету и поставити у водено купатило на 40°C . Припремити слијепу пробу постављањем 5.0 ml аликвота ацетат пуфера у другу тестну епрувету која се третира исто као раствор узорка.

У оба раствора додати Phadebas таблете помоћу пинцета и укључити штоперицу. Измијешати растворе на Vortexу док се таблете не распаду (око 10 секунди) и вратити их у водено купатило.

Прекинути реакцију након тачно 30 минута додавањем 1 ml раствора натријум-хидроксида. Поново смјесу измијешати на Vortexу приближно пет секунди. Одмах филтрирати растворе кроз филтер папире и измјерити апсорбанцију у киветама од 1 cm на 620 nm помоћу воде као референце. Апсорбанција слијепе пробе одузима се из раствора узорка (ΔA 620). Ако је апсорбанција већа од 1.0, разблажити узорак са водом. Узети у обзир фактор разблажења приликом рачунања резултата.

Рачунање и изражавање резултата

Класична метода за одређивање дијастатске активности меда је Schadeova метода (3,4).

Дијастатска активност се изражава као број дијастазе (DN) у јединицама Schade и дефинише се како слиједи: једна дијастатска јединица одговара ензимској активности од 1 g меда, који може хидролизovati 0.01 g скроба за један сат на 40°C .

Издена су истовремена мјерења по методама Phadebas и Schade 57 различитих узорака меда који покривају распон дијастатске активности од 8 до 40.

Постоји веома добар однос ($r=0.987$) између два мјерења. Линеарна регресија у (DN) naspram x (ΔA 620) довела је до сљедећег односа:

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

гдје су 28.2 и 2.64 редом наведени нагиб (slope) и пресјек (intercept) најбоље праве линије добијене помоћу линеарне регресије ΔA 620 (x оса) на DN (y оси).

За ниске дијастатске вриједности (између 0 и 6 DN) врло добар однос ($R^2 = 0,927$) са сљедећом линеарном регресијом у (DN) наспрам x (ΔA 620) дала је сљедећи однос:

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

гдје су 35.2 и 0.46 редом наведени нагиб и пресјек најбоље праве линије добијене помоћу линеарне регресије ΔA 620 (x оса) на DN (y оси).

Ову једначину треба користити за одређивање дијастатске активности до 8 дијастатских јединица.

Прецизност

- Подаци о прецизности утврђени у међулабораторијском поређењу лабораторија у Швајцарској (5):
 - Три различите врсте меда су биле тестиране у три лабораторије. Максимално одступање (распон) DN утврђено са таблетама из исте серије, између лабораторија, било је 3.7%.

- Стандардно одступање дијастатске активности утврђене са таблетама из двије различите серије са истим медом, у једној лабораторији, било је 3.7% (за n=24, n што је број анализа по серији).
- Распон тежине, за узорак од 20 таблета, био је 5%, са стандардним одступањем од 2%.

Међулабораторијско испитивање спровела је Међународна комисија за мед 1992. године са 14 лабораторија Европске уније и 21 швајцарском лабораторијом примјеном методе Phadebas са седам медова чије су вриједности A₆₂₀ варирале од 0,31 до 1,29 (6). Нису биле назначене серије реагенса Phadebas.

Добијене су сљедеће вриједности поновљивости (r) и репродукцибилности (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

гдје је A-620 вриједност апсорбације.

Од ових података израчунате су сљедеће корелационе једначине:

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

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

Референце

- Одређивање амилазе у меду са комерцијално доступним супстратом означеним бојом (U. Siegenthaler, Mitt Geb. Lebensm. Hyg 66, 393-399 (1975).
- Поређење различитих метода одређивања (S. Bogdanov, Honig diastase, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 75, 214-220 (1984)
- Активност дијастазе и хидроксиетилфурфурал у меду и њихова корисност у откривању топлотне адултерације (J. E. Schade, G. L. Marsh i J. E. Eckert: Food Research 23, 446-463 (1958).
- Одређивање активности дијастазе (DIN-NORM 10750(1990).
- Одређивање амилоактивности (према Phadebasu), Швајцарска књига хране Поглавље 23: Med, EDMZ, Bern (1995).
- Међулабораторијско испитивање Међународне комисије за мед: Методе одређивања Phadebas и Schade diastase, Влажност рефрактометријом и активност инвертазе: Извјештај за учеснике (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)).
- Научна напомена о Phadebasовој методи за масе са ниским садржајем ензима (L. Persano Oddo, P. Pulcini, Apidologie 30, 347-348 (1999).

Преузето из метода Међународне комисије за мед (Harmonized methods of the International Honey Commission, 2009)."

Члан 4.

У Одјелку Ј. Одређивање хидроксиетилфурфурола досадашња тачка "а)" мијења се и гласи: "а) **Одређивање хидроксиетилфурфурола (HMF) методом HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**", а досадашње тач. "а) и б)" постају тачке "б) и ц)".

Одређивање хидроксиетилфурфурола (HMF) методом HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Област примјене

Метода се може примијенити на све узорке меда. Мање узорка је потребно када је концентрација HMF врло висока.

Садржај

Методом се одређује концентрације 5- (хидроксиетил) фуран-2-карбалдехида. Резултат се обично изражава у милиграмима по килограму.

Принцип

HMF се одреди у бистром, филтрираном воденом раствору меда употребом HPLC реверзне фазе са UV детекцијом. Сигнал се упоређује с онима из узорака стандарда познате концентрације.

Реагенси

Мобилна фаза: вода-метанол (90:10, v/v), HPLC чистоће.

Стандардни раствор: 5-(хидроксиетил) фуран-2-карбалдехид (HMF), (нпр. Merck бр. 820 678 или Fluka бр. 55690). Од основног раствора HMF-а припремити калибрационе растворе 1, 2, 5 и 10 mg/L воденог раствора. Растворе треба припремити на дан коришћења.

Одређивање садржаја у стандарду HMF-а: Апсорбација А припремљеног стандардног раствора одређена је помоћу UV спектрофотометра на 285 nm у 1 cm кварцим киветама са водом у празној ћелији. Концентрације стандарда раствора могу се израчунати из литературних вриједности за моларну апсорпцију, $\epsilon = 16830$ или апсорпцију, $a_{1cm1\%} = 133.57$ (3).

$$\text{концентрација у mg/L} = \frac{A}{1 \times 133.57} \times 1,000, \text{ гдје је } A \text{ апсорбација стандардног раствора}$$

Израчунати садржај мора одговарати спецификацијама добављача. Стандард се мора чувати на 4 - 8°C. Стандард HMF-а је изузетно хигроскопан.

Препорука: Најбоље је HMF стандард чувати под азотом.

Апаратура и прибор

- Течни хроматограф (HPLC) са UV детектором и интегратором
- Колона: било која са RP C18-реверзном фазом материјала. нпр. Hypersil ODS 5 μm , 125 mm x 4 mm или 250 mm x 4 mm.
- Мембрански филтер, 0.45 μm (нпр. Dynagard).

Поступак

Прецизно измјерити око 10 g припремљеног узорка меда у посуду од 50 ml. Отопити узорак у око 25 ml воде и квантитативно пренијети у волуметријску тиквицу од 50 ml. Разриједити до 50 ml са водом. Филтрирати узорак кроз мембрански филтер од 0,45 μm да би се добио раствор узорка спреман за хроматографију.

Услови хроматографисања:

- брзина протока 1,0 ml/мин.
- волумен инјектирања 20 μL узорка или стандардног раствора
- детекција UV 285 nm; распон: 0,2 AUFS

Начин израчунавања:

Садржај HMF-а у узорку израчунава се упоређивањем пика из узорка и стандардних раствора, узимајући у обзир разријеђивање. Постоји линеарни однос између концентрације и површине пика HMF. Резултати се изражавају у mg/kg, на једно децимално мјесто.

Прецизност методе одредила је Међународна комисија за мед. Поновљивост (r) и репродукцибилност (R)

израчунати су из резултата три врсте меда анализираних у свим лабораторијама које су учествовале у поредбеним тестирањима, што је приказано у сљедећој табели.

Број узорка	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
---	------	-----	-----

На ниским концентрацијама НМФ-а (око 5 mg/kg) вриједности добијене овом методом упоредиве су с онима добијеним White методом, али су ниже од оних добијених методом п-толуидина. На вишим концентрацијама НМФ-а (20 и 40 mg/kg) вриједности све три методе немају значајне међусобне разлике.

Напомена

За фурфурал, који се налази само у врло малим количинама у поређењу са НМФ-ом, може се користити иста метода. Фурфурал елуира око 1,5 минута након НМФ-а.

Референце:

1. Високо ефикасна течна хроматографија фурфурала и хидроксиетилфурфурала у алкохолу и меду (J. Jeuring i F. Koppers, J. Ass. Chem. 63, 1215 (1980).
2. Одређивање хидроксиетилфурфурала помоћу HPLC (Swiss Food Manual, Kapitel Honig, Eidg. Druck und Material Zentrale (1995).
3. Спектрофотометријска метода за одређивање хидроксиетилфурфурала у меду (J. White, J. Ass Off. Chem. 62, 509 (1979).
4. Извјештај о међулабораторијском испитивању НМФ-а Међународне комисије за мед, Basel, V. Figueiredo (1991)

У тачки б) „Одређивање хидроксиетилфурфурала на двије таласне дужине (метода по Whiteu) у пододјелку Резултати, формула: „ $149,7 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 1000}{16830 \cdot 10 \cdot 5} \cdot \text{фактор}$ “ мијења се и гласи: „ $149,7 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 1000}{16830 \cdot 10 \cdot 5} \cdot \text{фактор}$ “.

Преузето из метода Међународне комисије за мед (Harmonized methods of the International Honey Commission, 2009)."

Члан 5.

(Усклађеност са прописима ЕУ)

Овим правилником преузимају се одредбе члана 4. став 1. Директиве Савјета 2001/110/ЕЗ од децембра 2001. о меду и одредбе Директиве 2014/63/ЕУ Европског парламента и Савјета од 15. маја 2014. године.

Члан 6.

(Ступање на снагу)

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

СМ број 175/19
12. новембра 2019. године
Сарајево

Предсједавајући
Савјета министара БиХ
Др **Денис Звиздић**, с. р.