

Mandarin (*)	Citrus reticulata Blanco	11,2
За оне производе означене звјездом (*) који су произведени као сок, минимална релативна густина се одређује као таква у односу на воду при 20/20 °C. За оне производе означене двијема звјездичама (**) који су произведени као каша, одређује се само најмања некоригирана вриједност ступња Brix (без корекције киселине).		

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 гласе:

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

"ј) одређивање хидроксиметилфурфузола HMF (HPLC метода², фотометријска метода по Winkleru² и методама на двије таласне дужине по Whiteu²)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-Schoorlu" у дијелу Реагенси став (9) мијења се и гласи: **"Carrez раствор (II): растворити у води 10,6 g калијумовог хексацијаноферата (II) трихидрата K₄[Fe(CN)₆] · 3H₂O 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 чистоће. Мора се користити дестилована вода или други еквиваленти аналитичке чистоће.

- Метанол, HPLC чистоће
- Ацетонитрил, HPLC чистоће

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 термостатан на 30°C, термички регулисана пећ на колони на 30°C, интегратор
- HPLC колона, нпр. 4.6 mm дијаметар, 250 mm дужина, пуњена аминомодификованим силика гелом величине честица 5-7 µm.

Прије употребе HPLC колоне урадити тест прикладности (систем suitability test) 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 успјешна.

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

Број узорка	Фруктоза 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

Број узорка	Глукоза 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

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

Број узорка	Тураноза 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

Број узорка	Малтоза 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

Поновљивост (r) 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.

Одјелак I. Одређивање активности дијастазе замјењује се новим Одјелком I. који гласи:

"Одјелак 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 $40,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$;
- штопераца;
- 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 - pH 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 pH вриједности, а затим допунити до 250 ml водом. Ако је потребно, pH вриједност подесити са натријум-ацетатом или сирћетном киселином уз коришћење pH 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 промукати. 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 сљедећњј 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 минутама. 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:

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

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

Референце:

1. 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).
2. 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).
3. 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)).
4. Одређивање активности дијастазе (DIN-Norm 10750 Bestimmung der Diastase-Aktivität, (1990)*.
5. Codexov стандард за мед (Codex Alimentarius Standard for Honey, Ref. Nr. CL 1993/14-SH, FAO and WHO, Rome (1993)).
6. Међулабораторијско испитивање Међународне комисије за мед, Phadebas и 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 услед хидролизе нестаје плава боја јода чије се нестајање мјери у интервалима. Из односа апсорбације и времена одређује се t_x - реакционо вријеме нестајања боје до специфичне апсорбације 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:

- (1) одмјерне тиквице запремине 1 литар, 0,5 литара, 0,1 литара;
- (2) конусна тиквица запремине 0,250 литара;
- (3) пламеник;

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

(5) спектрофотометар са читавањем на 660 nm.

Реагенси

- (1) 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.
- (2) 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 $c(\frac{J_2}{2} 0,0007 \text{ mol/l})$: у одмјерној тиквици

- (3) Ацетатни пуфер- pH 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, pH вриједност регулише се натријум-ацетатом или сирћетном киселином до 5,3 уз коришћење pH-метра, по потреби.
- (4) 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.
- (5) Скроб растворљиви п.а. (нпр. из кромпира).
- (6) 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.
- (7) 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 апсорбације треба да буде $0,760 \pm 0,020$. Ако је потребно, може се додати одређена запремина воде, тако да се добије исправна апсорпција.

Одређивање апсорбације

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

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

Апсорбација се одмах одређује на 660 nm, настави се узимати аликуот све док се апсорбација не смањи до вриједности од 0,235.

Израчунавање и изражавање резултата

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

Кроз најмање три последње тачке повуче се права линија да би се одредило вријеме кад реакциона смјеса достиже вриједност апсорбације 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 $\text{DN} = \text{ml } 1\text{-ног раствора скроба по } g \text{ меда/x при температуре од } 40^{\circ}\text{C}$

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

гдје је: t - редукција у минутима.

Референце:

Codex standard for honey (AOAC 958.09)

б) Метода по Codexovom стандарду за мед и ИНС-и (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. Апсорбација 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 узорака

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 аликуота 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 апсорбацију у киветама од 1 cm на 620 nm помоћу воде као референце. Апсорбација слијепе пробе одузима се из раствора узорка (ΔA 620). Ако је апсорбација 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 следећег 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 следећом линеарном регресијом у (DN) насрам x (ΔA 620) дала је следећи 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):
1. 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 следеће 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 следеће 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 хидроксиметилфурфурал 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 Одјелу Ј. Одређивање хидроксиметилфурфурола досадашња тачка "а)" мијења се и гласи: "а) Одређивање хидроксиметилфурфурола (HMF) методом HPLC (High Performance Liquid Chromatography)" , а досадашње тач. "а) и б)" постају тачке "б) и ц)".

Одређивање хидроксиметилфурфурола (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- (хидроксиметил) 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 УВ детекцијом. Сигнал се упоређује с онима из узорка стандарда познате концентрације.

Реагенси

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

Стандардни раствор: 5-(хидроксиметил) 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 УВ 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 УВ детектором и интегратором
- Колона: било која са RP C18-реверзном фазом материјала. нпр. Hypersil ODS 5 μ m, 125 mm x 4 mm или 250 mm x 4 mm.
- Мембрански филтер, 0.45 μ m (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 μ m да би се добио раствор узорка спреман за хроматографију.

Услови хроматографисања:

- брзина протока 1,0 ml/мин.
- волумен инјектирања 20 μ L узорка или стандардног раствора
- детекција УВ 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 следећој 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 HMF-а (око 5 mg/kg) вриједности добијене овом методом упоредиве су с онима добијеним White metodom, али су ниже од оних добијених методом п-толуидина. На вишим концентрацијама HMF-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 HMF-ом, може се користити иста метода. Фурфурал елимира око 1,5 минута након HMF-а.

Референце:

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

У тачки б) „Одређивање хидроксиметилфурфурала 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

Председавајући
Савјета министара БиХ
Др Денис Звиздић, с. р.

"ЕИ"

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

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

Члан 1.

У Правилнику о методама за контролу меда и других пчелиних 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 пчелиних производа с прописаним захтјевима квалитета признају се и све друге међународно признате акредитиране методе."

Члан 2.

У Анексу II. Поглавље I. Методе физичких, хемијских и биолошких анализа меда и других пчелиних производа, у Одјелјку 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}."

Тачке и) и ј) мијењају се и гласе:

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

"ј) одређивање хидроксиметилфурфурола HMF(HPLC метода², фотометријска метода по Winkleru² и методима на двије таласне дужине по Whiteu²)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 пчелиних производа, у Одјелјку C. Одређивање reducirаних шећера под тачком б) "Метода волуметријски по Luff-Schoorlu" у дијелу Reagensi став (9) мијења се и гласи: "Carrez rastvor (II): rastvoriti u vodi 10,6 g калијевог хексацијаноферата (II) трихидрата $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ i nadopuniti vodom do 100 ml."

У Одјелјку D. Одређивање сахарозе у пододјелјку Reagensi став (5) мијења се и гласи: "0,2%-тни rastvor metilen-plavog(2g/l)".

Иза Одјелјка D додаје се нови Одјелјак D1. који гласи:

"Одјелјак D1. Одређивање шећера

а) метода HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Област примјене

Методом се одређују фруктоза, глукоза, сахароза, тураноza 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: мелецитоza, ерлоза, изомалтоза, рафиноза и други као што је описано у изворно објављеној методи Богданов и Baumann.

Дефиниције

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

Принцип

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

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

Реagensи

Ако nije наведено другаџије, потребно је користити reagensе аналитичке чистоте. Mora се користити destilirana voda или други еквиваленти аналитичке чистоте.

- Metanol, HPLC чистоте
- Acetonitril, HPLC чистоте

Пажња: Acetonitril је опасна супстанца те је потребно користити мјере опреза и заштите при руковању. Mobilna faza (елуциони раствор за HPLC) састоји се од мјешавине 80 volumnih дијелова acetonitrila и 20 volumnih дијелова воде. Потребно је degasirati prije upotrebe.

Standardne supstance: фруктоза, глукоза, сахароза, тураноza и малтоза могу се набавити од уобичајених dobavljača, као и мелецитоza, рафиноза и изомалтоза. Видјети резолуције и времена задржавања свих шећера у меду.

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 učesnika 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 diastaze zamjenjuje se novim Odjeljkom I. koji glasi:

"Odjeljak I. Određivanje aktivnosti diastaze

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

Oblast primjene

Ova metoda može se primijeniti na sve uzorke meda.

Definicije

Jedinica aktivnosti diastaze, 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 diastaze 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 Codex 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 ± 0,2 °C;
- (5) štoperica;
- (6) kivete 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) Acetatni pufer - pH 5,3: rastvoriti 43,5 g natrijevog acetata (CH₃COONa·3H₂O) 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 ± 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 apsorbanca 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 diastaze.

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:

Apsorbanca 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 apsorbanca 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 apsorbanu 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 diastaze dobiva se dijeljenjem 300 s vremenom izraženim u minutama. Taj broj izražava aktivnost diastaze kao ml 1%-nog rastvora škroba koji je hidroliziran enzimom u 1 g meda za vrijeme od jednog sata pri 40 °C. Broj diastaze odgovara broju na Gothe skali.

Aktivnost diastaze se izražava kao broj diastaze (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 apsorbanca $A = 0,235$.

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:

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

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

Reference:

1. Aktivnost diastaze i hidroksimetilfurfural 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 diastaza 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 diastaze (DIN-Norm 10750 Bestimmung der Diastase-Aktivität, (1990)*.
5. Kodeks 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 diastaze, 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 apsorpcije i vremena određuje se t_x - reakciono vrijeme nestajanja boje do specifične apsorpcije 0,235. Aktivnost diastaze 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 deterdženta!

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 litra;
- (3) plamenik;
- (4) vođeno 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 ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 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, $c(\text{NaCl}) = 0,5$ 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 vođeno 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 promiješa 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 apsorpcije treba da bude $0,760 \pm 0,020$. Ako je potrebno, može se dodati određena zapremina vode tako da se dobije ispravna apsorpcija.

Određivanje apsorbancije

Pipetom se odmjeri 10 ml rastvora meda, prenese u gradirani cilindar od 50 ml i stavi u vodeno kupatilo na temperaturi od $40 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 diastaze (DN). Taj broj izražava aktivnost diastaze 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 diastaze odgovara broju na Gothe skali.

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

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

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 diastaze sa Phadebas)**Oblast primjene**

Ova metoda može se primijeniti na sve uzorke meda.

Definicija

Jedinica aktivnosti diastaze, 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 diastatske 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 diastatskoj 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 slijepe probe oduzima se iz rastvora uzorka (ΔA_{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 diastatske aktivnosti meda je Schadeova metoda (3,4).

Dijastatska aktivnost izražava se kao broj diastaze (DN) u Schade jedinicama i definira se kako slijedi: jedna diastatska 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 diastatske 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:

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

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

Za niske diastatske 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:

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

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

Ovu jednačinu treba koristiti za određivanje diastatske aktivnosti do 8 diastatskih jedinica.

Preciznost

- Podaci o preciznosti utvrđeni u međulaboratorijskom poređenju laboratorija u Švicarskoj (5):

1. 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%.
2. Standardno odstupanje diastatske 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).
3. 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 hidroksimetilfurfurula, dosadašnja tačka "a)" mijenja se i glasi: "a) **Određivanje hidroksimetilfurfurula (HMF) metodom HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**", a dosadašnje tač. "a) i b)" postaju tačke "b) i c)".

"**Određivanje hidroksimetilfurfurula (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 bistrom, filtriranom, 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 apsorpciju, $\epsilon = 16830$ ili apsorpciju, $a_{1cm1\%}=133.57$ (3).

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

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 eluiira oko 1,5 minuta nakon HMF-a.

Reference:

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

3. Spektrofotometrijska metoda za određivanje hidroksimetilfurfural 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 hidroksimetilfurfurala na dvije talasne dužine (metoda po Whiteu) u pododjeljku Rezultati, formula: „ $1,49,7 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 1000}{16830 \cdot 10 \cdot 5} = \text{faktor}$ “ mijenja se i glasi: „ $1,49,7 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 1000}{16830 \cdot 10 \cdot 5} = \text{faktor}$ “.

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

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.

"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 sahara (HPLC) metoda^{1,2}",

Točke i) i j) mijenjaju se i glase:

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

j) određivanje hidroksimetilfurfurala HMF (metoda HPLC², Winklerova fotometrijska metoda² i Whiteove metode na dvije valne duljine²)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.

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 sahara 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, sahara, 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 reagentne 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, sahara, 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; sahara: 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

- 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 $40,0 \pm 0,2$ °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 podešiti 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 kiveta 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 kiveti 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 diastaze 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 diastaza 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 diastaze (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. Međulaboratorijsko ispitivanje Međunarodne komisije za med, Phadebas i Schade diastaze, 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 apsorpcije i vremena određuje se t_x - reakcijsko vrijeme nestajanja boje do specifične apsorpcije 0,235. Aktivnost diastaze 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 deterdženta!

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 odmjerne 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 $c(\frac{J_2}{2} 0,0007 \text{ mol/l})$: u odmjerne 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 ključa 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 otopy i promiješa štapićem. Uzorak se već na hladno potpuno otopy. 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 apsorpcije treba biti $0,760 \pm 0,020$. Ako je potrebno, može se dodati određena zapremina vode, tako da se dobije ispravna apsorpcija.

Određivanje apsorpcije

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 doseže 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 alikvota 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 slijepe 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 hidroksimetilfurfurala 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 refraktrometrijom 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 hidroksimetilfurfurala dosadašnja točka **a)** mijenja se i glasi: "**a) Određivanje hidroksimetilfurfurala (HMF) metodom HPLC-a (High Performance Liquid Chromatography)**", a dosadašnje toč. **a)** i **b)** postaju toč. **b)** i **c)**.

Određivanje hidroksimetilfurfurala (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-(hidroksimetil) furan-2-karbaldehida. Rezultat se obično izražava u miligramima 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 uzoraka standarda poznate koncentracije.

Reagensi

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

Standardna otopina: 5-(hidroksimetil) 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 apsorbanacija 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, $a_{1cm1\%} = 133.57$ (3).

koncentracija u mg/L = $\frac{A}{1 \times 133.57} \times 1,000$, gdje je A apsorbanacija 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 μ m, 125 mm x 4 mm ili 250 mm x 4 mm
- Membranski filter, 0.45 μ m (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 μ m kako bi se dobila otopina uzorka spremna za kromatografiju.

Uvjeti kromatografiranja:

- brzina protoka 1,0 ml/min
- volumen injektiranja 20 μ L 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 hidroksimetilfurfurala u alkoholu i medu. (J. Jeuring i F. Kupperts, J. Ass. Chem. 63, 1215 (1980).
2. Određivanje hidroksimetilfurfurala pomoću HPLC-a, (Swiss Food Manual, Kapitel Honig, Eidg. Druck und Material Zentrale (1995).
3. Spektrofotometrijska metoda za određivanje hidroksimetilfurfurala 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 hidroksimetilfurfurala 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)".

Чланак 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.

Чланак 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.

МИНИСТАРСТВО СПОЉНЕ ТРГОВИНЕ И ЕКОНОМСКИХ ОДНОСА БОСНЕ И ХЕРЦЕГОВИНЕ

870

На основу члана 12. Одлуке о управљању тарифним квотата утврђеним Протоколом уз Споразум о стабилизацији и придруживању између Европских заједница и њихових држава чланица, с једне стране, и Босне и Херцеговине, с друге стране, како би се узело у обзир приступање Републике Хрватске Европској унији ("Службени гласник БиХ", бр. 8/17 и 50/17), и члана 61. став (2) Закона о управи ("Службени гласник БиХ", бр. 32/02 и 102/09), министар спољне трговине и економских односа Босне и Херцеговине доноси

УПУТСТВО

О ИЗМЈЕНИ УПУТСТВА О ПРОВОЂЕЊУ ОДЛУКЕ О УПРАВЉАЊУ ТАРИФНИМ КВОТАМА УТВРЂЕНИМ ПРОТОКОЛОМ УЗ СПОРАЗУМ О СТАБИЛИЗАЦИЈИ И ПРИДРУЖИВАЊУ ИЗМЕЂУ ЕВРОПСКИХ ЗАЈЕДНИЦА И ЊИХОВИХ ДРЖАВА ЧЛАНИЦА, С ЈЕДНЕ СТРАНЕ, И БОСНЕ И ХЕРЦЕГОВИНЕ, С ДРУГЕ СТРАНЕ, КАКО БИ СЕ УЗЕЛО У ОБЗИР ПРИСТУПАЊЕ РЕПУБЛИКЕ ХРВАТСКЕ ЕВРОПској УНИЈИ

Члан 1.

У Упутству о провођењу Одлуке о управљању тарифним квотата утврђеним Протоколом уз Споразум о стабилизацији и придруживању између Европских заједница и њихових држава чланица, с једне стране, и Босне и Херцеговине, с друге стране, како би се узело у обзир приступање Републике Хрватске Европској унији ("Службени гласник БиХ", број 33/17) члан 7. став (1) мијења се и гласи:

"(1) Министарство издаје Одобрење о повлачењу из тарифне квоте (у даљем тексту: Одобрење) на обрасцу из Прилога 2. овог Упутства, које потписује Помоћник министра за царинску политику и тарифе."

Члан 2.

Ово Упутство ступа на снагу даном доношења и објављује се у "Службеном гласнику БиХ".

Број 07-4-20-4474/19
17. децембра 2019. године

Министар
Мирко Шаровић, с. р.

На основу члана 12. Одлуке о управљању тарифним квотата утврђеним Протоколом уз Споразум о стабилизацији и придруживању између Европских заједница и њихових држава чланица, с једне стране, и Босне и Херцеговине, с друге стране, како би се узело у обзир приступање Републике Хрватске Европској унији ("Службени гласник БиХ", бр. 8/17 и 50/17), и члана 61. став (2) Закона о

управи ("Службени гласник БиХ", бр. 32/02 и 102/09), министар ванjsке трговине и економских односа Босне и Херцеговине доноси

УПУТСТВО

О ИЗМЈЕНИ УПУТСТВА О ПРОВОЂЕЊУ ОДЛУКЕ О УПРАВЉАЊУ ТАРИФНИМ КВОТАМА УТВРЂЕНИМ ПРОТОКОЛОМ УЗ СПОРАЗУМ О СТАБИЛИЗАЦИЈИ И ПРИДРУЖИВАЊУ ИЗМЕЂУ ЕВРОПСКИХ ЗАЈЕДНИЦА И ЊИХОВИХ ДРЖАВА ЧЛАНИЦА, С ЈЕДНЕ СТРАНЕ, И БОСНЕ И ХЕРЦЕГОВИНЕ, С ДРУГЕ СТРАНЕ, КАКО БИ СЕ УЗЕЛО У ОБЗИР ПРИСТУПАЊЕ РЕПУБЛИКЕ ХРВАТСКЕ ЕВРОПској УНИЈИ

Члан 1.

У Упутству о провођењу Одлуке о управљању тарифним квотата утврђеним Протоколом уз Споразум о стабилизацији и придруживању између Европских заједница и њихових држава чланица, с једне стране, и Босне и Херцеговине, с друге стране, како би се узело у обзир приступање Републике Хрватске Европској унији ("Службени гласник БиХ", број 33/17) члан 7. став (1) мијења се и гласи:

"(1) Министарство издаје Одобрење о повлачењу из тарифне квоте (у даљем тексту: Одобрење) на обрасцу из Прилога 2. овог Упутства, које потписује Помоћник министра за царинску политику и тарифе."

Члан 2.

Ово Упутство ступа на снагу даном доношења и објављује се у "Службеном гласнику БиХ".

Број 07-4-20-4474/19
17. децембра 2019. године

Министар
Мирко Шаровић, с. р.

Темелјем члана 12. Одлуке о управљању тарифним квотата утврђеним Протоколом уз Споразум о стабилизацији и придруживању између Европских заједница и њихових држава чланица, с једне стране, и Босне и Херцеговине, с друге стране, како би се узело у обзир приступање Републике Хрватске Европској унији ("Службени гласник БиХ", бр. 8/17 и 50/17), и члана 61. став (2) Закона о управи ("Службени гласник БиХ", бр. 32/02 и 102/09), министар ванjsке трговине и економских односа Босне и Херцеговине доноси

УПУТУ

О ИЗМЈЕНИ УПУТЕ О СПРОВОЂЕЊУ ОДЛУКЕ О УПРАВЉАЊУ ТАРИФНИМ КВОТАМА УТВРЂЕНИМ ПРОТОКОЛОМ УЗ СПОРАЗУМ О СТАБИЛИЗАЦИЈИ И ПРИДРУЖИВАЊУ ИЗМЕЂУ ЕВРОПСКИХ ЗАЈЕДНИЦА И ЊИХОВИХ ДРЖАВА ЧЛАНИЦА, С ЈЕДНЕ СТРАНЕ, И БОСНЕ И ХЕРЦЕГОВИНЕ, С ДРУГЕ СТРАНЕ, КАКО БИ СЕ УЗЕЛО У ОБЗИР ПРИСТУПАЊЕ РЕПУБЛИКЕ ХРВАТСКЕ ЕВРОПској УНИЈИ

Чланак 1.

У Упути о спровођењу Одлуке о управљању тарифним квотата утврђеним Протоколом уз Споразум о стабилизацији и придруживању између Европских заједница и њихових држава чланица, с једне стране, и Босне и Херцеговине, с друге стране, како би се узело у обзир приступање Републике Хрватске Европској унији ("Службени гласник БиХ", број 33/17) чланак 7. став (1) мијења се и гласи:

"(1) Министарство издаје Одобрење о повлачењу из тарифне квоте (у даљем тексту: Одобрење) на обрасцу из Прилога 2. овог Упутства, које потписује Помоћник министра за царинску политику и тарифе."