

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 organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, na sjednici, održanoj 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 Aneksu II. Poglavlje II. Metode fizičkih, kemijskih i bioloških analiza kojima se vrši kontrola meda i drugih pčelinjih proizvoda, iza Odjeljka D, dodaje se novi Odjeljak D1. koji glasi :

„Određivanje šećera metodom HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Područje primjene

Metoda se primjenjuje za kvantitativno određivanje fruktoze, glukoze, saharoze, turanoze i maltoze u medu. Može se koristiti i za kvantitativno određivanje ostalih šećera u medu kao što su melecitoza, erloza, izomaltoza, raninoza i drugi kao što je opisano u izvorno objavljenom metodi Bogdanov i Baumann.

Sadržaj

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

Princip

Ova metoda se temelji na izvorno objavljenom metodi Bogdanov i Baumann (1).

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

Reagensi

Ako nije navedeno drugačije, potrebno je koristiti reagense analitičke čistoće. Mora se koristiti destilirana voda ili druga ekvivalentene analitičke čistoće.

Metanol, HPLC čistoće

Acetonitril, HPLC čistoće

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

Standardne supstance fruktoza, glukoza, saharoza, turanoza i maltoza mogu se nabaviti od uobičajenih dobavljača, kao i melecitoza, rafinoza i izomaltoza. Vidjeti u prilogu (1) rezolucije i vremena zadržavanja svih šećera u medu.

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

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

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

Otopine standarda su stabilne 4 sedmice u frižideru na 4 °C ili šest mjeseci na -18 °C.

Pribor i oprema

Vialice za uzorke

Ultrasonično kupatilo

Kalibrisani normalni sudovi od 100 mL

Pipete od 25 mL

Membranski filteri za vodene rastvore, veličina pora 0,45 μm

Odgovarajuća šprica sa adapterom za membranske filtere

HPLC uređaj sa pumpom, odgovarajućim injektorom, RI detektorom sa regulatorom temperature, termostatom kolone i integratorom.

HPLC kolona, npr. 4.6 mm dijametar, 250 mm dužina, punjena aminomodificiranim silika-gelom veličine čestica 5-7 μm.

Preporuka: prije upotrebe HPLC kolone uraditi test prikladnosti (system suitability test) da bi se utvrdila separacija šećera.

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

Postupak

Priprema uzorka

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 sa vodom do marke. Profiltrirati uzorke i prenijeti u označene vial. Uskladištiti otopine kao i otopine standarda ako je potrebno.

HPLC uvjeti

Ako se upotrijebi kromatografska kolona prethodno opisana onda zadovoljavajući rezultati se mogu očekivati u sljedećim uvjetima: 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 kromatografiranje provesti sa temperaturom kolone i detektora na 30 °C onda se može raditi u ambijentalnim uvjetima. U ovim uvjetima separacija melecitoze i erloze neće biti uspješna.

Napomena 2: Volumen injektiranja otopina uzorka i standarda je identičan.

Proračun i izražavanje rezultata

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

Maseni procenat određenih 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, A₁ = površina ili visina pika šećera iz otopine standarda; A₂ = površina ili visina pika šećera iz otopine uzorka; V₁ = Ukupni volumen otopine uzorka (mL); V₂ = Ukupni volumen otopine standarda (mL); m₁ = masa šećera (g) u ukupnom volumenu otopine standarda (V₂). m₀ = odvaga uzorka (g). Rezultat se zaokruži na jedno decimalno mjesto.

Preciznost postupka

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

Sample No. g	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

Sample No. g	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

Sample No. g	Saharoza g/100	r	R
1	-	-	-
2	-	-	-
3	2.8	0.4	0.9

Sample No. g	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

Sample No. g	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 kod svih laboratorija učesnica u testiranju.

Reference:

1. S. Bogdanov, S.E. Baumann, *Određivanje šećera meda s HPLC. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 79, 198-206. (1988).
2. DIN standard 10758, *Određivanje sadržaja saharida. HPLC metoda.* (1992).
Preuzeto iz međunarodne komisije za med (2009).“

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

„Odjeljak I. Određivanje aktivnosti dijastaze

a) Metoda I (odgovara metodi Schade)

Područje primjene

Ova metoda se može 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. Standardna otopina škroba u reakciji sa 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 apsorbacije i vremena određuje se t_x – reakciono vrijeme nestajanja boje do specifične apsorbancije 0,235. Aktivnost dijastaze se izražava kao broj $300/t_x$. Ova metoda je bazirana na originalnoj metodi Schade i drugi (1) 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 1 litar, 0,5 litara, 0,1 litara;
- (2) konusna tikvica zapremine 0,250 litra;
- (3) plamenik;
- (4) vodeno kupatilo na $40 \pm 0,2$ °C;
- (5) spektrofotometar sa očitavanjem na 660 nm.

Reagensi

- (1) Matični rastvori joda: rastvori se 8,8 g joda p.a., pomiješa se sa 22 g kalijum 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 $c\left(\frac{J_2}{2} 0,0007 \text{ mol/l}\right)$: u odmjerne tikvici

(3) Acetatni pufer- pH 5,3: rastvori se 87 g natrijum-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 natrijum-acetatom ili sirćetnom kiselinom do 5,3 uz korišćenje pH metra, po potrebi.

(4) Rastvor natrijum-klorida, $c(\text{NaCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$: rastvori se 1,45 g natrijum-klorida u prokuhanoj destiliranoj vodi i dopuni do 50 ml. Rok trajanja tog rastvora je ograničen.

(5) Skrob rastvorljivi p.a. (npr. iz krompira)

(6) Određivanje vode u rastvorljivom skrobu

Odmjeri se oko 2 g rastvorljivog skroba i u tankom sloju rasporedi na dno posudice promjera 5 cm. Suši se sat i po na temperature od 130°C . Zatim se ohladi u eksikatoru i premjeri. Gubitak mase u odnosu na 100g jeste količina vode.

(7) Rastvor skroba

Odmjeri se količina skroba koja odgovara masi od 2,0 g bezvodnog skroba 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 sa plamenika, pokrije i ostavi da se postepeno ohladi do sobne temperature. Rastvor se zatim prenese u odmjernu bocu od 100 ml i stavi na vodeno kupatilo zagrijano na 40°C . Kad rastvor dostigne tu temperature, 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 natrijum-klorida i otopljen rastvor meda i dopuni vodom do oznake.

Uzorak mora biti puferiziran prije miješanja sa natrijum-kloridom.

Pripremanje standardnog rastvora

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

ml i doda u 10 ml $0,0007 \text{ mol/l} \left(\frac{J_2}{2}\right)$ rastvora joda, razblaži sa 35 ml vode i izmiješa.

Nastala boja očitava se na 660 nm prema slijepoj probi.

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

Određivanje apsorpcije

Pipetom se odmjeri 10 ml rastvora meda, prenese u gradirani cilindar od 50 ml i stavi u vodeno kupatilo na temperaturi od $40^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$, zajedno sa posudom u kojoj je rastvor skroba. Poslije 15 minuta, pipetom se odmjeri 5 ml rastvora skroba 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 apsorbcija ne smanji do vrijednosti od 0,235.

Izračunavanje i izražavanje rezultata

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

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

Aktivnost dijastaze DN= ml 1%-nog rastvora skroba po g meda/h pri temperature od 40°C

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

gdje je: t- redukcija u minutama.

Preciznost postupka

Parametri ponovljivosti (r) i reproducibilnosti (R) su određeni u međulaboratorijskom testiranju u 14 laboratorija evropske unije (5, 6) na devet uzoraka meda pri čemu su dobijeni sljedeći rezultati:

BD	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 su dobijene sljedeće korelacione jednačine:

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

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

b) Metoda II (Određivanje aktivnosti dijastaze sa Phadebas)

Područje primjene

Ova metoda se može primijeniti na sve uzorke meda.

Definicija

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

Princip

Određivanje dijastatske aktivnosti meda je fotometrijska metoda po kojoj se nerastvorljiva plavo obojena umrežena vrsta skroba koristi kao supstrat. Hidrolizuje ga enzim dajući plave fragmente koji su topivi u vodi i koji se određuju fotometrijski na 620 nm. Apsorbancija rastvora je direktno proporcionalna dijastatskoj aktivnosti uzorka. Metoda se zasniva na prvobitno objavljenoj metodi od Siegenthaler (1) i izmijenjenoj od Bogdanov (2).

Reagensi

(1) Phadebas tablete, Pharmacia Diagnostics;

(2) Natrijum hidroksid 0.5M.

(3) Acetatni pufer (0.1M, pH 5.2): Rastvoriti 13.6 g natrijum acetat trihidrata u vodi. Podesiti pH rastvora do 5.2 sa glacijalnom sirćetnom kiselinom (1 - 2 ml) i razblažiti do 1L sa vodom.

Oprema

(1) fotometar/spektrofotometar

(2) Vortex

(3) Termostatsko vodeno kupatilo

(4) Štoperica

Procedura

Priprema test uzoraka

Određivanje

Odmjeriti 1.00 g meda u odmjernu tikvicu od 100ml, rastvoriti u acetatnom puferu i dopuniti do oznake. Dovršiti proceduru u roku od jednog sata. Prebaciti 5.0 ml rastvora u test epruvetu i postaviti u vodeno kupatilo na 40°C. Pripremiti slijepu probu postavljanjem 5.0 ml alikvota acetat pufera u drugu test 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 (cca. 10 sekundi) i vratiti ih u vodeno kupatilo.

Prekinuti reakciju nakon tačno 15 minuta dodavanjem 1 ml rastvora natrijum hidroksida. Ponovo smjesu izmiješati na Vortexu približno 5 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 se oduzima iz rastvora uzorka (ΔA_{620}). Ako je apsorbancija veća od 1.0, razblažiti uzorak sa vodom. Uzeti u obzir faktor razblaženja prilikom računanja rezultata.

Računanje i izražavanje rezultata

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

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

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

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

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

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 BD (y osi).

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

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

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

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

Preciznost

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

1. Tri različite vrste meda su bile testirane u tri laboratorije. Maksimalno odstupanje (raspon) BD utvrđeno sa tabletama iz iste serije, između laboratorija, bilo je 3.7 %
2. Standardno odstupanje dijastatske aktivnosti utvrđene sa 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 je rađeno 1992 sa 14 laboratorija evropske unije i 21 švajcarskom laboratorijom od strane International Honey Commission sa metodom Phadebas sa 7 medova čije su vrijednosti A_{620} varirale od 0,31 do 1,29 (6). Nisu bile naznačene serije reagensa Phadebas.

Dobijene 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. U.Siegenthaler, određivanje amilaze u medu s komercijalno dostupnim supstratom označenim bojom, *Mitt Geb. Lebensm. Hig* 66, 393-399 (1975).
2. S. Bogdanov, Honig Diastase, Usporedba različitih metoda određivanja, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 75, 214-220 (1984)
3. J.E.Schade, G.L.Marsh i J.E.Eckert: Aktivnost diastaze i hidrosimetilfurfural u medu i njihova korisnost u otkrivanju toplinske adulteracije. *Food Research* 23, 446-463 (1958).
4. DIN-NORM 10750 Određivanje aktivnosti diastaze. (1990) ..
5. Određivanje amiloaktivnosti (prema Phadebasu), Švicarska knjiga hrane Poglavlje 23: Med, EDMZ, Bern, (1995).
6. S.Bogdanov i P. Lischer, Međulaboratorijsko ispitivanje Međunarodne komisije za med: Metode određivanja Phadebas i Schade diastaze, Vlažnost refraktometrijom i aktivnost invertaze: Izvještaj za sudionike (1993).
7. L. Persano Oddo, P. Pulcini, Znanstvena napomena o Phadebasovoj metodi za mase s niskim sadržajem enzima, *Apidologie* 30, 347-348 (1999). "

Na kraju Odjeljka J. Određivanje hidrosimetilfurfurola iza tačke b) dodaje se nova tačka c), koja glasi:

„Određivanje hidrosimetilfurfurola (HMF) metodom HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Metoda se može primijeniti na sve uzorke meda. Manje uzorka je potrebno kada je koncentracija HMF vrlo visoka. Metodom se određuje koncentracije 5- (hidrosimetil) furan-2-karbaldehida. Rezultat se obično izražava u miligramima po kilogramu.

HMF se odredi u bistroj, filtriranoj vodenoj otopini meda upotrebom HPLC reverzne faze sa 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- (hidrosimetil) furan-2-karbaldehid (HMF), (npr. Merck br. 820 678 ili Fluka br. 55690). Od osnovne otopine HMF-a pripremiti kalibracione otopine 1, 2, 5 i 10 mg / L vodene otopine. Otopine treba pripremiti na dan korištenja.

Određivanje sadržaja u standardu HMF-a: Apsorbancija A pripremljene standardne otopine određena je pomoću UV spektrofotometra na 285 nm u 1 cm kvarcnim kivetama s vodom u praznoj ćeliji. Koncentracija standarda otopine se mogu izračunati iz literaturnih vrijednosti za molarnu 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 apsorbancija standardne otopine.

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

Preporuka: Najbolje je HMF standard čuvati pod dušikom.

Aparatura i pribor

- Tečni kromatograf (HPLC) s UV detektorom i integratorom
- Kolona: bilo koja sa 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 cca. 25 ml vode i kvantitativno prenijeti u volumetrijsku tikvicu od 50 ml. Razrijediti do 50 ml sa vodom. Filtrirati uzorak kroz membranski filter od 0,45 µm da bi se dobila otopina uzorka spremna za kromatografiju.

Uvjeti kromatografiranja:

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 usporedbom pika iz uzorka i standardnih otopina, 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 je određena od Međunarodne komisije za med. Ponovljivost (r) i reproducibilnost (R) su izračunati iz rezultata tri vrste meda analiziranog u svim laboratorijima koje su sudjelovale u poredbenim testiranjima, prikazano u sljedećoj tabeli.

Uzorak br.	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 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 usporedbi s HMF-om, može se koristiti ista metoda. Furfural eluira oko 1,5 minuta nakon HMF-a.

Reference:

1. J. Jeuring i F. Koppers, visoko učinkovita tekuća kromatografija furfurala i hidroksimetilfurfurala u alkoholu i medu. *J.Ass. Chem.* 63, 1215 (1980).

2. Određivanje hidroksimetilfurfurala pomoću HPLC, *Swiss Food Manual, Kapitel Honig, Eidg. Druck und Material Zentrale* (1995).

3. J. White, Spektrofotometrijska metoda za određivanje hidroksimetilfurfural u medu, *J. Ass Off. Chem.* 62, 509 (1979).

4. V. Figueiredo, Izveštaj o HMF inter laboratorijskom ispitivanju Međunarodne komisije meda, Basel, (1991)

Preuzeto iz međunarodne komisije za med (2009).“

Članak 2.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH”

Predsjedavajući
Vijeća ministara BiH
Dr.Denis Zvizdić

VM broj _____
_____ 2019 godine
Sarajevo