*UE*

*Proiect*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| **GUVERNUL REPUBLICII MOLDOVA****H O T Ă R Â R E nr**.**\_\_\_\_\_\_\_****din** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ **2023****Chișinău** |

**Cu privire la modificarea Hotărârii Guvernului nr. 1459/2016 cu privire la aprobarea Metodologiei de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate**

În temeiul Legii nr. 306/2018 privind siguranța alimentelor (Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 2019, nr. 59-65 art. 120),

**Guvernul HOTĂRĂŞTE:**

Hotărârea Guvernului nr. 1459/2016 cu privire la aprobarea Metodologiei de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate (Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 2017, nr. 50-59, art.115) se modifică după cum urmează:

1. În clauza de adoptare, textul „Legii nr. 78-XV din 18 martie 2004 privind produsele alimentare (Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 2004, nr. 83-87, art. 431)” se substituie cu textul „Legii nr. 306/2018 privind siguranța alimentelor (Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 2019, nr. 59-65, art. 120)”;
2. Clauza de armonizare se modifică și va avea următorul cuprins:

„Metodologia de analiză şi evaluare calitativă a laptelui şi a produselor lactate (în continuare – Metodologie) transpune parțial Regulamentul (UE) 2016/1240 al Comisiei din 18 mai 2016 de stabilire a normelor de aplicare a Regulamentului (UE) nr. 1308/2013 al Parlamentului European și al Consiliului în ceea ce privește intervenția publică și ajutorul pentru depozitarea private, publicat în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene L 206 din 30 iulie 2016, așa cum a fost modificat ultima dată prin Regulamentul (UE) 2018/150 al Comisiei din 30 ianuarie 2018”;

1. Pe tot parcursul textului, textul „balanță analitică” se substituie cu textul „cântar analitic”;
2. La pct. 27, textul „SM SR EN ISO/CEI 17025” se substituie cu textul „SM EN ISO/IEC 17025:2018”;
3. La pct. 31, textul „pct. 5.10 din standardul SM SR EN ISO/CEI 17025” se substituie cu textul „pct. 7.8 din standardul SM EN ISO/IEC 17025:2018”;
4. Anexa nr.1 la Metodologie, va avea următorul cuprins:

„Anexa nr.1

la Metodologia de analiză și

evaluare calitativă a laptelui

și a produselor lactate

**LISTA**

**Metodelor de referință**

**Partea I**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Produsul** | **Parametrul** | **Limita(1)** | **Metoda de referinţă** | **Notă** |
| Unt fără sare | Grăsime | min. 82 % m/m | SM SR EN ISO 17189:2012 |  |
| Umiditate | max. 16 % m/m | SM SR EN ISO 3727-1:2012 |  |
| Substanțe solide fără grăsimi (SNF) | max. 2 % m/m | SM SR EN ISO 3727-2:2012 |  |
| Acizi graşi liberi | max. 1,2 mmol/100 g grăsime | SM ISO 1740:2015 |  |
| Valoarea indicelui de peroxid (PV) | max. 0,3 meq oxigen/1000 g grăsime | SM ISO 3976:2015 | *Nota 1* |
| Bacterii coliforme | nedetectabile în 1g | Anexa nr. 9 | *Nota 4* |
| Grăsimi care nu provin din lapte | Nedetectabile prin analiza trigliceridică | Anexa nr. 19 |  |
| Marcatori de steroli | Nedetectabili, β-sitosterol ≤ 40 mg/kg | Anexa nr. 7 |  |
| Alți marcatori: |  |  |  |
| -vanilină | Nedetectabilă | Anexa nr. 5 |  |
| -etil esterul acidului carotenic | ≤ 6 mg/kg | Anexa nr. 6 |  |
| -trigliceride ale acidului enantic | Nedetectabile | Anexa nr. 4 |  |
| Caracteristici senzoriale | Cel puţin 4 din 5 puncte pentru aspect, miros şi consistență | Anexa nr. 3 |  |
| Dispersia apei | Cel puţin 4 puncte |  | *Nota 2* |
| Unt sărat | Grăsime | min. 80 % m/m | SM SR EN ISO 17189:2012 |  |
| Grăsimi care nu provin din lapte | Nedetectabile prin analiza trigliceridelor | Anexa nr. 19 |  |
| Umiditate | max. 16 % m/m | SM SR EN ISO 3727-1:2012 |  |
| Substanțe solide fără grăsimi (SNF) (cu excepția sării) | max. 2 % m/m | SM SR EN ISO 3727-2:2012 |  |
| Sare | max. 2 % m/m | SM ISO 15648:2015 |  |
| Marcatori: |  |  |  |
| -steroli | A se vedea anexa nr. 7 | Anexa nr. 7 |  |
| -vanilină | A se vedea anexa nr. 5 | Anexa nr. 5 |  |
| -etil esterul acidului carotenic | A se vedea anexa nr. 6 | Anexa nr. 6 |  |
| -trigliceride ale acidului enantic | A se vedea anexa nr. 4 | Anexa nr. 4 |  |
| Unt concentrat utilizat pentru fabricarea produselor de patiserie, îngheţatei şi altor produse alimentare | Grăsime | min. 99,8 % m/m | SM ISO 8851-3:2015  |  |
| Umiditate şi Substanțe solide fără grăsimi (SNF) | max. 0,2 % m/m | SM ISO 8851-1:2015 SM ISO 8851-2:2015  |  |
| Acizi graşi liberi | max. 1,2 mmol/100 g grăsime | SM ISO 1740:2015 |  |
| Valoarea indicelui de peroxid (PV) | max.0,5 mechiv. oxigen/1000 g grăsime | SM ISO 3976:2015 | *Nota 1* |
| Grăsime care nu provine din lapte | Absentă | Anexa nr. 19 |  |
| Aromă | Proaspătă |
| Miros | Fără mirosuri străine |
| Altele | Absența agenților de neutralizare, a antioxidanților și conservanților |  |
| Marcatori: |  |  |  |
| -steroli | A se vedea anexa nr. 7 | Anexa nr. 7 |  |
| -vanilină | A se vedea anexa nr. 5 | Anexa nr. 5 |  |
| -etil esterul acidului carotenic | A se vedea anexa nr. 6 | Anexa nr. 6 |  |
| -trigliceride ale acidului enantic | A se vedea anexa nr. 4 | Anexa nr. 4 |  |
| Unt concentrat destinat consumului direct | Grăsime | min. 96 % m/m | SM ISO 8851-3:2015 |  |
| Grăsime care nu provine din lapte |  | Anexa nr. 19 |  |
| Substanțe solide fără grăsimi (SNF) | max. 2 % m/m  | SM SR EN ISO 3727-2:2012 |  |
| Marcatori: |  |  |  |
| -stigmasterol (95 % m/m) | 15 g/100 kg de unt concentrat | Anexa nr. 7  |  |
| -stigmasterol (85 % m/m) | 17 g/100 kg de unt concentrat | Anexa nr. 7  |  |
| -trigliceride ale acidului enantic | 10,34 g/100 t de unt concentrat | Anexa nr. 4 |  |
| -etil ester al acidului butiric și stigmasterol |  | * etil esterul acidului butiric;
* anexa nr. 8 (stigmasterol)
 | *Nota 2* |
| -etil esterul acidului butiric și trigliceridele acidului enantic |  | * etil esterul acidului butiric;
* anexa nr. 5 (trigliceride ale acidului enantic)
 | *Nota 2* |
| Lecitină (E 322) | max. 0,5 % m/m |  | *Nota 2* |
| NaCl | max. 0,75 % m/m  | SM ISO 15648:2015 |  |
| Acizi grași liberi | max. 1,2 mmol/100 g grăsime | SM ISO 1740:2015 |  |
| Valoarea indicelui de peroxid (PV) | max. 0,5 mechiv. oxigen/1000 g grăsime | SM ISO 3976:2015 | *Nota 1* |
| Aromă | Proaspătă |  |  |
| Miros | Fără mirosuri străine |  |  |
| Altele | Absenţa agenţilor de neutralizare, a antioxidanţilor şi a conservanţilor |  |  |
| Smântână | Grăsime | min. 35 % m/m | SM EN ISO 450:2014 |  |
| Grăsime care nu provine din lapte |  | Anexa nr. 19 |  |
| Marcatori: |  |  |  |
| -steroli | A se vedea anexa nr. 7 |  | *Nota 2* |
| -vanilină | A se vedea anexa nr. 5 | Anexa nr. 5 |  |
| -etil esterul acidului carotenic | A se vedea anexa nr. 6 |  | *Nota 2* |
| -trigliceride ale acidului enantic | A se vedea anexa nr. 4 | Anexa nr. 4 |  |
| Brânză produsă din lapte de oaie şi/sau capră | Lapte de vacă | < 1 % m/m | Anexa nr. 8 |  |
| Cazeină acidă  | Umiditate | max. 12,00 % m/m | SM ISO 5550:2015 |  |
| Grăsime | max. 1,75 % m/m | SM ISO 5543:2015 |  |
| Aciditate liberă | max. 0,30 ml soluţie 0,1 N NaOH/g | SM ISO 5547:2012 |  |
| Numărul total de bacterii (TBC) | max. 30000/g | SM EN ISO 4833-1:2014SM EN ISO 4833-2:2014 | *Nota 3* |
| Bacterii coliforme | Absente în 0,1 g | Anexa nr. 9 | *Nota 3* |
| Numărul de bacterii termofile (Therm) | max. 5000/g | SM EN ISO 4833-1:2014SM EN ISO 4833-2:2014 | *Notele 3 și 4* |
| Cazeină cheag | Umiditate | max. 12,00 % m/m | SM ISO 5550:2015 |  |
| Grăsime | max. 1,00 % m/m | SM ISO 5543:2015 |  |
| Cenuşă | min. 7,50 % m/m | SM SR ISO 5545:2012 |  |
| Numărul total de bacterii (TBC) | max. 30000/g | SM EN ISO 4833-1:2014SM EN ISO 4833-2:2014 | *Nota 3* |
| Bacterii coliforme | Absente în 0,1 g | Anexa nr. 9 | *Nota 3* |
| Numărul de bacterii termofile (Therm) | max. 5000/g | SM EN ISO 4833-1:2014SM EN ISO 4833-2:2014 | *Notele 3 și 4* |
| Cazeinaţi  | Umiditate | max. 6,00 % m/m | SM ISO 5550:2015 |  |
| Proteine ale laptelui | min. 88,00 % m/m | SM SR ISO 5549:2012 |  |
| Grăsime | max. 1,50 % m/m | SM ISO 5543:2015 |  |
| Cenuşă | max. 6,50 % m/m | SM ISO 5544:2015SM SR ISO 5545:2012 |  |
| Cenuşă insolubilă |  | SM ISO 5544:2015 |  |
| Lactoză | max. 1,00 % m/m | SM ISO 5548:2015 |  |
| Numărul total de bacterii (TBC) | max. 30000/g | SM EN ISO 4833-1:2014SM EN ISO 4833-2:2014 | *Nota 3* |
| Bacterii coliforme | Absente în 0,1 g | Anexa nr. 9 | *Nota 3* |
| Numărul de bacterii termofile (Therm) | max. 5000/g | SM EN ISO 4833-1:2014SM EN ISO 4833-2:2014 | *Notele 3 și 4* |
| Furaje combinate şi lapte praf degresat (SMP) (folosite în furaje) | Umiditate (zară acidă praf) | max. 5 % m/m | Anexa nr. 18 |  |
| Proteine | min. 31,4 % m/m din materia uscată negrasă | SM EN ISO 8968-1:2014 SM EN ISO 8968-3:2014 |  |
| Umiditate (SMP) | max. 5 % m/m | SM EN ISO 5537:2014 |  |
| Grăsimi (SMP) | max. 11 % m/m | SM SR EN ISO 1736:2012 |  |
| Zer închegat (SMP) | Absent | Anexa nr. 12 |  |
| Amidon (SMP) | Absent | Anexa nr. 16 |  |
| Umiditate (amestecuri) | max. 5 % din materia negrasă | SM EN ISO 5537:2014 |  |
| Grăsime (amestecuri) |  | SM SR ISO 6492:2012 |  |
| Zer închegat (amestecuri) | Absent | Anexa nr. 12 |  |
| Conţinutul SMP (din produsul final) | min. 50 % m/m | Anexa nr. 15 |  |
| Grăsime (din produsul final) | min. 2,5 % m/m sau 5 % m/m | SM SR ISO 6492:2012 |  |
| Amidon (din produsul final) | min. 2 % m/m | Anexa nr. 16 |  |
| Cupru (din produsul final) | 25 ppm | SM SR EN ISO 6869:2012 |  |
| SPM (spray) | Grăsime | max. 1,0 % m/m | SM SR EN ISO 1736:2012 |  |
| Proteine | min. 34 m/m din materia uscată negrasă | SM EN ISO 8968-1:2014  |  |
| Umiditate | max. 3,5 % m/m | SM EN ISO 5537:2014 |  |
| Aciditate | max. 19,5 ml, 0,1 N NaOH, 10 g substanţe solide fără grăsimi | SM ISO 6091:2014 |  |
| Lactaţi | max. 150 mg/100 g substanţe solide fără grăsimi | SM EN ISO 8069:2014 |  |
| Fosfatază | Negativ | SM EN ISO 11816-1:2014 |  |
| Indicele de insolubilitate | max. 0,5 ml la 240C | SM STB ISO 8156:2015 |  |
| Particule arse | Disc A sau B (15,0 mg) |  | *Nota 2* |
| Numărul total de bacterii (TBC) | 40000/g | SM EN ISO 4833-1:2014SM EN ISO 4833-2:2014 | *Nota 3* |
| Bacterii coliforme | Negativ/0,1 g | Anexa nr. 9 | *Nota 3* |
| Zară | Negativ | Anexa nr. 13 |  |
| Zer închegat | Negativ | Anexa nr. 11 |  |
| Zer acid | Negativ |  | *Nota 2* |
| Agenţi antimicrobieni |  | Anexa nr. 14 |  |

1. Fără a se aduce atingere cerinţelor prezentei Metodologii.

**Partea II**

**Metodele de referință enumerate în partea II pot fi folosite pentru analiza laptelui și a produselor lactate**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Produsul** | **Codul poziţiei tarifare** | **Parametrul** | **Limita** | **Metoda de referinţă** | **Notă** |
| Lapte şi smântână din lapte, neconcentrate, fără adaos de zahăr sau de alţi îndulcitori | 0401 | Grăsime(≤ 6 % m/m) | Limitele sânt cele specificate în descrierea codului NC pentru produsul respectiv | SM EN ISO 1211:2015 |  |
| Grăsime(> 6 % m/m) |  | SM EN ISO 2450:2014 |  |
| Lapte şi smântână din lapte, concentrate sau cu adaos de zahăr sau ori de alţi îndulcitori | 0402 | Grăsime (formă lichidă) |  | SM EN ISO 1737:2015 |  |
| Grăsime (formă solidă) |  | SM SR EN ISO 1736:2012 |  |
| Proteine  |  | SM EN ISO 8968-1:2014 SM EN ISO 8968-3:2014 |  |
| Sucroză (conţinut normal) |  | SM ISO 2911:2015 |  |
| Sucroză (conţinut scăzut) |  |  | *Nota 2* |
| Solide (SCM) |  | SM ISO 6734:2015 |  |
| Solide (EMC) |  | SM ISO 6731:2014 |  |
| Umiditate (lapte praf) |  | SM EN ISO 5537:2014 |  |
| Umiditate (smântână praf) |  | Anexa nr. 17 |  |
| Iaurt; zară, lapte şi smântână covăsite, chefir şi alte sortimente de lapte şi smântână fermentate sau acrite, chiar concentrate, sau cu adaos de zahăr ori de alţi îndulcitori, sau aromatizate, ori cu adaos de fructe, fructe cu coajă lemnoasă sau cacao | 0403 | Grăsime |  | SM EN ISO 1211:2015SM SR EN ISO 1736:2012SM EN ISO 2450:2014SM EN ISO 7208:2014SM SR ISO 8262-3:2012 |  |
| Proteine |  | SM EN ISO 8968-1:2014 SM EN ISO 8968-3:2014 |  |
| Sucroză (conţinut normal) |  | SM ISO 2911:2015 |  |
| Sucroză (conţinut scăzut) |  |  | *Nota 2* |
| Umiditate (zară acidă praf) |  | Anexa nr. 18 |  |
| Umiditate (zară dulce praf) |  | SM EN ISO 5537:2014 |  |
| Solide (alte produse) |  |  | *Nota 2* |
| Zer, chiar concentrat sau cu adaos de zahăr sau de alţi îndulcitori; produse obţinute din compuşi naturali ai laptelui, chiar cu adaos de zahăr sau de alţi îndulcitori, nedenumite şi necuprinse în altă parte | 0404 | Grăsime |  | SM SR EN ISO 1736:2012SM EN ISO 2450:2014SM EN ISO 7208:2014 |  |
| Proteine |  | SM EN ISO 8968-1:2014 SM EN ISO 8968-3:2014 |  |
| Sucroză (conţinut normal) |  | SM ISO 2911:2015 |  |
| Sucroză (conţinut scăzut) |  |  | *Nota 2* |
| 0404 90 | Proteine |  | SM EN ISO 8968-1:2014  |  |
| Umiditate |  |  | *Nota 2* |
| Solide |  | SM ISO 6734:2015 |  |
| (Produse concentrate) |  | SM ISO 6731:2014 |  |
| Unt şi alte grăsimi care provin din lapte; pastă din lapte pentru tartine | 0405 | Grăsime (în cazul în care ≤ 85 % m/m) |  | SM SR EN ISO 17189:2012 |  |
| Unt | Umiditate |  | SM SR EN ISO 3727-1:2012 |  |
|  | Substanțe solide fără grăsimi (SNF) |  | SM SR EN ISO 3727-2:2012 |  |
| NaCl |  | SM ISO 15648:2015 |  |
| Grăsime (în cazul în care > 99 % m/m) |  | SM SR EN ISO 17189:2012 |  |
| Ulei de unt |  | Umiditate (în cazul în care < 99 % m/m) |  | SM EN ISO 5536:2014  |  |
| Brânză şi caş | 0406 | Grăsime |  | SM EN ISO 23319:2022 |  |
| Solide |  | SM SR EN ISO 5534:2014 |  |
| Solide (Urdă) |  | SM ISO 2920:2015 |  |
| NaCl |  | SM EN ISO 5943:2012 |  |
| Lactoză |  | SM ISO 5765-1:2015SM ISO 5765-2:2015 |  |
| Preparate de tipul celor utilizate pentru hrana animalelor | 2309 | Lactoză |  | Anexa 20 |  |

***Observații la lista metodelor de referință:***

*Nota 1:* Izolarea grăsimii din lapte conform SM ISO 1740:2015 (la adăpost de lumină).

*Nota 2:* Nu s-a stabilit nici o metodă de referinţă.

*Nota 3:* Proba este preparată conform SM EN ISO 6887-5:2020.

*Nota 4:* Incubate timp de 48 de ore la temperatura de 55˚C, acordându-se atenţie prevenirii uscării mediului de cultură.

*Nota 5:* % m/m SNF = % m/m solide - % m/m grăsime.

***Abrevieri:***

min. = minimum;

max. = maximum;

SNF = substanţe solide fără grăsimi;

PV = valoarea indicelui de peroxid;

TBC = număr total de bacterii;

Therm = număr de bacterii termofile;

SMP = furaje combinate şi lapte praf degresat;

SCM = lapte condensat îndulcit;

EMC = lapte sau smântână evaporate;

ISO = Organizaţia Internaţională de Standardizare.”

1. Anexa nr. 2 la Metodologie, va avea următorul cuprins:

„Anexa nr. 2

la Metodologia de analiză și

evaluare calitativă a laptelui

și a produselor lactate

**Evaluarea conformității unui lot cu limita legală**

1. **Principiul metodei**

În cazul în care legislația prevede proceduri detaliate de prelevare a probelor, aceste proceduri trebuie să fie respectate. În toate celelalte cazuri, se utilizează o probă compusă din cel puțin 3 unităţi de probă luate aleatoriu din lotul supus controlului. Se poate prepara o probă compusă. Rezultatul obţinut este comparat cu limitele stabilite în legislație prin calcularea unui interval de încredere de 95 % ca 2 × deviaţia standard, unde deviaţia standard relevantă depinde:

1. de validarea metodei prin colaborare internaţională cu valorile pentru σr şi σR;

sau

1. în cazul validării interne, de calcularea reproductibilităţii interne.

Acest interval de încredere va fi apoi comparat cu incertitudinea de măsurare a rezultatului.

1. **Validarea metodei prin colaborare internațională**

În cazul în care metoda este validată prin colaborare internaţională, deviația standard σr a repetabilității şi deviația standard σR a reproductibilității au fost stabilite, iar laboratorul poate demonstra conformitatea cu caracteristicile de performanţă a metodei validate.

Se calculează media aritmetică $\overline{x}$ a seriei de n măsurători repetate.

Se calculează incertitudinea extinsă (*k* = 2) a $\overline{x}$ ca:

$U=2\sqrt{σ\_{R}^{2}- \frac{n-1}{n} σ\_{r}^{2} }$.

În cazul în care rezultatul final *x* al măsurătorii este calculat utilizând o formulă de forma x = y1+y2, x=y1–y2, x=y1·y2 sau x=y1/y2, se respectă procedurile uzuale de combinare a deviaţiilor standard în astfel de cazuri.

Lotul este considerat ca nefiind în conformitate cu limita superioară UL stabilită în legislație dacă:

$\overline{x}$– U > UL;

în caz contrar, este considerat ca fiind în conformitate cu UL.

Lotul este considerat ca nefiind în conformitate cu limita inferioară LL stabilită în legislație dacă:

$\overline{x}$ + U < LL;

în caz contrar, este considerat ca fiind în conformitate cu LL.

1. **Validarea internă cu calcularea deviației standard a reproductibilității interne**

În cazurile în care se utilizează metode care nu sunt specificate în prezenta Metodologie şi nu au fost stabilite măsuri de precizie, se efectuează o validare internă. Deviaţia standard a repetabilităţii interne sir şi deviaţia standard a reproductibilităţii interne siR se utilizează în loc de σr și σR, în formulele de calculare a incertitudinii extinse U.

Regulile care trebuie urmate pentru a determina conformitatea cu limita stabilită în legislație, sunt cele prezentate la punctul 1 din prezenta anexă. Cu toate acestea, în cazul în care lotul este considerat neconform cu limita stabilită în legislație, măsurătorile se repetă cu metoda specificată în prezenta Metodologie, iar rezultatul se evaluează în conformitate cu punctul 1.”

1. Anexa nr.8 la Metodologie, va avea următorul cuprins:

„Anexa nr. 8

la Metodologia de analiză și

evaluare calitativă a laptelui

și a produselor lactate

**Metoda de referință pentru detectarea laptelui de vacă şi a cazeinatului**

**în brânzeturile produse din lapte de oaie, lapte de capră sau lapte**

**de bivoliţă sau din amestecuri de lapte de oaie, capră şi bivoliţă**

1. Metoda implică o procedură de detectare a laptelui de vacă şi a cazeinei în brânzeturile produse din lapte de oaie, lapte de capră, lapte de bivoliţă sau din amestecuri de lapte de oaie, capră şi de bivoliţă prin focalizarea izoelectrică a γ-cazeinelor după plasminoliză.
2. Această metodă poate fi utilizată pentru detectarea sensibilă şi specifică a laptelui de vacă natural şi tratat termic şi a cazeinatului în brânzeturile proaspete şi maturate produse din lapte de oaie, lapte de capră, lapte de bivoliţă sau din amestecuri de lapte de oaie, capră şi de bivoliţă. Nu poate fi utilizată pentru detectarea modificării laptelui şi a brânzei cu concentrate proteice din zer de bovine tratate termic.
3. **Principiul metodei constă în:**
4. izolarea cazeinei din brânză şi din standardele de referință;
5. dizolvarea cazeinelor izolate şi supunerea lor la clivare cu plasmină;
6. focalizarea izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină în prezenţa ureei şi colorarea proteinelor;
7. evaluarea profilelor colorate de cazeină γ3 șiγ2 (dovadă a prezenţei laptelui de vacă) prin compararea profilului obţinut din probă cu cele obţinute în acelaşi gel din standardele de referinţă conţinând 0 % şi 1 % lapte de vacă.
8. **Reactivi**

În afara cazurilor în care se indică altfel, se utilizează produse chimice de calitate analitică. Apa trebuie să fie dublu distilată sau de o puritate echivalentă.

Următoarele detalii se aplică gelurilor de poliacrilamide cu conţinut de uree preparate în laborator, având dimensiunile de 265 × 125 × 0,25 mm. În cazul în care se utilizează geluri de alte dimensiuni sau tipuri, poate fi necesară ajustarea condițiilor de separare.

***Focalizarea izoelectrică***

1. **Reactivi pentru producerea gelurilor de poliacrilamide cu conţinut de uree**
2. ***Soluție - stoc de gel***

Se dizolvă:

4,85 g acrilamidă;

0,15 g N, N'-metilen-bis-acrilamidă (BIS);

48,05 g uree;

15,00 g glicerol (87 % m/m);

în apă şi se completează până la 100 ml, apoi se toarnă într-un recipient de sticlă de culoare maro și se depozitează în frigider.

În locul cantităţilor fixe de acrilamide neurotoxice menţionate se poate utiliza o soluţie de acrilamidă/BIS preamestecată, disponibilă în comerţ. În cazul în care o astfel de soluţie conţine 30 % m/V acrilamidă şi 0,8 % m/V BIS, pentru preparare se utilizează un volum de 16,2 ml de soluţie în locul cantităților fixate. Termenul de valabilitate a soluției-stoc este de maxim 10 zile; în cazul în care conductivitatea sa este mai mare de 5 μS, se deionizează prin agitare cu 2 g Amberlite MB-3 timp de 30 de minute, apoi se filtrează printr-o membrană cu pori de 0,45 μm.

1. ***Soluţia de gel***

Se prepară o soluţie de gel amestecând aditivii şi amfoliţii cu soluția-stoc de gel (a se vedea subpct. 1, lit. a) din prezentul punct):

9,0 ml soluție-stoc;

24 mg β-alanină;

500 μl amfolit pH 3,5-9,5;

250 μl amfolit pH 5-7;

250 μl amfolit pH 6-8.

Se amestecă soluţia sub formă de gel şi se degazează timp de două sau trei minute într-o baie cu ultrasunete sau în vid.

Soluţia sub formă de gel se prepară imediat înainte de a o turna (conform pct. 6 subpct 2)).

1. ***Soluţii - catalizator***
* N, N, N' N' – tetrametiletilendiamină (Temed);
* 40 % m/V persulfat de amoniu (PER):

Se dizolvă 800 mg de PER în apă şi se completează până la 2 ml.

Întotdeauna se utilizează soluţie PER proaspăt preparată.

1. **Fluid de contact – kerosen sau parafină lichidă**
2. **Soluţie anodică**

Se dizolvă în apă 5,77 g acid fosforic (85 % m/m) şi se diluează până la 100 ml.

1. **Soluţie catodică**

Se dizolvă în apă 2,00 g hidroxid de sodiu şi se diluează până la 100 ml.

***Prepararea probei***

1. **Reactivi pentru izolarea proteinelor**
2. Se diluează acid acetic (25,0 ml acid acetic glacial completat cu apă până la 100 ml)
3. Diclormetan
4. Acetonă
5. **Soluţie - tampon pentru dizolvarea proteinelor**

Se dizolvă:

5,75 g glicerol (87 % m/m);

24,03 g uree;

250 mg ditiotreitol

în apă şi se completează până la 50 ml.

Se păstrează în frigider, termenul de valabilitate: maximum o săptămână.

1. **Reactivi pentru clivarea cu plasmină a cazeinelor**
2. **Soluţie - tampon de carbonat de amoniu;**

Se titrează până la pH 8 o soluție de carbonat acid de amoniu 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml apă) conținând acid etilendiaminotetraacetic 0,05 mol/l (EDTA, 1,46 g/100 ml) cu o soluție de carbonat de amoniu 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml apă) conținând 0,05 mol/l EDTA.

1. **Plasmină de bovină, cu activitate de minimum 5 U/ml;**
2. **Soluţie de acid ε-aminocaproic pentru inhibarea enzimelor.**

Se dizolvă 2,624 g acid ε-aminocaproic (acid 6-amino-n-hexanoic) în 100 ml de etanol 40 % (V/V).

1. **Standarde**
2. Amestecuri de lapte închegat de oaie şi capră cu conţinutul de 0 %, respectiv 1 % lapte de vacă.
3. Prepararea probelor de referinţă provizorii de laborator din lapte de bivoliţă închegat conţinând 0 % şi 1 % lapte de vacă.

Laptele degresat se prepară prin centrifugarea laptelui crud în vrac de bivoliţă sau de vacă la 37 °C (2 500 g, timp de 20 de minute). După răcirea rapidă a tubului şi a conţinutului la 6-8 °C, stratul superior de lipide se îndepărtează în totalitate. Pentru prepararea standardului 1 %, se adaugă 5,00 ml de lapte de bovine degresat la 495 ml lapte de bivoliţă degresat într-un vas de 1 l, se ajustează pH-ul la 6,4 prin adăugarea de acid lactic diluat (10 % m/V). Se ajustează temperatura la 35 °C şi se adaugă 100 μl de cheag de viţel, se amestecă timp de 1 minut, apoi se lasă vasul acoperit cu o folie de aluminiu la 35 °C timp de 1 oră pentru a permite formarea coagulului. După formarea acestuia, laptele închegat este liofilizat fără omogenizare prealabilă şi fără a se drena zerul. După liofilizare, produsul se macină mărunt până se obţine o pulbere omogenă. Pentru prepararea standardului 0 %, se urmează aceeaşi procedură utilizând lapte degresat de bivoliţă autentic. Standardele se păstrează la –20 °C.

Înaintea preparării standardelor, se recomandă verificarea purităţii laptelui de bivoliţă prin focalizarea izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină.

***Reactivi pentru colorarea proteinelor***

1. **Fixativ**

Se dizolvă în apă 150 g acid tricloracetic şi se completează până la 1 000 ml.

1. **Soluţie pentru decolorare**

Se diluează 500 ml de metanol și 200 ml de acid acetic glacial cu apă distilată până la 2000 ml.

Se prepară zilnic o soluţie proaspătă de decolorare. Soluţia poate fi preparată prin amestecarea de volume egale de soluții stoc de metanol 50 % (V/V) şi de acid acetic glacial 20 % (V/V).

1. **Soluții pentru colorare**
2. **Soluţie pentru colorare (soluție-stoc 1)**

Se dizolvă 3,0 g Albastru Coomassie Briliant G-250 în 1 000 ml metanol 90 % (V/V) utilizând un agitator magnetic (timp de aproximativ 45 minute), apoi se filtrează prin două filtre pliate de viteză medie.

1. **Soluţie pentru colorare (soluție-stoc 2)**

Se dizolvă 5,0 g sulfat de cupru pentahidrat în 1 000 ml acid acetic 20 % (V/V)

1. **Soluţie pentru colorare (soluţie de lucru)**

Se amestecă câte 125 ml din fiecare soluție-stoc imediat înainte de colorare.

Se recomandă prepararea soluţiei de colorare în ziua utilizării acesteia.

1. **Echipamente:**
2. plăci de sticlă (265 × 125 × 4 mm); rolă de cauciuc (lăţime 15 cm); masă reglabilă;
3. foaie purtătoare de gel (265 × 125 mm);
4. foaie de acoperire (280 × 125 mm). Se lipeşte o bandă adezivă (280 × 6 ×0,25 mm) pe fiecare latură lungă (figura 1);



**Figura 1: *Desen schematic al foii de acoperire***

1. cuvă de electrofocalizare cu placă de răcire cu unitate de alimentare electrică adecvată (≥ 2,5 kV) sau cu dispozitiv automat de electroforeză;
2. criostat de circulație controlat termostatic la 12 ± 0,5 °C;
3. centrifugă ajustabilă la 3 000 g;
4. benzi de electrozi (lungime ≥ 265 mm);
5. sticle picurătoare de plastic pentru soluţiile anodice şi catodice;
6. aplicatoare de probe (10 × 5 mm, hârtie de filtrare din viscoză sau cu absorbție mică a proteinelor);
7. vase din oţel inoxidabil sau din sticlă pentru colorare şi decolorare (de exemplu, tăvi de instrumente de 280x150 mm);
8. omogenizator ajustabil cu tijă (diametrul tijei 10 mm),intervalul rpm 8 000-20 000;
9. agitator magnetic;
10. baie cu ultrasunete;
11. aparat de sudat folii;
12. micropipete de 25 μl;
13. concentrator sub vid sau liofilizator;
14. baie de apă controlată termostatic, ajustabilă la 35 şi 40 ± 1 °C, cu agitator;
15. echipament de densitometrie cu citire la λ = 634 nm.
16. **Procedura**

Procedura de detectare a laptelui de vacă şi a cazeinei în brânzeturile produse din lapte de oaie, lapte de capră, lapte de bivoliţă sau din amestecuri de lapte de oaie, capră şi bivoliţă are loc în felul următor:

1. **Pregătirea probei**
2. **Izolarea cazeinelor**

Se cântărește într-un tub de centrifugă de 100 ml echivalentul a 5 g materie uscată de brânză sau standarde de referință, se adaugă 60 ml apă distilată şi se omogenizează cu un omogenizator cu tijă (8 000-10 000 rpm). Se ajustează la un pH de 4,6 cu o soluţie de acid acetic diluat şi se centrifughează (5 minute, 3 000 g). Se decantează lipidele şi zerul, se omogenizează reziduul la 20 000 rpm în 40 ml apă distilată ajustată la un pH de 4,5 cu acid acetic diluat, se adaugă 20 ml diclormetan, se omogenizează din nou şi se centrifughează (5 minute, 3 000 g). Se îndepărtează cu o spatulă stratul de cazeină care se află între faza apoasă şi cea organică (figura 2) şi se elimină ambele faze. Se reomogenizează cazeina în 40 ml apă distilată şi în 20 ml diclormetan, apoi se centrifughează. Se repetă procedura până când ambele faze de extracție sunt incolore (de două sau trei ori). Se omogenizează reziduul proteic cu 50 ml acetonă şi se filtrează printr-o hârtie de filtrare pliată de viteză medie. Se spală de fiecare dată reziduul de pe filtru cu câte două porții separate de 25 ml acetonă şi se lasă să se usuce în aer sau sub jet de azot, apoi se macină fin într-un mojar.

Izolatele de cazeină uscată se păstrează la –20 °C.



**Figura 2***. Strat de cazeină suspendat între fazele apoasă şi organică după centrifugare*

1. **Clivarea plasminică a ß-cazeinelor pentru intensificarea γ-cazeinelor**

 Se dispersează 25 mg cazeine izolate (subpct. 1 lit. a) din prezentul punct) în 0,5 ml soluţie-tampon de carbonat de amoniu şi se omogenizează timp de 20 minute utilizând, de exemplu, tratament ultrasonic. Se încălzeşte la 40 °C şi se adaugă 10 μl plasmină, apoi se amestecă şi se incubează timp de o oră la 40 °C, agitând continuu. Pentru a inhiba enzima se adaugă 20 μl soluţie de acid ε-aminocaproic, apoi se adaugă 200 mg uree solidă şi 2 mg ditiotreitol.

Pentru a obține o simetrie mai mare a benzilor de cazeină focalizate, se recomandă liofilizarea soluţiei după adăugarea acidului ε-aminocaproic şi apoi dizolvarea reziduurilor în 0,5 ml soluţie-tampon pentru dizolvarea proteinelor.

1. **Prepararea gelurilor poliacrilamide care conțin uree**

Cu ajutorul câtorva picături de apă se rulează foaia purtătoare de gel pe o placă de sticlă, îndepărtându-se surplusul de apă cu un șervețel din hârtie sau textil. Se rulează în mod similar foaia de acoperire cu distanțiere (0,25 mm) pe o altă placă de sticlă. Se aşează placa orizontal pe o masă reglabilă.

Se adaugă 10 μl Temed la soluţia de gel pregătită și dezaerată, se amestecă şi se adaugă 10 μl soluţie PER, se amestecă minuțios şi se toarnă imediat uniform în centrul foii de acoperire. Se pune o margine a plăcii purtătoare de gel (cu latura foii îndreptată în jos) pe placa de acoperire a foii şi se coboară încet, astfel încât între foi să se formeze un strat subțire de gel care să se întindă uniform şi fără bule (figura 3). Se coboară cu grijă placa purtătoare de gel, complet, utilizând o spatulă fină, apoi se aşează încă trei plăci de sticlă deasupra ei pentru a acţiona ca greutăți. După încheierea polimerizării (aproximativ 60 minute), se transferă gelul polimerizat pe foaia purtătoare de gel împreună cu foaia de acoperire, înclinând plăcile de sticlă. Se curăță cu grijă reversul foii purtătoare de gel pentru a îndepărta reziduurile de gel şi ureea. Sandvișul de gel se sudează, astfel încât să se obțină un tub cu perete pelicular şi se păstrează în frigider (timp de maximum șase săptămâni).



**Figura 3. *Tehnică de pliere pentru formarea straturilor ultrafine de geluri poliacrilamidice***

a – bandă de distanțiere (0,25 mm);

b – foaie de acoperire;

c, e – plăci de sticlă;

d – soluţie de gel;

f – foaie purtătoare de gel.

Foaia de acoperire şi distanțierele pot fi reutilizate. Gelul de poliacrilamidă poate fi tăiat la dimensiuni mai mici, acțiune recomandată în cazul în care există puține probe sau în cazul în care se utilizează un aparat automat de electroforeză (două geluri, dimensiuni 4,5 × 5 cm).

1. **Focalizarea izoelectrică**

 Se reglează termostatul de răcire la 12 °C. Se șterge cu kerosen reversul foii purtătoare de gel, apoi se picură câteva picături de kerosen în centrul blocului de răcire. Apoi se rulează sandvișul de gel, cu partea purtătoare de gel îndreptată în jos, pe el, având grijă să se evite formarea bulelor. Se șterge excesul de kerosen şi se îndepărtează foaia de acoperire. Se îmbibă benzile de electrozi în soluţiile electrolitice, se taie după lungimea gelului şi se plasează în poziţia prevăzută (distanţa dintre electrozi de 9,5 cm).

 *Condiţii pentru focalizarea izoelectrică:*

 Dimensiunile gelului 265 × 125 × 0,25 mm

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Etapă** | **Timp****(min.)** | **Tensiune****(V)** | **Intensitate****(mA)** | **Putere****(W)** | **Volţi oră****(Vh)** |
| 1.  Prefocalizare | 30 | maximum 2 500 | maximum 15 | constant 4 | c. 300 |
| 2. Focalizarea probei (1) | 60 | maximum 2 500 | maximum 15 | constant 4 | c. 1 000 |
| 3.  Focalizarea finală | 60 | maximum 2 500 | maximum 5 | maximum 20 | c. 3 000 |
| 40 | maximum 2 500 | maximum 6 | maximum 20 | c. 3 000 |
| 30 | maximum 2 500 | maximum 7 | maximum 25 | c. 3 000 |
| (1) Aplicarea probei: După prefocalizare (etapa 1) se pipetează 18 μl de probă şi de soluţii-standard pe aplicatorii probei (10 × 5 mm), se plasează aplicatorii pe gel la distanţe de 1 mm unul față de celălalt şi la 5 mm longitudinal faţă de anod şi se apasă ușor. Se efectuează focalizarea utilizând condiţiile specificate mai sus, îndepărtând cu grijă aplicatorii probei după 60 de minute de focalizare a probei. |

În cazul în care se modifică grosimea sau lățimea gelurilor, atunci intensitatea şi puterea curentului trebuie ajustate în consecință.

1. **Colorarea proteinelor**
2. **Fixarea proteinelor**

Se îndepărtează benzile de electrozi imediat după oprirea curentului electric şi se plasează imediat gelul într-un vas de colorare/decolorare umplut cu 200 ml fixative. Se lasă acolo timp de 15 minute, agitând în continuu.

1. **Spălarea şi colorarea plăcii de gel**

Se drenează cu grijă fixativul şi se spală placa de gel de două ori, timp de câte 30 de secunde, cu 100 ml soluţie decolorantă. Se scurge soluția decolorantă şi se umple vasul cu 250 ml soluţie colorantă; se lasă 45 de minute să se coloreze, agitându-se ușor vasul.

1. **Decolorarea plăcii de gel**

Se scurge soluția colorantă, se spală placa de gel de două ori, cu câte 100 ml soluţie decolorantă, apoi se agită timp de 15 minute cu 200 ml de soluţie decolorantă şi se repetă etapa de decolorare de cel puțin două-trei ori, până când fundalul vasului este limpede şi necolorat. Se clătește apoi placa de gel cu apă distilată (2 × 2 minute) şi se usucă la aer (2-3 ore) sau cu un uscător de păr (10-15 minute).

Fixarea, spălarea, colorarea şi decolorarea se efectuează la 20 °C. A nu se folosi temperaturi ridicate.

În cazul în care se preferă colorarea mai sensibilă cu argint, probele de cazeină tratate cu plasmină trebuie diluate la 5 mg/ml.

1. Evaluarea este efectuată prin compararea profilelor proteice ale probei necunoscute cu standardele de referință efectuate pe același gel. Detectarea laptelui de vacă în brânzeturile din lapte de oaie, lapte de capră şi lapte de bivoliţă şi în amestecurile de lapte de oaie, capră şi bivoliţă se face prin intermediul cazeinelor γ3 șiγ2 ale căror puncte izoelectrice se află în intervalul pH 6,5-pH 7,5 (figurile 4a, 4b şi figura 5). Limita de detecție este mai mică de 0,5 %.



***Figura 4a: Focalizare izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină din brânză din lapte***

***de oaie şi de capră conţinând diverse cantităţi de lapte de vacă***

% CM – procentaj de lapte de vacă;

C – vacă;

E – oaie;

G – capră.

Este ilustrată jumătatea de sus a gelului IEF.



**Figura 4b: *Focalizare izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină provenite din brânză produsă din amestecuri de lapte de oaie, de capră şi de bivoliţă conţinând diverse cantități de lapte de vacă***

% CM – procentaj de lapte de vacă;

1+ – probă conținînd 1% lapte de vacă şi modificat cu cazeină pură de lapte de bovine la mijlocul traiectului;

C – vacă;

E – oaie;

G – capră;

B – bivoliţă.

Este ilustrată distanța de separare totală a gelului IEF.



**Figura 5: *Suprapunerea densitogramelor standardelor (STD) şi a probelor de brânză produse dintr-un amestec de lapte de oaie şi de capră după focalizarea izoelectrică***

a, b – standarde conținând 0, și respectiv 1% lapte de vacă;

c-g – probe de brânză conținând 0, 1, 2, 3 şi 7% lapte de vacă;

C – vacă;

E – oaie;

G – capră.

Jumătatea de sus a gelului IEF a fost scanată la λ = 634 nm.

1. **Estimare vizuală**

Pentru evaluarea vizuală a cantității de lapte de vacă se recomandă ajustarea concentrațiilor probelor şi a standardelor pentru a obține același nivel de intensitate a cazeinelor γ3 șiγ2 din laptele de ovine, caprine şi/sau bivolițe (a se vedea „γ2 E, G, B” și „γ3 E, G, B” din figurile 4a şi 4b şi din figura 5). După aceasta, nivelul de lapte de vacă (mai mic decât, egal cu sau mai mare de 1 %) din proba necunoscută poate fi estimat direct, prin compararea intensității cazeinelor γ3 șiγ2 din laptele de vacă (a se vedea „γ3 C” și „γ2 C” din figurile 4a, 4b şi 5) cu cea a standardelor de referință de 0 % şi 1 % (oaie, capră) sau cu standardele provizorii de laborator (bivoliţă).

1. **Estimare densitometrică**

În cazul în care este disponibilă, se aplică densitometria pentru determinarea raportului dintre aria vârfurilor γ2- şi γ3-cazeinelor din laptele de vacă, respectiv din laptele de oaie, capră şi/sau bivoliţă (figura 5). Această valoare se compară cu raportul dintre aria vârfurilor γ2- şi γ3-cazeinelor pentru standardul de referință 1 % (oaie, capră) sau pentru standardul provizoriu de laborator (bivoliţă), analizate pe același gel.

Metoda funcționează corespunzător în cazul în care se obține un semnal pozitiv clar pentru ambele cazeine bovine γ2- şi γ3- din standardul de referință 1 %, dar nu şi din standardul de referință 0 %. Dacă nu, procedura trebuie îmbunătățită respectându-se cu exactitate detaliile metodei.

 O probă este considerată pozitivă în cazul în care ambele cazeine bovine γ2- şi γ3- sau raportul ariei vârfurilor corespunzător sunt mai mari sau egale cu nivelul din standardul de referință 1%.”

1. În anexa nr. 9, la pct.1, textul „SM SR EN ISO 6887-5” se înlocuiește cu textul „SM EN ISO 6887-5:2020”;
2. Anexa nr. 11 la Metodologie, va avea următorul cuprins:

„Anexa nr. 11

la Metodologia de analiză și

evaluare calitativă a laptelui

și a produselor lactate

**Detectarea zerului închegat din laptele praf degresat destinat depozitării**

**publice prin determinarea cazeinmacropeptidelor prin cromatografie în mediu lichid de înaltă performanță (HPLC)**

1. Această metodă permite detectarea zerului închegat din laptele praf degresat destinat depozitării publice prin determinarea cazeinmacropeptidelor.
2. Conținutul de materii solide compuse din zer închegat se definește ca procent masic astfel cum este determinat de conținutul de cazeinmacropeptide prin procedura descrisă.
3. **Principiul metodei**

Principiul metodei de detectare a zerului închegat din laptele praf degresat destinat depozitării publice prin determinarea cazeinmacropeptidelor constă în:

1. reconstituirea laptelui praf degresat, îndepărtarea lipidelor şi a proteinelor cu acid tricloracetic, urmată de centrifugare sau de filtrare;
2. determinarea cantităţii de cazeinmacropeptide (CMP) din supernatant prin cromatografie în mediu lichid de înaltă performanţă (HPLC);
3. evaluarea rezultatelor obținute pentru probe în raport cu probele-standard constând din lapte praf degresat cu sau fără adăugarea unui procent cunoscut de zer praf.
4. **Reactivi**

Toţi reactivii sunt de calitate analitică recunoscută. Apa utilizată trebuie să fie apă distilată sau apă de o puritate cel puţin echivalentă.

1. **Soluţie de acid tricloroacetic**

Se dizolvă 240 g de acid tricloracetic (CCl3COOH) în apă şi se completează până la 1 000 ml. Soluția trebuie să fie limpede şi incoloră.

1. **Soluţie eluantă, pH 6,0**

Se dizolvă 1,74 g de fosfat acid de potasiu (K2HPO4), 12,37 g de fosfat diacid de potasiu (KH2PO4) şi 21,41 g de sulfat de sodiu (Na2SO4) în aproximativ 700 ml de apă. În cazul în care este necesar, se ajustează până la pH 6,0 cu ajutorul unei soluţii de acid fosforic sau de hidroxid de potasiu.

Se completează cu apă până la 1 000 ml şi se omogenizează.

Compoziţia eluentului poate fi actualizată pentru a respecta certificatul standardelor sau recomandările producătorului de pe ambalajul coloanei.

Soluţia eluent se filtrează înainte de folosire printr-o membrană filtrantă cu diametrul porilor de aproximativ 0,45 μm.

1. **Solvent de irigare**

Se amestecă un volum de acetonitril (CH3CN) cu nouă volume de apă. Amestecul se filtrează înainte de utilizare printr-o membrană filtrantă având pori cu diametrul de 0,45 μm.

Se poate folosi orice alt solvent de spălare cu efect bactericid care nu afectează eficienţa rezoluţiei coloanelor.

1. **Probele-standard**
2. lapte praf degresat care îndeplinește cerinţele prezentei rezoluții (respectiv [0]);
3. acelaşi lapte praf degresat modificat cu 5 % (m/m) zer închegat praf cu compoziție standard (respectiv [5]).
4. **Aparatură de laborator**
5. cântar analitic;
6. opțional, centrifugă capabilă să atingă o forță de centrifugare de 2 200 g, prevăzută cu tuburi de centrifugare astupate cu o capacitate de aproximativ 50 ml;
7. agitator mecanic;
8. agitator magnetic;
9. coloane de sticlă cu diametrul de aproximativ 7 cm;
10. filtre de hârtie cu filtrare medie cu diametrul de aproximativ 12,5 cm;
11. echipament de filtrare din sticlă prevăzut cu membrană filtrantă cu diametrul porilor de 0,45 μm;
12. pipete gradate permițând dozarea a 10 ml sau un sistem de dispersare capabil să furnizeze 10,0 ml în două minute;
13. sistem de dispersare capabil să furnizeze 20,0 ml de apă la o temperatură de aproximativ 50°C;
14. baie de apă termostatică, reglată la 25 ± 0,5°C;
15. echipament pentru HPLC format din:
16. pompă;
17. injector, manual sau automat, cu o capacitate de 15-30 μl;
18. două coloane TSK 2 000-SW în serie (lungime de 30 cm, diametru intern de 0,75 cm) sau coloane echivalente şi o precoloană (3 cm × 0,3 cm) umplute cu material I 125 sau cu un material cu eficiență echivalentă;
19. cuptor cu coloană termostatic, reglat la 35 ± 1°C;
20. detector UV cu lungime de undă variabilă care permite măsurători la 205 nm cu o sensibilitate de 0,008 A;
21. integrator capabil să realizeze integrare depresiune-la-depresiune.

Se poate lucra cu coloane păstrate la temperatura camerei, dar puterea lor de rezoluţie este ușor mai mică. În acest caz, temperatura nu trebuie să varieze cu mai puțin de ± 5 °C în nici o serie de analize.

1. **Prelevarea probelor**

Probele se prelevează în conformitate cu procedura prevăzută în standardul SM SR EN ISO 707:2012.

Probele se depozitează în condiții care împiedică orice deteriorare sau modificare a compoziției.

1. **Procedura**

Procedura de detectare a zerului închegat din laptele praf degresat destinat depozitării publice prin determinarea cazeinmacropeptidelor are loc în felul următor:

1. **Pregătirea probei de testat**

Se transferă laptele praf într-un recipient cu o capacitate aproximativ dublă faţă de volumul laptelui praf, prevăzut cu un capac etanș pentru aer. Recipientul se închide imediat. Laptele praf se amestecă bine prin răsturnări repetate ale recipientului.

1. **Porția de testat**

Se cântăresc 2,000 ± 0,001 g din proba de testat într-un tub de centrifugare sau într-un flacon astupat în mod corespunzător (50 ml).

1. **Îndepărtarea lipidelor şi a proteinelor**
2. Se adaugă 20,0 ml de apă caldă (50 °C) la porția de testat. Se dizolvă laptele praf agitându-se timp de cinci minute cu ajutorul unui agitator mecanic. Tubul se introduce în baia de apă şi se lasă să se echilibreze la 25 °C.
3. Se adaugă 10,0 ml de soluţie de acid tricloracetic la aproximativ 25 °C în două minute, amestecându-se puternic cu ajutorul agitatorului magnetic. Tubul se introduce într-o baie de apă şi se lasă timp de 60 de minute.
4. Se centrifughează timp de 10 minute la 2 200 g sau se filtrează printr-o hârtie, eliminându-se primii 5 ml de filtrat.
5. **Determinarea cromatografică**
6. Se injectează 15-30 μl de supernatant sau filtrat măsurat cu precizie în dispozitivul HPLC funcționând la un debit de 1,0 ml de soluţie eluent pe minut.

Se poate utiliza un alt debit în funcţie de diametrul intern al coloanelor utilizate sau de instrucțiunile producătorului coloanei.

Soluția eluantă se menține la 85 °C pe parcursul întregii analize cromatografice pentru ca eluantul să se menţină degazat şi pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor. Se poate recurge la orice măsură de precauţie cu efect similar.

Coloanele se clătesc cu apă în timpul fiecărei întreruperi. Soluţia-eluent nu se lasă niciodată în coloane.

Înainte de orice întrerupere care durează mai mult de 24 de ore, coloanele se clătesc cu apă şi se spală cu soluţie timp de cel puţin trei ore la un debit de 0,2 ml per minut.

1. Rezultatele analizei cromatografice a probei de testat [E] se obțin sub forma unei cromatograme în care fiecare vârf se identifică după timpul de retenție RT după cum urmează:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Vârful II | - | Al doilea vârf al cromatogramei având un RT de aproximativ 12,5 minute |
| Vârful III | - | Al treilea vârf al cromatogramei, corespunzând CMP-urilor, cu un RT de 15,5 minute |

Alegerea coloanei (coloanelor) poate afecta în mod considerabil timpii de retenție ai fiecărui vârf.

Integratorul calculează automat aria A a fiecărui vârf.

|  |  |
| --- | --- |
| AII: | aria vârfului II |
| AIII: | aria vârfului III |

Este esenţial să se examineze aspectul fiecărei cromatograme înainte de interpretarea cantitativă pentru a se detecta orice anomalii cauzate fie de funcţionarea necorespunzătoare a aparaturii sau a coloanelor, fie de originea sau natura probei analizate.

În cazul în care există dubii, analiza se repetă.

1. **Calibrare**
2. Probelor-standard (pct.4, subpct. 4)) li se aplică cu exactitate procedura descrisă de la subpunctele 2) – 4) din prezentul punct.

Se folosesc soluţii proaspăt preparate, întrucât CMP se degradează într-un mediu 8 % tricloroacetic. Pierderea este estimată la 0,2 % pe oră la 30 °C.

1. Înainte de determinarea cromatografică a probelor, coloanele se condiţionează prin injectarea repetată a probei-standard în soluţie (litera a) din prezentul subpunct), până când aria vârfului şi timpul de retenție al acestuia pentru CMP sunt constante.
2. Factorul de răspuns R se determină prin injectarea aceluiași volum de filtrați (litera a) din prezentul subpunct) utilizat şi pentru probe.
3. **Exprimarea rezultatelor**

Exprimarea rezultatelor se efectuează în felul următor:

1. **Metoda de calcul şi formule**
2. **Calcularea factorilor de răspuns R:**

|  |  |
| --- | --- |
| Vârful II: | RII = 100/(AII[0]) |

*unde:*

RII – factorii de răspuns pentru vârfurile II;

AII [0] – ariile vârfurilor II pentru proba-standard [0] obținute la pct. 7 subpct. 5) lit. c).

|  |  |
| --- | --- |
| Vârful III: | RIII=W/(AIII[5]– AIII[0]) |

*unde:*

RIII – factorul de răspuns al vârfului III;

AIII [0] şi AIII [5] – ariile vârfului III pentru probele-standard [0] şi, respectiv, [5] obținute la pct. 7 subpct. 5) lit. c);

W – cantitatea de zer din proba-standard [5], respectiv 5.

1. **Calcularea ariei relative a vârfurilor probei [E]**

SII[E] = RII × AII[E]

SIII[E] = RIII × AIII[E]

SIV[E] = RIV × AIV[E]

*unde:*

SII [E], SIII [E], SIV [E] – ariile relative ale vârfurilor II, III şi, respectiv, IV din proba [E];

AII [E], AIII [E] – ariile vârfurilor II şi, respectiv, III din proba [E] obținute la pct. 7 subpct. 4) lit. b);

RII, RIII – factorii de răspuns calculați la lit. a) din prezentul subpct.

1. **Calcularea timpului relativ de retenție al vârfului III pentru proba [E]:**

RRTIII[E] = (RTIII[E])/(RTIII[5]),

*unde:*

RRTIII [E] – timpul relativ de retenţie al vârfului III pentru proba [E];

RTIII [E] – timpul de retenţie al vârfului III pentru proba [E] obținut la pct. 7 subpct. 4) lit. b);

RTIII [5] – timpul de retenţie al vârfului III pentru proba de control [5] obținut la pct. 7 subpct. 5) lit. c).

1. **Experimentele au demonstrat că Există o relaţie liniară între timpul relativ de retenţie al vârfului III, adică RRTIII [E] şi procentul de zer praf adăugat până la 10 %:**
* RRTIII [E] este < 1,000 în cazul în care conţinutul de zer este > 5 %;
* RRTIII [E] este ≥ 1,000 în cazul în care conţinutul de zer este ≤ 5 %.

Incertitudinea permisă pentru valorile RRTIII este de ± 0,002.

În mod normal, valoarea RRTIII [0] deviază puțin de la 1,034. În funcţie de starea coloanelor, valoarea se poate apropia de 1,000, dar întotdeauna trebuie să fie mai mare decât această valoare.

1. **Calcularea procentului de zer închegat praf din probă:**

W = SIII[E] – [1, 3 + (SIII[0] – 0, 9)],

*unde:*

W – procentul m/m de zer închegat din proba [E];

SIII [E] – aria relativă a vârfului III a probei de testat [E] obținut ca la subpct.1) lit. b) din prezentul pct.;

1,3 – reprezintă aria medie relativă a vârfului III exprimată în grame de zer închegat per 100 g determinată pentru lapte praf degresat nemodificat provenit din diverse surse. Această cifră a fost obținută experimental;

SIII [0] – reprezintă aria relativă a vârfului III care este egală cu RIII × AIII [0]. Aceste valori sunt obținute la subpct. 1 lit. a) din prezentul pct. şi, respectiv, pct. 7 subpct. 5) lit c);

(SIII [0] - 0,9) – reprezintă corecția care trebuie efectuată la aria medie relativă 1,3 când SIII [0] nu are valoarea 0,9. În mod experimental, aria medie relativă a vârfului III al probei de control [0] este 0,9.

1. **Precizia metodei**
2. **Repetabilitatea**

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate simultan sau în succesiune rapidă de către acelaşi analist utilizând aceeași aparatură pe material de testare identic nu trebuie să depășească 0,2 % m/m.

1. **Reproductibilitatea**

Diferența dintre două rezultate singulare şi independente, obținute în două laboratoare diferite cu material de testare identic nu trebuie să depășească 0,4 % m/m.

1. **Interpretarea rezultatelor**

Se presupune că zerul este absent în cazul în care aria relativă a vârfului III, SIII [E] exprimată în grame de zer închegat per o sută de grame de produs este ≤ 2,0 + (SIII[0] – 0,9),

*unde:*

2,0 – valoarea maximă permisă pentru aria relativă a vârfului III ținând cont de:

* aria relativă a vârfului III, adică 1,3;
* incertitudinea cauzată de variații ale compoziției laptelui praf degresat;
* reproductibilitatea metodei (pct. 8 subpct. 3) lit. b));

(SIII [0] –0,9) – corecția de efectuat în cazul în care aria SIII [0] este diferită de 0,9 (pct. 8 subpct 2)).

În cazul în care aria relativă a vârfului III, SIII[E] este > 2,0 + (SIII[0] – 0,9) şi aria relativă a vârfului II, SII[E] ≤ 160, se determină conţinutul de zer închegat conform indicațiilor de la pct. 8 subpct. 2).

În cazul în care aria relativă a vârfului III, SIII [E] este > 2,0 + (SIII [0] – 0,9) şi aria relativă a vârfului II, SII [E] ≤ 160, se determină conţinutul total de proteine (P%). Apoi se examinează graficele 1 şi 2.



Linia continuă reprezintă regresia liniară, ai cărei coeficienți se calculează prin metoda celor mai mici pătrate.

Linia dreaptă punctată marchează limita superioară a ariei relative a vârfului III, cu probabilitatea ca aceasta să nu fie depășită în 90 % din cazuri.

Ecuațiile liniilor drepte punctate din graficele 1 şi 2 sunt:

SIII = 0,376 P % – 10,7 (graficul 1);

SIII = 0,0123 SII [E] + 0,93 (graficul 2);

*unde:*

SIII – ariei relativă a vârfului III calculată fie pe baza conținutului total de proteine, fie pe baza ariei relative a vârfului SII [E];

P % ─ conţinutul total de proteine exprimat ca procent masic;

SII [E] – aria relativă pentru probă calculată la pct. 8, subpct. 1) lit b).

Diferența (T1 şi T2) dintre aria relativă SIII[E] determinată şi aria relativă SIII se calculează după cum urmează:

T1 = SIII[E] – [(0,376 P % – 10,7) + (SIII[0] – 0,9)]

T2 = SIII[E] – [(0,0123 SII[E] + 0,93) + (SIII[0] – 0,9)]

Dacă T1 şi/sau T2 sunt zero sau mai mici, prezența zerului închegat nu poate fi determinată, iar dacă T1 şi T2 depășesc zero, zerul închegat este prezent.

Conţinutul de zer închegat se calculează cu ajutorul formulei următoare:

W = T2+0,91

*unde:*

0,91 – distanța pe axa verticală dintre linia dreaptă continuă şi linia dreaptă punctată.”

1. Anexa nr. 12 la Metodologie, va avea următorul cuprins:

„Anexa nr. 12

la Metodologia de analiză și

evaluare calitativă a laptelui

și a produselor lactate

**Determinarea materiilor solide compuse din zer închegat în laptele praf degresat**

1. Conţinutul de materii solide compuse din zer închegat este definit ca procentul masic astfel cum este determinat prin intermediul conţinutului de cazeinmacropeptide prin procedura descrisă.
2. **Principiul metodei**

Conţinutul de cazeinmacropeptide se determină conform anexei nr. 11. Probele sunt analizate pentru a determina cazeinmacropeptida A printr-o procedură care implică cromatografie în mediu lichid de înaltă performanţă cu fază inversată (procedura HPLC). Ca soluţie alternativă, probele sunt analizate direct prin procedura HPLC în fază inversă. Evaluarea rezultatelor se face prin referire la probe-standard formate din lapte praf degresat care conțin sau nu un procent cunoscut de zer praf. Rezultatele mai mari de 1 % (m/m) indică prezența materiilor solide compuse din zer închegat.

1. **Reactivi**

Toţi reactivii sunt de calitate analitică recunoscută. Apa utilizată trebuie să fie apă distilată sau apă de o puritate cel puțin echivalentă. Acetonitrilul trebuie să fie de calitate spectroscopică sau de calitate HPLC.

Reactivii necesari pentru această procedură sunt descriși în anexa nr. 11 la prezenta Metodologie.

1. **Soluţie de acid tricloroacetic**

Se dizolvă 240 g de acid tricloroacetic (CCl3COOH) în apă şi se completează până la 1 000 ml. Soluția trebuie să fie limpede şi incoloră.

1. **Eluenții A şi B**

*Eluentul A:* într-un flacon gradat de 1 000 ml se introduc 150 ml acetonitril (CH3CN), 20 ml izopropanol (CH3CHOHCH3) şi 1,00 ml de acid trifluoracetic (TFA, CF3COOH). Se completează cu apă până la 1 000 ml.

*Eluentul B:* într-un flacon gradat de 1 000 ml se introduc 550 ml acetonitril, 20 ml izopropanol şi 1,00 ml TFA. Se completează cu apă până la 1 000 ml. Soluția-eluent se filtrează înainte de utilizare printr-o membrană filtrantă având pori cu diametrul de 0,45 μm.

1. **Conservarea coloanei**

După analize, coloana se irigă cu eluentul B (prin intermediul unui gradient), iar apoi se irigă cu acetonitril (prin intermediul unui gradient timp de 30 de minute). Coloana se păstrează în acetonitril.

1. **Probele-standard**
2. Lapte praf degresat care îndeplinește cerinţele pentru depozitare publică (adică [0]).
3. Același lapte praf degresat modificat cu 5 % (m/m) zer închegat praf cu compoziție standard (adică [5]).
4. Același lapte praf degresat modificat cu 50 % (m/m) zer închegat praf cu compoziție standard (adică [50]).
5. **Aparatura**

Aparatura necesară pentru procedura descrisă este cea descrisă în anexa nr. 11 la prezenta Metodologie;

1. cântar analitic;
2. opțional, centrifugă capabilă să atingă o forță de centrifugare de 2 200 g, prevăzută cu tuburi de centrifugare astupate, cu o capacitate de aproximativ 50 ml;
3. agitator mecanic;
4. agitator magnetic;
5. coloane de sticlă cu diametrul de aproximativ 7 cm;
6. filtre de hârtie, cu filtrare medie, cu diametrul de aproximativ 12,5 cm;
7. echipamente de filtrare din sticlă prevăzut cu membrană filtrantă cu diametrul porilor de 0,45 μm;
8. pipete gradate, permițând dozarea a 10 ml, sau un sistem de dispersare capabil să furnizeze 10,0 ml în două minute;
9. sistem de dispersare capabil să furnizeze 20,0 ml de apă la o temperatură de 50°C;
10. baie de apă termostatică, reglată la 25 ± 0,5°C;
11. echipament pentru HPLC format din:
12. sistem binar de pompare pe bază de gradient;
13. injector, manual sau automat, cu o capacitate de 100 μl;
14. coloană Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (lungime 25 cm, diametru intern 0,46 cm) sau o coloană echivalentă cu fază inversată pe bază de silice cu pori largi;
15. cuptor cu coloană termostatic, reglat la 35 ± 1 °C;
16. detector UV cu lungime de undă variabilă care permite măsurători la 210 nm (în cazul în care este necesar se poate utiliza o lungime de undă mai mare, de până la 220 nm) cu o sensibilitate de 0,02 Å;
17. integrator capabil să stabilească integrarea la linia de bază comună sau depresiune- la- depresiune.

Operarea coloanei la temperatura camerei este posibilă, cu condiția ca temperatura camerei să nu fluctueze cu mai mult de 1°C; în caz contrar, există variaţii prea mari ale timpului de retenţie al CMPA.

1. **Prelevarea probelor**
2. Prelevarea Probelor se face în conformitate cu procedura prevăzută în standardul SM SR EN ISO 707:2012.
3. Probele se depozitează în condiții care împiedică orice deteriorare sau modificare a compoziției.
4. **Procedura**

Procedura de determinare a materiilor solide din zer închegat în laptele praf degresat se realizează în felul următor:

1. **Pregătirea probei de testat**

Se transferă laptele praf într-un recipient cu o capacitate aproximativ dublă faţă de volumul laptelui praf, prevăzut cu un capac etanș pentru aer. Recipientul se închide imediat. Laptele praf se amestecă bine prin răsturnări repetate ale recipientului.

1. **Porția de testat**

Se cântăresc 2,00 ± 0,001 g din proba de testat într-un tub de centrifugare sau într-un flacon adecvat astupat (50 ml).

În cazul amestecurilor, se cântărește o astfel de probă de testat încât porția conținând proba degresată să corespundă la 2,00 g.

1. **Îndepărtarea lipidelor şi a proteinelor**
2. Se adaugă 20,0 ml de apă caldă (50 °C) la porția de testat. Se dizolvă laptele praf agitându-se timp de cinci minute cu ajutorul unui agitator mecanic. Tubul se introduce în baia de apă şi se lasă să se echilibreze la 25 °C.
3. Se adaugă 10,0 ml de soluţie de acid tricloracetic la aproximativ 25 °C în mod constant pe parcursul a două minute, în timp ce se amestecă energic cu ajutorul unui agitator magnetic. Tubul se introduce într-o baie de apă şi se lasă timp de 60 de minute.
4. Se centrifughează 2 200 g timp de 10 minute sau se filtrează prin hârtie, eliminându-se primii 5 ml de filtrat.
5. **Determinarea cromatografică**
6. Se efectuează analiza HPLC conform descrierii din anexa nr. 11. În cazul în care se obține un rezultat negativ, proba analizată nu conține solide din zer închegat în cantități detectabile. În cazul în care rezultatul este pozitiv, se aplică procedura HPLC în fază inversată descrisă mai jos. Ca soluţie alternativă, se poate aplica direct metoda HPLC în fază inversată. Prezenţa zarei acide praf poate provoca apariţia unor rezultate fals pozitive folosind metoda descrisă în anexa nr. 11. Metoda HPLC în fază inversă exclude această posibilitate.
7. Înainte de efectuarea analizei HPLC cu fază inversă se optimizează condiţiile de gradient. Pentru sistemele pe bază de gradient care au un volum mort de aproximativ 6 ml (volum de la punctul în care solvenții se întâlnesc până la volumul buclei injectorului inclusiv) timpul de retenţie de 26 ± 2 minute pentru CMPA este optim. Sistemele pe bază de gradient care au un volum mort mai mic (de exemplu, 2 ml) trebuie să utilizeze valoarea de 22 de minute. ca timp optim de retenție.

Se iau soluții din probele-standard fără și cu zer închegat 50 %.

Se injectează 100 μl de supernatant sau de filtrat în dispozitivul HPLC care funcționează în condiţiile de gradient de explorare din tabelul 1.

**Tabelul 1:** *Condițiile gradientului de explorare*

*pentru optimizarea cromatografiei*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Timp (min.)** | **Flux (ml/min.)** | **% A** | **% B** | **Curbă** |
| Iniţial | 1,0 | 90 | 10 | \* |
| 27 | 1,0 | 60 | 40 | (liniar) |
| 32 | 1,0 | 10 | 90 | (liniar) |
| 37 | 1,0 | 10 | 90 | (liniar) |
| 42 | 1,0 | 90 | 10 | (liniar) |

Comparația celor două cromatograme trebuie să evidențieze localizarea vârfului CMPA.

Utilizând formula redată mai jos compoziția inițială a solventului de utilizat pentru gradientul normal poate fi calculat:

% B = 10 – 2,5 + (13,5 + (RTcmpA – 26) / 6) × 30 / 27

% B = 7,5 + (13,5 + (RTcmpA – 26) / 6) × 1,11

*unde:*

RTcmpA – timpul de retenţie al CMPA pentru gradientul de explorare;

10 ─ % B inițial al gradientului de explorare;

2,5 ─ % B în punctul de mijloc minus % B inițial la gradientul normal;

13,5 – timpul de mijloc al gradientului de explorare;

26 – timpul de retenţie necesar al CMPA;

6 – raportul pantelor gradienților de explorare şi normal;

30 ─ % B inițial minus % B la 27 de minute în gradientul de explorare;

27 – timpul de rulare al gradientului de explorare.

1. **Se iau soluţiile conținând probele de testat**

Se injectează 100 μl de supernatant sau de filtrat (subpct. 3) lit. c) din prezentul pct), măsurat cu exactitate în dispozitivul HPLC care funcţionează la un debit de 1,0 ml de soluţie-eluent per minut.

Compoziția eluentului la începutul analizei se obține de la lit. b) din acest subpct. În mod normal este apropiată de A:B = 76:24.

Imediat după injectare se pornește un gradient liniar, rezultatul fiind un procent al B cu 5% mai mare după 27 minute. Ulterior, se pornește un gradient liniar, care aduce compoziția eluentului la 90% B în 5 minute. Această compoziție este menţinută timp de cinci minute, după care compoziția este modificată cu ajutorul unui gradient liniar în decurs de cinci minute, până se ajunge la compoziţia iniţială. În funcţie de volumul intern al sistemului de pompare, următoarea injectare se poate face la 15 minute după ce se obțin condiţiile iniţiale.

Timpul de retenţie al CMPA trebuie să fie de 26 ± 2 minute. Acesta se poate obţine prin modificarea condițiilor iniţiale şi finale ale primului gradient. Totuși, diferența la nivelul %B pentru condiţiile iniţiale şi finale ale primului gradient trebuie să se mențină la valoarea de 5% B.

Eluenții trebuie degazați suficient şi trebuie, de asemenea, să rămână degazați. Acest aspect este esențial pentru buna funcționare a sistemului de pompare pe bază de gradient. Deviația standard a timpului de retenţie al vârfului CMPA trebuie să fie sub 0,1 minute (n = 10).

La fiecare cinci probe se injectează proba de referință şi se utilizează pentru calcularea unui nou factor de răspuns R (pct. 7 subpct 1).

1. **Rezultatele analizei** cromatografice a probei de testat (E) se obțin sub forma unei cromatograme în care vârful CMPA este identificat prin timpul său de retenţie de aproximativ 26 minute.

Integratorul calculează automat înălțimea vârfului H a vârfului CMPA. Se verifică poziția liniei de bază în fiecare cromatogramă. În cazul în care poziția liniei de bază este incorect, localizată, analiza sau integrarea se repetă.

În cazul în care vârful CMPA este suficient de separat de alte vârfuri, se utilizează alocarea liniei de bază depresiune-la-depresiune altminteri, se utilizează perpendiculare verticale până la o linie de bază comună, care trebuie să aibă punctul de plecare aproape de vârful CMPA. Pentru standard şi pentru probe se utilizează același tip de integrare iar în cazul utilizării liniei de bază comune, se verifică coerența acesteia pentru probe şi standard

Este esențial să se examineze aspectul fiecărei cromatograme înainte de interpretarea cantitativă pentru a se detecta orice anomalii cauzate fie de funcţionarea necorespunzătoare a aparaturii sau a coloanei, fie de originea sau natura probei analizate. În cazul în care există dubii, analiza se repetă.

1. **Calibrare**
2. se aplică cu exactitate procedura descrisă de la pct. 6 subpunctele 2) – 4) utilizând probele-standard de la pct. 3 subpct. 4) lit. a) și b). Se utilizează soluții proaspăt preparate deoarece CMP se degradează într-un mediu de acid tricloracetic 8 % la temperatura camerei. La 4 °C soluția rămâne stabilă timp de 24 de ore. În cazul seriilor lungi de analize este preferabil ca în injectorul automat să se utilizeze o tavă cu probe răcită.

Pct. 6 subpct. 4) lit. b) se poate omite în cazul în care % B în condiţiile iniţiale este cunoscut din analizele efectuate anterior.

Cromatograma probei de referință [5] trebuie să fie analoagă cu cea din Figura 1.



**Figura 1.** *Cromatograma probei de referință [5]*

1. Înainte de determinarea cromatografică a probelor se injectează 100 μl din proba- standard care nu conține zer închegat [0] (pct. 3 subpct. 4) lit. a)).

Pe cromatogramă nu trebuie să apară un vârf la timpul de retenţie al vârfului CMPA.

1. Factorul de răspuns R se determină prin injectarea aceluiași volum de filtrat (lit. a) din prezentul subpct.) ca și cel utilizat pentru probe.
2. **Exprimarea rezultatelor**

**Exprimarea rezultatelor se efectuează în felul următor:**

1. **Metodă de calcul şi formule**

**Calcularea factorului de răspuns R:**

Vârful CMPA: R = W/H

*unde:*

R – factorul de răspuns al vârfului CMPA;

H – înălțimea vârfului CMPA;

W – cantitatea de zer din proba-standard.

1. **Calcularea procentului de zer închegat praf din probă**

W(E) = R × H(E)

*unde:*

W(E) – procentul (m/m) de zer închegat din proba (E);

R – factorul de răspuns al vârfului CMPA (subpct. 1) din prezentul pct.);

H(E) – înălțimea vârfului CMPA al probei (E).

În cazul în care W(E) este mai mare de 1% şi diferența dintre timpul de retenţie şi cel al probei-standard este mai mică de 0,2 minute, atunci sunt prezente materii solide compuse din zer închegat.

1. **Precizia metodei**
2. **Repetabilitatea**

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate simultan sau în succesiune rapidă de către același analist utilizând aceeași aparatură pe material de testare identic nu trebuie să depășească 0,2 % m/m.

1. **Reproductibilitatea**

Nu s-a determinat

1. **Liniaritate**

De la 0 la 16 % zer închegat trebuie să se obţină o relaţie liniară cu un coeficient de corelare > 0,99.”

1. Anexa nr. 13 la Metodologie, va avea următorul cuprins:

**„**Anexa nr. 13

la Metodologia de analiză și

evaluare calitativă a laptelui

și a produselor lactate

**Lapte praf degresat: determinarea cantitativă a fosfatidilserinei şi a fosfatidiletanolaminei**

**Metoda: HPLC în fază inversă.**

1. Metoda descrie o procedură de determinare cantitativă a fosfatidilserinei (PS) şi a fosfatidiletanolaminei (PE) din laptele praf degresat (SMP) şi este adecvată pentru determinarea substanţelor solide din zară în SMP.
2. Conţinutul de PS + PE reprezintă fracţiunea masică a substanţei determinată prin procedura specificată în prezenta anexă. Rezultatul se exprimă în miligrame de dipalmitoil fosfatidiletanolamină (PEDP) în 100 g de praf.
3. **Principiul metodei**

Extracția aminofosfolipidelor cu metanol din lapte praf reconstituit. Determinarea PS şi a PE ca derivați ai o-ftaldialdehidei (OPA) prin HPLC în fază inversă (RP) şi prin detectare prin fluorescenţă. Cuantificarea conţinutului de PS şi de PE din proba de testat prin referire la o probă-standard conținând o cantitate cunoscută de PEDP.

1. **Reactivi**

Toţi reactivii sunt de calitate analitică recunoscută. Apa utilizată trebuie să fie apă distilată sau apă de o puritate cel puţin echivalentă, cu excepţia cazurilor în care se specifică altfel.

1. **Material-standard: PEDP, cu o puritate de cel puţin 99 %**

Materialul-standard se depozitează la 18 °C.

1. **Reactivi pentru prepararea probei-standard şi a probei de testat**
2. Metanol de calitate HPLC;
3. Cloroform de calitate HPLC;
4. Monoclorhidrat de triptamină.
5. **Reactivi pentru derivarea o-ftaldialdehidei**
6. Hidroxid de sodiu, soluţie apoasă 12 M;
7. Acid boric, soluţie apoasă 0,4 M ajustată la pH de 10,0 cu hidroxid de sodiu;
8. 2-mercaptoetanol;
9. o-ftaldialdehidă (OPA).
10. **Solvenți de eluție HPLC**
11. Solvenţii de eluție se prepară utilizând reactivi de calitate HPLC;
12. Apă de calitate HPLC;
13. Metanol cu puritate fluorimetrică testată;
14. Tetrahidrofuran;
15. Fosfat diacid de sodiu;
16. Acetat de sodiu;
17. Acid acetic.
18. **Aparatură**
19. Cântar analitic capabil să cântărească până la cea mai apropiată valoare de 1 mg, cu lizibilitate de 0,1 mg;
20. Pahare Berzelius cu capacitate de 25 şi 100 ml;
21. Pipete, capabile să dozeze 1 şi 10 ml;
22. Agitator magnetic;
23. Pipete gradate capabile să dozeze 0,2, 0,5 şi 5 ml;
24. Flacoane gradate cu capacitate de 10, 50 şi 100 ml;
25. Seringi cu capacitate de 20 şi 100 μl;
26. Baie cu ultrasunete;
27. Centrifugă capabilă să funcționeze la 27 000 × g;
28. Fiole de sticlă, cu capacitate de aproximativ 5 ml;
29. Cilindru gradat, cu capacitate de 25 ml;
30. pH-metru cu precizie de 0,1 unități de pH;
31. Echipament HPLC:
32. Sistem de pompare pe bază de gradient capabil să funcţioneze la 1,0 ml/min. la 200 bari;
33. Aparat de prelevare de probe automată cu posibilitate de derivare;
34. Încălzitor cu coloană capabil să mențină coloana la 30 °C ± 1 °C;
35. Detector cu fluorescență, capabil să funcționeze la o lungime de undă de excitație de 330 nm şi la o lungime de undă de emisie 440 nm;
36. Integrator sau software de procesare de date capabil să măsoare aria vârfului;
37. O coloană Licrosfer – 100 (250 × 4,6 mm) sau o coloană echivalentă umplută cu octadecilsilan (C 18), particule de 5 μm.
38. **Prelevarea probelor**

Prelevarea probelor se realizează în conformitate cu standardul SM SR EN ISO 707:2012.

1. **Procedura**

Procedura de determinare cantitativă a fosfatidilserinei şi a fosfatidiletanolaminei din laptele praf degresat se realizează în felul următor:

1. **Prepararea soluţiei-standard interne**
2. Se cântăresc 30,0 ± 0,1 mg de monoclorhidrat de triptamină într-un flacon gradat de 100 ml şi se completează până la marcaj cu metanol.
3. Se pipetează 1 ml din această soluţie într-un flacon gradat de 10 ml şi se completează până la marcaj cu metanol pentru a se obţine o concentraţie de triptamină de 0,15 mM.
4. **Prepararea soluţiei conținând proba de testat**
5. Se cântăresc 1,000 ± 0,001 g de probă de SMP într-un pahar Berzelius de 25 ml.

Se adaugă 10 ml de apă distilată cu temperatura de 40 °C ± 1 °C cu o pipetă şi se amestecă cu un agitator magnetic timp de 30 de minute pentru a se dizolva orice concrețiuni.

1. Se pipetează 0,2 ml din laptele reconstituit într-un flacon gradat de 10 ml, se adaugă 100 μl din soluţia de triptamină de 0,15 mM cu ajutorul unei seringi şi se completează până la volum cu metanol. Se amestecă cu grijă prin răsturnare şi se expune ultrasunetelor timp de 15 minute.
2. Se centrifughează la 27 000 × g timp de 10 minute şi se colectează supernatantul într-o fiolă de sticlă.

Soluţia conținând proba de testat se depozitează la 4 °C până la finalizarea analizei HPLC.

1. **Prepararea soluţiei-standard externe**
2. Se cântăresc 55,4 g de PEDP într-un flacon gradat de 50 ml şi se adaugă aproximativ 25 ml de cloroform cu ajutorul unui cilindru gradat. Se încălzește flaconul astupat la 50 °C ± 1 °C şi se amestecă cu grijă până când PEDP se dizolvă. Flaconul se răcește la 20 °C, se completează până la volum cu metanol şi se amestecă prin răsturnare.
3. Se pipetează 1 ml din această soluţie într-un flacon gradat de 100 ml şi se completează până la volum cu metanol. Se pipetează 1 ml din această soluţie într-un flacon gradat de 10 ml, se adaugă 100 μl de soluţie de triptamină de 0,15 mM obținută la subpct. 1) din prezentul pct. şi se completează până la volum cu metanol. Se amestecă prin răsturnare.

Soluţia conținând proba de referință se depozitează la 4 °C până la efectuarea analizei HPLC.

1. **Prepararea reactivului de derivare**

Se cântăresc 25,0 ± 0,1 mg de OPA într-un flacon gradat de 10 ml, se adaugă 0,5 ml de metanol şi se amestecă cu grijă pentru ca OPA să se dizolve. Se completează până la marcaj cu soluţie de acid boric şi se adaugă 20 μl de 2-mercaptoetanol cu o seringă.

Reactivul de derivare se depozitează la 4 °C într-o fiolă de sticlă maro și este stabil timp de o săptămână.

1. **Determinarea prin HPLC**
2. Solvenţi de eluție

*Solventul A*: Soluţie de fosfat diacid de sodiu 0,3 mM şi soluţie de acetat de sodiu 3 mM (ajustată cu acid acetic la un pH de 6,5 ± 0,1):metanol: tetrahidrofuran = 558:440:2 (V/V/V);

*Solventul B*: metanol.

1. Gradient de eluare recomandat:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Timp (min.)** | **Solventul A (%)** | **Solventul B (%)** | **Debit (ml/min.)** |
| Iniţial | 40 | 60 | 0 |
| 0,1 | 40 | 60 | 0,1 |
| 5,0 | 40 | 60 | 0,1 |
| 6,0 | 40 | 60 | 1,0 |
| 6,5 | 40 | 60 | 1,0 |
| 9,0 | 36 | 64 | 1,0 |
| 10,0 | 20 | 80 | 1,0 |
| 11,5 | 16 | 84 | 1,0 |
| 12,0 | 16 | 84 | 1,0 |
| 16,0 | 10 | 90 | 1,0 |
| 19,0 | 0 | 100 | 1,0 |
| 20,0 | 0 | 100 | 1,0 |
| 21,0 | 40 | 60 | 1,0 |
| 29,0 | 40 | 60 | 1,0 |
| 30,0 | 40 | 60 | 0 |

Este posibil ca gradientului de eluție să necesite o ușoară modificare pentru a se obţine rezoluţia din figura 1.

Temperatura coloanei: 30 °C.

1. Volumul de injectare: 50 μl reactiv de derivare şi 50 μl soluţie conținând proba.
2. Echilibrarea coloanei

Se pornește sistemul în fiecare zi, se irigă coloana cu solvent B 100 % timp de 15 minute, apoi se reglează la A:B = 40:60 şi se echilibrează la 1 ml/min timp de 15 minute. Se efectuează o funcționare de probă prin injectarea de metanol.

Înainte de o depozitare pe termen lung, coloana se irigă cu metanol: cloroform = 80:20 (V/V) timp de 30 de minute.

1. Determinarea conţinutului de PS + PE din proba de testat
2. Secvența de analize cromatografice se efectuează păstrând constantă perioada între efectuări pentru a se obține timpi de reținere constanți. Soluţia-standard externă se injectează la fiecare 5-10 soluții conținând proba de testat pentru a se calcula factorul de răspuns.

Coloana se curăţă prin irigare cu solventul B (lit. a) din prezentul subpct.) 100 % timp de cel puţin 30 de minute la fiecare 20-25 de funcționări.

1. **Modul de integrare**
2. Vârful PEDP

PEDP este eluat ca un singur vârf. Se determină aria vârfului prin integrare depresiune-la-depresiune

1. Vârful triptaminei

Triptamina este eluată ca un singur vârf (figura 1). Se determină aria vârfului prin integrare depresiune-la-depresiune.

1. Grupurile de vârfuri ale PS şi PE

În condiţiile descrise (figura 1), PS eluează sub forma a două vârfuri principale parţial incomplete, precedate de un vârf minor. PE eluează sub forma a trei vârfuri principale parţial incomplete. Se determină întreaga arie a fiecărui grup de vârfuri, stabilindu-se linia de bază ca în figura 1.



***Figura 1. Profilul HPLC al derivaților OPA ai fosfatidilserinei (PS) şi ai fosfatidiletanolamidei (PE) în extractul de metanol al laptelui praf degresat reconstituit. Se raportează modul de integrare a vârfurilor PS, PE și al triptaminei (standard intern)***

1. **Calcularea și exprimarea rezultatelor**

Conţinutul de PS și PE din proba de testat se calculează după cum urmează:

C = 55,36 × [(A2)/(A1)] × [(T1)/(T2)],

*unde:*

C – conţinutul de PS sau PE (mg/100 g praf) din proba de testat

A1 – aria vârfului PEDP a soluţiei conținând proba-standard (pct. 7 subpct 3);

A2 – aria vârfului PS sau PE a soluţiei conținând proba de testat (pct. 7 subpct. 2);

T1 – aria vârfului triptaminei a soluţiei conținând proba-standard (pct. 7 subpct. 3);

T2 – aria vârfului triptaminei a soluţiei conținând proba de testat (pct 7. subpct. 2).

1. **Precizia metodei**

Precizia metodei rezultă din valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate:

1. **Repetabilitate**

Derivaţia standard relativă a repetabilităţii, care exprimă variabilitatea rezultatelor analitice independente obţinute de acelaşi operator utilizând aceeași aparatură în aceleași condiții pe aceeași probe de testat și într-un interval de timp scurt, nu trebuie să depășească 2% relative. În cazul în care se obţin două determinări în aceste condiţii, diferenţa relativă dintre cele două rezultate nu trebuie să fie mai mare de 6 % din media aritmetică a rezultatelor.

1. **Reproductibilitate**

În cazul în care se realizează două determinări de către operatori din laboratoare diferite care utilizează aparatură diferită în condiții diferite pentru analizarea aceleiași probe, de testat, diferenţa relativă dintre cele două rezultate nu trebuie să fie mai mare de 11 % din media aritmetică a rezultatelor.”

**Prim-ministru Dorin RECEAN**

Viceprim-ministru,

Ministrul agriculturii și Vladimir BOLEA

industriei alimentare