



GUVERNUL REPUBLICII MOLDOVA

HOTĂRÎRE nr. _____

din _____
Chișinău

**Cu privire la aprobarea Metodologiei de analiză
și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate**

În temeiul Legii nr.78-XV din 18 martie 2004 privind produsele alimentare (Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 2004, nr. 83-87, art. 431), Guvernul HOTĂRĂȘTE:

1. Se aprobă Metodologia de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate (se anexează).
2. Prezenta hotărîre intră în vigoare la 24 de luni de la data publicării în Monitorul Oficial al Republicii Moldova.
3. Controlul asupra executării prezentei hotărîri se pune în sarcina Agenției Naționale pentru Siguranța Alimentelor.

Prim-ministru

PAVEL FILIP

METODOLOGIE
de analiză și evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

Metodologia de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate (în continuare – *Metodologie*) de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate transpune Regulamentul (CE) nr. 273/2008 al Comisiei din 5 martie 2008 de stabilire a normelor de aplicare a Regulamentului (CE) nr. 1255/1999 al Consiliului privind metodele de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate, publicat în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene (JO) nr. L 088 din 29 martie 2008.

I. DOMENIU DE APLICARE

1. Prezenta Metodologie stabilește metodele de referință pentru efectuarea de către laboratoarele naționale acreditate a analizelor chimice, fizice și microbiologice și pentru evaluarea senzorială a laptelui și a produselor lactate (în continuare – *produse*) provenite din producția autohtonă și din import.

2. Sub incidența prezentei Metodologii cad grupele de produse cu pozițiile tarifare 0401-0406 și 2309, conform Nomenclurii combinate a mărfurilor, aprobate prin Legea nr. 172 din 25 iulie 2014.

II. DISPOZIȚII GENERALE

3. Metodele de referință pentru analiza chimică, fizică și microbiologică și pentru evaluarea senzorială a laptelui și a produselor lactate, precum și normele de aplicare a metodelor respective sînt prevăzute în anexa nr. 1.

4. Metodele de rutină pot fi folosite pentru analizele necesare, cu condiția să fie validate și verificate pe baza metodelor de referință de către un laborator acreditat. Rezultatele sînt comparate ținînd cont de inegalitățile constante, de repetabilitate și de reproductibilitate.

În cazul unor contestații, rezultatul obținut prin metoda de referință este hotărîtor.

5. Evaluarea conformității unui lot cu limita legală, cu excepția analizei marcatorilor, se specifică în anexa nr. 2 și se aplică în scopul definirii conformității cu cerințele în ceea ce privește compoziția.

6. Pentru evaluarea senzorială a laptelui și a produselor lactate, altele decît untul destinat depozitării publice, ca metodă de referință se folosește fie standardul SM ISO 22935-1:2015, SM ISO 22935-2:2015, SM ISO 22935-3:2015, fie alte metode comparabile.

7. Procedura prevăzută în anexa nr. 3 se aplică ca metodă de referință pentru evaluarea senzorială a untului.

8. Metoda de analiză prevăzută în anexa nr. 4 se folosește ca metodă de referință pentru determinarea conținutului de trigliceride ale acidului enantic în unt, ulei de unt și smântână.

9. Metoda de analiză prevăzută în anexa nr. 5 se folosește ca metodă de referință pentru determinarea conținutului de vanilină în untul concentrat, unt și smântână.

10. Metoda de analiză prevăzută în anexa nr. 6 se folosește ca metodă de referință pentru determinarea conținutului de etil ester al acidului beta-apo-8'-carotenic în untul concentrat și în unt.

11. Metoda de analiză prevăzută în anexa nr. 7 se folosește ca metodă de referință pentru determinarea conținutului de β -sitosterol și stigmasterol în unt și în untul concentrat.

12. Untul concentrat, untul și smântâna se consideră a fi marcate în cazul în care rezultatele obținute sînt conforme cu specificațiile prevăzute la punctele 12 și 13 din anexa nr. 4, punctul 8 din anexele nr. 5 și nr. 6 și punctul 12 din anexa nr. 7.

13. Metoda de referință prevăzută în anexa nr. 8 asigură faptul că brînză produsă numai din lapte de oaie, de capră sau de bivoliță ori dintr-un amestec de lapte de oaie, capră și bivoliță nu conține cazeină din lapte de vacă.

14. Se consideră că este prezentă cazeina din lapte de vacă în cazurile în care conținutul de cazeină din lapte de vacă al probei analizate este egal sau mai mare decît conținutul probei de referință conținînd 1% lapte de vacă în conformitate cu anexa nr. 8.

15. Metodele de rutină pentru detectarea cazeinei din laptele de vacă în brînzeturi prevăzute la punctele 13 și 14 pot fi folosite cu condiția că:

- a) limita de detecție să fie de maximum 0,5 %;
- b) să nu existe rezultate fals pozitive;
- c) cazeina din lapte de vacă să poată fi detectată cu sensibilitatea necesară chiar și după perioade lungi de maturare, precum în condiții obișnuite de comercializare.

În cazul în care niciuna dintre cerințele menționate la literele a)-c) din prezentul punct nu este îndeplinită, se folosește metoda de referință prevăzută în anexa nr. 8.

16. Detectarea bacteriilor coliforme în unt, lapte praf degresat, cazeină și cazeinați se efectuează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 9.

17. Determinarea conținutului de lactoză al produselor care intră sub incidența codului tarifar 2309 al Nomenclaturii combinate a mărfurilor se efectuează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 10.

18. Detectarea zerului încheșat în laptele praf degresat se efectuează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 11.

19. Zerul încheșat în laptele praf degresat și în amestecurile destinate utilizării ca furaje pentru animale se detectează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 11. În cazul detectării zerului încheșat se aplică anexa nr. 12.

20. Detectarea zarei în laptele praf degresat se efectuează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 13.

21. Detectarea reziduurilor antimicrobiotice în laptele praf degresat se efectuează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 14.

22. Determinarea conținutului de lapte praf degresat în furajele combinate se efectuează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 15.

23. Detectarea amidonului în laptele praf degresat, în laptele praf denaturat și în furajele combinate se efectuează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 16.

24. Determinarea conținutului umed în smântîna deshidratată se efectuează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 17.

25. Determinarea conținutului umed al zarei praf acide destinate utilizării în furaje se efectuează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 18.

26. Determinarea purității grăsimilor din lapte se efectuează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa nr. 19.

27. Analizele se realizează în laboratoare acreditate conform SM SR EN ISO/CEI 17025 Cerințele generale pentru competența laboratoarelor de încercări și etalonări, în care există un sistem analitic de asigurare a calității, inclusiv proceduri interne de control al calității.

28. În laborator trebuie să fie disponibilă pentru consultare o descriere detaliată a sistemelor utilizate de asigurare a calității.

29. Laboratoarele acreditate în conformitate cu standardele internaționale de referință adoptate ca standarde naționale asigură participarea la testele de competență după cum este stabilit în standardul de referință.

30. Prelevarea de probe se realizează în conformitate cu prezenta Metodologie pentru produsul în cauză. În cazul în care nu există dispoziții privind prelevarea de probe, se folosește standardul SM SR EN ISO 707:2012 Lapte și produse lactate. Ghid pentru eșantionare.

31. Rapoartele de încercări emise de laborator privind rezultatele analizei trebuie să conțină suficiente informații conform pct. 5.10 din standardul SM SR EN ISO/CEI 17025 pentru a se putea efectua o evaluare a rezultatelor în conformitate cu prevederile anexelor nr. 2 și nr.20.

32. În cazul în care rezultatele unei analize nu sînt acceptate de către operator, se folosește procedura descrisă în anexa nr. 20.

33. În cazul în care producătorul poate demonstra, în termen de cinci zile lucrătoare de la prelevarea probelor, că procedura de prelevare a probelor nu a fost realizată corect, laboratorul își asumă responsabilitatea pentru repetarea acesteia.

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 referință | Notă |
|---------------------------------|---|--|----------------------------|--------|
| Unt fără sare | Grăsime, min. | 82 % m/m | SM SR EN ISO 17189:2012 | |
| | Apă, max. | 16 % m/m | SM SR EN ISO 3727-1:2012 | |
| | SNF, max. | 2 % m/m | SM SR EN ISO 3727-2:2012 | |
| | Acizi grași liberi | 1,2 mmol/100 g grăsime | SM ISO 1740:2015 | |
| | PV, max. | 0,3 mechiv. oxigen/1000 g grăsime | SM ISO 3976:2015 | Nota 1 |
| | Bacterii coliforme | Nedetectabile în 1 g | Anexa nr. 9 | Nota 4 |
| | Grăsime care nu provine din lapte | Nedetectabilă prin analiza trigliceridelor | Anexa nr. 19 | |
| | Marcatori de steroli | Nedetectabili, β -sitosterol \leq 40 mg/kg | Anexa nr. 7 | |
| | Alți marcatori: - vanilină - etil esterul acidului carotenic - trigliceride ale acidului enantic | Nedetectabilă \leq 6 mg/kg | Anexa nr. 5 Anexa nr. 6 | |
| | | Nedetectabile | Anexa nr. 4 | |
| Caracteristici de sensibilitate | Cel puțin 4 din 5 puncte pentru A, F și C | Anexa nr. 3 | | |
| Dispersia apei | Cel puțin 4 puncte | | Nota 2 | |
| Unt sărat | Grăsime, min. | 80 % m/m | SM SR EN ISO 17189:2012 | |
| | Grăsime care nu provine din lapte | | Anexa nr. 19 | |
| | Apă, max. | 16 % m/m | SM SR EN ISO 3727-1:2012 | |
| | 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 - vanilină | A se vedea anexa nr. 7 A se vedea anexa nr. 5 | Anexa nr. 7 Anexa nr. 5 | |

| | | | | |
|---|--|---|--|----------------------|
| | - etil esterul acidului carotenic - trigliceride ale acidului enantic | A se vedea anexa nr. 6 A se vedea anexa nr. 4 | Anexa nr. 6 Anexa nr. 4 | |
| Unt concentrat utilizat pentru fabricarea produselor de patiserie, înghețatei și altor produse alimentare | Grăsime, min. | 99,8 % m/m | SM ISO 8851-3:2015 | |
| | Apă și SNF, max. | 0,2 % m/m | SM ISO 8851-1:2015 (apă) SM ISO 8851-2:2015 (SNF) | |
| | Acizi grași liberi | 1,2 mmol/100 g grăsime | SM ISO 1740:2015 | |
| | PV, max | 0,5 mechiv. oxigen/1000 g grăsime | SM ISO 3976:2015 | Nota 1 |
| | Grăsime care nu provine din lapte Aromă Miros Altele | Absentă Proaspătă Fără mirosuri străine Absența agenților de neutralizare, a antioxidanților și a conservanților | Anexa nr. 19 | |
| | Marcatori: - steroli - vanilină - etil esterul acidului carotenic - trigliceride ale acidului enantic | A se vedea anexa nr. 7 A se vedea anexa nr. 5 A se vedea anexa nr. 6 A se vedea anexa nr. 4 | Anexa nr. 7 Anexa nr. 5 Anexa nr. 6 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 | |
| | SNF, max. Marcatori: - stigmasterol (95 % m/m) - stigmasterol (85 % m/m) - trigliceride ale acidului enantic - etil ester al acidului butiric și stigmasterol - etil esterul acidului butiric și trigliceridele acidului enantic | 2 % m/m 15 g/100 kg de unt concentrat 17 g/100 kg de unt concentrat 10,34 g/100 t de unt concentrat | SM SR EN ISO 3727-2:2012 Anexa nr. 7 Anexa nr. 7 Anexa nr. 4 - etil esterul acidului butiric - anexa nr. 8 (stigmasterol) - etil esterul acidului butiric - anexa nr. 5 (trigliceride ale | Nota 2 Nota 2 |

| | | | | |
|---|---|--|--|----------------------|
| | | | acidului enantic) | |
| | | | - | |
| | lecitină (E 322), max. | 0,5 % m/m | | Nota 2 |
| | NaCl, max. | 0,75 % m/m | SM ISO 15648:2015 | |
| | Acizi grași liberi | 1,2 mmol/100 g grăsime | SM ISO 1740:2015 | |
| | PV, max | 0,5 mechiv. oxigen/1000 g grăsime | SM ISO 3976:2015 | Nota 1 |
| | Aromă | Proaspătă | | |
| | Miros | Fără mirosuri străine | | |
| | Altele | Absența agenților de neutralizare, a antioxidanților și a conservanților | | |
| Smântână | Grăsime, min. | 35 % m/m | SM EN ISO 2450:2014 | |
| | Grăsime care nu provine din lapte | | Anexa nr. 19 | |
| | Marcatori: - steroli - vanilină - etil esterul acidului carotenic - trigliceride ale acidului enantic | A se vedea anexa nr. 7 A se vedea anexa nr. 5 A se vedea anexa nr. 6 A se vedea anexa nr. 4 | Anexa nr. 5 Anexa nr. 4 | Nota 2 Nota 2 |
| Brânză produsă din lapte de oaie și/sau capră | Lapte de vacă | < 1 % m/m | Anexa nr. 8 | |
| Cazeină acidă | Apă, 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 soluție 0,1 N NaOH/g | SM SR ISO 5547:2012 | |
| | TBC, max. | 30000/g | SM EN ISO 4833-1:2014 SM EN ISO 4833-2:2014 | Nota 3 |
| | Bacterii coliforme | Absente în 0,1 g | Anexa nr. 9 | Nota 3 |
| | Therm., max. | 5000/g | SM EN ISO 4833-1:2014 SM EN ISO 4833-2:2014 | Notele 3 și 4 |
| Cazeină cheag | Apă, max. | 12,00 % m/m | SM ISO 5550:2015 | |
| | Grăsime, max. | 1,00 % m/m | SM ISO 5543:2015 | |
| | Cenușă, min. | 7,50 % m/m | SM SR ISO 5545:2012 | |
| | TBC, max. | 30000/g | SM EN ISO 4833-1:2014 | Nota 3 |

| | | | | |
|---|--|---------------------------------------|--|---------------|
| | | | SM EN ISO 4833-2:2014 | |
| | Bacterii coliforme | Absente în 0,1 g | Anexa nr. 9 | Nota 3 |
| | Therm., max. | 5000/g | SM EN ISO 4833-1:2014 SM EN ISO 4833-2:2014 | Notele 3 și 4 |
| Cazeinați | Apă, max. | 6,00 % m/m | SM ISO 5550:2015 | |
| | Proteine ale laptelui, min. | 88,00 % m/m | SM SR ISO 5549:2012 | |
| | Grăsimi, max. | 1,50 % m/m | SM ISO 5543:2015 | |
| | Cenușă, max. | 6,50 % m/m | SM ISO 5544:2015 SM SR ISO 5545:2012 | |
| | Cenușă insolubilă | | SM ISO 5544:2015 | |
| | Lactoză, max. | 1,00 % m/m | SM ISO 5548:2015 | |
| | TBC, max. | 30000/g | SM EN ISO 4833-1:2014 SM EN ISO 4833-2:2014 | Nota 3 |
| | Bacterii coliforme | Absente în 0,1 g | Anexa nr. 9 | Nota 3 |
| | Therm., max. | 5000/g | SM EN ISO 4833-1:2014 SM EN ISO 4833-2:2014 | Notele 3 și 4 |
| | Furaje combinate și lapte praf degresat (SMP) (folosite în furaje) | Apă (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 | |
| Apă (SMP), max. | | 5 % m/m | SM EN ISO 5537:2014 | |
| Grăsimi (SMP), max. | | 11 % m/m | SM SR EN ISO 1736:2012 | |
| Zer încheșat (SMP) | | Absent | Anexa nr. 12 | |
| Amidon (SMP) | | Absent | Anexa nr. 16 | |
| Apă (amestecuri), max. | | 5 % din materia negrasă | SM EN ISO 5537:2014 | |
| Grăsimi (amestecuri) | | | SM SR ISO 6492:2012 | |
| Zer încheșat (amestecuri) | | Absent | Anexa nr. 12 | |
| Conținutul SMP (din produsul final), min. | | 50 % m/m | Anexa nr. 15 | |
| Grăsimi (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 | | 25 ppm | SM SR EN ISO | |

| | | | | |
|----------------|--------------------------------|--|--|--------|
| | final) | | 6869:2012 | |
| SPM (spray) | Grăsime, max. | 1,0 % m/m | SM SR EN ISO 1736:2012 | |
| | Proteine, min. | 34 m/m din materia uscată grasă | SM EN ISO 8968-1:2014 | |
| | Apă, max. | 3,5 % m/m | SM EN ISO 5537:2014 | |
| | Aciditate, max. | 19,5 ml, 0,1 N NaOH, 10 g substanțe solide negre | SM ISO 6091:2014 | |
| | Lactați, max. | 150 mg/100 g substanțe solide negre | SM EN ISO 8069:2014 | |
| | Fosfatază | Negativ | SM EN ISO 11816-1:2014 | |
| | Indicele insolubilității, max. | 0,5 ml la 24 ⁰ C | SM STB ISO 8156:2015 | |
| | Particule arse | Disc A sau B (15,0 mg) | | Nota 2 |
| | TBC | 40000/g | SM EN ISO 4833-1:2014 SM EN ISO 4833-2:2014 | Nota 3 |
| | Bacterii coliforme | Negativ/0,1 g | Anexa nr. 9 | Nota 3 |
| | Zară | Negativ | Anexa nr. 13 | |
| | Zer încheșat | Negativ | Anexa nr. 11 | |
| | Zer acid | Negativ | | Nota 2 |
| | Agenti antimicrobieni | | Anexa nr. 14 | |

(¹) Fără a se aduce atingere cerințelor prezentei Metodologii.

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

| Produsul | Codul poziției tarifare | Parametrul | Limita | Metoda de referință | Notă |
|--|-------------------------|---------------------------|---|---------------------|------|
| Lapte și smântână din lapte, neconcentrate, fără adaos de zahăr sau alți îndulcitori | 0401 | Grăsime (≤ 6 % m/m) | Limitele sînt cele specificate în descrierea codului NC pentru produsul respectiv | SM EN ISO 1211:2015 | |

| | | | | | |
|---|------|---------------------------|--|--|--------|
| | | Grăsimi (> 6 % m/m) | | SM EN ISO 2450:2014 | |
| Lapte și smântână din lapte, concentrate sau cu adaos de zahăr sau alți îndulcitori | 0402 | Grăsimi (formă lichidă) | | SM EN ISO 1737:2015 | |
| | | Grăsimi (formă solidă) | | SM SR EN ISO 1736:2012 | |
| | | Proteine | | SM EN ISO 8968-1:2014 SM EN ISO 8968-3:2014 | |
| | | Sucroză (conținut normal) | | SM ISO 2911:2015 | |
| | | Sucroză (conținut scăzut) | | | Nota 2 |
| | | Solide (SCM) | | SM ISO 6734:2015 | |
| | | Solide (EMC) | | SM ISO 6731:2014 | |
| | | Apă (lapte praf) | | SM EN ISO 5537:2014 | |
| | | Apă (smântână praf) | | Anexa nr. 17 | |
| Lapte acru, lapte și smântână covăsite, iaurt, chefir și alte sortimente de lapte și smântână fermentate sau acrite, chiar concentrate, sau cu adaos de zahăr sau alți îndulcitori, sau aromatizate, sau cu adaos de fructe, nuci sau cacao | 0403 | Grăsimi | | SM EN ISO 1211:2015 SM SR EN ISO 1736:2012 SM EN ISO 2450:2014 SM EN ISO 7208:2014 SM SR ISO 8262-3:2012 | |
| | | Proteine | | SM EN ISO 8968-1:2014 SM EN ISO 8968-3:2014 | |
| | | Sucroză (conținut normal) | | SM ISO 2911:2015 | |
| | | Sucroză (conținut scăzut) | | | Nota 2 |
| | | Apă (zară acidă praf) | | Anexa nr. 18 | |
| | | Apă (zară dulce praf) | | SM EN ISO 5537:2014 | |
| | | Solide (alte produse) | | | Nota 2 |
| Zer, chiar concentrat sau cu adaos de zahăr sau de alți | 0404 | Grăsimi | | SM SR EN ISO 1736:2012 SM EN ISO 2450:2014 | |

| | | | | | |
|--|---------|--|--|--|--------|
| îndulcitori; produse obținute din compuși naturali ai laptelui, chiar cu adaos de zahăr sau alți îndulcitori, nedenumite și necuprinse în altă parte | | | | SM EN ISO 7208:2014 | |
| | | Proteine | | SM EN ISO 8968-1:2014 SM EN ISO 8968-3:2014 | |
| | | Sucroză (conținut normal) | | SM ISO 2911:2015 | |
| | | Sucroză (conținut scăzut) | | | Nota 2 |
| | 0404 90 | Proteine | | SM EN ISO 8968-1:2014 | |
| | | Apă | | | Nota 2 |
| | | Solide (Produse concentrate) | | SM ISO 6734:2015 SM ISO 6731:2014 | |
| Unt și alte grăsimi care provin din lapte; pastă din lapte pentru tartine | 0405 | Grăsimi (în cazul în care ≤ 85 % m/m) | | SM SR EN ISO 17189:2012 | |
| | Unt | Apă | | SM SR EN ISO 3727-1:2012 | |
| | | SNF | | SM SR EN ISO 3727-2:2012 | |
| | | NaCl | | SM ISO 15648:2015 | |
| | | Grăsimi (în cazul în care > 99 % m/m) | | SM SR EN ISO 17189:2012 | |
| Ulei de unt | | Apă (în cazul în care < 99 % m/m) | | SM EN ISO 5536:2014 | |
| Brânză și caș | 0406 | Grăsimi | | SM EN ISO 1735:2014 | |
| | | Solide | | SM SR EN ISO 5534:2014 | |
| | | Solide (Urdă) | | SM ISO 2920:2015 | |
| | | NaCl | | SM SR EN ISO 5943:2012 | |
| | | Lactoză | | SM ISO 5765- 1:2015 SM ISO 5765- 2:2015 | |
| Preparate de tipul celor folosite 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 referință.

Nota 3: Proba este preparată conform SM SR EN ISO 6887-5:2014.

Nota 4: Incubate timp de 48 de ore la temperatura de 55⁰C, acordându-se atenție prevenirii uscării mediului de cultură.

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

Abrevieri:

Min. = minimum

Max. = maximum

SNF = substanțe solide negrase

PV = valoarea peroxidului

A = aspect

F = miros

C = consistență

TBC = număr total de bacterii

Therm = număr de bacterii termofile

SMP = furaje combinate și lapte praf degresat

SCM = lapte condensat îndulcit

EMC = lapte sau smântână evaporate

ISO = Organizația Internațională de Standardizare

Anexa nr. 2
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

Evaluarea conformității unui lot cu limita legală

1. În cazurile în care este stabilită o normă de reglementare care prevede proceduri detaliate de prelevare a probelor, aceste proceduri trebuie utilizate. În toate celelalte cazuri, se utilizează o probă din cel puțin 3 unități de probă luate la întâmplare din lotul supus controlului. Se poate prepara o probă compozită. Rezultatul obținut este comparat cu limitele legale prin calcularea intervalului de încredere de 95 % pe baza a 2 x deviația standard, unde deviația standard relevantă depinde:

1) de validarea metodei în cadrul colaborării internaționale cu valorile pentru σ_r și σ_R ; sau

2) în cazul validării interne, de calcularea reproductibilității interne. Acest interval de încredere este apoi comparat cu incertitudinea de măsurare a rezultatului.

2. În cazul în care metoda este validată în cadrul colaborării internaționale, iar deviația standard a repetabilității σ_r și deviația standard a reproductibilității σ_R au fost stabilite, laboratorul poate demonstra conformitatea cu caracteristicile de performanță ale metodei validate.

A se calcula media aritmetică \bar{x} din n măsurători repetate.

A se calcula incertitudinea extinsă ($k = 2$) din \bar{x} pe baza

$$U = 2 \sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n} \sigma_r^2} .$$

În cazul în care rezultatul final x al măsurătorii se calculează utilizând o formulă de forma $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ sau $x = y_1 / y_2$, se respectă procedurile obișnuite de combinare a deviațiilor standard în astfel de cazuri.

Se apreciază că lotul nu respectă limita legală superioară UL în cazul în care:

$$\bar{x} - U > UL;$$

în caz contrar, se apreciază că lotul respectă UL.

Se apreciază că lotul nu respectă limita legală inferioară LL în cazul în care:

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

în caz contrar, se apreciază că lotul respectă LL.

3. În cazurile în care se folosesc metode care nu sînt specificate în prezenta Metodologie și nu sînt stabilite măsuri de precizie, se realizează o validare internă. Se utilizează deviația standard a repetabilității interne s_{ir} și deviația standard a reproductibilității interne s_{iR} în locul σ_r și σ_R , respectiv, în formulele de calcul al incertitudinii extinse U.

Regulile de luare a unei decizii sînt aceleași ca la punctul 1 din prezenta anexă. Cu toate acestea, în cazul în care se consideră că lotul nu respectă limita legală, măsurătorile se repetă folosind metoda specificată în prezenta Metodologie, decizia urmînd să fie luată în conformitate cu punctul 1 din prezenta anexă.

Anexa nr. 3
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

Evaluarea senzorială a untului

1. Scopul procedurii de evaluare senzorială a untului este de a furniza o metodă uniformă aplicabilă pe teritoriul republicii.

2. În scopul aplicării prezentei anexe, termenii folosiți se definesc după cum urmează:

1) *evaluare senzorială* – examinare a caracteristicilor unui produs cu ajutorul organelor de simț;

2) *panel* – grup de evaluatori selectați de către conducătorul laboratorului acreditat, care, pe perioada evaluării, lucrează independent, fără a comunica între ei și fără a se influența reciproc;

3) *evaluator* – persoana aleasă pentru capacitatea sa de a efectua un test senzorial. Acest tip de evaluator poate avea experiență limitată;

4) *evaluator expert* – persoana cu un grad înalt de sensibilitate senzorială și cu experiență în metodologia senzorială, care este capabilă să efectueze evaluări coerente și sigure ale unor produse variate. Acest tip de evaluator dispune pe termen lung de o bună memorie senzorială;

5) *punctare* – evaluare senzorială realizată de un panel, folosindu-se o scală numerică. Trebuie să se folosească un nomenclator al defectelor;

6) *clasificare* – clasificare calitativă realizată pe baza punctării;

7) *documente de control* – documente folosite pentru înregistrarea punctajelor individuale pentru fiecare caracteristică și a clasificării finale a produsului (acest document poate fi folosit și pentru înregistrarea compoziției chimice).

3. Condițiile privind camera de testare sînt:

1) Evaluatorii din camera de testare nu trebuie să fie influențați de factori externi.

2) În camera de testare nu trebuie să existe mirosuri străine și trebuie să fie ușor de curățat. Pereții trebuie să aibă o culoare deschisă și nereflectantă.

3) Camera de testare și iluminarea acesteia trebuie să fie de așa natură încît să nu afecteze proprietățile produsului care urmează să fie punctat.

4) Camera trebuie dotată cu un sistem adecvat de control al temperaturii care să permită păstrarea unei temperaturi constante a untului. Untul trebuie să aibă o temperatură de 12 °C (± 2 °C) în momentul clasificării.

4. Un evaluator trebuie să fie familiarizat cu produsele din unt și să aibă competența necesară pentru a realiza o gradare a sensibilității senzoriale. Competența evaluatorului este controlată de către conducătorul panelului în mod regulat (cel puțin o dată pe an).

Cerințele generale și testele de selecție care trebuie aplicate înaintea utilizării oficiale a unui nou evaluator sînt specificate în SM ISO 22935-1.

Formarea profesională trebuie să fie continuă, iar conducătorul panelului trebuie să organizeze ședințe generale cel puțin o dată pe trimestru. Formarea profesională a panelului se efectuează conform SM EN ISO 8586.

Formarea inițială trebuie să acopere următoarele:

- 1) teoria generală și importanța practică a evaluării senzoriale;
- 2) metodele, scalele și descrierea percepțiilor senzoriale;
- 3) detectarea și recunoașterea caracteristicilor senzoriale și termenilor senzoriali specifici;
- 4) pregătirea de bază în fabricarea untului;
- 5) referințele și probele valide care să îl ajute pe evaluator în identificarea aromelor specifice și a intensității aromei produsului.

5. Numărul evaluatorilor din panel trebuie să fie impar, numărul minim fiind de trei. Majoritatea acestora trebuie să fie angajați ai unui laborator acreditat, dar să nu fie angajați în industria de prelucrare a laptelui.

Înainte de evaluare trebuie avuți în vedere mai mulți factori pentru obținerea unor performanțe optime ale subiecților:

- 1) nu trebuie să sufere de boli care le-ar putea afecta performanța. Într-un asemenea caz, evaluatorul în cauză trebuie înlocuit în panel cu un alt evaluator;
- 2) trebuie să se prezinte în mod punctual la evaluare și să dispună de suficient timp pentru realizarea evaluării;
- 3) nu trebuie să folosească substanțe cu miros puternic cum ar fi parfum, loțiune după ras, deodorant etc. și trebuie să evite consumul de alimente cu arome puternice (de exemplu, foarte condimentate) etc.;
- 4) nu au voie să fumeze, să mănînce și să bea altceva decît apă cu o jumătate de oră înainte de evaluare.

6. Toți evaluatorii trebuie să participe în mod regulat la paneele de evaluare senzorială pentru a-și păstra competențele. Frecvența acestora depinde de volumul și capacitatea de producție a untului și, în măsura în care acest lucru este posibil, trebuie să se organizeze cel puțin un panel pe lună.

7. Este esențial ca identitatea probelor să fie ascunsă în timpul evaluării, astfel încît să se evite orice posibilitate de favorizare. Probele trebuie să fie codate.

Această etapă are loc înaintea evaluării propriu-zise. Se stabilește temperatura untului în timpul transportului către camera de testare ($6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Cînd evaluarea senzorială se realizează într-un antrepozit frigorific, proba este prelevată cu ajutorul unui prelevator de unt. În cazul în care evaluarea senzorială se realizează în alt loc decît în antrepozitul frigorific, se prelevează o probă de cel puțin 500 g. Pe parcursul evaluării, untul trebuie să aibă o temperatură de $12\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C})$. Deviațiile mari trebuie evitate.

8. Evaluarea senzorială se realizează pentru următoarele trei caracteristici: aspect, consistență și aromă.

Aspectul implică următoarele caracteristici: culoare, puritate vizibilă, absența contaminării fizice, absența fungilor și uniformitatea de dispersie a apei.

Consistența implică următoarele caracteristici: corp, textură și fermitate. Tartinabilitatea poate fi monitorizată prin utilizarea mijloacelor fizice, în cazul în care agentul economic dorește acest lucru în vederea satisfacerii cerințelor clientului.

Corpul reprezintă termenul care se referă la coeziunea produsului în timp ce este consumat. În mod normal este asociat cu fermitatea și tartinabilitatea și trebuie să fie uniform în întregul produs. Se află în strânsă legătură cu textura și reprezintă abilitatea produsului de a-și menține poziția inițială. Este indicat de rezistență la tăiere, putînd fi măsurat mecanic și prin evaluare bucotală și tactilă.

Aroma reprezintă caracteristica percepută în cavitatea bucală, în principal prin intermediul papilelor gustative de la nivelul limbii.

Mirosul reprezintă caracteristica percepută prin intermediul nasului și al simțului olfactiv.

O deviație semnificativă față de temperatura recomandată împiedică evaluarea sigură a consistenței și a aromei. Temperatura este extrem de importantă.

Clasificarea untului trebuie amînată în cazul în care temperatura se află în afara intervalului recomandat.

Fiecare caracteristică trebuie să facă obiectul unei evaluări senzoriale separate. Punctarea se realizează în conformitate cu tabelul 1.

Tabelul 1

Punctajul pentru unt

| Aspect | | | Consistență | | | Aromă+miros | | |
|--------|-------------|--|----------------------------|----------|--|----------------------------|----------------------|--|
| Puncte | Nr. (1) | Observații | Puncte (clasă de calitate) | Nr. (1) | Observații | Puncte (clasă de calitate) | Nr. (1) | Observații |
| 5 | | <i>Foarte bine</i> tipul ideal cea mai bună calitate (substanță uscată egală) | 5 | | <i>Foarte bine</i> tipul ideal cea mai bună calitate (bine tartinabil) | 5 | | <i>Foarte bine</i> tipul ideal cea mai bună calitate (cea mai fină aromă absolut pură) |
| 4 | | <i>Bine</i> (2) nu există defecte evidente | 4 | 16 17 | <i>Bine</i> (2) tare moale | 4 | | <i>Bine</i> (2) nu există defecte evidente |
| 3 | 1 2 3 | <i>Acceptabil (mici defecte)</i> nelegat (necompact), umed neuniform, în două culori, | 3 | 13 14 | <i>Acceptabil (mici defecte)</i> dezemulsionat, friabil, sfărîmicios, păstos, de consistența | 3 | 19 20 23 25 | <i>Acceptabil (mici defecte)</i> impur, arome străine, acid, aromă de copt, aromă de ars, |

| | | | | | | | | |
|---|---|--|---|----------------------------|---|---|--|---|
| | 4 5 6 7 8 | cu dungi, pestriț, marmorat, cu aspect granulat, separare a uleiurilor, supracolorat, textură slabă, deschisă | | 15 16 17 | aluatului, gras lipicios, tare, moale | | 31 32 33 | aromă de furaj, aspru, amar, suprasărat |
| 2 | 1 3 4 5 6 7 9 10 11 12 | <i>Slab (defecte evidente)</i> nelegat, (necompact), umed, cu dungi, pestriț, marmorat, cu aspect granulat, separare a uleiurilor, supracolorat, granulat, materii străine, mucegăit, sare nedizolvată | 2 | 13 14 15 16 17 | <i>Slab (defecte evidente)</i> dezemulsionat, friabil, sfărâmicios, păstos, de consistența aluatului, gras, lipicios, tare, moale | 2 | 19 20 21 23 30 31 32 33 34 36 | <i>Slab (defecte evidente)</i> impur, arome străine, vechi, acid, miros oxidat, miros metalic, aromă de furaj aspru, amar, suprasărat, mucegăit, putred, miros de substanțe chimice |
| 1 | 1 3 4 5 6 7 9 10 11 12 | <i>Foarte slab (defecte mari)</i> nelegat (necompact), umed, cu dungi pestriț, marmorat, cu aspect granulat, separare a uleiurilor, supracolorat, granulat, materii străine, mucegăit, sare nedizolvată | 1 | 13 14 15 16 17 | <i>Foarte slab (defecte mari)</i> dezemulsionat, friabil, sfărâmicios, păstos, de consistența aluatului, gras, lipicios, tare, moale | 1 | 20 22 23 24 26 27 28 29 30 32 33 34 35 36 | <i>Foarte slab (defecte mari)</i> arome străine, brânzos, miros de brânză lactică, acid, spumos, miros de mucegai, rînced, uleios, cu gust de pește, cu aspect/gust de seu, miros oxidat, miros metalic, aspru, amar, suprasărat, mucegăit, putred, cu aspect de malț, miros de substanțe chimice |

(1) Punctul 10.

(2) Defectele menționate la “bun” reprezintă numai deviații foarte mici de la tipul ideal.

Pentru a se obține uniformitate, uneori este de dorit ca, înainte de începerea evaluării, evaluatorii să punteze împreună una sau mai multe probe de referință, în privința aspectului, a consistenței și a aromei.

Punctajul de acceptare este următorul:

| | Maxim | Necesar |
|-------------|--------------|----------------|
| Aspect | 5 | 4 |
| Consistență | 5 | 4 |
| Aromă/miros | 5 | 4 |

În cazurile în care nu se obține punctajul necesar, trebuie să se prezinte o descriere a defectului.

Punctajul acordat de fiecare evaluator pentru fiecare caracteristică trebuie înregistrat în documentul de control.

Produsul este acceptat sau respins pe baza deciziei majorității evaluatorilor.

Nu trebuie să se înregistreze în mod frecvent cazuri în care diferențele dintre punctajele individuale acordate pentru fiecare caracteristică să fie mai mari de un punct (nu mai frecvent de un caz la 20 de probe). În caz contrar, competența panelului trebuie verificată de conducătorul panelului.

9. Conducătorul panelului, care trebuie să fie angajat al laboratorului acreditat și care poate fi membru al panelului, trebuie să răspundă în general pentru întreaga procedură de evaluare. Acesta trebuie să înregistreze, în documentul de control punctajele, individuale pentru fiecare caracteristică și să confirme dacă produsul este acceptat sau respins.

10. Defectele untului sînt redată în tabelul 2.

Tabelul 2

Defectele untului

| I. Aspect: | |
|-------------------|---------------------------|
| 1. | nelegat (necompact), umed |
| 2. | neuniform, în două culori |
| 3. | cu dungi |
| 4. | pestriț, marmorat |
| 5. | cu aspect granulat |
| 6. | separare a uleiurilor |
| 7. | supracolorat |
| 8. | textură slabă, deschisă |
| 9. | granulat |
| 10. | materii străine |
| 11. | mușegăit |
| 12. | sare nedizolvată |

| II. Consistență: | |
|-----------------------------|--|
| 13. | dezemulsionat, friabil, sfărâmicios |
| 14. | păstos, de consistența aluatului, gras |
| 15. | lipicios |
| 16. | tare |
| 17. | moale |
| III. Miros și aromă: | |
| 18. | fără miros |
| 19. | impur ⁽¹⁾ |
| 20. | arome străine |
| 21. | vechi |
| 22. | brînzos, miros de brînză lactică |
| 23. | acid |
| 24. | spumos |
| 25. | (a) aromă de copt |
| | (b) aromă de ars |
| 26. | miros de mucegai |
| 27. | rînced |
| 28. | uleios, cu gust de pește |
| 29. | cu aspect/gust de seu |
| 30. | (a) miros oxidat |
| | (b) miros metalic |
| 31. | aromă de furaj |
| 32. | aspru, amar |
| 33. | suprasărat |
| 34. | mucegăit, putred |
| 35. | cu aspect de malț |
| 36. | miros de substanțe chimice |

⁽¹⁾ Această desemnare trebuie folosită cât mai rar posibil și numai atunci cînd defectul nu poate fi descris mai exact.

Anexa nr. 4
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

**Determinarea conținutului de trigliceride ale acidului enantic în unt,
ulei de unt și smântână prin analiza cromatografică în fază gazoasă
a trigliceridelor**

1. Prezenta metodă stabilește o metodă pentru determinarea conținutului de trigliceride ale acidului enantic în unt, ulei de unt și smântână.

2. Conținutul de acid enantic reprezintă conținutul de trigliceride ale acidului enantic determinat prin procedura specificată în prezenta anexă.

Conținutul de acid enantic este exprimat în kg/tonă din produs pentru uleiul de unt și unt, iar pentru smântână este exprimat în kg/tonă din grăsimea din lapte.

3. Grăsimea din lapte este extrasă din diferite produse în conformitate cu SM ISO 14156. Determinarea cantitativă a conținutului de trigliceride ale acidului enantic în grăsimea extrasă este realizată prin cromatografie în fază gazoasă în coloană capilară (GC). Rezultatul obținut pentru probă este evaluat prin aplicarea standardului privind trigliceridele acidului caproic.

4. Se folosesc reactivi de calitate analitică recunoscută:

- 1) n-Hexan;
- 2) trigliceride etalon ale acidului caproic, cel puțin 99 % puritate;
- 3) trigliceride etalon ale acidului enantic, cel puțin 99 % puritate;
- 4) sulfat de sodiu, anhidru (Na_2SO_4).

5. Aparatura obișnuită de laborator:

- 1) balanță analitică echilibrată la 1 mg;
- 2) baloane cotate cu capacitate de 10 ml și 20 ml;
- 3) tuburi de centrifugă cu capacitate de 30 ml;
- 4) evaporator rotativ;
- 5) cuptor care să poată fi menținut la o temperatură de $50\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$;
- 6) hârtie de filtru de porozitate medie cu diametrul de aproximativ 15 cm;
- 7) aparatură de cromatografie în fază gazoasă;

a) cromatograf în fază gazoasă dotat cu un injector cu sau fără divizare sau „în coloană” și cu un detector cu ionizare în flacără;

b) coloană de cromatografie în fază gazoasă cu fază staționară care a fost folosită cu succes în operațiunea de separare a trigliceridelor (100 % dimetilpolisiloxan sau 5 % fenil-95 % metilpolisiloxan). Se selectează faza staționară, se ajustează lungimea coloanei (între 4 m și 15 m), diametrul intern (între 0,22 mm și 0,50 mm) și grosimea stratului (0,12 μm sau mai mult), ținând cont de experiența laboratorului și de sistemul de injectare aplicat. În orice caz, coloana selectată produce în același timp o separare completă între vârful

solventului și trigliceridele acidului caproic și o rezoluție a liniei de bază între vîrfurile trigliceridelor acidului caproic și ale acidului enantic;

8) seringă pentru injectare, cu capacitate de 5 μ l.

6. Proba primită în laborator trebuie să fie reprezentativă și care să nu fi fost deteriorată sau modificată în timpul transportului sau pe durata depozitării.

Metoda recomandată de prelevare a probelor este prezentată în SM SR EN ISO 707:2012 Lapte și produse lactate. Ghid pentru eșantionare.

7. Prepararea probei pentru analiză și a cantității analizate se realizează în conformitate cu SM ISO 14156.

1) Ulei de unt, unt

a) Se topește între 50 g și 100 g din proba pentru analiză în cuptor.

b) Se pun între 0,5 g și 1 g de sulfat de sodiu anhidru într-o hîrtie de filtru pliată.

c) Se filtrează grăsimea prin hîrtia de filtru care conține sulfat de sodiu anhidru, colectînd filtratul într-un pahar de laborator care se păstrează în cuptor. În timpul decantării, se acordă multă atenție untului topit în hîrtia de filtru, pentru a nu se transfera serul.

2) Smîntînă

a) Proba analizată se aduce la o temperatură de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

b) Proba se amestecă sau se agită bine.

c) Se diluează o cantitate adecvată din proba analizată pentru a se obține 100 ml de cantitate analizată cu o fracțiune de masă a grăsimii de aproximativ 4 %.

d) Se procedează ca și în cazul laptelui crud și al laptelui omogenizat (SM ISO 14156) pentru a extrage grăsimea din smîntînă.

e) Se cîntărește, cu o precizie de 1 mg, 1 g din grăsimea extrasă, într-un balon cotat de 10 ml. Se adaugă 1 ml din soluția indicată la punctul 8 subpunctul 1). Se completează pînă la 10 ml cu n-hexan și se omogenizează.

f) Se introduce 1 ml din soluția indicată la subpunctul 1 litera b) din prezentul punct, într-un balon cotat de 10 ml și se diluează pînă la 10 ml cu n-hexan.

8. Prepararea etaloanelor de calibrare se efectuează în felul următor:

1) Se dizolvă 100 mg de trigliceride ale acidului enantic în 10 ml de n-hexan.

2) Se dizolvă 100 mg de trigliceride ale acidului caproic în 10 ml de n-hexan.

3) Se introduce 1 ml din soluția indicată la subpunctul 2) din prezentul punct, într-un balon cotat de 10 ml. Se completează pînă la 10 ml cu n-hexan.

4) Se introduce 1 ml din soluția indicată la subpunctul 1) din prezentul punct și 1 ml din soluția indicată la subpunctul 2) din prezentul punct punctul 2, într-un balon cotat de 10 ml. Se completează pînă la 10 ml cu n-hexan.

5) Se introduce 1 ml din soluția indicată la subpunctul 4) din prezentul punct într-un balon cotat de 10 ml și se completează pînă la 10 ml cu n-hexan.

9. Determinarea cromatografică se efectuează în felul următor.

1) Se injectează de două ori 1 μ l din soluția etalon indicată la punctul 8 subpunctul 5).

2) Se injectează 1 μ l din fiecare soluție de probă.

În cazul în care se adoptă sistemul de injectare în coloană, se aplică o diluare mai mare atât soluției etalon, cât și soluției de probă.

3) Operația indicată la subpunctul 1) din prezentul punct se repetă la fiecare 3 probe, în vederea încadrării probelor între injectările etalon martor. Rezultatele se bazează pe media coeficienților de răspuns din cromatogramele etalon.

10. Pentru fiecare cromatogramă, se integrează suprafața vîrfurilor asociate cu trigliceridele acidului enantic și ale acidului caproic.

Se urmează aceste instrucțiuni pentru fiecare ciclu delimitat, respectiv pentru un set de probe delimitate, etalonul injectat de două ori imediat după acestea este STD₁, iar etalonul injectat de două ori imediat după acestea este STD₂.

1) Calibrare

a) Se calculează coeficientul de răspuns pentru fiecare duplicat al STD₁, Rf₁(a) și Rf₁(b), unde:

Rf₁ (a) sau (b) = (Suprafața vîrfului pentru trigliceridele acidului caproic/Suprafața vîrfului pentru trigliceridele acidului enantic) \times 100.

Se calculează media coeficientului de răspuns, Rf₁, unde:

$$Rf_1 = [Rf_1(a) + Rf_1(b)] / 2$$

b) În mod similar, se calculează media coeficientului de răspuns STD₂, Rf₂.

c) Se calculează media coeficientului de răspuns, Rf:

$$Rf = (Rf_1 + Rf_2) / 2.$$

2) Probele analizate

Pentru fiecare cromatogramă a probei obținută între STD₁ și STD₂, se calculează conținutul de acid enantic, C (kg/ton):

$C = (\text{Suprafața vîrfului pentru trigliceridele acidului enantic} \times Rf \times 100) / (\text{Suprafața vîrfului pentru trigliceridele acidului caproic} \times Wt \times 1\,000)$,

unde:

Wt = greutatea grăsimii prelevate (g);

100 = volumul de diluare pentru probă;

1 000 = coeficientul de transformare (pentru μ g/g în kg/t).

Pentru probele de unt, se ține cont de conținutul de grăsime al untului și se calculează o valoare a concentrației corectată, C_{unt} (kg/t de unt):

$$C_{unt} = C_{grăsime} \times F,$$

unde F este conținutul de grăsime al untului.

11. Valorile pentru limita de repetabilitate și reproductibilitate sînt exprimate pentru nivelul de probabilitate de 95 %, fiind posibil ca acestea să nu fie aplicabile în cazul altor intervale și matrice de concentrație decît cele prezentate.

1) Repetabilitate

Diferențele absolute dintre două rezultate individuale ale unui singur test, obținute prin aceeași metodă aplicată asupra unor materiale de testare identice, în același laborator, de către același operator, utilizându-se același echipament, la un interval scurt de timp nu vor fi mai mari de 0,35 kg/t, în nu mai mult de 5 % din cazuri.

2) Reproductibilitate

Diferențele absolute dintre două rezultate individuale ale unui singur test, obținute prin aceeași metodă aplicată asupra unor materiale de testare identice, în laboratoare diferite, de către operatori diferiți, utilizându-se echipamente diferite nu vor fi mai mari de 0,66 kg/t, în nu mai mult de 5 % din cazuri.

12. Limitele de toleranță: limite inferioare (în cazul cantităților insuficiente)

1) Pentru a verifica marcarea corectă a produsului, trebuie prelevate trei probe din produsul studiat.

2) Unt și unt concentrat

a) Rata de încorporare este de 11 kg din trigliceridele acidului enantic cu o puritate de cel puțin 95 %, respectiv 10,45 kg/t.

b) Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se utilizează la verificarea ratei și a omogenității de încorporare a marcatorilor, iar cel mai slab rezultat se compară cu următoarele limite:

- 9,51 kg/t (rată de încorporare minimă de 95 % pentru trigliceridele acidului enantic cu o puritate de 95 %, determinare separată);

- 6,89 kg/t (rată de încorporare minimă de 70 % pentru trigliceridele acidului enantic cu o puritate de 95 %, determinare separată);

- concentrația marcatorului din proba cu rezultatul cel mai slab este utilizată prin interpolare, respectiv între 9,51 kg/t și 6,89 kg/t.

3) Smântână

a) Rata de încorporare este de 10 kg de trigliceride ale acidului enantic, cu o puritate de cel puțin 95 %, pe tona de grăsimi din lapte, respectiv 9,5 kg/t grăsimi din lapte marcate.

b) Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se folosesc pentru verificarea ratei omogenității de încorporare a marcatorilor, iar cel mai slab rezultat se compară cu următoarele limite:

- 8,60 kg/t (rată de încorporare minimă de 95 % pentru trigliceridele acidului enantic cu o puritate de 95 %, determinare separată);

- 6,23 kg/t (rată de încorporare minimă de 70 % pentru trigliceridele acidului enantic cu o puritate de 95 %, determinare separată);

- concentrația marcatorului din proba cu rezultatul cel mai slab este utilizată prin interpolare, respectiv între 8,60 kg/t și 6,23 kg/t.

13. Limitele de toleranță: limitele superioare (în cazul depășirii cantității cu peste 20 %)

1) Pentru a verifica marcarea corectă a produsului, trebuie prelevate trei probe din produsul studiat.

2) Unt și unt concentrat

Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se folosesc pentru verificarea ratei și omogenității de încorporare a marcatrilor, iar media acestor rezultate se compară cu limita superioară de 12,96 kg/t.

3) Smântână

Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se folosesc pentru verificarea ratei și omogenității de încorporare a marcatrilor, iar media acestor rezultate se compară cu limita superioară de 11,82 kg/t.

Anexa nr. 5

la Metodologia de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate

Determinarea conținutului de vanilină în untul concentrat, unt și smântână prin cromatografie lichidă de înaltă performanță

1. Metoda implică o procedură de determinare cantitativă a vanilinei din untul concentrat, unt și smântână.

2. Extragerea unei cantități cunoscute de probă cu ajutorul unui amestec de izopropanol/etanol/acetonitril (1:1:2). Precipitarea majorității grăsimii prin răcire între $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ și $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, urmată de centrifugare și decantare.

Soluția decantată este diluată cu apă și filtrată. Filtratul este gata pentru determinarea conținutului de vanilină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC).

3. Aparatură de laborator:

1) Refrigerator cu funcționare în intervalul de temperatură $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

2) Seringi de unică folosință cu capacitate de 2 ml

3) Membrană filtrantă cu pori de $0,45\text{ }\mu\text{m}$, rezistentă la o soluție conținând 5 % soluție de extragere

4) Sistem de cromatografie lichidă conținând o pompă (cu debit de $1,0\text{ ml/min}$), un injector (injectare automată sau manuală a $20\text{ }\mu\text{l}$), un detector UV (acționat la 306 nm , $0,01\text{ \AA}$ scală completă), un înregistrator sau integrator și o coloană termostată care funcționează la $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

5) Coloană analitică (aproximativ $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$ diametru interior) umplută cu LiChrospher RP 18 (Merck, $5\text{ }\mu\text{m}$) sau o coloană echivalentă

6) Coloană de control (aproximativ $20\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ diametru interior) umplută cu LiChrospher RP 18 ($5\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$) sau o coloană echivalentă

7) Centrifugă care operează la $2\text{ }000\text{ rpm}$.

4. Reactivii utilizați trebuie să fie de calitate analitică recunoscută.

1) Izopropanol

2) Etanol 96 % (v/v)

3) Acetonitril

4) Soluție de extragere

Se amestecă izopropanol, etanol și acetonitril în proporție de 1:1:2 (v/v).

5) Vanilină (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehidă) $\geq 98\text{ }%$

a) Soluție „stock” de vanilină (= $500\text{ }\mu\text{g/ml}$)

Se cântăresc, cu o precizie de $0,1\text{ mg}$, aproximativ 50 mg (CM mg) de vanilină într-un balon cotat de 100 ml , se adaugă 25 ml de soluție de extragere și se completează cu apă.

b) Soluție etalon de vanilină (= $10\text{ }\mu\text{g/ml}$)

Se pipetează 5 ml de soluție „stock” de vanilină într-un balon cotat de 250 ml și se completează cu apă.

- c) Metanol, calitate HPLC
- d) Acid acetic, glacial
- e) Apă, calitate HPLC
- f) Faza mobilă HPLC

Se amestecă 300 ml de metanol cu aproximativ 500 ml apă și 20 ml de acid acetic într-un balon cotat de 1 000 ml și se completează cu apă. Se filtrează printr-un filtru de 0,45 μm.

5. Procedura de determinare cantitativă a vanilinei din untul concentrat, unt și smântână are loc în felul următor:

1) Prepararea probei pentru analiză

a) Unt

Se încălzește proba pînă cînd începe să se topească. Se evită supraîncălzirea unor porțiuni din probă la peste 30 °C. În orice caz, există posibilitatea ca untul să nu se separe în două faze. Cînd proba devine suficient de maleabilă, se omogenizează prin scuturare. Untul se amestecă timp de 15 s înainte de prelevarea unei probe. Se cîntăresc, cu o precizie de 1 mg, aproximativ 5 g (SM g) de unt într-un balon cotat de 100 ml.

b) Unt concentrat

Imediat după prelevarea probei, recipientul conținînd un concentrat se introduce în cuptor la 40-50 °C pînă cînd se topește complet. Proba se amestecă prin turbionare sau agitare, evitîndu-se formarea de bule de aer din cauza amestecării prea puternice. Se cîntăresc, cu o precizie de 1 mg, aproximativ 4 g (SM g) de unt concentrat într-un balon cotat de 100 ml.

c) Smîntînă

Proba se încălzește în baie de apă sau într-un incubator la o temperatură de 35-40 °C. Grăsimea se distribuie omogen prin turbionare și, după caz, prin amestecare. Proba se răcește rapid la 20 ± 2 °C. Proba trebuie să aibă un aspect omogen; în caz contrar, procedura trebuie repetată. Se cîntăresc, cu o precizie de 1 mg, aproximativ 10 g (SM g) de smîntînă într-un balon cotat de 100 ml.

2) Prepararea soluției de analiză

Se adaugă aproximativ 75 ml de soluție de extragere la proba prelevată (punctul 5 subpunctul 1 litera a), b) sau c)), se agită sau se scutură cu putere timp de aproximativ 15 minute și se completează cu soluție de extragere. Se transferă aproximativ 10 ml din acest extract într-o eprubetă prevăzută cu dop. Eprubeta se introduce în refrigerator timp de aproximativ 30 minute. Extractul rece se centrifughează timp de 5 minute la aproximativ 2 000 rpm și se decantează imediat. Soluția decantată se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se pipetează 5 ml din soluția decantată într-un balon cotat de 100 ml și se completează cu apă. Se filtrează o parte alicotă printr-o membrană microfiltrantă cu ajutorul unei seringi. Filtratul este gata pentru determinarea HPLC.

3) Calibrare

Se pipetează 5 ml de soluție etalon de vanilină într-un balon cotat de 100 ml. Se adaugă 5 ml de soluție de extragere și se completează cu apă pînă la marcaj. Această soluție conține 0,5 μg/ml de vanilină.

4) Determinarea prin HPLC

Se lasă sistemul cromatografic să se stabilizeze timp de aproximativ 30 minute. Se injectează soluția etalon (subpunctul 3) din prezentul punct). Procedura se repetă pînă cînd diferența dintre suprafețele vîrfurilor sau dintre înălțimile vîrfurilor a două injectări succesive este sub 2 %. În condițiile descrise, timpul de retenție al vanilinei este de aproximativ 9 minute. Soluția etalon (subpunctul 3) din prezentul punct) se analizează în duplicat prin injectarea a 20 μl. Se injectează 20 μl din soluția de analiză (subpunctul 2) din prezentul punct). Se determină suprafața sau înălțimea vîrfului obținut pentru vanilină. Se repetă injectarea soluției etalon (subpunctul 3) din prezentul punct) în duplicat, după 10 injectări ale probelor analizate (subpunctul 2) din prezentul punct).

6. Se calculează suprafața (sau înălțimea) medie a vîrfurilor (AC) pentru vîrfurile vanilinei asociate injectării duplicatelor la începutul și la sfîrșitul fiecărui lot de soluție de analiză (în total patru suprafețe sau înălțimi).

Se calculează coeficientul de răspuns (R):

$$R=AC/CM$$

unde:

CM este masa vanilinei în mg.

Conținutul (mg/kg) de vanilină (C) din probă se calculează cu ajutorul formulei:

$$C=[(AS \times 20 \times 0,96)/(SM \times R)],$$

unde:

AS – suprafața vîrfului sau înălțimea pentru vîrfurile vanilinei din proba pentru analiză;

SM – masa probei pentru analiză exprimată în g (punctul 5 subpunctul 1 literele a), b) sau c));

La analiza vanilinei din smîntînă, concentrația marcatorului se exprimă ca mg marcator/kg grăsime din lapte. Pentru aceasta se înmulțește C cu 100/f.;

f este conținutul de grăsime al smîntînii în procente (m/m);

20 – coeficientul de diluare a probei etalon și a probei pentru analiză;

0,96 – factorul de corecție pentru conținutul de grăsime la prima diluare a probei pentru analiză.

În locul suprafeței vîrfului se poate folosi înălțimea vîrfului (a se vedea punctul 8 subpunctul 3 din prezenta anexă).

7. Precizia metodei rezultă din valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate:

1) Repetabilitate, (r)

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în cel mai scurt interval de timp posibil de un operator care utilizează aceeași aparatură pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 16 mg/kg.

2) Reproductibilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate de operatori din laboratoare diferite care utilizează aparatură diferită pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 27 mg/kg.

8. Trebuie să se preleveze trei probe din produsul urmărit pentru a se verifica omogenitatea

1) Marcator obținut fie din vanilie, fie din vanilină sintetică:

a) Rata de încorporare pentru 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehidă este de 250 g pe tonă de unt concentrat sau de unt. Pentru smântâna marcată, rata de încorporare este de 250 g pe tonă de grăsime din lapte.

b) Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se utilizează la verificarea ratei și a omogenității de încorporare a marcatorilor, iar cel mai slab rezultat se compară cu următoarele limite:

- 220,8 mg/kg (95 % din rata minimă de încorporare);
- 158,3 mg/kg (70 % din rata minimă de încorporare).

Concentrația marcatorului din proba cu rezultatul cel mai slab este utilizată prin interpolare între 220,8 mg/kg și 158,3 mg/kg.

2) Marcator obținut numai din păstăi de vanilie sau extracte integrale ale acestora:

a) Rata de încorporare pentru 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehidă este de 100 g pe tonă de unt concentrat sau de unt. Pentru smântâna marcată, rata de încorporare este de 100 g pe tonă de grăsime din lapte.

b) Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se folosesc pentru verificarea ratei și a omogenității de încorporare a marcatorilor, iar cel mai slab rezultat se compară cu următoarele limite:

- 78,3 mg/kg (95 % din rata minimă de încorporare);
- 53,3 mg/kg (70 % din rata minimă de încorporare).

Concentrația marcatorului din proba cu rezultatul cel mai slab este utilizată prin interpolare între 78,3 mg/kg și 53,3 mg/kg.

9. Recuperarea vanilinei adăugate la un nivel de 250 mg/kg ulei de unt variază de la 97,0 la 103,8. Conținutul mediu identificat a fost de 99,9 %, cu o deviație standard de 2,7 %.

Soluția etalon conține 5 % soluție de extragere pentru a compensa creșterea suprafeței vârfului provocată de prezența a 5 % soluție de extragere în probă. Astfel, se poate opera o clasificare în funcție de înălțimea vârfului.

Analiza se bazează pe o curbă liniară de etalonare, cu intersecție cu punctul zero.

Folosindu-se soluții diluate adecvate de soluție etalon, se verifică liniaritatea în momentul realizării primei analize, iar apoi la intervale regulate și după modificări sau reparații la echipamentul HPLC. Vanilina poate fi degradată în acid vanilic, divanilină și alți compuși prin acțiunea enzimelor intrinseci în smântâna nepasteurizată sau produsele obținute din aceasta.

Anexa nr. 6
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

**Detectarea prin spectrometrie a etil esterului acidului
beta-apo-8'-carotenic în untul concentrat și în unt**

1. Această metodă descrie o procedură de determinare cantitativă a etil esterului acidului beta-apo-8'-carotenic (ester apocarotenic) în untul concentrat și în unt. Esterul apocarotenic este suma tuturor substanțelor prezente într-un extract din probe prelevate în condițiile prevăzute pentru această metodă, care absorb lumină la 440 nm.

2. Grăsimea din unt se dizolvă în eter de petrol și se măsoară absorbanta la 440 nm. Conținutul de ester apocarotenic se determină prin raportare la un standard extern.

3. Aparatură de laborator:

- 1) Pipete gradate, cu capacitate de 0,25, 0,50, 0,75 și 1,0 ml
- 2) Spectrofotometru – adecvat utilizării la 440 nm (și la 447-449 nm) și prevăzut cu celule cu drum optic de 1 cm
- 3) Baloane cotate, de 20 ml și de 100 ml
- 4) Balanță analitică cu sensibilitate de 0,1 mg, cu o capacitate de cântărire având o precizie de 1 mg, cu o capacitate de citire de 0,1 mg
- 5) Cuptor, 45 °C ± 1 °C
- 6) Filtre fără cenușă cu filtrare rapidă

4. Toți reactivii utilizați trebuie să fie de calitate analitică recunoscută.

1) Suspensie de acid apocarotenic (aproximativ 20 %)

a) Conținutul suspensiei se determină astfel:

Suspensia se încălzește între 45 °C și 50 °C și se omogenizează în recipientul original închis. Se cântăresc aproximativ 400 mg într-un balon cotate (100 ml), se dizolvă în 20 ml cloroform și se completează volumul cu ciclohexan. Se diluează 5,0 ml din această soluție cu 100 ml de ciclohexan (soluția A). Se diluează 5,0 ml de soluție A cu ciclohexan până la 100 ml. Se măsoară absorbanta la 447-449 nm (se măsoară valoarea maximă față de o probă de ciclohexan ca probă martor, folosindu-se celule cu drum optic de 1 cm).

Conținutul de ester apocarotenic P (%) = $(Abs_{max} \times 40\,000) / (M_{susp} \times 2\,550)$ sau se dezvoltă: $(Abs_{max} / 2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$:

Abs_{max} = absorbanta soluției de măsurare la maximum;

M_{susp} = masa suspensiei (g);

2 550 = valoarea de referință Abs (1 %, 1 cm);

P = puritatea (conținutul) suspensiei (%).

Suspensia de ester apocarotenic este sensibilă la aer, căldură și lumină. Se poate păstra la loc rece timp de aproximativ 12 luni, în recipientul original închis

(sigilat sub azot). După deschiderea recipientului, conținutul trebuie utilizat cât de repede posibil.

b) Soluția etalon de ester apocarotenic, aproximativ 0,2 mg/ml.

Se cântăresc, cu o precizie de 1 mg, aproximativ 0,100 g de suspensie de ester apocarotenic (W), se dizolvă în ligroină, se transferă cantitativ într-un balon cotat cu capacitate de 100 ml și se completează pînă la marcaj cu ligroină.

Această soluție conține $(W \times P)/10$ mg/ml de ester apocarotenic.

Soluția trebuie păstrată la rece și la adăpost de lumină. Soluția nefolosită se aruncă după o lună.

2) Ligroină (40-60 °C)

3) Sulfat de sodiu anhidru, granulat, deshidratat în prealabil la 102 °C timp de 2 ore

4) Cloroform

5) Ciclohexan

5. Procedura de determinare cantitativă a etil esterului acidului beta-apo-8'-carotenic (ester apo-carotenic) în untul concentrat și în unt are loc în felul următor:

1) Prepararea probei pentru analiză

a) Unt concentrat

Proba se topește în cuptor la aproximativ 45 °C

b) Unt

Proba se topește în cuptor la aproximativ 45 °C și se filtrează o parte reprezentativă printr-un filtru care conține aproximativ 10 g de sulfat de sodiu anhidru într-un mediu protejat de lumina naturală sau artificială puternică și se păstrează la 45 °C. Se colectează o cantitate adecvată de grăsime din unt.

2) Determinare

Se cântărește, cu o precizie de 1 mg, aproximativ 1 g de unt concentrat [sau grăsime extrasă din unt (subpunctul 1 litera b) din prezentul punct), (M). Se transferă cantitativ într-un balon cotat de 20 ml (V), folosindu-se ligroină, se completează pînă la marcaj și se amestecă bine.

Se transferă o parte alicotă într-o celulă de 1 cm și se măsoară absorbanta la 440 nm, față de o probă martor de ligroină. Concentrația de ester apocarotenic în soluție se determină conform curbei de etalonare ($C \mu\text{g/ml}$).

3) Calibrare

Se pipetează 0, 0,25, 0,5, 0,75 și 1,0 ml de soluție etalon de ester apocarotenic în cinci baloane cotate de 100 ml. Se diluează la volum cu ligroină și se amestecă.

Concentrațiile aproximative ale soluției variază între 0 și 2 $\mu\text{g/ml}$ și se calculează cu precizie prin referire la concentrația soluției etalon de ester apocarotenic $(W \times P)/10$ mg/ml. Se măsoară absorbanta la 440 nm față de o probă martor de ligroină.

Valorile absorbantei se reprezintă pe axa y, iar pe axa x se reprezintă concentrația esterului apocarotenic. Se calculează ecuația curbei de etalonare.

6. Conținutul de ester apocarotenic, exprimat în mg/kg de produs, se calculează după cum urmează:

Unt concentrat: $(C \times V)/M$

Unt: $0,82 (C \times V)M$,

unde:

C – conținutul de ester apocarotenic, în $\mu\text{g/ml}$, citit de pe curba de etalonare (punctul 5 subpunctul 3);

V – volumul (ml) soluției de analiză (punctul 5 subpunctul 2);

M – masa (g) cantității analizate (punctul 5 subpunctul 2);

0,82 – factorul de corecție pentru conținutul de grăsime al untului.

7. Precizia metodei rezultă din valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate:

1) Repetabilitate

a) Analiza untului

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în cel mai scurt interval de timp posibil de un operator care utilizează aceeași aparatură pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 1,4 mg/kg.

b) Analiza untului concentrat

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în cel mai scurt interval de timp posibil de un operator care utilizează aceeași aparatură pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 1,6 mg/kg.

2) Reproductibilitate

a) Analiza untului

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate de operatori din laboratoare diferite care utilizează aparatură diferită pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 4,7 mg/kg.

b) Analiza untului concentrat

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate de operatori din laboratoare diferite care utilizează aparatură diferită pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 5,3 mg/kg.

8. Pentru a verifica marcarea corectă a produsului, trebuie prelevate trei probe din produsul studiat.

1) Unt

a) Rata de încorporare pentru unt, având în vedere absorbanta de fond, este de 22 mg/kg

b) Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se utilizează la verificarea ratei și a omogenității de încorporare a marcatorilor, iar cel mai slab rezultat se compară cu următoarele limite:

- 17,7 mg/kg (95 % din rata minimă de încorporare);

- 12,2 mg/kg (70 % din rata minimă de încorporare).

Concentrația marcatorului din proba cu rezultatul cel mai slab este utilizată prin interpolare între 17,7 mg/kg și 12,2 mg/kg.

2) Unt concentrat

a) Rata de încorporare pentru untul concentrat, având în vedere absorbanta de fond, este de 24 mg/kg.

b) Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se utilizează la verificarea ratei și a omogenității de încorporare a marcatorilor, iar cel mai slab rezultat se compară cu următoarele limite:

- 19,2 mg/kg (95 % din rata minimă de încorporare);
- 13,2 mg/kg (70 % din rata minimă de încorporare).

Concentrația marcatorului din proba cu rezultatul cel mai slab este utilizată prin interpolare între 19,2 mg/kg și 13,2 mg/kg.

Anexa nr. 7
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

**Determinarea sitosterolului sau a stigmasterolului în unt și în untul
concentrat prin cromatografia în fază gazoasă cu coloană capilară**

1. Metoda implică o procedură care permite determinarea cantitativă a sitosterolului și a stigmasterolului din unt și din untul concentrat. Conținutul de sitosterol reprezintă suma cantităților de β -sitosterol și de 22-dihidro- β -sitosterol, ceilalți sitosteroli fiind considerați nesemnificativi.

2. Untul sau untul concentrat este saponificat cu hidroxid de potasiu într-o soluție de etanol, iar substanțele nesaponificabile sînt extrase cu ajutorul dietil eterului.

Sterolii se transformă în trimetil-silil-eteri și sînt analizați prin cromatografie în fază de gaz cu coloană capilară prin raportare la un etalon intern/betulina.

3. Aparatură de laborator:

1) Balon de saponificare de 150 ml, dotat cu un refrigerator cu reflux cu capete rodate

2) Conducte de decantare de 500 ml

3) Baloane de 250 ml

4) Conducte de egalizare a presiunii, de 250 ml sau cu o capacitate similară, pentru a colecta dietil eterul residual

5) Coloană de sticlă de 350 mm \times 20 mm, prevăzută cu un racord cu frită

6) Baie de apă sau izotermă

7) Eprubete de reacție de 2 ml

8) Cromatograf cu gaz care poate fi utilizat cu coloană capilară, prevăzut cu un dispozitiv de scindare format din următoarele:

a) etuvă cu termostat pentru coloane, care poate menține temperatura dorită cu o precizie de ± 1 °C;

b) injector termoreglabil;

c) detector cu ionizare în flacără și convertor-amplificator;

d) integrator-înregistrator care poate fi utilizat împreună cu convertorul-amplificator.

9) Coloană capilară din sticlă de siliciu acoperită în întregime de BP1 sau de o substanță echivalentă (sau orice altă coloană cu rezoluție cel puțin egală) în strat uniform cu grosimea de 0,25 μ m; coloana trebuie să poată reduce derivații trimetil-silil ai lanosterolului și ai sitosterolului. Este recomandabil să se utilizeze o coloană cu lungimea de 12 m și diametrul intern de 0,2 mm.

10) Microseringă cu ac din oțel inoxidabil de 1 μ l pentru cromatografie cu gaz.

4. Toți reactivii utilizați trebuie să fie de calitate analitică recunoscută. Apa utilizată trebuie să fie apă distilată sau apă de o puritate cel puțin echivalentă.

1) Etanol, cu o puritate de cel puțin 95 %

2) Hidroxid de potasiu, soluție 60 %, prin dizolvarea a 600 g de hidroxid de potasiu (minimum 85 %) în apă, la care se adaugă apă pînă la 1 l

3) Betulină cu o puritate de cel puțin 99 %

a) Soluții de betulină în eter dietilic

Concentrația soluției de betulină utilizată pentru determinarea sitosterolului trebuie să fie de 1,0 mg/ml.

Concentrația soluției de betulină utilizată pentru determinarea stigmasterolului trebuie să fie de 0,4 mg/ml.

4) Eter dietilic de puritate analitică (fără peroxizi sau reziduuri).

5) Sulfat de sodiu anhidru, granulat, deshidratat în prealabil la 102 °C timp de 2 ore.

6) Reactiv de sililare (TRI-SIL) sau un reactiv echivalent (Important: TRI-SIL este inflamabil și toxic, coroziv și are un posibil potențial cancerigen. Personalul de laborator trebuie să cunoască normele de siguranță aplicabile în cazul utilizării TRI-SIL și trebuie să ia toate măsurile de precauție care se impun).

7) Lanosterol.

8) Sitosterol, cu puritate cunoscută, mai mare sau egală cu 90 % (P).

Soluția etalon de sitosterol: se prepară o soluție cu o precizie de 0,001 mg/ml, conținând aproximativ 0,5 mg/ml (W_1) de sitosterol în eter dietilic.

9) Stigmasterol, cu puritate cunoscută, mai mare sau egală cu 90 % (P).

Soluție etalon de stigmasterol: se prepară o soluție cu o precizie de 0,001 mg/ml, conținând aproximativ 0,2 mg/ml (W_1) de stigmasterol în eter dietilic.

10) Amestec pentru testul de rezoluție.

Se prepară o soluție conținând 0,05 mg/ml de lanosterol și 0,5 mg/ml de sitosterol în eter dietilic.

5. Prepararea soluțiilor etalon pentru cromatografie se efectuează în felul următor:

Se adaugă soluția etalon intern la soluția etalon de sterol adecvată și, simultan, la proba saponificată (punctul 6 subpunctul 2).

1) Soluția cromatografică etalon de sitosterol: se transferă 1 ml de soluție etalon de sitosterol în fiecare dintre cele două eprubete de reacție și se elimină dietil eterul sub flux de azot. Se adaugă 1 ml de soluție etalon intern și se elimină dietil eterul sub flux de azot

2) Soluția cromatografică etalon de stigmasterol: se transferă 1 ml de soluție etalon de stigmasterol în fiecare dintre cele două eprubete de reacție și se elimină dietil eterul sub flux de azot. Se adaugă 1 ml de soluție etalon intern și se elimină dietil eterul sub flux de azot.

6. Prepararea substanțelor nesaponificabile se efectuează în felul următor:

1) Se topește proba de unt la o temperatură de maximum 35 °C; se amestecă cu grijă.

Se cântărește, cu o precizie de 1 mg, aproximativ 1 g de unt (W_2) sau de unt concentrat (W_2) într-un balon de 150 ml. Se adaugă 50 ml de etanol și 10 ml de soluție de hidroxid de potasiu. Se adaptează refrigeratorul cu reflux și se aduce la aproximativ 75 °C timp de 30 de minute. Se deconectează refrigeratorul și se lasă balonul să se răcească la temperatura camerei.

2) Se adaugă 1,0 ml de soluție etalon intern în balon în cazul în care se determină sitosterolul sau în cazul în care se determină stigmasterolul. Se amestecă bine. Se transferă cantitativ conținutul balonului într-o conductă de decantare de 500 ml, se spală balonul cu 50 ml de apă, apoi cu 250 ml de eter dietilic. Se agită puternic conducta de decantare timp de 2 minute și se lasă fazele să se separe. Se elimină faza apoasă inferioară și se spală faza eterică agitându-se 4 părți alicote succesive de 100 ml apă.

Pentru a evita formarea unei emulsii, este neapărat necesar ca primele două spălări cu apă să se efectueze ușor (10 rotații). Pentru a treia spălare, se poate agita mai puternic timp de 30 de secunde. În cazul în care se formează o emulsie, aceasta poate fi eliminată prin adăugarea a 5 până la 10 ml de etanol. În cazul în care se adaugă etanol, este absolut necesar să se efectueze încă două spălări puternice cu apă.

3) Se trece faza eterică limpede și desaponificată pe o coloană de sticlă care conține 30 g de sulfat de sodiu anhidru. Se colectează eterul într-un balon de 250 ml. Se adaugă bile antiproiecție și se evaporă până la uscare aproape completă într-o baie de apă sau într-o izotermă, colectându-se solvenții care trebuie eliminați.

În cazul în care anumite părți din probă se evaporă în uscat la o temperatură prea ridicată, este posibil să se piardă cantități de sterol.

7. Prepararea trimetil-silil-eterilor se efectuează în felul următor:

1) Se transferă soluția de eter rămasă în balon într-o eprubetă de reacție de 2 ml cu ajutorul a 2 ml de dietil eter și se elimină eterul sub flux de azot. Se spală balonul cu două părți alicote suplimentare de 2 ml de eter dietilic, transferându-se conținutul în eprubetă și eliminându-se eterul de fiecare dată sub flux de azot.

2) Se sililează proba prin adăugarea a 1 ml de TRI-SIL. Se astupă eprubeta și se agită puternic pentru a produce dizolvarea. În cazul în care proba nu s-a dizolvat complet, se aduce la temperatura de 65-70 °C. Se lasă să stea cel puțin 5 minute înainte de a se injecta în cromatograful cu gaz. Se sililează etaloanele în același mod ca și probele. Se sililează amestecul pentru testul de rezoluție în același mod ca și probele.

Sililarea trebuie efectuată într-un mediu anhidru. Sililarea incompletă a betulinei se recunoaște prin obținerea unui al doilea vîrf apropiat de cel al betulinei.

Prezența etanolului în timpul sililării va interfera cu procesul de sililare. Acest fapt poate fi consecința unei spălări insuficiente în momentul extragerii. În

cazul în care această problemă persistă, în etapa de extragere se va include o a cincea spălare, cu agitare puternică timp de 30 de secunde.

8. Pentru analiza prin cromatografie cu gaz se instalează cromatograful cu gaz conform instrucțiunilor producătorului.

Condițiile pentru procedură sînt:

- 1) temperatura coloanei: 265 °C;
- 2) temperatura injectorului: 265 °C;
- 3) temperatura detectorului: 300 °C;
- 4) debitul gazului vector: 0,6 ml/min;
- 5) presiunea hidrogenului: 84 kPa;
- 6) presiunea aerului: 155 kPa;

7) fracționarea probei: de la 10:1 la 50:1; raportul de fracționare trebuie optimizat în funcție de instrucțiunile producătorului și de liniaritatea răspunsului detectorului și validat ulterior în funcție de intervalele de concentrații luate în considerare.

Camera de vaporizare trebuie curățată după fiecare utilizare sau săptămînal, în cazul în care nu a fost folosită;

8) cantitatea de substanță injectată: 1 μl de soluție TMSE.

Se lasă sistemul să se echilibreze și se obține un răspuns stabil înainte de a se efectua vreo analiză.

Aceste condiții pot fi modificate în funcție de caracteristicile coloanei și ale cromatografului cu gaz, pentru a se obține cromatograme care să îndeplinească condițiile următoare:

a) vîrfurile sitosterolului trebuie să prezinte o rezoluție suficientă față de lanosterol

b) timpii relativi de retenție ai sterolilor de mai jos trebuie să fie de aproximativ:

- colesterol: 1,0;
- stigmasterol: 1,3;
- sitosterol: 1,5;
- betulină: 2,5;

c) timpul de retenție al betulinei trebuie să fie de aproximativ 24 de minute.

9. Injectarea soluției de probă se efectuează în felul următor:

Se injectează 1 μl de soluție etalon sililată (stigmasterol sau sitosterol) și se ajustează parametrii de calibrare ai integratorului.

Se injectează din nou 1 μl de soluție etalon sililată pentru a se determina coeficientul de răspuns față de betulină.

Se injectează 1 μl de soluție de probă sililată și se măsoară suprafața vîrfurilor. Fiecare serie de probe trebuie precedată și urmată de o injectare de soluție etalon.

În general, injectarea soluției de probă se poate efectua după o serie de șase probe.

Integrarea vârfului sitosterolului trebuie să înglobeze suprafața vârfului 22- dihidro-β-sitosterolului (stigmastanol) care apare imediat după sitosterol în momentul evaluării sitosterolului total.

10. Calcularea rezultatelor se efectuează în felul următor:

Se determină suprafața vîrfurilor sterolului și a vîrfurilor betulinei în cele două etaloane, la începutul și la finalul fiecărei serii, și se calculează R_1 :

R_1 – (suprafața medie a vîrfului sterolului în etalon)/(suprafața medie a vîrfului betulinei în etalon)

Se determină suprafața vîrfului de sterol (stigmasterol sau sitosterol) și a vîrfului betulinei în probă și se calculează R_2 :

R_2 – (suprafața vîrfului sterolului în probă)/(suprafața vîrfului betulinei în probă)

W_1 – conținutul de sterol al etalonului (mg) din 1 ml de soluție etalon;

W_2 – masa probei (g);

P – puritatea sterolului etalon.

Conținutul de sterol din probă (mg/kg) = $[(R_2) / (R_1)] \times [(W_1) / (W_2)] \times P \times 10$.

11. Precizia metodei rezultă din valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate:

1) Unt

a) Repetabilitate

Stigmasterol

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în cel mai scurt interval de timp posibil de un operator care utilizează aceeași aparatură pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 19,3 mg/kg.

Sitosterol

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în cel mai scurt interval de timp posibil de un operator care utilizează aceeași aparatură pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 23,0 mg/kg.

b) Reproductibilitate

Stigmasterol

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate de operatori din laboratoare diferite care utilizează aparatură diferită pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 31,9 mg/kg.

Sitosterol

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate de operatori din laboratoare diferite care utilizează aparatură diferită pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 8,7 % din valoarea medie a acestor determinări.

2) Unt concentrat

a) Repetabilitate

Stigmasterol

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în cel mai scurt interval de timp posibil de un operator care utilizează aceeași aparatură pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 10,2 mg/kg.

Sitosterol

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate în cel mai scurt interval de timp posibil de un operator care utilizează aceeași aparatură pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 3,6 % din valoarea medie a acestor determinări.

b) Reproductibilitate

Stigmasterol

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate de operatori din laboratoare diferite care utilizează aparatură diferită pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 25,3 mg/kg.

Sitosterol

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate de operatori din laboratoare diferite care utilizează aparatură diferită pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 8,9 % din valoarea medie a acestor determinări.

12. Pentru a verifica marcarea corectă a produsului, trebuie prelevate trei probe din produsul studiat.

1) Unt

a) Stigmasterol

Rata de încorporare pentru stigmasterol este de 150 g de stigmasterol, cu o puritate de cel puțin 95 %, pe o tonă de unt, respectiv 142,5 mg/kg, sau de 170 g de stigmasterol, cu o puritate de cel puțin 85 %, pe o tonă de unt, respectiv 144,5 mg/kg.

Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se utilizează la verificarea ratei și a omogenității de încorporare a marcatorilor, iar cel mai slab rezultat se compară cu următoarele limite:

- 115,8 mg/kg (rată de încorporare minimă de 95 % pentru stigmasterol cu o puritate de 95 %);
- 117,7 mg/kg (rată de încorporare minimă de 95 % pentru stigmasterol cu o puritate de 85 %);
- 80,1 mg/kg (rată de încorporare minimă de 70 % pentru stigmasterol cu o puritate de 95 %);
- 81,5 mg/kg (rată de încorporare minimă de 70 % pentru stigmasterol cu o puritate de 85 %).

Concentrația marcatorului din proba cu rezultatul cel mai slab este utilizată prin interpolare între 115,8 mg/kg și 80,1 mg/kg sau între 117,7 mg/kg și 81,5 mg/kg.

b) Sitosterol

Rata de încorporare pentru sitosterol este de 600 g de sitosterol, cu o puritate de cel puțin 90 %, pe o tonă de unt, respectiv 540 mg/kg.

Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se folosesc pentru verificarea ratei și omogenității de încorporare a marcatorilor, iar cel mai slab rezultat se compară cu următoarele limite:

- 482,6 mg/kg (rată de încorporare minimă de 95 % pentru sitosterol cu o puritate de 90 %);

- 347,6 mg/kg (rată de încorporare minimă de 70 % pentru sitosterol cu o puritate de 90 %).

Concentrația marcatorului din proba cu rezultatul cel mai slab este utilizată prin interpolare între 482,6 mg/kg și 347,6 mg/kg.

2) Unt concentrat

a) Stigmasterol

Rata de încorporare pentru stigmasterol este de 150 g de stigmasterol, cu o puritate de cel puțin 95 %, pe o tonă de unt concentrat, respectiv 142,5 mg/kg; sau de 170 g de stigmasterol, cu o puritate de cel puțin 85 %, pe o tonă de unt concentrat, respectiv 144,5 mg/kg.

Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se utilizează la verificarea ratei și a omogenității de încorporare a marcatorilor, iar cel mai slab rezultat se compară cu următoarele limite:

- 118,5 mg/kg (rată de încorporare minimă de 95 % pentru stigmasterol cu o puritate de 95 %);

- 120,4 mg/kg (rată de încorporare minimă de 95 % pentru stigmasterol cu o puritate de 85 %);

- 82,9 mg/kg (rată de încorporare minimă de 70 % pentru stigmasterol cu o puritate de 95 %);

- 84,3 mg/kg (rată de încorporare minimă de 70 % pentru stigmasterol cu o puritate de 85 %).

Concentrația marcatorului din proba cu rezultatul cel mai slab este utilizată prin interpolare între 118,5 mg/kg și 82,9 mg/kg sau între 120,4 mg/kg și 84,3 mg/kg.

b) Sitosterol

Rata de încorporare pentru sitosterol este de 600 g de sitosterol, cu o puritate de cel puțin 90 %, pe o tonă de unt concentrat, respectiv 540 mg/kg.

Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se utilizează la verificarea ratei și a omogenității de încorporare a marcatorilor, iar cel mai slab rezultat se compară cu următoarele limite:

- 480,9 mg/kg (rată de încorporare minimă de 95 % pentru sitosterol cu o puritate de 90 %);

- 345,9 mg/kg (rată de încorporare minimă de 70 % pentru sitosterol cu o puritate de 90 %).

Concentrația marcatorului din proba cu rezultatul cel mai slab este utilizată prin interpolare între 480,9 mg/kg și 345,9 mg/kg.

Anexa nr. 8
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

**Metoda de referință pentru detectarea laptelui de vacă și a cazeinatului
în brânzeturile produse din lapte de oaie, lapte de capră sau lapte
de bivoliță sau din amestecuri de lapte de oaie, capră și bivoliță**

1. Metoda implică o procedură de detectare a laptelui de vacă și a cazeinei în brânzeturile produse din lapte de oaie, lapte de capră, lapte de bivoliță sau din amestecuri de lapte de oaie, capră și bivoliță prin focalizarea izoelectrică a γ -cazeinelor după plasminoliză.

2. Această metodă poate fi folosită pentru detectarea sensibilă și specifică a laptelui de vacă natural și tratat termic și a cazeinatului în brânzeturile proaspete și maturate produse din lapte de oaie, lapte de capră, lapte de bivoliță sau din amestecuri de lapte de oaie, capră și bivoliță. Nu poate fi folosită pentru detectarea falsificării laptelui și a brânzei cu concentrate de proteine de zer de bovine tratate termic.

3. Principiul metodei constă în:

- 1) izolarea cazeinei din brânză și din probele de referință;
- 2) dizolvarea cazeinelor izolate și tratarea acestora prin clivare plasminică;
- 3) focalizarea izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină în prezența ureii și colorarea proteinelor;
- 4) evaluarea benzilor colorate de γ_2 - și γ_3 -cazeină (dovezi ale prezenței laptelui de vacă) prin compararea benzilor obținute din probă cu benzile obținute pe același gel din probele de referință conținând 0 % și 1 % lapte de vacă.

4. În afara cazurilor în care se precizează altceva, produsele chimice utilizate trebuie să fie de puritate analitică. Apa folosită trebuie să fie dublu-distilată sau de o puritate echivalentă.

Următoarele detalii se aplică gelurilor de poliacrilamide cu conținut de uree preparate în laborator, cu dimensiunile de $265 \times 125 \times 0,25$ mm. În cazul în care se folosesc geluri de alte dimensiuni sau tipuri, poate fi necesară modificarea condițiilor de separare.

Focalizarea izoelectrică

1) Reactivi pentru producerea gelurilor de poliacrilamide cu conținut de uree

a) Soluție „stock” de gel

Se dizolvă în apă:

4,85 g acrilamidă;

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

48,05 g uree;

15,00 g glicerol (87 % m/m);

și se completează cu apă pînă la 100 ml, apoi se păstrează produsul obținut în refrigerator, într-un recipient de sticlă de culoare maro.

În locul cantităților fixe de acrilamide neurotoxice menționate mai sus se poate folosi o soluție de acrilamidă/BIS prefabricată disponibilă în comerț. În cazul în care o asemenea soluție conține 30 % m/v acrilamidă și 0,8 % m/v BIS, cantitățile de acrilamidă și BIS din preparatul de mai sus se înlocuiesc cu 16,2 ml de soluție. Termenul de valabilitate a soluției „stock” este de maximum 10 zile; în cazul în care conductibilitatea acesteia este mai mare de 5 μ S, se deionizează substanța prin agitare cu 2 g Amberlite MB-3 timp de 30 de minute, ulterior se filtrează printr-o membrană de 0,45 μ m.

b) Soluția de gel

Se prepară o soluție de gel amestecînd aditivii și amfoliții cu soluția „stock” de gel:

- 9,0 ml soluție „stock”;
- 24 mg β -alanină;
- 500 μ l amfolit pH 3,5-9,5;
- 250 μ l amfolit pH 5-7;
- 250 μ l amfolit pH 6-8.

Se amestecă soluția de gel și se degazeifică timp de două sau trei minute într-o baie ultrasonică sau sub vid.

Soluția de gel se prepară imediat înainte de a o turna (punctul 6 subpunctul 2)).

c) Soluții catalizator

N, N, N' N' – tetrametiletildiamină (Temed)

40 % m/v persulfat de amoniu (PER):

Se dizolvă 800 mg PER în apă și se completează cu apă pînă la 2 ml.

A se folosi întotdeauna soluție PER proaspăt preparată.

2) Fluid de contact – kerosen sau parafină lichidă

3) Soluție anodică

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

4) Soluție catodică

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

Prepararea probei

5) Reactivi pentru izolarea proteinelor

a) Se diluează acid acetic (25,0 ml acid acetic cristalizabil completat cu apă pînă la 100 ml)

b) Diclorometan

c) Acetonă

6) Soluție tampon de dizolvare a proteinelor

Se dizolvă în apă:

- 5,75 g glicerol (87 % m/m);
- 24,03 g uree;
- 250 mg ditiotritol;

și se completează cu apă pînă la 50 ml.

Se păstrează substanța în refrigerator, termen de valabilitate: maximum o săptămînă.

7) Reactivi pentru clivarea plasminică a cazeinelor

a) Soluție tampon de carbonat de amoniu

Se titrează pînă la pH 8 o soluție de hidrogenocarbonat de amoniu 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml apă) conținînd 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) conținînd 0,05 mol/l EDTA.

b) Plasmină bovină, cu activitate de minimum 5 U/ml

c) Soluție 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).

8) Standarde

a) Amestecuri de lapte închegat de oaie și capră cu conținutul de 0 %, respectiv 1 % lapte de vacă.

b) Prepararea probelor de referință provizorii de laborator din lapte de bivoliță închegat conținînd 0 % și 1 % lapte de vacă.

Laptele degresat se prepară prin centrifugarea laptelui crud de bivoliță sau de vacă în vrac la 37 °C (2 500 g, timp de 20 de minute). După răcirea rapidă a tubului și a conținutului la 6-8 °C, stratul superior de grăsime se îndepărtează în totalitate. Pentru prepararea probei etalon 1 % se adaugă 5,00 ml de lapte de vacă degresat la 495 ml lapte de bivoliță 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 și se adaugă 100 μ l de cheag de vițel, se amestecă timp de 1 minut, apoi se acoperă vasul cu o folie de aluminiu și se lasă la 35 °C timp de 1 oră pentru a se putea forma coagulul. După formarea acestuia, laptele închegat este liofilizat în întregime fără omogenizare prealabilă și fără a se extrage zerul. După liofilizare, produsul se zdrobește pînă se obține o pulbere fină omogenă. Pentru prepararea probei etalon 0 %, se urmează aceeași procedură folosind lapte degresat de bivoliță veritabil. Probele trebuie păstrate la -20 °C.

Înainte de prepararea probelor etalon, se recomandă verificarea purității laptelui de bivoliță prin focalizarea izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină.

Reactivi pentru colorarea proteinelor

9) Fixativ

Se dizolvă în apă 150 g acid tricloroacetic și se completează cu apă pînă la 1 000 ml.

10) Soluție pentru decolorare

Se diluează în apă distilată pînă la 2 000 ml 500 ml metanol și 200 ml acid acetic cristalizabil.

Se prepară zilnic o soluție proaspătă de decolorare; soluția poate fi preparată prin amestecarea de volume egale de soluții „stock” metanol 50 % (v/v) și acid acetic cristalizabil 20 % (v/v).

11) Soluții pentru colorare

a) Soluție pentru colorare (soluție „stock” 1)

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

b) Soluție pentru colorare (soluție „stock” 2)

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

c) Soluție pentru colorare (soluție de lucru)

Se amestecă 125 ml din fiecare soluție „stock” imediat înainte de colorare. Se recomandă prepararea soluției de colorare în ziua folosirii acesteia.

5. Aparatură de laborator:

1) Plăci de sticlă ($265 \times 125 \times 4$ mm); rolă de cauciuc (lățime 15 cm); masă reglabilă

2) Foaie susținătoare de gel (265×125 mm)

3) Foaie de acoperire (280×125 mm). Se lipește o bucată de bandă adezivă ($280 \times 6 \times 0,25$ mm) pe fiecare latură lungă (figura 1).

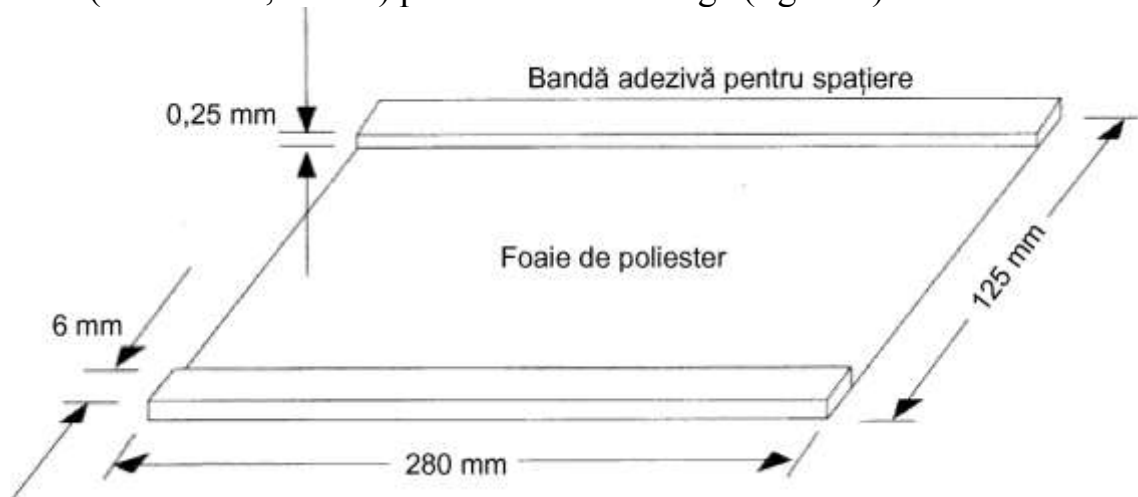


Figura 1. Schița foi de acoperire

- 4) Cuvă de electrofocalizare cu placă de răcire cu unitate de alimentare electrică adecvată ($\geq 2,5$ kV) sau cu aparat automat de electroforeză
- 5) Criostat de circulație controlat termostatic la $12 \pm 0,5$ °C
- 6) Centrifugă ajustabilă la 3 000 g
- 7) Benzi de electrozi (lungime ≥ 265 mm)
- 8) Sticle picurătoare de plastic pentru soluțiile anodice și catodice
- 9) Aplicatoare de probe (10×5 mm, vîscoză sau hîrtie de filtru cu absorbție redusă a proteinelor)
- 10) Foarfeci, scalpele și pensete din oțel inoxidabil
- 11) Cuve din oțel inoxidabil pentru colorare și decolorare
- 12) Omogenizator ajustabil cu tijă (diametrul tijei 10 mm), viteză de rotație 8 000-20 000 rpm
- 13) Agitator magnetic
- 14) Baie ultrasonică
- 15) Aparat de sudură a foliilor

- 16) Micropipete de 25 μ l
- 17) Concentrator sub vid sau liofilizator
- 18) Baie de apă cu agitator, controlată termostatic și ajustabilă la 35 și 40 ± 1 °C
- 19) Echipament de densitometrie cu citire la $\lambda = 634$ nm.

6. Procedura de detectare a laptelui de vacă și a cazeinei în brânzeturile produse din lapte de oaie, lapte de capră, lapte de bivoliță sau din amestecuri de lapte de oaie, capră și bivoliță are loc în felul următor:

- 1) Prepararea probei
 - a) Izolarea cazeinelor

Se cântărește într-un tub de centrifugă de 100 ml echivalentul a 5 g materie uscată de brânză sau probă de referință, se adaugă 60 ml apă distilată și se omogenizează cu un omogenizator cu tijă (8 000-10 000 rpm). Se ajustează la un pH de 4,6 cu o soluție de acid acetic diluat și se pune în centrifugă (5 minute, 3 000 g). Se decantează grăsimea și zerul, se omogenizează reziduul la 20 000 rpm în 40 ml apă distilată ajustată la un pH de 4,5 cu soluție de acid acetic diluat, se adaugă 20 ml diclorometan, se omogenizează din nou și se pune în centrifugă (5 min., 3 000 g). Se îndepărtează cu o spatulă stratul de cazeină care se află între faza apoasă și cea organică (figura 2) și se elimină ambele faze. Se reomogenizează cazeina în 40 ml apă distilată și în 20 ml diclorometan, apoi se pune în centrifugă. Se repetă procedura pînă cînd ambele faze extrase sînt incolore (de două sau trei ori). Se omogenizează reziduul de proteină cu 50 ml acetonă și se filtrează printr-o hîrtie de filtru pliată de viteză medie. Se spală de fiecare dată reziduul de pe filtru cu cîte două porții separate de 25 ml acetonă și se lasă să se usuce în aer sau sub jet de azot, apoi se transformă în pulbere într-un mojar.

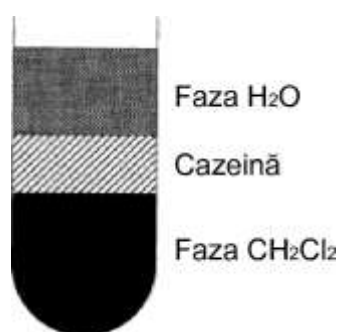


Figura 2. Strat de cazeină plutind după centrifugare între faza apoasă și faza organică

Cazeina izolată uscată trebuie păstrată la -20 °C.

b) Clivarea plasminică al β -cazeinelor pentru intensificarea γ -cazeinelor

Se prepară o suspensie de 25 mg cazeine izolate (subpunctul 1) din prezentul punct) în 0,5 ml soluție tampon de carbonat de amoniu și se omogenizează timp de 20 minute folosind, de exemplu, tratamentul ultrasonic. Se încălzește la 40 °C și se adaugă 10 μ l plasmină, apoi se amestecă și se incubează timp de o oră la 40 °C, agitînd continuu. Pentru a inhiba enzimele se

adaugă 20 μ l soluție de acid ϵ -aminocaproic, apoi se adaugă 200 mg uree solidă și 2 mg ditiotreitol.

Pentru a obține o simetrie mai mare a benzilor cazeinice focalizate, se recomandă liofilizarea soluției după adăugarea acidului ϵ -aminocaproic și dizolvarea reziduurilor în 0,5 ml soluție tampon pentru dizolvarea proteinelor.

2) Prepararea gelurilor poliacrilamide care conțin uree

Cu ajutorul câtorva picături de apă se întinde foaia susținătoare de gel pe o placă de sticlă, îndepărtându-se surplusul de apă cu un șervețel. Se întinde în mod similar foaia de acoperire cu spațiatore (0,25 mm) pe o altă placă de sticlă. Se așează placa orizontal pe masa reglabilă.

Se adaugă 10 μ l Temed la soluția de gel degazeificată pregătită, se amestecă și se adaugă 10 μ l soluție PER, se amestecă bine și se toarnă imediat amestecul într-un strat egal pe centrul foii de acoperire. Se pune o margine a plăcii susținătoare de gel (cu fața foii îndreptată în jos) pe placa de acoperire și se coboară încet, astfel încât între foi să se formeze un strat subțire de gel care să se întindă uniform și fără bule (figura 3). Se coboară cu grijă pînă la capăt placa susținătoare de gel, folosind o spatulă subțire, apoi se așează încă trei plăci de sticlă deasupra, pentru a acționa ca greutate. După încheierea polimerizării (aproximativ 60 minute), se transferă gelul polimerizat împreună cu foaia de acoperire pe foaia susținătoare de gel, înclinând plăcile de sticlă. Se curăță cu grijă spatele foii susținătoare de gel pentru a elimina reziduurile de gel și de uree. Se sudează marginile „sandvișului” de gel, astfel încât să se obțină un tub și se păstrează în refrigerator (timp de maximum șase săptămîni).

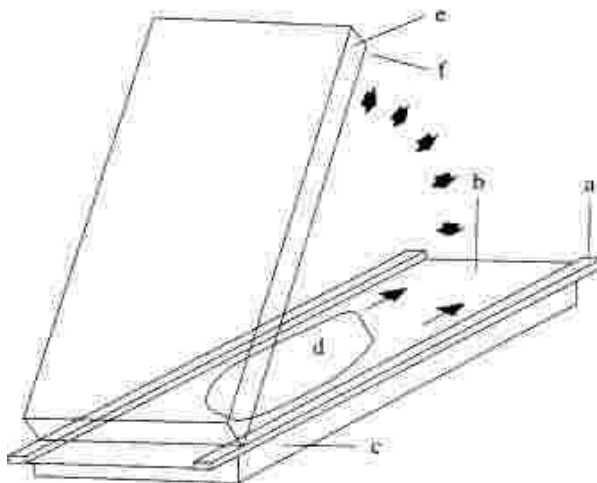


Figura 3. Tehnică de pliere pentru obținerea straturilor foarte fine de geluri poliacrilamide

- a – bandă adezivă pentru spațiere (0,25 mm);
- b – foaie de acoperire;
- c, e – plăci de sticlă;
- d – soluție de gel;
- f – foaie susținătoare de gel

Foaia de acoperire și spațiatorele pot fi refolosite. Gelul de poliacrilamidă poate fi tăiat la dimensiuni mai mici, acțiune care este recomandată în cazul în

care există puține probe sau în cazul în care se folosește un aparat automat de electroforeză (două geluri format $4,5 \times 5$ cm).

3) Focalizarea izoelectrică

Se reglează termostatul de răcire la $12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se șterge cu kerosen spatele foii susținătoare de gel, apoi se picură câteva picături de kerosen pe centrul blocului de răcire. Se rulează apoi pe el „sandvișul” de gel, cu partea susținătoare de gel îndreptată în jos, avînd grijă să se evite formarea bulelor. Se șterge excesul de kerosen și se îndepărtează foaia de acoperire. Se îmbibă benzile de electrozi în soluțiile electrolitice, se taie după lungimea gelului și se plasează în poziția prevăzută (distanța dintre electrozi de 9,5 cm).

Condiții pentru focalizarea izoelectrică:

Dimensiunile gelului $265 \times 125 \times 0,25$ mm

| Etapă | Timp (min.) | Tensiune (V) | Intensitate (mA) | Putere (W) | Volți 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 picură 18 μl din proba și din soluțiile standard pe aplicatorii probei (10×5 mm), se plasează aplicatorii pe gel la distanța de 1 mm unul de celălalt și la 5 mm longitudinal față de anod și se apasă ușor. Procedura de focalizare se finalizează în condițiile specificate mai sus, îndepărtînd cu grijă aplicatorii probei după 60 de minute de focalizare a probei.

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

4) Colorarea proteinelor

a) Fixarea proteinelor

Se îndepărtează benzile de electrozi imediat după stingerea aparatului și se plasează imediat gelul într-o cuvă de colorare/decolorare umplută cu 200 ml fixativ; se lasă acolo timp de 15 minute, agitînd încontinuu.

b) Spălarea și colorarea plăcii de gel

Se scurge cu grijă fixativul și se spală placa de gel de două ori, timp de cîte 30 de secunde, cu 100 ml soluție decolorantă. Se decantează soluția decolorantă și se umple cuva cu 250 ml soluție colorantă; se lasă 45 de minute să se coloreze, agitîndu-se ușor cuva.

c) Decolorarea plăcii de gel

Se decantează soluția colorantă, se spală placa de gel de două ori, cu cîte 100 ml soluție decolorantă, apoi se agită timp de 15 minute cu 200 ml soluție decolorantă și se repetă pasul de decolorare de cel puțin două-trei ori, pînă cînd fundul vasului este curățat și incolor. Se clătește apoi cu apă distilată placa de gel

(2 × 2 minute) și se usucă la aer (2-3 ore) sau cu un uscător de păr (10-15 minute).

Fixarea, spălarea, colorarea și 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.

7. Evaluarea este efectuată prin compararea benzilor de proteine ale probei necunoscute cu probele de referință efectuate pe același gel. Detectarea laptelui de vacă în brânzeturile din lapte de oaie, lapte de capră și lapte de bivoliță și în amestecurile de lapte de oaie, capră și bivoliță se face prin intermediul γ_3 - și γ_2 -cazeinelor, ale căror puncte izoelectrice se află în intervalul pH 6,5-pH 7,5 (figurile 4a, 4b și 5). Limita de detecție este mai mică de 0,5 %.

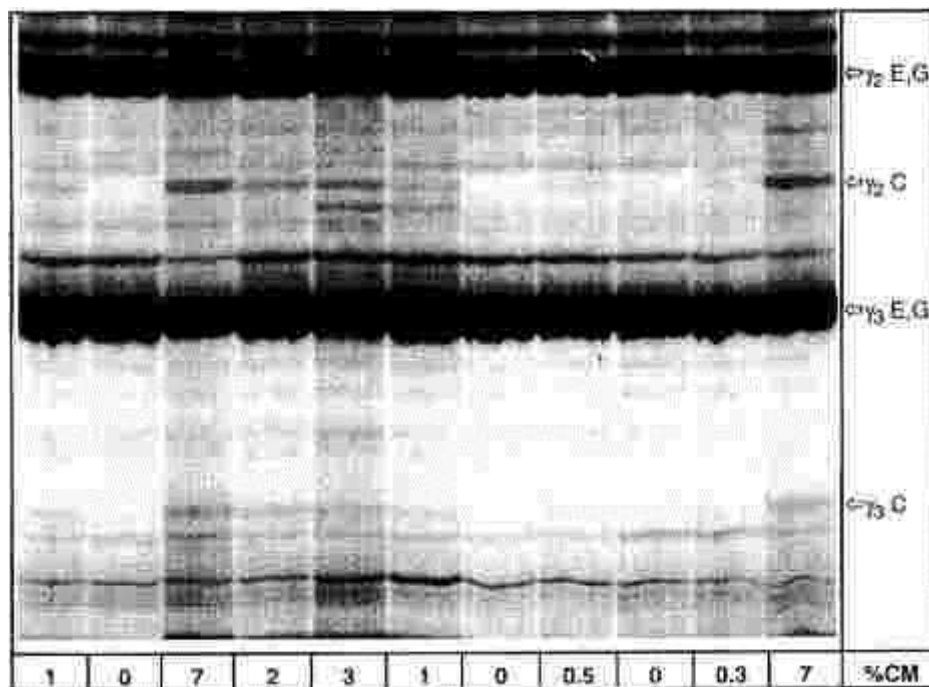


Figura 4a. Focalizare izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină din brânză din lapte de oaie și de capră care conține diferite cantități de lapte de vacă

% CM = procentaj lapte de vacă;

C = vacă;

E = oaie;

G = capră.

Este ilustrată jumătatea de sus a gelului IEF.

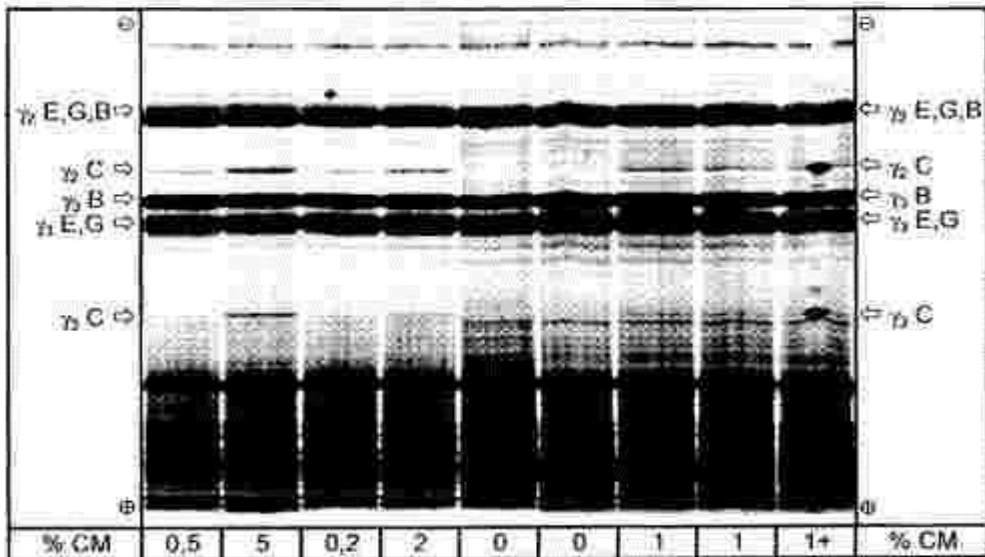


Figura 4b. Focalizare izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină din brânză din amestec de lapte de oaie, capră și bivoliță care conține diferite cantități de lapte de vacă

% CM = procentaj lapte de vacă;
 1 + = probă conținând 1 % lapte de vacă și dopat cu cazeină pură de lapte de vacă la mijlocul traiectului gelului.

C = vacă;

E = oaie;

G = capră;

B = bivoliță.

Este ilustrată distanța separatoare totală a gelului IEF.

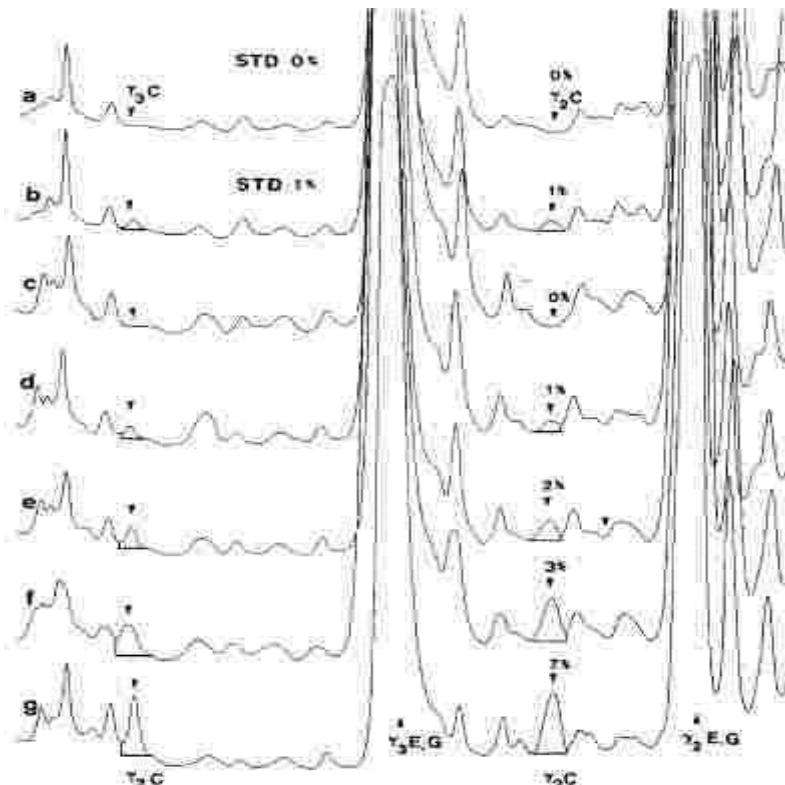


Figura 5. Suprapunerea densitogramelor probelor etalon (STD) și a probelor de brânză preparate din amestec de lapte de oaie și de capră după focalizarea izoelectrică

- a, b – probe etalon conținând 0, respectiv 1 % lapte de vacă;
 c-g – probe de brânză conținând 0, 1, 2, 3 și 7 % lapte de vacă.
 C – vacă;
 E – oaie;
 G – capră.

Jumătatea superioară a gelului IEF a fost scanată la $\lambda = 634 \text{ nm}$.

1) Estimare vizuală

Pentru evaluarea vizuală a cantității de lapte de vacă se recomandă ajustarea concentrațiilor probelor și a probelor etalon pentru a obține același nivel de intensitate a γ_2 - și γ_3 -cazeinelor din laptele de ovine, caprine și/sau bivolițe (a se vedea „ γ_2 E, G, B” și „ γ_3 E, G, B” din figurile 4 a și 4 b și 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 γ_3 - și γ_2 -cazeinelor din laptele de vacă (a se vedea „ γ_3 C” și „ γ_2 C” din figurile 4 a, 4 b și 5) cu cea a probelor de referință de 0 % și 1 % (oaie, capră) sau cu standardele provizorii de laborator (bivoliță).

2) Estimare densitometrică

În cazul în care este disponibilă, se aplică densitometria pentru determinarea raportului dintre suprafața vîrfurilor γ_2 - și γ_3 -cazeinelor din laptele de vacă, respectiv din laptele de oaie, capră și/sau bivoliță (figura 5). Această valoare se compară cu raportul dintre suprafața vîrfurilor γ_2 - și γ_3 -cazeinelor pentru proba de referință 1 % (oaie, capră) sau pentru standardul provizoriu de laborator (bivoliță), analizate pe același gel.

Metoda funcționează corespunzător în cazul în care se obține un semnal pozitiv clar pentru ambele cazeine bovine γ_2 - și γ_3 - din proba de referință 1 %, dar nu și din proba de referință 0 %. Dacă nu, procedura trebuie îmbunătățită respectîndu-se cu exactitate detaliile metodei.

O probă este considerată pozitivă în cazul în care ambele cazeine bovine γ_2 - și γ_3 - sau raportul suprafeței vîrfurilor corespunzător sînt mai mari sau egale cu nivelul din proba de referință 1 %.

Anexa nr. 9
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

**Metoda de referință pentru detectarea bacteriilor coliforme
din unt, lapte praf degresat, cazeină și cazeinați**

1. Prepararea probelor se realizează în conformitate cu standardul SM SR EN ISO 6887-5.

2. Detectarea bacteriilor coliforme se efectuează în conformitate cu standardul SM ISO 4831.

Se inoculează probe de 1 g de unt sau de 0,1 g de lapte praf degresat sau cazeină/cazeinați în mediul de cultură.

Se inoculează trei tuburi pentru fiecare probă.

3. În cazul în care cele 3 tuburi produc 3 rezultate negative, rezultatul este „conform”.

În cazul în care cele 3 tuburi produc 2 sau 3 rezultate pozitive, rezultatul este „neconform”.

În cazul în care cele 3 tuburi produc 2 rezultate negative, analiza se repetă (cu două tuburi).

1) În cazul în care cele 2 rezultate sînt negative, rezultatul este „conform”.

2) În cazul în care cel puțin 1 rezultat este pozitiv, rezultatul este „neconform”.

Anexa nr. 10
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

Determinarea lactozei în furajele combinate

1. Metoda implică o procedură de determinare a lactozei în furajele combinate.

2. Conținutul de lactoză se definește ca procent de masă determinat prin procedura descrisă.

Conținutul de lactoză anhidră se exprimă în g per 100 g.

3. Furajul compus se reconstituie cu apă. Se adaugă soluție „Biggs” la o parte alicotă cântărită diluată pentru precipitarea grăsimii și a fracțiunilor componente ale proteinei furajului combinat. Proba este filtrată (sau centrifugată) și filtratul (sau supernatantul) este injectat printr-o coloană HPLC de schimb de cationi în forma de plumb folosind apă de calitate HPLC ca fază mobilă. Lactoza eluată este detectată cu un refractometru¹ diferențial.

4. Se folosesc numai reactivi de calitate analitică recunoscută, cu excepția cazurilor în care se precizează altceva, și apă de calitate HPLC degazată.

1) Lactoză

Monohidratul de D-Lactoză [(C₁₂H₂₂)O₁₁. H₂O] poate prelua umezeala suplimentară. Înainte de folosire, se măsoară cantitatea reală de apă cu titratorul Karl-Fisher sau se elimină umezeala suplimentară plasând lactoza într-un cuptor la 105°C, timp de 8 ore.

2) Soluție concentrată Biggs/Szijarto

Se dizolvă 9,10 g dihidrat de acetat de zinc [Zn(CH₃COO)₂.2H₂O] și 5,46 g de acid fosfotungstic monohidrat (H₃[P(W₃O₁₀)₄.xH₂O]) în aproximativ 70 ml cu apă de calitate HPLC într-un balon cotat de 100 ml.

Se adaugă 5,81 ml acid acetic glacial (CH₃COOH). Se diluează pînă la nivelul de 100 ml cu apă de calitate HPLC și se amestecă. Soluția poate fi depozitată la temperatura camerei pentru o perioadă de 1 an.

3) Soluție diluată Biggs/Szijarto

Se diluează 25 ml de soluție concentrată Biggs/Szijarto cu apă pînă la nivelul de 500 ml folosind un balon cotat. Soluția poate fi depozitată la temperatura camerei pentru o perioadă de 1 lună.

4) Prepararea apei de calitate HPLC

Se filtrează apă ultra pură folosind sistemul de filtrare cu vid. Pentru a îmbunătăți performanța pompei și pentru a obține o linie de bază stabilă, se degazifică zilnic faza mobilă optînd pentru una dintre tehnicile disponibile, cum ar fi spălarea cu heliu, dezintegrarea, sistemul de degazificare în vid sau în linie.

Pentru a prelungi viața coloanei este esențial ca procentul de bioxid de carbon al eluantului să fie cît mai mic posibil și să fie împiedicată o reabsorbție.

5. Aparatură obișnuită de laborator și, în special, următoarele:

1) Coloană de plastic pentru schimb ioni HPLC

Umplerea coloanei: copolimer polistiren-divinilbenzen cu legătură între catene 8 %, funcționalizat cu grupuri de schimb de cationi în formă de plumb.

Dimensiunile coloanei: lungimea 300 mm, diametrul interior aproximativ 8 mm.

Este posibilă și utilizarea altor diametre, cu condiția ca debitul să fie reglat în mod corespunzător.

2) Coloană de control

Coloana de control este o combinație între un schimbător de cationi separat (H^+) și un schimbător de anioni (CO_3^-), fiecare introdus în coloane de aproximativ $30 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ($L \times ID$) și conectat în serie sau sub forma unui strat combinat constând din AG 50W-X4, – 400 ochiuri de sită (H^+) și AG3-X4A, 200-400 ochiuri de sită (OH^-) în raportul de 35:65 (m/m) umplute manual într-o coloană de aproximativ $20 \times 9 \text{ mm}$ ($L \times ID$).

3) Cuptorul de coloană

Cuptor capabil să mențină o temperatură constantă de $85 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

4) Pompa de HPLC

Pompă capabilă să genereze un debit constant (fluctuații $< 0,5 \%$) la 0,2-1,0 m/min.

5) Dispozitiv de injectare a HPLC

Autosondă capabilă să injecteze $25 \text{ } \mu\text{L}$ și având o repetabilitate $< 0,5 \%$.

Ca soluție alternativă poate fi folosit un dispozitiv manual.

6) Detector de HPLC

Detector de index refractant de mare sensibilitate având un zgomot $< 5 \cdot 10^{-9}$ RI unități.

7) Integrator

Software sau un integrator dedicat pentru a realiza strângerea datelor, procesarea și generarea suprafeței vîrfurilor și a înălțimilor vîrfurilor, care pot fi transformate în concentrații de lactoză.

8) Unitate de purificare a apei

Sistem capabil să furnizeze apă foarte pură având o rezistivitate $> 14 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$.

9) Unitate de filtrare a solventului

Sistem care asigură filtrarea apei folosind un filtru cu membrană filtrantă cu diametrul porilor de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$.

Multe unități de purificare a apei au o unitate de filtrare integrată de $0,45$ sau de $0,2 \text{ } \mu\text{m}$. Se poate renunța la o filtrare suplimentară dacă această apă este folosită direct.

10) Balanță analitică

Balanță având un afișaj de $0,1 \text{ mg}$.

11) Baie de apă

Baie de apă capabilă să mențină o temperatură de $40 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 0,5)$.

12) Centrifugă

Avînd o capacitate de generare de cel puțin 3 000 g pentru eprubete Eppendorf sau echivalente sau pentru tipuri mai mari de eprubete.

13) Balon cotate de 50 mL

Capacitate de 50 mL, clasa A.

Pot fi folosite și baloane de altă capacitate ținînd cont de factorul volum.

14) Balon cotate de 100 mL

Capacitate de 100 mL, clasa A.

15) Pipetă gradată

Pipetă gradată de 10 mL.

Ca soluție alternativă se poate folosi un picurător manual cu o capacitate de 5 mL, adăugînd un volum dublu de 5 mL de reactiv (punctul 4 subpunctul 3).

6. Este important ca laboratorul să primească o probă prelevată conform SM SR EN 707 care să fie cu adevărat reprezentativă și care să nu fi fost deteriorată în timpul transportului sau pe durata depozitării.

7. Soluția etalon de lactoză se prepară în felul următor:

1) Etalon 1

Se dizolvă o cantitate cîntărită exact (cu indicații de 0,1 mg) de aproximativ 50 mg monohidrat de lactoză într-un balon cotate de 100 mL și se completează cu apă pînă la marcaj.

2) Etalon 2

Se dizolvă o cantitate cîntărită exact (cu indicații de 0,1 mg) de aproximativ 100 mg monohidrat de lactoză într-un balon cotate de 100 mL și se completează cu apă pînă la marcaj.

Soluțiile etalon pot fi depozitate pentru maximum 1 săptămîină, la aproximativ 5 °C.

8. Proba pentru analiză se prepară în felul următor:

1) Reconstituirea probei

Se cîntăresc aproximativ 5 g de lapte praf într-un balon de 50 mL și se notează greutatea cu o precizie de 1 mg [W_1 , (11)]. Se adaugă 50 mL de apă și se notează creșterea de greutate [W_2 , (11)] cu o precizie de 0,01 g. Se așază balonul închis în baia de apă timp de 30 min. și se răstoarnă de cîteva ori în această perioadă. Apoi se lasă să se răcească la temperatura camerei.

2) Tratarea probei

Se ia aproximativ 1 g din această soluție și se pune într-un balon cotate de 50 mL, se notează greutatea cu o precizie de 1 mg [W_3 (11)], se adaugă 20 mL de apă, după care se adaugă 10 mL de reactiv diluat Biggs/Szijarto, completați cu apă pînă la marcaj. Balonul se răstoarnă ușor de 5 ori în timpul primelor 30 de minute.

După 1 oră, se ia o parte alicotă și se centrifughează la 3 000 g timp de 10 min. Se folosește o cotă alicotă de supernatant pentru analiza HPLC.

9. Determinarea HPLC se efectuează în felul următor:

1) Prepararea preliminară a HPLC

a) Instalarea coloanei și a precoloanei

Se întălează precoloana (punctul 5 subpunctul 2) în afara cuptorului de coloană (punctul 5 subpunctul 3) și coloana (punctul 5 subpunctul 1) în cuptor.

În cazul în care cuptorul nu conține țevi pentru preîncălzirea eluantului, este necesar ca eluantul să treacă prin aproximativ 15 cm de țevă de oțel inoxidabil în cuptor, înainte de a intra în coloană (este absolut necesar ca eluantul să se fi încălzit înainte de a intra în coloană, altfel va avea loc o creștere a suprafeței vârfului).

b) Detectorul și fluxul inițial

Pentru a obține o linie de bază stabilă, detectorul de HPLC se pune în funcțiune cu cel puțin 24 de ore înainte de a începe analiza. Se stabilește temperatura interioară a detectorului la 35 °C. Se stabilește debitul la 0,2 ml/min. (punctul 5 subpunctul 4) pentru cel puțin 20 min., în timp ce cuptorul de coloană este reglat la temperatura camerei.

c) Cuptorul de coloană și debitul final

Se reglează cuptorul de coloană la 85 °C. Când se atinge această temperatură, se crește, după 30 de minute, treptat, debitul de la 0,2 ml/min. la 0,6 ml/min. (punctul 5 subpunctul 4). Se lasă sistemul să ajungă în echilibru cu acest debit și la 85 °C, timp de 2 ore sau pînă se obține o linie de bază stabilă.

d) Integrarea

Se alege cu grijă parametrii de colectare a datelor și integrare (punctul 5 subpunctul 7), cum ar fi estimarea datelor, sensibilitatea, constanta de timp, lățimea vârfului și pragul.

Timpul de retenție al lactozei este de aproximativ 11 minute.

Multe programe software de strîngere de date (punctul 5 subpunctul 7) permit o măsurare ușoară a numărului de placă teoretic. Se măsoară numărul de placă teoretic al etalonului 1 în mod normal și se înlocuiește coloana (punctul 5 subpunctul 1) cînd numărul de placă este cu 25 % mai mic decît cel al valorii inițiale a unei noi coloane.

e) Testarea coloanei de control

Se verifică regulat (cel puțin o dată la fiecare ciclu de analiză) capacitatea coloanei de control de a elimina sărurile din probă prin injectarea a 25 μL de soluție 0,05 % de clorură de sodiu. De fiecare dată cînd apar vîrfuri, coloana de control trebuie schimbată.

2) Prelucrarea etaloanelor

Se injectează, la începutul fiecărei serii de analize, 25 μL (punctul 5 subpunctul 5) din etalonul 1 și apoi din etalonul 2. Această operațiune se repetă la fiecare 10-20 de probe și, de asemenea, la sfîrșitul ciclului.

3) Prelucrarea probelor

Se injectează 25 μL de supernatant (punctul 8 subpunctul 2) din probă.

10. Calcularea și exprimarea rezultatelor are loc în felul următor:

1) Calibrare

În mod normal, înălțimile vîrfurilor sînt folosite pentru a calcula rezultatele, totuși, dacă semnalul conține prea mult zgomot, se poate folosi suprafața vîrfului (cuantificarea în cazul înălțimii vîrfului este mai puțin influențată de vîrfurile componentelor în concentrație mică și care sînt separate în parte, dar nu suficient, de vîrfurile lactozei).

Cu ajutorul software-ului (punctul 5 subpunctul 7) trebuie să se calculeze o curbă liniară de etalonare ce trece forțat prin origine. Se verifică curba pentru a identifica posibila neliniaritate (neliniaritatea poate fi provocată de o greșeală în pregătirea etaloanelor 1 sau 2, de o integrare greșită și, mai puțin probabil, de o funcționare necorespunzătoare a injectorului).

Se folosesc ca date de introducere concentrațiile de lactoză calculate în mg/mL ale etaloanelor 1 și 2, cum ar fi lactoza fără apă.

Înclinarea (RF) a liniei de calibrare este definită de raportul suprafață/concentrație în mg/mL.

2) Probe

Rezultatul analizei este obținut în g/100 g și este calculat folosind software-ul (punctul 6 subpunctul 7) sau folosind următoarea formulă:

$$C = \frac{H \times (W_1 + W_2) \times 50}{RF \times W_1 \times W_3} \times 0,1,$$

unde:

C – concentrația lactozei în g/100 g lapte praf;

H – înălțimea vîrfului de lactoză al probei;

RF – factorul de răspuns (sau înclinarea) curbei de calibrare în mV/mg/mL;

W_1 – greutatea probei de lapte praf în g (punctul 8 subpunctul 1);

W_2 – greutatea apei adăugat în g la proba de lapte praf (punctul 8 subpunctul 1);

W_3 – greutatea probei din soluția reconstituită de lapte praf în g (punctul 8 subpunctul 2);

50 – volumul balonului cotate folosit în (punctul 8 subpunctul 2);

0,1 – conversia rezultatului în g/100 g.

11. Se poate ca valorile obținute prin această probă interlaboratoare să nu fie aplicabile la valorile și matricele de concentrație altele decît cele date.

Valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate vor fi derivate din rezultatul unei probe interlaboratoare realizate conform cu SM SR ISO 5725-1.

1) Repetabilitate

Diferența absolută dintre rezultatele a două probe individuale, obținute prin folosirea aceleiași metode pe material de probă identic în același laborator, cu același operator, folosind aceeași aparatură, într-un interval scurt de timp, nu va depăși, în peste 5 % din cazuri, xxx (care va fi determinată printr-o probă realizată în comun).

2) Reproductibilitate

Diferența absolută între două rezultate de probe individuale, obținute folosind aceeași metodă, pe material de probă identic, în laboratoare diferite, cu diferiți operatori, folosind aparatură diferită, nu va depăși, în peste 5 % din cazuri, 0,5 g/100 g (care va fi determinată printr-o probă realizată în comun).

Anexa nr. 11
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

Detectarea zerului praf din laptele praf degresat destinat depozitării publice prin determinarea cromatografiei lichide de înaltă performanță a cazeinomacropetidelor (HPLC)

1. Această metodă permite detectarea zerului încheșat din laptele praf degresat destinat depozitării publice prin determinarea cazeinomacropetidelor.

2. Conținutul de substanțe solide din zer încheșat se definește ca procent de masă determinat de conținutul de cazeinomacropetide prin procedura descrisă.

3. Principiul metodei de detectare a zerului încheșat din laptele praf degresat destinat depozitării publice prin determinarea cazeinomacropetidelor constă în:

1) reconstituirea laptelui praf degresat, îndepărtarea grăsimilor și proteinelor cu acid tricloroacetic, urmată de centrifugare sau filtrare;

2) determinarea cantității de cazeinomacropetide (CMP) din supernatant prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC);

3) evaluarea rezultatelor obținute pentru probe față de probe etalon formate din lapte praf degresat cu sau fără adăugarea unui procent cunoscut de zer praf.

4. Toți reactivii utilizați trebuie să fie de calitate analitică recunoscută. Apa utilizată trebuie să fie apă distilată sau apă de o puritate cel puțin echivalentă.

1) Soluție de acid tricloroacetic

Se dizolvă 240 g de acid tricloroacetic (CCl_3COOH) în apă și se completează până la 1 000 ml. Soluția trebuie să fie limpede și incoloră.

2) Soluție eluantă, pH 6,0

Se dizolvă 1,74 g de fosfat dipotasic (K_2HPO_4), 12,37 g de fosfat monopotasic (KH_2PO_4) și 21,41 g de sulfat de sodiu (Na_2SO_4) în aproximativ 700 ml de apă. În cazul în care este necesar, se ajustează cu ajutorul unei soluții de acid fosforic sau hidroxid de potasiu până la obținerea unui pH de 6,0.

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

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

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

3) Solvent de spălare

Se amestecă un volum de acetonitril (CH_3CN) cu nouă volume de apă. Amestecul se filtrează înainte de folosire printr-o membrană filtrantă cu pori cu diametrul de 0,45 μm .

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

4) Probele etalon:

a) lapte praf degresat care îndeplinește cerințele prezentei rezoluții (respectiv [0]);

b) același lapte praf degresat modificat cu 5 % (m/m) zer încheșat praf cu compoziție standard (respectiv [5]).

5. Aparatură de laborator:

1) balanță analitică;

2) centrifugă opțională cu o forță de centrifugare de 2 200 g, prevăzută cu tuburi astupate sau acoperite pentru centrifugare 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) dispozitiv de sticlă pentru filtrare prevăzut cu membrană filtrantă cu diametrul porilor de aproximativ 0,45 μm ;

8) pipete gradate de 10 ml sau un sistem prin care pot trece 10,0 ml în două minute;

9) sistem prin care pot trece 20,0 ml de apă la aproximativ 50°C;

10) baie termostat de apă, reglată la $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$;

11) echipament pentru HPLC format din:

a) pompă;

b) injector, manual sau automat, cu o capacitate de 15-30 μl ;

c) două coloane TSK 2 000-SW în serie (lungime de 30 cm, diametru intern de 0,75 cm) sau coloane echivalente și o precoloană (3 cm \times 0,3 cm) umplute cu I 125 sau cu un material cu eficiență echivalentă;

d) cuptor cu coloană termostat, reglat la $35 \pm 1^\circ\text{C}$;

e) detector UV cu lungime de undă variabilă care permite realizarea de măsurători la 205 nm cu o sensibilitate de 0,008 A;

f) integrator cu ajutorul căruia se poate realiza integrarea la linia de bază.

Se poate lucra cu coloanele aflate la temperatura camerei, dar puterea lor de rezoluție este puțin mai mică. În acest caz, temperatura nu trebuie să varieze cu mai mult de $\pm 5^\circ\text{C}$ în nici o serie de analize.

6. Probele se prelevează conform procedurii descrise de standardul SM SR EN ISO 707.

Probele se depozitează în condiții în care nu poate surveni nici o deteriorare sau modificare a compoziției.

7. Procedura de detectare a zerului încheșat din laptele praf degresat destinat depozitării publice prin determinarea cazeinomacropetidelor are loc în felul următor:

1) Prepararea probei pentru analiză

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

2) Cantitatea analizată

Se cântăresc $2,000 \pm 0,001$ g din proba analizată într-un tub de centrifugare sau într-un balon astupat adecvat (50 ml).

3) Îndepărtarea grăsimii și a proteinelor

a) Se adaugă 20,0 ml de apă caldă (50 °C) la cantitatea analizată. Se dizolvă laptele praf agitându-se câteva minute cu ajutorul unui agitator mecanic. Tubul se introduce în baia de apă și se lasă să se echilibreze la 25 °C.

b) Se adaugă 10,0 ml de soluție de acid tricloroacetic la aproximativ 25 °C timp de două minute, amestecându-se puternic cu ajutorul unui agitator magnetic. Tubul se introduce într-o baie de apă și se lasă timp de 60 de minute.

c) Se centrifughează timp de 10 minute la 2 200 g sau se filtrează printr-o hîrtie, eliminându-se primii 5 ml de filtrat.

4) Determinarea cromatografică

a) Se injectează 15-30 μ l de supernatant sau filtrat măsurat cu precizie în aparatul HPLC funcționînd la un debit de 1,0 ml de soluție eluantă pe minut.

Se poate folosi un alt debit în funcție 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 mențină degazat și pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor. Se poate recurge la orice măsură de precauție cu efect similar.

Coloanele se clătesc cu apă la fiecare întrerupere. Soluția nu se lasă niciodată în coloane.

Înainte de orice întrerupere care durează mai mult de 24 de ore, coloanele se clătesc cu apă și se spală cu soluție timp de cel puțin trei ore la un debit de 0,2 ml pe minut.

b) Rezultatele analizei cromatografice a probei etalon [E] se obțin sub forma unei cromatograme în care fiecare vîrf se identifică după timpul de retenție RT după cum urmează:

| | |
|------------|---|
| Vîrful II | Al doilea vîrf al cromatogramei cu un RT de aproximativ 12,5 minute |
| Vîrful III | Al treilea vîrf al cromatogramei, corespunzînd CMP, cu un RT de 15,5 minute |

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

Integratorul calculează automat suprafața A a fiecărui vîrf.

| | |
|--------------------|------------------------|
| A _{II} : | suprafața vîrfului II |
| A _{III} : | suprafața vîrfului III |
| | |

Este esențial să se examineze aspectul fiecărei cromatograme înainte de realizarea interpretării cantitative pentru a se detecta orice eventuale anomalii datorate fie funcționării necorespunzătoare a aparatului sau a coloanelor, fie originii sau naturii probei analizate.

În cazul în care există dubii, analiza se repetă.

5) Calibrare

a) Probelor etalon li se aplică exact procedura descrisă în subpunctele 2)-4) din prezentul punct.

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

b) Înainte de determinarea cromatografică a probelor, coloanele trebuie condiționate prin injectarea repetată a probei etalon în soluție (litera a) din prezentul subpunct), pînă cînd suprafața vîrfului și timpul de retenție al acestuia pentru CMP sînt constante.

c) Se determină coeficientul de răspuns R prin injectarea aceluiași volum de filtrați (litera a) din prezentul subpunct) folosit și în probe.

8. Experimentarea rezultatelor se efectuează în felul următor:

1) Metoda de calcul și formule

a) Calcularea factorilor de răspuns R:

| | |
|------------|----------------------------|
| Vîrful II: | $R_{II} = 100/(A_{II}[0])$ |
|------------|----------------------------|

unde:

R_{II} – coeficienții de răspuns pentru vîrfurile II;

$A_{II} [0]$ – suprafețele vîrfurilor II pentru proba etalon [0] obținute la punctul 7 subpunctul 5) litera c).

| | |
|-------------|---|
| Vîrful III: | $R_{III} = W/(A_{III}[5] - A_{III}[0])$ |
|-------------|---|

unde:

R_{III} – coeficientul de răspuns pentru vîrfurile III;

$A_{III} [0]$ și $A_{III} [5]$ – suprafețele vîrfurilor III pentru probele etalon [0] și, respectiv, [5] obținute la punctul 7 subpunctul 5) litera c);

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

b) Calcularea suprafeței relative a vîrfurilor probei [E]

$$S_{II}[E] = R_{II} \times A_{II}[E]$$

$$S_{III}[E] = R_{III} \times A_{III}[E]$$

$$S_{IV}[E] = R_{IV} \times A_{IV}[E]$$

unde:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E] – suprafețele relative ale vîrfurilor II, III și, respectiv, IV din proba [E];

A_{II} [E], A_{III} [E] – suprafețele vîrfurilor II și, respectiv, IV din proba [E] obținute la punctul 7 subpunctul 4) litera b);

R_{II} , R_{III} – coeficienții de răspuns calculați la litera a) din prezentul subpunct.

c) Calcularea timpului relativ de retenție al vîrfului III pentru proba [E]:

$$RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E]) / (RT_{III}[5]),$$

unde:

RRT_{III} [E] – timpul relativ de retenție al vîrfului III pentru proba [E];

RT_{III} [E] – timpul relativ de retenție al vîrfului III din proba [E] obținut la punctul 7 subpunctul 4) litera b);

RT_{III} [5] – timpul relativ de retenție al vîrfului III din proba de control [5] obținut la punctul 7 subpunctul 5) litera c).

d) Există o relație liniară între timpul relativ de retenție al vîrfului III, respectiv RRT_{III} [E] și procentul de zer praf de pînă la 10 % adăugat:

- RRT_{III} [E] este $< 1,000$ în cazul în care conținutul de zer este > 5 %;

- RRT_{III} [E] este $\geq 1,000$ în cazul în care conținutul de zer este ≤ 5 %.

Nesiguranța permisă pentru valorile RRT_{III} este de $\pm 0,002$.

În mod normal, valoarea RRT_{III} [0] deviază puțin de la 1,034. În funcție de starea coloanelor, valoarea se poate apropia de 1,000, dar este întotdeauna mai mare de această valoare.

2) Calcularea procentului de zer încheșat praf din probă:

$$W = S_{III}[E] - [1, 3 + (S_{III}[0] - 0, 9)],$$

unde:

W – procentul m/m de zer încheșat în proba [E];

S_{III} [E] – suprafața relativă a vîrfului III al probei analizate [E] obținută ca la subpunctul 1) litera b) din prezentul punct;

1,3 – reprezintă suprafața medie relativă a vîrfului III exprimată în grame de zer încheșat pe 100 g determinată pentru lapte praf degresat nemodificat cu diferite origini. Această valoare a fost obținută experimental;

S_{III} [0] – reprezintă suprafața relativă a vîrfului III egală cu $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Aceste valori au fost obținute la subpunctul 1 litera a) din prezentul punct și, respectiv, punctul 7 subpunctul 5) litera c);

$(S_{III}[0] - 0,9)$ – reprezintă corecția care trebuie adusă suprafeței relative 1,3 cînd S_{III} [0] nu are valoarea 0,9. În mod experimental, suprafața medie relativă a vîrfului III al probei martor [0] este de 0,9.

3) Precizia metodei

a) Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate simultan sau în cel mai scurt interval de timp posibil de același operator care utilizează aceeași aparatură pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 0,2 % m/m.

b) Reproducibilitate

Diferența dintre două rezultate separate și independente, obținute de doi operatori care lucrează în laboratoare diferite cu material de analiză identic nu trebuie să depășească 0,4 % m/m.

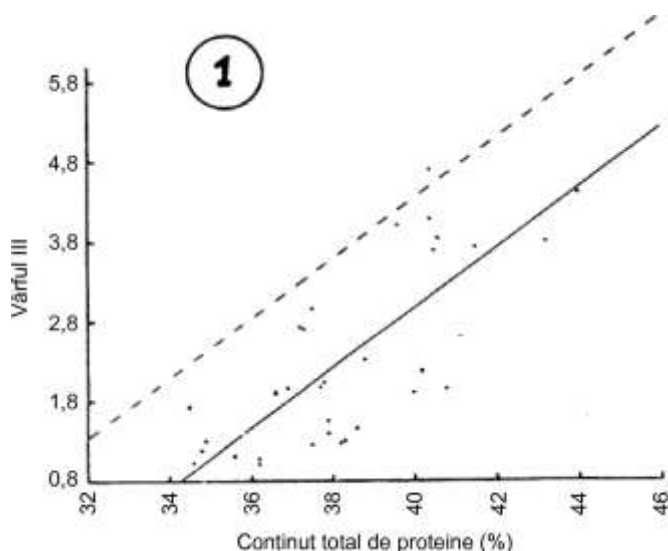
9. Se presupune că zerul este absent în cazul în care suprafața relativă a vârfului III, $S_{III}[E]$ exprimată în grame de zer încheșat pe o sută de grame de produs este $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$, unde:

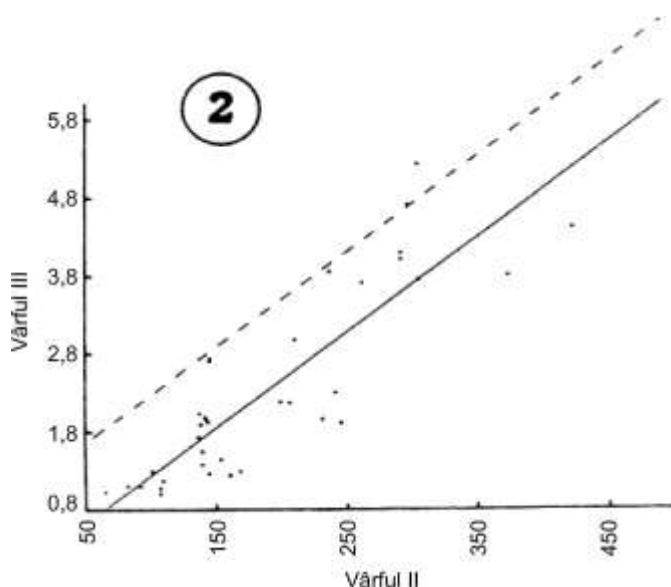
2,0 – valoarea maximă permisă a suprafeței relative a vârfului III avându-se în vedere suprafața relativă a vârfului III, respectiv 1,3, nesiguranța datorată variațiilor compoziției laptelui praf degresat și reproductibilitatea metodei (punctul 8 subpunctul 3) litera b));

$(S_{III}[0] - 0,9)$ – corecția care trebuie adusă când suprafața $S_{III}[0]$ nu este 0,9 (punctul 8 subpunctul 2).

În cazul în care suprafața relativă a vârfului III, $S_{III}[E]$ este $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ și suprafața relativă a vârfului II, $S_{II}[E] \leq 160$, se determină conținutul de zer încheșat conform indicațiilor de la punctul 8 subpunctul 2).

În cazul în care suprafața relativă a vârfului III, $S_{III}[E]$ este $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ și suprafața relativă a vârfului II, $S_{II}[E] \leq 160$, se determină conținutul total de proteine (P%); apoi se examinează graficele 1 și 2.





1) Linia continuă reprezintă regresia liniară, ai cărei coeficienți se calculează prin metoda pătratului celui mai mic.

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

Ecuatiile liniilor drepte punctate de pe graficele 1 și 2 sînt:

$$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7 \text{ (graficul 1);}$$

$$S_{III} = 0,0123 S_{II} [E] + 0,93 \text{ (graficul 2);}$$

și, respectiv, unde:

S_{III} – suprafața relativă a vârfului III calculată fie pe baza conținutului total de proteine, fie pe baza suprafeței relative a vârfului $S_{II}[E]$;

$P\%$ – conținutul total de proteine exprimat ca procent de masă;

$S_{II} [E]$ – suprafața relativă pentru probă calculată la punctul 8 subpunctul 1) litera b).

Diferența (T_1 și T_2) dintre suprafața relativă $S_{III}[E]$ determinată și suprafața relativă S_{III} se calculează după cum urmează: $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$ $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$.

2) În cazul în care T_1 și/sau T_2 au valoarea zero sau mai mică, nu se poate determina prezența zerului încheșat.

În cazul în care T_1 și T_2 au o valoare mai mare de zero, zerul încheșat este prezent.

Conținutul de zer încheșat se calculează cu ajutorul formulei: $W = T_2 + 0,91$,

unde 0,91 este distanța pe axa verticală între linia dreaptă continuă și linia dreaptă punctată.

Anexa nr. 12
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

Determinarea substanțelor solide din zer închegat în laptele praf degresat și în amestecurile ce conțin lapte praf degresat și, după caz, grăsime, vitamine, săruri minerale, zaharoză, agenți anticoagulanți și/sau agenți fluidizanți și alți agenți fluidizanți, în special antioxidanți și emulsificatori

1. Conținutul de substanțe solide din zer închegat reprezintă procentul de masă determinat de conținutul de cazeinomacropptide prin procedura descrisă.

2. Conținutul de cazeinomacropptide se determină conform anexei nr. 11. Probele pentru care se obțin rezultate pozitive se analizează pentru detectarea cazeinomacropptidelor A prin procedura de cromatografie lichidă de înaltă performanță în fază inversată (procedura HPLC). Ca soluție alternativă, probele sînt analizate direct prin procedura HPLC în fază inversă. Evaluarea rezultatelor se face prin referire la probe etalon formate din lapte praf degresat care conțin sau nu conțin un procent cunoscut de zer praf. Rezultatele mai mari de 1 % (m/m) indică prezența substanțelor solide din zer închegat.

3. Toți reactivii utilizați trebuie să fie 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 sînt descriși în anexa nr. 11 la prezenta Metodologie.

Reactivi pentru HPLC în fază inversată.

1) Soluție de acid tricloroacetic

Se dizolvă 240 g de acid tricloroacetic (CCl_3COOH) în apă și se completează pînă la 1 000 ml. Soluția trebuie să fie limpede și incoloră.

2) Eluanții A și B

Eluantul A: Se introduc într-un balon cotat de 1 000 ml 150 ml acetonitril (CH_3CN), 20 ml izopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) și 1,00 ml de acid trifloroacetic (TFA, CF_3COOH). Se completează cu apă pînă la 1 000 ml.

Eluantul B: Se introduc într-un balon cotat de 1 000 ml 550 ml acetonitril, 20 ml izopropanol și 1,00 ml TFA. Se completează cu apă pînă la 1 000 ml. Soluția eluantă se filtrează înainte de folosire printr-o membrană filtrantă cu pori cu diametrul de 0,45 μm .

3) Conservarea coloanei

După analize, coloana se clătește cu eluantul B (cu un gradient), iar apoi se clătește cu acetonitril (cu un gradient timp de 30 de minute). Coloana se păstrează în acetonitril.

4) Probele etalon

a) Lapte praf degresat care îndeplinește cerințele pentru depozitare publică (respectiv, [0]).

b) Același lapte praf degresat modificat cu 5 % (m/m) zer încheșat praf cu compoziție standard (respectiv [5]).

c) Același lapte praf degresat modificat cu 50 % (m/m) zer încheșat praf cu compoziție standard (respectiv [50]).

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

1) balanță analitică;

2) centrifugă opțională cu o forță de centrifugare de 2 200 g, prevăzută cu tuburi astupate sau acoperite pentru centrifugare 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 hîrtie cu filtrare medie cu diametrul de aproximativ 12,5 cm;

7) dispozitiv de sticlă pentru filtrare prevăzut cu membrană filtrantă cu diametrul porilor de aproximativ 0,45 μm;

8) pipete gradate de 10 ml, sau un sistem prin care pot trece 10,0 ml în două minute;

9) sistem prin care pot trece 20,0 ml de apă la aproximativ 50°C;

10) baie termostat de apă, reglată la $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$;

11) echipament pentru HPLC format din:

a) sistem binar de pompare reglabil;

b) injector, manual sau automat, cu o capacitate de 100 μl;

c) coloană Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (lungime 25 cm, diametru intern 0,46 cm) sau o coloană în fază inversată cu pori mari pe bază de silice echivalentă;

d) cuptor cu coloană termostat, reglat la $35 \pm 1^\circ\text{C}$;

e) detector UV cu lungime de undă variabilă care permite realizarea de măsurători la 210 nm (în cazul în care este necesar se poate folosi o lungime de undă mai mare, de pînă la 220 nm) cu o sensibilitate de 0,02 Å;

f) integrator cu ajutorul căruia se poate realiza integrarea la linia de bază comună sau la linia de bază.

Se poate lucra cu coloana la temperatura camerei, cu condiția ca temperatura să nu varieze cu mai mult de 1°C; în caz contrar, se înregistrează o variație mult prea mare a timpului de retenție al CMP_A .

5. Probele se prelevează conform procedurii descrise de standardul SM SR EN ISO 707.

Probele se depozitează în condiții în care nu poate surveni nici o deteriorare sau modificare a compoziției.

6. Procedura de determinare a substanțelor solide din zer încheșat în laptele praf degresat și în amestecurile ce conțin lapte praf degresat și, după caz,

grăsimi, vitamine, săruri minerale, zaharoză, agenți anticoagulanți și/sau agenți fluidizanți și alți agenți fluidizanți, în special antioxidanți și emulsificatori se realizează în felul următor:

1) Prepararea probei pentru analiză

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

2) Cantitatea analizată

Se cântăresc $2,00 \pm 0,001$ g din proba analizată într-un tub de centrifugare sau într-un balon astupat adecvat (50 ml).

În cazul amestecurilor, se cântărește o anumită cantitate din proba analizată, astfel încât să rezulte o cantitate de probă degresată de 2,00 g.

3) Îndepărtarea grăsimii și a proteinelor

a) Se adaugă 20,0 ml de apă caldă (50 °C) la cantitatea analizată. Se dizolvă laptele praf agitându-se cinci minute sau 30 de minute în cazul zarei acide cu ajutorul unui agitator mecanic. Tubul se introduce în baia de apă și se lasă să se echilibreze la 25 °C.

b) Se adaugă constant 10,0 ml de soluție de acid tricloroacetic la aproximativ 25 °C timp de peste două minute, amestecându-se puternic cu ajutorul unui agitator magnetic. Tubul se introduce într-o baie de apă și se lasă timp de 60 de minute.

c) Se centrifughează 2 200 g timp de 10 minute sau se filtrează prin hîrtie, eliminându-se primii 5 ml de filtrat.

4) Determinarea cromatografică

a) 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 încheșat în cantități detectabile. În cazul în care rezultatul este pozitiv, se aplică procedura HPLC în fază inversată descrisă mai jos. Ca soluție alternativă, se poate aplica direct metoda HPLC în fază inversată. Prezența zarei acide praf poate provoca apariția unor rezultate fals pozitive folosind metoda descrisă în anexa nr. 11. Metoda HPLC în fază inversă exclude această posibilitate.

b) Înainte de realizarea analizei HPLC în fază inversă se optimizează condițiile de gradient. Pentru sistemele reglabile cu un volum mort de aproximativ 6 ml (volum de la punctul în care solvenții se întîlnesc pînă la bucla injectorului inclusiv) timpul de retenție de 26 ± 2 minute pentru CMP_A este optim. Pentru sistemele reglabile cu un volum mort mai mic (de exemplu, 2 ml) timpul optim de retenție este de 22 de minute.

Se recoltează soluții de probă etalon cu și fără 50 % zer încheșat.

Se injectează 100 μl de supranatant sau de filtrat în sistemul HPLC care funcționează în condițiile de gradient de explorare din tabelul 1.

**Condiții de gradient de explorare
pentru optimizarea cromatografiei**

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

Compararea celor două cromatograme trebuie să indice poziția vârfului CMP_A .

Cu ajutorul formulei de mai jos se poate calcula compoziția inițială a solventului care se folosește pentru gradientul normal $\% B = 10 - 2,5 + [13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6] \times 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) \times 1,11$,

unde:

RT_{cmpA} – timpul de retenție al CMP_A la 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 corespunzător punctului de mijloc;

26 – timpul necesar de retenție pentru CMP_A ;

6 – raportul pantelor gradientilor de explorare și normal;

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

27 – timpul de rulare al gradientului de explorare.

c) Prelevarea soluțiilor din probele analizate

Se injectează 100 μ l de supernatant sau filtrat (subpunctul 3) litera c) din prezentul punct), măsurat cu precizie în aparatul HPLC funcționând la un debit de 1,0 ml de soluție eluantă pe minut.

Compoziția eluantului la începutul analizei se obține ca la punctul 6 subpunctul 4) litera b) din prezenta anexă. În mod normal este de aproximativ A:B = 76:24. Imediat după injectare se pornește un gradient liniar, rezultatul fiind un procent al B cu 5 % mai mare peste 27 minute. Apoi se pornește un gradient liniar, datorită căruia, după cinci minute, compoziția eluantului este de 90 % B. Compoziția se menține timp de cinci minute, după care compoziția se modifică în cinci minute, ia un gradient liniar, ajungând la compoziția inițială. În funcție de volumul intern al sistemului de pompare, următoarea injectare se poate face la 15 minute după ce se ajunge la condițiile inițiale.

Timpul de retenție al CMP_A trebuie să fie de 26 ± 2 minute. Acesta se poate obține prin modificarea condițiilor inițiale și finale ale primului gradient. Cu toate acestea, diferența la nivelul % B în condițiile inițiale și finale ale primului gradient trebuie să se mențină la 5 % B.

Eluanții trebuie degazați suficient și trebuie, de asemenea, să se mențină degazați. Acest lucru este esențial pentru buna funcționare a sistemului de

pompare reglabil. Deviația standard a timpului de retenție al vârfului CMP_A trebuie să fie sub 0,1 minute ($n = 10$).

După fiecare cinci probe se injectează proba de referință și se folosește pentru calcularea noului coeficient de răspuns R (punctul 8 subpunctul 1).

d) Rezultatele analizei cromatografice a probei analizate (E) se obțin sub forma unei cromatograme în care vârful CMP_A este identificat pe baza timpului său de retenție de aproximativ 26 minute.

Integratorul calculează automat înălțimea vârfului H pentru vârful CMP_A . Se verifică poziția liniei de bază în fiecare cromatogramă. În cazul în care poziția liniei de bază este incorectă, analiza sau integrarea se repetă.

În cazul în care vârful CMP_A este suficient de bine separat de alte vârfuri, se folosește alocarea liniei de bază tip bază la bază sau, dacă nu, se folosesc perpendiculare trase pe o linie de bază comună, care să aibă punctul de plecare lângă vârful CMP_A . Se folosește pentru etalon și pentru probe același tip de integrare și, în cazul liniei de bază comune, se verifică consistența pentru probe și etalon.

Este extrem de important să se examineze aspectul fiecărei cromatograme înainte de interpretarea cantitativă pentru a se detecta orice eventuale anomalii datorate fie funcționării necorespunzătoare a aparatului sau a coloanelor, fie originii sau naturii probei analizate. În cazul în care există dubii, analiza se repetă.

5) Calibrare

a) se aplică cu exactitate procedura descrisă la punctul 6 subpunctele 2)-4) folosindu-se probele etalon. Se folosesc soluții proaspăt preparate, întrucât CMP se degradează într-un mediu 8 % tricloroacetic la temperatura camerei. La 4 °C soluția este stabilă timp de 24 de ore. Pentru seriile lungi de analize este de preferabil ca în injectorul automat să se folosească o tavă răcită pentru probe.

Punctul 7 subpunctul 4) litera b) se poate omite în cazul în care se cunoaște % B în condițiile inițiale din analizele efectuate anterior.

b) Înainte de determinarea cromatografică a probei se injectează 100 μ l din proba etalon care nu conține zer încheșat [0].

Pe cromatogramă nu trebuie să apară un vârf pentru timpul de retenție al vârfului CMP_A .

c) Se determină coeficientul de răspuns R prin injectarea aceluiași volum de filtrate (litera a) din prezentul subpunct) folosit și în probe.

7. Explicarea rezultatelor se efectuează în felul următor:

1) Metoda de calcul și formula

Calcularea coeficientului de răspuns R:

Vârful CMP_A : $R = W/H$,

unde:

R – coeficientul de răspuns al vârfului CMP_A ;

H – înălțimea vârfului CMP_A ;

W – cantitatea de zer din proba etalon.

2) Calcularea procentului de zer încheșat praf din probă

$$W(E) = R \times H(E),$$

unde:

$W(E)$ – procentul (m/m) de zer încheat în proba (E);

R – coeficientul de răspuns al vârfului CMP_A (subpunctul 1);

$H(E)$ – înălțimea vârfului CMP_A al probei (E).

În cazul în care $W(E)$ este mai mare de 1 % și diferența dintre timpul de retenție și cel al probei etalon este mai mic de 0,2 minute, atunci sînt prezente substanțe solide din zer încheat.

3) Precizia metodei

a) Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate simultan sau în cel mai scurt interval de timp posibil de același operator care utilizează aceeași aparatură pe material de analiză identic nu trebuie să depășească 0,2 % m/m.

b) Reproductibilitate

Nedeterminată.

c) Liniaritate

De la 0 la 16 % zer încheat se obține o relație de liniaritate cu un coeficient de corelare $> 0,99$.

Anexa nr. 13
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

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

Metoda: HPLC în fază inversă.

1. Această metodă descrie o procedură de determinare cantitativă a fosfatidilserinei (PS) și a fosfatidiletanolaminei (PE) din laptele praf degresat (SMP) și este adecvată pentru determinarea substanțelor solide din zară din SMP.

2. Conținutul de PS + PE reprezintă fracțiunea de masă a substanței determinate prin procedura descrisă în prezenta anexă. Rezultatul se exprimă în miligrame de dipalmitoil fosfatidiletanolamină (PEDP) în 100 g praf.

3. Extragerea aminofosfolipidelor cu metanol din lapte praf reconstituit. Determinarea PS și PE ca derivați ai o-ftaldialdehidei (OPA) prin HPLC în fază inversă (RP) și prin detectare prin fluorescență. Cuantificarea conținutului de PS și PE din proba analizată prin referire la o probă etalon conținând o cantitate cunoscută de PEDP.

4. Toți reactivii utilizați trebuie să fie de calitate analitică recunoscută. Apa utilizată trebuie să fie apă distilată sau apă de o puritate cel puțin echivalentă, cu excepția cazurilor în care se precizează altceva.

1) Material etalon: PEDP, cu o puritate de cel puțin 99 %
Materialul etalon se depozitează la 18 °C.

2) Reactivi pentru prepararea probei etalon și a probei pentru analiză

a) Metanol de calitate HPLC

b) Cloroform de calitate HPLC

c) Monoclorhidrat de triptamină

3) Reactivi pentru derivarea o-ftaldialdehidei

a) Hidroxid de sodiu, soluție de apă 12 M

b) Acid boric, soluție de apă 0,4 M ajustată cu hidroxid de sodiu până la un pH de 10,0

c) 2-mercaptetanol

d) o-ftaldialdehidă (OPA)

4) Solvenți de eluare HPLC

a) La prepararea solvenților de eluare se folosesc reactivi de calitate HPLC

b) Apă de calitate HPLC

c) Metanol cu puritate fluorimetrică testată

d) Tetrahidrofuran

e) Fosfat monosodic

f) Acetat de sodium

g) Acid acetic

5. Aparatură de laborator:

- 1) Balanță analitică cu o capacitate de cântărire avînd o precizie de 1 mg, cu o capacitate de citire de 0,1 mg
- 2) Pahare de laborator cu capacitate de 25 și 100 ml
- 3) Pipete cu o capacitate de 1 și 10 ml
- 4) Agitator magnetic
- 5) Pipete gradate cu o capacitate de 0,2, 0,5 și 5 ml
- 6) Baloane cotate cu capacitate de 10, 50 și 100 ml
- 7) Seringi cu capacitate de 20 și 100 μ l
- 8) Baie ultrasonic
- 9) Centrifugă care poate opera la $27\ 000 \times g$
- 10) Firole de sticlă cu capacitate de aproximativ 5 ml
- 11) Cilindru gradat cu capacitate de 25 ml
- 12) Aparat de măsurare a pH-ului cu o precizie de 0,1 unități pH
- 13) Echipament HPLC
 - a) Sistem de pompare reglabil care poate funcționa la 1,0 ml/min. la 200 bari
 - b) Aparat de prelevare automată de probe cu posibilitate de derivare
 - c) Încălzitor de coloană care poate menține coloana la o temperatură de $30\ ^\circ\text{C} \pm 1\ ^\circ\text{C}$
 - d) Detector de fluorescență care poate opera la o lungime de undă de excitare de 330 nm și la o lungime de undă de emisie 440 nm
 - e) Integrator sau software de procesare de date care poate măsura suprafața vîrfului
 - f) Licrosferă – 100 coloană (250 \times 4,6 mm) sau o coloană echivalentă umplută cu octadecilsilan (C 18) cu particule de 5 μ m

6. Prelevarea probelor se realizează conform standardului SM SR EN ISO 707.

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

- 1) Prepararea soluției etalon intern
 - a) Se cântăresc $30,0 \pm 0,1$ mg de monoclorhidrat de triptamină într-un balon cotat de 100 ml și se completează cu metanol pînă la marcaj.
 - b) Se pipetează 1 ml din această soluție într-un balon cotat de 10 ml și se completează cu metanol pînă la marcaj pentru a se obține o concentrație de triptamină de 0,15 mM.
- 2) Prepararea soluției din proba pentru analiză
 - a) Se cântăresc $1,000 \pm 0,001$ g din proba de SMP într-un pahar de laborator de 25 ml. Se adaugă cu o pipetă 10 ml de apă distilată cu temperatura de $40\ ^\circ\text{C} \pm 1\ ^\circ\text{C}$ și se amestecă cu un agitator magnetic timp de 30 de minute pentru a se dizolva toate cocoloașele.
 - b) Se pipetează 0,2 ml din laptele reconstituit într-un balon cotat de 10 ml, se adaugă 100 μ l din soluția de triptamină de 0,15 mM cu ajutorul unei seringi și

se completează la volum cu metanol. Se amestecă cu grijă prin răsturnare și se sonichează timp de 15 minute.

c) Se centrifughează la 27 000 g × g timp de 10 minute și se colectează supranatantul într-o fiolă de sticlă.

Soluția probă se depozitează la 4 °C pînă la finalizarea analizei HPLC.

3) Prepararea soluției etalon extern

a) Se cîntăresc 55,4 g de PEDP într-un balon cotat de 50 ml și se adaugă aproximativ 25 ml de cloroform cu ajutorul unui cilindru gradat. Se încălzește balonul astupat la 50 °C ± 1 °C și se amestecă cu atenție pînă cînd se dizolvă PEDP. Balonul se răcește la 20 °C și se completează la volum cu metanol și amestecă prin răsturnare.

b) Se pipetează 1 ml din această soluție într-un balon cotat de 100 ml și se completează la volum cu metanol. Se pipetează 1 ml din această soluție într-un balon cotat de 10 ml și se adaugă 100 μl de soluție de triptamină de 0,15 mM (subpunctul 1) din prezentul punct) și se completează la volum cu metanol. Se amestecă prin răsturnare.

Soluția probă de referință se depozitează la 4 °C pînă la finalizarea analizei HPLC.

4) Prepararea reactivului de derivare

Se cîntăresc 25,0 ± 0,1 mg de OPA într-un balon cotat de 10 ml și se adaugă 0,5 ml de metanol și se amestecă cu atenție pentru ca OPA să se dizolve. Se completează pînă la marcaj cu soluție de acid boric și se adaugă 20 μl de 2-mercaptetanol cu o seringă.

Reactivul de derivare se depozitează la 4 °C într-o fiolă brună, rămînînd stabil timp de o săptămînă.

5) Determinarea prin HPLC

a) Solvenți de eluare

Solventul A: Soluție 0,3 mM de fosfat monosodic și 3 mM de soluție de acetat de sodiu (ajustată cu acid acetic la un pH de 6,5 ± 0,1):metanol:tetrahidrofuran = 558:440:2 (v/v/v).

Solventul B: metanol.

b) Gradient de eluare recomandat:

| Timp (min.) | Solventul A (%) | Solventul B (%) | Debit (ml/min.) |
|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Inițial | 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 să fie nevoie de o ușoară modificare a gradientului de eluare pentru a se obține rezoluția din figura 1.

Temperatura coloanei: 30 °C.

c) Volumul injectat: 50 μl reactiv de derivare și 50 μl soluție probă.

d) Echilibrarea coloanei

Sistemul se pornește în fiecare zi, se clătește coloana cu solvent B 100 % timp de 15 minute, apoi se reglează la A:B = 40:60 și se echilibrează la 1 ml/min. timp de 15 minute. Se lucrează cu o probă martor injectându-se metanol.

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

e) Se determină conținutul de PS + PE din proba analizată.

f) Se realizează secvența de analize cromatografice lăsându-se un timp constant între seriile de analize pentru a se obține timpi de reținere constanți. Soluția etalon extern se injectează la fiecare 5-10 soluții probă pentru a se calcula coeficientul de răspuns

Coloana se curăță prin clătire cu solvent B 100 % (litera a) din prezentul subpunct) timp de cel puțin 30 de minute la fiecare 20-25 de serii.

6) Modul de integrare

a) Vîrfurile PEDP

PEDP este eluat ca un singur vîrf (figura 1). Se determină suprafața vîrfului prin integrare la linia de bază.

b) Vîrfurile triptaminei

Triptamina este eluată ca un singur vîrf (figura 1). Suprafața vîrfului se determină prin integrare la linia de bază.

c) Grupurile de vîrfuri ale PS și PE

În condițiile descrise (figura 1), PS eluează sub forma a două vîrfuri principale parțial fără rezoluție, precedate de un vîrf minor. PE eluează sub forma a trei vîrfuri principale parțial fără rezoluție. Se determină întreaga suprafață a fiecărei aglomerări de vîrfuri, stabilindu-se linia de bază ca în figura 1.

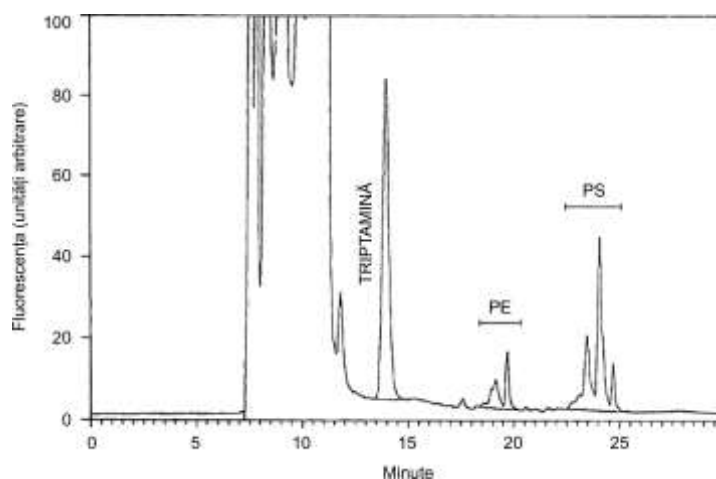


Figura 1. Model HPLC al derivațiilor OPA ai fosfatidilserinei (PS) și ai fosfatidiletanolamidei (PE) în extractul de metanol al laptelui praf reconstituit

8. Conținutul de PS și PE din proba analizată se calculează după cum urmează:

$$C = 55,36 \times [(A_2)/(A_1)] \times [(T_1)/(T_2)],$$

unde:

C – conținutul de PS sau PE (mg/100 g praf) din proba analizată;

A₁ – suprafața vârfului PEDP din soluția etalon din probă (punctul 7 subpunctul 3);

A₂ – suprafața vârfului PS sau PE din soluția din probă (punctul 7 subpunctul 2);

T₁ – suprafața vârfului triptaminei din soluția etalon din probă (punctul 7 subpunctul 3);

T₂ – suprafața vârfului triptaminei din soluția din probă (punctul 7 subpunctul 2).

9. Precizia metodei rezultă din valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate:

1) Repetabilitate

Derivația standard relativă a repetabilității, care exprimă variabilitatea rezultatelor independente de analiză obținute de același operator care folosește aceeași aparatură în aceleași condiții și probe pentru analiză identice într-un interval scurt de timp, nu trebuie să depășească relativ 2 %. În cazul în care se obțin două determinări în aceste condiții, diferența relativă dintre cele două rezultate nu trebuie să fie mai mare de 6 % din media aritmetică a rezultatelor.

2) Reproducibilitate

În cazul în care se realizează două determinări de către operatori din laboratoare diferite care folosesc aparatură diferită în condiții diferite și aceeași probă pentru analiză, diferența relativă dintre cele două rezultate nu trebuie să fie mai mare de 11 % din media aritmetică a rezultatelor.

Anexa nr. 14
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

Detectarea reziduurilor antimicrobiotice în laptele praf degresat

Se folosește un test de selecție al unui inhibitor microbial în care se folosește *Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis* ca microorganism de test și care este suficient de sensibil pentru a detecta 4 μg benzilpenicilină per kg de lapte și 100 μg sulfamidină per kg de lapte. Sînt disponibile și se pot folosi kituri comerciale pentru analize în cazul în care acestea au sensibilitatea necesară la benzilpenicilină și sulfamidină.

Pentru analiză, se folosește lapte praf degresat reconstituit (1 g praf +9 ml apă distilată). Testul se realizează în conformitate cu standardul SM ISO/TS 26844:2015 sau în conformitate cu instrucțiunile producătorului kitului pentru analize.

Rezultatele pozitive se interpretează după cum urmează:

1. Prezența β-lactamilor poate fi confirmată prin repetarea analizei, adăugîndu-se penicilază în sistemul de analiză:

Rezultat negativ: Substanța inhibitoare este un antibiotic β-lactam.

Rezultatul pozitiv rămîne: Substanța inhibitoare nu poate fi identificată prin această procedură, se continuă cu 2.

2. Prezența sulfamidelor poate fi confirmată prin repetarea analizei, adăugîndu-se acid p-aminobenzoic în sistemul de analiză:

Rezultat negativ: Substanța inhibitoare este o sulfamidă.

Rezultatul pozitiv rămîne: Substanța inhibitoare nu poate fi identificată prin această procedură, se continuă cu 3.

3. Prezența combinației dintre β-lactam și sulfamidă poate fi confirmată prin repetarea analizei, adăugîndu-se penicilinază + acid p-aminobenzoic în sistemul de analiză:

Rezultat negativ: Substanțele inhibitoare sînt un antibiotic β-lactam și o sulfamidă.

Rezultat pozitiv: Substanța inhibitoare nu poate fi identificată prin această procedură.

Anexa nr. 15
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

**Determinarea cantitativă a laptelui praf degresat în furajele
combinat prin coagularea enzimatică a paracazeinei**

1. Scopul metodei este determinarea cantitativă a laptelui praf degresat în furajele combinate prin coagularea enzimatică a paracazeinei.

2. Această metodă se aplică furajelor combinate conținând cel puțin 10 % lapte praf degresat; prezența unor cantități mari de zară și/sau de anumite proteine care nu provin din lapte pot duce la apariția unor interferențe.

3. Principiul metodei constă în:

1) dizolvarea cazeinei conținute în furajele combinate prin extragere cu soluție de citrat de sodiu;

2) ajustarea concentrației de ioni de calciu la nivelul necesar pentru precipitarea paracazeinei se realizează prin adăugarea de cheag;

3) conținutul de azot al precipitatului de paracazeină se determină prin metoda Kjeldahl, așa cum este descrisă în standardul SM EN ISO 8968-1:2014; cantitatea de lapte praf degresat se calculează pe baza unui conținut minim de cazeină de 27,5 % (punctul 8).

4. Toți reactivii utilizați trebuie să fie de calitate analitică recunoscută. Apa utilizată trebuie să fie apă distilată sau apă de o puritate cel puțin echivalentă. Cu excepția cheagului, toți reactivii și toate soluțiile trebuie să nu conțină substanțe azotate.

1) Citrat trisodic (soluție 1 % m/v)

2) Clorură de calciu (aproximativ 5 M de soluție)

Se dizolvă 75 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ în 100 ml de apă distilată prin scuturare (se acordă atenție reacției exotermice). Soluția se lasă peste noapte și apoi se filtrează. Soluția se păstrează în refrigerator.

3) Hidroxid de sodiu 0,1 N

4) Acid clorhidric 0,1 N

5) Cheag lichid de vițel (tărie de aproximativ 100 IMCU/ml). Se păstrează în refrigerator la 4-6 °C.

6) Reactivii pentru determinarea cantitativă a azotului în conformitate cu metoda Kjeldahl descrisă în standardul SM EN ISO 8968-1:2014

5. Aparatură obișnuită de laborator ce cuprinde:

1) mojar sau omogenizator;

2) balanță analitică cu o capacitate de cântărire avînd o precizie de 1 mg, cu o capacitate de citire de 0,1 mg;

3) centrifugă de masă (500 g sau 2 000-3 000 rpm) cu tuburi de 50 ml și 2 000 g;

4) agitator magnetic (10-15 mm) cu minimagneți;

- 5) pahare de laborator de 150-200 ml;
- 6) baloane de 250 și 500 ml;
- 7) conducte de sticlă cu diametru de 60-80 mm;
- 8) filtre fără cenușă cu filtrare rapidă cu diametrul de 150 mm;
- 9) pipete cu diverse volume nominale;
- 10) Baie de apă cu termostat la $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 11) aparat de măsurare a pH-ului cu o precizie de 0,1 unități;
- 12) termometre cu o precizie de $1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6. Procedura de determinare cantitativă a laptelui praf degresat în furajele combinate prin coagularea enzimatică a paracazeinei se realizează în felul următor:

1) Prepararea probei

Se zdrobesc în mojar sau se omogenizează în rîșniță 10-20 g din probă pentru a se obține un amestec omogen.

2) Dizolvarea laptelui praf și separarea rezidului insolubil

a) Se cîntăresc $1,000 \pm 0,002$ g de furaje combinate bine omogenizate direct într-un tub de centrifugare de 50 ml. Se adaugă 30 ml de soluție de citrat trisodic încălzit în prealabil la $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se amestecă timp de cel puțin cinci minute cu ajutorul unui agitator magnetic sau prin scuturare puternică cu mîna.

b) Se centrifughează la 500 g (2 000-3 000 rpm) timp de 10 minute și se decantează cu atenție supranatantul apos limpede într-un pahar de laborator de 150-200 ml, pentru a nu se pierde material.

c) Se realizează încă două extrageri de reziduu prin aceeași procedură și se adaugă extractele la primul.

d) În cazul în care se formează un strat de ulei la suprafață, se răcește în refrigerat pînă cînd grăsimile se solidifică și se îndepărtează stratul solid cu o spatulă.

3) Coagularea cazeinei cu enzime din cheag

a) Se amestecă continuu și se adaugă prin picurare 2 ml de clorură de calciu la întregul extract apos (aproximativ 100 ml). Se ajustează pH-ul la 6,4-6,5 cu soluții de NaOH sau de HCl. Se introduce în baia de apă controlată prin termostat la $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de 15-20 minute pentru a se obține un echilibru salin. Acesta este indicat de o ușoară tulburare.

b) Lichidul se transferă într-un tub de centrifugare și se centrifughează la 2 000 g timp de 10 minute pentru a se îndepărta substanțele precipitate. Se transferă supranatantul, fără a se spăla sedimentul, în alt tub de centrifugare.

c) Supranatantul se aduce din nou la temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. În timp ce se amestecă extractul, se adaugă prin picurare 0,5 ml de cheag lichid. Coagularea se produce în două minute.

d) Proba se introduce din nou în baia de apă și se lasă la o temperatură de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de 15 minute. Proba se scoate din baie, iar coagulul se sparge prin amestecare. Se centrifughează la 2 000 g timp de 10 minute. Se filtrează supranatantul printr-o hîrtie de filtru adecvată și se păstrează hîrtia de filtru.

Precipitatul se clătește în tubul de centrifugare cu 50 ml de apă la aproximativ 35 °C, amestecându-se precipitatul.

Se centrifughează din nou la 2 000 g timp de 10 minute. Supranatantul se filtrează prin hîrtia de filtru păstrată.

4) Determinarea azotului din cazeină

După clătire, precipitatul se transferă cantitativ în hîrtia de filtru rămasă de la punctul 6 subpunctul 3 litera d) cu ajutorul apei distilate. Hîrtia de filtru uscată se transferă în balonul Kjeldhal. Se determină azotul prin metoda Kjeldahl în conformitate cu standardul SM EN ISO 8968-1:2014.

7. Se efectuează cîte un test cu probă martor supusă la mineralizare prin metoda Kjeldhal în conformitate cu standardul SM EN ISO 8968-1:2014, folosindu-se o hîrtie de filtru fără cenușă umezită cu un amestec de 90 ml de soluție de citrat de sodiu, 2 ml soluție de clorură de calciu, 0,5 ml de cheag lichid și spălat cu 3 × 15 ml de apă distilată.

Volumul de acid folosit pentru testul cu probă martor se ia din volumul de acid folosit pentru titrarea probei.

8. Procentul de lapte praf concentrat din furajul combinat se calculează cu ajutorul formulei de mai jos:

$$\%SMP = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100\right) - 2,81}{0,908},$$

unde:

N – procentul de azot din para-cazeină;

27,5 – coeficientul de transformare a cazeinei determinate în procentul de lapte praf degresat;

2,81 și 0,908 – coeficienții de corecție obținuți prin analiza regresiei.

9. Precizia metodei rezultă din valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate:

1) Repetabilitate

Analiza probelor martor pentru aceeași probă realizată de același operator în același laborator trebuie să dea rezultate echivalente cu cele pentru o cantitate nu mai mare de 2,3 g de lapte praf degresat în 100 g de furaj combinat.

2) Reproductibilitate

În cel puțin 95 % din cazurile studiate, analiza probelor martor pentru aceeași probă realizată de două laboratoare trebuie să dea rezultate echivalente cu cele pentru o cantitate nu mai mare de 6,5 g de lapte praf degresat în 100 g de furaj combinat.

10. Pe parcursul procedurii pot apărea următoarele situații:

1) Adăugarea unor procente mari de proteine care nu provin din lapte și, în special, de proteine din soia care sînt încălzite împreună cu laptele praf degresat poate genera rezultate prea mari din cauza coprecipitării cu paracazeina din lapte.

2) Adăugarea de zară poate duce la obținerea unor cifre mai mici din cauza faptului că se determină numai cantitatea fără grăsime. Adăugare de zară acidă

poate genera rezultate considerabil mai mici din cauza dizolvării incomplete în soluția de citrat.

3) Adăugarea de 0,5 % sau mai multă lecitină poate, de asemenea, genera rezultate cu valori mici.

4) Încorporarea de lapte praf degresat tratat la temperaturi înalte poate genera obținerea de valori prea mari din cauza coprecipitării anumitor proteine cu paracazeina din lapte.

Anexa nr. 16
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

**Detectarea amidonului din laptele praf degresat,
laptele praf denaturat și furajele combinate**

1. Prin această metodă se detectează amidonul utilizat ca marcator în laptele praf denaturat.

Limita de detectare a metodei este de aproximativ 0,05 g de amidon în 100 g de probă.

2. Reacția se bazează pe cea folosită în iodometrie:

1) fixarea iodului liber din soluție apoasă de către coloizi;

2) absorbția de către miceliile de amidon și prin colorare.

3. Reactivii utilizați sînt:

Soluție de iod

1) iod – 1,0 g;

2) iodură de potasiu - 2,0 g;

3) apă distilată - 100 ml.

Se dizolvă 1,0 g de iod și 2,0 g de iodură de potasiu în apă, într-un balon cotat de 100 ml cu un singur marcaj. Se diluează cu apă pînă la marcajul de 100 ml.

4. Aparatură de laborator:

1) balanță analitică;

2) baie de apă care fierbe;

3) eprubete, 25 mm × 200 mm.

5. Se cîntărește 1,0 g din probă cu o precizie de 0,1 g și se transferă într-o eprubetă.

Se adaugă 20 ml de apă distilată și se amestecă pentru a se dispersa proba.

Se introduce în baia de apă și se lasă timp de 5 minute.

Se scoate din baia de apă și se răcește la temperatura camerei.

Se adaugă 0,5 ml de soluție de iod și se amestecă, observîndu-se culoarea rezultată.

6. Culoarea albastră indică prezența amidonului natural în probă.

În cazul în care proba conține amidon modificat, poate rezulta o altă culoare decît albastru.

7. Culoarea, intensitatea culorii și aspectul observat la microscop al amidonului variază în funcție de originea amidonului natural (de exemplu, porumb sau cartof) și de tipul de amidon modificat din probă.

În prezența amidonului modificat, culoarea rezultată este violet, roșu sau maro, în funcție de amploarea modificării din structura cristalină a amidonului natural.

Anexa nr. 17
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

Determinarea conținutului umed în smântîna deshidratată

1. Prezenta anexă precizează o metodă de determinare a conținutului umed în smântîna deshidratată.

2. Conținutul umed reprezintă pierderea de masă determinată prin procedura specificată în prezenta Metodologie.

Acesta este exprimat ca procent de masă.

3. Uscarea unei cantități analizate la 102 ± 2 °C pînă se obține o masă constantă și cîntărirea în vederea determinării pierderii de masă.

4. Aparatură obișnuită de laborator, în special următoarele:

1) balanță analitică cu o capacitate de cîntărire avînd o precizie de 1 mg, cu o capacitate de citire de 0,1 mg;

2) cuptor de uscare, bine ventilat, care poate fi menținut prin termostat la 102 ± 2 °C în întregul spațiu de lucru;

3) desicator, prevăzut cu silicagel proaspăt uscat cu indicator higroscopic sau un alt desicat eficace;

4) vase cu fundul plat, avînd o adîncime de aproximativ 25 mm, cu diametru de aproximativ 50 mm, confecționate dintr-un material adecvat (de exemplu, sticlă, oțel inoxidabil, nichel sau aluminiu), prevăzute cu capace potrivite și ușor de desfăcut;

5) sticle cu dopuri etanșe, pentru amestecarea probelor de laborator.

5. Proba primită în laborator nu trebuie să fie deteriorată sau modificată în timpul transportului sau pe durata depozitării.

Prelevarea probelor nu face parte din metoda specificată în prezenta Metodologie. În standardul SM SR EN ISO 707 este prezentată metoda recomandată de prelevare a probelor.

Probele se depozitează în condiții în care nu poate surveni nici o deteriorare sau modificare a compoziției.

6. Se amestecă proba cu grijă prin scuturarea și răsturnarea repetată a recipientului (în cazul în care este necesar, după transferarea tuturor probelor pentru analiză într-un recipient etanș cu o capacitate suficientă care să permită realizarea acestei operații).

În cazul în care nu se obține omogenizarea completă prin această procedură, se iau cantitățile analizate (pentru două determinări separate) din proba pregătită la două puncte situate cît mai departe posibil unul de celălalt.

7. Procedura de determinare a conținutului umed în smântîna deshidratată se realizează în felul următor:

1) Prepararea vasului

a) Se încălzesc un vas neacoperit și capacul acestuia în cuptor, reglat la 102 ± 2 °C, timp de cel puțin o oră.

b) Se așază capacul pe vas și se transferă vasul acoperit în desicator; se lasă să se răcească la temperatura sălii de balanțe și se cântărește cu o precizie de 1 mg, înregistrând greutatea la 0,1 mg.

2) Cantitatea analizată

Se transferă aproximativ 1-3 g din proba pregătită în vas, se acoperă cu capacul și se cântărește cu o precizie de 1 mg, înregistrând greutatea la 0,1 mg.

3) Determinare

a) Se descoperă vasul și se așază împreună cu capacul acestuia în cuptor, reglat la 102 ± 2 °C, timp de două ore.

b) Se reaşază capacul și se transferă vasul acoperit în desicator; se lasă să se răcească la temperatura sălii de balanțe și se cântărește cu o precizie de 1 mg, înregistrând greutatea la 0,1 mg.

c) Se descoperă vasul și se încălzește din nou, împreună cu capacul, în cuptor, timp de o oră. Se repetă apoi operația de la litera b) din prezentul subpunct.

d) Se repetă procedura de încălzire și cântărire pînă cînd masa scade cu 1 mg sau mai puțin sau crește între două cântăriri succesive.

Se folosește pentru calcule cea mai mică masă înregistrată.

8. Conținutul umed, exprimat în g/100 g, este egal cu:

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100,$$

unde:

m_0 – masa vasului și a capacului exprimată în grame (punctul 7 subpunctul 1, litera b));

m_1 – masa vasului, a capacului și a cantității analizate exprimată în grame înainte de uscare (punctul 7 subpunctul 2);

m_1 – masa vasului, a capacului și a cantității analizate exprimată în grame după uscare (punctul 7 subpunctul 3) litera d)).

Rezultatul se raportează cu două zecimale.

9. Precizia metodei rezultă din valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate:

1) Repetabilitate

Diferența absolută dintre rezultatele a două determinări separate, obținute prin aceeași metodă cu material de analiză identic, în același laborator, de către același operator, folosind aceeași aparatură, într-un interval scurt de timp, va depăși în nu mai mult de 5 % din cazuri 0,20 g de conținut umed per 100 g de produs.

2) Reproductibilitate

Diferența absolută dintre rezultatele a două determinări separate, obținute prin aceeași metodă cu material de analiză identic, în laboratoare diferite, de

către operatori diferiți, folosind aparatură diferită, va depăși în nu mai mult de 5 % din cazuri 0,40 g de conținut umed per 100 g de produs.

10. Raportul de analiză specifică:

- 1) toate informațiile necesare pentru identificarea completă a probei;
- 2) metoda de prelevare a probelor, dacă aceasta este cunoscută;
- 3) metoda de analiză folosită în conformitate cu prezentul standard internațional;

- 4) toate detaliile de funcționare care nu sînt specificate în prezentul standard internațional sau sînt considerate opționale, alături de detalii asupra oricăror incidente care ar fi putut influența rezultatul (rezultatele);

rezultatul (rezultatele) de analiză obținut(e) și, în cazul în care repetabilitatea a fost verificată, rezultatul final obținut menționat anterior.

Anexa nr. 18
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

Determinarea umidității în zara praf acidă

1. Prezenta anexă precizează o metodă de determinare a conținutului de umiditate din zara praf acidă destinată inițial furajelor.

2. Proba se usucă în vid. Pierderea de masă se determină prin cântărire.

3. Aparatură de laborator:

1) Balanță analitică cu o capacitate de cântărire avînd o precizie de 1 mg, cu o capacitate de citire de 0,1 mg.

2) Vase din metal care nu se corodează sau de sticlă cu capace etanșe la aer; o suprafață de lucru care să permită întinderea probei la aproximativ $0,3 \text{ g/cm}^2$.

3) Cuptor electric reglabil cu vid prevăzut cu pompă de ulei și cu un mecanism de introducere a aerului uscat fierbinte printr-un turn conținînd, de exemplu, oxid de calciu sau sulfat de calciu (conținînd indicator de umiditate).

4) Desicator cu agent de uscare eficient.

5) Cuptor de uscare ventilat cu temperatura controlată de un termostat la $102 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

4. Se încălzesc un vas și capacul acestuia în cuptor timp de cel puțin o oră. Se așază capacul pe recipient și se transferă imediat în desicator; se lasă să se răcească la temperatura camerei și se cântărește cu o precizie de 1 mg, înregistrînd masa la 0,1 mg.

Se descoperă vasul, se transferă aproximativ 5 g din probă în vas și se cântărește cu o precizie de 1 mg, înregistrînd masa la 0,1 mg. Se așază vasul împreună cu capacul în cuptorul cu vid preîncălzit la $83 \text{ }^\circ\text{C}$. Pentru a împiedica scăderea temperaturii din cuptor la o valoare inacceptabilă, vasul se introduce în cuptor cît mai rapid posibil.

Se mărește presiunea pînă la 100 Torr (13,3 kPa) și se lasă să se usuce la o masă constantă (timp de aproximativ patru ore) la această presiune într-un curent de aer fierbinte și uscat.

Timpul de uscare se calculează din momentul în care temperatura cuptorului revine la $83 \text{ }^\circ\text{C}$. Presiunea cuptorului se reduce cu grijă pînă la nivelul presiunii atmosferice. Se deschide cuptorul, vasul se acoperă imediat cu capacul, se scoate vasul din cuptor și se lasă să se răcească în desicator timp de 30-45 minute și se cântărește cu o precizie de 1 mg, înregistrînd masa la 0,1 mg. Se usucă timp de încă 30 de minute în cuptorul cu vid la $83 \text{ }^\circ\text{C}$ și se cântărește din nou. Se repetă procedura de încălzire și cântărire pînă cînd masa vasului și a capacului scade cu 1 mg sau mai puțin sau crește între două cântăriri succesive. Se folosește pentru calcule cea mai mică masă înregistrată.

5. Calcularea umidității:

$$\% \text{ Umiditate} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100 \%,$$

unde:

m_0 – masa vasului și a capacului;

m_1 – masa recipientului, a capacului și a cantității analizate înainte de uscare;

m_2 – masa recipientului, a capacului și a cantității analizate după uscare.

Rezultatele se înregistrează cu o precizie de 0,1 g/100 g.

6. Precizia metodei rezultă din valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate:

1) Limita de repetabilitate

Diferența absolută dintre rezultatele a două determinări separate, obținute prin aceeași metodă cu material de analiză identic, în același laborator, de către același operator, folosind aceeași aparatură, într-un interval scurt de timp, va depăși, în nu mai mult de 5 % din cazuri, 0,4 g de apă/100 g de zară praf.

2) Limita de reproductibilitate

Diferența absolută dintre rezultatele a două determinări separate, obținute prin aceeași metodă cu material de analiză identic, în laboratoare diferite, de către operatori diferiți, folosind aparatură diferită, va depăși, în nu mai mult de 5 % din cazuri, 0,6 g de apă/100 g de zară praf acidă.

Anexa nr. 19
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

**Metoda de referință pentru determinarea purității grăsimilor
din lapte prin analiza cromatografică în fază gazoasă a trigliceridelor**

1. Prezenta Metodologie descrie o metodă de referință pentru determinarea purității grăsimii din lapte utilizând analiza cromatografică în fază gazoasă a trigliceridelor. Pot fi detectate atât grăsimile vegetale, cât și cele animale, cum ar fi seul de vită și untura.

Cu ajutorul anumitor formule pentru trigliceride se poate determina integritatea grăsimilor din lapte. În principiu, metoda descrisă se aplică laptelui de vacă în vrac sau produselor derivate din acesta, indiferent de condițiile de hrănire, reproducere sau lactație. Rezultatele fals pozitive pot să apară doar în cazul hrănirii excesive cu uleiuri vegetale pure, cum ar fi uleiul de rapiță. De asemenea, produsele de lapte obținute de la fiecare vacă în parte pot produce rezultate fals pozitive.

Metoda este aplicabilă în special grăsimilor extrase din produsele de lapte care ar trebui să conțină grăsimi pure din lapte a căror compoziție este nemodificată, cum ar fi untul, smântâna, laptele și laptele praf. Tratatamentul tehnologic al grăsimilor din lapte, cum ar fi eliminarea colesterolului sau fracționarea, poate produce rezultate fals pozitive. Acest lucru se aplică și în cazul grăsimii din lapte obținută din laptele degresat sau zară. Metoda nu este întotdeauna aplicabilă pentru grăsimea extrasă din brânză, deoarece procesul de maturare poate afecta compoziția grăsimii atât de mult încât se obțin rezultate fals pozitive.

Acidul butiric (n-butanoic) (C_4) apare exclusiv în grăsimile din lapte și permite realizarea estimării cantitative a cantităților mici pînă la cele medii de grăsimi din lapte în grăsimile vegetale și animale. Totuși, datorită variațiilor mari ale C_4 în procente aproximative ale intervalului fracțiunii de masă de 3,1 % și 3,8 %, este dificil de furnizat informații calitative și cantitative referitoare la fracțiunile de masă de pînă la 20 % ale grăsimilor străine din grăsimile pure din lapte.

Practic, rezultatele cantitative nu pot fi obținute din conținutul de steroli al grăsimilor vegetale, deoarece acestea depind de condițiile de producție și de prelucrare. Mai mult, determinarea calitativă a grăsimilor vegetale cu ajutorul sterolilor este ambiguă.

2. Puritatea grăsimii din lapte se definește ca absența grăsimilor vegetale sau animale, determinate cu ajutorul procedurii specificate în prezenta Metodologie.

Puritatea este determinată cu ajutorul valorilor S care sînt obținute din compoziția trigliceridelor. Frațiunile de masă ale trigliceridelor sînt exprimate procentual.

3. Grăsimea extrasă din lapte sau produse de lapte este analizată prin gaz-cromatografie cu ajutorul unei coloane umplute sau al unei coloane capilare scurte în scopul determinării trigliceridelor (TG) care sînt separate prin numărul total de atomi de carbon. Prin introducerea fracțiunii de masă a moleculelor de grăsime de diferite dimensiuni (C_{24} pînă la C_{54} , utilizînd doar numere pare pentru atomii de C), exprimată procentual, în formule adecvate pentru trigliceride, se pot calcula valorile S. Prezența grăsimilor străine este detectată dacă valorile S depășesc limitele stabilite pentru grăsimile pure din lapte.

Valoarea S este suma tuturor fracțiunilor de masă a TG, înmulțită cu coeficienții respectivi definiți.

4. Reactivi utilizați sînt:

1) gaz vector: azot sau, ca alternativă, heliu sau hidrogen, avînd toate o puritate de cel puțin 99,995 %;

2) grăsimi standard pentru standardizarea unei grăsimi standard din lapte în conformitate cu punctul 7 subpunctul 3:

a) trigliceride etalon saturate; în comerț sînt disponibile produse adecvate;

b) colesterol etalon;

3) metanol (CH_3OH), fără apă;

4) n-hexan ($CH_3(CH_2)_4CH_3$);

5) n-heptan ($CH_3(CH_2)_5CH_3$);

6) alte gaze: hidrogen, puritate de cel puțin 99,995 %, fără impurități organice ($C_nH_m < 1 \mu l/l$); aer sintetic, fără impurități organice ($C_nH_m < 1 \mu l/l$);

7) sulfat de sodiu anhidru (Na_2SO_4).

5. Aparatură de laborator:

1) Gaz-cromatograf pentru temperatură înaltă

Gaz-cromatograf pentru temperatură înaltă trebuie să fie adecvat pentru temperaturi de cel puțin 400 °C și să fie prevăzut cu detector cu ionizare în flacără. Pereții despărțitori utilizați pentru injector trebuie să reziste la temperaturi înalte și trebuie să prezinte un grad foarte scăzut de „curgere”. Pentru gaz-cromatograf (GC) cu coloane capilare, se folosește un injector pentru coloane. Întotdeauna se utilizează garnituri de grafit pentru a conecta atît coloanele, cît și injectorul și/sau racordurile detectorului (acolo unde este cazul).

2) Coloana de cromatografie

a) Coloană umplută

Se utilizează o coloană de sticlă cu diametru intern de 2 mm și lungime de 500 mm, umplută cu OV-1 3 % în fază staționară la 125 μm pînă la 150 μm (100 pînă la 120 ochiuri de sită) Gas ChromQ. Prepararea, silanizarea, umplerea și condiționarea coloanei umplute sînt descrise în instrucțiunea nr.1.

Ca o alternativă, se poate utiliza o coloană capilară.

b) Coloană capilară

Se utilizează o coloană capilară scurtă, de exemplu, de lungime de 5 m cu o fază staționară nepolară care poate rezista la temperaturi de sau peste 400°C. Coloana se condiționează prin efectuarea a 20 de analize pentru o soluție de grăsime din lapte (punctul 8) în decurs de 2 pînă la 3 zile cu ajutorul indicațiilor date la punctul 9 subpunctul 4) litera b). Apoi, coeficienții de răspuns (punctul 9 subpunctul 3) se vor apropia de valoarea 1, dar vor fi mai mici de 1,20.

Se pot utiliza coloane cu dimensiuni diferite și cu faze diferite nepolare, rezistente la temperaturi înalte, atît timp cît performanța acestora corespunde cu prezenta Metodologie.

3) Coloană Extrelut cu capacitatea de 1 ml pînă la 3 ml cu gel de siliciu, necesară extracției grăsimii din lapte în conformitate cu punctul 7 subpunctul 3).

4) Garnituri de grafit, rezistente la temperaturi de cel puțin 400 °C, care sînt folosite pentru a conecta atît coloanele GC, cît și injectorul și/sau racordurile detectorului.

5) Baie de apă, care să mențină o temperatură de 50 °C ± 2 °C.

6) Cuptor care funcționează la 50 °C ± 2 °C și 100 °C ± 2 °C.

7) Micropipetă.

8) Pipetă gradată, avînd capacitatea de 5 ml.

9) Balon cu fund rotund, avînd capacitatea de 50 ml.

10) Balon Erlenmeyer, cu volum nominal de 250 ml.

11) Pîlnie.

12) Filtru de hîrtie cu pori fini.

13) Evaporator rotativ.

14) Firole, cu volum nominal de 1 ml, prevăzute cu capac de aluminiu acoperit cu politetrafluoroetilen, care se atașează sau se înșurubează.

15) Seringă de injectare al cărei piston nu trebuie să ajungă la vîrfurile acului (GC cu coloană umplută).

Cu aceste seringi se obține o repetabilitate mai mare a rezultatelor.

16) Balanță analitică, cu care se pot cîntări greutatea pînă la aproximativ 1 mg, cu capacitate de citire de 0,1 mg.

6. O probă trebuie trimisă la laborator. În timpul transportului sau al depozitării, aceasta nu trebuie să fie deteriorată sau modificată.

Prelevarea probelor se efectuează conform SM SR EN ISO 707.

7. Pentru prepararea probelor pentru analiză se folosește una dintre următoarele trei metode de extracție a grăsimii din lapte.

1) Izolarea din unt sau ulei de unt

Se topesc 50 g pînă la 100 g din proba pentru analiză la 50 °C, utilizînd o baie de apă sau un cuptor. Se pun 0,5 pînă la 1,0 g de sulfat de sodiu într-un filtru de hîrtie pliat. Preîncălziți un balon Erlenmeyer de 250 ml și o pîlnie cu filtrul de hîrtie introdus în cuptorul reglat la 50 °C. Stratul de grăsime din proba topită se filtrează, în timp ce balonul preîncălzit, pîlnia și dispozitivul de filtrare introdus se mențin în cuptor. Trebuie acordată atenția corespunzătoare, astfel încît serul să nu fie transferat.

Poate fi folosită o cantitate mai mică din proba analizată doar în cazurile în care este disponibilă o cantitate limitată de probă, iar procedura trebuie adaptată în consecință. Cu toate acestea, manipularea unei cantități mai mici de probă implică un risc mai mare de obținere a unei mostre nereprezentative.

Untul poate fi obținut din smântână prin agitarea și spălarea temeinică a granulelor de unt rezultate.

Grăsimea din lapte obținută prin utilizarea procedurii descrise în prezentul punct nu va conține aproape deloc fosfolipide.

2) Extracția conform metodei gravimetrice Röse-Gottlieb

Fracțiunea grăsimilor se extrage din proba pentru analiză prin utilizarea metodei gravimetrice descrisă în unul dintre standardele SM EN ISO 1211:2015, SM EN ISO 2450:2014 sau SM EN ISO 7328.

Dacă în grăsimea din lapte sînt prezente fosfolipide, se va obține un vîrf de colesterol cu aproape 0,1 % mai mare. Influența asupra compoziției TG standardizate la 100 %, inclusiv colesterolul, este deci negliabilă

3) Extracția din lapte utilizînd coloane cu silicagel

Se adaugă cu ajutorul micropipetei 0,7 ml din proba pentru analiză la o temperatură de 20 °C într-o coloană Extrelut de 1 ml pînă la 3ml. Se lasă să se distribuie uniform pe silicagel timp de aproximativ 5 min.

Pentru denaturarea complexelor protein-lipidice, se adaugă în coloana Extrelut 1,5 ml de metanol, cu ajutorul pipetei gradate. În consecință, fracțiunea grăsimilor se extrage din proba pentru analiză cu 20 ml de *n*-hexan. *n*-Hexanul se adaugă treptat în cantități mici. Solventul drenat se colectează într-un balon cu fund rotund de 50 ml, care a fost uscat în prealabil, pînă la obținerea unei mase constante cunoscute, cîntărită cu o precizie de 1 mg, înregistrînd masa la 0,1 mg.

După extracție, coloana se lasă să se scurgă pînă la golire. Solvenții din eluant se distilează într-un evaporator rotativ cu baia de apă reglată la o temperatură între 40 °C și 50 °C. După distilarea solvenților, se usucă și se cîntărește în continuare balonul cu fund rotund și conținutul acestuia cu o precizie de 1 mg înregistrînd masa la 0,1 mg. Se determină masa grăsimii rezultată prin scăderea din masa obținută a masei balonului uscat cu fund rotund.

Extracția grăsimilor prin metodele Gerber, Weibull-Berntrop sau Schmid-Bonzynski-Ratzlaff sau izolarea grăsimilor din lapte cu ajutorul detergenților (metoda BDI) nu sînt adecvate pentru analiza TG, deoarece cantități semnificative de gliceride parțiale sau de fosfolipide pot trece în fază grasă. În consecință, aplicarea prezentei Metodologii este limitată la anumite produse, în particular la brînză.

8. Pentru gaz-cromatografia cu coloană umplută, se prepară o soluție de grăsime (punctul 7) de 5 % (fracțe de volum) în *n*-hexan sau *n*-heptan. În funcție de dimensiunile coloanei, se folosește o concentrație de 1 % (0,53 mm, tub deschis de diametru mare) sau mai mică în cazul injectării coloanei cu o coloană capilară.

În funcție de coloana utilizată și de masa grăsimilor obținute la punctul 7 subpunctul 3), se determină cantitatea de solvent care trebuie adăugată la proba

pentru analiză din balon pe baza cântăririi cu o precizie de 1 mg și a înregistrării masei la 0,1 mg. Cantitatea rămasă se dizolvă complet.

Se transferă aproximativ 1 ml din soluția de probă într-o fiolă.

9. Determinarea cromatografică a trigliceridelor are loc în felul următor:

1) Deviația liniei de bază

Pentru a reduce creșterea liniei de bază, coloana trebuie condiționată după cum este specificat la punctul 5 subpunctul 2) litera b) (coloana capilară) sau în instrucțiunea nr. 1 (coloana umplută).

Din cauza temperaturii înalte a coloanei, analiza TG este în mod particular sensibilă la creșterile liniei de bază pentru valorile mari ale numărului de atomi de carbon.

2) Tehnica injectării

a) Coloana umplută

Pentru evitarea efectelor de discriminare, se aplică tehnica injectării fierbinți în scopul îmbunătățirii cuantificării componentelor trigliceridice cu punct înalt de fierbere. Se umple acul cu aer prin tragerea soluției grase în seringă. Acul se introduce în injector. Înaintea injectării, acul se încălzește timp de aproximativ 3 s. Apoi, conținutul seringii se injectează rapid.

b) Coloană capilară

Cînd se folosește injectarea la rece în coloană, se introduce acul seringii și se injectează imediat. Timpul de retenție al acului în orificiul de injectare trebuie să fie în așa fel încît să se poată evita curbele ample ale vârfului solventului.

În mod normal, timpul optim de retenție este de aproximativ 3 s.

3) Calibrare

a) Generalități

Pentru calibrarea probelor analizate se realizează două pînă la trei analize ale grăsimilor standardizate din lapte la începutul fiecărei zile. Se folosește ultima analiză a grăsimilor standardizate din lapte pentru determinarea coeficienților de răspuns (fracțiunea de masă/fracțiunea de arie) ai TG și ai colesterolului care se aplică următoarelor probe pentru analiză (punctul 11 subpunctul 1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \Sigma A_{Si}}{\Sigma w_{Si} \times A_{Si}} \quad (1),$$

unde:

w_{Si} – fracțiunea de masă, exprimată procentual, pentru fiecare dintre TG sau pentru colesterolul din grăsimea standardizată din lapte;

A_{Si} – valoarea numerică a ariei de vîrf pentru fiecare TG sau pentru colesterolul din grăsimea standardizată din lapte.

Se utilizează fie litera b), fie litera c) din prezentul subpunct pentru a obține grăsimi standardizate din lapte care au o compoziție cunoscută de TG.

b) Grăsimi comerciale standard din lapte

Cea mai bună metodă de determinare a coeficientului de răspuns pentru fiecare compus al probei pentru analiză o reprezintă utilizarea grăsimilor standardizate din lapte care au o compoziție de TG certificată.

c) Grăsimi standard din lapte obținute în laborator

Se prepară aproximativ 1 g din amestecul de grăsimi standard (punctul 4 subpunctul 2, care conține cel puțin trigliceridele saturate C_{24} , C_{30} , C_{36} , C_{42} , C_{48} și C_{54} , precum și colesterol; în plus, de preferință, C_{50} și C_{52}) prin cântărire cu o precizie de 1 mg, înregistrând masa la 0,1 mg, pentru a obține o compoziție relativă a TG asemănătoare cu grăsimile din lapte.

Se analizează în mod repetat o soluție de amestec de grăsimi standard în *n*-hexan sau *n*-heptan, conform subpunctului 4) din prezentul punct. Păstrând aceeași desfășurare secvențională, se analizează repetat compoziția aproximativă a grăsimilor din lapte.

Din amestecul de grăsimi standard, se determină coeficienții de răspuns ai TG. Coeficienții de răspuns parțial ai TG, care nu există în amestec, se pot calcula prin interpolare matematică. Coeficienții de răspuns obținuți se aplică grăsimilor din lapte pentru a obține o compoziție standardizată. Grăsimile standardizate din lapte astfel obținute au un termen de valabilitate de mai mulți ani, în condiții de depozitare cu azot și la o temperatură maximă de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4) Condiții de cromatografie

Utilizarea coloanelor umplute sau a coloanelor capilare are ca rezultat o rezoluție asemănătoare cu figura 1. Descompunerea trigliceridelor cu număr par de atomi de C nu se observă în mod obișnuit și trebuie evitată.

a) Coloana umplută

Programul de temperatură – temperatura inițială a cuptorului se fixează la $210\text{ }^{\circ}\text{C}$. Această temperatură se menține timp de 1 min. Apoi temperatura se mărește cu $6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. pînă ajunge la $350\text{ }^{\circ}\text{C}$. Această temperatură (finală) se menține timp de 5 min.

Temperaturile pentru detector și injector – ambele temperaturi se fixează la $370\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Gazul vector – se utilizează azotul cu un debit constant de aproximativ $40\text{ ml}/\text{min}$. Debitul exact al gazului vector se ajustează astfel încît C_{54} este eluată la o temperatură de $341\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Durata analizei – $29,3\text{ min}$.

Volumul injectat – se injectează $0,5\text{ }\mu\text{l}$ din soluția de probă de 5 % (fracțiune de volum).

Dacă nu se desfășoară nici o analiză a TG, se menține temperatura inițială a cuptorului, se mențin temperaturile detectorului și injectorului și se menține rata de flux a gazului vector la un nivel constant, de asemenea și în timpul nopții, în weekend sau în timpul concediilor. Acest lucru asigură performanța optimă a coloanei.

b) Coloană capilară

Programul de temperatură – temperatura inițială a cuptorului se fixează la $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Această temperatură se menține timp de $0,5\text{ min}$. Apoi temperatura se mărește cu $50\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. pînă la $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ și, apoi, cu $6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. pînă la $350\text{ }^{\circ}\text{C}$. Această temperatură (finală) se menține timp de 5 min.

Temperatura detectorului – se fixează la $370\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Gazul vector – se utilizează azotul la un debit constant de aproximativ 3 ml/min.

Durata analizei – 34,4 min.

Volumul injectat – se injectează 0,5 μ l din soluția de probă de 1 % (fracțiune de volum).

Aceste setări se mențin și în timpul perioadei de standby, pentru a se asigura performanțe optime (litera a) din prezentul subpunct).

Setările analitice prezentate la prezentul subpunct sînt adecvate pentru utilizarea unei coloane cu diametru interior larg (0,53 mm ID). Dacă se utilizează o coloană cu alte dimensiuni sau altă fază, trebuie aplicate condiții diferite.

10. Se evaluează vîrfurile de pe cromatogramă cu un sistem de integrare cu care se poate trasa o linie de bază și cu care se poate realiza o reintegrare. În figura 1 este prezentată o cromatogramă integrată corect, în timp ce în figura 2 este prezentată o eroare sporadică la sfîrșitul liniei de bază după C₅₄ care influențează procentajul tuturor trigliceridelor. Vîrfurile eluate după C₅₄ se exclud din evaluare.

Trigliceridele cu număr acil-C impar ($2n + 1$) se combină cu trigliceridele anterioare cu număr par ($2n$). Nu se iau în considerare conținutul mic de C₅₆. Aria procentelor trigliceridelor rămase, inclusiv colesterolul, se înmulțește cu coeficienții de răspuns corespunzători ai grăsimii standard din lapte (de la ultima calibrare) și se normalizează global la 100 conform punctului 11 subpunctul 1.

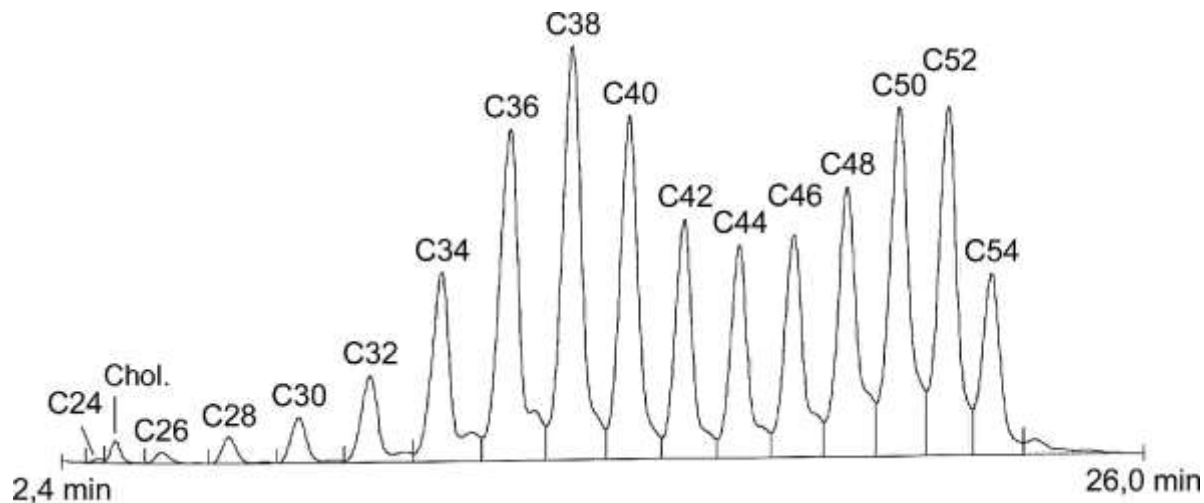


Figura 1. Exemplu de cromatogramă trigliceridică a grăsimii din lapte cu linia de bază trasată corect

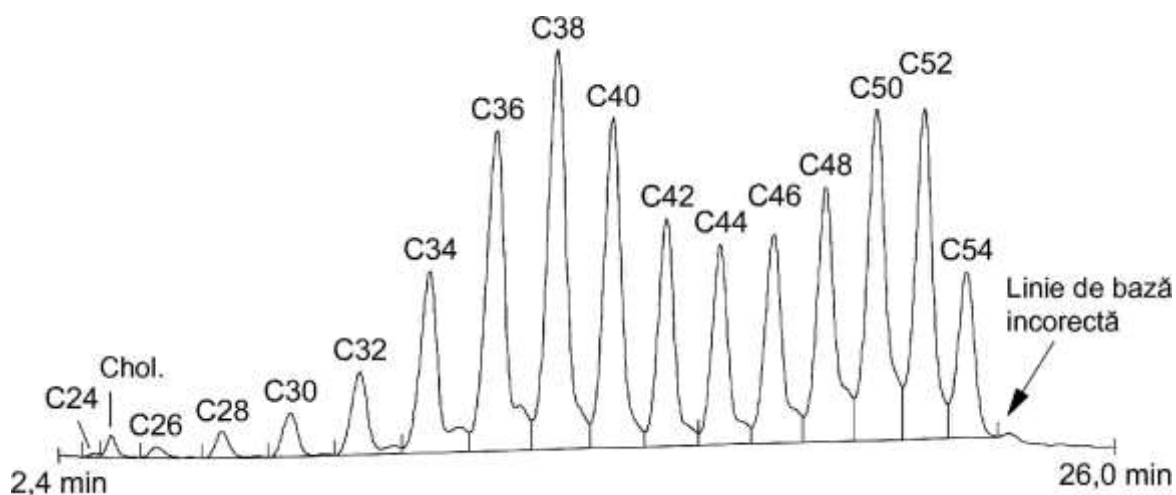


Figura 2. Exemplu de cromatogramă trigliceridică a grăsimii din lapte cu linia de bază trasată incorect

Pentru controlarea condițiilor de măsurare, se compară coeficienții de variație, CV, exprimați procentual pentru diferite trigliceride prezentate în tabelul 1 și care se bazează pe 19 analize consecutive pentru aceeași probă de grăsime din lapte.

Dacă valorile CV sînt semnificativ mai mari decît valorile date în tabelul 1, condițiile de cromatografie nu sînt adecvate.

Tabelul 1

**Coeficienții de variație pentru conținutul de trigliceride
(19 analize consecutive)**

| Trigliceridă | CV % |
|-----------------|-------|
| C ₂₄ | 10,00 |
| C ₂₆ | 2,69 |
| C ₂₈ | 3,03 |
| C ₃₀ | 1,76 |
| C ₃₂ | 1,03 |
| C ₃₄ | 0,79 |
| C ₃₆ | 0,25 |
| C ₃₈ | 0,42 |
| C ₄₀ | 0,20 |
| C ₄₂ | 0,26 |
| C ₄₄ | 0,34 |
| C ₄₆ | 0,37 |
| C ₄₈ | 0,53 |
| C ₅₀ | 0,38 |
| C ₅₂ | 0,54 |
| C ₅₄ | 0,60 |

Valorile prezentate în tabelul 1 nu sînt obligatorii, dar sînt orientative pentru controlul calității.

Cu toate acestea, în cazul în care se acceptă valori mai mari ale CV, trebuie să se respecte limitele de repetabilitate și de reproductibilitate din clauza 12.

11. Rezultatele se calculează și se exprimă în felul următor:

1) Compoziția de trigliceride

a) Calcularea

Se calculează fracțiunea de masă pentru fiecare TG (pentru $i = C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52},$ și C_{54}) și pentru colesterol, w_i , exprimat ca procent, din conținutul total de TG al probei pentru analiză prin utilizarea formulei următoare:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{Si}}{\Sigma(A_1 \times RF_{Si})} \times 100 \quad (2),$$

unde:

A_i – valoarea numerică a ariei vârfului pentru fiecare dintre TG din proba pentru analiză;

RF_{si} – coeficientul de răspuns pentru fiecare TG determinată prin calibrare (punctul 9 subpunctul 3).

b) Exprimarea rezultatelor analizei

Rezultatele se exprimă cu două zecimale.

2) Valorile S

a) Calcularea

Valorile S, exprimate procentual, se calculează prin introducerea w_i (subpunctul 1 litera a) din prezentul punct), calculat pentru procentul adecvat de TG în formulele de la (3) la (7). Se folosesc toate formulele, indiferent de tipul suspectat de grăsime străină.

Ulei de soia, de floarea-soarelui, de măsline, de rapiță, de in, de germeni de grâu, de germeni de porumb, din semințe de bumbac și de pește

$$S = 2,098\ 3 \cdot w_{C30} + 0,728\ 8 \cdot w_{C34} + 0,692\ 7 \cdot w_{C36} + 0,635\ 3 \cdot w_{C38} + 3,745\ 2 \cdot w_{C40} - 1,292\ 9 \cdot w_{C42} + 1,354\ 4 \cdot w_{C44} + 1,701\ 3 \cdot w_{C46} + 2,528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

Grăsime de palmier și grăsime din sîmburi de palmier

$$S = 3,745\ 3 \cdot w_{C32} + 1,113\ 4 \cdot w_{C36} + 1,364\ 8 \cdot w_{C38} + 2,154\ 4 \cdot w_{C42} + 0,427\ 3 \cdot w_{C44} + 0,580\ 9 \cdot w_{C46} + 1,292\ 6 \cdot w_{C48} + 1,030\ 6 \cdot w_{C50} + 0,995\ 3 \cdot w_{C52} + 1,239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

Ulei de palmier și seu de vită

$$S = 3,664\ 4 \cdot w_{C28} + 5,229\ 7 \cdot w_{C30} - 12,507\ 3 \cdot w_{C32} + 4,428\ 5 \cdot w_{C34} - 0,201\ 0 \cdot w_{C36} + 1,279\ 1 \cdot w_{C38} + 6,743\ 3 \cdot w_{C40} - 4,271\ 4 \cdot w_{C42} + 6,373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

Untură

$$S = 6,512\ 5 \cdot w_{C26} + 1,205\ 2 \cdot w_{C32} + 1,733\ 6 \cdot w_{C34} + 1,755\ 7 \cdot w_{C36} + 2,232\ 5 \cdot w_{C42} + 2,800\ 6 \cdot w_{C46} + 2,543\ 2 \cdot w_{C52} + 0,989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

Total

$$S = - 2,757\ 5 \cdot w_{C26} + 6,407\ 7 \cdot w_{C28} + 5,543\ 7 \cdot w_{C30} - 15,324\ 7 \cdot w_{C32} + 6,260\ 0 \cdot w_{C34} + 8,010\ 8 \cdot w_{C40} - 5,033\ 6 \cdot w_{C42} + 0,635\ 6 \cdot w_{C44} + 6,017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

b) Exprimarea rezultatelor analizei

Rezultatele se exprimă cu două zecimale.

3) Detectarea grăsimilor străine

Se compară cele 5 valori S obținute la subpunctul 2) litera a) din prezentul punct cu limitele S corespunzătoare prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Limitele S pentru grăsimile pure din lapte

| Grăsimia străină | Formulă | Limitele S ⁽¹⁾ |
|--|---------|---------------------------|
| Ulei de soia, de floarea-soarelui, de măsline, de rapiță, de in, de germeți de grâu, de germeți de porumb, din semințe de bumbac și de pește | (3) | 98,05–101,95 |
| Grăsimi de palmier și grăsime din sîmburi de palmier | (4) | 99,42–100,58 |
| Ulei de palmier și seu de vită | (5) | 95,90–104,10 |
| Untură | (6) | 97,96–102,04 |
| Total | (7) | 95,68–104,32 |

⁽¹⁾ Calculată pentru un nivel de încredere de 99 %, astfel încît adăugarea de grăsimi străine este indicată doar dacă limitele de detectare ale formulei respective sînt depășite (tabelul 1).

Proba pentru analiză se consideră grăsime pură din lapte dacă toate cele 5 valori S sînt cuprinse între limitele menționate în tabelul 2. Cu toate acestea, dacă o valoare S este în afara limitelor corespunzătoare, se consideră că proba conține grăsime străină.

Cu toate că fiecare formulă de la (3) la (6) este mai sensibilă pentru anumite grăsimi străine decît formula totală (7) (tabelul 1), un rezultat pozitiv obținut doar cu o singură formulă de la (3) la (6) nu permite tragerea unor concluzii cu privire la tipul de grăsime străină.

Instrucțiunea nr. 2 prezintă o modalitate de calcul al conținutului de grăsime vegetală sau animală în grăsimea impură din lapte. Acest procedeu nu este validat, fiind doar orientativ.

12. Precizia metodei rezultă din valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate:

1) Analiză interlaboratoare

Valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate sînt determinate pe baza formulelor de la (3) la (7), utilizîndu-se grăsimi pure din lapte, fiind posibil ca acestea să nu fie aplicabile în cazul altor matrice decît cele prezentate.

2) Repetabilitate

Diferența absolută dintre două rezultate individuale ale unui singur test, obținute cu aceeași metodă aplicată asupra unor materiale de testare identice, în același laborator, de către același operator, utilizîndu-se același echipament, la un interval scurt de timp, nu va depăși limitele din tabelul 3 în peste 5 % din cazuri.

Tabelul 3

Limitele de repetabilitate, r, pentru formulele de la (3) la (7)

| Grăsimea străină | Formulă | r % |
|--|----------------|------------|
| Ulei de soia, de floarea-soarelui, de măsline, de rapiță, de in, de germeni de grâu, de germeni de porumb, din semințe de bumbac și de pește | (3) | 0,67 |
| Grăsimi de palmier și grăsime din sîmburi de palmier | (4) | 0,12 |
| Ulei de palmier și seu de vită | (5) | 1,20 |
| Untură | (6) | 0,58 |
| Total | (7) | 1,49 |

3) Reproductibilitate

Diferența absolută dintre două rezultate ale unui singur test, obținute cu aceeași metodă aplicată asupra unor materiale de testare identice, în laboratoare diferite, de către operatori diferiți, utilizîndu-se un echipament diferit, nu va depăși limitele din tabelul 4 în peste 5 % din cazuri.

Tabelul 4

Limitele de reproductibilitate, R, pentru formulele de la (3) la (7)

| Grăsimea străină | Formulă | R % |
|--|----------------|------------|
| Ulei de soia, de floarea-soarelui, de măsline, de rapiță, de in, de germeni de grâu, de germeni de porumb, din semințe de bumbac și de pește | (3) | 1,08 |
| Grăsimi de palmier și grăsime din sîmburi de palmier | (4) | 0,40 |
| Ulei de palmier și seu de vită | (5) | 1,81 |
| Untură | (6) | 0,60 |
| Total | (7) | 2,07 |

13. Incertitudinea extinsă pentru valoarea S se poate calcula cu ajutorul repetabilității, r, și a reproductibilității, R.

Introducerea incertitudinii extinse (pe baza probelor martor) între limitele S din tabelul 2 are ca rezultat extinderea limitelor S prezentate în tabelul 5.

Tabelul 5

Limitele S extinse pentru grăsimile pure din lapte, inclusiv incertitudinea extinsă

| Grăsimea străină | Formulă | Limitele S extinse |
|--|----------------|---------------------------|
| Ulei de soia, de floarea-soarelui, de măsline, de rapiță, de in, de germeni de grâu, de germeni de | (3) | 97,36–102,64 |

| | | |
|--|-----|--------------|
| porumb, din semințe de bumbac și de pește | | |
| Grăsimi de palmier și grăsimi din sîmburi de palmier | (4) | 99,14–100,86 |
| Ulei de palmier și seu de vită | (5) | 94,77–105,23 |
| Untură | (6) | 97,65–102,35 |
| Total | (7) | 94,42–105,58 |

14. Raportul de analiză specifică:

- 1) toate informațiile necesare pentru identificarea completă a probei;
- 2) metoda utilizată pentru prelevarea probelor, dacă se cunoaște;
- 3) metoda de analiză utilizată în conformitate cu prezentul standard internațional;
- 4) toate detaliile operaționale care nu sînt specificate în prezentul standard internațional sau care sînt considerate opționale, împreună cu detaliile referitoare la orice incident care ar putea influența rezultatul (rezultatele) testului;
- 5) rezultatul (rezultatele) testului care a fost obținut și, dacă repetabilitatea a fost verificată, rezultatul final stabilit care a fost obținut.

Prepararea coloanei umplute

1. Reactivii și echipamentele ce se utilizează sînt:
 - 1) Toluen ($C_6H_5CH_3$).
 - 2) Soluție de dimetildiclorosilan [$Si(CH_3)_2Cl_2$]
Se dizolvă 50 ml de dimetildiclorosilan în 283 ml de toluen.
 - 3) Soluție de unt de cocos, cu o fracțiune de masă de 5 % unt de cocos în n-hexan sau n-heptan
 - 4) Fază staționară, 3-% OV-1 la 125 μm pînă la 150 μm (100 pînă la 120 ochiuri de sită) Gas ChromQ
 - 5) Coloană de sticlă, avînd un diametru intern de 2 mm și o lungime de 500 mm, în formă de U
 - 6) Echipament pentru umplerea coloanei
 - a) Coloană de umplere, cu capac care se înșurubează, prevăzut cu un marcaj pînă la care se poate umple cu cantitatea necesară de fază staționară
 - b) Sită fină, cu dimensiunea ochiurilor de sită de aproximativ 100 μm , cu capac care se înșurubează pentru etanșeizarea coloanei de sticlă
 - c) Vată de sticlă silanizată, dezactivată
 - d) Vibrator, pentru distribuția uniformă a fazei staționare în timpul umplerii
 - e) Dispozitive de silanizare, pentru silanizarea suprafeței de sticlă a coloanei
 - f) Vas Woulff
 - g) Pompă de aspirație a apei.
2. După conectarea vasului Woulff la pompa de aspirație a apei, se introduce tubul 2 (figura 3) în soluția de dimetilclorsilan. Se umple coloana cu această soluție prin închiderea robinetului. Se deschide robinetul din nou și apoi se îndepărtează cele două tuburi. Se fixează coloana pe stativ. Se umple complet cu soluția de dimetildiclorosilan cu ajutorul unei pipete.

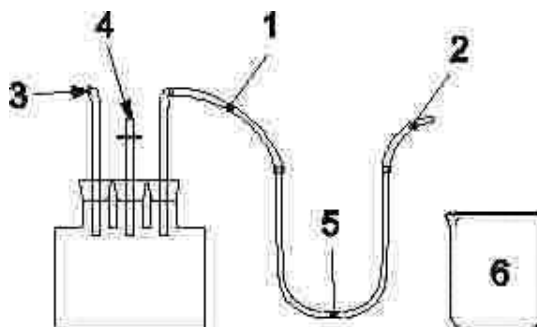


Figura 3. Dispozitivul de silanizare (dezactivarea suprafeței de sticlă)

Legendă

1 – tub 1;

- 2 – tub 2;
- 3 – pompă de aspirație;
- 4 – robinet;
- 5 – coloană de sticlă;
- 6 – dimetildiclorsilan și toluen.

Se lasă coloana în poziție verticală între 20 și 30 min. Apoi se înlocuiește vasul Woulff cu un balon de filtrare. Se golește coloana prin conectarea acesteia la pompa de aspirație a apei (figura 4). Se clătește repetat coloana golită cu 75 ml de toluen și 50 ml metanol prin introducerea tubului 2 în solvent. Coloana clătită se usucă în cuptor la 100 °C timp de aproximativ 30 min.

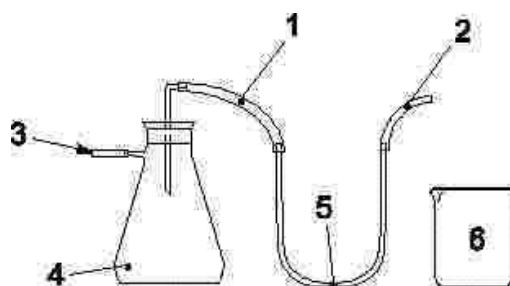


Figura 4. Dispozitivul de clătire

Legendă

- 1 – tub 1;
- 2 – tub 2;
- 3 – pompă de aspirație a apei;
- 4 – balon de filtrare;
- 5 – coloană de sticlă;
- 6 – agent de clătire.

3. Coloana se umple cu ajutorul dispozitivului reprezentat în figura 5. Coloana de umplere se umple cu fază staționară pînă la marcaj. Capătul inferior al coloanei de sticlă se sigilează cu un dop de vată comprimată de sticlă silanizată cu o lungime de aproximativ 1 cm. Capătul coloanei de sticlă se închide cu o sită fină.

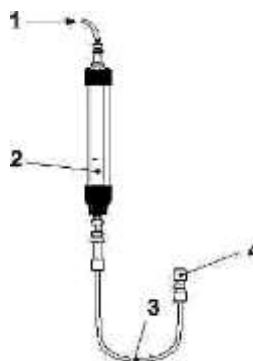


Figura 5. Umplerea coloanei de sticlă

Legendă

- 1 – orificiu de pătrundere a azotului;
- 2 – coloana de umplere care trebuie umplută cu OV-1 pînă la marcaj;

3 – coloana de sticlă care trebuie umplută;

4 – capac care se înșurubează, cu filtru, prin care fibrele de sticlă și faza staționară sînt comprimate.

Coloana se umple cu faza staționară sub presiune (300 kPa și debit de azot). Pentru a se obține o umplere uniformă, continuă și fermă, în timpul umplerii se deplasează vibratorul în sus și în jos pe coloana de sticlă. După umplere, la capătul celălalt al coloanei umplute se atașează un dop solid de vată de sticlă silanizată. Capetele care ies în exterior se taie. Dopul se împinge în interiorul coloanei cu cîteva milimetri cu ajutorul unei spatule.

4. Pentru a se evita contaminarea, în timpul etapelor de la (a) la (c), capătul din spate al coloanei nu se conectează la detector. Coloana umplută se condiționează după cum urmează:

1) coloana se spală cu azot timp de 15 min, la un debit de 40 ml/min. și o temperatură a cuptorului GC de 50 °C;

2) coloana se încălzește cu 1 °C/min. pînă la 355 °C, cu un debit al azotului de 10 ml/min;

3) coloana se menține la 355 °C, timp de 12 h pînă la 15 h;

4) se injectează de două ori 1 μl de soluție de unt de cocos, utilizîndu-se programul de temperatură al coloanei umplute prezentat la punctul 9 subpunctul 4) litera a);

Untul de cocos este format aproape în întregime din trigliceride C₅₀ pînă la C₅₄ cu punct ridicat de fierbere, reducîndu-se eforturile condiționării coloanei în conformitate cu coeficienții de răspuns respectiv;

5) se injectează de 20 de ori 0,5 μl de soluție de grăsimi din lapte timp de 2 pînă la 3 zile conform punctului 8, utilizînd indicațiile pentru coloana umplută prezentate la punctul 9 subpunctul 4) litera a).

La probele pentru analiză se utilizează doar coloane cu coeficienți de răspuns aproape de 1. Coeficienții de răspuns nu trebuie să depășească 1,20.

Cuantificarea conținutului de grăsimi străine

1. Tabelul 1 prezintă limitele de detectare pentru diferite grăsimi străine calculate pentru un interval de încredere de 99 %. Coloana din mijloc indică limitele de detectare pentru cele mai bune formule de la (3) la (6).

Limitele de detectare a formulei totale (7), indicate de coloana din extrema dreaptă, sînt ceva mai mari. În principiu, formula (7) este necesară doar pentru cuantificarea grăsimilor străine.

Cu ajutorul tuturor formulelor pot fi detectate, de asemenea, combinații ale diferitor tipuri de grăsimi străine. Diferența de compoziție a TG dintre probele individuale ale unui tip de grăsime străină nu influențează semnificativ limitele de detectare.

Dacă se folosesc ambele formule individuale și ecuația totală, se aplică limitele de detectare ale ecuațiilor individuale. Cu toate acestea, în anumite cazuri, valoarea S pentru formula totală este necesară pentru cuantificare.

Tabelul 6

Limitele de detectare cu o precizie de 99 % pentru grăsimile străine adăugate în grăsimile din lapte exprimate procentual

| Grăsimi străină | Formulă individuală % | Formulă totală % |
|----------------------------|-----------------------|------------------|
| Ulei de soia | 2,1 | 4,4 |
| Ulei de floarea-soarelui | 2,3 | 4,8 |
| Ulei de măsline | 2,4 | 4,7 |
| Ulei de cocos | 3,5 | 4,3 |
| Ulei de palmier | 4,4 | 4,7 |
| Ulei de sîmburi de palmier | 4,6 | 5,9 |
| Ulei de rapiță | 2,0 | 4,4 |
| Ulei de in | 2,0 | 4,0 |
| Ulei de germeni de grâu | 2,7 | 6,4 |
| Ulei de germeni de porumb | 2,2 | 4,5 |
| Ulei din semințe de bumbac | 3,3 | 4,4 |
| Untură | 2,7 | 4,7 |
| Seu de vită | 5,2 | 5,4 |
| Ulei de pește hidrogenat | 5,4 | 6,1 |

2. Determinarea cantitativă a grăsimii străine se realizează doar dacă cel puțin una dintre limitele S (tabelul 2 sau tabelul 5) este depășită. Pentru a se obține informații cantitative, se calculează fracțiunea de masă a grăsimii străine

sau fracțiunea de masă a amestecului de grăsimi străine din proba pentru analiză, w_f , exprimată procentual, cu ajutorul formulei următoare:

$$w_f = 100 \frac{(100-S)}{(100-S_f)} \quad (8),$$

unde:

S – rezultatul obținut prin introducerea datelor despre TG din grăsimea din lapte, la care s-a adăugat o grăsime străină sau un amestec de grăsimi străine, în una dintre formulele de la (3) la (7);

S_f – o constantă care depinde de tipul de grăsime străină adăugat.

Dacă nu se cunoaște tipul de grăsime străină adăugat la grăsimea din lapte, se utilizează o valoare generală pentru S_f de 7,46 (tabelul 7). Se utilizează întotdeauna valoarea S obținută din formula (7), chiar dacă limitele S pentru aceasta nu sînt depășite, spre deosebire de limitele altei formule.

Dacă se cunosc grăsimile străine, valorile individuale S_f ale acestora (tabelul 7) se introduc în formula (8). Pentru a se calcula valoarea S , se alege formula relevantă pentru grăsimea străină din formulele de la (3) la (6).

Tabelul 7

Valorile S_f pentru diferitele grăsimi străine

| Grăsimea străină | S_f |
|----------------------------|--------|
| Necunoscută | 7,46 |
| Ulei de soia | 8,18 |
| Ulei de floarea-soarelui | 9,43 |
| Ulei de măsline | 12,75 |
| Ulei de cocos | 118,13 |
| Ulei de palmier | 7,55 |
| Ulei de sîmburi de palmier | 112,32 |
| Ulei de rapiță | 3,30 |
| Ulei de in | 4,44 |
| Ulei de germeni de grâu | 27,45 |
| Ulei de germeni de porumb | 9,29 |
| Ulei din semințe de bumbac | 41,18 |
| Untură | 177,55 |
| Seu de vită | 17,56 |
| Ulei de pește | 64,12 |

3. Rezultatele analizei se exprimă cu două zecimale.

Anexa nr. 20
la Metodologia de analiză și
evaluare calitativă a laptelui
și a produselor lactate

**Procedura aplicabilă când rezultatele unei analize
sînt contestate (analiză chimică)**

1. La cererea producătorului, se poate realiza o analiză suplimentară prin metoda relevantă în alt laborator acreditat, cu condiția să fie disponibile probe martor sigilate din produs care să fi fost depozitate în siguranță de primul laborator care a efectuat analizele. Cererea se face în termen de 7 zile lucrătoare de la notificarea rezultatelor primei analize. Analiza este efectuată în termen de 21 de zile lucrătoare de la primirea cererii. Primul laborator trimite aceste probe unui al doilea laborator, la cererea și pe cheltuiala producătorului. Cel de-al doilea laborator trebuie să aibă competențe dovedite în realizarea analizelor în cauză.

2. Incertitudinile extinse ($k = 2$) pentru valoarea medie \bar{y}_1 pentru măsurătorile n_1 repetate în laboratorul 1 și pentru valoarea medie \bar{y}_2 pentru măsurătorile n_2 repetate în laboratorul 2 sunt:

$$U_{\bar{y}_1} = 2 \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2 \left(1 - \frac{1}{n_1}\right)} \text{ și respectiv } U_{\bar{y}_2} = 2 \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2 \left(1 - \frac{1}{n_2}\right)},$$

unde:

σ_r – deviația standard a repetabilității; iar

σ_R – deviația standard a reproductibilității pentru metoda relevantă.

Dacă rezultatul y al măsurătorii în laboratoare este calculat folosind o formulă de tipul:

$$y = x_1 + x_2, y = x_1 - x_2, y = x_1 \cdot x_2 \text{ or } y = x_1 / x_2,$$

în astfel de cazuri trebuie urmate modalitățile obișnuite de combinare a deviațiilor standard pentru a obține incertitudinea.

3. Pentru a verifica dacă rezultatele celor două laboratoare corespund cu deviația standard σ_R a reproductibilității metodei, se calculează incertitudinea extinsă a diferenței $\bar{y}_1 - \bar{y}_2$.

$$4. U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2} = \sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_2}^2} = 2 \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2 \left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Dacă valoarea absolută a diferenței dintre valorile medii $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ obținute de laborator nu este mai mare decât incertitudinea $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

rezultatele celor două laboratoare corespund cu deviația standard σ_r a reproductibilității, iar media aritmetică a valorilor medii obținute de cele două laboratoare:

$$\bar{y} = \frac{y_1 + y_2}{2},$$

este raportată drept rezultat final. În acest caz, incertitudinea extinsă este:

$$U_y = \frac{1}{2} \sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_2}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_F^2 \left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Lotul este respins pentru că nu respectă limita legală superioară UL în cazul în care:

$$\bar{y} - U_y > UL.$$

În caz contrar, lotul este acceptat ca respectând UL.

Lotul este respins pentru că nu respectă limita legală inferioară LL în cazul în care:

$$\bar{y} - U_y < LL.$$

În caz contrar, lotul este acceptat ca respectând LL.

Dacă valoarea absolută a diferenței dintre valorile medii $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ obținute de laborator este mai mare decât incertitudinea $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$, $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| > U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$, rezultatele celor două laboratoare nu respectă deviația standard a reproductibilității.

În cazul în care a doua analiză o confirmă pe prima, lotul este respins ca fiind neconform. În caz contrar, lotul este acceptat ca fiind conform.

Rezultatele finale trebuie notificate de către laborator producătorului cât mai curînd posibil. În cazul în care lotul este respins, costurile celei de-a doua analize sînt suportate de către producător.

Notă informativă
la proiectul Hotărîrii Guvernului cu privire la aprobarea Metodologiei de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate

În scopul realizării art. 70, Capitolul 12 „Agricultura și dezvoltarea rurală” din Planul național de acțiuni pentru implementarea Acordului de Asociere Republica Moldova – Uniunea Europeană pentru anii 2014-2016, aprobat prin Hotărîrea Guvernului nr. 808 din 07.10.2014, inclusiv a pct. 10, Compartimentul „Agricultură și dezvoltare regională” din anexa Hotărîrii Guvernului nr. 16 din 26.02.2015 cu privire la aprobarea Planului național de armonizare a legislației pentru anul 2015 și a Planului de armonizare a legislației agroalimentare și veterinară pentru perioada anului 2015, aprobat prin Ordinul Ministerului Agriculturii și Industriei Alimentare nr. 39 din 19 martie 2015, a fost elaborat proiectul Hotărîrii Guvernului cu privire la aprobarea Metodologiei de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate. Proiectul propus spre armonizare va transpune Regulamentul (CE) nr. 273/2008 al Comisiei din 5 martie 2008 de stabilire a normelor de aplicare a Regulamentului (CE) nr. 1255/1999 al Consiliului privind metodele de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate, publicat în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene nr. L 088 din 29 martie 2008.

Prezentul proiect are drept scop stabilirea procedeelelor de referință ce vor fi aplicate în următoarele cazuri, spre exemplu:

- verificarea corespunderii loturilor de produse lactate supuse intervenției de către stat indicilor de calitate reglementați;
- evaluarea rezultatelor în urma efectuării analizei senzoriale;
- determinarea conținutului de marcatori în unt, unt topit și smântînă;
- determinarea cazeinei din laptele de vacă în brînzeturile produse din lapte de oaie, capră sau bivoliță, sau al amestecurilor acestora;
- detectarea bacteriilor coliforme în unt, lapte praf degresat, cazeină și cazeinați;
- precum și a altor determinări.

Cerințele prevăzute în anexe se vor aplica în cazuri de divergențe sau la dorința operatorilor economici, precum și la aplicarea de către stat a instrumentelor de intervenții, directe sau indirecte, pe piața laptelui și produselor lactate în cazuri de destabilizare sau riscul de destabilizare a pieței interne de influența factorilor interni și/sau externi, în scopul stabilirii calității loturilor de produse supuse acestor intervenții.

Pentru evaluarea senzorială a produselor lactate, în componența panelului trebuie să fie un număr impar de evaluatori. Majoritatea acestora, precum și conducătorul panelului trebuie să fie angajați ai autorității competente, pentru a evita luarea deciziilor subiective. Astfel de practici ce țin de componența panelului, sunt aplicate și în Uniunea Europeană, prevederi stipulate în anexa IV. Evaluarea senzorială a untului, Regulamentul (CE) nr. 273/2008 al Comisiei din 5 martie 2008 de stabilire a normelor de aplicare a Regulamentului (CE) nr. 1255/1999 al

Consiliului privind metodele de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate.

Cheltuielile pentru implementarea proiectului prenotat vor fi suportate de către agenții economici.

În contextul celor expuse și în scopul armonizării cadrului național de determinare și evaluare a calității laptelui și a produselor lactate aplicate de către laboratoarele de profil la cerințele internaționale asumate de către Republica Moldova în procesul de integrare europeană, considerăm necesară examinarea și promovarea proiectului în cauză.

Ministru



Eduard GRAMA

Ex. Elena Negrei,
Tel. 022-228-104