I

(Acte adoptate în temeiul Tratatelor CE/Euratom a căror publicare este obligatorie)

REGULAMENTE

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

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Regulamentul (CE) nr. 1255/1999 al Consiliului din 17 mai 1999 privind organizarea comună a pieței în sectorul laptelui și al produselor lactate [1], în special articolele 10 și 15 și articolul 26 alineatul (3), articolul 29 alineatul (1) și articolul 31 alineatul (4),

întrucât:

(1) Regulamentul (CE) nr. 213/2001 al Comisiei [2] stabilește normele de aplicare a Regulamentului (CE) nr. 1255/1999 al Consiliului privind metodele de analiză și evaluare calitativă a laptelui și a produselor lactate. Având în vedere progresele tehnologice în domeniul metodologiei analitice, sunt necesare noi modificări substanțiale. În interesul clarității și eficienței și dat fiind numărul și caracterul tehnic al modificărilor, Regulamentul (CE) nr. 213/2001 ar trebui abrogat și înlocuit cu un nou regulament.

(2) Cerințele privind compoziția și calitatea laptelui și a produselor lactate prevăzute de măsurile menționate în Regulamentul (CE) nr. 1255/1999 trebuie verificate pentru a se asigura stricta lor respectare.

(3) Metodele de referință pentru asemenea verificări sunt adesea metodele publicate de organizații internaționale cum ar fi Comitetul European pentru Standardizare (CEN), Federația Internațională a Producătorilor de Lapte (FIL), Organizația Internațională pentru Standardizare (ISO), Asociația științifică dedicată excelenței analitice (AOAC International) și sunt actualizate cu regularitate de organizațiile menționate anterior. În anumite cazuri se stabilește o metodă de referință comunitară, în timp ce în alte cazuri nu se specifică nicio metodă de referință în normele comunitare. Pentru a se asigura aplicarea uniformă a metodelor de referință, trebuie să se redacteze o listă de metode de referință și să i se acorde Comisiei posibilitatea de a adapta lista în caz de necesitate.

(4) Posibilitatea aplicării metodelor de rutină nu trebuie eliminată. În acest scop, ar trebui precizate condițiile minime de aplicare a acestora.

(5) Ar trebui, de asemenea, stabilite metode comune pentru a se asigura o practică uniformă pentru evaluarea rezultatelor analizelor, pentru evaluarea senzorială a produselor în cauză și pentru reexaminarea rezultatelor contestate.

(6) Pentru anumite analize nu există în prezent metode de referință acceptate la nivel internațional care să fie validate, neexistând astfel informații privind variațiile rezultatelor analitice între laboratoare. În consecință, ar trebui să se stabilească metode comunitare, care au fost validate conform normelor instituite la nivel internațional și care ar trebui aplicate ca metode de referință.

(7) Regulamentul (CE) nr. 1898/2005 al Comisiei [3] stabilește normele de punere în aplicare a Regulamentului (CE) nr. 1255/1999 al Consiliului în ceea ce privește măsurile de comercializare a smântânii, a untului și a untului concentrat pe piața comunitară și prevede adăugarea de marcatori smântânii, untului și untului concentrat în anumite situații pentru a se asigura o utilizare finală corectă a acestor produse. Adăugarea de marcatori este importantă pentru buna funcționare a programului. Pentru a se asigura aplicarea unui tratament egal operatorilor din cadrul acestui program, ar trebui instituite metode comune pentru determinarea unora dintre acești marcatori.

[1] JO L 160, 26.6.1999, p. 48. Regulament modificat ultima dată prin Regulamentul (CE) nr. 1152/2007 (JO L 258, 4.10.2007, p. 3). Regulamentul (CE) nr. 1255/1999 va fi înlocuit cu Regulamentul (CE) nr. 1234/2007 (JO L 299, 16.11.2007, p. 1) începând cu 1 iulie 2008.

[2] JO L 37, 7.2.2001, p. 1.

[3] JO L 308, 25.11.2005, p. 1. Regulament modificat ultima data prin Regulamentul (CE) nr. 1546/2007 (JO L 337, 21.12.2007, p. 68).

(8) În temeiul articolului 9 din Regulamentul (CE) nr. 1255/1999, se poate acorda un ajutor pentru depozitarea privată a brânzeturilor fabricate din lapte de oaie. Pentru aceleași produse se poate acorda o rambursare în temeiul articolului 31 din regulamentul menționat anterior. Brânzeturile obținute din lapte de oaie, lapte de capră, lapte de bivoliță și din amestecuri de lapte de oaie, capră și bivoliță pot fi importate din anumite țări terțe în Comunitate în cadrul unor acorduri preferențiale. În temeiul dispozițiilor menționate anterior, este necesară efectuarea de controale corespunzătoare pentru a se asigura faptul că în produsele în cauză nu a fost încorporat lapte de vacă. Prin urmare, ar trebui prevăzută o metodă comunitară de referință pentru detectarea laptelui de vacă, fără a se aduce atingere folosirii metodelor de rutină, cu condiția ca acestea să respecte anumite criterii.

(9) În temeiul Regulamentului (CEE) nr. 2921/90 al Comisiei din 10 octombrie 1990 de acordare de ajutoare pentru laptele degresat în vederea fabricării cazeinei și a cazeinaților ([1]), trebuie detectată absența bacteriilor coliforme. Metoda de referință acceptată la nivel internațional pentru detectarea bacteriilor coliforme în lapte și produse lactate este ISO 4831. Pe baza standardului menționat anterior, a fost prevăzută o metodă de referință comunitară pentru detectarea bacteriilor coliforme.

(10) Regulamentul (CEE) nr. 2658/87 al Consiliului din 23 iulie 1987 privind Nomenclatura tarifară și statistică și Tariful Vamal Comun ([2]) prevede rate diferite ale taxelor vamale pentru furajele combinate care intră sub incidența poziției tarifare nr. 2309, în funcție de conținutul lor de produse lactate. Pentru a asigura aplicarea uniformă a normelor în cauză, trebuie prevăzută o metodă general recunoscută de analizare a conținutului de lactoză care să fie folosită în mod obligatoriu în toate statele membre.

(11) În temeiul Regulamentului (CE) nr. 1255/1999, untul și laptele praf degresat destinate intervenției sau, în cazul laptelui praf degresat, utilizării ca furaj pentru animale trebuie să îndeplinească anumite cerințe calitative. Pentru verificarea îndeplinirii acestor cerințe ar trebui prevăzute metode de referință.

(12) Unele metode sunt introduse pentru prima dată prin prezentul regulament. Ar trebui prevăzută o perioadă suficientă de timp de la data intrării în vigoare a prezentului regulament pentru a permite laboratoarelor să introducă și să folosească în mod corect aceste noi metode. Ori de câte ori o metodă de referință menționată în anexa I este modificată și publicată de către Organizația de dezvoltare a standardelor, laboratoarele ar trebui să aibă la dispoziție o perioadă de șase luni pentru a-și actualiza metodele analitice în conformitate cu noul standard.

(13) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului de gestionare a laptelui și a produselor lactate,

([1]) JO L 279, 11.10.1990, p. 22. Regulament modificat ultima data prin Regulamentul (CE) nr. 1487/2006 (JO L 278, 10.10.2006, p. 8).

([2]) JO L 256, 7.9.1987, p. 1. Regulament modificat ultima dată prin Regulamentul (CE) nr. 1352/2007 al Comisiei (JO L 303, 21.11.2007, p. 3).

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

CAPITOLUL I

DISPOZIȚII GENERALE

Articolul 1

Obiectul și domeniul de aplicare

(1) Prezentul regulament stabilește anumite metode de referință pentru analiza chimică, fizică și microbiologică și pentru evaluarea senzorială a laptelui și a produselor lactate care urmează să fie folosite în cadrul măsurilor prevăzute în organizarea comună a pieței în sectorul laptelui și al produselor lactate instituită prin Regulamentul (CE) nr. 1255/1999, precum și normele de aplicare a metodelor respective.

(2) Lista metodelor de referință aplicabile analizelor menționate la alineatul (1) figurează în anexa I la prezentul regulament.

(3) Comisia actualizează lista în conformitate cu procedura prevăzută la articolul 42 din Regulamentul (CE) nr. 1255/1999.

Articolul 2

Metodele de rutină

Metodele de rutină pot fi folosite pentru analizele necesare în conformitate cu normele comunitare, cu condiția să fie calibrate în mod adecvat și verificate cu regularitate pe baza metodei de referință. Rezultatele sunt comparate ținând cont de inegalitățile constante, de repetabilitate și de reproductibilitate.

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

Statele membre informează Comisia cu privire la folosirea metodelor de rutină în cadrul analizei menționate la articolul 1.

CAPITOLUL II

METODE DE ANALIZĂ

Articolul 3

Evaluarea conformității unui lot cu limita legală

Cu excepția analizei marcatorilor, anexa II la prezentul regulament se aplică în scopul definirii conformității cu cerințele legale în ceea ce privește compoziția.

Articolul 4

Evaluarea senzorială

(1) Pentru lapte și produse lactate altele decât untul destinat depozitării publice, metoda de referință care trebuie folosită de către statele membre pentru evaluarea senzorială este fie standardul FIL 99C:1997, fie alte metode comparabile pe care acestea le notifică Comisiei.

Procedurile descrise în anexa III se aplică în vederea verificării performanței evaluatorilor și a preciziei rezultatelor în analizele senzoriale.

(2) Pentru untul destinat depozitării publice, procedurile descrise în anexa III se aplică în vederea verificării performanței evaluatorilor și a acurateții rezultatelor în analizele senzoriale.

Procedura prevăzută în anexa IV se aplică ca metodă de referință pentru evaluarea senzorială.

Articolul 5

Marcatori

(1) Metoda de analiză prevăzută în anexa V se folosește ca metodă de referință pentru determinarea conținutului de trigliceride ale acidului enantic în unt, ulei de unt și smântână.

(2) Metoda de analiză prevăzută în anexa VI se folosește ca metodă de referință pentru determinarea vanilinei în untul concentrat, unt și smântână.

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

(4) Metoda de analiză prevăzută în anexa VIII se folosește ca metodă de referință pentru determinarea conținutului de β-sitosterol și stigmasterol în unt și în untul concentrat.

(5) Untul concentrat, untul și smântâna se consideră a fi marcate în conformitate cu normele comunitare relevante, în cazul în care rezultatele obținute sunt conforme cu specificațiile prevăzute la punctele 10 și 11 din anexa V și punctul 8 din anexele VI, VII și VIII.

Articolul 6

Detectarea cazeinei din laptele de vacă

(1) Metoda de referință pentru analiza prevăzută în anexa IX se folosește pentru a se asigura faptul că brânza produsă numai din lapte de oaie, din lapte de capră sau din lapte de bivoliță sau dintr-un amestec de lapte de oaie, capră și bivoliță nu conține cazeină din lapte de vacă.

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 cu sau mai mare decât conținutul probei de referință conținând 1 % lapte de vacă în conformitate cu anexa IX.

(2) Metodele de rutină pentru detectarea cazeinei din laptele de vacă în brânzeturi prevăzute la alineatul (1) pot fi folosite cu condiția ca:

(a) limita de detecție să fie de maximum 0,5 %; și

(b) să nu existe rezultate fals pozitive; și

(c) cazeina din lapte de vacă să poată fi detectată cu sensibilitatea necesară chiar și după perioade lungi de maturare, cum este cazul în condiții obișnuite de comercializare.

În cazul în care niciuna dintre cerințele menționate mai sus nu este îndeplinită, se folosesc metodele de referință prevăzute în anexa IX.

Articolul 7

Detectarea bacteriilor coliforme

Bacteriile coliforme în unt, lapte praf degresat, cazeină și cazeinați se detectează în conformitate cu metoda de referință prevăzută la anexa X.

Articolul 8

Determinarea conținutului de lactoză

Conținutul de lactoză al produselor care intră sub incidența codului NC 2309 se determină în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa XI.

Articolul 9

Detectarea zerului închegat

(1) Zerul închegat în laptele praf degresat destinat depozitării publice se detectează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa XII.

(2) Zerul închegat în laptele praf degresat și în amestecurile destinate utilizării ca furaje pentru animale se detectează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa XII. În cazul detectării zerului închegat se aplică anexa XIII.

Articolul 10

Detectarea zarei

Zara în laptele praf degresat se detectează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa XIV.

Articolul 11

Detectarea reziduurilor antimicrobiotice

Reziduurile antimicrobiotice în laptele praf degresat se detectează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa XV.

Articolul 12

Determinarea conținutului de lapte praf degresat

Conținutul de lapte praf degresat în furajele combinate se detectează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa XVI.

Articolul 13

Detectarea amidonului

Amidonul în laptele praf degresat, în laptele praf denaturat și în furajele combinate se detectează în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa XVII.

Articolul 14

Determinarea conținutului umed în smântâna deshidratată

Conținutul umed în smântâna deshidratată se determină în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa XVIII.

Articolul 15

Determinarea conținutului umed al zarei praf acide

Conținutul umed în zara praf acidă destinată utilizării în furaje se determină în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa XIX.

Articolul 16

Determinarea purității grăsimilor din lapte

Puritatea grăsimilor din lapte se determină în conformitate cu metoda de referință prevăzută în anexa XX.

CAPITOLUL III

DISPOZIȚII GENERALE ȘI FINALE

Articolul 17

Asigurarea calității

Analizele se realizează în laboratoare în care există un sistem analitic de asigurare a calității, inclusiv proceduri interne de control al calității. Laboratoarele neacreditate participă la programe de testare a competenței cel puțin o dată pe an și rezultatele acestora nu trebuie să aibă o deviație mai mare de $2\sigma_R$ (deviația standard a reproductibilității aferente metodei de referință) de la valoarea agreată. O descriere detaliată a sistemelor utilizate trebuie să fie disponibilă pentru consultare în laborator.

Laboratoarele acreditate în conformitate cu standardele prevăzute la articolul 12 din Regulamentul (CE) nr. 882/2004 al Parlamentului European și al Consiliului din 29 aprilie 2004 privind controalele oficiale efectuate pentru a asigura verificarea conformității cu legislația privind hrana pentru animale și produsele alimentare și cu normele de sănătate animală și de bunăstare a animalelor [1] sunt scutite de obligația de a susține teste de competență.

Articolul 18

Prelevarea de probe și contestarea rezultatelor analizei

(1) Prelevarea de probe se realizează în conformitate cu regulamentul relevant pentru produsul în cauză. În cazul în care nu există dispoziții privind prelevarea de probe, se folosește dispoziția menționată în ISO 707FIL 50, Lapte și produse lactate – Orientări privind prelevarea de probe.

(2) Rapoartele de laborator privind rezultatele analizei trebuie să conțină suficiente informații pentru a se putea realiza o evaluare a rezultatelor în conformitate cu anexa II și anexa XXI.

(3) Pentru analizele obligatorii conform regulilor comunitare se prelevează probe martor.

(4) Procedura descrisă în anexa XXI se folosește în cazurile în care rezultatele unei analize nu sunt acceptate de către operator.

(5) În cazul în care producătorul poate dovedi, în termen de cinci zile lucrătoare de la prelevarea probelor, că procedura de prelevare a probelor nu a fost realizată corect, aceasta trebuie repetată, în măsura în care acest lucru este posibil. În cazul în care prelevarea probelor nu poate fi repetată, lotul trebuie acceptat.

Articolul 19

Perioada de tranziție

Evaluarea conformității în temeiul anexei II la prezentul regulament se efectuează în termen de 12 luni de la intrarea sa în vigoare. Statele membre notifică imediat Comisiei, ori de câte ori este necesar, orice probleme majore întâmpinate în această perioadă în legătură cu procedura de control statistic.

Articolul 20

Abrogări

Regulamentul (CE) nr. 213/2001 se abrogă.

Trimiterile la regulamentul abrogat se interpretează ca trimiteri la prezentul regulament și se citesc în conformitate cu tabelul de corespondență din anexa XXII.

[1] JO L 165, 30.4.2004, p. 1.

Articolul 21

Intrarea în vigoare

Prezentul regulament intră în vigoare în a treia zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Se aplică de la 31 martie 2008.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 5 martie 2008.

Pentru Comisie
Mariann FISCHER BOEL
Membru al Comisiei

ANEXA I

(Articolul 1)

LISTA METODELOR DE REFERINȚĂ

Index: Min. = minimum, Max. = maximum, Anexă = anexa la regulamentul menționat anterior, SNF = substanțe solide negrase, PV = valoarea peroxidului, A = aspect, F = miros, C = consistență, TBC = număr total de bacterii, Therm = număr de bacterii termofile, MS = stat membru, FIL = Federația Internațională a Laptelui, ISO = Organizația Internațională de Standardizare, IUPAC = Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată, ADPI = Institutul American pentru Produse Lactate, SCM = lapte condensat îndulcit, EMC = lapte sau smântână evaporate.

PARTEA A

Regulamentul Comisiei	Produsul	Parametrul	Limita [1]	Metoda de referință	Notă
Regulamentul (CE) nr. 2771/1999 – Depozitare publică	Unt fără sare	Grăsime	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Apă	Până la 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		SNF	Până la 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
		Acizi grași liberi	1,2 mmol/100 g grăsime	ISO 1740:2004|FIL 6:2004	
		PV (max.)	0,3 mechiv. oxigen/1 000 g grăsime	ISO 3976:2006|FIL 74:2006	Nota 1
		Bacterii coliforme	Nedetectabile în 1 g	Anexa X	Nota 3
		Grăsime care nu provine din lapte	Nedetectabilă prin analiza trigliceridelor	Anexa XX	
		Marcatori de steroli	Nedetectabili, β-sitosterol ≤ 40 mg/kg	Anexa VIII	
		Alți marcatori:			
		— vanilină	Nedetectabilă	Anexa VI	
		— etil esterul acidului carotenic	≤ 6 mg/kg	Anexa VII	
		— trigliceride ale acidului enantic	Nedetectabile	Anexa V	
		Caracteristici de sensibilitate	Cel puțin 4 din 5 puncte pentru A, F și C	Anexa IV	

Regulamentul Comisiei	Produsul	Parametrul	Limita (1)	Metoda de referință	Notă
		Dispersia apei	Cel puțin 4 puncte	ISO 7586:1985|FIL 112A:1989	
Regulamentul (CE) nr. 2771/1999 – Depozitare privată	Unt fără sare	Grăsime	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Apă	Până la 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		SNF	Până la 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
Regulamentul (CE) nr. 2771/1999 – Depozitare privată	Unt sărat	Grăsime	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Apă	Până la 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		SNF (cu excepția sării)	Până la 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
		Sare	Până la 2 % m/m	ISO 15648:2004|FIL 179:2004	
Regulamentul (CE) nr. 1898/2005 – capitolul II	Unt fără sare	Grăsime	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Grăsime care nu provine din lapte		Anexa XX	
		Apă	Până la 16 % m/m	ISO 3727-1 2001|FIL 80-1:2001	
		SNF	Până la 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
		Marcatori:			
		— steroli	A se vedea anexa VIII	Anexa VIII	
		— vanilină	A se vedea anexa VI	Anexa VI	
		— etil esterul acidului carotenic	A se vedea anexa VII	Anexa VII	
		— trigliceride ale acidului enantic	A se vedea anexa V	Anexa V	
Regulamentul (CE) nr. 1898/2005 – capitolul II	Unt sărat	Grăsime	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Grăsime care nu provine din lapte		Anexa XX	
		Apă	Până la 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		SNF (cu excepția sării)	Până la 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
		Sare	Până la 2 % m/m	ISO 15648:2004|FIL 179:2004	
		Marcatori:			
		— steroli	A se vedea anexa VIII	Anexa VIII	
		— vanilină	A se vedea anexa VI	Anexa VI	

Regulamentul Comisiei	Produsul	Parametrul	Limita (1)	Metoda de referință	Notă
		— etil esterul acidului carotenic	A se vedea anexa VII	Anexa VII	
		— trigliceride ale acidului enantic	A se vedea anexa V	Anexa V	
Regulamentul (CE) nr. 1898/2005 – capitolul II	Unt concentrat	Grăsime	Min. 99,8 % m/m	FIL 24:1964	
		Apă și SNF	Până la 0,2 % m/m	ISO 5536:2002|FIL 23:2002 (umiditate) FIL 24:1964 (SNF)	
		Acizi grași liberi	1,2 mmol/100 g grăsime	ISO 1740:2004|FIL 6:2004	
		PV (max.)	0,5 mechiv. oxigen/1 000 g grăsime	ISO 3976:2006|FIL 74:2006	Nota 1
		Grăsime care nu provine din lapte	Absentă	Anexa XX	
		Aromă	Proaspătă		
		Miros	Fără mirosuri străine		
		Altele	Absența agenților de neutralizare, a antioxidanților și conservanților		
		Marcatori:			
		— steroli	A se vedea anexa VIII	Anexa VIII	
		— vanilină	A se vedea anexa VI	Anexa VI	
		— etil esterul acidului carotenic	A se vedea anexa VII	Anexa VII	
		— trigliceride ale acidului enantic	A se vedea anexa V	Anexa V	
Regulamentul (CE) nr. 1898/2005 – capitolul II	Smântână	Grăsime	Minimum 35 % m/m	ISO 2450:1999|FIL 16 C:1987	
		Grăsime care nu provine din lapte		Anexa XX	
		Marcatori:			
		— steroli	A se vedea anexa VIII		Nota 2
		— vanilină	A se vedea anexa VI	Anexa VI	
		— etil esterul acidului carotenic	A se vedea anexa VII		Nota 2
		— trigliceride ale acidului enantic	A se vedea anexa V	Anexa V	

Regulamentul Comisiei	Produsul	Parametrul	Limita (1)	Metoda de referință	Notă
Regulamentul (CE) nr. 1898/2005 – capitolul III	Unt concentrat	Grăsime	Min. 96 % m/m		Nota 2
		Grăsime care nu provine din lapte		Anexa XX	
		SNF	Până la 2 % m/m		Nota 2
		Marcatori:			
		— stigmasterol (95 % m/m)	15 g/100 kg de unt concentrat	Anexa VIII	
		— stigmasterol (85 % m/m)	17 g/100 kg de unt concentrat	Anexa VIII	
		— trigliceride ale acidului enantic	10,34 kg/100 t de unt concentrat	Anexa V	
		— etil ester al acidului butiric și stigmasterol		— etil esterul acidului butiric — stigmasterol: anexa VIII	Nota 2
		— etil esterul acidului butiric și trigliceridele acidului enantic		— etil esterul acidului butiric — trigliceride ale acidului enantic: anexa V	Nota 2
		lecitină (E 322)	Până la 0,5 % m/m		Nota 2
		NaC1	Până la 0,75 % m/m	ISO 15648:2004|FIL 179:2004	
		Acizi grași liberi	1,2 mmol/100 g grăsime	ISO 1740:2004|FIL 6:2004	
		PV (max.)	Până la 0,5 mechiv. oxigen/1 000 g grăsime	ISO 3976:2006|FIL 74:2006	Nota 1
		Aromă	Proaspătă		
		Miros	Fără mirosuri străine		
		Altele	Absența agenților de neutralizare, a antioxidanților și a conservanților		
Regulamentul (CE) nr. 1898/2005 – capitolul IV	Unt fără sare	Grăsime	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Apă	Până la 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		SNF	Până la 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
Regulamentul (CE) nr. 1898/2005 – capitolul IV	Unt sărat	Grăsime	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	

Regulamentul Comisiei	Produsul	Parametrul	Limita (1)	Metoda de referință	Notă
		Apă	Până la 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		SNF (cu excepția sării)	Până la 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
		Sare	Până la 2 % m/m	ISO 15648:2004|FIL 179:2004	
Articolul 9 și titlul II din Regulamentul (CE) nr. 1255/1999	Brânză produsă din lapte de oaie și/sau capră	Lapte de vacă	< 1 % m/m	Anexa IX	
Regulamentul (CEE) nr. 2921/90	Anexa I – Cazeină acidă	Apă	Până la 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Grăsime	Până la 1,75 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Aciditate liberă	Până la 0,30 ml soluție 0,1 N NaOH/g	ISO 5547:1978|FIL 91:1979	
Regulamentul (CEE) nr. 2921/90	Anexa I – Cazeină cheag	Apă	Până la 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Grăsime	Până la 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Cenușă	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978|FIL 90:1979	
Regulamentul (CEE) nr. 2921/90	Anexa I – Cazeinați	Apă	Până la 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Proteine ale laptelui	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978|FIL 92:1979	
		Grăsime și cenușă	Până la 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Cenușă insolubilă		ISO 5544:1978|FIL 89:1979	
		Cenușă		ISO 5545:1978|FIL 90:1979	
Regulamentul (CEE) nr. 2921/90	Anexa II – Cazeină acidă	Apă	Până la 10,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Grăsime	Până la 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Aciditate liberă	Până la 0,20 ml soluție 0,1 N NaOH/g	ISO 5547:1978|FIL 91:1979	
		TBC (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Bacterii coliforme	Absente în 0,1 g	Anexa X	Nota 3
		Therm. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Notele 3 și 4
Regulamentul (CEE) nr. 2921/90	Anexa II – Cazeină cheag	Apă	Până la 8,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Grăsime	Până la 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Cenușă	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978|FIL 90:1979	
		TBC (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Bacterii coliforme	Absente în 0,1 g	Anexa X	Nota 3

Regulamentul Comisiei	Produsul	Parametrul	Limita (1)	Metoda de referință	Notă
		Therm. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Notele 3 și 4
Regulamentul (CEE) nr. 2921/90	Anexa II – Cazeinați	Apă	Până la 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Proteine ale laptelui	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978|FIL 92:1979	
		Grăsime și cenușă	Până la 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004 ISO 5544:1978|FIL 89:1979 sau ISO 5545:1978|FIL 90:1979	
		TBC (max.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Bacterii coliforme	Absente în 0,1 g	Anexa X	Nota 3
		Therm. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Notele 3 și 4
Regulamentul (CEE) nr. 2921/90	Anexa III – Cazeinați	Apă	Până la 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Proteine ale laptelui	Min. 85,00 % m/m	ISO 5549:1978|FIL 92:1979	
		Grăsime	Până la 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Lactoză	Până la 1,00 % m/m	ISO 5548:2004|FIL 106:2004	
		Cenușă	Până la 6,50 % m/m	ISO 5544:1978|FIL 89:1979 sau ISO 5545:1978|FIL 90:1979	
		TBC (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Bacterii coliforme	Absente în 0,1 g	Anexa X	Nota 3
		Therm. (max.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Notele 3 și 4
Regulamentul (CE) nr. 2799/1999	Furaje combinate și lapte praf degresat (SMP) (folosite în furaje)	Apă (zară acidă praf)	Până la 5 % m/m	Anexa XIX	
		Proteine	31,4 % m/m (min.) din materia uscată negrasă	ISO 8968-1|2|3:2001|FIL 20-1|2|3:2001	
		Apă (SMP)	Până la 5 % m/m	ISO 5537:2004|FIL 26:2004	
		Grăsimi (SMP)	Până la 11 % m/m	ISO 1736:2000|FIL 9C:1987	
		Zer închegat (SMP)	Absent	Anexa XIII	Nota 6
		Amidon (SMP)	Absent	Anexa XVII	
		Apă (amestecuri)	Până la 5 % din materia negrasă	ISO 5537:2004|FIL 26:2004	
		Grăsime (amestecuri)		Directiva 84/4/CEE a Comisiei (JO L 15, 18.1.1984, p. 29)	

Regulamentul Comisiei	Produsul	Parametrul	Limita (1)	Metoda de referință	Notă
		Zer închegat (amestecuri)	Absent	Anexa XIII	
		Conținutul SMP (din produsul final)	Min. 50 % m/m	Anexa XVI	
		Grăsime (din produsul final)	Min. 2,5 % m/m sau 5 % m/m	Directiva 84/4/CEE a Comisiei (JO L 15, 18.1.1984, p. 29)	Nota 7
		Amidon (din produsul final)	Min. 2 % m/m	Anexa XVII	Nota 8
		Cupru (din produsul final)	25 ppm	Directiva 78/633/CEE a Comisiei (JO L 206, 26.7.1987, p. 43)	
Regulamentul (CE) nr. 214/2001	SPM (spray)	Grăsime	Până la 1,0 % m/m	ISO 1736:2000|FIL 9C:1987	
		Proteine	31,4 % (2) m/m (min.) din materia uscată negrasă	ISO 8968-1/2:2001|FIL 20-1/2:2001	
		Apă	Până la 3,5 % m/m	ISO 5537:2004|FIL 26:2004	
		Aciditate	Până la 19,5 ml, 0,1 N NaOH, 10 g substanțe solide negrase	ISO 6091:1980|FIL 86:1981	
		Lactați	Până la 150 mg/100 g substanțe solide negrase	ISO 8069:2005|FIL 69:2005	
		Fosfatază	Negativ	ISO 11816-1:2006|FIL 155-1:2006	
		Indicele insolubilității	Până la 0,5 ml la 24 °C	ISO 8156:2005|FIL 129:2005	
		Particule arse	Disc A sau B (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		TBC	40 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Bacterii coliforme	Negativ/ 0,1 g	Anexa X	Nota 3
		Zară	Negativ	Anexa XIV	
		Zer închegat	Negativ	Anexa XII	
		Zer acid	Negativ		Nota 2
		Agenți antimicrobieni		Anexa XV	

(1) Fără a se aduce atingere cerințelor regulamentului în cauză.
(2) De la 1 septembrie 2009 conținutul minim de proteine va fi de 34 %.

PARTEA B

Metodele de referință enumerate în partea B pot fi folosite pentru analiza produselor din domeniul reglementat de oricare dintre regulamentele enumerate în coloana 1.

Regulamentul Comisiei	Produsul	Codul NC	Parametrul	Limita	Metoda de referință	Notă
Regulamentul (CEE) nr. 2658/87 Regulamentul (CE) nr. 2535/2001 Regulamentul (CE) nr. 1282/2006	Lapte și smântână din lapte, neconcentrate, fără adaos de zahăr sau alți îndulcitori	0401	Grăsime (≤ 6 % m/m)	Limitele sunt cele specificate în descrierea codului NC pentru produsul respectiv, specificate mai apoi, după caz, în Regulamentul (CEE) nr. 3846/87 al Comisiei (JO L 366, 24.12.1987, p. 1), partea 9 din nomenclatura pentru export sau Regulamentul (CE) nr. 2535/2001 (JO L 341, 22.12.2001, p. 29)	ISO 1211:2001|FIL 1D:1996	
			Grăsime (> 6 % m/m)		ISO 2450:1999|FIL 16C:1987	
	Lapte și smântână din lapte, concentrate sau cu adaos de zahăr sau alți îndulcitori	0402	Grăsime (formă lichidă)		ISO 1737:1999|FIL 13C:1987	
			Grăsime (formă solidă)		ISO 1736:2000|FIL 9C:1987	
			Proteine		ISO 8968-1|2|3:2001|FIL 20-1|2|3:2001	
			Sucroză (conținut normal)		ISO 2911:2004| FIL 35:2004	
			Sucroză (conținut scăzut)			Nota 2
			Solide (SCM)		ISO 6734:1989|FIL 15B:1991	
			Solide (EMC)		ISO 6731:1989|FIL 21B:1987	
			Apă (lapte praf)		ISO 5537:2004|FIL 26:2004	
			Apă (smântână praf)		Anexa XVIII	
	Lapte acru, lapte sau smântână fermentate sau acrite, concentrate sau neconcentrate, cu adaos de zahăr sau alți îndulcitori	0403	Grăsime		ISO 1211:2001|FIL 1D:1996 ISO 1736:2000|FIL 9C:1987 ISO 2450:1999|FIL 16 C:1987 ISO 7208:1999|FIL 22B:1987 ISO 8262-3:2005|FIL 124-3:2005	

Regulamentul Comisiei	Produsul	Codul NC	Parametrul	Limita	Metoda de referință	Notă
			Proteine		ISO 8968-1|2|3:2001|FIL 20-1|2|3:2001	
			Sucroză (conținut normal)		ISO 2911:2004|FIL 35:2004	
			Sucroză (conținut scăzut)			Nota 2
			Apă (zară acidă praf)		Anexa XIX	
			Apă (zară dulce praf)		ISO 5537:2004|FIL 26:2004	
			Solide (alte produse)		Metode aprobate de autoritatea competentă	
	Zer, chiar concentrat sau cu adaos de zahăr sau de alți îndulcitori; produse obținute din compuși naturali ai laptelui	0404	Grăsime		ISO 1736:2000|FIL 9C:1987 ISO 2450:1999|FIL 16C:1987 ISO 7208:1999|FIL 22B:1987	
			Proteine		ISO 8968-1|2|3:2001|FIL 20-1|2|3:2001	
			Sucroză (conținut normal)		ISO 2911:2004|FIL 35:2004	
			Sucroză (conținut scăzut)			Nota 2
		0404 90	Proteine		ISO 8968 1/2 2001|FIL 20-1/2:2001	
			Apă		FIL 21B:1987	
			Solide		ISO 6734:1989|FIL 15B:1991	
			(Produse concentrate)		ISO 6731:1989|FIL 21B:1987	
	Unt și alte grăsimi care provin din lapte; pastă din lapte pentru tartine	0405	Grăsime (în cazul în care ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Unt	Apă		ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
			SNF		ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	

Regulamentul Comisiei	Produsul	Codul NC	Parametrul	Limita	Metoda de referință	Notă
			NaCl		ISO 15648:2004|FIL 179:2004	
			Grăsime (în cazul în care > 99 % m/m)		FIL 24:1964	
	Ulei de unt		Apă (în cazul în care grăsimea < 99 % m/m)		ISO 5536:2002|FIL 23:2002	
	Brânză și caș	0406	Grăsime		ISO 1735:2004|FIL 5:2004	
			Solide		ISO 5534:2004|FIL 4:2004	
			Solide (Urdă)		ISO 2920:2004|FIL 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006|FIL 88:2006	
			Lactoză		ISO 5765-1/2:2002|FIL 79-1/2:2002	
Regulamentul (CEE) nr. 2658/87	Furaje combinate	2309	Lactoză		Anexa XI	

Observații la lista metodelor de referință ale Uniunii Europene:
Nota 1: Izolarea grăsimii din lapte conform ISO 1740:1991 (la adăpost de lumină).
Nota 2: Nu s-a stabilit nicio metodă de referință. Metode aprobate de autoritatea competentă.
Nota 3: Proba este preparată conform ISO 8261:2001|FIL 122:2001.
Nota 4: Incubare timp de 48 de ore la temperatură de 55 °C, acordându-se atenție prevenirii uscării mediului de cultură.
Nota 5: % m/m SNF = % m/m solide – % m/m grăsime.
Nota 6: Directiva 84/4/CEE a Comisiei.
Nota 7: Regulamentul (CE) nr. 2799/1999 al Comisiei (JO L 340, 31.12.1999, p. 3-27).
Nota 8: Directiva 78/633/CEE a Comisiei.

ANEXA II

(Articolul 3)

EVALUAREA CONFORMITĂȚII UNUI LOT CU LIMITA LEGALĂ

1. PRINCIPIU

În cazurile în care legislația relevantă 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. METODA ESTE VALIDATĂ ÎN CADRUL COLABORĂRII INTERNAȚIONALE

În acest caz, deviația standard a repetabilității σ_r și deviația standard a reproductibilității σ_R au fost stabilite și 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. VALIDAREA INTERNĂ ASOCIATĂ CU CALCULAREA DEVIAȚIEI STANDARD A REPRODUCTIBILITĂȚII INTERNE

În cazurile în care se folosesc metode care nu sunt specificate în prezentul regulament și nu sunt 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 ale incertitudinii extinse *U*.

Regulile de luare a unei decizii sunt aceleași ca la punctul 1. Cu toate acestea, în cazul în care se consideră că lotul nu respectă limita legală, măsurătorile se repetă folosind metoda specificată în prezentul regulament, decizia urmând să fie luată în conformitate cu punctul 1.

ANEXA III

(Articolul 4)

EVALUAREA EVALUATORILOR ȘI FIABILITATEA REZULTATELOR ÎN ANALIZELE SENZORIALE

În cazul în care se folosesc metode de punctare se aplică următoarele proceduri (Standard FIL 99C:1997).

A. DETERMINAREA „INDICELUI DE REPETABILITATE”

Cel puțin 10 probe sunt analizate de un evaluator ca duplicat probă martor într-o perioadă de 12 luni. Această procedură se realizează de obicei în câteva ședințe. Rezultatele pentru caracteristicile produsului individual sunt evaluate utilizându-se formula:

$$w_1 = 1 + \left(\left(\sum \left(x_{i1} - x_{i2}\right)^2\right)/n\right)$$

unde:

w_I: indice de repetabilitate;

x_{i1}: punctajul pentru prima evaluare a probei x_i;

x_{i2}: punctajul pentru a doua evaluare a probei x_i;

n: numărul de probe.

Probele care urmează a fi evaluate trebuie să reflecte o gamă largă de calitate. w_1 nu trebuie să depășească 1,5 (pe o scară de 5 puncte).

B. DETERMINAREA „INDICELUI DE DEVIAȚIE”

Acest indice trebuie utilizat pentru a se verifica în cazul în care un evaluator utilizează aceeași scală pentru evaluarea calitativă ca și un grup de evaluatori experimentați. Punctajul obținut de evaluator este comparat cu media punctajelor obținute de grupul de evaluatori.

Pentru evaluarea rezultatelor se utilizează următoarea formulă:

$$D_1 = 1 + \left(\sum \left[\left(x_{i1} - \bar{x}_{i1}\right)^2 + \left(x_{i2} - \bar{x}_{i2}\right)^2\right]\right) / \left(2n\right)$$

unde:

x_{i1}; x_{i2}: a se vedea punctul A;

$\bar{x}_{i1}$; $\bar{x}_{i2}$: punctajul mediu al grupului de evaluatori pentru prima, respectiv a doua evaluare a probei x_i;

n: numărul de probe (cel puțin zece per 12 luni).

Probele care urmează a fi evaluate trebuie să reflecte o gamă largă de calitate. D_I nu trebuie să depășească 1,5 (pe o scară de 5 puncte).

Statele membre notifică orice dificultăți întâmpinate în aplicarea prezentei proceduri.

În cazul în care se constată că evaluatorii individuali depășesc limita de 1,5 pentru indicii de repetabilitate sau de deviație, expertul (experții) autorității publice trebuie să efectueze una sau mai multe verificări aleatorii de „reevaluare” asupra probelor clasificate de aceștia în următoarele câteva săptămâni sau să efectueze una sau mai multe verificări „în paralel” cu evaluatorii respectivi. Este necesară o monitorizare atentă în vederea luării unei decizii de menținere a serviciilor acestora. Constatările trebuie să fie atestate în mod corespunzător, fiind reținute ca dovadă în acțiunile ulterioare.

C. COMPARAREA REZULTATELOR OBȚINUTE ÎN REGIUNI DIFERITE ALE STATELOR MEMBRE ȘI ÎN DIFERITE STATE MEMBRE

După caz, se organizează un test cel puțin o dată pe an pentru a compara rezultatele obținute de evaluatorii din diferite regiuni. În cazul în care se constată diferențe semnificative, se iau măsurile necesare pentru a se identifica motivele și pentru a se obține rezultate comparabile.

Statele membre pot organiza teste pentru a compara rezultatele obținute de evaluatorii lor cu cele obținute de evaluatori ai statelor membre învecinate. Diferențele semnificative duc la investigații detaliate în scopul de a obține rezultate comparabile.

Statele membre notifică Comisiei rezultatele acestor comparații.

ANEXA IV

(Articolul 4)

EVALUAREA SENZORIALĂ A UNTULUI

1. DOMENIUL DE APLICARE

Scopul acestei proceduri de evaluare senzorială a untului este acela de a furniza o metodă uniformă aplicabilă în toate statele membre.

A se consulta actualul standard internațional FIL pentru lapte și produse lactate, FIL 99 – părțile 1, 2, 3 privind Evaluarea senzorială, pentru detalii suplimentare.

2. DEFINIȚII

„Evaluare senzorială" înseamnă examinarea caracteristicilor unui produs cu ajutorul organelor de simț.

„Panel" înseamnă un grup de evaluatori selectați care, pe perioada evaluării, lucrează independent, fără a comunica între ei și fără a se influența reciproc.

„Evaluatorul" este o persoană aleasă pentru capacitatea sa de a efectua un test senzorial. Acest tip de evaluator poate avea experiență limitată.

„Evaluatorul expert" este o persoană 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.

„Punctare" înseamnă evaluarea senzorială realizată de un panel, folosindu-se o scală numerică. Trebuie să se folosească un nomenclator al defectelor.

„Clasificare" înseamnă clasificarea calitativă realizată pe baza punctării.

„Documente de control": documentele 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. CAMERĂ DE TESTARE

A se consulta ISO 8589 și ISO/DIS 22935-2 | FIL 99-2 punctul 7, pentru mai multe detalii.

Sunt necesare măsuri de precauție pentru ca evaluatorii dintr-o cameră de testare să nu fie influențați de factori externi.

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.

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

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. SELECȚIA EVALUATORILOR

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 monitorizată de către autoritatea competentă în mod regulat (cel puțin o dată pe an).

4.1. Se consultă ISO/DIS 22935-1 | FIL 99-1 punctul 4 (recrutarea) și punctul 5.1 pentru detalii privind cerințele generale și testele de selecție care trebuie aplicate înaintea utilizării oficiale a unui nou evaluator.

Este esențial ca formarea profesională să fie continuă, iar ședințele generale trebuie să aibă loc în mod regulat. A se consulta ISO 8586-1 pentru informații privind formarea profesională a panelului.

4.2. Formarea inițială trebuie să acopere următoarele:

— teoria generală și importanța practică a evaluării senzoriale;

— metodele, scalele și descrierea percepțiilor senzoriale;

— detectarea și recunoașterea caracteristicilor senzoriale și termenilor senzoriali specifici;

— pregătire de bază în fabricarea untului;

— referințe și probe validate care să îl ajute pe evaluator în identificarea aromelor specifice și a intensității aromei produsului.

5. CERINȚE PENTRU PANEL

Numărul evaluatorilor din panel trebuie să fie impar, numărul minim fiind de trei. Majoritatea acestora trebuie să fie angajați ai autorității competente sau persoane autorizate care nu sunt angajate în industria de prelucrare a laptelui.

Conducătorul panelului trebuie să răspundă pentru întreaga procedură și poate participa în panel.

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

— subiecții 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;

— subiecții trebuie să se prezinte în mod punctual la evaluare și să dispună de suficient timp pentru realizarea evaluării;

— subiecții 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.;

— subiecții nu au voie să fumeze, să mănânce și să bea altceva decât apă cu o jumătate de oră înainte de evaluare.

6. PERFORMANȚA

Toți evaluatorii trebuie să participe în mod regulat la panele 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.

Evaluatorii principali trebuie, de asemenea, să participe la un număr de panele în fiecare an și, în măsura în care acest lucru este posibil, cel puțin o dată pe trimestru.

7. PRELEVAREA ȘI PREPARAREA PROBEI

Este esențial ca identitatea probelor să fie ascunsă în timpul evaluării, astfel încât 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 °C ± 2 °C).

Când 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 decât în antrepozitul frigorific, se prelevează o probă de cel puțin 500 g. Pe parcursul evaluării, untul trebuie să aibă o temperatură de 12 °C (± 2 °C) (referință: în ISO/DIS 22935-2 | FIL 99-2 temperatura de evaluare a untului este 14 °C ± 2 °C). Deviațiile mari trebuie evitate cu orice preț.

8. EVALUAREA VALORII FIECĂREI CARACTERISTICI

8.1. 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. Dispersia apei se testează în conformitate cu standardul FIL 112A/1989.

„Consistența” implică următoarele caracteristici: corp, textură și fermitate. Tartinabilitatea poate fi monitorizată prin utilizarea mijloacelor fizice, în cazul în care un stat membru dorește acest lucru în vederea satisfacerii cerințelor clientului. Comisia poate decide să armonizeze metodologia în viitor.

„Corp” este 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, putând fi măsurat mecanic și prin evaluare buco-tactilă și tactilă.

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

„Mirosul” este 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 amânată în cazul în care temperatura se află în afara intervalului recomandat.

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

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

8.4. Punctajul de acceptare este următorul:

A se consulta partea 7 – Nomenclator și descrierea aplicabilă punctelor în momentul punctării.

	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.

— 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. SUPRAVEGHERE

Conducătorul panelului, care trebuie să fie angajat oficial al autorității competente și care poate fi membru al panelului, trebuie să răspundă în general pentru întreaga procedură. El/ea trebuie să înregistreze în documentul de control punctajele individuale pentru fiecare caracteristică și să certifice dacă produsul este acceptat sau respins.

10. NOMENCLATOR

A se consulta tabelul 2 anexat.

11. REFERINȚE

FIL 99C:1997 Evaluarea senzorială a produselor lactate prin punctare – Metoda de referință

ISO/DIS 22935 | FIL 99 Standardul internațional pentru lapte și produse lactate – Evaluarea senzorială – părțile 1-3

ISO 8586-1 Analiza senzorială – Orientări generale pentru selecția, formarea și monitorizarea evaluatorilor – partea 1

ISO 8589 Analiza senzorială – Orientări generale pentru proiectarea camerelor de testare

FIL 112A:1989 Untul – Determinarea valorii dispersiei apei

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		*Foarte bine* tipul ideal cea mai bună calitate (substanță uscată egală)	5		*Foarte bine* tipul ideal cea mai bună calitate (bine tartinabil)	5		*Foarte bine* tipul ideal cea mai bună calitate (cea mai fină aromă absolut pură)
4		*Bine* (2) nu există defecte evidente	4	17 18	*Bine* (2) tare moale	4		*Bine* (2) nu există defecte evidente
3		*Acceptabil (mici defecte)*	3		*Acceptabil (mici defecte)*	3		*Acceptabil (mici defecte)*
	1	nelegat (necompact), umed		14	dezemulsionat, friabil, sfărâmicios		21	impur
	2	neuniform, în două culori		15	păstos, de consistența aluatului, gras		22	arome străine
	3	cu dungi					25	acid
	4	pestriț, marmorat		16	lipicios		27	aromă de copt, aromă de ars
	5	cu aspect granulat		17	tare		33	aromă de furaj
	6	separare a uleiurilor		18	moale		34	aspru, amar
	7	supracolorat					35	suprasărat
	8	textură slabă, deschisă						
2		*Slab (defecte evidente)*	2		*Slab (defecte evidente)*	2		*Slab (defecte evidente)*
	1	nelegat (necompact), umed		14	dezemulsionat, friabil, sfărâmicios		21	neclar
	3	cu dungi		15	păstos, de consistența aluatului, gras		22	arome străine
	4	pestriț, marmorat					23	vechi
	5	cu aspect granulat		16	lipicios		25	acid
	6	separare a uleiurilor		17	tare		32	miros oxidat, miros metalic
	10	materii străine		18	moale		33	aromă de furaj
	11	mucegăit					34	aspru, amar
	12	sare nedizolvată					35	suprasărat
							36	mucegăit
							38	miros de substanțe chimice
1		*Foarte slab (defecte mari)*	1		*Foarte slab (defecte mari)*	1		*Foarte slab (defecte mari)*
	1	nelegat (necompact), umed		14	dezemulsionat, friabil, sfărâmicios		22	arome străine
	3	cu dungi		15	păstos, de consistența aluatului, gras		24	brânzos, miros de brânză lactică
	4	pestriț, marmorat					25	acid
	5	cu aspect granulat		16	lipicios		26	spumos
	6	separare a uleiurilor		17	tare		28	miros de mucegai
	7	supracolorat		18	moale		29	rânced
	9	granulat					30	uleios, cu gust de pește
	10	materii străine					31	cu aspect/gust de seu
	11	mucegăit					32	miros oxidat, miros metalic
	12	sare nedizolvată					34	aspru, amar
							35	suprasărat
							36	mucegăit, putred
							37	cu aspect de malț
							38	miros de substanțe chimice

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

Tabelul 2

Tabelul defectelor 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.	mucegăit
12.	sare nedizolvată
II.	Consistență
14.	dezemulsionat, friabil, sfărâmicios
15.	păstos, de consistența aluatului, gras
16.	lipicios
17.	tare
18.	moale
III.	Miros și aromă
20.	fără miros
21.	impur ([1])
22.	arome străine
23.	vechi
24.	brânzos, miros de brânză lactică
25.	acid
26.	spumos
27.	(a) aromă de copt
	(b) aromă de ars
28.	mucegăit
29.	rânced
30.	uleios, cu gust de pește
31.	cu aspect/gust de seu
32.	(a) miros oxidat
	(b) miros metalic
33.	aromă de furaj
34.	aspru, amar
35.	suprasărat
36.	mucegăit, putred
37.	cu aspect de malț
38.	miros de substanțe chimice

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

ANEXA V

(Articolul 5)

DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE TRIGLICERIDE ALE ACIDULUI ENANTIC ÎN UNT, ULEI DE UNT ȘI SMÂNTÂNĂ PRIN ANALIZA CROMATOGRAFICĂ ÎN FAZĂ GAZOASĂ A TRIGLICERIDELOR

1. OBIECTUL

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

2. TERMENI ȘI DEFINIȚIE

Conținutul de acid enantic: conținutul de trigliceride ale acidului enantic determinat prin procedura specificată în prezenta metodă.

Notă: 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. PRINCIPIU

Grăsimea din lapte este extrasă din diferite produse în conformitate cu ISO 14156 | FIL 172:2001. 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 intern privind trigliceridele acidului caproic.

Notă: S-a constatat de asemenea că tributirina este un standard intern satisfăcător.

4. REACTIVI

A se folosi numai reactivi de calitate analitică recunoscută.

4.1. n-Hexan

4.2. Trigliceride etalon ale acidului caproic, cel puțin 99 % puritate

4.3. Trigliceride etalon ale acidului enantic, cel puțin 99 % puritate

4.4. Sulfat de sodiu, anhidru (Na_2SO_4)

5. APARATURĂ

Aparatură obișnuită de laborator și, în special, următoarele:

5.1. Balanță analitică echilibrată la 1 mg

5.2. Baloane cotate cu capacitate de 10 ml și 20 ml

5.3. Tuburi de centrifugă cu capacitate de 30 ml

5.4. Evaporator rotativ

5.5. Cuptor care să poată fi menținut la o temperatură de 50 °C ± 5 °C

5.6. Hârtie de filtru de porozitate medie cu diametrul de aproximativ 15 cm

5.7. Aparatură de cromatografie în fază gazoasă

5.7.1. Cromatograf în fază gazoasă dotat cu un injector cu sau fără divizare sau „în coloană” și cu un detector cu ionizare în flacără.

5.7.2. 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). Selectați faza staționară, ajustați 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 vârfurile trigliceridelor acidului caproic și ale acidului enantic. Mai jos sunt enumerate câteva exemple de condiții aplicabile.

5.7.2.1. Exemplu de condiții aplicabile folosind un injector cu divizare:

— gaz vector: heliu;

— presiunea în capul coloanei: 100 KPa;

— coloană: coloană din sticlă de siliciu de 12 m lungime, 0,5 mm diametru intern, 0,1 μm grosimea stratului;

— fază staționară: 100 % dimetilpolisiloxan sau 5 % fenil-95 % dimetilpolisiloxan (de exemplu, HT5);

— temperatura coloanei: temperatură inițială de 130 °C, menținută timp de 1 min, ridicată cu o rată de 20 °C/min. până la 260 °C și apoi ridicată cu o rată de 30 °C/min. până la 360 °C; a se menține 10 min. la 360 °C;

— temperatura detectorului: 370 °C;

— temperatura injectorului: 350 °C;

— raportul de fracționare 1:30;

— cantitatea din proba injectată: 1 μl.

5.7.2.2. Exemplu de condiții aplicabile folosind un injector în coloană:

— gaz vector: hidrogen (sistem de flux constant);

— presiunea în capul coloanei: 89 kPa;

— coloană: coloană din sticlă de siliciu de 4 m lungime, 0,32 mm diametru intern, 0,25 μm grosimea stratului;

— fază staționară: 5 % fenil, 95 % dimetilpolisiloxan;

— temperatura coloanei: temperatură inițială de 60 °C, menținută timp de 2 min, ridicată cu o rată de 35 °C/min. până la 340 °C, menținută la această temperatura timp de 5 min;

— temperatura detectorului: 350 °C;

— cantitatea din proba injectată: 1 μl.

5.8. Seringă pentru injectare, cu capacitate de 5 μl.

6. PRELEVAREA PROBELOR

Este important ca laboratorul să primească o probă care să fie cu adevărat reprezentativă și care să nu fi fost deteriorată sau modificată în timpul transportului sau pe durata depozitării.

Prelevarea probelor nu face parte din metoda specificată în actualul standard internațional. În standardul FIL:50C:1995 sau ISO 707-1997 – Lapte și produse lactate – Metode de prelevare a probelor este prezentată metoda recomandată de prelevare a probelor.

7. PROCEDURĂ

7.1. **Prepararea probei de analiză și a cantității analizate**

A se proceda în conformitate cu ISO 14156 | FIL 172:2001.

7.1.1. *Ulei de unt, unt*

7.1.1.1. Se topește între 50 g și 100 g din proba de analiză în cuptor (5.5)

7.1.1.2. Se pun între 0,5 g și 1 g de sulfat de sodiu anhidru (5.4) într-o hârtie de filtru pliată

7.1.1.3. Se filtrează grăsimea prin hârtia de filtru care conține sulfat de sodiu anhidru, colectând filtratul într-un pahar de laborator care se păstrează în cuptor (5.5). În timpul decantării, se acordă multă atenție untului topit în hârtia de filtru, pentru a nu se transfera serul

7.1.2. *Smântână*

7.1.2.1. Proba analizată se aduce la o temperatură de 20 °C ± 2 °C

7.1.2.2. Proba se amestecă sau se agită bine

7.1.2.3. 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 %

7.1.2.4. Se procedează ca și în cazul laptelui crud și al laptelui omogenizat (a se vedea ISO 14156 | FIL 172:2001, §8.3) pentru a extrage grăsimea din smântână

7.1.2.5. Se cântărește, cu o precizie de 1 mg, 1 g din grăsimea extrasă, într-un balon cotat de 10 ml (5.2). Se adaugă 1 ml din soluția 7.2.2. Se completează până la 10 ml cu n-hexan (4.1) și se omogenizează

7.1.2.6. Se introduce 1 ml din soluția 7.1.1.2 într-un balon cotat de 10 ml (5.2) și se diluează până la 10 ml cu n-hexan (4.1)

7.2. **Prepararea etaloanelor de calibrare**

7.2.1. Se dizolvă 100 mg de trigliceride ale acidului enantic (4.3) în 10 ml de n-hexan (4.1)

7.2.2. Se dizolvă 100 mg de trigliceride ale acidului caproic (4.2) în 10 ml de n-hexan (4.1)

7.2.3. Se introduce 1 ml din soluția 7.2.2 într-un balon cotat de 10 ml (5.2). Se completează până la 10 ml cu n-hexan (4.1)

7.2.4. Se introduce 1 ml din soluția 7.2.1 și 1 ml din soluția 7.2.2 într-un balon cotat de 10 ml (5.2). Se completează până la 10 ml cu n-hexan (4.1)

7.2.5. Se introduce 1 ml din soluție 7.2.4 într-un balon cotat de 10 ml (5.2) și se completează până la 10 ml cu n-hexan (4.1)

7.3. **Determinarea cromatografică**

7.3.1. Se injectează de două ori 1 µl din soluția etalon 7.2.5

7.3.2. Se injectează 1 µl din fiecare soluție de probă

Notă: 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.

7.3.3. Operația 8.3.1 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.

8. CALCULAREA REZULTATELOR

Pentru fiecare cromatogramă, se integrează suprafața vârfurilor 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 STD_1, iar etalonul injectat de două ori imediat după acestea este STD_2.

8.1. **Calibrare**

8.1.1. Se calculează coeficientul de răspuns pentru fiecare duplicat al STD_1, Rf_1(a) și Rf_1(b).

Rf_1 (a) sau (b) = (Suprafața vârfului pentru trigliceridele acidului caproic/Suprafața vârfului pentru trigliceridele acidului enantic) × 100

Se calculează media coeficientului de răspuns, Rf_1

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

8.1.2. În mod similar, se calculează media coeficientului de răspuns STD_2, Rf_2

8.1.3. Se calculează media coeficientului de răspuns, Rf

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

8.2. **Probele analizate**

Pentru fiecare cromatogramă a probei obținută între STD_1 și STD_2, se calculează conținutul de acid enantic, C (kg/ton):

C = (Suprafața vârfului pentru trigliceridele acidului enantic × Rf × 100)/(Suprafața vârfului pentru trigliceridele acidului caproic × Wt × 1 000)

unde:

— Wt = greutatea grăsimii prelevate (g);

— 100 = volumul de diluare pentru probă;

— 1 000 = coeficientul de transformare (pentru µg/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.

9. PRECIZIA

Detaliile referitoare la testul realizat între laboratoare asupra untului, în conformitate cu ISO 5725-1 și ISO 5725-2 privind precizia metodei se află în (12).

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

9.1. **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.

9.2. **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.

10. LIMITELE DE TOLERANȚĂ: LIMITE INFERIOARE (ÎN CAZUL CANTITĂȚILOR INSUFICIENTE)

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

10.2. **Unt și unt concentrat**

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

10.2.2. 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.

10.3. **Smântână**

10.3.1. 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.

10.3.2. 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.

11. LIMITELE DE TOLERANȚĂ: LIMITELE SUPERIOARE (ÎN CAZUL DEPĂȘIRII CANTITĂȚII CU PESTE 20 %)

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

11.2. **Unt și unt concentrat**

11.2.1. Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se folosesc pentru verificarea ratei și omogenității de încorporare a marcatorilor, iar media acestor rezultate se compară cu următoarele limite:

— Limita superioară este 12,96 kg/t.

11.3. **Smântână**

11.3.1. Rezultatele pentru cele trei probe obținute în urma analizei produsului se folosesc pentru verificarea ratei și omogenității de încorporare a marcatorilor, iar media acestor rezultate se compară cu următoarele limite:

— Limita superioară este 11,82 kg/t.

12. INFORMAȚII SUPLIMENTARE: ANALIZA STATISTICĂ A REZULTATELOR PRIVIND DETERMINAREA TRIENANTATULUI ÎN GRĂSIMEA DIN UNT PRIN ANALIZA TRIGLICERIDELOR

Au fost realizate patru studii de colaborare pentru determinarea conținutului de trienantat din probele de unt urmărite.

La primul test circular au participat nouă laboratoare și nu au fost puse la dispoziție specificații cu privire la metodele analitice care trebuie folosite:

La cel de-al doilea test circular au participat zece laboratoare și au fost aplicate patru metode diferite:

— determinarea heptonatului de metil utilizând n-nonan sau nonanoatul de metil drept standard intern;

— determinarea trienantatului utilizând tricaproatul drept standard intern;

— determinarea heptonatului de metil utilizând o probă de calibrare/amestec;

— determinarea heptonatului de metil utilizând un amestec de calibrare.

În plus, dacă au fost analizați esterii metilici ai acizilor grași (FAME), au fost folosite două metode diferite de metilare (De Francesco și Christopherson & Glass).

Datorită rezultatelor obținute, pentru realizarea celui de-al treilea test circular au fost alese două metode:

— determinarea heptonatului de metil utilizând n-nonan sau nonanoatul de metil drept standard intern;

— determinarea trienantatului utilizând tricaproatul drept standard intern.

Rezultatele obținute de 7 laboratoare au demonstrat că metoda FAME a produs o variabilitate mai mare și, în consecință, s-a decis să se utilizeze doar determinarea trienantatului sub formă de trigliceride, folosindu-se metoda de determinare a trienantatului prin utilizarea tricaproatului drept standard intern. În plus, analizarea trigliceridelor a trebuit să se realizeze cu ajutorul coloanei capilare.

În cel de-al patrulea test circular au fost transmise patru probe (A, B, C, D), nouă laboratoare oferind rezultatele (tabelele 1-2).

Două laboratoare (DE și UE) au analizat probele utilizând metoda FAME.

Din cauza numărului scăzut de laboratoare, calculul statistic a fost efectuat atât pentru setul complet de date, inclusiv rezultatele aplicării metodei FAME (figurile 1-2), cât și asupra datelor obținute din analiza TG.

Teste pentru valorile aberante:

— proba A. Testele Dixon, Cochran și Grubbs la niveluri de 1 și 5 % au arătat o valoare aberantă în cadrul analizei;

— proba B. Testul Grubbs la nivel de 5 % a arătat o valoare aberantă în cadrul analizei;

— proba C. Testele Dixon și Grubbs la niveluri de 1 și 5 % au arătat o valoarea aberantă în cadrul analizei;

— proba D. Testele Dixon și Grubbs la niveluri de 1 și 5 % au arătat o valoare aberantă în cadrul analizei.

Valoarea aberantă a fost exclusă din calcul.

Trebuie menționat faptul că valorile obținute prin metoda FAME nu au fost niciodată considerate aberante în urma testelor aplicate.

Parametrii de precizie

Tabelele 1 și 2 prezintă rezultatele tuturor laboratoarelor și parametrii de precizie calculați pentru un număr acceptabil (8) de laboratoare, dar, din nefericire, nu toate rezultatele sunt obținute prin aceeași metodă analitică.

Tabelele 3 și 4 prezintă rezultatele care sunt obținute doar prin metoda TG și parametrii de precizie corespunzători. Acceptarea acestor parametri este condiționată de acceptarea numărului scăzut de laboratoare (6).

Figurile 2 și 3 prezintă tendințele pentru Sr și SR calculate pentru cele 4 probe ale celor 2 seturi de date descrise mai sus.

Tabelul 5 prezintă valorile pentru Sr și SR împreună cu valorile colective aferente și parametrii globali r și R.

În final, a fost calculată diferența critică pentru un nivel al probabilității de 95 %.

Tabelul 1

Rezultatele statistice ale metodelor TG + FAME*

Proba A		R_1	R_2	Medie	Nr. de laboratoare reținute după eliminarea valorilor aberante	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Nr. de valori aberante	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Valori aberante	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Valoare medie	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valoare reală	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Deviația standard a repetabilității (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Deviația standard relativă a repetabilității (RSDr %)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Repetabilitate r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Repetabilitatea relativă r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Deviația standard a reproductibilității (SR)	0,23
					Deviația standard relativă a reproductibilității (RSDR %)	2,04
					Reproductibilitate R (95 %)	0,84
					Reproductibilitatea relativă R %	5,71
Proba B		R_1	R_2	Medie	Nr. de laboratoare reținute după eliminarea valorilor aberante	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Nr. de valori aberante	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Valori aberante	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Valoare medie	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valoare reală	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Deviația standard a repetabilității (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Deviația standard relativă a repetabilității (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Repetabilitate r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Repetabilitatea relativă r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Deviația standard a reproductibilității (SR)	0,35
					Deviația standard relativă a reproductibilității (RSDR %)	2,61
					Reproductibilitate R (95 %)	0,99
					Reproductibilitatea relativă R %	7,31

Tabelul 2

Rezultatele statistice ale metodelor TG + FAME*

Proba C		R_1	R_2	Medie	Nr. de laboratoare reținute după eliminarea valorilor aberante	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Nr. de valori aberante	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Valori aberante	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Valoare medie	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valoare reală	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Deviația standard a repetabilității (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Deviația standard relativă a repetabilității (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Repetabilitate r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Repetabilitatea relativă r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Deviația standard a reproductibilității (SR)	0,17
					Deviația standard relativă a reproductibilității (RSDR %)	1,82
					Reproductibilitate R (95 %)	0,47
					Reproductibilitatea relativă R %	5,10

Proba D		R_1	R_2	Medie	Nr. de laboratoare reținute după eliminarea valorilor aberante	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Nr. de valori aberante	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Valori aberante	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Valoare medie	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valoare reală	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Deviația standard a repetabilității (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Deviația standard relativă a repetabilității (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Repetabilitate r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Repetabilitatea relativă r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Deviația standard a reproductibilității (SR)	0,24
					Deviația standard relativă a reproductibilității (RSDR %)	11,43
					Reproductibilitate R (95 %)	0,67
					Reproductibilitatea relativă R %	32,00

Tabelul 3

Rezultatele statistice ale metodelor TG + FAME*

Proba A		R_1	R_2	Medie	Nr. de laboratoare reținute după eliminarea valorilor aberante	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Nr. de valori aberante	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Valori aberante	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valoare medie	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Valoare reală	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Deviația standard a repetabilității (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Deviația standard relativă a repetabilității (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Repetabilitate r (95 %)	0,25
					Repetabilitatea relativă r %	2,24
					Deviația standard a reproductibilității (SR)	0,13
					Deviația standard relativă a reproductibilității (RSDR %)	1,16
					Reproductibilitate R (95 %)	0,36
					Reproductibilitatea relativă R %	3,25
Proba B		R_1	R_2	Medie	Nr. de laboratoare reținute după eliminarea valorilor aberante	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Nr. de valori aberante	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Valori aberante	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valoare medie	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Valoare reală	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Deviația standard a repetabilității (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Deviația standard relativă a repetabilității (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Repetabilitate r (95 %)	0,42
					Repetabilitatea relativă r %	3,16
					Deviația standard a reproductibilității (SR)	0,33
					Deviația standard relativă a reproductibilității (RSDR %)	2,48
					Reproductibilitate R (95 %)	0,93
					Reproductibilitatea relativă R %	6,94

Tabelul 4

Rezultatele statistice ale metodei TG

Proba C		R_1	R_2	Medie	Nr. de laboratoare reținute după eliminarea valorilor aberante	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Nr. de valori aberante	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Valori aberante	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valoare medie	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Valoare reală	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Deviația standard a repetabilității (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Deviația standard relativă a repetabilității (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Repetabilitate r (95 %)	0,42
					Repetabilitatea relativă r %	4,51
					Deviația standard a reproductibilității (SR)	0,19
					Deviația standard relativă a reproductibilității (RSDR %)	2,04
					Reproductibilitate R (95 %)	0,53
					Reproductibilitatea relativă R %	5,71
Proba D		R_1	R_2	Medie	Nr. de laboratoare reținute după eliminarea valorilor aberante	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Nr. de valori aberante	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Valori aberante	DK
					Valoare medie	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valoare reală	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Deviația standard a repetabilității (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Deviația standard relativă a repetabilității (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Repetabilitate r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Repetabilitatea relativă r %	12,01
					Deviația standard a reproductibilității (SR)	0,25
					Deviația standard relativă a reproductibilității (RSDR %)	11,90
					Reproductibilitate R (95 %)	0,69
					Reproductibilitatea relativă R %	33,32

Tabelul 5

Repetabilitate și reproductibilitate (cu FAME)

	Nr. de laboratoare	Valoare maximă excepțională	Repetabilitate Sr (95 %)	Reproductibilitate SR (95 %)
Proba A	8	1	0,09	0,23
Proba B	8	1	0,14	0,35
Proba C	8	1	0,14	0,17
Proba D	8	1	0,08	0,24
Valoare colectivă			0,116	0,256
			R	**R**
Valoare colectivă* 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40

Puritate minimă declarată pentru trienantat = 95 %

Limită minimă declarată pentru trienantat în grăsimea din unt = 11 kg/t

Luându-se în considerare diferența critică pentru un nivel de probabilitate de 95 %, media celor două rezultate nu este mai mică decât: 10,05 kg/t, în cazul în care se încorporează trienantat cu o puritate de 95 %.

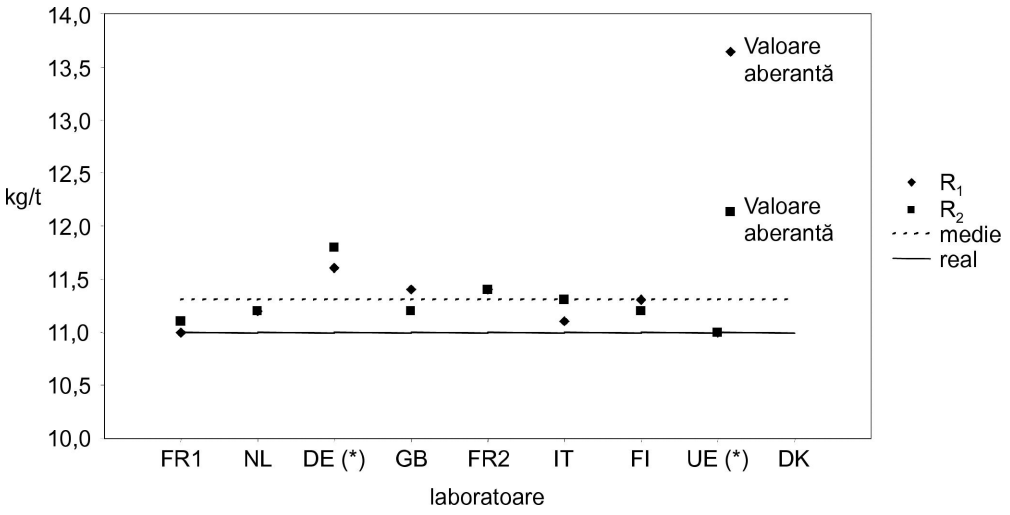
Repetabilitate şi reproductibilitate (fără FAME)

	Nr. de laboratoare	Valoare maximă excepţională	Repetabilitate Sr (95 %)	Reproductibilitate SR (95 %)
Proba A	6	1	0,09	0,13
Proba B	6	1	0,15	0,33
Proba C	6	1	0,15	0,19
Proba D	6	1	0,09	0,25
Valoare colectivă			0,124	0,237
			r	**R**
Valoare colectivă* 2,8			**0,347**	**0,663**

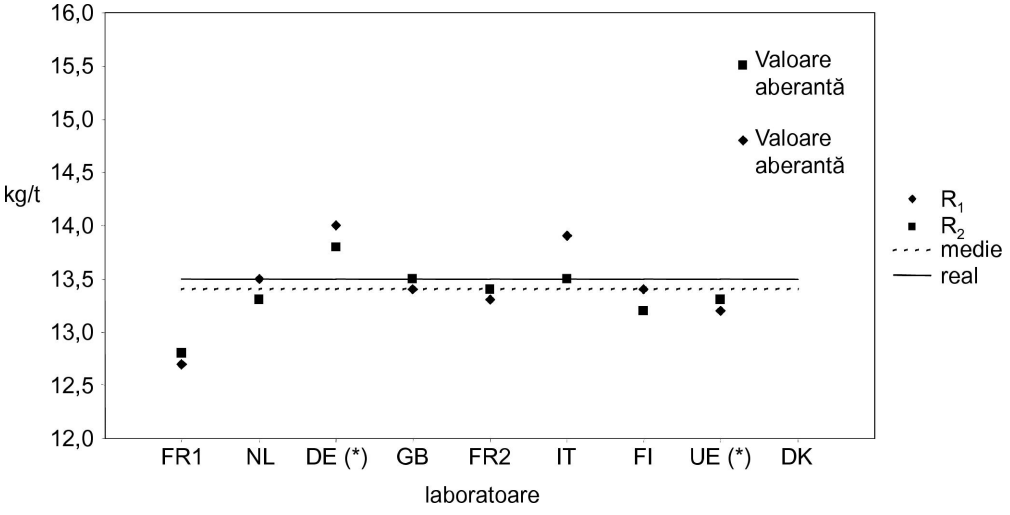
CrD95 = 0,36
Puritate minimă declarată pentru trienantat = 95 %
Limită minimă declarată pentru trienantat în grăsimea din unt = 11 kg/t
Luându-se în considerare diferenţa critică pentru un nivel de probabilitate de 95 %, media celor două rezultate nu este mai mică decât: 10,09 kg/t, în cazul în care se încorporează trienantat cu o puritate de 95 %.

Figura 1 (*)

Rezultate experimentale: Proba A

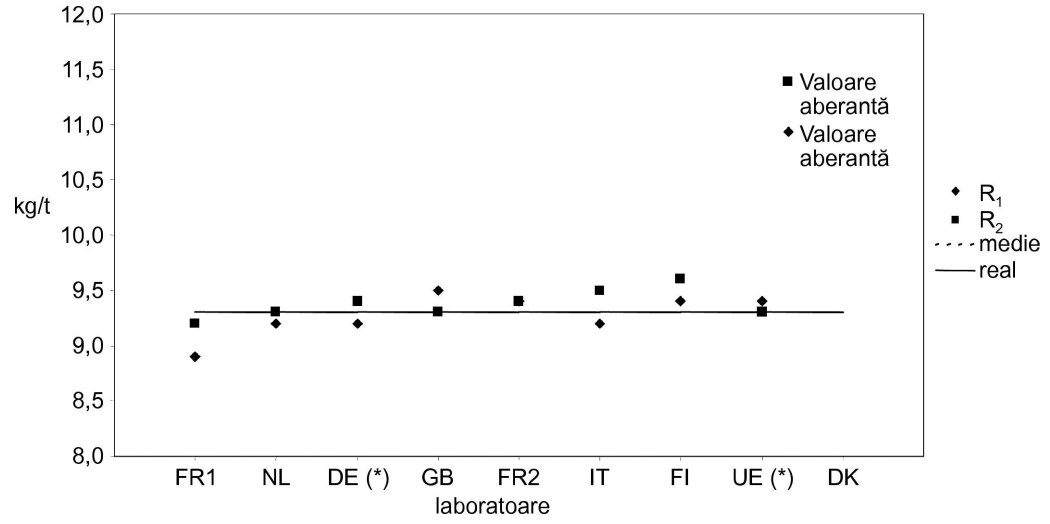


Rezultate experimentale: Proba B



(*) = metoda FAME.

Rezultate experimentale: Proba C



Rezultate experimentale: Proba D

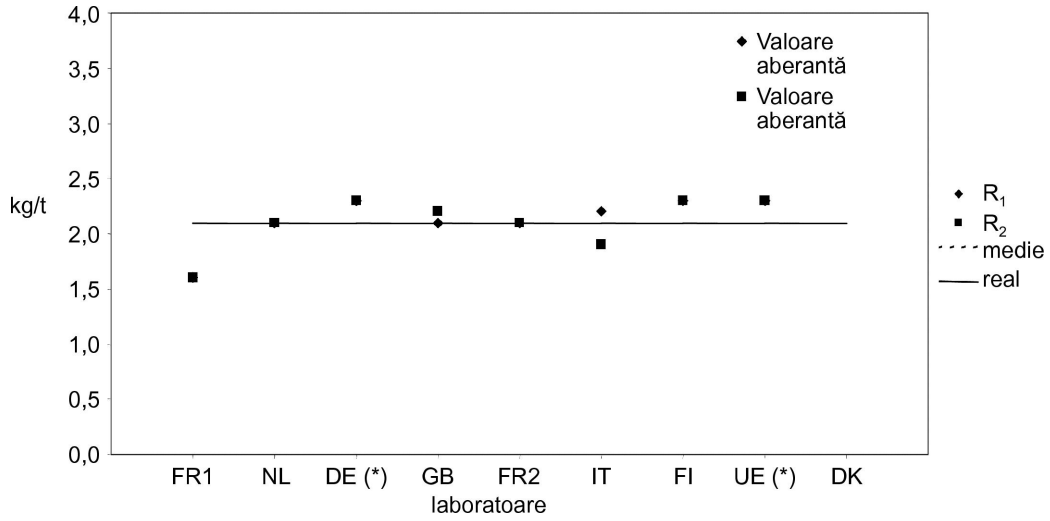


Figura 2

Deviația standard a repetabilității și a reproductibilității la diferite niveluri (TG + FAME)

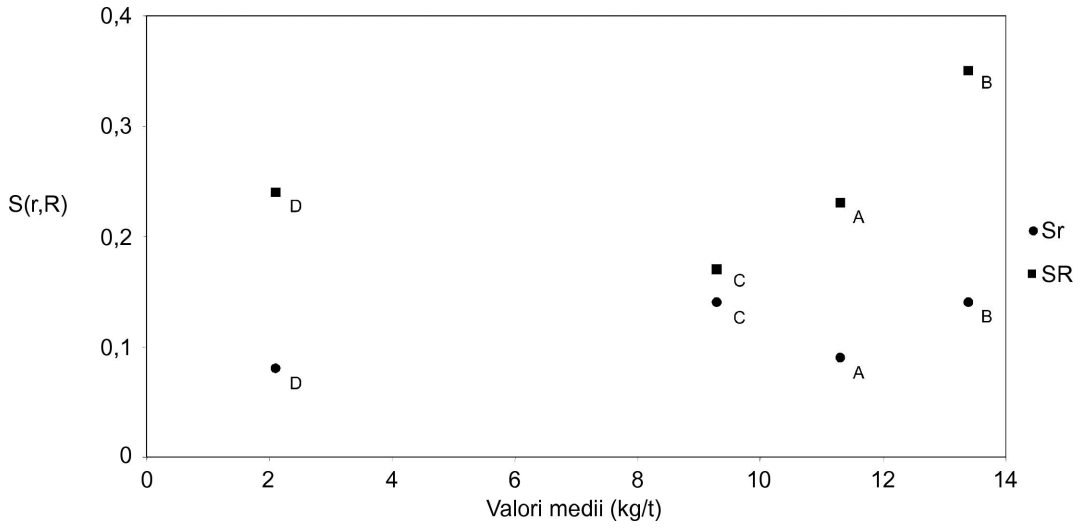


Figura 3

Deviația standard a repetabilității și a reproductibilității la diferite niveluri (TG)

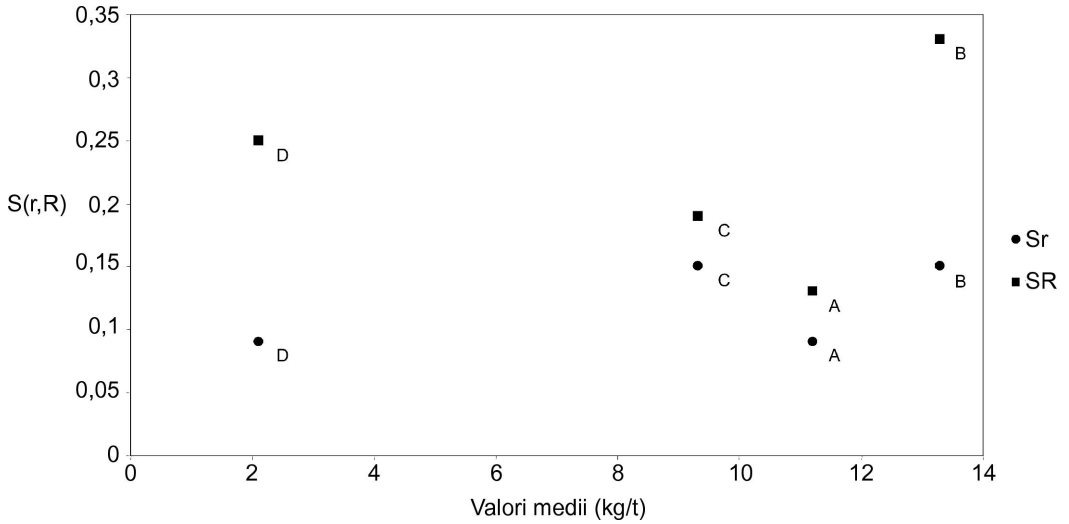
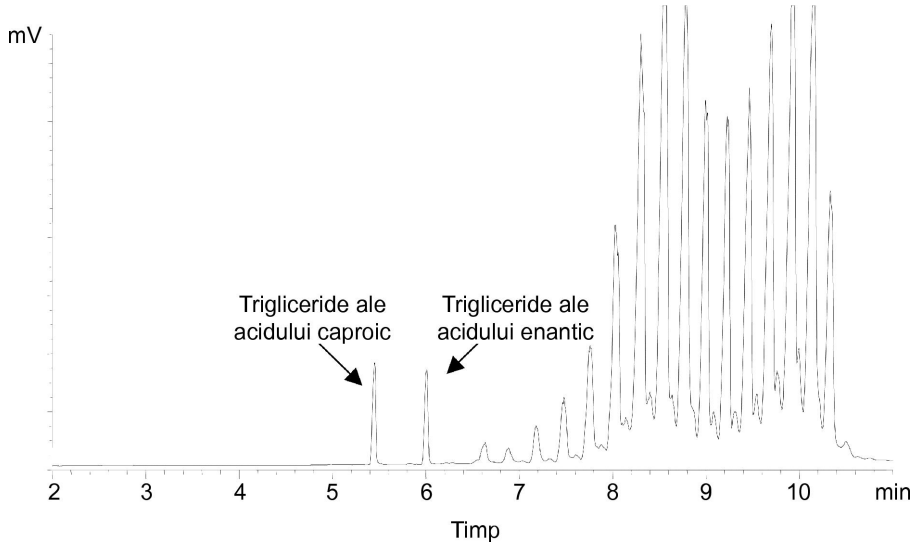


Figura 4

Exemplu folosind un injector în coloană



ANEXA VI

(Articolul 5)

DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE VANILINĂ ÎN UNTUL CONCENTRAT, UNT SAU SMÂNTÂNĂ PRIN CROMATOGRAFIE LICHIDĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ

1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE

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

2. PRINCIPIU

Extragerea unei cantități cunoscute din probă cu ajutorul unui amestec de izopropanol/etanol/acetonitril (1:1:2). Precipitarea majorității grăsimii prin răcire între – 15 °C și – 20 °C, urmată de centrifugare.

După diluarea cu apă, determinarea conținutului de vanilină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC).

3. APARATURĂ

Aparatură obișnuită de laborator, în special următoarele:

3.1. Refrigerator cu funcționare în intervalul de temperatură – 15 °C la – 20 °C

3.2. Seringi de unică folosință cu capacitate de 2 ml

3.3. Membrană filtrantă cu pori de 0,45 µm, rezistentă la o soluție conținând 5 % soluție de extragere (4.4)

3.4. Sistem de cromatografie lichidă conținând o pompă (cu debit de 1,0 ml/min), un injector (injectare automată sau manuală a 20 µl), un detector UV (acționat la 306 nm, 0,01 Å scală completă), un înregistrator sau integrator și o coloană termostat care funcționează la 25 °C

3.5. Coloană analitică (aproximativ 250 mm × 4,6 mm diametru interior) umplută cu LiChrospher RP 18 (Merck, 5 µm) sau o coloană echivalentă

3.6. Coloană de control (aproximativ 20 mm × 3 mm diametru interior) umplută cu LiChrospher RP 18 (5-10 µm) sau o coloană echivalentă

3.7. Centrifugă care operează la 2 000 rpm.

4. REACTIVI

Toți reactivii utilizați trebuie să fie de calitate analitică recunoscută.

4.1. Izopropanol

4.2. Etanol 96 % (v/v)

4.3. Acetonitril

4.4. Soluție de extragere

Se amestecă izopropanol (4.1), etanol (4.2) și acetonitril (4.3) în proporție de 1:1:2 (v/v).

4.5. Vanilină (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehidă) ≥ 98 %

4.5.1. *Soluție „stock" de vanilină (= 500 µg/ml)*

Se cântăresc, cu o precizie de 0,1 mg, aproximativ 50 mg (CM mg) de vanilină (4.5) într-un balon cotat de 100 ml, se adaugă 25 ml de soluție de extragere (4.4) și se completează cu apă.

4.5.2. *Soluție etalon de vanilină (= 10 µg/ml)*

Se pipetează 5 ml de soluție „stock” de vanilină (4.5.1) într-un balon cotat de 250 ml și se completează cu apă.

4.5.3. *Metanol, calitate HPLC*

4.5.4. *Acid acetic, glacial*

4.5.5. *Apă, calitate HPLC*

4.5.6. *Faza mobilă HPLC*

Se amestecă 300 ml de metanol (4.5.3) cu aproximativ 500 ml apă (4.5.5) și 20 ml de acid acetic (4.5.4) într-un balon cotat de 1 000 ml și se completează cu apă (4.5.5). Se filtrează printr-un filtru de 0,45 µm (3.3).

5. PROCEDURĂ

5.1. **Prepararea probei de analiză**

5.1.1. *Unt*

Se încălzește proba până când 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. Când proba devine suficient de maleabilă, se omogenizează prin scuturare. Untul se amestecă timp de 15 s înainte de prelevarea unei probe. Se cântăresc, cu o precizie de 1 mg, aproximativ 5 g (SM g) de unt într-un balon cotat de 100 ml.

5.1.2. *Unt concentrat*

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

5.1.3. *Smântână*

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 cântăresc, cu o precizie de 1 mg, aproximativ 10 g (SM g) de smântână într-un balon cotat de 100 ml.

5.2. **Prepararea soluției de analiză**

Se adaugă aproximativ 75 ml de soluție de extragere (4.4) la proba prelevată (5.1.1, 5.1.2 sau 5.1.3), se agită sau se scutură cu putere timp de aproximativ 15 minute și se completează cu soluție de extragere (4.4). Se transferă aproximativ 10 ml din acest extract într-o eprubetă prevăzută cu dop. Eprubeta se introduce în refrigerator (3.1) 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 (3.3) cu ajutorul unei seringi (3.2). Filtratul este gata pentru determinarea HPLC.

5.3. **Calibrare**

Se pipetează 5 ml de soluție etalon de vanilină (4.5.2) într-un balon cotat de 100 ml. Se adaugă 5 ml de soluție de extragere (4.4) și se completează cu apă până la marcaj. Această soluție conține 0,5 µg/ml de vanilină.

5.4. **Determinarea prin HPLC**

Se lasă sistemul cromatografic să se stabilizeze timp de aproximativ 30 minute. Se injectează soluția etalon (5.3). Procedura se repetă până când diferența dintre suprafețele vârfurilor sau dintre înălțimile vârfurilor a două injectări succesive este sub 2 %. În condițiile descrise timpul de retenție al vanilinei este de aproximativ 9 minute. Soluția etalon (5.3) se analizează în duplicat prin injectarea a 20 µl. Se injectează 20 µl din soluția de analiză (5.2). Se determină suprafața sau înălțimea vârfului obținut pentru vanilină. Se repetă injectarea soluției etalon (5.3) în duplicat, după 10 injectări ale probelor analizate (5.2).

6. CALCULAREA REZULTATELOR

Se calculează suprafața (sau înălțimea) medie a vârfurilor (AC) pentru vârfurile vanilinei asociate injectării duplicatelor la începutul și la sfârșitul 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 (4.5.1).

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

$$C = \left|\left(AS \times 20 \times 0{,}96\right) / \left(SM \times R\right)\right|$$

unde:

AS = suprafața vârfului sau înălțimea pentru vârful vanilinei din proba de analiză

SM = masa probei de analiză exprimată în g (5.1.1, 5.1.2 sau 5.1.3).

Notă: La analiza vanilinei din smântână, 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 smântânii în procente (m/m).

20 = coeficientul de diluare a probei etalon și a probei de analiză

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

Notă: În locul suprafeței vârfului se poate folosi înălțimea vârfului (a se vedea 8.3).

7. PRECIZIA METODEI

7.1. **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.

7.2. **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. LIMITELE DE TOLERANȚĂ

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

8.2. Marcator obținut fie din vanilie, fie din vanilină sintetică

8.2.1. 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.

8.2.2. 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.

8.3. Marcator obținut numai din păstăi de vanilie sau extracte integrale ale acesteia:

8.3.1. Rata de încorporare pentru 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehidă est 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.

8.3.2. 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. NOTE

9.1. 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 %.

9.2. 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.

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

9.4. Folosindu-se soluții diluate adecvate de soluție etalon (4.5.2), 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 VII

(Articolul 5)

DETECTAREA PRIN SPECTOMETRIE A ETIL ESTERULUI ACIDULUI BETA-APO-8'-CAROTENIC ÎN UNTUL CONCENTRAT ȘI ÎN UNT

1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE

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

2. PRINCIPIU

Grăsimea din unt se dizolvă în eter de petrol și se măsoară absorbanța la 440 nm. Conținutul de ester apo-carotenic se determină prin raportare la un standard extern.

3. APARATURĂ

3.1. Pipete – gradate, cu capacitate de 0,25, 0,50, 0,75 și 1,0 ml

3.2. Spectrofotometru – adecvat utilizării la 440 nm (și la 447-449 nm) și prevăzut cu celule cu drum optic de 1 cm

3.3. Baloane cotate, de 20 ml și de 100 ml

3.4. 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

3.5. Cuptor, 45 °C ± 1 °C

3.6. Filtre fără cenușă cu filtrare rapidă

4. REACTIVI

Toți reactivii utilizați trebuie să fie de calitate analitică recunoscută.

4.1. Suspensie de acid apo-carotenic (aproximativ 20 %)

4.1.1. 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 cotat (100 ml), se dizolvă în 20 ml cloroform (4.4) și se completează volumul cu ciclohexan (4.5). 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 absorbanța 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 apo-carotenic 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} = absorbanța soluției de măsurare la maximum

M_{susp} = masa suspensiei (g)

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

P = Puritatea (conținutul) suspensiei (%)

Notă: Suspensia de ester apo-carotenic 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.

4.1.2. Soluția etalon de ester apo-carotenic, aproximativ 0,2 mg/ml

Se cântăresc, cu o precizie de 1 mg, aproximativ 0,100 g de suspensie de ester apo-carotenic (4.1.1.) (W), se dizolvă în ligroină (4.2), se transferă cantitativ într-un balon cotat cu capacitate de 100 ml și se completează până la marcaj cu ligroină.

Această soluție conține (W × P)/10 mg/ml de ester apo-carotenic.

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

4.2. Ligroină (40-60 °C)

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

4.4. Cloroform

4.5. Ciclohexan

5. PROCEDURĂ

5.1. **Prepararea probei de analiză**

5.1.1. *Unt concentrat*

Proba se topește în cuptor la aproximativ 45 °C.

5.1.2. *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 (4.3) 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.

5.2. **Determinare**

Se cântărește, cu o precizie de 1 mg, aproximativ 1 g de unt concentrat [sau grăsime extrasă din unt (5.1.2)], (M). Se transferă cantitativ într-un balon cotat de 20 ml (V), folosindu-se ligroină (4.2), se completează până la marcaj și se amestecă bine.

Se transferă o parte alicotă într-o celulă de 1 cm și se măsoară absorbanța la 440 nm, față de o probă martor de ligroină. Concentrația de ester apo-carotenic în soluție se determină conform curbei de etalonare (C µg/ml).

5.3. **Calibrare**

Se pipetează 0, 0,25, 0,5, 0,75 și 1,0 ml de soluție etalon de ester apo-carotenic (4.1.2) în cinci baloane cotate de 100 ml. Se diluează la volum cu ligroină (4.2) și se amestecă.

Concentrațiile aproximative ale soluției variază între 0 și 2 µg/ml și se calculează cu precizie prin referire la concentrația soluției etalon (4.1.2) (W × P)/10 mg/ml. Se măsoară absorbanța la 440 nm față de o probă martor de ligroină (4.2).

Valorile absorbanței se reprezintă pe axa y, iar pe axa x se reprezintă concentrația esterului apo-carotenic. Se calculează ecuația curbei de etalonare.

6. CALCULAREA REZULTATELOR

6.1. Conținutul de ester apo-carotenic, exprimat în mg/kg de produs, se calculează după cum urmează:

Unt concentrat: (C × V)/M

Unt: 0,82 (C × V)M

unde:

C = conținutul de ester apo-carotenic, în μg/ml, citit de pe curba de etalonare (5.3);

V = volumul (ml) soluției de analiză (5.2);

M = masa (g) cantității analizate (5.2);

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

7. PRECIZIA METODEI

7.1. **Repetabilitate**

7.1.1. *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.

7.1.2. *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.

7.2. **Reproductibilitate**

7.2.1. *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.

7.3. **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.

7.4. **Sursa datelor de precizie**

Datele de precizie au fost determinate printr-un experiment realizat în 1995, în cadrul căruia au participat 11 laboratoare și s-au folosit 12 probe urmărite (șase duplicate probă martor) pentru unt și 12 probe urmărite (șase duplicate probă martor) pentru unt concentrat.

8. LIMITELE DE TOLERANȚĂ

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

8.2. **Unt**

8.2.1. Rata de încorporare pentru unt, având în vedere absorbanța de fond, este de 22 mg/kg.

8.2.2. 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.

8.3. **Unt concentrat**

8.3.1. Rata de încorporare pentru untul concentrat, având în vedere absorbanța de fond, este de 24 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:

— 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 VIII

(Articolul 5)

DETERMINAREA SITOSTEROLULUI SAU A STIGMASTEROLULUI DIN UNT ŞI UNT CONCENTRAT PRIN CROMATOGRAFIA ÎN FAZĂ GAZOASĂ CU COLOANĂ CAPILARĂ

1. OBIECTUL ŞI DOMENIUL DE APLICARE

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. PRINCIPIU

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

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

3. APARATURA

3.1. Balon de saponificare de 150 ml, dotat cu un refrigerator cu reflux cu capete rodate

3.2. Conducte de decantare de 500 ml

3.3. Baloane de 250 ml

3.4. Conducte de egalizare a presiunii, de 250 ml sau cu o capacitate similară, pentru a colecta dietil eterul rezidual

3.5. Coloană de sticlă de 350 mm × 20 mm, prevăzută cu un racord cu frită

3.6. Baie de apă sau izotermă

3.7. Eprubete de reacție de 2 ml

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

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

3.8.2. injector termoreglabil;

3.8.3. detector cu ionizare în flacără și convertor-amplificator;

3.8.4. integrator-înregistrator care poate fi utilizat împreună cu convertorul-amplificator (3.8.3).

3.9. 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 μm; 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.

3.10. Microseringă cu ac din oțel inoxidabil de 1 μl pentru cromatografie cu gaz.

4. REACTIVI

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.

4.1. Etanol, cu o puritate de cel puțin 95 %

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

4.3. Betulină cu o puritate de cel puțin 99 %

4.3.1. Soluții de betulină în eter dietilic (4.4)

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

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

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

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

4.6. Reactiv de sililare, de exemplu, TRI-SIL (poate fi procurat de la Pierce Chemical Co., Categoria nr. 49001) 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).

4.7. Lanosterol

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

Nota 1: Puritatea materialelor etalon utilizate pentru calibrare trebuie determinată prin metoda de normalizare. Se presupune că toți sterolii din probă sunt reprezentați în cromatogramă, că suprafața totală a vârfurilor reprezintă 100 % din compușii sterolilor și că sterolii dau aceeași reacție la detector. Liniaritatea sistemului trebuie validată pentru nivelurile de concentrație luate în calcul.

4.8.1. Soluție 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 (4.8) în eter dietilic (4.4)

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

4.9.1. 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 (4.9) în eter dietilic (4.4)

4.10. Amestec pentru testul de rezoluție. Se prepară o soluție conținând 0,05 mg/ml de lanosterol (4.7) și 0,5 mg/ml de sitosterol (4.8) în eter dietilic (4.4)

5. METODĂ

5.1. **Prepararea soluțiilor etalon pentru cromatografie**

Se adaugă soluția etalon intern (4.3.1) la soluția etalon de sterol adecvată și, simultan, la proba saponificată (a se vedea 5.2.2).

5.1.1. Soluția cromatografică etalon de sitosterol: se transferă 1 ml de soluție etalon de sitosterol (4.8.1) în fiecare dintre cele două eprubete de reacție (3.7) și se elimină dietil eterul sub flux de azot. Se adaugă 1 ml de soluție etalon intern (4.3.1.1) și se elimină dietil eterul sub flux de azot.

5.1.2. Soluția cromatografică etalon de stigmasterol: se transferă 1 ml de soluție etalon de stigmasterol (4.9.1) în fiecare dintre cele două eprubete de reacție (3.7) și se elimină dietil eterul sub flux de azot. Se adaugă 1 ml de soluție etalon intern (4.3.1.2) și se elimină dietil eterul sub flux de azot.

5.2. **Prepararea substanțelor nesaponificabile**

5.2.1. 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 (3.1). Se adaugă 50 ml de etanol (4.1) și 10 ml de soluție de hidroxid de potasiu (4.2). 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.

5.2.2. Se adaugă 1,0 ml de soluție etalon intern în balon (4.3.1.1), în cazul în care se determină sitosterolul, sau (4.3.1.2), în cazul în care se determină stigmasterolul. Se amestecă bine. Se transferă cantitativ conținutul balonului într-o conductă de decantare de 500 ml (3.2), se spală balonul cu 50 ml de apă, apoi cu 250 ml de eter dietilic (4.4). 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.

Nota 2: 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.

5.2.3. Se trece faza eterică limpede și desaponificată pe o coloană de sticlă (3.5) care conține 30 g de sulfat de sodiu anhidru (4.5). Se colectează eterul într-un balon de 250 ml (3.3). 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.

Nota 3: 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.

5.3. **Prepararea trimetil-silil-eterilor**

5.3.1. Se transferă soluția de eter rămasă în balon într-o eprubetă de reacție de 2 ml (3.7) 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.

5.3.2. Se sililează proba prin adăugarea a 1 ml de TRI-SIL (4.6). 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 (4.10) în același mod ca și probele.

Nota 4: Sililarea trebuie efectuată într-un mediu anhidru. Sililarea incompletă a betulinei se recunoaște prin obținerea unui al doilea vârf 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.

5.4. **Analiza prin cromatografie cu gaz**

5.4.1. *Alegerea condițiilor pentru procedură*

Se instalează cromatograful cu gaz conform instrucțiunilor producătorului.

Condițiile indicate pentru procedură sunt următoarele:

— temperatura coloanei: 265 °C;

— temperatura injectorului: 265 °C;

— temperatura detectorului: 300 °C;

— debitul gazului vector: 0,6 ml/min;

— presiunea hidrogenului: 84 kPa;

— presiunea aerului: 155 kPa;

— 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.

Nota 5: Curățarea regulată a camerei de vaporizare este deosebit de importantă.

— cantitatea de substanță injectată: 1 µl de soluție TMSE.

Se lasă sistemul să se echilibreze și se obține un răspuns suficient de 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:

— vârful sitosterolului trebuie să prezinte o rezoluție suficientă față de lanosterol. Figura 1 prezintă o cromatogramă tipică, cea care trebuie obținută pentru un amestec sililat prin testul de rezoluție (4.10);

— 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;

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

5.4.2. *Protocolul de analiză*

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 vârfurilor. 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.

Nota 6: Integrarea vârfului stigmasterolului trebuie să prezinte curbele indicate la punctele 1, 2 și 3 din figura 2b.
Integrarea vârfului sitosterolului trebuie să înglobeze suprafața vârfului 22-dihidro-β-sitosterolului (stigmastanol) care apare imediat după sitosterol (a se vedea figura 3b) în momentul evaluării sitosterolului total.

6. CALCULAREA REZULTATELOR

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

R_1 = (suprafața medie a vârfului sterolului în etalon)/(suprafața medie a vârfului betulinei în etalon)

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

R_2 = (suprafața vârfului sterolului în probă)/(suprafața vârfului betulinei în probă)

W_1 = conținutul de sterol al etalonului (mg) din 1 ml de soluție etalon (4.8.1 sau 4.9.1)

W_2 = masa probei (g) (5.2.1)

P = puritatea sterolului etalon (4.8 sau 4.9)

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

7. PRECIZIA METODEI

7.1. **Unt**

7.1.1. *Repetabilitate*

7.1.1.1. 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.

7.1.1.2. 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.

7.1.2. *Reproductibilitate*

7.1.2.1. 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.

7.1.2.2. 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.

7.1.3. *Sursa datelor de precizie*

Datele de precizie au fost determinate printr-un experiment realizat în 1992 în care au fost implicate opt laboratoare și șase probe (trei duplicate probă martor) pentru stigmasterol și șase probe (trei duplicate probă martor) pentru sitosterol.

7.2. **Unt concentrat**

7.2.1. *Repetabilitate*

7.2.1.1. 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.

7.2.1.2. 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.

7.2.2. *Reproductibilitate*

7.2.2.1. 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.

7.2.2.2. 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.

7.2.3. *Sursa datelor de precizie*

Datele de precizie au fost determinate printr-un experiment realizat în 1991 în care au fost implicate opt laboratoare și șase probe (trei duplicate probă martor) pentru stigmasterol și șase probe (trei duplicate probă martor) pentru sitosterol.

8. LIMITE DE TOLERANȚĂ

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

8.2. **Unt**

8.2.1. *Stigmasterol*

8.2.1.1. 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.

8.2.1.2. 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.

8.2.2. *Sitosterol*

8.2.2.1. 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.

8.2.2.2. 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.

8.3. **Unt concentrat**

8.3.1. *Stigmasterol*

8.3.1.1. 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.

8.3.1.2. 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.

8.3.2. *Sitosterol*

8.3.2.1. 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.

8.3.2.2. 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.

Figura 1

Cromatograma amestecului pentru testul de rezoluție

Se preferă rezoluția completă, respectiv vârful lanesterolului trebuie să revină la linia de bază, înainte de a se îndrepta către vârful sitosterolului, deși este tolerată și o rezoluție incompletă.

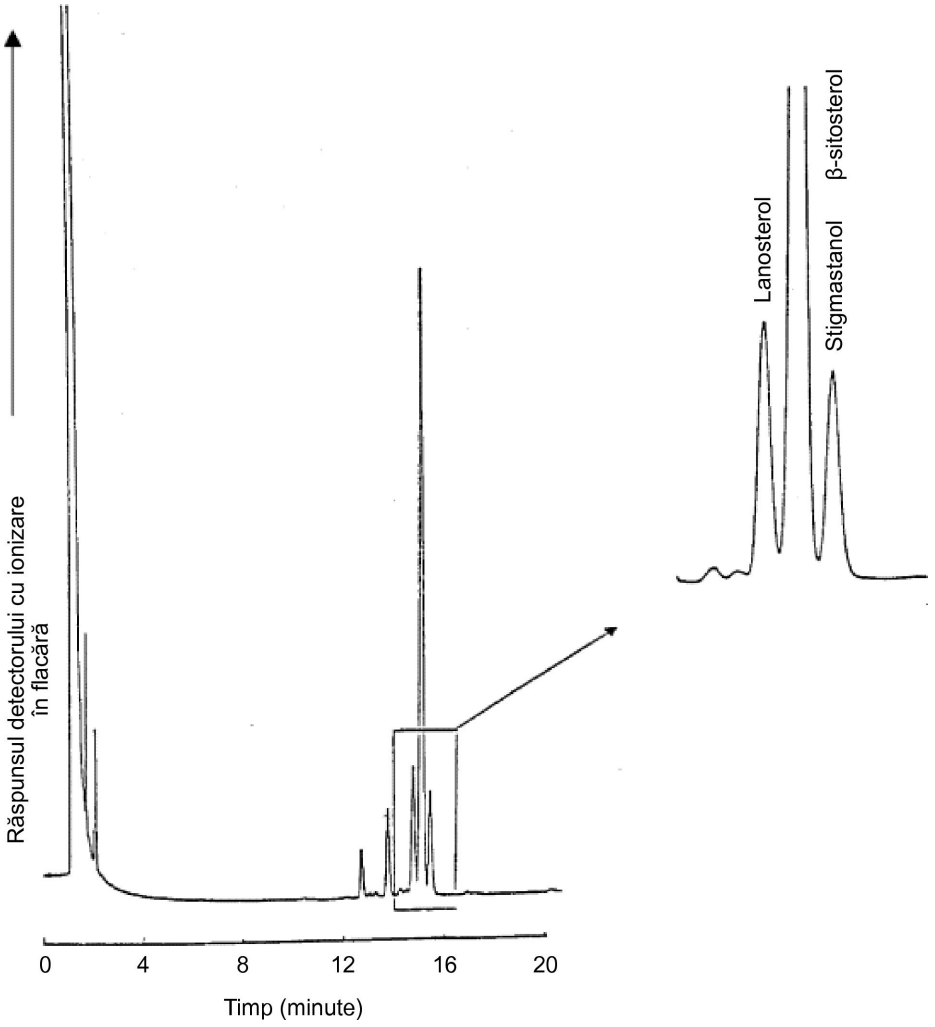


Figura 2a

Etalon stigmasterol

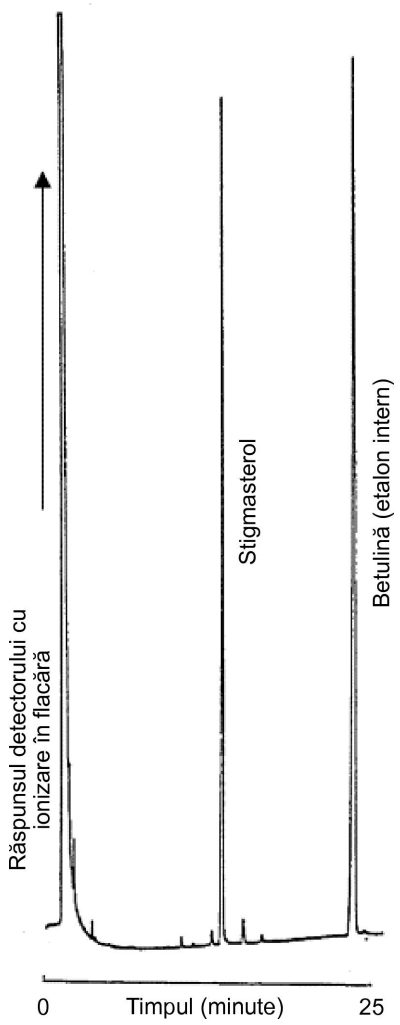
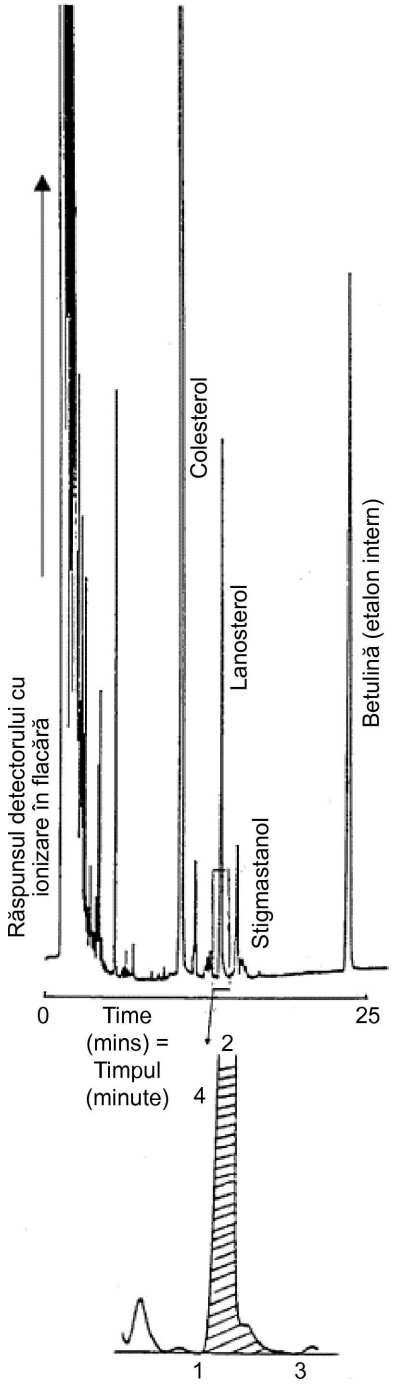


Figura 2b

Probă de unt denaturat cu stigmasterol



Notă: Integrarea vârfului stigmasterolului trebuie să includă toate traseele cuprinse între punctele 1, 2 și 3.

a*Figura 3a*

Etalon sitosterol

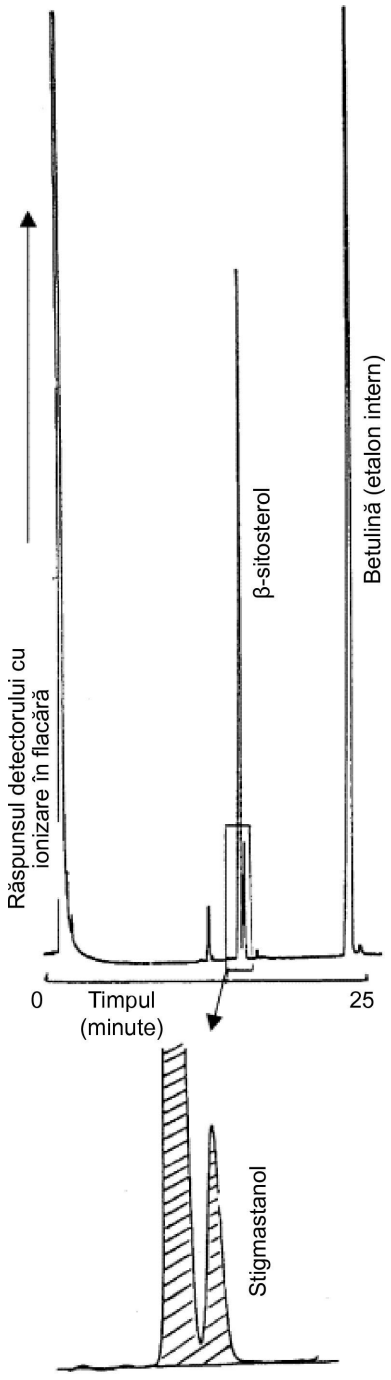
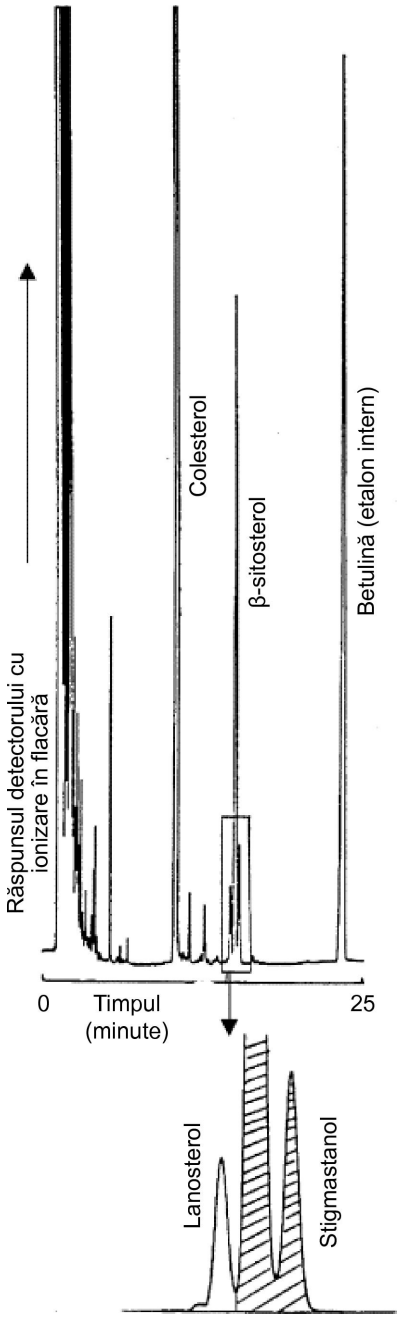


Figura 3b

Probă de unt denaturat cu ß-sitosterol



Notă: β-sitosterolul conține frecvent o impuritate (stigmastanol) care apare imediat după β-sitosterol. Suprafețele celor două vârfuri trebuie însumate la evaluarea cantității totale de β-sitosterol existente.

ANEXA IX

(Articolul 6)

METODĂ 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. OBIECTUL

Detectarea 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. DOMENIUL DE APLICARE

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

3.1. Izolarea cazeinei din brânză și din probele de referință

3.2. Dizolvarea cazeinelor izolate și tratarea acestora prin clivare plasminică (EC.3.4.21.7)

3.3. Focalizarea izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină în prezența ureii și colorarea proteinelor

3.4. 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. REACTIVI

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.

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

Focalizarea izoelectrică

4.1. **Reactivi pentru producerea gelurilor de poliacrilamide cu conținut de uree**

4.1.1. *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 până la 100 ml, apoi se păstrează produsul obținut în refrigerator, într-un recipient de sticlă de culoare maro.

Notă: 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 μS, se deionizează substanța prin agitare cu 2 g Amberlite MB-3 timp de 30 minute, ulterior se filtrează printr-o membrană de 0,45 μm.

4.1.2. *Soluția de gel*

Se prepară o soluție de gel amestecând aditivii și amfoliții cu soluția „stock” de gel (a se vedea 4.1.1).

9,0 ml soluție „stock”
24 mg β-alanină
500 µl amfolit pH 3,5-9,5 ([1])
250 µl amfolit pH 5-7 ([1])
250 µl amfolit pH 6-8 ([1]).

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

Notă: Soluția de gel se prepară imediat înainte de a o turna (a se vedea 6.2).

4.1.3. *Soluții catalizator*

4.1.3.1. N, N, N’ N’ – tetrametiletilendiamină (Temed)

4.1.3.2. 40 % m/v persulfat de amoniu (PER):

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

Notă: A se folosi întotdeauna soluție PER proaspăt preparată.

4.2. **Fluid de contact**

Kerosen sau parafină lichidă

4.3. **Soluție anodică**

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

4.4. **Soluție catodică**

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

Prepararea probei

4.5. **Reactivi pentru izolarea proteinelor**

4.5.1. *Se diluează acid acetic (25,0 ml acid acetic cristalizabil completat cu apă până la 100 ml)*

4.5.2. *Diclorometan*

4.5.3. *Acetonă*

4.6. **Soluție tampon de dizolvare a proteinelor**

Se dizolvă în apă

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

și se completează cu apă până la 50 ml.

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

4.7. **Reactivi pentru clivarea plasminică a cazeinelor**

4.7.1. *Soluție tampon de carbonat de amoniu*

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

([1]) Produsele Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) și Resolyte® pH 5-7 și pH 6-8 (BDH, Merck) s-au dovedit deosebit de adecvate pentru obținerea gradului necesar de separare a γ-cazeinelor.

4.7.2. *Plasmină bovină (EC. 3.4.21.7), cu activitate de minimum 5 U/ml*

4.7.3. *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).

4.8. **Standarde**

4.8.1. *De la Institutul pentru Materiale și Măsurători de Referință al Comisiei, B-2440 Geel, Belgia pot fi obținute probe de referință certificate obținute din amestecuri de lapte închegat de oaie și capră conținând 0 %, respectiv 1 % lapte de vacă.*

4.8.2. *Prepararea probelor de referință provizorii de laborator din lapte de bivoliță închegat conținând 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 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 µl de cheag de vițel (activitatea reninică 1: 10 000, c. 3 000 U/ml), 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 până 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.

Notă: Înaintea preparării probelor etalon, se recomandă verificarea purității laptelui de bivoliță prin focalizarea izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină.

Reactivi pentru colorarea proteinelor

4.9. **Fixativ**

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

4.10. **Soluție pentru decolorare**

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

Notă: 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).

4.11. **Soluții pentru colorare**

4.11.1. *Soluție pentru colorare (soluție „stock” 1)*

Se dizolvă 3,0 g Albastru Briliant de Coomassie G-250 (C.I. 42655) 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.

4.11.2. *Soluție pentru colorare (soluție „stock” 2)*

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

4.11.3. *Soluție pentru colorare (soluție de lucru)*

Se amestecă 125 ml din fiecare soluție „stock” (4.11.1, 4.11.2) imediat înainte de colorare.

Notă: Se recomandă prepararea soluției de colorare în ziua folosirii acesteia.

5. APARATURĂ

5.1. Plăci de sticlă (265 × 125 × 4 mm); rolă de cauciuc (lățime 15 cm); masă reglabilă

5.2. Foaie susținătoare de gel (265 × 125 mm)

5.3. Foaie de acoperire (280 × 125 mm). Se lipește o bucată de bandă adezivă (280 × 6 ×0,25 mm) pe fiecare latură lungă (a se vedea figura 1)

5.4. Cuvă de electrofocalizare cu placă de răcire (de exemplu 265 × 125 mm) cu unitate de alimentare electrică adecvată (≥ 2,5 kV) sau cu aparat automat de electroforeză

5.5. Criostat de circulație controlat termostatic la 12 ± 0,5 °C

5.6. Centrifugă ajustabilă la 3 000 g

5.7. Benzi de electrozi (lungime ≥ 265 mm)

5.8. Sticle picurătoare de plastic pentru soluțiile anodice și catodice

5.9. Aplicatoare de probe (10 × 5 mm, vâscoză sau hârtie de filtru cu absorbție redusă a proteinelor)

5.10. Foarfeci, scalpele și pensete din oțel inoxidabil

5.11. Cuve din oțel inoxidabil pentru colorare și decolorare (de exemplu, tăvi de 280 × 150 mm)

5.12. Omogenizator ajustabil cu tijă (diametrul tijei 10 mm), viteză de rotație 8 000-20 000 rpm

5.13. Agitator magnetic

5.14. Baie ultrasonică

5.15. Aparat de sudură a foliilor

5.16. Micropipete de 25 µl

5.17. Concentrator sub vid sau liofilizator

5.18. Baie de apă cu agitator, controlată termostatic și ajustabilă la 35 și 40 ± 1 °C

5.19. Echipament de densitometrie cu citire la λ = 634 nm

6. PROCEDURĂ

6.1. **Prepararea probei**

6.1.1. *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 (4.5.1) 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 (4.5.1), se adaugă 20 ml diclorometan (4.5.2), se omogenizează din nou și se pune în centrifugă (5 minute, 3 000 g). Se îndepărtează cu o spatulă stratul de cazeină care se află între faza apoasă și cea organică (a se vedea figura 2) și se elimină ambele faze. Se reomogenizează cazeina în 40 ml apă distilată (a se vedea mai sus) și în 20 ml diclorometan (4.5.2), apoi se pune în centrifugă. Se repetă procedura până când ambele faze extrase sunt incolore (de două sau trei ori). Se omogenizează reziduul de proteină cu 50 ml acetonă (4.5.3) și se filtrează printr-o hârtie de filtru pliată de viteză medie. Se spală de fiecare dată reziduul de pe filtru cu câte 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.

Notă: Cazeina izolată uscată trebuie păstrată la – 20 °C.

6.1.2. *Clivarea plasminică al ß-cazeinelor pentru intensificarea γ-cazeinelor*

Se prepară o suspensie de 25 mg cazeine izolate (6.1.1) în 0,5 ml soluție tampon de carbonat de amoniu (4.7.1) și se omogenizează timp de 20 minute folosind, de exemplu, tratamentul ultrasonic. Se încălzește la 40 °C și se adaugă 10 µl plasmină (4.7.2), apoi se amestecă și se incubează timp de o oră la 40 °C, agitând continuu. Pentru a inhiba enzimele se adaugă 20 µl soluție de acid ε-aminocaproic (4.7.3), apoi se adaugă 200 mg uree solidă și 2 mg ditiotreitol.

Notă: 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 (4.6).

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

Cu ajutorul câtorva picături de apă se întinde foaia susținătoare de gel (5.2) pe o placă de sticlă (5.1), îndepărtându-se surplusul de apă cu un șervețel. Se întinde în mod similar foaia de acoperire (5.3) cu spațiatoare (0,25 mm) pe o altă placă de sticlă. Se așază placa orizontal pe masa reglabilă.

Se adaugă 10 µl Temed (4.1.3.1) la soluția de gel degazeificată pregătită (4.1.2), se amestecă și se adaugă 10 µl soluție PER (4.1.3.2), 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 până la capăt placa susținătoare de gel, folosind o spatulă subțire, apoi se așază 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 săptămâni).

Notă: Foaia de acoperire și spațiatoarele 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 × 5 cm).

6.3. **Focalizarea izoelectrică**

Se reglează termostatul de răcire la 12 °C. Se șterge cu kerosen spatele foii susținătoare de gel, apoi se picură câteva picături de kerosen (4.2) pe centrul blocului de răcire. Se rulează apoi pe el „sandvișul" de gel, cu partea susținătoare de gel îndreptată în jos, având 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 (4.3, 4.4), se taie după lungimea gelului și se plasează în poziția prevăzută (distanța dintre electrozi de 9,5 cm).

Condiții pentru focalizarea izoelectrică:

6.3.1. *Dimensiunile gelului 265 × 125 × 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 distanță 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, îndepărtând cu grijă aplicatorii probei după 60 minute de focalizare a probei.

Notă: În cazul în care se modifică grosimea sau lățimea gelurilor, atunci intensitatea și puterea curentului trebuie ajustate în consecință (de exemplu, în cazul în care se folosește un gel de 265 × 125 × 0,5 mm se dublează valorile pentru intensitatea și puterea curentului electric).

6.3.2. *Exemplu de program de tensiune pentru un aparat automat de electroforeză (2 geluri de 5,0 × 4,5 cm), cu electrozi fără benzi și aplicați direct pe gel*

Etapă	Tensiune	Intensitate	Putere	Temp.	Volți oră
1. Prefocalizare	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Focalizarea probei	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Focalizare	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Focalizare	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Se plasează aplicatorul probei la pasul 2 la 0 Vh.

Se îndepărtează aplicatorul probei la pasul 2 la 30 Vh.

6.4. **Colorarea proteinelor**

6.4.1. *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 (4.9); se lasă acolo timp de 15 minute, agitând în continuu.

6.4.2. *Spălarea și colorarea plăcii de gel*

Se scurge cu grijă fixativul și se spală placa de gel de două ori, timp de câte 30 de secunde, cu 100 ml soluție decolorantă (4.10). Se decantează soluția decolorantă și se umple cuva cu 250 ml soluție colorantă (4.11.3); se lasă 45 minute să se coloreze, agitându-se ușor cuva.

6.4.3. *Decolorarea plăcii de gel*

Se decantează soluția colorantă, se spală placa de gel de două ori, cu câte 100 ml soluție decolorantă (4.10), apoi se agită timp de 15 minute cu 200 ml soluție decolorantă și se repetă pasul de decolorare de cel puțin două-trei ori, până când 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).

Nota 1: Fixarea, spălarea, colorarea și decolorarea se efectuează la 20 °C. A nu se folosi temperaturi ridicate.

Nota 2: În cazul în care se preferă colorarea mai sensibilă cu argint (de exemplu, Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, cod nr. 17-1150-01), probele de cazeină tratate cu plasmină trebuie diluate la 5 mg/ml.

7. EVALUARE

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 4 a și 4 b, figura 5). Limita de detecție este mai mică de 0,5 %.

7.1. **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 și 4 b și din figura 5) cu cea a probelor de referință de 0 % și 1 % (oaie, capră) sau cu standardele provizorii de laborator (bivoliță).

7.2. **Estimare densitometrică**

În cazul în care este disponibilă, se aplică densitometria (5.19) pentru determinarea raportului dintre suprafața vârfurilor γ_2- și γ_3-cazeinelor din laptele de vacă, respectiv din laptele de oaie, capră și/sau bivoliță (a se vedea figura 5). Această valoare se compară cu raportul dintre suprafața vârfurilor γ_2- și γ_3-cazeinelor pentru proba de referință 1 % (oaie, capră) sau pentru standardul provizoriu de laborator (bivoliță), analizate pe același gel.

Notă: 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 respectându-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 vârfurilor corespunzător sunt mai mari sau egale cu nivelul din proba de referință 1 %.

8. REFERINȚE

1. *Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2-caseins. Milchwissenschaft 45, 708-711 (1990).*

2. *Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. Milchwissenschaft 50, 83-85 (1995).*

3. *Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ-caseins using plasmin as signal amplifier. in: Electrophoresis-Forum 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).*

4. *Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 195-199 (1982).*

5. *Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μm polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. Electrophoresis 1, 43-56 (1980).*

Figura 1

Schița foii de acoperire

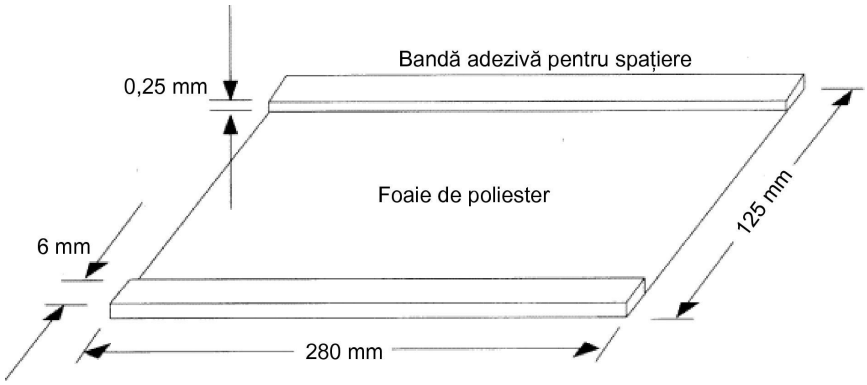


Figura 2

Strat de cazeină plutind după centrifugare între faza apoasă și faza organică

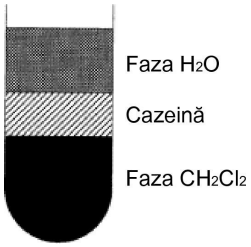
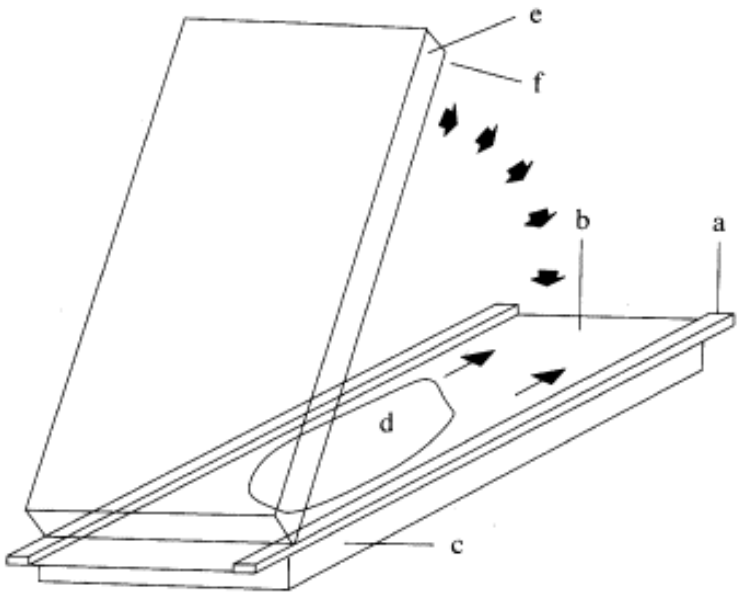


Figura 3

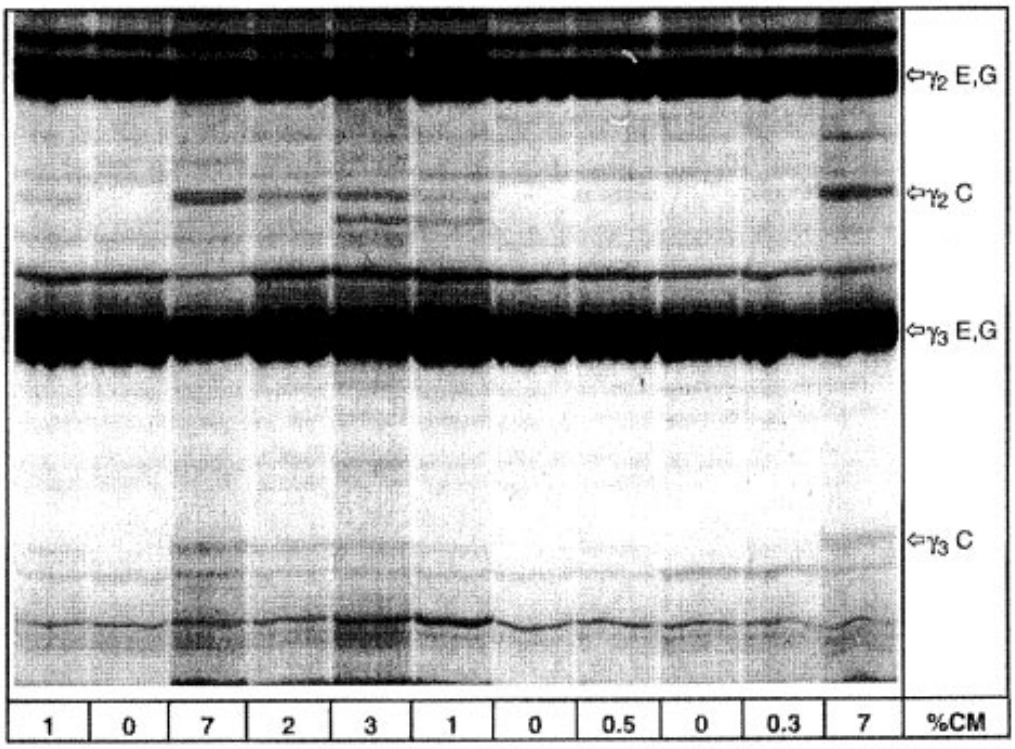
Tehnică de pliere pentru obținerea straturilor foarte fine de geluri poliacrilamide



a = bandă adezivă pentru spațiere (0,25 mm); b = foaie de acoperire (5.3); c, e = plăci de sticlă (5.1); d = soluție de gel (4.1.2); f = foaie susținătoare de gel (5.2)

Figura 4 a

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

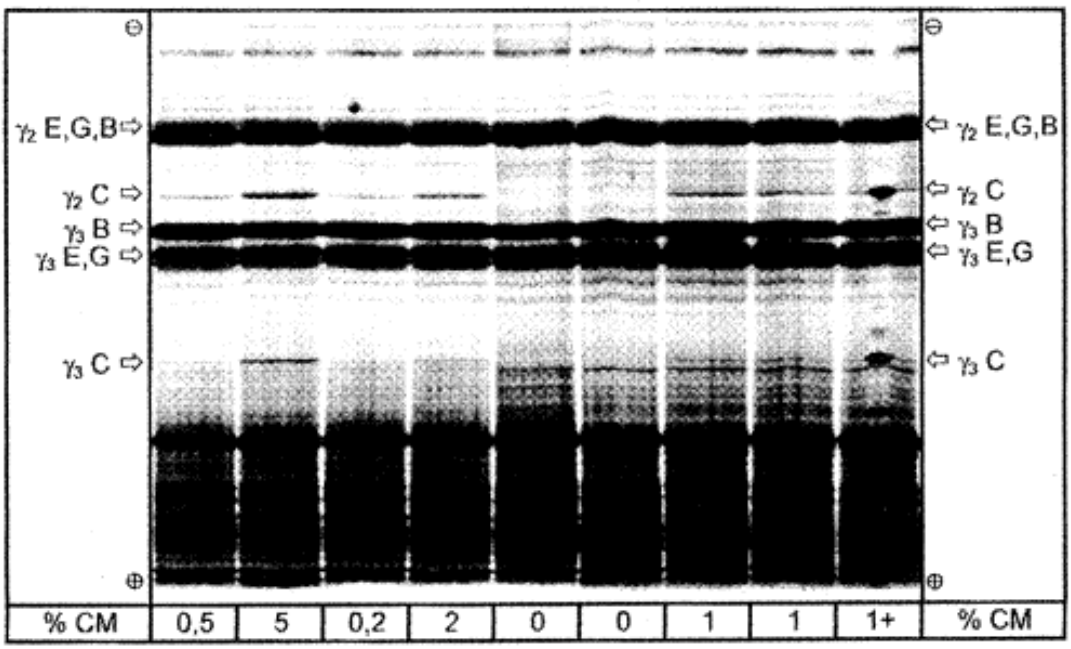


% CM = procentaj lapte de vacă; C = vacă; E = oaie; G = capră.

Este ilustrată jumătatea de sus a gelului IEF.

Figura 4 b

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

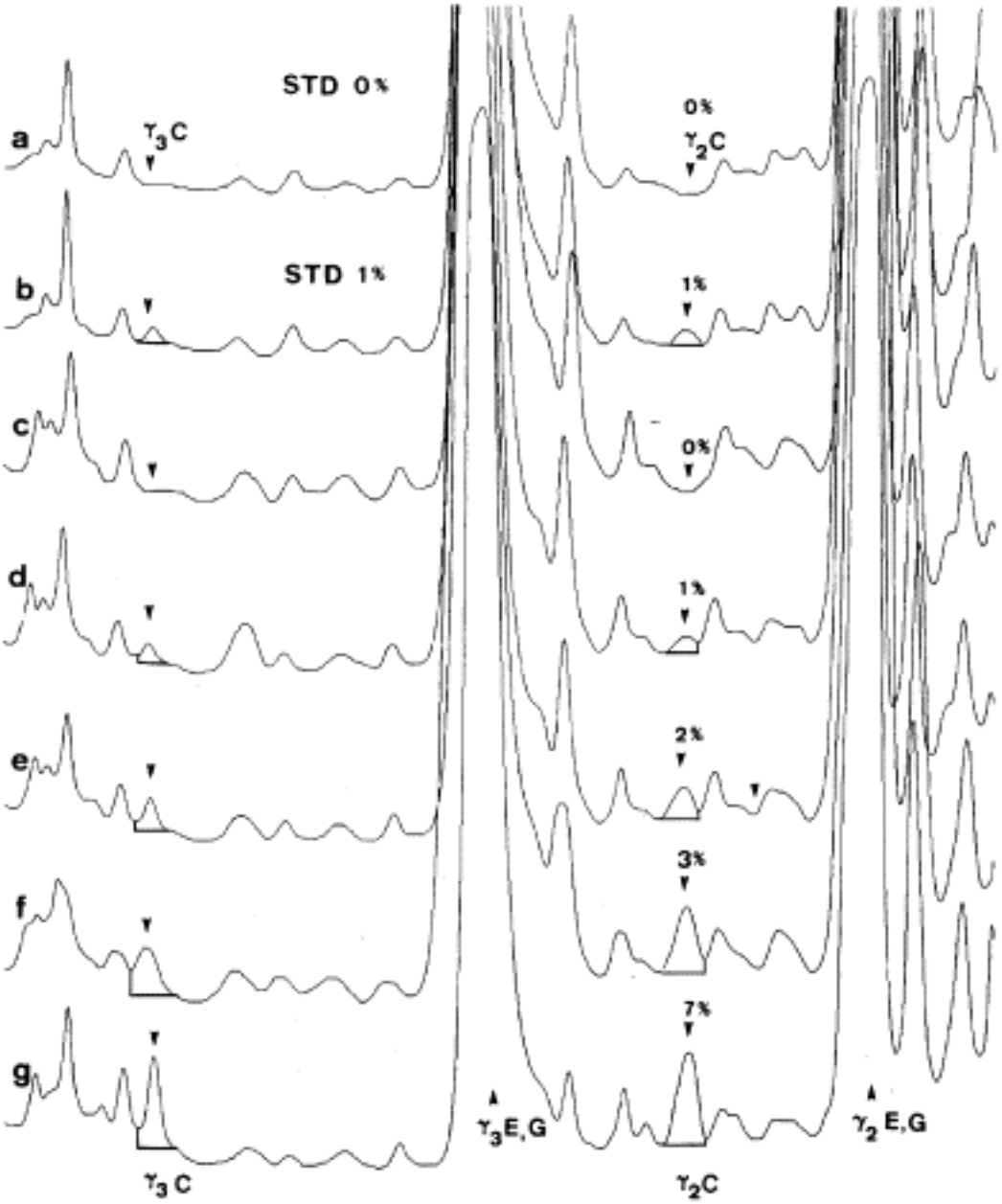


% CM = procentaj lapte de vacă; 1 + = probă conținând 1 % lapte de vacă și dopat cu cazeină pură de lapte de vacă la mijlocul traiectului gelului. C = vacă; E = oaie; G = capră; B = bivoliță.

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 λ = 634 nm.

ANEXA X

(Articolul 7)

METODĂ DE REFERINȚĂ PENTRU DETECTAREA BACTERIILOR COLIFORME DIN UNT, LAPTE PRAF DEGRESAT, CAZEINĂ ȘI CAZEINAȚI

1. PREPARAREA PROBELOR

   Standardul ISO 8261

2. PROCEDURĂ

   Standardul 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. REZULTATE

   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)

   — În cazul în care cele 2 rezultate sunt negative, rezultatul este „conform”

   — În cazul în care cel puțin 1 rezultat este pozitiv, rezultatul este „neconform”

ANEXA XI

(Articolul 8)

DETERMINAREA LACTOZEI ÎN FURAJELE COMBINATE

1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE

Determinarea lactozei în furajele combinate.

2. REFERINȚE

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

3. DEFINIȚIE

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

4. PRINCIPIU

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 refractometru [i] diferențial ([i]).

5. REACTIVI

5.1. **Generalități**

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

5.2. **Lactoză**

Monohidratatul de D-Lactoză [$(C_{12}H_{22})O_{11}$. H_2O] 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 (lactoza nu-și pierde apa cristalizată prin acest tratament).

5.3. **Soluție concentrată Biggs/Szijarto** ([ii])

Se dizolvă 9,10 g dihidrat de acetat de zinc [$Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$] și 5,46 g de acid fosfotungstic monohidrat ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$) în aproximativ 70 ml cu apă de calitate HPLC într-un balon cotat de 100 ml.

Se adaugă 5,81 ml acid acetic glacial (CH_3COOH). Se diluează până 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.

5.4. **Soluție diluată Biggs/Szijarto**

Se diluează 25 ml de soluție concentrată Biggs/Szijarto (5.3) cu apă până la nivelul de 500 ml folosind un balon cotat. Soluția poate fi depozitată la temperatura camerei pentru o perioadă de 1 lună.

5.5. **Prepararea apei de calitate HPLC**

Se filtrează apă ultra pură folosind sistemul de filtrare cu vid (6.9). Pentru a îmbunătăți performanța pompei și pentru a obține o linie de bază stabilă, se degazifică zilnic faza mobilă optând pentru una dintre tehnicile disponibile, cum ar fi spălarea cu heliu, dezintegrarea, sistemul de degazificare în vid sau în linie.

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

6. APARATURĂ

Aparatură obișnuită de laborator și, în special, următoarele:

6.1. **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.

6.2. **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 mm × 4,6 mm (L × ID) (de exemplu, coloane de microcontrol într-un suport de microcontrol) 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 × 9 mm (L × ID).

6.3. **Cuptorul de coloană**

Cuptor capabil să mențină o temperatură constantă de 85 °C ± 1 °C.

6.4. **Pompa de HPLC**

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

6.5. **Dispozitiv de injectare a HPLC**

Autosondă capabilă să injecteze 25 µL și având o repetabilitate < 0,5 %.

Ca soluție alternativă poate fi folosit un dispozitiv manual (cu aceleași cerințe ca la autosondă).

6.6. **Detector de HPLC**

Detector de index refractant de mare sensibilitate având un zgomot < 5.10^{-9} RI unități.

6.7. **Integrator**

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

6.8. **Unitate de purificare a apei**

Sistem capabil să furnizeze apă foarte pură (tip 1) având o rezistivitate >14 MΩ.cm.

6.9. **Unitate de filtrare a solventului**

Sistem care asigură filtrarea apei folosind un filtru cu membrană filtrantă cu diametrul porilor de 0,45 µm.

Notă: Multe unități de purificare a apei (6.8) au o unitate de filtrare integrată de 0,45 sau de 0,2 µm. Se poate renunța la o filtrare suplimentară dacă această apă este folosită direct.

6.10. **Balanță analitică**

Balanță având un afișaj de 0,1 mg.

6.11. **Baie de apă**

Baie de apă capabilă să mențină o temperatură de 40 °C (± 0,5).

6.12. **Centrifugă**

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

6.13. **Balon cotat de 50 mL**

Capacitate de 50 mL, clasa A.

Notă: Pot fi folosite și baloane de altă capacitate ținând cont de factorul volum.

6.14. **Balon cotat de 100 mL**

Capacitate de 100 mL, clasa A.

6.15. **Pipetă gradată**

Pipetă gradată de 10 mL.

Notă: Ca soluție alternativă, se poate folosi un picurător manual cu o capacitate de 5 mL, adăugând un volum dublu de 5 mL de reactiv (5.3).

7. PRELEVAREA PROBELOR

Este important ca laboratorul să primească o probă prelevată conform ISO 707/FIL 50 ([iii]), care să fie cu adevărat reprezentativă și care să nu fi fost deteriorată în timpul transportului sau pe durata depozitării.

8. PREPARAREA SOLUȚIEI ETALON DE LACTOZĂ

8.1. **Etalon 1**

Se dizolvă o cantitate cântărită exact (cu indicații de 0,1 mg) de aproximativ 50 mg monohidrat de lactoză (5.2) într-un balon cotat de 100 mL (6.14) și se completează cu apă până la marcaj.

8.2. **Etalon 2**

Se dizolvă o cantitate cântărită exact (cu indicații de 0,1 mg) de aproximativ 100 mg monohidrat de lactoză (5.2) într-un balon cotat de 100 mL (6.14) și se completează cu apă până la marcaj.

Notă: Soluțiile etalon pot fi depozitate pentru maximum 1 săptămână, la aproximativ 5 °C.

9. PREPARAREA PROBEI DE ANALIZĂ

9.1. **Reconstituirea probei**

Se cântăresc aproximativ 5 g de lapte praf într-un balon de 50 mL (6.13) 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 (6.11) timp de 30 min. și se răstoarnă de câteva ori în această perioadă. Apoi se lasă să se răcească la temperatura camerei.

9.2. **Tratarea probei**

Se ia aproximativ 1 g din această soluție și se pune într-un balon cotat de 50 mL (6.13), 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 (5.4), completați cu apă până 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 (6.12) la 3 000 g timp de 10 min. (poate fi folosită o g mai mare într-o perioadă de timp micșorată în mod corespunzător). Se folosește o cotă alicotă de supernatant pentru analiza HPLC.

10. DETERMINAREA HPLC

10.1. **Prepararea preliminară a HPLC**

10.1.1. *Instalarea coloanei și a precoloanei*

Se intalează precoloana (6.2) în afara cuptorului de coloană (6.3) și coloana (6.1) în cuptor.

Notă: În cazul în care cuptorul nu conține țevi pentru preîncălzirea eluantului, este necesar ca eluantul să treacă prin aproximativ 15 cm de țeavă 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).

10.1.2. *Detectorul și fluxul inițial*

Pentru a obține o linie de bază stabilă, detectorul (6.6) 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. (6.4) pentru cel puțin 20 min., în timp ce cuptorul de coloană (6.3) este reglat la temperatura camerei.

10.1.3. *Cuptorul de coloană și debitul final*

Se reglează cuptorul de coloană (6.3) 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. (6.4). Se lasă sistemul să ajungă în echilibru cu acest debit și la 85 °C, timp de 2 ore sau până se obține o linie de bază stabilă.

10.1.4. *Integrarea*

Se aleg cu grijă parametrii de colectare a datelor și integrare (6.7), cum ar fi estimarea datelor, sensibilitatea, constanta de timp, lățimea vârfului și pragul.

Timpul de retenție al lactozei este de aproximativ 11 minute.

Notă: Multe programe software de strângere de date (6.7) permit o măsurare ușoară a numărului de placă teoretic. Se măsoară numărul de placă teoretic al etalonului 1 (8.1) în mod normal și se înlocuiește coloana (6.1) când numărul de placă este cu 25 % mai mic decât cel al valorii inițiale a unei noi coloane.

10.1.5. *Testarea coloanei de control*

Se verifică regulat (cel puțin o dată la fiecare ciclu de analiză) capacitatea coloanei de control (6.2) de a elimina sărurile din probă prin injectarea a 25 µL de soluție 0,05 % de clorură de sodiu. De fiecare dată când apar vârfuri, coloana de control trebuie schimbată.

10.2. **Prelucrarea etaloanelor**

Se injectează, la începutul fiecărei serii de analize, 25 µL (6.5) din etalonul 1 (8.1) și apoi din etalonul 2 (8.2). Această operațiune se repetă la fiecare 10-20 de probe și, de asemenea, la sfârșitul ciclului.

10.3. **Prelucrarea probelor**

Se injectează 25 µL de supernatant (9.2) din probă.

11. CALCULAREA ȘI EXPRIMAREA REZULTATELOR

11.1. **Calibrare**

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

Cu ajutorul software-ului (6.7) trebuie să se calculeze o curbă liniară de etalonare ce trece forțat prin origine. Se verifică curba pentru a identifica posibila neliniaritate [se pare că neliniaritatea este provocată foarte probabil de o greșeală în pregătirea etaloanelor 1 (8.1) sau 2 (8.2), de o integrarea 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 (8.1) și 2 (8.2), cum ar fi lactoza fără apă.

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

11.2. **Probe**

Rezultatul analizei este obținut în g/100 g și este calculat folosind software-ul (6.7) 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 vârfului 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 (9.1);

W_2: greutatea apei adăugat în g la proba de lapte praf (9.1);

W_3: greutatea probei din soluția reconstituită de lapte praf în g (9.2);

50: volumul balonului cotat folosit în (9.2);

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

12. PRECIZIA

Se poate ca valorile obținute prin această probă interlaboratoare să nu fie aplicabile la valorile și matricele de concentrație altele decât cele date. Valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate vor fi derivate din rezultatul unei probe interlaboratoare realizate conform cu ISO 5725 ([iv]).

12.1. **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) ([v]).

12.2. **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).

13. REFERINȚE

([i]) J. Koops en C. Olieman, Netherlands Milk and Dairy Journal, 39 (1985) 89-106.

([ii]) D.A. Biggs en L. Szijarto, Journal of Dairy Science, 46 (1963) 1196.

([iii]) ISO 707 (FIL 50), Lapte și produse lactate – Metode de prelevare a probelor.

([iv]) ISO 5725-1, Acuratețea (fidelitatea și precizia) metodelor de măsurare și a rezultatelor. Partea 1: Principii generale și definiții.

([v]) ISO 5725-2, Acuratețea (fidelitatea și precizia) metodelor de măsurare și a rezultatelor. Partea 2: O metodă de bază pentru determinarea repetabilității și a reproductibilității metodei standard de măsurare.

Anexa XII

(Articolul 9)

DETECTAREA ZERULUI PRAF DIN LAPTELE PRAF DEGRESAT DESTINAT DEPOZITĂRII PUBLICE PRIN DETERMINAREA CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ A CAZEINOMACROPEPTIDELOR (HPLC)

1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE

Această metodă permite detectarea zerului închegat din laptele praf degresat destinat depozitării publice prin determinarea cazeinomacropeptidelor.

2. REFERINȚE

Standardul internațional ISO 707 – Lapte și produse lactate – Metode de prelevare a probelor conform indicațiilor din anexa I punctul 2 litera (c) ultimul paragraf.

3. DEFINIȚIE

Conținutul de substanțe solide din zer închegat se definește ca procent de masă determinat de conținutul de cazeinomacropeptide prin procedura descrisă.

4. PRINCIPIU

— Reconstituirea laptelui praf degresat, îndepărtarea grăsimilor și proteinelor cu acid tricloroacetic, urmată de centrifugare sau filtrare.

— Determinarea cantității de cazeinomacropeptide (CMP) din supranatant prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC).

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

5. REACTIVI

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.

5.1. **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.

5.2. **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.

Notă: 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.

5.3. **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.

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

5.4. **Probele etalon**

5.4.1. *Lapte praf degresat care îndeplinește cerințele prezentei rezoluții (respectiv [0]).*

5.4.2. *Același lapte praf degresat modificat cu 5 % (m/m) zer închegat praf cu compoziție standard (respectiv [5]).*

6. APARATURĂ

6.1. Balanță analitică

6.2. 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.

6.3. Agitator mecanic

6.4. Agitator magnetic

6.5. Coloane de sticlă cu diametrul de aproximativ 7 cm

6.6. Filtre de hârtie cu filtrare medie cu diametrul de aproximativ 12,5 cm

6.7. Dispozitiv de sticlă pentru filtrare prevăzut cu membrană filtrantă cu diametrul porilor de aproximativ 0,45 µm

6.8. Pipete gradate de 10 ml (ISO 648, clasa A sau ISO/R 835) sau un sistem prin care pot trece 10,0 ml în două minute

6.9. Sistem prin care pot trece 20,0 ml de apă la aproximativ 50 °C

6.10. Baie termostat de apă, reglată la 25 ± 0,5 °C

6.11. Echipament pentru HPLC format din:

6.11.1. Pompă

6.11.2. Injector, manual sau automat, cu o capacitate de 15-30 µl

6.11.3. Două coloane TSK 2 000-SW în serie (lungime de 30 cm, diametru intern de 0,75 cm) sau coloane echivalente (de exemplu, TSK 2 000-SWxl unic, Agilent Technologies Zorbax GF 250 unic) și o precoloană (3 cm × 0,3 cm) umplute cu I 125 sau cu un material cu eficiență echivalentă

6.11.4. Cuptor cu coloană termostat, reglat la 35 ± 1 °C

6.11.5. Detector UV cu lungime de undă variabilă care permite realizarea de măsurători la 205 nm cu o sensibilitate de 0,008 A

6.11.6. Integrator cu ajutorul căruia se poate realiza integrarea la linia de bază

Notă: Se poate lucra cu coloanele aflate la temperatura camerei, dar puterea lor de rezoluție este puțin mai mică. În acest caz, temperatura nu trebui să varieze cu mai mult de ± 5 °C în nicio serie de analize.

7. PRELEVAREA PROBELOR

7.1. Probele se prelevează conform procedurii descrise de standardul internațional ISO 707. Cu toate acestea, statele membre pot folosi și altă metodă de prelevare a probelor, cu condiția ca aceasta să respecte principiile standardului menționat anterior.

7.2. Probele se depozitează în condiții în care nu poate surveni nicio deteriorare sau modificare a compoziției.

8. PROCEDURĂ

8.1. **Prepararea probei de 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.

8.2. **Cantitatea analizată**

Se cântăresc 2,000 ± 0,001 g din proba analizată într-un tub de centrifugare (6.2) sau într-un balon astupat adecvat (50 ml).

8.3. **Îndepărtarea grăsimii și a proteinelor**

8.3.1. 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 (6.3) Tubul se introduce în baia de apă (6.10) și se lasă să se echilibreze la 25 °C.

8.3.2. Se adaugă 10,0 ml de soluție de acid tricloroacetic (5.1) la aproximativ 25 °C timp de două minute, amestecându-se puternic cu ajutorul unui agitator magnetic (6.4). Tubul se introduce într-o baie de apă (6.10) și se lasă timp de 60 de minute.

8.3.3. Se centrifughează (6.2) timp de 10 minute la 2 200 g sau se filtrează printr-o hârtie (6.6), eliminându-se primii 5 ml de filtrat.

8.4. **Determinarea cromatografică**

8.4.1. Se injectează 15-30 µl de supernatant sau filtrat (8.3.3) măsurat cu precizie în aparatul HPLC (6.11) funcționând la un debit de 1,0 ml de soluție eluantă (5.2) pe minut.

Nota 1: Se poate folosi un alt debit în funcție de diametrul intern al coloanelor utilizate sau de instrucțiunile producătorului coloanei.

Nota 2: Soluția eluantă (5.2) 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.

Nota 3: Coloanele se clătesc cu apă la fiecare întrerupere. Soluția nu se lasă niciodată în coloane (5.2).

Înainte de orice întrerupere care durează mai mult de 24 de ore, coloanele se clătesc cu apă și se spală cu soluție (5.3) timp de cel puțin trei ore la un debit de 0,2 ml pe minut.

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

Vârful II:	Al doilea vârf al cromatogramei cu un RT de aproximativ 12,5 minute.
Vârful III:	Al treilea vârf al cromatogramei, corespunzând CMP, cu un RT de 15,5 minute.

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

Integratorul (6.11.6) calculează automat suprafața A a fiecărui vârf.

A_{II}:	suprafața vârfului II
A_{III}:	suprafața vârfului 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.

8.5. **Calibrare**

8.5.1. Probelor etalon (5.4) li se aplică exact procedura descrisă de la punctul 8.2 la punctul 8.4.2.

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

8.5.2. Înainte de determinarea cromatografică a probelor, coloanele trebuie condiționate prin injectarea repetată a probei etalon (5.4.2) în soluție (8.5.1), până când suprafața vârfului și timpul de retenție al acestuia pentru CMP sunt constante.

8.5.3. Se determină coeficientul de răspuns R prin injectarea aceluiași volum de filtrați (8.5.1) folosit și în probe.

9. EXPRIMAREA REZULTATELOR

9.1. **Metoda de calcul și formule**

9.1.1. *Calcularea factorilor de răspuns R:*

Vârful II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$

unde:

R_{II} = coeficienții de răspuns pentru vârfurile II;

A_{II} [0] = suprafețele vârfurilor II pentru proba etalon [0] obținute la 8.5.3.

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

unde:

R_{III} = coeficientul de răspuns pentru vârful III;

A_{III} [0] și A_{III} [5] = suprafețele vârfului III pentru probele etalon [0] și, respectiv, [5] obținute la 8.5.3;

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

9.1.2. *Calcularea suprafeței relative a vârfurilor 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 vârfurilor II, III și, respectiv, IV din proba [E];

A_{II} [E], A_{III} [E] = suprafețele vârfurilor II și, respectiv, IV din proba [E] obținute la 8.4.2;

R_{II}, R_{III} = coeficienții de răspuns calculați la 9.1.1.

9.1.3. *Calcularea timpului relativ de retenție al vârfului III pentru proba [E]: $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$*

unde:

RRT_{III} [E] = timpul relativ de retenție al vârfului III pentru proba [E];

RT_{III} [E] = timpul relativ de retenție al vârfului III din proba [E] obținut la 8.4.2;

RT_{III} [5] = timpul relativ de retenție al vârfului III din proba de control [5] obținut la 8.5.3.

9.1.4. Experimentele au demonstrat că există o relație liniară între timpul relativ de retenție al vârfului III, respectiv RRT_{III} [E] și procentul de zer praf de până la 10 % adăugat.

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

— RRT_{III} [E] este ≥ 1,000 în cazul în care conținutul de zer este ≤ 5 %.

Nesiguranța permisă pentru valorile RRT_{III} este de ± 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.

9.2. Calcularea procentului de zer închegat praf din probă:

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

unde:

W	=	procentul m/m de zer închegat în proba [E];
S_{III} [E]	=	suprafața relativă a vârfului III al probei analizate [E] obținută ca la 9.1.2;
1,3	=	reprezintă suprafața medie relativă a vârfului III exprimată în grame de zer închegat 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 vârfului III egală cu $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Aceste valori au fost obținute la 9.1.1 și, respectiv, 8.5.3;
(S_{III} [0] – 0,9)	=	reprezintă corecția care trebui adusă suprafeței relative 1,3 când S_{III} [0] nu are valoarea 0,9. În mod experimental, suprafața medie relativă a vârfului III al probei martor [0] este de 0,9.

9.3. **Precizia metodei**

9.3.1. *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.

9.3.2. *Reproductibilitate*

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.

9.4. **Interpretare**

9.4.1. Se presupune că zerul este absent în cazul în care suprafața relativă a vârfului III, S_{III}[E] exprimată în grame de zer închegat pe o sută de grame de produs este ≤ 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 (9.3.2);
(S_{III} [0] – 0,9)	=	corecția care trebuie adusă când suprafața S_{III} [0] nu este 0,9 (a se vedea punctul 9.2).

9.4.2. 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, $S_{II}[E]$ ≤ 160, se determină conținutul de zer închegat conform indicațiilor de la punctul 9.2.

9.4.3. 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, $S_{II}[E]$ ≤ 160, se determină conținutul total de proteine (P%); apoi se examinează graficele 1 și 2.

9.4.3.1. Datele obținute în urma analizei probelor de lapte praf degresat nemodificat cu un conținut total de proteine ridicat sunt reprezentate în graficele 1 și 2.

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.

Ecuațiile liniilor drepte punctate de pe graficele 1 și 2 sunt:

S_{III} = 0,376 P % – 10,7	(graficul 1)
S_{III} = 0,0123 S_{II} [E] + 0,93	(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 9.1.2.

Pe baza acestor ecuații rezultă graficele din figura 1.3, menționate la 9.2.

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

9.4.3.2.

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

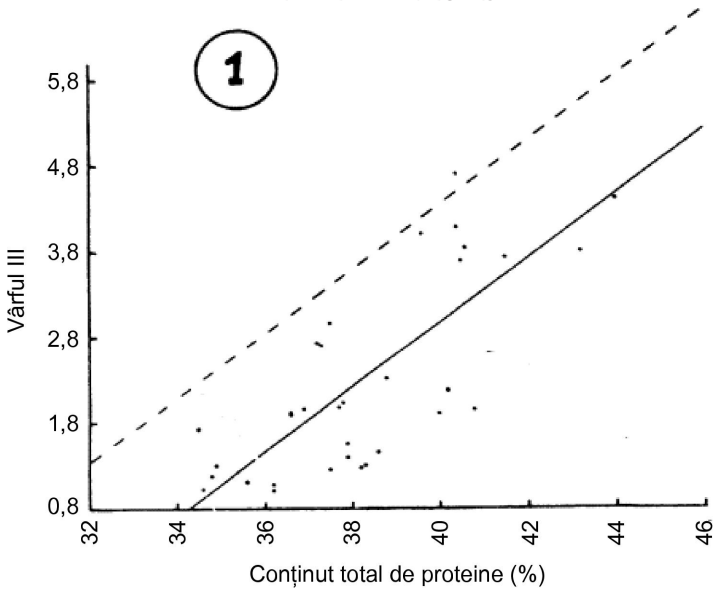
În cazul în care T_1 și T_2 au o valoare mai mare de zero, zerul închegat este prezent.

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

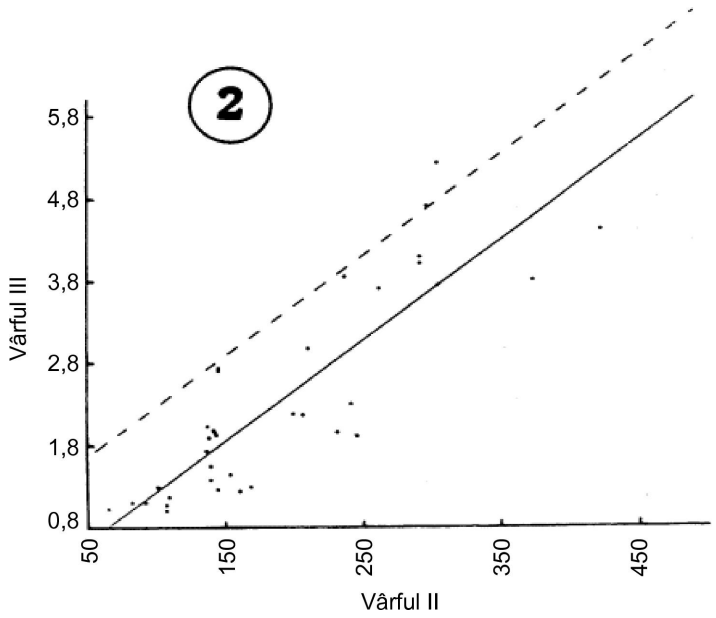
unde:

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

LAPTE PRAF DEGRESAT



LAPTE PRAF DEGRESAT



ANEXA XIII

(Articolul 9)

DETERMINAREA SUBSTANȚELOR SOLIDE DIN ZER ÎNCHEGAT ÎN LAPTELE PRAF DEGRESAT ȘI ÎN AMESTECURILE MENȚIONATE ÎN REGULAMENTUL (CE) NR. 2799/1999

1. SCOP: DETECTAREA SUBSTANȚELOR SOLIDE DIN ZER ÎNCHEGAT ADĂUGATE ÎN:

(a) laptele praf degresat, după cum este definit la articolul 2 din Regulamentul (CE) nr. 2799/1999; și

(b) amestecuri, după cum sunt definite la articolul 4 din Regulamentul (CE) nr. 2799/1999.

2. REFERINȚE: STANDARDUL INTERNAȚIONAL ISO 707

3. DEFINIȚIE

Conținutul de substanțe solide din zer închegat se definește ca procent de masă determinat de conținutul de cazeinomacropeptide prin procedura descrisă.

4. PRINCIPIU

Conținutul de cazeinomacropeptide se determină conform anexei XII. Probele pentru care se obțin rezultate pozitive se analizează pentru detectarea cazeinomacropeptidelor A prin procedura de cromatografie lichidă de înaltă performanță în fază inversată (procedura HPLC). Ca soluție alternativă, probele sunt 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.

5. REACTIVI

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 sunt descriși în anexa XII la prezentul regulament.

Reactivi pentru HPLC în fază inversată

5.1. **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.

5.2. **Eluanții A și B**

Eluantul A: Se introduc într-un balon cotat de 1 000 ml 150 ml acetonitril (CH_3CN), 20 ml izopropanol ($CH_3CHOHCH_3$) și 1,00 ml de acid trifloroacetic (TFA, CF_3COOH). Se completează cu apă până 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 până la 1 000 ml. Soluția eluantă se filtrează înainte de folosire printr-o membrană filtrantă cu pori cu diametrul de 0,45 μm.

5.3. **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.

5.4. **Probele etalon**

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

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

5.4.3. Același lapte praf degresat modificat cu 50 % (m/m) zer închegat praf cu compoziție standard (respectiv [50]) [1].

6. APARATURĂ

Aparatura necesară pentru procedura descrisă este cea descrisă în anexa XII la prezentul regulament.

6.1. Balanță analitică

6.2. 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

6.3. Agitator mecanic

6.4. Agitator magnetic

6.5. Coloane de sticlă cu diametrul de aproximativ 7 cm

6.6. Filtre de hârtie cu filtrare medie cu diametrul de aproximativ 12,5 cm

6.7. Dispozitiv de sticlă pentru filtrare prevăzut cu membrană filtrantă cu diametrul porilor de aproximativ 0,45 µm

6.8. Pipete gradate de 10 ml (ISO 648, clasa A, sau ISO/R 835), sau un sistem prin care pot trece 10,0 ml în două minute.

6.9. Sistem prin care pot trece 20,0 ml de apă la aproximativ 50 °C

6.10. Baie termostat de apă, reglată la 25 ± 0,5 °C

6.11. Echipament pentru HPLC format din:

6.11.1. Sistem binar de pompare reglabil

6.11.2. Injector, manual sau automat, cu o capacitate de 100 µl

6.11.3. 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

6.11.4. Cuptor cu coloană termostat, reglat la 35 ± 1 °C

6.11.5. 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 până la 220 nm) cu o sensibilitate de 0,02 Å

6.11.6. Integrator cu ajutorul căruia se poate realiza integrarea la linia de bază comună sau la linia de bază

Notă: 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.

7. PRELEVAREA PROBELOR

7.1. Probele se prelevează conform procedurii descrise de standardul internațional ISO 707. Cu toate acestea, statele membre pot folosi și altă metodă de prelevare a probelor, cu condiția ca aceasta să respecte principiile standardului menționat anterior.

7.2. Probele se depozitează în condiții în care nu poate surveni nicio deteriorare sau modificare a compoziției.

[1] Zerul închegat praf cu compoziție standard, precum și laptele praf degresat modificat pot fi procurate de la NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20 – NL-6710 BA Ede. Cu toate acestea, se pot folosi și prafuri care produc rezultate echivalente celor obținute pentru produsele NIZO.

8. PROCEDURĂ

8.1. **Prepararea probei de 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.

8.2. **Cantitatea analizată**

Se cântăresc 2,00 ± 0,001 g din proba analizată într-un tub de centrifugare (6.2) sau într-un balon astupat adecvat (50 ml).

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

8.3. **Îndepărtarea grăsimii și a proteinelor**

8.3.1. 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 (6.3). Tubul se introduce în baia de apă (6.10) și se lasă să se echilibreze la 25 °C.

8.3.2. Se adaugă constant 10,0 ml de soluție de acid tricloroacetic la aproximativ 25 °C (5.1) timp de peste două minute, amestecându-se puternic cu ajutorul unui agitator magnetic (6.4). Tubul se introduce într-o baie de apă (6.10) și se lasă timp de 60 de minute.

8.3.3. Se centrifughează (6.2) 2 200 g timp de 10 minute sau se filtrează prin hârtie (6.6), eliminându-se primii 5 ml de filtrat.

8.4. **Determinarea cromatografică**

8.4.1. Se efectuează analiza HPLC conform descrierii din anexa XII. În cazul în care se obține un rezultat negativ, proba analizată nu conține solide din zer închegat în cantități detectabile. În cazul în care rezultatul este pozitiv, se alică 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 XII. Metoda HPLC în fază inversă exclude această posibilitate.

8.4.2. 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 întâlnesc până 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 (5.4) cu și fără 50 % zer închegat.

Se injectează 100 µl de supranatant sau de filtrat (8.3.3) în sistemul HPLC care funcționează în condițiile de gradient de explorare din tabelul 1.

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 (a se vedea 8.4.3) $\%\ B = 10 - 2{,}5 + [13{,}5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6] \times 30 / 27\ \%\ B = 7{,}5 + (13{,}5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) \times 1{,}11$

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 gradienților de explorare și normal

30: % B inițial minus % B la 27 minute la gradientul de explorare

27: timpul de rulare al gradientului de explorare.

8.4.3. Prelevarea soluțiilor din probele analizate

Se injectează 100 µl de supernatant sau filtrat (8.3.3) măsurat cu precizie în aparatul HPLC funcționând la un debit de 1,0 ml de soluție eluantă (5.2) pe minut.

Compoziția eluantului la începutul analizei se obține ca la punctul 8.4.2. În mod normal este de aproximativ A:B = 76:24 (5.2). 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, via 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.

Nota 1: 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.

Nota 2: 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).

Nota 3: După fiecare cinci probe se injectează proba de referință (5) și se folosește pentru calcularea noului coeficient de răspuns R (9.1.1).

8.4.4. 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 (6.11.6) 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.

Notă: 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 (deci nu la t = 0 min.!). 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.

8.5. **Calibrare**

8.5.1. Se aplică cu exactitate procedura descrisă de la punctul 8.2 la punctul 8.4.4 folosindu-se probele etalon (5.4.1-5.4.2). 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 ore. Pentru seriile lungi de analize este de preferabil ca în injectorul automat să se folosească o tavă răcită pentru probe.

Notă: 8.4.2. se poate omite în cazul în care se cunoaște % B în condițiile inițiale din analizele efectuate anterior.

Cromatograma probei de referință [5] trebuie să fie similară cu cea din figura 1. În această figură, vârful CMP_A este precedat de două vârfuri mici. Este extrem de important să se obțină o separare similară.

8.5.2. Înainte de determinarea cromatografică a probei. se injectează 100 µl din proba etalon care nu conține zer închegat [0] (5.4.1).

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

8.5.3. Se determină coeficientul de răspuns R prin injectarea aceluiași volum de filtrat (8.5.1) folosit și în probe.

9. EXPRIMAREA REZULTATELOR

9.1. **Metoda de calcul și formula**

9.1.1. *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 [5].

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

W(E) = R × H(E)

unde:

W(E) = procentul (m/m) de zer închegat în proba (E);

R = coeficientul de răspuns al vârfului CMP_A (9.1.1);

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 [5] este mai mic de 0,2 minute, atunci sunt prezente substanțe solide din zer închegat.

9.3. **Precizia metodei**

9.3.1. *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.

9.3.2. *Reproductibilitate*

Nedeterminată.

9.3.3. *Liniaritate*

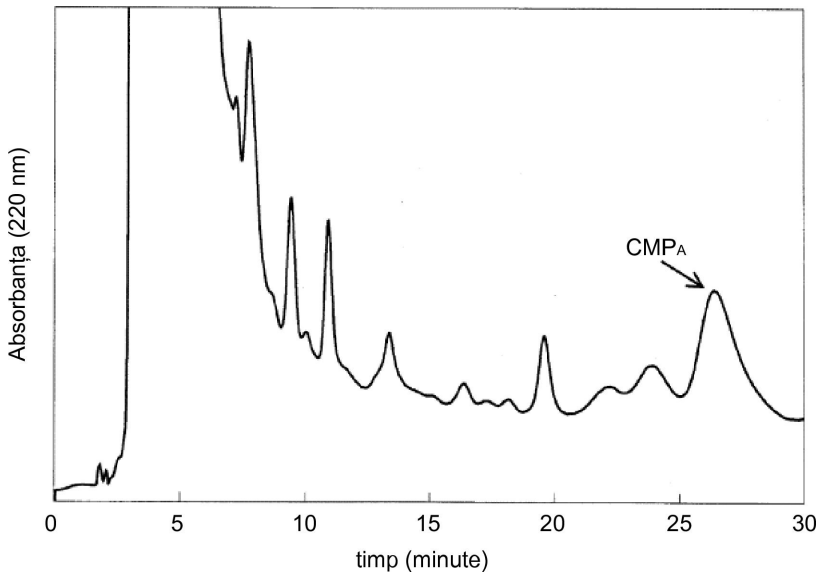
De la 0 la 16 % zer închegat se obține o relație de liniaritate cu un coeficient de corelare > 0,99.

9.4. **Interpretare**

Limita de 1 % se stabilește în conformitate cu prevederile de la punctele 9.2 și 9.4.1 din anexa XIX la Regulamentul (CEE) nr. 214/2001 și include incertitudinea datorată reproductibilității.

Tabelul 1

Ni-4.6 standard



Anexa XIV

(Articolul 10)

Lapte praf degresat: determinarea cantitativă a fosfatidilserinei și a fosfatidiletanolaminei

Metodă: HPLC în fază inversă.

1. Obiectul și domeniul de aplicare

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. Definiție

Conținutul de PS + PE: 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. Principiul metodei

Extragerea aminofosfolipidelor cu metanol din lapte praf reconstituit. Determinare 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. Reactivi

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.

4.1. **Material etalon: PEDP, cu o puritate de cel puțin 99 %**

Notă: Materialul etalon se depozitează la – 18 °C.

4.2. **Reactivi pentru prepararea probei etalon și a probei de analiză**

4.2.1. Metanol de calitate HPLC

4.2.2. Cloroform de calitate HPLC

4.2.3. Monoclorhidrat de triptamină

4.3. **Reactivi pentru derivarea o-ftaldialdehidei**

4.3.1. Hidroxid de sodiu, soluție de apă 12 M

4.3.2. Acid boric, soluție de apă 0,4 M ajustată cu hidroxid de sodiu până la un pH de 10,0 (4.3.1)

4.3.3. 2-mercaptetanol

4.3.4. o-ftaldialdehidă (OPA)

4.4. **Solvenți de eluare HPLC**

4.4.1. La prepararea solvenților de eluare se folosesc reactivi de calitate HPLC.

4.4.2. Apă de calitate HPLC

4.4.3. Metanol cu puritate fluorimetrică testată

4.4.4. Tetrahidrofuran

4.4.5. Fosfat monosodic

4.4.6. Acetat de sodiu

4.4.7. Acid acetic

5. Aparatură

5.1. Balanță analitică cu o capacitate de cântărire având o precizie de 1 mg, cu o capacitate de citire de 0,1 mg

5.2. Pahare de laborator cu capacitate de 25 și 100 ml

5.3. Pipete cu o capacitate de 1 și 10 ml

5.4. Agitator magnetic

5.5. Pipete gradate cu o capacitate de 0,2, 0,5 și 5 ml

5.6. Baloane cotate cu capacitate de 10, 50 și 100 ml

5.7. Seringi cu capacitate de 20 și 100 µl

5.8. Baie ultrasonică

5.9. Centrifugă care poate opera la 27 000 × g

5.10. Fiole de sticlă cu capacitate de aproximativ 5 ml

5.11. Cilindru gradat cu capacitate de 25 ml

5.12. Aparat de măsurare a pH-ului cu o precizie de 0,1 unități pH

5.13. Echipament HPLC

5.13.1. Sistem de pompare reglabil care poate funcționa la 1,0 ml/min. la 200 bari

5.13.2. Aparat de prelevare automată de probe cu posibilitate de derivare

5.13.3. Încălzitor de coloană care poate menține coloana la o temperatură de 30 °C ± 1 °C

5.13.4. 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

5.13.5. Integrator sau software de procesare de date care poate măsura suprafața vârfului

5.13.6. Licrosferă – 100 coloană (250 × 4,6 mm) sau o coloană echivalentă umplută cu octadecilsilan (C 18) cu particule de 5 µm

6. Prelevarea probelor

Prelevarea probelor se realizează conform standardului ISO 707.

7. Procedură

7.1. **Prepararea soluției etalon intern**

7.1.1. Se cântăresc 30,0 ± 0,1 mg de monoclorhidrat de triptamină (4.2.3) într-un balon cotat de 100 ml (5.6) și se completează cu metanol (4.2.1) până la marcaj.

7.1.2. Se pipetează 1 ml (5.3) din această soluție într-un balon cotat de 10 ml (5.6) și se completează cu metanol (4.2.1) până la marcaj pentru a se obține o concentrație de triptamină de 0,15 mM.

7.2. **Prepararea soluției din proba de analiză**

7.2.1. Se cântăresc 1,000 ± 0,001 g din proba de SMP într-un pahar de laborator de 25 ml (5.2). Se adaugă cu o pipetă (5.3) 10 ml de apă distilată cu temperatura de 40 °C ± 1 °C și se amestecă cu un agitator magnetic (5.4) timp de 30 de minute pentru a se dizolva toate cocoloașele.

7.2.2. Se pipetează 0,2 ml (5.5) din laptele reconstituit într-un balon cotat de 10 ml (5.6), se adaugă 100 µl din soluția de triptamină de 0,15 mM (7.1) cu ajutorul unei seringi (5.7) și se completează la volum cu metanol (4.2.1). Se amestecă cu grijă prin răsturnare și se sonichează (5.8) timp de 15 minute.

7.2.3. Se centrifughează (5.9) la 27 000 g × g timp de 10 minute și se colectează supranatantul într-o fiolă de sticlă (5.10).

Notă: Soluția probă se depozitează la 4 °C până la finalizarea analizei HPLC.

7.3. **Prepararea soluției etalon extern**

7.3.1. Se cântăresc 55,4 g de PEDP (4.1) într-un balon cotat de 50 ml (5.6) și se adaugă aproximativ 25 ml de cloroform (4.2.2) cu ajutorul unui cilindru gradat (5.11). Se încălzește balonul astupat la 50 °C ± 1 °C și se amestecă cu atenție până când se dizolvă PEDP. Balonul se răcește la 20 °C și se completează la volum cu metanol (4.2.1) și amestecă prin răsturnare.

7.3.2. Se pipetează 1 ml (5.3) din această soluție într-un balon cotat de 100 ml (5.6) și se completează la volum cu metanol (4.2.1). Se pipetează 1 ml (5.3) din această soluție într-un balon cotat de 10 ml (5.6) și se adaugă 100 µl (5.7) de soluție de triptamină de 0,15 mM (7.1) și se completează la volum cu metanol (4.2.1). Se amestecă prin răsturnare.

Notă: Soluția probă de referință se depozitează la 4 °C până la finalizarea analizei HPLC.

7.4. **Prepararea reactivului de derivare**

Se cântăresc 25,0 ± 0,1 mg de OPA (4.3.4) într-un balon cotat de 10 ml (5.6) și se adaugă 0,5 ml (5.5) de metanol (4.2.1) și se amestecă cu atenție pentru ca OPA să se dizolve. Se completează până la marcaj cu soluție de acid boric (4.3.2) și se adaugă 20 µl de 2-mercaptetanol (4.3.3) cu o seringă (5.7).

Notă: Reactivul de derivare se depozitează la 4 °C într-o fiolă brună, rămânând stabil timp de o săptămână.

7.5. **Determinarea prin HPLC**

7.5.1. *Solvenți de eluare (4.4)*

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.

7.5.2. *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

Notă: 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.

7.5.3. *Volumul injectat: 50 µl reactiv de derivare și 50 µl soluție probă*

7.5.4. *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 (4.2.1).

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

7.5.5. *Se determină conținutul de PS + PE din proba analizată*

7.5.6. *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 (7.3) se injectează la fiecare 5-10 soluții probă pentru a se calcula coeficientul de răspuns.*

Notă: Coloana se curăță prin clătire cu solvent B 100 % (7.5.1) timp de cel puțin 30 de minute la fiecare 20-25 de serii.

7.6. **Modul de integrare**

7.6.1. *Vârful PEDP*

PEDP este eluat ca un singur vârf. Se determină suprafața vârfului prin integrare la linia de bază.

7.6.2. *Vârful triptaminei*

Triptamina este eluată ca un singur vârf (figura 1). Se determină suprafața vârfului prin integrare la linia de bază.

7.6.3. *Grupurile de vârfuri ale PS și PE*

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

8. Calcularea și exprimarea rezultatelor

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;

A_1 = suprafața vârfului PEDP din soluția etalon din probă (7.3);

A_2 = suprafața vârfului PS sau PE din soluția din probă (7.2);

T_1 = suprafața vârfului triptaminei din soluția etalon din probă (7.3);

T_2 = suprafața vârfului triptaminei din soluția din probă (7.2).

9. Precizia metodei

Notă: Valorile repetabilității au fost calculate conform standardului internațional FIL ([1]). Limita orientativă de reproductibilitate a fost calculată conform procedurii definite în anexa III(b) la prezentul document.

9.1. **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 de 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.

([1]) Standardul internațional FIL 135B/1999. Lapte și produse lactate. Caracteristicile de precizie ale metodei de analiză. Prezentare generală a procedurii de studiu în colaborare.

9.2. **Reproductibilitate**

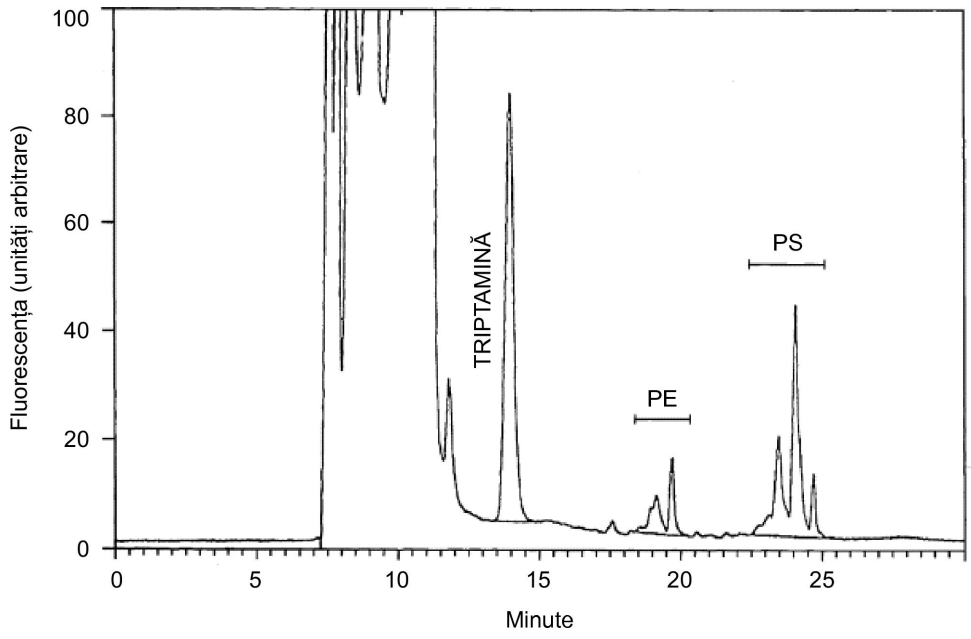
În cazul în care se realizează două determinări de către operatori din laboratoare diferite care folosesc aparatură diferită în condiții diferite și aceeași probă de analiză, diferența relativă dintre cele două rezultate nu trebuie să fie mai mare de 11 % din media aritmetică a rezultatelor.

10. Referințe

10.1. *Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., „Detection of buttermilk solids in skimmilk powder by HPLC quantification of aminophospholipids". Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39,395 (1988).*

Figura 1

Modelul HPLC al derivaților OPA ai fosfatidilserinei (PS) și ai fosfatidiletanolaminei (PE) în extractul de metanol al laptelui praf reconstituit. Se raportează modul de integrare a vârfurilor PS, PE și a triptaminei (etalon intern).



ANEXA XV

(Articolul 11)

DETECTAREA REZIDUURILOR ANTIMICROBIOTICE ÎN LAPTELE PRAF DEGRESAT

Se folosește un test de selecție al unui inhibitor microbian în care se folosește *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (identică cu tulpina C953) 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. Sunt 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 ISO/TS 26844:2006 Lapte și produse lactate – Determinarea reziduurilor antimicrobiotice – Test de difuzie în eprubetă FIL – Buletinul nr. 258/1991, secțiunea 1, capitolul 2 sau în conformitate cu instrucțiunile producătorului kitului pentru analize ([1]).

Rezultatele pozitive se interpretează după cum urmează:

1. Prezența β-lactamilor poate fi confirmată prin repetarea analizei, adăugându-se penicilinază în sistemul de analiză ([2]):

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

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

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

   Rezultat negativ: Substanța inhibitoare este o sulfamidă.

   Rezultatul pozitiv rămâne: 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, adăugându-se penicinilază + acid p-aminobenzoic în sistemul de analiză:

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

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

([1]) Observație importantă: La analiza laptelui praf degresat se pot obține rezultate fals pozitive. De aceea, este important să se verifice dacă sistemul nu generează rezultate fals pozitive.

([2]) Anumiți β-lactami sunt mai puțin sensibili la β-lactamază. În asemenea cazuri, se recomandă un pretratament suplimentar al probei (1 ml de probă analizată cu 0,3 ml de penază concentrată la 37 °C timp de două ore).

ANEXA XVI

(Articolul 12)

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A LAPTELUI PRAF DEGRESAT ÎN FURAJELE COMBINATE PRIN COAGULAREA ENZIMATICĂ A PARA-CAZEINEI

1. SCOPUL

Determinarea cantitativă a laptelui praf degresat în furajele combinate prin coagularea enzimatică a para-cazeinei.

2. OBIECTUL

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

3.1. Dizolvarea cazeinei conținute în furajele combinate prin extragere cu soluție de citrat de sodiu.

3.2. Ajustarea concentrației de ioni de calciu la nivelul necesar pentru precipitarea para-cazeinei se realizează prin adăugarea de cheag.

3.3. Conținutul de azot al precipitatului de para-cazeină se determină prin metoda Kjeldahl, așa cum este descrisă în standardul ISO 8968-2:2001|FIL 20-2:2001; cantitatea de lapte praf degresat se calculează pe baza unui conținut minim de cazeină de 27,5 % (a se vedea 8.1).

4. REACTIVI

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 (4.5), toți reactivii și toate soluțiile trebuie să nu conțină substanțe azotate.

4.1. Citrat trisodic (soluție 1 % m/v)

4.2. Clorură de calciu (aproximativ 5 M de soluție)

Se dizolvă 75 g de $CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ 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.

4.3. Hidroxid de sodiu 0,1 N

4.4. Acid clorhidric 0,1 N

4.5. Cheag lichid de vițel (tărie de aproximativ 100 IMCU/ml în conformitate cu standardul ISO 11815/FIL 157) Se păstrează în refrigerator la 4-6 °C.

4.6. Reactivii pentru determinarea cantitativă a azotului în conformitate cu metoda Kjeldahl descrisă în ISO 8968-2:2001|FIL 20-2:2001

5. APARATURĂ

Aparatură obișnuită de laborator, cuprinzând:

5.1. Mojar sau omogenizator

5.2. Balanță analitică cu o capacitate de cântărire având o precizie de 1 mg, cu o capacitate de citire de 0,1 mg

5.3. Centrifugă de masă (500 g sau 2 000-3 000 rpm) cu tuburi de 50 ml și 2 000 g

5.4. Agitator magnetic (10-15 mm) cu minimagneți

5.5. Pahare de laborator de 150-200 ml

5.6. Baloane de 250 și 500 ml

5.7. Conducte de sticlă cu diametru de 60-80 mm

5.8. Filtre fără cenușă cu filtrare rapidă cu diametrul de 150 mm (Whatman N° 41 sau echivalent)

5.9. Pipete cu diverse volume nominale

5.10. Baie de apă cu termostat la 37 °C ± 1 °C

5.11. Aparat de măsurare a pH-ului cu o precizie de 0,1 unități

5.12. Termometre cu o precizie de 1 °C

6. PROCEDURĂ

6.1. **Prepararea probei**

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

6.2. **Dizolvarea laptelui praf şi separarea reziduului insolubil**

6.2.1. Se cântăresc 1,000 ± 0,002 g de furaje combinate bine omogenizate (6.1) direct într-un tub de centrifugare de 50 ml. Se adaugă 30 ml de soluție de citrat trisodic (4.1) încălzit în prealabil la 45 °C ± 2 °C. Se amestecă timp de cel puțin cinci minute cu ajutorul unui agitator magnetic sau prin scuturare puternică cu mâna.

6.2.2. 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.

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

6.2.4. În cazul în care se formează un strat de ulei la suprafață, se răcește în refrigerator până când grăsimile se solidifică și se îndepărtează stratul solid cu o spatulă.

6.3. **Coagularea cazeinei cu enzime din cheag**

6.3.1. Se amestecă continuu și se adaugă prin picurare 2 ml de clorură de calciu (4.2) la întregul extract apos (aproximativ 100 ml). Se ajustează pH-ul la 6,4-6,5 cu soluții de NaOH (4.3) sau de HCl (4.4). Se introduce în baia de apă controlată prin termostat la 37 °C ± 1 °C timp de 15-20 minute pentru a se obține un echilibru salin. Acesta este indicat de o ușoară tulburare.

6.3.2. 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.

6.3.3. Supranatantul se aduce din nou la temperatura de 37 °C ± 1 °C. În timp ce se amestecă extractul, se adaugă prin picurare 0,5 ml de cheag lichid (4.5). Coagularea se produce în două minute.

6.3.4. Proba se introduce din nou în baia de apă și se lasă la o temperatură de 37 °C ± 1 °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 hârtie de filtru adecvată (5.8) și se păstrează hârtia 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 hârtia de filtru păstrată.

6.4. **Determinarea azotului din cazeină**

6.4.1. După clătire, precipitatul se transferă cantitativ în hârtia de filtru rămasă de la 6.3.4 cu ajutorul apei distilate. Hârtia de filtru uscată se transferă în balonul Kjeldhal. Se determină azotul prin metoda Kjeldahl în conformitate cu standardul ISO 8968-2:2001|FIL 20-2:2001.

7. TEST CU PROBĂ MARTOR

7.1. În mod regulat se efectuează câte un test cu probă martor supusă la mineralizare prin metoda Kjeldhal în conformitate cu standardul ISO 8968-2:2001|IDF 20-2:2001, folosindu-se o hârtie de filtru fără cenușă (5.8) umezită cu un amestec de 90 ml (4.1) de soluție de citrat de sodiu, 2 ml soluție de clorură de calciu (4.2), 0,5 ml de cheag lichid (4.5) și spălat cu 3 × 15 ml de apă distilată.

7.2. Volumul de acid folosit pentru testul cu probă martor se ia din volumul de acid (4.4) folosit pentru titrarea probei.

8. EXPRIMAREA REZULTATELOR

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

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

unde:

N este procentul de azot din para-cazeină;

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

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

9. PRECIZIA METODEI

9.1. **Repetabilitate**

În cel puțin 95 % din cazurile studiate, 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.

9.2. **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. OBSERVAȚII

10.1. Adăugarea unor procente mari de proteine care nu provin din lapte și în special de proteine din soia care sunt încălzite împreună cu laptele praf degresat poate genera rezultate prea mari din cauza coprecipitării cu para-cazeina din lapte.

10.2. 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.

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

10.4. Încorporarea de lapte praf degresat tratat la temperaturi înalte poate genera obținerea de valori prea mari din cauza coprecipitării anumitor proteine cu para-cazeina din lapte.

ANEXA XVII

(Articolul 13)

DETECTAREA AMIDONULUI DIN LAPTELE PRAF DEGRESAT, LAPTE PRAF DENATURAT ȘI FURAJE COMBINATE

1. OBIECTUL

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

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

2. PRINCIPIU

Reacția se bazează pe cea folosită în iodometrie:

— fixarea iodului liber din soluție apoasă de către coloizi;

— absorbția de către miceliile de amidon și prin colorare.

3. REACTIVI

3.1. Soluție de iod:

— iod: 1,0 g;

— iodură de potasiu: 2,0 g;

— 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 până la marcajul de 100 ml.

4. APARATURĂ

4.1. Balanță analitică

4.2. Baie de apă care fierbe

4.3. Eprubete, 25 mm × 200 mm

5. PROCEDURĂ

Se cântărește 1,0 g din probă cu o precizie de 0,1 g și se transferă într-o eprubetă (4.3).

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

Se introduce în baia de apă (4.2) 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 (3.1) și se amestecă, observându-se culoarea rezultată.

6. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Culoarea albastră indică prezența amidonului natural în probă.

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

7. OBSERVAȚII

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 XVIII

(Articolul 14)

DETERMINAREA CONȚINUTULUI UMED ÎN SMÂNTÂNA DESHIDRATATĂ

1. OBIECTUL

Prezenta anexă precizează o metodă de determinare a conținutului umed în smântâna deshidratată.

2. TERMENI ȘI DEFINIȚII

În sensul prezentei anexe, se aplică următoarea definiție.

Conținut umed: pierderea de masă determinată prin procedura specificată în prezentul standard internațional.

Acesta este exprimat ca procent de masă.

3. PRINCIPIU

Uscarea unei cantități analizate la 102 ± 2 °C până se obține o masă constantă și cântărirea în vederea determinării pierderii de masă.

4. APARATURĂ

Aparatură obișnuită de laborator, în special următoarele:

4.1. Balanță analitică cu o capacitate de cântărire având o precizie de 1 mg, cu o capacitate de citire de 0,1 mg

4.2. Cuptor de uscare, bine ventilat, care poate fi menținut prin termostat la 102 ± 2 °C în întregul spațiu de lucru.

4.3. Desicator, prevăzut cu silicagel proaspăt uscat cu indicator higroscopic sau un alt desicant eficace.

4.4. Vase cu fundul plat, având o adâncime 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.

4.5. Sticle cu dopuri etanșe, pentru amestecarea probelor de laborator

5. PRELEVAREA PROBELOR

Este important ca laboratorul să primească o probă care să fie cu adevărat reprezentativă și care să nu fi fost deteriorată sau modificată în timpul transportului sau pe durata depozitării.

Prelevarea probelor nu face parte din metoda specificată în prezentul standard internațional. În ISO 707|FIL 50 este prezentată metoda recomandată de prelevare a probelor.

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

6. PREPARAREA PROBEI DE ANALIZĂ

Se amestecă proba cu grijă prin scuturarea și răsturnarea repetată a recipientului (în cazul în care este necesar, după transferarea tuturor probelor de 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 cât mai departe posibil unul de celălalt.

7. PROCEDURĂ

7.1. **Prepararea vasului**

7.1.1. Se încălzesc un vas neacoperit și capacul acestuia (4.4) în cuptor (4.2), reglat la 102 ± 2 °C, timp de cel puțin o oră.

7.1.2. Se așază capacul pe vas și se transferă vasul acoperit în desicator (4.3); 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.

7.2. **Cantitatea analizată**

Se transferă aproximativ 1-3 g din proba pregătită (6) în vas, se acoperă cu capacul și se cântărește cu o precizie de 1 mg, înregistrând greutatea la 0,1 mg.

7.3. **Determinare**

7.3.1. Se descoperă vasul și se așază împreună cu capacul acestuia în cuptor (4.2), reglat la 102 ± 2 °C, timp de două ore.

7.3.2. Se reașază 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.

7.3.3. Se descoperă vasul și se încălzește din nou, împreună cu capacul, în cuptor, timp de o oră. Se repetă apoi operația 7.3.2.

7.3.4. Se repetă procedura de încălzire și cântărire până când masa scade cu 1 mg sau mai puțin sau crește între două cântăriri succesive.

Se folosește pentru calcule cea mai mică masă înregistrată.

8. CALCULAREA ȘI EXPRIMAREA REZULTATELOR

8.1. **Calcularea**

Conținutul umed, exprimat în g/100 g, este egal cu:

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

unde:

m_0 este masa vasului și a capacului exprimată în grame (7.1.2);

m_1 este masa vasului, a capacului și a cantității analizate exprimată în grame înainte de uscare (7.2);

m_1 este masa vasului, a capacului și a cantității analizate exprimată în grame după uscare (7.3.4).

Rezultatul se raportează cu două zecimale.

9. PRECIZIA

Notă: Valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate se obțin din rezultatele unui test inter-laboratoare (a se vedea Steiger, G. Buletinul FIL nr. 285/1993, p. 21-28) realizat în conformitate cu standardul FIL 135B:1991 – Lapte și produse lactate – Caracteristicile de precizie ale metodei de analiză – Prezentare generală a procedurii de studiu în colaborare.

9.1. **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.

9.2. **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

Raportul de analiză specifică:

— toate informațiile necesare pentru identificarea completă a probei;

— metoda de prelevare a probelor, dacă aceasta este cunoscută;

— metoda de analiză folosită în conformitate cu prezentul standard internațional;

— toate detaliile de funcționare care nu sunt specificate în prezentul standard internațional sau sunt 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 XIX

(Articolul 15)

DETERMINAREA UMIDITĂȚII ÎN ZARA PRAF ACIDĂ

1. OBIECTUL

Determinarea conținutului de umiditate din zara praf acidă destinată inițial furajelor.

2. PRINCIPIU

Proba se usucă în vid. Pierderea de masă se determină prin cântărire.

3. APARATURĂ

3.1. Balanță analitică cu o capacitate de cântărire având o precizie de 1 mg, cu o capacitate de citire de 0,1 mg

3.2. 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 g/cm^2

3.3. Cuptor electric reglabil cu vid prevăzut cu pompă de ulei și cu un mecanism de introducere a aerului uscat fierbinte printr-un turn conținând, de exemplu, oxid de calciu sau sulfat de calciu (conținând indicator de umiditate).

3.4. Desicator cu agent de uscare eficient

3.5. Cuptor de uscare ventilat cu temperatura controlată de un termostat la 102 ± 2 °C

4. PROCEDURĂ

Se încălzesc un vas (3.2) și capacul acestuia în cuptor (3.5) timp de cel puțin o oră. Se așază capacul pe recipient și se transferă imediat în desicator (3.4); se lasă să se răcească la temperatura camerei și se cântărește cu o precizie de 1 mg, înregistrând 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, înregistrând masa la 0,1 mg. Se așază vasul împreună cu capacul în cuptorul cu vid (3.3) preîncălzit la 83 °C. Pentru a împiedica scăderea temperaturii din cuptor la o valoare inacceptabilă, vasul se introduce în cuptor cât mai rapid posibil.

Se mărește presiunea până 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 °C. Presiunea cuptorului se reduce cu grijă până 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 (3.4) timp de 30-45 minute și se cântărește cu o precizie de 1 mg, înregistrând masa la 0,1 mg. Se usucă timp de încă 30 de minute în cuptorul cu vid (3.3) la 83 °C și se cântărește din nou. Se repetă procedura de încălzire și cântărire până când 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

% Umiditate = $(m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$ %

unde:

m_0 este masa vasului și a capacului;

m_1 este masa recipientului, a capacului și a cantității analizate înainte de uscare;

m_2 este masa recipientului, a capacului și a cantității analizate după uscare.

Rezultatele se înregistrează cu o precizie de 0,1 g/100 g.

6. PRECIZIA

6.1. **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.

6.2. **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.

6.3. **Sursa datelor de precizie**

Datele de precizie au fost determinate printr-un experiment realizat în 1995, în cadrul căruia au participat opt laboratoare și s-au folosit 12 probe (șase duplicate probă martor).

ANEXA XX

(Articolul 16)

METODA DE REFERINȚĂ PENTRU DETERMINAREA PURITĂȚII GRĂSIMILOR DIN LAPTE PRIN ANALIZA CROMATOGRAFICĂ ÎN FAZĂGAZOASĂ A TRIGLICERIDELOR – REVIZIA 2

1. OBIECTUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE

Prezentul standard 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. Tratamentul 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.

Nota 1: Acidul butiric (n-butanoic) (C_4) apare exclusiv în grăsimile din lapte și permite realizarea estimării cantitative a cantităților mici până 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 până la 20 % ale grăsimilor străine din grăsimile pure din lapte [1].

Nota 2: 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. DEFINIȚIE

Puritatea grăsimii din lapte: absența grăsimilor vegetale sau animale determinate cu ajutorul procedurii specificate în prezentul standard.

Notă: Puritatea este determinată cu ajutorul valorilor *S* care sunt obținute din compoziția trigliceridelor. Fracțiunile de masă ale trigliceridelor sunt exprimate procentual.

3. PRINCIPIUL METODEI

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 sunt separate prin numărul total de atomi de carbon. Prin introducerea fracțiunii de masă a moleculelor de grăsime de diferite dimensiuni (C_{24} până la C_{54}, utilizând 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.

Nota 1: Oportunitatea și echivalența atât pentru coloanele umplute, cât și pentru coloanele capilare au fost demonstrate anterio r[2-4].

Nota 2: Valoarea *S* este suma tuturor fracțiunilor de masă a TG, înmulțită cu coeficienții respectivi definiți.

4. REACTIVI

Toți reactivii utilizați trebuie să fie de calitate analitică recunoscută.

4.1. Gaz vector: azot sau, ca alternativă, heliu sau hidrogen, având toate o puritate de cel puțin 99,995 %.

4.2. Grăsimi standard pentru standardizarea unei grăsimi standard din lapte în conformitate cu clauza 7.7.3.

4.2.1. Trigliceride etalon saturate; în comerț sunt disponibile produse adecvate.

4.2.2. Colesterol etalon.

4.3. Metanol (CH_3OH), fără apă.

4.4. n-hexan ($CH_3(CH_2)4CH_3$).

4.5. n-heptan ($CH_3(CH_2)5CH_3$).

4.6. Alte gaze: hidrogen, puritate de cel puțin 99,995 %, fără impurități organice (C_nH_m < 1 µl/l); aer sintetic, fără impurități organice (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7. Sulfat de sodiu anhidru (Na_2SO_4).

5. APARATURĂ

Aparatură obișnuită de laborator, în special următoarele:

5.1. **Gaz-cromatograf pentru temperatură înaltă**

Gaz-cromatograful de temperatură înaltă trebuie să fie adecvat pentru temperaturi de cel puțin 400 °C și să fie prevăzut cu detector cu ionizare în flacără (FID, *flame ionization detector*). Pereții despărțitori utilizați pentru injector trebuie să reziste la temperaturi înalte și trebuie să prezinte un grad foarte scăzut de „curgere". Pentru gaz-cromatograful (GC) cu coloane capilare, se folosește un injector pentru coloane. Întotdeauna se utilizează garnituri de grafit pentru a conecta atât coloanele, cât și injectorul și/sau racordurile detectorului (acolo unde este cazul).

5.2. **Coloana de cromatografie**

5.2.1. *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 până la 150 µm (100 până la 120 ochiuri de sită) Gas ChromQ ([1]). Prepararea, silanizarea, umplerea și condiționarea coloanei umplute sunt descrise în anexa A.

Ca o alternativă, se poate utiliza o coloană capilară (5.2.2).

5.2.2. *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 400 °C sau peste ([2]). Coloana se condiționează prin efectuarea a 20 de analize pentru o soluție de grăsime din lapte (7.2) în decurs de 2 până la 3 zile cu ajutorul indicațiilor date în secțiunea 7.3.4.2. Apoi, coeficienții de răspuns (7.3.3) se vor apropia de valoarea 1, dar vor fi mai mici de 1,20.

Notă: Se pot utiliza coloane cu dimensiuni diferite și cu faze diferite nepolare, rezistente la temperaturi înalte, atât timp cât performanța acestora corespunde cu prezentul standard. A se vedea, de asemenea, 7.3.4.2.

5.3. Coloană Extrelut, având capacitatea de 1 ml până la 3 ml cu gel de siliciu, necesară extracției grăsimii din lapte doar în conformitate cu 7.1.3.

5.4. Garnituri de grafit, rezistente la temperaturi de cel puțin 400 °C, care sunt folosite pentru a conecta atât coloanele GC, cât și injectorul și/sau racordurile detectorului.

5.5. Baie de apă, care să mențină o temperatură de 50 °C ± 2 °C.

5.6. Cuptor care funcționează la 50 °C ± 2 °C și 100 °C ± 2 °C.

5.7. Micropipetă.

([1]) Exemplu de produs adecvat disponibil în comerț. Această informație este prezentată pentru beneficiul utilizatorilor acestui standard internațional și nu reprezintă o susținere a acestui produs.

([2]) CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) este un exemplu de produs adecvat disponibil comercial. Această informație este prezentată pentru beneficiul utilizatorilor acestui standard internațional și nu reprezintă o susținere a acestui produs.

5.8. Pipetă gradată, având capacitatea de 5 ml.

5.9. Balon cu fund rotund, având capacitatea de 50 ml.

5.10. Balon Erlenmeyer, cu volum nominal de 250 ml.

5.11. Pâlnie.

5.12. Filtru de hârtie cu pori fini.

5.13. Evaporator rotativ.

5.14. Fiole, cu volum nominal de 1 ml, prevăzute cu capac de aluminiu acoperit cu politetrafluoroetilen, care se atașează sau se înșurubează.

5.15. Seringă de injectare al cărei piston nu trebuie să ajungă la vârful acului (GC cu coloană umplută).

Notă: Cu aceste seringi se obține o repetabilitate mai mare a rezultatelor.

5.16. Balanță analitică, cu care se pot cântări greutăți până la aproximativ 1 mg, cu capacitate de citire de 0,1 mg.

6. PRELEVAREA PROBELOR

O probă semnificativă ar trebui trimisă la laborator. În timpul transportului sau al depozitării nu ar trebui să fie deteriorată sau modificată.

Prelevarea probelor nu face parte din metoda specificată în prezentul standard internațional. În ISO 707 | FIL 50 [5] este prezentată o metodă recomandată de prelevare a probelor.

7. PROCEDURĂ

7.1. **Prepararea probelor de analiză**

Pentru prepararea probelor de analiză se folosește una dintre următoarele trei metode de extracție a grăsimii din lapte.

7.1.1. *Izolarea din unt sau ulei de unt*

Se topesc 50 g până la 100 g din proba de analizat la 50 °C, utilizând o baie de apă (5.5) sau un cuptor (5.6). Se pun 0,5 până la 1,0 g de sulfat de sodiu (4.7) într-un filtru de hârtie pliat (5.12). Preîncălziți un balon Erlenmeyer de 250 ml (5.10) și o pâlnie (5.11) cu filtrul de hârtie introdus în cuptorul (5.6) reglat la 50 °C. Stratul de grăsime din proba topită se filtrează, în timp ce balonul preîncălzit, pâlnia și dispozitivul de filtrare introdus se mențin în cuptor. Trebuie acordată atenția corespunzătoare, astfel încât 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.

Nota 1: Untul poate fi obținut din smântână prin agitarea și spălarea temeinică a granulelor de unt rezultate.

Nota 2: Grăsimea din lapte obținută prin utilizarea procedurii descrise la 7.1.1 nu va conține aproape deloc fosfolipide.

7.1.2. *Extracția conform metodei gravimetrice Röse-Gottlieb*

Fracțiunea grăsimilor se extrage din proba de analiză prin utilizarea metodei gravimetrice descrisă în unul dintre standardele ISO 1211 FIL 001D, ISO 2450FIL 016C sau ISO 7328FIL 116A.

Notă: Dacă în grăsimea din lapte sunt prezente fosfolipide, se va obține un vârf de colesterol cu aproape 0,1 % mai mare. Influența asupra compoziției TG standardizate la 100 %, inclusiv colesterolul, este deci neglijabilă.

7.1.3. *Extracția din lapte utilizând coloane cu silicagel*

Se adaugă cu ajutorul micropipetei (5.7) 0,7 ml din proba de analiză la o temperatură de 20 °C într-o coloană Extrelut (5.3) de 1 ml până 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 (4.3), cu ajutorul pipetei gradate. În consecință, fracțiunea grăsimilor se extrage din proba de analiză cu 20 ml de *n*-hexan (4.4). *n*-Hexanul se adaugă treptat în cantități mici. Solventul drenat se colectează într-un balon cu fund rotund de 50 ml (5.9), care a fost uscat în prealabil, până la obținerea unei mase constante cunoscute, cântărită cu o precizie de 1 mg, înregistrând masa la 0,1 mg.

După extracție, coloana se lasă să se scurgă până la golire. Solvenții din eluant se distilează într-un evaporator rotativ (5.13) cu baia de apă reglată la o temperatură între 40 °C și 50 °C. După distilarea solvenților, se usucă și se cântărește în continuare balonul cu fund rotund și conținutul acestuia cu o precizie de 1 mg înregistrând masa la 0,1 mg. Se determină masa grăsimii rezultată prin scăderea din masa obținută a masei balonului uscat cu fund rotund.

Notă: Extracția grăsimilor prin metodele Gerber, Weibull-Berntrop sau Schmid-Bonzynski-Ratzlaff sau izolarea grăsimilor din lapte cu ajutorul detergenților (metoda BDI) nu sunt adecvate pentru analiza TG, deoarece cantități semnificative de gliceride parțiale sau de fosfolipide pot trece în fază grasă. În consecință, aplicarea prezentului standard internațional este limitată la anumite produse, în particular la brânză.

7.2. **Prepararea soluției de probă**

Pentru gaz-cromatografia cu coloană umplută, se prepară o soluție de grăsime (obținută conform 7.1) de 5 % (fracție de volum) în *n*-hexan (4.4) sau *n*-heptan (4.5). 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 7.1.3, se determină cantitatea de solvent (4.4 sau 4.5) care trebuie adăugată la proba de 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 (5.14).

7.3. **Determinarea cromatografică a trigliceridelor**

7.3.1. *Deviația liniei de bază*

Pentru a reduce creșterea liniei de bază, coloana trebuie condiționată după cum este specificat la punctul 5.2.2 (coloana capilară) sau în anexa A.4 (coloana umplută).

Notă: Din cauza temperaturii înalte a coloanei, analiza TG este în mod particular sensibilă la creșteri ale liniei de bază pentru valorile mari ale numărului de atomi de carbon.

7.3.2. *Tehnica injectării*

7.3.2.1. 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.

7.3.2.2. Coloană umplută

Când se folosește injectarea la rece în coloană (7.3.4.2), se introduce acul seringii și se injectează imediat. Timpul de retenție al acului în orificiul de injectare trebuie să fie în așa fel încât să se poată evita curbele ample ale vârfului solventului.

Notă: În mod normal, timpul optim de retenție este de aproximativ 3 s.

7.3.3. *Calibrare*

7.3.3.1. Generalități

Pentru calibrarea probelor analizate se realizează două până 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 de analiză (a se vedea 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \quad (1)$$

unde:

w_{si} este fracțiunea de masă, exprimată procentual, pentru fiecare dintre TG sau pentru colesterolul din grăsimea standardizată din lapte;

A_{si} este valoarea numerică a ariei de vârf pentru fiecare TG sau pentru colesterolul din grăsimea standardizată din lapte.

Se utilizează fie punctul 7.3.3.2, fie punctul 7.3.3.3 pentru a obține grăsimi standardizate din lapte care au o compoziție cunoscută de TG.

7.3.3.2. Grăsimi comerciale standard din lapte

Cea mai bună metodă de determinare a coeficientului de răspuns pentru fiecare compus al probei de analiză o reprezintă utilizarea grăsimilor standardizate din lapte care au o compoziție de TG certificată.

Notă: Un standard adecvat este CRM 519 (grăsime anhidră din lapte), care se poate obține de la Institutul pentru Materiale de Referință și Măsurători (IRMM), Geel, Belgia ([1]).

7.3.3.3. Grăsimi standard din lapte obținute în laborator

Se prepară aproximativ 1 g din amestecul de grăsimi standard (a se vedea punctul 4.2, 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 (4.4) sau *n*-heptan (4.5), conform punctului 7.3.4. 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 °C.

7.3.4. *Condiții de cromatografie*

Notă: În general, 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.

7.3.4.1. Coloana umplută

(a) Programul de temperatură: temperatura inițială a cuptorului se fixează la 210 °C. Această temperatură se menține timp de 1 min. Apoi temperatura se mărește cu 6 °C/min. până ajunge la 350 °C. Această temperatură (finală) se menține timp de 5 min.

(b) Temperaturile pentru detector și injector: ambele temperaturi se fixează la 370 °C.

(c) Gazul vector: se utilizează azotul cu un debit constant de aproximativ 40 ml/min. Debitul exact al gazului vector se ajustează, astfel încât C_{54} este eluată la o temperatură de 341 °C.

(d) Durata analizei: 29,3 min.

(e) Volumul injectat: se injectează 0,5 µl din soluția de probă de 5 % (fracțiune de volum).

([1]) Exemplu de produs adecvat disponibil în comerț. Această informație este prezentată pentru beneficiul utilizatorilor acestui standard internațional și nu reprezintă o susținere a acestui produs.

Dacă nu se desfășoară nicio analiză a TG, se menține temperatura inițială a cuptorului stabilită la litera (a), se mențin temperaturile detectorului și injectorului stabilite la litera (b) și se menține rata de flux a gazului vector stabilită la litera (c) la un nivel constant, de asemenea și în timpul nopții, în weekend sau în timpul concediilor. Acest lucru asigură performanța optimă a coloanei.

7.3.4.2. Coloană capilară

(a) Programul de temperatură: temperatura inițială a cuptorului se fixează la 80 °C. Această temperatură se menține timp de 0,5 min. Apoi temperatura se mărește cu 50 °C/min. până la 190 °C și, apoi, cu 6 °C/min. până la 350 °C. Această temperatură (finală) se menține timp de 5 min.

(b) Temperatura detectorului: se fixează la 370 °C.

(c) Gazul vector: se utilizează azotul la un debit constant de aproximativ 3 ml/min.

(d) Durata analizei: 34,4 min.

(e) Volumul injectat: se injectează 0,5 µl 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 (a se vedea punctul 7.3.4.1).

Setările analitice prezentate la punctul 7.3.4.2 sunt adecvate pentru utilizarea unei coloane cu diametru interior larg (0,53 mm ID) astfel cum se menționează la punctul 5.2.2. Dacă se utilizează o coloană cu alte dimensiuni sau altă fază, trebuie aplicate condiții diferite.

8. INTEGRAREA, EVALUAREA ȘI CONTROLUL PERFORMANȚEI ANALITICE

Se evaluează vârfurile 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 sfârșitul liniei de bază după C_{54} care influențează procentajul tuturor trigliceridelor. În orice caz, vârfurile eluate după C_{54} 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 C_{56}. 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 9.1.

Figura 1

Exemplu de cromatogramă trigliceridică a grăsimii din lapte, cu linia de bază trasată corect

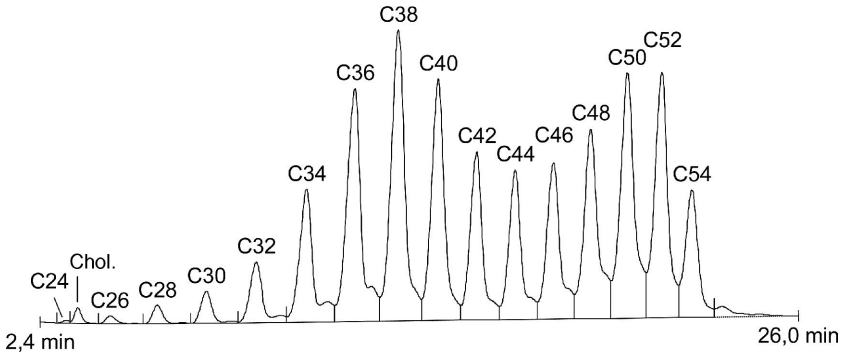
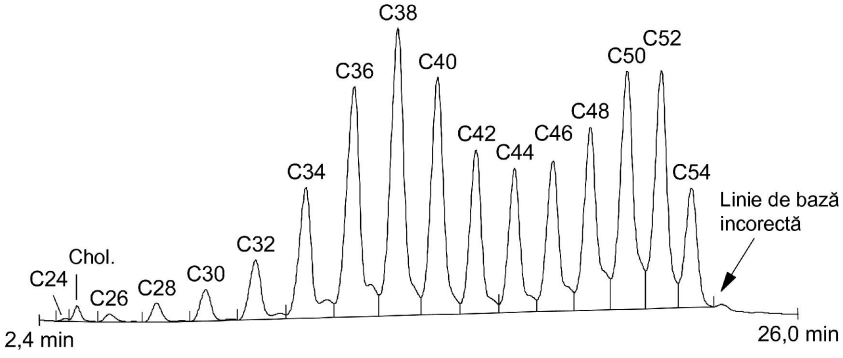


Figura 2

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 sunt semnificativ mai mari decât valorile date în tabelul 1, condițiile de cromatografie nu sunt adecvate.

Notă: Valorile prezentate în tabelul 1 nu sunt obligatorii, dar sunt 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 10.

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

9. CALCULAREA ȘI EXPRIMAREA REZULTATELOR

9.1. **Compoziția de trigliceride**

9.1.1. *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 de analiză prin utilizarea formulei următoare:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum (A_1 \times RF_{si})} \times 100 \qquad (2)$$

unde:

A_i este valoarea numerică a ariei vârfului pentru fiecare dintre TG din proba de analiză;

RF_{si} este coeficientul de răspuns pentru fiecare TG determinată prin calibrare (7.3.3).

9.1.2. *Exprimarea rezultatelor analizei*

Rezultatele se exprimă cu două zecimale.

9.2. **Valorile *S***

9.2.1. *Calcularea*

9.2.1.1. Valorile *S*, exprimate procentual, se calculează prin introducerea w_i (9.1.1) calculat pentru procentul adecvat de TG în formulele de la (3) la (7). Se folosesc toate formulele, indiferent de tipul suspectat de grăsime străină.

9.2.1.2. Ulei de soia, de floarea-soarelui, de măsline, de rapiță, de in, de germeni de râu, de germeni de porumb, din semințe de bumbac și de pește

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Grăsime de palmier și grăsime din sâmburi de palmier

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Ulei de palmier și seu de vită

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Untură

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

9.2.1.6. Total

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Exprimarea rezultatelor analizei*

Rezultatele se exprimă cu două zecimale.

9.3. **Detectarea grăsimilor străine**

Se compară cele 5 valori *S* obținute la punctul 9.2.1 cu limitele *S* corespunzătoare prezentate în tabelul 2.

Proba de analiză se consideră grăsime pură din lapte dacă toate cele 5 valori *S* sunt 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 decât formula totală (7) (a se vedea tabelul B1), 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.

Anexa B 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.

Tabelul 2

Limitele *S* pentru grăsimile pure din lapte

Grăsimea străină	Formulă	Limitele *S* [a]
Ulei de soia, de floarea-soarelui, de măsline, de rapiță, de in, de germeni de râu, de germeni de porumb, din semințe de bumbac și de pește	(3)	98,05–101,95
Grăsime de palmier și grăsime din sâmburi 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

[a] Calculată pentru un nivel de încredere de 99 %, astfel încât adăugarea de grăsimi străine este indicată doar dacă limitele de detectare ale formulei respective sunt depășite (a se vedea tabelul B.1).

10. PRECIZIA

10.1. **Analiză interlaboratoare**

Valorile pentru repetabilitate și reproductibilitate sunt determinate pe baza formulelor de la (3) la (7), utilizându-se grăsimi pure din lapte, fiind posibil ca acestea să nu fie aplicabile în cazul altor matrice decât cele prezentate.

10.2. **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, utilizându-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 râu, de germeni de porumb, din semințe de bumbac și de pește	(3)	0,67
Grăsime de palmier și grăsime din sâmburi de palmier	(4)	0,12
Ulei de palmier și seu de vită	(5)	1,20
Untură	(6)	0,58
Total	(7)	1,49

10.3. **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, utilizându-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)

Grăsime 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
Grăsime de palmier și grăsime din sâmburi de palmier	(4)	0,40
Ulei de palmier și seu de vită	(5)	1,81
Untură	(6)	0,60
Total	(7)	2,07

11. INCERTITUDINEA DE MĂSURARE

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 râu, de germeni de porumb, din semințe de bumbac și de pește	(3)	97,36–102,64
Grăsime de palmier și grăsime din sâmburi 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

12. RAPORTUL DE ANALIZĂ

Raportul de analiză specifică:

— toate informațiile necesare pentru identificarea completă a probei;

— metoda utilizată pentru prelevarea probelor, dacă se cunoaște;

— metoda de analiză utilizată, în conformitate cu prezentul standard internațional;

— toate detaliile operaționale care nu sunt specificate în prezentul standard internațional sau care sunt considerate opționale, împreună cu detaliile referitoare la orice incident care ar putea influența rezultatul (rezultatele) testului;

— rezultatul (rezultatele) testului care a fost obținut și, dacă repetabilitatea a fost verificată, rezultatul final stabilit care a fost obținut.

Anexa A

(normativă)

Prepararea coloanei umplute

A.1 Reactivi și echipament

A.1.1 **Toluen** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2 **Soluție de dimetildiclorsilan** [$Si(CH_3)_2Cl_2$]

Se dizolvă 50 ml de dimetildiclorsilan în 283 ml de toluen (A1.1.1).

A.1.3 **Soluție de unt de cocos**, cu o fracțiune de masă de 5 % unt de cocos în n-hexan (4.4) sau n-heptan (4.5).

A.1.4 **Fază staționară**, 3-% OV-1 la 125 μm până la 150 μm (100 până la 120 ochiuri de sită) Gas ChromQ [1]

Notă: Indicația pentru granule a fost convertită în micrometri în conformitate cu BS 410 (toate părțile)[6].

A.1.5 **Coloană de sticlă**, având un diametru intern de 2 mm și o lungime de 500 mm, în formă de U

A.1.6 **Echipament** pentru umplerea coloanei.

A.1.6.1 *Coloană de umplere*, cu capac care se înșurubează, prevăzut cu un marcaj până la care se poate umple cu cantitatea necesară de fază staționară.

A.1.6.2 *Sită fină*, cu dimensiunea ochiurilor de sită de aproximativ 100 μm, cu capac care se înșurubează pentru etanșeizarea coloanei de sticlă, conform figurii A.3.

A.1.6.3 *Vată de sticlă silanizată*, dezactivată.

A.1.6.4 *Vibrator*, pentru distribuția uniformă a fazei staționare în timpul umplerii.

A.1.6.5 *Dispozitive de silanizare*, pentru silanizarea suprafeței de sticlă a coloanei.

A.1.6.6 *Vas Woulff*.

A.1.6.7 *Pompă de aspirație a apei*.

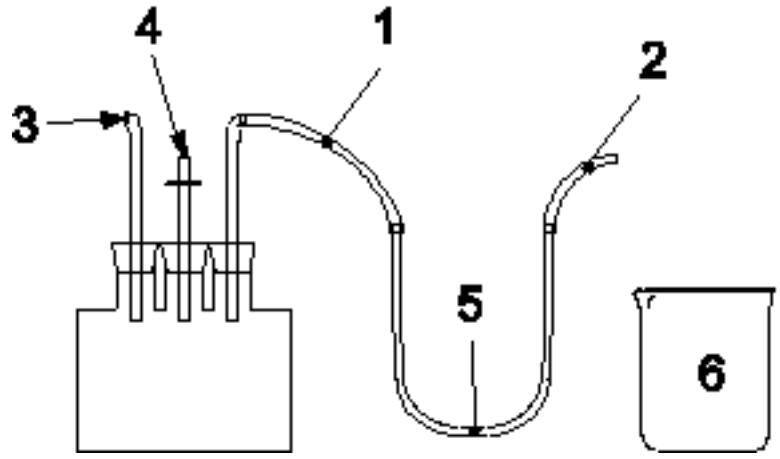
A.2 Silanizarea (dezactivarea suprafeței de sticlă)

După conectarea vasului Woulff (A.1.6.6) la pompa de aspirație a apei (A.1.6.7), se introduce tubul 2 (a se vedea figura A.1) în soluția de dimetilclorsilan (A.1.2). Se umple coloana (A.1.5) 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 dimetildiclorsilan (A.1.2) cu ajutorul unei pipete.

[1] Exemplu de produs adecvat disponibil în comerț. Această informație este prezentată pentru beneficiul utilizatorilor acestui standard internațional și nu reprezintă o susținere de către ISO sau FIL a acestui produs.

Figura A.1

Dispozitivul de silanizare



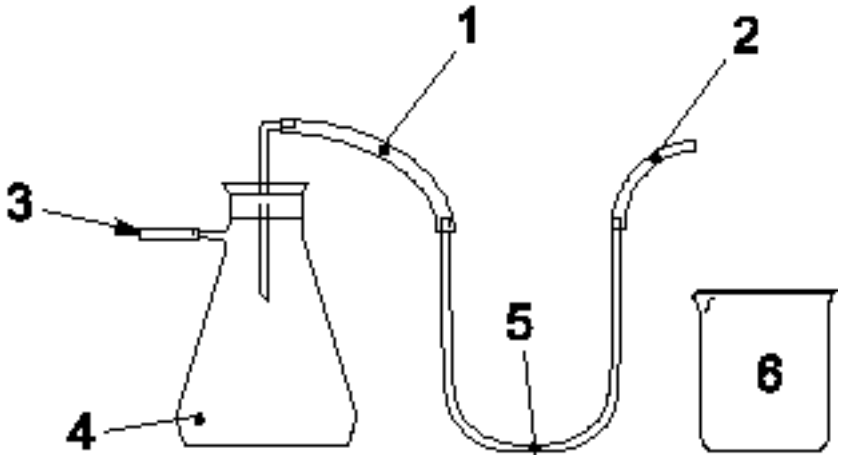
Legendă

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 (A.1.6.7) (a se vedea figura A.2). Se clătește repetat coloana golită cu 75 ml de toluen (A.1.1) și 50 ml metanol (4.3) prin introducerea tubului 2 în solvent. Coloana clătită se usucă în cuptor (5.6) la 100 °C timp de aproximativ 30 min.

Figura A.2

Dispozitivul de clătire



Legendă

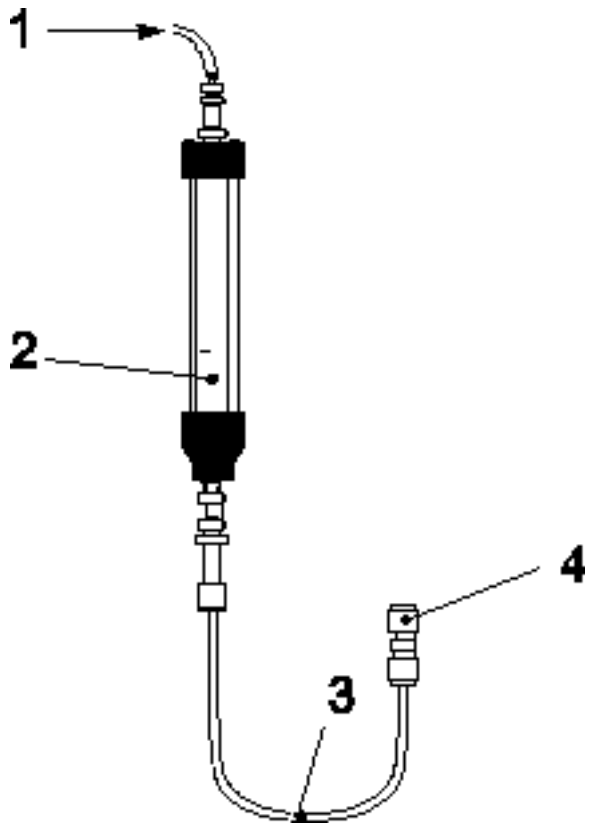
1 tub 1
2 tub 2
3 pompă de aspirație a apei
4 balon de filtrare
5 coloană de sticlă
6 agent de clătire

A.3 Umplerea

Coloana se umple cu ajutorul dispozitivului reprezentat în figura A.3. Coloana de umplere (1.6.1) se umple cu fază staționară (A.1.4) până la marcaj. Capătul inferior al coloanei de sticlă se sigilează cu un dop de vată comprimată de sticlă silanizată (A.1.6.3) cu o lungime de aproximativ 1 cm. Capătul coloanei de sticlă se închide cu o sită fină (A.1.6.2).

Figura A.3

Umplerea coloanei de sticlă



Legendă

1 orificiu de pătrundere a azotului

2 coloana de umplere care trebuie umplută cu OV-1 până la marcaj

3 coloana de sticlă care trebuie umplută

4 capac care se înșurubează, cu filtru, prin care fibrele de sticlă și faza staționară sunt 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 (A.1.6.3). Capetele care ies în exterior se taie. Dopul se împinge în interiorul coloanei cu câțiva milimetri cu ajutorul unei spatule.

A.4 Condiționarea

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 (A.3) se condiționează după cum urmează:

(a) 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;

(b) coloana se încălzește cu 1 °C/min. până la 355 °C, cu un debit al azotului de 10 ml/min;

(c) coloana se menține la 355 °C, timp de 12 h până la 15 h;

(d) se injectează de două ori 1 µl de soluție de unt de cocos (A.1.3), utilizându-se programul de temperatură al coloanei umplute prezentat la punctul 7.3.4.1;

Notă: Untul de cocos este format aproape în întregime din trigliceride C_{50} până la C_{54} cu punct ridicat de fierbere, reducându-se eforturile condiționării coloanei în conformitate cu coeficienții de răspuns respectivi.

(e) se injectează de 20 de ori 0,5 µl de soluție de grăsimi din lapte timp de 2 până la 3 zile conform punctului 7.2, utilizând indicațiile pentru coloana umplută prezentate la punctul 7.3.4.1.

— Pentru probele de analiză se utilizează doar coloane cu coeficienți de răspuns aproape de 1. Coeficienții de răspuns nu trebuie să depășească 1,20.

ANEXA B

(informativă)

CUANTIFICAREA CONȚINUTULUI DE GRĂSIMI STRĂINE

B.1 GENERALITĂȚI

Tabelul B.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, sunt 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 diferitelor 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 (B.2), valoarea S pentru formula totală este necesară pentru cuantificare.

Tabelul B.1

Limitele de detectare cu o precizie de 99 % pentru grăsimile străine adăugate în grăsimile din lapte exprimate procentual

Grăsime 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 sâmburi 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

B.2 CALCULARE

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 de analiză, w_f, exprimată procentual, cu ajutorul formulei următoare:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad (B.1)$$

unde:

S este 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 este 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 valoarea generală pentru S_f de 7,46 (tabelul B.2). Se utilizează întotdeauna valoarea S obținută din formula (7), chiar dacă limitele S pentru aceasta nu sunt depășite, spre deosebire de limitele altei formule.

Dacă se cunosc grăsimile străine, valorile individuale S_f ale acestora (tabelul B.2) se introduc în formulă (B.1). Pentru a se calcula valoarea S, se alege formula relevantă pentru grăsimea străină din formulele de la (3) la (6).

Tabelul B.2

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 sâmburi 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

B.3 EXPRIMAREA REZULTATELOR ANALIZEI

Rezultatele analizei se exprimă cu două zecimale.

Bibliografie

1. Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, pp. 82-85
2. Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, pp. 16-17
3. Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, pp. 265-270
4. Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, pp. 791-797
5. ISO 707IDF 50, Milk and milk products – Guidance on sampling
6. BS 410:1988, Test sieves – Technical requirements and testing
7. Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, 43, 1991, pp. 219-242
8. Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol.*, 93, 1991, pp. 538-544
9. DIN 10336:1994, *Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Detection and determination of foreign fats in milk fat using a gas chromatographic triglyceride analysis]
10. Comisia Comunităților Europene: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92, VI/5317/92, VI/4604/93
11. Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, pp. 505-510

ANEXA XXI

(Articolul 18)

PROCEDURA APLICABILĂ CÂND REZULTATELE UNEI ANALIZE SUNT CONTESTATE (ANALIZĂ CHIMICĂ)

1. La cererea producătorului, se poate realiza o analiză suplimentară prin metoda relevantă în alt laborator aprobat de autoritatea competentă, cu condiția să fie disponibile probe martor sigilate din produs care să fi fost depozitate corespunzător de autoritatea competentă. Cererea se face în termen de 7 șapte zile lucrătoare de la notificarea rezultatelor primei analize. Analiza este efectuată în termen de 21 de zile lucrătoare de la primirea cererii. Autoritatea competentă trimite aceste probe unui al doilea laborator, la cererea și pe cheltuiala producătorului. Laboratorul trebuie să fie autorizat în vederea efectuării de analize oficiale și 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

3. $U_{\bar{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ și respectiv $U_{\bar{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$ unde σ_r este deviația standard a repetabilității, iar σ_R este deviația standard a reproductibilității pentru metoda relevantă. Dacă rezultatul *y* al măsurătorii în laboratoare este calculat folosind o formulă de tipul $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ or $y = x_1/x_2$, în astfel de cazuri trebuie urmate modalitățile obișnuite de combinare a deviațiilor standard pentru a obține incertitudinea.

4. Pentru a verifica dacă rezultatele celor două laboratoare corespund cu deviația standard σ_R a reproductibilității metodei, se calculează incertitudinea extinsă a diferenței $\bar{y}_1 - \bar{y}_2$.

5. $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2} = \sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Dacă valoarea absolută a diferenței dintre valorile medii $\left|\bar{y}_1 - \bar{y}_2\right|$, obținute de laborator, nu este mai mare decât incertitudinea $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$\left|\bar{y}_1 - \bar{y}_2\right| \leq U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

rezultatele celor două laboratoare corespund cu deviația standard σ_r a reproductibilității, iar media aritmetică a valorilor medii obținute de cele două laboratoare,

$$\bar{y} = \frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_2}{2},$$

este raportată drept rezultat final. În acest caz, incertitudinea extinsă este

$$U_{\bar{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

Lotul este respins pentru că nu respectă limita legală superioară *UL* în cazul în care

$$\bar{y} - U_{\bar{y}} > UL;$$

în caz contrar, lotul este acceptat ca respectând *UL*.

Lotul este respins pentru că nu respectă limita legală inferioară *LL* în cazul în care

$$\bar{y} - U_{\bar{y}} < LL;$$

în caz contrar, lotul este acceptat ca respectând *LL*.

Dacă valoarea absolută a diferenței dintre valorile medii $\left|\bar{y}_1 - \bar{y}_2\right|$, obținute de laborator, este mai mare decât incertitudinea $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

$$\left|\bar{y}_1 - \bar{y}_2\right| > U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

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 autoritatea competentă producătorului, cât mai curând posibil. Costurile celei de-a doua analize sunt suportate de producător, în cazul în care lotul este respins.

ANEXA XXII

TABEL DE CORESPONDENȚĂ

Regulamentul (CE) nr. 213/2001	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 1
Articolul 2	Articolul 1
Articolul 3	Articolul 2
—	Articolul 3
Articolul 4	—
Articolul 5	—
Articolul 6	Articolul 4
Articolul 7	Articolul 18
Articolul 8	—
Articolul 9	Articolul 5
Articolul 10	Articolul 6
Articolul 11	Articolul 7
Articolul 12	Articolul 8
Articolul 13	Articolul 9
Articolul 14	Articolul 10
Articolul 15	Articolul 11
Articolul 16	Articolul 12
Articolul 17	Articolul 13
—	Articolul 14
Articolul 18	Articolul 15
Articolul 19	Articolul 16
	Articolul 17
	Articolul 19
Articolul 20	—
Articolul 21	—
Articolul 22	Articolul 20
Articolul 23	Articolul 21