



Ediția în limba română

## Legislație

Anul 61

31 ianuarie 2018

Cuprins

## II Acte fără caracter legislativ

### ACORDURI INTERNAȚIONALE

- ★ Decizia (UE) 2018/145 a Consiliului din 9 octombrie 2017 privind încheierea, în numele Uniunii, a Acordului multilateral între Comunitatea Europeană și statele sale membre, Republica Albania, Bosnia și Herțegovina, Republica Bulgaria, Republica Croația, fosta Republică iugoslavă a Macedoniei, Republica Islanda, Republica Muntenegru, Regatul Norvegiei, România, Republica Serbia și Misiunea administrației interimare a Națiunilor Unite în Kosovo\* privind înființarea unui spațiu aerian comun european (SACE) ..... 1
- ★ Decizia (UE) 2018/146 a Consiliului din 22 ianuarie 2018 privind încheierea, în numele Uniunii, a Acordului euro-mediteranean privind serviciile aeriene între Comunitatea Europeană și statele sale membre, pe de o parte, și Regatul Maroc, pe de altă parte ..... 4

### REGULAMENTE

- ★ Regulamentul (UE) 2018/147 al Consiliului din 29 ianuarie 2018 de modificare a Regulamentului (UE) nr. 1370/2013 în ceea ce privește limita cantitativă pentru achiziționarea de lapte praf degresat ..... 6
- ★ Regulamentul delegat (UE) 2018/148 al Comisiei din 27 septembrie 2017 de modificare a anexelor II, III și IV la Regulamentul (UE) nr. 978/2012 al Parlamentului European și al Consiliului de aplicare a unui sistem generalizat de preferințe tarifare ..... 8
- ★ Regulamentul delegat (UE) 2018/149 al Comisiei din 15 noiembrie 2017 de modificare a Regulamentului delegat (UE) 2016/1238 în ceea ce privește cerințele privind compoziția și caracteristicile calitative pentru laptele și produsele lactate eligibile pentru intervenție publică și ajutoarele pentru depozitarea privată ..... 11

\* Această denumire nu aduce atingere pozițiilor privind statutul și este conformă cu RCSONU 1244 (1999), precum și cu Avizul Curții Internaționale de Justiție privind declarația de independență a Kosovo.

- ★ Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2018/150 al Comisiei din 30 ianuarie 2018 de modificare a Regulamentului de punere în aplicare (UE) 2016/1240 în ceea ce privește metodele de analiză și evaluare calitativă a laptelui și produselor lactate eligibile pentru intervenția publică și pentru ajutoarele pentru depozitarea privată ..... 14
- ★ Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2018/151 al Comisiei din 30 ianuarie 2018 de stabilire a normelor de aplicare a Directivei (UE) 2016/1148 a Parlamentului European și a Consiliului în ceea ce privește aducerea unor precizări suplimentare cu privire la elementele care trebuie să fie luate în considerare de către furnizorii de servicii digitale pentru gestionarea riscurilor la adresa securității rețelelor și a sistemelor informatice, precum și cu privire la parametrii necesari pentru a se determina dacă un incident are un impact substanțial 48

## DECIZII

- ★ Decizia (UE) 2018/152 a Consiliului din 29 ianuarie 2018 de numire a unui supleant, propus de Republica Federală Germania, în cadrul Comitetului Regiunilor ..... 52

## Rectificări

- ★ Rectificare la Regulamentul (UE) 2017/1084 al Comisiei din 14 iunie 2017 de modificare a Regulamentului (UE) nr. 651/2014 în ceea ce privește ajutoarele pentru infrastructurile portuare și aeroportuare, pragurile de notificare pentru ajutoarele pentru cultură și pentru conservarea patrimoniului, ajutoarele pentru infrastructurile sportive și pentru infrastructurile de agrement multifuncționale, precum și schemele de ajutoare regionale de exploatare pentru regiunile ultraperiferice și de modificare a Regulamentului (UE) nr. 702/2014 în ceea ce privește calcularea costurilor eligibile (JO L 156, 20.6.2017) ..... 53

## II

(Acte fără caracter legislativ)

## ACORDURI INTERNAȚIONALE

## DECIZIA (UE) 2018/145 A CONSILIULUI

din 9 octombrie 2017

**privind încheierea, în numele Uniunii, a Acordului multilateral între Comunitatea Europeană și statele sale membre, Republica Albania, Bosnia și Herțegovina, Republica Bulgaria, Republica Croația, fosta Republică iugoslavă a Macedoniei, Republica Islanda, Republica Muntenegru, Regatul Norvegiei, România, Republica Serbia și Misiunea administrației interimare a Națiunilor Unite în Kosovo \* privind înființarea unui spațiu aerian comun european (SACE)**

CONSILIUL UNIUNII EUROPENE,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene, în special articolul 100 alineatul (2), coroborat cu articolul 218 alineatul (6) litera (a),

având în vedere propunerea Comisiei Europene,

având în vedere aprobarea Parlamentului European ( <sup>(1)</sup>),

întrucât:

- (1) Comisia a negociat, în numele Comunității Europene și al statelor membre, un acord multilateral între Comunitatea Europeană și statele sale membre, Republica Albania, Bosnia și Herțegovina, Republica Bulgaria, Republica Croația, fosta Republică iugoslavă a Macedoniei, Republica Islanda, Republica Muntenegru, Regatul Norvegiei, România, Republica Serbia și Misiunea administrației interimare a Națiunilor Unite în Kosovo privind înființarea unui spațiu aerian comun european (SACE) („acordul”).
- (2) Acordul a fost semnat în numele Comunității la 9 iunie 2006, sub rezerva încheierii sale la o dată ulterioară, în temeiul Deciziei 2006/682/CE a Consiliului și a reprezentanților statelor membre ale Uniunii Europene, reuniți în cadrul Consiliului ( <sup>(2)</sup>).
- (3) Acordul a fost ratificat de toate statele membre.
- (4) Cu ocazia aderării lor la Uniune, Republica Bulgaria, România și Republica Croația au devenit state membre și, prin urmare, a încetat automat calitatea lor de părți asociate în temeiul acordului în conformitate cu articolul 31 alineatul (2) din acord. Acest lucru ar trebui să fie reamintit printr-o notificare, care urmează să fie făcută cu ocazia depunerii instrumentului de aprobare a acordului.

\* Această denumire nu aduce atingere pozițiilor privind statutul și este conformă cu RCSONU 1244 (1999), precum și cu Avizul Curții Internaționale de Justiție privind declarația de independență a Kosovo.

(<sup>1</sup>) JO C 81E, 15.3.2011, p. 5.

(<sup>2</sup>) Decizia 2006/682/CE a Consiliului și a reprezentanților statelor membre ale Uniunii Europene reuniți în cadrul Consiliului din 9 iunie 2006 privind semnarea și aplicarea provizorie a Acordului multilateral dintre Comunitatea Europeană și statele sale membre, Republica Albania, Bosnia și Herțegovina, Republica Bulgaria, Republica Croația, fosta Republică iugoslavă a Macedoniei, Republica Islanda, Republica Muntenegru, Regatul Norvegiei, România, Republica Serbia și Misiunea Administrativă Interimară a Organizației Națiunilor Unite în Kosovo cu privire la instituirea unei Zone comune europene de aviație (ECAA) (JO L 285, 16.10.2006, p. 1).

- (5) În ceea ce privește modificările aduse anexei I la acord referitoare doar la includerea legislației Uniunii în anexa respectivă, care urmează să fie adoptate de comitetul mixt instituit în temeiul articolului 18 din acord, competența de a aproba astfel de modificări în numele Uniunii ar trebui acordată Comisiei, după consultarea unui comitet special desemnat de Consiliu.
- (6) În toate celelalte cazuri, poziția care urmează să fie luată în cadrul comitetului mixt în numele Uniunii cu privire la aspecte care țin de competența Uniunii ar trebui stabilită de la caz la caz, în conformitate cu dispozițiile relevante din Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene (TFUE).
- (7) Dat fiind faptul că atât Uniunea, cât și statele sale membre sunt părți la acord, strânsa cooperare dintre ele este esențială. Pentru a asigura o cooperare atât de strânsă și unitatea reprezentării externe în cadrul comitetului mixt și fără a aduce atingere tratatelor, în special articolului 16 alineatul (1) din Tratatul privind Uniunea Europeană și articolului 218 alineatul (9) din TFUE, ar trebui să aibă loc o coordonare a pozițiilor care urmează să fie adoptate în cadrul comitetului mixt, în numele Uniunii și al statelor membre, cu privire la aspecte care țin atât de competența Uniunii, cât și de cea a statelor membre, înaintea oricărei reuniuni a comitetului mixt care se ocupă de aspectele respective.
- (8) Articolul 2 din Decizia 2006/682/CE conține dispoziții privind stabilirea pozițiilor care urmează să fie adoptate în cadrul comitetului mixt în timpul aplicării provizorii a acordului. În lumina hotărârii Curții de Justiție din 28 aprilie 2015 în Cauza C-28/12, Comisia/Consiliul <sup>(1)</sup>, aplicarea respectivelor dispoziții ar trebui să înceteze de la data intrării în vigoare a prezentei decizii.
- (9) Acordul ar trebui să fie aprobat,

ADOPTĂ PREZENTA DECIZIE:

#### Articolul 1

(1) Se aprobă, în numele Uniunii, Acordul multilateral între Comunitatea Europeană și statele sale membre, Republica Albania, Bosnia și Herțegovina, Republica Bulgaria, Republica Croația, fosta Republică iugoslavă a Macedoniei, Republica Islanda, Republica Muntenegru, Regatul Norvegiei, România, Republica Serbia și Misiunea administrației interimare a Organizației Națiunilor Unite în Kosovo privind înființarea unui spațiu aerian comun european (SACE) <sup>(2)</sup>.

(2) Președintele Consiliului desemnează persoana împuternicită sau persoanele împuternicite să depună, în numele Uniunii, actul de aprobare prevăzut la articolul 29 alineatul (2) din acord <sup>(3)</sup> și procedează la următoarea notificare:

„(1) Ca o consecință a intrării în vigoare a Tratatului de la Lisabona la 1 decembrie 2009, Uniunea Europeană a înlocuit Comunitatea Europeană și i-a succedat acesteia. Începând cu data respectivă, exercită toate drepturile și preia toate obligațiile Comunității Europene. Prin urmare, trimerile la «Comunitatea Europeană» din textul acordului se interpretează, acolo unde este cazul, drept trimeri la «Uniunea Europeană».

(2) Ca urmare a aderării lor la Uniunea Europeană, Republica Bulgaria, România și Republica Croația au devenit state membre ale Uniunii Europene și, prin urmare, în conformitate cu articolul 31 alineatul (2) din acord, a încetat calitatea lor de părți asociate în temeiul acordului.”

#### Articolul 2

Comisia adoptă poziția care urmează a fi luată de Uniune în ceea ce privește deciziile comitetului mixt în temeiul articolului 17 din acord privind doar includerea legislației Uniunii în anexa I la acord, sub rezerva modificărilor tehnice necesare, după consultarea unui comitet special desemnat de Consiliu.

#### Articolul 3

Articolul 2 din Decizia 2006/682/CE încetează să se aplice de la data intrării în vigoare a prezentei decizii.

<sup>(1)</sup> ECLI:EU:C:2015:282.

<sup>(2)</sup> Acordul a fost publicat în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene* (JO L 285, 16.10.2006, p. 3) împreună cu decizia privind semnarea și aplicarea cu titlu provizoriu.

<sup>(3)</sup> Data intrării în vigoare a acordului va fi publicată în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene* de către Secretariatul General al Consiliului.

*Articolul 4*

Prezenta decizie intră în vigoare la data adoptării.

Adoptată la Luxemburg, 9 octombrie 2017.

*Pentru Consiliu*

*Președintele*

S. KIISLER

---

**DECIZIA (UE) 2018/146 A CONSILIULUI****din 22 ianuarie 2018****privind încheierea, în numele Uniunii, a Acordului euro-mediteraneean privind serviciile aeriene între Comunitatea Europeană și statele sale membre, pe de o parte, și Regatul Maroc, pe de altă parte**

CONSILIUL UNIUNII EUROPENE,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene, în special articolul 100 alineatul (2), coroborat cu articolul 218 alineatul (6) litera (a),

având în vedere propunerea Comisiei Europene,

având în vedere aprobarea Parlamentului European <sup>(1)</sup>,

întrucât:

- (1) Comisia a negociat în numele Uniunii și al statelor membre un acord euro-mediteraneean privind serviciile aeriene cu Regatul Maroc („acordul”), în conformitate cu decizia Consiliului de autorizare a Comisiei în vederea deschiderii negocierilor.
- (2) Acordul a fost semnat la 12 decembrie 2006, în temeiul Deciziei 2006/959/CE a Consiliului și a reprezentanților guvernelor statelor membre reuniți în cadrul Consiliului <sup>(2)</sup>. Acordul a fost ratificat de către toate statele membre, cu excepția Bulgariei, României și Croației. Se intenționează ca aceste state membre să accedă la acord în conformitate cu articolul 6 alineatul (2) din actele lor de aderare respective.
- (3) În ceea ce privește modificările aduse anumitor anexe la acord care urmează să fie adoptate de comitetul mixt instituit în temeiul articolului 22 din acord, competența de a aproba astfel de modificări în numele Uniunii ar trebui acordată Comisiei, după consultarea comitetului special desemnat de Consiliu.
- (4) În toate celelalte cazuri, pozițiile care urmează să fie luate în cadrul comitetului mixt în numele Uniunii, cu privire la aspecte care țin de competența Uniunii, ar trebui stabilite de la caz la caz, în conformitate cu dispozițiile relevante din Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene (TFUE).
- (5) Dat fiind faptul că atât Uniunea, cât și statele sale membre sunt părți la acord, strânsă cooperare dintre ele este esențială. Pentru a asigura o strânsă cooperare și unitatea reprezentării externe în cadrul comitetului mixt și fără a aduce atingere tratatelor, în special articolului 16 alineatul (1) din Tratatul privind Uniunea Europeană și articolului 218 alineatul (9) din TFUE, ar trebui să aibă loc o coordonare a pozițiilor care urmează să fie adoptate în cadrul comitetului mixt, în numele Uniunii și al statelor membre, cu privire la aspecte care țin atât de competența Uniunii, cât și de cea a statelor membre, înaintea oricărei reuniuni a comitetului mixt care se ocupă de aspectele respective.
- (6) Articolele 2-5 din Decizia 2006/959/CE conțin dispoziții privind luarea deciziilor de către Consiliu cu privire la diverse aspecte prevăzute în acord, inclusiv privind stabilirea pozițiilor care urmează să fie adoptate în cadrul comitetului mixt și privind obligațiile de informare ale statelor membre în timpul aplicării provizorii a acordului. Respectivele dispoziții fie nu sunt necesare, fie aplicarea lor ar trebui să înceteze în lumina hotărârii Curții de Justiție din 28 aprilie 2015 în cauza C-28/12, Comisia/Consiliu <sup>(3)</sup>. Prin urmare, este necesar ca toate dispozițiile respective să înceteze să se mai aplice de la data intrării în vigoare a prezentei decizii.
- (7) Acordul ar trebui aprobat,

<sup>(1)</sup> JO C 81E, 15.3.2011, p. 5.

<sup>(2)</sup> Decizia 2006/959/CE a Consiliului și a reprezentanților guvernelor statelor membre reuniți în cadrul Consiliului din 4 decembrie 2006 privind semnarea și aplicarea provizorie a Acordului euromediteraneean privind serviciile aeriene între Comunitatea Europeană și statele membre, pe de o parte, și Regatul Maroc, pe de altă parte (JO L 386, 29.12.2006, p. 55).

<sup>(3)</sup> ECLI:EU:C:2015:282.

ADOPTĂ PREZENTA DECIZIE:

*Articolul 1*

(1) Se aprobă, în numele Uniunii, Acordul euro-mediteraneean privind serviciile aeriene între Comunitatea Europeană și statele sale membre, pe de o parte, și Regatul Maroc, pe de altă parte <sup>(1)</sup>.

(2) Președintele Consiliului este autorizat să desemneze persoana (persoanele) împuternicită (împuternicite) să transmită Regatului Maroc notele diplomatice prevăzute la articolul 30 din acord <sup>(2)</sup> și să facă următoarea notificare:

„Ca urmare a intrării în vigoare a Tratatului de la Lisabona la 1 decembrie 2009, Uniunea Europeană s-a substituit Comunității Europene și i-a succedat acesteia și, începând cu data respectivă, exercită toate drepturile și preia toate obligațiile Comunității Europene. Prin urmare, trimiterile la «Comunitatea Europeană» în textul acordului se interpretează, după caz, ca trimiteri la «Uniunea Europeană».”

*Articolul 2*

Pozițiile care urmează să fie adoptate de Uniune în cadrul comitetului mixt, instituit în temeiul articolului 22 din acord, în ceea ce privește modificarea anexelor la acord, cu excepția anexei I (Servicii autorizate și rute specificate) și a anexei IV (Dispoziții tranzitorii) sunt adoptate de către Comisie, după consultarea unui comitet special numit de Consiliu.

*Articolul 3*

Articolele 2-5 din Decizia 2006/959/CE încetează să se aplice de la data intrării în vigoare a prezentei decizii.

*Articolul 4*

Prezenta decizie intră în vigoare la data adoptării.

Adoptată la Bruxelles, 22 ianuarie 2018.

*Pentru Consiliu*  
*Președintele*  
F. MOGHERINI

---

<sup>(1)</sup> Acordul a fost publicat în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene* (JO L 386, 29.12.2006, p. 57) împreună cu decizia privind semnarea și aplicarea provizorie.

<sup>(2)</sup> Data intrării în vigoare a acordului va fi publicată în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene* de către Secretariatul General al Consiliului.

# REGULAMENTE

## REGULAMENTUL (UE) 2018/147 AL CONSILIULUI

din 29 ianuarie 2018

### de modificare a Regulamentului (UE) nr. 1370/2013 în ceea ce privește limita cantitativă pentru achiziționarea de lapte praf degresat

CONSILIUL UNIUNII EUROPENE,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene, în special articolul 43 alineatul (3),

având în vedere propunerea Comisiei Europene,

întrucât:

- (1) La finalul lunii iulie 2017, s-a raportat că, în Uniune, stocurile de intervenție publică de lapte praf degresat se situau la 357 359 de tone. Un supliment de 22 710 tone a fost oferit pentru achiziționare la preț fix până la 30 septembrie 2017, când s-a încheiat perioada de intervenție.
- (2) Sectorul laptelui și al produselor lactate traversează o deconectare fără precedent între prețurile la grăsimi și prețurile la proteine, ca urmare a unei cereri de unt deosebit de mari.
- (3) Se prevede o creștere a livrărilor de lapte în Uniune în 2018, ceea ce va duce la o producție mai mare de unt și de lapte praf degresat.
- (4) Este probabil ca, în 2018, prețurile pentru laptele crud plătite producătorilor să rămână la un nivel la care creșterea animalelor de lapte să fie profitabilă datorită actualei cereri puternice de unt și de brânză, în pofida prețurilor relativ scăzute la proteina lactată.
- (5) Aceste elemente ale pieței creează o situație excepțională pentru anul 2018, care trebuie să fie luată în considerare în mod special în ceea ce privește modul de funcționare a mecanismului de intervenție publică pentru produsele lactate.
- (6) Articolul 3 din Regulamentul (UE) nr. 1370/2013 al Consiliului <sup>(1)</sup> stabilește o limită cantitativă pentru achiziționarea de lapte praf degresat la prețul fix menționat la articolul 2 din regulamentul respectiv. Odată ce această limită este atinsă, achiziționarea se face prin intermediul unei proceduri de licitație pentru a se stabili prețul maxim de achiziție.
- (7) Pentru a evita ca laptele praf degresat să fie achiziționat la preț fix într-o situație în care acest fapt nu ar fi în conformitate cu obiectivele dispozitivului de siguranță, toate intervențiile publice în cazul laptelui praf degresat ar trebui operate în cadrul unei proceduri de licitație. În acest sens, pentru anul 2018, limita cantitativă pentru achiziționarea de lapte praf degresat la preț fix ar trebui să fie stabilită la zero.
- (8) Prin urmare, Regulamentul (CE) nr. 1370/2013 ar trebui modificat în consecință.
- (9) Pentru a se asigura că măsura temporară prevăzută în prezentul regulament are un impact imediat asupra pieței și pentru a permite ca operatorii de pe piață să fie informați în timp util înainte de începutul următoarei campanii de intervenție, prezentul regulament ar trebui să intre în vigoare în ziua următoare datei publicării,

<sup>(1)</sup> Regulamentul (UE) nr. 1370/2013 al Consiliului din 16 decembrie 2013 privind măsuri pentru stabilirea anumitor ajutoare și restituții în legătură cu organizarea comună a piețelor produselor agricole (JO L 346, 20.12.2013, p. 12).



ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

*Articolul 1*

La articolul 3 alineatul (1) din Regulamentul (UE) nr. 1370/2013, se adaugă următorul paragraf:

„Prin derogare de la primul paragraf, în anul 2018, limita cantitativă pentru achiziționarea de lapte praf degresat la preț fix este de 0 tone.”

*Articolul 2*

Prezentul regulament intră în vigoare în ziua următoare datei publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

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

Adoptat la Bruxelles, 29 ianuarie 2018.

Pentru Consiliu  
Președintele  
R. PORODZANOV

---

**REGULAMENTUL DELEGAT (UE) 2018/148 AL COMISIEI****din 27 septembrie 2017****de modificare a anexelor II, III și IV la Regulamentul (UE) nr. 978/2012 al Parlamentului European și al Consiliului de aplicare a unui sistem generalizat de preferințe tarifare**

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Regulamentul (UE) nr. 978/2012 al Parlamentului European și al Consiliului din 25 octombrie 2012 de aplicare a unui sistem generalizat de preferințe tarifare și de abrogare a Regulamentului (CE) nr. 732/2008 al Consiliului <sup>(1)</sup>, în special articolul 5 alineatul (3), articolul 10 alineatul (5) și articolul 17 alineatul (2),

întrucât:

- (1) Articolul 4 din Regulamentul (UE) nr. 978/2012 stabilește criteriile de acordare a preferințelor tarifare în temeiul regimului general al Sistemului generalizat de preferințe („SGP”).
- (2) La articolul 4 alineatul (1) literele (a) și (b) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012 se prevede că o țară care a fost clasificată de Banca Mondială ca țară cu venituri medii-superioare sau cu venituri mari timp de trei ani consecutiv sau, respectiv, o țară care beneficiază de un regim de acces preferențial pe piață, care oferă preferințe tarifare identice sau mai favorabile decât SGP pentru cea mai mare parte a schimburilor comerciale, nu poate să beneficieze de SGP.
- (3) Lista țărilor care beneficiază de regimul general al SGP menționat la articolul 1 alineatul (2) litera (a) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012 este stabilită în anexa II la regulamentul respectiv. Articolul 5 alineatul (2) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012 prevede că anexa II trebuie revizuită până la data de 1 ianuarie a fiecărui an. Revizuirea ar trebui să țină cont de modificările condițiilor economice, de dezvoltare sau comerciale ale țărilor beneficiare în raport cu criteriile stabilite la articolul 4.
- (4) În conformitate cu articolul 5 alineatul (2) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012, țările și operatorii economici care beneficiază de SGP trebuie să dispună de suficient timp pentru o adaptare corectă în urma revizuirii statutului țării în cadrul SGP. Prin urmare, regimul SGP trebuie menținut timp de un an de la data intrării în vigoare a unei modificări a statutului unei țări în conformitate cu articolul 4 alineatul (1) litera (a) și timp de doi ani de la data punerii în aplicare a unui regim de acces preferențial pe piață în conformitate cu articolul 4 alineatul (1) litera (b).
- (5) Paraguayul a fost clasificat de Banca Mondială ca țară cu venituri medii-superioare în 2015, 2016 și 2017. Prin urmare, Paraguayul nu mai îndeplinește condițiile pentru acordarea statutului de țară beneficiară a SGP în conformitate cu articolul 4 alineatul (1) litera (a) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012 și ar trebui să fie eliminat din lista țărilor care beneficiază de SGP din anexa II la respectivul regulament, cu aplicare de la 1 ianuarie 2019.
- (6) Anumite regimuri de acces preferențial pe piață au început să se aplice în cazul Cotei d'Ivoire la 3 septembrie 2016, al Swaziland la 10 octombrie 2016 și al Ghanei la 15 decembrie 2016. Prin urmare, în conformitate cu articolul 4 alineatul (1) litera (b), Côte d'Ivoire, Swaziland și Ghana ar trebui, de asemenea, să fie eliminate din anexa II la Regulamentul (UE) nr. 978/2012 începând de la 1 ianuarie 2019.
- (7) Articolul 9 alineatul (1) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012 enunță criteriile specifice de eligibilitate pentru acordarea de preferințe tarifare în cadrul regimului special de încurajare a dezvoltării durabile și a bunei guvernante („SGP+”) țărilor care beneficiază de SGP. Lista țărilor care beneficiază de SGP+ este stabilită în anexa III la Regulamentul (UE) nr. 978/2012.
- (8) Ca urmare a faptului că nu mai este țară beneficiară a SGP începând de la 1 ianuarie 2019, Paraguayul încetează, de asemenea, să mai fie țară beneficiară a SGP+ în conformitate cu articolul 9 alineatul (1) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012. Prin urmare, Paraguayul ar trebui eliminat din anexa III la respectivul regulament începând de la 1 ianuarie 2019.

<sup>(1)</sup> JO L 303, 31.10.2012, p. 1.

- (9) Articolul 17 alineatul (1) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012 prevede că o țară care este identificată de ONU ca aparținând categoriei țărilor cel mai puțin dezvoltate ar trebui să beneficieze de preferințele tarifare acordate în temeiul regimului special pentru țările cel mai puțin dezvoltate [inițiativa „Totul în afară de arme” – „Everything But Arms” – „EBA”]. Lista țărilor care beneficiază de regimul EBA este stabilită în anexa IV la regulamentul menționat.
- (10) La 4 iunie 2017, ONU a eliminat Guineea Ecuatorială din rândul țărilor cu statutul de țară cel mai puțin dezvoltată. Prin urmare, Guineea Ecuatorială nu mai îndeplinește condițiile pentru acordarea statutului de țară beneficiară a EBA în temeiul articolului 17 alineatul (1) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012 și ar trebui eliminată din anexa IV la respectivul regulament. În conformitate cu articolul 17 alineatul (2) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012, eliminarea Guineei Ecuatoriale din lista țărilor beneficiare ale EBA ar trebui să se aplice după o perioadă de tranziție de trei ani de la data la care prezentul regulament intră în vigoare, și anume de la 1 ianuarie 2021.
- (11) În plus, Guineea Ecuatorială a fost de asemenea clasificată de Banca Mondială ca țară cu venituri mari în 2015 și ca țară cu venituri medii-superioare în 2016 și în 2017. Prin urmare, Guineea Ecuatorială nu mai îndeplinește condițiile pentru acordarea statutului de țară beneficiară a SGP în conformitate cu articolul 4 alineatul (1) litera (a) din Regulamentul (UE) nr. 978/2012 și ar trebui eliminată din lista țărilor care beneficiază de SGP din anexa II la respectivul regulament, cu aplicare de la 1 ianuarie 2021,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

#### *Articolul 1*

### **Modificări ale Regulamentului (UE) nr. 978/2012**

Regulamentul (UE) nr. 978/2012 se modifică după cum urmează:

1. În anexa II, din coloanele A și, respectiv, B se elimină următoarele coduri alfabetice și țările aferente:

CI Cote d'Ivoire

GH Ghana

PY Paraguay

SZ Swaziland

2. În anexa III, din coloanele A și, respectiv, B se elimină următorul cod alfabetic și țara aferentă:

PY Paraguay

3. În anexele II și IV, din coloanele A și, respectiv, B se elimină următorul cod alfabetic și țara aferentă:

GQ Guineea Ecuatorială

#### *Articolul 2*

### **Intrare în vigoare și aplicare**

Prezentul regulament intră în vigoare la 1 ianuarie 2018.

Articolul 1 alineatele (1) și (2) se aplică de la 1 ianuarie 2019.

Articolul 1 alineatul (3) se aplică de la 1 ianuarie 2021.

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

Adoptat la Bruxelles, 27 septembrie 2017.

*Pentru Comisie*  
*Președintele*  
Jean-Claude JUNCKER

---

**REGULAMENTUL DELEGAT (UE) 2018/149 AL COMISIEI****din 15 noiembrie 2017****de modificare a Regulamentului delegat (UE) 2016/1238 în ceea ce privește cerințele privind compoziția și caracteristicile calitative pentru laptele și produsele lactate eligibile pentru intervenție publică și ajutoarele pentru depozitarea privată**

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Regulamentul (UE) nr. 1308/2013 al Parlamentului European și al Consiliului din 17 decembrie 2013 de instituire a unei organizări comune a piețelor produselor agricole și de abrogare a Regulamentelor (CEE) nr. 922/72, (CEE) nr. 234/79, (CE) nr. 1037/2001 și (CE) nr. 1234/2007 ale Consiliului <sup>(1)</sup>, în special articolul 19 alineatul (1) litera (a),

întrucât:

- (1) Regulamentul delegat (UE) 2016/1238 al Comisiei <sup>(2)</sup> stabilește cerințele privind compoziția și caracteristicile calitative pentru laptele și produsele lactate eligibile pentru intervenție publică și ajutoarele pentru depozitarea privată.
- (2) Datorită ameliorărilor tehnice ale metodologiei utilizate în ceea ce privește analiza și evaluarea calitativă a laptelui și produselor lactate și în scopul de a armoniza normele existente ale Uniunii referitoare la cerințele în materie de igienă, este necesar să se revizuiască și să se actualizeze parametrii cerințelor privind compoziția și ai caracteristicilor calitative ale anumitor produse lactate eligibile pentru intervenție publică și pentru ajutoare pentru depozitarea privată.
- (3) Prin urmare, anexele IV și V la Regulamentul delegat (UE) 2016/1238 ar trebui modificate în consecință,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

*Articolul 1*

Anexele la Regulamentul delegat (UE) 2016/1238 se modifică după cum urmează:

- (a) Partea II din anexa IV se înlocuiește cu textul din anexa I la prezentul regulament.
- (b) Partea II din anexa V se înlocuiește cu textul din anexa II la prezentul regulament.

*Articolul 2*Prezentul regulament intră în vigoare în a șaptea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

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

Adoptat la Bruxelles, 15 noiembrie 2017.

Pentru Comisie  
Președintele  
Jean-Claude JUNCKER

---

<sup>(1)</sup> JO L 347, 20.12.2013, p. 671.

<sup>(2)</sup> Regulamentul delegat (UE) 2016/1238 al Comisiei din 18 mai 2016 de completare a Regulamentului (UE) nr. 1308/2013 al Parlamentului European și al Consiliului în ceea ce privește intervenția publică și ajutoarele pentru depozitarea privată (JO L 206, 30.7.2016, p. 15).

## ANEXA I

**„PARTEA II****Cerințe privind compoziția și caracteristici calitative**

Untul este o emulsie solidă, în principal de tip apă în ulei, care prezintă următoarele caracteristici privind compoziția și calitatea:

Parametri	Caracteristici legate de calitate și conținut
Grăsimi	Minimum 82 %
Apă	Maximum 16 %
Substanțe solide fără grăsimi	Maximum 2 %
Acizi grași	Maximum 1,2 mmol/100 g grăsimi
Indice de peroxid	Maximum 0,3 meq oxigen/1 000 g grăsimi
Grăsimi care nu provin din lapte	Nedetectabile prin analiza trigliceridică
Caracteristici senzoriale	Cel puțin patru din cinci puncte pentru aspect, gust și consistență”

## ANEXA II

## „PARTEA II

**Cerințe privind compoziția și caracteristici calitative**

Parametri	Caracteristici legate de calitate și conținut
Proteine	Minimum 34,0 % din substanța uscată fără grăsimi
Grăsimi	Maximum 1,00 %
Apă	Maximum 3,5 %
Aciditate titrabilă în ml de soluție decinormală de hidroxid de sodiu	Maximum 19,5 ml
Lactați	Maximum 150 mg/100 g
Testul fosfatazei	Negativ, adică nu mai mult de 350 mU de activitate fosfatazică per litru de lapte reconstituit
Index de insolubilitate	Maximum 0,5 ml (24 °C)
Particule arse	Maximum 15,0 mg, respectiv minimum disc B
Microorganisme	Maximum 40 000 CFU per gram
Zară <sup>(1)</sup>	Lipsă <sup>(2)</sup>
Zer încheșat <sup>(3)</sup>	Lipsă
Zer acid <sup>(3)</sup>	Lipsă <sup>(4)</sup> sau maximum 150 mg/100 g <sup>(5)</sup>
Gust și miros	Curat
Aspect	Culoare albă sau ușor gălbuie, fără impurități și particule colorate

<sup>(1)</sup> «Zara» este produsul secundar al producției de unt care se obține după baterea smântânii și separarea grăsimilor solide.

<sup>(2)</sup> Absența zarei poate fi stabilită fie printr-o inspecție la fața locului a unității de producție efectuată inopinat cel puțin o dată pe săptămână, fie printr-o analiză de laborator a produsului final care indică o valoare maximă de 69,31 mg dipalmitoil fosfatidiletanolamină PEDP per 100 g.

<sup>(3)</sup> «Zerul» este produsul secundar al producției de brânză sau de cazeină obținut prin acțiunea acizilor, prin încheșare și/sau procese chimico-fizice.

<sup>(4)</sup> Atunci când se efectuează inspecții la fața locului.

<sup>(5)</sup> Atunci când se aplică ISO 8069.”

**REGULAMENTUL DE PUNERE ÎN APLICARE (UE) 2018/150 AL COMISIEI****din 30 ianuarie 2018****de modificare a Regulamentului de punere în aplicare (UE) 2016/1240 în ceea ce privește metodele de analiză și evaluare calitativă a laptelui și produselor lactate eligibile pentru intervenția publică și pentru ajutoarele pentru depozitarea privată**

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Regulamentul (UE) nr. 1306/2013 al Parlamentului European și al Consiliului din 17 decembrie 2013 privind finanțarea, gestionarea și monitorizarea politicii agricole comune și de abrogare a Regulamentelor (CEE) nr. 352/78, (CE) nr. 165/94, (CE) nr. 2799/98, (CE) nr. 814/2000, (CE) nr. 1290/2005 și (CE) nr. 485/2008 ale Consiliului <sup>(1)</sup>, în special articolul 62 alineatul (2) litera (i),

întrucât:

- (1) Regulamentul delegat (UE) 2016/1238 al Comisiei <sup>(2)</sup> și Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2016/1240 <sup>(3)</sup> al Comisiei stabilesc norme în ceea ce privește intervenția publică și ajutoarele pentru depozitarea privată. Regulamentul (CE) nr. 273/2008 al Comisiei <sup>(4)</sup> stabilește metodele care trebuie aplicate pentru a se evalua dacă laptele și produsele lactate îndeplinesc cerințele de eligibilitate prevăzute în regulamentele menționate, referitoare la intervenția publică și la ajutoarele pentru depozitarea privată.
- (2) Având în vedere evoluțiile tehnice ale metodologiei utilizate pentru analiza și evaluarea calitativă a laptelui și produselor lactate, ar trebui aduse modificări substanțiale în scopul simplificării și al furnizării unor referiri actualizate la standardele ISO. Din motive de claritate și eficiență și având în vedere amploarea și natura tehnică a modificărilor aduse dispozițiilor Regulamentului (CE) nr. 273/2008, dispozițiile relevante ale regulamentului respectiv ar trebui încorporate în Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2016/1240.
- (3) Pentru a se asigura respectarea uniformă a noilor standarde și metode în toate statele membre, ar trebui să se acorde laboratoarelor o perioadă de timp suficientă pentru revizuirea procedurilor și aplicarea metodelor actualizate.
- (4) Prin urmare, Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2016/1240 ar trebui modificat în consecință.
- (5) Din motive de securitate juridică, Regulamentul (CE) nr. 273/2008 ar trebui abrogat.
- (6) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului pentru organizarea comună a piețelor agricole,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

*Articolul 1*

Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2016/1240 se modifică după cum urmează:

1. Articolul 4 se modifică după cum urmează:

(a) alineatul (1) se modifică după cum urmează:

(i) litera (d) se înlocuiește cu următorul text:

„(d) pentru unt: în părțile I și Ia ale anexei IV la prezentul regulament”;

(ii) litera (e) se înlocuiește cu următorul text:

„(e) pentru laptele praf degresat: în părțile I și Ia ale anexei V la prezentul regulament”;

<sup>(1)</sup> JO L 347, 20.12.2013, p. 549.<sup>(2)</sup> Regulamentul delegat (UE) 2016/1238 al Comisiei din 18 mai 2016 de completare a Regulamentului (UE) nr. 1308/2013 al Parlamentului European și al Consiliului în ceea ce privește intervenția publică și ajutoarele pentru depozitarea privată (JO L 206, 30.7.2016, p. 15).<sup>(3)</sup> Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2016/1240 al Comisiei din 18 mai 2016 de stabilire a normelor de aplicare a Regulamentului (UE) nr. 1308/2013 al Parlamentului European și al Consiliului în ceea ce privește intervenția publică și ajutorul pentru depozitarea privată (JO L 206, 30.7.2016, p. 71).<sup>(4)</sup> 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 (JO L 88, 29.3.2008, p. 1).



(b) alineatul (2) se înlocuiește cu următorul text:

„(2) Metodele care trebuie utilizate pentru determinarea calității cerealelor, a untului și a laptelui praf degresat eligibile pentru intervenția publică menționate în anexele I, IV și, respectiv, V, sunt cele prevăzute în cele mai recente versiuni ale standardelor europene sau internaționale relevante, după caz, aflate în vigoare de cel puțin 6 luni înainte de prima zi a perioadei de intervenție publică stabilite la articolul 12 din Regulamentul (UE) nr. 1308/2013.”

2. Se introduce următorul articol 60a:

„Articolul 60a

**Dispoziții specifice privind controalele legate de intervenția publică și de ajutoarele pentru depozitarea privată a laptelui și produselor lactate**

(1) Eligibilitatea untului, a laptelui praf degresat și a brânzei pentru care urmează a se primi ajutor pentru depozitarea privată se stabilește în conformitate cu metodele prevăzute în anexele VI, VII și, respectiv, VIII.

Metodele respective se stabilesc prin referire la cele mai recente versiuni ale standardelor europene sau internaționale relevante, după caz, aflate în vigoare de cel puțin 6 luni înainte de prima zi a perioadei de intervenție publică stabilite la articolul 12 din Regulamentul (UE) nr. 1308/2013.

(2) Rezultatele verificărilor efectuate prin aplicarea metodelor prevăzute în prezentul regulament se evaluează în conformitate cu anexa IX.”

3. Anexele se modifică în conformitate cu anexa la prezentul regulament.

*Articolul 2*

Regulamentul (CE) nr. 273/2008 se abrogă.

*Articolul 3*

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

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

Adoptat la Bruxelles, 30 ianuarie 2018.

*Pentru Comisie*  
*Președintele*  
Jean-Claude JUNCKER

## ANEXĂ

Anexele la Regulamentul de punere în aplicare (UE) nr. 2016/1240 se modifică după cum urmează:

1. Anexa IV se modifică după cum urmează:

(a) în partea I punctul 2, paragraful al doilea se înlocuiește cu următorul text:

„Fiecare probă este evaluată individual. Nu este permisă repetarea prelevării probelor sau reevaluarea.”;

(b) se introduce următoarea parte Ia:

## „PARTEA IA

**Metodele de analiză a untului nesărat pentru intervenție publică**

Parametru	Metodă
Lipide <sup>(1)</sup>	ISO 17189 sau ISO 3727 partea 3
Apă	ISO 3727 partea 1
Substanțe solide fără lipide	ISO 3727 part 2
Aciditatea lipidelor	ISO 1740
Indice de peroxid	ISO 3976
Lipide care nu provin din lapte	ISO 17678
Caracteristici senzoriale	ISO 22935 partea 2 și 3 tabelul de punctaj de mai jos.

(<sup>1</sup>) Agenția de plăți aprobă metoda care trebuie aplicată.

**Tabel de punctaj**

Aspect		Consistență		Miros și aromă	
Puncte	Comentarii	Puncte	Comentarii	Puncte	Comentarii
5	<i>Foarte bun</i> Tip ideal Calitate maximă (uscat uniform)	5	<i>Foarte bun</i> Tip ideal Calitate maximă (tartinabil uniform)	5	<i>Foarte bun</i> Tip ideal Calitate maximă (absolut cel mai fin miros pur)
4	<i>Bun</i> (fără defecte evidente)	4	<i>Bun</i> (fără defecte evidente)	4	<i>Bun</i> (fără defecte evidente)
1, 2 sau 3	Orice defect	1, 2 sau 3	Orice defect	1, 2 sau 3	Orice defect”.

2. În anexa V se introduce următoarea parte Ia:

„PARTEA IA

**Metode de analiză a laptelui praf degresat pentru intervenție publică**

Parametru	Metodă
Proteine	ISO 8968 partea 1
Lipide	ISO 1736
Apă	ISO 5537
Aciditate	ISO 6091
Lactați	ISO 8069
Testul fosfatazei	ISO 11816 partea 1
Index de insolubilitate	ISO 8156
Particule arse <sup>(1)</sup>	ADPI
Microorganisme	ISO 4833 partea 1
Lapte acidulat	Apendicele I
Zer încheșat <sup>(2)</sup>	Apendicele II și III
Zer acid <sup>(3)</sup>	ISO 8069 sau inspecții la fața locului
Verificări senzoriale <sup>(4)</sup>	ISO 22935 partea 2 și 3

<sup>(1)</sup> Analizele particulelor arse pot fi efectuate sistematic. Totuși, astfel de analize se efectuează întotdeauna în cazul în care nu se efectuează niciun control senzorial.

<sup>(2)</sup> Agenția de plăți aprobă metoda care trebuie aplicată (una sau ambele metode).

<sup>(3)</sup> Agenția de plăți aprobă metoda care trebuie aplicată.

<sup>(4)</sup> Verificările senzoriale se efectuează în cazul în care se consideră necesar, după ce analiza bazată pe riscuri este aprobată de agenția de plăți.

## Apendicele I

**LAPTE PRAF DEGRESAT: DETERMINAREA CANTITATIVĂ A FOSFATIDILSERINEI ȘI A FOSFATIDILETANOLAMINEI****Metodă: HPLC în fază inversă**

## 1. OBIECTIV ȘI DOMENIUL DE APLICARE

Metoda 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 în SMP.

## 2. DEFINIȚIE

Conținut PS + PE: fracțiunea masică a substanței determinată prin procedura specificată aici. Rezultatul se exprimă în miligrame de dipalmitoil fosfatidiletanolamină (PEDP) per 100 g de praf.

## 3. PRINCIPIUL METODEI

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

## 4. REACTIVI

Toți reactivii sunt 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 specifică altfel.

4.1. **Material-standard: PEDP cu o puritate de cel puțin 99 %**

Notă: Materialul-standard se depozitează la – 18 °C.

4.2. **Reactivi pentru prepararea probei-standard și a probei de testat**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 apoasă 12 M*4.3.2. *Acid boric, soluție apoasă 0,4 M ajustată la pH de 10,0 cu hidroxid de sodiu (4.3.1)*4.3.3. *2-mercaptoetanol*4.3.4. *o-ftaldialdehidă (OPA)*4.4. **Solvenți de eluție HPLC**4.4.1. *Solvenții de eluție se prepară utilizând reactivi de calitate HPLC.*4.4.2. *Apă de calitate HPLC*4.4.3. *Metanol cu puritate fluorimetrică testată*4.4.4. *Tetrahidrofur*4.4.5. *Fosfat diacid de sodiu*4.4.6. *Acetat de sodiu*4.4.7. *Acid acetic.*

## 5. APARATURĂ

- 5.1. **Cântar analitic, capabil să cântărească până la cea mai apropiată valoare de 1 mg, cu lizibilitate de 0,1 mg**
- 5.2. **Pahare Berzelius, cu capacitate de 25 și 100 ml**
- 5.3. **Pipete, capabile să dozeze 1 și 10 ml**
- 5.4. **Agitator magnetic**
- 5.5. **Pipete gradate, capabile să dozeze 0,2, 0,5 și 5 ml**
- 5.6. **Flacoane gradate, cu capacitate de 10, 50 și 100 ml**
- 5.7. **Seringi, cu capacitate de 20 și 100  $\mu$ l**
- 5.8. **Baie cu ultrasunete**
- 5.9. **Centrifugă, capabilă să funcționeze la 27 000  $\times$  g**
- 5.10. **Fiole de sticlă, cu capacitate de aproximativ 5 ml**
- 5.11. **Cilindru gradat, cu capacitate de 25 ml**
- 5.12. **pH-metru, cu precizie de 0,1 unități de pH**
- 5.13. **Echipament HPLC**
  - 5.13.1. *Sistem de pompare pe bază de gradient, capabil să funcționeze la 1,0 ml/min la 200 bari*
  - 5.13.2. *Aparat de prelevare de probe automată cu posibilitate de derivare*
  - 5.13.3. *Încălzitor cu coloană, capabil să mențină coloana la 30 °C  $\pm$  1 °C*
  - 5.13.4. *Detector cu fluorescență, capabil să funcționeze la o lungime de undă de excitație de 330 nm și la o lungime de undă de emisie de 440 nm*
  - 5.13.5. *Integrator sau software de procesare de date capabil să măsoare aria vârfului*
  - 5.13.6. *O coloană LiChrospher® – 100 (250  $\times$  4,6 mm) sau o coloană echivalentă umplută cu octadecilsilan (C 18), particule de 5  $\mu$ m.*

## 6. PRELEVAREA PROBELOR

Prelevarea probelor se realizează în conformitate cu standardul ISO 707.

## 7. PROCEDURA

7.1. **Prepararea soluției-standard interne**

- 7.1.1. *Se cântăresc 30,0  $\pm$  0,1 mg de monoclorhidrat de triptamină (4.2.3) într-un flacon gradat de 100 ml (5.6) și se completează până la marcaj cu metanol (4.2.1).*
- 7.1.2. *Se pipetează 1 ml (5.3) din această soluție într-un flacon gradat de 10 ml (5.6) și se completează până la marcaj cu metanol (4.2.1) pentru a se obține o concentrație de triptamină de 0,15 mM*

7.2. **Prepararea soluției conținând proba de testat**

- 7.2.1. *Se cântăresc 1,000  $\pm$  0,001 g de probă de SMP într-un pahar Berzelius de 25 ml (5.2). Se adaugă 10 ml de apă distilată cu temperatura de 40 °C  $\pm$  1 °C cu o pipetă (5.3) și se amestecă cu un agitator magnetic (5.4) timp de 30 de minute pentru a se dizolva orice concrețiuni.*
- 7.2.2. *Se pipetează 0,2 ml (5.5) din laptele reconstituit într-un flacon gradat de 10 ml (5.6), se adaugă 100  $\mu$ l din soluția de triptamină de 0,15 mM (7.1) cu ajutorul unei seringi (5.7) și se completează până la volum cu metanol (4.2.1). Se amestecă cu grijă prin răsturnare și se expune ultrasunetelor (5.8) timp de 15 min*
- 7.2.3. *Se centrifughează (5.9) la 27 000  $\times$  g timp de 10 minute și se colectează supernatantul într-o fiolă de sticlă (5.10)*

Notă: Soluția conținând proba de testat se depozitează la 4 °C până la finalizarea analizei HPLC.

**7.3. Prepararea soluției-standard externe**

- 7.3.1. Se cântăresc 55,4 g de PEDP (4.1) într-un flacon gradat 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 flaconul astupat la  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  și se amestecă cu grijă până când PEDP se dizolvă. Flaconul se răcește la  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se completează până la volum cu metanol (4.2.1) și se amestecă prin răsturnare
- 7.3.2. Se pipetează 1 ml (5.3) din această soluție într-un flacon gradat de 100 ml (5.6) și se completează până la volum cu metanol (4.2.1). Se pipetează 1 ml (5.3) din această soluție într-un flacon gradat de 10 ml (5.6), se adaugă 100  $\mu\text{l}$  (5.7) de soluție de triptamină de 0,15 mM (7.1) și se completează până la volum cu metanol (4.2.1). Se amestecă prin răsturnare

Notă: Soluția conținând proba de referință se depozitează la  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  până la efectuarea analizei HPLC.

**7.4. Prepararea reactivului de derivare**

Se cântăresc  $25,0 \pm 0,1$  mg de OPA (4.3.4) într-un flacon gradat de 10 ml (5.6), se adaugă 0,5 ml (5.5) de metanol (4.2.1) și se amestecă cu grijă pentru ca OPA să se dizolve. Se completează până la marcaj cu soluție de acid boric (4.3.2) și se adaugă 20  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol (4.3.3) cu o seringă (5.7).

Notă: Reactivul de derivare se depozitează la  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  într-o fiolă de sticlă maro și este stabil timp de o săptămână.

**7.5. Determinarea prin HPLC****7.5.1. Solvenți de eluție (4.4)**

Solventul A: Soluție de fosfat diacid de sodiu 0,3 mM și soluție de acetat de sodiu 3 mM (ajustată cu acid acetic până la pH  $6,5 \pm 0,1$ ); 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 ca gradientul de eluție să necesite o ușoară modificare pentru a se obține rezoluția prezentată în figura 1.

Temperatura coloanei:  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

7.5.3. Volumul de injecție: 50  $\mu$ l reactiv de derivare și 50  $\mu$ l soluție conținând proba.

7.5.4. Echilibrarea coloanei

Se pornește sistemul în fiecare zi, se irigă coloana cu solvent B 100 % timp de 15 minute, apoi se reglează la A: B = 40:60 și se echilibrează la 1 ml/min timp de 15 minute. Se efectuează o funcționare de probă prin injecția de metanol (4.2.1).

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

7.5.5. Determinarea conținutului de PS + PE din proba de testat

7.5.6. Secvența de analize cromatografice se efectuează păstrând constantă perioada între efectuări pentru a se obține timpi de reținere constanți. Soluția-standard externă (7.3) se injectează la fiecare 5-10 soluții conținând proba de testat pentru a se calcula factorul de răspuns

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

## 7.6. Modul de integrare

7.6.1. Vârful PEDP

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

7.6.2. Vârful triptaminei

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

7.6.3. Grupurile de vârfuri ale PS și PE

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

## 8. CALCULAREA ȘI EXPRIMAREA REZULTATELOR

Conținutul de PS și PE din proba de testat 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 de testat

A<sub>1</sub> = aria vârfului PEDP a soluției conținând proba-standard (7.3)

A<sub>2</sub> = aria vârfului PS sau PE a soluției conținând proba de testat (7.2)

T<sub>1</sub> = aria vârfului triptaminei a soluției conținând proba-standard (7.3)

T<sub>2</sub> = aria vârfului triptaminei a soluției conținând proba de testat (7.2)

## 9. PRECIZIA METODEI

Notă: Valorile repetabilității au fost calculate conform Standardului Internațional IDF (\*).

### 9.1. Repetabilitatea

Derivația standard relativă a repetabilității, care exprimă variabilitatea rezultatelor analitice independente obținute de același operator utilizând aceeași aparatură în aceleași condiții pe aceeași probe de testat și într-un interval de timp scurt nu trebuie să depășească 2 % relativ. 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.

## 9.2. Reproducibilitatea

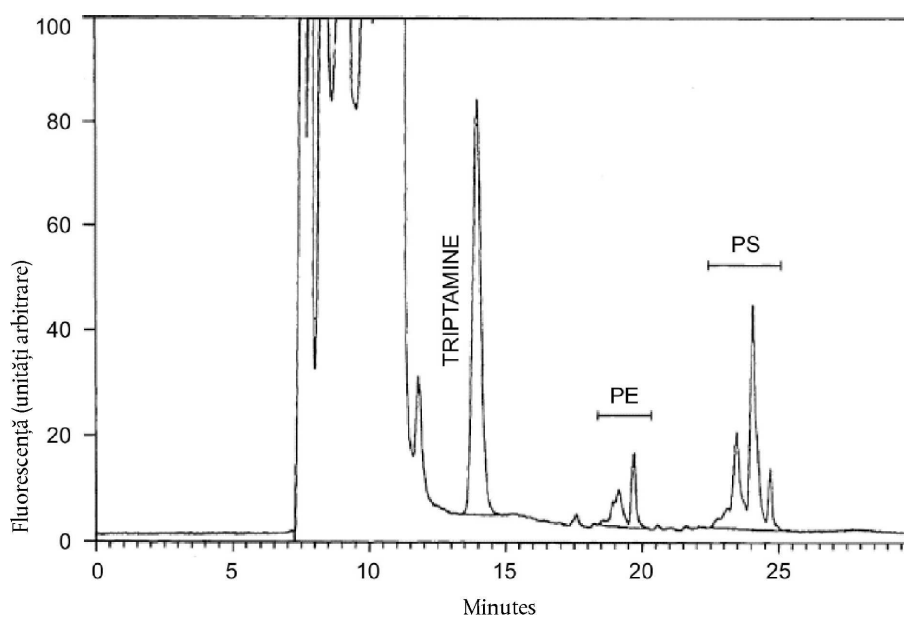
În cazul în care se obțin două determinări de către operatori din laboratoare diferite care utilizează aparatură diferită în condiții diferite pentru analizarea aceleiași probe de testat, diferența relativă dintre cele două rezultate nu trebuie să fie mai mare de 11 % din media aritmetică a rezultatelor.

## 10. REFERINȚE

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

Figura 1

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





## Apendicele II

**DETECTAREA ZERULUI ÎNCHEGAT DIN LAPTELE PRAF DEGRESAT DESTINAT DEPOZITĂRII PUBLICE PRIN DETERMINAREA CAZEINMACROPEPTIDELOR PRIN CROMATOGRAFIE ÎN MEDIU LICHID DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)****1. OBIECT ȘI DOMENIU DE APLICARE**

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

**2. REFERINȚĂ**

Standardul internațional ISO 707 – Lapte și produse lactate – Orientări privind prelevarea de probe.

**3. DEFINIȚIE**

Conținutul de materii solide compuse din zer închegat se definește ca procent masic, astfel cum este determinat de conținutul de cazeinmacropeptide prin procedura descrisă.

**4. PRINCIPIU**

- Reconstituirea laptelui praf degresat, îndepărtarea lipidelor și a proteinelor cu acid tricloracetic, urmată de centrifugare sau de filtrare;
- Determinarea cantității de cazeinmacropeptide (CMP) din supernatant prin cromatografie în mediu lichid de înaltă performanță (HPLC);
- Evaluarea rezultatelor obținute pentru probe în raport cu probele-standard constând din lapte praf degresat cu sau fără adăugarea unui procent cunoscut de pudră de zer.

**5. REACTIVI**

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

**5.1. Soluție de acid tricloracetic**

Se dizolvă 240 g de acid tricloracetic ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) în apă și se completează până la 1 000 ml. Soluția trebuie să fie limpede și incoloră.

**5.2. Soluția-eluent, pH 6,0**

Se dizolvă 1,74 g de fosfat acid de potasiu ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 12,37 g de fosfat diacid de potasiu ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) și 21,41 g de sulfat de sodiu ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) în aproximativ 700 ml de apă. În cazul în care este necesar, se ajustează până la pH 6,0 cu ajutorul unei soluții de acid fosforic sau de hidroxid de potasiu.

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

*Notă:* Compoziția eluentului poate fi actualizată pentru se conforma certificatului standardelor sau recomandărilor producătorului materialului de umplere a coloanei.

Soluția-eluent se filtrează înainte de utilizare printr-o membrană filtrantă având pori cu diametrul de 0,45  $\mu\text{m}$ .

**5.3. Solvent de irigare**

Se amestecă un volum de acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) cu nouă volume de apă. Amestecul se filtrează înainte de utilizare printr-o membrană filtrantă având pori cu diametrul de 0,45  $\mu\text{m}$ .

*Notă:* Se poate utiliza orice alt solvent de irigare cu efect bactericid care nu scade eficiența rezoluției coloanei.

**5.4. Probele-standard**

5.4.1. *Lapte praf degresat care îndeplinește cerințele prezentului regulament (adică [0])*

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

6. APARATURĂ
- 6.1. **Cântar analitic**
- 6.2. **Opțional, centrifugă capabilă să atingă o forță de centrifugare de 2 200 g, prevăzută cu tuburi de centrifugare astupate, cu o capacitate de aproximativ 50 ml**
- 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. **Echipament de filtrare din sticlă prevăzut cu membrană filtrantă cu diametrul porilor de 0,45 μm**
- 6.8. **Pipete gradate permițând dozarea a 10 ml (ISO 648, clasa A sau ISO/R 835) sau un sistem de dispersare capabil să furnizeze 10,0 ml în două minute**
- 6.9. **Sistem de dispersare capabil să furnizeze 20,0 ml de apă la o temperatură de aproximativ 50 °C**
- 6.10. **Baie de apă termostatică, 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 singură, Agilent Technologies Zorbax GF 250 singură) și o precoloană (3 cm × 0,3 cm) umplute cu material I 125 sau cu un material cu eficiență echivalentă*
  - 6.11.4. *Cuptor cu coloană termostatic, reglat la 35 ± 1 °C*
  - 6.11.5. *Detector UV cu lungime de undă variabilă care permite măsurători la 205 nm cu o sensibilitate de 0,008 Å*
  - 6.11.6. *Integrator capabil să realizeze integrare depresiune-la-depresiune*

Notă: Se poate lucra cu coloane păstrate la temperatura camerei, dar puterea lor de rezoluție este ușor mai mică. În acest caz, temperatura nu trebuie să varieze cu mai puțin de ± 5 °C în nicio serie de analize.
7. PRELEVAREA PROBELOR
  - 7.1. Prelevarea probelor se face în conformitate cu procedura prevăzută în standardul internațional ISO 707. Totuși, statele membre pot utiliza o altă metodă de prelevare a probelor, cu condiția ca aceasta să fie conformă cu principiile standardului menționat anterior
  - 7.2. Probele se depozitează în condiții care împiedică orice deteriorare sau modificare a compoziției
8. PROCEDURA
  - 8.1. **Pregătirea probei de testat**

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

Se cântăresc 2,000 + 0,001 g din proba de testat într-un tub de centrifugare (6.2.) sau într-un flacon astupat în mod corespunzător (50 ml).
  - 8.3. **Îndepărtarea lipidelor și a proteinelor**
    - 8.3.1. *Se adaugă 20,0 ml de apă caldă (50 C) la porția de testat. Se dizolvă pudra agitându-se timp de cinci 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 tricloracetic (5.1.) la aproximativ 25 °C în două minute, amestecându-se puternic cu ajutorul agitatorului 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) măsurate cu precizie în dispozitivul HPLC (6.11) funcționând la un debit de 1,0 ml de soluție-eluent (5.2) per minut

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

Nota 2. Coloanele se clătesc cu apă în timpul fiecărei întreruperi. Soluția-eluent 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 apoi se spală cu soluție (5.3) timp de cel puțin trei ore la un debit de 0,2 ml per minut.

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

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

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

Integratorul (6.11.6) calculează automat aria A a fiecărui vârf:

$A_{II}$ :	aria vârfului II,
$A_{III}$ :	aria vârfului III,

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

În cazul în care există dubii, analiza se repetă.

#### 8.5. Calibrarea

8.5.1. Probelor-standard (5.4) li se aplică cu exactitate procedura descrisă de la punctul 8.2 la punctul 8.4.2.

Se utilizează soluții proaspăt preparate, întrucât CMP se degradează într-un mediu tricloracetic de 8 %. Pierderea este estimată la 0,2 % per oră la 30 °C.

8.5.2. Înainte de determinarea cromatografică a probelor, coloanele se condiționează prin injectarea repetată a probei-standard (5.4.2) în soluție (8.5.1) până când aria vârfului și timpul de retenție al acestuia pentru CMP sunt constante.

8.5.3. Factorul de răspuns R se determină prin injectarea aceleiași volum de filtrați (8.5.1) utilizat și pentru probe

### 9. EXPRIMAREA REZULTATELOR

#### 9.1. Metodă de calcul și formule

9.1.1. Calcularea factorilor de răspuns R:

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

unde:

$R_{II}$  = factorii de răspuns a vârfurilor II,

$A_{II} [0]$  = ariile vârfurilor II pentru proba-standard [0] obținute la 8.5.3.

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

unde:

- $R_{III}$  = factorul de răspuns al vârfului III,  
 $A_{III}[0]$  și  $A_{III}[5]$  = ariile vârfului III pentru probele-standard [0] și respectiv [5] obținute la 8.5.3.  
 $W$  = cantitatea de zer din proba-standard [5], adică 5.

9.1.2. *Calcularea ariei relative a vârfulor 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:

- $S_{II}[E]$ ,  $S_{III}[E]$ ,  $S_{IV}[E]$  = ariile relative ale vârfulor II, III și respectiv IV din proba [E],  
 $A_{II}[E]$ ,  $A_{III}[E]$  = ariile vârfulor II și respectiv III din proba [E] obținute la 8.4.2,  
 $R_{II}$ ,  $R_{III}$  = factorii 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 de retenție al vârfului III pentru proba [E] obținut la 8.4.2,  
 $RT_{III}[5]$  = timpul de retenție al vârfului III pentru 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, adică  $RRT_{III}[E]$  și procentul de zer praf adăugat până la 10 %.*

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

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

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

9.2. **Calcularea procentului de zer încheșat praf din probă:**

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

unde:

- $W$  = procentul m/m de zer încheșat din proba (E);  
 $S_{III}[E]$  = aria relativă a vârfului III a probei de testat [E] obținut ca la punctul 9.1.2;  
1,3 = reprezintă aria medie relativă a vârfului III exprimată în grame de zer încheșat per 100 g, determinată pentru lapte praf degresat nemodificat provenit din diverse surse. Această cifră a fost obținută experimental;  
 $S_{III}[0]$  = reprezintă aria relativă a vârfului III care este egală cu  $R_{III} \times A_{III}[0]$ . Aceste valori sunt obținute la 9.1.1 și, respectiv, 8.5.3;  
 $(S_{III}[0] - 0,9)$  = reprezintă corecția care trebuie efectuată la aria medie relativă 1,3 când  $S_{III}[0]$  nu are valoarea 0,9. În mod experimental, aria medie relativă a vârfului III al probei de control [0] este 0,9.

### 9.3. Precizia procedurii

#### 9.3.1. Repetabilitatea

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

#### 9.3.2. Reproducibilitatea

Diferența dintre două rezultate singulare și independente, obținute în două laboratoare diferite cu material de testare 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 aria relativă a vârfului III,  $S_{III} [E]$  exprimată în grame de zer încheșat per 100 g de produs este  $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$

unde

2,0	este valoarea maximă permisă pentru aria relativă a vârfului III ținând cont de aria medie relativă a vârfului III, adică 1,3, de incertitudinea cauzată de variații ale compoziției laptelui praf degresat și de reproducibilitatea metodei (9.3.2),
$(S_{III} [0] - 0,9)$	este corecția de efectuat în cazul în care aria $S_{III} [0]$ este diferită de 0,9 (a se vedea punctul 9.2)

9.4.2. În cazul în care aria relativă a vârfului III,  $S_{III} [E]$  este  $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$  și aria relativă a vârfului II,  $S_{II} [E] \leq 160$ , se determină conținutul de zer încheșat conform indicațiilor de la punctul 9.2.

9.4.3. În cazul în care aria relativă a vârfului III,  $S_{III} [E]$  este  $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$  și aria relativă a vârfului II,  $S_{II} [E] \leq 160$ , 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 mare sunt reprezentate în graficele 1 și 2.

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

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

Ecuatiile liniilor drepte punctate din 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),

respectiv unde:

$S_{III}$  este aria relativă a vârfului III calculată fie pe baza conținutului total de proteine, fie pe baza ariei relative a vârfului  $S_{II} [E]$ ,

P % este conținutul total de proteine exprimat ca procent masic;

$S_{II} [E]$  este aria relativă pentru probă calculată la punctul 9.1.2.

Aceste ecuații sunt echivalente cu cifra 1,3 menționate la punctul 9.2.

Diferența ( $T_1$  și  $T_2$ ) dintre aria relativă  $S_{III} [E]$  determinată și aria 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. Dacă  $T_1$  și/sau  $T_2$  sunt zero sau mai mici, prezența zerului încheșat nu poate fi determinată.

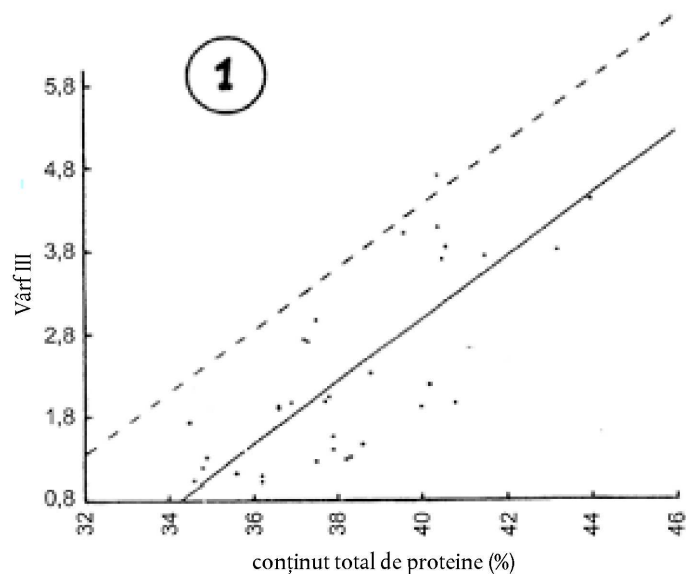
Dacă  $T_1$  și  $T_2$  depășesc zero, zerul încheșat este prezent.

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

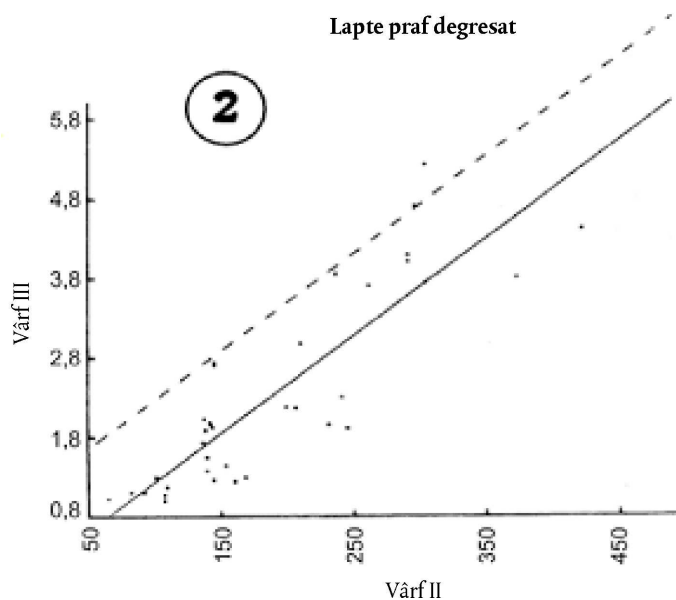
unde:

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

#### Lapte praf degresat



#### Lapte praf degresat



## Apendicele III

**DETERMINAREA MATERIILOR SOLIDE COMPUSE DIN ZER ÎNCHEGAT ÎN LAPTELE PRAF DEGRESAT**

1. SCOP: DETECTAREA ADĂUGĂRII DE MATERI SOLIDE COMPUSE DIN ZER ÎNCHEGAT ÎN LAPTELE PRAF DEGRESAT
2. REFERINȚE: STANDARDUL INTERNAȚIONAL ISO 707

3. DEFINIȚIE

Conținutul de materii solide compuse din zer încheगत este definit ca procentul masic astfel cum este determinat prin intermediul conținutului de cazeinmacropeptide prin procedura descrisă.

4. PRINCIPIU

Probele sunt analizate pentru a determina cazeinmacropeptida A printr-o procedură care implică cromatografie în mediu lichid de înaltă performanță cu fază inversată (procedură HPLC). Evaluarea rezultatelor se face prin referire la probe-standard formate din lapte praf degresat care conțin sau nu un procent cunoscut de zer praf. Rezultatele mai mari de 1 % (m/m) indică prezența materiilor solide compuse din zer încheगत.

5. REACTIVI

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

- 5.1. **Soluție de acid tricloracetic**

Se dizolvă 240 g de acid tricloracetic ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) în apă și se completează până la 1 000 ml. Soluția trebuie să fie limpede și incoloră.

- 5.2. **Eluenții A și B**

Eluentul A: Într-un flacon gradat de 1 000 ml se introduc 150 ml acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), 20 ml de izopropanol ( $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ ) și 1,00 ml de acid trifluoracetic (TFA,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ). Se completează cu apă până la 1 000 ml.

Eluentul B: Într-un flacon gradat de 1 000 ml se introduc 550 ml de acetonitril, 20 ml de izopropanol și 1,00 ml de TFA. Se completează cu apă până la 1 000 ml. Soluția-eluent se filtrează înainte de utilizare printr-o membrană filtrantă având pori cu diametrul de 0,45  $\mu\text{m}$ .

- 5.3. **Conservarea coloanei**

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

- 5.4. **Probele-standard**

- 5.4.1. *Lapte praf degresat care îndeplinește cerințele pentru depozitare publică [adică (0)].*
- 5.4.2. *Același lapte praf degresat modificat cu 5 % (m/m) zer încheगत praf cu compoziție standard (adică [5]).*
- 5.4.3. *Același lapte praf degresat, modificat cu 50 % (m/m) zer încheगत praf cu compoziție standard (adică [50]).*

6. APARATURĂ

- 6.1. **Cântar analitic**

- 6.2. **Opțional, centrifugă capabilă să atingă o forță de centrifugare de 2 200 g, prevăzută cu tuburi de centrifugare astupate, cu o capacitate de aproximativ 50 ml**

- 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. **Echipament de filtrare din sticlă prevăzut cu membrană filtrantă cu diametrul porilor de 0,45 µm**
- 6.8. **Pipete gradate, permițând dozarea a 10 ml (ISO 648, clasa A sau ISO/R 835) sau un sistem de dispersare capabil să furnizeze 10,0 ml în două minute**
- 6.9. **Sistem de dispersare capabil să furnizeze 20,0 ml de apă la o temperatură de aproximativ 50 °C**
- 6.10. **Baie de apă termostatică, reglată la 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **Echipament pentru HPLC, format din:**
  - 6.11.1. Sistem binar de pompare pe bază de gradient
  - 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 echivalentă cu fază inversată pe bază de silice cu pori largi
  - 6.11.4. Cuptor cu coloană termostatic, reglat la 35 ± 1 °C
  - 6.11.5. Detector UV cu lungime de undă variabilă care permite măsurători la 210 nm (în cazul în care este necesar, se poate utiliza o lungime de undă mai mare, de până la 220 nm) cu o sensibilitate de 0,02 Å
  - 6.11.6. Integrator capabil să stabilească integrarea la linia de bază comună sau depresiune-la-depresiune

Notă: Operarea coloanei la temperatura camerei este posibilă cu condiția ca temperatura camerei să nu fluctueze cu mai mult de 1 °C, în caz contrar, există variații prea mari ale timpului de retenție al  $CMP_A$ .

## 7. PRELEVAREA PROBELOR

- 7.1. **Prelevarea probelor se face în conformitate cu procedura prevăzută în standardul internațional ISO 707. Totuși, statele membre pot utiliza o altă metodă de prelevare a probelor, cu condiția ca aceasta să fie conformă cu principiile standardului menționat anterior**
- 7.2. **Probele se depozitează în condiții care împiedică orice deteriorare sau modificare a compoziției.**

## 8. PROCEDURA

### 8.1. Pregătirea probei de testat

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

### 8.2. Porția de testat

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

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

### 8.3. Îndepărtarea lipidelor și a proteinelor

- 8.3.1. Se adaugă 20,0 ml de apă caldă (50 °C) la porția de testat. Se dizolvă pudra agitându-se timp de cinci minute cu ajutorul unui agitator mecanic (6.3). Tubul se introduce în baie 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 tricloracetic la aproximativ 25 °C (5.1) în mod constant pe parcursul a două minute, în timp ce se amestecă energic 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) la 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. *Metoda HPLC cu fază inversă exclude posibilitatea de a avea rezultate fals pozitive din cauza prezenței zarei praf acidulate.*
- 8.4.2. *Înainte de efectuarea analizei HPLC cu fază inversă se optimizează condițiile de gradient. Pentru sistemele pe bază de gradient care au un volum mort de aproximativ 6 ml (volum de la punctul în care solvenții se întâlnesc până la volumul buclei injectorului, inclusiv) timpul de retenție de  $26 \pm 2$  minute pentru CMP A este optim. Sistemele pe bază de gradient care au un volum mort mai mic (de ex. 2 ml) trebuie să utilizeze valoarea de 22 de minute ca timp optim de retenție*

Se iau soluții din probele-standard (5.4) fără și cu zer încheșat 50 %.

Se injectează 100  $\mu$ l de supernatant sau de filtrat (8.3.3) în dispozitivul HPLC care funcționează în condițiile de gradient de explorare din tabelul 1.

Tabelul 1

#### Condițiile gradientului de explorare pentru optimizarea cromatografiei

Timp (min)	Debit (ml/min)	% A	% B	Curbă
Inițial	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	liniar
32	1,0	10	90	liniar
37	1,0	10	90	liniar
42	1,0	90	10	liniar

Comparația celor două cromatograme trebuie să evidențieze localizarea vârfului CMP<sub>A</sub>.

Utilizând formula redată mai jos, compoziția inițială a solventului de utilizat pentru gradientul normal (a se vedea 8.4.3) poate fi calculată  $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{\text{cmpA}} - 26) / 6) * 30 / 27$   $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{\text{cmpA}} - 26) / 6) * 1,11$

Unde:

RT<sub>cmpA</sub>: timpul de retenție al CMP<sub>A</sub> pentru gradientul de explorare

10: % B inițial al gradientului de explorare

2,5: % B în punctul de mijloc minus % B inițial în gradientul normal

13,5: timpul de mijloc al gradientului de explorare

26: timpul de retenție necesar al CMPA

6: raportul pantelor gradientilor de explorare și normal

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

27: timpul de rulare al gradientului de explorare.

#### 8.4.3. Se iau soluțiile conținând probele de testat

Se injectează 100  $\mu$ l de supernatant sau de filtrat (punctul 8.3.3) măsurat cu exactitate în dispozitivul HPLC care funcționează la un debit de 1,0 ml de soluție-eluent (5.2) per minut.

Compoziția eluentului la începutul analizei se obține de la 8.4.2. În mod normal este apropiată de A:B = 76:24 (5.2). Imediat după injectare se pornește un gradient liniar, rezultatul fiind un procent al B cu 5 % mai mare după 27 de minute. Ulterior, se pornește un gradient liniar care aduce compoziția eluentului la 90 % B în cinci minute. Această compoziție este menținută timp de cinci minute, după care compoziția este modificată cu ajutorul unui gradient liniar în decurs de cinci minute până se ajunge la compoziția inițială. În funcție de volumul intern al sistemului de pompare, următoarea injectare se poate face la 15 minute după ce se obțin condițiile inițiale.

*Nota 1.* Timpul de retenție al CMP<sub>A</sub> trebuie să fie de  $26 \pm 2$  minute. Acesta se poate obține prin modificarea condițiilor inițiale și finale ale primului gradient. Totuși, diferența la nivelul % B pentru condițiile inițiale și finale ale primului gradient trebuie să se mențină la valoare de 5 % B.

*Nota 2.* Eluenții trebuie degazați suficient și trebuie, de asemenea, să rămână degazați. Acest aspect este esențial pentru buna funcționare a sistemului de pompare pe bază de gradient. Deviația standard a timpului de retenție al vârfului  $CMP_A$  trebuie să fie sub 0,1 minute ( $n = 10$ ).

*Nota 3.* La fiecare cinci probe se injectează proba de referință [5] și se utilizează pentru calcularea unui nou factor de răspuns R. (9.1.1).

- 8.4.4. *Rezultatele analizei cromatografice a probei de testat (E) se obțin sub forma unei cromatograme în care vârful  $CMP_A$  este identificat prin timpul său de retenție de aproximativ 26 de minute*

Integratorul (6.11.6) calculează automat înălțimea vârfului H a vârfului  $CMP_A$ . Se verifică poziția liniei de bază în fiecare cromatogramă. În cazul în care poziția liniei de bază este incorect localizată, analiza sau integrarea se repetă.

*Notă:* În cazul în care vârful  $CMP_A$  este suficient de separat de alte vârfuri, se utilizează alocarea liniei de bază depresiune-la-depresiune, altminteri se utilizează perpendiculare verticale până la o linie de bază comună, care trebuie să aibă punctul de plecare aproape de vârful  $CMP_A$  (deci, nu la  $t = 0$  min!). Pentru standard și pentru probe se utilizează același tip de integrare, iar în cazul utilizării liniei de bază comune se verifică coerența acestora pentru probe și standard.

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

## 8.5. Calibrarea

- 8.5.1. *Se aplică cu exactitate procedura descrisă de la punctul 8.2 la punctul 8.4.4 utilizând probele-standard (5.4.1-5.4.2). Se utilizează soluții proaspăt preparate, deoarece CMP se degradează într-un mediu de acid tricloracetic 8 % la temperatura camerei. La 4 °C, soluția rămâne stabilă timp de 24 ore. În cazul seriilor lungi de analize este preferabil ca în injectorul automat să se utilizeze o tavă cu probe răcită.*

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

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

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

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

- 8.5.3. *Factorul de răspuns R se determină prin injectarea aceluiași volum de filtrat (8.5.1) ca și cel utilizat pentru probe.*

## 9. EXPRIMAREA REZULTATELOR

### 9.1. Metodă de calcul și formule

- 9.1.1. *Calcularea factorului de răspuns R:*

$$\text{Vârful } CMP_A: R = W/H$$

Unde:

R = factorul de răspuns al vârfului  $CMP_A$

H = înălțimea vârfului  $CMP_A$

W = cantitatea de zer din proba-standard [5].

## 9.2. Calcularea procentului de zer încheșat praf din probă

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

Unde:

$W(E)$  = procentul (m/m) de zer încheșat din proba (E).

$R$  = factorul 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-standard (5) este mai mică de 0,2 minute, atunci sunt prezente materii solide compuse din zer încheșat.

## 9.3. Precizia procedurii

### 9.3.1. Repetabilitatea

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

### 9.3.2. Reproducibilitatea

Nu s-a determinat.

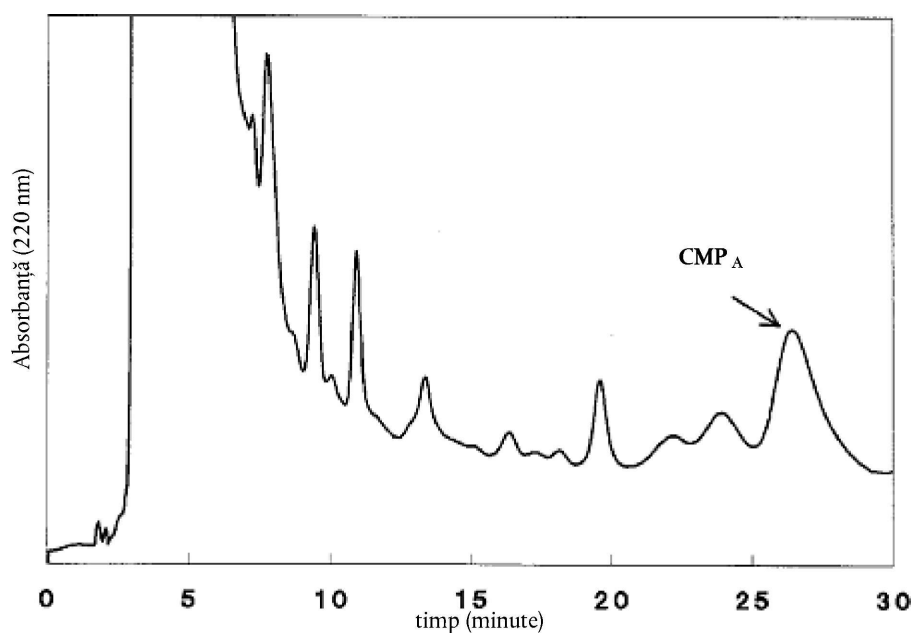
### 9.3.3. Liniaritate

De la 0 la 16 % zer încheșat trebuie să se obțină o relație liniară cu un coeficient de corelare > 0,99.

## 9.4. Interpretare

Limita de 1 % include incertitudinea cauzată de reproducibilitate.

Figura 1  
Ni—4.6 standard



(\*) Standardul Internațional IDF 135B/1991. Lapte și produse lactate. Caracteristicile preciziei metodelor de analiză. Prezentare generală a procedurii de studiu în colaborare.”

3. Se adaugă următoarele anexe:

„ANEXA VI

**Metode de analiză ale untului în condiții de depozitare privată**

Parametru	Metodă
Lipide <sup>(1)</sup>	ISO 17189 sau ISO 3727 partea 3
Apă	ISO 3727 partea 1
Materii solide altele decât lipidele (cu excepția sării)	ISO 3727 partea 2
Sare	ISO 15648

<sup>(1)</sup> Agenția de plăți aprobă metoda care trebuie aplicată.

ANEXA VII

**Metode de analiză a laptelui praf degresat în condiții de depozitare privată**

Parametru	Metodă
Lipide	ISO 1736
Proteine	ISO 8968 partea 1
Apă	ISO 5537

## ANEXA VIII

**Metode de analiză a brânzeturilor în condiții de depozitare privată**

1. Metoda de analiză prevăzută în apendice se utilizează pentru a se asigura faptul că brânza produsă exclusiv din lapte de oaie, de capră sau de bivoliță sau dintr-un amestec de lapte de oaie, de capră și de 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 care conține 1 % lapte de vacă astfel cum se menționează în apendice.

2. Metodele pentru detectarea cazeinei din lapte de vacă în brânzeturile menționate la punctul 1 pot fi utilizate dacă:
  - (a) limita de detecție este de maxim 0,5 %; și
  - (b) nu existe rezultate fals pozitive; și
  - (c) cazeina din lapte de vacă este detectabilă cu sensibilitatea necesară chiar și după perioade lungi de maturare, cum se poate întâmpla în condiții de comercializare uzuale.

Dacă niciuna dintre cerințele de mai sus nu este îndeplinită, se utilizează metodele prezentate în apendice.

---

## Apendice

**METODĂ PENTRU DETECTAREA LAPTELUI DE VACĂ ȘI A CAZEINATULUI ÎN BRÂNZETURILE PRODUSE DIN LAPTE DE OAIIE, DE CAPRĂ SAU DE BIVOLIȚĂ SAU DIN AMESTECURI DE LAPTE DE OAIIE, DE CAPRĂ ȘI DE BIVOLIȚĂ**

## 1. DOMENIU DE APLICARE

Detectarea laptelui de vacă și a cazeinatului în brânzeturile produse din lapte de oaie, de capră, de bivoliță sau din amestecuri de lapte de oaie, de capră și de bivoliță prin focalizarea izoelectrică a  $\gamma$ -cazeinelor după plasminoliză.

## 2. APLICAREA ÎN PRACTICĂ

Această metodă poate fi utilizată 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, de capră, de bivoliță sau din amestecuri de lapte de oaie, de capră și de bivoliță. Nu poate fi utilizată pentru detectarea modificării laptelui și a brânzei cu concentrate proteice din zer de bovine tratate termic.

## 3. PRINCIPIUL METODEI

## 3.1. Izolarea cazeinelor din brânză și din standardele de referință

## 3.2. Dizolvarea cazeinelor izolate și supunerea lor la clivare cu plasmină (EC.3.4.21.7).

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

3.4. Evaluarea profilurilor colorate de cazeină  $\gamma_3$  și  $\gamma_2$  (dovadă a prezenței laptelui de vacă) prin compararea profilului obținut din probă cu cele obținute în același gel din standardele de referință conținând 0 % și 1 % lapte de vacă.

## 4. REACTIVI

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

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

**Focalizarea izoelectrică**

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

## 4.1.1. Soluție-stoc de gel

Se dizolvă:

4,85 g acrilamidă

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

48,05 g uree

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

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

*Notă:* În locul cantităților fixe de acrilamide neurotoxice menționate se poate utiliza o soluție de acrilamidă/BIS preamestecată disponibilă în comerț. În cazul în care o astfel de soluție conține 30 % m/V acrilamidă și 0,8 % m/V BIS, pentru preparare se utilizează un volum de 16,2 ml de soluție în locul cantităților fixate. Termenul de valabilitate a soluției-stoc este de maxim 10 zile; în cazul în care conductivitatea sa este mai mare de 5  $\mu$ S, se deionizează prin agitare cu 2 g Amberlite MB-3 timp de 30 minute, apoi se filtrează printr-o membrană cu pori de 0,45  $\mu$ m.

#### 4.1.2. Soluția de gel

Se prepară o soluție de gel amestecând aditivi și amfoliți (\*) cu soluția-stoc de gel (a se vedea 4.1.1).

9,0 ml soluție-stoc

24 mg  $\beta$ -alanină

500  $\mu$ l amfolit pH 3,5-9,5

250  $\mu$ l amfolit pH 5-7

250  $\mu$ l amfolit pH 6-8

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

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

#### 4.1.3. Soluții-catalizator

##### 4.1.3.1. N, N, N' N' – tetrametiletilediamină (Temed)

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

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

Notă: Întotdeauna se utilizează 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.

#### **Pregătirea probei**

#### 4.5. Reactivi pentru izolarea proteinelor

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

4.5.2. Diclorometan

4.5.3. Acetonă

#### 4.6. Soluție-tampon pentru dizolvarea proteinelor

Se dizolvă

5,75 g glicerol (87 % m/m)

24,03 g uree

250 mg ditiotritol

în apă și se completează până la 50 ml

Notă: Se păstrează în frigider, termenul de valabilitate maxim fiind de o săptămână.

**4.7. Reactivi pentru clivarea cu plasmină a cazeinelor****4.7.1. Soluție-tampon de carbonat de amoniu**

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

**4.7.2. Plasmină de bovine (EC. 3.4.21.7), activitate de minim 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 standarde de referință certificate compuse din amestecuri de lapte încheșat de oaie și de capră conținând 0 %, respectiv 1 %, lapte de vacă.

4.8.2. Prepararea standardelor de referință provizorii de laborator din lapte de bivoliță încheșat conținând 0 % și 1 % lapte de vacă

Laptele degresat se prepară prin centrifugarea laptelui crud în vrac de bivoliță sau de vacă la 37 °C, la 2 500 g, timp de 20 minute. După răcirea rapidă a tubului și a conținutului la 6-8 °C, stratul superior de lipide se îndepărtează complet. Pentru prepararea standardului 1 % se adaugă 5,00 ml de lapte de bovine 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 cheagului 1: 10 000, c. 3 000 U/ml), se amestecă timp de 1 minut, apoi se lasă vasul, acoperit cu o folie de aluminiu, la 35 °C timp de o oră pentru a permite formarea coagulului. După formarea acestuia, întregul lapte încheșat este liofilizat fără omogenizare prealabilă și fără a se drena zerul. După liofilizare, produsul se macină mărunț până se obține o pulbere omogenă. Pentru prepararea standardului 0 %, se urmează aceeași procedură utilizând lapte degresat de bivoliță autentic. Standardele se păstrează la - 20 °C.

Notă: Înaintea preparării standardelor 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 de acid tricloracetic și se completează până la 1 000 ml.

**4.10. Soluție pentru decolorare**

Se diluează 500 ml de metanol și 200 ml de acid acetic glacial cu apă distilată până la 2 000 ml.

Notă: Se prepară zilnic o soluție proaspătă de decolorare; ea poate fi preparată prin amestecarea unor volume egale de soluții-stoc de metanol 50 % (V/V) și de acid acetic glacial 20 % (V/V).

**4.11. Soluții pentru colorare****4.11.1. Soluție pentru colorare (soluție-stoc 1)**

Se dizolvă 3,0 g Alabastru Coomassie Brilliant G-250 (C.I. 42655) în 1 000 ml metanol 90 % (V/V) utilizând un agitator magnetic (timp de aproximativ 45 minute), apoi se filtrează prin două filtre pliate de viteză medie.

**4.11.2. Soluție pentru colorare (soluție-stoc 2)**

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

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

Se amestecă câte 125 ml din fiecare soluție-stoc (4.11.1, 4.11.2) imediat înainte de colorare.

Notă: Soluția pentru colorare se prepară în ziua în care este utilizată.



5. ECHIPAMENTE
  - 5.1. **Plăci de sticlă (265 × 125 × 4 mm); rolă de cauciuc (lățime 15 cm); masă reglabilă**
  - 5.2. **Foaie purtătoare de gel (265 × 125 mm)**
  - 5.3. **Foaie de acoperire (280 × 125 mm) Se lipește 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 ( $\geq 2,5$  kV) sau cu dispozitiv automat de electroforeză**
  - 5.5. **Criostat de circulație, controlat termostatic la  $12 \pm 0,5$  °C**
  - 5.6. **Centrifugă ajustabilă la 3 000 g**
  - 5.7. **Benzi de electrozi (lungime  $\geq 265$  mm)**
  - 5.8. **Sticle picurătoare din plastic pentru soluțiile anodice și catodice**
  - 5.9. **Aplicatoare de probe (10 × 5 mm, hârtie de filtrare din viscoză sau cu absorbție mică a proteinelor).**
  - 5.10. **Vase din oțel inoxidabil sau din sticlă pentru colorare și decolorare (de exemplu, tăvi de instrumente de 280 × 150 mm)**
  - 5.12. **Omogenizator ajustabil cu tijă (diametrul tijei 10 mm), intervalul rpm 8 000-20 000**
  - 5.13. **Agitator magnetic**
  - 5.14. **Baie cu ultrasunete**
  - 5.15. **Aparat de sudat folii**
  - 5.16. **Micropipete de 25  $\mu$ l**
  - 5.17. **Concentrator sub vid sau liofilizator**
  - 5.18. **Baie de apă controlată termostatic, ajustabilă la 35 și  $40 \pm 1$  °C, cu agitator**
  - 5.19. **Echiptament de densitometrie cu citire la  $\lambda = 634$  nm**
6. PROCEDURA
  - 6.1. **Pregătirea 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 standarde de referință, se adaugă 60 ml apă distilată și se omogenizează cu un omogenizator cu tijă (8 000-10 000 rpm). Se ajustează la pH de 4,6 cu o soluție de acid acetic diluat (4.5.1) și se centrifughează (5 minute, 3 000 g). Se decantează lipidele și zerul, se omogenizează reziduul la 20 000 rpm în 40 ml apă distilată ajustată la pH de 4,5 cu acid acetic diluat (4.5.1), se adaugă 20 ml diclormetan (4.5.2), se omogenizează din nou și se centrifughează (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 diclormetan (4.5.2), apoi se centrifughează. Se repetă procedura până când ambele faze de extracție sunt incolore (de două sau de trei ori). Se omogenizează reziduul proteic cu 50 ml acetona (4.5.3) și se filtrează printr-o hârtie de filtrare pliată de viteză medie. Se spală de fiecare dată reziduul de pe filtru cu câte două porții separate de 25 ml acetona și se lasă să se usuce în aer sau sub jet de azot, apoi se macină fin într-un mojar.

*Notă:* Izolatele de cazeină uscată se păstrează la  $-20$  °C.

- 6.1.2. *Clivarea cu plasmină a  $\beta$ -cazeinelor pentru intensificarea  $\gamma$ -cazeinelor*

Se dispersează 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 utilizând, de exemplu, tratament ultrasonic. Se încălzește la 40 °C și se adaugă 10  $\mu$ l plasmină (4.7.2), apoi se amestecă și se incubează timp de o oră la 40 °C, agitând continuu. Pentru a inhiba enzima se adaugă 20  $\mu$ l soluție de acid  $\epsilon$ -aminocaproic (4.7.3), apoi se adaugă 200 mg de uree solidă și 2 mg de ditiotritol.

*Notă:* Pentru a obține o simetrie mai mare a benzilor de cazeină focalizate se recomandă liofilizarea soluției după adăugarea acidului  $\epsilon$ -aminocaproic și apoi dizolvarea reziduurilor în 0,5 ml soluție-tampon pentru dizolvarea proteinelor (4.6).

## 6.2. Prepararea gelurilor poliacrilamidice care conțin uree

Cu ajutorul câtorva picături de apă se rulează foaia purtătoare de gel (5.2) pe o placă de sticlă (5.1), îndepărtându-se surplusul de apă cu un șervețel din hârtie sau textil. Se rulează în mod similar foaia de acoperire (5.3) cu distanțiere (0,25 mm) pe o altă placă de sticlă. Se așează placa orizontal pe o masă reglabilă.

Se adaugă 10  $\mu$ l Temed (4.1.3.1) la soluția de gel pregătită și dezaerată (4.1.2), se amestecă și se adaugă 10  $\mu$ l soluție PER (4.1.3.2), se amestecă minuțios și se toarnă imediat uniform în centrul foii de acoperire. Se pune o margine a plăcii purtătoare de gel (cu latura foii îndreptată în jos) pe placa de acoperire a foii și se coboară încet astfel încât între foi să se formeze un strat subțire de gel, care se întinde uniform și fără bule (figura 3). Se coboară cu grijă placa purtătoare de gel, complet, utilizând o spatulă fină, apoi se așează încă trei plăci de sticlă deasupra ei pentru a acționa ca greutate. După încheierea polimerizării (aproximativ 60 minute), se transferă gelul polimerizat pe foaia purtătoare de gel împreună cu foaia de acoperire, înclinând plăcile de sticlă. Se curăță cu grijă reversul foii purtătoare pentru a îndepărta reziduurile de gel și ureea. Sandvișul de gel se sudează astfel încât să se obțină un tub cu perete pelicular și se păstrează în frigider (timp de maxim șase săptămâni).

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

## 6.3. Focalizare izoelectrică

Se reglează termostatul de răcire la 12 °C. Se șterge cu kerosen reversul foii purtătoare de gel, apoi se picură câteva picături de kerosen (4.2) în centrul blocului de răcire. Apoi se rulează sandvișul de gel, cu partea purtătoare îndreptată în jos, pe el, 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 electrodice (4.3, 4.4), se taie după lungimea gelului și se plasează în pozițiile prevăzute (distanța dintre electrozi de 9,5 cm).

### Condiții pentru focalizarea izoelectrică:

#### 6.3.1. Dimensiunile gelului 265 $\times$ 125 $\times$ 0,25 mm

Etapă	Timp (min.)	Tensiune (V)	Intensitate (mA)	Putere (W)	Volți-oră (Vh)
1. Prefocalizare	30	maximă 2 500	maximă 15	constant 4	c. 300
2. Focalizarea probei <sup>(1)</sup>	60	maximă 2 500	maximă 15	constant 4	c. 1 000
3. Focalizare finală	60	maximă 2 500	maximă 5	maximă 20	c. 3 000
	40	maximă 2 500	maximă 6	maximă 20	c. 3 000
	30	maximă 2 500	maximă 7	maximă 25	c. 3 000

<sup>(1)</sup> Aplicarea probei: După prefocalizare (etapa 1), se pipetează 18  $\mu$ l de probă și de soluții-standard pe aplicatorii probei (10  $\times$  5 mm), se plasează aplicatorii pe gel la distanțe de 1 mm unul față de celălalt și la 5 mm longitudinal față de anod și se apasă ușor. Se efectuează focalizarea utilizând condițiile de mai sus, îndepărtând cu grijă aplicatorii probei după 60 de minute de focalizare a probei.

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

- 6.3.2. *Exemplu de program de tensiune pentru un dispozitiv automat de electroforeză (2 geluri de 5,0 × 4,5 cm), cu electrozi fără benzi, 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 în etapa 2 la 0 Vh.

Se îndepărtează aplicatorul probei în etapa 2 la 30 Vh.

#### 6.4. **Colorarea proteinelor**

##### 6.4.1. *Fixarea proteinelor*

Se îndepărtează benzile de electrozi imediat după oprirea curentului electric și se plasează imediat gelul într-un vas de colorare/decolorare umplut cu 200 ml de fixativ (4.9); se lasă timp de 15 minute, agitând în continuu.

##### 6.4.2. *Spălarea și colorarea plăcii de gel*

Se drenează 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 scurge soluția decolorantă și se umple vasul cu 250 ml de soluție colorantă (4.11.3); se lasă să se coloreze timp de 45 minute agitându-se ușor.

##### 6.4.3. *Decolorarea plăcii de gel*

Se scurge soluția colorantă, se spală placa de gel de două ori cu câte 100 ml de soluție decolorantă (4.10), apoi se agită timp de 15 minute cu 200 ml de soluție decolorantă și se repetă etapa de decolorare de cel puțin două sau trei ori, până când fundalul este limpede și necolorat. Se clătește apoi placa de gel cu apă distilată (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. Nu utilizați 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 profilului proteic al probei necunoscute cu standardele de referință pe același gel. Detectarea laptelui de vacă în brânzeturile din lapte de oaie, de capră și de bivoliță și în amestecurile de lapte de oaie, de capră și de bivoliță se face prin intermediul cazeinelor  $\gamma_3$  și  $\gamma_2$ , ale căror puncte izoelectrice se află în intervalul de pH 6,5-7,5 (figurile 4 a, b, figura 5). Limita de detecție este mai mică de 0,5 %.

### 7.1. **Estimare vizuală**

Pentru evaluarea vizuală a cantității de lapte de bovine se recomandă ajustarea concentrațiilor probelor și a standardelor pentru a obține același nivel de intensitate a cazeinelor  $\gamma_2$  și  $\gamma_3$  din lapte de ovine, de caprine și/sau de bivolițe (a se vedea « $\gamma_2$  E,G,B» și « $\gamma_3$  E,G,B» în figurile 4 a, b și în figura 5). După aceasta, nivelul de lapte de bovine (mai mic decât, egal cu sau mai mare de 1 %) din proba necunoscută poate fi apreciat direct, prin compararea intensității cazeinelor  $\gamma_3$  și  $\gamma_2$  din laptele de bovine (a se vedea « $\gamma_3$  C» și « $\gamma_2$  C» din figurile 4 a, b și din figura 5) cu cele ale standardelor 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 aria vârfurilor pentru cazeinele  $\gamma_2$  și  $\gamma_3$  din laptele de bovine, caprine și/sau bivoliță (a se vedea figura 5). Această valoare se compară cu raportul dintre aria vârfurilor cazeinelor  $\gamma_2$  și  $\gamma_3$  ale standardului de referință 1 % (oaie, capră) sau ale standardului provizoriu de laborator (bivoliță), analizate pe același gel.

*Notă:* Metoda funcționează satisfăcător în cazul în care se obține un semnal pozitiv clar pentru ambele cazeine  $\gamma_2$  și  $\gamma_3$  din laptele de bovine în standardul de referință 1 %, dar nu și în standardul de referință 0 %. În caz contrar, procedura se optimizează respectându-se cu exactitate detaliile metodei.

O probă este considerată pozitivă în cazul în care ambele cazeine  $\gamma_2$  și  $\gamma_3$  din laptele de bovine sau rapoartele ariei vârfurilor corespunzătoare sunt egale cu sau mai mari decât nivelul standardului de referință 1 %.

## 8. REFERINȚE

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  $\gamma_2$ -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).

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).

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  $\gamma$ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.) pp. 389-393, Bode-Verlag, München (1989).

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).

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

Figura 1

### Desen schematic al foii de acoperire

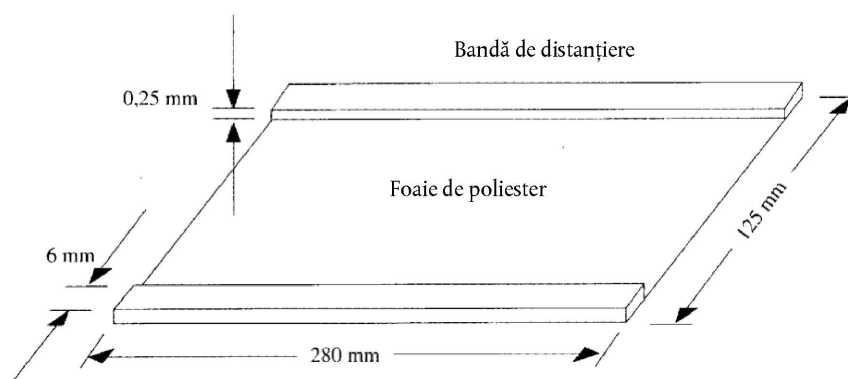


Figura 2

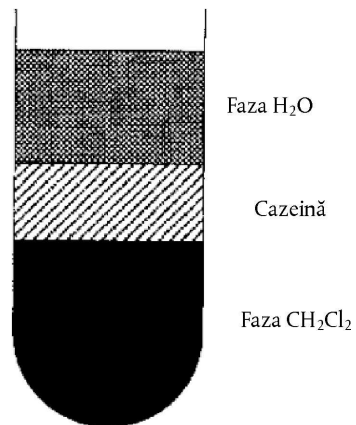
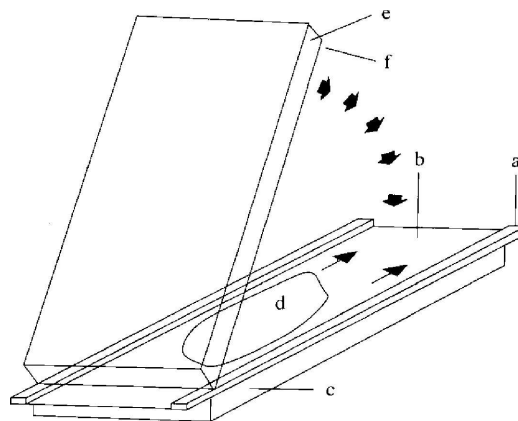
**Strat de cazeină suspendat între fazele apoasă și organică după centrifugare**

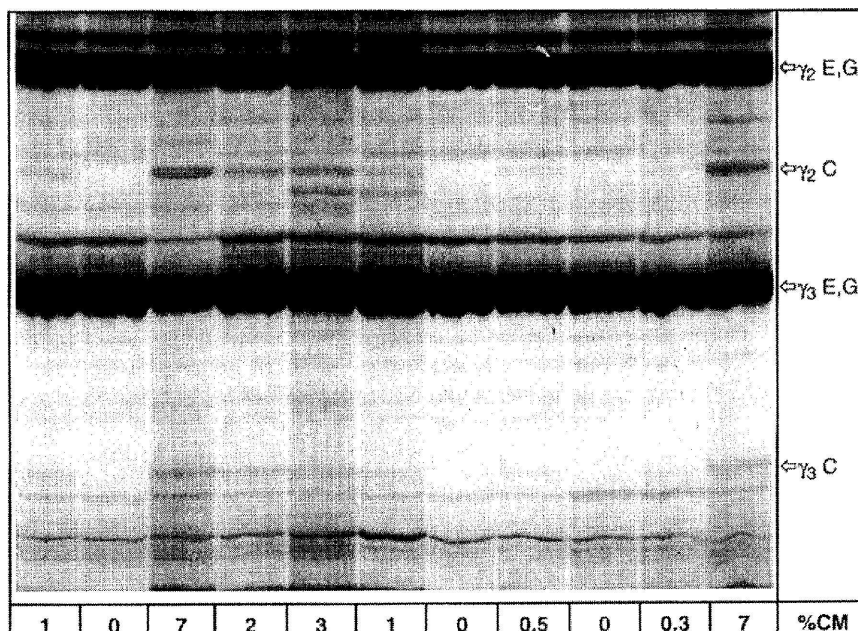
Figura 3

**Tehnică de pliere pentru formarea straturilor ultrafine de geluri poliacrilamidice**

a = bandă de distanțiere (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 purtătoare de gel (5.2)

Figura 4a

Focalizare izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină din brânză din lapte de oaie și de capră conținând diverse cantități de lapte de vacă

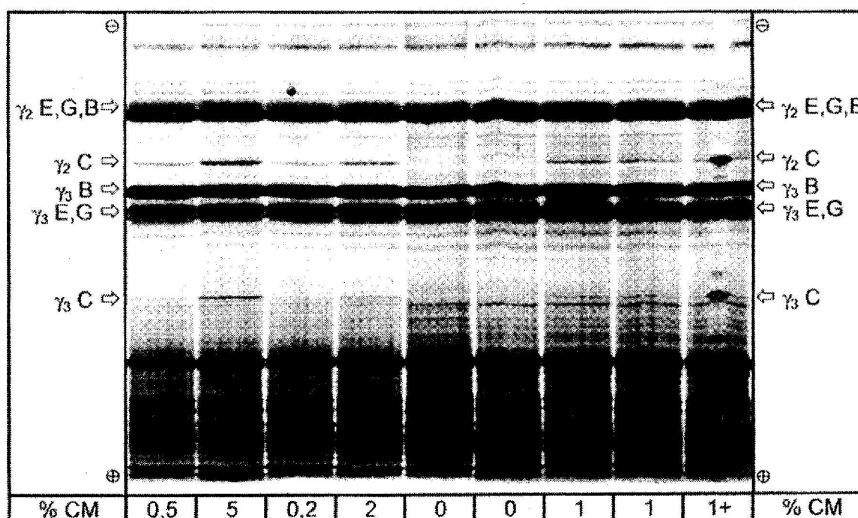


% CM = procent de lapte de vacă; C = vacă; E = oaie; G = capră

Jumătatea de sus a gelului IEF este ilustrată.

Figura 4b

Focalizare izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină provenite din brânză produsă din amestecuri de lapte de oaie, de capră și de bivoliță conținând diverse cantități de lapte de vacă

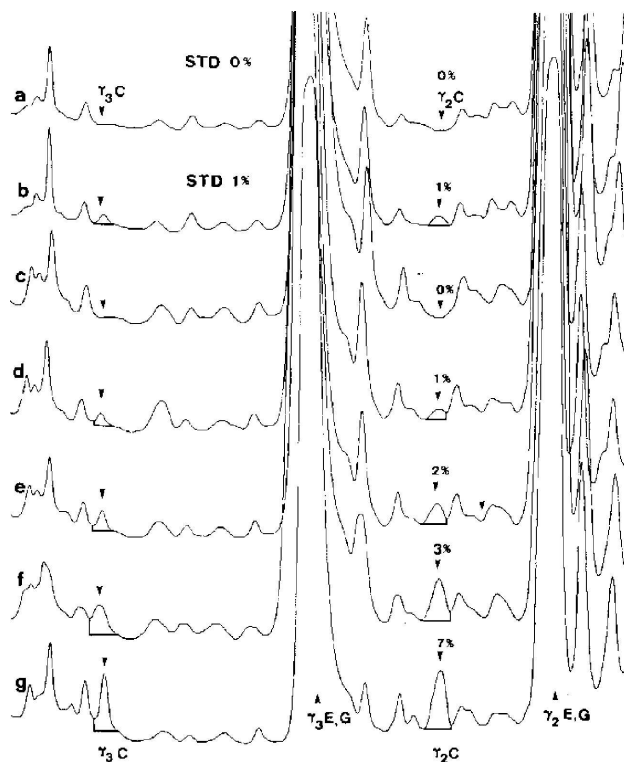


% CM = procent de lapte de vacă; 1 + = probă conținând 1 % lapte de vacă și modificat cu cazeină pură din lapte de bovine la mijlocul traiectului. C = vacă, E = oaie, G = capră, B = bivoliță.

Distanța de separare totală a felului IEF este ilustrată.

Figura 5

Suprapunerea densitogramelor standardelor (STD) și a probelor de brânză produse dintr-un amestec de lapte de oaie și de capră după focalizare izoelectrică



a,b = standarde conținând 0 și 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 de sus a gelului IEF a fost scanată la  $\lambda = 634$  nm.

## ANEXA IX

**Evaluarea analizelor****1. Asigurarea calității**

Analizele se efectuează de laboratoare desemnate în conformitate cu articolul 12 din Regulamentul (CE) nr. 882/2004 (\*\*) sau desemnate de autoritățile competente ale statului membru.

**2. Prelevarea probelor și litigiile referitoare la rezultatele analizelor**

1. Prelevarea de probe se efectuează în conformitate cu regulamentul relevant pentru produsul în cauză. În cazul în care nu există dispoziții exprese privind prelevarea de probe, se utilizează dispozițiile prevăzute în ISO 707, Lapte și produse lactate – Orientări privind prelevarea de probe.
2. Rapoartele de laborator cu rezultatele analizelor trebuie să conțină suficiente informații pentru a se putea efectua o evaluare a rezultatelor în conformitate cu apendicele.
3. Pentru analizele necesare în baza reglementărilor Uniunii se prelevează probe duplicat.
4. În cazul în care apare un litigiu referitor la rezultate, agenția de plăți efectuează din nou analizele necesare pe produsul în cauză, costurile fiind suportate de partea care pierde.

Analizele de mai sus se efectuează dacă există probe duplicat sigilate prelevate din produs și dacă acestea au fost depozitate corespunzător de autoritatea competentă. Producătorul trimite o cerere la agenția de plăți pentru a efectua analiza în termen de 7 de zile lucrătoare de la notificarea rezultatelor primei analize. Analiza se efectuează de către agenția de plăți în termen de 21 de zile lucrătoare de la primirea cererii.

5. Rezultatul obținut în urma contestației este cel definitiv.
6. 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 efectuată corect, aceasta trebuie repetată, dacă este posibil. Dacă prelevarea de probe nu este posibilă, transportul se acceptă.

---



## Apendice

**Evaluarea conformității unui transport în raport cu limitele stabilite în legislație****1. Principiu**

În cazul în care legislația privind intervenția publică și depozitarea privată prevede proceduri detaliate de prelevare a probelor, aceste proceduri trebuie să fie respectate. În toate celelalte cazuri se utilizează o probă compusă din cel puțin 3 unități de probă luate aleator din transportul supus controlului. Se poate prepara o probă compusă. Rezultatul obținut este comparat cu limitele stabilite în legislație prin calcularea unui interval de încredere de 95 % ca  $2 \times$  deviația standard, unde deviația standard relevantă depinde (1) de validarea metodei prin colaborare internațională cu valori pentru  $\sigma_r$  și  $\sigma_R$  sau (2) în cazul validării interne, de calcularea reproductibilității interne. Acest interval de încredere va fi apoi comparat cu incertitudinea de măsurare a rezultatului.

**2. Metoda este validată prin colaborare internațională**

În acest caz, deviația standard  $\sigma_r$  a repetabilității și deviația standard  $\sigma_R$  a reproductibilității au fost stabilite, iar laboratorul poate demonstra conformitatea cu caracteristicile de performanță a metodei validate.

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

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

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

În cazul în care rezultatul final  $x$  al măsurătorii este calculat 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 uzuale de combinare a deviațiilor standard în astfel de cazuri.

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

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

altminteri este considerat ca fiind în conformitate cu UL.

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

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

altminteri este considerat ca fiind în conformitate cu LL.

**3. Validare internă cu calcularea deviației standard a reproductibilității interne**

În cazurile în care se utilizează metode care nu sunt specificate în prezentul regulament și nu au fost stabilite măsuri de precizie, se efectuează o validare internă. Deviația standard a repetabilității interne  $s_r$  și deviația standard a reproductibilității interne  $s_{rR}$  se utilizează în loc de  $\sigma_r$  respectiv  $\sigma_R$ , în formulele de calculare a incertitudinii extinse  $U$ .

Regulile care trebuie urmate pentru a determina conformitatea cu limita stabilită în legislație sunt cele prezentate la punctul 1. Totuși, în cazul în care transportul este considerat neconform cu limita stabilită în legislație, măsurătorile se repetă cu metoda specificată în prezentul regulament, iar rezultatul se evaluează în conformitate cu punctul 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 separării necesare a  $\gamma$ -cazeinelor.

(\*\*) 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 (JO L 165, 30.4.2004, p. 1)."

**REGULAMENTUL DE PUNERE ÎN APLICARE (UE) 2018/151 AL COMISIEI****din 30 ianuarie 2018**

**de stabilire a normelor de aplicare a Directivei (UE) 2016/1148 a Parlamentului European și a Consiliului în ceea ce privește aducerea unor precizări suplimentare cu privire la elementele care trebuie să fie luate în considerare de către furnizorii de servicii digitale pentru gestionarea riscurilor la adresa securității rețelelor și a sistemelor informatice, precum și cu privire la parametrii necesari pentru a se determina dacă un incident are un impact substanțial**

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Directiva (UE) 2016/1148 a Parlamentului European și a Consiliului din 6 iulie 2016 privind măsuri pentru un nivel comun ridicat de securitate a rețelelor și a sistemelor informatice în Uniune <sup>(1)</sup>, în special articolul 16 alineatul (8),

întrucât:

- (1) În conformitate cu Directiva (UE) 2016/1148, furnizorii de servicii digitale au libertatea de a lua măsurile tehnice și organizatorice pe care le consideră adecvate și proporționale pentru a gestiona riscurile la adresa securității rețelelor și a sistemelor lor informatice, atât timp cât aceste măsuri asigură un nivel adecvat de securitate și țin seama de elementele prevăzute în directiva respectivă.
- (2) Atunci când identifică măsurile tehnice și organizatorice adecvate și proporționale, furnizorul de servicii digitale ar trebui să abordeze chestiunea securității informațiilor în mod sistematic, utilizând o abordare bazată pe riscuri.
- (3) Pentru a garanta securitatea sistemelor și a instalațiilor, furnizorii de servicii digitale ar trebui să efectueze proceduri de evaluare și analiză. Aceste activități ar trebui să se refere la gestionarea sistematică a rețelelor și a sistemelor informatice, la securitatea fizică și a mediului, la securitatea aprovizionării și la controlul accesului.
- (4) Atunci când efectuează o analiză de risc în cadrul gestionării sistematice a rețelelor și a sistemelor informatice, furnizorii de servicii digitale ar trebui să fie încurajați să identifice riscurile specifice și să cuantifice importanța acestora, de exemplu prin identificarea amenințărilor la adresa bunurilor critice și a modului în care acestea pot afecta operațiunile și prin definirea celor mai bune modalități de a atenua aceste riscuri pe baza capacităților existente și a resurselor necesare.
- (5) Politicile privind resursele umane ar putea să se refere la gestionarea competențelor, inclusiv la aspectele legate de dezvoltarea competențelor în materie de securitate și de creșterea informării în acest domeniu. Atunci când decid cu privire la un set adecvat de politici privind securitatea operațiunilor, furnizorii de servicii digitale ar trebui să fie încurajați să aibă în vedere aspectele legate de gestionarea schimbărilor, gestionarea vulnerabilității, formalizarea practicilor operaționale și administrative, precum și cartografierea sistemului.
- (6) Politicile privind arhitectura de securitate ar putea cuprinde separarea rețelelor și a sistemelor, precum și măsuri specifice de securitate pentru operațiunile critice, cum ar fi operațiunile de administrare. Separarea rețelelor și a sistemelor ar putea permite unui furnizor de servicii digitale să facă distincția între elemente precum fluxurile de date și resursele informatice care aparțin unui client, unui grup de clienți, furnizorului de servicii digitale propriu-zis sau părților terțe.
- (7) Măsurile luate cu privire la securitatea fizică și a mediului ar trebui să asigure securitatea rețelelor și a sistemelor informatice ale unei organizații pentru a le proteja împotriva daunelor cauzate de incidente cum ar fi furturile, incendiile, inundațiile sau alte fenomene meteo și deficiențele din sectorul telecomunicațiilor sau al energiei electrice.
- (8) Securitatea aprovizionării – de exemplu cu energie electrică, combustibil sau energie pentru răcire – ar putea include securitatea lanțului de aprovizionare, care include în special securitatea contractanților și subcontractanților terți, precum și securitatea de la nivelul conducerii acestora. Trasabilitatea bunurilor critice se referă la capacitatea furnizorului de servicii digitale de a identifica sursele bunurilor respective și de a ține evidența acestora.
- (9) Categoria utilizatorilor de servicii digitale ar trebui să includă și persoanele fizice și juridice care sunt clienți sau abonați ai unei piețe online sau ai unui serviciu de cloud computing ori care vizitează un site web al unui motor de căutare online pentru a efectua căutări după cuvinte-cheie.

<sup>(1)</sup> JOL 194, 19.7.2016, p. 1.

- (10) Atunci când se determină în ce măsură impactul unui incident este substanțial, lista de incidente substanțiale prevăzută în prezentul regulament ar trebui să fie considerată drept neexhaustivă. Ar trebui să se tragă învățăminte din punerea în aplicare a prezentului regulament și din lucrările grupului de cooperare în ceea ce privește colectarea informațiilor referitoare la cele mai bune practici privind riscurile și incidentele și discuțiile privind modalitățile de raportare a notificărilor incidentelor menționate la articolul 11 alineatul (3) literele (i) și (m) din Directiva (UE) 2016/1148. Rezultatul ar putea fi formularea unor orientări cuprinzătoare cu privire la pragurile cantitative ale parametrilor de notificare care ar putea declanșa obligația de notificare pentru furnizorii de servicii digitale în temeiul articolului 16 alineatul (3) din Directiva (UE) 2016/1148. Dacă este cazul, Comisia ar putea, de asemenea, să aibă în vedere revizuirea pragurilor prevăzute actualmente de prezentul regulament.
- (11) Pentru ca autoritățile competente să poată fi informate cu privire la noi riscuri potențiale, furnizorii de servicii digitale ar trebui să fie încurajați să semnaleze în mod voluntar orice incident ale cărui caracteristici le erau anterior necunoscute, cum ar fi noi exploit-uri, vectori de atac, entități răuvoitoare, vulnerabilități și pericole.
- (12) Prezentul regulament ar trebui să se aplice în ziua următoare expirării termenului de transpunere a Directivei (UE) 2016/1148.
- (13) Măsurile prevăzute de prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului pentru securitatea rețelelor și a sistemelor informatice instituit în temeiul articolului 22 din Directiva (UE) 2016/1148,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

#### *Articolul 1*

##### **Obiect**

Prezentul regulament precizează mai în detaliu elementele care trebuie luate în considerare de către furnizorii de servicii digitale atunci când identifică și ia măsuri pentru a asigura un anumit nivel de securitate a rețelelor și a sistemelor informatice pe care le utilizează în contextul furnizării serviciilor menționate în anexa III la Directiva (UE) 2016/1148 și descrie mai detaliat parametrii care trebuie luați în considerare pentru a stabili dacă un incident are un impact substanțial asupra furnizării serviciilor respective.

#### *Articolul 2*

##### **Elemente de securitate**

- (1) Securitatea sistemelor și a instalațiilor menționată la articolul 16 alineatul (1) litera (a) din Directiva (UE) 2016/1148 înseamnă securitatea rețelelor și a sistemelor informatice și a mediului fizic al acestora și include următoarele elemente:
- (a) gestionarea sistematică a rețelelor și a sistemelor informatice, care înseamnă cartografierea sistemelor informatice și stabilirea unui set de politici adecvate privind gestionarea securității informațiilor, incluzând analiza riscurilor, resursele umane, securitatea operațiunilor, arhitectura securității, securitatea datelor și gestionarea ciclului de viață al sistemului, precum și, dacă este cazul, criptarea și gestionarea acesteia;
  - (b) securitatea fizică și a mediului, care înseamnă existența unui set de măsuri menite să protejeze securitatea rețelelor și a sistemelor informatice ale furnizorilor de servicii digitale împotriva daunelor, cu ajutorul unei abordări bazate pe riscuri care să țină seama de toate tipurile de pericole, printre care deficiențele sistemului, erorile umane, acțiunile răuvoitoare și fenomenele naturale;
  - (c) securitatea aprovizionării, care înseamnă instituirea și menținerea unor politici adecvate pentru a asigura accesibilitatea și, după caz, trasabilitatea bunurilor critice utilizate în furnizarea serviciilor;
  - (d) controlul accesului la rețele și la sistemele informatice, care înseamnă existența unui set de măsuri prin care să se asigure că accesul fizic și logic la rețele și la sistemele informatice, incluzând securitatea administrativă a rețelelor și a sistemelor informatice, este autorizat și restricționat pe baza unor cerințe operaționale și de securitate.
- (2) În ceea ce privește gestionarea incidentelor menționată la articolul 16 alineatul (1) litera (b) din Directiva (UE) 2016/1148, printre măsurile luate de furnizorul de servicii digitale se numără:
- (a) procesele și procedurile de detectare menținute și testate pentru a asigura identificarea adecvată și în timp util a evenimentelor anormale;
  - (b) procesele și politicile referitoare la raportarea incidentelor și identificarea punctelor slabe și a vulnerabilităților în propriile sisteme informatice;

- (c) un răspuns conform cu procedurile instituite și raportarea rezultatelor măsurilor luate;
- (d) o evaluare a gravității incidentului, cu documentarea concluziilor trase din analiza incidentului și colectarea informațiilor relevante care ar putea servi drept mijloace de probă și ar putea sprijini procesul de îmbunătățire continuă.
- (3) Gestionarea continuității activității menționată la articolul 16 alineatul (1) litera (c) din Directiva (UE) 2016/1148 înseamnă capacitatea unei organizații de a menține sau, dacă este cazul, de a restabili furnizarea de servicii la nivelurile acceptabile predefinite, în urma unui incident perturbator. Aceasta cuprinde:
- (a) crearea și utilizarea de planuri de urgență pe baza unei analize a impactului asupra activității, pentru asigurarea continuității serviciilor oferite de furnizorii de servicii digitale; acestea trebuie evaluate și testate periodic, de exemplu prin exerciții;
- (b) capacități de redresare în caz de dezastru, care trebuie evaluate și testate periodic, de exemplu prin exerciții.
- (4) Monitorizarea, auditarea și testarea menționate la articolul 16 alineatul (1) litera (d) din Directiva (UE) 2016/1148 includ stabilirea și menținerea unor politici privind:
- (a) efectuarea unei serii planificate de observații sau măsurători pentru a evalua dacă rețelele și sistemele informatice funcționează în mod corespunzător;
- (b) inspecții și verificări pentru a determina dacă un anumit standard sau set de orientări este respectat, dacă evidențele sunt exacte și dacă obiectivele în materie de eficiență și eficacitate sunt atinse;
- (c) o procedură menită să scoată la iveală deficiențele din mecanismele de securitate ale unei rețele sau ale unui sistem informatic destinate să protejeze datele și să mențină funcționalitatea preconizată. O astfel de procedură include procesele tehnice și personalul implicat în fluxul operațional.
- (5) Standardele internaționale menționate la articolul 16 alineatul (1) litera (e) din Directiva (UE) 2016/1148 înseamnă standardele care sunt adoptate de către un organism de standardizare internațional, astfel cum sunt menționate la articolul 2 alineatul (1) litera (a) din Regulamentul (UE) nr. 1025/2012 al Parlamentului European și al Consiliului <sup>(1)</sup>. În temeiul articolului 19 din Directiva (UE) 2016/1148, pot fi, de asemenea, utilizate standardele și specificațiile europene sau cele acceptate la nivel internațional relevante pentru securitatea rețelilor și a sistemelor informatice, inclusiv standardele naționale existente.
- (6) Furnizorii de servicii digitale se asigură că dispun de documentația adecvată care să îi permită autorității competente să verifice conformitatea cu elementele de securitate stabilite la alineatele (1), (2), (3), (4) și (5).

### Articolul 3

#### **Parametrii care trebuie luați în considerare pentru a determina dacă impactul unui incident este substanțial**

- (1) În ceea ce privește numărul de utilizatori afectați de un incident, în special utilizatori care se bazează pe serviciul în cauză pentru furnizarea propriilor servicii, menționat la articolul 16 alineatul (4) litera (a) din Directiva (UE) 2016/1148, furnizorul de servicii digitale trebuie să fie în măsură să estimeze unul dintre următoarele elemente:
- (a) numărul de persoane fizice și juridice afectate cu care s-a încheiat un contract pentru furnizarea serviciului respectiv sau
- (b) numărul de utilizatori afectați care au utilizat serviciul respectiv, pe baza datelor de transfer anterioare.
- (2) Durata unui incident menționată la articolul 16 alineatul (4) litera (b) din Directiva (UE) 2016/1148 înseamnă perioada cuprinsă între momentul perturbării furnizării adecvate a serviciului în ceea ce privește disponibilitatea, autenticitatea, integritatea sau confidențialitatea și momentul reluării activității.
- (3) Distribuția geografică în ceea ce privește zona afectată de incident menționată la articolul 16 alineatul (4) litera (c) din Directiva (UE) 2016/1148 se referă la faptul că furnizorul de servicii digitale trebuie să fie în măsură să determine dacă incidentul afectează furnizarea serviciilor sale în anumite state membre.
- (4) Amploarea perturbării funcționării serviciului menționată la articolul 16 alineatul (4) litera (d) din Directiva (UE) 2016/1148 se măsoară în ceea ce privește una sau mai multe dintre următoarele caracteristici afectate de un incident: disponibilitatea, autenticitatea, integritatea sau confidențialitatea datelor sau a serviciilor conexe.

<sup>(1)</sup> Regulamentul (UE) nr. 1025/2012 al Parlamentului European și al Consiliului din 25 octombrie 2012 privind standardizarea europeană, de modificare a Directivelor 89/686/CEE și 93/15/CEE ale Consiliului și a Directivelor 94/9/CE, 94/25/CE, 95/16/CE, 97/23/CE, 98/34/CE, 2004/22/CE, 2007/23/CE, 2009/23/CE și 2009/105/CE ale Parlamentului European și ale Consiliului și de abrogare a Deciziei 87/95/CEE a Consiliului și a Deciziei nr. 1673/2006/CE a Parlamentului European și a Consiliului (JO L 316, 14.11.2012, p. 12).

(5) În ceea ce privește amploarea impactului asupra activităților economice și societale menționată la articolul 16 alineatul (4) litera (e) din Directiva (UE) 2016/1148, furnizorul de servicii digitale trebuie să fie în măsură să concluzioneze, pe baza unor factori cum ar fi natura relațiilor sale contractuale cu clientul sau, dacă este cazul, numărul potențial al utilizatorilor afectați, dacă incidentul a provocat daune materiale sau morale semnificative pentru utilizatori, de pildă în ceea ce privește sănătatea și siguranța ori deteriorarea proprietății.

(6) În sensul alineatelor (1), (2), (3), (4) și (5), furnizorii de servicii digitale nu au obligația de a colecta informații suplimentare la care nu au acces.

#### Articolul 4

### Impactul substanțial al unui incident

(1) Se consideră că un incident are un impact substanțial în cazul în care a survenit cel puțin una dintre următoarele situații:

- (a) serviciul oferit de un furnizor de servicii digitale a fost indisponibil timp de mai bine de 5 000 000 de ore-utilizator; termenul „oră-utilizator” se referă la un utilizator afectat în Uniune pe o durată de șaiszeci de minute;
- (b) incidentul a avut ca rezultat o pierdere a integrității, autenticității sau confidențialității datelor stocate, transmise ori prelucrate sau a serviciilor conexe oferite de rețeaua sau sistemul de informații al furnizorului de servicii digitale sau accesibile prin intermediul rețelei sau al sistemului respectiv care afectează mai mult de 100 000 de utilizatori din Uniune;
- (c) incidentul a creat un risc la adresa ordinii sau a siguranței publice ori în ceea ce privește pierderea de vieți omenești;
- (d) incidentul i-a provocat daune materiale cel puțin unui utilizator din Uniune, dacă dauna cauzată acestuia depășește 1 000 000 EUR.

(2) Bazându-se pe cele mai bune practici colectate de grupul de cooperare în exercitarea sarcinilor sale conferite în temeiul articolului 11 alineatul (3) din Directiva (UE) 2016/1148 și pe discuțiile purtate în temeiul articolului 11 alineatul (3) litera (m), Comisia poate revizui plafoanele prevăzute la alineatul (1).

#### Articolul 5

### Intrarea în vigoare

- (1) Prezentul regulament intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.
- (2) Se aplică de la 10 mai 2018.

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

Adoptat la Bruxelles, 30 ianuarie 2018.

Pentru Comisie  
Președintele  
Jean-Claude JUNCKER

## DECIZII

### DECIZIA (UE) 2018/152 A CONSILIULUI

din 29 ianuarie 2018

**de numire a unui supleant, propus de Republica Federală Germania, în cadrul Comitetului Regiunilor**

CONSILIUL UNIUNII EUROPENE,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene, în special articolul 305,

având în vedere propunerea guvernului german,

întrucât:

- (1) La 26 ianuarie 2015, 5 februarie 2015 și 23 iunie 2015, Consiliul a adoptat Deciziile (UE) 2015/116 <sup>(1)</sup>, (UE) 2015/190 <sup>(2)</sup> și (UE) 2015/994 <sup>(3)</sup> de numire a membrilor și a supleanților în cadrul Comitetului Regiunilor pentru perioada cuprinsă între 26 ianuarie 2015 și 25 ianuarie 2020.
- (2) Un loc de supleant în cadrul Comitetului Regiunilor a devenit vacant ca urmare a încheierii mandatului doamnei Anke SPOORENDONK,

ADOPTĂ PREZENTA DECIZIE:

#### *Articolul 1*

Este numită în calitate de supleant în cadrul Comitetului Regiunilor pentru durata rămasă a mandatului actual, care se încheie la 25 ianuarie 2020:

— Doamna Sabine SÜTTERLIN-WAACK, *Ministerin für Justiz, Europa, Verbraucherschutz und Gleichstellung des Landes Schleswig-Holstein.*

#### *Articolul 2*

Prezenta decizie intră în vigoare la data adoptării.

Adoptată la Bruxelles, 29 ianuarie 2018.

Pentru Consiliu  
Președintele  
R. PORODZANOV

---

<sup>(1)</sup> Decizia (UE) 2015/116 a Consiliului din 26 ianuarie 2015 de numire a membrilor și a supleanților în cadrul Comitetului Regiunilor pentru perioada 26 ianuarie 2015-25 ianuarie 2020 (JO L 20, 27.1.2015, p. 42).

<sup>(2)</sup> Decizia (UE) 2015/190 a Consiliului din 5 februarie 2015 de numire a membrilor și a supleanților în cadrul Comitetului Regiunilor pentru perioada 26 ianuarie 2015-25 ianuarie 2020 (JO L 31, 7.2.2015, p. 25).

<sup>(3)</sup> Decizia (UE) 2015/994 a Consiliului din 23 iunie 2015 de numire a membrilor și a supleanților în cadrul Comitetului Regiunilor pentru perioada 26 ianuarie 2015-25 ianuarie 2020 (JO L 159, 25.6.2015, p. 70).

**RECTIFICĂRI**

**Rectificare la Regulamentul (UE) 2017/1084 al Comisiei din 14 iunie 2017 de modificare a Regulamentului (UE) nr. 651/2014 în ceea ce privește ajutoarele pentru infrastructurile portuare și aeroportuare, pragurile de notificare pentru ajutoarele pentru cultură și pentru conservarea patrimoniului, ajutoarele pentru infrastructurile sportive și pentru infrastructurile de agrement multifuncționale, precum și schemele de ajutoare regionale de exploatare pentru regiunile ultraperiferice și de modificare a Regulamentului (UE) nr. 702/2014 în ceea ce privește calcularea costurilor eligibile**

*(Jurnalul Oficial al Uniunii Europene L 156 din 20 iunie 2017)*

La articolul 1 punctul 11, teza introductivă a alineatului (4) al articolului 15 (care a fost înlocuit):

*în loc de:* „În regiunile ultraperiferice, schemele de ajutoare de exploatare compensează costurile suplimentare de exploatare suportate în aceste regiuni ca efect direct al unuia sau mai multor handicapuri permanente menționate la articolul 349 din tratat, atunci când beneficiarii își desfășoară activitatea economică într-o regiune ultraperiferică, cu condiția ca valoarea anuală a ajutorului per beneficiar pentru toate schemele de ajutoare de exploatare realizate în temeiul prezentului regulament să nu depășească oricare dintre următoarele procentaje:”;

*se citește:* „În regiunile ultraperiferice, schemele de ajutoare de exploatare compensează costurile suplimentare de exploatare suportate în aceste regiuni ca efect direct al unuia sau mai multor handicapuri permanente menționate la articolul 349 din tratat, atunci când beneficiarii își desfășoară activitatea economică într-o regiune ultraperiferică, însă cu condiția ca valoarea anuală a ajutorului per beneficiar pentru toate schemele de ajutoare de exploatare puse în aplicare în temeiul prezentului regulament să nu depășească unul dintre următoarele procentaje:”.

---











ISSN 1977-0782 (ediție electronică)  
ISSN 1830-3625 (ediție tipărită)



**Oficiul pentru Publicații al Uniunii Europene**  
2985 Luxemburg  
LUXEMBURG

**RO**