

**RO**  
**ANEXĂ**

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

(1) Anexa VIII 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**

<b>de punctaj</b>	<b>Parametru</b>	<b>Metodă</b>	<b>Tabel</b>
	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.	

<b>Aspect</b>		<b>Consistență</b>		<b>Miros și aromă</b>	
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)

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

Aspect		Consistență		Miros și aromă	
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>2</sup>	ADPI
Microorganisme	ISO 4833 partea 1
Lapte acidulat	Apendicele I
Zer încheșat <sup>3</sup>	Apendicele II și III
Zer acid <sup>4</sup>	ISO 8069 sau inspecții la fața locului
Verificări senzoriale <sup>5</sup>	ISO 22935 partea 2 și 3

<sup>2</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>3</sup> Agenția de plăți aprobă metoda care trebuie aplicată (una sau ambele metode).

<sup>4</sup> Agenția de plăți aprobă metoda care trebuie aplicată.

---

<sup>5</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 x 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 x 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  $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  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  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  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	Solventul A	Solventul B	Debit
------	-------------	-------------	-------

(min)	(%)	(%)	(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 °C.

7.5.3. *Volumul de injectare: 50 μl reactiv de derivare și 50 μl 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 injectarea 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.<sup>6</sup>

### 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

<sup>6</sup> Standardul Internațional IDF 135B/1999. Lapte și produse lactate. Caracteristicile preciziei metodelor de analiză. Prezentare generală a procedurii de studiu în colaborare.

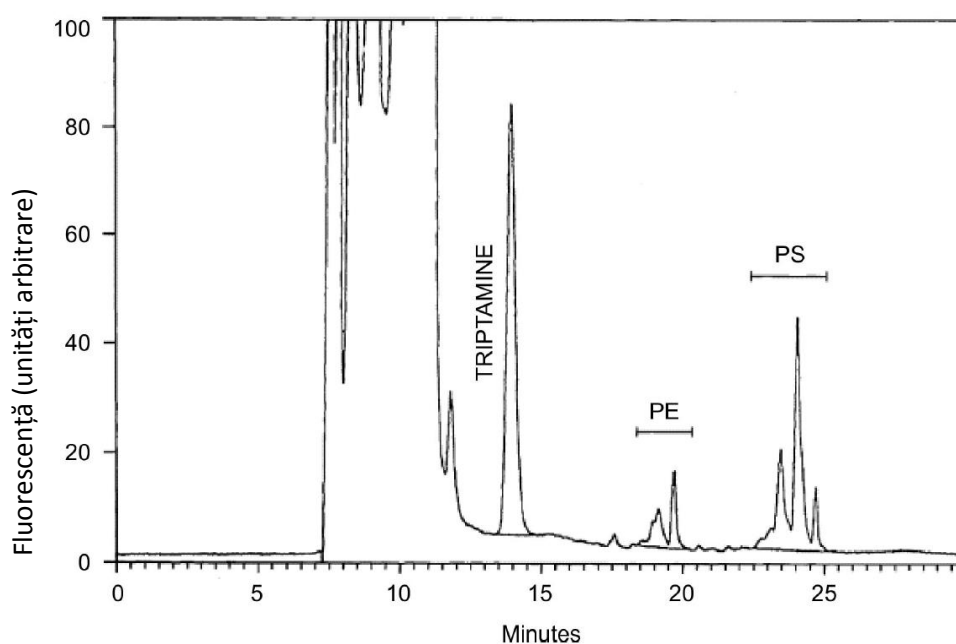
aceleiași probe de testat, diferența relativă dintre cele două rezultate nu trebuie să fie mai mare de 11 % din media aritmetică a rezultatelor.

## 10. REFERINȚE

- 10.1. *Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., „Detection of buttermilk solids in skimmilk 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 încheșat 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 încheșat 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 încheșat 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 $0,45 \mu\text{m}$

### 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 $50 \text{ }^\circ\text{C}$

### 6.10. Baie de apă termostatică, reglată la $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$

### 6.11. Echipament pentru HPLC, format din:

#### 6.11.1. Pompă

6.11.2. *Injector, manual sau automat, cu o capacitate de 15 – 30  $\mu\text{l}$*

6.11.3. *Două coloane TSK 2000-SW în serie (lungime de 30 cm, diametru intern de 0,75 cm) sau coloane echivalente (de exemplu TSK 2000-SWxl singură, Agilent Technologies Zorbax GF 250 singură) și o precoloană (3 cm x 0,3 cm) umplute cu material I 125 sau cu un material cu eficiență echivalentă*

6.11.4. *Cuptor cu coloană termostatic, reglat la  $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$*

6.11.5. *Detector UV cu lungime de undă variabilă care permite măsurători la 205 nm cu o sensibilitate de  $0,008 \text{ \AA}$*

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  $\pm 5$  °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  $\mu$ l 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 aparaturii 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 aceluiași 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.
- 9.4.4. 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.

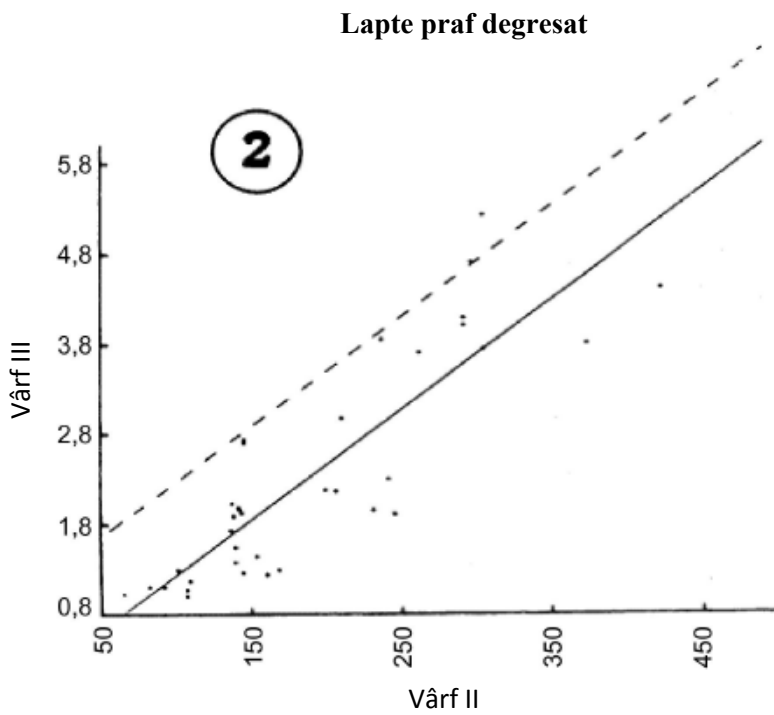
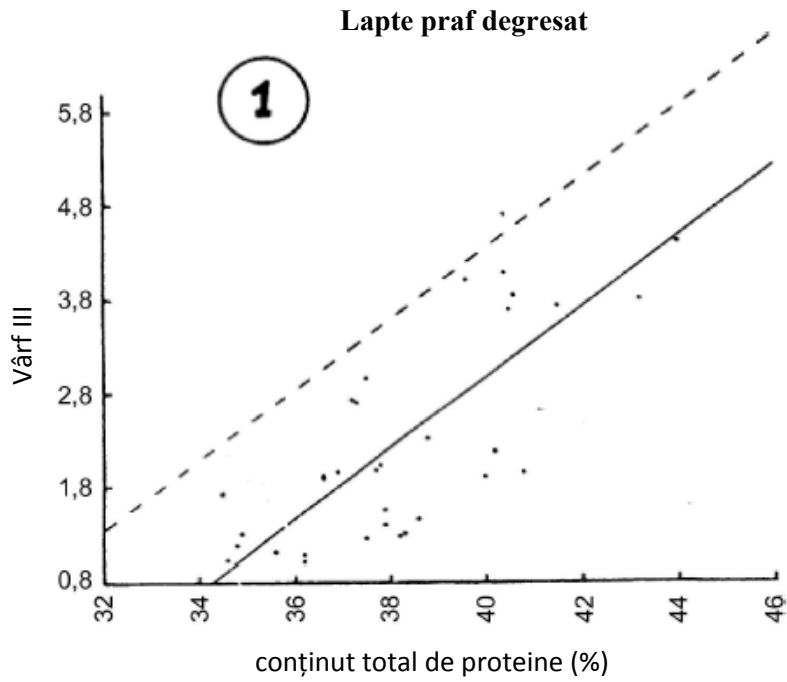
Dacă  $T_1$  și/sau  $T_2$  sunt zero sau mai mici, prezența zerului încheșat nu poate fi determinată.

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.



”

### „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 încheșgat 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 încheșgat.
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 încheșat praf cu compoziție standard (adică [5]).*

5.4.3. *Același lapte praf degresat, modificat cu 50 % (m/m) zer încheșat 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. **Echiptament 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. **Echiptament 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  $2,00 \pm 0,001$  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 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 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) 2 200 g timp de 10 minute sau se filtrează prin hârtie (6.6), eliminându-se primii 5 ml de filtrat.*

8.4. **Determinarea cromatografică**

8.4.1. *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 μl 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  $CMP_A$ .

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

Unde:		
$RT_{CMPA}$	:	timpul de retenție al $CMP_A$ 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 $CMP_A$
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 injecție se poate face la 15 minute după ce se obțin condițiile inițiale.

*Nota 1.* Timpul de retenție al  $CMP_A$  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 acestuia 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 aceleiași 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:*

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 închegat praf din probă

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

Unde:

$W(E)$  = procentul (m/m) de zer închegat 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 închegat.

### 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. Reproductibilitatea

Nu s-a determinat.

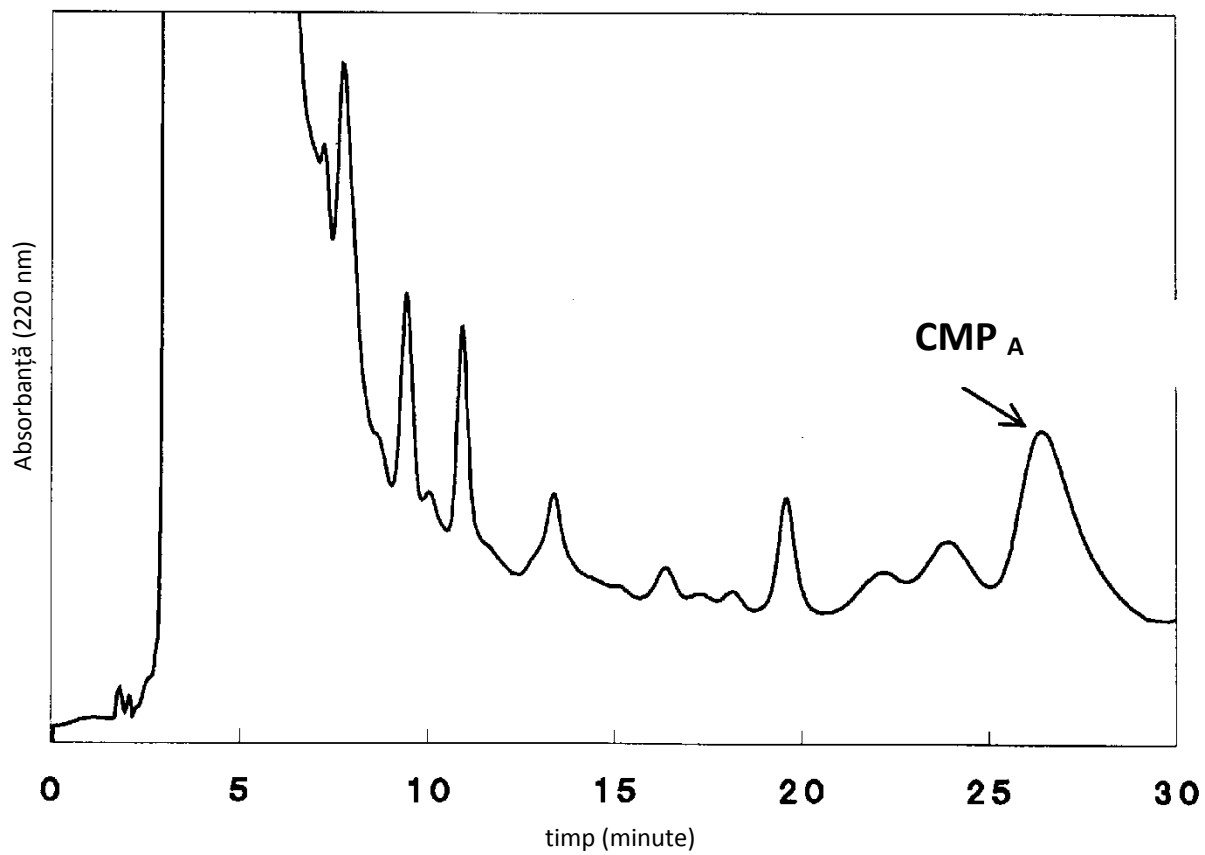
#### 9.3.3. Liniaritate

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

#### 9.4. Interpretare

Limita de 1 % include incertitudinea cauzată de reproductibilitate.

Figura 1  
*Ni—4.6 standard*



”

(3) Se adaugă următoarele anexe:

#### „ANEXA VI

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

Parametru	Metodă
Lipide <sup>7</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

#### 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

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.

<sup>7</sup> Agenția de plăți aprobă metoda care trebuie aplicată.

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 OAI, DE CAPRĂ SAU DE BIVOLIȚĂ SAU DIN AMESTECURI DE LAPTE DE OAI, 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 profilelor 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  $265 \times 125 \times 0,25$  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<sup>8</sup> 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' – tetrametiletildiamină (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***

---

<sup>8</sup> 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.

#### 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. *Diclormetan*

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 drenera zerul. După liofilizare, produsul se macină mărunt

până se obține o pulbere omogenă. Pentru prepararea standardului 0 %, se urmează aceeași procedură utilizând lapte degresat de bivoliță autentic. Standardele se păstrează la  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*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 Albastru 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 ( $265 \times 125 \times 4$ mm); rolă de cauciuc (lățime 15 cm); masă reglabilă**

#### 5.2. **Foaie purtătoare de gel ( $265 \times 125$ mm)**

#### 5.3. **Foaie de acoperire ( $280 \times 125$ mm) Se lipește bandă adezivă ( $280 \times 6 \times 0,25$ mm) pe fiecare latură lungă (a se vedea figura 1)**

#### 5.4. **Cuvă de electrofocalizare cu placă de răcire (de exemplu $265 \times 125$ 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 x 150 mm)**
- 5.12. **Omogenizator ajustabil cu tijă (diametrul tijeii 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 μl**
- 5.17. **Concentrator sub vid sau liofilizator**
- 5.18. **Baie de apă controlată termostatic, ajustabilă la 35 și 40 ± 1 °C, cu agitator**
- 5.19. **Echiptament de densitometrie cu citire la λ = 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 acetonă (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 acetonă 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 β-cazeinelor pentru intensificarea γ-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 μl 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 μl soluție de acid ε-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 ε-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. Sandwichul 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 sandwichul 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 x 125 x 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>9</sup>	60	maximă	maximă	constant 4	c. 1 000

<sup>9</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.

		2 500	15		
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

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

6.3.2. *Exemplu de program de tensiune pentru un dispozitiv automat de electroforeză (2 geluri de  $5,0 \times 4,5$  cm), cu electrozi fără benzi, aplicaţi direct pe gel*

Etapă	Tensiune	Intensitate	Putere	Temp.	Volţi-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 şi 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 şi colorarea plăcii de gel*

Se drenează cu grijă fixativul şi se spală placa de gel de două ori, timp de câte 30 de secunde, cu 100 ml soluţie decolorantă (4.10). Se scurge soluţia decolorantă şi se umple vasul cu 250 ml de soluţie colorantă (4.11.3); se lasă să se coloreze timp de 45 minute agitându-se uşor.

6.4.3. *Decolorarea plăcii de gel*

Se scurge soluţia colorantă, se spală placa de gel de două ori cu câte 100 ml de soluţie decolorantă (4.10), apoi se agită timp de 15 minute cu 200 ml de soluţie decolorantă şi se repetă etapa de decolorare de cel puţin două sau trei ori, până când fundalul este limpede şi necolorat. Se clăteşte apoi placa de gel cu apă

distilată ( $2 \times 2$  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 profilelor proteice ale 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**

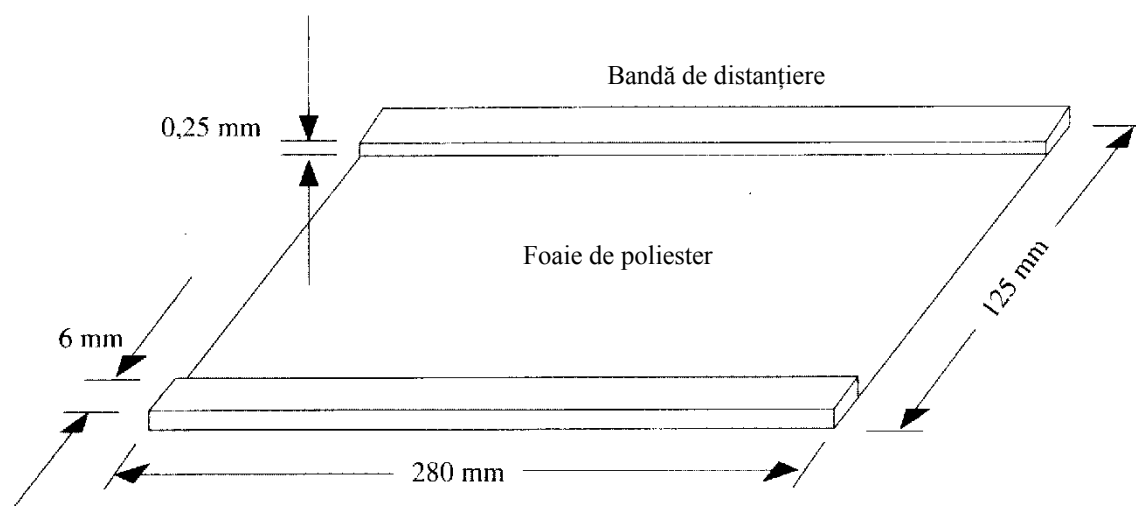
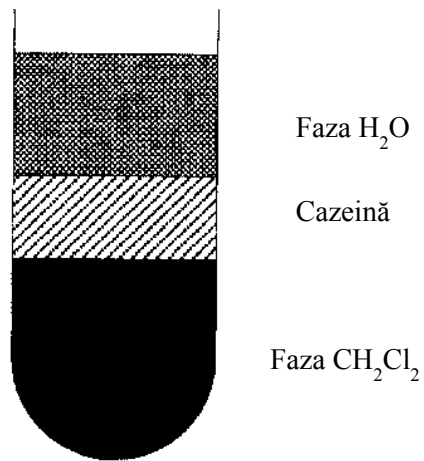


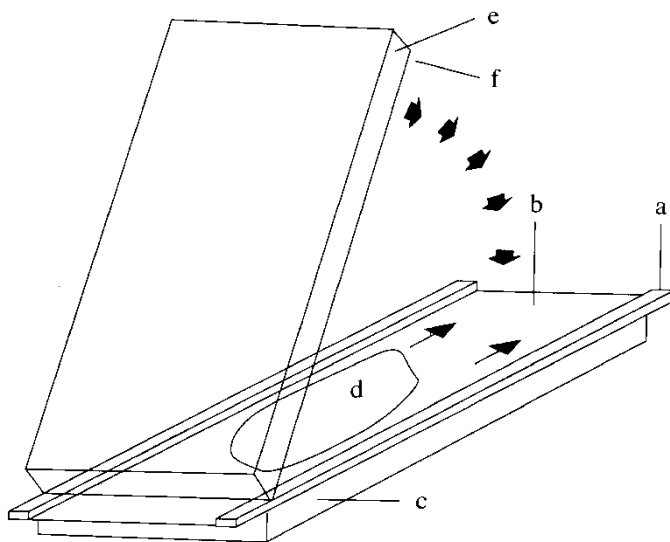
Figura 2

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



*Figura 3*

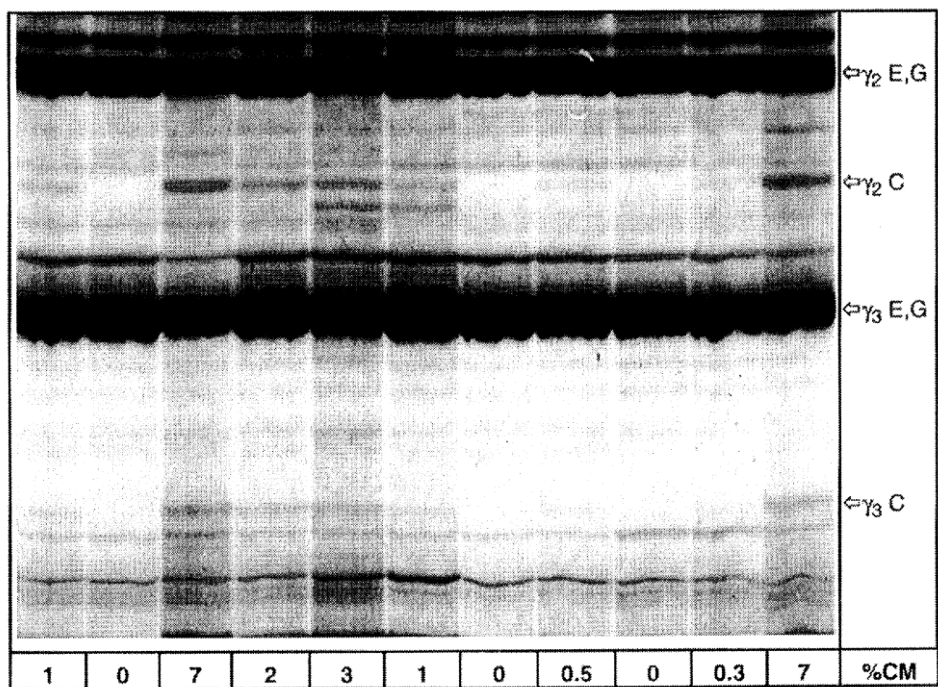
***Tehnică de pliere pentru formarea straturilor ultrafine de geluri poliacrilamidice***



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*

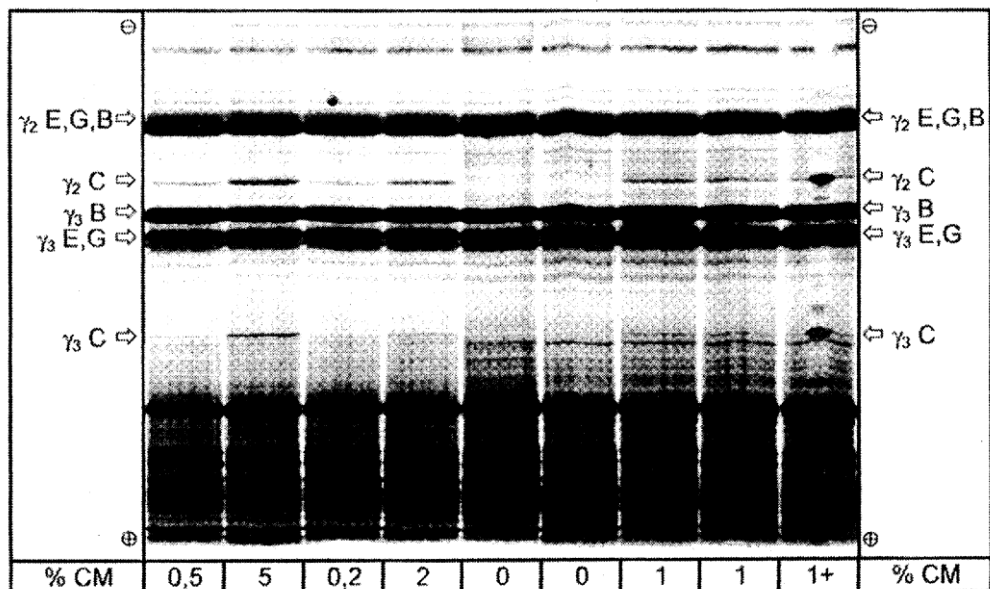
***Focalizare izoelectrică a cazeinelor tratate cu plasmină din brânză din lapte de oaie și de capră conținând diverse cantități de lapte de vacă.***



% 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.*

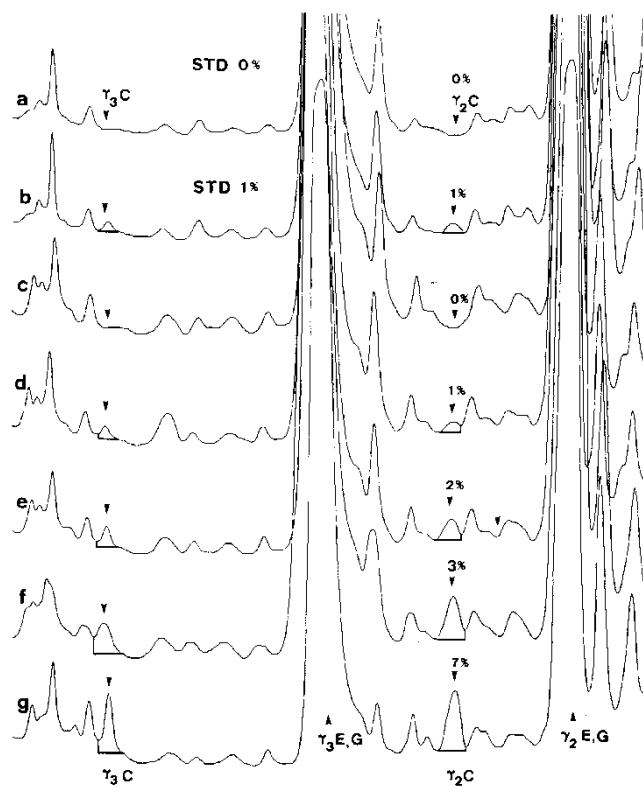


% CM = procent de lapte de vacă; 1 + = probă conținând 1 % lapte de vacă și modificat cu caseină pură din lapte de bovine la mijlocul traiectului. C = vacă, E = oaie, G = capră, B = bivoliță.

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<sup>10</sup> 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 x deviația standard, unde deviația standard relevantă depinde (1) de validarea metodei prin colaborare internațională cu valori pentru  $\sigma_F$  și  $\sigma_R$  sau (2) în

---

<sup>10</sup> 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

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 DE VIAȚIEI 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  $s_{ir}$  și deviația standard a reproductibilității interne  $s_{iR}$  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.”