



MONITORUL OFICIAL

AL

ROMÂNIEI

Anul 172 (XVI) — Nr. 7

PARTEA I
LEGI, DECRETE, HOTĂRĂRI ȘI ALTE ACTE

Miercuri, 7 ianuarie 2004

SUMAR

<u>Nr.</u>	<u>Pagina</u>	<u>Nr.</u>	<u>Pagina</u>
DECIZII ALE CURȚII CONSTITUȚIONALE		analiză pentru determinarea vitaminei A, a vitaminei E și a triptofanului din furaje	
Decizia nr. 449 din 25 noiembrie 2003 referitoare la excepția de neconstituționalitate a dispozițiilor art. 47 ¹ din Legea nr. 137/2002 privind unele măsuri pentru accelerarea privatizării, introduse prin Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 208/2002	1-3	1.153/2003. — Ordin al ministrului sănătății pentru aprobarea Reglementărilor privind autorizarea de funcționare a unităților de producție a medicamentelor de uz uman	4-12 12-15
ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE		ACTE ALE CONSILIULUI NAȚIONAL AL AUDIOVIZUALULUI	
967/2003. — Ordin al ministrului agriculturii, pădurilor, apelor și mediului privind aprobarea Normei sanitare veterinare ce stabilește metode naționale de		377/2003. — Decizie pentru modificarea și completarea Deciziei Consiliului Național al Audiovizualului nr. 274/2003 privind asigurarea informării corecte a opiniei publice	16

DECIZII ALE CURȚII CONSTITUȚIONALE

CURTEA CONSTITUȚIONALĂ

DECIZIA Nr. 449 din 25 noiembrie 2003

referitoare la excepția de neconstituționalitate a dispozițiilor art. 47¹ din Legea nr. 137/2002 privind unele măsuri pentru accelerarea privatizării, introduse prin Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 208/2002

Nicolae Popa — președinte
Costică Bulai — judecător
Nicolae Cochinescu — judecător
Constantin Doldur — judecător
Kozsokár Gábor — judecător
Petre Ninosu — judecător
Șerban Viorel Stănoiu — judecător
Lucian Stângu — judecător

Ioan Vida — judecător
Aurelia Popa — procuror
Mihai Paul Cotta — magistrat-asistent

Pe rol se află soluționarea excepției de neconstituționalitate a dispozițiilor art. 47¹ din Legea nr. 137/2002 privind unele măsuri pentru accelerarea privatizării, introduse prin Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 208/2002, excepție

ridicată de Societatea de Investiții Financiare „Moldova” — S.A. — Bacău în Dosarul nr. 1.332/2003 al Curții de Apel Bacău — Secția comercială și contencios-administrativ.

La apelul nominal răspunde consilier juridic Cristinel Pătrașcu pentru autorul excepției, lipsind celelalte părți, față de care procedura de citare a fost legal îndeplinită.

Curtea dispune a se face apelul și în dosarele nr. 462C/2003 și nr. 480C/2003 privind excepții de neconstituționalitate cu același obiect, ridicate de Societatea de Investiții Financiare „Oltenia” — S.A. — Craiova în dosarele nr. 6.843/2003 și nr. 2.477/2003 ale Tribunalului Mehedinți — Secția comercială și contencios-administrativ.

La apelul nominal se constată lipsa părților, față de care procedura de citare a fost legal îndeplinită.

Curtea, din oficiu, pune în discuție conexarea dosarelor, având în vedere identitatea de obiect și de părți a acestora.

Reprezentantul Ministerului Public și reprezentantul Societății de Investiții Financiare „Moldova” — S.A. — Bacău sunt de acord cu conexarea dosarelor.

Curtea, în temeiul art. 16 din Legea nr. 47/1992, republicată, raportat la art. 164 din Codul de procedură civilă, dispune conexarea dosarelor nr. 462C/2003 și nr. 480C/2003 la Dosarul nr. 335C/2003, care a fost primul înregistrat.

Reprezentantul autorului excepției de neconstituționalitate — Societatea de Investiții Financiare „Moldova” — S.A. — Bacău solicită admiterea acesteia, depunând la dosar, în acest sens, concluzii scrise.

Reprezentantul Ministerului Public pune concluzii de respingere a excepției. Se arată că dispozițiile art. 47¹ din Legea nr. 137/2002 au mai fost supuse controlului de constituționalitate. Curtea, prin mai multe decizii, a reținut constituționalitatea acestora, iar în cauză nu există elemente noi care să justifice schimbarea acestei jurisprudențe.

CURTEA,

având în vedere actele și lucrările dosarelor, constată următoarele:

Prin Încheierea din 22 mai 2003, pronunțată în Dosarul nr. 1.332/2003, și prin încheierile din 8 octombrie 2003 și 22 septembrie 2003, pronunțate în dosarele nr. 6.843/2003 și nr. 2.477/2003, **Curtea de Apel Bacău — Secția comercială și contencios-administrativ și, respectiv, Tribunalul Mehedinți — Secția comercială și contencios-administrativ au sesizat Curtea Constituțională cu excepția de neconstituționalitate a dispozițiilor art. 47¹ din Legea nr. 137/2002 privind unele măsuri pentru accelerarea privatizării, excepție ridicată de Societatea de Investiții Financiare „Moldova” — S.A. — Bacău și, respectiv, Societatea de Investiții Financiare „Oltenia” — S.A. — Craiova.**

În motivarea excepției de neconstituționalitate autorii acesteia susțin că textul criticat încalcă dispozițiile constituționale ale art. 41, 134 și 135 cu privire la ocrotirea dreptului de proprietate privată.

Se arată, în esență, că Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 208/2002, care a introdus în Legea nr. 137/2002 textul criticat pentru neconstituționalitate, „legiferează în mod abuziv eliminarea unei proceduri speciale stabilită anterior, prin Ordonanța de urgență nr. 28/2002”. Se consideră că această posibilitate creată de art. 47¹ din Legea nr. 137/2002 încalcă drepturile acționarilor minoritari (în special dreptul de proprietate asupra acțiunilor pe care aceștia le dețin). În continuare se susține că textul de

lege criticat creează un „dezechilibru între acționarul majoritar și ceilalți acționari ai unei societăți comerciale”, prin „reducerea substanțială a cotelor din capitalul social pe care le dețin acești acționari minoritari”.

Curtea de Apel Bacău — Secția comercială și contencios-administrativ consideră că excepția este neîntemeiată. În motivarea acestei opinii instanța arată că „privatizarea Societății Comerciale «Chimcomplex» — S.A. Borzești este dispusă de Legea nr. 137/2002, modificată și completată prin Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 208/2002 și Ordinul APAPS nr. 5/2002, în lege fiind prevăzute dispoziții imperative, astfel că această privatizare urmează a se derula cu respectarea legislației în vigoare, dispoziții ce nu vin în contradicție cu prevederile Constituției”.

Tribunalul Mehedinți — Secția comercială și contencios-administrativ consideră că „art. 47¹ din Legea nr. 137/2002 este constituțional, [întrucât] prin această reglementare s-a urmărit accelerarea privatizării și nicidecum crearea unei inegalități între diferiți acționari”.

Potrivit prevederilor art. 24 alin. (1) din Legea nr. 47/1992, republicată, încheierea de sesizare a fost comunicată președinților celor două Camere ale Parlamentului și Guvernului, pentru a-și exprima punctele de vedere asupra excepției de neconstituționalitate ridicate. De asemenea, în conformitate cu dispozițiile art. 18¹ din Legea nr. 35/1997, cu modificările ulterioare, s-a solicitat punctul de vedere al instituției Avocatul Poporului.

Avocatul Poporului consideră că dispozițiile legale criticate sunt constituționale. În argumentarea acestui punct de vedere se arată că textul „nu instituie vreo discriminare între investitorii-cumpărători ai acțiunilor deținute de stat în societățile comerciale și micii investitori-acționari ai societăților în cauză”. Se susține totodată că, „având în vedere diferența de situații juridice în care se află investitorii, existența unui tratament juridic diferit pentru aceștia nu contravine principiului egalității în fața legii, întrucât, așa cum s-a decis în mod constant în jurisprudența Curții Constituționale, principiul egalității nu presupune uniformitate, iar la situații diferite se impune aplicarea unui tratament juridic deosebit”.

În legătură cu pretinsa încălcare a dispozițiilor art. 41 alin. (2) coroborat cu art. 135 alin. (1) și (6) din Constituție, în punctul de vedere prezentat se susține că „procedura de majorare a capitalului social, așa cum este stabilită prin dispozițiile Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 208/2002, nu aduce atingere principiului ocrotirii egale a proprietății private, indiferent de titular”. Textul de lege criticat instituie, potrivit susținerilor Avocatului Poporului, „o garanție în sensul prevederilor art. 134 alin. (2) lit. b) din Constituție, conform căruia statul trebuie să asigure protejarea intereselor naționale în activitatea economică, financiară și valutară”.

Președinții celor două Camere ale Parlamentului și Guvernul nu au comunicat punctele lor de vedere asupra excepției de neconstituționalitate.

CURTEA,

examinând încheierile de sesizare, punctele de vedere ale Avocatului Poporului, rapoartele întocmite de judecătorul-raportor, concluziile procurorului, dispozițiile legale criticate, raportate la prevederile Constituției, precum și Legea nr. 47/1992, reține următoarele:

Curtea Constituțională a fost legal sesizată și este competentă, potrivit dispozițiilor art. 146 lit. d) din Constituție,

republicată, precum și celor ale art. 1 alin. (1), ale art. 2, 3, 12 și 23 din Legea nr. 47/1992, republicată, să soluționeze excepția de neconstituționalitate ridicată.

Obiectul excepției de neconstituționalitate îl constituie dispozițiile art. 47¹ din Legea nr. 137 din 28 martie 2002 privind unele măsuri pentru accelerarea privatizării, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 215 din 28 martie 2002, text introdus prin art. I pct. 18 din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 208 din 18 decembrie 2002, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 961 din 28 decembrie 2003.

Textul criticat pentru neconstituționalitate are următorul cuprins: „Sunt exceptate de la prevederile Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 28/2002 privind valorile mobiliare, serviciile de investiții financiare și piețele reglementate, aprobată cu modificări prin Legea nr. 525/2002, operațiunile de majorare a capitalului social efectuate în conformitate cu prevederile prezentei legi și ale Ordonanței Guvernului nr. 25/2002 privind unele măsuri de urmărire a executării obligațiilor asumate prin contractele de privatizare a societăților comerciale, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 506/2002.“

Critica de neconstituționalitate a dispozițiilor art. 47¹ din Legea nr. 137/2002 se bazează pe susținerea că excepția prevăzută de acest text de la aplicarea normelor generale prevăzute de Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 28/2002 cu privire la majorarea capitalului social încalcă dreptul de proprietate privată al acționarilor minoritari asupra acțiunilor pe care le dețin, drept a cărei ocrotire este consacrată de art. 41 alin. (1) și (2) teza întâi și de art. 135 alin. (1) și (6) din Constituție, devenite, după revizuirea și republicarea Constituției României în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 767 din 31 octombrie 2003, art. 44 alin. (1) și (2) teza întâi și art. 136 alin. (5). Dispozițiile fostului articol 135 alin. (1) nu se mai regăsesc în art. 136, ele fiind incluse în prevederile art. 44 alin. (1) și (2) teza întâi, cu un conținut mai complex. Totodată, în motivarea excepției se face referire și la dispozițiile art. 134 alin. (1) din Constituție, devenite, ca urmare a revizuirii constituționale, art. 135 alin. (1). Textele constituționale invocate în susținerea excepției, care nu au suferit modificări esențiale, au în prezent următorul cuprins:

— Art. 44 alin. (1) și alin. (2) teza întâi: „(1) Dreptul de proprietate, precum și creanțele asupra statului, sunt garantate. Conținutul și limitele acestor drepturi sunt stabilite de lege.

(2) Proprietatea privată este garantată și ocrotită în mod egal de lege, indiferent de titular. [...]”;

— Art. 135 alin. (1): *Economia României este economie de piață, bazată pe libera inițiativă și concurență.*”;

— Art. 136 alin. (5): *„Proprietatea privată este inviolabilă, în condițiile legii organice.”*

Analizând excepția de neconstituționalitate, Curtea constată că dispozițiile legale criticate în cauza de față au mai fost supuse controlului de constituționalitate.

Curtea Constituțională a respins excepțiile de neconstituționalitate formulate cu privire la dispozițiile art. 47¹ din Legea nr. 137/2002, cu modificările ulterioare, prin raportare la aceleași prevederi constituționale, prin Decizia nr. 350 din 23 septembrie 2003, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 794 din 11 noiembrie 2003, Decizia nr. 365 din 30 septembrie 2003, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 778 din 5 noiembrie 2003, și Decizia nr. 370 din 2 octombrie 2003, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 790 din 10 noiembrie 2003.

În considerentele deciziilor respective Curtea a reținut, în esență, că exceptarea măsurii de majorare a capitalului social de la aplicarea Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 208/2002, întemeiată pe interesul general al accelerării privatizării, este opțiunea legiuitorului, fără ca prin aceasta să fie afectat dreptul de proprietate al acționarilor minoritari asupra acțiunilor pe care le dețin. În acest sens s-a arătat că prin măsura legală criticată nu se realizează un transfer de proprietate, ci, cel mult, se poate produce o modificare a ponderii pe care unii acționari o dețin în totalul acțiunilor societății comerciale. De altfel, se subliniază în considerentele care stau la baza soluției pronunțate de Curte, măsura majorării capitalului social, ca atare, este prevăzută de lege și uzitată în practica societăților comerciale.

Soluția pronunțată și considerentele care au stat la baza acesteia își păstrează valabilitatea și în cauza de față, întrucât nu se invocă situații noi, de natură să determine reconsiderarea jurisprudenței Curții.

Față de cele de mai sus, în temeiul art. 146 lit. d) și al art. 147 alin. (4) din Constituție, republicată, precum și al art. 13 alin. (1) lit. A.c), al art. 23 și al art. 25 alin. (1) din Legea nr. 47/1992, republicată,

CURTEA

În numele legii

DECIDE:

Respinge excepția de neconstituționalitate a dispozițiilor art. 47¹ din Legea nr. 137/2002 privind unele măsuri pentru accelerarea privatizării, introduse prin Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 208/2002, excepție ridicată de Societatea de Investiții Financiare „Moldova” — S.A. — Bacău în Dosarul nr. 1.332/2003 al Curții de Apel Bacău — Secția comercială și contencios-administrativ și de Societatea de Investiții Financiare „Oltenia” — S.A. — Craiova în dosarele nr. 6.843/2003 și nr. 2.477/2003 ale Tribunalului Mehedinți — Secția comercială și contencios-administrativ.

Definitivă și obligatorie.

Pronunțată în ședința publică din data de 25 noiembrie 2003.

PREȘEDINTELE CURȚII CONSTITUȚIONALE,
prof. univ. dr. **NICOLAE POPA**

Magistrat-asistent,
Mihai Paul Cotta

ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE

MINISTERUL AGRICULTURII, PĂDURILOR, APELOR ȘI MEDIULUI

ORDIN

privind aprobarea Normei sanitare veterinare ce stabilește metode naționale de analiză pentru determinarea vitaminei A, a vitaminei E și a triptofanului din furaje

În temeiul prevederilor art. 31 alin. (1) din Legea sanitară veterinară nr. 60/1974, republicată, în baza Hotărârii Guvernului nr. 739/2003 privind organizarea și funcționarea Ministerului Agriculturii, Pădurilor, Apelor și Mediului, văzând Referatul de aprobare nr. 155.067 din 23 septembrie 2003, întocmit de Agenția Națională Sanitară Veterinară,

ministrul agriculturii, pădurilor, apelor și mediului emite următorul ordin:

Art. 1. — Se aprobă Norma sanitară veterinară ce stabilește metode naționale de analiză pentru determinarea vitaminei A, a vitaminei E și a triptofanului din furaje, prevăzută în anexa care face parte integrantă din prezentul ordin.

Art. 2. — Institutele centrale de profil și direcțiile sanitare veterinare județene și a municipiului București vor duce la îndeplinire prevederile prezentului ordin.

Art. 3. — Agenția Națională Sanitară Veterinară va controla modul de îndeplinire a prezentului ordin.

Art. 4. — Prezentul ordin se va publica în Monitorul Oficial al României, Partea I.

Ministrul agriculturii, pădurilor, apelor și mediului,
Ilie Sârbu

București, 25 noiembrie 2003.
Nr. 967.

NORMĂ SANITARĂ VETERINARĂ ce stabilește metode naționale de analiză pentru determinarea vitaminei A, a vitaminei E și a triptofanului din furaje

ANEXĂ

Art. 1. — Autoritatea veterinară centrală a României trebuie să solicite ca analizele efectuate în scopul controalelor oficiale pentru determinarea conținutului de vitamina A, vitamina E și triptofan al furajelor și premixurilor să fie efectuate folosindu-se metoda stabilită în anexa la prezenta normă sanitară veterinară.

Art. 2. — (1) Autoritatea veterinară centrală a României trebuie să implementeze, până cel târziu la 31 august 2005, actele normative, reglementările sau prevederile administrative necesare pentru a se supune prevederilor prezentei norme sanitare veterinare.

(2) Când autoritatea veterinară centrală a României adoptă aceste măsuri, acestea trebuie să cuprindă o referință la prezenta normă sanitară veterinară sau trebuie să fieacompaniate de astfel de referințe la momentul publicării oficiale a acestora. Procedura pentru o astfel de referință

va fi adoptată de autoritatea veterinară centrală a României.

Art. 3. — (1) Autoritatea veterinară centrală a României poate adopta, prin Ministerul Agriculturii, Pădurilor, Apelor și Mediului, acte normative sau prevederi administrative suplimentare prezentei norme sanitare veterinare.

(2) Autoritatea veterinară centrală a României, prin Ministerul Agriculturii, Pădurilor, Apelor și Mediului, va lua măsurile necesare și va sancționa, potrivit legii, orice încălcare a prevederilor prezentei norme sanitare veterinare.

(3) Autoritatea veterinară centrală a României va lua măsurile necesare și va sancționa, potrivit legii, orice încălcare a prevederilor prezentei norme sanitare veterinare.

Art. 4. — Anexa face parte integrantă din prezenta normă sanitară veterinară.

ANEXĂ

la norma sanitară veterinară

PARTEA A

Determinarea vitaminei A (retinol)

1. Scop și domeniu

Această metodă se folosește pentru determinarea vitaminei A (retinol) din furaje și premixuri. Vitamina A include toți compușii alcool trans-retinol și izomerii cis ce sunt

determinați prin această metodă. Conținutul de vitamina A este exprimat în unități internaționale (UI)/kg. O unitate internațională corespunde activității a 0,300 μg a tuturor compușilor alcoolici trans ai vitaminei A sau 0,344 μg a tuturor compușilor acetați trans ai vitaminei A ori 0,550 μg a tuturor compușilor palmitați trans ai vitaminei A. Limita de determinare este de 2.000 UI vitamina A/kg.

2. Principiu

Proba este hidrolizată cu soluție etanolică de hidroxid de potasiu, iar vitamina A este extrasă în eter de petrol. Solventul este înlăturat prin evaporare, iar reziduu este diluat în metanol și, dacă este necesar, diluat până la concentrația necesară. Conținutul de vitamina A este determinat prin lichid cromatografie de înaltă performanță cu fază inversă (RP-HPCL), folosindu-se un detector cu UV sau cu fluorescență. Parametrii cromatografici sunt aleși astfel încât să nu existe nici o diferență între toți compușii alcoolici trans ai vitaminei A și izomerii cis.

3. Reactivi:

3.1. Etanol, s=96%

3.2. Petrol ușor, interval de fierbere 40° la 60°C

3.3. Metanol

3.4. Soluție de hidroxid de potasiu, $\beta = 50$ g/100 ml

3.5. Soluția de ascorbat de sodiu, $\beta = 10$ g/100 ml (a se vedea observațiile de la pct. 7.7)

3.6. Sulfit de sodiu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)

3.6.1. Soluție de sulfit de sodiu, $c = 0,5$ mol/l în glicerol, $\beta = 120$ g/l (pentru $x = 9$) (a se vedea observațiile de la pct. 7.8)

3.7. Soluție de fenoftaleină, $\beta = 2$ g/100 ml în etanol (pct. 3.1)

3.8. 2-Propanol

3.9. Faza mobilă pentru HPLC: amestec de metanol (pct 3.3) și apă, de exemplu 980 + 20 (v + v). Raportul exact trebuie determinat prin intermediul caracteristicilor coloanei folosite.

3.10. Azot, liber de oxigen

3.11. Soluție stoc din retinol acetat trans total: se cântăresc, cu aproximație de 0,1 mg, 50 mg din acetat de vitamina A într-un balon de 100 ml. Se dizolvă în 2-propanol (pct. 3.8) și se completează până la semn cu același solvent. Concentrația nominală a acestei soluții este de 1.400 UI vitamina A/ml. Conținutul exact trebuie determinat în conformitate cu pct. 5.6.3.2.

3.12. Palmitat de vitamina A, extrapur, cu activitate certificată, de exemplu $1,80 \times 10^6$ UI/g

3.12.1. Soluție stoc din retinol palmitat trans total: se cântăresc, cu aproximație de 0,1 mg, 80 mg din palmitat de vitamina A (pct. 3.12) într-un balon cotat de 100 ml. Se dizolvă în 2-propanol (pct. 3.8) și se completează până la semn cu același solvent. Concentrația nominală a acestei soluții este de 1.400 UI vitamina A/ml. Conținutul exact trebuie determinat în conformitate cu pct. 5.6.3.2.

3.13. 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (a se vedea observațiile de la pct. 7.5).

4. Aparatură:

4.1. Evaporator rotator cu vacuum

4.2. Sticlărie brună

4.2.1. Baloane conice cu fund plat de 500 ml, cu slif

4.2.2. Baloane cotate cu dopuri rodate, cu gât strâmt, cu capacitate de 10, 25, 100 și 500 ml

4.2.3. Pâlnii de separare, conice, de 1.000 ml, cu dopuri din sticlă

4.2.4. Baloane de 250 ml

4.3. Condensator Allihn, cu lungimea învelișului de 300 mm

4.4. Hârtie de filtru pentru separarea fazică, cu diametrul de 185 mm (de exemplu Schleicher & Schuell 597 HY1/2 sau similar)

4.5. Lichid cromatografie de înaltă presiune (echipament HPLC cu sistem de injecție)

4.5.1. Coloană de lichid cromatografie, 250 mm x 4 mm, C_{18} , de 5 sau 10 μm sau echivalent (criteriu de performanță: doar un singur peak pentru toți izomerii retinolului în baza condițiilor HPLC)

4.5.2. Detector UV sau de fluorescență, cu ajustare variabilă a lungimii de undă

4.6. Spectrofotometru cu cuve de cuarț de 10 mm;

4.7. Baie de apă cu agitator magnetic

4.8. Aparat de extracție ce constă din:

4.8.1. cilindru de sticlă cu capacitate de 1 l, echipat cu gât și dop rotat;

4.8.2. mufă rodată, echipată cu un braț exterior și un tub ajustabil ce trece prin centru. Tubul ajustabil trebuie să aibă un capăt în formă de U în partea de jos și o parte efilată la partea opusă, astfel încât stratul superior de lichid din cilindru să poată fi transferat într-un tub de separare.

5. Procedură

NOTĂ: Vitamina A este sensibilă la lumină (UV) și oxidare. Toate operațiunile trebuie efectuate în absența luminii (folosindu-se sticlărie brună sau sticlărie protejată cu folie de aluminiu) și a oxigenului (a se purja cu azot). În timpul extracției aerul de deasupra lichidului trebuie înlocuit cu azot (evitați presiunea în exces prin lărgirea dopului din când în când).

5.1. Pregătirea probei

Se mărunțește proba astfel încât să treacă printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, avându-se grijă să se evite generarea de căldură. Mărunțirea trebuie efectuată imediat înainte de cântărire și saponificare, altfel ar putea avea loc pierderi de vitamina A.

5.2. Saponificarea

În funcție de conținutul de vitamina A, se cântăresc (cu aproximație de 0,01 g) 2 până la 25 g din probă, într-un balon cu fund plat sau conic (pct. 4.2.1). Se adaugă în continuare, prin amestecare, 130 ml etanol (pct. 3.1), aproximativ 100 mg BHT (pct. 3.13), 2 ml de soluție de sulfit de sodiu (pct. 3.6). Se potrivește un condensator (pct. 4.3) la balon și se scufundă balonul într-o baie de apă cu agitator mecanic (pct. 4.7). Se încălzește până la fierbere și se lasă la reflux timp de 5 minute. Se adaugă apoi 25 ml soluție de hidroxid de potasiu (pct. 3.4) prin condensator (pct. 4.3) și se lasă la reflux timp de încă 25 de minute, agitându-se sub un flux ușor de azot. Se clătește apoi condensatorul cu aproximativ 20 ml de apă și se răcește conținutul balonului la temperatura camerei.

5.3. Extracție

Se transferă prin decantare întreaga soluție saponificată, prin clătire cu un volum total de 250 ml apă până la 1.000 ml a pâlniei de separare (pct. 4.2.3) sau a aparatului de extracție (pct. 4.8). Se clătește balonul de saponificare în continuare cu 25 ml etanol (pct. 3.1) și 100 ml eter de petrol (pct. 3.2) și se transferă soluțiile de clătire în pâlnia de separare sau în aparatul de extracție. Proporția de apă și etanol în soluțiile combinate ar trebui să fie de 2:1. Se scutură viguros timp de două minute și se lasă să se sedimenteze timp de două minute.

5.3.1. Extracție folosind un tub de separare (pct. 4.2.3)

Când straturile de lichid s-au separat (a se vedea observația de la pct. 7.3), se transferă stratul de eter de petrol într-o altă pâlnie de separare (pct. 4.2.3). Se repetă această extracție de două ori, cu 100 ml eter de petrol (pct. 3.2) și de două ori cu 50 ml eter de petrol (pct. 3.2).

Se spală extractele combinate în pâlnia de separare, de două ori, prin amestecare ușoară — pentru a se evita formarea emulsiilor — cu cantități de 100 ml apă și apoi cu cantități de 100 ml apă, cu agitare repetată, până când

apa rămâne incoloră la adăugarea soluției de fenofaleină (pct. 3.7) — spălarea de patru ori este suficientă —. Se filtrează extractul spălat printr-un filtru de hârtie pentru separare fazică (pct. 4.4), pentru a se înlătura orice cantitate de apă în suspensie, într-un balon cotat de 500 ml (pct. 4.2.2). Se spală pâlnia de separare și filtrul cu 50 ml eter de petrol, se umple până la semn cu eter de petrol (pct. 3.2) și se amestecă bine.

5.3.2. Extracție folosind un aparat de extracție (pct. 4.8)

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la pct. 7.3), se înlocuiește dopul cilindrului de sticlă (pct. 4.8.1) prin inserție din sticlă mată (pct. 4.8.2) și se aranjează capătul de mai jos în formă de U al tubului ajustabil, astfel încât să se afle deasupra nivelului interfeței. Prin aplicarea unei presiuni de la generatorul de azot prin brațul exterior, se transferă stratul superior de eter de petrol într-un tub de separare de 1.000 ml (pct. 4.2.3). Se adaugă 100 ml eter de petrol (pct. 3.2) într-un cilindru de sticlă, se atașează dopul și se agită bine. Se lasă straturile să se separe și se transferă stratul de deasupra în tubul de separare, la fel ca înainte. Se repetă procedura extracției cu încă 100 ml eter de petrol (pct. 3.2), apoi de două ori cu cantități de 50 ml eter de petrol (pct. 3.2) și se adaugă straturile de eter de petrol în tubul de separare.

Se spală extractele combinate din eter de petrol, după cum este descris la pct. 5.3.1, și se procedează după cum este descris la acel punct.

5.4. Prepararea soluției probă pentru HPLC

Se pipetează o cantitate alicotă din soluția de eter de petrol (de la pct. 5.3.1 la pct. 5.3.2) într-un balon în formă de pară de 250 ml (pct. 4.2.4). Se evaporă solventul până aproape de uscare, pe evaporatorul rotativ (pct. 4.1), cu presiune redusă, la o temperatură a băii ce nu depășește 40°C. Se restabilește presiunea atmosferică prin admisie de nitrogen (pct. 3.10) și se îndepărtează balonul de pe evaporatorul rotativ. Se înlătură solventul rămas printr-un curent de azot (pct. 3.10) și se dizolvă imediat reziduul cu un volum cunoscut (10–100 ml) de metanol (pct. 3.3) (concentrația de vitamina A trebuie să fie între 5 UI/ml și 30 UI/ml).

5.5. Determinare prin HPLC

Vitamina A este separată pe o coloană cu fază inversată de C_{18} (pct. 4.5.1), iar concentrația este măsurată printr-un detector de UV (325 nm) sau un detector de fluorescență (excitație: 325 nm, emisie: 475 nm) (pct. 4.5.2).

Se injectează o cantitate alicotă (de exemplu 20 μ l) de soluție metanolică obținută conform pct. 5.4 și se realizează o eluție cu faza mobilă (pct. 3.9). Se calculează media peak-urilor înălțimii mai multor injecții din aceeași soluție de probă și media peak-urilor înălțimii mai multor injecții ale soluțiilor de calibrare (pct. 5.6.2).

Condiții de separare HPLC

Sunt oferite următoarele condiții pentru instruire; pot fi folosite alte condiții, cu obligația ca acestea să ofere rezultate echivalente.

Coloana de lichid cromatografie (pct. 4.5.1): 250 mm x 4 mm, C_{18} de 5 sau 10 μ m ori echivalent

Faza mobilă (pct. 3.9): amestec de metanol (pct. 3.3) și apă, de exemplu 980 + 20 (v + v)

Rata de curgere: 1–2 ml/min.

Detector (pct. 4.5.2): detector cu UV (325 nm) sau detector cu fluorescență (excitație: 325 nm/emisie: 475 nm)

5.6. Calibrare

5.6.1. Prepararea soluțiilor standard de lucru

Se pipetează 20 ml soluție de acetat vitamina A (pct. 3.11) sau 20 ml soluție stoc de palmitat vitamina A (pct. 3.12.1)

într-un balon cu fund plat sau conic (pct. 4.2.1) și se hidrolizează după cum este descris la pct. 5.2, dar fără a se adăuga BHT. Se aplică apoi extracția cu eter de petrol (pct. 3.2) în conformitate cu pct. 5.3 și se completează până la 500 ml cu eter de petrol (pct. 3.2). Se evaporă 100 ml din acest extract pe evaporatorul rotativ (a se vedea pct. 5.4) până aproape de uscare, se înlătură solventul rămas cu un curent de azot (pct. 3.10) și se redizolvă reziduul în 10,0 ml metanol (pct. 3.3). Concentrația nominală a acestei soluții este 560 UI vitamina A/ml. Conținutul exact trebuie determinat în conformitate cu pct. 5.6.3.3. Soluția standard de lucru trebuie preparată proaspătă, înainte de folosire. Se pipetează 2,0 ml din această soluție standard de lucru, într-un balon gradat, se completează cu metanol până la semn (pct. 3.3) și se amestecă. Concentrația nominală a acestei soluții standard de lucru diluată este de 56 UI de vitamina A/ml.

5.6.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a graficului de calibrare: se transferă 1,0; 2,0; 5,0 și 10,0 ml din soluția standard de lucru, diluată într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (pct. 3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt 2,8; 5,6; 14,0 și 28,0 UI de vitamina A/ml. Se injectează 20 μ l din fiecare soluție de calibrare de mai multe ori și se determină media înălțimilor peak-urilor. Folosindu-se media înălțimilor peak-urilor, se întocmește un grafic de calibrare, luându-se în considerare rezultatele controlului UV (pct. 5.6.3.3).

5.6.3. Standardizarea UV a soluțiilor standard

5.6.3.1. Soluție acetat de vitamina A

5.6.3.2. Se pipetează 2,0 ml din soluția acetat de vitamina A (pct. 3.11) într-un balon gradat de 50 ml (pct. 4.2.2) și se completează până la semn cu 2-propanol (pct. 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 56 UI vitamina A/ml. Se pipetează 3,0 ml din această soluție de acetat vitamina A într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (pct. 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI vitamina A/ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții față de 2-propanol (pct. 3.8) cu un spectrofotometru (pct. 4.6), la o lungime de undă între 300 nm și 400 nm. Extincția maximă trebuie să fie între 325 nm și 327 nm. Calcularea conținutului de vitamina A:

UI vitamina A/ml = $E_{326} \times 19,0$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ pentru retinol acetat = 1.530 la 326 nm în 2-propanol)

5.6.3.3. Soluție standard palmitat de vitamina A: se pipetează 3,0 ml din soluția standard de vitamina A nediluată, preparată în conformitate cu pct. 5.6.1, într-un balon cotat de 50 ml (pct. 4.2.2) și se completează până la semn cu 2-propanol (pct. 3.8). Se pipetează 5 ml din această soluție într-un balon cotat de 25 ml și se aduce la semn cu 2-propanol (pct. 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI de vitamina A/ml. Se măsoară spectrul acestei soluții față de 2-propanol (pct. 3.8) cu spectrofotometru (pct. 4.6) la lungime de undă între 300 nm și 400 nm. Extincția maximă trebuie să fie între 325 nm și 327 nm. Calcularea conținutului în vitamina A:

UI vitamina A/ml = $E_{325} \cdot 18,3$

($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ pentru retinol = 1.821 la 325 nm în 2-propanol)

6. Calcularea rezultatelor

Pornindu-se de la înălțimea medie a peak-urilor de vitamina A a soluției de probă, se determină concentrația soluției de probă în UI/ml, prin referire la curba de calibrare (pct. 5.6.2).

Conținutul w de vitamina A în UI/kg ale probei este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2 \cdot 1000 \text{ [UI/kg]}}{V_1 \cdot m}$$

în care:

β = concentrația de vitamina A din soluția de probă (pct. 5.4) la UI/ml;

V_1 = volumul soluției de probă (pct. 5.4), în ml;

V_2 = volumul cantității alicote luate conform pct. 5.4, în ml;

m = masa porțiunii de testare, în g.

7. Observații

7.1. Pentru probe cu concentrație redusă de vitamina A poate fi util să se combine extractele de eter de petrol din două încărcături de saponificare (cantitate cântărită = 25 g) într-o soluție de probă pentru determinare HPLC.

7.2. Greutatea probei utilizate pentru analiză nu ar trebui să conțină mai mult de 2 g grăsimi.

7.3. Dacă separarea fazică nu are loc, adăugați aproximativ 10 ml etanol (pct. 3.1) pentru a întrerupe emulsia.

7.4. Pentru ulei din ficat de cod și alte grăsimi pure timpul de saponificare trebuie să fie extins la 45–60 de minute.

7.5. Poate fi folosită hidrochinonă în loc de BHT.

7.6. Folosindu-se o coloană fazică normală, este posibilă separarea de izomeri de retinol.

7.7. Se pot folosi aproximativ 150 mg de acid ascorbic în loc de soluție de ascorbat de sodiu.

7.8. Se pot folosi aproximativ 50 mg EDTA în loc de soluția de sulfat de sodiu.

8. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele, efectuate pe aceeași probă, nu trebuie să depășească 15%, cu referire la cel mai bun rezultat.

9. Rezultate ale unui studiu de colaborare*)

	Premix	Furaj cu premix	Concentrat mineral	Furaj proteic	Purcel
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
medie [UI/kg]	$17,02 \cdot 10^6$	$1,21 \cdot 10^6$	537100	151800	18070
s_p [UI/kg]	$0,51 \cdot 10^6$	$0,039 \cdot 10^6$	22080	12280	682
r [UI/kg]	$1,43 \cdot 10^6$	$0,109 \cdot 10^6$	61824	34384	1910
CV _p [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [UI/kg]	$1,36 \cdot 10^6$	$0,069 \cdot 10^6$	46300	23060	3614
R [UI/kg]	$3,81 \cdot 10^6$	$0,193 \cdot 10^6$	129640	64568	10119
CV _R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: număr de laboratoare

n: număr de valori singulare

s_p : deviația standard a repetabilității

s_R : deviația standard a reproductibilității

r: repetabilitate

R: reproductibilitate

CV_p: coeficient de variație al repetabilității

CV_R: coeficient de variație al reproductibilității

PARTEA B

Determinarea vitaminei E (tocoferol)

1. Scop și domeniu

Această metodă se folosește pentru determinarea vitaminei E din furaje și premixuri. Conținutul de vitamina E este exprimat ca mg de DL acetat de tocoferol/kg. Astfel, 1 mg DL acetat de tocoferol corespunde la 0,91 mg DL tocoferol (vitamina E).

Limita de determinare este de 2 mg vitamina E/kg.

2. Principiu

Proba este hidrolizată cu soluție de hidroxid de potasiu etanolic, iar vitamina E este extrasă în eter de petrol. Solventul este înlăturat prin evaporare, iar reziduul este dizolvat în metanol și, dacă este necesar, diluat până la concentrația necesară. Conținutul de vitamina E este determinat prin lichid cromatografie de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), folosindu-se un detector cu fluorescență sau UV.

3. Reactivi

3.1. Etanol, s = 96%

3.2. Eter de petrol, fracția 40°C – 60°C

3.3. Metanol

3.4. Soluție de hidroxid de potasiu, $\beta = 50$ g/100 ml

3.5. Soluție de ascorbat de sodiu, $\beta = 10$ g/100 ml (a se vedea observațiile de la pct. 7.7)

3.6. Sulfat de sodiu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)

3.6.1. Soluție de sulfat de sodiu, $c = 0,5$ mol/l în glicerol, $\beta = 120$ g/l (pentru $x = 9$) (a se vedea observațiile de la pct. 7.8)

3.7. Soluție de fenoltaleină, $\beta = 2$ g/100 ml în etanol (pct. 3.1)

3.8. Faza mobilă pentru HPLC: amestec de metanol (pct. 3.3) și apă, de exemplu: 980 + 20 (v + v). Raportul exact trebuie să fie determinat prin intermediul caracteristicilor coloanei folosite.

3.9. Azot, liber de oxigen

3.10. DL- α -tocoferol acetat, extrapur, cu activitate certificată

3.10.1. Soluție stoc din DL- α -acetat de tocoferol: se cântăresc, cu aproximație de 0,1 mg, 100 mg DL- α -acetat de tocoferol (pct. 3.10) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în etanol (pct. 3.1) și se completează până la semn cu același solvent. Astfel, 1 ml din această soluție conține 1 mg DL- α -acetat de tocoferol (pentru control UV, a se vedea pct. 5.6.2.3; pentru stabilizare, a se vedea observațiile de la pct. 7.4)

3.11. DL- α -tocoferol, extrapur, cu activitate certificată

3.11.1. Se cântăresc, cu aproximație de 0,1 mg, 100 mg de DL- α -tocoferol (pct. 3.10), într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în etanol (pct. 3.1) și se completează până la semn cu același solvent. Astfel, 1 ml din această soluție conține 1 mg DL- α -tocoferol (pentru control UV, a se vedea pct. 5.6.2.3; pentru stabilizare, a se vedea observațiile de la pct. 7.4)

3.12. 2,6 di-terț-butil-metilfenol (BHT) (a se vedea observațiile de la pct. 7.5).

4. Aparatură

4.1. Evaporator rotativ cu vacuum

4.2. Sticlărie brună

4.2.1. Baloane cu fund plat sau conice de 500 ml, cu sliif

4.2.2. Baloane cotate, cu dopuri rotative, cu gât strâmt, cu capacitate de 10, 25, 100 și 500 ml

4.2.3. Pâlnii de separare conice, de 1.000 ml, cu dopuri de sticlă

4.2.4. Baloane de 250 ml

*) Realizat de grupul de lucru pentru furaje din Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs-und Forschungsanstalten (VDLUFA).

4.3. Condensator Allihn, de 300 mm, cu legătură din sticlă, cu adaptor pentru o pipă de aprovizionare cu gaz

4.4. Hârtie de filtru pentru separare fazică, cu diametrul de 185 mm (de exemplu Schleicher & Schuell 597 HY 1/2 sau similar).

4.5. Echipament HPLC cu sistem de injecție

4.5.1. Coloana de lichid cromatografie, 250 mm x 4 mm, C18, de 5 ori 10 μ m sau echivalent

4.5.2. Detector UV sau de fluorescență, cu ajustare variabilă a lungimii de undă

4.6. Spectrofotometru cu cuve de cuarț de 10 mm

4.7. Baie de apă cu agitator magnetic

4.8. Aparat de extracție constând din:

4.8.1. Cilindru de sticlă, de capacitate de 1 l, căruia i se pun un gât și dop de sticlă

4.8.2. Mufă din sticlă mată, echipată cu un braț exterior și cu un tub ajustabil ce trece prin centru. Tubul ajustabil trebuie să aibă un capăt în formă de U situat în partea de jos și un capăt efilat la partea opusă, astfel încât stratul superior de lichid din cilindru să poată fi transferat într-o pâlnie de separare.

5. Procedură

NOTĂ: Vitamina E este sensibilă la lumină (UV) și oxidare. Toate operațiunile trebuie efectuate în absența luminii (folosindu-se sticlărie brună sau sticlărie protejată cu folie de aluminiu) și a oxigenului (a se spăla cu azot). În timpul extracției, aerul de deasupra lichidului trebuie înlocuit de azot (a se evita presiunea, prin lărgirea dopului din când în când)

5.1. Pregătirea probei: se mărunțește proba astfel încât să treacă printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, avându-se grijă să se evite generarea de căldură. Mărunțirea trebuie efectuată imediat înainte de cântărire și saponificare, altfel pot avea loc pierderi de vitamina E.

5.2. Saponificare: în funcție de conținutul de vitamina E, se cântăresc, cu aproximație de 0,01 g, 2 până la 25 g din probă, într-un balon de 500 ml cu fundul plat sau conic (pct. 4.2.1). Se adaugă în continuare, prin amestecare, 130 ml etanol (pct. 3.1), aproximativ 100 mg BHT (pct. 3.12), 2 ml soluție de ascorbat de sodiu (pct. 3.5) și 2 ml soluție de sulfat de sodiu (pct. 3.6). Se potrivește un condensator (pct. 4.3) la balon și se scufundă balonul într-o baie de apă cu agitator mecanic (pct. 4.7). Se încălzesc până la fierbere și se lasă la reflux timp de 5 minute. Se adaugă apoi 25 ml soluție de hidroxid de potasiu (pct. 3.4) prin condensator (pct. 4.3) și se lasă la reflux timp de 25 de minute, agitându-se sub un flux ușor de azot. Apoi se clătește condensatorul cu aproximativ 20 ml apă și se răcește conținutul balonului la temperatura camerei.

5.3. Extracție: se transferă, prin decantare, întreaga soluție de saponificare, prin clătire cu un volum total de 250 ml apă până la 1.000 ml, a pâlniei de separare sau a aparatului de extracție (pct. 4.8). Se clătește balonul de saponificare, în continuare, cu 25 ml etanol (pct. 3.1) și 100 ml eter de petrol (pct. 3.2) și se transferă soluțiile de clătire în tubul de separare sau în aparatul de extracție. Proporția de apă și etanol în soluțiile combinate trebuie să fie 2:1. Se scutură viguros timp de două minute și se lasă să se sedimenteze timp de două minute.

5.3.1. Extracție folosind un tub de separare (pct. 4.2.3); când straturile de lichid s-au separat (a se vedea pct. 7.3), se transferă stratul de eter de petrol într-un alt tub separator (pct. 4.2.3). Se repetă această extracție de două ori cu 100 ml eter de petrol (pct. 3.2) și de două ori cu 50 ml eter de petrol (pct. 3.2). Se spală extractele combinate în tubul de separare, de două ori, prin amestecare ușoară (pentru a se evita formarea emulsiilor), cu cantități de

100 ml apă și apoi cu cantități de 100 ml apă, cu agitare repetată, până când apa rămâne incoloră la adăugarea soluției de fenoltaleină (pct. 3.7) (spălarea de 4 ori este de obicei suficientă). Se filtrează extractul spălat printr-un filtru împăturit, pentru separare fazică (pct. 4.4), pentru a se înlătura orice cantitate de apă în suspensie, într-un balon gradat de 500 ml (pct. 4.2.2). Se spală tubul de separare și filtrul cu 50 ml eter de petrol (pct. 3.2), se umple până la semn cu eter de petrol (pct. 3.2) și se amestecă bine.

5.3.2. Extracție folosind un aparat de extracție (pct. 4.8); când straturile s-au separat (a se vedea observația de la pct. 7.3) se înlocuiește dopul cilindrului de sticlă (pct. 4.8.1) printr-o inserție din sticlă (pct. 4.8.2) și se aranjează capătul de jos în formă de U al tubului ajustabil, astfel încât să se afle deasupra nivelului interfeței. Prin aplicarea unei presiuni de la generatorul nitrogenului, prin brațul exterior, se transferă stratul superior de eter de petrol într-un tub de separare de 1.000 ml (pct. 4.2.3). Se adaugă 100 ml eter de petrol (pct. 3.2) în cilindrul de sticlă, se atașează dopul și se agită bine. Se lasă straturile să se separe și se transferă stratul de deasupra în tubul de separare, ca și mai înainte. Se repetă procedura extracției cu încă 100 ml eter de petrol (pct. 3.2), apoi de două ori cu cantități de 50 ml eter de petrol (pct. 3.2) și se adaugă straturi de eter de petrol tubului de separare. Se spală extractele combinate din eter de petrol, după cum este descris la pct. 5.3.1, și se procedează după cum este descris acolo.

5.4. Prepararea soluției probă pentru HPLC: se pipetează o cantitate alicotă din soluția de eter de petrol (de la pct. 5.3.1 la pct. 5.3.2) într-un balon în formă de pară, de 250 ml (pct. 4.2.4). Se evaporă solventul aproape de uscare pe evaporatorul rotativ (pct. 4.1) cu presiune redusă, la o temperatură a băii ce nu depășește 40°C. Se reduce la presiunea atmosferică prin admisie de azot (pct. 3.9) și se îndepărtează balonul de pe evaporatorul rotativ. Se înlătură solventul rămas printr-un curent de azot (pct. 3.9) și se dizolvă imediat reziduul cu un volum cunoscut (10–100 ml) de metanol (pct. 3.3) (concentrația de L- α -tocoferol trebuie să fie între 5 μ g/ml și 30 μ g/ml).

5.5. Determinare prin HPLC: vitamina E este separată pe o coloană cu fază inversată de C₁₈ (pct. 4.5.1), iar concentrația este măsurată printr-un detector de fluorescență (excitație: 295 nm, emisie: 330 nm) sau un detector de UV (292 nm) (pct. 4.5.2). Se injectează o fracție alicotă (de exemplu: 20 μ l) de soluție metanolică obținută conform pct. 5.4 și se realizează o eluție cu faza mobilă (pct. 3.8). Se calculează media înălțimii peak-ului mai multor injecții din aceeași soluție de probă și mediile înălțimii peak-ului ale mai multor injecții ale soluțiilor de calibrare (pct. 5.6.2). Condiții HPLC. Sunt oferite următoarele condiții pentru orientare; pot fi folosite alte situații, cu condiția ca acestea să ofere rezultate echivalente.

Coloană de lichid cromatografie (pct. 4.5.1): 250 mm x 4 mm, C₁₈, ambalaje de 5 ori 10 μ m sau echivalent.

Faza mobilă (pct. 3.8): amestec de metanol (pct. 3.3) și apă, de exemplu: 980 + 20 (v + v)

Rata de curgere: 1–2 ml/min.

Detector (pct. 4.5.2): detector cu fluorescență (excitație: 5 nm/emisie: 330 nm) sau detector de UV (292 nm)

5.6. Calibrare (DL acetat de tocoferol sau DL- α -tocoferol)

5.6.1. DL acetat de tocoferol standard

5.6.1.1. Prepararea soluției standard de lucru

Se transferă cu o pipetă 25 ml soluție de DL acetat de tocoferol (pct. 3.10.1), într-un balon de 500 ml cu fund plat sau conic (pct. 4.2.1) și se hidrolizează după cum este descris la pct. 5.2, dar fără a se adăuga BHT. Apoi se extrage cu eter de petrol (pct. 3.2), în concordanță cu pct. 5.3, și se completează până la 500 ml cu eter de petrol (pct. 3.2). Se evaporă 25 ml din acest extract, pe evaporatorul rotativ (a se vedea pct. 5.4) până aproape de uscare, se înlătură solventul rămas cu un curent de nitrogen (pct. 3.9) și se redizolvă reziduurile în 25,0 ml metanol (pct. 3.3). Concentrația nominală a acestei soluții este 45,5 μg DL- α -tocoferol/ml, echivalent cu 50 μg DL- α -tocoferol acetat/ml. Soluția standard de lucru trebuie preparată proaspătă, înainte de folosire.

5.6.1.2. Prepararea soluțiilor de calibrare sau a graficului de calibrare: se transferă 1,0, 2,0, 4,0 și 10,0 ml din soluția standard de lucru, într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (pct. 3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt: 2,5; 5,0; 10,0 și 25,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tocoferol acetat, de exemplu: 2,28, 4,55, 9,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tocoferol. Se injectează 20 μl din fiecare soluție de calibrare, de mai multe ori, și se determină media înălțimii peak-ului. Folosindu-se mediile înălțimii peak-ului, se întocmește un grafic de calibrare.

5.6.1.3. Standardizarea UV a soluției de tocoferol acetat (pct. 3.10.1)

Se dizolvă 5,0 ml soluție de tocoferol acetat (pct. 3.10.1) până la 25,0 ml cu etanol și se măsoară spectrul UV al soluției față de etanol (pct. 3.1), cu un spectrofotometru (pct. 4.6) la un lungime de undă între 250 nm și 320 nm.

Absorbția maximă trebuie să fie la 284 nm:

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ la } 284 \text{ nm în etanol}$$

La această diluție trebuie obținută o valoare de extincție de $\sim 0,84-0,88$.

5.6.2. DL- α -tocoferol standard

5.6.2.1. Prepararea soluției standard de lucru

Se transferă, cu pipeta, 2,0 ml soluție de tocoferol acetat (pct. 3.11.1) într-un balon cotelat de 50 ml, se dizolvă în metanol (pct. 3.3) și se completează până la semn cu metanol. Concentrația nominală a acestei soluții este de 40 μg DL tocoferol acetat/ml, echivalent cu 44,0 μg de tocoferol acetat/ml. Soluția standard de lucru trebuie preparată proaspătă înainte de folosire.

5.6.2.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a graficului de calibrare

Se transferă 1,0; 2,0; 4,0 și 10,0 ml din soluția standard de lucru diluată, într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (pct. 3.3) și se amestecă.

Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt: 2,0; 4,0; 8,0 și 20,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ și 22,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tocoferol acetat. Se injectează 20 μl din fiecare soluție de calibrare de mai multe ori și se determină mediile înălțimii peak-ului. Folosindu-se mediile înălțimii peak-ului, se întocmește un grafic de calibrare.

5.6.2.3. Standardizarea UV a soluției DL- α -tocoferol (pct. 3.11.1)

Se dizolvă 2,0 ml până la 25,0 ml din soluția stoc de tocoferol (pct. 3.11.1) cu etanol (pct. 3.1) și se măsoară spectrul UV al acestei soluții față de etanol, cu spectrofotometru (pct. 4.6) la lungime de undă între 250 nm și 320 nm.

Absorbția maximă trebuie să fie la 292 nm:

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ la } 292 \text{ nm în etanol}$$

La această diluție trebuie obținută o valoare de extincție de 0,6.

6. Calcularea rezultatelor

Pornindu-se de la media înălțimii peak-ului pentru vitamina E a soluției de probă, se determină concentrația soluției de probă în $\mu\text{g}/\text{ml}$ (calculată ca α -tocoferol acetat) prin referire la graficul de calibrare (pct. 5.6.1.2 sau 5.6.2.2).

Conținutul w de vitamina E în mg/kg de probă este dat de următoarea formulă:

$$w = 500 \times \beta \times V_2 \text{ [mg/kg]} / V_1 \times m,$$

în care:

β = concentrația de vitamina E din soluția de probă (pct. 5.4) în UI/ml;

V_1 = volumul soluției de probă (pct. 5.4), în $\mu\text{g}/\text{ml}$;

V_2 = volumul cantității alicote folosite la pct. 5.4, în ml;

m = masa porțiunii de testat, în g.

7. Observații

7.1. Pentru probe cu concentrație redusă de vitamina E poate fi util să se combine extractele de eter de petrol din două încărcături de saponificare (cantitate cântărită: 25 g) într-o soluție de probă, pentru determinare HPLC.

7.2. Greutatea probei utilizate pentru analiză nu ar trebui să conțină mai mult de 2 g grăsime.

7.3. Dacă separarea fazică nu are loc, se adaugă aproximativ 10 ml l etanol (pct. 3.1), pentru a întrerupe emulsia.

7.4. După măsurarea cu spectrofotometru a soluției de tocoferol acetat sau DL- α -tocoferol, în conformitate cu pct. 5.6.1.3 sau 5.6.2.3, se adaugă aproximativ 10 mg BHT (pct. 3.12) la soluție (3.10.1 sau 3.10.2) și se păstrează soluția la frigider (perioadă de păstrare de maximum 4 săptămâni).

7.5. Poate fi folosită hidrochinona în loc de BHT.

7.6. Folosindu-se o coloană fazică normală, este posibilă separarea unui α -, β -, γ și d-tocoferol.

7.7. Se pot folosi aproximativ 150 mg acid ascorbic în loc de soluție de ascorbat de sodiu.

7.8. Se pot folosi aproximativ 50 mg EDTA în loc de soluție de sulfid de sodiu.

8. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele, efectuate pe aceeași probă, nu trebuie să depășească 15 %, cu referire la cel mai bun rezultat.

9. Rezultatele unui studiu de colaborare*)

	Premix	Furaj cu premix	Concentrat mineral	Furaj proteic	Purcel
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
medie [UI/kg]	17380	1187	926	315	61,3
s_R [UI/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r[UI/kg]	1075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV_r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
S_R [UI/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R[UI/kg]	2324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L:	număr de laboratoare
n:	număr de valori singulare
s_r :	deviația standard a repetabilității
S_R :	deviația standard a reproductibilității
r:	repetabilitate
R:	reproductibilitate
CV_r :	coeficient de variație al repetabilității
CV_R :	coeficient de variație al reproductibilității

*) Realizat de grupul de lucru pentru furaje din Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs-und Forschungsanstalten (VDLUFA).

PARTEA C

Determinarea triptofanului

1. Scop și domeniu

Această metodă se folosește pentru determinarea cantității totale și libere de triptofan din furaje. Nu se face distincție între formele D și L.

2. Principiu

Pentru determinarea triptofanului total, proba este hidrolizată în condiții alcaline cu soluție saturată de hidroxid de bariu și încălzită la 110°C, pentru 20 de ore. După hidroliză se adaugă standardul intern. Pentru determinarea triptofanului liber proba este extrasă în condiții de aciditate ușoară, în prezența standardului intern. Triptofanul și standardul intern din hidrolizat sau din extract sunt determinate prin HPLC cu detectare cu fluorescență.

3. Reactivi

3.1. Trebuie folosită apă dublu distilată sau apă de calitate echivalentă (conductivitate < 10 μ S/cm)

3.2. Substanța standard: triptofan (puri-tate/conținut > 99%), uscată sub vacuum pe pentoxid de fosfor

3.3. Substanță standard intern: a-metil-triptofan (puri-tate/conținut > 99%), uscată sub vacuum pe pentoxid de fosfor

3.4. Hidroxid de bariu octahidrat (trebuie avut grijă pentru a nu se expune $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ excesiv la aer, pentru a se evita formarea de $BaCO_3$ ce ar putea afecta determinarea) (a se vedea observația de la pct. 9.3)

3.5. Hidroxid de sodiu

3.6. Acid ortofosforic, w = 85%

3.7. Acid clorhidric, 20 = 1,19 g/ml

3.8. Metanol, grade HPLC

3.9. Eter de petrol, domeniu de fierbere 40–60°C

3.10. Soluție de hidroxid de sodiu, c = 1 mol/l

Se dizolvă 40,0 g NaOH (pct. 3.5) în apă și se completează cu apă până la 1 l (pct. 3.1)

3.11. Acid clorhidric, c = 6 mol/l. Se iau 492 ml HCL (pct. 3.7) și se completează cu apă până la 1 l.

3.12. Acid clorhidric, c = 1 mol/l. Se iau 82 ml HCL (pct. 3.7) și se completează cu apă până la 1 l.

3.13. Acid clorhidric, c = 0,1 mol/l. Se iau 8,2 ml HCL (pct. 3.7) și se completează cu apă până la 1 l.

3.14. Acid ortofosforic, c = 0,5 mol/l. Se iau 34 ml acid ortofosforic (pct. 3.6) și se completează cu apă până la 1 l (pct. 3.1).

3.15. Soluție concentrată de triptofan (pct. 3.2), c = 2,50 μ mol/ml: într-un balon volumetric de 500 ml se dizolvă 0,2553 g triptofan (pct. 3.2) în acid clorhidric (pct. 3.13) și se completează până la semn cu acid clorhidric (pct. 3.13). Se depozitează la 18°C pentru maximum 4 săptămâni.

3.16. Soluție concentrată standard intern, c = 2,50 μ mol/ml. Într-un balon volumetric de 500 ml se dizolvă 0,2728 g a-metil-triptofan (pct. 3.3) în acid clorhidric (pct. 3.13) și se completează până la semn cu acid clorhidric (pct. 3.13). Se depozitează la -18°C pentru maximum 4 săptămâni.

3.17. Soluție de triptofan standard de calibrare și standard intern: se iau 2,00 ml soluție concentrată de triptofan (pct. 3.15) și 2,00 ml soluție standard intern concentrat (a-metil-triptofan) (pct. 3.16). Se diluează cu apă (pct. 3.1) și metanol (pct. 3.8) cu aproximativ același volum și până la aproximativ aceeași concentrație de metanol (10–30%) ca și hidrolizatul finisat. Soluția standard trebuie preparată proaspătă înainte de folosire.

3.18. Acid acetic

3.19. 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol

3.20. Etanolamină > 98%

3.21. Soluție de 1 g — 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (pct. 3.19) în 100 ml metanol (pct. 3.8)

3.22. Fază mobilă pentru HPLC: 3,00 g acid acetic (pct. 3.18) + 900 ml apă (pct. 3.1) + 50,0 ml soluție (pct. 3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (pct. 3.19) în metanol (pct. 3.8) (1g/100 ml). Se ajustează pH-ul la 5,00, folosindu-se etanolamină (pct. 3.20). Se completează până la 1.000 ml cu apă (pct. 3.1).

4. Aparatură

4.1. Echipament HPLC cu un detector spectrofluorimetric

4.2. Coloană de lichid cromatografie, 125 mm x 4 mm, C_{18} , în ambalaje de 3 μ m sau echivalent

4.3. pH-metru

4.4. Balon de polipropilenă, capacitate 125 ml, cu gât larg și dop cu șurub

4.5. Filtru de membrană, 0,45 μ m

4.6. Autoclavă, 110 de bar (-2). 0 C, 1,4 (-0,1)

4.7. Agitator mecanic sau agitator magnetic

4.8. Mixer cu vortex

5. Procedură

5.1. Prepararea probelor

Proba trebuie să treacă printr-o sită de 0,5 mm. Probele cu umiditate ridicată trebuie să fie uscate în aer, la o temperatură ce nu depășește 50°C sau uscate cu gheață, înainte de mărunțire. Probele cu conținut ridicat de grăsimi trebuie extrase cu eter de petrol (pct. 3.9) înainte de mărunțire.

5.2. Determinarea triptofanului liber (extract)

Se cântărește, cu aproximație de 1 mg, o cantitate adecvată (1–5 g) din proba preparată (pct. 5.1) într-un balon conic. Se adaugă 100,0 ml acid clorhidric, c = 0,1 mol/l (pct. 3.13) și 5,00 ml din soluție standard internă concentrată (pct. 3.16). Se agită sau se amestecă timp de 60 de minute, folosindu-se un agitator mecanic sau un agitator magnetic (pct. 4.7). Se permite sedimentului să se depună și se pipetează 10,0 ml din soluția de supernatant într-un pahar de laborator. Se adaugă suficient metanol (pct. 3.8) pentru a se realiza o concentrație între 10 și 30% de metanol volum final. Se transferă într-un balon volumetric de volum corespunzător și se diluează cu apă până la un volum necesar pentru cromatografie (aproximativ același volum ca și soluția de calibrare standard (pct. 3.17)).

Se filtrează câțiva ml de soluție printr-un filtru de membrană de 0,45 μ m (pct. 4.5), înaintea injectării pe coloana HPLC. Se trece la etapa cromatografiei, în conformitate cu pct. 5.4. Se protejează soluția standard și extrasele față de lumina directă a soarelui. Dacă nu este posibil să se analizeze extractele în aceeași zi, acestea pot fi păstrate la 5°C pentru maximum 3 zile.

5.3. Determinarea triptofanului total (hidrolizat)

Se cântărește cu aproximație 0,2 mg, de la 0,1 la 1 g din proba preparată (pct. 5.1), în balonul de propilenă (pct. 4.4). Cantitatea de probă cântărită trebuie să aibă un conținut de nitrogen de 10 mg. Se adaugă 8,4 g de octahidrat de hidroxid de bariu (pct. 3.4) și 10 ml de apă. Se amestecă cu un mixer cu vortex (pct. 4.8) sau cu un agitator magnetic (pct. 4.7). Se lasă magnetul acoperit cu teflon, în amestec. Se spală pereții vasului cu 4 ml de apă. Se pune dopul cu șurub și se închide ușor balonul. Se transferă într-o autoclavă (pct. 4.6) cu apă ce fierbe și se lasă la aburi pentru 30–60 de minute). Se închide autoclava și se realizează autoclavare la 110 (+2)°C pentru 20 de ore.

Înainte de deschiderea autoclavei se reduce temperatura până la 100°C. Pentru a evita cristalizarea $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$, se adaugă la amestecul cald 30 ml de apă la temperatura

camerei. Se scutură sau se agită ușor. Se adaugă 2,00 ml soluție standard intern concentrată (de a-metil-triptofan) (pct. 3.16). Se răcesc vasele pe baie de apă timp de 15 minute. Se adaugă apoi 5 ml de acid ortofosforic, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (pct. 3.14). Se păstrează vasul la baia de răcire și se neutralizează cu HCl, $c = 6 \text{ mol/l}$ (pct. 3.11) în timp ce se agită și se ajustează pH-ul la 3,0 folosindu-se HCl, $c = 1 \text{ mol/l}$ (pct. 3.12). Se adaugă suficient metanol pentru a se realiza o concentrație între 10 și 30% de metanol în volumul final. Se transferă într-un balon volumetric de volum corespunzător și se diluează cu apă până la volumul definit, necesar pentru cromatografie (de exemplu 100 ml). Adăugarea de metanol nu trebuie să cauzeze precipitate.

Se filtrează câțiva ml din soluție printr-un filtru de membrană de $0,45 \mu\text{m}$ (pct. 4.5) înainte de injectare pe coloana HPLC, se trece la etapa cromatografiei, în conformitate cu pct. 5.4. Se protejează soluția standard și hidrolizatele față de lumina directă a soarelui. Dacă nu este posibil să se analizeze hidrolizatele în aceeași zi, acestea pot fi depozitate la 5°C , pentru maximum 3 zile.

5.4. Determinare prin HPLC

Sunt oferite pentru instruire următoarele condiții de eluție isocratică; pot fi folosite alte situații, cu condiția ca acestea să ofere rezultate echivalente (a se vedea, de asemenea, observațiile de la pct. 9.1 și 9.2).

Coloana de lichid cromatografie (pct. 4.2): 125 mm x 4 mm, C_{18} , ambalaj de $3 \mu\text{m}$ sau echivalentul

Temperatura coloanei: temperatura camerei

Faza mobilă (pct. 3.22): 3,00 g acid acetic apă (pct. 3.1) + 50,0 ml soluție (pct. 3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (pct. 3.19) în metanol (pct. 3.8) (1 g/100 ml).

Se ajustează pH-ul la 5,00, folosindu-se etanolamină (pct. 3.20).

Se completează până la 1.000 ml cu apă (pct. 3.1; de exemplu: 980+20 (v+v).

Rata de curgere: 1 ml/min.

Timpul total de funcționare: aproximativ 34 min.

Detecția la lungimea de undă: excitație: 280 nm, emisie: 356 nm

Volumul de injecție: 20 μl

6. Calcularea rezultatelor

$A \times B \times C \times D \times E \times MW = g \text{ triptofan} / 100 \text{ g probă}$
 $F \times G \times H \times 10.000 \times W$

A = zona peak-ului pentru standardul intern, soluție standard de calibrare (pct. 3.17)

B = zona peak-ului triptofanului, extract (pct. 5.2) sau hidrolizat (pct. 3.3)

C = volumul, în ml (2 ml), al soluției de triptofan concentrat (pct. 3.15) adăugat soluției de calibrare (pct. 3.17)

D = concentrația, în $\mu\text{mol/ml}$ (= 2,50), din soluția de triptofan concentrat (pct. 3.15) adăugată soluției de calibrare (pct. 3.17)

E = volumul, în ml, al soluției concentrate standard intern (pct. 3.16), adăugată la extract (pct. 5.2) (= 5,00 ml) sau hidrolizat (pct. 5.3) (= 2,00 ml)

F = zona peak-ului pentru standardul intern, extract (pct. 5.2) sau hidrolizat (pct. 5.3)

G = zona peak-ului triptofanului, soluție standard de calibrare (pct. 3.17)

H = volumul în ml (= 2,00) al soluției standard intern concentrată (pct. 3.16), adăugată la soluția standard de calibrare (pct. 3.17)

W = greutatea probei în g (corectată la greutatea originală, dacă este uscată și/sau degresată)

MW = greutatea moleculară a triptofanului (= 204,23)

7. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele, efectuate pe aceeași probă, nu trebuie să depășească 10% față de cel mai mare rezultat.

8. Rezultate ale unui studiu de colaborare

A fost realizat un studiu de colaborare la nivelul comunitar (a patra intercomparație) în cadrul căruia s-au analizat 3 probe, de către 12 laboratoare, pentru a certifica metoda pentru hidroliză. Au fost menționate contraprobe (5) din fiecare probă. Rezultatele sunt oferite de tabelul următor:

	Proba 1 Furaj pentru porcine	Proba 2 Furaj pentru porcine suplimentat cu L-triptofan	Proba 3 Concentrat de furaj pentru porcine
L	12	12	12
N	50	55	50
medie [g/kg]	2,42	3,40	4,22
S_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
S_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R[g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L: număr de laboratoare
n: număr de valori singulare
 S_r : deviația standard a repetabilității
 S_R : deviația standard a reproductibilității
r: repetabilitate
R: reproductibilitate
 CV_r : coeficient de variație al repetabilității
 CV_R : coeficient de variație al reproductibilității

A fost realizat un alt studiu de colaborare la nivelul comunitar (a treia intercomparație) în cadrul căruia s-au analizat două probe de către 13 laboratoare, pentru a se certifica metoda de extracție pentru triptofan liber. Au fost efectuate analize replicate (5) din fiecare probă. Rezultatele sunt oferite de tabelul următor:

	Proba 4 Amestec de grâu și soia	Proba 5 Amestec de grâu și soia (= proba 4) cu triptofan adăugat (0,457 g/kg)
L	12	12
N	55	60
medie [g/kg]	0,391	0,931
S_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
S_R [g/kg]	0,018	0,048
R[g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L: număr de laboratoare
n: număr de valori singulare
 S_r : deviația standard a repetabilității
 S_R : deviația standard a reproductibilității
r: repetabilitate
R: reproductibilitate
 CV_r : coeficient de variație al repetabilității
 CV_R : coeficient de variație al reproductibilității

A fost realizat un alt studiu de colaborare la nivel comunitar, în cadrul căruia s-au analizat 4 probe de către 7 laboratoare, cu scopul unei certificări a triptofanului prin hidroliză. Rezultatele sunt oferite mai jos. Analize replicate (5) au fost efectuate pe fiecare probă.

	Proba 1 Furaj amestecat pentru porcine (CRM 117)	Proba 2 Hrană pentru pește, cu nivel scăzut de grăsime (CRM 118)	Proba 3 Hrană din soia-fasole (CRM 119)	Proba 4 Pudră de lapte ecremat (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
medie [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
S _r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r[g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV _r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S _R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R[g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV _R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22
L:	număr de laboratoare			
n:	număr de valori singulare			
S _r :	deviația standard a repetabilității			
S _R :	deviația standard a reproductibilității			
r:	repetabilitate			
R:	reproductibilitate			
CV _r :	coeficient de variație al repetabilității			
CV _R :	coeficient de variație al reproductibilității			

9. Observații

9.1. Folosirea unor condiții de cromatografie speciale poate crea o mai bună separare între triptofan și a-metil-triptofan.

Eluție isocratică urmată de spălarea gradientului de coloană lichid cromatografie cu: 125 mm x 4 mm, C¹⁸, ambalaje de 5 μm sau echivalent.

Temperatura coloanei: 32°C

Faza mobilă: A: 0,01 mol/KH₂PO₄/metanol, 95+5(V+V) 1
B: Metanol

Program gradient: 0 min. 100% A 0% B
15 min. 100% A 0% B
17 min. 60% A 40% B
19 min. 60% A 40% B
21 min. 100% A 0% B
33 min. 100% A 0% B

Rata de culegere: 1,2 ml/min.

Timpu total de separare: aproximativ 33 de minute

9.2. Cromatografia variază în concordanță cu tipul de HPLC și de materialul de împachetare a coloanei folosit. Sistemul ales trebuie să fie capabil să ofere o separare de bază între triptofan și standardul intern. Mai mult, este important ca produsele de degradare să fie bine separate de triptofan și de standardul intern. Hidrolizatele fără standard intern trebuie testate pentru a se verifica linia de bază pentru impurități sub standardul intern. Este important ca timpul de utilizare să fie suficient de lung pentru eluția tuturor produselor de degradare, altfel pot interfera limite cu eluție târzie cu utilizări cromatografice ulterioare. În domeniul funcționării sistemul de cromatografie trebuie să ofere răspuns linear. Răspunsul linear trebuie măsurat cu o concentrație constantă (normală) a standardului intern și a concentrațiilor variate de triptofan. Este important și faptul că mărimea atât a peak-urilor triptofanului, cât și a peak-urilor standardelor interne este cuprinsă în domeniul linear al sistemului HPLC/fluorescență. Dacă peak-ul triptofanului și/sau al standardului intern este prea mic sau ridicat, analiza trebuie repetată cu o altă cantitate de probă și/sau cu un volum final schimbat.

9.3. Hidroxid de bariu

Cu timpul hidroxidul de bariu devine mai dificil de dizolvat.

Aceasta duce la o soluție neclară pentru determinarea HPLC ce poate produce rezultate scăzute pentru triptofan.

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII

ORDIN

pentru aprobarea Reglementărilor privind autorizarea de funcționare a unităților de producție a medicamentelor de uz uman

Având în vedere prevederile art. 10 alin. (9) din Ordonanța Guvernului nr. 125/1998 privind înființarea, organizarea și funcționarea Agenției Naționale a Medicamentului, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 594/2002, cu modificările și completările ulterioare,

văzând Referatul de aprobare al Direcției generale farmaceutice, inspecția de farmacie și aparatură medicală nr. OB. 6.436/2003,

în temeiul Hotărârii Guvernului nr. 743/2003 privind organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății,

ministrul sănătății emite următorul ordin:

Art. 1. — Se aprobă Reglementările privind autorizarea de funcționare a unităților de producție a medicamentelor de uz uman, conform anexei care face parte integrantă din prezentul ordin.

Art. 2. — Prevederile contrare prezentului ordin se abrogă.

Art. 3. — Prezentul ordin intră în vigoare la 1 ianuarie 2004.

Art. 4. — Agenția Națională a Medicamentului, precum și persoanele juridice interesate vor duce la îndeplinire prevederile prezentului ordin.

Art. 5. — Prezentul ordin se va publica în Monitorul Oficial al României, Partea I.

Ministrul sănătății,

Ovidiu Brînzan

București, 11 decembrie 2003.

Nr. 1.153.

REGLEMENTĂRI

privind autorizarea de funcționare a unităților de producție a medicamentelor de uz uman

Art. 1. — Autorizarea de funcționare a unităților de producție este emisă de Agenția Națională a Medicamentului, denumită în continuare ANM, în conformitate cu prevederile Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 152/1999 privind medicamentele de uz uman, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 336/2002, cu modificările și completările ulterioare.

Art. 2. — (1) Autorizația de funcționare se emite ca urmare a solicitării unităților de producție.

(2) Autorizația de funcționare pentru unitățile de producție se emite în baza raportului favorabil de inspecție întocmit de inspectorii ANM.

(3) Pentru obținerea autorizației de funcționare, unitatea de producție înaintea ANM o cerere de planificare a inspecției, conform modelului din anexa nr. 1 care face parte integrantă din prezentele reglementări, însoțită de următoarele documente:

a) documente administrative:

— actele constitutive ale societății;

— copie a certificatului de înregistrare la registrul comerțului, cu anexele sale și, dacă este cazul, certificatele de înscriere de mențiuni aferente;

— titlul deținerii spațiului/spațiilor societății;

b) documente tehnice:

— declarația de intenție privind tipul de medicamente care se vor fabrica: formă farmaceutică, grupa terapeutică, capacitatea de producție; se va specifica dacă se vor fabrica medicamente cu antibiotice (peniciline, cefalosporine, alte antibiotice), hormoni, substanțe anticanceroase, stupefiante, psihotrope, precursori și alte toxice;

— angajamentul prin care unitatea de producție se obligă să nu desfășoare activitate de producție decât după ce a obținut Certificatul de bună practică de fabricație;

— angajamentul prin care unitatea de producție se obligă să completeze documentația de autorizare cu documentele prevăzute de reglementările legale în legătură cu regimul deținerii și utilizării stupefiantelor, precursorilor, toxicelor;

— organigrama;

— documente care să ateste competențele persoanelor responsabile cu activitatea de fabricație, de control și cu cea de eliberare a seriei de fabricație, în conformitate cu prevederile art. 36 din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 152/1999, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 336/2002, cu modificările și completările ulterioare;

— date privind localul unității de producție:

— amplasare, construcție, compartimentări, finisări;

— planul clădirii/clădirilor, indicând fluxurile de personal, de materiale, de fabricație;

— utilități: sursa de apă potabilă, sisteme de tratare a apei, energia electrică și termică, sisteme de încălzire, ventilație și aer condiționat, aer comprimat, azot și alte gaze, exhaustare, dacă este cazul;

— date privind dotarea cu echipamente pentru fabricație și control.

Art. 3. — În termen de 15 zile lucrătoare de la data înregistrării cererii, ANM îi va răspunde solicitantului cu privire la documentele transmise, în vederea efectuării inspecției:

a) dacă documentația prezentată este în acord cu prevederile art. 2, solicitantul este anunțat cu privire la acceptarea cererii sale de inspecție și cu privire la valoarea tarifului de inspecție, aprobat prin ordin al ministrului

sănătății, care trebuie achitat în termen de 15 zile lucrătoare de la data primirii înștiințării, redactată conform modelului din anexa nr. 2 care face parte integrantă din prezentele reglementări; inspecția va avea loc în termen de 30 de zile de la confirmarea efectuării plății, la o dată care se va stabili de comun acord cu solicitantul;

b) dacă documentația nu este completă, solicitantul va fi anunțat cu privire la informațiile care trebuie transmise la ANM;

c) în cazul unităților de producție care au obținut Certificat de bună practică de fabricație, autorizația de funcționare se emite numai pe baza documentelor prevăzute la art. 2 alin. (3) lit. a).

Art. 4. — Inspecția se va desfășura în acord cu un program de inspecție întocmit de inspectorul desemnat din ANM, care se va transmite unității solicitante cu minimum 3 zile înainte de data inspecției.

Art. 5. — Inspecția pentru autorizarea de funcționare va urmări respectarea principiilor Regulilor de bună practică de fabricație în unitatea inspectată.

Art. 6. — Inspecția se finalizează cu un raport de inspecție care se va transmite solicitantului în maximum 15 zile lucrătoare de la data efectuării inspecției:

a) în cazul unui raport de inspecție favorabil, autorizația de funcționare se va emite de către ANM în termen de maximum 90 de zile de la data înregistrării de către solicitant a documentației complete;

b) în cazul unui raport de inspecție nefavorabil, solicitantul poate face contestație la ANM în termen de 5 zile de la data primirii raportului de inspecție.

Răspunsul la contestație se va comunica solicitantului în termen de 15 zile de la data depunerii acesteia.

Art. 7. — Autorizația de funcționare pentru unitățile de producție se va emite în formatul prezentat în anexa nr. 3 care face parte integrantă din prezentele reglementări, în două exemplare originale, dintre care unul se va înmâna unității de producție, iar celălalt va rămâne la ANM — Departamentul inspecție farmaceutică (DIF).

Art. 8. — Schimbarea locului de fabricație într-un nou spațiu sau orice modificare vizând fluxurile de fabricație presupune eliberarea unei anexe la autorizația inițială de funcționare, în baza unui nou raport de inspecție favorabil, documentele necesare efectuării inspecției fiind cele prevăzute la art. 2.

Art. 9. — Unitățile de producție au obligația de a comunica la ANM orice modificare care intervine după obținerea autorizației de funcționare.

Art. 10. — Autorizația de funcționare se anulează în cazul neridicării acesteia de la ANM — DIF, în termen de 60 de zile de la data semnării ei de către președintele ANM.

Art. 11. — Pierderea autorizației de funcționare atrage anularea acesteia, iar emiterea unei noi autorizații de funcționare se face în baza următoarelor documente:

— cererea în formatul prevăzut în anexa nr. 4 care face parte integrantă din prezentele reglementări;

— dovada de publicare a pierderii într-un cotidian de largă circulație;

— copii de pe documentele depuse la dosarul inițial de autorizare.

Art. 12. — (1) ANM poate suspenda autorizația de funcționare în situația în care unitatea de producție modifică

neanunțat, conform art. 8, condițiile pentru care s-a acordat autorizația de funcționare sau la cererea motivată a unității de producție, cu precizarea perioadei de timp.

(2) Suspendarea autorizației de funcționare pentru unitatea de producție se poate face pentru o perioadă de maximum un an.

Art. 13. — ANM poate retrage autorizația de funcționare în următoarele situații:

a) în cazul în care, în termen de un an de la eliberarea autorizației de funcționare, producătorul nu obține Certificatul de bună practică de fabricație;

b) în cazul în care unitatea desfășoară activitate de fabricație înainte de obținerea Certificatului de bună

practică de fabricație sau fabrică și comercializează produse fără autorizație de punere pe piață;

c) în cazul în care unitatea autorizată își încetează activitatea.

Art. 14. — Decizia de emitere, suspendare, respectiv retragere a autorizației de funcționare, împreună cu raportul care a stat la baza ei, se comunică Ministerului Sănătății în termen de 48 de ore de la data emiterii.

Art. 15. — În vederea emiterii autorizațiilor de funcționare pentru anul 2004, cererile de inspecție în vederea autorizării de funcționare se vor primi la ANM începând cu data de 15 noiembrie 2003.

Art. 16. — Prezentele reglementări intră în vigoare la data de 1 ianuarie 2004.

*ANEXA Nr. 1
la reglementări*

CERERE DE PLANIFICARE A INSPECȚIEI în vederea autorizării de funcționare

Către

Agenția Națională a Medicamentului — Departamentul inspecție farmaceutică

Unitatea,
cu sediul în, adresa,
telefon/fax, înregistrată la registrul comerțului, cod unic
de înregistrare, reprezentată prin,
(numele, prenumele)
funcția, vă rog să planificați inspecția la sediul unității în vederea autorizării de
funcționare/vă rog să ne emiteți autorizația de funcționare*).

Semnătura și ștampila

*) Se aplică în cazul celor care dețin Certificat de bună practică de fabricație.

*ANEXA Nr. 2
la reglementări*

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AGENȚIA NAȚIONALĂ A MEDICAMENTULUI
Str. Av. Sănătescu nr. 48, sectorul 1
011478, București
Tel. 224.11.02, fax 224.34.97

Către

Vă informăm prin prezenta că, în urma studierii documentației depuse la Agenția Națională a Medicamentului, solicitarea dumneavoastră de efectuare a unei inspecții în vederea autorizării de funcționare a fost admisă.

Vă rugăm ca în termen de 15 zile lucrătoare să achitați tariful aferent efectuării inspecției, în sumă de ..., în conformitate cu Ordinul ministrului sănătății nr.

Inspecția va avea loc în termen de 30 de zile de la confirmarea efectuării plății, la o dată care va fi stabilită de comun acord cu dumneavoastră.

Președinte,

.....

*Șeful Departamentului
inspecție farmaceutică,*

.....

ANEXA Nr. 3
la reglementări

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AGENȚIA NAȚIONALĂ A MEDICAMENTULUI
Str. Av. Sănătescu nr. 48, sectorul 1
011478, București
Tel. 224.11.02, fax 224.34.97

— față —

AUTORIZAȚIE DE FUNCȚIONARE

Nr./data emiterii

În conformitate cu prevederile Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 152/1999 privind medicamentele de uz uman, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 336/2002, cu modificările și completările ulterioare, ale Ordonanței Guvernului nr. 125/1998 privind înființarea, organizarea și funcționarea Agenției Naționale a Medicamentului, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 594/2002, cu modificările și completările ulterioare, în baza inspecției efectuate la data/în baza documentației înaintate la data de*), Agenția Națională a Medicamentului autorizează funcționarea unității de producție:

1. numele și adresa sediului unității;
2. adresa locului de producție;
3. tipul de activități pe care le va efectua (fabricație totală, parțială, forme farmaceutice, grupe terapeutice, după caz).

Orice modificare a condițiilor care au stat la baza emiterii prezentei autorizații de funcționare fără anunțarea prealabilă a acestei modificări la Agenția Națională a Medicamentului atrage suspendarea autorizației de funcționare.

Activitatea de producție pentru care s-a acordat autorizația de funcționare se poate desfășura numai după obținerea Certificatului de bună practică de fabricație și numai pe perioada valabilității acestuia.

Adresa autorității emitente:

*Președintele Agenției Naționale
a Medicamentului,*
.....

Data (emiterii)
L.S.

*) Se aplică numai în cazul celor care dețin Certificat de bună practică de fabricație.

— verso —

Data eliberării
Numele reprezentantului beneficiarului
Semnătura reprezentantului beneficiarului

ANEXA Nr. 4
la reglementări

CERERE de eliberare a unei noi autorizații de funcționare

Către

Agenția Națională a Medicamentului — Departamentul inspecție farmaceutică

Unitatea,
cu sediul în, adresa,
telefon/fax, înregistrată la registrul comerțului, cod unic de
înregistrare, reprezentată prin, funcția
(numele, prenumele)

....., în conformitate cu art. 11 din Ordinul ministrului sănătății nr. 1.153/2003, vă rog să eliberați o nouă autorizație de funcționare. Anexăm la prezenta cerere dovada anunțării pierderii autorizației de funcționare în cotidianul

Semnătura și ștampila

ACTE ALE CONSILIULUI NAȚIONAL AL AUDIOVIZUALULUI

CONSILIUL NAȚIONAL AL AUDIOVIZUALULUI

DECIZIE**pentru modificarea și completarea Deciziei Consiliului Național
al Audiovizualului nr. 274/2003 privind asigurarea informării corecte a opiniei publice**

Având în vedere dubla calitate a Consiliului Național al Audiovizualului, de garant al interesului public și de unică autoritate de reglementare în domeniul programelor audiovizuale,

ținând seama de obligația radiodifuzorilor de a favoriza pluralismul opiniilor și de a informa în mod obiectiv publicul prin prezentarea corectă a faptelor și a evenimentelor, precum și de obligația Consiliului Național al Audiovizualului de a garanta imparțialitatea radiodifuzorilor,

în temeiul art. 17 alin. (1) lit. d) din Legea audiovizualului nr. 504/2003, cu modificările și completările ulterioare,

membrii Consiliului Național al Audiovizualului adoptă următoarea decizie:

Articol unic. — Decizia Consiliului Național al Audiovizualului nr. 274/2003 privind asigurarea informării corecte a opiniei publice, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 699 din 6 octombrie 2003, se modifică și se completează după cum urmează:

1. După alineatul (2) al articolului 1 se introduce un nou alineat, alineatul (3), cu următorul cuprins:

„(3) În vederea respectării și garantării principiilor prevăzute la alin. (1), următoarele categorii de persoane nu pot edita și prezenta emisiuni informative sau nu pot realiza și modera emisiuni audiovizuale:

a) parlamentari;

b) reprezentanți ai administrației publice centrale și locale sau persoane asimilate prin lege acestora;

c) reprezentanți ai Administrației Prezidențiale;

d) persoane cu funcții în partidele politice;

e) persoane desemnate public de către partidele politice să candideze sau care și-au anunțat public intenția de a candida la alegerile locale, parlamentare ori prezidențiale.“

2. La articolul 10, alineatul (1) va avea următorul cuprins:

„Art. 10. — (1) Încălcarea prevederilor art. 1 alin. (3), art. 3 lit. e)—h), ale art. 4 alin. (1) și (3) și ale art. 5—9 se sancționează potrivit dispozițiilor art. 91 din Legea audiovizualului nr. 504/2002.“

Președintele Consiliului Național al Audiovizualului,
Ralu Filip

București, 11 decembrie 2003.
Nr. 377.

EDITOR: PARLAMENTUL ROMÂNIEI — CAMERA DEPUTAȚILOR

Regia Autonomă „Monitorul Oficial”, str. Izvor nr. 2-4, Palatul Parlamentului, sectorul 5, București,
cont nr. 2511.1—12.1/ROL Banca Comercială Română — S.A. — Sucursala „Unirea” București
și nr. 5069427282 Direcția de Trezorerie și Contabilitate Publică a Municipiului București
(alocat numai persoanelor juridice bugetare).

Adresa pentru publicitate: Centrul pentru relații cu publicul, București, șos. Panduri nr. 1,
bloc P33, parter, sectorul 5, tel. 411.58.33 și 411.97.54, tel./fax 410.77.36.

Tiparul : Regia Autonomă „Monitorul Oficial”, tel. 490.65.52, 335.01.11/2178 și 402.21.78,
E-mail: marketing@ramo.ro, Internet: www.monitoruloficial.ro