



MONITORUL OFICIAL

AL

ROMÂNIEI

Anul 175 (XIX) — Nr. 141

PARTEA I
LEGI, DECRETE, HOTĂRÂRI ȘI ALTE ACTE

Marti, 27 februarie 2007

SUMAR

<u>Nr.</u>		<u>Pagina</u>
	ORDONANȚE ȘI HOTĂRÂRI ALE GUVERNULUI ROMÂNIEI	
10.	— Ordonanță de urgență pentru modificarea și completarea anexei nr. 4 la Legea nr. 495/2004 privind salarizarea și alte drepturi bănești ale personalului din administrația centrală a Ministerului Afacerilor Externe și de la misiunile diplomatice, oficiile consulare și institutele culturale românești din străinătate	2
185.	— Hotărâre pentru modificarea și completarea Hotărârii Guvernului nr. 1.273/2002 privind stabilirea condițiilor de salarizare și a altor categorii de cheltuieli pentru încadrarea unui diplomat român în conducerea Inițiativei de Cooperare în Sud-Estul Europei (SECI)	3
	ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE	
22.	— Ordin al președintelui Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor privind aprobarea Normei sanitare veterinare ce stabilește metode de analiză pentru controlul oficial al furajelor privind nivelurile amidonului, proteinei brute, proteinei brute care poate fi dizolvată de pepsină și acid clorhidric, gosipolului liber și total și cu referire la activitatea pepsinei, precum și determinarea nivelurilor de tilozină și virginiamicină din furaje	4–13
520/C.	— Ordin al ministrului justiției privind aprobarea tarifelor de publicare în Buletinul procedurilor de insolvență a actelor de procedură emise de administratorii și lichidatorii judiciari	14
521/C.	— Ordin al ministrului justiției privind aprobarea tarifelor pentru eliberarea de copii de pe Buletinul procedurilor de insolvență, copii certificate de pe actele de procedură publicate și furnizarea de informații din Buletinul procedurilor de insolvență	14–16

ORDONANȚE ȘI HOTĂRÂRI ALE GUVERNULUI ROMÂNIEI**GUVERNUL ROMÂNIEI**

ORDONANȚĂ DE URGENȚĂ
pentru modificarea și completarea anexei nr. 4 la Legea nr. 495/2004
privind salarizarea și alte drepturi bănești ale personalului din administrația centrală
a Ministerului Afacerilor Externe și de la misiunile diplomatice,
oficiile consulare și institutele culturale românești din străinătate

Având în vedere importanța asigurării unui nivel optim de reprezentare al diplomatului român delegat la Inițiativa de Cooperare în Sud-Estul Europei,

ținând cont de atribuțiile reprezentantului special la Inițiativa de Cooperare în Sud-Estul Europei (Southeast European Cooperative Initiative — SECI), care vizează contacte la nivel înalt în state membre ale Uniunii Europene și la Comisia Europeană, precum și în statele din Europa de Sud-Est, coordonarea și interacțiunea cu statele participante SECI, consultarea Comisiei Europene, Organizației pentru Securitate și Cooperare în Europa (OSCE), Comisiei Economice ONU pentru Europa (CEE/ONU) și altor instituții subregionale, regionale și internaționale, și de faptul că aceste acțiuni sunt complementare activităților Comisiei Europene în regiune în domeniul justiție și afaceri interne, precum și în evaluarea îndeplinirii prevederilor acordurilor de stabilizare și asociere, sunt îndeplinite condițiile legale privind urgența și caracterul extraordinar al reglementării conform art. 115 alin. (4) din Constituția României, republicată, în temeiul art. 115 alin. (4) din Constituția României, republicată,

Guvernul României adoptă prezenta ordonanță de urgență.

Articol unic. — Anexa nr. 4 la Legea nr. 495/2004 privind salarizarea și alte drepturi bănești ale personalului din administrația centrală a Ministerului Afacerilor Externe și de la misiunile diplomatice, oficiile consulare și institutele culturale românești din străinătate, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 1.136 din 1 decembrie 2004, cu modificările și completările ulterioare, se modifică și se completează după cum urmează:

1. Poziția nr. 1 va avea următorul cuprins:

Nr. crt.	Funcția de încadrare la misiune	Nivelul studiilor	Coeficientul de ierarhizare
„1	Reprezentant special SECI	S	8,00“

2. După poziția nr. 1 se introduce o nouă poziție, poziția nr. 1¹, cu următorul cuprins:

Nr. crt.	Funcția de încadrare la misiune	Nivelul studiilor	Coeficientul de ierarhizare
„1 ¹	Ambasador, emisar special pentru zonele de conflict armat, asistent diplomatic al reprezentantului special SECI	S	4,20“

3. Poziția nr. 14 va avea următorul cuprins:

Nr. crt.	Funcția de încadrare la misiune	Nivelul studiilor	Coeficientul de ierarhizare
„14	Șef birou administrativ, asistent administrativ al reprezentantului special SECI	M	1,70“

PRIM-MINISTRU
CĂLIN POPESCU-TĂRICEANU

Contrasemnează:

Ministrul afacerilor externe,
Mihai Răzvan Ungureanu

p. Ministrul finanțelor publice,
Alice Cezarina Bîtu,
 secretar de stat

București, 20 februarie 2007.

Nr. 10.

GUVERNUL ROMÂNIEI

HOTĂRÂRE

**pentru modificarea și completarea Hotărârii Guvernului nr. 1.273/2002
privind stabilirea condițiilor de salarizare și a altor categorii de cheltuieli
pentru încadrarea unui diplomat român în conducerea
Inițiativei de Cooperare în Sud-Estul Europei (SECI)**

În temeiul art. 108 din Constituția României, republicată,

Guvernul României adoptă prezenta hotărâre.

Articol unic. — Hotărârea Guvernului nr. 1.273/2002 privind stabilirea condițiilor de salarizare și a altor categorii de cheltuieli pentru încadrarea unui diplomat român în conducerea Inițiativei de Cooperare în Sud-Estul Europei (SECI), publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 850 din 25 noiembrie 2002, se modifică și se completează după cum urmează:

1. Titlul hotărârii va avea următorul cuprins:

**„HOTĂRÂRE
privind stabilirea condițiilor de salarizare
și a altor categorii de cheltuieli
pentru încadrarea personalului român
pe lângă Inițiativa de Cooperare în Sud-Estul Europei
(SECI)“**

2. După articolul 1 se introduce un nou articol, articolul 1¹, cu următorul cuprins:

„Art. 1¹. — Reprezentantul special pe lângă SECI este însoțit de 2 asistenți diplomatici și de un asistent administrativ selecționați din cadrul salariaților încadrați în centrala Ministerului Afacerilor Externe.“

3. Articolul 2 va avea următorul cuprins:

„Art. 2. — Pe perioada misiunii în străinătate salariile în valută pentru persoanele prevăzute la art. 1 și 1¹ se stabilesc potrivit Legii nr. 495/2004 privind salarizarea și alte drepturi bănești ale personalului din administrația centrală a Ministerului Afacerilor Externe și de la misiunile diplomatice, oficiile consulare și institutele culturale românești din străinătate, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 1.136 din 1 decembrie 2004, cu modificările și completările ulterioare.“

PRIM-MINISTRU

CĂLIN POPESCU-TĂRICEANU

Contrasemnează:

Ministrul afacerilor externe,

Mihai Răzvan Ungureanu

Ministrul muncii, solidarității sociale și familiei,

Gheorghe Barbu

p. Ministrul finanțelor publice,

Alice Cezarina Bîtu,

secretar de stat

București, 20 februarie 2007.

Nr. 185.

ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE

AUTORITATEA NAȚIONALĂ SANITARĂ VETERINARĂ ȘI PENTRU SIGURANȚA ALIMENTELOR

ORDIN

privind aprobarea Normei sanitare veterinare ce stabilește metode de analiză pentru controlul oficial al furajelor privind nivelurile amidonului, proteinei brute, proteinei brute care poate fi dizolvată de pepsină și acid clorhidric, gosipolului liber și total și cu referire la activitatea pepsinei, precum și determinarea nivelurilor de tilozină și virginiamicină din furaje

Văzând Referatul de aprobare nr. 70.058 din 22 ianuarie 2007, întocmit de Direcția de control și coordonare a activității farmaceutice veterinare din cadrul Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor, având în vedere prevederile art. 10 lit. b) din Ordonanța Guvernului nr. 42/2004 privind organizarea activității sanitar-veterinare și pentru siguranța alimentelor, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 215/2004, cu modificările și completările ulterioare,

în temeiul art. 3 alin. (3) și al art. 4 alin. (3) din Hotărârea Guvernului nr. 130/2006 privind organizarea și funcționarea Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor și a unităților din subordinea acesteia,

președintele Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor emite următorul ordin:

Art. 1. — Se aprobă Norma sanitară veterinară ce stabilește metode de analiză pentru controlul oficial al furajelor privind nivelurile amidonului, proteinei brute, proteinei brute care poate fi dizolvată de pepsină și acid clorhidric, gosipolului liber și total și cu referire la activitatea pepsinei, precum și determinarea nivelurilor de tilozină și virginiamicină din furaje, prevăzută în anexa care face parte integrantă din prezentul ordin.

Art. 2. — Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor, institutele veterinare centrale și direcțiile sanitar-veterinare și pentru siguranța alimentelor județene și a municipiului București vor duce la îndeplinire prevederile prezentului ordin.

Art. 3. — La data intrării în vigoare a prezentului ordin se abrogă Ordinul ministrului agriculturii, pădurilor, apelor și mediului nr. 968/2003 privind aprobarea Normei sanitare veterinare ce stabilește metode de analiză pentru controlul oficial al furajelor privind amidonul, proteina brută, proteina

brută descompusă de pepsină și acid clorhidric, estimarea activității pepsinei, a gosipolului liber și cu referire la identificarea antibioticelor din grupul tetraciclinelor, al clortetraciclinelor, oxitetraciclinelor și tetraciclinelor, a oleandomicinei și a virginiamicinei, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 59 și 59 bis din 23 ianuarie 2004.

Art. 4. — Prezentul ordin transpune prevederile Directivei Comisiei 72/199/CEE ce stabilește metode comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor, publicată în Jurnalul Oficial al Comunităților Europene (JOCE) nr. L 123 din 29 mai 1972, p. 6, astfel cum a fost modificată ultima dată de Directiva Comisiei 1999/79/CE, publicată în Jurnalul Oficial al Comunităților Europene (JOCE) nr. L 209 din 7 august 1999, p. 23.

Art. 5. — Prezentul ordin va fi publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I.

Președintele Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor,
Marian Avram

București, 1 februarie 2007.
Nr. 22.

ANEXĂ

NORMĂ SANITARĂ VETERINARĂ

ce stabilește metode de analiză pentru controlul oficial al furajelor privind nivelurile amidonului, proteinei brute, proteinei brute care poate fi dizolvată de pepsină și acid clorhidric, gosipolului liber și total și cu referire la activitatea pepsinei, precum și determinarea nivelurilor de tilozină și virginiamicină din furaje

Art. 1. — Analizele pentru controalele oficiale ale furajelor, în ceea ce privește nivelurile acestora de amidon, proteină brută, proteină brută ce poate fi descompusă de pepsină și acid clorhidric, de gosipol liber sau total și în ceea ce privește activitatea pepsinei, se efectuează utilizându-se metodele descrise în anexa nr. 1.

Art. 2. — Analizele pentru controalele oficiale ale furajelor, în ceea ce privește determinarea nivelurilor de

tilozină și virginiamicină din furaje, se efectuează utilizându-se metodele descrise în anexa nr. 2.

Art. 3. — Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor informează Comisia Europeană cu privire la actele normative și prevederile administrative necesare pentru implementarea prezentei norme sanitare veterinare.

Art. 4. — Anexele nr. 1 și 2 fac parte integrantă din prezenta normă sanitară veterinară.

I. DETERMINAREA AMIDONULUI**Metoda polarimetrică****1. Scop și domeniu de aplicare**

Această metodă se utilizează pentru determinarea nivelurilor de amidon și a produselor de degradare a amidonului cu greutate moleculară mare din furaje, în scopul verificării conformității cu Norma veterinară ce stabilește metoda de calcul pentru valoarea energetică a furajelor combinate pentru păsări, aprobată prin Ordinul președintelui Agenției Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor nr. 17/2004, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 1.020 și 1.020 bis din 4 noiembrie 2004, ce transpune în legislația națională Directiva Comisiei 86/174/CEE, și cu Norma sanitară veterinară privind circulația și utilizarea materiilor prime furajere, aprobată prin Ordinul ministrului agriculturii, pădurilor, apelor și mediului nr. 507/2003, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 683 și 683 bis din 29 septembrie 2003, ce transpune în legislația națională Directiva Consiliului 96/25/CE.

2. Principiu

Metoda cuprinde două etape. În prima etapă, proba se tratează, atunci când este fierbinte, cu acid clorhidric diluat. După clarificare și filtrare, rotația optică a soluției trebuie măsurată prin polarimetrie.

În a doua etapă, proba trebuie extrasă cu etanol 40%. După acidifierea filtratului cu acid clorhidric, clarificând și filtrând soluția, rotația optică se măsoară ca în prima etapă.

Conținutul în amidon al probei se calculează făcându-se diferența dintre cele două măsurători, multiplicată cu un factor cunoscut.

3. Reactivi

3.1. Acid clorhidric (w/w) 25%, d: 1,126 g/ml

3.2. Acid clorhidric (w/v) 1,128%

Concentrația trebuie să fie controlată prin titrare, utilizându-se o soluție de hidroxid de sodiu 0,1 mol/litru în prezența de roșu de metil (w/v) 0,1% în etanol 94% (V/V). 10 ml = 30,94 ml de NaOH 0,1 mol/litru

3.3. Soluție Carrez I: Se dizolvă în apă 21,9 g acetat de zinc $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ și 3g de acid acetic glacial. Se aduce la volum până la 100 ml cu apă

3.4. Soluție Carrez II: Se dizolvă în apă 10,6 g de ferocianură de potasiu $[K_4(Fe(CN)_6)] \cdot 3H_2O$. Se aduce la volum până la 100 ml cu apă

3.5. Etanol 40% (v/v), d : 0,948 g/ml la 20°C.

4. Aparatură

4.1. Retortă Erlenmeyer de 250 ml cu ajustare de sticlă mată standard și cu condensator de reflux

4.2. Polarimetru sau sacharimetru

5. Procedură

5.1. Prepararea probei

Se mărunțește proba până când este destul de fină pentru a trece printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm.

5.2. Determinarea rotației optice totale (P sau S) (Vezi observația 7.1)

Se cântăresc 2,5 g din proba mărunțită, cu o aproximație de mg, și se plasează într-o retortă gradată de 100 ml. Se adaugă 25 ml de acid clorhidric (pct. 3.2), se agită pentru a se obține chiar distribuția probei-test și se adaugă încă 25 ml de acid clorhidric (pct. 3.2). Se

imersază retorta în apă fiartă, agitându-se energic și constant timp de 3 minute, pentru a se preveni formarea de flocoane. Cantitatea de apă din baia de apă trebuie să fie suficientă pentru ca baia să rămână la punctul de fierbere, atunci când retorta este introdusă în aceasta.

Retorta nu trebuie să fie scoasă din baie cât timp se agită. După exact 15 minute, se scoate retorta din baie, se adaugă 30 ml de apă rece și se răcește imediat la 20°C.

Se adaugă 5 ml de soluție Carrez I (pct. 3.3) și se agită timp de un minut. Apoi se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (pct. 3.4) și se agită din nou, timp de un minut. Se aduce la volum cu apă, se omogenizează și se filtrează. Dacă filtratul nu este perfect clar (fapt ce este rar), se repetă determinarea utilizându-se o cantitate mai mare de soluții Carrez I și II, de exemplu 10 ml.

Se măsoară rotația optică a soluției într-un tub de 200 mm cu polarimetru sau cu sacharimetru.

5.3. Determinarea rotației optice (P' sau S') a substanțelor solubile în etanol 40%

Se cântăresc 5 g din probă cu o aproximație de mg, se plasează într-o retortă gradată de 100 ml și se adaugă aproximativ 80 ml de etanol (pct. 3.5) (vezi observația 7.2). Se lasă retorta să stea timp de o oră la temperatura camerei. În acest timp, se agită puternic de 6 ori, astfel încât proba-test este bine amestecată cu etanol. Se aduce la volum cu etanol (pct. 3.5), se omogenizează și se filtrează.

Se picură 50 ml din filtrat (= 2,5 g din probă) într-o retortă Erlenmeyer de 250 ml, se adaugă 2,1 ml de acid clorhidric (pct. 3.1) și se agită cu vigoare. Se echipează retorta Erlenmeyer cu un condensator de reflux și se imersează acesta din urmă într-o baie de apă fierbinte. După exact 15 minute se îndepărtează retorta Erlenmeyer din baie, se transferă conținutul într-o retortă gradată de 100 ml, clătindu-se cu puțină apă rece, și se răcește la 20°C. Se clarifică filtratul utilizându-se soluțiile Carrez I (pct. 3.3) și II (pct. 3.4), se aduce la volum cu apă, se omogenizează, se filtrează și se măsoară rotația optică, așa cum s-a indicat la pct. 5.2.

6. Calcularea rezultatelor

Conținutul de amidon (%) este calculat după cum urmează:

6.1. Măsurare cu polarimetru

$$\text{Conținut de amidon (\%)} = \frac{2000(P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

unde:

P = rotația optică totală în grade;

P' = rotația optică în grade a substanțelor solubile în etanol 40% (V/V);

$[\alpha]_D^{20}$ = rotație optică specifică de amidon pur. Valorile numerice acceptate convențional pentru acest factor sunt următoarele:

+ 185,9°: amidon din orez;

+ 185,4°: amidon din cartofi;

+ 184,6°: amidon din porumb;

+ 182,7°: amidon din grâu;

+ 181,5°: amidon din orz;

+ 181,3°: amidon din ovăz;

+ 184,0°: alte tipuri de amidon și amestecuri de amidon din furaje combinate.

6.2. Măsurarea cu zaharimetru

$$\text{Conținut de amidon} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20}} \times \frac{(2N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6 N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20}}$$

unde:

S = rotația optică totală în grade zaharimetrice;

S' = rotația optică în grade zaharimetrice a substanțelor solubile în etanol 40% (V/V);

N = greutatea în grame a sucrozei în 100 ml de apă, ce dă o rotație optică de 100 grade zaharimetrice, atunci când este măsurată utilizând un tub de 200 mm. Greutatea variază după cum urmează, în conformitate cu tipul de zaharimetru utilizat:

– 16,29 g pentru zaharimetrele franceze;

– 26,00 g pentru zaharimetrele germane;

– 20,00 g pentru zaharimetrele mixte;

$[\alpha]_D^{20}$ = rotație optică specifică a amidonului pur (vezi pct. 6.1).

6.3. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe aceeași probă trebuie să fie de maximum 0,4, în valoare absolută, pentru un conținut de amidon mai mic de 40% și 1,1%, în valoare relativă, pentru conținuturi de amidon de minimum 40%.

7. Observații

7.1. Dacă proba conține mai mult de 6% carbonați, calculați în termeni de carbonat de calciu, aceștia trebuie să fie distruși prin tratament cu exact cantitatea corespunzătoare de diluție de acid sulfuric, înainte de determinarea rotației optice totale.

7.2. În cazul produselor cu un conținut ridicat de lactoză, precum zerul pudră sau laptele praf degresat, se procedează după cum urmează: după ce se adaugă 80 ml de etanol (pct. 3.5), se echipează retorta cu un condensator de reflux și se imersează aceasta din urmă într-o baie cu apă la 50°C, timp de 30 de minute. Se lasă să se răcească și se continuă analiza așa cum s-a indicat la pct. 5.3.

7.3. În cazul în care următoarele materii furajere sunt prezente în cantitate semnificativă în furaje, pot apărea interferențe atunci când se determină conținutul de amidon prin metoda polarimetrică și, de aceea, pot fi obținute rezultate incorecte:

a) produse din sfeclă (de zahăr), cum ar fi: pulpă de sfeclă (de zahăr), melasă de sfeclă (de zahăr), pulpă melasată de sfeclă (de zahăr), borhot de sfeclă (de zahăr), zahăr (de sfeclă);

b) pulpă de citrice;

c) sămânță de in; turte de in obținute prin presare; turte de in rezultate după extracție;

d) sămânță de rapiță; turte de rapiță obținute prin presare; turte de rapiță rezultate după extracție; hoaspe de sămânță de rapiță;

e) sămânță de floarea-soarelui; turte de floarea-soarelui rezultate după extracție; sămânță de floarea-soarelui parțial decorticată, extrasă;

f) turte de copra obținute prin presare; turte de copra rezultate după extracție;

g) pulpă de cartof;

h) drojdie deshidratată;

i) produse bogate în inulină (de exemplu, tăiței și făină de topinambur);

j) jumări.

II. DETERMINAREA PROTEINEI BRUTE

1. Scop și domeniu de aplicare

Această metodă se utilizează pentru determinarea conținutului de proteină brută din furaje pe baza conținutului de azot, determinat în conformitate cu metoda Kjeldahl.

2. Principiu

Proba se digeră cu acid sulfuric în prezența unui catalizator. Soluția acidă trebuie alcalinizată cu soluție de hidroxid de sodiu. Amoniacul se distilează și se colectează într-o cantitate măsurată de acid sulfuric, al cărui exces este titrat cu o soluție standard de hidroxid de sodiu.

3. Reactivi

3.1. Sulfat de potasiu

3.2. Catalizator: oxid de cupru (II) CuO sau sulfat de cupru pentahidrat (II), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

3.3. Zinc granulat

3.4. Acid sulfuric, $\rho_{20} = 1,84\text{g/ml}$

3.5. Acid sulfuric $\text{C}(\frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.6. Acid sulfuric $\text{C}(\frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.7. Indicator roșu de metil: se dizolvă 300 mg de roșu de metil în 100 ml de etanol, $\sigma = 95-96\%$ (v/v)

3.8. Soluție de hidroxid de sodiu (poate fi utilizat gradul tehnic) $\beta = 40\text{g}/100\text{ml}$ (m/v: 40%)

3.9. Soluție c de hidroxid de sodiu = 0,25ml/l

3.10. Soluție c de hidroxid de sodiu = 0,1mol/l

3.11. Piatră ponce granulată, spălată în acid clorhidric și aprinsă

3.12. Acetanilidă (m.p. = 114°C, N = 10,36%)

3.13. Sucroză (liberă de azot).

4. Aparatură

Aparatură potrivită pentru efectuarea digestiei, distilării și titrării, în conformitate cu procedura Kjeldahl.

5. Procedură

5.1. Digestie

Se cântărește 1 g de probă cu o aproximație de 0,001 g și se transferă în retorta aparatului de digestie. Se adaugă 15 g de sulfat de potasiu (pct. 3.1), o cantitate corespunzătoare de catalizator (pct. 3.2) [0,3 până la 0,4 g de oxid de cupru (II) sau 0,9 până la 1,2 g de sulfat de cupru pentahidrat(II)], 25 ml de acid sulfuric (pct. 3.4) și câteva granule de piatră ponce (pct. 3.11) și se amestecă. Se încălzește mai întâi retorta cu moderație, rotindu-se din când în când, dacă este necesar, până când masa de probă s-a carbonizat și spuma a dispărut. Se încălzește apoi mai intens până când lichidul fierbe constant. Încălzirea este adecvată dacă acidul fierț condensează pe pereții retortei. Se previne ca pereții să devină supraîncălziți și ca particule organice să se lipească pe aceștia. Când soluția devine clară și verde deschis, se continuă să se fiarbă timp de încă două ore, apoi se lasă să se răcească.

5.2. Distilare

Se adaugă cu grijă destulă apă pentru dizolvarea completă a sulfatilor. Se lasă să se răcească și apoi se adaugă câteva granule de zinc (pct. 3.3).

Se plasează în retorta de colectare a aparatului de distilare o cantitate exactă măsurată de 25 ml de acid sulfuric (pct. 3.5 sau 3.6), depinzând de conținutul de azot estimat. Se adaugă câteva picături de indicator de roșu de metil (pct. 3.7).

Se conectează retorta de digestie la condensatorul aparatului de distilare și se imersează porțiunea terminală a condensatorului în lichidul conținut în retorta de colectare, la o adâncime de cel puțin 1 cm (vezi observația de la pct. 8.3). Se toarnă încet 100 ml de soluție de hidroxid de sodiu (pct. 3.8) în retorta de digestie, fără a se pierde amoniac (vezi observația de la pct. 8.1).

Se încălzește retorta până când amoniacul s-a distilat.

5.3. Titrare

Se titrează excesul de acid sulfuric în retorta de colectare cu soluție de hidroxid de sodiu (pct. 3.9 sau 3.10), depinzând de concentrația de acid sulfuric utilizată, până când este atins punctul final.

5.4. Test martor

Pentru a se confirma că reactivii sunt liberi de azot, se efectuează un test martor (digestie, distilare și titrare), utilizându-se 1 g de sucroză (pct. 3.13) în locul probei.

6. Calcularea rezultatelor

Conținutul în proteină brută este calculat în conformitate cu următoarea formulă:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

unde:

V_0 = volumul (ml) de NaOH (pct. 3.9 sau pct. 3.10) utilizat la testul martor;

V_1 = volumul (ml) de NaOH (pct. 3.9 sau pct. 3.10) utilizat la titrarea probei;

c = concentrația (mol/l) de hidroxid de sodiu (pct. 3.9 sau pct. 3.10);

m = masa probei (g).

7. Verificarea metodei

7.1. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele, efectuate pe aceeași probă, trebuie să fie de maximum:

– 0,2% în valoare absolută, pentru un conținut de proteină brută mai mic de 20%;

– 1,0% relativ la valoarea mai mare, pentru un conținut de proteină brută de la 20% la 40%;

– 0,4% în valoare absolută, pentru un conținut de proteină brută de peste 40%.

7.2. Acuratețe

Se efectuează analiza (digestie, distilare și titrare) pe 1,5 până la 2 g de acetanilidă (pct. 3.12), în prezența a 1 g de sucroză (pct. 3.13); 1 g de acetanilidă consumă 14,8 ml de acid sulfuric (pct. 3.5). Recuperarea trebuie să fie de cel puțin 99%.

8. Observații

8.1. Aparatura poate fi de tip manual, semiautomat sau automat. Dacă aparatura necesită transferul între fazele de digestie și de distilare, acest transfer trebuie să fie efectuat fără pierdere. Dacă retorta aparatului de distilat nu este echipată cu o pâlnie, se adaugă imediat, înainte de conectarea retortei la condensator, hidroxid de sodiu, turnând încet pe pereți.

8.2. Dacă materialul digerat se solidifică, se reîncepe determinarea, utilizându-se o cantitate mai mare de acid sulfuric (pct. 3.4) decât cea specificată anterior.

8.3. Pentru produse cu un conținut scăzut de azot, volumul de acid sulfuric (pct. 3.6) ce trebuie plasat în retorta de colectare poate fi redus până la 10 sau 15 ml, dacă este necesar, și se aduce la volum cu apă până la 25 ml.

III. DETERMINAREA PROTEINEI BRUTE DESCOMPUSE DE PEPSINĂ ȘI ACID CLORHIDRIC

1. Scop și domeniu de aplicare

Această metodă se utilizează pentru determinarea fracțiunii de proteină brută descompusă de pepsină și acid clorhidric în baza condițiilor definite. Aceasta este aplicabilă tuturor furajelor.

2. Principiu

Proba trebuie încălzită timp de 48 de ore, la 40°C, într-o soluție clorhidrică de pepsină. Suspensia trebuie filtrată, iar conținutul în azot al filtratului, determinat în conformitate cu metoda pentru determinarea proteinei brute.

3. Reactivi

3.1. Acid clorhidric, d: 1,125

3.2. Acid clorhidric, 0,075 N

3.3. 2,0 U/mg pepsină. Activitatea pepsinei este definită de metoda descrisă în partea a 4-a a acestei anexe și trebuie să fie stabilită în conformitate cu acea metodă.

3.4. Aproximativ 0,2% (w/v) soluție proaspăt preparată de acid clorhidric (pct. 3.2); Activitate: 400 U/L

3.5. Emulsie antispumă (de exemplu, silicon).

3.6. Toți reactivii menționați la pct. 3 pentru metoda de determinare a proteinei brute.

4. Aparatură

4.1. Baie de apă sau incubator, fixat la 40°C ± 1°C

4.2. Aparatură de digestie și de distilare Kjeldahl.

5. Procedură

5.1. Prepararea soluției (vezi observația 7.2)

Se cântăresc 2 g din probă, cu o aproximație de mg, și se plasează într-o retortă gradată de 500 ml. Se adaugă 450 ml de soluție clorhidrică de pepsină (pct. 3.4), încălzită anterior la 40°C, și se agită pentru a se preveni formarea flocoanelor. Se controlează ca pH-ul suspensiei să fie mai mic de 1,7. Se plasează retorta într-o baie de apă sau incubator (pct. 4.1) și se lasă acolo timp de 48 de ore. Se agită după 8, 24 și 32 de ore. După 48 de ore se adaugă 15 ml de acid clorhidric (pct. 3.1), se răcește până la 20°C, se aduce la volum cu apă și se filtrează.

5.2. Digestia

Se iau 250 ml de filtrat și se plasează în retorta aparatului de distilare (pct. 4.2). Se adaugă reactivii necesari pentru digestia indicată în a doua propoziție a pct. 5.1 din metoda pentru determinarea proteinei brute. Se omogenizează și se aduce la fierbere. Dacă se formează orice spumă, se adaugă câteva picături de emulsie antispumă (pct. 3.5). Se continuă fierberea cu vigoare până când apa s-a evaporat aproape complet. Se reduce căldura și se elimină cu atenție ultimele urme de apă.

Când soluția devine clară și incoloră (sau verde deschis, dacă este utilizat un catalizator pe bază de cupru), se continuă fierberea timp de încă o oră. Se lasă să se răcească.

5.3. Distilare și titrare

Se procedează, așa cum s-a indicat la pct. 5.2 și 5.3 din metoda pentru determinarea proteinei brute.

5.4. Test martor

Se efectuează un test martor, aplicându-se aceeași procedură, dar omițându-se proba ce trebuie analizată.

6. Calcularea rezultatelor

Se scade volumul de acid sulfuric consumat la testul martor din cel consumat la proba-test. 1 ml de acid sulfuric 0,1 N corespunde la 1,4 mg de azot.

Se multiplică cantitatea de azot cu factorul 6,25. Se exprimă rezultatul ca procent din probă.

Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele, efectuate pe aceeași probă, trebuie să fie de maximum:

- 0,4, în valoare absolută, pentru un conținut mai mic de 20%;
- 2,0%, în valoare absolută, pentru un conținut peste 20% și nu mai mult de 40%;
- 0,8, în valoare absolută, pentru un conținut de peste 40%.

7. Observații

7.1. Valorile obținute prin această metodă nu au conexiune directă cu digestibilitatea *in vivo*.

7.2. Produsele cu un conținut în ulei sau grăsime ce depășește 10% trebuie mai întâi să fie degresate prin extracție cu eter petrol (B.P. 40°C până la 60°C).

IV. ESTIMAREA ACTIVITĂȚII PEPSINEI**1. Scop și domeniu de aplicare**

Această metodă se utilizează la stabilirea activității de pepsină utilizată în determinarea proteinei brute descompuse de pepsină și acid clorhidric.

2. Principiu

Hemoglobina trebuie tratată cu pepsină, într-un mediu de acid clorhidric, în baza condițiilor definite. Frațiunea nehidrolizată a proteinei este precipitată în acid tricloracetic. Sunt adăugate filtratului hidroxid de sodiu și reactiv Folin-Ciocalteu. Densitatea optică a acestei soluții trebuie măsurată la lungimea de undă de 750 nm, iar cantitatea corespunzătoare de tirozină trebuie citită de pe curba de calibrare.

Definiție: Unitatea de pepsină este definită ca fiind cantitatea din acea enzimă ce, în baza condițiilor metodei, eliberează pe minut o anumită cantitate din grupele hidroxilic care, atunci când intră în contact cu reactivul Folin-Ciocalteu, are o densitate optică corespunzătoare celei la care un μmol de tirozină reacționează în aceeași manieră.

3. Reactivi

- 3.1. Acid clorhidric 0,2 N
- 3.2. Acid clorhidric 0,06 N
- 3.3. Acid clorhidric 0,025 N
- 3.4. Soluție 5% (w/v) de acid tricloracetic
- 3.5. Soluție de hidroxid de sodiu 0,5 N
- 3.6. Reactiv Folin-Ciocalteu.

Se plasează 100 g de tungstat de sodiu ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g de molibdat de sodiu ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) și 700 ml de apă într-o retortă cu fundul rotund de 2 litri echipată cu o îmbinare standard de sticlă mată. Se adaugă 50 ml de acid fosforic (d:1,71) și 100 ml de acid clorhidric concentrat (d: 1,19), se conectează un condensator de reflux la retortă, se aduce la fierbere și se ține soluția fierbând ușor timp de 10 ore. Se lasă să se răcească, se detașează condensatorul de reflux, se adaugă 175 g de sulfat de litiu ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 50 ml de apă și 1 ml de bromură. Se fierbe timp de 15 minute pentru a se elimina excesul de bromură.

Se lasă să se răcească, se transferă soluția într-o retortă gradată de un litru, se aduce la volum cu apă, se omogenizează și se filtrează. Nu trebuie să rămână nicio colorație verzuie. Înainte de utilizare se diluează un volum de reactiv cu două volume de apă.

3.7. Soluție de hemoglobină

Se cântărește o cantitate de hemoglobină (aproximativ 2 g de substrat proteic determinat în conformitate cu Anson) ce corespunde la 354 mg de azot⁽¹⁾ și se plasează într-o retortă de 200 ml echipată cu o îmbinare standard de sticlă mată.

Se adaugă câțiva ml de acid clorhidric (pct. 3.2), se conectează retorta la pompa de vacuum și se agită până când hemoglobina a fost dizolvată complet. Se eliberează vacuumul și se adaugă, în timp ce se agită, acid clorhidric (pct. 3.2), se completează până la 100 ml. Se prepară imediat înainte de utilizare.

3.8. Soluție standard de tirozină

Se dizolvă 181,2 mg de tirozină în acid clorhidric (pct. 3.1) și se completează până la un litru cu același acid (soluție Stick). Se iau 20 ml și se diluează până la 100 ml cu acid clorhidric (pct. 3.1). 1 ml din această soluție conține 0,2 μmol de tirozină.

4. Aparatură

- 4.1. Baie de apă fixată la $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ prin ultratermostat
- 4.2. Spectrofotometru
- 4.3. Cronometru, acuratețe: o secundă
- 4.4. Ph-metru.

5. Procedură

5.1. Prepararea soluției (vezi observația de la pct. 7.1)

Se dizolvă 150 mg de pepsină în 100 ml de acid clorhidric (pct. 3.2). Se pipetează 2 ml din soluție într-o retortă gradată de 50 ml și se aduce la volum cu acid clorhidric (pct. 3.3). Ph-ul, controlat cu ph-metru, trebuie să fie de $1,6 \pm 0,1$. Se imersează retorta într-o baie de apă (pct. 4.1).

5.2. Hidroliză

Se pipetează 5,0 ml de soluție de hemoglobină (pct. 3.7) într-o eprubetă, se încălzește într-o baie de apă la 25°C (pct. 4.1), se adaugă 1 ml de soluție de pepsină obținută ca la pct. 5.1 și se amestecă cu o baghetă de sticlă îngroșată la un capăt, cu aproximativ 10 mișcări înainte și înapoi. Se lasă eprubeta într-o baie de apă la 25°C , exact 10 minute, măsurate de la adăugarea soluției de pepsină (trebuie să fie respectate cu strictețe durata și temperatura). Apoi se adaugă 10,0 ml de soluție de acid tricloracetic (pct. 3.4), încălzită anterior la 25°C , se omogenizează și se filtrează printr-un filtru uscat.

5.3. Evoluția colorării și măsurarea densității optice

Se pipetează 5,0 ml de filtrat într-o retortă Erlenmeyer de 50 ml, se adaugă 10,0 ml de soluție de hidroxid de sodiu (pct. 3.5) și, agitându-se constant, 3 ml de reactiv Folin-Ciocalteu diluat (pct. 3.6). După 5 până la 10 minute, se determină densitatea optică a soluției cu spectrofotometru la 750 nm în celule de 1 cm impermeabile.

5.4. Test martor

Pentru fiecare determinare se efectuează un test martor, după cum urmează: Se pipetează 5 ml de soluție de hemoglobină (pct. 3.7) într-o eprubetă, se încălzește într-o baie de apă la 25°C (pct. 4.1), se adaugă 10,0 ml de soluție de acid tricloracetic (pct. 3.4) încălzită anterior la 25°C , se omogenizează, apoi se adaugă 1,0 ml de soluție de pepsină obținută la pct. 5.1. Se amestecă cu o baghetă de sticlă și se lasă eprubeta în baia de apă (pct. 4.1) la 25°C pentru exact 10 minute. Se omogenizează și se filtrează printr-un filtru uscat. Se urmează procedura indicată la pct. 5.3.

⁽¹⁾ Se determină conținutul în azot prin metoda semi-micro Kjeldahl (conținutul teoretic: 17,7% de azot).

5.5. Curba de calibrare

Se plasează 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 și 5,0 ml alicote de soluție standard de tirozină (pct. 3.8), corespunzând la 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 și 1,0 μ moli de tirozină respectiv, în retorte Erlenmeyer de 50 ml. Se încheie seriile cu o soluție de referință liberă de tirozină. Se aduce la volum până la 5 ml cu acid clorhidric (pct. 3.1). Se adaugă 10,0 ml de soluție de hidroxid de sodiu (pct. 3.5) și, agitându-se constant, 3 ml de diluție de reactiv Folin-Ciocalteu (pct. 3.6). Se măsoară densitatea optică, așa cum s-a indicat la ultima propoziție a pct. 5.3. Se trasează curba de calibrare prin schițarea densităților optice corelate cu cantitățile de tirozină.

6. Calcularea rezultatelor

De pe curba de calibrare se citește cantitatea de tirozină în μ moli ce corespunde densității optice a soluției colorate, corectată pe baza valorii martor.

Activitatea pepsinei, în μ moli de tirozină la 25°C per mg și per minut, se calculează utilizându-se formula:

$$\text{Unități per mg (U/mg)} = \frac{0,32a}{P},$$

unde:

a = cantitatea de tirozină în μ moli ce se citește de pe curba de calibrare;

P = greutatea în mg a cantității de pepsină adăugată la pct. 5.2.

7. Observații

7.1. Cantitatea de pepsină ce trebuie dizolvată trebuie să fie astfel încât, la măsurarea fotometrică finală, să fie obținută o densitate optică de $0,35 \pm 0,035$.

7.2. Două unități per mg, obținute prin această metodă, corespund la: 3,64 miliunități Anson/mg (μ moli de tirozină/mg . min. la 35,5°C) sau 36.400 unități comerciale/g (μ moli de tirozină/g în 10 min. la 35,5°C).

V. DETERMINAREA DE GOSIPOL LIBER

1. Scop și domeniu de aplicare

Această metodă se utilizează pentru determinarea nivelurilor de gosipol liber, de gosipol total și de substanțe chimic legate de acesta din sămânța de bumbac, făină de sămânță de bumbac și brichete de sămânță de bumbac și din furaje combinate ce conțin aceste substanțe, atunci când sunt prezente în cantitate mai mare de 20 ppm.

2. Principiu

Gosipolul trebuie extras în prezența 3-aminopropan-1-ol, fie cu un amestec de propan-2-ol și hexan, pentru determinarea gosipolului liber, sau cu dimetilformamidă, pentru determinarea gosipolului total. Gosipolul este convertit de anilină în gosipol-dianilină, a cărei densitate optică este măsurată la lungimea de undă de 440 nm.

3. Reactivi

3.1. Amestec de propan-2-ol-hexan: se amestecă 60 de părți de volum de propan-2-ol A.R. cu 40 de părți de volum de n-hexan.

3.2. Solvent A: se plasează într-o retortă gradată de 1 litru aproximativ 500 ml de amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1), 2 ml de aminopropan-1-ol, 8 ml de acid acetic glacial și 50 ml de apă. Se aduce la volum cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1). Acest reactiv este stabil timp de o săptămână.

3.3. Solvent B: se pipetează 2 ml de 3-aminopropan-1-ol și 10 ml de acid acetic glacial într-o retortă gradată de 100 ml. Se răcește la temperatura camerei și se aduce la

volum cu N, N-dimetilformamidă. Acest reactiv este stabil timp de o săptămână.

3.4. Anilină A.R.: Dacă densitatea optică a testului martor depășește 0,022, se distilează anilina peste praf de zinc, aruncând prima și ultima fracțiune de 10% a distilatului. Refrigerat și depozitat într-o retortă maro cu dop de sticlă, acest reactiv se va ține timp de câteva luni.

3.5. Soluție standard A de gosipol: Se plasează 27,9 mg de acetat de gosipol într-o retortă gradată de 250 ml. Se dizolvă și se aduce la volum cu solvent A (pct. 3.2). Se pipetează 50 ml din această soluție într-o retortă gradată de 250 ml și se aduce la volum cu solvent A. Concentrația în gosipol a acestei soluții este de 0,02 mg per ml. Se lasă să stea timp de o oră la temperatura camerei înainte de utilizare.

3.6. Soluție B standard de gosipol: Se plasează 27,9 mg de acetat de gosipol într-o retortă gradată de 50 ml. Se dizolvă și se aduce la volum cu solvent B (pct. 3.3). Concentrația de gosipol a acestei soluții este de 0,5 mg per ml.

Soluțiile standard A și B de gosipol vor rămâne stabile timp de 24 de ore, dacă au fost ferite de lumină.

4. Aparatură

- 4.1. Mixer (cu pahar): aproximativ 35 rpm.
- 4.2. Spectrofotometru.

5. Procedură

5.1. Probă-test

Cantitatea de probă-test utilizată depinde de conținutul estimat de gosipol al probei. Este preferabil să se lucreze cu o probă-test mică și cu o parte relativ mare de alicotă a filtratului, astfel încât să se obțină suficient gosipol, pentru ca să fie posibilă măsurarea fotometrică precisă. Pentru determinarea de gosipol liber din sămânță de bumbac, făină de sămânță de bumbac și din brichetele de sămânță de bumbac, proba-test nu trebuie să depășească 1 g. Pentru furaje combinate, aceasta poate fi de maximum 5 g. O parte de alicotă de 10 ml din filtrat este corespunzătoare în majoritatea cazurilor. Aceasta trebuie să conțină 50 până la 100 μ g de gosipol. Pentru determinarea gosipolului total, proba-test trebuie să fie între 0,5 și 5 g, pentru ca o parte de 2 ml de alicotă din filtrat să conțină 40 până la 200 μ g de gosipol.

Analiza trebuie să fie efectuată la o temperatură a camerei de aproximativ 20°C.

5.2. Determinarea de gosipol liber

Se plasează proba-test într-o retortă cu gât strâmt de 250 ml, fundul retortei fiind acoperit cu sticlă pisată. Utilizându-se o pipetă, se adaugă 50 ml de solvent A (pct. 3.2), se astupă retorta și se amestecă timp de o oră cu mixerul. Se filtrează printr-un filtru uscat și se colectează filtratul într-o retortă cu gâtul strâmt. Se acoperă pâlnia în timpul filtrării cu o sticlă de ceas. Se pipetează părți identice de alicotă din filtrat ce conține 50 până la 100 μ g de gosipol în fiecare din cele două retorte gradate de 25 ml (A și B). Dacă este necesar, se aduce la volum până la 10 ml cu solventul A (pct. 3.2). Apoi se aduce la volum conținutul retortei (A) cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1). Această soluție este utilizată ca soluție de referință față de care se măsoară soluția probei.

Se pipetează 10 ml de solvent A (pct. 3.2) în fiecare dintre celelalte două retorte gradate de 25 ml (C și D). Se aduce la volum conținutul retortei (C) cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1). Această soluție este utilizată ca soluție de referință față de care se măsoară soluția testului martor.

Se adaugă 2 ml de anilină (pct. 3.4) în fiecare dintre retorte (D) și (B). Se încălzește timp de 30 de minute deasupra unei băi de apă fierbinte, pentru a dezvolta culoarea. Se răcește la temperatura camerei, se aduce la volum cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1), se omogenizează și se lasă să stea timp de o oră.

Se determină densitatea optică a soluției testului martor (D) prin comparare cu soluția de referință (C) și densitatea optică a soluției probei (B) prin comparare cu soluția de referință (A), cu spectrofotometru la o lungime de undă de 440 nm, utilizându-se celule de sticlă de 1 cm.

Se scade densitatea optică a soluției testului martor din cea a soluției probei (= densitatea optică corectată). Din această valoare se calculează conținutul în gosipol liber, așa cum s-a indicat la pct. 6.

5.3. Determinarea gosipolului total

Se plasează o probă-test ce conține 1 până la 5 mg de gosipol într-o retortă gradată de 50 ml și se adaugă 10 ml de solvent B (pct. 3.3). În același timp, se prepară un test martor, plasând 10 ml de solvent B (pct. 3.3) în altă retortă gradată de 50 ml. Se încălzesc cele două retorte timp de 30 de minute deasupra unei băi de apă fierbinte. Se răcește la temperatura camerei și se aduce la volum conținutul fiecărei retorte cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1), se omogenizează și se lasă să sedimenteze timp de 10 până la 15 minute, apoi se filtrează și se colectează filtratele în retorte de sticlă mată cu gât strâmt.

Se pipetează 2 ml de filtrat al probei în fiecare dintre cele două retorte gradate de 25 ml și încă 2 ml de filtrat al probei martor în fiecare dintre alte două retorte de 25 ml. Se aduce la volum conținutul unei retorte din fiecare serie până la 25 ml, cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1). Aceste soluții sunt utilizate ca soluții de referință.

Se adaugă 2 ml de anilină (pct. 3.4) în fiecare dintre cele două retorte. Se încălzește timp de 30 de minute deasupra unei băi de apă fierbinte, pentru a dezvolta culoarea. Se răcește la temperatura camerei, se aduce la volumul de 25ml cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1), se omogenizează și se lasă să sedimenteze timp de o oră.

Se determină densitatea optică, așa cum s-a indicat la pct. 5.2 pentru gosipolul liber. Din această valoare se calculează conținutul de gosipol liber, așa cum s-a indicat la pct. 6.

6. Calcularea rezultatelor

Rezultatele pot fi calculate fie pornindu-se de la densitatea optică specifică (pct. 6.1), fie prin referire la o curbă de calibrare (pct. 6.2).

6.1. Utilizarea densității optice specifice

Densitățile optice specifice, în baza condițiilor descrise, sunt următoarele:

$$\text{gosipol liber: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{gosipol total: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Conținutul de gosipol liber și total al probei este calculat după următoarea formulă:

$$\% \text{ gosipol} = \frac{E \times 1250}{E_{1 \text{ cm}}^{1\%} \times p \times a},$$

unde:

E = densitatea optică corectată, determinată așa cum s-a indicat la pct. 5.2;

p = proba-test, în g;

a = parte de alicotă a filtratului, în ml;

6.2. Utilizarea curbei de calibrare

6.2.1. Gosipol liber

Se prepară două serii de cinci retorte gradate de 25 ml. Se pipetează alicote de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 și 10,0 de soluție standard A de gosipol (pct. 3.5) în fiecare serie de retorte. Se aduce la volum până la 10 ml cu solvent A (pct. 3.2). Se completează fiecare serie cu o retortă gradată de 25 ml care conține numai 10 ml de solvent A (pct. 3.2) (test martor).

Se aduc la volum retortele din primele serii (incluzând retorta pentru testul martor) până la 25 ml cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1) (serii de referință).

Se adaugă 2 ml de anilină (pct. 3.4) pentru fiecare retortă din a doua serie (incluzând retorta pentru testul blank). Se încălzește timp de 30 de minute într-o baie de apă fierbinte pentru a dezvolta culoarea. Se răcește la temperatura camerei, se aduce la volum cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1), se omogenizează și se lasă să stea timp de o oră (serii standard).

Densitatea optică a soluțiilor din seriile standard se determină, așa cum s-a indicat la pct. 5.2, prin comparare cu soluțiile corespunzătoare din seriile de referință. Se trasează curba de calibrare prin schițarea densității optice în raport cu cantitățile de gosipol (în μg).

6.2.2. Gosipol total

Se prepară 6 retorte gradate de 50 ml. În prima retortă se plasează 10 ml de solvent B (pct. 3.3), iar în celelalte se plasează respectiv 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 și 10,0 ml de soluție standard B de gosipol (pct. 3.6). Se umple conținutul fiecărei retorte până la 10 ml cu solvent B (pct. 3.3). Se încălzește timp de 30 de minute într-o baie de apă fierbinte. Se răcește la temperatura camerei, se umple volumul cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1) și se omogenizează.

Se plasează 2,0 ml din aceste soluții în fiecare dintre cele două serii de 6 retorte gradate de 25 ml. Se umple conținutul retortelor din prima serie până la 25 ml cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1) (serii de referință).

Se adaugă 2 ml de anilină (pct. 3.4) în fiecare retortă dintre cele două serii. Se încălzește timp de 30 de minute într-o baie cu apă fierbinte. Se răcește la temperatura camerei, se aduce la volum cu amestec de propan-2-ol-hexan (pct. 3.1), se omogenizează și se lasă să stea timp de o oră (serii standard).

Se determină densitatea optică a soluțiilor din seriile standard, așa cum s-a indicat la pct. 5.2, prin comparare cu soluțiile corespunzătoare din seriile de referință. Se trasează curba de calibrare prin schițarea densității optice în raport cu cantitățile de gosipol (în μg).

6.3. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele celor două determinări paralele efectuate pe aceeași probă trebuie să fie de maximum:

a) 15%, în valoare absolută, pentru conținut de gosipol mai mic de 500 ppm;

b) 75 ppm, în valoare absolută, pentru conținut de gosipol de minimum 500 ppm și maximum 750 ppm;

c) 10%, în valoare absolută, pentru conținut de gosipol mai mare de 750 ppm.

I. DETERMINAREA TILOZINEI

— prin difuziune pe agar —

1. Scop și domeniu de aplicare

Această metodă se utilizează pentru determinarea conținutului de tilozină din furaje, concentrate și premixuri, atunci când este prezentă în cantitate mai mare de 2 ppm.

2. Principiu

Proba trebuie tratată cu o soluție tampon fosfat la pH 8, încălzită anterior la 80°C și apoi extrasă cu metanol. După centrifugare, extrasul trebuie diluat și determinată activitatea antibiotică a acestuia prin măsurarea difuziei tilozinei pe mediu de agar însămânțat cu *Sarcina lutea*. Difuzia este evidențiată prin formarea de zone de inhibiție în prezența microorganismului. Diametrul acestor zone este direct proporțional cu logaritmul concentrației de antibiotic.

3. Microorganism: *Sarcina lutea* ATCC nr. 9341

3.1. Întreținerea tulpinii parentale

Se inoculează cu *Sarcina lutea* un tub de agar înclinat prelevat din mediul de cultură (pct. 4.1), se ajustează până la pH 7,0. Se incubează peste noapte la aproximativ 35°C. Se ține cultura într-un refrigerat și se reinoculează agarul înclinat cu aceasta în fiecare lună.

3.2. Prepararea suspensiei bacteriene

Se colectează bacteriile dintr-o eprubetă cu agar înclinat, recent preparată (pct. 3.1), utilizându-se 2 până la 3 ml de soluție fiziologică salină (pct. 4.4). Cu această suspensie se însămânțează o retortă Roux ce conține 250 ml mediu de cultură (pct. 4.1), ajustat la pH 7,0. Se incubează timp de 24 de ore, la 35°C, apoi se colectează bacteriile în 25 ml de ser fiziologic (pct. 4.4). Se omogenizează și se diluează această suspensie pentru a se obține o transmisie a luminii de aproximativ 75% la 650 nm.

Această soluție poate fi utilizată timp de o săptămână, dacă a fost ținută într-un refrigerat.

Prin teste preliminare pe plăcuțe cu mediu primar pentru determinare (pct. 4.1) se stabilește cantitatea de inocul care, pentru diferite concentrații de tilozină utilizate, va induce cele mai mari zone de inhibiție posibile ce sunt încă clare. Mediul de cultură este inoculat la temperaturi între 48 până la 50°C.

4. Medii de cultură și reactivi

4.1. Mediu primar pentru determinare (1)

Glucoză	1 g
Peptonă triptică	10 g
Extract de carne	1,5 g
Extract de drojdie	3 g
Agar, conform cu calitatea	10 până la 20 g
Apă distilată	până la 1.000 ml

Se ajustează pH-ul la 7, imediat înainte de utilizare, pentru a se întreține tulpina parentală și prepararea suspensiei de bacterii și la pH 8 pentru determinare.

4.2. Soluție tampon fosfat, pH 8

Fosfat de potasiu dehidrogenat	0,523 g
KH_2PO_4 A.R.	
Fosfat de dipotasiu hidrogenat	16,730 g
K_2HPO_4 A.R.	
Apă distilată	până la 1.000 ml

4.3. Soluție tampon fosfat, pH 7

Fosfat de potasiu dehidrogenat	5,5 g
KH_2PO_4 A.R.	
Fosfat de dipotasiu hidrogenat	13,6 g
K_2HPO_4 A.R.	
Apă distilată	până la 1.000 ml

4.4. Ser fiziologic steril.

4.5. Metanol pur.

4.6. Metanol 40% (v/v)

4.7. Amestec de soluție tampon fosfat (pct. 4.2)/metanol pur: 60/40 ca volum.

4.8. Substanță standard: tilozină cu activitate cunoscută.

5. Soluții standard

Se usucă substanța standard (pct. 4.8) timp de 3 ore la 60°C într-un cuptor cu vacuum (5 mm de mercur). Se cântăresc 10 până la 50 mg într-o retortă gradată, se dizolvă în 5 ml de metanol (pct. 4.5) și se diluează soluția cu soluție tampon fosfat, pH 7 (pct. 4.3), pentru a se obține o concentrație de tilozină bază de 1.000 μg per ml.

Se prepară din această soluție de stoc o soluție standard de lucru S_8 ce conține 2 μg per ml de tilozină bază prin diluare cu amestecul (pct. 4.7).

Se prepară apoi prin diluții succesive (1+1), utilizându-se amestecul (pct. 4.7), următoarele concentrații:

S_4	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
S_2	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
S_1	0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$

6. Extracție

Pentru concentrate, se ia o probă-test de 10 g; pentru premixuri și furaje, o probă test de 20 g. Se adaugă 60 ml de soluție tampon fosfat, pH 8 (pct. 4.2), încălzită anterior până la 80°C, și se omogenizează timp de două minute (cu mixer domestic, Ultra-turrax etc).

Se lasă să sedimenteze timp de 10 minute, se adaugă 40 ml de metanol (pct. 4.5) și se omogenizează timp de 5 minute. Se centrifughează extractul și se diluează o parte alicotă cu amestecul (pct. 4.7), pentru a se obține o concentrație prezumtivă de tilozină de 2 μg per ml (= U_8). Se prepară apoi concentrațiile U_4 , U_2 și U_1 prin diluții succesive (1 + 1), utilizându-se amestecul (pct. 4.7).

Pentru un conținut mai mic de 10 ppm, se evaporă extractul până se usucă, într-un evaporator rotativ la 35°C, și se dizolvă reziduul în metanol 40% (pct. 4.6).

7. Metodă de determinare

7.1. Inocularea mediului de cultură

Se inoculează mediul primar pentru determinare, la 48 până la 50°C (pct. 4.1), se ajustează până la pH 8,0, cu suspensie de bacterii (pct. 3.2).

7.2. Prepararea plăcilor

Difuzia în agar este efectuată pe plăci, utilizându-se 4 concentrații de soluții standard (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) și 4 concentrații ale extractului (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Cele 4 concentrații ale soluției standard și ale extractului trebuie să fie plasate în fiecare placă.

De aceea, se alege tăvi ce sunt destul de mari pentru a permite ca cel puțin 8 godeuri cu diametrul de 10 până la 13 mm să fie realizate în mediu de agar. Se calculează necesarul de mediu de cultură de inoculat (pct. 7.1) pentru a se furniza o acoperire uniformă de aproximativ 2 mm grosime. Testul trebuie să fie efectuat, de preferință, pe plăci ce constau din plăci plate de sticlă, echipate cu un

inel din aluminiu sau plastic perfectat la nivel, cu diametrul de 200 mm și înalt de 20 mm.

Se pipetează în godeuri cantitățile măsurate cu acuratețe între 0,1 și 0,15 ml de soluție antibiotică, depinzând de diametrul godeurilor.

Pentru fiecare probă se repetă difuzia de cel puțin 4 ori cu fiecare concentrație, în așa fel încât fiecare determinare să cuprindă o evaluare de 32 de zone de inhibiție.

7.3. Incubare

Se incubează tăvile peste noapte, la 35 până la 37°C.

8. Evaluare

Se măsoară diametrul zonelor de inhibiție, de preferință prin proiectare. Se înregistrează măsurătorile pe hârtie semilogaritmă, împărțind logaritmul concentrațiilor la diametrul zonelor de inhibiție. Se urmăresc liniile soluției standard și ale extractului. Cele două linii sunt paralele, cu condiția să nu existe nicio interferență.

Logaritmul activității relative este calculat utilizându-se următoarea formulă:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Activitate reală = activitate prezumată x activitate relativă.

9. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele, efectuate pe aceeași probă, nu trebuie să depășească 10% în valoare relativă.

II. DETERMINAREA VIRGINIAMICINEI

— prin difuziune pe un mediu de agar —

1. Scop și domeniu de aplicare

Metoda se utilizează pentru determinarea virginiamicinei din furaje și premixuri. Limita cea mai joasă de determinare este 2 mg/kg (2 ppm)⁽¹⁾.

2. Principiu

Proba trebuie extrasă cu o soluție metanolică de Tween 80. Extractul este decantat sau centrifugat și diluat. Activitatea antibiotică a acestuia se determină prin măsurarea difuziei virginiamicinei într-un mediu de agar inoculat cu *Micrococcus luteus*. Difuzia este relevată prin formarea de zone de inhibiție ale microorganismului. Diametrul acestor zone este estimat a fi direct proporțional cu logaritmul concentrației de antibiotic peste limita concentrațiilor de antibiotic utilizate.

3. Microorganism: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1. Întreținerea culturii stoc

Se inoculează eprubete ce conțin medii de cultură înclinate (pct. 4.1) cu *Micrococcus luteus* și se incubează timp de 24 de ore la 30°C. Se păstrează cultura într-un frigider, la aproximativ 4°C. Se reinoculează la fiecare două săptămâni.

3.2. Prepararea suspensiei bacteriene^(a)

Se recoltează creșterea bacteriană dintr-un agar înclinat, recent preparat (pct. 3.1) cu 2 până la 3 ml de soluție de clorură de sodiu (pct. 4.3). Se utilizează această suspensie pentru a se inocula 250 ml de cultură de mediu (pct. 4.1) conținută într-o retortă Roux și se incubează timp de 18 până la 20 de ore la 30°C. Se recoltează creșterea bacteriană în 25 ml de soluție de clorură de sodiu (pct. 4.3) și se amestecă. Se diluează suspensia până la

1/10 cu soluție de clorură de sodiu (pct. 4.3). Transmisia de lumină a suspensiei trebuie să fie de aproximativ 75%, măsurată la 650 nm, într-o celulă de 1 cm, față de soluție de clorură de sodiu. Această suspensie poate fi păstrată timp de o săptămână, la aproximativ 4°C.

4. Medii de cultură și reactivi

4.1. Mediu de cultură și de probă^(b)

Peptonă de carne	6 g
Triptonă	4 g
Extract de drojdie	3 g
Extract de carne	1,5 g
Glucoză	1 g
Agar	10 până la 20 g
Apă	1.000 ml

pH 6,5 (după stilizare).

4.2. Fosfat tampon, pH 6

Fosfat acid de potasiu, K_2HPO_4	2g
Fosfat diacid de potasiu, KH_2PO_4	8g
Apă până la	1.000 ml

4.3. Soluție de clorură de sodiu 0,8% (w/v): se dizolvă 8 g de clorură de sodiu în apă și se diluează până la 1.000 ml, apoi se sterilizează.

4.4. Metanol

4.5. Amestec de fosfat tampon (pct. 4.2)/metanol (pct. 4.4): 80/20 (v/v).

4.6. Soluție metanolică Tween 80 0,5% (w/v): se dizolvă 5 g de Tween 80 în metanol (pct. 4.4) și se diluează cu metanol până la 1.000 ml.

4.7. Substanță standard: virginiamicină cu activitate cunoscută.

5. Soluții standard

Se dizolvă o cantitate din substanța standard cântărită cu acuratețe (pct. 4.7) în metanol (pct. 4.4) și se diluează cu metanol (pct. 4.4), pentru a se obține o soluție stoc ce conține 1.000 μg de virginiamicină per ml.

Depozitată într-o retortă astupată la 4°C, această soluție este stabilă până la 5 zile.

Din această soluție stoc se prepară, prin diluție succesivă cu amestecul (pct. 4.5), următoarele soluții:

S_8	1 μg/ml;
S_4	0,5 μg/ml;
S_2	0,25 μg/ml;
S_1	0,125 μg/ml.

6. Prepararea extractului și a soluțiilor de testare

6.1. Extracție

6.1.1. Produse cu un conținut de virginiamicină de până la 100 mg/kg

Se cântărește o cantitate din probă de 50 g, se adaugă 200 ml de soluție (pct. 4.6) și se agită timp de 30 de minute. Se lasă să se sedimenteze sau se centrifughează, se iau 20 ml de soluție de supernatant și se evaporă până la aproximativ 5 ml, într-un evaporator rotativ, la o temperatură ce nu depășește 40°C. Se diluează reziduu cu amestecul (pct. 4.5), pentru a se obține un conținut de virginiamicină estimat la 1 μg/ml (= U_8).

6.1.2. Produse cu un conținut de virginiamicină mai mare de 100 mg/kg

Se cântărește o cantitate de probă ce nu depășește 10 g și care conține între 1—50 mg de virginiamicină, se adaugă 100 ml de soluție (pct. 4.6) și se agită timp de 30 de minute. Se lasă să se sedimenteze sau se centrifughează, apoi se diluează soluția de supernatant cu amestecul (pct. 4.5), pentru a se obține un conținut de virginiamicină estimat de 1 μg/ml (= U_8).

⁽¹⁾ 1 mg de virginiamicină este echivalent cu 1.000 de unități UK.

^(a) Pot fi utilizate alte metode, cu condiția să fi fost stabilit că acestea dau suspensii bacteriene similare.

^(b) Poate fi utilizat orice mediu de cultură comercial de compoziție similară și care da aceleași rezultate.

6.2. Soluții de probă

Din soluția U_8 se prepară soluții U_4 (conținut estimat: $0,5 \mu\text{g/ml}$), U_2 (conținut estimat: $0,25 \mu\text{g/ml}$) și U_1 (conținut estimat: $0,125 \mu\text{g/ml}$) prin intermediul diluției succesive (1+1) cu amestecul (pct. 4.5).

7. Procedura de testare

7.1. Inocularea mediului de testare

Se inoculează mediul de testare (pct. 4.1) cu suspensie bacteriană (pct. 3.2) la aproximativ 50°C . Prin teste preliminare pe plăci cu mediu (pct. 4.1) se determină cantitatea de suspensie bacteriană necesară pentru a induce cele mai mari și mai clare zone de inhibiție, cu concentrații variate de virginiamicină.

7.2. Prepararea plăcilor

Difuzia pe agar este efectuată pe plăci cu 4 concentrații ale soluției standard (S_8 , S_4 , S_2 și S_1) și cele patru concentrații ale soluției de testare (U_8 , U_4 , U_2 și U_1). Aceste 4 concentrații de extract și de standard trebuie neapărat să fie plasate în fiecare placă. În acest scop, se selectează plăci destul de mari pentru a permite realizarea a cel puțin 8 godeuri cu diametrul de 10 până la 13 mm și de cel puțin 30 mm între centre, ce trebuie realizate în mediu de agar. Testul poate fi efectuat pe plăci ce constau din plăci plate de sticlă echipate cu un inel perfectat la nivel, din aluminiu sau plastic, cu diametrul de 200 mm și înalt de 20 mm.

Se toarnă în plăci o cantitate de mediu (pct. 4.1), se inoculează ca la pct. 7.1, pentru a se obține o grosime de aproximativ 2 mm (60 ml pentru o placă cu diametrul de 200 mm). Se lasă să se fixeze la o poziție de nivel, se realizează godeurile și se plasează în acestea volume măsurate cu exactitate de testare și din soluții standard (între 0,1 și 0,15 ml per gaură, în conformitate cu diametrul). Se replică fiecare concentrație de cel puțin 4 ori, astfel încât fiecare determinare să fie supusă unei evaluări a 32 de zone de inhibiție.

7.3. Incubare

Se incubează plăcile timp de 16 până la 18 ore la $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

8. Evaluare

Se măsoară diametrul zonelor de inhibiție cu o aproximație de 0,1 mm. Se înregistrează măsurătorile medii pentru fiecare concentrație pe hârtie grafică semi-logaritmică, relevându-se logaritmul concentrațiilor în legătură cu diametrele zonelor de inhibiție. Se schițează liniile cele mai potrivite, atât ale soluției standard, cât și ale extractului. Se determină punctul „cel mai potrivit” pentru nivelul standard cel mai scăzut (SL), utilizându-se formula:

$$a) SL = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8}{10}$$

Se determină punctul „cel mai potrivit” pentru nivelul standard cel mai înalt (SH), utilizându-se formula:

$$b) SH = \frac{7S_8 + 4S_4 + S_2 - 2S_1}{10}$$

Se calculează în mod similar punctele „cele mai potrivite” pentru nivelul cel mai scăzut (UL) al extractului și nivelul cel mai înalt al extractului, înlocuind U_1 , U_2 , U_4 și U_8 pentru S_1 , S_2 , S_4 și S_8 în formula anterioară.

Se înregistrează valorile calculate SL și SH pe aceeași hârtie grafică și acestea se unesc, pentru a da linia „cea mai potrivită” pentru soluția standard. Se înregistrează, în mod similar, UL și UH și acestea se unesc, pentru a da linia „cea mai potrivită” pentru extract.

Liniile trebuie să fie paralele în absența oricărei interferențe. Din motive practice, liniile pot fi considerate paralele, dacă valorile (SH – SL) și (UH – UL) nu diferă cu mai mult de 10% din valoarea medie a acestora.

Dacă liniile sunt estimate a nu fi paralele, fie U_1 și U_8 sau U_8 și S_8 pot fi ignorate și SL, SH, UL și UH calculate, utilizându-se formula alternativă, pentru a da liniile alternative „cele mai potrivite”:

$$a') SL = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \text{ sau } SL = \frac{5S_2 + 2S_2 - S_8}{6}$$

$$b') SH = \frac{5S_4 + 2S_2 - S_1}{6} \text{ sau } SH = \frac{5S_8 + 2S_4 - S_2}{6}$$

și în mod similar pentru UL și UH. Trebuie să fie îndeplinite aceleași criterii de paralelism. Trebuie să fie notat în raportul final faptul că rezultatul a fost calculat pornindu-se de la 3 niveluri.

Atunci când liniile sunt considerate ca fiind paralele, se calculează logaritmul activității relative (log A) prin intermediul uneia dintre următoarele formule, depinzând dacă au fost utilizate 3 sau 4 niveluri pentru evaluarea paralelismului.

Pentru 4 niveluri:

$$c) \text{Log A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Pentru 3 niveluri:

$$d) \text{Log A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

sau

$$d') \text{Log A} = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Activitatea extractului de probă = activitatea standardului relevant x A

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Dacă se constată că activitatea relativă este în afara intervalului 0,5 până la 2,0, atunci se repetă testarea, efectuându-se ajustările corespunzătoare la concentrațiile extractului sau, dacă acest lucru nu este posibil, la soluțiile standard. Atunci când activitatea relativă nu poate fi adusă în intervalul solicitat, orice rezultat obținut trebuie să fie considerat ca aproximativ și acesta trebuie să fie notat în raportul final.

Atunci când liniile sunt considerate ca nefiind paralele, se repetă determinarea. Dacă paralelismul nu este încă atins, determinarea trebuie să fie considerată ca nesatisfăcătoare.

Se exprimă rezultatul în miligrame de virginiamicină per kilogram de furaj.

9. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele, efectuate pe aceeași probă, de același analist, trebuie să fie de maximum:

– 2 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de virginiamicină de până la 10 mg/kg;

– 20% în relație cu cea mai mare valoare pentru un conținut de 10 până la 25 mg/kg;

– 5 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de 25 până la 50 mg/kg;

– 10% în relație cu cea mai mare valoare pentru un conținut de peste 50 mg/kg.

MINISTERUL JUSTIȚIEI

ORDIN**privind aprobarea tarifelor de publicare în Buletinul procedurilor de insolvență a actelor de procedură emise de administratorii și lichidatorii judiciari**

Având în vedere dispozițiile art. 7 din Legea nr. 85/2006 privind procedura insolvenței, cu modificările ulterioare, în conformitate cu dispozițiile art. 14 din Hotărârea Guvernului nr. 460/2005 privind conținutul, etapele, condițiile de finanțare, publicare și distribuire a Buletinului procedurilor de insolvență, cu modificările și completările ulterioare, în temeiul prevederilor art. 4 pct. VIII.6 din Hotărârea Guvernului nr. 83/2005 privind organizarea și funcționarea Ministerului Justiției, cu modificările și completările ulterioare,

ministrul justiției emite următorul ordin:

Art. 1. — (1) Se aprobă tariful de publicare în Buletinul procedurilor de insolvență a actelor de procedură emise de administratorii/lichidatorii judiciari în cadrul procedurii de insolvență reglementate de Legea nr. 85/2006 privind procedura insolvenței, cu modificările ulterioare, respectiv 34 lei/pagină de document.

(2) Pentru publicarea actelor de procedură în maximum 24 de ore de la înregistrare se aplică un tarif suplimentar de 50%.

Art. 2. — (1) Tariful de publicare se calculează pe pagină de document, care conține 32 de rânduri, și include reprezentările grafice și listele anexe. În situația în care pagina de document conține până la 16 rânduri inclusiv, se aplică jumătate din tariful de publicare pe pagină.

(2) Actele de procedură trebuie să respecte un minimum de cerințe de publicare, respectiv: redactare sau export în Microsoft WORD, imprimare pe hârtie format A4 și utilizare font Times New Roman, dimensiune 10, spațiere la un rând, diacritice. Listele anexe, precum și orice reprezentare

grafică trebuie redactate sau exportate în Microsoft WORD, EXCEL și imprimate pe hârtie format A4, prin excepție A3. Fișierele în format electronic ale actelor de procedură trebuie să fie: doc, rtf, txt, xls.

(3) Actele de procedură trebuie să respecte regulile de ortografie, ortoepie și de punctuație și să nu conțină erori materiale.

Art. 3. — Oficiul Național al Registrului Comerțului stabilește cerințele de publicare pe care trebuie să le respecte actele de procedură, ori de câte ori este necesar.

Art. 4. — Tariful de publicare în Buletinul procedurilor de insolvență a actelor de procedură se actualizează anual cu rata inflației.

Art. 5. — Administratorii și lichidatorii judiciari și Oficiul Național al Registrului Comerțului vor lua măsurile necesare în vederea ducerii la îndeplinire a prevederilor prezentului ordin.

Art. 6. — Prezentul ordin se publică în Monitorul Oficial al României, Partea I.

p. Ministrul justiției,
Katalin Barbara Kibedi,
secretar de stat

București, 20 februarie 2007.
Nr. 520/C.

MINISTERUL JUSTIȚIEI

ORDIN**privind aprobarea tarifelor pentru eliberarea de copii de pe Buletinul procedurilor de insolvență, copii certificate de pe actele de procedură publicate și furnizarea de informații din Buletinul procedurilor de insolvență**

Având în vedere dispozițiile art. 7 din Legea nr. 85/2006 privind procedura insolvenței, cu modificările ulterioare, în conformitate cu dispozițiile art. 12 alin. (4) și ale art. 15 din Hotărârea Guvernului nr. 460/2005 privind conținutul, etapele, condițiile de finanțare, publicare și distribuire a Buletinului procedurilor de insolvență, cu modificările și completările ulterioare,

în temeiul prevederilor art. 4 pct. VIII.6 din Hotărârea Guvernului nr. 83/2005 privind organizarea și funcționarea Ministerului Justiției, cu modificările și completările ulterioare,

ministrul justiției emite următorul ordin:

Art. 1. — Se aprobă tarifele pentru eliberarea de către Oficiul Național al Registrului Comerțului și oficiile registrului comerțului de pe lângă tribunale de copii de pe Buletinul procedurilor de insolvență, prevăzute în anexa nr. 1.

Produs electronic destinat exclusiv informării gratuite a persoanelor fizice asupra actelor ce se publică în Monitorul Oficial al României

Art. 2. — Se aprobă tariful pentru eliberarea de către Oficiul Național al Registrului Comerțului și oficiile registrului comerțului de pe lângă tribunale de copii certificate de pe

actele de procedură publicate în Buletinul procedurilor de insolvență, prevăzut în anexa nr. 2.

Art. 3. — Se aprobă tarifele pentru furnizarea de către Oficiul Național al Registrului Comerțului și oficiile registrului comerțului de pe lângă tribunale de informații din Buletinul procedurilor de insolvență, prevăzute în anexa nr. 3, care face parte integrantă din prezentul ordin.

Art. 4. — (1) Copiile de pe Buletinul procedurilor de insolvență, copiile certificate de pe actele de procedură publicate și informațiile din Buletinul procedurilor de

insolvență se eliberează în termen de maximum 3 zile lucrătoare de la data înregistrării solicitărilor.

(2) Pentru furnizarea de informații în maximum 24 de ore de la data înregistrării solicitărilor se aplică un tarif suplimentar de 50%.

Art. 5. — Tarifele prevăzute la art. 1—3 se actualizează anual cu rata inflației.

Art. 6. — Anexele nr. 1, 2 și 3 fac parte integrantă din prezentul ordin.

Art. 7. — Prezentul ordin se publică în Monitorul Oficial al României, Partea I.

p. Ministrul justiției,
Katalin Barbara Kibedi,
secretar de stat

București, 20 februarie 2007.

Nr. 521/C.

ANEXA Nr. 1

TARIFELE
pentru eliberarea de către Oficiul Național al Registrului Comerțului și oficiile registrului
comerțului de pe lângă tribunale de copii de pe Buletinul procedurilor de insolvență

copie format A4 — o față	0,25 lei
copie format A4 — față/verso	0,35 lei

ANEXA Nr. 2

TARIFUL
pentru eliberarea de către Oficiul Național al Registrului Comerțului și oficiile registrului
comerțului de pe lângă tribunale de copii certificate de pe actele de procedură publicate
în Buletinul procedurilor de insolvență

copie certificată	4 lei + 0,2 lei/pagină certificată
-------------------	------------------------------------

ANEXA Nr. 3

TARIFELE
pentru furnizarea de către Oficiul Național al Registrului Comerțului și oficiile registrului
comerțului de pe lângă tribunale de informații din Buletinul procedurilor de insolvență

Nr. crt.	Categoriile de informații	Tariful — lei —
1.	Informații punctuale despre un debitor	
	a) date de identificare: denumirea, forma juridică, codul de identificare fiscală, numărul de înregistrare și registrul în care este înregistrat	3
	b) date de identificare a administratorului/lichidatorului judiciar: denumirea, forma juridică, codul de identificare fiscală, numărul matricol din Tabloul practicienilor în insolvență	3 pentru fiecare administrator/lichidator judiciar
	c) alte informații: sediul social al debitorului, sediul social al administratorului/lichidatorului judiciar, numărul și anul dosarului de insolvență, instanța judecătorească, tipul procedurii de insolvență, faza procedurală, alte informații	0,85 pentru fiecare dintre informațiile enumerate
	d) informații cu număr variabil de apariții: termenele de judecată, numerele de buletin în care sunt publicate acte de procedură, actele de procedură publicate, alte informații cu număr variabil de apariții, date de identificare a creditorilor*), alte informații	0,85 pentru fiecare informație distinctă extrasă

Nr. crt.	Categorii de informații	Tariful — lei —
2.	Informații serii de debitori grupate pe diferite criterii*)	
a)	arie geografică: național/județ/localitate/sector	7 + 3/debitor
b)	tipul procedurii: generală/simplificată	7 + 3/debitor
c)	faza procedurală: reorganizare judiciară/faliment	7 + 3/debitor
d)	instanța de judecată	7 + 3/debitor
e)	forma juridică de organizare	7 + 3/debitor
f)	creditor	7 + 3/debitor
g)	administrator/lichidator judiciar	7 + 3/debitor
h)	alte criterii	7 + 3/debitor
3.	Raport istoric despre un debitor (de la deschiderea procedurii de insolvență și până la data solicitării raportului sau pe anumite perioade)	20 + 3/act de procedură publicat
4.	Informații statistice în funcție de un singur criteriu	20
5.	Certificat constatator dacă un act de procedură este sau nu este înregistrat și publicat în Buletinul procedurilor de insolvență	30

- *) Tarifele se reduc în funcție de numărul de debitori/creditori despre care se solicită informații:
- între 11—50 de debitori/creditori: 10%;
 - între 51—100 de debitori/creditori: 20%;
 - între 101—1.000 de debitori/creditori: 30%;
 - peste 1.000 de debitori/creditori: 50%.

EDITOR: PARLAMENTUL ROMÂNIEI — CAMERA DEPUTAȚILOR

„Monitorul Oficial“ R.A., Str. Parcului nr. 65, sectorul 1, București; C.I.F. RO427282,
 IBAN: RO55RNCB0082006711100001 Banca Comercială Română — S.A. — Sucursala „Unirea“ București
 și IBAN: RO12TREZ7005069XXX000531 Direcția de Trezorerie și Contabilitate Publică a Municipiului București
 (alocat numai persoanelor juridice bugetare)
 Tel. 318.51.29/150, fax 318.51.15, E-mail: marketing@ramo.ro, Internet: www.monitoruloficial.ro
 Adresa pentru publicitate: Centrul pentru relații cu publicul, București, șos. Panduri nr. 1,
 bloc P33, parter, sectorul 5, tel. 411.58.33 și 410.47.30, fax 410.77.36 și 410.47.23
 Tiparul: „Monitorul Oficial“ R.A.

