



**Cofinanțat de
Uniunea Europeană**



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287



IM3.2 - Raport privind testele interlaboratoare Final

Titlu proiect	Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+	309287
Descriere raport	Descrierea metodologiei de orgnizare a comparărilor interlaboratoare
Subactivitate	A3.1 Sistem de calitate integrat pentru asigurarea calității și trasabilității măsurărilor din laborator
Responsabil	IBA-București
Perioada raportată	Decembrie 2024 - februarie 2025
Termen de predare	Iulie 2026
Rezultat asociat	R2 - Oferta finală de servicii
Termen finalizare	Iulie 2026
Criteriu de validare	Aprobare de către partenerii consorțiului participanți la această activitate
Dovezi care probează îndeplinirea criteriilor	Document postat pe website-ul METROFOOD-RO - la interfața internă a proiectului





Cuprins

Structura parteneriatului pentru realizare IM3.2	4
Introducere	5
1. METODOLOGIA DE ORGANIZARE A COMPARĂRILOR INTERLABORATOARE	7
1.1. Definirea domeniului de activitate	7
1.2. Termeni și definiții.....	8
1.3. Referențiale aplicabile domeniului (standarde ISO)	10
1.4. Utilizarea comparărilor interlaboratoare	14
1.5. Cerințe generale pentru competența furnizorilor de încercări de competență	15
2. ORGANIZAREA COMPARARILOR INTERLABORATOARE	17
2.1. Planificarea comparărilor interlaboratoare (ILC)	18
2.2. Lansarea invitației de participare la ILC.....	19
2.3. Selectarea produsului și stabilire parametrului de măsurare	19
2.3. Studii colaborative	19
3. STABILIREA OBIECTIVELOR COMPARĂRILOR INTERLABORATOARE	20
4. PREGĂTIREA PRODUSULUI DE TESTARE	23
5. MĂSURAREA POLIFENOLILOR TOTALI.....	26
5.1. Metode utilizate de IBA București	26
5.2. Metode utilizate de Universitatea din București	28
5.3. Metode utilizate de INOE	37
5.4. Metode utilizate de USVT	39
5.5. Metode utilizate de USAMVB.....	42
5.6. Metode utilizate de UDJG.....	43
6. STUDII DE OMOGENITATE ȘI STABILITATE	55
6.1. Studii de omogenitate	55
6.2. Studii de stabilitate	57



5.3. Condiții de ambalare, depozitare și transport	61
7. REALIZAREA TESTĂRII INTERLABORATOARE	62
TEST 01/ PARTICIPANT: P1- IBA BUCUREȘTI	63
TEST 02 / Participant: P1- IBA București	64
TEST 01/ Participant: P2- INOE 2000	65
TEST 02/ Participant: P2- INOE 2000	68
TEST 01/ Participant: P3- USAMVB	71
TEST 02/ Participant: P3- USAMVB	73
TEST 01/ Participant: P4- UB	74
TEST 02/ Participant: P4- UB	74
TEST 01/ Participant: P5- USVT	75
TEST 02/ Participant: P5- USVT	81
TEST 01/ Participant: P6- UDJG	82
TEST 02/ Participant: P6- UDJG	86
8. PRELUCRAREA STATISTICĂ A REZULTATELOR OBTINUTE DIN ANALIZA POLIFENOLILOR DIN MR-01TP	91
8.1. Elaborarea proiectului statistic	91
8.2. Colectarea rezultatelor	94
8.3. Calcularea indicatorilor statistici pentru metoda de măsurare a polifenolilor totali din MR-01TP	96
8.4. Concluziile studiului statistic și măsuri recomandate	100
8.4.1. Test 01- Determinarea conținutului de polifenoli totali MR-01TP	100
8.4.2. Test 02- Efectul criogenării asupra conținutului de polifenoli totali	101
9. OPTIMIZAREA METODEI DE ANALIZĂ A POLIFENOLILOR DIN MR-01TP	104
10. CARACTERIZAREA MR-01TP	116
11. EVALUAREA PERFORMANȚEI LABORATOARELOR PARTICIPANTE	118
Concluzii	121
Echipa de experți care a participat la elaborarea documentului	121



**Cofinanțat de
Uniunea Europeană**



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Structura parteneriatului pentru realizare IM3.2

Pentru realizarea **IM3.2- Raport privind testele interlaboratoare** au participat 6 parteneri din consorțiul METROFOOD-RO Evolve.

Partener	Conform Acord colaborare din Cererea de finantare		Raport
1	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Bioresurse Alimentare	IBA	x
2	INCDO INOE 2000 Filiala Institutul de Cercetări pentru Instrumentație Analitică	ICIA	x
3	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Mole-culare	ITIM	-
4	Universitatea de Științele Vieții "Regele Mihai I" - Facultatea de Inginerie Alimentară	USVT	x
5	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Mașini și Instalații destinate Agriculturii și Industriei Alimentare	INMA	x
6	Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București	USAMVB	x
7	Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați	UDJG	x
8	Universitatea din București	UB	x





Introducere

Conform cererii de finanțare METROFOOD-RO Evolve, activitățile incluse în indicatorul **IM3.2- Raport privind testele interlaboratoare** sunt organizarea de min. 2 teste interlaboratoare pentru 2 metode validate. Aceste activități contribuie la realizarea obiectivului specific OS3- Consolidarea poziționării METROFOOD-RO în comunitatea științifică la nivel național, METROFOOD-RI și european, obiectiv implementat prin intermediul activității A3.1. Obiectivul specific al subactivității A3.1- Sistem de calitate integrat pentru asigurarea calității și trasabilității măsurătorilor din laborator, coordonată de IBA București, este dezvoltarea de instrumente utilizate în evaluarea calității rezultatelor obținute din testarea produselor agroalimentare.

Instrumentele propuse a se dezvolta în această subactivitate au fost: (i) materiale de referință, (ii) teste interlaboratoare, (iii) sisteme digitale de management al calității laboratoarelor de analiză.

Pentru dezvoltarea instrumentelor propuse s-au aplicat principiile și cerințele standardelor ISO adecvate domeniului. **IM3.2- Raport privind testele interlaboratoare** s-a realizat în perioada 02.2025-07.2026, conform graficului Gantt prezentat mai jos.

Planul de realizare activitate A3.1/2025- 2027

Activități/ IM	2025												2026												2027				
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	
Dezvoltare MR / IM 3.1																													
Organizare teste interlab. / IM 3.2																													
Dezvoltare soft calitate/ IM 3.3																													



Scopul realizării activităților din IM3.2 a fost acela de a dezvolta competențe în domeniul organizării testelor de comparații interlaboratoare.

Activitatea s-a desfășurat pe o perioadă de 17 luni, în intervalul martie 2025- iulie 2026, conform graficului Gantt prezentat în continuare.

Planul de realizare IM3.2 /2025- 2026

Activități	2025										2026						
Teste interlaboratoare	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7
Cerințe generale privind organizarea testelor	Blue	Blue															
Stabilire analit/matrice			Green	Green													
Elaborare documente				Orange	Orange	Orange	Orange										
Logistică lansare test					Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow		
Studii de omogenitate							Grey	Grey	Grey	Grey							
Studii de stabilitate OIC					Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey						
Realizarea testării												Purple	Purple	Purple	Purple	Purple	
Elaborare proiect statistic										Purple	Purple						
Prelucrare statistică												Cyan	Cyan	Cyan	Cyan	Cyan	
Elaborare metodologie organizare comparari interlaboratoare	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange

Activitățile realizate pentru atingerea scopului propus sunt prezentate în **Metodologia de organizare a comparațiilor interlaboratoare**, astfel, IM3.2 prezintă etapele necesare organizării unor teste care au un obiectiv clar definit.



1. METODOLOGIA DE ORGANIZARE A COMPARĂRILOR INTERLABORATOARE

Metodologia de organizare a comparărilor interlaboratoare este structurată astfel:

1. Definirea domeniului de aplicare
2. Organizarea comparărilor interlaboratoare
3. Pregătirea materialului de testare
4. Testarea produsului
5. Prelucrarea statistică a datelor (ISO 13528)
6. Elaborare raport

1.1. Definirea domeniului de activitate

Metodologia se aplică pentru organizarea comparărilor interlaboratoare în cadrul activității METROFOOD-RO.

Comparările interlaboratoare se realizează prin intermediul testelor interlaboratoare realizate în cadrul încercărilor de competență, instrumente utilizate în evaluarea calității rezultatului unei măsurători indiferent de domeniul aplicat (agroalimentar/ farmaceutic/ medical/ nuclear etc).

Pentru scopul standardului ISO 17043 sunt definiți termenii în conformitate cu standardul ISO 17000:2004, Ghidul ISO/IEC 99:2010



1.2. Termeni și definiții

Pentru scopul standardului ISO 17043 sunt definiți termenii în conformitate cu standardul ISO 17000:2004 și Ghidul ISO/IEC 99:2010, astfel:

- *încercare de competență*, evaluarea performanțelor unui participant prin intermediul comparărilor interlaboratoare, în raport cu criterii prestabilite
- *furnizor de încercări de competență* (FIC), organizație care își asumă responsabilitatea pentru toate sarcinile de dezvoltare și realizare a unei scheme de încercări de competență
- *schema de încercare de competență* (PT), încercare de competență concepută și utilizată în una sau mai multe runde pentru un anumit domeniu de încercare, măsurare, etalonare sau inspecție.

Pentru trasabilitatea terminologiei standardul ISO 17043 extinde definiția încercării de competență cu includerea următoarelor:

- schemă cantitativă, atunci când obiectivul este de a cuantifica unul sau mai mulți măsuranzi ai obiectului supus încercării de competență • schemă calitativă, atunci când obiectivul este de a identifica/ descrie una sau mai multe caracteristici ale unui obiect supus încercării de competență
- schemă continuă, atunci când obiectele supuse încercării de competență sunt furnizate la intervale regulate
- transformare și interpretare a datelor, atunci când sunt furnizate seturi de date sau alte informații, iar informațiile sunt prelucrate pentru a furniza alte rezultate (interpretare date).



Pentru scopul standardului ISO 13528 sunt definiți următorii termeni:

- **valoarea atribuită**, valoarea atribuită unei anumite proprietăți a unui articol de testare a competenței;
- **abatere standard** pentru evaluarea competenței, măsură a dispersiei utilizate în evaluarea rezultatelor încercărilor de competență, bazată pe informațiile disponibile. De precizat că nu toate schemele de încercări de competență evaluează competența pe baza dispersiei rezultatelor;
- eroare de măsurare, valoarea cantității măsurate minus o valoare a cantității de referință (SR GHID ISO/CEI 99:2010)
- validare, confirmare prin furnizare de dovezi obiective, a satisfacerii cerințelor pentru o anumită aplicație sau pentru o utilizare avută în intenție;
- verificare confirmare, prin furnizare de dovezi obiective, a satisfacerii cerințelor specificate

De asemenea, în elaborarea procedurilor s-au utilizat și definițiile și prescurtările din SR EN ISO/CEI 17043, EA-4/18 și ISO/IEC Guide 99, astfel:

-**comparare interlaboratoare (ILC)**- proiectarea, organizare, efectuare și evaluarea unor măsurări sau încercări pe obiecte identice sau asemănătoare, de către două sau mai multe laboratoare în conformitate cu condiții predeterminate (clauza 3.2)

-**tehnica de măsurare** - proces de încercare / identificare a proprietății, inclusiv orice pretratament al eșantionului original pentru a-l pune în contact cu echipamentul de măsurare (clauza 3.3)

-**proprietate** - reprezintă mărimea care este măsurată (clauza 3.4)

-**produs** - obiect asupra căruia se aplică tehnica de măsurare (clauza 3.5)

-**FIC** - furnizor de încercări de competență



1.3. Referențiale aplicabile domeniului (standarde ISO)

Conform Ghidului ISO/CEI 2:1996, standardul este documentul stabilit prin consens și aprobat de către un organism recunoscut, care asigură reguli, linii directoare sau caracteristici pentru activități sau rezultatele lor, cu scopul de a obține performanță într-un anumit context.

Aproape toate domeniile de activitate sunt standardizate, generând astfel un limbaj comun și, în același timp, un rezultat performant. Cu mici excepții, implementarea standardelor de calitate este benevolă dar stimulată de unele reglementări cum ar fi participarea la licitații publice și, respectiv, benefică în activitatea comercială, mai ales în caz de litigiu.

Organismele de standardizare internaționale (ISO/CEI) și, respectiv, cele europene (CEN/CENELEC), oferă suport tehnic pentru realizarea de proceduri utilizate în recunoașterea mutuală a rezultatelor încercărilor de conformitate cu standardele.

Pentru a veni în sprijinul producătorilor, furnizorilor, organismelor de certificare și de acreditare, Asociația de Standardizare din România (ASRO) a adoptat standardele europene și cea mai mare parte din standardele internaționale referitoare la evaluarea conformității (<https://standardizare.wordpress.com/2009/04/13/evaluarea-conformitatii/>).

În tabelul 1.1 sunt prezentate principalele standarde internaționale utilizate în elaborarea metodologiei de organizare a comparărilor interlaboratoare.





Tabel 1.1 Standarde internaționale utilizate în organizarea comparațiilor interlaboratoare	
Referențial	Denumire
ISO 17043:2023	Evaluarea conformității. Cerințe generale pentru încercările de competență
ISO 13528:2022	Metode statistice utilizate în testarea competențelor prin comparații interlaboratoare
ISO 17025:2018	Cerințe generale pentru competența laboratoarelor de încercări și etalonări
ISO 17034: 2017	Cerințe generale pentru competența producătorilor de materiale de referință

Organizarea încercărilor de competență este reglementată de standardul internațional **ISO/CEI 17043:2023- Evaluarea conformității. Cerințe generale pentru încercările de competență**. Pentru implementarea cu succes a standardelor internaționale care evaluează calitatea rezultatelor obținute din analiza produselor alimentare, în 2023 a fost aprobată varianta armonizată a standardului ISO 17043 cu ISO 17025 și 17034.

Standardul a fost preluat și de către Asociația Română de Standardizare (ASRO) care oferă, contra cost, versiunea în limba română a versiunii armonizate (SR EN ISO/CEI 17043:2023).

Armonizarea a vizat atât structura tehnică cât și a cerințelor sistemului de management. În tabelul 1.2 sunt prezentate comparativ cele două versiuni ale standardului ISO 17043 (util în actualizarea procedurilor specifice deja elaborate după cerințele standardului din 2010).



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Tabel 1.2. Corespondența cerințelor celor două versiuni ale standardului ISO 17043

Nr. cerință ISO 17043:2023	Cerință	Nr. cerință ISO 17043:2010
4.1	Imparțialitate	5.1.4 și 5.1.5 (d)
4.2	Confidențialitate	4.10 și 5.1.5 (c)
5	Cerințe structurale	5.1
6.1	General	4.1
6.2	Personal	4.2
6.3	Dotări și condiții de mediu	4.3
6.4	Produse și servicii furnizate extern	5.5 și 5.6
7.1.1	Revizuirea cererii, licitației și contractului	5.4
7.1.2	Comunicare Scheme PT	4.9
7.2.1	General	4.4.1
7.2.2	Proiectare statistică	4.4.4
7.2.3	Determinarea valorii atribuite	4.4.5
7.3.1	Producția de articole PT	4.4.2
7.3.2	Evaluarea omogenității și stabilității articolelor PT	4.4.3
7.3.3	Manipularea și depozitarea articolelor PT	4.6.2
7.3.4	Ambalarea, etichetarea și distribuția articolelor PT	4.6.3
7.3.5	Instrucțiuni pentru participanți	4.6.1
7.4.1	Analiza datelor	4.7.1
7.4.2	Evaluarea performanței	4.7.2
7.4.3	rapoarte PT	4.8
7.5.1	Înregistrări tehnice	5.13.2
7.5.2	Controlul managementului datelor și informațiilor	5.13.1
7.5.3	Supravegherea proceselor	NOU
7.5.4	Lucrare neconformă	5.9
7.6	Tratarea reclamațiilor	5.8
7.7	Gestionarea contestațiilor	4.9.3
8.1	Cerințe generale	5.2.4
8.2	Documentația sistemului de management	5.2
8.3	Controlul documentelor sistemului de management	5.3
8.4	Controlul înregistrărilor	5.13.1



8.5	Acțiuni pentru abordarea riscurilor și oportunităților	5.12
8.6	Îmbunătățire	5.10 și 5.7
8.7	Acțiuni corective	5.11
8.8	Audituri interne	5.14
8.9	Recenzii de management	5.15

Un alt standard ISO frecvent utilizat în activitatea de organizare teste interlaboratoare este standardul internațional **ISO 13528:2022 - Metode statistice utilizate în testarea competențelor prin comparații interlaboratorie** (Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison) care oferă modele de aplicare a statisticii în calcularea scorului de performanță. Varianta în limba română a standardului ISO 13528- Metode statistice pentru utilizare în încercările de competență prin comparații interlaboratoare nu există, dar a fost adoptat de ASRO ca SR ISO 13528:2023 astfel încât să poată fi utilizat în activitatea curentă. Acest document oferă suport pentru implementarea ISO/IEC 17043, în special, cu privire la cerințele pentru proiectarea statistică, validarea elementelor de testare a competenței, revizuirea rezultatelor și raportarea lor.

Ultima revizuire a standardului ISO 13528 s-a realizat în 2022 și ea păstrează majoritatea metodelor statistice și îndrumările din ediția anterioară, din 2015 (înlocuită). Cea mai importantă modificare din ediția a treia (2022) se referă la reprezentarea grafică a rezultatelor

(<https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:13528:ed-3:v1:en>).

1.4. Utilizarea comparărilor interlaboratoare

Laboratoarele de testare acreditate în conformitate cu cerințele standardului ISO 17025 sunt obligate să își dovedească competența prin participarea la comparații interlaboratoare. Instrumentul de lucru în testele de performanță (PT) sunt comparațiile interlaboratoare, și ele reflectă competența laboratoarelor de testare. În funcție de obiectivul evaluării, comparațiile interlaboratoare sunt utilizate pentru :

- stabilirea eficacității și comparabilității metodelor de măsurare
- identificarea neconformităților în activitatea de laborator
- creșterea încrederii în competența laboratorului de măsurare
- caracterizarea MRC-urilor
- evaluarea performanței laboratorului
- studii colaborative (compararea metodelor de analiza realizate prin tehnici de măsurare diferite)

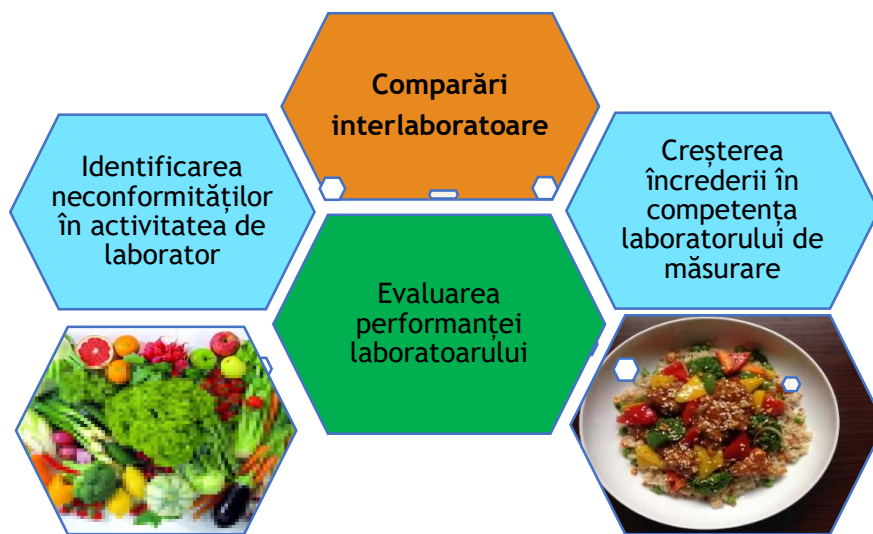


Figura 1.1. Utilizarea comparărilor interlaboratoare în evaluarea performanței laboratoarelor de testare produse agroalimentare



1.5. Cerințe generale pentru competența furnizorilor de încercări de competență

Pentru operarea coerentă a tuturor schemelor de încercări de competență, entitățile care doresc să organizeze astfel de încercări trebuie să respecte cerințele standardului ISO 17043. De asemenea, standardul prezintă cerințele de imparțialitate a furnizorilor de încercări de competență.

Prima ediție a standardului ISO 17043 a fost aprobată în anul 2010 și ea înlocuia Ghidul ISO/CEI 43-1:2007- Încercări de competență prin comparări interlaboratoare.

În 2023 a fost aprobată ediția a doua a standardului ISO 17043, principalele modificări urmărind: (i) armonizarea cu ISO/IEC 17025:2017, inclusiv cerințele tehnice și structură; (ii) armonizarea cu ISO 13528:2022 din punct de vedere terminologic; (iii) încorporarea cerințelor din ISO/CASCO PROC 33; (iiii) includerea cerinței conform căreia activitățile de testare, activitățile de calibrare și producția de articole de testare a competenței sunt conforme cu cerințele relevante ale standardelor corespunzătoare de evaluare a conformității ISO.

De asemenea, ediția din 2023 a standardului ISO 17043 precizează că sunt 3 tipuri de teste interlaboratoare care nu trebuie să poarte denumirea testelor de competență și nici nu trebuie să respecte cerințele ISO 17043, dar pot utiliza principiile standardului astfel: (1) evaluarea caracteristicilor de performanță ale unei metode de măsurare sau de testare (descrise adesea ca încercări în colaborare); (2) atribuirea de valori materialelor de referință; (3) sprijin pentru declarații privind echivalența măsurătorilor institutelor naționale de metrologie (NMI).



În vederea realizării trasabilității determinărilor, rezultatele trebuie să fie raportate la un etalon de referință, asigurarea acestei componente a sistemului integrat pentru asigurarea calității incluzând: utilizarea de echipamente echilibrate, documentarea lanțului de trasabilitate, menținerea certificatelor de calibrare, dar și integrarea rezultatelor din testele interlaboratoare ca mijloc indirect de validare.

În concluzie, un **sistem integrat pentru asigurarea calității și trasabilității măsurărilor din laborator** vizează politici, proceduri, procese și resurse implementate într-un laborator cu scopul de a asigura calitatea rezultatelor măsurărilor dar și trasabilitatea măsurărilor. Astfel, rezultatele experimentale trebuie să fie precise, corecte și reproductibile și de asemenea, trebuie să fie obținute prin metode standardizate conforme cu cerințele specificate.

Pentru organizarea comparațiilor interlaboratoare utilizate în calcularea scorului de performanță integral al unui laborator, furnizorul de comparații interlaboratoare (FIC) trebuie să-și implementeze, în propria activitate, cerințele specifice standardului SR EN ISO/CEI 17043:2023 -Evaluarea conformității. Cerințe generale pentru competența furnizorilor de încercări de competență”.

Totuși, cerințele standardului SR EN ISO/CEI 17043:2023 ***nu se aplică furnizorilor de comparații interlaboratoare organizate în alte scopuri decât evaluarea competenței***, cum ar fi validarea metodelor, testarea capacității personalului, stabilirea caracteristicilor unui material de control sau atribuirea valorii unui material de referință.



2. ORGANIZAREA COMPARARILOR INTERLABORATOARE

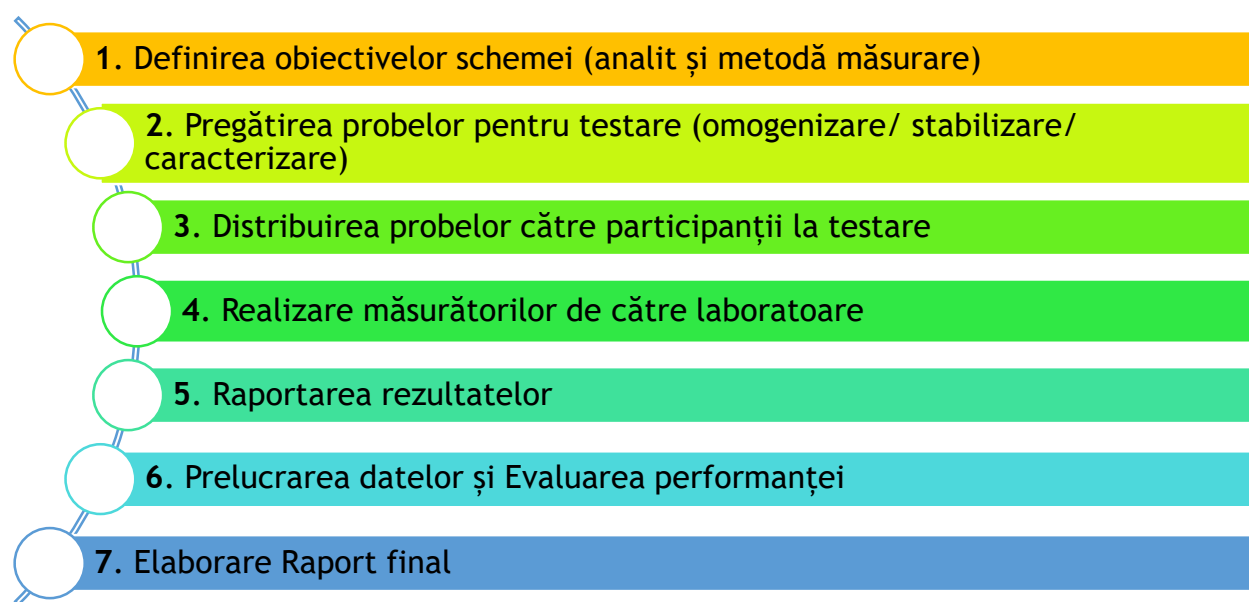
Pe lângă dezvoltarea de procese/ proceduri interne și respectiv, calificarea/ autorizarea personalului, pentru realizarea unor teste de comparații interlaboratoare, organizatorul lor trebuie să respecte etapele prezentat în tabelul 2.1.

Tabel 2.1. Etapele organizării testelor de performanță utilizând comparațiile interlaboratoare			
Nr.crt.	Denumire	Activități	Documente
1	Planificarea	-stabilirea obiectivului -stabilirea tipului de comparare	Proiect
2	Selectarea materialului	-achiziție produs/ producere material de referință -pregătire probă	Studii de omogenitate și stabilitate
3	Invitația participanților	-identificarea participanților la testele interlaboratoare	Invitație participare
4	Proiectarea statistica	-stabilirea valorii atribuite -stabilirea deviației standard pentru testare	Proiect statistic
5	Expedierea probei	-ambalare proba -asigurare transport optim condițiilor impuse conservării stabilității produsului	Dovezi transport garantat
6	Colectarea datelor	-preluarea rezultatelor de la participanți	Liste valori rezultate
7	Evaluarea statistica	-prelucrarea statistica a rezultatelor -interpretarea rezultatelor	Histograme cu rezultatele evaluării
8	Evaluarea performantei	-calcularea scorului de performanță	
9	Elaborare raport	-autorizare raport	Raport de performanță
10	Comunicare	-pregătirea comunicatelor -transmiterea rapoartelor de performanta	Platforma comunicare rezultate



Conform standardului ISO 22117:2019- *Microbiologia lanțului alimentar. Cerințe specifice și linii directoare referitoare la încercarea competenței prin comparare interlaboratoare*, o schemă de testare de competență include mai multe etape după cum se poate observa și din figura 2.1.

Figura 2.1. Schema de organizare a unei testări de competență (conform ISO 22117:2019)



2.1. Planificarea comparărilor interlaboratoare (ILC)

Compararea interlaboratoare este inițiată prin elaborarea unui plan ILC care trebuie să includă:

- Titlul comparărilor interlaboratoare (ILC), data emiterii
- Informații despre produs, parametri de măsurare (analizi)
- Numărul de produse de control/testare care trebuie trimise fiecărui laborator
- Procedura de pregătire și analiză a produsului testat de către organizator
- Procedura de transport a probelor testate



2.2. Lansarea invitației de participare la ILC

Pentru dimensionarea unei scheme de testare, organizatorul lansează o invitație de participare la ILC astfel încât să știe cantitatea de produs necesar acoperirii nevoilor de testare. Acest sondaj se realizează prin transmiterea unui formular de înregistrare, formular care nu angajează obligativitatea participării la testare.

Scrisoarea de invitație include: scopul ILC, calendarul, numărul și cantitatea produselor testate, și eventual cerințe speciale, dacă este cazul.

2.3. Selectarea produsului și stabilire parametrului de măsurare

Activități realizate sunt: (i) stabilirea proprietăților/ parametrilor și încercărilor selectate, precum și o scurtă descriere a considerațiilor care au stat la baza selecției; (ii) descrierea modului prin care sunt obținute, pregătite, caracterizate, verificate și distribuite produsele pentru analiza, (iii) alegerea metodei de încercare/ măsurare/ etalonare (de obicei sunt metodele uzuale ale participanților).

2.3. Studii colaborative

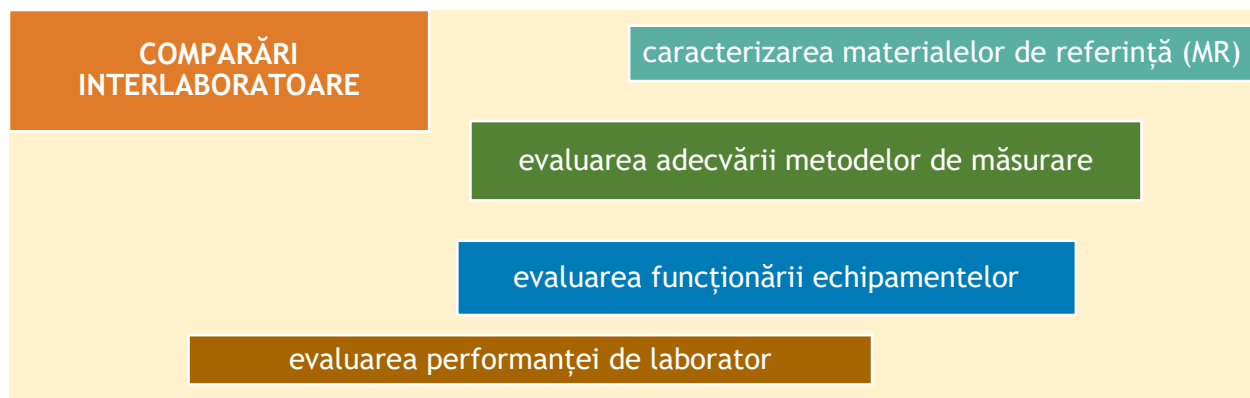
Studiile colaborative sunt comparații interlaboratoare organizate pentru stabilirea caracteristicilor de performanță ale unei metode de măsurare sau testare sau pentru a caracteriza un material de referință. În general, se recomandă organizarea studiilor colaborative care au un singur obiectiv astfel încât, participanții să înțeleagă scopul studiului și în acest fel să nu compromită rezultatele. Organizarea comparațiilor interlaboratoare cu mai multe obiective trebuie să evite potențialele incompatibilități sau conflicte de interese.



3. STABILIREA OBIECTIVELOR COMPARĂRILOR INTERLABORATOARE

Comparările interlaboratoare sunt concepute ca exerciții controlate de comparație, desfășurate pe eșantioane comune și analizate prin metode standardizate (ex. HPLC-DAD, LC-MS, spectrofotometrie, ICP-MS, GC-MS etc.). Fiecare laborator participant primește probe identice, pregătite și omogenizate conform unui protocol comun, iar măsurătorile se realizează respectând specificațiile tehnice agreate la nivel METROFOOD-RI.

În funcție de obiectivul evaluării, comparările interlaboratoare sunt utilizate pentru: validare metode măsurare, caracterizare MR, verificare funcționare corectă echipamente măsurare, evaluare personal implicat în activități de laborator și evaluarea performanței unui laborator care, sintetic spus înglobează toate celelalte utilizări secvențiale prezentate anterior (fig.1).



Figură 3.1. Utilizarea comparărilor interlaboratoare în diverse scopuri identificate prin obiectivele stabilite



Activitățile din A3.1 au urmărit demonstrarea utilității testelor de comparări interlaboratoare și în alte scopuri decât cel tradițional, și anume, de evaluare a performanței de măsurare, performanță cuantificată prin scorul z (cel mai frecvent) și, la care toate laboratoarele acreditate trebuie să participe.

În acest context, IBA București a coordonat desfășurarea a două teste de comparări interlaboratoare, definite după obiectivul fiecărui test astfel:

- TEST 01- Determinarea conținutului de polifenoli totali din MR-01TP

- TEST 02- Efectul criogenării asupra conținutului de polifenoli totali din MR-01TP

De asemenea, rezultatele celor două teste au fost utilizate și pentru caracterizarea materialului de referință MR-01TP realizat în IM3.1 și în optimizarea tehnicii de măsurare a polifenolilor din produse vegetale.

Deoarece substanța uscată dintr-un material de referință influențează valoarea parametrului măsurat și raportat, în cele două teste interlaboratoare s-au prelucrat statistic rezultatele și pentru substanța uscată din MR-01TP și astfel s-a calculat scorul z pentru laboratoarele participante.

Pentru această activitate INCD IBA București a asigurat produsul de testare MR01-TP, a efectuat studiile de omogenitate și stabilitate pentru MR01-TP, a asigurat logistica (ambalarea MR01-TP, transportul lui către sediul participanților la teste), a colectat rezultatele și a prelucrat datele obținute din testare și a formulat concluzii.



Rolul partenerilor din METROFOOD-RO implicați în testele interlaboratoare este prezentat în tabelul 1.

Tabel 1. Implicarea partenerilor în realizarea testelor interlaboratoare		
Nr.crt	Activitate specifică IM3.2	Participant
1	Organizare/ Logistică teste interlaboratoare	IBA
2	Pregătire MR polifenoli utilizat în testele interlaboratoare	IBA/ ITIM
3	Evaluare omogenitate/ stabilitate MR polifenoli din făina de piețițe de roșii (MR-01TP)	IBA
4	Măsurarea cantității de polifenoli totali din MR-01TP	IBA; INOE;UDJG;USAMVB; USAVT; UB
5	Prelucrare date și elaborare raport teste interlaboratoare	IBA

Pentru analiza polifenolilor totali din MR-01TP, toți participanții au primit câte un flacon de material de referință, astfel încât toate laboratoarele să măsoare cantitatea de polifenoli totali din același lot de material de referință.



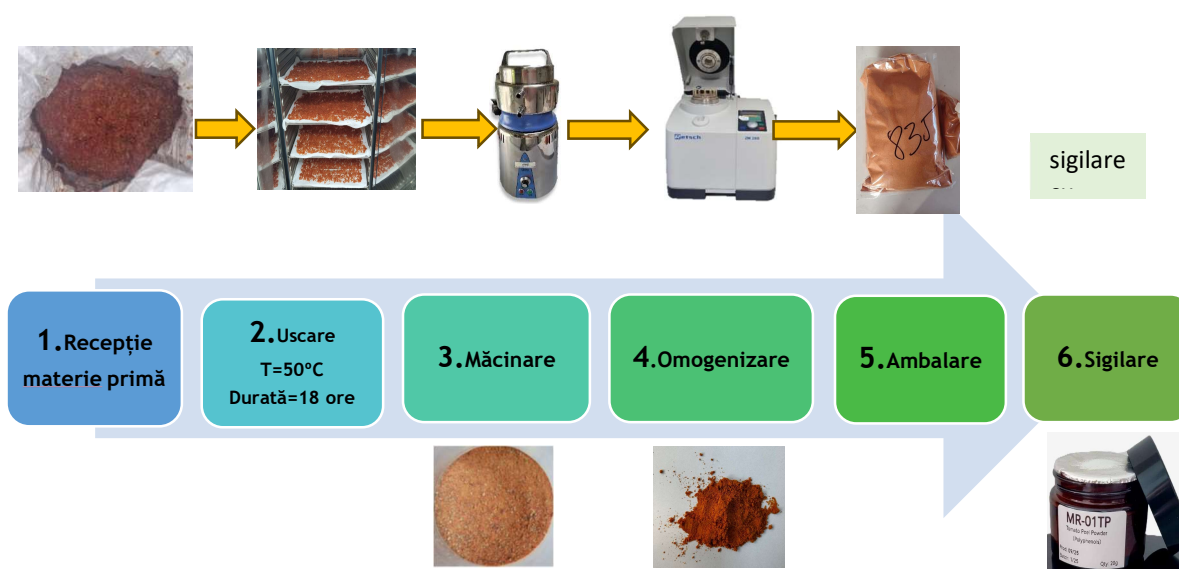
Fiecare laborator participant a efectuat măsurătorile în condiții controlate și a documentat riguros fiecare etapă analitică.

Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

4. PREGĂTIREA PRODUSULUI DE TESTARE

Pentru ambele teste s-a utilizat o schemă *simultană* de comparări interlaboratoare, toți participanții au primit același material de testare suficient de omogen și stabil (MR-01TP), realizat conform tehnologiei descrise în IM3.1- Raport privind obținerea materialelor de referință.

Schema procesului tehnologic de obținere MR-01TP



MR-01TP este o făină obținută din tescovina de roșii (pielețe de roșii + semințe și nervuri), conform tehnologiei dezvoltate în proiectul METROFOOD-RO Evolve în activitatea A3.1 și descrisă în IM3.1

Tehnologia de realizare a MR-01TP

Masa solidă, constituită din subprodusele reziduale rezultate în urma procesării roșiilor, a fost obținută în timpul procesului de preparare a sucului de roșii. Separarea fazei lichide de cea solidă s-a realizat prin stoarcere la rece, utilizând un storcător industrial cu ax melcat, care permite obținerea eficientă a sucului, concomitent cu păstrarea componentelor solide valoroase (coajă, semințe și pulpă reziduală).



Figura 4.1. Storcător cu presare la rece



Figura 4.2. Deșeu umed tescovina suc de roșii

Proba de deșeu vegetal a fost supusă unui proces de uscare controlată utilizând un uscător convectiv Memmert 100-800 (Figura 3). Procesul s-a desfășurat la o temperatură constantă de 50°C, pe o durată de 17 ore și 48 de minute.



Figura 4.3. Parametrii procesului de uscare a pulberii de roșii

După finalizarea procesului de uscare, proba a fost mărunțită preliminar cu ajutorul unei râșnițe de laborator MRC-300CC (Figura 4.5), pentru a facilita manipularea și procesarea ulterioară. În urma acestei etape s-a obținut un amestec cu textură neuniformă (Figura 4.6), conținând atât particule fine, cât și fragmente vizibile de pielițe, nervuri și semințe.



Figura 4.5. Râșniță de laborator



Figura 4.6. Amestecul obținut utilizând râșnița de laborator

Pentru îmbunătățirea gradului de omogenitate și obținerea unei dimensiuni uniforme a particulelor, materialul a fost ulterior supus unui proces de măcinare fină, utilizând o moară de laborator Retsch ZM 200 (Figura 4.7). În urma acestui proces s-a obținut o pulbere fină, cu aspect similar făinii (Figura 4.8), în care au fost integrate toate componentele structurale – semințele, pielițele și nervurile – considerate părți naturale ale matricei vegetale.



Figura 4.7. Moară de laborator



Figura 4.8. Pulberea obținută utilizând o moară de laborator



5. MĂSURAREA POLIFENOLILOR TOTALI

După stabilirea obiectivului testului de comparații interlaboratoare, în prezentul raport sunt prezentate capabilitățile partenerilor din METROFOOD-RO în ceea ce privește participarea la testul de măsurare a polifenolilor din MR01-TP. În acest sens, au fost identificați partenerii din METROFOOD-RO care efectuează teste specifice măsurării conținutului de polifenoli și stadiul validării metodei utilizate.

5.1. Metode utilizate de IBA București

Pentru măsurarea polifenolilor totali din MR-01TP, IBA București a utilizat metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu (F-C).

Principiul testului F-C constă în reducerea reactivului Folin-Ciocalteu în prezența substanțelor fenolice, rezultând producerea de albastru de molibden-tungsten care este măsurat spectrofotometric la $\lambda=752$ nm, iar intensitatea crește liniar odată cu concentrația de compuși fenolici în mediul de reacție. Conținutul total de compuși polifenolici a fost determinat prin metoda Folin-Ciocalteu (Wojdylo și col., 2007), adaptată la condițiile de lucru din laborator. Pe scurt, 500 μ L extract metanolic a fost amestecat cu 5 mL reactiv Folin-Ciocalteu (dilat cu apă în proporție de 1:15) și incubat la întuneric timp de 10 minute. După expirarea celor 10 minute se adaugă 500 μ L carbonat de sodiu 20% și se lasă la incubat timp de 20 minute. După 20 minute de incubare la temperatura camerei, la întuneric, compusul albastru colorat dezvoltat a fost măsurat spectrofotometric la $\lambda=752$ nm utilizând un spectrofotometru (Specord 210 UV-VIS, Analytic Jena, Germania). S-a realizat o curbă standard folosind diferite concentrații (0,005-0,175 mg/mL) de acid galic în aceleași condiții cu proba

($R^2=0,9999$). Rezultatele au fost exprimate ca medie a 6 rezultate, în mg miliechivalenți acid galic/100 g (mg GAE/100g) (Figura 5.1).

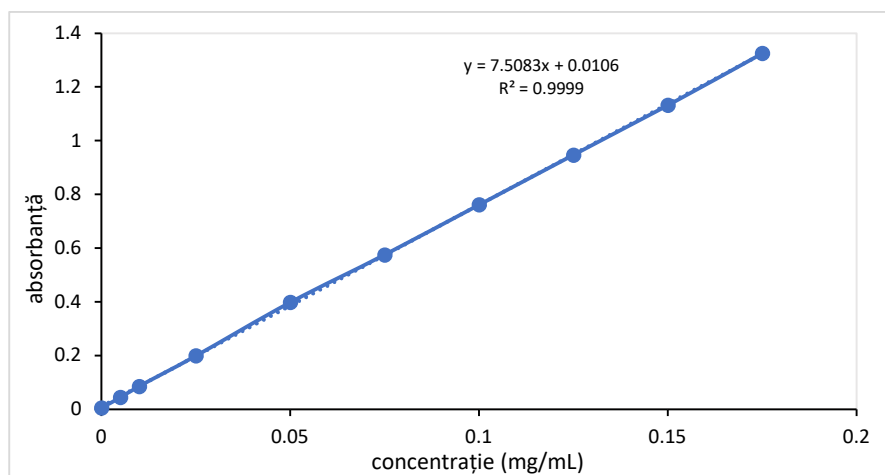


Figura 5.1. Curba de calibrare pentru acid galic utilizată pentru determinarea compușilor polifenolici

Reactivi utilizați

Reactiv Folin Ciocalteu – Sigma Aldrich

Acid galic – Sigma Aldrich

Carbonat de sodiu – Carl Roth

Metanol – Carlo Erba

Pentru extracția compușilor polifenolici, s-a cântărit o cantitate de 0,1 g probă peste care s-a adăugat un volum de 10 mL de solvent de extracție (metanol 80%). Extractele au fost obținute prin vortexare (Vortex Multi reax, Heidolph Instruments, Schwabach, Germania) la temperatura camerei, timp de 4 ore și 30 minute. După vortexare, acestea au fost centrifugate timp de 30 minute la 10.000 rotații pe minut (rpm) la o temperatură de 4°C pentru a îndepărta reziduurile.

Pentru recuperarea completă a polifenolilor, peste reziduul rămas (ce rămâne după ce se colectează extractul) a fost adăugat un volum de 10 mL metanol și supus unui proces

suplimentar de vortexare timp de 1 oră. Ulterior, amestecul a fost centrifugat la 10.000 rpm, timp de 30 de minute, la o temperatură controlată de 4°C, pentru a asigura o separare eficientă a fracției lichide. Au fost analizate atât extractele inițiale, cât și cele obținute după vortexarea și centrifugarea rezidului. Concentrațiile celor două au reprezentat concentrația finală pentru o probă.



(a)

(b)

Echipamentele utilizate pentru obținerea extractelor (a) vortex, (b) centrifugă

5.2. Metode utilizate de Universitatea din București

Universitatea din București a implementat și validat o metodă analitică robustă, bazată pe cromatografie lichidă de înaltă performanță cu detecție de tip diode array (HPLC-DAD). Această metodă este utilizată în mod curent în cadrul activităților de caracterizare fitochimică desfășurate în laboratoarele universității, fiind adaptată pentru evaluarea extractelor vegetale, produselor alimentare și a subproduselor agroalimentare rezultate din procesele de valorificare circulară. Prin sensibilitatea și selectivitatea ridicată, metoda HPLC-DAD permite identificarea și cuantificarea simultană a compușilor polifenolici majori, oferind informații esențiale privind compoziția chimică, potențialul antioxidant și valorificarea funcțională a matricei analizate. În plus, utilizarea de standarde certificate și respectarea condițiilor controlate de analiză asigură trasabilitatea metrologică a măsurătorilor, conform principiilor de calitate impuse de sistemul METROFOOD-RI.



Pentru analiza compușilor polifenolici, Universitatea din București utilizează o metodă cromatografică de înaltă performanță (HPLC) cu detecție de tip diode array (DAD), optimizată pentru separarea și cuantificarea precisă a acizilor fenolici, flavonoidelor, stilbenilor și taninurilor hidrolizabile. Probele sunt extrase cu un solvent hidroalcoolic, iar compușii polifenolici sunt separați pe o coloană C18, în condiții de gradient, folosind o fază mobilă acidificată cu acid trifluoroacetic (TFA). Detecția se realizează cu detectorul DAD la multiple lungimi de undă, iar cuantificarea se efectuează pe baza curbelor de calibrare obținute din standarde certificate.

Analizele se realizează cu ajutorul unui sistem HPLC-DAD Rigol L-3000, echipat cu pompă cuaternară, degazor, autosampler, detector DAD și coloană termostată. Separarea se efectuează pe o coloană Kinetex EVO C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm), adaptată pentru compuși fenolici de polaritate medie și ridicată. Filtrarea fazelor mobile și a extractelor se face prin filtre PTFE de 0.45 μm, iar pregătirea soluțiilor de lucru se realizează cu ajutorul unei băi ultrasonice. Sistemul este controlat prin software-ul Rigol LabSolutions, care permite achiziția simultană de spectre UV-Vis și integrarea automată a vârfurilor cromatografice.



Sistemul HPLC DAD Rigol L-3000

Fazele mobile utilizate sunt: (A) 0,1% TFA în apă ultrapură și (B) 0,1% TFA în acetonitril (HPLC grade). Această combinație asigură o bună rezoluție și simetrie a vârfurilor,



reducând interacțiunile secundare ale analitelor cu faza staționară. Reagenții utilizați sunt de puritate ridicată: apă ultrapură, acetonitril de grad HPLC, TFA și standarde de polifenoli certificate – acid galic, catechină, acid clorogenic, rutină și quercetină.

Pentru prepararea probelor, se cântăresc între 0,5 și 1,0 g de probă vegetală uscată și măcinată fin, peste care se adaugă 10 mL de solvent de extracție metanol:apă (80:20, v/v), conținând 0,1% TFA. Amestecul se sonichează timp de 30 de minute la temperatura camerei, apoi se centrifughează timp de 10 minute la 5000 rpm. Supernatantul clar se filtrează prin filtru PTFE de 0.45 μ m și se transferă în flacon HPLC pentru analiză

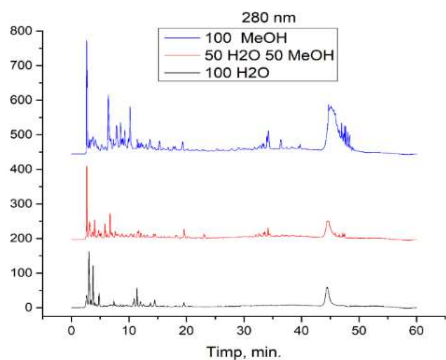
Separarea compușilor se realizează în condiții controlate: coloana este menținută la 30°C, debitul fazei mobile este de 0,6 mL/min, iar volumul de injecție este de 10 μ L. Gradientul de elutie este stabilit de la 2% la 100% fază B în 55 de minute, urmat de o perioadă izocratică de 5 minute la 100% B, apoi reechilibrare la 2% B. Detecția se efectuează simultan la 255, 280, 325 și 355 nm, lungimea de undă de 280 nm fiind utilizată pentru cuantificarea principală datorită răspunsului optim pentru majoritatea polifenolilor.

Pentru calibrare și controlul calității, se utilizează curbe de calibrare cu cinci puncte (5-100 μ g/mL) obținute din standarde certificate, cu linearitate de cel puțin $R^2 \geq 0.995$. Controlul zilnic al performanței instrumentale se realizează prin injecția unei soluții de catechină de 25 μ g/mL, iar între seturile de probe se rulează probe blank pentru verificarea contaminării.

Identificarea compușilor se face prin compararea timpilor de retenție și a spectrelor UV-Vis cu cele ale standardelor pure, iar cuantificarea se realizează prin interpolarea suprafeței vârfurilor în curbele de calibrare corespunzătoare. Rezultatele sunt



exprimate în mg echivalent compus/g probă uscată, permițând comparabilitatea între probe și metode de extracție.



Exemplu de cromatogramă- analiza polifenolilor din extracte vegetale

Pentru verificarea reproductibilității și comparabilității interlaborator, se utilizează probe etalon comune pentru toate laboratoarele participante, determinate în triplicat.

Rezultatele sunt considerate acceptabile dacă prezintă o deviație standard relativă (RSD) $\leq 5\%$ și o recuperare între 90-110% față de valorile de referință.

Tabel 5.1. Categoriile compușilor regăsiți în extractele analizate

Substanță	Categorie	Subcategorie
Acid galic	Acid fenolic	Derivat de acid benzoic
Acid protocatehic	Acid fenolic	Derivat de acid benzoic
Acid vanilic	Acid fenolic	Derivat de acid benzoic
Acid siringic	Acid fenolic	Derivat de acid benzoic
Acid cafeic	Acid fenolic	Derivat de acid cinamic
Acid p-coumaric	Acid fenolic	Derivat de acid cinamic
Acid o-coumaric	Acid fenolic	Derivat de acid cinamic
Acid ferulic	Acid fenolic	Derivat de acid cinamic
Acid sinapic	Acid fenolic	Derivat de acid cinamic
Acid clorogenic	Acid fenolic	Ester al acidului cafeic



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Acid rozmarinic	Acid fenolic	Ester derivat din acid cafeic
Acid ellagic	Acid fenolic / Tanin simplu	Dimer al acidului galic
Catechina	Flavonoid	Flavanol
Epicatechina	Flavonoid	Flavanol
Quercetina	Flavonoid	Flavanol
Isoquercetina	Flavonoid	Flavanol (glicozidă de quercetină)
Rutina	Flavonoid	Flavanol (quercetin-rutinozidă)
Hiperozide	Flavonoid	Flavanol (quercetin-galactozidă)
Kaemferol	Flavonoid	Flavanol
Glicozidă kaemferol	Flavonoid	Flavanol (glicozidă de kaemferol)
Miricetina	Flavonoid	Flavanol
Luteolina	Flavonoid	Flavonă
Glicozidă luteolina	Flavonoid	Flavonă (glicozidă de luteolină)
Naringenina	Flavonoid	Flavanonă
Naringina	Flavonoid	Flavanonă (glicozidă de naringenină)
Rezveratrol	Stilben	—
Acid tanic	Tanin hidrolizabilă	Polimer de acid galic

Din punct de vedere al siguranței, se respectă toate normele de protecție a muncii. Atât acidul trifluoroacetic, cât și acetonitrilul sunt substanțe toxice și volatile, motiv pentru care manipularea lor se face exclusiv sub hotă, utilizând echipament individual de protecție complet (mănuși, ochelari, halat). Deșeurile lichide rezultate din analiză se colectează separat și se neutralizează conform procedurilor interne de mediu.

Rezultatele obținute sunt raportate sub formă de profil cromatografic și valori cantitative pentru fiecare compus identificat. Se indică atât conținutul total de polifenoli, cât și distribuția specifică pe clase de compuși. Toate datele generate sunt arhivate electronic în format .csv și .pdf, cu fișiere de calibrare, cromatograme brute și rapoarte de integrare, asigurând astfel trasabilitatea completă a măsurătorilor în cadrul sistemului de calitate integrat METROFOOD-RO.

Protocol de extracție asistată de microunde a compușilor naturali

Extracția asistată de microunde se realizează cu ajutorul unui sistem de tip Milestone Ethos Sel care permite extracția simultană a 10 probe după un program. Matricea solidă și solventul se introduc într-un vas de teflon prevăzut cu sisteme de siguranță (figura 5.2, d).

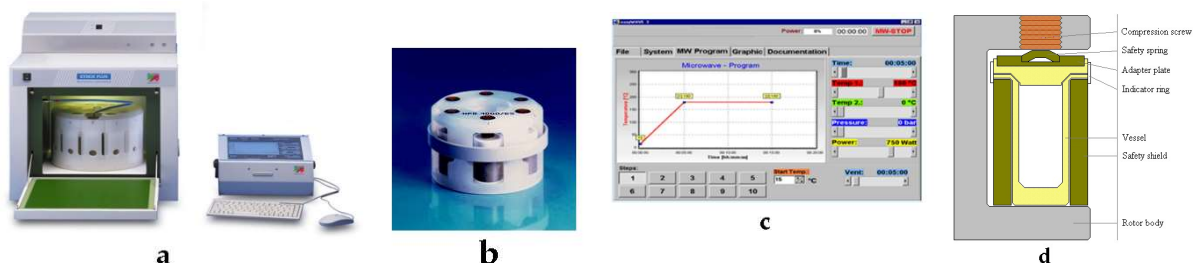


Figura 5.2. Sistemul Milestone Ethos Sel (a), rotorul cu 10 pozitii (b), interfata grafica pentru selectarea parametrilor (c), vasul de extracție inserat in sistemul de siguranță (d).

Operarea sistemului de extracție

- Se creează o metoda noua prin accesarea „MW PROGRAM” și se deschide fereastra de setare a programului (figura 5.2, c) in care se pot modifica: temperatura, timpul și puterea.
- Se trece la pregătirea probelor pentru analiza și se pornește programul de lucru din fereastra meniului principal

Mod de lucru

Din proba omogenizata se cântărește cu o precizie de 0,001g, o cantitate de produs solid in fiecare din vasele de teflon. Se adaugă apoi diverse cantități de solvent. Se acoperă vasul din teflon cu capacul aferent, in jurul căruia se adaugă inelul de etanșare din teflon (figura 3, d), se introduce vasul in mantaua de siguranță, peste capac se așază adaptorul și resortul. Unul dintre aceste vase de teflon este acoperit cu un capac special, prevăzut cu o teacă (din teflon căptușit cu ceramică) în care se introduce



senzorul de temperatură. Extracția se efectuează la diverse intervale de timp și valori de temperatură. După răcirea rotorului se scot vasele, se separă extractul de materialul solid utilizând filtre de 0,2 mm după care se supune caracterizării prin diverse metode de: HPLC, GC, zaharuri reducătoare, capacitate antioxidantă, flavonoide totale, polifenoli totali etc. Pentru fiecare tip de matrice vegetală se aplică metoda Response Surface Methodology (RSM) pentru optimizarea parametrilor operaționali (temperatura, timp, raport solvent/solid, tip de solvent etc.).

Protocol de extracție a compușilor naturali utilizând extracția accelerată cu solvenți

Extracția accelerată cu solvenți (ASE) este o tehnică automatizată care folosește solvenți cu puncte de fierbere scăzute în amestecuri sau monosolvent la temperaturi ridicate de până la 200 °C și presiune (1500 psi) pentru izolarea compușilor țintă. Aceste condiții de operare cresc considerabil solubilitatea compușilor de extras, viteza de difuzie a solventului și transferul de masă, în timp ce viscozitatea și tensiunea superficială scad. ASE prezintă multe avantaje față de tehnicile tradiționale de extracție solid / lichid.

Prezentarea și pregătirea aparatului pentru lucru

În cadrul proiectului, extracția accelerată cu solvenți se realizează cu ajutorul unui aparat DIONEX ASE 200 prevăzut cu celule de 33 ml din oțel inoxidabil și echipat cu un controler pentru solvent (figura 5.3). Principiul de funcționare este prezentat în schema generală (figura 5.4).



Figura 5.3. Sistemul de extracție ASE200 prevăzut cu controler pentru dozarea solvenților

Mod de lucru:

Extracția se efectuează la temperaturi diferite (50, 100 și 150 °C) și diferite amestecuri de solvent. O cantitate de probă solidă se introduce în celulele de inox iar spațiul liber se completează cu granule de sticlă. După plasarea filtrelor la ambele capete ale celulei aceasta se sigilează și se introduce în autosampler. În timpul procesului celula care conține proba se preumple cu solvent de extracție, sub presiune și apoi se încălzește. Parametrii aparatului pentru o extracție tipică sunt: presiune (1500 psi), 2 cicluri de extracție, volumul de solvent pentru clătirea celulei (60%), timp de purjare cu azot (120 s), timp staționare (5 min), și timp de preîncălzire (5 min). Probele colectate se filtrează (filtru 0.2 mm) și se caracterizează prin diverse metode. Pentru fiecare tip de matrice vegetala se aplica metoda Response Surface Methodology (RSM) pentru optimizarea parametrilor operaționali (temperatura, timp, raport solvent/solid, tip de solvent etc.).

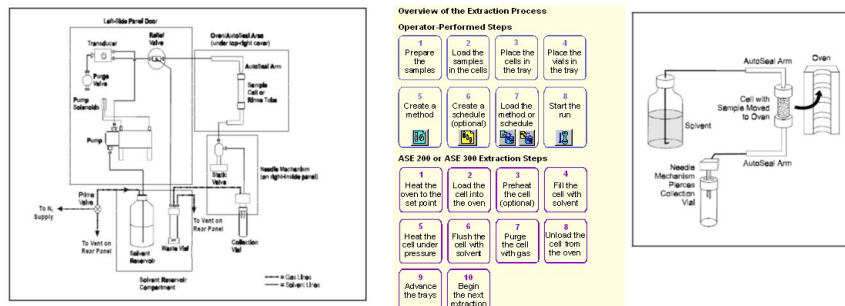


Figura 5.4. Schema generala de funcționare a sistemului de extracție ASE 200 și etapele procesului de extracție

Protocol pentru analiza prin metoda HPLC a compusilor naturali din extracte

Metoda HPLC este foarte versatila deoarece cu ajutorul unor coloane adecvate și a unui cromatograf de lichide dotat cu detectori DAD, fluorescența și conductivitate se pot analiza majoritatea compușilor de interes care se întâlnesc în extracte. Astfel se vor utiliza două sisteme HPLC : un sistem Rigol prevăzut cu DAD și un sistem Varian Pro Star

prevăzut cu detector de fluorescență și conductivitate. Diagrama schematică a cromatografului este prezentată în figura 5.5.

Faza mobilă - sunt folosiți diferenți eluenți, alegerea lor depinzând de tipul coloanei de separare și al detectorului. De obicei pentru a stabili compoziția exactă a eluentului se urmăresc instrucțiunile producătorului în ceea ce privește coloana. În cazul coloanelor de tip C18 eluenții cel mai des folosiți sunt metanolul, acetonitrilul și apa care sunt modificați parțial prin adăugare de acid trifluoracetic sau soluții tampon. Se introduc probele de analizat în recipiente speciale și pentru fiecare compus de analizat se prepara 5 standarde pentru trasarea curbei de etalonare. Softul aparatului integrează automat valorile adsorbanțelor probelor în curbele de calibrare pentru fiecare compus iar rezultatele sunt exprimate în mg/L sau alte unități de măsură adecvate.

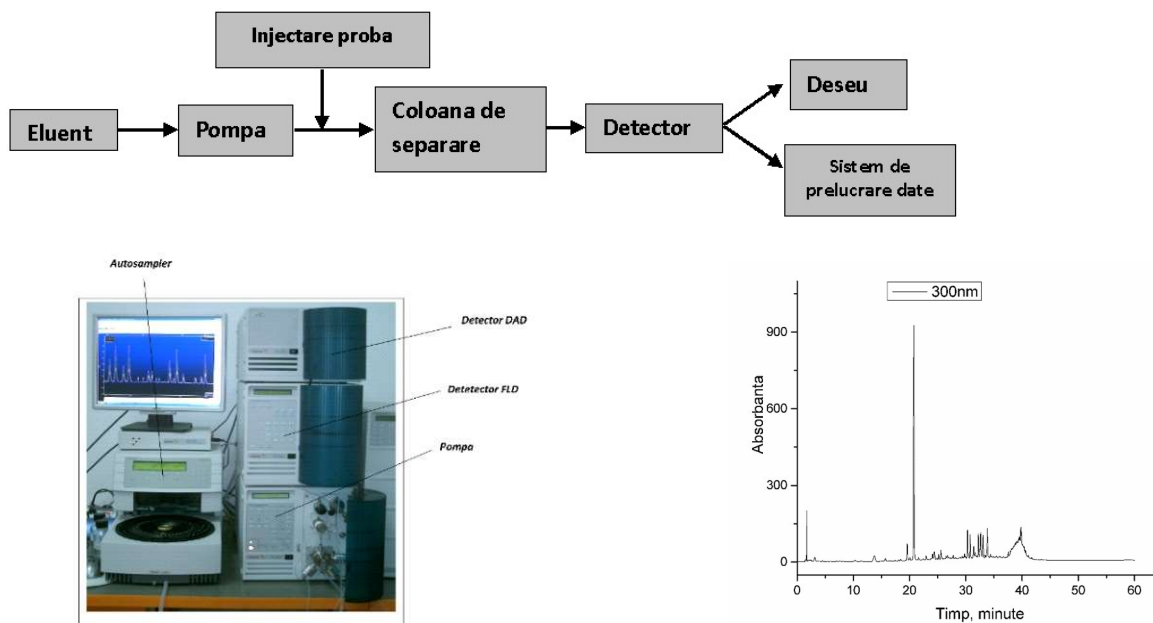


Figura 5.5. Schema generală de funcționare a unui sistem HPLC și o cromatogramă tipică rezultată din analiza unui extract de plante



5.3. Metode utilizate de INOE

Determinarea conținutului total de polifenoli din subprodusele de roșii s-a realizat prin metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu, adaptată după Bobková et al. (2020).

Pentru extracție, s-a cântărit o cantitate de 0,5 g de probă omogenizată, peste care s-au adăugat 5 mL de metanol (MeOH). Amestecul a fost agitat utilizând un mixer vortex (model Vortex 2, IKA, Staufen, Germania) la 2500 rotații pe minut, timp de 2 minute, pentru a facilita extragerea compușilor fenolici din matricea solidă.

După prima extracție, amestecul a fost centrifugat la 11.000 rpm timp de 2 minute, iar supernatantul a fost separat cu atenție. Reziduul solid a fost supus unei a doua extracții în aceleași condiții (5 mL MeOH, 2 minute vortexare, 11.000 rpm centrifugare). Cele două supernatante au fost reunite și filtrate printr-o membrană de celuloză cu porozitatea de 0,45 μ m, obținându-se extractul final utilizat pentru determinare.

Reacția colorimetrică s-a realizat într-un tub de centrifugare de 15 mL, în care s-au adăugat succesiv următoarele soluții:

- 5 mL apă distilată,
- 1,5 mL soluție de carbonat de sodiu 10% (Na_2CO_3),
- 0,5 mL extract filtrat,
- 0,5 mL reactiv Folin-Ciocalteu.

După adăugarea reactivilor, amestecul a fost omogenizat ușor și lăsat la incubat în întuneric, la temperatura camerei (22-25°C), timp de 45 minute. În acest timp, compușii fenolici reduc ionii de molibden și tungsten din reactiv, formând un complex colorat albastru, a cărui intensitate este proporțională cu concentrația totală de polifenoli.



Absorbanța a fost măsurată la lungimea de undă de 765 nm, utilizând un spectrofotometru UV-Vis Lambda 25 (PerkinElmer, Waltham, MA, SUA), cu probă martor pregătită identic, dar fără extract.

Conținutul total de polifenoli a fost determinat pe baza curbei de calibrare realizate cu soluții standard de acid galic (interval 10-200 mg/L). Rezultatele au fost exprimate ca mg echivalenți acid galic (GAE) per gram de probă uscată.

Toate determinările au fost efectuate în triplicat, iar valorile finale au fost exprimate ca medie $\pm$ deviație standard, pentru a asigura precizia și reproductibilitatea rezultatelor.

Determinarea licopenului și β -carotenului prin HPLC-DAD

Determinarea conținutului de licopen și β -caroten din subprodusele de roșii (pielețe și semințe) s-a realizat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu detecție în rețea de diode (HPLC-DAD).

Pentru extracție, s-a cântărit o cantitate de 0,5 g de probă omogenizată și uscată, peste care s-au adăugat 10 mL dintr-un amestec de solvenți format din hexan:acetonă:etanol în raport volumic 2:1:1 (v/v/v). Amestecul a fost agitat utilizând un mixer vortex pentru a asigura o dispersie uniformă, apoi a fost lăsat să stea 10 minute la temperatura camerei, pentru a facilita solubilizarea pigmentilor carotenoidici. După extracție, probele au fost centrifugate la 11.000 rpm timp de 2 minute, iar supernatantul limpede a fost separat și filtrat printr-o membrană de celuloză cu porozitatea de 0,45 μ m înainte de analiza cromatografică. Toate etapele de extracție și manipulare a probelor s-au efectuat în condiții de lumină redusă, pentru a preveni degradarea carotenoizilor sensibili la lumină și oxigen.



Analizele au fost realizate pe un sistem UHPLC Vanquish (Thermo Fisher Scientific, Germania), echipat cu detector DAD (diode array detector). Separarea cromatografică s-a efectuat pe o coloană Thermo Scientific™ Acclaim™ C30 (3 μ m, 3,0 $\times$ 150 mm), menținută la o temperatură constantă de 40°C. Faza mobilă a fost alcătuită dintr-un amestec de metanol conținând 3,2 g/L acetat de amoniu (70%) și acetonitril (30%), pompată izocratic la un debit de 1,7 mL/min. Volumul de injecție utilizat pentru fiecare probă a fost de 8 μ L. Detectia s-a realizat la lungimea de undă de 460 nm, corespunzătoare absorbției maxime a licopenului și β -carotenului. Identificarea compușilor s-a bazat pe compararea timpilor de retenție și a spectrelor de absorbție obținute cu cele ale standardelor pure. Cuantificarea licopenului și β -carotenului s-a efectuat prin metoda curbei de calibrare externe, utilizând standarde certificate de HPLC pentru licopen și β -caroten (Supelco, Sigma-Aldrich), în patru puncte de concentrație: 1, 5, 10 și 20 ng/mL.

Rezultatele au fost exprimate în μ g/g probă uscată. Toate determinările s-au realizat în triplicat, iar valorile raportate reprezintă media $\pm$ deviația standard, asigurând acuratețea și reproductibilitatea analizelor.

5.4. Metode utilizate de USVT

Metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu adaptată conform ISO 14502-1:2005 - Determination of substances characteristic of green and black tea - Part 1: Content of total polyphenols in tea - Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent

Principiul metodei

Polifenolii din pielite de roșii se extrag într-o soluție hidroalcoolică (70 % metanol) sau în apă conținând 10 % acetonitril. Compușii fenolici extrași reduc reactivul Folin-



Ciocalteu în mediu alcalin, formând un complex colorat albastru. Intensitatea culorii se determină spectrofotometric la 765 nm și este proporțională cu conținutul total de polifenoli, exprimat ca echivalent acid galic (GAE) raportat la substanța uscată a probei.

Reactiv / Soluție	Preparare / Observații
Soluție de extracție (metanol 70 % v/v)	Se amestecă 700 mL metanol cu 300 mL apă distilată
Reactiv Folin-Ciocalteu (10 % v/v)	Se diluează 1 parte reagent concentrat cu 9 părți apă; se prepară zilnic
Soluție de Na ₂ CO ₃ (7,5 % m/v)	Se dizolvă 7,5 g Na ₂ CO ₃ în apă caldă și se completează la 100 mL
Soluție standard de acid galic (1000 µg/mL)	Se dizolvă 0,100 g acid galic monohidrat în apă distilată și se completează la 100 mL
Soluții standard de calibrare (10-50 µg/mL)	Se prepară diluții adecvate din soluția stoc

Aparatură: spectrofotometru capabil să măsoare la $\lambda=765$ nm; baie termostată la 70°C; pipete automate și baloane cotate; centrifugă sau filtre de hârtie; eprubete sau cuve de reacție.

Pregătirea probei- Proba se macină fin și se omogenizează. Se determină conținutul de substanță uscată prin uscare la 103°C până la masă constantă. Rezultatul se exprimă ca fracție în calculul final.

Extracția polifenolilor (1) se cântăresc 0,200 g ($\pm 0,001$ g) de probă mărunțită și se adaugă 5,00 mL metanol 70 % (v/v) la 70°C; (2) se agită energic timp de câteva secunde pentru dispersarea completă a probei; (3) se încălzește amestecul la 70°C/ 10 minute, agitând intermitent în timpul extracției, (4) se răcește, se centrifughează (3500 rpm, 10 minute), colectând supernatantul; (5) se repetă extracția cu alți 5,00 mL solvent, se combină extractele și se completează până la volum final de 10,00 mL cu metanol 70%, rece. Probele pot fi diluate dacă este cazul.



Reacția colorimetrică

Se pipetează 1,0 mL extract (în duplicat), se adaugă 5,0 mL reactiv Folin-Ciocalteu (10 %) și, după 3-8 minute se adaugă 4,0 mL soluție de Na_2CO_3 (7,5 %). Se lasă 60 de minute la temperatura camerei și se măsoară absorbanta la 765 nm.

Curba de calibrare

Curba de calibrare se trasează folosind standard de acid galic (10-50 $\mu\text{g/mL}$) și complexul se citește spectrofotometric la 765 nm. Coeficientul de corelație R^2 trebuie să fie $\geq 0,995$.

Calculul conținutului de polifenoli totali

$$w_T = \frac{(D_{\text{sample}} - D_{\text{intercept}}) \times 10\,000 \times V_{\text{sample}} \times d}{S_{\text{std}} \times m_{\text{sample}} \times w_{\text{DM}}}$$

unde:

- w_T = conținutul total de polifenoli (exprimat în % echivalenți acid galic, GAE);
- D_{sample} = absorbția probei după corectarea cu blank;
- $D_{\text{intercept}}$ = absorbția la interceptul curbei de calibrare;
- S_{std} = panta curbei de calibrare ($\mu\text{g/mL}$ per unitate de absorbție);
- V_{sample} = volumul extractului de probă (mL);
- d = factorul de diluție aplicat (dacă este cazul);
- m_{sample} = masa probei analizate (g);
- w_{DM} = fracția de substanță uscată a probei.

Rezultatul se exprimă în procente (% m/m) echivalenți acid galic (GAE) raportat la substanța uscată.

Controlul calității

Se verifică linearitatea curbei ($R^2 \geq 0,995$). Determinările se efectuează în duplicat sau triplicat. Se folosesc reactivi proaspeți, iar soluțiile se păstrează protejate de lumină.



Raportarea rezultatelor

Se raportează tipul de proba, masa probei, condițiile de extracție, valorile absorbanțelor, curba de calibrare și rezultatul final (% GAE din substanța uscată).

5.5. Metode utilizate de USAMVB

Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali

Determinarea cantitativă a polifenolilor totali se realizează folosind o metodă spectrofotometrică ce se bazează pe reducerea fosfowolframaților și fosfomolibdaților din reactivul Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999).

Mod de lucru

O cantitate bine determinată de probă (cântărită la balanța analitică) se supune extracției în etanol 40%, prin ultrasonicare la 50°C, timp de 20 de minute. Ulterior extracției, 1 ml din probele filtrate se adăugă în baloane brune cotate (25 ml) peste care se adăugă 0,25 ml reactiv Folin-Ciocalteu și 4,75 ml apă distilată. După formarea compușilor colorați în albastru, la întuneric timp de 10 minute, se adaugă o soluție de Na_2CO_3 7% până la cotă, iar probele se incubează timp de 30 de minute pentru definitivarea complexului colorat. Apoi probele se răcesc și se determină extincția la 750 nm față de un martor preparat în mod identic, dar în care proba a fost înlocuită cu apă distilată.

Calculul rezultatelor

Cuantificarea rezultatelor se face folosind o curbă de etalonare realizată cu acid galic, soluțiile standard (10-200 $\mu\text{g/ml}$) fiind preparate în același mod că și probele. Se trasează curba extincție funcție de concentrația de acid galic. După fitare se obține ecuația dreptei care se utilizează apoi pentru calcularea cantității de compuși cu structură fenolică din proba căreia i s-a determinat extincția la 750 nm, exprimarea



făcându-se în mg GAE/100 g produs (GAE=echivalent acid galic). În final, cantitatea de compuși fenolici totali se raportează la conținutul în substanță uscată a materialului de referință și se exprimă în mg GAE/100 g SU.

Bibliografie

1. Singleton V.L, Orthofer R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299, 152-178
2. Versari A., Parpinello G. P., Mattioli A. U., 2007. Characterisation of Colour Components and Polymeric Pigments of Commercial Red Wines by Using Selected UV-Vis Spectrophotometric Methods. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 28, p. 6-10
3. Soyong, M., Guevarra, P. R., Mateo, J. M. C., & Galvez, H. F. (2021). Evaluation of tomatoes fruits flesh colour, beta-carotene and lycopene content.

5.6. Metode utilizate de UDJG

Determinarea conținutului în polifenoli din surse vegetale prin metoda colorimetrică este bazată pe o reacție de transfer de electroni între compușii fenolici și reactivul Folin-Ciocalteu, un amestec de acid fosfomolibdenic ($H_3PW_{12}O_{40}$) și acid fosfotungstic ($H_3PMo_{12}O_{40}$). În mediu bazic, fenolii transferă electroni către molibden, formând un complex colorat albastru intens, care absoarbe lumina în domeniul infraroșu, la o lungime de undă de 760 nm. Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația totală de fenoli din probă (Singleton & Rossi, 1965; Afonso et al., 2021). Absorbția maximă a complexului colorat format în reacția Folin-Ciocalteu se măsoară în infraroșu, de obicei la o lungime de undă situată între 740 și 770 nm. Valorile cel mai frecvent utilizate în literatura de specialitate sunt:

- $\lambda = 750$ nm - lungimea de undă originală propusă în metoda Singleton & Rossi (1965);
- $\lambda = 760$ nm - valoare utilizată frecvent în aplicațiile clasice;
- $\lambda = 765$ nm - valoare standardizată în protocoalele moderne AOAC și ISO 14502-1 (Ainsworth & Gillespie, 2007; Sánchez-Rangel et al., 2013);



Protocolul publicat în revista Nature Protocols de [Ainsworth & Gillespie \(2007\)](#) - Estimarea conținutului total de compuși fenolici și a altor substraturi de oxidare din țesuturile vegetale utilizând reactivul Folin-Ciocalteu propune lungimea de undă de 765 nm și are peste 4000 de citări pe platforma Google Scholar. Însă, determinarea a fost raportată și la 725 nm. [Makkar \(2003\)](#), citat de 156 ori, folosește 725 nm pentru determinarea conținutului total de polifenoli și taninuri, iar [Margraf et al. \(2015\)](#) folosește aceeași lungime pentru determinarea polifenolilor din sucuri și ceaiuri și este citat de peste 250 ori pe platforma Google Scholar. [Bancuta et al. \(2016\)](#) au studiat prin comparație mai multe lungimi de undă, 725, 750, 760 și 765 nm. Rezultatele au arătat că determinarea realizată pe acid galic a dat rezultate mai mari în intervalul 750 și 760 nm. Totuși, pe materie vegetală - struguri - rezultate semnificativ mai mari au fost obținute pentru 725 nm. Prin utilizarea metodelor statistice (regresie liniară, corelații Pearson, analiza componentelor principale, testul t Student) autorii au concluzionat că 725 nm este cea mai bună lungime de undă care s-a corelat cel mai mult cu valorile concentrației. Rezultatele obținute la 765 nm și 760 nm au conținut un raport de eroare ridicat, din această cauză fiind diferite de rezultatele obținute la 725 nm și 750 nm. Deși interferă ușor, semnalul principal la 725 nm este mult mai intens și mai stabil decât la 750-765 nm. În acest interval, absorbția complexului este deja în scădere, iar semnalul este mai zgomotos, rezultând o eroare statistică mai mare ([Bancuta et al., 2016](#)), lungimea de undă de 725 nm fiind un compromis optim între sensibilitate și stabilitate, chiar dacă include o mică interferență cu alți compuși decât polifenolii.

Reactivul Folin-Ciocalteu se pregătește prin dizolvarea inițială a 100 g tungstat de sodiu ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) și 25 g Molibdat de sodiu ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) în 700 mL apă distilată. Apoi, soluția astfel obținută este acidifiată cu 50 mL acid clorhidric concentrat și 50 mL acid fosforic 85%. Soluția acidifiată este fiartă timp de 10 h și răcită. Ulterior, se adaugă 150



g de sulfat de litiu ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Soluția de culoare galben intens rezultată este reactivul Folin-Ciocalteu ([Sánchez-Rangel et al., 2013](#)). Reacția dintre polifenoli și reactivul Folin-Ciocalteu pentru a genera complexul de culoare albastră (posibil $[\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}]^{4-}$) are loc în mediu alcalin, la pH 10. Această valoare este atinsă prin adăugare de carbonat de sodiu (Na_2CO_3). În aceste condiții bazice, disocierea protonilor fenolici duc la formarea ionului fenolat, capabil să reducă reactivul Folin-Ciocalteu ([Sánchez-Rangel et al., 2013](#)).

Pentru extracția polifenolilor din surse vegetale sunt utilizați în mod obișnuit solvenții organici; cu toate acestea, selecția lor variază în funcție de studiu ([Knez et al., 2025](#)). Cei mai utilizați solvenți sunt n-hexanul, acetona, metanolul și etanolul, adesea combinați cu apă. Influența tipului și a concentrației solventului asupra eficienței extracției polifenolilor a fost investigată pe larg. De exemplu, s-a observat un conținut mai mare de polifenoli în extractele obținute folosind 70% etanol în apă, comparativ cu cele obținute cu 70% metanol, etanol absolut sau metanol absolut ([Knez et al., 2025](#) și bibliografia citată). Totuși, [Ammar et al. \(2018\)](#) au concluzionat că o polaritate mai mare a solventului sporește eficiența extracției. În studiul lor, eficacitatea diluanților a urmat următoarea ordine: extract metanolic > extract etanolic > extract acetonic > extract dietilic eter > extract acetat de etil > extract hexan.

Amestecul este centrifugat și se recuperează solventul, numit în continuare extract. Extractul se diluează apoi corespunzător, iar la un volum cunoscut de extract se adaugă reactiv Folin-Ciocalteu și soluție de carbonat de sodiu 60g/L (Na_2CO_3) pentru a crea mediul alcalin. După o perioadă de reacție cuprinsă între 30 de minute și maximum 2 ore ([Ainsworth & Gillespie, 2007](#); [Bancuta et al., 2016](#)), la temperatura camerei, absorbția este măsurată spectrofotometric la 760 nm ([Sohrabvandi et al., 2012](#)).



Rezultatele se exprimă de obicei în mg echivalenți acid galic/L (mg GAE/L), folosind o curbă de calibrare realizată cu standard de acid galic sau în mg echivalenți acid ferulic/L (mg FAE/L), folosind o curbă de calibrare realizată cu standard de acid ferulic.

Metoda clasică, propusă de [Singleton & Rossi \(1965\)](#) presupune reacția dintre un volum de 0,2 ml extract și 1,5 ml reactiv Folin Ciocalteu. După 5 min de reacție se adaugă 1,5 ml soluție Na_2CO_3 , 60g/L. Amestecul de reacție se lasă în repaus timp de 90 min la temperatura camerei, după care se citește absorbanta la $\lambda=750$ nm față de metanol acidifiat. Deși metoda Folin-Ciocalteu este **rapidă, sensibilă și reproductibilă**, nu este complet specifică doar pentru compușii fenolici. Ea poate reacționa și cu alți compuși reducători, precum anumite zaharuri, aminoacizi, sulfiți sau vitamina C, fapt care poate duce la **supraestimarea** valorii totale a fenolilor ([Everette et al., 2010](#); [Sánchez-Rangel et al., 2013](#)). Cu toate acestea, datorită simplității și aplicabilității largi, metoda rămâne una dintre cele mai utilizate în cuantificarea polifenolilor.

Principiul metodei de separare prin HPLC

Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) este o tehnică de separare bazată pe diferențele de interacțiune dintre compușii dintr-un amestec și cele două faze implicate ([Agilent Technology, 2025](#)):

- Faza mobilă - lichidul care curge prin sistem (un solvent sau un amestec de solvenți);
- Faza staționară - materialul fixat în interiorul coloanei (de obicei particule de silice modificate chimic).

Compușii fenolici (polifenolii) se separă în funcție de polaritatea și afinitatea lor față de aceste faze.

Polifenolii sunt compuși aromatici, adesea polari, care conțin mai multe grupări hidroxil (-OH) atașate la un nucleu fenolic. De aceea, HPLC în fază inversă (*reverse phase* HPLC,



RP-HPLC) este cea mai utilizată metodă pentru separarea lor. În RP-HPLC cele două faze implicate sunt următoarele:

- Faza staționară - nepolară, de exemplu o coloană C18 - octadecilsilană;
- Faza mobilă - polară: amestecuri de apă cu metanol, acetonitril sau acid formic.

Compușii mai polari vor avea interacțiuni mai slabe cu faza staționară și vor ieși mai repede, în timp ce compușii mai nepolari se vor reține mai mult în coloană.

Etapetele separării prin HPLC sunt următoarele:

- a) Injectia probei - un volum mic (de obicei 10-20 μL) din extractul care conține polifenolii este introdus în fluxul fazei mobile.
- b) Transportul prin coloană - faza mobilă transportă compușii prin faza staționară.
- c) Separarea - fiecare polifenol se deplasează cu o viteză diferită, în funcție de interacțiunile hidrofobe, hidrogen, și dipol-dipol.
- d) Detectia - compușii separați sunt detectați la ieșirea din coloană, de obicei cu detector UV-Vis (deoarece polifenolii absorb în UV, 254-370 nm).
- e) Obținerea cromatogramei - un grafic semnal (absorbție) vs. timp, în care fiecare vârf (peak) corespunde unui compus.

Interacțiunile implicate în separare sunt:

- Interacțiuni hidrofobe între lanțurile C18 și părțile nepolare ale polifenolilor.
- Legături de hidrogen între grupările -OH și faza mobilă.
- Interacțiuni π - π între nucleeele aromatice și faza staționară.

Acestea determină timpul de retenție (t_R) al fiecărui compus.

Avantajele metodei de separare a polifenolilor prin HPLC sunt:

- Rezoluție înaltă între compuși similari (izomeri, derivați).
- Sensibilitate mare, potrivită pentru concentrații mici.
- Posibilitatea de cuantificare (determinarea concentrațiilor).

– Compatibilitate cu diverse tipuri de extracte vegetale.

În fig. 5.6 este prezentată schema de principiu a unui aparat HPLC iar în fig. 5.7 succesiunea operațiilor pentru extracția polifenolilor prin HPLC.

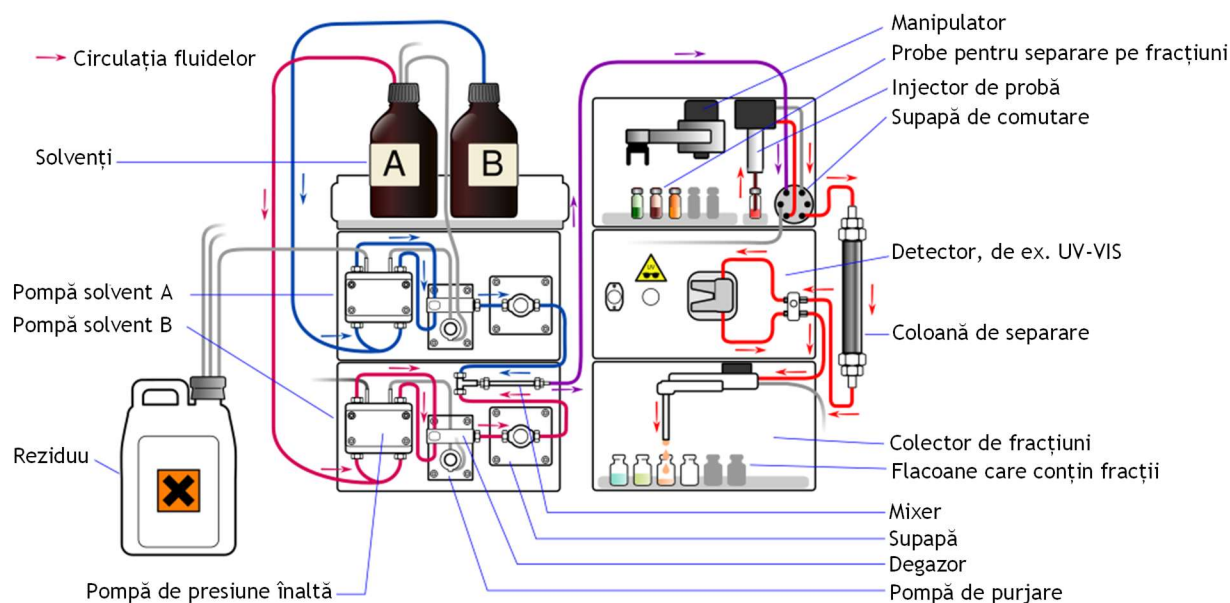


Fig. 5.6. Schema de principiu a unui aparat HPLC

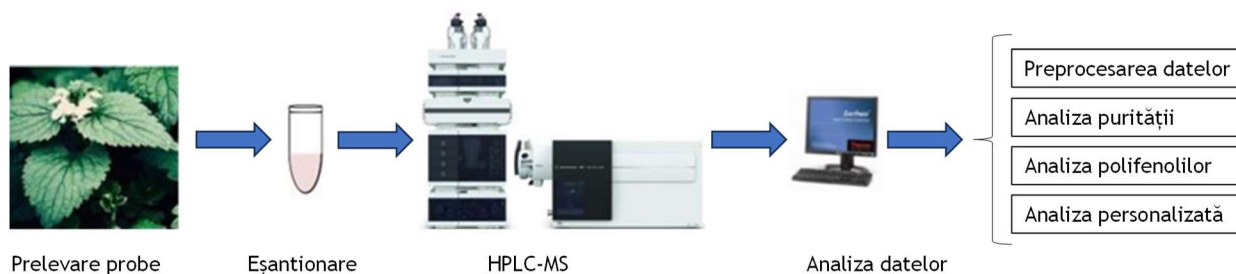


Fig.5.7. Succesiunea operațiilor pentru analiza polifenolilor

Pregătirea probelor pentru separarea polifenolilor prin HPLC cuprinde următoarele etape ([López-Fernández et al., 2020](#)):



- Extracție: 1 g probă solidă (ex. plantă uscată) + 10 mL solvent metanol: apă 80:20 v/v acidificat (0.1% HCl sau 0.1% acid formic) cu agitare 30 min la sonicare sau 1 h pe agitator magnetic.
- Centrifugare 10 min 4000 rpm și decantare. Se repetă extracția dacă e necesar, apoi se combină extractele.
- Evaporare sub N₂ în rota-evaporator până la uscare și reconstituire în volum cunoscut (ex. 2 mL MeOH:H₂O 50:50). Filtrare prin filtru 0.22 μm înainte de injecție.
- Curățare (opțional): SPE C18 pentru probe complexe (se aplică extract, se spală cu apă, apoi cu metanol/acetonitril).

Alegerea coloanei de separare: pentru separarea polifenililor prin metoda HPLC clasică se recomandă coloană C18 150 × 4.6 mm, 3-5 μm, iar pentru metoda UPLC, coloană 100 × 2.1 mm, 1.7-2.1 μm (López-Fernández *et al.*, 2020). O coloană fenil-hexil sau C18 cu grupări polare încorporate poate îmbunătăți separarea izomerilor aromatici.

Exemplu general - metodă robustă pentru un amestec tipic: acid galic, acid cafeic, acid clorogenic, catechină, epicatechină, rutină, quercetină, kaempferol (Somkuwar *et al.*, 2018; Kalogiouri *et al.*, 2022; Ueda *et al.*, 2023):

- Coloană: C18 150 × 4.6 mm, 5 μm/ Temperatura: 30 °C/ Flux: 1.0 mL/min/ Injecție: 10 μL (ajustează la concentrări)/ Monitorizare la 280, 320 și 360 nm; scanare 200-400 nm pentru identificare/ Fază mobilă: A = Apă + 0.1% acid formic, B = acetonitril + 0.1% acid formic/ Gradient (total ≈ 50 min):
 - 0.0 min – 5% B (echilibrare inițială)
 - 0-5 min – 5% B (start)
 - 5-30 min – liniar la 40% B
 - 30-38 min – liniar la 60% B
 - 38-42 min – linear la 95% B (spălare coloanei pentru compuși nepolari)



42-50 min – 5% B reechilibrare (sau 42-55 min reechilibrare completă)

- Timp de rulare recomandat: 50 min (se poate scurta la ~30-35 min pentru separări mai rapide, dar s-ar putea pierde rezoluție).

Ordinea tipică de eluție (orientativă, depinde de coloană) este:

- Acizi fenolici foarte polari (ex. acid galic)/ Acizi cinnamici (acid cafeic, clorogenic)/ Flavanoli (catechină, epicatechină)/ Rutinozide (rutină)/ Aglicone flavonoli (quercetină, kaempferol) – elutează spre sfârșit (sunt mai nepolari după hidroliză).

Exemplu de separare polifenoli din făină de pielite sau semințe de struguri prin HPLC

Parametri experimentali tipici ([Dabetic et al., 2022](#); [Pérez-Navarro et al., 2019](#)):

- Probă uscată la 40...50 °C, măcinată la < 1 mm pentru pielite/semințe de struguri;
- Extracție: raport probă:solvent = 1:10 (w/v); solvent metanol: apă (80:20) acidificat (de exemplu 0.1 % acid formic). Agitare/sonicare circa 30 min la aproximativ 50 °C;
- Filtrare la 0,22 μm, eventual degazare solvent;
- Coloană HPLC: C18 inversă (de exemplu 150 × 4.6 mm, 5 μm) sau echivalent; temperatura circa 30 °C;
- Faze mobile: A = apă + 0.1 % acid formic; B = acetonitril + 0.1 % acid formic;
- Program gradient (exemplu): 0-5 min: 5 % B; 5-30 min: 5 → 40 % B; 30-38 min: 40 → 60 % B; 38-42 min: 60 → 95 % B; 42-50 min: revenire la 5% B & reechilibrare până la 50 min. Flux ~1.0 mL/min, injecție 10 μL. Detector DAD, monitorizare la 280 nm (flavanoli, acizi fenolici), 320 nm (acizi cinnamici), 360 nm (flavonoli) sau scanare 200-400 nm.



Observație: în semințe de struguri domină flavan-3-oli (catechină / epicatechină) și procianidine; în pielețe de struguri se găsesc și flavonoli/glicozide + acizi fenolici (Ky & Teissedre, 2015).

Exemplu de separare polifenoli din făină de pielețe de roșii prin HPLC

Parametri experimentali tipici (Perea-Domínguez *et al.*, 2018; Kızıllırmak Esmer *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 2024):

- Probă uscată la 40...50 °C, măcinată la < 1 mm;
- Extracție: solvent metanol:apă 80:20 v/v + acid (ex. 0.1% formic);
- Coloană HPLC: C18 250 × 4.6 mm, 5 μm la circa 30 °C;
- Faze mobile: de exemplu A = apă + 1% acetic acid; B = metanol; flux ~1.1 mL/min; injecție 10 μL. Se pot separa 16 polifenoli simultan conform metodei Xiao *et al.* (2024).
- Program gradient (exemplu): început ~x% B (ex. metanol) → creștere până la ~... în ~60 min; metoda validată pentru 0.1-20 μg/mL interval (Xiao *et al.*, 2024).
- Detecție DAD, monitorizare tipic la 280 nm, 320 nm etc.

Observație: în pielețele de roșii se găsesc acizi fenolici (cafeic, ferulic, p-coumaric), naringenin, rutină, catehină etc., sub formă legată sau conjugată (Kızıllırmak Esmer *et al.*, 2022).

Bibliografie

- Shalaby, E. A., Shanab, S. M., & Singh, V. (2010). Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), 2622-2632.
- Lamuela-Raventós R.M. (2018). Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications*, 107-115.



- Prior, R.L., Wu, X. & Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Martínez-Huelamo, M. et al. (2011) Phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity as chemotaxonomic markers of tomato varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3994-4001.
- Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Afonso, J.J., Paiva, A., Cardoso, S.M., & Calhela, R.C. (2021). Craft beers as functional beverages: phenolic profile and antioxidant activity. *Beverages*, 7(1), 1-13.
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical methods*, 5(21), 5990-5999.
- Makkar, H. P. (2003). Measurement of total phenolics and tannins using Folin-Ciocalteu method. In *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: A Laboratory Manual* (pp. 49-51). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Margraf, T., Karnopp, A. R., Rosso, N. D., & Granato, D. (2015). Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. *Journal of food science*, 80(11), C2397-C2403.
- Bancuta, O. R., Chilian, A., Bancuta, I., Ion, R. M., Setnescu, R., Setnescu, T., & Gheboianu, A. (2016). Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. *Romanian Journal of Physics*, 61(7-8), 1255-1264.
- Knez, E., Kadac-Czapska, K., & Grembecka, M. (2025). Evaluation of Spectrophotometric Methods for Assessing Antioxidant Potential in Plant Food Samples—A Critical Approach. *Applied Sciences*, 15(11), 5925.
- Ammar, A.F., Baeshen, M.; Aqlan, F.M., Siddeeg, A., Chamba, M.V.M., Afifi, M., Almulaiky, Y.Q., Alayafi, A. (2018). Solvent Effects on Antioxidant Activities and Phenolic Contents of the Alhydwān (Boerhavia Elegans Choisy) Seed Flour. *J. Food Meas. Charact.* 12, 2121-2127
- Sohrabvandi, S., Taghizadeh, M., Mortazavian, A.M., & Ghavi, F. (2012). Assessment of antioxidant activity and some quality properties of non-alcoholic beers. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4), 1071-1079.
- Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., & Walker, R.B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139-8144.
- Agilent Technology 2025. Liquid chromatography. <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography>, accesat în noiembrie 2025.



- Ahmed R. **2024**. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, applications, versatility, efficiency, innovation and comparative analysis in modern analytical chemistry and in pharmaceutical sciences, *Clinical Investigation*, 14(9),
- Chen S., Yuan Y., Zhang F., Lin S., Zu P., Farag M.A., Simal-Gandara J., Cao H. & Xiao J. **2025**. UPLC-ESI-MS/MS-based chemometric approach for investigating the effect of conventional versus modern extraction methods on polyphenols recovery from grape seed wastes. *Food Chemistry*, 487, 144619. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144619>
- Dabetic N., Todorovic V., Malenovic A., Sobajic S. & Markovic B. **2022**. Optimization of Extraction and HPLC-MS/MS profiling of phenolic compounds from red grape seed extracts using conventional and deep eutectic solvents. *Antioxidants*, 11(8), 1595. <https://doi.org/10.3390/antiox11081595>
- De Araújo F.F., de Paulo Farias D., Neri-Numa I.A. & Pastore G.M. **2021**. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 127535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>
- Dhalaria R., Verma R., Kumar D., Puri S., Tapwal A., Kumar V., Nepovimova E. & Kuca K. **2020**. Bioactive Compounds of Edible Fruits with Their Anti-Aging Properties: A Comprehensive Review to Prolong Human Life, *Antioxidants* 2020, 9(11), 1123. <https://doi.org/10.3390/antiox9111123>
- Intharuksa A., Kuljarusnont S., Sasaki Y. & Tungmunnithum D. **2024**. Flavonoids and other polyphenols: Bioactive molecules from traditional medicine recipes/medicinal plants and their potential for phytopharmaceutical and medical application. *Molecules*, 29(23), 5760. <https://doi.org/10.3390/molecules29235760>
- Kalogiouri N.P., Karadimou C., Avgidou M.S., Petsa E., Papadakis E.-N., Theocharis S., Mourtzinis I., Menkissoglu-Spiroudi U. & Koundoura S. **2022**. An optimized HPLC-DAD methodology for the determination of anthocyanins in grape skins of red Greek winegrape cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Molecules*, 27(20), 7107. <https://doi.org/10.3390/molecules27207107>
- Kızılırmak Esmer, Ö., Koçak, E., Cevrem, A. E., & Kıcıkoğlu, O. (2022). *Alkali Extraction of Phenolic Compounds from Tomato Peel: Optimization of Extraction Conditions and Investigation of Phenolic Profile by LC-MS/MS*. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 10(sp2), 2966-2976. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10isp2.2966-2976>
- Ky I. & Teissedre P.-L. **2015**. Characterisation of Mediterranean grape pomace seed and skin extracts: polyphenolic content and antioxidant activity. *Molecules*, 20(2), 2190-2207. <https://doi.org/10.3390/molecules20022190>
- López-Fernández O., Pateiro M., Munekata P.E.S., Rocchetti G. & Lorenzo J.M. **2020**. Determination of Polyphenols Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Technique (LC-MS/MS): A Review. *Antioxidants*, 9(6), 479. <https://doi.org/10.3390/antiox9060479>
- Palos-Hernández A., González-Paramás A.M. & Celestino Santos-Buelga C. **2024**. Latest advances in green extraction of polyphenols from plants, foods and food by-products. *Molecules*, 30(1), 55.
- Pandey K.B. & Rizvi S.I. **2009**. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Perea-Domínguez X.P., Hernández-Gastélum L.Z., Olivas-Olguín H.R., Espinosa-Alonso L.G., Valdez-Morales M. & Medina-Godoy S. **2018**. Phenolic composition of tomato varieties and an industrial



- tomato by-product: free, conjugated and bound phenolics and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3453-3461. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3269-9>
- Pérez-Navarro J., Izquierdo-Cañas P.M., Mena-Morales A., Martínez-Gascuña J., Chacón-Vozmediano J.L., García-Romero E., Hermosín-Gutiérrez I. & Gómez-Alonso S. **2019**. Phenolic compounds profile of different berry parts from novel *Vitis vinifera* L. red grape genotypes and Tempranillo using HPLC-DAD-ESI-MS/MS: A varietal differentiation tool. *Food Chemistry*, 295, 350-360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.137>
- Plaza M., Domínguez-Rodríguez G., Castro-Puyana M., Marina M.L. **2018**. Polyphenols analysis and related challenges. In Galanakis C.M. (Ed.) *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 177-232.
- Pyrzyska K. & Sentkowska A. **2019**. Chromatographic Analysis of Polyphenols. Ch. 21 in *Polyphenols in Plants. Isolation, Purification and Extract Preparation (Second Edition)*, pp. 353 - 364. Elsevier, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00021-9>
- Rusu M.E., Fizeșan I., Vlase L. & Popa D.-S. **2022**. Antioxidants in Age-related diseases and anti-aging strategies. *Antioxidants*, 1(10), 1868. <https://doi.org/10.3390/antiox11101868>
- Somkuwar R.G., Bhangé M.A., Oulkar D.P., Sharma A.K. & Ahammed Shabeer T.P. **2018**. Estimation of polyphenols by using HPLC-DAD in red and white wine grape varieties grown under tropical conditions of India. *Journal of Food Science and Technology*, 55(12), 4994-5002. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3438-x>
- Sun M.-F., Jiang C.-L., Kong Y.-S., Luo J.-L., Yin P. & Guo G.-Y. **2022**. Recent advances in analytical methods for determination of polyphenols in tea: A comprehensive review. *Foods*, 11(10), 1425. <https://doi.org/10.3390/foods11101425>
- Ueda J.M., Griebler K.R., Finimundy T.C., Rodrigues D.B., Veríssimo, L., Pires T. C. S. P., Gonçalves J., Fernandes I.P., Pereira E., Barros L., Heleno S.A. & Calheta R.C. **2023**. Polyphenol composition by HPLC-DAD-(ESI-)MS/MS and bioactivities of extracts from grape agri-food wastes. *Molecules*, 28(21), 7368. <https://doi.org/10.3390/molecules28217368>
- Xiao X., Liu F., Sun M., Tang Z., Wu Y., Lyu J., Khan K.S. & Yu J. **2024**. Development of a high-performance liquid chromatography method for simultaneous quantification of sixteen polyphenols and application to tomato. *Journal of Chromatography A*, 1733, 465254. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465254>
- Yu M., Gouvêas I., Rocha J. et al. **2021**. Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Scientific Reports*, 11, 10041. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89437-4>
- Zagoskina N.V., Zubova M.Y., Nechaeva T.L., Kazantseva V.V., Goncharuk E.A., Katanskaya V.M., Baranova E.N. & Maria A Aksenova M.A. **2023**. Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13874. <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>
- Zhang H. & Tsao R. **2016**. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>



6. STUDII DE OMOGENITATE ȘI STABILITATE

6.1. Studii de omogenitate

Testele de omogenitate sunt esențiale pentru a asigura consistența proprietăților materialelor de referință (MR) în toate unitățile și în cadrul unităților individuale. Ghidul ISO 35:2017 oferă îndrumări detaliate privind efectuarea testelor de omogenitate ca parte a procesului de producție a MR (Figura 6.1). Testele de omogenitate asigură că materialul de măsurare este potrivit pentru utilizarea prevăzută, iar rezultatele sunt utilizate pentru a calcula componenta de incertitudine asociată cu omogenitatea. Dacă se constată că materialul este insuficient de omogen, pot fi necesare procesări sau ajustări suplimentare.

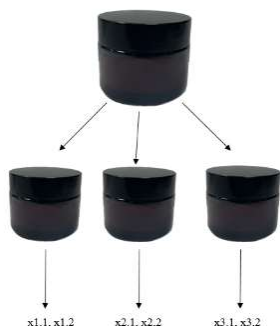
Testele de omogenitate asigură:

- omogenitatea între unități: toate unitățile MR au valori ale proprietăților consistente în limita incertitudinii declarate.
- omogenitatea în cadrul unității: materialul din cadrul fiecărei unități este uniform, în special atunci când se prelevează subeșantioane pentru măsurare.

Evaluarea omogenității

- variabilitatea între unități: abaterea standard între unități este calculată pentru a determina dacă variabilitatea este acceptabilă pentru utilizarea preconizată a MR.
- variabilitatea în cadrul unității: dacă este permisă subeșantionarea, variabilitatea în cadrul unității este evaluată pentru a se asigura că dimensiunea minimă a eșantionului este suficientă pentru măsurători precise.

Testarea omogenității este o etapă esențială în producția de materiale de referință pentru a asigura fiabilitatea și consecvența măsurărilor în toate unitățile și subeșantioanele.



Studiile de omogenitate au fost realizate de către laboratorul acreditat din IBA București. Rezultatele arată că MR-01TP este un produs omogen, analizele au respectat cerințele standardului ISO 17043 și ISO 35 (omogenitatea între unități/omogenitatea în cadrul unității).

Probă		Umiditate (%)	TPC (mg GAE/100g) rap. la s.u	Medie pe lot	Medie	Deviația standard
1	1.1	5,00	730,24	720,77	740,38	17,45
	1.2	5,02	711,29			
2	2.1	4,98	774,23	754,19		
	2.2	4,95	734,14			
3	3.1	5,01	748,83	746,20		
	3.2	4,99	743,57			

S-au analizat următorii parametri: varianța între loturi, varianța între replicare și incertitudinea măsurărilor, pentru a evalua omogenitatea probelor. Această analiză a permis evidențierea variațiilor atât între loturi cât și în cadrul replicatelor, oferind o imagine clară asupra consistenței și repetabilității măsurărilor realizate.



Astfel în analiza omogenității s-au analizat 3 loturi, fiecare lot în dublu. Aplicând analiza statistică cu programul MiniTab, obținem următoarele

Analiza statistică cu programul MiniTab pentru 3 loturi, fiecare lot în dublu	
Varianța între loturi (SB)	609,24 (mg/100g) ²
Varianța între replici (SW)	332,32 (mg/100g) ²
Incertitudinea standard pentru o unitate	12,89 mg/100g
Incertitudinea standard a mediei globale	7,44 mg/100g
Incertitudinea totală (variabilitatea între loturi și între replici)	16,08 mg/100g

6.2. Studii de stabilitate

Studiile de stabilitate au fost realizate de către laboratorul acreditat din IBA București. Rezultatele arată că MR-01TP este un produs stabil, analizele fiind efectuate conform cerințelor din standardul ISO 17043 și ISO 35.

A fost calculat p-value pentru a testa dacă există diferențe semnificative între loturi. Astfel valoarea obținută a fost de 0,29 ($p > 0,05$), ceea ce înseamnă că nu există diferențe semnificative între loturi, proba este omogenă. Rezultatele obținute în urma determinărilor efectuate asupra făinii din subprodusul rămas după stoarcerea roșiilor sunt prezentate în Tabelul 6.2.

Săptămânal au fost analizate câte trei flacoane, fiecare determinat în dublu.



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Tabelul 6.2. Conținutul de TPC în MR-01TP

Timp de depozitare	Codificare	Probă în dublu	Umiditate (%)	TPC (mg GAE/100g) rap. la s.u	Medie lot	Medie
T0	0.1	1	5,05	779,01	764,31	762,24
		2	5,08	749,61		
	0.2	1	5,00	762,38	761,51	
		2	5,05	760,65		
	0.3	1	5,01	776,60	760,88	
		2	5,02	745,17		
T1	1.1	1	5,08	752,82	744,68	757,34
		2	5,00	736,54		
	1.2	1	4,93	742,40	753,05	
		2	4,94	763,70		
	1.3	1	4,91	784,39	774,30	
		2	5,01	764,20		
T2	2.1	1	5,20	730,47	750,12	752,95
		2	5,24	769,77		
	2.2	1	5,18	717,56	733,26	
		2	5,24	748,96		
	2.3	1	5,37	769,44	775,37	
		2	5,35	781,34		
T3	3.1	1	5,09	714,28	725,85	741,24
		2	4,94	737,43		
	3.2	1	5,23	777,68	770,80	
		2	5,16	763,92		
	3.3	1	4,98	711,55	727,08	
		2	5,31	742,61		
T4	4.1	1	4,98	729,06	729,56	737,87
		2	5,0	730,05		
	4.2	1	5,07	711,57	725,68	
		2	5,09	739,79		
	4.3	1	5,06	785,74	758,38	
		2	5,10	731,01		
T5	5.1	1	4,77	737,66	731,86	734,85
		2	5,33	725,70		
	5.2	1	5,46	738,98	722,03	
		2	5,32	705,07		



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

	5.3	1	5,28	773,98	750,84	
		2	5,27	727,86		
T6	6.1	1	5,06	719,53	724,36	725,34
		2	5,06	729,19		
	6.2	1	4,93	743,40	741,75	
		2	5,07	740,10		
	6.3	1	5,02	712,17	709,90	
		2	5,22	707,62		
T7	7.1	1	4,89	715,44	723,31	722,24
		2	4,95	731,17		
	7.2	1	4,79	720,14	716,24	
		2	4,93	712,34		
	7.3	1	4,99	707,46	727,18	
		2	4,99	746,89		
T8	8.1	1	5,02	723,37	736,11	716,77
		2	5,00	748,86		
	8.2	1	4,98	672,50	693,35	
		2	5,06	714,90		
	8.3	1	4,99	700,78	720,84	
		2	5,05	740,91		
T9	9.1	1	5,15	707,12	721,93	712,41
		2	5,21	736,73		
	9.2	1	5,01	712,11	709,80	
		2	5,16	707,49		
	9.3	1	5,08	724,54	705,49	
		2	5,08	686,44		

Analiza statistică ANOVA a permis calcularea varianței între flacoane (SB), a varianței între replici (SW), precum și a statisticii F și a p-value corespunzătoare pentru fiecare săptămână.

Rezultatele obținute în urma analizei statistice sunt prezentate în tabelul 6.3.



Tabelul 6.3. Analiza statistică ANOVA cu privire la stabilitatea făinii obținute din subprodusul rămas după stoarcerea roșiilor

Săptămâna	SB (variația între flacoane) (mg/100g) ²	SW (variația între replicare) (mg/100g) ²	F	p-value
0	6,65	309,20	0,021	0,9789
1	466,15	187,73	2,483	0,2311
2	899,26	445,34	2,019	0,2783
3	1311,00	281,66	4,654	0,1203
4	638,19	632,12	1,010	0,4621
5	432,77	570,00	0,759	0,5410
6	104,71	26,48	3,954	0,1442
7	61,93	311,68	0,199	0,8298
8	932,82	441,15	2,115	0,2673
9	145,23	391,62	0,371	0,7179

Interpretarea datelor indică faptul că, în toate săptămânile, diferențele dintre flacoane nu sunt semnificative statistic ($p\text{-value} > 0,05$), iar variabilitatea internă între replicare este mai mare decât diferențele între unități, confirmând **stabilitatea materialului**. Această constatare susține utilizarea făinii obținute din subprodusul rămas după stoarcerea roșiilor ca **material de referință stabil și omogen** pentru determinarea compușilor polifenolici pe parcursul a 9 săptămâni de depozitare.

Concluziile studiilor de omogenitate și stabilitate

Omogenitatea materialului a fost evaluată prin analiza a trei flacoane, fiecare determinată în dublu. Rezultatele ANOVA au arătat că diferențele dintre flacoane nu sunt semnificativ statistic, iar variabilitatea internă între replicare a fost mai mare decât cea între flacoane. Stabilitatea materialului pe durata celor 9 săptămâni a fost evaluată prin monitorizarea conținutului de polifenoli totali. Media generală a valorilor



obținute, precum și deviația standard calculată pe toate cele 60 de analize ($736,5 \pm 25,5$), indică faptul că materialul este stabil pe termen scurt. Variabilitatea observată se încadrează în intervalul deviația standard și confirmă păstrarea caracterului analitic al materialului pe întreaga perioadă de studiu.

Interpretarea datelor indică faptul că, în toate săptămânile, diferențele dintre flacoane nu sunt semnificative statistic ($p\text{-value} > 0,05$), iar variabilitatea internă între replicate este mai mare decât diferențele între unități, confirmând stabilitatea materialului.

5.3. Condiții de ambalare, depozitare și transport

Polifenolii din produsele vegetale sunt sensibili la condițiile de mediu (lumină și oxigen), prin urmare s-a propus ambalarea în flacoane din sticlă brună care reduce degradarea polifenolilor inițiată de lumina naturală. De asemenea, capacitatea mică a flacoanelor permite un contact minim cu oxigenul din mediul de ambalare. Temperatura de depozitare și transport este de 4°C - 30°C .





7. REALIZAREA TESTĂRII INTERLABORATOARE

IBA București a furnizat fiecărui participant la testele interlaboratoare câte 3 produse de material de testare.

Probă	Denumire	Descriere
Proba 1	MR-01-TP	făină din piețițe de roșii ambalată în flacon din sticlă brună, etichetat, sigilat prin termosudare cu folie de aluminiu
Proba 2	fiolă roșie	făină din piețițe de roșii obținută prin distilare criogenică a produsului din MR-01-TP
Proba 3	fiolă albastră	produs MR-01-TP ambalat în vid

Cantitatea de produs din fiecare probă

Probă	Denumire	Gramaj produs (g)
Proba 1	MR-01-TP	20
Proba 2	fiolă roșie	2
Proba 3	fiolă albastră	2



Produsele au fost realizate conform tehnologiei dezvoltate în activitatea A3.1 din proiectul METROFOOD-RO Evolve și descrisă în IM3.1.

Pentru prelucrarea datelor adecvată obiectivului stabilit, s-a optat pentru standardizarea raportării rezultatelor, astfel încât toți participanții să transmită informațiile necesare din Testul 01-CI și, respectiv Testul 02-CI.



TEST 01/ PARTICIPANT: P1- IBA BUCUREȘTI

Participant: IBA București

TEST 01-CI -DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI DIN MR-01TP

Rezultatele se raportează cu două zecimale, unitatea de măsură fiind mg GAE/100g s.u.

Caracteristici	Unitate de măsură	Rezultat	Metoda de testare utilizată	Metodă acreditată(da/nu)
Umiditate (Substanță uscată)	%	5,08±0,14 (94,92)	Gravimetrică	da
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	699,09	Spectrofotometrică Folin-Ciocalteu	da
Polifenoli totali/ s.u	mg GAE/100g s.u	736,50±25,50	-	-
Substanțe reducătoare	g/100 g			
Licopen				

Persoana responsabilă cu raportarea rezultatelor: Anghel Mihaela

Denumire metoda 1 - Metoda Folin Ciocalteu

Principiul metodei - Principiul testului F-C constă în reducerea reactivului Folin-Ciocalteu în prezența substanțelor fenolice, rezultând producerea de albastru de molibden-tungsten care este măsurat spectrofotometric la 752 nm, iar intensitatea crește liniar odată cu concentrația de fenolici în mediul de reacție.

Parametri lucru - extracție 2000 rpm, temp 25°C, centrifugare 10000 rpm, temp 4°C.

Mod de lucru - Conținutul total de compuși polifenolici a fost determinat prin metoda Folin-Ciocalteu (Wojdylo și col., 2007), adaptată la condițiile de lucru din laborator. Pe scurt, 500 µL extract metanolic a fost amestecat cu 5 mL reactiv Folin-Ciocalteu (dilat cu apă în proporție de 1:15) și incubat la întuneric timp de 10 minute. După expirarea celor 10 minute se adaugă 500 µL carbonat de sodiu 20% și se lasă la incubat timp de 20 minute. După 20 minute de incubare la temperatura camerei, la întuneric, compusul albastru colorat dezvoltat a fost măsurat spectrofotometric la 752 nm



utilizând un spectrofotometru (Specord 210 UV-VIS, Analytic Jena, Germania). S-a realizat o curbă standard folosind diferite concentrații (0,005-0,175 mg/mL) de acid galic în aceleași condiții cu proba ($R^2=0,9999$). Rezultatele au fost exprimate în mg miliechivalenți acid galic/100 g substanță uscată (mg GAE/100g s.u.).

TEST 02 / Participant: P1- IBA București

Participant: IBA Bucuresti

TEST 02-CI RAPORTAREA REZULTATELOR

EFFECTUL CRIOGENĂRII ASUPRA CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI

Rezultatele se raportează cu două zecimale, unitatea de măsură fiind mg GAE/100g s.u.

Caracteristici	Unitate de măsură	Proba 1 MR-01TP	Proba 2 Fiola roșie	Proba 3 Fiola albastră
Substanță uscată	%	94,92	95,0	95,00
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	699,09	626,29	595,84
Polifenoli totali/substanță uscată	mg GAE/100g s.u	736,50±25,50	659,25±28,08	627,20±11,28

Responsabil transmitere rezultat – Anghel Mihaela

DESCRIEREA METODEI DE DETERMINARE A CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI DIN MR-01TP

Denumire metoda 1 - Metoda Folin Ciocalteu, descrisă anterior.



TEST 01/ Participant: P2- INOE 2000

Participant: 2. INCDO INOE 2000 ICIA

TEST 01-CI RAPORTAREA REZULTATELOR DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI DIN MR-01TP

Rezultatele se raportează cu două zecimale, unitatea de măsură fiind mg GAE/100g s.u.

Caracteristici	Unitate de măsură	Rezultat	Metoda de testare utilizată	Metodă acreditată(da/nu)
Umiditate (Substanță uscată)	%	5,90	Gravimetrică	nu
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	510.03	Spectrofotometrică Folin-Ciocalteu	nu
Polifenoli totali/ s.u	mg GAE/100g s.u	542	-	-
Substanțe reducătoare	g/100 g	-	-	-
β - caroten	mg/100 g s.u.	10.69	HPLC DAD	nu
Licopen	mg/100 g s.u.	14.73	HPLC DAD	nu

Persoana responsabilă cu raportarea rezultatelor: Anca Becze

7.DESCRIEREA METODEI DE DETERMINARE A CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI DIN MR-01TP

7.1.Denumire metoda: Determinarea conținutului total de polifenoli prin metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu

•**Principiul metodei:** Metoda Folin-Ciocalteu se bazează pe capacitatea compușilor fenolici de a reduce, în mediu alcalin, complexul fosfomolibdat-fosfotungstat din reactivul Folin-Ciocalteu, cu formarea unui complex colorat albastru. Intensitatea culorii dezvoltate este proporțională cu concentrația totală de polifenoli din probă și este determinată spectrofotometric la 765 nm. Conținutul total de polifenoli se



cuantifică prin raportare la o curbă de calibrare realizată cu acid galic și se exprimă ca mg echivalenți acid galic per gram de probă uscată (mg GAE/g s.u.).

•**Parametri de lucru:**

-Masă probă: 0,5 g probă omogenizată/-Solvent de extracție: metanol (MeOH)/-Volum solvent extracție: 2×5 mL

-Metodă de extracție: vortexare/-Timp vortexare: 2 minute/-Viteză vortex: 2500 rpm

-Centrifugare: 11.000 rpm, 2 minute/-Filtrare: membrană de celuloză, 0,45 μ m

-Volum extract utilizat la reacție: 0,5 mL

-Reactivi: reactiv Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3 10%/-Timp incubare: 45 minute/-Temperatură incubare: 22-25 °C

-Lungime de undă: 765 nm/-Echipament: spectrofotometru UV-Vis/-de calibrare: acid galic, 10-200 mg/L

•**Mod de lucru:** Se cântăresc 0,5 g de probă omogenizată, peste care se adaugă 5 mL metanol. Amestecul se vortexază timp de 2 minute la 2500 rpm, apoi se centrifughează la 11.000 rpm timp de 2 minute. Supernatantul se separă, iar reziduul solid este supus unei a doua extracții în aceleași condiții. Supernatantele obținute se reunesc și se filtrează prin membrană de celuloză de 0,45 μ m. Pentru reacția colorimetrică, într-un tub de centrifugare de 15 mL se adaugă succesiv 5 mL apă distilată, 1,5 mL soluție de Na_2CO_3 10%, 0,5 mL extract filtrat și 0,5 mL reactiv Folin-Ciocalteu. Amestecul se omogenizează ușor și se lasă la incubat în întuneric, la temperatura camerei, timp de 45 minute. Absorbanța se măsoară la 765 nm față de un martor preparat identic, dar fără extract. Conținutul total de polifenoli se calculează pe baza curbei de calibrare cu acid galic și se exprimă ca mg GAE/g substanță uscată. Determinările se efectuează în triplicat, rezultatele fiind raportate ca medie $\pm$ deviație standard.

7.2 Denumire metodă: Determinarea conținutului de licopen și β -caroten prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu detecție în rețea de diode (HPLC-DAD)

•**Principiul metodei:** Metoda se bazează pe separarea și determinarea cantitativă a carotenoizilor (licopen și β -caroten) prin cromatografie lichidă de înaltă performanță, utilizând o coloană C30 specifică separării izomerilor carotenoidici și detecție UV-Vis cu detector în rețea de diode. Licopenul și β -carotenul sunt extrași din matricea solidă cu un amestec de solvenți organici nepolari și polari, apoi separați cromatografic și detectați la lungimea de undă de 460 nm, corespunzătoare maximului de absorbție al



carotenoizilor. Cuantificarea se realizează prin raportare la curbe de calibrare externe obținute cu standarde certificate, rezultatele sunt exprimate ca $\mu\text{g/g}$ probă uscată.

•Parametri de lucru:

- Masă probă: 0,5 g probă omogenizată și uscată/-Solvent extracție 10 mL: hexan:acetonă:etanol (2:1:1, v/v/v)
- Metodă de extracție: vortexare/10 minute/-Temperatura de extracție: 22-25 °C
- Centrifugare: 11.000 rpm, 2 minute/-Filtrare: membrană de celuloză, 0,45 μm
- Echipament cromatografic: UHPLC Vanquish (Thermo Fisher Scientific)
- Coloană cromatografică: Thermo Scientific™ Acclaim™ C30, 3 μm , 3,0 $\times$ 150 mm
- Temperatură coloană: 40 °C
- Fază mobilă: metanol cu 3,2 g/L acetat de amoniu (70%) : acetonitril (30%)
- Mod de eluție: isocratic
- Debit fază mobilă: 1,7 mL/min/-Volum injecție: 8 μL /- λ = 460 nm
- Detector: DAD (diode array detector)
- Standarde de calibrare: licopen și β -caroten (HPLC grade, Supelco, Sigma-Aldrich)
- Interval calibrare: 1-20 ng/mL (1, 5, 10, 20 ng/mL)

•Mod de lucru: Se cântăresc 0,5 g de probă omogenizată și uscată, peste care se adaugă 10 mL din amestecul de solvenți hexan:acetonă:etanol (2:1:1, v/v/v). Probele se vortexează pentru asigurarea unei dispersii uniforme și se lasă la extracție timp de 10 minute la temperatura camerei. După extracție, suspensiile se centrifughează la 11.000 rpm timp de 2 minute, iar supernatantul limpede se separă și se filtrează prin membrană de celuloză de 0,45 μm . Analiza cromatografică se realizează pe sistem UHPLC Vanquish echipat cu detector DAD, utilizând o coloană C30 menținută la 40 °C. Separarea se efectuează izocratic, cu un amestec de metanol conținând acetat de amoniu și acetonitril, la un debit de 1,7 mL/min. Volumul de injecție este de 8 μL , iar detecția se realizează la 460 nm. Identificarea licopenului și β -carotenului se bazează pe compararea timpilor de retenție și a spectrelor de absorbție cu cele ale standardelor pure. Cuantificarea se efectuează utilizând curbe de calibrare externe, iar rezultatele sunt exprimate în $\mu\text{g/g}$ probă uscată. Toate determinările se realizează în triplicat, rezultatele fiind raportate ca medie $\pm$ deviație standard. Toate etapele de extracție și manipulare a probelor se desfășoară în condiții de lumină redusă, pentru a preveni degradarea carotenoizilor sensibili la lumină și oxigen.



Participant: 2.INCDO INOE 2000 INOE

CARACTERISTICILE METODEI DETERMINAREA POLIFENOLILOR TOTALI DIN MR-01TP

SPECTROFOTOMETRICE FOLIN-CIOCÂLTEU

Caracteristici	Valori
Solvent extracție	metanol
Temperatura de extracție, °C	22–25°C
Durata de extracție, minute	30
λ utilizată, nm	765
Alți parametri de interes	Vortexare 2500 rpm; extracție dublă; centrifugare 11.000 rpm; incubare reacție Folin–Ciocalteu 45 minute în întuneric; calibrare cu acid galic (10–200 mg/L)

TEST 02/ Participant: P2- INOE 2000

Participant: 2.INCDO INOE 2000 ICIA

TEST 02-CI EFECTUL CRIOGENĂRII ASUPRA CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI

Rezultatele se raportează cu două zecimale, unitatea de măsură fiind mg GAE/100g s.u.

Caracteristici	Unitate de măsură	Proba 1 MR-01TP	Proba 2 Fiola albastră	Proba 3 Fiola roșie
Substanță uscată	%	94.1	96	97.9
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	510.03	464.87	380.71
Polifenoli totali/s.u	mg GAE/100g s.u	541.99	484.24	388.77

Responsabil transmitere rezultat – Anca Becze



Denumire metoda: Determinarea conținutului total de polifenoli prin metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu

TEST 3 -IC / RAPORTAREA REZULTATELOR

EFECTUL CRIOGENĂRII ASUPRA CONȚINUTULUI DE LICOPEN ȘI B -CAROTEN

Rezultatele se raportează cu două zecimale, unitatea de măsură fiind mg/100g s.u.

Caracteristici	Unitate de măsură	Proba 1 MR-01TP	Proba 2 Fiola roșie	Proba 3 Fiola albastră
Substanță uscată	g/100 g	94.1	96	97.9
B - caroten	mg/100g s.u	10.69	14.1	14.08
Licopen	mg/100g s.u	14.73	15.07	15.94

Responsabil transmitere rezultat Anca Becze

Denumire metodă: Determinarea conținutului de licopen și B-caroten prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu detecție în rețea de diode (HPLC-DAD)

Principiul metodei: Metoda se bazează pe separarea și determinarea cantitativă a carotenoizilor (licopen și B-caroten) prin cromatografie lichidă de înaltă performanță, utilizând o coloană C30 specifică separării izomerilor carotenoidici și detecție UV-Vis cu detector în rețea de diode. Licopenul și B-carotenul sunt extrași din matricea solidă cu un amestec de solvenți organici nepolari și polari, apoi separați cromatografic și detectați la lungimea de undă de 460 nm, corespunzătoare maximului de absorbție al carotenoizilor. Cuantificarea se realizează prin raportare la curbe de calibrare externe obținute cu standarde pure certificate, iar rezultatele sunt exprimate ca μg/g probă uscată.

Parametri de lucru:

- Masă probă: 0,5 g probă omogenizată și uscată
- Solvent de extracție: 10 mL hexan:acetonă:etanol (2:1:1, v/v/v)



- Metodă de extracție: vortexare/ 10 minute
 - Temperatura de extracție: 22-25 °C
 - Centrifugare: 11.000 rpm, 2 minute
 - Filtrare: membrană de celuloză, 0,45 μm
 - Echipament cromatografic: UHPLC Vanquish (Thermo Fisher Scientific)
 - Coloană cromatografică: Thermo Scientific™ Acclaim™ C30, 3 μm, 3,0 × 150 mm
 - Temperatură coloană: 40 °C
 - Fază mobilă: metanol cu 3,2 g/L acetat de amoniu (70%) : acetonitril (30%)
 - Mod de elutie: isocratic
 - Debit fază mobilă: 1,7 mL/min
 - Volum injecție: 8 μL
 - Lungime de undă detecție: 460 nm
 - Detector: DAD (diode array detector)
 - Standarde de calibrare: licopen și β-caroten (HPLC grade, Supelco, Sigma-Aldrich)
- Interval calibrare: 1-20 ng/mL (1, 5, 10, 20 ng/mL)

Mod de lucru: Se cântăresc 0,5 g de probă omogenizată și uscată, peste care se adaugă 10 mL din amestecul de solvenți hexan:acetonă:etanol (2:1:1, v/v/v). Probele se vortexează pentru asigurarea unei dispersii uniforme și se lasă la extracție timp de 10 minute la temperatura camerei. După extracție, suspensiile se centrifughează la 11.000 rpm timp de 2 minute, iar supernatantul limpede se separă și se filtrează prin membrană de celuloză de 0,45 μm. Analiza cromatografică se realizează pe sistem UHPLC Vanquish echipat cu detector DAD, utilizând o coloană C30 menținută la 40 °C. Separarea se efectuează izocratic, cu un amestec de metanol conținând acetat de amoniu și acetonitril, la un debit de 1,7 mL/min. Volumul de injecție este de 8 μL, iar detecția se realizează la 460 nm. Identificarea licopenului și β-carotenului se bazează pe compararea timpilor de retenție și a spectrelor de absorbție cu cele ale standardelor pure. Cuantificarea se efectuează utilizând curbe de calibrare externe, iar rezultatele sunt exprimate în μg/g probă uscată. Toate determinările se realizează în triplicat, rezultatele fiind raportate ca medie ± deviație standard. Toate etapele de extracție și manipulare a probelor se desfășoară în condiții de lumină redusă, pentru a preveni degradarea carotenoizilor sensibili la lumină și oxigen.



TEST 01/ Participant: P3- USAMVB

Participant: USAMV - BUCURESTI

TEST 1- DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI DIN MR-01TP

Rezultatele se raportează cu două zecimale, unitatea de măsură fiind mg GAE/100g s.u.

Caracteristici	Unitate de măsură	Rezultat	Metoda de testare utilizată	Metodă acreditată (da/nu)
Substanță uscată	g/100 g produs	94,01±0,11	Gravimetrică	nu
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	815,98±15,61	Spectrofotometrică Folin-Ciocalteu	nu
Polifenoli totali/substanță uscată	mg GAE/100g s.u	867,97±16,50	-	-
Substanțe reducătoare	g/100 g			
Licopen				

Persoana responsabilă cu raportarea rezultatelor: Bălan Daniela

DESCRIEREA METODEI DE DETERMINARE A CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI DIN MR-01TP

METODA SPECTROFOTOMETRICA FOLIN-CIOCALTEU

- Descrierea metodei aplicate

Principiul metodei: Reducerea fosfowolframatiilor și fosfomolibdaților din reactivul Folin-Ciocalteu

Mod de lucru:- Extracție: 0,2 grame proba în 10 ml solvent de extracție (etanol acidifiat cu HCl 0,1%);



- Ultrasonicare la 50°C; timp 20 min; - Centrifugare 10 min la 5000 rpm; se separă supernatantul;
- Reactia cu reactivul Folin-Ciocalteu: 0,5 ml supernatant obținut anterior se aduc la balon cotat de 25 ml; se adaugă 9,5 ml apă distilată, apoi 1 ml reactiv Folin-Ciocalteu; agitare, 5 min repaus; se adaugă 10 ml Na₂CO₃ 7% și se aduce la cota cu apă distilată;
- Termostatare 30 min, 40°C pentru definitivarea reacției;
- Citire la spectrofotometru, l = 750nm față de un martor preparat identic, în care extractul se înlocuiește cu apă distilată.

Optimizarea metodei de extracție a polifenolilor

o Alegerea solventului de extracție

Au fost testate trei concentrații ale solventului de extracție: 40%, 60% și 80% etanol acidifiat cu HCl 0,1% pe proba reprezentată de făină din piețițe și sâmburi de tomate. Determinările au fost făcute în duplicat.

Proba	Solvent de extracție	Polifenoli (mgGAE/100g)
Înainte de degresare	40% etanol 0,1% HCl	795,82 ± 8,65
	60% etanol 0,1% HCl	820,19 ± 10,75
	80% etanol 0,1% HCl	773,02 ± 14,03

Rezultatele obținute au indicat varianta etanol 60% acidifiat cu HCl 0,1% că fiind cea mai eficientă în a extrage cantitatea maximă de polifenoli.

o Delipidizarea probei

A fost testată o metodă de degresare (delipidizare) a probei (făină din piețițe și sâmburi de tomate) pentru a îndepărta compușii care ar putea interfera în extracția polifenolilor (lipide, pigmenți și alți compuși liposolubili).

Mod de lucru:- 1 gram proba în 10 ml solvent izooctan; vortexare 1 min;

- Repaus la temperatura camerei timp de 2 ore;
- Centrifugare 10 min la 5000 rpm; se îndepărtează supernatantul; reziduul solid se usucă la temperatura camerei pentru eliminarea totală a solventului.

Din reziduul obținut s-au cântărit 0,2 g și s-a determinat cantitatea de polifenoli utilizând ca solvent de extracție varianta optimă selectată (etanol 60% acidifiat cu HCl



0,1%) conform protocolului menționat. S-a obținut o concentrație mai mică de polifenoli, ceea ce indică faptul că degresarea probei nu îmbunătățește metoda de analiză. Determinările au fost făcute în duplicat.

Proba	Solvent de extracție	Polifenoli (mgGAE/100g)
Inainte de degresare	60% etanol 0,1% HCl	820,19 ± 10,75
Dupa degresare	60% etanol 0,1% HCl	702,38 ± 24,43

TEST 02/ Participant: P3- USAMVB

- Denumire metodă 1: Metoda spectrofotometrica Folin-Ciocalteu

Participant: USAMV - BUCURESTI

TEST 2 - EFECTUL CRIOGENĂRII ASUPRA CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI

Caracteristici	Unitate de măsură	Proba 1 MR-01TP	Proba 2 Fiola roșie	Proba 3 Fiola albastră
Substanță uscată	g/100 g	94,01±0,11	95,65±0,02	98,05±0,06
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	815,98±15,61	657,78±12,17	668,72±12,37
Polifenoli totali/substanță uscată	mg GAE/100g s.u	867,97±16,50	687,69±12,73	681,95±12,62

Participant: USAMV - BUCURESTI

CARACTERISTICILE METODEI SPECTROFOTOMETRICE FOLIN-CIOCÂLTEU

Caracteristici	Valori
Solvent extracție	Etanol 60% cu 0,1% HCl
Temperatura de extracție, °C	50
Durata de extracție, minute	20
λ utilizată, nm	750
Alți parametri de interes	-



TEST 01/ Participant: P4- UB

TEST 01-CI

DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI DIN MR-01TP

Rezultatele se raportează cu două zecimale, unitatea de măsură fiind mg GAE/100g s.u.

Caracteristici	Unitate de măsură	Rezultat	Metoda de testare utilizată	Metodă acreditată (da/nu)
Substanță uscată	%	95,42	Gravimetrică	da
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	509,84	Spectrofotometrică Folin-Ciocalteu	da
Polifenoli totali/ s.u	mg GAE/100g s.u	534,31	-	-

Persoana responsabilă cu raportarea rezultatelor: -

TEST 02/ Participant: P4- UB

Caracteristici	Unitate de măsură	Proba 1 MR-01TP	Proba 2 Fiola roșie	Proba 3 Fiola albastră
Substanță uscată	g/100 g	95.42	98.35	98.25
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	509.83	548.04	564.53
Polifenoli totali/s.u.	mg GAE/100g s.u	534.30	557.24	574.59

Participant: UB

CARACTERISTICILE METODEI SPECTROFOTOMETRICE FOLIN-CIOCÂLTEU

Caracteristici	Valori
Solvent extracție	metanol
Temperatura de extracție, 0C	45
Durata de extracție, minute	4 ore
λ utilizată, nm	752



TEST 01/ Participant: P5- USVT

Principiul metodei Folin-Ciocalteu (conform ISO 14502-1:2005), modificată
Polifenolii se extrag într-o soluție hidroalcoolică (70 % metanol). Compușii fenolici extrași reduc reactivul Folin-Ciocalteu în mediu alcalin, formând un complex colorat albastru. Intensitatea culorii se determină spectrofotometric la 765 nm și este proporțională cu conținutul total de polifenoli, exprimat ca echivalent acid galic (GAE) raportat la substanța uscată a probei.

Reactiv / Soluție	Preparare / Observații
Soluție de extracție (metanol 70 % v/v)	Se amestecă 700 mL metanol cu 300 mL apă distilată
Reactiv Folin-Ciocalteu (10 % v/v)	Se diluează 1 parte reagent concentrat cu 9 părți apă; se prepară zilnic
Soluție de Na ₂ CO ₃ (7,5 % m/v)	Se dizolvă 7,5 g Na ₂ CO ₃ în apă caldă și se completează la 100 mL
Soluție standard de acid galic (1000 µg/mL)	Se dizolvă 0,100 g acid galic monohidrat în apă distilată și se completează la 100 mL
Soluții standard de calibrare (10-50 µg/mL)	Se prepară diluții adecvate din soluția stoc

Aparatură- Se utilizează: spectrofotometru capabil să măsoare la 765 nm; pentru macrometoda s-a utilizat spectrofotometrul Perkin Elmer Lambda 25 și pentru micrometoda cititorul de placi Tecan Infinite M1000 Pro. Bloc termostatat la 70°C Etuva - 103±2 °C)



Spectrofotometrul Perkin Elmer Lambda 25.



Cititor de placi Tecan Infinite M1000 Pro

Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287



Bloc termosta



Etuva Binder

Determinarea umidității s-a efectuat prin metoda:

Într-o fiolă de cântărire conținând o baghetă de sticlă se introduc circa 20 g nisip de mare și se usucă în etuvă la temperatura de 103 ± 2 °C până la masă constantă. După răcirea fiolei în exsicator, se introduc circa 5 g probă pregătită pentru analiză. Se amestecă cu ajutorul baghetei. Se introduce fiola în etuvă la 50-60 °C și se menține 2-3 ore, agitând din când în când conținutul cu ajutorul baghetei. Se reglează apoi temperatura etuvei la 103 ± 2 °C și se continuă încălzirea fiolei timp de 3-4 ore, amestecând din când în când cu ajutorul baghetei. După răcire în exsicator până la temperatură ambiantă, se cântărește fiola. Se repetă încălzirea în etuvă timp de 30 minute, răcirea și cântărirea, până când diferența între două cântăriri consecutive nu depășește 0,004 g.

Pentru probele evaluate au fost obtinute urmatoarele rezultate:

Denumire proba	MR-01-TP	Fiola rosie	Fiola albastre
ID proba	17_1_2026	17_2_2026	17_3_2026

Extracția polifenolilor

- Se cântăresc 0,200 g ($\pm 0,001$ g) de probă mărunțită;
- Se adaugă 5,00 mL metanol 70 % (v/v) la 70 °C;
- Se agită energic timp de câteva secunde pentru dispersarea completă a probei;
- Se încălzește amestecul la 70 °C timp de 10 minute, agitând intermitent în timpul extracției.
- Se răcește, se centrifughează (3500 rpm, 10 minute), colectând supernatantul;



- Se repetă extracția cu alți 5,00 mL solvent, se combină extractele și se completează până la volum final de 10,00 mL cu metanol 70%, rece;
- Probele pot fi diluate dacă este cazul.

Reacția colorimetrică

Reacția de culoare a fost efectuată prin doua metode: macrometoda, conform standardului și micrometoda (pe microplacă).

Macrometoda

Se pipetează în triplicat 1,0 mL extract se adaugă 5,0 mL reactiv Folin-Ciocalteu (10 %) și, după 3-8 minute se adaugă 4,0 mL soluție de Na_2CO_3 (7,5 %). Se lasă 60 de minute la temperatura camerei și se măsoară absorbanta la 765 nm.

Micrometoda

Se pipetează în triplicat în microplaca 25 μL extract, se adaugă 125 μL reactiv Folin-Ciocalteu (10%) și, după 3-8 minute se adaugă 100 μL soluție de Na_2CO_3 (7,5 %). Se acoperă placa și se lasă 60 de minute la temperatura camerei și se măsoară absorbanta la 765 nm.



Micrometoda



Macrometoda

Curba de calibrare

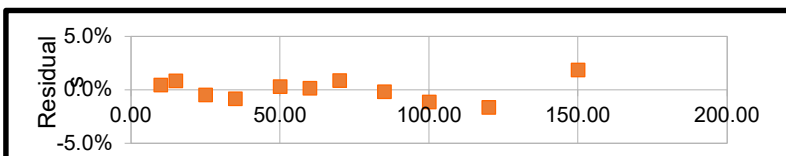
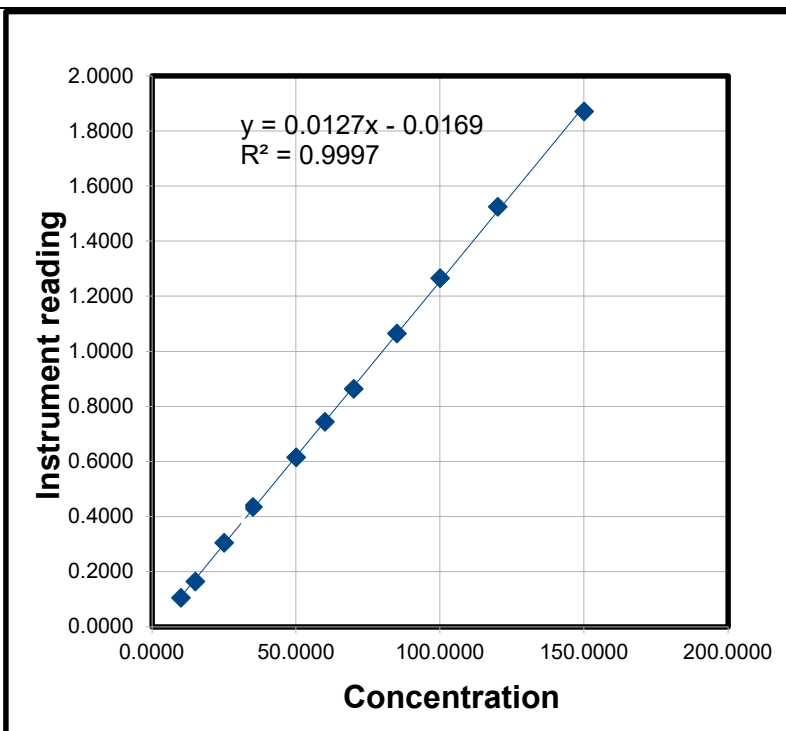
Curba de calibrare se trasează folosind standard de acid galic (10-150 $\mu\text{g/mL}$) și complexul se citește spectrofotometric la 765 nm. Coeficientul de corelație R^2 trebuie să fie $\geq 0,995$.

S-au efectuat doua curbe de calibrare, una pentru macrometoda și alta pentru micrometoda.

Curba calibrare macrometoda:



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287



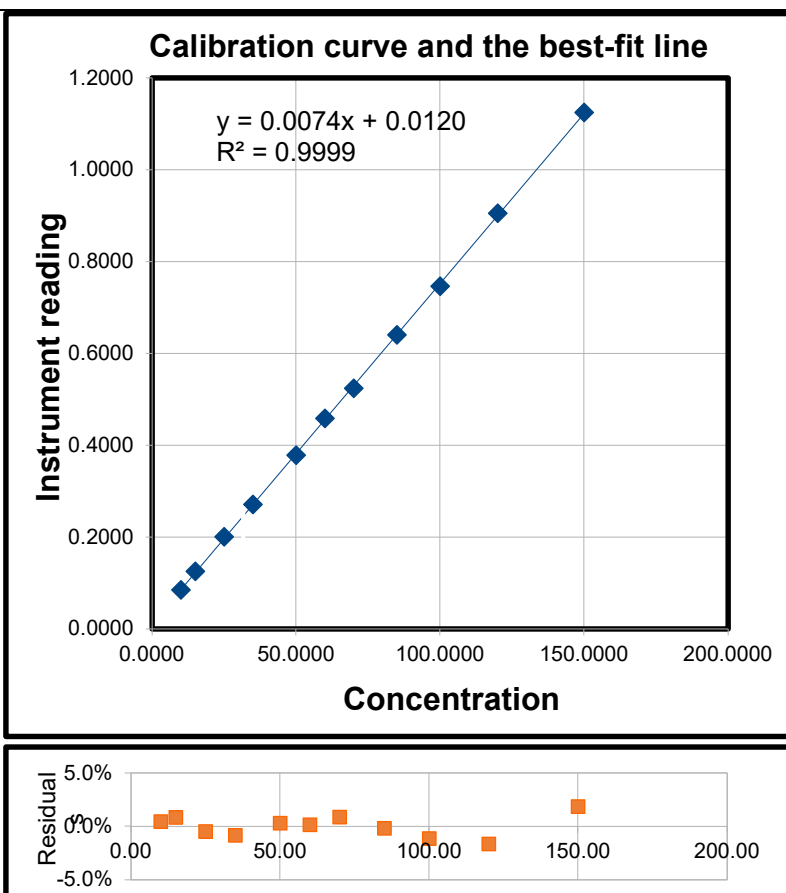
Curba de calibrare macrometoda

Curba calibrare micrometoda:

Tabel nr. 2 Densitățile optice pentru curba de

Concentrație standard	DO
10,0000	0,1060
15,0000	0,1655
25,0000	0,3058
35,0000	0,4366
50,0000	0,6160
60,0000	0,7448
70,0000	0,8648
85,0000	1,0660
100,0000	1,2662
120,0000	1,5258
150,0000	1,8720

calibrare macrometodă



Tabel nr. 3 Densitățile optice pentru curba de calibrare

Concentrație standard	DO
10,0000	0,0856
15,0000	0,1257
25,0000	0,2011
35,0000	0,2715
50,0000	0,3791
60,0000	0,4586
70,0000	0,5243
85,0000	0,6405
100,0000	0,7468
120,0000	0,9057
150,0000	1,1251

micrometoda

Curba de calibrare micrometoda

- Se cântăresc în duplicat 0,2g de probă mărunțită;
- Se adaugă 5,00 mL metanol 70 % (v/v) la 70 °C;
- Se agită energic timp de câteva secunde pentru dispersarea completă a probei;
- Se încălzește amestecul la 70 °C timp de 10 minute, agitând intermitent
- Se răcește, se centrifughează (3500 rpm, 10 minute), colectând supernatantul;
- Se repetă extracția cu alți 5,00 mL solvent, se combină extractele și se completează până la volum final de 10,00 mL cu metanol 70%, rece;

Curba de calibrare

Curba de calibrare se trasează folosind standard de acid galic (10-50 µg/mL) și complexul se citește spectrofotometric la $\lambda=765$ nm. Coeficientul de corelație R^2 trebuie să fie $\geq 0,995$.

8. Calculul conținutului de polifenoli totali



$$Wt = \frac{(D_{\text{sample}} - D_{\text{intercept}}) \cdot 10\,000 \cdot V_{\text{sample}} \cdot d}{S_{\text{std}} \cdot m_{\text{sample}} \cdot W_{\text{dm}}}, \text{ unde:}$$

- Wt = conținutul de polifenoli totali (exprimat în echivalenți acid galic);
- D_{sample} = absorbanța probei după corecția cu blank;
- $D_{\text{intercept}}$ = absorbanța la interceptul curbei de calibrare;
- S_{std} = panta curbei de calibrare ($\mu\text{g/mL}$);
- V_{sample} = volumul extractului de probă (mL);
- d = factorul de diluție (aplicat dacă este cazul);
- m_{sample} = masa de probă (g);
- W_{dm} = fracția de substanță uscată (g);

Rezultatul se exprimă în procente (% m/m) echivalenți acid galic (GAE) raportat la substanța uscată.

ID probă	DO	Concentrație curbă	Masă probă	SU	
----------	----	--------------------	------------	----	--

10. Rezultate și discuții

Umiditatea reziduală determinată gravimetric a fost:

- Proba 17_1: 1,200 %
- Proba 17_2: 1,986 %
- Proba 17_3: 3,895 %

Fracția de substanță uscată (DW) a fost calculată conform relației:

$$DW = 1 - (\text{umiditate} / 100)$$

rezultând:

- 17_1: 0,9880
- 17_2: 0,98014
- 17_3: 0,96105

1.4 Conversia în mg GAE/g

Cantitatea totală de polifenoli din extract: $x \times 10 \text{ mL } (\mu\text{g})$

Conversie în mg : $(x \times 10) / 1000$

Raportare la masa probei (0,4 g): $\text{mg GAE/g} = (x \times 10) / (1000 \times 0,4)$

Formula finală utilizată: $\text{mg GAE/g} = x \times 0,025$

Corecția pentru umiditate: $\text{mg GAE/g DW} = (\text{mg GAE/g probă}) / \text{fracția DW}$

2. Rezultate

2.1 Micrometodă

Valori obținute conținut polifenoli

- 17_1 = 3,77 $\pm$ 0,02 mg GAE/g
- 17_2 = 3,34 $\pm$ 0,18 mg GAE/g
- 17_3 = 3,48 $\pm$ 0,12 mg GAE/g



2.2 Macrometodă

Valori inițiale:

- $17_1 = 3,70 \pm 0,12$ mg GAE/g
- $17_2 = 3,23 \pm 0,14$ mg GAE/g
- $17_3 = 3,56 \pm 0,11$ mg GAE/g

4. Discuții

Concordanța ridicată între micro și macro confirmă:

- liniaritatea reacției în domeniul analizat,
- validitatea curbelor de calibrare,
- corectitudinea conversiei matematice,
- reproductibilitatea metodei.

5. Limitări metodologice

Diferențele minore între micro și macro pot fi influențate de:

- erori de pipetare la volume mici (25 μ L),
- diferențe de omogenizare,
- stabilitatea reactivului.

6. Concluzii Cele două metode sunt echivalente analitic, diferențele fiind minore și nesemnificative statistic.

TEST 02/ Participant: P5- USVT

Participant: USVT

TEST 2 - EFECTUL CRIOGENĂRII ASUPRA CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI TOTALI

Caracteristici	Unitate de măsură	Proba 1 MR-01TP	Proba 2 Fiola roșie	Proba 3 Fiola albastră
Substanță uscată	g/100 g	-	-	-
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	370	356	323
Polifenoli totali/substanță uscată	mg GAE/100g s.u	-	-	-

Responsabil transmitere rezultat



TEST 01/ Participant: P6- UDJG

Test 1-Determinarea conținutului de polifenoli totali din MR-01TP

Rezultatele pentru fenoli totali se raportează cu două zecimale, unitatea de măsură fiind mg GAE/100 g, respectiv mg GAE/100 g s.u.

Caracteristici	U.M.	Rezultat	Metoda de testare utilizată	Metodă acreditată
Substanța uscată	g/ 100 g produs	93,96 ± 0,06	Gravimetrică (AOAC 925.10)	Nu
Polifenoli totali	mg GAE/100 g produs	586 ± 0,01 *	Metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu (AOAC 2017.13)	Nu
Polifenoli totali/ substanța uscată	mg GAE/100 g s.u.	623 ± 0,01 *	Calcul	

* Rezultatele sunt de la extracția fenolilor totali din MR-01TP în apă

7. Descrierea metodei de determinare a conținutului de polifenoli MR-01TP

- Denumire metoda 1: Metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu - Metoda oficială AOAC 2017.13
Pentru determinarea conținutului total de fenoli (CTF) s-a utilizat metoda oficială AOAC 2017.13 (Kupina *et al.*, 2018).
- Principiul metodei

Determinarea conținutului în polifenoli din surse vegetale prin metoda colorimetrică este bazată pe o reacție de transfer de electroni între compușii fenolici și reactivul Folin-Ciocalteu, un amestec de acid fosfomolibdenic (H₃PMo₁₂O₄₀) și acid fosfotungstic (H₃PMo₁₂O₄₀). În mediu bazic, fenolii transferă electroni către molibden, formând un complex colorat albastru intens, care absoarbe lumina în domeniul infraroșu, la o lungime de undă de 760 nm. Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația totală de fenoli din probă (Singleton & Rossi, 1965; Afonso *et al.*, 2021). Absorbția maximă a complexului colorat format în reacția Folin-



Ciocalteu se măsoară în infraroșu, de obicei la o lungime de undă situată între 740 și 770 nm. Valorile cel mai frecvent utilizate în literatura de specialitate sunt:

- $\lambda = 750$ nm - lungimea de undă originală propusă în metoda Singleton & Rossi (1965);
- $\lambda = 760$ nm - valoare utilizată frecvent în aplicațiile clasice;
- $\lambda = 765$ nm - valoare standardizată în protocoalele moderne AOAC și ISO 14502-1 (Ainsworth & Gillespie, 2007; Sánchez-Rangel *et al.*, 2013).

- Parametri de lucru

Solvenți: - Apă

- Etanol 20%

- Metanol 70%

- Metanol 70% acidifiat cu HCl 1%

Temperatura de extracție: $23 \pm 1^\circ \text{C}$

Alte condiții: Ultrasonare 10 min/Omogenizare 1 oră - agitator mecanic la 1000 rpm.

- Mod de lucru

În acord cu prevederile metodei colorimetrice Folin-Ciocalteu (AOAC 2017.13), curba etalon a fost pregătită folosind o soluție stoc de standard având concentrația de 1000 mg/L acid galic. Valorile absorbantei, citite la lungimea de undă de 765 nm, pentru soluțiile de calibrare având concentrații cuprinse în intervalul 40-200 mg/L acid galic au fost utilizate pentru trasarea curbei de calibrare ($y = 5,5325 \cdot x + 0,0053$; $R^2 = 0,9994$). Rezultatele obținute prin raportare la această curbă de calibrare au fost exprimate ca mg echivalent acid galic/g s.u. (mg GAE/g s.u.). Valorile raportare reprezintă medii $\pm$ abatere standard înregistrate pentru trei determinări paralele. În acord cu metoda oficială AOAC 2017.13, fenolii sunt extrași din probele de analizat în apă, iar extractul obținut este supus reacției cu reactivul Folin-Ciocalteu în prezența carbonatului de sodiu pentru a forma un complex de culoare albastră. Intensitatea culorii albastre este proporțională cu cantitatea de compuși fenolici din proba de analizat care reacționează cu reactivul Folin-Ciocalteu. Conținutul total de fenoli se determină prin măsurarea absorbției amestecului de reacție la 765 nm și compararea cu o curbă de calibrare.

Extracția compușilor fenolici din probele de analizat a fost realizată utilizând apă drept solvent. În acord cu metoda oficială AOAC 2017.13, suspensia obținută a fost supusă ultrasonării timp de 10 min, pentru a facilita solubilizarea compușilor din faza solidă a amestecului, și implicit extracția compușilor fenolici.



Pentru a urmări influența solventului asupra eficienței extracției compușilor fenolici au fost efectuate teste paralele, utilizând drept solvent soluții de etanol 70%, metanol 70% și metanol 70% acidificat cu 1% HCl.

Pentru a determina influența ultrasonicării suspensiilor asupra eficienței extracției compușilor fenolici, pentru toate tipurile de solvent a fost efectuată extracția compușilor fenolici în condițiile omogenizării cu ajutorul unui agitator mecanic la 1000 rpm, timp de 1 oră la temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. În cazul tuturor condițiilor de extracție testate, separarea fazei lichide de faza solidă s-a efectuat prin filtrare.

Codificarea extractelor obținute din MR-01TP folosind solvenți și condiții de extracție variate

Condiții de extracție	Codificare probe P1 (MR-01TP)	
	Ultrasonare 10 min	Omogenizare 1 h
Tip solvent		
Apă	P1-W-US	P1-W
Etanol 70%	P1-E-US	P1-E
Metanol 70%	P1-M-US	P1-M
Metanol 70% acidfiat cu 1% HCl	P1-MA-US	P1-MA

Influența condițiilor de extracție asupra conținutului total de fenoli (CTF) din proba P1 (MR-01TP)

Caracteristici	Polifenoli totali, mg GAE/100 g	Polifenoli totali/ s.u., mg GAE/100 g s.u.
Proba		
P1-W-US	$620 \pm 0,03$	$660 \pm 0,03$
P1-W	$586 \pm 0,01$	$623 \pm 0,01$
P1-E-US	$811 \pm 0,06$	$863 \pm 0,07$
P1-E	$830 \pm 0,11$	$883 \pm 0,12$
P1-M-US	$801 \pm 0,13$	$852 \pm 0,14$
P1-M	$813 \pm 0,07$	$865 \pm 0,08$
P1-MA-US	$880 \pm 0,04$	$936 \pm 0,04$
P1-MA	$923 \pm 0,02$	$982 \pm 0,03$



Din analiza rezultatelor prezentate în [Tabelul 4](#) se poate observa că solventul utilizat pentru extracția compușilor fenolici și tehnica aplicată pentru asistarea extracției au influențat semnificativ rezultatele obținute.

Participant: P6-UDJG

Determinarea polifenolilor totali din MR-01TP

Caracteristicile metodei colorimetrice Folin-Ciocalteu

În tabelele următoare sunt prezentate caracteristicile metodei colorimetrice Folin-Ciocalteu în variantele cu omogenizare, respectiv cu ultrasonicare.

Caracteristicile metodei Folin-Ciocalteu, varianta cu omogenizare

Caracteristici	Valori - varianta cu omogenizare			
	a)	b)	c)	d)
Solvent extracție	Apă	Metanol 70%	Etanol 70%	Metanol 70% acidifiat cu HCl 1%
Temperatura de extracție, °C	23±1	23±1	23±1	23±1
Durata de extracție, min	60	60	60	60
Lungimea de undă, λ, nm	765	765	765	765
Agitare mecanică, rpm	1000	1000	1000	1000

Caracteristicile metodei colorimetrice Folin-Ciocalteu, varianta cu ultrasonicare

Caracteristici	Valori - varianta cu omogenizare			
	a)	b)	c)	d)
Solvent extracție	Apă	Metanol 70%	Etanol 70%	Metanol 70% acidifiat cu HCl 1%
Temperatura de extracție, °C	23±1	23±1	23±1	23±1
Durata de extracție, min	60	60	60	60
Lungimea de undă, λ, nm	765	765	765	765
Durata ultrasonicare, min	10	10	10	10



TEST 02/ Participant: P6- UDJG

Participant: P6-UDJG

Test 2- Efectul criogenării asupra conținutului de polifenoli totali

Caracteristici determinate și metode de testare utilizate

Caracteristici	U.M.	P1 MR-01TP	P2 Fiola albastră	P3 Fiola roșie
Substanța uscată	g/ 100 g produs	93,96 ± 0,06	96	100
Polifenoli totali	mg GAE/100 g produs	586 ± 0,01 *	447 ± 0,03 **	466 ± 0,03 ***
Polifenoli totali/ s.u.	mg GAE/100 g s.u.	623 ± 0,01 *	469 ± 0,04 **	469 ± 0,04 ***

* Rezultatele sunt pentru extracția fenolilor totali din proba P1 (MR-01TP) în apă

** Rezultatele sunt pentru extracția fenolilor totali din proba P2 (fiola albastră) în apă

*** Rezultatele sunt pentru extracția fenolilor totali din proba P3 (fiola roșie) în apă

7. Descrierea metodei de determinare a conținutului de polifenoli totali din MR-01TP

- Denumire metoda 1: Metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu - Metoda oficială AOAC 2017.13 Pentru determinarea conținutului total de fenoli (CTF) s-a utilizat metoda oficială AOAC 2017.13 (Kupina *et al.*, 2018).
- Principiul metodei

Determinarea conținutului în polifenoli din surse vegetale prin metoda colorimetrică este bazată pe o reacție de transfer de electroni între compușii fenolici și reactivul Folin-Ciocalteu, un amestec de acid fosfomolibdenic (H₃PW₁₂O₄₀) și acid fosfotungstic (H₃PMo₁₂O₄₀). În mediu bazic, fenolii transferă electroni către molibden, formând un complex colorat albastru intens, care absoarbe lumina în domeniul infraroșu, la o lungime de undă de 760 nm. Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația totală de fenoli din probă (Singleton & Rossi, 1965; Afonso *et al.*, 2021). Absorbția maximă a complexului colorat format în reacția Folin-



Ciocalteu se măsoară în infraroșu, de obicei la o lungime de undă situată între 740 și 770 nm. Valorile cel mai frecvent utilizate în literatura de specialitate sunt:

- $\lambda = 750$ nm - lungimea de undă originală propusă în metoda Singleton & Rossi (1965);
- $\lambda = 760$ nm - valoare utilizată frecvent în aplicațiile clasice;
- $\lambda = 765$ nm - valoare standardizată în protocoalele moderne AOAC și ISO 14502-1 (Ainsworth & Gillespie, 2007; Sánchez-Rangel *et al.*, 2013).

- Parametri de lucru

Solvenți: - Apă
- Etanol 20%
- Metanol 70%
- Metanol 70% acidifiat cu HCl 1%

Temperatura de extracție: $23 \pm 1^\circ \text{C}$

Alte condiții: Ultrasonare 10 min/ Omogenizare 1 oră - agitator mecanic la 1000 rpm.

- Mod de lucru

În acord cu prevederile metodei colorimetrice Folin-Ciocalteu (AOAC 2017.13), curba etalon a fost pregătită folosind o soluție stoc de standard având concentrația de 1000 mg/L acid galic. Valorile absorbantei, citite la lungimea de undă de 765 nm, pentru soluțiile de calibrare având concentrații cuprinse în intervalul 40-200 mg/L acid galic au fost utilizate pentru trasarea curbei de calibrare ($y = 5,5325 \cdot x + 0,0053$; $R^2 = 0,9994$). Rezultatele obținute prin raportare la această curbă de calibrare au fost exprimate ca mg echivalent acid galic/g s.u. (mg GAE/g s.u.). Valorile raportare reprezintă medii $\pm$ abatere standard înregistrate pentru trei determinări paralele.

În acord cu metoda oficială AOAC 2017.13, fenolii sunt extrași din probele de analizat în apă, iar extractul obținut este supus reacției cu reactivul Folin-Ciocalteu în prezența carbonatului de sodiu pentru a forma un complex de culoare albastră. Intensitatea culorii albastre este proporțională cu cantitatea de compuși fenolici din proba de analizat care reacționează cu reactivul Folin-Ciocalteu. Conținutul total de fenoli se determină prin măsurarea absorbției amestecului de reacție la 765 nm și compararea cu o curbă de calibrare.

Extracția compușilor fenolici din probele de analizat a fost realizată utilizând apă drept solvent. În acord cu metoda oficială AOAC 2017.13, suspensia obținută a fost



supusă ultrasonării timp de 10 min, pentru a facilita solubilizarea compușilor din faza solidă a amestecului, și implicit extracția compușilor fenolici.

Pentru a urmări influența solventului asupra eficienței extracției compușilor fenolici au fost efectuate teste paralele, utilizând drept solvent soluții de etanol 70%, metanol 70% și metanol 70% acidificat cu 1% HCl.

Pentru a determina influența ultrasonării suspensiilor asupra eficienței extracției compușilor fenolici, pentru toate tipurile de solvent a fost efectuată extracția compușilor fenolici în condițiile omogenizării cu ajutorul unui agitator mecanic la 1000 rpm, timp de 1 oră la temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. În cazul tuturor condițiilor de extracție testate, separarea fazei lichide de faza solidă s-a efectuat prin filtrare.

Codificarea extractelor obținute din pulberile de pieițe de roșii pregătite folosind solvenți și condiții de extracție variate

Tip solvent	Condiții extracție	Probe de pulbere supusă extracției		
		P1 (MR-01TP)	P2 (fiolă albastră)	P3 (fiolă roșie)
Apă	Ultrasonare 10 min	P1-W-US	P2-W-US	P3-W-US
	Omogenizare 1 h	P1-W	P2-W	P3-W
Etanol 70%	Ultrasonare 10 min	P1-E-US	P2-E-US	P3-E-US
	Omogenizare 1 h	P1-E	P2-E	P3-E
Metanol 70%	Ultrasonare 10 min	P1-M-US	P2-M-US	P3-M-US
	Omogenizare 1 h	P1-M	P2-M	P3-M
Metanol 70% acidfiat 1% HCl	Ultrasonare 10 min	P1-MA-US	P2-MA-US	P3-MA-US
	Omogenizare 1 h	P1-MA	P2-MA	P3-MA

Rezultatele obținute pentru conținutul total de fenoli din toate probele analizate sunt prezentate în [Tabelul 7.1](#).

Din analiza rezultatelor prezentate în [Tabelul 7.1](#) se poate observa că solventul utilizat pentru extracția compușilor fenolici și tehnica aplicată pentru asistarea extracției au influențat semnificativ rezultatele obținute.



În cazul utilizării solvenților cu polaritate mai redusă (metanol, metanol acidifiat și etanol), nu au mai fost observate diferențe semnificative între valorile CTF ale probelor obținute din același tip de pulbere prin tehnici de extracție diferite (asistată de ultrasunete și în condiții de agitare). Independent de tipul solventului, cele mai ridicate valori ale CTF au fost obținute pentru pulberea P1 ($p < 0,05$).

Analizând eficiența solvenților pentru extracția compușilor fenolici (Tabelul 3), se observă că, independent de tehnica utilizată pentru asistarea extracției, pentru toate tipurile de pulberi supuse caracterizării, valorile CTF au scăzut în următoarea ordine metanol acidifiat > metanol = etanol > apă ($p < 0,05$).

Tabelul 7.1. Influența condițiilor de extracție asupra conținutului total de fenoli

CTF \ Proba	P1 MR-01TP		P2 Fiola albastră		P3 Fiola roșie	
Proba	P1-W-US	P1-W	P2-W-US	P2-W	P3-W-US	P3-W
CTF, mg GAE/100 g	620±0,03	586±0,01	460±0,01	447±0,03	520±0,02	469±0,04
CTF, mg GAE/100 gsu	660±0,03	623±0,01	479±0,01	466±0,03	520±0,02	469±0,04
Proba	P1-E-US	P1-E	P2-E-US	P2-E	P3-E-US	P3-E
CTF, mg GAE/100 g	811±0,06	830±0,11	653±0,01	636±0,06	676±0,04	697±0,15
CTF, mg GAE/100 gsu	863±0,07	883±0,12	680±0,01	662±0,07	676±0,04	697±0,15
Proba	P1-M-US	P1-M	P2-M-US	P2-M	P3-M-US	P3-M
CTF, mg GAE/100 g	801±0,13	813±0,07	654±0,08	634±0,05	663±0,13	674±0,11
CTF, mg GAE/100 gsu	852±0,14	865±0,08	682±0,08	660±0,05	663±0,13	674±0,11
Proba	P1-MA-US	P1-MA	P2-MA-US	P2-MA	P3-MA-US	P1-MA
CTF, mg GAE/100 g	880±0,04	923±0,02	719±0,14	720±0,03	740±0,01	707±0,26
CTF, mg GAE/100 gsu	936±0,04	982±0,03	748±0,15	751±0,03	740±0,01	707±0,26

Rezultatele obținute în cadrul prezentului experiment sunt ușor inferioare valorilor CTF (10.38 - 11.27 mg GAE/g s.u.) raportate de [Farinon et al. \(2024\)](#) pentru subprodusele rezultate în urma separării pulpei de tomate. Succesiunea operațiilor aplicate pentru obținerea subproduselor, parametrii de procesare, dar și solventul utilizat pentru pregătirea extractelor pot influența eficiența extracției fenolilor ([Silva et al., 2019](#);



Vorobyova *et al.*, 2022). În plus, diferențele dintre rezultate pot fi datorate variabilității genetice, condițiilor de climă și agrotehnice, precum compoziția minerală a solului, managementul agricol, stresurile biotice și abiotice (Heimler *et al.*, 2017).

Bibliografie

- Farinon, B., Felli, M., Sulli, M., Diretto, G., Savatin, D. V., Mazzucato, A., ... & Costantini, L. (2024). Tomato pomace food waste from different variants as a high antioxidant potential resource. *Food Chemistry*, 452, 139509.
- Heimler, D., Romani, A., & Ieri, F. (2017). Plant polyphenol content, soil fertilization and agricultural management: A review. *European Food Research and Technology*, 243(7), 1107-1115.
- Kupina, S., Fields, C., Roman, M. C., & Brunelle, S. L. (2018). Determination of total phenolic content using the Folin-C assay: Single-laboratory validation, first action 2017.13. *Journal of AOAC international*, 101(5), 1466-1472.
- Official methods of analysis of AOAC International. AOAC Official Method 925.10 *Solids (Total) and Loss on Drying (Moisture) in Flour: Air Oven Method*
- Silva, P. A. Y., Borba, B. C., Pereira, V. A., Reis, M. G., Caliari, M., Brooks, M. S. L., & Ferreira, T. A. P. C. (2019). Characterization of tomato processing by-product for use as a potential functional food ingredient: Nutritional composition, antioxidant activity and bioactive compounds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(2), 150-160.
- Vorobyova, V., Skiba, M., & Vasyliiev, G. (2022). Extraction of phenolic compounds from tomato pomace using choline chloride-based deep eutectic solvents. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(2), 1087-1104.



8. PRELUCRAREA STATISTICĂ A REZULTATELOR OBTINUTE DIN ANALIZA POLIFENOLILOR DIN MR-01TP

8.1. Elaborarea proiectului statistic

Standardul ISO 13528/2022- Metode statistice utilizate în testarea competențelor prin comparații interlaboratoare (<https://www.iso.org/standard/78879.html>) oferă modele de evaluare statistică a rezultatelor obținute de la participanți, incluzând calcularea și interpretarea diferitelor scoruri de performanță. Conform standardului ISO 17043 proiectul statistic trebuie creat astfel încât să satisfacă obiectivele schemei comparări interlaboratoare, luând în calcul natura informațiilor, presupunerile statistice, natura erorilor și numărul rezultatelor. Acest lucru generează proiecte statistice diferite, în funcție de obiectivele și sursa de date aferentă schemelor de încercări de competență.

Cele mai frecvente tehnici de analiză statistică presupun că un set de rezultate de la un grup de participanți are o distribuție simetrică. În cazul în care distribuția nu este suficient de simetrică, standardul ISO/IEC 17043:2023 și IUPAC Harmonized Protocol recomandă eliminarea valorilor aberante, marginale din setul de date încă de la începutul procesului de analizare. Unele valori considerate ca erori pot fi corectate prin contactarea participanților, dar numai conform procedurilor aprobate. Dacă se constată că nu au fost erori de transmitere date, atunci valoarea este luată în analiza statistică și se utilizează metode statistice robuste.

Multe dintre tehnicile robuste utilizate folosesc **mediana** pentru calcul și se recomandă utilizarea acestora în defavoarea metodelor ce recurg la eliminarea valorilor aberante din calculul final. În cazurile în care nu pot fi folosite metode statistice robuste, este



permisă utilizarea respingerii valorilor aberante ca urmare a utilizării unui test cu grad ridicat de încredere.

Modelele statistice robuste au avantajul de a reduce contribuția valorilor aberante asupra parametrilor statistici calculați așa cum este media și abaterea standard. În acest sens, ISO 13528 recomandă abordări statistice robuste descrise în Anexa D.

De interes major în prelucrarea statistică a datelor dintr-un test de comparare este stabilirea valorii atribuite și incertitudinea standard de prelucrare statistică. Standardul ISO 13528 prezintă variantele agreeate pentru acest scop și anume: (i) utilizarea unui MRC, dacă acesta este disponibil, ceea ce nu este aplicabil la un MR nou dezvoltat, (ii) rezultatele de la 1 laborator acreditat și de încredere, (iii) valoarea unanimă de la laboratoarele „expert”, (iiii) valoarea de la laboratoarele „participant”, valoare numită și *valoare consensuală*.

Standardul ISO 13528 menționează trei abordări generale, diferite, pentru evaluarea performanței în cadrul unei scheme de comparări interlaboratoare. Acestea sunt menite să satisfacă scopuri diferite ale schemelor de încercări de competență.

Calitatea rezultatelor se poate măsura prin intermediul unor indicatori statistici, cum ar fi scorul z care măsoară distanța unei valori, în cazul nostru rezultatul din analiză, față de media/ mediana unui set de date, exprimată în număr de abateri standard.

În prezenta activitate s-a utilizat scorul z pentru a evalua distribuția simetrică a rezultatelor și respectiv, pentru a calcula abaterea standard și compararea ei cu o valoare de referință agreeată pentru schema de comparare realizată.



De asemenea, s-a utilizat formula de calcul scor z care include valoarea consensuală calculată ca mediană (tehnica robustă) atât pentru valoarea atribuită, cât și pentru abaterea standard (Ecuația 8.1).

$$z = (x_i - x^*) / s^* \quad (\text{ecuația 8.1})$$

unde:

x_i reprezintă valoarea obținută de laboratorul i ;

x^* reprezintă valoarea medie robustă (mediana);

s^* reprezintă abaterea standard robustă.

În funcție de numărul de participanți la testul de comparare, valoarea de referință pentru abaterea standard robustă (s^*) se stabilește în conformitate cu recomandările D1.4.2 din standardul ISO 13528, astfel

pentru $p = 2$

valoare de referință = mediana = media

$$s^* = s = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{2}}$$

pentru $p > 4$

valoare de referință = mediana

$$s^* = \frac{1}{0,798 \cdot p} \sum_{i=1}^p |x_i - \text{med}(x)|$$

sau:

$$s^* = \frac{1,253}{p} \sum_{i=1}^p |x_i - \text{med}(x)|$$

De asemenea, pentru identificarea valorilor aberante din setul de valori transmise de laboratoarele participante s-a utilizat și reprezentarea grafică (distribuția rezultatelor și scorul z).



8.2. Colectarea rezultatelor

IBA București a colectat rezultatele și le-a prelucrat conform principiilor statistice recomandate de standardul ISO 13528:2022.

Lista celor 6 participanți la schema de comparații interlaboratoare - TEST 01-Determinarea conținutului de polifenoli totali din MR-01TP este prezentată în Tabelul 8.1.

Tabel 8.1. Lista participanților la schema de comparații interlaboratoare TEST 1

Nr. crt.	Denumire participant	Acronim
1	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Bioresurse Alimentare	IBA București
2	INCDO INOE 2000 Filiala Institutul de Cercetări pentru Instrumentație Analitică	INOE
3	Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București	USAMVB
4	Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați	UDJG
5	Universitatea din București	UB
6	Universitatea de Științele Vieții "Regele Mihai I" - Facultatea de Inginerie Alimentară	USVT

Pentru formularea concluziilor asupra rezultatelor obținute, participanților la testele comparative li s-a solicitat și descrierea metodei de analiză utilizată.

Pentru interpretarea corectă a rezultatelor, de exemplu tratarea valorilor aberante (așa cum sunt descrise de standardul ISO 13258:2022), participanților li s-a solicitat să detalieze metoda de analiză utilizată).



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Participant 1- IBA București

Caracteristici	Unitate de măsură	Rezultat	Metodă acreditată(da/nu)
Substanță uscată	%	94,92	da
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	699,09	da
Polifenoli totali/ s.u	mg GAE/100g s.u	736,50±25,50	-

Parametri de lucru-extracție 2000 rpm, temp.25°C, centrifugare 10.000 rpm, temp 4°C.
Mod de lucru - 500 µL extract metanolic a fost amestecat cu 5 mL reactiv Folin-Ciocalteu (diluât cu apă în proporție de 1:15) și incubat la întuneric timp de 10 minute.

Participant 2- INOE

Caracteristici	Unitate de măsură	Rezultat	Metodă acreditată(da/nu)
Substanță uscată	%	94,10	nu
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	510.03	nu
Polifenoli totali/ s.u	mg GAE/100g s.u	542	-

Parametri de lucru: 0,5 g probă omogenizată/-Solvent de extracție: metanol (MeOH)/-Volum solvent extracție: 2 × 5 mL -Metodă de extracție: vortexare/-Timp vortexare: 2 minute/- Viteză vortex: 2500 rpm -Centrifugare: 11.000 rpm, 2 minute/-Filtrare: membrană de celuloză, 0,45 µm -Volum extract utilizat la reacție: 0,5 mL Mod de lucru: 0,5 g de probă vortexată la 2500 rpm timp de 2 minute cu 5 mL metanol.

Participant 3- USAMVB

Caracteristici	Unitate de măsură	Rezultat	Metodă acreditată
Substanță uscată	g/100 g produs	94,01±0,11	nu
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	815,98±15,61	nu
Polifenoli totali/ S.U.	mg GAE/100g s.u	867,97±16,50	-

Mod de lucru: Extracție: 0,2 grame proba în 10 ml solvent de extracție (etanol acidifiat cu HCl 0,1%); Ultrasonicare la 50°C; timp 20 min;-Centrifugare 10 min la 5000 rpm; se separă supernatantul; -Reacția cu reactivul Folin-Ciocalteu: 0,5 ml supernatant obținut anterior se aduc la balon cotat de 25 ml; se adaugă 9,5 ml apă distilată, apoi 1 ml reactiv Folin-Ciocalteu; agitare, 5 min repaus; se adaugă 10 ml Na₂CO₃ 7% și se aduce la cota cu apă distilată; Termostatare la 40°C timp de 30 min; Citire la spectrofotometru, λ = 750nm față de un martor preparat identic, în care extractul se înlocuiește cu apă distilată.



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Participant 4-UB				
Caracteristici	Unitate de măsură	Rezultat	Metoda de testare	Metodă acreditată
Substanță uscată	%	95,42	Gravimetrică	da
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	509,84	Folin-Ciocalteu	da
Polifenoli totali/ s.u	mg GAE/100g s.u	534,31	-	-
Parametri de lucru:-Extracție: in etanol 60%, acidifiat cu HCl 0,1%; -Ultrasonicare la 50°C; timp 20 min;/ Centrifugare 10 min la 5000rpm. Mod de lucru: Reactie cu reactivul Folin-Ciocalteu a extractului, agitare, 5 min repaus; Adaugare Na ₂ CO ₃ 7%;/Termostatare 30 min, 40°C;/Citire la spectrofotometru, λ =752 nm; Determinările au fost realizate in trplicat.				

Participant 5- USVT				
Caracteristici	Unitate de măsură	Rezultat	Metoda	Acreditata
Substanță uscată	g/100 g	-	-	nu
Polifenoli totali	mg GAE/100g produs	370	-	nu
Polifenoli totali/S.U.	mg GAE/100g s.u	-	-	-

Participant 6-UDJG				
Caracteristici	U.M.	Rezultat	Metoda de testare	Metodă acreditată
Substanța uscată (s.u)	g/ 100 g produs	93,96 ± 0,06	Gravimetrică (AOAC 925.10)	Nu
Polifenoli totali	mg GAE/100 g produs	586 ± 0,01	Folin-Ciocalteu (AOAC 2017.13)	Nu
Polifenoli totali/ s.u	mg GAE/100 g s.u.	623 ± 0,01	Calcul	
<u>Parametri de lucru</u> - Solvenți:- Apă;- Etanol 20% - Metanol 70% - Metanol 70% acidifiat cu HCl 1%; Temperatură de extracție: 23±1 °C; Alte condiții: Ultrasonare 10 min/Omogenizare 1 oră - agitator mecanic la 1000 rpm. Rezultatul este pentru extracția in apa a polifenolilor.				

8.3. Calcularea indicatorilor statistici pentru metoda de măsurare a polifenolilor totali din MR-01TP



Toți participanții la testele interlaboratoare au fost acreditați cu competența necesară analizei polifenolilor totali, adică dețin infrastructura necesară (echipamente, personal calificat) și materialele utilizate în analiză.

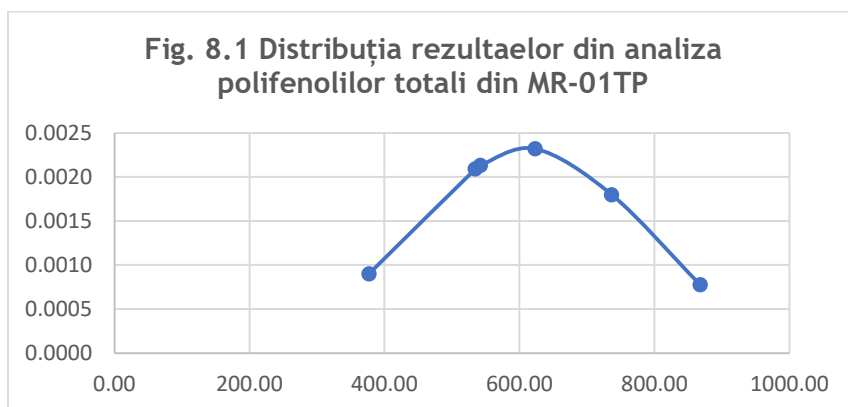
Tabel 8.2. Rezultatele obținute din analiza polifenolilor totali din MR-01TP

Nr. participant	Denumire participant	Substanță uscată, %	Polifenoli totali, mg GAE/100g produs	Polifenoli totali/ s.u	Participant acreditat
1	IBA	94,92	699,09	736,50	da
2	INOE	94,10	510,03	542,00	nu
3	USAMVB	94,01	815,98	867,97	nu
4	UB	95,42	509,84	534,31	da
5	UDJG	93,96	586,00	623,00	da
6	USVT	-	370,00	377,00	nu

În acest context, s-au utilizat următoarele:

- nu s-au eliminat punctele de extremă
- metoda robustă pentru stabilirea valorii atribuite și respectiv, a deviației standard
- valoarea atribuită a fost stabilită consensual
- valoarea consensuală a fost calculată ca mediana șirului de date
- deviația standard a fost calculată ca distanța punctului față de mediană
- nu au fost considerate aberante rezultatele de extremă și ele au fost luate în calcul
- reprezentarea grafică a distribuției datelor (rezultatelor) s-a aliniat curbei lui Gauss (Figura 8.1).

Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287



Calculare abatere standard robustă

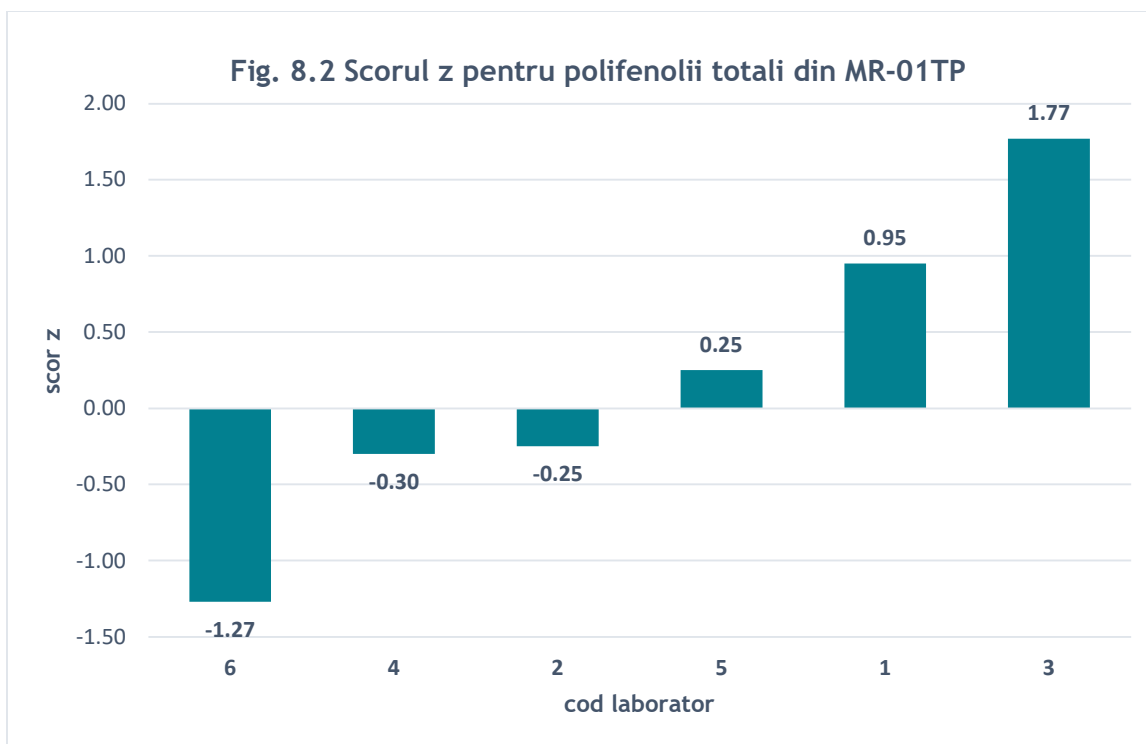
Calculare abatere standard și valoare atribuită						$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{med})^2}{n}}$	
* rezultate filtrate							
Denumire laborator	cod laborator	polifenoli totali	$(X_i - X_{med})$	$(X_i - X_{med})^2$	$ X_i - X_{med} $	valoare atribuita (X_{med})	582.50
IBA	1	736.50	154	23,716.00	154.00	nr. rez	6
INOE	2	542.00	-40.5	1,640.25	40.50		
USAMVB	3	867.97	285.47	81,493.12	285.47	$\sum (X_i - X_{med})^2$	153042
UB	4	534.31	-48.19	2,322.28	48.19	σ (std dev mediana)	159.71
UDJG	5	623.00	40.5	1,640.25	40.50	$s^* = \frac{1,253}{p} \sum_{i=1}^p x_i - med(x) $	
USVT	6	377.00	-205.5	42,230.25	205.50		
mediana		582.50				s^*	161.67
						Deviatia standard relativă	27,75



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Calculare scor z

Denumire laborator	cod laborator	polifenoli totali	Xi-Xmed	scor z (σ std dev mediană)	scor Z (s*)
IBA	1	736.50	154.00	0.96	0.95
INOE	2	542.00	-40.50	-0.25	-0.25
USAMVB	3	867.97	285.47	1.79	1.77
UB	4	534.31	-48.19	-0.30	-0.30
UDJG	5	623.00	40.50	0.25	0.25
USVT	6	377.00	-205.50	-1.29	-1.27





8.4. Concluziile studiului statistic și măsuri recomandate

8.4.1. Test 01- Determinarea conținutului de polifenoli totali MR-01TP

Analiza statistica a rezultatelor *Testului 01- Determinarea conținutului de polifenoli totali din MR-01TP* a semnalat că deși rezultatele urmăresc o distribuție normală gaussiană, că scorul z este în limita a 3 deviații standard, totuși deviație standard de 161,67 mgEAG/100g s.u este mult prea mare pentru caracterizarea unui material de referință. În concluzie s-a propus optimizarea tehnicii de analiză a polifenolilor totali din MR-01TP.

De menționat că, atribuirea valorii proprietății reprezentative a unui material de referință nou dezvoltat este o activitate complexă și ea se realizează prin studii colaborative.

Scopul este obținerea unei valori credibile și bine fundamentate, care să poată fi utilizată în aplicații interne de control al calității, validări metodologice sau studii comparative.

Documentarea procesului de atribuire a valorii polifenolilor totali din MR-01TP trebuie să includă detalii relevante: metoda analitică, echipamentele utilizate, trasabilitatea materialelor etalon, rezultatele individuale și justificarea valorii finale.

Deși în studiile de omogenitate între unități efectuate de laboratorul acreditat din IBA București s-au raportat deviații standard de până în 18 mgEAG/100g s.u, în testul de comparații interlaboratoare deviația standard a fost de 161,67 mgEAG/100g s.u. Din această cauză s-a propus evaluarea tehnicii de măsurare a polifenolilor totali din MR-01TP.



Valoarea conținutului de polifenoli totali, astfel stabilită, a fost inclusă în fișa tehnică/documentația de însoțire a MR-01TP, cu mențiunea caracterului necertificat al valorii și absența incertitudinii formale.

8.4.2. Test 02- Efectul criogenării asupra conținutului de polifenoli totali

Tehnologic, pentru creșterea conservabilității materialului de referință MR-01TP, s-a propus eliminarea totală a apei din materialul de referință prin criogenare, proces descris în IM3.1.

Prin urmare, obiectivul Testului 2 a fost *evaluarea efectului criogenării asupra conținutului de polifenoli totali din MR-01TP*. În paralel, a fost evaluat și efectul vidării (eliminarea aerului) din produsul solid MR-01TP.

IBA București a furnizat fiecărui participant la testele interlaboratoare câte 3 produse de material de testare, codificate conform descrierii din tabelul următor.



Probă	Denumire	Descriere
Proba 1	MR-01-TP	făină din pielițe de roșii ambalată în flacon din sticlă brună, etichetat, sigilat prin termosudare cu folie de aluminiu
Proba 2	fiolă roșie	făină din pielițe de roșii obținută prin distilare criogenică a produsului din MR-01-TP
Proba 3	fiolă albastră	produs MR-01-TP ambalat în vid

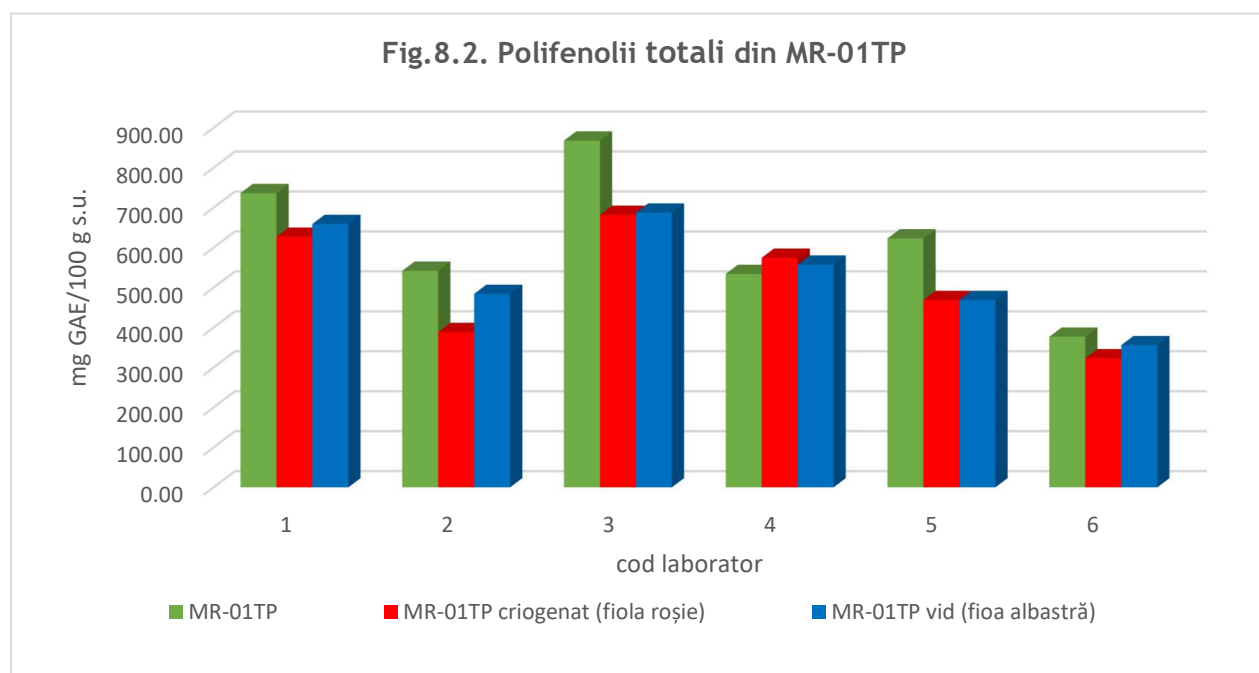
La testul 2 au participat aceiași 6 parteneri din METROFOOD-RO implicați și în testul 1, respectiv IBA, INOE, USAMV București, Universitatea București, USV Timișoara și UDJ Galați. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor.



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Test 2- Poliifenolii totali din MR-01TP				
Participant	cod lab	MR-01TP	MR-01TP criogenat (fiola roșie)	MR-01TP vid (fioa albastră)
IBA	1	736.50	627.2	659.25
INOE	2	542.00	388.77	484.24
USAMVB	3	867.97	681.95	687.69
UB	4	534.31	574.59	557.24
UDJG	5	623.00	469	469
USVT	6	377.00	323	356

Cu o singură excepție, laborator 4 (UB), toți ceilalți participanți au raportat un conținut mai mic de polifenoli totali în probele criogenate (fiola roșie) comparativ cu proba martor MR-01TP. De asemenea, și vidarea probei duce la scăderea concentrației de polifenoli totali din MR-01TP (figura 8.2).





Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

**Calculare abatere standard si valoare atribuita pentru MR criogenat
(fiola roșie)**

Denumire Laborator	cod lab	polifenoli totali	(Xi - Xmed)	(Xi - Xmed)^2	Xi - Xmed
IBA	1	627.20	105.405	11,110.21	105.41
INOE	2	388.77	-133.025	17,695.65	133.03
USAMVB	3	681.95	160.155	25,649.62	160.16
UB	4	574.59	52.795	2,787.31	52.80
UDJG	5	469.00	-52.795	2,787.31	52.80
USVT	6	323.00	-198.795	39,519.45	198.80
mediana		521.80			

$$\sigma = \sqrt{\sum((Xi - X_{mrc})^2)/n}$$

valoare atribuita (Xmed)	521.80
nr. rez	6

$\sum(Xi - X_{mr})^2$	99,549.56
σ (std dev mediana)	128.81

$$s^* = \frac{1.253}{p} \sum_{i=1}^p |x_i - med(x)|$$

s*	146.80
deviatia standard relativa, %	28.13

**Calculare abatere standard si valoare atribuita pentru MR vidat
(fiolă albastră)**

* rezultate
filtrate

Denumire Laborator	cod lab	polifenoli totali	(Xi - Xmed)	(Xi - Xmed)^2	Xi - Xmed
IBA	1	659.25	138.51	19,185.02	137.46
INOE	2	484.24	-36.5	1,332.25	37.56
USAMVB	3	687.69	166.95	27,872.30	165.90
UB	4	557.24	36.5	1,332.25	35.44
UDJG	5	469	-51.74	2,677.03	52.80
USVT	6	356	-164.74	27,139.27	165.80
mediana		520.74			

$$z = (Xi - X_{mrc}) / \sigma$$

$$\sigma = \sqrt{\sum((Xi - X_{mrc})^2)/n}$$

valoare atribuita (Xmed)	520.74
nr. rez	6

$\sum(Xi - X_{mr})^2$	79,538.12
σ (std dev mediana)	115.14

$$s^* = \frac{1.253}{p} \sum_{i=1}^p |x_i - med(x)|$$

s*	124.24
deviatia standard relativa, %	23.86

Concluzia studiului indică faptul că nu se justifică costurile suplimentare pentru criogenarea sau vidarea produsului MR-01TP (infrastructura și consumul energetic mai mare).



9. OPTIMIZAREA METODEI DE ANALIZĂ A POLIFENOLILOR DIN MR-01TP

La primul test de comparații interlaboratoare realizat pentru măsurarea cantității de polifenolilor totali din materialul de referință MR-01TP au participat șase parteneri din proiect, respectiv IBA, INOE, USAMV București, Universitatea București, USV Timișoara și UDJ Galați.

Toți partenerii au analizat probe provenite din același lot, imediat după desigilarea ambalajului, abordând metode proprii de extracție și cuantificare. Rezultatele determinărilor realizate în triplicat și raportate la 100 g substanță uscată sunt prezentate în Tabelul 9.1.

Tabel 9.1 Rezultatele testului 1 de măsurare a polifenolilor totali din MR-01TP

Partener	Raport extracție	Solvent	Concentrație solvent	Metoda de extracție	Timp de extracție (min)	Temperatura de extracție (°C)	Conținut de polifenoli totali (mg EAG/100g SU)
IBA București	1:100	Metanol	80%	Agitare, 2000 rpm	240	25	736,50±25,50
INOE	(1:10) x 2	Metanol	100%	Agitare 2500rpm	2	20	542
USAMVB	1:50	Etanol cu HCl 0.1% (fără degresare)	60 %	Ultrasoni care	20	50	867,97±16,50
	1:50	Etanol cu HCl 0.1%	40%	Ultrasoni care	20	50	795,82 ± 8,65
	1:50	Etanol cu HCl 0.1% (cu degresare)	60%	Ultrasoni care	20	50	820,19 ± 10,75



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

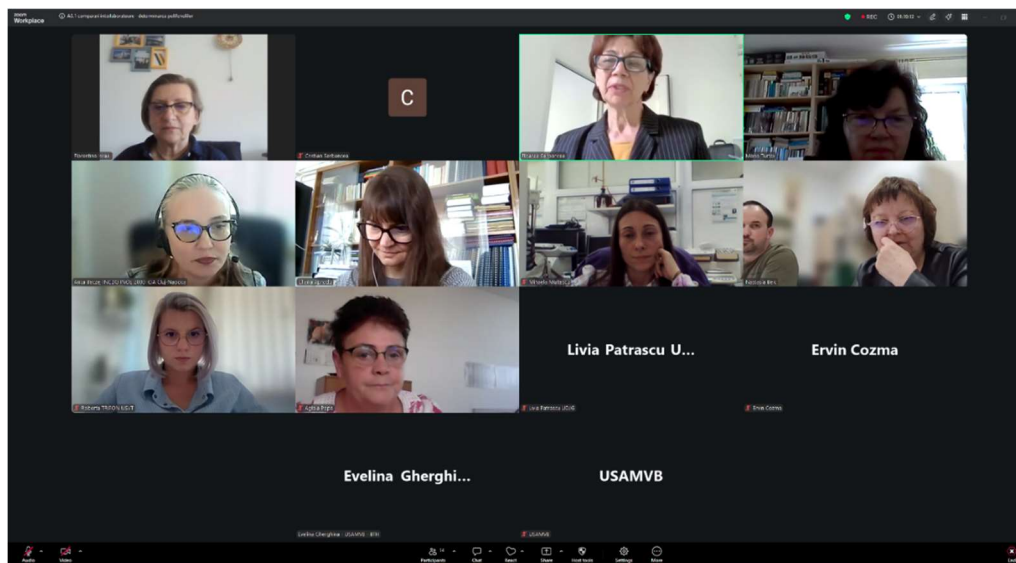
	1:50	Etanol cu HCl 0.1%	80%	Ultrasoni care	20	50	773,02 ± 14,03
UB		Etanol cu HCl 0.1%	60 %	Ultrasoni care	20	50	534,31
USVT	1:10	Etanol	70%	Ultrasoni care	30	50	377
UDJG		Apă	100%	Ultrasoni care	10	23	660 ± 0,03
		Apă	100%	Agitare 1000 rpm	60	23	623 ± 0,01
		Etanol	70%	Ultrasoni care	10	23	863 ± 0,07
		Etanol	70%	Agitare 1000 rpm	60	23	883 ± 0,12
		Metanol	70%	Ultrasoni care	10	23	852 ± 0,14
		Metanol	70%	Agitare 1000 rpm	60	23	865 ± 0,08
		Metanol cu HCl 1%	70%	Ultrasoni care	10	23	936 ± 0,04
		Metanol cu HCl 1%	70%	Agitare 1000 rpm	60	23	982 ± 0,03

La o prima analiză a datelor raportate s-a observat o diferență foarte mare între valorile raportate pentru conținutul de polifenoli totali. Media calculată pentru valorile prezentate cu caractere bold este de **613,463 mg EAG/100 g SU**, cu o deviație standard de **± 171,63 mg EAG/100 g SU** și o deviație standard relativă de **27,98%**.



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Deoarece această deviație standard relativă este mult prea mare pentru valoarea analitului măsurat într-un material de referință, s-a organizat o întâlnire cu participanții la acest prim test.



Scopul întâlnirii a constat în analiza detaliată a metodei de extracție a polifenolilor, observându-se din variantele de extracție prezentate de unii dintre participanți că pentru condiții similare valorile determinate au fost mult mai apropiate. Ca urmare au fost luați în discuție următorii parametri:

- raport de extracție dintre materialul vegetal și solvent
- tipul solventului de extracție
- concentrația solventului
- timpul
- temperatura de extracție.

S-au analizat posibilele variante ale acestor parametri în strânsă corelație cu rezultatele obținute de parteneri la determinarea concentrației compușilor fenolici.



Legat de metoda de extracție, s-a decis ca, în funcție de dotări, partenerii să opteze pentru agitare sau ultrasonicare, cu ajustarea timpului de extracție.

În final, s-a stabilit o metodă de extracție cu parametri bine definiți care s-a aplicat de toți partenerii participanți la test 1.2 (Tabelul 9.2).

Tabelul 9.2. Parametrii de extracție stabiliți pentru etapa a 2-a a testului

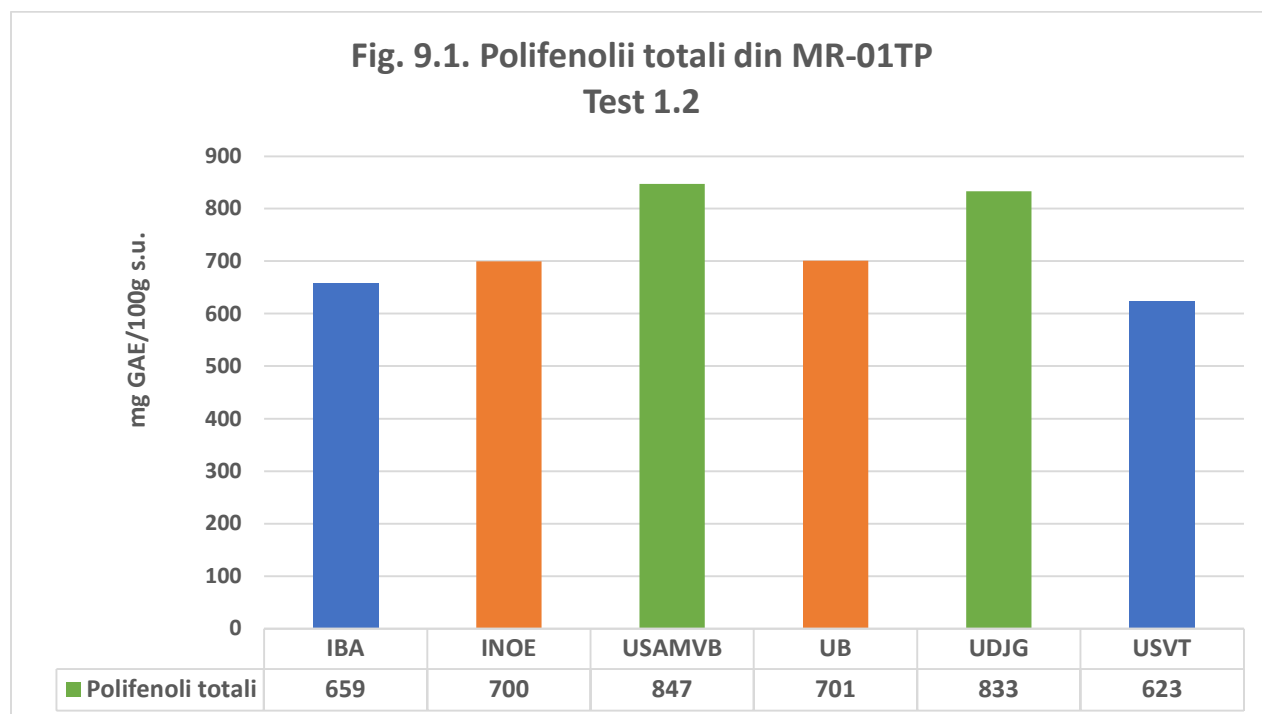
Parametru	Raport extracție (material vegetal: solvent de extracție)	Solvent	Concentrație solvent (%)	Metoda de extracție detaliată	Timp de extracție (min)	Temperatura de extracție (°C)
	1:50	Etanol (fără acidifiere)	70	Agitare / ultrasonicare	60/10	40

De asemenea, participanții la Testul 1.2 au primit și fișa de produs cu instrucțiunile de aplicat în măsurarea polifenolilor din MR-01TP.



Deoarece optimizarea tehnicii de măsurare se înscrie în obiectivul testului 1, rezultatele colectate au fost codificate cu rezultate test 1.2, testul inițial fiind test

1.1. Rezultatele testului 1.2 sunt prezentate grafic în figura 9.1



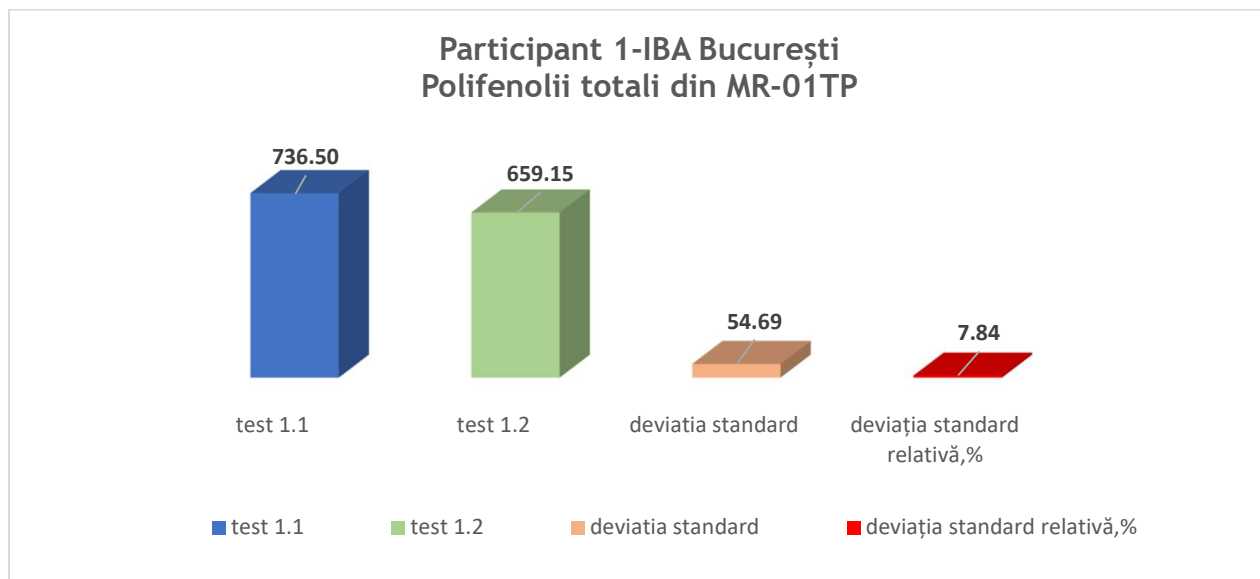
Rezultatele celor două teste (1.1 și 1.2) au fost comparate și reprezentate grafic atât individual cât și cumulativ.

Pentru varianta individuală a fost prezentată și metoda de extracție a polifenolilor din MR-01TP utilizată în testul 1.1, respectiv în testul 1.2 și deviația standard calculată pentru cele 2 teste și respectiv, deviația standard relativă.



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

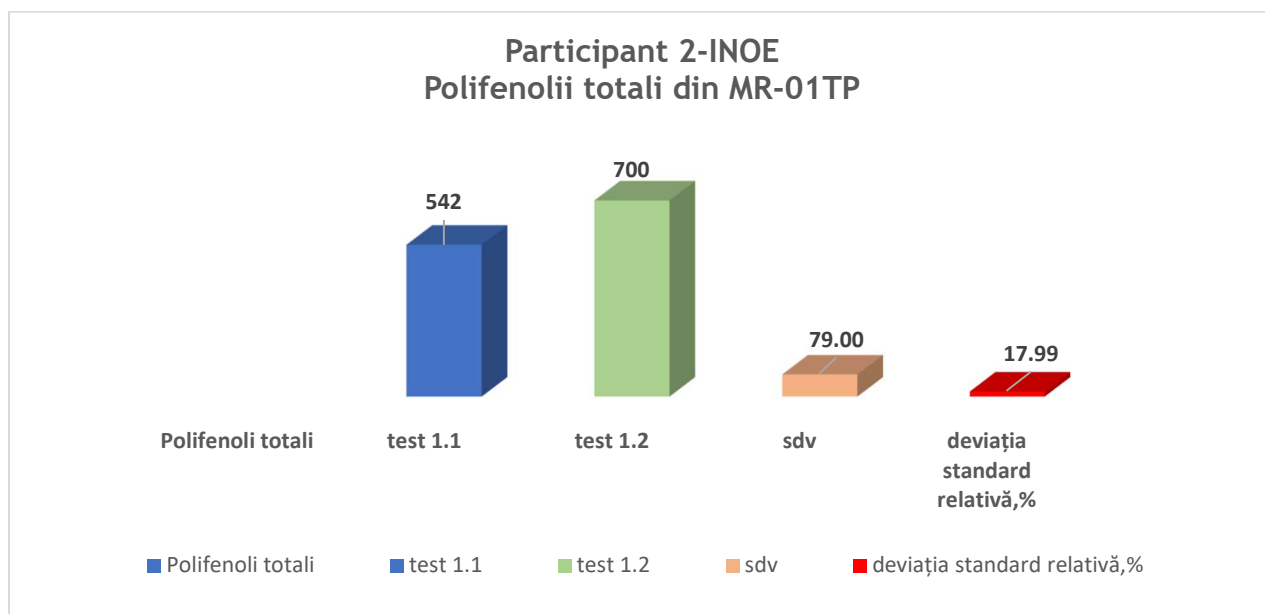
Participant 1- IBA București		
Caracteristici	Rezultat Test 1.1	Rezultat Test 1.2
Substanță uscată	94.92	93.15
Polifenoli totali/ s.u	736.50±25,50	659,15
Tehnică extracție	Vortexare 2.000 rpm/ 25°C; centrifugare 10.000 rpm, temp 4°C	Ultrasonicare temp 40°C/10 min.
Substanță uscată : g/100g Polifenoli totali/ s.u : mg GAE/100g s.u Metodă acreditată : DA		





Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

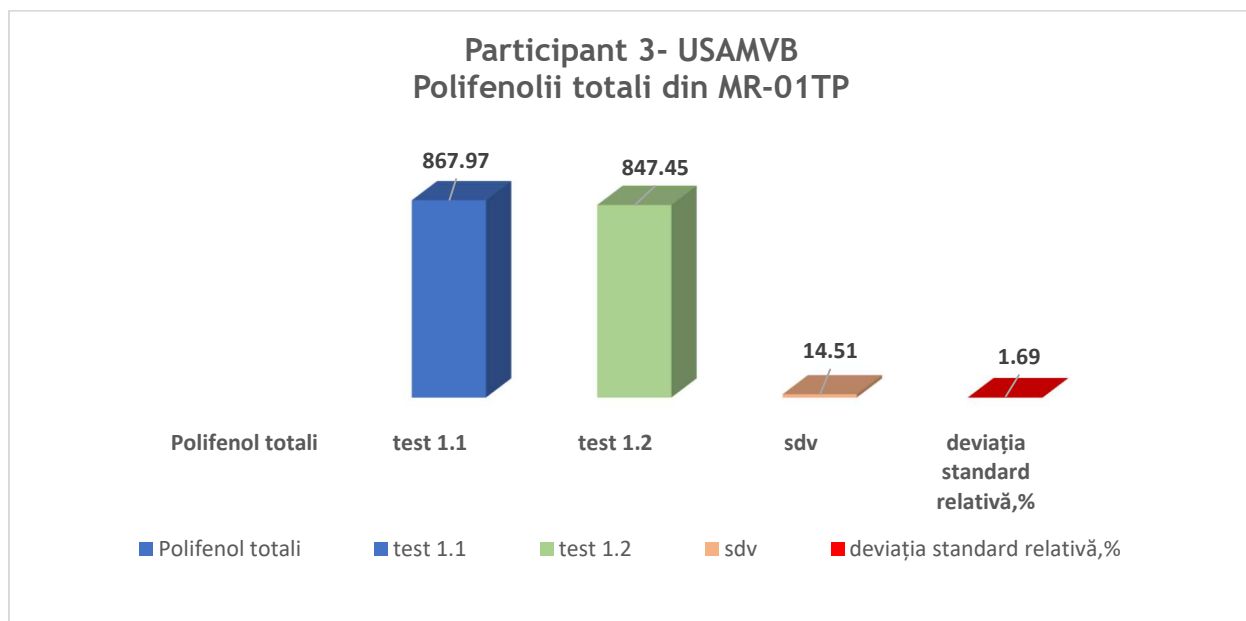
Participant 2- INOE		
Caracteristici	Rezultat Test 1.1	Rezultat Test 1.2
Substanță uscată	94.10	95.71
Polifenoli totali/ s.u	542	707,00
Tehnică extracție	Vortexare 2.500 rpm/ 25°C; centrifugare 11.000 rpm/ 2 min., temp 4°C	Ultrasonicare temp 40°C/10 min.
Substanță uscată : g/100g Polifenoli totali/ s.u : mg GAE/100g s.u Metodă acreditată : NU		





Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

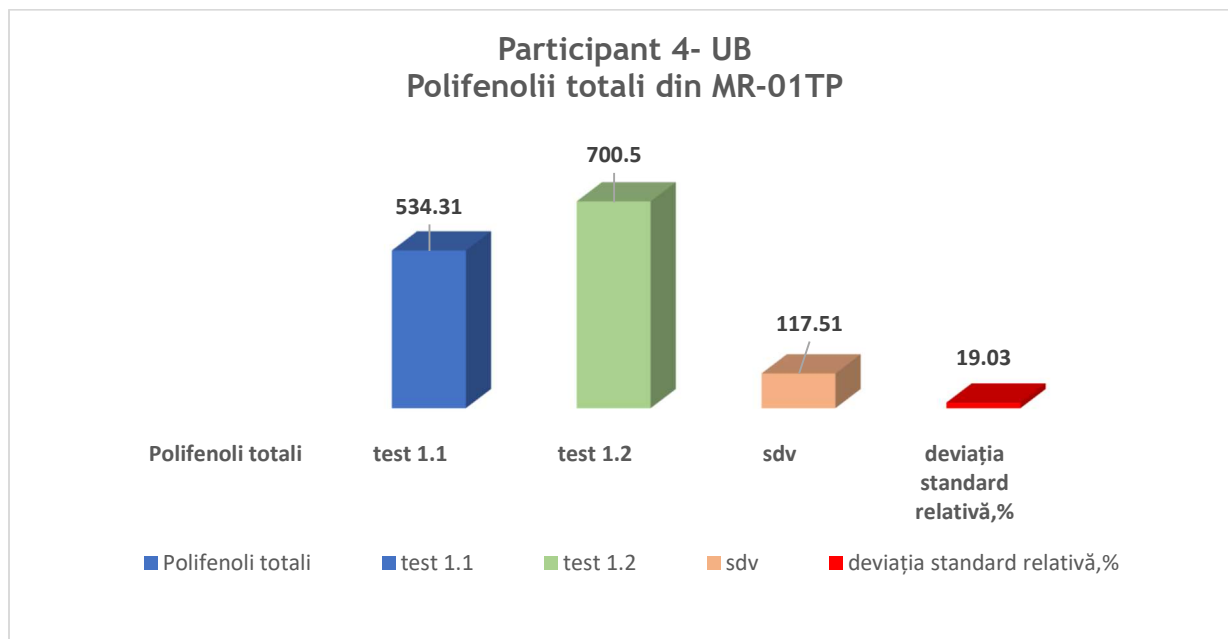
Participant 3- USAMVB		
Caracteristici	Rezultat Test 1.1	Rezultat Test 1.2
Substanță uscată	94,01±0,11	93,86 ± 0,12
Polifenoli totali/s.u.	867,97±16,50	847,45 ± 4,06
Tehnică extracție	Ultrasonicare 50°C/20 min; Centrifugare 5000 rpm/10 min.	Ultrasonicare 40°C/10 min; Centrifugare 5000 rpm/10 min.
Substanță uscată : g/100g Polifenoli totali/ s.u : mg GAE/100g s.u Metodă acreditată : NU		





Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

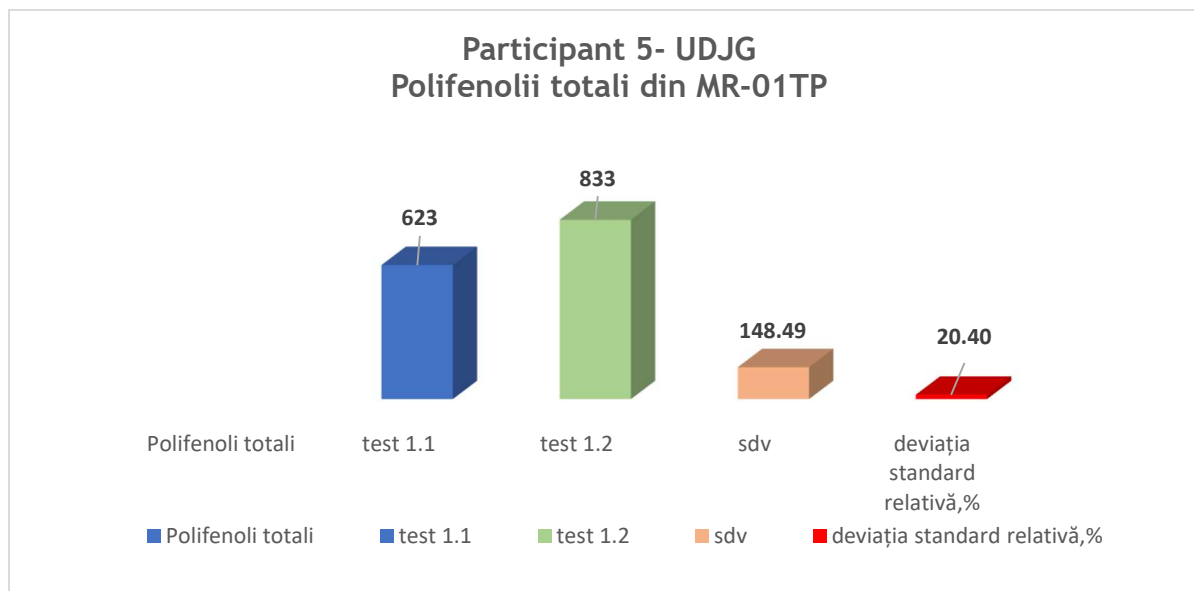
Participant 3- UB		
Caracteristici	Rezultat Test 1.1	Rezultat Test 1.2
Substanță uscată*	95.42	95.60
Polifenoli totali/ s.u.	534.31	700.50
Tehnică extracție	Ultrasonicare 50°C/20 min; Centrifugare 5000 rpm/10 min.	Ultrasonicare 40°C/10 min; Centrifugare 5000 rpm/10 min.
*Substanță uscată : g/100g Polifenoli totali/ s.u : mg GAE/100g s.u Metodă acreditată : NU		





Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

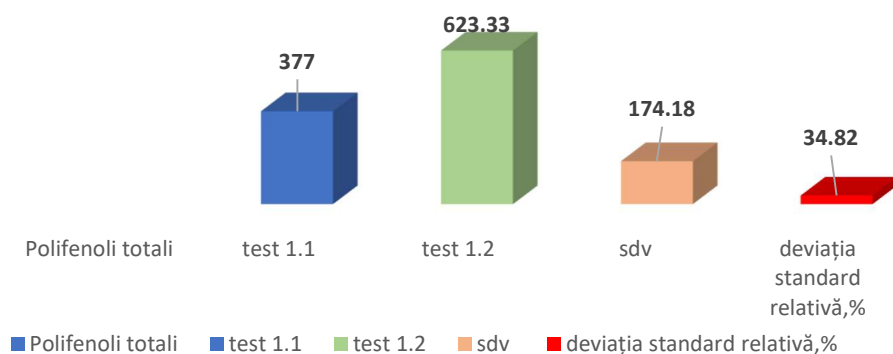
Participant 6: UDJG		
Caracteristici	Test 1.1	Test 1.2
Substanța uscată*	93,96 ± 0,06	92,25±0,04
Polifenoli totali/ s.u	623 ± 0,01	833,36±9,40
Tehnică extracție	Ultrasonicare 50°C/20 min; Centrifugare 5000 rpm/10 min.	Ultrasonicare 40°C/10 min; Centrifugare 5000 rpm/10 min.
*Substanță uscată : g/100g Polifenoli totali/ s.u : mg GAE/100g s.u Metodă acreditată : NU		



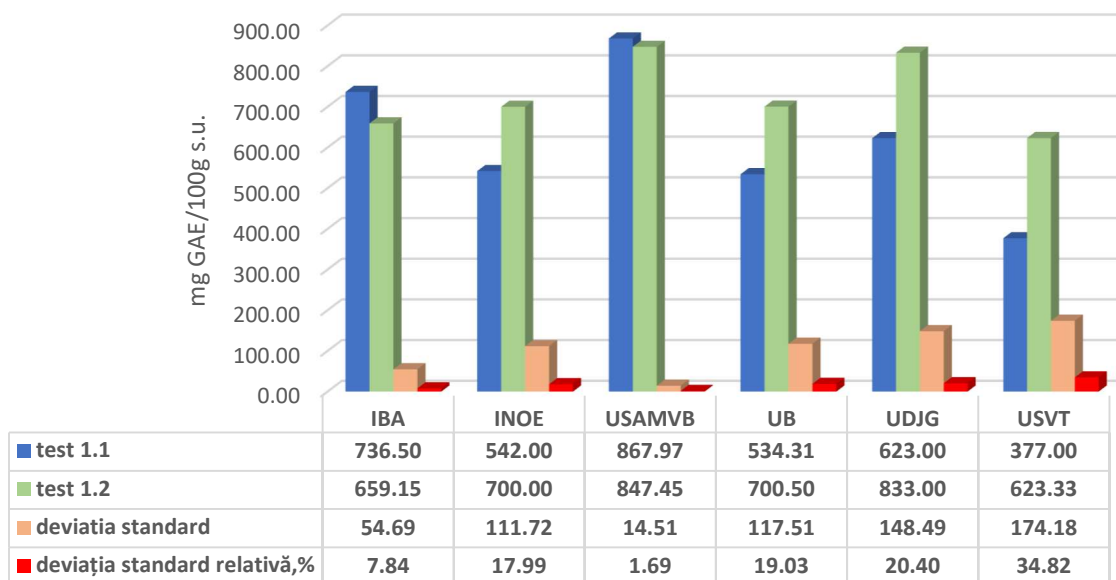


Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Participant 6- USVT Polifenolii totali din MR-01TP



Polifenolii totali din MR-01TP Test 1.1 și Test 1.2





Calculare abatere standard și valoare atribuită MR-01TP (Test 1.2)

* rezultate filtrate

Den Lab	cod lab	polifenoli totali	(Xi - Xmed)	(Xi - Xmed)^2	Xi - Xmed
IBA	1	659.15	-44.6	1,989.16	44.60
INOE	2	707.00	3.25	10.56	3.25
USAMVB	3	847.45	143.7	20,649.69	143.70
UB	4	700.50	-3.25	10.56	3.25
UDJG	5	833.36	129.61	16,798.75	129.61
USVT	6	623.33	-80.42	6,467.38	80.42
mediana		703.75			

$$z = (X_i - X_{mrc}) / \sigma$$

$$\sigma = \sqrt{(\sum (X_i - X_{mrc})^2) / n}$$

valoare atribuita (Xmed)	703.75
nr. rez	6

$\sum (X_i - X_{mr})^2$	45,926
σ (std dev mediana)	87.49

$$s^* = \frac{1.253}{p} \sum_{i=1}^p |x_i - med(x)|$$

s*	84.54
deviația standard relativă	12.01

Prin optimizarea etapei de extracție din metoda de măsurare a polifenolilor totali din MR-01TP, deviația standard a scăzut de la 159,71 mg EAG/100 g SU la 87.49 mg EAG/100 g SU. Exprimată ca deviație standard relativă aceasta a scăzut de la 27,75% la 12,01% ceea ce confirmă ipoteza că extracția analitului din matricea MR-01TP este o etapă cu impact mare asupra calității rezultatului măsurătorii.



10. CARACTERIZAREA MR-01TP

Deoarece atribuirea valorii proprietății reprezentative a unui material de referință nou dezvoltat este o activitate complexă, ea se realizează prin studii colaborative. Scopul este obținerea unei valori bine fundamentate, care să poată fi utilizată în aplicații interne de control al calității, validări metodologice sau studii comparative.

Există mai multe abordări utilizate în atribuirea valorii informative, în funcție de resursele disponibile, nivelul de complexitate al matricei și scopul utilizării materialului. În lipsa unui design interlaborator, o strategie comună constă în caracterizarea internă cu ajutorul unui sau mai multor laboratoare competente, utilizând metode analitice validate și echipamente calibrate. Cu toate acestea, pentru consolidarea încrederii în valoarea atribuită, pot fi utilizate și teste interlaboratoare, în care mai multe laboratoare independente analizează același lot de material, în condiții comparabile. Această abordare permite validarea externă a caracterizării și crește credibilitatea valorii informative, chiar în afara unui cadru acreditat.

Prin urmare, abordările multi-laborator și multi-metodă sunt adesea utilizate ca strategii de caracterizare a materialelor de referință nou dezvoltate. Astfel, se utilizează tehnici analitice multiple (de exemplu, volumetrie, gravimetrie, spectrometrie etc.) pentru a reduce impactul erorii asupra rezultatelor certificate.

Metodele analitice utilizate în cadrul acestor caracterizări, fie interne, fie interlaboratoare, trebuie să fie trasabile la standarde internaționale sau naționale recunoscute. În mod ideal, se utilizează metode de referință (standardizate sau oficiale), dar pot fi acceptate și metode alternative, cu condiția ca acestea să fie



complet validate și să demonstreze rezultate comparabile. Fiecare laborator participant trebuie să opereze în condiții controlate și să documenteze riguros fiecare etapă analitică, incluzând controlul intern al calității. În cazul în care se obțin valori apropiate din surse independente, consistența acestora consolidează încrederea în valoarea informativă atribuită.

Atribuirea valorii trebuie efectuată exclusiv după confirmarea omogenității lotului. În cazul utilizării unor studii interlaboratoare, unitățile distribuite către participanți trebuie să provină dintr-un lot verificat ca fiind omogen și stabil pe termen scurt. Datele colectate pot fi ulterior comparate și integrate pentru obținerea unei valori.

Documentarea procesului de atribuire a valorii informative trebuie să includă toate detaliile relevante: metodele analitice, echipamentele utilizate, trasabilitatea materialelor etalon, rezultatele individuale și justificarea valorii finale. În cazul în care caracterizarea implică mai multe laboratoare, trebuie menționate clar criteriile de selecție a acestora și condițiile de participare. Valoarea informativă rezultată poate fi inclusă în fișa tehnică sau în documentația de însoțire a MR-ului, cu mențiunea explicită privind caracterul necertificat al valorii și absența unei incertitudini formale.

Pe baza analizei rezultatelor din testul 1.2 utilizat în optimizarea tehnicii de măsurare a polifenolilor din MR-01TP, se recomandă ca valoarea atribuită materialului de referință caracterizat să fie valoarea **703,75 mg EAG/100g s.u.**



11. EVALUAREA PERFORMANȚEI LABORATOARELOR PARTICIPANTE

Pentru evaluarea performanței laboratoarelor la testele de comparări interlaboratoare au fost prelucrate rezultatele măsurătorilor substanței uscate (s.u) din MR-01TP organizate în testul 1.2.

S-a ales acest parametru deoarece este o tehnică simplă și utilizată intens în măsurătorile din laborator. De asemenea, este important de subliniat că umiditatea reprezintă un factor esențial care influențează semnificativ conținutul de polifenoli totali raportat la substanța uscată.

Cantitatea de substanță uscată din produs a fost determinată indirect prin măsurarea umidității din produs. Analiza de determinare a umidității a fost efectuată prin metoda gravimetrică, la etuvă, la temperatura de 105°C, uscare până la masă constantă (cca. 4 ore).

- **valoarea atribuită** a fost stabilită consensual, ca medie a celor 5 rezultate;
- **abatere standard** pentru evaluarea competenței, măsură a dispersiei utilizate în evaluarea rezultatelor încercărilor de competență, a fost calculată față de media rezultatelor
- pentru **calcularea scorului z**, expresie a performanței laboratorului, s-a utilizat formula

$$z = (x_i - \bar{x}) / s \quad (\text{ecuația 11})$$

unde:

x_i reprezintă valoarea obținută de laboratorul i ;

$\bar{x}$ reprezintă valoarea medie robustă (mediana);

s reprezintă abaterea standard robustă.



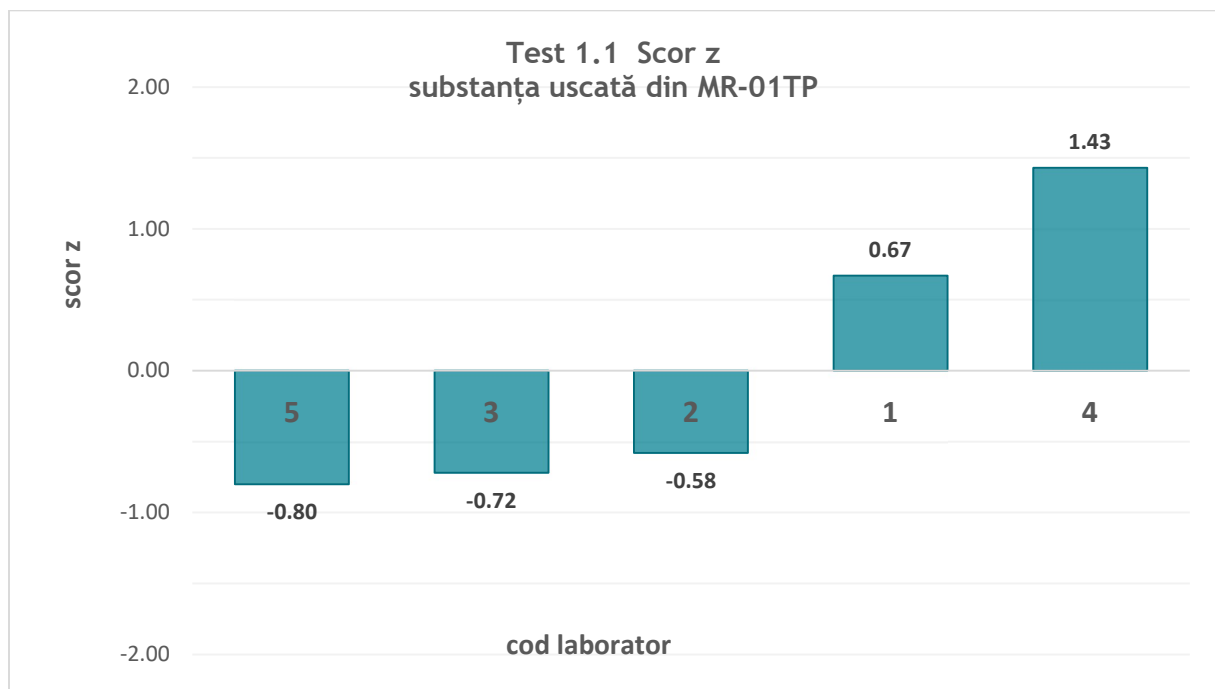
Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

-

Datele (rezultatele) prelucrate sunt prezentate în tabelul 1

Test 1.1. Calculare scor z pentru rezultatele substanță uscată din MR-01TP

Nr	Denumire Laborator	cod lab	X_i	$(X_i - X_{med})$	z
1	IBA	1	94.92	0.44	0.67
2	INOE	2	94.10	-0.38	-0.58
3	USAMVB	3	94.01	-0.47	-0.72
4	UB	4	95.42	0.94	1.43
5	UDJG	5	93.96	-0.52	-0.80
6	USVT	6	0.00	0.00	0.00
	media (X_{med})		94.48		
	sdv		0.65		
	RSD		0.69		



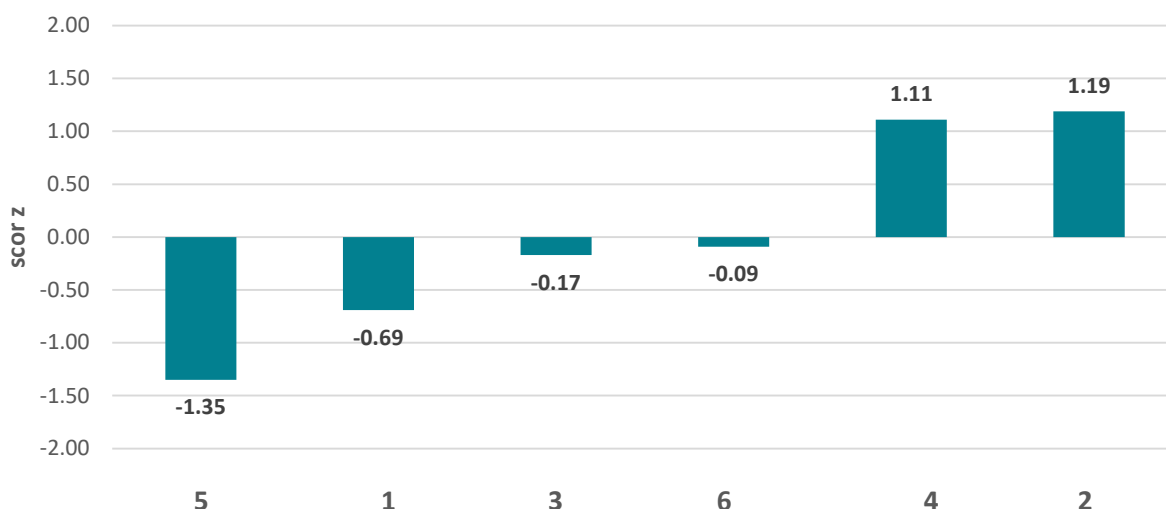


Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Test 1.2. Calculare scor z pentru rezultatele substanță uscată din MR-01TP

Nr	Denumire Laborator	cod lab	X_i (substanță uscată)	$(X_i - X_{med})$	scor z
1	IBA	1	93.15	-0.94	-0.69
2	INOE	2	95.71	1.62	1.19
3	USAMVB	3	93.86	-0.23	-0.17
4	UB	4	95.60	1.51	1.11
5	UDJG	5	92.25	-1.84	-1.35
6	USVT	6	93.96	-0.13	-0.09
	media		94.09		
	sdv		1.36		
	RSD		1.45		

Scorul z pentru măsurarea substanței uscate din MR-01TP (Test 1.2)



Conform datelor prelucrate, toți participanții au obținut scoruri z mai mici decât 2, ceea ce indică o performanță bună a laboratoarelor participante la testele de comparări interlaboratoare.

Interpretarea scorului z

$|z| \leq 2$ performanță satisfăcătoare

$2 < |z| < 3$ performanță discutabilă

$|z| \geq 3$ performanță nesatisfăcătoare



Concluzii

IM3.2- Raport privind testele interlaboratoare prezintă metodologia de realizare a comparărilor interlaboratoare prin exemplificarea pe 2 teste de comparare, pe optimizarea unei metode de măsurare și respectiv, caracterizarea unui material de referință dezvoltat în cadrul prezentului proiect și, de asemenea, a unei performanțe de măsurare.

Rezultatele activității A3.1, specifice IM3.2, sunt în conformitate cu cererea de finanțare și în raport se regăsesc descrise toate etapele pentru organizarea comparărilor interlaboratoare astfel:

- **TEST 01**- Determinarea conținutului de polifenoli totali din MR-01TP
- **TEST 02**- Efectul criogenării asupra conținutului de polifenoli totali din MR-01TP
- **TEST 1.2**- Optimizarea metodei de măsurare a polifenolilor totali din MR-01TP
- **Caracterizarea** materialului de referință MR-01TP
- **Calcularea scorului z** pentru laboratoarele participante la testele 1 și 2.

Echipa de experți care a participat la elaborarea documentului

Nume, prenume	Funcția în proiect	Contribuția la activitate
1.IBA		
Șerbancea Floarea	Coordonator activitate A3.1/ CSII/Expert	- Planificare activitate A3.1 organizare și realizare test 1 și test 2 comparări interlaboratoare pentru MR-01TP și elaborare raport IM3.2- Parțial 5 - Introducere; 1.metodologie de implementare a comparărilor interlaboratoare,2. Cerințe generale pentru competența furnizorilor de încercări de competență - Planificare activitate A3.1, elaborare raport IM3.2- Parțial 6, coordonarea optimizării metodei de analiză polifenoli totali din MR-01TP, elaborarea proiectului statistic, distribuția normală a rezultatelor, calcul deviație



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

		standard, calcul scor z pentru rezultatele din analiza polifenolilor totali din MR-01TP
Anghel Mihaela	Expert IBA	Participare la realizare test 1.1 și test 1.2 si test 2 comparari interlaboratoare pentru MR-01TP
Mărculescu Ovidiu	Expert IBA	Contribuții la organizarea testelor de comparații interlaboratoare pentru MR-01TP; Ambalare și transport MR-01TP pentru cele două teste de comparații interlaboratoare
Șerbancea Cristian	Expert IBA	Participare la elaborarea proiectului statistic, distribuția normală a rezultatelor, calcul deviație standard, calcul scor z pentru rezultatele din analiza polifenolilor totali din MR-01TP-test 1.1+ test 1.2+ test 2
2. INOE		
Babalau Fuss Vanda	Expert INOE	Realizarea testelor analitice în cadrul comparațiilor interlaboratoare pentru evaluarea performanței metodelor de determinare a polifenolilor totali și carotenoizilor
Cadar Oana	Expert INOE	Realizarea testelor analitice în cadrul comparațiilor interlaboratoare pentru evaluarea performanței metodelor de determinare a polifenolilor totali și carotenoizilor, cu raportarea rezultatelor conform cerințelor testului
Dordai Lucian	Expert INOE	Participare la evaluarea rezultatelor din analiza MR-01TP și propuneri de optimizare a metodei de analiza a polifenolilor totali din MR-01TP
Socaciu Nicoleta Bianca	Expert INOE	Realizarea testelor analitice în cadrul comparațiilor interlaboratoare pentru evaluarea performanței metodelor de determinare a polifenolilor totali și carotenoizilor / Participare la evaluarea rezultatelor din analiza MR-01TP și propuneri de optimizare a metodei de analiza a polifenolilor totali din MR-01TP
Senila Lacrămioara	Expert INOE	Contribuții la dezvoltarea metodologiei de organizare comparații interlaboratoare -cerințele standardului ISO 17043:2023
3. USVT		
Poiana Mariana-Atena	Expert USVT	Adaptarea protocolului Metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu adaptata conform ISO 14502- 1:2005 - Determination of substances characteristic of green and black tea - Part 1: Content of total polyphenols in tea -



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

		Colorimetric method using FolinCiocalteu reagent- pentru matricea pielite de rosii -contributii la prelucrarea standardelor internationale utilizate in evaluarea calitatii rezultatelor obtinute din analiza produselor realizate in cadrul proiectului METROFOOD-RO Evolve/ Participare la evaluarea rezultatelor statiatice pentru polifenoli totali din MR-01TP analizat in Testul 1./ Propuneri de optimizare a metodei de analiza polifenoli totali din MR-01TP
Radulov Isidora	Expert USVT	Determinarea continutului de polifenoli și redactarea raportului/ -contributii la prelucrarea standardelor internationale utilizate in evaluarea calitatii rezultatelor obtinute din analiza produselor realizate in cadrul proiectului METROFOOD-RO Evolve Participare la evaluarea rezultatelor statiatice pentru polifenoli totali din MR-01TP analizat in Testul 1./ Propuneri de optimizare a metodei de analiza polifenoli totali din MR-01TP
Tripon Roberta	Expert USVT	Determinarea continutului de polifenoli și redactarea raportului/ -contributii la prelucrarea standardelor internationale utilizate in evaluarea calitatii rezultatelor obtinute din analiza produselor realizate in cadrul proiectului METROFOOD-RO Evolve Participare la evaluarea rezultatelor statiatice pentru polifenoli totali din MR-01TP analizat in Testul 1./ Propuneri de optimizare a metodei de analiza polifenoli totali din MR-01TP
Tulcan Camelia	Expert USVT	Adaptarea protocolului Metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu adaptata conform ISO 14502- 1:2005 - Determination of substances characteristic of green and black tea - Part 1: Content of total polyphenols in tea - Colorimetric method using FolinCiocalteu reagent- pentru matricea pielite de rosii.Determinarea continutului de polifenoli și redactarea raportului -contribuții la prelucrarea standardelor internationale utilizate in evaluarea calitatii rezultatelor obtinute din analiza produselor realizate in cadrul proiectului METROFOOD-RO Evolve Optimizarea metodei de analiza a polifenolilor totali din MR-01TP
4.USAMV		



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Balan Daniela	Expert USAMVB	Determinarea conținutului de polifenoli totali a celor trei probe de material de referință incluse în această etapă de testare interlaboratoare
Bujor - Nenița Oana - Crina	Expert USAMVB	Studiul metodologiei de organizare a testelor interlaboratoare (ISO 17043/2003)/ Contribuții la stabilirea tipului de test interlaborator și a analitului urmărit
Danila Elena	Expert USAMVB	Pregătire probe; Preparare reactivi; Spălare sticlărie de laborator
ISRAEL- ROMING Florentina	Expert USAMVB	Participări la discuții cu partenerii din proiect implicați în realizarea testului 1 interlaboratoare pentru materialul de referință în vederea stabilirii informațiilor suplimentare care trebuie furnizate pentru analiza rezultatelor și evidențierea gradului de influență a metodei de extracție a polifenolilor asupra cuantificării acestora. Discuții cu partenerii din proiect și stabilirea tuturor parametrilor de extracție a polifenolilor pentru a aplica aceeași metodă în următoarea etapă de testare interlaboratoare privind conținutul total de polifenoli din materialul de referință (IM3.2 Raport privind teste interlaboratoare);
Mitelut Amalia	Expert USAMVB	Studiu privind privind posibile soluții de ambalare a materialului de referință elaborat, în corelație cu proprietățile fizico-chimice ale acestuia. Studiu privind privind posibile soluții de ambalare a materialului de referință elaborat, în corelație cu proprietățile fizico-chimice ale acestuia. (IM3.2 Raport privind teste interlaboratoare)
Popa Aglaia	Expert USAMVB	Optimizarea extracției polifenolilor totali din materialul de referință în vederea analizei cantitative. Determinarea conținutului în lipide și influența acestuia asupra cuantificării polifenolilor totali din materialul de referință. Determinarea substanței uscate a celor 3 probe MR Studiul metodologiei de organizare a testelor interlaboratoare (ISO 17043/2003) Contribuții la stabilirea tipului de test interlaborator și a analitului urmărit/ Completarea informațiilor de la parteneri și pregătirea documentelor pentru interpretarea datelor și stabilirea metodei de extracție a polifenolilor din materialul de referință pentru a fi aplicată în următoarea etapă a testării interlaboratoare



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

5.UDJG		
Aprodu Iuliana	Expert UDJG	Participare la determinarea conținutului total de fenoli din probele de făină din piețițe de roșii în cadrul testelor interlaboratoare și elaborarea Raportului pentru această activitate/ Participare la evaluarea rezultatelor statistice obținute la determinarea conținutului total de fenoli din proba MR-01-TP analizată în Testul 1; Participare la întâlnirile a grupului de lucru implicat în testele interlaboratoare. Propuneri de optimizare a metodei de analiză a conținutului total de fenoli din MR-01TP
Borda Daniela	Expert UDJG	Contribuții la elaborarea studiului „Separarea polifenolilor prin HPLC”
Patrașcu Livia	Expert UDJG	Contribuții la elaborarea studiului „Identificarea polifenolilor cu metoda Folin Ciocalteu”
Turtoi Maria	Expert UDJG	Contribuții la elaborarea studiului „Separarea polifenolilor prin HPLC” Integrarea „Raportului privitor la determinarea conținutului total de fenoli din probele de făină din piețițe de roșii în cadrul testelor interlaboratoare” în Raportul de progres RP5-UDJG și pregătirea raportului tehnic pentru IM3.2 - Raport privind testele interlaboratoare (parțial)/ Standarde internaționale utilizate în organizarea testelor interlaboratoare (identificare și prelucrare informații)/ Participare la întâlnirea grupului de lucru implicat în testele interlaboratoare. Propuneri de optimizare a metodei de analiză a conținutului total de fenoli din MR-01TP
Vasilean Ina	Expert UDJG	Participare la determinarea conținutului total de fenoli din probele de făină din piețițe de roșii în cadrul testelor interlaboratoare
6.UB		
Moza Iasmina	Expert UB	Desfășurarea testelor interlaborator pentru detecția și cuantificarea polifenolilor totali și individuali, utilizând HPLC-DAD/ -contributii la prelucrarea standardelor internaționale utilizate în evaluarea calitatii rezultatelor obținute din analiza produselor realizate în cadrul proiectului METROFOOD-RO Evolve/ Desfășurarea testelor interlaborator pentru detecția și cuantificarea polifenolilor totali și individuali, utilizând HPLC-DAD



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

7. INMA		
Ionescu Alexandru	Expert INMA	-contribuții la prelucrarea standardelor internaționale utilizate în evaluarea calității rezultatelor obținute din analiza produselor realizate în cadrul proiectului METROFOOD-RO Evolve. Standarde studiate ISO 17043:2023; ISO 17034:2017 și ISO 13528:2022.
Mircea Costin	Expert INMA	-contribuții la prelucrarea standardelor internaționale utilizate în evaluarea calității rezultatelor obținute din analiza produselor realizate în cadrul proiectului METROFOOD-RO Evolve. Standarde studiate ISO 17043:2023; ISO 17034:2017 și ISO 13528:2022.
Voicea Iulian	Expert INMA	-contribuții la dezvoltarea metodologie de organizare a comparărilor interlaboratoare; organizarea comparărilor interlaboratoare și a studiilor colaborative

Responsabil realizare document,

Șerbancea Floarea