



Obsah

II *Nelegislativní akty*

MEZINÁRODNÍ DOHODY

- ★ **Rozhodnutí Rady (EU) 2018/145 ze dne 9. října 2017 o uzavření Mnohostranné dohody mezi Evropským společenstvím a jeho členskými státy a Albánskou republikou, Bosnou a Hercegovinou, Bulharskou republikou, Bývalou jugoslávskou republikou Makedonií, Republikou Černá Hora, Chorvatskou republikou, Islandskou republikou, Prozatímní správní misí Organizace spojených národů v Kosovu*, Norským královstvím, Rumunskem a Republikou Srbsko o vytvoření společného evropského leteckého prostoru jménem Unie** 1
- ★ **Rozhodnutí Rady (EU) 2018/146 ze dne 22. ledna 2018 o uzavření Evropsko-středomořské letecké dohody mezi Evropským společenstvím a jeho členskými státy na jedné straně a Marockým královstvím na straně druhé jménem Unie** 4

NAŘÍZENÍ

- ★ **Nářízení Rady (EU) 2018/147 ze dne 29. ledna 2018 o změně nařízení (EU) č. 1370/2013, pokud jde o množstevní omezení pro nákup sušeného odstředěného mléka** 6
- ★ **Nářízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2018/148 ze dne 27. září 2017, kterým se mění přílohy II, III a IV nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 978/2012 o uplatňování systému všeobecných celních preferencí** 8
- ★ **Nářízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2018/149 ze dne 15. listopadu 2017, kterým se mění nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2016/1238, pokud jde o požadavky na složení a jakostní znaky mléka a mléčných výrobků způsobilých pro veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování** 11

* Tímto označením nejsou dotčeny postoje k otázce statusu a označení je v souladu s rezolucí Rady bezpečnosti OSN 1244 (1999) a se stanoviskem Mezinárodního soudního dvora k vyhlášení nezávislosti Kosova.

- ★ **Prováděcí nařízení Komise (EU) 2018/150 ze dne 30. ledna 2018, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) 2016/1240, pokud jde o metody analýzy a hodnocení jakosti mléka a mléčných výrobků způsobilých pro veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování** 14
- ★ **Prováděcí nařízení Komise (EU) 2018/151 ze dne 30. ledna 2018, kterým se stanoví pravidla pro uplatňování směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2016/1148, pokud jde o bližší upřesnění prvků, které musí poskytovatelé digitálních služeb zohledňovat při řízení bezpečnostních rizik, jimiž jsou vystaveny sítě a informační systémy, a parametrů pro posuzování toho, zda je dopad incidentu významný** 48

ROZHODNUTÍ

- ★ **Rozhodnutí Rady (EU) 2018/152 ze dne 29. ledna 2018 o jmenování jedné náhradnice Výboru regionů, navržené Spolkovou republikou Německo** 52

Opravy

- ★ **Oprava nařízení Komise (EU) 2017/1084 ze dne 14. června 2017, kterým se mění nařízení (EU) č. 651/2014, pokud jde o podporu na přístavní a letištní infrastrukturu, prahové hodnoty oznamovací povinnosti pro podporu na kulturu a zachování kulturního dědictví a pro podporu na sportovní a multifunkční rekreační infrastrukturu a režimy regionální provozní podpory pro nejvzdálenější regiony, a mění se nařízení (EU) č. 702/2014, pokud jde o výpočet způsobilých nákladů (Úř. věst. L 156, 20.6.2017)** 53

II

(Nelegislativní akty)

MEZINÁRODNÍ DOHODY

ROZHODNUTÍ RADY (EU) 2018/145

ze dne 9. října 2017

o uzavření Mnohostranné dohody mezi Evropským společenstvím a jeho členskými státy a Albánskou republikou, Bosnou a Hercegovinou, Bulharskou republikou, Bývalou jugoslávskou republikou Makedonií, Republikou Černá Hora, Chorvatskou republikou, Islandskou republikou, Prozatímní správní misí Organizace spojených národů v Kosovu *, Norským královstvím, Rumunskem a Republikou Srbsko o vytvoření společného evropského leteckého prostoru jménem Unie

RADA EVROPSKÉ UNIE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie, a zejména na čl. 100 odst. 2 ve spojení s čl. 218 odst. 6 písm. a) této smlouvy,

s ohledem na návrh Evropské komise,

s ohledem na souhlas Evropského parlamentu ⁽¹⁾,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Komise jménem Evropského společenství a jeho členských států sjednala Mnohostrannou dohodu mezi Evropským společenstvím a jeho členskými státy a Albánskou republikou, Bosnou a Hercegovinou, Bulharskou republikou, Bývalou jugoslávskou republikou Makedonií, Republikou Černá Hora, Chorvatskou republikou, Islandskou republikou, Prozatímní správní misí Organizace spojených národů v Kosovu, Norským královstvím, Rumunskem a Republikou Srbsko o vytvoření společného evropského leteckého prostoru (dále jen „dohoda“).
- (2) Dohoda byla jménem Společenství podepsána dne 9. června 2006 s výhradou pozdějšího uzavření na základě rozhodnutí Rady a zástupců vlád členských států Evropské unie, zasedajících v Radě, 2006/682/ES ⁽²⁾.
- (3) Dohoda byla ratifikována všemi členskými státy.
- (4) Svým přistoupením k Unii se Bulharská republika, Rumunsko a Chorvatská republika staly členskými státy, a tudíž automaticky přestaly být přidruženými stranami podle dohody v souladu s jejím čl. 31 odst. 2. To by mělo být zmíněno v oznámení, které má být učiněno při uložení listiny o schválení dohody.

* Tímto označením nejsou dotčeny postoje k otázce statusu a označení je v souladu s rezolucí Rady bezpečnosti OSN 1244 (1999) a se stanoviskem Mezinárodního soudního dvora k vyhlášení nezávislosti Kosova.

⁽¹⁾ Úř. věst. C 81E, 15.3.2011, s. 5.

⁽²⁾ Rozhodnutí Rady a zástupců vlád členských států Evropské unie, zasedajících v Radě, 2006/682/ES ze dne 9. června 2006 o podpisu a prozatímním uplatňování mnohostranné dohody mezi Evropským společenstvím a jeho členskými státy a Albánskou republikou, Bosnou a Hercegovinou, Bulharskou republikou, Bývalou jugoslávskou republikou Makedonií, Republikou Černá Hora, Chorvatskou republikou, Islandskou republikou, Prozatímní správní misí Organizace spojených národů v Kosovu, Norským královstvím, Rumunskem a Republikou Srbsko o vytvoření společného evropského leteckého prostoru jménem Unie (Úř. věst. L 285, 16.10.2006, s. 1).

- (5) Pokud jde o změny přílohy I dohody spočívající v pouhém zahrnutí právních předpisů Unie do této přílohy, jež mají být přijaty smíšeným výborem zřízeným článkem 18 dohody, měla by pravomoc schvalovat tyto změny jménem Unie mít Komise po konzultaci se zvláštním výborem jmenovaným Radou.
- (6) Ve všech ostatních případech by postoj, který má být zaujat jménem Unie ve smíšeném výboru, pokud jde o záležitosti spadající do pravomoci Unie, měl být stanoven případ od případu v souladu s příslušnými ustanoveními Smlouvy o fungování Evropské unie.
- (7) Vzhledem k tomu, že smluvními stranami dohody jsou Unie i členské státy, má zásadní význam úzká spolupráce mezi nimi. Aby se zajistila tato úzká spolupráce a jednota vnějšího zastupování ve smíšeném výboru a aniž jsou dotčeny Smlouvy, zejména čl. 16 odst. 1 Smlouvy o Evropské unii a čl. 218 odst. 9 Smlouvy o fungování Evropské unie, mělo by před každým zasedáním smíšeného výboru zabývajících se záležitostmi spadajícími do pravomoci Unie i členských států dojít ke koordinaci postojů, které mají být ve smíšeném výboru k těmto záležitostem jménem Unie a členských států zaujaty.
- (8) Článek 2 rozhodnutí 2006/682/ES obsahuje ustanovení o stanovení postojů, které mají být zaujaty ve smíšeném výboru během prozatímního provádění dohody. S ohledem na rozsudek Soudního dvora ze dne 28. dubna 2015 ve věci C-28/12, Komise v. Rada ⁽¹⁾, by tato ustanovení měla pozbyt platnosti ke dni vstupu tohoto rozhodnutí v platnost.
- (9) Dohoda by měla být schválena,

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

Článek 1

1. Mnohostranná dohoda mezi Evropským společenstvím a jeho členskými státy a Albánskou republikou, Bosnou a Hercegovinou, Bulharskou republikou, Bývalou jugoslávskou republikou Makedonií, Republikou Černá Hora, Chorvatskou republikou, Islandskou republikou, Prozatímní správní misí Organizace spojených národů v Kosovu, Norským královstvím, Rumunskem a Republikou Srbsko o vytvoření společného evropského leteckého prostoru (dále jen „dohoda“) se schvaluje jménem Unie ⁽²⁾.
2. Předseda Rady jmenuje osobu nebo osoby zmocněné uložit jménem Unie listinu o schválení podle čl. 29 odst. 2 dohody ⁽³⁾ a učinit toto oznámení:
 - „1. V důsledku vstupu Lisabonské smlouvy v platnost dnem 1. prosince 2009 Evropská unie nahradila Evropské společenství a je jeho nástupkyní a od uvedeného dne vykonává všechna jeho práva a povinnosti. Odkazy na „Evropské společenství“ ve znění dohody se proto na příslušných místech považují za odkazy na „Evropskou unii“.
 2. Svým přistoupením k Evropské unii se Bulharská republika, Rumunsko a Chorvatská republika staly členskými státy Evropské unie, a v souladu s čl. 31 odst. 2 dohody proto přestaly být přidruženými stranami podle dohody.“

Článek 2

Postoj, který má Unie zaujmout k rozhodnutím smíšeného výboru podle článku 17 dohody, pokud jde o pouhé začlenění právních předpisů Unie do přílohy I dohody s výhradou případných potřebných technických úprav, přijímá Komise po konzultaci se zvláštním výborem jmenovaným Radou.

Článek 3

Článek 2 rozhodnutí 2006/682/ES pozbývá platnosti ke dni vstupu tohoto rozhodnutí v platnost.

⁽¹⁾ ECLI:EU:C:2015:282.

⁽²⁾ Dohoda byla zveřejněna v *Úředním věstníku Evropské unie* (Úř. věst. L 285, 16.10.2006, s. 3) spolu s rozhodnutím o podpisu a prozatímním provádění.

⁽³⁾ Den vstupu dohody v platnost zveřejní generální sekretariát Rady v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Článek 4

Toto rozhodnutí vstupuje v platnost dnem přijetí.

V Lucemburku dne 9. října 2017.

*Za Radu
předseda
S. KIISLER*

ROZHODNUTÍ RADY (EU) 2018/146**ze dne 22. ledna 2018****o uzavření Evropsko-středomořské letecké dohody mezi Evropským společenstvím a jeho členskými státy na jedné straně a Marockým královstvím na straně druhé jménem Unie**

RADA EVROPSKÉ UNIE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie, a zejména na čl. 100 odst. 2 ve spojení s čl. 218 odst. 6 písm. a) této smlouvy,

s ohledem na návrh Evropské komise,

s ohledem na souhlas Evropského parlamentu ⁽¹⁾,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Komise sjednala jménem Unie a členských států evropsko-středomořskou leteckou dohodu s Marockým královstvím (dále jen „dohoda“) v souladu s rozhodnutím Rady pověřujícím Komisi zahájením jednání.
- (2) Dohoda byla podepsána dne 12. prosince 2006 na základě rozhodnutí Rady a zástupců vlád členských států, zasedajících v Radě, 2006/959/ES ⁽²⁾. Dohoda byla ratifikována všemi členskými státy s výjimkou Bulharska, Rumunska a Chorvatska. Předpokládá se, že tyto státy přistoupí k dohodě v souladu s čl. 6 odst. 2 svých aktů o přistoupení.
- (3) Pokud jde o změny některých příloh dohody, jež mají být přijaty smíšeným výborem zřízeným podle článku 22 dohody, měla by pravomoc schvalovat tyto změny jménem Unie mít Komise po konzultaci se zvláštním výborem jmenovaným Radou.
- (4) Ve všech ostatních případech by postoje, které mají být zaujaty jménem Unie ve smíšeném výboru, pokud jde o záležitosti spadající do pravomoci Unie, měly být stanoveny případ od případu v souladu s příslušnými ustanoveními Smlouvy o fungování Evropské unie.
- (5) Vzhledem k tomu, že smluvními stranami dohody jsou Unie i členské státy, má zásadní význam úzká spolupráce mezi nimi. Aby se zajistila tato úzká spolupráce a jednota vnějšího zastupování ve smíšeném výboru a aniž jsou dotčeny Smlouvy, zejména čl. 16 odst. 1 Smlouvy o Evropské unii a čl. 218 odst. 9 Smlouvy o fungování Evropské unie, mělo by před každým zasedáním smíšeného výboru zabývajícího se záležitostmi spadajícími do pravomoci Unie i členských států dojít ke koordinaci postojů, které mají být ve smíšeném výboru k těmto záležitostem jménem Unie a členských států zaujaty.
- (6) Články 2 až 5 rozhodnutí 2006/959/ES obsahují ustanovení týkající se rozhodování v Radě ohledně různých záležitostí uvedených v dohodě, včetně stanovení postojů, které mají být zaujaty ve smíšeném výboru, a informačních povinností členských států během prozatímního provádění dohody. Uvedená ustanovení buď již nejsou nezbytná, nebo by jejich uplatňování mělo být ukončeno s ohledem na rozsudek Soudního dvora ze dne 28. dubna 2015 ve věci C-28/12, Komise v. Rada ⁽³⁾. Je tudíž na místě, aby všechna uvedená ustanovení pozbyla platnosti ke dni vstupu tohoto rozhodnutí v platnost.
- (7) Dohoda by měla být schválena,

⁽¹⁾ Úř. věst. C 81E, 15.3.2011, s. 5.

⁽²⁾ Rozhodnutí Rady a zástupců vlád členských států, zasedajících v Radě, 2006/959/ES ze dne 4. prosince 2006 o podpisu a prozatímním uplatňování Evropsko-středomořské letecké dohody mezi Evropským společenstvím a jeho členskými státy na jedné straně a Marockým královstvím na straně druhé (Úř. věst. L 386, 29.12.2006, s. 55).

⁽³⁾ ECLI:EU:C:2015:282.

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

Článek 1

1. Evropsko-středomořská letecká dohoda mezi Evropským společenstvím a jeho členskými státy na jedné straně a Marockým královstvím na straně druhé se schvaluje jménem Unie ⁽¹⁾.
2. Předseda Rady je oprávněn jmenovat osobu nebo osoby zmocněné doručit Marockému království diplomatické nóty podle článku 30 dohody ⁽²⁾ a učinit toto oznámení:

„V důsledku vstupu Lisabonské smlouvy v platnost dnem 1. prosince 2009 Evropská unie nahradila Evropské společenství a je jeho nástupkyní a od uvedeného dne vykonává všechna jeho práva a povinnosti. Odkazy na „Evropské společenství“ ve znění dohody se proto na příslušných místech považují za odkazy na „Evropskou unii“.“

Článek 2

Postoj, který má Unie zaujmout ve smíšeném výboru zřízeném článkem 22 dohody, pokud jde o změny příloh dohody jiných, než jsou příloha I (Dohodnuté služby a určené trasy) a příloha IV (Přechodná ustanovení), přijímá Komise po konzultaci se zvláštním výborem jmenovaným Radou.

Článek 3

Články 2 až 5 rozhodnutí 2006/959/ES pozbývají platnosti ke dni vstupu tohoto rozhodnutí v platnost.

Článek 4

Toto rozhodnutí vstupuje v platnost dnem přijetí.

V Bruselu dne 22. ledna 2018.

Za Radu
předsedkyně
F. MOGHERINI

⁽¹⁾ Dohoda byla zveřejněna v *Úředním věstníku Evropské unie* (Úř. věst. L 386, 29.12.2006, s. 57) spolu s rozhodnutím o podpisu a prozatímním provádění.

⁽²⁾ Den vstupu dohody v platnost zveřejní generální sekretariát Rady v *Úředním věstníku Evropské unie*.

NAŘÍZENÍ

NAŘÍZENÍ RADY (EU) 2018/147

ze dne 29. ledna 2018

o změně nařízení (EU) č. 1370/2013, pokud jde o množstevní omezení pro nákup sušeného odstředěného mléka

RADA EVROPSKÉ UNIE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie, a zejména na čl. 43 odst. 3 této smlouvy,

s ohledem na návrh Evropské komise,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Množství veřejných intervenčních zásob sušeného odstředěného mléka v Unii bylo na konci července 2017 vykazováno ve výši 357 359 tun. Až do ukončení intervenčního období dne 30. září 2017 nabídnuto k nákupu za pevnou cenu dalších 22 710 tun.
- (2) V odvětví mléka a mléčných výrobků v současnosti kvůli vysoké poptávce po másle dochází k nebývalému nesouladu mezi cenami tuku a bílkovin.
- (3) Dodávky mléka v Evropské unii se mají v roce 2018 zvýšit, což povede k větší produkci másla a sušeného odstředěného mléka.
- (4) Je pravděpodobné, že vzhledem k vysoké poptávce po másle a sýru zůstanou ceny syrového mléka vyplácené zemědělcům v roce 2018 na úrovni, která je pro produkci mléka rentabilní, a to i přes poměrně nízké ceny mléčných bílkovin.
- (5) Tyto prvky trhu vytvářejí pro rok 2018 mimořádnou situaci, kterou je nutno zohlednit, zejména pokud jde o fungování mechanismu veřejných intervencí u mléčných výrobků.
- (6) Článek 3 nařízení Rady (EU) č. 1370/2013 ⁽¹⁾ stanoví množstevní omezení pro nákup sušeného odstředěného mléka za pevně stanovenou cenu uvedenou v článku 2 téhož nařízení. Po dosažení daných omezení se nákup má provádět na základě nabídkového řízení s cílem určit maximální nákupní cenu.
- (7) Aby sušené odstředěné mléko nebylo vykupováno za pevnou cenu v situaci, kdy by to bylo v rozporu s cíli bezpečnostní sítě, měly by se všechny veřejné intervence u sušeného odstředěného mléka provádět na základě nabídkového řízení. Za tímto účelem by se množstevní omezení pro nákup sušeného odstředěného mléka za pevnou cenu pro rok 2018 mělo stanovit na nulovou hodnotu.
- (8) Nařízení (EU) č. 1370/2013 by proto mělo být odpovídajícím způsobem změněno.
- (9) S cílem zajistit okamžitý dopad dočasného opatření stanoveného tímto nařízením na trh a umožnit informovanost hospodářských subjektů na trhu v dostatečném předstihu před zahájením příští intervenční kampaně by toto nařízení mělo vstoupit v platnost prvním dnem po vyhlášení,

⁽¹⁾ Nařízení Rady (EU) č. 1370/2013 ze dne 16. prosince 2013, kterým se určují opatření týkající se stanovení některých podpor a náhrad v souvislosti se společnou organizací trhů se zemědělskými produkty (Úř. věst. L 346, 20.12.2013, s. 12).

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

V čl. 3 odst. 1 nařízení (EU) č. 1370/2013 se doplňuje nový pododstavec, který zní:

„Odchylně od prvního pododstavce se v roce 2018 množstevní omezení pro nákup sušeného odstředěného mléka za pevnou cenu stanoví na 0 tun.“

Článek 2

Toto nařízení vstupuje v platnost prvním dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 29. ledna 2018.

Za Radu
předseda
R. PORODZANOV

NAŘÍZENÍ KOMISE V PŘENESENÉ PRAVOMOCI (EU) 2018/148**ze dne 27. září 2017,****kterým se mění přílohy II, III a IV nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 978/2012 o uplatňování systému všeobecných celních preferencí**

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 978/2012 ze dne 25. října 2012 o uplatňování systému všeobecných celních preferencí a o zrušení nařízení Rady (ES) č. 732/2008 ⁽¹⁾, a zejména na čl. 5 odst. 3, čl. 10 odst. 5 a čl. 17 odst. 2 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Článek 4 nařízení (EU) č. 978/2012 stanoví kritéria pro poskytnutí celních preferencí v rámci obecného režimu systému všeobecných preferencí (dále jen „systém GSP“).
- (2) V čl. 4 odst. 1 písm. a) a b) nařízení (EU) č. 978/2012 se stanoví, že země, která byla Světovou bankou zařazena mezi země s vysokými příjmy nebo země s vyššími středními příjmy po dobu tří po sobě následujících let, nebo země, která využívá preferenční ujednání pro přístup na trh, které poskytuje stejné nebo výhodnější celní preference jako systém GSP v podstatě pro veškerý obchod, by neměla využívat systém GSP.
- (3) Seznam zemí zvýhodněných v rámci obecného režimu systému GSP podle čl. 1 odst. 2 písm. a) nařízení (EU) č. 978/2012 je stanoven v příloze II uvedeného nařízení. V čl. 5 odst. 2 nařízení (EU) č. 978/2012 se stanoví, že příloha II se má do 1. ledna každého roku přezkoumat. Tento přezkum by měl vzít v potaz změny, k nimž ve zvýhodněných zemích došlo, pokud jde o hospodářské a obchodní podmínky či podmínky rozvoje, v souvislosti s kritérii stanovenými v článku 4.
- (4) Podle čl. 5 odst. 2 nařízení (EU) č. 978/2012 země zvýhodněná v rámci systému GSP a hospodářské subjekty mají mít dostatek času na řádné přizpůsobení změně statusu země v rámci systému GSP. Uplatňování režimu GSP proto pokračuje po dobu jednoho roku ode dne vstupu změny statusu země podle čl. 4 odst. 1 písm. a) v platnost a po dobu dvou let ode dne použitelnosti preferenčního ujednání pro přístup na trh uvedeného v čl. 4 odst. 1 písm. b).
- (5) Paraguay byla v letech 2015, 2016 a 2017 Světovou bankou zařazena mezi země s vyššími středními příjmy. Proto již Paraguay není způsobilá pro status země zvýhodněné v rámci systému GSP v souladu s čl. 4 odst. 1 písm. a) nařízení (EU) č. 978/2012 a měla by být vyňata ze seznamu zemí zvýhodněných v rámci systému GSP v příloze II uvedeného nařízení, s použitelností ode dne 1. ledna 2019.
- (6) Preferenční ujednání pro přístup na trh se začala uplatňovat s Pobřezím slonoviny ode dne 3. září 2016, se Svazijskem ode dne 10. října 2016 a s Ghanou ode dne 15. prosince 2016. Proto by Pobřeží slonoviny, Svazijsko a Ghana měly být v souladu s čl. 4 odst. 1 písm. b) rovněž vyňaty z přílohy II nařízení (EU) č. 978/2012, s použitelností ode dne 1. ledna 2019.
- (7) V čl. 9 odst. 1 nařízení (EU) č. 978/2012 jsou stanovena specifická kritéria způsobilosti pro poskytování celních preferencí v rámci zvláštního pobídkového režimu pro udržitelný rozvoj a řádnou správu věcí veřejných (dále jen „režim GSP+“) zemím zvýhodněným v rámci systému GSP. Seznam zemí zvýhodněných v rámci režimu GSP+ je stanoven v příloze III nařízení (EU) č. 978/2012.
- (8) V důsledku toho, že k 1. lednu 2019 přestane být Paraguay zemí zvýhodněnou v rámci systému GSP, přestane být rovněž zemí zvýhodněnou v rámci režimu GSP+ podle čl. 9 odst. 1 nařízení (EU) č. 978/2012. Paraguay by proto měla být vyňata rovněž z přílohy III uvedeného nařízení, s použitelností ode dne 1. ledna 2019.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 303, 31.10.2012, s. 1.

- (9) V čl. 17 odst. 1 nařízení (EU) č. 978/2012 se stanoví, že země, která je Organizací spojených národů (OSN) zařazena mezi nejméně rozvinuté země, by měla využívat celní preference v rámci zvláštního režimu pro nejméně rozvinuté země („Vše kromě zbraní“ (dále jen „EBA“)). Seznam zemí zvýhodněných v rámci režimu EBA je uveden v příloze IV uvedeného nařízení.
- (10) OSN přeřadila dne 4. června 2017 Rovníkovou Guineu z kategorie nejméně rozvinutých zemí. Rovníková Guinea proto již není způsobilá pro status země zvýhodněné v rámci režimu EBA podle čl. 17 odst. 1 nařízení (EU) č. 978/2012 a měla by být vyňata z přílohy IV uvedeného nařízení. V souladu s čl. 17 odst. 2 nařízení (EU) č. 978/2012 by se vynětí Rovníkové Guiney ze seznamu zemí zvýhodněných v rámci režimu EBA mělo použít po uplynutí přechodného období tří let ode dne vstupu tohoto nařízení v platnost, konkrétně ode dne 1. ledna 2021.
- (11) Rovníková Guinea byla kromě toho Světovou bankou v roce 2015 zařazena mezi země s vysokými příjmy a letech 2016 a 2017 mezi země s vyššími středními příjmy. Proto již Rovníková Guinea není způsobilá pro status země zvýhodněné v rámci systému GSP v souladu s čl. 4 odst. 1 písm. a) nařízení (EU) č. 978/2012 a měla by být vyňata rovněž ze seznamu zemí zvýhodněných v rámci systému GSP v příloze II uvedeného nařízení, s použitelností ode dne 1. ledna 2021,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Změny nařízení (EU) č. 978/2012

Nařízení (EU) č. 978/2012 se mění takto:

1) V příloze II se ze sloupců A a B vyjímají tyto abecední kódy a odpovídající země:

CI	Pobřeží slonoviny
GH	Ghana
PY	Paraguay
SZ	Svazijsko

2) V příloze III se ze sloupců A a B vyjímá tento abecední kód a odpovídající země:

PY	Paraguay
----	----------

3) V přílohách II a IV se ze sloupců A a B vyjímá tento abecední kód a odpovídající země:

GQ	Rovníková Guinea
----	------------------

Článek 2

Vstup v platnost a použitelnost

Toto nařízení vstupuje v platnost dnem 1. ledna 2018.

Ustanovení čl. 1 odst. 1 a 2 se použijí ode dne 1. ledna 2019.

Ustanovení čl. 1 odst. 3 se použije ode dne 1. ledna 2021.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 27. září 2017.

Za Komisi
předseda
Jean-Claude JUNCKER

NAŘÍZENÍ KOMISE V PŘENESENÉ PRÁVOMOCI (EU) 2018/149**ze dne 15. listopadu 2017,****kterým se mění nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2016/1238, pokud jde o požadavky na složení a jakostní znaky mléka a mléčných výrobků způsobilých pro veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování**

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013, kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a zruší nařízení Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007 ⁽¹⁾, a zejména na čl. 19 odst. 1 písm. a) uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2016/1238 ⁽²⁾ stanoví požadavky na složení a jakostní znaky mléka a mléčných výrobků, které jsou způsobilé pro veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování.
- (2) Vzhledem k technickým vylepšením v metodice, která se používá k analyzování a kvalitativnímu hodnocení mléka a mléčných výrobků, a v zájmu dosažení souladu mezi stávajícími předpisy Unie, jež souvisejí s hygienickými požadavky, je třeba přezkoumat a aktualizovat parametry požadavků na složení a jakostních znaků u některých mléčných výrobků způsobilých pro veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování.
- (3) Přílohy IV a V nařízení v přenesené pravomoci (EU) 2016/1238 by proto měly být odpovídajícím způsobem změněny,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Přílohy nařízení v přenesené pravomoci (EU) 2016/1238 se mění takto:

- a) Část II přílohy IV se nahrazuje zněním uvedeným v příloze I tohoto nařízení.
- b) Část II přílohy V se nahrazuje zněním uvedeným v příloze II tohoto nařízení.

Článek 2Toto nařízení vstupuje v platnost sedmým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 15. listopadu 2017.

Za Komisi

předseda

Jean-Claude JUNCKER

⁽¹⁾ Úř. věst. L 347, 20.12.2013, s. 671.⁽²⁾ Nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2016/1238 ze dne 18. května 2016, kterým se doplňuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013, pokud jde o veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování (Úř. věst. L 206, 30.7.2016, s. 15).

PŘÍLOHA I

„ČÁST II

Požadavky na složení a jakostní znaky

Máslo je pevná emulze, hlavně typu „voda v oleji“, s tímto složením a těmito jakostními znaky:

Parametry	Obsah a jakostní znaky
Tuk	nejméně 82 %
Voda	nejvýše 16 %
Tukuprostá sušina	nejvýše 2 %
Kyselost tuku	nejvýše 1,2 mmol/100 g tuku
Peroxidové číslo	nejvýše 0,3 meq kyslíku/1 000 g tuku
Nemléčný tuk	nezjistitelný analýzou triglyceridů
Smyslové vlastnosti	alespoň čtyři z pěti bodů za vzhled, aroma a konzistenci“

PŘÍLOHA II

„ČÁST II

Požadavky na složení a jakostní znaky

Parametry	Obsah a jakostní znaky
Bílkoviny	nejméně 34,0 % v tukuprosté sušině
Tuk	nejvýše 1,00 %
Voda	nejvýše 3,5 %
Titrovatelná kyselost vyjádřená v ml decinormálního roztoku hydroxidu sodného	nejvýše 19,5 ml
Mléčnany	nejvýše 150 mg/100 g
Fosfatázový test	negativní, tj. stejný či menší než 350 mU fosfatázové aktivity na litr rekonstituovaného mléka
Index nerozpustnosti	nejvýše 0,5 ml (24 °C)
Připálené částice	nejvýše 15,0 mg, tj. nejméně disk B
Mikroorganismy	nejvýše 40 000 KTJ na gram
Podmáslí ⁽¹⁾	žádné ⁽²⁾
Syřidlová syrovátka ⁽³⁾	žádná
Kyselá syrovátka ⁽³⁾	žádná ⁽⁴⁾ nebo nejvýše 150 mg/100 g ⁽⁵⁾
Chuť a vůně	čisté
Vzhled	bílá nebo slabě nažloutlá barva, bez nečistot a zbarvených částic

⁽¹⁾ „Podmáslím“ se rozumí vedlejší produkt výroby másla získaný po stlučení smetany a oddělení pevného tuku.

⁽²⁾ Nepřítomnost podmáslí může být stanovena na základě neohlášené kontroly na místě prováděné ve výrobním závodu nejméně jednou týdně nebo laboratorní analýzou konečného produktu, která prokáže nejvýše 69,31 mg dipalmitoyl-fosfatidylethanolaminu (PEDP) na 100 g.

⁽³⁾ „Syrůvkou“ se rozumí vedlejší produkt při výrobě sýru nebo kaseinu, který se získá působením kyselin, syřidla a/nebo chemicko-fyzikálními procesy.

⁽⁴⁾ Jsou-li prováděny kontroly na místě.

⁽⁵⁾ Použije-li se norma ISO 8069.“

PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2018/150**ze dne 30. ledna 2018,****kterým se mění prováděcí nařízení (EU) 2016/1240, pokud jde o metody analýzy a hodnocení jakosti mléka a mléčných výrobků způsobilých pro veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování**

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1306/2013 ze dne 17. prosince 2013 o financování, řízení a sledování společné zemědělské politiky a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 352/78, (ES) č. 165/94, (ES) č. 2799/98, (ES) č. 814/2000, (ES) č. 1290/2005 a (ES) č. 485/2008 ⁽¹⁾, a zejména na čl. 62 odst. 2 písm. i) uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2016/1238 ⁽²⁾ a prováděcí nařízení Komise (EU) 2016/1240 ⁽³⁾ stanoví pravidla pro veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování. Nařízení Komise (ES) č. 273/2008 ⁽⁴⁾ stanoví metody, které mají být použity při posuzování, zda mléko a mléčné výrobky splňují požadavky na způsobilost stanovené v uvedených nařízeních pro veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování.
- (2) S ohledem na technický vývoj metod analýzy a hodnocení jakosti mléka a mléčných výrobků by měly být provedeny podstatné změny, aby se zjednodušily a aktualizovaly odkazy na normy ISO. V zájmu jasnosti a účinnosti a s ohledem na rozsah a technickou povahu změn ustanovení nařízení (ES) č. 273/2008 by příslušná ustanovení uvedeného nařízení měla být začleněna do prováděcího nařízení (EU) 2016/1240.
- (3) V zájmu zajištění jednotného dodržování nových norem a metod ve všech členských státech by laboratořím měla být poskytnuta dostatečná lhůta na přezkum postupů a použití aktualizovaných metod.
- (4) Prováděcí nařízení (EU) 2016/1240 by proto mělo být odpovídajícím způsobem změněno.
- (5) Nařízení (ES) č. 273/2008 je třeba v zájmu právní jistoty zrušit.
- (6) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Výboru pro společnou organizaci zemědělských trhů,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Prováděcí nařízení (EU) 2016/1240 se mění takto:

1) Článek 4 se mění takto:

a) odstavec 1 se mění takto:

i) písmeno d) se nahrazuje tímto:

„d) u másla: v částech I a Ia přílohy IV tohoto nařízení“;

ii) písmeno e) se nahrazuje tímto:

„e) u sušeného odstředěného mléka: v částech I a Ia přílohy V tohoto nařízení“;

⁽¹⁾ Úř. věst. L 347, 20.12.2013, s. 549.⁽²⁾ Nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2016/1238 ze dne 18. května 2016, kterým se doplňuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013, pokud jde o veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování (Úř. věst. L 206, 30.7.2016, s. 15).⁽³⁾ Prováděcí nařízení Komise (EU) 2016/1240 ze dne 18. května 2016, kterým se stanoví pravidla pro uplatňování nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013, pokud jde o veřejnou intervenci a podporu soukromého skladování (Úř. věst. L 206, 30.7.2016, s. 71).⁽⁴⁾ Nařízení Komise (ES) č. 273/2008 ze dne 5. března 2008, kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 1255/1999, pokud jde o metody analýzy a hodnocení jakosti mléka a mléčných výrobků (Úř. věst. L 88, 29.3.2008, s. 1).

b) odstavec 2 se nahrazuje tímto:

„2. Metodami uvedenými v přílohách I, IV and V, jež mají být použity na určení jakosti obilovin, másla a sušeného odstředěného mléka způsobilých pro veřejnou intervenci, jsou metody stanovené v poslední verzi příslušných evropských, případně mezinárodních norem platných nejméně 6 měsíců před prvním dnem období veřejné intervence stanoveného v článku 12 nařízení (EU) č. 1308/2013.“

2) Vkládá se nový článek 60a, který zní:

„Článek 60a

Zvláštní ustanovení o kontrolách týkajících se veřejné intervence a podpory soukromého skladování mléka a mléčných výrobků

1. Způsobilost másla, sušeného odstředěného mléka a sýrů k získání podpory soukromého skladování se určí v souladu s metodami stanovenými v přílohách VI, VII a VIII.

Uvedené metody se určí s odkazem na poslední verzi příslušných evropských, případně mezinárodních norem platných nejméně 6 měsíců před prvním dnem období veřejné intervence stanoveného v článku 12 nařízení (EU) č. 1308/2013.

2. Výsledky kontrol, které jsou prováděny s použitím metod stanovených tímto nařízením, se hodnotí v souladu s přílohou IX.“

3) Přílohy se mění v souladu s přílohou tohoto nařízení.

Článek 2

Nařízení (ES) č. 273/2008 se zrušuje.

Článek 3

Toto nařízení vstupuje v platnost sedmým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 30. ledna 2018.

Za Komisi
předseda
Jean-Claude JUNCKER

PŘÍLOHA

Přílohy prováděcího nařízení (EU) 2016/1240 se mění takto:

1) Příloha IV se mění takto:

a) v části I bodu 2 se druhý pododstavec nahrazuje tímto:

„Každý vzorek musí být posuzován jednotlivě. Není povolen další odběr vzorků ani opětovné posouzení.“

b) vkládá se nová část Ia, která zní:

„ČÁST IA

Metody analýzy nesoleného másla určeného k veřejné intervenci

Parametr	Metoda
Tuk ⁽¹⁾	ISO 17189 nebo ISO 3727 část 3
Voda	ISO 3727 část 1
Tukuprostá sušina	ISO 3727 část 2
Kyselost tuku	ISO 1740
Peroxidové číslo	ISO 3976
Nemléčný tuk	ISO 17678
Organoleptické vlastnosti	ISO 22935 část 2 a 3 a tabulka s bodovým hodnocením níže

⁽¹⁾ Metodu, která má být použita, musí schválit platební agentura.

Tabulka s bodovým hodnocením

Vzhled		Konzistence		Vůně a chuť	
Body	Poznámky	Body	Poznámky	Body	Poznámky
5	<i>Velmi dobrý</i> Ideální druh Nejvyšší jakost (rovnoměrný suchý)	5	<i>Velmi dobrá</i> Ideální druh Nejvyšší jakost (rovnoměrně roztíratelné)	5	<i>Velmi dobré</i> Ideální druh Nejvyšší jakost (absolutně čisté nejjemnější aroma)
4	<i>Dobrý</i> (bez zjevných vad)	4	<i>Dobrá</i> (bez zjevných vad)	4	<i>Dobré</i> (bez zjevných vad)
1, 2 nebo 3	Jakákoli závada	1, 2 nebo 3	Jakákoli závada	1, 2 nebo 3	Jakákoli závada“

2) V příloze V se vkládá nová část Ia, která zní:

„ČÁST IA

Metody analýzy sušeného odstředěného mléka určeného k veřejné intervenci

Parametr	Metoda
Bílkoviny	ISO 8968 část 1
Tuk	ISO 1736
Voda	ISO 5537
Kyselost	ISO 6091
Mléčnany	ISO 8069
Fosfatázový test	ISO 11816 část 1
Index nerozpustnosti	ISO 8156
Připálené částice ⁽¹⁾	ADPI
Mikroorganismy	ISO 4833 část 1
Podmáslí	Dodatek I
Syřidlová syrovátka ⁽²⁾	Dodatky II a III
Kyselá syrovátka ⁽³⁾	ISO 8069 nebo kontroly na místě
Organoleptické kontroly ⁽⁴⁾	ISO 22935 část 2 a 3

⁽¹⁾ Analýzy připálených částic mohou být prováděny systematicky. Tyto analýzy se však provádějí vždy, pokud neprobíhají organoleptické kontroly.

⁽²⁾ Metodu, která má být použita, musí schválit platební agentura (jednu metodu nebo obě).

⁽³⁾ Metodu, která má být použita, musí schválit platební agentura.

⁽⁴⁾ Organoleptické kontroly se provádějí v případě potřeby na základě analýzy rizik schválené platební agenturou.

Dodatek I

**KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ FOSFATIDYLSERINU A FOSFATIDYLETHANOLAMINU V SUŠENÉM ODSTŘE-
DĚNÉM MLÉČE****Metoda: HPLC s obrácenými fázemi**

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda popisuje postup kvantitativního stanovení fosfatidylserinu (PS) a fosfatidylethanolaminu (PE) v sušeném odstředěném mléce (SOM) a je vhodná pro zjišťování sušiny podmáslí v SOM.

2. DEFINICE

Obsah PS + PE: hmotnostní zlomek látky stanovené popisovaným postupem. Výsledek se vyjadřuje v miligramech dipalmitoyl-fosfatidylethanolaminu (PEDP) na 100 g prášku.

3. PODSTATA METODY

Extrakce aminofosfolipidů methanolem z rekonstituovaného sušeného mléka. Stanovení obsahu PS a PE jako derivátů o-ftaldialdehydu (OPA) metodou HPLC s obrácenými fázemi (RP) a fluorescenční detekcí. Kvantitativní stanovení obsahu PS a PE ve zkušebním vzorku porovnáním se srovnávacím vzorkem, který obsahuje známé množství PEDP.

4. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a. Pokud není uvedeno jinak, používá se pouze destilovaná voda nebo voda nejméně rovnocenné čistoty.

4.1. **Referenční materiál: PEDP o čistotě nejméně 99 %**

Poznámka: Referenční materiál musí být skladován při teplotě – 18 °C.

4.2. **Chemikálie pro přípravu srovnávacích a zkušebních vzorků**

4.2.1. *Methanol čistoty pro HPLC*

4.2.2. *Chloroform čistoty pro HPLC*

4.2.3. *Monohydrochlorid tryptaminu*

4.3. **Chemikálie pro přípravu o-ftaldialdehydových derivátů**

4.3.1. *Hydroxid sodný, 12 M vodný roztok*

4.3.2. *Kyselina boritá, 0,4 M vodný roztok s hodnotou pH upravenou hydroxidem sodným (4.3.1) na 10,0*

4.3.3. *2-merkaptoethanol*

4.3.4. *o-ftaldialdehyd (OPA)*

4.4. **Eluční rozpouštědla pro HPLC**

4.4.1. *Eluční rozpouštědla musí být připravena pomocí chemikálií čistoty pro HPLC.*

4.4.2. *Voda čistoty pro HPLC*

4.4.3. *Methanol fluorometricky zjištěné čistoty*

4.4.4. *Tetrahydrofuran*

4.4.5. *Natrium dihydrogenfosforečnan*

4.4.6. *Octan sodný*

4.4.7. *Kyselina octová.*

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 5.1. **Analytické váhy s přesností měření na 0,1 mg a s možností odečtu po 1 mg**
- 5.2. **Kádinky o objemu 25 a 100 ml**
- 5.3. **Pipety schopné dávkovat od 1 do 10 ml**
- 5.4. **Magnetická míchačka**
- 5.5. **Dělené pipety schopné dávkovat 0,2, 0,5 a 5 ml**
- 5.6. **Odměrné baňky o objemu 10, 50 a 100 ml**
- 5.7. **Injekční stříkačky o objemu 20 a 100 μ l**
- 5.8. **Ultrazvuková lázeň**
- 5.9. **Odstředivka fungující při 27 000 \times g**
- 5.10. **Skleněné nádoby o objemu asi 5 ml**
- 5.11. **Odměrný válec o objemu 25 ml**
- 5.12. **pH metr s přesností na 0,1 jednotky pH**
- 5.13. **Zařízení na HPLC**
 - 5.13.1. *Gradientový čerpací systém schopný fungovat při průtoku 1,0 ml/min při 200 barech*
 - 5.13.2. *Automatický dávkovač vzorků s možností derivatizace*
 - 5.13.3. *Termostat kolony schopný kolonu udržovat na teplotě 30 °C \pm 1 °C*
 - 5.13.4. *Fluorescenční detektor schopný fungovat při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 440 nm*
 - 5.13.5. *Integrátor nebo programové vybavení pro zpracování dat schopné měřit plochy píků*
 - 5.13.6. *Kolona LiChrospher® – 100 (250 \times 4,6 mm) nebo rovnocenná kolona naplněná oktadecylsilanem (C 18), velikost částic 5 μ m*

6. ODBĚR VZORKŮ

Vzorky se odebírají v souladu s normou ISO 707.

7. PRACOVNÍ POSTUP**7.1. Příprava roztoku vnitřního standardu**

- 7.1.1. *Navážte 30,0 \pm 0,1 mg tryptaminhydrochloridu (4.2.3) do odměrné baňky na 100 ml (5.6) a doplňte po značku methanolem (4.2.1).*
- 7.1.2. *Pipetou (5.3) přeneste 1 ml tohoto roztoku do odměrné baňky na 10 ml (5.6) a doplňte po značku methanolem (4.2.1) s cílem získat koncentraci tryptaminu 0,15 mM.*

7.2. Příprava roztoku zkušebního vzorku

- 7.2.1. *Navážte 1,000 \pm 0,001 g vzorku SOM do kádinky na 25 ml (5.2). Pipetou (5.3) přidejte 10 ml destilované vody o teplotě 40 °C \pm 1 °C a po dobu 30 minut míchejte magnetickou míchačkou (5.4), aby se rozpustily všechny kousky.*
- 7.2.2. *Pipetou (5.5) přeneste 0,2 ml rekonstituovaného mléka do odměrné baňky na 10 ml (5.6), pomocí injekční stříkačky (5.7) přidejte 100 μ l 0,15 mM roztoku tryptaminu (7.1) a doplňte po značku methanolem (4.2.1). Převrácením opatrně promíchejte a vložte na 15 minut do ultrazvukové lázně (5.8).*
- 7.2.3. *Odstřeďte (5.9) při 27 000 \times g po dobu 10 minut a supernatant odeberte do skleněné nádoby (5.10).*

Poznámka: Do provedení analýzy HP musí být roztok zkušebního vzorku skladován při teplotě 4 °C.

7.3. Příprava roztoku vnějšího standardu

- 7.3.1. Navažte 55,4 mg PEDP (4.1) do odměrné baňky na 50 ml (5.6) a odměrným válcem (5.11) přidejte asi 25 ml chloroformu (4.2.2). Zazátkovanou baňku zahřejte na $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ a opatrně promíchejte, dokud se PEDP nerozpustí. Baňku ochlaďte na 20 °C , doplňte po značku methanolem (4.2.1) a promíchejte převrácením.
- 7.3.2. Pipetou (5.3) přeneste 1 ml tohoto roztoku do odměrné baňky na 100 ml (5.6) a doplňte po značku methanolem (4.2.1). Pipetou (5.3) přeneste 1 ml tohoto roztoku do odměrné baňky na 10 ml (5.6), přidejte 100 μl (5.7) 0,15mM roztoku tryptaminu (7.1) a doplňte po značku methanolem (4.2.1). Promíchejte převrácením.

Poznámka: Do provedení analýzy HP musí být roztok referenčního vzorku skladován při teplotě 4 °C .

7.4. Příprava derivatizačního činidla

Do odměrné baňky na 10 ml (5.6) navažte $25,0 \pm 0,1$ mg OPA (4.3.4), přidejte 0,5 ml (5.5) methanolu (4.2.1) a pečlivě promíchejte, aby se OPA rozpustil. Doplňte po značku roztokem kyseliny borité (4.3.2) a injekční stříkačkou (5.7) přidejte 20 μl 2-merkптоethanolu (4.3.3).

Poznámka: Derivatizační činidlo musí být skladováno v hnědé nádobě při teplotě 4 °C ; činidlo zůstává stále po dobu jednoho týdne.

7.5. Stanovení pomocí HPLC**7.5.1. Eluční rozpouštědla (4.4)**

Rozpouštědlo A: Roztok 0,3 mM natria dihydrogenfosforečnanu a roztok 3 mM octanu sodného (s hodnotou pH upravenou na $6,5 \pm 0,1$ kyselinou octovou): methanol: tetrahydrofuran = 558: 440:2 (obj.).

Rozpouštědlo B: Methanol

7.5.2. Doporučený eluční gradient:

Čas (min)	Rozpouštědlo A (%)	Rozpouštědlo B (%)	Průtok (ml/min)
Počáteční	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Poznámka: Může se stát, že eluční gradient bude muset být mírně upraven, aby bylo dosaženo rozlišení znázorněné na obrázku 1.

Teplota kolony: 30 °C .

7.5.3. Objem nástřiku: 50 µl derivatizačního činidla a 50 µl roztoku vzorku

7.5.4. Ekvilibrace kolony

Při každodenním provádění pokusů kolonu promývejte 100 % rozpouštědlem B po dobu 15 minut, potom připravte poměr A:B = 40:60 a provádějte ekvilibraci po dobu 15 minut při průtoku 1 ml/min. Proveďte slepý pokus nástřikem methanolu (4.2.1).

Poznámka: Před uskladněním kolony na delší dobu kolonu promývejte po dobu 30 minut směsí methanolu s chloroformem v poměru 80:20 (obj.).

7.5.5. Stanovení obsahu PS + PE ve zkušební vzorku

7.5.6. Proveďte sérii chromatografických analýz při zachování stejných časových odstupů mezi jednotlivými pokusy, abyste získali konstantní retenční časy. Pro výpočet odezvového faktoru nastříknete roztok vnějšího standardu (7.3) na každých 5–10 roztoků zkušebních vzorků.

Poznámka: Kolonu je nutné po každých 20–25 pokusech vyčistit nejméně třicetiminutovým promýváním 100 % rozpouštědlem B (7.5.1).

7.6. Integrovaný režim

7.6.1. Pík PEDP

PEDP se vymývá v podobě jediného píku. Plochu píku stanovte integrací mezi sedly.

7.6.2. Pík tryptaminu

Tryptamin se vymývá v podobě jediného píku (obrázek 1). Plochu píku stanovte integrací mezi sedly.

7.6.3. Skupiny píků PS a PE

Za takto popsaných podmínek (obrázek 1) se PS vymývá v podobě dvou hlavních, částečně nerozlišených píků, před nimiž se nachází jeden menší pík. PE se vymývá v podobě tří hlavních, částečně nerozlišených píků. Celou plochu každé skupiny píků stanovte nastavením základní linie tak, jak je znázorněno na obrázku 1.

8. VÝPOČET A VYJADŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Obsah PS + PE ve zkušební vzorku se vypočte takto:

$$C = 55,36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$$

kde:

C = obsah PS nebo PE (v mg/100 g prášku) ve zkušební vzorku

A₁ = plocha píku PEDP roztoku srovnávacího vzorku (7.3)

A₂ = plocha píku PS nebo PE roztoku zkušebního vzorku (7.2)

T₁ = plocha píku tryptaminu roztoku srovnávacího vzorku (7.3)

T₂ = plocha píku tryptaminu roztoku zkušebního vzorku (7.2).

9. PŘESNOST METODY

Poznámka: Hodnoty pro opakovatelnost byly vypočteny podle Mezinárodní normy IDF (*).

9.1. Opakovatelnost

Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, která vyjadřuje proměnlivost nezávislých analytických výsledků, které u stejného zkušebního vzorku získá stejný pracovník na stejném přístroji v krátkém časovém odstupu, by neměla překročit relativní 2 %. Jestliže se za těchto podmínek získají dvě stanovení, relativní rozdíl mezi jejich výsledky by neměl být větší než 6 % aritmetického průměru výsledků.

9.2. Reprodukovatelnost

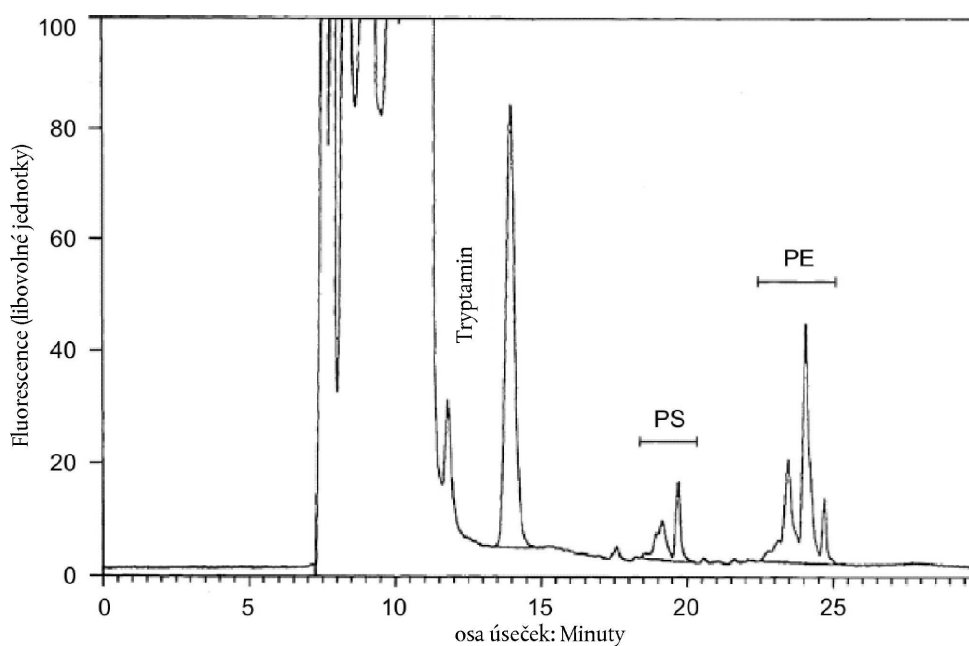
Jestliže dva pracovníci provedou v různých laboratořích na různých přístrojích a za různých podmínek analýzu téhož zkušební vzorku a dospějí k různým stanovením, relativní rozdíl mezi oběma výsledky by neměl být větší než 11 % aritmetického průměru výsledků.

10. LITERATURA

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

Obrázek 1

HPLC chromatogram OPA-derivátů fosfatidylserinu (PS) a fosfatidylethanolaminu (PE) v methanolovém extraktu z rekonstituovaného sušeného odstředěného mléka. Je zázorněn integrační režim pro píky PS, PE a tryptamin (vnitřní standard).



Dodatek II

ZJIŠŤOVÁNÍ SYŘIDLOVÉ SYROVÁTKY V SUŠENÉM ODSTŘEDĚNÉM MLÉCE URČENÉM PRO VEŘEJNÉ SKLADOVÁNÍ NA ZÁKLADĚ STANOVENÍ KASEINOMAKROPEPTIDŮ VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRÁFIÍ (HPLC)

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda umožňuje zjistit přítomnost syřidlové syrovátky v sušeném odstředěném mléce určeném k veřejnému skladování na základě stanovení kaseinomakropeptidů.

2. NORMATIVNÍ ODKAZ

Mezinárodní norma ISO 707 – Mléko a mléčné výrobky – Směrnice pro odběr vzorků.

3. DEFINICE

Obsah sušiny ze syřidlové syrovátky je definován jako hmotnostní procento stanovené popsáním postupem podle obsahu kaseinomakropeptidů.

4. PODSTATA METODY

- Rekonstituce sušeného odstředěného mléka, odstranění tuku a bílkovin kyselinou trichloroctovou a následným odstředěním nebo filtrací;
- Stanovení množství kaseinomakropeptidů (CMP) v supernatantu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC);
- Vyhodnocení výsledku získaného u vzorků porovnáním se srovnávacími vzorky, které tvoří sušené odstředěné mléko s přídavkem nebo bez přídavku známého procenta sušené syrovátky.

5. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a. Použitá voda musí být voda destilovaná nebo voda nejméně rovnocenné čistoty.

5.1. **Roztok kyseliny trichloroctové**

Rozpusťte 240 g kyseliny trichloroctové (CCl_3COOH) ve vodě a doplňte na 1 000 ml. Roztok by měl být čirý a bezbarvý.

5.2. **Eluční roztok, pH 6,0**

Rozpusťte 1,74 g fosforečnanu draselného sekundárního (K_2HPO_4), 12,37 g hydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) a 21,41 g síranu sodného (Na_2SO_4) asi v 700 ml vody. V případě potřeby upravte pH na 6,0 roztokem kyseliny fosforečné nebo hydroxidu draselného.

Doplňte vodou na 1 000 ml a homogenizujte.

Poznámka: Složení eluentu lze obnovit tak, aby odpovídal osvědčení standardů nebo doporučením výrobce balicích materiálů na kolony.

Eluční roztok před použitím přefiltrujte přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm .

5.3. **Promývací roztok**

Smíchejte jeden objem acetonitrilu (CH_3CN) s devíti objemy vody. Před použitím směs přefiltrujte přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm .

Poznámka: Lze použít jakýkoliv jiný promývací roztok, který má baktericidní účinek a který nezhoršuje rozlišovací účinnost kolony.

5.4. **Srovnávací vzorky**

5.4.1. Sušené odstředěné mléko splňující požadavky tohoto nařízení (tj. [0]).

5.4.2. Totéž sušené odstředěné mléko zfalšované přídavkem 5 % hm. sušené syřidlové syrovátky standardního složení (tj. [5]).

6. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 6.1. **Analytické váhy**
- 6.2. **Volitelná odstředivka schopná dosáhnout odstředivé síly 2 200 g a vybavená odstředivkovými zkumavkami se zátkou o objemu asi 50 ml**
- 6.3. **Mechanická třepačka**
- 6.4. **Magnetická míchačka**
- 6.5. **Skleněné nálevky o průměru asi 7 cm**
- 6.6. **Filtrační papíry střední hustoty o průměru asi 12,5 cm**
- 6.7. **Skleněné filtrační zařízení s membránovým filtrem o velikosti pórů 0,45 μ m**
- 6.8. **Dělené pipety umožňující dávkovat 10 ml (ISO 648, třída A, nebo ISO/R 835) nebo dávkovací systém schopný dodávat 10,0 ml za dvě minuty**
- 6.9. **Dávkovací systém schopný dodávat 20,0 ml vody při teplotě asi 50 °C**
- 6.10. **Termostatická vodní lázeň nastavená na 25 \pm 0,5 °C**
- 6.11. **Zařízení na HPLC, které tvoří:**
 - 6.11.1. Čerpadlo
 - 6.11.2. *Nástříkové zařízení – ruční nebo automatické – o objemu 15 až 30 μ l*
 - 6.11.3. *Dvě kolony TSK 2 000-SW za sebou (délka 30 cm, vnitřní průměr 0,75 cm), nebo kolony s rovnocennou účinností (např. jedna kolona TSK 2 000-SWxl, jedna kolona Agilent Technologies Zorbax GF 250) a jedna předkolona (3 cm \times 0,3 cm) naplněná materiálem I 125 nebo jiným materiálem s rovnocennou účinností*
 - 6.11.4. *Termostat kolony nastavený na 35 \pm 1 °C*
 - 6.11.5. *UV detektor s proměnnou vlnovou délkou umožňující měřit při 205 nm s citlivostí 0,008 Å.*
 - 6.11.6. *Integrátor schopný integrovat mezi sedly*

Poznámka: Lze pracovat s kolonami udržovanými při laboratorní teplotě, avšak jejich rozlišovací schopnost je o trochu nižší. V tomto případě je třeba, aby výkyvy teploty v průběhu jednoho analytického pokusu byly menší než 5 °C.
7. ODBĚR VZORKŮ
 - 7.1. Vzorky musí být odebírány postupem stanoveným v mezinárodní normě ISO 707. Členské státy však mohou používat jinou metodu odběru vzorků za předpokladu, že tato metoda odpovídá zásadám uvedené normy.
 - 7.2. Vzorek skladujte takovým způsobem, aby nemohlo dojít ke znehodnocení nebo změně složení.
8. PRACOVNÍ POSTUP
 - 8.1. **Příprava zkušebního vzorku.**

Sušené mléko převedte do nádobky, jejíž objem je asi dvakrát větší než objem prášku a která je opatřena vzduchotěsným víčkem. Nádobku ihned uzavřete. Sušené mléko důkladně promíchejte opakovaným převrácením nádobky.
 - 8.2. **Zkušební dávka**

Do odstředivkové zkumavky (6.2) nebo vhodné baňky se zátkou na 50 ml navažte 2,000 \pm 0,001 g zkušebního vzorku.
 - 8.3. **Odstranění tuku a bílkovin**
 - 8.3.1. *Ke zkušební dávce přidejte 20,0 ml teplé (50 °C) vody. Prášek rozpustíte třepáním po dobu pěti minut na mechanické třepačce (6.3). Zkumavku vložte do vodní lázně (6.10), dokud se její teplota neustálí na 25 °C.*

8.3.2. Během dvou minut přidejte za stálého míchání magnetickou míchačkou (6.4) 10,0 ml roztoku kyseliny trichloroctové (5.1) o teplotě asi 25 °C. Zkumavku vložte na 60 minut do vodní lázně (6.10).

8.3.3. Odstřeďte (6.2) po dobu 10 minut při odstředivé síle 2 200 g, nebo přefiltrujte přes papír (6.6) a prvních 5 ml filtrátu vyhoďte.

8.4. Chromatografické stanovení

8.4.1. Nastříknete 15 až 30 µl přesně odměřeného supernatantu nebo filtrátu (8.3.3) do zařízení na HPLC (6.11) s průtokem 1,0 ml elučního roztoku (5.2) za minutu.

Poznámka 1. V závislosti na vnitřním průměru použitých kolon nebo na pokynech výrobce kolony lze použít i jiný průtok.

Poznámka 2. Při každém přerušení promyjte kolony vodou. Nikdy v nich nenechávejte eluční roztok (5.2).

Před každým přerušením na více než 24 hodin se kolony propláchnou vodou a potom se promývají roztokem (5.3) nejméně po dobu tří hodin při průtoku 0,2 ml za minutu.

8.4.2. Výsledky chromatografické analýzy zkušební vzorku [E] se získají ve formě chromatogramu, v němž je každý pík určen svým retenčním časem RT takto:

Pík II:	Druhý pík chromatogramu s RT asi 12,5 minuty
Pík III:	Třetí pík chromatogramu odpovídající CMP s RT 15,5 minuty

Retenční časy jednotlivých píků mohou být značně ovlivněny výběrem kolony (kolon).

Integrátor (6.11.6) automaticky vypočítává plochu A každého píku:

A_{II} :	plocha píku II
A_{III} :	plocha píku III

Před kvantitativní interpretací je nezbytné prozkoumat vzhled každého chromatogramu za účelem zjištění případných anomálií způsobených buď nesprávnou funkcí zařízení, nebo kolon, nebo původem a povahou analyzovaného vzorku.

V případě pochybností analýzu zopakujte.

8.5. Kalibrace

8.5.1. U srovnávacích vzorků (5.4) se přesně použije postup popsany v bodech 8.2 až 8.4.2.

Použijte čerstvě připravené roztoky, protože CMP se v prostředí 8 % kyseliny trichloroctové odbourávají. Jejich obsah se při teplotě 30 °C snižuje odhadem o 0,2 % za hodinu.

8.5.2. Před chromatografickým stanovením vzorků stabilizujte kolony opakovanými nástřiky roztoku (8.5.1) srovnávacího vzorku (5.4.2), dokud se plocha a retenční čas píku odpovídajícího CMP neustálí na konstantních hodnotách.

8.5.3. Stanovte odezvové faktory R nastříknutím stejného objemu filtrátů (8.5.1), jakého jste použili pro vzorky.

9. VYJÁDRĚNÍ VÝSLEDKŮ

9.1. Metoda výpočtu a vzorce

9.1.1. Výpočet odezvového faktoru R:

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

kde:

R_{II} = odezvové faktory píků II

$A_{II}[0]$ = plochy píků II srovnávacího vzorku [0] získané v 8.5.3

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

kde:

- R_{III} = odezvo­vý faktor píku III
 $A_{III} [0]$ and $A_{III} [5]$ = plochy píku III srovnávacích vzorků [0] a [5] získané v 8.5.3
 W = množství syrovátky ve srovnávacím vzorku [5], tj. 5

9.1.2. Výpočet relativní plochy píků ve vzorku [E]

$$S_{II}[E] = R_{II} \times A_{II}[E]$$

$$S_{III}[E] = R_{III} \times A_{III}[E]$$

$$S_{IV}[E] = R_{IV} \times A_{IV}[E]$$

kde:

- $S_{II} [E]$, $S_{III} [E]$, $S_{IV} [E]$ = relativní plochy píků II, III a IV ve vzorku [E]
 $A_{II} [E]$, $A_{III} [E]$ = plochy píků II a III ve vzorku [E] získané v 8.4.2
 R_{II} , R_{III} = odezvo­vé faktory vypočtené v 9.1.1

9.1.3. Výpočet relativního retenčního času píku III ve vzorku [E]:

$$RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$$

kde:

- $RRT_{III} [E]$ = relativní retenční čas píku III ve vzorku [E]
 $RT_{III} [E]$ = relativní retenční čas píku III ve vzorku [E] získaný v 8.4.2
 $RT_{III} [5]$ = relativní retenční čas píku III v kontrolním vzorku [5] získaný v 8.5.3

9.1.4. Pokusy ukazují, že mezi relativním retenčním časem píku III, tj. $RRT_{III} [E]$ a procentem přidané sušené syrovátky až do pří­davku 10 % existuje lineární vztah

- při obsahu syrovátky > 5 % je $RRT_{III} [E] < 1,000$;
- při obsahu syrovátky ≤ 5 % je $RRT_{III} [E] ≥ 1,000$.

Pří­pustná neurčitost pro hodnoty RRT_{III} je ± 0,002.

Za normálních okolností se hodnota $RRT_{III} [0]$ jen málo liší od 1,034. Podle stavu kolon se může hodnota blížit 1,000, avšak vždy musí být vyšší než 1,000.

9.2. Výpočet procenta sušené syřidlové syrovátky obsažené ve vzorku:

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

kde:

- W = hmotnostní procento syřidlové syrovátky ve vzorku [E];
 $S_{III} [E]$ = relativní plocha píku III zkušebního vzorku [E] získaná podle 9.1.2;
1,3 = představuje relativní průměrnou plochu píku III vyjádřenou v gramech syřidlové syrovátky na 100 g stanovené v nezfalšovaném sušeném odstředěném mléce různého původu. Toto číslo bylo získáno experimentálně
 $S_{III} [0]$ = představuje relativní plochu píku III, která je rovna $R_{III} \times A_{III}[0]$. Tyto hodnoty se získají v 9.1.1 a 8.5.3;
 $(S_{III} [0] - 0,9)$ = představuje opravu, kterou je nutno provést na relativní průměrné ploše 1,3, jestliže $S_{III} [0]$ není rovno 0,9. Experimentálně je relativní průměrná plocha píku III kontrolního vzorku [0] rovna 0,9.

9.3. **Přesnost metody**9.3.1. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušební vzorku provedl současně nebo v těsném sledu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 0,2 % hm.

9.3.2. *Reprodukovatelnost*

Rozdíl mezi dvěma jednotlivými a nezávislými výsledky získanými ve dvou různých laboratořích u stejného zkušební vzorku by neměl překročit 0,4 % hm.

9.4. **Interpretace**9.4.1. *Lze předpokládat, že syrovátka není přítomna, je-li relativní plocha píku III $S_{III} [E]$ vyjádřena v gramech syřidlové syrovátky na 100 g produktu, $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$*

kde

2,0	je maximální hodnota povolena pro relativní plochu píku III s přihlédnutím k relativní průměrné ploše píku III, tj. 1,3, k nejistotě z důvodu kolísání ve složení sušeného odstředěného mléka a k reprodukovatelnosti metody (9.3.2);
$(S_{III} [0] - 0,9)$	je oprava, která musí být provedena, jestliže je plocha $S_{III} [0]$ jiná než 0,9 (viz bod 9.2).

9.4.2. *Je-li relativní plocha píku III $S_{III} [E] > 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ a relativní plocha píku II $S_{II} [E] \leq 160$, stanovte obsah syřidlové syrovátky podle bodu 9.2.*9.4.3. *Je-li relativní plocha píku III $S_{III} [E] > 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ a relativní plocha píku II $S_{II} [E] \leq 160$, stanovte celkový obsah bílkovin (P %). Potom prostudujte grafy 1 a 2.*9.4.3.1. *Data získaná po analýze vzorků nezfalšovaného sušeného odstředěného mléka s vysokým celkovým obsahem bílkovin jsou zanesena do grafů 1 a 2.*

Plná přímka představuje lineární regresi, jejíž koeficienty se vypočítají metodou nejmenších čtverců.

Čárkovaná přímka určuje horní mez relativní plochy píku III, a to s pravděpodobností, že nebude překročena v 90 % případů.

Rovnice čárkovaných přímek v grafech 1 a 2 jsou:

$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7$	(graf 1)
$S_{III} = 0,0123 S_{II} [E] + 0,93$	(graf 2)

kde:

S_{III} je relativní plocha píku III vypočtená buď podle celkového obsahu bílkovin, nebo podle relativní plochy píku $S_{II} [E]$,

P % je celkový obsah bílkovin vyjádřený jako procento hmotnosti,

$S_{II} [E]$ je relativní plocha vzorku vypočtená v bodu 9.1.2.

Tyto rovnice jsou rovnocenné číslu 1,3 uvedenému v bodu 9.2.

Rozdíl (T_1 a T_2) mezi zjištěnou relativní plochou $S_{III} [E]$ a relativní plochou S_{III} je dán těmito vztahy: $T_1 = S_{III} [E] - [(0,376 P\% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$; $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$.

9.4.3.2. Jsou-li T_1 a/nebo T_2 rovny nule nebo menší než nula, nelze obsah syřidlové syrovátky stanovit.

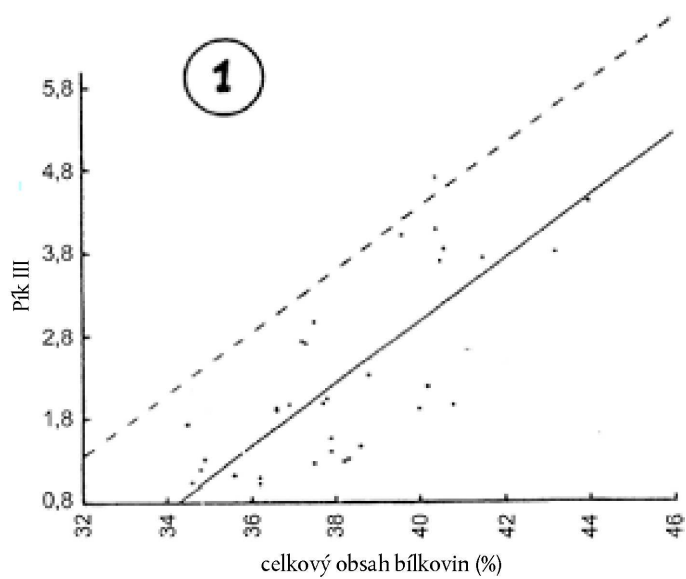
Jsou-li T_1 a T_2 větší než nula, je syřidlová syrovátka přítomna.

Obsah syřidlové syrovátky se vypočítá podle vzorce: $W = T_2 + 0,91$

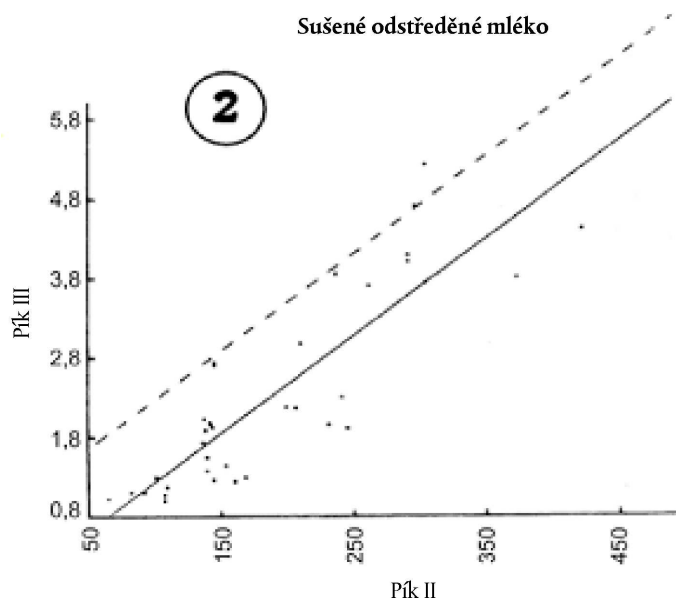
kde:

0,91 je vzdálenost na svislé ose mezi plnou a přerušovanou přímkou.

Sušené odstředěné mléko



Sušené odstředěné mléko



Dodatek III

STANOVENÍ SUŠINY ZE SYŘIDLOVÉ SYROVÁTKY V SUŠENÉM ODSTŘEDĚNÉM MLÉCE

1. PŘEDMĚT: STANOVENÍ PŘÍDAVKU SUŠINY ZE SYŘIDLOVÉ SYROVÁTKY DO SUŠENÉHO ODSTŘEDĚNÉHO MLÉKA
2. NORMATIVNÍ ODKAZ: MEZINÁRODNÍ NORMA ISO 707

3. DEFINICE

Obsah sušiny ze syřidlové syrovátky je definován jako hmotnostní procento stanovené popsáním postupem podle obsahu kaseinomakropeptidů.

4. PODSTATA METODY

Vzorky jsou analyzovány na kaseinomakropeptidy A vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s obrácenými fázemi (metodou HPLC). Vyhodnocení výsledků se provádí porovnáním se srovnávacími vzorky, které tvoří sušené odstředěné mléko bez přídavku nebo s přídavkem známého procenta sušené syrovátky. Pokud je výsledek vyšší než 1 % hm., je přítomnost sušiny ze syřidlové syrovátky prokázána.

5. CHEMIKÁLIE

Používají se pouze chemikálie čistoty p.a. Použitá voda musí být voda destilovaná nebo voda nejméně rovnocenné čistoty. Acetonitril musí mít spektroskopickou jakost nebo jakost vhodnou pro HPLC.

- 5.1. **Roztok kyseliny trichloroctové**

Rozpusťte 240 g kyseliny trichloroctové (CCl_3COOH) ve vodě a doplňte na 1 000 ml. Roztok by měl být čirý a bezbarvý.

- 5.2. **Eluenty A a B**

Eluent A: Vneste 150 ml acetonitrilu (CH_3CN), 20 ml isopropanolu ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) a 1,00 ml kyseliny trifluoroctové (TFA, CF_3COOH) do odměrné baňky a doplňte na 1 000 ml vodou.

Eluent B: Vneste 550 ml acetonitrilu, 20 ml isopropanolu a 1,00 ml TFA do odměrné baňky na 1 000 ml a doplňte na 1 000 ml vodou. Eluční roztok před použitím přefiltrujte přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm .

- 5.3. **Uchování kolony**

Po analýzách se kolona promyje eluentem B (spádem) a potom se propláchne acetonitrilem (spádem po dobu 30 minut). Kolona se uchovává v acetonitrilu.

- 5.4. **Srovnávací vzorky**

- 5.4.1. *Sušené odstředěné mléko splňující požadavky stanovené pro veřejné skladování (tj. [0]).*
- 5.4.2. *Totéž sušené odstředěné mléko zfalšované přídavkem 5 % hm. sušené syřidlové syrovátky standardního složení (tj. [5]).*
- 5.4.3. *Totéž sušené odstředěné mléko zfalšované přídavkem 50 % hm. sušené syřidlové syrovátky standardního složení (tj. [50]).*

6. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 6.1. **Analytické váhy**

- 6.2. **Volitelná odstředivka schopná dosáhnout odstředivé síly 2 200 g a vybavená odstředivkovými zkumavkami se zátkou o objemu asi 50 ml**

- 6.3. **Mechanická třepačka**

- 6.4. **Magnetická míchačka**

- 6.5. **Skleněné nálevky o průměru asi 7 cm**

- 6.6. **Filtrační papíry střední hustoty o průměru asi 12,5 cm**
- 6.7. **Skleněné filtrační zařízení s membránovým filtrem o velikosti pórů 0,45 µm**
- 6.8. **Dělené pipety umožňující dávkovat 10 ml (ISO 648, třída A, nebo ISO/R 835), nebo dávkovací systém schopný dodávat 10,0 ml za dvě minuty**
- 6.9. **Dávkovací systém schopný dodávat 20,0 ml vody při teplotě asi 50 °C**
- 6.10. **Termostatická vodní lázeň nastavená na 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **Zařízení na HPLC, které tvoří:**
 - 6.11.1. Čerpadlo s binárním gradientem
 - 6.11.2. Nástříkové zařízení – ruční nebo automatické, o objemu 100 µl
 - 6.11.3. Kolona Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (délka 25 cm, vnitřní průměr 0,46 cm), nebo jiná rovnocenná kolona pro obrácené fáze s velkými póry na bázi křemene
 - 6.11.4. Termostat kolony nastavený na 35 ± 1 °C
 - 6.11.5. UV detektor s proměnnou vlnovou délkou, který umožňuje provádět měření při 210 nm (v nutných případech je možné použít větší vlnové délky až do 220 nm) s citlivostí 0,02 Å.
 - 6.11.6. Integrovaný s možností nastavení integrace na obecnou základní linii nebo mezi sedly

Poznámka: Práce s kolonami udržovanými na teplotě místnosti je možná za předpokladu, že teplota nekolísá více než o 1 °C, jinak dochází k příliš velkým změnám retenčního času CMP_A .

7. **ODBĚR VZORKŮ**
 - 7.1. **Vzorky musí být odebírány postupem stanoveným v mezinárodní normě ISO 707. Členské státy však mohou používat jinou metodu odběru vzorků za předpokladu, že tato metoda odpovídá zásadám uvedené normy.**
 - 7.2. **Vzorek skladujte takovým způsobem, aby nemohlo dojít ke znehodnocení nebo změně složení.**

8. PRACOVNÍ POSTUP

8.1. Příprava zkušební vzorku

Sušené mléko převedte do nádoby, jejíž objem je asi dvakrát větší než objem prášku a která je opatřena vzduchotěsným víčkem. Nádobku ihned uzavřete. Sušené mléko důkladně promíchejte opakovaným převrácením nádoby.

8.2. Zkušební dávka

Do odstředivkové zkumavky (6.2) nebo vhodné baňky se zátkou na 50 ml navažte 2,00 ± 0,001 g zkušební vzorku.

Poznámka: V případě směsi navažte takové množství zkušební vzorku, aby tuku zbavená zkušební dávka odpovídala 2,00 g.

8.3. Odstranění tuku a bílkovin

- 8.3.1. Ke zkušební dávce přidejte 20,0 ml teplé (50 °C) vody. Pětiminutovým třepáním na mechanické třepačce (6.3) se prášek rozpustí. Zkumavku vložte do vodní lázně (6.10), dokud se její teplota neustálí na 25 °C.
- 8.3.2. Během dvou minut za stálého míchání magnetickou míchačkou (6.4) přidejte 10,0 ml roztoku kyseliny trichloroctové o teplotě asi 25 °C (5.1). Zkumavku vložte na 60 minut do vodní lázně (6.10).
- 8.3.3. Odstřeďte (6.2) po dobu 10 minut při odstředivé síle 2 200 g, nebo přefiltrujte přes papír (6.6) a prvních 5 ml filtrátu vyhoďte.

8.4. Chromatografické stanovení

- 8.4.1. Metoda HPLC s obrácenými fázemi vylučuje možnost falešně pozitivních výsledků díky přítomnosti sušeného kysaného podmaslí.
- 8.4.2. Před provedením analýzy HPLC s obrácenými fázemi je třeba optimalizovat podmínky gradientu. Pro gradientové systémy s mrtvým objemem asi 6 ml (objem od bodu, kde se stékají rozpouštědla k objemu nástřikové smyčky včetně) je optimální retenční čas v délce 26 minut \pm 2 minuty pro CMP_A . Pro gradientové systémy s menším mrtvým objemem (např. 2 ml) je optimální retenční čas 22 minut.

Vezměte roztoky srovnávacích vzorků (5.4) s obsahem 50 % syřidlové syrovátky a bez obsahu této syrovátky.

Nastříkněte 100 μ l supernatantu nebo filtrátu (8.3.3) do zařízení na HPLC, které musí fungovat za podmínek referenčního gradientu uvedených v tabulce 1.

Tabulka 1

Podmínky referenčního gradientu pro optimalizaci chromatografie

Čas (min)	Průtok (ml/min)	% A	% B	Křivka
Počátek	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	přímka
32	1,0	10	90	přímka
37	1,0	10	90	přímka
42	1,0	90	10	přímka

Porovnání obou chromatogramů by mělo ukázat polohu píku CMP_A .

Počáteční složení rozpouštědla, které je nutno použít pro normální gradient (viz 8.4.3), lze vypočítat podle tohoto vzorce: $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) * 1,11$

kde

RT_{cmpA} : retenční čas CMP_A v referenčním gradientu

10: počáteční % B v referenčním gradientu

2,5: % B ve středním bodu minus počáteční % B v normálním gradientu

13,5: čas odpovídající střednímu bodu referenčního gradientu

26: požadovaný retenční čas CMP_A

6: poměr směrnic referenčního a normálního gradientu

30: % B v počátečním bodu minus % B po 27 minutách v referenčním gradientu

27: doba běhu referenčního gradientu

8.4.3. Nástřik roztoků zkušebních vzorků

Nastříkněte 100 μ l přesně odměřeného supernatantu nebo filtrátu (8.3.3) do zařízení na HPLC s průtokem 1,0 ml elučního roztoku (5.2) za minutu.

Složení eluentu na začátku analýzy se získá z 8.4.2. Za normálních okolností se blíží poměru A:B = 76:24 (5.2). Okamžitě po nástřiku se spustí lineární gradient, což způsobí, že procento B se za 27 minut zvýší o 5 %. Potom se spustí lineární gradient, kterým složení eluentu dosáhne v pěti minutách 90 % B. Toto složení se udržuje po dobu pěti minut a po jejím uplynutí se pomocí lineárního gradientu složení opět změní během pěti minut na složení počáteční. V závislosti na vnitřním objemu čerpacího systému může být další nástřik proveden 15 minut po dosažení původních podmínek.

Poznámka 1. Retenční čas CMP_A by měl být 26 ± 2 minuty. Toho lze dosáhnout změnou počátečních a konečných podmínek prvního gradientu. Rozdíl v % B mezi počátečními a konečnými podmínkami prvního gradientu však zůstává ve výši 5 % B.

Poznámka 2. Eluenty je třeba dostatečně odplynit a uchovávat je odplyněné. Je to nezbytně nutné pro to, aby gradientový čerpací systém správně fungoval. Směrodatná odchylka retenčního času píku CMP_A musí být menší než 0,1 minuty ($n = 10$).

Poznámka 3. Na každých pět vzorků je třeba nastříknout referenční vzorek [5] a použít jej pro výpočet nového odezvového faktoru R (9.1.1).

- 8.4.4. *Výsledky chromatografických analýz zkušební vzorku (E) se získávají ve formě chromatogramu, na němž je pík CMP_A určen svým retenčním časem přibližně v délce 26 minut.*

Výšku H píku CMP_A automaticky vypočítává integrátor (6.11.6). Polohu základní linie je třeba kontrolovat na každém chromatogramu. Jestliže je základní linie nesprávně umístěna, analýzu nebo integraci je třeba zopakovat.

Poznámka: Je-li pík CMP_A dostatečně oddělen od ostatních píků, mělo by se použít přiřazení základní linie mezi sedly. V opačném případě použijte svislé kolmice ke společné základní linii, jejichž počáteční bod by měl být v blízkosti píku CMP_A (tedy ne v čase $t = 0$ min!). Pro referenční standard a vzorky použijte stejný typ integrace a u společné základní linie zkontrolujte, zda je se vzorky a referenčním standardem konzistentní.

Před kvantitativní interpretací je nezbytné prozkoumat vzhled každého chromatogramu za účelem zjištění případných anomálií způsobených buď nesprávnou funkcí zařízení, nebo kolony, nebo původem a povahou analyzovaného vzorku. V případě pochybností analýzu zopakujte.

8.5. Kalibrace

- 8.5.1. *U srovnávacích vzorků (5.4.1 až 5.4.2) se přesně použije postup popsany v bodech 8.2 až 8.4.4. Použijte čerstvě připravené roztoky, protože CMP se v prostředí 8 % kyseliny trichloroctové odbourává. Při teplotě 4 °C zůstává roztok stálý po dobu 24 hodin. V případě dlouhých analytických pokusů je žádoucí používat v automatickém nástřikovém zařízení chlazenou misku na vzorek.*

Poznámka: Fáze 8.4.2 může být vynechána, jestliže je % B v počátečních podmínkách známo z předchozích analýz.

Chromatogram referenčního vzorku (5) by měl být obdobný chromatogramu znázorněnému na obrázku 1. Na tomto obrázku jsou před píkem CMP_A dva malé píky. Je nezbytně nutné dosáhnout podobné separace.

- 8.5.2. *Před chromatografickým stanovením vzorků nastříknete 100 μ l srovnávacího vzorku bez syřidlové syrovátky [0] (5.4.1).*

Chromatogram nesmí vykazovat pík v retenčním čase CMP_A píku.

- 8.5.3. *Odezvové faktory R stanovte nastříknutím stejného objemu filtrátu (8.5.1), jakého bylo použito pro vzorky.*

9. VYJÁDŘENÍ VÝLEDKŮ

9.1. Metoda výpočtu a vzorce

- 9.1.1. *Výpočet odezvového faktoru R :*

$$\text{Pík } CMP_A: R = W/H$$

kde

R = odezvový faktor píku CMP_A

H = výška píku CMP_A

W = množství syrovátky ve srovnávacím vzorku [5]

9.2. Výpočet procenta sušené syřidlové syrovátky obsažené ve vzorku

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

kde

$W(E)$ = hmotnostní procento syřidlové syrovátky ve vzorku [E]

R = odezvový faktor píku CMP_A (9.1.1)

$H(E)$ = výška píku CMP_A vzorku (E)

Pokud je $W(E)$ vyšší než 1 % a rozdíl mezi retenčním časem a časem srovnávacího vzorku [5] menší než 0,2 minuty, pak je přítomnost sušiny ze syřidlové syrovátky prokázána.

9.3. Přesnost metody

9.3.1. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení, která u stejného zkušebního vzorku provedl současně nebo v těsném sledu jeden pracovník na stejném přístroji, by neměl překročit 0,2 % hm.

9.3.2. Reprodukovatelnost

Nestanovena.

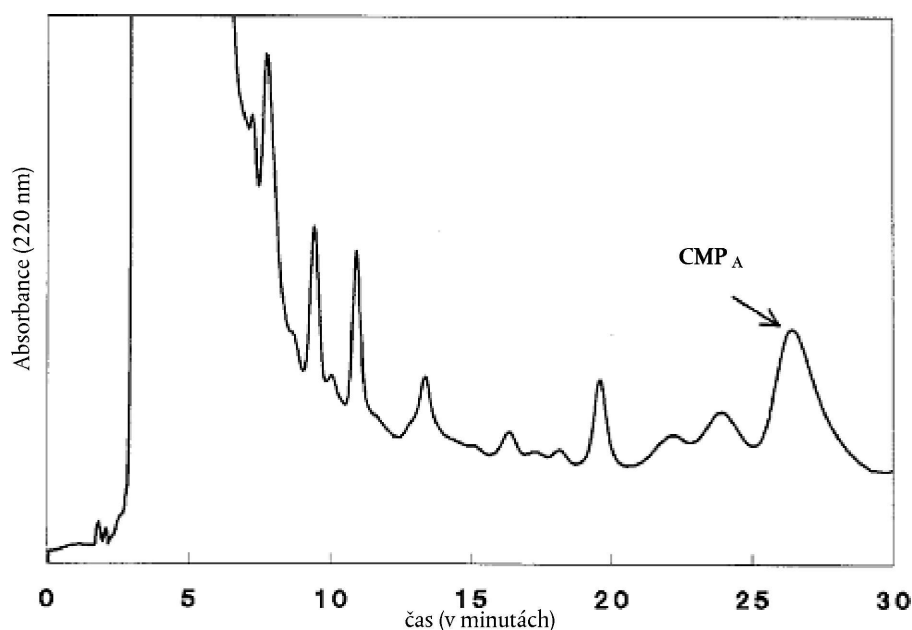
9.3.3. Linearita

Pro hodnoty od 0 % do 16 % syřidlové syrovátky je třeba získat lineární vztah s korelačním koeficientem $> 0,99$.

9.4. Interpretace

Mezní hodnota 1 % obsahuje nejistotu z důvodu reprodukovatelnosti.

Obrázek 1
Ni—4.6 standard



(*) Mezinárodní norma IDF 135B/1991. Mléko a mléčné výrobky. Přesnostní charakteristiky analytických metod. Stručný popis práce na společné studii.“

3) Doplnují se nové přílohy, které znějí:

„PŘÍLOHA VI

Metody analýzy másla v soukromém skladování

Parametr	Metoda
Tuk ⁽¹⁾	ISO 17189 nebo ISO 3727 část 3
Voda	ISO 3727 část 1
Tukuprostá sušina (s výjimkou soli)	ISO 3727 část 2
Sůl	ISO 15648

⁽¹⁾ Metodu, která má být použita, musí schválit platební agentura.

PŘÍLOHA VII

Metody analýzy sušeného odstředěného mléka v soukromém skladování

Parametr	Metoda
Tuk	ISO 1736
Bílkoviny	ISO 8968 část 1
Voda	ISO 5537

PŘÍLOHA VIII

Metody analýzy sýrů v soukromém skladování

1. Je nutné zaručit, že sýry vyráběné výhradně z ovčího mléka, kozího mléka či buvolího mléka, nebo ze směsi ovčího, kozího a buvolího mléka neobsahují kasein z kravského mléka, a za tímto účelem se použije metoda analýzy uvedená v dodatku.

Přítomnost kaseinu z kravského mléka se považuje za prokázanou, pokud obsah kaseinu z kravského mléka v analyzovaném vzorku je stejný nebo vyšší v porovnání s obsahem v referenčním vzorku obsahujícím 1 % kravského mléka, který je uveden v dodatku.

2. Metody ke zjišťování kaseinu z kravského mléka v sýrech uvedených v odstavci 1 mohou být používány za těchto podmínek:
 - a) jejich detekční limit musí být nejvýše 0,5 %;
 - b) jejich výsledky nesmí být falešně pozitivní;
 - c) musí umožňovat detekci kaseinu z kravského mléka s požadovanou citlivostí i po dlouhé době zrání, k čemuž může za běžných obchodních podmínek docházet.

Není-li jeden z výše uvedených požadavků splněn, použijí se metody uvedené v dodatku.

Dodatek

METODA PRO ZJIŠŤOVÁNÍ KRAVSKÉHO MLÉKA A KASEINÁTŮ V SÝRECH Z OVČÍHO MLÉKA, KOZÍHO MLÉKA NEBO BUVOLÍHO MLÉKA, NEBO SMĚSÍ OVČÍHO, KOZÍHO A BUVOLÍHO MLÉKA

1. PŘEDMĚT

Zjišťování kravského mléka a kaseinátů v sýrech vyrobených z ovčího mléka, kozího mléka, buvolího mléka anebo ze směsí ovčího, kozího a buvolího mléka izoelektrickou fokusací γ -kaseinů po plasminolýze.

2. OBLAST POUŽITÍ

Metoda je vhodná pro citlivé a specifické zjišťování mléka a kaseinátu, též tepelně ošetřených, v čerstvých a zralých sýrech vyrobených z ovčího mléka, kozího mléka, buvolího mléka nebo ze směsí ovčího, kozího a buvolího mléka. Není vhodná k odhalení falšování mléka a sýrů tepelně ošetřenými bílkovinnými koncentráty z hovězí syrovátky.

3. PODSTATA METODY

3.1. Izolace kaseinů ze sýra a referenčních standardů

3.2. Rozpuštění izolovaných kaseinů a proteolýza plasminem (EC.3.4.21.7)

3.3. Izoelektrická fokusace plasminem ošetřených kaseinů za přítomnosti močoviny a vybarvení bílkovin

3.4. Vyhodnocení vybarvených obrazců kaseinu γ_3 a γ_2 (důkaz přítomnosti kravského mléka) na základě porovnání obrazce získaného ze vzorku s obrazci získanými u téhož gelu z referenčních standardů obsahujících 0 % a 1 % kravského mléka.

4. CHEMIKÁLIE

Není-li stanoveno jinak, používají se pouze chemikálie čistoty p.a. Voda musí být redestilovaná nebo rovnocenné čistoty.

Poznámka: Následující údaje se vztahují na laboratorně připravované polyakrylamidové gely s obsahem močoviny o rozměrech 265 × 125 × 0,25 mm. Pokud se použijí jiné rozměry nebo druhy gelu, může být nutné upravit podmínky separace.

Izoelektrická fokusace

4.1. Chemikálie pro přípravu polyakrylamidových gelů s obsahem močoviny

4.1.1. Zásobní roztok gelu

Ve vodě rozpusťte:

4,85 g akrylamidu

0,15 g N, N'-metylen-bis-akrylamidu (BIS)

48,05 g močoviny

15,00 g glycerolu (87 % hm.),

doplňte na 100 ml a uložte do chladničky v hnědé skleněné lahvi.

Poznámka: Místo uvedených množství neurotoxického akrylamidu lze použít komerčně dostupný, předem namíchaný roztok akrylamidu a BIS. V případě, že koncentrace komerčního roztoku je 30 % hm./obj. akrylamidu a 0,8 % hm./obj. BIS, pak uvedená množství (4,85 g akrylamidu a 0,15 g BIS) musí být nahrazena komerčním roztokem o objemu 16,2 ml. Zásobní roztok lze skladovat nejdéle 10 dnů. Pokud je jeho vodivost vyšší než 5 μ S, je nutné provést jeho deionizaci promícháváním s 2 g Amberlitu MB-3 po dobu 30 minut a poté jej přefiltrovat přes 0,45 μ m membránu.

4.1.2. Roztok gelu

Připravte roztok gelu smícháním přísad a amfolytů (*) se zásobním roztokem gelu (viz 4.1.1).

9,0 ml zásobního roztoku

24 mg β -alaninu

500 μ l amfolytu pH 3,5–9,5

250 μ l amfolytu pH 5–7

250 μ l amfolytu pH 6–8

Gelový roztok promíchejte a odplyňte po dobu dvou až tří minut v ultrazvukové lázni nebo ve vakuu.

Poznámka: Gelový roztok se musí připravit bezprostředně před naléváním (viz 6.2).

4.1.3. Roztoky katalyzátorů

4.1.3.1. N, N, N', N'-tetramethylendiamin (Temed)

4.1.3.2. 40 % hm./obj. roztoku persíranu amonného (PER)

800 mg PER se rozpustí ve vodě a doplní se do 2 ml.

Poznámka: Vždy používejte čerstvě připravený roztok PER.

4.2. Kontaktní tekutina

Kerosin nebo kapalný parafin

4.3. Anodový roztok

Rozpusťte 5,77 g kyseliny fosforečné (85 % hm.) ve vodě a zřeďte na 100 ml.

4.4. Katodový roztok

Rozpusťte 2,00 g hydroxidu sodného ve vodě a zřeďte vodou na 100 ml.

Příprava vzorku

4.5. Chemikálie určené k izolaci bílkovin

4.5.1. Zředěná kyselina octová (25,0 ml ledové kyseliny octové doplněné vodou do 100 ml).

4.5.2. Dichlormethan

4.5.3. Aceton

4.6. Tlumivý roztok pro rozpuštění bílkovin

Ve vodě rozpusťte:

5,75 g glycerolu (87 % hm.)

24,03 g močoviny

250 mg dithiothreitolu

a doplňte na 50 ml vodou.

Poznámka: Skladujte v chladničce; maximální doba uskladnění je jeden týden.

4.7. Chemikálie určené k plasminovému štěpení kaseinů**4.7.1. Tlumivý roztok uhličitanu amonného**

Titrujte molární roztok hydrogenuhličitanu amonného 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml vody) obsahující 0,05 mol/l kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA, 1,46 g/100 ml) roztokem uhličitanu amonného 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml vody) obsahujícího 0,05 mol/l EDTA na pH 8.

4.7.2. Hovězí plasmin (EC. 3.4.21.7), s aktivitou nejméně 5 U/ml.**4.7.3. Roztok kyseliny ε-aminokapronové určené k inhibici enzymu**

Rozpusťte 2,624 g kyseliny ε-aminokapronové (6-amino-n-hexankyseliny) ve 100 ml 40 % obj. ethanolu.

4.8. Referenční standardy

4.8.1. Certifikované referenční standardy směsi ovčího a kozího odstředěného mléka vysráženého pomocí syřidla a s obsahem 0 % a 1 % kravského mléka lze získat od Ústavu pro referenční materiály a měření působícího při Komisi, B-2440, Geel, Belgie.

4.8.2. Příprava laboratorních prozatímních standardů buvolího mléka vysráženého pomocí syřidla a s obsahem 0 % a 1 % kravského mléka

Odstředěné mléko se připraví odstředěním syrového buvolího nebo kravského mléka při teplotě 37 °C (2 500 g, 20 minut). Po rychlém ochlazení zkumavky a jejího obsahu na 6 až 8 °C se úplně odstraní horní tuková vrstva. Pro přípravu 1 % standardu přidejte 5,00 ml odstředěného kravského mléka do 495 ml odstředěného buvolího mléka v kádince o obsahu 1 l. Hodnotu pH upravte na 6,4 přidáním zředěné kyseliny mléčné (10 %, hm./obj.). Teplotu upravte na 35 °C, přidejte 100 µl telecího syřidla (aktivita syřidla 1: 10 000, cca 3 000 U/ml) a míchejte po dobu 1 minuty. Poté kádinku zakryjte hliníkovou fólií a nechte hodinu stát při teplotě 35 °C k vytvoření sýřeniny. Po vytvoření sýřeniny se veškeré mléko vysrážené pomocí syřidla lyofilizuje, aniž by předtím byla provedena homogenizace nebo odebrání syrovátky. Lyofilizované mléko se jemně rozeleme na homogenní prášek. K přípravě referenčního standardu 0 % použijte stejný postup u čistého odstředěného buvolího mléka. Referenční standardy musí být skladovány při teplotě – 20 °C.

Poznámka: Před přípravou referenčních standardů se doporučuje zkontrolovat čistotu buvolího mléka izoelektrickou fokusací kaseinů vystavených působení plasminu.

Chemikálie určené k barvení bílkovin**4.9. Fixativ**

Rozpusťte 150 g kyseliny trichloroctové ve vodě a doplňte na 1 000 ml.

4.10. Odbarvovací roztok

Zředte 500 ml methanolu a 200 ml ledové kyseliny octové destilovanou vodou na 2 000 ml.

Poznámka: Odbarvovací roztok se připravuje každý den čerstvý; lze jej připravit smícháním stejných objemů zásobního roztoku 50 % (obj.) methanolu a zásobního roztoku 20 % (obj.) ledové kyseliny octové.

4.11. Barvicí roztoky**4.11.1. Barvicí roztok (zásobní roztok 1)**

V 1 000 ml 90 % obj. methanolu rozpusťte pomocí magnetické míchačky (asi 45 minut) 3,0 g brilantní modři Coomassie G-250 (C. I. 42655) a roztok přefiltrujte přes dva středně husté skládané filtry.

4.11.2. Barvicí roztok (zásobní roztok 2)

V 1 000 ml 20 % obj. kyseliny octové rozpusťte 5,0 g síranu měďnatého, pentahydrátu.

4.11.3. Barvicí roztok (pracovní roztok)

Bezprostředně před barvením smíchejte 125 ml obou zásobních roztoků (4.11.1 a 4.11.2).

Poznámka: Barvicí roztok je třeba použít v den přípravy.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 5.1. Skleněné desky (265 x 125 x 4 mm), pryžový váleček (o šířce 15 cm), nivelační stolek.
- 5.2. Nosná fólie gelu (265 × 125 mm)
- 5.3. Krycí fólie (280 × 125 mm). Na každý dlouhý okraj nalepte pruh lepicí pásky (280 × 6 × 0,25 mm) (viz obrázek 1).
- 5.4. Elektrofokusační komora s chladicí deskou (např. 265 × 125 mm) a vhodný napájecí zdroj ($\geq 2,5$ kV) nebo automatické elektroforetické zařízení
- 5.5. Cirkulační kryostat s regulací teploty ve výši $12 \pm 0,5$ °C
- 5.6. Odstředivka nastavitelná na 3 000 g
- 5.7. Elektrodové proužky (o délce ≥ 265 mm)
- 5.8. Plastové kapací nádoby na anodový a katodový roztok
- 5.9. Aplikátory vzorku (10 × 5 mm, z viskózy nebo filtračního papíru s nízkou adsorpcí bílkovin)
- 5.10. Odbarvovací a barvicí misky (např. misky na nástroje 280 × 150 mm) z nerezové oceli nebo skleněné
- 5.12. Nastavitelný tyčový homogenizátor s průměrem tyče 10 mm a rychlostí 8 000 až 20 000 ot/min
- 5.13. Magnetická míchačka
- 5.14. Ultrazvuková lázeň
- 5.15. Svářečka fólií
- 5.16. Mikropipety na 25 μ l
- 5.17. Vakuová odstředivka nebo lyofilizátor
- 5.18. Termostatem řízená vodní lázeň, nastavitelná na 35 a 40 ± 1 °C s třepačkou
- 5.19. Densitometrické zařízení umožňující měření na vlnové délce $\lambda = 634$ nm
6. PRACOVNÍ POSTUP
- 6.1. Příprava vzorku
- 6.1.1. Izolace kaseinů

Do odstředivkové kyvety na 100 ml navažte množství sýra nebo referenčního standardu odpovídající 5 g sušiny, přidejte 60 ml destilované vody a obsah homogenizujte tyčovým homogenizátorem (8 000 až 10 000 ot/min). Upravte pH na 4,6 zředěnou kyselinou octovou (4.5.1) a odstředějte (5 minut, 3 000 g). Dekantujte tuk a syrovátku a zbytek homogenizujte při 20 000 ot/min se 40 ml destilované vody s hodnotou pH upravenou na 4,5 zředěnou kyselinou octovou (4.5.1). Přidejte 20 ml dichlormethanu (4.5.2) a znovu homogenizujte a odstředějte (5 minut, 3 000 g). Špachtlí vyjměte kaseinovou vrstvu, která se nachází mezi vodnou a organickou fází (viz obrázek 2), a obě fáze dekantujte. Kasein se znovu homogenizuje se 40 ml destilované vody (viz výše) a 20 ml dichlormethanu (4.5.2) a odstředí se. Tento postup opakujte, dokud obě extrakční fáze nejsou bezbarvé (dvakrát až třikrát). Bílkovinný zbytek homogenizujte s 50 ml acetonu (4.5.3) a přefiltrujte přes středně hustý skládaný papírový filtr. Zbytek promyjte dvěma samostatnými 25 ml dávkami acetonu a nechte vysušit na vzduchu nebo v proudu dusíku. Potom jemně rozmělněte v třecí misce.

Poznámka: Suché bílkovinné extrakty se musí uchovávat při teplotě -20 °C.

- 6.1.2. Přeměna β -kaseinů na γ -kaseiny působením plasminu

Rozptylte 25 mg izolovaných kaseinů (6.1.1) v 0,5 ml tlumivého roztoku uhličitanu amonného (4.7.1) a směs 20 minut homogenizujte, např. ultrazvukem. Směs zahřejte na 40 °C a přidejte 10 μ l plasminu (4.7.2), promíchejte a inkubujte 1 hodinu při teplotě 40 °C za stálého třepání. Pro inhibici enzymu přidejte 20 μ l roztoku kyseliny ϵ -aminokapronové (4.7.3). Poté přidejte 200 mg pevné močoviny a 2 mg dithiothreitolu.

Poznámka: Pro získání lepší symetrie fokusovaných kaseinových pásů se doporučuje po přidání kyseliny ϵ -aminokapronové roztok lyofilizovat a poté zbytky rozpustit v 0,5 ml tlumivého roztoku pro rozpouštění bílkovin (4.6).

6.2. Příprava polyakrylamidových gelů s obsahem močoviny

Na skleněnou desku (5.1) válečkem naneste nosnou fólii gelu (5.2) s pomocí několika kapek vody a přebytečnou vodu odsajte papírovým ubrouskem nebo kapesníčkem. Stejným způsobem válečkem naneste druhou, krycí fólii (5.3) s distančními vložkami (0,25 mm) na jinou skleněnou desku. Tuto druhou desku uložte vodorovně na nivelační stolek.

K připravenému odplyněnému roztoku gelu (4.1.2) přidejte 10 μ l Temedu (4.1.3.1), protřepejte a přidejte 10 μ l roztoku PER (4.1.3.2); důkladně promíchejte a okamžitě nalijte rovnoměrně na střed krycí fólie. Jeden okraj nosné desky gelu (stranou s fólií směrem dolů) přiložte k desce s krycí fólií a pomalu pokládejte tak, aby se mezi fóliemi vytvořila pravidelně rozprostřená tenká vrstva gelu bez bublin (obrázek 3). Pomocí tenké špachtle nosnou desku gelu opatrně přitiskněte po celé délce a položte na ni tři další skleněné desky, aby ji zatížily. Po skončení polymerace (asi po 60 minutách) spolu s krycí fólií sejměte gel zpolymerovaný na nosné fólii gelu tak, že skleněné desky nakloníte. Zadní stranu nosné fólie pečlivě očistěte, aby se odstranily zbytky gelu a močoviny. „Gelový sendvič“ zavařte do tenké fólie a uložte do chladničky (nejdéle na šest týdnů).

Poznámka: Krycí fólii s distančními vložkami lze použít znovu. Polyakrylamidový gel může být rozřezán na menší části; je to vhodné v případě omezeného počtu vzorků nebo v případě použití automatického elektroforetického zařízení (dva gely o rozměrech 4,5 \times 5 cm).

6.3. Izoelektrická fokusace

Nastavte kryostat na 12 °C. Zadní stranu nosné fólie gelu otřete kerosinem a poté na střed chladicího bloku kápněte několik kapek kerosinu (4.2). Opatrně přiložte „gelový sendvič“ nosnou fólií obrácený dolů, aby se vytlačily všechny vzduchové bubliny. Přebytečný kerosin otřete a sejměte krycí fólii. Elektroodové proužky napusíte elektroodovými roztoky (4.3, 4.4), seřízněte na délku gelu a uložte na místo (vzdálenost elektrod 9,5 cm).

Podmínky izoelektrické fokusace

6.3.1. Rozměry gelu 265 \times 125 \times 0,25 mm

Fáze	Doba (min)	Napětí (V)	Proud (mA)	Příkon (W)	Volty/hodiny (Vh)
1. Předběžná fokusace	30	max. 2 500	max. 15	konstantní 4	cca 300
2. Fokusace vzorku ⁽¹⁾	60	max. 2 500	max. 15	konstantní 4	cca 1 000
3. Konečná fokusace	60	max. 2 500	max. 5	max. 20	cca 3 000
	40	max. 2 500	max. 6	max. 20	cca 3 000
	30	max. 2 500	max. 7	max. 25	cca 3 000

⁽¹⁾ Použití vzorku: Po předběžné fokusaci (krok 1) pipetou odměřte 18 μ l vzorku a standardních roztoků do aplikátorů vzorku (10 \times 5 mm), vložte na gel ve vzdálenosti 1 mm od sebe a 5 mm podélně od anody a jemně přitlačte. Fokusaci proveďte za výše uvedených podmínek a aplikátory vzorku opatrně vyjměte po 60 minutách fokusace vzorku.

Poznámka: Jestliže se změní tloušťka nebo šířka gelů, hodnoty proudu a příkonu musí být odpovídajícím způsobem upraveny (např. hodnoty proudu a příkonu se zdvojnásobí, použije-li se gel o rozměrech 265 \times 125 \times 0,5 mm).

- 6.3.2. *Příklad programování napětí u automatického elektroforetického zařízení (2 gely 5,0 × 4,5 cm, elektrody bez proužků se přikládají přímo na gel.*

Fáze	Napětí	Proud	Příkon	Teplota	Volty/hodiny
1. Předběžná fokusace	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Fokusace vzorku	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fokusace	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fokusace	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Aplikátor vzorku ve fázi 2 vložte při 0 Vh.

Aplikátor vzorku ve fázi 2 odstraňte při 30 Vh.

6.4. Barvení bílkovin

6.4.1. Fixace bílkovin

Okamžitě po vypnutí napájení se odstraní elektrodové proužky a gel se ihned vloží do barvicí/odbarvovací misky naplněné 200 ml fixatérů (4.9). Gel v ní ponechte 15 minut za stálého třepání.

6.4.2. Praní a barvení gelové desky

Fixatér beze zbytku dekantujte a gelovou desku dvakrát promývejte po dobu 30 sekund vždy ve 100 ml odbarvovacího roztoku (4.10) Odbarvovací roztok dekantujte, misku naplňte 250 ml barvicího roztoku (4.11.3) a gel nechte za mírného třepání po dobu 45 minut zbarvovat.

6.4.3. Odbarvení gelové desky

Barvicí roztok dekantujte a gelovou desku dvakrát promývejte po dobu 30 sekund vždy ve 100 ml odbarvovacího roztoku (4.10). Poté 15 minut protřepávejte s 200 ml odbarvovacího roztoku; fázi odbarvování opakujte nejméně dvakrát až třikrát, dokud není pozadí čiré a bezbarvé. Gelovou desku potom promyjte destilovanou vodou (2 × 2 minuty) a nechte uschnout na vzduchu (2 až 3 hodiny) nebo usušte vysoušečem vlasů (10 až 15 minut).

Poznámka 1: Fixaci, promývání, barvení a odbarvování provádějte při teplotě 20 °C. Vyšší teploty nepoužívejte.

Poznámka 2: Pokud upřednostňujete citlivější obarvení stříbrem (např. Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, kód č. 17-1150-01), musí být kaseinové vzorky ošetřeny plasminem zředěny v poměru 5 mg/ml.

7. HODNOCENÍ

Hodnocení se provádí porovnáním proteinových obrazců zkoumaného vzorku s obrazci referenčních standardů u stejného gelu. Zjišťování kravského mléka v sýrech vyrobených z ovčího mléka, kozího mléka, buvolího mléka nebo ze směsi ovčího, kozího a buvolího mléka se provádí prostřednictvím γ_3 - a γ_2 -kaseinů, jejichž izoelektrické body se nacházejí v rozmezí mezi pH 6,5 a pH 7,5 (obrázky 4a, b, obrázek 5). Detekční mez je nižší než 0,5 %.

7.1. Vizuální hodnocení

Pro vizuální hodnocení množství kravského mléka se doporučuje upravit koncentraci vzorků a referenčních standardů s cílem dosáhnout u hovězích, kozích a/nebo buvolích γ_2 - a γ_3 -kaseinů (viz „ γ_2 E,G,B“ a „ γ_3 E,G,B“ na obrázcích 4a, b a obrázku 5) stejné úrovně intenzity. Pouze za těchto podmínek lze přímo posoudit množství kravského mléka (menší nebo větší než 1 % nebo ve výši 1 %) v analyzovaném vzorku porovnáním intenzity hovězích γ_3 - a γ_2 -kaseinů (viz „ γ_3 C“ a „ γ_2 C“ na obrázcích 4 a, b a obrázku 5) s intenzitami kaseinů v referenčních standardech s obsahy 0 % a 1 % (ovčích, kozích), nebo prozatímních laboratorních standardech (buvolích).

7.2. Denzitometrické hodnocení

Pokud je to možné, použijte pro stanovení poměru mezi plochami píků hovězích γ_2 - a γ_3 -kaseinů a plochami píků ovčích, kozích a/nebo buvolích γ_2 - a γ_3 -kaseinů (viz obrázek 5) denzitometrii (5.19). Tuto hodnotu porovnejte s poměrem ploch píků γ_2 - a γ_3 -kaseinů v 1 % referenčním standardu (ovčím, kozím) nebo prozatímním laboratorním standardu (buvolím) analyzovaných u téhož gelu.

Poznámka: Tato metoda funguje uspokojivě, pokud existuje jasný pozitivní signál obou hovězích γ_2 - a γ_3 -kaseinů v 1 % referenčním standardu, avšak nikoli v 0 % referenčním standardu. V opačném případě je nutné postup optimalizovat při přesném dodržení pokynů stanovených v dané metodě.

Vzorek je považován za pozitivní, jestliže hodnoty obou hovězích γ_2 - a γ_3 -kaseinů nebo příslušných poměrů ploch píků jsou stejné nebo větší než hodnoty odpovídající 1 % referenčnímu standardu.

8. LITERATURA

Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708–711 (1990).

Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. *Milchwissenschaft* 50, 83–85 (1995).

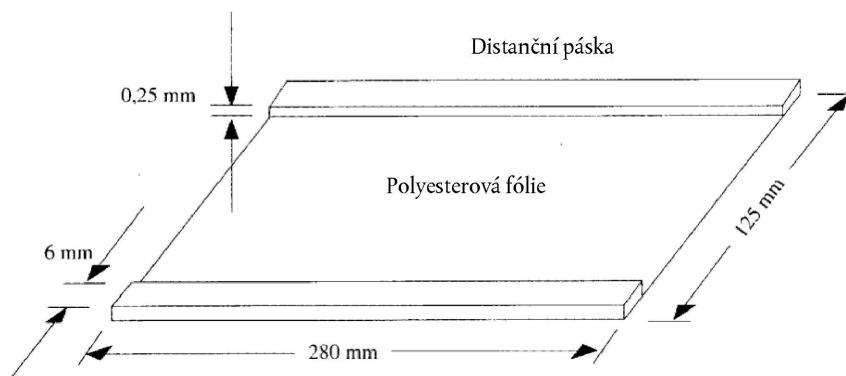
Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. in: *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).

Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195–199 (1982).

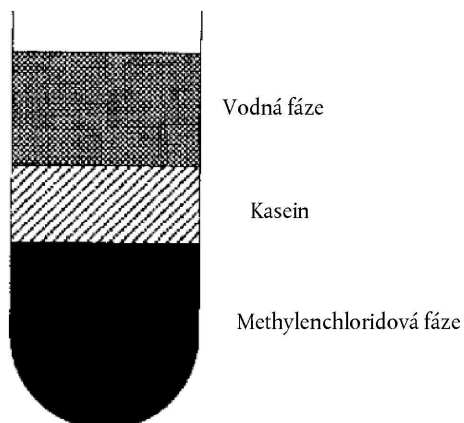
Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43–56 (1980).

Obrázek 1

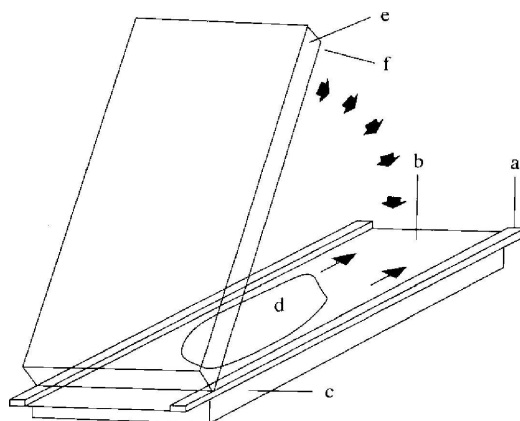
Schematický výkres krycí fólie



Obrázek 2

Kaseinová vrstva plovoucí mezi vodnou a organickou fází po odstředění

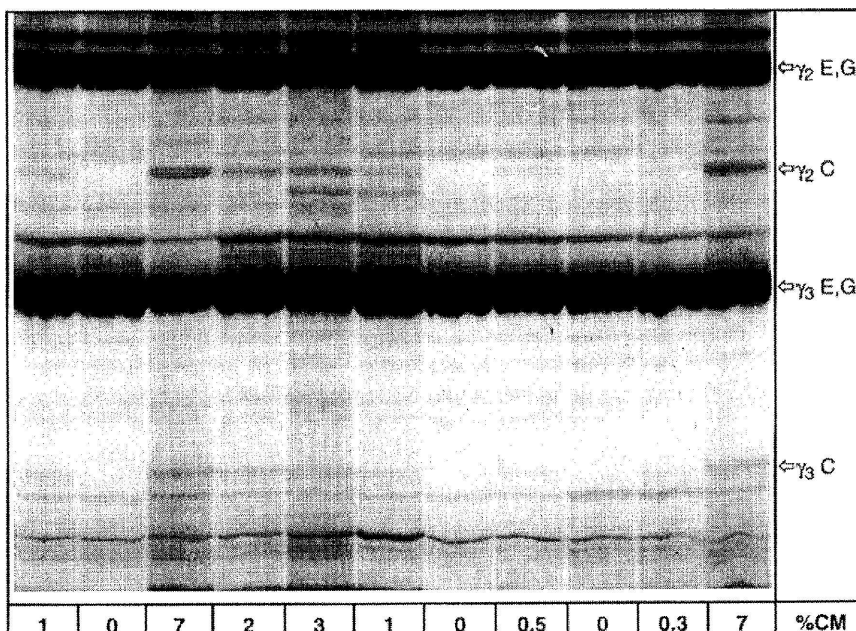
Obrázek 3

Sklápěcí technika pro odlévání ultratenkých polyakrylamidových gelů

a = distanční páska (0,25 mm); b = krycí fólie (5.3); c, e = skleněné desky (5.1); d = gelový roztok (4.1.2); f = nosná fólie gelu (5.2).

Obrázek 4a

Izoelektrická fokusace kaseinů ze sýrů z ovčího a kozího mléka, ošetřených plasminem, s různým obsahem kravského mléka

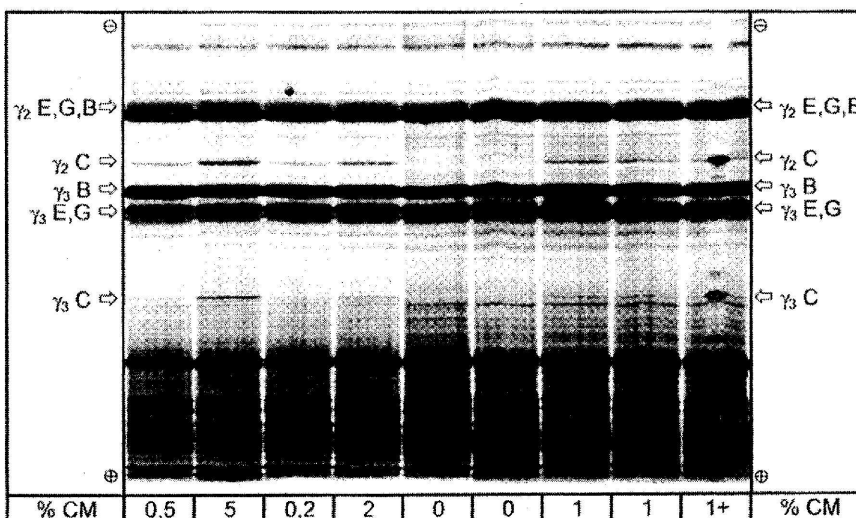


% CM = procento kravského mléka, C = kravské, E = ovčí, G = kozí

Na obrázku je znázorněna horní polovina gelu IEF.

Obrázek 4b

Izoelektrická fokusace kaseinů ze sýrů vyrobených ze směsí ovčího, kozího a buvolího mléka, ošetřených plasminem, s různým obsahem kravského mléka

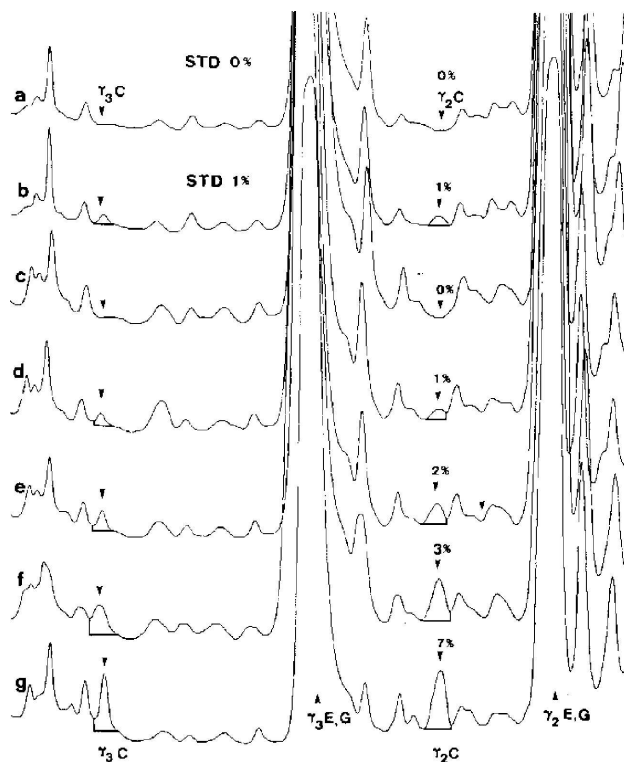


% CM = procento kravského mléka; 1 + = vzorek s obsahem 1 % kravského mléka a s přidavkem čistého hovězího kaseinu ve středu dráhy. C = kravské, E = ovčí, G = kozí, B = buvolí

Na obrázku je znázorněna celá separační vzdálenost gelu IEF.

Obrázek 5

Superpozice denzitogramů referenčních standardů (STD) a vzorků sýra vyrobeného ze směsi ovčího a kozího mléka, po izoelektrické fokusaci



a, b = referenční standardy obsahující 0 a 1 % kravského mléka; c-g = vzorky sýra obsahujícího 0, 1, 2, 3 a 7 % kravského mléka; C = kravské, E = ovčí, G = kozí.

Byla snímána horní polovina gelu IEF při $\lambda = 634$ nm.

PŘÍLOHA IX

Hodnocení analýz**1. Zajištění jakosti**

Analýzy provádějí laboratoře určené v souladu s článkem 12 nařízení (ES) č. 882/2004 (*) nebo určené příslušnými orgány členského státu.

2. Odběr vzorků a námitky proti výsledkům analýzy

1. Odběr vzorků se provádí v souladu s příslušným nařízením pro posuzovaný výrobek. Neexistují-li žádná ustanovení pro odběr vzorku, použijí se ustanovení uvedená v normě ISO 707 „Mléko a mléčné výrobky – Směrnice pro odběr vzorků“.
2. Laboratorní zprávy o výsledcích analýz obsahují dostatečné údaje, které umožní hodnocení výsledků v souladu s dodatkem.
3. Pro analýzy stanovené v právních předpisech Unie se odebírají duplicitní vzorky.
4. Pokud dojde ke sporu ohledně výsledků, platební agentury musí nechat znovu provést nezbytnou analýzu dotyčného produktu a náklady hradí strana, která spor prohraje.

Výše uvedená analýza se provede za předpokladu, že zapečetěné duplicitní vzorky produktu jsou k dispozici a byly řádně uloženy u příslušného orgánu. Výrobce zašle platební agentuře žádost k provedení analýzy do sedmi pracovních dnů od sdělení výsledků první analýzy. Platební agentura provede analýzu do 21 dnů od obdržení žádosti.

5. Výsledek opravného prostředku se považuje za konečný.
6. Jestliže výrobce do pěti pracovních dnů po odběru vzorků prokáže, že postup při odběru vzorků nebyl správný, odběr vzorků se v rámci možností zopakuje. Pokud odběr vzorků zopakovat nelze, je šarže přijata.

Dodatek

Zhodnocení splnění zákonem stanovené mezní hodnoty s ohledem na šarži**1. Podstata metody**

V případech, kdy právní předpisy týkající se veřejné intervence a soukromého skladování stanoví podrobné postupy pro odběr vzorků, dodržují se tyto postupy. Ve všech ostatních případech se používá vzorek nejméně ze 3 jednotek vzorku odebraných náhodně ze šarže odevzdané ke kontrole. Lze připravit i složený vzorek. Získaný výsledek se porovná se zákonem stanovenými mezními hodnotami na základě výpočtu 95 % intervalu spolehlivosti jakožto dvojnásobku směrodatné odchyly, kde příslušná směrodatná odchylnka závisí buď na tom, 1) zda byla metoda validována na základě mezinárodní spolupráce s hodnotami pro σ_r a σ_R , nebo v případě vnitrolaboratorní validace na tom, 2) zda byla vypočítána vnitřní reprodukovatelnost. Tento interval spolehlivosti se potom rovná nejistotě měření výsledku.

2. Metoda je validována na základě mezinárodní spolupráce

V tomto případě byla směrodatná odchylnka opakovatelnosti σ_r a směrodatná odchylnka reprodukovatelnosti σ_R stanovena a laboratoř může prokázat soulad s pracovními charakteristikami validované metody.

Vypočítá se aritmetický průměr \bar{x} z počtu n opakovaných měření.

Vypočítá se rozšířená nejistota ($k = 2$) z \bar{x} takto:

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

Je-li konečný výsledek měření x vypočítán ze vzorce ve tvaru $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ nebo $x = y_1/y_2$, musí se v takových případech postupovat podle běžných postupů pro kombinování směrodatných odchylek.

Šarže se považuje za nevyhovující horní zákonem stanovené mezní hodnotě UL, jestliže

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

jinak se má za to, že hodnotě UL vyhovuje.

Šarže se považuje za nevyhovující dolní zákonem stanovené mezní hodnotě LL, jestliže

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

jinak se má za to, že hodnotě LL vyhovuje.

3. Vnitrolaboratorní validace s výpočtem směrodatné odchyly vnitřní reprodukovatelnosti

V případech, kdy jsou použity metody, které nejsou stanoveny v tomto nařízení, a kdy nebyla stanovena opatření pro zajištění shodnosti, je třeba provést vnitrolaboratorní validaci. Namísto σ_r a σ_R se musí ve vzorci pro výpočet rozšířené nejistoty U použít směrodatná odchylnka vnitřní opakovatelnosti s_{ir} a směrodatná odchylnka vnitřní reprodukovatelnosti s_{iR} .

Pravidla, jež je třeba dodržovat za účelem splnění zákonem stanovené mezní hodnoty, jsou uvedena v bodě 1. Považuje-li se však šarže za nesplňující zákonem stanovenou mezní hodnotu, měření se zopakují pomocí metody stanovené v tomto nařízení a výsledek se vyhodnotí v souladu s bodem 1.

(*) Jako zvláště vhodné pro dosažení žádoucího rozdělení γ -kaseinů se ukázaly výrobky Ampholine® pH 3,5–9,5 (Pharmacia) a Resolyte® pH 5–7 a pH 6–8 (BDH, Merck).

(**) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 ze dne 29. dubna 2004 o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat (Úř. věst. L 165, 30.4.2004, s. 1).“

PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2018/151**ze dne 30. ledna 2018,****kterým se stanoví pravidla pro uplatňování směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2016/1148, pokud jde o bližší upřesnění prvků, které musí poskytovatelé digitálních služeb zohledňovat při řízení bezpečnostních rizik, jimiž jsou vystaveny sítě a informační systémy, a parametrů pro posuzování toho, zda je dopad incidentu významný**

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na směrnici Evropského parlamentu a Rady (EU) 2016/1148 ze dne 6. července 2016 o opatřeních k zajištění vysoké společné úrovně bezpečnosti sítí a informačních systémů v Unii ⁽¹⁾, a zejména na čl. 16 odst. 8 uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) V souladu se směrnicí (EU) 2016/1148 mají poskytovatelé digitálních služeb možnost přijímat technická a organizační opatření, jež považují za vhodná a přiměřená z hlediska řízení bezpečnostních rizik, jimiž jsou vystaveny sítě a informační systémy, pokud uvedená opatření zajišťují odpovídající úroveň bezpečnosti a zohledňují prvky stanovené v uvedené směrnicí.
- (2) Při určování vhodných a přiměřených technických a organizačních opatření by poskytovatelé digitálních služeb měli přistupovat k bezpečnosti informací systematicky a využívat přitom přístup založený na posouzení rizik.
- (3) Za účelem zajištění bezpečnosti systémů, budov a zařízení by poskytovatelé digitálních služeb měli provádět postupy posuzování a analýzy. Tyto činnosti by se měly týkat systematického řízení sítí a informačních systémů, fyzické a environmentální bezpečnosti, bezpečnosti dodávek a kontrol přístupu.
- (4) Při provádění analýzy rizik v rámci systematického řízení sítí a informačních systémů by poskytovatelé digitálních služeb měli být vybízeni k tomu, aby určili specifická rizika a kvantifikovali jejich významnost, například určením hrozeb pro klíčová aktiva a jejich případného dopadu na provoz, a přitom stanovili způsob, jak uvedeným hrozbám co nejlépe zabránit na základě stávajících kapacit a požadavků na zdroje.
- (5) Politiky v oblasti lidských zdrojů by mohly odkazovat na řízení získávání dovedností, včetně aspektů souvisejících s rozvojem dovedností souvisejících s bezpečností a zvyšováním informovanosti. Při rozhodování o přiměřeném souboru politik v oblasti bezpečnosti provozu by poskytovatelé digitálních služeb měli být vybízeni k tomu, aby zohlednili aspekty řízení změn, řízení zranitelností, formalizace provozních a správních postupů a mapování systémů.
- (6) Politiky v oblasti bezpečnostní architektury by mohly zahrnovat zejména oddělení sítí a systémů, jakož i zvláštní bezpečnostní opatření pro kritické operace, jako je například správa. Oddělení sítí a systémů by mohlo poskytovatelům digitálních služeb umožnit rozlišovat prvky, jako jsou např. toky dat a výpočetní zdroje, které patří klientovi, skupině klientů, poskytovateli digitálních služeb nebo třetím stranám.
- (7) Opatření přijatá v souvislosti s fyzickou a environmentální bezpečností by měla zajistit bezpečnost sítí a informačních systémů organizace před poškozením v případě výskytu incidentů, jako jsou například krádež, požár, zatopení nebo jiné povětrnostní vlivy, jakož i telekomunikační selhání či výpadky proudu.
- (8) Bezpečnost dodávek, jako např. elektrické energie, pohonných hmot či chlazení, by mohla zahrnovat bezpečnost dodavatelského řetězce, což zahrnuje zejména bezpečnost vnějších dodavatelů a subdodavatelů a jejich řízení. Sledovatelností kritických dodávek se rozumí schopnost poskytovatele digitálních služeb určit a zaznamenat zdroje uvedených dodávek.
- (9) Uživatelé digitálních služeb by měli zahrnovat fyzické a právnické osoby, které jsou zákazníky internetového tržiště nebo služby cloud computingu či účastníky ve vztahu k internetovému tržišti nebo službě cloud computingu nebo navštívily stránku internetového vyhledávače za účelem vyhledávání pomocí klíčových slov.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 194, 19.7.2016, s. 1.

- (10) Při definování významnosti dopadu incidentu by se případy stanovené v tomto nařízení měly považovat za demonstrativní výčet významných incidentů. Je zapotřebí využít zkušeností získaných z provádění tohoto nařízení a z činnosti skupiny pro spolupráci v rámci shromažďování informací o osvědčených postupech, pokud jde o rizika a incidenty, a jednání o způsobech hlášení incidentů, jak je uvedeno v čl. 11 odst. 3 písm. i) a m) směrnice (EU) 2016/1148. Výsledkem by mohly být komplexní pokyny o kvantitativních mezních hodnotách parametrů hlášení, které by mohly vést k aktivaci ohlašovací povinnosti poskytovatelů digitálních služeb podle čl. 16 odst. 3 směrnice (EU) 2016/1148. Komise by v příslušných případech mohla rovněž zvážit přezkum mezních hodnot, které jsou v současné době stanoveny v tomto nařízení.
- (11) Aby příslušné orgány mohly být informovány o potenciálních nových rizicích, měli by poskytovatelé digitálních služeb být vybízeni k tomu, aby dobrovolně hlásili jakékoli incidenty, jejichž charakteristiky jim předtím nebyly známy, např. nové způsoby zneužití zranitelností (tzv. exploits), nové cesty vedení útoku nebo aktéry ohrožení, zranitelnosti a nebezpečí.
- (12) Toto nařízení by se mělo použít od prvního dne po uplynutí lhůty k provedení směrnice (EU) 2016/1148.
- (13) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Výboru pro bezpečnost sítí a informačních systémů uvedeného v článku 22 směrnice (EU) 2016/1148,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Předmět

Toto nařízení blíže upřesňuje prvky, které musí poskytovatelé digitálních služeb zohlednit při určování a přijímání opatření za účelem zajištění úrovně bezpečnosti sítí a informačních systémů, které využívají v souvislosti s nabízením služeb uvedených v příloze III směrnice (EU) 2016/1148, a blíže upřesňuje parametry, které je nutné zvážit při posouzení toho, zda má incident významný dopad na poskytování uvedených služeb.

Článek 2

Bezpečnostní prvky

1. Bezpečností systémů a zařízení podle v čl. 16 odst. 1 písm. a) směrnice (EU) 2016/1148 se rozumí bezpečnost sítí a informačních systémů a jejich fyzického prostředí a zahrnuje tyto prvky:
 - a) systematické řízení sítí a informačních systémů, což znamená mapování informačních systémů a vytvoření souboru vhodných politik v oblasti řízení bezpečnosti informací, včetně analýzy rizik, lidských zdrojů, bezpečnosti operací, bezpečnostní architektury, bezpečného řízení životního cyklu dat a systémů, případně šifrování a jeho řízení;
 - b) fyzickou a environmentální bezpečnost, což znamená dostupnost souboru opatření za účelem ochrany bezpečnosti sítí a informačních systémů poskytovatelů digitálních služeb před poškozením na základě přístupu založeném na posouzení rizik, který zohledňuje například selhání systému, lidské chyby, svévolné zásahy nebo přírodní jevy;
 - c) bezpečnost dodávek, což znamená vytvoření a udržování příslušných politik za účelem zajištění dostupnosti a případně sledovatelnosti kritických dodávek používaných při poskytování služeb;
 - d) kontroly přístupu k sítím a informačním systémům, což znamená dostupnost souboru opatření za účelem zajištění, že fyzický a logický přístup k sítím a informačním systémům, včetně administrativní bezpečnosti sítí a informačních systémů, je autorizován a omezen na základě obchodních a bezpečnostních požadavků;
2. Pokud jde o řešení incidentů podle čl. 16 odst. 1 písm. b) směrnice (EU) 2016/1148, opatření přijatá poskytovateli digitálních služeb zahrnují:
 - a) udržování a testování postupů a procesů pro detekci za účelem zajištění včasného a dostatečného informování o výskytu anomálií;
 - b) postupy a politiky týkající se ohlašování incidentů a identifikace slabých stránek a zranitelností v jejich informačních systémech;

- c) reakci v souladu se stanovenými postupy a podávání zpráv o výsledcích přijatých opatření;
- d) posouzení závažnosti incidentu, zdokumentování znalostí z analýzy incidentu a shromáždění příslušných informací, které mohou sloužit jako důkaz a podpora procesu neustálého zlepšování.
3. Řízení kontinuity provozu podle čl. 16 odst. 1 písm. c) směrnice (EU) 2016/1148 znamená schopnost organizace udržovat či případně obnovovat poskytování služeb na přijatelné, předem definované úrovni následně po rušivém incidentu a zahrnuje:
- a) vypracování a používání krizových plánů na základě analýzy dopadu na podnikatelskou činnost za účelem zajištění kontinuity služeb poskytovaných poskytovateli digitálních služeb, které musí být pravidelně posuzovány a testovány například prostřednictvím cvičení;
- b) schopnosti pro obnovení provozu po mimořádné události, které musí být pravidelně posuzovány a testovány například prostřednictvím cvičení.
4. Monitorování, audity a testování podle čl. 16 odst. 1 písm. d) směrnice (EU) 2016/1148 zahrnují vypracování a udržování politik týkajících se:
- a) provádění plánované série pozorování či měření za účelem posouzení, zda sítě a informační systémy fungují zamýšleným způsobem;
- b) inspekci a ověřování za účelem kontroly, zda jsou dodržovány normy nebo soubory pokynů, zda záznamy jsou přesné a zda jsou plněny cíle v oblasti účinnosti a účelnosti;
- c) procesu pro odhalování nedostatků v bezpečnostních mechanismech sítě a informačního systému, které chrání data a udržují zamýšlenou funkcionalitu. Tento proces zahrnuje technické postupy a pracovníky zapojené do provozu.
5. Mezinárodními normami uvedenými v čl. 16 odst. 1 písm. e) směrnice (EU) 2016/1148 se rozumí normy přijaté mezinárodním normalizačním orgánem, jak stanoví čl. 2 odst. 1 písm. a) nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1025/2012⁽¹⁾. Podle článku 19 směrnice (EU) 2016/1148 se mohou použít evropské nebo mezinárodně uznávané normy a specifikace upravující bezpečnost sítí a informačních systémů, včetně stávajících vnitrostátních norem.
6. Poskytovatelé digitálních služeb zajistí, že budou mít k dispozici odpovídající dokumentaci, aby příslušný orgán mohl ověřit dodržování bezpečnostních prvků uvedených v odstavcích 1, 2, 3, 4 a 5.

Článek 3

Parametry, které musí být zohledněny při posuzování toho, zda je dopad incidentu významný

1. S ohledem na počet uživatelů postižených incidentem, zejména těch uživatelů, kteří na službu spoléhají při poskytování vlastních služeb, jak je uvedeno v čl. 16 odst. 4 písm. a) směrnice (EU) 2016/1148, musí být poskytovatel digitálních služeb schopen odhadnout jeden z těchto počtů:
- a) počet fyzických a právnických osob postižených incidentem, s nimiž uzavřel smlouvu na poskytování služeb nebo
- b) počet dotčených uživatelů, kteří službu použili, založený zejména na předchozích údajích o provozu.
2. Délkou trvání incidentu uvedenou v čl. 16 odst. 4 písm. b) se rozumí časové období od narušení řádného poskytování služby ve smyslu dostupnosti, autenticity, integrity nebo důvěrnosti až po obnovení služby.
3. Pokud jde o zeměpisný rozsah oblasti dotčené incidentem uvedený v čl. 16 odst. 4 písm. c) směrnice (EU) 2016/1148, musí být poskytovatel digitálních služeb schopen určit, zda se incident dotýká poskytování jeho služeb v určitých členských státech.
4. Rozsah, v jakém bylo narušeno fungování služby, uvedený v čl. 16 odst. 4 písm. d) směrnice (EU) 2016/1148 se posuzuje na základě alespoň jedné z těchto charakteristik, které byly narušeny incidentem: dostupnost, autenticita, integrita nebo důvěrnost dat či souvisejících služeb.

⁽¹⁾ Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1025/2012 ze dne 25. října 2012 o evropské normalizaci, změně směrnic Rady 89/686/EHS a 93/15/EHS a směrnic Evropského parlamentu a Rady 94/9/ES, 94/25/ES, 95/16/ES, 97/23/ES, 98/34/ES, 2004/22/ES, 2007/23/ES, 2009/23/ES a 2009/105/ES, a kterým se ruší rozhodnutí Rady 87/95/EHS a rozhodnutí Evropského parlamentu a Rady č. 1673/2006/ES (Úř. věst. L 316, 14.11.2012, s. 12).

5. Pokud jde o rozsah dopadu na společenské a ekonomické činnosti uvedený v čl. 16 odst. 4 písm. e) směrnice (EU) 2016/1148, poskytovatel digitálních služeb musí být na základě ukazatelů, jako je například povaha jeho smluvních vztahů se zákazníkem či případně potenciální počet dotčených uživatelů, schopen určit, zda incident způsobil uživatelům závažné materiální či nemateriální škody, např. ve vztahu ke zdraví, bezpečnosti nebo poškození majetku.

6. Pro účely odstavců 1, 2, 3, 4 a 5 se nepožaduje, aby poskytovatelé digitálních služeb shromažďovali další informace, k nimž nemají přístup.

Článek 4

Významný dopad incidentu

1. Za incident, který má významný dopad, se považuje incident, u něž nastala alespoň jedna z těchto situací:
 - a) služba poskytovaná poskytovatelem digitálních služeb byla nedostupná v rozsahu větším než 5 000 000 uživatelských hodin, přičemž pojmem uživatelská hodina se vztahuje k počtu uživatelů v Unii, kteří byli dotčeni po dobu šedesáti minut;
 - b) incident vedl ke ztrátě integrity, autenticity nebo důvěrnosti uchovávaných, předávaných nebo zpracovávaných dat nebo souvisejících služeb, které nabízejí síť nebo informační systémy poskytovatele digitálních služeb nebo které jsou jejich prostřednictvím přístupné, a ovlivněno bylo více než 100 000 uživatelů v Unii;
 - c) incident vytvořil riziko pro veřejnou bezpečnost a ochranu nebo ztrátu života;
 - d) incident způsobil materiální škodu alespoň jednomu uživateli v Unii, přičemž škoda způsobená uvedenému uživateli překračuje 1 000 000 EUR;
2. Na základě osvědčených postupů shromážděných skupinou pro spolupráci v rámci svých úkolů podle čl. 11 odst. 3 směrnice (EU) 2016/1148 a na základě jednání podle čl. 11 odst. 3 písm. m) uvedené směrnice, může Komise přezkoumat mezní hodnoty uvedené v odstavci 1.

Článek 5

Vstup v platnost

1. Toto nařízení vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.
2. Použije se ode dne 10. května 2018.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 30. ledna 2018.

Za Komisi
předseda
Jean-Claude JUNCKER

ROZHODNUTÍ

ROZHODNUTÍ RADY (EU) 2018/152

ze dne 29. ledna 2018

o jmenování jedné náhradnice Výboru regionů, navržené Spolkovou republikou Německo

RADA EVROPSKÉ UNIE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie, a zejména na článek 305 této smlouvy,

s ohledem na návrh německé vlády,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Dne 26. ledna 2015, dne 5. února 2015 a dne 23. června 2015 přijala Rada rozhodnutí (EU) 2015/116 ⁽¹⁾, (EU) 2015/190 ⁽²⁾ a (EU) 2015/994 ⁽³⁾ o jmenování členů a náhradníků Výboru regionů na období od 26. ledna 2015 do 25. ledna 2020.
- (2) Po skončení funkčního období paní Anke SPOORENDONKOVÉ se uvolnilo místo náhradníka Výboru regionů,

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

Článek 1

Do Výboru regionů je na zbývající část funkčního období, tedy do 25. ledna 2020, jmenována jako náhradnice:

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

Článek 2

Toto rozhodnutí vstupuje v platnost dnem přijetí.

V Bruselu dne 29. ledna 2018.

Za Radu

předseda

R. PORODZANOV

⁽¹⁾ Rozhodnutí Rady (EU) 2015/116 ze dne 26. ledna 2015 o jmenování členů a náhradníků Výboru regionů na období od 26. ledna 2015 do 25. ledna 2020 (Úř. věst. L 20, 27.1.2015, s. 42).

⁽²⁾ Rozhodnutí Rady (EU) 2015/190 ze dne 5. února 2015 o jmenování členů a náhradníků Výboru regionů na období od 26. ledna 2015 do 25. ledna 2020 (Úř. věst. L 31, 7.2.2015, s. 25).

⁽³⁾ Rozhodnutí Rady (EU) 2015/994 ze dne 23. června 2015 o jmenování členů a náhradníků Výboru regionů na období od 26. ledna 2015 do 25. ledna 2020 (Úř. věst. L 159, 25.6.2015, s. 70).

OPRAVY

Oprava nařízení Komise (EU) 2017/1084 ze dne 14. června 2017, kterým se mění nařízení (EU) č. 651/2014, pokud jde o podporu na přístavní a letištní infrastrukturu, prahové hodnoty oznamovací povinnosti pro podporu na kulturu a zachování kulturního dědictví a pro podporu na sportovní a multifunkční rekreační infrastrukturu a režimy regionální provozní podpory pro nejvzdálenější regiony, a mění se nařízení (EU) č. 702/2014, pokud jde o výpočet způsobilých nákladů

(Úřední věstník Evropské unie L 156 ze dne 20. června 2017)

Strana 10, čl. 1 bod 11, ve znění návětí nahrazovaného čl. 15 odst. 4:

- místo:* „V nejvzdálenějších regionech poskytují režimy provozní podpory náhradu za dodatečné provozní náklady, které v uvedených regionech vznikly v přímém důsledku jednoho či více trvalých znevýhodnění uvedených v článku 349 Smlouvy, za předpokladu, že příjemci vyvíjejí v některém z nejvzdálenějších regionů svou hospodářskou činnost, pokud roční výše podpory na příjemce v rámci všech režimů provozní podpory uplatňovaných v rámci tohoto nařízení nepřesáhne jakýkoli z následujících procentních podílů:“;
- má být:* „V nejvzdálenějších regionech poskytují režimy provozní podpory náhradu za dodatečné provozní náklady, které v uvedených regionech vznikly v přímém důsledku jednoho či více trvalých znevýhodnění uvedených v článku 349 Smlouvy, za předpokladu, že příjemci vyvíjejí v některém z nejvzdálenějších regionů svou hospodářskou činnost, pokud roční výše podpory na příjemce v rámci všech režimů provozní podpory uplatňovaných v rámci tohoto nařízení nepřesáhne jeden z následujících procentních podílů:“.
-

ISSN 1977-0626 (elektronické vydání)
ISSN 1725-5074 (papírové vydání)



Úřad pro publikace Evropské unie
2985 Lucemburk
LUCSEMBURSKO

CS