



Sisukord

II Muud kui seadusandlikud aktid

RAHVUSVAHELISED LEPINGUD

- ★ Nõukogu otsus (EL) 2018/145, 9. oktoober 2017, Euroopa Ühenduse ja selle liikmesriikide, Albaania Vabariigi, Bosnia ja Hertsegoviina, Bulgaaria Vabariigi, endise Jugoslaavia Makedoonia Vabariigi, Horvaatia Vabariigi, Islandi Vabariigi, Montenegro Vabariigi, Norra Kuningriigi, Rumeenia, Serbia Vabariigi ning ÜRO Kosovo* missiooni vahelise Euroopa ühise lennunduspiirkonna (ECAA) rajamise mitmepoolse lepingu liidu nimel sõlmimise kohta 1
- ★ Nõukogu otsus (EL) 2018/146, 22. jaanuar 2018, ühelt poolt Euroopa Ühenduse ja selle liikmesriikide ning teiselt poolt Maroko Kuningriigi vahelise Euroopa – Vahemere piirkonna lennunduslepingu liidu nimel sõlmimise kohta 4

MÄÄRUSED

- ★ Nõukogu määrus (EL) 2018/147, 29. jaanuar 2018, millega muudetakse nõukogu määrust (EL) nr 1370/2013 seoses lõssipulbri kokkuostu suhtes kohaldatava koguselise piiranguga 6
- ★ Komisjoni delegeeritud määrus (EL) 2018/148, 27. september 2017, millega muudetakse Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EL) nr 978/2012 (üldiste tariifsete soodustuste kava kohaldamise kohta) II, III ja IV lisa 8
- ★ Komisjoni delegeeritud määrus (EL) 2018/149, 15. november 2017, millega muudetakse delegeeritud määrust (EL) 2016/1238 riikliku sekkumise raames kokkuostuks ja eraladustamistoetuse saamiseks kõlbliku piima ja kõlblike piimatoodete koostisele esitatavate nõuete ning asjaomaste toodete kvaliteedinäitajate osas 11

* Kõnealune nimetus ei piira seisukohti staatuse suhtes ning on kooskõlas ÜRO Julgeolekunõukogu resolutsiooniga 1244 (1999) ja Rahvusvahelise Kohtu arvamusega Kosovo iseseisvusdeklaratsiooni kohta.

- ★ Komisjoni rakendusmäärus (EL) 2018/150, 30. jaanuar 2018, millega muudetakse rakendusmäärust (EL) 2016/1240 seoses riikliku sekkumise ja eraladustamistoetuse jaoks kõlbliku piima ja kõlblike piimatoodete analüüsimise ning kvaliteedi hindamise meetoditega 14
- ★ Komisjoni rakendusmäärus (EL) 2018/151, 30. jaanuar 2018, millega nähakse ette Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivi (EL) 2016/1148 kohaldamise eeskirjad, et täpsustada elemendid, mida digitaalse teenuse osutajad peavad võrgu- ja infosüsteemide turvalisust ohustavate riskide haldamiseks arvesse võtma, ja parameetrid, mille põhjal tehakse kindlaks intsidendi mõju olulisus 48

OTSUSED

- ★ Nõukogu otsus (EL) 2018/152, 29. jaanuar 2018, millega nimetatakse ametisse Saksamaa Liitvabariigi esitatud Regioonide Komitee asendusliige 52

Parandused

- ★ Komisjoni 14. juuni 2017. aasta määruse (EL) 2017/1084 (millega muudetakse määrust (EL) nr 651/2014 sadama- ja lennujaamataristule antava abi, kultuuri edendamiseks ja kultuuripärandi säilitamiseks antavast abist teavitamise künnise, spordi- ja mitmeotstarbelise vaba aja veetmise taristule antava abi ja äärepoolseimaid piirkondi käsitlevate regionaalse tegevusabi kavade osas ning millega muudetakse määrust (EL) nr 702/2014 abikõlblike kulude arvutamise osas) parandus (ELT L 156, 20.6.2017) 53

II

(Muud kui seadusandlikud aktid)

RAHVUSVAHELISED LEPINGUD

NÕUKOGU OTSUS (EL) 2018/145,

9. oktoober 2017,

Euroopa Ühenduse ja selle liikmesriikide, Albaania Vabariigi, Bosnia ja Hertsegoviina, Bulgaaria Vabariigi, endise Jugoslaavia Makedoonia Vabariigi, Horvaatia Vabariigi, Islandi Vabariigi, Montenegro Vabariigi, Norra Kuningriigi, Rumeenia, Serbia Vabariigi ning ÜRO Kosovo * missiooni vahelise Euroopa ühise lennunduspiirkonna (ECAA) rajamise mitmepoolse lepingu liidu nimel sõlmimise kohta

EUROOPA LIIDU NÕUKOGU,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut, eriti selle artikli 100 lõiget 2 koostoimes artikli 218 lõike 6 punktiga a,

võttes arvesse Euroopa Komisjoni ettepanekut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi nõusolekut ⁽¹⁾

ning arvestades järgmist:

- (1) Euroopa Komisjon pidas Euroopa Ühenduse ja liikmesriikide nimel läbirääkimisi Euroopa Ühenduse ja selle liikmesriikide, Albaania Vabariigi, Bosnia ja Hertsegoviina, Bulgaaria Vabariigi, endise Jugoslaavia Makedoonia Vabariigi, Horvaatia Vabariigi, Islandi Vabariigi, Montenegro Vabariigi, Norra Kuningriigi, Rumeenia, Serbia Vabariigi ning ÜRO Kosovo missiooni vahelise Euroopa ühise lennunduspiirkonna (ECAA) rajamise mitmepoolse lepingu („leping“) üle.
- (2) Leping allkirjastati ühenduse poolt 9. juunil 2006, tingimusel et see sõlmitakse hilisemal kuupäeval, vastavalt nõukogu ja nõukogus kokku tulnud Euroopa Liidu liikmesriikide esindajate otsusele 2006/682/EÜ ⁽²⁾.
- (3) Leping on ratifitseerinud kõik liikmesriigid.
- (4) Bulgaaria Vabariik, Rumeenia ja Horvaatia Vabariik on liiduga ühinemise tulemusel saanud liikmesriikideks ning seega on nad vastavalt lepingu artikli 31 lõikele 2 lakanud olemast assotsiatsioonilepingu osalised. Seda asjaolu tuleks meelde tuletada lepingu heakskiitmiskirja hoiuleandmise ajal esitatavas teates.

* Kõnealune nimetus ei piira seisukohti staatuse suhtes ning on kooskõlas ÜRO Julgeolekunõukogu resolutsiooniga 1244 (1999) ja Rahvusvahelise Kohtu arvamusega Kosovo iseseisvusdeklaratsiooni kohta.

⁽¹⁾ ELT C 81 E, 15.3.2011, lk 5.

⁽²⁾ Nõukogu ja nõukogus kokku tulnud Euroopa Liidu liikmesriikide esindajate 9. juuni 2006. aasta otsus 2006/682/EÜ, mis käsitleb Euroopa Ühenduse ja selle liikmesriikide, Albaania Vabariigi, Bosnia ja Hertsegoviina, Bulgaaria Vabariigi, endise Jugoslaavia Makedoonia Vabariigi, Horvaatia Vabariigi, Islandi Vabariigi, Montenegro Vabariigi, Norra Kuningriigi, Rumeenia, Serbia Vabariigi ning ÜRO Kosovo missiooni vahelise Euroopa ühise lennunduspiirkonna (ECAA) rajamise mitmepoolse lepingu allkirjastamist ja ajutist kohaldamist (ELT L 285, 16.10.2006, lk 1).

- (5) Mis puutub lepingu artikli 18 alusel loodud ühiskomitees vastuvõetavate lepingu I lisa muudatustesse, millega üksnes lisatakse liidu õigusakte lepingu kõnealusesse lisasse, siis õigus sellised muudatused pärast nõukogu määratud erikomiteega konsulteerimist liidu nimel heaks kiita tuleks anda komisjonile.
- (6) Kõikidel muudel juhtudel tuleks liidu nimel ühiskomitees võetav seisukoht liidu pädevusse kuuluvates küsimustes kindlaks määrata iga juhtumi puhul eraldi kooskõlas Euroopa Liidu toimimise lepingu („ELi toimimise leping“) asjakohaste sätetega.
- (7) Võttes arvesse, et lepinguosalisel on nii liit kui ka liikmesriigid, on oluline nende tihe koostöö. Tiheda koostöö ja välistegevuse ühtsuse tagamiseks ühiskomitees ning ilma et see piiraks aluslepingute, eelkõige Euroopa Liidu lepingu artikli 16 lõike 1 ja ELi toimimise lepingu artikli 218 lõike 9 kohaldamist, peaks ühiskomitees liidu ja liikmesriikide nimel võetavate seisukohtade kooskõlastamine küsimustes, mis kuuluvad nii liidu kui ka liikmesriikide pädevusse, toimuma enne iga ühiskomitee koosolekut, kus sellist küsimust käsitletakse.
- (8) Otsuse 2006/682/EÜ artikkel 2 sisaldab sätteid ühiskomitees võetavate seisukohtade kindlaksmääramiseks lepingu ajutise kohaldamise ajal. Pidades silmas Euroopa Kohtu 28. aprilli 2015. aasta otsust kohtuasjas C-28/12, komisjon vs nõukogu, (¹) peaks kõnealuste sätete kohaldamise lõpetama käesoleva otsuse jõustumise päeval.
- (9) Leping tuleks heaks kiita,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA OTSUSE:

Artikkel 1

1. Euroopa Ühenduse ja selle liikmesriikide, Albaania Vabariigi, Bosnia ja Hertsegoviina, Bulgaaria Vabariigi, endise Jugoslaavia Makedoonia Vabariigi, Horvaatia Vabariigi, Islandi Vabariigi, Montenegro Vabariigi, Norra Kuningriigi, Rumeenia, Serbia Vabariigi ning ÜRO Kosovo missiooni vaheline Euroopa ühise lennunduspiirkonna (ECAA) rajamise mitmepoolne leping kiidetakse liidu nimel heaks (²).

2. Nõukogu eesistuja määrab isiku(d), kes on volitatud liidu nimel hoiule andma lepingu artikli 29 lõikes 2 sätestatud heakskiitmiskirja (³) ja esitama järgmise teate:

„1. Lissaboni lepingu 1. detsembril 2009 jõustumise tulemusena on Euroopa Liit asendanud Euroopa Ühenduse ja on selle õigusjärglane, võttes nimetatud kuupäevast üle kõik Euroopa Ühenduse õigused ja kohustused. Seega tuleb vajaduse korral lepingu tekstis esinevaid viiteid Euroopa Ühendusele käsitada viidetena Euroopa Liidule.

2. Bulgaaria Vabariik, Rumeenia ja Horvaatia Vabariik on Euroopa Liiduga ühinemise tulemusel saanud Euroopa Liidu liikmesriikideks ning seega on nad vastavalt lepingu artikli 31 lõikele 2 lakanud olemast assotsiatsioonilepingu osalisel.“

Artikkel 2

Liidu seisukoha ühiskomitee poolt artikli 17 alusel tehtavate selliste otsuste suhtes, millega vajalikke tehnilisi kohandusi arvesse võttes üksnes lisatakse liidu õigusakte lepingu I lisasse, võtab pärast konsulteerimist nõukogu määratud erikomiteega vastu komisjon.

Artikkel 3

Otsuse 2006/682/EÜ artikli 2 kohaldamine lõpeb käesoleva otsuse jõustumise päeval.

(¹) ECLI:EU:C:2015:282.

(²) Leping koos selle allkirjastamise ja ajutise kohaldamise otsusega on avaldatud *Euroopa Liidu Teatajas* (ELT L 285, 16.10.2006, lk 3).

(³) Nõukogu peasekretariaat avaldab lepingu jõustumise kuupäeva *Euroopa Liidu Teatajas*.

Artikkel 4

Käesolev otsus jõustub selle vastuvõtmise päeval.

Luxembourg, 9. oktoober 2017

Nõukogu nimel

eesistuja

S. KIISLER

NÕUKOGU OTSUS (EL) 2018/146,**22. jaanuar 2018,****ühelt poolt Euroopa Ühenduse ja selle liikmesriikide ning teiselt poolt Maroko Kuningriigi vahelise Euroopa – Vahemere piirkonna lennunduslepingu liidu nimel sõlmimise kohta**

EUROOPA LIIDU NÕUKOGU,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut, eriti selle artikli 100 lõiget 2 koostoimes artikli 218 lõike 6 punktiga a,

võttes arvesse Euroopa Komisjoni ettepanekut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi nõusolekut ⁽¹⁾

ning arvestades järgmist:

- (1) Komisjon pidas liidu ja liikmesriikide nimel Maroko Kuningriigiga läbirääkimisi Euroopa – Vahemere piirkonna lennunduslepingu („leping“) üle kooskõlas nõukogu otsusega, millega antakse komisjonile volitused läbirääkimiste alustamiseks.
- (2) Lepingule kirjutati alla 12. detsembril 2006 vastavalt nõukogu ja nõukogus kokku tulnud liikmesriikide valitsuste esindajate otsusele 2006/959/EÜ ⁽²⁾. Kõik liikmesriigid peale Bulgaaria, Rumeenia ja Horvaatia on lepingu ratifitseerinud. Kõnealuste liikmesriikide ühinemine lepinguga on kavandatud kooskõlas nende vastavate ühinemisaktide artikli 6 lõikega 2.
- (3) Mis puutub lepingu artikli 22 alusel asutatud ühiskomitees vastuvõetavate lepingu teatavate lisade muudatustesse, siis õigus sellised muudatused pärast nõukogu määratud erikomiteega konsulteerimist liidu nimel heaks kiita tuleks anda komisjonile.
- (4) Kõikidel muudel juhtudel tuleks liidu nimel ühiskomitees võetav seisukoht liidu pädevusse kuuluvates küsimustes kindlaks määrata iga juhtumi puhul eraldi kooskõlas Euroopa Liidu toimimise lepingu („ELi toimimise leping“) asjakohaste sätetega.
- (5) Võttes arvesse, et lepinguosalistel on nii liit ja kui ka liikmesriigid, on oluline nende tihed koostöö. Tiheda koostöö ja välistegevuse ühtsuse tagamiseks ühiskomitees ning ilma et see piiraks aluslepingute, eelkõige Euroopa Liidu lepingu artikli 16 lõike 1 ja ELi toimimise lepingu artikli 218 lõike 9 kohaldamist, peaks ühiskomitees liidu ja liikmesriikide nimel võetavate seisukohtade kooskõlastamine küsimustes, mis kuuluvad nii liidu kui ka liikmesriikide pädevusse, toimuma enne iga ühiskomitee koosolekut, kus sellist küsimust käsitletakse.
- (6) Otsuse 2006/959/EÜ artiklid 2–5 sisaldavad sätteid nõukogu poolt otsuste tegemise kohta erinevates lepingus sätestatud küsimustes, sealhulgas seoses ühiskomitees võetavate seisukohtade kindlaksmääramise ja liikmesriikide teavitamiskohustustega, lepingu ajutise kohaldamise ajal. Kõnealused sätted kas ei ole vajalikud või tuleks nende kohaldamine lõpetada, pidades silmas Euroopa Kohtu 28. aprilli 2015. aasta otsust kohtuasjas C-28/12, komisjon vs nõukogu ⁽³⁾. Seetõttu on asjakohane, et kõikide nimetatud sätete kohaldamine lõpeb käesoleva otsuse jõustumise päeval.
- (7) Leping tuleks heaks kiita,

⁽¹⁾ ELT C 81 E, 15.3.2011, lk 5.⁽²⁾ Nõukogu ja nõukogus kokku tulnud liikmesriikide valitsuste esindajate 4. detsembri 2006. aasta otsus 2006/959/EÜ ühelt poolt Euroopa Ühenduse ja selle liikmesriikide ning teiselt poolt Maroko Kuningriigi vahelisele Euroopa–Vahemere lennunduslepingule allakirjutamise ja selle ajutise kohaldamise kohta (ELT L 386, 29.12.2006, lk 55).⁽³⁾ ECLI:EU:C:2015:282.

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA OTSUSE:

Artikkel 1

1. Ühelt poolt Euroopa Ühenduse ja selle liikmesriikide ning teiselt poolt Maroko Kuningriigi vaheline Euroopa – Vahemere piirkonna lennundusleping ⁽¹⁾ kiidetakse liidu nimel heaks.
2. Nõukogu eesistujal on õigus määrata isik(ud), kes on volitatud esitama Maroko Kuningriigile lepingu artiklis 30 sätestatud diplomaatilised noodid ⁽²⁾ ning järgmise teate:

„Lissaboni lepingu 1. detsembril 2009 jõustumise tulemusena on Euroopa Liit asendanud Euroopa Ühenduse ja on selle õigusjärglane, võttes nimetatud kuupäevast üle kõik Euroopa Ühenduse õigused ja kohustused. Seega tuleb vajaduse korral lepingu tekstis esinevaid viiteid Euroopa Ühendusele käsitada viidetena Euroopa Liidule.“

Artikkel 2

Seisukoha, mille liit võtab lepingu artikli 22 alusel asutatud ühiskomitees seoses lepingu lisade (v.a I lisa (Kokkulepitud teenused ja kindlaksmääratud lennuliinid) ja IV lisa (Üleminekusätted)) muutmise, võtab komisjon vastu pärast konsulteerimist nõukogu määratud erikomiteega.

Artikkel 3

Otsuse 2006/959/EÜ artiklite 2–5 kohaldamine lõpeb käesoleva otsuse jõustumise päeval.

Artikkel 4

Käesolev otsus jõustub selle vastuvõtmise päeval.

Brüssel, 22. jaanuar 2018

Nõukogu nimel
eesistuja
F. MOGHERINI

⁽¹⁾ Leping koos selle allakirjutamise ja ajutise kohaldamise otsusega on avaldatud *Euroopa Liidu Teatajas* (ELT L 386, 29.12.2006, lk 57).
⁽²⁾ Nõukogu peasekretariaat avaldab lepingu jõustumise kuupäeva *Euroopa Liidu Teatajas*.

MÄÄRUSED

NÕUKOGU MÄÄRUS (EL) 2018/147,

29. jaanuar 2018,

millega muudetakse nõukogu määrust (EL) nr 1370/2013 seoses lõssipulbri kokkuostu suhtes kohaldatava koguselise piiranguga

EUROOPA LIIDU NÕUKOGU,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut, eriti selle artikli 43 lõiget 3,

võttes arvesse Euroopa Komisjoni ettepanekut

ning arvestades järgmist:

- (1) Lõssipulbri riiklikud sekkumisvarud liidus olid 2017. aasta juuli lõpus 357 359 tonni. Lisaks sellele pakuti 30. septembril 2017 lõppenud sekkumisperioodil kokkuostuks 22 710 tonni kindlaksmääratud hinnaga lõssipulbrit.
- (2) Tulenevalt eriti suurest nõudlusest või järele süvenes piima- ja piimatoodete sektoris enneolematu lõhe rasva ja valgu hindade vahel.
- (3) Liidu piimatarned peaksid prognooside kohaselt 2018. aastal suurenema, mille tulemusena suureneb või ja lõssipulbri tootmine.
- (4) Põllumajandustootjatele makstav toorpiima hind jääb 2018. aastal tõenäoliselt tasemele, mis muudab piimakarjakaasvatuse tasuvaks praeguse suure nõudluse tõttu või ja juustu osas, kuigi piimavalgu hind on suhteliselt madal.
- (5) Need turutingimused loovad 2018. aastaks erakorralise olukorra, mida tuleb eriti arvesse võtta riikliku sekkumise mehhanismi rakendamisel piimatoodete valdkonnas.
- (6) Nõukogu määruse (EL) nr 1370/2013⁽¹⁾ artikliga 3 on kehtestatud koguseline piirang lõssipulbri kokkuostuks kindlaksmääratud hinnaga vastavalt kõnealuse määruse artiklile 2. Kui kõnealune piirang on saavutatud, toimub kokkuost hankemenetluse teel, et määrata kindlaks kokkuostuhinna ülemmäär.
- (7) Et vältida kindlaksmääratud hinnaga lõssipulbri kokkuostu olukorras, kus see ei oleks kooskõlas turvavõrgu eesmärgiga, peaks kogu riiklik sekkumine lõssipulbri osas olema korraldatud hankemenetluse teel. Seega peaks 2018. aastal olema kindlaksmääratud hinnaga lõssipulbri kokkuostu koguseline piirang null tonni.
- (8) Määrust (EL) nr 1370/2013 tuleks seetõttu vastavalt muuta.
- (9) Selle tagamiseks, et käesoleva määrusega ette nähtud ajutisel meetmel oleks vahetu mõju turule ja et see võimaldaks turuosalisi õigel ajal teavitada enne järgmise sekkumismeetme algust, peaks käesolev määrus jõustuma järgmisel päeval pärast selle avaldamist,

⁽¹⁾ Nõukogu 16. detsembri 2013. aasta määrus (EL) nr 1370/2013, millega määratakse kindlaks põllumajandustoodete ühise turukorraldusega seotud teatavate toetuste kehtestamise meetmed (ELT L 346, 20.12.2013, lk 12).

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Määruse (EL) nr 1370/2013 artikli 3 lõikesse 1 lisatakse järgmine lõik:

„Erandina esimesest lõigust on 2018. aastal kindlaksmääratud hinnaga lõssipulbri kokkuostu koguseline piirang 0 tonni.“

Artikkel 2

Käesolev määrus jõustub järgmisel päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 29. jaanuar 2018

Nõukogu nimel
eesistuja
R. PORODZANOV

KOMISJONI DELEGEERITUD MÄÄRUS (EL) 2018/148,**27. september 2017,****millega muudetakse Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EL) nr 978/2012 (üldiste tariifsete soodustuste kava kohaldamise kohta) II, III ja IV lisa**

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 25. oktoobri 2012. aasta määrust (EL) nr 978/2012 üldiste tariifsete soodustuste kava kohaldamise ning nõukogu määruse (EÜ) nr 732/2008 kehtetuks tunnistamise kohta, ⁽¹⁾ eriti selle artikli 5 lõiget 3, artikli 10 lõiget 5 ja artikli 17 lõiget 2,

ning arvestades järgmist:

- (1) Määruse (EL) nr 978/2012 artiklis 4 on sätestatud kriteeriumid, mille raames antakse tariifseid soodustusi üldiste tariifsete soodustuste kava (edaspidi „kava“) üldise korra alusel.
- (2) Määruse (EL) nr 978/2012 artikli 4 lõike 1 punktides a ja b on vastavalt sätestatud, et kui riik on maailmapanga liigituse kohaselt kõrge või üle keskmise sissetulekuga riik kolmel järjestikusel aastal või kui riigi suhtes kohaldatakse turulepääsu sooduskorda kava tariifsete soodustustega samadel või nendest soodsamatel tingimustel peaaegu kogu kaubavahetuse ulatuses, ei tuleks tema suhtes kava alusel antavaid soodustusi kohaldada.
- (3) Määruse (EL) nr 978/2012 artikli 1 lõike 2 punktis a osutatud üldise korra alusel soodustatud riikide loetelu on kehtestatud kõnealuse määruse II lisas. Määruse (EL) nr 978/2012 artikli 5 lõikes 2 on sätestatud, et II lisa tuleb iga aasta 1. jaanuariks läbi vaadata. Läbivaatamisel tuleks vastavalt kõnealuse määruse artiklis 4 sätestatud kriteeriumidele arvesse võtta muutusi soodustatud riikide majanduses, arengus või kaubandustingimustes.
- (4) Vastavalt määruse (EL) nr 978/2012 artikli 5 lõikele 2 tuleb kava üldise korra alusel soodustatud riigile ja ettevõtjatele anda piisavalt aega, et kohaneda kava alusel antud staatuse läbivaatamisega. Vastavalt artikli 4 lõike 1 punktile a jätkatakse kava üldise korra kohaldamist ühe aasta jooksul pärast riigi staatuse muutmise jõustumise kuupäeva ja vastavalt artikli 4 lõike 1 punktis b sätestatud kahe aasta jooksul pärast liidu turule pääsu sooduskorra kohaldamise kuupäeva.
- (5) Maailmapank on liigitanud Paraguay aastatel 2015, 2016 ja 2017 üle keskmise sissetulekuga riikide hulka. Seega ei kvalifitseeru Paraguay vastavalt määruse (EL) nr 978/2012 artikli 4 lõike 1 punktile a enam kava üldise korra alusel soodustatud riigi staatusega riigiks ning ta tuleks alates 1. jaanuarist 2019 välja jätta kõnealuse määruse II lisas sätestatud üldise korra alusel soodustatud riikide loetelust.
- (6) Turulepääsu sooduskorda hakati Côte d'Ivoire'i suhtes kohaldama 3. septembril 2016, Svaasimaa suhtes 10. oktoobril 2016 ning Ghana suhtes 15. detsembril 2016. Seega tuleks Côte d'Ivoire, Svaasimaa ja Ghana vastavalt määruse (EL) nr 978/2012 artikli 4 lõike 1 punktile b kõnealuse määruse II lisast välja jätta alates 1. jaanuarist 2019.
- (7) Määruse (EL) nr 978/2012 artikli 9 lõikega 1 on kehtestatud teatavad konkreetseid abikõlblikkuse kriteeriumid tariifsete soodustuste andmiseks säästvat arengut ja head valitsemistava stimuleeriva erikorra (edaspidi „GSP+“) alusel. GSP+ alusel soodustatud riikide loetelu on esitatud määruse (EL) nr 978/2012 III lisas.
- (8) Kuna Paraguay ei kuulu alates 1. jaanuarist 2019 enam kava üldise korra alusel soodustatud riikide hulka, ei kuulu ta vastavalt määruse (EL) nr 978/2012 artikli 9 lõikele 1 enam ka GSP+ alusel soodustatud riikide hulka. Seepärast tuleks Paraguay alates 1. jaanuarist 2019 määruse (EL) nr 978/2012 III lisast välja jätta.

⁽¹⁾ ELTL 303, 31.10.2012, lk 1.

- (9) Määruse (EL) nr 978/2012 artikli 17 lõikes 1 on sätestatud, et riigi suhtes, mille ÜRO on tunnistanud vähim arenenud riigiks, tuleks kohaldada tariifseid soodustusi vähim arenenud riikide suhtes kohaldatava erikorra „Kõik peale relvade“ (edaspidi „EBA“) alusel. EBA alusel soodustatud riikide loetelu on esitatud kõnealuse määruse IV lisas.
- (10) ÜRO jättis Ekvatoriaal-Guinea vähim arenenud riikide kategooriast välja 4. juunil 2017. Seega ei kvalifitseeru Ekvatoriaal-Guinea enam määruse (EL) nr 978/2012 artikli 17 lõike 1 kohaselt EBA soodustatud riigi staatusega riigiks ning ta tuleks kõnealuse määruse IV lisast välja jätta. Vastavalt määruse (EL) nr 978/2012 artikli 17 lõikele 2 tuleb Ekvatoriaal-Guinea EBA alusel soodustatud riikide loetelust välja jätta pärast käesoleva määruse jõustumisele järgnevat kolmeaastast üleminekuperioodi, nimelt 1. jaanuaril 2021.
- (11) Lisaks oli Ekvatoriaal-Guinea ka maailmapanga liigituse kohaselt 2015. aastal kõrge sissetulekuga riik ning 2016. ja 2017. aastal üle keskmise sissetulekuga riik. Seega ei kvalifitseeru Ekvatoriaal-Guinea vastavalt määruse (EL) nr 978/2012 artikli 4 lõike 1 punktile a enam kava üldise korra alusel soodustatud riigi staatusega riigiks ning ta tuleks alates 1. jaanuarist 2021 välja jätta kõnealuse määruse II lisas sätestatud üldise korra alusel soodustatud riikide loetelust,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Määruse (EL) nr 978/2012 muutmine

Määrust (EL) nr 978/2012 muudetakse järgmiselt.

1. II lisa veergudest A ja B jäetakse välja järgmised tähestikulised koodid ja neile vastavad riigid.

CI Côte d'Ivoire

GH Ghana

PY Paraguay

SZ Svaasimaa

2. III lisa veergudest A ja B jäetakse välja järgmine tähestikuline kood ja sellele vastav riik.

PY Paraguay

3. II ja IV lisa veergudest A ja B jäetakse välja järgmine tähestikuline kood ja sellele vastav riik.

GQ Ekvatoriaal-Guinea

Artikkel 2

Jõustumine ja kohaldamine

Käesolev määrus jõustub 1. jaanuaril 2018.

Artikli 1 lõikeid 1 ja 2 kohaldatakse alates 1. jaanuarist 2019.

Artikli 1 lõiget 3 kohaldatakse alates 1. jaanuarist 2021.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 27. september 2017

Komisjoni nimel
president
Jean-Claude JUNCKER

KOMISJONI DELEGEERITUD MÄÄRUS (EL) 2018/149,**15. november 2017,****millega muudetakse delegeeritud määrust (EL) 2016/1238 riikliku sekkumise raames kokkuostuks ja eraladustamistoetuse saamiseks kõlbliku piima ja kõlblike piimatoodete koostisele esitatavate nõuete ning asjaomaste toodete kvaliteedinäitajate osas**

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 17. detsembri 2013. aasta määrust (EL) nr 1308/2013, millega kehtestatakse põllumajandustoodete ühine turukorraldus ning millega tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrused (EMÜ) nr 922/72, (EMÜ) nr 234/79, (EÜ) nr 1037/2001 ja (EÜ) nr 1234/2007, (¹) eriti selle artikli 19 lõike 1 punkti a,

ning arvestades järgmist:

- (1) Komisjoni delegeeritud määrusega (EL) 2016/1238 (²) kehtestatakse riikliku sekkumise raames kokkuostuks ja eraladustamistoetuse saamiseks kõlbliku piima ja kõlblike piimatoodete koostisele esitatavad nõuded ning asjaomaste toodete kvaliteedinäitajad.
- (2) Kuna piima ja piimatoodete analüüsiks ja kvaliteedi hindamiseks kasutatavaid meetodeid on tehniliselt täiustatud ning selleks, et tagada järjepidevus olemasolevate liidu õigusaktidega piimatoodete hügieeninõuete kohta, on vaja läbi vaadata nõuded teatavate riikliku sekkumise raames kokkuostuks ja eraladustamistoetuse saamiseks kõlblike piimatoodete koostisele ja nende piimatoodete kvaliteedinäitajad ning neid ajakohastada.
- (3) Seepärast tuleks delegeeritud määruse (EL) 2016/1238 IV ja V lisa vastavalt muuta,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Delegeeritud määruse (EL) 2016/1238 lisasid muudetakse järgmiselt:

- a) IV lisa II osa asendatakse käesoleva määruse I lisa esitatud tekstiga;
- b) V lisa II osa asendatakse käesoleva määruse II lisa esitatud tekstiga.

*Artikkel 2*Käesolev määrus jõustub seitsmendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 15. november 2017

Komisjoni nimel
president
Jean-Claude JUNCKER

⁽¹⁾ ELT L 347, 20.12.2013, lk 671.

⁽²⁾ Komisjoni 18. mai 2016. aasta delegeeritud määrus (EL) 2016/1238, millega täiendatakse Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrust (EL) nr 1308/2013 riikliku sekkumise ja eraladustamistoetuse osas (ELT L 206, 30.7.2016, lk 15).

I LISA

„II OSA

Nõuded koostisele ja kvaliteedinäitajad

Või on vesi-õlis-tüüpi tahke emulsioon, mille koostis ja kvaliteedinäitajad on järgmised.

Parameetrid	Sisaldus ja kvaliteedinäitajad
Rasvasisaldus	vähemalt 82 %
Veesisaldus	kuni 16 %
Rasvata kuivainete sisaldus	kuni 2 %
Rasva happesus	kuni 1,2 mmol 100 g rasva kohta
Peroksiid arv	kuni 0,3 meq hapnikku 1 000 g rasva kohta
Mittepiimarasv	triglütseriidide analüüsiga ei ole avastatav
Organoleptilised omadused	välimuse, maitse ja lõhna ning konsistentsi eest vähemalt 4 punkti 5st“

II LISA

„II OSA

Nõuded koostisele ja kvaliteedinäitajad

Parameetrid	Sisaldus ja kvaliteedinäitajad
Valgusisaldus	vähemalt 34,0 % rasvata kuivainest
Rasvasisaldus	kuni 1,00 %
Veesisaldus	kuni 3,5 %
Tiitritav happesus ml detsinormaalse naatriumhüdroksiidilahuse kohta	kuni 19,5 ml
Laktaadisisaldus	kuni 150 mg / 100 g
Fosfataastest	negatiivne, st fosfataasi aktiivsus alla 350 mU liitri taastatud piima kohta
Mittelahustuvuse indeks	kuni 0,5 ml (24 °C)
Kõrbenud osakesed	kuni 15,0 mg, s.o vähemalt ketas B
Mikroorganismide üldarv	kuni 40 000 CFU grammi kohta
Petipiim ⁽¹⁾	puudub ⁽²⁾
Laabivadak ⁽³⁾	puudub
Happevadak ⁽³⁾	puudub ⁽⁴⁾ või kuni 150 mg/100 g ⁽⁵⁾
Maitse ja lõhn	puhas
Välimus	valge või veidi kollakas värvus, lisanditeta ja värviliste osakesteta

⁽¹⁾ Petipiim – või tootmise kõrvalsaadus, mis tekib pärast koore kloppimist ja tahke rasva eraldamist.

⁽²⁾ Petipiima puudumist saab kindlaks teha vähemalt kord nädalas ettevõttes teostatava tootmisplaani kohapealse etteteatamiseta kontrolli või lõpptoote laboratoorse analüüsi abil, mille tulemus on kuni 69,31 mg dipalmitoüülfosfatidüületanolamiini (PEDP) 100 g pulbri kohta.

⁽³⁾ Vadak – juustu või kaseiini tootmise kõrvalsaadus, mis tekib laabi või hapete toimetel ja/või keemilis-füüsikaliste protsesside tulemusena.

⁽⁴⁾ Kui tehakse kohapealseid etteteatamiseta kontrole.

⁽⁵⁾ Kui kohaldatakse standardit ISO 8069.“

KOMISJONI RAKENDUSMÄÄRUS (EL) 2018/150,**30. jaanuar 2018,****millega muudetakse rakendusmäärust (EL) 2016/1240 seoses riikliku sekkumise ja eraladustamistoetuse jaoks kõlbliku piima ja kõlblike piimatoodete analüüsimise ning kvaliteedi hindamise meetoditega**

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 17. detsembri 2013. aasta määrust (EL) nr 1306/2013 ühise põllumajanduspoliitika rahastamise, haldamise ja seire kohta ning millega tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrused (EMÜ) nr 352/78, (EÜ) nr 165/94, (EÜ) nr 2799/98, (EÜ) nr 814/2000, (EÜ) nr 1290/2005 ja (EÜ) nr 485/2008, ⁽¹⁾ eriti selle artikli 62 lõike 2 punkti i,

ning arvestades järgmist:

- (1) Komisjoni delegeeritud määruses (EL) 2016/1238 ⁽²⁾ ja komisjoni rakendusmääruses (EL) 2016/1240 ⁽³⁾ on sätestatud riikliku sekkumise ja eraladustamistoetuse eeskirjad. Komisjoni määruses (EÜ) nr 273/2008 ⁽⁴⁾ on sätestatud meetodid, mida kasutatakse, et hinnata piima ja piimatoodete vastavust kõnealustes määrustes sätestatud kõlblikkusnõuetele seoses riikliku sekkumise ja eraladustamistoetusega.
- (2) Võttes arvesse piima ja piimatoodete analüüsi- ja kvaliteedihindamismetoodika tehnilist arengut, tuleks teha sisulisi muutusi, et kõnealust metoodikat lihtsustada ja ajakohastada viited ISO standarditele. Selguse ja tõhususe huvides ning võttes arvesse määruse (EÜ) nr 273/2008 sätete muutmise ulatust ja tehnilist iseloomu, tuleks kõnealuse määruse asjaomased sätted lisada rakendusmäärusesse (EL) 2016/1240.
- (3) Et tagada uute standardite ja meetodite ühtne järgimine kõigis liikmesriikides, tuleks laboritele anda piisavalt aega menetluste läbivaatamiseks ja ajakohastatud meetodite rakendamiseks.
- (4) Seepärast tuleks rakendusmäärust (EL) 2016/1240 vastavalt muuta.
- (5) Õiguskindluse huvides tuleks määrus (EÜ) nr 273/2008 kehtetuks tunnistada.
- (6) Käesoleva määrusega ettenähtud meetmed on kooskõlas põllumajandusturgude ühise korralduse komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Rakendusmäärust (EL) 2016/1240 muudetakse järgmiselt.

1) Artiklit 4 muudetakse järgmiselt:

a) lõiget 1 muudetakse järgmiselt:

i) punkt d asendatakse järgmisega:

„d) või puhul käesoleva määruse IV lisa I ja Ia osa;“

ii) punkt e asendatakse järgmisega:

„e) lõssipulbri puhul käesoleva määruse V lisa I ja Ia osa.“;

⁽¹⁾ ELT L 347, 20.12.2013, lk 549.⁽²⁾ Komisjoni 18. mai 2016. aasta delegeeritud määrus (EL) 2016/1238, millega täiendatakse Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrust (EL) nr 1308/2013 riikliku sekkumise ja eraladustamistoetuse osas (ELT L 206, 30.7.2016, lk 15).⁽³⁾ Komisjoni 18. mai 2016. aasta rakendusmäärus (EL) 2016/1240, millega kehtestatakse Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EL) nr 1308/2013 rakenduseeskirjad riikliku sekkumise ja eraladustamistoetuse osas (ELT L 206, 30.7.2016, lk 71).⁽⁴⁾ Komisjoni 5. märtsi 2008. aasta määrus (EÜ) nr 273/2008, millega kehtestatakse nõukogu määruse (EÜ) nr 1255/1999 üksikasjalikud rakenduseeskirjad piima ja piimatoodete analüüsimise ning kvaliteedi hindamise meetodite kohta (ELT L 88, 29.3.2008, lk 1).

b) lõige 2 asendatakse järgmisega:

„2. Meetodid, mida riikliku sekkumise puhul kasutatakse vastavalt I, IV ja V lisas osutatud teravilja, või ja lõssipulbri kvaliteedi määramiseks, peavad vastama asjaomaste Euroopa või rahvusvaheliste standardite viimastele versioonidele, mis on kehtinud vähemalt kuus kuud enne riikliku sekkumise ajavahemiku esimest päeva, nagu määratletud määruse (EL) nr 1308/2013 artiklis 12.“

2) Lisatakse artikkel 60a:

„Artikkel 60a

Riikliku sekkumise ja eraladustamistoetusega seotud piima ja piimatoodete kontrollide erisätted

1. Või, lõssipulbri ja juustu kõlblikkus eraladustamistoetuse saamiseks tehakse kindlaks vastavalt VI, VII ja VIII lisaga kehtestatud meetoditele.

Kõnealused meetodid peavad vastama asjaomaste Euroopa või rahvusvaheliste standardite viimastele versioonidele, mis on kehtinud vähemalt kuus kuud enne riikliku sekkumise ajavahemiku esimest päeva, nagu määratletud määruse (EL) nr 1308/2013 artiklis 12.

2. Käesoleva määrusega sätestatud meetodite abil läbi viidud kontrollide tulemusi hinnatakse vastavalt IX lisale.“

3) Lisasid muudetakse vastavalt käesoleva määruse lisale.

Artikkel 2

Määrus (EÜ) nr 273/2008 tunnistatakse kehtetuks.

Artikkel 3

Käesolev määrus jõustub seitsmendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 30. jaanuar 2018

Komisjoni nimel
president
Jean-Claude JUNCKER

LISA

Rakendusmääruse (EL) 2016/1240 lisasid muudetakse järgmiselt.

1) IV lisa muudetakse järgmiselt:

a) I osas asendatakse punkti 2 teine lõik järgmisega:

„Iga proovi hinnatakse eraldi. Uute proovide võtmine ja kordushindamine ei ole lubatud.“;

b) lisatakse Ia osa järgmiselt:

„IA OSA

Mageda või analüüsimetodid seoses riikliku sekkumisega

Parameeter	Meetod
Rasvasisaldus ⁽¹⁾	ISO 17189 või ISO 3727, 3. osa
Veesisaldus	ISO 3727, 1. osa
Rasvata kuivainete sisaldus	ISO 3727, 2. osa
Rasva happesus	ISO 1740
Peroksiid arv	ISO 3976
Mittepiimarasv	ISO 17678
Organoleptilised omadused	ISO 22935, 2. ja 3. osa ning allpool esitatud hindamistabel.

(1) Kasutatava meetodi kiidab heaks makseasutus.

Hindamistabel

Välimus		Konsistents		Lõhn ja maitse	
Punktid	Märkused	Punktid	Märkused	Punktid	Märkused
5	<i>Väga hea</i> Ideaalne tüüp Kõrgeim kvaliteet (ühtlaselt kuiv)	5	<i>Väga hea</i> Ideaalne tüüp Kõrgeim kvaliteet (ühtlaselt määratav)	5	<i>Väga hea</i> Ideaalne tüüp Kõrgeim kvaliteet (täiesti puhas õrn lõhn)
4	<i>Hea</i> (märgatavaid puudusi ei ole)	4	<i>Hea</i> (märgatavaid puudusi ei ole)	4	<i>Hea</i> (märgatavaid puudusi ei ole)
1, 2 või 3	Mis tahes puudus	1, 2 või 3	Mis tahes puudus	1, 2 või 3	Mis tahes puudus“

2) V lisas lisatakse järgmine Ia osa:

„IA OSA

Lõssipulbri analüüsimeetodid seoses riikliku sekkumisega

Parameeter	Meetod
Valgusisaldus	ISO 8968, 1. osa
Rasvasisaldus	ISO 1736
Veesisaldus	ISO 5537
Happesus	ISO 6091
Laktaadisaldus	ISO 8069
Fosfataastest	ISO 11816, 1. osa
Mittelahustuvuse indeks	ISO 8156
Kõrbenud osakesed ⁽¹⁾	ADPI
Mikroorganismide üldarv	ISO 4833, 1. osa
Petipiimasisaldus	I liide
Laabivadaku sisaldus ⁽²⁾	II ja III liide
Happevadaku sisaldus ⁽³⁾	ISO 8069 või kohapealsed kontrollid
Organoleptiline kontroll ⁽⁴⁾	ISO 22935, 2. ja 3. osa

⁽¹⁾ Kõrbenud osakeste analüüse võib teha süstemaatiliselt. Kõnealuseid analüüse tuleb siiski teha alati, kui organoleptilist kontrolli ei tehta.

⁽²⁾ Kasutatava meetodi (ühe või mõlemad) kiidab heaks makseasutus.

⁽³⁾ Kasutatava meetodi kiidab heaks makseasutus.

⁽⁴⁾ Organoleptilised kontrollid tehakse juhul, kui makseasutus seda pärast riskipõhist analüüsi vajalikuks peab.

I liide

LÖSSIPULBER: FOSFATIDÜÜLSERIINI JA FOSFATIDÜÜLETANOOLAMIINI KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE**Meetod: pöördfaasiline kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC)**

1. EESMÄRK JA RAKENDUSALA

Käesoleva meetodiga on võimalik määrata fosfatidüülseriini (PS) ja fosfatidüületanoolamiini (PE) kogus lõssipulbris ja sellega saab tuvastada petipiimapulbri lisandit lõssipulbris.

2. MÄÄRATLUS

PS + PE sisaldus: aine massiosa, mis on määratud siinkirjeldatud meetodi abil. Tulemus väljendatakse dipalmitoüülfosfatidüületanoolamiini (PEDP) milligrammides 100 g pulbri kohta.

3. MEETODI PÕHIMÕTE

Taastatud piimapulbrist ekstraheeritakse metanooliga aminofosfolipiidid. PS ja PE määratakse *o*-ftaaldialdehüüd-derivaatidena (OPA) pöördfaasilise HPLC ja fluorestsentsdetektori abil. PS ja PE sisaldus uuritavas proovis määratakse kvantitatiivselt standardproovi suhtes, mis sisaldab teadaolevat kogust PEDPd.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Kasutada tuleb destilleeritud või vähemalt samaväärselt puhtusastmega vett, kui ei ole ette nähtud teisiti.

4.1. **Standardaine: vähemalt 99 % puhtusastmega PEDP**

Märkus: standardainet tuleb säilitada – 18 °C juures.

4.2. **Reaktiivid standardproovide ja uuritavate proovide valmistamiseks**

4.2.1. HPLC jaoks sobiva puhtusastmega metanool

4.2.2. HPLC jaoks sobiva puhtusastmega kloroform

4.2.3. Triüptamiinmonohüdrokloriid

4.3. **Reaktiivid *o*-ftaaldialdehüüdi derivaatide valmistamiseks**

4.3.1. Naatriumhüdroksiidi 12 M vesilahus

4.3.2. Boorhappe 0,4 M vesilahus, pH naatriumhüdroksiidiga (4.3.1) reguleeritud 10,0-ni

4.3.3. 2-merkaptotetanool

4.3.4. *o*-ftaaldialdehüüd (OPA)

4.4. **HPLC elueerimislahustid**

4.4.1. Elueerimislahustid peavad olema valmistatud HPLC jaoks sobiva puhtusastmega reaktiividest.

4.4.2. HPLC jaoks sobiva puhtusastmega vesi

4.4.3. Metanool, mille puhtus on fluorimeetriliselt kontrollitud

4.4.4. Tetrahüdrofuraan

4.4.5. Naatriumdivesinikfosfaat

4.4.6. Naatriumatsetaat

4.4.7. Äädikhape

5. APARATUUR

5.1. **Analüütilised kaalud, mõõtetäpsus 1 mg, jaotise väärtus 0,1 mg.**5.2. **Keeduklaasid ruumalaga 25 ja 100 ml**5.3. **Pipetid, millega saab lisada 1 ja 10 ml**5.4. **Magnetsegur**5.5. **Mõõtepipetid, millega saab lisada 0,2, 0,5 ja 5 ml**5.6. **Mõõtekolvid ruumalaga 10, 50 ja 100 ml**5.7. **Süstlad ruumalaga 20 ja 100 µl.**5.8. **Ultrahelivann**5.9. **Tsentrifuug, mis võimaldab kiirendusi 27 000 × g**5.10. **Klaasviaalid ruumalaga ligikaudu 5 ml**5.11. **Mõõtesilinder ruumalaga 25 ml**5.12. **pH-meeter täpsusega kuni 0,1 pH ühikut**5.13. **HPLC seadmed**5.13.1. *Gradientpumbasüsteem, töökiirus 1,0 ml/min 200-baarise rõhu juures*5.13.2. *Automaatproovisest, mille abil saab valmistada derivaate*5.13.3. *Kolonnisojendi, mis võimaldab hoida kolonni temperatuuril 30 ± 1 °C*5.13.4. *Fluorestsentsdetektor, reguleeritud ergastuslainepikkusele 330 nm ja kiirguslainepikkusele 440 nm*5.13.5. *Integraator või andmetöötlustarkvara, mis võimaldab mõõta piikide pindala*5.13.6. *Kolonn LiChrospher® – 100 (250 × 4,6 mm) või samaväärne kolonn, mis on täidetud oktadeküülsililaaniga (C 18), osakeste suurus 5 µm.*

6. PROOVIVÕTT

Proovid tuleb võtta vastavalt ISO standardile 707.

7. TÖÖ KÄIK

7.1. **Sisestandardlahuse valmistamine**7.1.1. *Kaaluda 100 ml mõõtekolbi (5.6) 30,0 ± 0,1 mg trüptamiinmonohüdrokloriidi (4.2.3) kaalutis ning täita kolb metanooliga (4.2.1) kuni märgini.*7.1.2. *Pipettida 1 ml (5.3) saadud lahust 10 ml mõõtekolbi (5.6) ning täita kolb metanooliga (4.2.1) kuni märgini, et saavutada trüptamiini kontsentratsioon 0,15 mM.*7.2. **Uuritava proovi lahuse valmistamine**7.2.1. *Kaaluda 25 ml keeduklaasi (5.2) 1,000 ± 0,001 g lõssipulbri proovi. Lisada pipetiga (5.3) 10 ml destilleeritud vett temperatuuriga 40 ± 1 °C ja segada magnetseguriga (5.4) 30 minutit, kuni kõik tükid on lahustunud.*7.2.2. *Pipettida 0,2 ml (5.5) taastatud piima 10 ml mõõtekolbi (5.6), lisada süstlaga (5.7) 100 µl 0,15 mM trüptamiinilahust (7.1) ja täiendada metanooliga (4.2.1) märgini. Segada hoolikalt, pöörates kolbi korduvalt ümber, ja töödelda ultraheliga (5.8) 15 minutit.*7.2.3. *Tsentrifugida (5.9) 27 000 × g juures 10 minutit ja koguda supernatant klaasviaali (5.10).*

Märkus: uuritava proovi lahust tuleks HPLC analüüsi tegemiseni säilitada 4 °C juures.

7.3. Välisstandardlahuse valmistamine

- 7.3.1. Kaaluda 50 ml mõõtekolbi (5.6) 55,4 mg PEDPd (4.1) ning lisada mõõtesilindriga (5.11) ligikaudu 25 ml kloroformi (4.2.2). Kuumatada korgiga suletud kolb temperatuurini 50 ± 1 °C ja segada hoolikalt, kuni PEDP on lahustunud. Jahutada kolb temperatuurini 20 °C, täiendada metanooliga (4.2.1) määrgini ja segada kolbi ümber pöörates.
- 7.3.2. Pipettida 1 ml (5.3) saadud lahust 100 ml mõõtekolbi (5.6) ning täiendada metanooliga (4.2.1) määrgini. Pipettida 1 ml (5.3) saadud lahust 10 ml mõõtekolbi (5.6), lisada 100 µl (5.7) 0,15 mM trüptamiinilahust (7.1) ja täiendada metanooliga (4.2.1) määrgini. Segada, pöörates kolbi korduvalt ümber.

Märkus: standardproovi lahust tuleks HPLC-analüüsi tegemiseni säilitada 4 °C juures.

7.4. Derivaatimisreaktiivi valmistamine

Kaaluda 10 ml mõõtekolbi (5.6) $25,0 \pm 0,1$ mg OPAd (4.3.4), lisada 0,5 ml (5.5) metanooli (4.2.1) ja segada hoolikalt, et OPA lahustuks. Täiendada määrgini boorhappe lahusega (4.3.2) ning lisada süstlaga (5.7) 20 µl 2-merkaptotetanooli (4.3.3).

Märkus: derivaatimisreaktiivi tuleb säilitada tumedas klaasviaalis 4 °C juures ning see säilib üks nädal.

7.5. Määramine HPLC-ga

7.5.1. Elueerimislahustid (4.4)

Lahusti A: 0,3 mM naatriumdivesinikfosfaadi ja 3 mM naatriumatsetaadi lahus (pH reguleeritud aädikhappega väärtuseni $6,5 \pm 0,1$): metanool: tetrahüdrofuraan = 558:440:2 (mahusuhe)

Lahusti B: metanool

7.5.2. Soovitav elueerimisgradient

Aeg (min)	Lahusti A (%)	Lahusti B (%)	Voolutuskiirus (ml/min)
Algus	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

Märkus: Joonisel 1 näidatud lahutusvõime saavutamiseks võib olla vaja elueerimisgradienti natuke muuta.

Kolonne temperatuur: 30 °C.

7.5.3. Sisestusruumala: 50 µl derivaatimisreaktiivi ja 50 µl proovilahust

7.5.4. Kolonni tasakaalustamine

Süsteemi tavalisel igapäevasel käivitamisel pesta kolonni 15 minutit 100 % lahustiga B, seejärel segada A:B suhtes 40:60 ja tasakaalustada 15 minutit voolutiskiirusel 1 ml/min. Teha pimekatse, sisestades metanooli (4.2.1).

Märkus: enne pikaajalist hoiustamist pesta kolonni metanooli ja kloroformi seguga (mahusuhe 80:20) 30 minutit.

7.5.5. PS + PE sisalduse määramine uuritavas proovis

7.5.6. Teha järjestikused kromatograafilised analüüsid, hoides nende läbiviimise vahelise aja konstantsena, et saada konstantseid retentsiooniaegu. Tundlikkusteguri arvutamiseks sisestada iga 5–10 uuritava proovilahuse järel välisstandardlahust (7.3).

Märkus: pärast iga 20–25 töösükli tuleb kolonni puhastada, pestes vähemalt 30 minutit 100 % lahustiga B (7.5.1).

7.6. Integreerimismeetod

7.6.1. PEDP piik

PEDP elueeritakse ühe piigina. Piigi pindala määratakse miinimumist miinimumini integreerimisega.

7.6.2. Trüptamiini piik

Trüptamiin elueeritakse ühe piigina (joonis 1). Piigi pindala määratakse miinimumist miinimumini integreerimisega.

7.6.3. PS ja PE piigirühmad

Kirjeldatud tingimustel (joonis 1) elueerub PS kahe peamise osaliselt lahknemata piigina, millele eelneb väiksem piik. PE elueerub kolme peamise osaliselt lahknemata piigina. Iga piigirühma kogupindala määramiseks pannakse nulljoon paika joonisel 1 esitatud viisil.

8. TULEMUSTE ARVUTAMINE JA ESITAMINE

PS ja PE sisaldus uuritavas proovis arvutatakse järgmiselt:

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

kus:

C on PS või PE sisaldus uuritavas proovis (mg/100 g pulbri kohta),

A₁ on standardproovi lahuse (7.3) PEDP piigi pindala,

A₂ on uuritava proovi lahuse (7.2) PS või PE piigi pindala,

T₁ on standardproovi lahuse (7.3) trüptamiini piigi pindala,

T₂ on uuritava proovi lahuse (7.2) trüptamiini piigi pindala.

9. MEETODI TÄPSUS

Märkus: Korduvuse väärtused on arvutatud IDFi rahvusvahelise standardi (*) kohaselt.

9.1. Korduvus

Korduvuse suhteline standardhälve, mis väljendab sõltumatute analüüsitulemuste varieeruvust ning mis on lühikese aja jooksul saadud ühe ja sama analüüsija poolt samades tingimustes sama seadme ja prooviga, ei tohi ületada 2 %. Kui nendes tingimustes on saadud kaks tulemust, ei tohi kahe tulemuse suhteline erinevus olla suurem kui 6 % tulemuste aritmeetilise keskmisest.

9.2. Korratavus

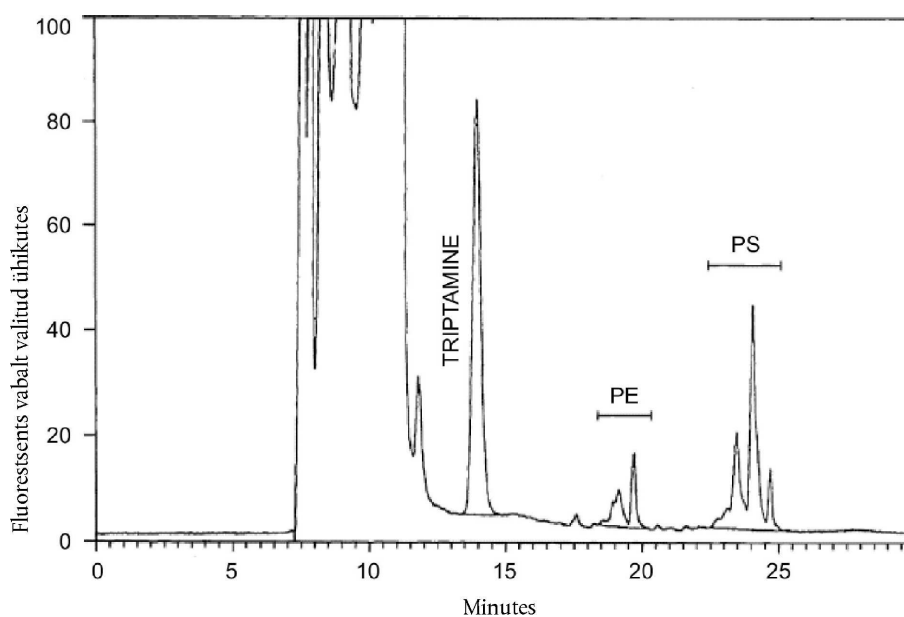
Kui eri laborite analüüsijad on ühe ja sama proovi analüüsimisel saanud kaks erinevat tulemust, kasutades eri seadmeid eri tingimustes, ei tohi kahe tulemuse suhteline erinevus olla suurem kui 11 % nende tulemuste aritmeetilisest keskmisest.

10. KIRJANDUS

- 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).

Joonis 1

Fosfatidüülseriini (PS) ja fosfatidüületanoolamiini (PE) OPA-derivaatide piigid pulbrist taastatud lõssi metanooliekstrakti HPLC-kromatogrammil. Näidatud on PS, PE ja trüptamiini (sisestandard) piikide integreerimine.



II liide

RIIKLIKUKS LADUSTAMISEKS ETTE NÄHTUD LÖSSIPULBRIS ESINEVA LAABIVADAKU TUVASTAMINE KASEIINI MAKROPEPTIIDIDE MÄÄRAMISE TEEL KÕRGSURVEVEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) ABIL

1. RAKENDATAVUS JA RAKENDUSALA

Käesoleva meetodiga on võimalik kaseiini makropeptiidide määramise teel tuvastada laabivadaku lisand riiklikuks ladustamiseks ette nähtud lõssipulbris.

2. VIIDE

Rahvusvaheline standard ISO 707 – Piim ja piimatooted – Proovivõtjuhend.

3. MÄÄRATLUS

Tahke laabivadaku sisaldus massiprotsentides leitakse kaseiini makropeptiidide sisalduse kaudu kirjeldatud meetodit kasutades.

4. PÕHIMÕTE

— Lõssipulbrist taastatakse lõss, rasv ja valgud eraldatakse trikloroäädikhappega ning seejärel tsentrifuugitakse või filtritakse.

— Supernatandis määratakse kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) abil kaseiini makropeptiidide kogus.

— Proovide tulemusi võrreldakse lõssipulbri standardproovidega, millele kas on lisatud teadaolev protsent vadakupulbrit või ei ole seda tehtud.

5. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Kasutada tuleb destilleeritud või vähemalt samaväärse puhtusastmega vett.

5.1. **Trikloroäädikhappe lahus**

Lahustada vees 240 g trikloroäädikhapet (CCl_3COOH) ja täiendada ruumalani 1 000 ml. Lahus peab olema puhas ja värvitu.

5.2. **Eluentlahus, pH 6,0**

Lahustada 1,74 g dikaaliumvesinikfosfaati (K_2HPO_4), 12,37 g kaaliumdivesinikfosfaati (KH_2PO_4) ja 21,41 g naatriumsulfaati (Na_2SO_4) umbes 700 ml vees. Vajaduse korral reguleerida pH 6,0-le, kasutades fosforhappe või kaaliumhüdrosiidi lahust.

Täiendada veega 1 000 ml margini ja homogeniseerida.

Märkus: eluendi koostist võib ajakohastada, et see vastaks etalonide sertifikaadile või kolonni täitematerjali tootja soovitudele.

Enne kasutamist filtrida eluentlahus läbi membraanfiltrit, mille pooride läbimõõt on 0,45 μm .

5.3. **Pesulahus**

Segada üks mahuosa atsetonitriili (CH_3CN) üheksa mahuosa veega. Enne kasutamist filtrida segu läbi membraanfiltrit, mille pooride läbimõõt on 0,45 μm .

Märkus: võib kasutada mõnda muud baktereid tapva toimega pesulahust, mis ei vähenda kolonnide lahutusvõimet.

5.4. **Standardproovid**

5.4.1. *Lõssipulber, mis vastab käesoleva määruse nõuetele (s.t [0])*

5.4.2. *Sama lõssipulber, millele on lisatud 5 massiprotsenti standardkoostisega laabivadakupulbrit (s.t [5])*

6. APARATUUR
- 6.1. **Analüütilised kaalud**
- 6.2. **Tsentrifuug, mis võimaldab saavutada tsentrifuugimiskiirenduse 2 200 g ja on varustatud umbes 50 ml suletavate tsentrifuugianumatega**
- 6.3. **Mehhaaniline loksuti**
- 6.4. **Magnetsegur**
- 6.5. **Umbes 7 cm läbimõõduga klaaslehtrid**
- 6.6. **Umbes 12,5 cm läbimõõduga keskmise tihedusega paberfiltrid**
- 6.7. **Klaasist filtrimisese, mille membraanfiltrid pooride läbimõõt on 0,45 µm**
- 6.8. **Mõõtepipetid, mis võimaldavad mõõta 10 ml (ISO 648, klass A või ISO/R 835), või doseerimisese, millega saab mõõta 10,0 ml kahe minuti jooksul**
- 6.9. **Doseerimisese, mis võimaldab mõõta 20,0 ml vett umbes 50 °C juures**
- 6.10. **Termostaadiga vesivann, reguleeritud temperatuurile 25 ± 0,5 °C**
- 6.11. **HPLC-seade, mille komplekti kuulub:**
 - 6.11.1. *Pump*
 - 6.11.2. *Sisesti mahtude 15–30 µl käsitsi või automaatseks sisestamiseks*
 - 6.11.3. *Kaks järjestikust TSK 2 000-SW kolonni (pikkus 30 cm, sisediameeter 0,75 cm) või samaväärsed kolonnid (nt üks TSK 2 000-SWxl, üks Agilent Technologies Zorbax GF 250) ja üks eelkolonn (3 cm × 0,3 cm), täidetud I 125ga või samaväärsel põhusel materjaliga*
 - 6.11.4. *Termostaadiga koloniahi, reguleeritud temperatuurile 35 ± 1 °C*
 - 6.11.5. *Muudetava lainepikkusega 0,008 Å tundlikkusega UV-detektor, mis võimaldab teha mõõtmisi 205 nm juures.*
 - 6.11.6. *Integraator, mis võimaldab integreerida miinimumist miinimumini*

Märkus: võib töötada ka toatemperatuuril hoitavate kolonnidega, kuid siis on nende lahutusvõime pisut madalam. Sellisel juhul ei tohi temperatuur ühe analüüsiseeria jooksul muutuda rohkem kui ± 5 °C.
7. PROOVIVÕTT
- 7.1. Proove võetakse vastavalt rahvusvahelise standardiga ISO 707 sätestatud korrale. Liikmesriigid võivad kasutada muud proovide võtmise meetodit, kui see on kooskõlas eespool nimetatud standardi põhimõtetega.
- 7.2. Proovi hoitakse tingimustes, mis välistavad selle riknemise või koostise muutumise.
8. TÖÖ KÄIK
- 8.1. **Uuritava proovi ettevalmistamine**

Panna lõssipulber õhukindla kaanega anumasse, mille maht on lõssipulbri mahust umbes kaks korda suurem. Sulgeda anum kohe. Segada lõssipulber hästi läbi, anumat korduvalt ümber pöörates.
- 8.2. **Katsekogus**

Kaaluda tsentrifuugianumasse (6.2) või sobivasse suletavasse anumasse (50 ml) 2,000 ± 0,001 g uuritavat proovi.
- 8.3. **Rasva ja valkude eemaldamine**
 - 8.3.1. *Lisada katsekogusele 20,0 ml kuuma vett (50 °C). Lahustada pulber, loksutades segu mehaanilisel loksutil (6.3) viis minutit. Asetada anum vesivanni (6.10) ja tasakaalustada 25 °C juures.*

8.3.2. Magnetseguriga (6.4) tugevasti segades lisada kahe minuti jooksul ühtlase kiirusega 10,0 ml trikloroäädikhapet (5.1), mille temperatuur on 25 °C. Seejärel asetada tops 60 minutiks vesivanni (6.10).

8.3.3. Tsentrifuugida (6.2) 10 minutit 2 200 g juures või filtrida läbi paberi (6.6), visates filtraadist ära esimesed 5 ml.

8.4. Kromatograafiline määramine

8.4.1. Süstida HPLC-seadmesse (6.11), milles eluentlahuse (5.2) voolukiirus on 1,0 ml/min, täpselt mõõdetud 15–30 µl supernatanti või filtraati (8.3.3).

Märkus 1. Võib kasutada muud voolukiirust sõltuvalt kasutatava kolonni sisediameetrist või kolonni tootja soovist.

Märkus 2. Iga töökatkestuse ajal tuleb kolonne veega pesta. Kolonnidesse ei tohi jätta eluentlahust (5.2).

Enne töö katkestamist enam kui 24 tunniks tuleb kolonnid veega läbi pesta ja seejärel pesta vähemalt kolme tunni vältel lahusega (5.3) voolukiirusel 0,2 ml/min.

8.4.2. Uuritava proovi [E] kromatograafilise analüüsi tulemused saadakse kromatogrammina, millel iga piik identifitseeritakse selle retentsiooniaja (RT) järgi järgmiselt.

II piik	Kromatogrammi teine piik, mille RT on umbes 12,5 minutit.
III piik	Kromatogrammi kolmas piik, mis vastab kaseiini makropeptiidile ja mille RT on 15,5 minutit.

Kolonni(de) valik võib oluliselt mõjutada üksikpiikide retentsiooniaega.

Integraator (6.11.6) arvutab automaatselt välja iga piigi pindala A.

A _{II} :	II piigi pindala
A _{III} :	III piigi pindala

Enne kvantitatiivset tõlgendamist tuleb kontrollida iga kromatogrammi kuju, et avastada võimalikud kõrvalekalded, mis on tingitud seadme või kolonnide puudulikkusest tööst või analüüsitava proovi päritolust ja omadustest.

Kahtluse korral tuleb analüüsi korrata.

8.5. Tundlikkustegurite leidmine

8.5.1. Kasutada täpselt sama meetodit, mida on kirjeldatud standardproovide (5.4) puhul punktides 8.2–8.4.2.

Kasutada värskelt valmistatud lahuseid, sest kaseiini makropeptiidid lagunevad 8 % trikloroäädikhappe keskkonnas. Hinnanguline kadu 30 °C juures on 0,2 % tunnis.

8.5.2. Enne proovide kromatograafilist analüüsi tuleb kolonnid tasakaalustada, süstides korduvalt standardproovi (5.4.2) lahust (8.5.1), kuni kaseiini makropeptiidile vastava piigi pindala ja retentsiooniaeg jääb konstantseks.

8.5.3. Määrata tundlikkustegurid R, süstides sama palju filtraate (8.5.1) nagu uuritavate proovide puhul.

9. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

9.1. Arvutusmeetod ja -valemid

9.1.1. Tundlikkusteguri R arvutamine

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

kus:

R_{II} = II piikide tundlikkustegurid;

A_{II} [0] = punktis 8.5.3 saadud standardproovi [0] II piikide pindalad.

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

kus:

- R_{III} = III piigi tundlikkustegur;
 $A_{III}[0]$ ja $A_{III}[5]$ = punktis 8.5.3 saadud standardproovide [0] ja [5] III piigi pindalad;
 W = standardproovi [5] vadakusisaldus, s.t 5.

9.1.2. *Proovi [E] piikide suhtelise pindala arvutamine*

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

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

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

kus:

- $S_{II}[E]$, $S_{III}[E]$, $S_{IV}[E]$ = proovi [E] piikide II, III ja IV suhtelised pindalad;
 $A_{II}[E]$, $A_{III}[E]$ = punktile 8.4.2 vastavalt saadud proovi [E] piikide II ja III pindalad;
 R_{II} , R_{III} = punktis 9.1.1 arvatud tundlikkustegurid.

9.1.3. *Proovi [E] piigi III suhtelise retentsiooniaja arvutamine:*

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

kus:

- $RRT_{III}[E]$ = proovi [E] III piigi suhteline retentsiooniaeg;
 $RT_{III}[E]$ = punktis 8.4.2 saadud proovi [E] III piigi retentsiooniaeg;
 $RT_{III}[5]$ = punktis 8.5.3 saadud kontrollproovi [5] III piigi retentsiooniaeg.

9.1.4. *Katsed on näidanud lineaarse seose olemasolu III piigi suhtelise retentsiooniaja (s.t $RRT_{III}[E]$) ja lisatud vadakupulbri sisalduse vahel kuni 10 % sisalduseni.*

- $RRT_{III}[E]$ on < 1,000, kui vadakusisaldus on > 5 %;
- $RRT_{III}[E]$ on \geq 1,000, kui vadakusisaldus on \leq 5 %.

RRT_{III} väärtuste lubatud kõikumine on \pm 0,002.

Tavaliselt ei erine $RRT_{III}[0]$ väärtus palju 1,034st. Sõltuvalt kolonnide olukorrast võib väärtus läheneda väärtusele 1,000, kuid peab alati olema sellest suurem.

9.2. **Proovis sisalduva laabivadakupulbri protsendi arvutamine**

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

kus:

- W = proovis [E] sisalduva laabivadaku massiprotsent;
 $S_{III}[E]$ = punktis 9.1.2 saadud uuritava proovi [E] III piigi suhteline pindala;
1,3 = III piigi suhteline keskmine pindala, väljendatud laabivadaku grammides 100 g kohta ning määratud erineva päritoluga lõssipulbris, mida ei ole võltsitud. See väärtus on saadud katseliselt;
 $S_{III}[0]$ = on III piigi suhteline pindala, mis võrdub $R_{III} \times A_{III}[0]$. Need väärtused on saadud vastavalt punktidele 9.1.1 ja 8.5.3;
 $(S_{III}[0] - 0,9)$ = on parandus, mis tuleb teha keskmisele suhtelisele pindalale 1,3, kui $S_{III}[0]$ ei ole võrdne 0,9ga. Katseliselt saadud kontrollproovi [0] III piigi suhteline keskmine pindala on 0,9.

9.3. Meetodi täpsus

9.3.1. Korduvus

Ühel ja samal ajal või kohe üksteise järel samade seadmetega ühe ja sama analüüsija poolt identse katsematerjaliga läbi viidud kahe määramise tulemuste vaheline erinevus ei tohi olla suurem kui 0,2 massiprotsenti.

9.3.2. Korratavus

Erinevus kahe üksiktulemuse vahel, mis on saadud kahes eri laboris sama katsematerjaliga, ei tohi olla suurem kui 0,4 massiprotsenti.

9.4. Tõlgendamine

9.4.1. *Vadak puudub, kui III piigi suhteline pindala S_{III} [E], väljendatuna laabivadaku grammides 100 g toote kohta, on $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$,*

kus:

2,0	III piigi pindala lubatud maksimaalne väärtus, võttes arvesse III piigi keskmist suhtelist pindala (s.t 1,3), määramatus on tingitud lõssipulbri koostise kõikumistest ja meetodi korratavusest (9.3.2);
$(S_{III}[0] - 0,9)$	parandus, mis tuleb teha, kui pindala $S_{III}[0]$ on erinev 0,9st (vt punkt 9.2).

9.4.2. *Kui III piigi suhteline pindala $S_{III}[E] > 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ ja II piigi suhteline pindala $S_{II}[E] \leq 160$, määrata laabivadakusisaldus vastavalt punktis 9.2 osutatule.*

9.4.3. *Kui III piigi suhteline pindala $S_{III}[E]$ on $> 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$ ja II piigi suhteline pindala $S_{II}[E] \leq 160$, määrata üldine valgusisaldus (P %), seejärel uurida jooniseid 1 ja 2.*

9.4.3.1. *Suure valgusisaldusega võltsimata koostisega lõssipulbri proovide analüüsimisel saadud teave on kokku võetud joonistel 1 ja 2.*

Pidev joon kujutab lineaarset regressiooni, mille koefitsiendid arvutatakse vähimruutude meetodil.

Sirge katkendjoon fikseerib III piigi suhtelise pindala ülemmäära, kusjuures on tõenäoline, et 90 % juhtudest seda ei ületata.

Jooniste 1 ja 2 katkendjoonte võrrandid:

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

kus:

S_{III} on III piigi suhteline pindala, arvutatud kas kogu valgusisalduse või piigi suhtelise pindala $S_{II}[E]$ põhjal;

P % on kogu valgusisaldus, väljendatud massiprotsentides;

$S_{II}[E]$ on punktis 9.1.2 arvutatud proovi suhteline pindala.

Need võrrandid on võrdsed punktis 9.2 nimetatud arvuga 1,3.

Lahknevus (T_1 ja T_2) leitud suhtelise pindala $S_{III}[E]$ ja suhtelise pindala S_{III} vahel saadakse järgmiselt: $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P\% - 10,7) + (S_{III}[0] - 0,9)]$; $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[0] - 0,9)]$

9.4.3.2. Kui T_1 ja/või T_2 on null või väiksem, ei saa laabivadaku sisaldust tuvastada.

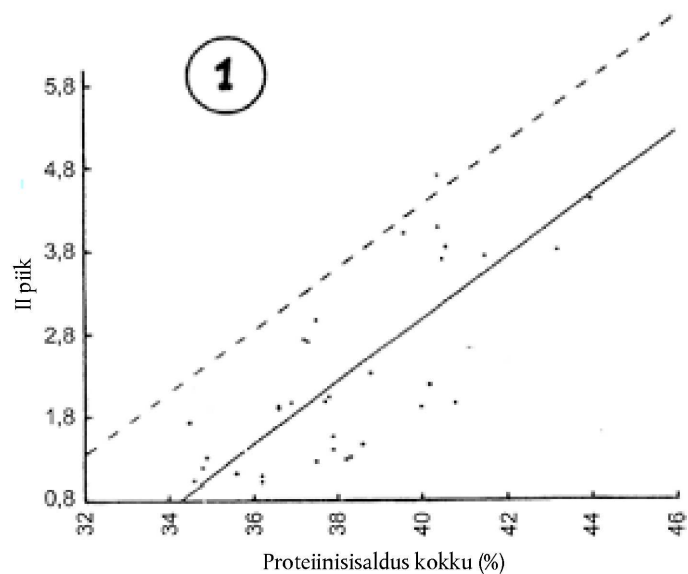
Kui T_1 ja T_2 on suuremad kui null, sisaldab proov laabivadakut.

Laabivadaku sisaldus arvutatakse vastavalt järgmisele võrrandile: $W = T_2 + 0,91$

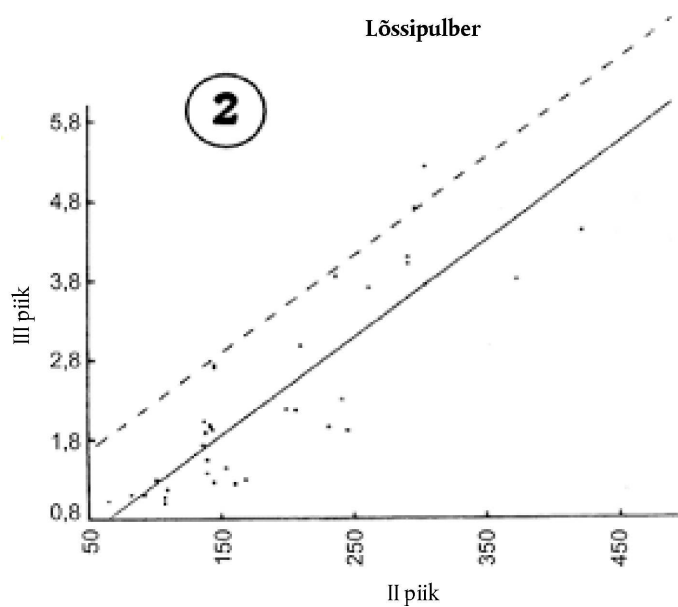
kus:

0,91 on pidevjoone ja katkendjoone vaheline kaugus vertikaalteljel.

Lössipulber



Lössipulber



III liide

LAABIVADAKUPULBRI MÄÄRAMINE LÖSSIPULBRIS

1. EESMÄRK: LÖSSIPULBRILE LISATUD LAABIVADAKUPULBRI TUVASTAMINE
2. KIRJANDUS: RAHVUSVAHELINE STANDARD ISO 707
3. MÄÄRATLUS
Laabivadakupulbri sisalduse leidmiseks määratakse kaseiini makropeptiidide sisaldus massiprotsentides järgnevalt kirjeldatud meetodil.
4. PÕHIMÕTE
Proove analüüsitakse kaseiini makropeptiidi A tuvastamiseks pöördfaasilise kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) abil. Saadud tulemusi võrreldakse lössipulbri standardproovidega, millest osale on lisatud teatav kogus vadakupulbrit. Kui tulemus on suurem kui 1 massiprotsent, näitab see, et proov sisaldab laabivadakupulbrit.
5. REAKTIIVID
Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Kasutada tuleb destilleeritud või vähemalt samaväärse puhtusastmega vett. Atsetonitriili kvaliteet peab vastama spektroskoopia või HPLC nõuetele.
- 5.1. **Trikloroäädikhappe lahus**
Lahustada vees 240 g trikloroäädikhapet (CCl_3COOH) ja täiendada ruumalani 1 000 ml. Lahus peab olema puhas ja värvitu.
- 5.2. **Eluendid A ja B**
Eluent A: panna 1 000 ml mõõtekolbi 150 ml atsetonitriili (CH_3CN), 20 ml isopropanooli ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) ja 1,00 ml trifluoroäädikhapet (TFA, CF_3COOH). Täita veega ruumalani 1 000 ml.
Eluent B: panna 1 000 ml mõõtekolbi 550 ml atsetonitriili, 20 ml isopropanooli ja 1,00 ml TFA. Täita veega ruumalani 1 000 ml. Filtrida eluentlahus enne kasutamist läbi membraanfiltrit, mille pooride läbimõõt on 0,45 μm .
- 5.3. **Kolonni konserveerimine**
Pärast analüüse pestakse kolonni eluendiga B (gradiendi järgi) ja seejärel 30 minuti jooksul atsetonitriiliga (gradiendi järgi). Kolonni säilitatakse atsetonitriilis.
- 5.4. **Standardproovid**
 - 5.4.1. Riikliku ladustamise nõuetele vastav lössipulber (s.t [0])
 - 5.4.2. Sama lössipulber, millele on lisatud 5 massiprotsenti standardkoostisega laabivadakupulbrit (s.t [5])
 - 5.4.3. Sama lössipulber, millele on lisatud 50 massiprotsenti standardkoostisega laabivadakupulbrit (s.t [50])
6. APARATUUR
 - 6.1. **Analüütilised kaalud**
 - 6.2. **Tsentrifuug, mis võimaldab saavutada tsentrifuugimiskiirenduse 2 200 g ja on varustatud umbes 50 ml suletavate tsentrifuugianumatega**
 - 6.3. **Mehhaaniline loksuti**
 - 6.4. **Magnetsegur**
 - 6.5. **Umbes 7 cm läbimõõduga klaaslehtrid**

- 6.6. Umbes 12,5 cm läbimõõduga keskmise tihedusega paberfiltrid
- 6.7. Klaasist filtrimiseseade, mille membraanfiltrid on 0,45 µm
- 6.8. Mõõtepipetid, mis võimaldavad mõõta 10 ml (ISO 648, klass A või ISO/R 835), või doseerimiseseade, millega saab mõõta 10,0 ml kahe minuti jooksul.
- 6.9. Doseerimiseseade, mis võimaldab mõõta 20,0 ml vett umbes 50 °C juures
- 6.10. Termostaadiga vesivann, reguleeritud temperatuurile 25 ± 0,5 °C
- 6.11. HPLC-seade, mis koosneb järgmistest osadest.
 - 6.11.1. Pumbasüsteem, mis võimaldab saada kahekomponendilist gradienti
 - 6.11.2. Sisesti ruumala 100 µl käsitsi või automaatseks sisestamiseks
 - 6.11.3. Kolonn Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (pikkus 25 cm, siseläbimõõt 0,46 cm) või samaväärne suurepõriline silikageeliga täidetud pöördfaaskolonn
 - 6.11.4. Termostaadiga kolonniahi, reguleeritud temperatuurile 35 ± 1 °C
 - 6.11.5. Muudetava lainepikkusega UV-detektor, mis võimaldab teha mõõtmisi 210 nm juures (vajaduse korral võib kasutada suuremat lainepikkust kuni 220 nm), tundlikkusega 0,02 Å
 - 6.11.6. Integraator, mis võimaldab integreerida ühise nulljooneni või miinimumist miinimumini.

Märkus: kolonniga saab töötada toatemperatuuril, kui see ei kõigu rohkem kui 1 °C, vastasel korral varieerub kaseiini makropeptiidi A retentsiooniaeg liiga palju.

7. PROOVIVÕTT

- 7.1. Proove võetakse vastavalt rahvusvahelise standardiga ISO 707 sätestatud korrale. Liikmesriigid võivad kasutada muud proovide võtmise meetodit, kui see on kooskõlas eespool nimetatud standardi põhimõtetega.
- 7.2. Proovi hoitakse tingimustes, mis välistavad selle riknemise või koostise muutumise.

8. TÖÖ KÄIK

8.1. Uuritava proovi ettevalmistamine

Panna lõssipulber õhukindla kaanega anumasse, mille maht on lõssipulbri mahust umbes kaks korda suurem. Sulgeda anum kohe. Segada lõssipulber hästi läbi, anum korduvalt ümber pöörates.

8.2. Katsekogus

Kaaluda tsentrifuugianumasse (6.2) või sobivasse suletavasse anumasse (50 ml) 2,00 ± 0 001 g uuritavat proovi.

Märkus: segu puhul kasutada uuritava proovi kaalutist, mis pärast rasvast vabastamist vastab kogusele 2,00 g.

8.3. Rasva ja valkude eemaldamine

- 8.3.1. Lisada katsekogusele 20,0 ml kuuma vett (50 °C). Lahustada pulber, loksutades segu mehaanilisel loksutil (6.3) viis minutit. Asetada anum vesivanni (6.10) ja tasakaalustada 25 °C juures.
- 8.3.2. Magnetseguriga (6.4) tugevasti segades lisada kahe minuti jooksul ühtlase kiirusega 10,0 ml 25 °C trikloroäädikhapet (5.1). Seejärel asetada anum 60 minutiks vesivanni (6.10).
- 8.3.3. Tsentrifugida (6.2) 10 minutit 2 200 g juures või filtrida läbi paberi (6.6), visates filtraadist ära esimesed 5 ml.

8.4. **Kromatograafiline määramine**8.4.1. *Pöordfaasiline HPLC välistab valepositiivsete tulemuste saamise hapukoorepeti pulbri sisalduse tõttu.*8.4.2. *Enne pöordfaasilise HPLC analüüsi läbiviimist tuleb optimeerida gradiendi tingimused. Umbes 6 ml surnud ruumalaga (ruumala lahuste ühinemispunkti kuni injektori silmuseni, viimane kaasa arvatud) gradientsüsteemide puhul on optimaalne kaseiini makropeptiidi A retentsiooniaeg 26 ± 2 minutit. Väiksema surnud ruumalaga (näiteks 2 ml) gradientsüsteemide puhul on optimaalne retentsiooniaeg 22 minutit.*

Võtta standardproovide (5.4) lahuseid, millest osa sisaldab 50 % laabivadakut.

Sisestada HPLC-seadmesse 100 µl supernatanti või filtraati (8.3.3) tabelis 1 esitatud proovigradiendi tingimustel.

Tabel 1

Proovigradiendi tingimused kromatograafilise analüüsi optimeerimiseks

Aeg (min)	Voolutuskiirus (ml/min)	% A	% B	Köver
Algus	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lineaarne
32	1,0	10	90	lineaarne
37	1,0	10	90	lineaarne
42	1,0	90	10	lineaarne

Kahe kromatogrammi võrdlus peab andma kaseiini makropeptiidi A piigi asukoha.

Järgmist valemit kasutades saab välja arvutada normaalgradiendi puhul kasutatava esialgse lahuse koostise (vt 8.4.3): $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{\text{cmpA}} - 26) / 6) \times 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{\text{cmpA}} - 26) / 6) \times 1,11$

kus

 RT_{cmpA} : kaseiini makropeptiidi A retentsiooniaeg proovigradiendis

10: % B proovigradiendi alguses

2,5: % B normaalgradiendi keskel, millest lahutatakse % B normaalgradiendi alguses

13,5: proovigradiendi keskpunkti saavutamise aeg

26: kaseiini makropeptiidi A nõutav retentsiooniaeg

6: proovi- ja normaalgradiendi tõusude suhe

30: % B proovigradiendi alguses, millest lahutatakse % B 27 minuti pärast

27: proovigradiendi läbijooksuaeg.

8.4.3. *Võtta uuritavate proovide lahused.*

Süstida HPLC-seadmesse täpselt mõõdetult 100 µl supernatanti või filtraati (8.3.3) eluendi (5.2) voolukiirusel 1,0 ml/minutis.

Eluendi koostis analüüsi alguses saadakse punkti 8.4.2 kohaselt. Harilikult on see ligikaudu A:B = 76:24 (5.2). Kohe pärast sisestamist alustada lineaargradiendi, mille tulemuseks on 5 % võrra suurem B kogus 27 minuti pärast. Seejärel alustada lineaargradiendi, mille tulemusel on eluendis viie minuti pärast 90 % B. Seda eluendi koostist hoida viis minutit ja pärast seda taastada lineaargradiendiga viie minuti jooksul esialgne koostis. Sõltuvalt pumbasüsteemi mahutavusest võib järgmist analüüsi alustada 15 minutit pärast algtingimuste saavutamist.

Märkus 1. Kaseiini makropeptiidi A retentsiooniaeg peab olema 26 ± 2 minutit. Seda on võimalik saavutada, muutes esimese gradiendi alg- ja lõpplingimusi. % B erinevus esimese gradiendi alg- ja lõpplingimustel peab siiski olema 5 % B.

Märkus 2. Eluentidest tuleb õhk piisavalt hästi eemaldada ja need peavad sellisena püsima. See on oluline gradientpumbasüsteemi tõrgeteta toimimiseks. Kaseiini makropeptiidi A piigi retentsioonaja standardhälve peab olema alla 0,1 minuti ($n = 10$).

Märkus 3. Iga viienda proovi järel tuleb sisestada standardproov [5] ja arvutada selle alusel uus tundlikkustegur R (9.1.1).

- 8.4.4. *Uuritava proovi (E) kromatograafilise analüüsi tulemused saadakse kromatogrammina, millel kaseiini makropeptiidi A piik tehakse kindlaks 26minutilise retentsioonaja alusel.*

Integraator (6.11.6) arvutab automaatselt kaseiini makropeptiidi A piigi kõrguse H. Kontrollida tuleb iga kromatogrammi nulljoone asukohta. Kui nulljoone asukoht on vale, tuleb analüüsi või integreerimist korrata.

Märkus: kui kaseiini makropeptiidi A piik on muudest piikidest piisavalt hästi eraldunud, tuleb nulljoon kindlaks määrata miinimumist miinimumini, muudel juhtudel kasutada vertikaalide tõmbamist ühise nulljooneni, mille alguspunkt peab olema kaseiini makropeptiidi A piigi läheduses (seega mitte ajahetkel $t = 0$ min!). Standardi ja proovide puhul tuleb kasutada sama tüüpi integreerimist ning ühise nulljoone puhul tuleb kontrollida selle sobivust proovidele ja standardile.

Enne kvantitatiivset interpreteerimist tuleb kontrollida iga kromatogrammi kuju, et avastada võimalikud kõrvalekalded, mis on tingitud seadme või kolonni puudulikust tööst või uuritava proovi päritolust ja omadustest. Kahtluse korral tuleb analüüsi korrata.

8.5. Tundlikkustegurite leidmine

- 8.5.1. *Kasutada täpselt sama meetodit, mida on kirjeldatud standardproovide (5.4.1–5.4.2) puhul punktides 8.2–8.4.4. Kasutada värskest valmistatud lahuseid, sest kaseiini makropeptiid laguneb toatemperatuuril 8 % trikloroäädikhappe keskkonnas. Temperatuuril 4 °C püsib lahus stabiilsena 24 tundi. Pikkade analüüsiseeriade korral on automaatsesiti puhul soovitatav kasutada jahutatud proovialust.*

Märkus: Punkti 8.4.2 võib vahele jätta, kui eelmistest analüüsides on teada algtingimustele vastav % B.

Standardproovi [5] kromatogramm peab vastama joonisele 1. Sellel joonisel eelneb kaseiini makropeptiidi A piigile kaks väikest piiki. Piigid peavad eristuma samal määral.

- 8.5.2. *Enne proovide kromatograafilist analüüsi sisestada 100 µl standardproovi, mis ei sisalda laabivadakut [0] (5.4.1).*

Kromatogrammil ei tohi olla kaseiini makropeptiidi A retentsioonijale vastavat piiki.

- 8.5.3. *Määrata tundlikkustegurid R, sisestades samas mahus filtraati (8.5.1) nagu uuritavate proovide puhul.*

9. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

9.1. Arvutusmeetod ja -valemid

- 9.1.1. *Tundlikkusteguri R arvutamine*

Kaseiini makropeptiidi A piik: $R = W/H$

kus

R = kaseiini makropeptiidi A piigi tundlikkustegur,

H = kaseiini makropeptiidi A piigi kõrgus,

W = standardproovi [5] vadakusisaldus.

9.2. Proovis sisalduva laabivadakupulbri protsendi arvutamine

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

kus

$W(E)$ = proovis [E] sisalduva laabivadaku massiprotsent,

R = kaseini makropeptiidi A piigi tundlikkustegur (9.1.1),

$H(E)$ = proovi [E] kaseini makropeptiidi A piigi kõrgus.

Kui $W(E)$ on suurem kui 1 % ning kui retentsiooniaegade erinevus proovi ja standardproovi [5] puhul on väiksem kui 0,2 minutit, näitab see, et proov sisaldab laabivadakupulbrit.

9.3. Meetodi täpsus

9.3.1. Korduvus

Ühel ja samal ajal või kohe üksteise järel samade seadmetega ühe ja sama analüüsija poolt identse katsematerjaliga läbi viidud kahe määramise tulemuste vaheline erinevus ei tohi olla suurem kui 0,2 massiprotsenti.

9.3.2. Korratavus

Ei ole määratud.

9.3.3. Lineaarsus

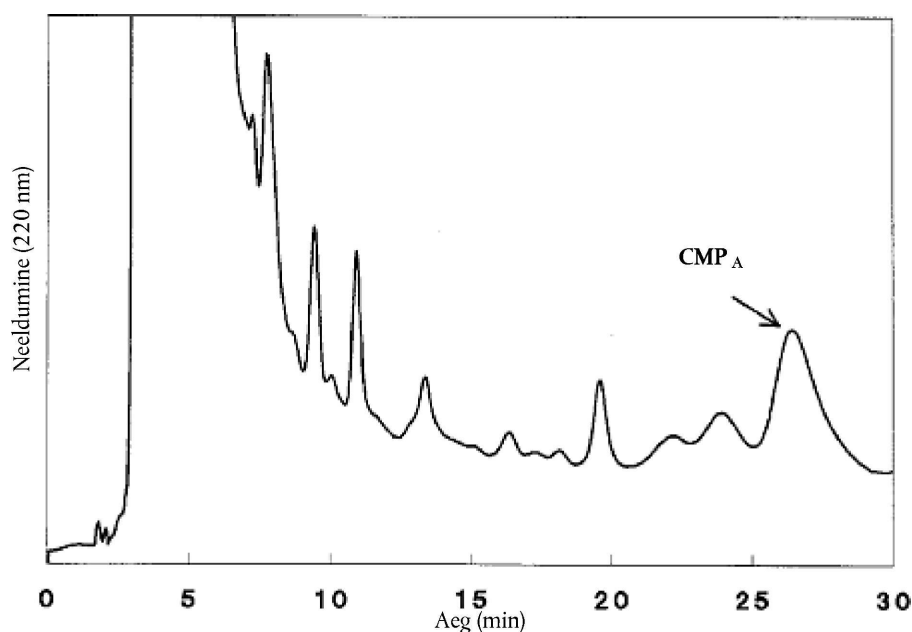
Laabivadaku kontsentratsioonide vahemikus 0–16 % peavad tulemused olema lineaarses seoses korrelatsiooni-koefitsiendiga $> 0,99$.

9.4. Tõlgendamine

1 % piir hõlmab korratavusest tulenevalt määramatust.

Joonis 1

Ni-4.6 standard



(*) Rahvusvaheline IDFi standard 135B/1991. Piim ja piimatooted. Analüütiliste meetodite täpsusnäitajad. Võrdluskatse läbiviimise meetod.“

3) Lisatakse järgmised lisad.

„VII LISA

Eraladustuslepingute alusel ladustatud lõssipulbri analüüsi meetodid

Parameeter	Meetod
Rasvasisaldus ⁽¹⁾	ISO 17189 või ISO 3727, 3. osa
Veesisaldus	ISO 3727, 1. osa
Rasvata kuivainete (v.a sool) sisaldus	ISO 3727, 2. osa
Soolasisaldus	ISO 15648

⁽¹⁾ Kasutatava meetodi kiidab heaks makseasutus.

VII LISA

Eraladustuslepingute alusel ladustatud lõssipulbri analüüsi meetodid

Parameeter	Meetod
Rasvasisaldus	ISO 1736
Valgusisaldus	ISO 8968, 1. osa
Veesisaldus	ISO 5537

VIII LISA

Eraladustuslepingute alusel ladustatud juustu analüüsi meetodid

1. Selle tagamiseks, et juust, mis peaks olema valmistatud üksnes lamba-, kitse- või pühvlipiimast või lamba-, kitse- ja pühvlipiima segust, ei sisaldaks lehmapiima kaseiini, kasutatakse liites esitatud analüüsimeetodit.

Lehmapiima kaseiini sisaldust peetakse tõendatuks, kui uuritavas proovis on lehmapiima kaseiini sama palju või rohkem kui liites kehtestatud standardproovis, mis sisaldab 1 % lehmapiima.

2. Meetodeid lehmapiima kaseiini tuvastamiseks lõikes 1 osutatud juustudes võib kasutada tingimusel, et:
 - a) avastamispiir on 0,5 % või väiksem;
 - b) valepositiivseid tulemusi ei esine ja
 - c) lehmapiima kaseiin on nõutava tundlikkusega tuvastatav isegi pärast pikka laagerdusaega, mis võib esineda tavalistes kaubandustingimustes.

Kui mõni eespool nimetatud nõuetest ei ole täidetud, tuleb kasutada liites esitatud meetodeid.

Liide

MEETOD LEHMAPIIMA JA LEHMAPIIMA KASEINAADI MÄÄRAMISEKS JUUSTUS, MIS ON VALMISTATUD LAMBA-, KITSE- VÕI PÜHVLIPIIMAST VÕI LAMBA-, KITSE- JA PÜHVLIPIIMA SEGUST

1. RAKENDATAVUS

Lehmapiima ja lehmapiima kaseinaadi määramine lamba-, kitse- või pühvliimast või lamba-, kitse- ja pühvliima segust valmistatud juustus γ -kaseiinide isoelektrilise fookustamise abil pärast lüüsimist plasmiiiniga.

2. RAKENDUSALA

Käesolev tundlik ja spetsiifiline meetod sobib töötlemata ja kuumtöödeldud lehmapiima ning lehmapiima kaseinaadi tuvastamiseks laagerdumata ja laagerdunud juustus, mis on valmistatud lamba-, kitse- või pühvliimast või lamba-, kitse- ja pühvliima segust. See meetod ei sobi võltsimise tuvastamiseks, kui piima või juustu on võltsitud lehmapiimast eraldatud kuumtöödeldud vadakuvalgu kontsentraadiga.

3. MEETODI PÕHIMÕTE

3.1. Kaseiinide eraldamine juustust ja etalonainetest

3.2. Eraldatud kaseiinide lahustamine ja lõhustamine plasmiiiniga (EC.3.4.21.7)

3.3. Plasmiiiniga töödeldud kaseiinide isoelektriline fookustamine karbamiidi juuresolekul ja valkude värvimine

3.4. Värviga töödeldud γ_3 - ja γ_2 -kaseiini mustrite (tõend lehmapiima olemasolust) võrdlemine mustritega, mis on saadud katsetes 0 % ja 1 % lehmapiima sisaldavate etalonainetega samas geelis.

4. REAKTIIVID

Kui ei ole öeldud teisiti, tuleb kasutada analüütiliselt puhtaid kemikaale. Vesi peab olema kahekordselt destilleeritud või samaväärse puhtusastmega.

Märkus: järgnev eeskiri kehtib laboris valmistatud karbamiidisaldusega polüakrüülamiidgeelide puhul mõõtmetega 265 × 125 × 0,25 mm. Kui kasutatakse muud tüüpi ja teistsuguse suurusega geele, tuleb lahustustingimusi vastavalt kohandada.

Isoelektriline fookustamine

4.1. Reaktiivid karbamiidi sisaldavate polüakrüülamiidgeelide valmistamiseks

4.1.1. Geeli põhilahus

Lahustada vees:

4,85 g akrüülamiidi,

0,15 g N,N'-metüleenbisakrüülamiidi (BIS),

48,05 g karbamiidi,

15,00 g 87massiprotsendilist glütserooli,

täiendada ruumalani 100 ml ning säilitada külmikus tumedas klaaspudelis.

Märkus: neurotoksilise akrüülamiidi määratud kaalutiste asemel on parem kasutada müügil olevat akrüülamiidi ja BISi eelvalmistatud lahust. Kui valmislahus sisaldab 30 % massikontsentratsioonis akrüülamiidi ja 0,8 % massikontsentratsioonis BISi, tuleb eespool nimetatud segu valmistamiseks võtta nimetatud kaalutiste asemel 16,2 ml valmislahust. Põhilahuse säilivusaeg on kuni 10 päeva; kui põhilahuse juhtivus on suurem kui 5 μ S, tuleb see deioniseerida, segades seda 2 g ioonvahetiga Amberlite MB-3 kolmekümne minuti jooksul ja filtreerides seejärel läbi 0,45 m membraani.

4.1.2. Geeli lahus

Segada geeli põhilahus (vt 4.1.1) lisandite ja amfolüütidega (*):

9,0 ml põhilahust;

24 mg β -alaniini;

500 μ l amfolüüti, pH 3,5–9,5;

250 μ l amfolüüti, pH 5–7;

250 μ l amfolüüti, pH 6–8.

Segada geeli lahus ning degaseerida see ultrahelivannis või vaakumis kahe kuni kolme minuti jooksul.

Märkus: geeli lahus valmistada vahetult enne selle valamist kattekilele (vt 6.2).

4.1.3. Katalüsaatori lahused

4.1.3.1. N,N,N',N'-tetrametüületüleendiamiin (TEMED)

4.1.3.2. 40 % massikontsentratsiooniga ammooniumpersulfaadi lahus (PER):

lahustada 800 mg PERi vees ja täiendada ruumalani 2 ml.

Märkus: alati tuleb kasutada värskelt valmistatud PERi lahust.

4.2. Kontaktvedelik

Petrool või vedel parafiin

4.3. Anoodilahus

Lahustada 5,77 g 85massiprotsendilist fosforhapet vees ja täiendada ruumalani 100 ml.

4.4. Katoodilahus

Lahustada 2,00 g naatriumhüdroksiidi vees ja täiendada veega ruumalani 100 ml.

Proovi ettevalmistamine

4.5. Reaktiivid valgu eraldamiseks

4.5.1. Lahjendatud äädikhape (täiendada 25,0 ml jää-äädikhappe ruumala veega ruumalani 100 ml)

4.5.2. Diklorometaan

4.5.3. Atsetoon

4.6. Valke lahustav puhver

Lahustada vees:

5,75 g 87massiprotsendilist glütserooli,

24,03 g karbamiidi,

250 mg ditiotreitooli

ja täiendada ruumalani 50 ml.

Märkus: säilitada külmikus; säilimisaeg kuni üks nädal.

4.7. Reaktiivid kaseiinide lõhustamiseks plasmiiniga**4.7.1. Ammooniumkarbonaatpuhver**

Tiitrida 0,2 mol/l ammooniumvesinikkarbonaadi lahus (1,58 g/100 ml vees, mis sisaldab 0,05 mol/l etüleendiamiintetraatsetaati (EDTA, 1,46 g/100 ml vees), 0,2 mol/l ammooniumkarbonaadi lahusega (1,92 g/100 ml vees, sisaldab 0,05 mol/l EDTAd) kuni pH-ni 8.

4.7.2. Veise plasmiin (EC. 3.4.21.7) aktiivsusega vähemalt 5 U/ml**4.7.3. ϵ -aminokaproonhappe lahus ensüümi inhibeerimiseks**

Lahustada 2,624 g ϵ -aminokaproonhapet (6-amino-n-heksaanhapet) 100 ml 40mahuprotsendilises etanoolis.

4.8. Standardained

4.8.1. *Laabiga kalgendatud lamba- ja kitsepiimalõssi segust saadud sertifitseeritud etalonaineid, mis sisaldavad 0 % ja 1 % lehmapiima, on võimalik hankida Komisjoni Etalonainete ja Mõõtmiste Instituudist (Commission's Institute for Reference Materials and Measurements, B-2440 Geel, Belgia).*

4.8.2. *0 % ja 1 % lehmapiima sisaldavate laboratoorsete vaheetalonainete valmistamine laabiga kalgendatud pühvliimast*

Lõssi saamiseks tseentrifuugida kas pühvli või veise toorpiima 37 °C ja 2 500 g juures 20 minutit. Pärast tseentrifuugianuma ja selle sisu kiiret jahutamist temperatuurini 6–8 °C kõrvaldada ülemine rasvakiht täielikult. 1 %-lise etalonsegu valmistamiseks panna 1 l keeduklaasi 495 ml pühvliimialõssi, lisada 5,00 ml lehmapiimalõssi ja reguleerida piimhapet (massikontsentratsioon 10 %) lisades pH-le 6,4. Temperatuur reguleerida väärtusele 35 °C, lisada 100 μ l vasika laapi (aktiivsus 1:10 000, ligikaudu 3 000 U/ml), segada üks minut ja jätta keeduklaas alumiiniumfooliumiga kaetuna 35 °C juures üheks tunniks seisma, et lõss kalgenduks. Kui kalgend on moodustunud, külmuivatada kogu kalgendunud mass, seda eelnevalt homogeniseerimata ja vadakat eraldamata. Jahvatada külmuivatatud mass peeneks ühtlaseks pulbriks. Nullprotsendiline etalonaine valmistatakse sama meetodi abil puhtast pühvliimialõssist. Etalonaineid tuleb säilitada – 20 °C juures.

Märkus: enne etalonainete valmistamist on soovitatav pühvliimialõssi puhtust kontrollida plasmiiniga töödeldud kaseiinide isoelektrilise fookustamise teel.

Reaktiivid valgu eraldamiseks**4.9. Kinnisti**

Lahustada 150 g trikloroäädikhapet vees ja täiendada ruumalani 1 000 ml.

4.10. Värvil väljapesemise lahus

Täiendada 500 ml metanooli ja 200 ml jää-äädikhappe segu destilleeritud veega ruumalani 2 000 ml.

Märkus: iga päev tuleb valmistada värske värvi väljapesemise lahus. Seda saab valmistada, segades 50mahuprotsendilise metanooli ja 20mahuprotsendilise jää-äädikhappe põhilahuseid võrdsed ruumalad.

4.11. Värvimislahused**4.11.1. Värvimislahus (värvi põhilahus 1)**

Lahustada magnetseguri abil 3,0 g Coomassie-briljantsinist G-250 (C.I. 42655) 1 000 ml 90mahuprotsendilises metanoolis umbes 45 minuti jooksul ja filtreerida läbi kahe keskmise kiirusega toimiva kurdfiltritri.

4.11.2. Värvimislahus (värvi põhilahus 2)

Lahustada 5,0 g vasksulfaatpentahüdraati 1 000 ml 20mahuprotsendilises äädikhappes.

4.11.3. Värvimislahus (töölahus)

Segada vahetult enne värvimist kokku 125 ml kumbagi värvi põhilahust (4.11.1 ja 4.11.2).

Märkus: värvimislahus tuleb valmistada kasutamise päeval.

5. SEADMED
- 5.1. **Klaasplaadid (265 × 125 × 4 mm), kummirull (laius 15 cm), nivelleerimislaud**
- 5.2. **Geeli kandekile (265 × 125 mm)**
- 5.3. **Kattekile (280 × 125 mm). Pikematele servadele panna riba kleeplinti (280 × 6 × 0,25 mm) (vt joonis 1).**
- 5.4. **Elektrofookustamiskamber jahutusplaadiga (nt 265 × 125 mm) ja sobiva pingeallikaga (≥ 2,5 kV) või automaatne elektroforeesiseade**
- 5.5. **Tsirkulatsioonkrüostaat, mis võimaldab termostaadiga hoida temperatuuri 12 ± 0,5 °C**
- 5.6. **Tsentrifuug, mis võimaldab töötada 3 000 g juures**
- 5.7. **Elektroodribad (≥ 265 mm pikkused)**
- 5.8. **Plastist tilgapudelid anoodi- ja katoodilahustele**
- 5.9. **Proovi aplikaatorid (10 × 5 mm, viskoosist või valke väheadsorbeerivast filterpaberist)**
- 5.10. **Roostevabast terasest või klaasist anumad värvimiseks ja värvi väljapesemiseks (nt 280 × 150 mm instrumendialused)**
- 5.12. **Reguleeritav varrashomogenisaator (varda diameeter 10 mm, 8 000 – 20 000 pööret minutis)**
- 5.13. **Magnetsegur**
- 5.14. **Ultrahelivann**
- 5.15. **Kilekeevitusaparaat**
- 5.16. **25 µl mikropipetid**
- 5.17. **Vaakumsentrifuug või külmuivat**
- 5.18. **Temperatuuridele 35 ja 40 ± 1 °C reguleeritav loksutiga ja termostaadiga vesivann**
- 5.19. **Densitomeeter, mis võimaldab töötada lainepikkusel λ = 634 nm**

6. TÖÖ KÄIK

6.1. Proovi ettevalmistamine

6.1.1. Kaseiinide eraldamine

Panna 100 ml tsentrifuugianumasse juustu või etalonaine kaalutis, mis on ekvivalentne 5 g kuivmassiga, lisada 60 ml destilleeritud vett ja homogeenida varrashomogenisaatori abil (8 000 – 10 000 pööret minutis). Reguleerida pH lahjendatud äädikhappega (4.5.1) väärtusele 4,6 ja tsentrifuugida (5 minutit, 3 000 g). Rasv ja vadak dekanteerida, jääk homogeenida kiirusel 20 000 pööret minutis 40 ml destilleeritud vees, mille pH on lahjendatud äädikhappega (4.5.1) reguleeritud väärtusele 4,5, lisada 20 ml diklorometaani (4.5.2), homogeenida uuesti ja tsentrifuugida (5 minutit, 3 000 g). Eraldada spaatliga kaseiinikiht, mis jääb vee- ja orgaanilise faasi vahele (vt joonis 2), ning kõrvaldada mõlemad faasid dekanteerimise teel. Homogeenida kaseiin uuesti 40 ml destilleeritud vees (vt espool) ja 20 ml diklorometaanis (4.5.2) ning tsentrifuugida. Seda protseduuri korrata seni (kaks või kolm korda), kuni mõlemad ekstraheerimisfaasid jäävad värvusetuks. Homogeenida valgujääk 50 ml atsetoonis (4.5.3) ja filtrida läbi keskmise kiirusega toimiva kurdpaberfiltril. Filtrile kogutud jääki pesta kahe eraldi 25 ml atsetoonikogusega, kuivatada õhu käes või lämmastikuvoolus ja hõõruda uhmris peeneks.

Märkus: kuivi kaseiinipreparaate tuleb säilitada – 20 °C juures.

6.1.2. β-kaseiinide lõhustamine plasmiooni abil γ-kaseiinide intensiivistamiseks

Dispergeerida 25 mg kaseiinipreparaati (6.1.1) 0,5 ml ammooniumkarbonaatpuhvris (4.7.1) ja homogeenida 20 minutit näiteks ultraheliga töötlemise teel. Soojendada temperatuurini 40 °C, lisada 10 µl plasmiooni (4.7.2), segada ja inkubeerida 40 °C juures ühe tunni jooksul pidevalt loksutades. Ensüümi inhibeerimiseks lisada 20 µl ε-aminokaproonhappe lahust (4.7.3), seejärel lisada 200 mg tahket karbamiidi ja 2 mg ditiotreitooli.

Märkus: et fookustatud kaseiniribad tuleksid sümmeetrilisemad, on soovitatav pärast ε-aminokaproonhappe lisamist lahust külmuivatada ja kuivjääk lahustada 0,5 ml valke lahustavas puhvris (4.6).

6.2. Karbamiidi sisaldavate poliäkrüülamiidgeelide valmistamine

Niisutada geeli kandekilet (5.2) mõne tilga veega ja rullida see klaasplaadile (5.1), kõrvaldades eralduva vee paberrätiku või lapiga. Vahebadega (0,25 mm) kattekile (5.3) rullida teisele klaasplaadile samal viisil. Asetada plaat nivelleerimislauale horisontaalasendisse.

Ettevalmistatud deaereeritud geelilahusele (4.1.2) lisada 10 µl TEMEDi (4.1.3.1), segada, lisada 10 µl PERi lahust (4.1.3.2), segada hoolikalt ja valada kohe kattekile keskele ühtlaselt laiali. Asetada geeli kandeplaadi üks serv, kilepind allpool, kattekilega plaadile ja lasta kandeplaat aeglaselt alla, nii et kahe kile vahel moodustub ühtlane mullideta geelikile (joonis 3). Lasta geeli kandeplaat õhukese spaatli abil ettevaatlikult lõpuni alla ja asetada selle peale raskuseks veel kolm klaasplaati. Umbes 60 minuti pärast, kui polümerisatsioon on lõppenud, eemaldada kergelt klaasplaate koputades kandekilele polümeriseerunud geel koos kattekilega. Kandekile väline pind puhastada hoolikalt geelijääkidest ja karbamiidist. Kande- ja kattekile vahel olev geel keevitada kiletorusse ja säilitada külmikus (säilivusaeg kuni kuus nädalat).

Märkus: klepribadega kattekilet võib kasutada korduvalt. Kui proove on vähe või kasutatakse automaatset elektroforesiseadet, võib poliäkrüülamiidgeeli lõigata väiksemateks tükkideks (kaks geeli 4,5 × 5 cm).

6.3. Isoelektriline fookustamine

Reguleerida jahutustermostaat temperatuurile 12 °C. Geeli kandekile väline pind puhastada petrooliga, lasta jahutusploki keskele mõned tilgad petrooli (4.2). Seejärel rullida geel selle peal lahti nii, et kandekile jääks allapoole ega tekiks mulle. Pühkida liigne petrool ära ja eemaldada kattekile. Niisutada elektroodribad elektroodilahustega (4.3, 4.4), lõigata geeliga ühepikkuseks ja asetada kohale (elektroodide vahekaugus 9,5 cm).

Isoelektrilise fookustamise tingimused

6.3.1. Geeli suurus 265 × 125 × 0,25 mm

Etapp	Aeg (min)	Pinge (V)	Voolutugevus (mA)	Võimsus (W)	Volttunnid (Vh)
1. Eelfookustamine	30	maksimaalselt 2 500	maksimaalselt 15	konstantselt 4	u 300
2. Proovi fookustamine ⁽¹⁾	60	maksimaalselt 2 500	maksimaalselt 15	konstantselt 4	u 1 000
3. Lõppfookustamine	60	maksimaalselt 2 500	maksimaalselt 5	maksimaalselt 20	u 3 000
	40	maksimaalselt 2 500	maksimaalselt 6	maksimaalselt 20	u 3 000
	30	maksimaalselt 2 500	maksimaalselt 7	maksimaalselt 25	u 3 000

⁽¹⁾ Proovi pealekandmine: pärast eelfookustamist (1. etapp) pipettida 18 µl proovi ja standardlahust proovi aplikaatoritele (10 × 5 mm), asetada need 1 mm vahedega geelile, pikisuunas 5 mm kaugusele anoodist, ja vajutada kergelt. Fookustada eelpool nimetatud tingimustel ja eemaldada proovi aplikaatorid ettevaatlikult pärast 60minutilist proovi fookustamist.

Märkus: kui geeli paksust või laiust muudetakse, tuleb voolutugevust ja võimsust reguleerida sellele vastavalt (nt 265 × 125 × 0,5 mm geeli puhul tuleb voolutugevust ja võimsust kahekordistada).

- 6.3.2. Automaatse elektroforeesiseadme pingeprogrammi näide (kaks $5,0 \times 4,5$ cm geeli; elektroodid on geelile asetatud vahetult, ilma elektroodribadeta)

Etapp	Pinge	Voolutugevus	Võimsus	Temperatuur	Volttunnid
1. Eelfookustamine	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Proovi fookustamine	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Fookustamine	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Fookustamine	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Proovi aplikaator asetada kohale 2. etapis, kui protsess on kestnud 0 volttundi.

Proovi aplikaator eemaldada 2. etapis, kui protsess on kestnud 30 volttundi.

6.4. Valkude värvimine

6.4.1. Valkude kinnistamine

Pärast pinge väljalülitamist eemaldada viivitamatult elektroodribad ja asetada geeli kohe värvimis-/pesemisküveti, millesse on valatud 200 ml kinnistit (4.9). Hoida geeli kinnistis 15 minutit, loksutada pidevalt.

6.4.2. Geeli pesemine ja värvimine

Nõrutada kogu kinnisti välja ja pesta geeli kaks korda 100 ml värvi väljapesemise lahusega (4.10), iga kord 30 sekundit. Valada värvi väljapesemise lahus ära ja asendada 250 ml värvimislahusega (4.11.3). Lasta geelil värvuda 45 minutit, lahust ettevaatlikult loksutades.

6.4.3. Värvide väljapesemine geelist

Valada värvimislahus välja, pesta geeli kaks korda 100 ml värvi väljapesemise lahusega (4.10), seejärel loksutada 200 ml värvi väljapesemise lahusega 15 minutit, korrata värvi väljapesemisetappi vähemalt 2–3 korda, kuni saadakse selge värvitu foon. Seejärel loputada geeli destilleeritud vees (2×2 minutit) ja lasta sellel õhu käes kuivada (2–3 tundi) või kuivatada fööniga (10–15 minutit).

Märkus 1: kinnistada, pesta, värvida ja värvi välja pesta tuleb 20 °C juures. Kõrgemat temperatuuri mitte kasutada.

Märkus 2: kui eelistatakse värvimist tundlikuma hõbedaga (nt Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code nr 17-1150-01), tuleb plasmiiniga töödeldud kaseiiniproove lahjendada kuni kontsentratsioonini 5 mg/ml.

7. HINDAMINE

Hindamiseks võrreldakse uuritava proovi valgumustreid etalonainete muustriga samal geelil. Lehmapiima olemasolu juustus, mis on valmistatud lamba-, kitse- või pühvlipiimast või lamba-, kitse- ja pühvlipiima segust, tehakse kindlaks γ_2 - ja γ_3 -kaseiini järgi, mille isoelektrilised punktid on pH 6,5 ja pH 7,5 vahel (joonised 4a, 4b ja 5). Avastamispiir on alla 0,5 %.

7.1. Visuaalne hindamine

Lehmapiima koguse visuaalseks hindamiseks on soovitatav reguleerida proovide ja etalonainete kontsentratsioonid selliseks, et lamba-, kitse- ja/või pühvlipiima γ_2 - ja γ_3 -kaseiini ribade intensiivsus oleks ühesugune (vt γ_2 E, G, B ja γ_3 E, G, B joonistel 4a, 4b ja 5). Sel juhul saab uuritava proovi lehmapiimasisaldust (mis võib olla suurem või väiksem kui 1 % või võrdne 1 %ga) hinnata otse, võrreldes lehmapiima γ_3 - ja γ_2 -kaseiini ribade intensiivsusi (vt γ_3 C ja γ_2 C joonistel 4a, 4b ja 5) 0- ja 1-protsendiliste etalonainete (lammas, kits) või laboratoorse vaheetalonaine (pühvel) vastavate intensiivsustega.

7.2. Densitomeetriline hindamine

Võimaluse korral tuleks lehmapiima γ_2 - ja γ_3 -kaseiinile vastavate piikide pindalade suhted lamba-, kitse- ja pühvli piima vastavate piikide pindaladesse (joonis 5) määrata densitomeetriliselt (5.19). Neid suhteid võrreldakse γ_2 - ja γ_3 -kaseiinile vastavate piikide pindalade suhetega samal geelil analüüsitud 1-protsendiliste etalonainete (lammas, kits) või laboratoorse vaheetalonaine (pühvel) puhul.

Märkus: meetod toimib rahuldavalt, kui 1-protsendilise etalonaine puhul saadakse nii lehma γ_2 - kui ka γ_3 -kaseiini olemasolu kohta selge kinnitus, kuid 0-protsendilise etalonaine puhul seda ei saada. Kui selliseid tulemusi ei saada, tuleb määramisprotsessi optimeerida, pidades täpselt kinni meetodi tingimustest kõigis üksikasjades.

Proov loetakse positiivseks, kui nii lehma γ_2 - kui ka γ_3 -kaseiini ribade intensiivsused või piikide pindalad on samaväärsed või suuremad kui 1-protsendilise etalonaine vastavad näitajad.

8. KIRJANDUS

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).

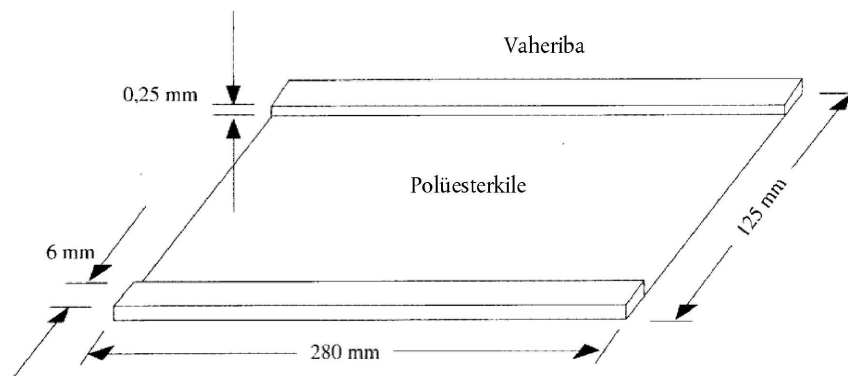
Krause, I., Berner, I., Klostermeyer, H. Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte – and carrier ampholyte/immobilized pH gradient – isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier. *Electrophoresis-Forum*, 89 (B. J. Radola, ed.) lk 389–393,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

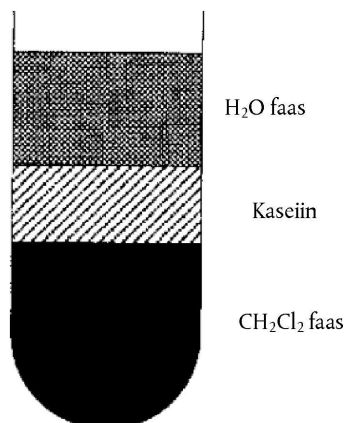
Joonis 1

Kattekile skeem



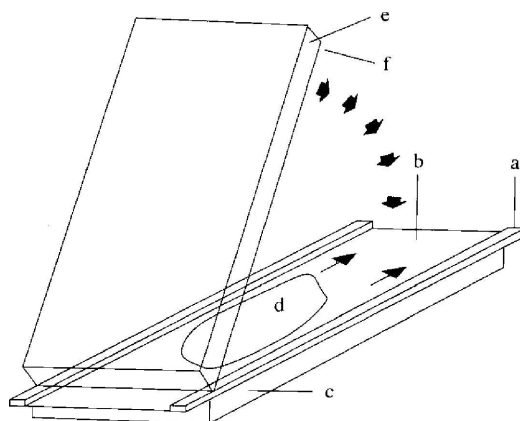
Joonis 2

Kaseiiniikiht, mis jääb pärast tseentrifuugimist ujuma vee- ja orgaanilise faasi vahele



Joonis 3

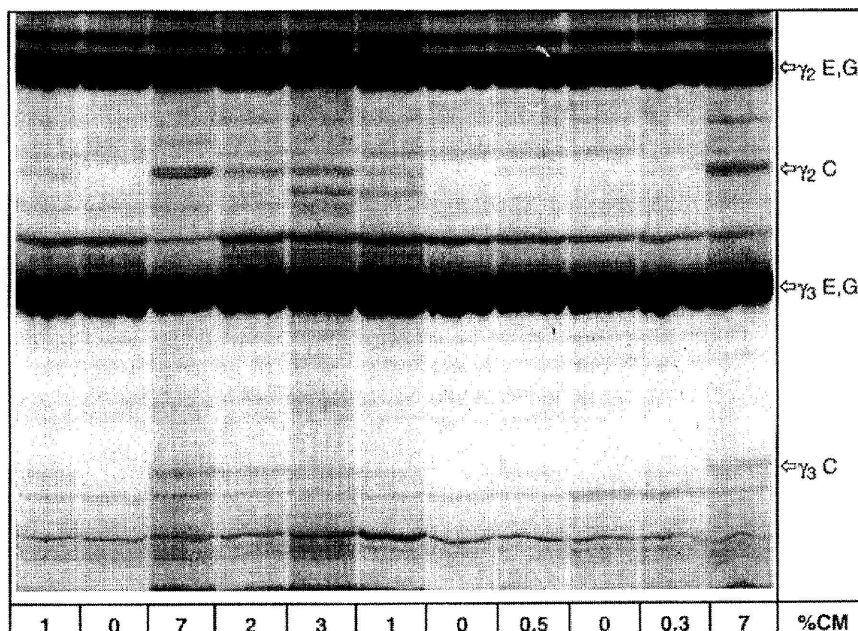
Üliõhukese polüakrüülamiidgeeli valmistamine pressimismeetodil



a = vaheriba (0,25 mm); b = kattekile (5.3); c, e = klaasplaadid (5.1); d = geelilahus (4.1.2); f = geeli kandekile (5.2)

Joonis 4a

Erineva lehmapiimasisaldusega lamba- ja kitsepiimajuustust eraldatud ja plasmiiniga töödeldud kaseiinide isoelektriline fookustamine

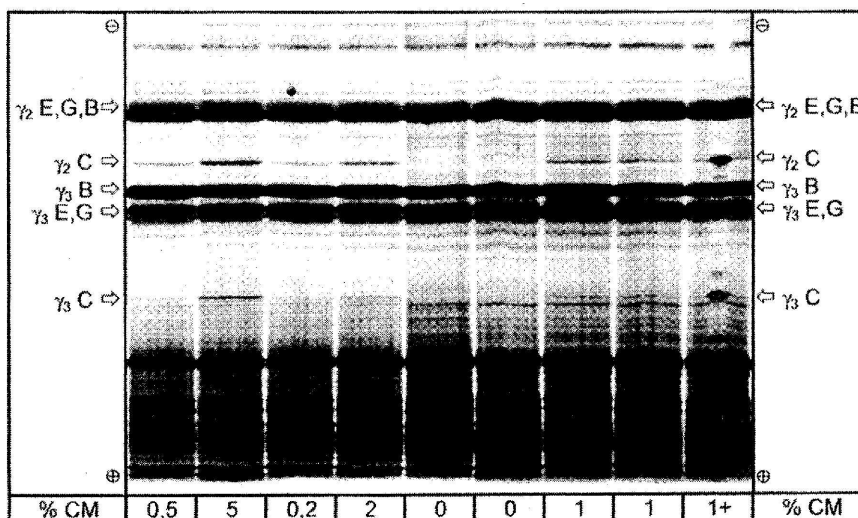


% CM = lehmapiima protsent, C = lehm, E = lammas, G = kits

Kujutatud on isoelektriliselt fookustatud geeli ülemist poolt.

Joonis 4b

Erineva lehmapiimasisaldusega lamba-, kitse- ja pühvlipiimasegu juustust eraldatud ja plasmiiniga töödeldud kaseiinide isoelektriline fookustamine

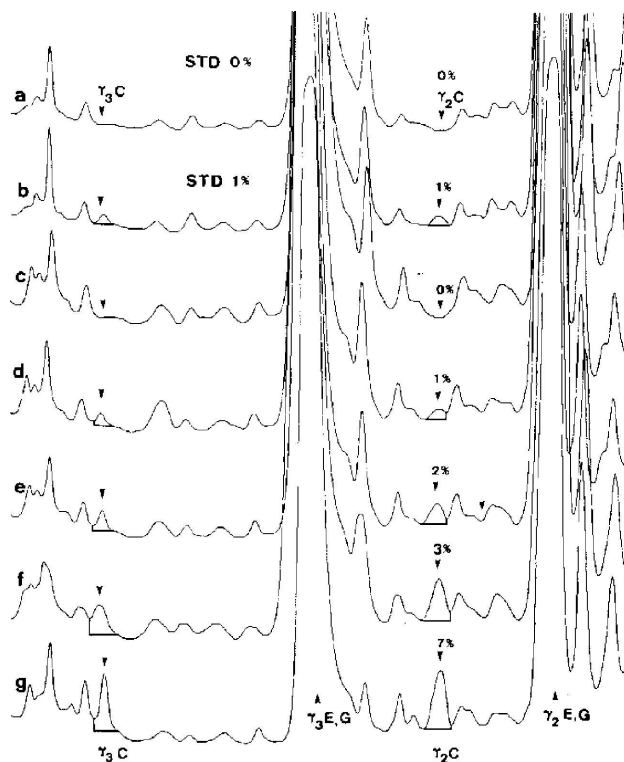


% CM = lehmapiima protsent; 1+ = proov, mis sisaldab 1 % lehmapiima ja millele on lisatud puhast veise kaseiini (spektri keskosas). C = lehm, E = lammas, G = kits, B = pühvel.

Kujutatud on isoelektriliselt fookustatud geel kogu lahutusala ulatuses.

Joonis 5

Etalonainete (STD) ning lamba- ja kitsepiima segust valmistatud juustu proovide densitogrammide superpositsioon pärast isoelektrilist fookustamist.



a,b = standardained, mis sisaldavad 0 ja 1 % lehmapiima; c-g = juustuproovid, mis sisaldavad 0, 1, 2, 3 ja 7 % lehmapiima. C = lehm, E = lammas, G = kits.

Isoelektriliselt fookustatud geeli ülemist poolt skanniti lainepikkusel $\lambda = 634$ nm.

IX LISA

Analüüsi hindamine**1. Kvaliteedi tagamine**

Analüüsid tehakse vastavalt määruse (EÜ) nr 882/2004 (**) artiklile 12 määratud või liikmesriikide pädevate asutuste määratud laborites.

2. Proovi võtmine ja analüüsitulemuste vaidlustamise

1. Proovi võtmine toimub asjaomast toodet käsitleva eeskirja kohaselt. Kui selgesõnalisi eeskirju ei ole, järgitakse juhiseid, mis on esitatud standardis ISO 707 – Piim ja piimatooted – Proovi võtmine.
2. Laboratoorse analüüsi tulemuste protokoll peab sisaldama piisavalt teavet, et tulemusi oleks võimalik hinnata vastavalt liitele.
3. Liidu õigusaktidega ette nähtud analüüsides jaoks tuleb võtta kordusproovid.
4. Kui tulemuste üle tekib vaidlus, laseb makseasutus toote kõnealuse analüüsi uuesti teha ning kulub katab kaotanud pool.

Eespool kirjeldatud analüüsid tehakse tingimusel, et toote pitseeritud kordusproovid on kättesaadavad ning need on pädevate asutuste poolt asjakohaselt ladustatud. Tootja saadab makseasutusele taotluse analüüsi tegemiseks seitsme tööpäeva jooksul pärast esimese analüüsi tulemustest teada saamist. Analüüsi teeb makseasutus 21 tööpäeva jooksul pärast taotluse saamist.

5. Kordusanalüüsi tulemus on lõplik.
6. Kui ettevõtja suudab viie tööpäeva jooksul pärast proovi võtmist tõendada, et proovi ei võetud õigesti, tuleb võimaluse korral võtta kordusproov. Kui kordusproovi ei ole võimalik võtta, tuleb analüüsitud tootepartii heaks kiita.

Liide

Tootepartii piirnormile vastavuse hindamine**1. Põhimõte**

Kui riikliku sekkumise ja eraladustusabi käsitlevates õigusaktides on sätestatud üksikasjalik proovi võtmise kord, siis seda korda järgitakse. Kõikidel muudel juhtudel kontrollitakse esitatud tootepartiid vähemalt 3 juhuslikult valitud prooviühikust koosneva prooviga. Võib teha liitproovi. Saadud tulemuse võrdlemiseks sätestatud piirnormidega arvutatakse 95 % usaldusvahemik välja kahekordse standardhälvena, kusjuures asjakohane standardhälve sõltub sellest, kas 1) meetod on väärtuste σ_r ja σ_R osas rahvusvaheliselt valideeritud või 2) laborisisese valideerimisel on välja arvutatud sisemine korratavus. See usaldusvahemik võrdsustatakse tulemuse mõõtemääramatusega.

2. Meetod on rahvusvaheliselt valideeritud

Sel juhul on korduvuse standardhälve σ_r ja korratavuse standardhälve σ_R kindlaks määratud ning labor saab tõendada vastavust valideeritud meetodi sobivuskriteeriumidele.

Arvutatakse korratud mõõtmiste arvu n aritmeetiline keskmine \bar{x} .

\bar{x} Laiendmääramatus ($k = 2$) arvutatakse järgmiselt:

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

Kui mõõtmise lõpptulemuse x arvutamiseks kasutatakse ühte järgmistest valemite: $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ või $x = y_1/y_2$, tuleb standardhälbed ühendada tavapärase meetoditega.

Tootepartii loetakse sätestatud ülemisele piirnormile UL mittevastavaks, kui

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

muudel juhtudel loetakse see piirnormile UL vastavaks.

Tootepartii loetakse sätestatud alumisele piirnormile LL mittevastavaks, kui

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

muudel juhtudel loetakse see piirnormile LL vastavaks.

3. Laborisisene valideerimine laborisisese korratavuse standardhälbe väljaarvutamise

Kui kasutatakse käesolevas määruses määratlemata meetodeid ja täpsuspiirid ei ole kindlaks määratud, tuleb läbi viia laborisisene valideerimine. Selleks tuleb laiendmääramatuse U arvutamise valemis kasutada σ_r ja σ_R asemel laborisisese korduvuse standardhälvet s_r ja laborisisese korduvuse standardhälvet s_{Rr} .

Piirnormile vastavuse hindamisel järgitavad eeskirjad on sätestatud punktis 1. Kui leitakse, et tootepartii ei vasta sätestatud piirnormile, tuleb mõõtmist korrata käesolevas määruses kirjeldatud meetodi abil ning hinnata tulemust vastavalt punktile 1.

(*) Tooted Ampholine® pH 3,5–9,5 (Pharmacia) ja Resolyte® pH 5–7 ja pH 6–8 (BDH, Merck) sobivad eriti hästi γ -kaseiinide nõutud lahutustaseme saavutamiseks.

(**) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 29. aprilli 2004. aasta määrus (EÜ) nr 882/2004 ametlike kontrollide kohta, mida tehakse sööda- ja toidualaste õigusnormide ning loomatervishoidu ja loomade heaolu käsitlevate eeskirjade täitmise kontrollimise tagamiseks (ELT L 165, 30.4.2004, lk 1).“

KOMISJONI RAKENDUSMÄÄRUS (EL) 2018/151,**30. jaanuar 2018,**

millega nähakse ette Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivi (EL) 2016/1148 kohaldamise eeskirjad, et täpsustada elemendid, mida digitaalse teenuse osutajad peavad võrgu- ja infosüsteemide turvalisust ohustavate riskide haldamiseks arvesse võtma, ja parameetrid, mille põhjal tehakse kindlaks intsidendi mõju olulisus

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 6. juuli 2016. aasta direktiivi (EL) 2016/1148 meetmete kohta, millega tagada võrgu- ja infosüsteemide turvalisuse ühtlaselt kõrge tase kogu liidus, ⁽¹⁾ eriti selle artikli 16 lõiget 8,

ning arvestades järgmist:

- (1) Direktiivi (EL) 2016/1148 kohaselt on digitaalse teenuse osutajatel vabadus võtta tehnilisi ja korralduslikke meetmeid, mida nad peavad oma võrgu- ja infosüsteemide turvalisust ohustavate riskide haldamiseks asjakohaseks ja proportsionaalseks, tingimusel et nende meetmetega tagatakse asjakohane turvalisuse tase ning võetakse arvesse direktiiviga ette nähtud elemente.
- (2) Asjakohaste ja proportsionaalsete tehniliste ja korralduslike meetmete kindlakstegemiseks peaks digitaalse teenuse osutaja käsitlema infoturvet süsteemselt, rakendades riskipõhist lähenemisviisi.
- (3) Süsteemide ja rajatiste turvalisuse tagamiseks peaksid digitaalse teenuse osutajad korraldama hindamisi ja analüüse. Need peaksid käsitlema järgimisi aspekte: võrgu- ja infosüsteemide süsteemne haldamine, füüsiline ja keskkonnaga seotud turvalisus, tarnete turvalisus ning juurdepääsukontroll.
- (4) Kui digitaalse teenuse osutajad teevad võrgu- ja infosüsteemide süsteemse haldamise raames riskianalüüsi, tuleks neil soovitada välja selgitada spetsiifilised riskid ja kirjeldada kvantitatiivsete näitajate abil nende olulisust, näiteks võiks kindlaks teha elutähtsat vara ähvardavad ohud ja nende võimaliku mõju tegevusele ning otsustada, kuidas neid olemasoleva suutlikkuse ja nõutavate ressursside alusel kõige paremini leevendada.
- (5) Personalipoliitika võiks hõlmata oskuste kujundamist, sealhulgas turvalisusega seotud oskuste arendamist ja teadlikkuse suurendamist puudutavaid aspekte. Tegevuse turvalisust käsitlevate põhimõtete üle otsustamisel peaksid digitaalse teenuse osutajad võtma arvesse muutuste juhtimise, haavatavustegurite haldamise, tegevus- ja haldustavade formaliseerimise ja süsteemide kaardistamise aspekte.
- (6) Turvaarhitektuuri põhimõtted võiksid eelkõige hõlmata võrkude ja süsteemide lahusust ning konkreetseid turbemeetmeid elutähtsate toimingute, nagu haldustoimingute jaoks. Võrkude ja süsteemide lahusus võiks võimaldada digitaalse teenuse osutajal eristada selliseid elemente nagu andmevood ja andmetöötlusressursid, mis kuuluvad kliendile, klientide rühmale, digitaalse teenuse osutajale või kolmandatele isikutele.
- (7) Füüsilise ja keskkonnaga seotud turvalisuse kindlustamiseks võetavad meetmed peaksid tagama organisatsiooni võrgu- ja infosüsteemide turvalisuse selliste ohtude põhjustatud intsidentide puhul nagu vargus, tulekahju, üleujutus või muud ilmastikuolud, telekommunikatsiooniprobleemid või voolukatkestused.
- (8) Elektri-, kütuse- või jahutusenergiaga varustamise kindlus võiks katta ka tarneahelat, mis hõlmab eelkõige väliste töövõtjate ja alltöövõtjate ning nende juhtimisega seotud turvalisust. Elutähtsate tarnete jälgitavus tähendab digitaalse teenuse osutaja suutlikkust teha kindlaks ja registreerida nende tarnete allikad.
- (9) Digitaalse teenuse kasutajatena tuleks käsitada füüsilisi ja juriidilisi isikuid, kes on internetipõhise kauplemiskoha või pilvandmetöötlusteenuse kliendid või tellijad või kes külastavad internetipõhise otsingumootori veebisaiti märksõnaotsingu tegemiseks.

⁽¹⁾ ELTL 194, 19.7.2016, lk 1.

- (10) Intsidendi mõju olulisuse kindlaksmääramisel tuleks käesolevas määruses nimetatud juhtumitesse suhtuda kui oluliste intsidentide mitteammendavasse loetelusse. Käesoleva määruse rakendamisel ja tööst, mida koostöörühm teeb, et koguda parimaid tavasid riskide ja intsidentide kohta ning arutada intsidentidest teatamise korra üle vastavalt direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 11 lõike 3 punktidele i ja m, tuleks teha järeldusi. Tulemuseks võiksid olla põhjalikud suunised selle kohta, milliste teatamisparameetrite kvantitatiivsete piirmäärade ületamise korral tekib digitaalse teenuse osutajal direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 16 lõike 3 kohane teatamiskohustus. Kui see on asjakohane, võiks komisjon kaaluda ka määruses praegu sätestatud piirmäärade läbivaatamist.
- (11) Selleks et pädevaid asutusi oleks võimalik potentsiaalsetest uutest riskidest teavitada, tuleks julgustada digitaalse teenuse pakkujaid vabatahtlikult teatama intsidentidest, mille omadustega nad ei ole varem kokku puutunud, nagu uued nõrkuste ärakasutamise moodsused, ründevektorid või ohusubjektid, haavatavused ja ohud.
- (12) Käesolevat määrust tuleks hakata kohaldama alates direktiivi (EL) 2016/1148 ülevõtmise tähtaja möödumisele järgnevast päevast.
- (13) Käesoleva määrusega ette nähtud meetmed on kooskõlas direktiivi (EL) 2016/1148 artiklis 22 nimetatud võrgu- ja infoturbesüsteemide komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Reguleerimise

Käesolevas määruses täpsustatakse, milliseid elemente peavad digitaalse teenuse pakkujad arvesse võtma, kui nad määravad kindlaks ja võtavad meetmeid, et tagada direktiivi (EL) 2016/1148 III lisas nimetatud teenuste osutamiseks kasutatavate võrgu- ja infosüsteemide turvalisus, ning täpsustatakse parameetrid, mida võetakse arvesse intsidendi mõju olulisuse kindlakstegemiseks.

Artikkel 2

Turvalisuse elemendid

1. Direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 16 lõike 1 punktis a nimetatud süsteemide ja rajatiste turvalisus tähendab võrgu- ja infosüsteemide ning nende füüsilise keskkonna turvalisust ja hõlmab järgimisi elemente:
- a) võrgu- ja infosüsteemide süsteemne haldamine, mis tähendab infosüsteemide kaardistamist ja asjakohaste põhimõtete väljatöötamist infoturbe haldamise, sealhulgas riskianalüüsi, personali, toimingute turvalisuse, turvaarhitektuuri, andmete ja süsteemi elutsükli turvalise haldamise ning vajaduse korral krüpteerimise ja selle haldamise jaoks;
 - b) füüsiline ja keskkonnaga seotud turvalisus, mis tähendab, et olemas on meetmed, millega kaitstakse digitaalse teenuse osutaja võrgu- ja infosüsteemide turvalisust kahju eest, rakendades kõiki ohte hõlmavat riskipõhist lähenemisviisi, mille puhul tegeldakse näiteks süsteemitõrgete, inimeksimuste, pahatahtliku tegevuse ja loodusnähtustega;
 - c) tarnete turvalisus, mis tähendab asjakohaste põhimõtete väljatöötamist ja säilitamist, et tagada teenuste osutamiseks kasutatavate peamiste tarnete kättesaadavus ja vajaduse korral jälgitavus;
 - d) võrgu- ja infosüsteemide juurdepääsu kontroll, mis tähendab, et olemas on meetmed, millega tagatakse, et võrgu- ja infosüsteemide füüsilise ja loogilise juurdepääsu, sealhulgas võrgu- ja infosüsteemide haldusturvalisuse jaoks kasutatakse talitus- ja turvanõuetel põhinevaid volitusi ja piiranguid.
2. Direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 16 lõike 1 punktis b nimetatud intsidentide käsitlemisel hõlmavad digitaalse teenuse osutaja võetavad meetmed järgmist:
- a) tuvastamisprotsessid ja -menetlused, mida hoitakse alal ja testitakse, et tagada õigeaegne ja piisav teadlikkus anomaalsetest juhtumitest;
 - b) intsidentidest teatamise ja infosüsteemide nõrkade kohtade ja haavatavuste kindlakstegemise protsessid ja põhimõtted;

- c) kehtestatud korra kohane reageerimine ja võetud meetmete tulemustest teatamine;
- d) intsidendi raskusastme hindamine, intsidendianalüüsi põhjal saadud teadmuse dokumenteerimine ja sellise asjakohase info kogumine, mida saab kasutada tõendusmaterjalina ja mille põhjal saab protsesse pidevalt täiustada.
3. Direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 16 lõike 1 punktis c nimetatud talitluspidevuse haldamine tähendab organisatsiooni suutlikkust säilitada või vajaduse korral taastada pärast häirivat intsidenti teenuste osutamine varem kokku lepitud vastuvõetaval tasemel ja see hõlmab järgmist:
- a) toime analüüsi põhjal koostatud hädaolukorra lahendamise kavade koostamine ja kasutamine, et tagada digitaalse teenuse osutajate poolse teenuse pakkumise järjepidevus, mida hinnatakse ja testitakse regulaarselt, näiteks õppuste kaudu;
- b) avariitaastesuutlikkus, mida hinnatakse ja testitakse regulaarselt, näiteks õppuste kaudu.
4. Direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 16 lõike 1 punktis d nimetatud seire, auditeerimine ja testimine hõlmab põhimõtete väljatöötamist ja rakendamist, et reguleerida järgmist:
- a) vaatluste või mõõtmiste kavandatud seeriade korraldamine, et hinnata, kas võrgu- ja infosüsteemid toimivad eesmärgipäraselt;
- b) inspekteerimine ja kontrollimine, et teha kindlaks, kas standardeid või suuniseid järgitakse, andmed on täpsed ning täidetakse tõhususe ja tulemuslikkuse eesmärgi;
- c) protsess, mille eesmärk on tuvastada puudused võrgu- ja infosüsteemide turvamehhanismides, millega kaitstakse andmeid ja tagatakse eesmärgipärane toimimine. Selline protsess hõlmab toiminguvooga seotud tehnilisi protsesse ja personali.
5. Direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 16 lõike 1 punktis e nimetatud rahvusvahelised standardid tähendavad standardeid, mille on vastu võtnud Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EL) nr 1025/2012⁽¹⁾ artikli 2 lõike 1 punktis a nimetatud rahvusvaheline standardiorganisatsioon. Direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 19 kohaselt võib kasutada ka Euroopas või rahvusvaheliselt heaks kiidetud võrgu- ja infosüsteemide turvalisuse alaseid standardeid ja spetsifikatsioone, sealhulgas liikmesriikide standardeid.
6. Digitaalse teenuse osutajad tagavad, et neil on olemas asjakohased dokumendid, mille alusel pädevad asutused saavad kontrollida, kas lõigetes 1, 2, 3, 4 ja 5 nimetatud turvalisuse elementidest peetakse kinni.

Artikkel 3

Parameetrid, mida tuleb intsidendi mõju olulisuse kindlakstegemiseks arvesse võtta

1. Direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 16 lõike 4 punktis a nimetatud intsidendist mõjutatud kasutajate ja eelkõige nende kasutajate arvu osas, kes sõltuvad asjaomasest teenusest oma teenuste osutamisel, peab digitaalse teenuse osutajal olema võimalik hinnata üht järgmistest:
- a) selliste mõjutatud füüsiliste ja juriidiliste isikute arv, kellega on teenuse osutamiseks sõlmitud leping, või
- b) teenust kasutanud mõjutatud kasutajate arv, mille aluseks on eelkõige varasemad andmeliiklusandmed.
2. Artikli 16 lõike 4 punktis b nimetatud intsidendi kestus tähendab ajavahemikku alates hetkest, mil teenuse osutamine katkeb käideldavuse, autentsuse, tervikluse või konfidentsiaalsuse seisukohast, kuni selle taastamiseni.
3. Direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 16 lõike 4 punktis c nimetatud intsidendist mõjutatud geograafilise ala ulatuse osas peab digitaalse teenuse pakkujal olema võimalik kindlaks teha, kas intsident mõjutab tema teenuste osutamist konkreetsetes liikmesriikides.
4. Direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 16 lõike 4 punktis d nimetatud teenuse toimimise katkestuse ulatuse mõõtmisel võetakse arvesse üht või mitut järgmistest komponentidest, mida intsident on kahjustanud: andmete või seonduvate teenuste käideldavus, autentsus, terviklus ja konfidentsiaalsus.

⁽¹⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 25. oktoobri 2012. aasta määrus (EL) nr 1025/2012, mis käsitleb Euroopa standardimist ning millega muudetakse nõukogu direktiive 89/686/EMÜ ja 93/15/EMÜ ning Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiive 94/9/EÜ, 94/25/EÜ, 95/16/EÜ, 97/23/EÜ, 98/34/EÜ, 2004/22/EÜ, 2007/23/EÜ, 2009/23/EÜ ja 2009/105/EÜ ning millega tunnistatakse kehtetuks nõukogu otsus 87/95/EMÜ ning Euroopa Parlamendi ja nõukogu otsus nr 1673/2006/EÜ (ELT L 316, 14.11.2012, lk 12).

5. Direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 16 lõike 4 punktis e nimetatud majandus- ja ühiskondlikule tegevusele avalduva mõju ulatuse osas on digitaalse teenuse osutajal võimalik otsustada selliste näitajate alusel nagu tema ja kliendi lepinguliste suhete laad, või kui see on asjakohane, mõjutatud kasutajate potentsiaalne arv, kas intsident on põhjustanud kasutajatele märkimisväärset materiaalsset või mittemateriaalsset kahju, näiteks seoses tervise, ohutuse või varalise kahjuga.

6. Lõigete 1, 2, 3, 4 ja 5 kohaldamisel ei kohustata digitaalse teenuse osutajat koguma täiendavat infot, millele tal puudub juurdepääs.

Artikkel 4

Intsidendi oluline mõju

1. Intsidendi mõju peetakse oluliseks, kui esinenud on vähemalt üks järgmistest olukordadest:
 - a) digitaalse teenuse osutaja pakutav teenus ei olnud kättesaadav üle 5 000 000 kasutajatunni, kusjuures kasutajatund tähendab liidus asuvate mõjutatud kasutajate arvu kuuekümneme minuti jooksul;
 - b) intsident on põhjustanud salvestatud, edastatud või töödeldud andmete või digitaalse teenuse osutaja võrgu- ja infosüsteemi kaudu pakutavate või juurdepääsetavate asjaomaste teenuste tervikluse, autentsuse või konfidentsiaalsuse kadu, mis mõjutab rohkem kui 100 000 kasutajat liidus;
 - c) intsident on seadnud ohtu avaliku ohutuse, avaliku julgeoleku või inimelu;
 - d) intsident on põhjustanud liidus vähemalt ühele kasutajale materiaalsset kahju, mis ületab 1 000 000 eurot.
2. Komisjon võib lõikes 1 sätestatud piirmäärad läbi vaadata, tuginedes parimatele tavadele, mida koostöörühm on kogunud, täites direktiivi (EL) 2016/1148 artikli 11 lõikest 3 tulenevaid ülesandeid, ja artikli 11 lõike 3 punkti m kohastele aruteludele.

Artikkel 5

Jõustumine

1. Käesolev määrus jõustub kahekümnendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.
2. Seda kohaldatakse alates 10. maist 2018.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 30. jaanuar 2018

Komisjoni nimel
president
Jean-Claude JUNCKER

OTSUSED

NÕUKOGU OTSUS (EL) 2018/152,

29. jaanuar 2018,

millega nimetatakse ametisse Saksamaa Liitvabariigi esitatud Regioonide Komitee asendusliige

EUROOPA LIIDU NÕUKOGU,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut, eriti selle artiklit 305,

võttes arvesse Saksamaa valitsuse ettepanekut

ning arvestades järgmist:

- (1) Nõukogu võttis 26. jaanuaril 2015, 5. veebruaril 2015 ja 23. juunil 2015 vastu otsused (EL) 2015/116, ⁽¹⁾ (EL) 2015/190 ⁽²⁾ ja (EL) 2015/994, ⁽³⁾ millega nimetatakse ametisse Regioonide Komitee liikmed ja asendusliikmed ajavahemikuks 26. jaanuarist 2015 kuni 25. jaanuarini 2020.
- (2) Seoses Anke SPOORENDONKI ametiaja lõppemisega on Regioonide Komitees vabanenud asendusliikme koht,

ON VASTU VÕTNUD JÄRGMISE OTSUSE:

Artikkel 1

Regioonide Komitee asendusliikmeks nimetatakse järelejäänud ametiajaks kuni 25. jaanuarini 2020 järgmine isik:

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

Artikkel 2

Käesolev otsus jõustub selle vastuvõtmise päeval.

Brüssel, 29. jaanuar 2018

Nõukogu nimel
eesistuja
R. PORODZANOV

⁽¹⁾ Nõukogu 26. jaanuari 2015. aasta otsus (EL) 2015/116 Regioonide Komitee liikmete ja asendusliikmete ametisse nimetamise kohta ajavahemikuks 26. jaanuarist 2015 kuni 25. jaanuarini 2020 (ELT L 20, 27.1.2015, lk 42).

⁽²⁾ Nõukogu 5. veebruari 2015. aasta otsus (EL) 2015/190 Regioonide Komitee liikmete ja asendusliikmete ametisse nimetamise kohta ajavahemikuks 26. jaanuarist 2015 kuni 25. jaanuarini 2020 (ELT L 31, 7.2.2015, lk 25).

⁽³⁾ Nõukogu 23. juuni 2015. aasta otsus (EL) 2015/994, millega nimetatakse ametisse Regioonide Komitee liikmed ja asendusliikmed ajavahemikuks 26. jaanuarist 2015 kuni 25. jaanuarini 2020 (ELT L 159, 25.6.2015, lk 70).

PARANDUSED

Komisjoni 14. juuni 2017. aasta määruse (EL) 2017/1084 (millega muudetakse määrust (EL) nr 651/2014 sadama- ja lennujaamataristule antava abi, kultuuri edendamiseks ja kultuuripärandi säilitamiseks antavast abist teavitamise künnise, spordi- ja mitmeotstarbelise vaba aja veetmise taristule antava abi ja äärepoolseimaid piirkondi käsitlevate regionaalse tegevusabi kavade osas ning millega muudetakse määrust (EL) nr 702/2014 abikõlblike kulude arvutamise osas) parandus

(Euroopa Liidu Teataja L 156, 20. juuni 2017)

Leheküljel 10 artikli 1 punktis 11 esitatud asendatud artikli 15 lõike 4 sissejuhatavas lauses

- asendatakse* „Äärepoolseimates piirkondades kompenseeritakse regionaalse tegevusabi kavadega lisategevuskulud, mis tekivad nendes piirkondades aluslepingu artiklis 349 osutatud ühe või mitme püsiva ebasoodsa tingimuse otsesel mõjul, kui abisaajate majandustegevus toimub äärepoolseimas piirkonnas, tingimusel et iga-aastane abisumma abisaaja kohta käesoleva määruse kohaselt rakendatavate kõigi tegevusabi kavade raames ei ületa järgmisi protsendimäärasid:“
- järgmisega:* „Äärepoolseimates piirkondades kompenseeritakse regionaalse tegevusabi kavadega lisategevuskulud, mis tekivad nendes piirkondades aluslepingu artiklis 349 osutatud ühe või mitme püsiva ebasoodsa tingimuse otsesel mõjul, kui abisaajate majandustegevus toimub äärepoolseimas piirkonnas, tingimusel et iga-aastane abisumma abisaaja kohta käesoleva määruse kohaselt rakendatavate kõigi tegevusabi kavade raames ei ületa ühte järgmist protsendimäära:“.
-

ISSN 1977-0650 (elektroniline väljaanne)
ISSN 1725-5082 (paberväljaanne)



Euroopa Liidu Väljaannete Talitus
2985 Luxembourg
LUKSEMBURG

ET